



Máster Universitario en Investigación Química y Química Industrial

Preparación de análogos de las amonabactinas y su posible aplicación
como antimicrobianos contra la forunculosis

Preparación de análogos das amonabactinas e a súa posible
aplicación como antimicrobianos contra a forunculosis

Preparation of analogues of amonabactins and their possible
application as antimicrobials against furunculosis

Director(es): Carlos Jiménez González

Jaime Rodríguez González

Almudena Saavedra Bouza

Julio 2018

ÍNDICE

Abreviaturas	0
Resumen.....	1
Introducción	5
Enfermedades infecciosas en peces causadas por la presencia de bacterias en sistemas de acuicultura	6
La importancia del hierro	8
Sideróforos	9
Mecanismo de actuación de los sideróforos	10
Tipos de sideróforos.....	11
Aplicaciones de los sideróforos	11
Antecedentes.....	17
Sideróforo de la bacteria patógena de peces <i>Aeromonas salmonicida</i> subsp. <i>salmonicida</i> ...	19
Objetivos	25
Parte experimental	29
Preparación de los análogos de amonabactinas	29
Síntesis del compuesto 3	29
Síntesis del compuesto 5	30
Síntesis del compuesto 6	31
Síntesis del compuesto 8	32
Síntesis del compuesto 9	33
Síntesis del compuesto 10	34
Síntesis del compuesto 12	35
Síntesis del compuesto 13	36
Síntesis del compuesto 14	37
Síntesis del compuesto 15	38
Síntesis del compuesto 17	39
Síntesis del compuesto 18	40
Síntesis del compuesto 19	41
Síntesis del compuesto 20	42
Aislamiento de las amonabactinas naturales	43
Detección de la presencia de sideróforos producidos por <i>A. salmonicida</i> subsp. <i>salmonicida</i> en un cultivo bacteriano.	43
Aislamiento de amonabactinas.....	43

Purificación de amonabactinas	43
Resultados y discusiones	47
Preparación de los análogos de amonabactinas	47
Preparación del análogo A (10).....	47
Preparación del análogo B (20).....	49
Aislamiento de las amonabactinas naturales	51
Ensayos de la actividad siderófora.....	56
Conclusiones.....	61
Bibliografía	65
Anexos.....	69

Abreviaturas

ADN ácido desoxirribonucleico

ARN ácido ribonucleico

atm atmósfera

Bn bencilo

Boc *tert*-butoxicarbonilo

c cuádruplete

°C grado Celsius

Cbz benciloxicarbonilo

d doblete

dd doble doblete

ddd doble doblete de dobletes

DIPEA N,N-diisopropiletilamina

DMF N,N-dimetilformamida

dt doble triplete

EDC 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida

g gramos

h hora

Hz hercio

HPLC High Performance Liquid Chromatography (Cromatografía líquida de alta resolución)

iPr isopropilo

J constante de acoplamiento

LR Low Resolution (Baja resolución)

M concentración molar

m multiplete

m/z relación masa/carga del ión

mL mililitro

mmol milimol

MPLC Medium Pressure Liquid Chromatography (Cromatografía líquida de media presión)

MS Mass Spectrometry (Espectrometría de masas)

RMN Resonancia Magnética Nuclear

s singulete

sa singulete ancho

t triplete

TBTU tetrafluoroborato de O-(1H-Benzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio

td triple doblete

TFA ácido trifluoroacético

THF tetrahidrofurano

v/v porcentaje volumen/volumen

δ desplazamiento químico en ppm (RMN)

λ longitud de onda

μL microlitro

RESUMEN

Resumen

Aeromonas salmonicida subsp. *salmonicida* es una proteobacteria Gram-negativa identificada como el agente causal de la enfermedad infecciosa llamada forunculosis, que afecta a peces de acuicultura provocando importantes pérdidas económicas.

Por otra parte, el hierro es un micronutriente esencial para todos los organismos vivos ya que está implicado en reacciones enzimáticas fundamentales. Una de las estrategias más comunes para la captación de hierro (III) en bacterias es la producción de sideróforos.

Se ha demostrado que la mayoría de las cepas de *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* producen simultáneamente dos tipos de sideróforos: acinetobactina y tipo amonabactina. Estudios más recientes sugirieron que las proteínas FstC y FstB son los receptores de membrana de las amonabactinas. Sin embargo, el receptor de proteína específico para cada amonabactina aún no se conoce.

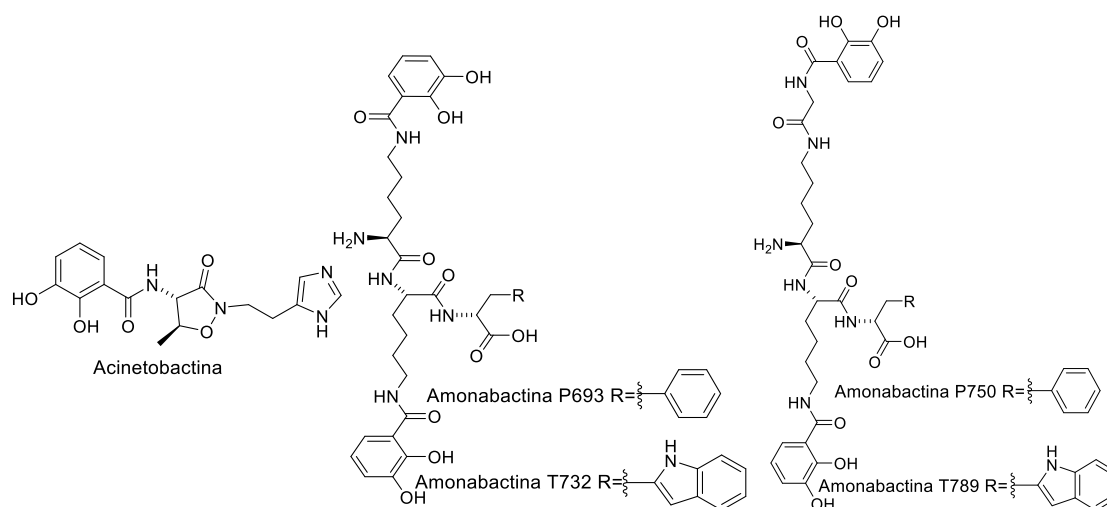


Figura 1. Estructura de las amonabactinas y de la acinetobactina.

El presente Trabajo de Fin de Máster se centra en la síntesis de varios análogos de las amonabactinas junto con el aislamiento de las amonabactinas naturales de los sobrenadantes de cultivo de *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* para determinar los requisitos estructurales necesarios para el reconocimiento molecular de cada receptor de membrana (FstB y / o FstC).

SUMMARY

Aeromonas salmonicida subsp. *salmonicida* is a Gram-negative proteobacteria identified as the causative agent of the infectious disease called furunculosis, that affects aquaculture fish causing important economic losses.

On the other hand iron is an essential micronutrient for all the living organisms and it is involved in fundamental enzymatic reactions. One of the most common strategies for the iron (III) uptake in bacteria is the production of siderophores.

It has been shown that most strains of *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* simultaneously produce two types of siderophores: acinetobactin and amonabactin-like. Most recent studies suggested that the FstC and FstB proteins are the membrane receptors of the amonabactins. However, the specific protein receptor for each amonabactin is not known yet.

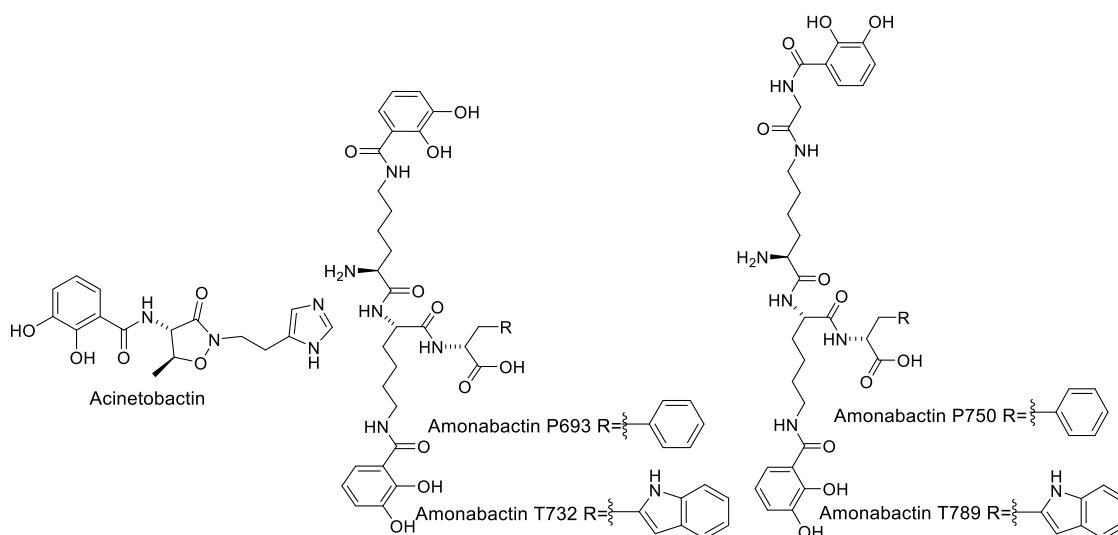


Figure 1. Structure of amonabactins and of the acinetobactin.

The present Master's thesis is focused on the synthesis of several amonabactin analogs along with the isolation of the natural amonabactins from the culture supernatants of the *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* to determine the structural requirements for the molecular recognition by each membrane receptor (FstB and/or FstC).

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 llegarán a alcanzar los 8.500 millones en 2030, 9.700 millones en 2050 y 11.200 millones en 2100. Por lo tanto, la humanidad se enfrentará a un problema de cómo alimentar a millones de personas en un contexto de cambio climático, incertidumbre económica y financiera y un aumento de la competencia por los recursos naturales.¹

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.

La pesca y la acuicultura siguen siendo importantes fuentes de alimentos, nutrición, ingresos y medios de vida para cientos de millones de personas en todo el mundo. La oferta mundial *per capita* de pescado alcanzó un nuevo máximo histórico de 20 kg en 2014, gracias a un intenso crecimiento de la acuicultura, ya que 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 2015.²

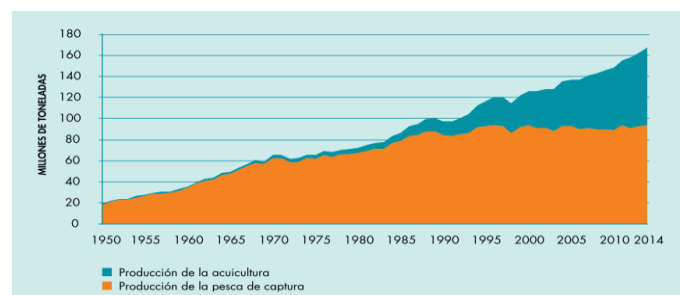


Figura 1. Producción de la pesca mundial de captura y la acuicultura.²

INTRODUCCIÓN

La producción acuícola de rodaballo en España en 2014 fue 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, siendo también una importante fuente productora de lenguado y besugo, además de la principal región productora de moluscos de España y de Europa.³

Galicia, Castilla y León, Asturias y País Vasco son las comunidades autónomas con mayor consumo relativo, mientras que ambos archipiélagos, como la región de Murcia son las que menos consumen comparativamente.⁴

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

Una de las mayores pérdidas en acuicultura es causada por la presencia de enfermedades infecciosas en peces debidas a la presencia de bacterias. A continuación, se describen algunas de las enfermedades más representativas.

Vibriosis

La bacteria patógena Gram negativa *Vibrio anguillarum* es un agente etiológico clásico de la vibriosis. Es 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, lubina, dorada, etc. Puede presentarse en forma aguda o crónica, siendo los síntomas más usuales las lesiones en la piel, úlceras, inflamación, necrosis hemorrágica en el tejido muscular, hemorragia en la base de las aletas, opacidad de las córneas y oscurecimiento de la piel.⁵



*Figura 2. Pez infectado por la bacteria Vibrio anguillarum.*⁶

Photobacteriosis

La photobacteriosis, también conocida como pasteurelisis, es causada por la bacteria halófila *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. Esta bacteria se aisló 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.⁵



*Figura 3. Pez infectado cuya bacteria patógena es la Photobacterium damsela subsp. piscicida.*⁷

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.

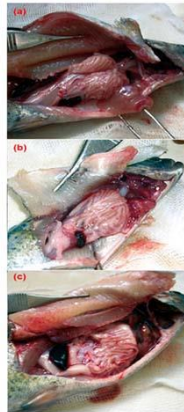


Figura 2. Hígado pálido y hemorrágico (a); bazo normal (b); bazo esplénico (c).

Figura 4. Pez infectado por la bacteria *Yersinia ruckeri*.⁸

Forunculosis

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

Se desarrolla como una septicemia hemorrágica crónica o aguda, a menudo con una extensa necrosis liquefactiva.⁵



Figura 5. Pez infectado cuya bacteria patógena es la

Aeromonas salmonicida subsp. *salmonicida*.¹⁰

La importancia del hierro

Se ha observado que el mecanismo de captación de hierro utilizado por las bacterias es una buena estrategia para combatir este tipo de enfermedades infecciosas.

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.¹¹

A pesar de la abundancia del hierro en la corteza terrestre, este 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} .¹²

En el caso de las bacterias, cuando infectan a un huésped se enfrentan a un entorno pobre en hierro, ya que normalmente el nivel de hierro libre en fluidos biológicos es del orden de 10^{-18} M, y concretamente en el suero humano, la transferrina mantiene una concentración libre de iones férricos en torno a 10^{-24} M. Por tanto, la capacidad de obtención del hierro a partir del huésped es uno de los mecanismos de virulencia más importante de las bacterias patógenas.¹³

Para facilitar la absorción adecuada de hierro (III), los microorganismos biosintetizan moléculas de bajo peso molecular, denominadas sideróforos o portadores de hierro.¹¹

Sideróforos

Una de las estrategias más comunes para la captación de hierro es la producción de sideróforos, que son compuestos de bajo peso molecular (500-1500 daltons) que poseen una alta afinidad y selectividad por el hierro (III). La biosíntesis de los sideróforos está típicamente regulada por los niveles de hierro del entorno donde se encuentra el organismo. Hay más de 500 sideróforos diferentes, de los cuales más de 270 se han caracterizado estructuralmente. Algunos de ellos poseen hasta seis átomos de oxígeno o nitrógeno que actúan como dadores de electrones que se coordinan con el catión metálico.

Las propiedades y la actividad biológica de los sideróforos están dictadas por su estructura, quiralidad y la medida en que su conformación se adapta a los centros de unión de proteínas receptoras específicas dentro de la membrana.

INTRODUCCIÓN

Los sideróforos se coordinan con el hierro (III) y lo introduce en los microorganismos a través de receptores específicos de membrana y proteínas.¹¹

Mecanismo de actuación de los sideróforos

Una vez que los sideróforos se biosintetizan y secretan fuera de las células bacterianas, se unen a los iones Fe^{3+} para formar un complejo férrico-sideróforo. El sideróforo férrico se internaliza posteriormente mediante el mecanismo de transporte apropiado. Los mecanismos para la introducción del complejo férrico-sideróforo varían según el tipo de bacteria. En las bacterias Gram-negativas, los complejos son transportados a través de las membranas externa e interna por un sistema dependiente de la energía. Los componentes de dichos sistemas incluyen un transportador férrico-sideróforo dependiente de TonB específico (TBDT), acoplada a un transportador ABC que cataliza las etapas finales del transporte férrico-sideróforo a través de la membrana citoplasmática desde el periplasma hasta el citosol. Una vez que el complejo ha alcanzado el citoplasma, la liberación del hierro puede realizarse mediante reducción del Fe(III) del complejo a Fe(II) o mediante la degradación del sideróforo.¹⁴

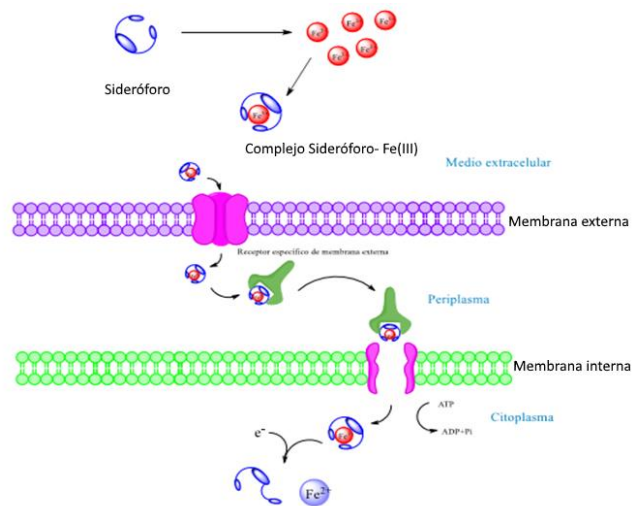


Figura 6. Mecanismo de captación de Fe (III) en bacterias Gram-negativas mediante sideróforos.

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 Fe^{3+} . Estas tres clases son: catecolatos, hidroxamatos y α -hidroxicarboxilatos. Otros sideróforos menos comunes son: hidroxifeniloxazolona, α -amino-carboxilato y α -hidroxiimidazol.

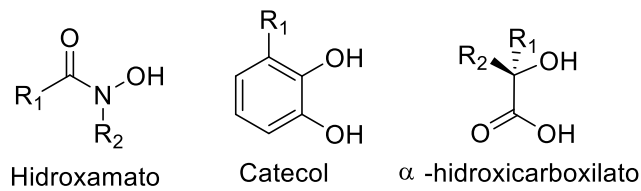


Figura 7. Estructura de los tres grupos quelatantes principales que se encuentran en los sideróforos.

La mayoría de los sideróforos poseen dadores de oxígeno, y son ligandos hexadentados que forman complejos octaédricos con hierro. Forman complejos con el ion Fe^{3+} que se caracterizan por una alta estabilidad termodinámica.

Los sideróforos también pueden formar complejos con otros iones metálicos tales como Al^{3+} , Zn^{2+} , Ga^{3+} , Cr^{3+} , debido a la presencia de grupos funcionales dadores que muestran alta afinidad por otros iones de metales pesados. Esta característica les 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.

Aplicaciones de los sideróforos

Los sideróforos y sus derivados poseen un gran potencial en el tratamiento de muchas enfermedades, incluidas las infecciones. 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.¹⁵ En la actualidad se están desarrollando

INTRODUCCIÓN

importantes aplicaciones en el tratamiento de infecciones, sobrecarga aguda y crónica de hierro, intoxicaciones agudas, anemia de células falciformes, malaria y neoplasias malignas.¹⁵ Aprovechando su gran afinidad por el hierro, la deferoxamina B (Desferal®) se utiliza como fármaco en enfermedades provocadas por exceso de hierro asociadas a transfusiones sucesivas de sangre. La deferoxamina B quelata los cationes Fe (III) libres formando ferrioxamina, que es mucho más soluble en agua y permite su eliminación a través de la orina. Aunque se aplique principalmente en enfermedades que necesitan transfusiones de sangre de forma continuada (talasemia, leucemia, etc), también se ha utilizado para la eliminación de metales como aluminio o vanadio en casos de contaminación, así como el uso de sensores fluorescentes basados en sideróforo.¹⁶

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.¹⁷

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 tipo Caballo de Troya.¹⁷

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 conocido. El papel del sideróforo es unir el hierro, mientras que la función del espaciador es unir el fármaco al sideróforo y, posteriormente, controlar su liberación del complejo. El fármaco solo tiene actividad antibacteriana en la forma libre. Cuando los conjugados sideróforo-fármaco alcanzan el citoplasma matan el microorganismo al liberar el fármaco.



Figura 8. Representación esquemática del conjugado sideróforo-fármaco en la estrategia del “Caballo de Troya”.

Una aplicación diferente es la de producción de vacunas a partir de proteínas recombinantes. Esta consiste en primer lugar en caracterizar la proteína receptora 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 *Escherichia 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 vacunas 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.

INTRODUCCIÓN

La producción de las 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 sencillo, evitando trabajar con el organismo causante de la enfermedad, lo que después de las etapas iniciales de investigación conlleva un menor costo de producción.¹⁸

Los sideróforos también se pueden utilizar como sensores fluorescentes para controlar la contaminación por iones metálicos o detectar patógenos. La razón clave para el uso de sideróforos fluorescentes es su capacidad para disminuir o aumentar su emisión de fluorescencia con hierro vinculante.¹⁶

ANTECEDENTES

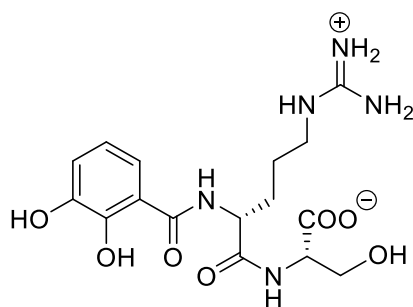
Antecedentes

Los primeros ejemplos de extracción e identificación de complejos de hierro-sideróforo naturales se informaron a principios de la década de 1950. 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. Ahora hay más de 270 sideróforos conocidos estructuralmente distintos.¹⁶

El subgrupo de investigación PRONAMAR, que ahora forma parte del grupo QUIMOLMAT de la Universidad de A Coruña, 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 plana de vancrobactina.¹⁹

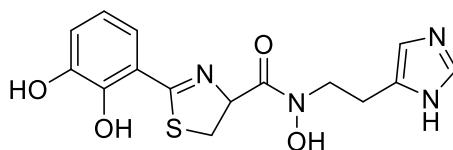
Este patógeno es el agente causante de la vibriosis, una septicemia hemorrágica extremadamente mortal que produce considerables pérdidas económicas en la acuicultura en todo el mundo. Un año más tarde, se logró realizar la síntesis total de vancrobactina, lo que además permitió dilucidar su configuración absoluta.²⁰

ANTECEDENTES



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 significativamente a la virulencia de esta bacteria. El sideróforo más estudiado producido por *V. anguillarum* es la anguibactina, aislada por primera vez en el año 86. Aunque el serotipo patógeno O2 puede producir ambos sideróforos, está por determinar cuál de ellos es el factor de virulencia más determinante.



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, las cuales son resistentes a los antibióticos comunes.

Una forma de aumentar la eficacia de los antimicrobianos contra las infecciones bacterianas es la "estrategia del caballo de Troya" en la que los fármacos antimicrobianos son acoplados a sideróforos y son 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, introduciendo de forma más efectiva el antibiótico.¹⁵

Con estos antecedentes el grupo de investigación ha propuesto que vancrobactina procedente de *V. anguillarum* podría ser un candidato muy interesante para una estrategia de este tipo de profármacos, y que podría ser utilizada para el desarrollo de nuevos antimicrobianos contra la vibriosis y probablemente contra otras enfermedades infecciosas relacionadas.²¹ El grupo ha sintetizado además distintos análogos que ayudaron a realizar un estudio de estructura-actividad, con el fin de elucidar qué partes del sideróforo son claves para que se produzca el reconocimiento molecular con la proteína de membrana. Este conocimiento permitió determinar qué grupo funcional era el más adecuado para realizar la conjugación en la estrategia de Caballo de Troya, para realizar conjugados de análogos de vancrobactina con el antibiótico norfloxacin.²²

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 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*.⁹

Las amonabactinas pertenecen a la familia de sideróforos tetradentados de catecolato, y se identificaron en 1989, estas presentan una cadena lateral de triptófano o

ANTECEDENTES

fenilalanina con dos unidades quelantes de catecol unidas a través de unidades espaciadoras de lisina y glicina.¹⁶

Los equipos de investigación de la Universidad de A Coruña y de la Universidad de Santiago de Compostela 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.

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 biosintética. 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.⁹

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.¹⁴

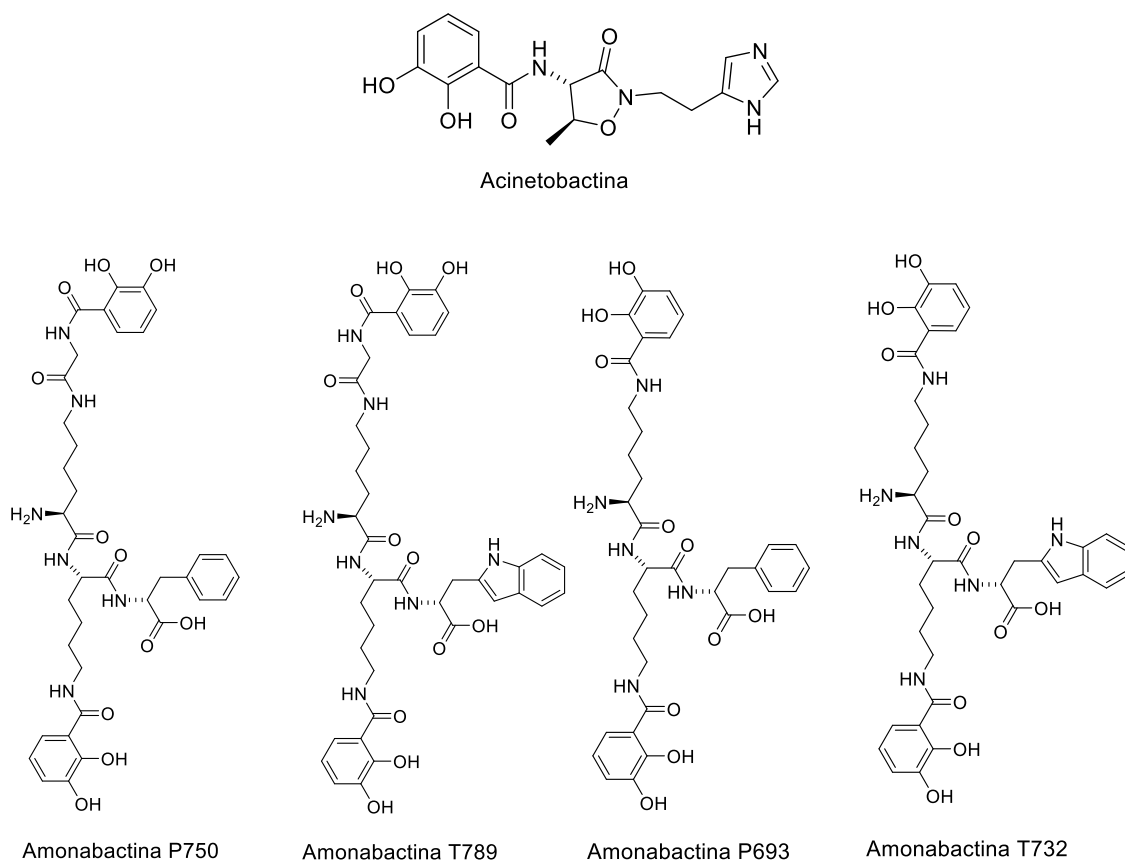


Figura 9. Sideróforos producidos por la bacteria patógena *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*.

En el año 2017, el grupo de Microbiología de la Universidad de Santiago de Compostela junto a nuestro grupo de investigación publicaron que la proteína de membrana externa FstB es el receptor de la ferriacinetobactina en *A. salmonicida* subsp. *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. Mediante este estudio se encontró que el enantiómero de la acinetobactina posee también 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. Se propuso que algunos de los análogos de acinetobactina sintéticos descritos podrían usarse como puntos de partida en el desarrollo de nuevos fármacos

ANTECEDENTES

contra *A. salmonicida* y probablemente contra otros productores de acinetobactina como el patógeno humano *Acinetobacter baumannii*.¹⁴

Recientes estudios realizados por el grupo de Microbiología de la Universidad de Santiago de Compostela sugieren que tanto la proteína FstC como la FstB son los receptores de las amonabactinas, siendo una u otra en función de la estructura. Por ello se planteó sintetizar una serie de análogos simplificados de las amonabactinas y obtener las naturales a partir de un cultivo bacteriano, con el fin de realizar un estudio de la relación estructura-actividad de forma similar a como se realizó con la acinetobactina y así determinar que proteína es receptora de cada amonabactina. De esta forma se podría averiguar qué parte estructural es esencial para interactuar con cada proteína receptora.

OBJETIVOS

Objetivos

Uno de los objetivos principales del grupo de investigación en donde se ha realizado el presente trabajo, es la síntesis de análogos de las amonabactinas para el desarrollo de aplicaciones en el tratamiento de la forunculosis y la posible utilización de estos sideróforos en estrategias terapéuticas del tipo “Caballo de Troya”.

Este Trabajo de Fin de Máster se centra en la preparación de varios análogos de las amonabactinas junto con el aislamiento de las naturales a partir de los sobrenadantes de cultivo de las bacterias. El fin último de obtener estos sideróforos de forma natural es determinar los requisitos estructurales para el reconocimiento molecular de cada proteína receptora (FstB y/o FstC) con ellos.

Para alcanzar dicho objetivo se propone el siguiente esquema de trabajo:

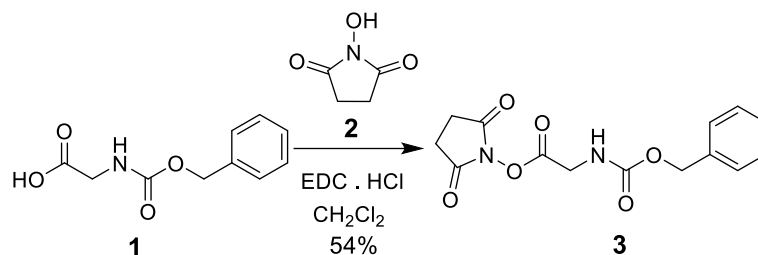
- Síntesis de análogos sencillos de las amonabactinas, mediante estrategias desarrolladas en el grupo de investigación.
- Aislamiento de las amonabactinas naturales de los sobrenadantes de cultivo de las bacterias, mediante la utilización del HPLC.
- Estudio de la actividad siderófora de los compuestos aislados y sintetizados.

PARTE EXPERIMENTAL

Parte experimental

Preparación de los análogos de amonabactinas

Síntesis del compuesto 3



Sobre 300 mg (1,43 mmol) de *N*-beniloxicarbonilglicina (**1**) se añadieron 330,08 mg (2,87 mmol) de *N*-hidroxisuccinimida (**2**) y 412,36 mg (2,15 mmol) de EDC. A continuación, se añadieron 8 mL de CH₂Cl₂ seco en un balón previamente purgado con argón y seco que contenía la mezcla de compuestos. Se dejó 12 h agitando y bajo atmósfera de argón. Pasado ese tiempo, se lavó tres veces la fase orgánica con una disolución diluida de NaHSO₃, tres veces con una disolución salina saturada, una vez con agua destilada y posteriormente la fase orgánica resultante se secó con MgSO₄. Finalmente, se concentró a presión reducida obteniéndose 235 mg (54% de rendimiento) de compuesto **3** como un sólido blanco.

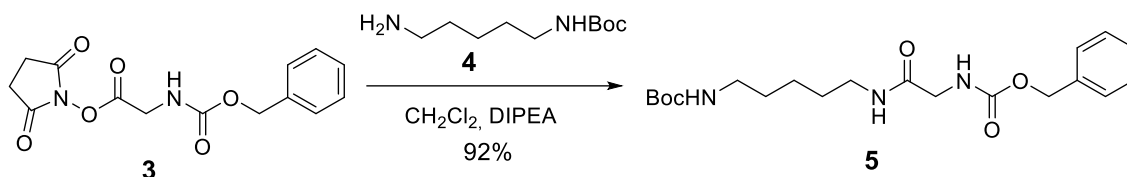
¹H-RMN (CDCl₃), δ_H ppm: 7,35 (s, 5H); 5,13 (s, 2H); 4,30 (s, 2H); 2,76 (s, 4H)

¹³C-RMN (CDCl₃), δ_C ppm: 169,1 (C=O); 166,2 (C=O); 156,3 (C=O); 136,1 (C- Ph); 128,3 (CH); 67,4 (CH₂); 40,7 (CH₂); 25,6 (CH₂)

(+)-LR-ESIMS *m/z*: 329 [M+Na]⁺

PARTE EXPERIMENTAL

Síntesis del compuesto 5



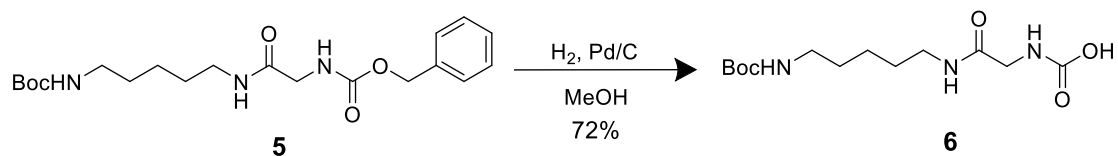
Se añadieron 230 mg (0,750 mmol) de **3**, 152 mg (0,751 mmol) de *N*-Boc-cadaverina (**4**) y 10 mL de CH₂Cl₂ seco en un balón purgado previamente con argón. A continuación, se agita y se adicionaron bajo agitación 0,3 mL de DIPEA a 0°C. Se dejó 12 h agitando en atmósfera de argón. Pasado ese tiempo, se concentró la mezcla a presión reducida, se disolvió en 15 mL de EtOAc y se lavó tres veces con agua destilada, una vez con una disolución saturada de NaCl y la fase orgánica resultante se secó con MgSO₄. Finalmente, se concentró a presión reducida obteniéndose 273,3 mg (92% de rendimiento) de compuesto **5** como un aceite marrón claro.

¹H-RMN (CDCl₃), δ_H ppm: 7,28 (s, 5H); 6,72 (s, 1H); 6,09 (t, *J* = 5,8 Hz, 1H); 5,06 (s, 2H); 4,87 (t, *J* = 5,8 Hz, 1H); 3,78 (d, *J* = 5,8 Hz, 2H); 3,15 (m, 2H); 3,01 (m, 2H); 1,38 (s, 13H); 1,23 (m, 2H)

¹³C-RMN (CDCl₃), δ_C ppm: 169,3 (C=O); 156,8 (C=O); 156,2 (C=O); 136,2 (C- Ph); 128,5 (C- Ph); 79,0 (C); 66,9 (CH₂); 44,5 (CH₂); 40,2 (CH₂); 39,2 (CH₂); 29,5 (CH₂); 28,9 (CH₂); 28,4 (CH₃); 23,9 (CH₂)

(+)-LR-ESIMS *m/z*: 416 [M+Na]⁺

Síntesis del compuesto 6



Sobre 76,00 mg (0,193 mmol) de **5** y una cantidad catalítica de catalizador Pd/C al 5%, se añadieron 5 mL de MeOH, y se dejó bajo agitación a temperatura ambiente en una atmósfera de H₂ durante 24 h. Pasado este tiempo, se filtró sobre un doble filtro de pliegues y se concentró a presión reducida, obteniéndose 36,1 mg (72% de rendimiento) de compuesto **6** como un sólido blanco.

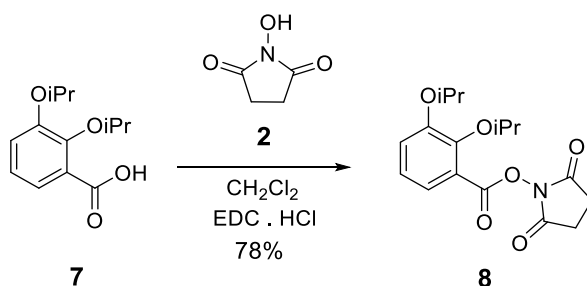
¹H-RMN (CDCl₃), δ_H ppm: 8,43 (sa, 1H); 8,05 (sa, 2H); 3,98 (sa, 2H); 3,10 (m, 4H); 1,40-1,52 (m, 15H)

¹³C-RMN (CDCl₃), δ_C ppm: 166,9 (C=O); 156,7 (C=O); 79,4 (C-O); 42,5 (CH₂); 40,9 (CH₂); 40,1 (CH₂); 30,1 (CH₂); 29,0 (CH₃); 24,6 (CH₂)

(+)-LR-ESIMS m/z : 282 [M+Na]⁺

PARTE EXPERIMENTAL

Síntesis del compuesto 8



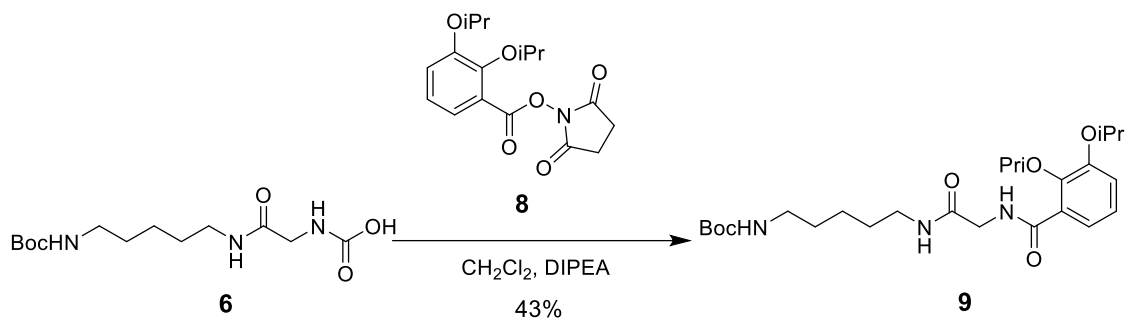
Sobre 500 mg (2,10 mmol) de **7** se añadieron 482,99 mg (4,20 mmol) de *N*-hidroxisuccinimida (**2**) y 603,39 mg (3,15 mmol) de EDC. A continuación, se añadieron 10 mL de CH_2Cl_2 seco en un balón previamente purgado con argón que contenía la mezcla de compuestos. Se dejó 12 h agitando y bajo atmósfera de argón. Pasado ese tiempo, se lavó tres veces la fase orgánica con una disolución diluida de NaHSO_3 , tres veces con una disolución salina saturada, una vez con agua destilada y posteriormente 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, usando como fase móvil EtOAc/Hexano (1:3), obteniéndose finalmente 570 mg (78% rendimiento) de compuesto **8** como un aceite marrón.

$^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3), δ_{H} ppm: 7,55 (m, 1H); 7,10 (m, 2H); 4,60 (m, 2H); 2,87 (m, 4H); 1,34 (d, $J = 6,0$ Hz, 6H); 1,29 (d, $J = 6.3$ Hz, 6H)

$^{13}\text{C-RMN}$ (CDCl_3), δ_{C} ppm: 169,4 (C=O); 161,3 (C=O); 152,1 (C-O); 123,6 (C-Ph); 123,4 (C-Ph); 121,9 (C-Ph); 76,7 (CH); 25,8 (CH_2); 22,4 (CH_3); 22,2 (CH_3)

(+)-LR-ESIMS m/z : 358 $[\text{M}+\text{Na}]^+$

Síntesis del compuesto 9



Partiendo de 36 mg (0,139 mmol) del compuesto **6** y realizando el mismo procedimiento que en la obtención del compuesto **5**, se obtuvieron 28,7 mg (43% de rendimiento) de compuesto **9** como un aceite marrón.

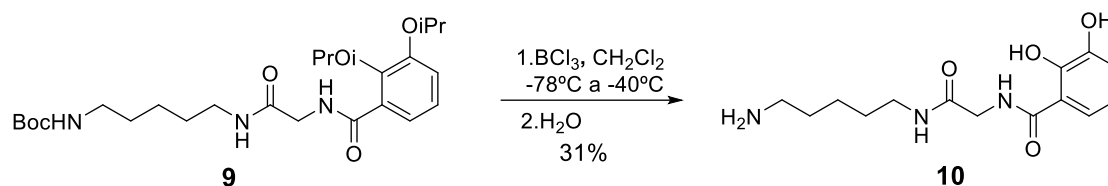
¹H-RMN (CDCl₃), δ_H ppm: 8,78 (t, *J* = 5,5Hz, 1H); 7,67 (m, 1H); 7,07 (m, 2H); 6,63 (s, 1H); 4,72 (m, 1H); 4,57 (m, 1H); 4,11 (d, *J* = 5,5 Hz, 2H); 3,27 (m, 2H); 3,08 (d, *J* = 7,4Hz, 2H); 1,31-1,44(m, 27H)

¹³C-RMN (CDCl₃), δ_C ppm: 169,1 (C=O); 166,5 (C=O); 156,0 (C=O); 150,9 (C-O); 146,7 (C-O); 127,3 (C-Ph); 123,6 (C-Ph); 122,8 (CH-Ph); 119,3 (CH-Ph); 79,0 (C-O); 71,41 (CH); 44,2 (CH₂); 40,3 (CH₂); 39,3 (CH₃); 29,6 (CH₂); 29,1 (CH₂); 28,4 (CH₂); 24,0 (CH₂); 22,2 (CH₃); 22,1 (CH₃)

(+)-LR-ESIMS *m/z*: 502 [M+Na]⁺

PARTE EXPERIMENTAL

Síntesis del compuesto 10

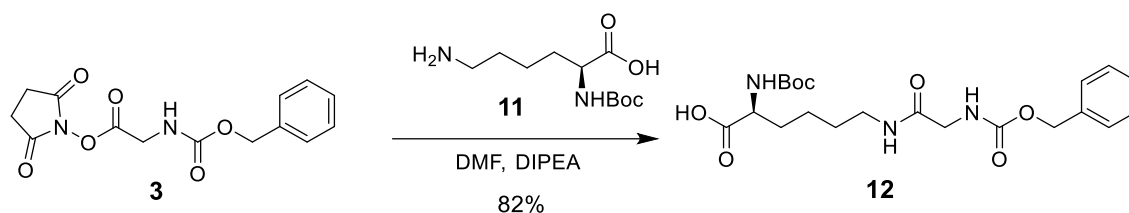


Sobre 28 mg (0,058 mmol) de **9** se añadieron 10 mL de CH₂Cl₂ seco, manteniendo dentro del balón una atmósfera de argón. El balón se introdujo en un baño a -78°C y bajo agitación se añadieron 0,35 mL de una disolución 1M de BCl₃. A continuación, se subió la temperatura a -40° C y se dejó en estas condiciones 12 h. Pasado este tiempo, se añadieron a la mezcla 5 mL de agua destilada, que tornó a color verde-amarillo, y se dejó que alcanzara la temperatura ambiente. Después de 20 min de agitación a esa temperatura, la mezcla adquirió un color blanco amarillento. A continuación, se filtró sobre celita con CH₂Cl₂ y se hizo pasar MeOH. Se concentró a presión reducida y se purificó sobre un cartucho de gel de sílice de fase reserva C18 previamente acondicionado con H₂O y MeOH, eluyéndose con MeOH. Se obtuvieron 5,3 mg (31% de rendimiento) del compuesto **10** como un sólido marrón.

¹H-RMN (CD₃OD), δ_H ppm: 7,30 (dd, *J* = 8,0; 1,5 Hz, 1H); 6,98 (dd, *J* = 8,0; 1,5 Hz, 1H); 6,78 (d, *J* = 8,0 Hz, 1H); 4,03(s, 2H); 3,28 (m, 2H); 2,94 (m, 2H); 1,38-1,70 (m, 6H).

¹³C-RMN (CD₃OD), δ_C ppm: 171,9 (C=O); 147,3 (C-Ph); 119,8 (C-Ph); 119,2 (C-Ph); 43,9 (CH₂); 40,7 (CH₂); 39,8 (CH₂); 29,9 (CH₂); 28,1 (CH₂); 24,5 (CH₂)

(+)-LR-ESIMS *m/z*: 296 [M+H]⁺

Síntesis del compuesto **12**

Se añadieron 125 mg (0,408 mmol) de **3**, 100 mg (0,408 mmol) de *N*- α -Boc-L-lisina (**11**) y 8 mL de CH_2Cl_2 seco en un balón purgado previamente con argón. A continuación, se añadieron 0,2 mL de DIPEA bajo agitación. Se dejó 12 h agitando en atmósfera de argón. Pasado ese tiempo, se concentró la mezcla a presión reducida, se disolvió en 15 mL de CH_2Cl_2 y posteriormente se añadió agua Milli-Q y HCl 5% v/v hasta pH ácido. La fase orgánica se lavó tres veces con agua destilada, una vez con una disolución saturada de NaCl y la fase orgánica resultante se secó con MgSO_4 . Finalmente, se concentró a presión reducida obteniéndose 147,3 mg (82% de rendimiento) de compuesto **12** como un aceite transparente.

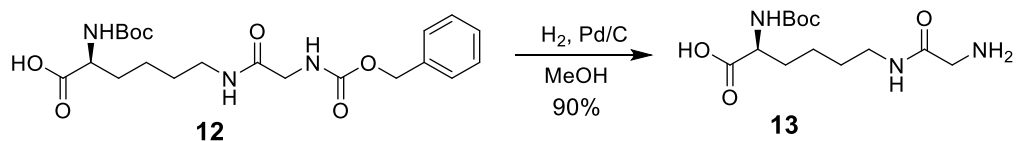
^1H -RMN (CDCl_3), δ_{H} ppm: 7,28 (m, 5H); 6,82 (s, 1H); 6,10 (s, 1H); 5,36 (d, $J = 8,0$ Hz, 1H); 5,05 (s, 2H); 4,20 (m, 1H); 3,79 (d, $J = 5,7$ Hz, 2H); 3,15 (m, 2H); 1,38-1,45 (m, 15H)

^{13}C -RMN (CDCl_3), δ_{C} ppm: 175,2 (C=O); 170,1 (C=O); 157,0 (C=O); 155,8 (C=O); 136,1 (C-Ph); 128,5 (C-Ph); 128,2 (C-Ph); 128,0 (CH-Ph); 79,96 (C); 67,11 (CH_2); 53,5 (CH); 44,4 (CH_2); 39,2 (CH_2); 36,8 (CH_2); 31,8 (CH_2); 28,6 (CH_2); 28,3 (CH_3); 22,4 (CH_2)

(+)-LR-ESIMS m/z : 460 $[\text{M}+\text{Na}]^+$

PARTE EXPERIMENTAL

Síntesis del compuesto **13**

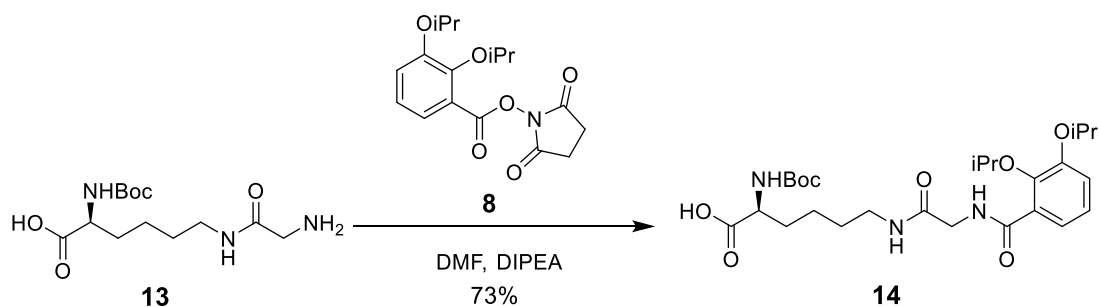


Partiendo de 147 mg (0,336 mmol) del compuesto **12** y realizando el mismo procedimiento que en la obtención del compuesto **6**, se obtuvieron 91,8 mg (90% de rendimiento) de compuesto **13** como un aceite marrón claro.

1H -RMN (CD_3OD), δ_H ppm: 3,79 (s, 1H); 3,50 (s, 2H); 3,06 (t, $J = 6,7$ Hz, 2H); 1,20-1,30 (m, 15H)

(+)-LR-ESIMS m/z : 326 $[M+H]^+$

Síntesis del compuesto **14**



Partiendo de 122 mg (0,402mmol) del compuesto **13** y realizando el mismo procedimiento que en la obtención del compuesto **12**, se obtuvieron 158,9 mg (73% de rendimiento) de compuesto **14** como un aceite marrón.

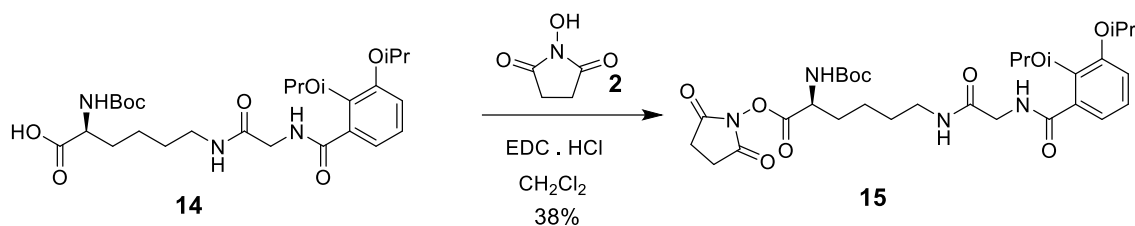
$^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3), δ_{H} ppm: 7,57 (s, 1H); 7,00 (m, 2H); 4,67 (m, 1H); 4,50(m, 1H) 4,09 (s, 2H); 3,21 (m, 2H); 1,47 (m, 2H); 1,36 (s, 9H); 1,32-1,23 (m, 16H)

$^{13}\text{C-RMN}$ (CDCl_3), δ_{C} ppm: 175,0 (C=O); 166,6 (C=O); 161,1 (C=O); 155,7 (C=O); 150,8 (C-Ph); 146,8 (C-Ph); 127,1 (C-Ph); 123,9 (CH-Ph); 123,5 (CH-Ph); 119,4 (CH-Ph); 79,7 (C); 77,9 (CH); 76,6 (CH); 43,74 (CH_2); 39,2 (CH_2); 31,9 (CH_2); 29,6 (CH_2); 28,8 (CH_2); 22,1 (CH_2); 21,9 (CH_3)

(+)-LR-ESIMS m/z : 546 $[\text{M}+\text{Na}]^+$

PARTE EXPERIMENTAL

Síntesis del compuesto 15

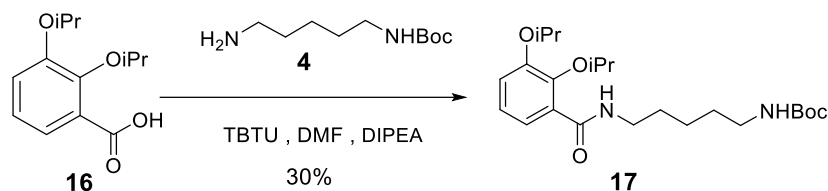


Sobre 158 mg (0,302mmol) de **14** se añadieron 69,4 mg (0,604 mmol) de *N*-hidroxisuccinimida (**2**) y 86,7 mg (0,453 mmol) de EDC. Se dejó en la línea de vacío para tenerlo perfectamente seco. A continuación, se añadieron 8 mL de CH₂Cl₂ seco en un balón previamente purgado con argón que contiene la mezcla de compuestos. Se dejó 12 h agitando y bajo atmósfera de argón. Pasado ese tiempo, se lavó tres veces la fase orgánica con una disolución diluida de NaHSO₃, tres veces con una disolución salina saturada, una vez con agua destilada, y posteriormente la fase orgánica resultante se secó con MgSO₄. Finalmente, se concentró a presión reducida y se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice, usando como fase móvil EtOAc/Hexano (3:1), obteniéndose finalmente 71,1 mg (38% rendimiento) de compuesto **15** como un aceite marrón claro.

¹H-RMN (CDCl₃), δ_H ppm: 8,74 (t, *J* = 5,3Hz, 1H); 7,62 (dd, *J* = 7,6;2,0 Hz, 1H); 7,03 (m, 2H); 4,70 (m, 1H); 4,52 (m, 1H); 4,09 (m, 2H); 3,28 (m, 2H); 2,79(m, 4H); 1,87 (m, 2H); 1,52 (m, 2H); 1,30-1,60 (m, 25H)

¹³C-RMN (CDCl₃), δ_C ppm: 169,1 (C=O); 169,0 (C=O); 166,3 (C=O); 150,8 (C=O); 146,7 (C-Ph); 127,5 (C-Ph); 123,6 (CH-Ph); 122,8 (CH-Ph); 119,2 (C-Ph); 80,4 (C); 71,3 (CH); 60,4 (CH); 43,8 (CH₂); 38,7 (CH₂); 28,6 (CH₂); 25,6 (CH₂); 22,1 (CH₂); 21,0 (CH₃)

(+)-LR-ESIMS *m/z*: 643 [M+Na]⁺

Síntesis del compuesto **17**

Se dejaron secar dos balones en la estufa cada uno con sus correspondientes agitadores magnéticos durante 2 horas a 120°C. Pasado ese tiempo, en uno de los balones se añadieron 100 mg (0,420 mmol) de **16** y 161 mg (0,504 mmol) de TBTU y en el otro balón se añadieron 84,90 mg (0,420 mmol) de (5-aminopentil)carbamato de *tert*-butilo (**4**). Se añadieron 6 mL de DMF en ambos balones purgados previamente con argón, y en el balón que contiene el compuesto **16** se añadieron 0,11 mL de DIPEA. Se agitaron ambos balones y se traspasó la disolución que contenía el compuesto **16** sobre la mezcla que contenía el compuesto **4**. 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 EtOAc y se lavó tres veces con agua destilada, una vez con una disolución saturada de NaCl y la fase orgánica resultante se secó con MgSO₄. Se purificó mediante cromatografía en columna con mezcla de EtOAc:Hexano utilizando un cartucho SNAP de gel de sílice de 10 g en el MPLC con un gradiente desde 25% al 50% de EtOAc, obteniéndose finalmente 52,4 mg (30% rendimiento) de compuesto **17** como un aceite verde claro.

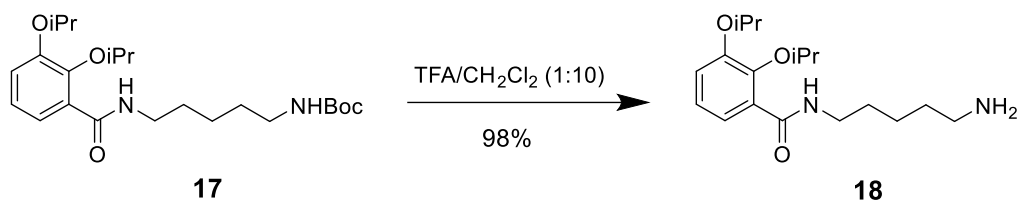
RMN ¹H (CDCl₃), δ_H ppm: 8,00 (t, *J* = 6,0 Hz, 1H); 7,62 (dd, *J* = 8,0; 1,8 Hz, 1H); 7,03 (t, *J* = 8,0 Hz, 1H); 6,95 (dd, *J* = 8,0; 1,8 Hz, 1H); 4,64 (m, 1H); 4,50 (m, 1H); 3,30 (m, 2H); 3,07 (m, 2H); 1,46-1,60 (m, 6H); 1,39 (s, 9H); 1,32 (d, *J* = 6,0 Hz, 6H); 1,25 (d, *J* = 6,0 Hz, 6H)

RMN ¹³C (CDCl₃), δ_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); 78,9 (C-O); 76,2 (CH); 71,0 (CH); 40,4 (CH₂); 39,3 (CH₂); 29,6 (CH₂); 29,3 (CH₂); 28,4 (CH₃); 24,3 (CH₂); 22,1 (CH₃)

(+)-LR-ESIMS *m/z*: 445 [M+Na]⁺

PARTE EXPERIMENTAL

Síntesis del compuesto 18



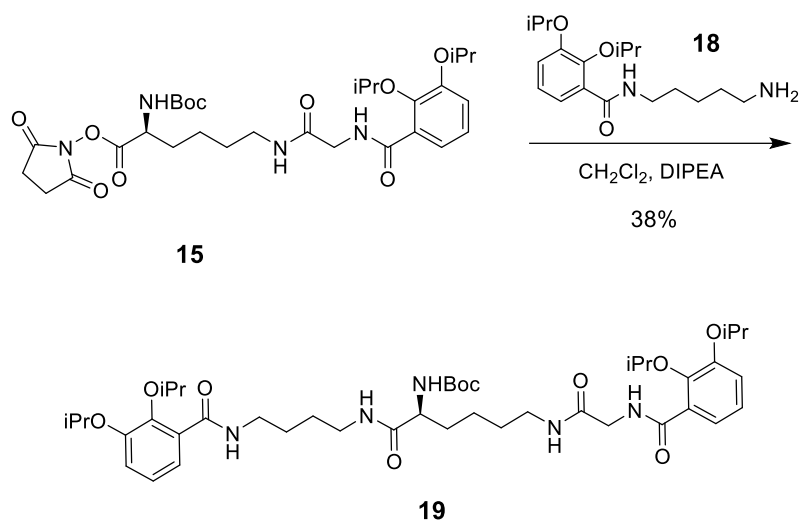
Sobre 135 mg (0,320 mmol) de **17** se añadieron 0,5 mL de TFA y 4,5 mL de CH₂Cl₂ y se dejó bajo agitación durante 2h. Finalmente, se concentró a presión reducida obteniéndose 101,0 mg (98% de rendimiento) de compuesto **18** como un aceite marrón.

RMN ¹H (CDCl₃), δ_H ppm: 8,52 (t, *J* = 5,7 Hz, 1H); 7,47 (m, 2H); 7,07 (m, 1H); 4,72 (m, *J* = 6,2 Hz, 1H); 4,56 (m, *J* = 6,2 Hz, 1H); 3,43 (q, *J* = 6,7 Hz, 2H); 3,06 (m, 2H); 1,55-1,70 (m, 6H); 1,36 (d, *J* = 6,2 Hz, 6H); 1,28 (d, *J* = 6,2 Hz, 6H)

RMN ¹³C (CDCl₃), δ_C ppm: 168,1 (C=O); 151,0 (C-Ph); 146,3 (C-Ph); 126,7 (C-Ph); 124,2 (CH-Ph); 122,2 (CH-Ph); 119,2 (CH-Ph); 77,0 (CH); 71,4 (CH); 40,5 (CH₂); 39,5 (CH₂); 28,8 (CH₂); 23,4 (CH₃); 22,1 (CH₃)

(+)-LR-ESIMS *m/z*: 323 [M+H]⁺

Síntesis del compuesto 19



Se añadieron 71 mg de **15**, 36,9 mg (0,115 mmol) de *N*-(5-aminopentil)-2,3-diisopropoxibenzamida (**18**) y 6 mL de CH₂Cl₂ seco en un balón purgado previamente con argón. A continuación, se añadieron bajo agitación 0,1 mL de DIPEA a 0°C. Se dejó 12 h agitando en atmósfera de argón. Pasado ese tiempo, se concentró la mezcla a presión reducida, se disolvió en 8 mL de EtOAc y se lavó tres veces con agua destilada, una vez con una disolución saturada de NaCl y la fase orgánica resultante se secó con MgSO₄. Finalmente, se concentró a presión reducida y se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice, usando como fase móvil CH₂Cl₂:MeOH con un gradiente de 95% hasta 90% de CH₂Cl₂, obteniéndose finalmente 35,4 mg (38% rendimiento) de compuesto **19** como un aceite marrón claro.

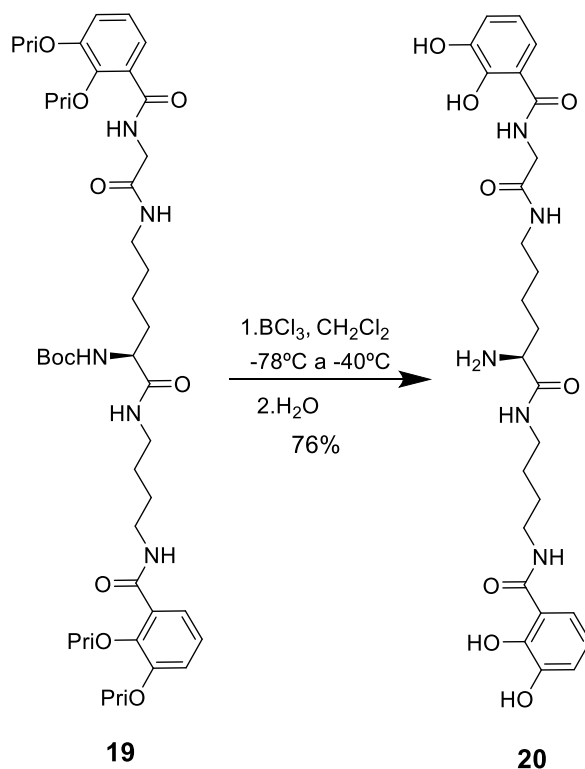
¹H-RMN (CDCl₃), δ_H ppm: 8,75 (t, *J* = 5,6 Hz, 1H); 8,06 (t, *J* = 5,6 Hz, 1H); 7,64(m, 2H); 6,90-7,05 (m, 5H); 4,65 (m, 4H); 4,09 (d, *J* = 5,6 Hz, 2H); 3,42 (m, 2H); 3,24 (m, 4H); 1,56 (m, 2H); 1,52 (m, 19H); 1,33 (m, 28H)

RMN ¹³C (CDCl₃), δ_C ppm: 172,1 (C=O); 169,3 (C=O); 166,7 (C=O); 166,1 (C=O); 151,9 (C-Ph); 146,0 (C-O); 128,6 (C-Ph); 127,5 (C-Ph); 123,9 (CH-Ph); 122,9 (CH-Ph); 119,4 (CH-Ph); 118,3 (CH-Ph); 76,4 (C); 71,5 (CH); 71,2 (CH); 54,5 (CH); 44,1 (CH₂); 39,4 (CH₂); 29,5 (CH₂); 29,1 (CH₂); 28,5 (CH₃); 24,3 (CH₂); 22,9 (CH₂); 22,5 (CH₂); 22,2 (CH₃)

(+)-LR-ESIMS *m/z*: 850 [M+Na]⁺

PARTE EXPERIMENTAL

Síntesis del compuesto 20



Partiendo de 35 mg (0,042 mmol) del compuesto **19** y realizando el mismo procedimiento que en la obtención del compuesto **10**, se obtuvieron 18 mg (76% de rendimiento) de compuesto **20** como un aceite incoloro.

RMN ^1H (CD_3OD), δ_{H} ppm: 7,28(dd, $J = 8,0; 1,4$ Hz, 1H); 7,21(dd, $J = 8,0; 1,4$ Hz, 1H); 6,95(td, $J = 8,0; 1,4$ Hz, 2H); 6,73 (m, 2H); 4,02 (s, 2H); 3,76 (t, $J = 6,6$ Hz, 1H); 3,39 (m, 2H); 3,25 (m, 4H); 1.83 (m, 2H); 1,60 (m, 6H); 1,43 (m, 2H)

RMN ^{13}C (CD_3OD), δ_{C} ppm: 171,8 (C=O); 171,5 (C=O); 170,0 (C=O); 149,9 (C-Ph); 147,3 (C-Ph); 119,8 (C-Ph); 119,6 (C-Ph); 119,3 (C-Ph); 118,7 (CH-Ph); 117,0 (C-Ph); 54,5 (CH); 43,7 (CH_2); 40,5(CH_2); 40,2 (CH_2); 39,6 (CH_2); 32,2 (CH_2); 30,1 (CH_2); 30,0 (CH_2); 29,9 (CH_2); 25,3 (CH_2); 23,0 (CH_2)

(+)-LR-ESIMS m/z : 560 $[\text{M}+\text{H}]^+$

Aislamiento de las amonabactinas naturales

Detección de la presencia de sideróforos producidos por *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* en un cultivo bacteriano.

0,5 L de sobrenadante filtrado y centrifugado obtenido del cultivo bacteriano de *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* en condiciones deficientes de hierro, se congeló y posteriormente se liofilizó para dar lugar a 13,2 g de material liofilizado. Con el fin de purificar los sideróforos producidos, se pasó 1 g de liofilizado a través de un cartucho OASIS® HLB (6 g). Para hacer la separación, los cartuchos fueron inicialmente acondicionados con 60 mL de CH₃CN con TFA al 0,1 % y 60 mL de agua MQ con TFA al 0,1 %. Posteriormente, se cargó la muestra disuelta en 1 mL de agua MQ con TFA al 0,1 %. A continuación, el cartucho se lavó con agua MQ con TFA al 0,1 %, para retirar las sales, y por último, los compuestos se eluyeron usando un gradiente CH₃CN y agua MQ con TFA al 0,1 % (10: 90, 20: 80, 30: 70, 50: 50, 70: 30, 100: 0). Después de eliminar el CH₃CN en el rotavapor a 25 °C, las fracciones se congelaron y liofilizaron. Para identificar cuál de las fracciones contenía los sideróforos, se utilizó la técnica de Cromatografía líquida acoplada con espectrómetro de masas (LC/MS), localizándose en la fracción eluida con 50:50 CH₃CN - agua MQ con TFA al 0,1 %.

Aislamiento de amonabactinas

Con el fin de purificar y caracterizar los sideróforos producidos por la bacteria, se repitió el procedimiento anterior, usando 5,02 g de liofilizado. La fracción eluida con 50:50 CH₃CN - agua MQ con TFA al 0,1 %, se concentró en el rotavapor para eliminar el CH₃CN y a continuación se congeló y luego se liofilizó, obteniéndose 45,3 mg de la fracción enriquecida en amonabactinas.

Purificación de amonabactinas

La fracción enriquecida en amonabactinas se purificó mediante HPLC con una columna Discovery HS F5 (5 µm, 100 x 4.6 mm) y gradiente CH₃CN- agua MQ con TFA al 0,1 % (5 min gradiente de 10 a 60 % de CH₃CN, 10 min gradiente de 60 a 100 % de CH₃CN y finalmente 3 minutos isocrático a 100 % de CH₃CN). De esta forma se obtuvieron 6,6

PARTE EXPERIMENTAL

mg de una mezcla de las amonabactinas P750 y T739; por otro lado se obtuvo 3,8 mg de la mezcla de las amonabactinas P693 y T732.

Cada una de las fracciones se sometieron a separación por HPLC con una columna Aeris 5 μm PEPTIDE C18 (5 μm , 250 x 10 mm) y se usó un gradiente de CH_3CN - agua MQ con TFA al 0,1 % (15 min gradiente de 0 a 100 % de CH_3CN , y finalmente 2 minutos isocrático a 0 % de CH_3CN).

A partir de la fracción mezcla de las amonabactinas P750 y T739 de la primera separación se obtuvieron mediante la segunda separación: 1,7 mg de una fracción mezcla 1,3:1 de las amonabactinas P750/T789; y 0,6 mg de una fracción mezcla de las amonabactinas P750 y T739, donde T739 se encuentra en mayor proporción. Por otro lado, se obtuvieron a partir de la fracción mezcla de las amonabactinas P693 y T732, 1,5 mg de una fracción mezcla 2,4:1 de las amonabactinas P693 y T732; y 0,7 mg de la mezcla de las amonabactinas P693 y T732 en una relación 1,3:1.

RESULTADOS Y DISCUSIONES

Resultados y discusiones

• Preparación de los análogos de amonabactinas

Se decidió sintetizar los análogos **A (10)** y **B (20)** con el fin de determinar cuáles son los requisitos estructurales necesarios para el reconocimiento molecular de las proteínas receptoras FstB y / o FstC.

Preparación del análogo A (10)

En la figura 9 se propone la ruta retrosintética para la obtención del análogo **A (10)**.

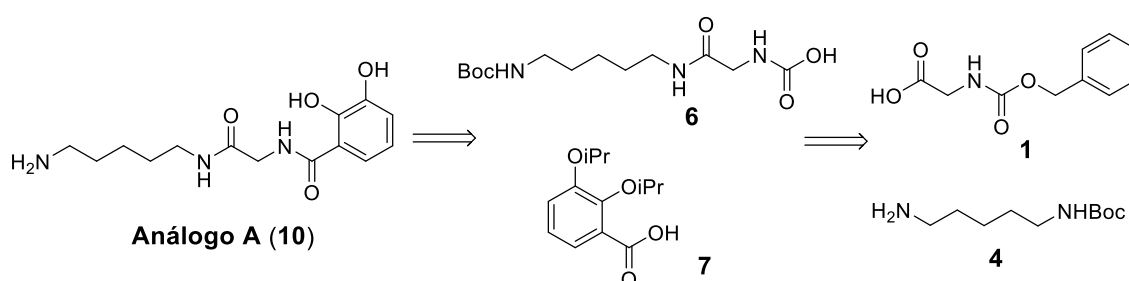


Figura 9. Ruta retrosintética del análogo **A (10)**.

Tal como se observa en la Figura 10, para la obtención del análogo **A (10)** se partió de una glicina comercial, compuesto **1**, con el grupo amino protegido con Cbz. La activación del ácido carboxílico del compuesto **1** con *N*-hidroxisuccinimida (**2**) y posterior acoplamiento con la cadaverina monoprotegida con un grupo Boc **4** condujo al compuesto **5**. La aparición de la señal a 3,78 ppm correspondiente a los protones α de la glicina y las señales a 3,10 y 3,01 ppm de los protones adyacentes a los nitrógenos de la cadaverina en su espectro RMN ^1H confirman su obtención. Posteriormente, se realizó la desprotección del grupo Cbz de la glicina mediante una hidrogenación catalítica para rendir el compuesto **6**, que se acopló con el ácido 2,3-diisopropoxibenzoico (**7**) tras su activación con *N*-hidroxisuccinimida (**2**) para dar la amida **9**. En los espectros de RMN tanto de ^1H como de ^{13}C del compuesto **9**, se puede confirmar el acoplamiento de los dos fragmentos por a la presencia de dos señales a δ_{H} 7,67 y a δ_{C} 7,07 correspondientes a los protones aromáticos, y a cuatro señales entre 119,3 y 127,3 ppm correspondientes a carbonos aromáticos. Por último, la

RESULTADOS Y DISCUSIONES

desprotección con BCl_3 de los grupos isopropilos y del grupo Boc presentes en **9** permitió la obtención del análogo **A (10)**. (Figura 10)

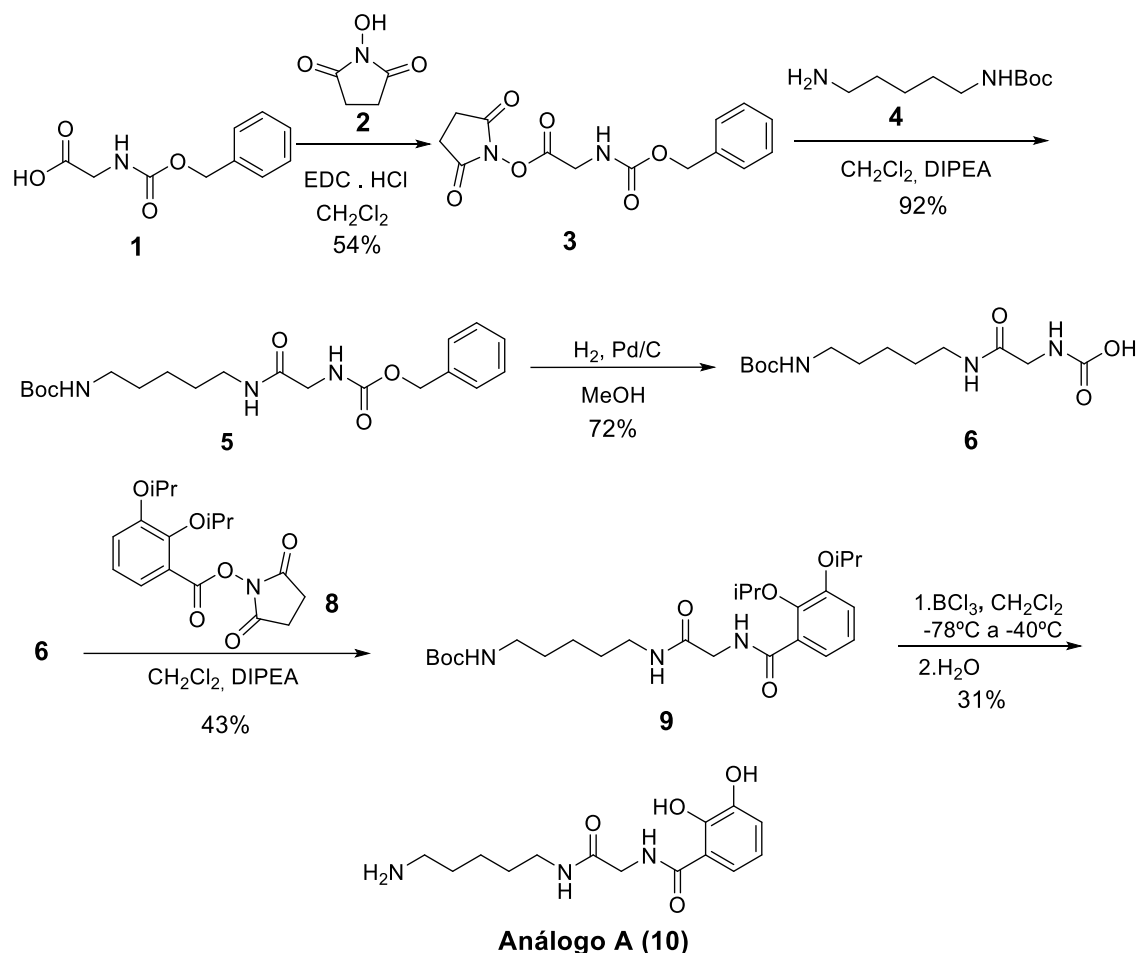


Figura 10. Esquema sintético del análogo **A (10)**.

En el espectro ^1H RMN del compuesto **10** se puede observar un singulete a δ_{H} 4,0 correspondiente al CH_2 de la glicina, dos señales entorno a 1,6 ppm correspondientes a los CH_2 centrales de la cadaverina, dos señales a 3,28 ppm y a 2,94 ppm de los CH_2 adyacentes a los nitrógenos de la cadaverina. También se observan dos doble dobletes a 7,30 ppm y a 6,98 ppm, y un doblete a 6,78 ppm, correspondientes a los hidrógenos del grupo catecol (Figura 17 en Anexos).

En el espectro de RMN del ^{13}C del compuesto **10** se puede observar la señal a 43,9 ppm correspondiente al CH_2 de la glicina, tres señales entre 24,5 y 29,9 ppm correspondiente a los CH_2 centrales de la cadaverina, dos señales a 40,7 y 39,8 ppm de

los carbonos adyacentes al nitrógeno, y dos señales aromáticas a δ_c 119,8 y 119,2 ppm correspondientes a los carbonos del grupo catecol (Figura 18 en Anexos).

Preparación del análogo B (20)

En la figura 11 se propone la ruta retrosintética para la obtención del análogo B (20).

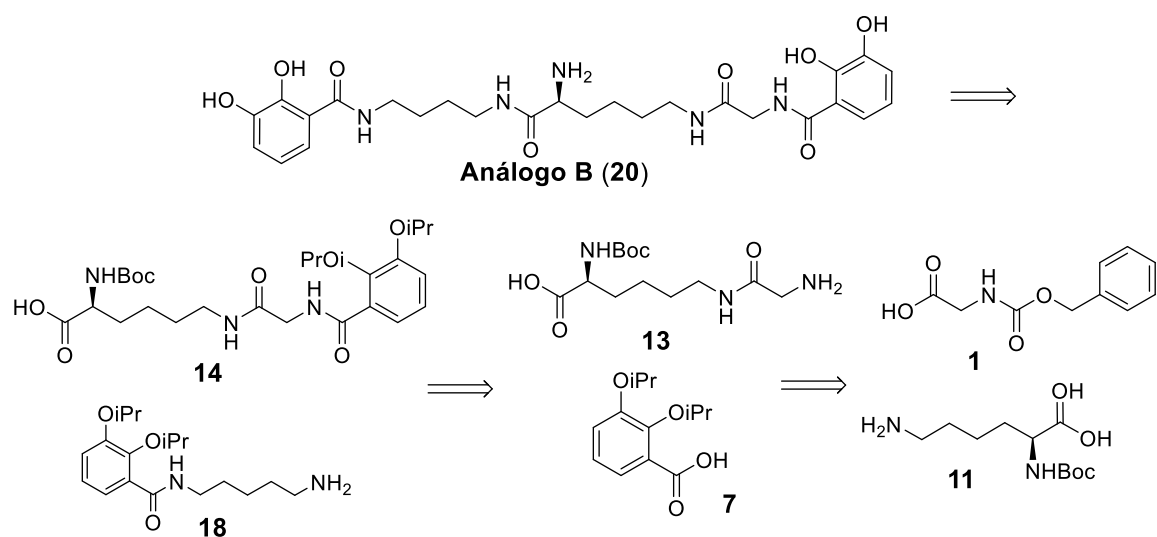


Figura 11. Ruta retrosintética del análogo B (20).

Para la obtención de este análogo B (20) se partió igualmente de una glicina comercial, compuesto **1**, con el grupo amino protegido con Cbz. La activación del ácido carboxílico del compuesto **1** con *N*-hidroxisuccinimida (**2**) y posterior acoplamiento con la lisina protegida en su grupo amino con Boc, compuesto **11**, condujo a la amida **12**. La aparición de una señal a 3,79 ppm, correspondiente a la glicina, y las señales a 3,15 y 1,38 ppm debido a la presencia de la unidad de cadaverina en su espectro RMN ^1H confirman su obtención. Posteriormente, se realizó la desprotección de la glicina mediante una hidrogenación catalítica para rendir el compuesto **13**, que se acopló con el ácido 2,3-diisopropoxibenzoico (**7**) tras la activación con *N*-hidroxisuccinimida (**2**) para dar la amida **14**. En los espectros de RMN tanto de ^1H como de ^{13}C del compuesto **14**, se puede confirmar el acoplamiento de los dos fragmentos debido a la presencia de un multiplete a 7,00 ppm en su espectro de RMN de ^1H correspondientes a los hidrógenos aromáticos, y cuatro señales entre δ_c 119,4 y 127,1 ppm correspondientes

RESULTADOS Y DISCUSIONES

a carbonos aromáticos. Posteriormente, el grupo ácido de la lisina del compuesto **14** se activó con *N*-hidroxisucinimida (**2**), para rendir la amida **15**, facilitando así el acoplamiento de ésta con el grupo amino de la cadaverina que está unida al ácido 2,3-diisopropoxibenzoico (**7**), obteniéndose de esta forma el compuesto **19**. En el espectro de RMN ^1H se observan dos señales, una a 7,65 ppm que integra por dos protones y una señal a 7,05 ppm que integra por cuatro protones, confirmándose así el acoplamiento entre ambos fragmentos. Por último, se realizó la desprotección de los grupos isopropilos y del grupo Boc presentes en **19** con BCl_3 que permitió la obtención del análogo **A** (**20**). (Figura 12)

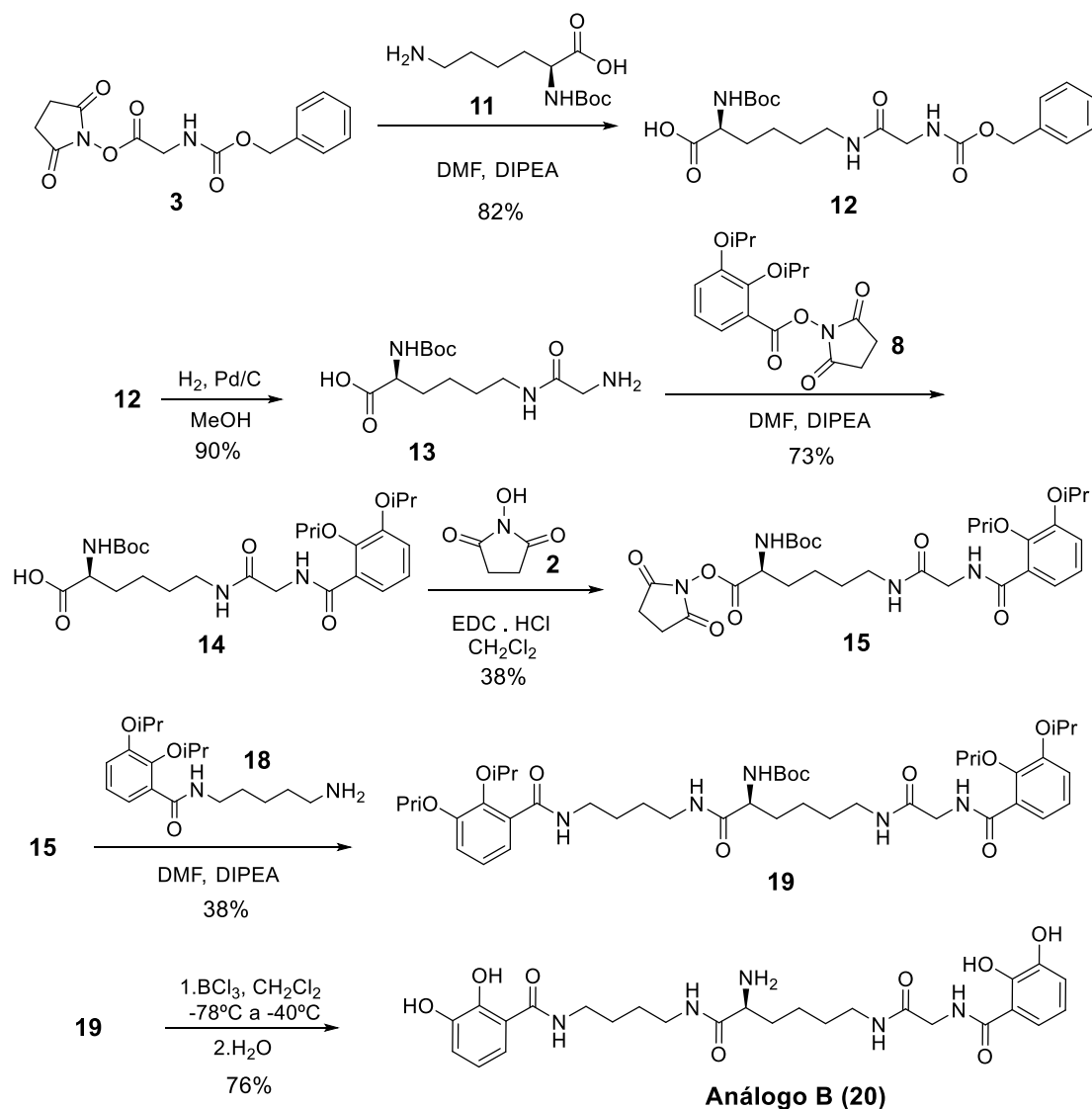


Figura 12. Esquema sintético del análogo B (**20**).

En el espectro de RMN de ^1H del compuesto **20** se puede observar el singulete a 4,00 ppm correspondiente al CH_2 de la glicina, tres señales entorno a 1,6 ppm correspondientes a los CH_2 centrales de la cadaverina y de la lisina, y tres señales entre δ_{H} 3,25 y 3,76 ppm pertenecientes a los CH_2 adyacentes a los nitrógenos. También se observan la presencia de dos doble dobles a 7,21 y 7,28 ppm, y un triple doblete a 6,95 ppm, todos ellos correspondientes a los hidrógenos del grupo catecol (Figura 42 en Anexos).

En el espectro de RMN de ^{13}C del compuesto **20** se puede observar la señal a δ_{C} 43,9 correspondiente al CH_2 de la glicina, una señal a 54,5 ppm correspondiente al CH de la lisina, siete señales entre 23 y 32 ppm correspondiente a los CH_2 centrales de la cadaverina y la lisina, entre 29,6 y 32,2 ppm tres señales de los carbonos CH_2 adyacentes al nitrógeno, y seis señales aromáticas entre 117,0 y 119,8 ppm correspondientes a los carbonos del grupo catecol (Figura 43 en Anexos).

Los espectros de todos los compuestos sintetizados se encuentran recogidos en el apartado de Anexos.

Aislamiento de las amonabactinas naturales

El presente trabajo también se centró en el aislamiento y caracterización de los sideróforos producidos por una cepa mutante de *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* a la que se le había eliminado la capacidad de producir el sideróforo acinetobactina de tal forma que solo biosintetiza las amonabactinas. Para tal fin, el sobrenadante del cultivo de esta cepa mutante, realizado en condiciones deficientes de hierro, se liofilizó y posteriormente se sometió a extracción en fase sólida (SPE) a través de cartuchos OASIS[®] HLB, usando gradiente de CH_3CN en H_2O con TFA al 0,1 %. De esta forma se obtuvieron 7 fracciones, las cuales se analizaron mediante cromatografía líquida acoplada con espectrometría de masas (LC/MS), para determinar cuál de las fracciones contenían las aminobactinas. Dicho análisis permitió localizarlas en la fracción eluída con $\text{CH}_3\text{CN}-\text{H}_2\text{O}$ (1:1) con TFA al 0,1 %. Esta fracción se separó mediante HPLC, usando una columna de fase reversa y como fase móvil un gradiente $\text{CH}_3\text{CN}-\text{H}_2\text{O}$ con TFA al 0,1 %, para dar lugar a dos fracciones mezcla. Estas fracciones fueron sometidas de nuevo

RESULTADOS Y DISCUSIONES

a una segunda separación por HPLC utilizando otra columna de fase reversa y como fase móvil un gradiente CH₃CN- H₂O con TFA al 0,1 %, obteniéndose finalmente 4 fracciones mezcla (A, B, C y D) de las distintas amonabactinas.

La caracterización de las fracciones mezcla de amonabactinas obtenidas por HPLC se realizó mediante RMN ¹H, identificándose así el tipo de amonabactina presente en cada fracción.

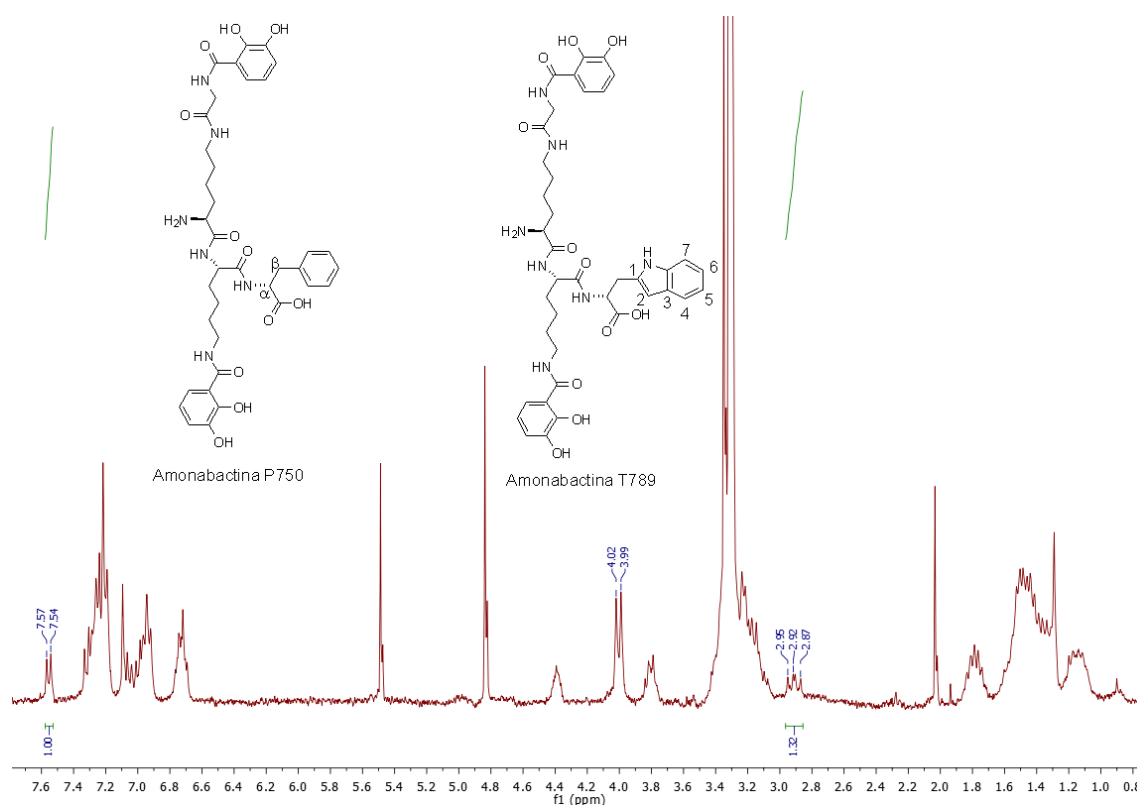


Figura 13. Espectro ¹H RMN de la fracción A (P750/T789) (300 MHz, CD₃OD).

En el espectro de RMN de ¹H de la fracción A se puede observar la presencia de dos singuletes a 4,02 y 3,99 ppm correspondientes a los CH₂ de residuos de glicinas indicando que contiene una mezcla de las amonabactinas P750/T789. La proporción 1,3:1 entre las amonabactinas P750/T789 en la fracción A se dedujo a partir de la relación de integrales entre la señal a 7,5 ppm, característica del protón H7 del triptófano de T789, y la señal a 2,9 ppm, correspondiente a uno de los protones β de la fenilalanina de P750.

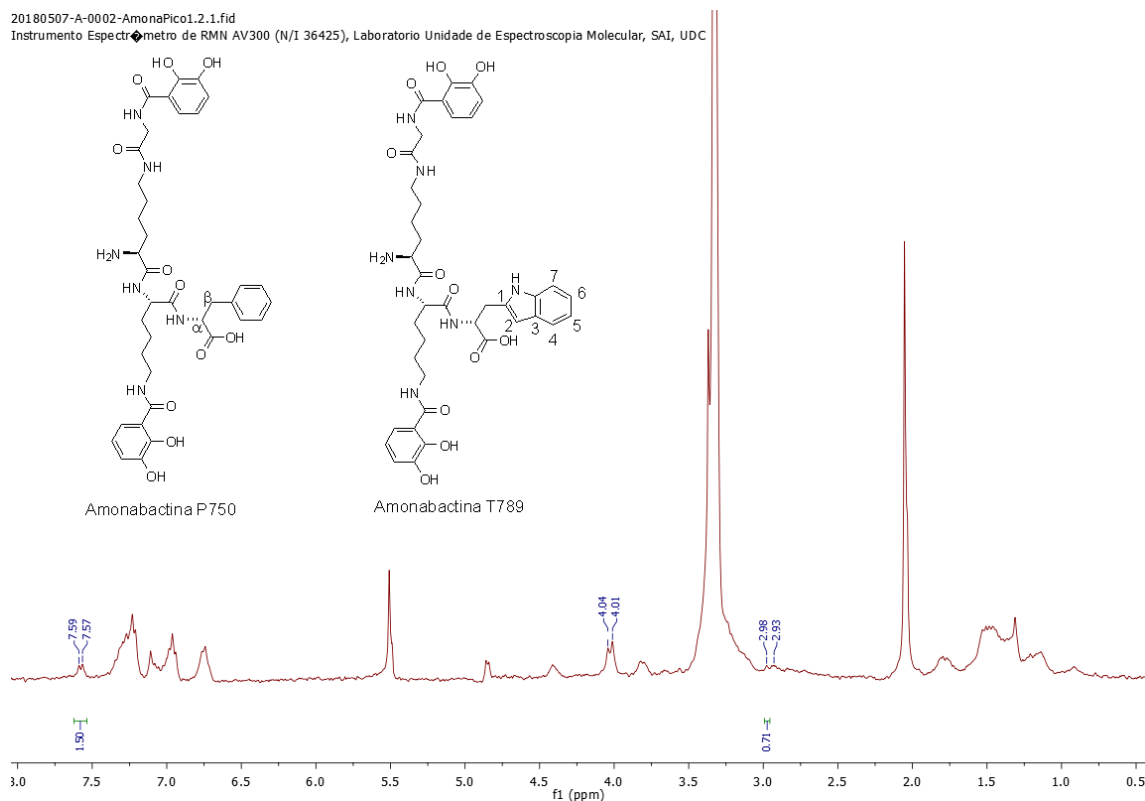


Figura 14. Espectro ¹H RMN de la fracción B (P750/T789) (300 MHz, CD₃OD).

En el espectro ¹H RMN de la fracción B también se puede observar los dos singuletes a 4,04 y 4,01 ppm correspondientes a los CH₂ de las glicinas de ambos compuestos que indican que también contiene una mezcla de P750/T789. Pero en este caso, dado que la integral de la señal a 4,01 ppm, correspondiente a la amonabactina T789, es mayor que la de la señal a 4,04 ppm, correspondiente a la amonabactina T750, se deduce que la T789 es mayoritaria en la mezcla. Adicionalmente, el hecho de que la señal a 7,5 ppm, característica del H7 del triptófano de T789, posea una integral mayor que la señal a 2,9 ppm correspondiente a uno de los protones β de la fenilalanina de P750, confirma que la T789 se encuentra en mayor proporción en la fracción B.

RESULTADOS Y DISCUSIONES

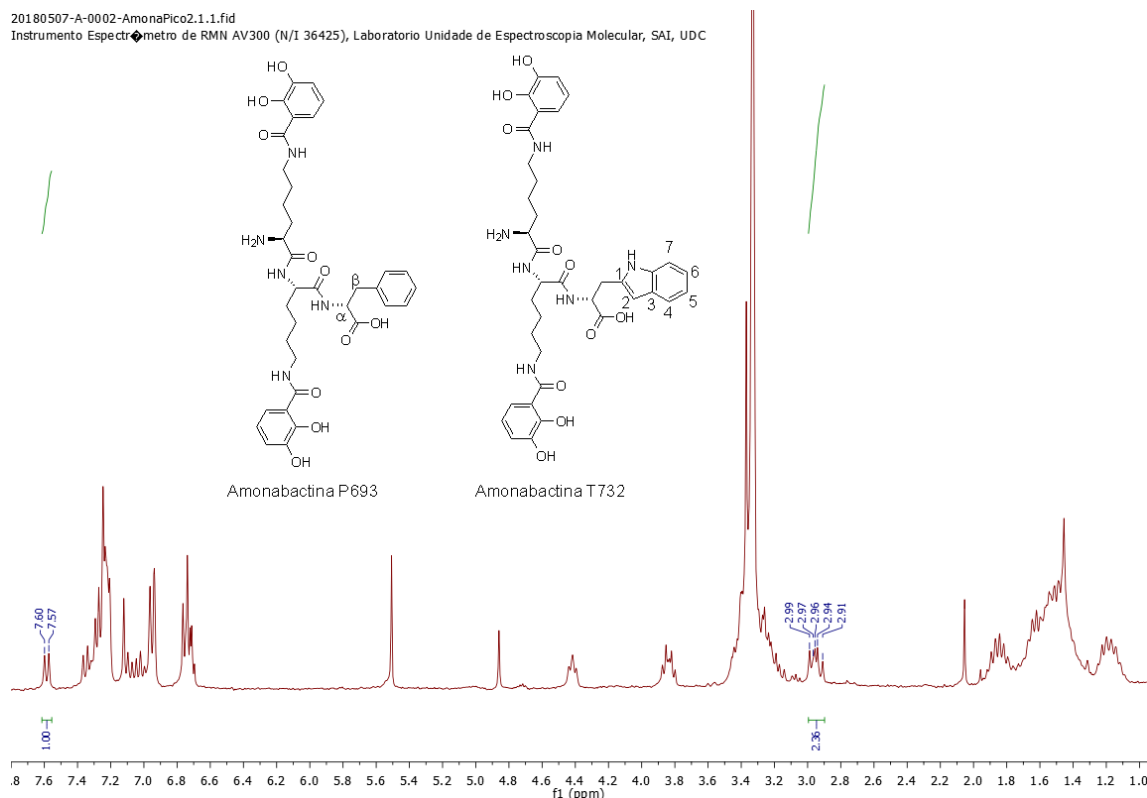


Figura 15. Espectro ¹H RMN de la fracción C (P693/T732) (300 MHz, CD₃OD).

En relación con la fracción C, la ausencia de singuletes en torno a 4 ppm en su espectro de RMN ¹H indica que en la mezcla no están presentes las amonabactinas que presentan glicina en su estructura como son la P750 y la T789. En este caso la proporción 2,4:1 entre las amonabactinas P693/T732 en la fracción C se dedujo a partir de la relación de integrales entre la señal a 7,58 ppm, característica del protón H7 del triptófano de T732, y la señal a 2,96 ppm, correspondiente a uno de los protones β de la fenilalanina de P693.

RESULTADOS Y DISCUSIONES

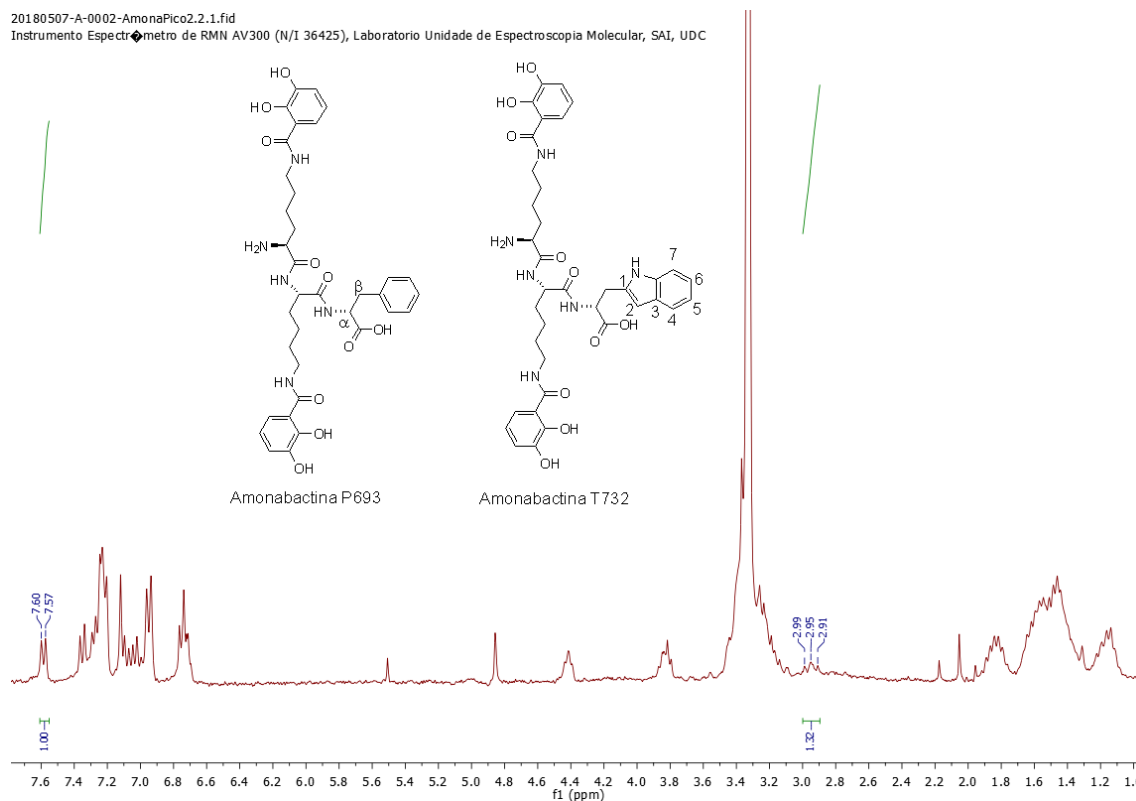


Figura 16. Espectro ^1H RMN de la mezcla D (P693/ T732) (300 MHz, CD_3OD).

De igual forma en el espectro de RMN de ^1H de la fracción D tampoco se observa ninguna señal entorno a 4 ppm, por lo que se puede afirmar que en la mezcla tampoco están presentes las amonabactinas que presentan glicina en su estructura. De nuevo la presencia de la señal a 7,56 ppm, característica del H7 del triptófano de T732, junto con la señal a 2,9 ppm anteriormente indicada, indica que esta fracción está compuesta también por una mezcla de P693/T732 en una relación 1,3:1.

RESULTADOS Y DISCUSIONES

- **Ensayos de la actividad siderófora**

Una vez caracterizados correctamente tanto las fracciones aisladas que contienen las amonabactinas como los análogos sintetizados, se realizaron los ensayos de actividad siderófora con el fin de determinar cuáles son los requisitos estructurales para el reconocimiento molecular de cada una de las proteínas receptoras (FstB y/o FstC). Estos ensayos se realizaron sobre diversas cepas mutantes a las que se le habían eliminado la capacidad de producción de ambos sideróforos y la expresión de alguna de las proteínas de membrana. Los resultados se muestran en las Tablas 1 y 2.

Tabla 1. Ensayos de actividad siderófora de los análogos sintetizados.

Compuesto	Receptores activos en la cepa mutada	Actividad siderófora	Reconocimiento molecular
Análogo A (10)	FstB/FstC	-	No
	FstC	-	
	FstB	-	
	Ninguno	-	
Análogo B (20)	FstB/FstC	+	FstB/FstC
	FstC	+	
	FstB	+	
	Ninguno	-	

En base a los resultados mostrados en la Tabla 1, que indican la ausencia de actividad siderófora del análogo **A (10)** y presencia de actividad en el análogo **B (20)**, se deduce que para derivados simplificados de las amonabactinas es necesaria la existencia de al menos dos anillos de catecol para que el análogo sea reconocido por la proteína receptora.

Tabla 2. Ensayos de actividad siderófora de las fracciones mezcla de amonabactinas naturales.

Compuesto	Receptores activos en la cepa mutada	Actividad siderófora	Reconocimiento molecular
Fracción A (P750/T789 1,3:1)	FstB/FstC	+	FstC
	FstC	+	
	FstB	-	
	Ninguno	-	
Fracción B (P750/T789, mayoritaria T789)	FstB/FstC	+	FstC
	FstC	+	
	FstB	-	
	Ninguno	-	
Fracción C (P693/T732 2,4:1)	FstB/FstC	+	FstB/FstC
	FstC	+	
	FstB	-	
	Ninguno	-	
Fracción D (P693/T732, 1,3:1)	FstB/FstC	+	FstB/FstC
	FstC	+	
	FstB	-	
	Ninguno	-	

Del análisis de la actividad siderófora de las fracciones mezcla de amonabactinas naturales, mostrado en la Tabla 2, se deduce que las que contienen la unidad de glicina (P750/T789) son exclusivamente reconocidas por la proteína receptora FstC, mientras que las que no poseen glicina (P693/T732) son reconocidas por ambas proteínas receptoras. Este resultado parece indicar que la presencia de glicina en las amonabactinas naturales es un requisito estructural clave en el reconocimiento molecular exclusivo por parte de la proteína receptora FstC.

CONCLUSIONES

Conclusiones

Durante este Trabajo de Fin de Máster se han utilizado diferentes rutas sintéticas para la obtención de análogos de las amonabactinas y se han buscado las condiciones adecuadas para el aislamiento de las amonabactinas naturales, con el fin de estudiar su actividad siderófora y determinar cuáles son los requisitos estructurales necesarios para el reconocimiento molecular de cada una de sus proteínas receptoras (FstB y/o FstC).

Del trabajo realizado en el presente Trabajo de Fin de Máster se deducen las siguientes conclusiones:

- Se han preparado los análogos **A (10)** y **B (20)** de las amonabactinas P750 y T789.
- Se han aislado varias fracciones mezcla de las amonabactinas naturales a partir de cultivos bacterianos de *Aeromonas salmonicida* susp. *salmonicida*.
- Se ha realizado la evaluación de la actividad siderófora de los compuestos sintetizados y aislados.
- De la actividad siderófora de los análogos sintetizados se deduce que es necesaria la presencia de al menos dos anillos de catecol para que el compuesto sea reconocido por la proteína receptora.
- De la actividad siderófora de la mezcla de las amonabactinas naturales se deduce que la presencia de glicina en su estructura determina el reconocimiento exclusivo de la proteína receptora FstC.

CONCLUSIONS

During this Master's thesis, different synthetic routes have been used to obtain amonabactins-analogs and the appropriate conditions for the isolation of natural amonabactins have been investigated, in order to study their siderophore activity and to determine the structural necessary requirements for the molecular recognition of each of their receptor proteins (FstB and / or FstC).

From the work carried out in the present Master's Thesis, the following conclusions are drawn:

- Analogs **A (10)** and **B (20)** of amonabactins P750 and T789 have been prepared.
- Several mixture fractions of the natural amonabactins have been isolated from bacterial cultures of *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*.
- From the siderophore activity of the synthesized analogs it was deduced that the presence of at least two rings of catecol is necessary for the compound to be recognized by the receptor protein.
- From the siderophore activity of the mixture of the natural amonabactinas, it was deduced that the presence of glycine in its structure determines the specific recognition of the receptor protein FstC.

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) APROMAR. *Apromar 2017*, 93.
- (5) Toranzo, A. E.; Magariños, B.; Romalde, J. L. *Aquaculture* **2005**, *246*, 37–61.
- (6) Tomado de <https://aquahealth.wordpress.com/2011/02/20/vibriosis-disease-occured-in-snapper/> (accessed Jun 14, 2018).
- (7) Tomado de <http://www.salmonexpert.cl/noticias/enfermedades-infecciosas/> (accessed Jun 14, 2018).
- (8) Tomado de: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S1727-99332011000300013&script=sci_arttext (accessed Jun 14, 2018).
- (9) Balado, M.; Souto, A.; Vences, A.; Careaga, V. P.; Valderrama, K.; Segade, Y.; Rodr, J.; Osorio, C. R.; Jiménez, 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:rftfs&Itemid=505&lang=es (accessed Jun 14, 2018).
- (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*, 1137–1145.

BIBLIOGRAFÍA

- (12) Hider, R. C.; Kong, X. *Nat. Prod. Rep.* **2010**, *27*, 637–657.
- (13) Wandersman, C.; Delepelaire, P. *Annu. Rev. Microbiol.* **2004**, *58*, 611–647.
- (14) Balado, M.; Segade, Y.; Rey, D.; Osorio, C. R.; Rodríguez, J.; Lemos, M. L.; Jiménez, C. *ACS Chem. Biol.* **2017**, *12*, 479–493.
- (15) Górska, A.; Sloderbach, A.; Marszałł, M. P. *Trends Pharmacol. Sci.* **2014**, *35*, 442–449.
- (16) Raines, D. J.; Sanderson, T.; Wilde, E.; Duhme-Klair, A.-K. *Ref. Modul. Chem. Mol. Sci. Chem. Eng.* **2015**, 1–32.
- (17) Sureda, J. C. *Trab. Fin Máster Univ. A Coruña* **2016**.
- (18) Katherine, A.; Pereira, V. *Tesis Dr. Univ. A Coruña* **2016**.
- (19) Soengas, R. G.; Anta, C.; Espada, A.; Paz, V.; Ares, I. R.; Lemos, L.; Jiménez, C.; Balado, M.; Rodríguez, J. *Tetrahedron Lett.* **2006**, *47*, 7113–7116.
- (20) Soengas, R. G.; Anta, C.; Espada, A.; Nieto, R. M.; Larrosa, M.; Jiménez, C.; Rodríguez, J. *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 3021–3024.
- (21) Soengas, R. G.; Larrosa, M.; Balado, M.; Rodríguez, J.; Lemos, L.; Jiménez, C. *Org. Biomol. Chem.* **2008**, *6*, 1278–1287.
- (22) Souto, A.; Montaos, M. A.; Balado, M.; Osorio, C. R.; Rodríguez, J.; Lemos, M. L.; Jiménez, C. *Bioorg Med. Chem.* **2013**, *21*, 295–302.

ANEXOS

20171129-A-0002-AS022purif.1.fid
Instrumento Espectrometro de RMN AV300 (N/I 36425), Laboratorio Unidad de Espectroscopia Molecular, SAI, UDC

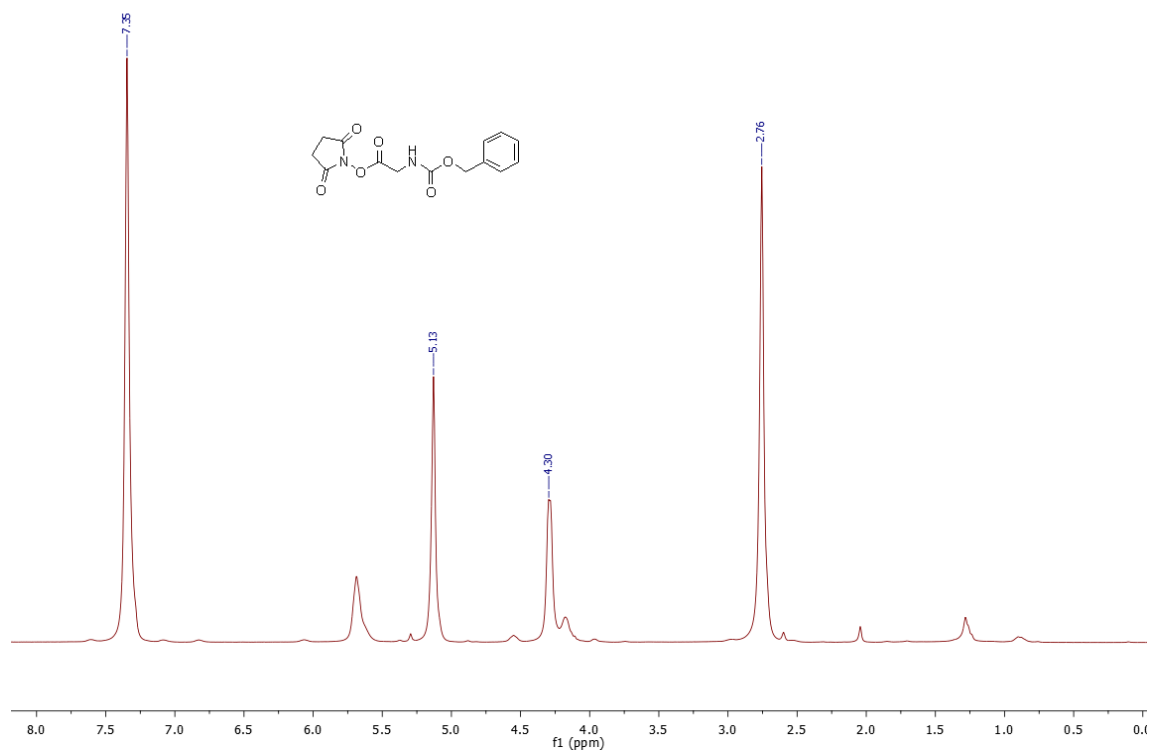


Figura 17. Espectro ^1H RMN del compuesto **3** (300 MHz, CDCl_3).

20171129-A-0002-AS022purif13C.1.fid
Instrumento Espectrometro de RMN AV300 (N/I 36425), Laboratorio Unidad de Espectroscopia Molecular, SAI, UDC

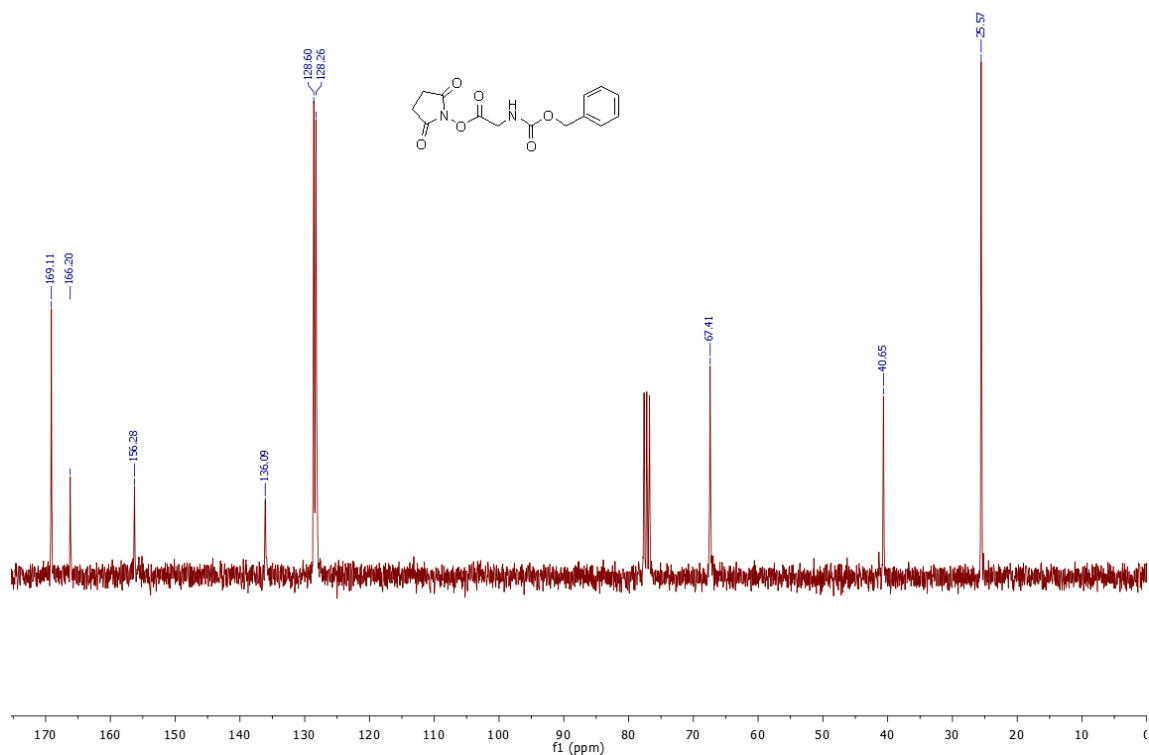


Figura 18. Espectro ^{13}C RMN del compuesto **3** (300 MHz, CDCl_3).

ANEXOS

20170307-A-0002-AS024A.1.fid
Instrumento Espectrómetro de RMN AV300 (N/I 36425), Laboratorio Unidade de Espectroscopia Molecular, SAI, UDC

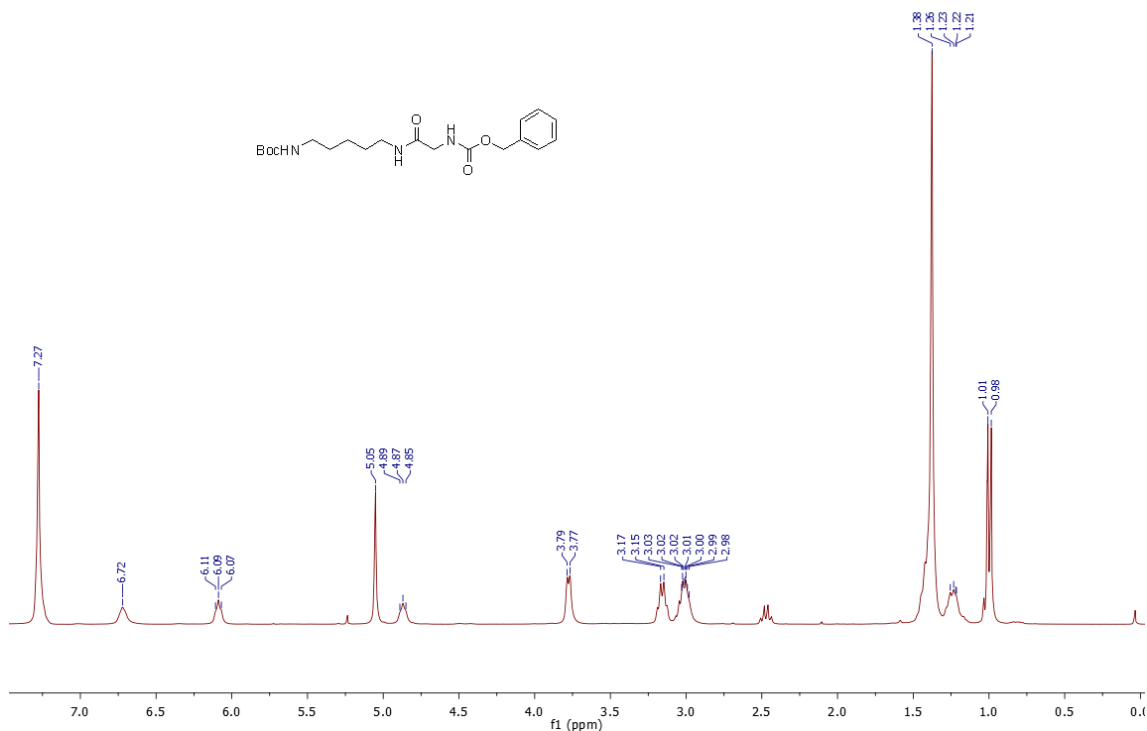


Figura 19. Espectro ^1H RMN del compuesto 5 (300 MHz, CDCl_3).

20170307-A-0002-AS024A.2.fid
Instrumento Espectrómetro de RMN AV300 (N/I 36425), Laboratorio Unidade de Espectroscopia Molecular, SAI, UDC

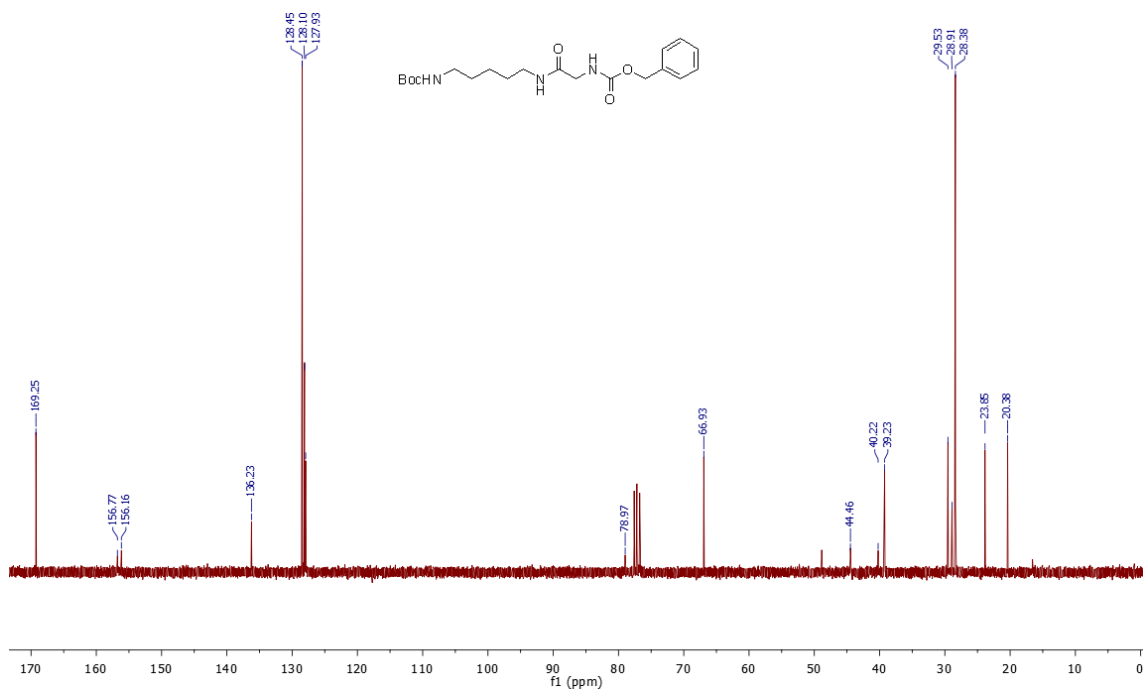
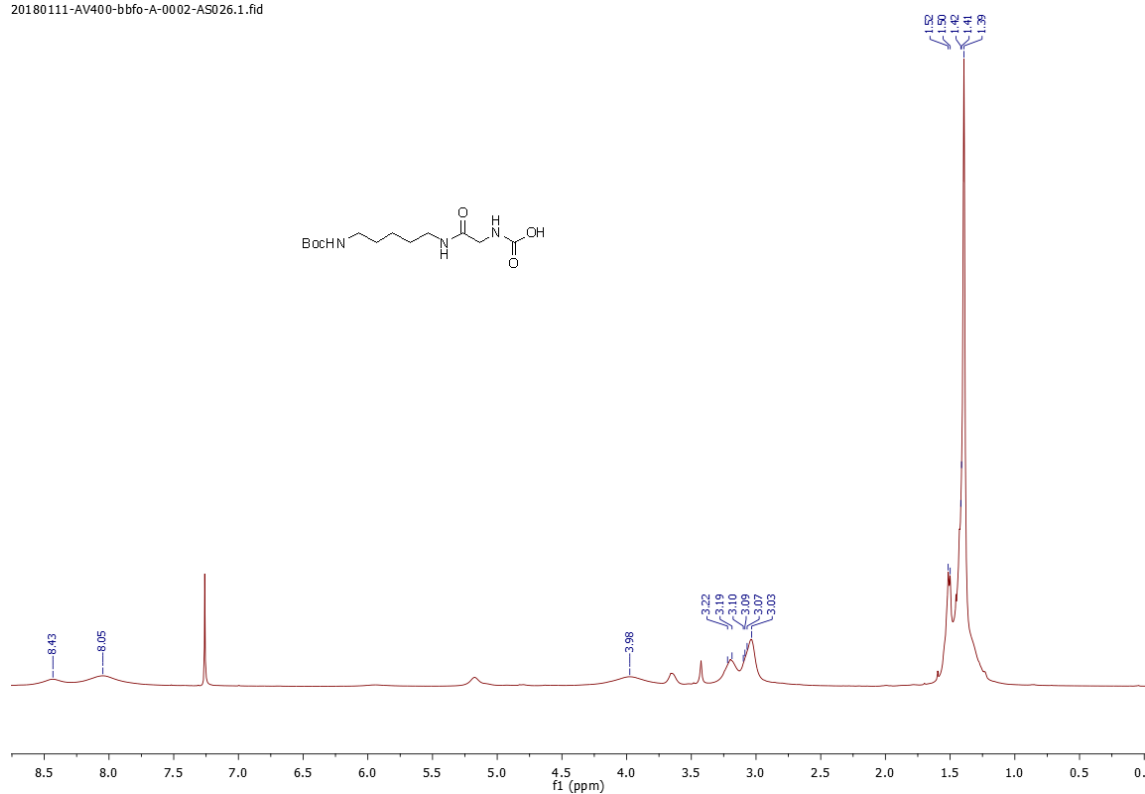
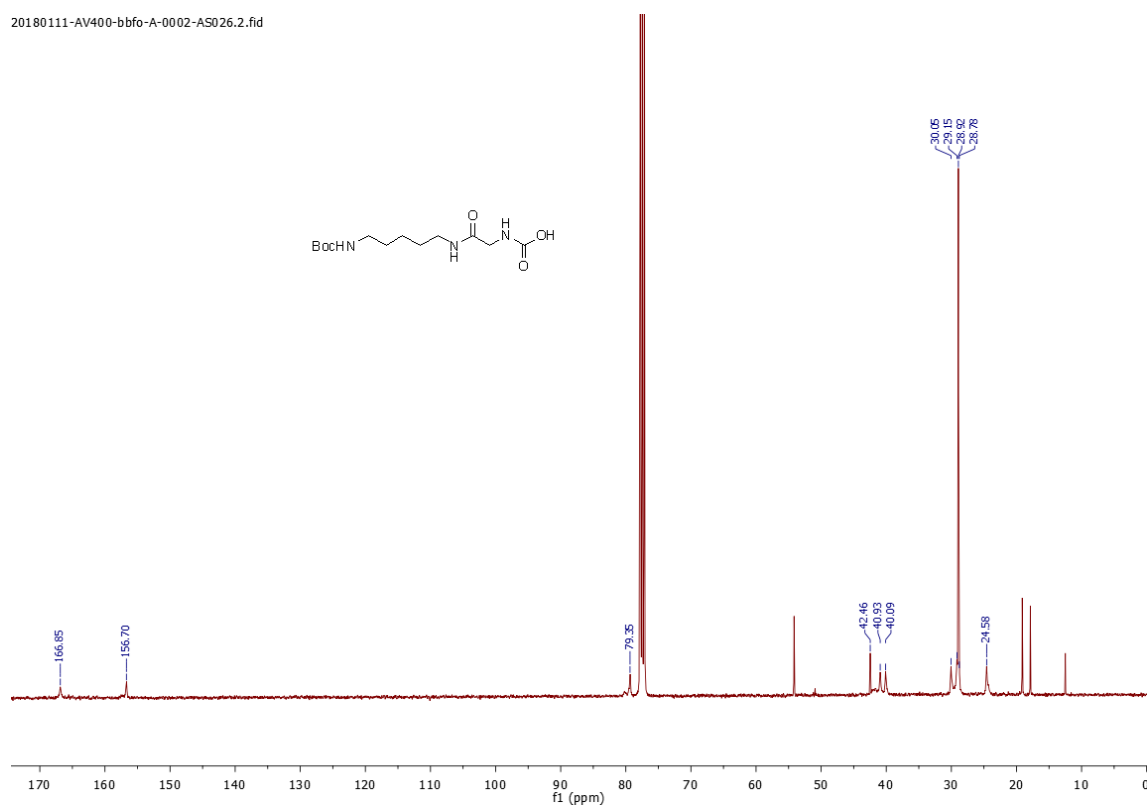


Figura 20. Espectro ^{13}C RMN del compuesto 5 (300 MHz, CDCl_3).

20180111-AV400-bbfo-A-0002-AS026.1.fid

Figura 21. Espectro ¹H RMN del compuesto 6 (400 MHz, CDCl₃).

20180111-AV400-bbfo-A-0002-AS026.2.fid

Figura 22. Espectro ¹³C RMN del compuesto 6 (400 MHz, CDCl₃).

ANEXOS

20180209-A-0002-JCS250.1.fid
Instrumento Espectrometro de RMN AV300 (N/I 36425), Laboratorio Unidad de Espectroscopia Molecular, SAI, UDC

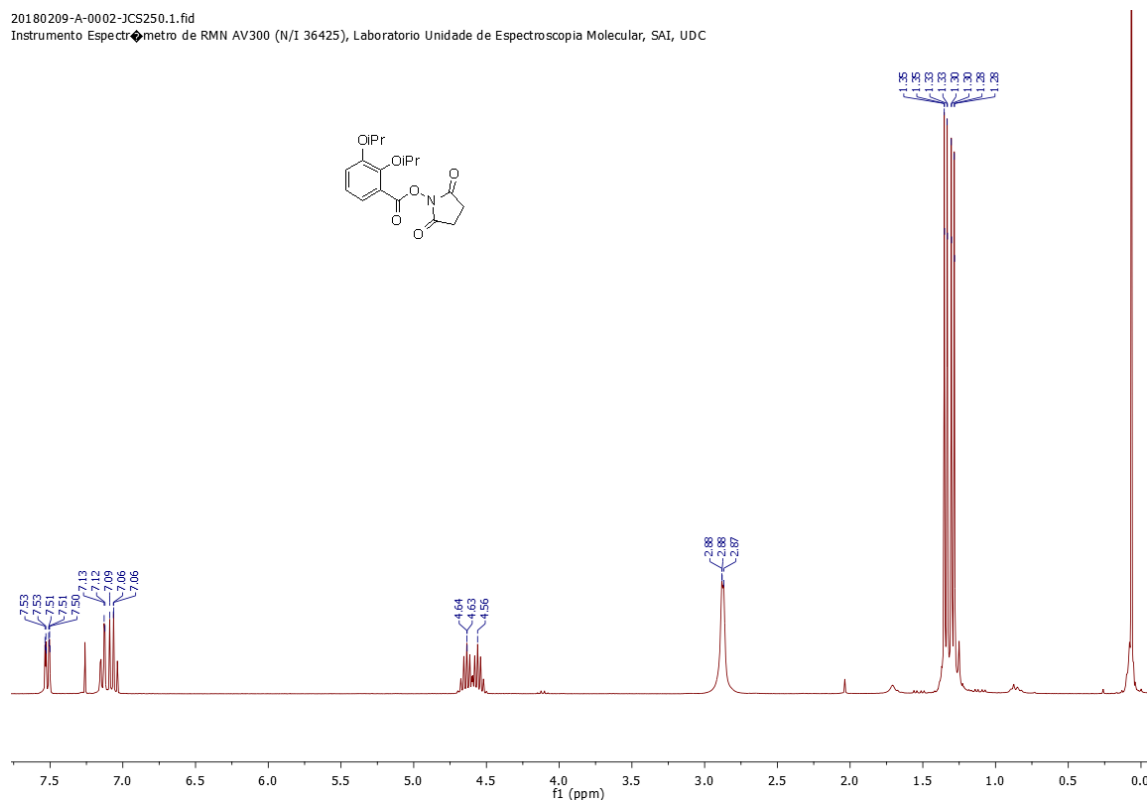


Figura 23. Espectro ^1H RMN del compuesto 8 (300 MHz, CDCl_3).

20180209-A-0002-JCS250.2.fid
Instrumento Espectrometro de RMN AV300 (N/I 36425), Laboratorio Unidad de Espectroscopia Molecular, SAI, UDC

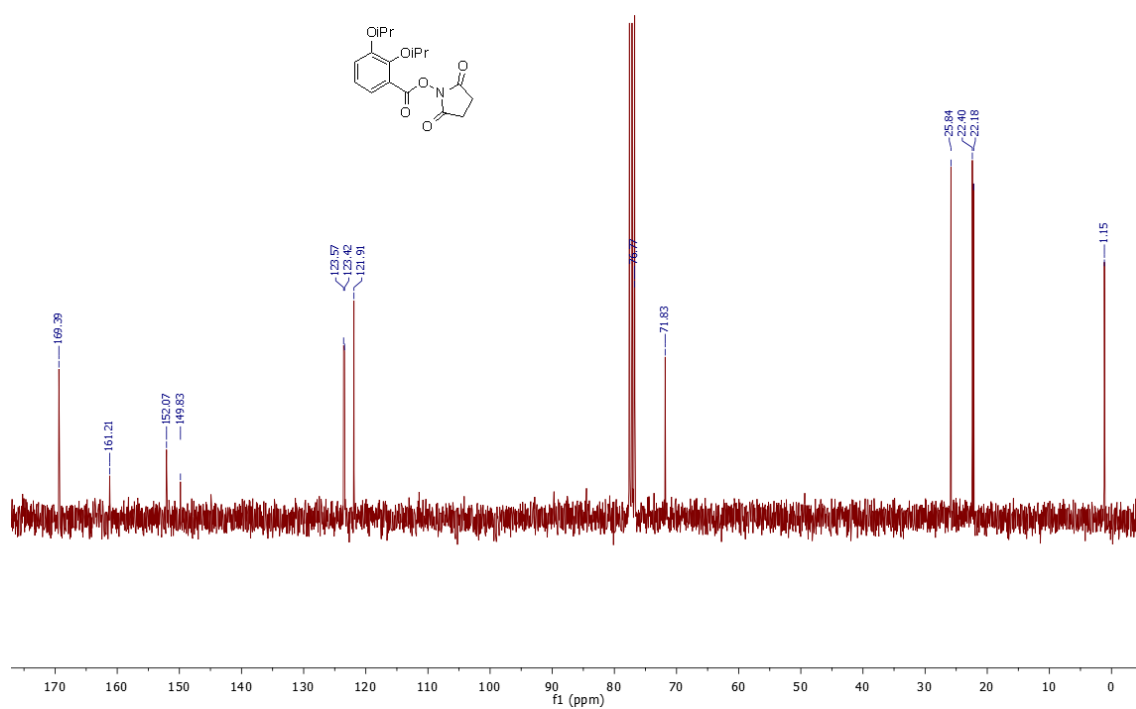


Figura 24. Espectro ^{13}C RMN del compuesto 8 (300 MHz, CDCl_3).

20180222-A-0002-AS032p.1.fid
Instrumento Espectrometro de RMN AV300 (N/I 36425), Laboratorio Unidad de Espectroscopia Molecular, SAI, UDC

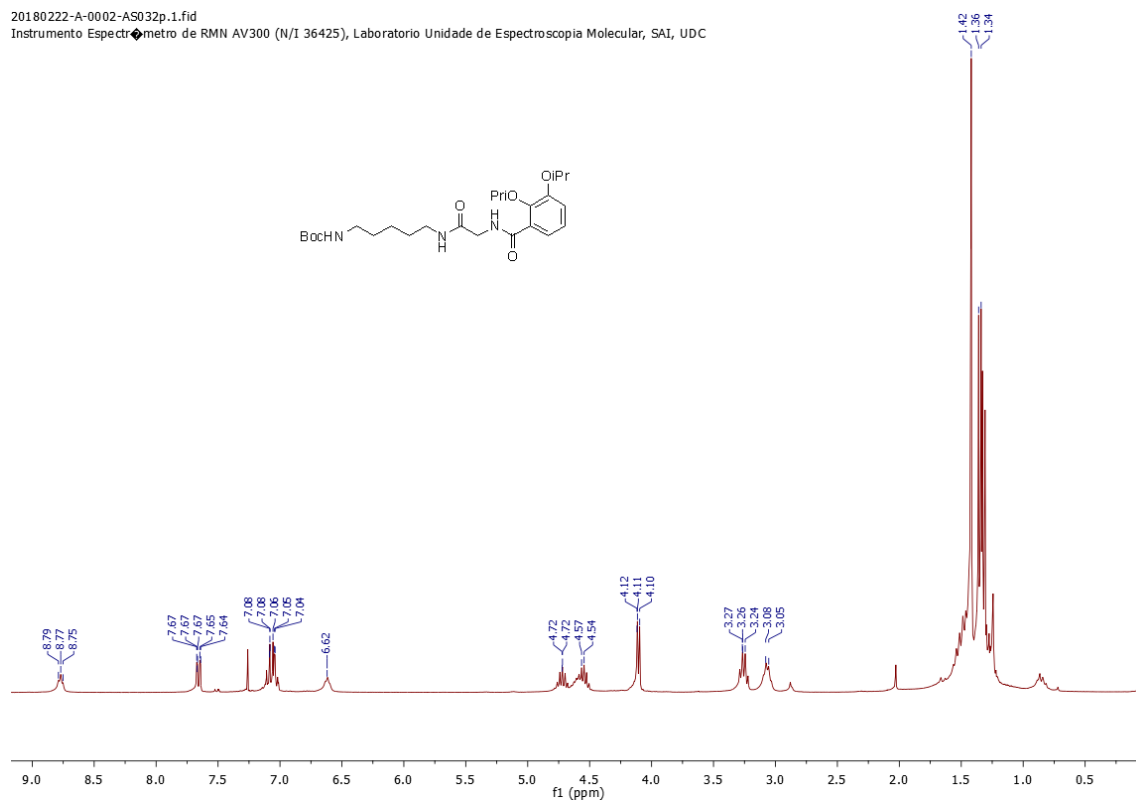


Figura 25. Espectro ^1H RMN del compuesto 9 (300 MHz, CDCl_3).

20180222-A-0002-AS032p.2.fid
Instrumento Espectrometro de RMN AV300 (N/I 36425), Laboratorio Unidad de Espectroscopia Molecular, SAI, UDC

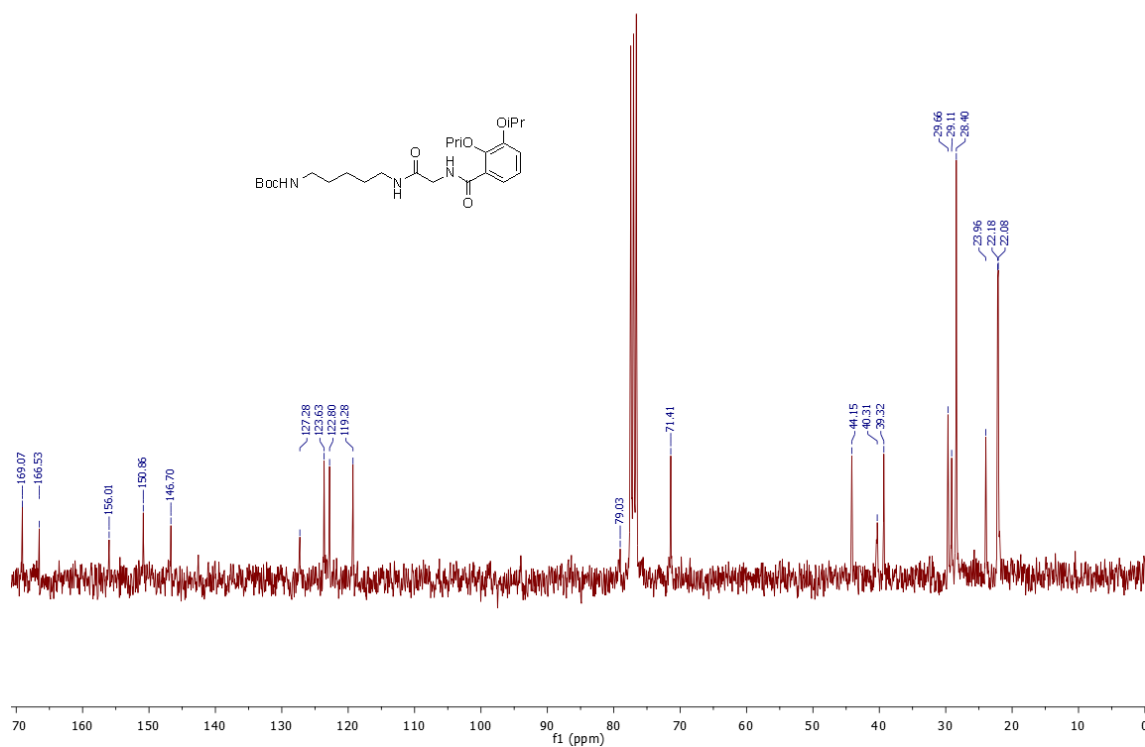


Figura 26. Espectro ^{13}C RMN del compuesto 9 (300 MHz, CDCl_3).

ANEXOS

20180412-A-0002-AS033Pico1.1.fid
Instrumento Espectrometro de RMN AV300 (N/I 36425), Laboratorio Unidde de Espectroscopia Molecular, SAI, UDC

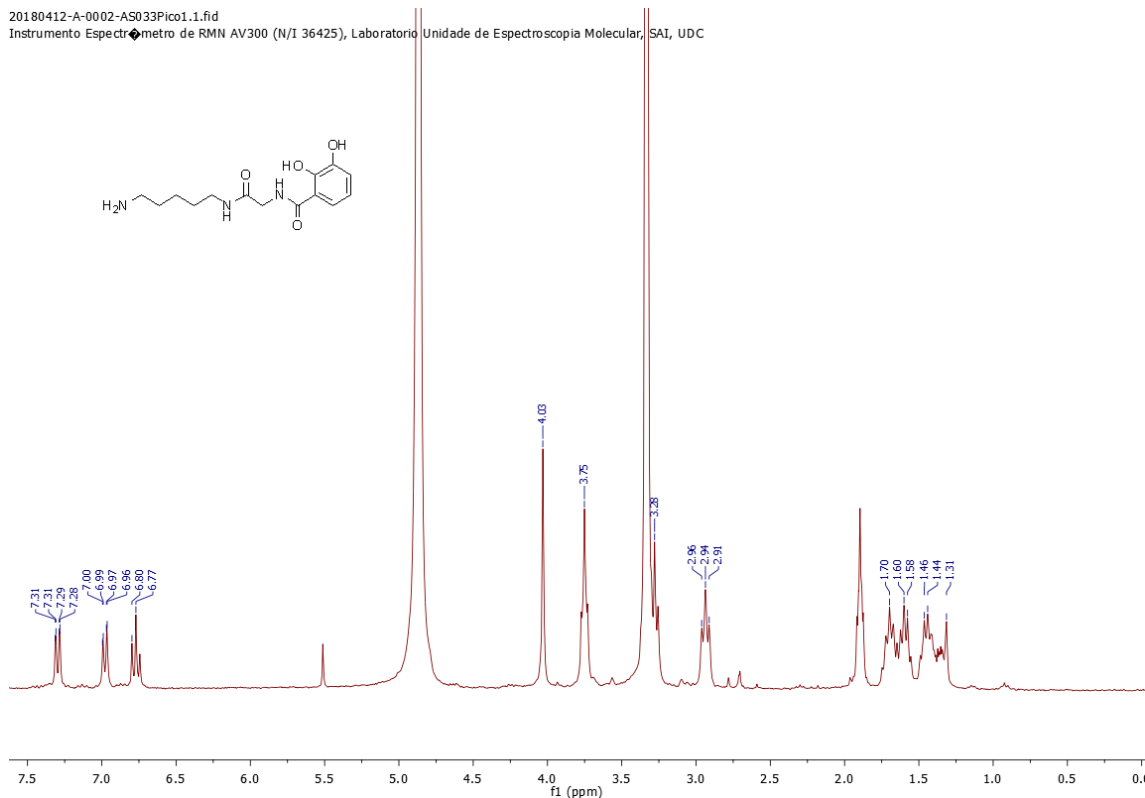


Figura 27. Espectro ^1H RMN del compuesto **10** (300 MHz, CD_3OD).

20180430-A-0002-AS033.2.fid
Instrumento Espectrometro de RMN AV300 (N/I 36425), Laboratorio Unidde de Espectroscopia Molecular, SAI, UDC

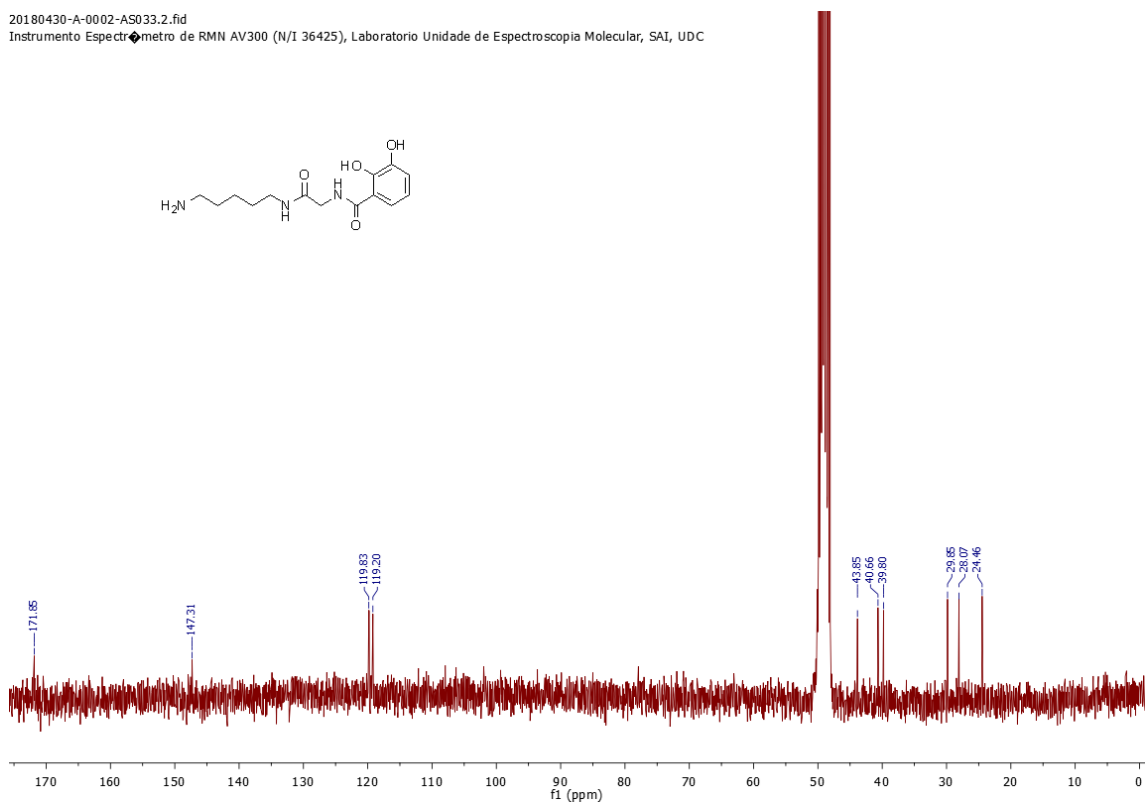


Figura 28. Espectro ^{13}C RMN del compuesto **10** (300 MHz, CD_3OD).

20180306-A-0002-AS034b.1.fid
Instrumento Espectrometro de RMN AV300 (N/I 36425), Laboratorio Unidad de Espectroscopia Molecular, SAI, UDC

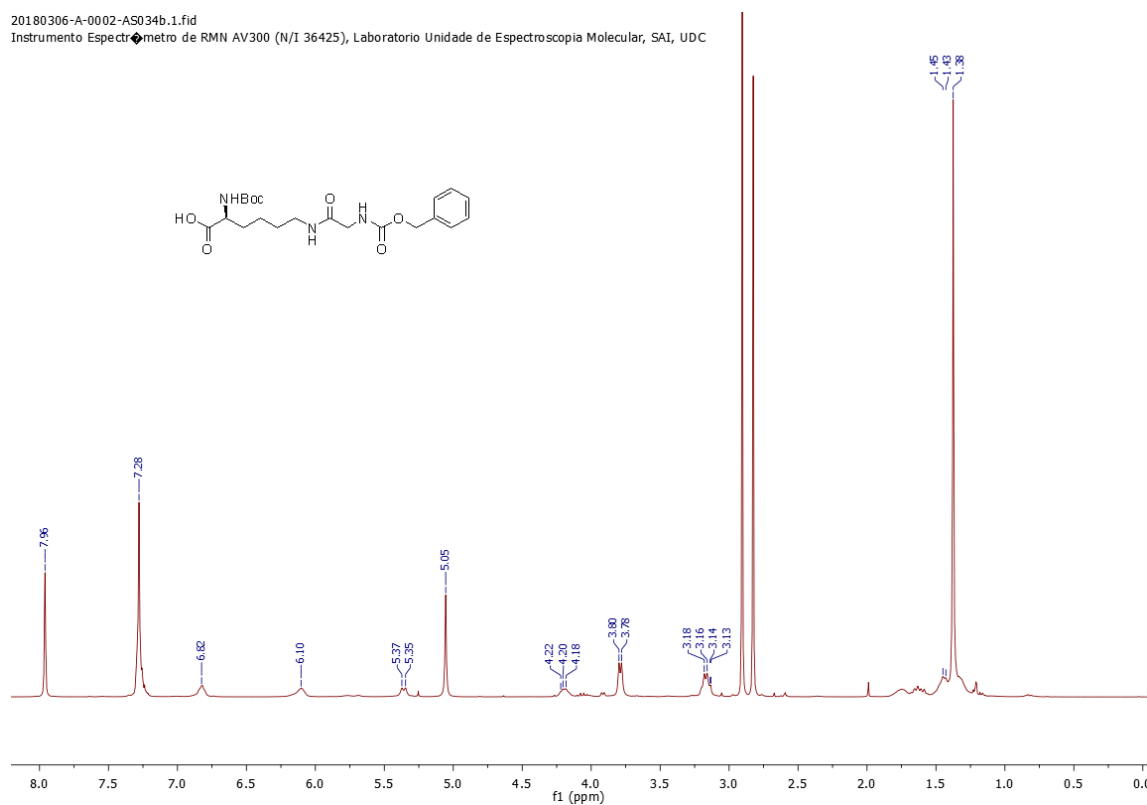


Figura 29. Espectro ^1H RMN del compuesto **12** (300 MHz, CDCl_3).

20180307-A-0002-AS035.2.fid
Instrumento Espectrometro de RMN AV300 (N/I 36425), Laboratorio Unidad de Espectroscopia Molecular, SAI, UDC

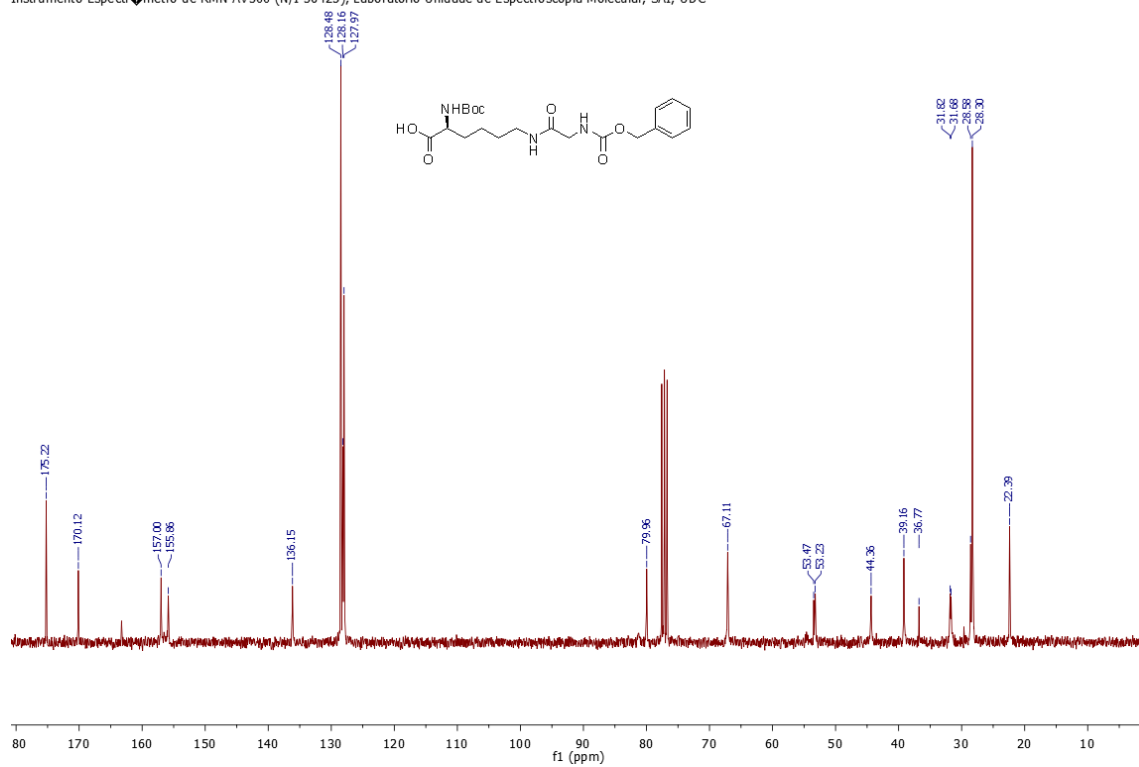
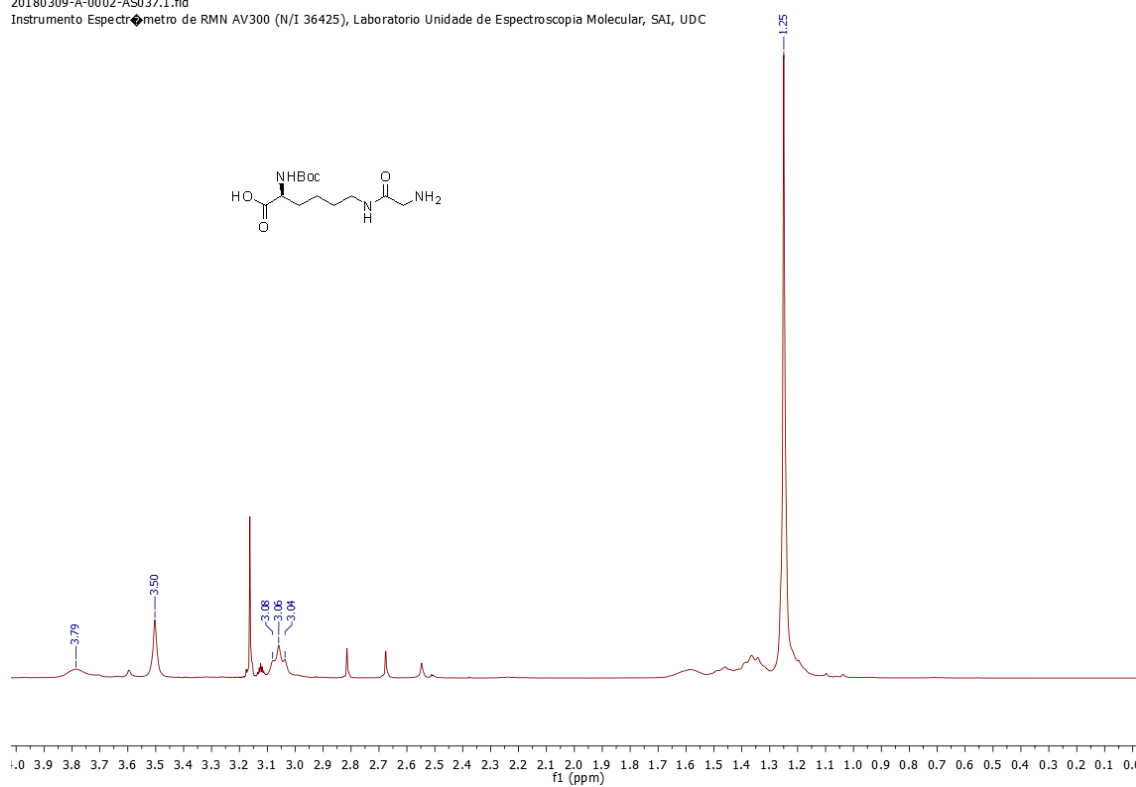
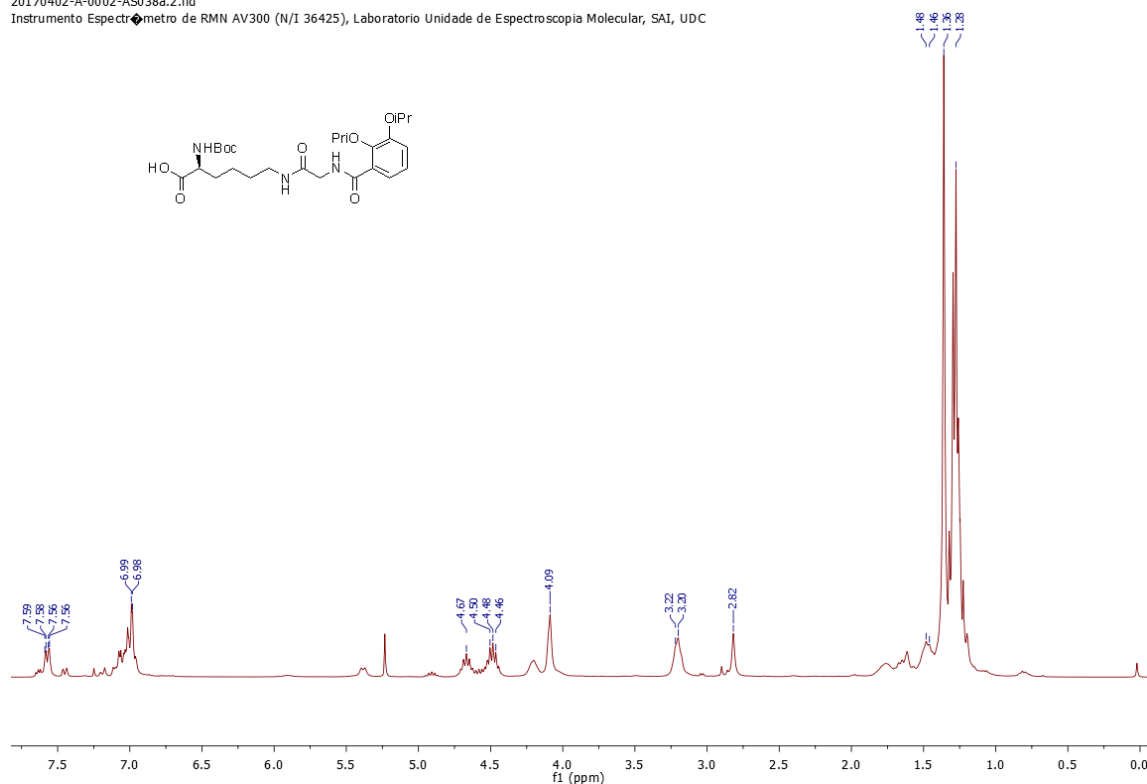


Figura 30. Espectro ^{13}C RMN del compuesto **12** (300 MHz, CDCl_3).

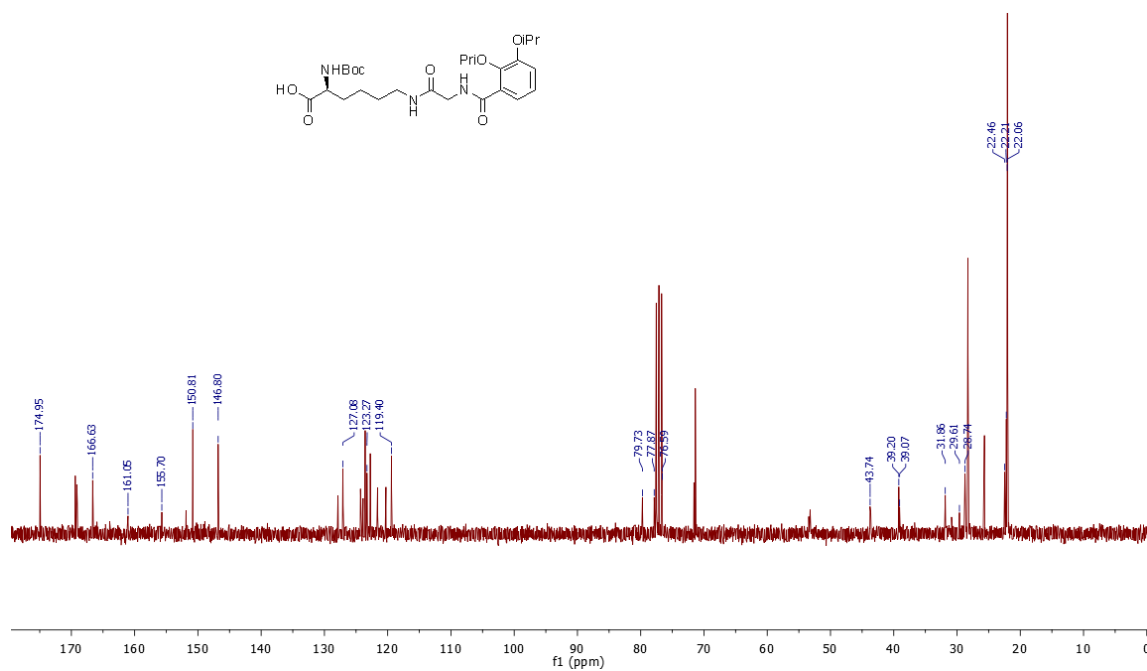
20180309-A-0002-AS037.1.fid
Instrumento Espectrometro de RMN AV300 (N/I 36425), Laboratorio Unidad de Espectroscopia Molecular, SAI, UDC



20170402-A-0002-AS038a.2.fid
Instrumento Espectrómetro de RMN AV300 (N/I 36425), Laboratorio Unidade de Espectroscopia Molecular, SAI, UDC



20170402-A-0002-AS038a.3.fid
Instrumento Espectrómetro de RMN AV300 (N/I 36425), Laboratorio Unidade de Espectroscopia Molecular, SAI, UDC



20170412-A-0002-AS039p.1.fid
Instrumento Espectrometro de RMN AV300 (N/I 36425), Laboratorio Unidad de Espectroscopia Molecular, SAI, UDC

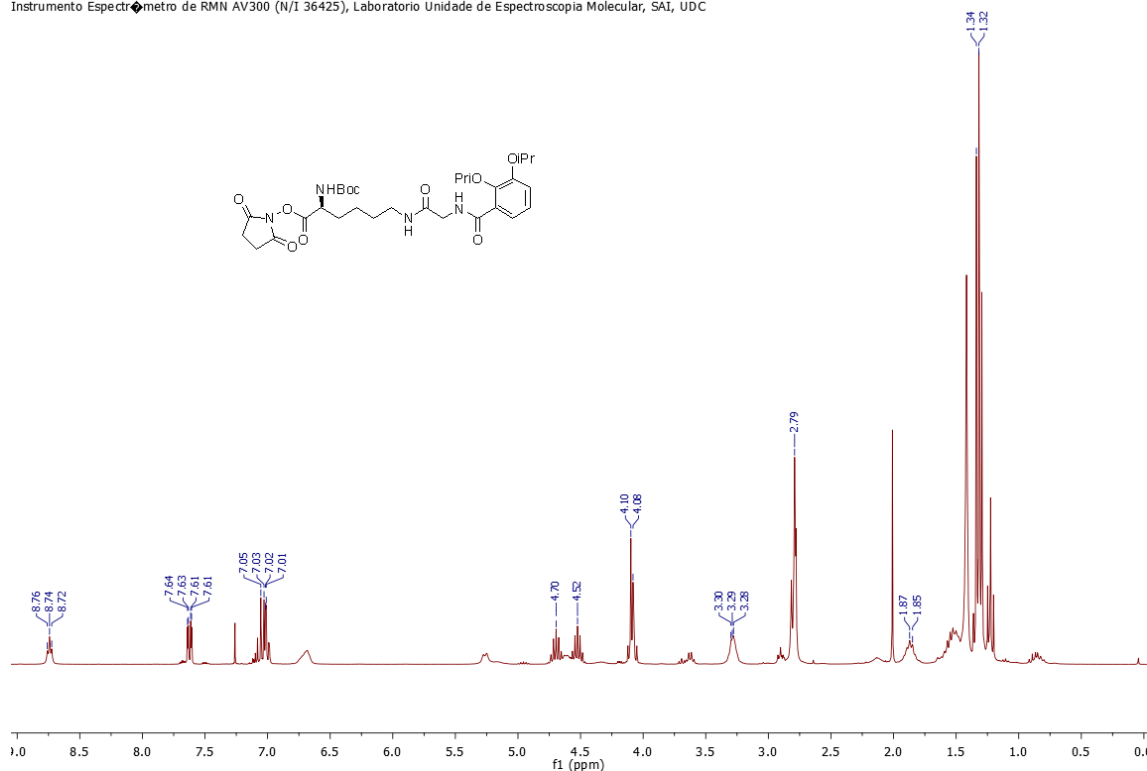


Figura 34. Espectro ^1H RMN del compuesto 15 (300 MHz, CDCl_3).

20170412-A-0002-AS039p.2.fid
Instrumento Espectrometro de RMN AV300 (N/I 36425), Laboratorio Unidad de Espectroscopia Molecular, SAI, UDC

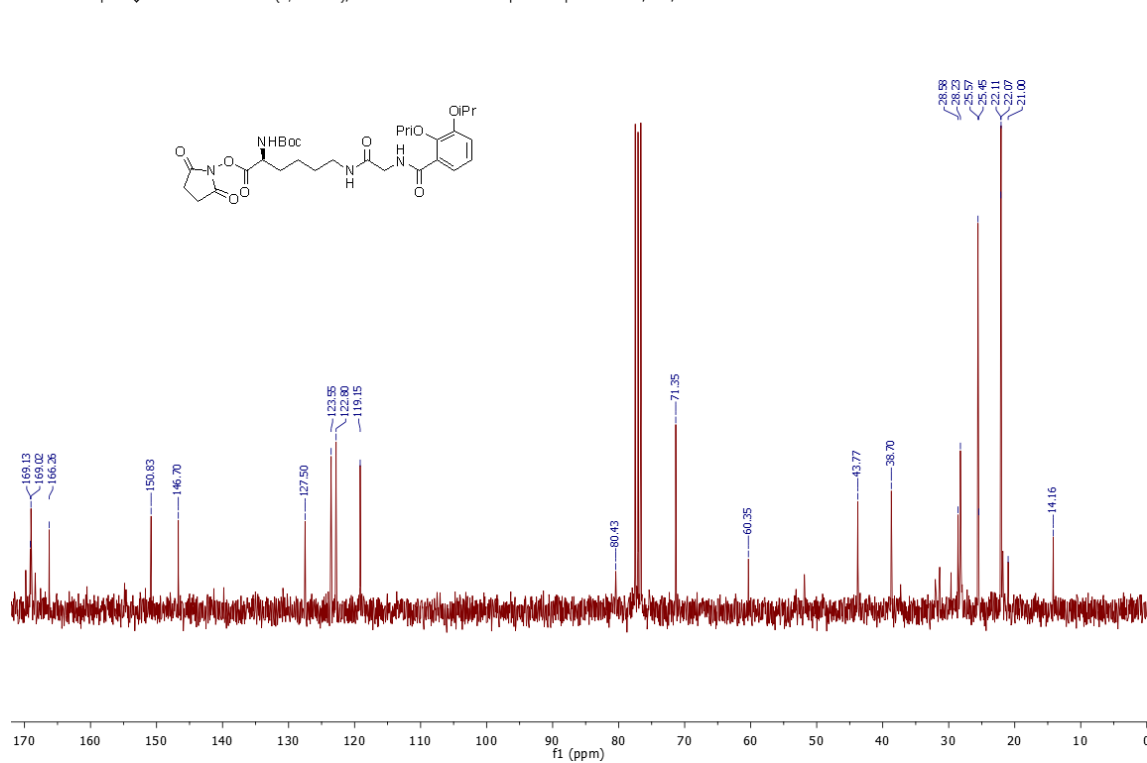
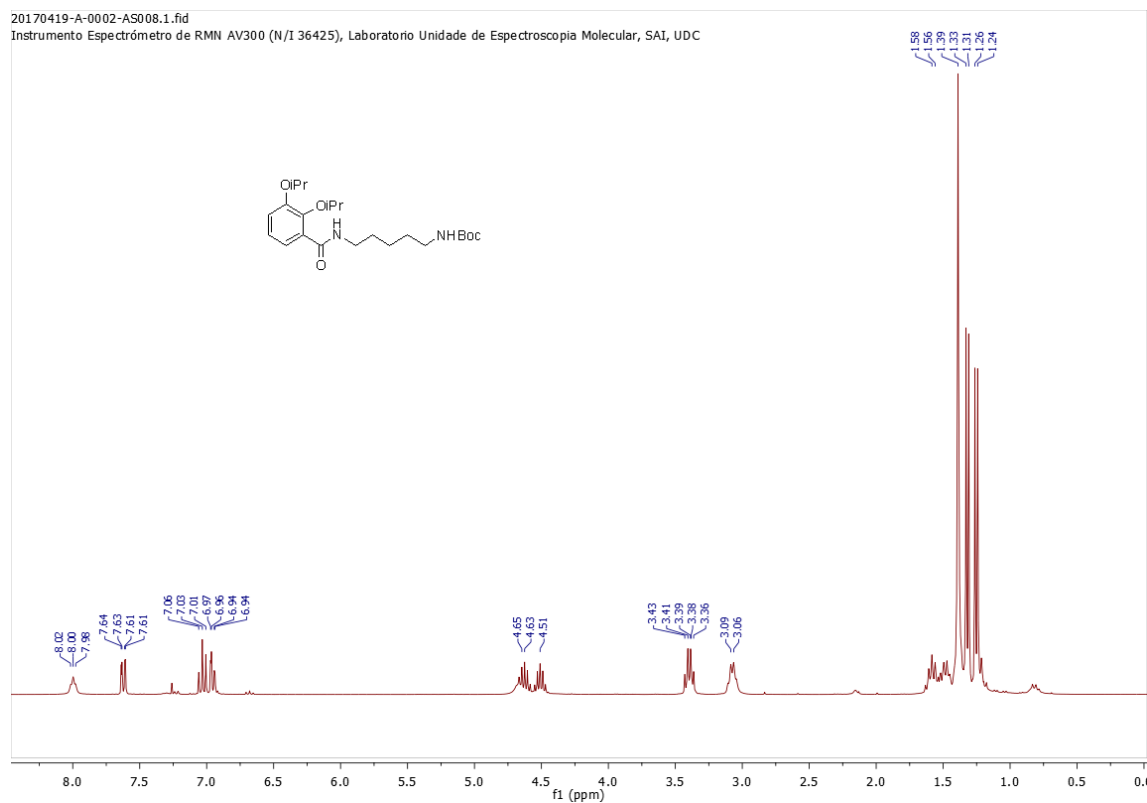


Figura 35. Espectro ^{13}C RMN del compuesto 15 (300 MHz, CDCl_3).

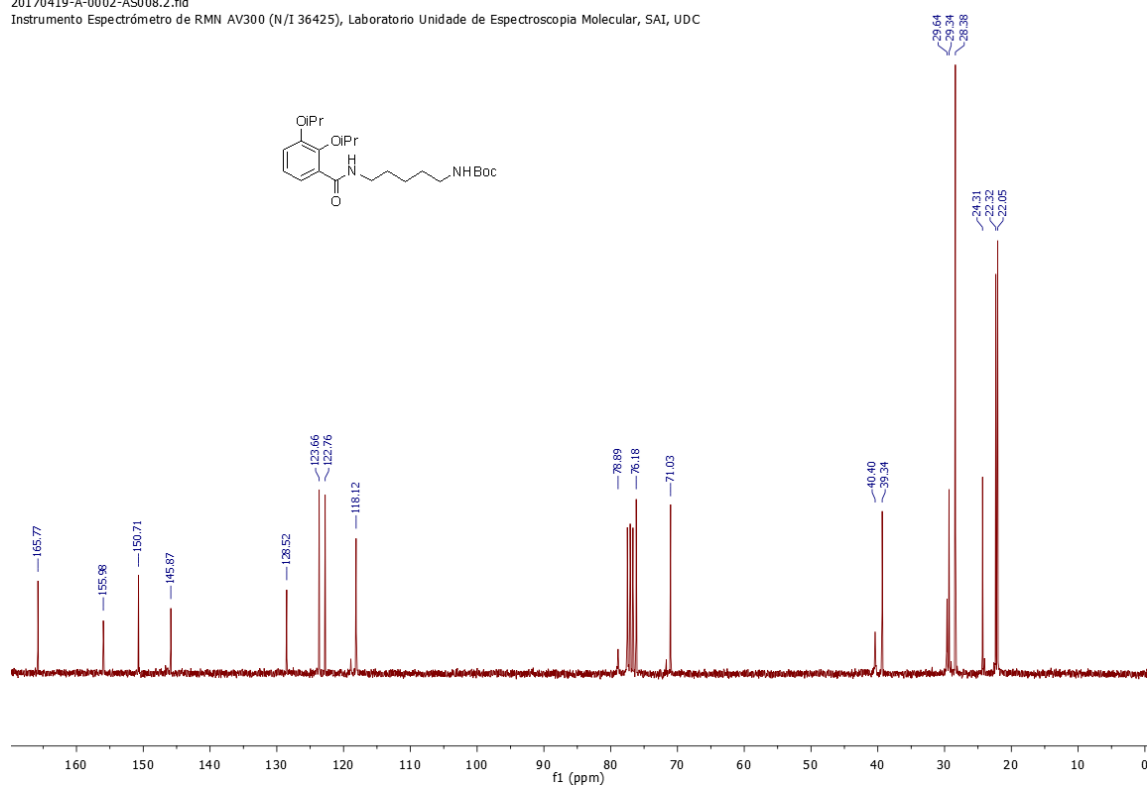
20170419-A-0002-AS008.1.fid

Instrumento Espectrómetro de RMN AV300 (N/I 36425), Laboratorio Unidad de Espectroscopia Molecular, SAI, UDC

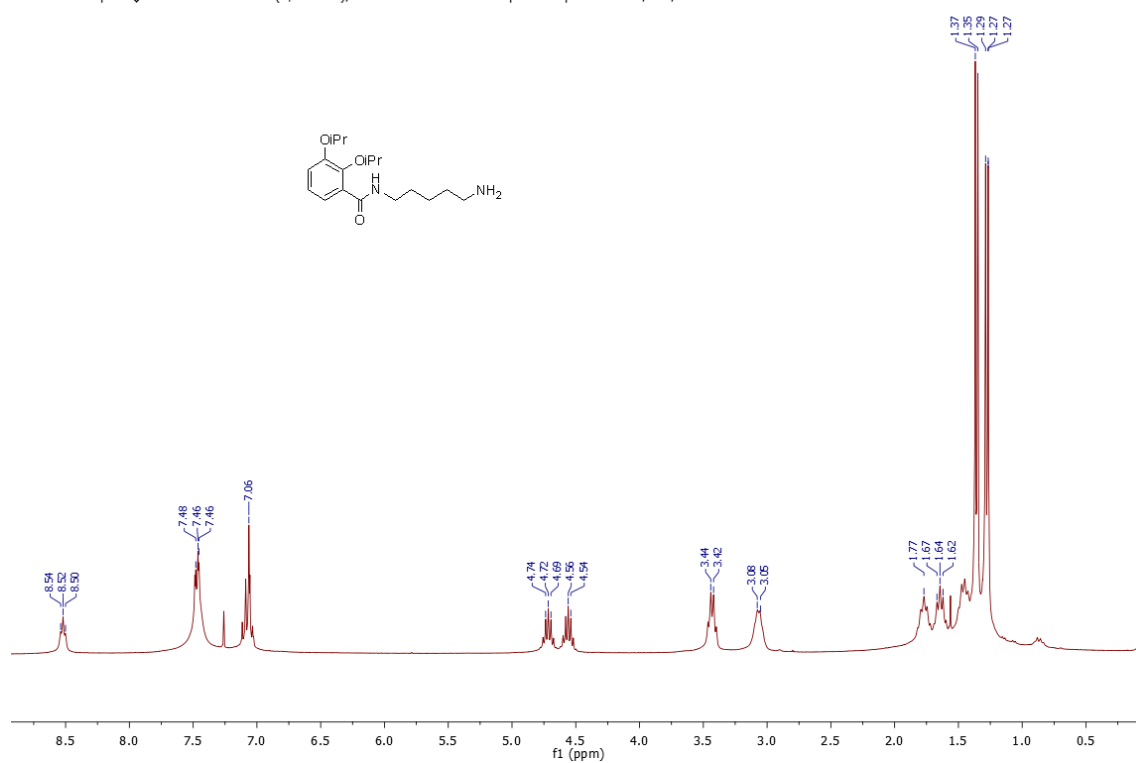
Figura 36. Espectro ^1H RMN del compuesto **17** (300 MHz, CDCl_3).

20170419-A-0002-AS008.2.fid

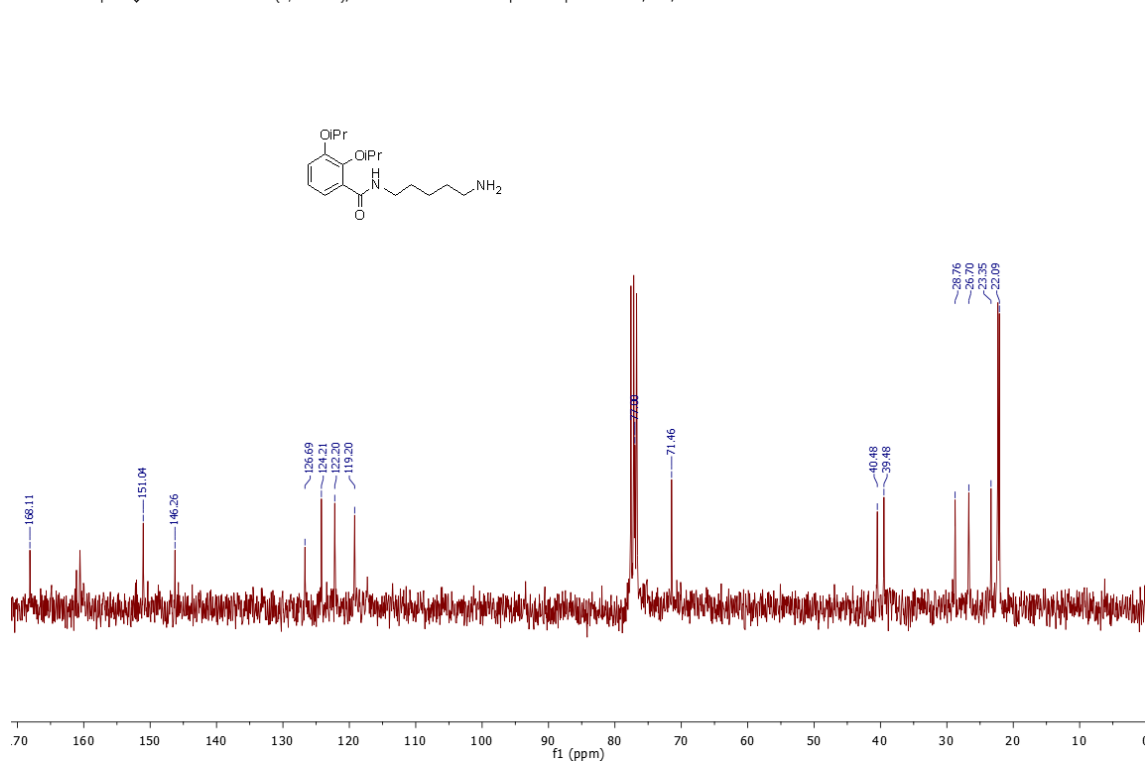
Instrumento Espectrómetro de RMN AV300 (N/I 36425), Laboratorio Unidad de Espectroscopia Molecular, SAI, UDC

Figura 37. Espectro ^{13}C RMN del compuesto **17** (300 MHz, CDCl_3).

20180226-A-0002-JCS260.1.fid
Instrumento Espectrómetro de RMN AV300 (N/I 36425), Laboratorio Unidade de Espectroscopia Molecular, SAI, UDC



20180226-A-0002-JCS260.2.fid
Instrumento Espectrómetro de RMN AV300 (N/I 36425), Laboratorio Unidade de Espectroscopia Molecular, SAI, UDC



20180419-A-0002-AS042m1.1.fid
 Instrumento Espectrómetro de RMN AV300 (N/I 36425), Laboratorio Unidade de Espectroscopia Molecular, SAI, UDC

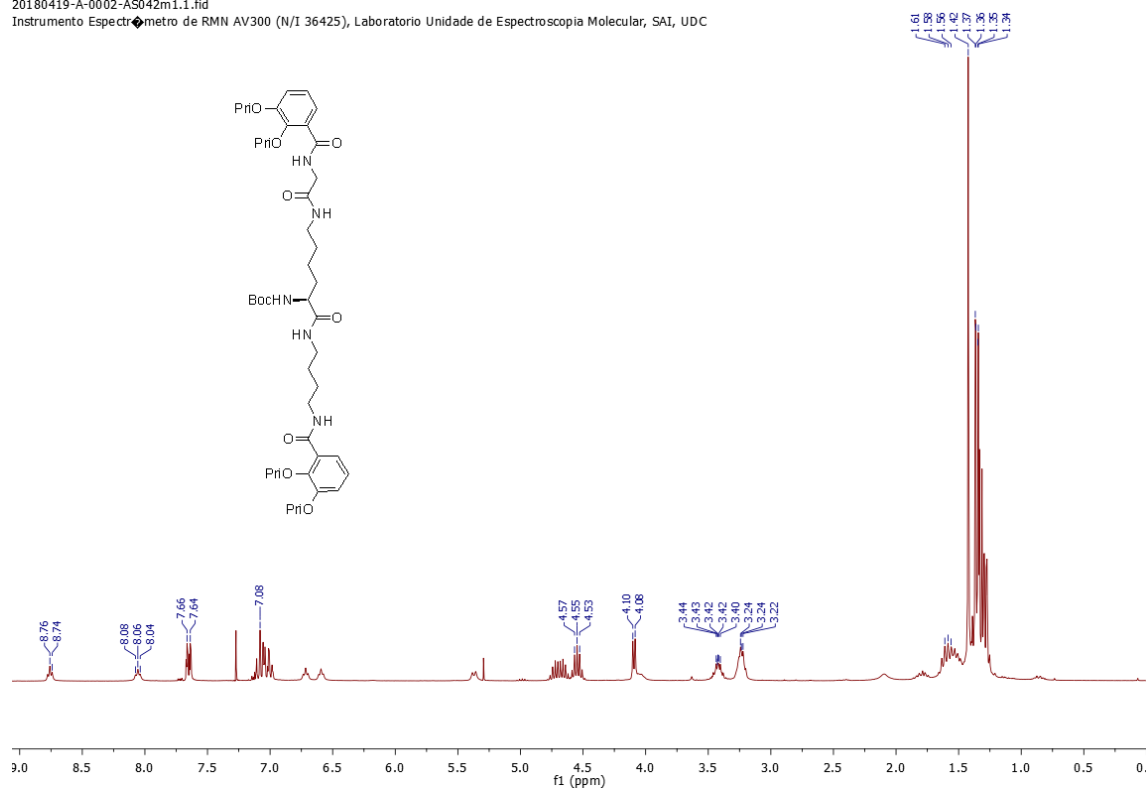


Figura 40. Espectro ^1H RMN del compuesto **19** (300 MHz, CDCl_3).

20180419-A-0002-AS042m1.2.fid
 Instrumento Espectrómetro de RMN AV300 (N/I 36425), Laboratorio Unidade de Espectroscopia Molecular, SAI, UDC

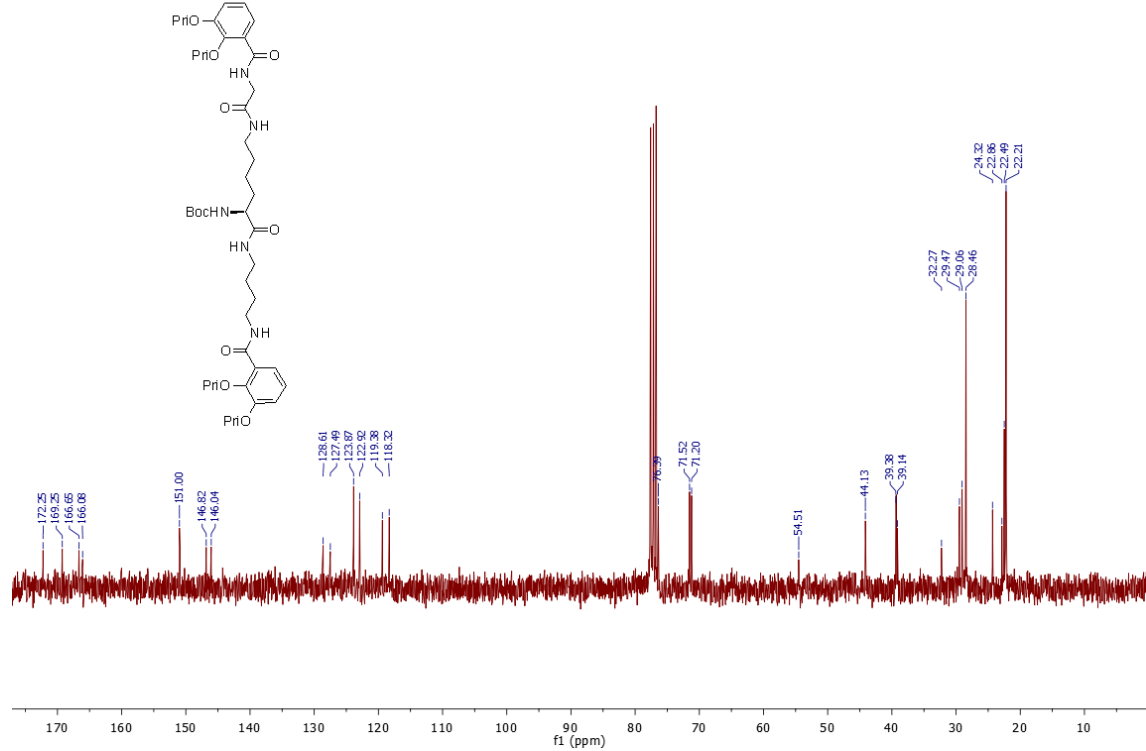
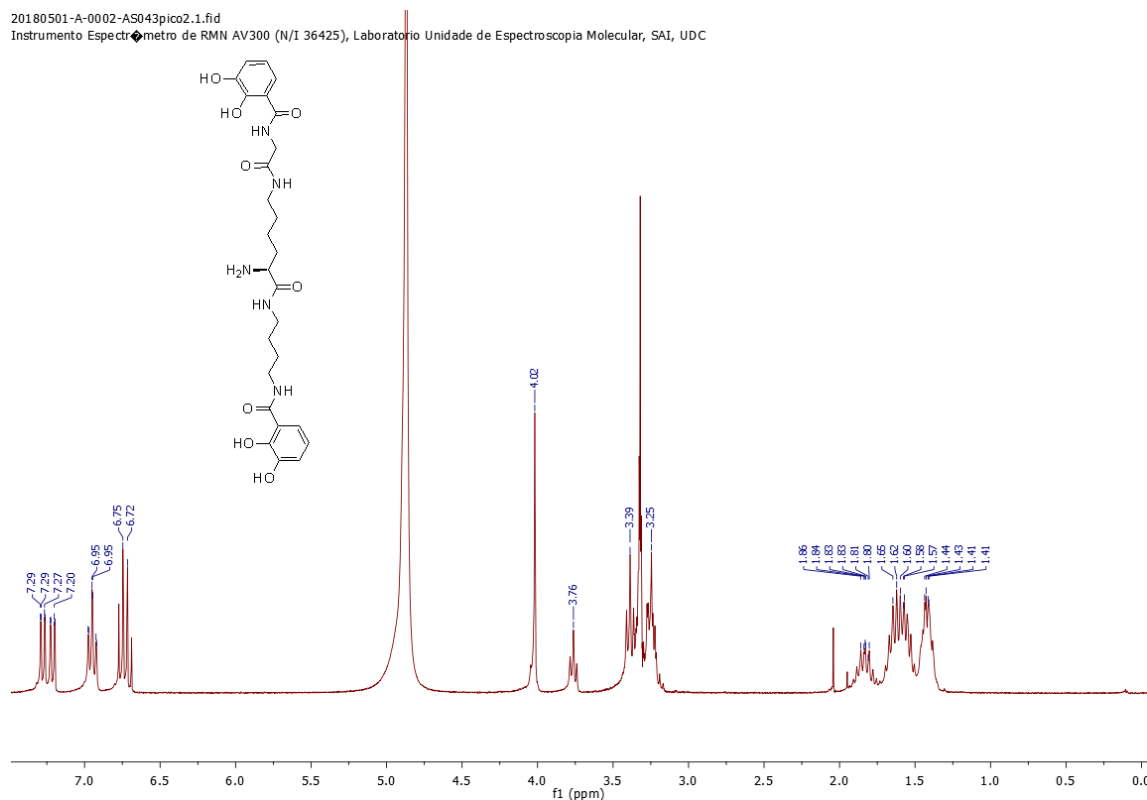


Figura 41. Espectro ^{13}C RMN del compuesto **19** (300 MHz, CDCl_3).

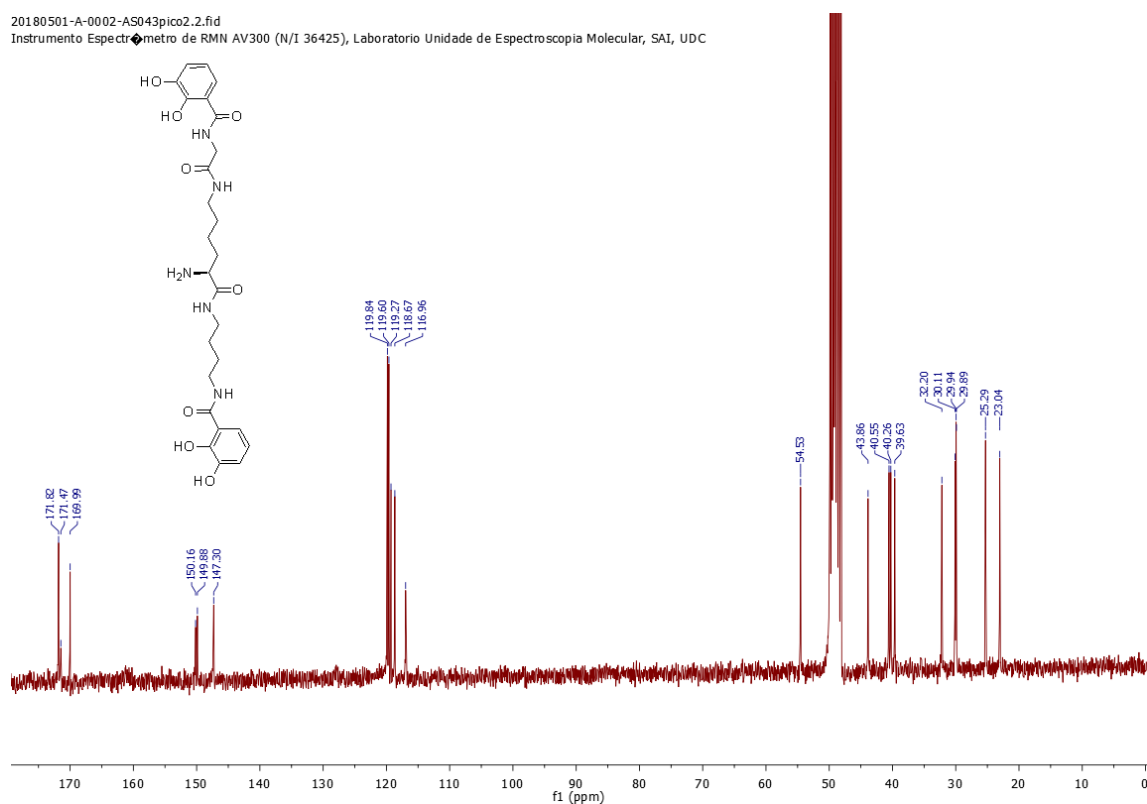
20180501-A-0002-AS043pico2.1.fid

Instrumento Espectrometro de RMN AV300 (N/I 36425), Laboratorio Unidade de Espectroscopia Molecular, SAI, UDC

Figura 42. Espectro ^1H RMN del compuesto **20** (300 MHz, CD_3OD).

20180501-A-0002-AS043pico2.2.fid

Instrumento Espectrometro de RMN AV300 (N/I 36425), Laboratorio Unidade de Espectroscopia Molecular, SAI, UDC

Figura 43. Espectro ^{13}C RMN del compuesto **20** (300 MHz, CD_3OD).

