

Universidad Nacional de La Plata

Facultad de Ciencias Exactas

Departamento de Química

Trabajo de Tesis Doctoral:

***“Síntesis de glicomiméticos inhibidores de anhidrasas
carbónicas como potenciales agentes antitumorales y
antibacterianos”***

Leonardo E. Riafrecha

Director: Pedro A. Colinas

2017

*Dedicada a mis grandes amores: mi madre Liliana, mi
esposa Angélica y a mi futuro hijo Sebastián.*

*Esta Tesis Doctoral fue realizada en el
Centro de Estudio de Compuestos Orgánicos
(CEDECOR) de la Facultad de Ciencias Exactas
de la Universidad Nacional de La Plata,
bajo la dirección del Dr. Pedro A. Colinas
y por intermedio de una Beca Interna de posgrado
otorgada por CONICET.*

Este trabajo de tesis doctoral no podría haber sido llevado a cabo con éxito sin el apoyo de mucha gente, a la cual no quiero dejar de darles un gran agradecimiento:

En primer lugar, al Dr. Pedro Colinas, con quien empecé a trabajar allá por 2012, quien me dirigió tanto en mi tesina, como en este trabajo de tesis, dándome su apoyo y confianza desde el primer día. Persona a la cual admiro en su labor, siendo un director dedicado y paciente, quien me enseña mucho todos los días, tanto a ser mejor profesional, como mejor persona.

A los que hicieron que el día a día tanto en el laboratorio como fuera de él sea genial, mis amigos Leticia Mendez, Romina Frenzel, Gustavo Yaful y Maria Luisa Villalba.

A Alicia Cánepa, Dario Vargas, Gisela Diaz, Leticia Lafuente, Cintia Santiago, Lucia Garritano, Agustin Rojas, Omar Guaymas, Agustin Ponzinibbio, Leandro Sasiambarrena, Sergio Laurella, Agustin Spaltro, Diego Colasurdo, Dacio Iglesias, Belen Gastaca, Matias Pila y Maricel Caputo compañeros del CEDECOR con los que compartimos almuerzos, mates y risas.

A las Dras. Patricia Allegretti, Mercedes Schiavoni y Danila Ruiz, docentes de la orientación, quienes me generaron la curiosidad de la investigación, y me ayudaron mucho durante la carrera.

Al Dr. Rodolfo Bravo por darme la posibilidad de trabajar en el CEDECOR.

A todos mis compañeros de la cátedra de Química Orgánica II, con los que también compartí y aprendí mucho.

A mi esposa Angélica, quien es mi sostén, me entiende como nadie, lleva el fruto de nuestro amor y amo con el alma.

A mi madre Liliana y a su esposo Edgardo, que me apoyan siempre en todo, dándome palabras de aliento, y me enseñan todos los días que con esfuerzo todo se alcanza. Los adoro.

A toda mi familia, que siempre está pendiente en todo lo que hago, que siempre están para acompañarme y me dan fuerza para seguir adelante.

A mis angelitos que me guiaron en esto también, Tía Beba y Abuelo Alfredo.

A los jurados Dra. Patricia Allegretti, Dra. Ana Bruno y Dr. Guillermo Labadie por su tiempo, disposición y por su mirada crítica hacia este trabajo.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICET) por la beca de posgrado otorgada.

A la Facultad de Ciencias Exactas (UNLP) por brindarme el lugar para desarrollar mi trabajo de tesis y mi carrera docente.

MUCHAS GRACIAS A TODOS LOS QUE FUERON PARTE DE ESTO, SIN USTEDES
NO PODRÍA HABER LLEGADO A CUMPLIR ESTA META

El trabajo de esta tesis se vió parcialmente plasmado en las siguientes publicaciones y congresos:

Publicaciones

- 1) *Synthesis of C-cinnamoyl glycosides and their inhibitory activity against mammalian carbonic anhydrases*. L. E. Riafrecha, O. M. Rodríguez, D. Vullo, C. T. Supuran and P. A. Colinas. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* **2013**, 21, 1489-1494.
- 2) *Inhibition of the β -carbonic anhydrases from Mycobacterium tuberculosis with C-cinnamoyl glycosides: identification of the first inhibitor with antimycobacterial activity*. M. V. Buccheri, L. E. Riafrecha, M. O. Rodríguez, D. Vullo, H. R. Morbidoni, C. T. Supuran, P. A. Colinas. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* **2013**, 23, 740-743.
- 3) *Attachment of carbohydrates to methoxyaryl moieties leads to highly selective inhibitors of the cancer associated carbonic anhydrase isoforms IX and XII*. L. E. Riafrecha, O. M. Rodríguez, D. Vullo, C. T. Supuran and P. A. Colinas. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* **2014**, 22, 5308-5314.
- 4) *C-glycosides incorporating the 6-methoxy-2-naphthyl moiety are selective inhibitors of fungal and bacterial carbonic anhydrases*. L. E. Riafrecha, D. Vullo, C. T. Supuran and P. A. Colinas. *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry* **2015**, 30, 857-861.
- 5) *Inhibition of β -carbonic anhydrases from Brucella suis with C-cinnamoyl glycosides incorporating the phenol moiety*. L. E. Riafrecha, D. Vullo, S. Ouahrani-Bettache, S. Köhler, P. Dumy, J.-Y. Winum, C. T. Supuran and P. A. Colinas. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* **2015**, 30, 1017-1020.
- 6) *Anti-tubercular and antioxidant activities of C-glycosyl carbonic anhydrase inhibitors: towards the development of novel chemotherapeutic agents against Mycobacterium tuberculosis*. M. J. Zaro, A. Borttoloti, L. E. Riafrecha, A. Concellón, H. R. Morbidoni, P. A. Colinas. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* **2016**, 31, 1726-1730.
- 7) *Synthesis and carbonic anhydrase inhibitory effects of new N-glycosylsulfonamides incorporating the phenol moiety*. L.E. Riafrecha, S. Bua, C.T. Supuran and P.A. Colinas. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* **2016**, 26, 3892-3895.
- 8) *Improving the carbonic anhydrase inhibition profile of the sulfamoylphenyl pharmacophore by attachment of carbohydrate moieties*. L. E. Riafrecha, S. Bua, C. T. Supuran and P. A. Colinas. *Bioorganic Chemistry* **2018**, 76, 61-66.

Congresos

- 1) "Glicomiméticos inhibidores de anhidrasa carbónica como agentes quimioterapéuticos para el tratamiento de la tuberculosis". **L. E. Riafrecha**, P. A. Colinas. XXI jornada de jóvenes investigadores AUGM UNNE, Corrientes, Argentina. Octubre de 2013. Trabajo Completo. Expositor oral.
- 2) "C-glicósidos como potenciales agentes quimioterapéuticos para el tratamiento de la tuberculosis" Autores: O. M. Rodríguez, **L. E. Riafrecha** y P. A. Colinas. XIX Simposio Nacional de Química Orgánica, Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina. Noviembre de 2013. Trabajo Completo.
- 3) "Hacia una nueva terapia antitumoral: C-glicósidos como inhibidores selectivos de la anhidrasa carbónica XII". **L. E. Riafrecha**, P. A. Colinas. XXII jornada de jóvenes investigadores AUGM UPLA, Valparaíso, Chile. Octubre de 2014. Trabajo Completo. Expositor oral.
- 4) "Síntesis de N-Glicosilsulfonamidas con potencial capacidad inhibitoria de la anhidrasa carbónica" Autores: **L. E. Riafrecha** y P. A. Colinas. XX Simposio Nacional de Química Orgánica, Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina. Noviembre de 2015. Trabajo Completo.
- 5) "Síntesis de sulfamatos con potencial capacidad inhibitoria de la anhidrasa carbónica" Autores: **L. E. Riafrecha** y P. A. Colinas. XXI Simposio Nacional de Química Orgánica, Potrero de los Funes, San Luis, Argentina. Noviembre de 2017. Trabajo Completo.

Lista de abreviaturas

°C	grados Celsius
μM	micromolar
Å	amstrong
AAZ	acetazolamida
Ac	acetilo
AC	anhidrasa carbónica
AcOEt	acetato de etilo
Ar	argón
Arg	arginina
Asp	ácido aspartico
BF₃. OEt₂	eterato de trifluoro de boro
bsAC	<i>Brucella suis</i> anhidrasa carbónica
CCD	cromatografía en capa delgada
Cys	cisteína
DCM	diclorometano
DMA	<i>N,N</i> -dimetilacetamida
DMSO	dimetilsulfóxido
DTC	ditiocarbamato
Et	etilo
g	gramos
Glu	ácido glutámico
h	horas

hAC	anhidrasa carbónica humana
HBr.PPh₃	aducto bromuro de hidrógeno-trifenilfosfonio
Hex	hexano
His	histidina
Hz	Hertz
IAC	inhibidor de anhidrasa carbónica
kDa	kilodalton
K_i	constante de inhibición
Leu	leucina
Me	metilo
mL	mililitros
mM	milimolar
mmoles	milimoles
mtAC	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> anhidrasa carbónica
N	normal
NaOMe	metóxido de sodio
nM	nanomolar
Pf	punto de fusión
ppm	partes por millón
RMN	resonancia magnética nuclear
Rto	rendimiento
s	segundos
TB	tuberculosis
TFA	ácido trifluoroacético
Thr	treonina

TMSOTf	triflato de trimetilsililo
UV	ultravioleta
Val	valina

Índice de contenidos

1. Objetivos.....	15
1.1. Objetivo general	16
1.2. Objetivos particulares	16
2. Introducción	17
2.1. La tuberculosis	18
2.2. La brucelosis	19
2.3. Anhidrasas Carbónicas	21
2.4. Mecanismo de catálisis e inhibición de las anhidrasas carbónicas	23
2.4.1. α -Anhidrasa carbónica.....	23
2.4.2. β -Anhidrasas carbónicas	25
2.4.3. γ -Anhidrasas carbónicas.....	31
2.4.4. δ -Anhidrasas carbónicas	31
2.5. Distribución y funciones.....	32
2.6. Inhibidores de la anhidrasa carbónica	34
2.6.1. Sulfonamida como inhibidor de la anhidrasa carbónica.....	34
2.6.2. Fenol como inhibidor de la anhidrasa carbónica	37
2.6.3. Cumarinas como inhibidores de la anhidrasa carbónica	40
2.6.4. Metoxifenilo como inhibidor de la anhidrasa carbónica	44
2.6.5. Ditiocarbamatos como inhibidores de la anhidrasa carbónica.....	44
2.7. Selectividad en el diseño de inhibidores de la anhidrásas carbónicas	46
2.7.1. Isozimas I y II.....	47
2.7.2. Isozimas IX y XII (AC extracelulares)	49

2.8. Glicomiméticos como agentes quimioterapéuticos	51
2.9. Glicomiméticos inhibidores de la anhidrasa carbónica	53
2.9.1. Tipo I.....	53
2.9.2. Tipo II.....	56
2.10. Diseño sintético de C-glicósidos.....	57
2.10.1. Reacciones de “Cross coupling”	57
2.10.2. Adición de silanos	60
3. Metodología de trabajo	62
3.1. Diseño sintético de los glicomiméticos	63
3.1.1. C-glicósidos.....	63
3.1.2. N-glicósidos.....	64
3.2. Determinación de la actividad biológica.....	64
4. Experimental	65
4.1. Materiales y métodos	66
4.1.1. Equipos y materiales utilizados.....	66
4.1.2. Solventes y reactivos.....	66
4.2. Síntesis de β -C-glicosil cetonas.....	70
4.2.1. Preparación de 1-(β -D-glucopiranosil)-propan-2-ona (GC1).....	70
4.2.2. Preparación de 1-(β -D-galactopiranosil)-propan-2-ona (GC2).....	70
4.2.3. Preparación de las β -C-glicosilpropanonas peracetilados GC3 y GC4	71
4.3. Síntesis de nuevos glicomiméticos derivados de fenol	72
4.4. Síntesis de nuevos glicomiméticos derivados de metoxiarilo...85	
4.5. Síntesis de nuevos N-glicosilsulfonamidas.....	100
4.5.1. Síntesis de materiales de partida.....	100
4.6. Síntesis de nuevos glicosilsulfamatos	115
4.6.1. Síntesis de cloruro de sulfamoilo ¹⁴⁶ (CS1)	115
4.7. Determinación de actividad biológica	127

3.7.1	Determinación de la actividad de los C-cinamoilglicósidos frente a la anhidrasa carbónica	127
3.7.2.	Determinación de la actividad frente a <i>Mycobacterium tuberculosis</i> 133	
5.	Discusión.....	136
5.1.	Obtención de los C-cinamoilglicósidos	137
5.1.1.	Síntesis de las β -C-glicosilcetonas y posterior acetilación.....	137
5.1.2.	Condensaciones aldólicas de las β -C-glicosilcetonas	140
5.1.3.	Sulfamoiación de los C-cinamoilglicósidos derivados del fenol	143
5.1.4.	Desprotección de los C-cinamoilglicósidos peracetilados	144
5.2.	Análisis de los C-cinamoilglicósidos obtenidos empleando ^1H y ^{13}C RMN	146
5.3.	Obtención de N-glicosilsulfonamidas.....	150
5.3.1.	Deacetilación de las N-glicosilsulfonamidas en condiciones Zemplen 153	
5.4.	Análisis de las N-glicosilsulfonamidas obtenidas empleando ^1H y ^{13}C RMN	154
5.5.	Actividad de los C-cinamoilglicósidos frente a las distintas anhidrasas carbónicas, a <i>Mycobacterium tuberculosis</i> y a <i>Brucella suis</i> 159	
5.5.1.	Actividad inhibitoria de los glicomiméticos derivados del fenol	160
5.5.2.	Actividad inhibitoria de los glicomiméticos derivados de metoxiarilo..	167
5.5.3.	Actividad inhibitoria de las N-glicosilsulfonamidas.....	174
5.5.4.	Actividad inhibitoria de los C-glicosilsulfamatos	177
6.	Conclusiones	182
7.	Bibliografía	187
	Anexo: Espectros Seleccionados	199

1. Objetivos

1.1. Objetivo general

Sintetizar nuevos glicomiméticos que puedan ser empleados como agentes antitumorales y antibacterianos.

1.2. Objetivos particulares

-Sintetizar C-glicósidos y N-glicósidos que presenten la función fenólica, metoxifenilo o sulfamato.

-Realizar el estudio conformacional de los glicósidos obtenidos empleando resonancia magnética nuclear y difracción de rayos X.

-Estudiar el perfil inhibitorio de los compuestos sintetizados frente a la anhidrasas carbónicas, tanto las isozimas humanas como aquellas presentes en *Mycobacterium tuberculosis* y *Brucella suis*.

-Estudiar la actividad antibacteriana de los glicósidos obtenidos frente a *Mycobacterium tuberculosis* y *Brucella suis*.

2. Introducción

2.1. La tuberculosis

La tuberculosis (TB) es una enfermedad infecciosa causada por la bacteria *Mycobacterium tuberculosis*. Se transmite de persona a persona a través del aire cuando las personas con TB pulmonar tosen o estornudan, propulsan los gérmenes de la tuberculosis al aire. Una persona necesita inhalar sólo algunos de estos gérmenes para infectarse. Es así que en los últimos años se registró que un tercio de la población mundial tiene tuberculosis latente, lo que significa que las personas han sido infectadas por la bacteria de la tuberculosis, pero no manifiestan la enfermedad, ni pueden transmitirla. Los síntomas (como tos, fiebre, sudoración nocturna o pérdida de peso) pueden ser leves durante muchos meses. Esto puede conducir a retrasos en la búsqueda de atención. Las personas con TB activa pueden infectar a otras 10-15 personas a través de un contacto cercano a lo largo de un año.

La tuberculosis afecta principalmente a los adultos en sus años más productivos. El consumo de tabaco aumenta en gran medida el riesgo de contraer la enfermedad, es así que más del 20% de los casos de TB en todo el mundo son atribuibles al tabaquismo.

En 2015 se registraron cerca de un millón de casos de la enfermedad en niños (de 0 a 14 años de edad), de los cuales 170.000 murieron. Se registró que el 95 % de estos casos ocurren en países en desarrollo.¹

Esta enfermedad ocurre en todas partes del mundo. En el último tiempo, el mayor número de nuevos casos de tuberculosis ocurrió en Asia con un 61%, seguido de África con un 26%.¹ En nuestro país se registran alrededor de 11000 casos nuevos cada año y mueren 800 personas debido a esta enfermedad.² Debe recordarse también que se trata de una enfermedad con alta incidencia en poblaciones inmunodeprimidas como es el caso de los enfermos de VIH/Sida. Las

personas con VIH tienen más probabilidades de desarrollar TB, ya que al estar inmunodeprimidos se acelera su progreso. En los últimos años, alrededor de 0,4 millones de personas que presentaban este cuadro combinado murieron. Alrededor del 35% de las muertes entre personas seropositivas se debieron a la TB únicamente. En 2015 se estimó que había 1,2 millones de nuevos casos entre las personas seropositivas, de las cuales el 71% vivían en África.

El tratamiento de la enfermedad requiere el uso de fármacos durante al menos seis meses, siendo tratada generalmente con éxito, con isoniazida en terapia combinada con otros antibióticos, que incluye rifampicina, etambutol, pirazinamida, y estreptomina. Recientemente, la aparición de cepas resistentes y multiresistentes de esta enfermedad ha provocado que los organismos de salud vuelquen su atención nuevamente a la tuberculosis, dado que estas variedades no tienen tratamiento conocido por el momento, provocando una alta mortalidad en todos los casos.³ Las terapias convencionales involucran agentes quimioterapéuticos desarrollados entre 1960 y 1980, sin que se hallan desarrollado nuevos fármacos antituberculosos en los últimos treinta años.⁴

Hace algunos años se ha secuenciado completamente el genoma de *M. tuberculosis*,⁵ lo cual ha permitido identificar nuevos objetivos farmacológicos que podrían dar lugar al desarrollo de compuestos con nuevos mecanismos de acción, que puedan resolver el problema de resistencia a los agentes quimioterapéuticos convencionales que se han mencionado anteriormente.

2.2. La brucelosis

La brucelosis es una enfermedad infecto-contagiosa de curso crónico que afecta tanto al hombre como a los animales domésticos, la fauna silvestre y los mamíferos marinos. Es causada por microorganismos del género *Brucella spp*, que son un grupo de bacterias intracelulares, inmóviles y de crecimiento lento. Se reconocen distintas especies, algunas de ellas afectan a animales terrestres (*B.*

abortus, *B. melitensis*, *B. suis*, *B. ovis*, *B. canis*, *B. neotomae* y *B. microti*) y otras a mamíferos marinos (*B. ceti* y *B. pinnipedialis*).

La brucelosis es una zoonosis de distribución mundial; su presentación en humanos está relacionada íntimamente con la enfermedad en animales domésticos. La enfermedad se asocia más frecuentemente al sexo masculino, entre los 30 y 40 años y en población rural. Presenta dos patrones epidemiológicos: uno es el urbano-alimentario, por consumo de leche y quesos no pasteurizados y el otro es el rural-laboral, por exposición profesional al ganado infectado o sus productos, sea por contacto o inhalación. En este caso tiene una cierta tendencia estacional, generalmente ocurre en primavera y verano, que es el período de reproducción de los animales. *Brucella spp* tiene afinidad por los tejidos de los órganos reproductivos, en consecuencia los mamíferos sexualmente maduros son más susceptibles a la infección. Los animales infectados eliminan las bacterias después de un aborto o de un parto, así como a través de la leche, secreciones vaginales, semen, sangre, orina y heces, contaminando pastos, agua y el medio ambiente. De esta forma se completa el ciclo infeccioso, asegurando la contaminación de otros animales y la persistencia del germen en la naturaleza. En el ambiente, pueden sobrevivir y mantener la capacidad infectante durante períodos variables de acuerdo con las condiciones del medio en el que sean eliminadas.

Si bien la prevalencia global de la brucelosis en el ser humano es desconocida, se estima que a nivel mundial afecta a 500.000 personas al año, especialmente en países del área mediterránea, Arabia, India, México, América Central y Sudamérica. En América Latina, Argentina, Perú y México son los países con prevalencia más elevada. En Argentina las infecciones por *B. melitensis* se encuentran en el ganado caprino localizado en el centro, oeste y norte del país; en tanto que *B. suis* y *B. abortus* tienen mayor incidencia en la región de la pampa húmeda donde predomina la explotación de ganado vacuno y porcino.

El tratamiento de la enfermedad incluye el uso de antimicrobianos y la administración de medicamentos sintomáticos. Las combinaciones más usadas

son las propuestas por la Organización Mundial de la Salud (OMS) que contemplan dos opciones; ambas incluyen la doxiciclina durante 6 semanas, combinada con estreptomocina durante 2 a 3 semanas, o rifampicina durante 6 semanas. Si bien el uso de estreptomocina sería más eficaz para la prevención de las recaídas su administración parenteral requiere la existencia de una red de atención domiciliaria. Por otra parte, el uso de rifampicina favorecería el desarrollo de resistencia comunitaria a la misma. Otros antimicrobianos que se pueden utilizar en combinación con los anteriores incluyen: trimetoprima-sulfametoxazol o quinolonas.²

2.3. Anhidrasas Carbónicas

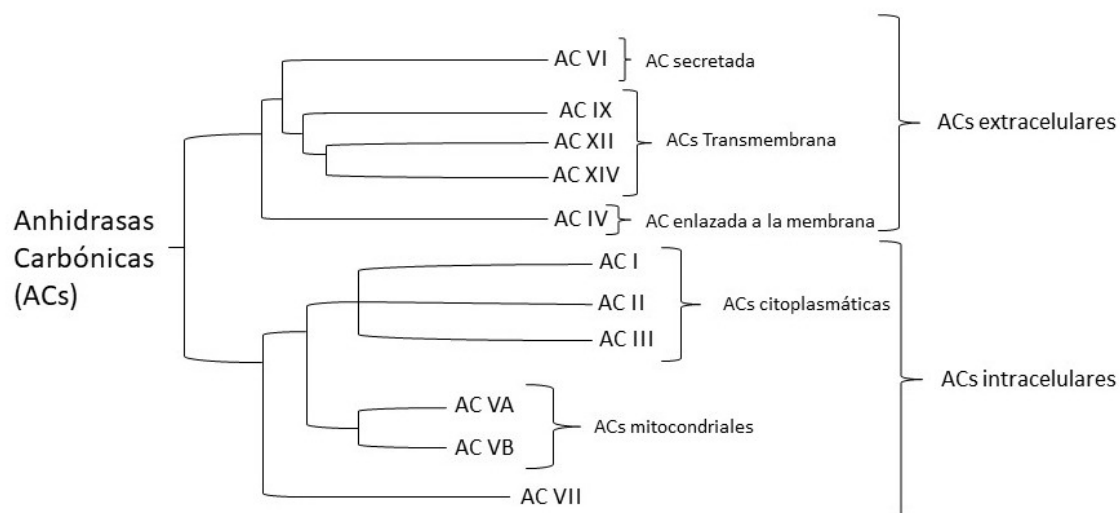
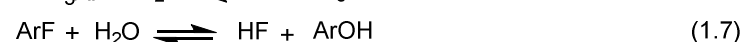
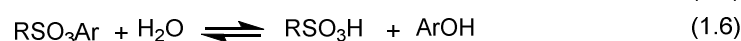
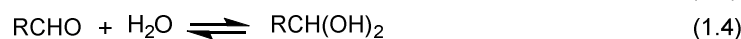
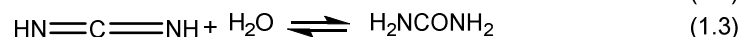
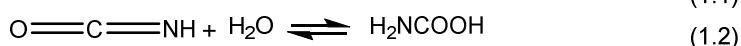
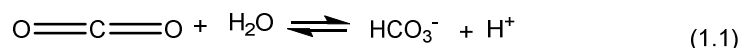


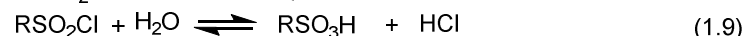
Figura 1. Familia de las anhidrasas carbónicas.

Las anhidrasas carbónicas (ACs) son una familia de metaloenzimas de Zn presentes en procariotas y eucariotas.⁶ Estas enzimas son un excelente ejemplo de la evolución convergente, además de las α -ACs, presentes en mamíferos hay cuatro familias no relacionadas: β -, γ -, δ - y ϵ -AC.⁷ Las β - que están predominantemente en bacterias, algas y cloroplastos de monocotiledóneas y dicotiledóneas; las γ -AC que se encuentran principalmente en algunas bacterias; y

los δ -AC que están presentes en diatomeas marinas.⁶ En los mamíferos existen 16 isoenzimas α -AC, con diferentes localizaciones subcelulares y distribución en tejidos. Básicamente hay 4 formas citosólicas (AC I-III, VII), 4 isozimas unidas a membranas (AC IV, IX, XII y XIV), una forma mitocondrial (AC V) y una isozima secretada, la AC VI. Estas enzimas catalizan la interconversión del dióxido de carbono a ión bicarbonato (Figura 2, Ec 1.1), hallándose involucradas en procesos fisiológicos cruciales, relacionados con la respiración y el transporte de CO₂/bicarbonato, homeóstasis de pH y CO₂, 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.⁷⁻²² Es así que muchas de estas enzimas son objetivos importantes para el diseño de inhibidores enzimáticos con aplicaciones clínicas, ya que muchos poseen este mecanismo de acción.



(Ar = 2,4-dinitrofenil)



(R= Me;Ph)

Figura 2. Reacciones catalizadas por α -ACs.²⁶

Además de la reacción fisiológica - la hidratación reversible de CO₂ a bicarbonato (Ecuación 1.1, Figura 2) - las α -AC catalizan una variedad de otras reacciones, como la hidratación de cianato a ácido carbámico o de cianamida a urea (Ecuación 1.2 y la Ecuación 1.3, Figura 2); aldehído a *gem*-dioles (Ecuación 1.4, Figura 2); hidrólisis de ésteres de ácidos carboxílicos o sulfónicos (Ecuación 1.5 y Ecuación 1.6, Figura 2); así como otros procesos hidrolíticos menos investigados,

como los descritos por la Ecuación 1.7 a la Ecuación 1.9 de la Figura 2.^{23–28} No está claro si las reacciones catalizadas por α -AC distintas de la hidratación con CO_2 tienen importancia fisiológica. Hasta la fecha, se han determinado las estructuras cristalinas de rayos X para seis α -AC (isoenzimas AC I a AC V, AC IX y AC XII)²⁹, así como para representantes de las β -³⁰ y γ -AC.^{12,31,32}

2.4. Mecanismo de catálisis e inhibición de las anhidrasas carbónicas

2.4.1. α -Anhidrasa carbónica

El ión cinc Zn(II) , presente en todas las α -ACs investigadas hasta el presente, es esencial para la catálisis.^{7,8,10,11,13–17,26,33} 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 3).

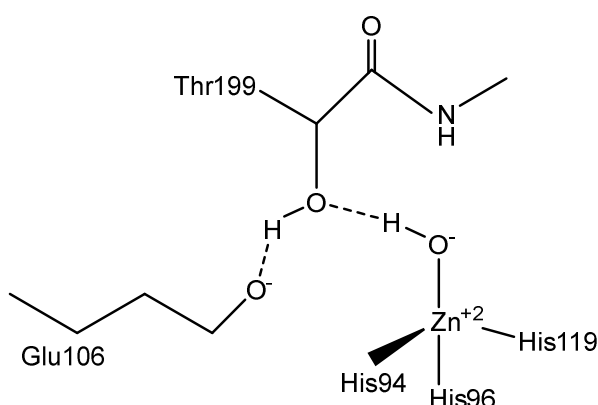


Figura 3. Coordinación del ión cinc en el sitio activo de la hCA II, con tres ligandos histidina (His94, His96 y His119) y dos residuos cercanos (Thr199 y Glu106).

El Zn se encuentra coordinado mediante 3 residuos de histidina (His 94, 96 y 119) y una molécula de agua ó un ión hidróxido.^{7,8,10-17,24,26,34} El enlace de cinc con el agua está también comprometido en interacciones del tipo puente de hidrógeno con el hidroxilo de treonina (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 (CO₂) hacia una ubicación favorable para el ataque nucleofílico.^{7-12,14-17}

La forma activa de la enzima es la básica, con el oxhidrilo unido al Zn (II) (Figura 4a). Este nucleófilo fuerte ataca al CO₂, en un bolsillo hidrofóbico vecino (el sitio de unión al sustrato comprende residuos Val121, Val143 y Leu198 en el caso de la isozima humana AC II) (figura 4b), que conduce a la formación del bicarbonato coordinado al Zn (II) (figura 4c). El ion bicarbonato es entonces desplazado por una molécula de agua y liberado en solución, que lleva a la forma ácida de la enzima, con agua coordinada al Zn (II) (figura 4d), que es catalíticamente inactiva.^{8,12,16,17,26,27,35,36} Para regenerar la forma básica (a), se produce una reacción de transferencia de protones desde el sitio activo, que puede ser asistida por residuos de His64 del sitio activo o por reguladores presentes en el medio.

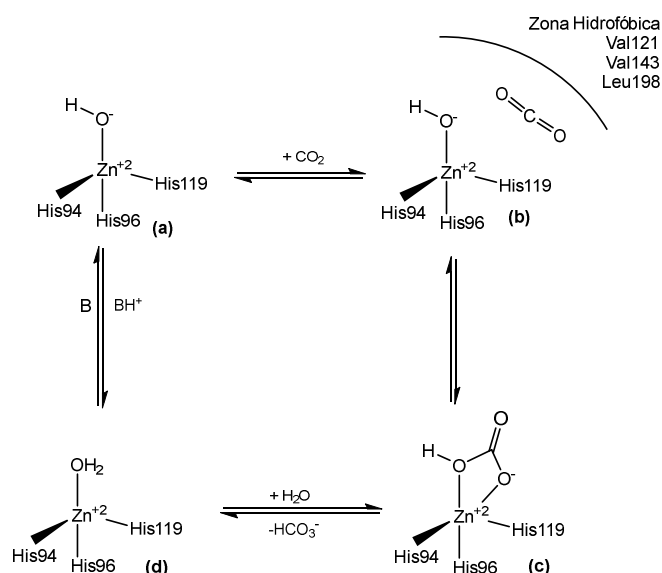


Figura 4. Representación esquemática del mecanismo catalítico para las α -ACs que catalizan la hidratación del CO₂.

El proceso catalítico para las α -ACs puede esquematizarse por las ecuaciones de la figura 5.

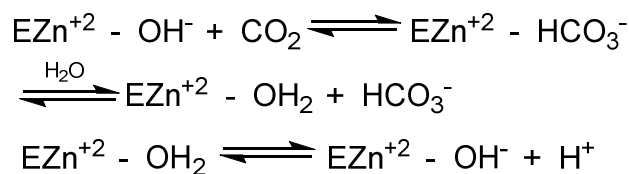


Figura 5. Proceso catalítico para las α -ACs.

2.4.2. β -Anhidrasas carbónicas

Muchas bacterias, las algas y los cloroplastos de algunas plantas poseen esta clase de anhidrasas carbónicas^{26,37-39}, la diferencia principal con las α -ACs es que usualmente las β -AC son oligómeros, generalmente formados de 2 a 6 monómeros de peso molecular entre 25-30 kDa.

El Zn (II) es esencial para la catálisis en ambas familias de enzimas, pero su coordinación es diferente y bastante variable para las β : en las β -AC procarióticas, el ión Zn (II) está coordinado por dos residuos de cisteína, un imidazol de un residuo His y un carboxilato perteneciente a un residuo Asp (figura 6a), mientras que la enzima del cloroplasto, por ejemplo, tiene el ion Zn (II) coordinado por los dos cisteínicos, el imidazol perteneciente a un residuo His y una molécula de agua (figura 6b).^{30,31,39}

El plegado de la cadena polipeptídica y la arquitectura del sitio activo es muy diferente al de la clase α .

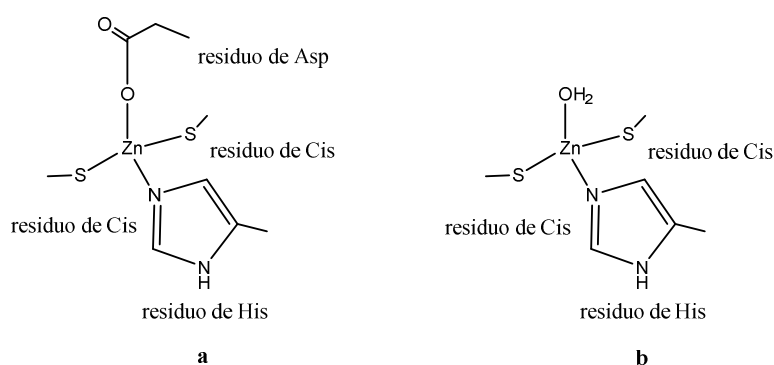


Figura 6. Coordinación del Zn a las β-ACs.

El mecanismo catalítico de esta familia fue propuesto por Mitsuahhi et al.³⁰ (Figura 7), por ejemplo en el caso de la enzima del alga *Porphyridium purpureum*, hay dos iones Zn (II) coordinados por cuatro pares de aminoácidos, estos pares son: Cys149 / Cys403, His205 / His459, Cys208 / Cys462 y Asp151 / Asp405. Es así que una molécula de agua está presente en el entorno de cada ion metálico, pero no se coordina directamente, formando un puente de hidrógeno con un oxígeno perteneciente al ligando de cinc Asp151 / Asp405 (Figura 7a).

Se plantea la hipótesis de que hay una reacción de transferencia de protones del agua unida al resto de carboxilato que está coordinado al residuo de aspartato, con la generación de un ion hidróxido que puede coordinarse al Zn (II) que adquiere una geometría de bipirámide trigonal (Figura 7b). Es así que el nucleófilo puede atacar al CO₂ dentro de la cavidad hidrófoba de la enzima (Figura 7c), con la generación de bicarbonato unido a Zn (II) (Figura 7d).

El intermedio es similar con el propuesto para las α-AC excepto que en este caso el residuo de ácido aspártico originalmente coordinado con cinc, está unido al bicarbonato coordinado (Figura 7d). En el último paso, el bicarbonato se libera en solución, junto con un protón, el aspartato genera recoordiación del ión Zn (II), y la molécula de agua que acompaña forma un enlace de hidrógeno con él. Así la enzima puede generar otro ciclo de catálisis.

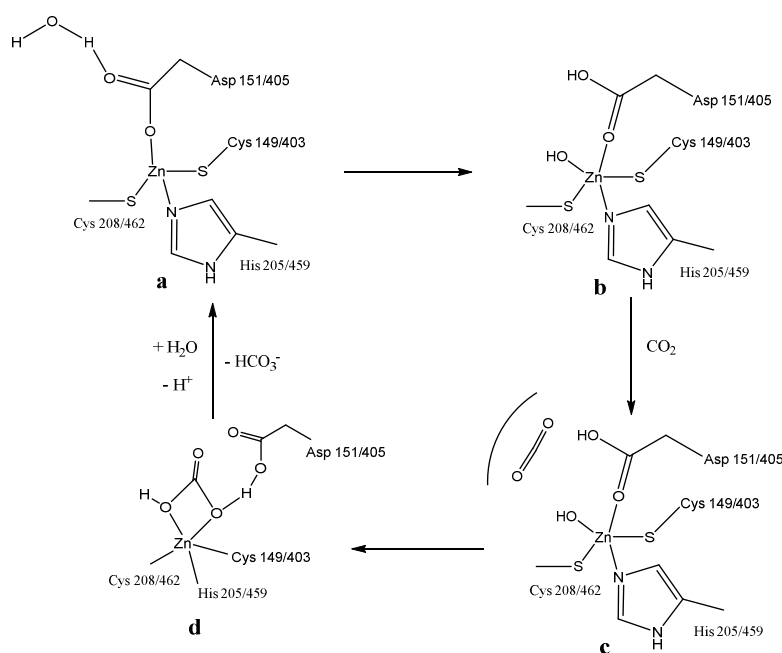


Figura 7. Mecanismo catalítico propuesto por Mitsuahahi.

En el genoma de *Mycobacterium tuberculosis* se encuentran también tres β -anhidrasas carbónicas halladas en la micobacteria, (mtACs). De manera similar a todas las β -ACs, las mtACs poseen todos los aminoácidos implicados en el ciclo catalítico de esta clase de enzimas: los residuos Cys35, His88 y Cys91 coordinados al Zn (II), así como el par Asp-Arg (en este caso constituido por Asp37 y Arg39). La mtAC 1 es una enzima mucho más pequeña, contiene sólo 163 residuos de aminoácidos⁴⁰, la mtAC 2 tiene 207 residuos de aminoácidos. Por otra parte la mtAC 3, es una proteína más compleja de 764 residuos de aminoácidos.

Se describirá la coordinación del ión cinc en el sitio activo para el caso de la mtAC1 (Figura 8). Esta enzima posee un ión metálico coordinado mediante 2 residuos de cisteína (Cys35 y Cys91) y uno de histidina (His88) y una molécula de agua o ión oxhidrilo, el cual es el nucleófilo que atacará al CO₂ y lo transformará en bicarbonato. Pero en el caso de esta enzima, dos aminoácidos (Asp-Arg) presentes en el sitio activo también se encuentran involucrados en el mecanismo de activación de la molécula de agua unida al Zn(II), a través de la formación de

puentes de hidrógeno, que pueden favorecer la pérdida del protón y la generación del ión oxhidrilo como cuarto ligando.^{41,42}

Se sabe que al menos una de estas tres mtACs, la mtAC 2 es esencial para el crecimiento de la bacteria.⁴³ Si bien no se puede excluir que las otras dos isozimas cumplan funciones biológicas importantes, esto no ha sido determinado, aunque se han encontrado indicios que la mtAC 3 podría estar involucrada en el proceso infeccioso. En base a esta información el desarrollo de inhibidores de las anhidrasas carbónicas presentes en la micobacteria podría dar lugar a una nueva terapia contra la tuberculosis.⁴⁴

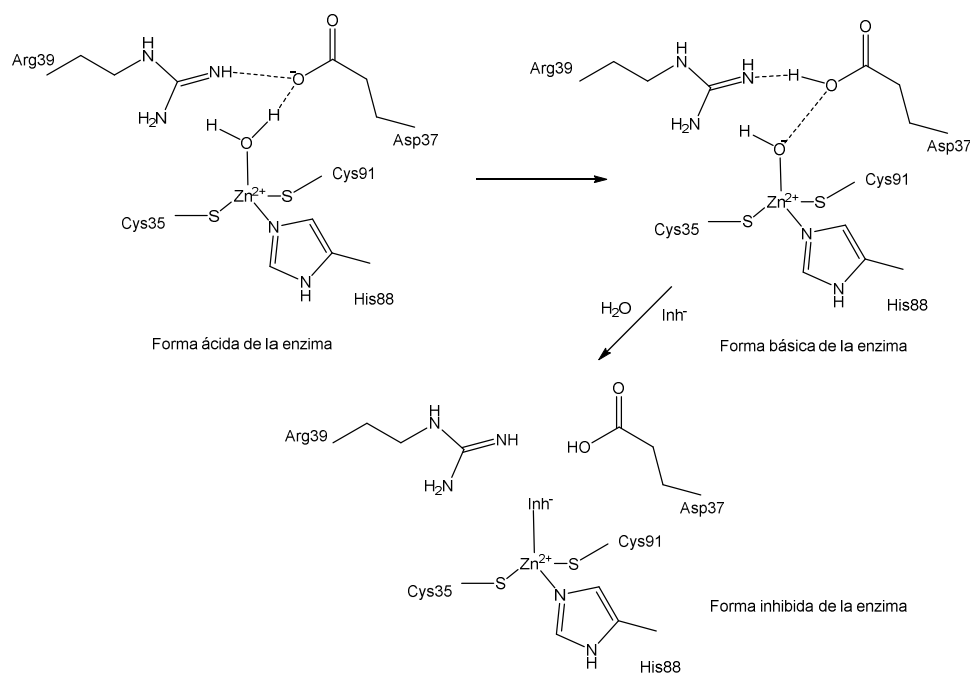


Figura 8. Coordinación del ión zinc en el sitio activo y mecanismo de inhibición de las mtAC 1.

La actividad catalítica de mtAC 1, mtAC 2 y mtAC 3 para la reacción de hidratación de CO_2 , se muestra en la tabla 1, así como también se muestra la actividad catalítica de la β -ACs de origen humano hAC I y hAC II para la comparación.⁴³

Tabla 1. Parametros cinéticos para la reacción de hidratación de CO₂ catalizada por algunas isozimas α -AC, β -AC de *Mycobacterium tuberculosis* y datos de inhibición con acetazolamida (AZZ).

Enzima	Clase	Nivel de actividad	K _{cat} (s ⁻¹)	K _i (nM) (AAZ)
hAC I	α	media	2,0 10 ⁵	250
hAC II	α	muy alta	1,4 10 ⁶	12
mtAC 1	β	moderada	3,9 10 ⁵	480
mtAC 2	β	alta	9,8 10 ⁵	9,8
mtAC 3	β	media	4,3 10 ⁵	104

Siguiendo con la clase β de las anhidrasas carbónicas se pudo ver que el genoma del patógeno bacteriano *Brucella suis* contiene dos ACs: bsAC I y bsAC II. Tanto la bsAC I como la bsAC II fueron clonadas y caracterizadas.^{45,46} Los dos genes codifican respectivamente una proteína de 219 residuos de aminoácidos (bsAC I) y de 213 aminoácidos (bsAC II). El análisis filogenético demostró que la bsAC I se agrupa con la β -ACs de *E. coli* y *H. influenza*, mientras que bsAC II está relacionada con *H. pylori* y *Synechococcus*. Las secuencias de aminoácidos de bsAC I y bsAC II con las de otras ACs recientemente investigadas evidenciaron que la de la bsAC I, así como la de bsAC II^{40,47-49} poseen todos los residuos de aminoácidos típicos de las β -AC implicados en el ciclo catalítico, es decir, los cuatro residuos unidos al cinc, Cys42, Asp44, His98 y Cys101 y el par Asp44-Arg46.^{50,51}

La bsCA II tiene un sitio activo abierto o cerrado. En la forma abierta se puede ver Cys42, Cys44, His98, y Zn (II) coordinado a la molécula de agua o ion oxhidrilo que permiten que la enzima sea activa en un amplio intervalo de pH. En la forma cerrada se observa Asp44 coordinada adicionalmente al ion Zn (II), reemplazando así la molécula de agua o ion oxhidrilo necesaria para la actividad catalítica. Solamente a valores de pH > 8, cuando el residuo de Arg46 forma un puente con Asp38, la cuarta posición de coordinación de Zn (II) puede estar disponible para la molécula de agua o ion oxhidrilo.

La actividad catalítica de bsCA I y bsCA II para la reacción de hidratación de CO₂, se muestra en la tabla 2, así como también se muestra la actividad catalítica de la β-ACs de origen humano como la de *H. pylori* para la comparación.⁵²

La bsAC II cataliza mejor que bsAC I la conversión de CO₂ a bicarbonato (a pH 8,3, cuando el sitio activo está abierto). La bsAC I tiene una actividad moderada como catalizador, similar a la de hAC XII, mientras que bsAC II muestra una alta actividad catalítica, mayor que la de bsAC I. También la bsAC II exhibe una actividad catalítica superior a la de hAC I, VA, XII y hpβAC. Sólo la hAC II, uno de los mejores catalizadores conocidos en la naturaleza, tiene mejor actividad que bsAC II.⁵³ También puede observarse que la actividad de ambas anhidrasas carbónicas de *Brucella suis* son inhibidas por el inhibidor por excelencia, el fármaco acetazolamida (AAZ).

Tabla 2. Parametros cinéticos para la reacción de hidratación de CO₂ catalizada por algunas isozimas α-AC, β-AC de *Brucella suis* y datos de inhibición con acetazolamida (AAZ).

Enzima	Clase	Nivel de actividad	K _{cat} (s ⁻¹)	K _i (nM) (AAZ)
hAC I ^a	α	media	2,0 10 ⁵	250
hAC II ^a	α	alta	1,4 10 ⁶	12
hAC V A ^a	α	baja	2,9 10 ⁵	63
hAC XII ^a	α	Media-baja	4,2 10 ⁵	5,7
hpβAC ^b	β	media	7,1 10 ⁵	40
bsAC I ^c	β	media	6,4 10 ⁵	63
bsAC II ^c	β	alta	1,1 10 ⁶	303

^a Isozima humana recombinante, método de flujo detenido de CO₂ (PH=7.5)

^b hp: *Helicobacter pylori*. Enzima recombinante, método de flujo detenido de CO₂ (PH=8.3)

^c bsAC I y bsAC II recombinantes, método de flujo detenido de CO₂ (PH=8.3)

2.4.3. γ -Anhidrasas carbónicas

El prototipo ha sido aislado del microorganismo *Metanosarcina Termofila*.³² Las γ - tienen varias características que las diferencian de las α - y β -, el plegado de la proteína está compuesto por un β -hélice interrumpida por tres bucles sobresalientes seguido por una α -hélice corta y una larga.

El ion Zn (II) dentro del sitio activo está coordinado por tres residuos de histidina, como en las α -ACs, pero el sitio activo de las γ - contiene ligandos adicionales unidos al metal, de manera que la geometría de coordinación es bipirámide trigonal para la que contiene cinc y octaédrica para la que contiene el cobalto.

El mecanismo de catálisis que se propuso es el que presentan las enzimas de la clase α . Se acepta el mecanismo del hidróxido de cinc como válido, ya que es probable que exista un equilibrio entre la bipirámide trigonal y el ión metálico tetraédrico del sitio activo de la enzima.³²

2.4.4. δ -Anhidrasas carbónicas

Esta clase de AC la diatomea marina *Thalassiosira Weissflogii* AC (TWCA1), mostrando un sitio activo similar al de las α -AC de mamíferos. El cinc tiene tres histidina unidas y una sola molécula de agua, siendo muy diferentes de las β -AC de plantas superiores en las que el cinc está coordinado por dos tiolatos de cisteína, una histidina y una molécula de agua.³⁸

Esta clase de AC no muestra una diferencia significativa de secuencia con otras anhidrasas carbónicas y puede que representen un ejemplo de evolución convergente a nivel molecular, ya que se descubrió que es la primera enzima que contiene cadmio, que es una proteína del tipo AC.¹⁶

2.5. Distribución y funciones

Se observó que las AC están presentes en muchos procariontes, en donde tienen importantes funciones tales como la respiración, el transporte de dióxido de carbono y la fotosíntesis.^{8,12,16,17,26,27,35,36}

Con respecto a los procariontes, se ve que las ACs tienen dos funciones generales: (i) el transporte de CO₂/bicarbonato entre diferentes tejidos del organismo; (ii) provisión de CO₂/bicarbonato para reacciones enzimáticas.³³ En los organismos acuáticos fotosintéticos, tiene como la función adicional mantener la concentración del CO₂, que ayuda a superar la limitación en el medio ambiente.

En los vertebrados, incluyendo el *Homo sapiens*, las funciones de las ACs se han investigado ampliamente en los últimos años.^{8,36,38,54} Las isozimas I, II y IV participan en la respiración y la regulación de la homeostasis ácido/base.⁸ Estos procesos complejos involucran el transporte de CO₂/bicarbonato entre tejidos metabolizantes y sitios de excreción (pulmones, riñones), facilitando la eliminación de CO₂ en los capilares y microvasculatura pulmonar, la eliminación de H⁺ en los conductos renales, así como la reabsorción.⁸

Las isozimas I, II y IV participan en estos procesos anteriormente mencionados, como el de la secreción de humor acuoso rico en bicarbonato (mediada por isozimas AC II, AC IV y AC XII) dentro del ojo. Las AC están involucradas en la visión, su funcionamiento defectuoso conduce a una alta presión intraocular y glaucoma.⁸ La AC II también participa en el desarrollo de los huesos. Las ACs participan en la secreción de electrolitos en muchos otros tejidos y órganos, proporcionando bicarbonato y regulando el pH en la producción de saliva, de ácido gástrico en el estómago, de bilis y de jugo pancreático.^{8,55} Las ACs también están involucradas en la protección del tracto gastrointestinal de condiciones extremas de pH (demasiado ácidas o demasiado básicas), el flujo seminal, las funciones musculares y la adaptación a estrés. Algunas isozimas, como AC V, están implicadas en los procesos de señalización molecular, como la secreción de

insulina.^{8,55} Las isozimas II y VA están implicadas en procesos metabólicos importantes, como proporcionar bicarbonato para la gluconeogénesis o síntesis de bases pirimidínicas. Finalmente, algunas isozimas (tales como AC IX, AC XII, AC VIII) son muy abundantes en tumores, estando involucrados en la oncogénesis y progresión tumoral.^{14,54}

Lo expuesto anteriormente nos muestra la importancia de las AC para una gran cantidad de procesos, tanto en estados normales como patológicos. Así se explica por qué los inhibidores de estas enzimas se instalaron en la medicina clínica desde hace varias décadas. Actualmente, los inhibidores de estas enzimas son utilizado como agentes antiglaucoma, diuréticos, antiepilépticos, úlceras gástricas y duodenales, trastornos neurológicos u osteoporosis entre otros.^{8,26,27} Debido al gran número de isozimas presentes en el cuerpo humano es necesaria la búsqueda de agentes específicos. En la actualidad se investiga al menos en cinco frentes en el diseño de agentes farmacológicos: (i) fármacos antiglaucoma mejores que la dorzolamida y la brinzolamida (isozimas II y XII como objetivo);⁸ (ii) los fármacos contra el cáncer dirigidos a AC IX y / o AC XII (isozimas presentes en células tumorales);^{14,54,56} (iii) agentes antiobesidad, basados en fuertes inhibidores de la AC que apunten a la isoformas mitocondriales AC VA y / o AC VB; (iv) anticonvulsivos (probablemente dirigidos a AC II, VII, XII y XIV) y (v) antibacterianos, antifúngicos y otros tipos de agentes dirigidos a varias AC de patógenos como las bacterias *H. pylori*, *Mycobacterium tuberculosis*, los protozoos *P. falciparum* o los hongos *C. albicans* y *Cr. Neoformans*, entre otros.⁵⁷⁻⁶³ Vemos así que estas enzimas y sus inhibidores son realmente importantes. El descubrimiento de muchas nuevas AC de este tipo en diversos organismos es también una señal de que estas antiguas enzimas están involucradas en procesos críticos de la vida, que mediante una perturbación de su actividad pueden derivar en nuevas formas de controlar muchas enfermedades.

2.6. Inhibidores de la anhidrasa carbónica

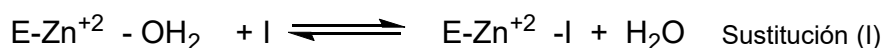
Los inhibidores enzimáticos son moléculas que se unen a las enzimas y disminuyen su actividad. Algunas de las clases de inhibidores de las ACs que han sido estudiados son:

- Sulfonamidas y sulfamatos: se unen en forma de portonada, es decir como aniones, al Zn (II) presente en el sitio activo reemplazando al cuarto ligando (molécula de agua o ión oxhidrilo).
- Fenoles: se unen a través de puentes de hidrógeno con la molécula de agua/ ión oxhidrilo unido al Zn (II).
- Cumarinas: exhiben un mecanismo de acción sin interacciones entre el inhibidor y el ión metálico presente en el sitio activo pero ocluyendo la entrada al mismo.
- Metoxilos: se unen dentro del sitio activo enzimático sin interacción con el ion cinc y por medio de diferentes interacciones con residuos de aminoácidos y moléculas de agua.
- Ditiocarbamatos: complejan los iones metálicos debido a la presencia del anión CS^- , que puede coordinar distintos metales de transición.

2.6.1. Sulfonamida como inhibidor de la anhidrasa carbónica

Se conocen distintos tipos de inhibidores de ACs: los inhibidores aniónicos, las sulfonamidas no sustituidas junto con grupos funcionales similares (sulfamatos,

sulfamidas, etc.), cumarinas, ditiocarbamatos y fenoles. Tanto los inhibidores aniónicos como los inhibidores derivados de sulfonamidas se enlazan al Zn(II) por sustitución de un ligando no proteico, desplazando a la molécula de agua (Ecuación (I) en Figura 9) ó por adición a la esfera de coordinación del metal (Ecuación (II) en Figura 9), generando una especie con forma de bipirámide trigonal.^{7,8,10,26,64–68} Las sulfonamidas se unen 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 9) interactúa con los residuos hidrofílicos e hidrofóbicos de la cavidad. Por otra parte, los aniones pueden unirse al ión metálico conformando un aducto tetragonal ó bipirámide trigonal, como por ejemplo el aducto tiocianato de la Figura 9.^{7–11,66}



Aducto tetrahédrico



Aducto bipiramidal trigonal

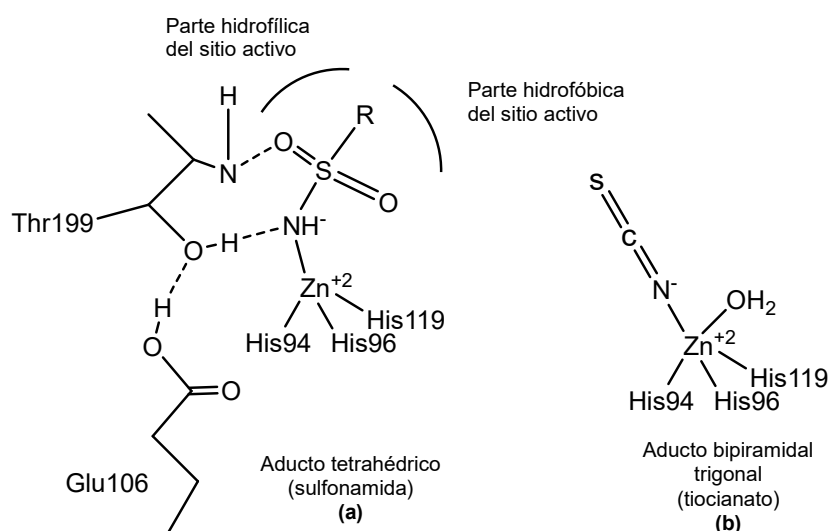


Figura 9. Mecanismo de inhibición de las α -CA mediante inhibidores del tipo sulfonamidas (a) y aniónicos (b).

Las sulfonamidas son las más importantes inhibidores de ACs (acetazolamida **1**, metazolamida **2**, etoxazolamida **3**, diclorofenamida **4**, dorzolamida **5** y brinzolamida **6** se unen al ion Zn (II) con una geometría tetraédrica (Figura 9), en su estado deprotonado, con el átomo de nitrógeno del resto sulfonamida coordinado con Zn (II) y una red extendida de enlaces de hidrógeno, que implica residuos de Thr199 y Glu106, participando también en la unión de la molécula inhibidora al ion metálico.

La parte aromática/heterocíclica del inhibidor (R) interactúa con residuos hidrofílicos e hidrofóbicos de la cavidad. Los aniones pueden unirse ya sea en geometría tetraédrica del ion metálico o como aductos con geometría de bipirámide trigonal tal como por ejemplo el aducto de tiocianato mostrado en la fig. 9b. Las estructuras cristalográficas de rayos X están disponibles para muchos aductos de sulfonamida/sulfamato/sulfamida con las isozimas I, II y IV.^{29,64–67,69}

En todos estos aductos, la sulfonamida/sulfamato/sulfamida deprotonado se coordina con el ion Zn (II) de la enzima, y su resto NH participa en la unión del H con el OH de Thr199, que a su vez está acoplado en la unión del hidrógeno al carboxilato de Glu106.^{12,64–69}

Uno de los átomos de oxígeno del grupo sulfonamido también participa en la unión del hidrógeno con el resto NH de la cadena principal de Thr199.

Cuatro sulfonamidas que son inhibidores de anhidrasas carbónicas (IACs) han sido utilizadas clínicamente como medicamentos antiglaucoma durante mucho tiempo: acetazolamida (**1**), metazolamida (**2**), etoxazolamida (**3**) y diclorofenamida (**4**). En la última década, se introdujeron dos nuevas drogas derivadas de sulfonamidas como IACs de actuación tópica, que son dorzolamida (**5**) y brinzolamida (**6**), que también actúan como inhibidores muy potentes de la mayoría de las isozimas α .

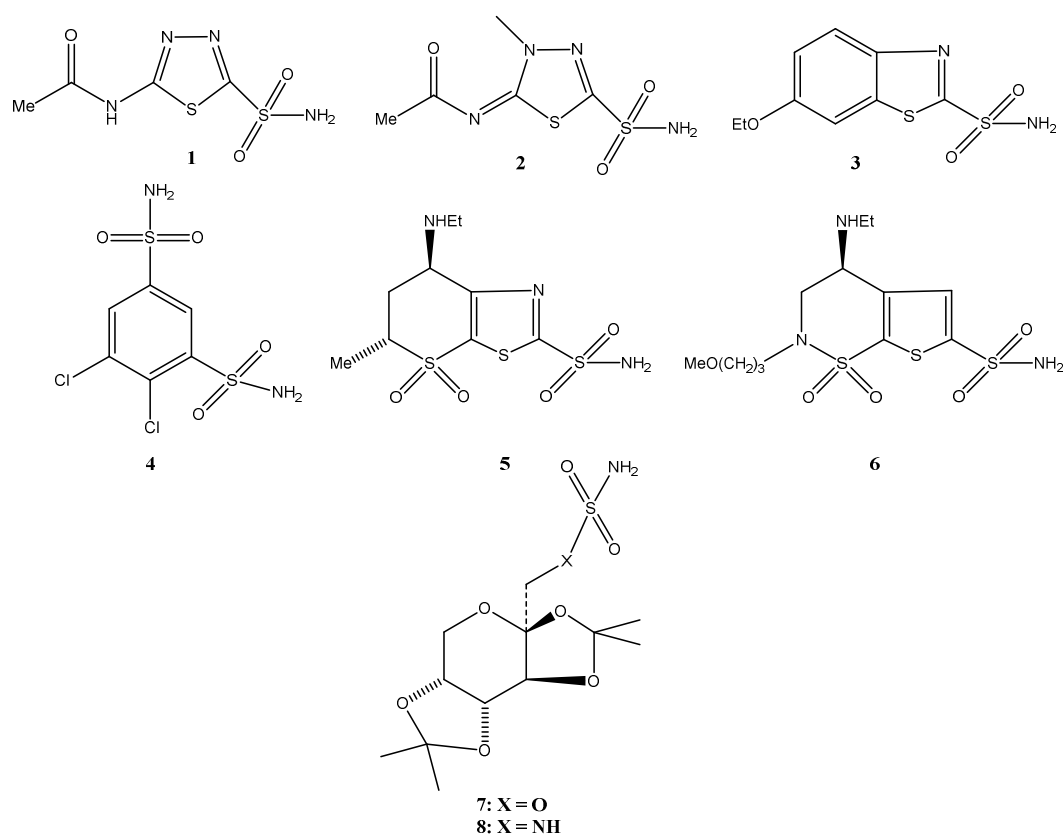


Figura 10. Sulfonamidas inhibidoras de ACs.

2.6.2. Fenol como inhibidor de la anhidrasa carbónica

Dentro de estos inhibidores se destacan los fenoles dado que su interacción con la anhidrasa carbónica es completamente diferente a las encontradas con los inhibidores tradicionales, por lo cual se constituyen en moléculas altamente interesantes para el desarrollo de nuevos inhibidores. Además, pese a que la potencial actividad biológica de los fenoles sintéticos y aquellos hallados en la naturaleza es ampliamente conocida (principalmente como antioxidantes), los mismos sólo han sido estudiados como inhibidores de las ACs en los últimos cinco años.⁷⁰ Recién en el año 1995 el grupo de Christianson reportó la estructura de Rayos X del aducto entre el fenol y la anhidrasa carbónica humana II (Figura 11).⁷¹ El análisis cristalográfico mostró que el inhibidor se unía de una manera única: el

grupo OH se encuentra fijado a través de un puente de hidrógeno al cuarto ligando del cinc, el cual es una molécula de agua, o mejor dicho un ión oxhidrilo porque la cristalización del aducto fue llevada a cabo a pH=10. Hay evidencia de un segundo puente de hidrógeno entre el átomo de oxígeno del fenol y el NH de la amida del residuo Thr199.

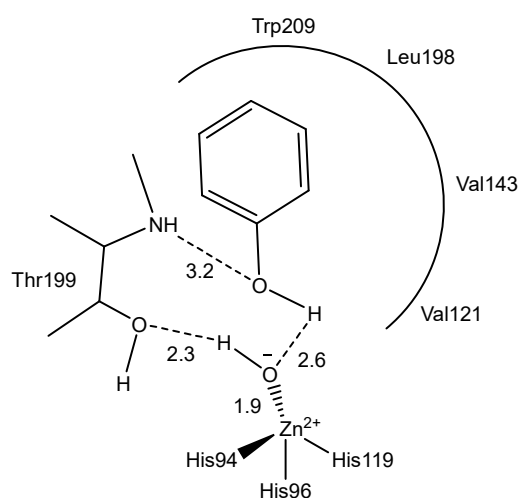


Figura 11. Representación esquemática de las interacciones del fenol con la hCA II (se representan distancias en Amstrong y los puentes de hidrógeno se representan como líneas punteadas).

Dentro de los distintos inhibidores de las anhidrasas carbónicas se han encontrados distintos inhibidores derivados de productos naturales, como por ejemplo una serie de compuestos fenólicos y sus derivados semisintéticos.⁷² Esta serie de compuestos **9-18** tiene en común la función OH y también presentan una variedad de funciones tales como ácidos carboxílicos, amidas, etc (Figura 12 y Tabla 3). Estos compuestos fenólicos inhiben la hAC I menos que el fenol. Es importante observar que, en general, los compuestos son mejores inhibidores de hAC II en un rango micromolar y similares al fenol. Se han encontrado resultados muy interesantes cuando se analizaron estos derivados de fenol frente a las isozimas mitocondriales VA y VB, que están implicadas en procesos biosintéticos tales

como gluconeogénesis, lipogénesis y la ureagénesis. Estas dos isoformas estaban muy débilmente inhibidas por el fenol pero son mucho más susceptibles a la inhibición con los compuestos fenólicos mencionados. Sin embargo no es posible racionalizar la inhibición debido a la escasa información estructural disponible para estas isoformas mitocondriales, pero la alta selectividad mostrada por la serie fenólica podría explotarse en el desarrollo de agentes antiobesidad con un mecanismo de acción novedoso.

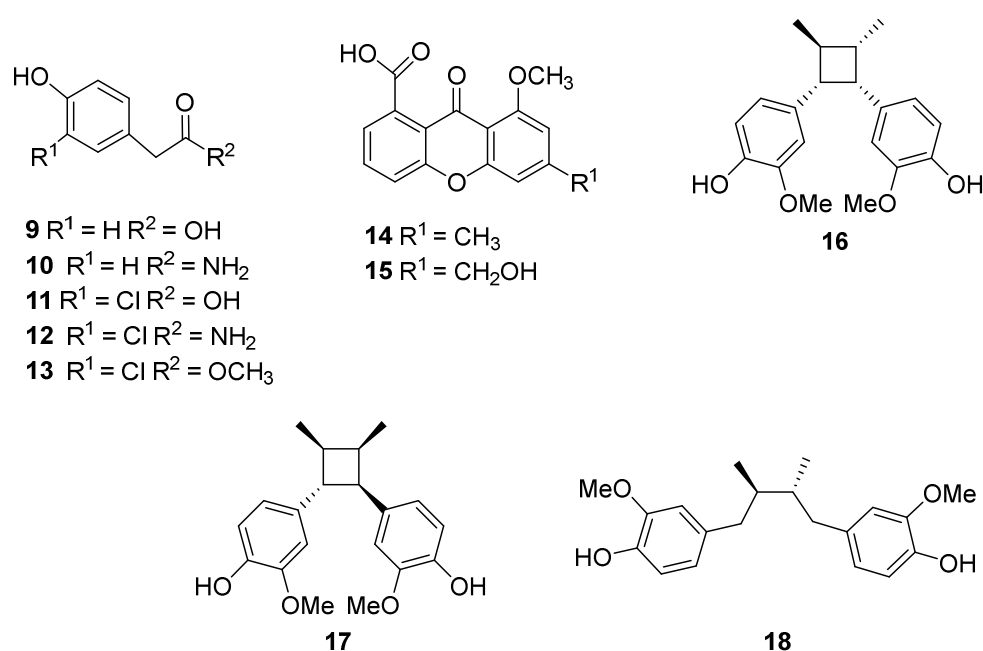


Figura 12. Compuesto fenólicos IACs derivados de productos naturales

Los compuestos **9-18** (Figura 12) también se han ensayado como inhibidores de β -ACs de organismos patógenos.⁷³

Las β -AC incluyen las enzimas de la *Mycobacterium tuberculosis* (Rv3273 y Rv1284), *Candida albicans* (NCE103) y *Cryptococcus neoformans* (Can2). Las ACs de *M. tuberculosis* (mtACs) fueron inhibidas muy débilmente por el fenol, utilizado como patrón, mientras que todos los derivados fenólicos mostraron mejor actividad enzimática para estas isozimas en comparación al fenol (Tabla 3); sin embargo, la relación estructura-actividad encontrada es muy compleja.

El ácido (-)-dihidroguaiaarético (**18**), un metabolito secundario de las plantas, inhibió preferentemente las AC fúngicas. El polifenol más flexible **18** es un inhibidor más débil de la hAC II comparado con los derivados de ciclobutano más rígidos (**16-18**). Por lo tanto, los cambios en la estructura llevaron a una mejora significativa en la actividad. Es así que el ácido (-)-dihidroguaiaarético es un compuesto interesante para el desarrollo de nuevos agentes antifúngicos.

Tabla 3. Datos de inhibición de las anhidrasas carbónicas α y β con fenoles de productos naturales y semisintéticos

compuesto	$K_i(\mu\text{M})$							
	hAC I	hAC II	hAC VA	hAC VB	mtRv3273	mtRv1284	Nce103	Can2
9	309	10,3	0,101	0,105	11,4	10,8	1,02	0,9
10	309	11,2	0,092	0,081	9,12	0,85	0,91	0,84
11	265	8,6	0,100	0,118	10,8	10,3	1,08	1,12
12	237	131	0,110	0,106	11,2	10,5	1,00	0,85
13	369	107	0,109	0,125	nd	nd	nd	nd
14	201	8,4	0,093	0,103	11,4	10,5	1,06	1,12
15	374	9,2	0,094	0,102	10,9	0,99	1,01	1,08
16	368	11,7	0,091	0,069	8,92	0,82	0,73	0,77
17	354	12,1	0,098	0,079	0,89	0,80	0,70	0,95
18	307	230	0,085	0,071	9,10	0,85	0,62	0,81
fenol	10,2	5,5	218	543	79,0	64,0	17,3	25,9

hAC: anhidrasa carbónica humana ; nd: no determinada

2.6.3. Cumarinas como inhibidores de la anhidrasa carbónica

Otros compuestos inhibidores de las anhidrasas carbónicas derivados de productos naturales son distintas cumarinas, el compuesto 6-(1S-hidroxi-3-metilbutil)-7-metoxi-2H-cromen-2-ona (**20**) fue la primera cumarina caracterizada como inhibidor de AC (Figura 13).⁷⁴ Utilizando cristalografía de rayos X, se obtuvo la estructura cristalina de este producto natural con la AC II humana. La cumarina hidrolizada, derivada del ácido *cis*-cinámico (**21**), se observó en el sitio activo y no en la estructura de la cumarina (**20**) (Figura 13). El producto hidrolizado (**21**) es voluminoso comparado con (**20**) y se encontró que se ubica en la entrada del sitio activo de la AC en lugar de interactuar con el catalizador del ion cinc (situado en la base del sitio activo). A diferencia de los IAC previamente conocidos que se

coordinan al cinc del sitio activo, este tiene un doble comportamiento de sustrato-inhibidor nunca antes observado.

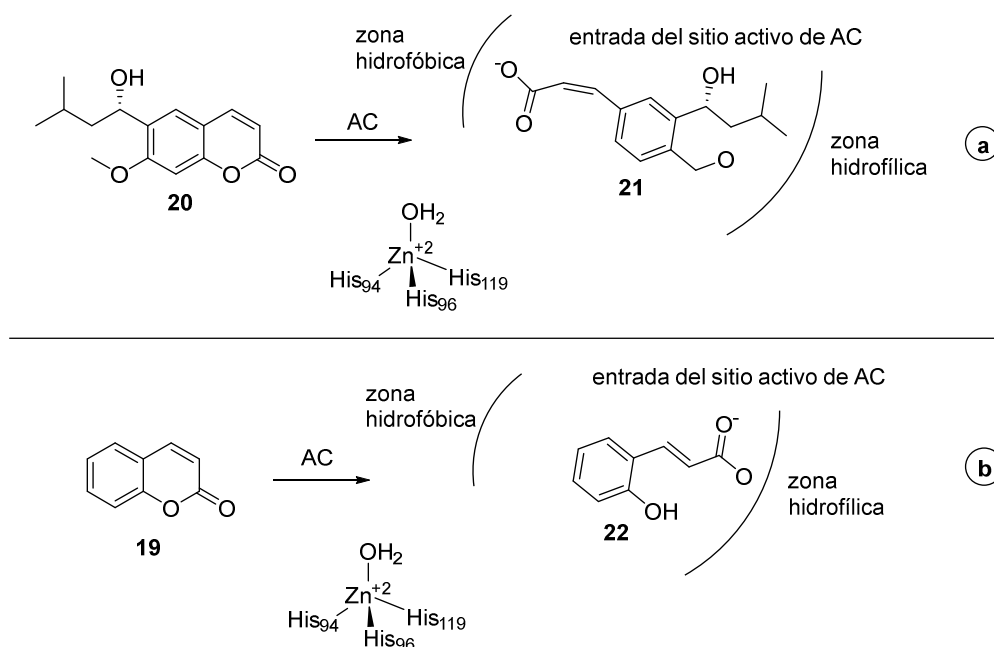


Figura 13. (a) La cumarina de producto natural **20** es hidrolizada por la AC para formar ácido *cis*-cinámico **21**.

(b) La cumarina **19** es hidrolizada por la AC para formar el ácido *trans*-cinámico.

AC: anhidrasa carbónica.

La actividad como esterasa es conocida para las ACs y la observación del ácido cinámico (**21**) en lugar de la cumarina **20** podría ser racionalizada como consecuencia de la actividad de la esterasa AC II que conduce a la hidrólisis de la lactona de **20**. Este modo de inhibición también se observó con la cumarina **19**, la más simple de las estructuras cumarínicas. Al igual que el producto natural **20**, se observó la lactona hidrolizada a partir de la cumarina **19** en la estructura cristalina, cerca de la entrada del sitio activo de la AC II⁷⁵ como el isómero *trans* del ácido cinámico (**22**), y no el isómero *cis* como para el compuesto **21** (Figura 13). Se cree que el volumen combinado de los dos sustituyentes de **21** obliga al isómero *cis* termodinámicamente menos estable a colocarse en la entrada del sitio activo de la AC.

Otra diferencia entre las estructuras proteína-ligando de la AC II con **21** y **22** fue la orientación del sustituyente carboxietileno. Con el producto natural simple **22**, este sustituyente carboxietileno estaba orientado hacia la mitad hidrofílica del sitio activo, mientras que con **21** estaba orientado hacia la mitad hidrofóbica del sitio activo con el sustituyente orientado hacia la mitad hidrofílica del sitio activo. La cumarina **19** no es un buen inhibidor de la mayoría de las ACs con la excepción de la AC I y II, mientras que el derivado **20** es un inhibidor en un rango submicromolar de esta anhidrasa carbónica y un inhibidor en un rango micromolar medio de todas las AC (con la excepción de la AC III donde es un inhibidor débil) (Tabla 4). Esta relación estructura-actividad implica que los sustituyentes 6 y/o 7 en la cumarina **20** son fundamentales para la interacción con las ACs. Como la zona del sitio activo donde estos ligandos se unen es la región más variable entre isozimas de AC humana, esto puede explicar la relación variable para el producto natural **20** comparado con la cumarina **19** (Tabla 4).

Tabla 4. Datos de inhibición de anhidrasas carbónicas humanas después de 6 h de preincubación: cumarina (**19**) y 6- (1S-hidroxi-3-metilbutil) -7-metoxi-2H-cromen-2-ona (**20**).

Compuesto	K _i s (μM) ^a										
	AC I	AC II	AC III	AC IV	AC VA	AC VB	AC VI	AC VII	AC IX	AC XII	AC XIV
19	3,1	9,2	>1000	62,3	>1000	578	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
20	0,08	0,06	>1000	3,8	96,0	17,7	35,7	27,9	54,5	48,6	7,8

^a Errores en el rango de ± 5%, a partir de tres medidas.

Al haber encontrado que el derivado **20** presenta un buen perfil inhibitorio, se ha realizado un estudio más detallado de las cumarinas derivadas de PN (**23-34**) (Figura 14) como IACs.⁷⁶ Es así, que se midió la actividad inhibitoria frente a las ACs I, II, IX y XII, siendo estas dos últimas de gran interés (Tabla 5). Las tendencias de la relación estructura-actividad incluyen una inhibición de la AC II muy débil, mientras que en la AC I, IX y XII tienen K_i en el intervalo de 1-10 μM. Estos compuestos representan un gran interés debido a sus características de

selectividad de inhibición. Por ejemplo, algunas de las cumarinas derivadas de productos naturales son selectivas para las ACs IX y XII.

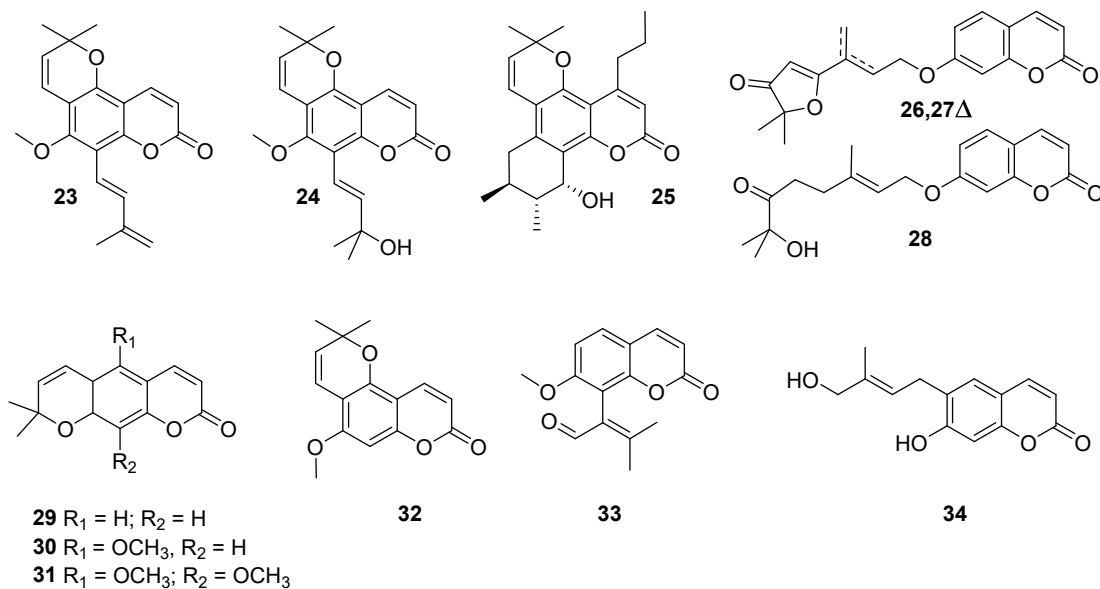


Figura 14. Cumarinas IACs derivadas de productos naturales.

Tabla 5. Datos de inhibición para las cumarinas de productos naturales **45-56** contra las isozimas de anhidrasa carbónica I, II, IX y XII.

Compuesto	K _i (μ M) ^a			
	AC I	AC II	AC IX	AC XII
23	7,66	>100	0,62	0,79
24	8,46	>100	0,78	0,77
25	9,31	50,7	0,83	0,81
26	59,2	63,4	0,89	0,60
27	9,75	>100	0,60	0,83
28	7,81	>100	4,03	0,70
29	21,5	>100	7,51	25,7
30	7,71	>100	0,74	0,96
31	9,21	49,3	0,86	8,35
32	5,60	>100	3,50	9,10
33	9,11	>100	8,12	7,44
34	7,52	78,9	9,75	0,77
AZA	0,25	0,012	0,025	0,0057

^aErrores en el rango de \pm 5%, a partir de tres medidas.

AZA: acetazolamida

Todas las proteínas eran recombinantes.

Esta variación en el perfil de inhibición de las isozimas de las ACs es muy favorable para el potencial descubrimiento de fármacos, en el que la inhibición selectiva de una AC específica es muy importante, debido que así se proporciona el efecto fisiológico deseado sin efectos secundarios.

2.6.4. Metoxifenilo como inhibidor de la anhidrasa carbónica

La metilación es una de las modificaciones químicas más comunes del oxhidrilo en el fenol. Sólo recientemente los derivados de metoxifenilo han sido investigados como inhibidores de la anhidrasa carbónica porque se consideraba que no tenían incidencia en la inhibición de AC.⁷⁰ Inesperadamente, di y tri-metoxibencenos son IACs bastante similares o mejores que fenol. Los estudios de docking han permitido explicar el comportamiento de estos compuestos. Así se encontró que la unión de metoxibenceno-sustituido dentro del sitio activo enzimático se realiza sin interacción con el ion cinc y por medio de diferentes interacciones con residuos de aminoácidos y moléculas de agua.⁷⁰ Los compuestos se sitúan entre el sitio de unión del fenol y el sitio de unión de la cumarina, llenando el centro de la cavidad enzimática, sin embargo esta hipótesis aún no está confirmada por cristalografía. De este modo surge la posibilidad de diseñar inhibidores de la anhidrasa carbónica. Sin embargo, muy pocos de estos derivados han sido investigados hasta el momento.⁷⁰

2.6.5. Ditiocarbamatos como inhibidores de la anhidrasa carbónica

Otra familia de compuestos interesantes son los ditiocarbamatos (DTCs). Son una clase bien conocida de compuestos, que complejan los iones metálicos debido a la presencia del anión CS^- que puede coordinar una variedad de metales de transición de manera mono- o bidentada.^{77,78} Además, muchos de estos derivados tienen aplicaciones en la agricultura como antifúngicos, protección de los cultivos,

así como también en la medicina. A pesar de que de que son conocidos por al menos seis décadas, no han sido muy investigados como inhibidores de metaloenzimas, más allá de ser estudiados como inhibidores de la tirosinasa (una enzima de cobre que muestra afinidad micromolar para algunos de estos compuestos).⁷⁸

Con respecto a estos compuestos sólo se reportaron algunos datos del *N, N*-dietil-ditiocarbamato como inhibidor de la AC bovina (tanto la nativa como la enzima sustituida con Co (II)), proponiéndose que el inhibidor se une al ión Co (II) con una geometría de bipiramide trigonal. Si bien se han investigado aniones inorgánicos como IACs,⁷⁹⁻⁸¹ se han encontrado tritocarbonatos (CS_3^{2-}) como inhibidores de varias isoformas α , planteado que los compuestos que posean esta nuevo unión con cinc, encontrada en el tritocarbonato podrían tener mejores propiedades inhibitorias en comparación con los aniones inorgánicos simples.

También se sabe que el dietil-ditiocarbamato, inhibe varias isoformas de AC en un rango micromolar bajo o submicromolar.⁷⁹⁻⁸¹ Es así que todos estos antecedentes permiten mostrar que una amplia gama de DTCs que incorporan funciones alifáticas y/o aromáticas unidas al átomo de nitrógeno, actúan como IACs en un rango nanomolar bajo e incluso subnanomolar. También fue elucidado el mecanismo de acción de esta nueva clase de potentes inhibidores, describiéndose las estructuras cristalinas de rayos X para los aductos de distintos DTCs.

Se conocen DTCs que poseen alta capacidad inhibitoria contra cuatro isoformas de α -ACs humanas (hAC I, hAC II y hAC IX).⁸²⁻⁸⁴ Por lo tanto esta familia de compuestos, los ditiocarbamatos también muestran actividad inhibitoria frente a las ACs.

2.7. Selectividad en el diseño de inhibidores de la anhidrasas carbónicas

Muchas sulfamidas y sulfamatos inhibidores de las ACs, como los derivados **1-8** (Figura 10), poseen alta afinidad para las principales isozimas de mamíferos como la AC II, AC VA, AC VB, AC VII, AC IX o AC XII (Tabla 6)^{8,26,27,68}. El desafío para el diseño de nuevos agentes farmacológicos de este tipo está constituido en la búsqueda de la especificidad de dichos compuestos.

Entre las 16 isozimas descritas hasta ahora, la AC II tiene una afinidad alta para la mayoría de inhibidores de sulfonamida/sulfamato (Tabla 6), y la principal búsqueda consiste en encontrar derivados que no actúan como inhibidores muy fuertes de esta isozima, conservando una buena afinidad con otra AC, como por ejemplo AC IX, AC XII. Lo mismo sucede para encontrar inhibidores con una mayor afinidad a AC I.

Tabla 6. Datos de Inhibición con las sulfonamidas **1-6**, el sulfamato **7** (topiramato) y el análogo del topiramato **8**, contra isozimas **I-XIV**

Isozima ^c	K _i (μM)							
	1	2	3	4	5	6	7	8
hAC I ^a	0,25	0,05	0,025	1,20	50	45	0,25	3,45
hAC II ^a	0,012	0,014	0,008	0,038	0,009	0,003	0,010	2,13
hAC III ^a	300	100	5	nd	8	nd	nd	nd
hAC IV ^a	0,074	6,2	0,093	15	8,5	nd	4.9	0,941
hAC VA ^a	0,063	0,065	0,025	0,63	0,042	0,05	0,063	0,032
hAC VB ^a	0,054	0,062	0,019	0,021	0,033	0,03	0,030	0,021
hAC VI ^a	0,011	0,010	0,043	0,079	0,010	0,0009	0,045	nd
hAC VII ^a	0,0025	0,0021	0,0008	0,026	0,0035	0,0028	0,0009	0,035
hAC IX ^b	0,025	0,027	0,034	0,050	0,052	0,037	0,058 ^d	4,58
hAC XII ^b	0,0057	0,0034	0,022	0,050	0,0035	0,002	0,0038	1,87
hAC XIV ^a	0,041	0,043	0,025	0,345	0,027	0,024	1,46	0,025

^aEnzima completa

^bDominio catalítico

^ch. humano

^dLos datos contra la enzima son de 1,59μM. nd. No probado (sin datos disponibles)

2.7.1. Isozimas I y II

La principal diferencia en la constitución del sitio activo de isozimas AC I y AC II es la presencia de un número de residuos de histidina en la primera isozima. Además de los ligandos de cinc (His94, His96 y His119), la His64 juega un papel importante en la catálisis. Este es el único residuo de histidina presente en el sitio activo de AC II, mientras que en AC I hay otros tres residuos adicionales, His67, His200 y His243.²⁴ Otra diferencia importante entre las dos isozimas es que la AC II contiene un cúmulo de histidina que está ausente en la AC I, constituido por residuos: His64, His4 (estos dos residuos tienen una conformación flexible en la estructura cristalina), His3, His10, His15 e His17 (que se prolonga desde el centro del sitio activo hasta el borde de la cavidad sobresaliendo en la superficie de la proteína).²⁴ Estas dos isozimas poseen también una diversidad diferente para las dos clases principales de inhibidores: AC I tiene una mayor afinidad que AC II para aniones (cianuro, tiocianato, cianato, haluros), mientras que AC II tiene generalmente una mayor afinidad para sulfonamidas en comparación con AC I (Tabla 6).^{8,68}

Es así que es difícil obtener inhibidores derivados de sulfonamidas con mayor afinidad para AC I que para AC II, aunque las dos isozimas poseen diferencias significativas en su sitio activo.

Todos los compuestos que poseen una mayor afinidad a la AC I en comparación con AC II, de los tipos **35-42** (Figura 15), contienen restos ureido o tioureido en sus moléculas. Los datos de inhibición frente a estas dos isozimas se muestran en la tabla 7.

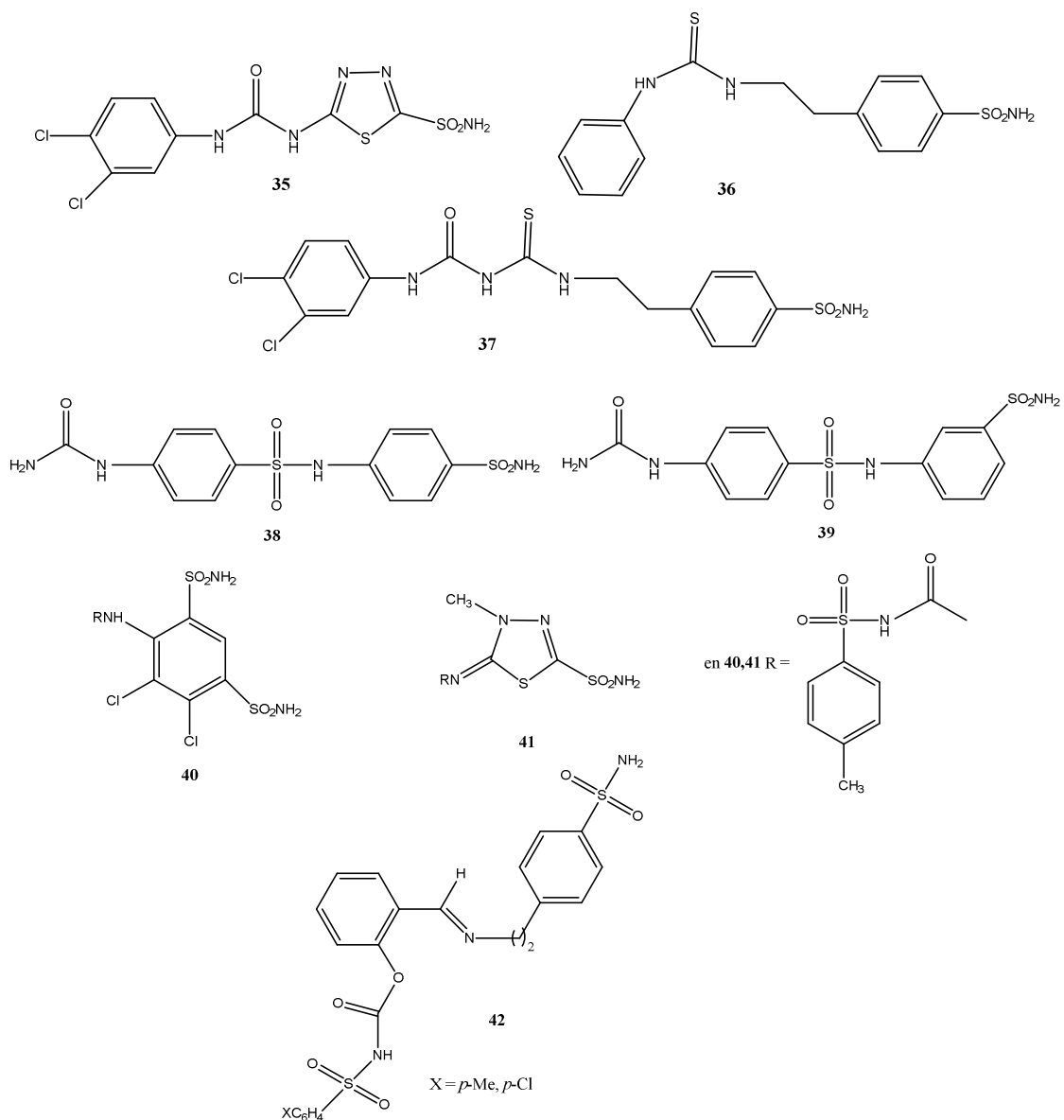


Figura 15. Inhibidores de AC I, II y IV.

Por lo tanto los inhibidores de la isozima I pertenecen tanto a sulfonamidas aromáticas, así como a la clase heterocíclica, mientras que los fragmentos ureido y tioureido pueden ser, o no, sustituidos con grupos más voluminosos (3,4-diclorofenilo; fenilo; fenilsulfonilo sustituido, etc.).⁸⁵⁻⁸⁸

Tabla 7. Inhibición de las isozimas I, II y IV con los compuestos **35-42**.

Inhibidor	Ki (nM)		
	hAC I	hAC II	bAC IV
35	3	6	8
36	50	53	70
37	7	10	24
38	3	8	20
39	4	10	25
40	8	12	14
41	4	5	11
42a (X = p-Me)	40	110	120
42b (X = p-Cl)	60	100	160

Los compuestos que contiene arilsulfonilcarbamatos inhiben también significativamente las isozimas II y IV, por lo tanto, no son inhibidores específicos de la isozima I, pero representan un paso importante hacia la generación IACs específicos.^{8,68}

2.7.2. Isozimas IX y XII (AC extracelulares)

Estas isozimas se asocian a membranas celulares, con el sitio activo enzimático siempre orientado extracelularmente. Juegan un papel fundamental en funciones fisiológicas (AC IX en la mucosa gástrica y muchas células tumorales; AC XII en tumores y también algunos epitelios normales).^{8,14}

La AC 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 AC IX en tejidos normales fue hallada en la mucosa del estómago y en la vesícula biliar.⁸⁹ En tanto que se observó una débil expresión de AC IX en el epitelio del conducto pancreático,⁹⁰ en el epitelio intestinal,⁹¹ en órganos reproductivos masculinos y en células que recubren la cavidad del cuerpo.^{92,93} Por otro lado, la AC 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.⁹⁴⁻⁹⁶ Sólo se halla ausente en tejidos normales y carcinomas de próstata.⁹¹

En cuanto a la AC 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,^{90,93,97} pero la relación de esta AC con el cáncer no es tan clara como la que presenta la AC IX. La expresión de AC XII ha sido detectada en muchos tejidos normales ⁹³ tales como en riñón, páncreas, colon, próstata, ovarios, testículos, pulmón, y cerebro.⁹⁸

Debido a que las AC 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 AC IX.⁹⁹⁻¹⁰¹

Las células tumorales necesitan una regulación del pH y del transporte de iones para adaptarse a la acidosis, y esto induce la expresión de AC IX/XII para que participen en estos procesos. La participación funcional de AC IX en la regulación del pH, se halla validada por tres experiencias experimentales. Primero, contribuye a la acidificación del microentorno extracelular de células hipóxicas,⁹⁹ segundo, minimiza el gradiente de pH intracelular, e incrementa el gradiente de pH extracelular en el núcleo tumoral,¹⁰⁰ y tercero contribuye a la acidificación extracelular (incluso también la AC 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 (Figura 16).¹⁰¹

El rol de la AC XII en la biología tumoral se halla mucho menos explorado. Además de que la AC XII contribuye al control del pH y crecimiento tumoral,¹⁰¹ se ha demostrado que la inhibición de la AC XII ocasiona una disminución del desarrollo de células del carcinoma renal *in vitro*.¹⁰²

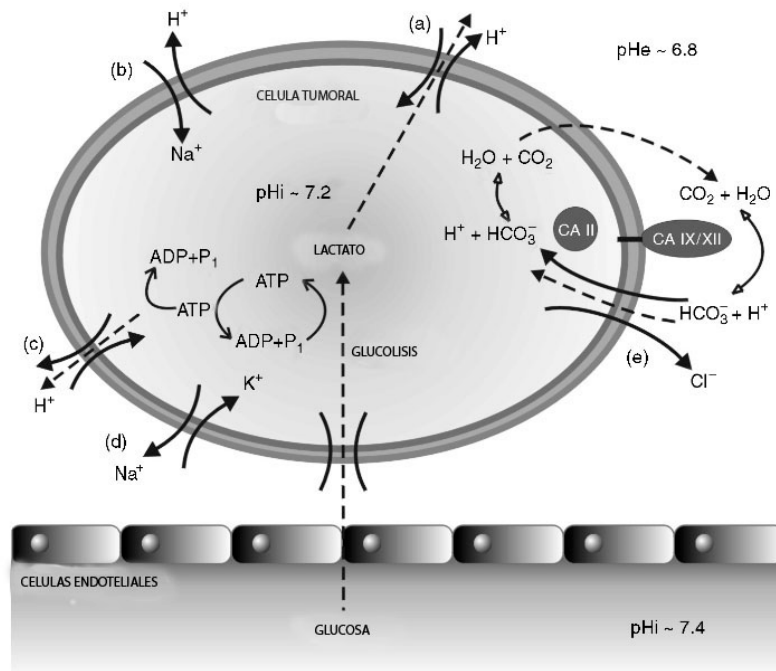


Figura 16. Ubicación de ACs II, IX y XII en una célula tumoral.

Debido a la localización extracelular de estas isoformas, es posible diseñar inhibidores impermeables a la membrana, que de esta manera se convierten en inhibidores de estas ACs.

2.8. Glicomiméticos como agentes quimioterapéuticos

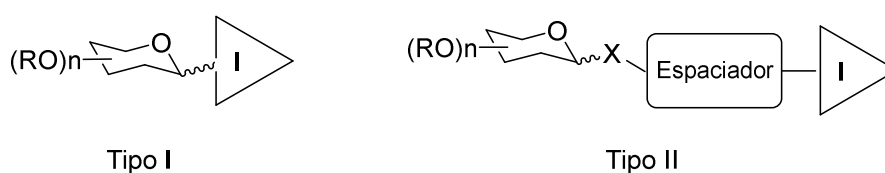
Los carbohidratos se hallan ampliamente distribuidos en la naturaleza y pueden ser considerados como los compuestos orgánicos más abundantes de la biomasa. Si bien los mismos desempeñan diversas funciones biológicas (glicoproteínas, polisacáridos de estructura y reserva, etc.) y en principio podrían ser empleados en el desarrollo de nuevos agentes quimioterapéuticos, su uso se encuentra restringido.¹⁰³ Esta limitación se debe a que el enlace O-glicosídico presente en los mismos, es hidrolizado por las glicosidasas lo cual afecta

notablemente el desarrollo de nuevos compuestos que sean útiles “*in vivo*”. Con el objetivo de evitar este inconveniente se han desarrollado distintos reemplazos de los O-glicósidos, entre ellos pueden mencionarse los C-, S- y N-glicósidos. En el caso de los C-glicósidos, en los cuales el oxígeno anomérico ha sido reemplazado por un átomo de carbono,¹⁰⁴ se ha demostrado que estos compuestos adoptan conformaciones similares a los glicósidos naturales por lo cual presentarían interacciones similares con los sitios activos de las diversas enzimas pero serían resistentes a la hidrólisis catalizada por las glicosidasas.¹⁰⁵ En los últimos años se han desarrollado una gran cantidad de estos miméticos de carbohidratos, o glicomiméticos, muchos de los cuales presentan actividad como inhibidores enzimáticos.¹⁰⁶

Para el desarrollo de este tipo de compuestos con actividad biológica existen dos posibilidades (Figura 17):

-Unión directa entre el grupo responsable de la inhibición y el carbohidrato (*Tipo I*)

-Unión a través de un espaciador (glicoconjugados) (*Tipo II*)



X= CH₂, NH, O

I: grupo responsable de la inhibición

Figura 17. Modelo de los glicomiméticos

2.9. Glicomiméticos inhibidores de la anhidrasa carbónica

Uno de los enfoques más exitosos para diseñar IACs dirigido a todas las isoformas conocidas hasta hoy, es el denominado metodología del apéndice. La metodología del apéndice consistió originalmente en unir diferentes grupos a funciones sulfonamidas para modular las propiedades fisicoquímicas de estos agentes farmacológicos. Un muy buen ejemplo de tales apéndices está constituido por los carbohidratos, que representan una amplia gama de quimiotipos, siendo nuevos IAC.^{106,107} La diversidad estereoquímica de los carbohidratos ofrece la oportunidad de buscar distintos tipos de uniones con el sitio activo de isozimas de las ACs. Los IAC glicosídicos fueron explorados previamente por los grupos de Poulsen^{108–112} y Winum^{83,113,114}, determinando que la presencia de carbohidrato en las moléculas se asocia con inhibición efectiva de isoformas fisiológicamente relevantes, entre ellas AC I, II, IX y XII.

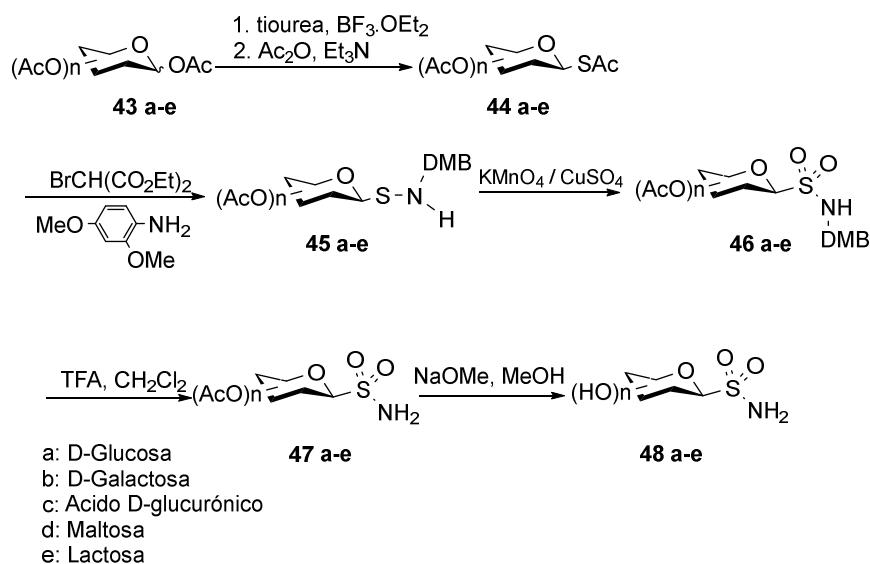
A continuación, se describen las síntesis más relevantes de derivados de carbohidratos que han sido estudiados como inhibidores de la anhidrasa carbónica.

2.9.1. Tipo I

Sulfonamidas anoméricas: son glicósidos que poseen un grupo sulfonamido directamente unido al centro anomérico de un carbohidrato. El grupo de Poulsen reportó una metodología eficiente para la síntesis de S-glicosil sulfonamidas a través de la oxidación de sulfonamidas protegidas (Esquema 1).¹¹⁵ Estos compuestos han sido preparados por reacción de tioacetatos de glicosilo **44** con bromomalonato de dietilo y 2,4-dimetoxibencilamina. La posterior oxidación con KMnO_4 en presencia de sulfato cúprico, y la eliminación del grupo protector bajo condiciones ácidas proporciona las glicosilsulfonamidas peracetiladas **47**. Luego el

uso de las condiciones de Zemplen permite obtener los glicósidos desprotegidos **48** en excelente rendimiento.

Los compuestos sintetizados fueron evaluados como inhibidores de diferentes isoformas de la anhidrasa carbónica humana encontrándose que los mismos exhiben escasa actividad. Utilizando cristalografía de Rayos X, el grupo de investigación pudo demostrar que el tamaño de los glicósidos sólo permite interacciones débiles con los residuos de aminoácidos del sitio activo.

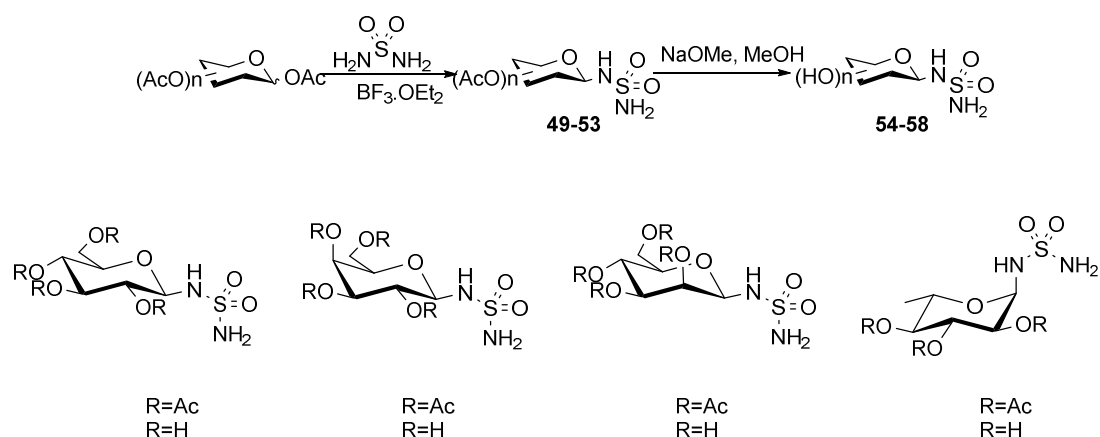


Esquema 1. Metodología para síntesis de S-glicosil sulfonamidas.

Sulfamidas anoméricas: un reemplazo poco usual para el enlace glicosídico es el grupo sulfonamido correspondiente a la unión de una glicosilamina que posee un grupo sulfonilo en el nitrógeno. Sin embargo, las glicosilaminas tienden a hidrolizarse, y exhiben anomerización. Para solucionar este problema se han desarrollado varias sulfonamidoglicosilaciones de carbohidratos.¹⁰⁷

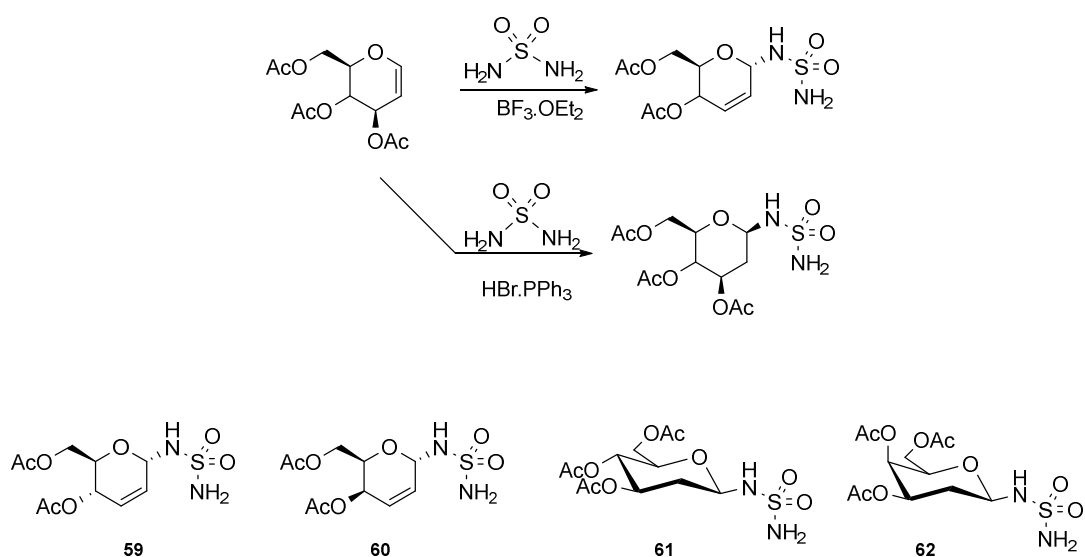
Recientemente se ha descrito la síntesis de *N*-glicosil sulfamidas, un nuevo tipo de compuestos que presentan la función sulfamida directamente unida al carbono anomérico de un monosacárido (Esquema 2).¹¹⁶

Varias piranosas peracetiladas se hicieron reaccionar con sulfamida en presencia de eterato de trifluoruro de boro para generar los β -sulfamidoglicósidos **49-53** en muy buenos rendimientos. Los compuestos fueron posteriormente desprotegidos empleando condiciones convencionales. Los compuestos sintetizados mostraron inhibición selectiva de la anhidrasa carbónica IX (sobreeexpresada en tejidos tumorales) frente a la isoforma II, que se encuentra ampliamente distribuida en el organismo, por lo cual podrían ser fármacos útiles para terapias antitumorales.¹¹⁷



Esquema 2. Síntesis de *N*-glicosil sulfamidas.

Además, se han sintetizado glicosil sulfamidas 2,3-insaturadas empleando la sulfonamidoglicosilación de *endo*-glicales peracetilados mediada o no por el reordenamiento de Ferrier (Esquema 3).^{118,119} Para estas síntesis se han empleado dos catalizadores: eterato de trifluoruro de boro o el aducto bromuro de hidrógeno-trifenilfosfonio. El derivado de *endo*-glucal **59** ha mostrado ser un inhibidor selectivo de la anhidrasa carbónica IX.¹²⁰

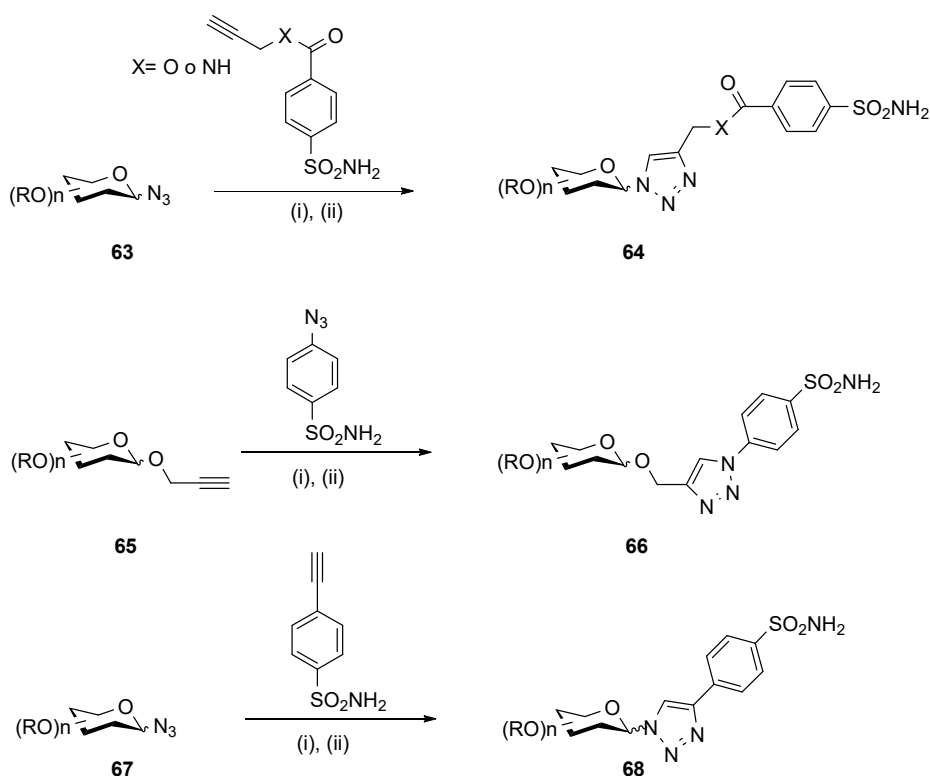


Esquema 3. Sulfonamidoglicosilación de *endo*-glicales peracetilados.

2.9.2. Tipo II

Sulfonamido glicoconjugados: La adición de una azida orgánica a un alquino terminal catalizada por Cu (I) ha sido utilizada para formar 1,2,3-triazoles 1,4-disustituidos, regioespecíficamente. Esta transformación se conoce como “click-chemistry” y ha sido utilizada por el grupo de Poulsen para sintetizar numerosos glicosiltriazoles como potenciales inhibidores de la anhidrasa carbónica (Esquema 4).^{107,121}

Con el objetivo de facilitar la generación de los triazoles, el grupo sintetizó sulfonamidas aromáticas que contenían un alquino terminal o bien una función azida, para reaccionar con el carbohidrato que contuviese la función complementaria. Los grupos de compuestos se sintetizaron por dos combinaciones posibles: i) un alquino conteniendo la función sulfonamido con un grupo de azido azúcares o ii) una azida conteniendo la función sulfonamido con un grupo de acetilenos derivados de carbohidratos. De esta gran cantidad de glicósidos sintetizados se han identificado 4 compuestos que exhiben inhibición selectiva de la AC IX.



Esquema 4. (i) Ascorbato de sodio, CuSO_4 , t-butanol/ H_2O ; NaOCH_3 , CH_3OH

2.10. Diseño sintético de C-glicósidos

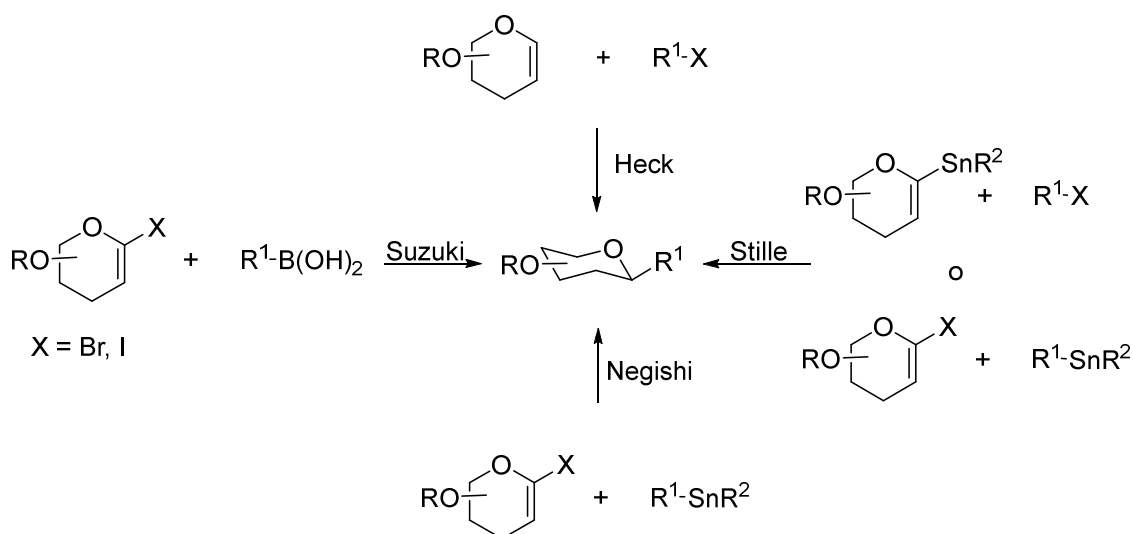
A continuación se discutirán sólo algunas estrategias sintéticas para la obtención de C-glicósidos:

2.10.1. Reacciones de “Cross coupling”

Los aril C-glicósidos son compuestos en los cuales un grupo arilo se encuentra unido directamente al carbono anomérico del C-glicósido. Dichas moléculas son de gran valor en química medicinal ya que son resistentes a la hidrólisis ácida y

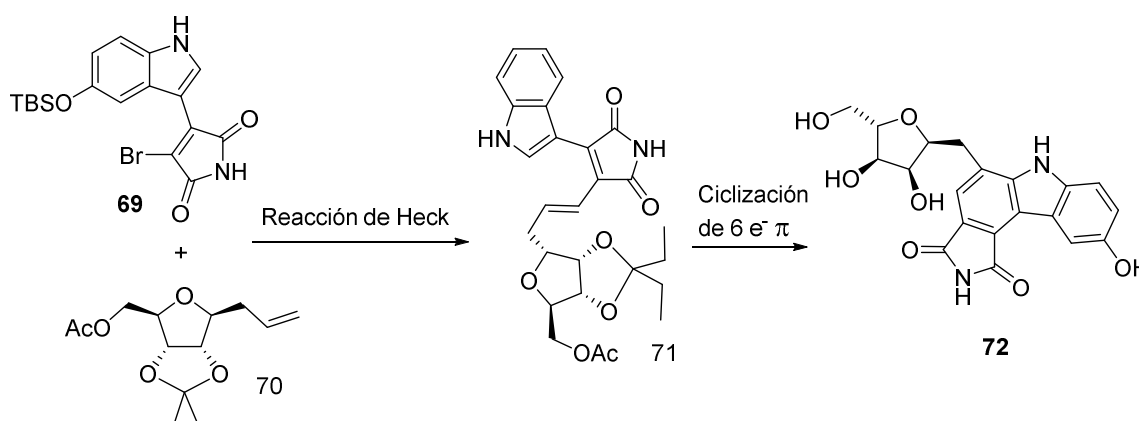
enzimática y por ende poseen un tiempo de vida considerable, lo que les permite ingresar a las células y ligarse al ADN. Dichos compuestos poseen actividad antifúngica, antibacteriana y tienen la capacidad de inhibir enzimas.¹²²

Los aril C-glicosidos son sintetizados principalmente por reacciones de Heck, Suzuki, Stille y además por reacciones tipo Negishi. Estas estrategias tienen a los glicales como intermediarios claves (Esquema 5).



Esquema 5. Estrategias para la síntesis de C-glicosidos.

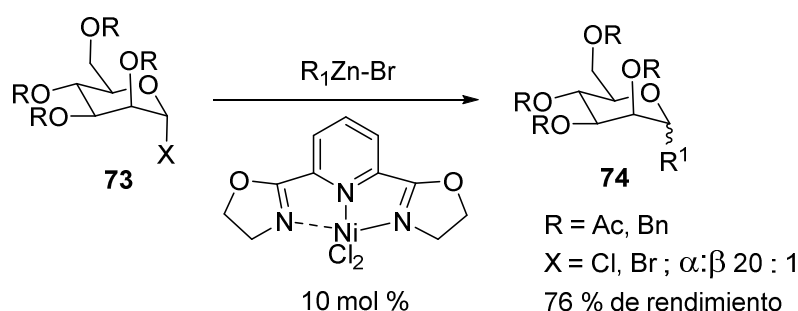
Se reportó la síntesis de indolocarbazol **72** inhibidor de la 1 kinasa mediante acoplamiento de Heck seguido por la ciclación de 6 electrones π (Esquema 6).



Esquema 6. Síntesis de C-glicosilpirrolo[3,4-c]carbazol-1,3(2H,6H)-dionas.

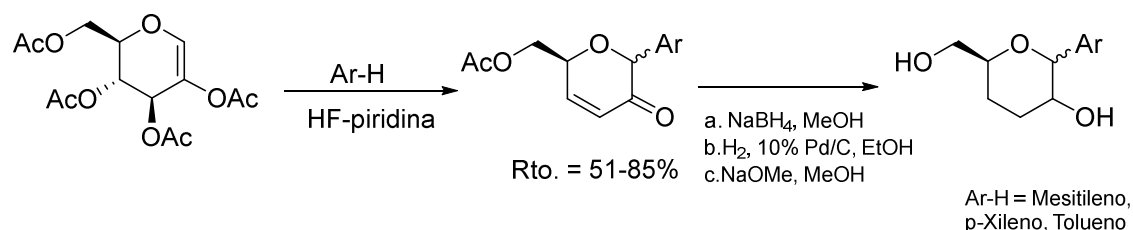
Otra ruta interesante para la síntesis de C-glicósidos es la de cross coupling de Suzuki, que implica la reacción entre ácidos aril o vinil-borónicos o organoboranos y el haluro correspondiente o triflatos catalizadas por complejos de paladio.¹²³⁻¹³³

Los C-glicósidos también se pueden sintetizar mediante reacción de acoplamiento de Negishi de un compuesto de organocinc y un haluro orgánico, catalizado por complejos de níquel o paladio. Además de los glicales, los haluros de glicosilo pueden usarse también como materiales de partida para la reacción de acoplamiento “cross coupling” de Negishi (Esquema 7).^{122,134-136}



Esquema 7. Síntesis de C-glicósidos por reacción de Negishi

Otro método de síntesis es el desarrollado por Hayashi y colaboradores, una síntesis asimétrica de *cis*- y *trans*-2-aril-6-metilpiranos del bromuro de tetra-O-acetil-D-glucopiranosilo. La reacción ocurre en dos pasos: uno implica la arilación directa en ausencia de reactivos organometálicos, y el otro incluye desoxigenación en la posición C-3 seguida por inversión de la configuración en la posición C-2 (Esquema 8).

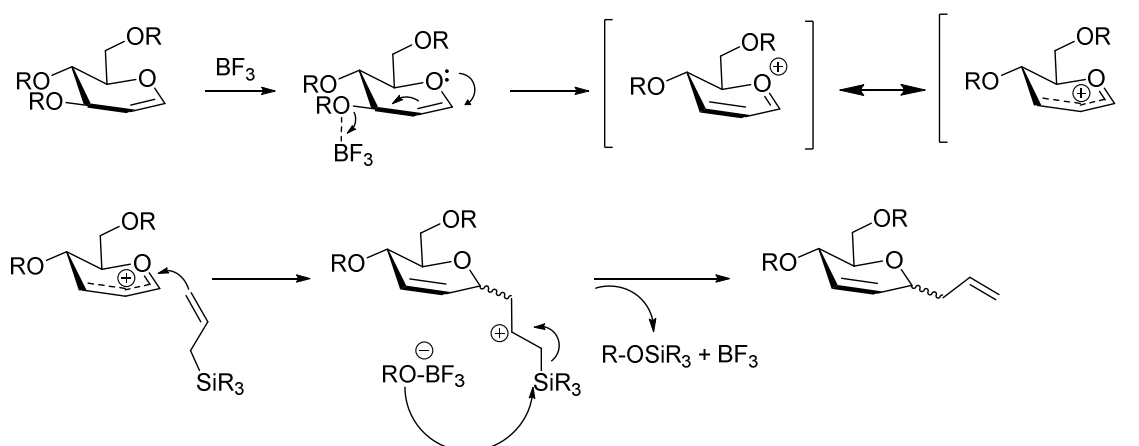


Esquema 8. Síntesis de 2-aril-3-hidroxi-6(hidroximetil)piranos.

2.10.2. Adición de silanos

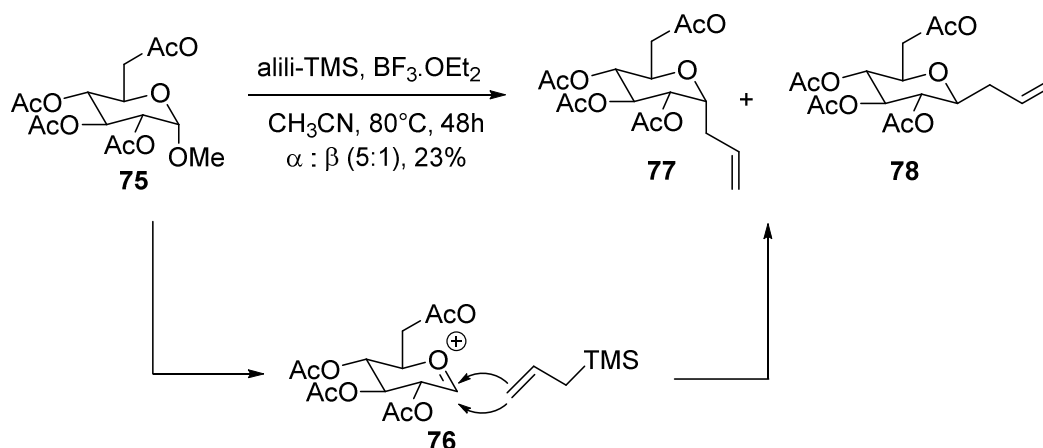
La síntesis de compuestos C-glicosídicos ha sido llevada a cabo mediante reordenamiento de Ferrier por adición de silanos sobre glicales. Este tipo de reacciones son llevadas a cabo empleando ácidos de Lewis como $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$, TMSOTf y SnCl_4 .

Un mecanismo propuesto para la adición de alililsilanos sobre glicales es el mostrado en el Esquema 9. Además de los alililsilanos, otros nucleófilos empleados en este tipo de reacciones son: vinilsilanos, cianuro de trimetilsililo y silili enol éteres.



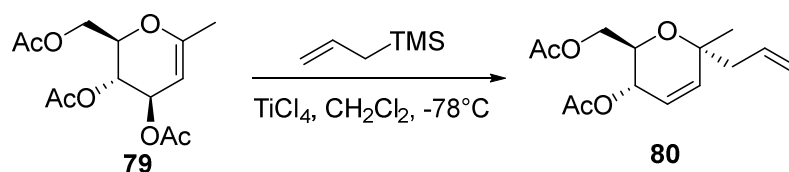
Esquema 9. Obtención de C-glicósidos mediante adición de silanos sobre glicales.

Horton¹³⁷ reportó la alilación del carbono anomérico de **75**. Dicha reacción fue catalizada por $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$. Esta reacción transcurre mediante la formación del ion oxonio **76**. Los anómeros α (**77**) y β (**78**) fueron obtenidos en una relación de 5:1 (Esquema 10).



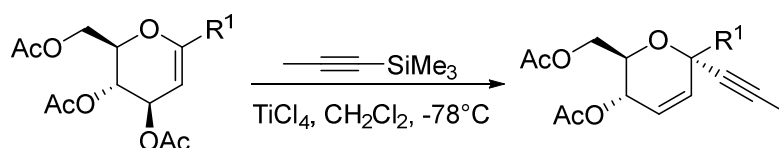
Esquema 10. Síntesis de alili C-glicósidos.

La síntesis estereoselectiva del C-glicósido **80** por la adición de alilsilano al glicál **79** empleando TiCl_4 como catalizador fue reportado por Nicolau (Esquema 11).¹³⁸



Esquema 11. Obtención de C-glicósidos por adición de alilsilanos a un glicál.

De manera similar a los alilsilanos, también se pueden usar los alquénilsilanos. Se encontraron que los sililacetilenos eran suficientemente reactivos para generar los C-glicósidos correspondientes (Esquema 12). Este tipo de alquínación de glicales usando alquinos activados como nucleófilo en la presencia de ZrCl_4 , $\text{HClO}_4 \cdot \text{SiO}_2$, $\text{Er}(\text{OTf})_3$, TMSOTf , AuCl dando los productos esperados con excelente rendimiento y con muy buena selectividad α .



Esquema 12. Síntesis de C-glicósidos mediante reordenamiento de Ferrier.

3. Metodología de trabajo

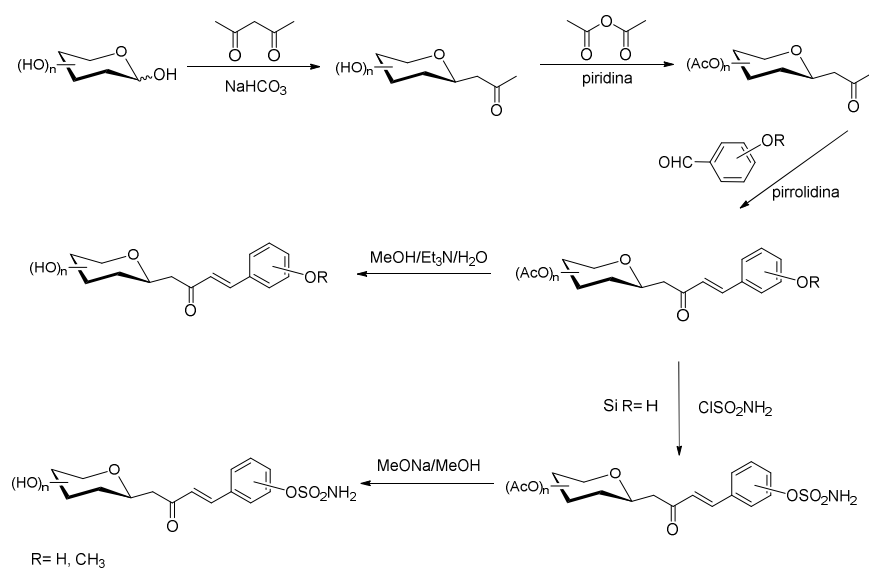
3.1. Diseño sintético de los glicomiméticos

3.1.1. C-glicósidos

Para la síntesis los C-glicósidos de este trabajo se ha propuesto el uso de un espaciador entre el carbohidrato y la función fenólica (*Tipo II*), empleando la vía sintética que se detalla a continuación (Esquema 13). El primer paso involucra la síntesis de 1-glicosil propanonas a través de la reacción de Knoevenagel de carbohidratos reductores (D-glucosa y D-galactosa) con pentan-2,4-diona en presencia de un medio básico acuoso.¹²⁰ Se realiza la protección de los grupos oxhidrilos del C-glicósido empleando para ello la reacción con anhídrido acético en piridina.

Luego se analizan las condensaciones aldólicas de las 1-glicosilpropanonas con diversos aldehídos aromáticos que contengan la función fenólica o metoxifenilo.

Los glicósidos se modifican empleando la sulfamoiación de los oxhidrilos fenólicos con cloruro de sulfamoilo con el fin de obtener los sulfamatos correspondientes.



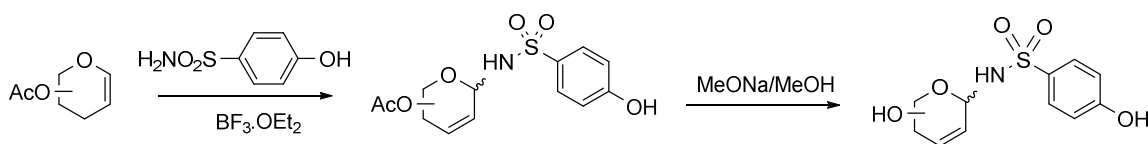
Esquema 13

Finalmente se estudiarán las condiciones de desprotección de los C-glicósidos peracetilados para obtener los glicósidos con una mayor solubilidad en agua.

3.1.2. N-glicósidos

Con el objetivo de obtener glicosil sulfonamidas que posean un oxhidrilo fenólico se estudió la adición de *p*-hidroxibencenosulfonamida a diferentes derivados de glicales (D-glucal y D-galactal) acetilados en presencia de $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ como catalizador.

Posteriormente se procederá a la desprotección de las N-glicosilsulfonamidas acetiladas a fin de obtener derivados con mayor solubilidad en el medio acuoso.



Esquema 14

3.2. Determinación de la actividad biológica

Con el objetivo de determinar la actividad biológica de los compuestos sintetizados en el presente trabajo se analizan los mismos como inhibidores de diferentes isozimas de la anhidrasa carbónica, tanto humana como las presentes en *Mycobacterium tuberculosis*, *Brucella suis* y en algunos casos frente a dichas bacterias.

4. Experimental

4.1. Materiales y métodos

4.1.1. Equipos y materiales 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 HSQC y COSY fueron registrados utilizando un equipo RMN Varian de 200 MHz y en un Bruker Avance III 600 MHz. 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 silicagel Merck 60 F254.

Los productos no visibles al UV se revelaron sumergiendo la placa en una solución de H_2SO_4 al 10% metanol, calentando posteriormente la misma en la llama.

Las cromatografías en columna fueron realizadas utilizando silicagel MN Kieselgel 60 Riedel-de Haen (230-400 mesh).

4.1.2. Solventes y reactivos

Los productos comerciales cuyo origen se indican a continuación, fueron purificados, si era necesario, utilizando técnicas generales de laboratorio.¹³⁹

2,4-Pentanodiona, Merck p.a.

3,4-Dihidroxibenzaldehído, p.f. 153-154 °C. Se recristalizó desde agua. Sintetizado previamente en el laboratorio.

6-metoxi-2-naftaldehido, Aldrich

Acetato de Etilo, Sigma Aldrich, pe 77°C. Se secó con K_2CO_3 y se realizó destilación fraccionada.

Acetato de sodio, Merck p.a.

Acetona, Anedra, p.e. 56 °C

Acetonitrilo anhidro, Sigma-Aldrich, p.e. 82 °C. Se secó con P_2O_5 y se realizó destilación fraccionada.

Acido acético glaciado, Merck p.a.

Ácido clorhídrico, Merck p.a.

Acido fórmico, Anedra, p.e. 101 °C. Se secó con B_2O_3 y se realizó una destilación fraccionada.

Acido perclórico, Merck p.a.

Ácido sulfúrico, Merck p.a. (95-97%)

Anhídrido acético, Carlo Erba

Benceno, Merck, p.e. 80 °C. Se secó con Na y se realizó destilación simple.

Bicarbonato de sodio, Mallinckrodt

Bromo, Prod. Acos Purest

Carbonato de sodio Anhidro, Mallinckrodt

Cinc en polvo, Cicarelli

Cloroformo, Merck p.a.

Cloruro de Sodio, Anedra p.a.

Diclorometano, Anedra, p.e. 40°C. Se secó con $CaCl_2$ y se destiló de forma simple desde P_2O_5

Dietilamina, p.e. 55,5 °C. Eastman organic chemicals

Etanol, Soria (96%)

Eterato de trifluoruro de boro, Merck

Fosforo rojo, Carlo Erba

α,β -D-Glucosa, Carlo Erba

α -D-Galactosa, Sigma Aldrich (97%)

Ioduro de sodio, J.T. Baker

i-Propanol, Anedra

Isocianato de clorosulfonilo, Aldrich

m-Anisaldehido, Sigma-Aldrich

Metanol, Anedra, p.e. 65°C. Se secó con Na y se realizó destilación simple.

m-Hidroxibenzaldehído, p.f. 108°C. Se recristalizó desde agua. Sintetizado previamente en el laboratorio.

N,N-Dimetilacetamida, Fluka, p.e. 165-166 °C. Se secó con BaO y se realizó destilación fraccionada a presión reducida.

n-Hexano, Anedra, p.e. 69°C. Se secó con Na₂SO₄ y se realizó una destilación simple.

Nitrito de sodio, Mallinckrodt

o-Hidroxibenzaldehído, p.e. 93°/25mm Hg. Se purificó por destilación fraccionada a presión reducida. Sintetizado previamente en el laboratorio.

Pentóxido de fósforo, Fluka

p-Hidroxibenzaldehído, p.f. 115-116°C. Se recristalizo desde agua, se secó con P₂O₅. Sintetizado previamente en el laboratorio.

Pirrolidina, Fluka p.a.

Resina amberlite IR 120P [H⁺], Sigma-Aldrich

Resina DOWEX (50X-8-200, H⁺), Aldrich

Sodio, Anedra

EXPERIMENTAL

Sulfanilamida (*p*-aminobencensulfonamida), Sigma-Aldrich

Sulfato de cobre pentahidratado, Mallinckrodt

Sulfato de sodio anhidro, Fluka (>97 %)

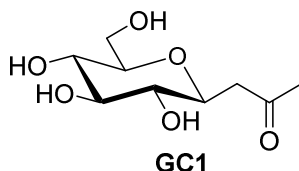
Sulfato de sodio, Fluka

Trietilamina, Merck p.a.

Veratraldehido, p.f 42-43 °C. Se recristalizó desde tolueno. Sintetizado previamente en el laboratorio.

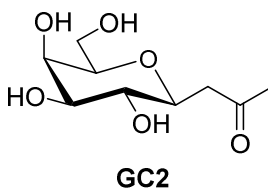
4.2. Síntesis de β -C-glicosil cetonas

4.2.1. Preparación de 1-(β -D-glucopiranosil)-propan-2-ona (GC1)



En un balón con un buzo se colocó 7,20 g (40 mmoles) de α,β -D-glucosa, se adicionó 20 mL de agua destilada y luego 4,90 mL (48,02 mmoles) de 2,4-pentanodiona. Se colocó dicha mezcla en un baño de silicona a 90°C. Se agitó magnéticamente por un lapso de 5 minutos y se agregaron 4,24 g (40 mmoles) de NaHCO_3 . Dicha mezcla de reacción se dejó a reflujo por un período de 2,5 horas. El progreso de la reacción se siguió por cromatografía de capa delgada (CCD). Una vez finalizada la reacción, la mezcla se filtró y mediante resina DOWEX (50X-8-200, H^+) se llevó a pH=5. Posteriormente se hizo un nuevo filtrado y se eliminó el agua por evaporación rotativa. El producto (**GC1**) crudo fue purificado en cromatografía en columna de sílica gel utilizando como eluyente DCM-MeOH 8:2 para obtener el correspondiente producto como un aceite espeso, cuya identidad se corroboró por comparación con los espectros de RMN reportados.¹⁴⁰ Rendimiento: 50%.

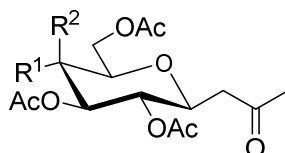
4.2.2. Preparación de 1-(β -D-galactopiranosil)-propan-2-ona (GC2)



EXPERIMENTAL

En un balón con un buzo se colocó 0,90 g (5 mmoles) de α,β -D-galactosa, se adicionó 2,5 mL de agua destilada y luego 0,61 mL (6 mmoles) de 2,4-pentanediona. Se colocó dicha mezcla en un baño de silicona a 90 °C. Se agito magnéticamente por un lapso de 5 minutos y se agregaron 0,52 g (5 mmoles) de NaHCO_3 . Dicha mezcla de reacción se dejó a reflujo por un período de 3 horas. El progreso de la reacción se siguió por cromatografía de capa delgada (CCD). Una vez pasado este tiempo la mezcla se filtró y mediante resina DOWEX (50x-8-200 H^+) se llevó a $\text{pH}=5$. Posteriormente se hizo un nuevo filtrado y se eliminó el agua por evaporación rotativa. El producto crudo se purificó por cromatografía en columna de sílica gel utilizando como eluyente DCM-MeOH 8:2 para obtener el correspondiente producto como un aceite espeso, cuya identidad se corroboró por comparación con los espectros de RMN publicados.¹⁴¹ Rendimiento: 70%

4.2.3. Preparación de las β -C-glicosilpropanonas peracetilados GC3 y GC4



GC3 $\text{R}^1=\text{OAc}$, $\text{R}^2=\text{H}$

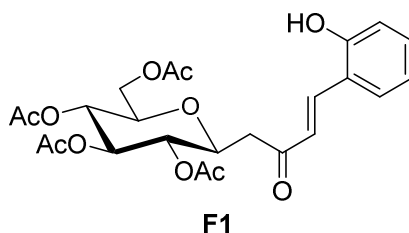
GC4 $\text{R}^1=\text{H}$, $\text{R}^2=\text{OAc}$

A una solución de 1 mmol de **GC1** o **GC2** disueltos en 10 mL de piridina, colocado en un balón de 25 mL, se le añadió un buzo para agitación magnética y se le agregaron 5 mL de anhídrido acético y se mantuvo a temperatura ambiente hasta observar por CCD que se consumió totalmente el reactivo (48 h). A la mezcla de reacción se le agregaron 25 mL de diclorometano y la fase orgánica se lavó 2 veces con 10 mL de agua, luego con solución 1N de HCl hasta reacción ácida de las aguas de lavado. Posteriormente se lavó con solución de NaHCO_3 hasta neutralidad y nuevamente con 10 mL de agua destilada. La fase orgánica fue secada con sulfato de magnesio y concentrada en evaporador rotativo. El residuo fue cromatografiado en columna de sílica gel utilizando AcOEt-Hex 1:1 como

eluyente para proporcionar el compuesto peracetilado, cuya identidad se corroboró por comparación con los espectros de RMN publicados.¹⁴¹ Ambos compuestos se presentaron como aceites muy viscosos. Rendimiento: 80% (**GC3**), 75% (**GC4**).

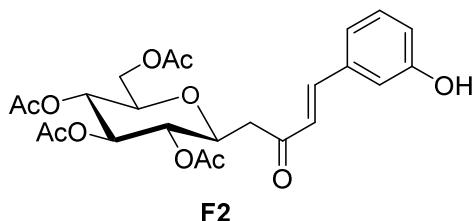
4.3. Síntesis de nuevos glicomiméticos derivados de fenol

Intento de síntesis de (E)-1-(2',3',4',6'-Tetra-O-acetil-β-D-glucopiranosil)-4-(2-hidroxifenil)but-3-en-2-ona (F1)



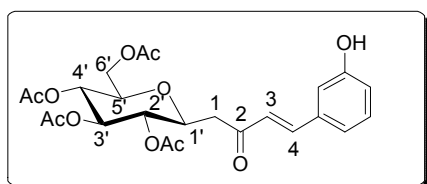
En un balón con un buzo se colocó 0,388 g (1 mmol) 1-(2',3',4',6'-Tetra-O-acetil-β-D-glucopiranosil)-propan-2-ona (**GC3**), se adicionó 0,151 g (1,1 mmoles) de 2-hidroxibenzaldehído, luego 5 mL de DCM y finalmente 0,015 mL (0,2 mmoles) de pirrolidina. Se dejó con agitación magnética a temperatura ambiente. Se siguió el avance de la reacción por medio de CCD, se reveló empleando revelado destructivo con H₂SO₄/MeOH, posterior de revelado con UV. Luego de 48 h. de reacción no se observó avance de la misma.

Síntesis de (E)-1-(2',3',4',6'-Tetra-O-acetil-β-D-glucopiranosil)-4-(3-hidroxifenil)but-3-en-2-ona (F2)



En un balón con un buzo se colocó 1,55 g (4 mmoles) 1-(2',3',4',6'-Tetra-O-acetil-β-D-glucopiranosil)-propan-2-ona (**GC3**), se adicionó 0,536 g (4,4 mmoles) de 3-hidroxibenzaldehído, luego 16 mL de DCM y finalmente 0,064 mL (0,8 mmoles) de pirrolidina. Se dejó con agitación magnética a temperatura ambiente. Se siguió el avance de la reacción por medio de cromatografía en capa delgada, hasta que se observó que se consumió todo el reactivo a las 1,5 h. El solvente fue eliminado mediante evaporador rotativo. El producto **F2** se purificó por medio de cromatografía en columna de sílica gel con Hex-AcOEt 6:4 como solvente de elución. El revelado de los cromatofolios se realizó por método destructivo con mezcla H₂SO₄/MeOH, posterior al revelado en lámpara UV. El producto obtenido se llevó a peso constante, mediante secado con bomba de vacío. El sólido obtenido fue recristalizado de acetato de etilo/hexano. A la muestra se le realizó el análisis de RMN, confirmando la estructura esperada. El rendimiento obtenido fue del 68%.

(E)-1-(2',3',4',6'-Tetra-O-acetil-β-D-glucopiranosil)-4-(3-hidroxifenil)but-3-en-2-ona (F2)

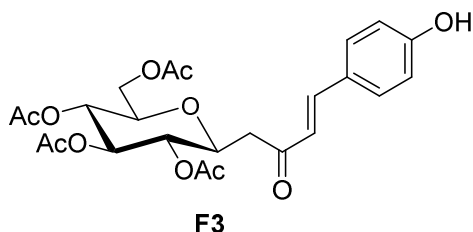


Sólido blanco: pf 152-153 °C. ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ 7,50 (d, 1H, *J* = 16,2 Hz, H-4), 7,27 (dd, 1H, *J* = 9,2, 6,5 Hz, ArH), 7,07 (t, *J* = 4,4 Hz, 2H, ArH), 6,91(m, 1H, ArH), 6,71 (d, 1H, *J* = 16,2 Hz, H-3), 6,69 (s, 1H, OH), 5,22 (t, 1H, *J* = 9,2 Hz, H-3'), 5,11 (da, 1H, *J* = 9,8 Hz, H-4'), 4,96 (t, 1H, *J* = 9,3 Hz, H-2'), 4,27 (dd, 1H, *J* = 12,4, 4,7 Hz, H-6'), 4,09 (m, 2H, H-1, H-6'), 3,73 (ddd, 1H, *J* = 9,7, 4,7, 2,2 Hz, H-5'), 3,02 (dd, 1H, *J* = 16,3, 8,6 Hz, H-1a), 2,68 (dd, 1H, *J* = 16,3, 3,1 Hz, H-1b), 2,04 (s, 3H,

EXPERIMENTAL

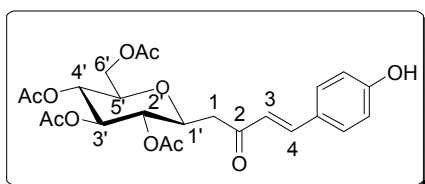
CH₃COO), 2,03 (s, 3H, CH₃COO), 2,02 (s, 3H, CH₃COO), 2,01 (s, 3H, CH₃COO).¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃) δ 196,99 (C-2), 171,27 (CH₃COO), 170,63 (CH₃COO), 170,37 (CH₃COO), 169,95 (CH₃COO), 156,83 (ArC), 144,22 (C-4), 135,79 (ArC), 130,44 (ArC), 126,46 (C-3), 121,29 (ArC), 11,8468 (ArC), 114,86 (ArC), 75,84 (C-5'), 74,40 (C-3'), 74,30 (C-4'), 71,84 (C-1'), 68,67 (C-2'), 62,29 (C-6'), 42,74 (C-1), 20,96 (CH₃CO), 20,93 (CH₃CO), 20,88 (CH₃CO), 20,88 (CH₃CO).

Síntesis de (E)-1-(2',3',4',6'-Tetra-O-acetil-β-D-glucopiranosil)-4-(4-hidroxifenil)but-3-en-2-ona (F3)



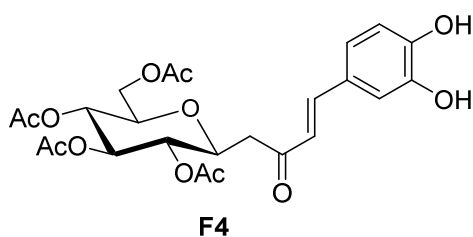
En un balón con un buzo se colocó 0,776 g (2 mmoles) 1-(2',3',4',6'-Tetra-O-acetil-β-D-glucopiranosil)-propan-2-ona (**GC3**), se adicionó 0,268 g (2,2 mmoles) de 4-hidroxibenzaldehído, luego 5 mL de DCM y finalmente 0,032 mL (0,4 mmoles) de pirrolidina. Se dejó con agitación magnética a temperatura ambiente. Se siguió el avance de la reacción por medio de cromatografía en capa delgada, hasta que se observó que se consumió todo el reactivo a las 48 horas. El solvente fue eliminado en evaporador rotativo y el producto **F3** se purificó por medio de cromatografía en columna de sílica gel con Hex-AcOEt 6:4 como solvente de elución. El revelado de los cromatofolios se realizó por método destructivo con mezcla H₂SO₄/MeOH, posterior al revelado en lámpara UV. El producto obtenido se llevó a peso constante, mediante secado con bomba de vacío. El sólido se recristalizó de acetato de etilo/hexano. A la muestra se le realizó un análisis de RMN, corroborando su identidad. El rendimiento obtenido fue del 44%.

(E)-1-(2',3',4',6'-Tetra-O-acetil-β-D-glucopiranosil)-4-(4-hidroxifenil)but-3-en-2-ona (F3)



Sólido blanco: pf 176-177 °C. ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ 7,50 (d, 1H, *J* = 16,1 Hz, H-4), 7,43 (d, 2H, *J* = 8,6 Hz, ArH), 6,97 (s, 1H, OH), 6,87 (d, 2H, *J* = 8,6 Hz, ArH), 6,59 (d, 1H, *J* = 16,1 Hz, H-3), 5,24 (t, 1H, *J* = 9,2 Hz, H-3'), 5,10 (d, 1H, *J* = 9,8 Hz, H-4'), 5,00 (dd, 1H, *J* = 13,6, 5,5 Hz, H-2'), 4,15 (m, 3H, H-1', H-6'), 3,72 (m, 1H, H-5'), 3,01 (dd, 1H, *J* = 16,3, 8,3 Hz, H-1a), 2,67 (dd, 1H, *J* = 16,3, 3,2 Hz, H-1b), 2,03 (s, 3H, CH₃COO), 2,02 (s, 3H, CH₃COO), 2,01 (s, 3H, CH₃COO), 2,01 (s, 3H, CH₃COO). ¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃) δ 196,84 (C-2), 171,16 (CH₃COO), 170,59 (CH₃COO), 170,41 (CH₃COO), 169,94 (CH₃COO), 159,18 (ArC), 144,42 (C-4), 130,75 (ArC), 126,67 (C-3), 123,84 (ArC), 116,34 (ArC), 75,89 (C-5), 74,45 (C-3'), 74,37 (C-4'), 71,98 (C-1'), 68,74 (C-2'), 62,31 (C-6'), 42,57 (C-1), 20,95 (CH₃CO), 20,95 (CH₃CO), 20,85 (CH₃CO), 20,85 (CH₃CO).

Intento de síntesis de (E)-1-(2',3',4',6'-Tetra-O-acetil-β-D-glucopiranosil)-4-(3,4-dihidroxifenil)but-3-en-2-ona (F4)

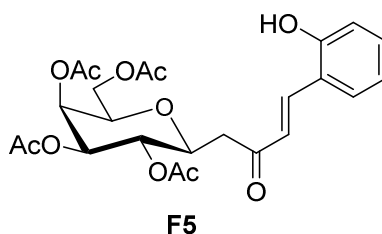


En un balón con un buzo se colocó 0,388 g (1 mmol) 1-(2',3',4',6'-Tetra-O-acetil-β-D-glucopiranosil)-propan-2-ona (**GC3**), se adicionó 0,152 g (1,1 mmoles) de 3,4-dihidroxibenzaldehído, luego 5,5 mL de DCM y finalmente 0,016 mL (0,2 mmoles) de pirrolidina. Se dejó con agitación magnética a temperatura ambiente. Se siguió el avance de la reacción por medio de CCD, se reveló empleando revelado destructivo con H₂SO₄/MeOH, posterior al revelado con UV. Como se sospechó

EXPERIMENTAL

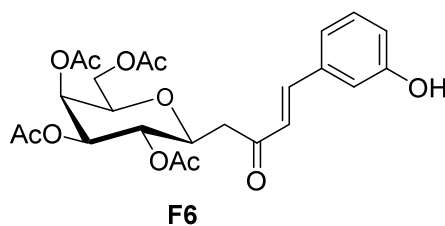
que el producto corre con el mismo R_f que el reactivo, se procedió a hacer un revelado selectivo de fenoles usando el revelador selectivo 5% FeCl₃ en solución 0,5N de HCl. Se dejó reaccionar 48 horas. El producto **F4** no se pudo obtener, ya que mediante la evaporación del solvente por evaporador rotativo se obtuvo un polímero de color naranja que no fue identificado.

Intento de síntesis de (E)-1-(2',3',4',6'-Tetra-O-acetil-β-D-galactopiranosil)-4-(2-hidroxifenil)but-3-en-2-ona (F5)



En un balón con un buzo se colocó 0,195 g (0,5 mmoles) 1-(2',3',4',6'-Tetra-O-acetil-β-D-galactopiranosil)-propan-2-ona (**GC4**), se adicionó 0,076 g (0,55 mmoles) de 2-hidroxibenzaldehído, luego 3 mL de DCM y finalmente 0,008 mL (0,2 mmoles) de pirrolidina. Se dejó con agitación magnética a temperatura ambiente. Se siguió el avance de la reacción por medio de CCD, se reveló empleando revelado destructivo con H₂SO₄/MeOH, posterior al revelado con UV. Luego de 48 horas de reacción no se observó avance de la misma.

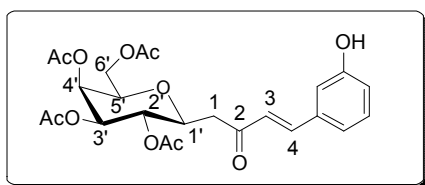
Síntesis de (E)-1-(2',3',4',6'-Tetra-O-acetil-β-D-galactopiranosil)-4-(3-hidroxifenil)but-3-en-2-ona (F6)



EXPERIMENTAL

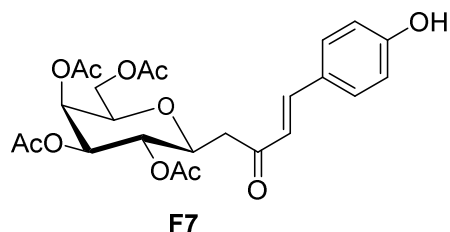
En un balón con un buzo se colocó 0,388 g (1 mmol) 1-(2',3',4',6'-Tetra-O-acetil-β-D-galactopiranosil)-propan-2-ona (**GC4**), se adicionó 0,134 g (1,1 mmoles) de 3-hidroxibenzaldehído, luego 5 mL de DCM y finalmente 0,016 mL (0,2 mmoles) de pirrolidina. Se dejó con agitación magnética a temperatura ambiente. Se siguió el avance de la reacción por medio de cromatografía en capa delgada, hasta que se observó que se consumió todo el reactivo a las 48 horas. Se eliminó el solvente de la mezcla de reacción mediante evaporador rotativo. El producto **F6** se purificó por medio de cromatografía en columna de sílica gel con Hex-AcOEt 6:4 como solvente de elución. El revelado de los cromatofolios se realizó por método destructivo con mezcla H₂SO₄/MeOH, posterior al revelado en lámpara UV. El producto obtenido se llevó a peso constante, mediante secado con bomba de vacío. La muestra se analizó mediante RMN, comprobando la identidad del mismo. El rendimiento obtenido fue del 62%.

(E)-1-(2',3',4',6'-Tetra-O-acetil-β-D-galactopiranosil)-4-(3-hidroxifenil)but-3-en-2-ona (F6)



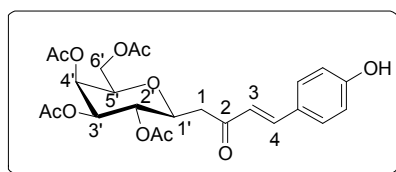
Sólido blanco pegajoso: ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ 7,51 (d, 1H, *J* = 16,1 Hz, H-4), 7,26 (t, 1H, *J* = 7,9 Hz, ArH), 7,08 (d, 2H, *J* = 6,8 Hz, ArH), 6,92 (d, 1H, *J* = 8,9 Hz, ArH), 6,72 (d, 1H, *J* = 16,1 Hz, H-3), 5,45 (dd, 1H, *J* = 3,2, 0,9 Hz, H-4'), 5,20 (m, 1H, H-2'), 5,08 (dd, 1H, *J* = 10,0, 3,3 Hz, H-3'), 4,04 (m, 4H, H-1', H-5', H-6'), 3,06 (dd, *J* = 16,1, 8,5 Hz, 1H, H-1a), 2,69 (dd, *J* = 16,1, 3,2 Hz, 1H, H-1b), 2,16 (s, 3H, CH₃COO), 2,04 (s, 3H, CH₃COO), 1,99 (s, 3H, CH₃COO), 1,96 (s, 3H, CH₃COO). ¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃) δ 197,19 (C-2), 170,99 (CH₃COO), 170,61 (CH₃COO), 170,57 (CH₃COO), 170,44 (CH₃COO), 156,88 (ArC), 144,12 (C-4), 135,85 (ArC), 130,39 (ArC), 126,49 (C-3), 121,23 (ArC), 118,42 (ArC), 114,86 (ArC), 74,87 (C-5'), 74,43 (C-1'), 72,24 (C-3'), 69,33 (C-2'), 67,99 (C-4'), 61,71 (C-6'), 42,98 (C-1), 21,03 (CH₃CO), 20,89 (CH₃CO), 20,82 (CH₃CO), 20,82 (CH₃CO).

Síntesis de (E)-1-(2',3',4',6'-Tetra-O-acetil-β-D-galactopiranosil)-4-(4-hidroxifenil)but-3-en-2-ona (F7)



En un balón con un buzo se colocó 0,388 g (1 mmol) 1-(2',3',4',6'-Tetra-O-acetil-β-D-galactopiranosil)-propan-2-ona (**GC4**), se adicionó 0,134 g (1,1 mmoles) de 4-hidroxibenzaldehído, luego 5 mL de DCM y finalmente 0,016 mL (0,2 mmoles) de pirrolidina. Se dejó con agitación magnética a temperatura ambiente. Se siguió el avance de la reacción por medio de cromatografía en capa delgada, hasta que se observó que se consumió todo el reactivo a las 48 horas. El solvente de la mezcla de reacción fue eliminado mediante evaporador rotativo. El producto **F7** se purificó por medio de cromatografía en columna de sílica gel con Hex-AcOEt 6:4 como solvente de elución. El revelado de los cromatofolios se realizó por método destructivo con mezcla H₂SO₄/MeOH, posterior al revelado en lámpara UV. El producto obtenido se llevó a peso constante, mediante secado con bomba de vacío. El sólido fue recristalizado de AcOEt/Hex. A la muestra se la analizó mediante RMN, corroborando la estructura esperada. El rendimiento obtenido fue del 40%.

(E)-1-(2',3',4',6'-Tetra-O-acetil-β-D-galactopiranosil)-4-(4-hidroxifenil)but-3-en-2-ona (F7)

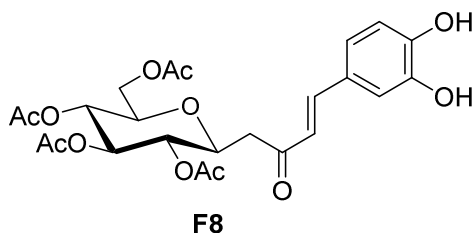


Sólido amarillo: pf 119-120 °C. ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ7,51 (d, 1H, *J* = 16,2 Hz, H-4), 7,43 (d, 2H, *J* = 8,6 Hz, ArH), 6,88 (d, 2H, *J* = 8,6 Hz, ArH), 6,61 (d, 1H, *J* = 16,1 Hz, H-3), 5,45 (d, 1H, *J* = 2,5 Hz, H-4'), 5,20(m, 1H, H-2'), 5,07 (dd, 1H, *J* = 10,0, 3,2 Hz, H-3'), 4,06 (m, 4H, H-1', H-5', H-6'), 3,06 (dd, 1H, *J* = 16,1, 8,4 Hz, H-1a), 2,68 (dd, 1H, *J* = 16,1, 3,3 Hz,

EXPERIMENTAL

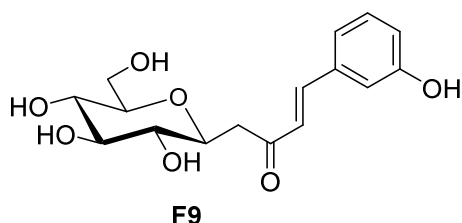
H-1b), 2,16 (s, 3H, CH₃COO), 2,04 (s, 3H, CH₃COO), 1,99 (s, 3H, CH₃COO), 1,97 (s, 3H, CH₃COO). ¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃) δ 197,17 (C-2), 170,96 (CH₃COO), 170,67 (CH₃COO), 170,49 (CH₃COO), 159,40 (ArC), 144,48 (C-4), 130,75 (ArC), 123,79 (C-3), 116,35 (ArC), 74,91 (C-5'), 74,40 (C-1'), 72,26 (C-3'), 69,40 (C-2'), 67,99 (C-4'), 61,69 (C-6'), 42,75 (C-1), 21,06 (CH₃CO), 20,92 (CH₃CO), 20,84 (CH₃CO).

Síntesis de (E)-1-(2',3',4',6'-Tetra-O-acetil-β-D-galactopiranosil)-4-(3,4-dihidroxifenil)but-3-en-2-ona (**F8**)



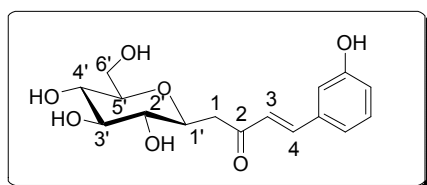
En un balón con un buzo se colocó 0,388 g (1 mmol) (E)-1-(2',3',4',6'-Tetra-O-acetil-β-D-glucopiranosil)-propan-2-ona (**GC4**), se adicionó 0,152 g (1,1 mmoles) de 3,4-dihidroxibenzaldehído, luego 5,5 mL de DCM y finalmente 0,016 mL (0,2 mmoles) de pirrolidina. Se dejó con agitación magnética a temperatura ambiente. Se siguió el avance de la reacción por medio de CCD, se reveló por medio de revelado destructivo con H₂SO₄/MeOH, posterior de revelado con UV. Como se sospechó que el producto corre con el mismo R_f que el reactivo, se procedió a hacer un revelado selectivo de fenoles usando el revelador selectivo 5% FeCl₃ en solución 0,5N de HCl. Se dejó reaccionar 48 horas. El producto **F8** no se pudo obtener, ya que mediante la evaporación del solvente, por evaporador rotativo se obtuvo un polímero de color rojo que no fue identificado.

Síntesis de 1-(β-D-glucopiranosil)-4-(3-hidroxifenil)but-3-en-2-ona (F9)



En un balón con un buzo se colocó 0,246 g (0,5 mmoles) de **F2** y se adicionó 10 mL de la mezcla MeOH/Et₃N/H₂O 8:1:1 (se tornó color amarillo) y se dejó con agitación magnética. Se siguió el avance de la reacción por medio de cromatografía en capa delgada. Se dejó reaccionar 48 horas. Luego de la evaporación del solvente, el producto **F9** se purificó por medio de cromatografía en columna de sílica gel con AcOEt-MeOH 5:1 como solvente de elución. El revelado de los cromatofolios se realizó por método destructivo con mezcla H₂SO₄/MeOH, posterior al revelado en lámpara UV. El producto obtenido se llevó a peso constante, mediante secado con bomba de vacío. La muestra se analizó mediante RMN, comprobando que se trataba de la estructura esperada. El rendimiento obtenido fue del 80%.

1-(β-D-glucopiranosil)-4-(3-hidroxifenil)but-3-en-2-ona (F9)

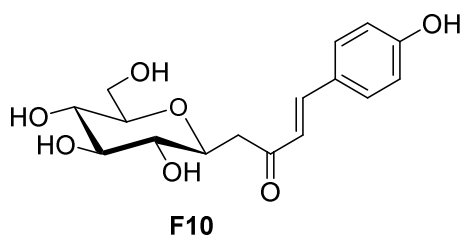


Sólido blanco: pf 172-173 °C. ¹H NMR (200 MHz, D₂O) δ 7,51 (d, 1H, *J* = 16,2 Hz, H-4), 7,28 (t, 1H, *J* = 7,8 Hz, ArH), 7,12 (d, 1H, *J* = 7,8 Hz, ArH), 7,03 (d, 1H, *J* = 2,0 Hz, ArH), 6,92 (dd, 1H, *J* = 8,1, 1,6 Hz, ArH), 6,73 (d, 1H, *J* = 16,2 Hz, H-3), 3,72 (m, 3H, H-5', H-6'), 3,35 (m, 4H, H-1', H-2', H-3', H-4'), 3,07 (dd, 1H, *J* = 14,9, 5,4 Hz, H-1a), 2,89 (dd, 1H, *J* = 16,2, 8,8 Hz, H-1b). ¹³C NMR (50 MHz, D₂O) δ 202,65 (C-2),

EXPERIMENTAL

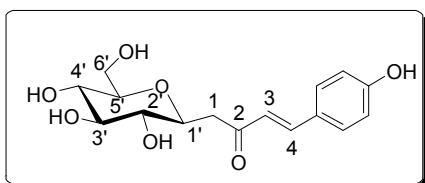
156,23 (ArC), 145,30 (C-4), 135,93 (ArC), 130,70 (ArC), 126,31 (C-3), 121,51 (ArC), 118,54 (ArC), 115,06 (ArC), 79,85 (C-5'), 77,67 (C-3'), 76,02 (C-4'), 73,58 (C-1'), 70,09 (C-2'), 61,16 (C-6'), 42,74 (C-1).

Síntesis de 1-(β -D-glucopiranosil)-4-(4-hidroxifenil)but-3-en-2-ona (**F10**)



En un balón con un buzo se colocó 0,246 g (0,5 mmoles) de **F3** y se adicionó 10 mL de la mezcla MeOH/Et₃N/H₂O 8:1:1 (se tornó color amarillo) y se dejó con agitación magnética. Se siguió el avance de la reacción por medio de cromatografía en capa delgada. Se dejó reaccionar 48 horas. El solvente se eliminó mediante evaporador rotativo. El producto **F10** se purificó por medio de cromatografía en columna de sílica gel con AcOEt-MeOH 5:1 como solvente de elución. El revelado de los cromatofolios se realizó por método destructivo con mezcla H₂SO₄/MeOH, posterior al revelado en lámpara UV. El producto obtenido se llevó a peso constante, mediante secado con bomba de vacío. La muestra se analizó empleando RMN, dando efectivamente la estructura esperada. El rendimiento obtenido fue del 80%.

1-(β -D-glucopiranosil)-4-(4-hidroxifenil)but-3-en-2-ona (**F10**)

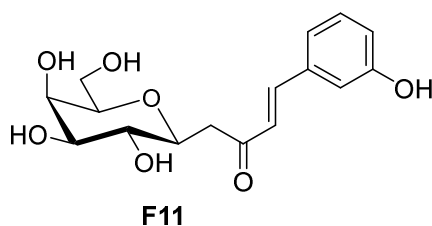


Sólido blanco: pf 123-124 °C. ¹H NMR (200 MHz, D₂O) d 7,64 (d, 1H, J = 16,2 Hz, H-4), 7,56 (d, 2 H, J = 8,5 Hz, ArH), 6,90 (d, 2 H, J = 8,5 Hz, ArH), 6,73 (d, 1H, J = 16,2 Hz, H-3), 3,68 (m, 3H, H-5', H-6'), 3,27 (m,

EXPERIMENTAL

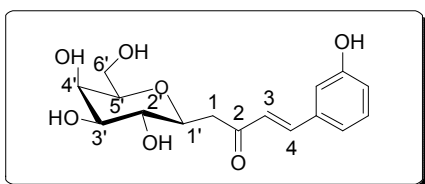
4H, H-1', H-2', H-3', H-4'), 3,06 (dd, 1H, $J = 16,2, 5,3$ Hz, H-1a), 2,87 (dd, 1H, $J = 16,2, 8,7$ Hz, H-1b). ^{13}C NMR (50 MHz, D_2O) δ 202,80 (C-2), 156,23 (ArC), 146,28 (C-4), 131,13 (ArC), 126,44 (C-3), 116,13 (ArC), 79,68 (C-5'), 77,40 (C-1'), 76,05 (C-3'), 73,15 (C-2'), 69,81 (C-4'), 60,83 (C-6'), 42,36 (C-1).

Síntesis de 1-(β -D-galactopiranosil)-4-(3-hidroxifenil)but-3-en-2-ona (**F11**)



En un balón con un buzo se colocó 0,125 g (0,25 mmoles) de **F4** y se adicionó 5,5 mL de la mezcla MeOH/ Et_3N / H_2O 8:1:1 (se tornó color amarillo) y se dejó con agitación magnética. Se siguió el avance de la reacción por medio de cromatografía en capa delgada. Se dejó reaccionar 48 horas. Luego de la eliminación del solvente en evaporador rotativo, el producto **F11** se purificó por medio de cromatografía en columna de sílica gel con AcOEt-MeOH 5:1 como solvente de elución. El revelado de los cromatofolio se realizó por método destructivo con mezcla $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{MeOH}$, posterior al revelado en lámpara UV. El producto obtenido se llevó a peso constante, mediante secado con bomba de vacío. A la muestra se le realizó un análisis de RMN, corroborando su identidad. El rendimiento obtenido fue del 80%.

1-(β -D-galactopiranosil)-4-(3-hidroxifenil)but-3-en-2-ona (**F11**)

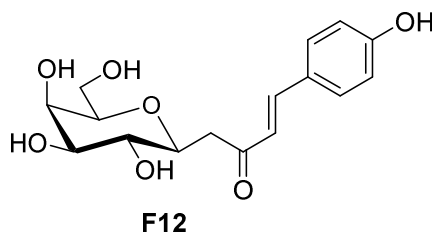


Sólido amarillo: pf 126,5-127 °C. ^1H NMR (200 MHz, D_2O) δ 7,53 (d, 1H, $J = 16,3$ Hz, H-4), 7,29 (t, 1H, $J = 7,8$ Hz, ArH), 7,14 (d, 1H, $J =$

EXPERIMENTAL

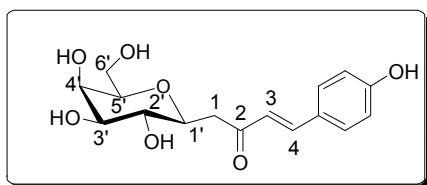
7,8 Hz, ArH), 7,04 (d, 1H, $J = 1,6$ Hz, ArH), 6,93 (dd, 1H, $J = 7,6, 2,1$ Hz, ArH), 6,75 (d, 1H, $J = 16,3$ Hz, H-3), 3,95 (d, 1H, $J = 3,2$ Hz, H-2'), 3,66 (m, 6H, H-1', H-3', H-4', H-5', H-6'), 3,18 (dd, 1H, $J = 16,2, 3,1$ Hz, H-1a), 2,94 (dd, 1H, $J = 16,3, 8,7$ Hz, H-1b). ^{13}C NMR (50 MHz, D_2O) δ 202,80 (C-2), 156,22 (ArC), 145,28 (C-4), 135,97 (ArC), 130,70 (ArC), 126,32 (C-3), 121,51 (ArC), 118,51 (ArC), 115,05 (ArC), 78,84 (C-5'), 76,46 (C-1'), 74,27 (C-4'), 70,98 (C-3'), 69,48 (C-2'), 61,49 (C-6'), 42,89 (C-1).

Síntesis de 1-(β -D-galactopiranosil)-4-(4-hidroxifenil)but-3-en-2-ona (**F12**)



En un balón con un buzo se colocó 0,125 g (0,25 mmoles) de **F7** y se adicionó 5,5 mL de la mezcla MeOH/ Et_3N / H_2O 8:1:1 (se tornó color amarillo) y se dejó con agitación magnética. Se siguió el avance de la reacción por medio de cromatografía en capa delgada. Se dejó reaccionar 48 horas. El solvente se eliminó empleando un evaporador rotativo. El producto **F12** se purificó por medio de cromatografía en columna de sílica gel con AcOEt-MeOH 5:1 como solvente de elución. El revelado de los cromatofolios se realizó por método destructivo con mezcla $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{MeOH}$, posterior al revelado en lámpara UV. El producto obtenido se llevó a peso constante, mediante secado con bomba de vacío. La muestra se analizó mediante RMN, corroborando la estructura esperada. El rendimiento obtenido fue del 90%.

1-(β -D-galactopiranosil)-4-(4-hidroxifenil)but-3-en-2-ona (**F12**)



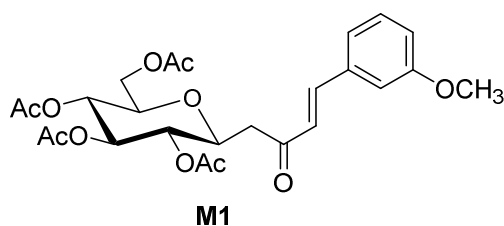
Sólido amarillo: pf 162-163 °C. ^1H NMR (200 MHz, D_2O) δ 7,51 (dd, 3H, $J = 14,5, 12,5$ Hz, H-4, ArH), 6,86 (d, 2H, $J = 8,6$ Hz, ArH), 6,64

EXPERIMENTAL

(d, 1H, $J = 16,1$ Hz, H-3), 3,95 (d, 1H, $J = 3,2$ Hz, H-2'), 3,64 (m, 6H, H-1', H-3', H-4', H-5', H-6'), 3,14 (dd, 1H, $J = 13,3, 6,6$ Hz, H-1a), 2,90 (dd, 1H, $J = 16,1, 8,8$ Hz, H-1b). ^{13}C NMR (50 MHz, D_2O) δ 202,84 (C-2), 159,01 (ArC), 146,02 (C-4), 131,27 (ArC), 126,63 (C-3), 116,31 (ArC), 78,84 (C-5'), 76,65 (C-1'), 74,28 (C-3'), 71,02 (C-2'), 69,49 (C-4'), 61,50 (C-6'), 42,70 (C-1).

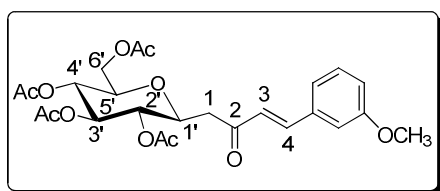
4.4. Síntesis de nuevos glicomiméticos derivados de metoxiarilo

Síntesis de (E)-1-(2',3',4',6'-Tetra-O-acetil-β-D-glucopiranosil)-4-(3-metoxifenil)but-3-en-2-ona (**M1**)



En un balón con un buzo se colocó 0,388 g (1 mmol) 1-(2',3',4',6'-Tetra-O-acetil-β-D-glucopiranosil)-propan-2-ona (**GC3**), se adicionó 0,150 g (1,1 mmoles) de 3-metoxibenzaldehído, luego 6 mL de DCM y finalmente 0,016 mL (0,2 mmoles) de pirrolidina. Se dejó con agitación magnética a temperatura ambiente. Se siguió el avance de la reacción por medio de CCD, hasta que se observó que se consumió todo el reactivo a las 78 h de reacción. El solvente fue eliminado mediante evaporador rotativo. El producto **M1** se purificó por medio de cromatografía en columna de sílica gel con Hex-AcOEt 1:1 como solvente de elución. El revelado de los cromatofolios se realizó por método destructivo con mezcla H₂SO₄/MeOH, posterior al revelado en lámpara UV. El producto obtenido se llevó a peso constante, mediante secado con bomba de vacío. A la muestra se le realizó el análisis de RMN, confirmando la estructura esperada. El rendimiento obtenido fue del 76%.

(E)-1-(2',3',4',6'-Tetra-O-acetil-β-D-glucopiranosil)-4-(3-metoxifenil)but-3-en-2-ona (M1)

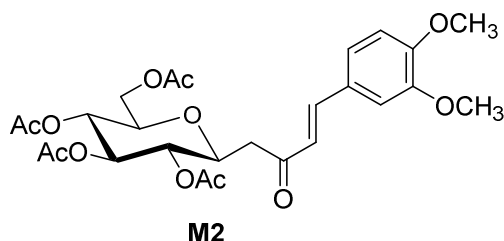


Sólido amarillo: pf 94-95 °C. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 7,53 (d, 1H, *J* = 16,2 Hz, H-4), 7,33 (t, 1H, *J* = 7,9 Hz, ArH), 7,16 (d, 1H, *J* = 7,6 Hz, ArH), 7,08 (m, 1H, ArH), 6,98

EXPERIMENTAL

(dd, 1H, $J = 8,2, 1,9$ Hz, ArH), 6,74 (d, 1H, $J = 16,2$ Hz, H-3), 5,25 (t, 1H, $J = 9,4$ Hz, H-3'), 5,09 (t, 1H, $J = 9,7$ Hz, H-4'), 5,01 (t, 1H, $J = 9,7$ Hz, H-2'), 4,28 (dd, 1H, $J = 12,4, 4,9$ Hz, H-6'b), 4,14 (ddd, 1H, $J = 10,0, 8,5, 3,2$ Hz, H-1'), 4,04 (dd, 1H, $J = 12,4, 2,2$ Hz, H-6'a), 3,86 (s, 3H, CH₃O), 3,74 (ddd, 1H, $J = 10,1, 4,9, 2,2$ Hz, H-5'), 3,04 (dd, 1H, $J = 16,3, 8,5$ Hz, H-1b), 2,70 (dd, 1H, $J = 16,3, 3,2$ Hz, H-1a), 2,05 (s, 3H, CH₃COO), 2,04 (s, 3H, CH₃COO), 2,03 (s, 6H, CH₃COO). ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 196,13 (C-2), 170,62 (CH₃COO), 170,22 (CH₃COO), 169,98 (CH₃COO), 169,55 (CH₃COO), 159,97 (ArC), 143,70 (C-4), 135,57 (ArC), 130,01 (ArC), 126,49 (C-3), 121,14 (ArC), 116,75 (ArC), 113,12 (ArC), 75,74 (C-5'), 74,19 (C-4'), 74,13 (C-3'), 71,70 (C-1'), 68,50 (C-2'), 62,04 (C-6'), 55,33 (CH₃O), 42,55 (C-1), 20,72 (CH₃CO), 20,66 (CH₃CO), 20,64 (CH₃CO), 20,62 (CH₃CO).

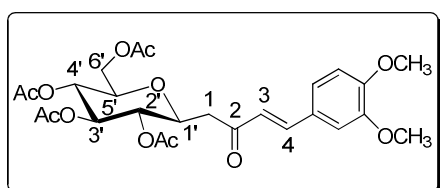
Síntesis de (E)-1-(2',3',4',6'-Tetra-O-acetil- β -D-glucopiranosil)-4-(3,4-dimetoxifenil)but-3-en-2-ona (**M2**)



En un balón con un buzo se colocó 0,388 g (1 mmoles) 1-(2',3',4',6'-Tetra-O-acetil- β -D-glucopiranosil)-propan-2-ona (**GC3**), se adicionó 0,182 g (1,1 mmoles) de veratraldehído, luego 6 mL de DCM y finalmente 0,016 mL (0,2 mmoles) de pirrolidina. Se dejó con agitación magnética a temperatura ambiente. Se siguió el avance de la reacción por medio de cromatografía en capa delgada, hasta que se observó que se consumió todo el reactivo a las 23 h. El solvente fue eliminado mediante evaporador rotativo. El producto **M2** se purificó por medio de cromatografía en columna de sílica gel con Hex-AcOEt 1:1 como solvente de elución. El revelado de los cromatofolios se realizó por método destructivo con mezcla H₂SO₄/MeOH, posterior al revelado en lámpara UV. El producto obtenido

se llevó a peso constante, mediante secado con bomba de vacío. A la muestra se le realizó el análisis de RMN, confirmando la estructura esperada. El rendimiento obtenido fue del 66%.

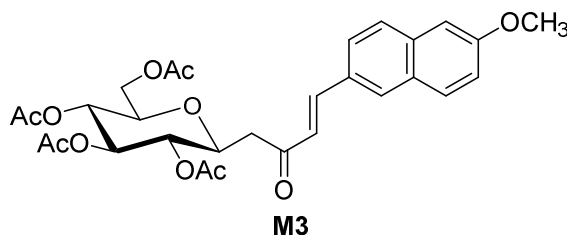
(E)-1-(2',3',4',6'-Tetra-O-acetil-β-D-glucopiranosil)-4-(3,4-dimetoxifenil)but-3-en-2-ona (M2)



Sólido blanco: pf 135-136 °C. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 7,51 (d, 1H, *J* = 16,1 Hz, H-4), 7,16 (d, 1H, *J* = 8,3 Hz, ArH), 7,09 (s, 1H, ArH), 6,90 (d, 1H, *J* = 8,3 Hz, ArH), 6,64 (d, 1H, *J* = 16,1 Hz, H-3), 5,25 (t, 1H, *J* = 9,4

Hz, H-3'), 5,09 (t, 1H, *J* = 9,7 Hz, H-4'), 5,00 (t, 1H, *J* = 9,7 Hz, H-2'), 4,28 (dd, 1H, *J* = 12,4, 4,9 Hz, H-1'), 4,14 (dd, 1H, *J* = 18,4, 3,2 Hz, H-6'b), 4,04 (dd, 1H, *J* = 12,3, 1,8 Hz, H-6'a), 3,94 (s, 6H, CH₃O), 3,74 (ddd, 1H, *J* = 10,0, 4,8, 2,0 Hz, H-5'), 3,03 (dd, 1H, *J* = 16,2, 8,4 Hz, H-1b), 2,68 (dd, 1H, *J* = 16,2, 3,2 Hz, H-1a), 2,04 (s, 1H, CH₃COO), 2,04 (s, 1H, CH₃COO), 2,02 (s, 1H, CH₃COO), 2,02 (s, 1H, CH₃COO). ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 196,00 (C-2), 170,63 (CH₃COO), 170,23 (CH₃COO), 170,03 (CH₃COO), 169,57 (CH₃COO), 151,60 (ArC), 149,30 (ArC), 143,85 (C-4), 127,11 (ArC), 124,28 (C-3), 123,33 (ArC), 111,08 (ArC), 109,70 (ArC), 75,71 (C-5'), 74,21 (C-1', C-3'), 71,72 (C-4'), 68,52 (C-2'), 62,04 (C-6'), 56,01 (CH₃O), 55,92 (CH₃O), 42,39 (C-1), 20,75 (CH₃CO), 20,68 (CH₃CO), 20,65 (CH₃CO), 20,63 (CH₃CO).

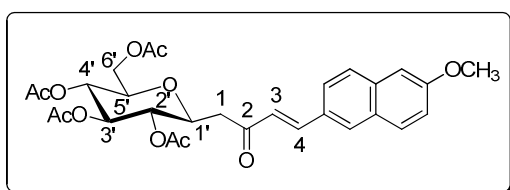
Síntesis de (E)-1-(2',3',4',6'-Tetra-O-acetil-β-D-glucopiranosil)-4-(6-metoxi-2-naftil)but-3-en-2-ona (M3)



EXPERIMENTAL

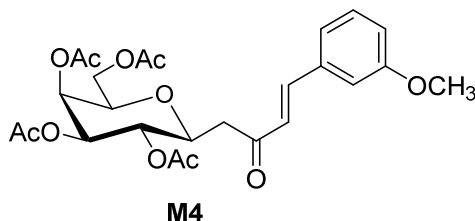
En un balón con un buzo se colocó 0,388 g (1 mmoles) 1-(2',3',4',6'-Tetra-O-acetil-β-D-glucopiranosil)-propan-2-ona (**GC3**), se adicionó 0,205 g (1,1 mmoles) de 6-metoxi-2-naftaldehído, luego 6 mL de DCM y finalmente 0,016 mL (0,2 mmoles) de pirrolidina. Se dejó con agitación magnética a temperatura ambiente. Se siguió el avance de la reacción por medio de cromatografía en capa delgada, hasta que se observó que se consumió todo el reactivo a las 71 h. El solvente fue eliminado mediante evaporador rotativo. El producto **M3** se purificó por medio de cromatografía en columna de sílica gel con Hex-AcOEt 1:1 como solvente de elución. El revelado de los cromatofolios se realizó por método destructivo con mezcla H₂SO₄/MeOH, posterior al revelado en lámpara UV. El producto obtenido se llevó a peso constante, mediante secado con bomba de vacío. A la muestra se le realizó el análisis de RMN, confirmando la estructura esperada. El rendimiento obtenido fue del 53%.

(E)-1-(2',3',4',6'-Tetra-O-acetil-β-D-glucopiranosil)-4-(6-metoxi-2-naftil)but-3-en-2-ona (**M3**)



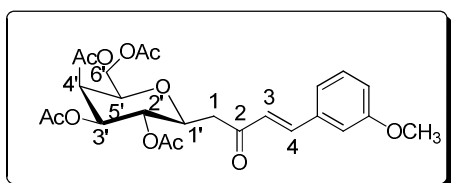
Sólido amarillo: pf 178-179 °C. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 7,93 (d, 1H, J = 8,8 Hz, ArH), 7,74 (m, 3H, ArH), 7,66 (dd, 1H, J = 8,6, 1,5 Hz, ArH), 7,20 (dd, 1H, J = 9,0, 2,5 Hz, ArH), 7,16 (d, 1H, J = 2,4 Hz, ArH), 6,83 (d, 1H, J = 16,1 Hz, H-3), 5,26 (t, 1H, J = 9,4 Hz, H-3'), 5,11 (t, 1H, J = 9,7 Hz, H-4'), 5,03 (t, 1H, J = 9,7 Hz, H-2'), 4,29 (dd, 1H, J = 12,4, 4,9 Hz, H-1'), 4,17 (dd, 1H, J = 18,3, 3,3 Hz, H-6'b), 4,05 (dd, 1H, J = 12,4, 2,1 Hz, H-6'a), 3,96 (s, 3H, CH₃O), 3,75 (ddd, 1H, J = 10,0, 4,8, 2,1 Hz, H-5'), 3,07 (dd, 1H, J = 16,2, 8,4 Hz, H-1b), 2,74 (dd, 1H, J = 16,2, 3,3 Hz, H-1a), 2,05 (s, 3H, CH₃COO), 2,05 (s, 3H, CH₃COO), 2,04 (s, 3H, CH₃COO), 2,02 (s, 3H, CH₃COO). ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 196,06 (C-2), 170,64 (CH₃COO), 170,24 (CH₃COO), 170,00 (CH₃COO), 169,57 (CH₃COO), 159,08 (ArC), 144,12 (C-4), 136,00 (ArC), 130,61 (ArC), 130,23 (ArC), 129,56 (ArC), 128,67 (ArC), 127,64 (ArC), 125,30 (ArC), 124,16 (C-3), 119,62 (ArC), 106,02 (ArC), 75,75 (ArC), 74,24 (C-3', C-1'), 71,76 (C-4'), 68,54 (C-2'), 62,07 (C-6'), 55,41 (CH₃O), 42,62 (C-1), 20,74 (CH₃CO), 20,68 (CH₃CO), 20,65 (CH₃CO), 20,63 (CH₃CO).

Síntesis de (E)-1-(2',3',4',6'-Tetra-O-acetil-β-D-galactopiranosil)-4-(3-metoxifenil)but-3-en-2-ona (**M4**)



En un balón con un buzo se colocó 0,776 g (2 mmoles) 1-(2',3',4',6'-Tetra-O-acetil-β-D-galactopiranosil)-propan-2-ona (**GC4**), se adicionó 0,299 g (2,2 mmoles) de 2-metoxibenzaldehído, luego 12 mL de DCM y finalmente 0,032 mL (0,4 mmoles) de pirrolidina. Se dejó con agitación magnética a temperatura ambiente. Se siguió el avance de la reacción por medio de CCD, hasta que se observó que se consumió todo el reactivo a las 70 horas. El solvente fue eliminado mediante evaporador rotativo. El producto **M4** se purificó por medio de cromatografía en columna de sílica gel con Hex-AcOEt 1:1 como solvente de elución. El revelado de los cromatofolios se realizó por método destructivo con mezcla H₂SO₄/MeOH, posterior al revelado en lámpara UV. El producto obtenido se llevó a peso constante, mediante secado con bomba de vacío. A la muestra se le realizó el análisis de RMN, confirmando la estructura esperada. El rendimiento obtenido fue del 72%.

(E)-1-(2',3',4',6'-Tetra-O-acetil-β-D-galactopiranosil)-4-(3-metoxifenil)but-3-en-2-ona (M4)

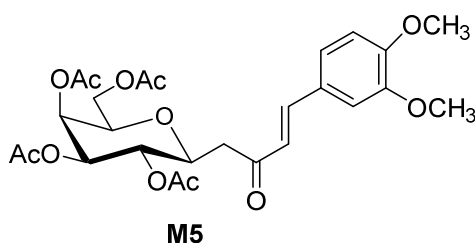


Sólido blanco: pf 111-112°C. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 7,54 (d, 1H, *J* = 16,2 Hz, H-4), 7,33 (t, 1H, *J* = 7,9 Hz, ArH), 7,16 (d, 1H, *J* = 7,6 Hz, ArH), 7,08 (s, 1H, ArH), 6,98 (dd, 1H, *J* = 8,2, 2,3 Hz, ArH), 6,75 (d, 1H, *J* = 16,2 Hz, H-3), 5,46 (d, 1H, *J* = 3,2 Hz, H-3'), 5,20 (t, 1H, *J* = 9,9 Hz, H-4'), 5,07 (m, 1H, H-2'), 4,12 (dd, 1H, *J* = 11,4, 4,1 Hz, H-1'a), 4,07 (m, 2H, H-6'a, H-6'b), 3,96 (m, 1H, H-5'), 3,86 (s, 3H, CH₃O), 3,09 (dd, 1H, *J* = 16,1, 8,4 Hz, H-1b), 2,71 (dd, 1H, *J* = 16,1, 3,2 Hz, H-1a), 2,17 (s, 3H, CH₃COO), 2,05 (s, 3H, CH₃COO), 2,00 (s, 3H, CH₃COO), 1,98 (s, 3H, CH₃COO).

EXPERIMENTAL

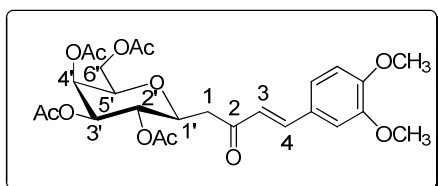
^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3) δ 196,45 (C-2), 170,45 (CH_3COO), 170,26 (CH_3COO), 170,24 (CH_3COO), 170,10 (CH_3COO), 159,94 (ArC), 143,66 (C-4), 135,58 (ArC), 130,01 (ArC), 126,52 (C-3), 121,15 (ArC), 116,70 (ArC), 113,15 (ArC), 74,66 (C-5'), 74,23 (C-1'), 71,99 (C-4'), 69,12 (C-3'), 67,72 (C-2'), 61,40 (C-6'), 55,34 (CH_3O), 42,75 (C-1), 20,83 (CH_3CO), 20,71 (CH_3CO), 20,62 (CH_3CO), 20,61 (CH_3CO).

Síntesis de (E)-1-(2',3',4',6'-Tetra-O-acetil- β -D-galactopiranosil)-4-(3,4-dimetoxifenil)but-3-en-2-ona (**M5**)



En un balón con un buzo se colocó 0,388 g (1 mmol) 1-(2',3',4',6'-Tetra-O-acetil- β -D-galactopiranosil)-propan-2-ona (**GC4**), se adicionó 0,182 g (1,1 mmoles) de veratraldehído, luego 6 mL de DCM y finalmente 0,016 mL (0,2 mmoles) de pirrolidina. Se dejó con agitación magnética a temperatura ambiente. Se siguió el avance de la reacción por medio de cromatografía en capa delgada, hasta que se observó que se consumió todo el reactivo a las 24 horas. El solvente de la mezcla de reacción fue eliminado mediante evaporador rotativo. El producto **M5** se purificó por medio de cromatografía en columna de sílica gel con Hex-AcOEt 1:1 como solvente de elución. El revelado de los cromatofolios se realizó por método destructivo con mezcla $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{MeOH}$, posterior al revelado en lámpara UV. El producto obtenido se llevó a peso constante, mediante secado con bomba de vacío. A la muestra se la analizó mediante RMN, corroborando la estructura esperada. El rendimiento obtenido fue del 65%.

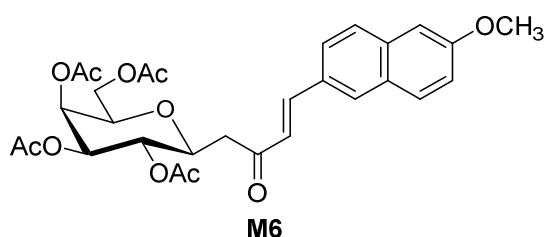
(E)-1-(2',3',4',6'-Tetra-O-acetil-β-D-galactopiranosil)-4-(3,4-dimetoxifenil)but-3-en-2-ona (M5)



Sólido amarillo: pf 89,5-90°C. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 7,53 (d, 1H, *J* = 16,1 Hz, H-4), 7,16 (d, 1H, *J* = 8,3 Hz, ArH), 7,10 (s, 1H, *J* = 7,9 Hz, ArH), 6,90 (d, 1H, *J* = 8,3

Hz, ArH), 6,65 (d, 1H, *J* = 16,1 Hz, H-3), 5,46 (d, 1H, *J* = 3,0 Hz, H-3'), 5,21 (t, 1H, *J* = 9,9 Hz, H-4'), 5,09 (dd, 1H, *J* = 10,1, 3,4 Hz, H-2'), 4,13 (dd, 1H, *J* = 10,2, 4,7 Hz, H-1'), 4,11 (m, 2H, H-6'), 4,04 (dd, 1H, *J* = 11,2, 6,6 Hz, H-5'), 3,94 (d, 6H, *J* = 1,1 Hz, CH₃O), 3,08 (dd, 1H, *J* = 16,1, 8,4 Hz, H-1b), 2,69 (dd, 1H, *J* = 16,0, 3,2 Hz, H-1a), 2,18 (s, 3H, CH₃COO), 2,05 (s, 3H, CH₃COO), 2,00 (s, 3H, CH₃COO), 1,98 (s, 3H, CH₃COO). ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 196,27 (C-2), 170,42 (CH₃COO), 170,26 (CH₃COO), 170,23 (CH₃COO), 170,08 (CH₃COO), 151,59 (ArC), 149,29 (ArC), 143,80 (C-4), 127,14 (ArC), 124,34 (C-3), 123,33 (ArC), 111,09 (ArC), 109,71 (ArC), 74,76 (C-5'), 74,22 (C-1'), 72,00 (C-3'), 69,16 (C-4'), 67,72 (C-2'), 61,35 (C-6'), 56,01 (CH₃O), 55,92 (CH₃O), 42,59 (C-1), 20,85 (CH₃CO), 20,71 (CH₃CO), 20,62 (CH₃CO).

Síntesis de (E)-1-(2',3',4',6'-Tetra-O-acetil-β-D-galactopiranosil)-4-(6-metoxi-2-naftil)but-3-en-2-ona (M6)

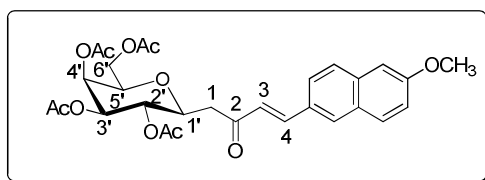


En un balón con un buzo se colocó 0,388 g (1 mmol) (E)-1-(2',3',4',6'-Tetra-O-acetil-β-D-glucopiranosil)-propan-2-ona (GC4), se adicionó 0,205 g (1,1 mmoles) de 6-metoxi-2-naftaldehído, luego 6 mL de DCM y finalmente 0,016 mL (0,2 mmoles) de pirrolidina. Se dejó con agitación magnética a temperatura ambiente. Se siguió el avance de la reacción por medio de cromatografía en capa delgada,

EXPERIMENTAL

hasta que se observó que se consumió todo el reactivo a las 47 h. El solvente fue eliminado mediante evaporador rotativo. El producto **M6** se purificó por medio de cromatografía en columna de sílica gel con Hex-AcOEt 1:1 como solvente de elución. El revelado de los cromatofolios se realizó por método destructivo con mezcla H₂SO₄/MeOH, posterior al revelado en lámpara UV. El producto obtenido se llevó a peso constante, mediante secado con bomba de vacío. A la muestra se le realizó el análisis de RMN, confirmando la estructura esperada. El rendimiento obtenido fue del 52%.

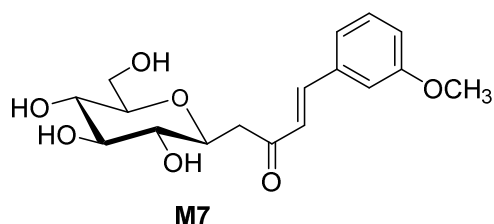
(E)-1-(2',3',4',6'-Tetra-O-acetil-β-D-galactopiranosil)-4-(6-metoxi-2-naftil)but-3-en-2-ona (M6)



Sólido amarillo: pf 114-115°C. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 7,92 (d, 1H, *J* = 8,2 Hz, ArH), 7,73 (m, 3H, H-4, ArH), 7,66 (dd, 1H, *J* = 8,6, 1,2 Hz, ArH),

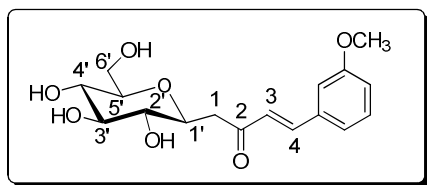
7,19 (dd, 1H, *J* = 8,9, 2,4 Hz, ArH), 7,15 (d, 1H, *J* = 2,1 Hz, ArH), 6,84 (d, 1H, *J* = 16,1 Hz, H-3), 5,47 (d, 1H, *J* = 3,2 Hz, H-4'), 5,23 (t, 1H, *J* = 9,9 Hz, H-2'), 5,10 (dd, 1H, *J* = 10,1, 3,4 Hz, H-3'), 4,13(m, 2H, H-5', H-1'), 4,06 (dd, 1H, *J* = 11,2, 6,4 Hz, H-6'b), 3,96 (m, 1H, H-6'a), 3,95 (s, 3H, CH₃O), 3,12 (m, 1H, H-1b), 2,75 (m, 1H, H-1a), 2,18 (s, 3H, CH₃COO), 2,05 (s, 3H, CH₃COO), 2,00 (s, 3H, CH₃COO), 1,97 (s, 3H, CH₃COO). ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 196,36 (C-2), 170,42 (CH₃COO), 170,26 (CH₃COO), 170,23 (CH₃COO), 170,09 (CH₃COO), 159,06 (ArC), 144,05 (C-4), 135,98 (ArC), 130,60 (ArC), 130,22 (ArC), 129,58 (ArC), 128,66 (ArC), 127,63 (ArC), 125,34 (ArC), 124,16 (C-3), 119,61 (ArC), 106,00 (ArC), 74,71 (C-5'), 74,25 (C-1'), 72,11 (C-3'), 69,19 (C-4'), 67,75 (C-2'), 61,42 (C-6'), 55,41 (CH₃O), 42,84 (C-1), 20,84 (CH₃CO), 20,72 (CH₃CO), 20,63 (CH₃CO), 20,62 (CH₃CO).

Síntesis de 1-(β-D-glucopiranosil)-4-(3-metoxifenil)but-3-en-2-ona (**M7**)



En un balón con un buzo se colocó 0,025 g (0,049 mmoles) de **M1** y se adicionó 11 mL de la mezcla MeOH/Et₃N/H₂O 8:2:1 y se dejó con agitación magnética. Se siguió el avance de la reacción por medio de cromatografía en capa delgada. Se dejó reaccionar 24 horas. Luego de la evaporación del solvente, el producto **M7** se purificó por medio de cromatografía en columna de sílica gel con AcOEt-MeOH 5:1 como solvente de elución. El revelado de los cromatofolios se realizó por método destructivo con mezcla H₂SO₄/MeOH, posterior al revelado en lámpara UV. El producto obtenido se llevó a peso constante, mediante secado con bomba de vacío. La muestra se analizó mediante RMN, comprobando que se trataba de la estructura esperada. El rendimiento obtenido fue del 80%.

1-(β-D-glucopiranosil)-4-(3-metoxifenil)but-3-en-2-ona (M7)

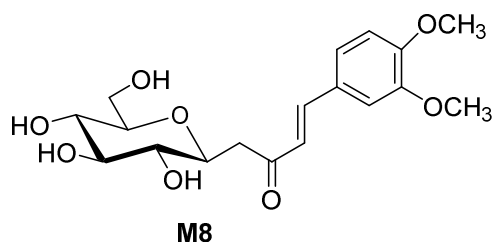


Sólido blanco: pf 116-117 °C. ¹H NMR (500 MHz, DMSO) δ 7,57 (d, 1H, *J* = 16,2 Hz, H-4), 7,35 (m, 1H, ArH), 7,29 (m, 2H, *J* = 4,8, 2,4 Hz, ArH), 7,00 (ddd, 1H, *J* = 8,2, 2,4, 1,1 Hz, ArH), 6,97 (m, 1H, H-3), 5,08 (d, 1H, *J* = 5,7 Hz, OH), 4,95 (t, 1H, *J* = 5,7 Hz, OH), 4,88 (d, 1H, *J* = 4,6 Hz, OH), 4,37 (t, 1H, *J* = 5,7 Hz, OH), 3,80 (s, 3H, CH₃O), 3,65 (dd, 1H, *J* = 9,2, 2,6 Hz, H-4'), 3,61 (dd, 1H, *J* = 11,2, 4,0 Hz, H-6'b), 3,40 (as, 1H, *J* = 11,0 Hz, H-6'a), 3,18 (dd, 1H, *J* = 8,3, 3,8 Hz, H-1'), 3,09 (m, 2H, H-2', H-5'), 2,97 (m, 2H, H-1b, H-3'), 2,82 (dd, 1H, *J* = 16,1, 8,8 Hz, H-1a). ¹³C NMR (126 MHz, DMSO) δ 198,60 (C-2), 160,05 (ArC), 142,49 (C-4), 136,41 (ArC), 130,42 (ArC), 127,57 (C-3), 121,52 (ArC), 116,92 (ArC), 113,53 (ArC), 81,15 (C-5'), 78,57

EXPERIMENTAL

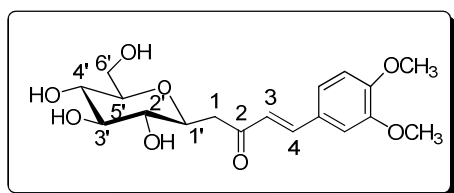
(C-1'), 76,26 (C-4'), 74,04 (C-3'), 70,74 (C-2'), 61,59 (C-6'), 55,68 (CH₃O), 43,88 (C-1).

Síntesis de 1-(β-D-glucopiranosil)-4-(3,4-dimetoxifenil)but-3-en-2-ona (**M8**)



En un balón con un buzo se colocó 0,267 g (0,5 mmoles) de **M2** y se adicionó 11 mL de la mezcla MeOH/Et₃N/H₂O 8:2:1 y se dejó con agitación magnética. Se siguió el avance de la reacción por medio de cromatografía en capa delgada. Se dejó reaccionar 24 horas. Luego de la evaporación del solvente, el producto **M8** se purificó por medio de cromatografía en columna de sílica gel con AcOEt-MeOH 5:1 como solvente de elución. El revelado de los cromatofolios se realizó por método destructivo con mezcla H₂SO₄/MeOH, posterior al revelado en lámpara UV. El producto obtenido se llevó a peso constante, mediante secado con bomba de vacío. La muestra se analizó mediante RMN, comprobando que se trataba de la estructura esperada. El rendimiento obtenido fue del 80%.

1-(β-D-glucopiranosil)-4-(3,4-dimetoxifenil)but-3-en-2-ona (**M8**)

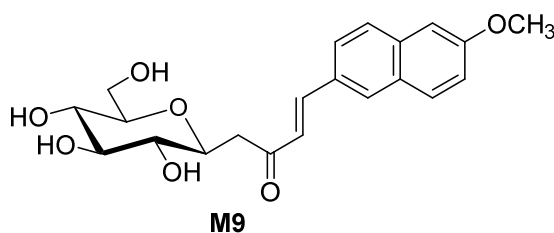


Sólido amarillo: pf 141-142 °C. ¹H NMR (500 MHz, DMSO) δ 7,54 (d, 1H, *J* = 16,1 Hz, H-4), 7,34 (d, 1H, *J* = 1,6 Hz, ArH), 7,27 (dd, 1H, *J* = 8,3, 1,7 Hz, ArH), 7,01 (d, 1H, *J* = 8,4 Hz, ArH), 6,87 (m, 1H, H-3), 5,07 (d, 1H, *J* = 4,9 Hz, OH), 4,95 (s, 1H, OH), 4,88 (s, 1H, OH), 4,36 (t, 1H, *J* = 5,7 Hz, OH), 3,82 (s, 3H, CH₃O), 3,81 (s, 3H, CH₃O), 3,62 (m, 2H, H-6'b, H-4'), 3,39 (m, 1H, H-6'a), 3,18 (t, 1H, *J* = 8,1 Hz, H-1'), 3,08 (m, 2H, H-2', H-5'), 2,95 (m, 2H, H-1b, H-3'), 2,79 (dd, 1H, *J* = 16,0, 8,8 Hz, H-1a). ¹³C NMR (126 MHz, DMSO) δ 198,35 (C-2), 151,43 (ArC), 149,41 (ArC), 142,92 (C-4),

EXPERIMENTAL

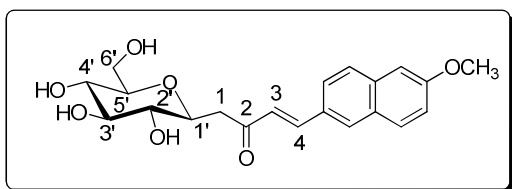
127,71 (ArC), 125,20 (C-3), 123,62 (ArC), 112,03 (ArC), 110,84 (ArC), 81,14 (C-5'), 78,59 (C-1'), 76,34 (C-4'), 74,06 (C-3'), 70,76 (C-2'), 61,60 (C-6'), 56,03 (2xCH₃O), 43,68 (C-1).

Síntesis de 1-(β-D-glucopiranosil)-4-(6-metoxi-2-naftil)but-3-en-2-ona (**M9**)



En un balón con un buzo se colocó 0,100 g (0,179 mmoles) de **M3** y se adicionó 11 mL de la mezcla MeOH/Et₃N/H₂O 8:2:1 y se dejó con agitación magnética. Se siguió el avance de la reacción por medio de cromatografía en capa delgada. Se dejó reaccionar 22 horas. Luego de la evaporación del solvente, el producto **M9** se purificó por medio de cromatografía en columna de sílica gel con AcOEt-MeOH 5:1 como solvente de elución. El revelado de los cromatofolios se realizó por método destructivo con mezcla H₂SO₄/MeOH, posterior al revelado en lámpara UV. El producto obtenido se llevó a peso constante, mediante secado con bomba de vacío. La muestra se analizó mediante RMN, comprobando que se trataba de la estructura esperada. El rendimiento obtenido fue del 80%.

1-(β-D-glucopiranosil)-4-(6-metoxi-2-naftil)but-3-en-2-ona (M9)

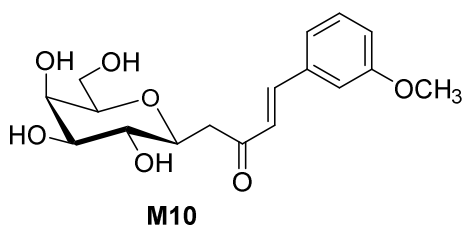


Sólido blanco: pf 130-131°C. ¹H NMR (500 MHz, DMSO) δ 8,16 (s, 1H, ArH), 7,87 (m, 3H, H-4, ArH), 7,72 (d, 1H, J = 16,1 Hz, ArH), 7,37 (d, 1H, J = 2,3 Hz, ArH), 7,22 (dd, 1H, J = 9,0, 2,4 Hz, ArH), 7,04 (d, 1H, J = 16,2 Hz, H-3), 5,09 (d, 1H, J = 5,7 Hz, OH), 4,96 (d, 1H, J = 3,9 Hz, OH), 4,89 (d, 1H, J = 4,0 Hz, OH),

EXPERIMENTAL

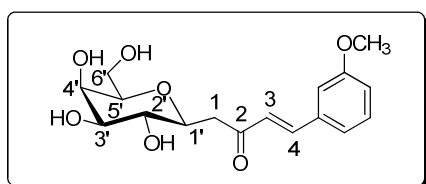
4,39 (t, 1H, $J = 5,6$ Hz, OH), 3,90 (s, 3H, CH₃O), 3,67 (dd, 1H, $J = 9,1, 2,3$ Hz, H-4'), 3,63 (m, 1H, H-6'b), 3,38 (as, 1H, $J = 10,1$ Hz, H-6'a), 3,20 (dd, 1H, $J = 8,1, 5,2$ Hz, H-1'), 3,10 (m, 2H, H-2', H-5'), 3,00 (dd, 2H, $J = 12,7, 3,5$ Hz, H-1b, H-3'), 2,83 (dd, 1H, $J = 16,0, 8,8$ Hz, H-1a).¹³C NMR (126 MHz, DMSO) δ 198,42 (C-2), 158,90 (ArC), 142,79 (C-4), 135,90 (ArC), 130,58 (ArC), 130,51 (ArC), 130,30 (ArC), 128,72 (ArC), 127,88 (ArC), 126,44 (ArC), 125,13 (C-3), 119,70 (ArC), 106,71 (ArC), 81,19 (C-5'), 78,60 (C-1'), 76,36 (C-4'), 74,08 (C-3'), 70,77 (C-2'), 61,61 (C-6'), 55,80 (CH₃O), 43,97 (C-1).

Síntesis de 1-(β -D-galactopiranosil)-4-(3-metoxifenil)but-3-en-2-ona (**M10**)



En un balón con un buzo se colocó 0,025 g (0,049 mmoles) de **M4** y se adicionó 11 mL de la mezcla MeOH/Et₃N/H₂O 8:2:1 y se dejó con agitación magnética. Se siguió el avance de la reacción por medio de cromatografía en capa delgada. Se dejó reaccionar 24 horas. Luego de la evaporación del solvente, el producto **M10** se purificó por medio de cromatografía en columna de sílica gel con AcOEt-MeOH 5:1 como solvente de elución. El revelado de los cromatofolios se realizó por método destructivo con mezcla H₂SO₄/MeOH, posterior al revelado en lámpara UV. El producto obtenido se llevó a peso constante, mediante secado con bomba de vacío. La muestra se analizó mediante RMN, comprobando que se trataba de la estructura esperada. El rendimiento obtenido fue del 80%.

1-(β -D-galactopiranosil)-4-(3-metoxifenil)but-3-en-2-ona (**M10**)

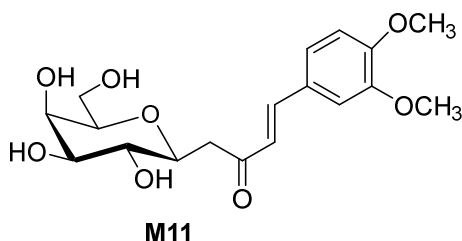


Sólido blanco: pf 91-92°C. ¹H NMR (500 MHz, DMSO) δ 7,56 (d, 1H, $J = 16,2$ Hz, H-4), 7,35 (t, 1H, $J = 8,1$ Hz, ArH), 7,29 (m, 2H, ArH), 6,99 (m, 2H, ArH, H-3), 4,89 (dd, 1H, J

EXPERIMENTAL

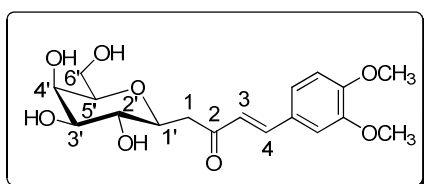
= 16,2, 4,6 Hz, OH), 4,70 (s, 1H, OH), 4,50 (t, 1H, $J = 5,5$ Hz, OH), 4,33 (dd, 1H, $J = 11,9, 4,6$ Hz, OH), 3,80 (s, 3H, CH₃O), 3,74 (dd, 1H, $J = 21,3, 3,0$ Hz, H-2'), 3,59 (td, 1H, $J = 8,8, 2,5$ Hz, H-1'), 3,48 (m, 1H, H-6'b), 3,38 (as, 1H, $J = 7,4$ Hz, H-6'a), 3,34 (m, 3H, $J = 9,4$ Hz, H-3', H-4', H-5'), 2,96 (dd, 1H, $J = 15,9, 2,5$ Hz, H-1b), 2,83 (dd, 1H, $J = 15,9, 8,9$ Hz, H-1a). ¹³C NMR (126 MHz, DMSO) δ 198,82 (C-2), 160,05 (ArC), 142,42 (C-4), 136,42 (ArC), 130,42 (ArC), 127,59 (C-3), 121,50 (ArC), 116,91 (ArC), 113,51 (ArC), 79,23 (C-5'), 76,89 (C-1'), 75,09 (C-4'), 70,94 (C-3'), 69,07 (C-2'), 60,87 (C-6'), 55,68 (CH₃O), 43,96 (C-1).

Síntesis de 1-(β -D-galactopiranosil)-4-(3,4-dimetoxifenil)but-3-en-2-ona (**M11**)



En un balón con un buzo se colocó 0,267 g (0,5 mmoles) de **M5** y se adicionó 11 mL de la mezcla MeOH/Et₃N/H₂O 8:2:1 y se dejó con agitación magnética. Se siguió el avance de la reacción por medio de cromatografía en capa delgada. Se dejó reaccionar 24 horas. Luego de la evaporación del solvente, el producto **M11** se purificó por medio de cromatografía en columna de sílica gel con AcOEt-MeOH 5:1 como solvente de elución. El revelado de los cromatofolios se realizó por método destructivo con mezcla H₂SO₄/MeOH, posterior al revelado en lámpara UV. El producto obtenido se llevó a peso constante, mediante secado con bomba de vacío. La muestra se analizó mediante RMN, comprobando que se trataba de la estructura esperada. El rendimiento obtenido fue del 80%.

1-(β -D-galactopiranosil)-4-(3,4-dimetoxifenil)but-3-en-2-ona (M11)

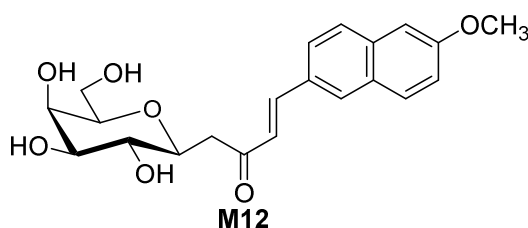


Sólido amarillo: pf 89-89,5°C. ¹H NMR (500 MHz, DMSO) δ 7,53 (d, 1H, $J = 16,1$ Hz, H-4), 7,34 (d, 1H, $J = 1,7$ Hz, ArH), 7,27 (dd, 1H, $J = 8,3, 1,7$ Hz,

EXPERIMENTAL

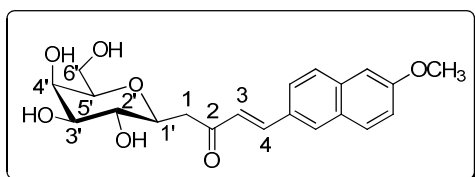
ArH), 7,01 (d, 1H, $J = 8,4$ Hz, ArH), 6,87 (d, 1H, $J = 16,2$ Hz, H-3), 4,89 (d, 1H, $J = 4,0$ Hz, OH), 4,69 (s, 1H, OH), 4,49 (t, 1H, $J = 5,6$ Hz, OH), 4,33 (d, 1H, $J = 4,5$ Hz, OH), 3,82 (s, 3H, $J = 3,4$ Hz, CH₃O), 3,81 (s, 3H, CH₃O), 3,71 (d, 1H, $J = 2,7$ Hz, H-2'), 3,57 (td, 1H, $J = 8,8, 2,5$ Hz, H-1'), 3,47 (m, 1H, H-6'b), 3,36 (as, 1H, H-6'a), 3,30 (s, 3H, $J = 6,3$ Hz, H-3', H-4', H-5'), 2,93 (dd, 1H, $J = 15,8, 2,4$ Hz, H-1b), 2,80 (dd, 1H, $J = 15,9, 9,0$ Hz, H-1a).¹³C NMR (126 MHz, DMSO) δ 198,59 (C-2), 151,42 (ArC), 149,42 (ArC), 142,86 (C-4), 127,71 (ArC), 125,24 (C-3), 123,60 (ArC), 112,04 (ArC), 110,82 (ArC), 79,21 (C-5'), 76,98 (C-1'), 75,11 (C-4'), 70,95 (C-3'), 69,06 (C-2'), 60,87 (C-6'), 56,03 (2xCH₃O), 43,75 (C-1).

Síntesis de 1-(β -D-galactopiranosil)-4-(6-metoxi-2-naftil)but-3-en-2-ona (**M12**)



En un balón con un buzo se colocó 0,100 g (0,179 mmoles) de **M6** y se adicionó 11 mL de la mezcla MeOH/Et₃N/H₂O 8:2:1 y se dejó con agitación magnética. Se siguió el avance de la reacción por medio de cromatografía en capa delgada. Se dejó reaccionar 22 horas. Luego de la evaporación del solvente, el producto **M12** se purificó por medio de cromatografía en columna de sílica gel con AcOEt-MeOH 5:1 como solvente de elución. El revelado de los cromatofolios se realizó por método destructivo con mezcla H₂SO₄/MeOH, posterior al revelado en lámpara UV. El producto obtenido se llevó a peso constante, mediante secado con bomba de vacío. La muestra se analizó mediante RMN, comprobando que se trataba de la estructura esperada. El rendimiento obtenido fue del 80%.

1-(β-D-galactopiranosil)-4-(6-metoxi-2-naftil)but-3-en-2-ona (M12)



Sólido amarillo: pf 120-121°C. ¹H NMR (500 MHz, DMSO) δ 8,16 (s, 1H, ArH), 7,87 (m, 3H, H-4, ArH), 7,72 (dd, 1H, *J* = 15,5, 7,5 Hz, ArH), 7,38 (d, 1H, *J* = 2,3 Hz, ArH), 7,22 (dd, 1H, *J* = 8,9, 2,4 Hz, ArH), 7,03 (d, 1H, *J* = 16,2 Hz, H-3), 4,92 (d, 1H, *J* = 2,8 Hz, OH), 4,71 (s, 1H, OH), 4,51 (t, 1H, *J* = 5,5 Hz, OH), 4,35 (d, 1H, *J* = 4,4 Hz, OH), 3,90 (s, 3H, *J* = 4,3 Hz, CH₃O), 3,72 (s, 1H, H-2'), 3,61 (dd, 1H, *J* = 8,8, 6,5 Hz, H-1'), 3,48 (m, 1H, H-6'b), 3,37 (as, 1H, *J* = 9,3 Hz, H-6'a), 3,33 (d, 3H, *J* = 6,0 Hz, H-3', H-4', H-5'), 2,99 (dd, 1H, *J* = 15,8, 2,3 Hz, H-1b), 2,84 (dd, 1H, *J* = 15,8, 9,0 Hz, H-1a). ¹³C NMR (126 MHz, DMSO) δ 198,64 (C-2), 158,90 (ArC), 142,73 (C-4), 135,89 (ArC), 130,57 (ArC), 130,49 (ArC), 130,30 (ArC), 128,72 (ArC), 127,88 (ArC), 126,46 (ArC), 125,11 (C-3), 119,70 (ArC), 106,71 (ArC), 79,26 (C-5'), 77,00 (C-1'), 75,11 (C-4'), 70,98 (C-3'), 69,09 (C-2'), 60,88 (C-6'), 55,80 (CH₃O), 44,05 (C-1).

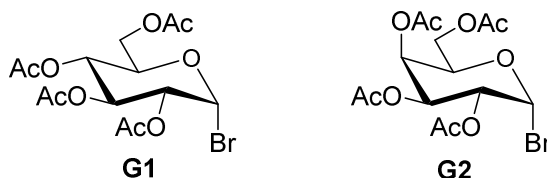
4.5. Síntesis de nuevos *N*-glicosilsulfonamidas

4.5.1. 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 (D-glucosa o D-galactosa).

Preparación de α -acetobromoglicósidos¹⁴² (**G1** y **G2**)

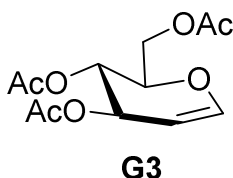


En un balón de tres bocas de 250 mL inmerso en baño de agua-hielo (temperatura 5°C aproximadamente), se le adosó un termómetro, una ampolla de compensación, y en la boca restante un tapón de vidrio. Se colocaron 84,5 mL (900 mmoles) de anhídrido acético, se enfrió agitando magnéticamente a 4°C y luego 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 g (111 mmoles) de α,β -D-glucosa o α,β -D-galactosa 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

EXPERIMENTAL

20 °C y se adicionó 6,1 g (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. Luego 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, ya sea **G1** o **G2**, según corresponda.

Síntesis de 3,4,6-tri-O-acetil-1,2-didesoxi-D-arabino-1-hexenopiranososa (Tri-O-acetil-D-glucal)¹⁴³ (**G3**):

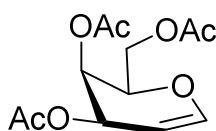


En un balón de tres bocas de 1 litro, con agitación mecánica, se colocó una mezcla de 73 g acetato de sodio disueltos en 104 mL de agua y 72 mL de ácido acético glacial), y se enfrió en una mezcla de hielo, sal y agua. Se adicionó 39,5 g de cinc (60 mmoles) y 3,9 g de sulfato de cobre pentahidratado previamente disuelto en 14,4 mL de agua. Luego se agregó lentamente el filtrado **G1** 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 60 mL). Los extractos orgánicos se lavaron con solución saturada de carbonato de sodio (2 x 60 mL) 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 g (49,6 mmoles) de **G3**. Rto: 60%. (Bibliografía: 60-70%).¹⁴³

Síntesis de 3,4,6-tri-O-acetil-1,2-didesoxi-D-lixo-1-hexenopiranososa (Tri-O-acetil-D-galacta)¹⁴³ (**G4**)

**G4**

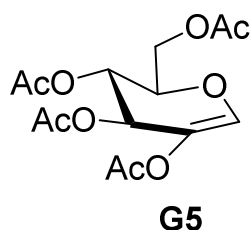
El procedimiento es muy similar al empleado para la obtención del tri-O-acetil-D-glucal, pero debe prestarse mayor atención al control de temperatura. Los pasos a seguir se describen a continuación:

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 g (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 g (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

EXPERIMENTAL

adicionó gota a gota a una mezcla preparada previamente por adición de 73 g de acetato de sodio anhidro, 105 mL de agua, 73 mL de ácido acético glacial, 40 g de cinc (61 mmoles) y 4 g 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 $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$, mediante un baño de hielo-cloruro de sodio-agua. La mezcla de reacción se agitó durante 3 horas, manteniendo la temperatura por debajo de $0\text{ }^{\circ}\text{C}$. 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 g (33,7 mmoles) de **G4**. Rto: 32% (Bibliografía: 35%).¹⁴³

Síntesis de 2,3,4,6-tetra-*O*-acetil-2-hidroxi-D-glucal (tetra-*O*-acetilglucal)^{142,144}(**G5**)

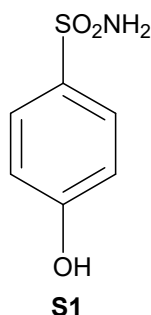


En un balón de 3 bocas de 250 mL, que contenía 2,9 g de yoduro de sodio y 12 mL de acetona, se agregó, con agitación mecánica, 5,87 g (14,3 mmoles) de la α -acetobromoglucosa, obtenida anteriormente, pasados 15 minutos, se agregó 6 mL de dietilamina y se dejó reaccionar 1h.

EXPERIMENTAL

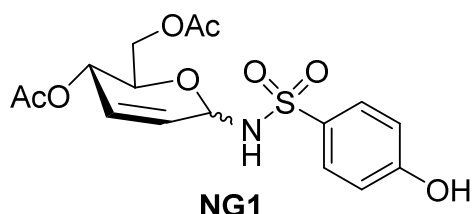
Pasado el lapso de tiempo, se agregó 24 mL DCM y 60 mL de agua destilada. Se pasó a una ampolla de decantación, se separó la fase orgánica, la cual se lavó con ácido clorhídrico 2N y agua (3 x 20 mL), hasta alcanzar un pH=7 (neutro). Se agregó sulfato de sodio como desecante, luego de un lapso de 40 minutos se filtró, y se evaporó el solvente en evaporador rotativo. El producto se secó en bomba de vacío hasta peso constante. Se purificó por columna cromatográfica utilizando hexano/acetato de etilo 7:3 como mezcla de elución. Se obtuvieron 1,89 g (5,72 mmoles) de **G5**. Rto: 40% (Bibliografía: 60 %).^{142,144}

Obtención de *p*-hidroxibencensulfonamida¹⁴⁵ (**S1**)



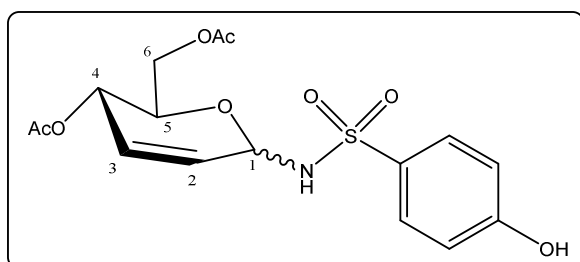
En un balón de 250 mL se disolvió 10 g (58 mmoles) de *p*-aminobencensulfonamida en 174 mL de agua destilada. Se enfrió a 0°C y luego con agitación magnética se agregaron 10,4 ml de ácido sulfúrico concentrado. Se agitó la mezcla hasta disolución total a 0°C, se agregó 4,08 g (55 mmoles) de nitrito de sodio disueltos en 40 ml de agua destilada. Luego se calentó la mezcla a 75 °C y se dejó a temperatura ambiente por 12 horas. Al día siguiente se filtró y se evaporó la solución de color anaranjado hasta la mitad de su volumen, cristalizando un sólido color naranja claro, que es la *p*-hidroxibencensulfonamida (**5**). Dicho producto se purificó por recristalización desde agua. El producto consistió en un sólido amarillo. Pf: 165°C-166°C. Se obtuvo 6,8 g (39 mmoles) de **S1**. Rto: 68 %.(Bibliografía: Pf: 165°C- 166°C. Rto: 75 %).¹⁴⁵

Síntesis de 4,6-Di-O-acetil-2,3-didesoxi-D-eritro-hex-2-enopiranosil
p-hidroxibencensulfonamida (**NG1**)



En un tubo de reacción se colocó un buzo, se tapó con septum y se gaseó con Ar calentándolo simultáneamente con pistola de calor. Una vez frío se agregaron 0,136 gr (0,5 mmoles) de **G3**, 0,092 g (0,55 mmoles) de **S1** y luego se cerró nuevamente con septum. Luego se agregó 2,5 mL de CH₃CN anhidro, finalmente se agregó 0,2 mL de solución de BF₃.Et₂O (1% mmol), se dejó con agitación por 2 h. EL progreso de la reacción se siguió por CCD. Una vez finalizada la reacción, se quencheó con 5 mL de solución saturada de bicarbonato de sodio (hasta pH=7) y se agregaron 6 mL CH₂Cl₂. Se pasó la mezcla de reacción a una ampolla de decantación, se extrajo con agua destilada (3 x 5 mL), luego con 5 mL de solución saturada de NaCl. Los extractos orgánicos se reunieron y se le agregó Na₂SO₄ como desecante, se filtró y se evaporó el solvente en evaporador rotativo. El producto obtenido se purificó por cromatografía flash con una mezcla de DCM-Hex 7:3 como solvente de elución. La muestra fue secada en bomba de vacío. El rendimiento obtenido fue del 71%, con una relación α/β 61:39.

**4,6-Di-O-acetil-2,3-didesoxi-D-eritro-hex-2-enopiranosil
p-hidroxibencensulfonamida (**NG1**)**



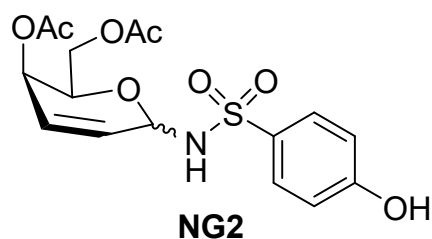
Aceite amarillo. Anómero α: ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 7,79 (d, 2H, *J* = 8,91, ArH), 7,38 (as, OH), 6,93 (d, 2H, *J* = 8,83, ArH), 5,97 (d, 1H, *J* = 8,9 Hz,

EXPERIMENTAL

NH), 5,91 (m, 1H, H-3), 5,83 (dd, 1H, $J = 3,0, 2,0$ Hz, H-2), 5,59 (ddd, 1H, $J = 10,0, 5,6, 4,4$ Hz, H-1), 5,29 (dd, 1H, $J = 9,2, 1,8$ Hz, H-4), 3,89 (dd, 1H, $J = 12,1, 3,2$ Hz, H-6b), 3,55 (dt, 1H, $J = 9,2, 3,0$ Hz, H-5), 3,51 (dd, 1H, $J = 12,1, 2,8$ Hz, H-6a), 2,04 (s, 6H, CH₃COO). ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 171,58 (CH₃COO), 170,26 (CH₃COO), 160,34 (ArC), 132,58 (ArC), 130,40 (ArC), 130,40 (ArC), 129,77 (C-2), 129,51 (C-3), 126,76 (ArC), 126,76 (ArC), 79,61 (C-1), 66,59 (C-5), 64,40 (C-4), 62,22 (C-6), 20,87 (CH₃CO), 20,87 (CH₃CO).

Anómero β: ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 7,76 (d, 2H, $J = 8,91$, ArH), 7,27 (s, 1H, OH), 6,87 (d, 2H, $J = 8,83$, ArH), 5,97 (d, 1H, $J = 8,9$ Hz, NH), 5,93 (m, 1H, H-3), 5,81 (dd, 1H, $J = 5,2, 2,5$ Hz, H-2), 5,56 (as, 1H, H-1), 5,19 (m, 1H, H-4), 4,13 (q, 1H, $J = 7,2$, H-6b), 4,00 (dd, 1H, $J = 12,0, 2,6$ Hz, H-6a), 3,77 (ddd, 1H, $J = 8,4, 5,4, 2,7$ Hz, H-5), 2,04 (s, 6H, CH₃COO). ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 171,58 (CH₃COO), 170,26 (CH₃COO), 160,25 (ArC), 132,69 (ArC), 130,07 (C-3), 129,77 (ArC), 129,77 (ArC), 126,76 (C-2), 115,41 (ArC), 115,41 (ArC), 77,11 (C-1), 73,44 (C-5), 64,40 (C-4), 62,22 (C-6), 20,87 (CH₃CO), 20,87 (CH₃CO).

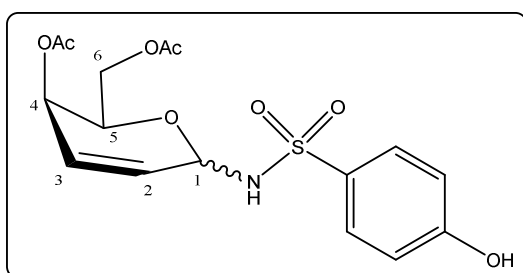
Síntesis de 4,6-Di-O-acetil-2,3-dideoxi-D-treo-hex-2-enopiranosil *p*-hidroxibencensulfonamida (**NG2**)



En un tubo de reacción se colocó un buzo, se tapó con septum y se gaseó con Ar calentándolo simultáneamente con pistola de calor. Una vez frío se agregaron 0,136 g (0,5 mmoles) de **G4**, 0,092 g (0,55 mmoles) de **S1** y luego se tapó nuevamente con septum. Se agregó 2,5 ml de CH₃CN anhidro, finalmente se agregó 0,2 mL de solución de BF₃.Et₂O (1% mmol), se dejó con agitación por 2,5 h. El progreso de la reacción se siguió por CCD. Luego se quencheó con 5 mL de

solución saturada de bicarbonato de sodio (hasta PH=7), se agregó 6 mL CH₂Cl₂. Se pasó la mezcla de reacción a una ampolla de decantación y se extrajo con agua destilada (3 x 5 mL), luego con 5 mL de solución saturada de NaCl. Los extractos orgánicos se juntaron y se le agregó Na₂SO₄ como desecante, se filtró y se evaporó el solvente en evaporador rotativo. El producto obtenido se purificó por cromatografía flash con una mezcla de DCM-Hex 7:3 como solvente de elución. La muestra fue secada en bomba de vacío. El rendimiento obtenido fue del 70%. La relación anomérica α/β fue de 65:45. La mezcla anomérica en este caso pudo ser separada mediante cromatografía en columna.

4,6-Di-O-acetil-2,3-didesoxi-D-treo-hex-2-enopiranosil *p*-hidroxibencensulfonamida (NG2)



Aceite amarillo. Anómero α : ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 7,78 (d, 2H, J = 8,8 Hz, ArH), 7,27 (s, 1H, OH), 6,92 (d, 2H, J = 8,8 Hz, ArH), 6,14 (ddd, 1H, J = 10,0, 5,5, 1,6 Hz, H-3), 6,04 (d, 1H, J = 8,9 Hz, NH), 5,99 (dd, 1H, J = 10,0, 3,3 Hz, H-2), 5,62

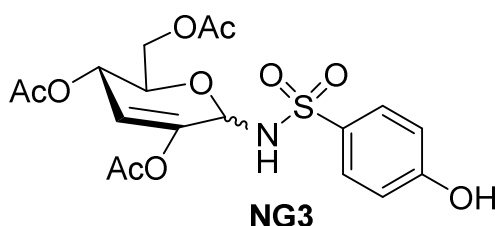
(ddd, 1H, J = 8,9, 3,3, 1,7 Hz, H-1), 4,94 (dd, 1H, J = 5,5, 1,6 Hz, H-4), 3,88 (m, 2H, H-5, H-6a), 3,56 (ddd, 1H, J = 9,9 Hz, H-6b), 2,05 (s, 3H, CH₃COO), 1,97 (s, 3H, CH₃COO). ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 171,26 (CH₃COO), 170,51 (CH₃COO), 160,31 (ArC), 132,57 (ArC), 129,48 (ArC), 129,48 (ArC), 129,46 (C-3), 126,45 (C-2), 115,83 (ArC), 115,83 (ArC), 76,77 (C-1), 66,34 (C-5), 61,72 (C-4), 61,60 (C-6), 20,76 (CH₃CO), 20,72 (CH₃CO).

Anómero β : ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 7,79 (d, 2H, J = 8,8 Hz, ArH), 7,27 (s, 1H, OH), 6,88 (d, 2H, J = 8,8 Hz, ArH), 6,11 (m, 1H, H-3), 5,95 (d, 1H, J = 10,1 Hz, H-2), 5,49 (m, 2H, NH, H-1), 5,03 (d, 1H, J = 5,6 Hz, H-4), 3,96 (m, 2H, H-6a, H-5, H-6b), 2,07 (s, 3H, CH₃COO), 2,01 (s, 3H, CH₃COO). ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 171,20 (CH₃COO), 170,41 (CH₃COO), 160,20 (ArC), 132,57 (ArC), 132,08 (C-2),

EXPERIMENTAL

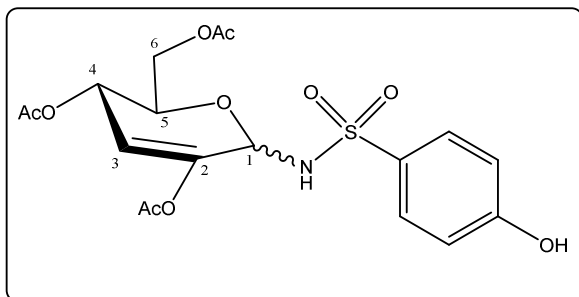
129,84 (ArC), 129,84 (ArC), 127,13 (C-3), 115,82 (ArC), 115,82 (ArC), 79,74 (C-1), 72,34 (C-5), 62,73 (C-4), 62.70 (C-6), 20,78 (CH₃CO), 20,77 (CH₃CO).

Síntesis de 2, 4, 6-Tri-O-acetil-3-desoxi-D-eritro-hex-2-enopiranosil
p-hidroxibencensulfonamida (**NG3**)



En un tubo de reacción se colocó un buzo, se tapó con septum y se gaseó con Ar calentándolo simultáneamente con pistola de calor. Una vez frío se agregaron 0,165 g (0,5 mmoles) de **G5**, 0,092 g (0,55 mmoles) de **S1** y luego se tapó nuevamente con un septum. Se agregó 2,5 ml de CH₃CN anhidro, finalmente se agregó 1 mL de solución de BF₃.Et₂O (1% mmol), se dejó con agitación por 5 h. El progreso de la reacción se siguió por CCD. Luego se quencheó con 5 mL de solución saturada de bicarbonato de sodio (hasta PH=7), se agregó 6 mL CH₂Cl₂. Se pasó la mezcla de reacción a una ampolla de decantación, se extrajo con agua destilada (3 x 5 mL), luego con 5 mL de solución saturada de NaCl. Los extractos orgánicos se juntaron y se le agregó Na₂SO₄ como desecante, se filtró y se evaporó el solvente en evaporador rotativo. El producto obtenido se purificó por cromatografía flash con una mezcla de DCM-Hex 7:3 como solvente de elución. La muestra fue secada en bomba de vacío. El rendimiento obtenido fue del 72%, con una relación α/β 78:22.

**2, 4, 6-Tri-O-acetil-3-desoxi-D-eritro-hex-2-enopiranosil
p-hidroxibencensulfonamida (NG3)**

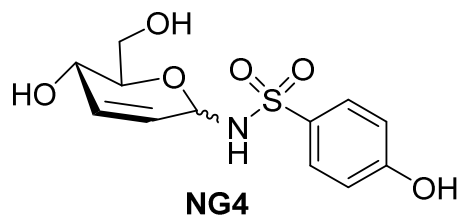


Aceite amarillo. Anómero α : ^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ 7,80 (d, 2H, $J = 8,8$ Hz, ArH), 7,38 (s, 1H, OH), 6,96 (d, 2H, $J = 8,8$ Hz, ArH), 5,92 (d, 1H, $J = 8,1$ Hz, NH), 5,72 (d, 1H, $J = 2,3$ Hz, H-3), 5,48 (as, 1H, H-1), 5,41 (ddd,

1H, $J = 9,0, 2,4, 1,5$ Hz, H-4), 4,03 (dd, 1H, $J = 12,0, 3,8$ Hz, H-6a), 3,74 (m, 1H, H-5, H-6b), 2,11 (s, 3H, CH_3COO), 2,07 (s, 6H, CH_3COO). ^{13}C NMR (151 MHz, CDCl_3) δ 207,16 (CO), 170,79 (CH_3COO), 169,95 (CH_3COO), 169,30 (CH_3COO), 160,39 (ArC), 144,86 (C-2), 133,73 (ArC), 129,48 (ArC), 118,09 (C-3), 115,81 (ArC), 77,34 (C-1), 67,15 (C-5), 64,65 (C-4), 61,73 (C-6), 20,86 (CH_3CO), 20,73 (CH_3CO), 20,64 (CH_3CO).

Anómero β : ^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ 7,96 (d, 2H, $J = 8,9$ Hz, ArH), 7,38 (s, 1H, OH), 6,91 (d, 2H, $J = 8,8$ Hz, ArH), 5,92 (d, 1H, $J = 8,1$ Hz, NH), 5,77 (d, 1H, $J = 2,2$ Hz, H-3), 5,47 (as, 1H, H-1), 5,34 (d, 1H, $J = 1,8$ Hz, H-4), 4,24 (m, 3H, H-6a, H-5, H-6b), 2,11 (s, 3H, CH_3COO), 2,07 (s, 6H, CH_3COO). ^{13}C NMR (151 MHz, CDCl_3) δ 207,16 (CO), 170,79 (CH_3COO), 169,95 (CH_3COO), 169,30 (CH_3COO), 160,39 (ArC), 146,43 (ArC), 133,73 (ArC), 129,48 (ArC), 115,81 (ArC), 115,40 (C-3), 77,34 (C-1), 67,20 (C-5), 64,65 (C-4), 62,56 (C-6), 20,86 (CH_3CO), 20,73 (CH_3CO), 20,64 (CH_3CO).

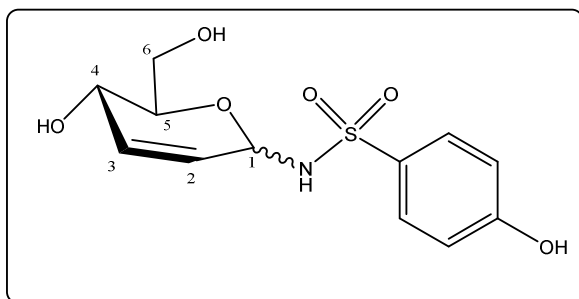
Síntesis de 2,3-didesoxi-D-eritro-hex-2-enopiranosil p-hidroxibencensulfonamida (NG4)



EXPERIMENTAL

En un balón se colocó un buzo magnético, 0,064 g (0,15 mmoles) de 4,6-Di-O-acetil-2,3-didesoxi-D-eritro-hex-2-enopiranosil *p*-hidroxibencensulfonamida (**NG1**), se disolvió en 5 mL de MeOH anhidro, se agregó 4 mL de MeONa/MeOH, se conectó un refrigerante y se dejó reaccionar en baño de agua-hielo por un lapso de 15 minutos, luego se deja a temperatura ambiente con agitación. El progreso de la reacción se siguió por cromatografía en capa delgada. Transcurrida 1,5 h del comienzo, se dió por finalizada la reacción. Se agregaron 1,5 g de resina amberlite [H⁺], se dejó con agitación, se controló el PH de la reacción, a las 4 horas llegó a PH= 6. Se aisló filtrando la resina amberlite [H⁺] por gravedad, se lavó la misma con MeOH y el filtrado se evaporó en evaporador rotativo. El producto obtenido se purificó por cromatografía flash con una mezcla de DCM-AcOEt 7:3 como solvente de elución. La muestra fue secada en bomba de vacío. El rendimiento obtenido fue del 80%, con una relación α/β 61:39.

2,3-didesoxi-D-eritro-hex-2-enopiranosil *p*-hidroxibencensulfonamida (**NG4**)



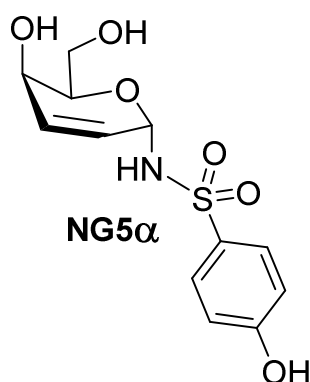
Aceite incoloro. Anómero α : ¹H NMR (500 MHz, DMSO) δ 8,36 (d, 1H, J = 9,2 Hz, NH), 7,68 (d, 2H, J = 8,7 Hz, ArH), 7,11 (s, 1H, OH), 6,89 (d, 2H, J = 4,4 Hz, ArH), 5,31 (dd, 1H, J = 6,4, 2,8 Hz, H-1), 4,63 (d, 1H, J = 6,2 Hz, H-2), 4,49 (t, 1H, J = 4,5 Hz, H-3), 4,22 (t, 1H, J = 4,9 Hz, H-4), 3,98 (m, 1H, H-5), 3,63 (m, 2H, H-6a, H-6b), 3,51 (s, 1H, OH), 3,24 (s, 1H, OH). ¹³C NMR (126 MHz, DMSO) δ 161,19 (ArC), 134,96 (C-3), 132,78 (C-2), 129,24 (2 x ArC), 128,26 (ArC), 115,71 (ArC), 115,62 (ArC), 86,30 (C-1), 80,95 (C-4), 71,93 (C-5), 71,46 (C-6).

Anómero β : ¹H NMR (500 MHz, DMSO) δ 8,36 (d, 1H, J = 9,2 Hz, NH), 7,64 (d, 2H, J = 8,6 Hz, ArH), 7,11 (s, 1H, OH), 6,87 (d, 2H, J = 4,5 Hz, ArH), 5,16 (dd, 1H, J = 5,3, 2,2 Hz, H-1), 4,66 (d, 1H, J = 4,5 Hz, H-2), 4,49 (t, 1H, J = 4,5 Hz, H-3), 4,31 (t, 1H, J = 4,8 Hz, H-4), 4,03 (m, 1H, H-5), 3,68 (m, 2H, H-6a, H-6b), 3,51 (s,

EXPERIMENTAL

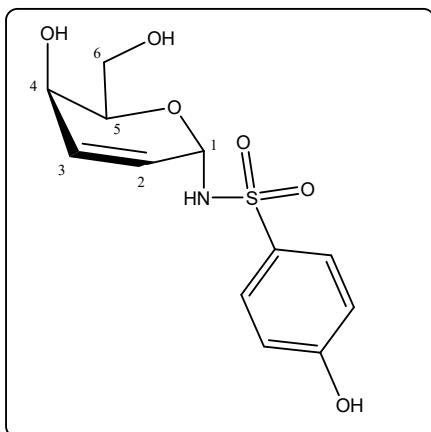
^1H , OH), 3,24 (s, 1H, OH). ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO) δ 161,19 (ArC), 134,96 (C-3), 132,78 (C-2), 129,24 (2 x ArC), 128,26 (ArC), 115,71 (ArC), 115,62 (ArC), 81,93 (C-1), 80,95 (C-4), 71,93 (C-5), 71,46 (C-6).

Síntesis de 2,3-dideoxi- α -D-treo-hex-2-enopiranosil *p*-hidroxibencensulfonamida (**NG5 α**)



En un balón se colocó un buzo magnético, 0,068 g (0,16 mmoles) de 4,6-Di-O-acetil-2,3-dideoxi- α -D-treo-hex-2-enopiranosil *p*-hidroxibencensulfonamida (**NG2 α**), se disolvió en 5 mL de MeOH anhidro, se agregó 4 mL de MeONa/MeOH, se conectó un refrigerante y se dejó reaccionar en baño de agua-hielo por un lapso de 15 minutos, luego se deja a temperatura ambiente con agitación. El progreso de la reacción se siguió por cromatografía en capa delgada. Transcurrida 1,5 h del comienzo, se dió por finalizada la reacción. Se agregaron 1,5 g de resina Amberlite [H^+], se dejó con agitación, se controló el PH de la reacción, a las 4 horas llegó a PH= 6. Se aisló filtrando la resina Amberlite [H^+] por gravedad, se lavó la misma con MeOH y el filtrado se evaporó en evaporador rotativo. El producto obtenido se purificó por cromatografía flash con una mezcla de DCM-AcOEt 7:3 como solvente de elución. La muestra fue secada en bomba de vacío. El rendimiento obtenido fue del 83%.

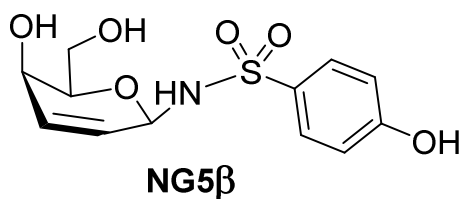
2,3-didesoxi- α -D-treo-hex-2-enopiranosil *p*-hidroxibencensulfonamida (NG5 α)



Aceite incoloro. ^1H NMR (600 MHz, DMSO) δ 8,35 (d, 1H, $J = 9,1$ Hz, NH), 7,63 (d, 2H, $J = 8,0$ Hz, ArH), 7,10 (s, 1H, OH), 6,88 (d, 2H, $J = 8,2$ Hz, ArH), 5,18 (d, 1H, $J = 7,5$ Hz, H-1), 5,08 (as, 1H, H-2), 4,63 (as, 1H, H-3), 4,09 (d, 1H, $J = 4,3$ Hz, H-4), 3,90 (as, 1H, H-5), 3,71 (dd, 1H, $J = 9,6, 3,8$ Hz, H-6a), 3,53 (m, 2H, H-6b, OH), 3,18 (s, 1H, OH). ^{13}C NMR (151 MHz, DMSO) δ 161,21 (ArC), 146,13 (ArC), 132,80 (C-3), 129,26

(C-2), 129,15 (ArC), 128,28 (ArC), 115,72 (ArC), 115,61 (ArC), 87,68 (C-1), 81,00 (C-4), 75,13 (C-5), 74,11 (C-6).

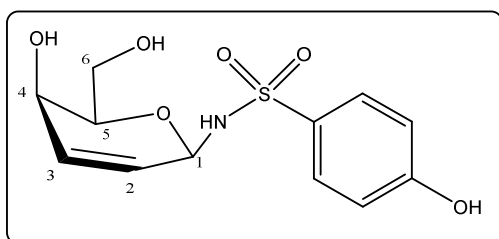
Síntesis de 2,3-dideoxi- β -D-treo-hex-2-enopiranosil *p*-hidroxibencensulfonamida (NG5 β)



En un balón se colocó un buzo magnético, 0,075 g (0,18 mmoles) de 4,6-Di-O-acetil-2,3-dideoxi- β -D-treo-hex-2-enopiranosil *p*-hidroxibencensulfonamida (NG2 β), se disolvió en 5 mL de MeOH anhidro, se agregó 4 mL de MeONa/MeOH, se conectó un refrigerante y se dejó reaccionar en baño de agua-hielo por un lapso de 15 minutos, luego se deja a temperatura ambiente con agitación. El progreso de la reacción se siguió por cromatografía en capa delgada. Transcurrida 1,5 h del comienzo, se dió por finalizada la reacción. Se agregaron 2 g de resina Amberlite

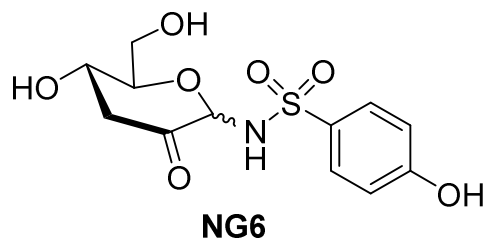
[H⁺], se dejó con agitación, se controló el PH de la reacción, a la hora llegó a PH= 6. Se aisló filtrando la resina Amberlite [H⁺] por gravedad, se lavó la misma con MeOH y el filtrado se evaporó en evaporador rotativo. El producto obtenido se purificó por cromatografía flash con una mezcla de DCM-AcOEt 7:3 como solvente de elución. La muestra fue secada en bomba de vacío. El rendimiento obtenido fue del 85%.

2,3-didesoxi-β-D-treo-hex-2-enopiranosil p-hidroxibencensulfonamida (NG5β)



Aceite amarillo. ¹H NMR (500 MHz, DMSO) δ 8,36 (d, 1H, *J* = 9,2 Hz, NH), 7,65 (d, 1H, *J* = 8,7 Hz, ArH), 7,62 (d, 1H, *J* = 8,7 Hz, ArH), 7,11 (s, 1H, OH), 6,88 (d, 2H, *J* = 8,7 Hz, ArH), 5,16 (m, 1H, H-1), 4,63 (as, 1H, H-3), 4,11 (dd, 1H, *J* = 15,7, 4,6 Hz, H-2), 4,04 (d, 1H, *J* = 7,1 Hz, H-4), 3,72 (ddd, 1H, *J* = 16,0, 9,5, 3,7 Hz, H-6a), 3,58 (m, 1H, H-5), 3,52 (d, 2H, *J* = 1,3 Hz, H-6b, OH), 3,18 (s, 1H, OH). ¹³C NMR (126 MHz, DMSO) δ 160,97 (ArC), 134,98 (ArC), 132,79 (C-3), 129,11 (C-2), 128,28 (2 x ArC), 115,62 (ArC), 115,62 (ArC), 85,61 (C-1), 81,07 (C-4), 74,85 (C-5), 70,25 (C-6).

Síntesis de D-eritro-hex-2-oxopiranosil p-hidroxibencensulfonamida (NG6)

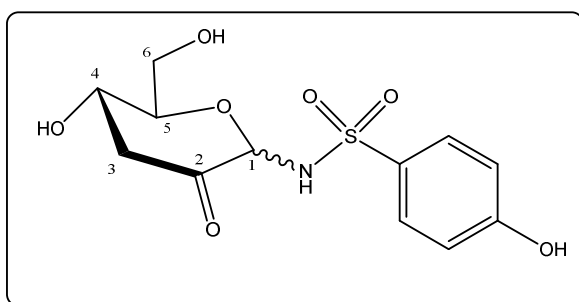


En un balón se colocó un buzo magnético, 0,088 g (0,21 mmoles) de 2, 4, 6-Tri-O-acetil-3-desoxi-D-eritro-hex-2-enopiranosil p-hidroxibencensulfonamida (**NG3**), se disolvió en 5 mL de MeOH anhidro, se agregó 4 mL de MeONa/MeOH, se conectó

EXPERIMENTAL

un refrigerante y se dejó reaccionar en baño de agua-hielo por un lapso de 15 minutos, luego se deja a temperatura ambiente con agitación. El progreso de la reacción se siguió por cromatografía en capa delgada. Transcurrida 2 h del comienzo, se dió por finalizada la reacción. Se agregaron 2,5 g de resina Amberlite [H⁺], se dejó con agitación, se controló el PH de la reacción, a la hora llegó a PH=6. Se aisló filtrando la resina Amberlite [H⁺] por gravedad, se lavó la misma con MeOH y el filtrado se evaporó en evaporador rotativo. El producto obtenido se purificó por cromatografía flash con una mezcla de DCM-AcOEt 7:3 como solvente de elución. La muestra fue secada en bomba de vacío. El rendimiento obtenido fue del 82%, con una relación α/β 78:22.

D-eritro-hex-2-oxopiranosil p-hidroxibencensulfonamida (NG6)

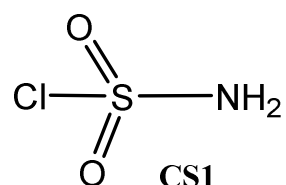


Aceite amarillo. Anómero α : ¹H NMR (600 MHz, DMSO) δ 10,24 (s, 1H, OH), 9,03 (d, 1H, J = 9,4 Hz, NH), 7,64 (dd, 2H, J = 8,7 Hz, ArH), 7,10 (s, 1H, OH), 6,88 (dd, 2H, J = 8,7 Hz, ArH), 5,19 (dd, 1H, J = 9,3 Hz, H-1), 4,99 (t, 1H, J = 5,8 Hz, H-4), 4,04 (d, 1H, J = 7,1 Hz, H-6a), 3,37 (dt, 1H, J = 10,9, 5,3 Hz, H-3a), 3,25 (dt, 1H, J = 10,9, 5,7 Hz, H-3b), 3,18 (d, 2H, J = 3,3 Hz, H-5, H-6b), 3,15 (s, 1H, OH). ¹³C NMR (151 MHz, DMSO) δ 189,02 (C-2), 152,46 (ArC), 135,02 (ArC), 129,26 (ArC), 128,28 (ArC), 115,75 (ArC), 115,61 (ArC), 81,53 (C-1), 69,84 (C-5), 63,20 (C-4), 62,57 (C-6), 49,07 (C-3).

Anómero β : ¹H NMR (600 MHz, DMSO) δ 10,41 (s, 1H, OH), 8,70 (d, 1H, J = 9,5 Hz, NH), 7,67 (dd, 2H, J = 8,8 Hz, ArH), 7,10 (s, 1H, OH), 6,90 (dd, 2H, J = 8,8 Hz, ArH), 5,35 (dd, 1H, J = 9,6, 1,8 Hz, H-1), 5,04 (t, 1H, J = 5,8 Hz, H-4), 4,04 (d, 1H, J = 7,1 Hz, H-6a), 3,45 (dt, 1H, J = 10,8, 5,2 Hz, H-3a), 3,25 (dt, 1H, J = 10,9, 5,7 Hz, H-3b), 3,18 (d, 2H, J = 3,3 Hz, H-5, H-6b), 3,15 (s, 1H, OH). ¹³C NMR (151 MHz, DMSO) δ 189,02 (C-2), 152,46 (ArC), 135,02 (ArC), 129,26 (ArC), 128,28 (ArC), 115,75 (ArC), 115,61 (ArC), 83,17 (C-1), 69,84 (C-5), 63,20 (C-4), 62,77 (C-6), 49,07 (C-3).

4.6. Síntesis de nuevos glicosilsulfamatos

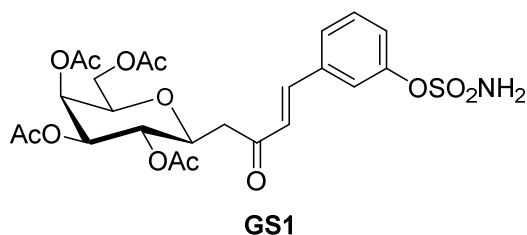
4.6.1. Síntesis de cloruro de sulfamoilo¹⁴⁶ (CS1)



En un balón de 2 bocas de 10 mL, saturado con Ar, se colocó un buzo para agitación magnética. Por una de las bocas, tapada con septum, se agregaron 4,66 g (32,96 mmoles), de isocianato de clorosulfonilo. Luego se agregaron 1,24 mL (32,96 mmoles) de ácido fórmico, y se dejó reaccionar con agitación en un baño a 0°C. La mezcla de reacción entró en ebullición casi inmediatamente y se liberaron gases por el burbujeador. Luego de que cesa la ebullición, se agregaron 7 mL de benceno anhidro. Se dejó con agitación hasta que parcialmente todo el sólido blanco que se había formado en la reacción se disolvió. El insoluble que queda es filtrado por medio de embudo con vidrio fritado en vacío. El filtrado se colectó en un balón y se evaporó el solvente en evaporador rotativo. Se guardó en freezer. Se obtuvieron 3,46 g (30 mmoles) de cloruro de sulfamoilo (**CS1**). Rto. 90 %, Pf: 39-40 °C. (Bibliografía: Rto: 91%, Pf: 40 °C).¹⁴⁶

4.6.2. Síntesis de nuevos glicosilsulfamatos

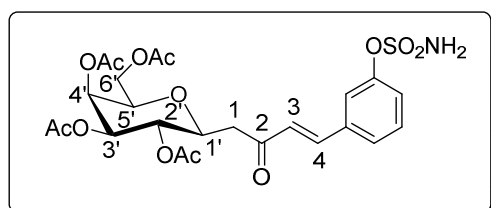
Síntesis de (E)-1-(2',3',4',6'-Tetra-O-acetil-β-D-galactopiranosil)-4-(3-sulfamoilfenil)but-3-en-2-ona (**GS1**)



EXPERIMENTAL

A un balón de 2 bocas se lo saturó con Ar y se lo secó con pistola de calor, se colocó un buzo magnético y se pesan 0,246 g (0,5 mmoles) de (E)-1-(2',3',4',6'-Tetra-O-acetil-β-D-galactopiranosil)-4-(3-hidroxifenil)but-3-en-2-ona (**F6**). Una de las bocas se tapó con un septum y en la boca restante se colocó un burbujeador de Ar. Se agregaron 1,5 mL (16 mmoles) de DMA anhidro con jeringa Hamilton y con agitación magnética, luego se colocó en baño de agua y hielo. Posteriormente se adicionó 0,220 g (1,9 mmoles) de cloruro de sulfamoilo con jeringa Hamilton, previamente disueltos en 1,5 mL (16 mmoles) de DMA anhidro. Se dejó reaccionar por el lapso de 1,5 h a temperatura ambiente. Se siguió la reacción por cromatografía en capa delgada. Una vez que se consumió todo el reactivo, se dió por finalizada la reacción y se aisló agregando 5 mL de AcOEt. Luego se hicieron extracciones con agua (2 x 5 mL), luego con una solución saturada de NaCl (2 x 3 mL). Se obtuvo la fase orgánica, de color amarillo, a la cual se le agregó sulfato de sodio como desecante. Se evaporó el solvente en evaporador rotativo. El producto obtenido se purificó por medio de cromatografía flash con una mezcla de Hex-AcOEt 4:6 como solvente de elución. La muestra fue secada en bomba de vacío. El rendimiento obtenido fue del 87 %.

(E)-1-(2',3',4',6'-Tetra-O-acetil-β-D-galactopiranosil)-4-(3-sulfamoilfenil)but-3-en-2-ona (**GS1**)

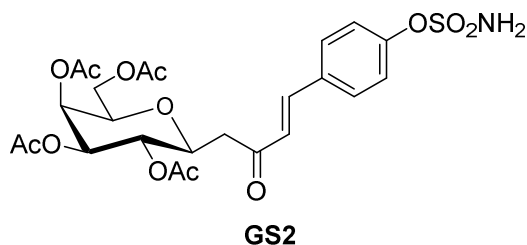


Sólido blanco: pf 53-54°C. ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ 7,56 (t, 1H, *J* = 1,9 Hz, ArH), 7,52 (d, 1H, *J* = 16,2 Hz, H-4), 7,46 (m, 2H, ArH), 7,38 (ddd, 1H, *J* = 7,7, 2,4, 1,4 Hz, ArH), 6,78 (d, 1H, *J* = 16,1 Hz, H-3), 5,81 (as, 2H, NH₂), 5,45 (dd, 1H, *J* = 3,5, 1,1 Hz, H-4'), 5,19 (t, 1H, *J* = 9,9 Hz, H-2'), 5,08 (dd, 1H, *J* = 10,1, 3,4 Hz, H-3'), 4,19 (dd, 1H, *J* = 10,5, 6,2 Hz, H-6'a), 4,03 (ddd, 1H, *J* = 9,8, 8,9, 3,1 Hz, H-1'), 3,94 (m, 2H, H-6b, H-5'), 3,06 (dd, 1H, *J* = 15,5, 8,9 Hz, H-1a), 2,67 (dd, 1H, *J* = 15,5, 3,0 Hz, H-1b), 2,18 (s, 3H, CH₃COO), 2,06 (s, 3H, CH₃COO), 2,00 (s, 3H, CH₃COO), 1,90 (s, 3H, CH₃COO). ¹³C NMR

EXPERIMENTAL

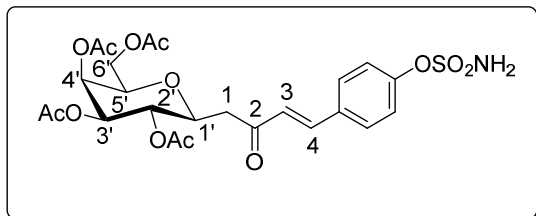
(151 MHz, CDCl₃) δ 196,77 (C-2), 170,89 (CH₃COO), 170,29 (CH₃COO), 170,23 (CH₃COO), 170,13 (CH₃COO), 150,72 (ArC), 141,89 (C-4), 136,31 (ArC), 130,46 (ArC), 127,62 (C-3), 127,29 (ArC), 124,39 (ArC), 121,20 (ArC), 75,02 (C-1'), 74,32 (C-5'), 71,92 (C-3'), 69,05 (C-2'), 67,77 (C-4'), 61,65 (C-6'), 43,11 (C-1), 20,81 (CH₃CO), 20,68 (CH₃CO), 20,60 (CH₃CO), 20,55 (CH₃CO).

Síntesis de (E)-1-(2',3',4',6'-Tetra-O-acetil- β -D-galactopiranosil)-4-(4-sulfamoilfenil)but-3-en-2-ona (**GS2**)



A un balón de 2 bocas se lo saturó con Ar y se lo secó con pistola de calor, se coloca un buzo magnético y se pesan 0,492 g (1 mmoles) de (E)-1-(2',3',4',6'-Tetra-O-acetil- β -D-galactopiranosil)-4-(4-hidroxifenil)but-3-en-2-ona (**F7**). Una de las bocas se tapó con un septum y en la boca restante se colocó un burbujeador de Ar. Se agregaron 3 mL (32 mmoles) de DMA anhidro con jeringa Hamilton y con agitación magnética, luego se colocó en baño de agua y hielo. Posteriormente se adicionó 0,440 g (3,8 mmoles) de cloruro de sulfamoilo con jeringa Hamilton, previamente disueltos en 3 mL (32 mmoles) de DMA anhidro. Se dejó reaccionar por el lapso de 1,5 h a temperatura ambiente. Se siguió la reacción por cromatografía en capa delgada. Una vez que se consumió todo el reactivo, se dió por finalizada la reacción y se aisló agregando 10 mL de AcOEt. Luego se hicieron extracciones con agua (2 x 10 mL), luego con una solución saturada de NaCl (2 x 6 mL). Se obtuvo la fase orgánica, de color amarillo, a la cual se le agrego sulfato de sodio como desecante. Se evaporó el solvente en evaporador rotatorio. El producto obtenido se purificó por medio de cromatografía flash con una mezcla de Hex-AcOEt de etilo 4:6 como solvente de elución. La muestra fue secada en bomba de vacío. El rendimiento obtenido fue del 60 %.

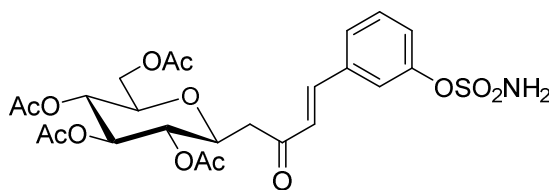
(E)-1-(2',3',4',6'-Tetra-O-acetil-β-D-galactopiranosil)-4-(4-sulfamoilfenil)but-3-en-2-ona (GS2)



Aceite incoloro. ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ 7,58 (d, 2H, *J* = 8,7 Hz, ArH), 7,52 (d, 1H, *J* = 16,1 Hz, H-4), 7,38 (m, 2H, ArH), 6,71 (d, 1H, *J* = 16,2 Hz, H-3), 6,05 (as, 2H, NH₂), 5,44 (dd, 1H, *J* =

3,5, 1,2 Hz, H-4'), 5,18 (t, 1H, *J* = 9,9 Hz, H-2'), 5,08 (dd, 1H, *J* = 10,1, 3,5 Hz, H-3'), 4,09 (m, 2H, H-1', H-6'a), 4,02 (dd, 1H, *J* = 11,3, 6,5 Hz, H-6'b), 3,94 (td, 1H, *J* = 6,6, 1,2 Hz, H-5'), 3,07 (dd, 1H, *J* = 16,0, 8,5 Hz, H-1a), 2,70 (dd, 1H, *J* = 16,1, 3,2 Hz, H-1b), 2,16 (s, 3H, CH₃COO), 2,04 (s, 3H, CH₃COO), 1,99 (s, 3H, CH₃COO), 1,96 (s, 3H, CH₃COO). ¹³C NMR (151 MHz, CDCl₃) δ 196,39 (C-2), 170,98 (CH₃COO), 170,52 (CH₃COO), 170,26 (CH₃COO), 170,12 (CH₃COO), 151,79 (ArC), 142,05 (C-4), 133,03 (ArC), 129,78 (2 x ArC), 126,91 (C-3), 122,80 (2 x ArC), 74,66 (C-1'), 74,24 (C-5'), 71,95 (C-3'), 69,12 (C-2'), 67,72 (C-4'), 61,44 (C-6'), 42,90 (C-1), 21,47 (CH₃CO), 20,81 (CH₃CO), 20,68 (CH₃CO), 20,60 (CH₃CO).

Síntesis de (E)-1-(2',3',4',6'-Tetra-O-acetil-β-D-glucopiranosil)-4-(3-sulfamoilfenil)but-3-en-2-ona (GS3)



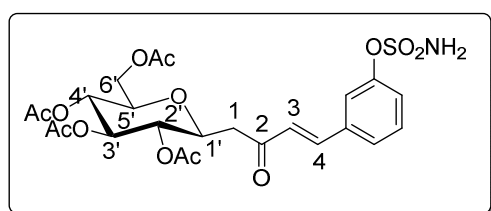
GS3

A un balón de 2 bocas se lo saturó con Ar y se lo secó con pistola de calor, se colocó un buzo magnético, se pesan 0,369 g (0,75 mmoles) de (E)-1-(2',3',4',6'-

EXPERIMENTAL

Tetra-O-acetil- β -D-glucopiranosil)-4-(3-hidroxifenil)but-3-en-2-ona (**F2**). Una de las bocas se tapó con un septum y en la boca restante se colocó un burbujeador de Ar. Se agregaron 2,25 mL (24 mmoles) de DMA anhidro con jeringa Hamilton y con agitación magnética, luego se puso en baño de agua y hielo. Posteriormente se adicionó 0,330 g (2,85 mmoles) de cloruro de sulfamoilo con jeringa Hamilton, previamente disueltos en 2,25 mL (24 mmoles) de DMA anhidro. Se dejó reaccionar por el lapso de 1,5 h a temperatura ambiente. Se siguió la reacción por cromatografía en capa delgada. Una vez que se consumió todo el reactivo, se dió por finalizada la reacción y se aisló agregando 7,5 mL de AcOEt. Luego se hicieron extracciones con agua (2 x 12 mL), luego con una solución saturada de NaCl (2 x 10 mL). Se obtuvo la fase orgánica, de color amarillo, a la cual se le agregó sulfato de sodio como desecante. Se evaporó el solvente en evaporador rotatorio. El producto obtenido se purificó por medio de cromatografía flash con una mezcla de Hex-AcOEt 4:6 como solvente de elución. La muestra fue secada en bomba de vacío. El rendimiento obtenido fue del 57 %.

(E)-1-(2',3',4',6'-Tetra-O-acetil- β -D-glucopiranosil)-4-(3-sulfamoilfenil)but-3-en-2-ona (**GS3**)

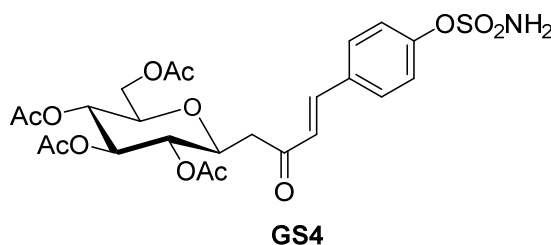


Sólido blanco: pf 54-54,5 °C. ^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ 7,55 (t, 1H, $J = 1,9$ Hz, ArH), 7,52 (d, 1H, $J = 16,1$ Hz, H-4), 7,48 (dd, 1H, $J = 3,4, 1,8$ Hz, ArH), 7,46 (d, 1H, $J = 7,7$ Hz, ArH), 7,39 (m, 1H, ArH), 6,77 (d, 1H, $J = 16,1$ Hz, H-3), 5,61 (as, 2H, NH_2), 5,23 (t, 1H, $J = 9,4$ Hz, H-3'), 5,08 (t, 1H, $J = 9,7$ Hz, H-4'), 4,98 (t, 1H, $J = 9,7$ Hz, H-2'), 4,27 (dd, 1H, $J = 12,4, 5,2$ Hz, H-6'a), 4,04 (m, 2H, H-1', H-6'b), 3,71 (ddd, 1H, $J = 10,1, 5,3, 2,2$ Hz, H-5'), 3,01 (dd, 1H, $J = 15,5, 8,9$ Hz, H-1a), 2,66 (dd, 1H, $J = 15,4, 3,0$ Hz, H-1b), 2,06 (s, 3H, CH_3COO), 2,05 (s, 3H, CH_3COO), 2,03 (s, 3H, CH_3COO), 1,94 (s, 3H,

EXPERIMENTAL

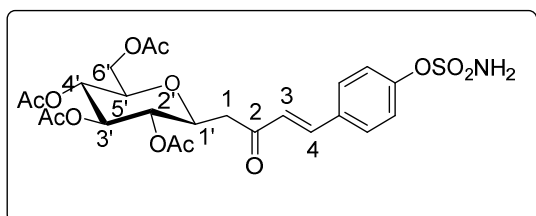
CH₃COO). ¹³C NMR (151 MHz, CDCl₃) δ 196,59 (C-2), 171,20 (CH₃COO), 170,27 (CH₃COO), 170,03 (CH₃COO), 169,59 (CH₃COO), 150,67 (ArC), 141,97 (C-4), 136,31 (ArC), 130,51 (ArC), 127,71 (C-3), 127,39 (ArC), 124,45 (ArC), 121,10 (ArC), 75,66 (C-5'), 74,59 (C-1'), 74,05 (C-3'), 71,62 (C-2'), 68,57 (C-4'), 62,15 (C-6'), 42,84 (C-1), 20,78 (CH₃CO), 20,72 (CH₃CO), 20,62 (2 x CH₃CO).

Síntesis de (E)-1-(2',3',4',6'-Tetra-O-acetil-β-D-glucopiranosil)-4-(4-sulfamoilfenil)but-3-en-2-ona (**GS4**)



A un balón de 2 bocas se lo saturó con Ar y se lo secó con pistola de calor, se colocó un buzo magnético, se pesan 0,246 g (0,5 mmoles) de (E)-1-(2',3',4',6'-Tetra-O-acetil-β-D-glucopiranosil)-4-(4-hidroxifenil)but-3-en-2-ona (**F3**). Una de las bocas se tapó con un septum y en la boca restante se colocó un burbujeador de Ar. Se agregaron 1,5 mL (16 mmoles) de DMA anhidro con jeringa Hamilton y con agitación magnética, luego se puso en baño de agua y hielo. Posteriormente se adicionó 0,220 g (1,9 mmoles) de cloruro de sulfamoilo con jeringa Hamilton, previamente disueltos en 1,5 mL (16 mmoles) de DMA anhidro. Se dejó reaccionar por el lapso de 1,5 h a temperatura ambiente. Se siguió la reacción por cromatografía en capa delgada. Una vez que se consumió todo el reactivo, se dió por finalizada la reacción y se aisló agregando 5 ml de AcOEt. Luego se hicieron extracciones con agua (2 x 5 mL), luego con solución saturada de NaCl (2 x 3 mL). Se obtuvo la fase orgánica, de color amarillo, a la cual se le agrego sulfato de sodio como desecante. Se evaporó el solvente en evaporador rotatorio. El producto obtenido se purificó por medio de cromatografía flash con una mezcla de Hex-AcOEt 4:6 como solvente de elución. La muestra fue secada en bomba de vacío. El rendimiento obtenido fue del 74 %.

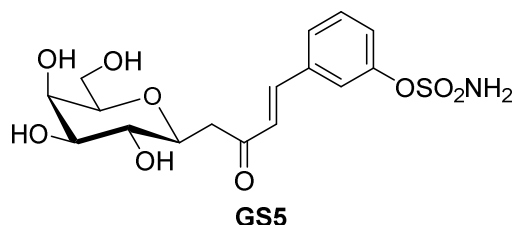
(E)-1-(2',3',4',6'-Tetra-O-acetil-β-D-glucopiranosil)-4-(4-sulfamoilfenil)but-3-en-2-ona (GS4)



Sólido blanco: pf 147-147,5°C. ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ 7,59 (d, 2H, *J* = 8,6 Hz, ArH), 7,52 (d, 1H, *J* = 16,2 Hz, H-4), 7,37 (d, 2H, *J* = 8,6 Hz, ArH), 6,70 (d, 1H, *J* = 16,2 Hz, H-3), 5,46

(as, 1H, NH₂), 5,24 (t, 1H, *J* = 9,4 Hz, H-3'), 5,08 (t, 1H, *J* = 9,7 Hz, H-4'), 4,99 (t, 1H, *J* = 9,7 Hz, H-2'), 4,24 (dd, 1H, *J* = 12,4, 4,9 Hz, H-6'a), 4,11 (ddd, 1H, *J* = 10,0, 8,7, 3,3 Hz, H-1'), 4,03 (dd, 1H, *J* = 12,4, 2,2 Hz, H-6'b), 3,73 (ddd, 1H, *J* = 10,1, 5,0, 2,2 Hz, H-5'), 3,03 (dd, 1H, *J* = 16,1, 8,6 Hz, H-1a), 2,69 (dd, 1H, *J* = 16,2, 3,1 Hz, H-1b), 2,04 (s, 6H, CH₃COO), 2,03 (s, 3H, CH₃COO), 2,01 (s, 3H, CH₃COO). ¹³C NMR (151 MHz, CDCl₃) δ 196,26 (C-2), 170,79 (CH₃COO), 170,28 (CH₃COO), 170,09 (CH₃COO), 169,64 (CH₃COO), 151,58 (ArC), 142,09 (C-4), 133,25(ArC), 129,87 (2 x ArC), 127,06 (C-3), 122,71 (2 x ArC), 75,71 (C-5'), 74,15 (C-1'), 74,13 (C-3'), 71,69 (C-2'), 68,52 (C-4'), 62,14 (C-6'), 42,65 (C-1), 20,72 (CH₃CO), 20,67 (CH₃CO), 20,63 (CH₃CO), 20,61 (CH₃CO).

Síntesis de 1-(β-D-galactopiranosil)-4-(3-sulfamoilfenil)but-3-en-2-ona (GS5)

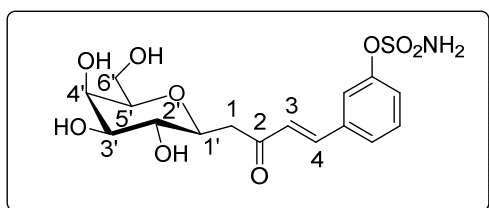


En un balón de 25 mL se colocó 0,103 g (0,25 mmoles) de (E)-1-(2',3',4',6'-Tetra-O-acetil-β-D-galactopiranosil)-4-(3-sulfamoilfenil)but-3-en-2-ona (**GS1**), se disolvió en 5mL de MeOH anhidro, con agitación. En otro balón de 10 mL se preparó 4mL

EXPERIMENTAL

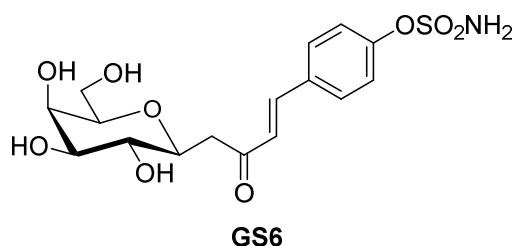
de MeONa/MeOH, se le adicionó al sulfamato disuelto, se dejó reaccionar en baño de agua a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se coloreó de amarillo. Se siguió la reacción por cromatografía en capa delgada. Luego de 2 h se consumió todo el reactivo y se dió por finalizada la reacción. Se agregaron 2 g de resina Amberlite [H⁺], se dejó con agitación, se controló el PH de la reacción, a la hora llegó PH= 6, se dió por finalizada la reacción. Se aisló filtrando la resina Amberlite [H⁺] por gravedad, se lavó la misma con MeOH y el filtrado se evaporó en evaporador rotativo. El producto obtenido se purificó por medio de cromatografía flash con una mezcla de AcOEt-MeOH 5:1 como solvente de elución. La muestra fue secada en bomba de vacío. El rendimiento obtenido fue del 72 %.

1-(β-D-galactopiranosil)-4-(3-sulfamoilfenil)but-3-en-2-ona (GS5)



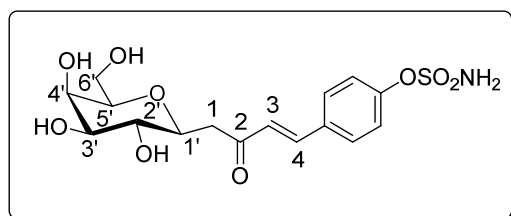
Aceite amarillo. ¹H NMR (600 MHz, DMSO) δ 7,48 (d, 1H, *J* = 16,2 Hz, H-4), 7,45 (as, 2H, NH₂), 7,23 (t, 1H, *J* = 7,8 Hz, ArH), 7,14 (d, 1H, *J* = 7,7 Hz, ArH), 7,05 (t, 1H, *J* = 2,0 Hz, ArH), 6,84 (d, 1H, *J* = 2,5 Hz, ArH), 6,82 (d, 1H, *J* = 16,2 Hz, H-3), 4,87 (d, 1H, *J* = 4,6 Hz, OH), 4,67 (d, 1H, *J* = 4,2 Hz, OH), 4,47 (t, 1H, *J* = 5,6 Hz, OH), 4,31 (d, 1H, *J* = 4,6 Hz, OH), 3,71 (as, 1H, H-4'), 3,57 (m, 1H, H-1'), 3,46 (m, 1H, H-6'a), 3,36 (as, 1H, H-6'b), 3,30 (m, 3H, H-2', H-3', H-5'), 2,95 (dd, 1H, *J* = 15,9, 2,6 Hz, H-1a), 2,81 (dd, 1H, *J* = 15,2, 8,2 Hz, H-1b). ¹³C NMR (151 MHz, DMSO) δ 198,74 (C-2), 158,15 (ArC), 142,66 (C-4), 136,25 (ArC), 130,39 (ArC), 127,13 (C-3), 119,88 (ArC), 118,04 (ArC), 115,16 (ArC), 79,22 (C-5'), 76,94 (C-1'), 75,10 (C-3'), 70,95 (C-2'), 69,06 (C-4'), 60,84 (C-6'), 43,94 (C-1).

Síntesis de 1-(β-D-galactopiranosil)-4-(4-sulfamoilfenil)but-3-en-2-ona (**GS6**)



En un balón de 25 mL se colocó 0,127 g (0,31 mmoles) de (E)-1-(2',3',4',6'-Tetra-O-acetil-β-D-galactopiranosil)-4-(4-sulfamoilfenil)but-3-en-2-ona (**GS2**), se disolvió en 5mL de MeOH anhidro, con agitación. En otro balón de 10 mL se preparó 4mL de MeONa/MeOH, se le adicionó al sulfamato disuelto, se dejó reaccionar en baño de agua a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se coloreó de amarillo. Se siguió la reacción por cromatografía en capa delgada. Luego de 2 h se consumió todo el reactivo y se dió por finalizada la reacción. Se agregaron 2,5 g de resina Amberlite [H⁺], se dejó con agitación, se controló el PH de la reacción, a la hora llegó PH= 6, se dió por finalizada la reacción. Se aisló filtrando la resina Amberlite [H⁺] por gravedad, se lavó la misma con MeOH y el filtrado se evaporó en evaporador rotativo. El producto obtenido se purificó por medio de cromatografía flash con una mezcla de AcOEt-MeOH 5:1 como solvente de elución. La muestra fue secada en bomba de vacío. El rendimiento obtenido fue del 70 %.

1-(β-D-galactopiranosil)-4-(4-sulfamoilfenil)but-3-en-2-ona (GS6)

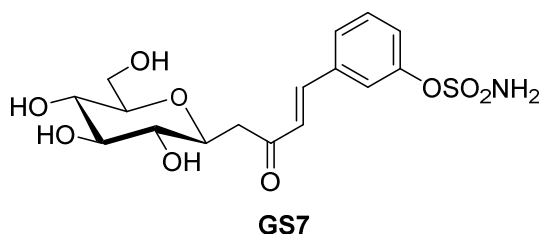


Sólido blanco: pf 104-105°C. ¹H NMR (600 MHz, DMSO) δ 7,56 (d, 2H, *J* = 8,6 Hz, ArH), 7,50 (d, 1H, *J* = 16,1 Hz, H-4), 7,45 (as, 2H, NH₂), 6,81 (d, 2H, *J* = 8,6 Hz, ArH), 6,74 (d, 1H, *J* = 16,1 Hz, H-3), 4,85 (d, 1H, *J* = 4,7 Hz, OH), 4,66 (d, 1H, *J* = 4,6 Hz, OH), 4,46 (t, 1H, *J* = 5,6 Hz, OH), 4,30 (d, 1H, *J* = 4,5 Hz, OH), 3,70 (d, 1H, *J* = 3,2 Hz, H-4'), 3,56 (td, 1H, *J* =

EXPERIMENTAL

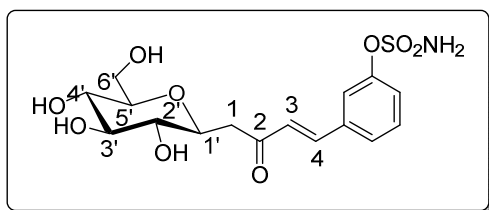
9,1, 2,8 Hz, H-1'), 3,46 (dt, 1H, $J = 10,6, 6,3$ Hz, H-6'a), 3,35 (m, 1H, H-6'b), 3,29 (dt, 3H, $J = 5,3, 2,6$ Hz, H-2', H-3', H-5'), 2,90 (dd, 1H, $J = 15,9, 2,5$ Hz, H-1a), 2,76 (dd, 1H, $J = 15,8, 9,0$ Hz, H-1b).¹³C NMR (151 MHz, DMSO) δ 198,43 (C-2), 160,28 (ArC), 142,82 (C-4), 130,88 (2 x ArC), 125,94 (ArC), 124,09 (C-3), 116,28 (2 x ArC), 79,22 (C-5'), 77,01 (C-1'), 75,13 (C-3'), 70,95 (C-2'), 69,08 (C-4'), 60,86 (C-6'), 43,75 (C-1).

Síntesis de 1-(β -D-glucopiranosil)-4-(3-sulfamoilfenil)but-3-en-2-ona (**GS7**)



En un balón de 25 mL se colocó 0,103 g (0,25 mmoles) de (E)-1-(2',3',4',6'-Tetra-O-acetil- β -D-glucopiranosil)-4-(3-sulfamoilfenil)but-3-en-2-ona (**GS3**), se disolvió en 5mL de MeOH anhidro, con agitación. En otro balón de 10 mL se preparó 4mL de MeONa/MeOH, se le adicionó al sulfamato disuelto, se dejó reaccionar en baño de agua a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se coloreó de amarillo. Se siguió la reacción por cromatografía en capa delgada. Luego de 2 h se consumió todo el reactivo y se dió por finalizada la reacción. Se agregaron 2 g de resina Amberlite [H⁺], se dejó con agitación, se controló el PH de la reacción, a la hora llegó PH= 6, se dió por finalizada la reacción. Se aisló filtrando la resina Amberlite [H⁺] por gravedad, se lavó la misma con MeOH y el filtrado se evaporó en evaporador rotativo. El producto obtenido se purificó por medio de cromatografía flash con una mezcla de AcOEt-MeOH 5:1 como solvente de elución. La muestra fue secada en bomba de vacío. El rendimiento obtenido fue del 65 %.

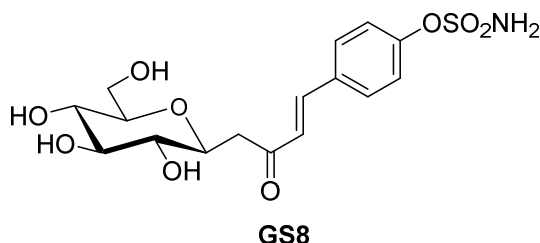
1-(β-D-glucopiranosil)-4-(3-sulfamoilfenil)but-3-en-2-ona (GS7)



Sólido marron pegajoso: pf 128-129°C. ¹H NMR (600 MHz, DMSO) δ 7,50 (d, 1H, *J* = 16,2 Hz, H-4), 7,44 (s, 2H, NH₂), 7,23 (t, 1H, *J* = 7,8 Hz, ArH), 7,15 (d, 1H, *J* = 7,6 Hz, ArH), 7,05 (t, 1H, *J* = 2,0 Hz, ArH),

6,84 (m, 1H, ArH), 6,82 (d, 1H, *J* = 16,2 Hz, H-3), 5,03 (d, 1H, *J* = 5,7 Hz, OH), 4,91 (d, 1H, *J* = 4,7 Hz, OH), 4,84 (d, 1H, *J* = 4,7 Hz, OH), 4,32 (t, 1H, *J* = 5,7 Hz, OH), 3,60 (m, 2H, H-1', H-6'a), 3,39 (dt, 1H, *J* = 11,2, 5,4 Hz, H-6'b), 3,17 (td, 1H, *J* = 8,4, 4,6 Hz, H-3'), 3,07 (m, 2H, H-4', H-5'), 2,95 (m, 2H, H-2', H-1a), 2,80 (dd, 1H, *J* = 16,1, 8,8 Hz, H-1b). ¹³C NMR (151 MHz, DMSO) δ 198,49 (C-2), 158,15 (ArC), 142,71 (C-4), 136,25 (ArC), 130,38 (ArC), 127,13 (C-3), 119,88 (ArC), 118,04 (ArC), 115,21 (ArC), 81,16 (C-5'), 78,60 (C-3'), 76,30 (C-1'), 74,04 (C-2'), 70,77 (C-4'), 61,60 (C-6'), 43,83 (C-1).

Síntesis de 1-(β-D-glucopiranosil)-4-(4-sulfamoilfenil)but-3-en-2-ona (GS8)

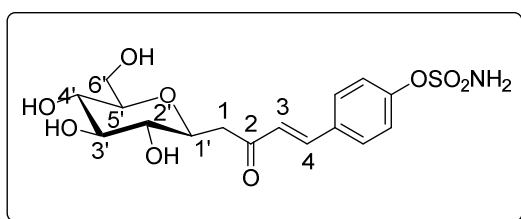


En un balón de 25 mL se colocó 0,106 g (0,26 mmoles) de (E)-1-(2',3',4',6'-Tetra-O-acetil-β-D-glucopiranosil)-4-(4-sulfamoilfenil)but-3-en-2-ona (**GS4**), se disolvió en 7mL de MeOH anhidro, con agitación. En otro balón de 10 mL se preparó 4mL de MeONa/MeOH, se le adicionó al sulfamato disuelto, se dejó reaccionar en baño de agua a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se coloreó de amarillo. Se siguió la reacción por cromatografía en capa delgada. Luego de 2 h se consumió todo el reactivo y se dio por finalizada la reacción. Se agregaron 2 g de resina Amberlite [H⁺], se dejó con agitación, se controló el PH de la reacción, a la

EXPERIMENTAL

hora llegó PH= 6, se dió por finalizada la reacción. Se aisló filtrando la resina Amberlite [H⁺] por gravedad, se lavó la misma con MeOH y el filtrado se evaporó en evaporador rotativo. El producto obtenido se purificó por medio de cromatografía flash con una mezcla de AcOEt-MeOH 5:1 como solvente de elución. La muestra fue secada en bomba de vacío. El rendimiento obtenido fue del 67 %.

1-(β -D-glucopiranosil)-4-(4-sulfamoilfenil)but-3-en-2-ona (GS8)



Sólido blanco: pf 212-213°C. ¹H NMR (600 MHz, DMSO) δ 7,56 (d, 2H, J = 8,6 Hz, ArH), 7,50 (d, 1H, J = 16,1 Hz, H-4) 7,45 (as, 2H, NH₂), 6,81 (d, 2H, J = 8,6 Hz, ArH), 6,74 (d, 1H, J = 16,2 Hz,

H-3), 5,03 (d, 1H, J = 5,8 Hz, OH), 4,90 (d, 1H, J = 4,7 Hz, OH), 4,84 (d, 1H, J = 4,8 Hz, OH), 4,34 (t, 1H, J = 5,7 Hz, OH), 3,60 (m, 2H, H-1', H-6'a), 3,36 (d, 1H, J = 1,8 Hz, H-6'b), 3,17 (t, 1H, J = 4,5 Hz, H-3'), 3,06 (m, 2H, H-4', H-5'), 2,95 (dt, 1H, J = 9,1, 4,5 Hz, H-2'), 2,91 (m, 1H, H-1a), 2,75 (dd, 1H, J = 16,0, 8,9 Hz, H-1b). ¹³C NMR (151 MHz, DMSO) δ 198,23 (C-2), 160,29 (ArC), 142,89 (C-4), 130,91 (2 x ArC), 125,93 (ArC), 124,06 (C-3), 116,28 (2 x ArC), 81,13 (C-5'), 78,61 (C-3'), 76,36 (C-1'), 74,04 (C-2'), 70,78 (C-4'), 61,61 (C-6'), 43,66 (C-1).

4.7. Determinación de actividad biológica

3.7.1 Determinación de la actividad de los C-cinamoilglicósidos frente a la anhidrasa carbónica

La actividad de las isozimas de la anhidrasa carbónica fue medida a través de la reacción de hidratación del CO₂ en el grupo de trabajo del Dr. Claudiu Supuran, Universidad de Florencia. Para realizar el estudio de la actividad de la anhidrasa carbónica a través de la hidratación del CO₂ se utilizó un equipo de flujo detenido (stopped-flow) Applied Photophysics mediante la metodología reportada por Khalifah.¹⁴⁷ Se empleó rojo de fenol (a una concentración de 0.02 mM) como indicador, trabajando a una absorbancia máxima de 557 nM, empleando 20 mM de Hepes (pH 7.5) como buffer y 20 mM de Na₂SO₄ (para mantener la fuerza iónica), siguiéndola velocidad inicial de la reacción de hidratación del CO₂ catalizada por la anhidrasa carbónica por un período de 10-100 s. La concentración de CO₂ para las determinaciones varió de 1.7 a 17 mM. La velocidad de la reacción no catalizada fue determinada de la misma manera y se sustrajo de las velocidades observadas. Las soluciones stock del inhibidor (0.1 mM) fueron preparadas en agua destilada y las diluciones hasta 0.01 nM fueron realizadas también con agua destilada. Las soluciones de inhibidor y de las enzimas fueron preincubadas conjuntamente por 15 min a temperatura ambiente previamente al ensayo. Las constantes de inhibición (K_i) fueron obtenidas mediante la ecuación de Cheng-Prusoff¹⁴⁸ y son el resultado de tres determinaciones diferentes. Los resultados se muestran en las tablas siguientes para cada serie de compuestos sintetizados.

Actividad inhibitoria de los C-cinamoilglicósidos derivados de fenol

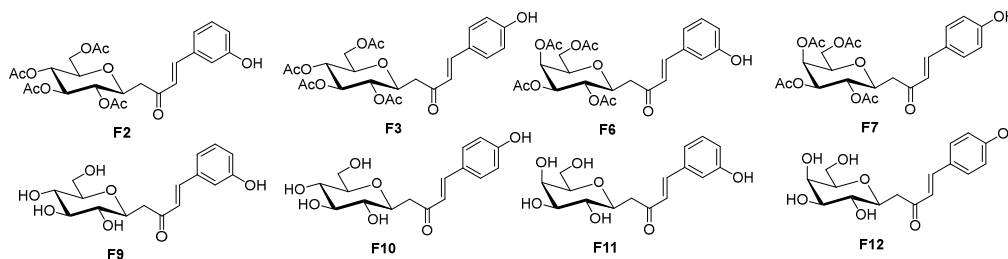


Figura 18. C-cinamoilglicósidos derivados de fenol.

Tabla 8. Datos de inhibición de las distintas α -ACs, mtACs y bsAC con los C-cinamoilglicósidos^a

C-glicósido	K _i (μ M) ^b								
	hAC I	hAC II	hAC IX	hAC XII	mt AC 1	mt AC 2	mt AC 3	bs AC I	bs AC II
F2	8,5	7,0	5,2	6,7	2,1	19,0	0,64	0,92	0,71
F3	5,7	3,9	5,9	6,2	2,9	13,1	0,35	5,65	2,68
F6	5,1	7,1	3,3	3,9	3,8	15,6	0,87	0,68	0,63
F7	9,3	5,5	2,9	4,2	4,5	12,0	1,15	7,18	4,85
F9	6,8	7,8	4,5	7,4	0,14	6,21	0,24	3,45	0,78
F10	3,7	8,8	8,2	8,7	0,93	4,13	0,13	7,92	4,75
F11	3,6	3,1	9,2	8,4	1,16	3,25	0,51	6,54	0,83
F12	5,5	6,8	8,2	6,8	4,5	4,13	0,94	5,43	2,80
Fenol	10,2	5,5	8,8	7,2	64,0	79,0	nd	nd	nd
AAZ	0,25	0,012	0,025	0,005	0,48	0,098	0,104	0,063	0,303

a) Determinaciones realizadas por el Dr. C. T. Supuran, Universidad de Florencia, Italia

b) Errores en el rango del 5-10 % del valor reportado, de 3 determinaciones diferentes

*Todas las ACs son recombinantes

Tabla 9. Datos de selectividad de la relación de K_i para distintas α -ACs y las dos isozimas de bsAC.

C-glicósido	Selectividad							
	I/IX	I/XII	II/IX	II/XII	hAC I/bsAC I	hAC II/bsAC II	hCA II/bsAC I	hAC II/bsAC II
F2	1,63	1,27	1,35	1,04	9,24	11,97	7,61	9,86
F3	0,97	0,92	0,66	0,63	1	2,13	0,69	1,45
F6	1,54	1,31	2,15	1,82	7,50	8,09	10,44	11,27
F7	3,21	2,21	1,90	1,31	1,29	1,92	0,77	1,13
F9	1,51	0,92	1,73	1,05	1,97	8,72	2,26	10
F10	0,45	0,42	1,07	1,01	0,47	0,78	1,11	1,85
F11	0,39	0,43	0,34	0,37	0,55	4,38	0,47	3,73
F12	0,67	0,81	0,83	1	1,01	1,96	1,25	2,43
AAZ	10	50	0,48	2,4	3,97	0,82	0,19	0,04

Actividad inhibitoria de los C-cinamoilglicósidos derivados de metoxiarilo

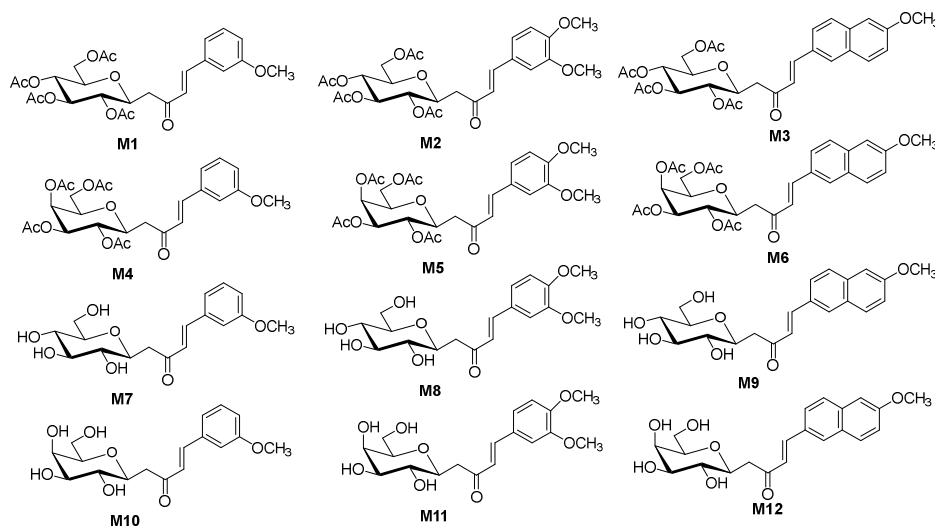


Figura 19. C-cinamoilglicósidos derivados de metoxiarilo.

Tabla 10. Actividad inhibitoria de los C-cinamoilglicósidos M1-M12.

C-glicósido	K_i (μM)					
	hAC I	hAC II	hAC IX	hAC XII	bsAC I	bsAC II
M1	5,67	0,42	0,78	0,79	0,89	0,49
M2	8,36	0,54	0,75	0,13	1,76	0,36
M3	>50	0,41	0,67	0,59	3,92	0,70
M4	8,69	>50	0,093	0,65	>50	4,02
M5	4,67	0,63	0,77	0,081	4,36	0,37
M6	6,65	>50	0,42	0,080	>50	8,05
M7	7,44	>50	0,61	0,68	7,56	8,01
M8	6,51	0,44	0,84	0,073	2,58	0,31
M9	>50	>50	0,46	0,24	0,42	0,22
M10	8,67	>50	3,86	0,084	>50	8,69
M11	7,48	0,55	0,94	0,23	4,49	>50
M12	7,21	>50	0,48	0,089	0,43	0,21
AAZ	0,25	0,012	0,025	0,005	0,063	0,303

a) Determinaciones realizadas por el Dr. C. T. Supuran, Universidad de Florencia, Italia

b) Errores en el rango del 5-10 % del valor reportado, de 3 determinaciones diferentes.

Tabla 11. Datos de selectividad de α -ACs.

C-glicósido	Selectividad			
	I/IX	I/XII	II/IX	II/XII
M1	7,3	7,1	0,5	0,53
M2	11,1	66,3	0,7	4,3
M3	>74,3	>85	0,6	0,7
M4	93,4	13,3	>538	>76
M5	6,0	57,7	0,81	7,8
M6	15,9	83,1	>120	>625
M7	12,1	10,9	>81	>73
M8	12,1	89,2	0,5	6,0
M9	>108	>212	>108	>212
M10	2,24	103,2	>13	>595
M11	8,0	31,8	0,6	2,3
M12	14,9	81,0	>103	>562

Actividad inhibitoria de las *N*-glicosilsulfonamidas

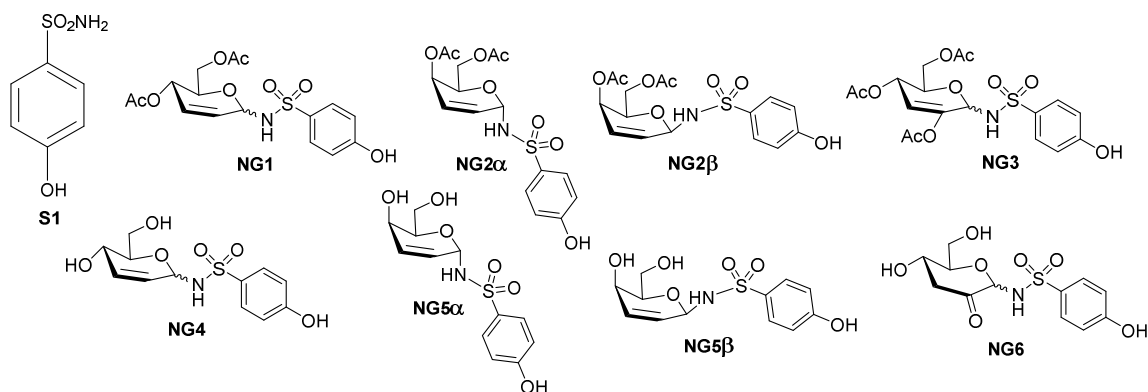


Figura 20. *N*-glicosilsulfonamidas.

Tabla 12. Datos de inhibición de 4 isoformas de la ACs con las diferentes *N*-glicosilsulfonamidas.

Compuesto	K_i (nM) ^a			
	hAC I	hAC II	hAC IX	hAC XII
Fenol	10200	5500	8800	9200
S1	5500	80	235	176
NG1	43,1	139	>50000	>50000
NG2 α	6630	695	>50000	>50000
NG2 β	3840	137	>50000	>50000
NG3	6690	360	>50000	>50000
NG4	454	142	>50000	>50000
NG5 α	8850	340	>50000	>50000
NG5 β	4025	295	>50000	>50000
NG6	6250	1680	>50000	>50000
AAZ	250	12,1	25,3	5,7

a) Error en el rango de \pm 5-10 % del valor reportado, a partir de 3 medidas

Actividad inhibitoria de los C-glicosilsulfamatos

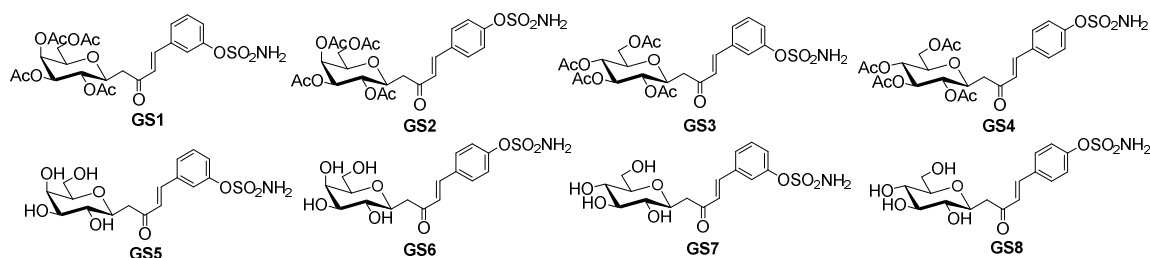


Figura 21. C-glicosilsulfamatos.

Tabla 13 .Datos de Inhibición de α -AC con los diferentes C-glicosilsulfamatos **GS1-GS8**.

C-glicósido	K_i (nM) ^a			Selectividad	
	hAC I	hAC II	hAC IX	I/IX	II/IX
GS1	90,6	5,1	21,2	4,27	0,24
GS2	73,3	3,4	29,6	2,47	0,11
GS3	57,5	3,4	15,7	3,66	0,21
GS4	57,5	4,3	24,3	2,37	0,18
GS5	338,6	842,3	952,9	0,35	0,88
GS6	76,0	27,6	23,1	3,29	1,02
GS7	585,8	180,4	198,9	2,95	0,91
GS8	340,7	570,9	100,9	3,38	5,66
AAZ	250	12	25	10	0,48
Topiramato^b	250	10	3,8	65,79	2,63
Fenilsulfamato	2,1	1,3	63	0,03	0,02

a) Error en el rango de 5-10 % del valor reportado, a partir de 3 medidas.

b) Inhibidor de ACs

3.7.2. Determinación de la actividad frente a *Mycobacterium tuberculosis*

Las determinaciones fueron realizadas por el grupo del Dr. Ricardo Morbidoni, Universidad Nacional de Rosario. La cepa patógena utilizada fue *M. tuberculosis* H₃₇Rv. El medio de cultivo utilizado fue Middlebrook 7H9 Difco suplementado con 1/10 v/v de ADS, glicerol (1% p/v). Los cultivos fueron desarrollados a 37 °C bajo agitación. Ensayos de actividad antibacteriana: se prepararon soluciones patrón de todos los compuestos analizados en DMSO a una concentración de 10 mg/mL. Luego las soluciones fueron diluidas con el medio de cultivo a una concentración de 400 µg/mL. La concentración inhibitoria mínima se definió como la concentración más baja que previene el crecimiento de la micobacteria, observado visualmente. Para evaluar la actividad en medio sólido, se adicionaron las cantidades elegidas de los compuestos al medio sólido fundido y luego de colocarlo en recipientes adecuados, se sembraron alícuotas de *M. tuberculosis* H₃₇Rv en la superficie del medio y se procedió a incubarlo por 30 días a 37 °C antes de inspeccionarlo visualmente. La CIM 99.9% fue aquella que causó una reducción del 99.9% en el conteo de células. Los resultados correspondientes se muestran en las tablas siguientes

Tabla 14. Actividad antituberculosa de los C-cinnamoilglicósidos **F2-F12** en medio líquido.

Compuesto	Concentración		
	100 µg/ml	50 µg/ml	≤25 µg/ml
F2	Si ^a (++++) ^b	Si (++)	No
F3	Si (++)	Si (+)	No
F6	No	No	No
F7	No	No	No
F9	No	No	No
F10	Si (++)	Si (+)	No
F11	Si (++)	Si (+)	No
F12	No	No	No

a) Si indica inhibición del crecimiento, analizado por turbidez.

b) inhibición (++)>(++)>(+)

Tabla 15. Evaluación de la actividad antimicobacteriana en medio sólido

Compuesto	Concentración					
	100 µg/ml	50 µg/ml	25 µg/ml	12.5 µg/ml	6.25 µg/ml	≤ 3.12 µg/ml
F2	Si ^a (++++) ^b	Si(++++)	Si(++++)	Si(++++)	Si(++++)	(*)
F3	No	No	No	No	No	No
F11	Si (++)	No	No	No	No	No

a) Si indica inhibición del crecimiento,

b) inhibición (++)>>(++)>(++)

(*) : colonias pequeñas

Tabla 16. Actividad antituberculosa de los C-cinnamoilglicósidos **M1-M12** en medio líquido

Compuesto	Concentración		
	100 µg/ml	50 µg/ml	≤25 µg/ml
M1	No	No	No
M2	Si (+++)	Si (++)	No
M3	No	No	No
M4	No	No	No
M5	No	No	No
M6	No	No	No
M7	No	No	No
M8	No	No	No
M9	No	No	No
M10	No	No	No
M11	No	No	No
M12	No	No	No

a) Si indica inhibición del crecimiento, analizado por turbidez.

b) inhibición (++)>>(++)>(++)

Tabla 17. Actividad antituberculosa de los *N*-glicósilsulfonamidas en medio líquido.

Compuesto	Concentración		
	100 µg/ml	50 µg/ml	≤25 µg/ml
NG1	No	No	No
NG2α	No	No	No
NG2β	Si	No	No
NG3	No	No	No
NG4	No	No	No
NG5α	No	No	No
NG5β	No	No	No
NG6	No	No	No

a) Si indica inhibición del crecimiento, analizado por turbidez.

Tabla 18. Actividad antituberculosa de C-glicosilsulfamatos **GS1-GS8** en medio líquido.

Compuesto	Concentración		
	100 µg/ml	50 µg/ml	≤25 µg/ml
GS1	No	Si	No
GS2	No	No	No
GS3	No	No	No
GS4	No	No	No
GS5	ND	ND	ND
GS6	ND	ND	ND
GS7	No	No	No
GS8	ND	ND	ND

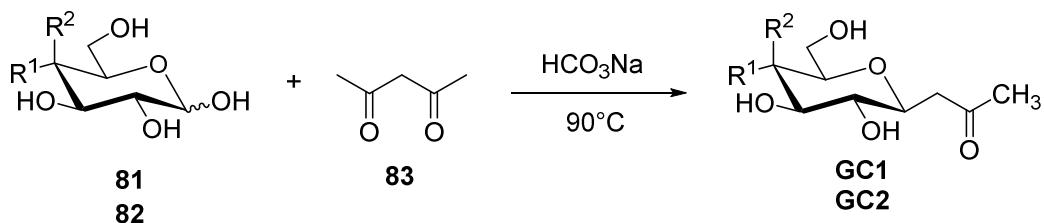
a) Si indica inhibición del crecimiento, analizado por turbidez.

5. Discusión

5.1. Obtención de los C-cinamoilglicósidos

5.1.1. Síntesis de las β -C-glicosilcetonas y posterior acetilación

Para la preparación de las β -C-glicosilcetonas **GC1** y **GC2** se utilizó la reacción de Knoevenagel de monosacáridos reductores con pentan-2,4-diona (**83**) en presencia de bicarbonato de sodio acuoso a 90 °C (Esquema 15). Bajo estas condiciones de reacción se obtuvieron los anómeros β exclusivamente de los compuestos deseados con un rendimiento del 50% en el caso de la D-glucosa y del 70% en el caso de la D-galactosa.



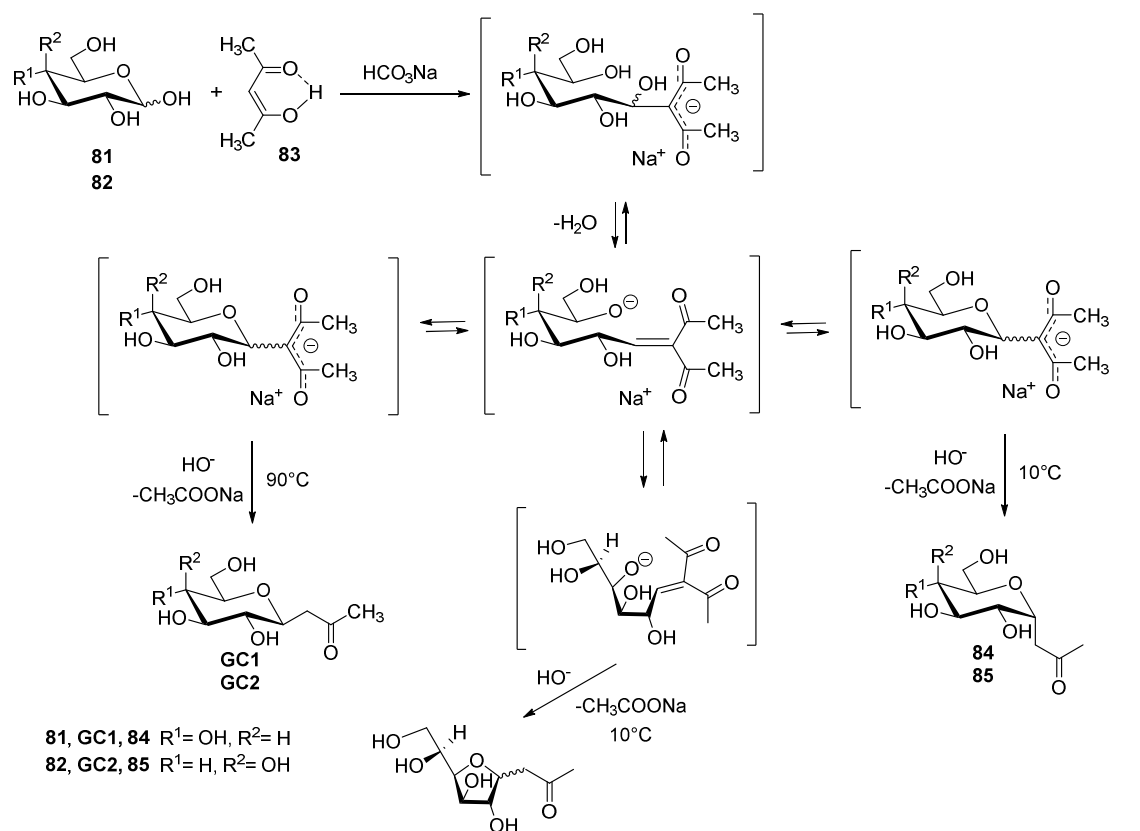
81, GC1 $\text{R}^1 = \text{OH}$, $\text{R}^2 = \text{H}$

82, GC2 $\text{R}^1 = \text{H}$, $\text{R}^2 = \text{OH}$

Esquema 15

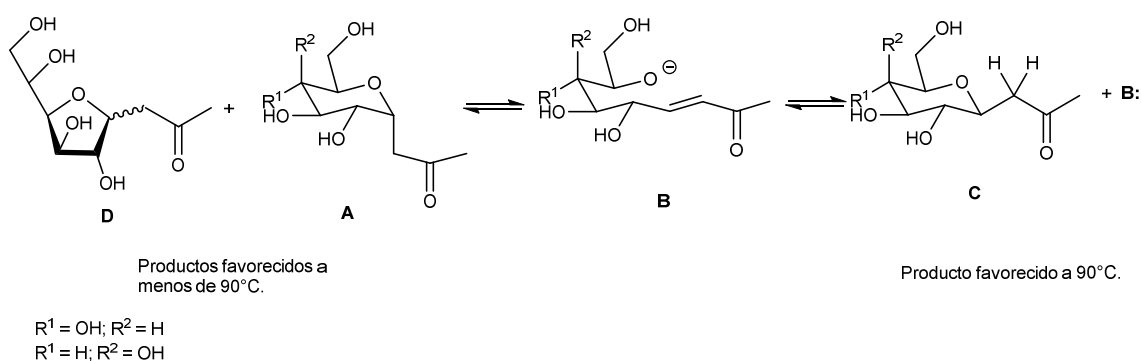
La formación de las glicosilcetonas puede explicarse en base a la condensación de un carbanión de una β -dicetona y el grupo formilo de un carbohidrato reductor (Esquema 16). Cabe destacar que en la bibliografía se describen rendimientos superiores, pero en ambos casos se trata de resultados inferidos del análisis de mezclas de reacción, mientras que en este trabajo de tesis se refieren a productos aislados y purificados.

Otro aspecto que se destaca en la bibliografía es que en la misma reacción de Knoevenagel, pero cambiando la temperatura a 10°C, utilizando carbonato de sodio como base, se obtuvieron tanto las α -C-glicopiranosas como la mezcla anomérica de C-glicofuranosas.¹⁴⁹



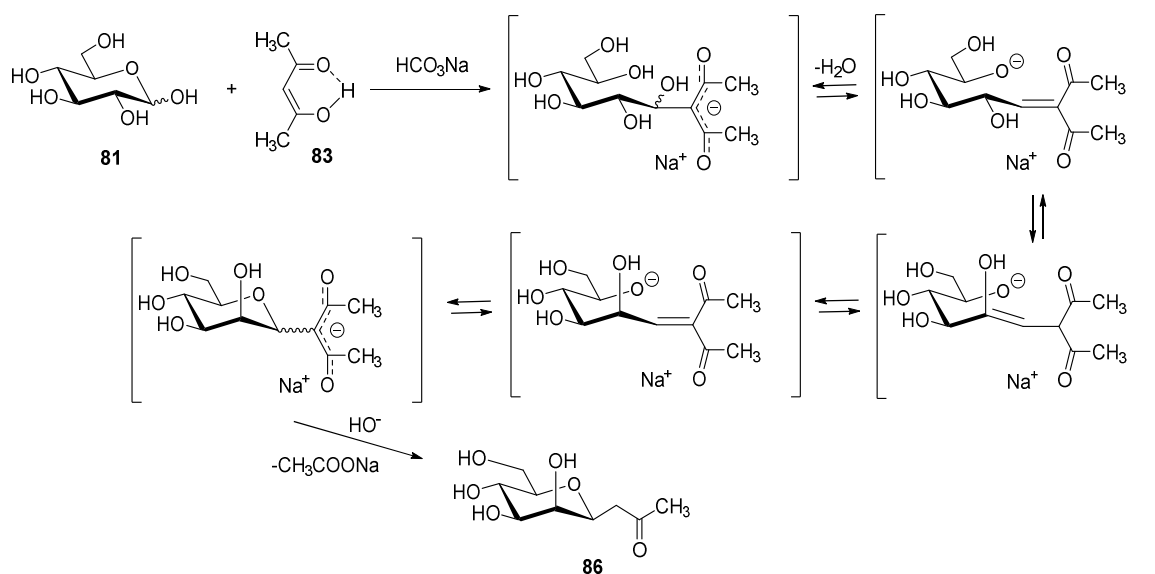
Esquema 16

El hecho de que se haya obtenido exclusivamente los anómeros β de las C-glicosil cetonas es consecuencia del control termodinámico bajo el cual fue llevada a cabo la reacción. Según lo reportado por Lubineau (Esquema 17),¹²⁰ cuando en medio básico se forma una cetona del tipo **C** (derivado de una glicopiranos), la cual posee hidrógenos activados sobre el carbono α al carbono anomérico de la piranosa, se va a establecer un equilibrio (promovido por la base) entre la forma abierta **B** y la forma cerrada de dicha glicopiranos. Si la reacción se lleva a cabo a una temperatura de 90°C, la ciclación de **B** favorece la formación del anómero estabilizado termodinámicamente en este caso el anómero β . Cuando la reacción se lleva a cabo a temperatura inferiores se favorece la formación de las α,β -C-glicofuranosas **D** junto con la α -C-glicopiranos **A**.



Esquema 17

En el caso de la D-glucosa (**81**) se encontró un segundo compuesto, el cual fue separado de la mezcla de reacción original y analizado mediante resonancia magnética nuclear de ¹H y ¹³C. El análisis demostró que se trataba de la correspondiente β-C-manosilpropanona (**86**). En el esquema 18 se puede ver la formación de este producto, que puede explicarse teniendo en cuenta la epimerización en medio alcalino de la D-glucosa. Un producto secundario similar se ha encontrado en la reacción de la pentan-2,4-diona con la N-acetil-D-glucosilamina. Para la reacción de síntesis de la C-galactosilpropanona (**GC2**), no se ha observado la formación de ningún producto secundario.

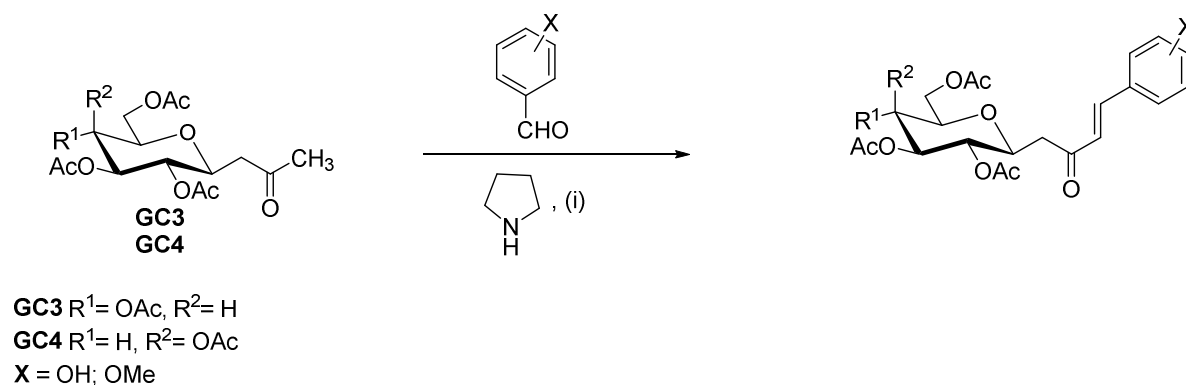


Esquema 18

Las β -C-glicosilcetonas fueron posteriormente protegidas empleando la acetilación de los grupos oxhidrilos presentes en sus moléculas. Para ello se empleó anhídrido acético en presencia de piridina a temperatura ambiente, lo cual ha permitido obtener los C-glicósidos peracetilados (**GC3** y **GC4**) en muy buenos rendimientos (75-80 %) luego del aislamiento correspondiente.

5.1.2. Condensaciones aldólicas de las β -C-glicosilcetonas

Para obtener los C-cinamoilglicósidos se empleó la reacción de condensación aldólica de las β -C-glicosil cetonas con diferentes aldehídos aromáticos conteniendo la función fenólica o metoxiarilo (Esquema 19). Como catalizador de la reacción, inicialmente, se utilizó pirrolidina. Este catalizador básico había sido descrito en la bibliografía en reacciones similares.¹⁵⁰ Bajo estas condiciones de reacción se obtuvo la formación de los compuestos carbonílicos α,β -insaturados como isómeros geométricos *E* con buenos rendimientos en muchos de los casos. En la tabla 19 pueden observarse los resultados obtenidos con los diferentes compuestos carbonílicos empleados y los aldehídos aromáticos que contienen la función fenólica, en la tabla 20 pueden observarse los resultados obtenidos para los mismos compuestos carbonílicos pero con los diferentes aldehídos aromáticos que contienen la función metoxiarilo.



Esquema 19. (i) DCM, t.amb.

Tabla 19. Síntesis de C-cinamoilglicósidos derivados de fenol^c.

Cetona	Benzaldehído	Tiempo reacción (h)	Prod.	Rend. (%)
C-glucosil (GC3)	2-hidroxi	48	F1	-
	3-hidroxi	1,5	F2	68
		24 ^b		NR ^a
	4-hidroxi	48	F3	44
3,4-dihidroxi	48	F4	-	
C-galactosil (GC4)	2-hidroxi	48	F5	-
	3-hidroxi	4	F6	62
		24 ^b		NR ^a
	4-hidroxi	48	F7	40
3,4-dihidroxi	48	F8	-	

a) No se observa formación de productos

b) Reacción utilizando trietilamina como catalizador.

c) 1 mmol de metilcetona, 1,1 mmol de aldehído, 0,2 mmol de pirrolidina, 4 mL de DCM y t. amb.

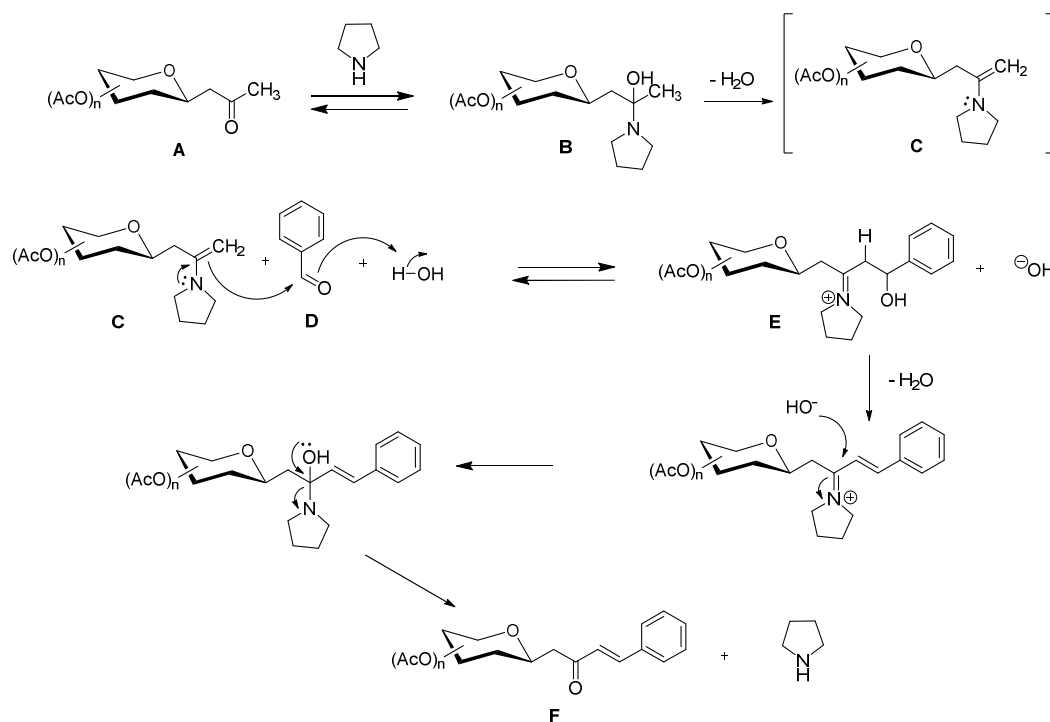
Tabla 20. Síntesis de C-cinamoilglicósidos derivados de metoxiarilo^a.

Cetona	Aldehído	Tiempo reacción (h)	Prod.	Rend. (%)
C-glucosil (GC3)	3-metoxibenzaldehído	78	M1	76
	veratraldehído	23	M2	66
	6-metoxi-2-naftaldehído	71	M3	53
C-galactosil (GC4)	3-metoxibenzaldehído	70	M4	72
	veratraldehído	24	M5	65
	6-metoxi-2-naftaldehído	47	M6	52

a) 1 mmol de metilcetona, 1,1 mmol de aldehído, 0,2 mmol de pirrolidina, 4 mL de DCM y t. amb.

Una explicación probable para la formación de los C-cinamoilglicósidos es que sea una condensación *via* enamina (Esquema 20), por lo que la β -C-glicosil cetona peracetilada (**A**) y la pirrolidina conducen a la formación de una enamina intermediaria (**C**), a través de la formación de la carbinolamina (**B**). Posteriormente

la enamina formada reacciona con el aldehído aromático (**D**) correspondiente para generar el ión iminio (**E**), el cual luego por deshidratación genera el correspondiente C-cinamoilglicósido (**F**) y la regeneración de la pirrolidina.



Esquema 20

La reacción de las β -C-glicosilcetonas **GC3** y **GC4** con el 2-hidroxibenzaldehído no proporcionó los productos esperados. De la mezcla de reacción fue posible recuperar los reactivos correspondientes sin hallarse formación de productos. Ese hecho puede explicarse en base al impedimento estérico que ocasiona la presencia del grupo oxhidrilo en la posición orto del anillo aromático. En la bibliografía se han descrito resultados similares empleando derivados del 2-hidroxibenzaldehído en condensaciones aldólicas con C-glicosilpropanonas.¹⁵¹

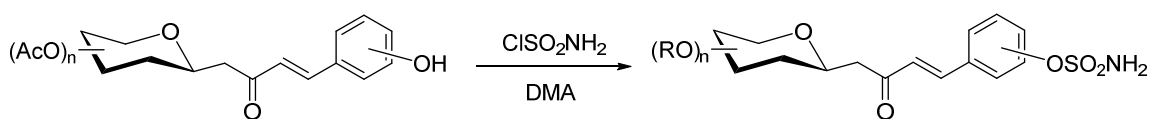
Posteriormente se intentó la reacción de las cetonas glicosídicas con el 3,4-hidroxibenzaldehído bajo las mismas condiciones de reacción. El análisis de la mezcla de reacción por CCD permitió observar que la reacción avanzaba lentamente y que luego de 24 horas de reacción, los reactivos habían sido consumidos en forma completa con la formación de un compuesto

extremadamente polar. Al eliminar el solvente en evaporador rotativo se obtuvieron, tanto para la D-glucosil- como para la D-galactosilpropanona, polímeros rojizos. El análisis de los mismos por ^1H y ^{13}C RMN mostró espectros extremadamente complejos con una gran cantidad de señales, lo cual impidió su adecuada interpretación.

El intento de reemplazar la pirrolidina por trietilamina como base en la condensación aldólica, no produjo resultados positivos ya que no fue posible obtener los C-cinamoilglicósidos (Tabla 19).

5.1.3. Sulfamoilación de los C-cinamoilglicósidos derivados del fenol

La serie de C-cinamoilglicósidos derivados del fenol fueron convertidos en los sulfamatos correspondientes mediante una reacción simple de sulfamoilación (Esquema 21), obteniéndose los C-glicosilsulfamatos en tiempos cortos de reacción y con buenos rendimientos (Tabla 21).



Esquema 21

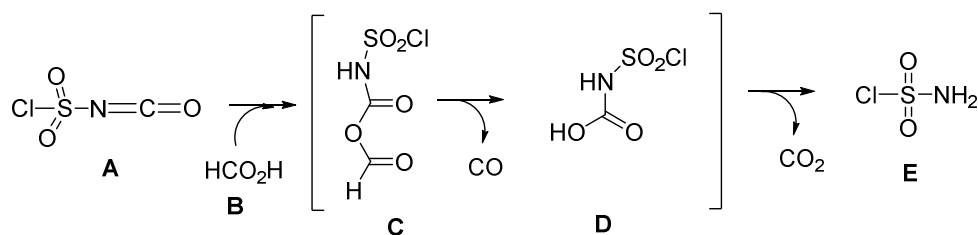
Tabla 21. Síntesis de C-glicosilsulfamatos^a.

C-glicosilfenol	Tiempo reacción (h)	Producto	Rend. (%)
C-galactosil-3-hidroxi	1,5	GS1	87
C-galactosil-4-hidroxi	1,5	GS2	60
C-glucosil-3-hidroxi	1,5	GS3	57
C-glucosil-4-hidroxi	1,5	GS4	74

a) 1 mmol de C-cinamoilglicósido, 3,8 mmol de cloruro de sulfamoilo, 3 mL de DMA, agitación magnética y 0°C → t. amb.

Para la reacción de sulfamoiación se utilizó el cloruro de sulfamoilo como sulfamoiante, si bien no es una reacción compleja, tuvo que ser optimizada, ya que en un primer intento, se trató de sintetizar los glicosil sulfamatos generando el cloruro de sulfamoilo *in situ* a partir de ácido fórmico e isocianato de clorosulfonilo, pero desafortunadamente, no se observó reacción. Por lo tanto, se optó por preparar el cloruro de sulfamoilo a partir de isocianato de clorosulfonilo y ácido fórmico como lo describe Appel.¹⁴⁶

En el esquema 22 se muestra la formación del cloruro de sulfamoilo (**E**), para la cual se hace reaccionar el isocianato de clorosulfonilo (**A**) con ácido fórmico (**B**), reacción que genera en una primer instancia un anhídrido intermediario (**C**), el cual por medio de una descarboxilación genera un ácido carbámico intermedio (**D**), que finalmente por una nueva pérdida de dióxido de carbono, en este caso, genera el cloruro de sulfamoilo deseado (**E**).



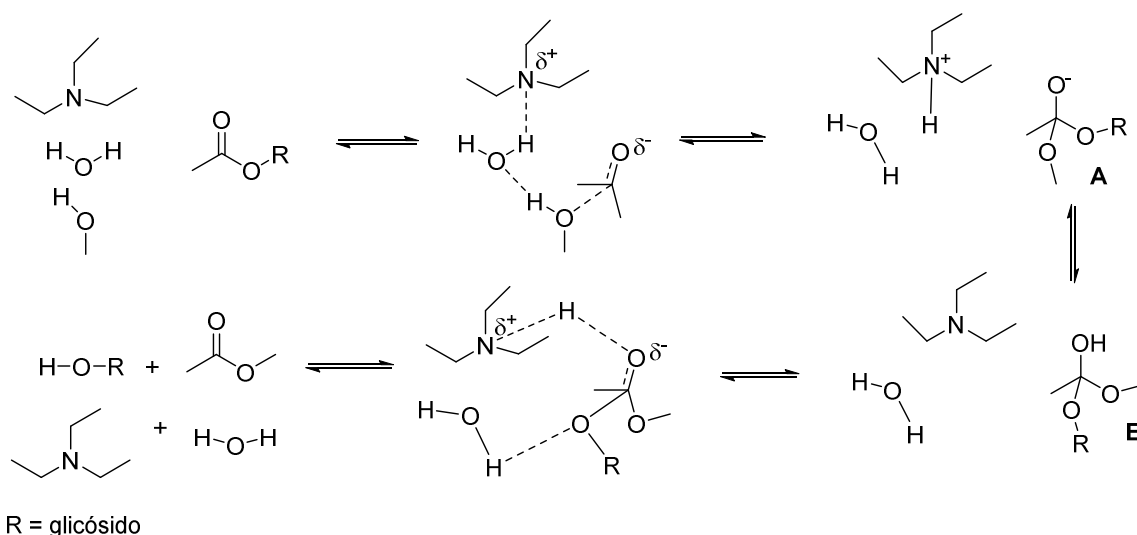
Esquema 22. Formación de cloruro de sulfamoilo.

Finalmente los sulfamatos deseados se prepararon mediante el procedimiento descrito por Winum¹⁵² para fenoles, empleando la reacción de los correspondientes C-glicosilfenoles con cloruro de sulfamoilo en *N,N*-dimetilacetamida como disolvente bajo atmósfera inerte, generando los productos esperados.

5.1.4. Desprotección de los C-cinamoilglicósidos peracetilados

Con el objetivo de obtener compuestos que tuvieran mayor solubilidad en el medio acuoso, los C-glicósidos fueron desprotegidos empleando una solución acuosa de trietilamina y metanol. El mecanismo propuesto para este tipo de desprotección es

mostrado en el esquema 23. En este caso un intercambio de protones entre trietilamina, agua y metanol hace que este último adquiera un carácter nucleofílico lo cual le permite adicionarse al doble enlace C=O del éster, el cual contiene el apéndice O-glicosídico. Dicha adición conlleva a la formación del dialcoxióxido **A**, el ión trietilamonio y agua. Una abstracción de protón desde el ión trietilamonio por parte del anión **A** genera dialcoxiol **B** y trietilamina. Un nuevo intercambio protónico entre trietilamina, agua y **B** genera la eliminación del apéndice O-glicosídico. En este paso también se forma acetato de metilo y se regeneran la trietilamina y el agua.¹⁵³



Esquema 23

Por lo tanto, según el mecanismo mostrado se puede pensar que el metanol en exceso actúa como reactivo en este tipo de deacetilación, en cambio la trietilamina y el agua, que se usan en cantidades menores, desempeñan el papel de catalizadores.

Mediante esta reacción de deacetilación luego del aislamiento se obtuvieron en todos los casos los compuestos esperados con muy buenos rendimientos (80-90%).

5.2. Análisis de los C-cinamoilglicósidos obtenidos empleando ^1H y ^{13}C RMN

Dada la similitud de los compuestos analizados, se describirán los espectros de resonancia magnética nuclear del glicósido **F2**, tomándolo como modelo. En el espectro de ^1H RMN (Figura 22) es posible observar cuatro singletes ubicados alrededor de 2 ppm que integran para 12 hidrógenos, que se corresponden con los metilos de los grupos acetilos. Luego se observan dos dobles dobles en 2,68 y 3,02 ppm, correspondientes a dos protones unidos a un metileno, los cuales, dado su ubicación a campos altos, deben estar unidos a un carbono deficiente en electrones.

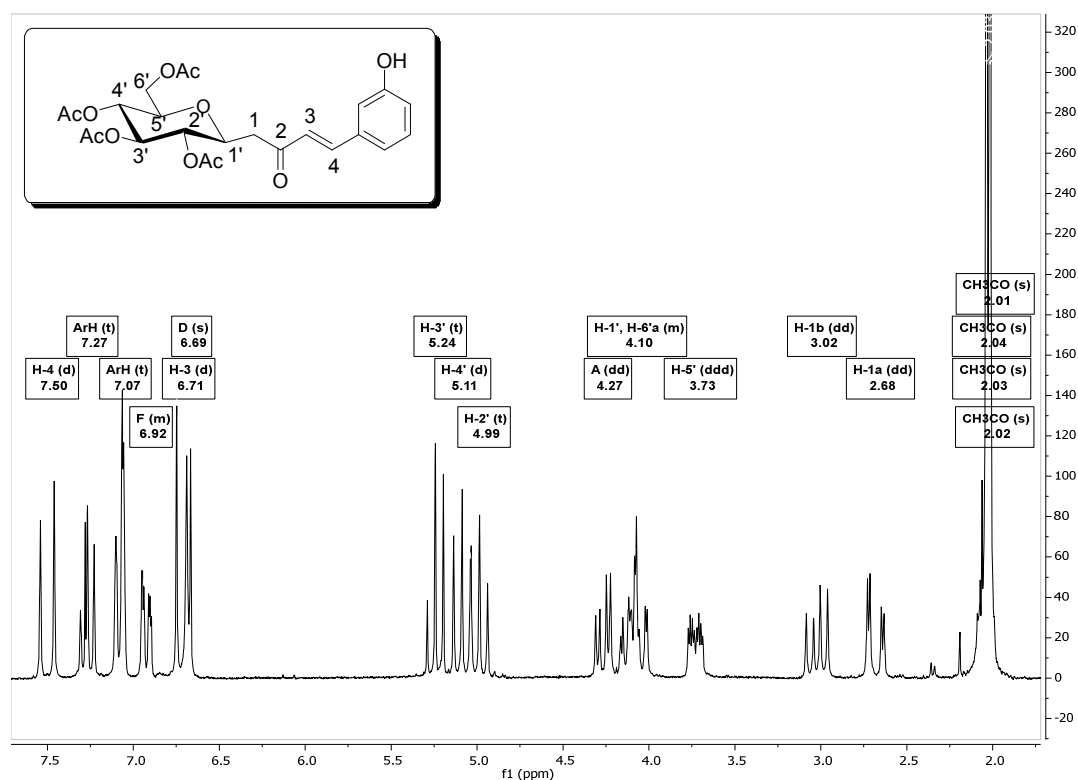


Figura 22. Espectro de ^1H RMN del C-cinamoilglicósido **F2**.

De allí surge su asignación a los H del C-1. Del espectro de correlación homonuclear (Figura 25) se puede deducir que estos protones se encuentran relacionados con el protón del carbono anomérico que se presenta como parte de un multiplete a 4,09 ppm. Continuando con el análisis del espectro de ^1H RMN se observa un doble doblete a 3,73 ppm, correspondiente a un protón, el cual se acopla según puede observarse del espectro COSY con dos protones correspondientes a un metileno y con otro protón. Observando la estructura del compuesto, el hidrógeno analizado se corresponde con el H-5', mientras que el metileno puede identificarse con los H-6', uno de ellos se presenta dentro del multiplete con el H-1 (4,10 ppm) y el otro como un doble doblete (4,27 ppm). El protón restante corresponde al H-4' que se observa como un doblete ancho ubicado a 5,11 ppm.

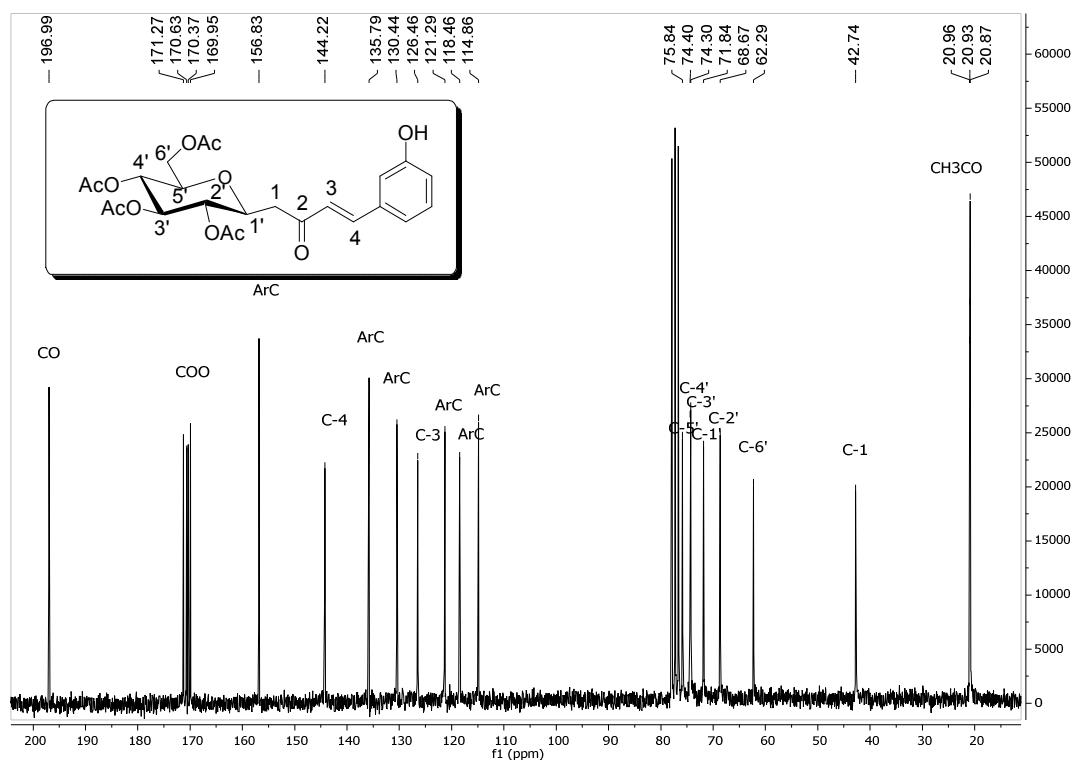


Figura 23. Espectro de ^{13}C RMN del C-cinamoilglicósido F2.

Continuando con el análisis del espectro se encuentra un triplete (4,99 ppm) correspondiente a un protón que se correlaciona con el protón del carbono

anomérico, por lo cual se trata del H-2'. En este caso es importante analizar la constante de acoplamiento que presenta este triplete. El valor elevado de esta constante de acoplamiento (9,3 Hz) indica que los protones adyacentes se encuentran en posición axial en el anillo del carbohidrato.¹ Esta observación permite corroborar que el compuesto sintetizado presenta la configuración β en el carbono anomérico. Si este no fuera el caso se habría encontrado una constante de acoplamiento menor entre el hidrógeno del C-2' y el anomérico dado que los protones estarían ubicados en posiciones más cercanas.

Luego encontramos un triplete ubicado a 5,24 ppm, que por su desplazamiento químico y su constante de acoplamiento, corresponde al H-3'. En la zona de 7 ppm encontramos los protones correspondientes al anillo aromático y además dos dobletes con una constante de acoplamiento de 16,2 Hz (6,71 ppm y 7,50 ppm) que corresponde a los hidrógenos olefínicos H-3 y H-4. El valor de 16,2 Hz muestra que el doble enlace exhibe la conformación *trans*.

A manera de resumen se presentan en la figura 24 las correlaciones entre hidrógenos explicadas anteriormente.

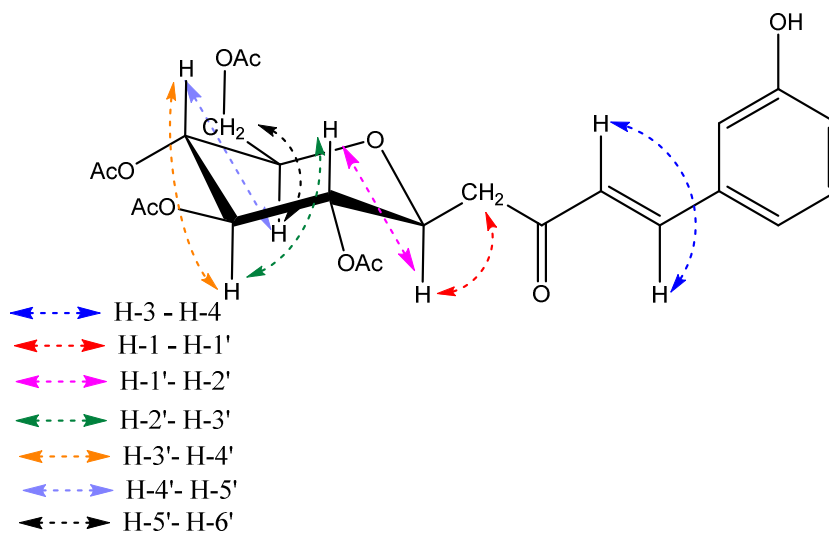


Figura 24. Correlaciones H-H deducidas del espectro COSY del compuesto **F2** (para mayor claridad no se muestran las correlaciones entre hidrógenos geminales).

¹ El uso de este valor de constante de acoplamiento en la ecuación de Karplus modificada por Altona y Haasnot (Coxon, B. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **2009**, 62, 17) da como resultado que los hidrógenos involucrados exhiben ángulos de torsión H-C-C-H de alrededor de 157° consistente con la disposición axial.

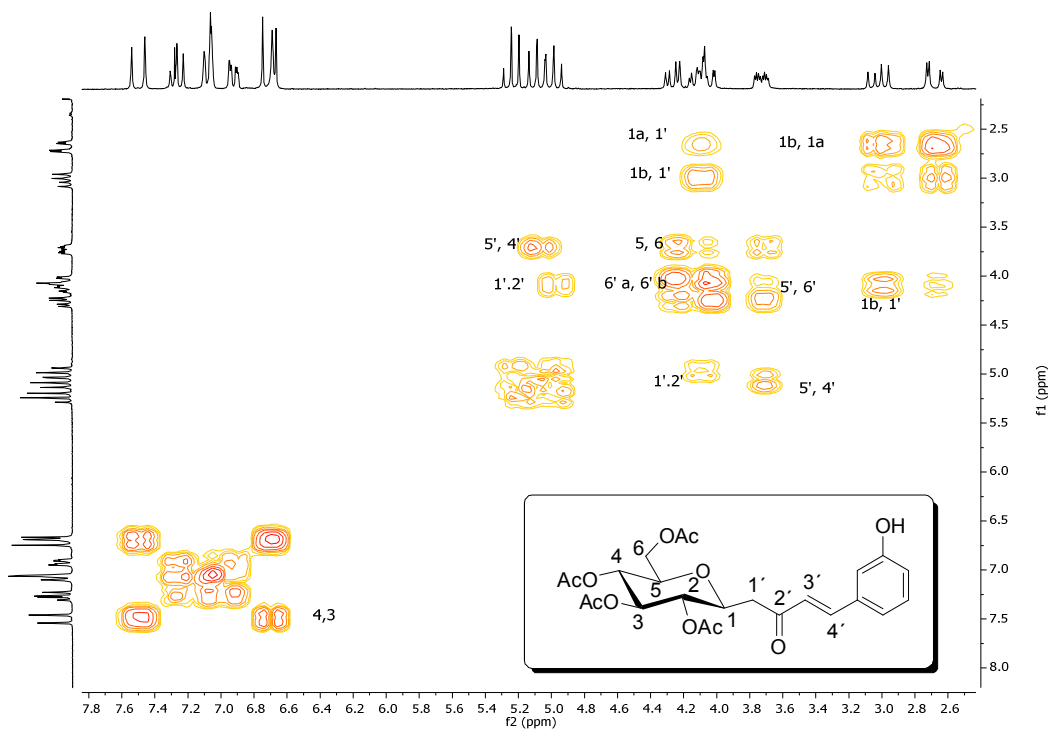


Figura 25. Espectro de correlación homonuclear (COSY) del C-cinamoilglicósido F2.

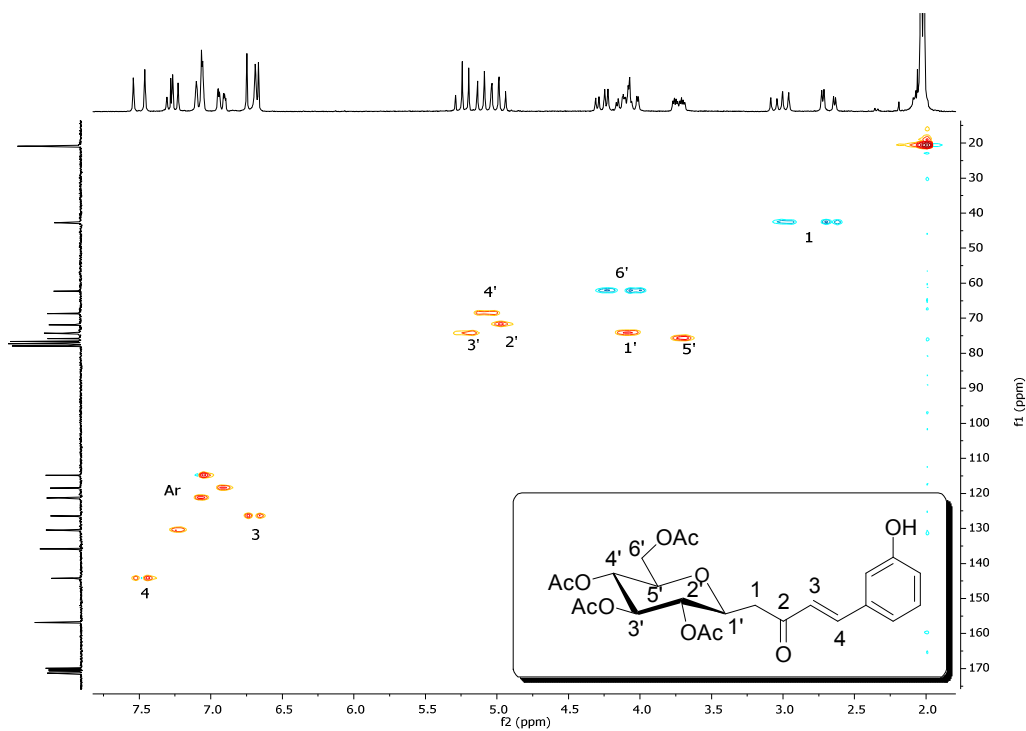
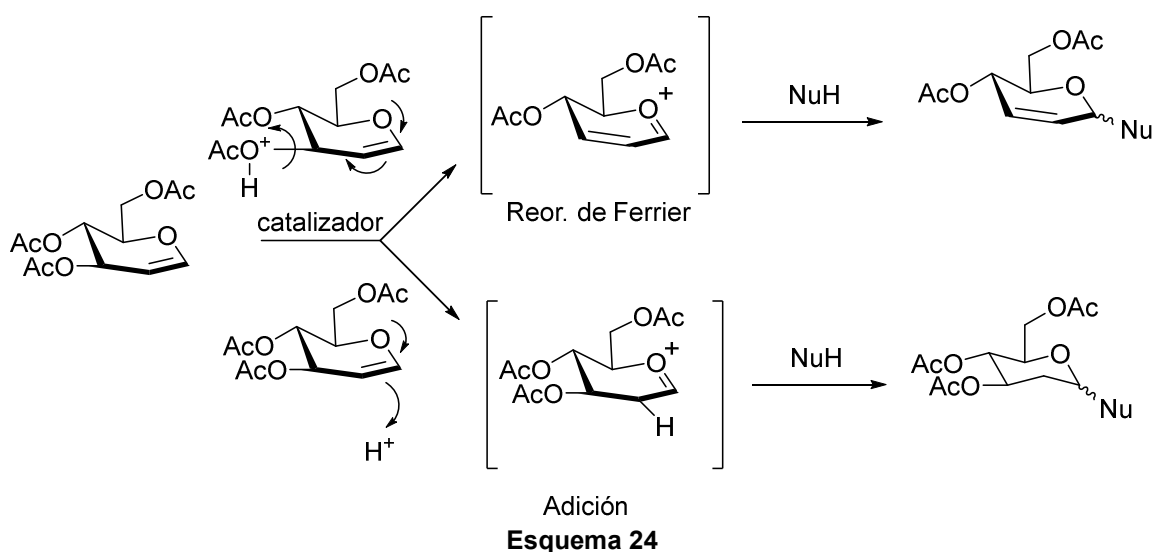


Figura 26. Espectro de correlación heteronuclear (HSQC) del C-cinamoilglicósido F2.

Otra señal interesante es el singulete a 6,69 ppm que como puede observarse en el espectro de correlación HSQC (Figura 26), no tiene ningún carbono asociado por lo cual debe tratarse del correspondiente al OH fenólico. Cabe mencionar que utilizando este espectro de correlación se completó la asignación de los distintos carbonos que presenta la molécula.

5.3. Obtención de *N*-glicosilsulfonamidas

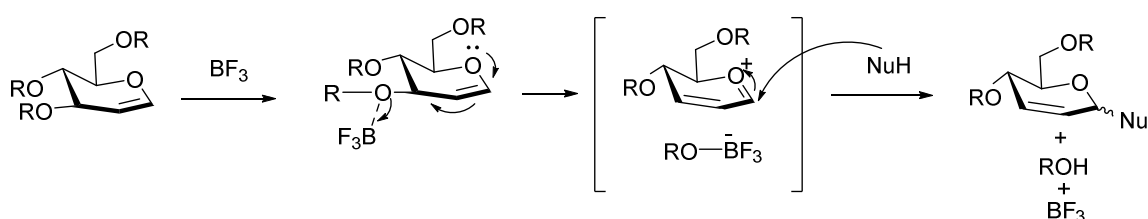
En la adición de nucleófilos a glicales pueden formarse dos tipos de productos dependiendo las condiciones de reacción. Uno de ellos es consecuencia de un mecanismo de adición y el otro ocurre a través de un reordenamiento alílico denominado reordenamiento de Ferrier (Esquema 24).



En general, los grupos protectores de los glicales son determinantes en la velocidad de glicosidación.^{154,155} Se ha propuesto que los grupos donores de electrones (ej. bencil éteres) facilitan el mecanismo de adición, mientras que por el contrario, la existencia de grupos atradores de electrones (ej. acetatos) hacen al ion oxonio relativamente menos estable, ya que el reordenamiento alílico tiene

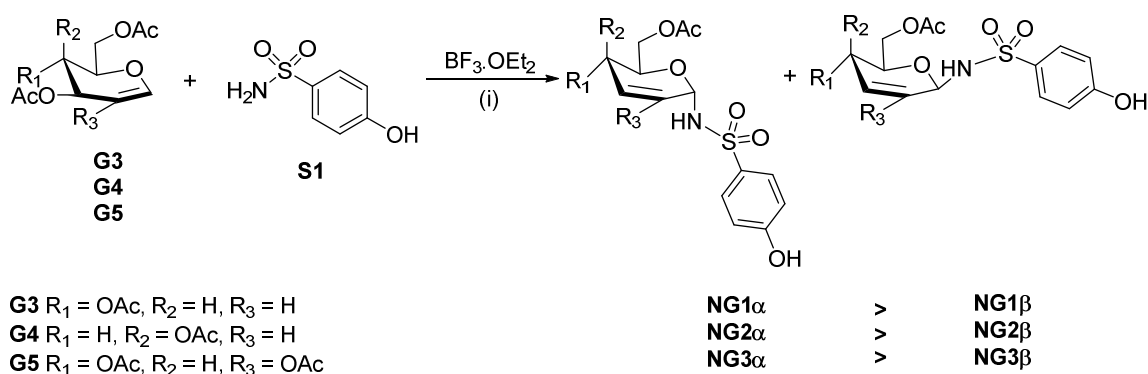
ventaja de formar un ion oxónio α , β conjugado.¹⁵⁶ Esta diferencia puede ser explicada en base a la estabilización del intermediario catiónico.

En presencia de ácidos de Lewis, los glicales pierden los grupos presentes en la posición alílica mediante una reacción de desplazamiento nucleofílico seguida de un reordenamiento alílico o de Ferrier, resultando en la formación de glicósidos 2,3-insaturados (Esquema 25).



Esquema 25

Con el objetivo de obtener glicosil sulfonamidas que posean un oxhidrilo fenólico se realizó la adición de hidroxibencenosulfonamidas a diferentes derivados de glicales (D-glucal y D-galactal) acetilados en presencia de $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ como catalizador (Esquema 26).



Esquema 26. (i) CH_3CN , t. amb.

Tabla 22. Síntesis de *N*-glicosilsulfonamidas^a.

Glical	Tiempo reacción (h)	Producto	Rend. (%)
Tri-OAc-glucal (G3)	1,5	NG1	51
Tri-OAc-galactal(G4)	2	NG2	50
Tetra-OAc-glucal(G5)	5	NG3	52

a) 1 mmol de glical, 1,1 mmol de *p*-hidroxibencensulfonamida, 0,2 mL de BF₃EtO₂ (1% mmol) en DCM, 2,5 mL de CH₃CN, agitación magnética y t. amb.

Como se observa en la tabla 22 se obtuvieron las diferentes *N*-glicosilsulfonamidas con buenos rendimientos y en cortos tiempos de reacción, obteniendo una relación α/β 6:4. Al ver las relaciones anoméricas obtenidas en los productos, se observa claramente una alta predominancia en la formación del anómero α . Esta preferencia se debe a la prevalencia del control cinético en las sulfonamidoglicosilaciones. Es decir, este anómero α 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 descrito en detalle en una publicación en la cual se estudió la estabilidad conformacional de una glicosilsulfonamida.¹⁵⁷

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) (Figura 27). 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. Pero, como la conformación del anillo en las *N*-glicosil sulfonamidas 2,3-insaturadas es casi plana,¹⁵⁸ 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.¹⁵⁹

En resumen, no sólo la interacción orbital $n_O \rightarrow \sigma^*_{C-N}$ (efecto *endoanomérico*) 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 .

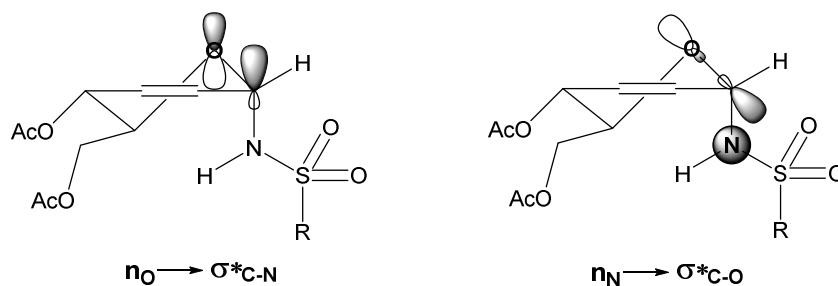


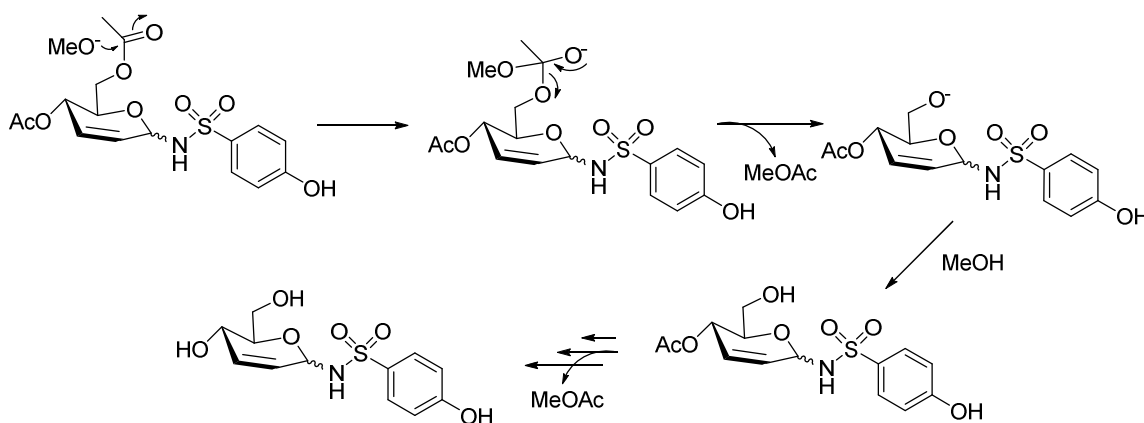
Figura 27. Efectos endo- y exo-anoméricos en α -sulfonamidoglicósidos 2,3-insaturados.

5.3.1. Deacetilación de las *N*-glicosilsulfonamidas en condiciones Zemplen

Con el objetivo de obtener compuestos que tuvieran mayor solubilidad en el medio acuoso, las *N*-glicosilsulfonamidas fueron desprotegidos empleando condiciones Zemplen (MeONa/MeOH), ya que esta es una forma eficiente de remoción de los grupos *O*-acetilos protectores de carbohidratos por tratamiento de los sustratos *O*-acetilados en metanol con una cantidad catalítica de metóxido de sodio a temperatura ambiente.

Esencialmente, los grupos *O*-acetilos de los carbohidratos forman acetato de metilo con el metanol, de modo que esta reacción también es llamada transesterificación Zemplen.

Comparado con la hidrólisis de un éster usando una base tal como hidróxido de sodio, que requiere una cantidad estequiométrica de base para cada grupo éster y genera una gran cantidad de acetato de sodio, la deacetilación en estas condiciones utiliza solo una cantidad catalítica de metóxido de sodio. En el esquema 27 puede observarse el mecanismo de reacción.



Esquema 27

Mediante esta forma de deacetilación en todos los casos, luego del aislamiento, se obtuvieron los compuestos esperados con muy buenos rendimientos (80-85%).

5.4. Análisis de las *N*-glicosilsulfonamidas obtenidas empleando ^1H y ^{13}C RMN

A modo de ejemplo y teniendo en cuenta la similitud de las nuevas *N*-glicosilsulfonamidas, se va a analizar el espectro de la 4,6-Di-*O*-acetil-2,3-dideoxi-D-eritro-hex-2-enopiranosil *p*-hidroxibencensulfonamida (**NG1**).

Cabe destacar que las señales de los distintos protones se ven “duplicadas”, lo cual es lógico debido a que la mezcla anomérica no pudo ser separada, correspondiendo las señales de menor intensidad e integración a las del anómero β , ya que es el minoritario, siendo la relación anomérica α/β 61:39.

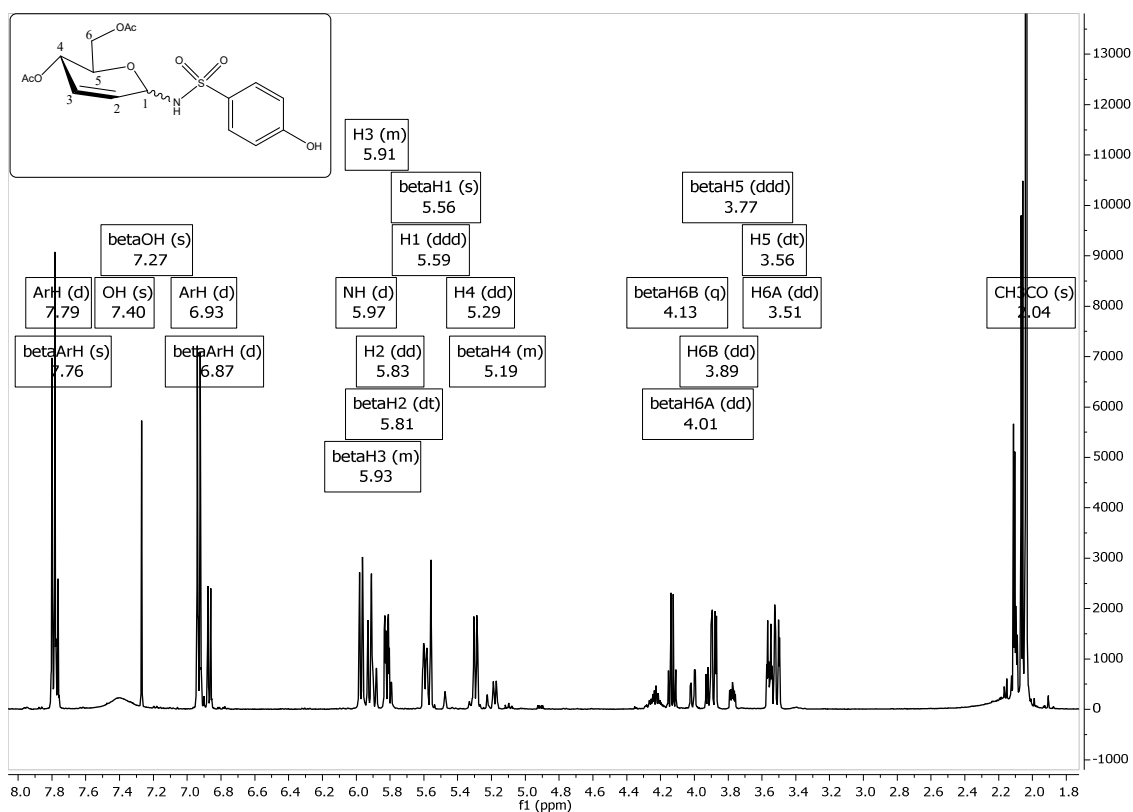


Figura 28. Espectro ^1H RMN del compuesto NG1.

Para el anómero α vemos en el espectro ^1H RMN una serie de singletes ubicados alrededor de 2,04 ppm que integran cada uno para 3 hidrógenos, que corresponde a los hidrógenos de los grupos acetilos de la molécula, luego a 3,51 ppm vemos un doble doblete que se corresponde a uno de los hidrógenos (H-6) del metileno, por correlación en el COSY, siendo el hidrógeno restante el que aparece a 3,89 ppm también como un doble doblete que se correlaciona con el doble triplete ubicado a 3,56 ppm en el espectro bidimensional de correlación homonuclear al H-5, y se correlacionan en el HSQC con la señal de 62,22 ppm, asignándola como C-6; en el mismo espectro bidimensional se ve una señal a 66,59 ppm que se correlaciona con dicho H-5 en consecuencia se la asigna como C-5.

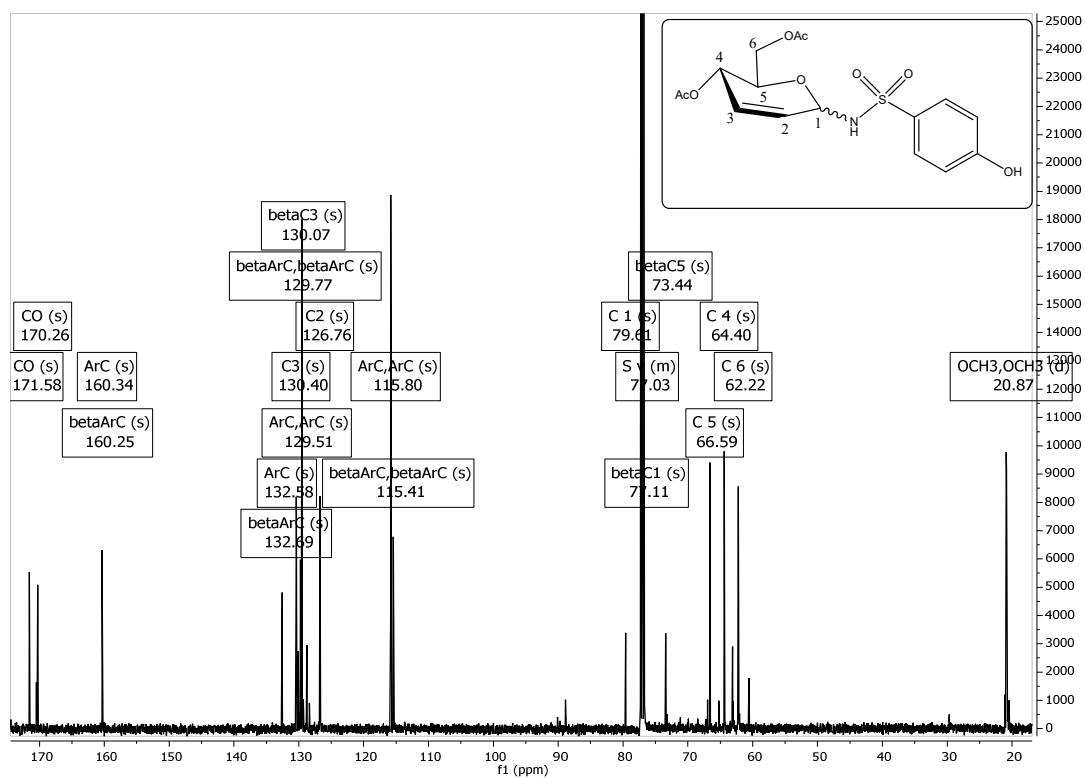


Figura 29. Espectro ^{13}C RMN del compuesto NG1.

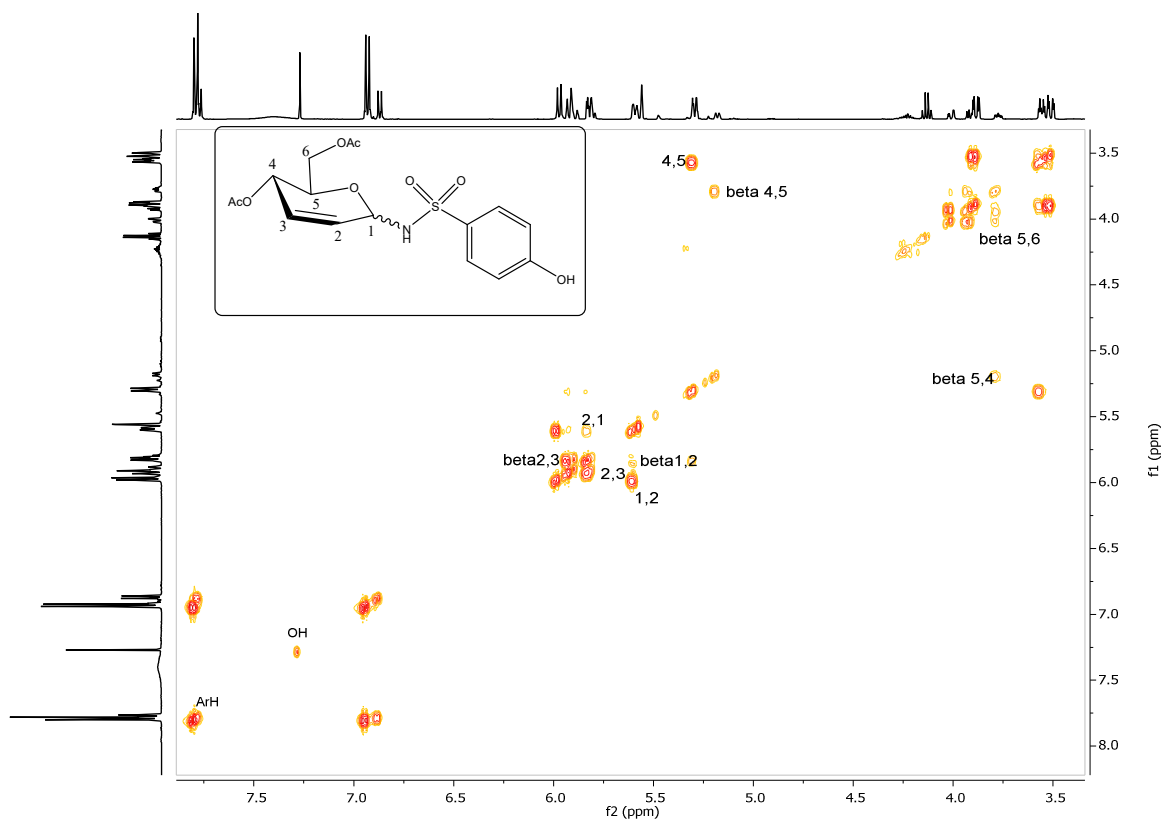


Figura 30. Espectro de correlación homonuclear (COSY) del compuesto NG1.

Siguiendo con el análisis, se ve a 5,29 ppm un doble doblete que integra para un protón que se correlaciona en el COSY tanto con el doble doblete a 3,56 ppm (H-5) como con el multiplete a 5,91 ppm que es el H-3, por correlación y por desplazamiento químico, este a su vez se correlaciona con la señal a 64,40 ppm en el HSQC, por lo que es el C-4.

Continuando con el análisis del espectro vemos un doble doblete a 5,59 ppm que se correlaciona con el doble doblete a 5,83 ppm en el COSY y con la señal a 79,61 ppm en el HSQC, por lo que se corresponde con el hidrogeno del C anomérico, el doble doblete es el hidrogeno del C-2. Luego aparece un multiplete a 5,91 ppm que por correlación en el espectro de correlación homonuclear se deduce que es el H-3, y con el HSQC la señal a 130,40 ppm se le asigna el C-3. El doblete siguiente, que integra para un hidrógeno y se ubica a 5,97 ppm, por correlación con el H-1 (5,59 ppm) en el espectro bidimensional homonuclear, y que no muestra correlación en el HSQC, se determina que es el H unido al N del grupo sulfonamida.

Finalmente, entre 6,8 ppm y 7,8 ppm vemos la zona de los protones aromáticos, y en esta zona aparecen un hidrógeno que se corresponde al OH fenólico, ya que no se corresponde con ningún carbono en el espectro de correlación heteronuclear y también por su desplazamiento químico.

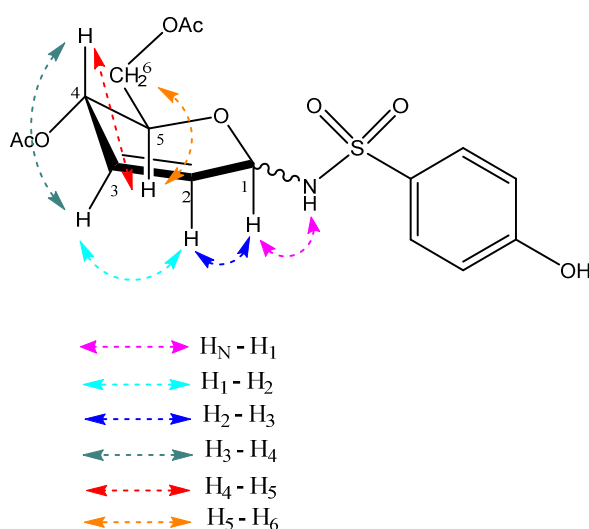


Figura 31. Correlaciones H-H deducidas del espectro COSY del compuesto **NG1**.

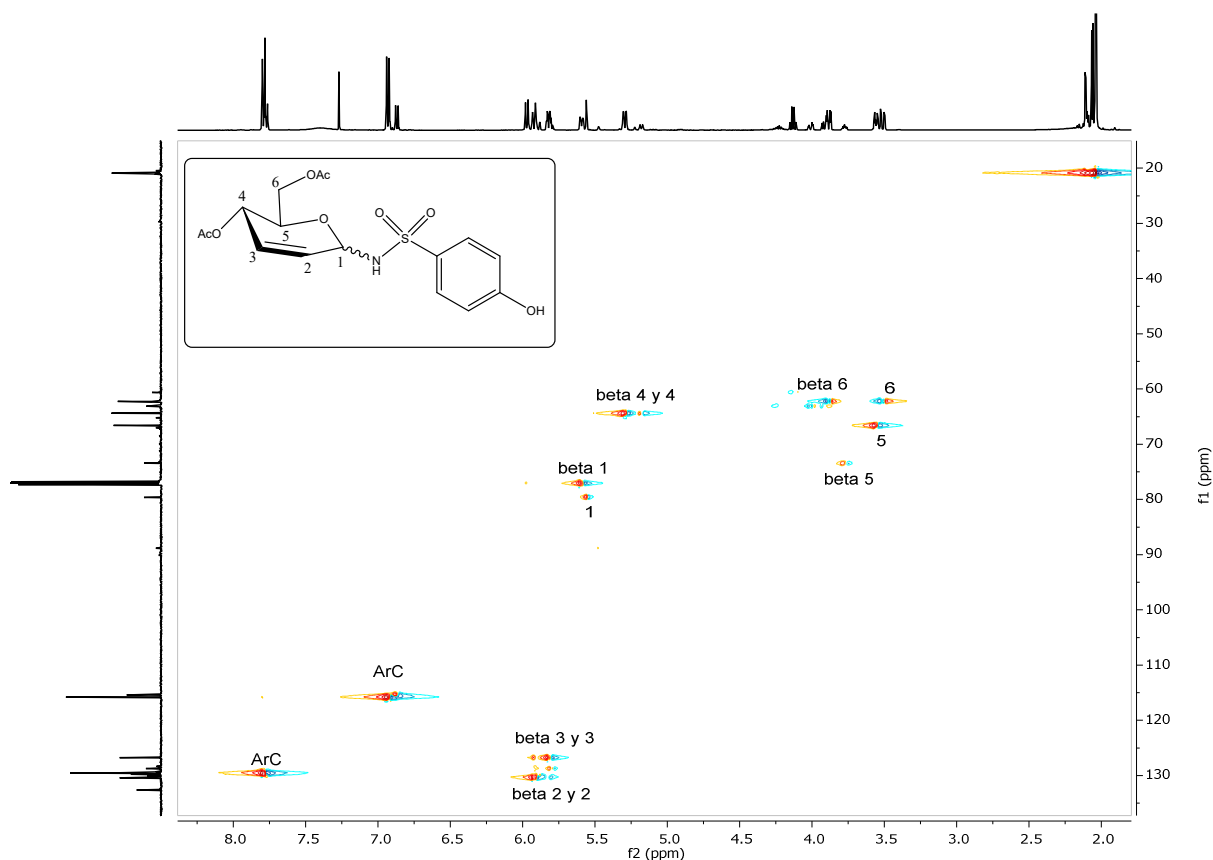
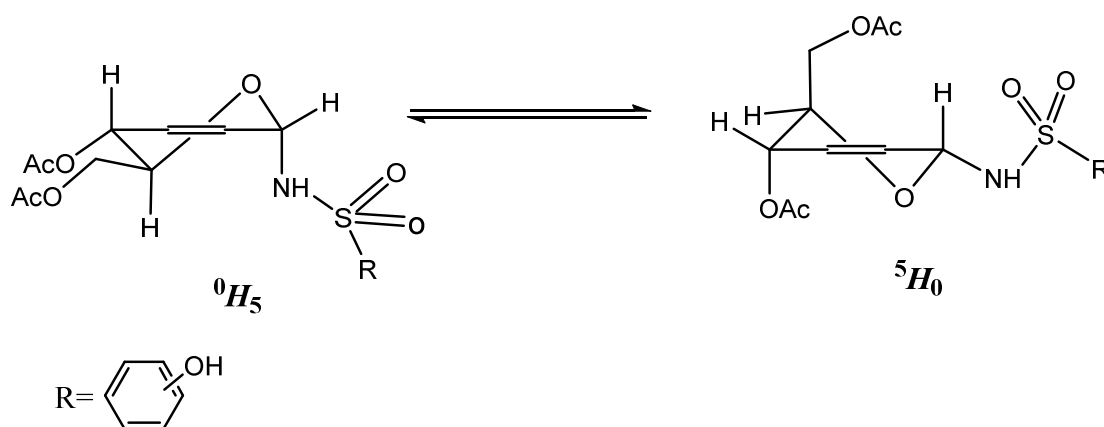


Figura 32. Espectro de correlación heteronuclear (HSQC) del compuesto NG1.

Para el caso del anómero β vemos las señales en el espectro en el mismo orden que para el anómero mayoritario α .

Un detalle importante son las constantes de acoplamiento J , que están directamente relacionadas con la magnitud de las fuerzas de enlace C-1 e H-1 y pueden correlacionarse con la operación de diferentes interacciones orbitálicas. El compuesto sustituido axialmente muestra la menor constante de acoplamiento.¹⁶⁰⁻¹⁶² Es así que en este sistema hex-2,3-enopiranosilo como el sintetizado es posible tener el equilibrio conformacional entre las formas 0H_5 y 5H_0 , (Esquema 28). El análisis de los espectros de RMN protónica muestran un valor de $J_{3,4} = 1,5$ Hz que concuerda con el hecho de que el conformero 0H_5 sea el mayoritario.



Esquema 28

5.5. Actividad de los C-cinamoilglicósidos frente a las distintas anhidrasas carbónicas, a *Mycobacterium tuberculosis* y a *Brucella suis*

Uno de los enfoques más exitosos para diseñar IACs dirigido a todas las isoformas conocidas hasta hoy, es el denominado metodología del apéndice. Un muy buen ejemplo de tales apéndices está constituido por carbohidratos, que representan una amplia gama de quimiotipos.^{106,107} Siguiendo esta metodología se sintetizaron derivados de fenoles, sulfamatos o metoxifenilos, unidos a carbohidratos a través de una cadena carbonada (C-glicósidos) o de un grupo sulfonamido (N-glicosilsulfonamidas).

Tanto los fenoles como los sulfamatos aromáticos han demostrado inhibir a la anhidrasa carbónica presente en patógenos como *Mycobacterium tuberculosis* y *Brucella suis*, mientras que el grupo metoxifenilo es un inhibidor moderado de las isozimas humanas y ha mostrado poseer un novedoso mecanismo de inhibición.⁷⁰ Recientemente se ha demostrado que algunos C-glicósidos, aún sin poseer funcionalidades que inhiban a la anhidrasa carbónica, han resultado promisorios agentes quimioterapéuticos contra la tuberculosis.¹⁶³

En los últimos años se ha incrementado el desarrollo de glicomiméticos debido a la inestabilidad de los carbohidratos frente a enzimas y diferentes condiciones de reacción.¹⁰³ La principal modificación ha sido el reemplazo del oxígeno anomérico

por otro átomo dando lugar a C- y N-glicósidos.¹⁰⁴ Este tipo de análogos presenta alta estabilidad frente a la hidrólisis enzimática o química, manteniendo su actividad biológica prácticamente inalterada.

En esta sección se discutirán los datos de inhibición de las distintas anhidrasas carbónicas humanas (hAC), de las isoformas presentes en la *Mycobacterium tuberculosis* (mtAC) y las presentes en la *Brucella Suis* (bsAC). Estas determinaciones fueron llevadas a cabo por el grupo del Dr. Claudiu T. Supuran (Universidad de Florencia) analizando la hidratación del CO₂ catalizada por las diferentes isoformas de la anhidrasa carbónica en presencia de los compuestos sintetizados y comparando la velocidad de la misma con la encontrada sin el agregado de los C-glicósidos. Es importante destacar que cuanto menor sea el valor de la constante inhibitoria encontrada (K_i) mayor es la actividad de los compuestos estudiados. También se muestran los resultados de la actividad de los compuestos obtenidos frente a la *Mycobacterium tuberculosis*. Este estudio fue llevado a cabo por el Dr. Ricardo Morbidoni en la Universidad Nacional de Rosario. Por otro lado los estudios de la actividad de los compuestos frente a la *Brucella suis* fueron llevados a cabo por el Dr. Jean-Yves Winum en la Universidad de Montpellier, Francia.

5.5.1. Actividad inhibitoria de los glicomiméticos derivados del fenol

Anhidrasas carbónicas humanas

Dentro de los inhibidores de las ACs se destacan los fenoles dado que su interacción con la anhidrasa carbónica es completamente diferente a las encontradas con los inhibidores tradicionales, por lo cual se constituyen en moléculas altamente interesantes para el desarrollo de nuevos inhibidores. Además, pese a que la potencial actividad biológica de los fenoles sintéticos y aquellos hallados en la naturaleza es ampliamente conocida (principalmente como

antioxidantes), los mismos sólo han sido estudiados como inhibidores de las ACs en los últimos años.

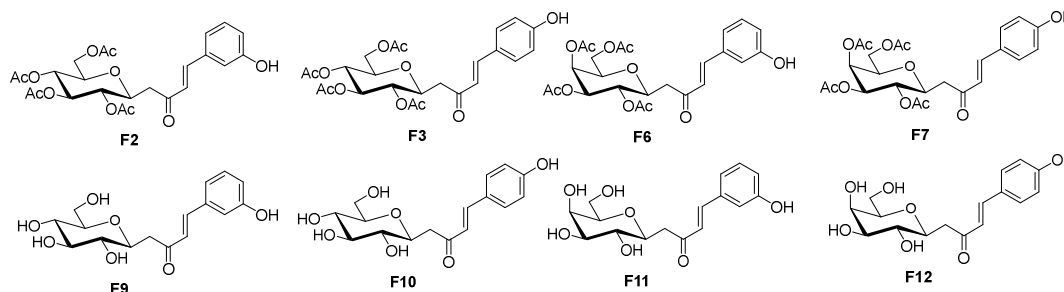


Figura 33

Tabla 23. Datos de inhibición y selectividad de las distintas α -ACs con los C-cinamoilglicósidos^a

C-glicósido	K _i (μ M) ^b				Selectividad			
	hAC I	hAC II	hAC IX	hAC XII	I/IX	I/XII	II/IX	II/XII
F2	8,5	7,0	5,2	6,7	1,63	1,27	1,35	1,04
F3	5,7	3,9	5,9	6,2	0,97	0,92	0,66	0,63
F6	5,1	7,1	3,3	3,9	1,54	1,31	2,15	1,82
F7	9,3	5,5	2,9	4,2	3,21	2,21	1,90	1,31
F9	6,8	7,8	4,5	7,4	1,51	0,92	1,73	1,05
F10	3,7	8,8	8,2	8,7	0,45	0,42	1,07	1,01
F11	3,6	3,1	9,2	8,4	0,39	0,43	0,34	0,37
F12	5,5	6,8	8,2	6,8	0,67	0,81	0,83	1
Fenol	10,2	5,5	8,8	7,2	1,15	1,42	0,62	0,76

a) Determinaciones realizadas por el Dr. C. T. Supuran, Universidad de Florencia, Italia

b) Errores en el rango del 5-10 % del valor reportado, de 3 determinaciones diferentes

*Todas las ACs son recombinantes

Podemos observar en la tabla 23 que el perfil de inhibición para las α -ACs de los C-glicósidos peracetilados que incorporan la función fenólica no muestra grandes variaciones. Estas pequeñas variaciones en los valores K_i para todas las isozimas, lleva a índices de selectividad de aproximadamente 1,0, es decir, no son inhibidores de ACs selectivos. Para el caso de los glicósidos desprotegidos se encuentra un perfil de inhibición más complejo. Debe observarse que todos los C-cinamoilglicósidos fueron eficientes inhibidores de hAC I y hAC II en un rango

micromolar, mostrando un perfil de inhibición similar para las dos isoformas asociadas a procesos tumorales (hAC IX y XII), siendo también inhibidores en un rango micromolar para cada una de ellas. Si bien esta serie de C-glicósidos no mostraron selectividad para estas ACs asociadas con células tumorales, sus propiedades fisicoquímicas (solubilidad, permeabilidad, etc.) conducirían a una inhibición preferencial de la AC IX transmembrana sobre AC II citosólica.

Entonces podemos concluir que ni la estereoquímica presentada por la porción de los diferentes carbohidratos ni la naturaleza del grupo oxhidrilo, ya sea como en los C-glicósidos (**F8-F12**) o menos polares y voluminosos como los peracetilado (**F2-F7**) influyen para alterar las características de inhibición enzimática. Además, no hay influencia en el perfil de inhibición debido a la posición del oxhidrilo en el anillo aromático. Sin embargo, tanto para los C-glicósidos peracetilados y los desprotegidos mostraron una mejor actividad inhibidora para casi todas los α -ACs que el fenol. Por lo tanto, esto confirma que unir una porción de carbohidrato al fenol mejora notablemente su actividad inhibitoria.

Brucella suis

En la tabla 24 se muestra, como se discutió anteriormente, que todos los C-glicósidos **F2-F12** fueron eficientes inhibidores para las isozimas hAC I y hAC II en un rango micromolar, de la misma manera esta serie de compuestos tienen el mismo rango de inhibición para la isoforma de la *B. suis*, bsCA I, pero se puede ver que se destacan los derivados peracetilados **F2** y **F6** que tienen la función 3-hidroxifenilo en su estructura, siendo inhibidores más eficientes de esta isozima. Por otro lado se observa que para la bsAC II el perfil de inhibición de la serie de compuestos sintetizados se puede dividir en dos grupos, el primer grupo incluye los compuestos **F2**, **F6**, **F9** y **F11** con K_i en un rango micromolar menor que el segundo grupo que incluye los C-glicósidos **F3**, **F7**, **F10** y **F12**, siendo estos inhibidores menos efectivos de la bsAC II. Se observa que los derivados del 3-hidroxifenilo son los inhibidores más efectivos, lo que permite inferir que la posición del oxhidrilo en el anillo aromático influye en el perfil de inhibición.

Tabla 24. Datos de inhibición de las distintas α -ACs y bsAC con los C-cinamoilglicósidos^a

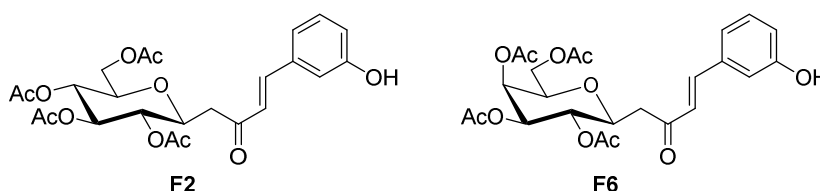
C-glicósido	Ki(μ M) ^b				Selectividad			
	hAC I	hAC II	bs AC I	bs AC II	hAC I/bsAC I	hAC I/bsAC II	hCA II/bsAC I	hAC II/bsAC II
F2	8,5	7,0	0,92	0,71	9,24	11,97	7,61	9,86
F3	5,7	3,9	5,65	2,68	1	2,13	0,69	1,45
F6	5,1	7,1	0,68	0,63	7,50	8,09	10,44	11,27
F7	9,3	5,5	7,18	4,85	1,29	1,92	0,77	1,13
F9	6,8	7,8	3,45	0,78	1,97	8,72	2,26	10
F10	3,7	8,8	7,92	4,75	0,47	0,78	1,11	1,85
F11	3,6	3,1	6,54	0,83	0,55	4,38	0,47	3,73
F12	5,5	6,8	5,43	2,80	1,01	1,96	1,25	2,43
Fenol	10,2	5,5	nd	nd	-	-	-	-
AAZ	0,25	0,012	0,063	0,303	3,97	0,82	0,19	0,04

a) Determinaciones realizadas por el Dr. C. T. Supuran, Universidad de Florencia, Italia

b) Errores en el rango del 5-10 % del valor reportado, de 3 determinaciones diferentes

*Todas las ACs son recombinantes

Con respecto a la selectividad se puede observar en la tabla 24 que los C-glicósidos protegidos **F2** y **F6** muestran ser hasta 12 veces más selectivos para las ACs de *Brucella suis* sobre la AC I y AC II, por lo tanto esto conduce a una preferencia para la inhibición de esta clase de β -ACs. La selectividad es clave para el diseño de inhibidores, y como se observa que varios compuestos muestran un mejor perfil de inhibición de las bsACs sobre las hACs, esto proporciona una oportunidad de explorar la unión de la porción 3-hidroxifenilo para el desarrollo de potentes inhibidores selectivos derivados de C-glicósidos. En el caso de los derivados desprotegidos **F9** y **F11** fueron los menos efectivos.



En vista de estos resultados se ensayó la inhibición de crecimiento de *Brucella suis* empleando los glicósidos mencionados. Lamentablemente ninguno de los compuestos estudiados mostró actividad tanto en concentraciones 100 μ M or 200 μ M. Este hecho podría deberse a que dado su tamaño y si bien los compuestos son lipofílicos, los mismos no pueden atravesar la pared celular de *B.suis* debido a su escasa permeabilidad.

Mycobacterium tuberculosis

En la tabla 25 se observan los datos de inhibición de la anhidrasa carbónica humana (hCA II) y de las tres isoformas presentes en *Mycobacterium tuberculosis* (mtACs). El análisis de la tabla permite ver que para el caso de la anhidrasa carbónica humana, la unión del carbohidrato a la función fenólica (la cual es la responsable de la inhibición) no produce resultados significativos en la actividad. La situación es totalmente distinta en el caso de las mtACs. Podemos observar que tanto para la mtAC 1 como la mtAC 2 los compuestos sintetizados exhiben mayor

actividad que el fenol, lo cual corrobora que unir carbohidratos a la función responsable de la inhibición mejora su actividad. Además, se observa que en general los compuestos desprotegidos presentan mejor actividad que los C-glicósidos peracetilados.

Tabla 25. Actividad inhibitoria de los C-cinamoilglicósidos^a

C-glicósido	K_i (μM) ^b			
	hAC II	mt AC 1	mt AC 2	mt AC 3
F2	7,0	2,1	19,0	0,64
F3	3,9	2,9	13,1	0,35
F6	7,1	3,8	15,6	0,87
F7	5,5	4,5	12,0	1,15
F9	7,8	0,14	6,21	0,24
F10	8,8	0,93	4,13	0,13
F11	3,1	1,16	3,25	0,51
F12	6,8	4,5	4,13	0,94
Fenol	5,5	64,0	79,0	nd

a) Determinaciones realizadas por el Dr. C. T. Supuran, Universidad de Florencia, Italia

b) Errores en el rango del 5-10 % del valor reportado, de 3 determinaciones diferentes.

Tabla 26. Actividad antituberculosa de los C-cinamoilglicósidos en medio líquido

Compuesto	Concentración		
	100 $\mu\text{g/ml}$	50 $\mu\text{g/ml}$	≤ 25 $\mu\text{g/ml}$
F2	Si ^a (++++) ^b	Si (++)	No
F3	Si (++)	Si (+)	No
F6	No	No	No
F7	No	No	No
F9	No	No	No
F10	Si (++)	Si (+)	No
F11	Si (++)	Si (+)	No
F12	No	No	No

a) Si indica inhibición del crecimiento, analizado por turbidez.

b) inhibición (++++)>>(++)>(+)

Otro hecho destacable es que los compuestos sintetizados presentan una muy buena actividad frente a la mtAC 3, la cual, recordemos, es esencial para el crecimiento de la bacteria.

En vista de estos resultados se decidió estudiar la actividad de los C-cinamoilglicósidos frente a la *Mycobacterium tuberculosis*. Para ello previamente se

realizó un ensayo preliminar empleando la visualización final de turbidez en medio líquido lo cual permitió determinar que los compuestos **F2**, **F3** y **F11** presentaban algún tipo de actividad frente a la micobacteria (Tabla 26).

Con el objetivo de obtener datos más precisos se ensayaron estos compuestos en medio sólido (Tabla 27). Para ello se expusieron cultivos frescos de *M. tuberculosis* H₃₇Rv a cantidades variables de los compuestos señalados, que fueron incubados a 37 °C durante 30 días. El resultado de estas determinaciones demostró que el compuesto **F2** presentó una CIM (concentración inhibitoria mínima) de 3,12 µg/mL mientras que los otros dos compuestos muestran actividad a altas concentraciones (≥100 µg/mL) sin embargo el C-glicósido **F3** disminuyó el tamaño de las colonias. Este hecho prueba que dicho compuesto interfiere con el metabolismo de la micobacteria, logrando disminuir su crecimiento, pero no impedirlo. De esta manera se ha logrado identificar que el compuesto **F2** como el primer inhibidor de las anhidrasas carbónicas presentes en *Mycobacterium tuberculosis*, que además impide el crecimiento de la micobacteria.

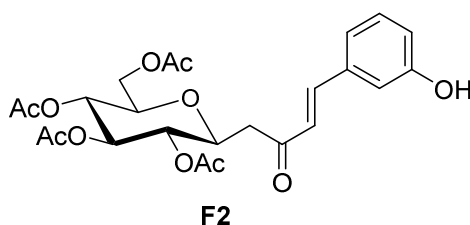


Tabla 27. Evaluación de la actividad antimicobacteriana en medio sólido

Compuesto	Concentración					
	100 µg/ml	50 µg/ml	25 µg/ml	12,5 µg/ml	6,25 µg/ml	≤ 3,12 µg/ml
F2	Si ^a (++++) ^b	Si(++++)	Si(++++)	Si(++++)	Si(++++)	(*)
F3	No	No	No	No	No	No
F11	Si (++)	No	No	No	No	No

a) Si indica inhibición del crecimiento,

b) inhibición (++++)>>(++)>(+))

(*) : colonias pequeñas

5.5.2. Actividad inhibitoria de los glicomiméticos derivados de metoxiarilo

Anhidrasas carbónicas humanas

La metilación es una de las modificaciones químicas más comunes del oxhidrilo en los compuestos fenólicos. Sólo recientemente los derivados de metoxifenilo han sido investigados como inhibidores de la anhidrasa carbónica porque se consideraba que no tenían incidencia en la inhibición de AC.⁷⁰ Los estudios de docking han permitido explicar el comportamiento de estos compuestos. De este modo surge la posibilidad de diseñar nuevos inhibidores de la anhidrasa carbónica. Sin embargo, muy pocos de estos derivados han sido investigados hasta el momento.⁷⁰

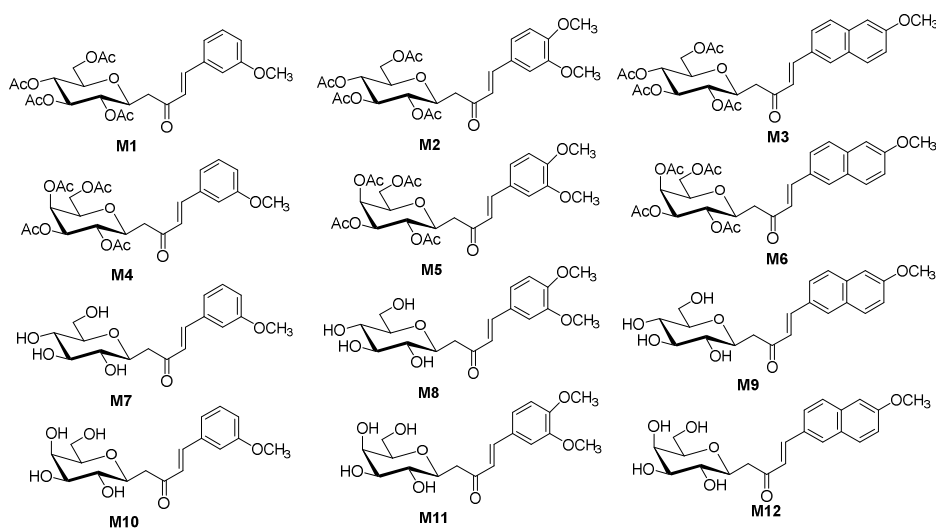


Figura 34

En la tabla 28 se presentan los resultados de los ensayos de inhibición frente a las diferentes isozimas de la anhidrasa carbónica, de los C-glicósidos **M1-M12**.

Podemos observar que los C-glicósidos sintetizados son inhibidores muy débiles de la AC I, incluso los derivados glucosidados del 6-metoxi-2-naftaldehído no muestran poseer actividad sobre esta isozima.

Tabla 28. Actividad inhibitoria y selectividad de los C-cinamoilglicósidos **M1-M12** frente a las α -ACs.

C-glicósido	K_i (μ M)					Selectividad			
	c log P ^c	hAC I	hAC II	hAC IX	hAC XII	I/IX	I/XII	II/IX	II/XII
M1	0,12	5,67	0,42	0,78	0,79	7,3	7,1	0,5	0,53
M2	-0,01	8,36	0,54	0,75	0,13	11,1	66,3	0,7	4,3
M3	1,11	>50	0,41	0,67	0,59	>74,3	>85	0,6	0,7
M4	0,12	8,69	>50	0,093	0,65	93,4	13,3	>538	>76
M5	-0,01	4,67	0,63	0,77	0,081	6,0	57,7	0,81	7,8
M6	1,11	6,65	>50	0,42	0,080	15,9	83,1	>120	>625
M7	-0,82	7,44	>50	0,61	0,68	12,1	10,9	>81	>73
M8	-0,93	6,51	0,44	0,84	0,073	12,1	89,2	0,5	6,0
M9	0,19	>50	>50	0,46	0,24	>108	>212	>108	>212
M10	-0,80	8,67	>50	3,86	0,084	2,24	103,2	>13	>595
M11	-0,93	7,48	0,55	0,94	0,23	8,0	31,8	0,6	2,3
M12	0,19	7,21	>50	0,48	0,089	14,9	81,0	>103	>562
AAZ	-	0,25	0,012	0,025	0,005	9,88	43,8	0,48	2,12

a) Determinaciones realizadas por el Dr. C. T. Supuran, Universidad de Florencia, Italia.

b) Errores en el rango del 5-10 % del valor reportado, de 3 determinaciones diferentes.

c) Datos calculados con el software libre Osiris Data Warrior.

Los glicósidos derivados del 3-metoxibenzaldehído y del 6-metoxi-2-naftaldehído no presentan actividad inhibitoria de la AC II. La única excepción es el glucósido peracetilado **M1**. Se observa que todos los derivados del veratraldehído muestran un comportamiento similar con un rango de inhibición submicromolar.

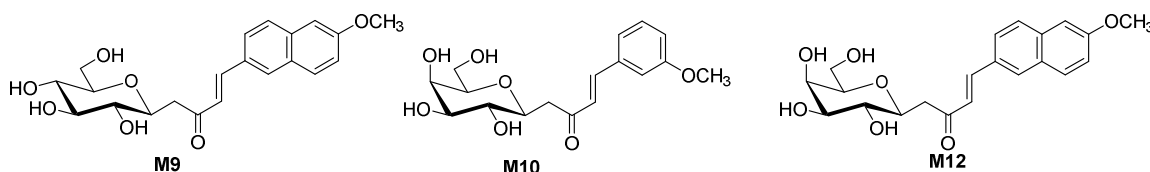
Respecto a la AC IX la mayoría de los compuestos presentan actividad en el rango sub- o micromolar con la excepción del glicósido **M4** que es un inhibidor más potente de esta isozima relacionada con procesos tumorales.

Finalmente con respecto a la isozima XII, se ha encontrado que varios de los compuestos son inhibidores en el rango milimolar como es el caso de los glucósidos **M7** y **M9**; y de los galactósidos **M4**, **M6**, **M10** y **M12**.

Si bien la información proporcionada hasta aquí es útil para interpretar el comportamiento que presentan los compuestos sintetizados frente a las isozimas de la anhidrasa carbónica, un dato de mayor utilidad a la hora de analizar el diseño

de inhibidores de estas enzimas es la selectividad que presentan frente a las isozimas citosólicas I y sobre todo la II, la cual se halla ampliamente distribuida en el organismo. En este sentido una mayor selectividad frente a esta isozima minimizará los efectos secundarios. Observando la tabla 28 es posible ver que varios de los compuestos sintetizados presentan excelente selectividad frente a ambas isozimas como es el caso del glucósido derivado del 6-metoxi-2-naftilo **M6** y de los galactósidos **M9** y **M12** derivados de la misma funcionalidad y los derivados del 3-metoxifenilo **M4** y **M10**.

En base al análisis precedente, surge que los glicósidos **M9** y **M12** derivados del 6-metoxi-2-naftilo y el galactósido **M10** derivado del 3-metoxifenilo presentan las mejores características como inhibidores selectivos de la anhidrasa carbónica XII.



Otro aspecto que se debe analizar es la posibilidad que presentan los diferentes compuestos de atravesar las membranas celulares dado que varias de las isozimas son citosólicas (I y II) y otras son enzimas de membrana (IX y XII). La medición directa de esta propiedad es sumamente dificultosa por lo cual se utiliza el cálculo teórico del coeficiente de reparto ($c \log P$) como una medida de la posibilidad que presentan las moléculas de penetrar las membranas. Si el valor hallado se encuentra entre 1 y 3 se considera que los compuestos presentan una buena permeabilidad y si el valor es menor que cero, tiene muy baja probabilidad de atravesar la membrana. En general los glicósidos sintetizados no serían capaces de atravesar la membrana celular (con la excepción de los glicósidos **M3** y **M6**), por lo cual inhibirían selectivamente a las isozimas ubicadas fuera de la célula, en este caso AC IX y XII.

Podemos observar que esta serie de glicomiméticos que contienen la función metoxilo presentan una mayor selectividad frente a las diferentes isoformas de la AC que los glicósidos que tienen un oxhidrilo fenólico en su molécula. Si bien una explicación de este efecto sólo podría darse en base a estructuras de rayos X de aductos de estos compuestos con alguna de las anhidrasas carbónicas, es posible esbozar un acercamiento a este problema. Al analizar la estructura de rayos X del aducto anhidrasa carbónica II-fenol (pág. 38), se encuentra que si bien el fenol no se une directamente al átomo de Zn del sitio activo, si se une a una molécula de agua ligada al mismo. En cambio los metoxifenilos no presentan esta unión sino que se ubican en la mitad del sitio activo sin interactuar directamente con el Zn o sus ligandos. Al analizar nuestros compuestos, entonces, encontramos que los glicósidos conteniendo la función metoxilo ubicarían sus apéndices glicosídicos hacia la boca del sitio activo, siendo precisamente esta zona donde se presenta mayor variabilidad en la composición de aminoácidos de las isoformas. La interacción con esta porción, entonces, colaboraría con la respuesta diferencial de cada isoforma frente a los C-glicósidos sintetizados, algo que no se observa en los análogos fenólicos.

Brucella suis

En la tabla 29 podemos observar los datos de inhibición de las isoforma citosólica hAC I y hAC II a modo de comparación, como observamos la hAC I fue inhibida muy debilmente por la mayoría de los C-glicósidos en un rango micromolar, incluso por el glucósido **M3** que tiene la porción 6-metoxi-2-naftilo y su derivado desprotegido **M9**.

Para el caso de la hAC II los C-glicósidos podíamos ver un perfil de inhibición muy interesante para todos los glucosidos derivados de veratraldehído (**M2**, **M5**, **M8** y **M11**) que mostraban ser buenos inhibidores en un rango micromolar. También los compuestos **M1** y **M3** son buenos inhibidores de la hAC II en un rango micromolar. Por lo tanto se puede observar que algunos de los nuevos compuestos muestran una baja inhibición de la hAC II pero una buena inhibición de las ACs de la *B. suis*.

Tabla 29. Datos de inhibición de las distintas α -ACs y bsAC con los C-cinamoilglicósidos M1-M12.

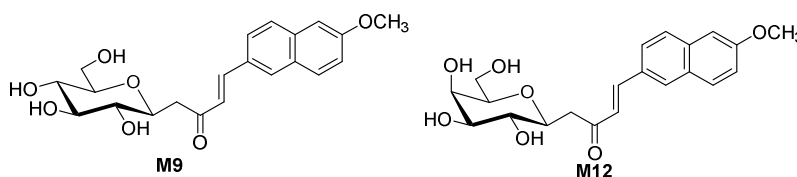
C-glicósido	K _i (μ M)				Selectividad			
	hAC I	hAC II	bsAC I	bsAC II	hAC I/bsAC I	hAC I/bsAC II	hCA II/bsAC I	hAC II/bsAC II
M1	5,67	0,42	0,89	0,49	6,37	11,61	0,47	0,86
M2	8,36	0,54	1,76	0,36	4,75	23,22	0,31	0,67
M3	>50	0,41	3,92	0,70	>13	>71	0,94	0,59
M4	8,69	>50	>50	4,02	<0,1	<0,1	-	>12
M5	4,67	0,63	4,36	0,37	1,07	11,78	0,14	1,70
M6	6,65	>50	>50	8,05	<0,1	0,83	-	>6
M7	7,44	>50	7,56	8,01	0,98	0,93	>6	>6
M8	6,51	0,44	2,58	0,31	2,52	21	0,17	0,71
M9	>50	>50	0,42	0,22	>119	>227	>119	>227
M10	8,67	>50	>50	8,69	<0,1	1	-	5,75
M11	7,48	0,55	4,49	>50	1,66	<0,1	0,12	<0,01
M12	7,21	>50	0,43	0,21	16,77	34,34	>116	>238
AAZ	0,25	0,012	0,063	0,303	3,96	0,83	0,19	0,04

Se observa también que la isoforma bsAC I es inhibida por la mayoría de C-glicósidos en rango un micromolar o submicromolar. Los C-galactósidos peracetilados **M4** y **M6**, al igual que el derivado desprotegido **M10** son inhibidores ineficaces de esta isoforma. De manera contraria se puede observar que los C-glicósidos desprotegidos **M9** y **M12** que contienen la porción 6-metoxi-2-naftilo muestran ser los inhibidores más eficientes de bsAC I.

Para la bsAC II el perfil de inhibición se puede separar en dos grupos. El primer grupo incluye los compuestos **M1-M3**, **M5**, **M8**, **M9** y **M12** que son los inhibidores más efectivos en un rango micromolar; el otro grupo incluye los glicósidos **M4**, **M6**, **M7** y **M10** que son inhibidores menos efectivos de esta isoforma.

Por lo tanto se puede determinar que el galactósido desprotegido **M11** derivado del veratraldehído no mostró ser buen inhibidor de la bsAC II y los glicósidos **M9** y **M12** demuestran ser los mejores inhibidores de la isoforma II de *Brucella suis*, como también lo eran para la bsAC I.

Analizando los datos de selectividad se observa que algunos compuestos exhiben una marcada tendencia inhibitoria hacia las ACs de la clase β por sobre las α -ACs, siendo los C-glicósidos **M9** y **M12** hasta cien veces más selectivos para AC de *B. suis* sobre AC I y II. Es así que estos derivados desprotegidos que contienen la porción 6-metoxi-2-naftilo pueden ser útiles para el desarrollo de potentes inhibidores selectivos para esta familia de β -ACs. En contraste con los análogos peracetilados (**M3** y **M6**) que no muestran eficacia. Se puede ver que el C-glicósido **M6** muestra un máximo de selectividad de 6 veces para bsAC II sobre la hAC II, pero sin selectividad sobre hAC I. Por otro lado, el C-glicósido **M3** muestra una excelente selectividad para la inhibición de las isoforma β - sobre hAC I, pero sin selectividad sobre hCA II.



Mycobacterium tuberculosis

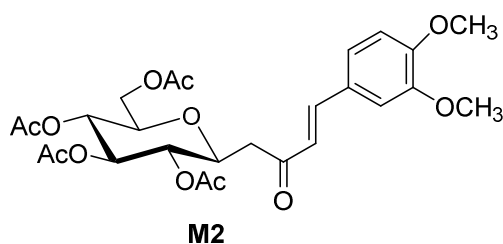
A pesar de que no se han podido realizar los ensayos correspondientes frente a las anhidrasas carbónicas presentes en la *Mycobacterium tuberculosis* para los nuevos compuestos que tiene la función metoxiarilo por problemas ajenos al grupo de trabajo igualmente se decidió estudiar la actividad de los C-cinamoilglicósidos frente a la *Mycobacterium tuberculosis*. Para ello se realizó un ensayo preliminar empleando la visualización final de turbidez en medio líquido lo cual permitió determinar que el compuesto **M2** presenta algún tipo de actividad frente a la micobacteria (Tabla 30).

Tabla 30. Actividad antituberculosa de los C-cinamoilglicósidos **M1-M12** en medio líquido

Compuesto	Concentración		
	100 µg/ml	50 µg/ml	≤25 µg/ml
M1	No	No	No
M2	Si (+++)	Si (++)	No
M3	No	No	No
M4	No	No	No
M5	No	No	No
M6	No	No	No
M7	No	No	No
M8	No	No	No
M9	No	No	No
M10	No	No	No
M11	No	No	No
M12	No	No	No

a) Si indica inhibición del crecimiento, analizado por turbidez.

b) inhibición (+++)>>(++)>(+)>(0)



5.5.3. Actividad inhibitoria de las N-glicosilsulfonamidas

Como se ha mencionado anteriormente dentro de los inhibidores de las ACs se destacan los fenoles dado que su interacción con la anhidrasa carbónica es completamente diferente a las encontradas con los inhibidores tradicionales, por lo cual se constituyen en moléculas interesantes para el desarrollo de nuevos inhibidores.

Por otro lado el desarrollo de glicomiméticos se produjo debido a la inestabilidad de los carbohidratos frente a enzimas y diferentes condiciones de reacción, siendo la sulfonamidoglicosilación una estrategia para el reemplazo del oxígeno anomérico. Esta metodología se aplicó a la síntesis de N-glicosil sulfamidas, que demostraron ser potentes inhibidores de la anhidrasa carbónica.¹¹⁷

Por lo tanto en la búsqueda de nuevos inhibidores de ACs se sintetizaron una serie de N-glicosilsulfonamidas que incorporan la función fenólica vía sulfonamidoglicosilación (Figura 35).

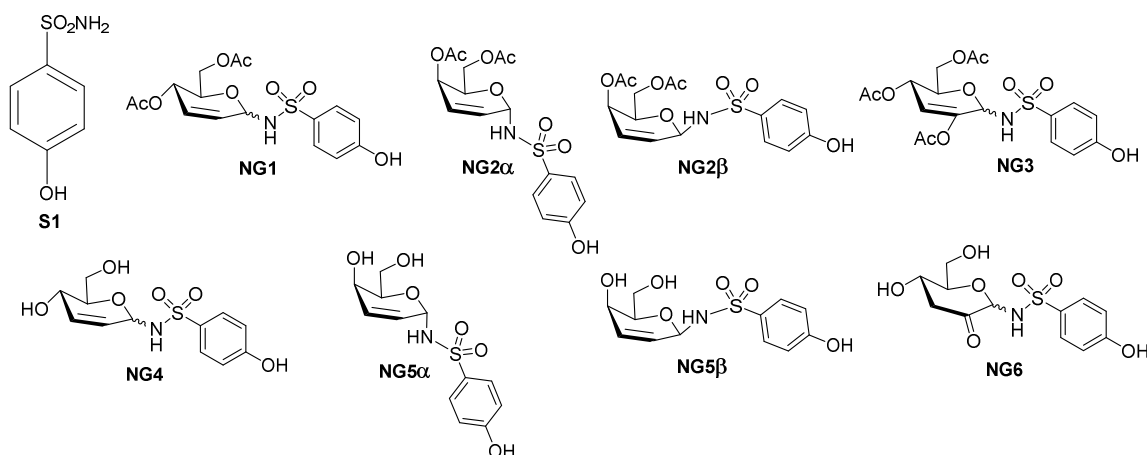


Figura 35

*Anhidrasas carbónicas humanas***Tabla 31.** Datos de inhibición de 4 isoformas de la ACs con las diferentes *N*-glicosilsulfonamidas.

Compuesto	K_i (nM) ^a			
	hAC I	hAC II	hAC IX	hAC XII
Fenol	10200	5500	8800	9200
S1	5500	80	235	176
NG1	43,1	139	>50000	>50000
NG2α	6630	695	>50000	>50000
NG2β	3840	137	>50000	>50000
NG3	6690	360	>50000	>50000
NG4	454	142	>50000	>50000
NG5α	8850	340	>50000	>50000
NG5β	4025	295	>50000	>50000
NG6	6250	1680	>50000	>50000
AAZ	250	12,1	25,3	5,7

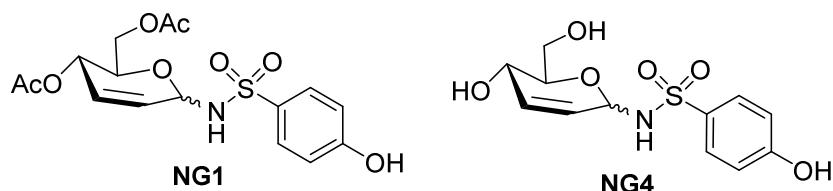
a) Error en el rango de \pm 5-10 % del valor reportado, a partir de 3 medidas

De la tabla 31 se pueden ver las siguientes relaciones de actividad inhibitoria con respecto a la estructura de los compuestos obtenidos.

Se puede observar que las *eritro* sulfonamidas **NG1** y **NG4** son inhibidores nanomolares de la hAC I, en contraste con las otras *N*-glicosilsulfonamidas que tiene muy poca actividad inhibitoria de esta isoforma. Otra aspecto interesante que se puede ver es que los anómeros β de las *treo* sulfonamidas **NG2 β** y **NG5 β** son mejores inhibidores que los anómeros α .

En base a los datos obtenidos se puede comparar el perfil de inhibición de esta isoforma con el perfil del fenol o de la *p*-hidroxibencensulfonamida (**S1**) concluyendo que la unión del carbohidrato (*eritro*-hex-2-enopiranosil) a la porción fenólica conduce a un aumento pronunciado en la potencia inhibitoria de estos compuestos frente a la hAC I. Por otro lado los *N*-glicósidos mostraron ser muy buenos inhibidores en el rango nanomolar para la hAC II a excepción del sulfonamidoglicósido desprotegido **NG6**. Así se confirma una vez más que la unión del glicósido a la porción fenólica conduce a una mejora en la actividad.

Para el caso las isozimas hAC IX y XII se puede observar que ninguna de las *N*-glicosilsulfonamidas presentan actividad inhibitoria.



En base a los resultados obtenidos para esta serie de *N*-glicosilsulfonamidas que tienen una función fenólica en su estructura se puede decir que presentan un perfil inhibitorio de la AC II mucho mejor que los *C*-glicosilfenoles, ya que inhiben esta isozima en un rango nanomolar menor. Para el caso de la AC I, la mayoría de los *N*-glicósidos presentan una actividad inhibitoria similar a la de los *C*-glicósido, excepto los compuestos **NG1** y **NG4**, que son los únicos que la inhiben en un rango nanomolar.

Concluyendo que la unión del carbohidrato a la porción fenólica mejora notablemente la actividad inhibitoria de la isoforma II de la AC.

Mycobacterium tuberculosis

A pesar de que para esta familia de compuestos tampoco se han podido realizar los ensayos correspondientes frente a las anhidrasas carbónicas presentes en la *Mycobacterium tuberculosis* (por problemas ajenos al grupo de trabajo) igualmente se decidió estudiar la actividad de los *N*-glicósidos frente a la *Mycobacterium tuberculosis*. Para ello previamente se realizó un ensayo preliminar empleando la visualización final de turbidez en medio líquido lo cual permitió determinar que solamente el compuesto **NG2 β** presenta algún tipo de actividad frente a la micobacteria (Tabla 32).

Tabla 32. Actividad antituberculosa de las *N*-glicósilsulfonamidas en medio líquido.

Compuesto	Concentración		
	100 µg/ml	50 µg/ml	≤25 µg/ml
NG1	No	No	No
NG2α	No	No	No
NG2β	Si	No	No
NG3	No	No	No
NG4	No	No	No
NG5α	No	No	No
NG5β	No	No	No
NG6	No	No	No

a) Si indica inhibición del crecimiento, analizado por turbidez.

5.5.4. Actividad inhibitoria de los *C*-glicosilsulfamatos

El grupo sulfamato, relacionada con las sulfonamidas, ha demostrado ser un potente inhibidor de las anhidrasas carbónicas. Como lo demuestran los datos estructurales de rayos X de los aductos de tales inhibidores con la isozima II de la AC¹⁶⁴, los sulfamatos se unen en forma deprotonada, es decir como aniones, al Zn (II) presente en el sitio activo reemplazando al cuarto ligando (molécula de agua o ión oxhidrilo).

La estructura cristalina de rayos X del aducto del ácido sulfámico, precursor de los sulfamatos, con la hAC II muestra que el ácido sulfámico es capaz de unirse al ion de zinc como dianión también a través una serie de contactos favorables en el sitio activo de hAC II.¹⁶⁴ Por lo tanto, este compuesto puede ser utilizado como molécula líder para el diseño de IACs.

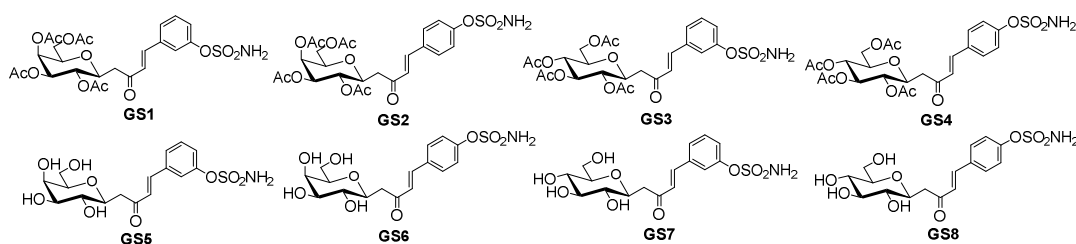


Figura 36

Anhidrasas carbónicas

En la tabla 33 se observan los datos de inhibición de tres isoformas de anhidrasas carbónicas, las hAC I y II que son isoformas citosólicas y la isoforma asociada a la membrana hAC IX.

Tabla 33. Datos de Inhibición de α -AC con los diferentes C- glicosilsulfamatos GS1-GS8.

C-glicósido	c log P ^c	K _i (nM) ^a			Selectividad	
		hAC I	hAC II	hAC IX	I/IX	II/IX
GS1	0,653	90,6	5,1	21,2	4,27	0,24
GS2	0,653	73,3	3,4	29,6	2,47	0,11
GS3	0,653	57,5	3,4	15,7	3,66	0,21
GS4	0,653	57,5	4,3	24,3	2,37	0,18
GS5	-1,285	338,6	842,3	952,9	0,35	0,88
GS6	-1,285	76,0	27,6	23,1	3,29	1,02
GS7	-1,285	585,8	180,4	198,9	2,95	0,91
GS8	-1,285	340,7	570,9	100,9	3,38	5,66
AAZ	-	250	12	25	10	0,48
Topiramato^b	-	250	10	3,8	65,79	2,63
Fenilsulfamato	-	2,1	1,3	63	0,03	0,02

a) Error en el rango de 5-10 % del valor reportado, a partir de 3 medidas.

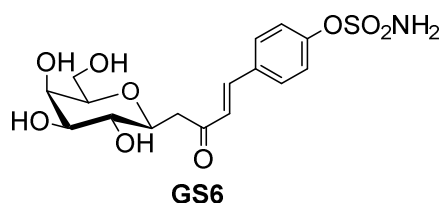
b) Inhibidor de ACs

c) Datos calculados con el software libre Osiris Data Warrior.

De los resultados de la tabla 33 se puede observar que los glicosilsulfamatos peracetilados (**GS1-GS4**) mostraron ser buenos inhibidores de hAC I en el rango nanomolar. Se encontró una tendencia similar para los análogos desprotegidos (**GS5-GS8**), la excepción es el C-glucosilsulfamato desprotegido **GS8** que es un mejor inhibidor de hAC I. Por otro lado, los C-glicosil sulfamatos peracetilados **GS1-GS4** son buenos inhibidores de hAC II en el rango nanomolar. La hAC II fue inhibida en el intervalo micromolar por todos los C-glicosil sulfamatos desprotegidos excepto el C-glucosilsulfamato desprotegido **GS8** que es un inhibidor nanomolar de esta isoforma.

Con respecto a la hAC IX los sulfamatos peracetilados **GS1-GS4** mostraron ser inhibidores nanomolares y los derivados desprotegidos **GS6** y **GS8** que incorporan la porción 4-sulfamoilfenilo son inhibidores micromolares de esta isozima.

Teniendo en cuenta que la selectividad para inhibir la isoforma asociada a tumores hAC IX sobre las formas citosólicas hCA I y II es clave para diseñar inhibidores de ACs, como puede observarse en la tabla 33, el compuesto **GS6** mostró el mejor perfil de actividad contra hAC IX sobre I y II, que es altamente deseable cuando solo inhibirían las isoformas asociadas a tumores. Además, la baja permeabilidad que presentan los C-glicósidos desprotegidos potenciaría la inhibición de hAC IX sobre hAC II.



En base a los resultados de inhibición obtenidos es interesante analizar la posibilidad que presentan los diferentes compuestos de atravesar las membranas celulares dado que varias de las isozimas son citosólicas (I y II) y otras son enzimas de membrana (IX y XII). La medición directa de esta propiedad es sumamente dificultosa por lo cual se utiliza el cálculo teórico del coeficiente de reparto ($\log P$) como una medida de la posibilidad que presentan las moléculas de penetrar las membranas. Si el valor hallado se encuentra entre 1 y 3 se considera que los compuestos presentan una buena permeabilidad y si el valor es menor que cero, tiene muy baja probabilidad de atravesar la membrana. Los valores de $\log P$ calculados para los C-glicósidos son de 0,653 para los compuestos **G1-G4** y -1,285 para los compuestos **G5-G8**, muestran que los compuestos desprotegidos caen dentro del rango de moléculas con poca permeabilidad de la membrana. Sin embargo los glicosilsulfamatos peracetilados debido a sus grupos acetilos disminuyen la polaridad del carbohidrato. Estos

valores predican que dichos compuestos pueden ser útiles para una administración vía oral, por ejemplo. El glicosilsulfamato **G2** una vez administrado y adsorbido, cambiaría sus propiedades fisicoquímicas producto de las esterasas, transformándolo en una molécula más polar (**G6**) que consecuentemente se dirige selectivamente al sitio activo extracelular de la AC IX asociada a procesos tumorales.

Podemos observar que esta serie de glicomiméticos que contienen la función sulfamato presentan una mayor selectividad frente a las diferentes isoformas de la AC que los glicósidos que tienen un oxhidrilo fenólico en su molécula. La estructura de rayos X del aducto de cada compuesto con la anhidrasa carbónica correspondiente, sería lo que nos daría una respuesta absoluta con respecto a la selectividad, sin embargo en base a la información que conocemos, se puede perfilar una respuesta. Recordemos que al analizar la estructura de rayos X del aducto anhidrasa carbónica II-fenol (pág. 38), se encuentra que si bien el fenol no se une directamente al átomo de Zn del sitio activo, si se une a una molécula de agua ligada al mismo. En cambio los sulfamatos si se une directamente con el ión Zn. Al analizar nuestros compuestos, entonces, encontramos que en los glicósidos conteniendo la función sulfamato, sus apéndices glicosídicos quedan atrapados en el bolsillo del sitio activo, lo que generaría un gran número de interacciones favorables (puentes de hidrógeno e hidrofóbicas) con residuos de aminoácidos y la molécula de agua del sitio activo. La interacción con esta porción colaboraría con la respuesta diferente de cada isoforma frente a los C-glicosilsulfamatos sintetizados, algo que no se observa en los análogos fenólicos.

Mycobacterium tuberculosis

Si bien de esta familia de compuestos tampoco se han podido realizar los ensayos correspondientes frente a las anhidrasas carbónicas presentes en la *Mycobacterium tuberculosis* por problemas ajenos al grupo de trabajo igualmente se decidió estudiar la actividad de los C-glicosilsulfamatos frente a la micobacteria.

Para ello se realizó un ensayo preliminar empleando la visualización final de turbidez en medio líquido, si bien no se pudo determinar para todos los compuestos sintetizados se pudo observar que **GS1** presenta una mínima actividad antituberculosa.

Tabla 34. Actividad antituberculosa de C-glicosilsulfamatos **GS1-GS8** en medio líquido.

Compuesto	Concentración		
	100 µg/ml	50 µg/ml	≤25 µg/ml
GS1	No	Si	No
GS2	No	No	No
GS3	No	No	No
GS4	No	No	No
GS5	ND	ND	ND
GS6	ND	ND	ND
GS7	No	No	No
GS8	ND	ND	ND

a) Si indica inhibición del crecimiento, analizado por turbidez.

6. Conclusiones

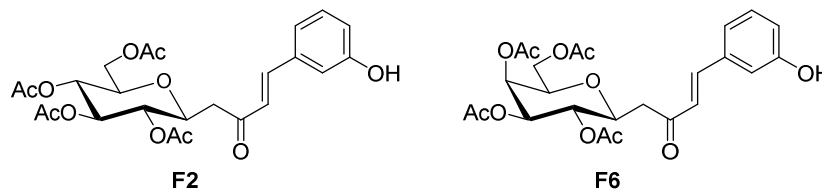
Durante el desarrollo de este trabajo de tesis doctoral, se han sintetizado:

- 24 nuevos C-cinamoilglicósidos, 8 de los cuales incorporan una función fenólica, 8 que incorporan el grupo metoxiarilo, ambos a través de una secuencia que involucra tres etapas de síntesis desde el monosacárido reductor. Y 8 que incorporan un grupo fenilsulfamato, a partir de los nuevos compuestos que incorporan la función fenólica.
- 6 nuevas N-glicosilsulfonamidas que incorporan una función fenólica.
- Se ha realizado el análisis de los compuestos sintetizados mediante ^1H y ^{13}C RMN permitiendo confirmar las estructuras propuestas para los mismos.
- Se ha estudiado la actividad inhibitoria de los C-cinamoilglicósidos y N-glicosilsulfonamidas frente a las anhidrasas carbónicas humanas I, II, IX y XII (presente en procesos tumorales), a las β -ACs de *Mycobacterium tuberculosis* y *Brucella suis*; frente a *M. tuberculosis* y en algunos casos frente a *Brucella suis*.²

En base a los resultados de actividad inhibitoria obtenidos se puede concluir para los C-glicósidos que incorporan la función fenólica que tanto los derivados peracetilados y deacetilados mostraron una mejor actividad inhibidora que el fenol para la mayoría de las α -ACs. Este hecho confirma que unir una porción de carbohidrato a la función fenólica mejora notablemente su actividad inhibitoria. Para el caso de las bsAC I y II se destacaron los derivados peracetilados que tienen la función 3-hidroxifenilo en su estructura (**F2** y **F6**), siendo inhibidores mas eficientes de esta isozima, mostrando también más selectividad para las ACs de *Brucella suis* sobre la AC I y AC II.

² Por problemas ajenos al grupo de trabajo, no se han podido realizar los ensayos correspondientes frente a las anhidrasas carbónicas presentes en la *Mycobacterium Tuberculosis* y frente a la *Brucella suis* para los nuevos compuestos que tiene la función metoxiarilo, sulfamatos y N-glicosilsulfonamidas.

Lamentablemente ninguno de los compuestos mostró actividad frente a *Brucella suis*.

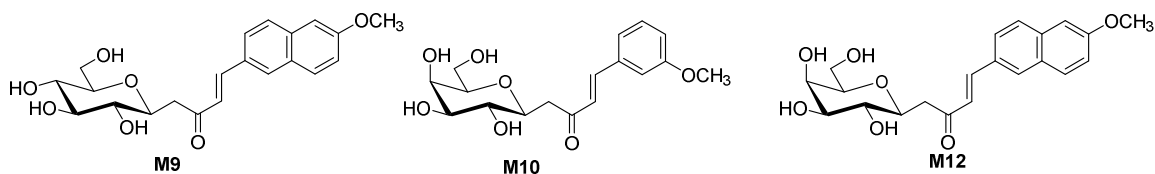


Cabe mencionar también que el acoplamiento de un carbohidrato a la función fenólica también mejora la actividad frente a la anhidrasas carbónicas presentes en la *M. tuberculosis*. Además se ha determinado que uno de los compuestos preparados,

(*E*)-1-(2',3',4',6'-tetra-*O*-acetil- β -D-glucopiranosil)-4-(3-hidroxifenil)but-3-en-2-ona (**F2**), inhibe el crecimiento de *M. tuberculosis* hasta en concentraciones de 3,12 μ g/ml. De esta manera se ha sintetizado e identificado el primer inhibidor de las anhidrasas carbónicas presentes en *M. tuberculosis* que presenta actividad antimicrobiana, constituyéndose en la prueba del concepto de que la inhibición de dichas enzimas puede dar lugar a nuevos agentes antimicrobianos.

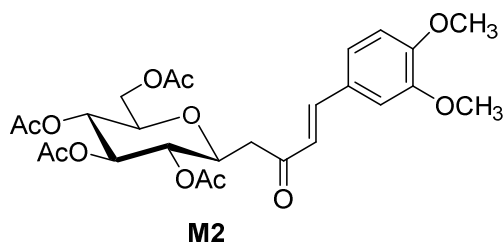
Para la serie de *C*-cinamoilglicósidos que incorporan una función metoxiarilo se encontró que la actividad inhibitoria frente a las diferentes isoformas de la anhidrasas carbónicas mejora notablemente con el acoplamiento de un carbohidrato a la función metoxiarilo, mejorando además su selectividad. Además, ha sido posible identificar 3 compuestos (**M9**, **M10** y **M12**) que presentan características óptimas como inhibidores de la AC XII, relacionada con procesos tumorales, siendo los primeros glicósidos que presentan esta característica. De esta manera los glicósidos sintetizados se constituyen en compuestos líderes para el desarrollo de nuevos agentes antitumorales y actualmente se está estudiando su actividad frente a líneas celulares tumorales.

CONCLUSIONES

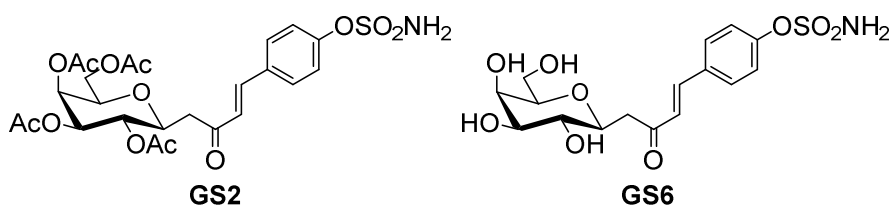


Además se ha encontrado que la unión del C-glicósido a un grupo metoxinaftilo (**M9** y **M12**), permite obtener compuestos que son inhibidores selectivos de las anhidrasas carbónicas presentes en *Brucella suis*.

Se analizó también la actividad de los glicósidos obtenidos frente a la *M. tuberculosis* encontrándose que uno de los galactósidos (**M2**) obtenidos es un inhibidor débil del crecimiento de dicha bacteria.



Para la serie de sulfamatos sintetizados a partir de los nuevos C-glicosilfenoles el compuesto **GS6** mostró el mejor perfil de actividad frente hAC IX sobre I y II. Sin embargo, en base a los cálculos de permeabilidad se concluyó que el glicosilsulfamato **GS2** una vez administrado y adsorbido, cambiaría sus propiedades fisicoquímicas producto de las esterasas, transformándolo en una molécula más polar (**GS6**) que consecuentemente se dirigiría selectivamente a la AC IX, asociada a procesos tumorales.



CONCLUSIONES

Finalmente para las nuevas *N*-glicosilsulfonamidas se concluyó que la unión de la parte del carbohidrato (*eritro*-hex-2-enopiranosil) a la porción fenólica conduce a un aumento pronunciado en la potencia inhibitoria de estos compuestos frente a la hAC I. Por otro lado los *N*-glicósidos mostraron ser muy buenos inhibidores en el rango nanomolar para la hAC II. Así se confirma una vez más que la unión del glicósido a la porción fenólica conduce a una mejora en su actividad.

7. Bibliografía

- (1) World Health Organization <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs104/en/index.html>.
- (2) Fuente:Ministerio de la Salud de la Nación <http://msal.gov.ar/htm/site>.
- (3) Dye, C. *Nat. Rev. Microbiol.* **2009**, 7 (1), 81–87.
- (4) Tomioka, H.; Tatano, Y.; Yasumoto, K.; Shimizu, T. *Expert Rev. Respir. Med.* **2008**, 2 (4), 455–471.
- (5) Cole, S. T.; Brosch, R.; Parkhill, J.; Garnier, T.; Churcher, C.; Harris, D.; Gordon, S. V.; Eiglmeier, K.; Gas, S.; Barry, C. E.; Tekaia, F.; Badcock, K.; Basham, D.; Brown, D.; Chillingworth, T.; Connor, R.; Davies, R.; Devlin, K.; Feltwell, T.; Gentles, S.; Hamlin, N.; Holroyd, S.; Hornsby, T.; Jagels, K.; Krogh, A.; McLean, J.; Moule, S.; Murphy, L.; Oliver, K.; Osborne, J.; Quail, M. A.; Rajandream, M.-A.; Rogers, J.; Rutter, S.; Seeger, K.; Skelton, J.; Squares, R.; Squares, S.; Sulston, J. E.; Taylor, K.; Whitehead, S.; Barrell, B. G. *Nature* **1998**, 393 (6685), 537–544.
- (6) Supuran, C. T. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, 20 (12), 3467–3474.
- (7) Supuran, C. T. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2008**, 7 (2), 168–181.
- (8) Supuran, C. T.; Scozzafava, A. . C.; J., E. *CRC Press Boca Rat.* **2004**, 300–363.
- (9) Supuran, C. T., Scozzafava, A.; Casini, A. *Med. Res. Rev.* **2003**, 23, 146–189.
- (10) Krishnamurthy, V. M.; Kaufman, G. K.; Urbach, A. R.; Gitlin, I.; Gudiksen, K. L.; Weibel, D. B.; Whitesides, G. M. *Chem. Rev.* **2008**, 108 (3), 946–1051.
- (11) Stiti, M.; Cecchi, A.; Rami, M.; Abdaoui, M.; Barragan-Montero, V.; Scozzafava, A.; Guari, Y.; Winum, J.-Y.; Supuran, C. T. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130 (48), 16130–16131.
- (12) Smith, K. S.; Ferry, J. G. *FEMS Microbiol. Rev.* **2000**, 24 (4), 335–366.
- (13) Badger, M. R. .; Price, G. D. *Annu. Rev. Plant Physiol Plant Mol. Biol.* **1994**, 45, 369–392.
- (14) Thiry, A.; Dogné, J.-M.; Masereel, B.; Supuran, C. T. *Trends Pharmacol. Sci.* **2006**, 27 (11), 566–573.
- (15) Xu, Y.; Feng, L.; Jeffrey, P. D.; Shi, Y.; Morel, F. M. M. *Nature* **2008**, 452 (7183), 56–61.
- (16) Lane, T. W.; Morel, F. M. M. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2000**, 97 (9), 4627–4631.

BIBLIOGRAFÍA

- (17) Hilvo, M.; Tolvanen, M.; Clark, A.; Shen, B.; Shah, G. N.; Waheed, A.; Halmi, P.; Hänninen, M.; Hämäläinen, J. M.; Vihinen, M.; Sly, W. S.; Parkkila, S. *Biochem. J.* **2005**, 392 (1), 83–92.
- (18) Nishimori, I.; Vullo, D.; Innocenti, A.; Andrea Scozzafava; Antonio Mastrolorenzo, & and; Claudiu T. Supuran. *Med. Chem.* **2005**, 48, 7860–7866.
- (19) Nishimori, I.; Minakuchi, T.; Onishi, S.; Vullo, D.; Andrea Scozzafava, A.; Claudiu T. Supuran. *Med. Chem.* **2007**, 50, 381–388.
- (20) Vullo, D.; Voipio, J.; Innocenti, A.; Rivera, C.; Ranki, H.; Scozzafava, A.; Kaila, K.; Supuran, C. T. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, 15 (4), 971–976.
- (21) Whittington, D. A.; Waheed, A.; Ulmasov, B.; Shah, G. N.; Grubb, J. H.; Sly, W. S.; Christianson, D. W. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2001**, 98 (17), 9545–9550.
- (22) Lehtonen, J.; Shen, B.; Vihinen, M.; Casini, A.; Scozzafava, A.; Supuran, C. T.; Parkkila, A.-K.; Saarnio, J.; Kivelä, A. J.; Waheed, A.; Sly, W. S.; Parkkila, S. *J. Biol. Chem.* **2004**, 279 (4), 2719–2727.
- (23) Scozzafava, A.; Menabuoni, L.; Mincione, F.; Briganti, F.; Giovanna Mincione, A.; Claudiu T. Supuran*. *J. chem. med.* **1999**, 42 (14), 2641–2650.
- (24) Briganti, F.; Mangani, S.; Orioli, P.; Scozzafava, A.; Guido Vernaglion, A.; Supuran, C. T. **1997**, 36 (34), 10384–10392.
- (25) Annalisa Guerri; Fabrizio Briganti; Andrea Scozzafava; Claudiu T. Supuran, and; Stefano Mangani. *Biochemistry* **2000**, 39 (40), 12391–12397.
- (26) Supuran, C. T.; Scozzafava, A.; Casini, A. *Med. Res. Rev.* **2003**, 23 (2), 146–189.
- (27) Supuran, C. T.; Scozzafava, A. *Expert Opin. Ther. Pat.* **2000**, 10 (5), 575–600.
- (28) Supuran, C. T.; Scozzafava, A. *Expert Opin. Ther. Pat.* **2002**, 12 (2), 217–242.
- (29) Stams, T.; Christianson, D. W. In *The Carbonic Anhydrases*; Birkhäuser Basel: Basel, 2000; 159–174.
- (30) Mitsuhashi, S.; Mizushima, T.; Yamashita, E.; Yamamoto, M.; Kumasaka, T.; Moriyama, H.; Ueki, T.; Miyachi, S.; Tsukihara, T. *J. Biol. Chem.* **2000**, 275 (8), 5521–5526.
- (31) Kisker, C.; Schindelin, H.; Alber, B. E.; Ferry, J. G.; Rees, D. C. *EMBO J.* **1996**, 15 (10), 2323–2330.
- (32) Tina M. Iverson; Birgit E. Alber; Caroline Kisker; James G. Ferry, and;

- Douglas C. Rees. *Biochemistry* **2000**, 39 (31), 9222–9231.
- (33) Smith, K. S.; Ferry, J. G. *FEMS Microbiol. Rev.* **2000**, 24 (4), 335–366.
- (34) Innocenti, A.; Scozzafava, A.; Parkkila, S.; Puccetti, L.; De Simone, G.; Supuran, C. T. *Investigations of the esterase, phosphatase, and sulfatase activities of the cytosolic mammalian carbonic anhydrase isoforms I, II, and XIII with 4-nitrophenyl esters as substrates*; 2008; Vol. 18.
- (35) Liljas, A.; Kannan, K. K.; Bergsten, P. C.; Waara, I. .; Fridborg, K.; Strandberg, B.; Carlbom, U.; Jarup, L. .; Lovgren, S.;Petef, M. *Nat. New Biol.* **1972**, 235, 131–137.
- (36) Liljas, A.; Håkansson, K.; Jonsson, B. H.; Xue, Y. In *EJB Reviews 1994*; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 1994; 1–10.
- (37) Cronk, J. D.; Endrizzi, J. A.; Cronk, M. R.; O’neill, J. W.; Zhang, K. Y. J. *Protein Sci.* **2001**, 10 (5), 911–922.
- (38) Elizabeth H. Cox; George L. McLendon; François M. M. Morel; Todd W. Lane; Roger C. Prince; Ingrid J. Pickering, A.; Graham N. George. *Biochemistry* **2000**, 39 (40), 12128–12130.
- (39) Kimber, M. S. and Pai, E. F. *EMBO J.* **2000**, 19 (7), 1407–1418.
- (40) Carta, F.; Maresca, A.; Covarrubias, A. S.; Mowbray, S. L.; Jones, T. A.; Supuran, C. T. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, 19 (23), 6649–6654.
- (41) Suarez Covarrubias, A.; Larsson, A. M.; Högbom, M.; Lindberg, J.; Bergfors, T.; Björkelid, C.; Mowbray, S. L.; Unge, T.; Jones, T. A. *J. Biol. Chem.* **2005**, 280 (19), 18782–18789.
- (42) Covarrubias, A. S.; Bergfors, T.; Jones, T. A.; Högbom, M. *J. Biol. Chem.* **2006**, 281 (8), 4993–4999.
- (43) Nishimoria, I.; Minakuchia, T.; Marescab, A.; Cartab, F.; Scozzafava, A.; T. Supuran, C. *Curr. Pharm. Des.* **2010**, 16 (29), 3300–3309.
- (44) Supuran, C. T. *Curr. Med. Chem.* **2012**, 19 (6), 831–844.
- (45) Joseph, P.; Turtaut, F.; Ouahrani-Bettache, S.; Montero, J.-L.; Nishimori, I.; Minakuchi, T.; Vullo, D.; Scozzafava, A.; Köhler, S.; Winum, J.-Y.; Supuran, C. T. *J. Med. Chem.* **2010**, 53 (5), 2277–2285.
- (46) Vullo, D.; Nishimori, I.; Scozzafava, A.; Köhler, S.; Winum, J.-Y.; Supuran, C. T. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, 20 (7), 2178–2182.
- (47) Takeuchi, H.; Supuran, C.; Onishi, S.; Nishimori, I. *Curr. Pharm. Des.* **2008**, 14 (7), 622–630.
- (48) Minakuchi, T.; Nishimori, I.; Vullo, D.; Scozzafava, A.; Supuran, C. T. *J. Med.*

- Chem.* **2009**, 52 (8), 2226–2232.
- (49) Nishimori, I.; Minakuchi, T.; Vullo, D.; Scozzafava, A.; Innocenti, A.; Supuran, C. T. *J. Med. Chem.* **2009**, 52 (9), 3116–3120.
- (50) Smith, K. S.; Jakubzick, C.; Whittam, T. S.; Ferry, J. G. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1999**, 96 (26), 15184–15189.
- (51) Rowlett, R. S. *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics* **2010**, 1804 (2), 362–373.
- (52) Winum, J.-Y.; Kohler, S.; T. Supuran, C. *Curr. Pharm. Des.* **2010**, 16 (29), 3310–3316.
- (53) Supuran, C. T. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2008**, 7, 168–181.
- (54) Pastorek, J.; Pastoreková, S.; Callebaut, I.; Mornon, J. P.; Zelník, V.; Opavský, R.; Zát'ovicová, M.; Liao, S.; Portetelle, D.; Stanbridge, E. J. *Oncogene* **1994**, 9 (10), 2877–2888.
- (55) Parkkila, S. In *The Carbonic Anhydrases*; Birkhäuser Basel: Basel, 2000; pp 79–93.
- (56) Pastorekova, S.; Parkkila, S.; Pastorek, J.; Supuran, C. T. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2004**, 19 (3), 199–229.
- (57) Zimmerman, S.; Innocenti, A.; Casini, A.; Ferry, J. G.; Scozzafava, A.; Supuran, C. T. *Carbonic anhydrase inhibitors. Inhibition of the prokariotic beta and gamma-class enzymes from Archaea with sulfonamides*; 2004; Vol. 14.
- (58) Klengel, T.; Liang, W.-J.; Chaloupka, J.; Ruoff, C.; Schröppel, K.; Naglik, J. R.; Eckert, S. E.; Mogensen, E. G.; Haynes, K.; Tuite, M. F.; Levin, L. R.; Buck, J.; Mühlischlegel, F. A. *Fungal Adenylyl Cyclase Integrates CO₂ Sensing with cAMP Signaling and Virulence*; 2005; Vol. 15.
- (59) Nishimori, I.; Minakuchi, T.; Morimoto, K.; Shuichi Sano; Saburo Onishi; Hiroaki Takeuchi; Daniela Vullo; Andrea Scozzafava and; Claudiu T. Supuran. *J. Med. Chem.* **2006**, 49 (6), 2117–2126.
- (60) Nishimori, I.; Vullo, D.; Minakuchi, T.; Morimoto, K.; Onishi, S.; Scozzafava, A.; Supuran, C. T. *Carbonic anhydrase inhibitors: Cloning and sulfonamide inhibition studies of a carboxyterminal truncated α -carbonic anhydrase from Helicobacter pylori*; 2006; Vol. 16.
- (61) Krungkrai, J.; Scozzafava, A.; Reungprapavut, S.; Krungkrai, S. R.; Rattanajak, R.; Kamchonwongpaisan, S.; Supuran, C. T. *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, 13 (2), 483–489.
- (62) Park, Y.-I.; Karlsson, J.; Rojdestvenski, I.; Pronina, N.; Klimov, V.; Öquist, G.;

- Samuelsson, G. *FEBS Lett.* **1999**, *444* (1), 102–105.
- (63) Nishimori, I.; Minakuchi, T.; Kohsaki, T.; Onishi, S.; Takeuchi, H.; Vullo, D.; Scozzafava, A.; Supuran, C. T. *Carbonic anhydrase inhibitors: The β -carbonic anhydrase from Helicobacter pylori is a new target for sulfonamide and sulfamate inhibitors*; 2007; Vol. 17.
- (64) Casini, A.; Antel, J.; Abbate, F.; Scozzafava, A.; David, S.; Waldeck, H.; Schäfer, S.; Supuran, C. T. *Carbonic anhydrase inhibitors: SAR and X-ray crystallographic study for the interaction of sugar sulfamates/sulfamides with isozymes I, II and IV*; 2003; Vol. 13.
- (65) Simone, G. De; Fiore, A. Di; Menchise, V.; Pedone, C.; Antel, J.; Casini, A.; Scozzafava, A.; Wurl, M.; Supuran, C. T. *Carbonic anhydrase inhibitors. Zonisamide is an effective inhibitor of the cytosolic isozyme II and mitochondrial isozyme V: solution and X-ray crystallographic studies*; 2005; Vol. 15.
- (66) Alterio, V.; Vitale, R. M.; Monti, S. M.; Pedone, C.; Scozzafava, A.; Cecchi, A.; De Simone, G., and; Supuran, C. T.. **2006**, *128* (25), 8329–8335.
- (67) Abbate, F.; Winum, J.-Y.; Potter, B. V. L.; Casini, A.; Montero, J.-L.; Scozzafava, A.; Supuran, C. T. *Carbonic anhydrase inhibitors: X-ray crystallographic structure of the adduct of human isozyme II with EMATE, a dual inhibitor of carbonic anhydrases and steroid sulfatase*; 2004; Vol. 14.
- (68) Winum, J.-Y.; Temperini, C.; El Cheikh, K.; Innocenti, A.; Vullo, D.; Ciattini, S.; Montero, J.-L.; Scozzafava, A.; Supuran, C. T.. *J. Med. Chem.* **2006**, *49* (24), 7024–7031.
- (69) Menchise, V.; De Simone, G.; Alterio, V.; Di Fiore, A.; Pedone, C.; Scozzafava, A., and; Supuran, C. T.. **2005**, *48* (18), 5721–5727.
- (70) Durdagi, S.; Şentürk, M.; Ekinci, D.; Balaydın, H. T.; Göksu, S.; Küfrevioğlu, Ö. İ.; Innocenti, A.; Scozzafava, A.; Supuran, C. T. *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, *19* (4), 1381–1389.
- (71) Nair, S. K.; Ludwig, P. A.; Christianson, D. W. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116* (8), 3659–3660.
- (72) Davis, R. A.; Innocenti, A.; Poulsen, S.-A.; Supuran, C. T. *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18* (1), 14–18.
- (73) Davis, R. A.; Hofmann, A.; Osman, A.; Hall, R. A.; Mühlischlegel, F. A.; Vullo, D.; Innocenti, A.; Supuran, C. T.; Poulsen, S.-A. *J. Med. Chem.* **2011**, *54* (6), 1682–1692.
- (74) Maresca, A.; Temperini, C.; Vu, H.; Pham, N. B.; Poulsen, S.-A.; Scozzafava, A.; Quinn, R. J.; Supuran, C. T. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131* (8), 3057–3062.

- (75) Maresca, A.; Temperini, C.; Pochet, L.; Masereel, B.; Scozzafava, A.; Supuran, C. T. *J. Med. Chem.* **2010**, *53* (1), 335–344.
- (76) Davis, R.; Vullo, D.; Maresca, A.; Supuran, C.; Poulsen, S.-A. *Bioorg. Med. Chem.* **2013**, *21* (6), 1539–1543.
- (77) Marzano, C.; Ronconi, L.; Chiara, F.; Giron, M. C.; Faustinelli, I.; Cristofori, P.; Trevisan, A.; Fregona, D. *Int. J. Cancer* **2011**, *129* (2), 487–496.
- (78) Amin, E.; Saboury, A. A.; Mansuri-Torshizi, H.; Moosavi-Movahedi, A. A. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2010**, *25* (2), 272–281.
- (79) Innocenti A, Scozzafava A, S. C. *Bioorg Med Chem Lett* **2009**, *19*, 1855–1857.
- (80) Innocenti, A.; Scozzafava, A.; Supuran, C. T. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20* (5), 1548–1550.
- (81) Temperini, C.; Scozzafava, A.; Supuran, C. T. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20* (2), 474–478.
- (82) Neri, D.; S. C. T. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2011**, *10*, 767.
- (83) Lou, Y.; McDonald, P. C.; Oloumi, A.; Chia, S.; Ostlund, C.; Ahmadi, A.; Kyle, A.; auf dem Keller, U.; Leung, S.; Huntsman, D.; Clarke, B.; Sutherland, B. W.; Waterhouse, D.; Bally, M.; Roskelley, C.; Overall, C. M.; Minchinton, A.; Pacchiano, F.; Carta, F.; Scozzafava, A.; Touisni, N.; Winum, J.-Y.; Supuran, C. T.; Dedhar, S. *Cancer Res.* **2011**, *71* (9).
- (84) Alterio, V.; Hilvo, M.; Di Fiore, A.; Supuran, C. T.; Pan, P.; Parkkila, S.; Scaloni, A.; Pastorek, J.; Pastorekova, S.; Pedone, C.; Scozzafava, A.; Monti, S. M.; De Simone, G. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2009**, *106* (38), 16233–16238.
- (85) Supuran, C. T.; Scozzafava, A.; Jurca, B. C.; Ilies, M. A. *Eur. J. Med. Chem.* **1998**, *33* (2), 83–93.
- (86) Scozzafava, A.; Supuran, C. T. *J. Enzyme Inhib.* **1998**, *13* (2), 103–123.
- (87) Scozzafava, A.; Supuran, C. T. *J. Enzyme Inhib.* **1999**, *14* (5), 343–363.
- (88) Scozzafava, A.; Banciu, M. D.; Popescu, A.; Supuran, C. T. *J. Enzyme Inhib.* **2000**, *15* (6), 533–546.
- (89) Pastorekova, S.; Parkkila, S.; Parkkila, A.; Opavsky, R.; Zelnik, V.; Saarnio, J.; Pastorek, J. *Gastroenterology* **1997**, *112* (2), 398–408.
- (90) Kivela, A.; Parkkila, S.; Saarnio, J.; Karttunen, T. *J. Gast.* **2005**.
- (91) Saarnio, J.; Parkkila, S.; Parkkila, A.-K.; Haukipuro, K.; Pastoreková, S.; Pastorek, J.; Kairaluoma, M. I.; Karttunen, T. *J. Am. J. Pathol.* **1998**, *153* (1),

279–285.

- (92) Karhumaa, P.; Kaunisto, K.; Parkkila, S.; Waheed, A.; Pastoreková, S.; Pastorek, J.; Sly, W. S.; Rajaniemi, H. *MHR Basic Sci. Reprod. Med.* **2001**, *7* (7), 611–616.
- (93) Ivanov, S.; Liao, S.-Y.; Ivanova, A.; Danilkovitch-Miagkova, A.; Tarasova, N.; Weirich, G.; Merrill, M. J.; Proescholdt, M. A.; Oldfield, E. H.; Lee, J.; Zavada, J.; Waheed, A.; Sly, W.; Lerman, M. I.; Stanbridge, E. J. *Am. J. Pathol.* **2001**, *158* (3), 905–919.
- (94) Liao, S. Y.; Brewer, C.; Závada, J.; Pastorek, J.; Pastorekova, S.; Manetta, A.; Berman, M. L.; DiSaia, P. J.; Stanbridge, E. J. *Am. J. Pathol.* **1994**, *145* (3), 598–609.
- (95) Turner, J. .; Odze, R. .; Crum, C. .; Resnick, M. . *Hum. Pathol.* **1997**, *28* (6), 740–744.
- (96) Liao, S.-Y.; Aurelio, O. N.; Jan, K.; Zavada, J.; Stanbridge, E. J. *Cancer Res.* **1997**, *57* (14).
- (97) Watson, P. H.; Chia, S. K.; Wykoff, C. C.; Han, C.; Leek, R. D.; Sly, W. S.; Gatter, K. C.; Ratcliffe, P.; Harris, A. L. *Br. J. Cancer* **2003**, *88* (7), 1065–1070.
- (98) 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. *Natl. Acad. ...* **1998**, *95*, 7608–7613.
- (99) Švastová, E.; Hulíková, A.; Rafajová, M.; Zat'ovičová, M.; Gibadulinová, A.; Casini, A.; Cecchi, A.; Scozzafava, A.; Supuran, C. T.; Pastorek, J.; Pastoreková, S. *FEBS Lett.* **2004**, *577* (3), 439–445.
- (100) Swietach, R.; Wigfield, S.; Cobden, P.; Supuran, C. T.; Harris, A. L.; Vaughan-fones, R. D. *Biol Chem.* **2008**, *283*, 2047–2048.
- (101) Chiche, J.; Ilc, K.; Laferrière, J.; Trottier, E.; Dayan, F.; Mazure, N. M.; Brahimi-Horn, M. C.; Pouysségur, J. *Cancer Res.* **2008**, *69* (1).
- (102) Parkkila, S.; Rajaniemi, H.; Parkkila, A. K.; Kivela, J.; Waheed, A.; Pastorekova, S.; Pastorek, J.; Sly, W. S. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2000**, *97* (5), 2220–2224.
- (103) Ernst, Beat; Magnani, J. L. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2009**, *8*, 661.
- (104) Koester, D.; Holkenbrink, A.; Werz, D. *Synt.* **2010**, *2010* (19), 3217–3242.
- (105) E. A. Taylor; Clinch, K.; Kelly, P. M.; Li, L.; Evans, G. B.; Tyler, P. C. and; Schramm, V. L. **2007**.
- (106) Colinas, P. *Curr. Org. Chem.* **2012**.

- (107) Winum, J.; Colinas, P.; Supuran, C. *Bioorg. Med. Chem.* **2013**.
- (108) Wilkinson, B. L.; Bornaghi, L. F.; Houston, T. A.; Innocenti, A.; Supuran, C. T. & Poulsen, S.-A. **2006**.
- (109) Wilkinson, B. L.; Bornaghi, L. F.; Houston, T. A.; Innocenti, A.; Vullo, D.; Supuran, C. T.; Poulsen, S.-A. *Inhibition of membrane-associated carbonic anhydrase isozymes IX, XII and XIV with a library of glycoconjugate benzenesulfonamides*; 2007; Vol. 17.
- (110) Wilkinson, B. L.; Bornaghi, L. F.; Houston, T. A.; Innocenti, A.; Vullo, D.; Claudiu T. Supuran And; Poulsen, S.-A. **2007**.
- (111) Wilkinson, B. L.; Innocenti, A.; Vullo, D.; Supuran, C. T.; Poulsen, S.-A. *J. Med. Chem.* **2008**, 51 (6), 1945–1953.
- (112) Singer, M.; Lopez, M.; Bornaghi, L. F.; Innocenti, A.; Vullo, D.; Supuran, C. T.; Poulsen, S.-A. *Inhibition of carbonic anhydrase isozymes with benzene sulfonamides incorporating thio, sulfinyl and sulfonyl glycoside moieties*; 2009; Vol. 19.
- (113) Winum, J.-Y.; Casini, A.; Mincione, F.; Starnotti, M.; Montero, J.-L. ; Scozzafava, A.; Supuran, C. T. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, 14 (1), 225–229.
- (114) Touisni, N.; Maresca, A.; McDonald, P. C.; Lou, Y.; Scozzafava, A.; Dedhar, S.; Winum, J.-Y.; Supuran, C. T. *J. Med. Chem.* **2011**, 54 (24), 8271–8277.
- (115) Lopez, M.; Drillaud, N.; Bornaghi, L. F.; Poulsen, S.-A. *J. Org. Chem.* **2009**, 74 (7), 2811–2816.
- (116) Colinas, P.; Témpera, C.; Rodríguez, O.; Bravo, R. *Synt.* **2009**, 2009 (24), 4143–4148.
- (117) Colinas, P. A.,Rodolfo D.Bravo,DanielaVullo,Andrea Scozzafava, C. T. S. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, 17 (18), 5086–5090.
- (118) Colinas,P. A. and Bravo, R. D. *Carbohydr. Res.* **2007**, 342 (15), 2297–2302.
- (119) Colinas, P. A. and; Bravo, R. D. **2003**.
- (120) Rodrigues, F.; Canac, Y.; Lubineau, A. *Chem. Comm.* **2000**, 2049.
- (121) Winum, J.-Y.; Poulsen, S.-A.; Supuran, C. T. *Med. Res. Rev.* **2009**, 29 (3), 419–435.
- (122) Gong , H.; Sinisi, R. A.; Gagné, M. R. **2007**.
- (123) Bai, Y.; Kim, L. M. H.; Liao, H.; Liu, X.-W. *J. Org. Chem.* **2013**, 78 (17), 8821–8825.

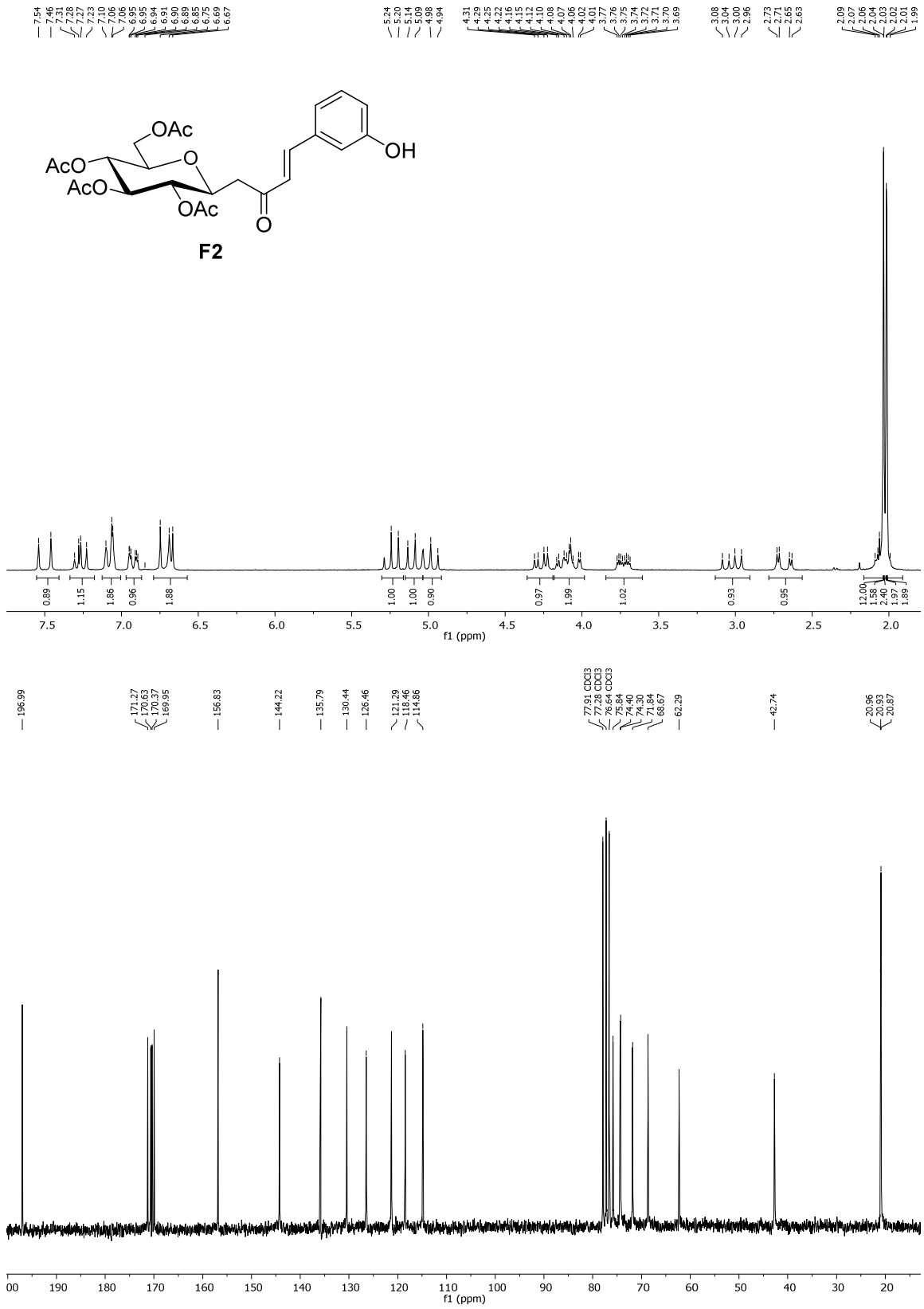
- (124) Sendai Fukusokan Kagaku Kenkyūjo., P.; Nihon Fukusokan Kagaku Kenkyūjo., T.; Marca, E. *Heterocycles*; Sendai Institute of Heterocyclic Chemistry, 2012; Vol. 86.
- (125) Yamamoto, Y.; Hashimoto, T.; Hattori, K.; Makoto Kikuchi And; Nishiyama, H. **2006**.
- (126) Leidy, M. R.; Hoffman, J. M.; Pongdee, R. *Tetrahedron Lett.* **2013**, 54 (50), 6889–6891.
- (127) Löppenber, M.; Müller, H.; Pulina, C.; Oddo, A.; Teese, M.; Jose, J.; Holl, R.; Raetz, C. R. H.; Collantes, E. M.; Chung, S. W.; Desbonnet, C.; Doty, J.; Doroski, M.; Engtrakul, J. J.; Harris, T. M.; Huband, M.; Knafels, J. D.; Leach, K. L.; Liu, S.; Marfat, A.; Marra, A.; McElroy, E.; Melnick, M.; Menard, C. A.; Montgomery, J. I.; Mullins, L.; Noe, M. C.; O'Donnell, J.; Penzien, J.; Plummer, M. S.; Price, L. M.; Shanmugasundaram, V.; Thoma, C.; Uccello, D. P.; Warmus, J. S.; Wishka, D. G. *Org. Biomol. Chem.* **2013**, 11 (36), 6056.
- (128) Chen, Q.; Zhong, Y.; O'Doherty, G. A.; Ikariya, T.; Noyori, R.; O'Doherty, G. A. *Chem. Commun.* **2013**, 49 (60), 6806.
- (129) Liang, D.; Luo, H.; Liu, Y.-F.; Hao, Z.-Y.; Wang, Y.; Zhang, C.-L.; Zhang, Q.-J. . C.; R.-Y.; Yu, D. -Q. *Tetrahedron* **2013**, 69 (9), 2093–2097.
- (130) Cobo, I.; Matheu, M. I.; Castillón, S.; Boutureira, O.; Davis, B. G. *Org. Lett.* **2012**, 14 (7), 1728–1731.
- (131) Handa, M.; Scheidt, K. A.; Bossart, M.; Nan Zheng And; Roush, W. R. **2007**.
- (132) G. E. M.; Barrett, A. G. M. **2006**.
- (133) Robina, I.; Vogel, P. *Synt.* **2005**, 2005 (5), 675–702.
- (134) Yu, X.; Dai, Y.; Yang, T.; Gagné, M. R.; Gong, H. *Tetrahedron* **2011**, 67 (1), 144–151.
- (135) Gong, H.; Gagné, M. R. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130 (36), 12177–12183.
- (136) Ousmer, M.; Boucard, V.; Lubin-Germain, N.; Uziel, J.; Augé, J. *European J. Org. Chem.* **2006**, 2006 (5), 1216–1221.
- (137) Horton, D. and M. T. *Carbohydr. Res.* **1988**, 184, 221–229.
- (138) Nicolaou, K. C.; Hwang, C.-K.; Duggan, M. E. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1986**, 925–926.
- (139) Perrin, D. D.; Armarego, W. L. F. *Purification of Laboratory Chemicals*, 3ra ed.; Pergamon Press., 1988.
- (140) Howard, S. and; Withers, S. G. **1998**.

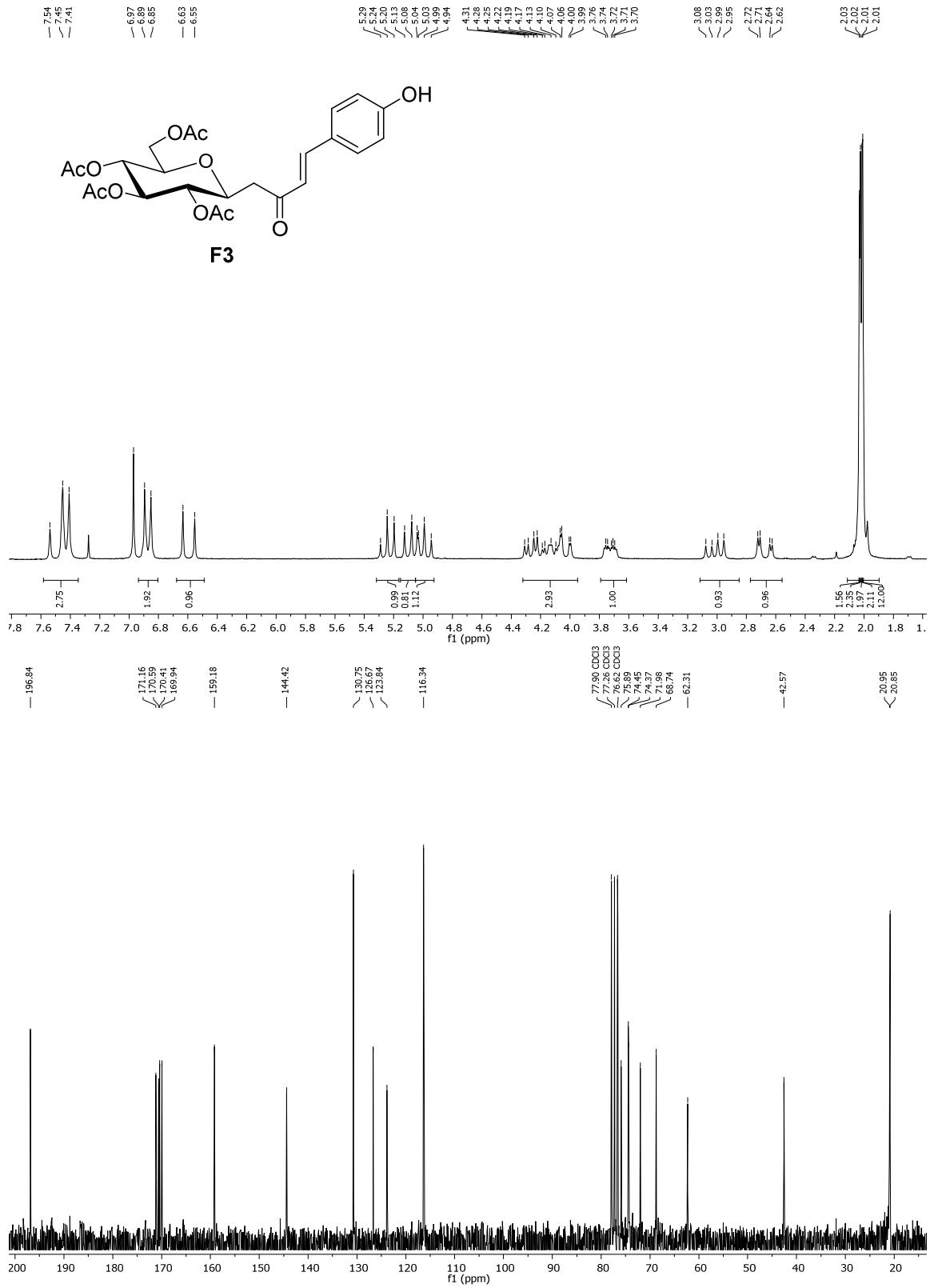
- (141) Bragnier, N.; Scherrmann, M.-C. *Synt.* **2005**, *2005* (5), 814–818.
- (142) Vogel, I.; Furniss, B.S; Hannaford, A.J; Rogers, B.; Smith, S.W.G; Tatchell, A. R. *Vogel's Textbook of Practical Organic Chemistry*, 5ta ed.; New York, **2000**.
- (143) Wolfrom, W. M. L. *Methods in carbohydrate chemistry Vol II*; Press, R. L. A., Ed.; New York, **1963**.
- (144) Ferrier, R.; Sankey, G. *J. Chem. Soc. C Org.* **1966**.
- (145) Parke, D. V. and W. R. T. *J. Chem. Soc.* **1950**, 1757–1760.
- (146) Appel, R.; Berger, G. *Chem. Ber.* **1958**, *91* (6), 1339–1341.
- (147) Khalifah, R. G. *J. Biol. Chem.* **1971**, *246* (8), 2561–2573.
- (148) Yung-Chi, C.; Prusoff, W. H. *Biochem. Pharmacol.* **1973**, *22* (23), 3099–3108.
- (149) Wang, J.; Li, Q.; Ge, Z. and Li, R. *Tetrahedron* **2012**, *68*, 1315–1320.
- (150) Bisht, S.; Pandey, J.; Sharma, A. and Tripathi, P. *Carbohydr. Res.* **2008**, *343* (9), 1399–1406.
- (151) Nagarajan, S.; Jeganathan Shanmugam, M.; Mohan Das, T. *Carbohydr. Res.* **2011**, *346* (6), 722–727.
- (152) Winum, J.-Y.; Vullo, D.; Casini, A.; Montero, J.-L.; Scozzafava, A. and Supuran, C. T.. **2003**.
- (153) Meier, L.; Monteiro, G. C.; Baldissera, R. A. M.; Sá, M. M. *J. Braz. Chem. Soc.* **2010**, *21* (5), 859–866.
- (154) Zhiyuan Zhang; Ian R. Ollmann; Xin-Shan Ye; Ralf Wischnat; Timor Baasov, A.; Wong, C.H. **1999**.
- (155) Paulson, H.; Richter, A.; Sinnwell, H. and Stenzel, W. *Carbohydr. Res.* **1974**, *38*, 312.
- (156) Lin, H.; Du, W.; Chan, C. and L. C. *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46* (30), 5071–5076.
- (157) Alegre, M. L.; Pis Diez, R.; Colinas, P. A. *J. Mol. Struct.* **2009**, *919* (1–3), 223–226.
- (158) Colinas, P. A.; Bravo, R. D.; Echeverria, G. A. *Carbohydr. Res.* **2008**, *343*, 3006–3009.
- (159) Lavecchia, M. J; Pis Diez, R.; Colinas, P. A. *Carbohydr. Res.* **2011**, *346*, 442–445.

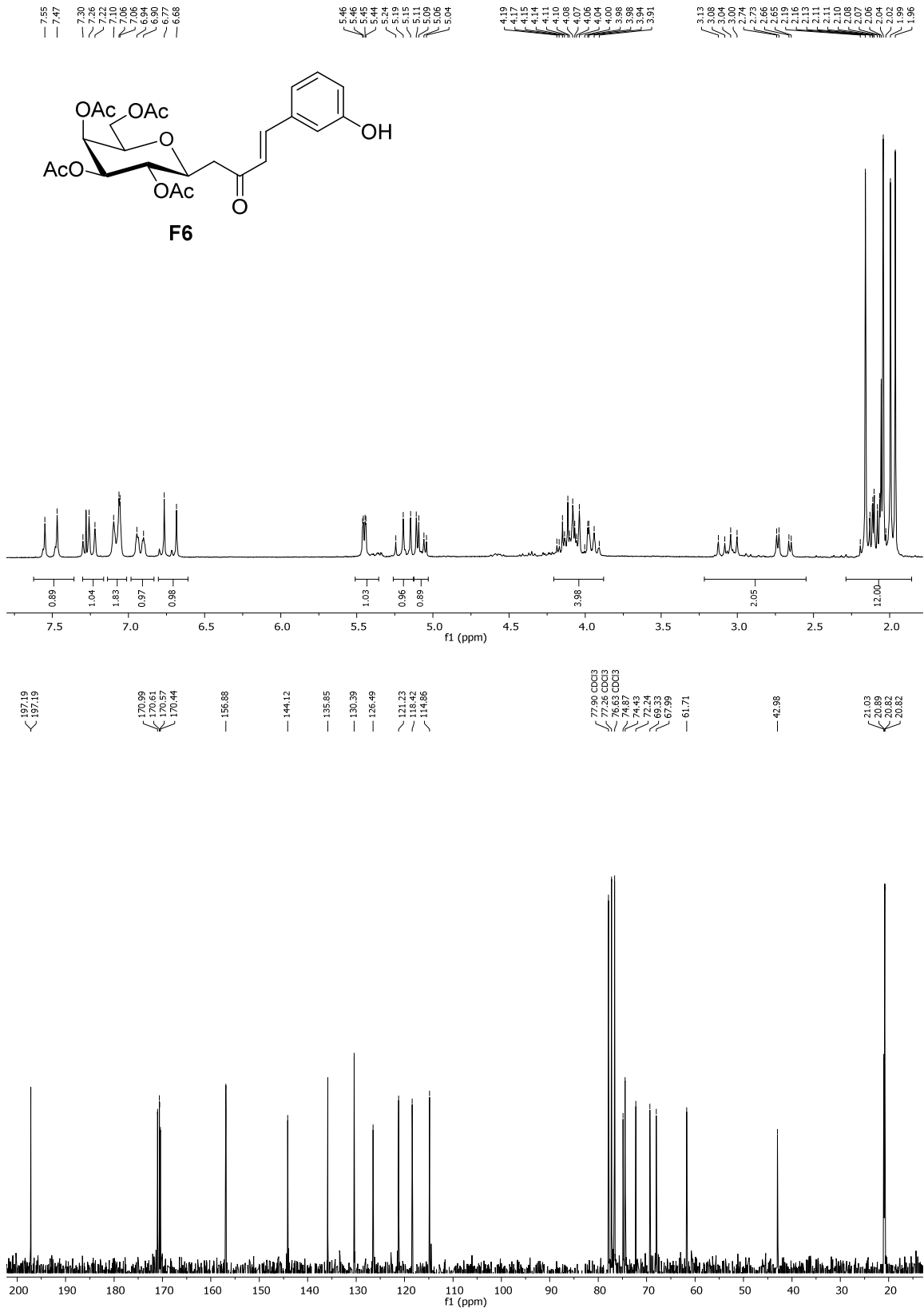
BIBLIOGRAFÍA

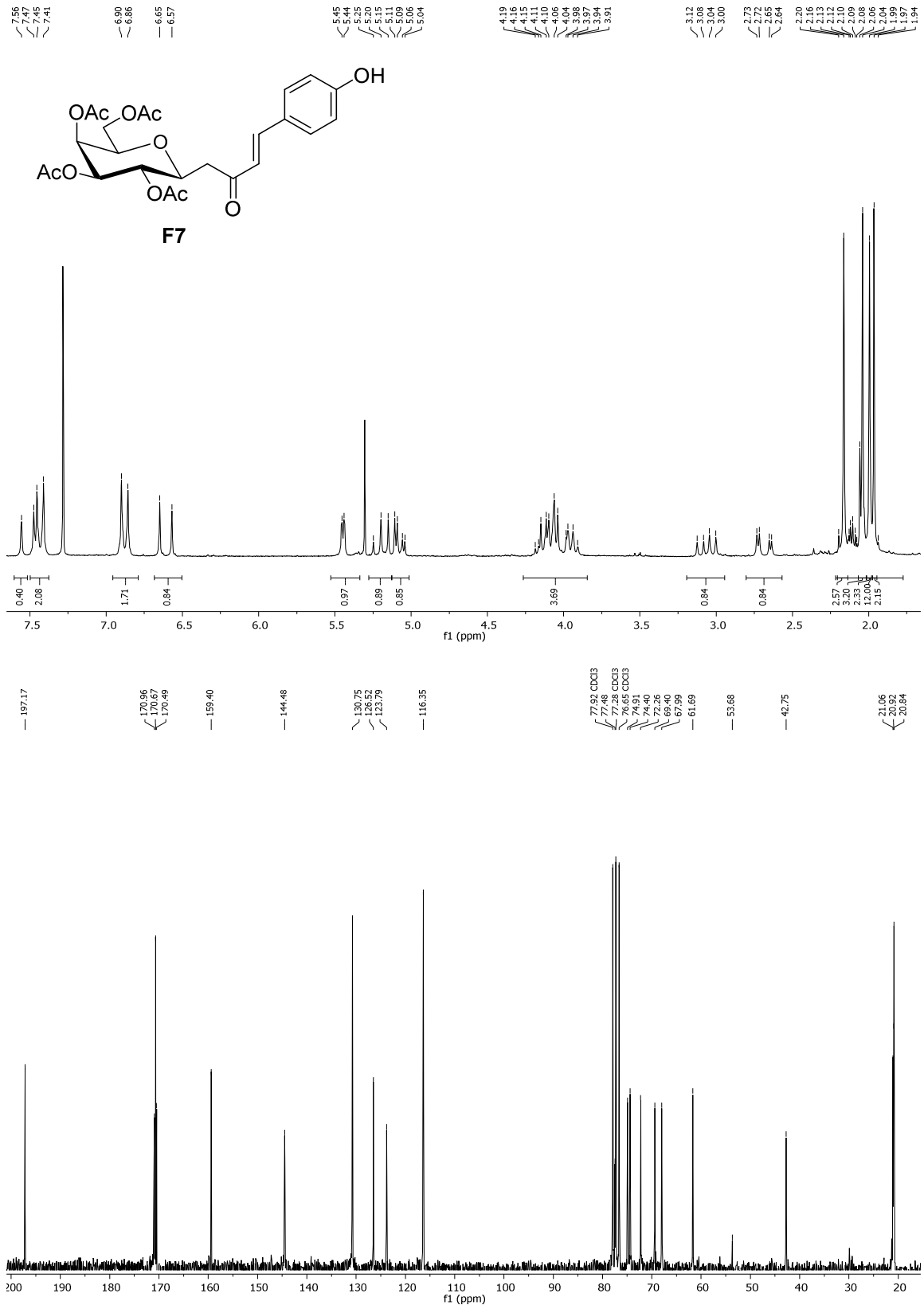
- (160) Randell , K. D.; Johnston, B. D.; Green, D. F., and; Pinto, B. M. **1999**.
- (161) Wolfe, S.; Pinto, B. M.; Varma, V.; Leung, R. Y. N. *Can. J. Chem.* **1990**, 68 (7), 1051–1062.
- (162) Wolfe, S.; Kim, C.-K. *Can. J. Chem.* **1991**, 69 (9), 1408–1412.
- (163) Mugunthan, G.; Ramakrishna, K.; Sriram, D.; Yogeeswari, P.; Ravindranathan Kartha, K. P. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, 21 (13), 3947–3950.
- (164) Abbate, F.; Supuran, C. T.; Scozzafava, A.; Orioli, P.; Stubbs, M. T. and; Klebe, G.. **2002**.

***Anexo: Espectros
Seleccionados***



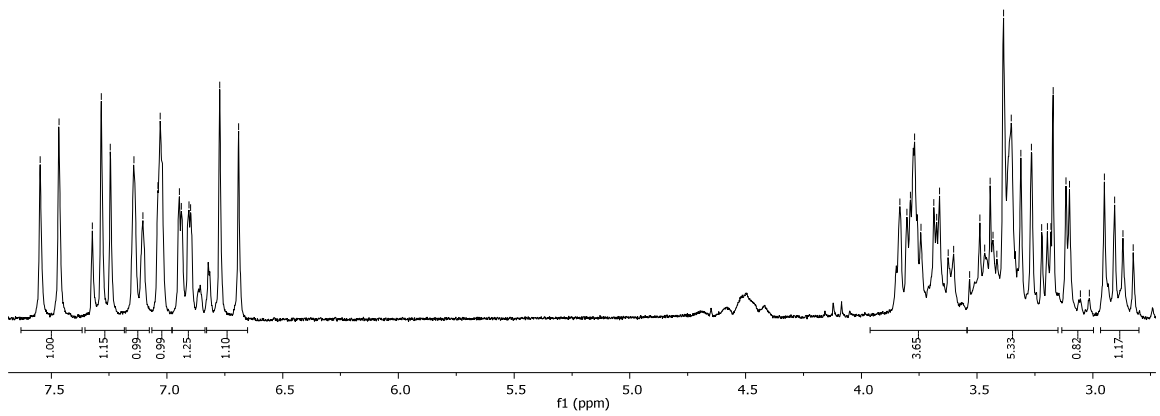
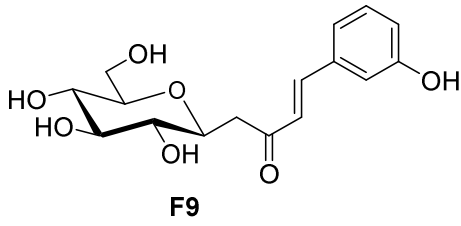




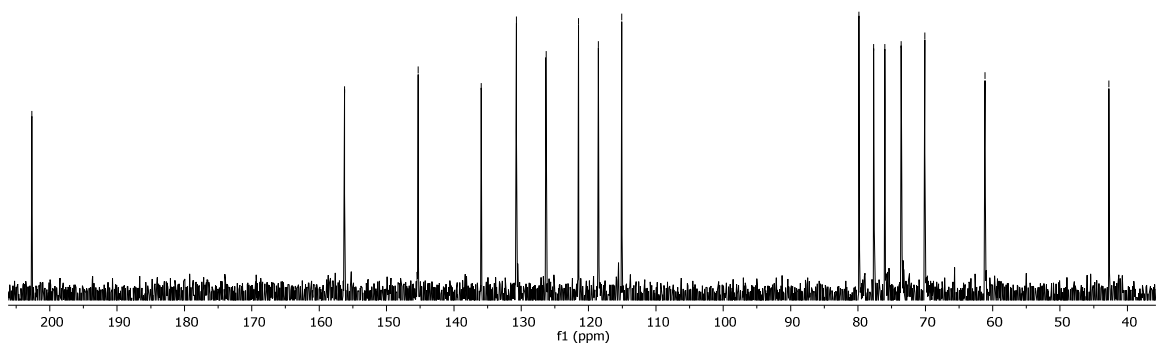


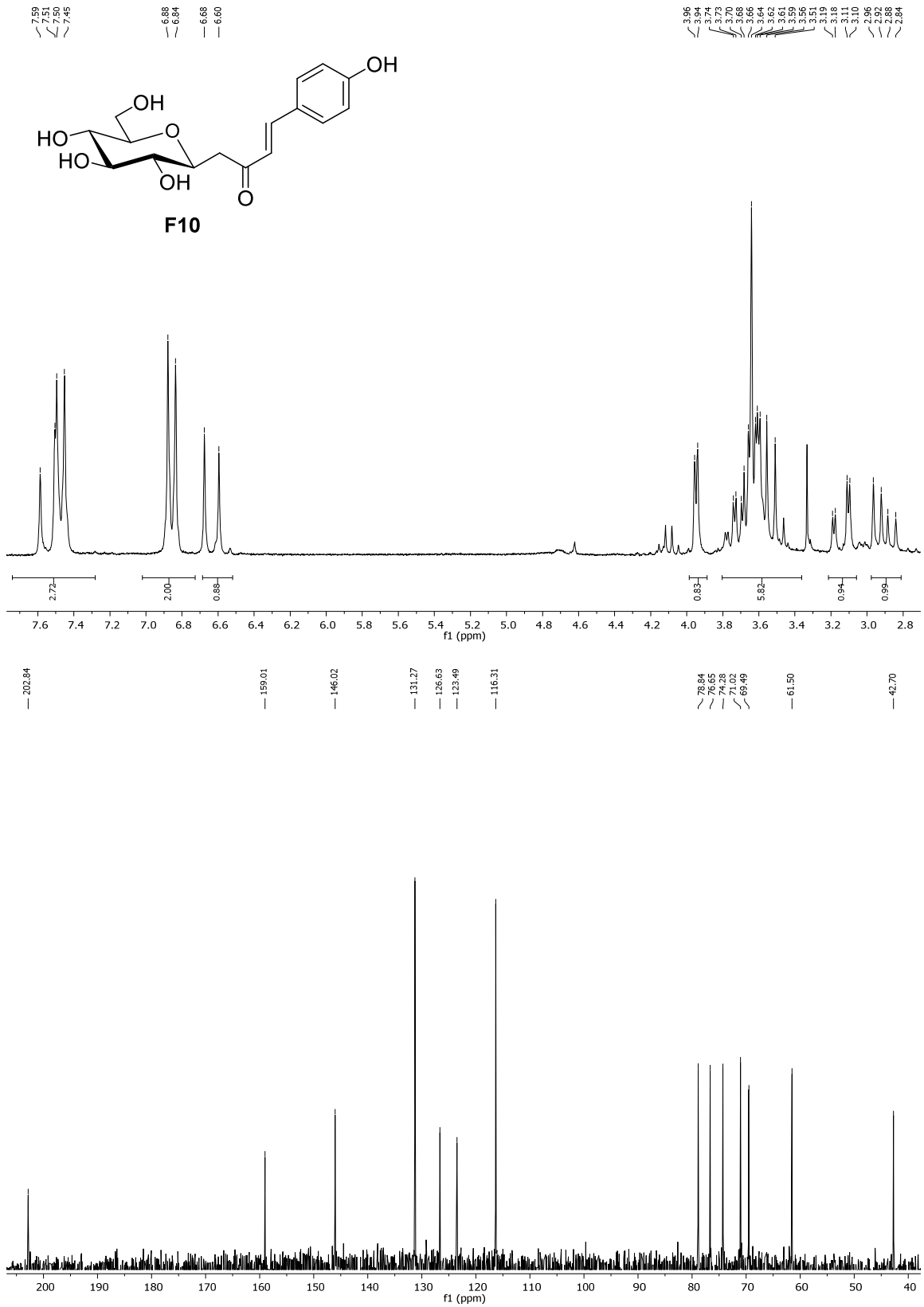
7.55
7.47
7.33
7.28
7.24
7.14
7.10
7.04
6.95
6.91
6.94
6.90
6.77
6.69

3.83
3.80
3.79
3.77
3.74
3.69
3.67
3.66
3.62
3.60
3.53
3.49
3.44
3.43
3.41
3.39
3.35
3.27
3.22
3.20
3.18
3.17
3.12
3.10
3.05
3.01
2.95
2.91
2.87
2.82



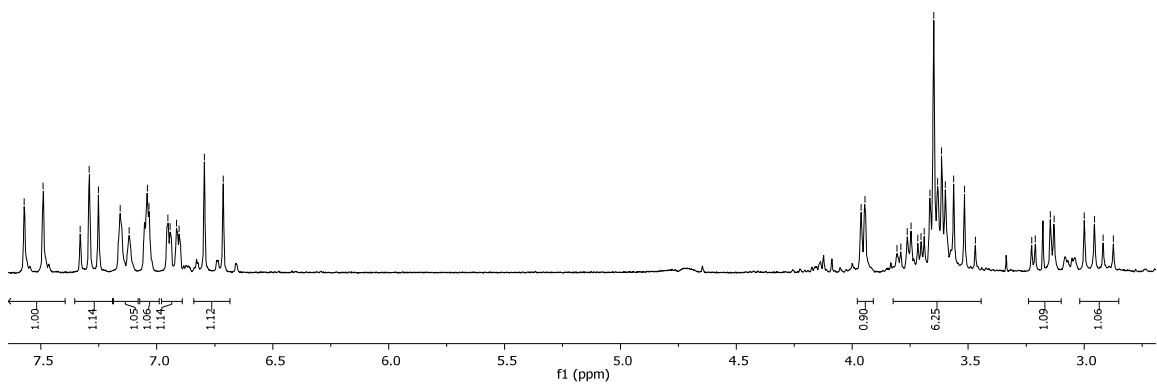
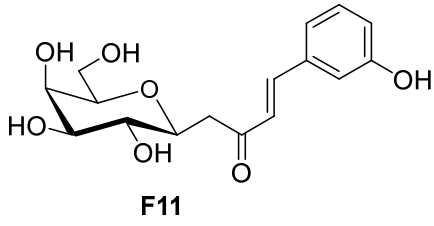
202.65
156.23
145.30
135.93
130.70
126.31
121.51
118.64
115.86
79.85
77.67
76.02
73.58
70.09
61.16
42.74



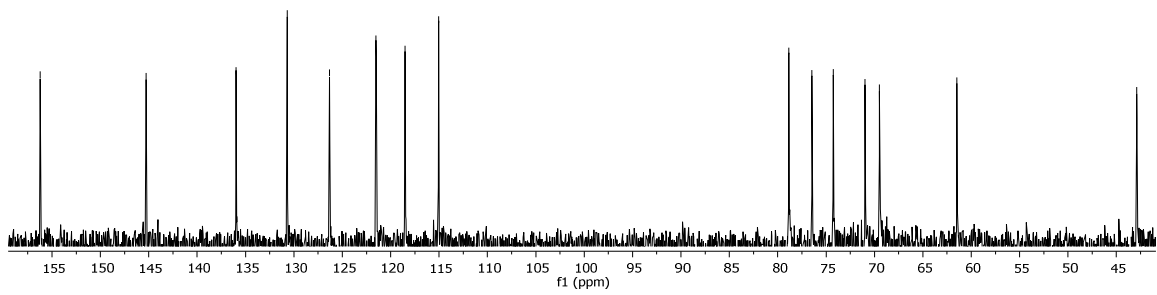


7.57
7.49
7.33
7.29
7.25
7.16
7.12
7.04
7.03
6.95
6.94
6.92
6.90
6.73
6.71

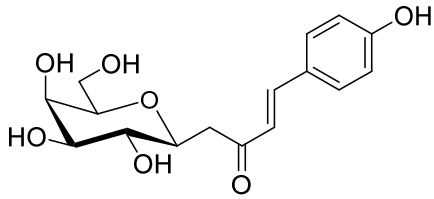
3.96
3.95
3.81
3.79
3.75
3.72
3.70
3.69
3.67
3.66
3.63
3.61
3.60
3.56
3.52
3.42
3.23
3.21
3.15
3.13
3.00
2.96
2.87



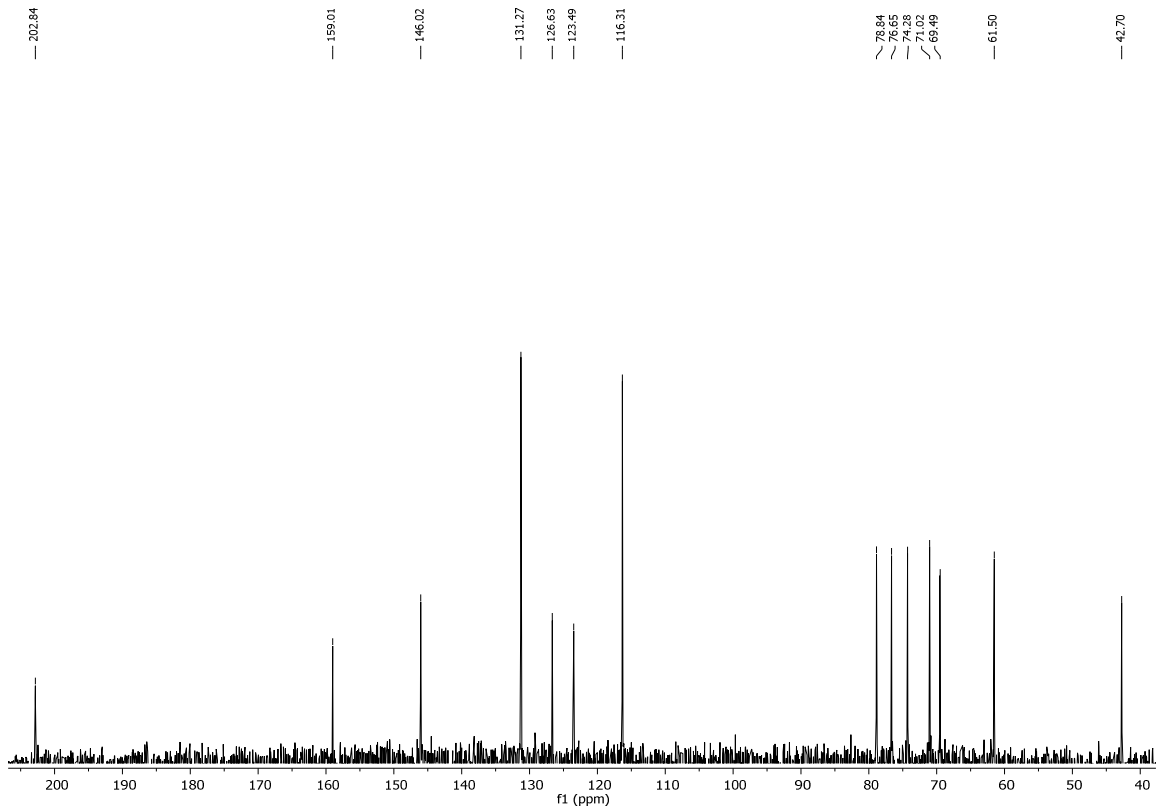
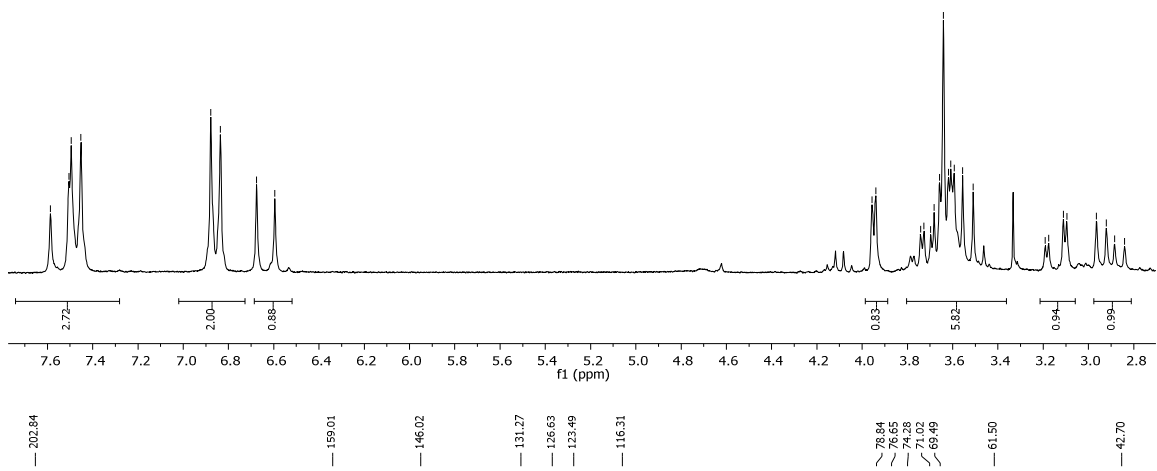
156.22
145.28
135.97
130.70
126.32
121.51
118.51
115.05
78.84
76.46
74.27
70.98
68.48
61.49
42.89

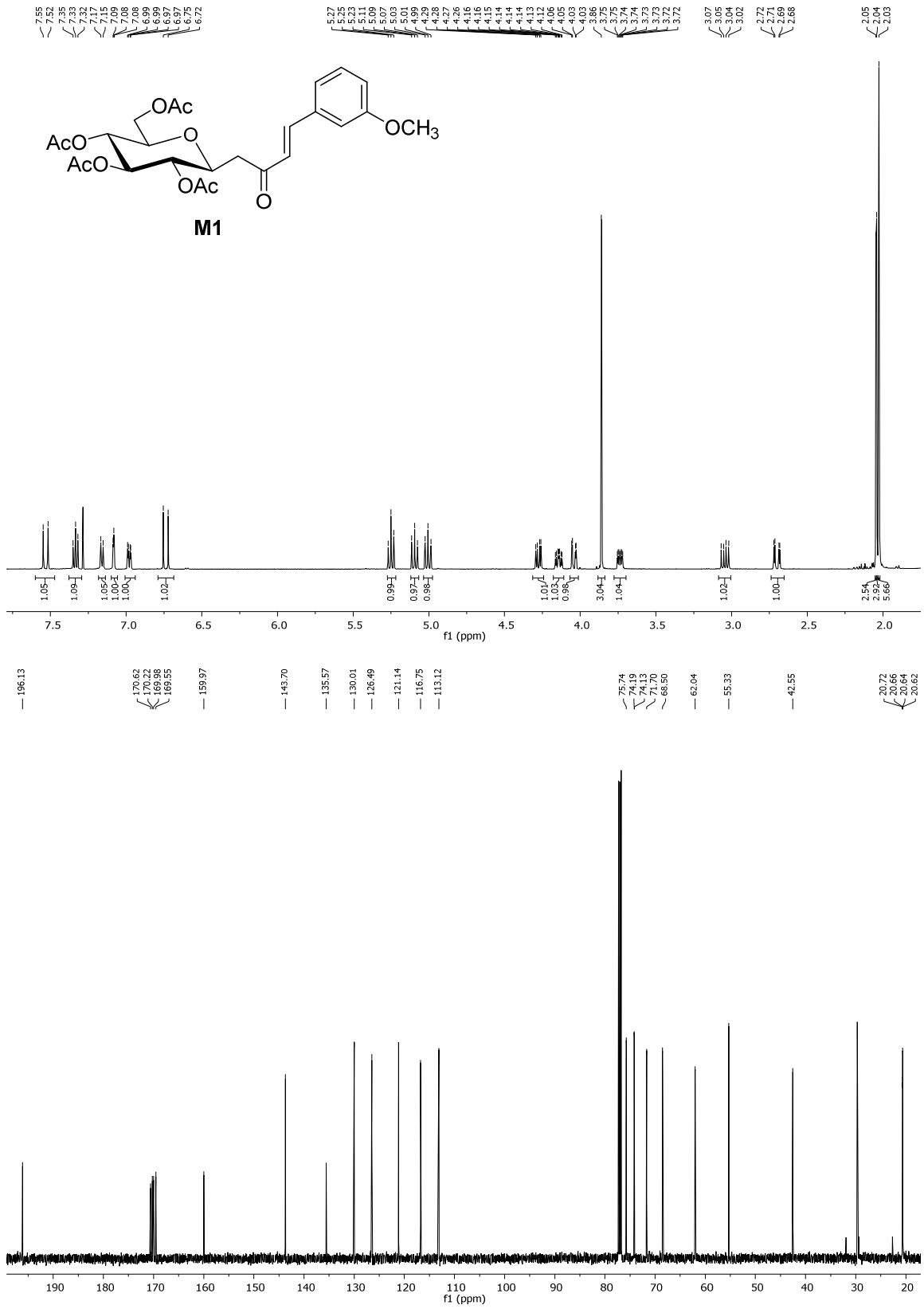


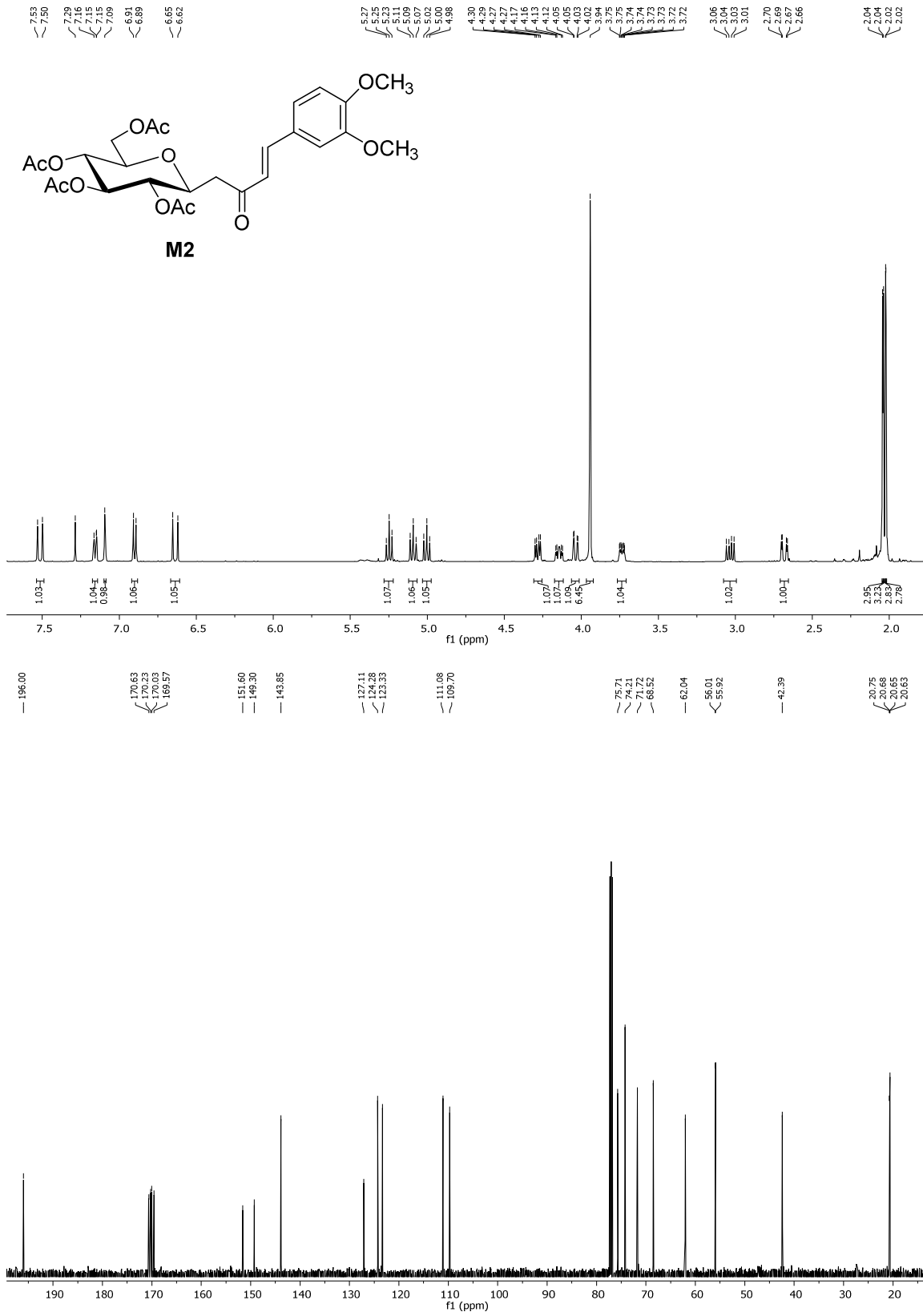
7.59
7.50
7.45
6.88
6.84
6.68
6.60
3.96
3.94
3.74
3.73
3.68
3.66
3.64
3.62
3.61
3.56
3.51
3.19
3.18
3.11
3.10
2.92
2.88
2.84

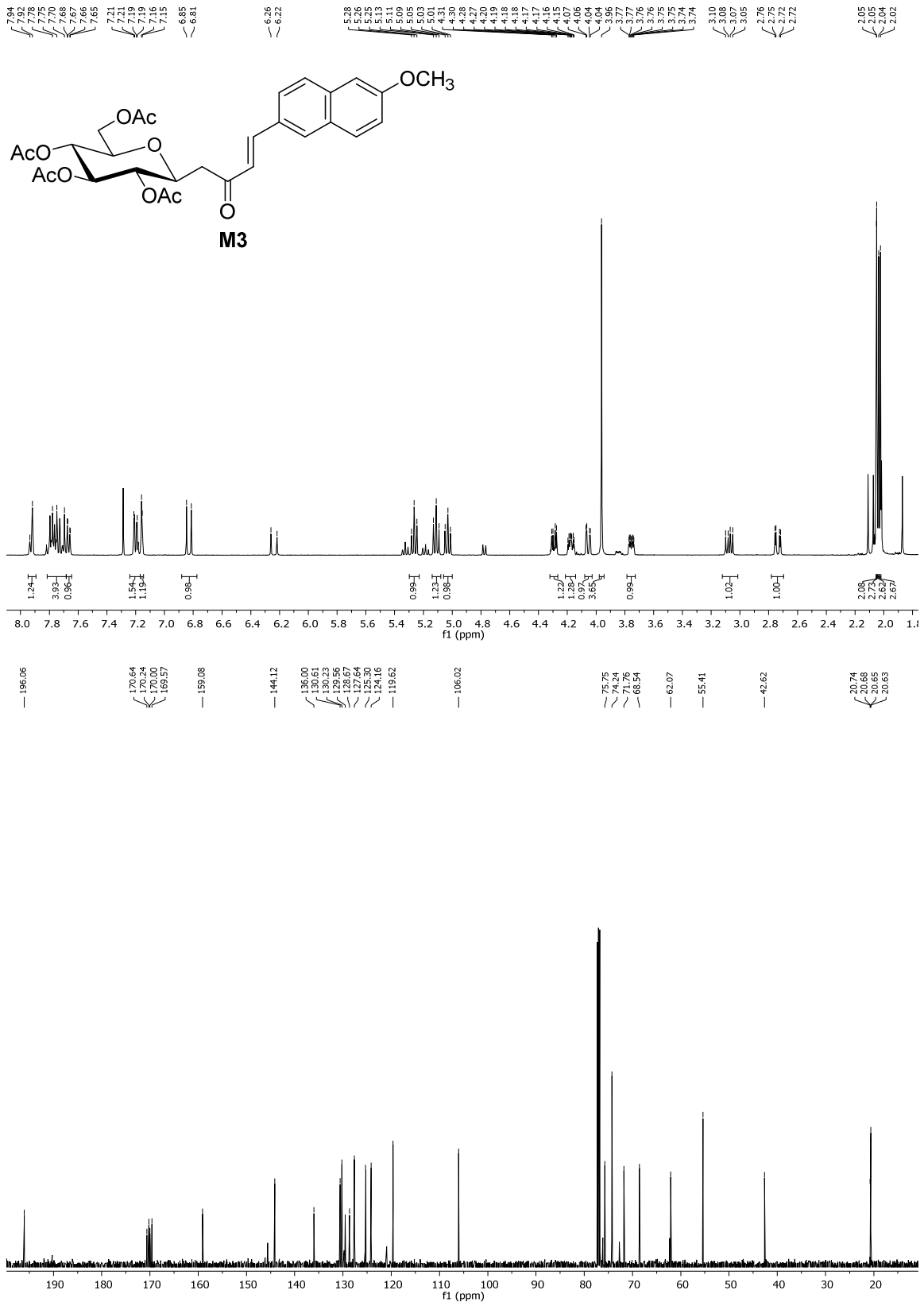


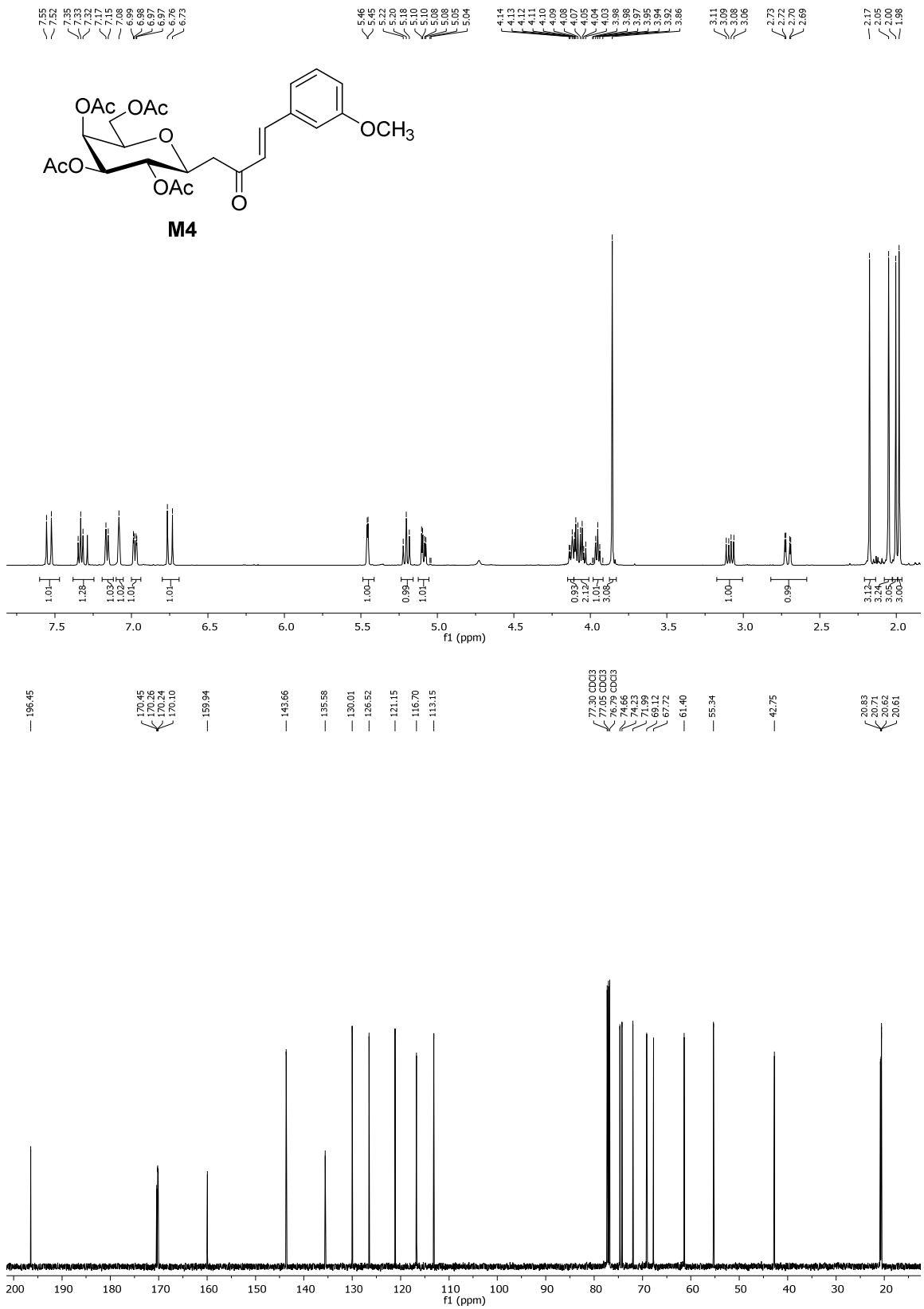
F12

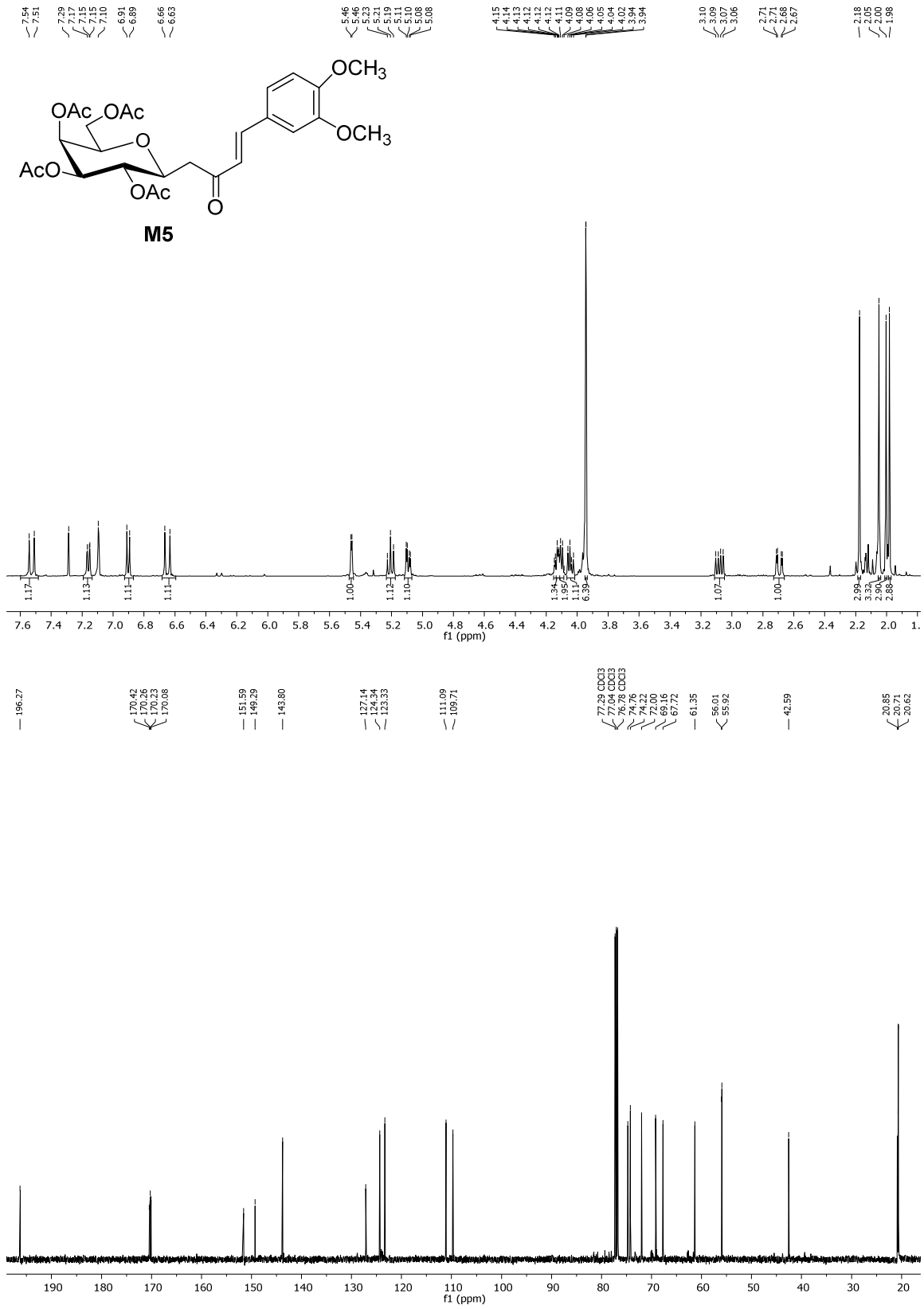


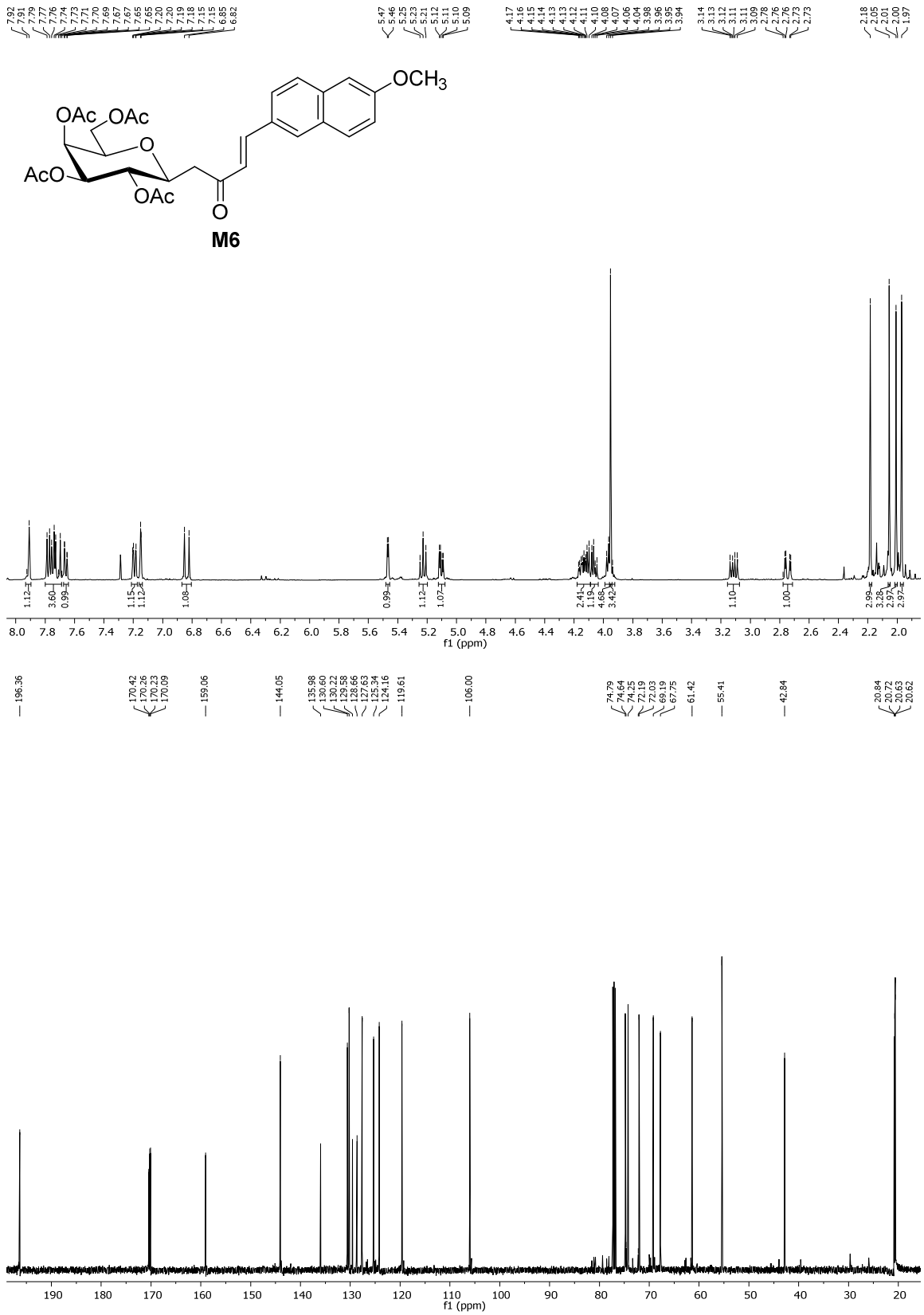






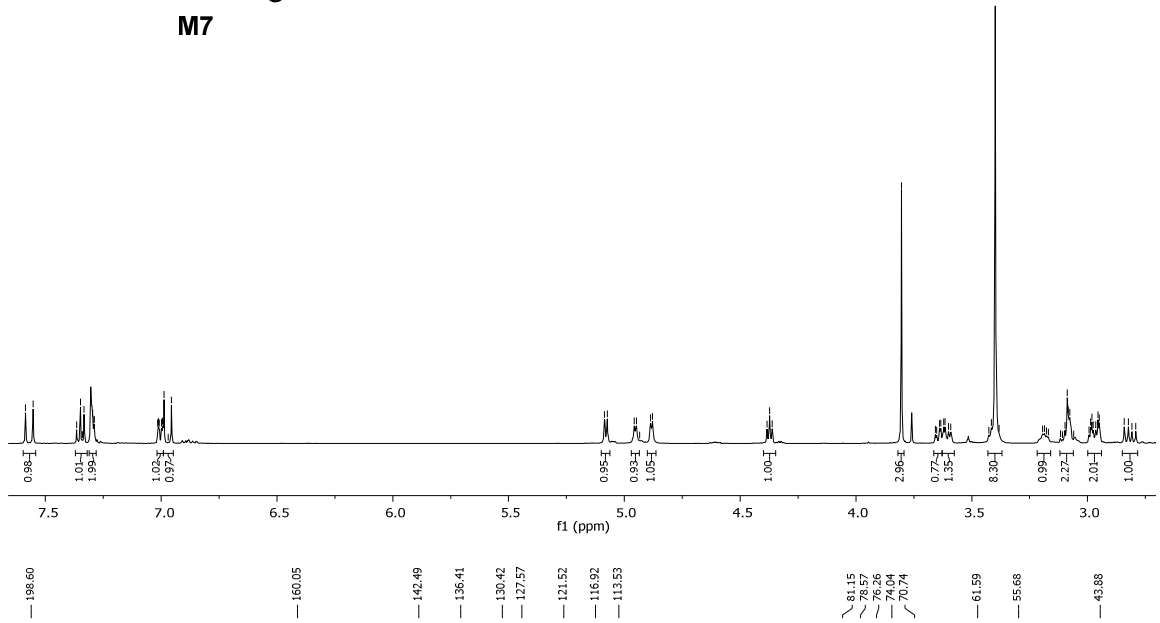
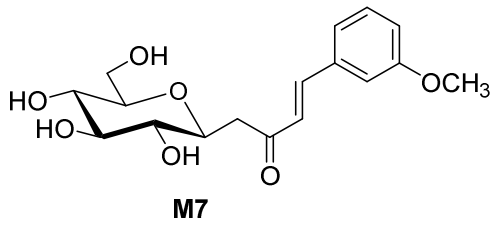






7.59
7.55
7.36
7.35
7.34
7.34
7.33
7.30
7.29
7.29
7.01
7.01
7.01
7.00
7.00
6.99
6.99
6.97
6.96

5.09
5.07
4.96
4.95
4.93
4.89
4.88
4.88
4.37
4.36
4.36
3.60
3.60
3.60
3.64
3.64
3.63
3.62
3.61
3.61
3.60
3.60
3.43
3.43
3.41
3.38
3.19
3.19
3.17
3.12
3.11
3.10
3.10
3.08
3.08
3.08
3.06
2.99
2.99
2.99
2.98
2.98
2.96
2.95
2.95
2.84
2.81
2.81
2.79



199.60
160.05
142.49
136.41
130.42
127.57
121.52
116.92
113.53
81.15
78.57
76.26
74.04
70.74
61.59
55.68
43.88

