

Grado en Química

Memoria del Trabajo de Fin de Grado

Preparación de conjugados moleculares basados en el sideróforo amonabactina de la bacteria patógena

Aeromonas salmonicida

Preparación de conxugados moleculares basados no sideróforo amonabactina da bacteria patóxena

Aeromonas salmonicida

Preparation of molecular conjugates based on the amonabactin siderophore from the pathogenic

bacterium *Aeromonas salmonicida*

Alumna: Lía Jove Filgueiras

Directores: Carlos Jiménez González, Jaime Rodríguez González

Curso: 2020-2021. **Convocatoria:** julio 2021



UNIVERSIDADE DA CORUÑA



Código Seguro De Verificación	Mp9HULCeSIMtn5CMoIse3g==	Estado	Data e hora
Asinado Por	Carlos Jiménez González Jaime Rodríguez González	Asinado Asinado	22/07/2021 09:44:42 22/07/2021 09:42:40
Observacións		Páxina	1/60
Url De Verificación	https://sede.udc.gal/services/validation/Mp9HULCeSIMtn5CMoIse3g==		



Código Seguro De Verificación	Mp9HULCeSIMtn5CMoIse3g==	Estado	Data e hora
Asinado Por	Carlos Jiménez González	Asinado	22/07/2021 09:44:42
	Jaime Rodríguez González	Asinado	22/07/2021 09:42:40
Observacións		Páxina	2/60
Url De Verificación	https://sede.udc.gal/services/validation/Mp9HULCeSIMtn5CMoIse3g==		




AGRADECIMIENTOS

A mis directores Dr. Carlos Jiménez González y Dr. Jaime González Rodríguez, gracias por su implicación y apoyo a lo largo de estos meses, así como por su cercanía y confianza que han hecho que me sienta parte del grupo desde el primer momento.

A todos mis compañeros del grupo y en especial a Javier, por haberme guiado y ayudado en este primer contacto con la investigación, y a Lucía, por haberme acogido, soportado y amenizado los días con todos los momentos compartidos tanto dentro como fuera del laboratorio.


A mi familia, gracias por la paciencia, la confianza y el apoyo incondicional sin el que este camino no hubiera sido posible.

Por último gracias a mis compañeros de grado por haberos convertido en una segunda familia durante estos seis largos años y en especial a Cora, por haber estado siempre a mi lado.


Código Seguro De Verificación	Mp9HULCeSIMtn5CMoIse3g==	Estado	Data e hora	
Asinado Por	Carlos Jiménez González	Asinado	22/07/2021 09:44:42	
	Jaime Rodríguez González	Asinado	22/07/2021 09:42:40	
Observacións		Página	3/60	
Url De Verificación	https://sede.udc.gal/services/validation/Mp9HULCeSIMtn5CMoIse3g==			

ABREVIATURAS

δ	Desplazamiento químico
ATP	Adenosín trifosfato
amb	Análogo de amonabactinas
amp	Ampicilina
Boc ₂ O	Anhídrido di-terc-butoxicarbonílico
CT	Caballo de Troya
Da	Dalton
d	Doblete
dd	Doble doblete
DEAD	Azodicarboxilato de dietilo
DIPEA	<i>N,N</i> -Diisopropiletilamina
DMF	<i>N,N</i> -Dimetilformamida
dt	Doble triplete
EDC·HCl	Clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida
ESI	Ionización por Electrospray
h	Horas
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficiencia
HRMS	Espectrometría de masas de alta resolución
Hz	Hercios
<i>J</i>	Constante de acoplamiento
<i>K_{Fe}</i>	Constante de formación de complejos con el hierro
M	Molar
mal	Maleimida
<i>m/z</i>	Relación carga-masa
NHS	<i>N</i> -hidroxisuccinimida
p	Quintuplete
PEG	Polietilenglicol
Phe	Fenilalanina

Código Seguro De Verificación	Mp9HULCeSIMtn5CMoIse3g==	Estado	Data e hora	
Asinado Por	Carlos Jiménez González	Asinado	22/07/2021 09:44:42	
	Jaime Rodríguez González	Asinado	22/07/2021 09:42:40	
Observacións		Página	4/60	
Url De Verificación	https://sede.udc.gal/services/validation/Mp9HULCeSIMtn5CMoIse3g==			


ppm	Partes por millón
q	Cuadruplete
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
s	Singulete
SF	Sonda fluorescente
subsp.	Subespecie
t	Triplete
TBTU	2-(1H-Benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilaminio tetrafluoroborato
TFA	Ácido trifluoroacético
TLC-MS	Cromatografía en capa fina acoplada con espectrometría de masas
Trp	Triptófano
UV	Ultravioleta

Código Seguro De Verificación	Mp9HULCeSIMtn5CMoIse3g==	Estado	Data e hora	
Asinado Por	Carlos Jiménez González	Asinado	22/07/2021 09:44:42	
	Jaime Rodríguez González	Asinado	22/07/2021 09:42:40	
Observacións		Páxina	5/60	
Url De Verificación	https://sede.udc.gal/services/validation/Mp9HULCeSIMtn5CMoIse3g==			

CRONOGRAMA

OCT	NOV	DIC	ENE	FEB	
					BÚSQUEDA BIBLIOGRÁFICA
					EXPERIMENTAL
					ANÁLISIS DE RESULTADOS
					MEMORIA

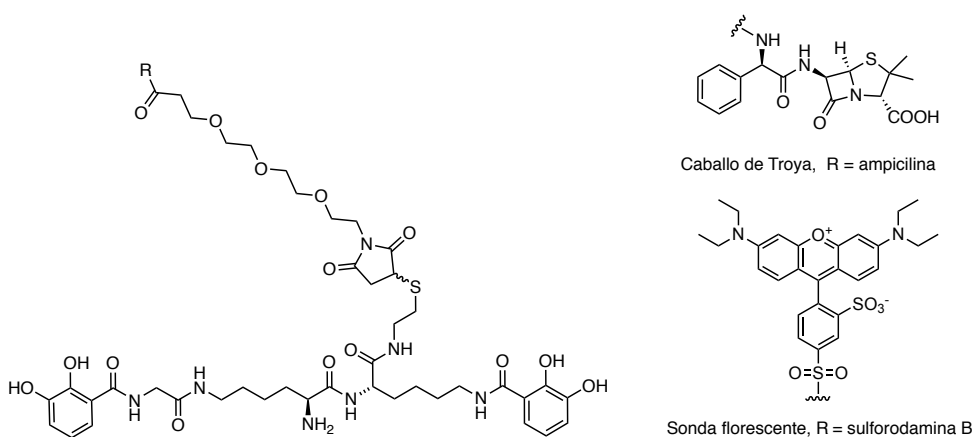
MAR	ABR	MAY	JUN	JUL	
					BÚSQUEDA BIBLIOGRÁFICA
					EXPERIMENTAL
					ANÁLISIS DE RESULTADOS
					MEMORIA

Código Seguro De Verificación	Mp9HULCeSIMtn5CMoIse3g==	Estado	Data e hora	
Asinado Por	Carlos Jiménez González	Asinado	22/07/2021 09:44:42	
Observacións	Jaime Rodríguez González	Asinado	22/07/2021 09:42:40	
Url De Verificación	https://sede.udc.gal/services/validation/Mp9HULCeSIMtn5CMoIse3g==		Páxina 6/60	

RESUMEN

La aparición y propagación de resistencias frente a los agentes antimicrobianos se ha visto acelerada en los últimos años, provocando una crisis sanitaria a nivel mundial y poniendo de manifiesto la necesidad urgente de desarrollar fármacos nuevos más efectivos. En el presente trabajo se planteó el desarrollo sintético de un conjugado sideróforo-antibiótico siguiendo una estrategia tipo “caballo de Troya”, así como la construcción de una sonda fluorescente para estudiar los mecanismos implicados en los procesos de reconocimiento e internalización, empleando en ambos casos un espaciador de mayor longitud al utilizado en estudios previos. El vector de entrada seleccionado fue un análogo de las amonabactinas, un sideróforo de la bacteria patógena *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* con el que se pretendía aprovechar el mecanismo de captación de hierro para promover la absorción activa del antibiótico (ampicilina) y el fluoróforo (sulforodamina B).

El trabajo desarrollado permitió la obtención de un conjugado sideróforo-antibiótico, sin embargo, su caracterización evidenció la presencia de otros compuestos que indicaron la posible degradación del producto. Estos resultados muestran la necesidad de realizar nuevos ensayos que permitan obtenerlo con mayor grado de pureza. Además, se consiguió la funcionalización del espaciador con los grupos reactivos necesarios para formar la sonda fluorescente, pero el acoplamiento con la sulforodamina B no dio los resultados esperados.



Palabras clave: sideróforo, “caballo de Troya”, amonabactinas, PEG₃, conjugados antibiótico-sideróforo, sonda fluorescente, ampicilina.

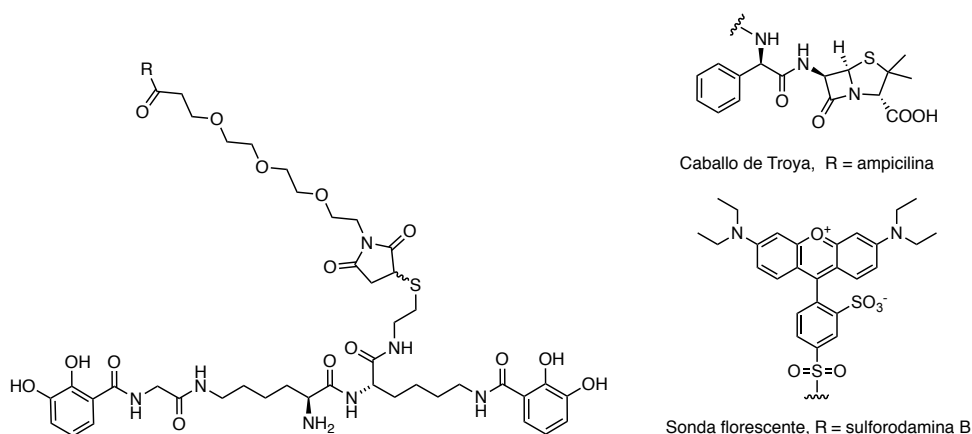
Código Seguro De Verificación	Mp9HULCeSIMtn5CMoIse3g==	Estado	Data e hora
Asinado Por	Carlos Jiménez González Jaime Rodríguez González	Asinado	22/07/2021 09:44:42
Observacións		Asinado	22/07/2021 09:42:40
Url De Verificación	https://sede.udc.gal/services/validation/Mp9HULCeSIMtn5CMoIse3g==		Página 7/60



RESUMO

A aparición e propagación de resistencias fronte os axentes antimicrobianos viuse acelerada nos últimos anos, provocando una crise sanitaria a nivel mundial e poñendo de manifesto a necesidade urxente de desenvolver novos fármacos mais efectivos. No presente traballo propúxose o desenvolvemento sintético dun conxugado sideróforo-antibiótico seguindo unha estratexia tipo “cabalo de Troia”, así como a construción dunha sonda fluorescente para estudar os mecanismos implicados nos procesos de recoñecemento e internalización, empregando en ambos casos un espaciador de maior lonxitude ao utilizado en estudos previos. O vector de entrada seleccionado foi un análogo das amonabactinas, un sideróforo da bacteria patóxena *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* co que se pretendía aproveitar o mecanismo de captación de ferro para promover a absorción activa do antibiótico (ampicilina) e o fluoróforo (sulforodamina B).

O traballo desenvolto permitiu a obtención dun conxugado sideróforo-antibiótico, non obstante, a súa caracterización evidenciou a presenza doutros compostos que indicaron a posible degradación do produto. Estes resultados mostraron a necesidade de realizar novos ensaios que permitan a súa obtención cun maior grado de pureza. Ademais, conseguiuase a funcionalización do espaciador cos grupos reactivos necesarios para formar a sonda fluorescente, pero o acoplamento coa sulforodamina B non deu os resultados esperados.



Palabras chave: sideróforo, “cabalo de Troia”, amonabactinas, PEG₃, conxugados sideróforo-antibiótico, sonda fluorescente, ampicilina.

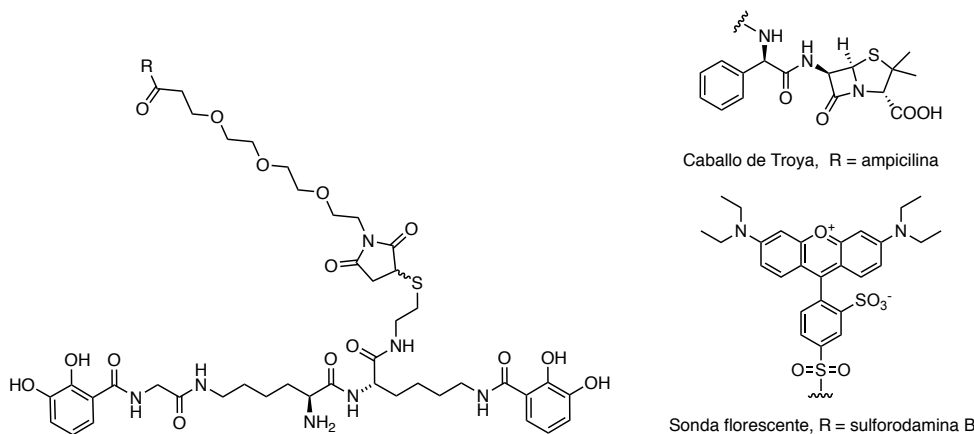
Código Seguro De Verificación	Mp9HULCeSIMtn5CMoIse3g==	Estado	Data e hora
Asinado Por	Carlos Jiménez González Jaime Rodríguez González	Asinado	22/07/2021 09:44:42
Observacións		Asinado	22/07/2021 09:42:40
Url De Verificación	https://sede.udc.gal/services/validation/Mp9HULCeSIMtn5CMoIse3g==	Páxina	8/60



ABSTRACT

The emergence and spread of resistance to antimicrobial agents has accelerated in recent years, causing a global health crisis and highlighting the urgent need to develop more effective new drugs. In the present work, the synthetic development of a siderophore-antibiotic conjugate following a “Trojan Horse” strategy was proposed, as well as the construction of a fluorescent probe to study the mechanisms involved in the recognition and internalization processes, using in both cases a linker longer than that used in previous studies. The selected entry vector was an analog of amonabactins, a siderophore of the pathogenic bacterium *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* with which it was intended to take advantage of the iron uptake mechanism to promote the active absorption of the antibiotic (ampicillin) and the fluorophore (sulforhodamine B).

The work carried out allowed the obtaining of a siderophore-antibiotic conjugate, however, its characterization showed the presence of other compounds that indicated the possible degradation of the product. These results show the need for new studies to obtain it with a higher degree of purity. Furthermore, functionalization of the spacer with the necessary reactive groups to form the fluorescent probe was achieved, but coupling with sulforhodamine B did not give the expected results.



Palabras clave: siderophore, “Tojan Horse”, amonabactin, PEG₃, siderophore-antibiotic conjugates, fluorescent probes, ampicillin.

Código Seguro De Verificación	Mp9HULCeSIMtn5CMoIse3g==	Estado	Data e hora
Asinado Por	Carlos Jiménez González Jaime Rodríguez González	Asinado	22/07/2021 09:44:42
Observacións		Asinado	22/07/2021 09:42:40
Url De Verificación	https://sede.udc.gal/services/validation/Mp9HULCeSIMtn5CMoIse3g==		Páxina 9/60



ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 LOS SIDERÓFOROS.....	2
1.1.1 Estructura química	2
1.1.2 Biosíntesis y mecanismos de entrada.....	3
1.2. SIDEROMICINAS NATURALES Y CONJUGADOS SINTÉTICOS	5
1.2.1 Elección del antibiótico.....	5
1.2.2 Elección del espaciador.....	6
1.2.3 Elección del sideróforo	7
2. ANTECEDENTES	9
3. OBJETIVOS	11
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	12
4.1. PREPARACIÓN DE UNA SONDA FLUORESCENTE (SF)	12
4.2. PREPARACIÓN DEL CONJUGADO SIDERÓFORO-ANTIBIÓTICO (CT)	16
5. SECCIÓN EXPERIMENTAL.....	23
5.1. MÉTODOS GENERALES	23
5.2. PROCEDIMIENTOS Y CARACTERIZACIÓN	24
CONCLUSIONES	34
BIBLIOGRAFÍA	37
ANEXOS	40

Código Seguro De Verificación	Mp9HULCeSIMtn5CMoIse3g==	Estado	Data e hora
Asinado Por	Carlos Jiménez González Jaime Rodríguez González	Asinado	22/07/2021 09:44:42 22/07/2021 09:42:40
Observacións		Página	10/60
Url De Verificación	https://sede.udc.gal/services/validation/Mp9HULCeSIMtn5CMoIse3g==		




1. INTRODUCCIÓN

El aumento de la prevalencia de las enfermedades infecciosas inducidas por patógenos, así como la aparición y propagación de resistencias a terapias antimicrobianas en entornos hospitalarios y comunitarios, está provocando una crisis de salud pública a nivel mundial.¹ El número de cepas resistentes se ha visto incrementado en los últimos años debido a la disminución de la eficacia de los actuales antibióticos, reduciendo en gran medida el número de terapias disponibles y aumentando la morbilidad, la mortalidad y los gastos derivados del tratamiento de estas infecciones.^{2,3}

Los antibióticos de amplio espectro tradicionales presentan dianas terapéuticas altamente conservadas y su mecanismo de entrada se basa, mayoritariamente, en la difusión pasiva mediada por porinas. Su uso excesivo contribuye a la rápida aparición de bacterias patógenas que adquieren resistencia a través de cuatro mecanismos principales: la disminución de la permeabilidad de la membrana, la expulsión a través de bombas de eflujo, la destrucción enzimática del antibiótico y la modificación de la diana terapéutica. Por tanto, el desafío principal en el diseño de nuevos antibióticos consiste en superar los mecanismos de resistencia existentes y retrasar la aparición de nuevos mecanismos de resistencia.⁴

Bajo el acrónimo “ESKAPE” se recogen los nombres de las seis especies de patógenos multiresistentes más relevantes a nivel clínico (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterobacter* spp). Estas bacterias han sido destacadas por la Organización Mundial de la Salud (OMS) dentro de la “lista de patógenos prioritarios” para los que se necesitan nuevos antibióticos de forma urgente.^{5,6}

La tendencia actual se orienta hacia el desarrollo de antibióticos de espectro reducido mediante el uso de vectores reconocidos por receptores específicos que facilitan su penetración en la célula, limitando en algunos casos la aparición de resistencias. Esta es la línea que se sigue en el presente trabajo, en donde se plantea la síntesis de un conjugado molecular de tipo sideromicina, que sea capaz de aprovechar las rutas de transporte de hierro mediadas por sideróforos para promover la absorción activa de los agentes terapéuticos y aumentar así su concentración intracelular.^{4,7,8}

Código Seguro De Verificación	Mp9HULCeSIMtn5CMoIse3g==	Estado	Data e hora	
Asinado Por	Carlos Jiménez González Jaime Rodríguez González	Asinado	22/07/2021 09:44:42	
Observacións		Asinado	22/07/2021 09:42:40	
Url De Verificación	Página		11/60	
	https://sede.udc.gal/services/validation/Mp9HULCeSIMtn5CMoIse3g==			

1.1 Los sideróforos

Los sideróforos (del griego “portadores de hierro”) son compuestos de bajo peso molecular (500-1500 Da) producidos por bacterias, hongos y gramíneas, con una alta afinidad y selectividad por el hierro(III).⁹


La captación de hierro es un proceso biológico fundamental para la mayoría de organismos vivos, pues se trata de un elemento esencial que actúa como cofactor de enzimas involucradas en multitud de procesos celulares básicos, tales como la síntesis de ácidos nucleicos, la transferencia de electrones, la protección contra especies reactivas de oxígeno y la regulación génica.^{9,10} Sin embargo, a pesar de su abundancia en la corteza terrestre, su biodisponibilidad es muy limitada y disminuye en gran medida a pH neutro y en condiciones aerobias debido a la formación de hidróxidos férricos insolubles. Estas condiciones son las que se dan en un contexto patogénico donde, además, el hierro se encuentra “secuestrado” por proteínas de almacenamiento del huésped, como la transferrina y la lactoferrina, llegando a alcanzar concentraciones de 10^{-24} M en el suero humano.¹¹

Por tanto, la adquisición de niveles adecuados de hierro, entre 10^{-8} y 10^{-6} M, es un factor fundamental para la supervivencia de los patógenos y la colonización del hospedador durante las infecciones bacterianas. Este hecho convierte a los sideróforos en importantes factores de virulencia que se presentan como prometedoras dianas terapéuticas, pues el desarrollo de resistencias frente a ellos reduce la capacidad del patógeno de prosperar en el huésped.^{12,13}

1.1.1 Estructura química

Los sideróforos se encuentran estructuralmente diseñados para la formación de complejos hexadentados de geometría octaédrica y alto spin con el hierro(III). Tanto la estereoquímica como el esqueleto orgánico están optimizados para favorecer una disposición espacial de los grupos quelatantes que permite la formación de complejos hierro-sideróforo extraordinariamente estables termodinámicamente ($K_{Fe} \approx 10^{49}$), capaces de competir con las proteínas del huésped por la unión al hierro ($K_{Fe} \approx 10^{20}$).^{2,4}

Código Seguro De Verificación	Mp9HULCeSIMtn5CMoIse3g==	Estado	Data e hora
Asinado Por	Carlos Jiménez González Jaime Rodríguez González	Asinado Asinado	22/07/2021 09:44:42 22/07/2021 09:42:40
Observacións		Página	12/60
Url De Verificación	https://sede.udc.gal/services/validation/Mp9HULCeSIMtn5CMoIse3g==		



Sin excepción, los sideróforos presentan una mayor afinidad por el hierro(III) que por el hierro(II), hecho que determina en gran medida su elevada selectividad, pues son pocos los cationes trivalentes involucrados en procesos biológicos. El átomo dador predominante es el oxígeno cargado negativamente por ser el que ofrece una mayor afinidad por el hierro(III), aunque también existen grupos funcionales con otros átomos dadores como el nitrógeno o el azufre.⁹

De acuerdo con la naturaleza química de los ligandos implicados en la quelatación del hierro, los sideróforos se pueden clasificar en siete clases: o-fenolatotiazolina, o-fenolatoxazolina, catecolato, hidroxamato, α -hidroxicarboxilato, α -aminocarboxilato y α -hidroxiimidazol, aunque también se conocen sideróforos de tipo mixto con más de un grupo quelatante en su estructura.¹

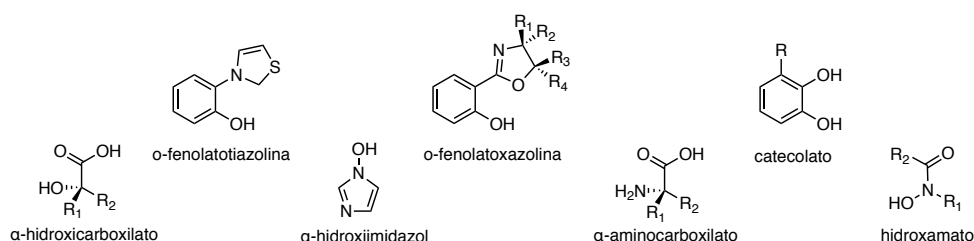



Figura 1. Estructura de los ligandos implicados en la coordinación con el hierro(III) de las siete clases principales de sideróforos.

1.1.2 Biosíntesis y mecanismos de entrada

La biosíntesis de sideróforos se encuentra fuertemente condicionada por los niveles de hierro a través de proteínas reguladoras de la captación férrica (Fur). En condiciones de restricción de hierro se activa la maquinaria transcripcional y comienza tanto la producción de las enzimas necesarias para la biosíntesis de sideróforos, como de las proteínas implicadas en su reconocimiento, transporte y procesamiento.^{4,14}

La mayoría de los sideróforos son sintetizados por unos complejos proteicos multifuncionales conocidos como sintetasas de péptidos no ribosómicos (*nonribosomal peptide synthetase*, NRPS). Estos complejos llevan a cabo la biosíntesis en el citoplasma, tras la cual los sideróforos son exportados al espacio extracelular. Una vez allí, forman complejos estables con el hierro(III) reconocidos por proteínas específicas que inician un mecanismo de transporte activo. Este mecanismo difiere ligeramente entre bacterias

Código Seguro De Verificación	Mp9HULCeSIMtn5CMoIse3g==	Estado	Data e hora
Asinado Por	Carlos Jiménez González	Asinado	22/07/2021 09:44:42
	Jaime Rodríguez González	Asinado	22/07/2021 09:42:40
Observacións		Página	13/60
Url De Verificación	https://sede.udc.gal/services/validation/Mp9HULCeSIMtn5CMoIse3g==		



Gram-negativas y bacterias Gram-positivas debido a la diferente composición de su envoltura celular.^{15,16}

En bacterias Gram-negativas, con dos membranas celulares separadas por un espacio periplasmático, los complejos hierro-sideróforo son reconocidos por un receptor de membrana externa específico (*outer-membrane receptor*, OMR). Tras la unión, el receptor experimenta un cambio conformacional que permite el transporte activo del complejo al espacio periplasmático gracias a la energía protón-motriz aportada por el complejo proteico TonB. Una vez en el periplasma, los sideróforos férricos son transportados por una proteína de unión periplasmática (*periplasmic binding protein*, PBP) hasta la membrana interna, donde son bombeados al citoplasma a través de un transportador de tipo ABC (*ATP Binding Casette*). Alcanzado el citoplasma, el hierro puede ser liberado por reducción o mediante la degradación enzimática del sideróforo. En algunos casos, como ocurre en *Pseudomonas aeruginosa*, se observan mecanismos alternativos en los que los complejos son hidrolizados en el periplasma, de forma que sólo el hierro es capaz de atravesar la membrana interna.¹

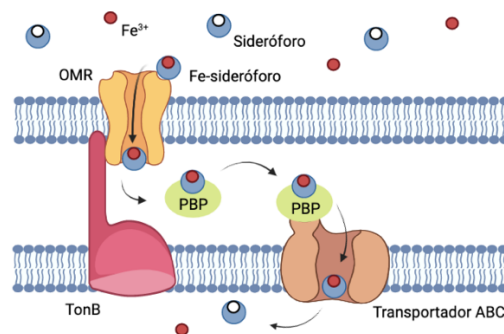


Figura 2. Mecanismo de transporte de los complejos Fe-sideróforo en bacterias Gram-negativas.

En bacterias Gram-positivas, con una única membrana, los complejos hierro-sideróforo son importados directamente a través de una permeasa ubicua de la membrana celular tras el reconocimiento por una proteína SBP (*siderophore-binding protein*).¹

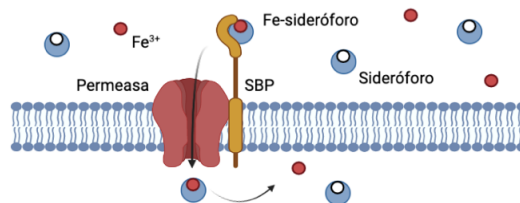


Figura 3. Mecanismo de transporte de los complejos Fe-sideróforo en bacterias Gram-positivas.

Código Seguro De Verificación	Mp9HULCeSIMtn5CMoIse3g==	Estado	Data e hora	
Asinado Por	Carlos Jiménez González	Asinado	22/07/2021 09:44:42	
Observacións	Jaime Rodríguez González	Asinado	22/07/2021 09:42:40	
Url De Verificación	https://sede.udc.gal/services/validation/Mp9HULCeSIMtn5CMoIse3g==		Página	

1.2. Sideromicinas naturales y conjugados sintéticos

Las sideromicinas son metabolitos secundarios biosintetizados por algunas bacterias como arma evolutiva para la lucha por la supervivencia. Estructuralmente, están constituidas por un resto sideróforo y un antibiótico. El sideróforo actúa como vector de entrada al ser reconocido por receptores específicos del organismo diana, mientras que el antibiótico, una vez internalizado, actúa como antimicrobiano.^{4,17}

Estos compuestos han servido de inspiración para la preparación de conjugados sintéticos, conocidos como “caballos de Troya”, que se constituyen por tres componentes básicos: un análogo de sideróforo, un espaciador y un antibiótico (Figura 4). Para la propuesta sintética de este trabajo se ha seleccionado como sideróforo un análogo de las amonabactinas, como antibiótico la ampicilina y como espaciador un derivado del polietilenglicol.⁴

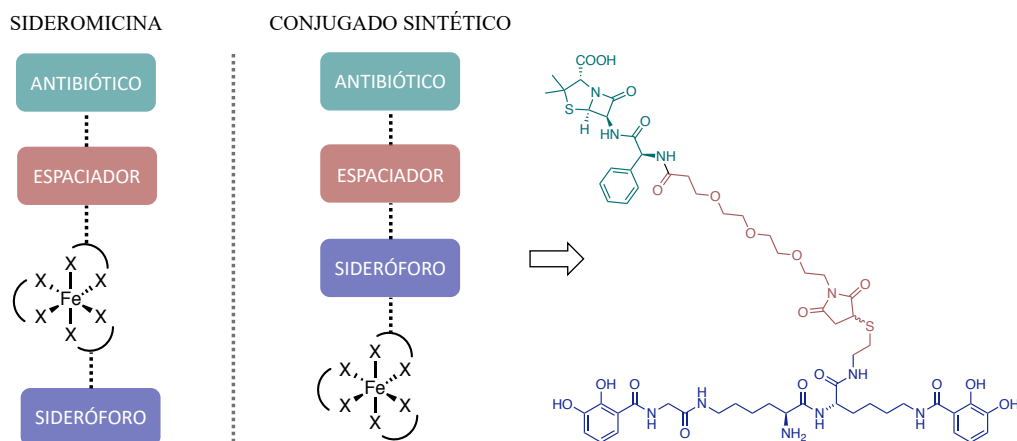


Figura 4. Esquema de la estructura básica de una sideromicina, un conjugado sintético y su correspondencia con la propuesta de este Trabajo de Fin de Grado.

1.2.1 Elección del antibiótico

Dentro de la amplia gama de antibióticos que pueden ser seleccionados para la preparación de “caballos de Troya” se encuentran los β -lactámicos, que actúan inhibiendo la biosíntesis de la pared bacteriana y han demostrado ser muy eficaces.⁴ Esto es así por presentar dianas celulares periplasmáticas que simplifican el mecanismo de transporte que deben experimentar los conjugados para ser biológicamente activos, pues tan solo deben ser reconocidos e internalizados por los receptores de membrana externa.

Código Seguro De Verificación	Mp9HULCeSIMtn5CMoIse3g==	Estado	Asinado	Data e hora	22/07/2021 09:44:42
Asinado Por	Carlos Jiménez González Jaime Rodríguez González		Asinado		22/07/2021 09:42:40
Observacións			Página		15/60
Url De Verificación	https://sede.udc.gal/services/validation/Mp9HULCeSIMtn5CMoIse3g==				



En el presente trabajo, se propone la preparación de un conjugado utilizando la ampicilina, un antibiótico β -lactámico perteneciente al grupo de las penicilinas. Estas se caracterizan estructuralmente por presentar, además del anillo β -lactámico, un anillo de tiazolidina formando el ácido 6-aminopenicilánico, estructura que deriva de la condensación de una cisteína y una valina (Figura 5). La cadena lateral, que varía de unas penicilinas a otras, tolera un alto grado de sustituciones, por lo que su conjugación con sideróforos voluminosos no impide la unión a su diana celular.¹⁸

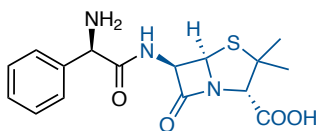



Figura 5. Estructura de la ampicilina con el ácido 6-aminopenicilánico que caracteriza al grupo de las penicilinas resaltado en azul.

1.2.2 Elección del espaciador

El espaciador empleado tiene como objetivo principal permitir la unión de los dos componentes del conjugado a través de enlaces covalentes pero manteniéndolos lo suficientemente separados para que no interfieran entre ellos. Además, debe ser resistente a las condiciones extracelulares, estable durante la translocación, no interferir en el reconocimiento del sideróforo y no impedir la unión del antibiótico con la diana celular. Por lo tanto, los puntos de unión del espaciador con el sideróforo y el antibiótico son clave y su diseño debe ser previamente optimizado para garantizar la actividad biológica del “caballo de Troya”.²

Existen dos clases principales de espaciadores, los escindibles y los no escindibles. En el caso de los conjugados que emplean estructuras β -lactámicas como antibióticos, no es necesaria la liberación del antibiótico para mantener la actividad, por lo que los espaciadores no escindibles son los más utilizados.²

Código Seguro De Verificación	Mp9HULCeSIMtn5CMoIse3g==	Estado		Data e hora	
Asinado Por	Carlos Jiménez González	Asinado		22/07/2021 09:44:42	
	Jaime Rodríguez González	Asinado		22/07/2021 09:42:40	
Observacións		Página		16/60	
Url De Verificación	https://sede.udc.gal/services/validation/Mp9HULCeSIMtn5CMoIse3g==				



1.2.3 Elección del sideróforo

El sideróforo actúa como un vector de entrada y determina el espectro de actividad antibacteriana, por lo que conocer su selectividad es un factor clave a la hora de su selección para la construcción de conjugados. Una forma de evaluar la selectividad es a través de la formación de conjugados con fluoróforos, otro de los objetivos específicos del presente trabajo.

Los conjugados constituidos por un análogo de sideróforo y un grupo fluoróforo actúan como sondas fluorescentes que permiten detectar si los sideróforos son reconocidos e internalizados por los organismos de interés. Además, una vez identificados estos organismos, las sondas pueden ser utilizadas como técnicas de diagnóstico para las infecciones derivadas de los mismos.

En este trabajo se ha seleccionado un análogo (**16**) de las amonabactinas P750 y P789 (Figura 6) como vector de entrada para los conjugados moleculares. La utilización de un análogo permite simplificar el procedimiento sintético, pero sin sacrificar los requerimientos estructurales básicos para el reconocimiento molecular de tal forma que se logra mantener una actividad siderófora similar a la de las amonabactinas naturales.

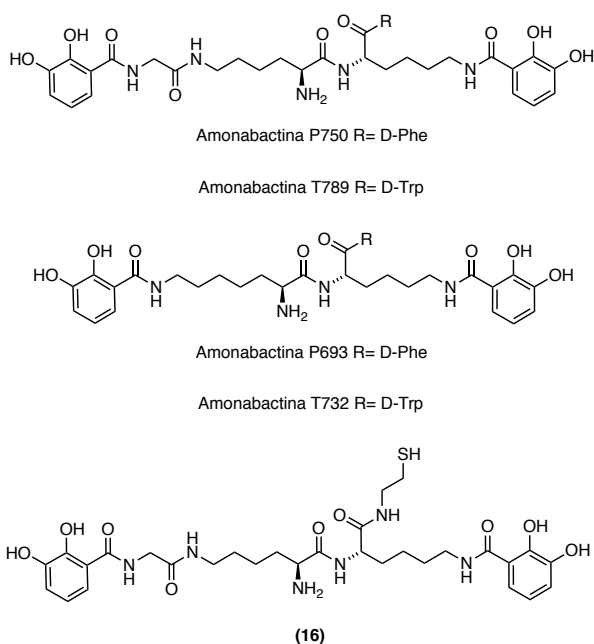



Figura 6. Estructura química de las amonabactinas y del análogo simplificado (**16**) seleccionado como vector de entrada.

Código Seguro De Verificación	Mp9HULCeSIMtn5CMoIse3g==	Estado	Data e hora
Asinado Por	Carlos Jiménez González Jaime Rodríguez González	Asinado	22/07/2021 09:44:42
Observacións		Asinado	22/07/2021 09:42:40
Url De Verificación	https://sede.udc.gal/services/validation/Mp9HULCeSIMtn5CMoIse3g==		Página 17/60



Las amonabactinas son sideróforos producidos por la bacteria patógena *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*, una γ -proteobacteria Gram-negativa que provoca la furunculosis, una enfermedad que causa importantes pérdidas económicas en la industria de la acuicultura a nivel mundial. Perteneciente a la familia de los catecolatos, se caracteriza estructuralmente por presentar un esqueleto peptídico con dos lisinas y una glicina opcional enlazando los dos residuos catecol que actúan como ligandos quelatantes del hierro(III), así como una cadena lateral de triptófano o fenilalanina.¹⁹

Código Seguro De Verificación	Mp9HULCeSIMtn5CMoIse3g==	Estado	Data e hora	
Asinado Por	Carlos Jiménez González	Asinado	22/07/2021 09:44:42	
	Jaime Rodríguez González	Asinado	22/07/2021 09:42:40	
Observacións		Páxina	18/60	
Url De Verificación	https://sede.udc.gal/services/validation/Mp9HULCeSIMtn5CMoIse3g==			

2. ANTECEDENTES

El desarrollo del presente Trabajo de Fin de Grado se llevó a cabo en el grupo PRONAMAR²⁰, un equipo interdisciplinar formado por miembros de los grupos QUIMOLMAT (Química Molecular y de Materiales)²¹ y GIBE (grupo de investigación en biología evolutiva)²² adscritos a la Facultad de Ciencias y al Centro de Investigaciones Científicas Avanzadas (CICA) de la Universidad de A Coruña.

Desde sus inicios a mediados de los 90, el grupo se ha centrado en la búsqueda de nuevas sustancias naturales con actividad biológica y el desarrollo de posibles aplicaciones terapéuticas, tanto de estas como de sus derivados obtenidos por procesos sintéticos.²⁰

Una de sus líneas de investigación se enfoca en el desarrollo de nuevos tratamientos y diagnósticos contra enfermedades infecciosas basados en los mecanismos de captación de Fe(III) mediados por sideróforos. Dentro de esta línea, el grupo publicó recientemente la síntesis de diversos análogos de amonabactinas que permitieron identificar el receptor de membrana externa (FstC) y definir los requerimientos estructurales mínimos para el reconocimiento molecular.¹⁹

Este avance permitió el diseño y la evaluación biológica de conjugados moleculares con tres antibióticos diferentes siguiendo una estrategia tipo “caballo de Troya” (Figura 7), así como de una sonda fluorescente para la evaluación de la selectividad de los mismos.

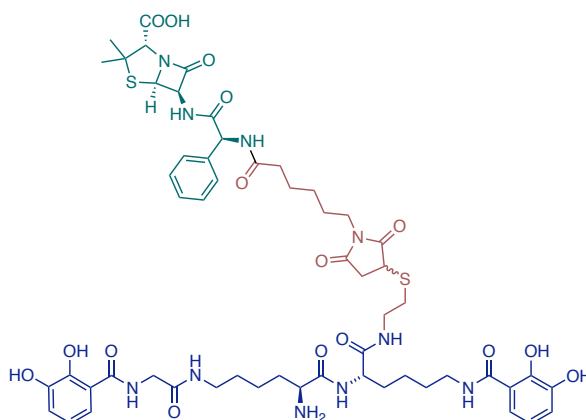


Figura 7. Estructura química de uno de los conjugados moleculares utilizados como “caballo de Troya” en el que se utilizó la ampicilina (verde) como antibiótico.

Código Seguro De Verificación	Mp9HULCeSIMtn5CMoIse3g==	Estado	Data e hora
Asinado Por	Carlos Jiménez González	Asinado	22/07/2021 09:44:42
	Jaime Rodríguez González	Asinado	22/07/2021 09:42:40
Observacións		Páxina	19/60
Url De Verificación	https://sede.udc.gal/services/validation/Mp9HULCeSIMtn5CMoIse3g==		



Los resultados obtenidos en los ensayos con la sonda fluorescente mostrada en la Figura 8, demostraron que los conjugados basados en análogos de las amonabactinas son reconocidos e internalizados por un amplio grupo de patógenos multiresistentes Gram-negativos y algún Gram-positivo. Desafortunadamente, los conjugados preparados con una estructura equivalente a la de la sonda fluorescente, pero en los que el fluoróforo fue sustituido por 3 antibióticos conocidos, no presentaron actividad antimicrobiana.

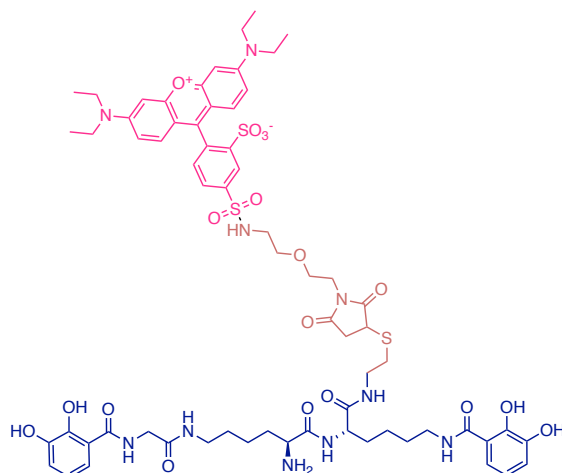
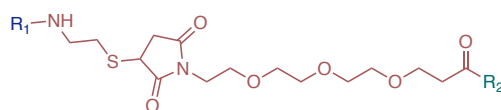


Figura 8. Estructura de la sonda fluorescente utilizada para estudiar el reconocimiento de los conjugados basados en el análogo de las amonabactinas.

Una posible explicación a la ausencia de actividad podría ser que el sideróforo al estar muy próximo al antibiótico interfiera en la interacción con su diana celular. Por tanto, basándonos en estos estudios previos, en el presente trabajo se propuso aumentar la distancia entre ambos componentes empleando un espaciador que posea tres unidades de etilenglicol (Figura 9) de tal forma que se consiga disminuir dicha interferencia.²³



R₁ = análogo de las amonabactinas

R₂ = ampicilina

Figura 9. Estructura general del espaciador derivado del polietilenglicol seleccionado para la unión del análogo de las amonabactinas y la ampicilina.


Código Seguro De Verificación	Mp9HULCeSIMtn5CMoIse3g==	Estado	Asinado	Data e hora	22/07/2021 09:44:42
Asinado Por	Carlos Jiménez González Jaime Rodríguez González	Asinado			22/07/2021 09:42:40
Observacións		Página			20/60
Url De Verificación	https://sede.udc.gal/services/validation/Mp9HULCeSIMtn5CMoIse3g==				



3. OBJETIVOS

El objetivo general del presente Trabajo de Fin de Grado es la síntesis de conjugados moleculares capaces de aprovechar el mecanismo de adquisición de hierro mediado por sideróforos, con el fin de promover la absorción activa de moléculas con posible actividad terapéutica. De esta forma, a lo largo de la memoria se describirán los aspectos experimentales y los procesos sintéticos seguidos para la consecución de los siguientes objetivos específicos:

- Preparación y caracterización de una sonda fluorescente basada en los sideróforos amonabactinas de la bacteria patógena *Aeromonas salmonicida*.
- Preparación y caracterización de un conjugado sideróforo-antibiótico siguiendo la estrategia del “caballo de Troya” basado en los sideróforos amonabactinas de la bacteria patógena *Aeromonas salmonicida*.

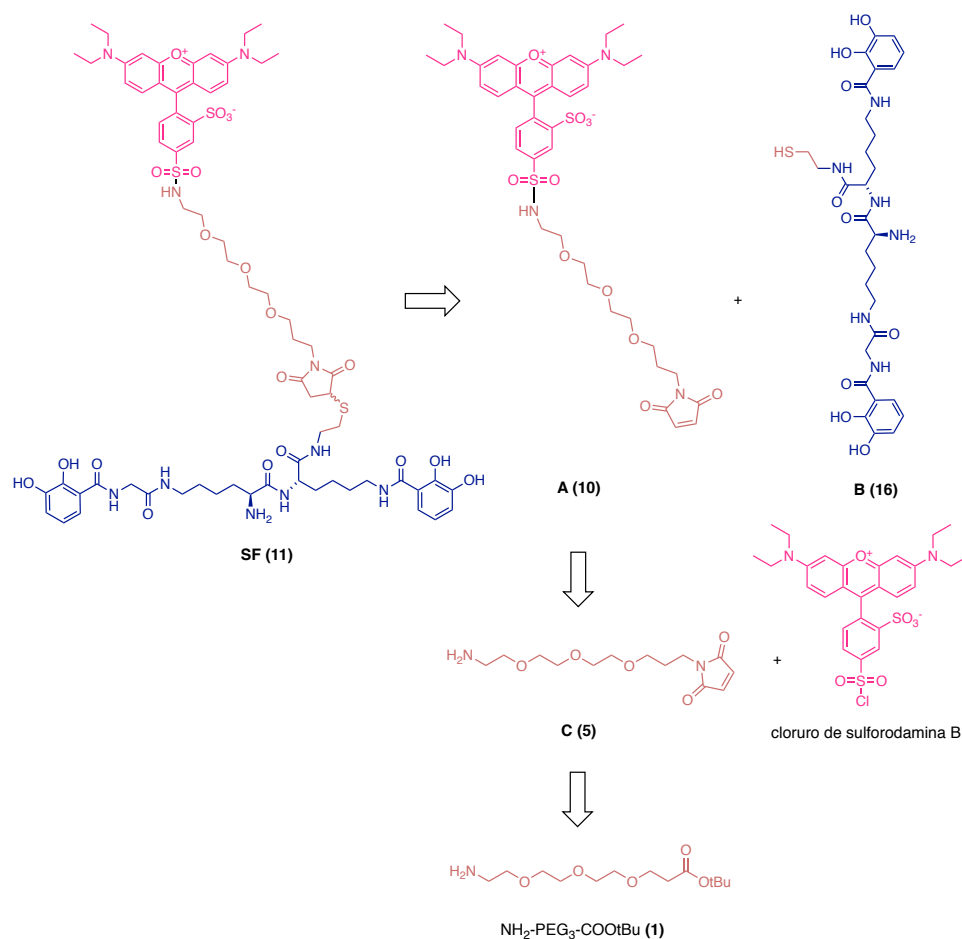
Código Seguro De Verificación	Mp9HULCeSIMtn5CMoIse3g==	Estado	Data e hora	
Asinado Por	Carlos Jiménez González	Asinado	22/07/2021 09:44:42	
	Jaime Rodríguez González	Asinado	22/07/2021 09:42:40	
Observacións		Páxina	21/60	
Url De Verificación	https://sede.udc.gal/services/validation/Mp9HULCeSIMtn5CMoIse3g==			

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este apartado se realizará una discusión sobre los planteamientos sintéticos propuestos para la preparación de los dos conjugados, así como una valoración de los resultados obtenidos.

4.1. Preparación de una sonda fluorescente (SF)

En primer lugar, se planteó un análisis retrosintético en el que se establecieron los grupos funcionales necesarios para el acoplamiento de los tres constituyentes básicos de la sonda fluorescente; el fluoróforo, que sería incorporado a través de un fragmento de sulforodamina B, el espaciador, constituido por tres de unidades etilenglicol, y el análogo de las amonabactinas (Esquema 1).



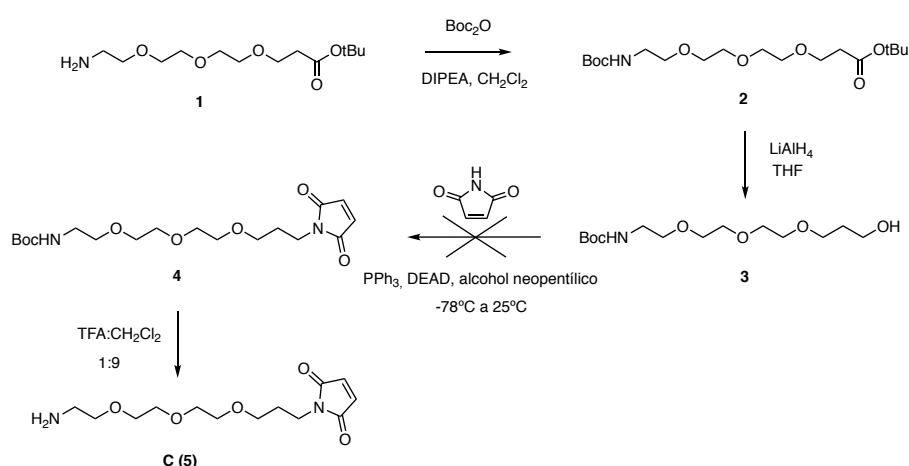
Esquema 1. Análisis retrosintético para la preparación de la sonda fluorescente (SF, 11).

Código Seguro De Verificación	Mp9HULCeSIMtn5CMoIse3g==	Estado	Data e hora
Asinado Por	Carlos Jiménez González Jaime Rodríguez González	Asinado	22/07/2021 09:44:42
Observacións		Asinado	22/07/2021 09:42:40
Url De Verificación	https://sede.udc.gal/services/validation/Mp9HULCeSIMtn5CMoIse3g==	Páxina	22/60



Con este planteamiento, se postularon como etapas clave de la síntesis, el acoplamiento del cloruro de sulforodamina B con el fragmento C a través de la amina primaria, y el acoplamiento del fragmento A resultante con el análogo de las amonabactinas mediante una reacción tipo “click” entre la maleimida y el tiol que porta el fragmento B.

El siguiente paso fue establecer una ruta sintética que permitiese la funcionalización del compuesto comercial **1** para formar el fragmento C. En una primera aproximación, reflejada en el Esquema 2, se planteó la formación de una maleimida *N*-sustituida a partir del alcohol **3** por medio de una reacción de Mitsunobu.²⁴



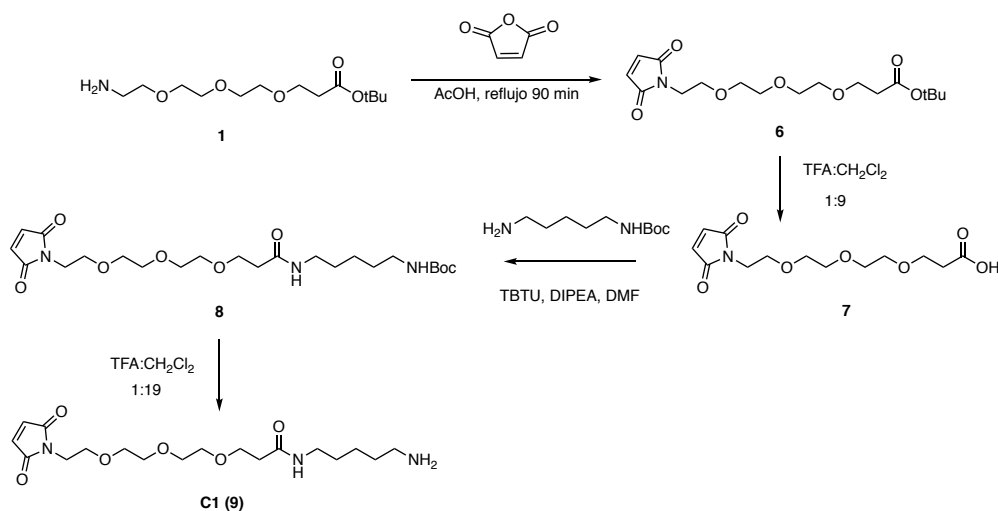
Esquema 2. Intento de obtención del fragmento C (5).

De esta forma, se llevó a cabo la protección de la amina con anhídrido di-*tert*-butoxicarbonílico (Boc_2O) para obtener el compuesto **2**, que se redujo con LiAlH_4 al alcohol **3** con un rendimiento global del 43% para las dos etapas. Todos los compuestos obtenidos fueron caracterizados por RMN de ^1H , ^{13}C y espectrometría de masas de alta resolución (HRMS) como se muestra en el apartado de *ANEXOS*. Desgraciadamente, la reacción de Mitsunobu con la que se pretendía formar la maleimida a partir del alcohol **3** no dio el resultado esperado. Cuatro intentos diferentes de esta reacción fueron infructuosos, pues no se observó la presencia de la maleimida alquilada en ninguna de las fracciones obtenidas tras la separación por columna, recuperándose siempre un 80% del compuesto inicial **3** sin reaccionar.

Código Seguro De Verificación	Mp9HULCeSIMtn5CMoIse3g==	Estado	Data e hora
Asinado Por	Carlos Jiménez González	Asinado	22/07/2021 09:44:42
	Jaime Rodríguez González	Asinado	22/07/2021 09:42:40
Observacións		Página	23/60
Url De Verificación	https://sede.udc.gal/services/validation/Mp9HULCeSIMtn5CMoIse3g==		



Por tanto, se decidió modificar el planteamiento sintético propuesto para formar la maleimida a través de la amina presente en el otro extremo del precursor comercial **1** (Esquema 3). Este cambio obligó a introducir una ligera variación del fragmento C (a partir de ahora fragmento C1) debido a la necesidad de generar una nueva amina primaria a partir del ácido para el acoplamiento con el cloruro de sulfurodamina B (Esquema 1).



Esquema 3. Planteamiento sintético para la obtención del fragmento C1 (9).

Para la formación de la maleimida **6**, el compuesto **1** se hizo reaccionar con anhídrido maleico en AcOH a reflujo (170°C) durante 90 min.²⁵ Como resultado, se obtuvo una mezcla del compuesto **6** y un intermedio de reacción **6a** (Figura 10) que fueron separados mediante un proceso de extracción ácido-base.

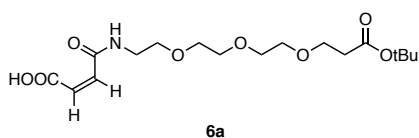


Figura 10: Estructura del intermedio de reacción **6a**

La estructura del producto **6**, obtenido con un 26% de rendimiento, se determinó por RMN-¹H, RMN-¹³C y espectrometría de masas de alta resolución. En el RMN-¹H se observó el singulete característico de la maleimida a δ_H 6.7, las señales de los grupos metilénicos del PEG₃ en torno a δ_H 3.7 y la señal del grupo *tert*-butilo a δ_H 1.4. Mediante espectroscopia de RMN-¹³C, se corroboró su estructura al observarse la presencia de las señales de la maleimida a δ_C 134 (carbono CH) y 171 (carbonilo), los carbonos

Código Seguro De Verificación	Mp9HULCeSIMtn5CMoIse3g==	Estado	Asinado	Data e hora	22/07/2021 09:44:42
Asinado Por	Carlos Jiménez González		Asinado		22/07/2021 09:42:40
Observacións			Página		24/60
Url De Verificación	https://sede.udc.gal/services/validation/Mp9HULCeSIMtn5CMoIse3g==				



secundarios metilénicos del PEG₃ en torno a δ_C 70 y las señales características del grupo *tert*-butilo a δ_C 80 (carbono cuaternario) y a δ_C 28 (grupos metilo). Por último, mediante espectrometría de masas, se observó el ion $[M + Na]^+$ a m/z 380.1686 (calcd. para $C_{17}H_{27}NO_7Na^+$, 380.1680). Además, el espectro de RMN-¹H permitió confirmar la correcta separación de los dos compuestos debido a la desaparición de dos dobletes a δ_H 6.4 y 6.3 que se corresponde con los dos hidrógenos del doble enlace del intermedio de reacción **6a** (Figura 11).

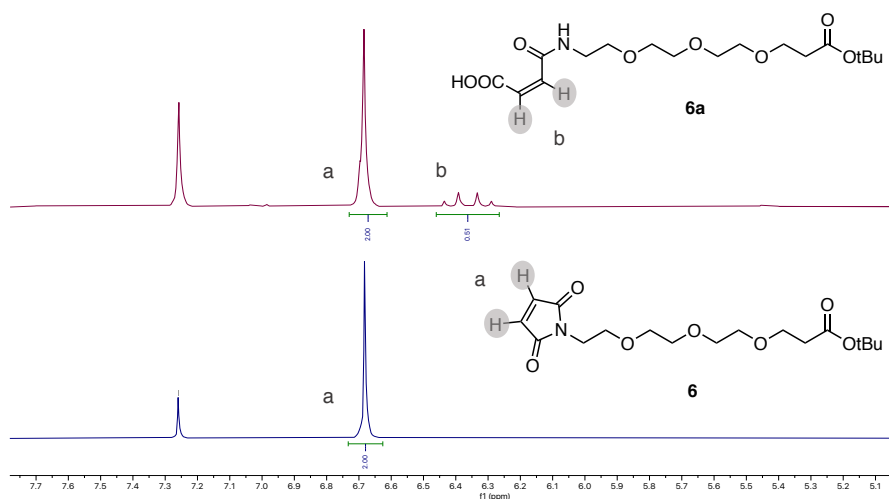


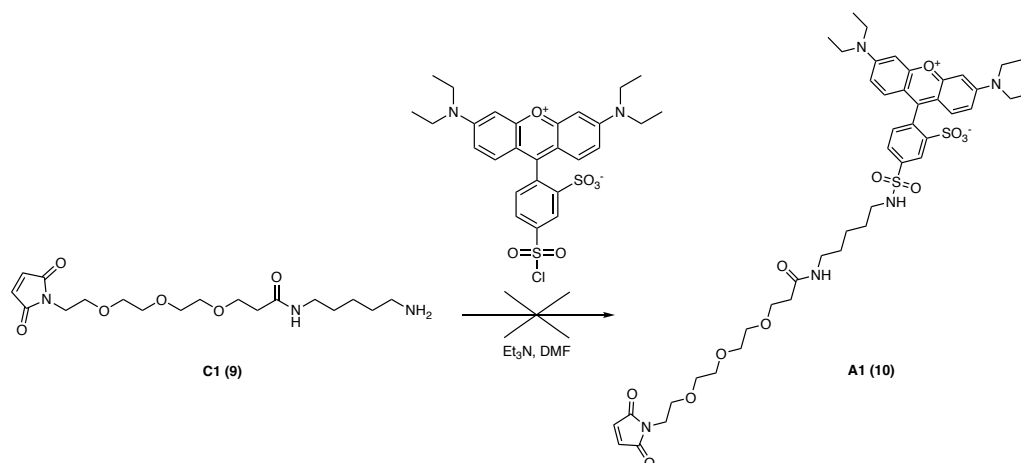
Figura 11. Comparación del espectro de RMN-¹H del crudo de reacción (granate, superior) con el del compuesto obtenido después de la extracción (azul, inferior). En el inferior, puede observarse la desaparición del multiplete característico del intermedio **6a**.

Una vez formada la maleimida **6**, se llevó a cabo la hidrólisis del éster con una mezcla TFA:CH₂Cl₂ (1:9) y, a continuación, el ácido resultante **7** se hizo reaccionar con *N*-Boc-cadaverina en DMF y en presencia de TBTU y DIPEA, para formar el compuesto **8** con un rendimiento global en las dos etapas del 63%. La estructura de este precursor del fragmento C1 fue determinada por RMN-¹H, en cuyo espectro se observó un singlete ancho a δ_H 6.5, correspondiente a la amida, y las señales del grupo *tert*-butilo y la maleimida a δ_H 1.4 y 6.7, respectivamente. Además, en el espectro de RMN-¹³C se detectaron las señales correspondientes a los carbonilos de amida y de carbamato a δ_C 172 y 156, respectivamente, así como las señales de la maleimida a δ_C 134 (carbono CH) y 171 (carbonilo). Adicionalmente, el espectro de masas de alta resolución muestra el ion $[M + Na]^+$ a m/z 508.2624 (calcd. para $C_{23}H_{39}N_3O_8Na^+$, 508.2629) que confirma la formación del compuesto.

Código Seguro De Verificación	Mp9HULCeSIMtn5CMoIse3g==	Estado	Asinado	Data e hora	22/07/2021 09:44:42
Asinado Por	Carlos Jiménez González	Asinado	Asinado	22/07/2021 09:42:40	
Observacións	Jaime Rodríguez González	Página		25/60	
Url De Verificación	https://sede.udc.gal/services/validation/Mp9HULCeSIMtn5CMoIse3g==				



Finalmente, después de la desprotección del grupo *tert*-butoxicarbonilo del compuesto **8** con una mezcla TFA:CH₂Cl₂ (1:19), se realizó el intento de acoplamiento del fragmento C1 resultante con el cloruro de sulforodamina B en DMF utilizando como base Et₃N (Esquema 4).²⁶ Después de 16 horas de reacción, se aislaron dos compuestos que fueron purificados mediante HPLC, pero ninguno de ellos resultó ser el compuesto deseado ya que no se observó la señal esperada por la presencia del fragmento maleimida a δ_H 6.7.




Esquema 4. Intento de acoplamiento del fragmento C1 (**9**) con el cloruro de sulforodamina B para la formación del fragmento A1 (**10**).

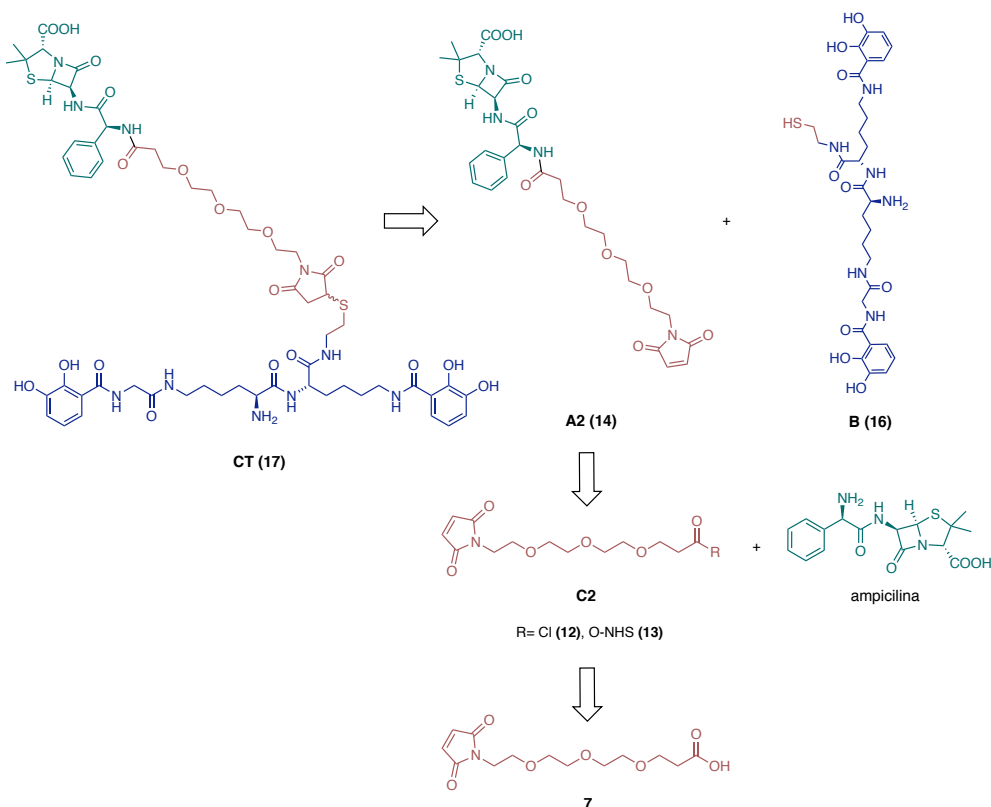
En vista de este resultado, y teniendo en cuenta que el compuesto **7** obtenido podría ser utilizado directamente para la preparación del conjugado sideróforo-antibiótico (CT), se decidió pasar al siguiente objetivo.

4.2. Preparación del conjugado sideróforo-antibiótico (CT)

De la misma manera que para la propuesta de síntesis de la sonda fluorescente, se realizó un análisis retrosintético en el que se establecieron los grupos funcionales necesarios para el acoplamiento de los constituyentes básicos del conjugado, que en este caso serán: el antibiótico ampicilina, el espaciador derivado del PEG₃ y, como sideróforo, el mismo análogo de las amonabactinas utilizado para la preparación de la sonda fluorescente (Esquema 5).

Código Seguro De Verificación	Mp9HULCeSIMtn5CMoIse3g==	Estado	Data e hora
Asinado Por	Carlos Jiménez González	Asinado	22/07/2021 09:44:42
	Jaime Rodríguez González	Asinado	22/07/2021 09:42:40
Observacións		Página	26/60
Url De Verificación	https://sede.udc.gal/services/validation/Mp9HULCeSIMtn5CMoIse3g==		





Esquema 5. Análisis retrosintético para la preparación del “caballo de Troya”, CT (17)

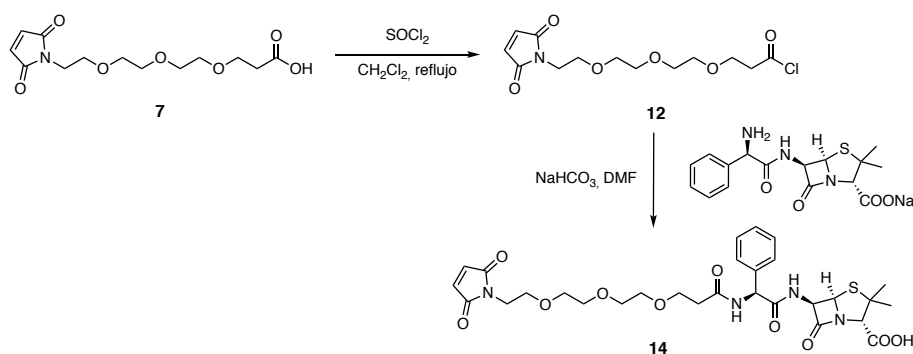
De nuevo, se postularon como etapas clave de la síntesis, el acoplamiento de la ampicilina con el fragmento C2, que tendría lugar a través de una forma activada del ácido 7, y el acoplamiento del fragmento A2 resultante con el fragmento B que, como se propuso en la anterior estrategia sintética, tendría lugar mediante una reacción tipo “click” entre la maleimida y el tiol. El compuesto 7 del que se parte para esta síntesis se obtuvo a partir del compuesto comercial 1, siguiendo las dos primeras etapas indicadas en el Esquema 3.

Para poder llevar a cabo el acoplamiento entre la ampicilina y el fragmento C2, el ácido 5 debe ser activado previamente con un buen grupo saliente para posibilitar el ataque nucleófilo de la amina primaria de la ampicilina.

Primero se formó el cloruro de ácido 12 como sustrato activado para el acoplamiento (Esquema 6).²⁷ Para ello, el ácido 7 se hizo reaccionar con cloruro de tionilo en diclorometano a reflujo bajo condiciones de atmósfera inerte e, inmediatamente después, se llevó a cabo la acilación de la ampicilina en DMF empleando NaHCO₃ como base.

Código Seguro De Verificación	Mp9HULCeSIMtn5CMoIse3g==	Estado	Asinado	Data e hora	22/07/2021 09:44:42
Asinado Por	Carlos Jiménez González Jaime Rodríguez González	Estado	Asinado		22/07/2021 09:42:40
Observacións		Página			27/60
Url De Verificación	https://sede.udc.gal/services/validation/Mp9HULCeSIMtn5CMoIse3g==				

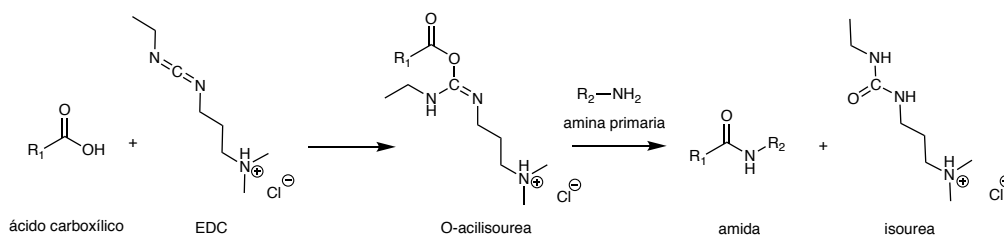




Esquema 6. Formación del fragmento A2 (14) a partir del cloruro de ácido (12)

Debido al bajo rendimiento global obtenido empleando el cloruro de ácido (16%), se decidió plantear una ruta alternativa utilizando un método más eficiente basado en las técnicas de bioconjugación desarrolladas para la síntesis peptídica.

En este ámbito, unos de los reactivos más empleados para la formación de amidas son las carbodiimidas como el EDC·HCl. Este compuesto reacciona con el ácido carboxílico para formar una O-acilisourea, un intermedio altamente reactivo que en presencia de una amina primaria da lugar a la correspondiente amida e isourea como producto secundario (Esquema 7). Además, para aumentar la eficiencia suele introducirse en el acoplamiento *N*-hidroxisuccinimida (NHS), que reacciona con la O-acilisourea para formar un éster de NHS estable.²⁸

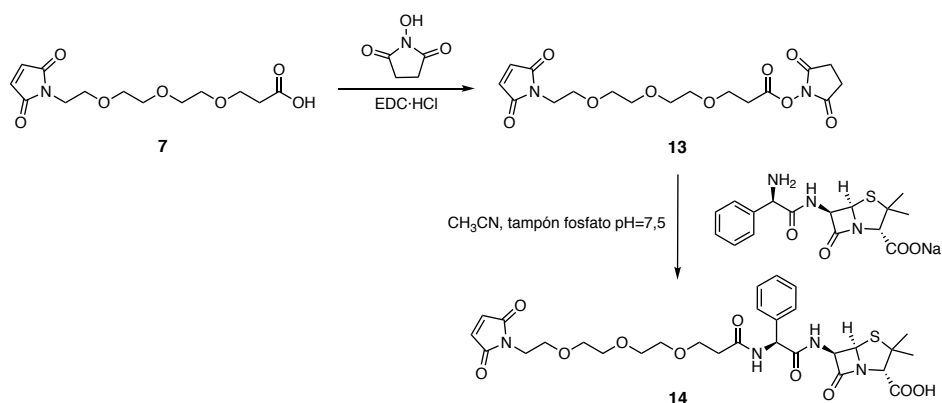


Esquema 7. Reacción de formación de amidas mediada por la activación del ácido carboxílico con EDC·HCl.

De esta forma, el ácido 7 se hizo reaccionar con EDC·HCl y NHS en CH₂Cl₂ bajo condiciones de atmosfera inerte para obtener el éster de NHS 13 con un rendimiento del 75%. Una vez activado el ácido, se llevó a cabo el acoplamiento con la ampicilina en una mezcla 2:1 de acetonitrilo y una disolución tampón de fosfato potásico a un pH de 7.5, obteniéndose el compuesto 14 con un rendimiento del 46% después de su purificación por HPLC.

Código Seguro De Verificación	Mp9HULCeSIMtn5CMoIse3g==	Estado	Data e hora
Asinado Por	Carlos Jiménez González	Asinado	22/07/2021 09:44:42
	Jaime Rodríguez González	Asinado	22/07/2021 09:42:40
Observacións		Página	28/60
Url De Verificación	https://sede.udc.gal/services/validation/Mp9HULCeSIMtn5CMoIse3g==		

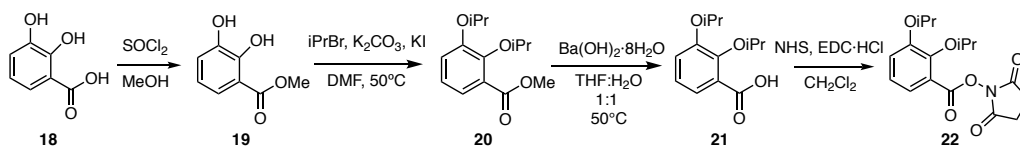




Esquema 8. Segundo planteamiento sintético para la formación del fragmento A2 (**14**)

La estructura del fragmento A2 se confirmó por RMN de protón y carbono-13 junto con espectrometría de masas de alta resolución. En el espectro de RMN-¹H se pudieron identificar las señales del anillo bencénico en torno a δ_H 7.3, la señal de la maleimida a δ_H 6.7 y las señales de los dos metilos de la ampicilina como singuletes a δ_H 1.6 y 1.5. Mediante el espectro de RMN-¹³C se observaron las señales del benceno monosustituído a δ_C 130 y 137, la de la maleimida a δ_C 134 (carbono CH) y 170 (carbonilo) y los dos carbonos primarios de la ampicilina a δ_C 31 y 27. Por último, por espectrometría de masas de alta resolución, la formación del producto se confirmó al observarse el ion $[M+K]^+$ a m/z 671.1772 (calcd. para C₁₉H₃₆N₄O₁₀SK⁺, 671.1784).

El siguiente paso consistió en la preparación del fragmento B (**16**) correspondiente con el análogo de las amonabactinas. Para ello se utilizó el compuesto protegido **15** sintetizado y proporcionado por Javier Cisneros Sureda, miembro del grupo de investigación. Si bien, cabe destacar que de forma paralela se inició la síntesis de uno de los fragmentos necesarios para su obtención (Esquema 9). Como esta síntesis ya había sido optimizada por miembros del grupo, se siguieron los procedimientos publicados,¹⁹ tal y como se refleja en la sección experimental.

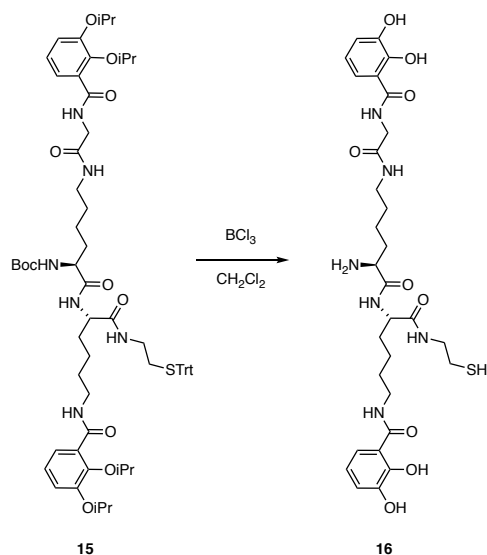


Esquema 9. Ruta sintética seguida para la preparación del compuesto **22**.

Código Seguro De Verificación	Mp9HULCeSIMtn5CMoIse3g==	Estado	Asinado	Data e hora	22/07/2021 09:44:42
Asinado Por	Carlos Jiménez González		Asinado		22/07/2021 09:42:40
Observacións	Jaime Rodríguez González		Página		29/60
Url De Verificación	https://sede.udc.gal/services/validation/Mp9HULCeSIMtn5CMoIse3g==				

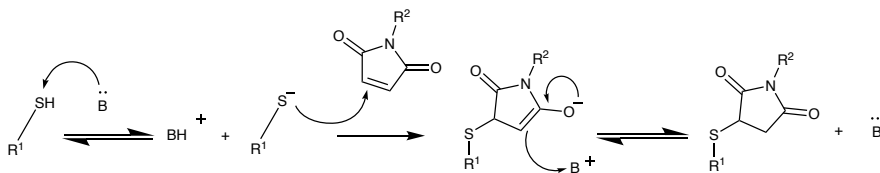


Para llevar a cabo la desprotección (Esquema 10), una disolución del compuesto **15** en CH_2Cl_2 se hizo reaccionar con BCl_3 durante 16 horas a -40°C y bajo condiciones de atmósfera inerte. El fragmento B (**16**) se obtuvo con un 47% de rendimiento y su formación pudo confirmarse a partir del análisis de su espectro de RMN- ^1H al mostrar las señales de los protones de los catecoles en torno a δ_H 7.0 y el triplete correspondiente con los protones en alfa al tiol que resuenan a δ_H 2.5.



Esquema 10. Desprotección del análogo de las amonabactinas (**15**) para la obtención del fragmento B (**16**).

Por último, para el acoplamiento de los fragmentos A2 (**14**) y B (**16**) se empleó una reacción tipo “click” maleimida-tiol. La química “click” engloba un conjunto de reacciones capaces de proporcionar rendimientos altos que se caracterizan por ser rápidas, versátiles y fáciles de purificar.²⁹ La reacción maleimida-tiol transcurre a través de una adición tipo sulfa-Michael (Esquema 11) altamente eficaz y selectiva. Esto es debido al efecto de retirada de carga que ofrecen los dos grupos carboxilo activadores de la maleimida, junto con la tensión del anillo de 5 miembros que se libera con la formación del producto.



Esquema 11. Mecanismo general de la reacción de adición sulfa-Michael maleimida-tiol catalizada por una base.

Código Seguro De Verificación	Mp9HULCeSIMtn5CMoIse3g==	Estado	Data e hora
Asinado Por	Carlos Jiménez González	Asinado	22/07/2021 09:44:42
Observacións	Jaime Rodríguez González	Asinado	22/07/2021 09:42:40
Url De Verificación	https://sede.udc.gal/services/validation/Mp9HULCeSIMtn5CMoIse3g==		Páxina 30/60



De esta forma, ambos fragmentos se hicieron reaccionar durante 24h a temperatura ambiente en una mezcla 2:1 de acetonitrilo y una disolución tampón de fosfato potásico a pH neutro (Figura 12A). El producto de reacción se purificó por HPLC obteniéndose un intenso pico cromatográfico con un tiempo de retención de 10.4 min (Figura 12B).

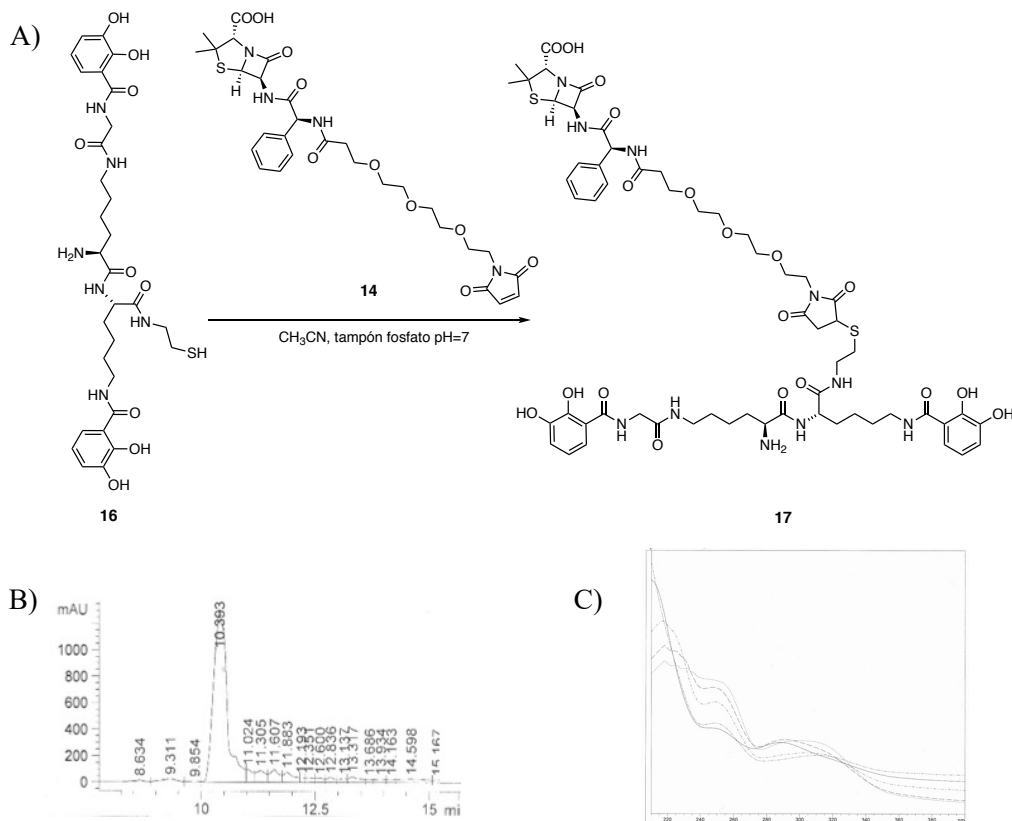


Figura 12. A) Esquema de reacción para la formación del compuesto **17**. B) Cromatograma derivado de la purificación por HPLC (tiempo de retención de 10.4 min). C) Espectro UV asociado al pico de 10.4 min, donde se aprecian máximos de absorción ligeramente desplazados.

En el espectro de masas de alta resolución en modo negativo del producto correspondiente a dicha fracción se observa el ion $[M-H]^-$ a m/z 1293.4752 (calcd. para $C_{59}H_{77}N_{10}O_{19}S_2^-$, 1293.4813) que confirma la formación del compuesto deseado **17**. Adicionalmente, en su espectro de RMN-¹H se pudieron identificar las señales características del compuesto, utilizando como referencia un conjugado preparado previamente por el grupo que tan solo difiere en el espaciador empleado. Como se observa en la Figura 13, existe una correspondencia entre las señales obtenidas y las del espectro de referencia a excepción de las características del PEG₃ que aparecen entre 3.5 y 3.8 ppm, rasgo distintivo entre ambos compuestos.

Código Seguro De Verificación	Mp9HULCeSIMtn5CMoIse3g==	Estado	Data e hora
Asinado Por	Carlos Jiménez González	Asinado	22/07/2021 09:44:42
Observacións	Jaime Rodríguez González	Asinado	22/07/2021 09:42:40
Url De Verificación	Página		31/60
	https://sede.udc.gal/services/validation/Mp9HULCeSIMtn5CMoIse3g==		



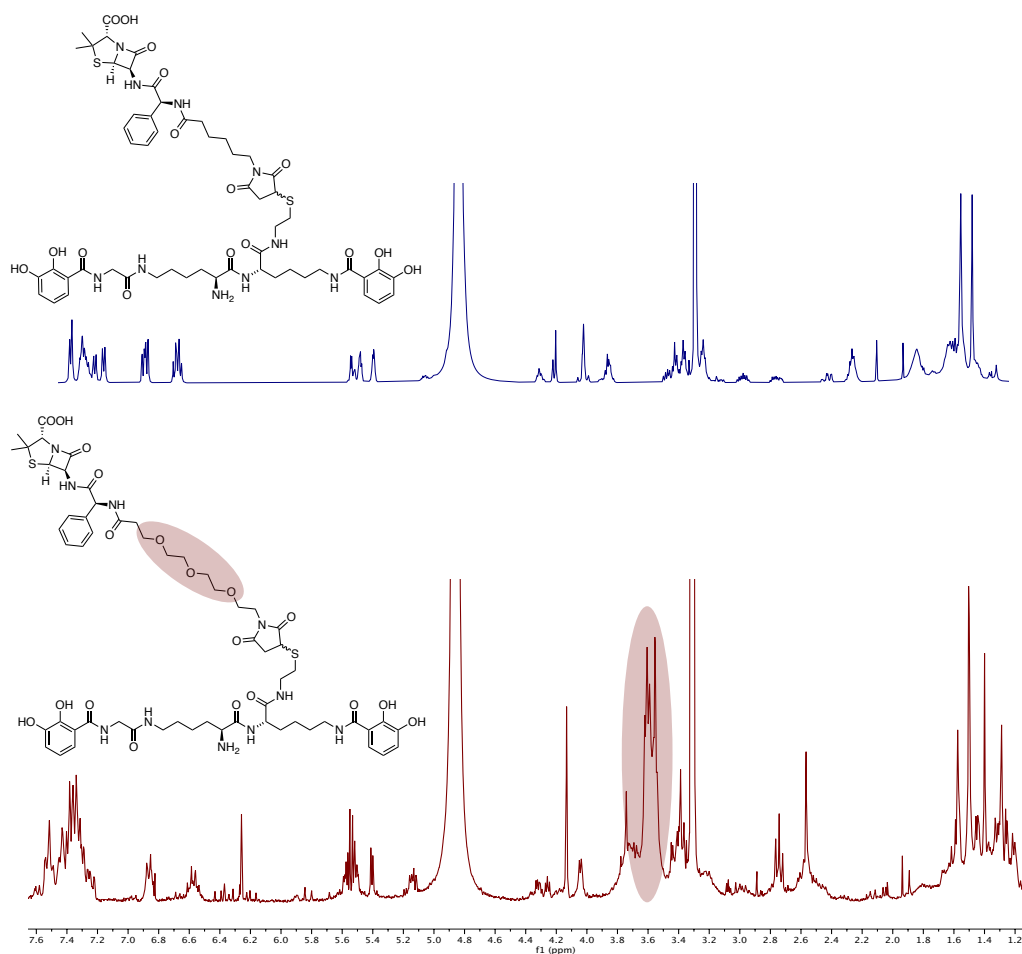


Figura 13. Comparación del espectro de RMN-¹H del producto de reacción de obtención del compuesto **17** (granate, inferior) y el correspondiente con el conjugado molecular tomado como referencia (azul, superior). Las señales características del PEG₃, que diferencian ambos compuestos, aparecen sombreadas.

Sin embargo, a pesar de estos resultados positivos, tanto el espectro UV del pico cromatográfico eluido del HPLC (Figura 12C) como el espectro de RMN-¹H del producto purificado (Figura 13), reflejaron la presencia de una mezcla de compuestos. Por lo tanto, se concluye que será necesario optimizar la reacción de acoplamiento en otras condiciones que nos permitan obtener el compuesto **17** de forma pura.

Código Seguro De Verificación	Mp9HULCeSIMtn5CMoIse3g==	Estado	Asinado	Data e hora	22/07/2021 09:44:42
Asinado Por	Carlos Jiménez González		Asinado		22/07/2021 09:42:40
Observacións			Página		32/60
Url De Verificación	https://sede.udc.gal/services/validation/Mp9HULCeSIMtn5CMoIse3g==				



5. SECCIÓN EXPERIMENTAL

En este apartado se describirá la metodología experimental empleada en las diferentes propuestas sintéticas, siguiendo la nomenclatura asignada en la sección de “Resultados y discusión”.

5.1. Métodos generales


Para evitar la formación de complejos con el Fe(III), todo el material de vidrio en contacto con el análogo de amonabactina desprotegido fue lavado previamente con una disolución concentrada de HCl durante 12 h. Las reacciones que requieren condiciones anhidras se llevaron a cabo bajo atmósfera de Ar desoxigenado seco (Ar C-50). Para bajar la temperatura a 0°C se utilizó un baño de agua/hielo mientras que, para las reacciones que transcurren a temperaturas inferiores, se empleó una sonda de refrigeración *Cryocool-inmersión CC-100 II (Neslab)* en un baño de acetona o MeOH.

Los disolventes secos utilizados se obtuvieron mediante un sistema de purificación de disolventes *MB sps-800 de M-BRAUN* a excepción de la DMF seca, que se tomó de una versión comercial con un 99.8% de pureza, extra seca, *AcroSeal™ de ACROS Organics™*. El agua ultrapura se obtuvo a partir del *Millipore Gradient A10* por dispensación automática y en caso de ser necesaria energía de ultrasonidos se empleó el equipo *Branson 3800*.

El seguimiento de las reacciones se llevó a cabo por cromatografía en capa fina utilizando cromatoplasmas de gel de sílice *Merck 60 F254* que se revelaron por exposición a radiación UV (254 nm) o por inmersión en una disolución de ácido fosfomolibdico (10% m/v en EtOH). Si bien, en aquellos casos en los que no fue posible subir el producto por capa fina, se siguió por TLC-MS empleando el módulo CAMAG Interface 2 conectado a un espectrómetro *Bruker AmaZon speed Toxyper®*

Las purificaciones de las reacciones se llevaron a cabo mediante cromatografía en columna en gel de sílice (tamaño de partícula 40-60 µm, tamaño de poro 60 Å) *ACROS Organics™*, o empleando un sistema de cromatografía de media presión *SP-1 de Biotage™* con cartuchos *SNAP kp-sil-50g*. Para las separaciones por HPLC se emplearon dos equipos diferentes (*Agilent HPI200* con detector UV-DAD y *Agilent HPI260 Infinity*

Código Seguro De Verificación	Mp9HULCeSIMtn5CMoIse3g==	Estado	Data e hora
Asinado Por	Carlos Jiménez González Jaime Rodríguez González	Asinado Asinado	22/07/2021 09:44:42 22/07/2021 09:42:40
Observacións		Página	33/60
Url De Verificación	https://sede.udc.gal/services/validation/Mp9HULCeSIMtn5CMoIse3g==		

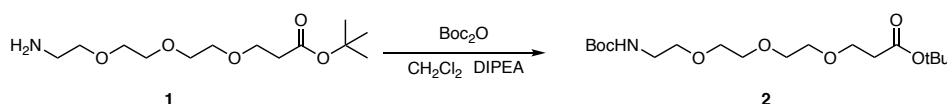


II con detector UV de onda fija), las columnas *Atlantis® Prep dC18* (100 x 10 mm, 5 µm), *Discovery® HS-F5* (250 x 10 mm, 5 µm) y *Luna Omega C18* (150 x 2.1 mm, 1.6 µm), y disolventes de calidad HPLC de la marca *FISHER*.

Por último, la caracterización por resonancia magnética nuclear se llevó a cabo empleando un espectrómetro *Bruker Avance 300* perteneciente al CICA (Centro de Investigaciones Científicas Avanzadas) y los espectrómetros *Bruker Avance III HD 4000* y *Bruker Avance 500* del SAI (Servicio de Apoyo a la Investigación de la Universidad de la Coruña). Los espectros de masas electrospray (ESI) se realizaron en un equipo *Qstar-QqTOF Tandem Hybrid System* con fuente de ESI de *Applied BioSystems*.

5.2. Procedimientos y caracterización

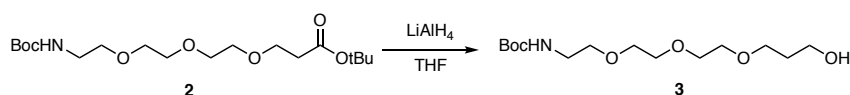
BocHN-PEG₃-COOtBu (2)



Sobre 10 mL de una disolución de 1 equiv. del compuesto **1** (100 mg, 360.54 µmol) y 1.2 equiv. de Boc₂O (94.43 mg, 432.65 µmol) en CH₂Cl₂ seco se añadieron 80 µL de DIPEA. La mezcla de reacción se dejó durante 16 horas bajo condiciones de atmósfera inerte y a temperatura ambiente. Al cabo de este tiempo, se eliminó el disolvente a presión reducida en el rotavapor y se elaboró por extracción líquido-líquido con AcOEt/H₂O. La fracción orgánica resultante se secó con MgSO₄ anhidro, se concentró a presión reducida y se purificó por columna cromatográfica (50% AcOEt/Hexano) para obtener **2** (108.6 mg, 80% de rendimiento) como un aceite incoloro. **RMN-¹H** (400.13 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 5.05 (s, 1H, H19), 3.71 (t, *J* = 1.2 Hz, 2H, H12), 3.62 (tt, *J* = 4.8, 2.3 Hz, 8H, H8-H11), 3.53 (t, *J* = 5.2 Hz, 2H, H7), 3.31 (q, *J* = 5.4 Hz, 2H, H6), 2.50 (t, *J* = 1.2 Hz, 2H, H13), 1.44 (s, 12H, H1-H3;H16-18). **RMN-¹³C** (100.6 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 171.04 (C, C14), 156.16 (C, C5), 80.67 (C, C15), 79.29 (C, C4), 70.69-70.39 (5 CH₂, C7-C11), 67.07 (CH₂, C12), 40.54 (CH₂, C6), 36.41 (CH₂, C13), 28.57 (3 CH₃, C1-C3), 28.24 (3 CH₃, C16-C18). **ESI-HRMS(+)**: *m/z* calculado para C₁₈H₃₆NO₇⁺ [M+H]⁺ 378.2486, encontrado 378.2488 (Δ*m* = 0.2 mmu), calculado para C₁₈H₃₅NO₇Na⁺ [M+Na]⁺ 400.2306, encontrado 400.2307 (Δ*m* = 0.1 mmu)

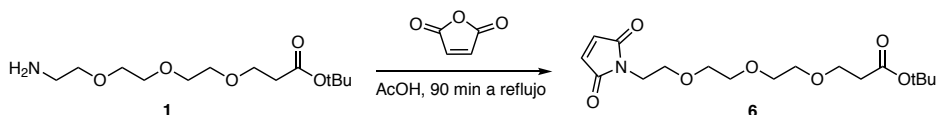
Código Seguro De Verificación	Mp9HULCeSIMtn5CMoIse3g==	Estado		Data e hora	
Asinado Por	Carlos Jiménez González	Asinado		22/07/2021 09:44:42	
	Jaime Rodríguez González	Asinado		22/07/2021 09:42:40	
Observacións		Página		34/60	
Url De Verificación	https://sede.udc.gal/services/validation/Mp9HULCeSIMtn5CMoIse3g==				

BocHN-PEG₃-OH (3)



Sobre 8 mL de una disolución del compuesto **2** (108.6 mg, 287.7 μmol) en THF se añadieron 5 equiv. de LiAlH₄ 1M (1.5 mL, 1.44 mmol) a 0°C y bajo condiciones de atmósfera inerte. Tras 16 horas de reacción a temperatura ambiente, se bajó de nuevo la temperatura a 0°C y se añadieron dos porciones de 1 mL de AcOEt. Transcurridos 5 min, se eliminó el disolvente a presión reducida y se elaboró por extracción líquido-líquido en AcOEt/H₂O. La fracción orgánica resultante se secó con MgSO₄ anhidro y se concentró a presión reducida para obtener **3** (42.2 mg 48% de rendimiento) como un aceite amarillo. **RMN-¹H** (400.13 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 5.65 (s, 1H, H16), 3.76 (t, $J = 6.1$ Hz, 2H, H14), 3.67 (t, $J = 5.8$ Hz, 2H, H12), 3.64 – 3.56 (m, 8H, H8-H11), 3.51 (t, $J = 5.1$ Hz, 2H, H7), 3.29 (q, $J = 5.1$ Hz, 2H, H6), 1.81 (p, $J = 5.6$ Hz, 2H, H13), 1.42 (s, 9H, H1-H3). **RMN-¹³C** (100.6 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 156.37 (C, C5), 79.08 (C, C4), 70.61-70.05 (5CH₂, C7-C11), 61.67(CH₂, C12), 40.48 (CH₂, C6), 31.83(CH₂, C14), 29.79 (CH₂, C13), 28.55 (3CH₃, C1-C3). **ESI-HRMS(+)**: m/z calculado para C₁₄H₂₉NO₆Na⁺ [M+Na]⁺ 330.1887, encontrado 330.1888 ($\Delta m = 0.1$ mmu)

Mal-PEG₃-COOtBu (6)



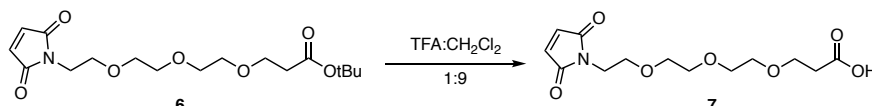
Sobre 5 mL de una disolución del compuesto **1** (200 mg, 721.08 μmol) en AcOH se añadió 1 equiv. de anhídrido maleico (70.71 mg, 721.08 μmol). Tras 90 min a reflujo (170°C) se eliminó el disolvente a presión reducida añadiendo dos porciones de 5 mL de tolueno para facilitar la destilación. Se elaboró mediante una extracción líquido-líquido en AcOEt y una disolución acuosa de NaHCO₃ (pH= 9) para separar el intermedio de reacción como sal de sodio con la fase acuosa. La fracción orgánica resultante se secó con MgSO₄ y se concentró bajo presión reducida para obtener **6** como un aceite amarillo (132.5 mg, 26% de rendimiento). El intermedio aislado (74.2 mg) se puso de nuevo a reflujo en AcOH para obtener, tras repetir el procedimiento descrito, 11.7 mg del producto final que mejoran el rendimiento a un 28%. **RMN-¹H** (400.13 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 6.69 (s, 2H, H1-H2), 3.75 – 3.66 (m, 4H, H6, H11), 3.65 -3.55 (m, 10H, H5, H7-H10), 2.49 (t, $J = 6.6$

Código Seguro De Verificación	Mp9HULCeSIMtn5CMoIse3g==	Estado	Data e hora
Asinado Por	Carlos Jiménez González	Asinado	22/07/2021 09:44:42
	Jaime Rodríguez González	Asinado	22/07/2021 09:42:40
Observacións		Página	35/60
Url De Verificación	https://sede.udc.gal/services/validation/Mp9HULCeSIMtn5CMoIse3g==		



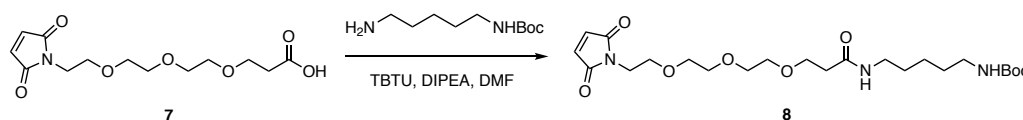
Hz, 2H, H12), 1.44 (s, 9H, H15-H17). **RMN-¹³C** (100.6 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 170.92 (C, C13), 170.64 (2C, C3-C4), 134.15 (2CH, C1-C2), 80.51 (C, C14), 70.56- 70,08 (4CH₂, C7-C10), 67.82 (CH₂, C11), 66.91 (CH₂, C6), 37.15 (CH₂, C5), 36.28 (CH₂, C12), 28.10 (3CH₃, C15-C17). **ESI-HRMS(+)**: *m/z* calculado para C₁₃H₁₉NO₇Na⁺ [M+Na-C₄H₈]⁺ 324.1054, encontrado 324.1060 (Δ*m* = 0.6 mmu), calculado para C₁₇H₂₇NO₇Na⁺ [M+Na]⁺ 380.1680, encontrado 380.1686 (Δ*m* = 0.6 mmu)

Mal-PEG₃-COOH (7)



Se disolvieron 71.3 mg de **6** en 2.5 mL de una mezcla 1:9 de TFA:CH₂Cl₂ y se dejaron reaccionando a temperatura ambiente. La reacción se siguió por capa fina usando una mezcla 1:1 AcOEt:Hex como fase móvil y, tras una hora, se eliminó el disolvente a presión reducida en el rotavapor para obtener **7** como un aceite amarillo con un rendimiento cuantitativo. **RMN-¹H** (400.13 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 6.73 (s, 2H), 3.81 (t, *J* = 6.0 Hz, 2H), 3.76 (t, *J* = 5.6 Hz, 2H), 3.69 – 3.60 (m, 10H), 2.67 (t, *J* = 6.0 Hz, 2H). **RMN-¹³C** (100.6 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 134.34 (2CH, C1-C2), 70.81-70.27 (4CH₂, C7-C10), 68.09 (CH₂, C11), 66.54 (CH₂, C6), 37.41 (CH₂, C5), 34.81 (CH₂, C12). **ESI-HRMS(+)**: *m/z* calculado para C₁₃H₁₉NO₇Na⁺ [M+Na]⁺ 324.1054, encontrado 324.1055 (Δ*m* = 0.1 mmu)

Mal-PEG₃-CONH-(CH₂)₅-NHBoc (8)

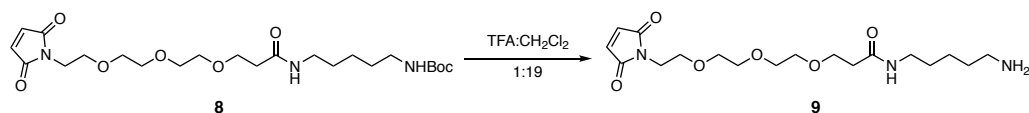


Sobre 5 mL de una disolución de 1 equiv. de **7** (41.9 mg, 139.07 μmol) y 1.2 equiv. de TBTU (54 mg, 166.88 μmol) en DMF anhidro se añadieron 1.5 equiv. de DIPEA (35.3 μL, 208.6 μmol) bajo condiciones de atmósfera inerte. A continuación, se canuló la mezcla sobre una disolución de 1.2 equiv. de *N*-boc-cadaverina (35 μL, 166.88 μmol) en 1 mL de DMF anhidro y se dejó reaccionando a temperatura ambiente durante 12 horas. Transcurrido ese tiempo, se concentró a presión reducida y se elaboró por extracción líquido-líquido en AcOEt y una disolución acuosa de HCl al 1% para evitar la hidrólisis de la maleimida. La fase orgánica obtenida se secó con MgSO₄, se concentró bajo presión

Código Seguro De Verificación	Mp9HULCeSIMtn5CMoIse3g==	Estado	Data e hora	
Asinado Por	Carlos Jiménez González	Asinado	22/07/2021 09:44:42	
Observacións	Jaime Rodríguez González	Asinado	22/07/2021 09:42:40	
Url De Verificación	https://sede.udc.gal/services/validation/Mp9HULCeSIMtn5CMoIse3g==		Página	

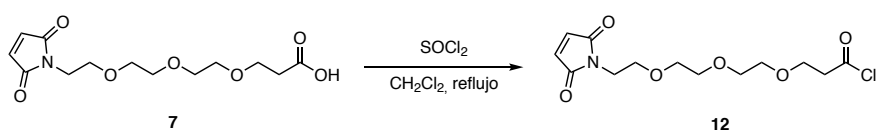
reducida y se purificó por columna cromatográfica (10% MeOH/CH₂Cl₂) para obtener el **8** (42.7 mg, 63% de rendimiento) como un aceite rosado. **RMN-¹H** (400.13 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 6.70 (s, 2H, H1-H2), 6.51 (s, 1H, H24), 4.63 (s, 1H, H25), 3.76 – 3.68 (m, 4H, H6, H11), 3.66 – 3.56 (m, 10H, H5, H7-H10), 3.22 (q, *J* = 7.0 Hz, 2H, H18), 3.10 (q, *J* = 6.3 Hz, 2H, H14), 2.46 (t, *J* = 5.8 Hz, 2H, H12), 1.55-1.46 (m, 4H, H15;H17), 1.43 (s, 9H, H21-H23), 1.38-1.30 (m, 2H, H16). **RMN-¹³C** (100.6 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 171.75 (C, C13), 170.81 (2C, C3-C4), 156.20 (C, C19), 134.33 (2CH, C1-C2), 79.20 (C, C20), 70.57-70.18 (4CH₂, C7-C10), 68.10 (CH₂, C6), 67.51 (CH₂, C11), 40.53 (CH₂, C5), 39.28 (CH₂, C18), 37.30 (CH₂, C12), 37.13 (CH₂, C14), 29.78 (CH₂, C15), 29.36 (CH₂, C17), 28.59 (CH₃, C21-C23), 24.11 (CH₂, C16). **ESI-HRMS(+)**: *m/z* calculado para C₁₈H₃₂N₃O₆⁺ [M+H-C₅H₇O₂]⁺ 386.2286, encontrado 386.2283 (Δ*m* = 0.3 mmu), calculado para C₂₃H₃₉N₃O₈Na⁺ [M+Na]⁺ 508.2629, encontrado 508.2624 (Δ*m* = 0.5 mmu).

Mal-PEG₃-CONH-(CH₂)₅-NH₂ (**9**); fragmento C



Se disolvieron 42.7 mg de **8** en 2.5 mL de una mezcla 1:19 de TFA:CH₂Cl₂ y se dejaron reaccionando a temperatura ambiente. La reacción se siguió por capa fina usando una mezcla 2:1 AcOEt:Hex como fase móvil y, tras una hora, se eliminó el disolvente a presión reducida en el rotavapor para obtener **9** como un aceite amarillo con un rendimiento cuantitativo.

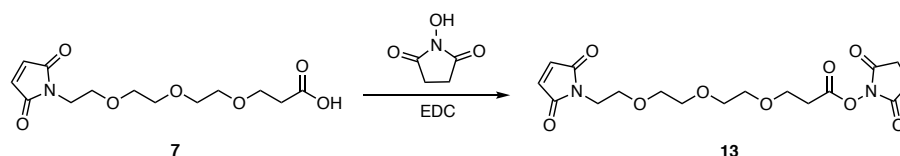
Mal-PEG₃-COCl (**12**); fragmento C2



Sobre 6 mL de una disolución de 1 equiv. de **7** (53,8 mg, 178,56 μmol) en CH₂Cl₂ seco se añadieron 2 equiv. de SOCl₂ bajo condiciones de atmósfera inerte. Tras 1.5 horas a reflujo se concentró a presión reducida en el rotavapor para obtener **12** como un aceite naranja que fue usado inmediatamente para la siguiente reacción.

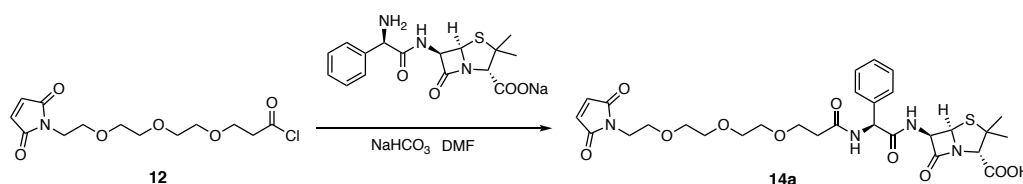
Código Seguro De Verificación	Mp9HULCeSIMtn5CMoIse3g==	Estado	Data e hora
Asinado Por	Carlos Jiménez González	Asinado	22/07/2021 09:44:42
Observacións	Jaime Rodríguez González	Asinado	22/07/2021 09:42:40
Url De Verificación	https://sede.udc.gal/services/validation/Mp9HULCeSIMtn5CMoIse3g==		Página
			37/60

Mal-PEG₃-NHS (13); fragmento C2




Sobre 5 mL de una disolución de **7** (60 mg, 199.14 μmol) en CH_2Cl_2 seco se añadieron 2 equiv. de NHS (46 mg, 399 μmol) y 1.5 equiv. de EDC $\cdot\text{HCl}$ (57.4 mg, 299 μmol). La mezcla se dejó reaccionando durante 16 horas a temperatura ambiente y bajo condiciones de atmósfera inerte. Transcurrido ese tiempo, se concentró a presión reducida en el rotavapor y se purificó por columna cromatográfica (100% AcOEt) para obtener **13** (60 mg, 75% de rendimiento) como un aceite amarillo. **RMN-¹H** (500.13 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 6.69 (s, 2H, H1-H2), 3.69 – 3.56 (m, 14H, H5;H6;H7-H10;H11), , 10H, H5;H7-H10), 2.63 (t, J = 6. Hz, 2H, H12). **RMN-¹³C** (100.6 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 170.85 (C, C13), 169.82 (2C, C3-C4), 169.18 (2C, C14; C17) 134.28 (2CH, C1-C2), 70.81- 70.15 (4CH₂, C7-C10), 67.93 (CH₂, C11), 65.83 (CH₂, C6), 37.25 (CH₂, C5), 32.26 (CH₂, C12), 25.71(2CH₂, C15-C16). **ESI-HRMS(+)**: m/z calculado para $\text{C}_{17}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_9\text{Na}^+$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 421.1218, encontrado 421.1213 (Δm = 0.5 mmu)

Mal-PEG₃-amp (14); fragmento A2

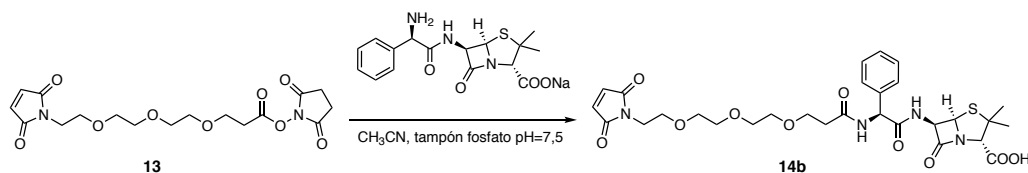


Preparación del compuesto 14, a partir del cloruro de ácido 12: sobre 5 mL de una disolución de 1 equiv. de ampicilina (66.31 mg, 178.56 μmol) y 4 equiv. de NaHCO₃ (60 mg, 714.21 μmol) en DMF anhidro se añadió 1 equiv. de **12** (57 mg, 178.56 μmol) a 0°C y bajo condiciones de atmósfera inerte. Tras 5 min en frío, se dejó reaccionando durante 2 h a temperatura ambiente y se adicionaron 10 mL de H₂O. Se lavó con dos porciones de 10 mL de AcOEt y después se acidificó con una disolución acuosa de HCl al 5% hasta alcanzar un pH de 3 para extraer el ácido protonado con AcOEt. La fase orgánica resultante se secó con MgSO₄ anhidro, se concentró bajo presión reducida y se purificó por HPLC de fase inversa, columna Atlantis semipreparativa, utilizando como eluyentes MeOH y H₂O de calidad HPLC sin TFA para evitar la degradación de la ampicilina. El

Código Seguro De Verificación	Mp9HULCeSIMtn5CMoIse3g==	Estado	Asinado	Data e hora	22/07/2021 09:44:42
Asinado Por	Carlos Jiménez González Jaime Rodríguez González	Asinado			22/07/2021 09:42:40
Observacións		Página			38/60
Url De Verificación	https://sede.udc.gal/services/validation/Mp9HULCeSIMtn5CMoIse3g==				



método empleado empezó con un 10% MeOH, subió a 60% en 5 min y alcanzó el 100% en 15 min. El compuesto **14**, eluido con un tiempo de retención de 9 min, se obtuvo, tras concentrar y secar, como un aceite amarillo (17.5 mg, 16% de rendimiento).

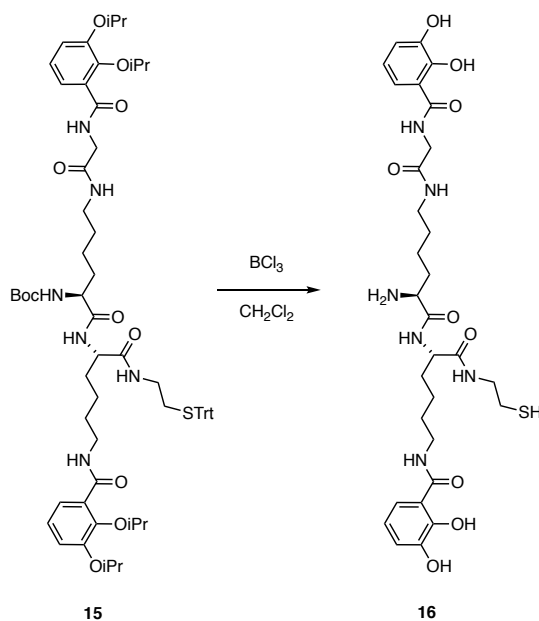


Preparación del compuesto 14, a partir del éster de NHS 13: se disolvió 1 equiv. de **13** (29 mg, 72.8 μmol) y 1 equiv. de ampicilina (27 mg, 72.8 μmol) en una mezcla 1:1 de acetonitrilo y un tampón de fosfato potásico de pH= 7,5 y se dejaron reaccionando 4 h a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo de reacción, se concentró a presión reducida en el rotavapor y se purificó por HPLC de fase inversa, columna Luna Omega semipreparativa, utilizando como eluyentes MeCN y H₂O de calidad HPLC sin TFA. El método aplicado comenzó con un 10% de MeCN, subió al 60% en el minuto 5 y al 100% en 15 min. El compuesto **14**, eluido con un tiempo de retención de 9 min, se obtuvo tras eliminar el disolvente, como un aceite amarillo (21 mg, 46% de rendimiento). **RMN-¹H** (400.13 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7.72 (d, $J = 7.2$ Hz, 1H, H30), 7.38 – 7.28 (m, 5H, H15-H20), 7.17 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H, H31), 6.68 (s, 2H, H1-H2), 5.63 (d, $J = 7.2$ Hz, 1H, H14), 5.59 (dd, $J = 8.6, 4.1$ Hz, 1H, H22), 5.44 (d, $J = 4.1$ Hz, 1H, H23), 4.36 (s, 1H, H25), 3.75 – 3.64 (m, 4H, H6;H11), 3.64 – 3.46 (m, 10H, H5;H7-H10), 2.55 (m, 2H, H12), 1.56 (s, 3H, H27), 1.49 (s, 3H, H28). **RMN-¹³C** (100.6 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 173.49 (C, C24), 171.93 (C, C13), 170.87 (2C, C3-C4), 170.08 (C C29), 169.83 (C, C21), 137.12 (C, C15), 134.31 (2CH, C1-C2), 129.13 (2CH, C16;C20), 128.65 (CH, C18), 127.56 (2CH, C17;C19), 70.77 (CH, C25), 70.54 (2CH₂, C8;C9), 70.11 (2CH₂, C7;C10), 67.95 (CH₂, C11), 67.77 (CH, C23), 67.28 (CH₂, C6), 64.58 (C, C26), 58.65 (CH, C22), 57.36 (CH, C14), 37.29 (CH₂, C5), 36.86 (CH₂, C12), 31.13 (CH₃, C27), 27.12 (CH₃, C28). **ESI-HRMS(+):** m/z calculado para C₂₉H₃₆N₄O₁₀SNa⁺ [M+Na]⁺ 655.2044, encontrado 655.2051 ($\Delta m = 0.7$ mmu).

Código Seguro De Verificación	Mp9HULCeSIMtn5CMoIse3g==	Estado	Data e hora
Asinado Por	Carlos Jiménez González	Asinado	22/07/2021 09:44:42
	Jaime Rodríguez González	Asinado	22/07/2021 09:42:40
Observacións		Página	39/60
Url De Verificación	https://sede.udc.gal/services/validation/Mp9HULCeSIMtn5CMoIse3g==		



Amb-SH (16); fragmento B

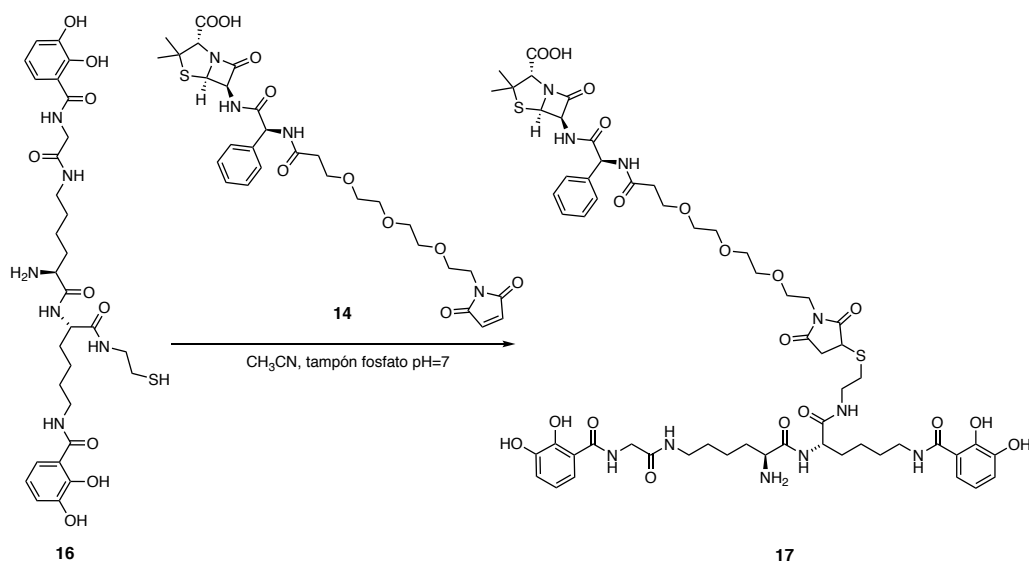


Sobre una disolución de 1 equiv. del análogo protegido **15** (60 mg, 51 μmol) en CH_2Cl_2 seco se añadieron gota a gota 12 equiv. de BCl_3 1M (600 μL , 600 μmol) a -77°C y bajo condiciones de atmósfera inerte. A continuación, se subió la temperatura a -40°C y se dejó reaccionando durante 16 horas. Transcurrido ese tiempo, se añadieron 4 mL de agua ultrapura y, después de 1 hora a temperatura ambiente, se concentró a presión reducida en el rotavapor. Finalmente, se purificó por HPLC en fase inversa, columna Discovery semipreparativa, utilizando acetonitrilo y H_2O de calidad HPLC con un 0,1% de TFA como eluyentes. El método empleado comenzó con un 10% de acetonitrilo, subió a un 60% en 5 min y alcanzó el 100% en 15 min. El producto **16**, con un tiempo de retención de 11.2 se obtuvo, tras eliminar el disolvente, como una espuma blanca (16 mg, 47% de rendimiento). **RMN- ^1H** (300.13 MHz, CD_3OD) δ (ppm): 7.23 (m, 2H), 6.94 (m, 2H), 6.72 (m, 2H), 4.31 (t, $J = 6.0$ Hz, 1H), 4.04 (s, 2H), 3.86 (t, $J = 6.4$ Hz, 1H), 3.50 – 3.26 (m, 6H), 2.58 (t, $J = 6.7$ Hz, 2H), 1.96-1.35 (m, 12H). **RMN- ^{13}C** (125.6 MHz, CD_3OD) δ (ppm): 173.86 (C, C28), 171.80 (C, C7), 171.73 (C, C21), 171.45 (C, C9), 170.09 (C, C15), 150.08 (C, C6), 149.92 (C, C27), 147.34 (C, C5), 147.30 (C, C26), 119.82 (CH, C4), 119.79 (CH, C25), 119.64 (CH, C3), 119.56 (CH, C24), 119.25 (CH, C2), 118.67 (CH, C23), 116.92 (C, C1), 116.88 (C, C22), 55.12 (CH, C16), 54.21 (CH, C14), 43.81 (2 CH_2 , C8;C29), 40.03 (CH_2 , C20), 39.62 (CH_2 , C10), 32.77 (CH_2 , C17), 32.16 (CH_2 , C13), 30.15 (CH_2 , C19), 29.87 (CH_2 , C11), 24.48 (CH_2 , C30), 24.25 (CH_2 , C18), 22.78 (CH_2 , C12). **ESI-HRMS(+)**: m/z calculado para $\text{C}_{30}\text{H}_{43}\text{N}_6\text{O}_9\text{S}^+$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 663.2807, encontrado 663.2796 ($\Delta m = 1.1$ mmu)

Código Seguro De Verificación	Mp9HULCeSIMtn5CMoIse3g==	Estado	Data e hora
Asinado Por	Carlos Jiménez González	Asinado	22/07/2021 09:44:42
	Jaime Rodríguez González	Asinado	22/07/2021 09:42:40
Observacións		Página	40/60
Url De Verificación	https://sede.udc.gal/services/validation/Mp9HULCeSIMtn5CMoIse3g==		




Amb-PEG₃-amp (17); “caballo de Troya”

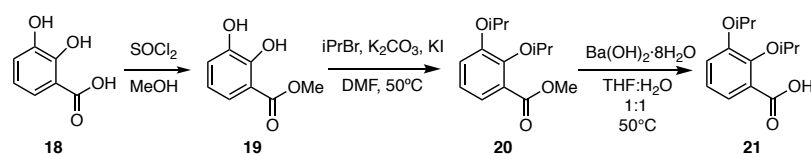


En una mezcla 2:1 de acetonitrilo y un tampón de fosfato potásico a pH= 7 se disolvió 1 equiv. de **14** (7 mg, 10.56 μmol) y 1 equiv. de **16** (7 mg, 10.56 μmol) y se dejaron reaccionando durante 24 horas a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo de reacción, se concentró a presión reducida en el rotavapor y para eliminar las sales se llevó a cabo una extracción con MeOH. El extracto obtenido se concentró a presión reducida y se purificó por HPLC de fase inversa, columna Luna Discovery semipreparativa, utilizando como eluyentes acetonitrilo y H₂O de calidad HPLC sin TFA. El método aplicado comenzó con un 10% de acetonitrilo, subió al 60% en el minuto 5 y alcanzó el 100% en 15 min. El producto eluido con un tiempo de retención de 10.4 min, se obtuvo, tras liofilizar, como un sólido blanco que adquiere color anaranjado al disolverse en MeOH (3.5 mg, 25% de rendimiento). **RMN-¹H** (300.13 MHz, CD₃OD) δ (ppm): 7.56 – 7.19 (m, 7H, H46-H50;H2;H23), 6.92-6.80 (m, 2H, H4;H25), 6.57 (m, 2H, H3;H24), 5.55 (m, 2H, H44;H53), 5.41 (d, $J = 4.0$ Hz, 1H, H53), 4.32 (m, 1H, H16), 4.28-4.23 (m, 1H, H55), 4.13 (s, 2H, H8), 4.04 (m, 2H, H31;H14), 3.84-3.48 (m, 12H, H36;H41), 3.47-3.2 (m, 10H, H10;H20;H29;H35;H32), 3,07 (m, 2H, H30), 2.74 (m, 2H, H32), 2.57 (s, 2H, H42), 1.70-1.18 (m, 18H, H11-H13;H17-H19;H57-H58). **ESI-HRMS(-)**: m/z calculado para C₅₉H₇₇N₁₀O₁₉S₂⁻ [M-H]⁻, 1293.4813, encontrado 1293.4752 ($\Delta m = 6.1$ mmu)

Código Seguro De Verificación	Mp9HULCeSIMtn5CMoIse3g==	Estado	Data e hora
Asinado Por	Carlos Jiménez González	Asinado	22/07/2021 09:44:42
	Jaime Rodríguez González	Asinado	22/07/2021 09:42:40
Observacións		Página	41/60
Url De Verificación	https://sede.udc.gal/services/validation/Mp9HULCeSIMtn5CMoIse3g==		



2,3-DHBAiPr (21)




Etapa 1: sobre una disolución de 1 equiv. de **18** (2 g, 12.98 mmol) en 20 mL de MeOH se añadieron 2 equiv. de SOCl_2 (2 mL, 25.95 mmol) y se dejaron a reflujo (80°C) durante 16 h. Transcurrido ese tiempo, se concentró a presión reducida en el rotavapor y se elaboró por extracción líquido-líquido en AcOEt/ H_2O . La fracción orgánica resultante se secó con MgSO_s anhidro y se concentró a presión reducida para obtener, después de secar, el 2,3-DHBMe **19** como un aceite amarillo claro (1.463 g, 66% de rendimiento).

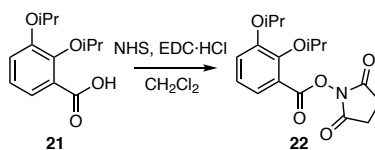
Etapa 2: sobre 15 mL de una disolución de 4 equiv. de K_2CO_3 (4.81 g, 34.8 mmol), 0.1 equiv. de KI (145 mg, 870.07 μmol) y 1 equiv. de **19** (1.46g, 8,7 mmol) en DMF seco se añadieron 4 equiv. de *iPrBr* (3,27 mL, 34,8 mmol). La mezcla se dejó reaccionando a reflujo (50°C) durante 16 h bajo condiciones de atmósfera inerte. Transcurrido ese tiempo, para asegurar el completo transcurso de la reacción, se adicionó 1 mL más de *iPrBr* y se dejó 1 h a 50°C . Finalmente, se llevó a cabo una extracción líquido-líquido con AcOEt/ H_2O y la fracción orgánica resultante se secó con MgSO_4 y concentró a presión reducida para obtener **20** como un aceite marrón oscuro (1.98 g, 90% de rendimiento).

Etapa 3: en 30 mL de una mezcla de THF: H_2O en proporción 1:1 se disolvieron 1 equiv. de **20** (1.08 g, 7.85 mmol) y 2 equiv. de $\text{Ba}(\text{OH})_2$ octahidratado (4.95 g, 15.69 mmol) y se pusieron a reflujo (50°C) durante 16 h. Transcurrido ese tiempo, se llevó a cabo una extracción líquido-líquido con AcOEt y una disolución acuosa de HCl a pH=3. La fracción orgánica resultante se secó con MgSO_4 y se concentró a presión reducida para obtener **21** como un aceite marrón (1.65 g, 88% de rendimiento). **RMN- ^1H** (300 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 7.73 (dd, $J = 6.5, 3.1$ Hz, 1H, H2), 7.18 – 7.10 (m, 2H, H1, H3), 4.99 (hept, $J = 6.3$ Hz, 1H, H9), 4.58 (hept, $J = 6.1$ Hz, 1H, H5), 1.41 – 1.35 (m, 12H, H6-H7, H10-H11). **RMN- ^{13}C** (101 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 165.65 (C, C13), 150.19 (C, C8), 146.68 (C, C4), 124.42 (CH, C1), 124.10 (CH, C2), 123.66 (C, C12), 120.34 (CH, C3), 78.02 (CH, C5), 71.73 (CH, C9), 22.11 (2 CH_3 , C6-C7), 22.04 (2 CH_3 , C10-C11). **ESI-HRMS(+):** m/z calculado para $\text{C}_{13}\text{H}_{18}\text{O}_4\text{Na}^+$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 261.1097, encontrado 261.1085 ($\Delta m = 1.2$ mmu)

Código Seguro De Verificación	Mp9HULCeSIMtn5CMoIse3g==	Estado	Data e hora
Asinado Por	Carlos Jiménez González	Asinado	22/07/2021 09:44:42
	Jaime Rodríguez González	Asinado	22/07/2021 09:42:40
Observacións		Página	42/60
Url De Verificación	https://sede.udc.gal/services/validation/Mp9HULCeSIMtn5CMoIse3g==		




2,3-DHBAiPr-NHS (22)



En 30 mL de CH_2Cl_2 anhidro se disolvieron 1 equiv de 2,3-DHBAiPr **21** (500 mg, 2.1 mmol), 2 equiv. de N-hidroxisuccinimida (483 mg, 4.2 mmol) y 1.5 equiv. de EDC·HCl (604 mg, 3.15 mmol) y se dejaron reaccionando a temperatura ambiente bajo condiciones de atmósfera inerte durante 16 h. Transcurrida la reacción, se concentró a presión reducida en el rotavapor y se purificó por MPLC de fase normal con AcOEt y hexano como eluyentes. El método empleado comenzó con 3 volúmenes de columna (CV) a un 25% de AcOEt, subió al 30% a lo largo de 12 CV, y se mantuvo a un 30% durante 1 CV. El compuesto **22**, eluido con 6 CV, se obtuvo como un aceite marrón (458.4 mg, 65% de rendimiento). **RMN-¹H** (300 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 7.52 (dd, $J = 7.7, 1.8$ Hz, 1H, H2), 7.17 – 7.02 (m, 2H, H1;H3), 4.71-4.49 (m, 2H, H5;H9), 2.94 – 2.82 (m, 4H, H17-H18), 1.35 (d, $J = 6.0$ Hz, 6H, H6-H7), 1.30 (d, $J = 6.2$ Hz, 6H, H10-H11). **RMN-¹³C** (126 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 169.43 (C, C13), 161.22 (C, C14-C15), 152.08 (C, C8), 149.86 (C, C4), 123.61 (CH, C1), 123.45 (CH, C2), 121.95 (CH, C3), 76.82 (CH, C5), 71.84 (CH, C9), 25.85 (CH_2 , C16-C17), 22.41 (2CH_3 , C6-C7), 22.20 (2CH_3 , C10-C11). **ESI-HRMS(+)**: m/z calculado para $\text{C}_{17}\text{H}_{21}\text{NO}_6\text{Na}^+$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 358.1261, encontrado 358.1263 ($\Delta m = 0.2$ mmu)

Código Seguro De Verificación	Mp9HULCeSIMtn5CMoIse3g==	Estado	Data e hora
Asinado Por	Carlos Jiménez González	Asinado	22/07/2021 09:44:42
	Jaime Rodríguez González	Asinado	22/07/2021 09:42:40
Observacións		Página	43/60
Url De Verificación	https://sede.udc.gal/services/validation/Mp9HULCeSIMtn5CMoIse3g==		




CONCLUSIONES

Teniendo en cuenta los objetivos planteados y los resultados obtenidos a partir de las diferentes propuestas sintéticas, se pueden extraer las siguientes conclusiones:

- Se realizó un estudio sintético para la preparación de una sonda fluorescente derivada de las amonabactinas llegando a obtener el fragmento C1 (**9**) funcionalizado con los grupos reactivos maleimida y amina. Sin embargo, el acoplamiento con el cloruro de sulforodamina B a través de la amina primaria no permitió la obtención del fragmento A (**10**).
- En la preparación del “caballo de Troya”, el fragmento A2 (**14**) fue sintetizado y caracterizado por dos procedimientos diferentes, consiguiendo a través de la formación del éster de NHS un método más limpio y eficiente.
- El acoplamiento de los fragmentos A2 (**14**) y B (**16**) a través de la reacción tipo click maleimida-tiol permitió la obtención del conjugado amb-amp (**17**) como demuestran el espectro de masas de alta resolución y el RMN-¹H del crudo. Sin embargo, tanto el RMN-¹H del producto purificado como el espectro de UV de la fracción eluida por HPLC donde se localizó la presencia de **17**, reflejan la existencia de una mezcla de compuestos.

Por tanto, de cara al futuro será necesario evaluar otras condiciones de reacción para el acoplamiento a través de la reacción tipo “click” maleimida-tiol con el fin de obtener el compuesto **17** en su forma pura.


Código Seguro De Verificación	Mp9HULCeSIMtn5CMoIse3g==	Estado	Data e hora	
Asinado Por	Carlos Jiménez González	Asinado	22/07/2021 09:44:42	
	Jaime Rodríguez González	Asinado	22/07/2021 09:42:40	
Observacións		Página	44/60	
Url De Verificación	https://sede.udc.gal/services/validation/Mp9HULCeSIMtn5CMoIse3g==			

CONCLUSIÓNS

Tendo en conta os obxectivos expostos e os resultados obtidos a partires das diferentes propostas sintéticas, pódense extraer as seguintes conclusións:

- Levouse a cabo un estudo sintético para a preparación dunha sonda fluorescente derivada das amonabactinas chegando a obter o fragmento C1 (**9**) funcionalizado cos grupos reactivos maleimida e amina. Porén, o acoplamento có cloruro de sulforodamina B a través da amina primaria non permitiu a obtención do fragmento A (**10**).
- Na preparación do “cabalo de Troia”, o fragmento A2 (**14**) foi sintetizado e caracterizado por dous procedementos distintos, conseguindo a través da formación do éster de NHS un método mais limpo e eficiente.
- O acoplamento dos fragmentos A2 (**14**) e B (**16**) a través da reacción tipo click maleimida-tiol permitiu a obtención do conxugado amb-amp (**17**) como demostran o espectro de masas de alta resolución e o RMN-¹H do bruto de reacción. Porén, tanto o RMN-¹H do produto purificado como o espectro de UV da fracción eluida por HPLC na que se localizou a presenza de **17**, reflexan a existencia dunha mestura de compostos.

Polo tanto, cara ao futuro cómpre avaliar outras condicións de reacción para o acoplamento a través da reacción tipo “click” maleimida-tiol co fin de obter o composto **17** na súa forma pura.


Código Seguro De Verificación	Mp9HULCeSIMtn5CMoIse3g==	Estado	Data e hora	
Asinado Por	Carlos Jiménez González	Asinado	22/07/2021 09:44:42	
	Jaime Rodríguez González	Asinado	22/07/2021 09:42:40	
Observacións		Páxina	45/60	
Url De Verificación	https://sede.udc.gal/services/validation/Mp9HULCeSIMtn5CMoIse3g==			

CONCLUSIONS

According to the objectives and the results obtained from the different synthetic proposals, the following conclusions can be drawn:

- A synthetic study was carried out for the preparation of a fluorescent probe derived from amonabactins, obtaining the fragment C1 (**9**) functionalized with the reactive groups maleimide and amine. However, the coupling with sulforhodamine B chloride through the primary amine did not allow the obtaining of fragment A (**10**).
- In the preparation of the "Trojan horse", the A2 fragment (**14**) was synthesized and characterized by two different procedures, achieving a cleaner and more efficient method through the formation of the NHS ester.
- The coupling of fragments A2 (**14**) and B (**16**) through the click maleimide-thiol reaction allowed obtaining the conjugate amb-amp (**17**) as shown by the high resolution mass spectrum and the ¹H-NMR of crude. However, both the ¹H-NMR of the purified product and the UV spectrum of the fraction eluted by HPLC in which the presence of **17** was located reflect the existence of a mixture of compounds.


Therefore, further research will be necessary to evaluate other reaction conditions for the coupling through the maleimide-thiol "click" reaction in order to obtain compound **17** in its pure form.

Código Seguro De Verificación	Mp9HULCeSIMtn5CMoIse3g==	Estado	Data e hora	
Asinado Por	Carlos Jiménez González	Asinado	22/07/2021 09:44:42	
	Jaime Rodríguez González	Asinado	22/07/2021 09:42:40	
Observacións		Páxina	46/60	
Url De Verificación	https://sede.udc.gal/services/validation/Mp9HULCeSIMtn5CMoIse3g==			

BIBLIOGRAFÍA

- (1) Fan, D.; Fang, Q. Siderophores for Medical Applications: Imaging, Sensors, and Therapeutics. *Int. J. Pharm.* **2021**, *597*, 120306. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2021.120306>.
- (2) Mislin, G. L. A.; Schalk, I. J. Siderophore-Dependent Iron Uptake Systems as Gates for Antibiotic Trojan Horse Strategies against *Pseudomonas aeruginosa*. *Metallomics* **2014**, *6* (3), 408–420. <https://doi.org/10.1039/c3mt00359k>.
- (3) Chairatana, P.; Zheng, T.; Nolan, E. M. Targeting Virulence: Salmochelin Modification Tunes the Antibacterial Activity Spectrum of β -Lactams for Pathogen-Selective Killing of Escherichia Coli. *Chem. Sci.* **2015**, *6* (8), 4458–4471. <https://doi.org/10.1039/c5sc00962f>.
- (4) Wenciewicz, T. A.; Miller, M. J. Sideromycins as Pathogen-Targeted Antibiotics. In *Antibacterials: Volume II*; Fisher, J. F., Mobashery, S., Miller, M. J., Eds.; Springer International Publishing: Cham, 2018; pp 151–183. https://doi.org/10.1007/7355_2017_19.
- (5) Sargun, A.; Sassone-Corsi, M.; Zheng, T.; Raffatellu, M.; Nolan, E. M. Conjugation to Enterobactin and Salmochelin S4 Enhances the Antimicrobial Activity and Selectivity of β -Lactam Antibiotics against Nontyphoidal Salmonella. *ACS Infect. Dis.* **2021**, *7* (5), 1248–1259. <https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.1c00005>.
- (6) Tacconelli, E.; Magrini, N.; Kahlmeter, G.; Singh, N. Global Priority List of Antibiotic-Resistant Bacteria to Guide Research, Discovery, and Development of New Antibiotics. *World Heal. Organ.* **2017**, *27*, 318–327.
- (7) Sanderson, T. J.; Black, C. M.; Southwell, J. W.; Wilde, E. J.; Pandey, A.; Herman, R.; Thomas, G. H.; Boros, E.; Duhme-Klair, A. K.; Routledge, A. A Salmochelin S4-Inspired Ciprofloxacin Trojan Horse Conjugate. *ACS Infect. Dis.* **2020**, *6* (9), 2532–2541. <https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.0c00568>.
- (8) Skwarecki, A. S.; Nowak, M. G.; Milewska, M. J. Synthetic Strategies in Construction of Organic Low Molecular-Weight Carrier-Drug Conjugates. *Bioorg. Chem.* **2020**, *104*, 104311. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2020.104311>.
- (9) Hider, R. C.; Kong, X. Chemistry and Biology of Siderophores. *Nat. Prod. Rep.* **2010**, *27* (5), 637–657. <https://doi.org/10.1039/b906679a>.
- (10) Schalk, I. J. Metal Trafficking via Siderophores in Gram-Negative Bacteria: Specificities and Characteristics of the Pyoverdine Pathway. *J. Inorg. Biochem.* **2008**, *102* (5–6), 1159–1169. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2007.11.017>.
- (11) Chen, P. H. C.; Ho, S. Y.; Chen, P. L.; Hung, T. C.; Liang, A. J.; Kuo, T. F.; Huang, H. C.; Wang, T. S. A. Selective Targeting of Vibrios by Fluorescent Siderophore-Based Probes. *ACS Chem. Biol.* **2017**, *12* (11), 2720–2724.


Código Seguro De Verificación	Mp9HULCeSIMtn5CMoIse3g==	Estado		Data e hora	
Asinado Por	Carlos Jiménez González	Asinado		22/07/2021 09:44:42	
	Jaime Rodríguez González	Asinado		22/07/2021 09:42:40	
Observacións		Páxina		47/60	
Url De Verificación	https://sede.udc.gal/services/validation/Mp9HULCeSIMtn5CMoIse3g==				




<https://doi.org/10.1021/acscchembio.7b00667>.

- (12) Sargun, A.; Johnstone, T. C.; Zhi, H.; Raffatellu, M.; Nolan, E. M. Enterobactin-And Salmochelin- β -Lactam Conjugates Induce Cell Morphologies Consistent with Inhibition of Penicillin-Binding Proteins in Uropathogenic *Escherichia coli* CFT073. *Chem. Sci.* **2021**, *12* (11), 4041–4056. <https://doi.org/10.1039/d0sc04337k>.
- (13) Centola, G.; Xue, F.; Wilks, A. Metallotherapeutics Development in the Age of Iron-Clad Bacteria. *Metallomics* **2020**, *12* (12), 1863–1877. <https://doi.org/10.1039/d0mt00206b>.
- (14) Wilson, B. R.; Bogdan, A. R.; Miyazawa, M.; Hashimoto, K.; Tsuji, Y. Siderophores in Iron Metabolism: From Mechanism to Therapy Potential. *Trends Mol. Med.* **2016**, *22* (12), 1077–1090. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2016.10.005>.
- (15) Kadi, N.; Challis, G. L. Chapter 17. Siderophore Biosynthesis a Substrate Specificity Assay for Nonribosomal Peptide Synthetase-Independent Siderophore Synthetases Involving Trapping of Acyl-Adenylate Intermediates with Hydroxylamine. *Methods Enzymol.* **2009**, *458*, 431–457. [https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(09\)04817-4](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(09)04817-4).
- (16) Fischbach, M. A.; Walsh, C. T. Assembly-Line Enzymology for Polyketide and Nonribosomal Peptide Antibiotics: Logic Machinery, and Mechanisms. *Chem. Rev.* **2006**, *106* (8), 3468–3496. <https://doi.org/10.1021/cr0503097>.
- (17) Southwell, J. W.; Black, C. M.; Duhme-Klair, A. K. Experimental Methods for Evaluating the Bacterial Uptake of Trojan Horse Antibacterials. *ChemMedChem* **2021**, *16* (7), 1063–1076. <https://doi.org/10.1002/cmde.202000806>.
- (18) Marín, M.; Gudiol, F. Antibióticos Betalactámicos. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* **2003**, *21* (1), 42–55. [https://doi.org/10.1016/s0213-005x\(03\)72873-0](https://doi.org/10.1016/s0213-005x(03)72873-0).
- (19) Rey-Varela, D.; Cisneros-Sureda, J.; Balado, M.; Rodríguez, J.; Lemos, M. L.; Jiménez, C. The Outer Membrane Protein FstC of *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* Acts as Receptor for Amonabactin Siderophores and Displays a Wide Ligand Plasticity. Structure-Activity Relationships of Synthetic Amonabactin Analogues. *ACS Infect. Dis.* **2019**, *5* (11), 1936–1951. <https://doi.org/10.1021/acscinfecdis.9b00274>.
- (20) Pronamar (Productos Naturales Marinos). Recuperado el día 13 de junio de 2021 de <https://www.pronamar.com/es/>.
- (21) Química Molecular y de Materiales - Nuevos Materiales - CICA. Recuperado el 27 de junio de 2021 de <https://cica.udc.gal/es/grupo/quimica-molecular-y-de-materiales>.

Código Seguro De Verificación	Mp9HULCeSIMtn5CMoIse3g==	Estado	Data e hora
Asinado Por	Carlos Jiménez González Jaime Rodríguez González	Asinado Asinado	22/07/2021 09:44:42 22/07/2021 09:42:40
Observacións		Páxina	48/60
Url De Verificación	https://sede.udc.gal/services/validation/Mp9HULCeSIMtn5CMoIse3g==		



- (22) Grupo de Investigación en Biología Evolutiva - Biotecnología - CICA. Recuperado el 27 de junio de 2021 de <https://cica.udc.gal/es/grupo/grupo-de-investigacion-en-biologia-evolutiva>.
- (23) Zheng, T.; Nolan, E. M. Enterobactin-Mediated Delivery of β -Lactam Antibiotics Enhances Antibacterial Activity against Pathogenic *Escherichia coli*. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136* (27), 9677–9691. <https://doi.org/10.1021/ja503911p>.
- (24) Walker, M. A. A High Yielding Synthesis of N-Alkyl Maleimides Using a Novel Modification of the Mitsunobu Reaction. *J. Org. Chem.* **1995**, *60* (16), 5352–5355. <https://doi.org/10.1021/jo00121a070>.
- (25) De Figueiredo, R. M.; Oczipka, P.; Fröhlich, R.; Christmann, M. Synthesis of 4-Maleimidobutyric Acid and Related Maleimides. *Synthesis (Stuttg)*. **2008**, No. 8, 1316–1318. <https://doi.org/10.1055/s-2008-1032016>.
- (26) Sunbul, M.; Jäschke, A. Contact-Mediated Quenching for RNA Imaging in Bacteria with a Fluorophore-Binding Aptamer. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2013**, *52* (50), 13401–13404. <https://doi.org/10.1002/anie.201306622>.
- (27) Ji, C.; Miller, P. A.; Miller, M. J. Iron Transport-Mediated Drug Delivery: Practical Syntheses and in Vitro Antibacterial Studies of Tris-Catecholate Siderophore-Aminopenicillin Conjugates Reveals Selectively Potent Antipseudomonal Activity. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134* (24), 9898–9901. <https://doi.org/10.1021/ja303446w>.
- (28) Thermo Fisher Scientific Inc. Crosslinking Technical Handbook. Thermo Scientific: Rockford 2012, pp 4–5.
- (29) Hein, C. D.; Liu, X.-M.; Wang, D. Click Chemistry, a Powerful Tool for Pharmaceutical Sciences. *Pharm. Res.* **2008**, *25* (10), 2216–2230. <https://doi.org/10.1007/s11095-008-9616-1>.

Código Seguro De Verificación	Mp9HULCeSIMtn5CMoIse3g==	Estado	Data e hora	
Asinado Por	Carlos Jiménez González	Asinado	22/07/2021 09:44:42	
	Jaime Rodríguez González	Asinado	22/07/2021 09:42:40	
Observacións		Páxina	49/60	
Url De Verificación	https://sede.udc.gal/services/validation/Mp9HULCeSIMtn5CMoIse3g==			

ANEXOS

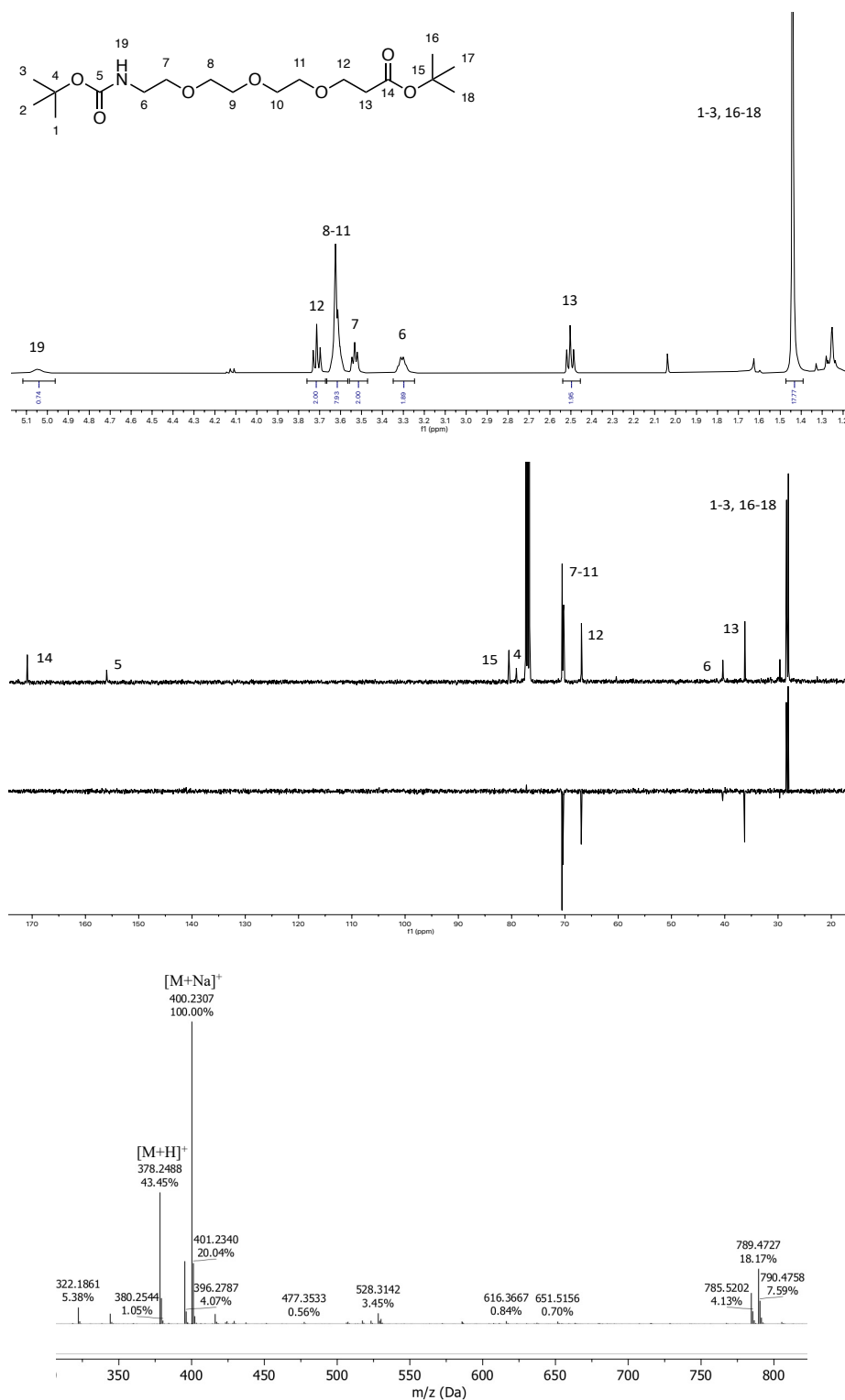


Figura 14. Espectros de RMN- $^1\text{H}/^{13}\text{C}$, DEPT y ESI-HRMS(+)² de **2**.

Código Seguro De Verificación	Mp9HULCeSIMtn5CMoIse3g==	Estado	Data e hora
Asinado Por	Carlos Jiménez González	Asinado	22/07/2021 09:44:42
Observacións	Jaime Rodríguez González	Asinado	22/07/2021 09:42:40
Url De Verificación	https://sede.udc.gal/services/validation/Mp9HULCeSIMtn5CMoIse3g==		Páxina 50/60



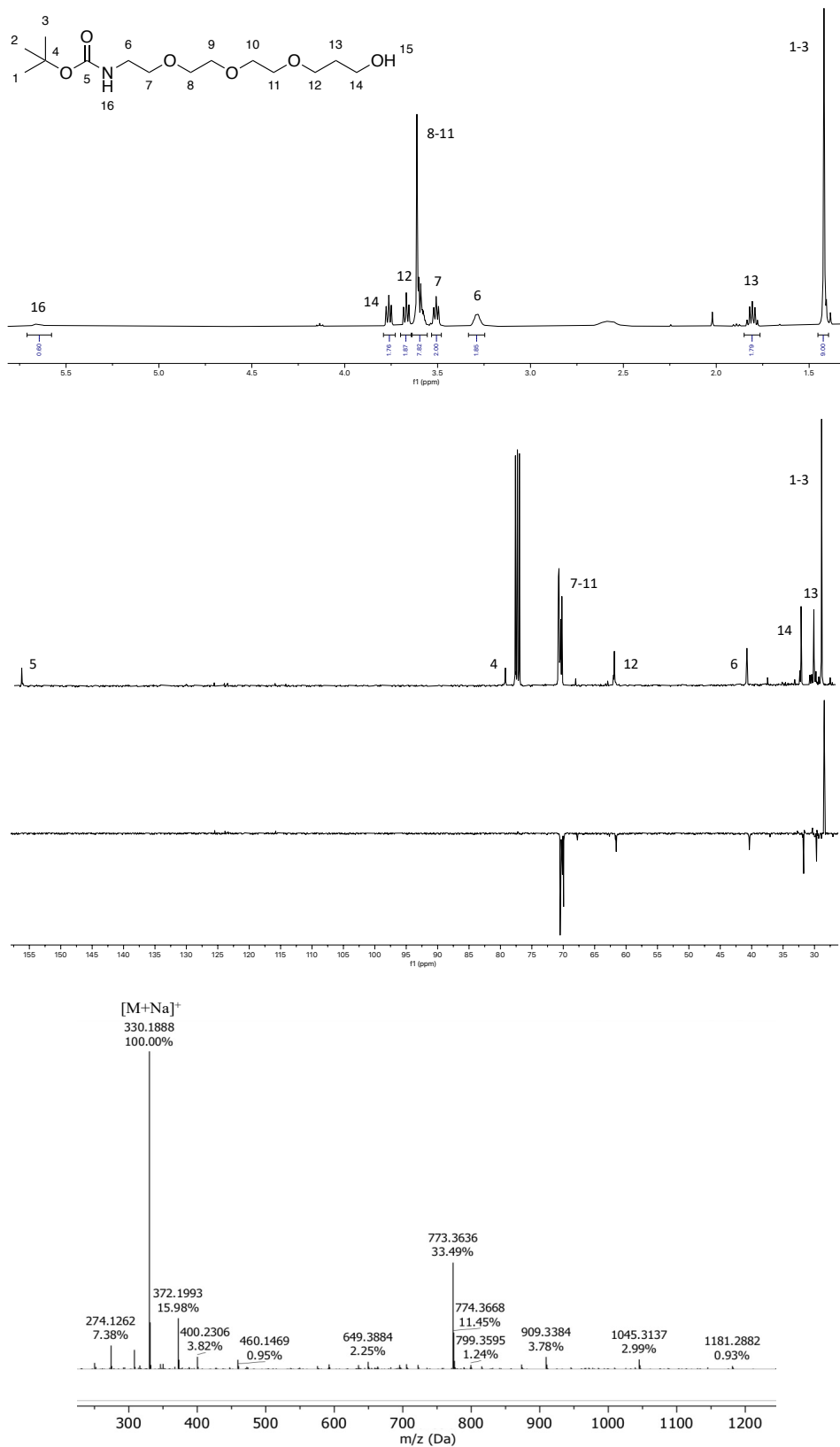


Figura 15. Espectros de RMN- $^1\text{H}/^{13}\text{C}$, DEPT y ESI-HRMS(+) de **3**.

Código Seguro De Verificación	Mp9HULCeSIMtn5CMoIse3g==	Estado	Data e hora
Asinado Por	Carlos Jiménez González	Asinado	22/07/2021 09:44:42
Observacións	Jaime Rodríguez González	Asinado	22/07/2021 09:42:40
Url De Verificación	https://sede.udc.gal/services/validation/Mp9HULCeSIMtn5CMoIse3g==		Páxina 51/60



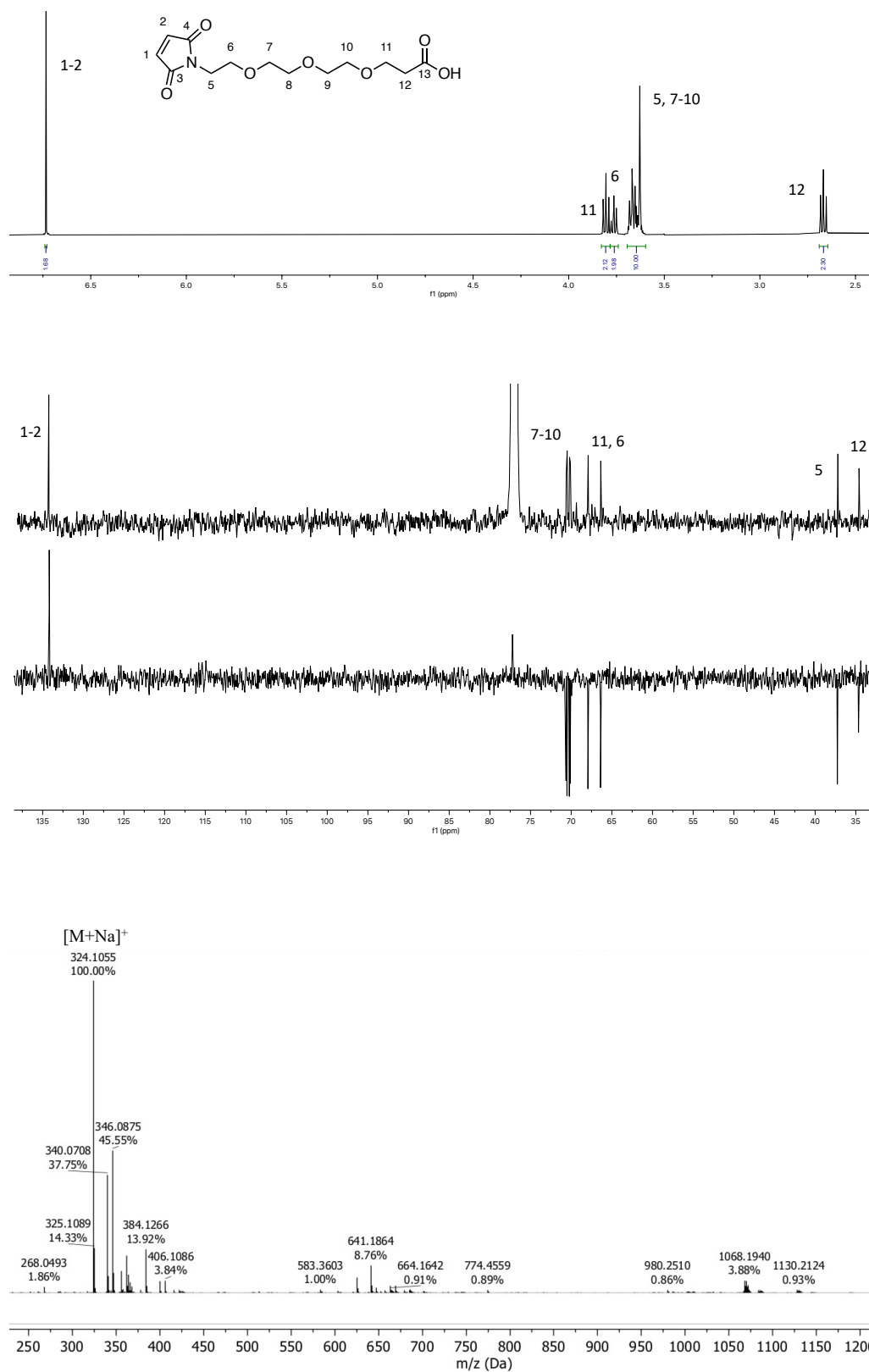


Figura 17. Espectros de $\text{RMN-}^1\text{H}/^{13}\text{C}$, DEPT y ESI-HRMS(+) de 7.

Código Seguro De Verificación	Mp9HULCeSIMtn5CMoIse3g==	Estado	Data e hora
Asinado Por	Carlos Jiménez González	Asinado	22/07/2021 09:44:42
Observacións	Jaime Rodríguez González	Asinado	22/07/2021 09:42:40
Url De Verificación	https://sede.udc.gal/services/validation/Mp9HULCeSIMtn5CMoIse3g==		Páxina 53/60



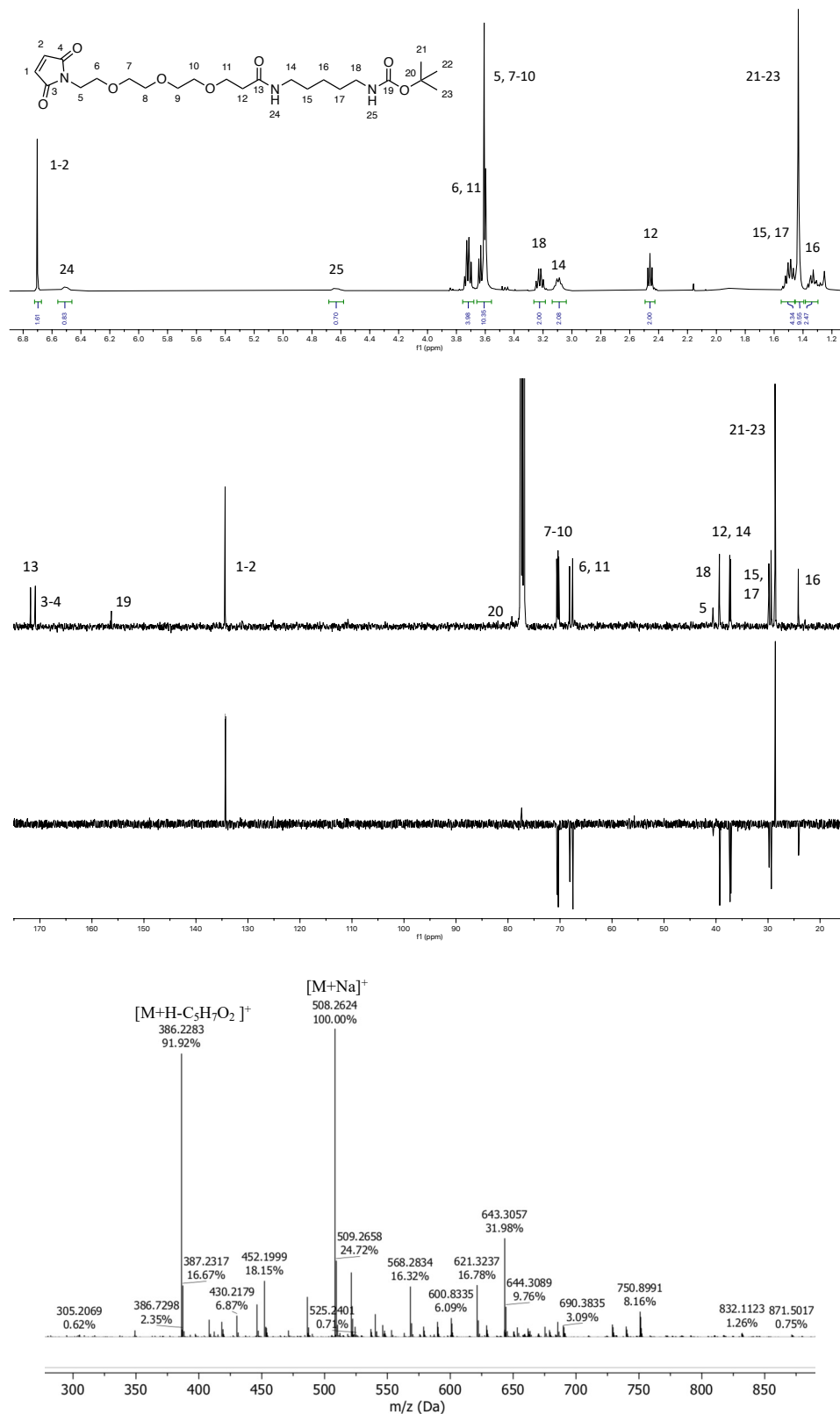


Figura 18. Espectros de RMN-¹H/¹³C, DEPT y ESI-HRMS(+) de **8**.

Código Seguro De Verificación	Mp9HULCeSIMtn5CMoIse3g==	Estado	Data e hora
Asinado Por	Carlos Jiménez González	Asinado	22/07/2021 09:44:42
Observacións	Jaime Rodríguez González	Asinado	22/07/2021 09:42:40
Url De Verificación	https://sede.udc.gal/services/validation/Mp9HULCeSIMtn5CMoIse3g==	Páxina	54/60



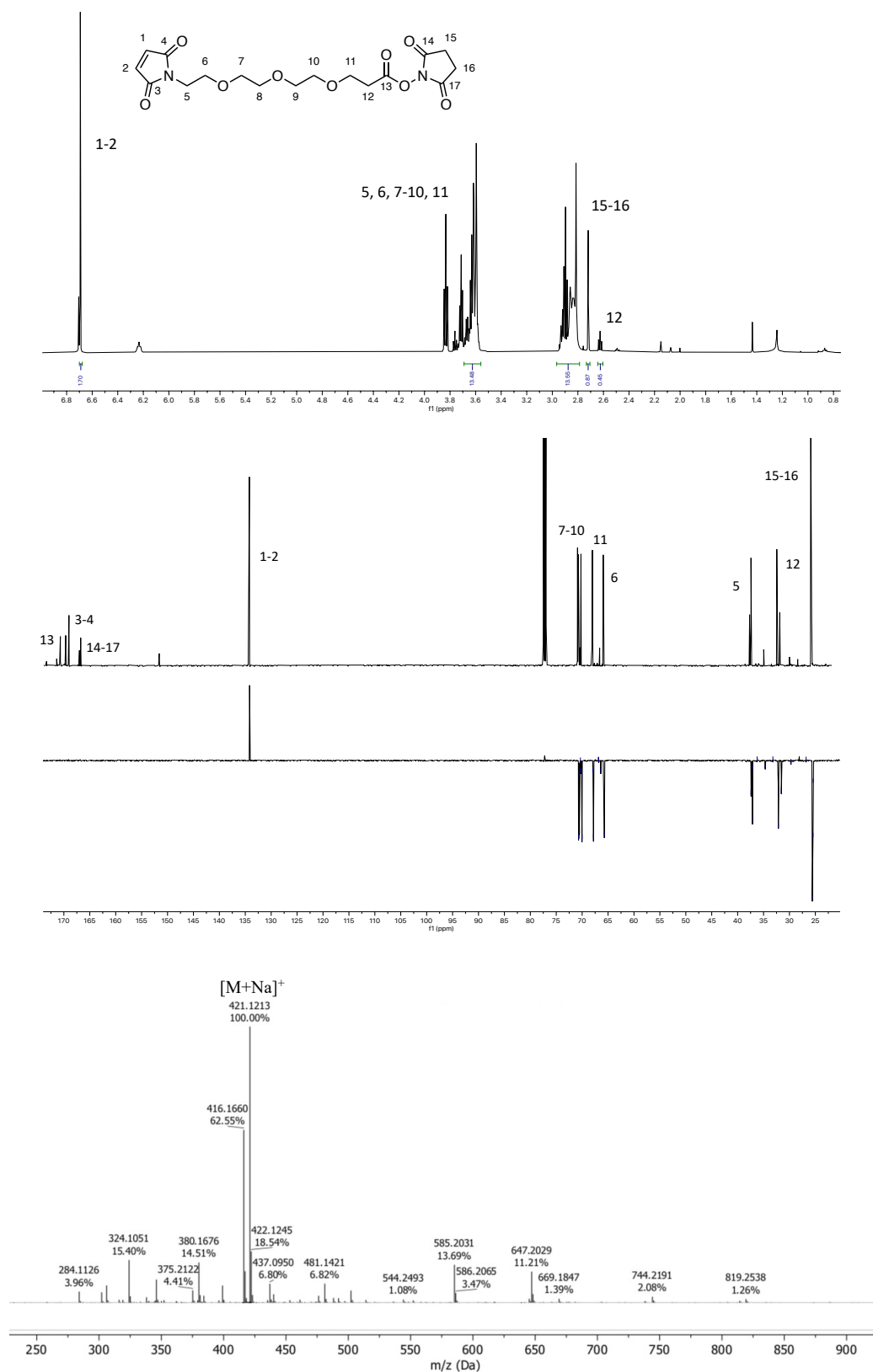


Figura 19. Espectros de RMN- $^1\text{H}/^{13}\text{C}$, DEPT y ESI-HRMS(+) de 13.

Código Seguro De Verificación	Mp9HULCeSIMtn5CMoIse3g==	Estado	Data e hora
Asinado Por	Carlos Jiménez González	Asinado	22/07/2021 09:44:42
Observacións	Jaime Rodríguez González	Asinado	22/07/2021 09:42:40
Url De Verificación	https://sede.udc.gal/services/validation/Mp9HULCeSIMtn5CMoIse3g==		Páxina 55/60



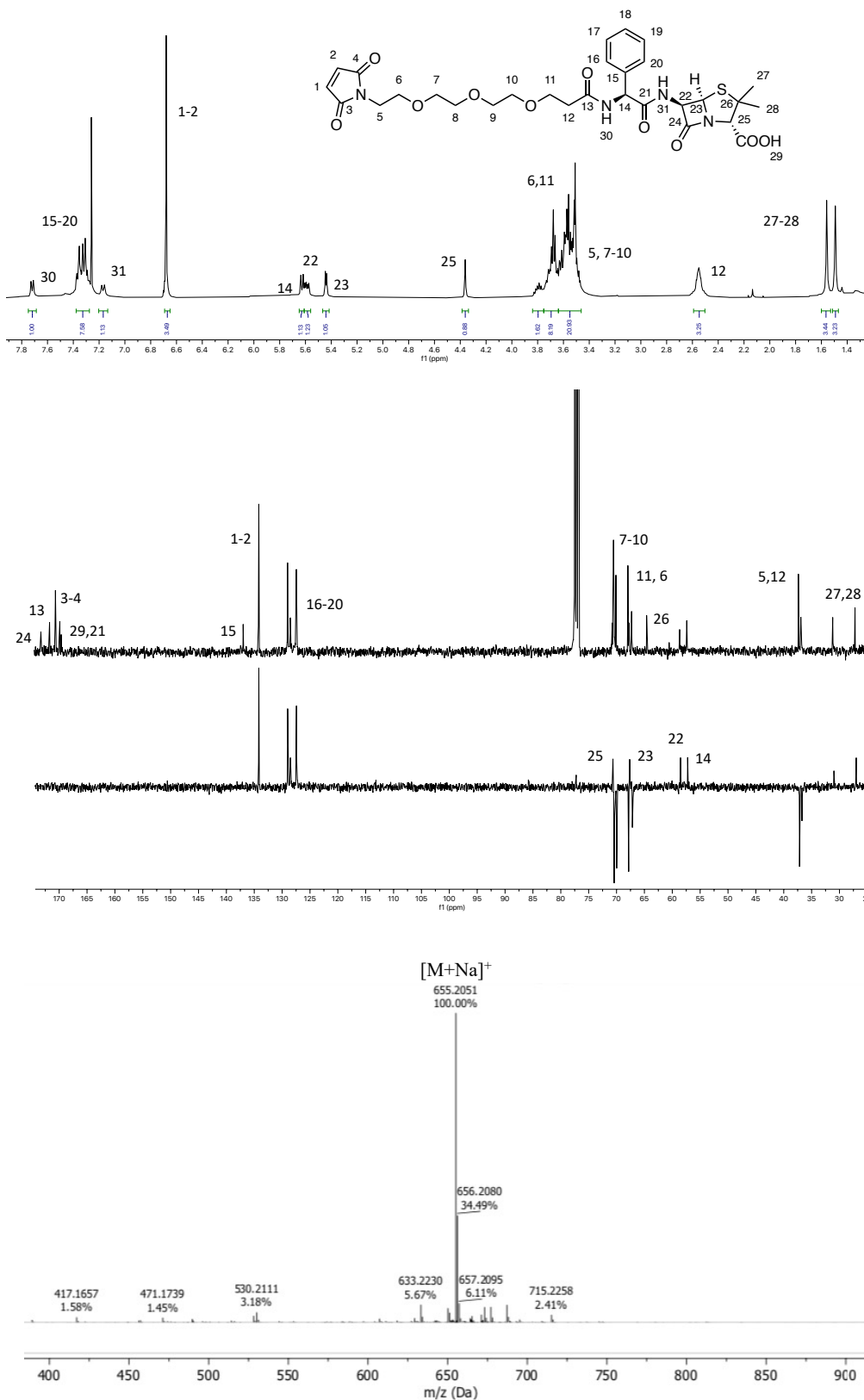


Figura 20: Espectros de RMN-¹H/¹³C, DEPT y ESI-HRMS(+) de 14.

Código Seguro De Verificación	Mp9HULCeSIMtn5CMoIse3g==	Estado	Data e hora
Asinado Por	Carlos Jiménez González	Asinado	22/07/2021 09:44:42
Observacións	Jaime Rodríguez González	Asinado	22/07/2021 09:42:40
Url De Verificación	https://sede.udc.gal/services/validation/Mp9HULCeSIMtn5CMoIse3g==		Páxina 56/60



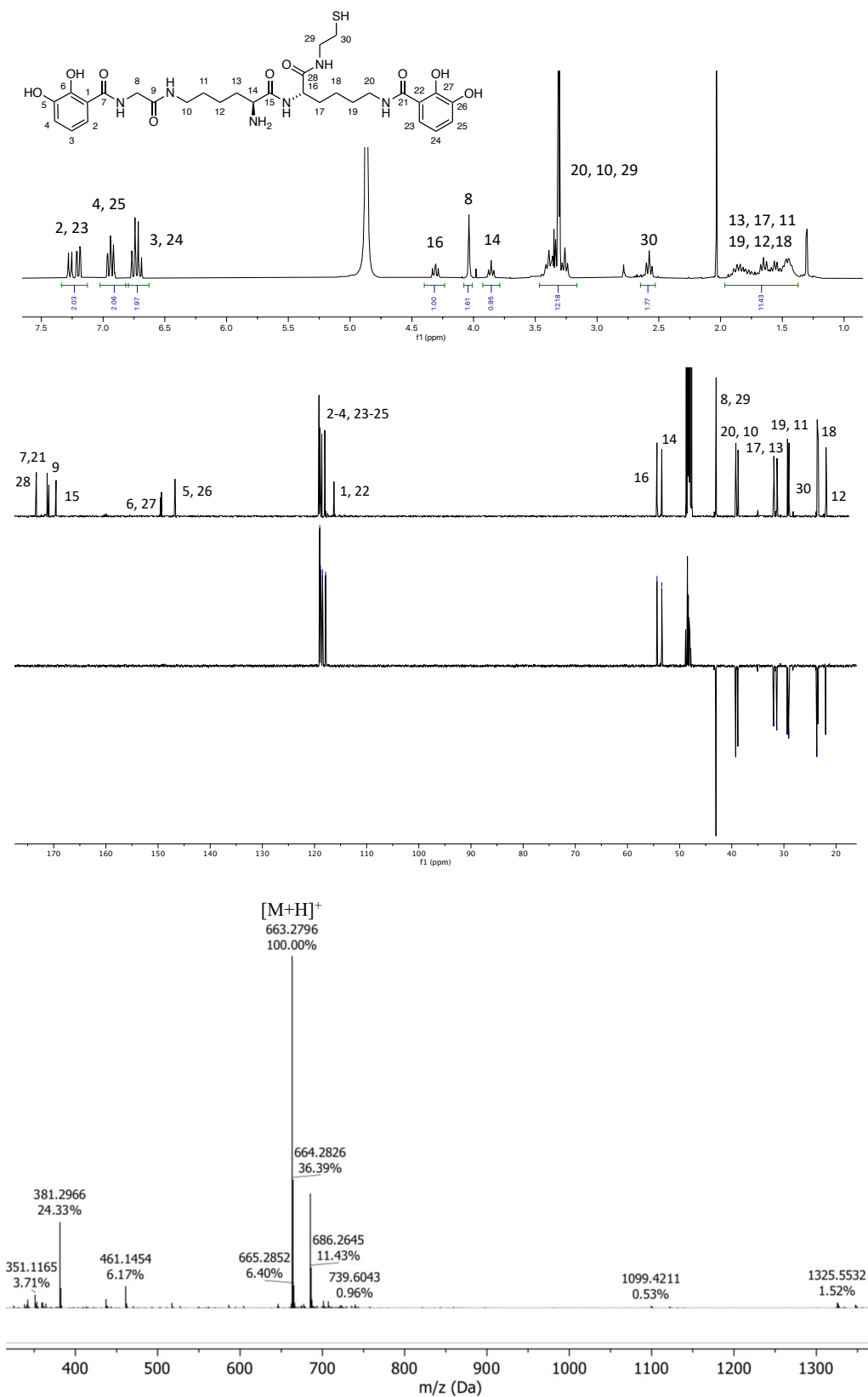


Figura 21. Espectros de RMN-¹H/¹³C, DEPT y ESI-HRMS(+) de 16.

Código Seguro De Verificación	Mp9HULCeSIMtn5CMoIse3g==	Estado	Data e hora
Asinado Por	Carlos Jiménez González	Asinado	22/07/2021 09:44:42
Observacións	Jaime Rodríguez González	Asinado	22/07/2021 09:42:40
Url De Verificación	https://sede.udc.gal/services/validation/Mp9HULCeSIMtn5CMoIse3g==		Páxina 57/60



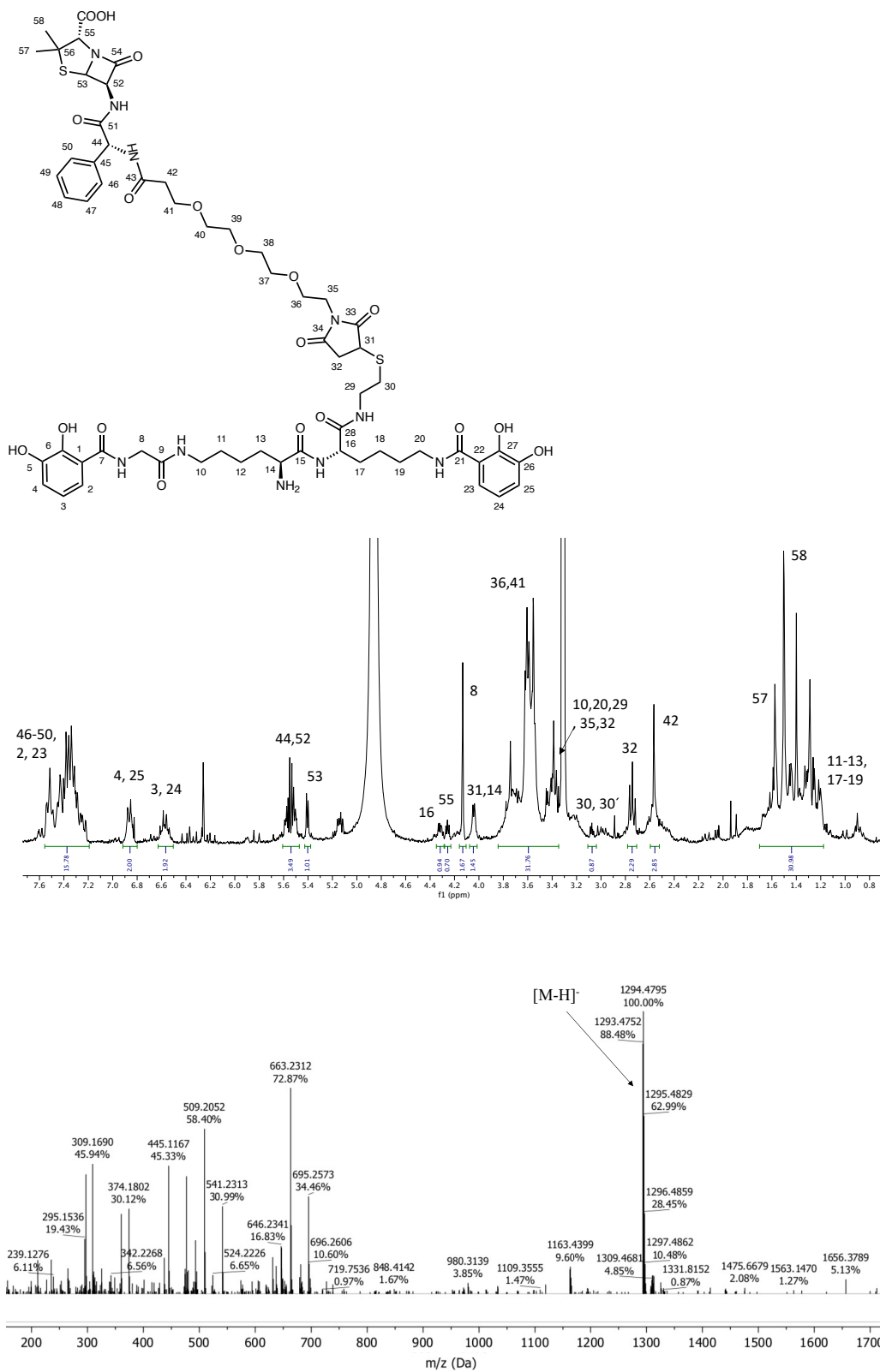


Figura 22. Espectros de RMN-¹H y ESI-HRMS(-) de 17

Código Seguro De Verificación	Mp9HULCeSIMtn5CMoIse3g==	Estado	Data e hora
Asinado Por	Carlos Jiménez González	Asinado	22/07/2021 09:44:42
Observacións	Jaime Rodríguez González	Asinado	22/07/2021 09:42:40
Url De Verificación	https://sede.udc.gal/services/validation/Mp9HULCeSIMtn5CMoIse3g==		



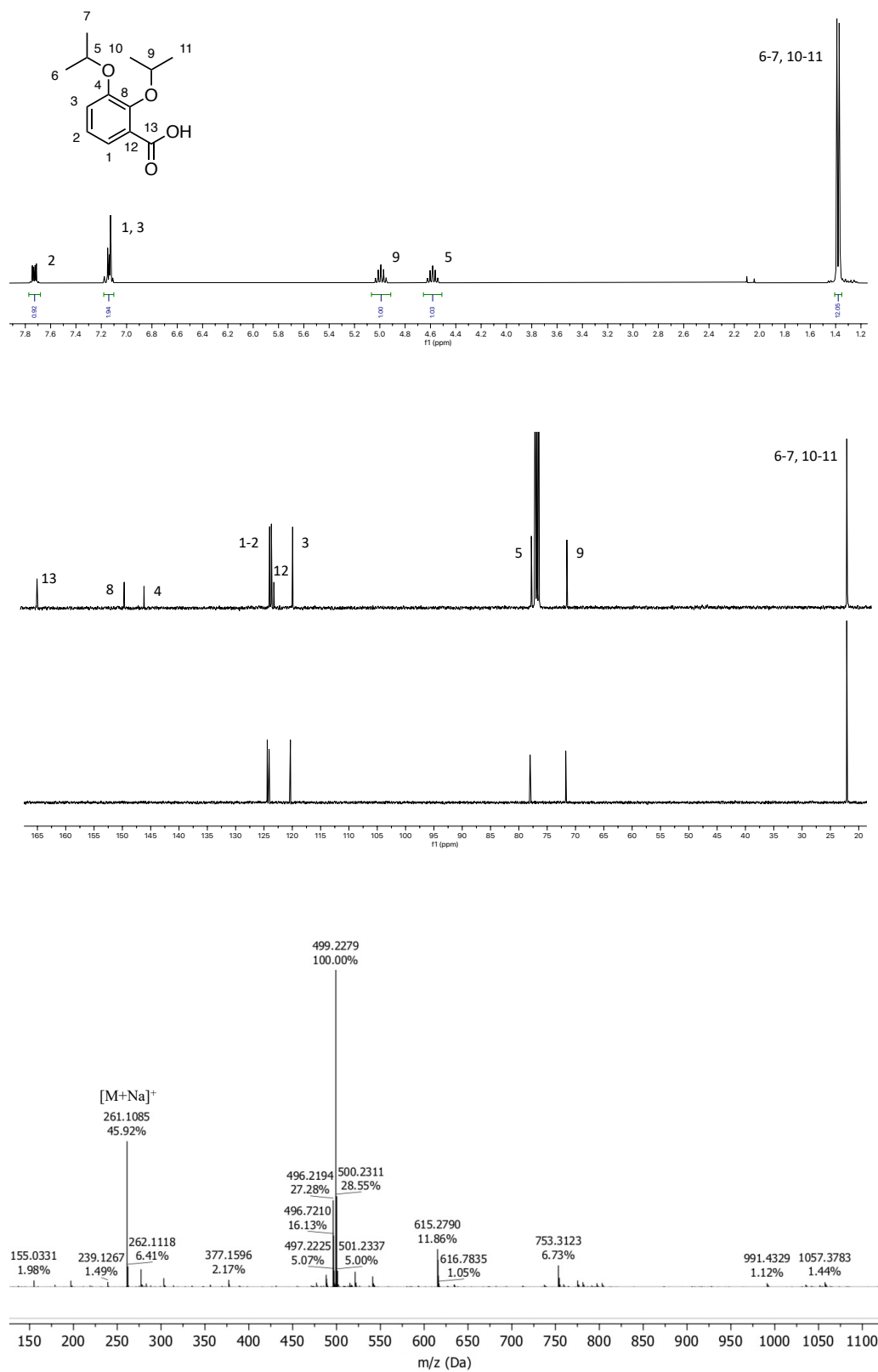


Figura 23. Espectros de $\text{RMN-}^1\text{H}/^{13}\text{C}$, DEPT y ESI-HRMS(+) de 21.

Código Seguro De Verificación	Mp9HULCeSIMtn5CMoIse3g==	Estado	Data e hora
Asinado Por	Carlos Jiménez González	Asinado	22/07/2021 09:44:42
Observacións	Jaime Rodríguez González	Asinado	22/07/2021 09:42:40
Url De Verificación	https://sede.udc.gal/services/validation/Mp9HULCeSIMtn5CMoIse3g==		Páxina 59/60



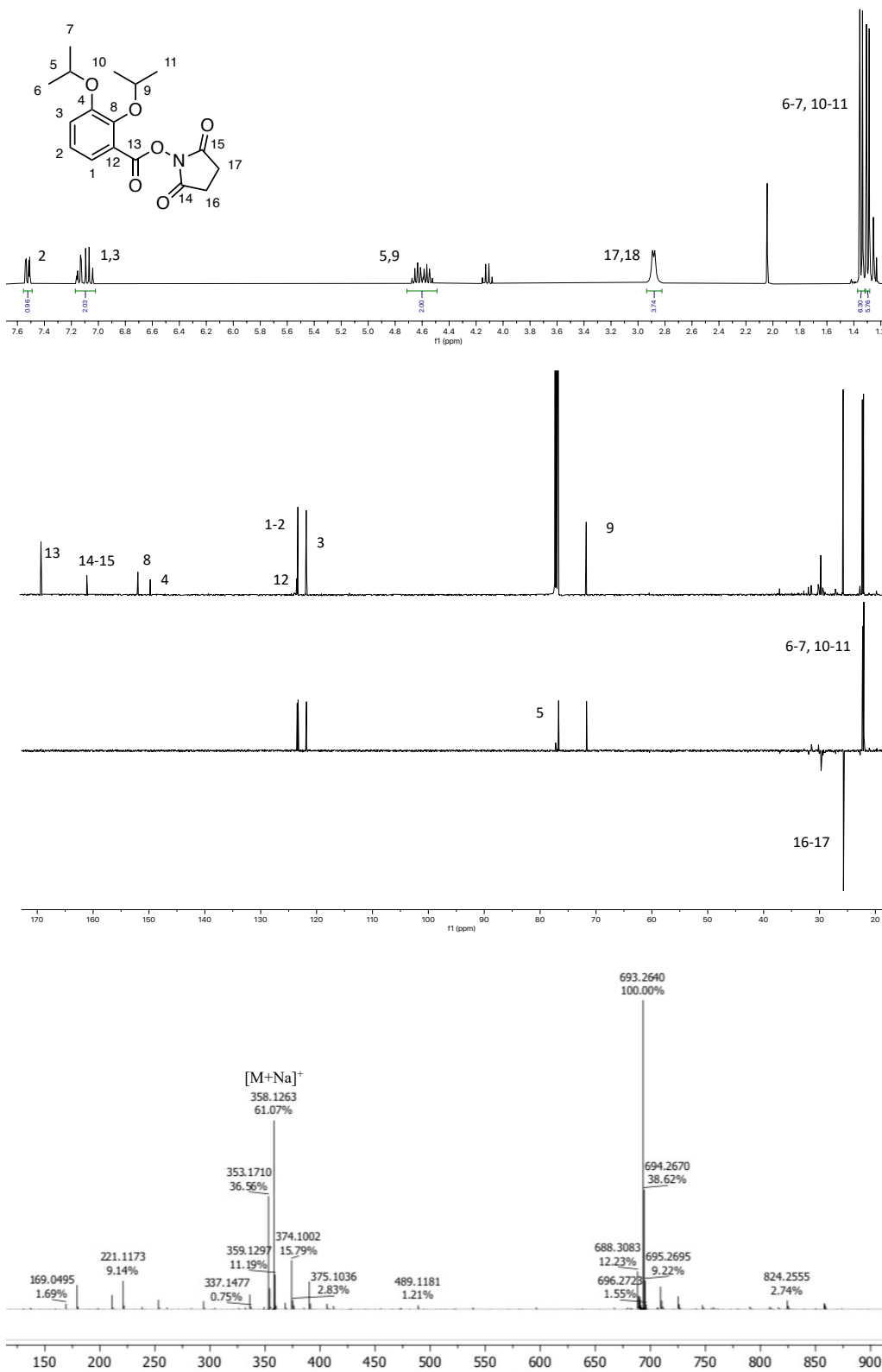


Figura 24. Espectros de RMN- $^1\text{H}/^{13}\text{C}$, DEPT y ESI-HRMS(+) de 22.

Código Seguro De Verificación	Mp9HULCeSIMtn5CMoIse3g==	Estado	Asinado	Data e hora	22/07/2021 09:44:42
Asinado Por	Carlos Jiménez González Jaime Rodríguez González		Asinado		22/07/2021 09:42:40
Observacións			Páxina		60/60
Url De Verificación	https://sede.udc.gal/services/validation/Mp9HULCeSIMtn5CMoIse3g==				

