

TRABAJO DE FIN DE MÁSTER



UNIVERSIDADE
DA CORUÑA



Universidade de Vigo



CICA

CENTRO INTERDISCIPLINAR
DE QUÍMICA E BIOLOXÍA

APROXIMACIÓN SINTÉTICA DE ANÁLOGOS ESTABLES DEL SIDERÓFORO PISCIBACTINA

Curso 2022/23

Grupo QUIMOLMAT – PRONAMAR

Centro Interdisciplinar de Química e Bioloxía (CICA), Departamento de
Química, Universidade da Coruña

Directores: Carlos Jiménez González

Jaime Rodríguez González

Período de evaluación: Julio 2023

Ana Rodríguez Pedrouzo

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

δ	Desplazamiento químico
Å	Armstrong
ADN	Ácido desoxirribonucleico
CESGA	Centro de Supercomputación de Galicia
CICA	Centro Interdisciplinar de Biología e Química
CM9	Medio mínimo de Miller suplementado con casaminoácidos al 0.2%
COSY	Espectroscopia de correlación
d	Doblete
Da	Dalton
DAST	Trifluoruro de dietilaminoazufre
DCC	<i>N,N</i> -Diciclohexilcarbodiimida
dd	Doble doblete
Deoxo-Fluor	Trifluoruro de bis-(2-metoxietil)-aminoazufre
DFT	Teoría de funcionales de densidad
DMAP	4-(Dimetilamino)-piridina
DMF	<i>N,N</i> -Dimetilformamida
dt	Doble triplete
ESI	Ionización por electrospray
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación
hept	Heptaplete
HR	Alta resolución
HSQC	Espectroscopia de coherencia cuántica simple heteronuclear
Hz	Hercios
Im	Imidazol
ⁱ Pr	Isopropilo
<i>J</i>	Constante de acoplamiento
K _f	Constante de formación
K _{ps}	Constante de solubilidad
M	Molar

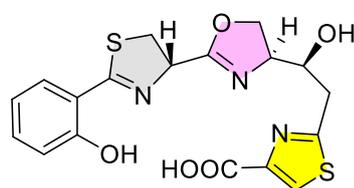
m	Multiplete
Me	Metilo
MHz	Megahercio
MS	Espectrometría de masas
m/z	Relación masa-carga
NMM	<i>N</i> -Metilmorfolina
NRPS	Sintetasas de péptidos no ribosómicos
O	Oxazol
OD	Oxazolidina
OMP	Proteína de membrana externa
OMS	Organización Mundial de la Salud
OZ	Oxazolina
P(C/T)	Pirrolidina (cis/trans)
PBP	Proteína periplásmica de unión
pK_a	Constante de disociación ácida
ppm	Partes por millón
PrePcb	Prepiscibactina
q	Cuadruplete
RAM	Resistencia antimicrobiana
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
s	Singulete
SAI	Servicio de Apoyo a la Investigación
STD	Desviación estándar
subsp.	Subespecie
t	Triplete
T	Tiazol
TBDPS	Terc-butildifenilsililo
TBDPSCI	Cloruro de <i>terc</i> -butildifenilsililo
TBTU	Tetrafluoroborato de 2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio
TD	Tiazolidina

THF	Tetrahidrofurano
TLC	Cromatografía de capa fina
TZ	Tiazolina
UDC	Universidade da Coruña
UV	Ultravioleta
Ycb	Yersiniabactina

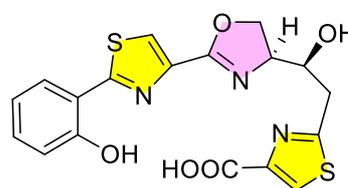
RESUMEN

La industria acuícola está siendo enormemente afectada por la aparición y propagación de enfermedades infecciosas en los peces, así como por la evolución y expansión de la resistencia bacteriana a los antibióticos actuales. Por tanto, surge la necesidad de buscar nuevas estrategias para prevenir y controlar esas enfermedades infecciosas con el fin de desarrollar nuevos fármacos más efectivos. La piscibactina (Pcb) es un sideróforo de tipo fenolato responsable de la captación de Fe^{3+} de las bacterias *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* y *Vibrio anguillarum*. Su baja estabilidad dificulta sus aplicaciones biotecnológicas, por lo que se hace indispensable la preparación de análogos estables de Pcb para poder desarrollarlas. En este trabajo se propone diseñar un nuevo análogo simplificado de Pcb con diferentes motivos estructurales deducidos mediante cálculos computacionales. Adicionalmente, se pretende llevar a cabo la preparación de un intermedio avanzado que pueda ser utilizado por el grupo de investigación en la síntesis de un análogo estable de Pcb que permita en un futuro desarrollar nuevas aplicaciones biotecnológicas.

Los cálculos computacionales mostraron que los modelos moleculares propuestos son adecuados para su coordinación con el Ga^{3+} . Dado que durante la síntesis del análogo simplificado de Pcb TZ_OZ_T (tiazolina-oxazolina-tiazol) tuvo lugar la oxidación del anillo de tiazolina, se decidió preparar el análogo T_OZ_T (tiazol-oxazolina-tiazol), obteniéndose un intermedio avanzado del mismo que permitirá completar su síntesis en el futuro. Todos los compuestos sintetizados se caracterizaron tanto por RMN como por espectrometría de masas.



TZ_OZ_T
(tiazolina-oxazolina-tiazol)



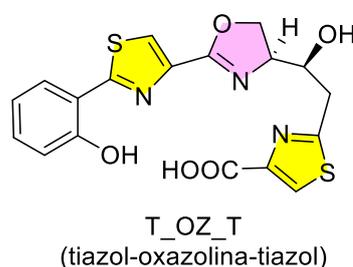
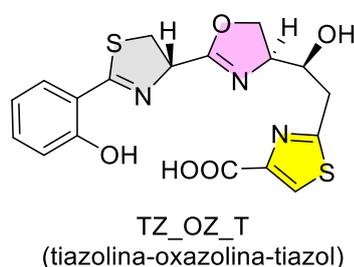
T_OZ_T
(tiazol-oxazolina-tiazol)

Palabras clave: sideróforo, piscibactina, análogo TZ_OZ_T, análogo T_OZ_T, cálculos computacionales.

RESUMO

A industria acuícola está sendo enormemente afectada pola aparición e propagación de enfermidades infecciosas nos peixes, así como pola evolución e aparición da resistencia bacteriana aos antibióticos actuais. Polo tanto, surxe a necesidade de buscar novas estratexias para previr e controlar esas enfermidades infecciosas co fin de desenvolver novos fármacos máis efectivos. A piscibactina (Pcb) é un sideróforo de tipo fenolato responsable da captación de Fe^{3+} das bacterias *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* e *Vibrio anguillarum*. A súa baixa estabilidade dificulta as súas aplicacións biotecnolóxicas, o que fai indispensable a preparación de análogos estables de Pcb para poder desenvolverlas. Neste traballo propónse deseñar un novo análogo simplificado de piscibactina (Pcb) con diferentes motivos estruturais deducidos mediante cálculos computacionais. Adicionalmente, preténdese levar a cabo a preparación dun intermedio avanzado que poida ser utilizado polo grupo de investigación na síntese dun novo análogo estable de Pcb que permita nun futuro desenvolver novas aplicacións biotecnolóxicas.

Os cálculos computacionais mostraron que os modelos moleculares propostos son axeitados para a súa coordinación co Ga^{3+} . Dado que durante a síntese do análogo simplificado de Pcb T_OZ_T (tiazol-oxazolina-tiazol) tivo lugar a oxidación do anel de tiazolina, decidiuse preparar o análogo T_OZ_T (tiazol-oxazolina-tiazol) obtendo un intermedio avanzado do mesmo que permitirá completar a súa síntese no futuro. Todos os compostos sintetizados caracterizáronse tanto por RMN como por espectrometra de masas.

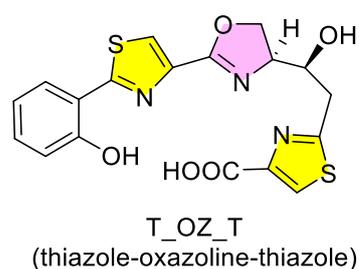
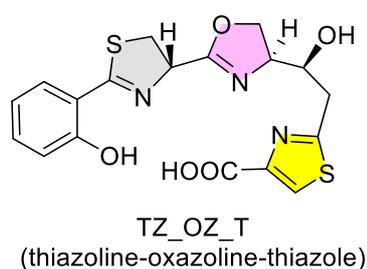


Palabras clave: sideróforo, piscibactina, análogo TZ_OZ_T, análogo T_OZ_T, cálculos computacionais.

ABSTRACT

The aquaculture industry is being greatly affected by the appearance and spread of fish infectious diseases and the evolution and spread of antimicrobial resistance to current antibiotics. Therefore, the search for new strategies to prevent and control these infectious diseases in order to develop new and more effective drugs, is urgently needed. Piscibactin (Pcb) is a phenolate-type siderophore responsible for Fe^{3+} uptake by the bacteria *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* and *Vibrio anguillarum*. Its low stability hampers its biotechnological applications, and so, the design of stable Pcb analogues is essential to develop them. In this work, the design of a new simplified analogue of Pcb with different structural motifs deduced by computational calculations is proposed. Additionally, another objective was the preparation of an advanced intermediate that can be used by the research group in the synthesis of a stable analogue of Pcb that allows in the future to develop new biotechnological applications.

Computational calculations showed that the proposed molecular models are suitable for coordination with Ga^{3+} . Since during the synthesis of the simplified analogue of Pcb TZ_OZ_T (thiazoline-oxazoline-thiazole), the oxidation of the thiazoline ring took place, the preparation of the analogue T_OZ_T (thiazole-oxazoline-thiazole) was addressed. In this way, an advanced intermediate was obtained which will allow the synthesis of that analogue in the future. All the synthetic compounds were characterized by both NMR and mass spectrometry techniques.



Keywords: siderophore, piscibactin, TZ_OZ_T analog, T_OZ_T analog, computational calculations.

ÍNDICE

1	INTRODUCCIÓN	1
1.1	PESCA Y ACUICULTURA	1
1.2	PRINCIPALES ENFERMEDADES BACTERIANAS DE PECES EN ACUICULTURA.....	3
1.2.1	<i>YERSINIOSIS O ENFERMEDAD DE LA BOCA ROJA</i>	3
1.2.2	<i>VIBRIOSIS</i>	4
1.2.3	<i>FORUNCULOSIS</i>	4
1.2.4	<i>FOTOBACTERIOSIS O PASTEURELOSIS</i>	4
1.3	EL PAPEL DEL HIERRO EN EL DESARROLLO BACTERIANO	5
1.4	LOS SIDERÓFOROS.....	5
1.4.1	ESTRUCTURAS DE LOS SIDERÓFOROS	7
1.4.2	BIOSÍNTESIS Y MECANISMOS DE ENTRADA	7
1.5	EL SIDERÓFORO PISCIBACTINA	9
1.6	ASPECTOS COMPUTACIONALES	10
2	ANTECEDENTES.....	12
3	OBJETIVOS.....	15
4	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	16
4.1	CÁLCULOS COMPUTACIONALES	16
4.2	ANÁLISIS RETROSINTÉTICO DEL ANÁLOGO DE PCB TZ_OZ_T (TIAZOLINA-OXAZOLINA-TIAZOL).....	20
4.3	ANÁLISIS RETROSINTÉTICO DEL ANÁLOGO DE PCB T_OZ_T (TIAZOL-OXAZOLINA-TIAZOL).....	21
4.4	PREPARACIÓN DEL ANÁLOGO DE PCB TZ_OZ_T.....	22
4.5	PREPARACIÓN DEL ANÁLOGO DE PCB T_OZ_T.....	23
5	PARTE EXPERIMENTAL.....	32
5.1	MÉTODOS GENERALES.....	32

5.2	PROCEDIMIENTOS Y CARACTERIZACIÓN.....	33
5.2.1	SÍNTESIS DE 1.....	33
5.2.2	SÍNTESIS DE 2.....	34
5.2.3	SÍNTESIS DE 5.....	35
5.2.4	SÍNTESIS 7.....	36
5.2.5	SÍNTESIS DE 10.....	36
5.2.6	SÍNTESIS DE 9.....	37
5.2.7	SÍNTESIS DE 12.....	37
5.2.8	SÍNTESIS DE 13.....	38
5.2.9	SÍNTESIS DE 14.....	38
5.2.10	SÍNTESIS DE 15a y 15b.....	39
5.2.11	SÍNTESIS DE 17.....	40
5.2.12	SÍNTESIS DE 16.....	40
6	CONCLUSIONES.....	42
7	CONCLUSIÓN.....	42
8	CONCLUSIONS.....	43
9	BIBLIOGRAFÍA.....	44
10	ANEXOS.....	49

1 INTRODUCCIÓN

1.1 PESCA Y ACUICULTURA

El consumo de pescado aporta numerosos beneficios para la salud humana al tratarse de un alimento con gran cantidad de proteínas y otros nutrientes, como ácidos grasos poliinsaturados (omega-3 y omega-6), minerales y oligoelementos. La Organización Mundial de la Salud (OMS) recomienda consumir 200 g de pescado por semana, lo que hace que la pesca y la acuicultura sean actividades esenciales para garantizar una alimentación adecuada, así como para generar ingresos y puestos de trabajo en el mundo.¹

Según el informe de la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), la producción mundial de animales acuáticos se estimó en 178 millones de toneladas en 2020, de las cuales el 51% provienen de la pesca de captura (90 millones de toneladas) y el 49% de la acuicultura (88 millones de toneladas) (*Figura 1*). La producción, el consumo y el comercio de pescado y productos acuícolas disminuyeron ligeramente en 2019, debido a los efectos de la pandemia de COVID-19, lo que representa una leve caída respecto al máximo histórico de 179 millones de toneladas registrado en 2018. En 2020, la producción de animales acuáticos aumentó un 0.2 % en comparación con 2019 y disminuyó el 0.6 % en comparación con la producción récord anterior de 2018, ya que la pesca de captura disminuyó el 4.4 % en 2019 en comparación con 2018, y otro 2% en 2020. A pesar de la caída en la pesca de captura, la acuicultura siguió mostrando un crecimiento en los últimos dos años, aunque a un ritmo anual más lento.²

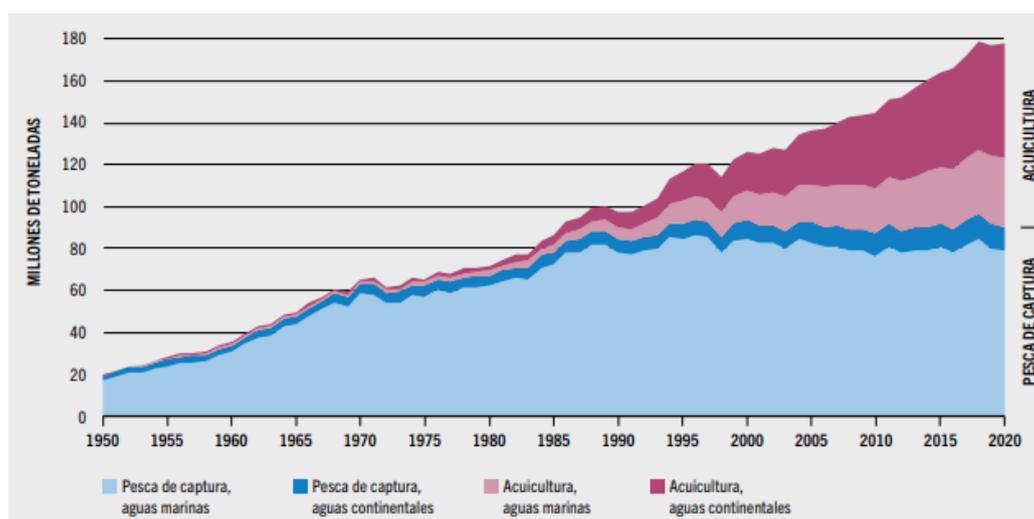


Figura 1. Producción mundial de pesca y acuicultura desde 1950 a 2020. NOTA: Excluidos mamíferos acuáticos, cocodrilos, lagartos, caimanes y algas. Los datos se expresan en términos de equivalente en peso vivo.²

Entre 1961 y 2019, la demanda mundial de alimentos relacionados con la pesca y la acuicultura creció a una tasa media anual del 3.0 %, casi duplicando el aumento anual de la población mundial (1.6 %) en el mismo período. El consumo per cápita de alimentos acuáticos de origen animal aumentó en torno a un 1.4 % al año, de los 9.0 kg (equivalente en peso vivo) registrados en 1961 a los 20.5 kg en 2019. Los datos preliminares para el año 2020 apuntan a un descenso leve hasta los 20.2 kg. En ese mismo año, la acuicultura representó el 56 % de la cantidad de alimentos acuáticos de origen animal producidos y disponibles para el consumo humano.²

China sigue destacando como primer país productor en acuicultura en el mundo, con 70.5 millones de toneladas en 2020. La Unión Europea, considerada como una unidad, produce 1.09 millones de toneladas, situándose en 12º lugar. En particular, España se sitúa en la 25ª posición con 276.6 toneladas, 4 puestos por debajo en comparación con 2019 y un descenso del -11.1 %. Sin embargo, España es el Estado miembro de la Unión Europea con una mayor cosecha de acuicultura en 2020 (25.3 % del total de la Unión).³

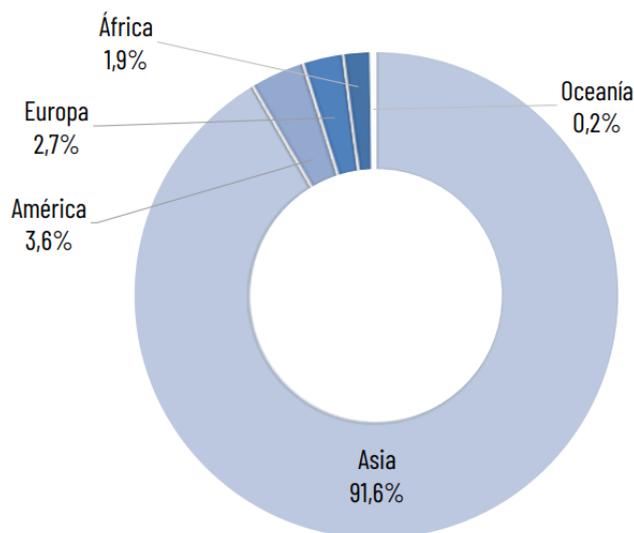


Figura 2. Distribución de la producción de acuicultura en los cinco continentes (a partir de FAO)³

La acuicultura marina en España produjo 58761 toneladas de peces en 2021, lo que supone un incremento del 13.7% respecto al año 2020. Las principales especies cultivadas son la dorada, la lubina, el rodaballo, la corvina y el lenguado, siendo Galicia la única región española que produce rodaballo, con una cosecha de 7681 toneladas en 2020, un 0.7 % menos que el año anterior.³

La acuicultura ha seguido su ritmo de expansión e intensificándose especialmente a lo largo de las últimas décadas, aumentándose significativamente la densidad poblacional de los animales acuáticos. Como consecuencia, la probabilidad de aparición y

propagación de enfermedades infecciosas, así como la mortalidad de los individuos, se ha visto incrementada, generando grandes pérdidas económicas en el sector.^{2,4} Además, el uso generalizado de antibióticos ha contribuido a la propagación de resistencia a los antimicrobianos (RAM), siendo necesario el desarrollo de nuevos antibióticos más efectivos.⁵ La utilización de antibióticos de amplio espectro que actúan sobre dianas terapéuticas muy conservadas presentes en múltiples patógenos bacterianos, producen resistencia que se manifiesta a través de varios mecanismos tales como la modificación de dicha diana. Sin embargo, la utilización de antibióticos de espectro reducido que se dirigen a patógenos específicos, retrasan la aparición de resistencia bacteriana.⁶ Además de estas resistencias, los peces son reservorios de patógenos zoonóticos como *Aeromonas hydrophilia* y *Photobacterium damsela* que afectan no sólo al animal huésped, sino también a los humanos.⁷ Por todas estas razones, la prevención y el control de las enfermedades bacterianas en la acuicultura es uno de los grandes desafíos de salud pública para la próxima década, por lo que se requieren nuevas estrategias para afrontarlo.

1.2 PRINCIPALES ENFERMEDADES BACTERIANAS DE PECES EN ACUICULTURA

Existen varias bacterias patógenas de peces, pero sólo algunas representan un verdadero problema a nivel mundial. Entre las enfermedades infecciosas más dañinas y que originan mayores pérdidas económicas para la acuicultura se encuentran la yersiniosis, la vibriosis, la fotobacteriosis y la forunculosis, todas ellas causadas por bacterias Gram-negativas.

1.2.1 YERSINIOSIS O ENFERMEDAD DE LA BOCA ROJA

La yersiniosis es una afección producida por la bacteria *Yersinia ruckeri* que afecta a gran variedad de peces de distintas partes del mundo, siendo los salmónidos los más susceptibles. Los individuos afectados no presentan síntomas específicos, aunque se suele observar un cambio en el comportamiento de los peces como nadar cerca de la superficie, movimientos lentos o falta de apetito, y también hemorragias alrededor de la cavidad bucal, en la superficie del cuerpo y en los órganos internos.

Existen diversos tratamientos para esta enfermedad, como los antibióticos, los inmunoestimulantes, los probióticos y las vacunas, siendo lo más eficaz mantener altas condiciones de higiene en los estanques lo que permite evitar los vectores portadores de la misma.⁸

1.2.2 VIBRIOSIS

La vibriosis es una enfermedad septicémica hemorrágica aguda o crónica, causada por la bacteria *Vibrio anguillarum*, que afecta tanto a peces de agua dulce o salada como de agua caliente o fría (salmón, trucha, rodaballo, lubina, dorada, etc.). Se manifiesta en úlceras, lesiones en la piel y con hemorragias en el vientre y las aletas.⁹ Se conocen más de 20 serotipos de esta bacteria, pero sólo dos de ellos, el O1 y el O2, y en menor medida el O3, son los responsables de la aparición de infecciones por vibriosis.¹⁰

Esta enfermedad se trata habitualmente con antibióticos, sin embargo, la bacteria ha adquirido resistencia a ellos. Algunos peces afectados sufren anorexia y no ingieren el antibiótico que se les administra en el agua. Existen muchas vacunas comerciales para prevenir la enfermedad, pero la mayoría solo protegen contra el serotipo O1.¹¹

1.2.3 FORUNCULOSIS

La forunculosis es una enfermedad septicémica hemorrágica aguda o crónica, causada por la bacteria *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*, que afecta a los peces salmónidos tanto de aguas dulces como saladas (salmón, trucha) y a algunos no salmónidos (dorada, rodaballo, etc.). Se manifiesta con necrosis licuefactiva, aparición de úlceras y hemorragias en aletas, músculos y órganos internos, produciendo también cambios en el comportamiento de los peces.¹² Esta patología es la más preocupante y la que produce mayores pérdidas económicas en el cultivo de rodaballo en Galicia, debido a la alta mortalidad que causa y a la rápida resistencia que desarrolla la bacteria a los antibióticos.¹³

Para combatir la enfermedad se emplean numerosas vacunas algunas no demasiado eficaces, denominadas bacterinas, que se pueden suministrar por inyección, inmersión o vía oral. En los salmónidos se logran largos períodos de protección frente a la bacteria, mientras que los resultados para el rodaballo no son satisfactorios.¹²

1.2.4 FOTOBACTERIOSIS O PASTEURELOSIS

La fotobacteriosis es una enfermedad causada por *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. Se manifiesta con la aparición de nódulos blancos en los órganos internos o por el agrandamiento del hígado o el riñón de peces como la dorada, lubina o lenguado. Generalmente la enfermedad no presenta síntomas superficiales, aunque puede observarse un oscurecimiento del color del cuerpo o la aparición de hemorragias en la base de las aletas.¹⁴

El uso indiscriminado de diversos antibióticos para paliar la patología ha resultado en la aparición de cepas resistentes. Como consecuencia, lo más eficaz es la administración de sueros y vacunas para prevenir su aparición.¹⁵

1.3 EL PAPEL DEL HIERRO EN EL DESARROLLO BACTERIANO

Durante los procesos infecciosos, las bacterias compiten con el organismo infectado por nutrientes como el hierro. El hierro es un micronutriente esencial para la mayoría de organismos vivos, entre ellos las bacterias, ya que participa en numerosos procesos biológicos como la síntesis de ácidos nucleicos, la reparación del ADN, la regulación génica y el transporte de oxígeno. Este elemento también actúa como cofactor de distintas enzimas metabólicas gracias a su química redox.^{16,17}

A pesar de su elevada abundancia en la corteza terrestre, el hierro se encuentra mayoritariamente a pH fisiológico en su forma oxidada Fe^{3+} , que es muy poco soluble en agua en ambientes aerobios ($K_{ps} = 10^{-39}$), precipitando como $\text{Fe}(\text{OH})_3$, y su biodisponibilidad disminuye. Además, la mayoría de las bacterias requieren una concentración de 10^{-6} M (concentración citoplasmática) para crecer, pero durante la infección se encuentran en un entorno con déficit de hierro. Por ejemplo, la proteína transferrina mantiene una concentración de los iones férricos sobre 10^{-24} M en el suero humano. Las bacterias Gram-positivas y Gram-negativas han desarrollado una serie de estrategias para superar la baja biodisponibilidad del Fe^{3+} , entre las que destaca la biosíntesis y secreción de sideróforos.¹⁸⁻²⁰

1.4 LOS SIDERÓFOROS

Los sideróforos son compuestos de bajo peso molecular (500-1500 Da) con elevada afinidad y selectividad por el Fe^{3+} , al que se unen formando complejos solubles. Son biosintetizados y utilizados por la mayoría de las bacterias para conseguir Fe^{3+} en medios deficientes.¹⁹ Dado que el hierro es un elemento crucial tanto para el crecimiento bacteriano como para el desarrollo de la infección, está demostrado que la producción de sideróforos es un factor de virulencia clave para que una bacteria potencialmente patógena pueda desarrollar el proceso infeccioso.

Los sideróforos pueden presentar otras funciones biológicas importantes para el desarrollo bacteriano como el transporte de metales diferentes al hierro, el transporte de no metales, el secuestro de metales tóxicos o detoxificación, la protección frente al estrés

oxidativo, la señalización molecular (*quorum sensing*) y la actividad antibiótica cuyo conocimiento están permitiendo el desarrollo de un gran número de aplicaciones biotecnológicas en medicina, tales como la biorremediación y el desarrollo de agentes de contraste para resonancia magnética nuclear de imagen.¹⁸ Los sideróforos y sus análogos son potenciales agentes antitumorales porque se basan en el principio de que un exceso de disponibilidad de hierro está relacionado con una incidencia mayor de cánceres. Las células cancerosas necesitan más hierro que las células normales para proliferar y crecer rápidamente, y al secuestrar el hierro, tanto los sideróforos como sus análogos pueden evitar que lo obtengan, frenándose de esta manera su proliferación y crecimiento. Existen numerosos ejemplos de ensayos clínicos en los que sideróforos y sus análogos están siendo investigados como agentes anticancerosos.²¹

Pero una de las aplicaciones más importantes es el desarrollo de nuevos antimicrobianos utilizando la estrategia de caballo de Troya. Esta consiste en aprovechar los mecanismos de captación de hierro de determinadas bacterias, que utilizan sideróforos específicos, para introducir dentro de la bacteria de forma más efectiva los antibióticos de interés.²² Para ello se prepara un conjugado formado por un análogo de sideróforo, que actúa como vector de entrada en la bacteria, un antibiótico o fármaco conocido, que tiene actividad antibacteriana en su forma libre, y un espaciador que une ambos elementos (*Figura 3*). El fragmento de sideróforo al coordinarse con el Fe^{3+} es reconocido por proteínas específicas de la bacteria patógena introduciéndolo dentro de la célula y con ella el antibiótico al que está unido. De esta forma se consigue eludir la baja permeabilidad de las membranas bacterianas y aumentar la eficacia del antibiótico.²² El cefiderocol, una cefalosporina siderófora sustituida con un catecol, fue el primer fármaco antimicrobiano para el tratamiento de infecciones en humanos causadas por bacterias aeróbicas Gram-negativas que ha sido aprobado por las autoridades sanitarias que sigue esta estrategia (*Figura 3*).²³

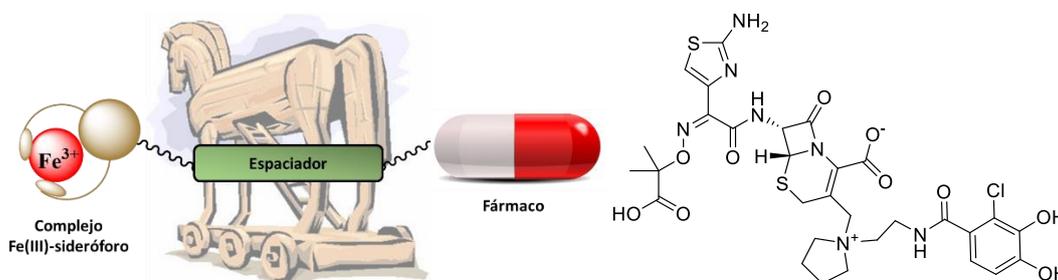


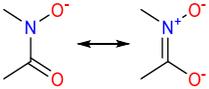
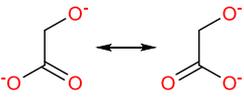
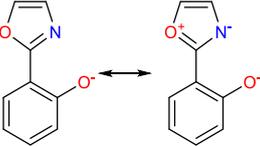
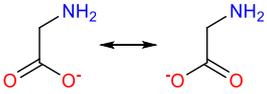
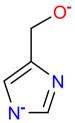
Figura 3. Diagrama de la estrategia del caballo de Troya basados en sideróforos y estructura de cefiderocol

1.4.1 ESTRUCTURAS DE LOS SIDERÓFOROS

Los sideróforos presentan grupos funcionales con átomos de oxígeno y nitrógeno donadores de electrones, y una estructura que les permite actuar como ligandos hexadentados y formar complejos octaédricos con el Fe^{3+} . Los complejos de alto espín sideróforo- Fe^{3+} son muy estables termodinámicamente ($K_f > 10^{30} \text{ M}^{-1}$) y la mayor afinidad por el Fe^{3+} frente al Fe^{2+} marcan su elevada selectividad.^{19,24}

Presentan una gran variedad de estructuras químicas y, en función de la naturaleza química de los ligandos bidentados de su estructura, pueden clasificarse en catecolatos, hidroxamatos, α -hidroxicarboxilatos, hidroxifeniloxazonas, α -aminocarboxilatos y α -hidroxiimidazoles (Tabla 1), de los cuales los 3 primeros son los más abundantes. Los valores de pK_a de cada tipo dan idea de su afinidad por el Fe^{3+} . También pueden encontrarse sideróforos mixtos con ligandos de distinto tipo.¹⁹

Tabla 1. Clasificación de los sideróforos más comunes según su ligando bidentado.¹⁹

Tipo de ligando	Estructura	pKa
Catecolato		9.2, 13.0
Hidroxamato		3.0, 14.5
α -Hidroxicarboxilato		9.0
Hidroxifeniloxazona		9.0
α -Aminocarboxilato		2.5, 9.5
α -Hidroxiimidazol		6.0, 14.5

1.4.2 BIOSÍNTESIS Y MECANISMOS DE ENTRADA

Las bacterias se enfrentan a bajos niveles de Fe^{3+} durante la infección de un huésped y, como consecuencia, se activa la maquinaria transcripcional y se forman los elementos necesarios para la síntesis, reconocimiento, transporte y procesamiento de los sideróforos. En el citoplasma bacteriano están las sintetasas de péptidos no ribosómicos

(nonribosomal peptide synthetase, NRPS), responsables de la síntesis de la mayoría de los sideróforos que, una vez formados, son liberados al medio extracelular, donde se coordinan con el ión férrico formando los complejos sideróforo-Fe³⁺. Seguidamente son reconocidos por receptores específicos y reintroducidos por diferentes mecanismos en función del tipo de microorganismo.^{19,25}

Los mecanismos de adquisición de sideróforos están siendo profundamente estudiados en las bacterias Gram-negativa. Este tipo de bacterias presentan una membrana externa de fosfolípidos y liposacáridos, junto a una fina capa de peptidoglicano, que les aportan estabilidad mecánica, y una membrana interna de fosfolípidos, separadas por el periplasma (*Figura 4*). Las proteínas de membrana externa (*outer membrane protein*, OMP) actúan como receptores específicos de los complejos sideróforo-Fe³⁺, los reconocen y transportan activamente al periplasma. El complejo TonB (formado por la caja TonB y las proteínas exbB y exbD) suministra la energía necesaria para desencadenar el cambio conformacional de las OMP y el transporte del complejo. Una vez en el periplasma, los complejos se unen a proteínas periplásmicas de unión (*periplasmic binding protein*, PBP) y avanzan hacia la membrana interna, donde una proteína de membrana dependiente de ATP o transportador tipo ABC (*ATP Binding Cassete*) los introduce en el citoplasma. Dentro de la bacteria, el hierro es desquelatado y liberado del sideróforo por acción de una reductasa, ya que su afinidad por el Fe²⁺ es mucho menor que por el Fe³⁺ (ver Mecanismo A de la *Figura 4*). En otros casos, otras enzimas específicas se encargan de la degradación del sideróforo.^{26,27} Existen casos, como en *Pseudomonas aeruginosa* con el sideróforo pioverdina, en los que el Fe²⁺ se libera ya en el periplasma, donde el complejo sideróforo-Fe³⁺ sufre una reducción. Un transportador tipo ABC lo introduce en el citoplasma y el sideróforo es devuelto al medio extracelular (ver Mecanismo B de la *Figura 4*).²⁸

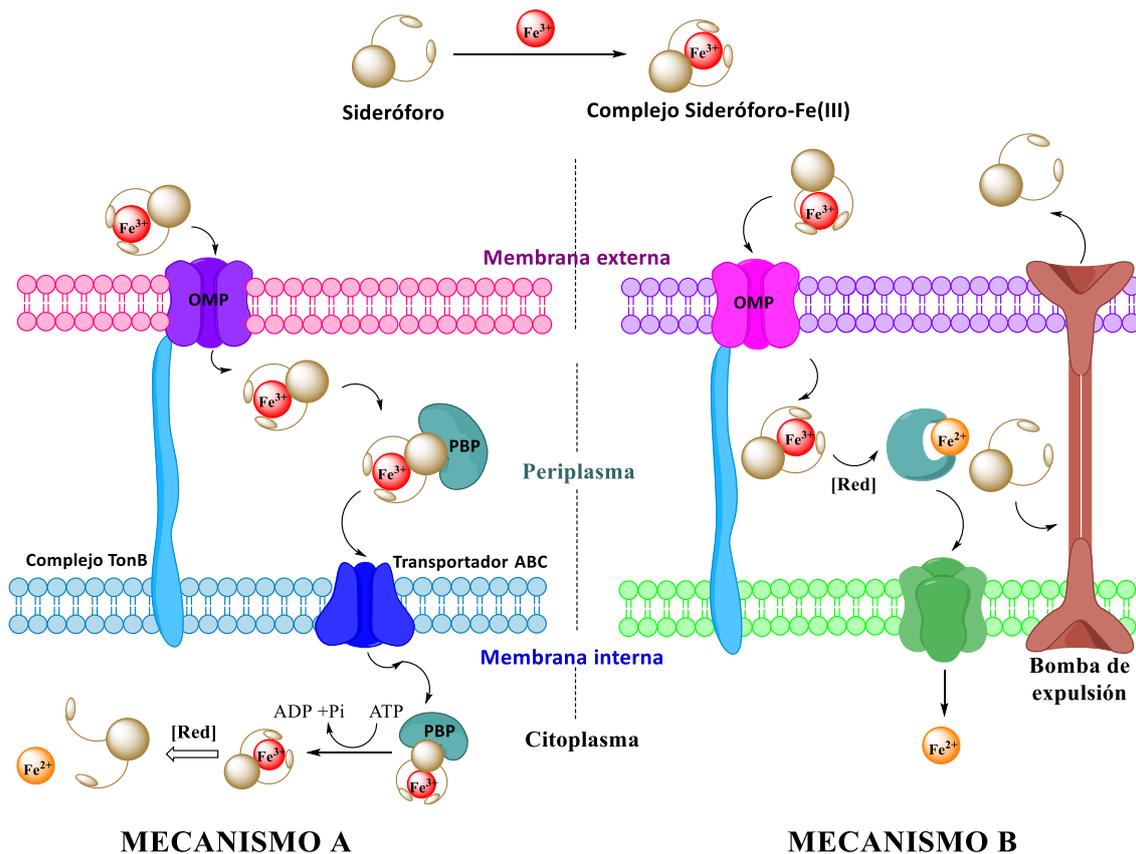


Figura 4. Mecanismos de adquisición de hierro mediante sideróforos en bacterias Gram-negativas.

Las bacterias Gram-positivas han sido menos estudiadas, pero al carecer de membrana externa y periplasma y presentar una sola membrana, parece que una proteína similar a la PBP reconoce directamente el complejo sideróforo-Fe³⁺ y lo introduce dentro del citoplasma con ayuda de un transportador tipo ABC.^{26,27}

Las bacterias pueden biosintetizar más de un tipo de sideróforo, pueden adquirir nuevos sistemas de captación de hierro mediado por sideróforos por transferencia horizontal a través de un plásmido, y emplear uno u otro en función de las condiciones del medio en el que se encuentren, de la temperatura, el pH o la presencia de otros microorganismos.²⁹

1.5 EL SIDERÓFORO PISCIBACTINA

La fotobacteriosis constituye el principal problema patológico en el cultivo de doradas y lubinas en los países mediterráneos, entre ellos España, lo que genera grandes pérdidas económicas en la acuicultura marina a nivel mundial. La bacteria *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* es el agente etiológico de la fotobacteriosis y utiliza la piscibactina (Pcb) como sideróforo responsable de la captación de Fe³⁺ para su crecimiento y virulencia.¹⁴

La estructura de Pcb (**1**) es muy similar a la de yersiniabactina (Ycb, **2**) (Figura 5), el sideróforo implicado en la captación de hierro de algunas especies patógenas de *Yersinia* como *Y. pestis*, causante de la peste bubónica o la Peste Negra y *Y. enterocolitica*, capaz de producir trastornos entéricos graves en humanos.³⁰ La Pcb es un sideróforo de tipo fenolato que presenta dos anillos de tiazolina (anillos B y D), uno de tiazolidina (anillo C), posee cinco centros estereogénicos y, a diferencia de Ycb, carece de dos grupos metilo en la posición C14. La presencia del anillo de tiazolidina lábil (anillo C) y del fragmento de α -metiltiazolina β -hidroxi-2,4-disustituida sensible a condiciones ácidas (tiazolina terminal, anillo D) podría explicar la baja estabilidad de Pcb.

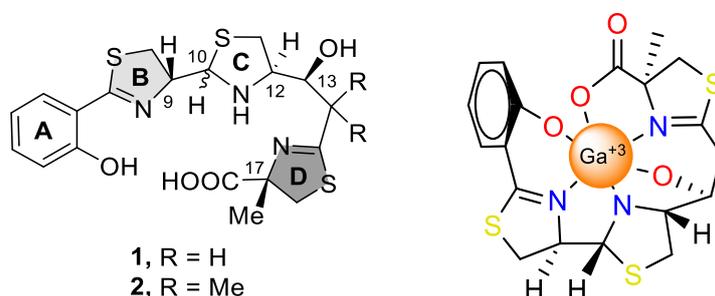


Figura 5. Estructura de piscibactina (**1**), yersiniabactina (**2**) y el complejo de Ga^{3+} de Pcb

1.6 ASPECTOS COMPUTACIONALES

La teoría de funcionales de densidad (DFT) es un método computacional que permite estudiar las propiedades electrónicas y estructurales de sistemas moleculares. La DFT se basa en el principio de que la energía total de un sistema depende solo de la densidad electrónica, que es una función de las coordenadas espaciales. La DFT es especialmente útil para estudiar complejos de hierro o galio, que son metales de transición con una gran variedad de estados de oxidación y geometrías. Estos complejos tienen aplicaciones en campos como la catálisis, la biología o la medicina. La DFT permite obtener información sobre la estabilidad, la reactividad y explicar aspectos espectroscópicos de los complejos, así como sobre los mecanismos de las reacciones que involucran a estos metales.³¹

Gracias al avance de la tecnología informática, hoy en día es posible realizar cálculos DFT con mayor rapidez y precisión que nunca. Los ordenadores modernos tienen una mayor capacidad de procesamiento, memoria y almacenamiento, lo que permite resolver ecuaciones más complejas y manejar modelos electrónicos más grandes. Además, existen numerosos programas y paquetes de software que facilitan la implementación y el uso de la DFT, ofreciendo una amplia gama de opciones y funcionalidades. El grupo de investigación en el que se ha realizado el presente trabajo de fin de máster tiene gran

experiencia en la utilización de esta herramienta tan potente a través de los ordenadores del Centro de Supercomputación de Galicia (CESGA).

2 ANTECEDENTES

Este trabajo de fin de máster se desarrolló en el grupo de investigación QUIMOLMAT-PRONAMAR del Centro Interdisciplinar de Química e Biología (CICA),³² cuyos miembros pertenecen también a la Facultad de Ciencias de la Universidade da Coruña (UDC).

El grupo no solo tiene una gran experiencia en el estudio de sideróforos de bacterias patógenas en peces, sino también en el aislamiento y determinación de productos de origen natural, logrando identificar estructuralmente gran número de nuevos compuestos naturales aislados de diversas fuentes naturales, sobre todo de origen marino. El estudio de sideróforos en bacterias patógenas en peces acuicultura y su aplicación en el desarrollo de nuevas aproximaciones en la diagnosis y el tratamiento contra las enfermedades infecciosas que provocan dichas bacterias está siendo desarrollado por el grupo desde hace varios años, en colaboración con el grupo de Microbiología del Dr. Manuel L. Lemos de la Univ. De Santiago de Compostela.

El grupo del Dr. Manuel L. Lemos ha identificado, clonado y caracterizado un *cluster* biogénico de aproximadamente 35 kb, que contiene los genes responsables de la síntesis de un sideróforo de tipo fenolato.³³ Se encontró una gran similitud entre el *cluster* caracterizado y la secuencia de genes que codifica la síntesis de las proteínas implicadas en la producción de Ycb.³⁰ Más tarde, gracias a dicha colaboración, el grupo PRONAMAR logró el aislamiento y la elucidación estructural del sideróforo Pcb, como complejos de Ga³⁺ y Fe³⁺, a partir de cultivos de la bacteria patógena Gram-negativa *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* en un medio CM9 con deficiencia de hierro.³⁴ Durante el aislamiento de Pcb, se aisló y caracterizó un metabolito más pequeño que fue denominado prepiscibactina (PrePcb), que podría ser un posible intermediario de su biosíntesis. En su estructura presenta un grupo fenol, un anillo de tiazolina y otro de tiazolidina fusionado con un anillo de γ -lactama (*Figura 6*).

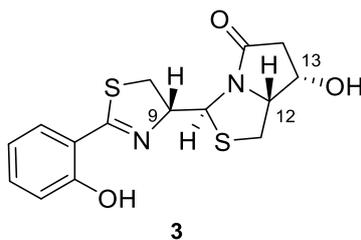


Figura 6. Estructura de prepiscibactina

Unos años más tarde, lograron determinar que la FrpA es la proteína de membrana receptora de Pcb. La clonación, expresión de esta proteína en *E. coli* permitió al grupo de investigación aislar la proteína recombinante rFrpA. Su ensayo como vacuna en lenguado mostró no solo elevadas propiedades inmunogénicas, sino también un alto grado de protección. Estos resultados fueron patentados,³⁵ publicados³⁶ y recibieron el premio de transferencia por la Real Academia de las Ciencias de Galicia en 2021. La importancia de Pcb fue descubierta posteriormente cuando descubrieron que también era producida por *Vibrio anguillarum*. Además, demostraron que Pcb confiere más virulencia en peces que el sideróforo vanchrobactina, otro sideróforo procedente de la bacteria *V. anguillarum* también descubierto por el grupo PRONAMAR.³⁷ Estudios posteriores mostraron que Pcb no solo era producido por numerosas bacterias de las Vibrionaceae,³⁸ como *V. ordalii*³⁹ y *V. neptunius*⁴⁰ (bacteria patógena de moluscos) sino también en bacterias de la especie *Xenorhabdus szentirmaii*, relacionando su producción, en este caso, a la actividad insecticida de estas bacterias.⁴¹ Dada la importancia de Pcb, el grupo de investigación PRONAMAR logró completar su síntesis total como su complejo de Ga³⁺ en el año 2021. Esta aproximación sintética permitirá desarrollar nuevos tratamientos antimicrobianos contra la fotobacteriosis basados en la captación del Fe³⁺. Se estableció su configuración absoluta como 9*R*, 10*R*, 12*R*, 13*S*, 17*S* y se comprobó que la ausencia del grupo dimetilo en C14 en comparación con Ycb cambia radicalmente la reactividad del resto de la tiazolina β-hidroxi-2,4-disustituida dificultando su síntesis.⁴²

Las propiedades óptimas de coordinación de metales que muestra la estructura de piscibactina son prometedoras para su aplicación en el diseño de nuevos agentes quelatantes de metales, con numerosas aplicaciones biotecnológicas entre las que destaca el diseño de vectores que puedan explotar la mencionada estrategia del Caballo de Troya. Pero su baja estabilidad impide su uso como vector. Por esta razón, se hace indispensable el diseño de análogos estables de Pcb, siendo necesario primero determinar cuáles son los requerimientos estructurales para la coordinación con el metal. En esta línea, y como primera aproximación, se llevó a cabo la síntesis de varios análogos en los que se encontró que: a) la sustitución del anillo de tiazolina terminal (anillo D) por un anillo de tiazol le confirió una mayor estabilidad y mantuvo además las propiedades quelatantes de Fe³⁺ y Ga³⁺, así como la actividad siderófora; b) era crucial mantener la configuración *S* del grupo hidroxilo en la posición 13, ya que los derivados tiazólicos con configuración 13*R* no quelataban, ni poseían actividad siderófora. Sin embargo, estos análogos simplificados

de Pcb todavía seguían siendo inestables, probablemente debido a la presencia del anillo de tiazolidina (anillo C) en su estructura.⁴³ Por ello, dentro del proyecto SIDEROCLAM financiado en la actualidad por el Ministerio de Ciencia e Innovación,⁴⁴ se plantea la preparación de análogos simplificados y estables de Pcb con el fin de desarrollar nuevas estrategias en la detección o eliminación de bacterias patógenas productoras de Pcb.

3 OBJETIVOS

El objetivo final de este trabajo de fin de máster es la preparación de un intermedio avanzado en la síntesis de un nuevo análogo de piscibactina (Pcb) con estructura simplificada, donde se sustituya el anillo D de tiazolina terminal por un tiazol, el anillo C de tiazolidina por un anillo heterocíclico más estable y se mantenga la configuración 13*S* del centro estereogénico del carbono que presenta el grupo hidroxilo en su estructura. Para ello se plantearon los siguientes objetivos específicos:

- Análisis a través de cálculos computacionales basados en la teoría de funcionales de densidad (DFT) de modelos moleculares de análogos simplificados de Pcb que mantengan la capacidad de coordinar con el Ga³⁺.
- Diseño de una ruta de síntesis de un análogo estable del sideróforo Pcb producido por *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*.
- Preparación y caracterización de un intermedio avanzado que nos permita en un futuro la síntesis de un análogo simplificado de Pcb.

4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este apartado se discuten los cálculos computacionales y las rutas sintéticas llevadas a cabo para la preparación de los análogos de Pcb y los resultados obtenidos.

4.1 CÁLCULOS COMPUTACIONALES

Como primer objetivo de este trabajo de fin de máster se pretende diseñar un análogo simplificado de Pcb que pueda quelatar el Fe^{3+} y que sea más estable que Pcb. Para comprobar si se pueden reemplazar los anillos de tiazolidina o tiazolina, más difíciles de obtener, por los de tiazol u oxazol, que al ser aromáticos son más estables, y si se mantiene la capacidad de formar complejos con Fe^{3+} o Ga^{3+} , se plantean diferentes motivos estructurales para ser estudiados mediante cálculos computacionales. Para ello se propone: a) utilización de modelos con complejos de Ga^{3+} en vez de Fe^{3+} para que puedan ser estudiados, una vez sintetizados, mediante técnicas de RMN; b) sustitución de la tiazolina terminal (anillo D) presente en Pcb por un anillo de tiazol (T), ya que, tal como ha demostrado el grupo en una reciente publicación⁴⁵, esta sustitución no afecta a la formación de complejos de Ga^{3+} ; c) sustitución de la tiazolina (TZ) presente en el anillo B de Pcb por tiazol (T), oxazol (O), y oxazolina (OZ); y d) sustitución de la tiazolidina (TD) del anillo C de Pcb por tiazolina, oxazolina, oxazolidina (OD) y pirrolidina (P). De esta manera se plantearon las estructuras modelos mostradas en la *Figura 7*, sobre las que se realizaron cálculos computacionales utilizando la teoría de funcionales de densidad (DFT) para comprobar si estos modelos poseen la capacidad de formar complejos octaédricos con Ga^{3+} .

El proceso comienza con búsquedas conformacionales para cada modelo empleando el software MAESTRO, usando una ventana de energía de 5 kcal/mol. En esta búsqueda inicial debido a su rigidez, todos los modelos dieron un solo conformero mayoritario que se minimizó energéticamente siguiendo sus frecuencias de vibración con un modelo DFT con una combinación conjunto base B3LYP, funcional 6-31G+(d,p) y con una contribución de efecto de disolvente mediante el modelo polarizable continuo (IEFPCM) utilizándose MeOH, todo ello implementado en el programa Gaussian16.

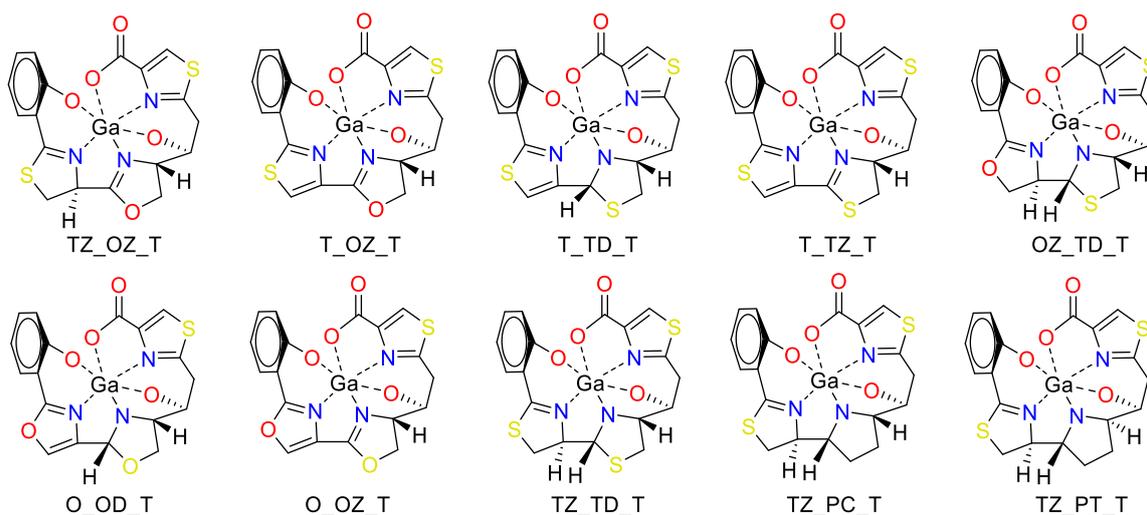


Figura 7. Modelos propuestos de análogos del sideróforo Pcb coordinados con el Ga^{3+} .

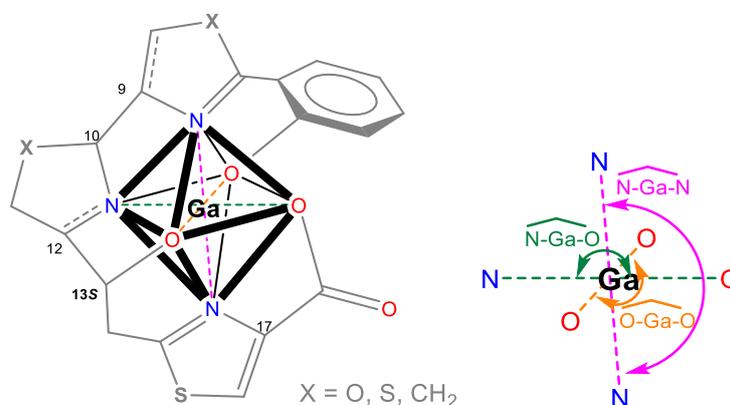
T:Tiazol; O:Oxazol; TZ:Tiazolina; OZ:Oxazolina; TD:Tiazolidina; OD:Oxazolidina; PC:Pirrolidina cis; PT:Pirrolidina trans

Para deducir la capacidad de cada uno de los modelos de formar complejos octaédricos de Ga^{3+} se utilizaron dos parámetros: la suma de los tres ángulos transversales que forman el octaedro y las diferencias entre las medias cuadráticas entre el octaedro formado por dos átomos de oxígeno y dos átomos de nitrógeno y un átomo de nitrógeno y otro de oxígeno en el complejo de Ga^{3+} , suponiendo una esfera perfecta de coordinación octaédrica (ver figura de la *Tabla 2*). Estas optimizaciones de todos los análogos propuestos permitieron observar el grado de distorsión de la esfera de coordinación del átomo de galio de geometría octaédrica. Aunque los ángulos transversales de un híbrido octaédrico ideal de $Ga^{3+} d^2sp^3$ deben ser de 180° , esta estructura óptima no puede lograrse debido a la distribución asimétrica de los seis átomos coordinados (tres de oxígeno y tres de nitrógeno). Lo ideal es que la suma de los ángulos transversales de la estructura octaédrica sea alrededor de 540° (tres veces 180°) y una desviación de este valor dará una idea de la estabilidad del complejo. Además, la diferencia entre la suma de las longitudes de los enlaces Ga-heteroátomos para las disposiciones N-Ga-N, O-Ga-N y O-Ga-O y la distancia transversal entre los heteroátomos N-N, O-N, y O-O, respectivamente, dará información acerca del grado de distorsión de la estructura octaédrica. La suma de los ángulos transversales para las disposiciones O-Ga-O, O-Ga-N y N-Ga-N de las estructuras DFT muestra un valor dentro de un rango de $489-501^\circ$ (*Tabla 2*). En los cálculos realizados (*Tabla 3*), se observaron distancias promedio de 1.96 \AA para el enlace Ga-O en el O-Ga-O, 2.05 \AA para el enlace Ga-N en el O-Ga-N y 2.03 \AA para el enlace Ga-N en las disposiciones N-Ga-N en todos los análogos, valores que están en buena concordancia con complejos de galio similares reportados en la bibliografía.^{46,47}

Consideramos que la desviación estándar (STD) de la diferencia de los valores entre la distancia transversal y la suma de las distancias metal-heteroátomo (N u O) en valor absoluto es adecuada cuando se encuentra dentro del rango 0.02-0.05, descartándolo cuando sea mayor de 0.05. Todos los análogos de Pcb propuestos muestran ángulos y valores de STD adecuados para una buena coordinación octaédrica con el Ga^{3+}

A la vista de los resultados obtenidos se decidió sintetizar inicialmente el análogo TZ_OZ_T (tiazolina-oxazolina-tiazol), aunque por complicaciones sintéticas que se explicarán más adelante, se sustituyó por el análogo T_OZ_T (tiazol-oxazolina-tiazol), que también muestra valores adecuados para los dos parámetros discutidos anteriormente.

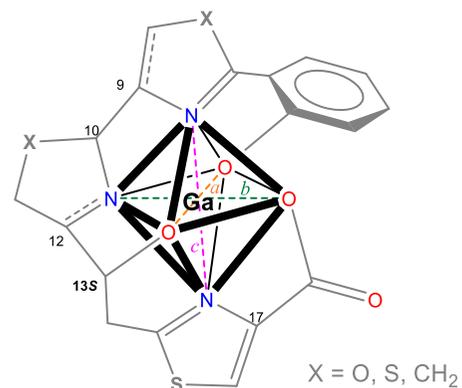
Tabla 2. Ángulos transversales en un entorno octaédrico para los análogos de Pcb propuestos.



Análogo	¹ O-Ga-O	² O-Ga-N	³ N-Ga-N	⁴ Suma
TZ_OZ_T	164.70	163.50	160.80	489.00
T_OZ_T	166.00	163.00	160.00	489.00
T_TD_T	166.90	170.10	160.50	497.50
T_TZ_T	165.00	162.20	159.80	487.00
OZ_TD_T	166.30	167.70	160.80	494.80
O_OD_T	166.80	165.30	157.40	489.50
O_OZ_T	166.00	160.20	158.40	484.60
TZ_TD_T	166.60	171.00	162.90	500.50
TZ_PC_T	166.30	171.10	164.40	501.80
TZ_PT_T	162.10	168.10	159.70	489.90

¹O-Ga-O ángulo transversal. ²O-Ga-N ángulo transversal. ³N-Ga-N ángulo transversal
⁴Suma = Σ ángulos (O-Ga-O ángulo transversal + O-Ga-N ángulo transversal + N-Ga-N ángulo transversal)

Tabla 3. Distancias ambientales octaédricas para los análogos de Pcb propuestos. Longitudes de enlace en Å.



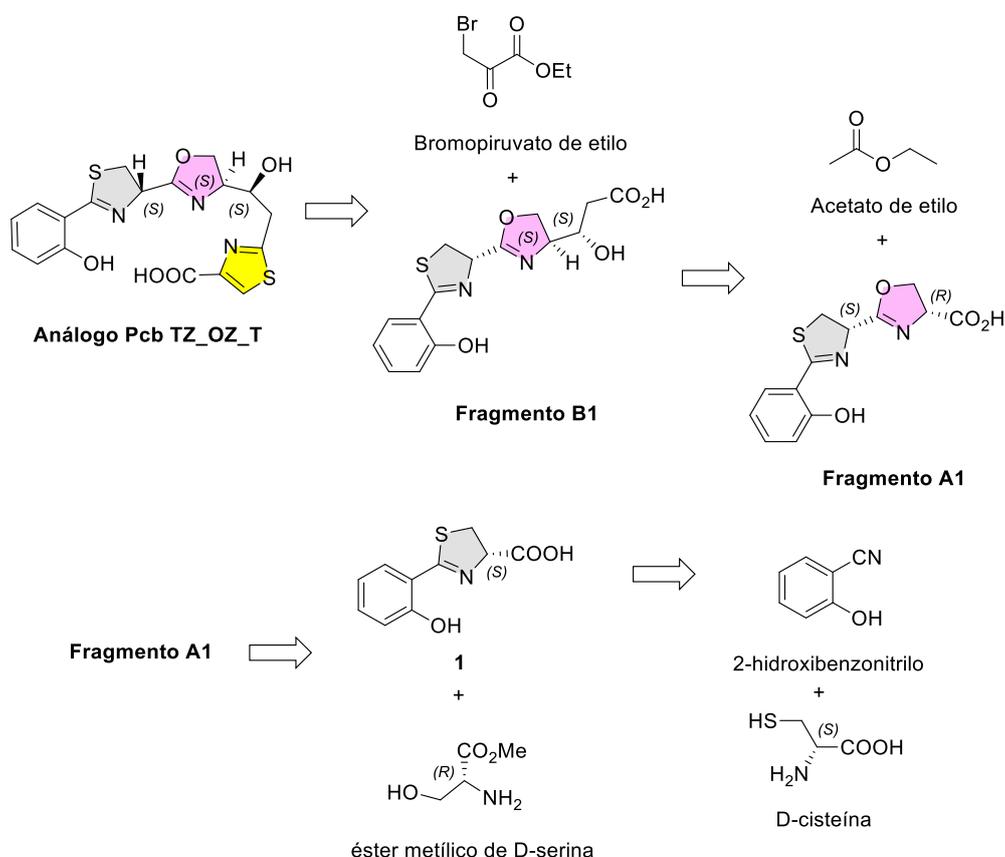
Comp.	Distancias Metal-O		Distancias Metal-N o Metal-O		Distancias Metal-N		Distancias transversales O-O, O-N o N-N			¹ Δ _{oo}	¹ Δ _{no}	¹ Δ _{nn}	² STD
	O-Ga-O	O-Ga-O	N-Ga-O	N-Ga-O	N-Ga-N	N-Ga-N	O-O (a)	N-O (b)	N-N (c)				
TZ_OZ_T	2.03	1.93	2.12	1.92	2.03	2.06	3.93	4.00	4.03	0.03	0.04	0.06	0.04
T_OZ_T	2.01	1.93	2.14	1.92	2.03	2.05	3.91	4.01	4.01	0.03	0.05	0.07	0.05
T_TD_T	2.01	1.90	2.21	1.91	1.99	2.05	3.89	4.10	3.98	0.02	0.02	0.06	0.03
T_TZ_T	2.02	1.92	2.14	1.92	2.02	2.05	3.91	4.01	4.01	0.03	0.05	0.06	0.05
OZ_TD_T	2.03	1.90	2.24	1.93	1.95	2.05	3.90	4.15	3.94	0.03	0.02	0.06	0.04
O_OD_T	2.00	1.90	2.28	1.92	1.97	2.04	3.86	4.16	3.96	0.04	0.04	0.05	0.04
O_OZ_T	2.00	1.92	2.21	1.93	1.99	2.04	3.89	4.08	3.96	0.03	0.06	0.07	0.05
TZ_TD_T	1.99	1.90	2.20	1.92	1.98	2.06	3.86	4.10	3.99	0.03	0.02	0.05	0.03
TZ_PC_T	1.99	1.90	2.13	1.93	1.97	2.06	3.87	4.05	4.00	0.02	0.01	0.03	0.02
TZ_PT_T	2.07	1.93	2.07	1.87	2.07	2.17	3.96	3.92	4.16	0.04	0.02	0.08	0.05

¹Diferencia entre la distancia transversal y la suma de las distancias metal-heteroátomo (N u O) (en valor absoluto)

² Desviación estándar de los valores de Δ en la entrada 1

4.2 ANÁLISIS RETROSINTÉTICO DEL ANÁLOGO DE PCB TZ_OZ_T (TIAZOLINA-OXAZOLINA-TIAZOL)

Para el diseño de la ruta sintética se planteó la retrosíntesis del análogo del sideróforo Pcb en el que el anillo C de tiazolidina (TD) de naturaleza lábil se sustituye por otro anillo de oxazolina (OZ) que es más estable. En base a estudios preliminares, se mantiene el anillo D de tiazol (T) terminal, que confiere mayor estabilidad a la estructura, y la configuración 13*S* para el grupo hidroxilo en esa posición, que es necesaria para la quelatación del Fe³⁺ y del Ga³⁺ (Esquema 1).⁴³

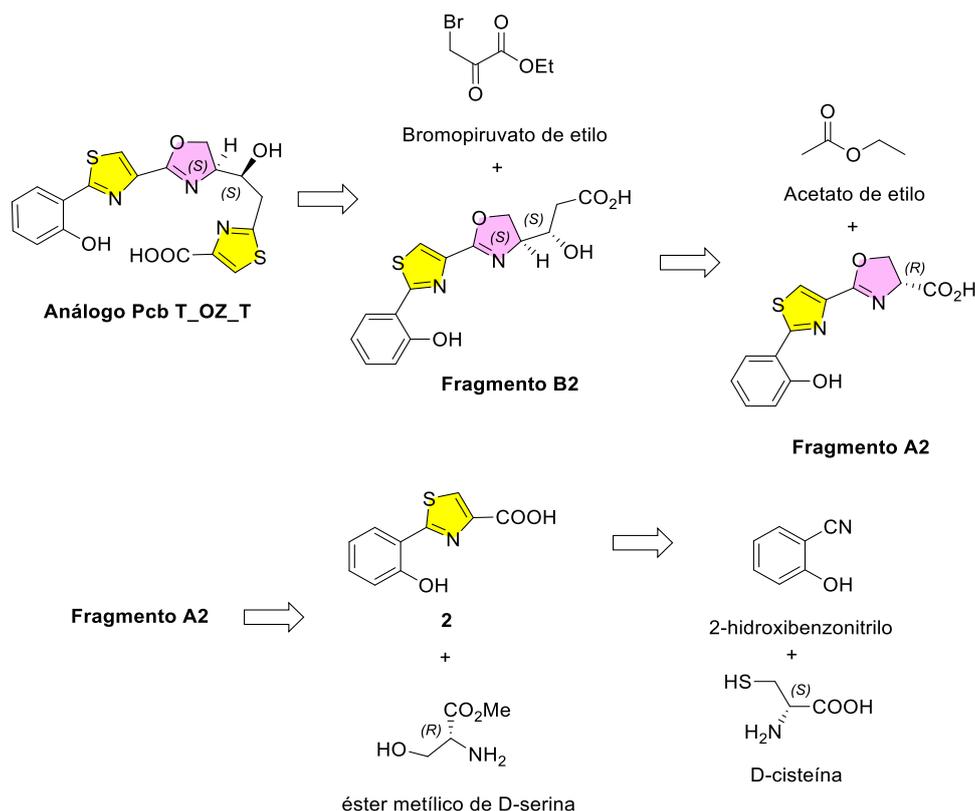


Esquema 1. Análisis retrosintético para la preparación del análogo de piscibactina (Pcb) con los anillos de tiazolina-oxazolina-tiazol (TZ_OZ_T).

En el análisis retrosintético del análogo de Pcb TZ_OZ_T, el anillo de tiazol terminal se obtendría utilizando la metodología de formación de tiazoles de Hantzsch a partir del fragmento B1 y el bromopiruvato de etilo.⁴⁸ El fragmento B1 se formaría a partir del acoplamiento entre el fragmento A1 y el acetato de etilo. A su vez el anillo de oxazolina del fragmento A1, se obtendría a partir del acoplamiento del compuesto 1 con el éster metílico de la D-serina. Por último, la tiazolina del compuesto 1 se formaría a partir del acoplamiento entre el 2-hidroxibenzonitrilo y la D-cisteína.

4.3 ANÁLISIS RETROSINTÉTICO DEL ANÁLOGO DE PCB T_OZ_T (TIAZOL-OXAZOLINA-TIAZOL)

A diferencia del análogo de Pcb anterior, en este análogo el anillo B de tiazolina (TZ) se sustituye por otro anillo de tiazol (T), además de cambiar el anillo C de tiazolidina (TD) por oxazolina (OZ) y mantener el anillo D de tiazol (T) terminal y la configuración 13S (Esquema 2).



Esquema 2. Análisis retrosintético para la preparación del análogo de piscibactina (Pcb) con los anillos de tiazol-oxazolina-tiazol (T_OZ_T).

En el análisis retrosintético del análogo de Pcb T_OZ_T, el anillo de tiazol terminal se obtendría utilizando la metodología de formación de tiazoles de Hantzsch a partir del fragmento B2 y el bromopiruvato de etilo (α -bromocetoéster).⁴⁸ El fragmento B2 se formaría a partir del acoplamiento entre el fragmento A2 y el acetato de etilo. A su vez el anillo de oxazolina del fragmento A2 se obtendría a partir del acoplamiento del compuesto **2** con el éster metílico de la D-serina. Por último, el tiazol del compuesto **2** se formaría a partir de la oxidación de la tiazolina resultante del acoplamiento entre el 2-hidroxibenzonitrilo y la D-cisteína.

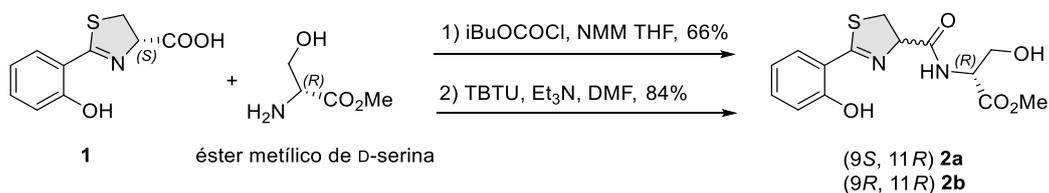
4.4 PREPARACIÓN DEL ANÁLOGO DE PCB TZ_OZ_T

La preparación del ácido carboxílico tiazolínico **1** se abordó mediante la condensación de 2-hidroxibenzonitrilo y D-cisteína, como fuente quiral de la posición 9*R*, a 65 °C en una mezcla 1:1 de MeOH en un tampón fosfato ajustado a pH 6.4 (*Esquema 3*).^{42,49} Aunque en la bibliografía se emplea 60 °C, hemos comprobado que aumentando la temperatura a 65 °C se logra mejorar el rendimiento de la reacción. La señal más característica de **1** en su espectro de RMN de ¹H es un triplete (*J* = 8.8 Hz) a 5.42 ppm, correspondiente al protón del carbono en la posición α al grupo carboxílico, que indicó la formación del anillo.



Esquema 3. Preparación del compuesto 1.

La síntesis del fragmento A1 (*Esquema 1*) comenzó con el acoplamiento del compuesto **1** con el éster metílico de la D-serina bajo dos condiciones inertes diferentes (*Esquema 4*). En el primer caso, se añadió *N*-metilmorfolina (NMM), seguido de cloroformiato de isobutilo a una solución de **1** en THF anhidro a -25 °C y se agitó durante 10 min. A continuación, se añadió el éster metílico D-serina junto con más NMM, originando el compuesto **2** como una mezcla de diastereoisómeros **2a-b**.⁵⁰ En un segundo caso, se añadió el éster metílico de la D-serina, el agente acoplante TBTU y Et₃N a una solución de **1** en DMF anhidro, originando también **2** como una mezcla de diastereoisómeros **2a-b**.⁵¹



Esquema 4. Preparación del compuesto 2

A partir de la integral de la señal de los protones del grupo CH₃ del éster metílico en sus espectros de RMN de ¹H se dedujo la relación de diastereoisómeros en cada uno de los dos procedimientos. En el primero caso, se observó una relación 1:1 de la mezcla de diastereoisómeros, mientras que en el segundo caso, se obtuvieron en una relación 1:3 (*Figura 8*). Por esta razón, este último método se consideró el más adecuado para la

formación de **2a**, y porque además el rendimiento obtenido fue mayor. Los diastereoisómeros **2a-b** se separaron por cromatografía en gel de sílice.

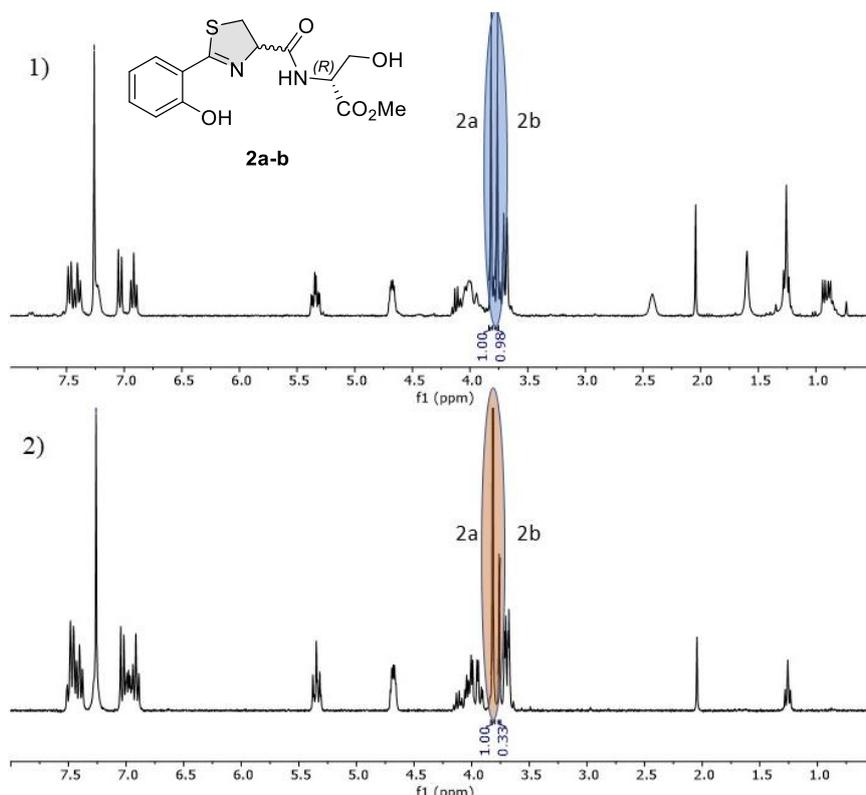
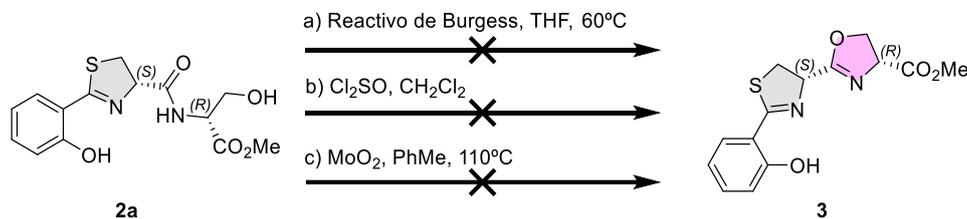


Figura 8. Espectro de ^1H -RMN del compuesto **2** bajo las condiciones: 1) $i\text{BuOCOC}$ l, NMM, THF; 2) TBTU, Et_3N , DMF. Las señales más relevantes aparecen coloreadas.

El siguiente paso consistió en la formación de la oxazolina a partir del diastereoisómero **2a**, para lo cual se ensayaron 3 condiciones distintas a) reactivo de Burgess en THF y a 60°C ,^{50,52} b) Cl_2SO en CH_2Cl_2 a temperatura ambiente⁵¹ y c) MoO_2 en tolueno y reflujo azeotrópico con la eliminación de agua usando un Dean-Stark⁵³ (Esquema 5). En todos los casos, no tuvo lugar la ciclación de formación de oxazolina, observándose además que se producía la oxidación de la tiazolina a tiazol.



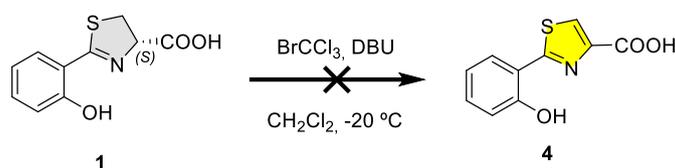
Esquema 5. Intentos de preparación del compuesto **3**.

4.5 PREPARACIÓN DEL ANÁLOGO DE PCB T_OZ_T

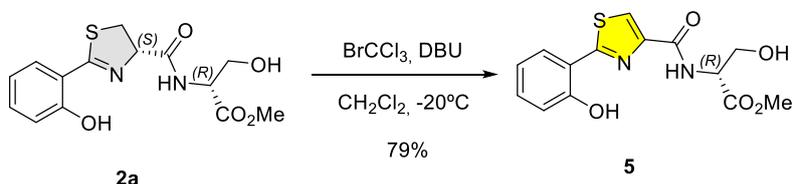
Debido a este inesperado resultado de oxidación del anillo de tiazolina a tiazol, se decidió preparar el análogo T_OZ_T, en vez del análogo TZ_OZ_T previsto anteriormente,

teniendo en cuenta que sería necesario obtener el anillo de tiazol antes de la formación de la oxazolina. Los estudios computacionales de quelatación con Ga^{3+} mostraron que este modelo también posee una estructura adecuada con los parámetros de suma de ángulos transversales de 489° (ver *Tabla 2*) y la desviación estándar de 0.05 (ver *Tabla 3*).

Aprovechando los intermedios ya preparados, se ensayó el paso de oxidación a partir de las tiazolinas **1** (*Esquema 6*) y **2a** (*Esquema 7*), bajo las mismas condiciones, adición de bromotriclorometano (BrCCl_3) y DBU en CH_2Cl_2 .⁵⁴⁻⁵⁶ La formación del compuesto **4** a partir del compuesto **1** (*Esquema 6*) no tuvo lugar, probablemente debido a la presencia del grupo carboxílico libre. El tiazol **5** se formó a partir del compuesto **2a** (*Esquema 7*), ya que se observó la señal más característica en el espectro de RMN de ^1H del protón tiazólico como singulete a 8.12 ppm. La formación del compuesto deseado se confirmó también a partir de su espectro de masas de alta resolución.

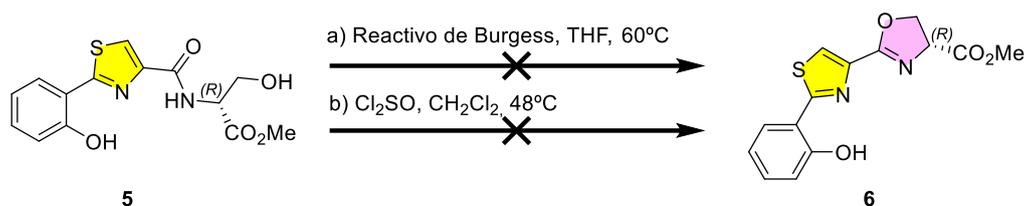


Esquema 6. Intento de preparación del compuesto 4 a partir del compuesto 1.

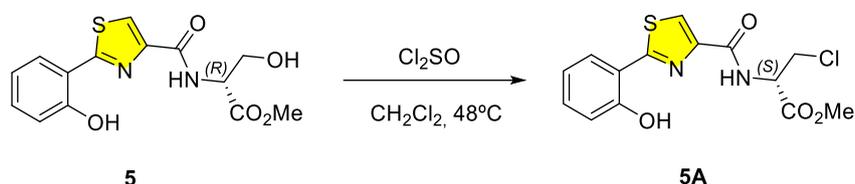


Esquema 7. Preparación del compuesto 5 a partir del compuesto 2

Con la presencia ya del anillo de tiazol en **5** se intentó de nuevo la formación de la oxazolina en **6** mediante las mismas condiciones mencionadas anteriormente (*Esquema 8*). En ambos casos no tuvo lugar la formación del anillo de oxazolina, probablemente debido a la presencia del OH fenólico libre. En la reacción de **5** con Cl_2SO a 48°C en CH_2Cl_2 se observó la formación del cloruro intermedio **5A** (*Esquema 9*) tanto por TLC-MS (presencia del grupo isotópico del átomo de cloro) como por ^1H -RMN en el que se observa un desplazamiento químico típico de un CH_2 unido a un Cl en lugar de a un grupo OH.

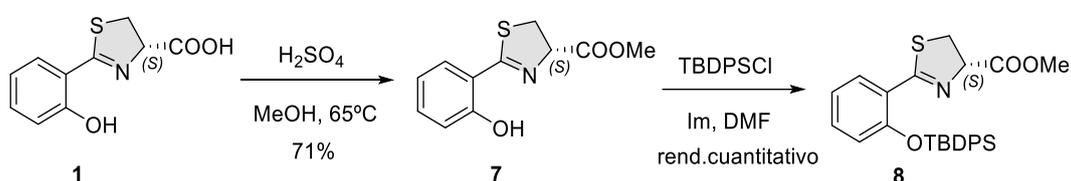


Esquema 8. Intentos de preparación del compuesto 6.



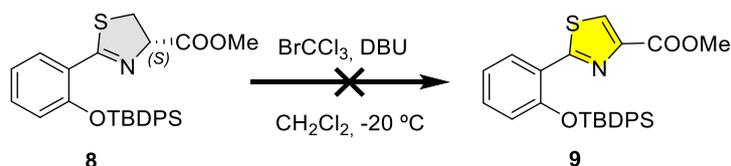
Esquema 9. Intento fallido de la preparación del compuesto 6 con la formación del cloruro 5A.

Con todos estos resultados se decidió modificar la ruta de síntesis, ya que se cree que es necesario proteger el grupo OH fenólico, para lo que es necesaria la previa protección del grupo ácido del compuesto **1**. Para ello, se protegió en primer lugar el ácido carboxílico de **1** como éster metílico empleando H_2SO_4 en MeOH a $65\text{ }^\circ\text{C}$ para dar **7** (Esquema 10).⁴² A continuación mediante química de grupos protectores empleando silicio, el grupo hidroxilo se protegió con TBDPSCI en presencia de una base.^{57,58} La formación de **7** y **8** se confirmó tanto por análisis de sus espectros de RMN de ^1H , como por sus espectros de masas de alta resolución.



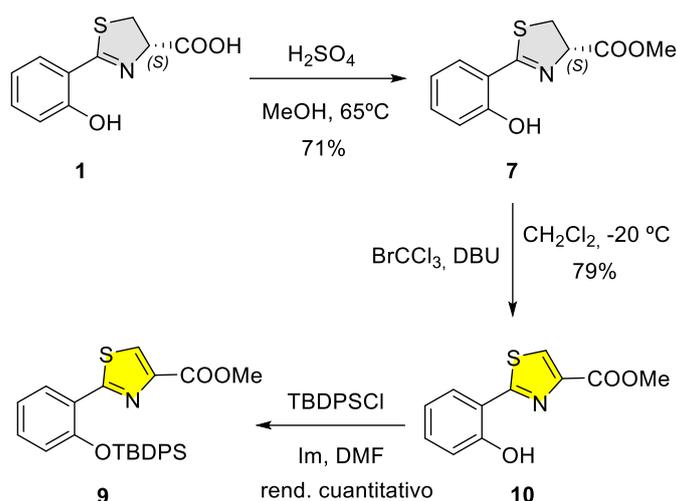
Esquema 10. Ruta de preparación de los compuestos 7 y 8.

La oxidación de la tiazolina **8**, bajo las condiciones ya probadas para **2** (Esquema 11), trajo consigo también la desprotección del fenol que portaba el grupo protector TBDPS. Para evitar la pérdida del grupo protector se invirtió el orden de las reacciones de protección y oxidación.



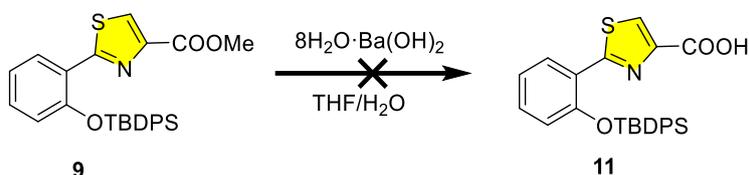
Esquema 11. Intento de preparación del compuesto 9.

Una vez esterificado el compuesto **1**, se oxidó **7** en las condiciones descritas previamente con $BrCCl_3$ y DBU, y se protegió el grupo OH en **10** como TBDPS, lográndose de esta forma proteger los grupos carboxílico e hidroxilo (Esquema 12).



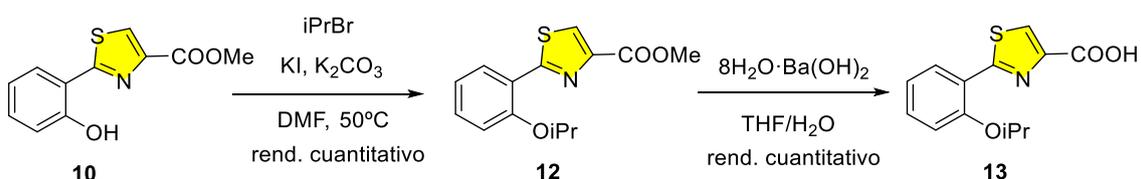
Esquema 12. Ruta de preparación del compuesto **9**.

Una vez obtenido **9**, para el acoplamiento con el éster metílico de la D-serina fue necesario realizar la desprotección selectiva del éster metílico presente (*Esquema 13*). Desafortunadamente, cuando se realizó la hidrólisis básica con hidróxido de bario en una mezcla THF/H₂O (1:1), aunque se logró la formación del ácido tiazólico,⁵⁷ también se desprotegió el grupo OH fenólico, probablemente debido a la labilidad del grupo protector TBDPSCl en estas condiciones.



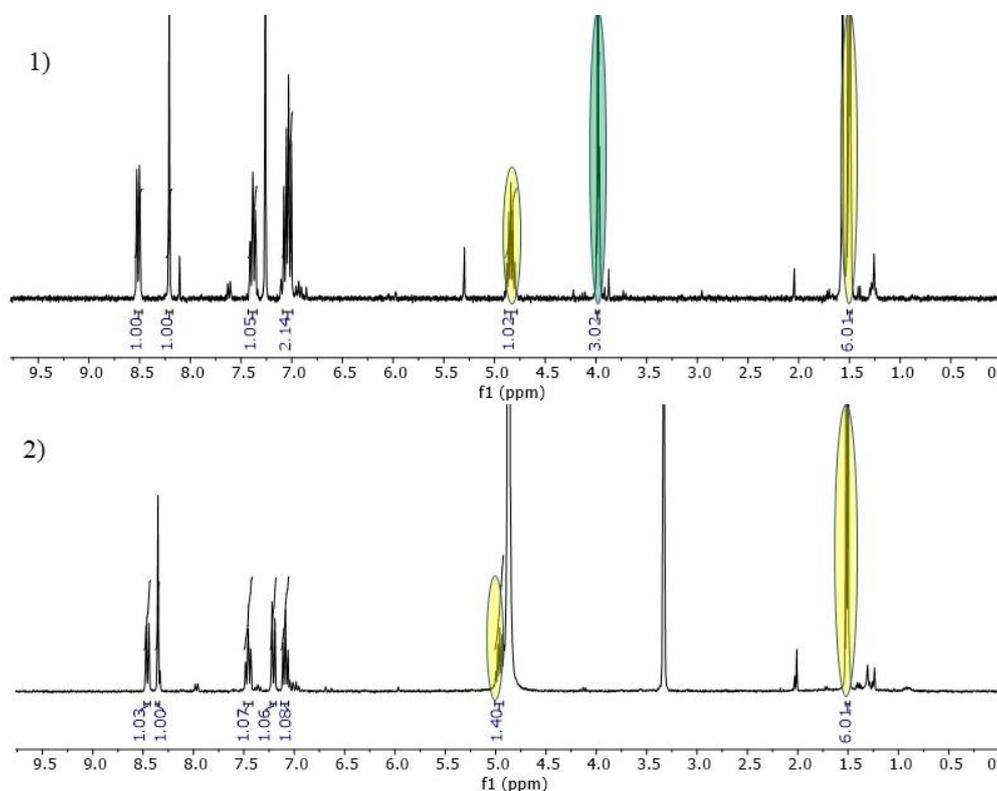
Esquema 13. Intento de preparación del compuesto **11**.

Una nueva modificación de la ruta de síntesis llevó a emplear un grupo protector más robusto a las condiciones de reacción, por lo que se decidió utilizar el grupo isopropilo (ⁱPr) en vez de un grupo sililo. La isopropilación de **10** para dar lugar a **12** se consiguió añadiendo ⁱPrBr y KI, en presencia de la base K₂CO₃ en DMF a 50 °C (*Esquema 14*).⁵⁹ A continuación, se hidrólizó el éster metílico de **12** con Ba(OH)₂.



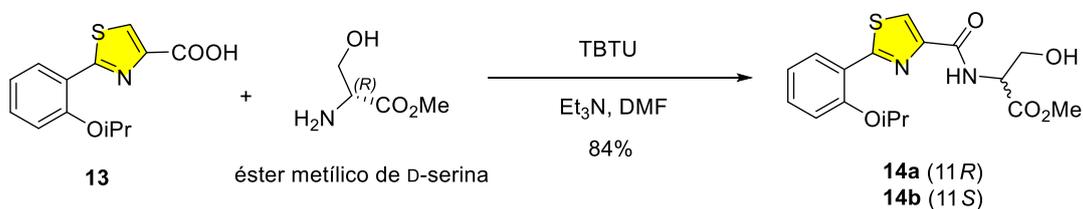
Esquema 14. Ruta de preparación de los compuestos **12** y **13**.

En los espectros de RMN de ^1H de los compuestos **12** y **13** se observan las señales correspondientes al grupo ^iPr a 4.90 y 1.5 ppm (*Figura 9*). La formación de ambos compuestos se confirmó también por espectrometría de alta resolución.



*Figura 9. Espectros de ^1H -RMN: 1) compuesto **12**; 2) compuesto **13**. Las señales más relevantes aparecen coloreadas.*

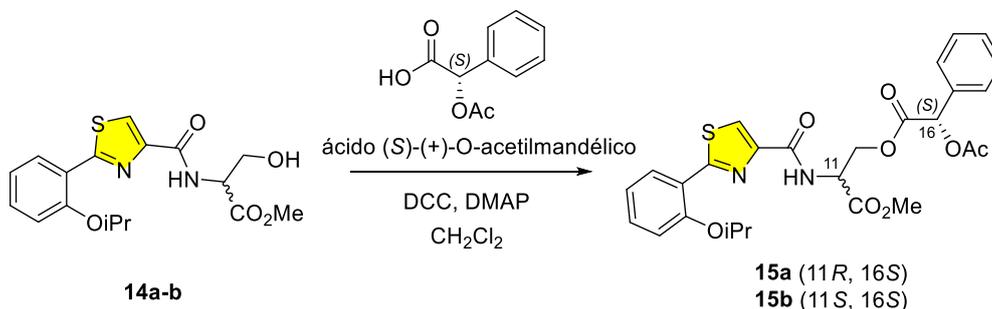
Para el acoplamiento entre el compuesto **13** y el éster metílico de D-serina se utilizó el agente acoplante TBTU y como base Et_3N en DMF (*Esquema 15*).⁵¹ A diferencia del compuesto **2a-b**, al sustituir la tiazolina por tiazol, se evita la formación y separación de posibles diastereoisómeros. Además, la reacción es más rápida gracias a la protección del OH fenólico.



*Esquema 15. Preparación del compuesto **14**.*

Con el fin de determinar el exceso enantiomérico de **14a-b** se formó el éster del alcohol primario con el ácido (*S*)-O-acetilmandélico en presencia de *N,N'*-diciclohexilcarbodiimida (DCC) y 4-(dimetilamino)-piridina (DMAP) (*Esquema 16*).

Aunque la reacción no tuvo lugar en su totalidad, fue suficiente para poder deducir el exceso enantiomérico.



Esquema 16. Preparación del compuesto **14A**.

En el espectro de RMN de ^1H se puede ver la presencia de dos diastereoisómeros **15a-b** en la señal correspondiente a los protones del grupo metilo del éster metílico a 3.62 ppm y la de los protones diastereotópicos del CH_2 en posición β al éster metílico a 4.67 ppm (Figura 10). La integración de dichas señales para cada uno de los diastereoisómeros permite determinar que el diastereoisómero **15a** (11R, 16S) se obtuvo con un 85% de exceso enantiomérico respecto a **15b** (11S, 16S). Esto demostraría que en algún momento de la síntesis tiene lugar una ligera epimerización de la posición C11.

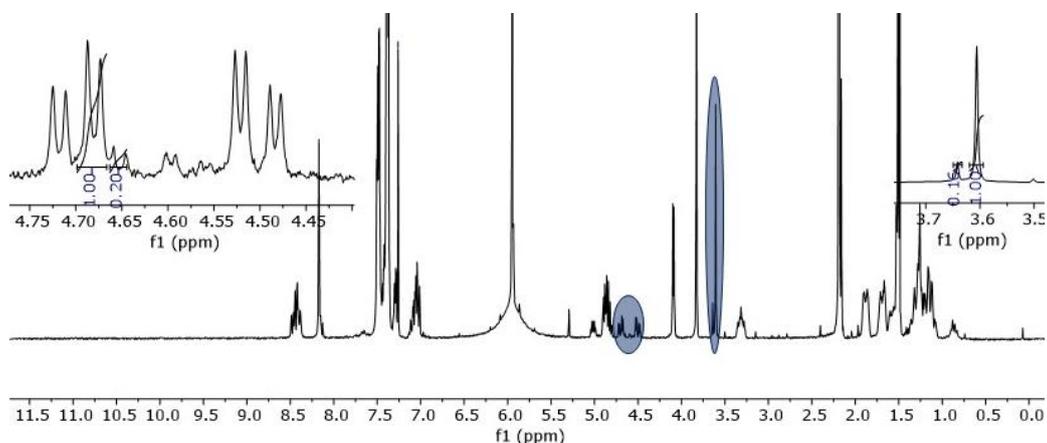
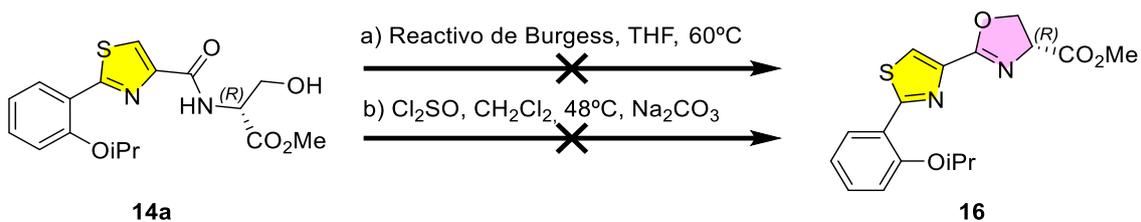


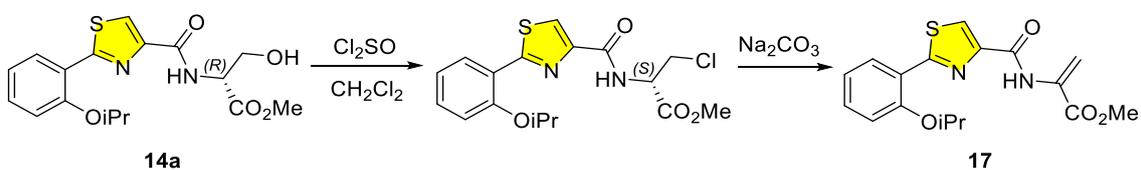
Figura 10. Espectros de ^1H -RMN de los compuestos **15a-b**. Las señales más relevantes aparecen coloreadas

Una vez alcanzado este punto, se intentaron de nuevo las condiciones de formación de la oxazolona a partir de la ciclación del compuesto **14a** con el reactivo de Burgess y con Cl_2SO a $48\text{ }^\circ\text{C}$, seguida de la adición de una base como es Na_2CO_3 (Esquema 17).⁶⁰ En ambos casos, la reacción no tuvo lugar como se esperaba.



Esquema 17. Intentos de preparación del compuesto 16.

En la reacción de **14a** con Cl₂SO en CH₂Cl₂ se observó la sustitución del grupo OH por el cloro que, tras añadir el Na₂CO₃ y calentando, trajo consigo la formación de un alqueno en α al éster metílico **17** (Esquema 18), fruto del proceso de eliminación del cloruro intermedio.



Esquema 18. Preparación del compuesto 17.

En el espectro de RMN de ¹H de **17** se observan las señales de los protones diastereotópicos vinílicos a desplazamientos de 6.8 y 6.0 ppm (Figura 11), que junto con el experimento HSQC-editado (Figura 12) confirman la formación del producto con el doble enlace.

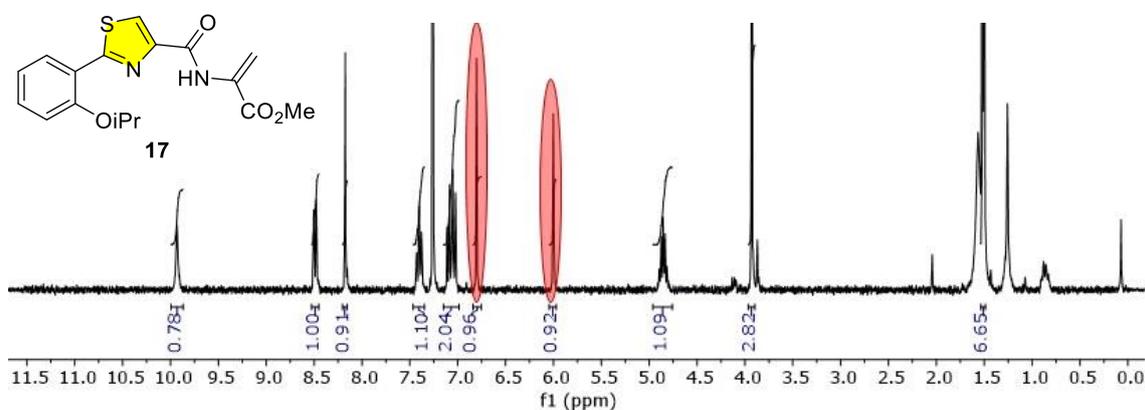


Figura 11. Espectro de ¹H-RMN del compuesto 17. Las señales más relevantes aparecen coloreadas

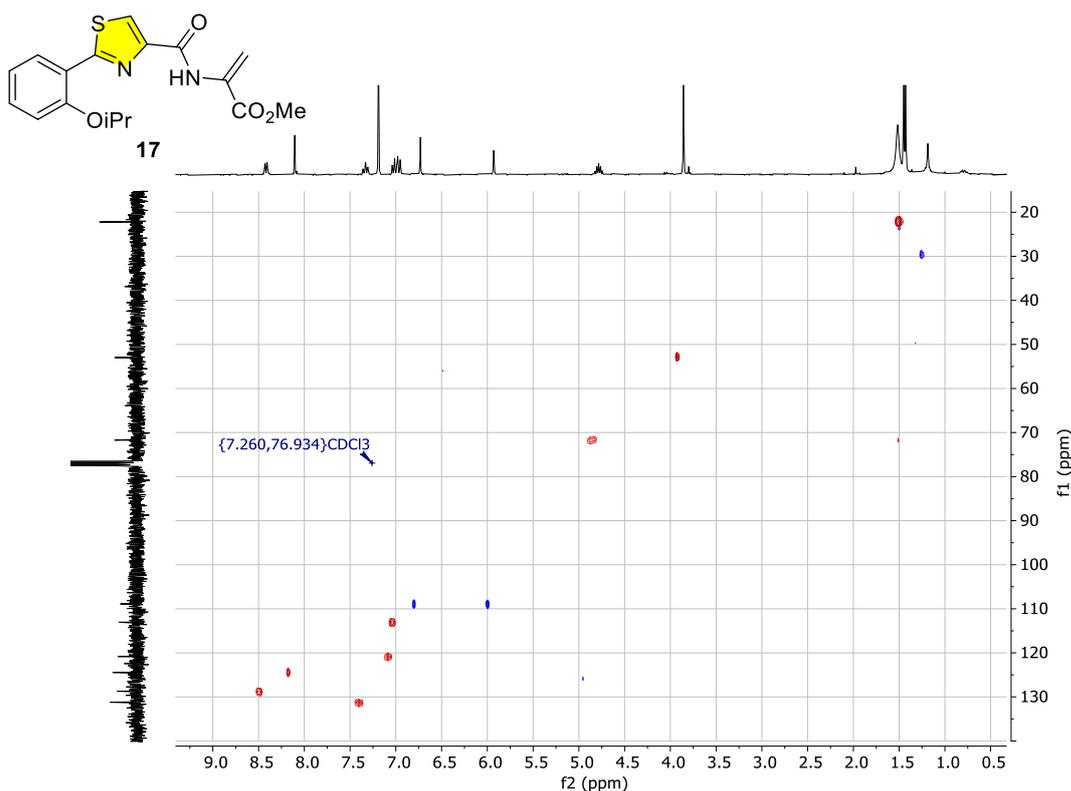


Figura 12. Espectro HSQC-editado (CH_3 y CH en rojo, CH_2 en azul) del compuesto **17**.

En vista de los resultados obtenidos, se buscaron otras alternativas para la formación de la oxazolina como la utilización de los reactivos como el DAST (trifluoruro de dietilaminoazufre) y el Deoxo-Fluor (trifluoruro de bis-(2-metoxietil)aminoazufre). En numerosos estudios se ha demostrado que ambos conducen a la ciclación deshidratante de β -hidroxiamidas en oxazolinas a baja temperatura de forma simple y sintéticamente versátil (Figura 13).⁶¹⁻⁶⁴

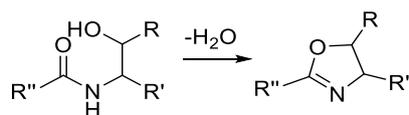
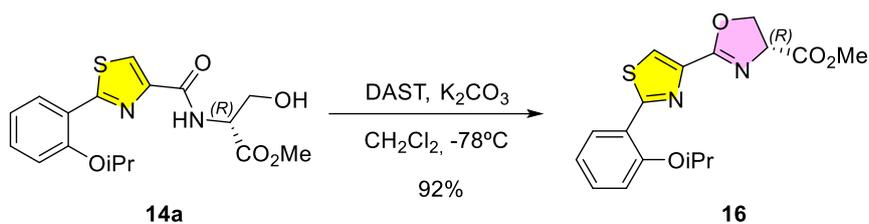


Figura 13. Ciclodeshidratación de β -hidroxiamidas a oxazolinas.⁶¹

Los rendimientos reportados en ambos casos son parecidos, pero en el caso de las β -hidroxiamidas derivadas de la serina, como la de este trabajo, los rendimientos reportados resultaron ser mayores cuando se emplea DAST. Por el contrario, los rendimientos de ciclación de las β -hidroxiamidas derivadas de la treonina son mayores con Deoxo-Fluor.⁶¹ Por este motivo, para la formación de la oxazolina deseada se hizo reaccionar **14a** con un ligero exceso de DAST a $-78\text{ }^\circ\text{C}$, seguido de la adición de K_2CO_3 (Esquema 19), obteniéndose **16** con un alto rendimiento (92%).



Esquema 19. Preparación del compuesto **16**.

En el espectro de RMN de ^1H de **16** las señales aparecen desplazadas con respecto a las del compuesto **14**, destacando las de los protones α y β al éster metílico de la serina (Figura 15). La espectrometría de alta resolución confirmó también la formación del producto deseado.

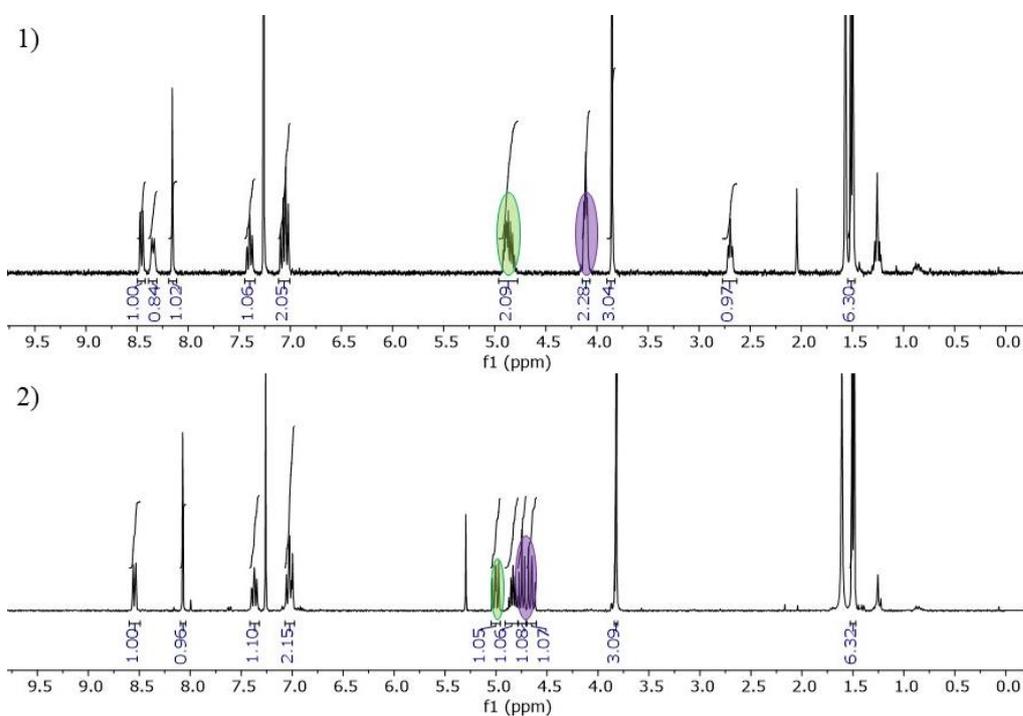


Figura 14. Espectros de ^1H -RMN del alqueno del compuesto **16**. Las señales más relevantes aparecen coloreadas

Tras conseguir la ciclación y obtención de **16** se continuará en la tesis doctoral con la síntesis del análogo simplificado de Pcb T_OZ_T siguiendo el análisis retrosintético planteado.

5 PARTE EXPERIMENTAL

5.1 MÉTODOS GENERALES

Las reacciones que requieren condiciones anhidras se llevaron a cabo bajo una atmósfera de argón desoxigenado seco (Ar C-50). Los disolventes y las disoluciones anhidras se añadieron al medio de reacción empleando una jeringa seca. Las reacciones a 0 °C se realizaron empleando baños de hielo/agua y para alcanzar temperaturas inferiores se empleó una sonda de refrigeración Cryocool-inmersión CC-100 II (Neslab) en un baño de acetona o MeOH. Cuando fue necesario, las reacciones se calentaron utilizando una placa de agitación equipada con un bloque de calentamiento de aluminio.

El disolvente seco CH₂Cl₂ se obtuvo presecándolo y refluviéndolo sobre hidruro de calcio (CaH₂), mientras que en el caso del DMF, Et₃N y THF se usó una versión comercial del 99.8% de pureza extra seca, AcroSeal™ de ACROS Organics™. El resto de disolventes y reactivos se utilizaron sin purificar.

Las reacciones se siguieron por cromatografía de capa fina (thin-layer chromatography, TLC) usando cromatoplasmas de gel de sílice GF-254 Merck que se visualizaron bajo radiación UV ($\lambda=254$ nm) o, en casos concretos, se revelaron por inmersión en una disolución de ácido fosfomolibdico (10% m/v en EtOH) o en una disolución de ninhidrina (0,2% en EtOH) y posterior calentamiento. En algunas reacciones este método no fue efectivo, por lo que se recurrió a TLC-MS empleando el módulo CAMAG Interfase 2 conectado a un espectrómetro Bruker AmaZon speed Toxtyper®. En los casos en los que no se distinguían los productos por ninguna de las técnicas anteriores, la reacción se siguió por HR-ESIMS y RMN-¹H.

Las purificaciones que se realizaron se hicieron mediante cromatografía de media presión en columna de gel de sílice (tamaño de partícula 230-400 mesh, tamaño de poro 60 Å) ACROS Organics™.

La caracterización por resonancia magnética nuclear se realizó en un espectrómetro Bruker Avance 300 con una consola NEO (300 MHz para ¹H y 75 MHz para ¹³C) del CICA (Centro Interdisciplinar de Química e Biología). Los disolventes deuterados utilizados fueron los siguientes: CDCl₃ (99.8% D) y CD₃OD (99.8% D). Los espectros de masas electrospray (ESI) se realizaron en un espectrómetro de masas ThermoLTQ Orbitrap Discovery del SAI (Servicio de Apoyo a la Investigación de la Universidad de A Coruña).

En cuanto a los métodos computacionales, las búsquedas conformacionales de los análisis de DP4+ se realizaron empleando el software MAESTRO, usando una ventana de energía de 5 kcal/mol. Las geometrías DFT se calcularon utilizando Gaussian 16 con la combinación B3LYP/6-31G+(d,p) y un modelo IEFPCM de MeOH. También se realizaron cálculos de frecuencia de vibración para confirmar la ausencia de confórmeros con puntos de silla.

5.2 PROCEDIMIENTOS Y CARACTERIZACIÓN

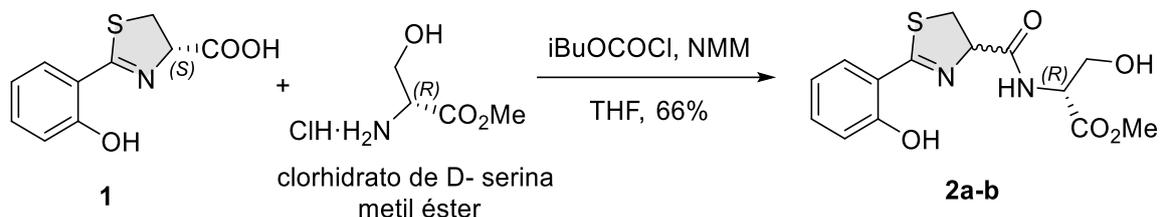
5.2.1 SÍNTESIS DE 1



A una solución de 2-hidroxibenzonitrilo (300 mg, 2.52 mmol) en 50 mL de una mezcla MeOH/tampón fosfato 0.1 M a pH = 6.4 (1:1), se añadió clorhidrato de D-cisteína monohidratado (885 mg, 5.03 mmol.). La mezcla de reacción se ajustó a pH = 6.4 añadiendo K_2CO_3 y se agitó a 65 °C toda la noche. El disolvente se eliminó a presión reducida. El sólido resultante se redisolvió en agua (50 mL) y la solución se acidificó a pH = 2-3 mediante la adición de 5% HCl. La fase acuosa se extrajo con CH_2Cl_2 (3 x 20 mL). Las fases orgánicas se combinaron, se secaron con MgSO_4 , se filtraron y el disolvente se eliminó bajo presión reducida para dar **1** como una espuma marrón (458.5 mg, 82%). **RMN-¹H (300 MHz, CDCl₃) δ ppm:** 7.48 – 7.33 (m, 2H, H3-H5), 7.03 (d, J = 8.0 Hz, 1H, H6), 6.90 (t, J = 8.0 Hz, 1H, H4), 5.42 (t, J = 8.8 Hz, 1H, H9), 3.79-3.53 (m, 2H, H8). **RMN-¹³C (300 MHz, CDCl₃) δ ppm:** 175.39 (COOH, C10), 174.08 (C, C7), 159.24 (C, C1), 134.00 (CH, C5), 131.01 (C, C3), 119.28 (CH, C4), 117.54 (CH, C6), 115.99 (C, C2), 76.35 (CH, C9), 33.75 (CH₂, C8). **(+)-HRMS (ESI) m/z :** 224.0376 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (calcd. para $\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{NO}_3\text{S}^+$: 224.0376).

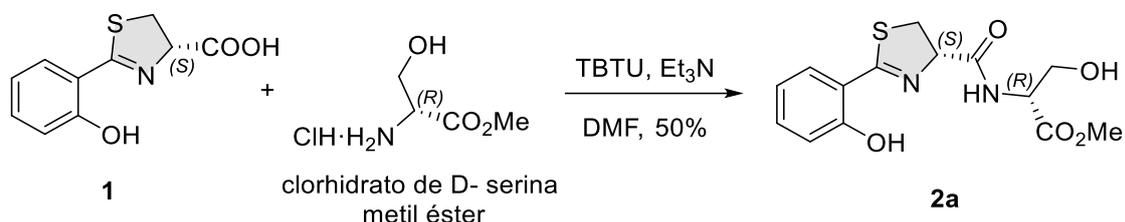
5.2.2 SÍNTESIS DE 2

5.2.2.1 Método A



A una solución de **1** (240 mg, 1.08 mmol) en 10 mL de THF anhidro a -25 °C, se añadió *N*-metilmorfolina (NMM) (170 µL, 1.54 mmol), seguido de cloroformiato de isobutilo (195 µL, 1.54 mmol) y se agitó a -25 °C durante 10 min. Luego se añadió clorhidrato de éster metílico de D-serina (120 mg, 771 µmol), seguido de NMM (170 µL, 1.54 mmol). Se dejó calentar gradualmente hasta temperatura ambiente y se agitó toda la noche bajo atmósfera inerte. Pasado este tiempo, la mezcla se inactivó con una solución saturada de NaHCO₃ y se extrajo con EtOAc (3 x 20 mL). Las fases orgánicas se combinaron, se secaron con MgSO₄, filtraron y se concentraron a presión reducida para dar **2a-b** como un aceite viscoso (234.0 mg, mezcla diastereoisómeros 1:1, 66%). **RMN-¹H (300 MHz, CDCl₃) δ ppm:** 7.47 (d, *J*=7.9 Hz, 1H, H3), 7.41 (t, *J*=7.9 Hz, 1H, H5), 7.23 (s, 1H, NH), 7.04 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H, H6), 6.92 (t, *J* = 7.9 Hz, 1H, H4), 5.34 (dt, *J* = 9.1, 3.6 Hz, 1H, H9), 4.71-4.63 (m, 1H, H11), 4.00 (m, 2H, H12), 3.82 (s, 1.5H, H14), 3.76 (s, 1.5H, H14), 3.70 (dd, *J* = 9.1, 2.5 Hz, 2H, H8), 2.42 (s, 1H, OH). **(+)-HRMS (ESI) *m/z*:** 325.0854 [M+H]⁺ (calcd. para C₁₄H₁₇N₂O₅S⁺: 325.0853).

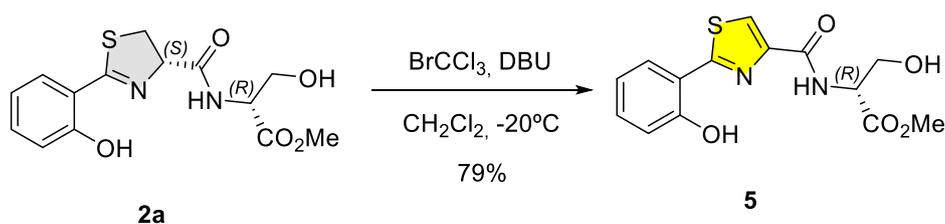
5.2.2.2 Método B



A una solución de **1** (268 mg, 1.20 mmol) en 10 mL de DMF anhidro, se añadió clorhidrato de éster metílico de D-serina (170 mg, 1.09 mmol), TBTU (351 mg, 1.09 mmol) y Et₃N (380 µL, 2.73 mmol) y se agitó durante toda la noche bajo atmósfera inerte. El disolvente se eliminó a presión reducida y el sólido obtenido se disolvió en EtOAc (30 mL) y se lavó con una solución saturada de NaHCO₃, agua, 0.05 M HCl, agua y una

solución saturada de NaCl (salmuera). La fase orgánica se secó con MgSO₄, se filtró y concentró a presión reducida para dar **2a-b** como un sólido amarillo (296.9 mg, mezcla de diastereoisómeros 1:3, 84%). El residuo se purificó mediante columna de gel de sílice (SiO₂, hexano a hexano/EtOAc al 40%), recogiendo el diastereoisómero **2a** mayoritario (175.70 mg, 50%) como un sólido blanco. **RMN-¹H (300 MHz, CDCl₃) δ ppm:** 7.47 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, H3), 7.41 (t, *J* = 7.9 Hz, 1H, H5), 7.22 (s, 1H, NH), 7.04 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, H6), 6.92 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H, H4), 5.35 (t, *J* = 9.0 Hz, 1H, H9), 4.72- 4.64 (m, 1H, H11), 4.08-3.86 (m, 2H, H12), 3.82 (s, 3H, H14), 3.70 (dd, *J* = 9.0, 1.9 Hz, 2H, H8), 2.37 (s, 1H, OH). **RMN-¹³C (300 MHz, CDCl₃) δ ppm:** 176.25 (COOMe, C13), 170.88 (C, C7), 170.37 (C, C10), 159.06 (C, C1), 134.15 (CH, C5), 131.10 (CH, C3), 119.51 (CH, C4), 117.58 (CH, C6), 116.06 (C, C2), 78.24 (CH, C9), 63.33 (CH₂, C12), 55.08 (CH, C11), 53.25 (CH₃, C14), 34.14 (CH₂, C8). **(+)-HRMS (ESI) *m/z*:** 347.0675 [M+Na]⁺ (calcd. para C₁₄H₁₆N₂NaO₅S⁺: 347.0672).

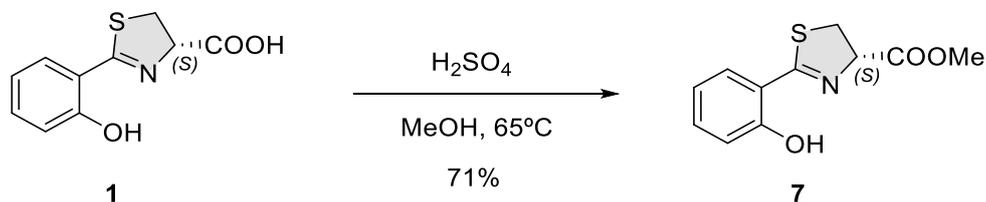
5.2.3 SÍNTESIS DE 5



A una solución de **2a** (200 mg, 617 μmol) en 20 mL de CH₂Cl₂ anhidro, se le añadió DBU (250 μL, 1.67 mmol) y la solución resultante se agitó a -20 °C durante 5 min. Luego se añadió bromotriclorometano (BrCCl₃) (100 μL, 1.01 mmol). La solución se calentó lentamente a temperatura ambiente y se agitó durante 2 horas bajo atmósfera inerte. Pasado este tiempo se observó el consumo total del producto de partida. La mezcla de reacción se lavó con una solución saturada de NaHCO₃, agua, 0.05 M HCl, agua y salmuera. La fase orgánica se secó con MgSO₄, se filtró y concentró a presión reducida para dar **5** como un polvo blanco (157.6 mg, 79%). **RMN-¹H (300 MHz, CDCl₃) δ ppm:** 11.06 (s, 1H, OH), 8.10 (s, 1H, H8), 7.79 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H, NH), 7.60 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H, H3), 7.36 (t, *J* = 7.7 Hz, 1H, H5), 7.07 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H, H6), 6.93 (t, *J* = 7.7 Hz, 1H, H4), 4.89-4.81 (m, 1H, H11), 4.18-4.02 (m, 2H, H12), 3.84 (s, 3H, H14), 2.78 (s, 1H, OH). **RMN-¹³C (300 MHz, CDCl₃) δ ppm:** 170.57 (COOMe, C13), 169.84 (C, C7), 160.52 (C, C10), 156.42 (C, C1), 148.55 (C, C9), 132.87 (CH, C5), 127.75 (CH, C3), 122.89 (CH, C8), 120.15 (CH, C4), 118.05 (CH, C6), 116.41 (C, C2), 63.38 (CH₂, C12),

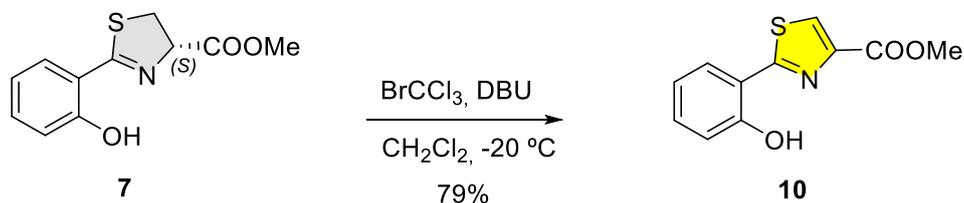
55.16 (CH, C11), 53.16 (CH₃, C14). (+)-**HRMS (ESI)** *m/z*: 345.0517 [M+Na]⁺ (calcd. para C₁₄H₁₄N₂NaO₅S⁺: 345.0516).

5.2.4 SÍNTESIS 7



Sobre una solución de **1** (300 mg, 1.34 mmol) en 20 mL de MeOH, se añadió H₂SO₄ 90-91% (100 μ L, 1.68 mmol) y la mezcla se agitó a reflujo (65 °C) toda la noche. Al cabo de este tiempo, se dejó alcanzar temperatura ambiente y se neutralizó con K₂CO₃. Una vez a pH = 7, se filtró y el filtrado se concentró a presión reducida. El residuo se distribuyó entre EtOAc (20 mL) y H₂O (20 mL), se separaron las fases y la fase acuosa se lavó con EtOAc. Las fases orgánicas se combinaron y lavaron con salmuera, se secaron con MgSO₄, filtraron y concentraron a presión reducida para dar **7** como un aceite marrón (225 mg, 71%). **RMN-¹H (300 MHz, CDCl₃) δ ppm:** 7.46-7.33 (m, 2H, H3-H5), 7.01 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, H6), 6.89 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H, H4), 5.36 (t, *J* = 9.0 Hz, 1H, H9), 3.83 (s, 3H, H11), 3.74-3.49 (m, 2H, H8). **RMN-¹³C (300 MHz, CDCl₃) δ ppm:** 174.50 (COOMe, C10), 170.82 (C, C7), 159.30 (C, C1), 133.74 (CH, C5), 130.95 (CH, C3), 119.14 (CH, C4), 117.44 (CH, C6), 116.13 (C, C2), 76.86 (CH, C9), 53.08 (CH, C11), 33.34 (CH₂, C8). (+)-**HRMS (ESI)** *m/z*: 260.0353 [M+Na]⁺ (calcd. para C₁₁H₁₁NNaO₃S⁺: 260.0352).

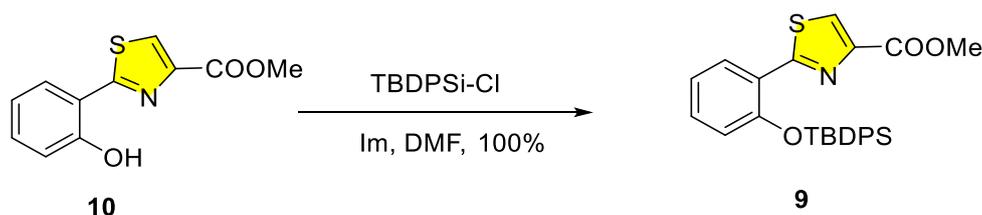
5.2.5 SÍNTESIS DE 10



A una solución de **7** (190 mg, 801 μ mol) en 10 mL de CH₂Cl₂ anhidro, se añadió DBU (280 μ L, 2.20 mmol) y la solución resultante se agitó a -20 °C durante 5 min. Luego se añadió BrCCl₃ (130 μ L, 1.32 mmol). La solución se calentó lentamente a temperatura ambiente y se agitó durante 2 horas bajo atmósfera inerte. Pasado este tiempo, se observó el consumo total del producto de partida. La mezcla de reacción se lavó con una solución saturada de NaHCO₃, agua, 0.05 M HCl, agua y salmuera. La fase orgánica se secó con

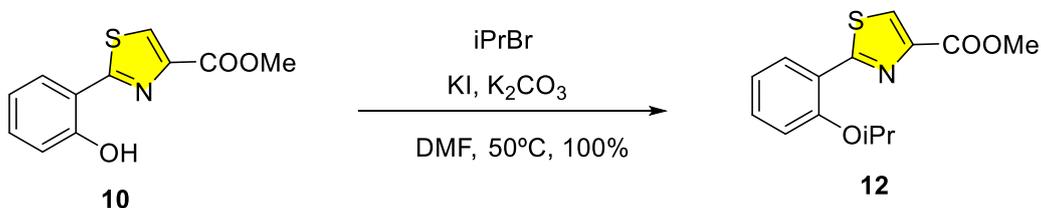
MgSO₄, se filtró y concentró a presión reducida para dar **10** como un sólido blanco (157.6 mg, 79%). **RMN-¹H (300 MHz, CDCl₃) δ ppm:** 8.11 (s, 1H, H8), 7.62 (d, *J* = 8 Hz, 1H, H3), 7.36 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H, H5), 7.09 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, H6), 6.93 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H, H4), 3.96 (s, 3H, H11). **RMN-¹³C (300 MHz, CDCl₃) δ ppm:** 169.50 (COOMe, C10), 161.15 (C, C7), 157.20 (C, C1), 145.87 (C, C9), 132.71 (CH, C5), 127.49 (CH, C3), 125.37 (CH, C8), 119.70 (CH, C4), 118.30 (CH, C6), 116.40 (C, C2), 52.65 (CH₃, C11). **(+)-HRMS (ESI) *m/z*:** 258.0196 [M+Na]⁺ (calcd. para C₁₁H₉NNaO₃S⁺: 258.0195).

5.2.6 SÍNTESIS DE 9



A una solución de **10** (20 mg, 85 μmol) en 2 mL de DMF anhidro a 0 °C, se añadió TBDPSCl (85 μL, 349 μmol) e imidazol (Im) (35 mg, 514 μmol). La mezcla de reacción se agitó durante toda la noche bajo atmósfera inerte. El disolvente se concentró a presión reducida y el sólido obtenido se disolvió en EtOAc (10 mL). Seguidamente se lavó con agua y salmuera, se secó con MgSO₄, filtró y concentró a presión reducida para dar **9** como un aceite oscuro (rendimiento cuantitativo). **RMN-¹H (300 MHz, CDCl₃) δ ppm:** 8.28 (s, 1H, H8), 6.97-6.81 (m, 2H, ArH), 6.50 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, ArH), 3.98 (s, 3H, H11), 1.10 (s, 9H, TBDPS). **(+)-HRMS (ESI) *m/z*:** 496.1348 [M+Na]⁺ (calcd. para C₂₇H₂₈NO₃SSi⁺: 474.1554).

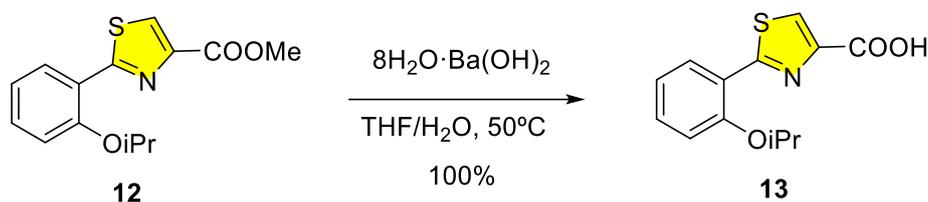
5.2.7 SÍNTESIS DE 12



Sobre una suspensión de **10** (50 mg, 213 μmol) en 2 mL DMF anhidro, se añadió KI (124 mg, 744 μmol), K₂CO₃ (117 mg, 850 μmol) y finalmente bromuro de iso-propilo (iPrBr) (40 μL, 425 μmol). A continuación, se agitó a 60 °C bajo atmósfera inerte durante toda la noche. Después de este tiempo, se dejó enfriar hasta temperatura ambiente, se distribuyó entre CH₂Cl₂ (10 mL) y H₂O (10 mL) y se separaron las fases. La fracción orgánica se lavó con 5% HCl (10 mL) y con salmuera (10 mL). Finalmente se secó con MgSO₄, se

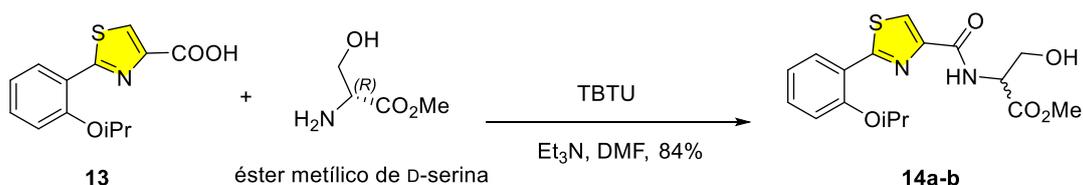
filtró y se concentró a presión reducida para obtener **12** como aceite amarillo (rendimiento cuantitativo). **RMN-¹H (300 MHz, CDCl₃) δ ppm:** 8.51 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H, H3), 8.21 (s, 1H, H8), 7.37 (t, *J* = 7.9 Hz, 1H, H5), 7.09 – 7.00 (m, 2H, H4-H6), 4.84 (hept, *J* = 6.1 Hz, 1H, ⁱPr), 3.98 (s, 3H, H11), 1.50 (d, *J* = 6.1 Hz, 6H, ⁱPr). **RMN-¹³C (300 MHz, CDCl₃) δ ppm:** 169.67 (COOMe, C10), 163.59 (C, C7), 162.67 (C, C1), 154.99 (C, C9), 131.32 (CH, C5), 129.40 (CH, C3), 128.17 (CH, C8), 122.43 (C, C2), 120.86 (CH, C4), 113.09 (CH, C6), 71.84 (CH, ⁱPr), 52.49 (CH₃, C11), 22.36 (CH₃, ⁱPr). (+)-**HRMS (ESI) *m/z*:** 300.0668 [M+Na]⁺ (calcd. para C₁₄H₁₅NNaO₃S⁺: 300.0665).

5.2.8 SÍNTESIS DE 13



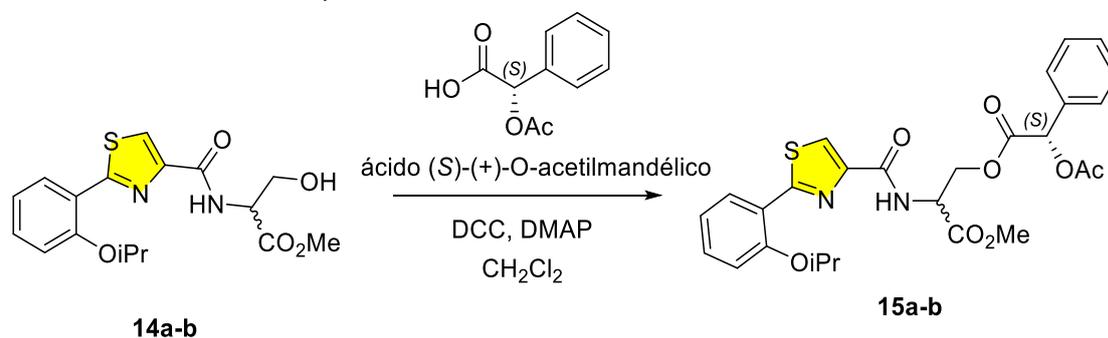
Sobre una disolución de **12** (170 mg, 613 μmol), en una mezcla 1:1 THF/H₂O (10 mL), se añadió Ba(OH)₂·8H₂O (393 mg, 920 μmol) y a continuación, se agitó durante toda la noche. Se eliminó el THF a vacío, se añadió EtOAc (10 mL) y se acidificó con 5% HCl. Después se separaron las fases y la fase acuosa se extrajo con EtOAc (2 x 10 mL). Las fases orgánicas se combinaron, se secaron con Mg₂SO₄, filtraron y concentraron a presión reducida para dar **13** como un sólido amarillo (rendimiento cuantitativo). **RMN-¹H (300 MHz, CD₃OD) δ ppm:** 8.46 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, H3), 8.35 (s, 1H, H8), 7.46 (t, *J* = 8.1 Hz, 1H, H5), 7.21 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, H6), 7.09 (t, *J* = 8.1 Hz, 1H, H4), 4.96 (hept, *J* = 6.1 Hz, 1H, ⁱPr), 1.51 (d, *J* = 6.1 Hz, 6H, ⁱPr). **RMN-¹³C (300 MHz, CD₃OD) δ ppm:** 164.67 (COOH, C10), 156.35 (C, C7), 147.42 (C, C1), 138.64 (C, C9), 132.58 (CH, C5), 129.87 (CH, C3), 129.18 (CH, C8), 123.43 (C, C2), 121.81 (CH, C4), 114.61 (CH, C6), 72.99 (CH, ⁱPr), 22.45 (CH₃, ⁱPr). (+)-**HRMS (ESI) *m/z*:** 286.0509 [M+Na]⁺ (calcd. para C₁₃H₁₃NNaO₃S⁺: 286.0508).

5.2.9 SÍNTESIS DE 14



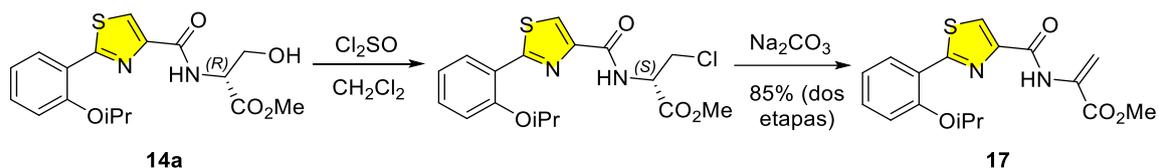
A una solución de **13** (151 mg, 573 μmol) en 4 mL de DMF anhidro, se añadió clorhidrato de éster metílico de D-serina (81 mg, 521 μmol), TBTU (167 mg, 521 μmol) y Et_3N (182 μL , 1.30 mmol) y se agitó durante toda la noche bajo atmósfera inerte. El disolvente se eliminó a presión reducida, el sólido obtenido se disolvió en EtOAc (10 mL) y se lavó con una solución saturada de NaHCO_3 , agua, 0.05 M HCl, agua y una solución saturada de NaCl (salmuera). La fase orgánica se secó con MgSO_4 , se filtró y concentró a presión reducida para dar **14a-b** como sólido amarillo (159.9 mg, 84%). **RMN- ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ ppm:** 8.46 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H, H3), 8.34 (d, $J = 7.4$ Hz, 1H, NH), 8.15 (s, 1H, H8), 7.40 (t, $J = 7.9$ Hz, 1H, H5), 7.13 – 6.99 (m, 2H, H4-H6), 4.95 – 4.78 (m, 2H, ^iPr -H11), 4.11 (t, $J = 5.5$ Hz, 2H, H12), 3.85 (s, 3H, H14), 2.70 (t, $J = 5.5$ Hz, 1H, OH), 1.51 (d, $J = 6.1$ Hz, 6H, ^iPr). **RMN- ^{13}C (300 MHz, CDCl_3) δ ppm:** 170.97 (COOMe, C13), 163.02 (C, C7), 162.14 (C, C10), 155.08 (C, C1), 147.85 (C, C9), 131.31 (CH, C5), 128.88 (CH, C3), 124.62 (CH, C8), 122.35 (C, C2), 120.86 (CH, C4), 113.24 (CH, C6), 71.85 (CH, ^iPr), 63.94 (CH_2 , C12), 55.15 (CH, C11), 52.99 (CH_3 , C14), 22.34 (CH_3 , ^iPr). **(+)-HRMS (ESI) m/z :** 387.0987 [$\text{M}+\text{Na}$] $^+$ (calcd. para $\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{NaO}_5\text{S}^+$: 387.0985).

5.2.10 SÍNTESIS DE 15a y 15b



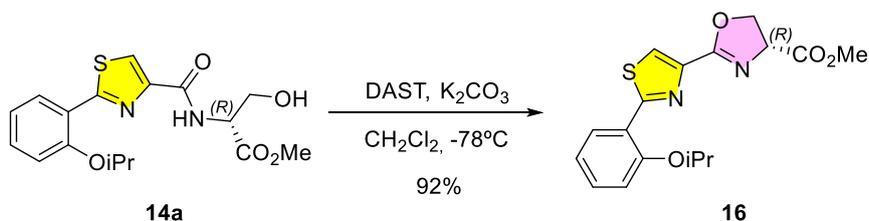
Sobre una disolución de **14a-b** (10 mg, 27 μmol) en 5 mL de CH_2Cl_2 anhidro, se añadió sucesivamente DMAP (0.4 mg, 3 μmol), DCC (11 mg, 53 μmol) y el ácido (S)-O-acetilmandélico (11 mg, 53 μmol). La mezcla de reacción se dejó agitar durante 24 horas y se lavó con una solución saturada NH_4Cl . La fase acuosa se extrajo con CH_2Cl_2 (2 x 5 mL) y las fases orgánicas se combinaron y lavaron con una disolución saturada de NaCl, se secaron (MgSO_4), filtraron y concentraron a presión reducida para dar **15a-b** (ee = 85%) junto con el producto de partida sin reaccionar **14a-b**.

5.2.11 SÍNTESIS DE 17



A una solución de **14a** (24 mg, 66 μmol) en 5 mL CH_2Cl_2 anhidro a 0 °C, se añadió Cl_2SO (40 μL , 551 μmol) gota a gota. La mezcla se agitó a 48 °C toda la noche, hasta observar por TLC el consumo total del producto de partida y la formación del cloruro. El sistema se abrió, se añadió en pequeñas porciones Na_2CO_3 en exceso hasta pH ligeramente básico (burbujeo por liberación de CO_2) y se agitó a 48 °C durante 5 horas. La suspensión resultante se filtró y extrajo con CH_2Cl_2 (2 x 5 mL), se secó (Mg_2SO_4), filtró y concentró a presión reducida para dar **17** como un aceite marrón oscuro (19.4 mg, 85%). **RMN- ^1H** (300 MHz, CDCl_3) δ ppm: 9.93 (s, 1H, NH), 8.49 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H, H3), 8.18 (s, 1H, H8), 7.40 (t, $J = 7.9$ Hz, 1H, H5), 7.14 – 6.99 (m, 2H, H4-H6), 6.80 (s, 1H, H12), 6.00 (s, 1H, H12), 4.85 (hept, $J = 6.1$ Hz, 1H, ^iPr), 3.93 (s, 3H, CH_3), 1.51 (d, $J = 6.1$ Hz, 6H). **RMN- ^{13}C** (300 MHz, CDCl_3) δ ppm: 164.69 (C, C7), 160.36 (C, C10), 155.10 (C, C1), 148.46 (C, C9), 131.35 (CH, C5), 128.85 (CH, C3), 124.59 (CH, C8), 122.17 (C, C2), 120.98 (CH, C4), 113.14 (CH, C6), 108.99 (CH_2 , C12), 71.86 (CH, ^iPr), 53.12 (CH, C14), 22.35 (CH_3 , ^iPr).

5.2.12 SÍNTESIS DE 16



A una solución de **14a** (84 mg, 231 μmol) en 5 mL de CH_2Cl_2 anhidro a -78 °C, se añadió el reactivo DAST (50 μL , 354 μmol) gota a gota y se agitó a -78 °C durante 2 horas. Pasado este tiempo se añadió K_2CO_3 anhidro (64 mg, 461 μmol), se agitó 10 min a -78 °C y se dejó calentar a temperatura ambiente durante 30 min. Luego se enfrió a 0 °C en un baño de agua/hielo y se añadió una solución saturada de NaHCO_3 (5 mL) con cuidado. Las fases se separaron y la fase acuosa se extrajo con CH_2Cl_2 (2 x 5 mL). Las fases orgánicas se combinaron y se lavaron con una solución saturada de NaCl , se secaron (MgSO_4), filtraron y concentraron a presión reducida para dar **16** como un sólido amarillo (73,6 mg, 92 %). **RMN- ^1H** (300 MHz, CDCl_3) δ ppm: 8.55 (dd, $J = 7.8, 1.8$ Hz, 1H,

H3), 8.07 (s, 1H, H8), 7.37 (dt, $J = 7.8, 1.8$ Hz, 1H, H5), 7.08 – 6.98 (m, 2H, H4-H6), 5.00 (dt, $J = 10.6, 8.0$ Hz, 1H, H11), 4.83 (hept, $J = 6.1$ Hz, 1H, ⁱPr), 4.75 (t, $J = 8.3$ Hz, 1H, H12), 4.65 (t, $J = 8.3$ Hz, 1H, H12), 3.82 (s, 3H, H14), 1.50 (d, $J = 6.1$ Hz, 6H, ⁱPr). **RMN-¹³C (300 MHz, CDCl₃) δ ppm:** 171.63 (COOMe, C13), 163.76 (C, C7), 162.27 (C, C10), 154.95 (C, C1), 142.23 (C, C9), 131.23 (CH, C5), 129.52 (CH, C3), 125.23 (CH, C8), 122.44 (C, C2), 120.78 (CH, C4), 113.06 (CH, C6), 71.84 (CH, ⁱPr), 70.04 (CH₂, C12), 68.86 55.15 (CH, C11), 52.86 (CH₃, C14), 22.36 (CH₃, ⁱPr). **(+)-HRMS (ESI) m/z :** 369.0880 [M+Na]⁺ (calcd. para C₁₇H₁₈N₂NaO₄S⁺: 369.0879).

6 CONCLUSIONES

En base a los objetivos planteados y a los resultados obtenidos se deducen las siguientes conclusiones:

- Los modelos moleculares propuestos de análogos de Pcb analizados mediante cálculos DFT muestran ángulos y valores de STD adecuados para una buena coordinación octaédrica con el Ga^{3+} .
- Se planteó una ruta sintética para la preparación del análogo TZ_OZ_T, que fue modificada para la formación del T_OZ_T a causa de los resultados experimentales observados.
- El trabajo desempeñado sirve como estudio experimental preliminar para la síntesis total del análogo T_OZ_T y para este tipo de compuestos, en los que la protección de los grupos funcionales resulta ser crucial para lograr la preparación de los compuestos requeridos.
- Se logró la preparación de un intermedio avanzado que podrá permitir en el futuro la síntesis del análogo simplificado de Pcb T_OZ_T.
- Las estructuras de todos los compuestos sintetizados se confirmaron mediante análisis de los correspondientes espectros de masas de alta resolución y de RMN de ^1H y ^{13}C .

7 CONCLUSIÓNS

A partir dos obxectivos marcados e dos resultados obtidos dedúcese as seguintes conclusións:

- Os modelos moleculares propostos de análogos de Pcb analizados mediante cálculos DFT mostran ángulos e valores de STD adecuados para unha boa coordinación octaédrica co Ga^{3+} .
- Propúxose unha vía sintética para a preparación do análogo TZ_OZ_T, que foi modificada para a formación do T_OZ_T debido aos resultados experimentais observados.
- O traballo desempeñado serve como estudo experimental preliminar para a síntesis total do análogo T_OZ_T e para este tipo de compostos, nos que a protección dos

grupos funcionais resultar ser fundamental para lograr a preparación dos compostos requeridos.

- Conseguiuse a preparación dun intermedio avanzado que poderá permitir no futuro a síntese do análogo simplificado de Pcb T_OZ_T.
- As estruturas de tódolos compostos sintetizados confirmáronse mediante análise dos correspondentes espectros de masas de alta resolución e de RMN de ^1H y ^{13}C .

8 CONCLUSIONS

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

- The proposed molecular models of Pcb analogues analyzed by DFT show suitable angles and STD values for good octahedral coordination with Ga^{3+} .
- A synthetic route for the preparation of the TZ_OZ_T analogue was proposed, which was modified for the formation of T_OZ_T because of the observed experimental results.
- The work performed served as a preliminary experimental study for the synthesis of the T_OZ_T analogue and for this type of compounds, in which the protection of the functional groups is crucial to achieve the preparation the required compounds.
- The preparation of an advanced intermediate was achieved, which may allow the synthesis of the simplified Pcb analogue T_OZ_T in the future.
- The structures of all synthesized compounds were confirmed by analysis of the corresponding high resolution mass spectra and ^1H and ^{13}C NMR.

9 BIBLIOGRAFÍA

- (1) OMS/FAO. Informe de La Consulta Mixta de Expertos Sobre Los Riesgos y Los Beneficios Del Consumo de Pescado. **2010**, Roma, 978.
- (2) FAO. *State of World Fisheries and Aquaculture*. <http://www.fao.org/state-of-fisheries-aquaculture/es/> (accessed 2023-06-05).
- (3) APROMAR. *La Acuicultura en España 2022*. <https://apromar.es/> (accessed 2023-06-06).
- (4) Kennedy, D. A.; Kurath, G.; Brito, I. L.; Purcell, M. K.; Read, A. F.; Winton, J. R.; Wargo, A. R. Potential Drivers of Virulence Evolution in Aquaculture. *Evol Appl* **2016**, 9 (2), 344–354. <https://doi.org/10.1111/eva.12342>.
- (5) Watts, J. E. M.; Schreier, H. J.; Lanska, L.; Hale, M. S. The Rising Tide of Antimicrobial Resistance in Aquaculture: Sources, Sinks and Solutions. *Mar Drugs* **2017**, 15 (6), 158. <https://doi.org/10.3390/md15060158>.
- (6) Wencewicz, T. A.; Miller, M. J. Sideromycins as Pathogen-Targeted Antibiotics. *Antibacterials* **2017**, 26, 151–183. https://doi.org/10.1007/7355_2017_19.
- (7) Gauthier, D. T. Bacterial Zoonoses of Fishes: A Review and Appraisal of Evidence for Linkages between Fish and Human Infections. *Veterinary Journal* **2015**, 203 (1), 27–35. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2014.10.028>.
- (8) Tobback, E.; Decostere, A.; Hermans, K.; Haesebrouck, F.; Chiers, K. *Yersinia ruckeri* Infections in Salmonid Fish. *J Fish Dis* **2007**, 30 (5), 257–268. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2007.00816.x>.
- (9) Frans, I.; Michiels, C. W.; Bossier, P.; Willems, K. A.; Lievens, B.; Rediers, H. *Vibrio anguillarum* as a Fish Pathogen: Virulence Factors, Diagnosis and Prevention. *J Fish Dis* **2011**, 34 (9), 643–661. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2011.01279.x>.
- (10) Conchas, R. F.; Lemos, M. L.; Barja, J. L.; Toranzo, A. E. Distribution of Plasmid- and Chromosome-Mediated Iron Uptake Systems in *Vibrio anguillarum* Strains of Different Origins. *Appl Environ Microbiol* **1991**, 57 (10), 2950–2962.
- (11) Toranzo, A. E.; Barja, J. L. A Review of the Taxonomy and Seroepizootiology of *Vibrio anguillarum*, with Special Reference to Aquaculture in the Northwest of Spain. **1990**, 9, 73–82.
- (12) Toranzo, A. E.; Magariños, B.; Romalde, J. L. A Review of the Main Bacterial Fish Diseases in Mariculture Systems. *Aquaculture* **2005**, 246 (1–4), 37–61. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.01.002>.
- (13) Santos, Y.; García-Marquez, S.; Pereira, P. G.; Pazos, F.; Riaza, A.; Silva, R.; El Morabit, A.; Ubeira, F. M. Efficacy of Furunculosis Vaccines in Turbot, *Scophthalmus maximus* (L.): Evaluation of Immersion, Oral and Injection Delivery. *J Fish Dis* **2005**, 28 (3), 165–172. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2005.00610.x>.
- (14) Magarinos, B.; Toranzo, A. E.; Romalde, J. L. Phenotypic and Pathobiological Characteristics of *Pasteurella piscicida*. *Pergamon Annual Review of Fish Diseases* **1996**, 6, 41–64.

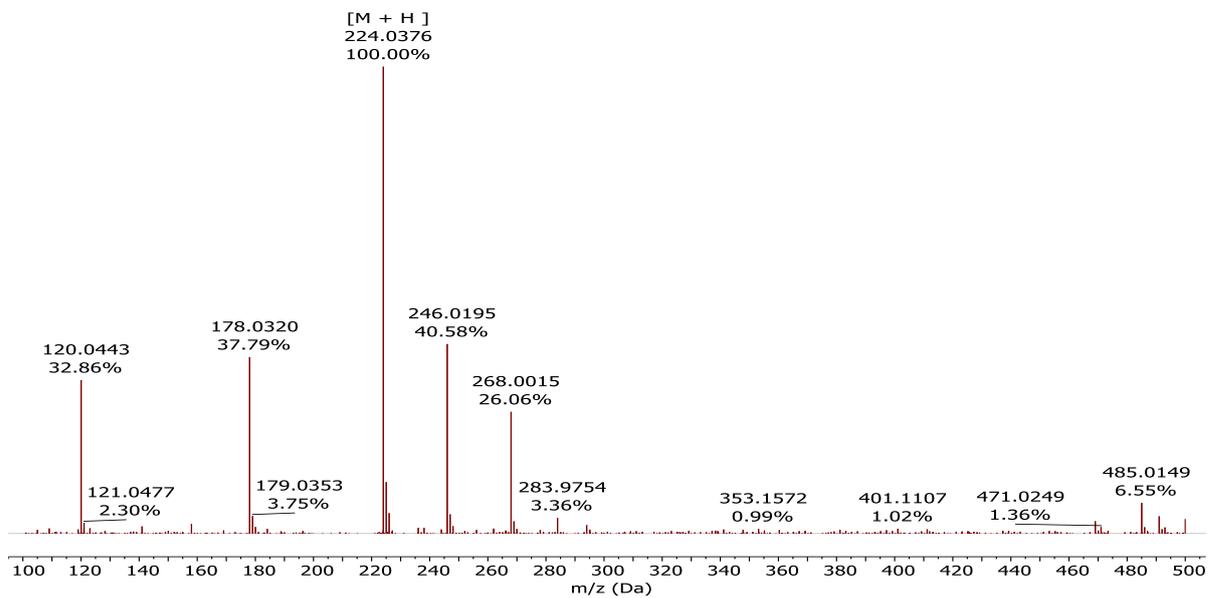
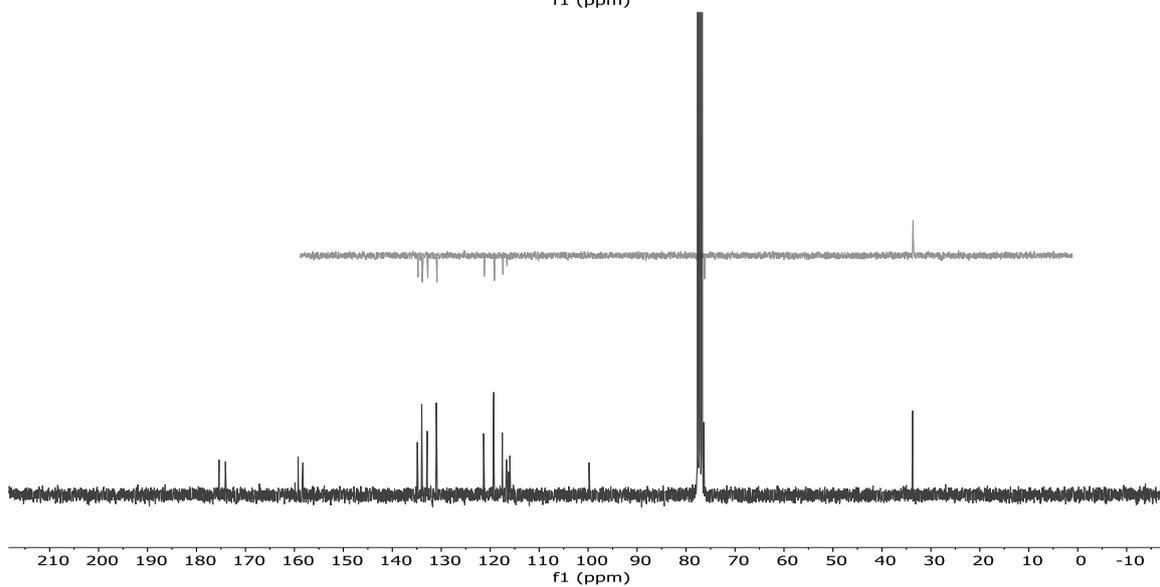
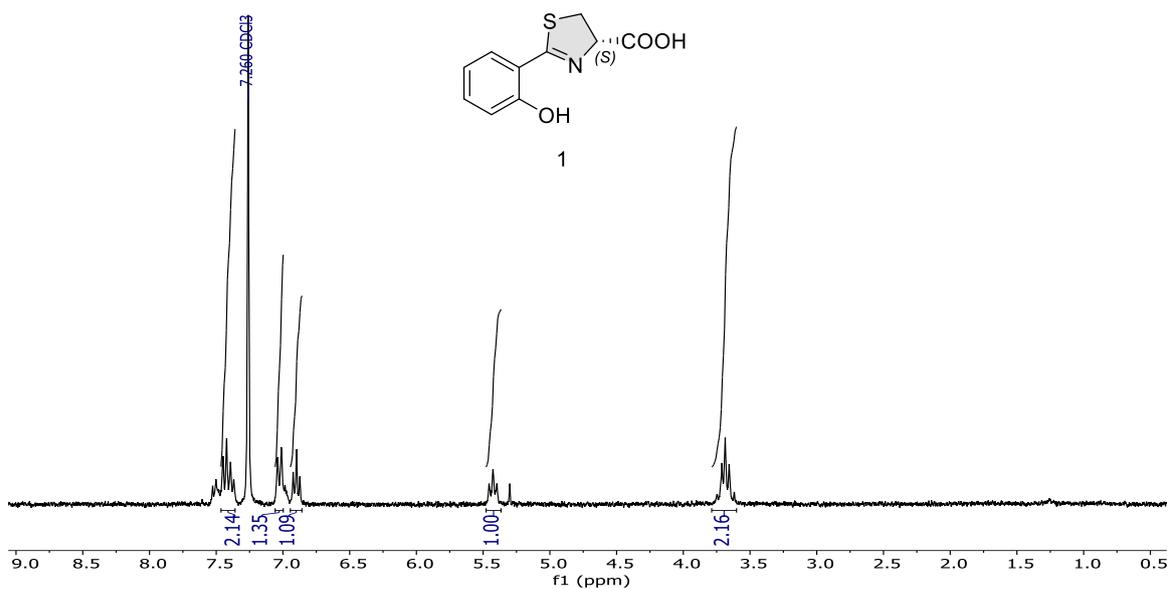
- (15) Pan-Chen Liu. Highly Virulent *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* Isolated from Taiwan Paradise Fish, *Macropodus opercularis* (L.), in Taiwan. *Afr J Microbiol Res* **2011**, 5 (15), 2107–2113. <https://doi.org/10.5897/ajmr11.303>.
- (16) Kornreich-Leshem, H.; Ziv, C.; Gumienna-Kontecka, E.; Arad-Yellin, R.; Chen, Y.; Elhabiri, M.; Albrecht-Gary, A. M.; Hadar, Y.; Shanzer, A. Ferrioxamine B Analogues: Targeting the FoxA Uptake System in the Pathogenic *Yersinia enterocolitica*. *J Am Chem Soc* **2005**, 127 (4), 1137–1145. <https://doi.org/10.1021/ja035182m>.
- (17) Ratledge, C.; Dover, L. G. Iron Metabolism in Pathogenic Bacteria. *Annu Rev Microbiol* **2000**, 54, 881–941.
- (18) Johnstone, T. C.; Nolan, E. M. Beyond Iron: Non-Classical Biological Functions of Bacterial Siderophores. *Dalton Transactions* **2015**, 44 (14), 6320–6339. <https://doi.org/10.1039/c4dt03559c>.
- (19) Hider, R. C.; Kong, X. Chemistry and Biology of Siderophores. *Nat Prod Rep* **2010**, 27 (5), 637–657. <https://doi.org/10.1039/b906679a>.
- (20) Raymond, K. N.; Dertz, E. A.; Kim, S. S. Enterobactin: An Archetype for Microbial Iron Transport. *PNAS* **2003**, 100 (7), 3584–3588.
- (21) Pita-Grisanti, V.; Chasser, K.; Sobol, T.; Cruz-Monserrate, Z. Understanding the Potential and Risk of Bacterial Siderophores in Cancer. *Front Oncol* **2022**, 12, 867271. <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.867271>.
- (22) Southwell, J. W.; Black, C. M.; Duhme-Klair, A. K. Experimental Methods for Evaluating the Bacterial Uptake of Trojan Horse Antibacterials. *ChemMedChem* **2021**, 16 (7), 1063–1076. <https://doi.org/10.1002/cmdc.202000806>.
- (23) El-Lababidi, R. M.; Rizk, J. G. Cefiderocol: A Siderophore Cephalosporin. *Ann Pharmacother* **2020**, 54 (12), 1215–1231. <https://doi.org/10.1177/1060028020929988>.
- (24) Wandersman, C.; Delepelaire, P. Bacterial Iron Sources: From Siderophores to Hemophores. *Annu Rev Microbiol* **2004**, 58, 611–647. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.58.030603.123811>.
- (25) 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*. Elsevier Ltd December 1, **2016**, pp 1077–1090. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2016.10.005>.
- (26) Raines, D. J.; Sanderson, T. J.; Wilde, E. J.; Duhme-Klair, A.-K. Siderophores. In *Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering*; Elsevier, **2015**. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409547-2.11040-6>.
- (27) Crosa, J. H. Genetics and Molecular Biology of Siderophore-Mediated Iron Transport in Bacteria. *Microbiol Rev* **1989**, 53 (4), 517–530.
- (28) Ganne, G.; Brillet, K.; Basta, B.; Roche, B.; Hoegy, F.; Gasser, V.; Schalk, I. J. Iron Release from the Siderophore Pyoverdine in *Pseudomonas aeruginosa* Involves Three New Actors: FpvC, FpvG, and FpvH. *ACS Chem Biol* **2017**, 12 (4), 1056–1065. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.6b01077>.
- (29) Williams, P. H. Novel Iron Uptake System Specified by ColV Plasmids: An Important Component in the Virulence of Invasive Strains of *Escherichia coli*. *Infect Immun* **1979**, 26 (3), 925–932.

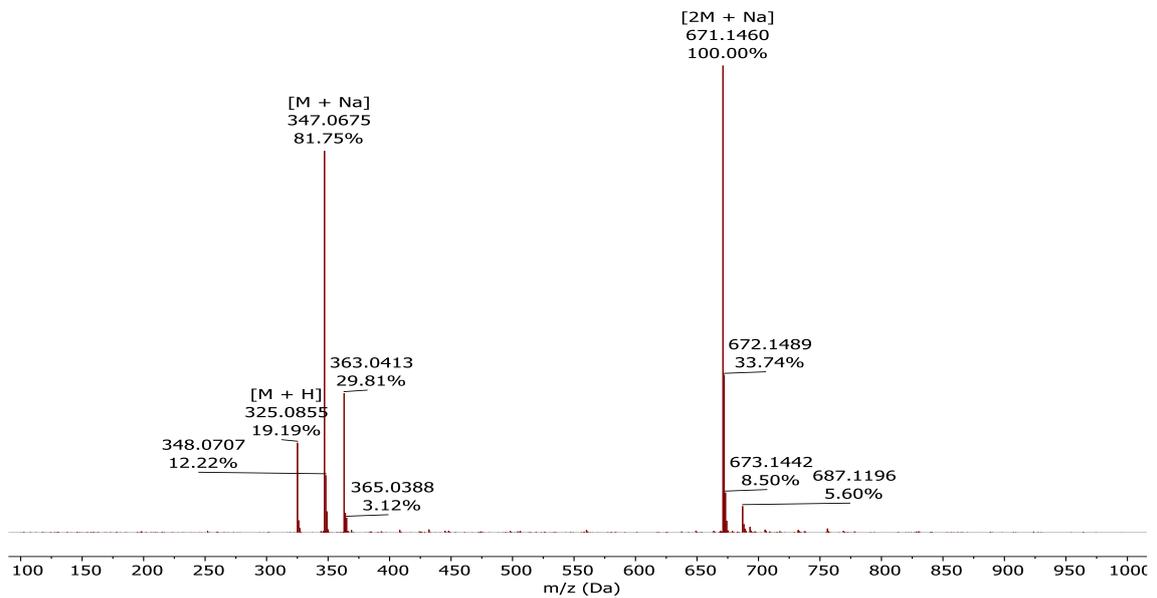
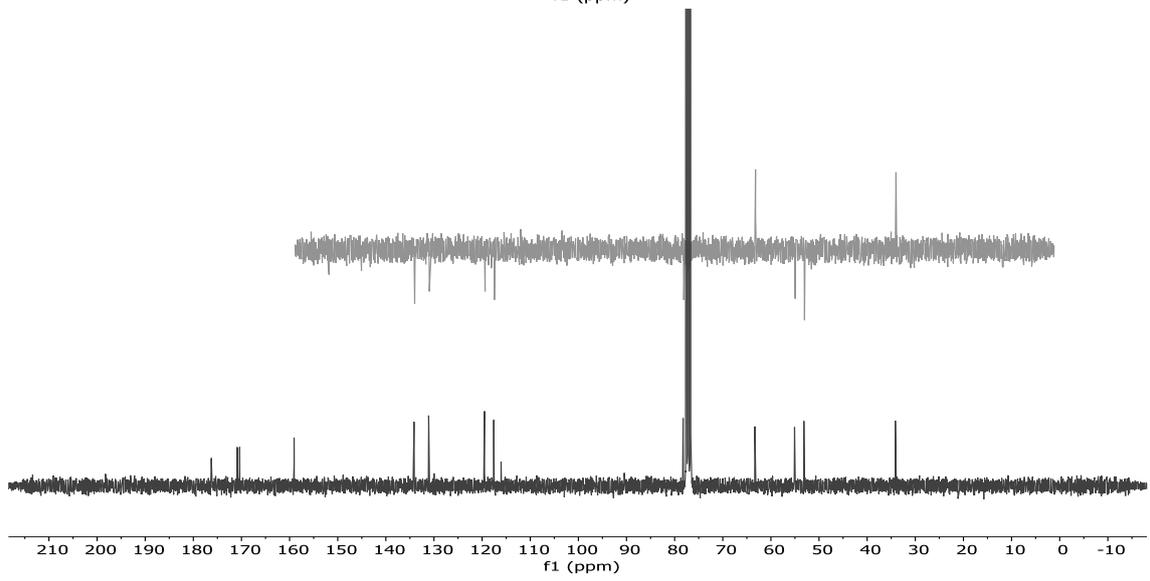
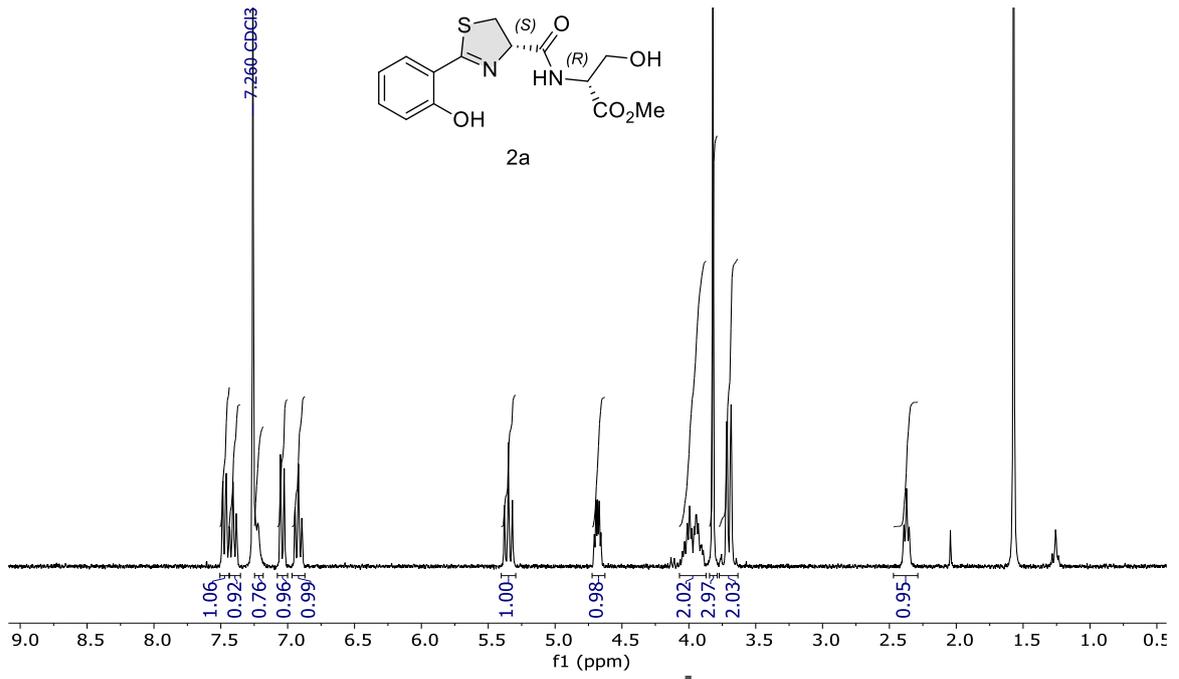
- (30) Drechsel, H.; Stephan, H.; Lotz, R.; Haag, H.; Zahner, H.; Hantke, K.; Jung, G.; Drechsel, H.; Stephan, H.; Lotz, R.; Haag, H.; Zahner, H.; Hantke, K.; Jung, G. Structure Elucidation of Yersiniabactin, a Siderophore from Highly Virulent *Yersinia* Strains. *Liebigs Ann.* **1995**, No. 10, 1727–1733.
- (31) Foresman, J. B.; Frisch, J. Exploring Chemistry with Electronic Structure Methods, third ed. Wallingford, CT: Gaussian, Inc, **2015**.
- (32) *Pronamar (Productos Naturales Marinos)*. <https://cica.udc.gal/group/pronamar/> (accessed 2023-06-10).
- (33) Osorio, C. R.; Juiz-Río, S.; Lemos, M. L. A Siderophore Biosynthesis Gene Cluster from the Fish Pathogen *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* Is Structurally and Functionally Related to the *Yersinia* High-Pathogenicity Island. *Microbiology* **2006**, *152* (11), 3327–3341. <https://doi.org/10.1099/mic.0.29190-0>.
- (34) Souto, A.; Montaños, M. A.; Rivas, A. J.; Balado, M.; Osorio, C. R.; Rodríguez, J.; Lemos, M. L.; Jiménez, C. Structure and Biosynthetic Assembly of Piscibactin, a Siderophore from *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*, Predicted from Genome Analysis. *European J Org Chem* **2012**, 5693–5700. <https://doi.org/10.1002/ejoc.201200818>.
- (35) PCT Int. Appl. (2017), WO 2017/009511 A1 20170119.
- (36) Valderrama, K.; Balado, M.; Rey-Varela, D.; Rodríguez, J.; Vila-Sanjurjo, A.; Jiménez, C.; Lemos, M. L. Outer Membrane Protein FrpA, the Siderophore Piscibactin Receptor of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*, as a Subunit Vaccine against Photobacteriosis in Sole (*Solea Senegalensis*). *Fish Shellfish Immunology* **2019**, *94*, 723–729. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.09.066>.
- (37) Balado, M.; Lages, M. A.; Fuentes-Monteverde, J. C.; Martínez-Matamoros, D.; Rodríguez, J.; Jiménez, C.; Lemos, M. L. The Siderophore Piscibactin Is a Relevant Virulence Factor for *Vibrio anguillarum* Favored at Low Temperatures. *Front Microbiol* **2018**, *9*, 1766. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01766>.
- (38) Thode, S. K.; Rojek, E.; Kozłowski, M.; Ahmad, R.; Haugen, P. Distribution of Siderophore Gene Systems on a Vibrionaceae Phylogeny: Database Searches, Phylogenetic Analyses and Evolutionary Perspectives. *PLoS One* **2018**, *13* (2), e0191860. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0191860>.
- (39) Ruiz, P.; Balado, M.; Fuentes-Monteverde, J. C.; Toranzo, A. E.; Rodríguez, J.; Jiménez, C.; Avendaño-Herrera, R.; Lemos, M. L. The Fish Pathogen *Vibrio ordalii* under Iron Deprivation Produces the Siderophore Piscibactin. *Microorganisms* **2019**, *7* (9), 313. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7090313>.
- (40) Galvis, F.; Ageitos, L.; Rodríguez, J.; Jiménez, C.; Barja, J. L.; Lemos, M. L.; Balado, M. *Vibrio neptunius* Produces Piscibactin and Amphibactin and Both Siderophores Contribute Significantly to Virulence for Clams. *Front Cell Infect Microbiol* **2021**, *11*, 750567. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.750567>.
- (41) Shi, Y. M.; Hirschmann, M.; Shi, Y. N.; Bode, H. B. Cleavage Off-Loading and Post-Assembly-Line Conversions Yield Products with Unusual Termini during Biosynthesis. *ACS Chem Biol* **2022**, *17* (8), 2221–2228. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.2c00367>.
- (42) De La Fuente, M. C.; Segade, Y.; Valderrama, K.; Rodríguez, J.; Jiménez, C. Convergent Total Synthesis of the Siderophore Piscibactin as Its Ga³⁺Complex. *Org Lett* **2021**, *23* (2), 340–345. <https://doi.org/10.1021/acs.orglett.0c03850>.

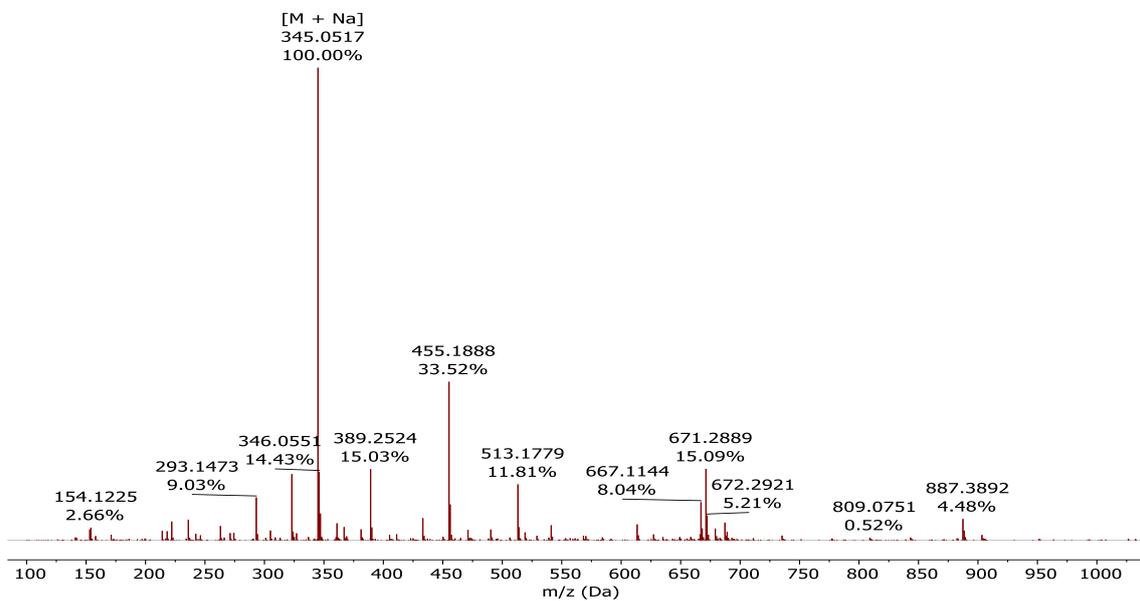
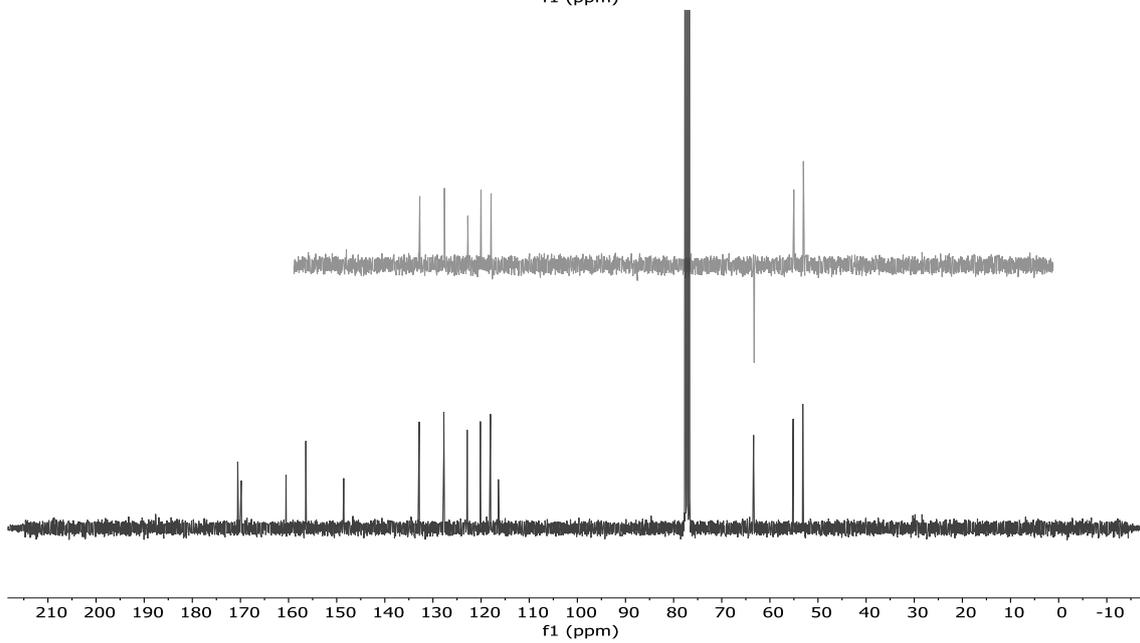
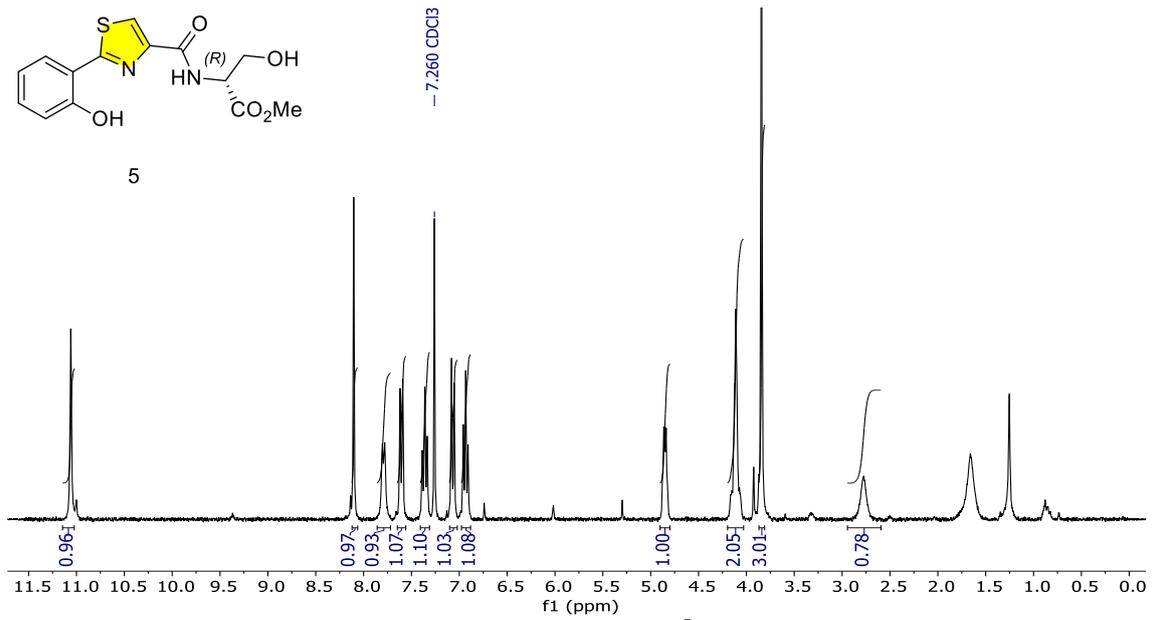
- (43) de la Fuente, M. C.; Ageitos, L.; Lages, M. A.; Martínez-Matamoros, D.; Forero, A. M.; Balado, M.; Lemos, M. L.; Rodríguez, J.; Jiménez, C. Structural Requirements for Ga³⁺ Coordination in Synthetic Analogues of the Siderophore Piscibactin Deduced by Chemical Synthesis and Density Functional Theory Calculations. *Inorg Chem* **2023**, *62* (19), 7503–7514. <https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.3c00787>.
- (44) PID2021-122732OB-C22.
- (45) Lages, M. A.; de la Fuente, M. C.; Ageitos, L.; Martínez-Matamoros, D.; Rodríguez, J.; Balado, M.; Jiménez, C.; Lemos, M. L. FrpA Is the Outer Membrane Piscibactin Transporter in *Vibrio anguillarum*: Structural Elements in Synthetic Piscibactin Analogues Required for Transport. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2022**, *27* (1), 133–142. <https://doi.org/10.1007/s00775-021-01916-1>.
- (46) Shakya, R.; Peng, F.; Liu, J.; Heeg, M. J.; Verani, C. N. Synthesis, Structure, and Anticancer Activity of Gallium(III) Complexes with Asymmetric Tridentate Ligands: Growth Inhibition and Apoptosis Induction of Cisplatin-Resistant Neuroblastoma Cells. *Inorg Chem* **2006**, *45* (16), 6263–6268. <https://doi.org/10.1021/ic060106g>.
- (47) Padilha, D. S.; Santos, Y. F.; Giacomini, L. C.; Castro, F. A. V.; Pereira, M. D.; Rocha, A. B.; Resende, J. A. L. C.; Scarpellini, M. Synthesis, Characterization and Biological Activity of Gallium(III) Complexes with Non-Symmetrical N₂O-Donor Schiff Bases. *Polyhedron* **2017**, *123*, 480–489. <https://doi.org/10.1016/j.poly.2016.12.020>.
- (48) Wu, Y. J.; Yang, B. V. Five-Membered Ring Systems. With N and S (Se) Atoms. In *Progress in Heterocyclic Chemistry*; Elsevier Ltd, **2013**; Vol. 25, pp 257–275. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-099406-2.00010-8>.
- (49) Rivault, F.; Schons, V.; Liébert, C.; Burger, A.; Sakr, E.; Abdallah, M. A.; Schalk, I. J.; Mislin, G. L. A. Synthesis of Functionalized Analogs of Pyochelin, a Siderophore of *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*. *Tetrahedron* **2006**, *62* (10), 2247–2254. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2005.12.012>.
- (50) Pihko, P. M.; Koskinen, A. M. P. Synthesis of the C 26-C 32 Oxazole Fragment of Calyculin C: A Test Case for Oxazole Syntheses. *J. Org. Chem.* **1998**, *63* (1), 92–98.
- (51) Balado, M.; Segade, Y.; Rey, D.; Osorio, C. R.; Rodríguez, J.; Lemos, M. L.; Jiménez, C. Identification of the Ferric-Acinetobactin Outer Membrane Receptor in *Aeromonas salmonicida subsp. salmonicida* and Structure-Activity Relationships of Synthetic Acinetobactin Analogues. *ACS Chem Biol* **2017**, *12* (2), 479–493. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.6b00805>.
- (52) Wipf, P.; Miller, C. P. A Short, Stereospecific Synthesis of Dihydrooxazoles from Serine and Threonine Derivatives. *Tetrahedron Lett* **1992**, *33* (7), 907–910.
- (53) Sakakura, A.; Kondo, R.; Ishihara, K. Molybdenum Oxides as Highly Effective Dehydrative Cyclization Catalysts for the Synthesis of Oxazolines and Thiazolines. *Org Lett* **2005**, *7* (10), 1971–1974. <https://doi.org/10.1021/ol050543j>.
- (54) Williams, D. R.; Lowder, P. D.; Gu, Y.-G.; Brooks, D. A. Studies of Mild Dehydrogenations in Heterocyclic Systems. *Tetrahedron Lett* **1997**, *38* (3), 331–334.
- (55) Hwang, H. J.; Son, Y. J.; Kim, D.; Lee, J.; Shin, Y. J.; Kwon, Y.; Ciufolini, M. A. Diversity-Oriented Routes to Thiopeptide Antibiotics: Total Synthesis and Biological Evaluation of Micrococcin P2. *Org Biomol Chem* **2022**, *20* (9), 1893–1899. <https://doi.org/10.1039/d1ob02145a>.

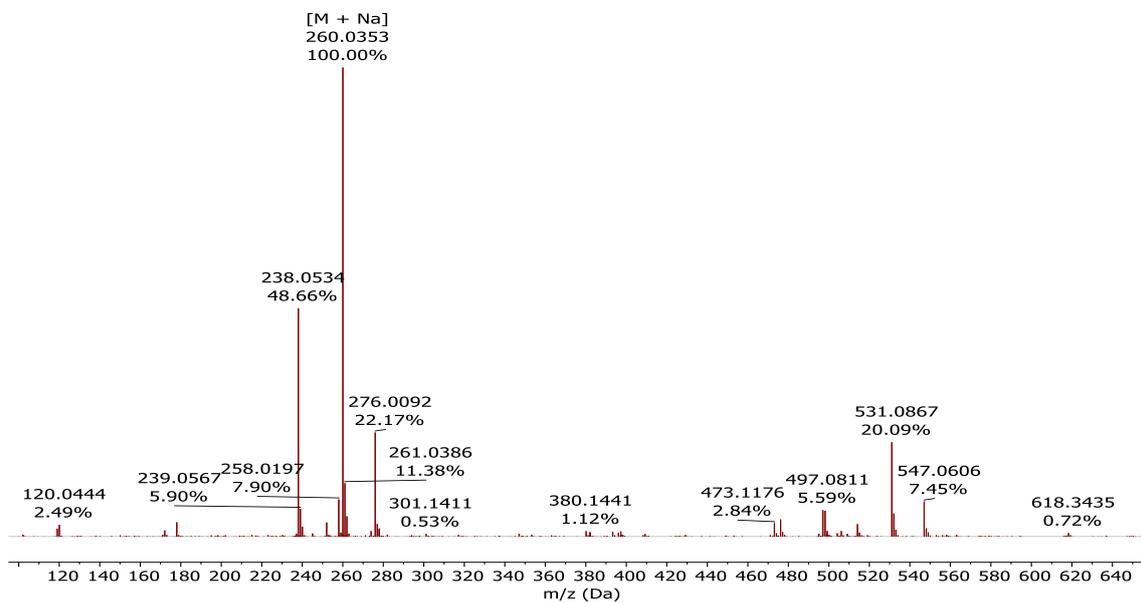
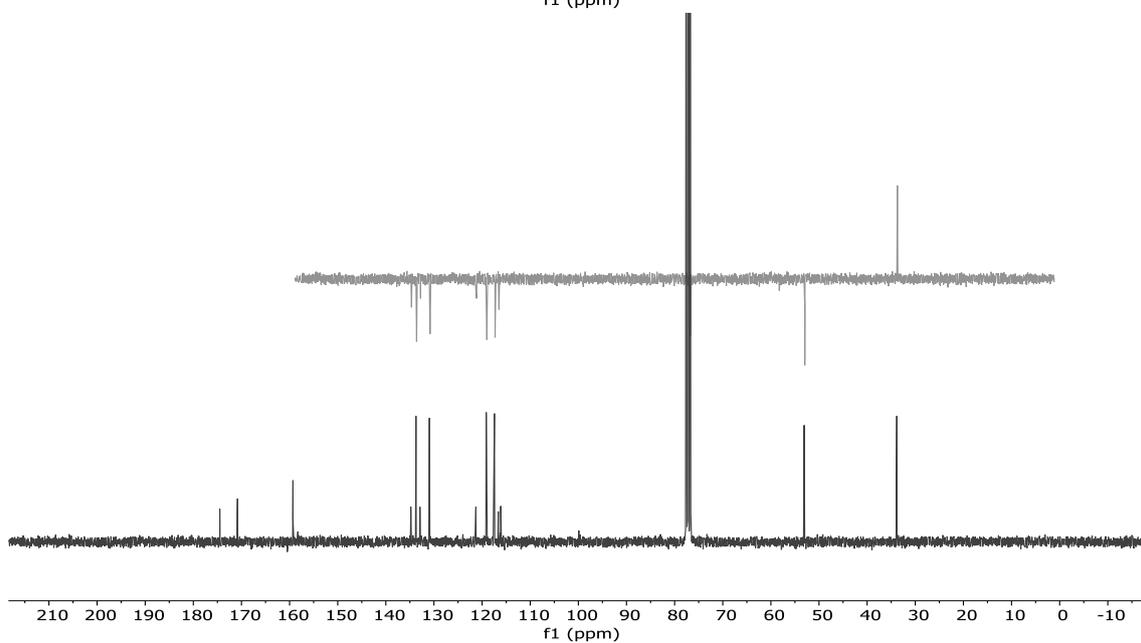
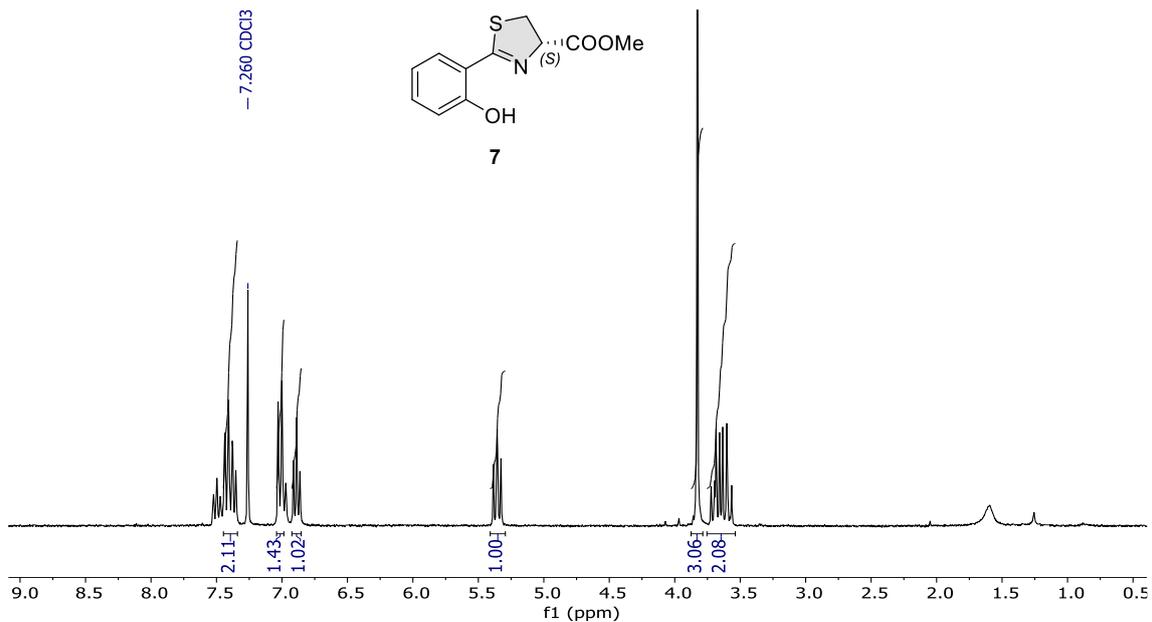
- (56) Christy, M. P.; Johnson, T.; McNerlin, C. D.; Woodard, J.; Nelson, A. T.; Lim, B.; Hamilton, T. L.; Freiberg, K. M.; Siegel, D. Total Synthesis of Micrococcin P1 through Scalable Thiazole Forming Reactions of Cysteine Derivatives and Nitriles. *Org Lett* **2020**, *22* (6), 2365–2370. <https://doi.org/10.1021/acs.orglett.0c00202>.
- (57) Ardá, A.; Soengas, R. G.; Nieto, M. I.; Jiménez, C.; Rodríguez, J. Total Synthesis of (-)-Dysithiazolamide. *Org Lett* **2008**, *10* (11), 2175–2178. <https://doi.org/10.1021/ol800551g>.
- (58) Segade, Y.; Montaos, M. A.; Rodríguez, J.; Jiménez, C. A Short Stereoselective Synthesis of Prepiscibactin Using a SmI₂-Mediated Reformatsky Reaction and Zn²⁺-Induced Asymmetric Thiazolidine Formation. *Org Lett* **2014**, *16* (21), 5820–5823. <https://doi.org/10.1021/ol502958u>.
- (59) Sargent, M. V. The Structure and Synthesis of the Novel Orchid Pigments Dengibsin and Dengi Bsinin. *J Chem Soc Perkin 1* **1987**, *11*, 2553–2563.
- (60) Reis, J. S.; Fernandes, A. B.; Freitas-Dörr, B. C.; Bastos, E. L.; Stefani, H. A. Oxazoline as Acceptor Moiety for Excited-State Intramolecular Proton Transfer. *Tetrahedron* **2018**, *74* (48), 6866–6872. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2018.10.019>.
- (61) Phillips, A. J.; Uto, Y.; Wipf, P.; Reno, M. J.; Williams, D. R. Synthesis of Functionalized Oxazolines and Oxazoles with DAST and Deoxo-Fluor. *Org Lett* **2000**, *2* (8), 1165–1168. <https://doi.org/10.1021/ol005777b>.
- (62) Savva, L.; Fossépré, M.; Keramidias, O.; Themistokleous, A.; Rizeq, N.; Panagiotou, N.; Leclercq, M.; Nicolaidou, E.; Surin, M.; Hayes, S. C.; Georgiades, S. N. Gaining Insights on the Interactions of a Class of Decorated (2-([2,2'-Bipyridin]-6-Yl)Phenyl)Platinum Compounds with c-Myc Oncogene Promoter G-Quadruplex and Other DNA Structures. *Chem. Eur. J.* **2022**, *28* (54), e2022014. <https://doi.org/10.1002/chem.202201497>.
- (63) Glöckner, S.; Tran, D. N.; Ingham, R. J.; Fenner, S.; Wilson, Z. E.; Battilocchio, C.; Ley, S. V. The Rapid Synthesis of Oxazolines and Their Heterogeneous Oxidation to Oxazoles under Flow Conditions. *Org Biomol Chem* **2015**, *13* (1), 207–214. <https://doi.org/10.1039/c4ob02105c>.
- (64) Williams, D. R.; Brooks, D. A.; Berliner, M. A. Total Synthesis of (-)-Hennoxazole A [17]. *J Am Chem Soc* **1999**, *121* (20), 4924–4925. <https://doi.org/10.1021/ja9904686>.

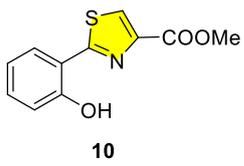
10 ANEXOS











- 7.260 CDCl₃

