



UNIVERSIDADE DA CORUÑA



CICA | CENTRO DE INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS AVANZADAS

Facultad de Ciencias

Grado en Química

Memoria Del Trabajo de Fin De Grado

Preparación de intermedios clave
en la síntesis del sideróforo piscibactina.

Preparación de intermediarios clave
na síntese do sideróforo piscibactina.

Preparation of key intermediates
in the synthesis of siderophore piscibactin.

Director(es): Carlos Jiménez González

Jaime Rodríguez González

Irene Fandiño Sánchez

Curso 2017/2018- Convocatoria de Junio

ÍNDICE

Contenido

RESUMEN	3
RESUMO	4
SUMMARY	5
1. INTRODUCCIÓN	9
1.1. Acuicultura en Galicia.....	9
1.2. Principales enfermedades asociadas a peces de acuicultura	9
Yersiniosis.....	10
Vibriosis	11
Forunculosis	12
Estreptococosis	12
Fotobacteriosis (Pasteurelosis)	13
1.3. La importancia del hierro.	14
1.4. Sideróforos	14
Mecanismos de actuación de sideróforos	15
Tipos de Sideróforos.....	16
Aplicaciones de los sideróforos.....	16
2. Antecedentes	21
2.1 Bacteria <i>Photobacterium damsela</i> subs. <i>piscicida</i>	21
2.2 Fotobacteriosis (pasteurelosis)	21
2.3 Compuestos estructuralmente relacionados con piscibactina	22
Síntesis de la pioquelina.....	23
Síntesis de yersiniabactina	24
Síntesis de prepiscibactina	25
3. OBJETIVOS	29
4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	33
4.1 Planteamiento retrosintético.....	33
4.2 Síntesis de los intermedios objetivo.	33
4.2.1 Preparación de la amida de Weinreb.....	33
4.2.2 Preparación del β -hidroxiéster.....	34
5. PARTE EXPERIMENTAL	39

5.1	Metodología General	39
5.2	Procedimientos experimentales	41
5.2.1	Síntesis de ácido (4 <i>S</i>)-2-(2-hidroxifenil)-4,5-dihidro-tiazol-4-carboxílico (3)	41
5.2.2	Síntesis de (4 <i>S</i>)-2-(2-hidroxifenil)- <i>N</i> -metoxi- <i>N</i> -metil-4,5-dihidrotiazol-4-carboxamida (1). Amida de Weinreb.	43
5.2.3	Síntesis de <i>S</i> -tritol-L-cisteína (4)	45
5.2.4	Síntesis de <i>N</i> -(<i>terc</i> -butoxicarbonil)- <i>S</i> -tritol-L-cisteína (5)	47
5.2.5	Síntesis de <i>terc</i> -butilcarbamato de (<i>R</i>)-(1-(metoxi(metil)amino)-1-oxo-3-(tritolio)propan-2-ilo. (6)	49
5.2.6	Síntesis de <i>terc</i> -butilcarbamato de (<i>R</i>)-1-oxo-3-(tritolio) propan-2-ilo. (7)	51
5.2.7	Síntesis del compuesto etil (3 <i>S</i> , 4 <i>R</i>)-4-((<i>terc</i> -butoxicarbonil) amino) —hidroxi-5-(tritolio) pentanoato (2 y 2').	53
6.	CONCLUSIONES	59
	REFERENCIAS	65

ABREVIATURAS

Boc:	<i>tert</i> -butoxicarbonilo
Boc ₂ O	Dicarbonato de di terbutilo
DCM:	Diclorometano
dd:	Doble doblete
DIPA:	Diisopropilamina
DIPEA:	<i>N, N</i> - Diisopropiletilamina
DMSO:	Dimetilsulfóxido
DMF:	<i>N, N</i> - Dimetilformamida
EDCI:	<i>N</i> - (3-dimetilaminopropil) – <i>N'</i> - etilcarbadiimida hidroclicrica
FAO:	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
Hex:	Hexano
Hz:	Hercio
<i>J</i> :	Constante de acoplamiento
m:	Multiplete
Me:	Metilo
MS:	Espectrometria de masas
ppm:	Parte por millón
RMN:	Resonancia Magnética Nuclear
s:	Singlete
THF:	Tetrahidrofurano
δ:	Desplazamiento químico

RESUMEN

RESUMEN

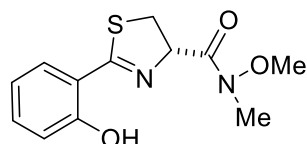
Palabras clave: *hierro, sideróforo, piscibactina.*

El hierro es un nutriente básico para el crecimiento en todos los seres vivos y es fundamental en numerosos procesos celulares. Por ello, los microorganismos, los hongos y las plantas han desarrollado estrategias para absorber el hierro del suelo o del agua. Una de las estrategias más comunes de las bacterias para la captación de hierro es la producción de sideróforos.

El presente trabajo de fin de grado se centra en la obtención de intermedios sintéticos clave en la preparación del sideróforo piscibactina, sideróforo producido por la bacteria *Photobacterium damselae* subs *piscicida*, patógeno de la enfermedad forobacteriosis en peces. Para su síntesis se siguió una propuesta de esquema retrosintético, que se estructura en la formación de tres fragmentos.

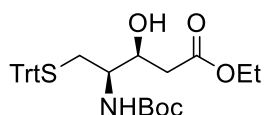
En concreto, los intermedios obtenidos en este trabajo son precursores de los fragmentos moleculares A y B.

La primera parte del trabajo se centra en la preparación de una amida de Weinreb (intermedio 1), precursor del fragmento molecular A.



Amida de Weinreb 1

En la segunda parte se sintetiza el precursor del fragmento B, el etil (3*S*, 4*R*)-4-((*tert*-butoxicarbonil) amino)—hidroxi-5-(trilitio) pentanoato, alcohol que corresponde al intermedio objetivo 2, junto con su epímero 2'.



2

La posterior caracterización de los productos sintetizados a lo largo de las distintas reacciones se lleva a cabo mediante espectroscopia de resonancia magnética nuclear de protón y carbono.

RESUMO

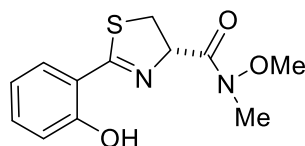
Palabras chave: *ferro, sideróforo, piscibactina.*

O ferro é un nutriente básico para o crecemento en tódolos seres vivos e é fundamental en numerosos procesos celulares. Por iso, os microorganismos, os fungos e as plantas desenvolveron estratexias para absorber o ferro do solo ou da auga. Unha das estratexias máis comúns das bacterias para a captación do ferro é a produción de sideróforos.

O presente traballo de final de Grao céntrase na obtención de intermedios sintéticos chave na preparación de piscibactina, sideróforo producido pola bacteria *Photobacterium damselae* subs *piscicida*, patóxeno da enfermidade fotobacteriosis en peixes. Para a súa síntese seguiu-se unha proposta de esquema retrosintético que se estrutura na formación de tres fragmentos.

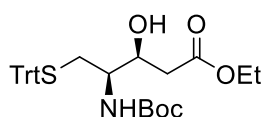
En concreto, os intermedios obtidos neste traballo son precursores dos fragmentos moleculares A e B.

A primeira parte do proxecto céntrase na preparación dunha amida de Weinreb (intermedio **1**), precursor do fragmento molecular A.



Amida de Weinreb 1

Na segunda parte, sintetízase o precursor do fragmento B, o (3*S*, 4*R*)-4-((*tert*-butoxicarbonil) amino)—hidroxi-5-(trilitio) pentanoato, alcohol que corresponde co intermedio obxectivo **2**, xunto co seu epímero 2'.



2

A posterior caracterización dos produtos sintetizados ó longo das distintas reaccións lévanse a cabo mediante espectroscopia de resonancia magnética nuclear de protón e carbono.

SUMMARY

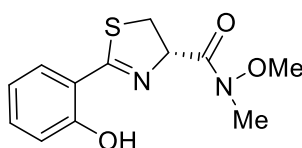
Key words: *iron, siderophore, piscibactin.*

Iron is a basic nutrient for the growth of all living beings and is fundamental in numerous cellular processes. Therefore, microorganisms, fungi and plants have developed strategies for iron uptake from soil or water. One of the most common strategies of bacteria for iron uptake is the production of siderophores.

The present final degree project focuses on the synthesis of key intermediates in the preparation of piscibactin, the siderophore produced by the bacterium *Photobacterium damselae* subsp. *piscicida*, pathogen of the disease in fish so-called photobacteriosis. For its synthesis, a retrosynthetic scheme was followed, which is structured in the formation of three fragments.

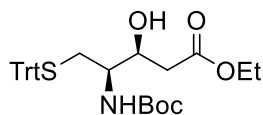
In particular, the intermediates obtained in this project are precursors of the molecular fragments A and B.

The first part of the project focuses on the preparation of a Weinreb amide (intermediate **1**), precursor of the molecular fragment A.



Weinreb amide 1

In the second part, the precursor of the fragment B, ethyl (3*S*, 4*R*)-4-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-3-hydroxy-5-(tritylthio)pentanoate, which corresponds to the objective intermediate **2**, is synthesized together with its epimer **2'**.



2

The subsequent characterization of the synthesized products throughout the different reactions is carried out by proton and carbon nuclear magnetic resonance.

INTRODUCCIÓN

1.INTRODUCCIÓN

1.1. Acuicultura en Galicia

El litoral de Galicia es muy complejo y la costa presenta como característica destacada la presencia de rías y antiguos valles fluviales, hoy ocupados por el mar. Existe desde tiempos muy antiguos una cultura muy arraigada en las poblaciones costeras que da como consecuencia una gran tradición pesquera y una cultura de consumo de productos marinos de elevada relevancia.

En la actualidad, la pesca extractiva cubre con dificultad la creciente demanda mundial de pescado para el consumo humano. Según la FAO, la acuicultura supondrá la única posibilidad de mantener la proporción actual de pescado en la dieta. Por esto, la acuicultura ha ganado una gran importancia, ya que de esta manera se pueden cultivar organismos acuáticos tanto en zonas costeras como del interior, lo que implica intervenciones en el proceso de cría para aumentar la producción.

En el Cantábrico y en Galicia se ha desarrollado el cultivo de especies de agua fría, principalmente moluscos, rodaballo y salmón

La acuicultura en Galicia ha avanzado mucho en los últimos 25 años obteniéndose grandes resultados, especialmente en la cría del rodaballo. En 1945 fue cuando se implantó el cultivo de bateas, pero no fue hasta 1968 cuando se inició la piscicultura de la trucha y posteriormente del salmón. Los criaderos de moluscos comenzaron su éxito en 1970, y en 1983 se inició en O Grove el cultivo industrial del rodaballo

La investigación tiene un papel fundamental en el desarrollo de la acuicultura en Galicia; gracias a ella, se han alcanzado los estándares actuales de producción y reconocimiento en el sistema productivo.¹

1.2. Principales enfermedades asociadas a peces de acuicultura

Los peces, los moluscos y los crustáceos son animales de sangre fría, lo que implica que su temperatura corporal y, por tanto, la de su metabolismo dependen esencialmente de la temperatura del medio en el que se encuentren.

Existe una serie de aspectos que deben ser considerados:

- Los agentes patógenos se transmiten más fácilmente a través del agua que por el aire.
- El agua tiene propiedades biológicas y químicas comparativamente mucho más complejas que el aire y una menor disponibilidad de oxígeno.
- La salud de las especies acuícolas depende fundamentalmente de la calidad del agua, de la nutrición y de las prácticas de manejo.

En el panorama de los procesos patológicos de acuicultura española existen actualmente unas enfermedades que están bajo control cuando aparecen. Sin embargo, hay otra serie de enfermedades que están causando importantes pérdidas y cuya aparición en el ámbito nacional puede suponer una amenaza para nuestra acuicultura.

En peces, las infecciones por virus o por bacterias, a menudo son seguidas por septicemias cuando el sistema inmunitario falla en neutralizar al agente patógeno. El agente patógeno o sus toxinas se difunden a través de la circulación sanguínea, incluyendo hemorragias en los órganos internos o en la musculatura, acumulación de fluidos en la cavidad abdominal y ojos saltones.

Un aspecto importante es la necesidad de controles eficaces de gestión de la sanidad pesquera, porque las enfermedades son el principal obstáculo para el crecimiento de la acuicultura.

Yersiniosis

La yersiniosis, también llamada *enfermedad de la boca roja intestinal*, es una enfermedad provocada por la bacteria *Yersinia ruckeri*, ocasionando pérdidas económicas significativas en la acuicultura de salmónidos en todo el mundo. Se aisló por primera vez en USA, en 1950, y produce infecciones. Puede provocar una afección septicémica con hemorragias en la superficie del cuerpo y en los órganos internos.

Algunos síntomas que pueden presentar las especies infectadas por esta bacteria suelen ser: a) cambios en el comportamiento de los peces, como nadar cerca de la superficie ó moverse lentamente, b) hemorragias en la superficie del cuerpo y alrededor de la boca, c) aumento del tamaño del bazo o inflamación del intestino y d) pérdida del apetito.



Figura 1. Hemorragias en las zonas ocular y palatal típicas en las septicemias por *Y. ruckeri*

Las infecciones provocadas por la *Yersinia ruckeri* pueden ser provocadas por una situación de estrés ambiental o por contacto directo con portadores infectados. Factores como la temperatura y la salinidad del agua pueden influir en la gravedad de las infecciones por esta bacteria.

El tratamiento administrado a los peces infectados se basa en antibióticos como la oxitetraciclina y el ácido oxolínico, aunque también existen medios preventivos como vacunas o probióticos.²

Vibriosis

La *vibriosis* es una enfermedad que ocasiona un grave problema en la acuicultura de todo el mundo. La bacteria responsable de esta enfermedad se denomina *Vibrio anguillarum*, afectando a una gran variedad de especies, independientemente de su tamaño y de la época del año. Galicia es una de las zonas más afectadas por las infecciones bacterianas más amenazantes limitando la producción de peces y mariscos.³

Existen hasta 23 serotipos reconocidos de *V. anguillarum*. en el sistema europeo, siendo los serotipos O1 y O2 los principales implicados en la enfermedad. Se puede dar tanto en peces de agua dulce como de agua salada.⁴



Figura 2. Alevín de rodaballo mostrando las típicas hemorragias producidas por *Vibrio anguillarum*.

Los peces afectados por esta enfermedad presentan signos típicos de una septicemia generalizada con hemorragia en la base de las aletas, úlceras, inflamación u oscurecimiento de la piel. Los peces moribundos son frecuentemente anoréxicos con branquias pálidas que reflejan una anemia severa.

Forunculosis

Hoy en día, las bacterias pertenecientes al género *Aeromonas* son consideradas no solo como importantes patógenos causantes de enfermedades en peces y otras especies de sangre fría, sino que también como agentes responsables de una variedad de complicaciones infecciosas en humanos.⁵ A día de hoy sólo cinco especies se conocen como patógenos humanos: *A. hydrophila*, *A. caviae*, *A. veronii*, *A. jandaei* y *A. schubertii*.



Figura 3. Úlceras características de infecciones por *A. salmonicida* en truchas

El agente principal causante de la enfermedad llamada forunculosis es la bacteria *Aeromonas salmonicida* subs. *salmonicida*. Generalmente se desarrolla como una septicemia hemorrágica crónica o aguda originando lesiones por úlceras. Presenta una amplia distribución y se origina principalmente en salmónidos, tanto de agua dulce como de agua salada, aunque también puede afectar a otras especies de peces.⁶

Para su erradicación, desde 1993, se ha venido utilizando vacunas altamente eficaces, por lo tanto, el problema de transmisión entre especies se ha reducido al mínimo.⁷

La forunculosis no tiene una época específica de aparición, sin embargo está asociada a algunos factores fisiológicos como la presencia de lesiones que se convierten en posibles entradas de la bacteria, así como a factores ambientales como las altas temperaturas y baja concentración de oxígeno.⁸

Estreptococosis

Actualmente se considera una de las infecciones más importantes en la acuicultura, debido a las importantes pérdidas económicas que causan las infecciones en las distintas especies de peces de agua dulce y salada de todo el mundo.

Existe una división general de la *estreptococosis* en dos formas según la virulencia de los agentes implicados a altas o bajas temperaturas. Por un lado, está la

estreptococosis de “agua caliente”, causada por la bacteria *Lactococcus garveae* (*Enterococcus seriolicida*) produce mortalidades a temperaturas superiores a 15°C; por otro lado existe la *estreptococosis* de “agua fría”, causada por patógenos como la *Vagococcus salmoninarum* o *Lactococcus piscium* produciendo muertes por debajo de los 15°C.

Las especies infectadas presentan una serie de síntomas entre los que se encuentran hemorragias alrededor del ojo, hemorragias petequiales, úlceras profundas, acumulación de líquido blanco en la cavidad pericárdica e inflamación del bazo y del hígado.⁹



Figura 4. Síntomas externos de la estreptococosis en rodaballo, como las acumulaciones de material purulento alrededor de los ojos y en la base de las aletas.

Fotobacteriosis (Pasteurelisis)

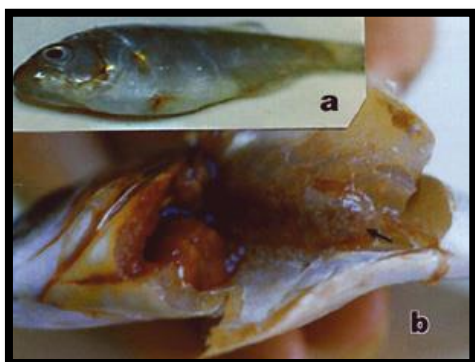


Figura 5. Lesiones típicas externas (a) y típicos nódulos blancos (tubérculos) en el riñón (b) producidos por *Photobacterium damsela* subs. *piscicida* en alevines de dorada

Es una septicemia bacteriana en la que el pez enfermo presenta tubérculos blanquecinos en los órganos internos. El agente patógeno que la origina es la bacteria *Pasteurella piscicida*, recientemente reclasificada como *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*, y por lo tanto la enfermedad que causa ha pasado a llamarse fotobacteriosis.

Los síntomas externos generalmente son poco visibles y los peces afectados presentan lesiones superficiales, aunque sólo algunos pueden presentar oscurecimiento de la piel o leves hemorragias en la cabeza y en las branquias. Los síntomas internos dependen de si la enfermedad es crónica o aguda. Si es aguda, hay pocos cambios patológicos: el hígado, riñón y bazo muestran una necrosis. Las lesiones crónicas en los órganos internos se caracterizan por la presencia de tubérculos blancos.

1.3. La importancia del hierro.

El hierro es un elemento esencial para casi todos los microorganismos, plantas y animales. Tiene una gran capacidad de coordinación y sirve como centro catalítico de algunas enzimas para reacciones redox. Éstas son fundamentales para los procesos celulares, como el transporte de electrones, la activación de oxígeno, la reducción de peróxido, la síntesis de aminoácidos, nucleósidos, ADN y la fotosíntesis.¹⁰

Por lo tanto, el hierro es un nutriente básico para el crecimiento en todos los seres vivos, y en el hombre, se necesita en cantidades relativamente grande (aproximadamente 4 g por adulto), aunque también es muy tóxico cuando se encuentra en exceso.¹¹

A pesar de que es un elemento abundante en la tierra, no es muy común en ambientes aerobios debido a la baja solubilidad del hierro (III), que precipita en forma de $\text{Fe}(\text{OH})_3$, cuya constante de solubilidad es de 10^{-39} .¹²

En estos ambientes biológicos la mayor parte del hierro es quelatado por proteínas de unión de alta afinidad. Por lo tanto, los patógenos han desarrollado mecanismos eficientes para obtener hierro del huésped y originar una infección. La capacidad de obtener hierro a partir de proteínas-hemo o hemo libres de los tejidos del huésped, constituye una importante fuente de hierro para muchos patógenos bacterianos.¹³

Por ello, los microorganismos, los hongos y las plantas han desarrollado estrategias para absorber el hierro del suelo o del agua. Una de las estrategias más comunes para la captación de hierro es la producción de sideróforos.¹²

1.4. Sideróforos

Para facilitar la absorción adecuada de Fe (III), los microorganismos han desarrollado moléculas de bajo peso molecular (500-1500 daltons) denominadas sideróforos o portadores de hierro. Debido a su gran afinidad por los iones férricos son capaces de captar el hierro de las proteínas de unión del huésped, e introducirlos en el microorganismo a través de receptores de membrana específicos y proteínas de

transporte. Se conocen más de 500 sideróforos diferentes, de los cuales más de 270 han sido caracterizados estructuralmente.

Las propiedades y la actividad biológica de un sideróforo están determinadas por su estructura, quiralidad y la conformación que adopta para unirse a las proteínas receptoras específicas dentro de la membrana.¹⁴

La mayoría de los sideróforos son ligandos hexadentados y donantes de oxígeno que forman complejos octaédricos con hierro, formando complejos 1:1.

Mecanismos de actuación de sideróforos

La resistencia de las bacterias frente a los antibióticos origina un grave problema en los tratamientos de enfermedades infecciosas. Uno de los mecanismos cruciales de esta resistencia es la disminución de la permeabilidad de la membrana externa frente a los antibióticos. Para eludir esta resistencia, un método que se usa es el “paso de contrabando” de la molécula de antibiótico a la célula bacteriana uniéndola a un sideróforo.

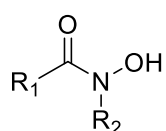
Las moléculas han desarrollado dos sistemas de transporte de hierro que se activan dependiendo de las condiciones ambientales. Un primer sistema denominado *sistema de baja afinidad* que se activa en condiciones de exceso de hierro. Un segundo mecanismo conocido como *sistema de alta afinidad*, que se activa en situaciones de estrés causadas por la deficiencia de hierro, e implica el transporte activo de iones de hierro a las células bacterianas mediante sideróforos.

En las bacterias Gram-negativas la absorción bacteriana de los complejos hierro-sideróforo depende de la membrana externa, de las proteínas de unión periplasmática y de los transportadores. La membrana externa reconoce al complejo hierro-sideróforo y se origina un transporte activo a través de ésta, mediante un balance energético, hasta llegar al periplasma. Aquí, se unen a sistemas de transporte para alcanzar el citoplasma y, una vez allí, el hierro es liberado por uno de dos mecanismos. La principal vía de liberación es la reducción Fe^{3+}/Fe^{2+} mediante la reductasa de hierro, aunque existe otro mecanismo de liberación mediante la hidrólisis del complejo hierro-sideróforo a través de enzimas específicas. Posteriormente, el sideróforo libre es degradado o secretado por bombas de flujo.¹⁵

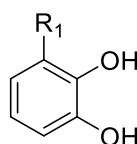
Existen estudios que muestran que los sideróforos no sólo son producidos por las bacterias para la aportación de hierro, sino que también pueden tener funciones más amplias y complejas. Su presencia es muy beneficiosa en un ambiente contaminado con metales tóxicos, y las bacterias capaces de producir sideróforos son más resistentes a los metales pesados que aquellas que no las producen, ya que éstos tienen una alta afinidad por el hierro pero también por los metales pesados.¹⁶

Tipos de Sideróforos

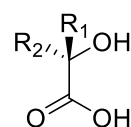
Se conocen un gran número de sideróforos producidos por diferentes microorganismos. Dependiendo de los grupos funcionales que participan en la coordinación con el Fe^{3+} , se pueden clasificar en catecolatos/fenolatos, hidroxamatos y los α -hidroxicarboxilatos. Las dos primeras clases se encontraron en un gran número de organismos, ya que los hongos producen principalmente sideróforos tipo hidroxamato y las bacterias producen, además de hidroxamato, también tipo catecolato. Posteriores estudios, que trajeron consigo un aumento de la información sobre nuevos sideróforos, condujo a una clasificación más compleja.¹⁷



Hidroxamato



Catecolato



α -hidroxicarboxilato

Aplicaciones de los sideróforos

Hoy en día existe un aumento de la resistencia a los antibióticos en bacterias patógenas, debido a su capacidad de adaptación por selección natural. Esto ha forzado a las industrias farmacéuticas a mejorar la efectividad de los antibióticos de una nueva manera: introducir la molécula de antibiótico en la célula bacteriana a través de su unión con un sideróforo.

Se puede controlar la necesidad de hierro de múltiples patógenos resistentes a los medicamentos mediante tres maneras, que incluyen: a) el concepto del caballo de Troya, para facilitar la absorción celular de los antibióticos, b) la privación artificial de

hierro, mediante sideróforos que no pueden utilizarse como fuente de hierro por el patógeno, y c) la inhibición de las vías del metabolismo del hierro.

La estrategia selectiva del “caballo de Troya” utiliza las capacidades de transporte de hierro de los sideróforos para transportar fármacos a las células mediante la preparación de conjugados entre sideróforos y agentes antimicrobianos. La parte sideróforo de este conjugado es capaz de atrapar hierro y es reconocida por los sistemas celulares de captación, mientras que la otra parte del conjugado tiene una actividad antibiótica, que se introduce de forma efectiva mediante el mecanismo de transporte de hierro. Los conjugados sideróforo-antibiótico pueden ser naturales o sintéticos.



Figura 6: Estrategia de "caballo de Troya"

Una importante aplicación clínica de los sideróforos es el tratamiento contra muchas enfermedades e infecciones humanas, principalmente provocadas por un exceso de hierro. Los sideróforos pueden usarse como agentes quelatantes, pueden unirse al hierro para producir complejos que conducen a la formación de ferrioxamina. Aprovechando su afinidad por el elemento, se utiliza desferrioxamina B (Desferal®) para el tratamiento de intoxicaciones por exceso de hierro. La desferrioxamina quelata cationes $Fe(III)$ libres y forma ferrioxamina, que es soluble en agua y por tanto puede ser eliminada por los riñones.¹⁸

Algunas de estas enfermedades son:

- Talasemia: es una anemia hereditaria en la que existe una disminución en la síntesis de hemoglobina.
- Anemia sideroblástica: trastorno genético en el que la médula ósea produce sideroblastos anillados en vez de glóbulos rojos sanos. Requiere muchas transfusiones.
- Hemocromatosis: incremento de hierro en el organismo causando deposiciones en el corazón, páncreas o hígado.

También se usa Desferal® para tratar otro tipo de enfermedades como la malaria, hematoma retobulbar, neuroblastomas y en la eliminación de elementos como el aluminio y el vanadio.⁸

Antecedentes

2. Antecedentes

2.1 Bacteria *Photobacterium damsela* subs. *piscicida*

El género *Photobacterium* comprende una gran familia de bacterias Gram-negativas que se pueden encontrar en el agua de mar, en sedimentos marinos, en la piel y órganos de peces.¹⁹

La bacteria *Photobacterium damsela* subs *piscicida* se aisló inicialmente en 1963 en la bahía de Chesapeake tras una mortalidad masiva de peces, denominando a la enfermedad con el nombre de pasteurelosis. El patógeno fue reasignado al género *Photobacterium* como *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*, y por ello, como ya se mencionó, la enfermedad se denomina Fotobacteriosis. Es uno de los patógenos bacterianos más devastadores en la acuicultura marina debido a su amplia distribución geográfica y mortalidad²⁰. Produjo grandes pérdidas económicas en la acuicultura de Japón y desde 1990 esta enfermedad se convirtió en un serio problema en Europa, cuyo primer brote tuvo lugar en el noroeste de España en el cultivo de dorada. En el mismo periodo también se produjeron brotes de pasteurelosis en el sudoeste de España, Francia, Italia, Israel y Grecia que afectaron principalmente al cultivo de dorada y lubina.²¹

2.2 Fotobacteriosis (pasteurelosis)

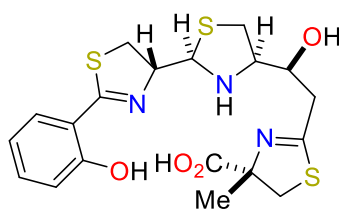
Como ya se dijo anteriormente, es la enfermedad infecciosa causada por la bacteria *Photobacterium damsela* subs. *piscicida*. La fotobacteriosis se puede desarrollar en forma aguda, provocando grandes mortalidades, o de manera crónica asintomática. En su forma aguda los peces enfermos suelen perder peso, presentar oscurecimiento de la piel, necrosis en las branquias y granulomas blancos en órganos como el bazo, el riñón o el hígado. Los brotes de pasteurelosis suelen producirse en verano cuando la temperatura del agua es adecuada, hay una salinidad del 20 al 30% y una baja calidad del agua.²²

El primer aislamiento que se realizó para determinar la presencia de *Photobacterium damsela* subs. *piscicida* en un organismo fue a partir de órganos internos de peces enfermos (riñón, hígado y bazo), utilizando medios tales como TSA o agar sangre.

El diagnóstico rápido se basa en el aislamiento de una varilla Gram-negativa no móvil, que es oxidasa y catalasa positiva, fermentativa, sensible al agente vibrostático O/129. En la actualidad existe un kit miniaturizado muy utilizado en acuicultura para el diagnóstico rápido de patógenos de peces bacterianos denominado sistema API-20E.

Se encontraron diversos tratamientos entre los que se incluyen antibióticos para eliminar infecciones causadas por *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* en peces. Se demostró que el organismo es sensible a la penicilina, cloranfenicol, tetraciclina y colistina. Sin embargo, el uso indiscriminado de algunos agentes quimioterapéuticos en el tratamiento de infecciones bacterianas de peces ha dado como resultado la aparición de cepas resistentes a tales compuestos, haciendo que la bacteria posea plásmidos que contengan genes asociados a la resistencia frente a estos compuestos. Teniendo en cuenta lo anterior, se opta por el desarrollo de vacunas efectivas para prevenir la aparición de la enfermedad.

El sideróforo responsable de la captación de hierro de la bacteria *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*, el agente etiológico de la pasteurelisis, fue denominado piscibactina (Pcb).



Piscibactina

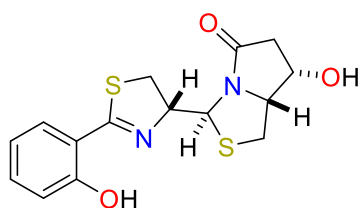
2.3 Compuestos estructuralmente relacionados con piscibactina

Numerosas investigaciones indican que el hierro juega un papel importante en la patogénesis de la *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*, aunque se desconocían los mecanismos por los cuales este patógeno puede captar hierro del huésped. Los patógenos compiten con el huésped por el hierro, y en muchos casos, lo hacen a través de la producción de quelatantes de hierro con una alta afinidad por éste, que junto con los receptores de la superficie celular, transportan el hierro a las células.²³

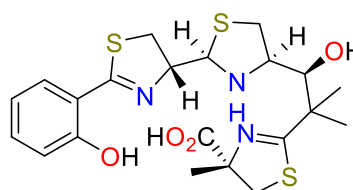
Durante el aislamiento del sideróforo piscibactina, realizado por el grupo QUIMOLMAT a partir de cultivos deficientes en hierro, también se aisló y se caracterizó un derivado más pequeño al que se denominó prepiscibactina (prePcb).²⁴

Estudios realizados por el grupo de Microbiología de la Universidad de Santiago de Compostela mostraron que el conjunto de genes que codifican la biosíntesis de yersiniabactina, sideróforo aislado de especies patógenas de *Yersinia*, es muy similar al implicado en la biosíntesis del sideróforo piscibactina. Por tanto, se dedujo que la estructura de la piscibactina puede estar relacionada con la de la yersiniabactina.²⁰

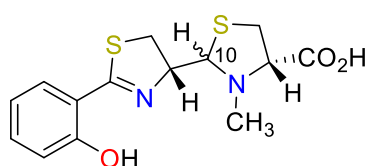
La estructura de Pcb, además de ser muy parecida a la de yersiniabactina, es muy similar a la estructura de otro sideróforo denominado pioquelina. Por lo tanto, con el fin de obtener una ruta de síntesis que permitiera la obtención de piscibactina, el análisis retrosintético se basó en las rutas sintéticas de compuestos que son similares estructuralmente a la piscibactina. Entre ellos se encuentra la prepiscibactina, la yersiniabactina y la pioquelina.



Prepiscibactina



Yersiniabactina

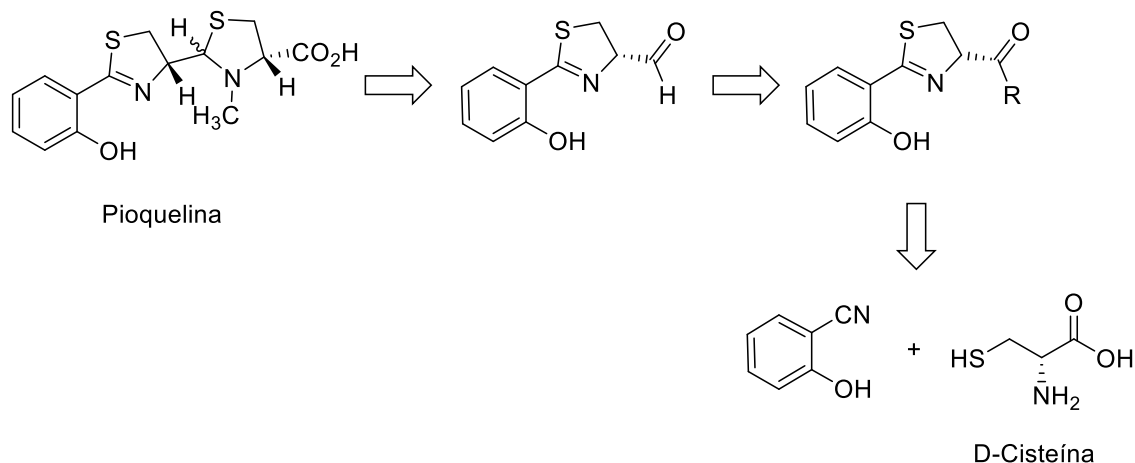


Pioquelina

Síntesis de la pioquelina

La pioquelina es un sideróforo de tipo fenolato que fue aislado de *Pseudomonas aeruginosa*. Este compuesto mejora el crecimiento de la bacteria en condiciones que limitan el hierro, lo que le da una gran importancia clínica debido a la participación del organismo en la infección de quemaduras graves²⁵. La primera síntesis se llevó a cabo en 1978 y se basó en la condensación de N-metil-L-cisteína

con un aldehído, que se obtuvo a partir de la condensación de 2-cianofenol con D-cisteína. ²⁶ (esquema 1)

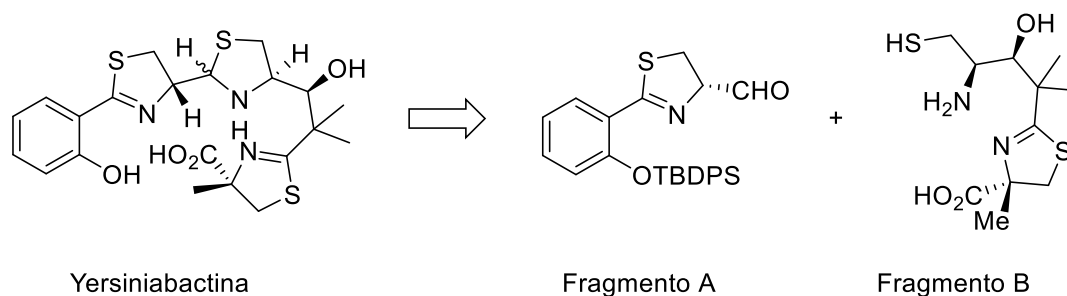


Esquema 1: Análisis retrosintético de pioquelina

Síntesis de yersiniabactina

La yersiniabactina es un sideróforo producido por bacterias patógenas pertenecientes al género *Yersinia*. Fue aislado en 1995 en su forma libre y como complejo con Ga (III) a partir de cultivos de *Yersinia enterocolitica* ²⁷. Como ya se dijo anteriormente, está estructuralmente relacionada con la piscibactina.

En el análisis retrosintético de yersiniabactina (esquema 2) se plantea su síntesis a partir de dos fragmentos A y B. La síntesis del fragmento A se realizó a partir de la D- Serina ²⁸.



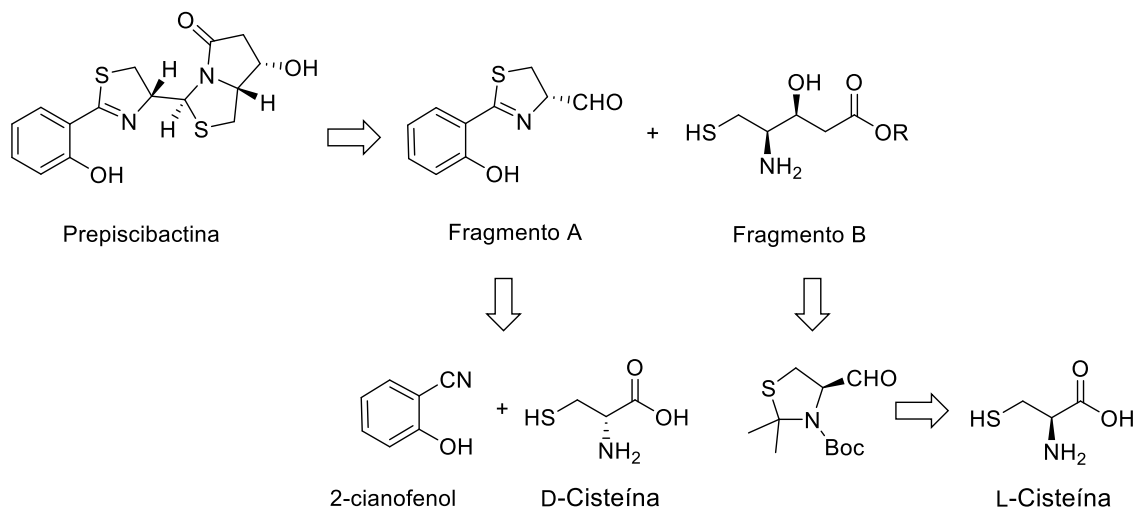
Esquema 2: Análisis retrosintético de yersiniabactina

Se puede observar que el fragmento A es común a uno de los fragmentos planteados en la síntesis de la pioquelina, aunque sus síntesis se llevaron a cabo de manera diferente.

Síntesis de prepiscibactina

Se planteó que prePcb podría ser un intermedio en la biosíntesis de Pcb. La síntesis de la prepiscibactina nos da mucha información sobre el diseño sintético, que debe ser aplicado a la síntesis de piscibactina.

El análisis retrosintético de la prepiscibactina (Esquema 3) implica la preparación de intermedios sintéticos clave A y B a partir de D y L-cisteína²⁹.

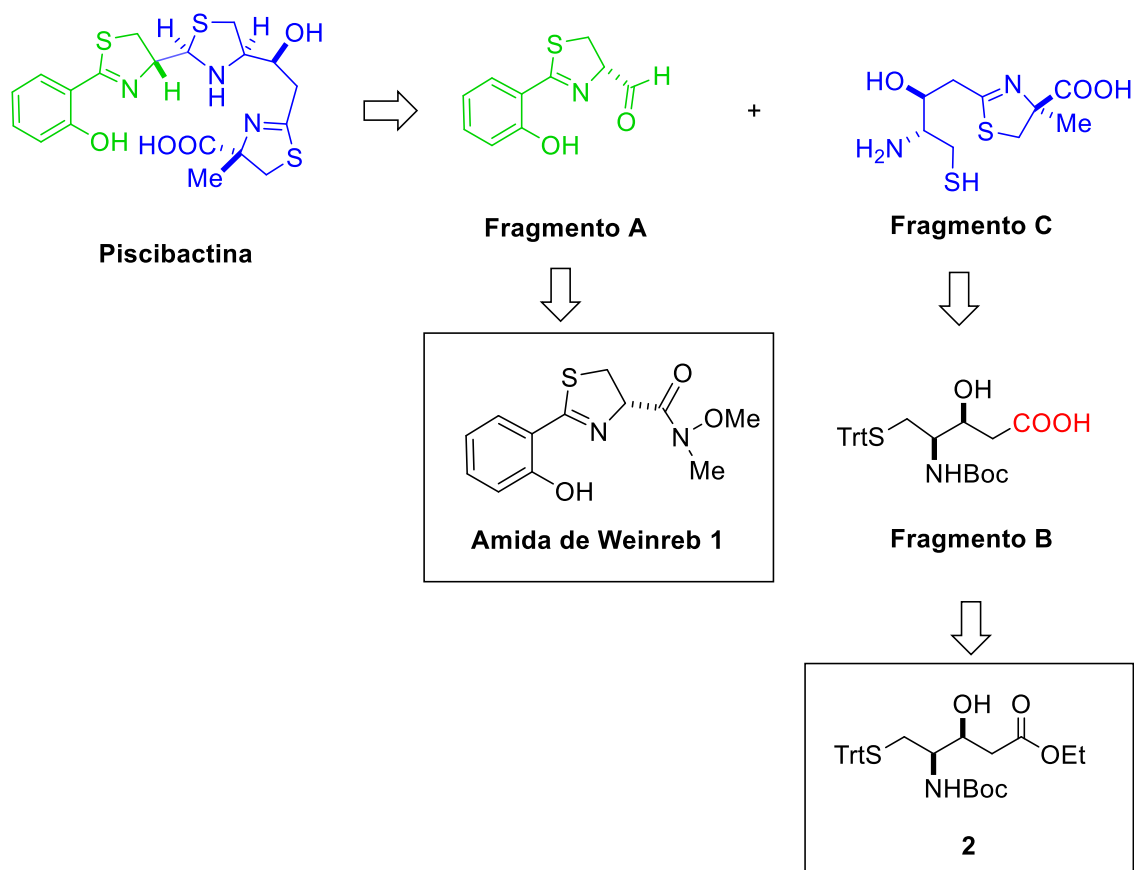


Esquema 3: Análisis retrosintético de prepiscibactina

OBJETIVOS

3.OBJETIVOS

Este Trabajo de Fin de Grado abarca la síntesis de varios intermedios claves de la síntesis del sideróforo piscibactina. En concreto, se plantea la síntesis de la amida de Weinreb como precursora del fragmento A y la síntesis del compuesto **1**, intermedio sintético clave en la preparación del fragmento B



Esquema 4: Ruta retrosintética del sideróforo piscibactina.

Los objetivos específicos de este trabajo experimental son los siguientes:

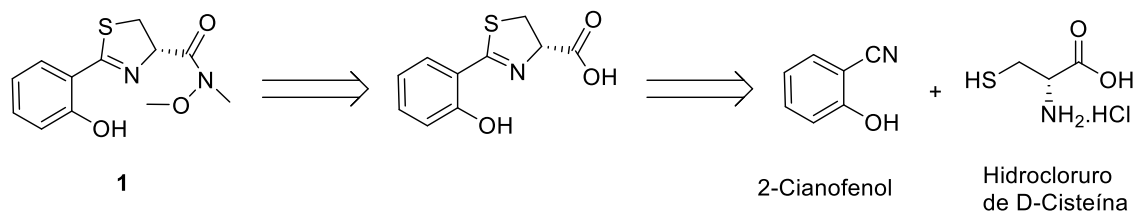
- (1) Síntesis de la amida de Weinreb **1**.
- (2) Síntesis del β -hidroxiéster **2**.
- (3) Caracterización de los intermedios sintéticos que se vayan obteniendo en cada reacción, mediante espectroscopia de resonancia magnética nuclear de protón y carbono.

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

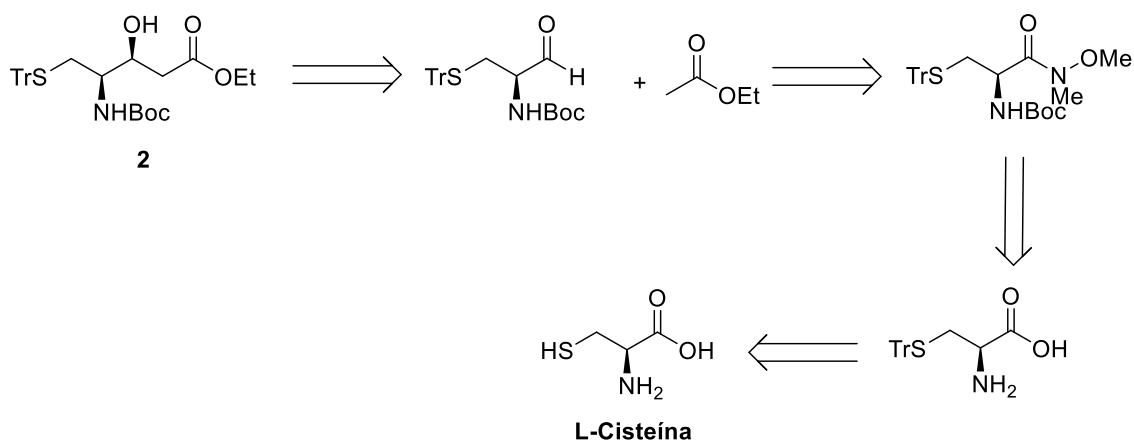
4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

4.1 Planteamiento retrosintético.

A continuación se presentan las rutas retrosintéticas para la obtención de los productos en los cuales se centra este trabajo, compuestos **1** y **2** (esquemas **5** y **6**), intermedios en la síntesis del sideróforo piscibactina



Esquema 5: Análisis retrosintético del compuesto **1** en la preparación de piscibactina

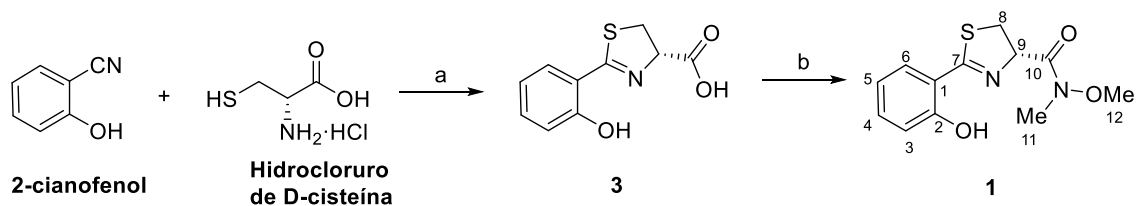


Esquema 6: Análisis retrosintético del compuesto **1** en la preparación de piscibactina.

4.2 Síntesis de los intermedios objetivo.

4.2.1 Preparación de la amida de Weinreb

El análisis retrosintético mostrado en el apartado anterior permite la preparación del compuesto **1** a partir del hidrocloreuro de D-cisteína.

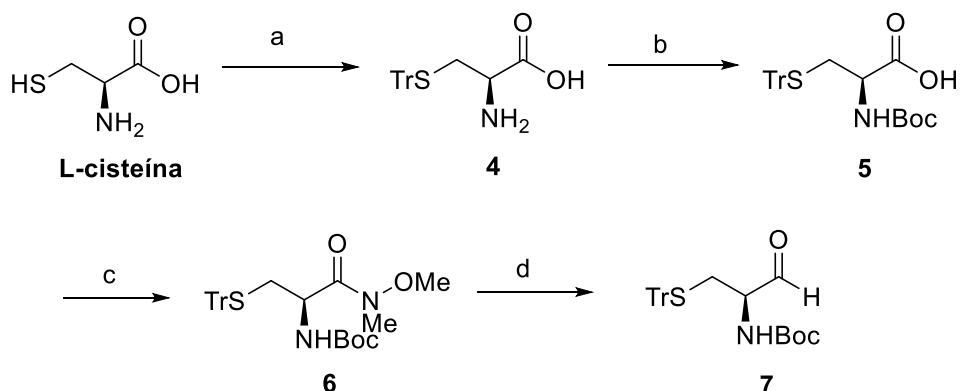


Esquema 7: Reactivos y condiciones: a) Tampón fosfato 0.1 M pH 6.4/MeOH (1:1). b) EDCI-HCl, MeHN-OMe-HCl, DMF, DIPEA.

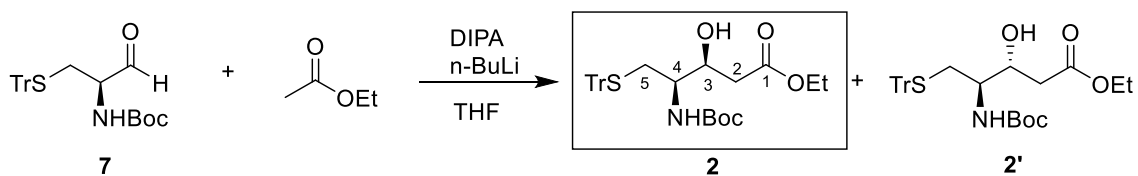
La síntesis del compuesto **1** comenzó con la condensación del 2-cianofenol y el hidrocloreuro de la D-cisteína para formar la tiazolina **3**. El posterior tratamiento de **3** con hidrocloreuro de *N,O*-dimetilhidroxilamina en medio básico (DIPEA), tras activar el ácido carboxílico con EDCI, conduce al compuesto **1**, que corresponde con una amida de Weinreb. La reducción del compuesto **1** con LiAlH_4 daría el aldehído que corresponde con el fragmento A. Esta amida de Weinreb **1** se almacena con gran facilidad ya que es más estable que el aldehído del fragmento A, y se puede utilizar más tarde en los siguientes pasos posteriores de la síntesis.

4.2.2 Preparación del β -hidroxiéster.

El análisis retrosintético de la sección 4.1 permite desarrollar la síntesis del fragmento C, a partir de productos comerciales como la L-cisteína. En esta secuencia de reacciones se incluye la obtención de uno de los intermedios clave del fragmento B, que es en el que se centra este trabajo.



Esquema 8a: Reacción y condiciones: a) Tr-Cl/ DMF, 2d; b) Boc_2O , NaOH 2 M. 24 h; c) MeHN-OMe-HCl, EDC-HCl, HOBT-H₂O, DIPEA/DCM; d) LAH/ THF 0°C.



Esquema 8b

La síntesis del compuesto **2** se realizó en dos partes, una primera etapa correspondiente a la síntesis del procedente de la L-cisteína (**esquema 8a**), y una segunda en la que el aldehído se condensa con el enolato del acetato de etilo (**esquema 8b**).

La síntesis comienza con la protección secuencial del grupo tiol y del grupo amino de la L-cisteína (**esquema 8a**) con los reactivos correspondientes: el grupo tiol con cloruro de tritilo (Tr-Cl) y el grupo amino con el dicarbonato de diterbutilo (Boc₂O), obteniéndose los compuestos **4** y **5** respectivamente. De esta manera, se disminuye la reactividad y se facilita su aislamiento y solubilidad, quedando libre el ácido carboxílico. La posterior obtención de la amida de Weinreb se realizó en unas condiciones similares a las utilizadas para la obtención de **1**. La reducción de la amida **6** con hidruro de litio y aluminio en THF a 0°C dio lugar al aldehído **7**.

En la segunda parte de la síntesis tiene lugar una condensación del aldehído **7** con acetato de etilo en las condiciones que se muestran en el **esquema 8b**. Como resultado de esta reacción se obtuvo, además del compuesto **2**, un epímero en la posición β, compuesto **2'**. El compuesto **2** será posteriormente utilizado en la síntesis de la piscibactina.

Parte Experimental

5. PARTE EXPERIMENTAL

5.1 Metodología General

En todos los casos, salvo que se indique lo contrario, para llevar a cabo una reacción se ha trabajado en una atmósfera inerte de Argón en condiciones anhidridas bajo la vitrina. El material de vidrio tiene que estar totalmente seco, por lo tanto es necesario tenerlo en la estufa a 60°C durante varias horas, incluida la barra agitadora que se utiliza para homogenizar la mezcla de reacción. Al retirar el material de vidrio seco de la estufa, se deja que se enfríe hasta llegar a la temperatura ambiente en un desecador. Como último paso para poner el material a punto para llevar a cabo la reacción, es necesario purgarlo para originar la atmósfera inerte de Argón. Para ello, al retirarse el material del desecador, se tapa rápidamente con un septum para que no entren restos de humedad y, ya en la vitrina, se hace pasar a través del septum una corriente de argón, durante cinco minutos aproximadamente, con una entrada y salida mediante una aguja.

A veces hace falta extremar las condiciones anhidridas. Para ello, una vez que se purga el material de vidrio con la corriente de Argón, se calienta con un decapador para eliminar cualquier posible resto de humedad que haya podido quedar dentro del material. Posteriormente, se tiene que volver a dejar enfriar a temperatura ambiente para llevar a cabo las reacciones.

En aquellas reacciones que es necesario realizarlas a bajas temperaturas se utilizó un baño de agua-hielo para condiciones de 0°C, y con enfriamiento mediante el equipo cryocool para reacciones a temperaturas menores de 0°C.

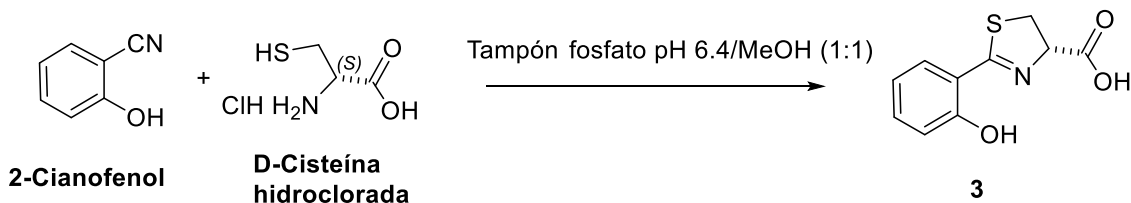
Los disolventes empleados en las reacciones se secaron previamente mediante reflujo en atmósfera inerte de argón con un agente desecante adecuado: Na/benzofenona para el THF y CaH₂ para el CH₂Cl₂. Otros disolventes, como el DMF, se adquirieron anhidridos de manera comercial, y para su utilización se purgó con argón tanto el envase como la jeringa que se utiliza para manipularlo. Los montajes de destilación para el THF y CH₂Cl₂ al ser disolventes muy utilizados, ya están en las vitrinas del laboratorio. Sin embargo para otros disolventes, como el acetato de etilo o la diisopropilamina (DIPA), fue necesario realizar el montaje de destilación utilizando como agentes desecantes tamices moleculares.

Para comprobar el avance de las reacciones y si se ha producido correctamente se siguió a través de cromatografías en capa fina (ccf). Para éstas se utilizaron placas de gel de sílice empleando como eluyente mezclas de EtOAc y hexano en distintas proporciones y para su visualización se utilizó luz ultravioleta a longitud de onda de 254 nm. Para purificar los productos obtenidos se hicieron cromatografías en columna rellenas con gel de sílice a baja con una mezcla de disolventes como fase móvil.

Los espectros de RMN de ^1H y ^{13}C algunos se realizaron manualmente en el espectrómetro Bruker Advance 300 MHz del CICA ó en un Bruker Advance 500 MHz ó Bruker Advance II de los Servicios de Apoyo á Investigación de la Universidade da Coruña (SAI). Como disolventes se utilizaron CDCl_3 y DMSO, dependiendo de la polaridad del compuesto que se analice. Los desplazamientos químicos fueron determinados en la escala δ en partes por millón (ppm) y las constantes de acoplamiento en Hz. Las multiplicidades de las señales de ^{13}C fueron determinadas mediante experimentos DEPT-135.

5.2 Procedimientos experimentales

5.2.1 Síntesis de ácido (4S)-2-(2-hidroxifenil)-4,5-dihidro-tiazol-4-carboxílico (3)

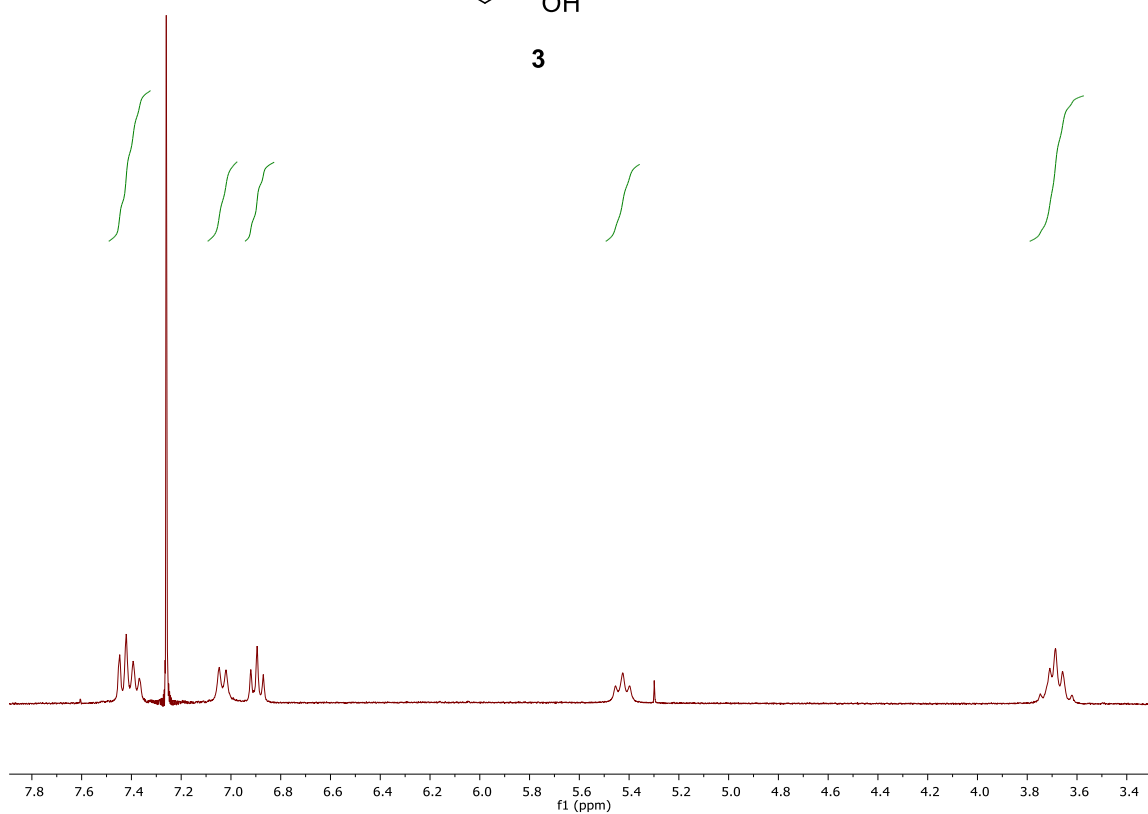
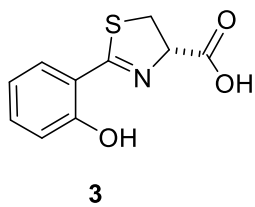


Se hizo reaccionar 1.00 g de 2-cianofenol (8.39 mmol) con hidroclicloruro de D-cisteína (2.03 g, 12.88 mmol) en una mezcla de metanol/disolución tampón 0.1 M de fosfato con unas proporciones de 1:1 a pH 6.4 (80 mL). Para ajustarlo al pH adecuado fue necesario adicionar K_2CO_3 sólido. Después de toda la noche agitando a una temperatura de $60^\circ C$, la mezcla de reacción se concentró a presión reducida. Posteriormente, el crudo se redisolvió en H_2O (50 mL) y, añadiendo gota a gota una disolución de HCl al 5% en v/v, se llevó a un pH de 2-3. Por último, se llevó a cabo la extracción con CH_2Cl_2 (3 x 50 mL) recogiendo las fases orgánicas, que se secaron con $MgSO_4$ anhidro antes de llevarlo a sequedad a presión reducida. De esta manera se obtuvieron 1.11 g con un rendimiento del 60% de ácido (4S)-2-(2-hidroxifenil)-4,5-dihidro-tiazol-4-carboxílico (**3**) que presenta un aspecto en polvo de color amarillento.

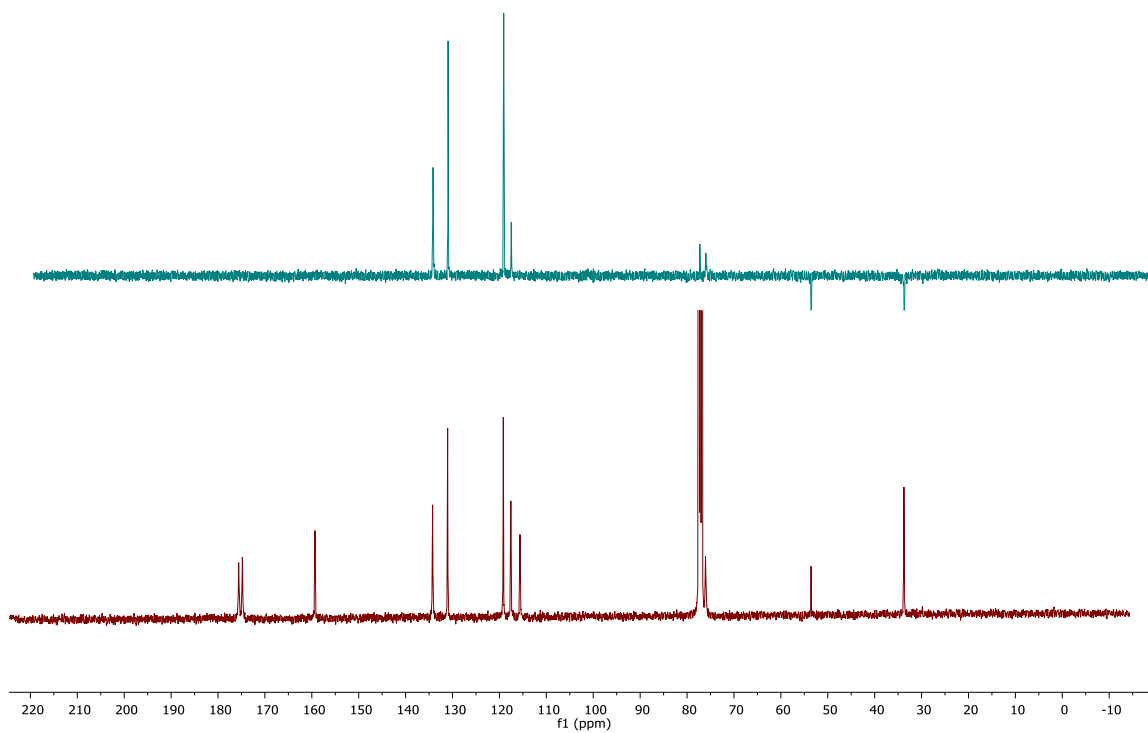
1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ ppm: 7.48 – 7.33 (m, 2H, H-3/H-5), 7.03 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H, H-6), 6.90 (t, $J = 7.5$ Hz, 1H, H-4), 5.43 (t, $J = 8.5$ Hz, 1H, H-9), 3.67 (q, $J = 11.0$, 9.0 Hz, 2H, H-8).

^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ ppm: 175.6 (C, C-10), 174.8 (C, C-7), 159.3 (C, C-1), 134.2 (C, C-5), 131.0 (C, C-3), 119.2 (C, C-4), 117.6 (C, C-6), 115.6 (C, C-2), 76.1 (C, C-9), 33.8 (C, C-8).

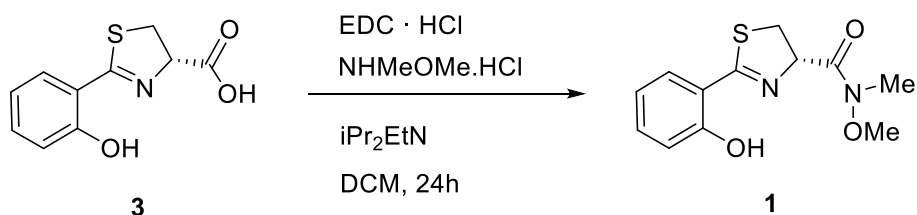
¹H RMN del compuesto 3:



¹³C RMN del compuesto 3



5.2.2 Síntesis de (4S)-2-(2-hidroxifenil)-N-metoxi-N-metil-4,5-dihidrotiazol-4-carboxamida (1). Amida de Weinreb.

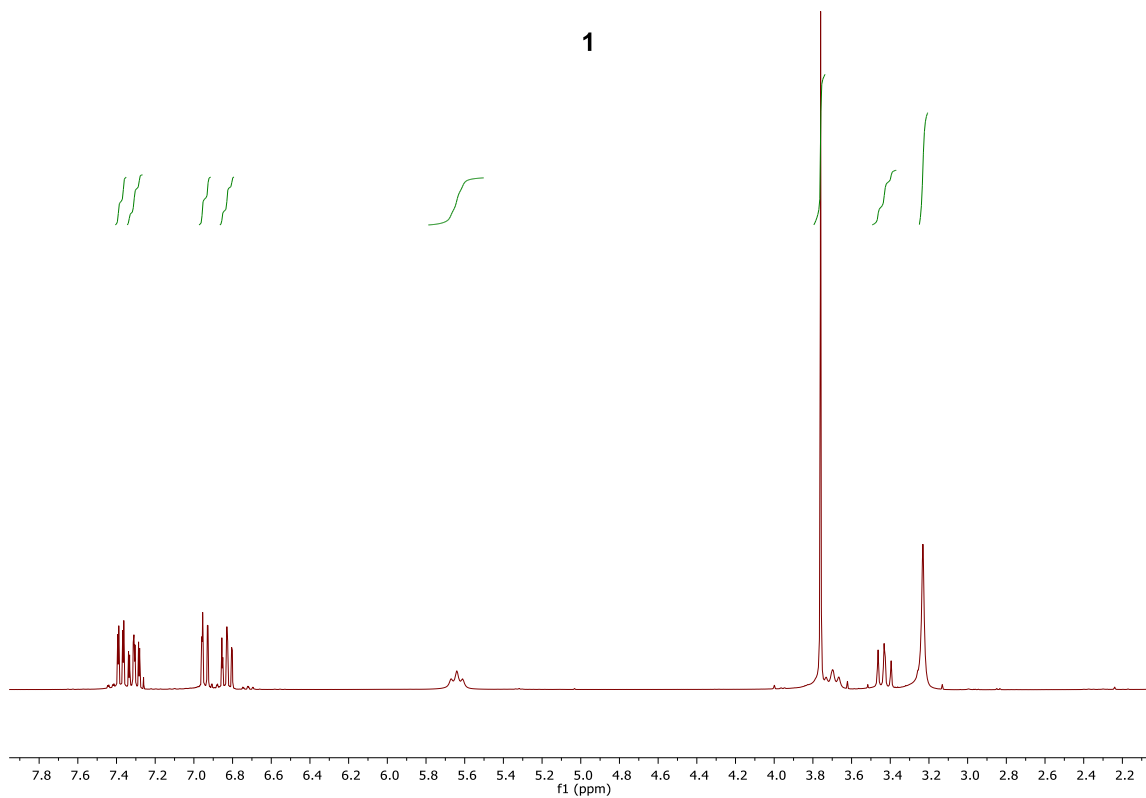
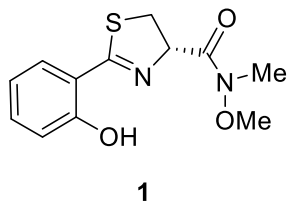


Sobre la disolución del ácido **3** (307 mg, 1.38 mmol) se añadió CH_2Cl_2 previamente secado (20 mL) dejándolo en agitación sobre un baño de hielo a 0°C . A continuación se comenzaron a añadir los reactivos en el siguiente orden: hidrocloreuro de N,O-dimetilhidroxilamina (160.96 mg, 1.65 mmol), DIPEA (0.3 mL, 1.65 mmol) y EDC (289.99 mg, 4.51 mmol). Se dejó agitando en baño de hielo y, tras una hora, se dejó enfriar a temperatura ambiente. El crudo se purificó mediante cromatografía en gel de sílice [hex/ Et_2O (1'5:1)] recogiendo 199.9 mg de (4S)-2-(2-hidroxifenil)-N-metoxi-N-metil-4,5-dihidrotiazol-4-carboxamida (**1**), con un rendimiento del 55% y con un aspecto aceitoso.

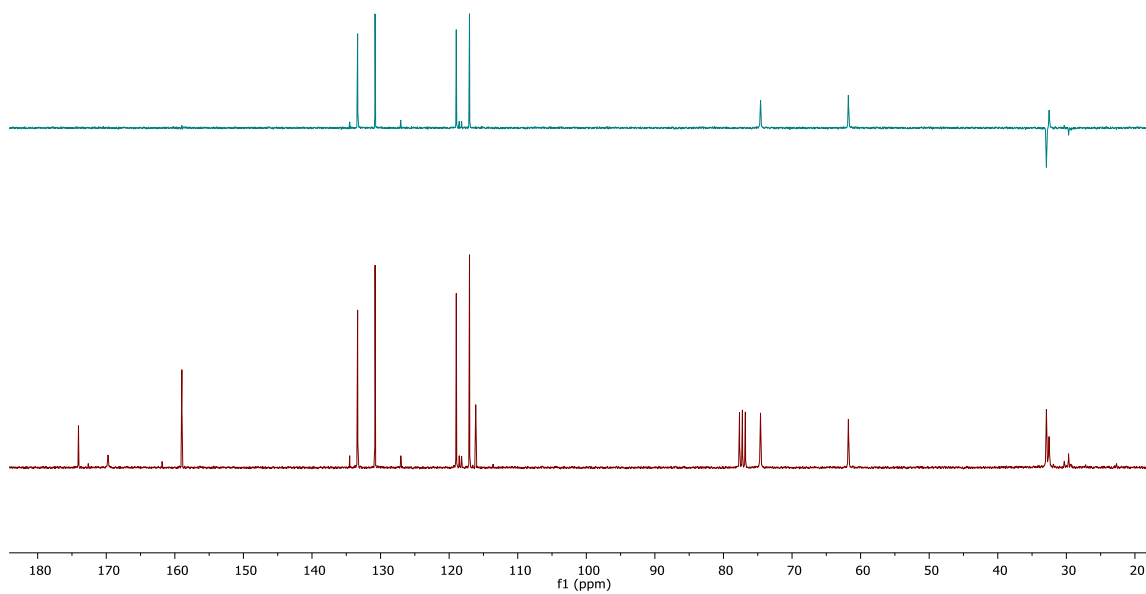
^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ ppm: 7.38 (dd, $J = 7.8, 1.6$ Hz, 1H, H-3), 7.35 – 7.27 (m, 1H, H-5), 6.94 (dd, $J = 8.4, 1.2, 0.4$ Hz, 1H, H-4), 6.83 (ddd, $J = 7.8, 7.3, 1.2$ Hz, 1H, H-6), 5.64 (t, $J = 9.0$ Hz, 1H, H-9), 3.76 (s, 3H, H-12), 3.68 (d, $J = 9.6$ Hz, 1H, H-8a), 3.55 – 3.40 (m, 1H, H-8b), 3.23 (s, 3H, H-11).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ ppm: 174.1 (CO, C-10), 169.7 (C, C-7), 159.0 (C, C-1), 133.3 (CH, C-5), 130.8 (CH, C-3), 119.0 (CH, C-4), 117.0 (CH, C-6), 116.1 (C, C-2), 74.6 (CH, C-9), 61.8 (OCH_3 , C-12), 32.9 (CH_2 , C-8), 32.5 (NCH_3 , C-11).

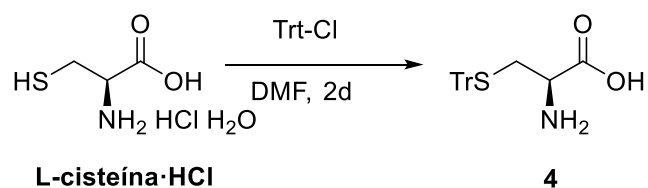
¹H RMN del compuesto 1:



¹³C RMN del compuesto 1



5.2.3 Síntesis de S-tritil-L-cisteína (4)



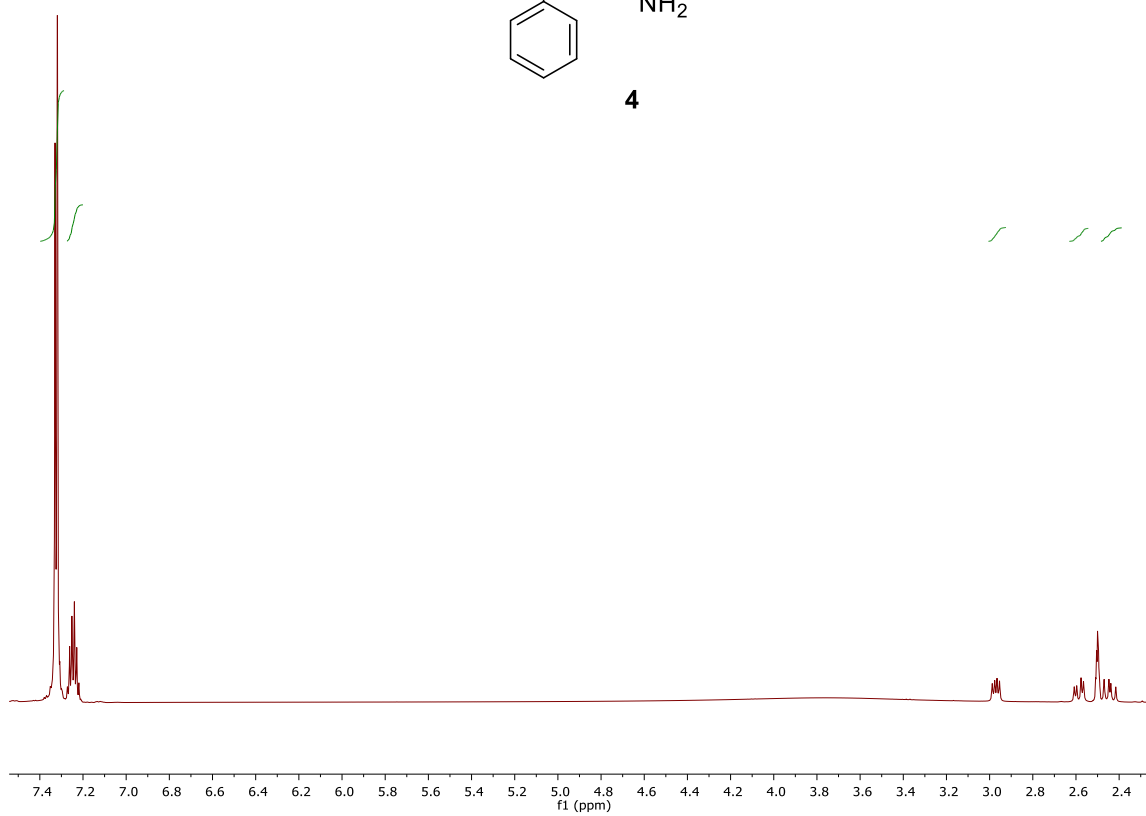
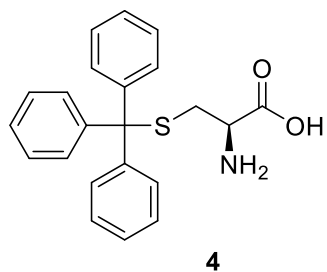
Se hizo reaccionar el producto de partida hidrocloreto de L-cisteína (1.00 g, 5.69 mmol) con cloruro de tritilo (2.38 g, 8.54 mmol) en DMF (5 mL) y se dejó agitando a temperatura ambiente durante dos días.

La elaboración de la reacción comenzó adicionando una disolución acuosa de NaOAc al 10 % (35 mL) para que se origine un precipitado blanco, facilitando la precipitación al enfriarla en un baño de hielo. El precipitado se filtró a vacío, se recoge en un balón, se redisolvió en acetona (40 mL) y se calentó a 50 °C con agitación durante 30 minutos. El precipitado se volvió a filtrar a vacío con lavados de acetona (15 mL) y Et₂O (25 mL) obteniéndose de esta manera 1.47 mg (rendimiento de un 71%) de S-tritil-L-cisteína (4).

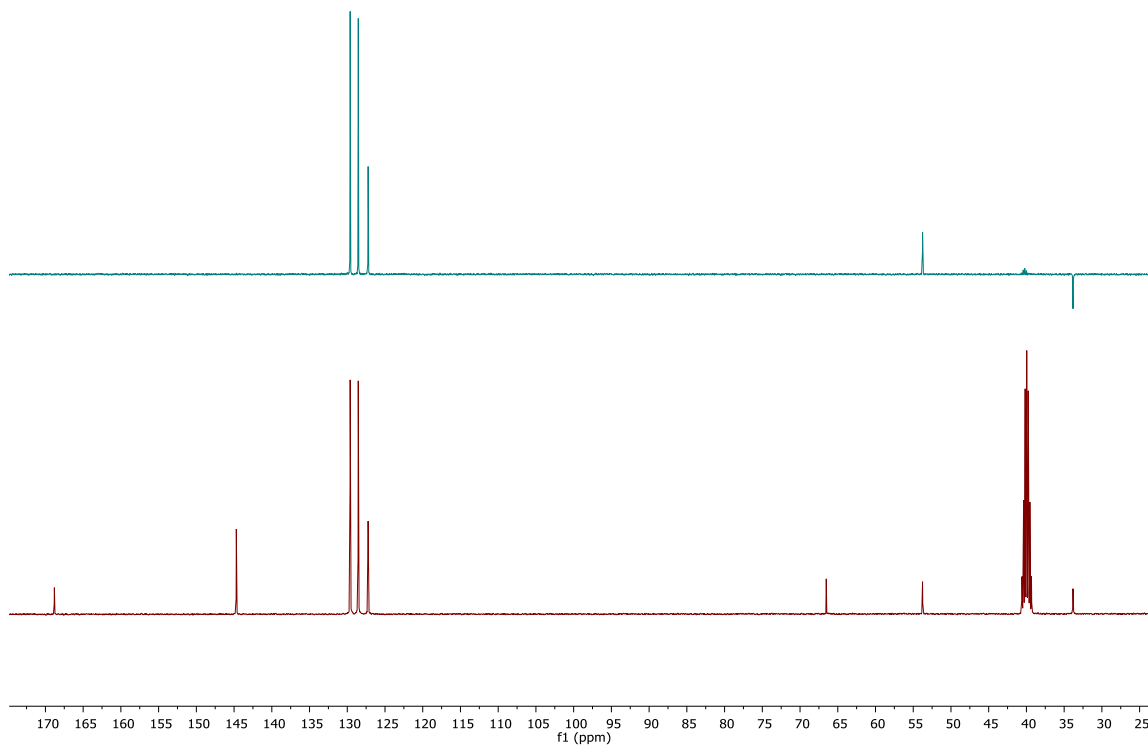
¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm: 7.45 – 7.15 (m, 15H, H-Aromáticos), 2.98 (dd, *J* = 8.9, 4.5 Hz, 1H, H-2), 2.59 (dd, *J* = 12.6, 4.5 Hz, 1H, H-3a), 2.45 (dd, *J* = 12.6, 8.9 Hz, 1H, H-3b).

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm: 168.8 (C, C-1), 144.7 (3 x C, Ci), 129.6 (4 x C, Cm), 128.5 (4 x C, Co), 127.2 (3 x C, Cp), 66.5 (C, C-4), 53.8 (CH, C-2), 33.8 (CH₂, C-3).

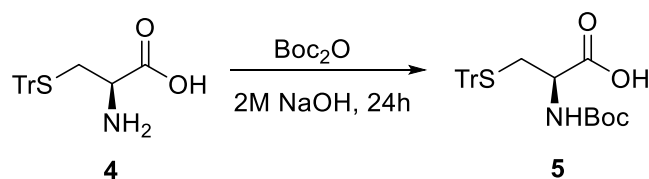
¹H NMR del compuesto 4



¹³C RMN del compuesto 4



5.2.4 Síntesis de *N*-(*tert*-butoxicarbonil)-*S*-tritol-L-cisteína (5)



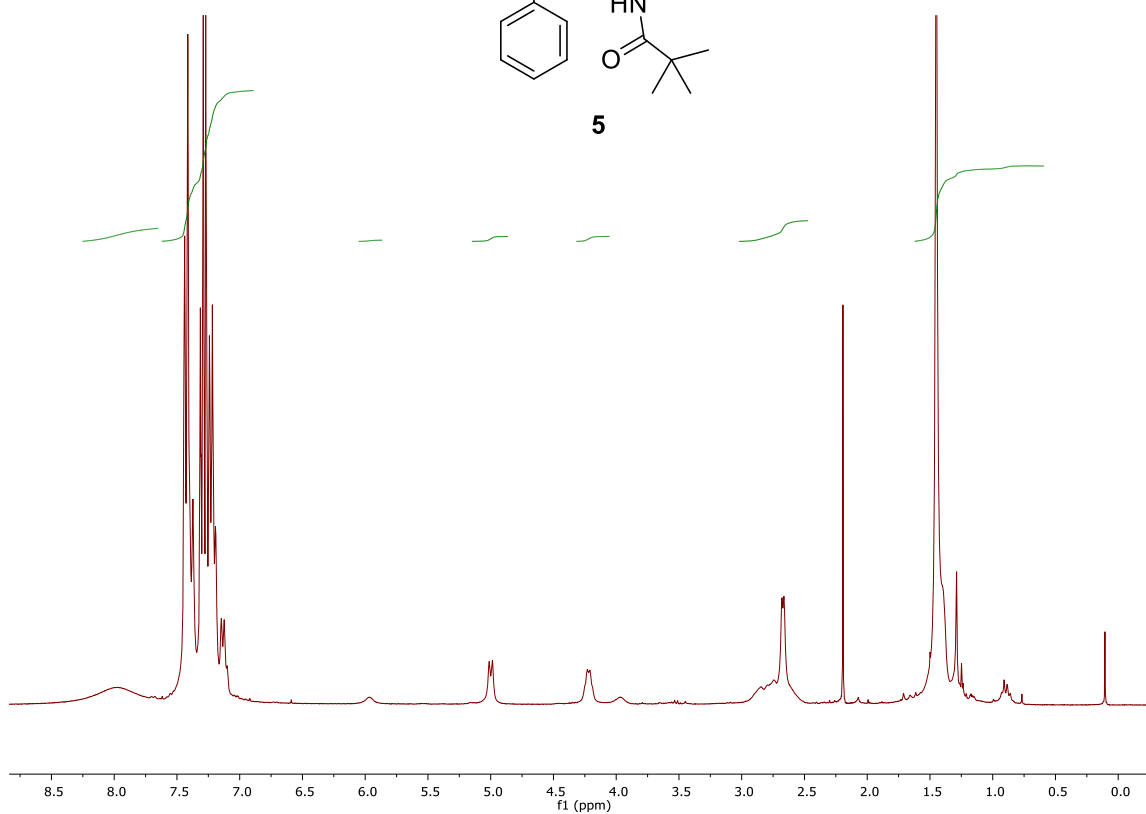
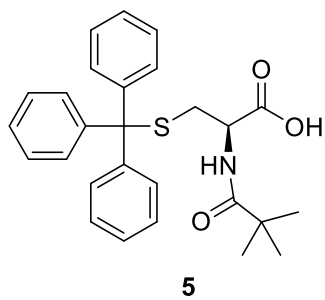
A 1.00 g de *S*-tritol-L-cisteína (**4**) (5.69 mmol) se adicionó una disolución acuosa de NaOH 2M (16mL) y el disolvente THF (2.2 mL), dejando agitar la mezcla de reacción hasta homogenizarla. A continuación se añadió el grupo protector Boc₂O (4.41 g, 6.47 mmol) y se dejó reaccionar bajo agitación durante 24 horas.

Se dejó 5 minutos en baño de hielo y se adicionó HCl comercial al 37% gota a gota para acidificar el medio (pH 1-2). Se extrajo con CH₂Cl₂ (3 x 30 mL) y las fases orgánicas se lavaron con salmuera (30 mL) y a continuación se secó con MgSO₄. Finalmente se evaporó el disolvente a presión reducida obteniéndose así 1.7 g de *N*-(*tert*-butoxicarbonil)-*S*-tritol-L-cisteína (**5**) con un rendimiento del 83%.

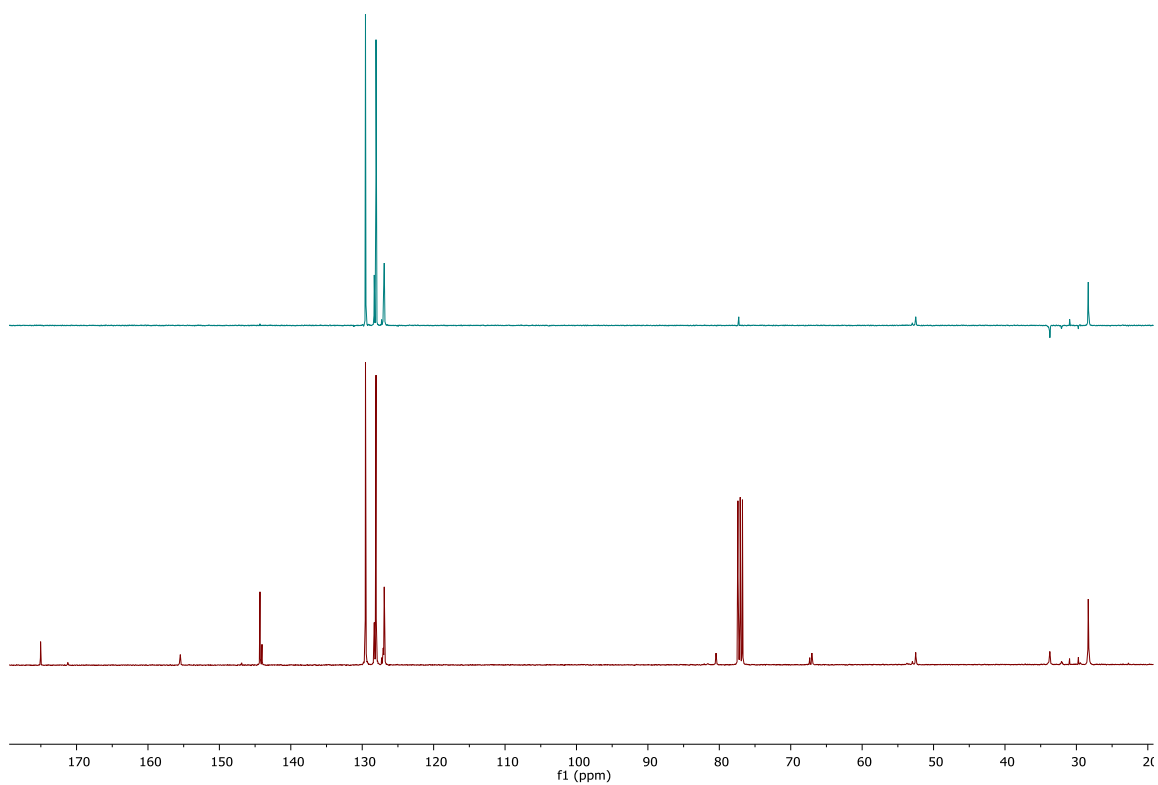
¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ ppm: 7.95 (s, 1H, OH), 7.73 – 6.86 (m, 15H, H aromáticos), 5.97 (s, 0H), 5.00 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 4.22 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H), 3.00 – 2.34 (m, 3H), 1.75 – 0.66 (m, 11H).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ ppm: 175.03 (C, C-1), 155.47 (C, C-5), 144.32 (C, Ci), 129.54 (C, Cm), 128.19 (C, Co) (d, *J* = 24.6 Hz), 127.0 (C, Cp) (d, *J* = 13.3 Hz), 80.5 (C, C-6), 67.04 (C, C-4), 52.5 (C, C-2), 29.7 (3 x CH₃, C-7/ C-8 / C-9), 28.3 (C, C-3).

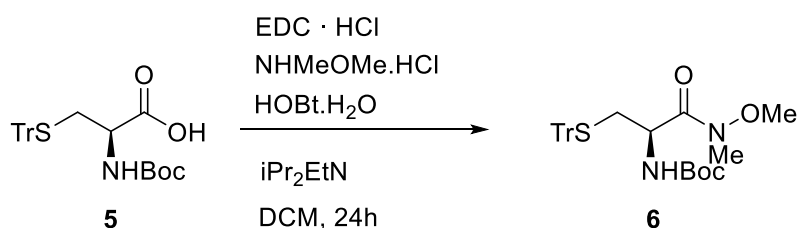
¹H RMN del compuesto 5



¹³C RMN del compuesto 5



5.2.5 Síntesis de *tert*-butilcarbamato de (*R*)-(1-(metoxi(metil)amino)-1-oxo-3-(trilitio)propan-2-ilo. (6)



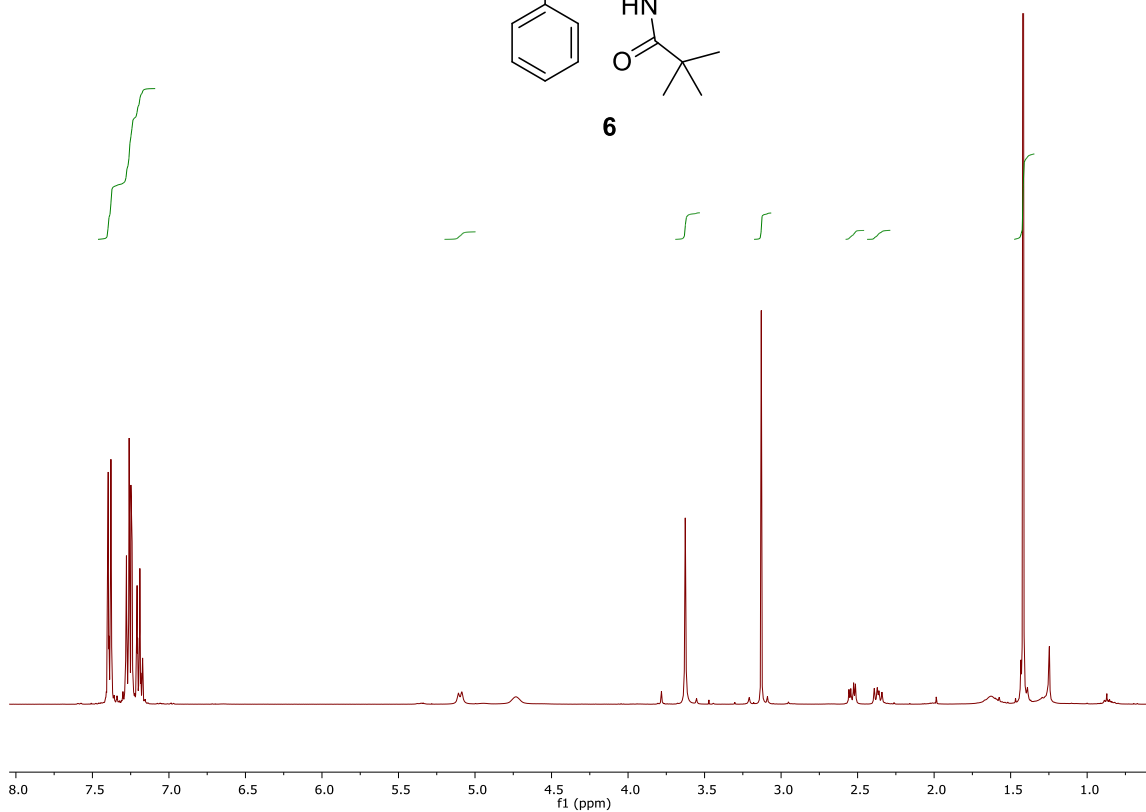
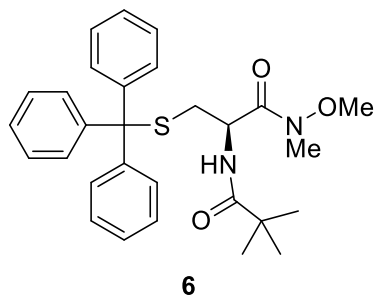
A 1.47 g de compuesto **5** (3.17 mmol) en un balón de fondo redondo se adicionó, con la ayuda de una jeringuilla, el disolvente seco CH_2Cl_2 (20 mL). Seguidamente se dejó en un baño de hielo a 0°C en agitación y se comenzaron a añadir los siguientes reactivos: hidrocloruro de *N*, *O*-dimetilhidroxilamina (1.12 g, 3.55 mmol), DIPEA (690.41 μmol , 3.96 mmol), EDC $\cdot\text{HCl}$ (790.23 mg, 4.12 mmol), HOBt $\cdot\text{H}_2\text{O}$ (631.27 mg, 4.12 mmol). La mezcla se mantuvo bajo agitación en un baño de hielo durante una hora y a continuación se dejó seguir reaccionando durante 24 horas a temperatura ambiente.

El disolvente se evaporó a presión reducida y se redisolvió el crudo en EtOAc (20 mL) y HCl 2.5% (20 mL). A continuación, se llevó a cabo la extracción líquido-líquido con EtOAc (3 x 30 mL) recogiendo las fases orgánicas y realizando lavados con NaHCO_3 (2 x 30 mL) y con NaCl (1 x 30 mL). Por último, se secó con MgSO_4 y se evaporó el disolvente a presión reducida. El producto se purificó por MPLC (*Medium Pressure Liquid Chromatography*), obteniéndose así 1.11 g de *tert*-butilcarbamato de (*R*)-1-(metoxi(metil)amino)-1-oxo-3-(trilitio)propan-2-ilo (**6**) con un rendimiento del 69 %.

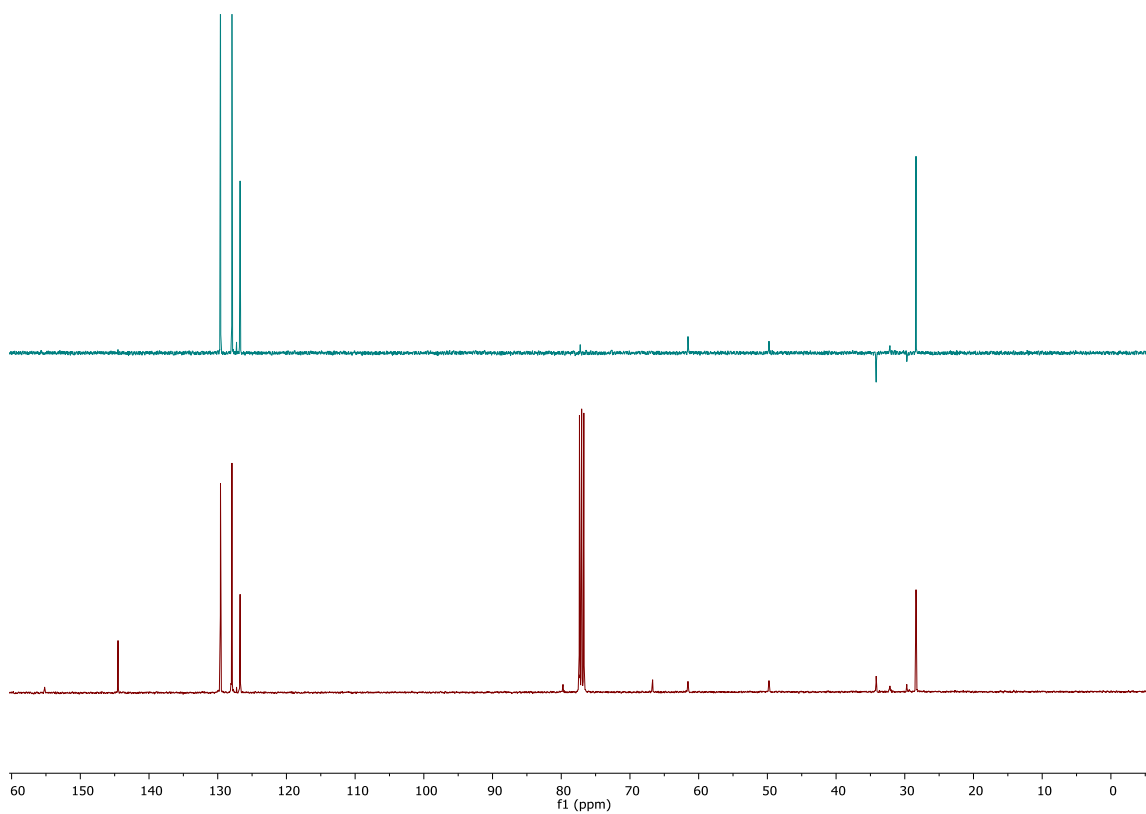
^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ ppm: 7.44 – 7.13 (m, 15H, Aromáticos), 5.10 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H, H-2), 3.63 (s, 3H, H-11), 3.13 (s, 3H, H-10), 2.54 (dd, $J = 12.1, 4.7$ Hz, 1H, H-3a), 2.37 (dd, $J = 12.1, 7.8$ Hz, 1H, H-3b), 1.42 (s, 9H, H-7/ H-8/ H-9).

^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ ppm: 171.14 (C, C-1), 155.2 (C, C-5), 144.5 (3 x C, Ci), 129.6 (6 x C, Co), 127.9 (6 x C, Cm), 126.7 (4 x C, Cp), 79.8 (C, C-6), 66.7 (C, C-4), 61.5 (CH_3 , C-11), 49.8 (CH, C-2), 34.2 (CH_2 , C-3), 32.2 (CH_3 , C-10), 28.4 (3 X CH_3 , C-7/ C-8/ C-9).

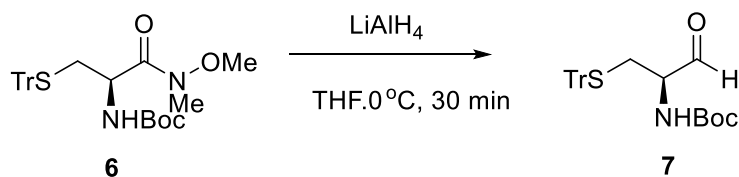
¹H RMN del compuesto 6



¹³C RMN del compuesto 6



5.2.6 Síntesis de *tert*-butilcarbamato de (*R*)-1-oxo-3-(trilitio) propan-2-ilo. (7)

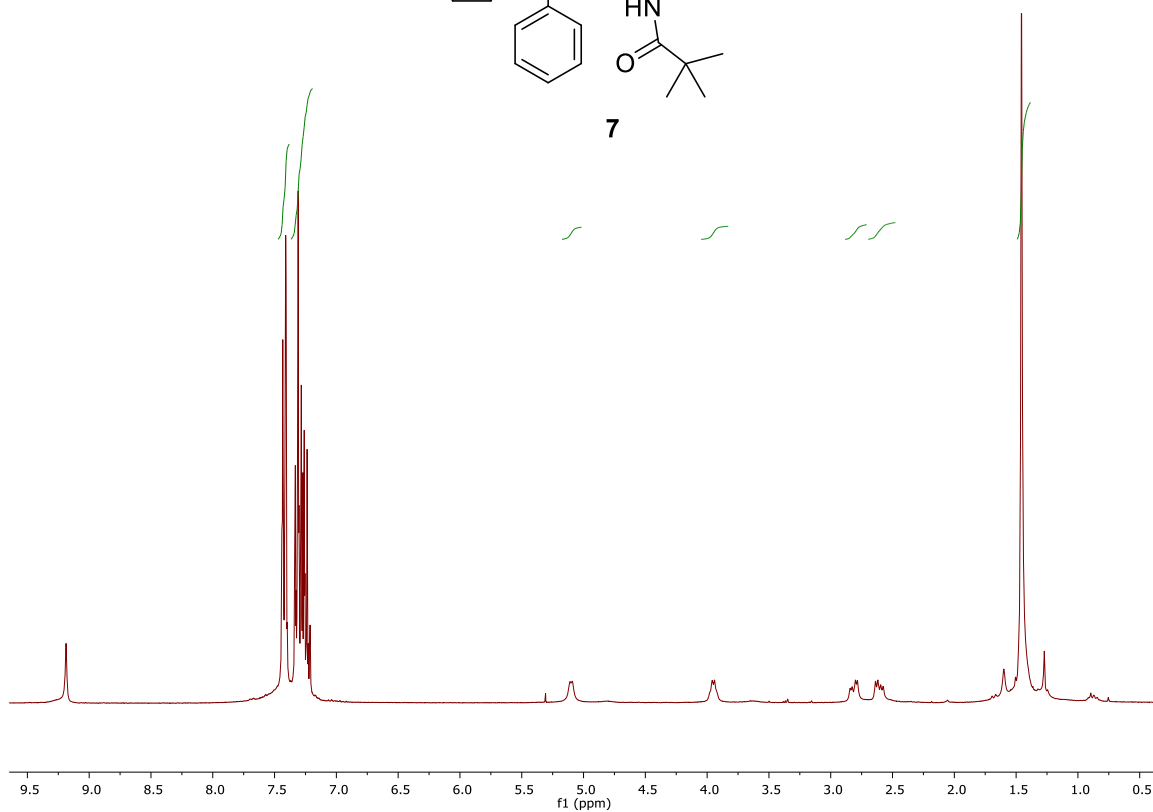
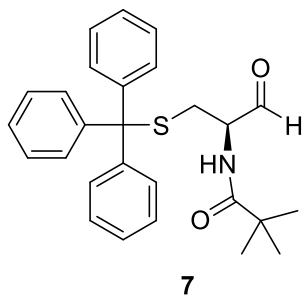


A la amida de Weinreb **6** (300 mg, 592.11 μ mol) se le adicionó THF seco (6 mL) y se dejó en el baño de hielo a 0°C. A continuación se añadió el agente reductor LiAlH_4 (67.42 mg, 1.78 mmol) y se dejó en agitación durante 30 minutos. Al cabo de ese tiempo a la mezcla de reacción se añadió EtOAc (4.5 mL), NaHPO_4 (2.7 g) y NaHCO_3 (2.7 mL) y se agitó durante 15 minutos. A continuación, se extrajo con CH_2Cl_2 (8 mL) y la fase orgánica se secó con MgSO_4 . Se filtró el crudo en una placa filtrante con celita, se recogió el filtrado y se llevaron a cabo los lavados en un embudo de decantación con HCl 1M 2.5% (2 x 30 mL) y con disolución saturada de cloruro de sodio (2 x 30 mL). El producto se secó con MgSO_4 y se evaporó el disolvente a presión reducida obteniendo un producto aceitoso de color amarillo. Este producto se purificó por cromatografía de columna de gel de sílice utilizando como eluyente una mezcla de Hex/EtOAc con proporciones de 30:1. Finalmente se obtuvieron 191.4 mg (rendimiento del 72%) de *tert*-butilcarbamato de (*R*)-1-oxo-3-(trilitio) propan-2-ilo (**8**) que presenta un aspecto espumoso de color blanco.

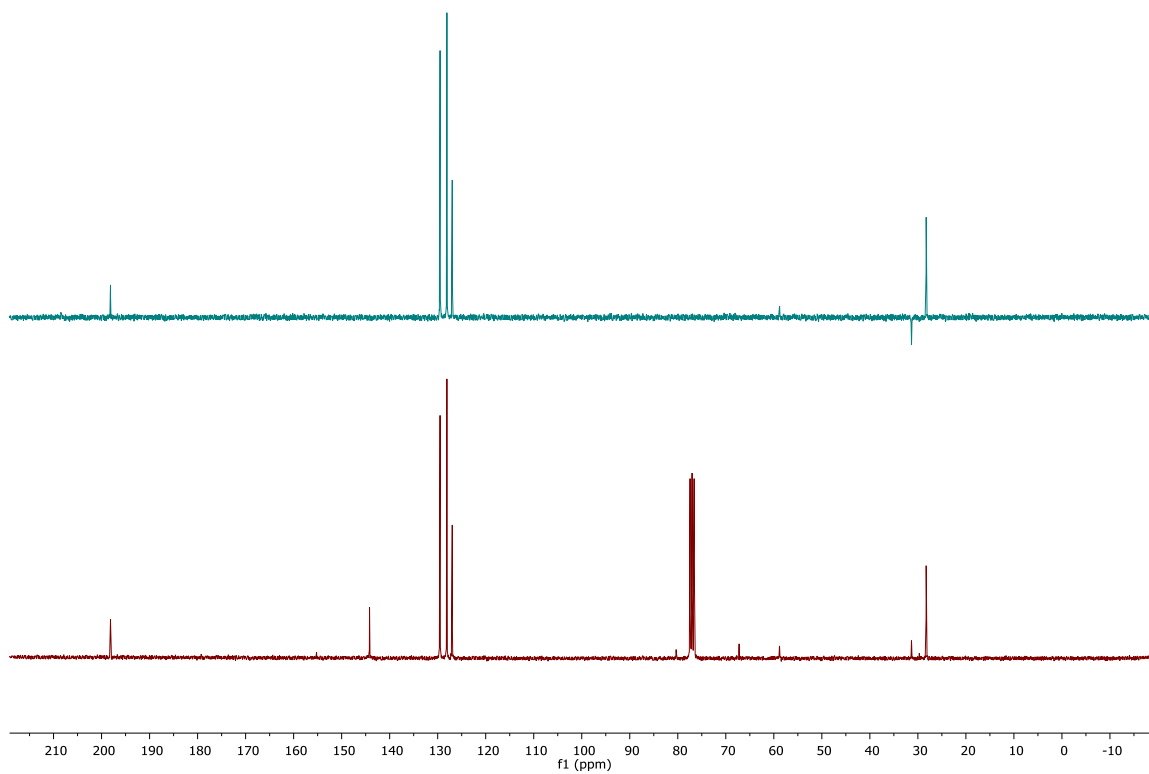
^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ ppm: 9.19 (s, 1H, COH), 7.46 – 7.20 (m, 15H, Aromáticos), 5.10 (d, $J = 6.7$ Hz, 1H, NH), 3.95 (d, $J = 6.2$ Hz, 1H, H-2), 2.81 (dd, $J = 12.9, 5.1$ Hz, 1H, H-3a), 2.61 (dd, $J = 12.9, 6.0$ Hz, 1H, H-3b), 1.46 (s, 9H, Boc).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ ppm: 198.1 (C, C-1), 155.2 (C, C-5), 144.2 (C, Ci), 129.5 (C, Cm), 128.1 (C, Co), 127.0 (C, Cp), 80.3 (C, C-6), 67.2 (C, C-2), 58.8 (C, C-4), 31.3 (C, C-7/ C-8/ C-9), 28.3 (C, C-3).

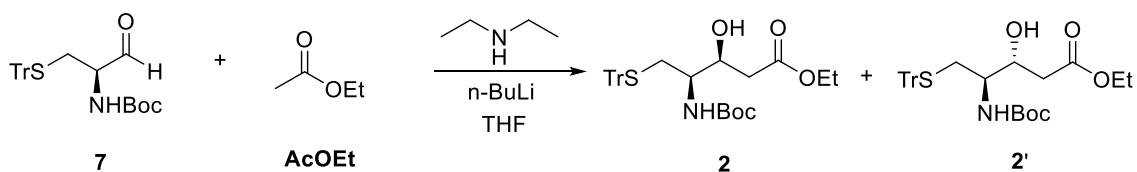
¹H RMN del compuesto 7



¹³C RMN del compuesto 7



5.2.7 Síntesis del compuesto etil (3*S*, 4*R*)-4-((*terc*-butoxicarbonil) amino) — hidroxi-5-(trilitio) pentanoato (2 y 2').



En un balón se añade THF seco (5 mL) y se coloca la reacción en agitación en un baño a -78°C en el cryocool. Se fueron añadiendo los reactivos, DIPA (135.15 mg, 1.34 mmol), n-BuLi (85.55 mg, 1.34 mmol) y se dejó agitando durante 15 minutos. Por último, se añadió 130.6 mL EtOAc seco (1.34 mmol) y se dejó reaccionar 45 minutos. En otro balón, que contiene 170.8 mg del aldehído protegido (**8**) (381.60 μmol), se adicionó THF seco (2 mL) y se canuló toda la disolución hasta el otro balón. Con las dos disoluciones mezcladas, se dejó en agitación durante 45 minutos a -78°C .

Posteriormente, se añadieron 3 mL de NH_4Cl y se retiró del baño de -78°C , dejando que se acondicione la mezcla de reacción a temperatura ambiente. Posteriormente, se realizó una extracción líquido-líquido con EtOAc (3 x 20 mL), las fases orgánicas se secaron con MgSO_4 y se evaporó el disolvente a presión reducida. El producto obtenido se separó por cromatografía en columna. Se obtuvieron 68.4 mg (rendimiento del 33.5%) de **2**, 47.6 mg de **2'** (rendimiento del 23%) y 27.9 mg de la mezcla de ambas (rendimiento del 13.6 %).

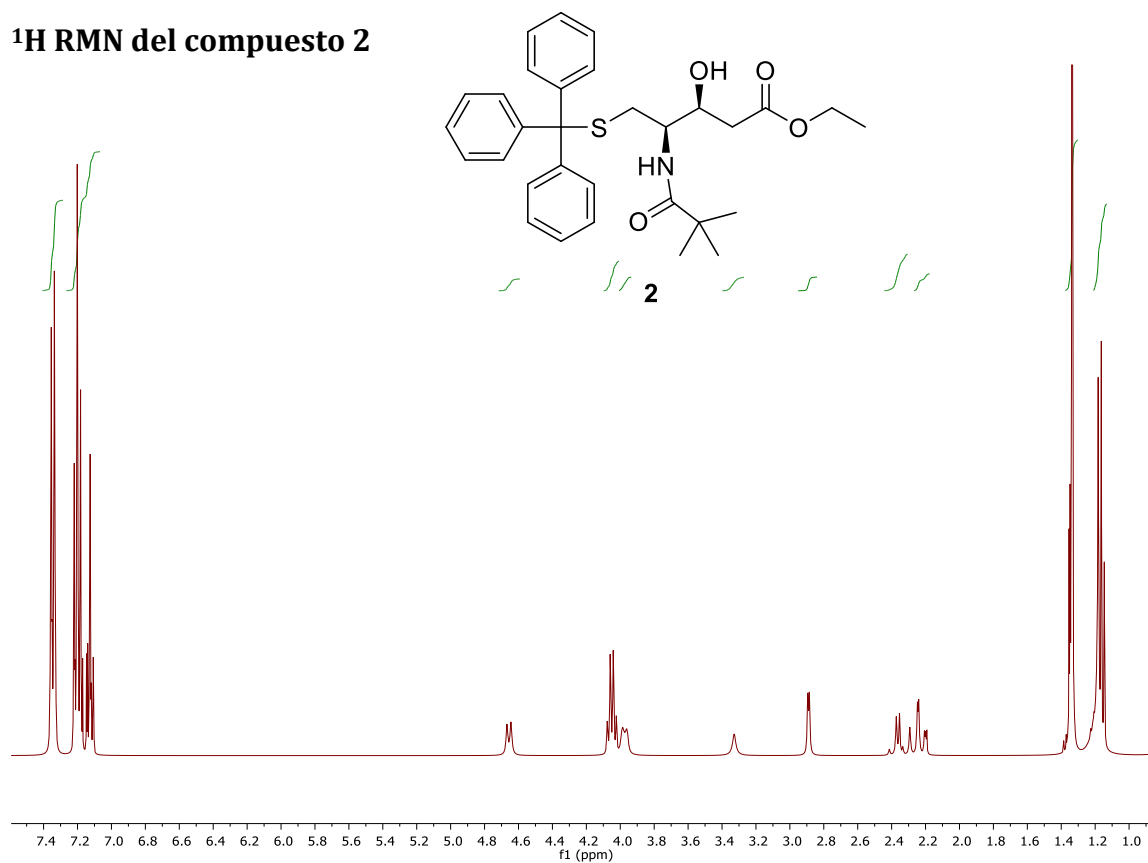
$^1\text{H NMR 2}$ (400 MHz, CDCl_3) δ ppm: 7.41 – 7.05 (m, 15H, Aromáticos), 4.66 (d, $J = 9.5$ Hz, 1H, NH), 4.05 (q, $J = 7.2, 1.2$ Hz, 2H, CH_2), 3.98 (d, 1H, H-3), 3.38 – 3.28 (m, 1H, H-4), 2.89 (d, $J = 3.8$ Hz, 1H, OH), 2.41 – 2.19 (m, 2H, 5a/ 5b), 2.22 (dd, 1H, H-2), 1.34 (s, 9H, Boc), 1.17 (q, $J = 6.9$ Hz, 3H, CH_3).

$^1\text{H NMR 2'}$ (400 MHz, CDCl_3) δ ppm: 7.41 – 7.05 (m, 15H, Aromáticos), 4.59 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H, NH), 4.04 (q, $J = 7.1$ Hz, 2H, CH_2), 3.82 (s, 1H, H-3), 3.44 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H, H-4), 3.20 (s, 1H, OH), 2.52 (dd, $J = 12.9, 7.3$ Hz, 1H, H-5a), 2.32 (dd, $J = 12.7, 4.0$ Hz, 1H, H-5b), 2.15 (dd, $J = 16.5, 9.1$ Hz, 1H, H-2), 1.35 (s, 9H, Boc), 1.16 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H, CH_3).

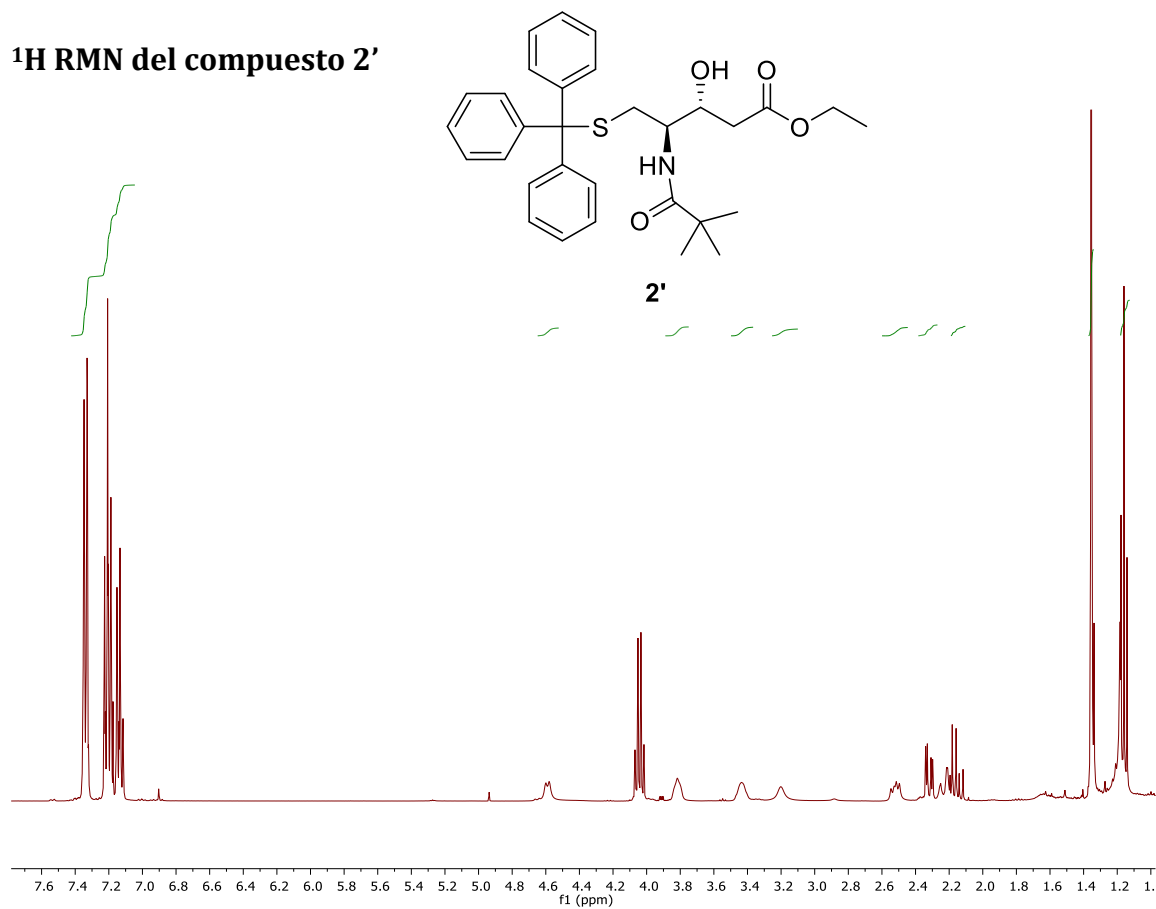
$^{13}\text{C NMR 2}$ (100 MHz, CDCl_3) δ ppm: 172.9 (CO, C-1), 155.7 (C, C-7), 144.8 (3 x C, Ci), 129.7 (6 x C, Cm), 128.04 (6 x C, Co), 126.8 (3 x C, Cp), 79.6 (C, C-8), 68.1 (CH, C-3), 67.0 (C, C-6), 60.9 (C H_2 , C-12), 53.4 (CH, C-4), 38.7 (CH_2 , C-2), 28.5 (3 x CH_3 , C-9/ C-10/ C-11), 27.0 (CH_2 , C-5), 14.3 (C H_3 , C-13).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ ppm: 172.6 (CO, C-1), 155.6 (C, C-7), 144.6 (3 x C, Ci), 129.7 (6 x C, Cm), 128.0 (6 x C, Co), 126.8 (3 x C, Cp), 79.8 (C, C-8), 70.0 (CH, C-3), 67.0 (C, C-6), 60.81 (C H₂, C-12), 53.8 (CH, C-4), 38.1 (CH₂, C-2), 29.7 (CH₃, C-9/ C-10/ C-11), 28.4 (CH₂, C-5), 14.2 (CH₃, C-13).

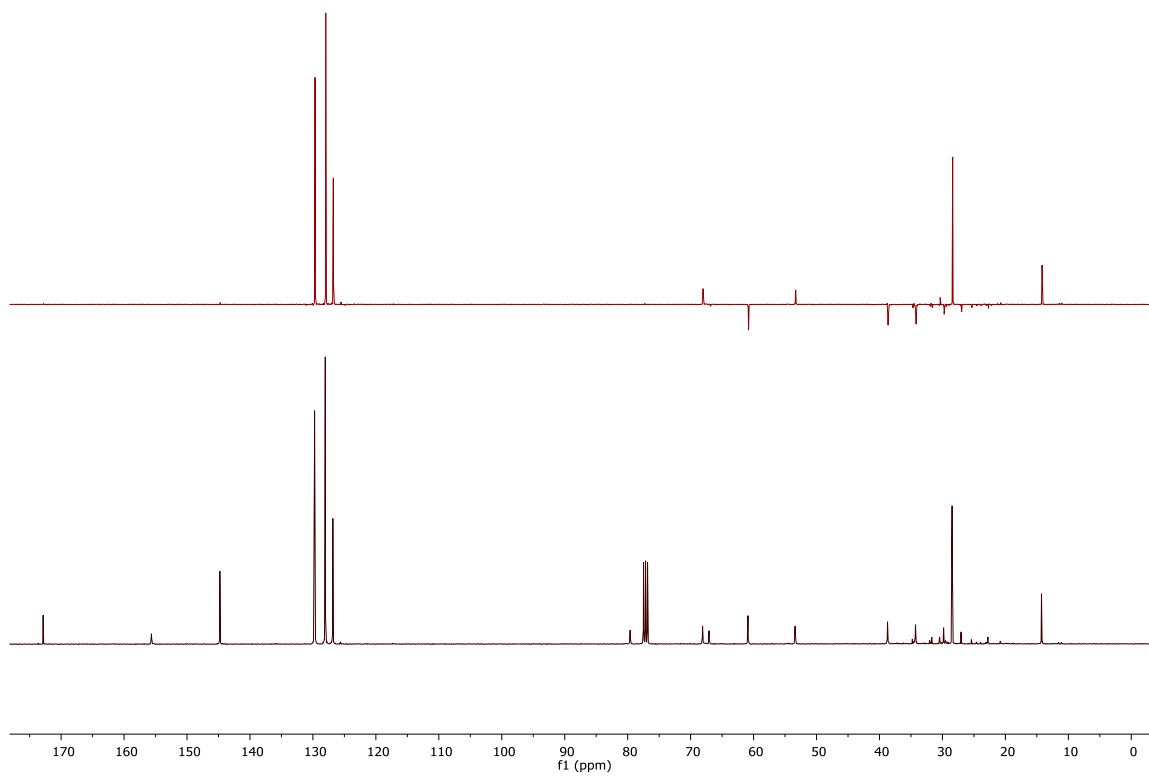
¹H RMN del compuesto 2



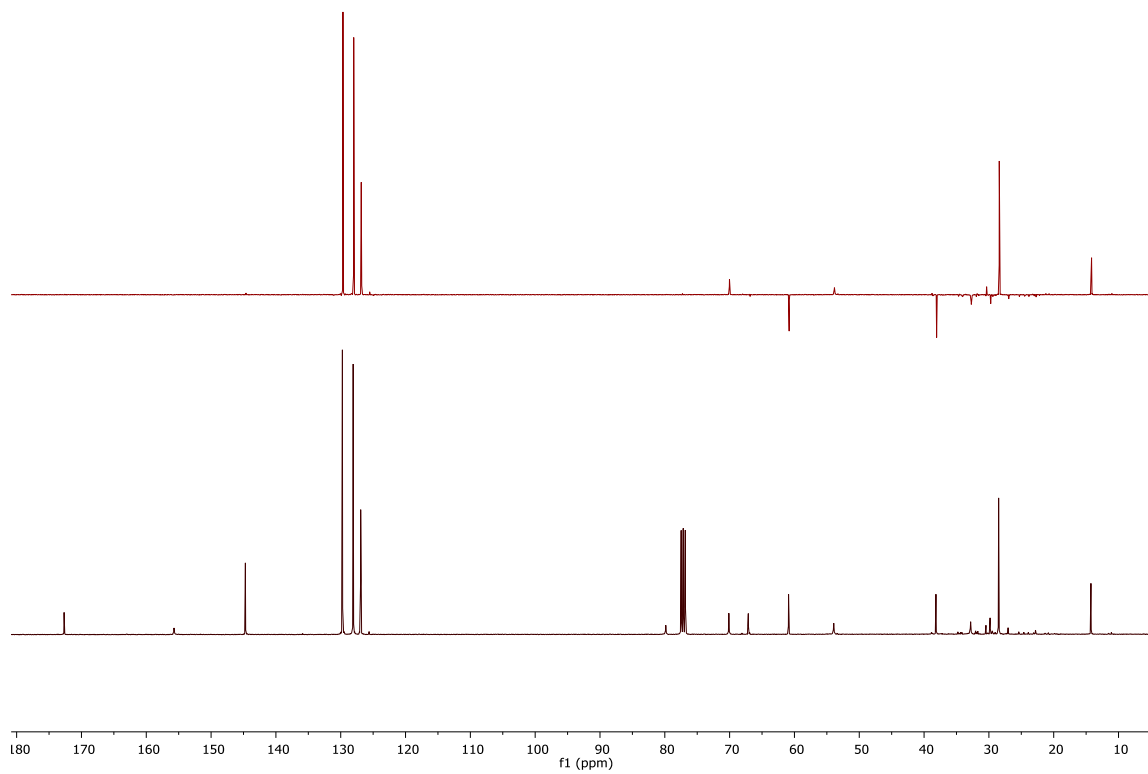
¹H RMN del compuesto 2'



¹³C RMN del compuesto 2



¹³C RMN del compuesto 2'



CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

En el presente trabajo de fin de Grado, se han llevado a cabo distintos tipos de reacciones con el objetivo de obtener los intermedios **1** y **2**, que podrán utilizarse posteriormente para continuar con la síntesis de piscibactina, sideróforo biosintetizado por la bacteria *Photobacterium damsela* subs. *piscicida*, responsable de la fotobacteriosis en peces.

Por lo tanto, tras los objetivos planteados anteriormente, se han obtenido los siguientes resultados:

- La síntesis de tiazolina **1**, un precursor del fragmento A, necesario en la síntesis total de piscibactina, mediante reacciones que abarcan la formación de una amida de Weinreb a partir de un ácido carboxílico.
- La síntesis del alcohol **2**, precursor del fragmento B, necesario en la síntesis total de piscibactina, a través de una metodología que incluye reacciones de protección de grupos funcionales, la formación de una amida de Weinreb y su posterior reducción a aldehído, seguido de un acoplamiento con EtOAc.
- La caracterización correcta de todos los productos obtenidos en las distintas síntesis llevadas a cabo para la obtención de los intermedios **1** y **2**, obteniéndose una cantidad de ambos en escala de gramos de manera satisfactoria.

También se han desarrollado distintas competencias a lo largo de la elaboración de la parte experimental y teórica en este trabajo de fin de grado:

- Búsqueda bibliográfica sobre diferentes estrategias de síntesis o sobre marco teórico del problema, implicando así un mayor conocimiento en el uso de programas de búsqueda de información.
- Aprendizaje en el laboratorio de las distintas técnicas más habituales en la síntesis orgánica en distintas condiciones: anhídridas, bajas temperaturas, etc,
- Aplicación de estrategias de separación y purificación de los compuestos obtenidos durante los procesos sintéticos.

- Aprendizaje en el uso de los equipos de técnicas espectroscópicas principalmente RMN
 - Desarrollo en la interpretación de los resultados obtenidos en espectros de ^1H -RMN y ^{13}C -RMN.

CONCLUSIONS

In the present final degree project, different types of reactions were carried out in order to obtain the intermediates **1** and **2**, which may then be used to continue with the synthesis of piscibactin, siderophore biosynthesized by the bacterium *Photobacterium damsela* subs. *piscicida* responsible for the photobacteriosis in fish.

Therefore, the following results have been achieved:

- The synthesis of thiazoline **1**, a precursor of fragment A that is necessary in the total synthesis of piscibactin, by means of reactions that include the formation of a Weinreb amide from a carboxylic acid.
- The synthesis of alcohol **2**, precursor of fragment B that is necessary in the total synthesis of piscibactin, based on a methodology that include the protection of functional groups, the formation of a Weinreb amide and its subsequent reduction to aldehyde, followed by a coupling with EtOAc.
- The correct characterization of all the products obtained in the different synthesis carried out to obtain intermediates **1** and **2**, obtaining both successfully in gram scale.

Different competences have also been developed throughout the elaboration of the experimental and theoretical part in this final degree project:

- Literature search for different synthesis strategies or theoretical framework, involving a greater knowledge for the use of information search programs.
- Learning in the laboratory of the most common techniques of organic synthesis in different conditions: anhydrides, low temperatures, etc.
- Application of separation strategies and purification of the compounds during the synthetic processes.
- Learning in the use of spectroscopic techniques equipment, mainly NMR.
- Development in the interpretation of the results obtained in $^1\text{H-NMR}$ and $^{13}\text{C-NMR}$.

AGRADECIMIENTOS

A mi familia por apoyarme siempre.

A los directores Carlos Jiménez González y Jaime Rodríguez González por ayudarme, aconsejarme y permitirme llevar a cabo este Trabajo de Fin de Grado en su grupo de investigación.

A Carmen de la Fuente Seijo por su apoyo y ayuda en todo momento y dedicarme su tiempo en cada paso del proyecto. Por enseñarme a trabajar y a manejarme en el laboratorio de investigación y resolver todas mis dudas.

Al resto del grupo de investigación por toda su amabilidad y ayuda en el laboratorio cuando me hizo falta.

A Graciela, Sara, Sabela, Rebeca y Virginia por ser las mejores amigas que se pueden tener, por estar siempre ahí y por hacerme pasar los mejores momentos junto a ellas.

A Sara, Alberto, Ángel y Adrián, que son lo mejor que me llevo de la carrera.

REFERENCIAS

- (1) Fernández Casal, J. Acuicultura en Galicia: Balance de 25 años y perspectivas para los siguientes 25. *AquaTIC* **2013**, 39, 11–22.
- (2) Decostere, A.; Tobback, E.; Hermans, K.; Haesebrouck, F.; Chiers, K. *Yersinia ruckeri* infections in salmonid fish. *J. Fish Dis.* **2007**, 30, 257–268.
- (3) Toranzo, A. E.; Barja, J. L. A review of the taxonomy and seroepizootiology of *Vibrio anguillarum*, with special reference to aquaculture in the northwest of Spain. *Dis. Aquat. Organ.* **1990**, 9, 73–82.
- (4) Balado, M.; Osorio, C. R.; Lemos, M. L. A gene cluster involved in the biosynthesis of vanchromobactin, a chromosome-encoded siderophore produced by *Vibrio anguillarum*. *Microbiology* **2006**, 152, 3517–3528.
- (5) Janda, J. M.; Abbott, S. L. The genus *Aeromonas*: taxonomy, pathogenicity, and infection. *Clin. Microbiol. Rev.* **2010**, 23, 35–73.
- (6) Toranzo, A. E.; Magariños, B.; Romalde, J. L. A review of the main bacterial fish diseases in mariculture systems. *Aquaculture* **2005**, 246, 37–61.
- (7) Johansen, L.-H.; I. Jensen, H. M.; Bjørn, P.-A.; Jansen, P. A.; Bergh, Ø. Disease interaction and pathogens exchange between wild and farmed fish populations with special reference to Norway. *Aquaculture* **2011**, 315, 167–186.
- (8) 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, 2015.
- (9) Romalde, J. L.; Ravelo, C.; Valdés, I.; Magariños, B.; de la Fuente, E.; San Martín, C.; Avendaño-Herrera, R.; Toranzo, A. E. *Streptococcus Phocae*, an emerging pathogen for salmonid culture. *Vet. Microbiol.* **2008**, 130, 198–207.
- (10) Wandersman, C.; Delepelaire, P. Bacterial iron sources: from siderophores to hemophores. *Annu. Rev. Microbiol.* **2004**, 58, 611–647.
- (11) Harris, W. R.; Raymond, K. N. Ferric Ion sequestering agents. 3. The spectrophotometric and potentiometric evaluation of two new enterobactin analogues: 1,5,9-*N, N', N'*-tris(2,3-dihydroxybenzoyl)- cyclotriazatridecane and 1,3,5-*N, N', N'*-Tris(2,3- dihydroxybenzoyl)triarninomethylbenze. *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, 101, 6534–6541.
- (12) Hider, R. C.; Kong, X. Chemistry and biology of siderophores. *Nat. Prod. Reports* **2010**, 27, 637–657.
- (13) Lemos, M. L.; Osorio, C. R. Heme, an iron supply for *Vibrios* pathogenic for fish. *Biometals* **2007**, 615–626.
- (14) Kornreich-Leshem, H.; Ziv, C.; Gumienna-Kontecka, E.; Arad-Yellin, R.; Chen, Y.; Elhabiri, M.; Albrecht-Gary, A.-M.; Hadar, Y.; Shanzler, A. Ferrioxamine B analogues: targeting the FoxA uptake system in the pathogenic *Yersinia enterocolitica*. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 1137–1145.
- (15) Górska, A.; Sloderbach, A.; Marszall, M. Siderophore-drugs complexes: potential

- medicinal applications of the “Trojan horse” strategy. *Trends Pharmacol. Sci.* **2014**, 35 (9), 442–449.
- (16) Schalk, I. J.; Hannauer, M.; Braud, A. New roles for bacterial siderophores in metal transport and tolerance. *Environ. Microbiol.* **2011**, 13 (11), 2844–2854.
- (17) Miethke, M.; Marahiel, M. A. Siderophore-based iron acquisition and pathogen control. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2007**, 71, 413–451.
- (18) Nagoba, B.; Vedpathak, D. Medical applications of siderophores. *Electron. J. Gen. Med.* **2011**, 8 (3), 229–235.
- (19) Urbanczyk, H.; Ast, J. C.; Dunlap, P. V. Phylogeny, genomics, and symbiosis of photobacterium. *FEMS Microbiol. Rev.* **2011**, 35, 324–342.
- (20) Osorio, C. R.; Río, S. J.; Lemos, M. L. A siderophore biosynthesis gene cluster from the fish pathogen *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* is structurally and functionally related to the yersinia high-pathogenicity island. *Microbiology* **2006**, 152, 3327–3341.
- (21) Magariños, B.; Toranzo, A. E.; Romalde, J. L. Phenotypic and pathobiological characteristics of *Pasteurella piscicida*. *Annu. Rev. Fish Dis.* **1996**, 6, 41–64.
- (22) Magariños, B.; Romalde, J. L.; Toranzo, A. E.; Martínez, M.; Congregado, F. Influence of the capsular layer on the virulence of *Pasteurella piscicida* for fish. *Microb. Pathog.* **1996**, 21, 289–297.
- (23) Magariños, B.; Romalde, J. L.; Lemos, M. L.; Barja, J. L.; Toranzo, A. E. Iron uptake by *Pasteurella piscicida* and its role in pathogenicity for fish. *Appl. Environ. Microbiol.* **1994**, 60, 2990–2999.
- (24) Souto, A.; Montaños, M. A.; Rivas, A. J.; Balado, M.; Osorio, C. R.; Rodríguez, J.; Lemos, M. L.; Jiménez, C. Structure and biosynthetic assembly of piscibactin, a siderophore from *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*, predicted from genome analysis. *European J. Org. Chem.* **2012**, 5693–5700.
- (25) Cox, C. D.; Rinehart, K. L.; Moore, M. L.; Cook, C. Pyochelin: novel structure of an iron-chelating growth promoter for *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **1981**, 78 (7), 4256–4260.
- (26) Ankenbauer, R. .; Toyokuni, T.; Staley, A.; Rinehart, K. L.; Cox, C. D. synthesis and biological activity of pyochelin, a siderophore of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **1988**, 170, 5344–5351.
- (27) Drechse, H.; Stephan, H.; Lotz, R.; Haag, H.; Zahner, H.; Hantke, K.; Jun, G. structure elucidation of yersiniabactin, a siderophore from highly virulent *Yersinia* strains. *Liebigs Ann* **1995**, 1727–1733.
- (28) Ino, A.; Murabayashi, A. Synthetic studies of thiazoline and thiazolidine-containing natural products. Part 3: total synthesis and absolute configuration of the siderophore yersiniabactin. *Tetrahedron Lett.* **3 2001**, 57 (10), 1897–1902.
- (29) Segade, Y.; Montaños, M. A.; Rodríguez, J.; Jiménez, C. A Short stereoselective synthesis of prepiscibactin using a smi2-mediated reformatsky reaction and zn²⁺-induced asymmetric thiazolidine formation. *Org. Lett.* **2014**, 16, 5820–5823.