UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS
DEPARTAMENTO DE QUIMICA

Trabajo de Tesis Doctoral

Síntesis y Análisis Estructural de Glicomiméticos como Potenciales Inhibidores Enzimáticos

Témpera, Carlos Agustín

Directores:
Bravo, Rodolfo Daniel
Colinas, Pedro Alfonso

Año 2013

***A mis abuelos
que me guían
desde el cielo***

***Agustín,
Carlos,
Carmen y
Elena***

***Esta Tesis Doctoral fue realizada
en el Laboratorio de Estudio de
Compuestos Orgánicos de la Facultad
de Ciencias Exactas de la
Universidad Nacional de La Plata,
bajo la dirección de los Dres. Rodolfo
Bravo y Pedro Colinas, por
intermedio de becas de postgrado
otorgadas por el CONICET.***

En este trabajo de Tesis debo entregar palabras de enorme agradecimiento a:

- *Mis directores: Pedro Colinas y Rodolfo Bravo, por dirigir mi trabajo en forma crítica, por sus enseñanzas, optimismo, y por brindarme su apoyo y confianza.*
- *A todos mis compañeros y amigos de laboratorio, que siempre estuvieron presentes durante el desarrollo de este trabajo, aportándome sus consejos y experiencias, momentos compartidos, y sobre todo por su amistad.*

Además agradezco a las siguientes instituciones:

- *Facultad de Ciencias Exactas (UNLP) por otorgarme el lugar de trabajo y desarrollo de mi docencia.*
- *Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por las becas obtenidas.*

*Y en especial agradecer a toda mi familia por haberme dado su apoyo incondicional para llevar a cabo esta labor de principio a fin. **Gracias de todo corazón!***

ÍNDICE DE CONTENIDOS

Objetivo	3
-----------------	----------

Introducción

<i>Anhidrasas Carbónicas e Inhibidores Enzimáticos: Fundamentos</i>	4
Anhidrasas carbónicas como drug targets	5
Mecanismos de catálisis e inhibición de anhidrasas carbónicas α	6
Búsqueda actual de inhibidores de anhidrasas carbónicas	10
Estructura general de inhibidores de anhidrasa carbónica	11
Sulfonamidas como inhibidores de anhidrasa carbónica	12
<i>Inhibidores de Isoformas IX y XII de Anhidrasa Carbónica</i>	15
Distribución tisular de CA IX y CA XII	15
Roles de CA IX y CA XII en tumores celulares	16
Sulfonamidas y derivados: inhibidores de CA IX y CA XII	17
Conclusiones	19
<i>Glicomiméticos como Potenciales Inhibidores Enzimáticos</i>	20
N-glicósidos	21
S-glicósidos	24
N-(hex-2-enopiranosil) sulfonamidas	30
Conclusiones	32
<i>Síntesis de N-glicosilsulfonamidas en nuestro laboratorio</i>	33
<i>N-glicosilsulfonamidas Saturadas</i>	33
Sulfonamidoglicosilación de glicales bencilados catalizada por HBr.PPh ₃	33
Síntesis de ribofuranosil sulfonamidas a partir de metil glicósidos	34
<i>N-glicosilsulfonamidas 2,3-Insaturadas</i>	35
Sulfonamidoglicosilación de D-glicales empleando BF ₃ .Et ₂ O	35
Síntesis de O- y N-glicósidos 2,3-Insaturados catalizada por HBF ₄ .SiO ₂ ⁸²	37
<i>El Efecto Anomérico</i>	39
<i>Antecedentes en el estudio conformacional de los carbohidratos</i>	39
El parámetro A en el equilibrio conformacional	40
<i>Causas del efecto anomérico</i>	42
<i>Efecto anomérico generalizado</i>	44
Efecto exo-anomérico	46
Efecto anomérico reverso	46
<i>Catalizadores ácidos heterogéneos: Resinas de Intercambio Iónico</i>	49

Introducción a la aplicación de Resinas de Intercambio Iónico en la Química	49
Orgánica	
Cómo se fabrica una resina	50
Grado de entrecruzamiento	50
Capacidad de intercambio iónico de una resina	51
Las resinas macroreticulares	51
Las resinas Amberlyst	51
Aplicaciones de las resinas Amberlyst	52

Parte Experimental

Parte experimental	55
Materiales y métodos	55
Equipos utilizados	55
Solventes y reactivos	55
Síntesis de materiales de partida	58
Síntesis de D-glicales	58
Preparación de glicósidos per-O-acetilados	65
Preparación general de Glicosil sulfamidas ⁷⁹	66
Síntesis de Nuevos Glicomiméticos empleando diversos catalizadores	68
Síntesis de N-glicosilsulfonamidas empleando Amberlyst 15	68
Síntesis de N-glicosilsulfonamidas saturadas a partir de piranosas per-O-acetiladas	76
Intentos iniciales de síntesis de N-disacáridos	80
Síntesis de N-disacáridos a partir de N-β-glicosilsulfamidas mediante Amberlyst 15	87
Síntesis de N-disacáridos empleando s-trioxano	89

Discusión de los Resultados

Discusión de los Resultados	96
Síntesis de N-glicosilsulfonamidas 2,3-insaturadas empleando Amberlyst 15	96
Análisis del espectro ¹ H y ¹³ C RMN del compuesto AM6:	99
Síntesis de N-glicosilsulfonamidas saturadas	103
Intentos iniciales de síntesis de N-disacáridos:	109
Intentos de Síntesis de N-disacáridos mediante Amberlyst 15	112
Síntesis de N-disacáridos partiendo de N-glicosilsulfamidas saturadas	112
Síntesis de N-disacáridos empleando s-trioxano	114
Análisis del espectro ¹ H y ¹³ C RMN del compuesto D2 junto con CT10:	117
Conclusiones	138

Objetivo

Como objetivo general, se propone desarrollar **Glicomiméticos** que puedan ser empleados en el diseño de inhibidores enzimáticos.

Objetivos particulares:

- ✓ Sintetizar pseudos *N*-disacáridos unidos mediante un grupo sulfonamido ó metilén bissulfonamido
- ✓ Realizar el análisis estructural de los compuestos obtenidos, empleando principalmente **Resonancia Magnética Nuclear**
- ✓ Estudiar la actividad biológica de los compuestos sintetizados como **Inhibidores Enzimáticos**.

Anhidrasas Carbónicas e Inhibidores Enzimáticos:

Fundamentos

A comienzos del siglo veinte, Ehrlich y Langley desarrollaron la idea de que ciertos compuestos pueden exhibir actividad biológica por medio de la unión a diversos componentes celulares.¹ Fue en ese momento que el viejo término “Drug Target” (en español: “objetivo farmacológico” ó “molécula objetivo”) comenzó a tener mucha relevancia.

Actualmente, muchas de las drug targets son proteínas derivadas del genoma humano que, mediante una interacción selectiva con determinados compuestos, pueden ser útiles para tratar una enfermedad ó para diagnosticarla.² Por ende, hay un gran interés en identificar las mismas en el proteoma humano, con el fin de diseñar drogas que puedan ser empleadas en el desarrollo de nuevas terapias para diversas enfermedades.

Varias drug targets, como la conocida Anhidrasa Carbónica (CA), se han identificado en estos últimos años, y su conocimiento ayuda enormemente a dilucidar el mecanismo de acción de las drogas y predecir las características que debe poseer un compuesto para ser útil farmacológicamente.

En estos últimos años, las enzimas que contienen metales (Metaloenzimas) han tomado un gran interés e importancia debido a la participación esencial en procesos de regulación genética en los que se hallan involucradas. El grupo más numeroso de metaloproteínas son las que presentan cinc en el sitio activo, con más de 300 conocidas hasta el presente, siendo una de las más conocidas la CA. Las mismas han ganado relevancia en el campo de las ciencias biomédicas, ya que la modulación de la actividad de estas metaloproteínas, mediante el empleo de pequeñas cantidades de drogas diseñadas para interactuar con el sitio activo, constituyen un área de desafíos para el diseño y descubrimiento de drogas.^{3,4} Además, el estudio mediante Cristalografía de Rayos X ha provisto de valiosa información en dicho campo.

¹ Silverman, R. B., Ed. *The Organic Chemistry of Drug Design and Drug Action*, 2nd ed.; Elsevier Academic Press, **2004**.

² Landry, Y.; Gies, J. P. *Fundam. Clin. Pharmacol.* **2008**, *22*, 1-18.

³ Anzellotti, A. L.; Farrell, N. P. *Chem. Soc. Rev.* **2008**, *57*, 1629-1651.

⁴ Jacobsen, F. E.; Lewis, J. A.; Cohén, S. E. *ChemMedChem* **2007**, *2*, 152-171.

Anhidrasas carbónicas como drug targets

Las anhidrasas carbónicas (CAs) se hallan presentes tanto en células eucariotas como procariotas.⁵ En mamíferos se han descubierto 16 isozimas α -CAs, con diferentes localizaciones subcelulares y distribución en tejidos. Básicamente hay 4 formas citosólicas (CA I-III, VII), 4 isozimas unidas a membranas (CA IV, IX, XII y XIV), una forma mitocondrial (CA V) y una isozima secretada, la CA VI. Estas enzimas catalizan la interconversión de dióxido de carbono a ión bicarbonato (Figura 1), hallándose involucradas en procesos fisiológicos cruciales, relacionados con la respiración y el transporte de CO_2 /bicarbonato, homeóstasis de pH y CO_2 , secreción de electrolitos en una amplia variedad de tejidos y órganos, reacciones biosintéticas (como gluconeogénesis, lipogénesis, y ureagénesis), reabsorción en huesos, calcificación, tumorigenicidad, y muchos otros procesos fisiológicos y patológicos.^{5,6} Por ello, estas enzimas son importantes drug targets para el diseño de inhibidores⁷ ó activadores con aplicaciones clínicas.

Figura 1: Hidratación reversible de CO_2 a bicarbonato.

⁵ A) Supuran, C. T. *Nat. Rev. Drug. Discov.* **2008**, 7, 168-181. B) Supuran, C. T.; Scozzafava, A.; Conway, J., Eds. *Carbonic Anhydrase: Its Inhibitors and Activators*; CRC Press: Boca Raton, FL, **2004**; 300-363, y referencias allí citadas. C) Supuran, C. T., Scozzafava, A.; Casini, A. *Med. Res. Rev.* **2003**, 23, 146-189. D) Krishnamurthy, V. M.; Kaufman, G. K.; Urbach, A. R.; Gitlin, L.; Gudiksen, K. L.; Weibel, D. B.; Whitesides, G. M. *Chem. Rev.* **2008**, 108, 946-1051. E) Stiti, M.; Cecchi, A.; Rami, M.; Abdaoui, M.; Barragán-Montero, V.; Scozzafava, A.; Guarí, Y.; Winum, J. Y.; Supuran, C. T. *Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 16130-16131. F) Smith, K. S.; Ferry, J. G. *FEMS Microbiol. Rev.* **2000**, 24, 335-366. G) Badger, M. R.; Price, G. D. *Annu. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol.* **1994**, 45, 369-392. H) Thiry, A.; Dogné, J. M.; Masereel, B.; Supuran, C. T. *Trends Pharmacol. Sci.* **2006**, 27, 566-573. I) Xu, Y.; Feng, L.; Jeffrey, P. D.; Shi, Y.; Morel, F. M. *Nature* **2008**, 452, 56-61. J) Lañe, T. W.; Morel, F. M. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, 97, 4627-4631. K) Hilvo, M.; Tolvanen, M.; Clark, A.; Shen, B.; Shah, G. N.; Waheed, A.; Halmi, P.; Hanninen, M.; Hamalainen, J. M.; Vihinen, M.; Sly, W. S.; Parkkila, S. *Biochem. J.* **2005**, 392, 83-92.

⁶ A) Nishimori, L.; Vullo, D.; Innocenti, A.; Scozzafava, A.; Mastrolorenzo, A.; Supuran, C. T. *Med. Chem.* **2005**, 48, 7860-7866. B) Nishimori, L.; Minakuchi, T.; Onishi, S.; Vullo, D.; Scozzafava, A.; Supuran, C. T. *Med. Chem.* **2007**, 50, 381-388. C) Vullo, I.; Voipio, J.; Innocenti, A.; Rivera, C.; Kanki, H.; Scozzafava, A.; Kaila, K.; Supuran, C. T. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, 75, 971-976. D) Whittington, D. A.; Waheed, A.; Ulmasov, B.; Shah, G. N.; Grubb, J. H.; Sly, W. S.; Christianson, D. W. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, 98, 9545-9550. E) Lehtonen, J.; Shen, B.; Vihinen, M.; Casini, A.; Scozzafava, A.; Supuran, C. T.; Parkkila, A. K.; Saarnio, J.; Kivelä, A.; Waheed, A.; Sly, W. S.; Parkkila, S. *Biol. Chem.* **2004**, 279, 2719-2727.

⁷ Los **inhibidores enzimáticos** son moléculas que se unen a enzimas y disminuyen su actividad. Puesto que el bloqueo de una enzima puede eliminar a un organismo patógeno o corregir un desequilibrio metabólico, muchos medicamentos actúan como inhibidores enzimáticos.

Mecanismos de catálisis e inhibición de anhidrasas carbónicas

α

El ión cinc Zn(II) , presente en todas las α -CAs investigadas hasta el presente, es esencial para la catálisis.⁵ Los estudios cristalográficos mediante Rayos-X muestran que el ión metálico se encuentra situado en la zona inferior de una profunda hendidura de 15 Å, perteneciente al sitio activo (Figura 2).

Figura 2: Coordinación del ión cinc en el sitio activo de la hCA II, con tres ligandos histidina (His94, His96 y His119) y dos residuos cercanos (Thr199 y Glu106).

El Zn se encuentra coordinado mediante 3 residuos de histidina (His 94, 96 y 119) y una molécula de agua ó un ión hidróxido.^{5,8,9} El enlace de cinc con el agua está también comprometido en interacciones del tipo puente de hidrógeno con el hidroxilo de tirosina (Thr199), el cual a su vez se une mediante un puente con la función carboxilato del ácido glutámico (Glu106). Estas interacciones incrementan la nucleofilicidad del enlace del cinc con la molécula de agua y orienta al sustrato (CO_2) hacia una ubicación favorable para el ataque nucleofílico (Figura 3).⁵

⁸ Briganti, F.; Mangani, S.; Orioli, P.; Scozzafava, A.; Vernaglione, G.; Supuran, C. T. *Biochemistry* **1997**, 36, 10384-10392.

⁹ Innocenti, A.; Scozzafava, A.; Parkkila, S.; Puccetti, L.; De Simone, G.; Supuran, C. T. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, 18, 2267-2271.

Figura 3: Representación esquemática del mecanismo catalítico para las α -CAs que catalizan la hidratación del CO_2 .

El proceso catalítico para las α -CAs puede esquematizarse de la siguiente manera, por las ecuaciones de la Figura 4.

Figura 4: Representación general de la reacción de hidratación catalítica de CO_2 .

Actualmente se conocen dos tipos principales de inhibidores de CA (abreviados CAIs)¹⁰: los inhibidores aniónicos y las sulfonamidas no sustituidas junto con grupos funcionales similares (sulfamatos, sulfamidas, etc.). Estos tipos de inhibidores se enlazan al Zn(II) por sustitución de un ligando no proteico, desplazando a la molécula de agua (Ecuación (I) en Figura 5) ó por adición a la esfera de coordinación del metal (Ecuación (II) en Figura 5), generando una especie con forma de bipirámide trigonal.^{5A-E,11} Las

¹⁰ La unión de un inhibidor puede impedir la entrada del sustrato al sitio activo de la enzima y/u obstaculizar que la enzima catalice su reacción correspondiente.

¹¹ A) Casini, A.; Antel, J.; Abbate, F.; Scozzafava, A.; David, S.; Waldeck, H.; Schäfer, S.; Supuran, C. T. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, 13, 841-845. B) De Simone, G.; Di Fiore, A.; Menchise, V.; Pedone, C.; Antel, J.; Casini, A.; Scozzafava, A.; Wurl, M.; Supuran, C. T. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, 15, 2315-2320. C) Menchise, V.; De Simone, G.; Alterio, V.; Di Fiore, A.; Pedone, C.; Scozzafava, A.; Supuran, C. T. *Med. Chem.* **2005**, 48, 5721-5727. D) Alterio, V.; Vitale, R. M.; Monti, S. M.; Pedone, C.; Scozzafava, A.; Cecchi, A.; De Simone, G.; Supuran, C. T. *Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 8329-8335. E) Abbate, F.; Winum, J. Y.; Potter, B. V.; Casini, A.; Montero, J. L.; Scozzafava, A.; Supuran, C. T. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, 14, 231-234. E) Winum, J. Y.; Temperini, C.; El Cheikh, K.; Innocenti, A.; Vullo, D.; Ciattini, S.; Montero, J. L.; Scozzafava, A.; Supuran, C. T. *Med. Chem.* **2006**, 49, 7024-7031.

sulfonamidas se enlazan al ión cinc, conformando una geometría tetraédrica con el átomo de nitrógeno de la sulfonamida coordinado a dicho ión y formando parte de una extensa red de enlaces de hidrógeno, involucrando residuos de Thr199 y Glu106. La parte heterocíclica ó aromática del inhibidor (abreviada como R en la Figura 5) interactúa con los residuos hidrofílicos e hidrofóbicos de la cavidad. Por otra parte, los aniones pueden enlazarse al ión metálico conformando un aducto tetragonal ó bipirámide trigonal, como por ejemplo el aducto tiocianato de la Figura 5. ^{5A-E,11D}

Figura 5: Mecanismo de inhibición de las α -CA mediante inhibidores del tipo sulfonamidas (a), y aniónicos (b).

Actualmente hay por los menos 30 drogas reportadas en desarrollo clínico, que poseen propiedades inhibitorias de CA (algunos ejemplos son los compuestos a-g de la Figura 6).⁵ Varias de estas moléculas clínicamente empleadas, tales como la acetazolamida (a), la metazolamida (b), etoxolamida (c), sultiama (d), y diclorofenamida (e) son conocidos desde hace décadas,

gracias a la búsqueda de nuevos diuréticos ó antiepilépticos durante los años 1950 y 1960.^{5,12} Aunque el empleo de estos compuestos como diuréticos no fue muy extenso, se observó que dichos inhibidores enzimáticos pueden ser empleados para el tratamiento sistemático del glaucoma.⁵ Este descubrimiento llevó a seguir desarrollando derivados para tratar este tipo de dolencia, por lo que en los años noventa, dos nuevos compuestos, la dorzolamida (f) y la brinzolamida (g), pudieron ser empleados como agentes antiglaucoma.⁵

Figura 6: Conocidas drogas con propiedades inhibitorias de CA.

Las aplicaciones clínicas de los CAIs son muy variadas, van desde los agentes diuréticos y antiglaucoma, a las drogas anticancerígenas, antiobesidad y antiepilépticas.^{5,12} El mayor inconveniente de diseñar este tipo de drogas es el de obtener inhibidores de isozimas selectivos para ser utilizadas en variadas aplicaciones farmacológicas.⁵

¹² A) Di Fiore, A.; Pedone, C.; D'Ambrosio, K.; Scozzafava, A.; De Simone, G.; Supuran, C. T. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 437-442. B) Scozzafava, A.; Briganti, E; Ilies, M. A.; Supuran, C. T. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 292-300. C) Scozzafava, A.; Menabuoni, L.; Mincione, E; Briganti, E; Mincione, G.; Supuran, C. T. *Med. Chem.* **2000**, *43*, 4542-4551. D) Abbate, E; Casini, A.; Owa, T.; Scozzafava, A.; Supuran, C. T. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 217-223. E) Abbate, E; Coetzee, A.; Casini, A.; Ciattini, S.; Scozzafava, A.; Supuran, C. T. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 337-341.

Búsqueda actual de inhibidores de anhidrasas carbónicas

Actualmente, la búsqueda de inhibidores está centrada en 5 frentes que tienen en cuenta los efectos farmacológicos siguientes:

- Drogas Antiglaucoma, como la dorzolamida y la brinzolamida.⁵ Las isozimas objetivos de estos compuestos son probablemente la CA II y la CA XII.
- Drogas Anticancerígenas, teniendo como objetivos primarios las CA IX y la CA XII, isozimas predominantes en tumores celulares (este aspecto se discutirá más adelante).^{5H}
- Agentes Antiobesidad, basados en los efectos reportados para los fuertes inhibidores de CA, topiramato^{11A} y zonisamida,^{11B} los cuales tienen probablemente como objetivo las isoformas mitocondriales CA VA y/o CA VB.
- Anticonvulsionantes, probablemente las CA II, VII, XII, y XIV como objetivos a inhibir.
- Antibacteriales, fungicidas, y otros tipos de agentes, tienen como objetivos varias CAs de microorganismos patogénicos.

Estructura general de inhibidores de anhidrasa carbónica

En la actualidad se comprenden en gran detalle los mecanismos de catálisis e inhibición de CA, y esto puede ayudar en el diseño de inhibidores muy potentes y específicos. Gracias a ello, se observaron tres elementos estructurales básicos muy importantes en un inhibidor: armazón, cola y ZBF (función de enlace al cinc). Las modificaciones de la naturaleza de la estructura orgánica, la fracción cola de los inhibidores para obtener una unión más firme y eventualmente CAIs específicos de isozimas, ha llevado al desarrollo de dos modificaciones generales: a) La “**modificación al anillo**”, que consiste en el empleo de una gran variedad de sistemas de anillos (aromáticos ó heteroaromáticos) que se enlazan a una sulfonamida que actúa como ZBF, es empleada principalmente para el desarrollo de agentes antiglaucoma; y b) La “**modificación cola**”, la cual consiste en la unión de diferentes colas a las estructuras de las bien conocidas sulfonamidas aromáticas/heterocíclicas, utilizada para modular las propiedades fisicoquímicas tales como la solubilidad en agua y la capacidad de anclaje a la enzima. La estructura general de un inhibidor se detalla en la Figura 7.

Figura 7: Estructura general de un inhibidor complejoado al sitio activo α -CA: se observa la ZBF, el armazón orgánico, y la cola. Ellos interaccionan con las partes hidrofílicas e hidrofóbicas del sitio activo (se muestran residuos aminoácidos representativos involucrados en la unión).

El tercer elemento estructural, las ZBFs, interaccionan directamente con el ión cinc de la enzima, y con los residuos Thr199 y Glu106, dos aminoácidos presentes en todas las CAs pertenecientes a la clase α (Figura 7). Además, la ZBF se halla vinculada a una fracción aromática ó heterocíclica que puede interactuar dentro de la cavidad enzimática con residuos hidrofílicos ó hidrofóbicos.

Este requerimiento estructural fue raramente tenido en cuenta, y hasta el comienzo de los años noventa, la fracción sulfonamida ($-\text{SO}_2\text{NH}_2$) fue considerada como ZBF de mayor importancia en el diseño de CAIs. En los últimos 10 años, hubo muchos progresos en la concepción de CAIs, incorporando estructuralmente nuevas funciones de anclaje como sulfamato, sulfamida, y *N*-sulfonamida/sulfamato/sulfamida sustituidas, vinculadas directamente a la fracción aromática/heterocíclica ó alifática.¹³ Otras ZBFs surgidas recientemente son los grupos fosfato/fosfonato.¹⁴

A continuación se detallarán algunos de los últimos descubrimientos reportados en el diseño de CAIs derivados del grupo sulfonamida.

Sulfonamidas como inhibidores de anhidrasa carbónica

Hasta la fecha, la función sulfonamida ($\text{R-SO}_2\text{NH}_2$) es considerada la ZBF de mayor importancia empleada en el diseño de CAIs. El primer caso descrito fue la de la sulfanilamida (compuesto (a) de la Figura 8), por Mann y Keilin¹⁵ en 1940, la cual fue ampliamente usada en la concepción de CAIs teniendo importantes aplicaciones biomédicas, esencialmente como agentes diuréticos y antiglaucoma. Otras sulfonamidas importantes son la acetazolamida (b), metazolamida (c), diclorofenamida (d), etoxolamida (e), dorzolamida (f), y brinzolamida (g),¹⁶ (Figura 8).

¹³ A) Winum, J. Y.; Scozzafava, A.; Montero, J. L.; Supuran, C. T. *Curr. Top. Med. Chem.* **2007**, 7, 835-848. B) Winum, J.-Y.; Scozzafava, A.; Montero, J.-L.; Supuran, C. T. *Mini Rev. Med. Chem.* **2006**, 6, 921-936.

¹⁴ Winum, J.-Y.; Scozzafava, A.; Montero, J.-L.; Supuran, C. T. *Curr. Pharm. Des.* **2008**, 14, 615-621.

¹⁵ Mann, T.; Keilin, D. *Nature* **1940**, 146, 164-165.

¹⁶ Mincione, R.; Scozzafava, A.; Supuran, C. T. *Curr. Pharm. Des.* **2008**, 14, 649-654.

Figura 8: Varias CAIs empleadas en medicina.

Varias sulfonamidas originalmente descriptas y diseñadas para otros fines bioquímicos, fueron identificadas posteriormente como inhibidores de varias isozimas CA. El compuesto llamado indisulan (h) (Figura 9), una droga antitumoral descubierta por la empresa Eisai Co., se halla actualmente en desarrollo clínico para el tratamiento de tumores sólidos, como un inhibidor del ciclo celular y un potente CAI con constante de inhibición de 15 nM, para el caso de la hCA II.¹⁷ En el caso de la droga antiepiléptica zonisamida (i), se descubrió que presenta propiedades inhibitorias frente a muchas isozimas relevantes de la CA (K_1 (hCA II) = 35 nM).¹⁸ Lo mismo fue demostrado para la antipsicótica sulpirida (j) (K_1 (hCA II) = 40 nM).¹⁹

Figura 9: Estructuras de varios inhibidores de anhidrasa carbónica.

¹⁷ Abbate, E; Casini, A.; Owa, T.; Scozzafava, A.; Supuran, C. T. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 217-223.

¹⁸ De Simone, G.; Di Fiore, A.; Menchise, V.; Pedone, C.; Antel, J.; Casini, A.; Scozzafava, A.; Wurl, M.; Supuran, C. T. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *75*, 2315-2320.

¹⁹ Abbate, F.; Coetzee, A.; Casini, A.; Ciattini, S.; Scozzafava, A.; Supuran, C. T. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 337-341.

En los últimos años, la función sulfonamida ha sido empleada como modelo de ZBF para el desarrollo de nuevos compuestos, especialmente teniendo como objetivo isoformas específicas de CA, como la CA IX asociada a tumores de transmembrana.²⁰

Otro concepto desarrollado para el diseño de inhibidores selectivos de CA, es la “modificación del carbohidrato”, que consiste en la incorporación de fracciones de glicósidos en diferentes esqueletos de sulfonamidas aromáticas/heterocíclicas.²⁰ Esta aproximación fue descripta inicialmente para el desarrollo de efectivos agentes antiglaucoma. En la Figura 10 se muestra un ejemplo: la estructura cristalina de alta resolución con rayos-X del aducto *N*-(4-sulfamoilfenil)- α -D-glucopiranosilamina (k).²¹

Figura 10: Estructura de Rayos-X del complejo hCA II-(k).

²⁰ Winum, J.-Y; Poulsen, S. A.; Supuran, C.-T. *Med. Res. Rev.* **2009**, 29, 419-435.

²¹ Di Fiore, A.; Scozzafava, A.; Winum, J.-Y; Montero, J.-L.; Pedone, C.; Supuran, C. T.; De Simone, G. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, 17, 1726-1731.

Inhibidores de Isoformas IX y XII de Anhidrasa

Carbónica

El cáncer representa una situación patológica caracterizada por numerosas intervenciones a niveles tisulares, celulares y moleculares. Incluye no sólo mutaciones y cambios epigenéticos que resultan en una disminución de la muerte celular y un incremento en la proliferación (y por lo tanto un aumento en los requerimientos energéticos y en el consumo de oxígeno y nutrientes), sino también anormalidades fisiológicas (tales como una baja entrega de oxígeno y nutrientes), que pueden ocasionar metabolismo anaeróbico, el cual genera productos ácidos causando un desbalance ácido-base.²² Dicho metabolismo tumoral requiere anhidrasas carbónicas como una parte de la maquinaria regulatoria que permita a las células cancerígenas adaptarse y sobrevivir a estas condiciones anormales. El mecanismo de cómo las anhidrasas carbónicas protegen a dichas células de este medio estresante, ha surgido recientemente de estudios de dos isoformas de la CA, la CA IX (casi exclusivamente asociada a tumores), y la CA XII (sobreexpresada en varios tipos de tumores). Estas dos isozimas han despertado un gran interés, no sólo por ser constituyentes de la fisiología tumoral, sino también por ser potenciales drug targets.²³

Distribución tisular de CA IX y CA XII

La CA IX es expresada en unos pocos tejidos normales, pero esta expresión es inducida en un amplio espectro de tumores humanos. La expresión más abundante de CA IX en tejidos normales fue hallada en la mucosa del estómago y en la vesícula biliar.²⁴ En tanto que se observó una débil expresión de CA IX en el epitelio del conducto pancreático,²⁵ en el epitelio

²² Brahimi-Horn, M. C.; Pouysségur, J. *Essays Biochem.* **2007**, *43*, 165-178.

²³ Pastorekova, S.; Parkkila, S.; Zavada, J. *Adv. Clin. Chem.* **2006**, *42*, 167-216.

²⁴ Püslörekövi, S.; Parkkila, S.; Parkkila, A. K.; Opavsky, R.; Zelnik, V.; Saarnio, J.; Pastorek, J. *Gastroenterology* **1997**, *772*, 398-408.

²⁵ Kivela, A.; Parkkila, S.; Saarnio, J.; Karttunen, T. J.; Kivela, J.; Parkkila, A. K.; Pastorekova, S.; Pastorek, J.; Waheed, A.; Sly, W. S.; Rajanien, H. *Histochem. Cell Biol* **2000**, *114*, 197-204.

intestinal,²⁶ en órganos reproductivos masculinos y en células que recubren la cavidad del cuerpo.^{27,28}

Por otro lado, la CA IX es expresada en niveles relativamente altos y con una alta prevalencia en diferentes tejidos tumorales: carcinomas del cuello uterino, esófago, riñón, mama, cerebro, etc.²⁹ Sólo se halla ausente en tejidos normales y carcinomas de próstata.³⁰

En cuanto a la CA XII, se ha observado que se sobreexpresa en varios tipos de tumores tales como carcinomas celulares renales, tumores ováricos, de mama, de cuello uterino, y cerebrales,^{28,31} pero la relación de esta CA con el cáncer no es tan clara como la que presenta la CA IX. La expresión de CA XII ha sido detectada en muchos tejidos normales²⁸ tales como en riñón, páncreas, colon, próstata, ovarios, testículos, pulmón, y cerebro.³²

Roles de CA IX y CA XII en tumores celulares

Debido a que las CA IX y XII son enzimas extracelulares activas involucradas en el metabolismo de CO₂, se hallan implicadas en la acidificación de la microenvoltura extracelular, y al mismo tiempo, en la protección de las células cancerígenas de la acidosis. La evidencia experimental de esta propuesta viene dada por estudios sobre la CA IX.^{33,34,35}

²⁶ Saarnio, J.; Parkkila, S.; Parkkila, A. K.; Waheed, A.; Casey, M C; Zhou, X. Y; Pastorekova, S.; Pastorek, J.; Karttunen, T.; Haukipuro, K.; Kairaluoma, M. I.; Sly, W. S. *J. Histochem. Cytochem.* 1998, **46**, 497-504.

²⁷ Karhumaa, P.; Kaunisto, K.; Parkkila, S.; Waheed, A.; Pastorekova, S.; Pastorek, J.; Sly, W. S.; Rajaniemi, H. *Mol Hum. Reprod.* **2001**, **7**, 611-616.

²⁸ Ivanov, S.; Liao, S. Y.; Ivanova, A.; Danilkovich-Miagkova, A.; Tarasova, N.; Weirich, G.; Merrill, M. J.; Proescholdt, M. A.; Oldfield, E. H.; Lee, J.; Zawada, J.; Waheed, A.; Sly, W.; Lerman, M. L.; Stanbridge, E. J. *Ara. J. Pathol.* **2001**, **158**, 905-919.

²⁹ A) Liao, S. Y.; Brewer, C.; Zavada, J.; Pastorek, J.; Pastorekova, S.; Vianetta, A.; Berman, M. L.; DiSaia, P. J.; Stanbridge, E. J. *Am. J. Pathol* **1994**, **145**, 598-609. B) Turner, J. R.; Odze, R. D.; Crum, C. R.; Resnick, M. B. *Hum. Pathol.* **1997**, **28**, 740-744. C) Liao, S. Y.; Aurelio, O. N.; Jan, K.; Zavada, J.; Stanbridge, E. J. *Cancer Res.* 1997, **57**, 2827-2831.

³⁰ Saarnio, J.; Parkkila, S.; Parkkila, A. K.; Haukipuro, K.; Pastoreková, S.; Pastorek, J.; Kairaluoma, M. L.; Karttunen, T. *Am. J. Pathol.* **1998**, **153**, 279-285.

³¹ A) Watson, P. H.; Chia, S. K.; Wykoff, C. C.; Han, C.; Leek, R. D.; Sly, W. S.; Gatter, K. C.; Ratcliffe, P. J.; Harris, A. L. *Br. J. Cancer* 2003, **88**, 1065-1070. B) Kivelä, A. J.; Parkkila, S.; Saarnio, J.; Karttunen, T. J.; Kivelä, J.; Parkkila, A. K.; Bartosova, M.; Mucha, V.; Novak, M.; Waheed, A.; Sly, W. S.; Rajaniemi, H.; Pastoreková, S.; Pastorek, J. *World J. Gastroenterol.* **2005**, **11**, 2616-2625.

³² Türeci, O.; Sahin, U.; Vollmar, E.; Siemer, S.; Gottert, E.; Seitz, G.; Parkkila, A. K.; Shah, G. N.; Grubb, J. H.; Pfreundschuh, M.; Sly, W. S. *Proc. Natl Acad. Sci USA* **1998**, **95**, 7608-7613.

³³ Svastova, E.; Hulikova, A.; Rafajova, M.; Zat'ovicova, M.; Gibadulinova, A.; Casini, A.; Scozzafava, A.; Supuran, C. T.; Pastorek, J.; Pastorekova, S. *FEBS Lett.* **2004**, **577**, 439-495.

³⁴ Swietach, R.; Wigfield, S.; Cobden, P.; Supuran, C. T.; Harris, A. L.; Vaughan-fones, R. D. *Biol Chem.* **2008**, **283**, 20473-2048.

³⁵ Chiche, J.; Laferrière, J.; Trotter, E.; Dayan, E.; Mazure, N. M.; Brahimi-Horn, M. C.; Pouyssegur, J. *Cancer Res.* **2009**, **69**, 358-368.

Las células tumorales necesitan una regulación del pH y del transporte de iones para adaptarse a la acidosis, y esto induce la expresión de CA IX/XII para que tomen parte en estos procesos. La participación funcional de CA IX en la regulación del pH, se halla validada por tres experiencias experimentales. Primero, contribuye a la acidificación del microentorno extracelular de células hipóxicas,³³ segundo, minimiza el gradiente de pH intracelular, e incrementa el gradiente de pH extracelular en el núcleo tumoral,³⁴ y tercero contribuye a la acidificación extracelular (incluso también la CA XII contribuye a tal efecto), y a un pH más alcalino en el entorno intracelular en respuesta a la carga de CO₂ y por lo tanto, apoya la supervivencia de las células en la acidosis.³⁵

El rol de la CA XII en la biología tumoral se halla mucho menos explorado. Además de que la CA XII contribuye al control del pH y crecimiento tumoral,³⁵ se ha demostrado que la inhibición de la CA XII ocasiona una disminución del desarrollo de células del carcinoma renal in vitro.³⁶

Sulfonamidas y derivados: inhibidores de CA IX y CA XII como drogas anticancerígenas

El concepto de inhibidores de anhidrasa carbónica como drogas anticancerígenas ha sido formulado por Supuran y colaboradores, basándose en los efectos antiproliferativos de derivados del grupo sulfonamido, observados en líneas celulares de diversos tipos de tumores humanos.³⁷ Sin embargo, las sulfonamidas generalmente muestran inhibición no selectiva frente a diferentes isoenzimas CA.

De acuerdo a estudios recientes, la CA IX y/o la CA XII podrían ser inhibidas por muchos tipos de derivados de sulfonamidas ó compuestos relacionados. Además de las clásicas sulfonamidas como la acetazolamida, metazolamida, etoxolamida, y diclorofenamida, se observaron buenas a excelentes propiedades inhibitorias de la CA IX y/o la CA XII por parte de sulfonamidas heterocíclicas y aromáticas,³⁸ derivadas de

³⁶ Parkkila, S.; Rajaniemi, H.; Parkkila, A. K.; Kivela, J.; Waheed, A.; Pastoreková, S.; Pastorek, J.; Sly, W. S. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, 97, 2220-2224.

³⁷ A) Supuran, C.T.; Scozzafava, A. *Expert Opin. Ther. Pat.* **2000**, 70, 575-600. B) Supuran, C. T.; Briganti, R.; Tilli, S.; Chegwidan, W. R.; Scozzafava, A. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, 9, 703-714.

³⁸ A) Vullo, D.; Franchi, M.; Gallón, E.; Pastorek, J.; Scozzafava, A.; Pastorekova, S.; Supuran, C. T. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, 13, 1005-1009. B) Jaiswal, M.; Khadikar, P. V.; Scozzafava, A.; Supuran, C. T.

halogenosulfanilamida y halogenofenilaminobenzolamida,³⁹ sulfonamidas lipofílicas,⁴⁰ sulfamatos,^{41,42} sulfonamidas conteniendo flúor,⁴³ la sulfonamida E7070 desarrollada originalmente como agente anticáncer que bloquea el ciclo celular,⁴⁴ derivados sulfanilamida/acetazolamida obtenidos por aproximación cola,⁴⁵ sulfonamidas incorporando fracciones hidrazina,⁴⁶ *N*-hidroxisulfamidas,⁴⁷ etc.

La selectividad de los inhibidores⁴⁸ frente a la CA IX y/o CA XII puede ser lograda a través de la modulación de las propiedades físicas y químicas, mediante inserción de varias cadenas laterales y otras modificaciones.^{49,50} Ciertas alteraciones pueden introducir ó mejorar la impermeabilidad de membrana, de forma de que el inhibidor se una sólo o en forma predominante a las CAs extracelulares.⁵¹ Otras modificaciones pueden afectar a la topología de tamaño ó superficie para lograr ubicarse mejor dentro de la cavidad del sitio activo de la CA IX/XII que dentro de otras isoformas. Varios tipos de modificaciones mejoran a los inhibidores, a tal punto de poder actuar a concentraciones subnanomolares.⁴³ Estos estudios revelaron que varios compuestos con una relación de selectividad razonable, favorecen la inhibición de actividad frente a la CA IX/XII, comparando con otras isoformas, en particular la CA II.

Bioorg. Med. Chem. Lett. **2004**, *14*, 3283-3290. C)Ozensoy, O.; Pucetti, L.; Fasolis, G.; Arslan, O.; Scozzafava, A.; Supuran, C. T. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 4862-4866.

³⁹ Ilies, M. A.; Vullo, D.; Pastorek, J.; Scozzafava, A.; Ilies, M.; Caproiu, M. T.; Pastorekova, S.; Supuran, C. T. *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 2187-2196.

⁴⁰ Franchi, M.; Vullo, D.; Gallori, E.; Pastorek, J.; Russo, A.; Scozzafava, A.; Pastorekova, S.; Supuran, C. T. *Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2003**, *18*, 333-338.

⁴¹ Winum, J. Y.; Vullo, D.; Casini, A.; Montero, J. L.; Scozzafava, A.; Supuran, C. T. *Med. Chem.* **2003**, *46*, 2197-2204.

⁴² Winum, J. Y.; Pastorekova, S.; Jakubickova, L.; Montero, J. L.; Scozzafava, A.; Pastorek, J.; Vullo, D.; Innocenti, A.; Supuran, C. T. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 573-578.

⁴³ Vullo, D.; Scozzafava, A.; Pastorekova, S.; Pastorek, J.; Supuran, C. T. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 2351-2356.

⁴⁴ E.; Casini, A.; Owa, T.; Scozzafava, A.; Supuran, C. T. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 225-229.

⁴⁵ Turkmen, H.; Dugrun, M.; Yilmaztekin, S.; Emul, M.; Innocenti, A.; Vullo, D.; Scozzafava, A.; Supuran, C. T. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *17*, 367-372.

⁴⁶ Winum, J. Y.; Dogne, J. M.; Casini, A.; de Leval, X.; Montero, J. L.; Scozzafava, A.; Vullo, D.; Innocenti, A.; Supuran, C. T. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 2121-2125.

⁴⁷ Winum, J. Y.; Innocenti, A.; Nasr, J.; Montero, J. L.; Scozzafava, A.; Vullo, D.; Supuran, C. T. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 2353-2358.

⁴⁸ La efectividad de un inhibidor enzimático suele venir determinada por su especificidad (su incapacidad de unirse a otras proteínas) y su potencia (su *K_i*, que indica la concentración necesaria para inhibir a una enzima). Una alta especificidad y potencia asegura que el medicamento tendrá pocos efectos secundarios, y por tanto una baja toxicidad.

⁴⁹ Scozzafava, A.; Mastrolorenzo, A.; Supuran, C. T. *Expert Opin. Ther. Pat.* **2004**, *14*, 667-702.

⁵⁰ Winum, J. Y.; Scozzafava, A.; Montero, J. L.; Supuran, C. T. *Curr. Pharm. Des.* **2008**, *14*, 615-621.

⁵¹ A) Casey, J. R.; Morgan, P. E.; Vullo, D.; Scozzafava, A.; Mastrolorenzo, A.; Supuran, C. T. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 2337-2347. B) Pastorekova, S.; Casini, A.; Scozzafava, A.; Vullo, D.; Pastorek, J.; Supuran, C. T. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 869-873.

Conclusiones

El diseño y descubrimiento de inhibidores de CAs continúan siendo objeto de intensa búsqueda. La modulación de la ZBF en la estructura de los inhibidores ofrece oportunidades interesantes para el desarrollo de nuevas drogas. Utilizando la función sulfonamida clásica como modelo de ZBF, pueden obtenerse potentes inhibidores de CA con selectividad hacia varios de los objetivos de la química medicinal que pertenecen a la familia de las enzimas.

Las CA IX y XII se han convertido en macromoléculas muy interesantes a ser tenidas en cuenta para el tratamiento de diversas enfermedades. El estudio molecular y funcional conduce a un mejor entendimiento de los mecanismos de control de pH que operan en células hipóxicas, a la elucidación de respuestas adaptativas a la hipoxia, y a la acidosis que conlleva a la progresión de tumores.^{22,52} Debido al patrón de expresión asociado a tumores, estas enzimas (particularmente la CA IX) pueden proveer clínicamente información valiosa de diagnóstico y/o pronóstico.⁵³ Numerosas evidencias experimentales sustentan estos hechos, mostrando que son un excelente objetivo para la inmunoterapia.⁵⁴ Sin embargo, esto se encuentra en una etapa temprana en la investigación preclínica, y requiere aún más tiempo y esfuerzo.

⁵² Pastorekova, S.; Ratcliffe, P. J.; Pastorek, J. *BJU Int.* **2008**, *101* (Suppl. 4), 8-15.

⁵³ Oosterwijk, E. *BJU Int.* **2008**, *101* (Suppl. 4), 2-7.

⁵⁴ Potter, C. P.; Harris, A. L. *Br. J. Cáncer* **2003**, *89*, 2-7.

Glicomiméticos como Potenciales Inhibidores

Enzimáticos

Los carbohidratos se han convertido en un gran foco de investigación bioquímica y biológica.⁵⁵ Dichos compuestos pueden ser considerados como una clase importante de biomoléculas ya que conforman parte de productos naturales, son fuentes de energía metabólica, y partícipes en procesos de reconocimiento celular. La alta variedad de grupos funcionales y de estructuras complejas⁵⁶ representan un gran desafío para los químicos orgánicos sintéticos.

Dentro de los procesos de reconocimiento biológico representados por los carbohidratos se encuentran respuestas inmunológicas, infecciones, inflamaciones, metástasis y desarrollo de células.

Los mecanismos que relacionan a los carbohidratos con numerosas enfermedades se hallan todavía escasamente estudiados. Asimismo, pocas veces se los considera para el desarrollo de drogas debido a la complejidad e hidrofiliidad que presentan, lo cual hace que no sean disponibles por vía oral.

Se ha demostrado que los carbohidratos se unen normalmente a determinados receptores pero presentan un punto débil: la falta de residuos hidrofóbicos y/o cargados ocasiona una débil afinidad por estos sitios. Los avances recientes en este campo han demostrado que algunos de estos problemas pueden ser abordados mediante el empleo de miméticos de carbohidratos (mimético: derivada de la palabra mimetismo, cuyo significado es “imitable”).⁵⁷ Por consiguiente, el diseño de miméticos que se enlacen a las enzimas, pero sin ser degradados por ellas, es un área interesante de investigación.

⁵⁵ A) Varki, A. *Glycobiology*. **1993**, 3, 97-130. B) Lis, H.; Sharon, N. *Eur. J. Biochem.* **1993**, 218, 1-27. C) Dwek, R. A. *Chem. Rev.* **1996**, 96, 683-720. D) Lee, Y. C.; Lee, R. T. *Acc. Chem. Res.* **1995**, 28, 321-340. E) Werz, D. B.; Seeberger, P. H. *Chem. Eur. J.* **2005**, 11, 3194-3206. F) Seeberger, P. H.; Werz, D. B. *Nature*. **2007**, 446, 1046-1051.

⁵⁶ A) Werz, D. B.; Ranzinger, R.; Herget, S.; Adibekian, A.; von der Lieth, C.-W.; Seeberger, P. H. *ACS Chem. Biol.* **2007**, 2, 685-691. B) Herget, S.; Toukach, P. V.; Ranzinger, R.; Hull, W. E.; Knirel, Y. A.; von der Lieth, C. W. *BMC Struct. Biol.* **2008**, 8, 35-48.

⁵⁷ Varios reviews en la química de miméticos de carbohidratos: A) Sears, P.; Wong, C. H. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, 38, 2300; *Angew. Chem.* **1999**, 111, 2446-2465. B) Gijzen, H. J. M.; Qiao, L.; Fitz, W.; Wong, C. H. *Chem. Rev.* **1996**, 96, 443-473. C) Wong, C. H. *Acc. Chem. Res.* **1999**, 32, 376-391.

Una problema para la aplicación de carbohidratos como drogas es la fragilidad del enlace glicosídico, por ello es que se busca sintetizar miméticos con mayor estabilidad. En los últimos años, una gran variedad de enlaces han tomado un considerable interés como miméticos de carbohidratos estables, debido a la resistencia que presentan frente a la degradación enzimática, y las posibilidades de ser empleados como inhibidores enzimáticos. Dentro de las modificaciones más comunes de uniones, podemos mencionar a los S-glicósidos, C-glicósidos y N-glicósidos. Esta nomenclatura considera que el oxígeno anomérico de un enlace glicosídico ha sido reemplazado por un azufre, un nitrógeno ó un átomo de carbono, respectivamente.

Así, el gran desarrollo de miméticos de carbohidratos, los **Glicomiméticos**, es impulsado principalmente por las propiedades de inhibición enzimática que ellos presentan. Por consiguiente, el campo de los glicomiméticos se halla bien posicionado a proveer una fuente rica de inspiración para el diseño de nuevos tipos de inhibidores enzimáticos.

A continuación se detallarán avances recientes en la síntesis de los glicomiméticos, enfocándose en los N-glicósidos y S-glicósidos.⁵⁸

N-glicósidos

Los N-glicósidos son una clase de glicomiméticos en los cuales el oxígeno anomérico ha sido reemplazado por un nitrógeno.⁵⁹ Dichos compuestos presentan un gran interés farmacéutico como agentes anticancerígenos.⁶⁰ Sin embargo, los métodos sintéticos para obtener enlaces N-glicosídicos son escasos.

Renaudet y Dummy publicaron una síntesis estereoselectiva de β -N(OMe) disacáridos enlazados (**6-8** Figura 11) empleando el método de Koenings-Knorr en 2002.⁶¹ Los nucleófilos que presentan una fracción hidroxilamina alquilada como **3**, pueden obtenerse mediante 4 pasos comenzando desde la α -D-glucopiranososa **1**. La reacción de glicosilación fue

⁵⁸ Para conocer ejemplos de síntesis de S- y C-glicósidos se recomienda el review Koester, Dennis C.; Holkenbrik, Annika; Werz, Daniel B. *Synthesis* **2010**, 19, 3217-3242.

⁵⁹ Neumann, J.; Weingarten, S.; Thiem, J. *Eur. J. Org. Chem.* **2007**, 1130-1144.

⁶⁰ A) He, Y.; Hinklin, R. J.; Chang, J.; Kiessling, L. L. *Org. Lett.* **2004**, 6, 44794-44815. B) Lian, S.; Su, H.; Zhao, B.-X.; Liu, W.-Y.; Zheng, L.-W.; Miao, J.-Y. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, 17, 7085-7092.

⁶¹ Renaudet, O.; Dumy, P. *Tetrahedron* **2002**, 58, 2127-2135.

realizada con donores bromoglicosidos del tipo de **4**, adicionando triflato de plata junto con carbonato de plata para obtener los disacáridos con puente de nitrógeno **5** y **7**, con rendimientos bajos (del 10 al 29%). Y todos los intentos de convertir la unidad *N*-OMe en *N*-H ó *N*-alquilo han fallado.

Figura 11: Disacáridos β -*N*(OMe) enlazados **6** y **8** mediante glicosilación del tipo Königs-Knorr.

En 2002, Pinto y colaboradores describieron la síntesis de 3 disacáridos unidos mediante nitrógeno con una fracción 4-tiogalacto-furanosil.⁶² El tioazúcar **9** fue sometido a una reacción de glicosilación con metil 3-amino-3-desoxi- α -D-manopiranosido **10** y los respectivos análogos **12** y **14** (Figura 12). La reacción fue llevada a cabo en reflujo de metanol con cantidades catalíticas de ácido acético, sin emplear protectores. Los disacáridos *N*-glicosídicos con uniones (1 $\rightarrow$ 3), (1 $\rightarrow$ 2) y (1 $\rightarrow$ 6) fueron obtenidos con rendimientos moderados de 52-66% y proporciones α/β de 1:3.

⁶² Randell, K. D.; Johnston, B. D.; Pinto, B. M. *Carbohydr. Res.* **2002**, 326, 145-162.

Figura 12: Preparación de disacáridos *N*-enlazados mediante catálisis ácida.

Un caso muy especial de uniones *N*-glicosídicas fue presentado en 2010 por Hackenberger y colaboradores.⁶³ Ellos sintetizaron glicopéptidos con uniones fosforamidato mediante la reacción de fosfito-Staudinger en un soporte sólido. El paso crucial de esta secuencia es la fosfitilación de un residuo serina protegido **16** incorporado en una cadena peptídica, para formar el péptido que contiene el dimetilfosfito. Éste fue sometido a una glicosilación con una glicosil azida para dar el glicopéptido con enlace fosforamidato **18** obteniéndose buenos rendimientos (Figura 13). La estereoquímica del carbono anomérico fue retenida durante la reacción de fosfito-Staudinger. Los grupos acetilos que actuaron como protectores fueron eliminados por reacción con hidracina, dando el péptido **19**.

⁶³Jaradat, D. M. M.; Hamouda, H.; Hackenberger, C. P. R. *Eur. J. Org. Chem.* **2010**, 26, 5004-5009 .

Figura 13: Reacción de Staudinger-fosfitopara obtener glicopéptidos enlazados mediante un grupo fosforamidato 19 según Hackenberg.

S-glicósidos

La segunda clase de glicomiméticos considerada, está constituida por los S-glicósidos.⁶⁴ Usualmente estos tiosacáridos con un átomo de azufre interglicosídico son resistentes a los procesos metabólicos en cuanto a la ruptura del enlace glicosídico, por lo que pueden ser potentes herramientas para emplearlas como inhibidores.

Dentro de este grupo, la clase de glicósidos más importante dada la resistencia que ofrecen frente a enzimas, son las sulfonamidas anoméricas, las cuales presentan una función sulfonamida enlazada al centro anomérico de un carbohidrato. La síntesis típica de sulfonamidas se realiza mediante amonólisis de los correspondientes cloruros de sulfonilo, los cuales son en general preparados mediante cloración del sulfonato. Se ha descrito el anclaje de varios ácidos sulfónicos y sus sales a esqueletos carbohidratados.⁶⁵ Los métodos generales para obtener dichos compuestos se lograron mediante un desplazamiento nucleofílico dado por un ácido tioacético ó tiourea en el correspondiente azúcar peracetilado. La subsecuente oxidación se llevó a cabo con dimetildioxirano, el cual provee las sales sulfónicas anoméricas en altos

⁶⁴ Para una revisión general de los S-glicósidos: Pachamuthu, K.; Schmidt, R. R. *Chem. Rev.* **2006**, 106, 160.

⁶⁵ A) Jakab, Z.; Fekete, A.; Borbás, A.; Lipták, A.; Antus, S., *Tetrahedron* **2010**, 66 (13), 2404-2414. B) Lipták, A.; Balla, E.; Jánossy, L.; Sajtos, F.; Szilágyi, L. *Tetrahedron Lett.* **2004**, 45 (4), 839-842.

rendimientos. Desafortunadamente el tratamiento de los sulfonatos con PCl_5 , POCl_3 ó SOCl_2 , generan mezcla de compuestos.⁶⁶ Knapp pudo aislar los correspondientes cloruros α -anoméricos a partir de las mezclas de reacción.⁶⁶ Se propuso que los cloruros de sulfonilo anoméricos son inestables, tienden a perder SO_2 , convirtiéndose rápidamente en los correspondientes cloruros. Es por ello que recientemente se han desarrollado estrategias más eficientes para preparar dichos compuestos.

La primera síntesis de S-glicosil sulfonamidas fue descrita por Knapp y otros (Figura 14).^{66A} La glucosil tiazolina **21** fue preparada previamente mediante la reacción de 1,3,4,6-tetra-O-acetil-2-acetamido-2-deoxi- β -D-glucopiranososa peracetilada **20** con el reactivo de Lawesson.⁶⁷ El tratamiento posterior con condiciones ácidas genera la tioglucopiranososa **22** con rendimiento cuantitativo. La reacción con bromo y dietilamina proporciona la correspondiente glicosil sulfenamida **23**. El paso final involucra la oxidación con ácido m-cloroperbenzoico, dando como producto la N,N-dietil-D-glucosilsulfonamida **24** para luego con NaOMe/MeOH obtener el compuesto **25** con un rendimiento global del 56% en 5 pasos.

Figura 14

Una pequeña serie de galactofuranosil sulfonamidas fueron preparadas por medio de oxidación de sulfenamidas con el objetivo de desarrollar

⁶⁶ A) Knapp, S.; Darout, E.; Amorelli, B., **2006**, 71 (4), 1380-1389. B) Czifrák, K.; Somsák, L. *Carbohydrate Research* **2009**, 344 (3), 269-277.

⁶⁷ Knapp, S.; Vocadlo, D.; Gao, Z.; Kirk, B.; Lou, J.; Withers, S. G. *Am. Chem. Soc.* **1996**, 118 (28), 6804-6805.

inhibidores del crecimiento micobacteriano (Figura 15).⁶⁸ La síntesis de glicosil sulfenamidas ha sido desarrollada mediante la reacción de tiolacetatos anoméricos peracetilados **27** con dietil bromalonato, en presencia de una dialquil amina. La oxidación posterior con un exceso de ácido m-cloroperbenzoico dá las correspondientes galactofuranosil sulfonamidas **29**. La desprotección usando metoxido de sodio en metanol lleva a los productos buscados en un rango de rendimientos de 75-92%. Desafortunadamente, sólo el *N,N*-dioctil derivado mostró actividad antimicrobacterial frente a *M. smegmatis* (ATCC 14468).

Figura 15

Posteriormente, el grupo de Poulsen reportó una metodología relacionada con lo anterior, para la síntesis de S-glicosil sulfonamidas mediante la oxidación de 2,4-dimetoxibencil sulfonamidas protegidas (Figura 16).⁶⁹ Estos compuestos han sido preparados por reacción de glicosil tioacetatos **31** con dietil bromalonato y 2,4-dimetoxibencilamina. La subsecuente oxidación con $\text{KMnO}_4/\text{CuSO}_4$ y la eliminación del grupo protector bajo condiciones ácidas, dieron lugar a las glicosilsulfonamidas per-O-acetiladas **33** (10-45% de rendimiento global en tres pasos). Aunque fueron usadas otras bencilaminas sustituidas para preparar las sulfenamidas intermediarias, sólo el grupo 2,3-dimetoxibencil pudo ser removido fácilmente para dar los productos finales. Los grupos acetilo de la fracción carbohidrato fueron removidos usando condiciones de Zemplén, para dar lugar a las S-glicosil sulfonamidas completamente

⁶⁸ Owen, D. J.; Davis, C. B.; Hartnell, R. D.; Madge, P. D.; Thomson, R. J.; Chong, A. K. J.; Coppel, R. L.; Von Itzstein, M., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, 17 (8), 2274-2277.

⁶⁹ Lopez, M.; Drillaud, N.; Bornaghi, L. F.; Poulsen, S. A., *J. Org. Chem.* **2009**, 74 (7), 2811-2816.

desprotegidas **34** con muy buenos rendimientos. Esta metodología se aplicó también a la síntesis de disacáridos enlazados mediante un puente sulfonamido.⁷⁰ La reacción de tioglicopiranosas **32** con diferentes glicosil aminas dieron lugar a los correspondientes sulfenamido disacáridos. La oxidación posterior con mCPBA y la desprotección con metóxido de sodio, llevó a obtener a los disacáridos con puente sulfonamido.

Figura 16

Esta fue la primera metodología general que permite la incorporación de puentes sulfonamido en lugar de enlace O-glicosídico.

Las sulfonamidas protegidas **35** y desprotegidas **36** fueron testeadas como CAIs.⁷¹ Dichos testeos se realizaron mediante ensayos de hidratación del CO_2 frente a las isozimas citosólicas hCA I y hCA II, y a las isozimas asociadas al cáncer hCA IX y XII. Desafortunadamente las sulfonamidas no mostraron selectividad alguna frente a las isozimas, con constantes de inhibición pobres en el rango micromolar. El grupo de Poulsen demostró, mediante cristalografía de rayos X, que las interacciones de las glicosilsulfonamidas con el sitio activo de la enzima son muy débiles. El carbohidrato de las sulfonamidas no provee un tamaño lo suficientemente voluminoso para ubicarse adecuadamente en la

⁷⁰ Lopez, M.; Bornaghi, L. F.; Innocenti, A.; Vullo, D.; Charman, S. A.; Supuran, C. T.; Poulsen, S. A. *J. Med. Chem.* **2010**, 53 (7), 2913-2926.

⁷¹ Lopez, M.; Paul, B.; Hofmann, A.; Morizzi, J.; Wu, Q. K.; Charman, S. A.; Innocenti, A.; Vullo, D.; Supuran, C. T.; Poulsen, S. A. *J. Med. Chem.* **2009**, 52 (20), 6421-6432.

hendidura del sitio activo, lo que ocasiona un alto grado de flexibilidad conformacional a los ligandos, provocando interacciones mínimas del inhibidor con el sitio activo.⁷¹

En el desarrollo de compuestos anticancerígenos que se enfoquen selectivamente en la isoforma enlazada a membrana CA IX versus la isoforma citosólica CA II, es crucial el diseño de inhibidores que no puedan atravesar la membrana. El grupo de Poulsen ha calculado la lipofilicidad y el área superficial polar topológica para las S-glicosil sulfonamidas, mostrando que todos los compuestos presentan una muy pobre permeabilidad de membrana. Aunque dichas sulfonamidas anoméricas no exhiben selectividad para las CAs asociadas al cáncer, sus propiedades fisicoquímicas conducirían a una inhibición preferencial de la transmembrana CA IX frente a la citosólica CA II.⁷¹

Al mismo tiempo, Somsák reportó una síntesis alternativa de S-glicosil sulfonamidas primarias (Figura 17).^{66B} El primer paso de la síntesis involucra la reacción de carbohidratos peracetilados con 3-sulfanilpropanoato de metilo en presencia de $\text{BF}_3\text{Et}_2\text{O}$, para dar los tioglicósidos con rendimientos moderados. La reacción de 1-tio- β -D-galactopiranososa **37** con 3-bromopropanoato de metilo dio lugar al β -tiogalactósido **38b** con un buen rendimiento y una excelente β -estereoselectividad. Su oxidación con ozono llevó lugar a la obtención de la sal de S-glicosil sulfinato primario **40**. Los sulfinatos fueron tratados con ácido hidroxilamino O-sulfónico para dar las sulfonamidas **36a-b**, con rendimientos moderados.

Figura 17

Recientemente la metodología de Poulsen fue empleada en la síntesis de sulfonamidas enlazadas con nuevos glicoconjugados (Figura 18).⁷² El primer paso involucra la reacción de glicosil tioacetatos **32** con aminas primarias para dar los sulfenamido glicoconjugados **41**. La oxidación de sulfenamidas con m-CPBA dan las sulfonamidas per-O-acetiladas **42**, con altos rendimientos. La desprotección mediante condiciones de Zemplen lleva a la obtención de los compuestos deseados **43**. Los nuevos glicoconjugados fueron testeados frente a las isozimas de la anhidrasa carbónica. Los productos desprotegidos **43** mostraron ser mejores inhibidores que los correspondientes acetilados. Los glicoconjugados **42** y **43** son buenos inhibidores de la CA IX en el rango nanomolar, pero dicha inhibición fue más débil que para la CA II.⁷²

⁷² Lopez, M.; Bornaghi, L. F.; Driguez, H.; Poulsen, S. A., *J. Org. Chem.* **2011**, 76 (9), 2965-2975.

Figura 18

Ahora se describirá brevemente un subgrupo de los *N*-glicósidos, que ha sido estudiado en nuestro laboratorio.

***N*-(hex-2-enopiranosil) sulfonamidas**

En presencia de ácidos de Lewis, los D-glicales pierden los grupos presentes en la posición alílica mediante una reacción de desplazamiento nucleofílico seguida de un reordenamiento alílico, resultando en la formación de glicósidos 2,3-insaturados (Figura 19) Esto es lo que se conoce comúnmente como el reordenamiento de Ferrier.⁷³

Figura 19

En el 2004, el grupo de Chandrasekhar desarrolló la azaglicosilación de Ferrier de D-glucal **44**, en presencia de tris(pentafluorofenil)borano como catalizador tipo ácido de Lewis (Figura 20).⁷⁴ Las D-hex-2-enopiranosilsulfonamidas fueron obtenidas con buenos a altos rendimientos y con una baja selectividad α . También la azaglicosilación con sulfonamidas *N*-sustituidas dieron las correspondientes glicosilsulfonamidas con buenos

⁷³ Ferrier, R. J.; Zubkov, O. A., *Org. React.* **2003**, 62, 569-736.

⁷⁴ Chandrasekhar, S.; Reddy, C. R.; Chandrashekar, G. *Tetrahedron Lett.* **2004**, 45 (34), 6481-6484.

rendimientos. Los autores reportaron estas reacciones en presencia de $\text{BF}_3\text{Et}_2\text{O}$, pero dando lugar a una mezcla compleja de productos. En el apartado siguiente, en donde se detallan las síntesis llevadas a cabo en nuestro laboratorio, se detallarán métodos más eficientes y selectivos para la preparación de *N*-glicosilsulfonamidas.

Figura 20

Conclusiones

Durante las últimas décadas surgieron una gran variedad de métodos eficientes para sintetizar glicomiméticos. Los *N*-, *S*- ó *C*-glicósidos son la clase de glicomiméticos que más han llamado la atención particularmente gracias a la gran estabilidad enzimática que presentan. Los *N*- y *S*-glicósidos son sintetizados ocasionalmente de una manera análoga a los *O*-glicósidos, en cambio los *C*-glicósidos requieren un conjunto diferente de reacciones para su preparación, no discutidas aquí.

El desarrollo de una gran variedad de glicomiméticos ayudará al completo entendimiento de los procesos biológicos, y proveerá un gran arsenal de inhibidores para drug targets. El reemplazo de enlaces glicosídicos por otros resistentes a la actividad enzimática provee una gran ayuda frente al diseño de compuestos con actividad biológica, como inhibidores de anhidrasa carbónica, agentes antibacteriales y antitumorales. Las fracciones carbohidrato otorgan propiedades únicas para la conocida funcionalidad sulfonamido.

Es deseable que mejore nuestra comprensión de la interacción de los glicomiméticos con las enzimas, así se promueve el desarrollo de inhibidores enzimáticos y agentes antiproliferativos más eficaces, proporcionando a futuro herramientas de acceso cada vez más sencillas para el tratamiento de enfermedades.

Tabla 1: Reacción de Sulfonamidas con Tri-O-bencil-D-glicales.^a

Entrada	Glical	Sulfonamida	Tiempo(h)	Producto	Rto (%)
1	1a	Bencil	1.5	2a	86
2	1a	Etan	0.5	2b	90
3	1a	<i>N</i> -Metil- <i>p</i> -toluen	1.5	2c	70
4	1b	Bencil	2	3a	74
5	1b	Etan	1	3b	72

^a Todas las reacciones fueron realizadas en CH₂Cl₂ empleando 0.05 equivalente de HBr.PPh₃ y 1.1 equiv de sulfonamida.

Síntesis de ribofuranosil sulfonamidas a partir de metil glicósidos⁷⁶

Debido a que los glicales furanósidos no son sencillos de obtener, y se empleaban reactivos muy complejos para tal fin,⁷⁷ se llevaron a cabo estudios para proveer una vía de síntesis de sulfonamidoribofuranósidos a partir de metilribofuranósidos, utilizando BF₃.Et₂O como catalizador (Figura 22). En la Tabla 2 se representan algunos resultados obtenidos. Se observaron buenos y altos rendimientos, y un leve predominio del anómero β. Esto puede ser debido a que los efectos estereoselectivos son muy leves en los carbohidratos de cinco miembros.⁷⁸

Figura 22: Síntesis de ribofuranosil sulfonamidas empleando BF₃.Et₂O.

⁷⁶ Colinas, P. A.; Bravo, R. D. *Tetrahedron Lett.* **2005**, 46, 1687-1689.

⁷⁷ Bravo, F.; Kassou, M.; Díaz, Y.; Castellón, S. *Carbohydr. Res.* **2001**, 336, 83-97, y referencias allí citadas.

⁷⁸ Kirby, A. J. *The Anomeric Effect and Related Stereoelectronic Effects at Oxygen*; Springer: New York, 1983, capítulo B.

Tabla 2: Reacción de sulfonamidas con metil glicósidos.^a

Entrada	Metil glicósido	Sulfonamida	Proporción $\alpha:\beta^b$	Producto	Rto (%)
1	1	Bencil	46:54	3a	84
2	1	Etan	48:52	3b	85
3	1	<i>N</i> -Metil- <i>p</i> -toluen	40:60	3c	74
4	1	<i>N</i> -Butilbencil	50:50	3d	64
5	1	<i>N</i> -Isopropil- <i>p</i> -toluen	45:55	3e	16
6 ^c	1	Sulfamida	50:50	3f	70
7	2	<i>p</i> -Toluen	40:60	4a	75

a) Todas las reacciones fueron realizadas en CH₂Cl₂ empleando 1 equiv de BF₃.Et₂O y 1.5 equiv de sulfonamida a temperatura ambiente en presencia de MS 4A.

b) Las proporciones anoméricas se determinaron mediante espectroscopía RMN ¹H.

c) Reacción realizada en CH₃CN.

N-glicosilsulfonamidas 2,3-Insaturadas

Sulfonamidoglicosilación de D-glicales vía reordenamiento de Ferrier, empleando BF₃.Et₂O⁷⁹

Este estudio demostró que el catalizador más efectivo en las sulfonamidoglicosilaciones de D-glicales es el BF₃Et₂O (Figura 23). En todos los casos se observó un claro predominio del anómero α como producto (Tabla 3), y que el empleo de diferentes catalizadores tiene una pequeña influencia en las relaciones anoméricas.

Las glicosilsulfonamidas **4c** y **5c** (Tabla 4) obtenidas en este trabajo, fueron testeadas como inhibidores de la Isozima II de la anhidrasa carbónica, observándose buenas propiedades inhibitorias (constantes de inhibición de 58 y 6 nM).⁸⁰

Desafortunadamente esta última metodología tiene una importante desventaja: el BF₃.Et₂O 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 HClO₄.SiO₂ y HBF₄.SiO₂ (ácido perclórico y ácido tetrafluoroborónico inmovilizados en sílica gel), son eficientes para la sulfonamidoglicosilación. Aunque en estos casos los rendimientos son

⁷⁹ Colinas, P. A.; Bravo R. D. *Carbohydrate Res.* **2007**, *342*, 2297-2302.

⁸⁰ Colinas, P.A.; Bravo, R. D.; Vullo, D.; Scozzafava, A.; Supuran, C. T. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*, 5086-5090.

relativamente más bajos, se tiene la ventaja del reciclado de estos catalizadores para posteriores síntesis.^{81,82} Como puede observarse en la Tabla 3, en todos los casos se obtuvo mayoritariamente el anómero α . Este hecho puede explicarse en base al efecto *endo*-anomérico que favorece la formación del anómero *pseudo* axial. (Ver apartado **El Efecto Anomérico**).

Tabla 3: Reacción de 3,4,6-tri-O-acetil-D-glucal (1) y 3,4,6-tri-O-acetil-D-galactal (2) con p-toluensulfonamida.^a

Entrada	Glicol	Catalizador	Tiempo (h)	$\alpha:\beta$	Rto (%)
1		BF ₃ .Et ₂ O (1 mol%)	0.5	87:13	95
2	Glucal	HClO ₄ .SiO ₂ (135 mg) ^c	3	83:17	80
3		HBF ₄ .SiO ₂ (270 mg) ^d	0.5	85:15	84
4		BF ₃ .Et ₂ O (1 mol%)	0.5	80:20	96
5	Galactal	HClO ₄ .SiO ₂ (135 mg)	3	80:20	79
6		HBF ₄ .SiO ₂ (270 mg)	1.5	87:17	83

a) Todas las reacciones fueron realizadas usando 1 mmol del glicol y 1.1 equiv de la sulfonamida.

b) Las proporciones anoméricas fueron determinadas por espectroscopía ¹H RMN.

c) 0,5 mmol de HClO₄.SiO₂ g⁻¹. d) 0.5 mmol de HBF₄ g⁻¹.

Figura 23: Sulfonamidoglicosilación de D-glicales empleando BF₃.Et₂O.

La metodología empleada con estos catalizadores permite obtener productos con elevada pureza. Finalizada cada reacción, sólo es necesario

⁸¹ Colinas, P. A.; Núñez, N. A.; Bravo, R. D. J. *Carbohydrate Chem.* **2008**, 27, 141-147.

⁸² Rodríguez, O. M.; Colinas, P. A.; Bravo, R. D. *Synlett.* **2009**, 7, 1154-1156.

filtrar el catalizador y luego evaporar el solvente. Seguidamente los productos pueden ser purificados por recristalización ó por cromatografía en columna. Los catalizadores recuperados del medio de reacción han sido reutilizados hasta 3 veces sin que se observe alteración en el rendimiento ó en la relación anomérica de los glicósidos obtenidos.

Tabla 4: Reacción de 3,4,6-tri-O-acetil-D-glucal (1) y 3,4,6-tri-O-acetil-D-galactal (2) con diferentes sulfonamidas.^a

Entrada	Glical	Sulfonamida	Tiempo (h)	Producto	$\alpha:\beta$	Rto (%)
1	Glucal	Etan	0.5	4a	85:15	95
2		<i>N</i> -metil- <i>p</i> -toluen	1	4b	95:5	80
3		Sulfamida ^c	0.5	4c	95:5	89
4	Galactal	Etan	1.5	5a	83:17	97
5		<i>N</i> -metil- <i>p</i> -toluen	2	5b	95:5	86
6		Sulfamida ^c	1	5c	95:5	94

a) Todas las reacciones fueron realizadas usando 1 mmol del glical, 1.1 equiv de la sulfonamida y 1 mol % de $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ en CH_2Cl_2 .

b) Las proporciones anoméricas fueron determinadas por espectroscopía RMN ^1H . c) Reacción realizada en CH_3CN .

Síntesis de *O*- y *N*-glicósidos 2,3-Insaturados mediante reordenamiento de Ferrier de D-glicales catalizada por $\text{HBF}_4 \cdot \text{SiO}_2$ ⁸²

En este trabajo se empleó el ácido fluorborónico adsorbido en sílicagel ($\text{HBF}_4 \cdot \text{SiO}_2$) como catalizador heterogéneo en el reordenamiento de Ferrier de glicales per-*O*-acetilados con alcoholes y sulfonamidas para dar *O*- y *N*-glicósidos 2,3-Insaturados con muy buenos rendimientos y alta estereoselectividad α . (Figura 24). En la Tabla 5 se detallan algunas de las reacciones ensayadas. Como en el trabajo anteriormente descrito, se observó un claro predominio del anómero α como producto.

Figura 24: Obtención de *O*- y *N*-glicósidos 2,3-Insaturados mediante $\text{HBF}_4 \cdot \text{SiO}_2$.

Tabla 5: Reacción de 3,4,6-Tri-O-acetil-D-glucal y 3,4,6-Tri-O-acetil-D-galactal con diferentes nucleófilos.^a

Entrada	D-Glical	Nucleófilo	$\alpha:\beta$ ^b	Rto (%)
1	Glucal	<i>i</i> -PrOH	95:5	85
2		BnOH	83:17	91
3		Etansulfonamida	85:15	98
4	Galactal	Alcohol alílico	95:5	75
5		<i>i</i> -PrOH	80:20	70
6		BnOH	95:5	74
7		Etansulfonamida	90:10	97

^aTodas las reacciones fueron realizadas usando 0,5 mmol del glical,2 equiv de nucleófilo y 68mg de HBF₄·SiO₂ en MeCN.^bLas proporciones anoméricas fueron determinadas por espectroscopía RMN ¹H.^cReacción realizada con 4 equiv de nucleófilo.

Además se estudió la reutilización del catalizador, usando como reacción base la glucosilación del alcohol alílico. El HBF₄·SiO₂ fue fácilmente recuperado de la mezcla de reacción mediante filtración y posterior empleo directo en un nuevo ciclo de reacción (Tabla 6). El protocolo se lo repitió 3 veces, obteniéndose en todos los casos un rendimiento superior al 90%, sin observarse cambios en la selectividad anomérica.

Tabla 6: Reusabilidad de HBF₄·SiO₂ como catalizador para la reacción de Ferrier.

Ciclo	Nucleófilo	Tiempo de reacción	Rto (%)
1	Alcohol alílico	30	91
2		30	94
3		30	92

El Efecto Anomérico

Antecedentes en el estudio conformacional de los carbohidratos

En el análisis conformacional, uno de los principios centrales indica que los sustituyentes presentes en un anillo de ciclohexano prefieren adoptar, por motivos estéricos, una disposición ecuatorial más que una axial.⁸³

La introducción de un simple átomo de oxígeno en un anillo de carbonos, provoca un efecto mínimo en la conformación. Por lo tanto las propiedades conformacionales de un anillo de tetrahidropirano son muy similares a las del ciclohexano. En la Figura 25 se puede observar la forma conformacional preferida del tetrahidropirano, en la cual la barrera de inversión es cercana a los 42 KJ (10 Kcal) mol⁻¹.⁸⁴

Figura 25: Conformación más estable del tetrahidropirano.

La aplicación de este principio significó un gran avance en la química de los carbohidratos, a pesar de basarse únicamente en interacciones estéricas. Al tomar como ejemplo clásico a la D-glucosa, la aldohexosa más abundante, la cual existe a temperatura ambiente como una mezcla anomérica en disolución acuosa, se puede observar que se halla constituida por un 64% del anómero β y un 36% del anómero α (Figura 26). Es decir, la conformación más estable es aquella que presenta todos los sustituyentes voluminosos en posición ecuatorial. Esta observación se halla de acuerdo con la conformación

⁸³ A) Juaristi, *Introduction to Stereochemistry and Conformational Analysis*, John Wiley, New York, **1991**. B) Kirby, J. *The Anomeric Effect and Related Stereoelectronic Effects at Oxygen*. Springer-Verlag, Berlin, **1983**. C) Thatcher, G. R. J. *The Anomeric Effect and Associated Stereoelectronic Effects*. ACS, Washington, **1993**. D) Carey, F. A. y Sundberg, R. J. *Advanced Organic Chemistry*, Part A. 4º Ed., Kluwer Academic/Plenum Publishers, N. Y., **2000**, cap. 3. E) Smith, M. B. y March J. *Advanced Organic Chemistry*. 5ª Edic, John Wiley & Sons, N. Y. **2001**, 172-177. F) Eliel, E. L. y Wilen, S. H. "Stereochemistry of Organic Compounds". John Wiley, N. Y., **1994**, 686-700. G) Para una revisión del efecto anomérico ver: Juaristi, E. y Cuevas, G. *Tetrahedron*. **1992**, 48, 5019-5100.

⁸⁴ A) Riddell, F.G. *The conformational Analysis of Heterocyclic Compounds*. London and New York: Academic Press. **1980**, 66-75. B) Armarego, W. L. F. *Stereochemistry of Heterocyclic Compounds*. New York, Wiley, **1977**, parte 2, 84-100.

preferencial de los ciclohexanos sustituidos. Sin embargo, hay que tener en cuenta otros factores, no sólo el estérico.

Figura 26: Equilibrio anomérico en agua de la D-glucopiranososa.

El parámetro A en el equilibrio conformacional

Se define el parámetro A para un sustituyente X, como la diferencia de energía libre en el equilibrio conformacional Axial ↔ Ecuatorial para el ciclohexano portando el sustituyente X.^{83A,85,86}

$$[A_x = -\Delta G_x^0]$$

Para el caso del ciclohexanol (Figura 27), el valor de A para el grupo hidroxilo en disolución acuosa a temperatura ambiente es de 1,25 Kcal/mol,⁸⁶ el valor máximo observado para este parámetro, y es mínimo en solventes apróticos probablemente debido a la alta solvatación del enlace por puente de hidrógeno que ocasiona un incremento en el tamaño del grupo. A partir de este valor, se predice una mezcla en equilibrio que contiene un 89 % del isómero ecuatorial y un 11% del isómero axial. Esta misma proporción debería esperarse para el equilibrio α:β de la D-glucopiranososa. Sin embargo, así como en muchos otros derivados de la D-glucosa, se observa no sólo una proporción del anómero axial mucho mayor de la esperada, sino que en la mayoría de los casos los sustituyentes anoméricos axiales (OMe, OAc, Cl, etc) predominan por sobre los ecuatoriales.

⁸⁵ Stoddart, J. F. "Stereochemistry of Carbohydrates". John Wiley, N. Y. 1971, 50-92.

⁸⁶ Durette, P. L.; Horton, D.; Adv. Carbohydrate Chem. 1971, 26, 49-56.

Figura 27: Equilibrio anómérico en el ciclohexanol.

Este fenómeno fue descrito por primera vez por J. T. Edward en 1955 y por R. U. Lemieux en 1958,^{87,88,89} conocido en la actualidad como **Efecto Anomérico** por implicar a sustituyentes localizados en la posición anomérica de anillos piranósicos de carbohidratos.

En la Tabla 7 puede observarse claramente que al aumentar la electronegatividad del sustituyente aumenta la preferencia hacia el anómero axial. Sólo en el caso de la D-glucopiranososa el isómero ecuatorial es el predominante.^{86,90,91}

Tabla 7: Equilibrio anómérico de Glucopiranósidos.

Compuesto	Sustituyente	Solvente	T (°C)	% Isómero Axial
D-Glucopiranososa	OH	Agua	25	36
Metil-D-Glucopiranósido	Me	Metanol	25	67
Penta- O-acetil-D-Glucopiranósido	OAc	AcH/Ac ₂ O 1:1	25	86
Cloruro de Tetra- O-acetil-D-glucopiranósido	Cl	Acetonitrilo	30	94

El efecto anómérico no se halla limitado únicamente a carbohidratos sustituidos. Por ejemplo se observó que el compuesto 1-metoxi-6-metiltetrahidropirano presenta su grupo metoxi en posición axial preferencialmente (Figura 28).⁹² Se observó además que el efecto anómérico se halla influenciado por la constante dieléctrica del medio. El valor de K_{eq} que toma el equilibrio de la Figura 4 es de 3,4 en CCl₄ ($\epsilon = 2.2$), y decrece a 1,8 en CH₃CN ($\epsilon = 37.5$).

⁸⁷ Edward, J. T. *Chem. Ind. (London)*. **1955**, 1102-1115.

⁸⁸ Lemieux, R. U.; Chü, N. J. *Abstr. Papers Amer. Chem. Soc. Meetings*, **1958**, 133, 31-45.

⁸⁹ Lemieux, R. U.; Kullnig, R. K.; Bernstein, H. J.; Schneider, W. G. *J. Am. Chem. Soc.* **1958**, 80, 6093-6100.

⁹⁰ A) Reeves, R. E. *J. Am. Chem. Soc.* **1949**, 71, 215-225. B) Angyal, S. J. *In The Carbohydrates*. Vol. IA, (ed.) Pigan, W. and Horton, D. New York: Academic Press. **1972**, 195. C) Stoddart, J. F. *Stereochemistry of Carbohydrates*. New York: Wiley-Interscience. **1971** D) *ibid.*, 172. E) *ibid.*, pág. 72. F) *ibid.* pág. 101. G) Durette, P. L.; Horton, D. *Adv. Carbohydrate Chem.* **1971**, 49, 26.

⁹¹ A) Edward, J. T. *Chem. and Ind.* **1955**, 1102-1115. B) Lemieux, R. U.; Chü, N. J. *Abstr. Papers, Amer. Chem. Soc.* **1958**, 133, 31-45. C) Martin, J. C. *Ann. Chem. (Paris)*. **1971**, 6, 205-215. D) Lemieux, R. U. et al. *Can. J. Chem.* **1969**, 47, 4427-4435. E) Szarek, W. A.; Horton, D. (eds.). *The Anomeric Effect: Origin and Consequences*, *Am. Chem. Soc. Symposium Series*. **1979**, Vol. 87.

⁹² Eliel, E. L.; Giza, C. A. *J. Org. Chem.* **1968**, 33, 3754-3378.

Figura 28: Equilibrio anomérico en el 2-metoxi-6-metiltetrahidropirano.

Por consiguiente, puede decirse que la magnitud del efecto anomérico se incrementa al aumentar la electronegatividad del sustituyente y disminuye al aumentar la constante dieléctrica del solvente.

Causas del efecto anomérico

Se han expuesto diversas explicaciones del efecto anomérico, basadas en interacciones electrostáticas, interacciones de orbitales moleculares e interacciones de pares de electrones.

Edward sugirió, en el marco de una teoría electrostática,⁸⁷ la presencia de una interacción desestabilizante entre los momentos dipolares de los enlaces polares que conforman el centro anomérico. En la Figura 29, se observa que esto ocurre entre el momento dipolar del enlace C-X y el resultante de los momentos polares individuales del enlace polar endocíclico C-Y y de los pares de electrones no enlazantes de Y. Esta interacción dipolo-dipolo se minimiza si el sustituyente polar adopta una disposición axial.

Además se realizaron estudios sobre la influencia del solvente en el efecto anomérico que justifican dicha explicación al comprobarse que el aumento de la constante dieléctrica del disolvente (aumento de polaridad del disolvente) disminuye la interacción dipolo-dipolo, ocasionando un incremento en la presencia del conformero ecuatorial,⁹² como puede observarse en la Tabla 8.⁹³

Figura 29: Momentos dipolares presentes en el equilibrio anomérico de un heterociclo con un sustituyente X.

⁹³ Lemieux, R.U., et al. *Can. J. Chem.* **1969**, 47, 4427-4455.

La teoría del orbital molecular ha brindado la explicación más aceptable para interpretar el efecto anomérico.⁹⁴ En base a la misma, se interpretó al efecto anomérico como el resultado de una interacción entre uno de los pares libres del átomo polar conectado al carbono (en el caso de un hidrato de carbono $Y = O$), y un orbital antienlazante vacío (σ^*) del enlace C-X (interacción $n_Y \rightarrow \sigma^*_{C-X}$, donde n corresponde al par libre de Y) (Figura 30).

Tabla 8: Variación en la relación anomérica al cambiar de solvente en el 1-metoxitetrahidropirano.

Solvente	Dipolo	% Axial
CCl ₄	2.2	83
Benceno	2.3	82
CHCl ₃	4.7	71
Acetona	20.7	72
MeOH	32.6	69
MeCN	37.5	68
H ₂ O	78.5	52

Esto ocasiona un aumento en la estabilidad cuando el enlace C-X es axial, no así cuando es ecuatorial, ya que en este último caso, un orbital tipo p de Y, que posee un par libre de electrones, no podrá interaccionar con el orbital molecular σ^* de C-X.

⁹⁴ A) Romers; Altona; Buys; Havinga. *Top. Stereochem.* **1969**, 4, 39-97. B) Wolfe; Whangbo; Mitchell. *Carbohydr. Res.* **1979**, 69, 1-8. C) Fuchs; Ellencweig; Tartakovsky; Aped. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1986**, 25, 287-295. D) Praly; Lemieux. *Can. J. Chem.* **1987**, 65, 213-225. E) Wolfe, S.; Rauk, A.; Tel, L. M., y Csizmadia, I. G. *J. Chem. Soc. B.* **1971**, 136-145. F) David, S.; Eisenstein, O.; Hehre, W. J.; Salem, L., y Hoffmann, R. *J. Am. Chem. Soc.*, **1973**, 95, 3806-3815. G) Van-Catledge, F. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1974**, 96, 5693-5700. H) Romers, C.; Altona, C.; Buys, H. R., y Havinga, E. *Top. Stereochem.* **1969**, 4, 39-42. I) Tvaroska, I.; y Bleha, T. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **1989**, 47, 45-54.

Figura 30: Interacción propuesta entre los pares libres de un oxígeno con un orbital antienlazante σ^* vacío del enlace C-X ($nO \rightarrow \sigma^*C-X$).

La interacción resultante en el conformero axial provoca la deslocalización del par de electrones junto a una transferencia electrónica al orbital σ^* , provocando una desestabilización del orbital σ enlazante, disminuyendo la fortaleza del enlace C-X y aumentando la del C-Y. Por lo tanto se prevé un alargamiento del enlace C-X y un acortamiento del C-Y. Esta situación puede representarse mediante el siguiente esquema de hiperconjugación, llamado “Hiperconjugación negativa” (Figura 31).⁹⁵ Este fenómeno ocasiona un aumento del orden de enlace para C-Y y una disminución en el caso del enlace C-X.

Figura 31: Representación del efecto de hiperconjugación denominado Hiperconjugación Negativa.

Efecto anomérico generalizado

Originalmente el efecto anomérico definido por Lemieux, hacía referencia a la estabilización relativa de O-glicósidos. Sin embargo, este efecto es observable también en compuestos acíclicos, en los cuales la misma interacción ocurre en la conformación *gauche* en compuestos que presentan un átomo de oxígeno y otro átomo electronegativo, unidos al mismo átomo de carbono mediante enlaces sigma. Un ejemplo de este tipo puede observarse en el fluoruro de metoximetilo FCH_2OCH_3 (Figura 32), en el cual la conformación *gauche* es dominante, en plena concordancia con cálculos de orbitales

⁹⁵ A) Rahman, M. M., y Lemal, D. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, 110, 1964-1970. B) Schleyer, P. V. R.; y Kos, A. J. *Tetrahedron*. **1983**, 39,1141-1155, y referencias allí citadas. C) Schleyer, P. v. R.; Jemmis, E. D., y Spitznagel, G. W. *J. Am. Chem. Soc.*, **1985**, 107, 6393-6402 y referencias citadas.

moleculares.⁹⁶ Otros ejemplos son: dimetoximetano, hidrato de cloral, polioximetileno (CH₂O)_x, etc (Figura 33).

En todos los casos mencionados, la conformación *gauche* es primordial para lograr el alineamiento de dichos orbitales, permitiendo un solapamiento máximo.

Figura 32: Conformación *gauche* del fluoruro de metoximetilo.

En conclusión, el efecto anomérico generalizado (Figura 34) describe la preferencia que adopta el fragmento X-C-Y-C (X e Y = átomo con pares de electrones no enlazantes, comúnmente uno de los cuales es N, O, S ó F), hacia una conformación sinclinal ó *gauche* sobre otra antiperiplanar.

Figura 33: Representación de compuestos en los que se observa efecto anomérico (a): dimetoximetano, (b): hidrato de cloral.

Figura 34: Efecto Anomérico Generalizado.

⁹⁶ Jeffrey, G. A., y Yates, J. H. *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, *101*, 820-845.

Efecto exo-anomérico

El efecto anomérico en los derivados de los carbohidratos no sólo describe la preferencia axial-ecuatorial del sustituyente anomérico, sino además la conformación exocíclica de dicho sustituyente ó aglicón. Es por ello que los efectos anoméricos han sido divididos en los efectos *endo* y los *exo*.

El efecto *endo*-anomérico describe la preferencia de los grupos electronegativos unidos al carbono hacia la orientación axial, debido a interacciones orbitales estabilizantes $n_Y \rightarrow \sigma^*_{C-X}$. El efecto *exo*-anomérico hace referencia a la preferencia por la conformación *gauche* alrededor del enlace O-R del grupo sustituyente (el aglicón en el caso de los azúcares),⁹⁷ ocasionando una interacción orbital estabilizante $n_X \rightarrow \sigma^*_{C-Y}$. Este efecto se manifiesta tanto en una disposición axial como una ecuatorial. (Figura 35).

Figura 35: Representación de los efectos endo- y exo-anoméricos.

Efecto anomérico reverso

Este efecto ha sido ampliamente discutido en literatura.⁹⁸ Describe una preferencia conformacional opuesta al efecto anomérico generalizado, debido a sustituyentes electronegativos cargados positivamente (Figura 36) y en el caso de glicósidos la preferencia del aglicón por la posición ecuatorial.

Esto fue definido inicialmente por Lemieux y Morgan,⁹⁹ como la tendencia de un aglicón que presenta una carga positiva a adoptar una orientación ecuatorial. Por ejemplo: se observó que el α -D-xilopiranosil derivado, adopta preferencialmente la conformación 1C_4 (Figura 37), con el sustituyente piridinio ecuatorial a pesar de que el resto de los sustituyentes se

⁹⁷ Lemieux, R. U., y Koto, S. *Tetrahedron*. **1974**, 30, 1933-1945.

⁹⁸ A) Jones, P. G.; Kirby, A. J.; Komarov, I. V., y Wothers, P. D. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1998**, 1695-1710. B) Perrin, C. L.; Fabian, M. A.; Brunckova, J., y Ohta, B. K. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 6911-6925 y trabajos anteriores. C) Randell, K. D.; Johnston, B. D.; Green, D. F.; y Pinto, B. M. *J. Org. Chem.* **2000**, 65, 220-234 y referencias allí citadas. D) Perrin, C. L. *Tetrahedron*. **1995**, 51, 11901-11912.

⁹⁹ A) Lemieux, R. U., y Morgan, A. R. *Can. J. Chem.* **1965**, 43, 2205. B) Lemieux, R. U. *Pure Appl. Chem.* **1971**, 25, 527-536.

dispongan axialmente.¹⁰⁰ Al parecer, la presencia de una carga positiva provoca un incremento del efecto estérico.¹⁰¹

Figura 36: Representación del equilibrio Axial-Ecuatorial en un derivado del tetrahidropirano con sustituyente cargado positivamente

Estudios posteriores afirmaron que la protonación de un sustituyente alquilamonio ó imidazólico, provoca un efecto anomérico más intenso,^{101,102} y que la preferencia ecuatorial tiene su origen en interacciones estéricas y electrostáticas favorables.¹⁰³

Figura 37: Equilibrios conformacionales de un α -D-xilopiranosilderivado, con un sustituyente portando una carga positiva.

Sin embargo, hay estudios que descartan la supuesta estabilización que otorga el efecto anomérico reverso. Por ejemplo, un análisis espectroscópico y estructural empleando ^1H -RMN y rayos X de monocristal a un derivado del 1,3-dioxolano,^{98A} que presenta un sustituyente muy voluminoso de quinuclidina cuaternaria, demostró la ausencia de una estabilización anomérica reversa (Figura 38).

¹⁰⁰ Lemieux, R. U. ; Koto, S. *Tetrahedron*. **1974**, 30, 1933-1945.

¹⁰¹ A) Finch, P.; y Nagpurkar, A. G. *Carbohydr. Res.* **1976**, 49, 275-292. B) Wolfe, S.; Whangbo, M. H.; y Mitchell, D. J. *Carbohydr. Res.* **1979**, 69, 1-10.

¹⁰² A) Krol, M. C.; Huige, C. H. J.; y Altona, C. J. *Comput. Chem.* **1990**, 11, 765-772. B) Jones, P. G.; Kirby, A. J.; Komarov, I. V.; y Wothers, P. D. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1998**, 1695-1702.

¹⁰³ A) Chan, S. S. C.; Szarek, W. A.; y Thatcher, G. R. J. *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* **1995**, 2, 45-53. B) Vaino, A. R.; Chan, S. C.; Szarek, W. A.; y Thatcher, G. R. *J. Org. Chem.* **1966**, 61, 4514-4525. C) Vaino, A. R.; y Szarek, W. A. *J. Org. Chem.* **2001**, 66, 1097-1105.

Figura 38: Derivado de 1,3-dioxolano, portando un sustituyente muy voluminoso.

Otra excepción interesante se observa en la Figura 39,¹⁰⁴ en la que el isómero axial predomina ampliamente a pesar de presentar un sustituyente lineal cargado positivamente.

Por consiguiente, en décadas recientes, surgió una controversia acerca del efecto anomérico reverso, el cual ha sido visto con recelo como una curiosa anomalía que se da en pocos casos aislados (como los presentados anteriormente). Es así que se llevó a cabo una vigorosa investigación por varios grupos para definir la situación de dicho fenómeno. Así se reunió una gran cantidad de datos experimentales, llegando a la conclusión de que el efecto anomérico reverso no existe generalmente.⁹⁸

Figura 39: Otro ejemplo interesante que pone en duda la preferencia otorgada mediante el efecto anomérico inverso.

¹⁰⁴ Ratcliffe, A. J; Fraser-Reid, B. J. *Chem. Soc. Perkin Trans.* **1990**, 747-750.

Catalizadores ácidos heterogéneos: Resinas de Intercambio Iónico

Introducción a la aplicación de Resinas de Intercambio Iónico en la Química Orgánica

Entre los numerosos tipos de catalizadores ácidos heterogéneos empleados se encuentran las zeolitas, arcillas, circonia sulfatada, heteropoliácidos, resinas de intercambio iónico, así como diferentes ácidos (sulfúrico, perclórico, trifluoruro de boro, etc) impregnados sobre distintos soportes (ZrO_2 , SiO_2 , TiO_2 , VO_2).¹⁰⁵

Dentro de ellas, las llamadas resinas de intercambio iónico han sido utilizadas para muchas finalidades, como son las separaciones cromatográficas, extracción de productos naturales, purificación de agua, etc.^{106,107,108} En el año 1918 se utilizaron por primera vez como agentes catalíticos para la inversión de la sacarosa.¹⁰⁹ Pero recién después de la segunda guerra mundial se extendió su uso para diferentes tipos de reacciones.

En los primeros años, además de ser empleadas en la hidrólisis de azúcar de caña,^{110,111} se las utilizó en reacciones de hidrólisis de ésteres de ácido acético,^{112,113} en esterificaciones de ácidos carboxílicos con diversos alcoholes,^{114,115} en formación de acetales, condensaciones aldólicas,¹¹⁶ etc.

Como se ve, la aplicación de estas resinas es muy amplia, tanto a nivel industrial como de laboratorio.

¹⁰⁵ De Angelis, A.; Ingallina, P. and Perego, C. *Ind. Eng. Chem. Res.* **2004**, *43*, 1169-1178.

¹⁰⁶ Dorfner, K. Ion Exchanger, W. de Gruyter, Berlín, New York, 1991.

¹⁰⁷ Polyanskii, N.G.. *Russian Chemical Reviews*, **1962**, *31*(9), 496-510.

¹⁰⁸ Polyanskii, N.G. *Russian Chemical Reviews*, **1970**, *39*(3), 244-255.

¹⁰⁹ Rice F.E. ; Osugi S. *Soil Sci.* **1918**, *5*, 333-342.

¹¹⁰ Deuel, J.; Solms, L.; Anayas, G. Huber. *Helv. Chim. Acta.* **1951**, *34*, 1849-1856.

¹¹¹ Jenny, H. *J. Colloid Sci.*, **1946**, *1*, 35-39.

¹¹² Bernard, S.A.; Hammet, L.P.; *J. Amer. Chem. Soc.*, **1953**, *75*, 6834-6855.

¹¹³ Desai, S.B.; Krishnaswamy, N. *Indian J. Techn.*, **1973**, *11*, 255-270.

¹¹⁴ Christensen, G.M. *J. Org. Chem.* , **1962**, *27*, 1442-1450.

¹¹⁵ Haran, N. P.; Bhagade, S.S. ; Nageshwar, G.D. *J Chem. Petrochem.* **1979**, *10*, 15-21.

¹¹⁶ Mastagli, P.; Lambert, P.; Francois, G. *Bull. Soc. Chim. France*, **1957**, 764-770.

Las enormes posibilidades que ofrecen estas resinas se deben indudablemente a la simplicidad de las reacciones en las que éstas son utilizadas, facilidad de separación de las mismas por filtrado y lavado con solvente, y obtención de productos crudos con un elevado grado de pureza y selectividad.¹¹⁷ Por otra parte el empleo de las mismas no genera desechos contaminantes, algo sin duda muy importante en la actualidad en lo que respecta al cuidado del medio ambiente.

Es de destacar también que pueden ser reutilizadas con una pérdida muy baja en su actividad.

Cómo se fabrica una resina

Las primeras resinas se obtuvieron por condensación de fenoles sulfonados con formaldehído.^{107,108} Posteriormente se sintetizaron por copolimerización entre 2 monómeros, de los cuales los más usados son el estireno y el divinilbenceno (DVB). A partir de estos polímeros se obtienen 2 tipos generales de resinas: catiónicas ó ácidas, y aniónicas ó básicas, dependiendo qué grupos se introducen en los anillos bencénicos de los monómeros.

A su vez, cada grupo se subdivide en: Catiónicas fuertes (aquellas que poseen, por ejemplo, grupos RSO_3H) y Catiónicas débiles (contienen, por ejemplo, grupos RPO_3H_2 , RCOOH , ROH). De igual forma, se hallan las resinas aniónicas fuertes (R^-NR_2) y aniónicas débiles (R_2NR^-).

Grado de entrecruzamiento

Cuando se construye la resina por copolimerización, la proporción de DVB utilizada genera el entrecruzamiento de la misma. El “grado de entrecruzamiento” de cada resina se lo indica mediante el porcentaje de DVB que posee, mediante el signo “x” seguido por el número que expresa tal porcentaje, y a continuación el nombre comercial de la resina en cuestión. A mayor grado de entrecruzamiento, menor es el tamaño del poro de la resina. Las más usadas son las x8, que poseen un 8% de DVB.

¹¹⁷ Malshe, V.C.; Sujatha, E.S. *React.Funct. Polym.*, **1997**, 35(3), 159-165.

Capacidad de intercambio iónico de una resina

Es la medida del contenido de sitios activos (facilidad de capturar contraiones) por unidad de volumen, y se la expresa como N° meq/gr de resina seca. La capacidad teórica es el número de grupos funcionales por unidad de peso seco.

Las resinas macroreticulares

En estas resinas el tamaño mayor del poro no impide la difusión de las moléculas hacia los sitios activos de la misma, lo cual es adecuado para ser usadas con solventes orgánicos de poca polaridad.

Las resinas macroreticulares han sido muy útiles en incontables reacciones, sobre todo cuando deben ser empleadas en ausencia de agua.

Dentro de las resinas macroreticulares fuertemente ácidas mas usadas en la actualidad pueden mencionarse las Amberlyst, Amberlite, las Nafion NR 50, y las Indion 130.

Las resinas Amberlyst

Las resinas Amberlyst 15 y Amberlyst XN1010 son resinas macroreticulares fuertemente ácidas que presentan grupos sulfónicos. Las mismas presentan diferencias fundamentales a la hora de su elección, dependiendo de los sustratos orgánicos a emplear. En el siguiente cuadro se resumen las características de cada una.¹¹⁸

Tipo Resina	Volumen del poro	Capacidad de Intercambio(meq/g)	Área superficial(m2/g)
Amberlyst 15	0,32	4,7	45
Amberlyst XN1010	0,47	3,3	540

¹¹⁸ Catálogo Merck, 1999.

Aplicaciones de las resinas Amberlyst

El empleo de estas resinas se remonta a la década del 70, en la que comenzaron a ser utilizadas en numerosas reacciones, como por ejemplo esterificaciones,^{119,120,121} hidratación de olefinas¹²², reacciones de adición a vinilsulfonas,¹²³ adición de cetonas α,β -insaturadas sobre pirroles,¹²⁴ empleo en sistemas libres de solvente,^{125,126} reacciones de Friedel-Crafts de arenos,¹²⁷ empleo de Amberlyst 15 en líquidos iónicos,¹²⁸ reacciones de apertura de anillo de epóxidos a β -alcoxi alcoholes,¹²⁹ etc.

Es de destacar que en nuestro laboratorio, desde hace años, se han empleado las resinas Amberlyst 15 en reacciones de ciclización, para obtener diversos heterociclos. Una publicación reciente describe el empleo de dichas resinas en la preparación de 1,2,4,5-tetrahidro-3,2-benzotiazepinas 3,3-dióxidos, a partir de 2-feniletanosulfonamidas y fomaldehído amidosulfonas,¹³⁰ obteniéndose rendimientos que van del 39 al 92%.

Figura 40: Preparación de 1,2,4,5-tetrahidro-3,2-benzotiazepinas 3,3-dióxidos empleando resinas Amberlyst 15.

Resultó interesante hallar una publicación reciente en la cual se empleó Amberlyst 15 en la preparación de O- y S-glicósidos 2,3-insaturados a partir de 3,4,6-tri-O-acetil-D-glucal vía reordenamiento de Ferrier (Figura 41).¹³¹ En primera instancia los autores determinaron las condiciones de reacción

¹¹⁹ Bhatnagar, R.; Arvind, R.; Bhatia, S. *Indian Chem. Eng., Setc A*, **1994**, 36(3), 120-128.

¹²⁰ Gimenez, J.; Cervera, S. *March. Appl. Catal*, **1989**, 48(2), 307-315.

¹²¹ Petrini, M.; Ballini, R.; Marcantoni, E. *Synth. Comm.*, **1988**, 18(8), 847-855.

¹²² Goto, S.; Chatani, T.; Matouq, M.H. *Can. J. Chem. Eng.*, **1993**, 71, 821-830.

¹²³ Esteves, P.; Silva, M. E.; Rodriguez, L. M.; Oliveira-Campos, A. M.; Herdina, R. *Tetrahedron Lett.*, **2007**, 9040-9050.

¹²⁴ Das, B.; Damodar, K.; Chowdhury, N. *J. Mol. Catal. Chem.*, **2007**, 269, 81-90.

¹²⁵ S. Ko y C. Yao, *Tetrahedron Lett.*, 2006, 8827-8835.

¹²⁶ Shiva Kumar, K.; Lqbal, Javed; Manojit Pal. *Tetrahedron Lett.* **2009**, volumen 50, 46, 6244-6246.

¹²⁷ Kadama, Santosh T.; Ponnaboina Thirupathia and Sung Soo Kim. *Tetrahedron*. 2009, Volumen 65, 50, 10383-10389.

¹²⁸ Qureshia, Ziyaaddin S.; Deshmukha, Krishna M.; Tambadea, Pawan J.; Bhanage. Bhalchandra M. *Tetrahedron Lett.* 2010, Volumen 51, 4, 724-729.

¹²⁹ Yu-Heng Liua, Qiu-Shuang Liua and Zhan-Hui Zhang. *Journal of Molecular Catalysis A:Chemical*. 2008, Volumen 296, 1-2, páginas 42-46.

¹³⁰ Sasiambarrena, L. D.; Cánepa, A. S. and Bravo, R. D. *Synt. Comm.* **2011**, 41, 200-205.

¹³¹ Tian, Q.; Zhu, X.-M.; Yang, J.-S. *Synth. Commun.* **2007**, 37, 691-701.

utilizando como reactivos de partida al 3,4,6-tri-O-acetil-D-glucal e isopropanol. Variaron la cantidad de catalizador empleado y se probó en distintos solventes orgánicos.

Figura 41: Síntesis general de glicósidos 2,3-insaturados empleando Amberlyst 15 como catalizador.

Tabla 9: Reacción de 1 con isopropanol (1a) con distintos solventes y proporciones de Amberlyst 15.^a

Entrada	Solvente	% Peso Amberlyst 15	Rto de 1b (%)	α/β b
1	CH ₂ Cl ₂	20	20	-
2	MeCN	20	40	α
3	PhMe	20	50	8/1
4	PhMe	50	75	10/1
5	PhMe	80	95	α

a) Todas las reacciones fueron realizadas a 25 °C con 1 equiv. Del reactivo 1 por 2hs.

b) Las proporciones anoméricas fueron determinadas mediante análisis espectroscópico de ¹H RMN (400 MHz).

En la Tabla 9 se detallan los resultados obtenidos. Ellos observaron que las condiciones óptimas resultan del empleo de tolueno como solvente de reacción, y de un 80% en peso de Amberlyst 15 con respecto al D-glucal. En estas condiciones obtuvieron únicamente el anómero α como producto. Mediante estas condiciones se sintetizaron una gran diversidad de O- y S-glicósidos. En la Tabla 10 se muestran algunos resultados, así como los productos obtenidos en la Figura 42.

Figura 42: Algunos glicósidos obtenidos a partir de la reacción de 3,4,6-tri-O-acetil-D-glucal con alcoholes ó tioles

Tabla 10: Glicosidaciones catalizadas mediante Amberlyst 15 de 3,4,6-tri-O-acetil-D-glucal con alcoholes y tioles

Entrada	Aceptor	Producto	Tiempo(hs)	Rto(%)	α/β
1	Isopropanol 1a	1b	2	95	α
2	Alcohol bencílico 2a	2b	1.5	93	α
3	Alcohol propargílico 3a	3b	1.2	96	10/1
4	Colesterol 4a	4b	2	95	α
5	p-Metiltiofenol 5a	5b	1.5	60	1.2/1

a) Reacciones realizadas a 25° C con 1 equiv. del aceptor en PhMe.

b) Distribuciones anoméricas determinadas por ^1H RMN (400MHz).

Parte experimental

Materiales y métodos

Equipos utilizados

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

Los espectros de ^1H -RMN, ^{13}C -RMN y HSQC fueron registrados utilizando un equipo RMN Varian de 200 MHz ó un equipo Bruker Avance II 500 MHz en casos especiales. Los desplazamientos químicos se indican en partes por millón con respecto al tetrametilsilano (TMS). Las multiplicidades se expresan como: singulete (s), doblete (d), triplete (t),cuarteto (c), quintuplete(q), multiplete (m), doble doblete (dd), doble cuarteto(dc), doble doble doblete (ddd) y triple doblete (td). Si se pospone una “a” a cualquiera de las multiplicidades nombradas, quiere decir que es una señal más ancha de lo normal. 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.

Los productos no visibles al UV se revelaron sumergiendo la placa en una solución de H₂SO₄ al 10% en metanol, calentando posteriormente la misma a la llama.

Las cromatografías en columna fueron realizadas utilizando silicagel Merck 60 (70-230 mesh ó 230-400 mesh).

Solventes y reactivos

Los productos comerciales cuyo origen se indica a continuación, fueron purificados si era necesario utilizando técnicas generales de laboratorio.^{132,133}

¹³² Perrin, D.D.; Armarego, W.L.F. “Purification of Laboratory Chemicals”, Third Edition **1988**. Pergamon Press.

¹³³ 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) Whistler/ M. L. Wolfrom., “*Methods in carbohydrate chemistry*” Vol II, 405-409. Ed. R. L. Academic Press, N.Y., **1963**.

- Acetona, Anedra, pe 56 °C
- Acetato de etilo, Sigma Aldrich, pe 77 °C. Se secó con K₂CO₃ y se realizó destilación fraccionada
- Acetonitrilo anhidro, Sigma Aldrich, pe 82 °C. Se secó con P₂O₅ y se realizó destilación fraccionada
- Ácido acético glacial, Merck p.a
- Ácido perclórico soportado en sílicagel, sintetizado previamente en el laboratorio¹³⁴
- Ácido tetrafluorbórico soportado en sílicagel, sintetizado previamente en el laboratorio¹³⁵
- Acetato de sodio, Merck p.a
- Ácido clorhídrico, Merck p.a
- Ácido sulfúrico, Merck p.a (95-97%)
- Anhídrido acético, Carlo Erba
- L-Arabinosa, Sigma Aldrich (99%)
- Bromo, Prod. Acos Purest
- Carbonato ácido de sodio, Anedra
- Carbonato de sodio anhidro, Mallinckrodt
- Ciclohexano (donación Petroquímica La Plata), pe 81 °C. Se secó con Na₂SO₄ y se sometió a una destilación simple
- Cinc en polvo, Cicarelli
- Cloroformo, Merck p.a
- Diclorometano, Anedra, pe 40 °C- se secó con CaCl₂ y se destiló de forma simple desde P₂O₅
- Dimetilsulfóxido, Cicarelli
- Etanol, Soria (96%)
- Etanosulfonamida, Fluka. Se purificó mediante recristalización desde H₂O. (Pf: 130-131 °C)
- Eterato de trifluoruro de boro, Merck
- Éter absoluto, Merck
- Éter de petróleo Merck
- Éter etílico, Merck p.a

¹³⁴ Chakraborti, A. K.; Gulhane, R. Chem. Commun. (Cambridge) **2003**, 1896-1897.

¹³⁵ Chakraborti, A. K.; Gulhane, R. *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 3521-3525.

- Fósforo rojo, Carlo Erba
- α -D-Galactosa, Sigma Aldrich (97%)
- α -D-Glucosa, Carlo Erba
- n-Hexano, Merck p.a, pe 69 °C. Se secó con Na₂SO₄ y se realizó una destilación simple.
- Metanol, Anedra, pe 65 °C
- Metansulfonamida, Sigma Aldrich (97%)
- Pentacloruro de fósforo, Merck p.a
- Pentóxido de fósforo, Fluka
- Resina Amberlyst 15, Sigma Aldrich
- Sulfamida, Fluka puriss, pf 91-92 °C
- Sulfato de Cobre pentahidratado, Mallinckrodt
- Sulfito de sodio anhidro, Fluka (>97%)
- N-metil-p-toluensulfonamida, Fluka
- p-Toluensulfonamida, Fluka
- Tolueno, Merck p.a
- 1,3,5-Trioxano, Sigma Aldrich (≥99%)
- D-Xilosa, Sigma Aldrich (99%)

Síntesis de materiales de partida

Síntesis de D-glicales

Como primer paso previo en la síntesis de 3,4,6-tri-O-acetil-D-glicales, es necesario preparar el α -acetobromo glicósido, que se obtiene empleando el carbohidrato correspondiente como material de partida.¹³³ En esta tesis se emplearon los D-glicales derivados de la glucosa y galactosa. (Figura 43).

Figura 43: Síntesis de D-glicales partiendo de hidratos de carbono.

Síntesis de 3,4,6-tri-O-acetil-D-glucal (3,4,6-tri-O-acetil-1,2-dideoxi-D-arabino-1-hexenopiranos) (**CT1**):

A) Preparación de α -acetobromoglucosa:^{133A}

En un balón de tres bocas de 250 ml inmerso en baño de agua-hielo (temperatura 5°C aproximadamente), se le adosó un termómetro, una ampolla de compensación, y en la boca restante un tapón de vidrio. Se colocaron 84,5 ml (900 mmoles) de anhídrido acético, se enfrió agitando magnéticamente a 4 °C y luego se adicionó 0,5 ml de ácido perclórico al 60%, gota a gota mediante una pipeta. Se removió el baño de agua-hielo y se dejó que la mezcla alcanzara temperatura ambiente. Seguidamente se agregó 19,6 gr (111 mmoles) de α -D-glucosa en pequeñas porciones con agitación continua,

cuidando que la temperatura se mantuviera entre 30 y 40 °C, enfriando ocasionalmente en baño de agua-hielo. Luego de este agregado se enfrió hasta 20 °C y se adicionó 6,1 gr (197 mmoles) de fósforo rojo. Posteriormente se agregó mediante ampolla de compensación, 11,3 ml (440 mmoles) de bromo cuidando que la temperatura de la mezcla no excediera los 20 °C. Acto seguido, se adicionó 7 ml de agua en un lapso de 30 minutos. Se mantuvo la mezcla de reacción a 20 °C por 2 horas, con agitación continua. Finalmente se filtró en vidrio fritado para eliminar el fósforo y se lavó con ácido acético glacial.

El filtrado obtenido se empleó directamente en la siguiente etapa de síntesis.

B) Síntesis de Tri-O-acetil-D-glucal (**CT1**):^{133B}

En un balón de tres bocas de 1 litro, con agitación mecánica, se colocó una mezcla de 73 gr acetato de sodio disueltos en 104 ml de agua y 72 ml de ácido acético glacial), y se enfrió en una mezcla de hielo, sal y agua. Se adicionó 39,5 gr de cinc (60 mmoles) y 3,9 gr de sulfato de cobre pentahidratado previamente disuelto en 14,4 ml de agua. Luego se agregó lentamente el filtrado obtenido en el procedimiento anterior, cuidando que la temperatura del baño se mantuviera por debajo de 0 °C. Terminado este agregado se dejó con agitación continua y el baño de hielo, sal y agua por 3 horas. La mezcla se la filtró con succión, lavando con ácido acético al 50%. Se adicionaron 180 ml de agua hielo al filtrado y se extrajo con diclorometano (3 x 60ml). Los extractos orgánicos se lavaron con solución saturada de carbonato de sodio (2 x 60ml) para neutralizar la acidez del medio de reacción.

El extracto orgánico resultante se lo secó con sulfato de sodio anhidro, se filtró y se eliminó el solvente mediante evaporador rotativo, obteniéndose un aceite amarillento. Al producto crudo se lo purificó mediante cromatografía en columna, solvente de elusión ciclohexano/AcOEt 8:2, utilizando 20 veces el peso en silicagel Merck 60 (70-230 mesh).

El producto obtenido tenía una consistencia de aceite incoloro que cristalizó luego de dejarlo en reposo en el freezer. Se obtuvieron 14 gr (49,6 mmoles) de tri-O-acetil-D-glucal. Rto: 60%.

3,4,6-Tri-O-acetil-D-Glucal (CT1)

Sólido amorfo blanco; pf: 54-55 °C (Literatura: 55 °C). ^1H RMN (200 MHz, CDCl_3): δ = 6.26 (dd, J = 6.1, 1.0 Hz, 1H, H-1), 5.14 – 5.06 (m, 1H, H-5), 4.97 (dd, J = 7.2, 5.8 Hz, 1H, H-3), 4.62 (dd, J = 6.1, 3.2 Hz, 1H, H-2), 4.19 (dd, J = 11.6, 5.3 Hz, 1H, H-4), 4.10 – 3.91 (m, 2H, H-6), 1.85 (s, 3H, CH_3COO), 1.84 (s, 3H, CH_3COO), 1.81 (s, 3H, CH_3COO).

^{13}C RMN (50 MHz, CDCl_3): δ =170.30 (CH_3COO), 170.14 (CH_3COO), 169.38 (CH_3COO), 145.65 (C-1), 99.01 (C-2), 73.94 (C-5), 67.36 (C-4), 67.14 (C-3), 61.28 (C-6), 20.83 (CH_3COO), 20.65 (CH_3COO), 20.56 (CH_3COO).

En las páginas siguientes se detalla los espectros RMN realizados a dicho producto.

Síntesis de Tri-O-acetil-D-galactal (3,4,6-tri-O-acetil-1,2-dideoxi-D-lixo-1-hexenopiranos) (CT2)^{133B}

El procedimiento es muy similar al empleado para la obtención del tri-O-acetil-D-glucal, pero debe prestarse mayor atención al control de temperatura. Los pasos a seguir se describen a continuación:

En un balón de tres bocas, de 250 ml, se colocaron 73 ml (774 mmoles) de anhídrido acético. En una de las bocas se adosó un termómetro, en otra un tapón de vidrio, y una ampolla de compensación en la restante, agitando magnéticamente. Con pipeta, gota a gota, se adicionó 0,44 ml de ácido perclórico. Luego se agregó 20 gr (111 mmoles) de α -D-galactosa en pequeñas porciones, cuidando que la temperatura se mantuviera entre 30-40 °C, enfriando ocasionalmente en baño de hielo. Esta mezcla se dejó agitando a temperatura ambiente durante una noche. Se enfrió a 15 °C mediante un baño de agua-hielo, y se agregó 5,5 gr (177 mmoles) de fósforo rojo en pequeñas porciones, y seguidamente desde la ampolla 10,5 ml (410 mmoles) de bromo gota a gota, manteniendo constante la temperatura a 15° C.

Posteriormente se agregó 5.5 ml de agua gota a gota, y se agitó durante 3 horas a temperatura ambiente. Transcurrido ese tiempo, se filtró por medio de un embudo con placa de vidrio sinterizado. El residuo se lavó con ácido acético glacial.

Luego de la filtración se adicionó gota a gota a una mezcla preparada previamente por adición de 73 gr de acetato de sodio anhidro, 105 ml de agua, 73 ml de ácido acético glacial, 40 gr de cinc (61 mmoles) y 4 gr de sulfato de cobre disueltos en 15 ml de agua, todo en un balón de 3 bocas, en el cual se adosó un agitador mecánico. Se agregó el filtrado gota a gota, manteniendo la mezcla del balón a -10 °C, mediante un baño de hielo-NaCl-agua.

La mezcla de reacción se agitó durante 3 horas, manteniendo la temperatura por debajo de 0 °C. Posteriormente se filtró por buchner, lavando el filtrado con solución acuosa de ácido acético al 50%. El filtrado se trató en ampolla de decantación con diclorometano frío (3 x 36 ml). Al extracto orgánico se lo lavó con agua fría (4 x 36 ml), y finalmente con 100 ml de solución de carbonato de sodio saturado, para neutralizar la acidez del medio de reacción.

El extracto orgánico resultante se secó con sulfato de sodio anhidro, se filtró y evaporó el solvente, obteniéndose el tri-*O*-acetil-D-galactal. Dicho producto se purificó mediante cromatografía en columna, empleando 20 veces el peso en sílicagel Merck 60 (70-230 mesh) y utilizando una mezcla de ciclohexano/ AcOEt 8:2, como solvente de elusión.

El producto consistió en un aceite amarillento. Se obtuvo 9,5 gr (33,7 mmoles). Rto: 32% (Literatura: 35%). A continuación se detallan las propiedades físicas y las señales de RMN del producto purificado.

3,4,6-Tri-*O*-acetil-D-Galactal (CT2)

Aceite amarillento. ^1H NMR (200 MHz, CDCl_3): δ = 6.62 (dd, J = 5.4, 1H, H-1), 5.28 (d, J = 3,5 Hz, 1H, H-4), 5.23 (dd, J = 7.0, 3.5 Hz, 1H, H-3), 4.91 (dd, J = 10.9, 7.0 Hz, 1H, H-2), 4.60 (sa, 1H, H-5), 4.54 (dd, J = 12.5, 1.4 Hz, 2H, H-6), 2.04 (s, 3H, CH_3COO), 1.98 (s, 2H, CH_3COO), 1.97 (s, 2H, CH_3COO).

^{13}C NMR (50 MHz, CDCl_3) δ 171.70 ($\text{CH}_3\text{C}\underline{\text{O}}$), 171.14 ($\text{CH}_3\text{C}\underline{\text{O}}$), 170.44 ($\text{CH}_3\text{C}\underline{\text{O}}$), 146.86 (C-1), 99.50 (C-2), 73.43 (C-5), 66.24 (C-4), 65.10 (C-3), 59.78 (C-6), 21.24 ($\underline{\text{C}}\text{H}_3\text{COO}$), 21.15 ($\underline{\text{C}}\text{H}_3\text{COO}$), 20.65 ($\underline{\text{C}}\text{H}_3\text{COO}$).

Preraración de glicósidos per-O-acetilados¹³⁶

A un balón conteniendo 10 mmoles del carbohidrato correspondiente se adicionó anhídrido acético (3,90 ml (41 mmoles) para el caso de L-arabinosa y D-xilosa, y 4,85 ml (51 mmoles) para D-glucosa y D-galactosa). Se colocó dicha mezcla en baño de hielo, con agitación continua. Seguidamente se agregaron 0,250 gr del catalizador heterogéneo $\text{HClO}_4 \cdot \text{SiO}_2$, dando lugar inmediatamente una reacción exotérmica. Luego de finalizada la reacción (monitoreada por CCD de sílicagel), aproximadamente 5 minutos, la mezcla se filtró con celite en un embudo de vidrio fritado. Posteriormente se evaporó el solvente con agregados de tolueno (2 x 5 ml). El producto crudo se lo purificó en cromatografía en columna de sílica gel Merck 60 (230-400 mesh) utilizando como eluyente hexano-acetato de etilo 1:1 para obtener el correspondiente producto per-O-acetilado, cuya identidad en cada preparación, se corroboró mediante análisis RMN y punto de fusión comparando con datos de literatura.¹³⁶

Figura 44: Método de síntesis de glicósidos per-O-acetilados.

Tabla 11: Glicósidos per-O-acetilados.

Producto/Código	Rto (%)	Pf (°C)
Pentaacetato de β-D-glucopiranososa (CT3)	92	130-32
Pentaacetato de β-D-galactopiranososa (CT4)	95	143-44
Tetraacetato de β-D-xilosa (CT5)	85	Aceite amarillento
Tetraacetato de L-arabinosa (CT6)	80	Aceite amarillento

¹³⁶ Misra, A. K.; Tiwari, P. and Madhusudan, S. K. *Carbohydr. Res.* **2005**, 340, 325-329.

Preparación general de Glicosil sulfamidas⁷⁹

Figura 45: Preparación de Glicosil sulfamidas partiendo de D-glicales.

A una solución del tri-O-acetil-D-glical (**CT1** ó **CT2**) (1 mmol) y la sulfamida (1,1 mmol), en 5 ml de acetonitrilo seco, se adicionó, bajo argón, 50µl de $\text{BF}_3\text{Et}_2\text{O}$, a temperatura ambiente. Luego de agitar durante 1 hora se agregaron 5 ml de diclorometano. Se lavó la mezcla de reacción con solución saturada de bicarbonato de sodio (2 x 5ml), con agua (2 x 5ml), y finalmente con solución saturada de cloruro de sodio (1 x 5ml). Se secó la fase orgánica con sulfato de sodio, se filtró y se eliminó el solvente en evaporador rotativo, obteniéndose un sólido blanco, el cual se lo purificó en cromatografía en columna de sílicagel, utilizando como mezcla de corrida hexano/acetato de etilo 1:1. Rto: 89% (sulfamida derivada del D-glucal), 94% (sulfamida derivada del D-galactal).

Propiedades físicas de las Glicosilsulfamidas:

4,6-Di-O-acetil-2,3-dideoxi- α -D-eritro-hex-2-eno-piranosil sulfamida (**CT7**)

Agujas blancas; pf 150-151 °C; ^1H RMN (200 MHz, CD_3CN): δ = 6.43 (da, 1H, J = 9.8 Hz, NH), 5.97 (dt, 1H, J = 10.3, 1.6 Hz, H-3), 5.86 (ddd, 1H, J = 10.3, 2.7 1.9 Hz, H-2), 5.45 (da, 1H, J = 9.8 Hz, H-1), 5.35 (sa, 1H, NH_2), 5.23 (dc, 1H, J = 9.0, 1.6 Hz, H-4), 4.29 (dd, 1H, J = 15.2, 6.7 Hz, H-6a), 4.07 (m, 1H, H-6b), 4.02 (m, 1H, H-5), 2.08 (s, 1H, CH_3COO), 2.02 (s, 1H, CH_3COO).

^{13}C RMN (50 MHz, CD_3CN): δ = 171.30 (CH_3COO), 171.10 (CH_3COO), 130.43 (C-3), 126.70 (C-2), 78.45 (C-1), 67.93 (C-5), 65.49 (C-4), 64.13 (C-6), 21.17 (CH_3COO), 20.86 (CH_3COO).

4,6-Di-O-acetil-2,3-dideoxi- α -D-*threo*-hex-2-eno-piranosil sulfamida (CT8)

Agujas blancas; pf 141-142 °C; ^1H RMN (CD_3CN) δ 6.35 (da, 1H, J = 9.7 Hz, NH), 6.17 (ddd, 1H, J = 10.1, 5.5, 1.5 Hz, H-3), 6.05 (dd, 1H, J = 10.1, 3.2 Hz, H-2), 5.50 (dc, 1H, J 9.7, 3.2, 1.5 Hz, H-1), 5.36 (sa, NH_2), 5.07 (dd, 1H, J = 5.3, 2.4 Hz, H-4), 4.29 (m, 1H, H-5, H-6a), 4.09 (dd, 1H, J = 12.3, 9.1 Hz, H-6b), 2.04 (s, 1H, CH_3COO), 2.01 (s, 1H, CH_3COO).

^{13}C RMN (CD_3CN): δ = 171.18 ($\text{CH}_3\text{C}\underline{\text{O}}$), 171.07 ($\text{CH}_3\text{C}\underline{\text{O}}$), 130.08 (C-3), 126.68 (C-2), 78.21 (C-1), 67.92 (C-5), 64.04 (C-4), 63.32 (C-6), 20.87 ($\underline{\text{C}}\text{H}_3\text{COO}$), 20.86 ($\underline{\text{C}}\text{H}_3\text{COO}$).

Síntesis de Nuevos Glicomiméticos empleando diversos catalizadores

Síntesis de *N*-glicosilsulfonamidas empleando Resinas de Intercambio Iónico Amberlyst 15

Se procedió a investigar el uso de Amberlyst 15 en reacciones de sulfonamidoglicosilación (Figura 46), para luego, en base a los resultados obtenidos, utilizar dicho catalizador en ensayos de obtención de *N*-disacáridos.

Figura 46: Síntesis de glicosilsulfonamidas con reordenamiento de Ferrier empleando Resinas Amberlyst 15.

Optimización de condiciones:

Figura 47: Reacción de 3,4,6-Tri-O-acetil-D-glucal con etanosulfonamida para determinar condiciones óptimas de reacción.

En un tubo de reacción se colocó 1 mmol del glicol (**CT1**) y 1,1 mmol de etanosulfonamida en 5 ml de acetonitrilo anhidro. Se adicionó entre 10 y 40% en peso de resina Amberlyst 15, a la temperatura indicada (Tabla 12). La mezcla se agitó magnéticamente en tubo cerrado hasta completa desaparición del D-glicol, 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 de sílicagel Merck 60 (230-400 mesh).

Tabla 12: 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

a) Reacciones realizadas en CH₃CN usando 1,1 mmol de la sulfonamida y 1 mmol de tri-O-acetil-D-glucal.

b) Las proporciones anoméricas fueron determinadas mediante análisis espectroscópico de ¹H RMN (200 MHz).

Determinadas las condiciones óptimas, las mismas se aplicaron a la reacción de 3,4,6-tri-O-acetil-D-glucal y 3,4,6-tri-O-acetil-D-galactal con varias sulfonamidas (Figura 48), permitiendo obtener las correspondientes glicosilsulfonamidas de la Tabla 13. La mezcla de reacción en cada uno de los casos pudo ser fácilmente purificada por cromatografía en columna empleando sílicagel Merck 60 (230-400 mesh).

Procedimiento general optimizado de *N*-glicosilsulfonamidas empleando Resinas Amberlyst 15:

A una solución agitada conteniendo 1 mmol del D-glicol y la correspondiente sulfonamida (1,1 equivalente), en solvente anhidro, se adicionó 30% en peso de resina Amberlyst 15, a temperatura ambiente. La mezcla fue agitada durante el tiempo necesario hasta completa desaparición del glicol, monitoreada mediante capa delgada. La mezcla de reacción se filtró y la resina se lavó con diclorometano anhidro. Se reunieron los lavados con el filtrado, se eliminó el solvente en evaporador rotativo y se secó hasta peso constante. El producto crudo se purificó en cromatografía en columna de sílica gel Merck 60 (230-400 mesh), utilizando como eluyente hexano-acetato de etilo 1:1 para obtener los correspondientes productos.

Figura 48: Síntesis de *N*-glicosilsulfonamidas a partir de CT1 ó CT2.

Tabla 13: 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
CT1	Metan	40	95:5	94	AM1
	Etan	60	87:13(85:15)	90(95)	AM2
	Bencil	40	70:30	94	AM3
	<i>p</i> -Toluen	60	78:22(87:13)	82(95)	AM4
	<i>N</i> -Metil- <i>p</i> -toluen	60	87:13(95:5)	78(80)	AM5
CT2	Metan	40	95:5	75	AM6
	Etan	50	84:16(83:17)	85(97)	AM7
	Bencil	60	95:5	72	AM8
	<i>p</i> -Toluen	60	90:10(80:20)	75(96)	AM9
	<i>N</i> -Metil- <i>p</i> -toluen	40	87:13(95:5)	70(86)	AM10

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

Propiedades físicas de las nuevas *N*-glicosilsulfonamidas sintetizadas mediante Amberlyst 15:

A continuación se detallan los datos espectroscópicos y puntos de fusión de las glicosilsulfonamidas nuevas 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.

4,6-Di-O-acetil-2,3-dideoxi- α -D-eritro-hex-2-enopiranosil

metansulfonamida (AM1)

Agujas blancas: pf 92-93 °C. ^1H RMN (CHCl_3 d_1): δ = 5.97 (d, 1H, J = 10.2 Hz, H-3), 5.86 (dd, 1H, J = 2.7, 1.9 Hz, H-2), 5.81 (d, 1H, NH), 5.54 (da, 1H, J = 7.4 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, CH_3), 2.09 (s, 1H, CH_3COO), 2.04 (s, 1H, CH_3COO).

^{13}C RMN (50 MHz, CHCl_3 d_1): δ = 170.76 (CH_3COO), 170.34 (CH_3COO), 130.60 (C-3), 126.88 (C-2), 76.99 (C-1), 67.68 (C-5), 64.90 (C-4), 63.45 (C-6), 43.23 (CH_3), 21.15 (CH_3COO), 20.94 (CH_3COO).

4,6-Di-O-acetil-2,3-dideoxi- α -D-treo-hex-2-enopiranosil

metansulfonamida (AM6)

Agujas blancas: pf 159-160 °C. ^1H RMN (CHCl_3 d_1): δ = 6.19 (ddd, 1H, J = 10.0, 5.4, 1.7 Hz, H-3), 6.01 (m, 1H, NH, H-2), 5.58 (ddd, 1H, J = 9.1, 3.1, 1.6 Hz, H-1), 5.03 (dd, 1H, J = 5.4, 1.7 Hz, H-4), 4.21 (m, 3H, H-5, 2xH-6), 3.12 (s, 1H, CH_3), 2.07 (s, 1H, CH_3COO), 2.01 (s, 1H, CH_3COO).

^{13}C RMN (CHCl_3 d_1): δ = 170.79 (CH_3COO), 170.58 (CH_3COO), 126.70 (C-3), 129.70 (C-2), 76.87 (C-1), 67.40 (C-5), 63.35 (C-4), 62.49 (C-6), 43.38 (CH_3), 20.96 (CH_3COO), 21.16 (CH_3COO).

4,6-Di-O-acetil-2,3-dideoxi- α -D-eritro-hex-2-enopiranosil

bencil

sulfonamida (AM3)

Agujas blancas: pf 130-132 °C. ^1H RMN (CHCl_3 d_1): δ = 7.41 (m, 5H, Ph), 5.85 (m, 1H, H-3), 5.80 (dd, 1H, J = 2.7, 1.7 Hz, H-2), 5.48 (m, 1H, NH), 5.52 (m, 1H, H-1), 5.21 (ddd, 1H, J = 8.3, 3.4, 1.5 Hz, H-4), 4.51 (d, 1H, J = 13.7 Hz, H-6a), 4.35 (d, 3H, J = 13.7 Hz, H-6b), 4.21 (m, 3H, H-5, CH_2), 2.08 (s, 1H, CH_3COO), 1.97 (s, 3H, CH_3COO).

^{13}C RMN (50 MHz, CHCl_3 d_1): δ = 170.90 (CH_3COO), 170.37 (CH_3COO), 131.02, 130.97, 128.97, 128.91 (Ph), 130.28 (C-2), 127.06 (C-3), 77.04 (C-1), 67.84 (C-5), 64.84 (C-4), 63.48 (C-6), 61.46 (CH_2), 21.16 (CH_3COO), 20.96 (CH_3COO).

4,6-Di-O-acetil-2,3-dideoxi- α -D-treo-hex-2-enopiranosil bencil sulfonamida (AM8)

Agujas blancas: pf 132-134 °C. ^1H RMN (CHCl_3 d_1): δ = 7.41 (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, CH_2 , H-5, H-6), 2.08 (s, 1H, CH_3COO), 1.95 (s, 3H, CH_3COO).

^{13}C RMN (CHCl_3 d_1): δ = 170.81 (CH_3COO), 170.56 (CH_3COO), 131.02, 130.95, 129.66, 128.87, 126.65 (Ph), 129.66 (C-2), 126.65 (C-3), 76.91 (C-1), 67.42 (C-5), 63.27 (C-4), 62.48 (C-6), 61.75 (CH_2), 21.15 (CH_3COO), 20.96 (CH_3COO).

Análisis de la reutilización de la resina Amberlyst 15:

Se llevaron a cabo ensayos con resina Amberlyst 15 recuperada de la mezcla de reacción por filtración y utilizada seguidamente en un nuevo ciclo de reacción, luego de secarlas en estufa a 120 °C durante 40 minutos. Empleando como reacción típica la glicosilación de etanosulfonamida con D-glucal y el catalizador reciclado, se repitió este protocolo 2 veces, alcanzando rendimientos siempre mayores ó iguales al 85% (Tabla 14).

Tabla 14: Reusabilidad de Amberlyst 15 como catalizador para la sulfonamidoglicosilación de 3,4,6-Tri-O-acetil-D-glucal.

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

a) Todas las reacciones fueron realizadas en CH_3CN utilizando 1,1 mmol de etansulfonamida y 1 mmol de tri-O-acetil-D-glucal.

Síntesis de *N*-glicosilsulfonamidas saturadas a partir de piranosas per-*O*-acetiladas

En primer lugar se determinaron las condiciones óptimas de preparación de dichos compuestos partiendo de piranosas per-*O*-acetiladas, empleando diversos catalizadores (Figura 49).¹³⁷

Figura 49: Sulfonamidoglicosilación de piranosas per-*O*-acetiladas empleando $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$.

Optimización de condiciones de preparación de *N*-glicosilsulfamidas:

A una solución agitada conteniendo 1 mmol del carbohidrato per-*O*-acetilado (se utilizó pentaacetato de glucopiranososa) y la correspondiente sulfonamida (adicionando entre 1 y 2 equivalentes de etanosulfonamida, que fue la elegida para optimizar condiciones de reacción en este trabajo), en 5 ml de acetonitrilo anhidro bajo argón, se adicionó el catalizador homogéneo ó heterogéneo (0,5 a 2 equivalentes) a la temperatura indicada (Tabla 15). La mezcla fue agitada durante el tiempo necesario hasta completa desaparición del carbohidrato, monitoreada mediante capa delgada (solvente de corrida hexano/acetato de etilo 1:1). Para el caso del empleo del catalizador $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$, la mezcla de reacción se neutralizó mediante agregado de 3 ml de solución de NaHCO_3 saturado y se extrajo con diclorometano anhidro (4 x 5 ml). Se reunieron los extractos orgánicos, se secó dicho solvente mediante agregado de Na_2SO_4 , y luego se filtró para posteriormente eliminar el solvente en evaporador rotativo.

Para el caso del empleo de los demás catalizadores, luego de agitación por un tiempo determinado, la mezcla de reacción fue filtrada mediante celite, para posterior eliminación del solvente en evaporador rotativo.

¹³⁷ Colinas, P. A.; Témpera, C. A.; Rodríguez, O. M.; Bravo, R. D. *Synthesis* 2009, 4143-4148.

En todos los casos el producto crudo se lo secó hasta peso constante y se lo purificó por cromatografía en columna de sílica gel utilizando como eluyente hexano-acetato de etilo 1:1 y/o cristalización desde la mencionada mezcla de solventes, para obtener los correspondientes productos.

Tabla 15: Reacción de pentaacetato de D-glucosa con etanosulfonamida bajo diferentes condiciones.^a

Entrada	Promotor	Sulfonamida (equiv)	T(°C)	Tiempo(hs)	Rto (%)
1	BF ₃ Et ₂ O (2 equiv.)	2	25	24	82
2	BF ₃ Et ₂ O (2 equiv.)	2	40	12	50
3	BF ₃ Et ₂ O (1.5 equiv.)	1.5	25	12	65
4	BF ₃ Et ₂ O (1 equiv.)	1	25	12	40
5	HClO ₄ .SiO ₂ (2 g.) ^b	2	25	24	-
6	HClO ₄ .SiO ₂ (4 g.) ^b	2	25	24	-
7	HBF ₄ .SiO ₂ (2 g.) ^c	2	25	24	-
8	HBF ₄ .SiO ₂ (4 g.) ^c	2	25	24	-

a) Todas las reacciones fueron realizadas en CH₃CN

b) 0.5 mmol de HClO₄ g⁻¹. c) 0.5 mmol de HBF₄ g⁻¹.

Obtenidas las condiciones óptimas, se procedió a sintetizar las *N*-glicosilsulfamidas. En la Tabla 16 se detallan algunos de los resultados obtenidos.

Procedimiento general optimizado de preparación de *N*-β-glicosilsulfonamidas:

A una solución agitada conteniendo 1 mmol del carbohidrato per-O-acetilado y la correspondiente sulfonamida (2 equivalentes,), en 5 ml de acetonitrilo anhidro bajo argón, se adicionó 2 equivalentes de BF₃Et₂O (0,25 ml) a temperatura ambiente. La mezcla fue agitada durante el tiempo necesario hasta completa desaparición del carbohidrato, monitoreada mediante capa delgada (solvente de corrida hexano/acetato de etilo 1:1). La mezcla de reacción se neutralizó mediante agregado de 3 ml de solución de NaHCO₃ saturado y se extrajo con diclorometano anhidro (4 x 5 ml). Se reunieron los extractos orgánicos, se secó dicho solvente mediante agregado de Na₂SO₄, y luego se filtró para posteriormente eliminar el solvente en evaporador rotativo. El producto crudo se lo secó hasta peso constante y se lo purificó en

cromatografía en columna de sílica gel utilizando como eluyente hexano-acetato de etilo 1:1 y/o cristalización desde la mencionada mezcla de solventes, para obtener los correspondientes productos.

Tabla 16: Reacción de sulfonamidoglicosilación de carbohidratos peracetilados.^a

Carbohidrato	Sulfonamida	Producto	Rendimiento (%)
D-Glucosa		CT9	83
D-Galactosa	Sulfamida	CT10	82
D-Xilosa		CT11	76
L-Arabinosa		CT12	72

a) Todas las reacciones fueron llevadas a cabo en acetonitrilo a temperatura ambiente empleando $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ como catalizador, con un tiempo promedio de 24 hs.

b) Las relaciones anómericas fueron determinadas empleando ^1H RMN.

Propiedades físicas de las sulfamidas peracetiladas:

2,3,4,6-Tetra-O-acetil- β -D-glucopiranosil sulfamida (CT9) Agujas blancas; pf 161–162 °C. ^1H RMN (200 MHz, $\text{MeCN}-d_3$): δ = 6.13 (d, J = 9.9 Hz, 1 H, NH), 5.32 (m, 3 H, H-4, NH_2), 5.02 (t, J = 9.8 Hz, 1 H, H-3), 4.90 (m, 2H, H-2, H-1), 4.20 (m, 2 H, 2 x H-6), 3.89 (d, J = 10.1, 3.3 Hz, 1 H, H-5), 2.04 (s, 3 H, CH_3COO), 2.03 (s, 3 H, CH_3COO), 2.00 (s, 3 H, CH_3COO), 1.97 (s, 3 H, CH_3COO).

^{13}C RMN (50 MHz, $\text{MeCN}-d_3$): δ = 171.53 ($\text{CH}_3\text{C}\text{--}\text{OO}$), 170.76 ($\text{CH}_3\text{C}\text{--}\text{OO}$), 170.70 ($\text{CH}_3\text{C}\text{--}\text{OO}$), 170.51 ($\text{CH}_3\text{C}\text{--}\text{OO}$), 83.78 (C-1), 73.87 (C-5), 73.57 (C-4), 70.84 (C-2), 69.04 (C-3), 62.51 (C-6), 20.89 ($\text{C}\text{--}\text{H}_3\text{COO}$), 20.82 (2 x $\text{C}\text{--}\text{H}_3\text{COO}$), 20.77 ($\text{C}\text{--}\text{H}_3\text{COO}$).

Anal. Calculado para $\text{C}_{14}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_{11}\text{S}$: C, 39.4; H, 5.2; N, 6.6; O, 41.3; S, 7.5. Hallado: C, 39.2; H, 5.3; N, 6.8; O, 41.3; S, 7.4.

2,3,4,6-Tetra-O-acetil- β -D-galactopiranosil sulfamida (CT10)

Agujas blancas; pf 185–186 °C. ^1H RMN (200 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ = 7.92 (da, J = 9.1 Hz, 1 H, NH), 6.53 (sa, 2 H, NH_2), 5.20 (m, 2 H, H-4, H-3), 4.95 (t, J = 9.1 Hz, 1 H, H-2), 4.77 (t, J = 9.1 Hz, 1 H, H-1), 4.08 (m, 3 H, H-5, 2 x H-6), 2.07 (s, 3 H, CH_3COO), 1.98 (s, 3 H, CH_3COO), 1.96 (s, 3 H, CH_3COO), 1.88 (s, 3 H, CH_3COO).

^{13}C RMN (50 MHz, DMSO- d_6): δ = 170.56 ($\text{CH}_3\text{C}\underline{\text{O}}$), 170.10 (2 x $\text{CH}_3\text{C}\underline{\text{O}}$), 169.78 ($\text{CH}_3\text{C}\underline{\text{O}}$), 83.26 (C-1), 71.78 (C-5), 71.60 (C-4), 68.48 (C-2), 67.90 (C-3), 61.44 (C-6), 21.29 (CH_3COO), 21.16 ($\underline{\text{C}}\text{H}_3\text{COO}$), 21.13 ($\underline{\text{C}}\text{H}_3\text{COO}$), 21.01 ($\underline{\text{C}}\text{H}_3\text{COO}$).

Anal. Calculado para $\text{C}_{14}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_{11}\text{S}$: C, 39.4; H, 5.2; N, 6.6; O, 41.3; S, 7.5. Hallado: C, 39.5; H, 5.4; N, 6.4; O, 41.4; S, 7.3.

2,3,4-Tri-O-acetil- β -D-xilopiranosil sulfamida (CT11)

Agujas blancas; pf 176-177 °C ^1H RMN (200 MHz, DMSO- d_6): δ = 6.70 (da, J = 9.5 Hz, 1H, NH), 6.57 (br s, 2 H, NH_2), 5.12 (m, 2H, H-4, H-3), 4.95 (m, 1H, H-2), 4.69 (ta, J = 9.5 Hz, 1H, H-1), 4.20 (m, 1H, H-5), 2.02 (s, 3 H, CH_3COO), 1.98 (s, 3 H, CH_3COO), 1.90 (s, 3 H, CH_3COO).

^{13}C RMN (50 MHz, DMSO- d_6): δ = 170.30 ($\text{CH}_3\text{C}\underline{\text{O}}$), 170.22 (2 x $\text{CH}_3\text{C}\underline{\text{O}}$), 169.79 ($\text{CH}_3\text{C}\underline{\text{O}}$), 83.30 (C-1), 73.23 (C-3), 71.04 (C-2), 69.17 (C-4), 63.73 (C-5), 21.22 ($\underline{\text{C}}\text{H}_3\text{COO}$), 21.17 ($\underline{\text{C}}\text{H}_3\text{COO}$), 21.05 ($\underline{\text{C}}\text{H}_3\text{COO}$).

Anal. Calculado para $\text{C}_{11}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_9\text{S}$: C, 37.3; H, 5.1; N, 7.9; O, 40.6; S, 9.1. Hallado: C, 37.2; H, 5.0; N, 7.8; O, 40.9; S, 9.0.

2,3,4-Tri-O-acetil- β -L-arabinopiranosil Sulfamida (CT12)

Aceite coloreado. ^1H RMN (200 MHz, DMSO- d_6): δ = 6.70 (da, J = 9.5 Hz, 1H, NH), 6.57 (br s, 2 H, NH_2), 5.12 (m, 2H, H-4, H-3), 4.95 (m, 1H, H-2), 4.69 (ta, J = 9.5 Hz, 1H, H-1), 4.20 (m, 2H, H-5), 2.02 (s, 3 H, CH_3COO), 1.98 (s, 3 H, CH_3COO), 1.90 (s, 3 H, CH_3COO).

^{13}C RMN (50 MHz, DMSO- d_6): δ = 170.54 ($\text{CH}_3\text{C}\underline{\text{O}}$), 170.18 (2 x $\text{CH}_3\text{C}\underline{\text{O}}$), 169.87 ($\text{CH}_3\text{C}\underline{\text{O}}$), 83.56 (C-1), 71.64 (C-4), 68.99 (C-3), 68.80 (C-2), 67.59 (C-5), 21.47 ($\underline{\text{C}}\text{H}_3\text{COO}$), 21.35 ($\underline{\text{C}}\text{H}_3\text{COO}$), 21.14 ($\underline{\text{C}}\text{H}_3\text{COO}$), 21.01 ($\underline{\text{C}}\text{H}_3\text{COO}$).

Anal. Calculado para $\text{C}_{11}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_9\text{S}$: C, 37.3; H, 5.1; N, 7.9; O, 40.6; S, 9.1. Hallado: C, 37.5; H, 5.0; N, 7.7; O, 40.8; S, 9.2.

Intentos iniciales de síntesis de *N*-disacáridos

Figura 50: Métodos iniciales propuestos para la obtención de *N*-disacáridos.

Las vías sintéticas que se desarrollaron en principio se encuentran descritas en la Figura 50. Para ensayar la síntesis de los *N*-disacáridos se prepararon los glicales D-glucal (**CT1**) y D-galactal ó (**CT2**) para ser utilizados como reactivos de partida.

Lista de variantes ensayadas en intentos de preparación de *N*-disacáridos:

Vía 1: Síntesis en dos pasos, preparando primero la glicosilsulfamida (**CT7** ó **CT8**), y posterior reacción con D-glicales (**CT1** ó **CT2**) (Figura 51).

Figura 51: Vía 1.

A continuación se detallarán las variantes ensayadas de la Vía 1:

Vía 1-A (Catalizada mediante $\text{BF}_3\text{Et}_2\text{O}$): a una solución agitada conteniendo 0,5 mmol de la glicosil sulfamida (**CT7** ó **CT8**) y 0,45 mmol de **CT1**, en 2,5 ml de acetonitrilo anhidro bajo argón, se adicionó 0,2 ml de $\text{BF}_3\text{Et}_2\text{O}$ (0,03 mmol) a temperatura ambiente. La mezcla fue agitada durante el tiempo necesario hasta completa desaparición del glical, monitoreada mediante capa delgada (solvente de corrida hexano/acetato de etilo 1:1). La mezcla de reacción se neutralizó mediante agregado de 3 ml de solución de NaHCO_3 saturado y se extrajo con diclorometano anhidro (4 x 5 ml). Se reunieron los extractos orgánicos, se secó mediante agregado de NaSO_4 , y luego se filtró para posterior eliminación del solvente en evaporador rotativo. El producto crudo se lo secó hasta peso constante y se lo purificó en cromatografía en columna de sílica gel Merck 60 (230-400 mesh) utilizando como eluyente hexano-acetato de etilo 1:1.

Vía 1-B (Catalizada mediante $\text{HClO}_4\cdot\text{SiO}_2$): a una solución agitada magnéticamente conteniendo 0,5 mmol de la glicosil sulfamida (**CT7** ó **CT8**) y 0,45 mmol de **CT1**, en 2,5 ml de acetonitrilo anhidro bajo argón, se adicionó 0,5 mmol de $\text{HClO}_4\cdot\text{SiO}_2$ a temperatura ambiente. La mezcla fue agitada durante el tiempo necesario hasta completa desaparición del glical, monitoreada mediante capa delgada (solvente de corrida hexano/acetato de etilo 1:1). Luego de agitación por un tiempo determinado, la mezcla de reacción fue filtrada mediante celite, para luego eliminar el solvente en evaporador rotativo. El residuo se lo secó hasta peso constante y se lo purificó en cromatografía en columna de sílica gel utilizando como eluyente hexano-acetato de etilo 1:1.

Vía 1-C: (Catalizada mediante $\text{HBF}_4\cdot\text{SiO}_2$): En un balón de 10 ml se colocó 0,5 mmol de glicosil sulfamida (**CT7** ó **CT8**) 0,45 mmol de **CT1**, y 2,5 ml de acetonitrilo anhidro bajo argón. Mediante agitación magnética continua se adicionó 0,5 mmol de $\text{HClO}_4\cdot\text{SiO}_2$ a temperatura ambiente. Dicha mezcla se agitó hasta no observar el glical de partida, realizando una capa delgada (solvente de corrida hexano/acetato de etilo 1:1). Seguidamente la mezcla de reacción fue filtrada mediante celite, y posterior eliminación del solvente mediante evaporador rotativo. El residuo resultante se lo secó hasta peso

constante y se lo purificó en cromatografía en columna de sílica gel empleando hexano-acetato de etilo 1:1 como eluyente.

Vía 1-D: (Catalizada mediante HBr.PPh₃): Se mezcló en un balón de 10 ml, 0,5 mmol de la glicosil sulfamida (**CT7** ó **CT8**) y 0,45 mmol de (**CT1**), en 2,5 ml de acetonitrilo anhidro bajo argón, se adicionó 0,1 mg de HBr.PPh₃ (0,025 mmol) a temperatura ambiente. La mezcla se la agitó mediante bazo magnético durante hasta completa desaparición del glical, controlada mediante capa delgada (solvente de corrida hexano/acetato de etilo 1:1). Seguidamente se neutralizó la mezcla de reacción mediante agregado de 3 ml de solución de NaHCO₃ saturado, y posterior extracción con diclorometano anhidro (4 x 5 ml). Los extractos orgánicos fueron reunidos en un erlenmeyer, se secó dicha solución mediante el agregado de NaSO₄ anhidro, y luego se la filtró para finalmente eliminar el solvente en evaporador rotativo. El producto obtenido se lo secó hasta peso constante y se llevó a cabo su purificación por medio de cromatografía en columna de sílica gel Merck 60 (230-400 mesh) empleando como eluyente hexano-acetato de etilo 1:1.

Vía 2: Síntesis “one pot” (partiendo del D-glical para llegar directamente al *N*-disacárido) (Figura 52).

Figura 52: Vía 2 “one pot”.

Vía 2-A (Catalizada mediante BF₃Et₂O): a una solución agitada conteniendo 1 mmol del D-glical (**CT1** ó **CT2**) y 0,55 mmol de sulfamida en 5 ml de acetonitrilo anhidro bajo argón, se adicionó 2 gotas de BF₃Et₂O (0,2 ml) a temperatura ambiente. El procedimiento de aislamiento y purificación fue el mismo que el descrito en la Vía 1-A.

Vía 2-B: a una solución en agitación conteniendo 1 mmol del D-glicol (**CT1** ó **CT2**) y 0,55 mmol de sulfamida en 5 ml de acetonitrilo anhidro bajo argón, se adicionó 0,5 mmol de $\text{HClO}_4 \cdot \text{SiO}_2$ a temperatura ambiente. El posterior aislamiento y purificación fue el mismo que el descrito en la Vía 1-B.

Vía 2-C: a un balón de 10 ml conteniendo 1 mmol del D-glicol (**CT1** ó **CT2**) y 0,55 mmol de sulfamida en 5 ml de acetonitrilo anhidro bajo argón, se adicionó 0,5 mmol de $\text{HBF}_4 \cdot \text{SiO}_2$ a temperatura ambiente. El posterior aislamiento y purificación fue el mismo que el descrito en la Vía 1-B.

Descripción de ensayos de síntesis basados en las variantes descriptas:

- I. En un balón de 10 ml se adicionó 146 mg (0,5 mmol) de glicosil sulfamida derivada del D-glucal (**CT7**), 123 mg (0,45 mmol) de D-glucal (**CT1**), y luego se agregó bajo argón, 2,5 ml de acetonitrilo anhidro, agitando mediante buzo magnético. Inmediatamente se adicionó a la mezcla de reacción 0,2 ml de $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ a temperatura ambiente (Vía 1-A). Cada 20 minutos se realizó una capa delgada a la mezcla de reacción, junto con patrones de los reactivos, utilizando como solvente de corrida hexano/acetato de etilo 1:1. Al cabo de 40 min se observaron una serie de pequeñas manchas de leve intensidad alrededor de la glicosilsulfamida (R_f : 0,45) y una mancha coloreada de alta intensidad en la zona de siembra. La solución, además, iba adquiriendo coloración verdosa. Transcurrida 1 hora de reacción, no se observó presencia alguna de **CT1**, por lo que se cortó la reacción neutralizándola con solución saturada de NaHCO_3 . Luego del aislamiento y posterior evaporación del solvente, se obtuvo un residuo de color verde oscuro, el cual fue cromatografiado en una columna de silicagel (100 veces el peso del aceite, utilizando como solvente de corrida hexano/acetato de etilo 1:1). Se logró aislar una fracción conteniendo dos manchas tenues, con R_f muy similares a la glicosilsulfamida, junto con una tercera más tenue que las otras dos, con un R_f inferior. Dicha fracción fue analizada por RMN.

En dicho análisis, se observó en ^{13}C -RMN, una gran cantidad de señales débiles, algunas de ellas coincidentes con la glicosilsulfamida, otras, sin

relación alguna con el producto esperado. En ^1H -RMN se observó una gran cantidad de pequeñas señales, algunas de ellas muy anchas, muy complicadas de interpretar. Luego de un análisis minucioso se pudo determinar que dicha fracción estaba compuesta en parte por la glicosilsulfamida isomerizada sin reaccionar (es decir, se observó la presencia de α y β glicosilsulfamida), junto con diversos subproductos, supuestamente entre ellos, el producto buscado, pero en muy baja proporción.

La mayor parte de la mezcla de reacción se halló concentrada en la mancha de alta intensidad observada en la zona de siembra, a la cual se la analizó por RMN, observándose incontables picos de muy baja intensidad, consecuencia de una alta descomposición de los reactivos de partida.

Se realizó por duplicado, teniendo un total cuidado de secado de reactivos, y de agregado de argón, para eliminar cualquier vestigio de humedad. Se obtuvieron resultados idénticos.

Se probó partiendo de **CT2** en vez de **CT1**, observándose resultados muy similares a los vistos empleando **CT1**.

- II. Con iguales cantidades de reactivos que en el caso anterior, pero adicionando 68 mg de $\text{HClO}_4 \cdot \text{SiO}_2$ (0,5 mmol, **Vía 1-B**) en vez de $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$, a temperatura ambiente. En este ensayo, se observó desaparición completa del D-glucal al cabo de 90 min. Por capa delgada se observaron idénticos resultados al ensayo anterior. Luego del aislamiento consistente en filtración mediante celite, y posterior eliminación del solvente, se purificó por cromatografía, utilizando como solvente de corrida hexano/acetato de etilo 1:1, y unas 100 veces en peso de sílicagel. Finalmente se analizó por RMN una fracción de muy similares características al caso anterior. Asimismo se observaron señales casi idénticas tanto en carbono 13 como en el RMN protónico.

Se realizó por duplicado, obteniéndose resultados idénticos.

- III. Empleando idénticas cantidades de reactivos que en el caso anterior, pero adicionando 67,5 mg de $\text{HBF}_4 \cdot \text{SiO}_2$ (0,5 mmol, **Vía 1-C**) en vez de $\text{HClO}_4 \cdot \text{SiO}_2$, a temperatura ambiente. Al cabo de una hora, por capa

delgada se observó una serie de manchas, nuevamente muy similares a los casos anteriores, observándose la presencia de D-glucal y de la glicosil sulfamida. Al cabo de dos horas de reacción, no se observaron cambios, por lo que se aisló la mezcla como en el caso anterior. Al cromatografiarla, se obtuvieron idénticos resultados al caso anterior, también en RMN se observaban una gran cantidad de señales de muy baja intensidad.

- IV. Se realizó un ensayo idéntico al caso anterior, pero a temperatura constante de 40 °C. Se observó, al cabo de una hora, una coloración verdosa intensa, resultado de una alta descomposición de los reactivos de partida, en especial del D-glucal. Se comprobó mediante capa delgada, la presencia de incontables manchas de leve intensidad, junto con una mancha intensa coloreada, en la zona de siembra.
- V. Se realizó un ensayo idéntico al caso **III**, pero en este caso se intentó dejar la solución en agitación hasta completa desaparición de los reactivos de partida. Al cabo de 12 hs la desaparición del D-glucal fue completa, no así de la glicosilsulfamida, la cual nuevamente presentó isomerización. Nuevamente se observaron una numerosa cantidad de manchas mediante capa delgada, que confirmaban la descomposición del D-glucal, y prácticamente nula aparición del producto buscado. El análisis por RMN no reveló aparición alguna de producto.
- VI. Se ensayó la **Vía 1-D**, empleando 0,025 mmoles de HBr.Ph₃, en idénticas condiciones que I. Al cabo de 1 hora de reacción, no se observó rastros de D-glucal, pero sí de la glicosilsulfamida (presencia de α y β). Con un R_f apenas mayor que la glicosilsulfamida, se notó la aparición de una mancha muy tenue. Mediante purificación por cromatografía en columna (como en I) luego del aislamiento, no se obtuvieron cantidades significativas del supuesto producto, pero sí se recuperó la mayor parte de la glicosilsulfamida (α y β). Esto fue revelado mediante RMN.
- VII. Se probó la **Vía 2-A**, adicionando BF₃.Et₂O (0,2 ml) a una mezcla de 1mmol del D-glucal y 0,55 mmol de sulfamida disuelta en 5 ml de acetonitrilo anhidro, bajo argón. Al cabo de 1 hora se observó la

aparición de la glicosilsulfamida correspondiente. El hecho de continuar con la reacción en agitación significó la completa desaparición del D-glicial al cabo de 2 horas, y la isomerización de la glicosilsulfamida sintetizada. No se observó aparición alguna de producto. La solución en este lapso tomó una coloración verdosa intensa (descomposición del D-glicial principalmente). No se llevó a cabo la purificación luego del aislamiento.

- VIII. Se procedió como en el ensayo anterior, pero empleando $\text{HClO}_4 \cdot \text{SiO}_2$ (0,5 mmol) (**Vía 2-B**). Los resultados observados fueron idénticos, salvo que la descomposición del D-glicial procedió de forma más lenta, al cabo de 3 hs ya no se observaba su presencia. Se aisló la mezcla de reacción (procedimiento idéntico al caso II), y en la purificación sólo pudo obtenerse en cantidades apreciables la glicosilsulfamida isomerizada.
- IX. Empleando $\text{HBF}_4 \cdot \text{SiO}_2$ (**Vía 2-C**) se observó un resultado idéntico al caso anterior. No se purificó la mezcla de reacción.

Síntesis de *N*-disacáridos a partir de *N*-β-glicosilsulfamidas mediante Amberlyst 15

Se procedió a realizar nuevamente ensayos de síntesis de *N*-disacáridos con Amberlyst 15 (Figura 53).

Figura 53: Preparación de *N*-disacáridos mediante Amberlyst 15.

Procedimiento general para la síntesis de *N*-disacáridos empleando resinas Amberlyst 15:

A una solución en agitación continua conteniendo 1 mmol de la glicosilsulfamida (**CT9** ó **CT10**) y el correspondiente D-glicol (1,1 equivalente, **CT1** ó **CT2**), en acetonitrilo anhidro, se adicionó 30% en peso de resina Amberlyst 15, a temperatura ambiente. La mezcla fue agitada durante el tiempo indicado, monitoreada mediante capa delgada. La mezcla de reacción obtenida se filtró y se lavó la resina con diclorometano anhidro. Se reunieron los lavados con el filtrado, se eliminó el solvente en evaporador rotativo y se secó hasta peso constante. El producto crudo se purificó en cromatografía en columna de sílica gel Merck 60 (230-400 mesh) utilizando como eluyente diclorometano/acetato de etilo 2:1 para obtener las correspondientes mezclas de reacción que poseen los productos y parte de la glicosilsulfamida sin reaccionar.

En las reacciones ensayadas no pudieron estimarse los rendimientos ya que aún luego de varias horas de reacción siempre se observaba la presencia de la glicosilsulfamida de partida (verificada mediante CCD solvente de elución hexano/acetato de etilo 1:1 ó diclorometano/acetato de etilo 2:1, revelado mediante H₂SO₄/MeOH 95:5 a la llama). A tiempos de reacción mayores a 2 ó 6 horas según el caso, la descomposición del D-glicol se tornaba notoria,

tomando la mezcla una coloración verdosa, dificultando el aislamiento y purificación de los productos.

Se intentó varias veces purificar las mezclas de reacción obtenidas en todos los ensayos recrystalizando, empleando diversos solventes y mezclas de solventes (como hexano/acetato, diclorometano/acetato, tolueno, cloroformo, éter etílico, etc), sin lograr purificar notablemente a los productos. Se probó además purificar mediante cromatografía en columna, empleando 40, 50, 80, 100 y hasta 200 veces en peso de sílicagel Merck 60(230-400 mesh), utilizando como solvente diversas proporciones de hexano/acetato de etilo. Siempre se observaba una gran cantidad de glicosilsulfamida presente, al observar un R_f muy cercano a los productos, con lo cual no fue posible una purificación satisfactoria. Este hecho dificultaba la interpretación de los espectros de RMN, y no pudieron estimarse los rendimientos.

Síntesis de *N*-disacáridos empleando s-trioxano

Se intentó obtener *N*-disacáridos que presenten puente metilén bis(sulfonamido) a partir de glicosulfamidas 2,3 insaturadas(**CT7,CT8**) (Figura 54). Los ensayos de síntesis se basaron en una técnica descrita para la obtención de *N,N*-metilén-bis-(*N*-metil-bencilsulfonamidas).¹³⁸ La técnica consistió en preparar una solución con 1 mmol de la glicosilsulfamida, y 0.33 mmoles de trioxano en acetonitrilo anhidro, a la cual se adicionó 0,1 ml de BF₃Et₂O, con agitación constante, a temperatura ambiente. Durante el agregado del catalizador se observó una notable turbidez. A los 5' se realizó una CCD, observándose una cantidad apreciable de manchas, con R_f muy similares entre sí. Prácticamente toda la glicosilsulfamida sufrió descomposición, sin lograr la reacción esperada. Repitiendo dicha reacción a 15 °C se observó una descomposición más lenta, pero sin llegar a reaccionar el reactivo de manera apreciable.

Figura 54: Primer Vía propuesta de síntesis de *N*-disacáridos con s-trioxano a partir de glicosilsulfamidas 2,3- insaturadas.

Posteriormente se ensayó nuevamente la reacción con trioxano, con idénticas condiciones, pero utilizando como reactivo de partida las glicosilsulfamidas per-*O*-acetiladas **CT10** (Figura 55). A diferencia del primer ensayo, esta vez no se observó descomposición alguna luego de 5 minutos,

¹³⁸ Bravo, R. D. Tesis Doctoral. UNLP. **1984**.172-73.

pero ni siquiera aparición de producto por capa delgada durante las primeras 12 horas (solvente corrida diclorometano/acetato de etilo 2:1), sólo estaba presente la mancha correspondiente al reactivo de partida **CT10**, ($R_f = 0,38$). Al cabo de 20 horas aproximadamente se observó la aparición de una mancha con un R_f superior al reactivo de partida ($R_f = 0,74$). Se dejó en agitación la reacción durante varios días, debido a que se observaba reactivo. Dado que entre 80-96 horas no se observaban cambios, se cortó la reacción mediante el agregado de solución de 5 ml de NaHCO_3 (sat), y se purificó por cromatografía en columna de sílicagel (solvente elusión diclorometano/acetato de etilo 2:1). Mediante RMN bidimensional HSQC se comprobó su estructura. Se obtuvo un rendimiento del 50%.

Figura 55: Segunda vía propuesta de preparación de *N*-disacáridos a partir de *N*-glicosulfamidas empleando *s*-trioxano como generador de formaldehído in situ.

A partir del producto obtenido, se realizaron nuevos ensayos para determinar las condiciones óptimas de reacción. En la Tabla 17 se detallan las condiciones de cada ensayo. Además de dichos ensayos se realizó uno en el cual se empleó una menor cantidad de trioxano (0,20 mmoles), observándose aparición de producto al cabo de 78 hs, y aún luego de 100 hs se observaba presencia de reactivo de forma apreciable por medio de cromatografía de capa delgada. El rendimiento obtenido al cabo de 120 hs fue del 30%.

Tabla 17: Reacción de 2,3,4,6-tetra-O-acetil galactopiranosil sulfamida (**CT10**) con s-trioxano^a

Cantidad BF ₃ Et ₂ O (ml)	Tiempo(hs)	Temperatura(°C)	Rendimiento (%)
0,1	80	25	50
0,2	72	25	52
0,3	72	25	45
0,3	30	40	60

a) Reacciones realizadas en CH₃CN usando 1 mmol de la glicosilsulfamida y 0,33 mmol de s-trioxano en 6 ml de acetonitrilo anhidro.

Procedimiento general optimizado para la síntesis de *N*-disacáridos empleando s-trioxano:

Se utilizó una solución de 1 mmol de glicosil sulfamida y 0.33 mmoles de s-trioxano en 10 ml de acetonitrilo anhidro, a la cual se le adicionó 2 equiv. de BF₃Et₂O (aprox. 0,3 ml). Se adosó al balón contenedor de dicha mezcla de reacción un refrigerante a reflujo, conteniendo en su extremo una bocha con CaCl₂ para proteger de la humedad ambiente. Se trabajó a una temperatura constante de 40°C, en un baño de siliconas. Luego de finalizada la reacción (monitoreada por CCD, solvente de elución CH₂Cl₂/AcOEt 2:1), se neutralizó mediante la adición de 5 ml de solución acuosa de NaHCO₃ (saturada), y posteriormente se extrajo con CH₂Cl₂ (4 x 10 ml). Se reunieron los extractos orgánicos, los cuales se lavaron con solución saturada de NaCl, y se secó con MgSO₄. Finalmente se eliminó el solvente mediante evaporador rotatorio, y el producto crudo se purificó en cromatografía en columna de sílica gel Merck 60 (230-400 mesh) (eluyente CH₂Cl₂/AcOEt 2:1). Es de destacar que todos los productos son muy solubles en la mayoría de los solventes orgánicos ensayados (diclorometano, cloroformo, acetato de etilo, acetonitrilo, dimetilsufóxido, diversas mezclas hexano/acetato de etilo).

Se aplicaron las condiciones más eficientes a las demás sulfamidas per-O-acetiladas **CT9**, **CT11** y **CT12** con s-trioxano, lo que permitió obtener otros tres compuestos (Tabla 18). La mezcla de reacción en cada uno de los casos pudo ser fácilmente purificada por cromatografía en columna. Sin embargo, al analizar minuciosamente los espectros de ¹H y ¹³C RMN realizados en CDCl₃ de los productos purificados, conjuntamente con los espectros bidimensionales

HSQC, se dudó de la identidad de los compuestos obtenidos, por lo cual se realizaron análisis adicionales (espectrometría RMN en DMSO deuterado y espectrometría de masas), llegando a que la estructura más probable de los productos de cada ensayo fue la representada en la Figura 56. Este análisis se detallará en la discusión de los resultados.

Tabla 18: Reacción de dimerización de glicosil sulfamidas con s-trioxano

Glicosilsulfamida ^a	Tiempo(hs)	Rend.(%)	Producto ^b
Glucosa(CT9)	30	66	D1
Galactosa(CT10)	30	60	D2
Arabinosa(CT11)	36	52	D3
Xilosa(CT12)	36	65	D4

a) Glicosil sulfamida per-O-acetilada, derivada del hidrato de carbono correspondiente.

b) Los rendimientos corresponden a los productos purificados.

Donde R = glicosido per-O-acetilado de partida

Figura 56: Estructura más probable de los compuestos obtenidos empleando s-trioxano.

Propiedades físicas de los nuevos *N*-disacáridos con puente metilén bissulfonamido:

Disacárido D1

Sólido blanco amorfo; Pf: 160 °C descompone. ^1H RMN (500 MHz, CDCl_3): δ = 5.34 (m, 2H, H-4), 5.29 (s, 1H, NH), 5.27 (s, 1H, NH), 5.02 (m, 2H, H-3), 4.93 (m, 3H, H-2, H-1, P), 4.84 (ta, J = 9.6 Hz, 2H, H-1', H-2'), 4.28 (m, 2H, H-6), 4.17 (da, J = 4.9 Hz, 2H, H-6'), 3.84 (ddd, J = 10.1, 4.6, 3.1 Hz, 1H, H-5), 3.76 (ddd, J = 10.1, 4.2, 3.3 Hz, 1H, H-5'), 2.14 (s, 3H, CH_3COO), 2.13 (s, 3H, CH_3COO), 2.11 (s, 3H, CH_3COO), 2.07 (s, 3H, CH_3COO), 2.05 (s, 3H, CH_3COO), 2.04 (s, 3H, CH_3COO).

^{13}C RMN (126 MHz, CDCl_3): δ = 171.09 ($\text{CH}_3\text{C}\underline{\text{O}}$), 170.51 ($\text{CH}_3\text{C}\underline{\text{O}}$), 170.43 ($\text{CH}_3\text{C}\underline{\text{O}}$), 169.91 ($\text{CH}_3\text{C}\underline{\text{O}}$), 169.80 ($\text{CH}_3\text{C}\underline{\text{O}}$), 169.37 ($\text{CH}_3\text{C}\underline{\text{O}}$), 83.32 (C-1), 74.85 (C-5), 73.66 (C-5'), 72.78 (C-4), 72.46 (C-4'), 69.78 (C-2), 67.90 (C-2'), 67.81 (C-3), 67.76 (C-3'), 61.76 (C-6), 61.51 (C-6'), 59.90 (P), 60.12 (P) 20.84 ($\underline{\text{C}}\text{H}_3\text{COO}$), 20.76 ($\underline{\text{C}}\text{H}_3\text{COO}$), 20.63 ($\underline{\text{C}}\text{H}_3\text{COO}$), 20.60 ($\underline{\text{C}}\text{H}_3\text{COO}$), 20.57 ($\underline{\text{C}}\text{H}_3\text{COO}$), 20.53 ($\underline{\text{C}}\text{H}_3\text{COO}$).

Disacárido D2

Sólido blanco amorfo; Pf: 151 °C descompone. ^1H RMN (500 MHz, CDCl_3): δ = 5.47 (d, J = 3.2 Hz, 1H, H-3), 5.44 (d, J = 2.7 Hz, 1H, H-3'), 5.42 (s, 1H, NH), 5.40 (s, 1H, NH), 5.19 (d, J = 9.0 Hz, 1H, H-2), 5.17 (d, J = 8.4 Hz, 1H, H-2'), 5.14 (dd, J = 3.2, 1.7 Hz, 1H, H-4), 5.12 (dd, J = 3.2, 1.1 Hz, 1H, H-4'), 5.09 (d, J = 9.2 Hz, 1H, H-1), 5.00 (m, 2H, P), 4.86 (m, 3H, H-1', P), 4.25 (dd, J = 11.5, 6.9 Hz, 2H, H-6), 4.19 (m, 2H, H-6'), 4.07 (m, 2H, H-5, H-6), 4.00 (t, J = 6.3 Hz, 1H, H-5'), 2.19 (s, 3H, CH_3COO), 2.15 (s, 3H, CH_3COO), 2.12 (s, 3H, CH_3COO), 2.08 (s, 3H, CH_3COO), 2.03 (s, 3H, CH_3COO), 2.02 (s, 3H, CH_3COO).

^{13}C RMN (126 MHz, CDCl_3): δ = 170.54 ($\text{CH}_3\text{C}\underline{\text{O}}$), 170.30 ($\text{CH}_3\text{C}\underline{\text{O}}$), 170.24 ($\text{CH}_3\text{C}\underline{\text{O}}$), 169.82 ($\text{CH}_3\text{C}\underline{\text{O}}$), 169.68 ($\text{CH}_3\text{C}\underline{\text{O}}$), 169.64 ($\text{CH}_3\text{C}\underline{\text{O}}$), 83.83 (C-1), 73.61 (C-5), 72.86 (C-5'), 70.99 (C-4), 70.59 (C-4'), 67.42 (C-2), 67.15 (C-2'), 66.64 (C-3), 65.63 (C-3'), 61.97 (C-6), 61.23 (C-6'), 59.92 (P),

59.53 (P), 20.86 ($\underline{\text{C}}\text{H}_3\text{COO}$), 20.69 ($\underline{\text{C}}\text{H}_3\text{COO}$), 20.62 ($\underline{\text{C}}\text{H}_3\text{COO}$), 20.55 ($\underline{\text{C}}\text{H}_3\text{COO}$), 20.48 ($\underline{\text{C}}\text{H}_3\text{COO}$), 20.46 ($\underline{\text{C}}\text{H}_3\text{COO}$).

Disacárido D3

Sólido blanco amorfo; Pf: 130 °C descompone. ^1H RMN (500 MHz, CDCl_3): δ = 6.19 (s, 1H, NH), 6.16 (s, 1H, NH), 5.36 (m, 1H, H-2), 5.30(m, 1H, H-2'), 5.13 (m, 2H, H-3), 4.95 (m, 5H, P, H-4, H-2', H-1), 4.75 (m, 3H, P, H-1') 3.82(m, 2H, H-5), 4.19 (m, 1H, H-5'), 4.01 (dd, J = 13.5, 2.1 Hz, 1H, H-5), 2.20 (s, 3H, CH_3COO), 2.16 (s, 3H, CH_3COO), 2.13 (s, 3H, CH_3COO), 2.07 (s, 3H, CH_3COO), 2.07 (s, 3H, CH_3COO), 2.06 (s, 3H, CH_3COO).

^{13}C RMN (126 MHz, CDCl_3): δ = 170.53 ($\text{CH}_3\underline{\text{C}}\text{OO}$), 169.91 ($\text{CH}_3\underline{\text{C}}\text{OO}$), 169.89 ($\text{CH}_3\underline{\text{C}}\text{OO}$), 169.71 ($\text{CH}_3\underline{\text{C}}\text{OO}$), 169.86 ($\text{CH}_3\underline{\text{C}}\text{OO}$), 169.40 ($\text{CH}_3\underline{\text{C}}\text{OO}$), 83.83 (C-1), 83.64 (C-1'), 71.27 (C-4), 70.78 (C-4'), 70.15 (C-3), 69.69 (C-3'), 67.68 (C-2), 67.56 (C-2'), 65.84 (C-5), 65.68 (C-5'), 59.50 (P), 59.68 (P), 20.83 ($\underline{\text{C}}\text{H}_3\text{COO}$), 20.71 ($\underline{\text{C}}\text{H}_3\text{COO}$), 20.69 ($\underline{\text{C}}\text{H}_3\text{COO}$), 20.62 ($\underline{\text{C}}\text{H}_3\text{COO}$), 20.59 ($\underline{\text{C}}\text{H}_3\text{COO}$), 20.57 ($\underline{\text{C}}\text{H}_3\text{COO}$).

Disacárido D4

Sólido blanco amorfo; Pf: 145 °C descompone. ^1H RMN (500 MHz, CDCl_3): δ = 6.47 (s, 1H, NH), 6.19 (s, 1H, NH), 5.78 (dd, J = 10.7, 4.6 Hz, 1H, NH), 5.33 (t, J = 8.7 Hz, 1H, H-3), 5.29(m, 1H, H-3'), 5.00 (m, 4H, P, H-4, H-2), 4.92 (m, 5H, P, H-4', H-2', H-1), 4.24 (dd, J = 11.5, 5.6 Hz, 1H, H-5), 4.17 (dd, J = 11.6, 5.7 Hz, 1H, H-5), 3.45 (dd, J = 11.3, 2.6 Hz, 1H, H-5'), 3.42 (dd, J = 6.8, 4.2 Hz, 1H, H-5'). 2.14 (s, 3H, CH_3COO), 2.14 (s, 3H, CH_3COO), 2.13 (s, 3H, CH_3COO), 2.07 (s, 3H, CH_3COO), 2.07 (s, 3H, CH_3COO), 2.06 (s, 3H, CH_3COO).

^{13}C RMN (126 MHz, CDCl_3): δ = 170.02 ($\text{CH}_3\underline{\text{C}}\text{OO}$), 169.94 ($\text{CH}_3\underline{\text{C}}\text{OO}$), 169.88 ($\text{CH}_3\underline{\text{C}}\text{OO}$), 169.82 ($\text{CH}_3\underline{\text{C}}\text{OO}$), 169.74 ($\text{CH}_3\underline{\text{C}}\text{OO}$), 169.68 ($\text{CH}_3\underline{\text{C}}\text{OO}$), 83.67 (C-1), 79.70 (C-1'), 72.15 (C-3), 71.95 (C-3'), 70.24 (C-2), 68.45 (C-4), 68.23 (C-4'), 64.78 (C-5), 64.43 (C-5'), 60.07 (P), 59.68 (P), 29.69 ($\underline{\text{C}}\text{H}_3\text{COO}$),

20.88 (CH₃COO), 20.76 (CH₃COO), 20.67 (CH₃COO), 20.64 (CH₃COO), 20.61 (CH₃COO).

Discusión de los Resultados

Síntesis de *N*-glicosilsulfonamidas 2,3-insaturadas empleando Resinas de Intercambio Iónico Amberlyst 15

Como se ha descrito previamente en nuestro laboratorio, se han podido sintetizar sulfonamidoglicósidos a partir de D-glicales, utilizando como catalizador $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$, obteniéndose efectivos inhibidores de la anhidrasa carbónica. Se demostró además que los catalizadores $\text{HClO}_4 \cdot \text{SiO}_2$ y $\text{HFB}_4 \cdot \text{SiO}_2$ son una buena alternativa para este tipo de reacciones. Otorgan rendimientos ligeramente más bajos, pero dichos catalizadores pueden ser reutilizados, son fácilmente manejables y no son altamente tóxicos.⁷⁹⁻⁸²

En esta tesis, visto las grandes ventajas que presentan con respecto a otros catalizadores, y que recientemente se ha reportado el empleo de Amberlyst 15 en la preparación de *O*- y *S*-glicósidos 2,3-insaturados a partir de 3,4,6-tri-*O*-acetil-D-glucal, vía reordenamiento de Ferrier,¹³¹ se procedió a investigar el uso de Amberlyst 15 en reacciones de sulfonamidoglicosilación (Figura 46), para luego, en base a los resultados obtenidos, emplear tal catalizador en ensayos de síntesis de *N*-disacáridos.

Figura 57: Síntesis de glicosilsulfonamidas con reordenamiento de Ferrier empleando Resinas Amberlyst 15.

Los resultados obtenidos en la búsqueda de las condiciones óptimas de reacción permitieron determinar que se obtienen los mejores rendimientos empleando 30% en peso de Amberlyst 15 a temperatura ambiente, con un tiempo de reacción bajo, inferior a 1 hora.

La aplicación de estas condiciones permitió obtener diversas glicosilsulfonamidas (Tabla 19). El análisis de los espectros RMN de ^1H y ^{13}C

confirmaron la configuración anomérica de los sulfonamidoglicósidos obtenidos en cada reacción, por comparación con los datos de la literatura. La selectividad de la reacción estuvo de acuerdo con los resultados previamente descriptos en nuestro laboratorio.⁷⁹

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, y se las utilizó nuevamente en otros ciclos. Los rendimientos obtenidos fueron siempre mayores ó iguales al 85% y se observó además que el empleo del catalizador reciclado no influyó en la selectividad anomérica.

Tabla 19: 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)	$\alpha:\beta$	Rto(%) [*]	roducto
CT1	Metan	40	95:5	94	AM1
	Etan	60	87:13(85:15)	90(95)	AM2
	Bencil	40	70:30	94	AM3
	<i>p</i> -Toluen	60	78:22(87:13)	82(95)	AM4
	<i>N</i> -Metil- <i>p</i> -toluen	60	87:13(95:5)	78(80)	AM5
CT2	Metan	40	95:5	75	AM6
	Etan	50	84:16(83:17)	85(97)	AM7
	Bencil	60	95:5	72	AM8
	<i>p</i> -Toluen	60	90:10(80:20)	75(96)	AM9
	<i>N</i> -Metil- <i>p</i> -toluen	40	87:13(95:5)	70(86)	AM10

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

Al revisar las proporciones anoméricas obtenidas en los productos, 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-glical un menor impedimento estérico que facilita el ataque del nucleófilo. Esto se ha descripto

en detalle en una publicación en la cual se estudió la estabilidad conformacional de una glicosilsulfonamida.¹³⁹

Se ha descrito que los efectos presentes en el anómero α se incrementan por medio de una interacción orbital $n_N \rightarrow \sigma^*_{C-O}$ (efecto *exo-anomérico*). En las *N*-glicosilsulfonamidas 2,3-insaturadas se observó una interacción antiperiplanar entre el nitrógeno del grupo sulfonamido y el hidrógeno anomérico, que permite la expresión de la interacción orbital $n_N \rightarrow \sigma^*_{C-O}$. En las α -glucopiranosas esta conformación localiza necesariamente al hidrógeno anomérico bajo el anillo piranósico, ocasionando un incremento del efecto estérico (esto se detallará en la próxima sección). Pero, como la conformación del anillo en las *N*-glicosil sulfonamidas 2,3-insaturadas es casi plana,¹⁴⁰ ocasiona la ausencia de dichas interacciones estéricas que desfavorecerían al anómero α . Este hecho también provoca la mayor estabilidad termodinámica del anómero α frente al β para esta reacción en particular.¹⁴¹

En resumen, no sólo la interacción orbital $n_O \rightarrow \sigma^*_{C-N}$ (efecto *endo-anomérico*) está presente, sino también el efecto *exo-anomérico*, los cuales en conjunto favorecen la obtención del isómero α en mayor proporción que el isómero β (Figura 58).

Figura 58: Efectos endo- y exo-anoméricos en α -sulfonamidoglicósidos 2,3-insaturados.

Si bien los rendimientos obtenidos son ligeramente menores a los observados empleando $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$, el uso de la resina Amberlyst 15 proporciona muy buenos rendimientos y simplifica el aislamiento de las *N*-

¹³⁹ Alegre, M. L.; Pis Diez, R.; Colinas, P. A. *J. Mol. Struct.* **2009**, 919, 223-226.

¹⁴⁰ Colinas, P. A.; Bravo, R. D.; Echeverría, G. A. *Carbohydr. Res.* **2008**, 343, 3006-3009.

¹⁴¹ Lavecchia, M. J.; Pis Diez, R.; Colinas, P. A. *Carbohydr. Res.* **2011**, 346, 442-445.

glicosilsulfonamidas. Además debe destacarse su menor costo e impacto medioambiental, y la posibilidad de su reutilización, con mínima pérdida en su actividad.

Cerrando este estudio en particular, se puede afirmar que las resinas Amberlyst 15 permiten obtener *N*-glicosilsulfonamidas con buenos rendimientos y alta α estereoselectividad. Las glicosilsulfonamidas **AM2 y AM7** han mostrado actividad antiproliferativa en el rango micromolar frente a líneas celulares de carcinomas hepatocelular (Hep-G2) y pulmonar (A549) humanos.¹⁴² En cambio los glicósidos **AM4 y AM9** han mostrado ser inhibidores poco potentes de la línea celular A549 pero presentan muy buena actividad frente a la Hep-G2.⁹⁹ Los productos obtenidos empleando bencilsulfonamida y metansulfonamida son nuevos y han sido caracterizados mediante punto de fusión y RMN (¹H, y ¹³C). Posteriormente se realizarán ensayos para evaluar la actividad biológica de estos nuevos compuestos.

Análisis del espectro ¹H y ¹³C RMN del compuesto AM6:

Las señales de RMN de ¹³C obtenidas de dicho carbohidrato fueron las siguientes:

4,6-Di-O-acetil-2,3-dideoxi- α -D-treo-hex-2-enopiranosil metansulfonamida (AM6) (Figura 59):

¹³C RMN (CHCl₃ d₁): δ = 170.79 (CH₃COO), 170.58 (CH₃COO), 126.70 (C-3), 129.70 (C-2), 76.87 (C-1), 67.40 (C-5), 63.35 (C-4), 62.49 (C-6), 43.38 (CH₃), 20,96 (CH₃COO), 21.16 (CH₃COO).

Todas las señales fueron asignadas en base a tablas experimentales¹⁴³ y aproximaciones mediante el programa computacional Chem Draw Ultra 10, y comparaciones con las señales obtenidas del reactivo de partida **CT1**. Se observaron las señales de los carbonos carbonílicos a δ = 170.79 y 170.58 ppm. En tanto que a δ = 20,96 y 21.16 ppm se hallaron las señales correspondientes a los metilos enlazados a los carbonilos.

¹⁴² Crespo, R.; G. de Bravo, M.; Colinas, P. A.; Bravo, R. D. *Bioorg. & Med. Chem. Lett.*, **2010**, 20, 6469–6471.

¹⁴³ Fresenius, W.; Huber, J. F. K.; Pungor, E.; Rechnitz, C. A.; Simon, W.; West, Th. S. *Tables of spectral data for structure determination of organic compounds*, 2nd edition, Springer-Verlog, Berlin, **1989**.

Figura 59: AM6 RMN de ^{13}C .

Las señales que indican que hubo reordenamiento de Ferrier fueron las correspondientes a $\delta = 129.70$ (C-2) y 126.70 ppm (C-3), ya que, al comparar dichas señales con las obtenidas con el compuesto de partida **CT1**, hubo un corrimiento considerable de desplazamientos químicos (los C-2 y C-3 de **CT1** se hallaron a 99.01 67.14 ppm, en el caso de **CT1**). Otra señal que evidenció el reordenamiento de Ferrier fue la del C-1 ($\delta = 76.87$ ppm), muy diferente comparada con la de **CT1** (C-1 $\delta = 145.65$ ppm). Las tres señales muy próximas al carbono anomérico correspondieron a las señales del solvente. Las señales correspondientes al C-4 y C-5 se hallaron a $\delta = 63.35$ y 67.40 ppm, en tanto que la señal perteneciente al C-6 se halló a $\delta = 62.49$ ppm, respaldadas mediante el análisis del espectro HSQC (Figura 61), en el cual se observa claramente la zona celeste (**6**), que corresponde a un grupo $-\text{CH}_2-$ (Las zonas anaranjadas corresponden a carbonos $-\text{CH}_3$ ó $-\text{CH}-$. En tanto que las zonas celestes corresponden a carbonos $-\text{CH}_2-$). Finalmente la señal a 43.38 ppm correspondió al grupo metilo enlazado a la función $-\text{SO}_2\text{NH}-$.

Las señales ^1H correspondientes al compuesto AM6 fueron las siguientes (Figura 60):

^1H RMN ($\text{CHCl}_3 d_1$): $\delta = 6.19$ (ddd, 1H, $J = 10.0, 5.4, 1.7$ Hz, H-3), 6.01 (m, 1H, NH, H-2), 5.58 (ddd, 1H, $J = 9.1, 3.1, 1.6$ Hz, H-1), 5.03 (dd, 1H, $J = 5.4, 1.7$ Hz, H-4), 4.21 (m, 3H, H-5, 2xH-6), 3.12 (s, 1H, CH_3), 2.07 (s, 1H, CH_3COO), 2.01 (s, 1H, CH_3COO).

Figura 60: AM6 RMN de ^1H .

En este espectro fue notable la señal correspondiente al metilo enlazado a la función $-\text{SO}_2\text{NH}-$ (singulete a $\delta = 3.12$ ppm), en tanto que los singuletes a $\delta = 2.07$ y 2.01 ppm correspondieron sin duda a los metilos de los grupos acetilos. Las señales de los C-5 y C-6 conformaron un multiplete a 4.21. Se corroboró la identidad de estos hidrógenos mediante análisis del espectro bidimensional HSQC.

En forma ampliada en la Figura 60 se observa el doble doblete del H-4 ($\delta = 5.03$ ppm, $J = 5.4, 1.7$ Hz) cuyas constantes de acoplamiento coincidieron con el H-3 ($\delta = 6.19$ ppm, $J = 10.0, 5.4, 1.7$ Hz), también ampliado en la figura. En tanto que el H-1 se halló a $\delta = 5.58$ ppm ($J = 9.1, 3.1, 1.6$ Hz) como un doble doblete. Finalmente la señal del H-2 conformó un multiplete con el H de la función $-\text{SO}_2\text{NH}-$ a $\delta = 6.01$ ppm.

Figura 61: AM6 Bidimensional HSQC.

Síntesis de *N*-glicosilsulfonamidas saturadas a partir de piranosas per-*O*-acetiladas

Se planteó la siguiente preparación de nuevas *N*-glicosilsulfonamidas a partir de carbohidratos per-*O*-acetilados (Figura 49), con el objetivo de utilizar reactivos aún más sencillos de elaborar que los D-glicales empleados, y capaces de resistir las condiciones ácidas necesarias en la obtención de *N*-disacáridos. En este trabajo se utilizó pentaacetato de glucopiranososa y etansulfonamida, ensayando con diversos catalizadores y temperaturas (Tabla 15) para determinar las condiciones óptimas de reacción en la obtención de las *N*-glicosilsulfamidas per-*O*-acetiladas.

Figura 62: Sulfonamidoglicosilación de piranosas per-*O*-acetiladas empleando $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$.

Tabla 20: Reacción de pentaacetato de D-glucosa con etansulfonamida bajo diferentes condiciones.^a

Entrada	Promotor	Sulfonamida (equiv)	T(°C)	Tiempo(hs)	Rto (%)
1	$\text{BF}_3\text{Et}_2\text{O}$ (2 equiv.)	2	25	12	82
2	$\text{BF}_3\text{Et}_2\text{O}$ (2 equiv.)	2	40	12	50
3	$\text{BF}_3\text{Et}_2\text{O}$ (1.5 equiv.)	1.5	25	12	65
4	$\text{BF}_3\text{Et}_2\text{O}$ (1 equiv.)	1	25	12	40
5	$\text{HClO}_4 \cdot \text{SiO}_2$ (2 g.) ^b	2	25	24	-
6	$\text{HClO}_4 \cdot \text{SiO}_2$ (4 g.) ^b	2	25	24	-
7	$\text{HBF}_4 \cdot \text{SiO}_2$ (2 g.) ^c	2	25	24	-
8	$\text{HBF}_4 \cdot \text{SiO}_2$ (4 g.) ^c	2	25	24	-

a) Todas las reacciones fueron realizadas en CH_3CN .

b) 0.5 mmol de HClO_4 g⁻¹. c) 0.5 mmol de HBF_4 g⁻¹.

El tratamiento de pentaacetato de glucopiranososa con 2 equivalentes de etansulfonamida en presencia de 2 equivalentes de $\text{BF}_3\text{Et}_2\text{O}$ a temperatura ambiente provee la *N*-glicosiletansulfonamida con muy buen rendimiento (82%) y completa β -estereoselectividad (Entrada 1 Tabla 15). Los catalizadores

heterogéneos $\text{HBF}_4 \cdot \text{SiO}_2$ y $\text{HClO}_2 \cdot \text{SiO}_2$ que demostraron ser muy eficientes en las sulfonamidoglicosilaciones de glicales 2,3-insaturados,⁷⁹ no los son frente a la obtención de estos compuestos peracetilados.

En base a estas condiciones optimizadas, se procedió a sintetizar *N*-glicosilsulfamidas. Se sintetizaron cuatro sulfamidoglicósidos a partir de carbohidratos peracetilados con buenos rendimientos (Tabla 21), para ser utilizados posteriormente en reacciones de obtención de *N*-disacáridos. (Figura 49).

Tabla 21: Reacción de sulfonamidoglicosilación de carbohidratos peracetilados.^a

Carbohidrato	Sulfonamida	Producto	Rendimiento (%)
D-Glucosa	Sulfamida	CT9	83
D-Galactosa		CT10	82
D-Xilosa		CT11	76
L-Arabinosa		CT12	72

a) Todas las reacciones fueron llevadas a cabo en CH_3CN a temperatura ambiente empleando $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ como catalizador, con un tiempo de 24 hs.

b) Las relaciones anoméricas fueron determinadas empleando ^1H RMN.

En los cuatro casos estudiados, se obtuvieron únicamente los anómeros β . En ellos es posible plantear varias posibilidades de reacción (Figura 63). Así el ataque del nucleófilo por la cara inferior dará el isómero α (Figura 63, vía a), mientras que el ataque desde la cara superior originará el isómero β (Figura 63, vía b). En la Figura 64 se muestran todas las interacciones orbitálicas posibles para el carbono anomérico de dichos carbohidratos. Las primeras tres (5-a, 5-b y 5-c) corresponden al anómero α , y las otras dos (5-d y 5-e) al anómero β .

Figura 63: Vías posibles de reacción en la sulfonamidoglicosilación de carbohidratos peracetilados.

Para el caso 5-a se muestra la interacción orbital $n_O \rightarrow \sigma^*_{C-N}$ asociada al efecto *endo*-anomérico, mientras que en el caso 5-b se detalla la interacción orbital $n_N \rightarrow \sigma^*_{C-O}$, que representa al efecto *exo*-anomérico. Una conformación axial alternativa, en la cual sólo se observa efecto *endo*-anomérico, es la representada en la Figura 64-c. Por otra parte, el caso 5-d muestra el efecto *exo*-anomérico para la conformación β , y 5-e muestra una interacción orbital adicional $n_O \rightarrow \sigma^*_{C-H}$ de la conformación β .

La formación del anómero β se ve favorecida principalmente por la interacción orbital $n_N \rightarrow \sigma^*_{C-O}$ (efecto *exo*-anomérico, Figura 64-d).¹⁴⁴ En el caso del anómero α , para que la misma interacción orbital sea efectiva, el protón del nitrógeno debería ubicarse *anti* respecto al protón anomérico (Figura 64-b y Figura 65). En esta conformación el protón del nitrógeno estaría situado por debajo del plano del anillo piranósico, originando una interacción estérica desfavorable. Si el protón del nitrógeno se ubicara de forma *syn* con respecto al hidrógeno anomérico, no habría efecto *exo*-anomérico estabilizante, sino sólo *endo*-anomérico (Figura 64-c).

¹⁴⁴ Lavecchia, M. J.; Pis Diez R.; Colinas, P. A.; *Carbohydr Res.* **2011**, 346, 442-448.

Figura 64: Interacciones orbitales posibles para los compuestos **CT9-CT12**.

Otra posibilidad que puede argumentarse es que el anómero α puede equilibrarse rápidamente para generar el β , aunque este hecho ha sido descartado mediante estudios de ^1H RMN analizando la mezcla de reacción a diferentes tiempos, donde no se ha observado aparición alguna de dicho anómero.

Figura 65: Interacciones estéricas desfavorables en el anómero α .

En resumen, la sulfonamidoglicosilación de carbohidratos peracetilados transcurre efectivamente por medio de la vía b de la Figura 63 con completa

selectividad β , debido principalmente a interacciones orbitálicas favorables y ausencia de fuertes interacciones estéricas.

Estudio de la actividad biológica:

Se analizó la actividad inhibitoria frente a las isozimas de la anhidrasa carbónica de algunos de los sulfonamidoglicósidos derivados de la sulfamida mediante ensayos que consisten en medir la actividad de hidratación de CO_2 catalizada por cada una de las CAs (hCA I, II, IX y XII), metodología desarrollada por Khalifah (Tabla 22 y Figura 66).¹⁴⁵ Este estudio se llevó a cabo en colaboración con el grupo del Dr. Claudiu Supuran (Universidad de Florencia, Italia).¹⁴⁶

Figura 66: Estructura de las N-glicosulfamidas 1,2 y 3, junto con dos de los compuestos sintetizados por el grupo de Poulsen.

¹⁴⁵ Khalifah, R. G. *J. Biol. Chem.* **1971**, *246*, 2561-2573.

¹⁴⁶ Rodríguez, Oscar M.; Maresca, Alfonso; Témpora, Carlos A.; Bravo, Rodolfo D.; Colinas, Pedro A.; Supuran, Claudiu T. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21*, 4447 – 4452.

Tabla 22: Inhibición de las isozimas de la anhidrasa carbónica.

Compuesto	Ki (nM)					
	hCA I	hCA II	hCA IX	hCA XII	hCAI/hCAIX	hCAII/hCAIX
CT9	3714	81	7.7	5.4	482.34	10.52
PO-1	4530	4500	3910	4660	1.16	1.15
CT10	8637	76	7.2	6.5	1198.58	10.55
PO-2	3920	4730	4090	4750	0.96	1.16
CT11	7195	66	7.5	5.6	959.33	13.2

Como se mencionó en la introducción, a menor Ki más fuerte será la unión del inhibidor con la enzima, impidiendo que el sitio activo pueda estar disponible para unirse al sustrato. Se observa claramente en la Tabla 22 que las *N*-glicosilsulfonamidas sintetizadas en esta tesis son inhibidores altamente efectivos de la CA IX y XII mostrando una selectividad aceptable frente a la isozima II. Como se ha comentado con anterioridad, esta selectividad es muy importante debido a que las isozimas CA IX y XII predominan en tumores celulares.

A modo de comparación se incluyen los datos de actividad inhibitoria de dos glicosilsulfonamidas sintetizadas por el grupo de Poulsen (PO-1 y PO-2 Figura 66). En este caso se observa que estos compuestos son muy poco activos frente a las isozimas II, IX y XII al presentar Ki muy elevados, demostrando no poseer selectividad alguna. Otro detalle no menor es que el tipo de carbohidrato empleado no influye en forma drástica sobre la actividad si bien, en nuestro caso particular, el uso de la D-glucosa proporciona un inhibidor con mayor selectividad con respecto a la isozima IX.

En resumen, las *N*-glicosilsulfonamidas son selectivos inhibidores de la CA IX y XII, pudiendo utilizarse en un futuro cercano como agentes antitumorales. Además, al comparar los resultados obtenidos con los de los compuestos sintetizados por el grupo de Poulsen, se concluye que el cambio de ZBF (función de enlace al cinc) de sulfonamida a sulfamida mejora enormemente la actividad inhibitoria.

Como objetivo inicial de esta tesis se planteó la síntesis de pseudo *N*-disacáridos unidos mediante los grupos sulfonamido (Figura 67) respectivamente, en reemplazo de los grupos fosfato y pirofosfato que son empleados en diversos procesos biológicos. Por ejemplo: se ha encontrado que el fosfodiéster α -D-GlcpNAc-(1-PO₃H)- α -D-Manp forma parte de ciertas hidrolasas e interviene en la biosíntesis de glicoproteínas en los mamíferos que contienen un residuo D-manosa-6-fosfato.¹⁴⁷ El reemplazo de los grupos fosfato y pirofosfato por un análogo que sea estable y neutro es altamente interesante debido a su potencial uso como inhibidores de reacciones enzimáticas en las cuales los pirofosfatos y fosfatos disustituidos actúan como sustratos. Estos últimos no son útiles como constituyentes de un inhibidor dado que son hidrolizados por las fosfatasas y además, siendo iónicos presentarán, probablemente, dificultades en atravesar la membrana celular.¹⁴⁸

Figura 67: Métodos iniciales propuestos para la obtención de *N*-disacáridos.

¹⁴⁷ Nikolaev, A. V.; Botvinko, I. V.; Ross, A. J. *Carbohydrate Res.* **2007**, 342, 297-344.

¹⁴⁸ Bertolino, A.; Altman, L. J.; Vasak, J.; Rilling, H. C. *Biochem. Biophys. Acta* **1978**, 530, 17-23.

Las vías sintéticas desarrolladas en principio se hallan descritas en la Figura 67.

En la primer vía de síntesis se partió del correspondiente glicol y de la sulfamida, adicionando el catalizador correspondiente ($\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$, $\text{HBr} \cdot \text{PPh}_3$, $\text{HBF}_4 \cdot \text{SiO}_2$, $\text{HClO}_4 \cdot \text{SiO}_2$) para obtener la correspondiente glicosil sulfamida. En cada ensayo realizado se aisló tal producto para utilizarlo seguidamente en la segunda parte de esta vía. Se probó entonces la reacción de glicosil sulfamidas con glicales, a dos temperaturas de reacción (25 y 40 °C) y tiempos (1-12 hs). En tanto que en la Vía 2 se partió también del D-glicol acetilado pero utilizando el método conocido como “one pot”, para intentar obtener en un solo paso el disacárido deseado.

Como se observó en la parte experimental, a pesar de la gran diversidad de condiciones de reacción practicadas, los resultados obtenidos no fueron los esperados. En la Vía 1, mediante análisis de RMN de ^1H y ^{13}C de la mezcla de reacción (luego de un paso previo de purificación mediante cromatografía en columna de silicagel) se observaron incontables señales de baja intensidad, algunas de ellas coincidentes con la glicosilsulfamida (sufrió isomerización en cada ensayo, observándose los anómeros α y β de muy similares R_f), y revelando también una alta descomposición de los reactivos de partida, que aumentaba en forma proporcional al tiempo de reacción. Con respecto a la vía 2, al cabo de un cierto tiempo se observaba la aparición de 2 manchas, las cuales mediante posterior análisis espectroscópico resultaron ser la glicosilsulfamida isomerizada y no el disacárido buscado. Sometiendo la mezcla a mayores tiempos de reacción sólo se observó una alta descomposición de los reactivos.

En resumen, las reacciones se llevaron a cabo empleando diferentes catalizadores tales como: $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$, $\text{HBr} \cdot \text{PPh}_3$, $\text{HClO}_4 \cdot \text{SiO}_2$, etc. con el objetivo de obtener diferentes productos dependiendo si la reacción de adición se encuentra o no acompañada del reordenamiento alílico de Ferrier. Ninguna de las 2 vías inicialmente propuestas resultaron eficientes para obtener *N*-disacáridos. Al partir de estos resultados, se puede decir que los glicales 2,3-insaturados no son aptos para la obtención de disacáridos al menos por esta vía. Han demostrado que preferentemente tienden a isomerizarse y también

descomponerse frente a las condiciones ácidas si se las somete a más de una hora de agitación a temperatura ambiente.

Intentos de Síntesis de *N*-disacáridos mediante Amberlyst 15

Visto los muy buenos rendimientos obtenidos en la síntesis de *N*-glicosilsulfonamidas utilizando Amberlyst 15, y dada la facilidad de aislamiento de los productos con dicho catalizador, se procedió a ensayar nuevamente la síntesis de *N*-disacáridos por los métodos descritos en la Figura 67 con Amberlyst 15. Sin embargo, los resultados fueron similares a los obtenidos con los demás catalizadores (rendimientos bajos, alta descomposición de los reactivos de partida). Por lo que se planteó la alternativa que se describe a continuación.

Síntesis de *N*-disacáridos partiendo de *N*-glicosilsulfamidas saturadas mediante Amberlyst 15

Debido a los inconvenientes citados en el párrafo anterior, se planteó una ruta alternativa de preparación de *N*-disacáridos (Figura 68), partiendo de *N*-β-glicosilsulfamidas, sintetizadas utilizando como catalizador BF₃·Et₂O. Se partió de estos compuestos debido a que no pudieron obtenerse con las resinas de intercambio iónico (aún a reflujo empleando acetonitrilo como solvente).

Figura 68: Método propuesto para la preparación de *N*-disacáridos mediante Amberlyst 15.

En la Figura 69 se ilustran las reacciones ensayadas. En total fueron 4 las síntesis estudiadas, partiendo de la sulfamida derivada de la glucosa ó de la galactosa per-*O*-acetilada, haciendo reaccionar cada una de ellas con el D-glucal ó D-galactal. Las condiciones de reacción empleadas fueron las mismas optimizadas durante la síntesis de *N*-glicosilsulfonamidas (30% Amberlyst 15, acetonitrilo como solvente, temperatura ambiente). Como no se pudo asegurar la formación de los productos esperados debido a que cualquier método de purificación probado no fue capaz de separar reactivos de productos de forma

eficiente, y la masa de producto obtenida en cada uno de los casos fue pobre, se procedió a investigar otra forma más efectiva de sintetizar *N*-disacáridos, la cual se discutirá a continuación.

Figura 69: Ensayos realizados de *N*-disacáridos a partir de *N*- β -glicosilsulfamidas mediante Amberlyst 15.

Síntesis de *N*-disacáridos empleando s-trioxano

Mediante el estudio anterior se sintetizaron *N*-disacáridos, sin embargo, al no obtener ninguno de ellos de forma pura, se procedió a investigar la síntesis de *N*-disacáridos con puente metilen bissulfonamido a partir de glicosilsulfamidas 2,3 insaturadas (Figura 54). Los ensayos de síntesis se basaron en una técnica descrita para la obtención de *N,N'*-metilén-bis-(*N*-metil-bencilsulfonamidas) (Figura 70). Durante dichos ensayos prácticamente toda la glicosilsulfamida sufrió descomposición, sin lograr la reacción esperada aún a temperaturas bajas.

Figura 70: Obtención de *N,N'*-metilén-bis-(*N*-metil-bencilsulfonamidas), técnica en la cual se basó la síntesis de nuevos *N*-disacáridos.

Como al parecer el problema estaba en que las glicosilsulfamidas insaturadas no son lo suficientemente estables como para reaccionar con trioxano sin descomponerse, se planeó ensayar dicha reacción utilizando como reactivos de partida las glicosilsulfamidas per-*O*-acetiladas (Figura 72), que son mucho más estables ante condiciones ácidas fuertes al no presentar un doble enlace que pueda interferir en reacciones posteriores.

Figura 71: Primer vía propuesta de síntesis de *N*-disacáridos con trioxano a partir de glicosilsulfamidas 2,3 insaturadas.

Los intentos fueron satisfactorios para estos reactivos de partida, pudiéndose determinar que las condiciones óptimas de síntesis se logran sometiendo la mezcla de reacción a temperatura constante de 40 °C, con refrigerante a reflujo durante 30 hs, con el agregado de 0,3 ml de $\text{BF}_3\text{Et}_2\text{O}$.

Figura 72: Segunda vía propuesta de preparación de *N*-disacáridos a partir de *N*-glicosilsulfamidas empleando s-trioxano como generador de formaldehído in situ.

Se aplicaron estas condiciones a las *N*-glicosilsulfamidas per-*O*-acetiladas derivadas de la glucosa, galactosa, arabinosa y xilosa con trioxano, para obtener los supuestos *N*-disacáridos como productos (Figura 73). La

mezcla de reacción en cada uno de los casos pudo ser fácilmente purificada por cromatografía en columna.

Figura 73: Los cuatro *N*-Disacáridos esperables a obtener con puente metilén bis(sulfonamido).

Al analizar los espectros de ^1H y ^{13}C RMN, en conjunto con los espectros bidimensionales HSQC realizados mediante un equipo Bruker Avance II de 500 MHz en deuteriocloroformo (se empleó este equipo debido a la complejidad espectroscópica observable mediante un equipo Varian de 200 MHz), se observó una señal adicional impensable para el carbono puente en el ^{13}C RMN. Es decir, el carbono puente, de ser uno sólo debería haberse observado una sola señal. Sin embargo se observaron dos, además de señales protónicas adicionales que llevaron a la idea de la presencia de un carbono puente adicional. Esto llevó a la realización de análisis adicionales que se detallarán a continuación en la siguiente sección, enfocando la discusión en torno al compuesto **D2**, derivado de la D-galactosa, además de su precursor, la sulfamida de la D-galactosa **CT10**.

Análisis del espectro ^1H y ^{13}C RMN del compuesto D2 junto con su precursor CT10:

Figura 74: precursor del disacárido a discutir.

Antes de analizar el compuesto **D2** derivado de la sulfamida de la galactosa per-O-acetilada, se describirá rápidamente las señales correspondientes a su precursor, el carbohidrato **CT10** (Figura 74), con el objetivo de simplificar el análisis del espectro del disacárido. Dichas señales, obtenidas mediante ^{13}C RMN, fueron las siguientes:

2,3,4,6-Tetra-O-acetil- β -D-galactopiranosil Sulfamida (**CT10**)

^{13}C RMN (50 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ = 170.56 ($\text{CH}_3\text{C}\text{OO}$), 170.10 (2 x $\text{CH}_3\text{C}\text{OO}$), 169.78 ($\text{CH}_3\text{C}\text{OO}$), 83.26 (C-1), 71.78 (C-5), 71.60 (C-4), 68.48 (C-2), 67.90 (C-3), 61.44 (C-6), 21.29 (CH_3COO), 21.16 (CH_3COO), 21.13 (CH_3COO), 21.01 (CH_3COO).

Las primeras tres señales (δ = 170.56, 170.10 y 169.78 ppm) corresponden indudablemente a los 4 carbonos carbonílicos (numerados como 7 en la Figura 74). La señal que sigue es la del carbono anomérico β (83.26 ppm), el cual posee el mayor δ de los carbonos que conforman el ciclo debido a la desprotección que causa el estar enlazado tanto al oxígeno del ciclo anillo, como al NH de la función sulfamida (nombrado B en la Figura 74). Los demás carbonos (C-6, C-5, C-4 y C-2) fueron asignados en base a tablas experimentales¹⁴³ y aproximaciones mediante el programa computacional Chem Draw Ultra 10. Las últimas 4 señales, de alrededor de 21 ppm correspondieron indudablemente a los 4 metilos de los acetilos.

Con respecto a las señales obtenidas mediante ^1H RMN:

^1H RMN (200 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ = 7.92 (da, J = 9.1 Hz, 1 H, NH), 6.53 (sa, 2 H, NH_2), 5.20 (m, 2 H, H-4, H-3), 4.95 (t, J = 9.1 Hz, 1 H, H-2), 4.77 (t, J = 9.1 Hz, 1 H, H-1), 4.08 (m, 3 H, H-5, 2 x H-6), 2.07 (s, 3 H, CH_3COO), 1.98 (s, 3 H, CH_3COO), 1.96 (s, 3 H, CH_3COO), 1.88 (s, 3 H, CH_3COO).

La primera señal corresponde al NH, un doblete ancho con una constante de acoplamiento (J) de 9,1 Hz, que coincidió con la del H-2 e H-1. Se observó un singulete ancho, correspondiente a los 2 hidrógenos enlazados al nitrógeno A. La constante de acoplamiento del H-1 (triplete con δ = 4.77 ppm) de 9.1 Hz, proporcionó la evidencia de que el compuesto obtenido fue el anómero β (la constante de acoplamiento axial-axial entre H-1 e H-2 de los anómeros β en carbohidratos siempre es mayor ó igual a 6 Hz). La señal que le perteneció al H-2 resultó un triplete, dado el acoplamiento que presenta con el hidrógeno del carbono anomérico y el del carbono 3, los cuales están en forma axial con respecto al H-2.

La integración de la señal a δ = 4.08 ppm dio aproximadamente 3 hidrógenos, correspondiendo al H-5 y a los dos H-6, debido a que suelen estar a campos más bajos (mayores δ) que los hidrógenos de los carbonos 1 y 2. El otro multiplete de δ = 5.20 ppm, que integra para 2 hidrógenos, correspondieron al H-3 y al H-4; al estar más alejados del centro anomérico, suelen hallarse a campos más altos que el resto de los hidrógenos del anillo. Las restantes 4 señales (δ comprendidos entre 21.29 y 21.01 ppm) corresponden a los metilos enlazados a los grupos carbonilo, fácilmente deducibles.

Ahora se llevará a cabo el análisis del disacárido derivado de la sulfamida de la galactosa. Se propuso obtener el disacárido *N,N'*-metilén-bis-(2,3,4,6)-Tetra-O-acetil- β -D-Galactopiranosil sulfamida (Figura 75).

Figura 75: Supuesto disacárido obtenido a analizar:

N, N-metilén-bis-(2,3,4,6-Tetra-O-acetil- β -D-Galactopiranosil sulfamida.

Las señales obtenidas de ^{13}C RMN fueron las siguientes:

^{13}C RMN (126 MHz, CDCl_3): δ = 170.54 ($\text{CH}_3\text{C}\text{OO}$), 170.30 ($\text{CH}_3\text{C}\text{OO}$), 170.24 ($\text{CH}_3\text{C}\text{OO}$), 169.82 ($\text{CH}_3\text{C}\text{OO}$), 169.68 ($\text{CH}_3\text{C}\text{OO}$), 169.64 ($\text{CH}_3\text{C}\text{OO}$), 83.83 (C-1), 73.61 (C-5), 72.86 (C-5'), 70.99 (C-4), 70.59 (C-4'), 67.42 (C-2), 67.15 (C-2'), 66.64 (C-3), 65.63 (C-3'), 61.97 (C-6), 61.23 (C-6'), 59.92 (P), 59.53 (P), 20.86 ($\text{CH}_3\text{C}\text{OO}$), 20.69 ($\text{CH}_3\text{C}\text{OO}$), 20.62 ($\text{CH}_3\text{C}\text{OO}$), 20.55 ($\text{CH}_3\text{C}\text{OO}$), 20.48 ($\text{CH}_3\text{C}\text{OO}$), 20.46 ($\text{CH}_3\text{C}\text{OO}$).

Figura 76: Espectro RMN de Carbono 13 del disacárido derivado de la galactosa **D2**.

Espectro RMN de Carbono 13, Zona 1 y Zona 3

En la zona 1 se hallaron todas las señales correspondientes a los carbonos carbonílicos (δ comprendidos entre 170.54 y 169.64 ppm). En tanto que en la zona 3 se observaron todas las señales correspondientes a los metilos enlazados a tales carbonilos (δ comprendidos entre 20.86 y 20.46 ppm).

Espectro RMN de Carbono 13, Zona 2

Esta zona va de 59 a 85 ppm. Se observaron 12 señales de muy buena intensidad (descontando las 3 señales a 77 ppm, correspondientes al solvente empleado, CDCl_3) y dos señales de muy baja intensidad ($\delta = 65,63$ ppm y un pico ancho muy débil a $\delta = 84,5$ ppm aproximadamente).

Figura 77: Zona 2 del espectro RMN ^{13}C del disacárido derivado de la galactosa **D2**.

Las señales que caracterizan y diferencian a este compuesto de su precursor fueron las observadas por debajo de 60 ppm, más precisamente 59,92 y 59,53 ppm, debido a que su precursor no presentó señal alguna por debajo de 64

ppm (a excepción de los carbonos de los metilos). Estas señales corresponden al carbono metileno puente (P en la Figura 75). Esto se verificó al analizar el espectro bidimensional HSQC. (Figura 78). Sin embargo, si el compuesto obtenido resultó ser el disacárido propuesto, sólo debería observarse una sola señal correspondiente al carbono puente y no dos. Esto se discutirá más adelante.

Las siguientes señales, de $\delta = 61,97$ y $61,23$ ppm, corresponden a los carbonos de la posición 6 en el anillo piranósico. Esto quedó demostrado al observar en el espectro bidimensional que las zonas de estos picos son de color celeste, correspondientes a carbonos $-\text{CH}_2-$.

Figura 78: Espectro HSQC de **D2**. Las zonas anaranjadas corresponden a carbonos $-\text{CH}_3$ ó $-\text{CH}-$. En tanto que las zonas celestes corresponden a carbonos $-\text{CH}_2-$.

Ahora se analizarán las señales superiores, la correspondiente a $\delta = 83,83$ ppm y la débil señal ancha de $\delta = 84,5$ ppm. Estas les pertenecen a los carbonos anoméricos β , en concordancia con el precursor de esta molécula (que fue de $\delta = 83,26$ ppm, valor muy próximo a ambas señales). Podría decirse que el compuesto analizado adopta tal conformación en el espacio (ó

varias conformaciones posibles) que provoca que se observen dos señales para cada tipo de carbono. Pero no debería observarse para el carbono puente.

Al analizar los picos de los carbonos siguientes (carbono 2 y 2': $\delta = 67,42$ y $67,15$ ppm; carbono 3 y 3': $\delta = 66,64$ y $65,63$ ppm) se observaron señales de intensidades similares para cada tipo de carbono. Esto se torna más notorio al ver los picos restantes (carbono 4 y 4': $\delta = 70,99$ y $70,59$ ppm; carbono 5 y 5': $\delta = 73,61$ y $72,86$ ppm). Es decir, cada par de señales que correspondieron a cada carbono van tomando intensidades similares al alejarse del centro anomérico de cada anillo, donde la probabilidad de que los carbonos tengan mayor libertad de movimiento aumenta. Cabe aclarar que la identificación de cada par de carbonos fue respaldada mediante el análisis del espectro HSQC.

Espectro RMN de Hidrógeno

Figura 79: Espectro completo ^1H RMN de D2.

En el análisis de este espectro se discutirán las señales de la zona 3, luego de la zona 2, y por último la zona 3, que es la más compleja, en donde se hallan las señales de hidrógenos más importantes. En esta discusión, como en

el caso del espectro de carbono 13, se ayudará mediante el espectro bidimensional.

Las señales obtenidas ^1H RMN del compuesto **D2** fueron las siguientes:

^1H RMN (500 MHz, CDCl_3): δ = 5.47 (d, J = 3.2 Hz, 1H, H-3), 5.44 (d, J = 2.7 Hz, 1H, H-3'), 5.42 (s, 1H, NH), 5.40 (s, 1H, NH), 5.19 (d, J = 9.0 Hz, 1H, H-2), 5.17 (d, J = 8.4 Hz, 1H, H-2'), 5.14 (dd, J = 3.2, 1.7 Hz, 1H, H-4), 5.12 (dd, J = 3.2, 1.1 Hz, 1H, H-4'), 5.09 (d, J = 9.2 Hz, 1H, H-1), 5.00 (m, 2H, P), 4.86 (m, 3H, H-1', P), 4.25 (dd, J = 11.5, 6.9 Hz, 2H, H-6), 4.19 (m, 2H, H-6'), 4.07 (m, 2H, H-5, H-6), 4.00 (t, J = 6.3 Hz, 1H, H-5'), 2.19 (s, 3H, CH_3COO), 2.15 (s, 3H, CH_3COO), 2.12 (s, 3H, CH_3COO), 2.08 (s, 3H, CH_3COO), 2.03 (s, 3H, CH_3COO), 2.02 (s, 3H, CH_3COO).

Espectro ^1H RMN Zona 3

Esta zona se la ha tomado como base para la integración de los hidrógenos, es decir, el conteo aproximado de hidrógenos en la molécula. Se le asignó como base 24 hidrógenos (los correspondientes a todos los hidrógenos de los grupos metilo enlazados a los carbonilos). Al integrar las demás zonas y contabilizar el total de hidrógenos se obtuvo como estimación que la molécula presenta en forma aproximada 43,70 protones, en muy buena concordancia con lo esperado (44 protones suponiendo la estructura obtenida sea la de la Figura 75).

Al observar a simple vista dicha zona, se ve que hay dos picos de δ = 2,19 y 2,08 ppm, con una mayor altura que los demás, por ende, un mayor valor de integración: entre 5,60 y 5,90 protones, justamente casi el doble de valor de la integración que los 4 picos de menor altura y anchura, los cuales dieron cada uno una integración de 2,90 protones en promedio, (en total se contabilizan los 24 aproximadamente).

Espectro ^1H RMN Zona 2

Figura 80: Espectro RMN ^1H de D2, zona 2.

Esta zona, para un mejor análisis, se la dividió en dos sub-zonas bien distanciadas: la sub-zona A (comprendida entre $\delta = 4,16$ a $4,26$ ppm), y la sub-zona B ($\delta = 3,98$ y $4,10$ ppm respectivamente).

En la sub-zona A se reveló que integra para 2,05 protones. Observando el RMN bidimensional se vio que en esa sub-zona hay presencia de grupos $-\text{CH}_2-$ correspondientes a dos hidrógenos de la posición 6 y al analizar la sub-zona B, que integra para 3 protones, se observa la presencia de los dos H-6 faltantes, junto con uno de los hidrógenos de la posición 5, a $\delta = 4,07$ ppm. Esto ocasiona la observación de un multiplete. Luego, a 4 ppm, se halla el hidrógeno de la posición 5 restante, el cual es un triplete bien definido.

Espectro RMN de Hidrógeno Zona 1

Esta zona fue la más complicada de analizar al estar muy cercanas las señales de los protones, a pesar de haber empleado un equipo Bruker Avance II de 500 MHz.

Figura 81: Espectro RMN ^1H zona 1 del compuesto **D2**.

Los dos dobletes bien definidos a $\delta = 5,47$ y $5,44$ ppm, correspondieron a los hidrógenos de la posición 3. En tanto que los dos singuletes de $\delta = 5,42$ ppm y $5,40$ ppm fueron los pertenecientes a los hidrógenos unidos a nitrógeno (A en la Figura 75). A campos más altos (δ más bajos), se hallaron los picos de los hidrógenos de posiciones 2, 4 y 1. Es de destacar que las dos señales pertenecientes a los hidrógenos anoméricos presentan una gran diferencia de desplazamientos, el primero de $\delta = 5,09$ ppm y el segundo de $\delta = 4,88$ ppm aproximadamente. Este hidrógeno se halla muy cercano a uno de los hidrógenos puente. Finalmente se vio que las señales de los hidrógenos del carbono $-\text{CH}_2-$ puente (P en la Figura 75), también tuvieron una notable diferencia en cuanto a desplazamientos químicos ($\delta = 5,00$ y $4,84$ ppm), y por desgracia se hallaron bastante distorsionadas. Además resultó desconcertante que las señales que corresponderían a los hidrógenos de los nitrógenos enlazados a los carbonos anoméricos se hallaron ausentes (B en la Figura 75). Se supuso en principio que serían partícipes en algún multiplete. Además hay que recordar que mediante ^{13}C RMN, el carbono metileno puente debería emitir una sola señal, y no dos como se observó en todos los demás carbonos. Dado estos interrogantes, se decidió llevar a cabo un estudio de Espectrometría de

Masas con un equipo LC-MS cuádrupolo simple modelo VL, con fuente de ionización ESI (electrospray), análisis onFlow scan 1500 UMA. Dicho resultado del análisis se muestra en la siguiente página para el caso del compuesto **D2**, y seguidamente el espectro de masas obtenido para el compuesto **D1**.

En ambos espectros la señal de mayor peso dio un valor de 878,1 correspondiente al peso molecular. Si el disacárido obtenido fuera el propuesto en principio con un solo puente metileno, el peso molecular debería haber sido de 864.19, es decir, una diferencia de 14 unidades aproximadamente. Dicha diferencia pudo corresponder a la presencia de un -CH₂- puente adicional.

En base a estos resultados se plantearon dos estructuras probables, detalladas en la Figura 82. Además del análisis de espectrometría de masas, se llevó a cabo un nuevo análisis de RMN de los compuestos **D1** y **D2** en DMSO mediante el equipo Bruker Advance 500 MHz. Se analizará a continuación los espectros obtenidos para **D2**.

Print of window 80: MS Spectrum

Figura 82: Estructuras probables para el compuesto **D2**.

Análisis de **D2** ^{13}C RMN en $\text{DMSO}-d_6$

Las señales obtenidas fueron las siguientes (ver espectros páginas siguientes):

^{13}C RMN (126 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ = 170.46 ($\text{CH}_3\text{C}\text{O}$), 170.38 ($\text{CH}_3\text{C}\text{O}$), 170.03 ($\text{CH}_3\text{C}\text{O}$), 169.91 ($\text{CH}_3\text{C}\text{O}$), 169.58 ($\text{CH}_3\text{C}\text{O}$), 84.97 (C-1), 82.29 (C-1'), 71.81 (C-5), 71.61 (C-5'), 71.16 (C-4), 71.03 (C-4'), 68.03 (C-2), 67.90 (C-2'), 67.10 (C-3), 65.47 (C-3'), 62.53 (C-6), 60.88 (C-6'), 59.66 (P), 20.84 ($\text{CH}_3\text{C}\text{O}$), 20.96 ($\text{CH}_3\text{C}\text{O}$), 20.94 ($\text{CH}_3\text{C}\text{O}$), 20.91 ($\text{CH}_3\text{C}\text{O}$), 20.89 ($\text{CH}_3\text{C}\text{O}$), 20.82 ($\text{CH}_3\text{C}\text{O}$), 20.80 ($\text{CH}_3\text{C}\text{O}$), 20.68 ($\text{CH}_3\text{C}\text{O}$).

Se observó que los desplazamientos químicos fueron notablemente diferentes a los obtenidos mediante CDCl_3 , sobre todo el espectro ^1H RMN. Lo más destacable es que se observó la ausencia de una de las señales que correspondiera a uno de los carbonos puente. Sólo se vió una señal a δ =

59.66 ppm. Esto podría ser una evidencia a favor de la estructura 1, que tiene dos carbonos puente supuestamente equivalentes.

Análisis de **D2** ^1H RMN en $\text{DMSO}-d_6$

Las señales que se obtuvieron fueron las siguientes (ver espectros páginas siguientes):

^1H RMN (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ = 8.65 (s, 1H, NH), 7.48 (s, 1H, NH), 5.40 (dd, J = 9.9, 3.2 Hz, 1H, H-4), 5.27 (m, 4H, H-1, H-2, H-3, H-4'), 5.16 (m, 2H, H-3', P), 4.98 (t, J = 9.5 Hz, 1H, H-2'), 4.83 (d, J = 8.9 Hz, 1H, H-1'), 4.73 (d, J = 12.8 Hz, 1H, P), 4.58 (d, J = 13.8, 2H, P'), 4.34 (dd, J = 7.1, 5.0 Hz, 1H, H-5), 4.27 (dd, J = 7.6, 6.1 Hz, 1H, H-5'), 4.16 (dd, J = 10.9, 5.4 Hz, 1H, H-6), 4.08 (dd, J = 11.4, 4.6 Hz, 1H, H-6), 4.01 (dd, J = 10.9, 8.5 Hz, 1H, H-6'), 3.97 (dd, J = 11.5, 7.7 Hz, 1H, H-6'), 2.12 (s, 3H, CH_3COO), 2.10 (s, 3H, CH_3COO), 2.03 (s, 3H, CH_3COO), 2.02 (s, 3H, CH_3COO), 2.01 (s, 3H, CH_3COO), 1.98 (s, 3H, CH_3COO), 1.94 (s, 3H, CH_3COO), 1.93 (s, 3H, CH_3COO).

Una integración minuciosa de dichas señales otorgó 44 protones en total. En este espectro la nitidez y resolución de las señales fue sorprendentemente superior a su contrapartida en CDCl_3 . Mediante los espectros HSQC y COSY pudieron resolverse todas las señales. Dichos espectros se hallan al final de esta discusión.

En el extremo izquierdo del espectro se hallaron dos singuletes correspondientes a los dos NH, con δ = 8.65 y 7.48 ppm respectivamente. En tanto que en el extremo derecho se ubicaron las 8 señales correspondientes a los metilos de los acetilos. Se tomó como base de integración estos 8 picos como 24 protones.

En la zona central, de izquierda a derecha se halló un doble doblete con δ = 5.40 ppm correspondiente a un hidrógeno de la posición 4. El otro hidrógeno de dicha posición se halló conformando un multiplete con los hidrógenos de las posiciones 1, 2, 3 y 4, a δ = 5.27 ppm. Otro multiplete se halló muy cercano a este último, a δ = 5.16 ppm, en el cual cayeron 2 hidrógenos, uno de la posición 3, y uno de los hidrógenos puente (P).

A δ = 4.98 ppm se ubicó un triplete muy bien definido (J = 9.5 Hz), correspondiente al hidrógeno de la posición 2. Le sigue uno de los hidrógenos anoméricos a δ = 4.83 ppm (J = 8.9 Hz), luego a δ = 4.73 ppm se halló un doblete con J = 12.8 Hz correspondiente a otro de los hidrógenos puente.

Seguidamente a $\delta = 4.58$ ppm se hallaron los dos hidrógenos puente restantes, con $J = 13.8$ Hz.

En la zona comprendida entre los $\delta = 4.34$ y 3.97 ppm se ubicaron los hidrógenos de las posiciones 5 y 6, todas señales bastante definidas. Y finalmente entre $\delta = 2.12$ y 1.93 ppm se hallaron los hidrógenos de los metilos enlazados a los carbonilos.

En basa a los resultados obtenidos, se puede decir que la estructura más probable es la 1 (Figura 82), debido a que todas las señales de los hidrógenos enlazados con los carbonos puente se hallan, por lo menos, como dobletes, dejando entendido que presentan interacciones con algún tipo de hidrógeno (que serían los hidrógenos de los nitrógenos adyacentes). Si el compuesto obtenido fuera el representado en la estructura 2, se debería observar claramente un singulete que integre para dos protones (el correspondiente para el carbono puente inferior, que se halla enlazado a dos nitrógenos terciarios). Dicha señal no se observó en ninguno de los análisis de RMN efectuados (en CDCl_3 y en DMSO-d_6).

Conclusiones

El objetivo principal de este trabajo ha sido la síntesis de glicomiméticos que puedan ser empleados en el diseño de inhibidores enzimáticos. Como objetivo secundario se propuso sintetizar pseudos *N*-disacáridos unidos mediante un grupo sulfonamido ó metilén bissulfonamido y realizar el análisis estructural de los compuestos obtenidos mediante Resonancia Magnética Nuclear. Asimismo, estudiar la actividad biológica de dichos compuestos como Inhibidores Enzimáticos.

Las rutas completas de síntesis ensayadas se resumen a continuación en la Figura 83.

En principio se realizaron ensayos de síntesis de *N*-glicosilsulfonamidas 2,3-insaturadas empleando resinas de intercambio iónico Amberlyst 15, obteniéndose 10 glicomiméticos, de los cuales 4 son nuevos (los derivados de la metansulfonamida y de la bencil sulfonamida, resta evaluar la potencial actividad biológica), y otros 4 exhibieron interesante actividad biológica (los derivados de la etanosulfonamida y *p*-toluensulfonamida).

Como no pudieron sintetizarse *N*-glicosilsulfamidas 2,3-insaturadas utilizando Amberlyst 15 para realizar los ensayos de la **Via 1** en pos de obtener disacáridos, se los sintetizó empleando otros catalizadores ya estudiados en nuestro laboratorio, siendo el $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ el más útil dado los altos rendimientos que otorga. Para nuestra sorpresa, no pudieron obtenerse *N*-disacáridos con ninguno de los catalizadores utilizados, y ni siquiera mediante la **Via 2**, en la cual se partió del D-glicol 3,4,6-tri-*O*-acetil-D-glucal ó del 3,4,6-tri-*O*-acetil-D-galactal. El fracaso de estas dos vías pudo deberse a que los glicales insaturados tienden preferentemente a isomerizarse y/ó descomponerse frente a las condiciones ácidas fuertes requeridas para estos ensayos.

Un segundo camino sintético consistió en emplear como reactivos de partida glicósidos per-*O*-acetilados, utilizando como catalizador $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$, para obtener *N*-glicosilsulfonamidas per-*O*-acetiladas. Se prepararon 4 compuestos de este tipo con muy buenos rendimientos y elevada selectividad β .

Figura 83: Vías sintéticas estudiadas en esta tesis.

Los mismos resultaron ser inhibidores muy efectivos de la anhidrasa carbónica IX y XII, mostrando una selectividad aceptable frente a la isozima II. Obtenidos dichos carbohidratos se intentó obtener *N*-disacáridos por medio de la **Vía 3**, empleando D-glicales (3,4,6-tri-*O*-acetil-D-glucal ó 3,4,6-tri-*O*-acetil-D-galactal). Dado los muy buenos rendimientos obtenidos en la síntesis de *N*-glicosilsulfonamidas utilizando Amberlyst 15 y la facilidad de aislamiento de los

productos, se probó con este catalizador heterogéneo y reutilizable. Lamentablemente no pudieron estimarse los rendimientos dado que la masa de producto obtenida en cada uno de los casos fue pobre, y la cantidad de reactivo remanente (las *N*-glicosilsulfamidas per-*O*-acetiladas) fue de tal magnitud que ningún método de laboratorio resultó eficiente para lograr una separación satisfactoria. Es por ello que se planteó otra vía más efectiva de preparación de *N*-disacáridos: la **Vía 4**.

Figura 84: Estructura general de los *N*-disacáridos que se intentaron obtener por medio de la Vía 4.

En la **Vía 4** se emplearon las *N*-glicosilsulfamidas per-*O*-acetiladas en intentos de dimerización mediante trioxano, utilizando $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$. Se buscó obtener compuestos de estructura como la representada en Figura 84. Sin embargo los compuestos obtenidos presentaron una estructura más que curiosa y compleja, acompañadas de buenos rendimientos. Como la complejidad estructural de estos disacáridos dificultaba la asignación de las señales espectrocópicas mediante nuestro equipo de RMN Varian de 200 MHz, se procedió a realizar análisis de RMN en un equipo Bruker Advance II de 500 MHz, utilizando CDCl_3 como solvente. Pero aún así surgieron dudas acerca de la estructura de dichos productos. Es por ello que se recurrió a un análisis de espectrometría de masas, además de nuevos análisis de RMN, ahora empleando $\text{DMSO}-d_6$ como solvente. Gracias a ello y a un análisis minucioso, se pudo determinar la estructura más probable de los *N*-disacáridos obtenidos. Resta evaluar la actividad biológica y un análisis estructural más profundo mediante otras técnicas que permitan dilucidar la/s conformación/es más estable/s de estos glicomiméticos complejos.

En resumen, se lograron todos los objetivos pautados, incluso los secundarios, habiéndose sintetizado un total de 18 compuestos, de los cuales 12 son nuevos, y varios de ellos exhiben propiedades inhibitorias interesantes. A pesar de que la síntesis de *N*-disacáridos implicó un gran esfuerzo y dedicación, no se

alcanzaron los resultados esperados. Sin embargo se consiguieron desarrollar disacáridos con una estructura única e innovadora, con potencial actividad biológica (Figura 85).

Figura 85