



## ***FACULTAD DE CIENCIAS***

### ***Grado en Química***

#### ***Memoria del Trabajo de Fin de Grado***

Diseño de sondas moleculares: Síntesis de análogos de sideróforos para la preparación de conjugados

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

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

Director(es): Carlos Jiménez González

Jaime Rodríguez González

**Almudena Saavedra Bouza**

**Julio 2017**



# Índice

## Contenido

Resumen.....	1
Introducción.....	7
Enfermedades en peces causadas por la presencia de bacterias en sistemas de acuicultura .	8
La importancia del hierro .....	10
Sideróforos.....	10
Mecanismo de actuación de los sideróforos .....	11
Tipos de sideróforos.....	12
Aplicaciones de los sideróforos.....	13
Antecedentes .....	17
Descubrimiento de los sideróforos .....	17
Sideróforo de la bacteria patógena de peces <i>Aeromonas salmonicida</i> subsp. <i>salmonicida</i> ..	19
Procedimientos experimentales .....	29
Síntesis del 2,3-dihidroxibenzoato de metilo.....	29
Síntesis del 2,3-diisopropoxibenzoato de metilo .....	30
Síntesis del ácido-2,3-diisopropoxibenzoico .....	31
Síntesis del 2,3-bisbenciloxibenzoato de metilo .....	32
Síntesis del ácido 2,3-bisbenciloxibenzoico .....	33
Síntesis del 2-N-((benciloxi) carbonil)-6-N-(2,3-bis (benciloxi)benzol)-L-lisinato de bencilo..	34
Síntesis de la benciloxicarbonil-L-lisina .....	35
Síntesis del (5-(2,3-diisopropoxibenzamido)pentil)carbamato de terc-butilo.....	36
Síntesis del 2-N-((benciloxi)carbonil-6-N-(2,3-diisopropoxibenzoil)-L-lisinato de bencilo .....	37
Síntesis del 2-N-((benciloxi) carboxil-6-N-(2,3-diisopropoxibenzoil)-L-lisinato de bencilo.....	38
Síntesis de la 6-N-(2,3-dihidroxibenzol)-L-lisina.....	39
Síntesis del (5-(2,3-diisopropoxibenzamido)pentil)carbamato de terc-butilo.....	40
Resultados y discusiones.....	43
Conclusiones .....	53
Bibliografía .....	57



# **RESUMEN**



**Palabras clave:** sideróforo, amonabactina, análogos.

El hierro es un micronutriente esencial para todos los organismos vivos y está implicado en reacciones enzimáticas fundamentales. Una de las estrategias más comunes para la captación de hierro para las bacterias es la producción de sideróforos.

El presente Trabajo de Fin de Grado se centra en la síntesis y caracterización de intermedios sintéticos sencillos, los cuales son clave en la preparación de los sideróforos tipo amonabactina, producidos por la bacteria patógena de peces *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*. Se propuso la obtención de dos análogos A y B como se puede observar en el esquema 1.

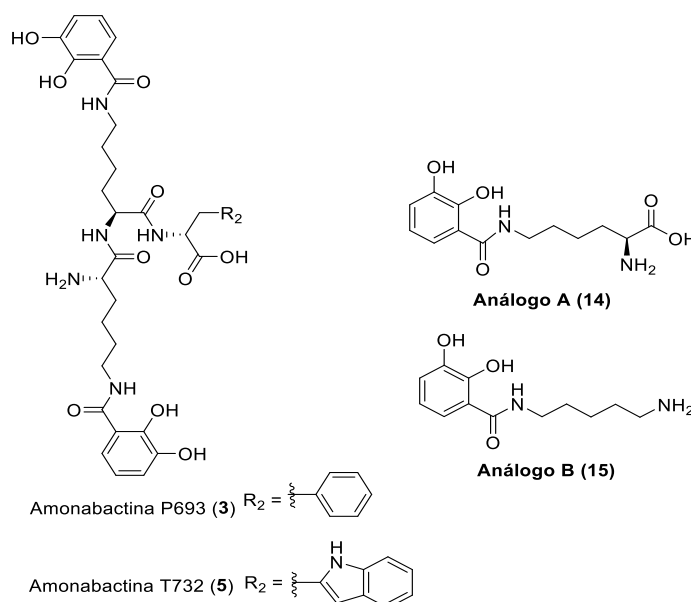


Figura 1. Estructura de las amonabactinas y de los análogos A y B sintetizados.

En la primera parte de este trabajo se estudia la obtención de los intermedios de reacción necesarios para la preparación de los análogos **A** y **B**, así como de cualquier sideróforo de tipo catecol, estos son el ácido-2,3-diisopropoxibenzoico y el ácido 2,3-bisbenciloxibenzoico.

En la segunda parte se prepara el análogo A, mediante el acoplamiento de derivados protegidos del ácido-2,3-diisopropoxibenzoico y un derivado de la L-lisina. En la última parte del trabajo se obtiene el análogo B mediante el acoplamiento de derivados protegidos del ácido 2,3-bisbenciloxibenzoico y el (5-aminopentil)carbamato de ter-butilo.

La caracterización de los productos sintetizados se lleva a cabo mediante espectroscopia de resonancia magnética nuclear de protón, carbono y técnicas de espectrometría de masas.

# RESUMO

**Palabras chave:** sideróforos, amonabactina, análogos.

O ferro é un micronutriente esencial para todos os organismos vivos e está implicado en reaccións encimáticas fundamentais. Unha das estratexias máis comúns para a captación de ferro para as bacterias é a produción de sideróforos.

O presente Traballo de Fin de Grao céntrase na síntese e caracterización de intermedios sintéticos sinxelos os cales son clave na preparación dos sideróforos tipo amonabactina, producidos pola bacteria patóxena de peixes *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*. Propúxose a obtención de dous análogos A e B como se pode observar no esquema 1.

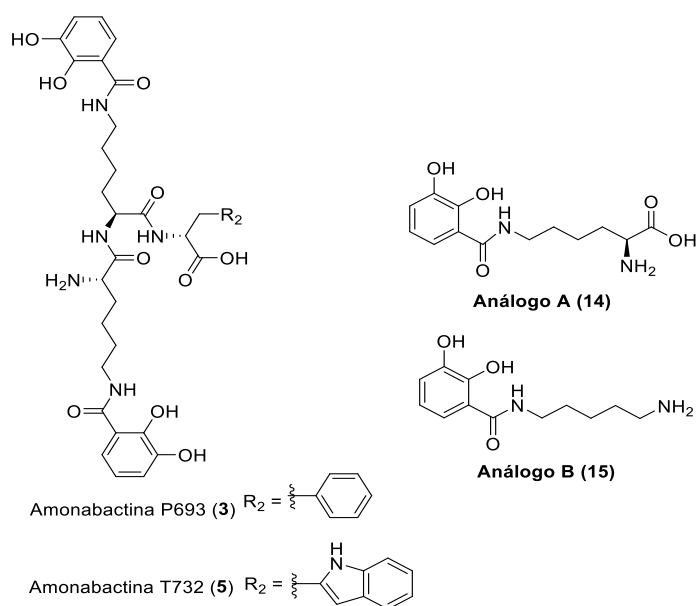


Figura 1. Estrutura das amonabactinas e dos análogos A e B sintetizados.

Na primeira parte deste traballo estúdase a obtención dos intermedios de reacción necesarios para a preparación dos análogos A e B, así como de calquera sideróforo de tipo catecol, estes son o ácido-2,3-diisopropoxibenzoico e o ácido 2,3-bisbenciloxibenzoico.

Na segunda parte prepárase o análogo A, mediante o axuste de derivados protexidos do ácido-2,3-diisopropoxibenzoico e o un derivado da L-lisina. Na última parte do traballo obtense o análogo B mediante o axuste de derivados protexidos do ácido 2,3-bisbenciloxibenzoico e o ter-butil(5-aminopentil)carbamato.

A caracterización dos produtos sintetizados leva a cabo mediante espectroscopia de resonancia magnética nuclear de protón, carbono e técnicas de espectrometría de masas.



**Key words:** siderophore, amonabactin, analogs.

Iron is an essential element for all living organisms and is involved in fundamental enzymatic reactions. One of the most common strategies for iron acquisition for bacteria is the production of siderophores.

This Final Degree Work is focused in the synthesis and characterization of simple synthetic intermediates which are essential in the preparation of the siderophore amonabactin, produced by the pathogenic bacteria of fish *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*. It was proposed the synthesis of two analogs A and B as it showed in the diagram 1.

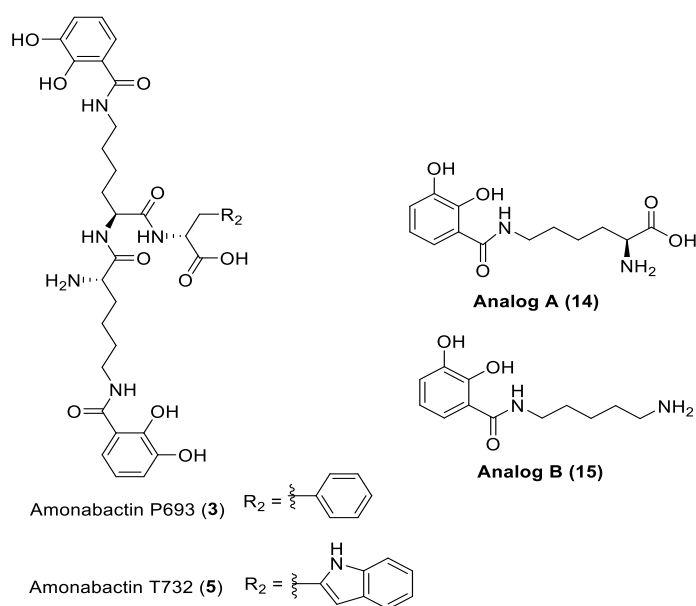


Figure 1: Structure of amonabactin and of the analogs A and B.

In the first part of this work, key intermediates for the preparation of the analogs A and B were obtained, as well as for any catechol siderophore type. These intermediates are the 2,3-bis(isopropoxy)benzoic acid and the 2,3-bis(benzyloxy)benzoic acid.

In the second part the analog A was synthesized by coupling 2,3-bis(benzyloxy)benzoic acid with a L-Lysine derivative. Finally, analog B was obtained by coupling 2,3-bis(isopropoxy)benzoic acid with N-Boc-cadaverine

Characterization of synthesized products were carried out by proton and carbon nuclear magnetic resonance spectroscopy and mass spectrometry.



# **INTRODUCCIÓN**



## Introducción

Está previsto que la población mundial aumente en más de 1.000 millones de personas en los próximos 15 años, por lo que se alcanzarían los 8.500 millones en 2030, 9.700 millones en 2050 y 11.200 millones en 2100.<sup>1</sup> Debido a esta previsión la humanidad se enfrenta a un problema de cómo alimentar a más de 9.000 millones de personas en un contexto de cambio climático, incertidumbre económica y financiera y un aumento de la competencia por los recursos naturales. Para afrontar este problema la comunidad internacional adquirió compromisos sin precedentes en septiembre de 2015 cuando los Estados miembros de las Naciones Unidas aprobaron la Agenda 2030 para el Desarrollo Sostenible. En esta Agenda también se fijan objetivos relativos a la contribución y la práctica de la pesca y la acuicultura en pro de la seguridad alimentaria y la nutrición así como en la utilización de los recursos naturales de tal manera que se garantice un desarrollo sostenible en términos económicos, sociales y ambientales.

Muchos milenios después de que la producción alimentaria terrestre pasara de actividades de caza y recolección a la agricultura, la producción de alimentos acuáticos ha dejado de basarse principalmente en la captura de peces salvajes para comprender la cría de un número creciente de especies cultivadas. En 2014 se alcanzó un hito cuando la contribución del sector acuícola al suministro de pescado para consumo humano superó por primera vez la del pescado capturado en el medio natural.

El consumo aparente de pescado *per capita* a nivel mundial registró un aumento de un promedio de 9,9 kg por persona al año en la década de 1960 a 14,4 kg en la década de 1990 y 19,7 kg en 2013, con estimaciones preliminares que apuntan a que seguirá aumentando hasta superar los 20 kg en 2014 y 2015.<sup>2</sup>

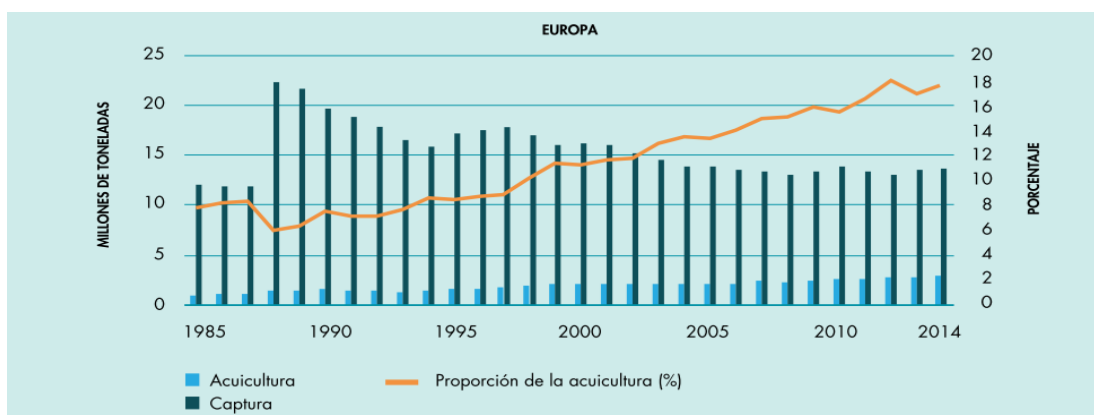


Figura 2. Producción en Europa de la pesca de captura y de acuicultura.<sup>2</sup>

# INTRODUCCIÓN

---

La producción acuícola de rodaballo en España en 2014 ha sido de 7.808 toneladas, un 14,6% más que la de 2013. Galicia es, con diferencia, la principal Comunidad Autónoma productora de rodaballo en España (99%), también es una importante fuente productora de lenguado y besugo, además es la principal región productora de moluscos de España y de Europa.

Por Comunidad Autónoma, Galicia, País Vasco, Castilla y León y Cantabria son las que consumen más pescado fresco por persona.<sup>3</sup>

## Enfermedades en peces causadas por la presencia de bacterias en sistemas de acuicultura

### Vibriosis

La bacteria patógena Gram negativa *Vibrio anguillarum* es un agente etiológico clásico de la vibriosis, que causa septicemia hemorrágica típica en una amplia variedad de especies de peces de agua fría y caliente, incluido el salmón del Pacífico y el Atlántico, la trucha arco iris, el rodaballo, etc.<sup>4</sup>



Figura 3. Pez infectado por la bacteria *Vibrio anguillarum*.<sup>5</sup>

### Yersiniosis

*Yersinia* es un género de bacterias anaerobias Gram-negativa. La especie *Yersinia ruckeri* es la responsable de la yersiniosis, también conocida como la enfermedad de la boca roja. Esta enfermedad afecta a peces de distintas partes del mundo tales como Europa, Australia, India, China, Canadá, etc.

Esta enfermedad no presenta signos significativos, los peces afectados pueden presentar cambios en el comportamiento como nadar en la superficie, pérdidas de apetito, hemorragias en la boca, en la superficie del cuerpo y en los órganos internos.<sup>6</sup>

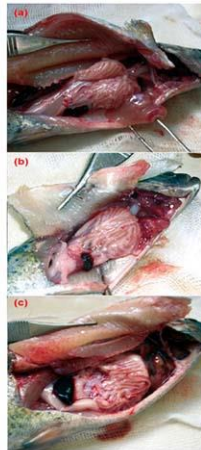


Figura 2. Hígado pálido y hemorrágico (a); bazo normal (b); bazo esplénico (c).

Figura 4. Pez infectado por la bacteria *Yersinia ruckeri*.<sup>7</sup>

## Pasteurelosis

La pasteurelosis, también conocida como photobacteriosis, es causada por la bacteria halófila *Photobacterium damsela* subs *piscicida*. Fue aislada por primera vez en la bahía de Chesapeake en Estados Unidos de la perca blanca (*Morone americanus*) y de la lubina rayada en 1963.

Se caracteriza por la presencia de nódulos blancos en las vísceras internas, particularmente en el bazo y el riñón.<sup>4</sup>



Figura 5. Pez infectado cuya bacteria patógena es la *Photobacterium damsela*.<sup>8</sup>

## Furunculosis

*Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* (en adelante *A. salmonicida*) es una proteobacteria Gram-negativa identificada como el agente causal de la furunculosis, una enfermedad devastadora que afecta a los peces cultivados y salvajes en todo el mundo, esta enfermedad causa pérdidas económicas significativas en una gran variedad de peces.<sup>9</sup>

# INTRODUCCIÓN

---

Se desarrolla como una septicemia hemorrágica crónica o aguda, a menudo con una extensa necrosis liquefactiva.<sup>4</sup>



Figura 6. Pez infectado cuya bacteria patógena es la *Aeromonas salmonicida*.<sup>10</sup>

## La importancia del hierro

El hierro es un micronutriente esencial para todos los organismos vivos y está implicado en reacciones enzimáticas fundamentales, como el metabolismo del oxígeno, procesos de transferencia de electrones y síntesis de ADN y ARN.<sup>11</sup>

A pesar de la abundancia del hierro en la tierra posee una baja biodisponibilidad en ambientes aerobios debido a la baja solubilidad del hierro (III), ya que precipita formando  $\text{Fe}(\text{OH})_3$ , el cual tiene una constante de solubilidad de  $10^{-39}$ .<sup>12</sup>

Un factor importante en el crecimiento y la multiplicación de las bacterias que producen infecciones en los peces, es la competición por hierro con el organismo infectado.<sup>13</sup>

Para facilitar la captación adecuada de hierro (III), muchos microorganismos han desarrollado una estrategia que implica la producción de moléculas, denominadas sideróforos o portadores de hierro.

## Sideróforos

Una de las estrategias más comunes para la captación de hierro para las bacterias es la producción de sideróforos. Estos son compuestos de bajo peso molecular (500-1500 daltons) que poseen una alta afinidad y selectividad para el hierro (III). Existen más de 500 tipos diferentes de sideróforos, de los cuales 270 han sido caracterizados estructuralmente.<sup>12</sup> Algunos de ellos poseen hasta seis átomos de oxígeno o nitrógeno que actúan como dadores de electrones, que se coordinan con el catión metálico.

En medio acuoso los sideróforos se coordinan con el hierro (III) y lo introduce en los microorganismos a través de receptores específicos de membrana y proteínas.<sup>11</sup>



La biosíntesis de estos receptores está regulada tanto por la concentración de hierro presente en el medio ambiente como por la que ya poseen las propias bacterias.

## Mecanismo de actuación de los sideróforos

La adquisición de hierro es uno de los factores esenciales de supervivencia de la especie patógena dentro del huésped. Sin esta capacidad será incapaz de crecer y eliminada efectivamente mediante los mecanismos de defensa del huésped o morirá de inanición de nutrientes.

Una vez que los sideróforos se biosintetizan y son secretados fuera de las células bacterianas, donde se coordinan con los iones  $\text{Fe}^{3+}$  para formar un complejo férrico-sideróforo, son posteriormente internalizado por el mecanismo de transporte apropiado. En las bacterias Gram-negativas, los complejos sideróforos férricos son transportados a través de la membrana externa e interna por un sistema dependiente de energía, que incluyen un transportador de ferrosideróforo dependiente de TonB específico (TBDT) localizado en la membrana externa, acoplado a un transportador ABC que cataliza las etapas finales del transporte de ferrosideróforo a través de la membrana citoplásmica desde el periplasma al citosol.<sup>14</sup>

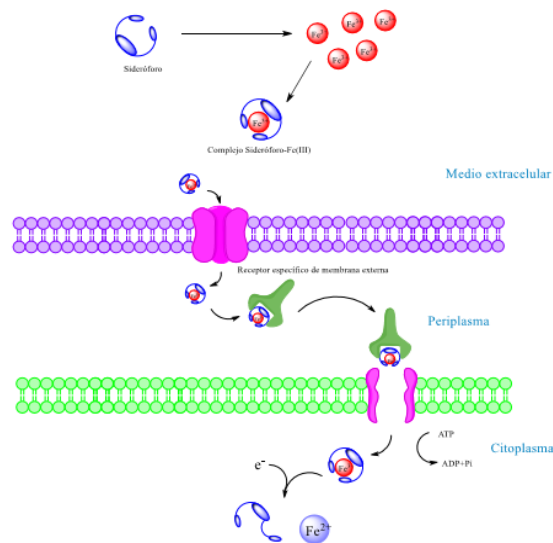


Figura 7. Mecanismo de introducción de  $\text{Fe(III)}$  en Gram-negativas mediante sideróforos

La adquisición de hierro por tanto se reconoce como uno de los pasos principales factores de virulencia de cualquier patógeno. Dada la importancia de dicha adquisición, se ha sugerido que la absorción de hierro podría ser un objetivo clave para el diseño de nuevos agentes quimioterapéuticos y, por lo tanto, se están realizando considerables investigaciones para

## INTRODUCCIÓN

---

comprender las posibles interrelaciones entre patógeno, huésped y hierro, así como ver cómo este conocimiento puede traducirse en nuevos tratamientos para las enfermedades.<sup>15</sup>

### Tipos de sideróforos

Los sideróforos son un grupo muy diverso de compuestos, pero los más comunes se dividen en tres clases principales basadas en la naturaleza química de las porciones que donan los ligandos de oxígeno para la coordinación de  $\text{Fe}^{3+}$ . Estas tres clases son: catecolatos, hidroxamatos y  $\alpha$ -hidroxicarboxilatos. Otros sideróforos menos comunes son los hidroxifeniloxazolona,  $\alpha$ -amino-carboxilato y  $\alpha$ -hidroxiimidazol.

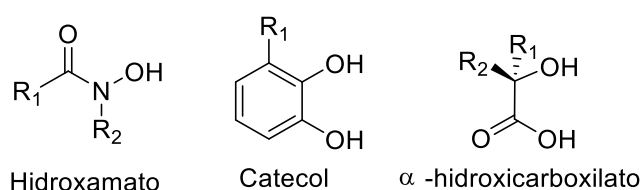


Figura 8. Estructura de los 3 principales ligandos de los sideróforos.

La mayoría de los sideróforos son donantes de oxígeno, ligandos hexadentados que forman complejos octaédricos con hierro. Todos estos grupos de ligando, catecolatos, hidroxamatos y  $\alpha$ -hidroxicarboxilatos, forman complejos con el ion  $\text{Fe}^{3+}$  que se caracterizan por una alta estabilidad termodinámica, estos grupos forman anillos de quelato de cinco miembros y ocupan dos sitios del centro de hierro.

Los sideróforos también pueden formar complejos con otros iones metálicos tales como  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Ga}^{3+}$ , etc. Esto se debe a la presencia de grupos funcionales dadores de pares de  $e^-$  en los grupos de unión que muestran alta afinidad por otros iones de metales pesados. Esta característica le otorga a los sideróforos una propiedad a mayores de la captación de hierro, ya que estos complejos con otros metales no son reconocidos por la bacteria, impidiendo así la entrada de metales tóxicos presentes en el medio por otras vías de absorción.

El conocimiento de la estructura de los sideróforos y la presencia de receptores de membrana microbiana implicados en la captación de hierro de estos conjugados hierro-sideróforo, ha abierto nuevas vías en las ciencias médicas y farmacéuticas. Los sideróforos también se puedan utilizar para facilitar la eliminación del exceso de hierro, con el fin de solucionar los trastornos que dicho exceso provoca en el organismo humano.<sup>16</sup>

## Aplicaciones de los sideróforos

Los sideróforos y derivados poseen un gran potencial en el tratamiento de muchas enfermedades, incluidas las infecciones. En la actualidad se están desarrollando importantes aplicaciones en el tratamiento de infecciones, sobrecarga aguda y crónica de hierro, intoxicaciones agudas, anemia de células falciformes, malaria y neoplasias malignas. Debido a su potencial para la inactivación selectiva de bacterias específicas y para superar los mecanismos de resistencia antimicrobiana, el desarrollo de aplicaciones se están centrando principalmente en la búsqueda de nuevos compuestos con actividad antibacteriana en el tratamiento de infecciones.<sup>16</sup>

Dado el incremento de cepas multirresistentes a los antibióticos en los últimos años, se ha aumentado la investigación sobre la obtención de nuevos antimicrobianos y vacunas que resulten más efectivos a la hora de tratar las infecciones producidas por estas cepas. Existen distintas estrategias para el desarrollo de nuevos antibacterianos basados en los mecanismos de captación de hierro siendo una de las más importantes la estrategia de Caballo de Troya.<sup>17</sup>

La terapia con fármacos mediante la estrategia de Caballo de Troya proporciona un nuevo enfoque para la administración de fármacos mejorando la adquisición celular de terapéuticos y permitiendo el transporte a través de biobarreras impermeables. La estrategia de Caballo de Troya consiste en la conjugación de un antibiótico con un sideróforo para formar un complejo en el que el antibiótico explota el sistema de captación de sideróforos de hierro como entrada celular.

Este mecanismo de absorción de hierro permite eludir la baja permeabilidad de la membrana externa de las bacterias. La estructura de los conjugados sideróforo-fármaco consiste en tres partes: un sideróforo, un espaciador (Linker) y un antibiótico (Drug) conocido (Figura 9). El papel del sideróforo es coordinar al hierro, mientras que la función del espaciador es unir el antibiótico conocido al sideróforo y, posteriormente, controlar su liberación del complejo.<sup>16</sup>

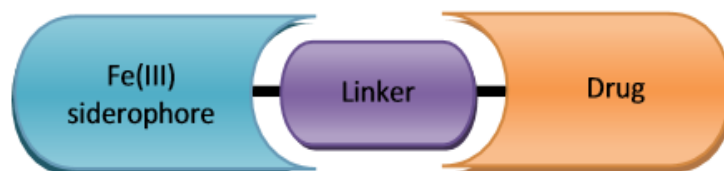


Figura 9. Representación esquemática del conjugado sideróforo-fármaco.<sup>16</sup>

## INTRODUCCIÓN

---

Un proceso diferente es el de producción de vacunas a partir de proteínas recombinantes, y consiste en primer lugar en caracterizar la proteína de membrana del sideróforo de la bacteria patógena. Una vez se haya caracterizado la proteína y determinado el gen que la produce, se construye un plásmido que lo pueda producir y se introduce en una cepa de *E.coli* para que la produzca en mayor cantidad. A continuación, se purifica la proteína pura y se combina con un adyuvante para obtener así la vacuna deseada. Estas son suministradas a los peces para que su sistema inmunitario quede marcado por esa proteína identificándola como patógena.

La prevención de las enfermedades bacterianas se puede conseguir mediante el uso de vacunas, las cuales se pueden clasificar en tres grupos principales: 1) Vacunas vivas atenuadas (replicantes): son las más eficientes y están constituidas por bacterias capaces de replicarse sin producir la infección, ya que son capaces de simular la infección de forma natural, sin embargo tienen mayor número de efectos adversos y es posible la existencia de que la bacteria recupere su virulencia; 2) Vacunas inactivadas (no replicantes): pueden estar constituidas por bacterias inactivadas (bacterinas) o por una subunidad recombinante, en general este tipo de vacunas son más seguras pero presentan menor protección, por lo que es necesario usarlas en concentraciones superiores y realizando refuerzos; 3) Vacunas génicas: están formadas por el material genético necesario para la producción del agente inmunizante deseado, se ha encontrado que este tipo de vacunas presentan buena respuesta protectora y son seguras.

La producción de vacunas formadas por proteínas recombinantes, tiene la ventaja de que habitualmente su producción puede realizarse en diferentes sistemas de expresión (bacterias, levaduras, células de insectos, etc.), su fermentación y escalado es más sencilla, evitando trabajar con el organismo causante de la enfermedad, lo que después de las etapas iniciales de investigación conlleva un menor costo de producción. <sup>18</sup>

# **ANTECEDENTES**



## Antecedentes

### Descubrimiento de los sideróforos

Los primeros ejemplos de extracción e identificación de complejos naturales de hierro-sideróforo se publicaron a principios de la década de 1950s. Fueron identificados como factores de crecimiento de los organismos de los que se obtuvieron, e incluyeron micobactinas y ferricromo. Los ensayos estándar de identificación de sideróforos se desarrollaron en los años ochenta como requisito para estudiar los sistemas de captación de hierro bacteriano.<sup>19</sup>

El grupo de investigación PRONAMAR, que ahora forma parte del grupo QUIMOLMAT de la UDC lleva desde mediados de los años 90 centrandose su actividad en la búsqueda de nuevas sustancias naturales con actividad biológica, principalmente de organismos marinos, y desarrollar sus posibles aplicaciones, ya sea a partir de ellos mismos o de sus derivados obtenidos por procesos sintéticos.

Dentro de esta línea de investigación, a mediados de los 2000 el grupo de investigación comenzó a realizar estudios sobre sideróforos de bacterias patógenas de acuicultura, los cuales desembocaron en el aislamiento de vancrobactina en 2006 a partir de cultivos deficientes en hierro en el medio del patógeno bacteriano *Vibrio anguillarum*. Mediante amplios estudios de RMN, se pudo determinar la estructura planar de vancrobactina.<sup>20</sup>

Este patógeno es el agente causante de la vibriosis, una septicemia hemorrágica extremadamente mortal que produce considerables pérdidas económicas en la acuicultura en todo el mundo. Un año más tarde, se logró realizar la síntesis total de vancrobactina, lo que además permitió dilucidar su configuración absoluta.<sup>21</sup>

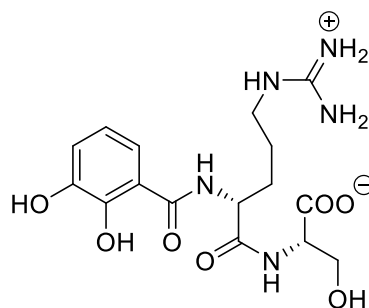


Figura 10. Estructura de la Vancrobactina.

Aunque los mecanismos de virulencia de *V. anguillarum* no se entienden completamente, se sabe que la capacidad de captar hierro a través de la utilización de sideróforos contribuye

## ANTECEDENTES

---

significativamente a la virulencia de esta bacteria. El sideróforo más estudiado producido por *V. anguillarum* es anguibactina, aislada por primera vez en el año 86. Aunque el serotipo patógeno O1 puede producir ambos sideróforos, está por determinar cuál de ellos es el factor de virulencia más determinante.

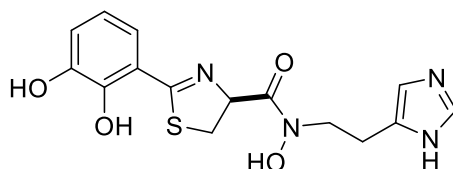


Figura 11. Estructura de la Anguibactina.

El aumento de la presión selectiva mediada por antibióticos ha llevado a la aparición de cepas multirresistentes en muchos patógenos bacterianos, y los patógenos de peces no son una excepción. Por lo tanto, son necesarios antimicrobianos nuevos y eficaces para tratar estas infecciones resistentes a los antibióticos comunes.

Una forma de aumentar la eficacia de los antimicrobianos contra las infecciones bacterianas, y que estudiada, en este proyecto podría ser la "estrategia del caballo de Troya", en la que los fármacos antimicrobianos están acoplados a sideróforos y transportados a través de las membranas bacterianas por medio de las vías de captación de hierro. Estos conjugados sideróforo-antibióticos son reconocidos por receptores específicos de membrana y son transportados activamente a través de las membranas bacterianas externas y citoplasmáticas, el hierro se libera del complejo sideróforo-hierro y se incorpora en las proteínas de hierro hemo y no hemo.<sup>16</sup>

Con estos antecedentes el grupo de investigación ha propuesto que la vanrobactina de *V. anguillarum* podría ser un candidato muy interesante para una estrategia de este tipo de profármacos dirigida al desarrollo de nuevos antimicrobianos contra la vibriosis y probablemente contra otras enfermedades infecciosas relacionadas.<sup>22</sup> Se realizó la síntesis de distintos análogos para realizar un estudio de las relaciones estructurales-actividad, para determinar qué partes del sideróforo son claves para que se produzca el reconocimiento molecular por parte de la proteína de membrana, lo que permitió determinar qué grupo funcional era el más adecuado para realizar la conjugación en la estrategia de Caballo de Troya, y posteriormente se realizaron conjugados de vanrobactina con el antibiótico norfloxacin.<sup>23</sup>



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

Los mecanismos de absorción de hierro basados en la síntesis de sideróforos utilizados por el patógeno de los peces *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* todavía no se entienden completamente. Aunque la producción de sideróforos en esta bacteria se conoce hace más de 30 años, se dispone de muy poca información sobre la química de los sideróforos producidos y la genética subyacente a su síntesis.

Estudios realizados por el grupo de Microbiología de la Universidad de Santiago de Compostela junto a nuestro grupo de investigación PRONAMAR de la Universidad de A Coruña realizó el análisis de las secuencias del genoma que permitía descubrir que esta bacteria posee dos grupos de genes implicados en la síntesis de sideróforos. Uno de ellos codifica la síntesis de acinetobactina, el sideróforo del patógeno humano *Acinetobacter baumannii*, mientras que el segundo grupo muestra una alta similitud con los genes que codifican la síntesis de las amonabactinas en *Aeromonas hydrophila*.<sup>9</sup>

Las amonabactinas pertenecen a la familia de sideróforos tetradentados de catecolato, y se identificaron en 1989, a partir de la *Aeromonas hydrophila* 495A2. Presentan una cadena lateral de triptófano o fenilalanina con dos unidades quelantes de catecol unidas a través de unidades espaciadoras de lisina y glicina.<sup>19</sup>

Los equipos de investigación de la UDC Y USC consiguieron mediante el uso de una combinación de análisis genómico, mutagénesis, ensayos biológicos, purificación química, y procedimientos de determinación estructural, demostrar que la mayoría de las cepas de *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* producen simultáneamente los dos sideróforos, la acinetobactina y las amonabactinas.

Curiosamente, la síntesis de ambos sideróforos comparten de los genes que codifican la síntesis del residuo de ácido 2,3-dihidroxibenzoico que están presentes sólo en el grupo de genes que codifican las amonabactinas. Una sólo mutación en dichos genes suprime la producción de ambos sideróforos.<sup>9</sup>

## ANTECEDENTES

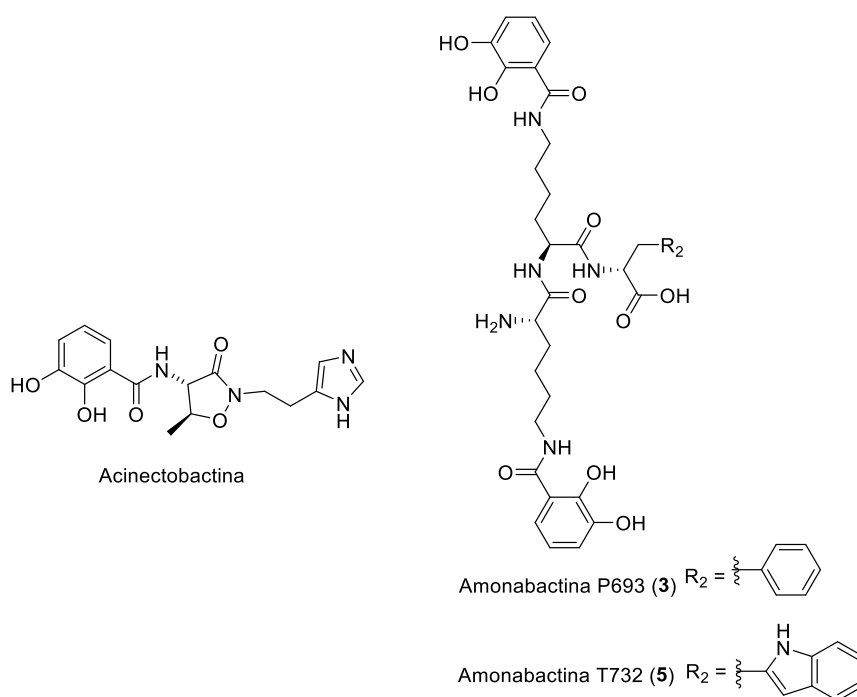


Figura 12. Sideróforos producidos por la bacteria patógena *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*.

Este estudio representa la primera evidencia de la producción simultánea de acinetobactina y amonabactina por un patógeno bacteriano y revela la plasticidad de los genomas bacterianos y vías biosintéticas. El hecho de que el mismo sideróforo sea producido por patógenos no relacionados destaca la importancia de estos sistemas y su intercambiabilidad entre diferentes bacterias.<sup>9</sup>

Estos sideróforos fueron aislados y caracterizados químicamente a partir de cepas *Aeromonas salmonicida* y se propuso una ruta biosintética basada en el análisis genético. Sin embargo, los mecanismos de internalización de la acinetobactina férrica y las amonabactinas férricas permanecían en gran parte desconocidos.<sup>14</sup>

El grupo de Microbiología de la Universidad de Santiago de Compostela junto al grupo de investigación PRONAMAR de la Universidad de A Coruña publicaron en 2017 un estudio demostrando que la proteína de membrana externa FstB es el receptor de la ferriacinetobactina en *A. salmonicida* ya que un mutante defectuoso de *fstB* es incapaz de crecer bajo limitación de hierro y no usa acinetobactina como fuente de hierro. Con el fin de estudiar el efecto que los cambios estructurales en la acinetobactina tienen sobre su actividad siderófora, se sintetizó una colección de análogos basados en acinetobactina, incluyendo su enantiómero y cuatro derivados desmetilados. La actividad biológica de estos análogos en una cepa *fstB* (+) comparada con una cepa *fstB* (-) permitió determinar las relaciones estructura-

actividad. Encontrándose que los dos enantiómeros de la acinetobactina poseen una actividad siderófora en *A. salmonicida*. Además, se observó que *A. salmonicida* no podía usar análogos de acinetobactina cuando el imidazol o un anillo heterocíclico similar estaba ausente de la estructura. Sorprendentemente, la eliminación del grupo metilo en el anillo de isoxazolidinona indujo una mayor actividad siderófora, sugiriendo así rutas alternativas de entrada en la célula que deben ser investigadas adicionalmente. Se propuso que algunos de los análogos de acinetobactina sintéticos descritos podrían usarse como puntos de partida en el desarrollo de nuevos fármacos contra *A. salmonicida* y probablemente contra otros productores de acinetobactina como el patógeno humano *Acinetobacter baumannii*.<sup>14</sup>

Recientes estudios realizados por el grupo de Microbiología de la Universidad de Santiago de Compostela sugieren que la proteína FstC es el receptor de las amonabactinas. Por ello se planteó sintetizar una serie de análogos de las amonabactinas con el fin de realizar un estudio de la relación estructura-actividad de forma similar a como se realizó con la acinetobactina.



# **OBJETIVOS**



### Objetivos

Uno de los objetivos principales del grupo de investigación es el estudio de la síntesis de análogos simplificados de las amonabactinas para el desarrollo de aplicaciones terapéuticas en el tratamiento de la enfermedad forunculosis y la posible utilización de este sideróforo en estrategias terapéuticas del tipo “Caballo de Troya”.

En el desarrollo de la presente memoria de Trabajo de Fin de Grado, se presentarán los aspectos experimentales relacionados con la preparación de ciertos intermedios clave en la síntesis química del sideróforo amonabactina así como la síntesis de dos análogos de éste para su posterior estudio biológico, con el fin de determinar los requisitos estructurales necesarios para que se produzca el reconocimiento molecular.

Los objetivos específicos que se proponen en el trabajo son:

- Síntesis y escalado de bloques sintéticos básicos para la síntesis de amonabactinas
- Síntesis de análogos sencillos de las amonabactinas
- Caracterización de todos los intermedios de reacción utilizando para ello espectroscopia de resonancia magnética nuclear de protón, carbono y técnicas de espectrometría de masas.



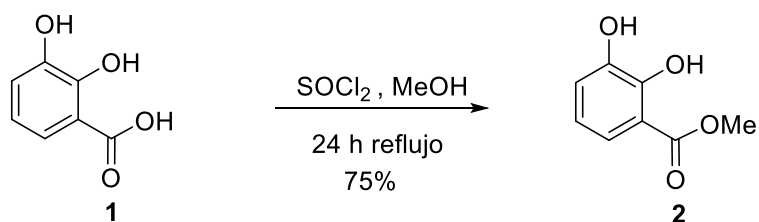


# **PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL**



Procedimientos experimentales

Síntesis del 2,3-dihidroxisenzoato de metilo



A 100 mg (648,84  $\mu\text{mol}$ ) de ácido-2,3-dihidroxisenzoico (**1**) se añadieron 10 mL de metanol para dar lugar a una disolución de color amarillo pálido. Mientras la disolución anterior se agita, se añadieron 100 mL de SOCl<sub>2</sub> cambiando el color a blanquecina y se dejó a reflujo 24 h a 60° C. Pasado ese tiempo, se dejó enfriar y posteriormente se concentró a presión reducida formándose un aceite marrón. Este aceite se disolvió en 25 mL de acetato de etilo, la disolución orgánica resultante se lavó tres veces con 25 mL agua destilada, otras tres veces con una disolución saturada de cloruro sódico, y por último la fase orgánica resultante se secó con MgSO<sub>4</sub>. Finalmente se concentró a presión reducida, obteniéndose 82 mg (75% de rendimiento) de 2,3-dihidroxisenzoato de metilo (**2**) como un sólido marrón blanquecino.

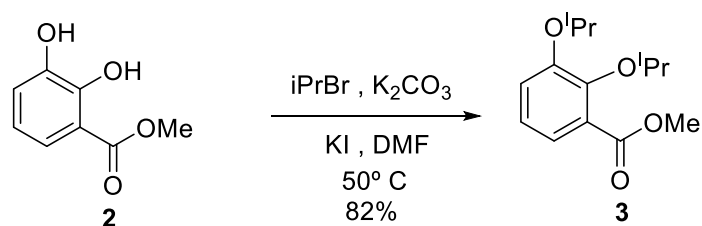
**RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>),  $\delta_{\text{H}}$  ppm:** 10,89 (s, 1H); 7,35 (dd,  $J = 8,1; 1,4$  Hz, 1H); 7,12 (dd,  $J = 8,0; 1,5$  Hz, 1H); 6,83 (t,  $J = 8,0$  Hz, 1H); 3,93 (s, 3H)

**RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>),  $\delta_{\text{C}}$  ppm:** 170,7 (C=O); 148,8 (C-Ph); 145,0 (C-Ph); 120,5 (CH-Ph); 119,8 (CH-Ph); 119,2 (CH-Ph); 122,4 (CH-Ph); 52,4 (OCH<sub>3</sub>)

**(+)-LR-ESIMS  $m/z$ :** 191 [M+Na]<sup>+</sup>

## PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

### Síntesis del 2,3-diisopropoxibenzoato de metilo



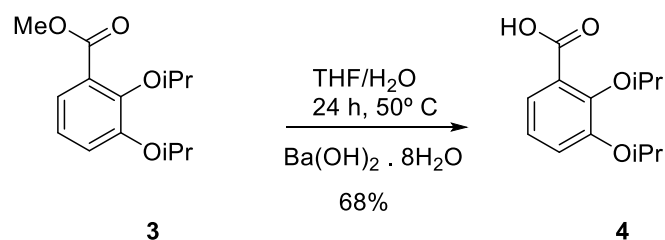
Sobre 100 mg (594,71  $\mu\text{mol}$ ) de **2** se añadieron 394,52 mg (2,85 mmol) de  $\text{K}_2\text{CO}_3$ , una punta de espátula de  $\text{KI}$ , y la mezcla resultante se disolvió con 5 mL de  $\text{DMF}$ . A continuación, se añadieron 0,1 mL de  $i\text{-PrBr}$  bajo agitación, adquiriendo la disolución anterior un color verde oscuro, se dejó a reflujo 24 h a  $50^\circ\text{C}$  bajo atmósfera de argón. Pasado ese tiempo, la mezcla, que cambió de color a marrón-verde oscuro se dejó enfriar y se concentró a presión reducida. Posteriormente, se redisolvió en cloroformo, se filtró sobre celita, y a continuación, se lavó tres veces con una disolución de  $\text{HCl}$  al 5% en v/v, tres veces con una disolución saturada de  $\text{NaCl}$  y la fase orgánica resultante se secó con  $\text{MgSO}_4$ . Finalmente, se concentró a presión reducida. Se obtuvieron 122 mg (82% de rendimiento) de 2,3-diisopropoxibenzoato de metilo (**3**) como un aceite marrón oscuro.

**RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta_{\text{H}}$  ppm:** 7,30 (dd,  $J = 6,3; 3,2$  Hz 1H); 7,02 (m, 2H); 4,52 (dhept,  $J = 12,5; 6,1$  Hz, 2H); 3,91 (s, 3H); 1,37 (d,  $J = 6,1$  Hz, 6H); 1,26 (d,  $J = 6,1$  Hz 6H)

**RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta_{\text{C}}$  ppm:** 167,6 (C=O); 123,3 (CH-Ph); 122,8 (CH-Ph); 120,1 (CH-Ph); 71,7 (CH); 52,1 ( $\text{OCH}_3$ ); 22,5 ( $\text{CH}_3$ ); 22,3 ( $\text{CH}_3$ )

**(+)-LR-ESIMS  $m/z$ :** 275 [ $\text{M}+\text{Na}$ ] $^+$

**Síntesis del ácido-2,3-diisoproxibenzoico**



Sobre 765,5 mg (765,50  $\mu\text{mol}$ ) de **3** se añadieron 2,87 g (9,10 mmol) de  $\text{Ba(OH)}_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$  y 10 mL de una mezcla 1:1 THF/ $\text{H}_2\text{O}$ , la mezcla resultante se agitó y se dejó a reflujo 24 h a  $50^\circ \text{C}$ . Pasado este tiempo, la mezcla que adquirió un color marrón se dejó enfriar y se añadió la resina Dowex 50 W ( $\text{H}^+$ ) acidificada con 15 mL de HCl al 5% en v/v. Se filtró la resina sobre algodón y el producto se extrajo con tres porciones de THF, la disolución resultante se concentró a presión reducida obteniéndose 489 mg (68% de rendimiento) de ácido-2,3-diisoproxibenzoico (**4**) como un aceite marrón oscuro.

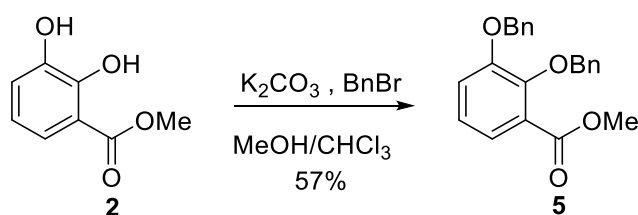
**RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta_{\text{H}}$  ppm:** 7,74 (c,  $J = 3,1$  Hz, 1H); 7,14 (t,  $J = 3,9$  Hz, 2H); 5,00 (m, 1H); 4,59 (m, 1H); 1,37 (d,  $J = 5,6$  Hz, 12H)

**RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta_{\text{C}}$  ppm:** 165,8 (C=O); 150,2 (CO); 146,7 (CO); 124,4 (CH-Ph); 124,1 (CH-Ph); 123,6 (CH-Ph); 120,3 (C-Ph); 71,7 (CO); 22,0 ( $\text{CH}_3$ )

**(+)-LR-ESIMS  $m/z$ :** 261 [ $\text{M}+\text{Na}$ ] $^+$

## PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

### Síntesis del 2,3-bisbenciloxibenzoato de metilo



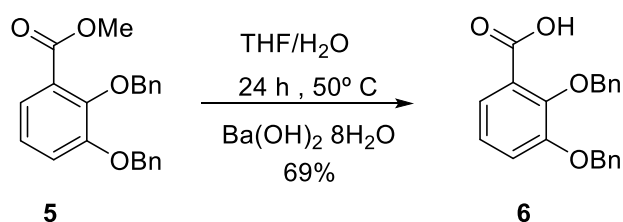
Sobre 920 mg (5,47 mmol) de **2** se añaden 6,05 g (43,77 mmol) de  $K_2CO_3$  y una mezcla  $MeOH/CHCl_3$  (5 mL/10 mL). Mientras la disolución anterior se agita, se añadieron 1,95 mL (16,41 mmol) de bromuro de bencilo y se dejó a reflujo 24 h a temperatura ambiente. Pasado ese tiempo, se filtró sobre celita y se concentró a presión reducida formándose un sólido marrón. El sólido resultante se disolvió en cloroformo, y a continuación se lavó tres veces con una disolución de HCl 5% v/v, tres veces con una disolución salina saturada y la fase orgánica resultante se secó con  $MgSO_4$ . Finalmente, se concentró a presión reducida y se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice, fase móvil  $AcOEt:Hexano$  con un gradiente desde 5% de  $AcOEt$  hasta el 20%, obteniendo finalmente 1,1 g (57% rendimiento) de 2,3-bisbenciloxibenzoato de metilo (**5**).

**RMN  $^1H$  ( $CDCl_3$ ),  $\delta_H$  ppm:** 7,38 (m, 11H); 7,14 (dd,  $J = 8,2; 1,9$  Hz, 1H); 7,09 (m, 1H); 5,13 (d,  $J = 9,6$  Hz, 4H); 3,85 (s, 3H)

**RMN  $^{13}C$  ( $CDCl_3$ ),  $\delta_H$  ppm:** 166,8 (C=O); 152,8 (CO); 148,3 (CO); 137,4 (C-Ph); 136,6 (C-Ph); 127,0 (CH-Ph); 126,9 (C-Ph); 124,0 (CH-Ph); 122,9 (CH-Ph); 118,1 (CH-Ph); 75,7 ( $CH_2$ ); 71,3 ( $CH_2$ ); 52,1 ( $OCH_3$ )

**(+)-LR-ESIMS  $m/z$ :** 371 [ $M+Na$ ] $^+$

**Síntesis del ácido 2,3-bisbenciloxibenzoico**



Se realizó el mismo procedimiento que en la obtención del compuesto **4**, partiendo de 1 g (2,87 mmol) del compuesto **5** se obtuvieron 665,6 mg (69% de rendimiento) de ácido 2,3-bisbenciloxibenzoico (**6**) como un sólido blanco.

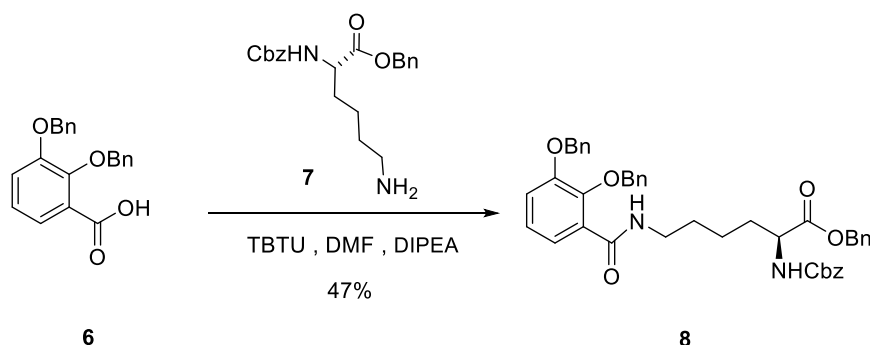
**RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>), δ<sub>H</sub> ppm:** 7,76 (dd, *J* = 8,0; 1,8 Hz, 1H); 7,41 (m, 11H); 7,19 (t, *J* = 8,0 Hz, 1H); 5,25 (m, 4H)

**RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>), δ<sub>H</sub> ppm:** 165,4 (C=O); 151,4 (CO); 147,2 (CO); 135,9 (C-Ph); 134,7 (C-Ph); 129,0 (CH-Ph); 125,0 (C-Ph); 124,4 (CH-Ph); 123,1 (CH-Ph); 119,0 (CH-Ph); 71,6 (CH<sub>2</sub>)

**(+)-LR-ESIMS m/z:** 357 [M+Na]<sup>+</sup>

## PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

### Síntesis del 2-*N*-((benciloxi) carbonil)-6-*N*-(2,3-bis (benciloxi)benzol)-L-lisinato de bencilo



Se dejaron secar dos balones en la estufa cada uno con sus correspondientes agitadores magnéticos durante 4 h. Pasado ese tiempo, en uno de los balones se añadieron 100 mg (299,07  $\mu\text{mol}$ ) del compuesto **6** y 115 mg (358,88  $\mu\text{mol}$ ) de TBTU y en el otro balón se añadieron 110 mg (299,07  $\mu\text{mol}$ ) de ((benciloxi)carbonil)-L-lisinato de bencilo (**7**). Se añadieron 6 mL de DMF en ambos balones purgados previamente con argón, y en el balón que contiene el compuesto **6** se añadieron 90  $\mu\text{L}$  de DIPEA. Se agitan ambos balones y se trasvasó la disolución que contiene el compuesto **6** sobre la mezcla que contiene el compuesto **7**. Se dejó 12 h agitando y bajo atmósfera de argón. Pasado ese tiempo, la mezcla adquirió un color marrón anaranjado, se concentró a presión reducida y posteriormente se disolvió en 15 mL de AcOEt. De seguido, la fase orgánica se lavó tres veces con agua destilada, una vez con una disolución saturada de NaCl y a continuación, la fase orgánica resultante se secó con  $\text{MgSO}_4$ . Se purificó mediante Medium Pressure Liquid Chromatography (MPLC) utilizando un cartucho SNAP de sílica de 10 g con un gradiente desde el 25% hasta el 50% de AcOEt en hexano, obteniendo finalmente 95,8 mg (47% rendimiento) de 2-*N*-((benciloxi) carbonil)-6-*N*-(2,3-bis (benciloxi)benzol)-L-lisinato de bencilo (**8**).

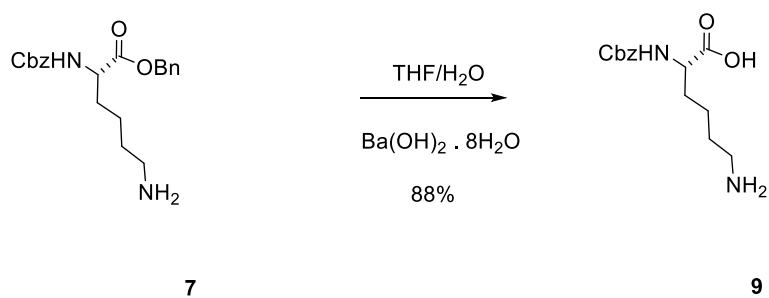
**RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta_{\text{H}}$  ppm:** 7,95 (t,  $J = 5,7$  Hz, 1H); 7,77 (dd,  $J = 7,5; 2,1$  Hz, 1H); 7,33 (m, 20H); 7,11 (m, 2H); 5,53 (m, 2H); 5,53 (d,  $J = 8,1$  Hz, 1H); 5,12 (m, 8H); 4,35 (m, 1H); 3,21 (m, 2H); 1,75 (m, 2H); 1,27 (m, 5H)

**RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta_{\text{H}}$  ppm:** 172,3 (C=O); 165,2 (C=O); 156,0 (C=O); 151,7 (CO); 146,8 (CO); 136,4 (C-Ph); 128 (CH-Ph); 127,7 (CH-Ph); 123,4 (CH-Ph); 116,9 (CH-Ph); 76,4 ( $\text{CH}_2$ -Ph); 71,3 ( $\text{CH}_2$ -Ph); 67,1 ( $\text{CH}_2$ -Ph); 66,9 ( $\text{CH}_2$ -Ph); 53,9 (CH); 39,0 ( $\text{CH}_2$ ); 31,8 ( $\text{CH}_2$ ); 28,9 ( $\text{CH}_2$ ); 22,5 ( $\text{CH}_2$ )

**(+)-LR-ESIMS  $m/z$ :** 709 [ $\text{M}+\text{Na}$ ] $^+$



Síntesis de la 2-*N*-benciloxycarbonil-L-lisina



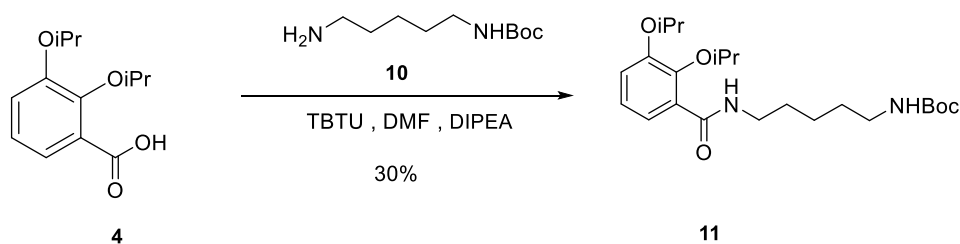
Se realizó el mismo procedimiento que en la obtención del compuesto **4**, partiendo de 100 mg (189,17  $\mu\text{mol}$ ) del compuesto **7** se obtuvieron 72,6 mg (88% de rendimiento) de 2-*N*-benciloxycarbonil-L-lisina (**9**) como un sólido naranja.

**RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ ),  $\delta_{\text{H}}$  ppm:** 7,41 (m, 6H); 4,95 (s, 1H); 4,01 (m, 1H); 2,78 (t,  $J = 7,6$  Hz, 2H); 1,49 (m, 6H); 1,25 (m, 2H)

**(+)-LR-ESIMS  $m/z$ :** 281  $[\text{M}+\text{Na}]^+$

## PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

### Síntesis del (5-(2,3-diisopropoxibenzamido)pentil)carbamato de terc-butilo



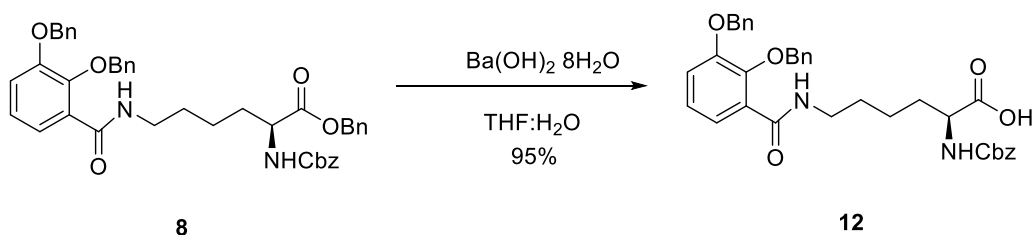
Se dejaron secar dos balones en la estufa cada uno con sus correspondientes agitadores magnéticos durante 2 horas. Pasado ese tiempo, en uno de los balones se añadieron 100 mg (419,67  $\mu$ mol) de **4** y 161 mg (503,60  $\mu$ mol) de TBTU y en el otro balón se añadieron 84,90 mg (419,67  $\mu$ mol) de (5-aminopentil)carbamato de terc-butilo (**10**). Se añadieron 6 mL de DMF en ambos balones purgados previamente con argón, y en el balón que contiene el compuesto **6** se añadieron 114  $\mu$ L de DIPEA. Se agitan ambos balones y se traspasó la disolución que contiene el compuesto **4** sobre la mezcla que contiene el compuesto **10**. Se dejó 12 h agitando en atmósfera de argón. Pasado ese tiempo, la mezcla adquirió un color marrón y se concentró a presión reducida. Posteriormente, se disolvió en 15 mL de AcOEt y se lavó tres veces con agua destilada, una vez con una disolución saturada de NaCl y la fase orgánica resultante se secó con MgSO<sub>4</sub>. Se purificó mediante cromatografía en columna AcOEt:Hexano utilizando un cartucho SNAP de gel de sílice de 10 g en el MPLC con un gradiente desde 25% de AcOEt hasta el 50% de este, obteniendo finalmente 52,4 mg (30% rendimiento) de (5-(2,3-diisopropoxibenzamido)pentil)carbamato de terc-butilo (**11**) como un aceite verde claro.

**RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>),  $\delta_H$  ppm:** 8,00 (t,  $J = 5,7$  Hz, 1H); 7,62 (dd,  $J = 7,8; 1,8$  Hz, 1H); 7,02 (t,  $J = 7,8$  Hz, 1H); 6,95 (dd,  $J = 8,0; 1,8$  Hz, 1H); 4,62 (m, 1H); 4,50 (m, 1H); 3,30 (c, 2H); 3,07 (m, 2H); 1,56 (m, 5H); 1,75 (m, 2H); 1,33 (s, 10H); 1,26 (dd,  $J = 8,1; 1,8$  Hz, 15H)

**RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>),  $\delta_C$  ppm:** 165,8 (C=O); 156,0 (C=O); 150,7 (C-Ph); 145,9 (C-Ph); 128,5 (C-Ph); 123,7 (CH-Ph); 122,8 (CH-Ph); 118,1 (CH-Ph); 76,2 (C); 71,0 (C); 40,4 (CH<sub>2</sub>); 39,3 (CH<sub>2</sub>); 29,6 (CH<sub>2</sub>); 29,3 (CH<sub>2</sub>); 28,4 (CH<sub>3</sub>); 24,3 (CH<sub>2</sub>); 22,1 (CH<sub>3</sub>)

**(+)-LR-ESIMS  $m/z$ :** 445 [M+Na]<sup>+</sup>

**Síntesis del 2-*N*-((benciloxi)carbonil-6-*N*-(2,3-diisopropoxibenzoil)-L-lisinato de bencilo**



Se realizó el mismo procedimiento que en la obtención del compuesto **4**, partiendo de 58 mg (84,45  $\mu\text{mol}$ ) del compuesto **8** se obtuvieron 48 mg (95 % de rendimiento) de 2-*N*-((benciloxi)carbonil-6-*N*-(2,3-diisopropoxibenzoil)-L-lisinato de bencilo (**12**) como un aceite marrón.

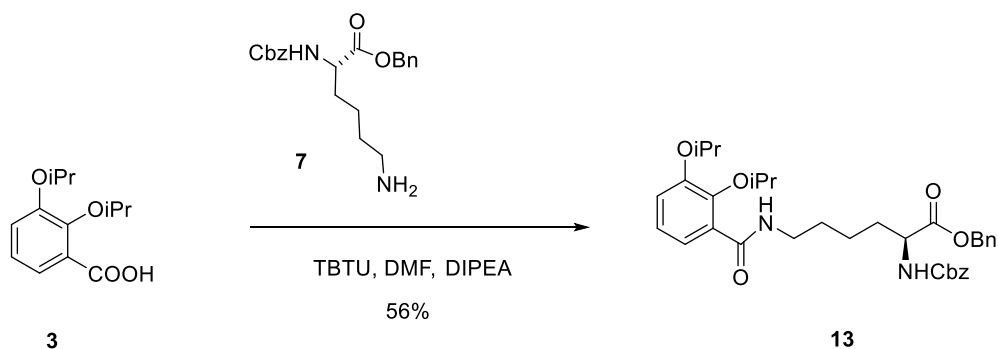
**RMN  $^1\text{H}$  (MeOD),  $\delta_{\text{H}}$  ppm:** 7,48 (d,  $J = 7,2$  Hz, 1H); 7,32 (m, 16H); 7,13(t,  $J = 7,2$  Hz, 1H); 5,17 (s, 6H); 4,10 (m, 1H); 3,22 (m, 2H); 1,64 (m, 2H); 1,38 (m, 4H)

**RMN  $^{13}\text{C}$  (MeOD),  $\delta_{\text{H}}$  ppm:** 174,5 (C=O); 166,9 (C=O); 157,2 (C=O); 151,9 (C-Ph); 146,2 (C-Ph); 136,8 (C-Ph); 128,2 (CH-Ph); 127,4 (C-Ph); 124,1 (CH-Ph); 121,4 (CH-Ph); 116,8 (CH-Ph); 75,8 (CH<sub>2</sub>); 70,8 (CH<sub>2</sub>); 66,2 (CH<sub>2</sub>); 53,8 (CH); 39,0 (CH<sub>2</sub>); 30,9 (CH<sub>2</sub>); 29,3 (CH<sub>2</sub>); 22,9 (CH<sub>2</sub>)

**(+)-LR-ESIMS  $m/z$ :** 619 [M+Na]<sup>+</sup>

## PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

### Síntesis del 2-*N*-((benciloxi) carboxil-6-*N*-(2,3-diisopropoxibenzoil)-*L*-lisinato de bencilo



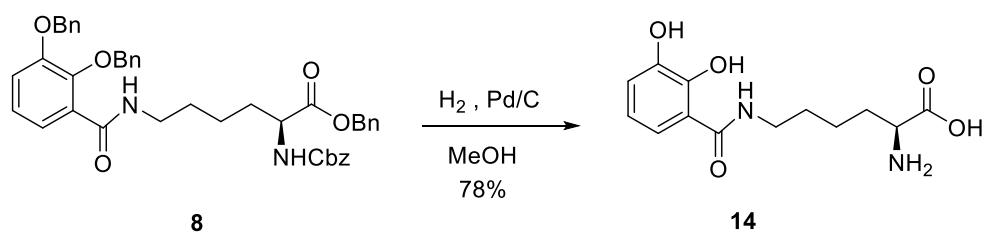
Se realizó el mismo procedimiento que en la obtención del compuesto **4**, partiendo de 100 mg (419,67  $\mu\text{mol}$ ) del compuesto **5** se obtuvieron 137,8 mg (56% de rendimiento) de 2-*N*-((benciloci)carboxil-6-*N*-(2,3-diisopropoxibenzoil)-*L*-lisinato de bencilo (**13**) como un aceite blanco.

**RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta_{\text{H}}$  ppm:** 8,04 (t,  $J = 5,8$  Hz, 1H); 7,66 (dd,  $J = 7,1; 2,5$  Hz, 1H); 7,31 (m, 11H); 5,72 (d,  $J = 2,5$  Hz, 2H); 5,08 (s, 4H); 4,64 (m, 1H); 4,52 (m, 1H); 4,38 (d,  $J = 8,0$  Hz, 1H); 3,37 (m, 2H); 1,76 (m, 2H); 1,55 (m, 2H); 1,34 (d,  $J = 6,0$  Hz, 7H); 1,26 (dd,  $J = 6,2; 1,5$  Hz, 7H)

**RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta_{\text{C}}$  ppm:** 172,3 (C=O); 165,9(C=O); 156,1 (C=O); 150,7 (C-Ph); 145,9 (C-Ph); 136,4 (C-Ph); 135,4 (CH-Ph); 128,5 (CH-Ph); 128,5 (CH-Ph); 123,7 (C-Ph); 122,8 (C-Ph); 118,2 (CH-Ph); 76,3 (CH-Ph); 71,0 (CH-Ph); 67,0 ( $\text{CH}_2$ ); 66,9 ( $\text{CH}_2$ ); 53,9 (CH); 38,9 ( $\text{CH}_2$ ); 31,8 ( $\text{CH}_2$ ); 29,3 ( $\text{CH}_2$ ); 22,4 ( $\text{CH}_2$ ); 22,1 ( $\text{CH}_3$ )

**(+)-LR-ESIMS  $m/z$ :** 613 [ $\text{M}+\text{Na}$ ] $^+$

**Síntesis de la 6-*N*-(2,3-dihidroxibenzol)-L-lisina**



Sobre 95,80 mg (139,49  $\mu\text{mol}$ ) de **8** y una cantidad catalítica de Pd/C al 5% en p/p, se añadieron 5 mL de MeOH, y se dejó bajo agitación a temperatura ambiente en una atmósfera de  $\text{H}_2$  durante 24 h. Pasado este tiempo, se filtró sobre un doble filtro de pliegues, se concentró a presión reducida, obteniéndose 28 mg (78% de rendimiento) de 6-*N*-(2,3-dihidroxibenzol)-L-lisina (**14**) como un aceite amarillo.

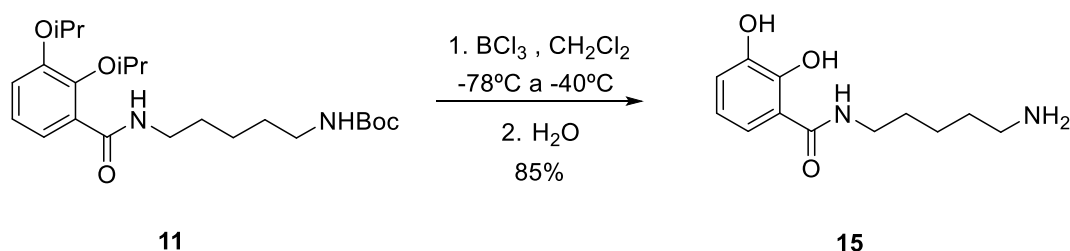
**RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta_{\text{H}}$  ppm:** 7,24 (dd,  $J = 8,1; 1,4$  Hz, 1H); 6,94 (dd,  $J = 7,9; 1,4$  Hz, 1H); 6,72(t,  $J = 7,9$  Hz, 1H); 3,57 (m, 2H); 3,43(m, 1H); 3,43 (m, 2H); 1,91 (m, 2H); 1,69 (m, 2H); 1,53 (m, 2H)

**RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta_{\text{H}}$  ppm:** 170,0 (C=O); 149,4 (C=O); 149,4 (C-Ph); 146,4 (C-Ph); 118,7 (CH-Ph); 117,8 (CH-Ph); 115,9 (C); 55,2 (CH); 39,2 (CH<sub>2</sub>); 31,8 (CH<sub>2</sub>); 31,1 (CH<sub>2</sub>); 22,8 (CH<sub>2</sub>)

**(+)-LR-ESIMS  $m/z$ :** 305  $[\text{M}+\text{Na}]^+$

## PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

### Síntesis del (5-(2,3-diisopropoxibenzamido)pentil)carbamato de terc-butilo



Sobre 52,4 mg (124,00  $\mu\text{mol}$ ) de **11** se añadieron 10 ml de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  seco, manteniendo dentro del balón una atmósfera de argón. El balón se introdujo en un baño a  $-78^\circ\text{C}$  y se agitó al mismo tiempo que se añadieron 600  $\mu\text{L}$  de  $\text{BCl}_3$ . A continuación, se subió la temperatura a  $-40^\circ\text{C}$  y se dejó en estas condiciones 12 h. Pasado este tiempo, se añadieron 5 ml de agua destilada a la mezcla que tornó a color verde-amarillo y se aumentó la temperatura hasta temperatura ambiente. Se dejó 20 min a esta temperatura agitando y adquiriendo la mezcla un color blanco amarillento. Se filtró sobre celita con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  y finalmente se hizo pasar  $\text{MeOH}$ , se concentró a presión reducida y se purificó sobre un cartucho de gel de sílice de fase reserva C18 previamente acondicionado con  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{MeOH}$  y se eluyó con  $\text{MeOH}$ . Se obtuvieron 25 mg (85% de rendimiento) de (5-(2,3-diisopropoxibenzamido)pentil)carbamato de terc-butilo (**15**) como un sólido amarillo.

**RMN  $^1\text{H}$  (MeOD),  $\delta_{\text{H}}$  ppm:** 7,25 (dd,  $J = 8,1; 1,5$  Hz, 1H); 6,94 (dd,  $J = 7,8; 1,5$  Hz, 1H); 6,75 (t,  $J = 8,1$  Hz, 1H); 3,43 (t,  $J = 7,5$  Hz, 2H); 2,93 (t,  $J = 7,5$  Hz, 2H); 1,71 (m, 6H)

**RMN  $^{13}\text{C}$  (MeOD),  $\delta_{\text{H}}$  ppm:** 170,13 (C=O); 145,94 (C-Ph); 138,45 (C-Ph); 118,65 (CH-Ph); 118,17 (CH-Ph); 117,29 (CH-Ph); 115,44 (C-Ph); 39,24 ( $\text{CH}_2$ ); 28,51 ( $\text{CH}_2$ ); 26,80 ( $\text{CH}_2$ ); 23,36 ( $\text{CH}_2$ )

**(+)-LR-ESIMS m/z:** 239  $[\text{M}+\text{H}]^+$

# **RESULTADOS**





## Resultados y discusiones

En la primera parte del Trabajo de Fin de Grado se propuso la preparación de intermedios de reacción necesarios tanto para la obtención de análogos de amonabactinas, sintetizados también en este trabajo, como para la obtención de otros sideróforos de tipo catecol utilizados en el grupo de investigación.

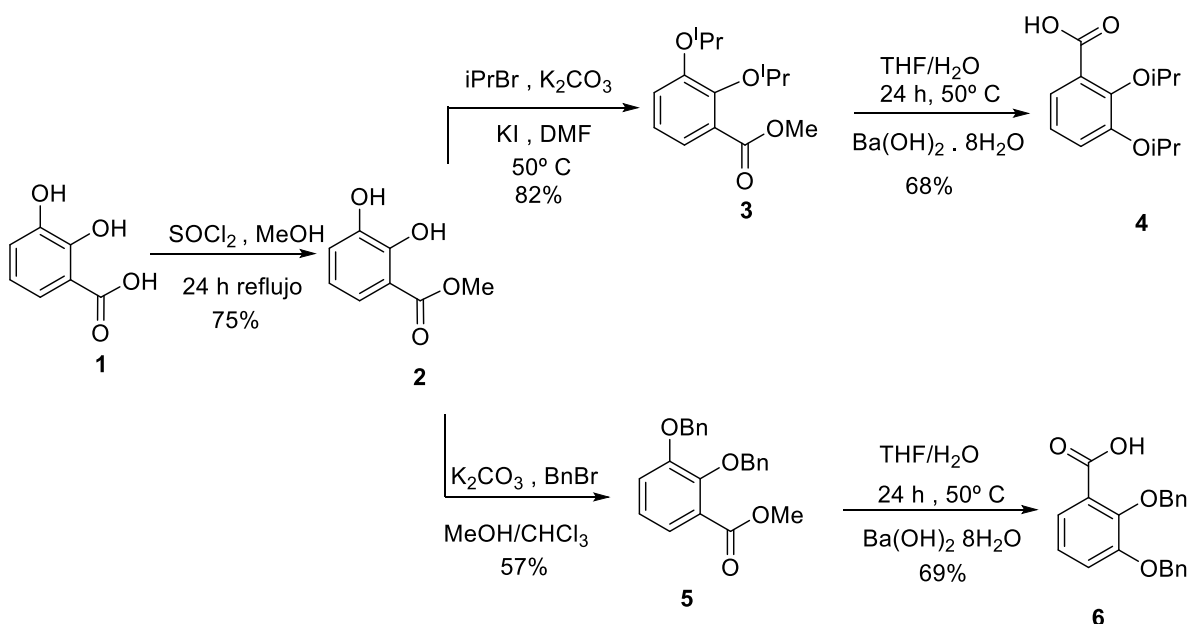


Figura 13. Esquema sintético de los intermedios de reacción 4 y 6.

En primer lugar, se realizó la síntesis de los compuestos 4 y 6 en una pequeña escala partiendo de 100 mg del compuesto ácido-2,3-dihidroxibenzoico. Posteriormente estos compuestos fueron correctamente caracterizados por RMN y espectrometría de masas, obteniendo rendimientos satisfactorios en ambas síntesis, con un rendimiento global de 41% para el compuesto 4 y de 29% para el compuesto 6. Esta síntesis fue escalada partiendo de 1 g del ácido-2,3-dihidroxibenzoico manteniéndose los rendimientos satisfactorios.

El primer paso supuso la esterificación de 1 empleando  $\text{SOCl}_2$  en metanol para dar el éster metílico 2. Seguidamente, la protección de los grupos hidroxilo fenólicos como éteres empleando bromuro de bencilo y carbonato potásico en una mezcla  $\text{MeOH}/\text{CHCl}_3$ , condujo al éster metílico 5, cuya hidrólisis en medio básico a 50 °C dio lugar al correspondiente ácido carboxílico 6. La protección del grupo catecol de 2 con bromuro de iso-propilo empleando carbonato potásico y yoduro potásico en DMF a 50 °C, condujo al compuesto 3 cuya hidrólisis con hidróxido de bario en  $\text{THF}/\text{H}_2\text{O}$  a 50 °C dio lugar al ácido carboxílico requerido 4.

# RESULTADOS Y DISCUSIONES

20170321-A-0002-AS03D.1.fid  
Instrumento Espectrómetro de RMN AV300 (N/I 36425), Laboratorio Unidad de Espectroscopia Molecular, SAI, UDC

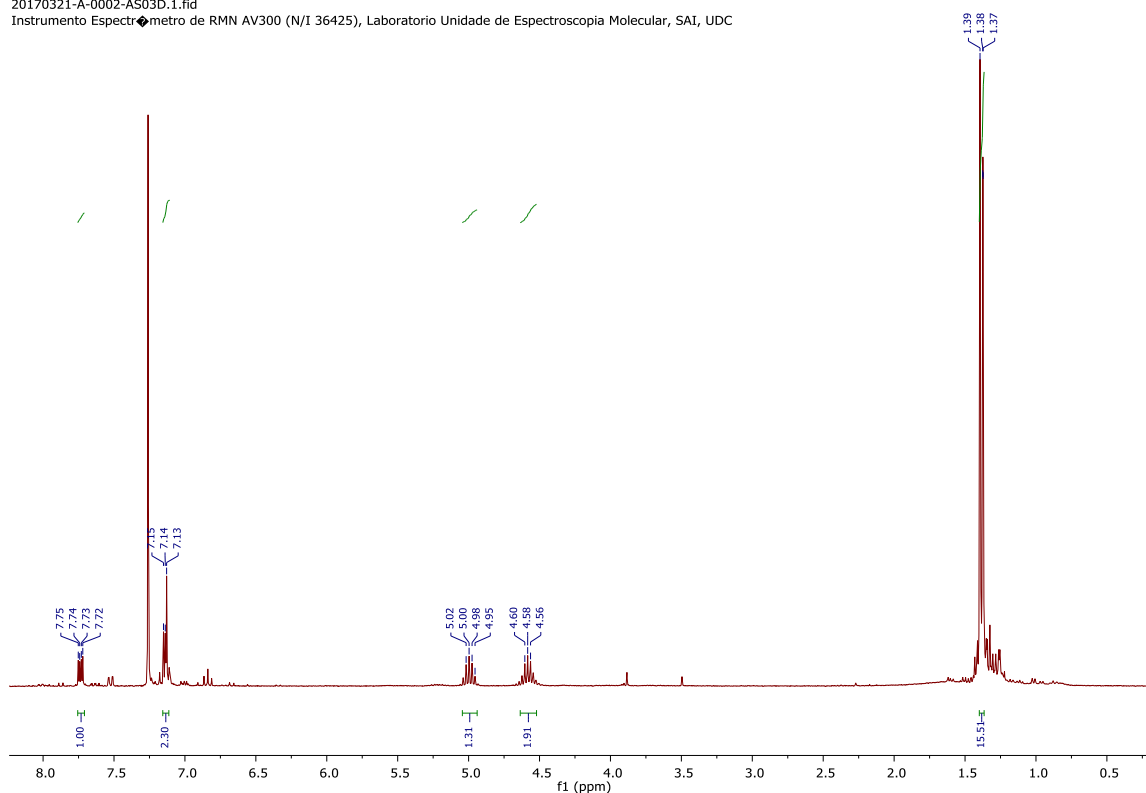


Figura 14. Espectro  $^1\text{H}$  RMN del compuesto 4.

20170223-A-0002-AS003A.1.fid  
Instrumento Espectrómetro de RMN AV300 (N/I 36425), Laboratorio Unidad de Espectroscopia Molecular, SAI, UDC

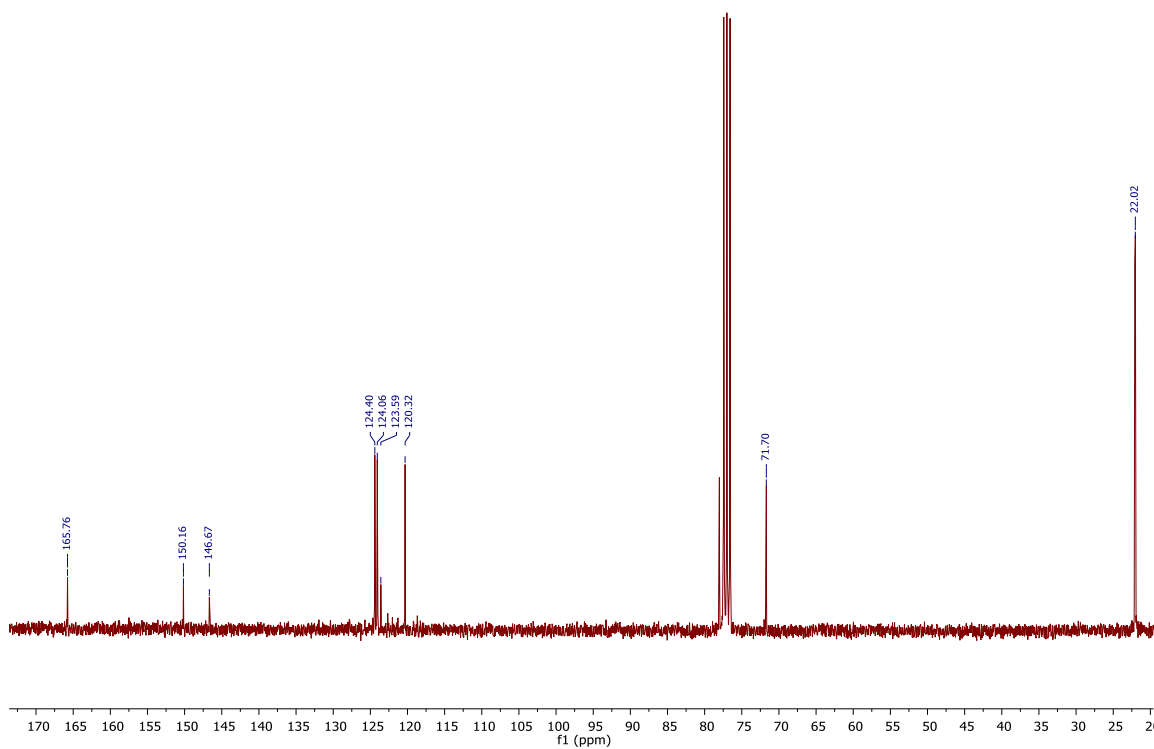


Figura 15. Espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN del compuesto 4.

# RESULTADOS Y DISCUSIONES

20170310-A-0002-AS005.1.fid  
Instrumento Espectrómetro de RMN AV300 (N/I 36425), Laboratorio Unidad de Espectroscopia Molecular, SAI, UDC

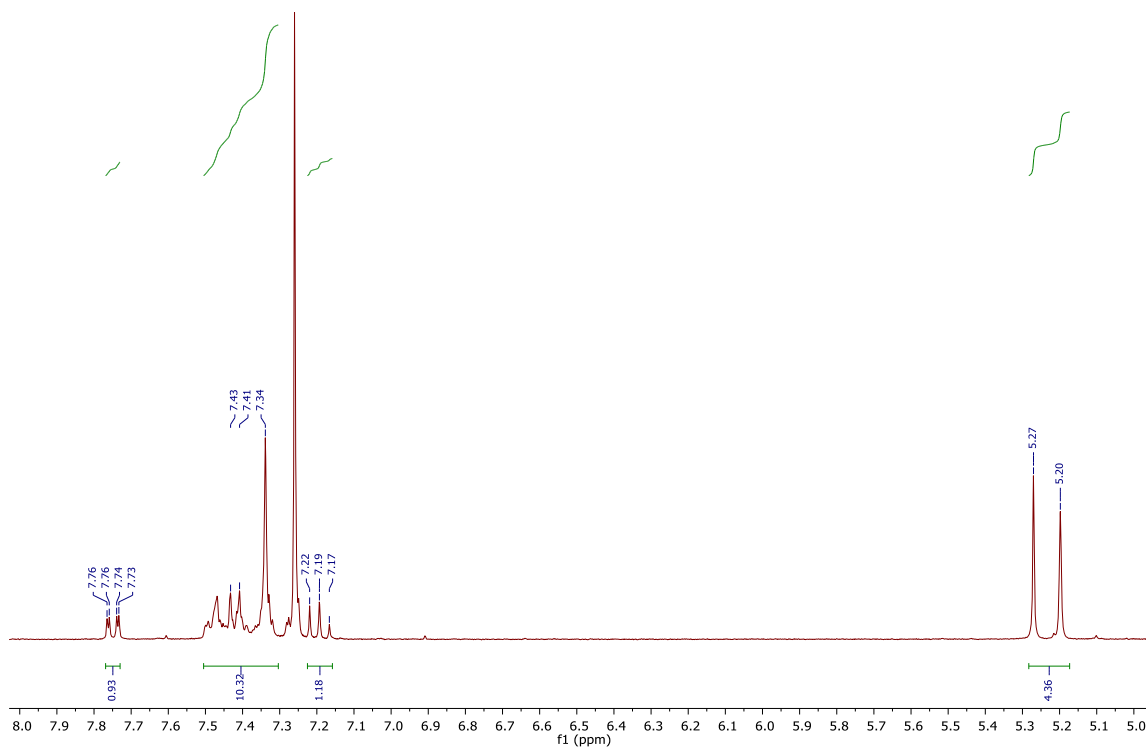


Figura 16. Espectro  $^1\text{H}$  RMN del compuesto 6.

20170316-A-0002-AS005.1.fid  
Instrumento Espectrómetro de RMN AV300 (N/I 36425), Laboratorio Unidad de Espectroscopia Molecular, SAI, UDC

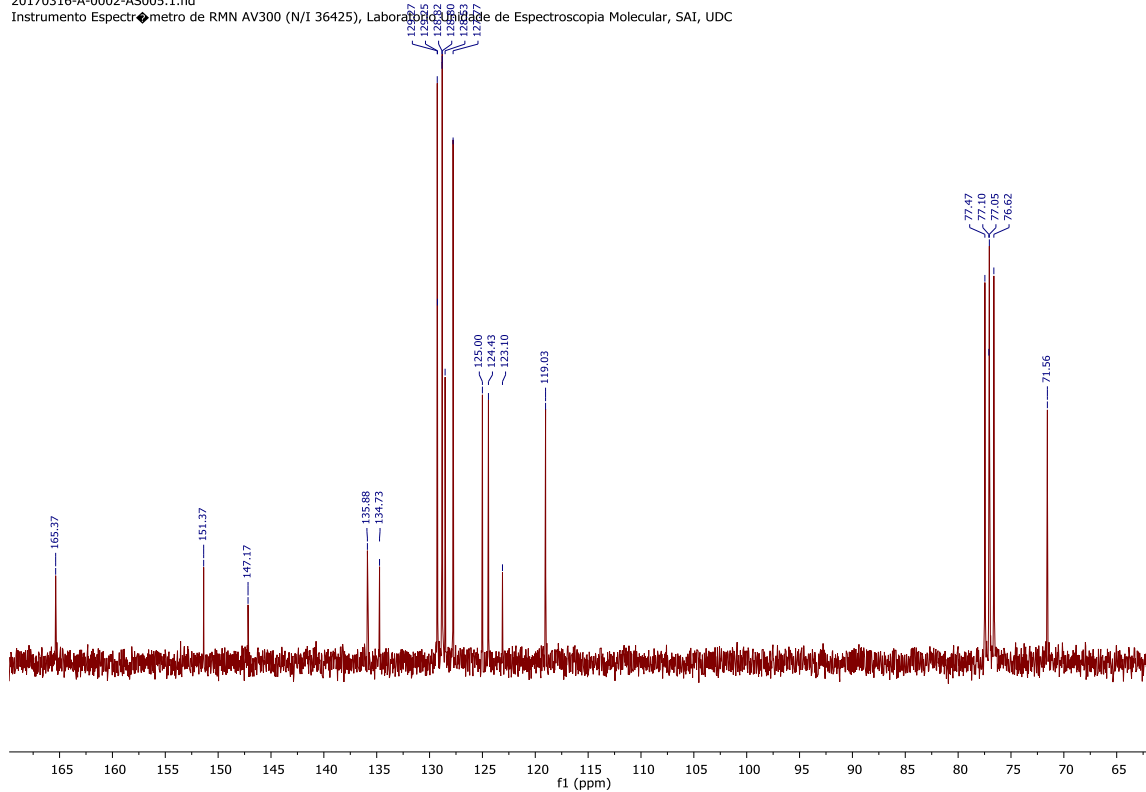


Figura 17. Espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN del compuesto 6.

## RESULTADOS Y DISCUSIONES

En los espectros de  $^1\text{H}$  RMN y  $^{13}\text{C}$  RMN de ambos compuestos se puede observar diferentes señales debidas a la presencia del isopropilo en el compuesto **4** y al bencilo en el compuesto **6**.

En espectro de  $^1\text{H}$  RMN del compuesto **4** (Figura 13) se puede observar unas señales a 1,37 ppm correspondiente a los grupos metilo y a 4,9 ppm correspondiente a los grupos CH debidos a la presencia de los grupos isopropilo. Por otro lado, en el espectro de  $^1\text{H}$  RMN del compuesto **6** (Figura 15) se observan señales de protones aromáticos alrededor de 7 ppm debido a los CH del grupo bencilo y a 5,25 ppm correspondiente a los grupos metileno del bencilo.

En el espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN del compuesto **4** (Figura 14) se puede observar una señal a 71,70 ppm, correspondiente a los grupos CH, y otra señal a 22,02 ppm del grupo metilo debida a la presencia del grupo isopropilo a diferencia del espectro del compuesto **6** (Figura 16) que aparecen las señales correspondientes al grupo bencilo a 129 ppm correspondiente a los CH aromáticos del bencilo y a 71,56 ppm del grupo metileno.

En la segunda parte del trabajo se propuso la realización de la síntesis de dos análogos simplificados del sideróforo amonabactina, partiendo para ello de los intermedios obtenidos en la anterior síntesis. Para ello, se planteó la retrosíntesis de ambos análogos (Figura 18), (Figura 19).

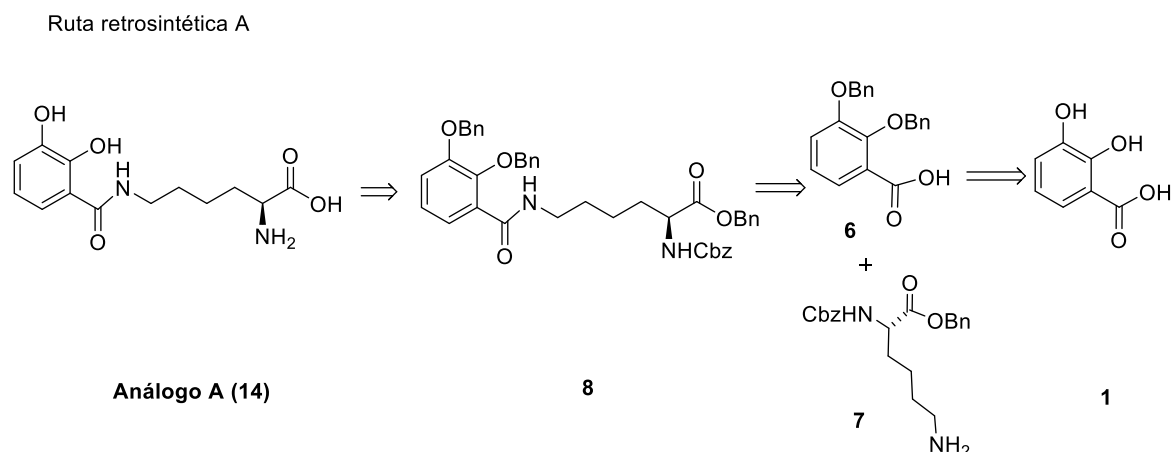


Figura 18. Ruta retrosintética del análogo A.

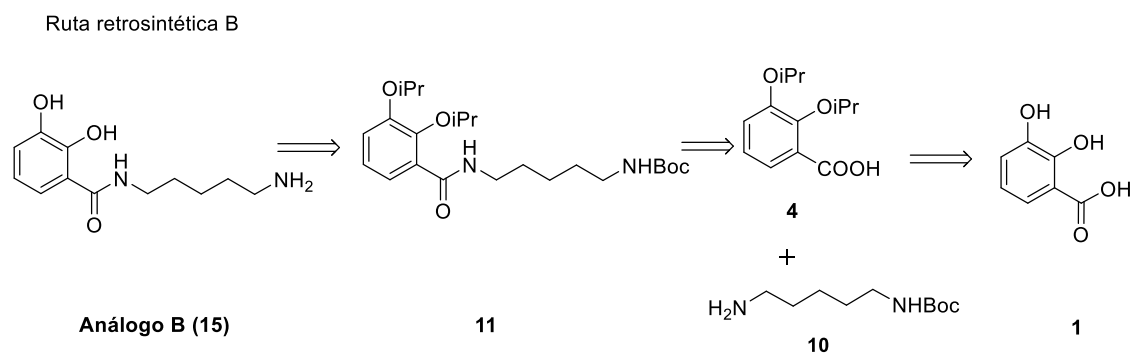


Figura 19. Ruta retrosintética del análogo B.

## RESULTADOS Y DISCUSIONES

Se decidió obtener estos análogos con el fin de comprobar la influencia de la presencia del grupo ácido y sin él en la actividad.

En la obtención del análogo **A** (**14**) se realizó el acoplamiento entre el derivado convenientemente protegido de la lisina **7** y el ácido 2,3-bisbenciloxibenzoico (**6**). Se escogió un derivado de la lisina protegido por grupos Bn y Cbz para poder realizar la desprotección de todos los grupos protectores de forma sencilla y en un solo paso mediante hidrogenación catalítica (Figura 24).

Para la obtención del análogo **B** (**15**) se realizó el acoplamiento entre la N-Boc-cadaverina (**10**) y el ácido-2,3-diisopropoxibenzoico (**4**). Para éste acoplamiento se eligió el isopropilo como grupo protector debido a que se conoce que ofrece mejores rendimientos y sus espectros de RMN son más definidos. Además, la reacción de desprotección de los grupos isopropilo con  $\text{BCl}_3$  también desprotege el grupo Boc (Figura 25). Los rendimientos fueron satisfactorios a pesar de las pérdidas debidas a la necesaria purificación de los compuestos **8** y **11**.

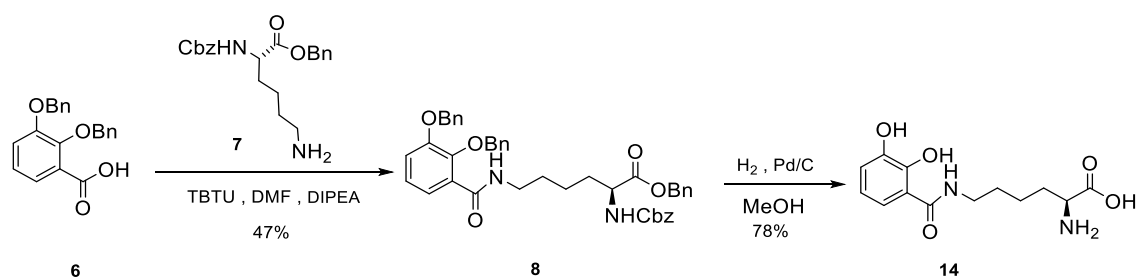


Figura 24: Esquema sintético del análogo **A** (**14**).

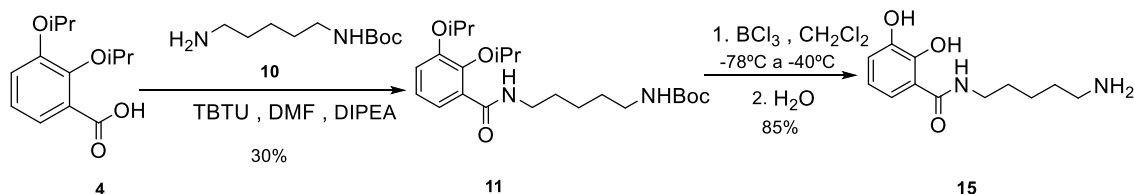


Figura 25: Esquema sintético del análogo **B** (**15**).

# RESULTADOS Y DISCUSIONES

20170606-A-0002-AS009A.1.fid  
Instrumento Espectrómetro de RMN AV300 (N/I 36425), Laboratorio Unidad de Espectroscopia Molecular, SAI, UDC

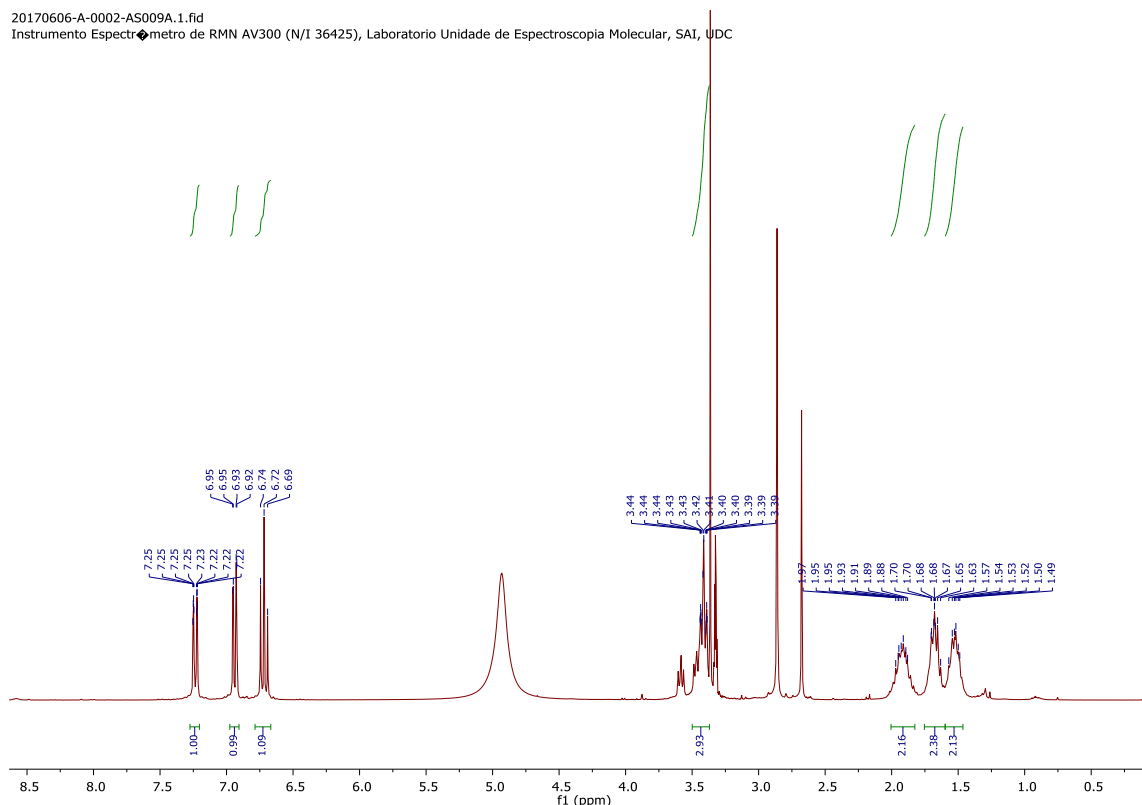


Figura 20. Espectro  $^1\text{H}$  RMN del compuesto **14**.

En el espectro  $^1\text{H}$  RMN del compuesto **14** se puede observar las señales entorno a 1,8 ppm, correspondientes a los  $\text{CH}_2$  centrales de la lisina, a 3,4 ppm de los adyacentes al nitrógeno, y las 3 señales aromáticas correspondientes al catecol.

20170606-A-0002-AS009A.2.fid  
Instrumento Espectrómetro de RMN AV300 (N/I 36425), Laboratorio Unidad de Espectroscopia Molecular, SAI, UDC

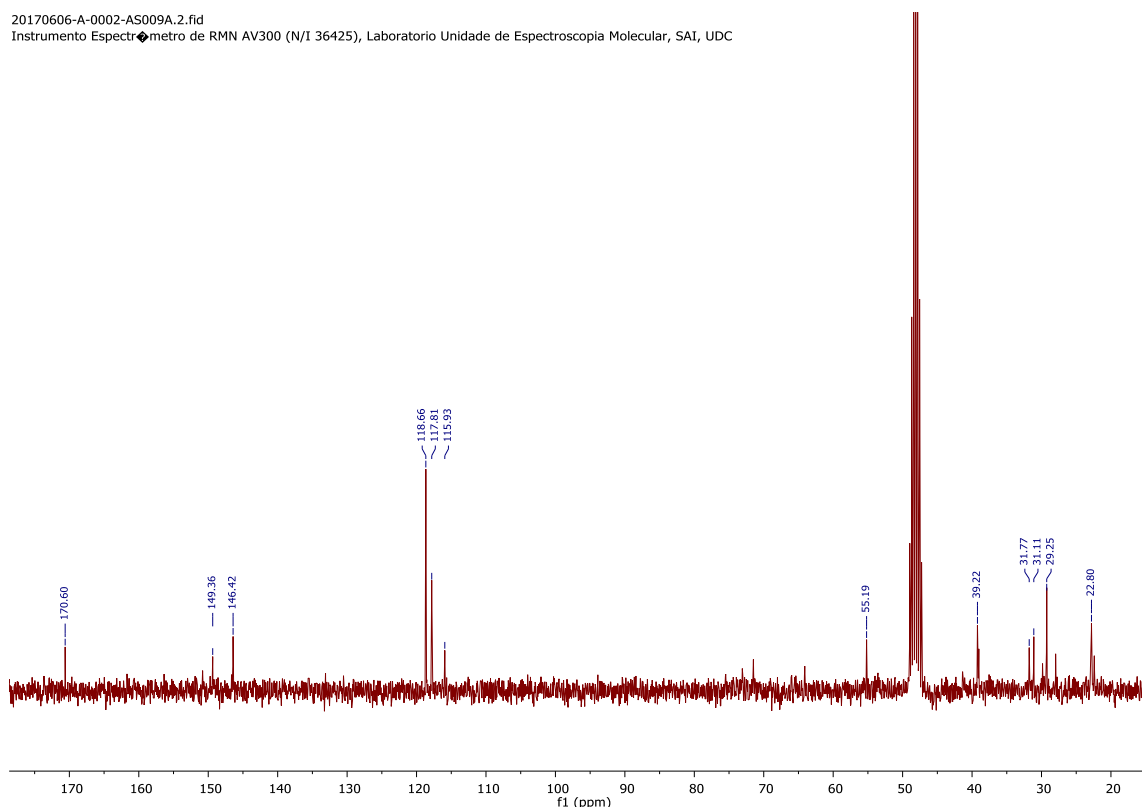


Figura 21. Espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN del compuesto **14**.

En el espectro  $^{13}\text{C}$  RMN del compuesto **14** se puede observar las señales entorno a 31 ppm, correspondiente al los  $\text{CH}_2$  centrales de la lisina, a 55,2 ppm de los carbonos adyacentes al nitrógeno, y las 3 señales aromáticas correspondientes al catecol.

20170426-A-0002-AS010purf.1.fid  
Instrumento Espectrometro de RMN AV300 (N/I 36425), Laboratorio Unidad de Espectroscopia Molecular, SAI, UDC

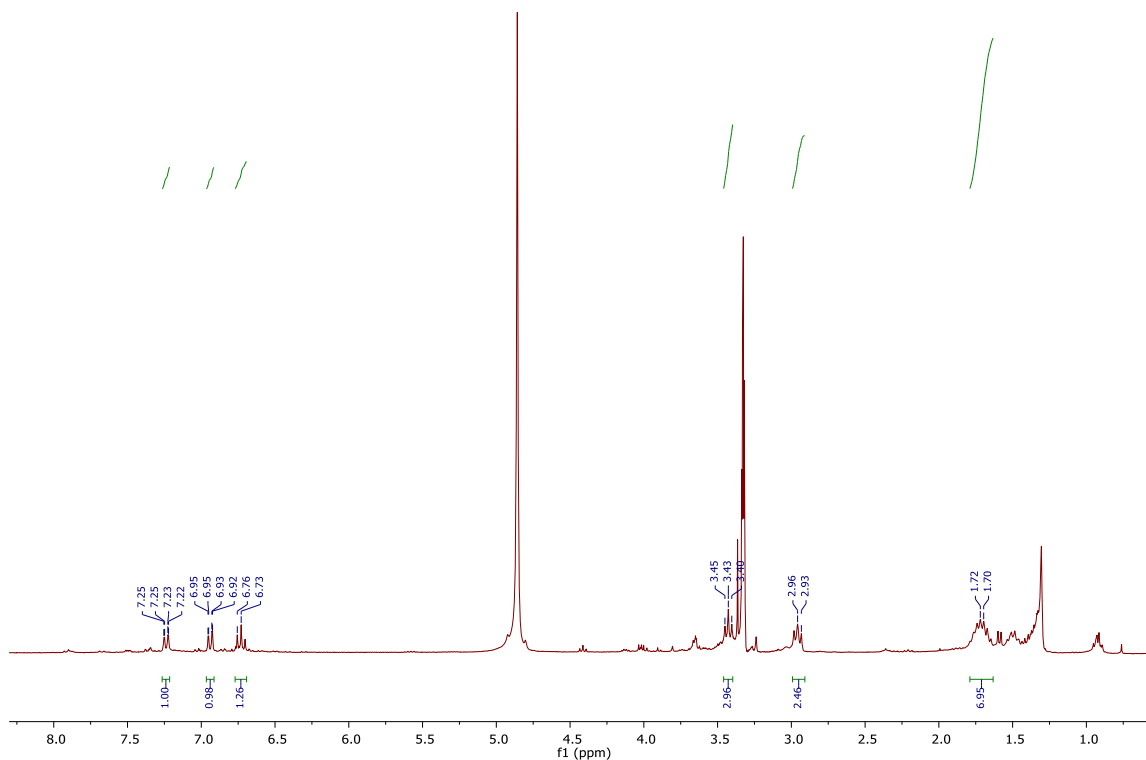


Figura 22. Espectro  $^1\text{H}$  RMN del compuesto **15**.

En el espectro  $^1\text{H}$  RMN del compuesto **15** se puede observar las señales entorno a 1,7 ppm correspondiente a los  $\text{CH}_2$  centrales de la cadaverina, a 2,9 ppm de los adyacentes al nitrógeno, y las 3 señales aromáticas correspondientes al catecol.

## RESULTADOS Y DISCUSIONES

20170426-AV400-bbfo-A-0002-AS010.20.fid

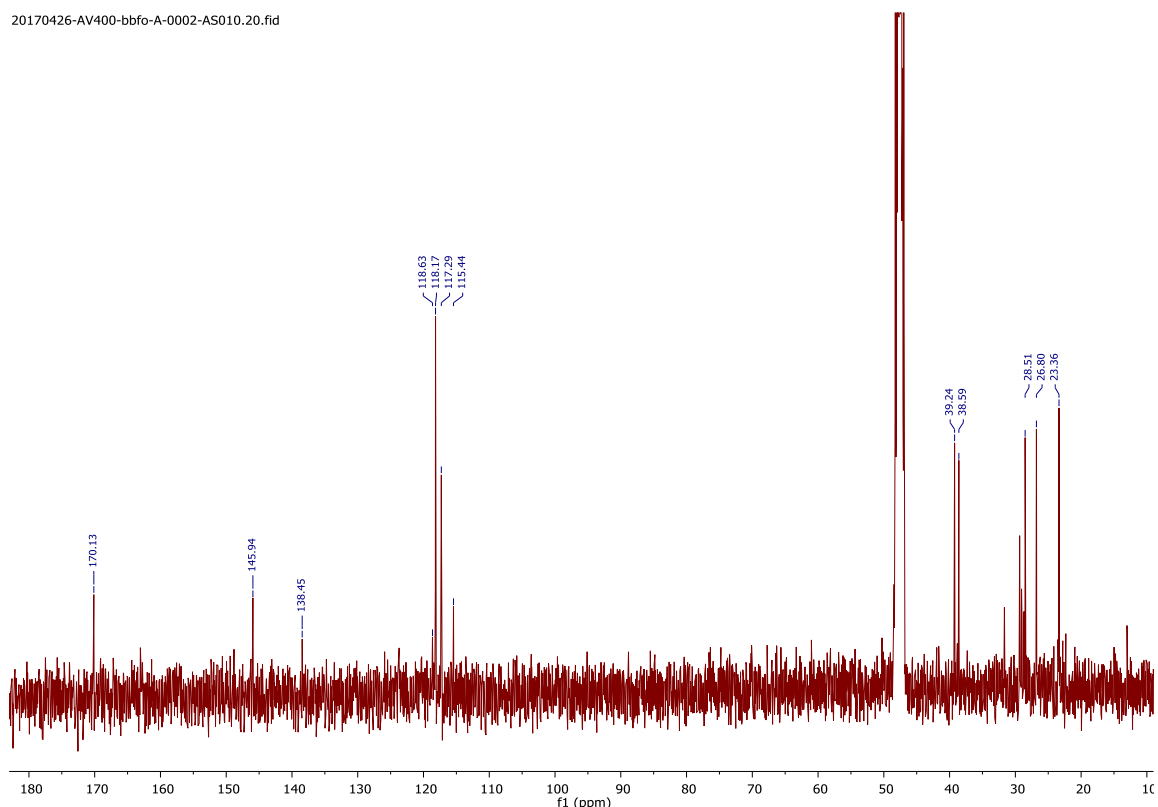


Figura 23. Espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN del compuesto 15.

En el espectro  $^{13}\text{C}$  RMN del compuesto 15 se puede observar las señales a 25 ppm correspondiente al los  $\text{CH}_2$  centrales de la cadaverina, a 39 ppm los adyacentes al nitrógeno, y las 3 señales aromáticas correspondientes al catecol.

Una vez sintetizados ambos análogos se realizaron las pruebas biológicas referentes a su actividad siderófora. Estos resultados ayudarán a determinar la relación actividad-estructura del sideróforo y para su reconocimiento molecular de la proteína receptora FstC.



# **CONCLUSIONES**



### Conclusiones

Durante la realización de este Trabajo de Fin de Grado se han desarrollado distintas secuencias sintéticas para la preparación de ciertos intermedios clave en la síntesis química del sideróforo amonabactina y la elaboración de dos análogos de éste.

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

- Obtención de los intermedios de reacción **4** y **6** de forma satisfactoria tanto a pequeña como a gran escala.
- Obtención de los análogos sencillos **A (14)** y **B (15)** de las amonabactinas P693 y T732, para la realización del estudio biológico de ambos.
- Correcta caracterización de todos los productos obtenidos durante el Trabajo de Fin de Grado.

## CONCLUSIONS

---

During this Final degree work, several synthetic routes were developed to obtain key intermediates for the preparation of amonabactins siderophore, and preparation of two analogs.

According to the specific proposed objectives, the conclusions have been reached are:

- Satisfactory preparation of synthetic intermediates, both small and large scale.
- Obtaining both **A (14)** and **B (15)** amonabactins P693 and T732 analogs for making biologic study.
- Full and proper characterization of all obtained products.

# **BIBLIOGRAFÍA**



## Bibliografía

- (1) United Nations, Dep. Econ. Soc. Aff. Popul. Div. (2017). *World Popul. Prospect. 2017 Revis. Key Find. Adv. Tables. Work. Pap. No. ESA/P/WP/248.* .
- (2) FAO. *El estado mundial de la pesca y la acuicultura, 2016.*
- (3) APROMAR **2015**, La Acuicultura en España.
- (4) Toranzo, A. E.; Magariños, B.; Romalde, J. L. *Aquaculture* **2005**, *246* (1–4), 37–61.
- (5) Tomado de <https://aquahealth.wordpress.com/2011/02/20/vibriosis-disease-occured-in-snapper/> (accessed Jul 12, 2017).
- (6) Kumar, G.; Menanteau-Ledouble, S.; Saleh, M.; El-Matbouli, M. *Vet. Res.* **2015**, *46* (1), 1–10.
- (7) Tomado de: [http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S1727-99332011000300013&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S1727-99332011000300013&script=sci_arttext) (accessed Jul 12, 2017).
- (8) Tomado de <http://www.salmonexpert.cl/noticias/enfermedades-infecciosas/> (accessed Jul 12, 2017).
- (9) Balado, M.; Souto, A.; Vences, A.; Careaga, V. P.; Valderrama, K.; Segade, Y.; Rodriguez, J.; Osorio, C. R.; Jimenez, C.; Lemos, M. L. *ACS Chem. Biol.* **2015**, *10*, 2850–2860.
- (10) Tomado de: [http://www.marcosgodoy.com/index.php?option=com\\_content&view=article&id=135:flavobacteriosis-abscedativa-en-trucha-arcoiris-oncorhynchus-mykiss-i-patologia-macroscopica&catid=83:rtfs&Itemid=505&lang=es](http://www.marcosgodoy.com/index.php?option=com_content&view=article&id=135:flavobacteriosis-abscedativa-en-trucha-arcoiris-oncorhynchus-mykiss-i-patologia-macroscopica&catid=83:rtfs&Itemid=505&lang=es) (accessed Jul 12, 2017).
- (11) Kornreich-Leshem, H.; Ziv, C.; Gumienna-Kontecka, E.; Arad-Yellin, R.; Chen, Y.; Elhabiri, M.; Albrecht-Gary, A. M.; Hadar, Y.; Shanzer, A. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127* (4), 1137–1145.
- (12) Hider, R. C.; Kong, X. *Nat. Prod. Rep.* **2010**, *27* (5), 637–657.
- (13) Braun, V. *Contrib Microbiol. Basel* **2005**, *12*, 210–233.
- (14) Balado, M.; Segade, Y.; Rey, D.; Osorio, C. R.; Rodriguez, J.; Lemos, M. L.; Jimenez, C.

## BIBLIOGRAFÍA

---

- ACS Chem. Biol.* **2017**, *12*, 479–493.
- (15) Schalk, I. J.; Hannauer, M.; Braud, A. *Environ. Microbiol.* **2011**, *13* (11), 2844–2854.
- (16) Górská, A.; Sloderbach, A.; Marszałł, M. P. *Trends Pharmacol. Sci.* **2014**, *35* (9), 442–449.
- (17) Sureda, J. C. *Trab. Fin Máster Univ. A Coruña* **2016**.
- (18) Katherine, A.; Pereira, V. *Tesis Dr. Univ. A Coruña* **2016**.
- (19) Raines, D. J.; Sanderson, T.; Wilde, E.; Duhme-Klair, A.-K. *Ref. Modul. Chem. Mol. Sci. Chem. Eng.* **2015**, 1–32.
- (20) Soengas, R. G.; Anta, C.; Espada, A.; Paz, V.; Ares, I. R.; Lemos, L.; Jimenez, C.; Balado, M.; Rodriguez, J. *ELSEVIER* **2006**, *47*, 7113–7116.
- (21) Soengas, R. G.; Anta, C.; Espada, A.; Nieto, R. M.; Larrosa, M.; Jimenez, C.; Rodriguez, J. *ELSEVIER* **2007**, *48*, 3021–3024.
- (22) Soengas, R. G.; Larrosa, M.; Balado, M.; Rodriguez, J.; Lemos, L.; Jimenez, C. *Org. Biomol. Chem.* **2008**, *6*, 1278–1287.
- (23) Souto, A.; Montaos, M. A.; Balado, M.; Osorio, C. R.; Rodríguez, J.; Lemos, M. L.; Jiménez, C. *Bioorganic Med. Chem.* **2013**, *21*, 295–302.