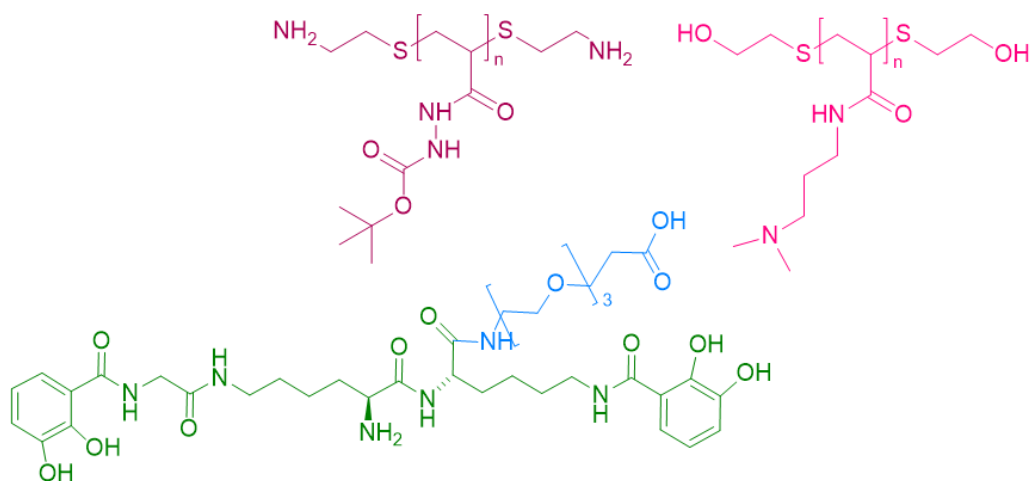


Grado en Química
Memoria del Trabajo de Fin de Grado

**Síntesis de un análogo del sideróforo
amonabactina P750 acoplado con un conector
PEG-3, para su posterior conjugación con
polímeros**

**Síntese dun análogo do sideróforo amonabactina
P750 acoplado cun conector PEG-3 para a súa
conxugación posterior con polímeros**

**Synthesis of an analogue of the siderophore
amonabactin P750 coupled with a PEG-3 linker
for subsequent conjugation with polymers**



Silvia Fuentes Rivera

Directores: Carlos Jiménez González y Francisco Fernández Trillo

Curso: 2021/2022 **Convocatoria:** Junio

CRONOGRAMA

	Búsqueda bibliográfica	Experimental	Análisis de resultados	Memoria
OCTUBRE				
NOVIEMBRE				
DICIEMBRE				
ENERO				
FEBRERO				
MARZO				
ABRIL				
MAYO				
JUNIO				

ABREVIATURAS

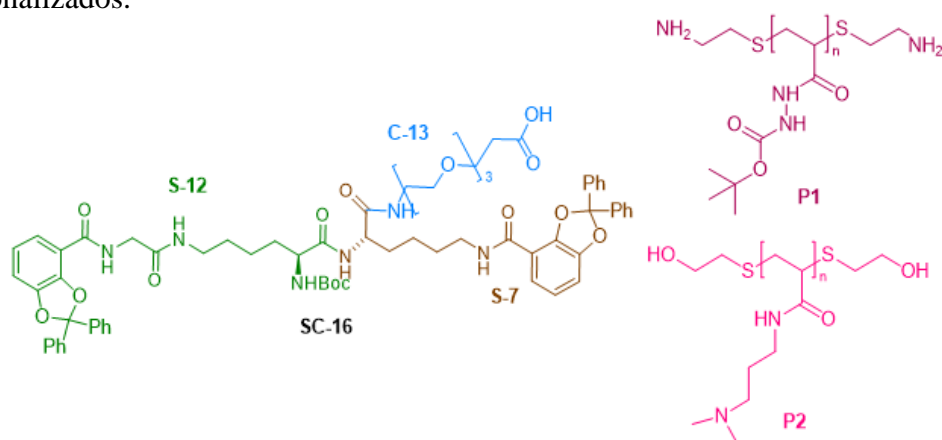
δ	Desplazamiento químico
ABC	ATP Binding Cassette
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ATP	Adenosín trifosfato
bs	Singulete ancho
CCF	Cromatografía en capa fina
d	Doblete
Da	Dalton
dd	Doble doblete
DIPEA	<i>N, N</i> -Diisopropiletilamina
DMF	<i>N, N</i> -Dimetilformamida
dt	Doble triplete
EDC·HCl	Clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida
ESI	Ionización por Electrospray
GC	Contenido de Guanina y Citosina
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficiencia
HR-ESIMS	Espectrometría de masas de ionización por electrospray de alta resolución
Hz	Hercios
<i>J</i>	Constante de acoplamiento
K_{Fe}	Constante de formación de complejos de hierro
m	multiplete
M	Molar
<i>m/z</i>	Relación carga-masa
NHS	<i>N</i> -hidroxisuccinimida
nm	Nanometros
NRPS	Nonribosomal peptide synthetase

OM	Outer membrane
p	Quintuplete
PEG	Polietilenglicol
Phe	Fenilalanina
PME	Proteína de Membrana Externa
ppm	Partes por millón
q	Cuadruplete
QS	<i>Quorum sensing</i>
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
s	Singulete
SBP	Siderophore-binding protein
subsp.	Subespecie
t	Triplete
TFA	Ácido trifluoroacético

RESUMEN

En los últimos años, la prevalencia de las enfermedades infecciosas producidas por patógenos y la resistencia bacteriana a los antibióticos han aumentado de forma considerable. Debido a que se están convirtiendo en una amenaza para la salud pública, se ha hecho necesario el desarrollo de nuevos agentes antimicrobianos. Por este motivo se ha planteado en este Trabajo de Fin de Grado la preparación de un sideróforo unido covalentemente a un conector, para su posterior conjugación con polímeros con el fin de ensayarlo como antimicrobiano. El sideróforo seleccionado para dirigir selectivamente el conjugado sintético sideróforo-polímero, fue un análogo de la amonabactina P750, que es uno de los sideróforos producido por la bacteria patógena *Aeromonas salmonicida* subsp *salmonicida*, mientras que el conector elegido fue un polietilenglicol (PEG-3).

En el desarrollo de este trabajo se planteó en primer lugar un análisis retrosintético para la síntesis del sideróforo elegido acoplado al conector, en el que se seleccionaron tres subestructuras principales: una subestructura del sideróforo formada por una lisina y un catecol (S-7), otra subestructura del sideróforo constituida por una glicina, una lisina y un catecol (S-12) y el conector, que contiene tres unidades etilenglicol (C-13). A continuación, se consiguió sintetizar y caracterizar cada una de las subestructuras propuestas y se logaron conectar con éxito para obtener el sideróforo acoplado con el conector planteado (SC-16). Desafortunadamente, los ensayos de acoplamiento de los polímeros con los fragmentos del sideróforo sintetizados fueron infructuosos. A la vista de los resultados obtenidos y con el fin de conseguir preparar los conjugados de interés, se plantea variar las condiciones de reacción de acoplamiento y/o emplear otros polímeros funcionalizados.

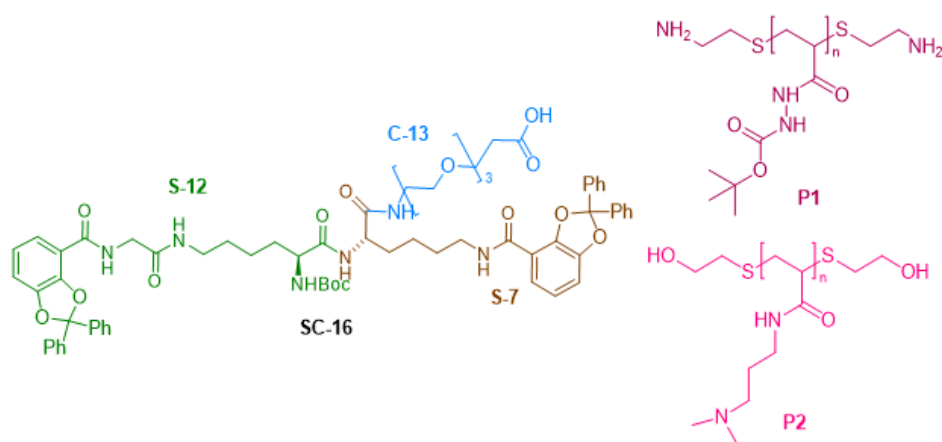


Palabras clave: sideróforo, polímeros, PEG₃, conjugado sideróforo-conector-polímero, amonabactinas.

RESUMO

Nos últimos anos, aumentou considerablemente a prevalencia de enfermidades infecciosas causadas por patóxenos e a resistencia bacteriana aos antibióticos. Debido a que se están a converter nunha ameaza para a saúde pública, fíxose necesario o desenvolvemento de novos axentes antimicrobianos. Por este motivo, neste Traballo Fin de Grao propúxose a elaboración dun sideróforo unido covalentemente a un conector, para a súa posterior conxugación con polímeros co fin de probalo como antimicrobiano. O sideróforo seleccionado, para dirixirse selectivamente ao conxugado sintético sideróforo-polímero, foi un análogo da amonabactina P750, que é un dos sideróforos producidos pola bacteria patóxena *Aeromonas salmonicida* susp. *salmonicida*, mentres que o conector elixido foi un polietilenglicol (PEG-3).

No desenvolvemento deste traballo propúxose primeramente unha análise retrosintética para a síntese do sideróforo elixido acoplado ao conector, na que se seleccionaron tres subestruturas principais: unha subestrutura do sideróforo formada por unha lisina e un catecol (S-7), outra subestrutura do sideróforo formada por unha glicina, unha lisina e un catecol (S-12) e o conector, que contén tres unidades de etilenglicol (C-13). A continuación, foi posible sintetizar e caracterizar cada unha das subestruturas propostas e conectalas para obter o sideróforo acoplado ao conector proposto (SC-16). Desafortunadamente, as probas de acoplamento dos polímeros cos fragmentos de sideróforo sintetizados non tiveron éxito. Á vista dos resultados obtidos e para poder preparar os conxugados de interese, propónse variar as condicións da reacción de acoplamento e/ou empregar outros polímeros funcionalizados.

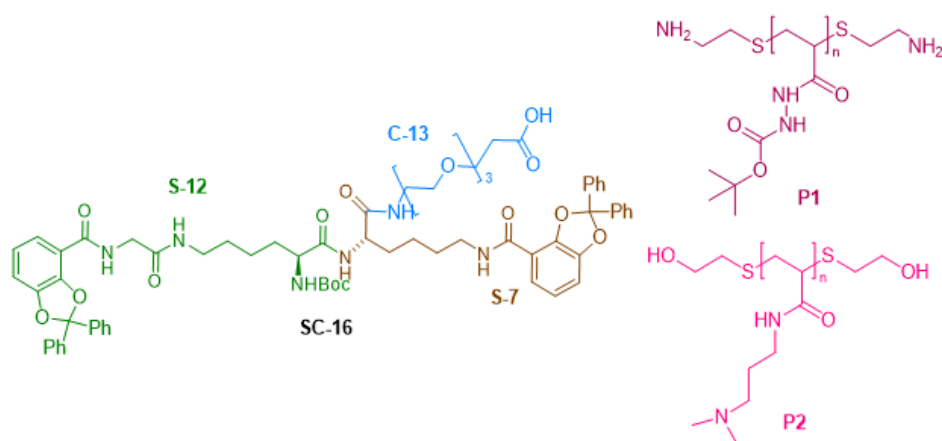


Palabras clave: sideróforo, polímeros, PEG₃, conxugado sideróforo-conector-polímero, amonabactinas.

ABSTRACT

In recent years, the prevalence of infectious diseases caused by pathogens and bacteria resistant to antibiotics have increased considerably. Because they are becoming a threat to public health, the development of new antimicrobial agents has become necessary. For this reason, the preparation of a siderophore covalently bonded to a linker has been proposed in this project, for its subsequent conjugation with polymers in order to test it as an antimicrobial. The selected siderophore, that will act as a targeting ligand in the synthetic siderophore-polymer conjugate, was an analog of amonabactin P750, which is one of the siderophores produced by the pathogenic bacterium *Aeromonas salmonicida* susp. *salmonicida*, and the chosen linker was a polyethylene glycol (PEG-3).

In the development of this project, a retrosynthetic analysis was first proposed for the synthesis of the chosen siderophore coupled to the linker, in which three main substructures were selected: a siderophore substructure formed by a lysine and a catechol (S-7), another siderophore substructure consisting of a glycine, a lysine and a catechol (S-12) and the linker, which contains three ethylene glycol units (C-13). Next, it was possible to synthesize and characterize each of the proposed substructures and successfully connect them to obtain the siderophore coupled with the proposed linker (SC-16). Unfortunately, the coupling tests of the polymers with the synthesized siderophore fragments were unsuccessful. In view of the results obtained and in order to be able to prepare the conjugates of interest, it is proposed to change the coupling reaction conditions and/or use other functionalized polymers.



Keywords: siderophore, polymers, PEG₃, siderophore-linker-polymer conjugate, amonabactin.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Los sideróforos.....	2
1.1.1. Estructura química.....	2
1.1.2. Mecanismos de captación de hierro.....	3
1.1.3. Biosíntesis.....	5
1.2. Los polímeros.....	6
1.3. Sideróforo-conector-polímero.....	7
1.3.1. Elección del sideróforo.....	8
1.3.2. Elección del conector.....	8
1.3.3. Elección del polímero.....	9
2. MARCO CONCEPTUAL	9
3. OBJETIVOS	10
4. RESULTADOS Y CONCLUSIONES	9
Síntesis del sideróforo (S) acoplado con el conector PEG-3 (C).....	10
Ensayos de acoplamiento de los fragmentos de sideróforo sintetizados con los polímeros (P) seleccionados.....	17
5. CONCLUSIONES	19
6. PARTE EXPERIMENTAL	19
6.1. Métodos generales.....	21
6.2. Procedimiento y caracterización.....	22
7. BIBLIOGRAFÍA	36
8. ANEXO	39

1. INTRODUCCIÓN

Los patógenos bacterianos han desarrollado, a lo largo de los últimos años, multitud de estrategias para invadir y proliferar en el huésped, de manera que la incidencia de enfermedades infecciosas producidas por patógenos ha aumentado de forma considerable.¹ El incremento de la resistencia bacteriana a los antibióticos se está convirtiendo en una gran amenaza para la salud pública, por lo que exige explorar constantemente nuevos agentes antimicrobianos con baja probabilidad de resistencia.²

Para el control de estas enfermedades infecciosas, tienen gran relevancia los elementos que actúan e interfieren en las interacciones bacteria-huésped, como los polímeros sintéticos.³ Los polímeros antimicrobianos son especialmente interesantes en estas aplicaciones ya que se consideran biocidas de última generación, debido a que son fáciles de fabricar y controlar con precisión su longitud, presentan una gran afinidad con los receptores de la superficie celular de las bacterias, aportan una estrategia respetuosa con el medio ambiente y parece que no fomentan la resistencia que inducen los antibióticos en ellas.³⁻⁵

Por otra parte, las bacterias han desarrollado estrategias alternativas para la adaptación ambiental y la invasión del huésped, como el *Quórum sensing* (QS).³ La detección de quórum consiste en un proceso de comunicación célula-célula, que es posible gracias a la capacidad de detección y respuesta a la densidad de población bacteriana. Las células bacterianas son capaces de compartir información sobre la densidad celular y en consecuencia controlar la expresión génica en determinados procesos, como la formación de biopelículas o secreción de determinadas sustancias entre otros.⁶ Por tanto, la inhibición del QS puede constituir en sí misma también un método adicional para el control de las infecciones bacterianas.³

En consecuencia, los elementos capaces de interferir tanto en estos mecanismos de comunicación bacteriana, como en las interacciones bacteria-huésped anteriormente comentados, amplían el número de estrategias antimicrobianas que se pueden aplicar.^{3,7} Una de ellas especialmente atractiva es el desarrollo de polímeros antibacterianos selectivos mediante su conjugación con sideróforos, ya que la incorporación de sideróforos se emplea para dirigir selectivamente a los polímeros a la superficie celular bacteriana.^{8,9}

1.1. Los sideróforos

Los sideróforos (del griego, sideros "hierro" y phoros "transportador"), también conocidos como metalóforos, son metabolitos secundarios de bajo peso molecular (entre 500 y 1500 Da) con alta afinidad y selectividad por los iones férricos producidos por bacterias, hongos y gramíneas.^{10,11}

1.1.1. Estructura química

Los sideróforos suelen formar complejos hexadentados con geometría octaédrica, donde la repulsión entre los seis ligandos dispuestos alrededor del hierro (III) de alto espín es mínima, presentando una gran estabilidad ($K_{Fe} > 10^{30} M^{-1}$). Los átomos donantes con mayor afinidad por el hierro son los átomos de oxígeno, debido a que la interacción es más estrecha cuanto mayor es la carga negativa. Sin embargo, también pueden existir grupos funcionales con otros átomos donadores de electrones y, por tanto, cargados negativamente, como el nitrógeno o el azufre. Además, presentan mayor afinidad por los cationes trivalentes, principalmente por el hierro (III) debido a que hay pocos cationes con valencia +3 implicados en procesos biológicos, lo que determina en gran medida la elevada selectividad de los sideróforos.^{10,12}

En estas estructuras hexadentadas puede incorporarse una amplia gama de ligandos bidentados a través de un diseño molecular apropiado. Los tres principales grupos bidentados con alta selectividad por el hierro (III) son los catecoles (representados en rosa), ácidos hidroxámicos (representados en azul) y ácidos α -hidroxicarboxílicos (representados en verde).^{10,11} Atendiendo a sus grupos funcionales de unión al hierro, la mayoría de los sideróforos se pueden agrupar en los siguientes tipos: catecolatos, hidroxamatos, α -hidroxicarboxilatos y de tipo mixto, presentando estos últimos una combinación de los anteriores (Figura 1).¹³

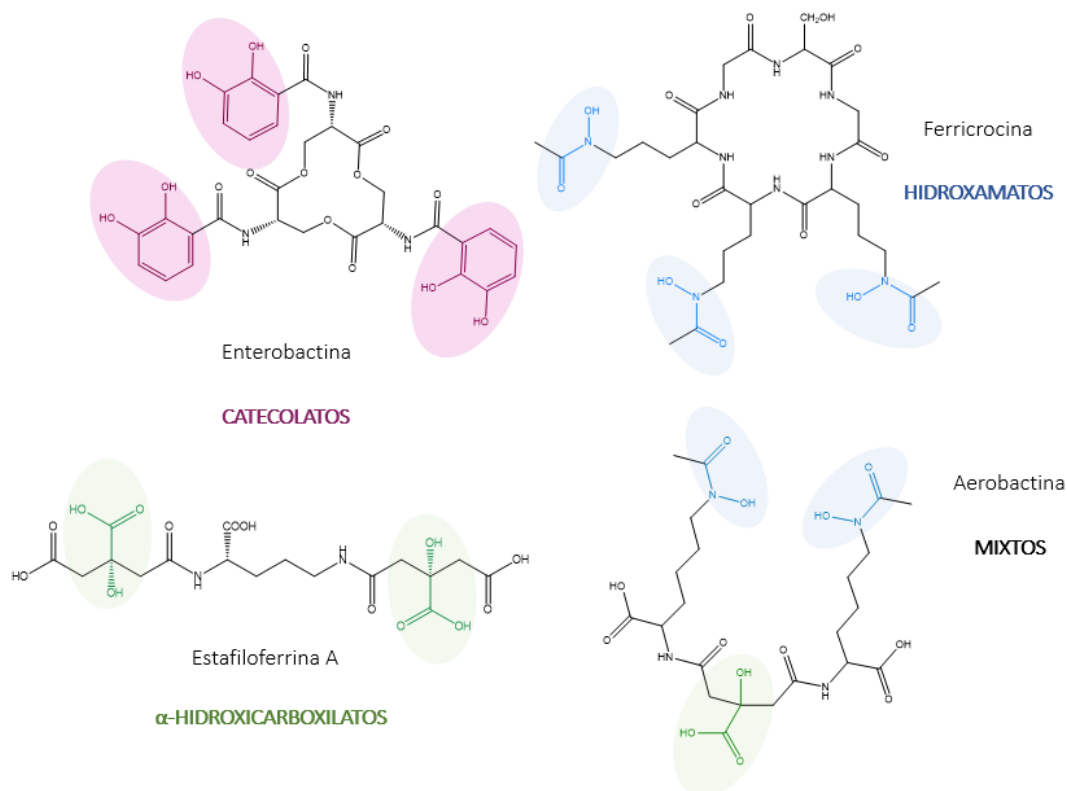


Figura 1. Ejemplos de los distintos tipos de sideróforos atendiendo a sus grupos funcionales.

1.1.2. Mecanismos de captación de hierro

El hierro se trata de un elemento esencial para todos los organismos vivos, ya que se requiere en infinidad de procesos biológicos como la síntesis y reparación del ADN o el transporte de oxígeno, además actúa como cofactor necesario para multitud de enzimas implicadas en el metabolismo.¹⁴ Su forma oxidada (Fe^{3+}) es insoluble, por lo que precipita como $\text{Fe}(\text{OH})_3$ en condiciones aerobias y de pH neutro, y su forma reducida (Fe^{2+}) tiene un alto grado de toxicidad al interactuar con la mayoría de las macromoléculas.^{10,12} Además, el hierro del huésped se encuentra secuestrado en proteínas de almacenamiento (como la lactoferrina y transferrina) disminuyendo su concentración y por tanto su disponibilidad en el suero.¹⁵

En consecuencia, a pesar de la gran abundancia del hierro en la corteza terrestre, su biodisponibilidad es muy baja, por lo que las bacterias para satisfacer sus necesidades requieren diversos sistemas de adquisición de hierro. Pueden captarlo a través del contacto directo con las fuentes exógenas hierro/hemo, o mediante moléculas, como sideróforos o hemóforos, que liberan al medio extracelular.^{10,12}

La biosíntesis de sideróforos es una de las estrategias más habituales de captación de hierro, tanto en bacterias Gram-positivas como Gram-negativas, regulada por los niveles de hierro del medio donde se encuentre el organismo. Los mecanismos de captación de hierro, por consiguiente, constituye una atractiva diana terapéutica, ya que el desarrollo de estrategias que actúan sobre ellos podría lograr la disminución de la colonización bacteriana en el huésped.^{9,16}

La regulación génica de la utilización de sideróforos y homeostasis del hierro en las bacterias generalmente está mediada a nivel transcripcional por el represor de captación férrica (Fur) en bacterias Gram-negativas y Gram-positivas con bajo contenido de Guanina y Citosina (GC) o el regulador de la toxina diftérica (DtxR) en bacterias Gram-positivas con alto contenido de GC.¹⁷

Los sideróforos, una vez excretados al medio, se coordinan con el ion hierro (III) en el medio extracelular dando lugar al complejo sideróforo-Fe(III) que debe ser reintroducido en las células (Figura 2). No obstante, el mecanismo de internalización de ese complejo es diferente en las bacterias Gram-positivas y Gram-negativas debido a su diferente composición estructural.^{11,16}

Las bacterias Gram-negativas presentan una membrana externa que actúa de barrera entre el medio intracelular y extracelular, protegiendo a las bacterias de toxinas, enzimas degradantes y detergentes. En la membrana externa están presentes las porinas, unas proteínas de barril β triméricas que permiten la difusión pasiva de solutos de pequeño tamaño (con un peso inferior a 600 Da). Sin embargo, la mayoría de los complejos sideróforo-Fe(III) exceden el peso molecular límite de estas proteínas y requieren de receptores de membrana externa (PME) específicos para incorporarse en el espacio periplásmico.¹⁸ En el periplasma, estos complejos son captados por proteínas periplasmáticas de unión (PBP; *periplasmic binding protein*) y conducidos hasta la proteína de membrana dependiente de ATP (transportador tipo ABC; *ATP Binding Cassette*) que se encuentra en la membrana interna. Finalmente, esta última proteína introduce el complejo en el citoplasma de la célula, donde el hierro es liberado bien por reducción o mediante la degradación del sideróforo gracias a enzimas específicas y el sideróforo vuelve a ser secretado al exterior para ser reutilizado (Figura 2).^{9,19}

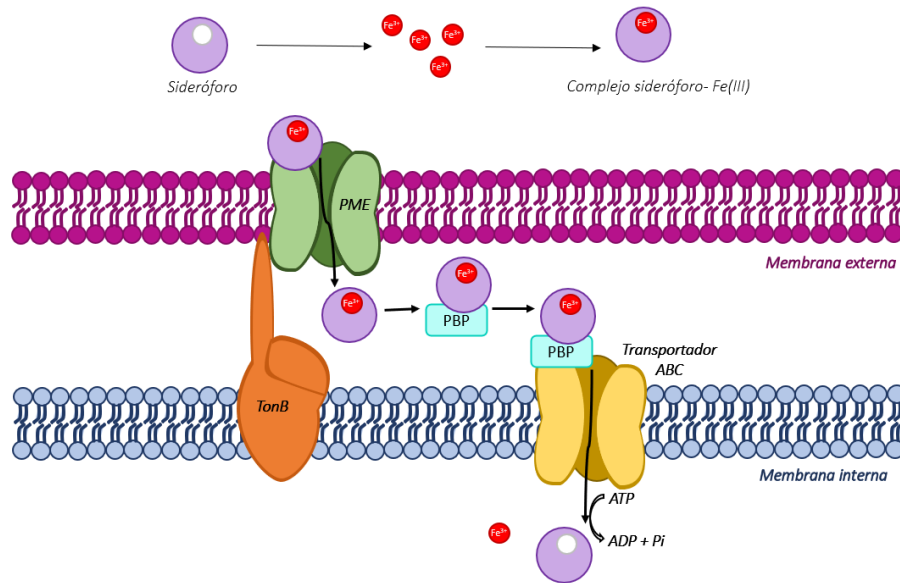


Figura 2. Mecanismo de captación de hierro mediante sideróforos en bacterias Gram-negativas.

Las bacterias Gram-positivas carecen de membrana externa y periplasma, de manera que los complejos sideróforo-Fe(III) pueden ser incorporados en el citoplasma celular directamente a través de una permeasa ubicada en la membrana plasmática, al ser reconocidos por una lipoproteína (SBP; *siderophore-binding protein*) (Figura 3).^{9,16}

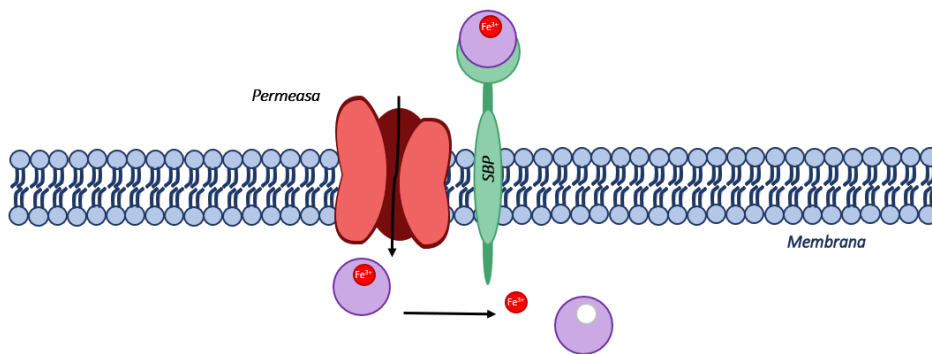


Figura 3. Mecanismo de captación de hierro mediante sideróforos en bacterias Gram-positivas.

1.1.3. Biosíntesis

La maquinaria transcripcional anteriormente mencionada se activa cuando la concentración de hierro es baja, de manera que comienza la producción de enzimas requeridas para la biosíntesis de sideróforos y de proteínas necesarias para su reconocimiento, transporte y procesamiento.¹⁶

La biosíntesis tiene lugar mediante distintos mecanismos atendiendo a la naturaleza química de los sideróforos. En general, la biosíntesis de los sideróforos tiene lugar en

grandes complejos proteicos multienzimáticos conocidos como NRPS (*nonribosomal peptide synthetase*). Estos complejos activan y ensamblan multitud de aminoácidos conformando una gran variedad estructural de sideróforos que después se exportan al espacio extracelular.¹⁷

1.2. Los polímeros

Los polímeros son macromoléculas (compuestos orgánicos) formadas por la unión covalente de unidades simples denominadas monómeros en un proceso denominado polimerización. Existen polímeros naturales como la celulosa o el ADN (Ácido desoxirribonucleico) y polímeros sintéticos como el polietileno empleado en la fabricación de bolsas o el policarbonato usado en gafas de laboratorio y botellas de plástico.^{20,21} El principal interés de los polímeros sintéticos es el gran abanico de posibilidades de personalización: longitud de la cadena, grupos funcionales, propiedades químicas, físicas, etc. según los requisitos necesarios.⁵

Además, tanto las macromoléculas catiónicas naturales como ciertos polímeros sintéticos son excelentes compuestos “antimicrobianos” debido a su capacidad de interacción con los microorganismos, resultado de su afinidad (presencia de carga positiva) con la envoltura cargada negativamente de las bacterias Gram-negativas y Gram-positivas. Por tanto, a concentraciones y densidades de carga elevadas, estas moléculas pueden afectar significativamente la integridad y crecimiento de la membrana, afectando a la actividad bacteriana y disminuyendo su viabilidad.²²

Sin embargo, a pesar de que se han sintetizado diversos monómeros, homopolímeros y copolímeros antimicrobianos, existe poco conocimiento sobre el efecto de estos elementos en la fisiología de las bacterias patógenas objetivo. Se sabe que las bacterias son capaces de detectar y responder a los cambios de su entorno mediante la combinación de señales químicas y físicas. Por ejemplo, algunas de ellas pueden transitar de una vida libre a un estado adherente como los biofilms cuando interactúan con algunos polímeros, lo que conlleva cambios de expresión génica que pueden dar lugar a la regulación de los genes de virulencia con una tendencia alcista.^{4,5} Estudios realizados con *Vibrio cholerae* han demostrado que cuando se adicionan polímeros antimicrobianos, se produce la agrupación de las bacterias y esta agregación conduce a la autoinducción, debido que se activan señales que producen un aumento rápido de la concentración de autoinductores de QS.^{4,22}

1.3. Sideróforo-conector-polímero

El desarrollo de polímeros antibacterianos selectivos constituye una de las estrategias antibacterianas de gran interés en investigación frente a los antibióticos, debido a que los polímeros antibacterianos presentan propiedades mejoradas respecto a los antibióticos, como estabilidad a largo plazo, toxicidad reducida, menor susceptibilidad de causar resistencia, etc.^{5,8} Por tanto, la conjugación de polímeros con sideróforos puede ser una propuesta atractiva para incrementar la actividad antibacteriana, debido a que la incorporación del sideróforo permite dirigir al polímero a la membrana bacteriana gracias a los receptores de membrana para la captación de sideróforos, de igual modo que en los antibióticos conjugados con sideróforos en los que se emplea la estrategia de "caballo de Troya".²³

Recientemente, Jing Qiao *et al.* ha evaluado la actividad antibacteriana selectiva de un copolímero conjugado a un xenosideróforo contra *Pseudomonas aeruginosa*. En este estudio observó como el polímero conjugado se dirige a receptores seleccionados de la membrana externa (OM) para eliminar xenosideróforos, y al mismo tiempo presenta una citocompatibilidad favorable que permite dañar de forma segura la OM bacteriana.⁸

Estos materiales antibacterianos propuestos están constituidos por un polímero unido a un sideróforo a través de un conector. El sideróforo permite unirse a las bacterias empleando sus sistemas de captación de hierro, elemento esencial para ellas, mientras que el polímero altera la integridad de la membrana bacteriana afectando a su actividad, actuando como antimicrobiano.²²

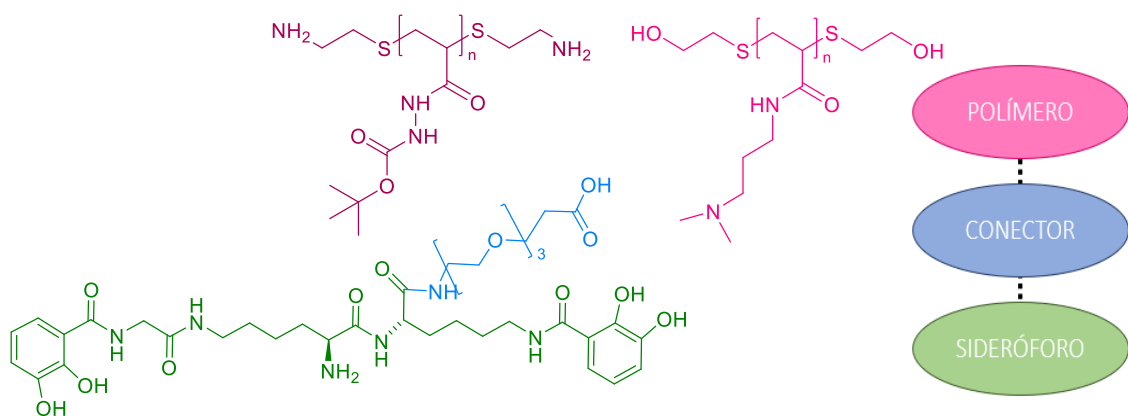


Figura 4. Propuesta de la estructura de los polímeros conjugados al sideróforo.

1.3.1. Elección del sideróforo

El objetivo principal del sideróforo es dirigir selectivamente al conjugado sintético polímero-sideróforo a la superficie celular bacteriana. Para ello se ha seleccionado como sideróforo un derivado de la amonabactina P750 (Figura 5).⁸

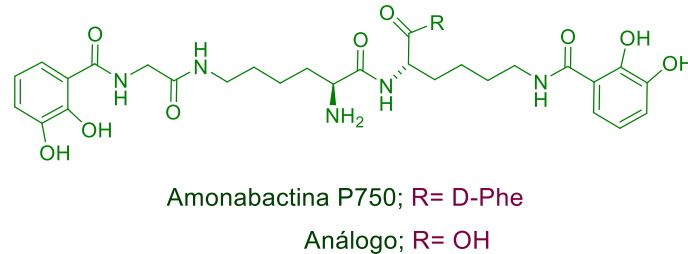


Figura 5. Estructura del sideróforo amonabactina P750 y del análogo seleccionado

Las amonabactinas son sideróforos producidos por la bacteria patógena *Aeromonas salmonicida* subsp *salmonicida* que es el agente responsable de la enfermedad infecciosa en peces, denominada forunculosis.²⁴ Pertenecen al grupo de las gamma-proteobacterias Gram-negativas ampliamente extendidas en medios acuáticos.²⁵ El sideróforo seleccionado presenta un esqueleto formado por dos lisinas, una glicina y dos catecoles como grupos funcionales, cada uno de ellos con una alta densidad de carga, que poseen gran afinidad por el hierro (III) gracias a los dos átomos en posición orto de los anillos aromáticos.¹⁰

1.3.2. Elección del conector

El conector debe tener como finalidad principal enlazar covalentemente el sideróforo con el polímero para obtener el conjugado sintético de interés. También es crucial disminuir las interacciones biológicas con el conector, para lo que es importante tener en cuenta su tamaño, forma, composición, propiedades fisicoquímicas y elasticidad. Además, debe ser estable en el medio extracelular y permitir la actuación del polímero y sideróforo en la bacteria diana.²⁶

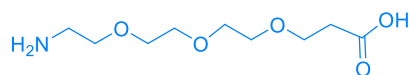


Figura 6. Estructura del conector seleccionado: polietilenglicol (PEG-3).

Atendiendo a estos requisitos se escogió el polietilenglicol mostrado en la Figura 6, ya que su naturaleza hidrófila mejora la estabilidad del conjugado sintético y reduce su afinidad de unión a componentes biológicos.²⁶

1.3.3. Elección del polímero

Los polímeros antibacterianos más eficaces se caracterizan por presentar gran cantidad de residuos catiónicos e hidrofóbicos y, además, por ser frecuentemente anfipáticos. La carga catiónica de los polímeros es necesaria para la interacción electrostática con la membrana bacteriana externa aniónica. Además, las cadenas alquilo hidrofóbicas del polímero son capaces de interrumpir la integridad de la membrana al insertarse en ella, pudiendo llegar a provocar la muerte bacteriana.⁸

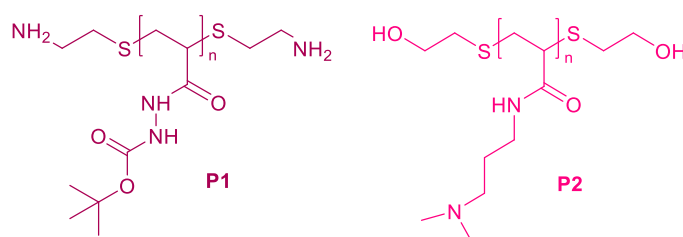


Figura 7. Estructuras de los polímeros P1 y P2 propuestos.

Los polímeros que han sido seleccionados atendiendo a los criterios recién mencionados son los que se muestran en la Figura 7. El poli *N'*-(*tert*-butoxicarbonil)acrililo hidrazida (polímero 1) se trata de un polímero anfifílico suficientemente estable en condiciones fisiológicas, que tiene que ser desprotegido tras su conjugación con el sideróforo, para después poder ser modificado con aldehídos catiónicos e hidrofóbicos y estudiar su capacidad antimicrobiana.^{27,28} El poli (*N*-[3-(dimetilamino)propil]metacrilamida (polímero 2) ha sido empleado con anterioridad para la inducción de QS en vibrios.^{4,22}

2. MARCO CONCEPTUAL

Este Trabajo de Fin de Grado fue realizado en el grupo de PRONAMAR, un equipo interdisciplinar formado por miembros del grupo de Química Molecular y de Materiales (QUIMOLMAT) y del grupo de investigación en biología evolutiva (GIBE) adscrito al Centro de Investigaciones Científicas Avanzadas (CICA) y a la Facultad de Ciencias de la Universidad de A Coruña. En este grupo se ha estudiado recientemente la síntesis de diversos análogos de amonabactinas con el fin de desarrollar nuevos tratamientos contra la forunculosis empleando los mecanismos de captación de Fe (III) mediados por sideróforos.²⁹

Por otro lado, el grupo de investigación de Francisco Fernández Trillo ha demostrado como ciertos polímeros con gran afinidad por las superficies bacterianas, presentan la capacidad de alterar el sistema de QS.⁷ Además, han probado la capacidad de interferencia

de algunos polímeros en la formación de biopelículas y producción de factores de virulencia regulados por QS.^{3,4}

Por tanto, estas dos líneas de investigación son las que han permitido diseñar los polímeros conjugados con sideróforos, con potencial de actuación en los mecanismos de comunicación bacteriana y las interacciones bacteria-huésped.

3. OBJETIVOS

En base a lo descrito anteriormente, el principal objetivo de este Trabajo de Fin de Grado es la síntesis y caracterización de los conjugados sideróforo-polímero (Figura 4). Para conseguirlo, se han planteado los siguientes objetivos específicos:

1. Plantear un análisis retrosintético para la síntesis de un análogo del sideróforo amonabactina P750 de la bacteria patógena *Aeromonas salmonicida* subsp *salmonicida* unido covalentemente a un conector PEG-3.
2. Sintetizar y caracterizar cada una de las subestructuras seleccionados como claves del análisis sintético planteado, así como del fragmento objetivo.
3. Realizar ensayos de acoplamiento entre fragmentos del sideróforo sintetizado con los polímeros seleccionados **P1** y **P2**, a través del conector PEG-3.

4. RESULTADOS Y CONCLUSIONES

Síntesis del sideróforo (S) acoplado con el conector PEG-3 (C).

En primer lugar, se planteó un análisis retrosintético para la síntesis del sideróforo análogo al de las amonabactinas acoplado al conector (Figura 8), en el que se seleccionaron tres subestructuras principales: la subestructura del sideróforo formada por una lisina y un catecol (**S-7**), la subestructura del sideróforo constituida por una glicina, una lisina y un catecol (**S-12**) y el conector, que contiene tres unidades etilenglicol (**C-13**).

Tras realizar este planteamiento retrosintético (Figura 8), se establecieron como etapas clave de la síntesis el acoplamiento del conector (**C-13**) con la subestructura del sideróforo (**S-7**) que contiene la lisina y el catecol y el posterior acoplamiento del fragmento resultante (**SC-15**) con la subestructura del sideróforo (**S-12**) constituida por la glicina, la lisina y el catecol.

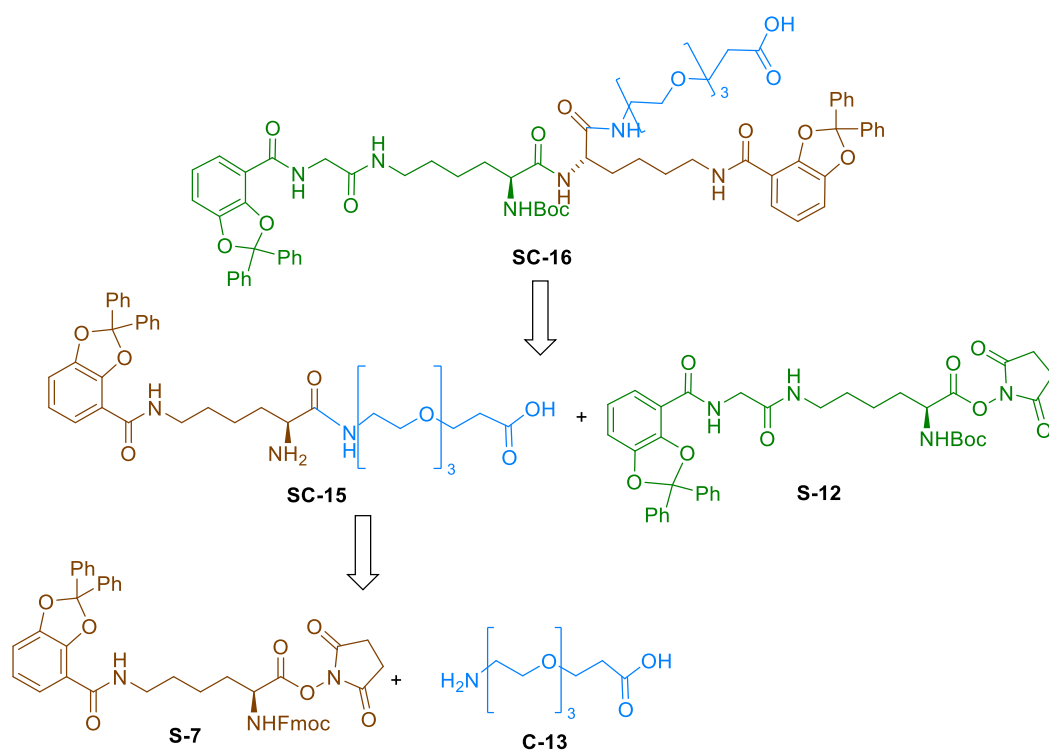


Figura 8. Análisis retrosintético para la síntesis del sideróforo acoplado al conector (SC-16).

Síntesis del fragmento S-7 y del fragmento C-13.

Para la preparación del fragmento S-7 se estableció una ruta sintética en la que se requiere en primer lugar la activación del ácido carboxílico del catecol convenientemente protegido (Figura 9) para el posterior acoplamiento con la lisina (Figura 10).

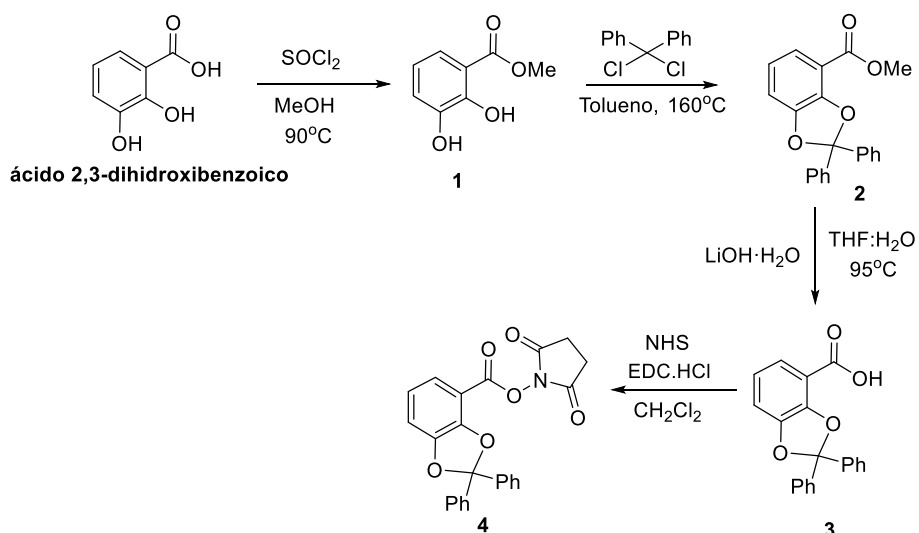


Figura 9. Activación del ácido carboxílico del catecol convenientemente protegido.

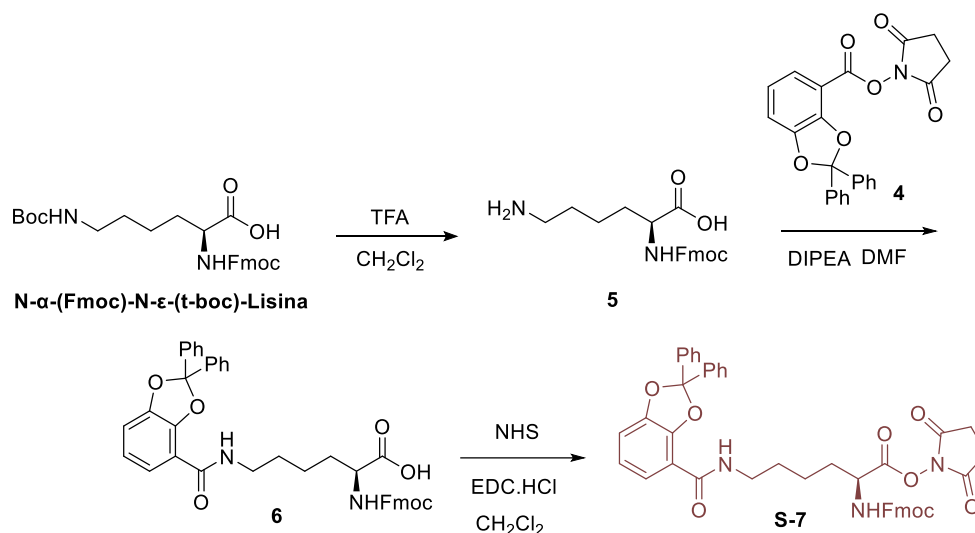


Figura 10. Acoplamiento del catecol a la lisina para dar lugar al fragmento S-7.

Para la obtención del catecol activado en primer lugar, se obtuvo el éster **1** por tratamiento del ácido 2,3-dihidroxibenzoico comercial con SOCl₂ en MeOH con un rendimiento del 90%. Después, se protegieron los grupos hidroxilos de las posiciones 2 y 3 en el éster **1** con diclorodifenilmetano obteniéndose el éster **2** y una vez protegido, se hidrolizó en medio básico para obtener el ácido carboxílico **3**. Por último, se activó el ácido carboxílico del catecol con NHS y EDC·HCl, dando lugar al compuesto **4**.

De forma paralela, se eliminó el grupo protector *tert*-butiloxicarbonilo (Boc) del *N*-α-(Fmoc)-*N*-ε-(t-boc)-L-Lisina para dar lugar a la amina **5**. El catecol activado **4** se acopló a la amina **5** obteniéndose la amida **6** con un rendimiento del 90%. Los compuestos **1** y **3-6** se caracterizaron por ¹H-RMN, ¹³C-RMN y espectrometría de masas de alta resolución (HR-ESIMS) como se muestra en el ANEXO.

Finalmente, el ácido carboxílico de la amida **6** se activó con NHS y EDC·HCl en condiciones de atmósfera inerte dando lugar al fragmento **S-7** con un rendimiento del 97%. La estructura de este fragmento también se determinó análisis de RMN, en cuyo espectro de ¹H-RMN se observa la señal a δ_H 2.8 característica del grupo NHS, la señal a δ_H 4.2 del hidrógeno alfa de la lisina y señales entre δ_H 6.8-7.8 correspondientes al grupo catecol. Además, en el espectro de ¹³C-RMN se pueden observar las señales correspondientes a los carbonos del NHS a δ_C 25.65 de los grupos CH₂ y a δ_C 168.6 y δ_C 168.3 de los carbonos carbonílicos. Adicionalmente, el espectro de masas de alta resolución mostró el ion [M+Na]⁺ *m/z* 788.2585 (Calculada para C₄₅H₃₉N₃NaO₉: 788.2579) que corroboró la síntesis del fragmento **S-7**.

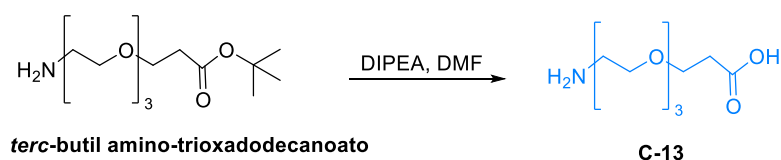


Figura 11. Síntesis del fragmento C-13.

El fragmento C-13 se sintetizó desprotegiendo el grupo *tert*-butilo del 1,1-dimietil 3-[2-[2-(2-aminoetoxi)etoxi]etoxi]propanoato de *tert*-butilo con un rendimiento del 99%, empleando las condiciones que se muestran en la Figura 11. Su estructura se confirmó por ^1H -RMN, ^{13}C -RMN y espectrometría de alta resolución. En el espectro ^1H -RMN del conector comercial se pueden observar las señales correspondientes al grupo *tert*-butilo a δ_{H} 1.4 (sombreada en rosa), que desaparecen al realizar la desprotección. Además, aparecen dos singuletes anchos que se corresponden con el NH_3^+ y OH a δ_{H} 7.6 y δ_{H} 8.7, del fragmento C-13 (Figura 12).

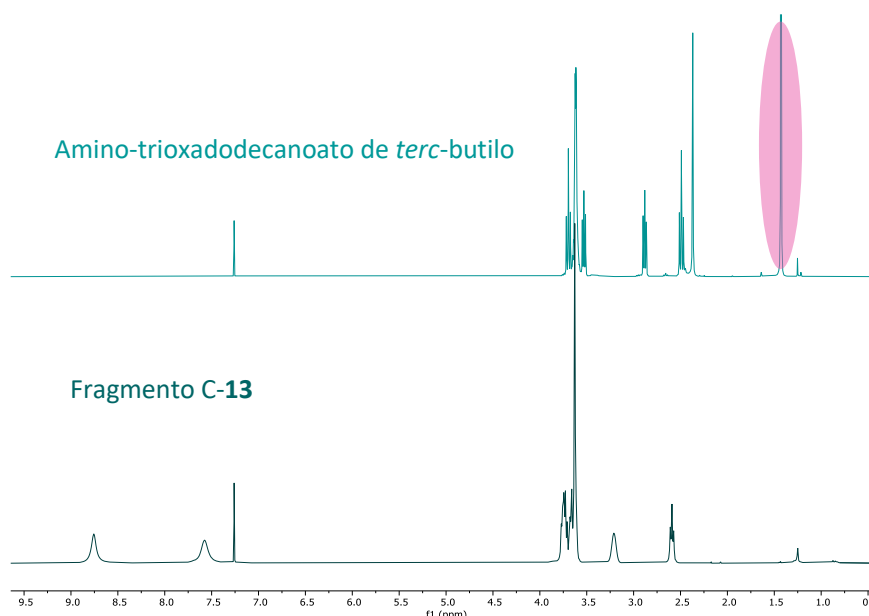


Figura 12. Espectros de ^1H -RMN apilados del conector comercial y el fragmento C-13.

En el espectro de masas de alta resolución del producto obtenido se observa el ion $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z 222.1336 (Calculada para $\text{C}_9\text{H}_{20}\text{NO}_5$: 222.1341) y el ion $[\text{M}+\text{Na}]^+$ m/z 244.1155 (Calculada para $\text{C}_9\text{H}_{19}\text{NNaO}_5$: 244.1161) que verifica que se ha formado el fragmento C-13 correctamente.

Síntesis del fragmento SC-15.

Para la preparación del fragmento SC-15 se realizó el acoplamiento de los dos fragmentos anteriormente sintetizados (S-7 y C-13) y la posterior desprotección del grupo Fmoc (Figura 13).

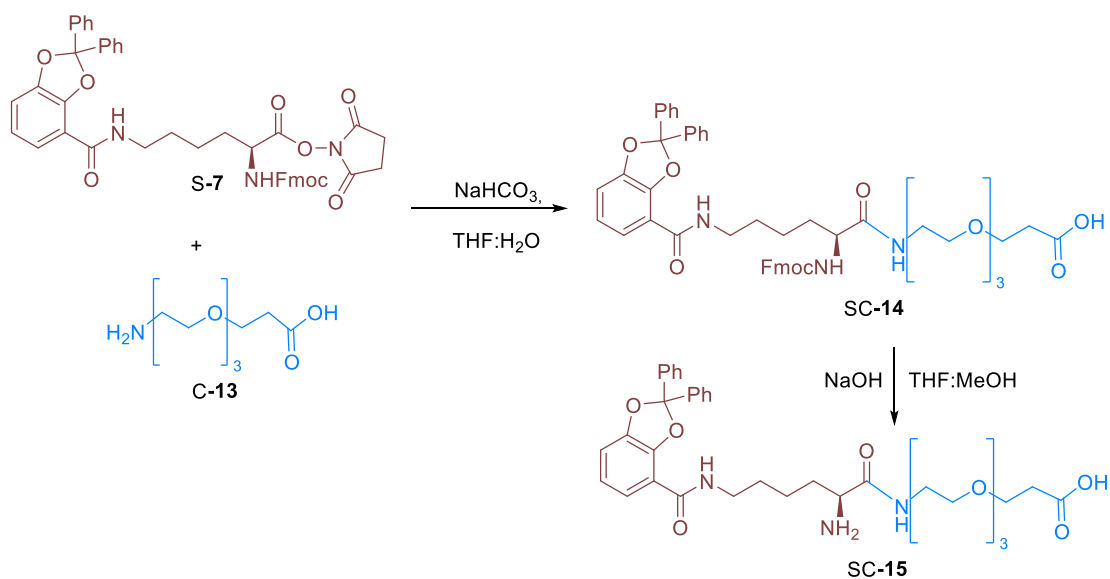


Figura 13. Ruta sintética del fragmento SC-15.

Una vez sintetizado el fragmento C-13 se acopló al fragmento S-7 con NaHCO₃ en una disolución THF: H₂O, obteniéndose el fragmento SC-14 con un rendimiento del 75%. Después, se desprotegió la amina, eliminando el grupo Fmoc del fragmento SC-14 con NaOH en THF:MeOH, formándose el fragmento SC-15 con un rendimiento del 76%. Ambos compuestos (SC-14 y SC-15) se caracterizaron por ¹H-RMN, ¹³C-RMN y espectrometría de masas de alta resolución (HR-ESIMS) como se muestra en el ANEXO. En los espectros de ¹H-RMN (Figura 14) se observan las señales características del conector a δ_H 3.6 (sombreado en verde) que indican que el fragmento C-13 se ha unido correctamente al fragmento SC-14, y, además se puede apreciar la desaparición de señales correspondientes al grupo protector Fmoc (sombreado en azul) en el fragmento SC-15.

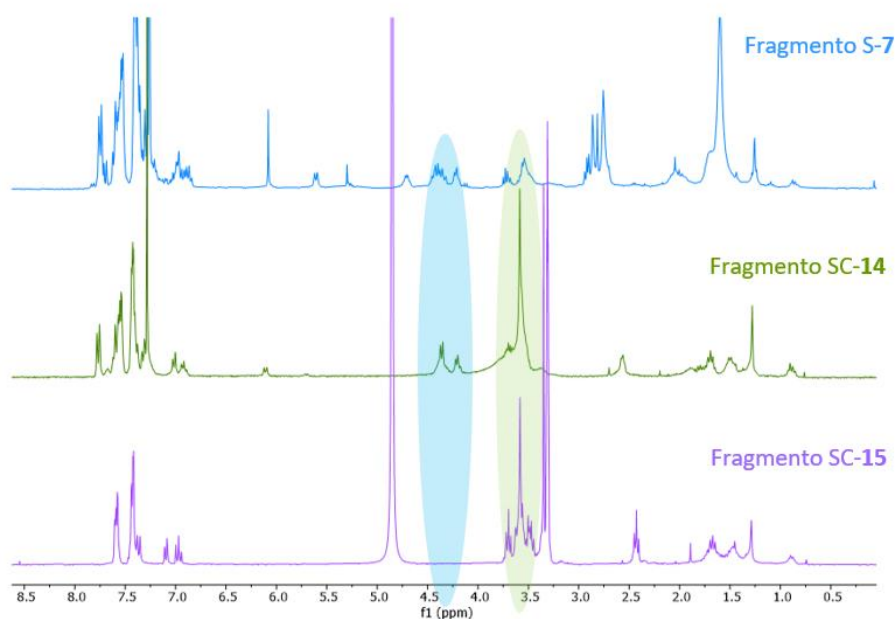


Figura 14. Espectros de ¹H-RMN apilados de los fragmentos S-7, SC-14 y SC-15.

Mediante espectroscopia de ^{13}C -RMN se confirmó la obtención del fragmento **SC-15**, ya que aparecen las señales características al conector entre 68.3 y 69.7 ppm y desaparecen las señales correspondientes al grupo protector Fmoc. Además, en espectrometría de masas de alta resolución (HR-ESIMS), se observan los iones $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z 650.3080 (Calculada para $\text{C}_{35}\text{H}_{44}\text{N}_3\text{O}_9$: 650.3072), $[\text{M}+\text{Na}]^+$ m/z 672.2889 (Calculada para $\text{C}_{35}\text{H}_{43}\text{N}_3\text{NaO}_9$: 672.2892) y $[\text{M}-\text{H}]^-$ m/z 648.2934 (Calculada para $\text{C}_{35}\text{H}_{42}\text{N}_3\text{O}_9$: 648.2927).

Síntesis del fragmento S-12.

La ruta sintética que se empleó en la síntesis del fragmento **S-12** se muestra en la Figura 15. En esta ruta es necesario activar la glicina, acoplarla posteriormente con la lisina, y una vez acopladas (fragmento **S-10**) conectarlas con el catecol activado **4** anteriormente sintetizado.

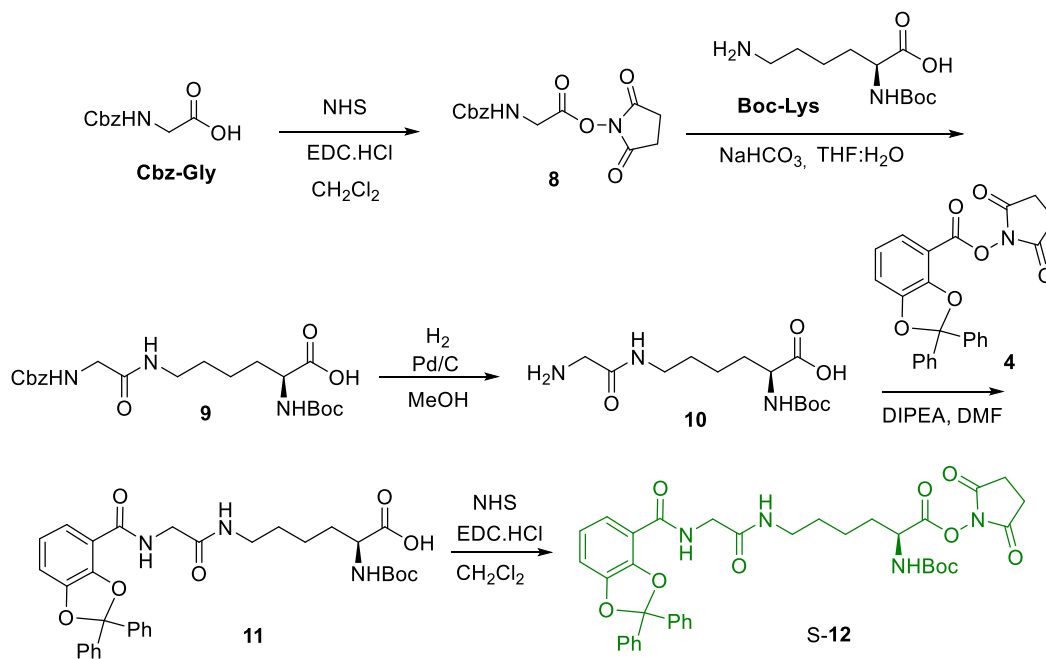


Figura 15. Ruta sintética del fragmento **S-12**.

Para la formación del fragmento **S-12**, se activó el ácido carboxílico de la glicina protegida con el grupo carboxibencilo (Cbz) con **NHS** y **EDC.HCl** para dar lugar al compuesto **8** con un rendimiento del 95%. El compuesto sintetizado **8** se acopló con la lisina protegida con el grupo Boc para formar el dipéptido **9** con un rendimiento del 92%, desprotegiendo el grupo Cbz a continuación con hidrógeno y el catalizador **Pd/C** para obtener el dipéptido **10** con un rendimiento del 95%. Seguidamente, el dipéptido **10** se acopló al catecol activado **4** sintetizado anteriormente (Figura 9) para formar el compuesto **11** con un rendimiento del 94%. Por último, el ácido carboxílico del

compuesto **11** se activó con NHS y EDC·HCl, para dar lugar al fragmento S-**12** con un rendimiento del 97%.

De nuevo, todos estos compuestos sintetizados se caracterizaron por ^1H -RMN, ^{13}C -RMN y espectrometría de masas de alta resolución (HR-ESIMS) como se muestra en el ANEXO.

La estructura del fragmento S-**12** pudo confirmarse por espectroscopia de ^1H -RMN donde se observan la señal correspondiente al NHS a δ_{H} 2.8, las señales de los hidrógenos aromáticos entre 6.9 y 7.6 ppm correspondientes al catecol protegido, la señal intensa del grupo protector Boc de la lisina a δ_{H} 1.5 y la señal característica del grupo Cbz de la glicina a δ_{H} 4.1. Esta estructura pudo corroborarse mediante el análisis de su espectro de ^{13}C -RMN con las señales correspondientes al grupo NHS a δ_{C} 25.6 y 169.0, las señales propias del Boc a δ_{C} 28.4 y 80.7 y las características de la glicina a δ_{C} 43.8 y 164.0. Además, en espectrometría de masas de alta resolución (HR-ESIMS) se observó el ion $[\text{M}+\text{Na}]^+$ m/z 723.2641 (Calculada para $\text{C}_{37}\text{H}_{40}\text{N}_4\text{NaO}_{10}$: 723.2637).

Síntesis del compuesto SC-16.

Finalmente, se sintetizó el sideróforo convenientemente protegido acoplado al conector (SC-**16**) para su posterior acoplamiento con los polímeros seleccionados. Para ello, se acoplaron los fragmentos SC-**15** y S-**12** anteriormente sintetizados, en un medio ligeramente básico para asegurarse que la amina es reactiva y neutralizar el ácido formado en el acoplamiento (Figura 16).

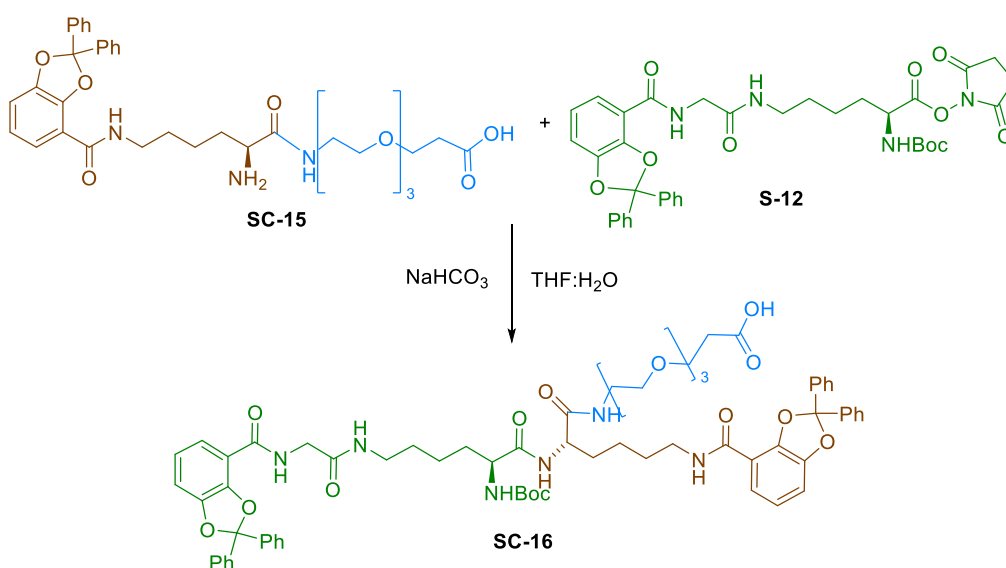


Figura 16. Acoplamiento de los fragmentos SC-15 y S-12 para formar el compuesto SC-16.

La estructura del compuesto **SC-16** se determinó por espectroscopia de ^1H -RMN (Figura 17) donde se observan las señales características del conector a δ_{H} 3.4 (sombreada en amarillo) y la señal intensa del grupo Boc a δ_{H} 1.4 (sombreada en lila).

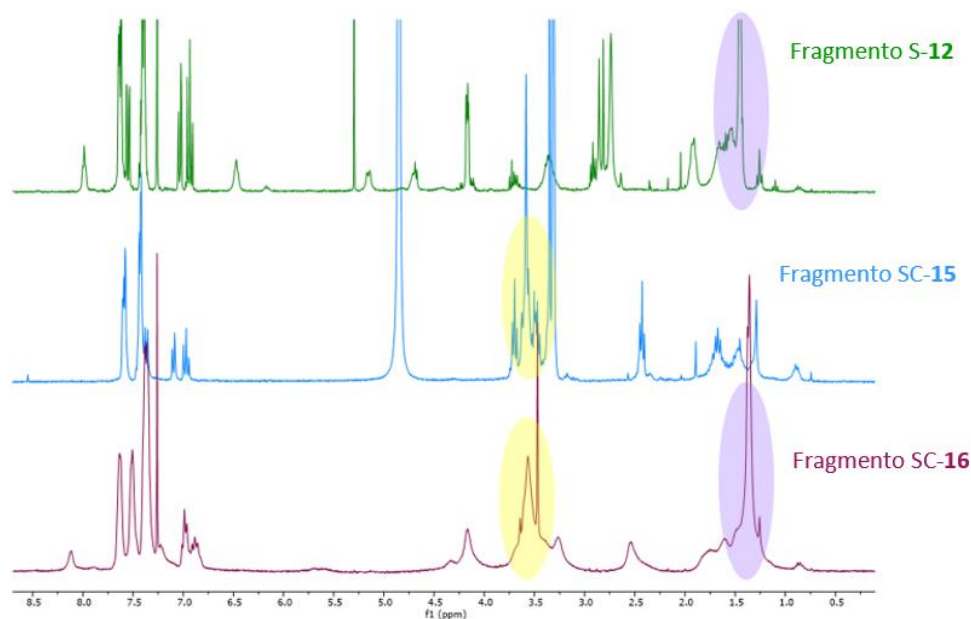


Figura 17. Espectros de ^1H -RMN apilados de los fragmentos **S-12**, **SC-15** y **SC-16**.

También se corroboró por espectroscopia de ^{13}C -RMN con la señal característica del Boc a δ_{C} 28.4 y las señales propias del conector entre 67.1 y 77.4 ppm. Así, como por espectrometría de masas de alta resolución (HR-ESIMS), donde se observó el ion $[\text{M}+\text{Na}]^+$ m/z 1257.5403 (Calculada para $\text{C}_{68}\text{H}_{78}\text{N}_6\text{NaO}_{16}$: 1257.5367) y el ion $[\text{M}-\text{H}]^-$ m/z 1233.5400 (Calculada para $\text{C}_{68}\text{H}_{77}\text{N}_6\text{O}_{16}$: 1233.5402).

Ensayos de acoplamiento de los fragmentos de sideróforo sintetizados con los polímeros (P) seleccionados

Con el fin de encontrar las condiciones adecuadas para realizar el acoplamiento entre el fragmento **SC-16** sintetizado y los polímeros comentados en la introducción, se realizaron cuatro pruebas con fragmentos del sideróforo sintetizados (**S-12** y **6**) y los polímeros (**P1** y **P2**) elegidos (Figura 18). En el caso del fragmento **S-12**, el hecho de que el grupo ácido se encuentre activado facilitaría la reacción de acoplamiento ya que solo habría que mezclar los compuestos en un medio ligeramente básico. Con el fragmento **6**, aunque no se encuentre activado, lo cual implicaría el empleo de un agente de acoplamiento, su empleo reduciría el número de etapas necesarias ya que no sería necesario el paso de activación si se consigue realizar el acoplamiento con éxito.

Para el acoplamiento del compuesto **6** con los polímeros **P1** y **P2**, se empleó EDC·HCl como agente activador, DMAP y DIPEA en DMF. Mientras que, para acoplar el fragmento **S-12** a ambos polímeros solo se adicionó DIPEA en DMF, ya que el fragmento del sideróforo ya se encontraba activado.

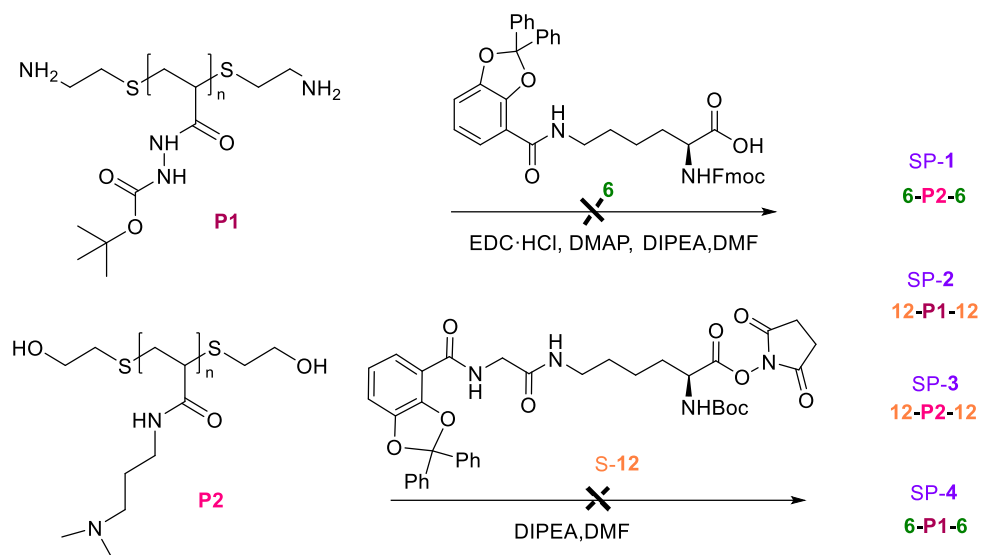


Figura 18. Ensayos de acoplamientos entre los fragmentos **6** y **S-12** y los polímeros **P1** y **P2** para formar los compuestos **SP-1**, **SP-2**, **SP-3** y **SP-4**.

Los cuatro productos obtenidos, resultado de las pruebas de acoplamiento mencionadas, se estudiaron por espectroscopia de $^1\text{H-RMN}$ (Figura 19 y ANEXO).

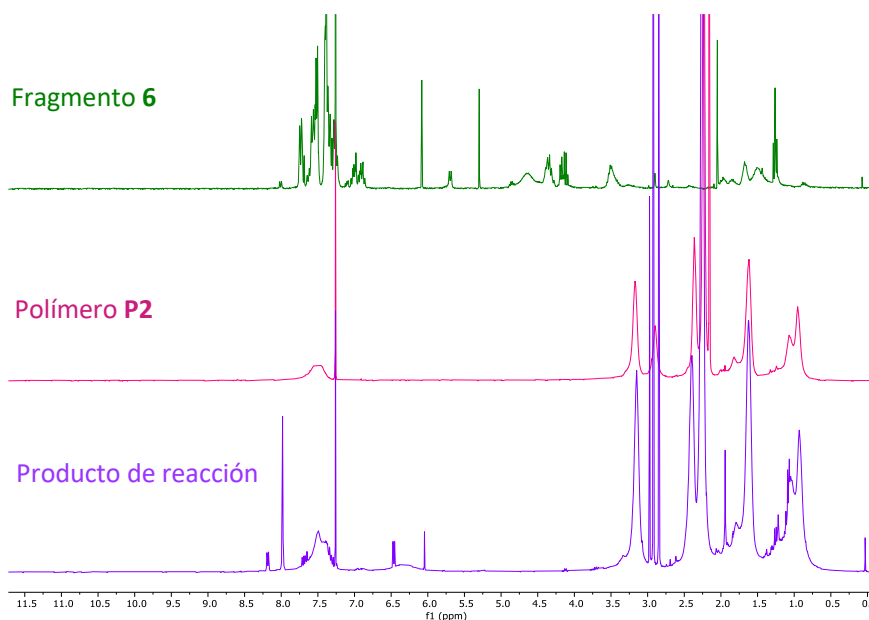


Figura 19. Espectro de $^1\text{H-RMN}$ apilados del fragmento **6**, el polímero **P2** y del producto de reacción.

En el espectro de ^1H -RMN correspondiente al primer ensayo de acoplamiento sideróforo-polímero se observa por un lado las señales características del polímero 2 (**P2**) y por otro lado las del fragmento **6**. Desafortunadamente, las señales de dicho espectro parecen indicar que no se ha producido el acoplamiento, ya que no se observan las señales ensanchadas del fragmento del sideróforo correspondiente, tal y como cabría esperar. En caso de que se hubiese producido el acoplamiento con éxito, el considerable mayor tamaño de SP-1 en relación con el del fragmento **6**, traería consigo una menor velocidad de rotación que como consecuencia produciría un ensanchamiento de las señales. Estos mismos resultados se observaron en los otros tres ensayos indicando que el acoplamiento no ha tenido lugar (ANEXO), pero debido a la extensión limitada del Trabajo de Fin de Grado, se decidió no realizar nuevos intentos.

En un futuro sería interesante realizar estos ensayos de acoplamiento con otras condiciones y/u otros polímeros funcionalizados para conseguir los polímeros conjugados con sideróforos objetivo de este trabajo. Una vez sintetizados, sería necesario desproteger los grupos funcionales de los catecoles para que puedan quelatar Fe (III) y actuar como sideróforo.

5. CONCLUSIONES

Atendiendo a los objetivos planteados y los resultados obtenidos, se establecen las siguientes conclusiones:

- Se planteó un análisis retrosintético para la síntesis del sideróforo análogo del amonabactina P750 unido covalentemente al conector PEG-3, en el que se seleccionaron tres subestructuras principales: una subestructura del sideróforo formada por una lisina y un catecol (**S-7**), otra subestructura del sideróforo constituida por una glicina, una lisina y un catecol (**S-12**) y el conector, que contiene tres unidades etilenglicol (**C-13**).
- Se consiguió sintetizar y caracterizar cada una de las subestructuras propuestas y se lograron conectar con éxito para obtener el sideróforo acoplado con el conector planteado (**SC-16**).
- Se realizaron cuatro ensayos de acoplamiento entre los fragmentos del sideróforo y los polímeros a través del conector PEG-3, que resultaron ser infructuosos.

Con el fin de conseguir los polímeros conjugados con sideróforo objetivo de este trabajo se propone realizar los ensayos de acoplamiento en otras condiciones con el fragmento SC-16 y/u otros polímeros funcionalizados. Además, una vez sintetizados, sería necesario desproteger los grupos funcionales de los catecoles para que puedan quelatar Fe (III) y actuar como sideróforos.

CONCLUSIONES

En función dos obxectivos marcados e dos resultados obtidos, establécense as seguintes conclusións:

- Propúxose un análise retrosintético para a síntese do sideróforo análogo á amonabactina P750 unido covalentemente ao conector PEG-3, no que se seleccionaron tres subestruturas principais: unha subestrutura do sideróforo formada por unha lisina e un catecol (S-7), outra subestrutura do sideróforo formada por unha glicina, unha lisina e un catecol (S-12) e o conector, que contén tres unidades de etilenglicol (C-13).
- Logrouse sintetizar e caracterizar cada unha das subestruturas propostas e conectáronse con éxito para obter o sideróforo acoplado ao conector proposto (SC-16).
- Realizáronse catro probas de acoplamento entre os fragmentos do sideróforo e os polímeros a través do conector PEG-3, que resultaron infrutuosos.

Para conseguir os polímeros conxugados co sideróforo que é o obxectivo deste traballo, propónse realizar as probas de acoplamento noutras condicións co fragmento SC-16 e/ou outros polímeros funcionalizados. Ademais, unha vez sintetizados, sería necesario desprotexer os grupos funcionais dos catecoles para que poidan quelatar Fe (III) e actuar como sideróforos.

CONCLUSIONS

Based on the objectives set and the results obtained, the following conclusions are established:

- A retrosynthetic analysis was proposed for the synthesis of the siderophore analogue of amonabactin P750 covalently linked to the PEG-3 linker, in which three main substructures were selected: a siderophore substructure formed by a lysine and a catechol (S-7), another siderophore substructure consisting of a glycine, a lysine and a catechol (S-12) and the linker, which contains three ethylene glycol units (C-13).

- It was possible to synthesize and characterize each of the proposed substructures and they were successfully connected to obtain the siderophore coupled with the proposed linker (SC-16).
- Four coupling tests were carried out between the siderophore fragments and the polymers through the PEG-3 linker, which turned out to be unsuccessful.

In order to achieve the polymers conjugated with the siderophore that is the objective of this project, it is proposed to carry out the coupling tests under other conditions with the SC-16 fragment and/or other functionalized polymers. In addition, once synthesized, it would be necessary to deprotect the functional groups of the catechols so that they can chelate Fe (III) and act as siderophores.

6. PARTE EXPERIMENTAL

En este apartado se explica la metodología experimental llevada a cabo, así como el procedimiento y la caracterización llevado a cabo para cada uno de los compuestos sintetizados, cuyos espectros se muestran en el apartado ANEXO.

6.1. Métodos generales

Todas las reacciones que requirieron condiciones anhidras fueron realizadas bajo atmósfera de argón desoxigenado seco (Argón C-50). Los disolventes y las disoluciones fueron añadidas a través de jeringas. Aquellas reacciones que necesitaban baja temperatura (0 °C) se llevaron a cabo utilizando baños de hielo/ agua. Las reacciones de hidrogenación se realizaron bajo atmósfera de hidrógeno (H₂ Premier X50S) con agitación magnética y una leve presión de hidrógeno. En las ocasiones que se requiso energía de ultrasonidos se utilizó el equipo *Branson 3800*.

Los disolventes anhidros se obtuvieron mediante un sistema de purificación de disolventes MB sps-800 de M-BRAUN. Excepto la DMF seca que se empleó una versión comercial con 99,8% de pureza, extra seca AcroSeal™ de ACROS Organics™.

Se siguieron las reacciones mediante cromatografía en capa fina (CCF), empleando cromatoplasmas de gel de sílice *Merck 60 F254* y revelándolas por exposición a la luz UV (254 nm) o por la inmersión en una disolución de ácido fosfomolibdico (10% m/v en EtOH) o ninhidrina (1% m/v en EtOH) y posterior calentamiento.

Las cromatografías en columna se realizaron en columna de vidrio empleando como fase estacionaria gel de sílice (tamaño de partícula 40-60 μm , tamaño de poro 60 \AA) de ACROS OrganicsTM.

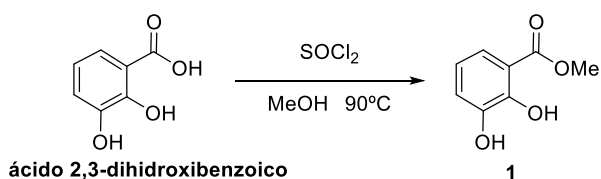
Los espectros obtenidos por resonancia magnética se obtuvieron de un espectrómetro *Bruker Avance 300* (300 MHz para ^1H y 75 MHz para ^{13}C) situado en el CICA (Centro de Investigaciones Científicas Avanzadas). Los disolventes deuterados empleados fueron: CDCl_3 (99.8% D) y CD_3OD (99.8% D).

Por otro lado, los espectros de masas electrospray (ESI) fueron realizados en un equipo *Qstar-QqTOF Tandem Hybrid System* con fuente de ESI de *Applied BioSystems*,

6.2. Procedimiento y caracterización

A continuación, se muestra el procedimiento experimental que se llevó a cabo y la caracterización de los compuestos sintetizados, donde los asteriscos sirven para indicar que las señales son intercambiables.

Síntesis de metil 2,3- dihidroxibenzoato (1)



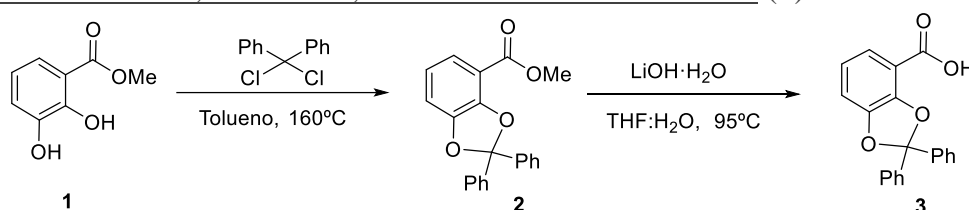
Se disolvieron 352.4 mg de ácido 2,3-dihidroxi benzoico (2.29 mmol) con 3.6 mL de MeOH. Después, mientras se enfriaba la disolución de color amarillento se añadieron 0.36 mL de cloruro de tionilo (4.60 mmol) bajo agitación, tornando en este momento la disolución a un color rosado. La mezcla se agitó bajo calentamiento a reflujo durante toda la noche, pudiéndose observar cómo adquirió un color anaranjado. Al día siguiente, la disolución se concentró a presión reducida, se redisolvió con 15 mL de AcOEt y se lavó con una disolución saturada de NaHCO_3 (2 x 15 mL). Se realizó una extracción con AcOEt de la fase acuosa (1x 15 mL) y las dos fases orgánicas resultantes se juntaron, se secaron con Na_2SO_4 anhidro y se filtraron a gravedad. Finalmente, el residuo se purificó concentrándose a presión reducida, obteniéndose 294.8 g del compuesto **1** (1.76 mmol, 90% de rendimiento) como un sólido cristalino de color marrón blanquecino.

¹H-RMN (CDCl₃), δ_H, ppm: 10.89 (s, OH, H-2), 7.37 (dd, *J* = 8.0, 1.5 Hz, H_{Ar}; H-6), 7.11 (dd, *J* = 8.0, 1.5 Hz, H_{Ar}; H-4), 6.80 (t, *J* = 8.0 Hz, H_{Ar}; H-5), 5.66 (s, OH, H-3), 3.96 (s, H₃C; OMe).

¹³C-RMN (CDCl₃), δ_C, ppm: 170.89 (CO, C-7), 148.86 (C_{Ar}-OH, C-2), 145.13 (C_{Ar}-OH, C-3), 120.68 (CH_{Ar}, C-4*), 120.02 (CH_{Ar}, C-6*), 119.33 (CH_{Ar}, C-5*), 112.50 (C_{Ar}, C-1), 52.54 (CH₃, OMe).

(-)-HR-ESIMS *m/z*: 167.0352 [M-H]⁻ (Calculada para C₈H₇O₄: 167.0350).

Síntesis del ácido 2,2-difenil-1,3-benzodioxol-4-carboxílico (3)



Se disolvieron 285 mg del compuesto 1 (1.69 mmol) en un balón previamente purgado con argón en 2 mL de tolueno y se adicionó 0.5 mL de diclorodifenilmetano (2.54 mmol), observándose un burbujeo. A continuación, se dejó la disolución de color amarillento bajo agitación y calentamiento con reflujo durante 3 horas. Transcurrido ese tiempo la disolución que adquirió un color marrón se concentró a presión reducida, se redisolvió en 10 mL de AcOEt y se lavó con una disolución saturada de NaHCO₃ (1 x 10 mL). Se realizó una extracción con AcOEt de la fase acuosa (1x 10 mL) y las dos fases orgánicas resultantes se lavaron con una disolución de NaCl saturada (1x 20 mL), se secaron con Na₂SO₄ anhidro y se filtraron a gravedad. Finalmente, el residuo se purificó concentrándose a presión reducida.

El producto oleoso de color marrón sintetizado en la etapa anterior se disolvió con 5 mL de THF bajo agitación y se adicionaron 750 mg de LiOH·H₂O (17.87 mmol) disueltos en 5 mL de H₂O. Después, la disolución de color marrón se dejó calentando con reflujo durante toda la noche. Al día siguiente, se observó un cambio de color a rojo intenso, se eliminó el THF a presión reducida, y la disolución resultante se acidificó con una disolución de HCl al 5% hasta pH 3, observándose la aparición de precipitado. Después se extrajo con AcOEt (3x 15 mL), comprobando que el pH se mantuviese ácido y se lavó la fase orgánica con una disolución saturada de NaCl (2x 30 mL). Por último, la fase orgánica se secó sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtró a gravedad y se concentró a presión

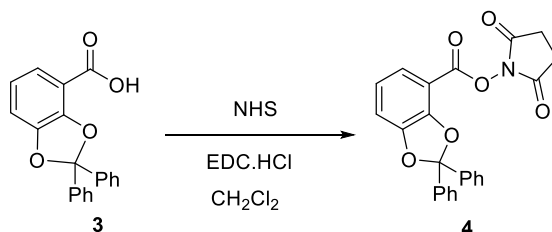
reducida obteniéndose un producto oleoso de color marrón. El residuo obtenido se purificó por columna de gel de sílice, fase móvil CH₂Cl₂/MeOH (5%), y se obtuvieron 267 mg del producto **3** (0.84 mmol) como un sólido amorfo amarillo.

¹H-RMN (CDCl₃), δ_H, ppm: 7.67 – 7.58 (m, 4x H_{Ar}), 7.48 (dd, *J* = 8.0, 1.1 Hz, H_{Ar}; H-6), 7.39 (dd, *J* = 5.1, 1.9 Hz, 6x H_{Ar}), 7.07 (dd, *J* = 8.0, 1.1 Hz, H_{Ar}; H-4), 6.89 (t, *J* = 8.0 Hz, H_{Ar}; H-5).

¹³C-RMN (CDCl₃), δ_C, ppm: 169.82 (CO, C-7), 148.94 (C_{Ar}-OH, C-2*), 148.52 (C_{Ar}-OH, C-3*), 139.72 (2x C_{Ar}), 129.49 (2x CH_{Ar}), 128.49 (4x CH_{Ar}), 126.56 (4x CH_{Ar}), 123.42 (CH_{Ar}, C-4), 121.47 (CH_{Ar}, C-6), 118.42 (C (4°); C-8), 113.34 (CH_{Ar}, C-5), 112.21 (C_{Ar}, C-1).

(-)-HR-ESIMS *m/z*: 317.0820 [M-H]⁻ (Calculada para C₂₀H₁₃O₄: 317.0819), 635.1714 [2M-H]⁻ (Calculada para C₄₀H₂₅O₈: 635.1712).

Síntesis del ácido 2,2-difenil-1,3-benzodioxol-4-carboxílico de 2,5-dioxopirrolidina (**4**)



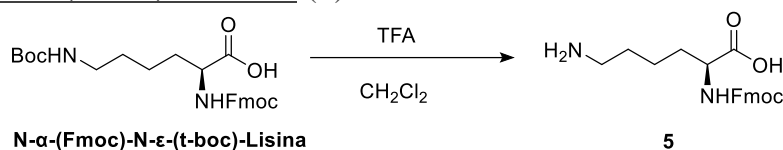
Se disolvieron 259 mg del compuesto **3** (0.81 mmol) en un balón previamente purgado con argón con 8 mL de CH₂Cl₂ anhidro. Sobre esta disolución se añadieron 190 mg de NHS (1.65 mmol) y 240 mg de EDC·HCl (1.25 mmol), obteniéndose una disolución transparente de color amarillo que se dejó agitando a temperatura ambiente durante toda la noche bajo atmósfera de argón. Al día siguiente, la disolución se lavó con HCl 0.1 M (2x 10 mL), con una disolución concentrada de NaHCO₃ (1x 20 mL) y con una disolución saturada de NaCl (1x 20 mL). Tras los lavados la fase orgánica se secó sobre Na₂SO₄ anhidro y se filtró a gravedad. Finalmente, el residuo se purificó concentrándose a presión reducida, obteniéndose 360 mg del compuesto **4** (0.86 mmol) con aspecto de espuma de color amarillo.

¹H-RMN (CDCl₃), δ_H, ppm: 7.64-7.55 (m, 4x H_{Ar}), 7.49 (dd, *J* = 8.0, 1.0 Hz, H_{Ar}; H-6), 7.38 (dd, *J* = 5.1, 1.7 Hz, 6x H_{Ar}), 7.11 (dd, *J* = 8.0, 1.0 Hz, H_{Ar}; H-4), 6.91 (t, *J* = 8.0 Hz, H_{Ar}; H-5), 2.90 (s, 2x H₂C; NHS).

¹³C-RMN (CDCl₃), δ_C, ppm: 169.31 (2x CO, NHS), 159.85 (CO, C-7), 149.55 (C_{Ar}-OH, C-2*), 148.68 (C_{Ar}-OH, C-3*), 139.39 (2x C_{Ar}), 129.59 (2x CH_{Ar}), 128.51 (4x CH_{Ar}), 126.49 (4x CH_{Ar}), 123.00 (CH_{Ar}, C-4), 121.84 (CH_{Ar}, C-6), 119.06 (C (4°); C-8), 114.26 (CH_{Ar}, C-5), 107.67 (C_{Ar}, C-1), 25.83 (2x CH₂, NHS).

(+)-HR-ESIMS *m/z*: 416.1131 [M+H]⁺ (Calculada para C₂₄H₁₈NO₆: 416.1129), 438.0951 [M+Na]⁺ (Calculada para C₂₄H₁₇NNaO₆: 438.0948).

Síntesis del N-α-(Fmoc)-L-Lisina (**5**).



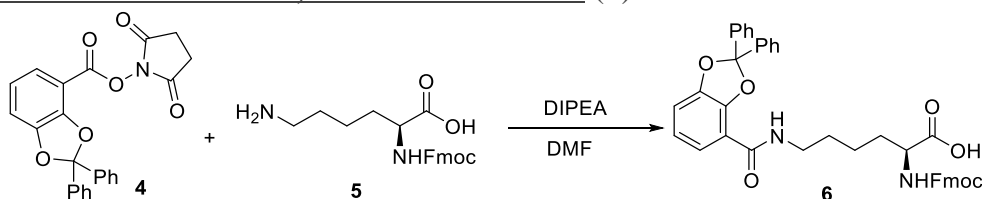
Se disolvieron 649 mg del compuesto *N*-α-(Fmoc)-N-ε-(t-boc)-Lisina (1.39 mmol) en 4 mL de CH₂Cl₂, se añadió 1 mL de TFA y la disolución transparente amarillenta resultante se dejó bajo agitación durante 3.5 horas. Transcurrido ese tiempo se concentró a presión reducida, se resuspendió en éter y se repitió este proceso tres veces para eliminar el TFA, después se disolvió en MeOH y se concentró a presión de reducida de nuevo otras 3 veces, obteniéndose finalmente 632 mg del compuesto **5** (1.36 mmol, 98% de rendimiento) con aspecto de espuma blanquecina.

¹H-RMN (CD₃OD), δ_H, ppm: 7.80 (d, *J* = 7.3 Hz, 2x H_{Ar}; Fmoc), 7.69 (d, *J* = 7.3 Hz, H_{Ar}; Fmoc), 7.66 (d, *J* = 7.3 Hz, H_{Ar}; Fmoc), 7.40 (t, *J* = 7.3 Hz, 2x H_{Ar}; Fmoc), 7.31 (t, *J* = 7.3 Hz, 2x H_{Ar}; Fmoc), 4.48 – 4.29 (m, H₂C; Fmoc), 4.24 (d, *J* = 6.8 Hz, HC; Fmoc), 4.18 (dt, *J* = 9.4, 4.9 Hz, HC; Lys- α), 2.92 (t, *J* = 7.3 Hz, H₂C; Lys- ε), 1.98 – 1.84 (m, H₂C; Lys- β*), 1.80 – 1.60 (m, H₂C; Lys- δ*), 1.56 – 1.43 (m, H₂C; Lys-γ).

¹³C-RMN (CD₃OD), δ_C, ppm: 175.65 (CO, Lys), 158.72 (CO, Fmoc), 145.10 (2x C_{Ar}, Fmoc), 142.55 (2x C_{Ar}, Fmoc), 128.77 (2x CH_{Ar}, Fmoc), 128.14 (CH_{Ar}, Fmoc), 128.12 (CH_{Ar}, Fmoc), 126.21 (CH_{Ar}, Fmoc), 126.16 (CH_{Ar}, Fmoc), 120.91 (2x CH_{Ar}, Fmoc), 67.91 (CH₂, Fmoc), 54.94 (CH, Lys-α), 48.55 (CH, Fmoc), 40.46 (CH₂, Lys-ε), 32.10 (CH₂, Lys-β), 27.97 (CH₂, Lys-δ), 23.84 (CH₂, Lys-γ).

(+)-HR-ESIMS *m/z*: 369.1809 [M+H]⁺ (Calculada para C₂₁H₂₅N₂O₄: 369.1809), 391.1627 [M+Na]⁺ (Calculada para C₂₁H₂₄N₂NaO₄: 391.1628) 759.3367 [2M+Na]⁺ (Calculada para C₄₂H₄₈N₄NaO₈:759.3364).

Síntesis del ácido (S)-N2-(N2-(9H-Fluoren-9-ylmethoxy)-N6-(2,2-difenil-1,3-benzodioxol-4-carboxilato)-L-lisina-metanoico (6).



Se disolvieron 400 mg del compuesto **4** (0.96 mmol) y 390 mg del compuesto **5** (1.06 mmol), en un balón previamente purgado, con 4 mL de DMF anhidra. A continuación, se añadieron 0.4 mL de DIPEA y la disolución de color dorado se dejó bajo agitación durante toda la noche. Al día siguiente, se eliminó el DMF a presión reducida sin calentar y se acidificó con HCl 0.1M, observándose la aparición de una gran cantidad de precipitado. Después, se extrajo con AcOEt (3x 10 mL), comprobando que el pH se mantuviese ácido y se lavó la fase orgánica con HCl 0.1 M (2x 20 mL) y una disolución saturada de NaCl (2x 20 mL). Por último, la fase orgánica se secó sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtró a gravedad y se concentró a presión reducida, obteniéndose 582 mg del producto **6** con aspecto espumoso color ocre (0.87mmol, 90 % de rendimiento).

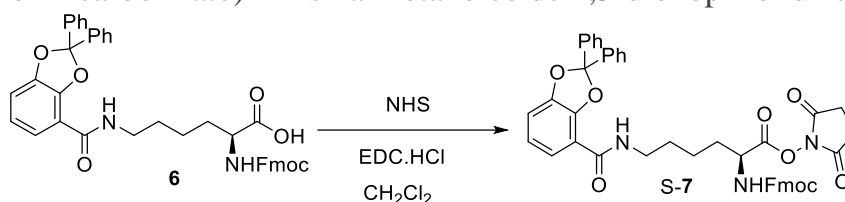
¹H-RMN (CDCl₃), δ_H, ppm: 7.73 (d, *J* = 7.5 Hz, 2x H_{Ar}), 7.61 – 7.48 (m, 7x H_{Ar}), 7.44 – 7.37 (m, 6x H_{Ar}), 7.34 (d, *J* = 7.7 Hz, 2x H_{Ar}), 7.26 – 7.20 (m, 2x H_{Ar}), 6.99 ((dd, *J* = 7.7, 1.1 Hz, H_{Ar}; H-11), 6.88 (t, *J* = 7.7 Hz, H_{Ar}; H-12), 5.75 (d, *J* = 7.7 Hz, H_N; Fmoc), 5.43 (bs, H_N; Lys), 4.50 – 4.24 (m, H_C y H_{2C}; Fmoc), 4.16 (t, *J* = 6.7 Hz, H_C; Lys- α), 3.57-3.46 (m, H_{2C}; Lys- ε), 1.90 (m, H_{2C}; Lys- β), 1.66 (p, *J* = 6.7 Hz, H_{2C}; Lys- δ), 1.58- 1.40 (m, H_{2C}; Lys-γ).

¹³C-RMN (CDCl₃), δ_C, ppm: 175.07 (CO, Lys), 164.40 (CO, C-1), 156.42 (CO, Fmoc), 147.31 (C_{Ar}-O, C-9*), 144.88 (C_{Ar}-O, C-10*), 143.90 (2x C_{Ar}, Fmoc), 141.38 (2x C_{Ar}, Fmoc), 139.10 (2x C_{Ar}), 129.88 (2x CH_{Ar}), 128.65 (4x CH_{Ar}), 127.80 (2x CH_{Ar}), 127.21 (2x CH_{Ar}, Fmoc), 126.53 (4x CH_{Ar}), 125.30 (2x CH_{Ar}, Fmoc), 122.66 (CH_{Ar}, C-13*), 122.33 (CH_{Ar}, C-11*), 120.05 (2x CH_{Ar}, Fmoc), 118.44 (C (4°); C-14), 115.60 (C_{Ar}, C-8), 112.08 (CH_{Ar}, C-12), 67.21 (CH₂, Fmoc), 53.82 (CH, Lys-α), 47.25 (CH, Fmoc), 39.47 (CH₂, Lys-ε), 31.75 (CH₂, Lys-β), 29.52 (CH₂, Lys-δ), 22.50 (CH₂, Lys-γ).

(+)-HR-ESIMS *m/z*: 669.2601 [M+H]⁺ (Calculada para C₄₁H₃₇N₂O₇: 669.2595), 691.2419 [M+Na]⁺ (Calculada para C₄₁H₃₆N₂NaO₇: 691.2415), 1359.4979 [2M+Na]⁺ (Calculada para C₈₂H₇₂N₄NaO₁₄: 1359.4938).

(-)-HR-ESIMS *m/z*: 667.2453 [M-H]⁻ (Calculada para C₄₁H₃₅N₂O₇: 667.2450).

Síntesis del ácido (S)-N2-(N2-(9H-fluoren-9-ylmethoxy)-N6-(2,2-difenil-1,3-benzodioxol-4-carboxilato)-L-lisina-metanoico de 2,5-dioxopirrolidina (S-7).



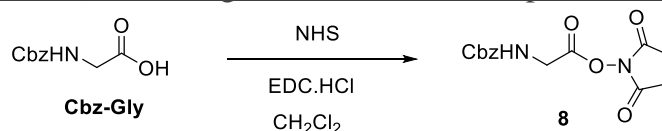
Se disolvieron 450 mg del compuesto **6** (0.67 mmol) en un balón previamente purgado con argón con 8 mL de CH₂Cl₂ anhidro. Sobre esta suspensión se añadieron 155 mg de NHS (1.35 mmol) y 195 mg de EDC·HCl (1.03 mmol), observándose en ese momento cómo se disolvió todo el soluto y se obtuvo una disolución con subtono dorado que se dejó agitando a temperatura ambiente durante toda la noche bajo atmósfera de argón. Al día siguiente, la disolución se lavó con HCl 0,1 M (2x 10 mL), con una disolución diluida de NaHCO₃ (1x 20 mL) y con una disolución saturada de NaCl (1x 20 mL). Tras los lavados la fase orgánica se secó sobre Na₂SO₄ anhidro y se filtró a gravedad. Finalmente, el residuo se purificó concentrándose a presión reducida, obteniéndose 502 mg del compuesto S-7 (0.65 mmol, 97% de rendimiento) con aspecto espumoso color blanquecino.

¹H-RMN (CDCl₃), δ_H, ppm: 7.79 – 7.68 (m, 2x H_{Ar}), 7.64 – 7.49 (m, 6x H_{Ar}), 7.43 – 7.32 (m, 8x H_{Ar}), 7.29 (d, *J* = 6.9 Hz, 2x H_{Ar}), 7.24 – 7.18 (m, H_{Ar}), 7.07 – 6.95 (m, H_{Ar}; H-11), 6.95 – 6.83 (m, H_{Ar}; H-12), 5.61 (d, *J* = 8.0 Hz, H_N; Fmoc), 4.70 (q, *J* = 6.0 Hz, H_C; Fmoc), 4.49 – 4.31 (m, H₂C; Fmoc), 4.28 – 4.18 (m, H_C; Lys- α), 3.62 – 3.41 (m, H₂C; Lys- ε), 2.76 (s, 2x H₂C; NHS), 2.09 – 1.91 (m, H₂C; Lys- β*), 1.76 – 1.61 (m, H₂C; Lys-γ y H₂C; Lys- δ*).

¹³C-RMN (CDCl₃), δ_C, ppm: 168.63 (2x CO, NHS), 168.34 (CO, Lys), 164.09 (CO, C-1), 155.86 (CO, Fmoc), 147.26 (C_{Ar}-O, C-9), 144.81 (C_{Ar}-O, C-10), 143.98 (2x C_{Ar}, Fmoc), 141.41 (2x C_{Ar}, Fmoc), 139.24 (2x C_{Ar}), 129.82 (2x CH_{Ar}), 128.62 (4x CH_{Ar}), 127.83 (2x CH_{Ar}), 127.24 (2x CH_{Ar}, Fmoc), 126.54 (4x CH_{Ar}), 125.28 (2x CH_{Ar}, Fmoc), 122.75 (CH_{Ar}, C-13*), 122.21 (CH_{Ar}, C-11*), 120.07 (2x CH_{Ar}, Fmoc), 118.24 (C (4°); C-14), 116.02 (C_{Ar}, C-8), 111.83 (CH_{Ar}, C-12), 67.43 (CH₂, Fmoc), 52.41 (CH, Lys-α), 47.24 (CH, Fmoc), 39.04 (CH₂, Lys-ε), 31.83 (CH₂, Lys-β), 29.47 (CH₂, Lys-δ), 25.65 (2x CH₂, NHS), 22.13 (CH₂, Lys-γ).

(+)-**HR-ESIMS** m/z : 788.2585 $[M+Na]^+$ (Calculada para $C_{45}H_{39}N_3NaO_9$: 788.2579), 1553.5287 $[2M+Na]^+$ (Calculada para $C_{90}H_{78}N_6NaO_{18}$: 1553.5265).

Síntesis de ((benciloxi)carbonil)glicinato de 2,5-dioxopirrolidina (**8**)



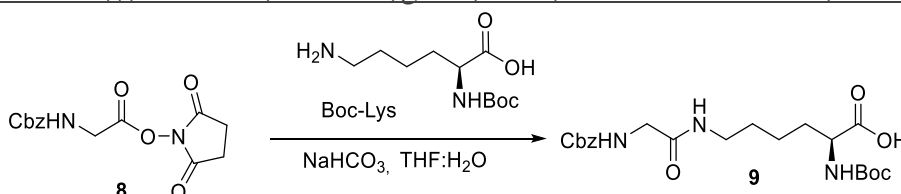
Se disolvió 1 g de Cbz-Gly (4.78 mmol) en 15 mL de CH_2Cl_2 anhidro en un balón previamente flameado y purgado con argón. Sobre esta suspensión se añadieron 1.10 g de NHS (9.56 mmol) y 1.37 mg de EDC·HCl (7.17 mmol), obteniéndose una disolución con subtono dorado que se dejó agitando a temperatura ambiente durante toda la noche bajo atmósfera de argón. Al día siguiente, la disolución se lavó con HCl 0,05 M (2x 15 mL), con una disolución diluida de $NaHCO_3$ (2x 15 mL) y con una disolución saturada de NaCl (1x 15 mL). Tras los lavados, la fase orgánica se secó sobre $MgSO_4$ anhidro y se filtró a gravedad. Finalmente, el residuo se concentró a presión reducida, obteniéndose 1.4 g del compuesto **8** (4.58 mmol, 95% de rendimiento) como un sólido blanco.

1H -RMN ($CDCl_3$), δ_H , ppm: 7.43 – 7.28 (m, 5x H_{Ar} , Cbz), 5.22 (s, H_N ; Gly), 5.15 (s, H_2C ; Cbz), 4.37 (d, $J = 5.9$ Hz, H_2C ; Gly), 2.85 (s, H_2C ; NHS).

^{13}C -RMN ($CDCl_3$), δ_C , ppm: 168.75 (2x CO, NHS), 166.10 (CO, Gly), 156.12 (CO, Cbz), 136.03 (C_{Ar} , Cbz), 128.71 (2x CH_{Ar} , Cbz), 128.46 (CH_{Ar} , Cbz), 128.35 (2x CH_{Ar} , Cbz), 67.63 (CH_2 , Cbz), 40.76 (CH_2 , Gly), 25.67 (2x CH_2 , NHS).

(+)-**HR-ESIMS** m/z : 329.0745 $[M+Na]^+$ (Calculada para $C_{14}H_{14}N_2NaO_6$: 329.0750), 635.1600 $[2M+Na]^+$ (Calculada para $C_{28}H_{28}N_4NaO_{12}$: 635.1596).

Síntesis de *N*6-(((benciloxi)carbonil)glicil)-*N*2-(terc-butoxicarbonil)-*L*-lisina (**9**)



Se disolvieron 1.39 g del compuesto **8** (4.55 mmol) en 6 mL de THF, obteniéndose una disolución completamente transparente. Sobre esta disolución se añadieron 0.59 g de $NaHCO_3$ (6.83 mmol) y 1.18 g de N_α -Boc-L-lisina (4.78 mmol) disueltos en 7 mL de

H₂O. La disolución de color amarillento (con una sola fase) se dejó agitando a temperatura ambiente durante toda la noche. Al día siguiente, se eliminó el THF a presión reducida sin calentar, y la disolución resultante se acidificó con HCl 0,1 M hasta pH 3, observándose la aparición de precipitado. Después se extrajo con AcOEt (15 mL), comprobando que el pH se mantuviese ácido y se lavó la fase orgánica con HCl 0.1 M (30 mL) y una disolución saturada de NaCl (30 mL). Por último, la fase orgánica se secó sobre MgSO₄ anhidro, se filtró a gravedad y se concentró a presión reducida, obteniéndose 1.8 g del producto **9** (4.12 mmol, 92% de rendimiento) como un sólido blanco.

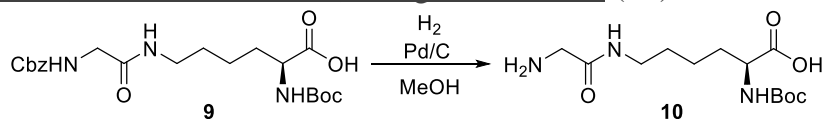
¹H-RMN (CDCl₃), δ_H, ppm: 7.32 (s, 5x H_{Ar}), 6.72 (s, H_N; Lys), 6.05 (s, H_N; Cbz), 5.41 (s, H_N; Boc), 5.10 (s, H₂C; Cbz), 4.22 (s, H_C; Lys-α), 3.83 (d, *J* = 5.9 Hz, H₂C; Gly), 3.21 (q, *J* = 5.9 Hz, H₂C; Lys-ε), 1.85- 1.58 (m, H₂C; Lys-β*), 1.58- 1.28 (m, 13H, H₂C; Lys-γ, H₂C; Lys-δ* y 3x H₃C; Boc).

¹³C-RMN (CDCl₃), δ_C, ppm: 175.51 (CO, Lys), 170.09 (CO, Gly), 157.14 (CO, Cbz), 156.00 (CO, Boc), 136.21 (C_{Ar}, Cbz), 128.68 (2x CH_{Ar}, Cbz), 128.40 (CH_{Ar}, Cbz), 128.22 (2x CH_{Ar}, Cbz), 80.27 (C, Boc), 67.40 (CH₂, Cbz), 53.39 (CH, Lys-α), 44.57 (CH₂, Gly), 39.19 (CH₂, Lys-ε), 31.85 (CH₂, Lys-β), 28.65 (CH₂, Lys-δ), 28.46 (3x CH₃, Boc), 22.32 (CH₂, Lys-γ).

(+)-HR-ESIMS *m/z*: 460.2045 [M+Na]⁺ (Calculada para C₂₁H₃₁N₃NaO₇: 460.2060), 897.4210 [2M+Na]⁺ (Calculada para C₄₂H₆₂N₆NaO₁₄: 897.4216).

(-)-HR-ESIMS *m/z*: 436.2096 [M-H]⁻ (Calculada para C₂₁H₃₀N₃O₇: 436.2089), 873.4262 [2M-H]⁻ (Calculada para C₄₂H₆₁N₆O₁₄: 873.4251).

Síntesis de *N*2-(*terc*-butoxicarbonil)-*N*6-glicil-L-lisina (**10**)



Se disolvieron 1.12 g del compuesto **9** (2.56 mmol) en 25 mL de MeOH (grado HPLC) en atmosfera inerte. Después, se añadió una cantidad catalítica de paladio sobre carbón activo al 10% (120 mg), manteniendo la atmósfera inerte y se adicionó H₂. La disolución de color negro se agitó bajo atmósfera de H₂ y a temperatura ambiente durante toda la noche. Al día siguiente se filtró a través de celita y se concentró a presión reducida,

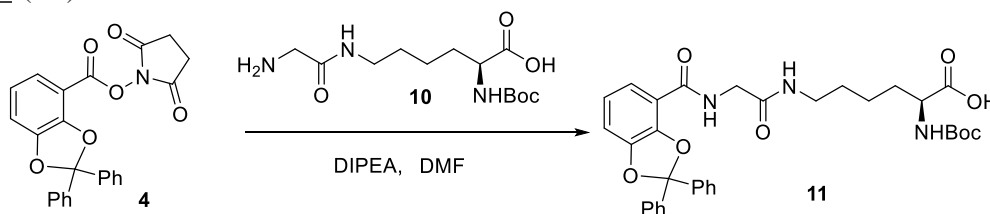
obteniéndose 734.3 mg (2.42 mmol, 95% de rendimiento) del compuesto **10** de aspecto cristalino blanco.

¹H-RMN (CD₃OD), δ_H, ppm: 3.99 (t, *J* = 6.1 Hz, HC; Lys-α), 3.63 (s, H₂C; Gly), 3.27 (t, *J* = 6.5 Hz, H₂C; Lys-ε), 1.84 – 1.62 (m, H₂C; Lys-β*), 1.62 – 1.50 (m, H₂C; Lys-δ*), 1.46 (s, 3x H₃C; Boc), 1.44 – 1.30 (m, H₂C; Lys-γ).

¹³C-RMN (MeOD), δ_C, ppm: 179.00 (CO, Lys), 167.41 (CO, Gly), 157.69 (CO, Boc), 80.08 (C (4°), Boc), 56.68 (CH, Lys-α), 41.58 (CH₂, Gly), 40.29 (CH₂, Lys-ε), 33.58 (CH₂, Lys-β), 29.86 (CH₂, Lys-δ), 28.77 (3x CH₃, Boc), 23.83 (CH₂, Lys-γ).

(+)-HR-ESIMS *m/z*: 304.1871 [M+H]⁺ (Calculada para C₁₃H₂₆N₄O₅: 304.1867), 326.1686 [M+Na]⁺ (Calculada para C₁₃H₂₅N₄NaO₅: 326.1686), 607.3671 [2M+H]⁺ (Calculada para C₂₆H₅₁N₈O₁₀: 607.3665).

Síntesis de N2-(terc-butoxicarbonil)-N6-((2,2-difenil-1,3-benzodioxol)glicil)-L-lisina (**11**)



Se disolvieron 553 mg de 2,2-difenil-1,3-benzodioxol-4-carboxilato de 2,5-dioxopirrolidina (1.33 mmol) y 598 mg del compuesto **4** (1.97 mmol), en un balón previamente purgado, con 6.5 mL de DMF anhidra. A continuación, se añadieron 600 μl de DIPEA y la disolución se dejó bajo agitación durante toda la noche. Al día siguiente, se eliminó el DMF a presión reducida sin calentar y se acidificó con HCl 0.1M, observándose la aparición de una gran cantidad de precipitado. Después, se extrajo con AcOEt (3x 15 mL), comprobando que el pH se mantuviese ácido y se lavó la fase orgánica con HCl 0.1 M (2x 30 mL) y una disolución saturada de NaCl (2x 30 mL). Por último, la fase orgánica se secó sobre MgSO₄ anhidro, se filtró a gravedad y se concentró a presión reducida, obteniéndose 748 mg del producto **11** con aspecto espumoso color ocre (1.26 mmol, 94% de rendimiento).

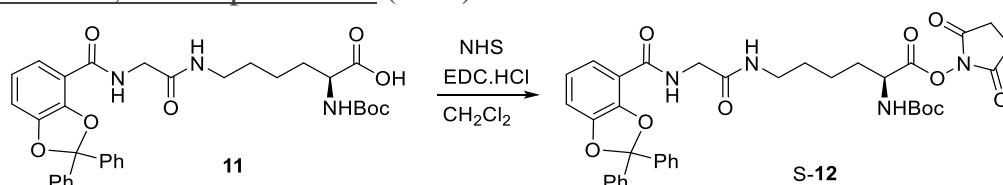
¹H-RMN (CDCl₃), δ_H, ppm 8.03 (t, *J* = 5.1 Hz, HN; Lys*), 7.62 (dd, *J* = 5.2, 5.9, 4x H_{Ar}), 7.52 (dd, *J* = 7.9, 1.3 Hz, H_{Ar}; H-15), 7.43-7.33 (m, 6x H_{Ar}), 7.03 (dd, *J* = 7.9, 1.3 Hz, H_{Ar}; H-13), 6.92 (t, *J* = 7.9 Hz, H_{Ar}; H-14), 6.66 (t, *J* = 5.1 Hz, HN; Gly*), 5.27 (s, HN; Boc), 4.35-4.22 (m, HC; Lys-α), 4.19 (d, *J* = 5.1 Hz, H₂C; Gly), 3.30 (q, *J* = 6.4 Hz, H₂C;

Lys- ϵ), 1.77 – 1.66 (m, $\underline{\text{H}}_2\text{C}$; Lys- β^*), 1.69 – 1.50 (m, $\underline{\text{H}}_2\text{C}$; Lys- δ^*), 1.42 (s, $\underline{\text{H}}_2\text{C}$; Lys- γ y 3x $\underline{\text{H}}_3\text{C}$; Boc).

^{13}C -RMN (CDCl_3), δ_{C} , ppm: 175.38 (CO, Lys), 169.16 (CO, C-9), 164.43 (CO, Gly), 155.90 (CO, Boc), 147.54 ($\text{C}_{\text{Ar}}\text{-O}$), 145.40 ($\text{C}_{\text{Ar}}\text{-O}$), 139.36 (2x C_{Ar}), 129.65 (2x CH_{Ar}), 128.62 (4x CH_{Ar}), 126.39 (4x CH_{Ar}), 122.25 (CH_{Ar} , C-15*), 122.15 (CH_{Ar} , C-13*), 118.72 (C (4°); C-8), 114.91 (C_{Ar} , C-10) 112.27 (CH_{Ar} , C-14), 80.12 (C, Boc), 43.89 (CH_2 , Gly), 39.34 (CH_2 , Lys- ϵ), 31.89 (CH_2 , Lys- β), 28.68 (CH_2 , Lys- δ), 28.44 (3x CH_3 , Boc), 22.41 (CH_2 , Lys- γ).

(-)-HR-ESIMS m/z : 602.2513 [M-H] $^-$ (Calculada para $\text{C}_{33}\text{H}_{36}\text{N}_3\text{O}_8$: 602.2508), 1205.5105 [2M-H] $^-$ (Calculada para $\text{C}_{66}\text{H}_{71}\text{N}_6\text{O}_{16}$: 1205.5094).

Síntesis de N 2-(terc-butoxicarbonil)- N 6-((2,2-difenil-1,3-benzodioxol)glicil)-L-lisinato de 2,5-dioxopirrolidina (S-12).



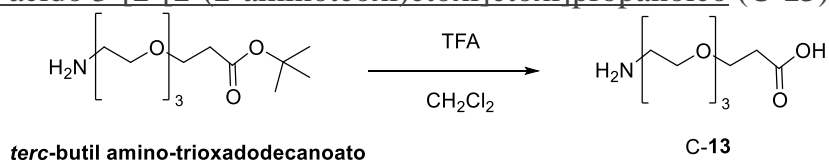
Se disolvieron 975 mg del compuesto **11** (1.62 mmol), en 15 mL de CH_2Cl_2 anhidro en un balón previamente purgado con argón y flameado. Sobre esta suspensión se añadieron 372 mg de NHS (3.23 mmol) y 465 mg de EDC·HCl (2.42 mmol), observándose en ese momento cómo se disolvió todo el soluto y se dejó la disolución resultante agitando a temperatura ambiente, durante toda la noche, bajo atmósfera de argón. Al día siguiente, la disolución se lavó con HCl 0.05 M (2x 15 mL), con una disolución diluida de NaHCO_3 (2x 15 mL) y con una disolución saturada de NaCl (1x 15 mL). Tras los lavados, la fase orgánica de color dorado se secó sobre MgSO_4 anhidro y se filtró a gravedad. Finalmente, el residuo se purificó concentrándose a presión reducida, obteniéndose 1.01 mg del compuesto S-12 (1.58 mmol, 97% de rendimiento) con aspecto espumoso color caramelo.

^1H -RMN (CDCl_3), δ_{H} , ppm: 7.97 (t, $J = 3.6$ Hz HN; Lys*), 7.63 (dd, $J = 5.7, 2.2$ Hz, 4x $\underline{\text{H}}_{\text{Ar}}$), 7.55 (dd, $J = 7.9, 1.3$ Hz, $\underline{\text{H}}_{\text{Ar}}$; H-15), 7.40 (dd, $J = 5.7, 2.2$ Hz, 6x $\underline{\text{H}}_{\text{Ar}}$), 7.03 (dd, $J = 7.9, 1.3$ Hz, $\underline{\text{H}}_{\text{Ar}}$; H-13), 6.93 (t, $J = 7.9$ Hz, $\underline{\text{H}}_{\text{Ar}}$; H-14), 6.43 (t, $J = 3.6$ Hz, $\underline{\text{H}}_{\text{N}}$; Gly*), 5.15 (d, $J = 8.4$ Hz, $\underline{\text{H}}_{\text{N}}$; Boc), 4.75- 4.65 (m, $\underline{\text{H}}_{\text{C}}$; Lys- α), 4.17 (t, $J = 3.6$, $\underline{\text{H}}_2\text{C}$; Gly), 3.41- 3.28 (m, $\underline{\text{H}}_2\text{C}$; Lys- ϵ), 2.75 (s, 2x $\underline{\text{H}}_2\text{C}$; NHS), 1.91– 1.56 (m, $\underline{\text{H}}_2\text{C}$; Lys- δ , $\underline{\text{H}}_2\text{C}$; Lys- β , $\underline{\text{H}}_2\text{C}$; Lys- γ), 1.45 (s, 3x $\underline{\text{H}}_3\text{C}$; Boc).

¹³C-RMN (CDCl₃), δ_c, ppm: 172.23 (CO, Lys), 169.03 (2x CO, NHS), 168.49 (CO, C-9), 163.98 (CO, Gly), 154.95 (CO, Boc), 147.49 (C_{Ar}-O), 145.29 (C_{Ar}-O), 139.41 (2x C_{Ar}), 129.64 (2x CH_{Ar}), 128.61 (4x CH_{Ar}), 126.41 (4x CH_{Ar}), 122.34 (CH_{Ar}, C-15*), 122.11 (CH_{Ar}, C-13*), 118.55 (C (4°); C-16), 115.26 (C_{Ar}, C-10) 112.08 (CH_{Ar}, C-14), 80.71 (C, Boc), 52.00 (CH, Lys-α), 43.79 (CH₂, Gly), 38.82 (CH₂, Lys-ε), 32.21 (CH₂, Lys-β), 28.62 (CH₂, Lys-δ), 28.38 (3x CH₃, Boc), 25.64 (2x CH₂, NHS), 21.67 (CH₂, Lys-γ).

(+)-HR-ESIMS *m/z*: 723.2641 [M+Na]⁺ (Calculada para C₃₇H₄₀N₄NaO₁₀: 723.2637), 1423.5418 [2M+Na]⁺ (Calculada para C₇₄H₈₀N₈NaO₂₀: 1423.5385).

Síntesis de ácido 3-[2-[2-(2-aminoteoxi)etoxi]etoxi]propanoico (C-13).



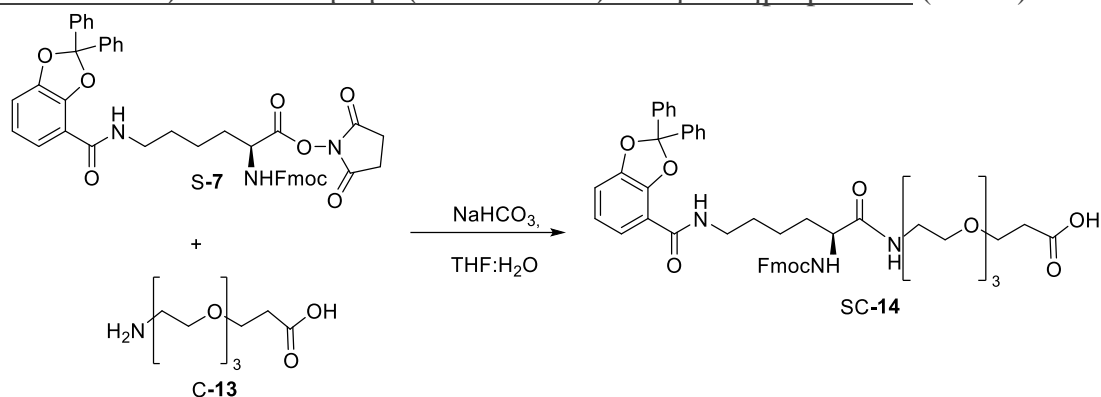
Se disolvieron 250 mg de 1,1-dimetiletil 3-[2-[2-(2-aminoetoxi)etoxi]etoxi]propanoato de *tert*-butilo (0.86 mmol) en 4 mL de CH₂Cl₂, se añadió 1 mL de TFA y la disolución resultante de color amarillento se dejó bajo agitación durante toda la noche. Transcurrido ese tiempo se concentró a presión reducida y se redisolvió en CH₂Cl₂ tres veces para eliminar el TFA, obteniéndose 270 mg del compuesto C-13 (0.85 mmol, 99% de rendimiento) como un sólido amorfo blanco.

¹H-RMN (CDCl₃), δ_H, ppm: 8.75 (bs, NH₃*), 7.57 (bs, OH*), 3.80- 3.71 (m, 2x H₂C; H-3, H-8), 3.71- 3.59 (m, 4x H₂C; C-4, C-5, C-6, C-7), 3.21 (s, H₂C; H-9), 2,59 (t, *J* =5.5 Hz, H₂C; H-2).

¹³C-RMN (CDCl₃), δ_c, ppm: 175.77 (CO; C-1), 70.23 (CH₂, C-8), 70.04 (CH₂, C-5*), 69.91 (2x CH₂, C-6*, C-7*), 66.76 (CH₂, C-4*), 66.61 (CH₂, C-3), 39.94 (CH₂, C-9), 34.91 (CH₂, C-2).

(+)-HR-ESIMS *m/z*: 222.1336 [M+H]⁺ (Calculada para C₉H₂₀NO₅: 222.1341), 244.1155 [M+Na]⁺ (Calculada para C₉H₁₉NNaO₅: 244.1161).

Síntesis de (S)-N2-(N2-(9H-fluoren-9-ylmethoxy)-N6-(2,2-difenil-1,3- benzodioxol-4-carboxilato)-L-lisina 3-[2-[2-(2-aminoteoxi)etoxi]etoxi]propanoico (SC-14)



Se disolvieron 500 mg del compuesto S-7 sin purificar (0.65 mmol) y 271 mg del compuesto C-13 (0.85 mmol) en 6 mL de THF. Se añadieron 82 mg de NaHCO₃ (0.98 mmol) disueltos en 6 mL de H₂O y la disolución de color amarillo se dejó bajo agitación durante toda la noche. Al día siguiente, se eliminó el THF a presión reducida, se diluyó la disolución con H₂O y se acidificó con HCl 0.1M. Después, se extrajo con AcOEt (3x 15 mL), comprobando que el pH se mantuviese ácido y se lavó la fase orgánica con HCl 0.1 M (2x 30 mL) y una disolución saturada de NaCl (2x 30 mL). Por último, la fase orgánica se secó sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtró a gravedad y se concentró a presión reducida, obteniéndose 444 mg del producto SC-14 (0.51 mmol, 75% de rendimiento) de aspecto espumoso color caramelo.

¹H-RMN (CDCl₃), δ_H, ppm: 7.77 (d, *J* = 7.5 Hz, 2x H_{Ar}), 7.68 (m, H_{Ar}), 7.62- 7.64 (m, H_{Ar}), 7.60 (m, H_{Ar}), 7.58- 7.50 (m, 5x H_{Ar}), 7.48- 7.36 (m, 9x H_{Ar}), 7.32 (m, 2x H_{Ar}), 7.23 (m, H_{Ar}), 7.02 (d, *J* = 7.7 Hz, H_{Ar}; H-11), 6.92 (t, *J* = 7.7 Hz, H_{Ar}; H-12), 6.11 (d, *J* = 8.0 Hz, H_N; Lys), 4.36 (d, *J* = 7.0 Hz, H₂C; Fmoc y H_C; Fmoc), 4.20 (t, *J* = 7.2 Hz, H_C; Lys-α), 3.75 – 3.64 (m, 2x H₂C; linker - β, linker -η), 3.64- 3.50 (m, 5x H₂C; linker-δ, linker -ε, linker -γ, linker -ζ y linker - θ), 3.47- 3.30 (m, H₂C; Lys- ε), 1.66- 2.47 (m, H₂C; linker-α), 1.68 (p, *J* = 7.2 Hz, H₂C; Lys- δ), 1.55- 1.43 (m, H₂C; Lys- β), 1.40- 1.22 (m, H₂C; Lys-γ).

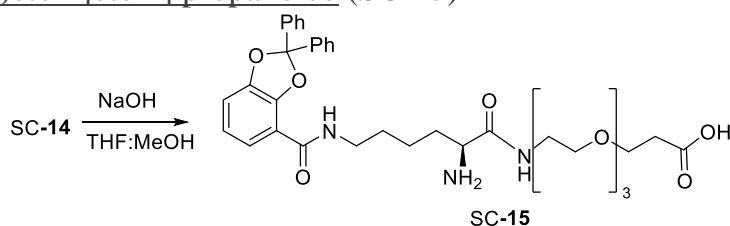
¹³C-RMN (CDCl₃), δ_C, ppm: 147.3 (2x C_{Ar}-O, C-3, C-4), 144.86 (2x C_{Ar}, Fmoc), 143.93 (C_{Ar}, Fmoc), 141.39 (C_{Ar}, Fmoc), 139.14 (2x C_{Ar}), 129.83 (2x CH_{Ar}), 128.64 (4x CH_{Ar}), 127.82 (2x CH_{Ar}), 127.21 (2x CH_{Ar}), 126.51 (4x CH_{Ar}), 125.29 (2x CH_{Ar}, Fmoc), 122.62 (CH_{Ar}, C-13*), 122.24 (CH_{Ar}, C-11*), 120.06 (2x CH_{Ar}, Fmoc), 118.37 (C (4°); C-14), 115.76 (C_{Ar}, C-8), 111.95 (CH_{Ar}, C-12), 70.71 (2x CH₂, linker), 70.43 (2x CH₂, linker), 69.84 (CH₂, linker-ζ), 67.20 (CH₂, Fmoc), 66.54 (CH₂, linker-β), 54.94 (CH, Lys-α),

47.24 (CH, Fmoc), 39.62 (2x CH₂, linker-θ, lys-ε), 34.82 (CH₂, linker-α), 29.83 (CH₂, Lys-δ*), 29.63 (CH₂, Lys-β*), 22.83 (CH₂, Lys-γ).

(+)-**HR-ESIMS** *m/z*: 894.3589 [M+Na]⁺ (Calculada para C₅₀H₅₃N₃NaO₁₁: 894.3572), 872.3762 [M+H]⁺ (Calculada para C₅₀H₅₄N₃O₁₁: 872.3753).

(-)-**HR-ESIMS** *m/z*: 870.3622 [M-H]⁻ (Calculada para C₅₀H₅₂N₃O₁₁: 870.3607).

Síntesis de (S)-N6-(2,2-difenil-1,3-benzodioxol-4-carboxilato)-L-lisinato 3-[2-[2-(2-aminoteoxi)etoxi]etoxi] propanoico (SC-15)



Se disolvieron 102 mg del compuesto SC-14 (0.117 mmol) en 2.5 mL de THF: MeOH (v: v) y se añadieron 0.90 mL de NaOH 0.4 M. La disolución resultante se dejó bajo agitación durante toda la noche. A continuación, la mezcla de reacción se neutralizó con HCl 0.5 M a pH 6-7 y se concentró a presión reducida. Después, se disolvió con CH₂Cl₂, se extrajo con H₂O (3x 40 mL) y se concentró la fase acuosa a presión reducida obteniéndose 57,2 mg de compuesto SC-15 (0.089 mmol, 76% de rendimiento) como un sólido amorfo amarillo.

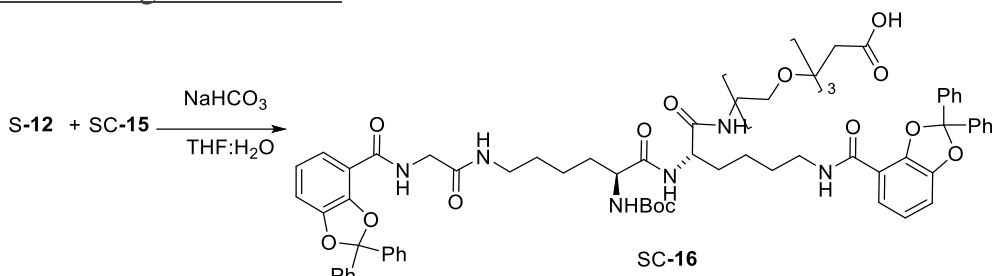
¹H-RMN (CD₃OD), δ_H, ppm: 7.62 – 7.55 (m, 4x H_{Ar}), 7.43 (dd, *J* = 5.2, 2.0 Hz, 5x H_{Ar}), 7.37 (d, *J* = 7.9 Hz, 2x H_{Ar}), 7.10 (d, *J* = 7.9 Hz, H_{Ar}; H-11), 6.97 (t, *J* = 7.9 Hz, H_{Ar}; H-12), 3.71 (t, *J* = 7.0 Hz, H₂C; linker-θ), 3.66 – 3.53 (m, 4x H₂C; linker-δ*, linker-ε*, linker-β*, linker-η*), 3.51- 3.45 (m, H₂C; Lys- ε), 3.42- 3.28 (m, 2x 2x H₂C; linker-γ*, linker-ζ*), 2.43 (t, *J* = 7.0 Hz, H₂C; linker-α), 1.67 (p, *J* = 7.0 Hz, H₂C; Lys- δ), 1.52 – 1.37 (m, H₂C; Lys- β), 1.37- 1.26 (m, H₂C; Lys-γ).

¹³C-RMN (CD₃OD), δ_C, ppm: 178.64 (CO), 147.54 (C_{Ar}-O ,C-9*), 144.93 (C_{Ar}-O ,C-10*), 139.33 (2x C_{Ar}), 129.30 (2x CH_{Ar}), 128.16 (4x CH_{Ar}), 126.02 (4x CH_{Ar}), 121.87 (CH_{Ar}, C-11*), 121.29 (CH_{Ar}, C-13*), 118.11 (C (4°); C-14), 116.01 (C_{Ar}, C-8), 111.35 (CH_{Ar}, C-12), 69.71 (CH₂, linker), 69.45 (2x CH₂, linker), 69.83 (2x CH₂, linker), 68.27 (CH₂, linker-β), 54.50 (CH, Lys-α), 39.19 (CH₂, linker-θ), 38.77 (CH₂, lys-ε), 37.99 (CH₂, linker-α), 34.38 (CH₂, Lys- β), 29.09 (CH₂, Lys-δ), 22.64 (CH₂, Lys-γ).

(+)-**HR-ESIMS** m/z : 650.3080 $[M+H]^+$ (Calculada para $C_{35}H_{44}N_3O_9$: 650.3072), 672.2889 $[M+Na]^+$ (Calculada para $C_{35}H_{43}N_3NaO_9$: 672.2892).

(-)-**HR-ESIMS** m/z : 648.2934 $[M-H]^-$ (Calculada para $C_{35}H_{42}N_3O_9$: 648.2927).

Síntesis del fragmento SC-16



Se disolvieron 42 mg del compuesto S-12 (0.060 mmol) y 47 mg compuesto SC-15 sin purificar (0.072 mmol) en 2 mL de THF. Se añadieron 10 mg de NaHCO₃ (0.120 mmol) disueltos en 0.3 mL de H₂O y la disolución se dejó bajo agitación durante toda la noche. Al día siguiente, se neutralizó con HCl 0,1 M hasta pH= 6-7 y se concentró a presión reducida. Por último, el compuesto SC-16 se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice, siendo la fase móvil MeOH/CH₂Cl₂ (10:90), obteniéndose 30 mg (25.06 mmol, rendimiento 41%).

¹H-RMN (CDCl₃), δ_H, ppm: 8.12 (s, 1H; NH), 7.64 (s, 5H), 7.51 (s, 5x H_{Ar}), 7.38 (d, $J = 3.9$ Hz, 12x H_{Ar}), 7.23 (s, H_{Ar}), 6.98 (d, $J = 6.8$ Hz, 2x H_{Ar}; H-13), 6.89 (t, $J = 6.8$ Hz, 2x H_{Ar}; H-14), 4.37 (s, 1H; NH), 4.31- 3.92 (m, H₂C; Gly, 2x H_C; Lys- α), 3.72 – 3.49 (m, 5x H₂C; linker), 3.48- 3.38 (m, 2x H₂C; linker), 3.37- 3.13 (m, 2x H₂C), 2.62- 2.43 (m, H₂C; linker-α), 1.83– 1.55 (m, 2x H₂C; Lys- δ), 1.54 – 1.45 (m, 2x H₂C; Lys- β*), 1.37 (s, 3x H₃C; Boc, 2x H₂C; Lys-γ).

¹³C-RMN (CDCl₃), δ_C, ppm: 168.87 (CO), 164.04 (2x CO), 147.50 (2x C_{Ar}-O, C-12*), 145.34 (C_{Ar}-O, C-11*), 144.86 (C_{Ar}-O, C-11*), 139.50 (2x C_{Ar}), 139.12 (2x C_{Ar}), 129.85 (2x CH_{Ar}), 129.56 (2x CH_{Ar}), 128.61 (8x CH_{Ar}), 126.47 (2x CH_{Ar}), 126.34 (6x CH_{Ar}), 122.23 (2x CH_{Ar}, C-15*) 122.04 (2x CH_{Ar}, C-13*), 118.59 (2x (C (4°)), 115.83 (C_{Ar}, C-10), 115.18 (C_{Ar}, C-10), 112.03 (2x CH_{Ar}, C-14), 77.37 (CH₂, linker), 70.15 (2x CH₂, linker), 69.84 (2x CH₂, linker), 67.14 (CH₂, linker-β), 53.87 (2x CH, Lys-α), 43.51 (CH₂, Gly), 39.33 (2x CH₂, linker-α*, linker-θ*), 39.08 (2x CH₂, Lys-ε*), 32.22 (2x CH₂, Lys-β), 29.56 (2x CH₂, Lys-δ), 28.44 (3x CH₃, Boc), 22.57 (2x CH₂, Lys-γ).

(+)-**HR-ESIMS** m/z : 1257.5403 $[M+Na]^+$ (Calculada para $C_{68}H_{78}N_6NaO_{16}$: 1257.5367).

(-)-**HR-ESIMS** m/z : 1233.5400 $[M-H]^-$ (Calculada para $C_{68}H_{77}N_6O_{16}$: 1233.5402).

7. BIBLIOGRAFÍA

- (1) WHO. Antimicrobial Resistance: Global Report on Surveillance. *World Health Organization* **2014**.
- (2) O'Neill, J. Tackling Drug-Resistant Infections Globally: Final Report and Recommendations. *HM Government and Wellcome Trust* **2016**, 1–84.
- (3) Xue, X.; Pasparakis, G.; Halliday, N.; Winzer, K.; Howdle, S. M.; Cramphorn, C. J.; Cameron, N. R.; Gardner, P. M.; Davis, B. G.; Fernández-Trillo, F.; Alexander, C. Synthetic Polymers for Simultaneous Bacterial Sequestration and Quorum Sense Interference. *Angewandte Chemie International Edition* **2011**, *50* (42), 9852–9856. <https://doi.org/10.1002/anie.201103130>
- (4) Perez-Soto, N.; Moule, L.; Crisan, D. N.; Insua, I.; Taylor-Smith, L. M.; Voelz, K.; Fernandez-Trillo, F.; Krachler, A. M. Engineering Microbial Physiology with Synthetic Polymers: Cationic Polymers Induce Biofilm Formation in *Vibrio Cholerae* and Downregulate the Expression of Virulence Genes. *Chemical Science* **2017**, *8* (8), 5291–5298. <https://doi.org/10.1039/C7SC00615B>
- (5) Kanth, S.; Malgar Puttaiahgowda, Y.; Nagaraja, A.; Bukva, M. Recent Advances in Development of Poly (Dimethylaminoethyl Methacrylate) Antimicrobial Polymers. *European Polymer Journal* **2022**, *163*, 110930. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2021.110930>
- (6) Rutherford, S. T.; Bassler, B. L. Bacterial Quorum Sensing: Its Role in Virulence and Possibilities for Its Control. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* **2012**, *2* (11), a012427. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a012427>
- (7) Lui, L. T.; Xue, X.; Sui, C.; Brown, A.; Pritchard, D. I.; Halliday, N.; Winzer, K.; Howdle, S. M.; Fernandez-Trillo, F.; Krasnogor, N.; Alexander, C. Bacteria Clustering by Polymers Induces the Expression of Quorum-Sensing-Controlled Phenotypes. *Nature Chemistry* **2013**, *5* (12), 1058–1065. <https://doi.org/10.1038/nchem.1793>
- (8) Qiao, J.; Liu, Z.; Cui, S.; Nagy, T.; Xiong, M. P. Synthesis and Evaluation of an Amphiphilic Deferoxamine:Gallium-Conjugated Cationic Random Copolymer against a Murine Wound Healing Infection Model of *Pseudomonas Aeruginosa*. *Acta Biomaterialia* **2021**, *126*, 384–393. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2021.03.005>
- (9) Fan, D.; Fang, Q. Siderophores for Medical Applications: Imaging, Sensors, and Therapeutics. *International Journal of Pharmaceutics* **2021**, *597*, 120306. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2021.120306>
- (10) Hider, R. C.; Kong, X. Chemistry and Biology of Siderophores. *Natural Product Reports* **2010**, *27* (5), 637–657. <https://doi.org/10.1039/b906679a>
- (11) Roskova, Z.; Skarohlid, R.; McGachy, L. Siderophores: An Alternative Bioremediation Strategy? *Science of The Total Environment* **2022**, *819*, 153144. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.153144>
- (12) Wandersman, C.; Delepelaire, P. Bacterial Iron Sources: From Siderophores to Hemophores. *Annual Review of Microbiology* **2004**, *58* (1), 611–647. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.58.030603.123811>

- (13) Gambino, D.; Otero, L. 13. Metal compounds in the development of antiparasitic agents: rational design from basic chemistry to the clinic. In *Essential Metals in Medicine: Therapeutic Use and Toxicity of Metal Ions in the Clinic*; De Gruyter.; 2019, pp: 331–358.
- (14) Ratledge, C.; Dover, L. G. Iron Metabolism in Pathogenic Bacteria. *Annual Review of Microbiology* **2000**, *54* (1), 881–941. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.54.1.881>
- (15) 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>
- (16) Wilson, B. R.; Bogdan, A. R.; Miyazawa, M.; Hashimoto, K.; Tsuji, Y. Siderophores in Iron Metabolism: From Mechanism to Therapy Potential. *Trends in Molecular Medicine* **2016**, *22* (12), 1077–1090. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2016.10.005>
- (17) Miethke, M.; Marahiel, M. A. Siderophore-Based Iron Acquisition and Pathogen Control. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **2007**, *71* (3), 413–451. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00012-07>
- (18) Krewulak, K. D.; Vogel, H. J. Structural Biology of Bacterial Iron Uptake. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **2008**, *1778* (9), 1781–1804. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2007.07.026>
- (19) Wilde, E. J.; Hughes, A.; Blagova, E. v.; Moroz, O. v.; Thomas, R. P.; Turkenburg, J. P.; Raines, D. J.; Duhme-Klair, A.-K.; Wilson, K. S. Interactions of the Periplasmic Binding Protein CeuE with Fe(III) n-LICAM4– Siderophore Analogues of Varied Linker Length. *Scientific Reports* **2017**, *7* (1), 45941. <https://doi.org/10.1038/srep45941>
- (20) Castiller, W. J. *Introducción a La Ciencia y Ingeniería de Los Materiales*, Reverté.; 1995: Barcelona, 1995; Vol. I y II.
- (21) Smith, W. F.; Barba Pingarrón, A.; Esquivel González, R.; Hashemi, J. *Fundamentos de La Ciencia e Ingeniería de Materiales*, McGraw-Hill.; 1998: Madrid, 2014.
- (22) Perez-Soto, N.; Creese, O.; Fernandez-Trillo, F.; Krachler, A.-M. Aggregation of *Vibrio Cholerae* by Cationic Polymers Enhances Quorum Sensing but Overrides Biofilm Dissipation in Response to Autoinduction. *ACS Chemical Biology* **2018**, *13* (10), 3021–3029. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.8b00815>
- (23) Page, M. G. P. The Role of Iron and Siderophores in Infection, and the Development of Siderophore Antibiotics. *Clinical Infectious Diseases* **2019**, *69* (Supplement_7), S529–S537. <https://doi.org/10.1093/cid/ciz825>
- (24) Johansen, L.-H.; Jensen, I.; Mikkelsen, H.; Bjørn, P.-A.; Jansen, P. A.; Bergh, Ø. Disease Interaction and Pathogens Exchange between Wild and Farmed Fish Populations with Special Reference to Norway. *Aquaculture* **2011**, *315* (3–4), 167–186. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.02.014>
- (25) 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 Infectious Diseases* **2019**, *5* (11), 1936–1951. <https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.9b00274>

- (26) Song, J.; Ju, Y.; Amarasena, T. H.; Lin, Z.; Mettu, S.; Zhou, J.; Rahim, Md. A.; Ang, C.-S.; Cortez-Jugo, C.; Kent, S. J.; Caruso, F. Influence of Poly(Ethylene Glycol) Molecular Architecture on Particle Assembly and *Ex Vivo* Particle–Immune Cell Interactions in Human Blood. *ACS Nano* **2021**, *15* (6), 10025–10038. <https://doi.org/10.1021/acsnano.1c01642>
- (27) Priegue, J. M.; Crisan, D. N.; Martínez-Costas, J.; Granja, J. R.; Fernandez-Trillo, F.; Montenegro, J. In Situ Functionalized Polymers for SiRNA Delivery. *Angewandte Chemie International Edition* **2016**, *55* (26), 7492–7495. <https://doi.org/10.1002/anie.201601441>
- (28) Creese, O.; Adoni, P.; Su, G.; Romanyuk, A. V.; Fernandez-Trillo, P. Poly(Boc-Acryloyl Hydrazide): The Importance of Temperature and RAFT Agent Degradation on Its Preparation. **2019**. <https://doi.org/10.26434/CHEMRXIV.7742882.V2>
- (29) 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 Infectious Diseases* **2019**, *5* (11), 1936-1951. https://doi.org/10.1021/ACSINFECDIS.9B00274/SUPPL_FILE/ID9B00274_LIVESLIDES.MP4.

8. ANEXO

Compuesto 1

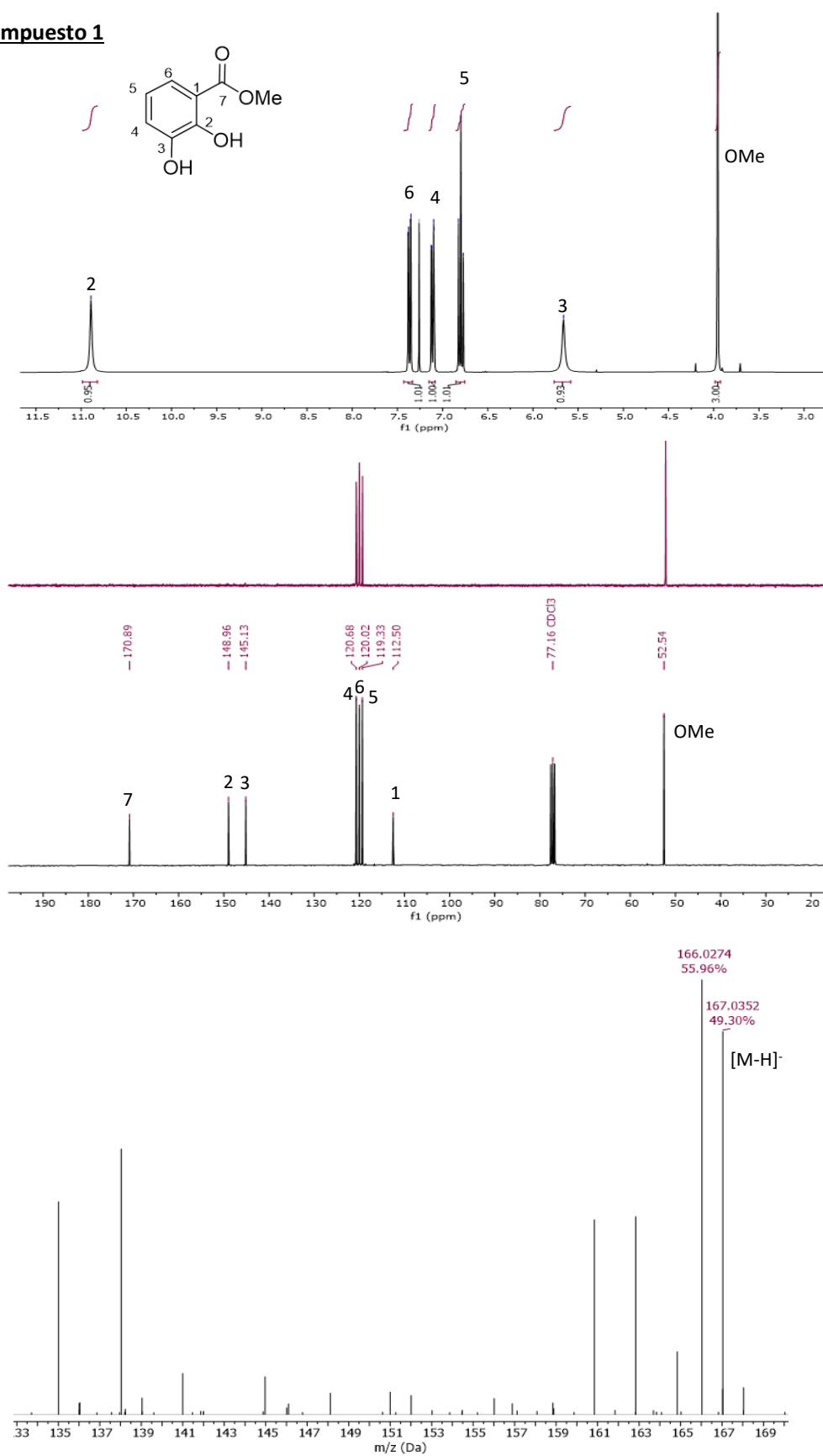


Figura 20. Espectros de RMN- ^1H , RMN- ^{13}C , DEPT en CDCl₃ y (-)-HR-ESIMS del compuesto 1.

Compuesto 3

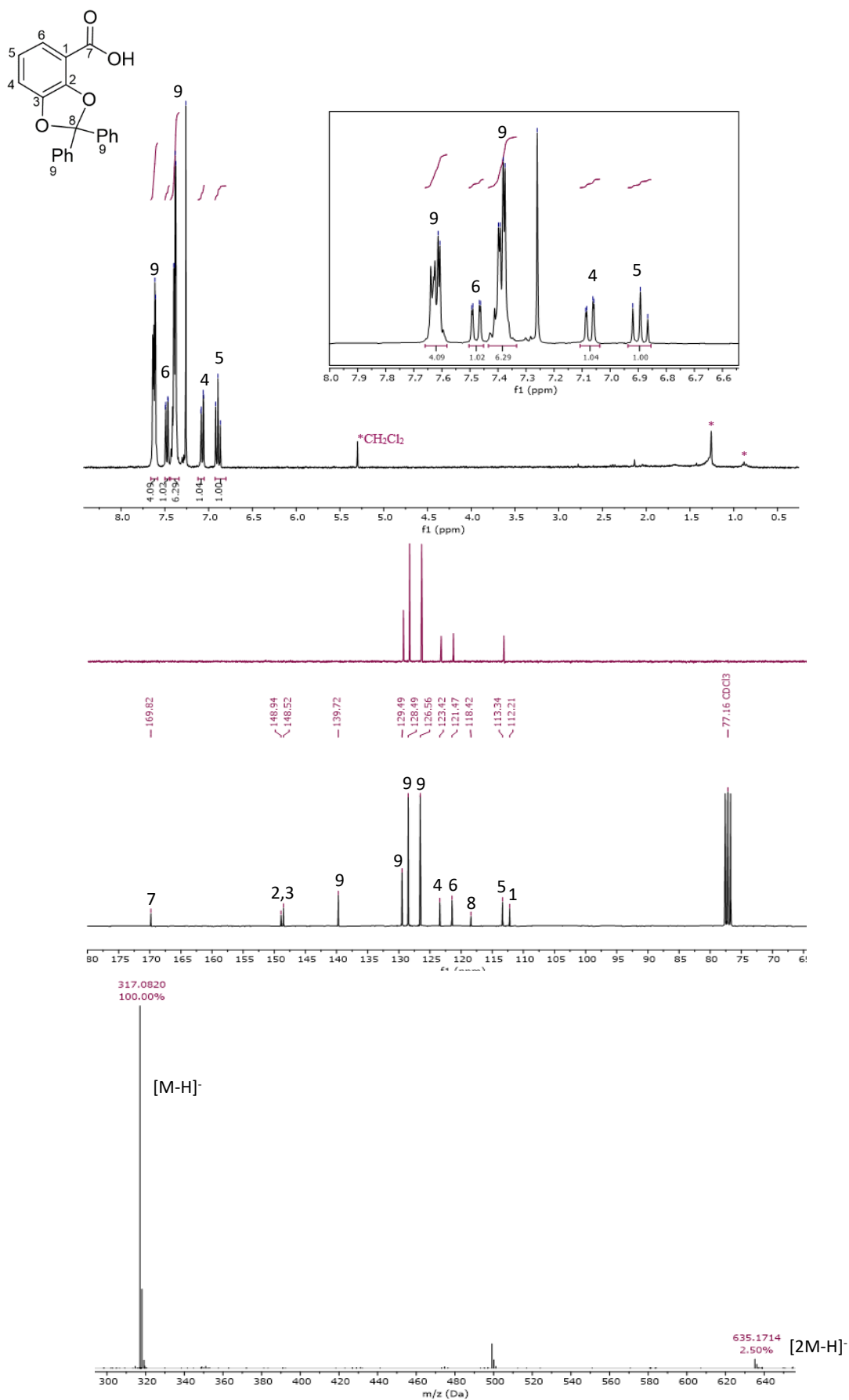


Figura 21. Espectros de RMN- ^1H , RMN- ^{13}C , DEPT en CDCl_3 y (-)-HR-ESIMS del compuesto 3.

Compuesto 4

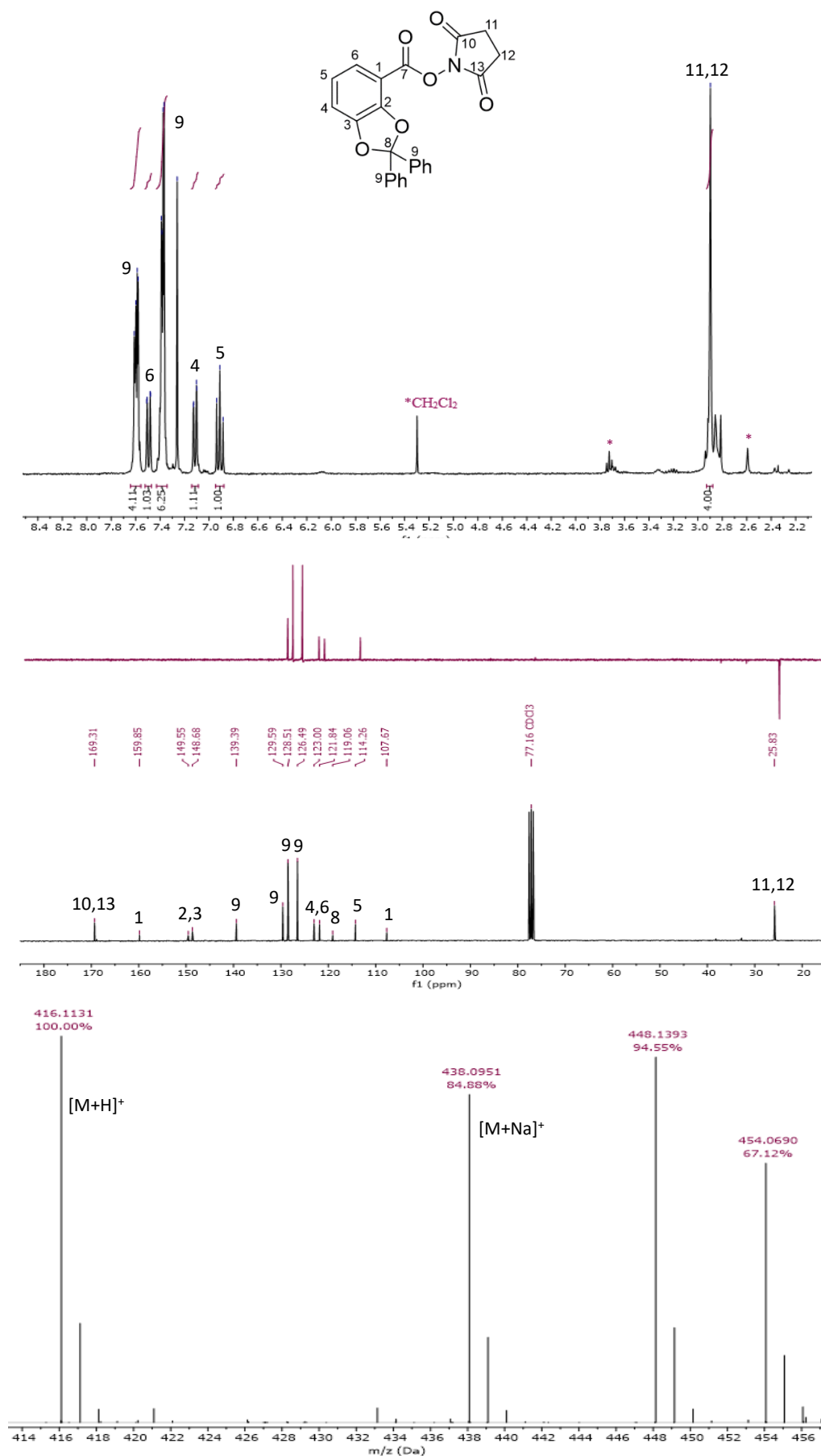


Figura 22. Espectros de RMN-¹H, RMN-¹³C, DEPT en CDCl₃ y (+)-HR-ESIMS del compuesto 4.

Compuesto 5

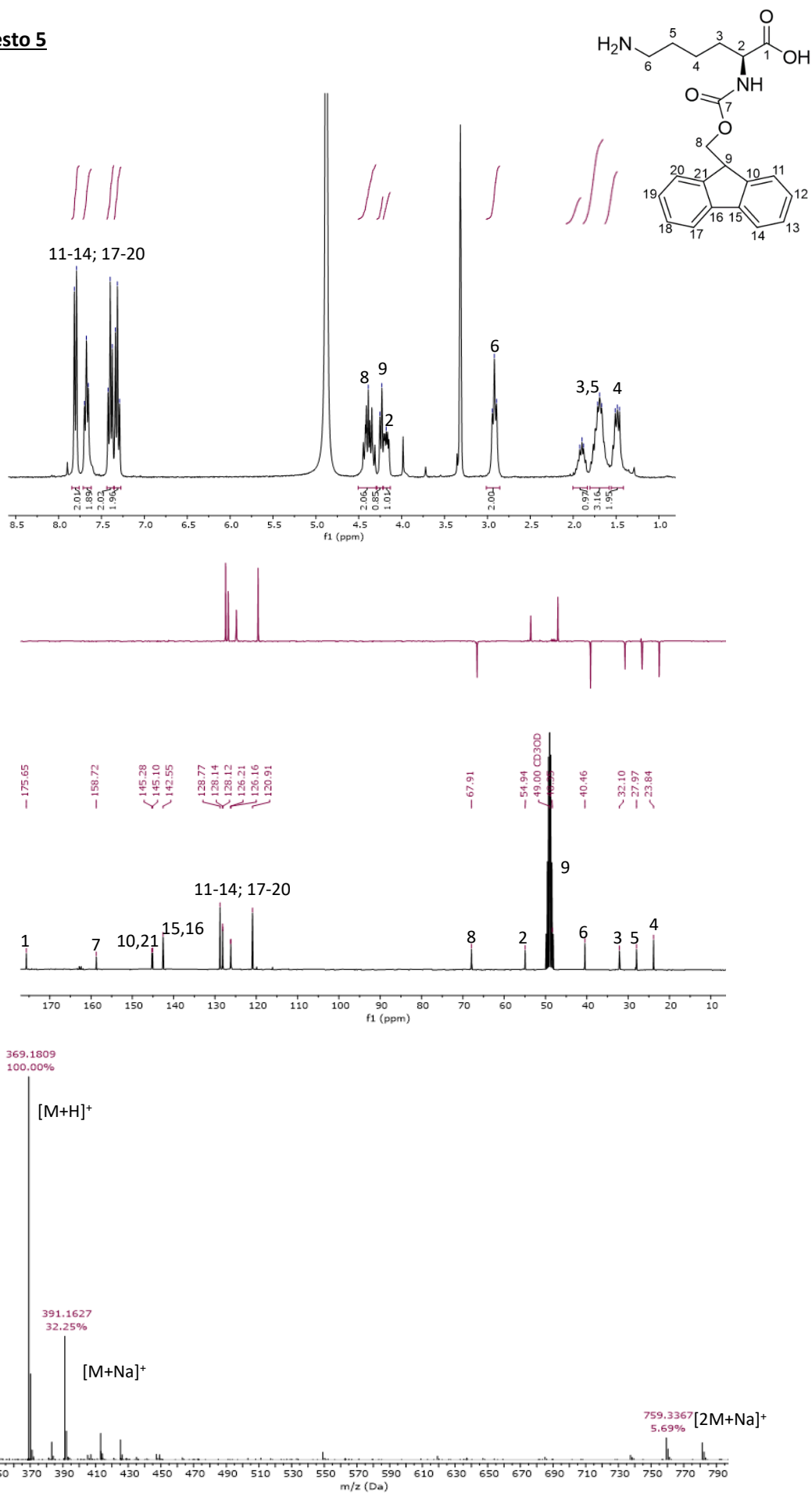


Figura 23. Espectros de RMN-¹H, RMN-¹³C, DEPT en CD₃OD y (+)-HR-ESIMS del compuesto 5.

Compuesto 6

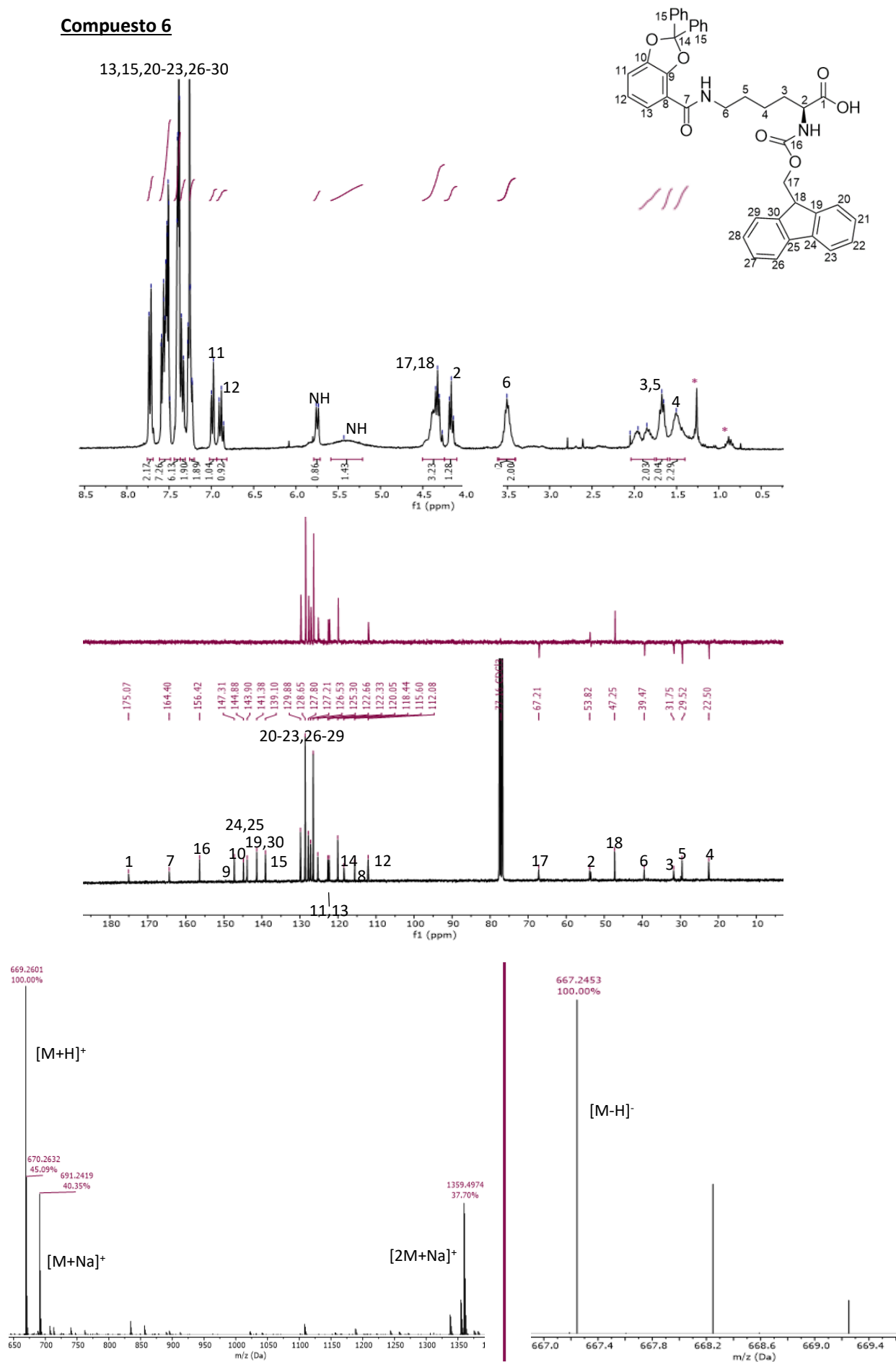


Figura 24. Espectros de RMN-¹H, RMN-¹³C, DEPT en CDCl₃, (+)-HR-ESIMS y (-)-HR-ESIMS del compuesto 6.

Compuesto 7

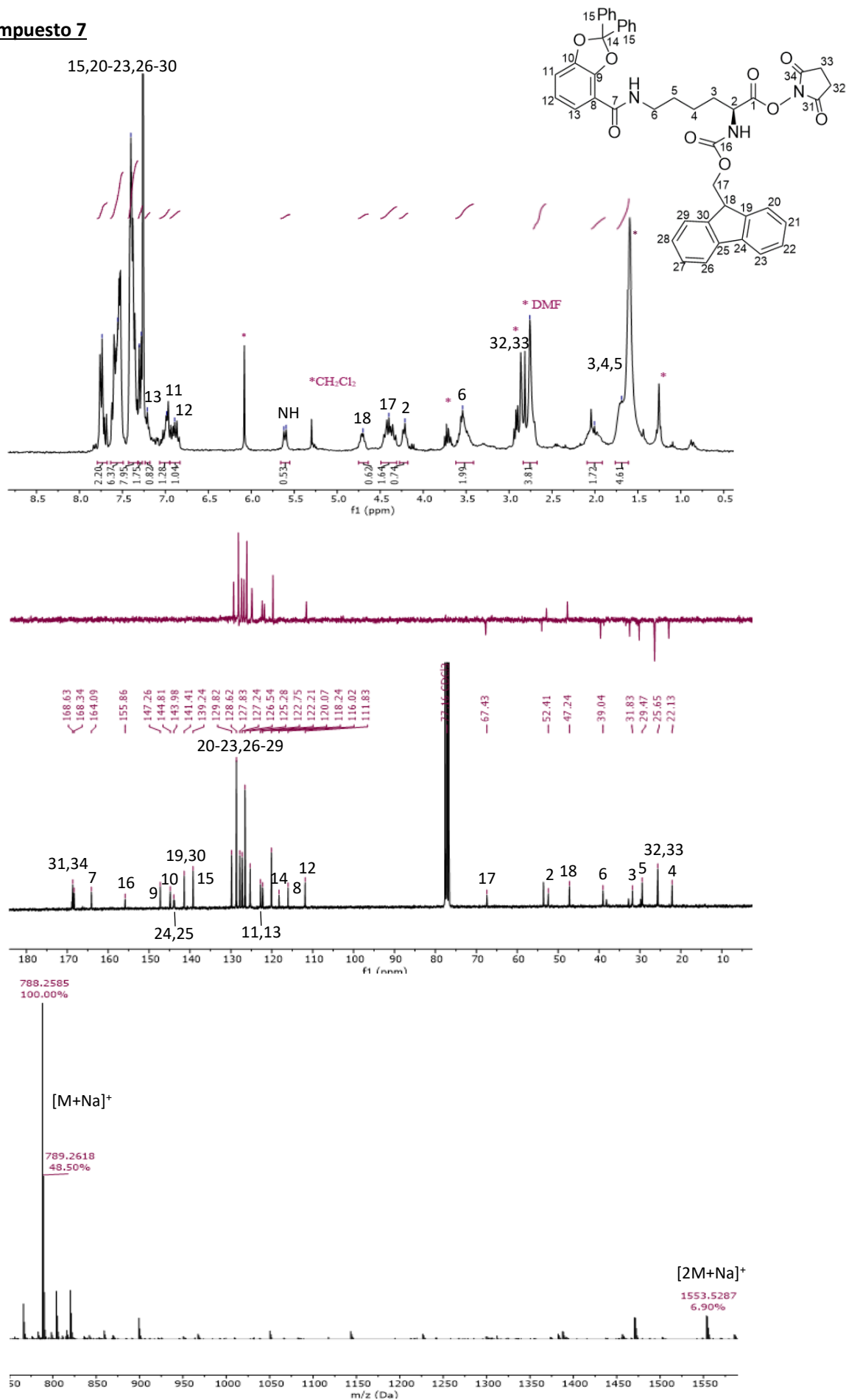


Figura 25. Espectros de RMN-1H, RMN-13C, DEPT en CDCl₃ y (+)-HR-ESIMS del compuesto 7.

Compuesto 8

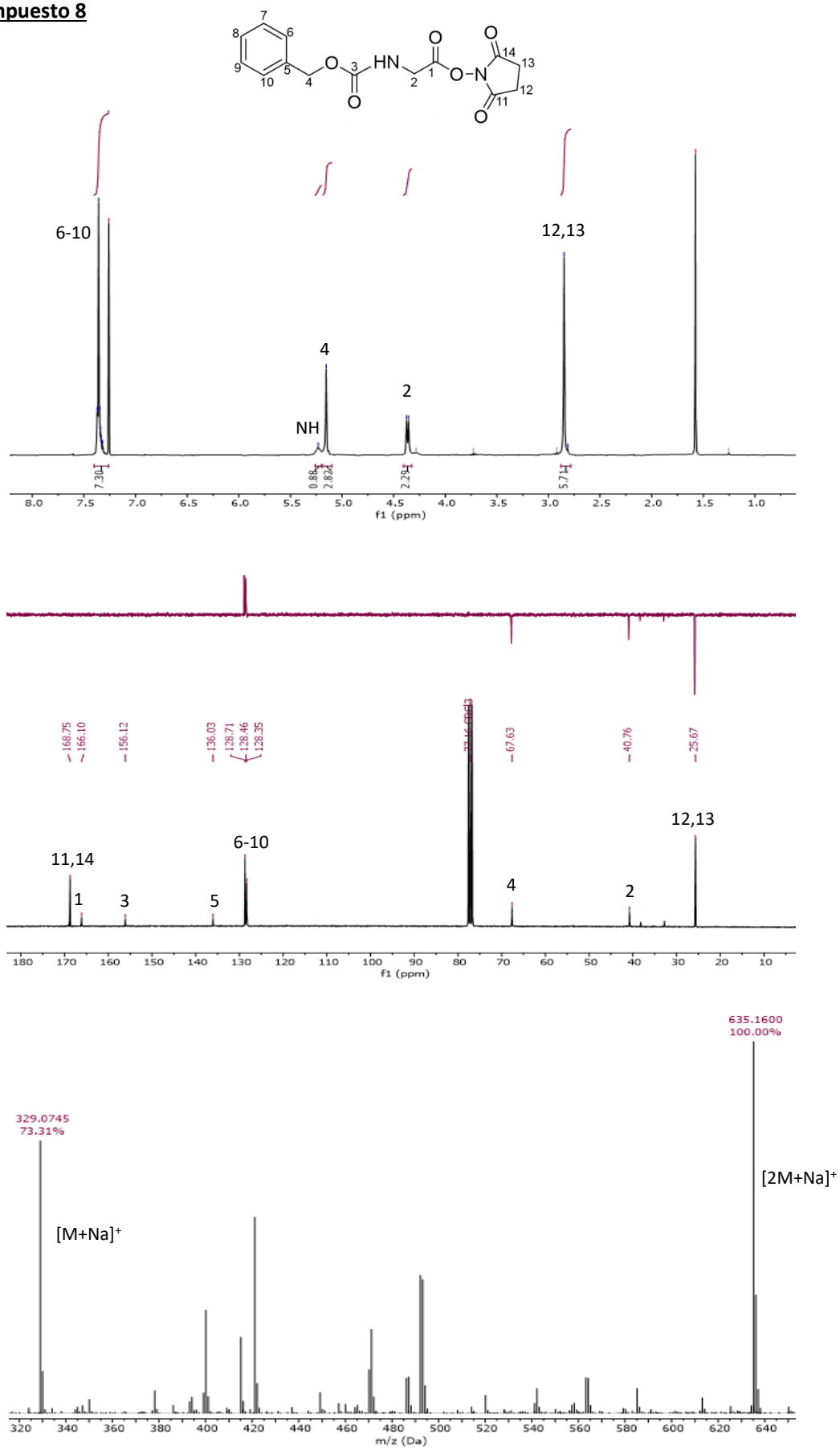


Figura 26. Espectros de RMN-1H, RMN-13C, DEPT en CDCl₃ y (+)-HR-ESIMS del compuesto 8.

Compuesto 9

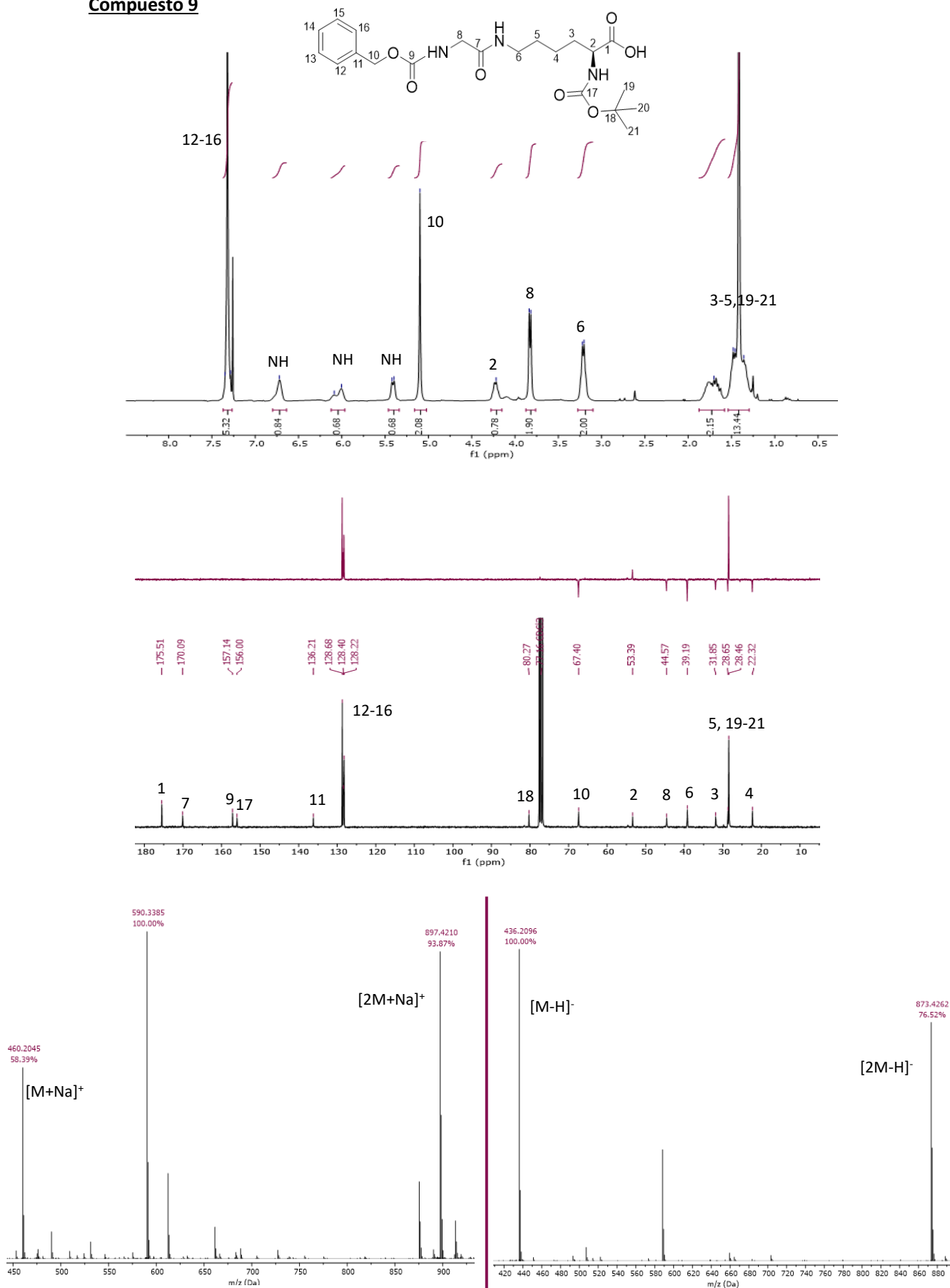


Figura 27. Espectros de RMN- ^1H , RMN- ^{13}C , DEPT en CDCl_3 , (+)-HR-ESIMS y (-)-HR-ESIMS del compuesto 9.

Compuesto 10

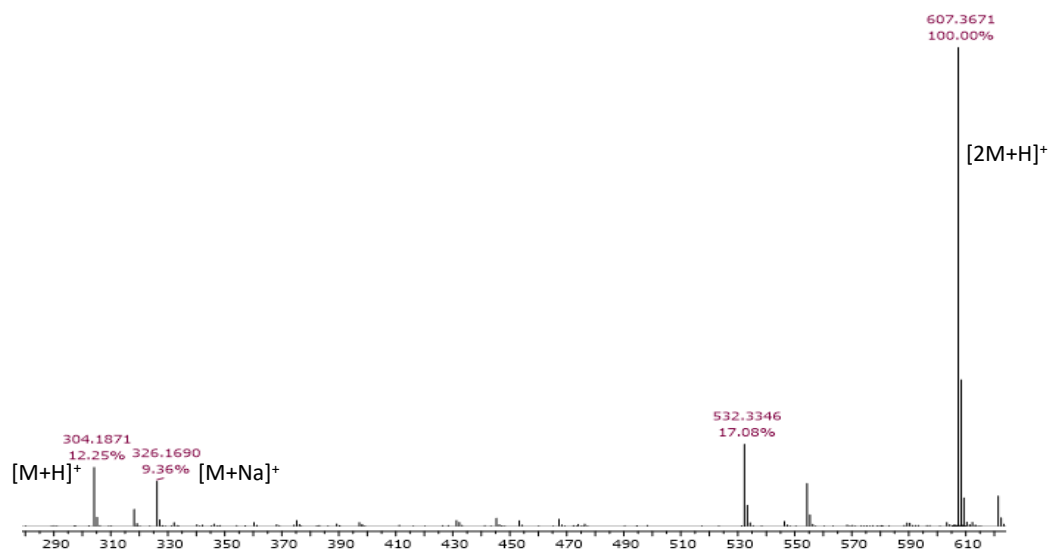
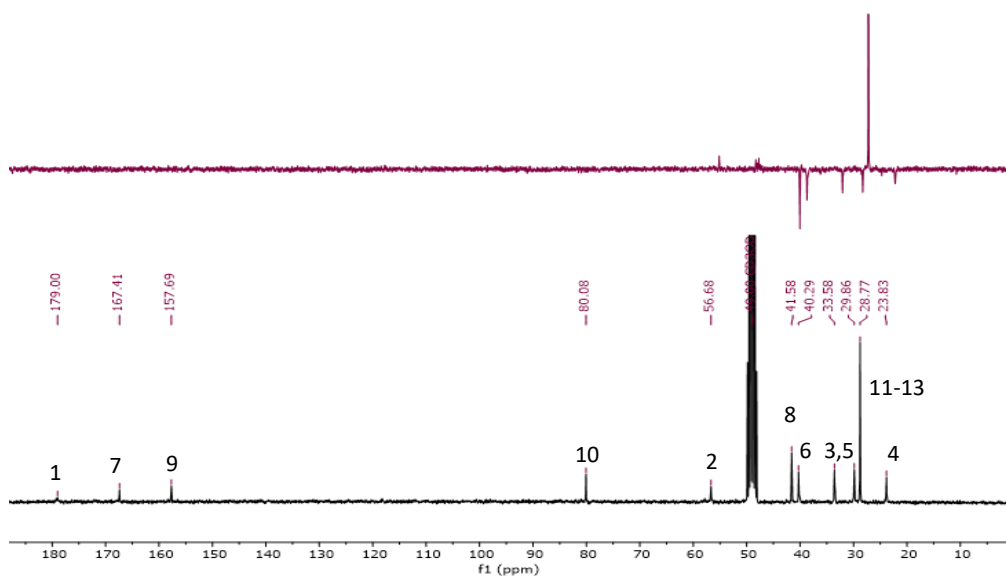
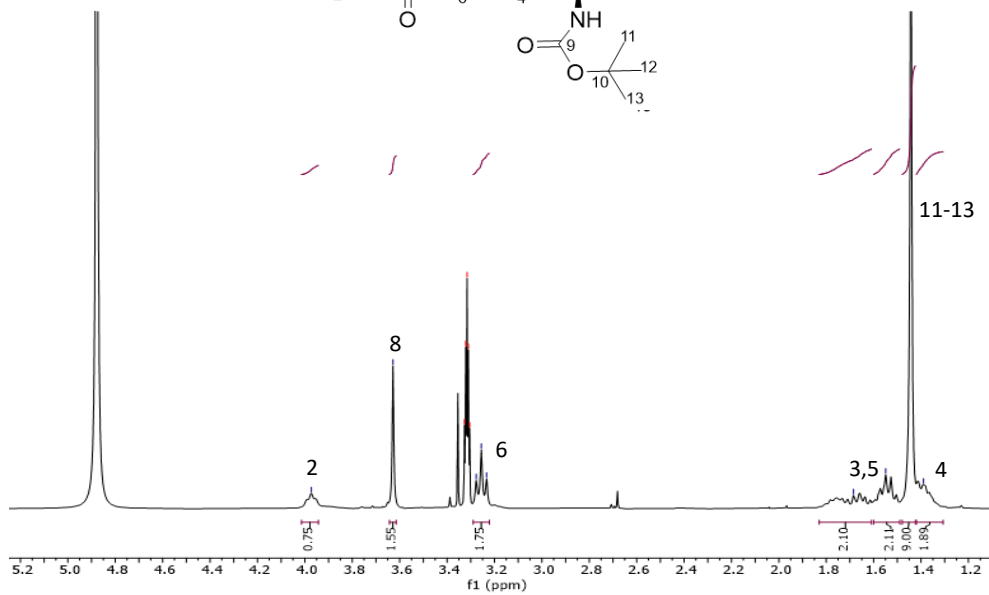
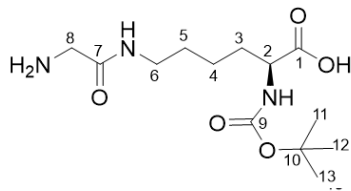


Figura 28. Espectros de RMN-1H, RMN-13C, DEPT en CD₃OD y (+)-HR-ESIMS del compuesto **10**.

Compuesto 11

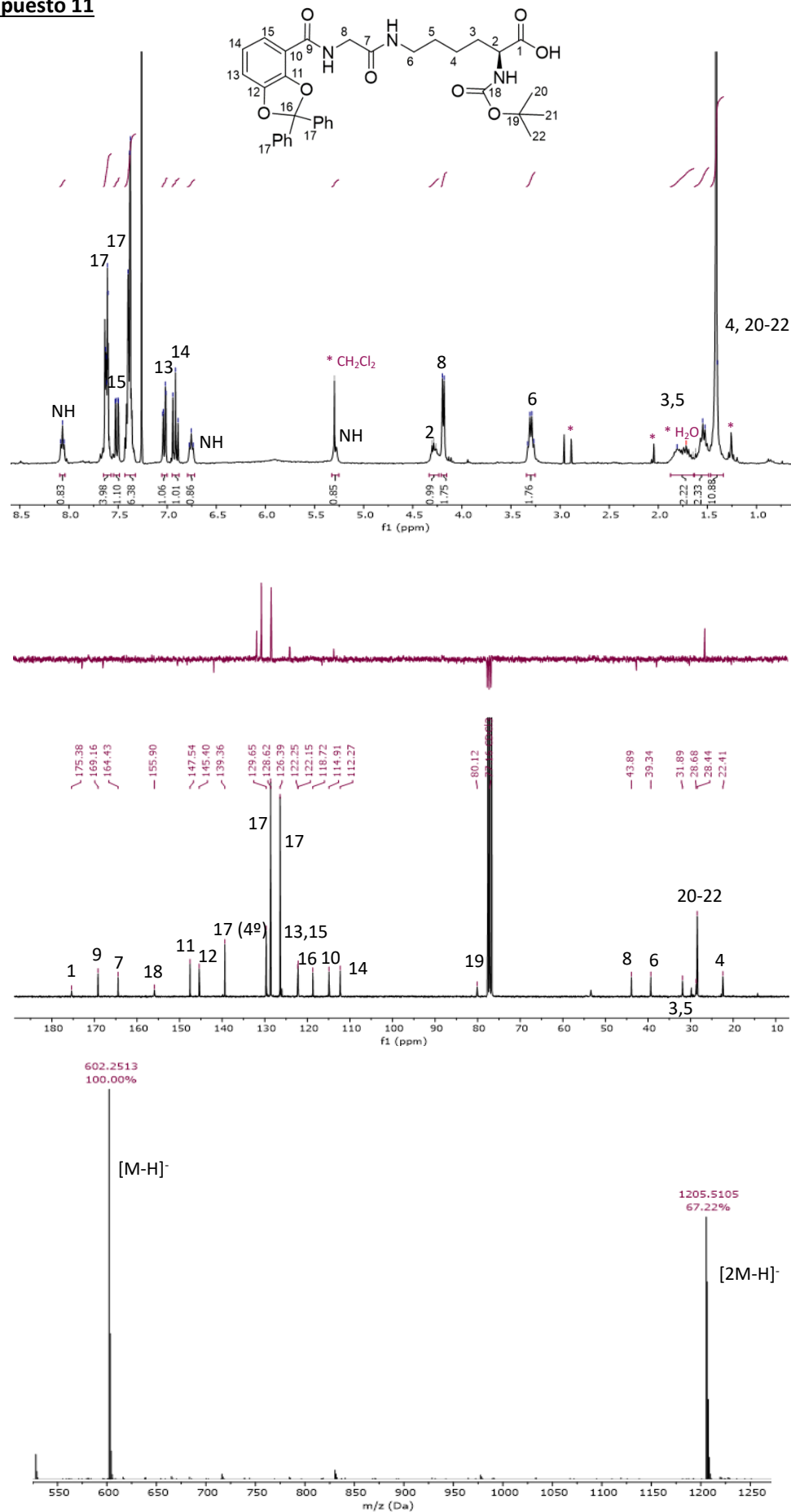


Figura 29. Espectros de RMN-1H, RMN-13C, DEPT en CDCl₃ y (-)-HR-ESIMS del compuesto 11.

Compuesto 12

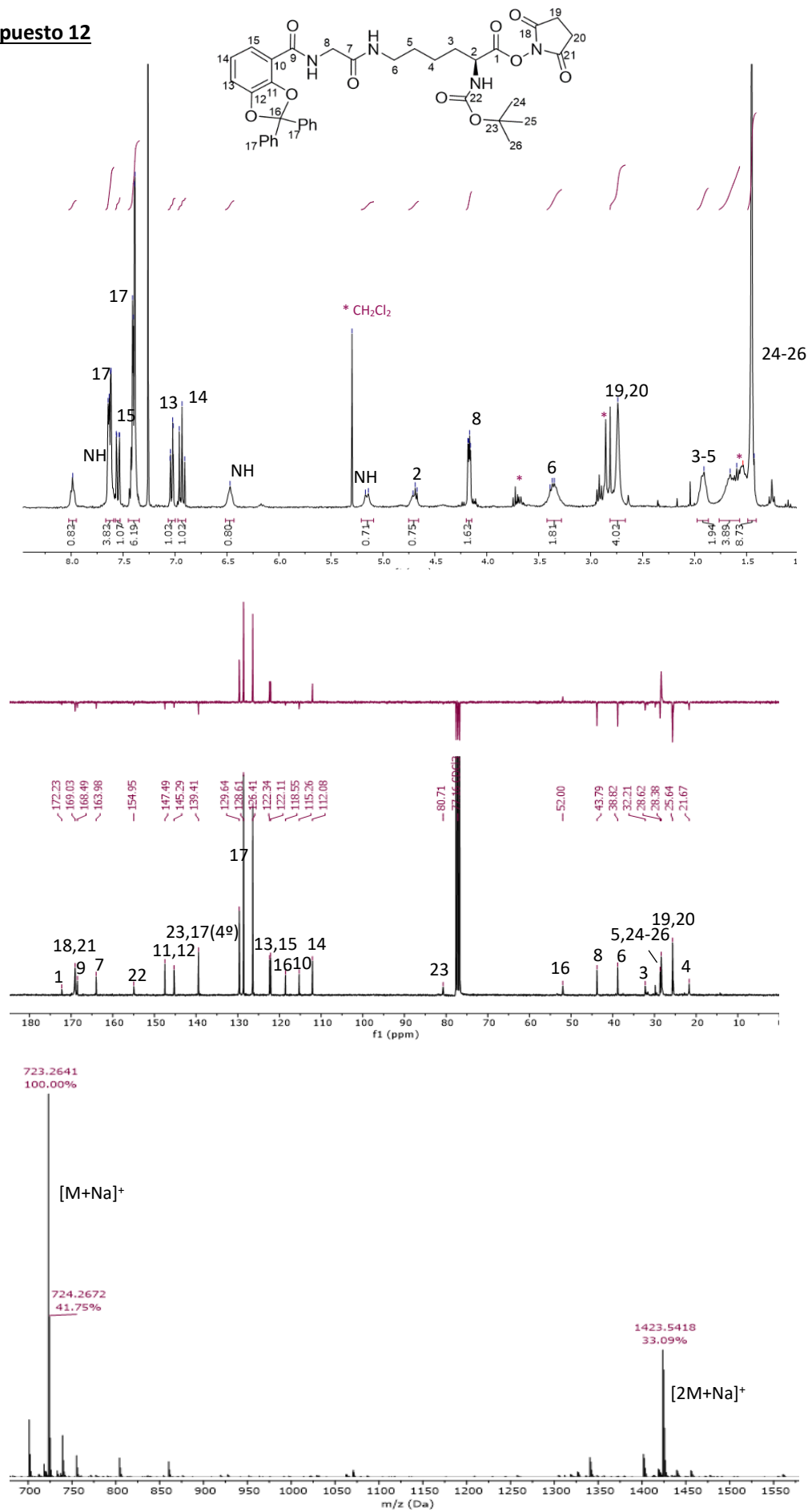


Figura 30. Espectros de RMN-1H, RMN-13C, DEPT en CDCl₃ y (+)-HR-ESIMS del compuesto 12.

Compuesto 13

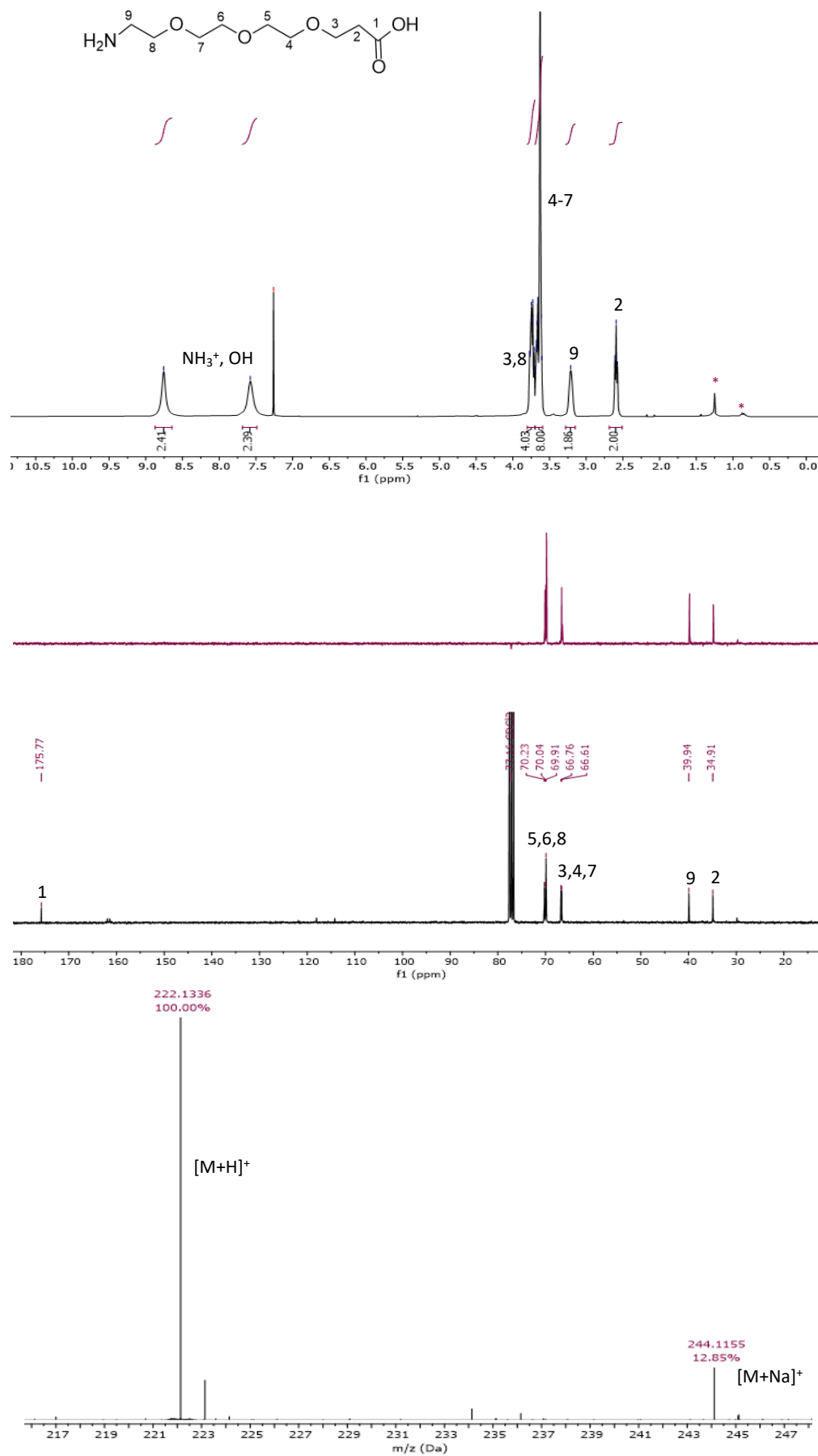


Figura 31. Espectros de RMN-1H, RMN-13C, DEPT en CDCl₃ y (+)-HR-ESIMS del compuesto 13.

Compuesto 15

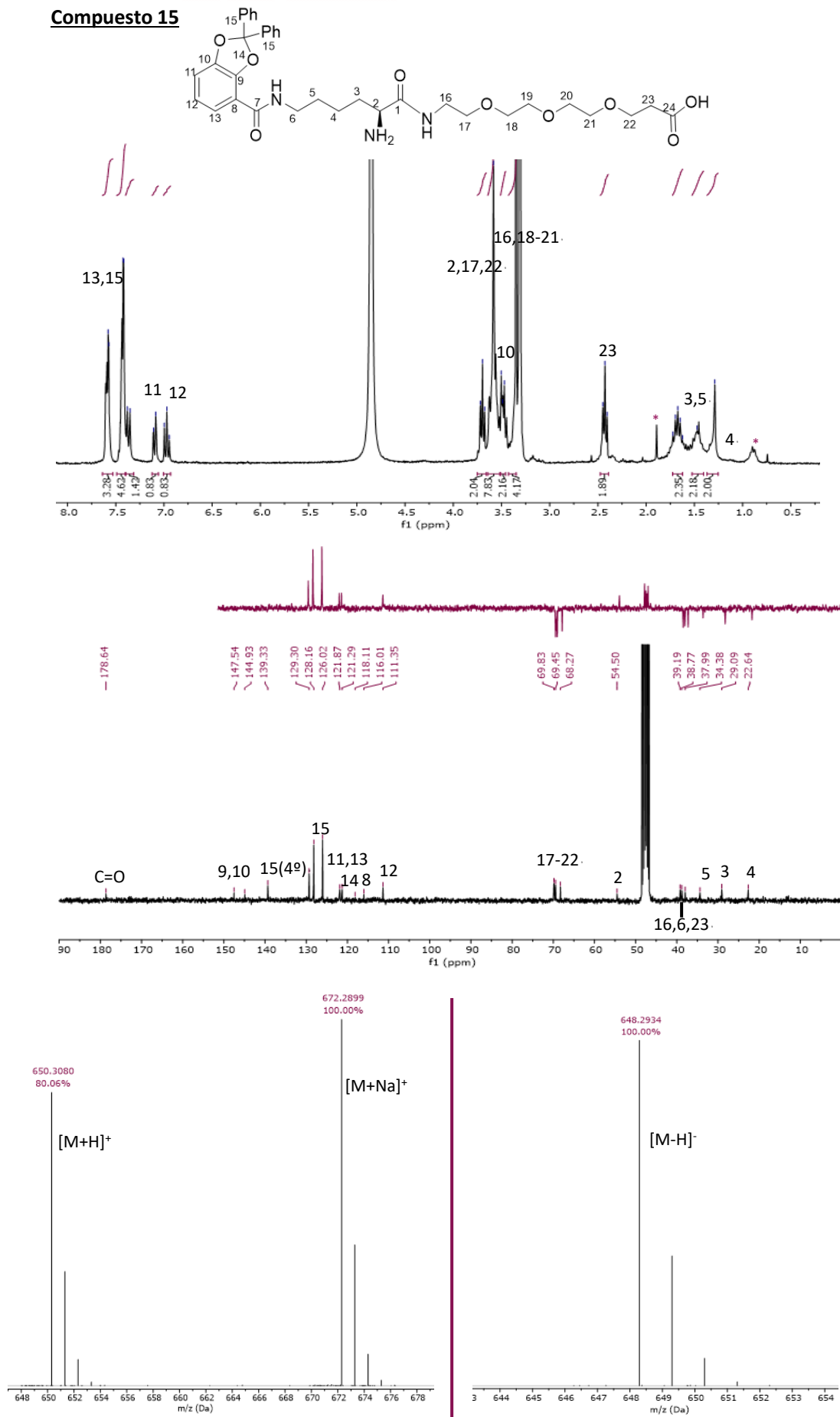


Figura 33. Espectros de RMN-1H, RMN-13C, DEPT en CD₃OD, (+)-HR-ESIMS y (-)-HR-ESIMS del compuesto 15.

Compuesto 16

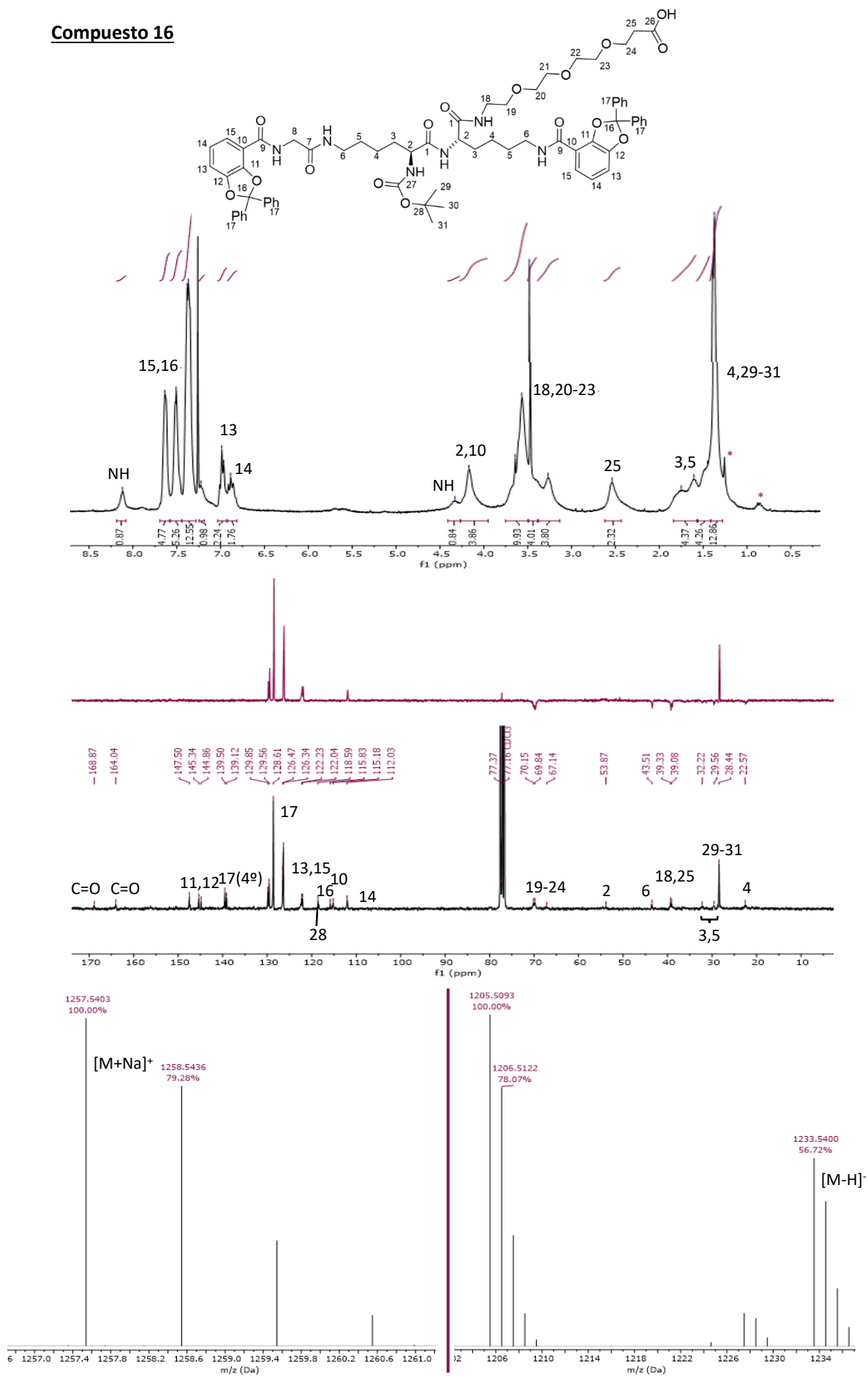


Figura 34. Espectros de RMN-1H, RMN-13C, DEPT en CDCl₃, (+)-HR-ESIMS y (-)-HR-ESIMS del compuesto 16.

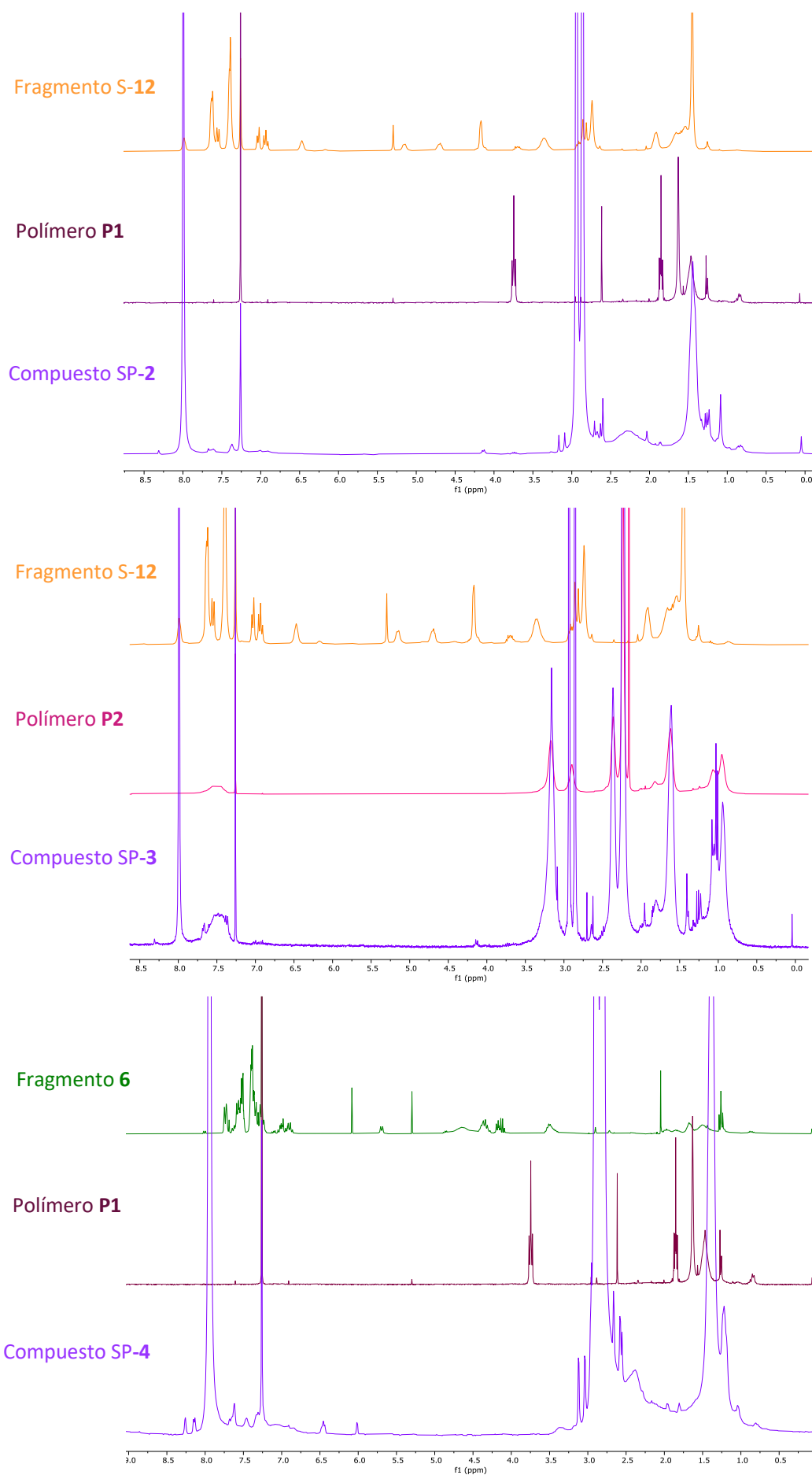


Figura 35. Ensayos de acoplamiento de los fragmentos de sideróforo (6 y S-12) a los polímeros P1 y P2.