



UNIVERSIDADE DA CORUÑA



CICA

CENTRO DE INVESTIGACIONES  
CIENTÍFICAS AVANZADAS

Grado en Química

## Memoria del Trabajo de Fin de Grado

---

Diseño y síntesis de una sonda fluorescente basada en el sideróforo  
amonabactina de la bacteria patógena *Aeromonas salmonicida* subsp.  
*salmonicida*

Deseño e síntese dunha sonda fluorescente baseada no sideróforo  
amonabactina da bacteria patóxena *Aeromonas salmonicida* subsp.  
*salmonicida*

Design and synthesis of a fluorescent probe based on amonabactin  
siderophore from the pathogenic bacterium *Aeromonas salmonicida* subsp.  
*salmonicida*

---

**Alumna:** Ana Rodríguez Pedrouzo

**Curso:** 2021-2022. **Convocatoria:** Junio 2022

**Directores:** Carlos Jiménez González, Jaime Rodríguez González



## AGRADECIMIENTOS

---

A mis directores Dr. Carlos Jiménez González y Dr. Jaime González Rodríguez por todo el apoyo, ayuda y confianza depositada en mi a la hora de emprender este trabajo.

A mis compañeros de grupo, por haber hecho más amenos los días de laboratorio, en especial a Carmen y a Lucía, por guiarme y enseñarme cada día un poco más.

A mi familia y amigas, por darme ayudarme a alcanzar mis metas, soportarme y animarme en los momentos más duros de la carrera. A mi pareja, por confiar siempre en mí, por formar parte de este camino y de los que vendrán.

Por último, a mis compañeros de grado, por todos los momentos vividos, buenos y malos. Gracias Lucía y Carlota por haber aparecido en mi vida y por poder compartir con vosotras todos estos años.

## ABREVIATURAS

---

$\delta$	Desplazamiento químico
$\lambda_{em}$	Longitud de onda de emisión
$\lambda_{exc}$	Longitud de onda de excitación
AMB	Amonabactina
Boc	<i>Terc</i> -butiloxicarbonilo
d	Doblete
Da	Dalton
dd	Doble doblete
DBF	Dibenzofulveno
DIPEA	<i>N,N</i> -Diisopropiletilamina
DMF	<i>N,N</i> -Dimetilformamida
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
EDC·HCl	Clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida
ESI	Ionización por electrospray
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación
Fmoc	9-Fluorenilmetiloxicarbonilo
HOBt	1-hidroxibenzotriazol
HOMO	<i>Highest Occupied Molecular Orbital</i>
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficiencia
HR	Alta resolución
HSQC	<i>Heteronuclear Single Quantum Coherence</i>
Hz	Hercios
<i>J</i>	Constante de acoplamiento
LUMO	<i>Lowest Unoccupied Molecular Orbital</i>
LYS	Lisina

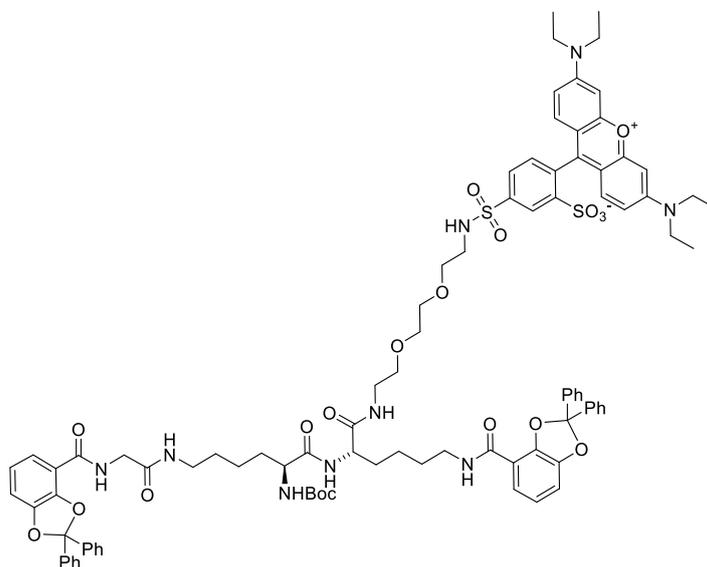
M	Molar
m	Multiplete
MS	Espectrometría de masas
m/v	Masa/volumen
$m/z$	Relación masa-carga
NHS	<i>N</i> -hidroxisuccinimida
NRPS	<i>Nonribosomal Peptide Synthetase</i>
OMP	<i>Outer Membrane Protein</i>
OMS	Organización Mundial de la Salud
PBP	<i>Periplasmic Binding Protein</i>
PEG	Polietilenglicol
Phe	Fenilalanina
ppm	Partes por millón
q	Cuadruplete
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
s	Singulete
SRB	Sulforodamina B
SF	Sonda fluorescente
subsp.	Subespecie
t	Triplete
TBTU	tetrafluoroborato de 2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio
TFA	Ácido trifluoroacético
THF	Tetrahidrofurano
TLC	<i>Thin-Layer Chromatography</i>
Trp	Triptófano
UV	Ultravioleta

## RESUMEN

---

La industria acuícola está siendo enormemente afectada por la aparición y propagación de enfermedades infecciosas en los peces y la elevada resistencia de las bacterias que las provocan a los antibióticos actuales. Por tanto, surge la necesidad de profundizar en el estudio de esas enfermedades infecciosas con el fin de desarrollar nuevos fármacos más efectivos. En este trabajo se propuso la síntesis de una sonda fluorescente (conjugado sideróforo-fluoróforo) para el posterior estudio de su internalización dentro de la bacteria y la monitorización de la forunculosis provocada por *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*. El sideróforo seleccionado como vector de entrada en la bacteria es un análogo de amonabactinas responsable de la captación de Fe(III) de la bacteria patógena *A. salmonicida*, siendo el fluoróforo la sulforodamina B. El espaciador utilizado para conectar el sideróforo y el fluoróforo fue PEG<sub>2</sub>, distinto al empleado en estudios previos.

El trabajo realizado permitió la obtención de un conjugado entre el sideróforo convenientemente protegido y el fluoróforo, la sulforodamina B, que fue caracterizado tanto por RMN como por espectrometría de masas. La eliminación de los grupos protectores del conjugado obtenido permitirá obtener la sonda fluorescente deseada.



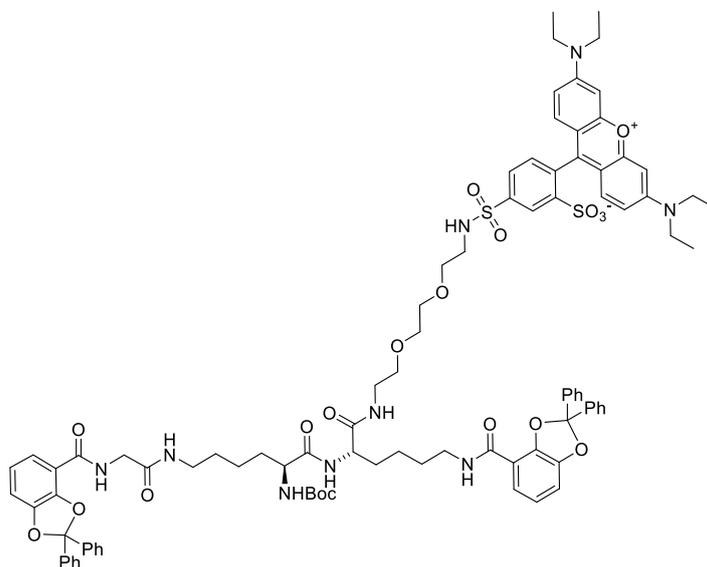
**Palabras clave:** sideróforo, amonabactinas, PEG<sub>2</sub>, sonda fluorescente, conjugado sideróforo-fluoróforo, sulforodamina B.

## RESUMO

---

A industria acuícola está sendo enormemente afectada pola aparición e propagación de enfermidades infecciosas nos peixes e a elevada resistencia das bacterias que as provocan aos antibióticos actuais. Por tanto, surxe a necesidade de profundizar no estudo desas enfermidades infecciosas co fin de desenvolver novos fármacos máis efectivos. Neste traballo propúxose a síntese dunha sonda fluorescente (conxugado sideróforo-fluoróforo) para o posterior estudo da súa internalización dentro da bacteria e a monitorización da forunculosis provocada por *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*. O sideróforo seleccionado como vector de entrada na bacteria é un análogo de amonabactinas responsable da captación de Fe(III) da bacteria patóxena *A. salmonicida*, sendo o fluoróforo a sulfordamina B. O espaciador utilizado para conectar o sideróforo e o fluoróforo foi PEG<sub>2</sub>, distinto ao empregado en estudos previos.

O traballo realizado permitiu a obtención dun conxugado entre o sideróforo convenientemente protexido e o fluoróforo, a sulfordamina B, que foi caracterizado tanto por RMN coma por espectrometría de masas. A eliminación dos grupos protectores do conxugado obtido permitirá obter a sonda fluorescente desexada.



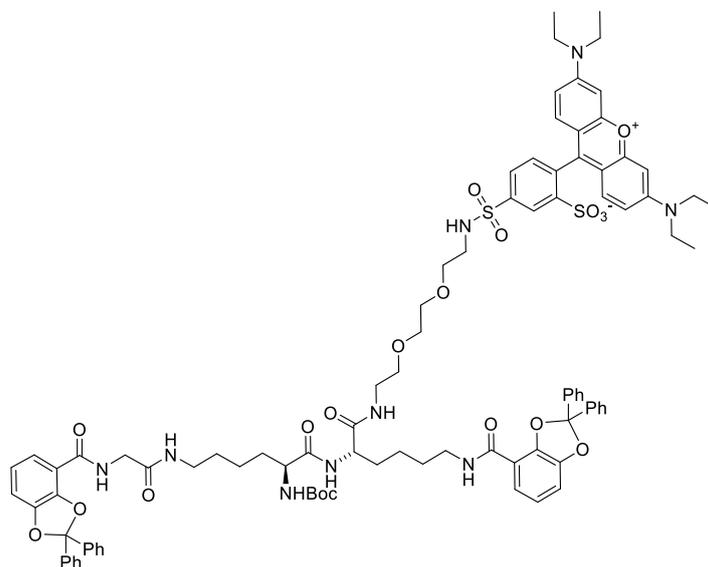
**Palabras clave:** sideróforo, amonabactinas, PEG<sub>2</sub>, sonda fluorescente, conxugado sideróforo-fluoróforo, sulfordamina B.

## ABSTRACT

---

The aquaculture industry is being severely affected by the emergence and spread of infectious diseases in fish and the high resistance of bacteria that cause them to current antibiotics. Therefore, there is a need to deepen the study of these infectious diseases in order to develop new and more effective drugs. In this work, the synthesis of a fluorescent probe (siderophore-fluorophore conjugate) was proposed for the subsequent study of its internalization within the bacterium and the monitoring of furunculosis caused by *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*. The siderophore selected as an input vector in the bacterium is an analog of the amonabactins, which are involved in the uptake of Fe(III) by the pathogenic bacterium *A. salmonicida* and the fluorophore is sulforhodamine B. The spacer used to connect the siderophore and the fluorophore was PEG<sub>2</sub>, different from the one used in previous studies.

This work allowed to obtain a conjugate between the suitably protected siderophore and fluorophore, the sulforhodamine B, which was characterized by both NMR and mass spectrometry. The elimination of the protecting groups of the obtained conjugate will allow obtaining the desired fluorescent probe.



**Palabras clave:** siderophore, ammonabactins, PEG<sub>2</sub>, fluorescent probe, siderophore-fluorophore conjugate, sulforhodamine B.

# ÍNDICE

---

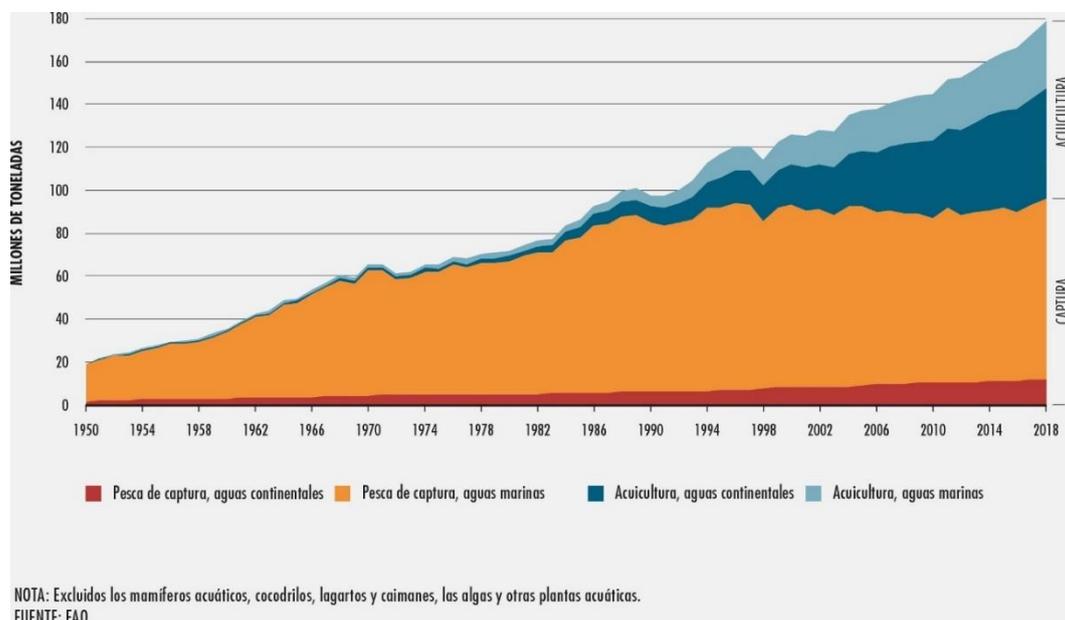
1	INTRODUCCIÓN.....	1
1.1	PESCA Y ACUICULTURA .....	1
1.1.1	ENFERMEDADES INFECCIOSAS EN PECES .....	2
1.2	SIDERÓFOROS .....	3
1.2.1	ESTRUCTURA QUÍMICA .....	3
1.2.2	BIOSÍNTESIS Y MECANISMOS DE ENTRADA .....	4
1.3	CONJUGADOS SIDERÓFORO-FLUORÓFORO.....	6
1.3.1	ELECCIÓN DEL SIDERÓFORO .....	7
1.3.2	ELECCIÓN DEL ESPACIADOR.....	7
1.3.3	ELECCIÓN DEL FLUORÓFORO.....	8
2	ANTECEDENTES .....	9
3	OBJETIVOS.....	11
4	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	12
4.1	DISEÑO DE UNA RUTA SINTÉTICA DE LA SONDA FLUORESCENTE .....	12
4.2	PREPARACIÓN DE LA SONDA FLUORESCENTE.....	13
5	SECCIÓN EXPERIMENTAL .....	22
5.1	MÉTODOS GENERALES.....	22
5.2	PRODECIMIENTOS Y CARACTERIZACIÓN.....	23
5.2.1	SÍNTESIS DEL FRAGMENTO A (7).....	23
5.2.2	SÍNTESIS DEL FRAGMENTO B (10) .....	27
5.2.3	ACOPLAMIENTO ENTRE EL FRAGMENTO B (10) Y EL FRAGMENTO A (7).....	29
5.2.4	SÍNTESIS DEL FRAGMENTO C1 (16) .....	32
5.2.5	ACOPLAMIENTO ENTRE 12 Y EL FRAGMENTO C1 (16).....	33
6	CONCLUSIONES.....	36
7	CONCLUSIÓNS .....	37
8	CONCLUSIONS .....	38
9	BIBLIOGRAFÍA .....	39
10	ANEXOS.....	43

# 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. Por ello, la pesca y la acuicultura son fundamentales para conseguir la ingesta beneficiosa de 200 g semanales de pescado recomendada por la Organización Mundial de la Salud (OMS), 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 pescado en 2018 fue de 179 millones de toneladas, de los que el 46% del total provino de la acuicultura (*Figura 1*) y el 87% se destinó al consumo humano (la acuicultura aporta el 52% del consumo humano). La tasa de consumo per cápita en 2018 aumentó 9.0 kg con respecto a 1961, lo que implica un incremento de 1.5% anual. (2)



*Figura 1.* Producción mundial de pesca de captura y acuicultura desde 1950 a 2018

La producción mundial de pescado en 2019 fue de 213.7 millones de toneladas, siendo España el Estado miembro de la Unión Europea con mayor producción de acuicultura, aunque en 2020 debido a la pandemia del COVID-19 y a episodios climáticos, dicha producción disminuyó de 308.033 a 307.168 toneladas. La cosecha de rodaballo de

acuicultura en España en 2020 fue de 7681 toneladas, un 5.6 % menos que en 2019, siendo Galicia la única comunidad productora de rodaballo del país. (3)

La acuicultura se ha ido expandiendo e intensificando a lo largo de las décadas, aumentando la densidad poblacional de los animales acuáticos. Esto llevó a una mayor aparición y propagación de enfermedades infecciosas y mortalidad de los individuos, generando grandes pérdidas económicas en el sector. (2) (4) Además, la resistencia de las cepas bacterias a los antibióticos actuales se ha visto enormemente incrementada por su uso masivo, siendo necesario el desarrollo de nuevos antibióticos más efectivos. (5) (6) Los antibióticos de amplio espectro actúan sobre dianas terapéuticas muy conservadas presentes en múltiples patógenos bacterianos, los cuales adquieren resistencia a los mismos por varios mecanismos como la modificación de dicha diana. Sin embargo, los antibióticos de espectro reducido se dirigen a patógenos específicos, retrasando la aparición de resistencia. (7)

### 1.1.1 ENFERMEDADES INFECCIOSAS EN PECES

Las enfermedades infecciosas causadas por bacterias en la industria acuícola que afectan gravemente a los peces son numerosas, entre las que podemos destacar:

- **Vibriosis:** enfermedad septicémica hemorrágica mortal causada por la bacteria patógena Gram-negativa *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, hemorragia en vientre y aletas. (8) (9)
- **Fotobacteriosis o pasteurelosis:** enfermedad causada por la bacteria Gram-negativa *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* que se manifiesta con la aparición de nódulos blancos en los órganos internos de peces como la dorada, lubina o lenguado. (8)
- **Yersiniosis o enfermedad de la boca roja:** enfermedad septicémica hemorrágica aguda o crónica provocada por bacterias de las bacterias Gram-negativas de la especie *Yersinia ruckeri*. Afecta al comportamiento de peces de distintas partes del mundo, siendo los salmónidos los más susceptibles. Genera hemorragias en distintas partes del cuerpo (boca, superficie corporal, órganos internos). (10)
- **Forunculosis:** enfermedad septicémica hemorrágica aguda o crónica, que se manifiesta a menudo con necrosis licuefactiva causada por la bacteria Gram-

negativa *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* (en lo sucesivo la denominaremos *A. salmonicida*). La forunculosis afecta principalmente a los peces salmónidos tanto de aguas dulces como saladas (salmón, trucha) y a algunos salmónidos (dorada, rodaballo, etc.). Se manifiesta con la aparición de úlceras y hemorragias en aletas, músculos y órganos internos, así como cambios en el comportamiento. (8) (11)

## 1.2 SIDERÓFOROS

Los sideróforos son compuestos de bajo peso molecular (500-1500 Da) con elevada afinidad y selectividad por el hierro, que son biosintetizados y utilizados por muchos microorganismos tales como bacterias y hongos para captar hierro. (12) Este es un elemento esencial para estos organismos, actuando como cofactor de numerosas enzimas implicadas en procesos metabólicos y participando en procesos como la síntesis de ácidos nucleicos, reparación del DNA y regulación génica. (12) (13)

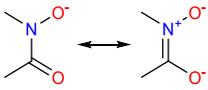
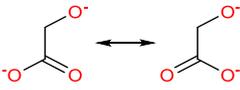
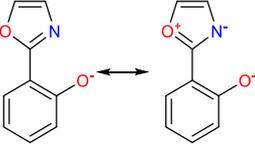
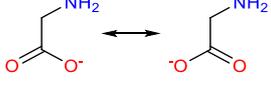
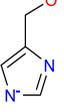
Aunque la abundancia de hierro en la corteza terrestre es elevada, se encuentra mayoritariamente en su forma oxidada Fe(III), siendo poco soluble en agua en ambientes aerobios, precipitando como Fe(OH)<sub>3</sub>, por lo que su biodisponibilidad se ve reducida. En el suero humano, la proteína transferrina mantiene una concentración del ion férrico sobre 10<sup>-24</sup> M, provocando que las bacterias patógenas, tanto Gram-positivas como Gram-negativas, se encuentren en medios deficientes en hierro y desarrollen mecanismos de captación de este elemento como es la biosíntesis de sideróforos. (5) (7) (14) (15) (16)

### 1.2.1 ESTRUCTURA QUÍMICA

Los sideróforos presentan átomos dadores de electrones, como oxígeno y nitrógeno, que, junto con su estructura, les permiten actuar como ligandos hexadentados y formar complejos octaédricos con el hierro. Los complejos de alto espín sideróforo-Fe(III) son muy estables termodinámicamente y la mayor afinidad por el Fe(III) frente al Fe(II) marcan su elevada selectividad. (5) (12) Los sideróforos pueden formar complejos con cationes metálicos distintos por la presencia de otros átomos dadores, como el azufre, con alta afinidad por metales pesados (Zn, Mn, Co, Ni), altamente tóxicos para muchas bacterias, de forma que, estos complejos no son reconocidos ni internalizados por las bacterias. (12) (17) Por lo tanto, los sideróforos, además de actuar en la captación del hierro, pueden desintoxicar el ambiente local. (17)

Los sideróforos pueden ser clasificados en función del tipo de ligando bidentado de su estructura (*Tabla 1*) en catecolatos, hidroxamatos y  $\alpha$ -hidroxicarboxilatos. Otros sideróforos menos comunes son: hidroxifeniloxazolona,  $\alpha$ -aminocarboxilato y  $\alpha$ -hidroxiimidazol. Pueden encontrarse también sideróforos mixtos, que presentan ligandos de distinto tipo. (12) (18)

*Tabla 1.* Clasificación de los sideróforos más comunes según su ligando bidentado. (12)

Tipo de ligando	Estructura
Catecolato	
Hidroxamato	
$\alpha$ -Hidroxicarboxilato	
Hidroxifeniloxazolona	
$\alpha$ -Aminocarboxilato	
$\alpha$ -Hidroxiimidazol	

## 1.2.2 BIOSÍNTESIS Y MECANISMOS DE ENTRADA

Durante la infección bacteriana, los bajos niveles de hierro activan la maquinaria transcripcional y, en consecuencia, se forman los elementos necesarios para la síntesis, reconocimiento, transporte y procesamiento de los sideróforos. (12) (18) La mayoría de los sideróforos son sintetizados en el citoplasma bacteriano por las sintetetas de péptidos no ribosómicos (nonribosomal peptide synthetase, NRPS). (12) Las bacterias suelen secretarlos al medio extracelular, donde forman el complejo sideróforo-Fe(III), y seguidamente lo reintroducen por diferentes mecanismos en función del microorganismo. (18)

Las bacterias Gram-negativas presentan dos membranas celulares, la externa y la interna separadas por un espacio intermembrana o periplasma, y el citoplasma (*Figura 2*). En la

membrana externa existen proteínas de membrana externa (outer membrane protein, OMP) que funcionan como receptores de los complejos sideróforo-Fe(III). 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 activo del complejo al espacio periplásmico. A continuación, las proteínas periplásmicas de unión (periplasmic binding protein, PBP) se unen al mismo y lo llevan a la membrana interna, donde una proteína de membrana dependiente de ATP o transportador tipo ABC (ATP Binding Cassete) bombea el complejo sideróforo-Fe(III) al citoplasma. Dentro de la bacteria, enzimas específicas se encargan de la liberación del hierro por reducción o por degradación del sideróforo. (7) (19) (20) Existen casos, como en *Pseudomonas aeruginosa*, en los que el hierro se libera ya en el periplasma donde un transportador tipo ABC lo introduce en el citoplasma mientras que el sideróforo es devuelto al medio extracelular. (19)

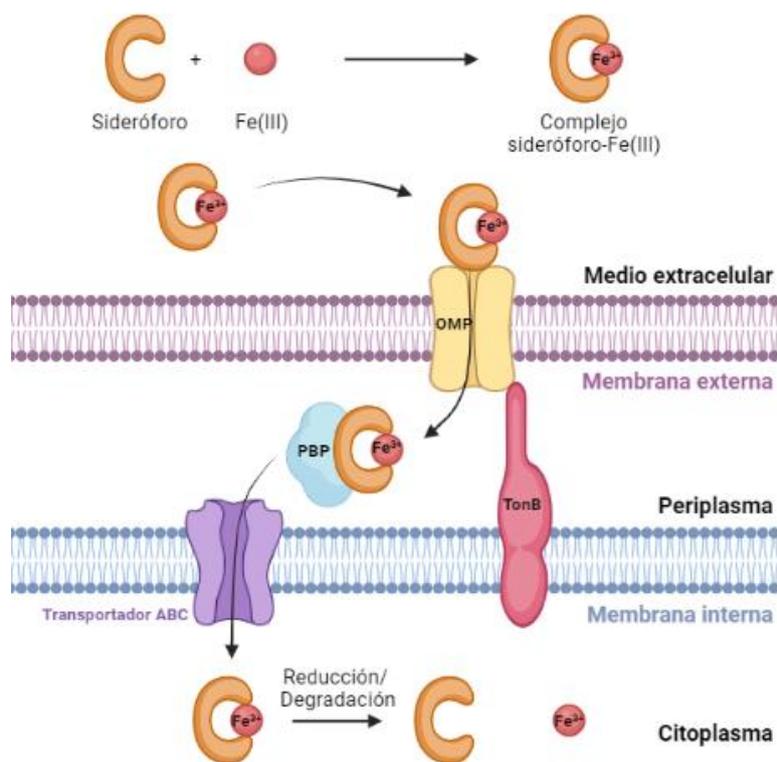


Figura 2. Mecanismo de adquisición de hierro en bacterias Gram-negativas.

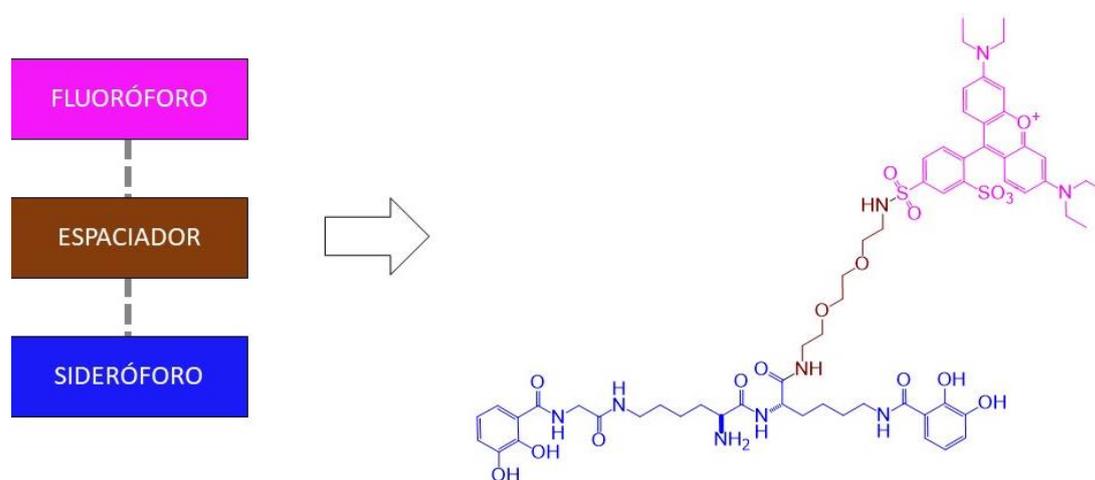
Sin embargo, las bacterias Gram-positivas presentan una sola membrana, de modo que, una proteína similar a la PBP reconoce al complejo sideróforo-Fe(III) y lo introduce dentro del citoplasma con ayuda de un transportador tipo ABC. (7) (19) (20)

Algunas especies bacterianas pueden biosintetizar distintos tipos de sideróforos en función de las condiciones del medio, como el pH, temperatura o por competencia con otros microorganismos por el hierro. Por ejemplo, *V. anguillarum* produce vancrobactina piscibactina y/o anguibactina y *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* produce acinetobactina y amonabactina. (21) (22)

### 1.3 CONJUGADOS SIDERÓFORO-FLUORÓFORO

Una de las aplicaciones de los sideróforos es su utilización como vectores en la preparación de sondas fluorescentes al unirse a un fluoróforo, que son usados en la monitorización de las infecciones bacterianas en el huésped. Los sideróforos presentan una alta afinidad por el Fe(III) y por sus receptores de membrana u OMP, lo que los hace idóneos para usarlos como sensores o sondas. Los conjugados sideróforo-fluoróforo pueden también utilizarse en el estudio previo para el desarrollo de nuevos antimicrobianos basados en la estrategia *Caballo de Troya* en los que tiene lugar la conjugación de un análogo de sideróforo con antibióticos conocidos. (23) (24) (25)

Las sondas fluorescentes están compuestas por los tres elementos básicos mostrados en la *Figura 3*: un análogo sintético de un sideróforo, un espaciador y un fluoróforo. En este trabajo se propuso como sideróforo un análogo de amonabactina, como espaciador un derivado del polietilenglicol y como fluoróforo la sulforodamina B (SRB).

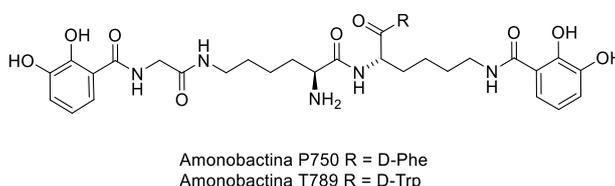


*Figura 3.* Esquema de la estructura básica de un conjugado sideróforo-fluoróforo y el propuesto en este Trabajo de Fin de Grado.

### 1.3.1 ELECCIÓN DEL SIDERÓFORO

En el presente trabajo se pretende sintetizar una sonda fluorescente que sea internalizada por *A. salmonicida* subsp. *salmonicida*, de modo que el sideróforo debe ser reconocido por las OMP, actuando como vector de entrada del conjugado.

Se ha seleccionado un análogo de las amonabactinas P750 y T789, ver *Figura 4*, como sideróforo del conjugado. Estructuralmente presentan un esqueleto peptídico con dos lisinas y una glicina enlazando los dos catecoles de los extremos, que son los ligandos que quelatan el Fe(III), y un aminoácido lateral de isomería D, fenilalanina (Phe) o triptófano (Trp). La presencia de dos biscatecolamidas en las amonabactinas es necesaria para el reconocimiento por parte de su receptor de membrana FstC y la presencia de una cadena larga de 15 átomos entre las catecolamidas hace que este reconocimiento sea más eficiente. Además, la presencia del aminoácido lateral no es esencial para el reconocimiento y la gran plasticidad de la proteína FstC, ya que es capaz de reconocer distintas variaciones estructurales de las amonabactinas, lo convierten en una potencial vía de entrada de otras moléculas como los conjugados sideróforo-fluoróforo. (26)

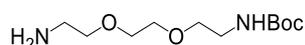


*Figura 4.* Estructuras de las amonabactinas P750 y T789.

### 1.3.2 ELECCIÓN DEL ESPACIADOR

El espaciador une los elementos fundamentales del conjugado, sideróforo y fluoróforo. La condición esencial del espaciador es que impida que dichos elementos interfieran entre sí y que el conjugado pueda ser reconocido por la OMP.

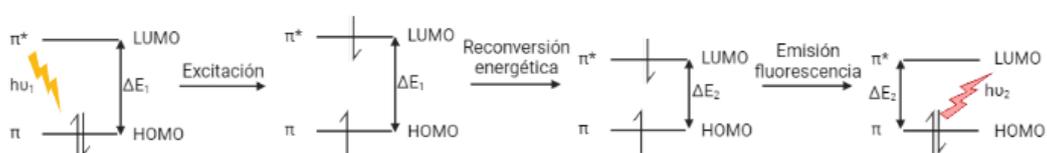
El espaciador elegido es NH<sub>2</sub>-PEG<sub>2</sub>-NHBoc (*Figura 5*), un derivado de polietilenglicol con dos aminas laterales, una de ellas unida a un grupo protector Boc que permite diferenciarlas en su reactividad.



*Figura 5.* Estructura del NH<sub>2</sub>-PEG<sub>2</sub>-NHBoc, espaciador elegido en este trabajo.

### 1.3.3 ELECCIÓN DEL FLUORÓFORO

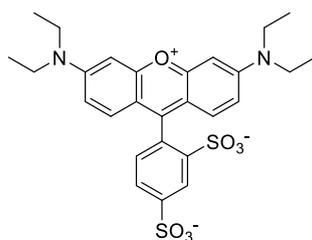
Los fluoróforos son compuestos que absorben radiación electromagnética de una determinada longitud de onda y luego emiten parte de esta en forma de luz con una longitud de onda mayor. (24) Por ejemplo, al incidir la luz UV en los fluoróforos con un sistema  $\pi$  conjugado, se promueven electrones desde el orbital molecular ocupado de mayor energía (HOMO, Highest Occupied Molecular Orbital) al orbital desocupado de menor energía (LUMO, Lowest Unoccupied Molecular Orbital) como se representa en la *Figura 6*. Una parte de la energía absorbida es disipada por un proceso de reconversión energética y el resto se libera en forma de fotón al decaer el electrón al HOMO. (27) (28)



*Figura 6.* Diagrama del proceso de fluorescencia en moléculas con sistemas  $\pi$  conjugados.

Algunos complejos sideróforo-fluoróforo, al coordinarse con iones de metales de transición como el hierro, ven extinguida su fluorescencia. En este trabajo será necesario el uso de un fluoróforo que siga produciendo fluorescencia, de forma que el conjugado quelatado con hierro permita visualizar las bacterias que lo internalizan y monitorizar el avance de la enfermedad en el huésped.

La sulforodamina B (SRB) es un fluoróforo que no se ve afectado por el proceso de extinción de fluorescencia al complejarse con el Fe(III) y su intensidad de fluorescencia es elevada, de modo que, será el empleado en la síntesis de la sonda. Sin embargo, su gran tamaño puede suponer una desventaja, ya que el efecto estérico de los tres anillos aromáticos fusionados (*Figura 7*) dificulta el reconocimiento y transporte a través de la membrana bacteriana. (29) Este fluoróforo absorbe en el verde ( $\lambda_{exc} = 565$  nm) y emite en el amarillo ( $\lambda_{em} = 586$  nm). (30)



*Figura 7.* Estructura Sulforodamina B.

## 2 ANTECEDENTES

---

Este trabajo de fin de grado se desarrolló en el grupo de investigación del Centro de Investigaciones Científicas Avanzadas (CICA) QUIMOLMAT-PRONAMAR (31), perteneciente al catálogo de investigación de la UDC, QUIMOLMAT (Química Molecular y de Materiales) (32), cuyos miembros pertenecen también a la Facultad de Ciencias de A Coruña.

Desde finales de la década de los 90, la búsqueda de nuevas sustancias naturales con actividad biológica y la aplicación de las mismas o de sus derivados sintéticos con fines terapéuticos ha sido el foco de estudio del grupo. (30) Por ejemplo, el estudio de los sideróforos de bacterias patógenas y el desarrollo de tratamientos y diagnósticos contra las mismas es una de sus líneas de investigación. En el año 2015, el grupo demostró que *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* producía simultáneamente dos tipos de sideróforos, acinetobactina y las amonabactinas, compartiendo parte de la ruta biogénica de síntesis. (21) En estudios más recientes (2017 y 2019), se sintetizaron diversos análogos de acinetobactina y de amonabactinas que permitieron identificar a FstB y FstC como sus respectivos receptores de membrana externa. Además, se pudieron determinar los requerimientos estructurales mínimos para el reconocimiento de ambos sideróforos y su internalización. (33) (26) Con los resultados obtenidos, recientemente se planteó la síntesis de distintos conjugados sideróforo-fluoróforo con el fin de determinar si el sideróforo es capaz de introducir la molécula asociada en el interior de la bacteria, lo que permitirá diseñar conjugados sideróforo-antibiótico siguiendo una estrategia tipo *Caballo de Troya* como posibles nuevos antimicrobianos.

De este modo el Dr. Javier Cisneros Sureda, miembro del grupo de investigación, sintetizó la sonda fluorescente amonabactina – sulforodamina B (AMB-SRB), (ver *Figura 8*), que fue reconocida e internalizada por *A. salmonicida*, pero no por otras bacterias patógenas de peces (*V. anguillarum* y *P. damselae*), lo que indica su posible aplicación en la detección selectiva de *A. salmonicida* frente a las otras dos bacterias patógenas. Pero sí fue captada por bacterias patógenas humanas (*A. hydrophila* y *Acinetobacter baumannii*), lo que puede ser interesante en el estudio de enfermedades infecciosas en humanos. (29)

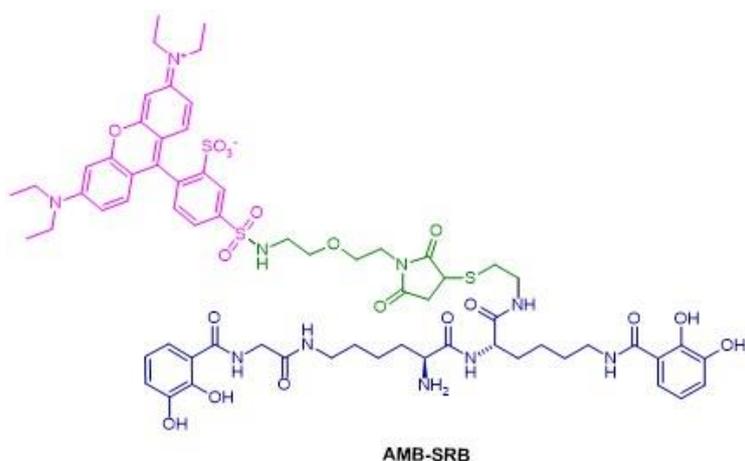


Figura 8. Estructura de la sonda fluorescente AMB-SRB.

Posteriormente se sintetizaron tres conjugados con estructura equivalente a la sonda fluorescente anterior, pero en los que el fluoróforo fue substituido por los antibióticos ampicilina, norfloxacin y minociclina respectivamente. Desafortunadamente, ninguno de los conjugados preparados presentaron actividad antimicrobiana. Creemos que la proximidad entre el sideróforo y el antibiótico pudo haber afectado a la interacción del antibiótico con su diana celular.

En este trabajo se propuso la síntesis de otra sonda fluorescente con un espaciador diferente con dos unidades de etilenglicol (Figura 9) y siguiendo una ruta sintética diferente, con el fin de evaluar la influencia de la estructura del espaciador.

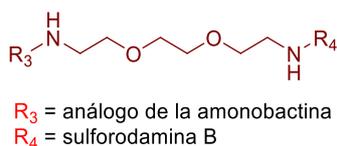


Figura 9. Estructura del espaciador derivado de polietilenglicol seleccionado para la unión del análogo de amonabactinas y el fluoróforo.

### 3 OBJETIVOS

---

El principal objetivo de este Trabajo de Fin de Grado es la síntesis de un conjugado de tipo sideróforo-fluoróforo que funcione como sonda fluorescente para la detección de la bacteria patógena *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*. Estos conjugados aprovechan el mecanismo de adquisición de hierro de la bacteria mediante sideróforos para su internalización. Para ello se plantearon dos objetivos principales:

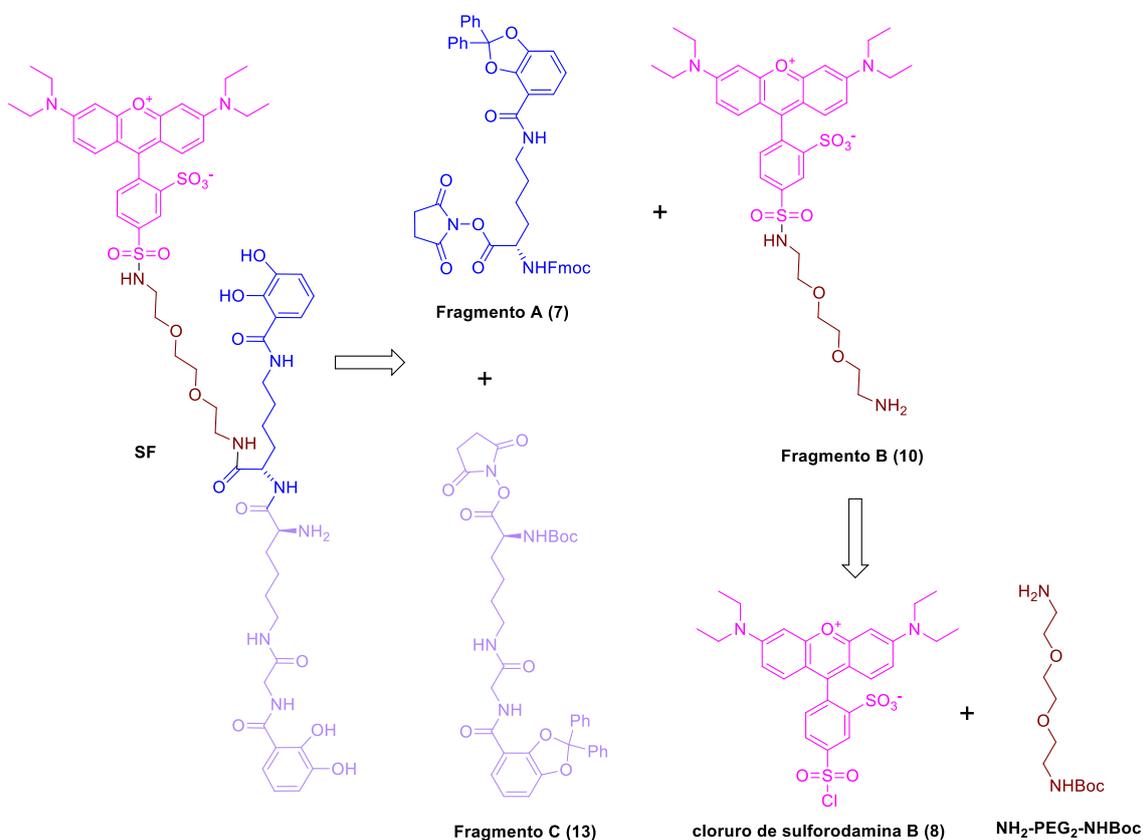
- Diseño de la ruta de síntesis de la sonda fluorescente basada en un análogo del sideróforo amonabactina producido por la bacteria *A. salmonicida*.
- Preparación y caracterización de la sonda fluorescente.

## 4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este apartado del trabajo se discuten las rutas sintéticas llevadas a cabo para la preparación de la sonda fluorescente y los resultados obtenidos.

### 4.1 DISEÑO DE UNA RUTA SINTÉTICA DE LA SONDA FLUORESCENTE

Para el diseño de la ruta sintética se planteó la retrosíntesis de la sonda fluorescente objetivo, en la que se distinguieron 4 fragmentos base. Uno de ellos es el fluoróforo, que procede de la sulforodamina B y confiere fluorescencia a la molécula. Otro es el espaciador  $\text{NH}_2\text{-PEG}_2\text{-NHBoc}$ , con dos unidades de etilenglicol y uno de sus grupos amina protegido. Y, por último, el análogo de las amonabactinas, que se divide en dos fragmentos sintetizados por separado (*Esquema 1*).

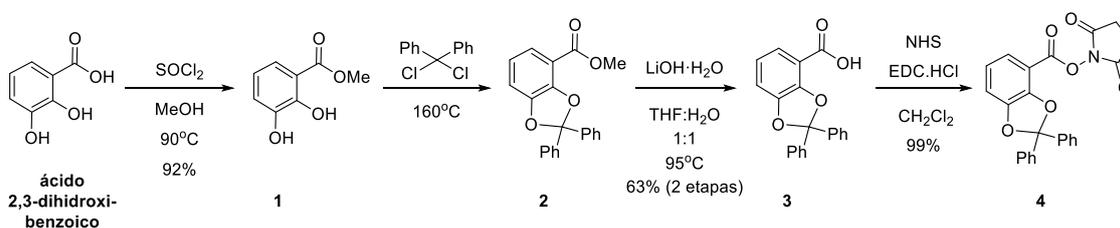


*Esquema 1. Análisis retrosintético para la preparación de la sonda fluorescente (SF)*

Los acoplamiento entre estos fragmentos son claves en la síntesis. El acoplamiento del cloruro de sulforodamina B con el espaciador se producirá a través de la amina primaria del mismo; el **fragmento B** resultante se acoplaría con el **fragmento A** y, por último, con el **fragmento C**, usando métodos estándares de conjugación entre aminas primarias y un ácido carboxílico activado.

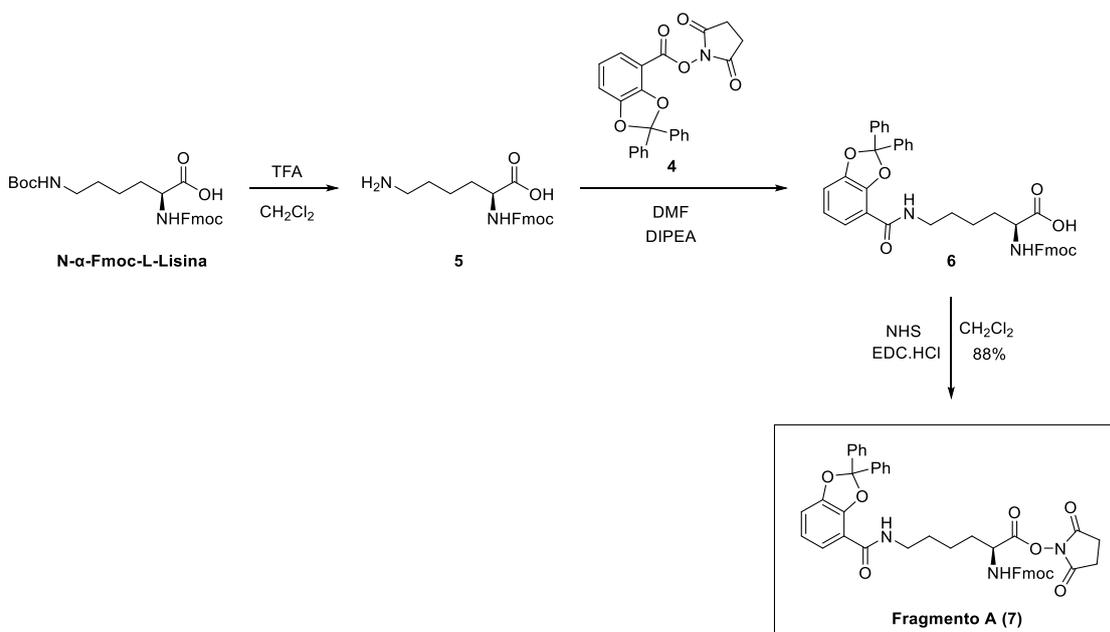
## 4.2 PREPARACIÓN DE LA Sonda FLUORESCENTE

La preparación del fragmento A comenzó con la síntesis del compuesto **4** (Esquema 2). Se partió del ácido 2,3-dihidroxibenzoico comercial, que se sometió a reacciones de protección y desprotección para obtener el catecol protegido **3** siguiendo un protocolo sintético descrito anteriormente. (34) El ácido carboxílico de **3** se activó usando NHS en presencia de EDC en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> para obtener el intermedio **4** bajo condiciones de atmósfera inerte. (26) El espectro de RMN-<sup>1</sup>H de **4** confirmó la formación del éster activado al observarse una señal singlete a 2.90 ppm correspondientes a los protones metilénicos de la succinimida.



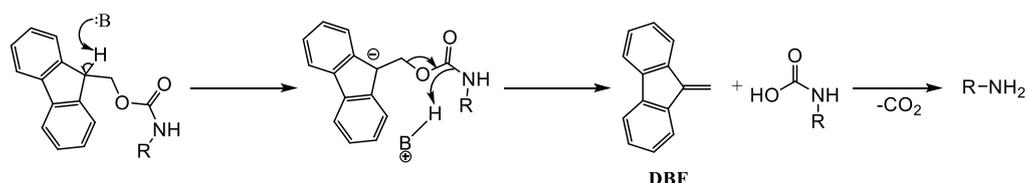
Esquema 2. Ruta sintética seguida para la preparación del compuesto **4**.

El siguiente paso fue la desprotección del grupo Boc de *N*- $\alpha$ -Fmoc-L-Lisina con TFA en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> para obtener el compuesto **5**, que se acopló con **4** en DMF y utilizando como base DIPEA en condiciones de atmósfera inerte, dando la amida **6**. (35) (36) El ácido carboxílico de esta se hizo reaccionar con una mezcla de NHS y EDC anhidros para obtener el **fragmento A** (**7**) con un rendimiento del 88%. (36)



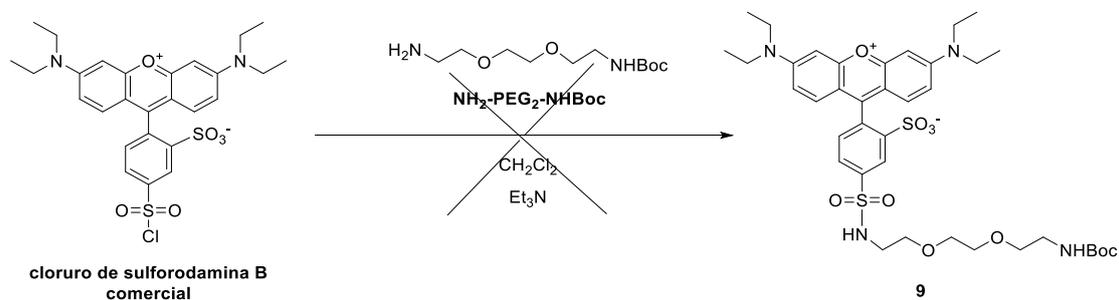
Esquema 3. Ruta sintética seguida para la preparación del **fragmento A** (**7**).

Las condiciones ligeramente básicas (DIPEA, Et<sub>3</sub>N, piperidina) en medios de reacción con compuestos que presentan el grupo protector Fmoc, pueden provocar la descomposición autocatalítica de este como se observa en el *Esquema 4*. La formación del dibenzofulveno (DBF) por escisión del Fmoc se identifica en el espectro de RMN-<sup>1</sup>H por la presencia de un singlete a 6.21 ppm de los protones exometilénicos del doble enlace. (37)



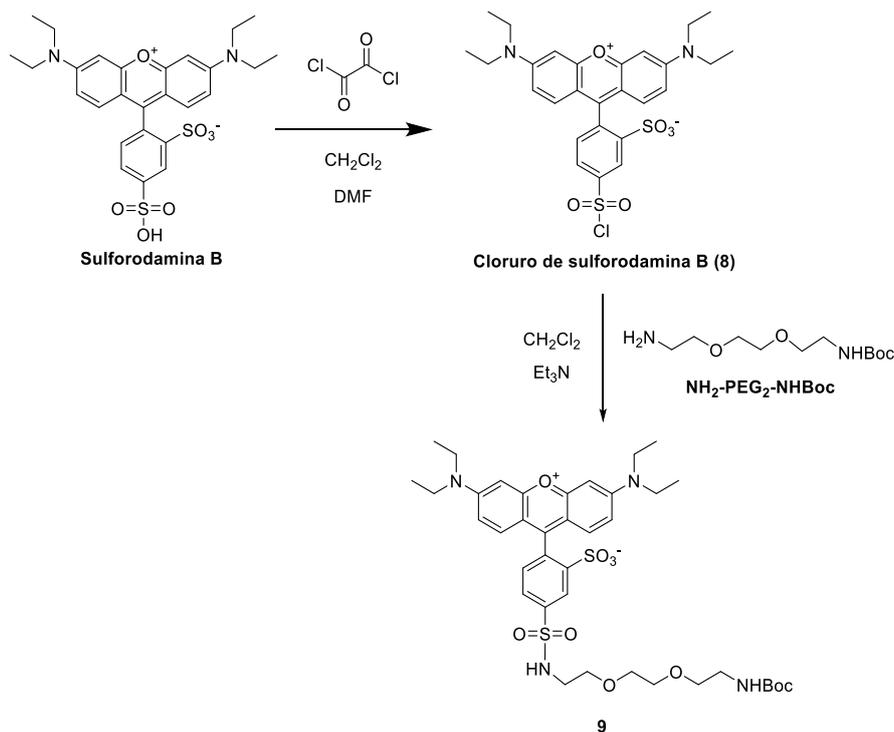
*Esquema 4.* Reacción de formación del dibenzofulveno (DBF) por descomposición autocatalítica del grupo protector Fmoc.

Para la síntesis del **fragmento B (10)** se intentó el acoplamiento entre el cloruro de sulforodamina B comercial con el espaciador NH<sub>2</sub>-PEG<sub>2</sub>-NHBoc en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> bajo condiciones de atmósfera inerte, utilizando como base Et<sub>3</sub>N. (38) (39) Después de 24 h de reacción a temperatura ambiente, tanto el espectro de masas como de RMN-<sup>1</sup>H indicaron que compuesto deseado no se había formado. El espectro HR-ESIMS indicó la presencia de la sulforodamina B hidrolizada y del espaciador por separado.



*Esquema 5.* Intento de acoplamiento entre el cloruro de sulforodamina B comercial y el espaciador NH<sub>2</sub>-PEG<sub>2</sub>-NHBoc.

Debido a este resultado, se planteó la regeneración del cloruro de sulforodamina B (**8**) en condiciones de atmósfera inerte a partir de la sulforodamina B con cloruro de oxalilo en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y DMF, que tuvo lugar de manera satisfactoria. (40) Seguidamente se hizo reaccionar con el espaciador bajo las condiciones propuestas anteriormente. El producto de reacción se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice, obteniéndose el compuesto **9**.



Esquema 6. Ruta sintética seguida para la preparación del compuesto 9.

Se confirmó la formación del compuesto 9 mediante el análisis de espectrometría de masas de alta resolución en modo positivo al mostrar el ión  $(M+Na)^+$  a  $m/z$  811.3021 (calculado para  $C_{38}H_{52}N_4NaO_{10}S_2^+$  811.3017). Además, en el espectro de RMN- $^1H$  se identificaron las señales características del compuesto. Como se observa en la Figura 10, aparecen las señales correspondientes a los protones unidos a nitrógeno entre 5.75 y 5 ppm, a los CH<sub>2</sub> del PEG<sub>2</sub>, a los CH<sub>3</sub> del grupo protector Boc sobre 1.6 ppm y las características de la sulforodamina B, como el singlete sobre 8.7 ppm.

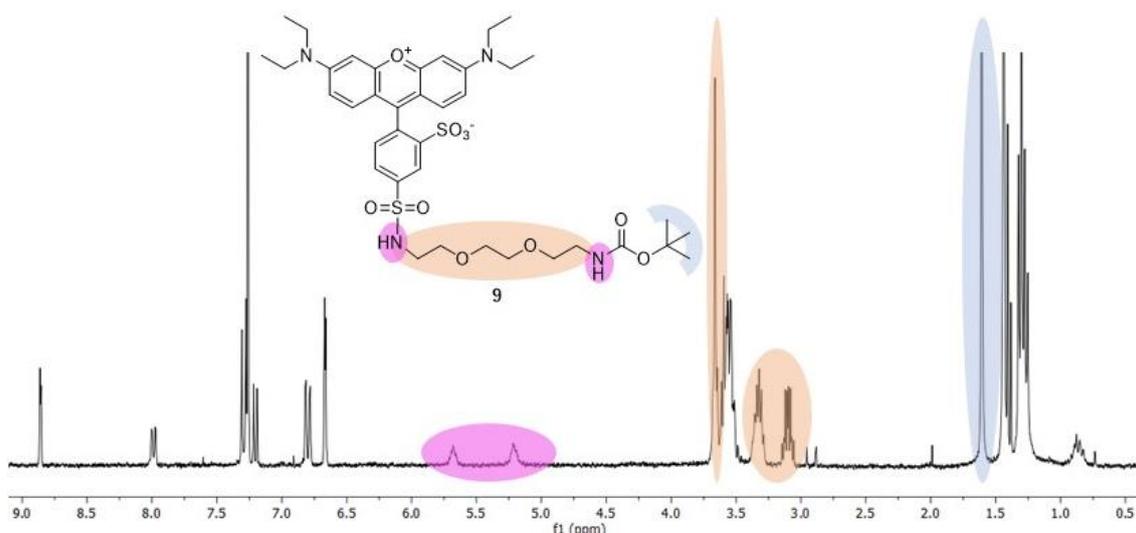
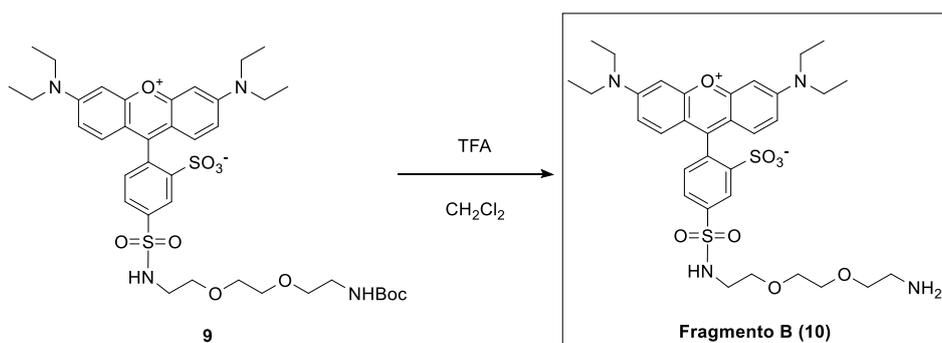


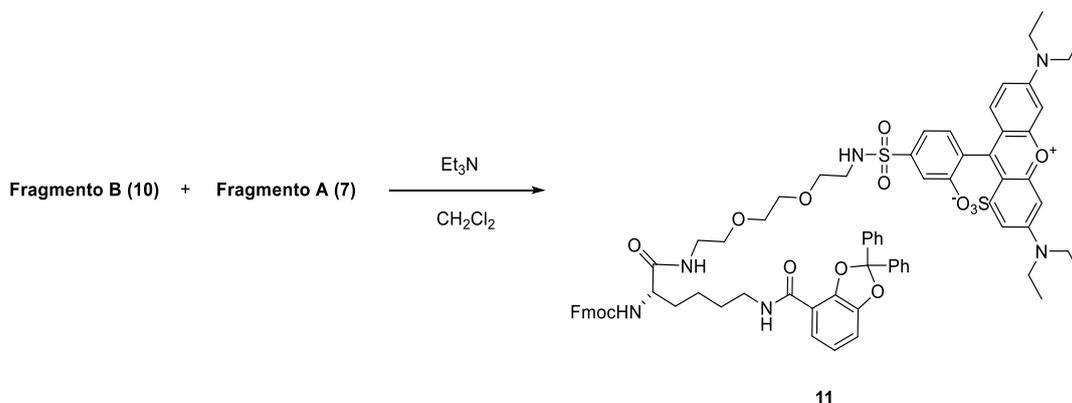
Figura 10. Espectro de RMN- $^1H$  del compuesto 9. Las señales más relevantes aparecen coloreadas.

La síntesis del **fragmento B (10)** se completó con la desprotección del grupo Boc del compuesto **9** con TFA en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. (41) El rendimiento de esta reacción es del 88% y se comprobó la formación del **fragmento B (10)** por espectrometría de masas de alta resolución en modo positivo ([M+H]<sup>+</sup> *m/z* 689.2679, calculado para C<sub>33</sub>H<sub>45</sub>N<sub>4</sub>O<sub>8</sub>S<sub>2</sub><sup>+</sup> 689.2673) y analizando el espectro de RMN-<sup>1</sup>H, en el que se observó la desaparición de la señal característica del grupo Boc.



Esquema 7. Desprotección del compuesto 9 para la obtención del fragmento B (10).

Para el acoplamiento de los **fragmentos A (7)** y **B (10)** se empleó un método estándar de conjugación entre la amina primaria del **fragmento B** y el éster activado del **fragmento A** en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> utilizando como base Et<sub>3</sub>N y bajo condiciones de atmósfera inerte. (38)



Esquema 8. Acoplamiento entre el **fragmento B (10)** y el **fragmento A (7)**.

El producto de la reacción se purificó mediante cromatografía en fase inversa con cartuchos C-18 obteniendo el compuesto **11**, confirmado por espectrometría de masas de alta resolución en modo positivo la cual mostró la presencia del ión [M+Na]<sup>+</sup> a *m/z* 1361.4921 (calculado para C<sub>74</sub>H<sub>78</sub>N<sub>6</sub>NaO<sub>14</sub>S<sub>2</sub><sup>+</sup> 1361.4910), observándose todavía en su espectro de RMN-<sup>1</sup>H una pequeña cantidad de dibenzofulveno (DBF) (Figura 11).

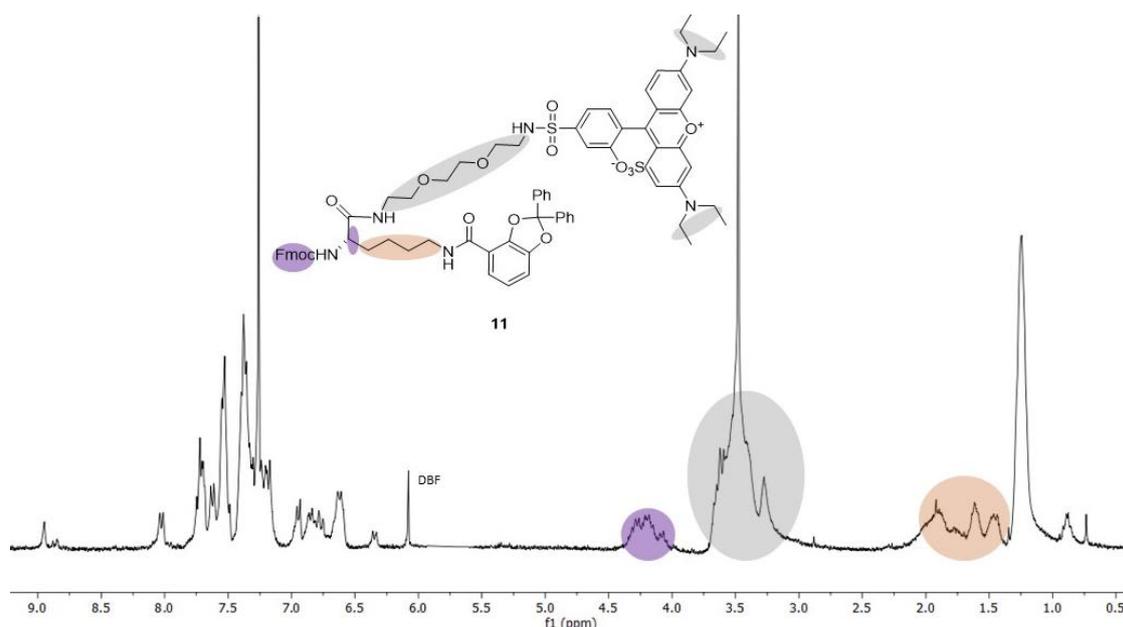
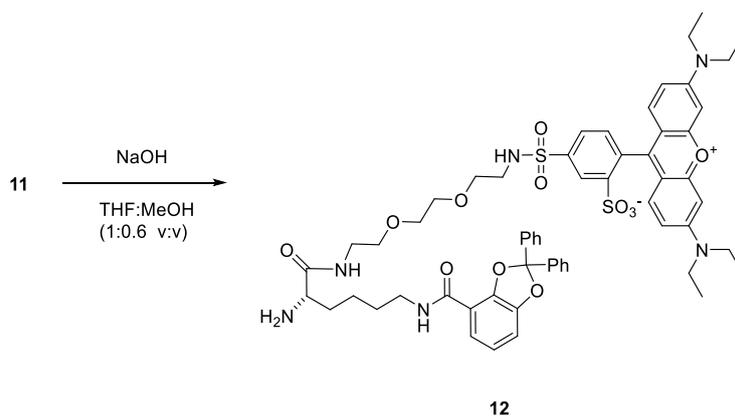


Figura 11. Espectro de RMN-<sup>1</sup>H del compuesto **11**. Las señales más relevantes aparecen coloreadas.

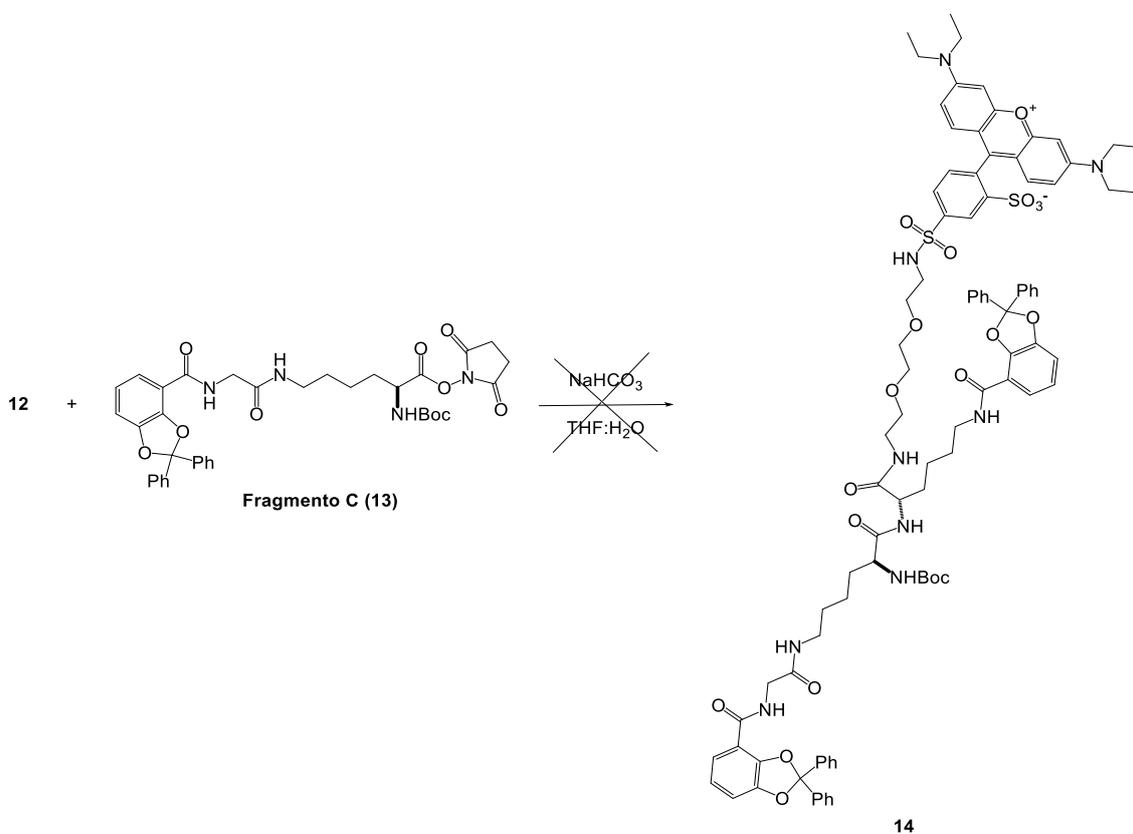
Para realizar el acoplamiento del compuesto **11** con el **fragmento C (13)** fue necesario, en primer lugar, eliminar el grupo Fmoc del compuesto **11**. El tratamiento del compuesto **11** con NaOH en una mezcla THF:MeOH, rindió el compuesto **12**, cuya presencia se corroboró por espectrometría de masas y RMN-<sup>1</sup>H, en donde las señales correspondientes al Fmoc desaparecen. El empleo de este método de desprotección en lugar del uso de aminas secundarias como piperidina o dietilamina, evitan la generación de productos secundarios difíciles de eliminar. (42) (43)



Esquema 9. Desprotección del compuesto **11** para la obtención del compuesto **12**.

Por último, para el acoplamiento de **12** con el **fragmento C (13)** sintetizado y proporcionado por Silvia Fuentes Rivera, miembro también del grupo de investigación, se propuso de nuevo un método estándar de conjugación entre la amina primaria de **12** y el éster activado del **fragmento C (13)** en presencia de NaHCO<sub>3</sub> acuoso y THF. (44)

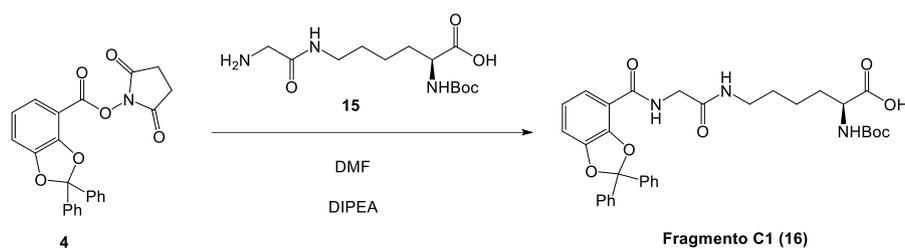
Después de 24 h de reacción, no se identificó el compuesto deseado **14** ni por espectrometría de masas ni por RMN-<sup>1</sup>H.



Esquema 10. Intento de obtención del compuesto **14**.

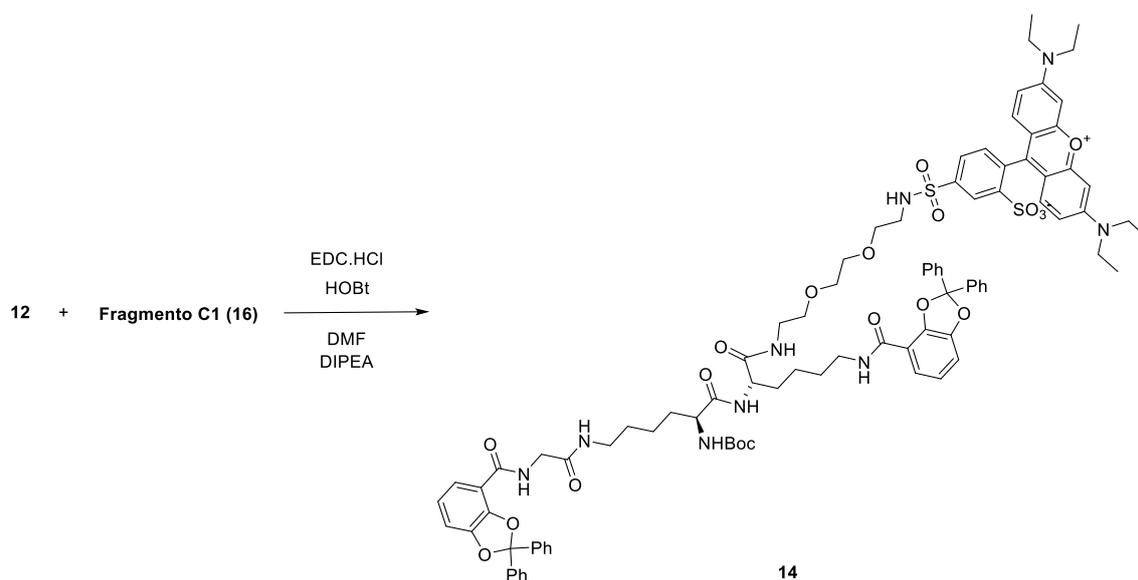
Se hizo un segundo intento de acoplamiento entre **12** y el **fragmento C (13)**, pero en presencia de DMF y DIPEA en condiciones de atmósfera inerte. Sin embargo, no se obtuvo el resultado esperado tras 24 h de reacción.

Teniendo en cuenta estos resultados, se cambió el método de acoplamiento usando agentes acoplantes evitando el uso de la NHS. Para ello, se hizo reaccionar el compuesto **4** con el compuesto **15**, también sintetizado y proporcionado por Silvia Fuentes Rivera, en DMF y utilizando DIPEA como base para rendir el **fragmento C1 (16)**. De esta manera se obtuvo el compuesto deseado con un rendimiento del 83% el cual fue caracterizado mediante espectrometría de masas en modo ion negativo ( $[\text{M-H}]^-$   $m/z$  602.2507, calculado para  $\text{C}_{33}\text{H}_{36}\text{N}_3\text{O}_8^-$  602.2508) y por RMN-<sup>1</sup>H.



*Esquema 11. Síntesis del fragmento C1 (16).*

El **fragmento C1 (16)** se hizo reaccionar con **12** en DMF y en presencia del agente acoplante TBTU y la base  $\text{Et}_3\text{N}$  bajo condiciones de atmósfera inerte. (45) Después de 24 h de reacción, no se detectó el compuesto deseado **14**. Debido a esto, se llevó a cabo un segundo intento de acoplamiento entre **12** y el fragmento C1 (**16**) en presencia de EDC.HCl y HOBT, disueltos en DMF y utilizando DIPEA como base. Tras 24 h de reacción, se obtuvo el compuesto **14** con un rendimiento del 79%. (46)



*Esquema 12. Acoplamiento entre el compuesto 12 y el fragmento C1 (16) para obtener el compuesto 14.*

La formación del compuesto **14** se confirmó mediante espectrometría de masas de alta resolución en modo positivo ya que se observó el pico correspondiente al ión  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  a  $m/z$  1724.6721 (calculado para  $\text{C}_{92}\text{H}_{103}\text{N}_9\text{NaO}_{19}\text{S}_2^+$  1724.6704). Además, en el espectro de RMN- $^1\text{H}$  se identificaron señales características del compuesto (*Figura 12*).

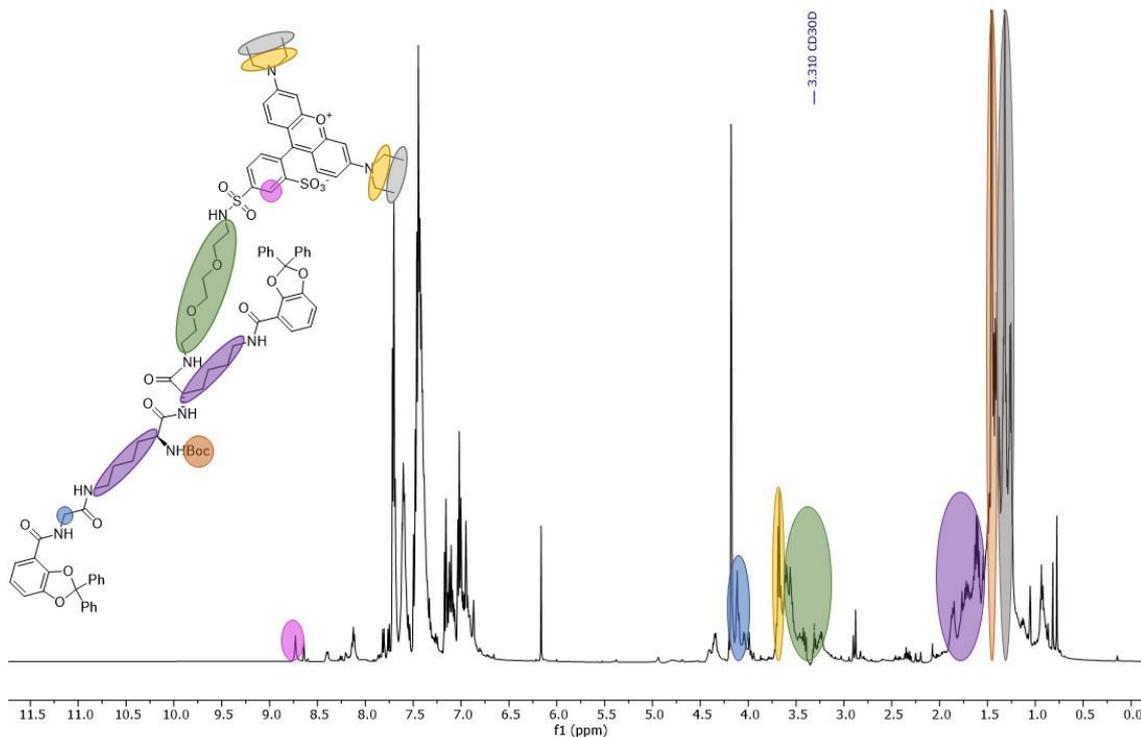
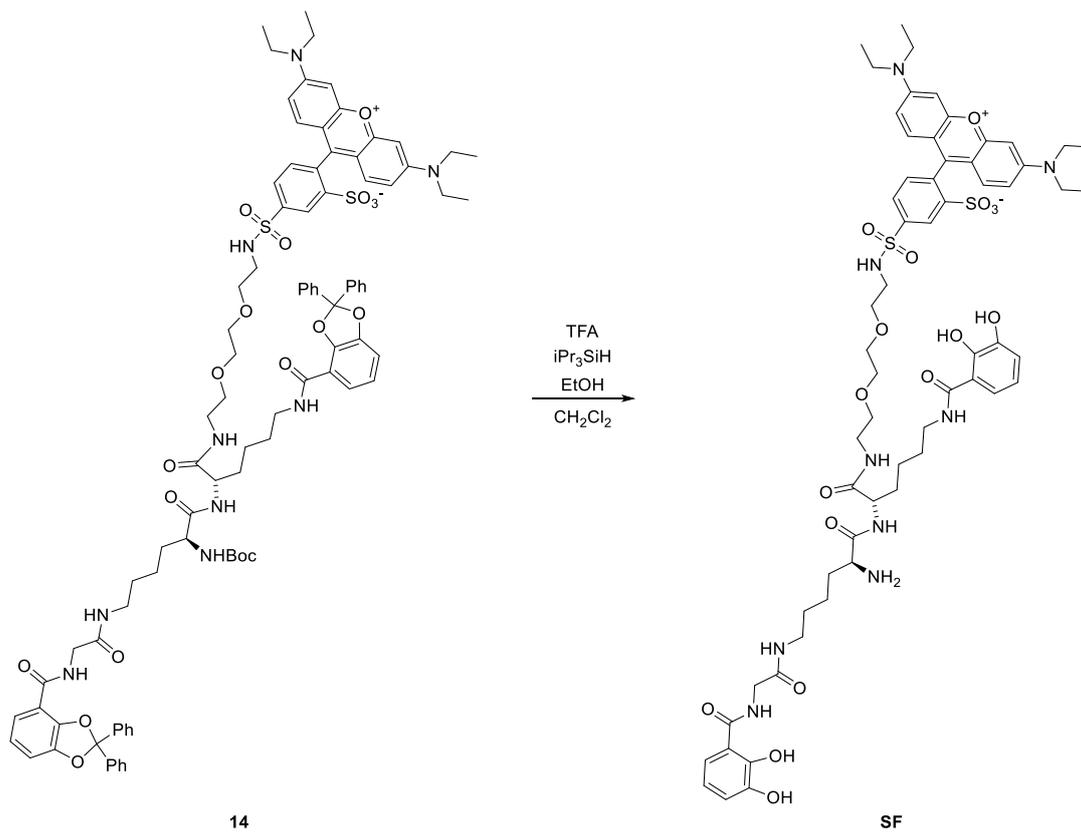


Figura 12. Espectro de RMN-<sup>1</sup>H del compuesto **14**. Las señales más relevantes aparecen coloreadas.

Para la obtención final de la sonda fluorescente deseada **SF**, será necesario la desprotección de los grupos protectoras compuesto **14**. La eliminación de los grupos protectores podría llevarse cabo por tratamiento de **14** con una disolución de 30% de TFA, 7.5% de triisopropilsilano (iPr<sub>3</sub>SiH) y 7.5% de EtOH en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, lavando previamente todo el material con 1M HCl y aclarándolo con agua milli-Q para eliminar la presencia de hierro y evitar que el sideróforo quelate. (47) Por falta de tiempo, esta reacción no pudo realizarse.



Esquema 13. Propuesta de desprotección de **14** y obtención final de la **SF**.

## 5 SECCIÓN 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 baja temperatura se realizaron empleando baños de hielo/agua para alcanzar 0°C.

El disolvente seco CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> se obtuvo de un sistema de purificación de disolventes MB SPS-800 de M-BRAUN, mientras que en el caso del DMF se usó una versión comercial del 99.8% de pureza extra seca, AcroSeal™ de ACROS Organics™. En algunos casos, el secado del CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> se hizo refluendo sobre hidruro de calcio (CaH<sub>2</sub>). 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 *Merck 60 F254* que se visualizaron bajo radiación UV ( $\lambda=254$  nm o 366 nm) o, en casos concretos, se revelaron por inmersión en una disolución de ácido fosfomolibdico (10% m/v 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 Toxyper*®. 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-<sup>1</sup>H.

Las purificaciones que se realizaron se hicieron mediante cromatografía en columna de gel de sílice (tamaño de partícula 40-60  $\mu$ m, tamaño de poro 60 Å) *ACROS Organics*™, o mediante un sistema de cromatografía de media presión *SP-1* de *Biotage*™ con cartuchos *Flash SNAP KP-Sil*.

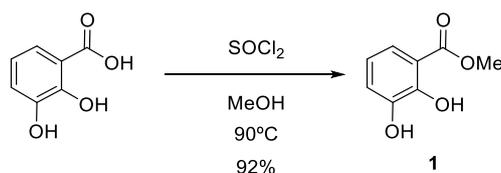
La caracterización por resonancia magnética nuclear se realizó en un espectrómetro *Bruker Avance 300* (300 MHz para <sup>1</sup>H y 75 MHz para <sup>13</sup>C) del CICA (Centro de Investigaciones Científicas Avanzadas) y el espectrómetro *Bruker Avance 500* (500 MHz para <sup>1</sup>H y 125 MHz para <sup>13</sup>C) del SAI (Servicio de Apoyo a la Investigación de la Universidad de la Coruña). Los disolventes deuterados utilizados fueron los siguientes: CDCl<sub>3</sub> (99.8% D) y CD<sub>3</sub>OD (99.8% D)

Los espectros de masas electrospray (ESI) se realizaron en un espectrómetro de masas LTQ-Orbitrap Discovery del SAI (Servicio de Apoyo a la Investigación de la Universidad de A Coruña).

## 5.2 PRODECIMIENTOS Y CARACTERIZACIÓN

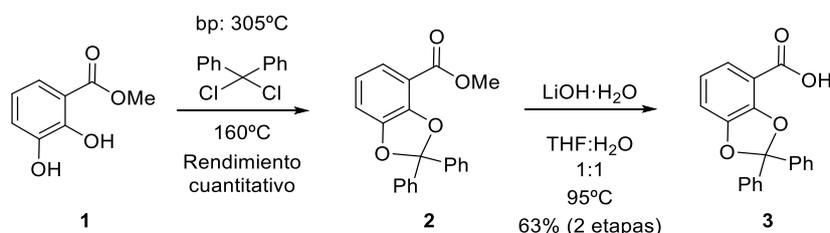
### 5.2.1 SÍNTESIS DEL FRAGMENTO A (7)

#### Síntesis de 1



A una disolución de 1 equiv. de **ácido 2,3-dihidroxibenzoico** comercial (1.20 g, 7.79 mmol) en 12 mL de MeOH se añadieron 2 equiv. de **SOCl<sub>2</sub>** (1.13 mL, 15.57 mmol) gota a gota a 0°C. Después la mezcla de reacción se calentó a 90 °C y se dejó a reflujo durante toda la noche. Al día siguiente, se concentró a presión reducida. El residuo fue redissuelto en 30 mL de EtOAc y lavado con NaHCO<sub>3</sub> saturado. La fase orgánica se lavó con salmuera, se secó con MgSO<sub>4</sub> anhidro, se filtró a gravedad y se concentró a presión reducida. Finalmente, el producto se secó en una bomba de alto vacío, obteniendo **1** como un sólido blanco (1.21 g, 92% de rendimiento). **RMN-<sup>1</sup>H** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm): 10.89 (s, 1H, OH), 7.37 (dd, *J* = 8.1, 1.5 Hz, 1H, H6), 7.16 – 7.06 (dd, *J* = 7.9, 1.5 Hz, 1H, H4), 6.80 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H, H5), 5.62 (s, 1H, OH), 3.96 (s, 3H, CH<sub>3</sub>). **RMN-<sup>13</sup>C** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm): 170.89 (CO, C7), 148.96 (C, C2), 145.13 (C, C3), 120.68 (CH, C6), 120.02 (CH, C5), 119.33 (CH, C4), 112.50 (C, C1), 52.54 (CH<sub>3</sub>, C8). **HR-ESIMS(-)**: *m/z* calculado para C<sub>8</sub>H<sub>7</sub>O<sub>4</sub><sup>-</sup> [**M-H**]<sup>-</sup> 167.0350, encontrado 167.0352 (Δ*m* = 0.2 mmu).

#### Síntesis de 3

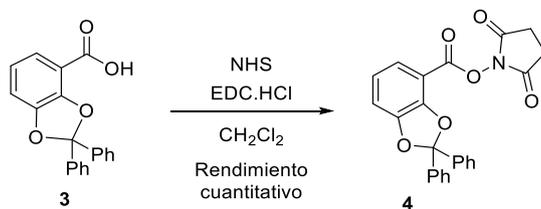


A 1 equiv. del precursor **1** (1 g, 5.95 mmol) se añadieron 1.50 equiv. de **diclorodifenilmetano** (1.71 mL, 8.92 mmol) y la mezcla se agitó bajo atmósfera de argón y se calentó a 160°C durante 1 hora. Transcurrida la reacción, la solución se dejó enfriar

a temperatura ambiente y se diluyó con 30 mL de EtOAc. A continuación, se lavó con NaHCO<sub>3</sub> saturado, salmuera, se secó con MgSO<sub>4</sub> anhidro y se filtró a gravedad. Luego, se concentró bajo presión reducida y se secó en la bomba de alto vacío, obteniendo **2** como un aceite amarronado con un rendimiento cuantitativo.

A una disolución del compuesto **2** en 20 mL de THF se añadieron 10 equiv. de LiOH·H<sub>2</sub>O (2.50 g, 59.57 mmol) en 20 mL de agua destilada (mezcla THF: H<sub>2</sub>O (1:1)). La mezcla se agitó y se calentó a 95 °C a reflujo durante toda la noche. Al día siguiente, la mezcla de reacción se dejó enfriar a temperatura ambiente y se concentró a presión reducida para reducir el volumen de disolvente. A continuación, se neutralizó con 5% v/v HCl, se acidificó con 0.05M HCl y se extrajo con EtOAc (3 x 30 mL). La fase orgánica se lavó con salmuera, se secó con MgSO<sub>4</sub> anhidro y se filtró a gravedad. Por último, se concentró a presión reducida y se secó en la bomba de alto vacío, obteniendo **3** como un sólido amarillento. El crudo se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice usando hexano:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1:2; 1:3), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>: 10% v/v MeOH como eluyentes. Se reunieron las fracciones purificadas que contenían el producto requerido, se concentraron a presión reducida y el producto se secó en una bomba de alto vacío, obteniendo **3** como un sólido blando (1.21 g, 63% de rendimiento, 2 etapas). **RMN-<sup>1</sup>H** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm): 7.68 – 7.54 (m, 4H, Phe), 7.48 (dd, *J* = 8.2, 1.3 Hz, 1H, H<sub>6</sub>), 7.45 – 7.32 (m, 6H, Phe), 7.07 (dd, *J* = 7.7, 1.3 Hz, 1H, H<sub>4</sub>), 6.89 (t, *J* = 7.9 Hz, 1H, H<sub>5</sub>). **RMN-<sup>13</sup>C** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm): 169.82 (CO, C<sub>7</sub>), 148.94 (C, C<sub>2</sub>), 148.52 (C, C<sub>3</sub>), 139.72 (C, Phe), 129.49 (CH, Phe), 128.49 (CH, Phe), 126.56 (CH, Phe), 123.42 (CH, C<sub>6</sub>), 121.47 (CH, C<sub>5</sub>), 118.42 (C, Phe-C-Phe), 113.34 (CH, C<sub>4</sub>), 112.21 (C, C<sub>1</sub>). **HR-ESIMS(-)**: *m/z* calculado para C<sub>20</sub>H<sub>13</sub>O<sub>4</sub> [**M-H**]<sup>-</sup> 317.0819, encontrado 317.0820 (Δ*m* = 0.1 mmu).

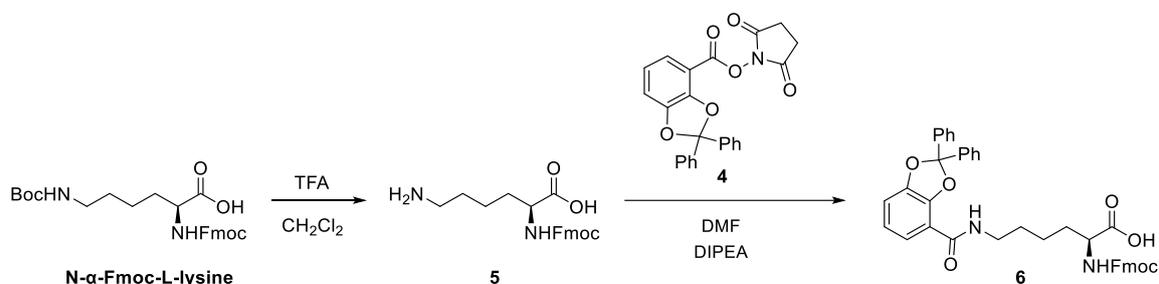
### Síntesis de 4



A una disolución de 1 equiv. de **3** (1.22 g, 3.83 mmol) en 30 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> anhidro se añadieron 2 equiv. de NHS anhidro (882.16 mg, 7.67 mmol) y 1.50 equiv. de EDC·HCl anhidro (1.10 g, 5.75 mmol) y se agitó bajo atmósfera de argón durante toda la noche. Al día siguiente, la mezcla de reacción se lavó con 0.1 M HCl y luego, la fase orgánica se

lavó con NaHCO<sub>3</sub> saturado, salmuera, se secó con MgSO<sub>4</sub> anhidro, se filtró a gravedad y se concentró bajo presión reducida. Por último, el extracto se secó en una bomba de alto vacío y se obtuvo **4** como una espuma amarillenta con un rendimiento cuantitativo. **RMN-<sup>1</sup>H** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm): 7.66 – 7.54 (m, 4H; Phe), 7.49 (dd, *J* = 8.3, 1.2 Hz, 1H, H6), 7.45 – 7.31 (m, 6H, Phe), 7.11 (dd, *J* = 7.7, 1.2 Hz, 1H, H4), 6.97 – 6.85 (t, *J* = 8 Hz, 1H, H5), 2.90 (s, 4H, NHS). **RMN-<sup>13</sup>C** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm): 169.31 (CO, C7), 159.85 (CO, NHS), 149.55 (C, C2), 148.68 (C, C3), 139.39 (C, Phe), 129.59 (CH, Phe), 128.51 (CH, Phe), 126.49 (CH, Phe), 123.00 (CH, C6), 121.84 (CH, C5), 119.06 (C, Phe-C-Phe), 114.26 (CH, C4), 107.67 (C, C1), 25.83 (CH<sub>2</sub>, NHS). **HR-ESIMS(+)**: *m/z* calculado para C<sub>24</sub>H<sub>18</sub>NO<sub>6</sub><sup>+</sup> [**M+H**]<sup>+</sup> 416.1129, encontrado 416.1131 (Δ*m* = 0.2 mmu).

### Síntesis de 6

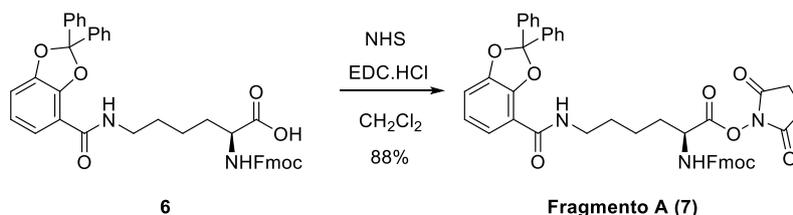


A una disolución con 1 equiv. de **N-α-Fmoc-L-Lisina (OtBu)** (923 mg, 1.97 mmol) en 12 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> se añadió el 20% de TFA (2.4 mL) y se agitó durante una hora a temperatura ambiente. Luego se concentró a presión reducida varias veces, redisolviendo en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> para eliminar todo el TFA. El producto **5** se secó en una bomba de alto vacío, obteniéndose una espuma incolora con un rendimiento cuantitativo.

A una disolución de **5** en DMF anhidro, se añadió 1 equiv. de **4** (750 mg, 1.81 mmol) y 2 equiv de DIPEA anhidra (0.08 mL, 0.4815 mmol), controlando el pH que debe ser neutro o ligeramente básico, y se dejó agitando toda la noche a temperatura ambiente bajo atmósfera de argón. Al día siguiente, la mezcla de reacción se concentró a vacío en una bomba de aceite. El residuo obtenido se disolvió en 20 mL de EtOAc, se acidificó con 0.1M HCl y se extrajo con EtOAc (3x30 mL). La fase orgánica se lavó con 0.1M HCl, salmuera, se secó con MgSO<sub>4</sub> anhidro, se filtró a gravedad y se concentró a presión reducida. Finalmente se secó en una bomba de alto vacío, obteniendo **6** con un rendimiento cuantitativo. **RMN-<sup>1</sup>H** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm): 7.73 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H, Ar-H), 7.62 – 7.46 (m, 7H, Ar-H), 7.43 – 7.31 (m, 8H, Ar-H), 7.31 – 7.19 (m, 4H, Ar-H),

6.99 (d,  $J = 6.8$  Hz, 1H, H4), 6.88 (t,  $J = 7.9$  Hz, 1H, H5), 5.75 (d,  $J = 7.7$  Hz, 1H, NHFmoc), 4.47 – 4.25 (m, 1H, 3H, Fmoc+H12), 4.16 (t,  $J = 7.2$  Hz, 1H, Fmoc), 3.51 (m, 2H, H8), 2.05 – 1.76 (m, 2H, H11), 1.66 (m, 2H, H9), 1.50 (m, 2H, H10). **RMN-<sup>13</sup>C** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm): 175.07 (CO, C13), 164.40 (CO, C7), 156.42 (CO, Fmoc), 147.31 (C, C-Ar), 144.88 (C, C-Ar), 143.90 (C, C-Ar), 141.38 (C, C-Ar), 139.10 (C, C-Ar), 129.88 (CH, CH-Ar), 128.65 (CH, CH-Ar), 127.80 (CH, CH-Ar), 127.21 (CH, CH-Ar), 126.53 (CH, CH-Ar), 125.30 (CH, CH-Ar), 122.66 (CH, CH-Ar), 122.33 (CH, CH-Ar), 120.05 (CH, CH-Ar), 118.44 (C, Phe-C-Phe), 115.60 (C, C1), 112.08 (CH, CH-Ar), 67.21 (CH<sub>2</sub>, Fmoc), 53.69 (CH, C12), 47.25 (CH, Fmoc), 39.47 (CH<sub>2</sub>, C8), 31.75 (CH<sub>2</sub>, C11), 29.52 (CH<sub>2</sub>, C9), 22.50 (CH<sub>2</sub>, C10). **HR-ESIMS(-)**:  $m/z$  calculado para C<sub>41</sub>H<sub>35</sub>N<sub>2</sub>O<sub>7</sub><sup>-</sup> [**M-H**]<sup>-</sup> 667.2450, encontrado 667.2453 ( $\Delta m = 0.3$  mmu).

### Síntesis del fragmento A (7)

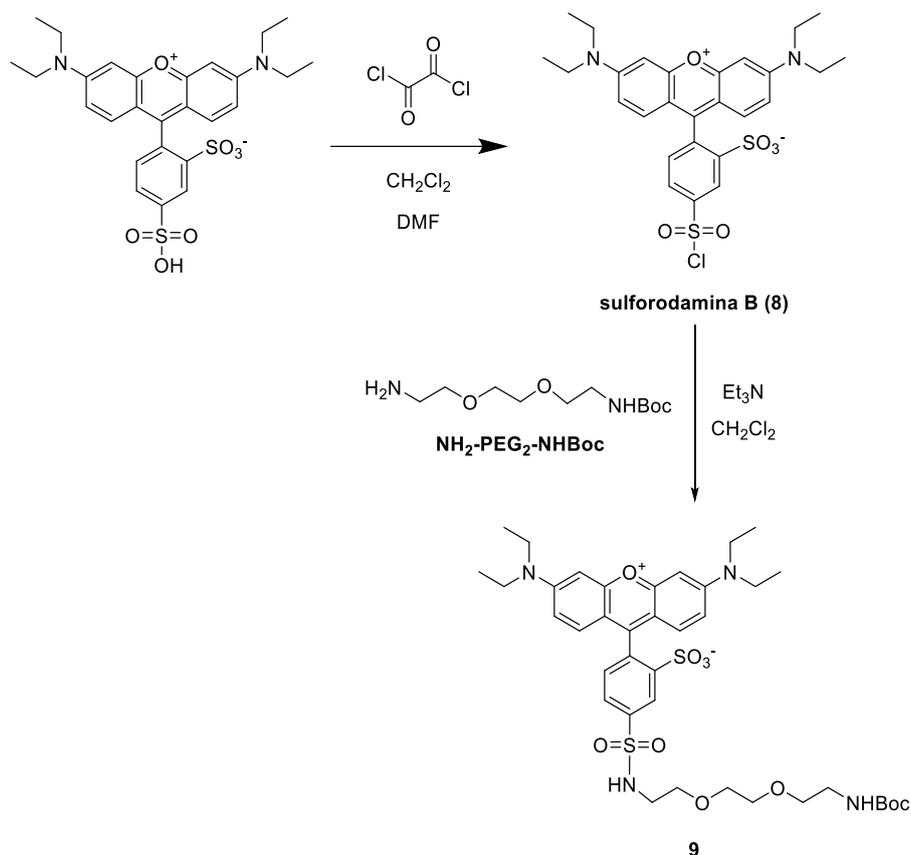


A una disolución de 1 equiv. de **6** (1.26 g, 1.88 mmol) en 20 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> anhidro se añadieron 2 equiv. de NHS (433.68 mg, 3.77 mmol) y 1.50 equiv. de EDC·HCl (541.79 mg, 2.83 mmol) y se agitó bajo atmósfera de argón durante toda la noche. Al día siguiente, la mezcla de reacción se lavó con 0.1M HCl y luego, la fase orgánica se lavó con NaHCO<sub>3</sub> saturado, salmuera, se secó con MgSO<sub>4</sub> anhidro, se filtró a gravedad y se concentró a presión reducida. Por último, el extracto se secó en una bomba de alto vacío y se obtuvo el **fragmento A (7)** como una espuma amarillada (1.26 g, 88% de rendimiento). **RMN-<sup>1</sup>H** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm): 7.79 – 7.70 (d,  $J=7.5$  Hz, 2H, Ar-H), 7.66 – 7.48 (m, 7H, Ar-H), 7.48 – 7.34 (m, 8H, Ar-H), 7.34 – 7.17 (m, 4H, Ar-H), 6.98 (d,  $J = 7.5$  Hz, 1H, H4), 6.87 (t,  $J = 7.5$  Hz, 1H, H5), 5.66 (d,  $J = 8.0$  Hz, 1H, NHFmoc), 4.70 (q,  $J = 7.3$  Hz, 1H, H12), 4.49 – 4.29 (m, 2H, Fmoc), 4.21 (t,  $J = 7.0$  Hz, 1H, Fmoc), 3.55 (m, 2H, H8), 2.75 (s, 4H, NHS), 2.10 – 1.95 (m, 2H, H11), 1.60 (m, 4H, H9;H10). **RMN-<sup>13</sup>C** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm): 168.68 (CO, C13), 164.20 (CO, C7), 155.91 (CO, Fmoc), 147.27 (C, C-Ar), 144.83 (C, C-Ar), 143.98 (C, C-Ar), 141.41 (C, C-Ar), 139.22 (C, C-Ar), 129.83 (CH, CH-Ar), 128.63 (CH, CH-Ar), 127.83 (CH, CH-Ar), 127.24 (CH, CH-Ar), 126.54 (CH, CH-Ar), 125.28 (CH, CH-Ar), 122.73 (CH, CH-Ar), 122.23 (CH, CH-Ar), 120.07

(CH, CH-Ar), 118.28 (C, Phe-C-Phe), 115.94 (C, C1), 111.87 (CH, CH-Ar), 67.43 (CH<sub>2</sub>, Fmoc), 52.41 (CH, C12), 47.23 (CH, CHFmoc), 39.09 (CH<sub>2</sub>, C8), 31.80 (CH<sub>2</sub>, C11), 29.44 (CH<sub>2</sub>, C9), 25.57 (CH<sub>2</sub>, NHS), 22.14 (CH<sub>2</sub>, C10). **HR-ESIMS(+)**:  $m/z$  calculado para C<sub>45</sub>H<sub>39</sub>N<sub>3</sub>O<sub>9</sub>Na<sup>+</sup> [**M+Na**]<sup>+</sup> 788.2584, encontrado 788.2585 ( $\Delta m = 0.1$  mmu).

## 5.2.2 SÍNTESIS DEL FRAGMENTO B (10)

### Síntesis de SRB-NH-PEG<sub>2</sub>-NHBoc (9)

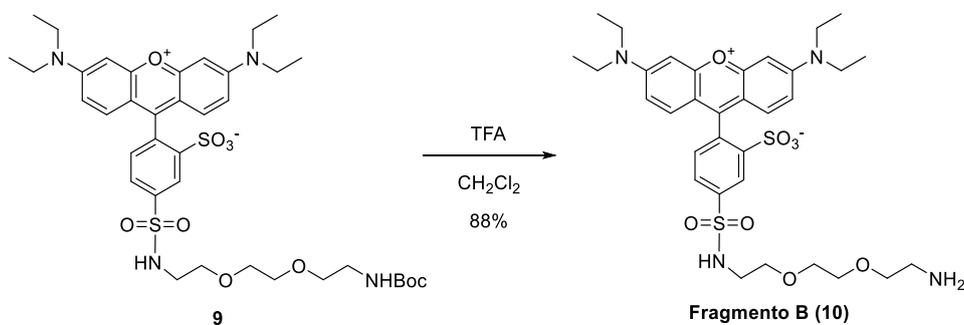


A una disolución de 1 equiv. de **rodamina B** hidrolizada como ácido (367.70 mg, 0.658 mmol) en 30 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> anhidro a 0 °C, se añadieron 5 equiv. de **cloruro de oxalilo** (260 µL, 3.29 mmol) gota a gota y una cantidad catalítica de DMF anhidro (13 µL). Luego, se dejó agitando bajo atmósfera de argón toda la noche formándose **8**. **HR-ESIMS(+)**:  $m/z$  calculado para C<sub>27</sub>H<sub>30</sub>ClN<sub>2</sub>O<sub>6</sub>S<sub>2</sub><sup>+</sup> [**M+H**]<sup>+</sup> 577.1228, encontrado 577.1201 ( $\Delta m = 2.7$  mmu).

A la disolución anterior de **8** en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> a 0°C, se añadió 1 equiv. de **[2-[2-(2-aminoetoxi)etoxi]etil]carbamato de *terc*-butilo (H<sub>2</sub>N-PEG<sub>2</sub>-NHBoc)** comercial (160 µL, 0.658 mmol) y 4 equiv. de Et<sub>3</sub>N anhidra (370 µL, 2.63 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente y bajo atmósfera de argón durante toda la noche. El crudo

obtenido se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice usando  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}$  (50:1; 100:3; 25:1; 20:1; 25:1, 25:2) y MeOH como eluyentes. Se filtraron las fracciones purificadas, se concentraron a presión reducida y el producto se secó en una bomba de alto vacío, obteniéndose **9** como un sólido violeta (160.2 mg, 31 % de rendimiento (2 etapas)). **RMN- $^1\text{H}$**  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 8.86 (s, 1H, H2), 7.99 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1H, H5), 7.29 (d,  $J = 9.5$  Hz, 2H, H4;H9), 7.20 (d,  $J = 7.9$  Hz, 1H, H18), 6.80 (dd,  $J = 9.5, 2.5$  Hz, 2H, H10;H12), 6.67 (d,  $J = 2.4$  Hz, 2H, H15;H17), 5.68 (s, 1H, NH), 5.21 (s, 1H, NH), 3.65 (t,  $J = 5.3$  Hz, 6H,  $\text{PEG}_2$ ), 3.63 – 3.49 (m, 8H, H20; H22; H24; H26), 3.32 (dt,  $J = 10.7, 5.3$  Hz, 4H,  $\text{PEG}_2$ ), 3.10 (qd,  $J = 7.3, 4.8$  Hz, 2H,  $\text{PEG}_2$ ), 1.61 (s, 9H, Boc), 1.42 (t, 7.3 Hz, 14H, H21;H23;H25;H27). **RMN- $^{13}\text{C}$**  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 158.10 (CH, CH-Ar), 155.69 (CH, CH-Ar), 133.73 (CH, CH-Ar), 129.78 (CH, CH-Ar), 127.58 (CH, CH-Ar), 114.58 (CH, CH-Ar), 113.60 (CH, CH-Ar), 95.76 (CH, CH-Ar), 70.63 ( $\text{CH}_2$ ,  $\text{PEG}_2$  (- $\text{CH}_2\text{O}$ -)) 45.98 ( $\text{CH}_2$ , C20;C22;C24;C26), 43.43 ( $\text{CH}_2$ ,  $\text{PEG}_2$  (- $\text{CH}_2\text{N}$ -)), 40.23 ( $\text{CH}_2$ ,  $\text{PEG}_2$  (- $\text{CH}_2\text{N}$ -)), 28.60 ( $\text{CH}_3$ , Boc), 12.74 ( $\text{CH}_3$ , C21;C23;C25;C27). **HR-ESIMS(+)**:  $m/z$  calculado para  $\text{C}_{38}\text{H}_{52}\text{N}_4\text{NaO}_{10}\text{S}_2^+$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$  811.3017, encontrado 811.3021 ( $\Delta m = 0.4$  mmu).

### Síntesis de SRB-NH- $\text{PEG}_2$ - $\text{NH}_2$ (10)

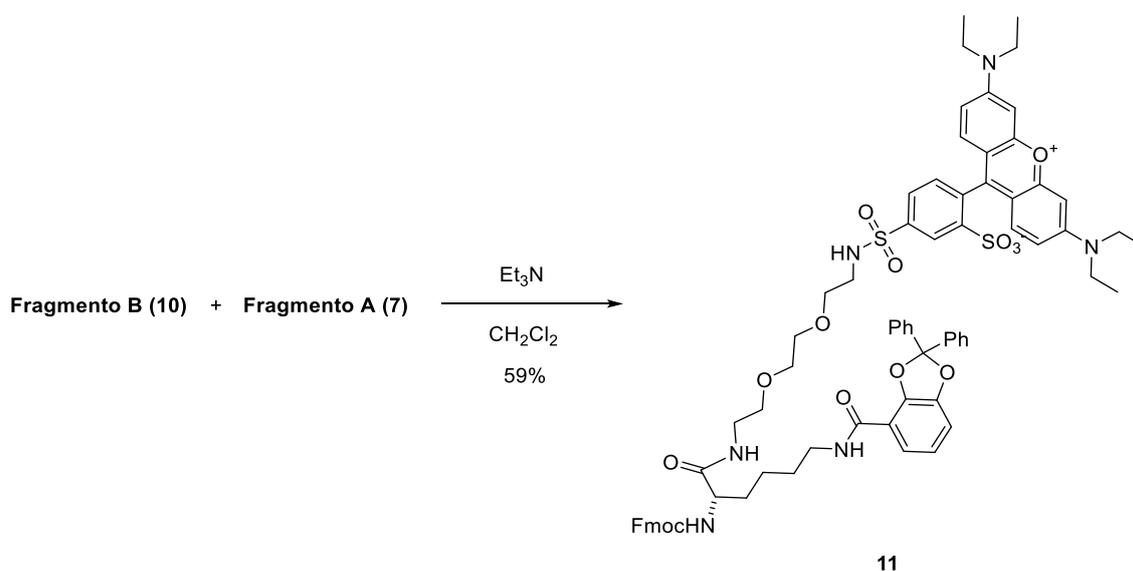


A una disolución con 1 equiv. de **9** (160.2 mg, 0.203 mmol) en 10 mL de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  se añadió un 20% de TFA y se agitó durante una hora a temperatura ambiente. A continuación, se concentró a presión reducida varias veces, redisolviendo en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  para eliminar todo el TFA. Finalmente se secó en una bomba de alto vacío, obteniéndose el **fragmento A (10)** como un sólido violeta (122.7 mg, 88 % de rendimiento). **RMN- $^1\text{H}$**  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 8.68 (s, 1H, H2), 8.05 (d,  $J = 7.9$  Hz, 1H, H5), 7.28 (s, 1H, H4), 7.13 (m, 2H, H9; H18), 6.83 (d,  $J = 9.6$  Hz, 2H, H10; H12), 6.76 (s, 2H, H15; H17), 3.69 – 3.26 (m, 16H, H20; H22; H24; H26;  $\text{PEG}_2$  (- $\text{CH}_2\text{O}$ -)), 3.22 – 3.07 (m, 4H,  $\text{PEG}_2$  (- $\text{CH}_2\text{N}$ -)), 1.37 – 1.22 (m, 21H, H21;H23;H25;H27). **RMN- $^{13}\text{C}$**  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$

(ppm): 157.90 (CH, CH-Ar), 155.76 (CH, CH-Ar), 133.72 (CH, CH-Ar), 130.40 (CH, CH-Ar), 114.19 (CH, CH-Ar), 96.01 (CH, CH-Ar), 69.98 (CH<sub>2</sub>, PEG<sub>2</sub> (-CH<sub>2</sub>O-)), 66.47 (CH<sub>2</sub>, PEG<sub>2</sub> (-CH<sub>2</sub>O-)), 46.08 (CH<sub>2</sub>, C20; C22; C24; C26), 42.56 (CH<sub>2</sub>, PEG<sub>2</sub> (-CH<sub>2</sub>N-)), 40.27 (CH<sub>2</sub>, PEG<sub>2</sub> (-CH<sub>2</sub>N-)), 12.64 (CH<sub>3</sub>, C21;C23;C25;C27). **HR-ESIMS(+)**: *m/z* calculado para C<sub>33</sub>H<sub>45</sub>N<sub>4</sub>O<sub>8</sub>S<sub>2</sub><sup>+</sup> [**M+H**]<sup>+</sup> 689.2673, encontrado 689.2679 ( $\Delta m = 0.6$  mmu)

### 5.2.3 ACOPLAMIENTO ENTRE EL FRAGMENTO B (10) Y EL FRAGMENTO A (7)

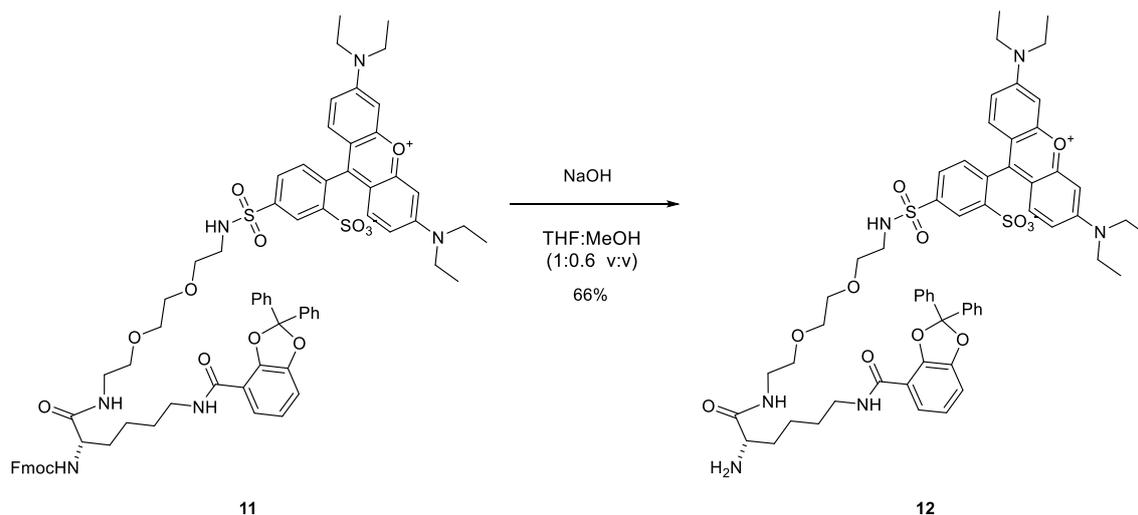
#### Síntesis de 11



A una disolución de 1 equiv. del **fragmento B (10)** (122.7 mg, 0.178 mmol) en 20 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> anhidro, se le añadieron 4 equiv. de Et<sub>3</sub>N anhidra (98.77  $\mu$ L, 0,712 mmol) y 1.10 equiv. del **fragmento A (7)** (150,05 mg, 0.196 mmol) previamente sintetizado y se agitó bajo atmósfera de argón toda la noche. Al día siguiente, la mezcla de reacción se lavó con H<sub>2</sub>O destilada y luego, la fase acuosa se extrajo con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 x 30 mL). Las fases orgánicas se lavaron con salmuera, se secaron con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtraron a gravedad, se concentraron a presión reducida y se secaron en una bomba del alto vacío. El residuo se purificó por columna cromatográfica C-18 usando 100% H<sub>2</sub>O, 25% MeOH, 50% MeOH 75% MeOH y 100% MeOH como eluyentes. Las fracciones que contienen el producto requerido se concentraron a presión reducida y se secaron en una bomba de alto vacío, obteniendo **11** como un sólido violeta (141.8 mg, 59 % de rendimiento). **RMN-<sup>1</sup>H** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm): 8.95 (s, 1H, H2), 8.03 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H, H5), 7.78 – 7.67 (m, 7H, Ar-H), 7.62 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H, Ar-H), 7.58 – 7.46 (m, 6H, Ar-H), 7.43 – 7.29 (m, 10H, Ar-H), 7.22 – 7.13 (m, 3H, Ar-H), 6.94 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H, Ar-H), 6.90 – 6.72 (m,

3H, Ar-H), 6.62 (m, 3H, Ar-H), 6.35 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1H, Ar-H), \*6.08 (s, DBF), 4.39 – 3.97 (m, 4H, Fmoc + H28), 3.69 – 3.34 (m, 23H, PEG<sub>2</sub>; H20; H22; H24; H26; H32), 2.10 – 1.77 (m, 2H, H29), 1.61 (m, 2H, H31), 1.50 – 1.39 (m, 2H, H30), 1.24 (m, 14H, H21;H23;H25;H27). **RMN-<sup>13</sup>C** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm): 133.81 (CH, CH-Ar), 131.03 (CH, CH-Ar), 129.66 (CH, CH-Ar), 128.65 (CH, CH-Ar), 126.42 (CH, CH-Ar), 121.70 (CH, CH-Ar), 120.10 (CH, CH-Ar), 119.85 (CH, CH-Ar), 95.54 (CH, CH-Ar), 70.22 (CH<sub>2</sub>, PEG<sub>2</sub> (-CH<sub>2</sub>O-)), 69.04 (CH<sub>2</sub>, PEG<sub>2</sub> (-CH<sub>2</sub>O-)), 61.66 (CH<sub>2</sub>, Fmoc), 53.57 (CH<sub>2</sub>, C32), 47.19 (CH, Fmoc), 45.95 (CH<sub>2</sub>, C20;C22; C24; C26), 39.40 (CH<sub>2</sub>, PEG<sub>2</sub> (-CH<sub>2</sub>N-)), 37.45 (CH<sub>2</sub>, LYS), 32.37 (CH<sub>2</sub>, LYS), 12.71 (CH<sub>3</sub>, C21;C23;C25;C27). **HR-ESIMS(+)**:  $m/z$  calculado para C<sub>74</sub>H<sub>78</sub>N<sub>6</sub>NaO<sub>14</sub>S<sub>2</sub><sup>+</sup> [M+Na]<sup>+</sup> 1361.4910, encontrado 1361.4921 ( $\Delta m = 1.1$  mmu).

### Síntesis de 12

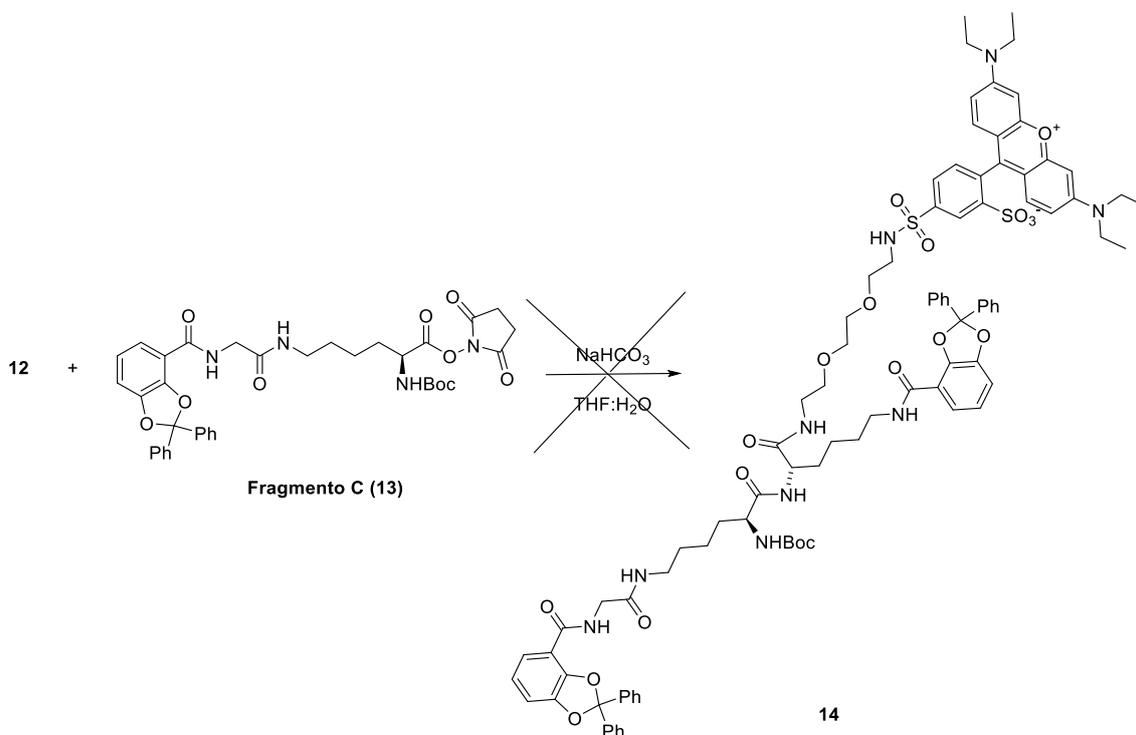


A 1 equiv. del compuesto **11** (46.60 mg, 0.0348 mmol) disuelto en 1.6 mL de una mezcla de THF / metanol (1: 0.6 v:v), se añadieron 3 equiv. de NaOH (4.17 mg, 0.1044 mmol) a partir de una disolución 0.4 M (0.26 mL) y se agitó toda la noche a temperatura ambiente. Al día siguiente, la mezcla de reacción se neutralizó con 0.05M HCl, se concentró a presión reducida y se secó en una bomba de alto vacío, obteniéndose el producto **12** como un sólido violeta oscuro (25.6 mg, 66% de rendimiento). **RMN-<sup>1</sup>H** (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  (ppm): 8.71 (s, 1H, H2), 8.13 (d,  $J = 7.9$  Hz, 1H, H5), 7.81 – 7.74 (m, Ar-H), 7.74 – 7.69 (m, Ar-H), 7.68 – 7.60 (m, Ar-H), 7.53 (m, Ar-H), 7.40 – 7.25 (m, Ar-H), 7.09 (dd,  $J = 9.3, 6.3$  Hz, Ar-H), 6.97 – 6.89 (m, Ar-H), 6.89 – 6.84 (m, Ar-H), 6.75 – 6.67 (m, Ar-H), 6.58 (t,  $J = 8.0$  Hz, Ar-H), 3.71 – 3.16 (m, PEG<sub>2</sub>; H20; H22; H24; H26; H32), 1.92 – 1.78 (m, 2H, H29), 1.67 – 1.53 (m, 2H, H31), 1.51 – 1.39 (m, 2H, H30), 1.37 – 1.23 (m,

H21;H23;H25;H27). **RMN-<sup>13</sup>C** (75 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  (ppm): 142.81 (CH, CH-Ar), 132.44 (CH, CH-Ar), 129.61 (CH, CH-Ar), 128.14 (CH, CH-Ar), 126.81 (CH, CH-Ar), 118.21(CH, CH-Ar), 95.63 (CH, CH-Ar), 69.94 (CH<sub>2</sub>, PEG<sub>2</sub> (-CH<sub>2</sub>O-)), 69.13 (CH<sub>2</sub>, PEG<sub>2</sub> (-CH<sub>2</sub>O-)), 45.45 (CH<sub>2</sub>, C20;C22; C24; C26), 39.16 (CH<sub>2</sub>, PEG<sub>2</sub> (-CH<sub>2</sub>N-)), 38.33 (CH<sub>2</sub>, LYS), 28.78 (CH<sub>2</sub>, LYS), 28.27 (CH<sub>2</sub>, LYS), 11.48 (CH<sub>3</sub>, C21;C23;C25;C27). **HR-ESIMS(+)**:  $m/z$  calculado para C<sub>59</sub>H<sub>69</sub>N<sub>6</sub>O<sub>12</sub>S<sub>2</sub><sup>+</sup> [**M+H**]<sup>+</sup> 1117.4409, encontrado 1117.4439 ( $\Delta m = 0.3$  mmu).

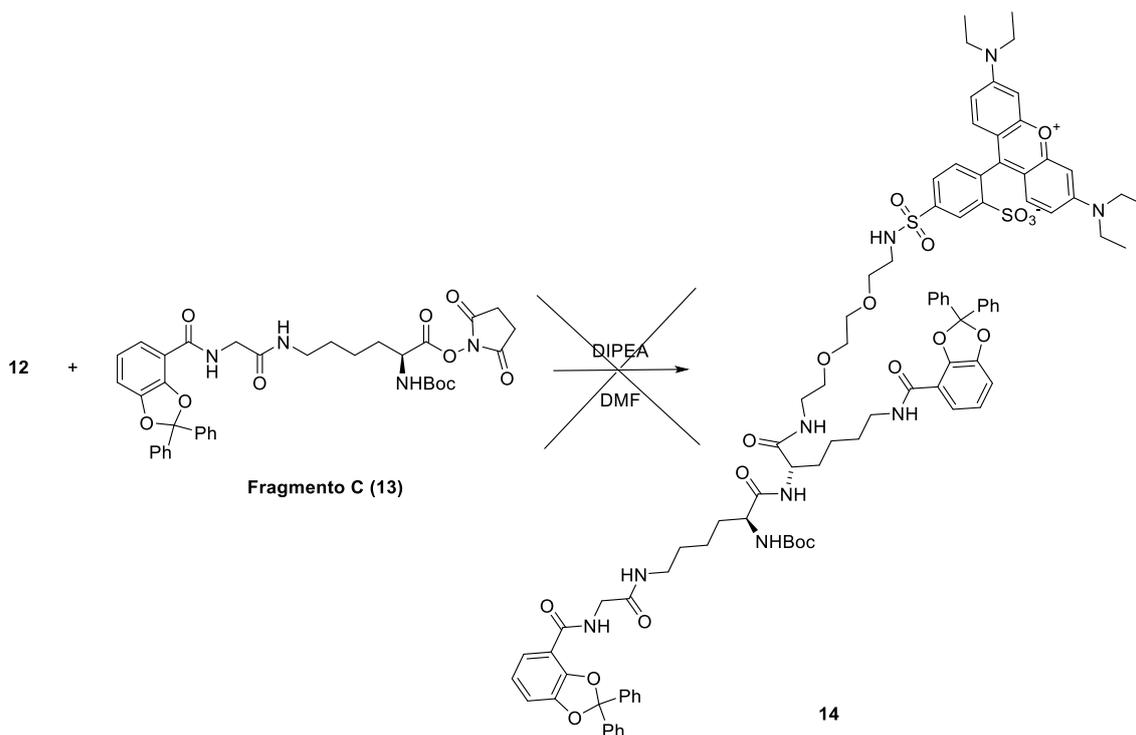
### Síntesis de 14. Acoplamiento entre 12 y el fragmento C (13)

#### A) Intento 1



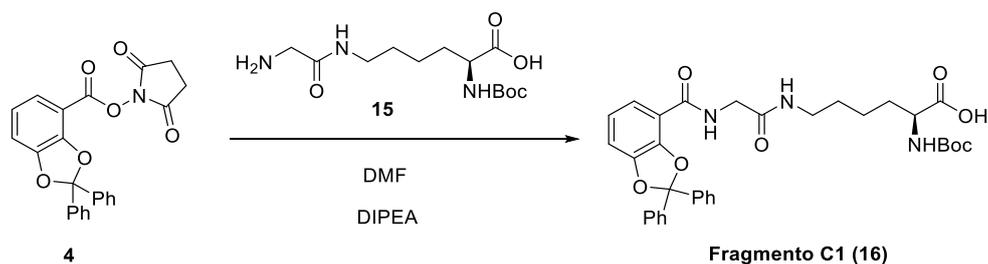
A una disolución de 1 equiv. de **12** (122.70 mg, 0.1098 mmol) y 1.10 equiv. de **13** (84.65 mg, 0.1208 mmol) en THF (3 mL) se añadieron 2.10 equiv. de NaHCO<sub>3</sub> acuoso (20 mg, 0.2306 mmol en 0.4 mL de H<sub>2</sub>O destilada) y la mezcla se agitó toda la noche a temperatura ambiente. Al día siguiente, la mezcla de reacción se neutralizó con 0.5M HCl, se concentró a presión reducida y se secó en una bomba de alto vacío. Los análisis de **RMN** de protón y **HR-ESIMS** indican que el producto requerido **14** no se ha obtenido.

#### B) Intento 2



A una disolución de 1 equiv. de **12** (25.60 mg, 0.0229 mmol) en DMF anhidro (3.5 mL), se añadieron 1.10 equiv. del **fragmento C (13)** (18.24 mg, 0.0252 mmol) y 2 equiv. de DIPEA anhidra (8  $\mu\text{L}$ , 0.0458 mmol), controlando el pH que debe ser neutro o ligeramente básico. La mezcla de reacción se agitó toda la noche bajo atmósfera de argón. Al día siguiente, el crudo se concentró a presión reducida y se secó en la bomba de alto vacío. Los análisis de **RMN** y **HR-ESIMS** indican que el producto requerido **14** no se ha obtenido.

## 5.2.4 SÍNTESIS DEL FRAGMENTO C1 (16)

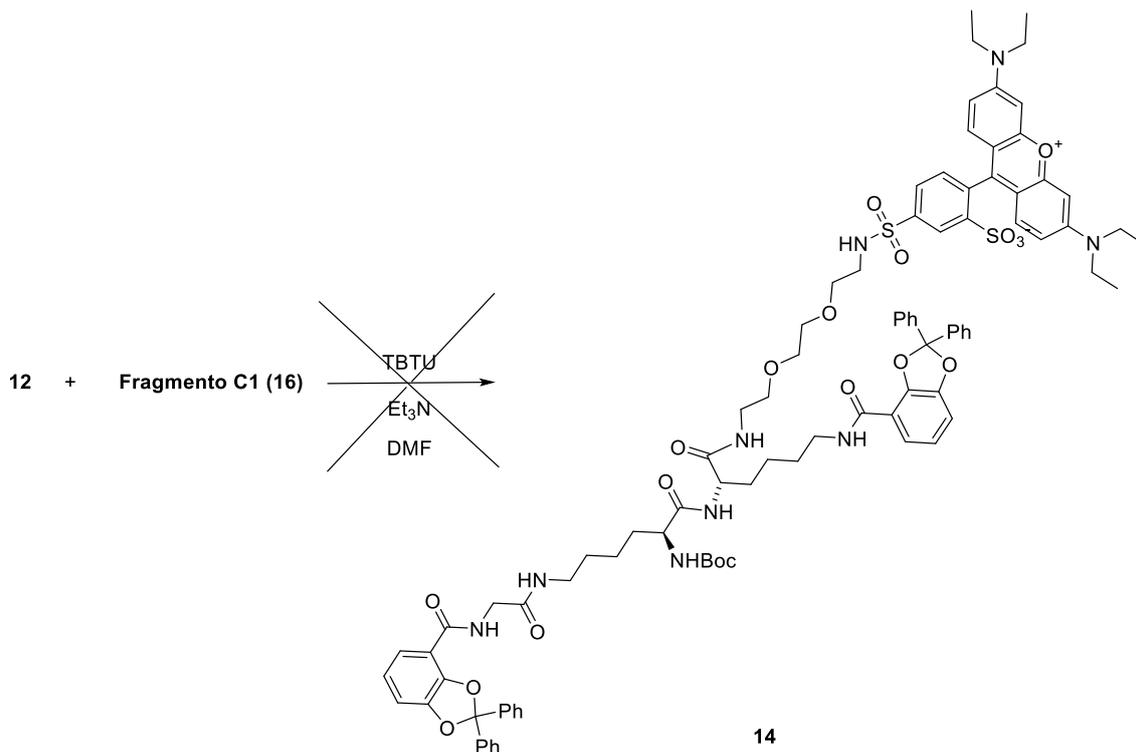


A 1 equiv. de **4** (78.80 mg, 0.190 mmol) se añadieron 1.40 equiv. de **15** (80.56 mg, 0.266 mmol) bajo atmósfera de argón, se disolvieron en 1 mL de DMF anhidro y se añadieron 2.40 equiv. de DIPEA anhidra (79.52  $\mu\text{L}$ , 0.4553 mmol), controlando el pH que debe ser neutro o ligeramente básico. La mezcla de reacción se dejó agitando bajo atmósfera de argón durante 6 horas. A continuación, se concentró a presión reducida en una bomba de aceite. El residuo se disolvió en  $\text{H}_2\text{O}$  destilada y se acidificó con 0.05M HCl hasta pH=3.

Luego se realizaron 3 extracciones con 15 mL de EtOAc (3x 15 mL). Las fases orgánicas se juntaron, se lavaron dos veces con 0.05M HCl, otras dos veces con salmuera, se secaron con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtraron a gravedad y se concentraron a presión reducida. Finalmente se secaron en la bomba de alto vacío, obteniéndose **16** como un sólido ligeramente amarillento (99.5 mg, 87% de rendimiento). **RMN-<sup>1</sup>H** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm): 8.97 (s, 1H, OH), 8.08 (t, *J* = 4.9 Hz, 1H, NH), 7.62 – 7.46 (m, 4H, Phe), 7.39 (dd, *J* = 8.1, 1.3 Hz, 1H, H6), 7.34 – 7.18 (m, 7H, Phe), 6.99 – 6.87 (m, 1H, H4), 6.87 – 6.74 (t, *J* = 7.9 Hz, 1H, H5), 5.95 (s, NH), 5.29 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, NHBoc), 4.19 – 3.95 (m, 2H, H8;H14), 3.21 – 3.06 (m, 2H, H10), 1.75 – 1.41 (m, 4H, H11;H12;H13), 1.29 (s, 9H, Boc). **RMN-<sup>13</sup>C** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm): 175.33 (CO), 171.36 (CO), 169.11 (CO), 164.30 (CO), 155.86, 147.49 (C, C-Ar), 145.35 (C, C-Ar), 139.36 (C, C-Ar), 128.56 (CH, CH-Ar), 125.91 (CH, CH-Ar), 122.12 (d, *J* = 5.1 Hz, CH, CH-Ar), 118.64 (C, Phe-C-Phe), 114.89 (CO, C1), 112.17 (CH, CH-Ar), 80.00 (C, Boc), 60.52, 53.32 (CH, C14), 43.77 (CH<sub>2</sub>, C8), 39.37 (CH<sub>2</sub>, C10), 31.92 (CH<sub>2</sub>, C13), 28.70 (CH<sub>2</sub>, C11), 28.38 (CH<sub>3</sub>, Boc), 22.49 (CH<sub>2</sub>, C12), 21.12, 14.26. **HR-ESIMS(-)**: *m/z* calculado para C<sub>33</sub>H<sub>36</sub>N<sub>3</sub>O<sub>8</sub><sup>-</sup> [**M-H**]<sup>-</sup> 602.2508, encontrado 602.2507 (Δ*m* = 0.1 mmu).

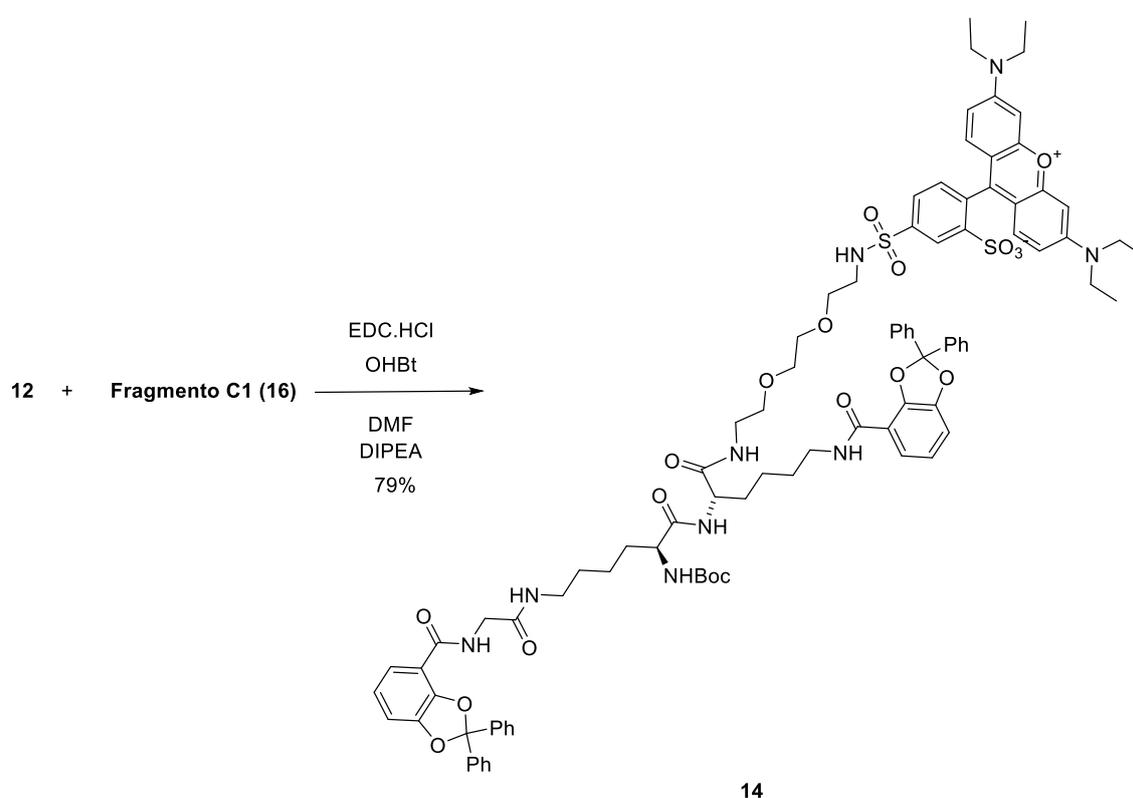
## 5.2.5 ACOPLAMIENTO ENTRE 12 Y EL FRAGMENTO C1 (16)

### A) Intento 1



A 1 equiv. de **12** (33.10 mg, 0.0296 mmol) se le añadió una disolución de 1.10 equiv. del **fragmento C1 (16)** (19.67 mg, 0.0326 mmol) en DMF anhidro (3 mL), 1.10 equiv. de TBTU (10.46 mg, 0.0326 mmol) y 2.26 equiv. de Et<sub>3</sub>N anhidra (9.28 μL, 0.0700 mmol). La mezcla de reacción se agitó toda la noche bajo atmósfera de argón. Al día siguiente, se concentró a presión reducida. El residuo fue redisolto en 15 mL de EtOAc y lavado con NaHCO<sub>3</sub> saturado, H<sub>2</sub>O destilada, 0.05M HCl y salmuera, se secó con MgSO<sub>4</sub> anhidro, se filtró a gravedad y se concentró a presión reducida. Finalmente, el producto se secó en una bomba de alto vacío. Los análisis de **RMN** y **HR-ESIMS** indican que el producto requerido **14** no se ha obtenido.

### B) Síntesis de 14



1 equiv. del **fragmento C1 (13)** (35.00 mg, 0.0580 mmol), 1.50 equiv. de **12** (97.17 mg, 0.0870 mmol), 1.45 equiv. de EDC.HCl (16.12 mg, 0.0841 mmol) y 2 equiv. de HOBT (15.67 mg, 0.1160 mmol) se disolvieron en 2 mL de DMF anhidro y se añadieron 2.91 equiv. de DIPEA anhidra (29.47 μL, 0.1687 mmol). La mezcla de reacción se agitó toda la noche bajo atmósfera de argón. Al día siguiente, se concentró a presión reducida en una bomba de aceite y se secó en una bomba de alto vacío. La formación del compuesto **14** se confirmó por **HR-ESIMS(+)**: *m/z* calculado para C<sub>92</sub>H<sub>103</sub>N<sub>9</sub>NaO<sub>19</sub>S<sub>2</sub><sup>+</sup> [M+Na]<sup>+</sup>

1724.6704, encontrado 1724.6721 ( $\Delta m = 1.7$  mmu). El residuo se purificó por columna cromatográfica C-18 usando 100% H<sub>2</sub>O, 25% MeOH, 50% MeOH 75% MeOH y 100% MeOH. como eluyentes Las fracciones que contienen el producto requerido se concentraron a presión reducida y se secaron en una bomba de alto, obteniendo **14** como un sólido violeta (78.3 mg, 79% de rendimiento). **RMN-<sup>1</sup>H** (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$ : 8.76 – 8.69 (s, 1H, Ar-H, SRB), 8.64 (d, Ar-H), 8.40 (d, Ar-H), 8.13 (m, Ar-H), 7.81 (m, Ar-H), 7.77 – 7.74 (m, Ar-H), 7.70 (m, Ar-H), 7.65 – 7.55 (m, Ar-H), 7.51 – 7.29 (m, Ar-H), 7.19 – 7.06 (m, Ar-H), 7.05 – 6.88 (m, Ar-H), 4.34 (m), 4.26 – 3.94 (m), 3.72 – 3.41 (m,, PEG<sub>2</sub>; SRB), 3.25 (m, PEG<sub>2</sub>), 1.90 – 1.79 (m, LYS), 1.72 (m, LYS), 1.62 (m, LYS), 1.52 (m, SRB), 1.36 (m, Boc). **RMN-<sup>13</sup>C** (126 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$ (ppm): 176.59 (CO), 170.76 (CO), 165.58 (CO), 159.28 (CO), 157.70 (CO), 148.89 (C, C-Ar), 146.58 (C, C-Ar), 140.68 (C, C-Ar), 133.59 (CH, CH-Ar), 130.63 (CH, CH-Ar), 129.88 (CH, CH-Ar), 129.57 (CH, CH-Ar), 128.20 (CH, CH-Ar), 127.76 (CH, CH-Ar), 127.31 (CH, CH-Ar), 122.76 (CH, CH-Ar), 122.04 (CH, CH-Ar), 120.67 (CH, CH-Ar), 119.75 (C, Phe-C-Phe), 116.28 (C), 115.20 (CH, CH-Ar), 112.77 (CH, CH-Ar), 108.30 (CH<sub>2</sub>), 96.95 (CH, CH-Ar), 80.45 (C, Boc), 70.61 (CH<sub>2</sub>, PEG<sub>2</sub>) 54.98 (CH, LYS), 46.79 (CH, C20;C22; C24; C26), 43.70 (CH, C8), 40.24 (CH, PEG<sub>2</sub>), 33.05 (CH<sub>2</sub>, LYS), 32.53 (CH<sub>2</sub>, LYS), 30.59 (CH<sub>2</sub>, LYS), 29.87 (CH<sub>2</sub>, LYS), 28.72 (CH<sub>2</sub>, LYS), 28.38 (CH<sub>3</sub>, Boc), 23.72 (CH<sub>2</sub>, LYS), 14.81, 14.45, 12.84 (CH<sub>3</sub>, C21;C23;C25;C27).

## 6 CONCLUSIONES

---

En base a los objetivos planteados y a los resultados obtenidos siguiendo las diferentes propuestas sintéticas, se deducen las siguientes conclusiones:

- Se planteó una ruta sintética para la preparación de una sonda fluorescente derivada de un análogo de las amonabactinas de la bacteria patógena *A. salmonicida* subsp. *salmonicida*
- Se llevó a cabo la síntesis del conjugado entre el sideróforo convenientemente protegido y el fluoróforo sulforodamina B a través del espaciador PEG<sub>2</sub>, el compuesto **14**.
- Las estructuras de todos los compuestos sintetizados, incluido el compuesto **14**, se confirmaron mediante análisis de los correspondientes espectros de masas de alta resolución y de RMN de <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C.
- Con el fin de la eliminación de los grupos protectores del compuesto **14**, se propone el tratamiento del mismo con un 30% de TFA, 7.5% de triisopropilsilano (iPr<sub>3</sub>SiH) y 7.5% de EtOH en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> para obtener la sonda fluorescente planteada.

## 7 CONCLUSIONES

---

En base aos obxectivos plantexados e aos resultados obtidos seguindo as diferentes propostas sintéticas, dedúcense as seguintes conclusións:

- Plantexouse unha ruta sintética para a preparación dunha sonda fluorescente derivada dun análogo das amonabactinas da bacteria patóxena *A. salmonicida* subsp. *salmonicida*
- Levouse a cabo a síntese do conxugado entre o sideróforo convenientemente protexido e o fluoróforo sulforodamina B a través do espaciador PEG<sub>2</sub>, o composto **14**.
- As estruturas de tódolos compostos sintetizados, inclusive o composto **14**, confirmáronse mediante análise dos correspondentes espectros de masas de alta resolución e de RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C.
- Co fin da eliminación dos grupos protectores do composto **14**, propónse o tratamento do mesmo cun 30% de TFA, triisopropilsilano (iPr<sub>3</sub>SiH) e 7.5% de EtOH en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> para obter a sonda fluorescente exposta.

## 8 CONCLUSIONS

---

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

- A synthetic route for the preparation of a fluorescent probe derived from an analogue of the ammonabactin of the pathogenic bacteria *A. salmonicida* subsp. *salmonicida*.
- The synthesis of the conjugate between the suitably protected siderophore and the sulforhodamine B fluorophore through the PEG<sub>2</sub> spacer, the compound **14**, was carried out
- The structures of all synthesized compounds, including compound **14**, were confirmed by analysis of the corresponding high resolution mass spectra and <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR.
- In order to eliminate the protective groups of **14**, it is proposed to treat it with 30% TFA, 7.5% triisopropylsilane (iPr<sub>3</sub>SiH) and 7.5% EtOH in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> to obtain the proposed fluorescent probe.

## 9 BIBLIOGRAFÍA

---

1. **OMS, FAO.** *Informe de la Consulta mixta de expertos sobre los riesgos y los beneficios del consumo de pescado.* Roma, 2010. Vol. 978.
2. **FAO.** *El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2020. La sostenibilidad en acción.* Roma, 2018.
3. **APROMAR.** *Apromar Informe anual: La acuicultura en España 2021.* 2021.
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.* *Evolutionary Applications*, 9(2), 344–354, 2016. <https://doi.org/10.1111/eva.12342>
5. **Mislin, G. L. A.; & Schalk, I. J.** *Siderophore-dependent iron uptake systems as gates for antibiotic Trojan horse strategies against *Pseudomonas aeruginosa*.* *Metallomics*, 6 (3), 408–420, 2014. <https://doi.org/10.1039/c3mt00359k>
6. **Chairatana, P.; Zheng, T.; & Nolan, E. M.** *Targeting virulence: salmochelin modification tunes the antibacterial activity spectrum of  $\beta$ -lactams for pathogen-selective killing of *Escherichia coli*.* *Chemical Science*, 6(8), 4458–4471, 2015. <https://doi.org/10.1039/c5sc00962f>
7. **Wencewicz, T. A.; & Miller, M. J.** *Sideromycins as Pathogen-Targeted Antibiotics.* . *Antibacterials: Volume II*; Fisher, J. F., Mobashery, S., Miller, M. J. Springer International Publishing: Topics in Medicinal Chemistry, 26, 151–183, 2018. [https://doi.org/10.1007/7355\\_2017\\_19](https://doi.org/10.1007/7355_2017_19)
8. **Toranzo, A. E.; Magariños, B.; & Romalde, J. L.** *A review of the main bacterial fish diseases in mariculture systems.* *Aquaculture*, 246(1–4), 37–61., 2005. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.01.002>
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.* *Journal of Fish Diseases*, 34 (9), 643–661, 2011. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2011.01279.x>
10. **Tobback, E.; Decostere, A.; Hermans, K.; Ryckaert, J.; Duchateau, L.; Haesebrouck, F.; & Chiers, K.** *Route of entry and tissue distribution of *Yersinia ruckeri* in experimentally infected rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*.* *Diseases of Aquatic Organisms*, 84(3), 219–228, 2009. <https://doi.org/10.3354/dao02057>
11. **Janda, J. M.; & Abbott, S. L.** *The genus *Aeromonas*: Taxonomy, pathogenicity, and infection.* *Clinical Microbiology Reviews*, 23(1), 35–73, 2010. <https://doi.org/10.1128/CMR.00039-09>
12. **Hider, R. C.; & Kong, X.** *Chemistry and biology of siderophores.* *Natural Product Reports*, 27(5), 637–657, 2010. <https://doi.org/10.1039/b906679a>
13. **Klemm, P.; Vejborg, R. M.; & Hancock, V.** *Prevention of bacterial adhesion.* *Applied Microbiology and Biotechnology*, 88(2), 451–459, 2010. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2805-y>

14. **Chen, P. H. C.; Ho, S. Y.; Chen, P. L.; Hung, T. C.; Liang, A. J.; Kuo, T. F.; Huang, H. C.; & Wang, T. S. A.** *Selective Targeting of Vibrios by Fluorescent Siderophore-Based Probes*. ACS Chemical Biology, 12 (11), 2720–2724, 2017. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.7b00667>
15. **Raymond, K. N.; Dertz, E. A.; & Kim, S. S.** *Enterobactin: An archetype for microbial iron transport*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 100(7), 3584–3588, 2003. <https://doi.org/10.1073/pnas.0630018100>
16. **Sargun, A.; Johnstone, T. C.; Zhi, H.; Raffatellu, M.; & Nolan, E. M.** *Enterobactin and Salmochelin- $\beta$ -Lactam Conjugates Induce Cell Morphologies Consistent with Inhibition of Penicillin-Binding Proteins in Uropathogenic Escherichia coli CFT073*. Chemical Science, 12(11), 4041–4056, 2021. <https://doi.org/10.1039/d0sc04337k>
17. **Kramer, J.; Özkaya, Ö.; & Kümmerli, R.** *Bacterial siderophores in community and host interactions*. Nature Reviews Microbiology, 18(3), 152–163, 2020. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0284-4>
18. **Wilson, B. R.; Bogdan, A. R.; Miyazawa, M.; & Hashimoto, K.** *Siderophores in iron metabolism: from mechanism to therapy potential*. Trends in Molecular Medicine, 22 (12), 1077–1090, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2016.10.005>
19. **Fan, D.; & Fang, Q.** *Siderophores for medical applications: Imaging, sensors, and therapeutics*. Elsevier B.V. International Journal of Pharmaceutics, 597:120306, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2021.120306>
20. **Raines, D. J.; Sanderson, T. J.; & Duhme-Klair, A-K.** *Siderophores*. Elsevier Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering Elsevier, 2015. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409547-2.11040-6>
21. **Balado, M.; Souto, A.; Vences, A.; Careaga, V.; Valderrama, K.; Segade, Y.; Rodríguez, J.; Osorio, C.; Jiménez, C.; & Lemos, M.** *Two Catechol Siderophores, Acinetobactin and Amonabactin, Are Simultaneously Produced by Aeromonas salmonicida subsp. salmonicida Sharing Part of the Biosynthetic Pathway*. ACS Chemical Biology, 10(12), 2850–2860, 2015. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.5b00624>
22. **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*. Frontier in Microbiology, 9:1766, 2018. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01766>
23. **Zheng, T.; & Nolan, E. M.** *Siderophore-based detection of Fe(III) and microbial pathogens*. Metallomics, 4(9), 866–880, 2012. <https://doi.org/10.1039/c2mt20082a>
24. **Lavis, L. D.; & Raines, R. T.** *Bright building blocks for chemical biology*. ACS Chemical Biology, 9(4), 855–866, 2014. <https://doi.org/10.1021/cb500078u>
25. **Southwell, J. W.; Black, C. M.; & Duhme-Klair, A. K.** *Experimental Methods for Evaluating the Bacterial Uptake of Trojan Horse Antibacterials*. John Wiley and Sons. ChemMedChem, 16(7), 1063–1076, 2021. <https://doi.org/10.1002/cmdc.202000806>

26. **Rey-Varela, D.; Cisneros-Sureda, J.; Balado, M.; Rodríguez, J.; Lemos, M. L.; & Jiménez, C.** *The outer membrane protein FstC of Aeromonas salmonicida subsp. salmonicida acts as receptor for amonabactin siderophores and displays a wide ligand plasticity. structure-activity relationships of synthetic amonabactin analogues.* ACS Infectious Diseases, 5(11), 1936–1951, 2019. <https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.9b00274>
27. **Remington, S. J.** *Green fluorescent protein: A perspective.* Protein Science, 20(9), 1509–1519, 2011. <https://doi.org/10.1002/pro.684>
28. **Fu, Y.; & Finney, N. S.** *Small-molecule fluorescent probes and their design.* Royal Society of Chemistry. RSC Advances, 8(51), 29051–29061, 2018. <https://doi.org/10.1039/c8ra02297f>
29. **Cisneros-Sureda, J.; Rey-Varela, D.; Rodríguez, J.; Balado, M.; Lemos, M. L.; & Jiménez, C.** *Selective detection of Aeromonas spp. by a fluorescent probe based on the siderophore amonabactin.* Journal of Inorganic Biochemistry, 230: 111743, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2022.111743>
30. Thermo Fisher Scientific Corporation. *Certificate of Analysis (Sulforhodamine B).* Life Technologies S103, Lote 2384022, 2021
31. Pronamar (Productos Naturales Marinos). <https://www.pronamar.com/es/>.
32. Química Molecular y de Materiales - Nuevos Materiales - CICA. <https://cica.udc.gal/es/grupo/quimica-molecular-y-de-materiales>.
33. **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 Chemical Biology, 12(2), 479-493, 2017. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.6b00805>
34. **Baco, E.; Hoegy, F.; Schalk, I. J.; & Mislin, G. L. A.** *Diphenyl-benzo[1,3]dioxole-4-carboxylic acid pentafluorophenyl ester: A convenient catechol precursor in the synthesis of siderophore vectors suitable for antibiotic Trojan horse strategies.* Organic and Biomolecular Chemistry, 12(5), 749-757, 2014. <https://doi.org/10.1039/c3ob41990h>
35. **Stallivieri, A.; Colombeau, L.; Devy, J.; Etique, N.; Chaintreuil, C.; Myrzakhmetov, B.; Achard, M.; Baros, F.; Arnoux, P.; Vanderesse, R.; & Frochot, C.** *New photodynamic molecular beacons (PMB) as potential cancer-targeted agents in PDT.* Bioorganic and Medicinal Chemistry, 26(3), 688-702, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2017.12.034>
36. **Despras, G.; Zamaleeva, A.; Dardevet, L.; Tisseyre, C.; Magalhaes, J.; Garner, C.; De Waard, M.; Amigorena, S.; Feltz, A.; Mallet, J.; & Collot, M.** *H-Rubies, a new family of red emitting fluorescent pH sensors for living cells.* Chemical Science, 6(10), 5928-5937, 2015. <https://doi.org/10.1039/C5SC01113B>
37. **Höck, S.; Marti, R.; Riedl, R.; & Simeunovic, M.** *Thermal cleavage of the Fmoc protection group.* Chimia, 64(3), 200–202., 2010. <https://doi.org/10.2533/chimia.2010.200>

- 38. Meguro, T.; Terashima, N.; Ito, H.; Koike, Y.; Kii, I.; Yoshida, S.; & Hosoya, T.** *Staudinger reaction using 2,6-dichlorophenyl azide derivatives for robust aza-ylide formation applicable to bioconjugation in living cells.* *Chemical Communications*, 54(57), 7904–7907, 2018. <https://doi.org/10.1039/c8cc00179k>
- 39. Samorì, C.; Ali-Boucetta, H.; Sainz, R.; Guo, C.; Toma, F. M.; Fabbro, C.; da Ros, T.; Prato, M.; Kostarelos, K.; & Bianco, A.** *Enhanced anticancer activity of multi-walled carbon nanotube-methotrexate conjugates using cleavable linkers.* *Chemical Communications*, 46(9), 1494–1496, 2010. <https://doi.org/10.1039/b923560d>
- 40. Loison, S.; Cottet, M.; Orcel, H.; Adihou, H.; Rahmeh, R.; Lamarque, L.; Trinquet, E.; Kellenberger, E.; Hibert, M.; Durroux, T.; Mouillac, B.; & Bonnet, D.** *Selective fluorescent nonpeptidic antagonists for vasopressin V2 GPCR: Application to ligand screening and oligomerization assays.* *Journal of Medicinal Chemistry*, 55(20), 8588–8602, 2012. <https://doi.org/10.1021/jm3006146>
- 41. Wang, Y.; Liu, D.; Zheng, Q.; Zhao, Q.; Zhang, H.; Ma, Y.; Fallon, J. K.; Fu, Q.; Haynes, M. T.; Lin, G.; Zhang, R.; Wang, D.; Yang, X.; Zhao, L.; He, Z.; & Liu, F.** *Disulfide bond bridge insertion turns hydrophobic anticancer prodrugs into self-assembled nanomedicines.* *Nano Letters*, 14(10), 5577–5583, 2014. <https://doi.org/10.1021/nl502044x>
- 42. Příbylka, A.; Krchňák, V.; & Schütznerová, E.** *Environmentally Friendly SPPS II: Scope of Green Fmoc Removal Protocol Using NaOH and Its Application for Synthesis of Commercial Drug Triptorelin.* *Journal of Organic Chemistry*, 85(14), 8798–8811, 2020. <https://doi.org/10.1021/acs.joc.0c00599>
- 43. Ogrel, A.; Bloemhoff, W.; Lugtenburg, J.; & Raap, J.** *Synthesis of the Isotopically Labelled C-Terminal Fragment of Zervamicin: An Approach to the Synthesis of Aib-Containing Peptides.* *Liebigs Annalen*, 1997(1), 41–47, 1997. <https://doi.org/10.1002/jlac.199719970109>
- 44. Choi, I.; Park, I. S.; Ryu, J. H.; & Lee, M.** *Control of peptide assembly through directional interactions.* *Chemical Communications*, 48(68), 8481–8483, 2012. <https://doi.org/10.1039/c2cc31872e>
- 45. Montalbetti, C. A. G. N.; & Falque, V.** *Amide bond formation and peptide coupling.* *Tetrahedron*, 61(46), 10827–10852, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2005.08.031>
- 46. Boyce, J. H.; Dang, B.; Ary, B.; Edmondson, Q.; Craik, C. S.; Degrado, W. F.; & Seiple, I. B.** *Platform to Discover Protease-Activated Antibiotics and Application to Siderophore-Antibiotic Conjugates.* *Journal of the American Chemical Society*, 142(51), 21310–21321, 2020. <https://doi.org/10.1021/jacs.0c06987>
- 47. Paulen, A.; Gasser, V.; Hoegy, F.; Perraud, Q.; Pesset, B.; Schalk, I. J.; & Mislin, G. L. A.** *Synthesis and antibiotic activity of oxazolidinone-catechol conjugates against Pseudomonas aeruginosa.* *Organic & Biomolecular Chemistry*, 13(47), 11567–11579, 2015. <https://doi.org/10.1039/c5ob01859e>

# 10 ANEXOS

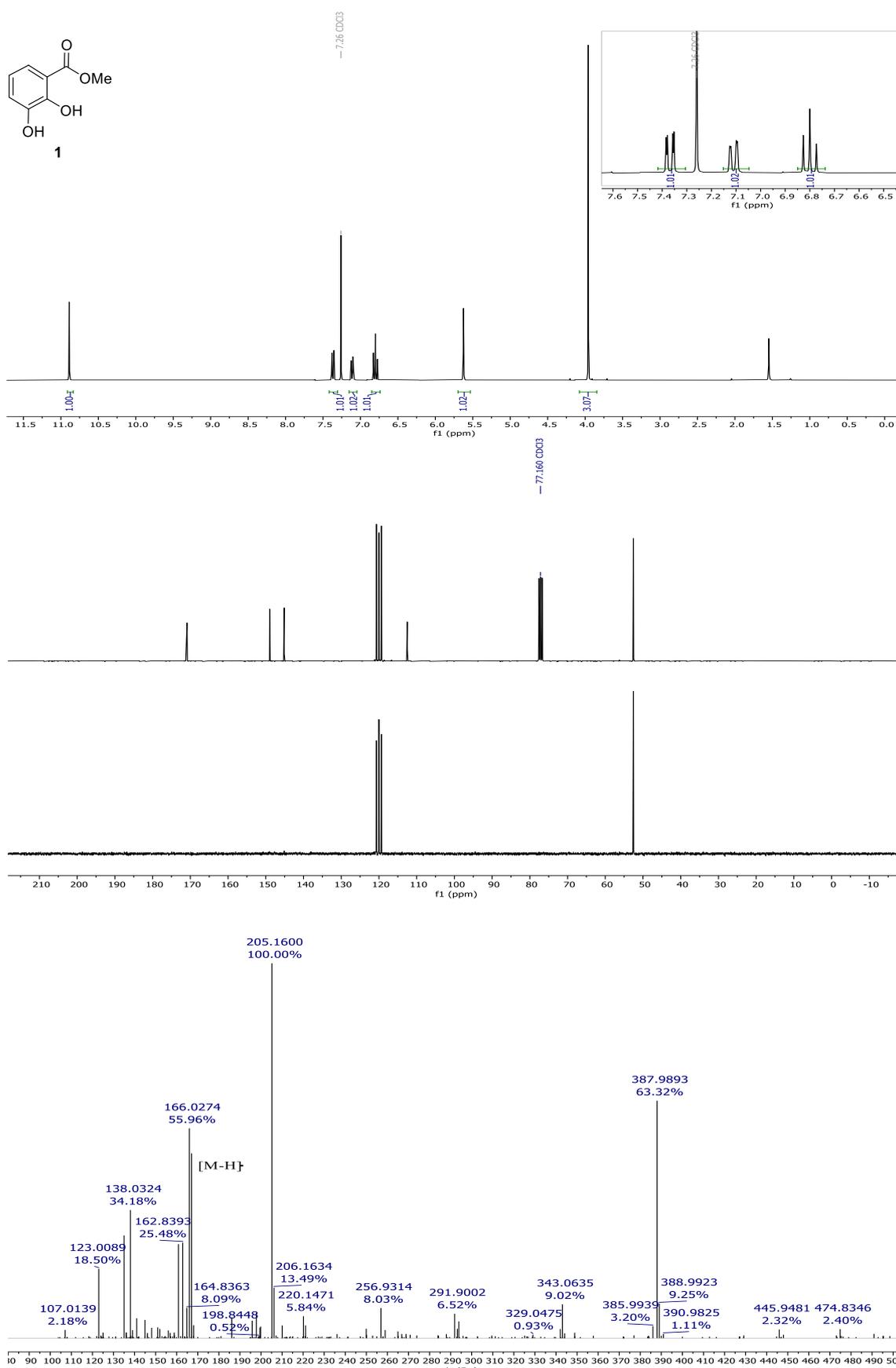


Figura 13. Espectros de RMN-<sup>1</sup>H/<sup>13</sup>C, DEPT y HR-ESIMS de 1.

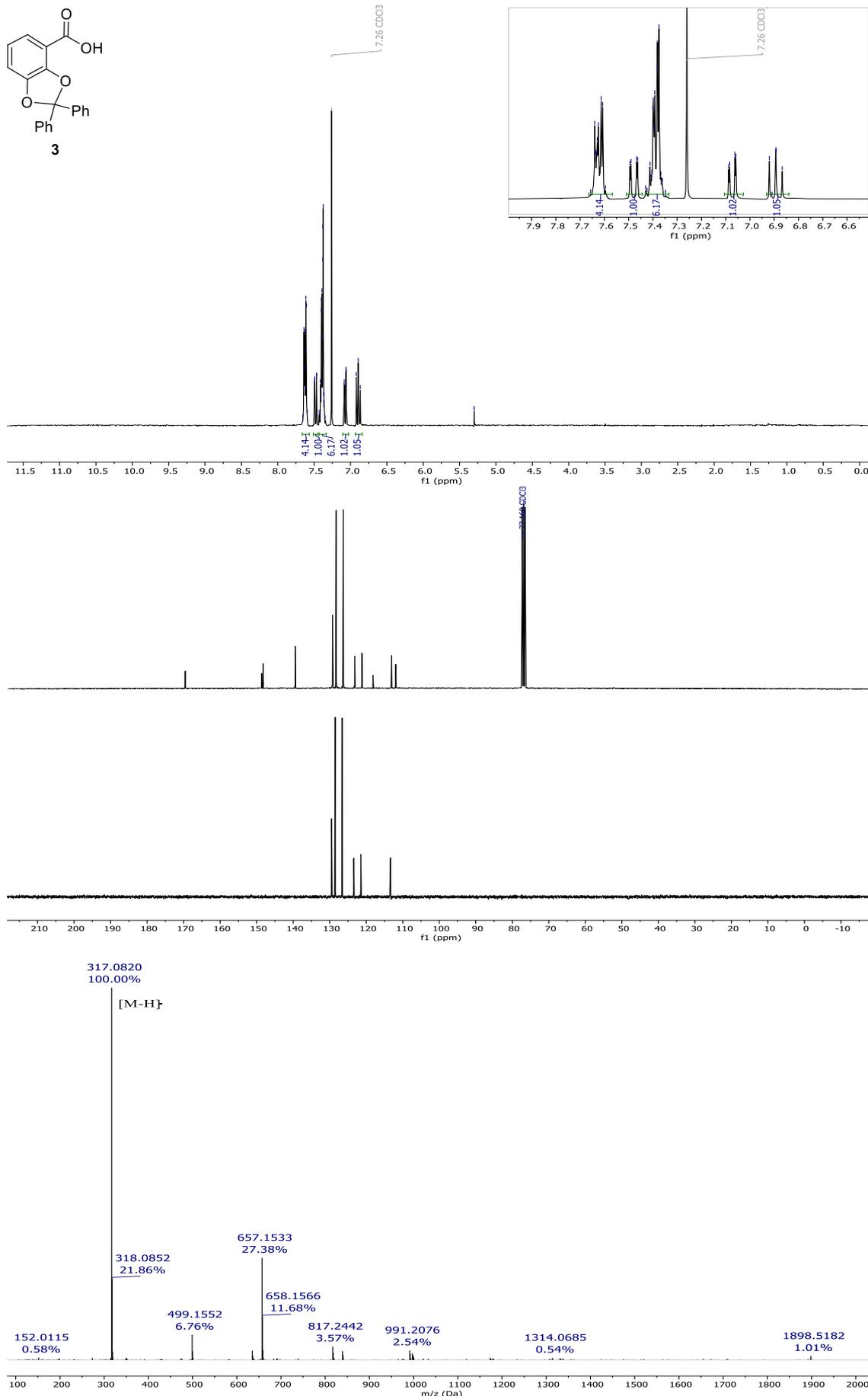


Figura 14. Espectros de RMN- $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ , DEPT y HR-ESIMS de 3.

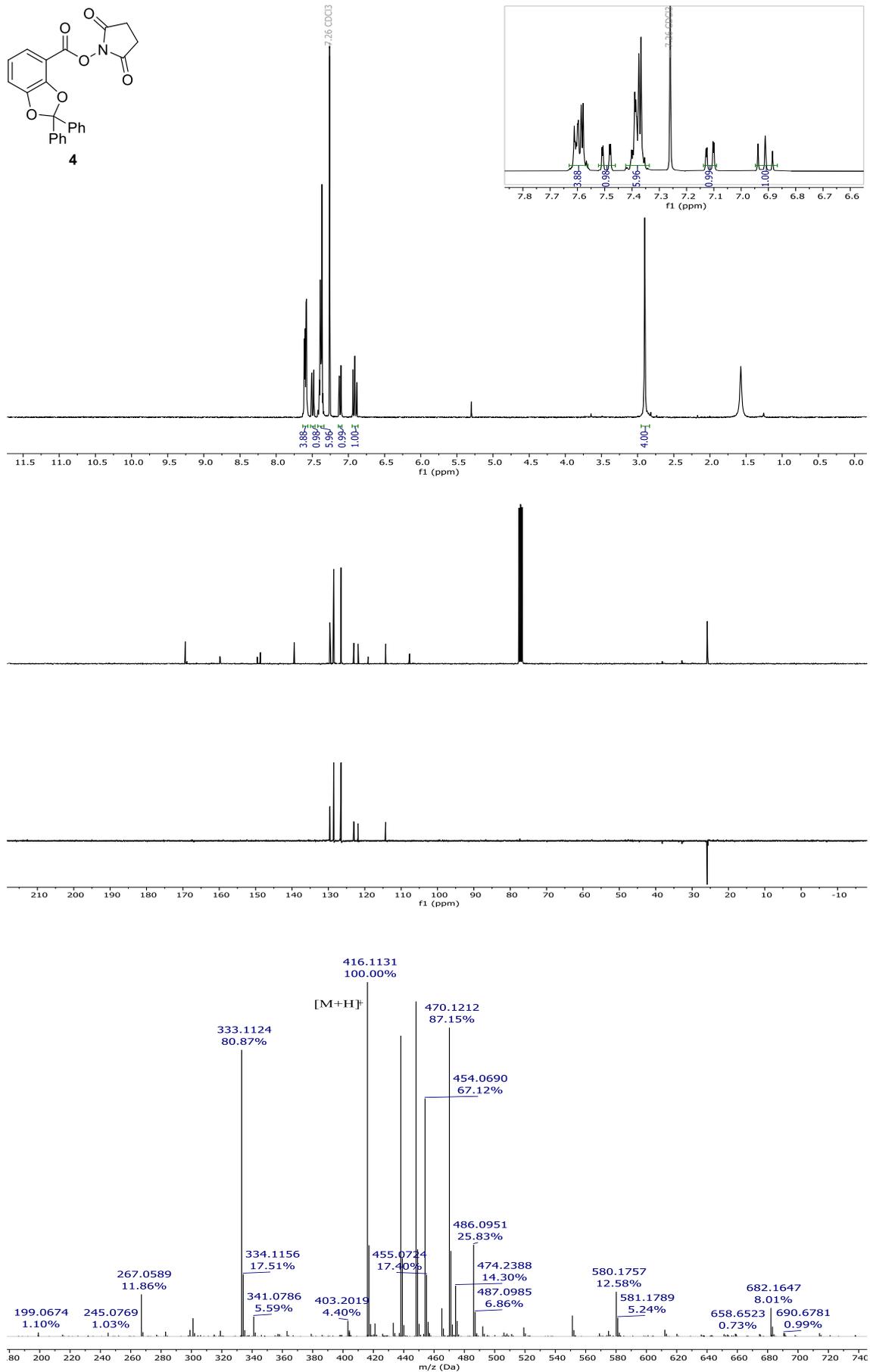


Figura 15 . Espectros de RMN- $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ , DEPT y HR-ESIMS de 4.

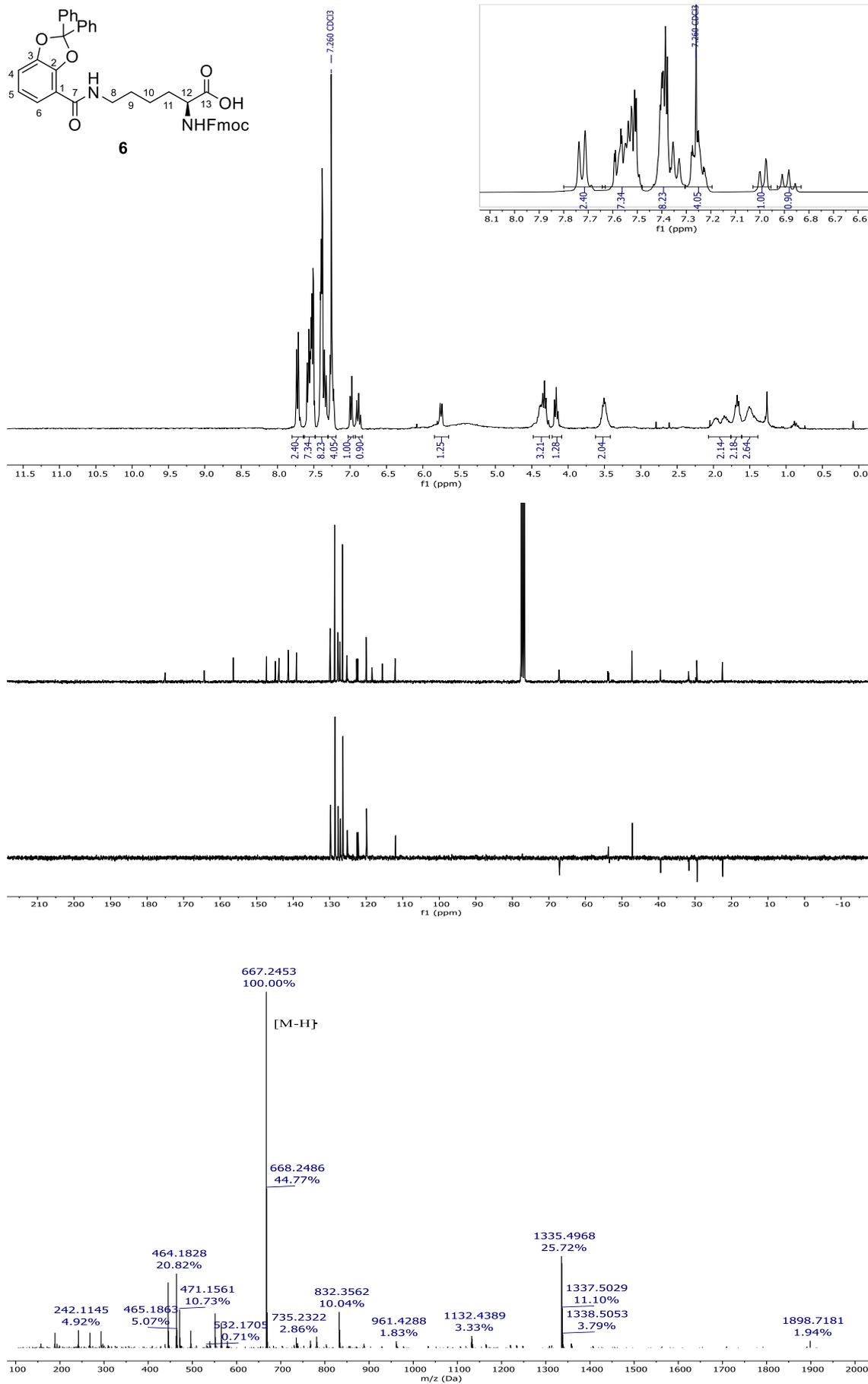


Figura 16. Espectros de RMN-<sup>1</sup>H/<sup>13</sup>C, DEPT y HR-ESIMS de 6.

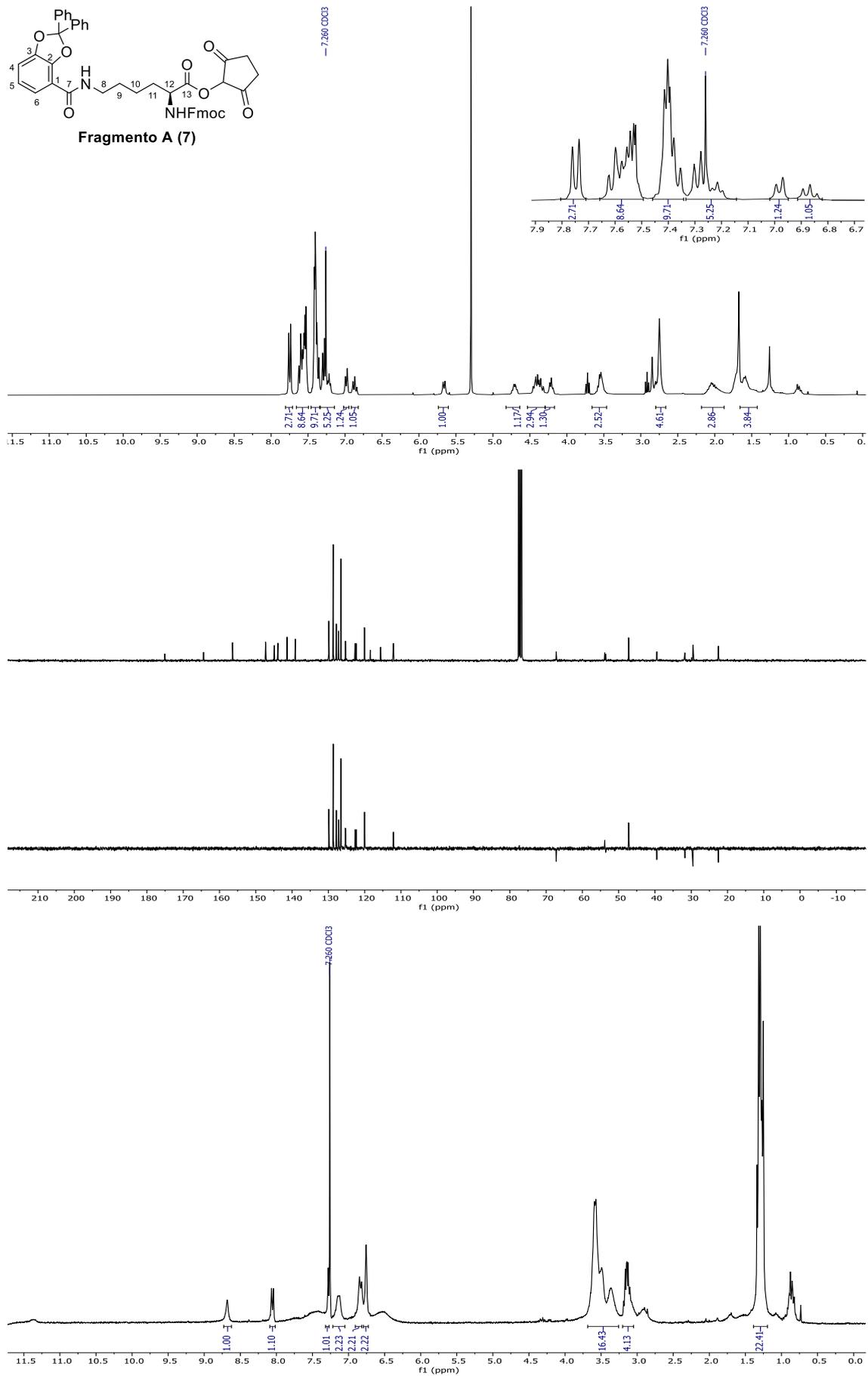


Figura 17. Espectros de RMN- $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ , DEPT y HR-ESIMS del **fragmento A (7)**.

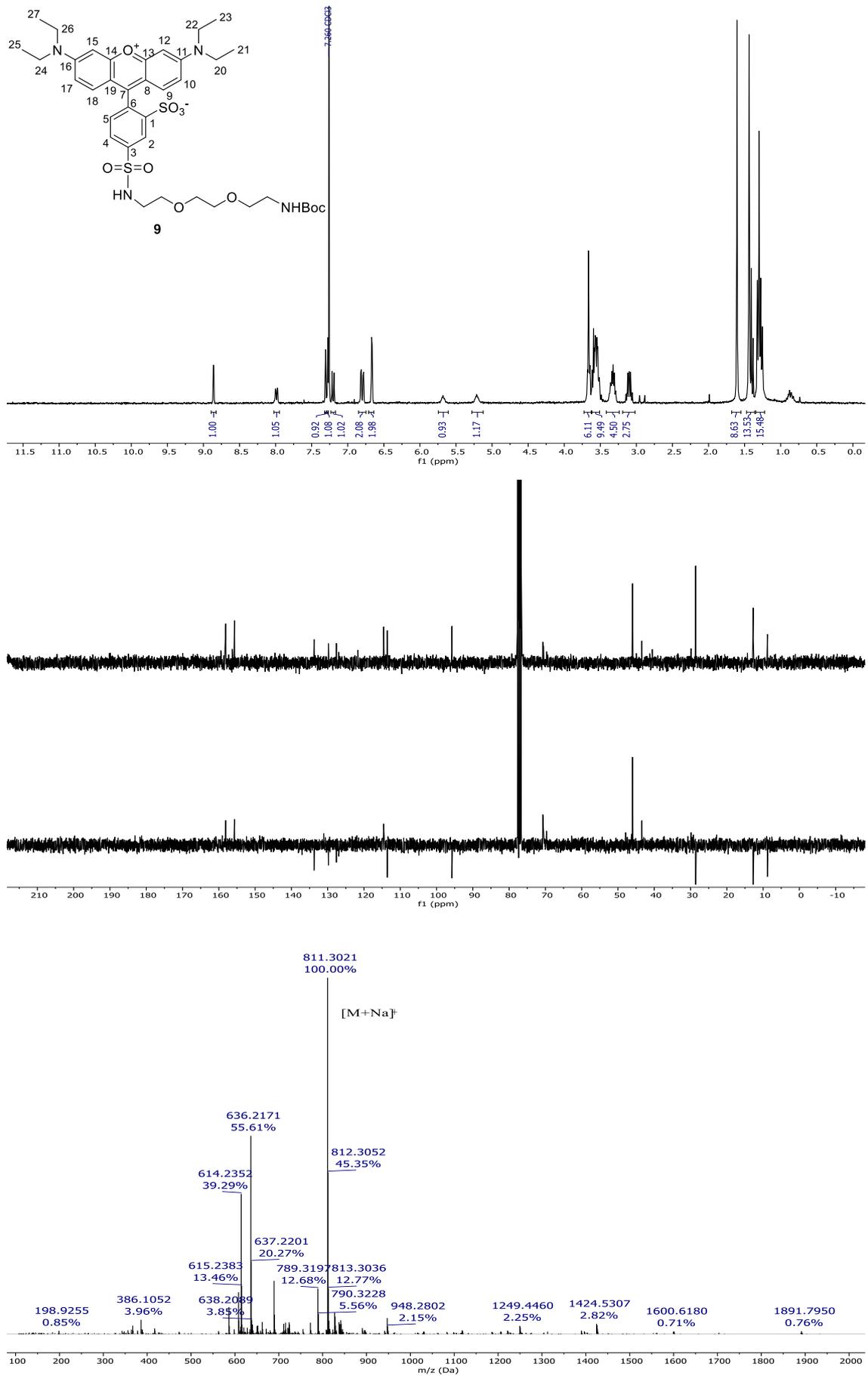


Figura 18. Espectros de RMN-<sup>1</sup>H/<sup>13</sup>C, DEPT y HR-ESIMS de **9**.

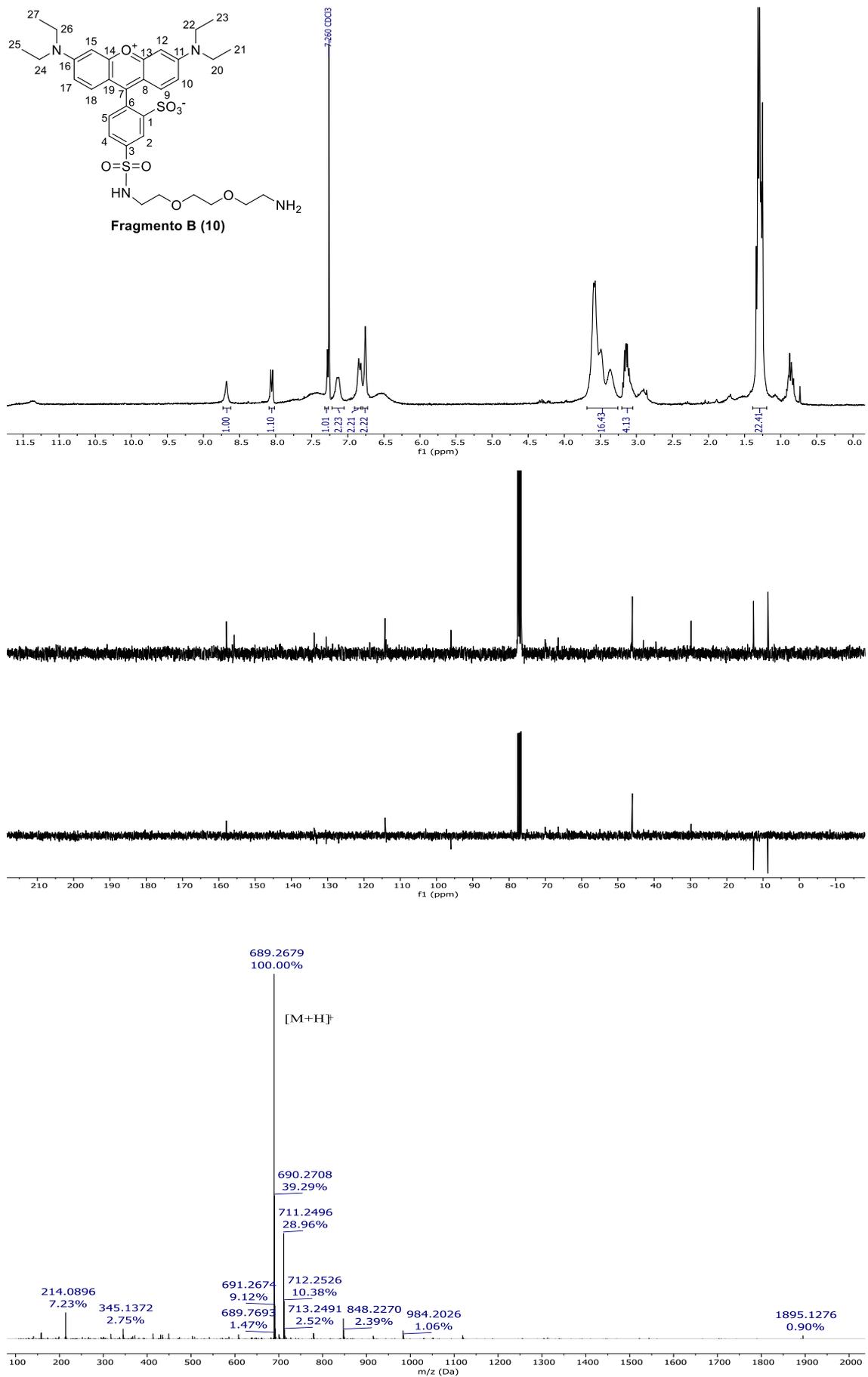


Figura 19. Espectros de RMN-<sup>1</sup>H/<sup>13</sup>C, DEPT y HR-ESIMS del **fragmento B (10)**.

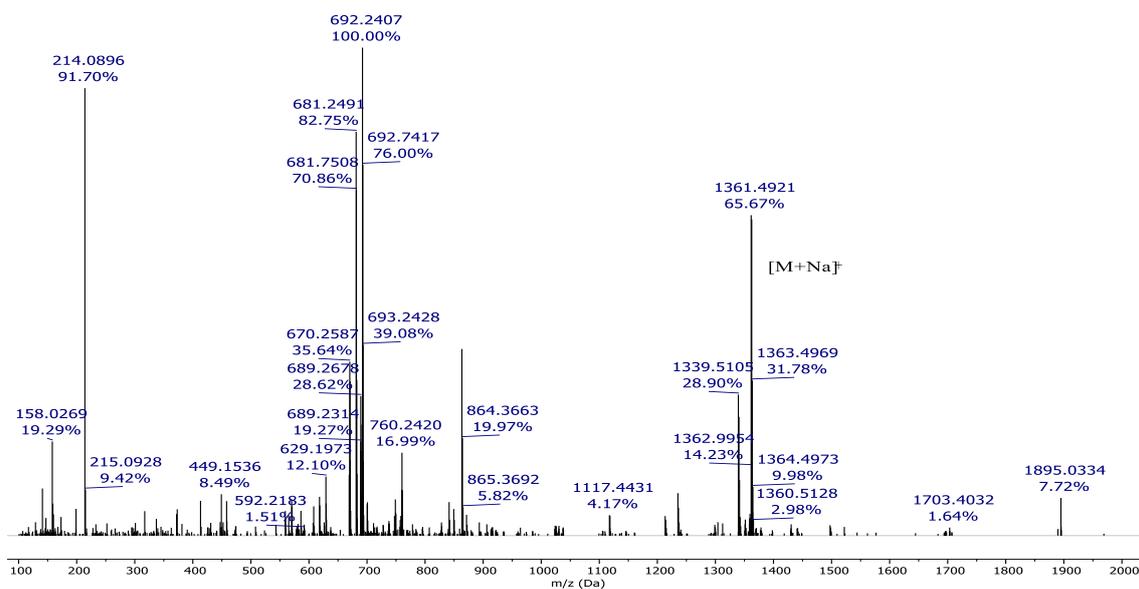
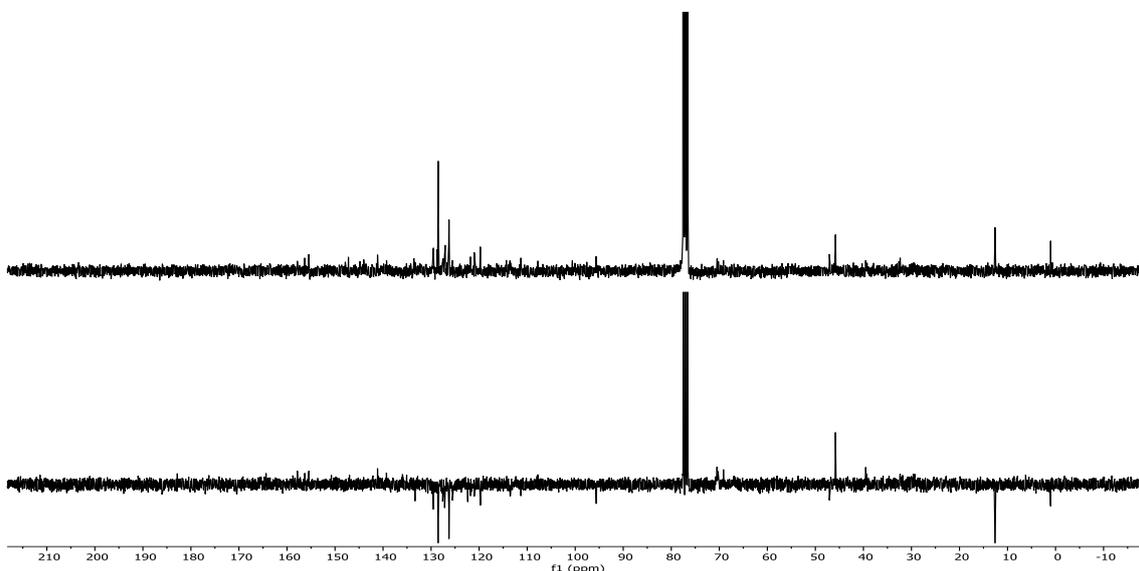
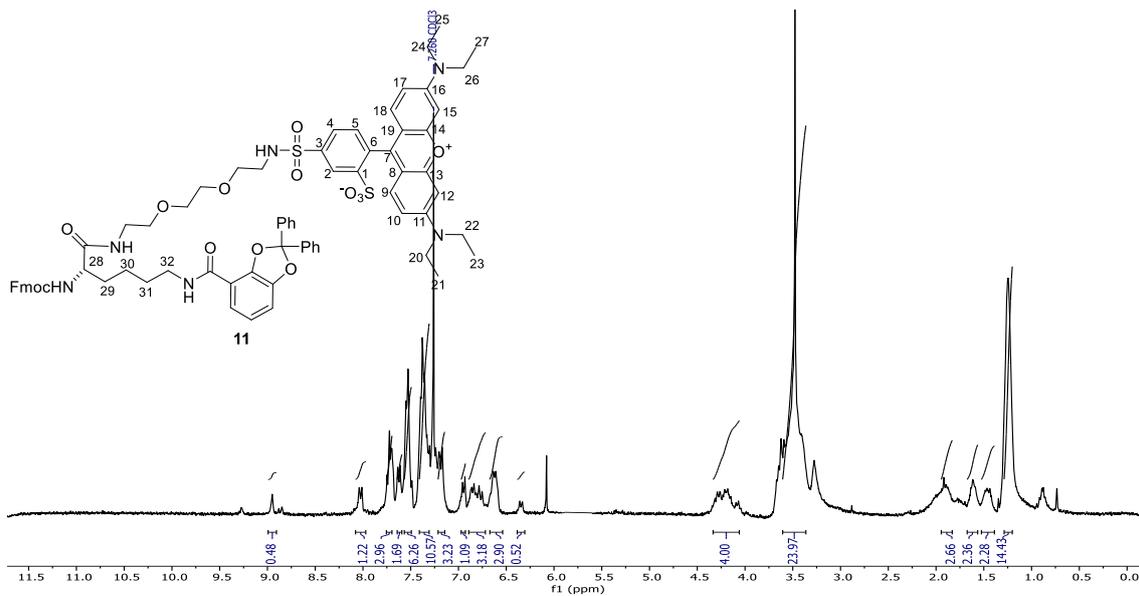


Figura 20. Espectros de RMN-<sup>1</sup>H/<sup>13</sup>C, DEPT y HR-ESIMS de 11.

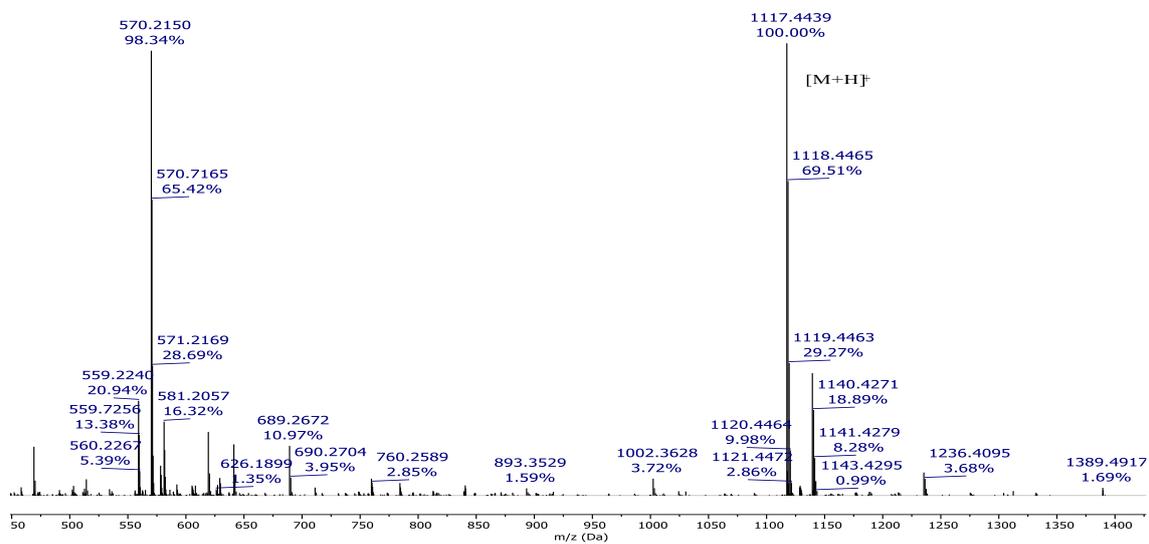
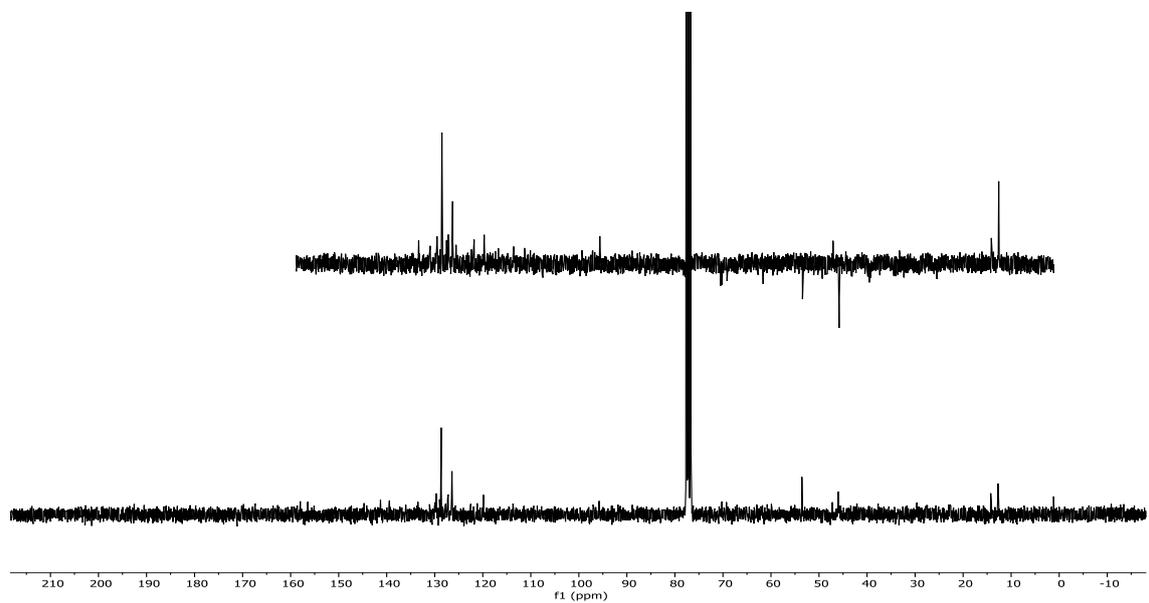
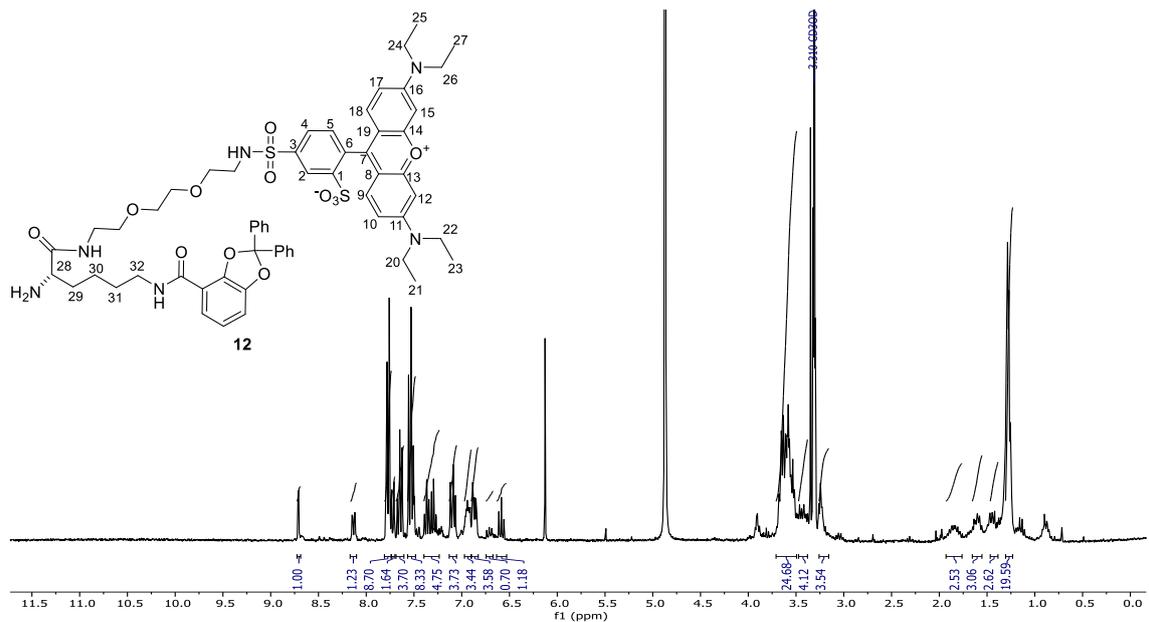


Figura 21. Espectros de RMN-<sup>1</sup>H/<sup>13</sup>C, DEPT y HR-ESIMS de **12**.

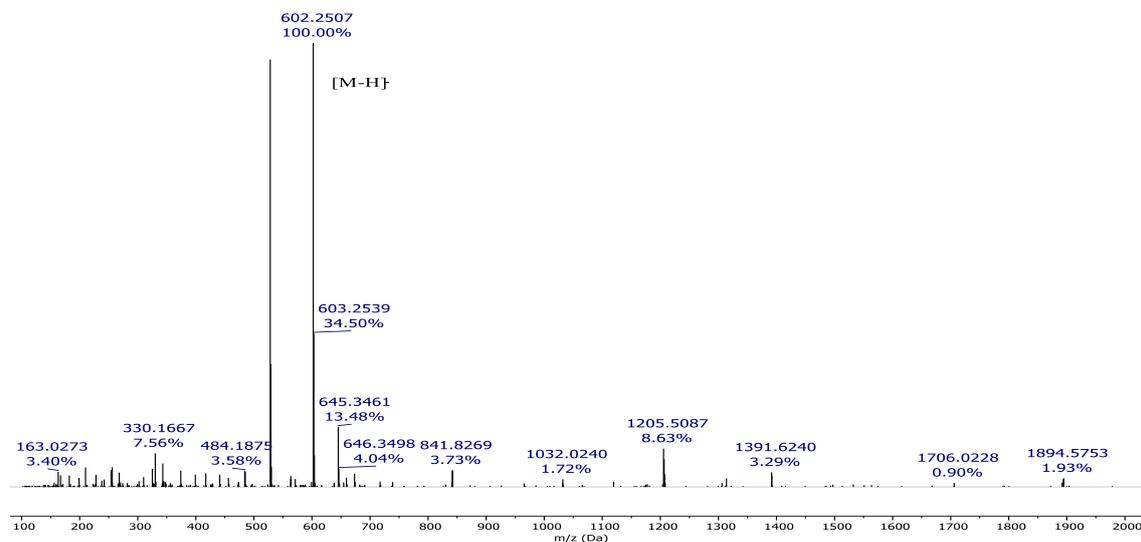
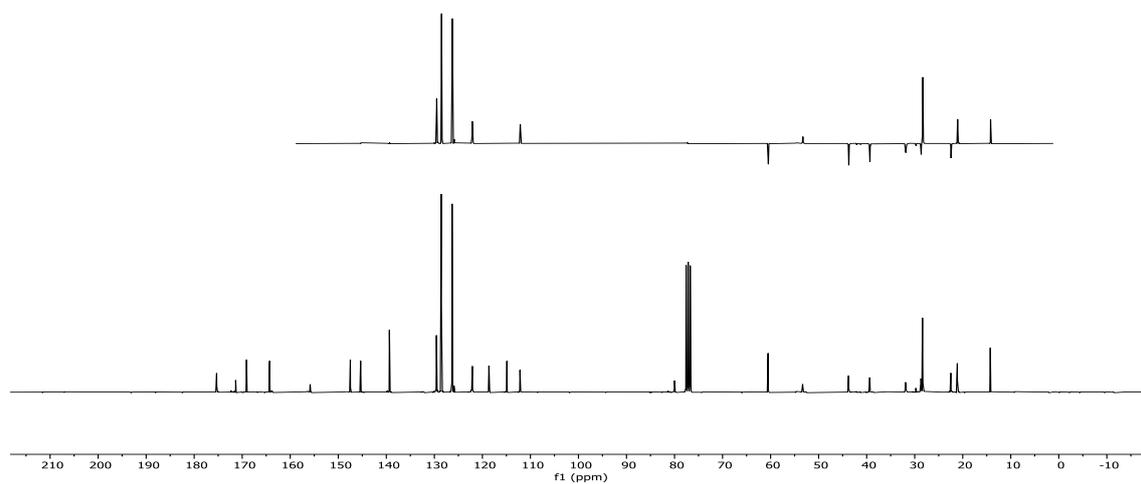
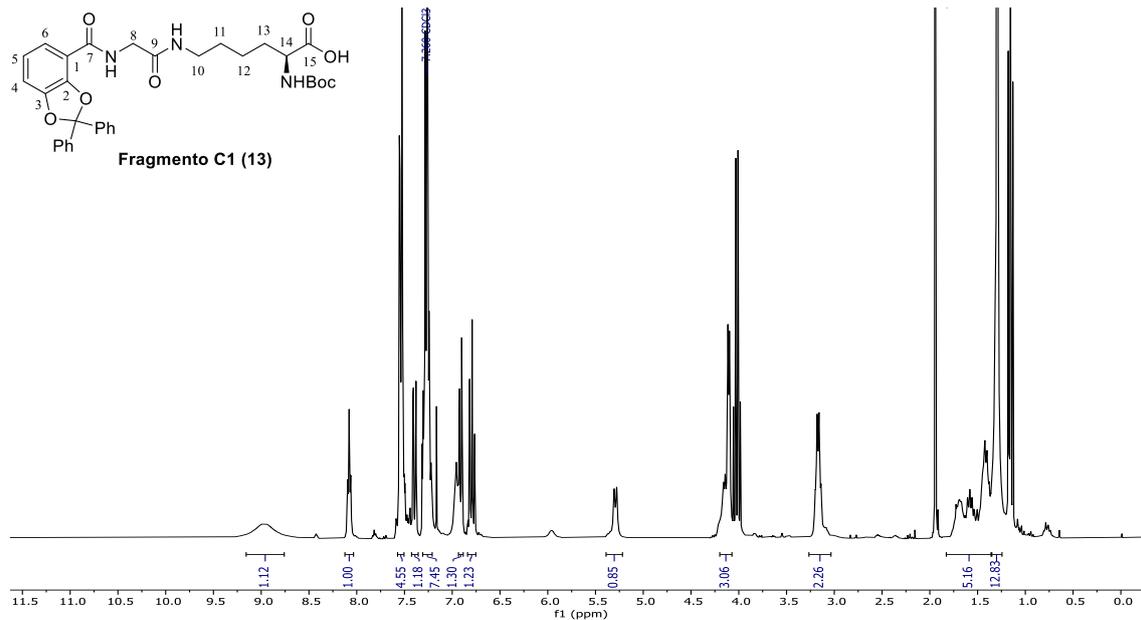


Figura 22. Espectros de RMN-<sup>1</sup>H/<sup>13</sup>C, DEPT y HR-ESIMS de **fragmento C1 (16)**.

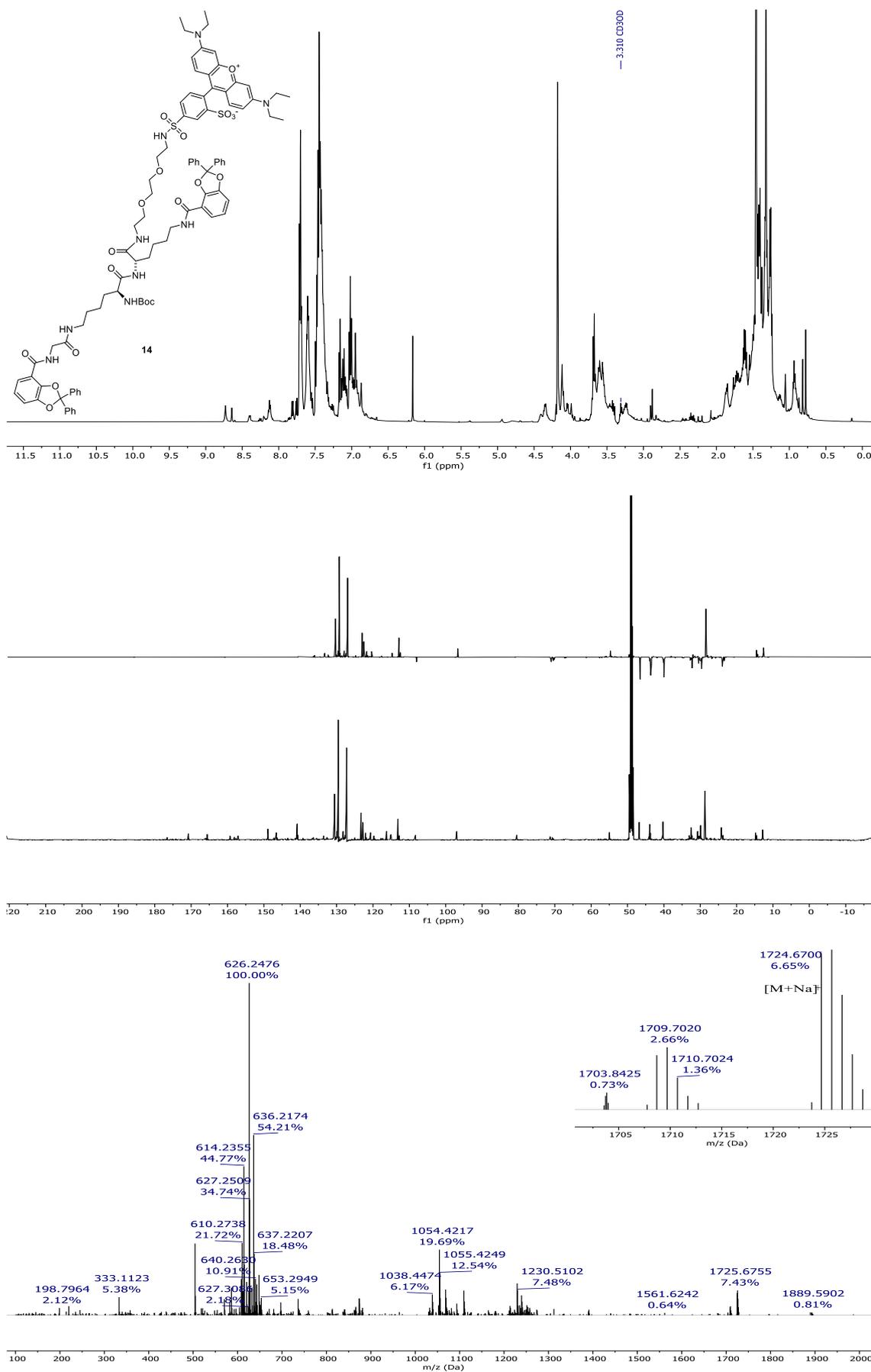


Figura 23. Espectros de RMN-<sup>1</sup>H/<sup>13</sup>C, DEPT y HR-ESIMS de 14.