

**XVII JORNADAS DE JOVENES INVESTIGADORES
ASOCIACION DE UNIVERSIDADES GRUPO MONTEVIDEO (AUGM)**

“UNIVERSIDAD, CONOCIMIENTO y DESARROLLO REGIONAL”

**Facultad de Ciencias de la Administración | Facultad de Ciencias de la
Alimentación
Universidad Nacional de Entre Ríos
Concordia. Entre Ríos
República Argentina
27, 28 y 29 de octubre de 2009**

UNIVERSIDAD: Universidad Nacional de La Plata (UNLP)

NÚCLEO DISCIPLINARIO/COMITÉ ACADÉMICO/TEMA PROPUESTO: Química

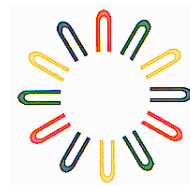
TÍTULO DEL TRABAJO:

**SÍNTESIS ECOCOMPATIBLE DE N-GLICOSILSULFONAMIDAS CON
ACTIVIDAD BIOLÓGICA**

AUTOR(ES): Carlos Agustín Témpera

CORREOS ELECTRÓNICOS DE LOS AUTORES: temperaca@gmail.com

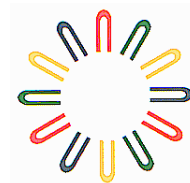
PALABRAS CLAVE: GLICOSILSULFONAMIDAS/AMBERLIST 15/
INHIBIDORES ENZIMÁTICOS



Introducción:

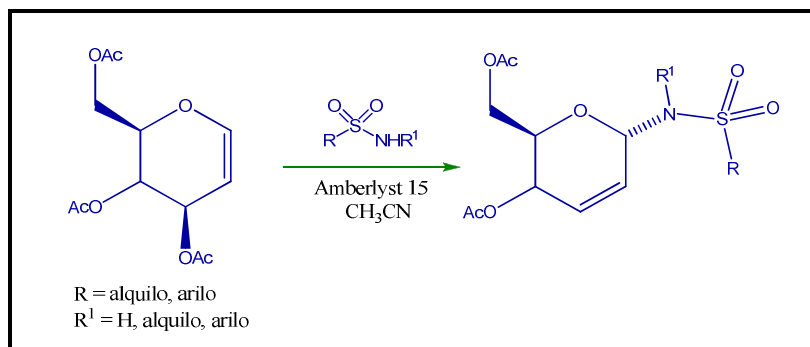
En los últimos años varios tipos de sulfonamidas han surgido como potentes agentes quimioterapéuticos para el tratamiento del cáncer. Entre las más conocidas se encuentran E7010¹, E7070¹, ABT751² y T138067³, las cuales se hallan bajo evaluación clínica para ser empleadas como drogas antitumorales. Desde hace ya varios años, en nuestro laboratorio, hemos desarrollado diversas metodologías para la síntesis de glicosilsulfonamidas.⁴ Varias de las glicosilsulfonamidas sintetizadas presentaron actividad inhibitoria de la anhidrasa carbónica⁵ y de la proliferación celular en líneas celulares de carcinomas hepatocelular y pulmonar humanos, en el rango micromolar.^{4a} Recientemente, en nuestro laboratorio, se ha descrito la sulfonamidoglicosilación de D-glicales catalizada por eterato de trifluoruro de boro ($\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$). Empleando esta metodología ha sido posible sintetizar una glicosilsulfonamida que inhibe selectivamente la CA IX (la cual se encuentra asociada a procesos tumorales) frente a la CA II, que se encuentra ampliamente distribuida en el organismo.^{4c}

Desafortunadamente esta metodología tiene una importante desventaja: el $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ es un reactivo sumamente tóxico. Este inconveniente llevó a iniciar estudios para hallar una ruta alternativa en la síntesis de glicosilsulfonamidas, con un menor impacto medioambiental. Así se descubrió que los catalizadores heterogéneos $\text{HClO}_4 \cdot \text{SiO}_2$ y $\text{HBF}_4 \cdot \text{SiO}_2$, son eficientes para la sulfonamidoglicosilación^{4d}. Actualmente nos encontramos interesados en el empleo de resinas de intercambio iónico para promover la adición de diversas sulfonamidas a D-glicales. Las resinas de intercambio iónico son muy utilizadas debido a las variadas ventajas que presentan con respecto a otros catalizadores, entre ellas pueden mencionarse alta reactividad y selectividad, reusabilidad, facilidad de separación, no generan desechos contaminantes, etc.⁶



Objetivo

Desarrollar la síntesis de *N*-glicosilsulfonamidas con actividad biológica a partir de D-glicales, vía reordenamiento de Ferrier, empleando resinas de intercambio iónico Amberlyst 15 (Figura 1).



Esquema 1: Síntesis de *N*-glicosilsulfonamidas empleando Amberlyst 15

Materiales y métodos

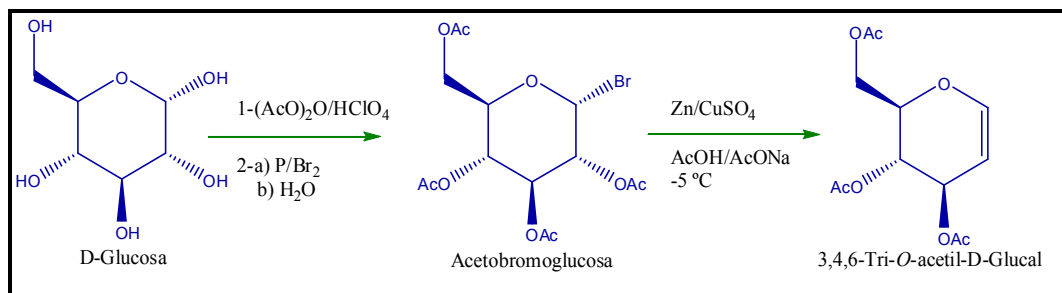
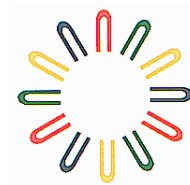
Los puntos de fusión fueron determinados en capilares cerrados en un equipo Buchi-Tottoli y no se encuentran corregidos.

Los espectros de ¹H-RMN y ¹³C-RMN fueron registrados utilizando un equipo RMN Varian Mercury de 200 MHz. Los desplazamientos químicos se indican en partes por millón con respecto al tetrametilsilano (TMS). Las multiplicidades se expresan como: singulete (s), doblete (d), doblete ancho (da), doblete aparente (dap), triplete (t), cuarteto (c), quintuplete (q), multiplete (m), doblete (dd), doblete (ddd) y triplete (td). Las constantes de acoplamiento están expresadas en Hertz.

Para la realización de cromatografía en capa delgada se emplearon cromatofolios de sílicagel Merck 60 F₂₅₄, con indicador de fluorescencia.

Las cromatografías en columna fueron realizadas utilizando sílicagel Merck 60 (230-400 mesh).

Los D-glicales fueron obtenidos mediante técnicas existentes en la literatura, partiendo de la D-glucosa ó D-galactosa a través de un camino sintético que implica la obtención del correspondiente compuesto acetobromado, para luego obtener el correspondiente D-glicol.⁷ En la Figura 2 se esquematiza el procedimiento a partir de la D-glucosa. En tanto que las sulfonamidas empleadas son de origen comercial.

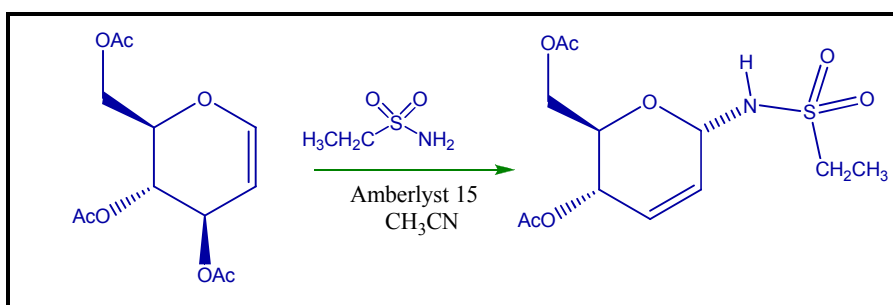


Esquema 2: Síntesis de 3,4,6-Tri-O-acetil-D-glucal a partir de D-glucosa

Las reacciones de sulfonamidoglicosilación se realizaron de la siguiente manera: en un tubo de reacción se colocó 1 mmol del glicial y 1,1 mmol de sulfonamida en 6 ml de acetonitrilo anhidro. Se adicionó entre 10 y 40% en peso de resina Amberlyst 15, a la temperatura indicada. La mezcla se agitó magnéticamente en tubo cerrado hasta completa desaparición del D-glicial, monitoreada mediante cromatografía en capa delgada (hexano/acetato de etilo 1:1). Finalizada la reacción, la mezcla resultante se separó de la resina mediante filtración, lavando la misma 3 veces con acetonitrilo. Se reunieron los extractos con la mezcla original, y se evaporó el solvente en evaporador rotativo, procediendo luego a la purificación del producto mediante cromatografía en columna.

Resultados

En primer lugar, se determinaron las condiciones óptimas de sulfonamidoglicosilación, empleando 3,4,6-tri-O-acetil-D-glucal y etanosulfonamida en acetonitrilo, a temperatura ambiente(Esquema 3). Los resultados se muestran en la Tabla 1.



Esquema 3: Reacción de 3,4,6-Tri-O-acetil-D-glucal con etanosulfonamida para determinar condiciones óptimas de reacción

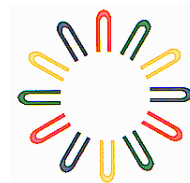


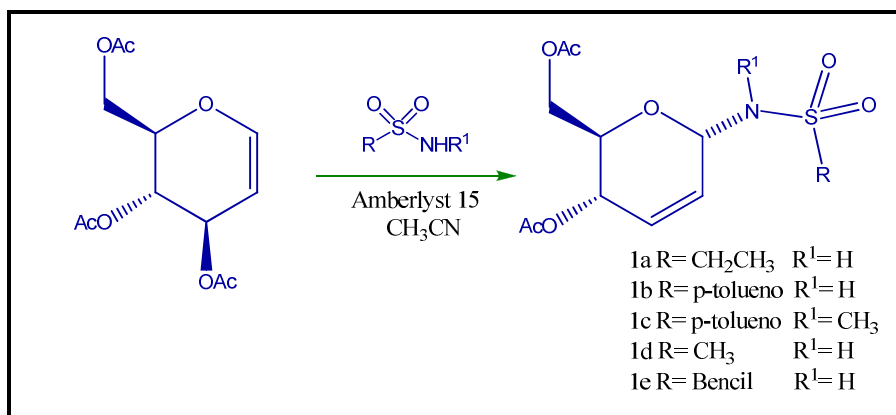
Tabla 1: Reacción de 3,4,6-Tri-O-acetil-D-glucal con etanosulfonamida^a

% Peso Amberlyst 15	Tiempo(min)	Temperatura(°C)	$\alpha:\beta^b$	Rendimiento (%)
10	60	25	87:13	78
20	60	25	87:13	80
30	50	25	87:13	94
30	30	40	87:13	86
40	40	25	87:13	76

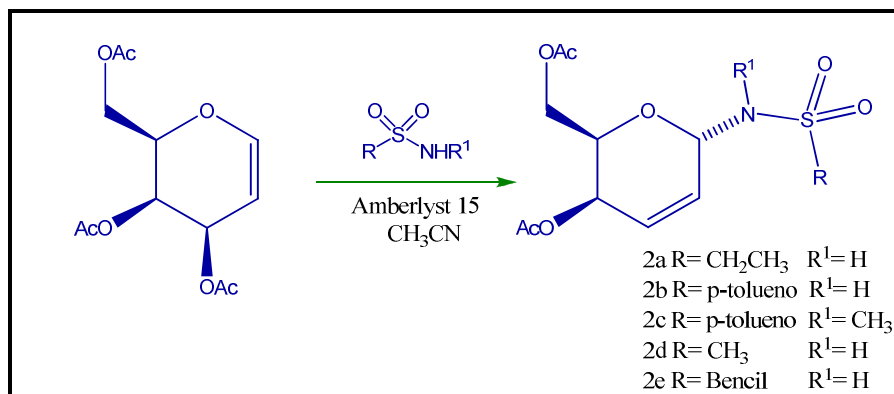
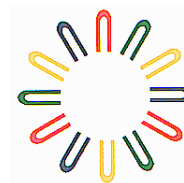
^aTodas las reacciones fueron realizadas en CH₃CN usando 1,1 mmol de la sulfonamida y 1 mmol de tri-O-acetil-D-glucal

^bLas proporciones anoméricas fueron determinadas mediante análisis espectroscópico de RMN 1H (200 MHz)

Se observa que el empleo de 30% en peso de Amberlyst 15, proporciona altos rendimientos. Utilizando 10 ó 20% de Amberlyst 15, el rendimiento disminuye en el mismo tiempo de reacción. El uso de altas cantidades del catalizador provoca bajos rendimientos, de forma similar al incrementar la temperatura. Los resultados enunciados permiten determinar que las condiciones óptimas de reacción son: 30% en peso de Amberlyst 15 a temperatura ambiente.



Esquema 4: Síntesis de glicosilsulfonamidas a partir de 3,4,6-Tri-O-acetil-D-glucal



Esquema 5: Síntesis de glicosilsulfonamidas a partir de 3,4,6-Tri-O-acetil-D-galactal

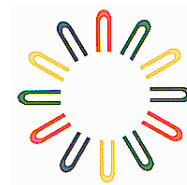
La aplicación de estas condiciones a la reacción de 3,4,6-tri-O-acetil-D-glucal y 3,4,6-tri-O-acetil-D-galactal con varias sulfonamidas (Esquemas 4 y 5), permitió obtener las correspondientes glicosilsulfonamidas (Tabla 2). La mezcla de reacción pudo ser fácilmente purificada por cromatografía en columna. Los datos de los espectros de ¹H y ¹³C RMN, confirmaron la configuración anomérica de los sulfonamidoglicósidos obtenidos en cada reacción, por comparación con los datos de la literatura.^{4c} La selectividad de la reacción estuvieron de acuerdo con los resultados previamente descritos en nuestro laboratorio.^{4c}

Tabla 2: Reacción de 3,4,6-Tri-O-acetil-D-glucal y 3,4,6-Tri-O-acetil-D-galactal con diferentes sulfonamidas

Glical	Sulfonamida	Tiempo(min)	α:β	Rto(%) [*]	Producto
Glucal	Metano	40	95:5	94	1a
	Etano	60	87:13(85:15)	90(95)	1b
	Bencilo	40	70:30	94	1c
	p-Tolueno	60	78:22(87:13)	82(95)	1d
	N-Metil-p-tolueno	60	87:13(95:5)	78(80)	1e
Galactal	Metano	40	95:5	75	2a
	Etano	50	84:16(83:17)	85(97)	2b
	Bencilo	60	95:5	72	2c
	p-Tolueno	60	90:10(80:20)	75(96)	2d
	N-Metil-p-tolueno	40	87:13(95:5)	70(86)	2e

^{*}Los rendimientos entre paréntesis, corresponden a los obtenidos empleando BF₃Et₂O^{4c}

En la denominada “química verde”, los catalizadores preferidos son aquellos que pueden ser reutilizados, debido a ello se analizó la posibilidad de reciclar el catalizador empleado. En este trabajo, las resinas Amberlyst 15 fueron fácilmente recuperadas de la mezcla de reacción por filtración y usadas seguidamente en un nuevo ciclo de reacción, luego de secarlas en estufa a 120 °C. Utilizando como



reacción típica la glicosilación de etanosulfonamida con D-glucal y el catalizador reciclado, se repitió este protocolo 2 veces, y los rendimientos obtenidos fueron siempre mayores ó iguales al 85% (Tabla 3) Se observó además que el empleo del catalizador reciclado no influyó en la selectividad anomérica.

Tabla 3: Reusabilidad de Amberlyst 15 como catalizador para la sulfonamidoglicosilación de 3,4,6-Tri-O-acetil-D-glucal^a

Ciclo	Sulfonamida	Tiempo de reacción	Rendimiento (%)
1	Etano	40	94
2		40	90
3		40	85

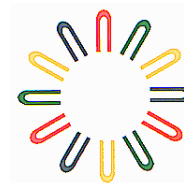
^aTodas las reacciones fueron realizadas en CH₃CN usando 1,1 mmol de etanosulfonamida y 1 mmol de tri-O-acetil-D-glucal

Discusión y Conclusiones

Comparando los productos **1a** a **1e**, se observa claramente una alta predominancia en la formación del isómero α . Esta preferencia se debe a la prevalencia del control cinético en las sulfonamidoglicosilaciones. Es decir, Este anómero es el producto que se forma más rápidamente, posiblemente al presentar la cara α del D-glicial un menor impedimento estérico que facilita el ataque del nucleófilo. Esto se ha descrito en detalle en una publicación en la cual se estudió la estabilidad conformacional de una glicosilsulfonamida.⁸ La estabilidad conformacional de las 2,3-enopiranosil sulfonamidas ha sido analizada mediante cálculos semiempíricos, mostrando que los anómeros β de los sulfonamidoglicósidos 2,3 insaturados son termodinámicamente más estables que los anómeros α .

Si bien los rendimientos obtenidos son ligeramente menores a los observados empleando BF₃·Et₂O, el uso de la resina Amberlyst 15 proporciona muy buenos rendimientos y simplifica el aislamiento de las N-glicosilsulfonamidas. Además debe destacarse su menor costo e impacto medioambiental, y la posibilidad de su reutilización, con mínima pérdida en su actividad.

En conclusión, las resinas Amberlyst 15 permiten obtener N-glicosilsulfonamidas con buenos rendimientos y alta α estereoselectividad. Las glicosilsulfonamidas **1b** y **2b** han mostrado actividad proliferativa en el rango micromolar frente a líneas celulares de carcinomas hepatocelular (Hep-G2) y pulmonar (A549) humanos. En cambio los glicósidos **1d** y **2d** han mostrado ser inhibidores poco potentes de la línea celular A549 pero presentan muy buena actividad frente a la Hep-



G2.⁹ Los productos obtenidos empleando bencilsulfonamida y metansulfonamida son nuevos y han sido caracterizados mediante punto de fusión y RMN (¹H, ¹³C, COSY, HSQC y NOESY). Posteriormente se realizarán ensayos para evaluar la actividad biológica de estos nuevos compuestos.

A continuación se detallan los datos espectroscópicos y puntos de fusión de algunas glicosilsulfonamidas sintetizadas en este trabajo. Se logró obtener el anómero α puro en cada caso mediante cristalización empleando como mezcla de solventes hexano/acetato de etilo (1:1).

Agradezco al CONICET, por el otorgamiento de una beca de postgrado, a la CIC por el financiamiento del proyecto, y al Dr. Rubén Rimada por la medición de los espectros RMN.

4,6-Di-O-acetil-2,3-dideoxi- α -D-*eritro*-hex-2-enopiranosil metansulfonamida (1a**)**

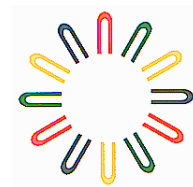
Agujas blancas: p.f : 92-93 °C ¹H RMN (CDCl₃) δ 5.86 (da, 1H, *J* 9.2 Hz, H-3), 5.84 (m, 2H, H-2, NH), 5.54 (da, 1H, *J* 9.2 Hz, H-1), 5.22 (dd, 1H, *J* 9.1, 1.6 Hz, H-4), 3.96 (ddd, 1H, *J* 9.1, 6.3, 2.4 Hz, H-5), 4.25 (dd, 1H, *J* 12.0, 4.3, 2.4 Hz, H-6a), 4.11 (dd, 1H, *J* 12.0, 6.3, 2.4 Hz, H-6b), 3.12 (s, 1H, CH₃), 2.07 (s, 1H, CH₃COO), 2.04 (s, 1H, CH₃COO); ¹³C RMN (CDCl₃) δ 170.76 (CH₃COO), 170.34 (CH₃COO), 130.60 (C-3), 126.88 (C-2), 76.63 (C-1), 67.68 (C-5), 64.65 (C-4), 63.45 (C-6), 43.23 (CH₃), 21,15 (CH₃COO), 20.94 (CH₃COO)

4,6-Di-O-acetil-2,3-dideoxi- α -D-*treo*-hex-2-enopiranosil metansulfonamida (2a**)**

Agujas blancas: p.f: 159-160 °C; ¹H RMN (CDCl₃) δ 6.01 (m, 1H, NH), 6.72 (ddd, 1H, *J* 10, 5.4, 1.6 Hz, H-3), 6.02 (dd, 1H, *J* 10.0, 3.1 Hz, H-2), 5.58 (ddd, 1H, *J* 9.1, 3.1, 1.6 Hz, H-1), 5.03 (dd, 1H, *J* 5.3, 1.7 Hz, H-4), 4.20 (m, 3H, H-5, 2xH-6), 3.12 (s, 1H, CH₃), 2.07 (s, 1H, CH₃COO), 2.02 (s, 1H, CH₃COO); ¹³C RMN (CDCl₃) δ 170.79 (CH₃COO), 170.58 (CH₃COO), 126.71 (C-3), 129.76 (C-2), 76.65 (C-1), 67.41 (C-5), 63.36 (C-4), 62.49 (C-6), 43.38 (CH₃), 20,94 (CH₃COO), 21.16 (CH₃COO)

4,6-Di-O-acetil-2,3-dideoxi- α -D-*treo*-hex-2-enopiranosil bencilo (2c**)**

Agujas blancas: p.f: 132-134 °C ¹H RMN (CDCl₃) δ 7.41-7.35 (m, 5H, Ph), 6.17 (ddd, 1H, *J* 9.9, 5.1, 1.91, H-3), 5.96(dd, 1H, *J* 9.9, 2.9 Hz, H-2), 5.75 (d, 1H, *J* 8.7 Hz, NH), 5.60 (ddd, 1H, *J* 8.7, 2.9, 1.7 Hz, H-1), 5.03 (dap, 1H, *J* 5.1 Hz, H-4), 4.54 (d, 1H, *J* 13.7 Hz, H-6a), 4.28 (m, 3H, CH₂H-5, H-6), 2.08 (s, 1H, CH₃COO), 1.95 (s, 3H, CH₃COO); ¹³C RMN (CDCl₃) δ 170.81 (CH₃COO), 170.57 (CH₃COO), 131.02, 129.11, 129.66, 128.87, 126.65 (Ph), 129.76 (C-2), 126.65 (C-3), 76.91 (C-1), 67.42 (C-5), 63.27 (C-4), 62.42 (C-6), 61,75 (CH₂), 21,15 (CH₃COO), 20.94 (CH₃COO).



Referencias bibliográficas:

- 1) Supuran, C.T. *Exp. Opin. Invest. Drugs* **2003**, 12, 283-287.
- 2) Jordan, M. A.; Wilson, L. *Nat. Rev. Cancer* **2004**, 4, 253-265.
- 3) Medina, J. C.; Roche, D.; Shan, B.; Learned, M.; Frankmoelle, W. P.; Clark, D. L.; Rosen, T.; Jaen, J. C. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1999**, 9, 1843-1846.
- 4) a) Colinas, P. A.; Bravo, R. D. *Organic Lett.* **2003**, 5, 4509-4511. b) Colinas, P. A.; Bravo, R. D. *Tetrahedron Lett.* **2005**, 46, 1687-1689. c) Colinas, P. A.; Bravo, R. D. *Carbohydrate Res.* **2007**, 342, 2297-2302. d) Colinas, P. A.; Núñez, N. A.; Bravo, R. D. *J. Carbohydrate Chem.* **2008**, 27, 141-147.
- 5) Colinas, P.A.; Bravo, R. D.; Vullo, D.; Scozzafava, A.; Supuran, C. T. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, 17, 5086-5090.
- 6) De Angelis, A.; Ingallina, P.; Perego, C. *Ind. Eng. Chem. Res.* **2004**, 43, 1169-1178.
- 7) a) Vogel, I.; Furniss, B.S.; Hannaford, A.J.; Rogers, B.; Smith, S.W.G.; Tatchell, A.R. *"Vogel's Textbook of Practical Organic Chemistry"*, 5ta ed. New York, **2000**. b) *Methods in carbohydrate chemistry Vol II*, 405-409. Ed. R. L. Whistler/ M. L. Wolfrom., Academic Press, N.Y., **1963**.
- 8) Alegre, M. L.; Pis Diez, R.; Colinas, P. A. *Journal of Molecular Structure.* **2009**, 919, 223-226.
- 9) García de Bravo, M. Inibiop (Facultad de Ciencias Médicas, UNLP). Comunicación personal.