

Tesis de Posgrado

Síntesis de oligosacáridos de galactofuranosa, componentes de glicoconjugados de tripanosomátidos

Gallo, Carola

1998

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Químicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Gallo, Carola. (1998). Síntesis de oligosacáridos de galactofuranosa, componentes de glicoconjugados de tripanosomátidos. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3020_Gallo.pdf

Cita tipo Chicago:

Gallo, Carola. "Síntesis de oligosacáridos de galactofuranosa, componentes de glicoconjugados de tripanosomátidos". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1998. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3020_Gallo.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

**Síntesis de Oligosacáridos de Galactofuranosa,
Componentes de Glicoconjugados de
Tripanosomátidos**

Directora de Tesis

Dra. Rosa M. de Lederkremer

Lugar de Trabajo

Departamento de Química Orgánica

Carola Gallo

Tesis presentada para optar por el título de
Doctor de la Universidad de Buenos Aires

Nº 3

Marzo de 1998

A Juan Bautista y Santiago

A mis padres Jose y Ana
A Haydée

Agradezco a la Dra. Rosa M. de Lederkremer, por su constante estímulo, su apoyo, su gran pasión por la investigación y por su afecto para la realización de este trabajo de Tesis.

Agradezco al Dr. Oscar Varela por sus valiosas enseñanzas, por su gran interés, su esfuerzo, su dedicación, su calidez y afecto.

AGRADECIMIENTOS

A mi amiga Rosalía Agustí por todos estos años.

A mis compañeros de laboratorio: Rosalía Agustí, Laura Bertello, Vanina Campo, María José Cancio, Alejandro Chioconni, Alicia Couto, Celina Gerardi, Leonardo Iglesias, Carlos Lima, Carla Marino, Karina Mariño, Verónica Nahmad, Marisa Ramírez, Laura Salto y María Laura Uhrig por el agradable clima de trabajo.

A María Laura Uhrig, Laura Bertello, Carla Marino, Sergio Bonesi, Daniel Murgida, Carlos Lima, Miriana Biondic, Cristián Di Nardo, Hernán Orgueira, Mariano Castro, Mirta Fascio, Patricia Zunszain y María Inés Errea por los gratos momentos compartidos.

Al Dr. Kenneth A. Jacobson por sus enseñanzas, su confianza incondicional y su increíble entusiasmo.

A los Dres. Carla Marino, Oscar Varela, Juan B. Rodriguez y la Lic. Cristina Tettamanzi por los espectros de RMN realizados.

Al Lic. Alejandro Chioconni por su invaluable ayuda para la preparación de diborano.

Al Dr. Eduardo G. Gros y Dra. Cristina Matulewicz por los elementos tipográficos suministrados.

A los Dres. José Kovensky, Alberto S. Cerezo y María Laura Uhrig por la bibliografía suministrada.

A la Dra. Rosa Erra por sus consejos y ayuda brindados.

A la Lic. Marta Marcote (UMYMFOR) por los microanálisis realizados.

Al personal de la biblioteca de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales.

A todo el personal docente y no docente del Departamento de Química Orgánica, en especial a María del Carmen Ares y Don Eduardo López, por facilitarme el trabajo y por su gran amabilidad.

A la Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales,
Departamento de Química Orgánica por haberme permitido realizar este trabajo de
Tesis en un laboratorio de su dependencia.

Síntesis de Oligosacáridos de Galactofuranosa, Componentes de Glicoconjugados de Tripanosomátidos

La glicobiología de la galactofuranosa es un tema de interés creciente. La galactosa en configuración furanósica es componente de bacterias, hongos y protozoarios patógenos mientras que en mamíferos sólo se encuentra galactopiranososa. En particular, se describieron glicoproteínas de *T. cruzi* con oligosacáridos de distinto tamaño en los cuales se determinó un "core" común de β -D-Galf-(1 \rightarrow 4)-GlcNAc (**9**). Esta resultó un tipo de unión no descrita previamente. El disacárido se ramifica con números diferentes de β -Galp convirtiendo a la cadena de azúcar en aceptora de ácido siálico en la reacción de trans-sialidación relacionada con la infectividad de *T. cruzi*. El oligosacárido aceptor de siálico más pequeño es β -D-Galf-(1 \rightarrow 4)-[β -D-Galp-(1 \rightarrow 6)]-GlcNAc (**23**). Es interesante que la presencia de unidades de β -D-Galf en los oligosacáridos depende de la cepa. En esta tesis se sintetizaron por primera vez el disacárido **9**, el trisacárido **23** y los alditoles correspondientes, que son la forma en que se obtienen en la reacción de β -eliminación de las glicoproteínas.

Por otra parte, en especies de *Leishmania*, Galf se encuentra interna en el "core" del lipofosfoglicano como α -D-Galp-(1 \rightarrow 3)-D-Galf. El sintón para el disacárido se sintetizó por glicosidación del derivado de Galp **52** con la 5,6-isopropilidén-2-O-pivaloil-D-galactono-1,4-lactona (**40**). El método del tricloroacetamidato utilizado mostró ser efectivo cuando el aceptor es una aldonolactona, precursora en este caso de la Galf.

Los oligosacáridos sintéticos que contienen galactofuranosa son útiles para la identificación de cepas, para relacionar la presencia de la misma con la infectividad y para estudios de biosíntesis.

Palabras Clave: Galactofuranosa, oligosacáridos, *Trypanosoma cruzi*, aldono-1,4-lactona, tricloroacetamidato.

Synthesis of Galactofuranose-containing Oligosaccharides, Glycoconjugate Components of Trypanosomatids

The glycobiology of galactofuranose is a topic of increasing interest. Galactose in furanose configuration is found in infectious bacteria, protozoa and fungi, while in mammals galactopyranose is present. In particular, glycoproteins from *T. cruzi* with O-glycosidically linked oligosaccharides of different size were reported. They share the core β -D-Galf-(1 \rightarrow 4)-GlcNAc (**9**). This unique type of linkage was not previously described. The disaccharide is further branched by different numbers of β -Galp units turning the sugar chain in an acceptor of sialic acid, in a trans-sialidase reaction related to the infectivity of the parasite. The minor oligosaccharide acceptor of sialic acid is β -D-Galf-(1 \rightarrow 4)-[β -D-Galp-(1 \rightarrow 6)]-GlcNAc (**23**). Interestingly, the presence of β -D-Galf units in these oligosaccharides is dependent on the strain. In this Thesis, disaccharide **9** trisaccharide **23** and the corresponding alditols were synthesized for the first time. Alditols are obtained in the β -elimination reaction from the glycoproteins.

On the other hand, internal Galf is found in the lipophosphoglycan core of *Leishmania* species as α -D-Galp-(1 \rightarrow 3)-D-Galf. The synthon for the disaccharide was synthesized by glycosidation of the Galp derivative **52** with 5,6-O-isopropylidene-2-O-pivaloyl-D-galactono-1,4-lactone (**40**). The trichloroacetamidate method proved to be effective using an aldonolactone as acceptor, in our case, D-galactono-1,4-lactone as precursor of Galf.

The synthetic galactofuranose-containing oligosaccharides are useful for the identification of strains, for relating its presence with infectivity and for biosynthetic studies.

Key Words : Galactofuranose, oligosaccharides, *Trypanosoma cruzi*, aldonolactone, trichloroacetamidate.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN

| | |
|---|----|
| Capítulo 1 : Galactofuranosa en tripanosomátidos | 1 |
| A. Galactofuranosa en glicoproteínas | 1 |
| B. Galactofuranosa en glicoinositolfosfolípidos (GIPLs) | 5 |
| Capítulo 2 : Síntesis de glicósidos. Método de tricloroacetamidato | 10 |
| A. Activación a través de intercambio de <i>O</i> -anomérico | 10 |
| B. Activación con retención de <i>O</i> -anomérico | 15 |

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

| | |
|--|----|
| Capítulo 3 : Síntesis de β-D-Galf-(1→4)-GlcNAc | 23 |
| Protección selectiva de bencil <i>N</i> -acetilglucosamina. Obtención de bencil 2-acetamido-3,6-di- <i>O</i> -benzoil-2-desoxi- α -D-glucopiranosido (3) | 24 |
| Glicosidación. Obtención de bencil (2,3,5,6-tetra- <i>O</i> -benzoil- β -D-galactofuranosil)-(1→4)-2-acetamido-3,6-di- <i>O</i> -benzoil-2-desoxi- α -D-glucopiranosido (6) | 30 |
| Capítulo 4 : Síntesis de β-D-Galf-(1→4)-[β-D-Galp-(1→6)]-GlcNAc | 40 |
| Glicosidación selectiva. Obtención de bencil (2,3,4,6-tetra- <i>O</i> -benzoil- β -D-galactopiranosil)-(1→6)-2-acetamido-3- <i>O</i> -benzoil-2-desoxi- α -D-glucopiranosido (16) | 45 |
| Obtención de bencil (2,3,5,6-tetra- <i>O</i> -benzoil- β -D-galactofuranosil)-(1→4)-[2,3,4,6-tetra- <i>O</i> -benzoil- β -D-galactopiranosil-(1→6)]-2-acetamido-3- <i>O</i> -benzoil-2-desoxi- α -D-glucopiranosido (19) | 49 |

| | |
|---|-----|
| Obtención de 4,6-di-O-(2,3,5,6-tetra-O-benzoil- β -D-galactofuranosil)-2-acetamido-3-O-benzoil-2-desoxi- α -D-glucopiranosido (20) | 53 |
| Obtención de bencil 2,3,5,6-tetra-O-benzoil- β -D-galactofuranosil-(1 \rightarrow 6)-2-acetamido-3-O-benzoil-2-desoxi- α -D-glucopiranosido (21) | 54 |
| Obtención de bencil (2,3,5,6-tetra-O-benzoil- β -D-galactofuranosil)-(1 \rightarrow 4)-[2,3,4,6-tetra-O-benzoil- β -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 6)]-2-acetamido-3-O-benzoil-2-desoxi- α -D-glucopiranosido (19) en un solo paso | 54 |
| Capítulo 5: Pivaloilación selectiva de aldono-1,4-lactonas | 68 |
| D-Galactono-1,4-lactona | 69 |
| D-Gulono-1,4-lactona | 74 |
| L-Manono-1,4-lactona | 77 |
| Capítulo 6 : Sintones para la introducción de Galf en oligosacáridos | 82 |
| Síntesis del sintón de β -D-Galp-(1 \rightarrow 3)-D-Galf | 82 |
| Síntesis del sintón de α -D-Galp-(1 \rightarrow 3)-D-Galf | 105 |
| Síntesis de β -D-Galf-(1 \rightarrow 3)-D-Gal-1,4-lactona, precursor del sintón de β -D-Galf-(1 \rightarrow 3)-D-Galf | 115 |
| PARTE EXPERIMENTAL | |
| Capítulo 7 | 123 |
| Instrumental y métodos generales | 123 |
| Reactivos generales | 124 |
| Purificación de solventes | 125 |
| Detalles Experimentales | 127 |
| RESUMEN | 171 |
| BIBLIOGRAFÍA | 180 |

ABREVIATURAS

| | |
|----------------|-------------------------------|
| Ac | acetilo |
| AcOH | ácido acético |
| Anal. | análisis elemental |
| Bn | bencilo |
| BnOH | alcohol bencílico |
| Bz | benzoilo |
| c | concentración |
| ccd | cromatografía en capa delgada |
| DMF | <i>N,N</i> -dimetilformamida |
| EtOAc | acetato de etilo |
| EtOH | etanol |
| Gal <i>f</i> | galactofuranosa |
| Gal <i>p</i> | galactopiranososa |
| GIPL | glicoinositolfosfolípido |
| GlcNAc | <i>N</i> -acetilglucosamina |
| lit. | literatura |
| LPG | lipofosfoglicano |
| Man | manosa |
| MeOH | metanol |
| NaOMe | metóxido de sodio |
| pf | punto de fusión |
| Piv | pivaloilo |
| ppm | partes por millón |
| R _f | relación de frente |
| RMN | resonancia magnética nuclear |
| sol. sat. | solución saturada |
| THF | tetrahidrofurano |
| TMSOTf | triflato de trimetilsililo |

INTRODUCCIÓN

CAPITULO 1

Galactofuranosa en tripanosomátidos

La D-galactosa se encuentra ampliamente distribuida en la Naturaleza. Es interesante que en mamíferos se encuentra en la configuración piranósica mientras que la presencia de galactofuranosa se restringe a bacterias (McNeil *et al.*, 1987; Gerwig *et al.*; 1993 Richards *et al.*,1983), protozoos (Lederkremer *et al.*, 1980; Mendelzon & Parodi, 1986; Moraes *et al.*, 1988; Mc Conville *et al.*, 1990, 1993; Previato *et al.*, 1992; Turco & Descoteaux, 1992) y hongos (Lee & Lloyd, 1975; Barreto-Bergter *et al.*, 1980; Mendoça-Previato *et al.*, 1980; Groisman & Lederkremer, 1987; Notermans *et al.*, 1988; Unkefer & Gander, 1990).

Como el mamífero huésped no biosintetiza Galf, genera anticuerpos contra esta unidad. Por esta razón, la glicobiología de la galactofuranosa es un tema de creciente interés. No se conoce aún el mecanismo metabólico por el cual la galactofuranosa se incorpora o se remueve de los glicoconjugados que la contienen. En este capítulo se describen glicoconjugados que contiene Galf dentro de la familia de tripanosomátidos (Lederkremer & Colli, 1995). Algunas especies de esta familia son infecciosas para el mamífero y en particular para el hombre, por ejemplo, *Trypanosoma cruzi*, agente del Mal de Chagas.

A. Galactofuranosa en glicoproteínas

En tripanosomátidos inferiores como *Crithidia fasciculata* y *Crithidia hamosa* (Mendelzon & Parodi, 1986), *Leptomonas samueli* y *Herpetomonas samuelpessoai* (Moraes *et al.*, 1988) la galactofuranosa se encuentra en oligosacáridos N-glicosídicos de alta manosa y unida directamente a la manosa en el extremo terminal no reductor del oligosacárido. La galactofuranosa puede ser liberada por la β -

galactofuranosidasa de *Penicillium charlesii*, sin embargo, en algunos casos no se ha determinado a que posición de la manosa está unida. Por ejemplo, en *L. samuelii*, se han caracterizado oligosacáridos de composición $\text{Gal}(1\rightarrow3)\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ y $\text{Gal}(1\rightarrow?)\text{Man}_{7,8}\text{GlcNAc}$; y en *Crithidia fasciculata* $\text{Gal}(1\rightarrow?)\text{Man}_6\text{GlcNAc}$.

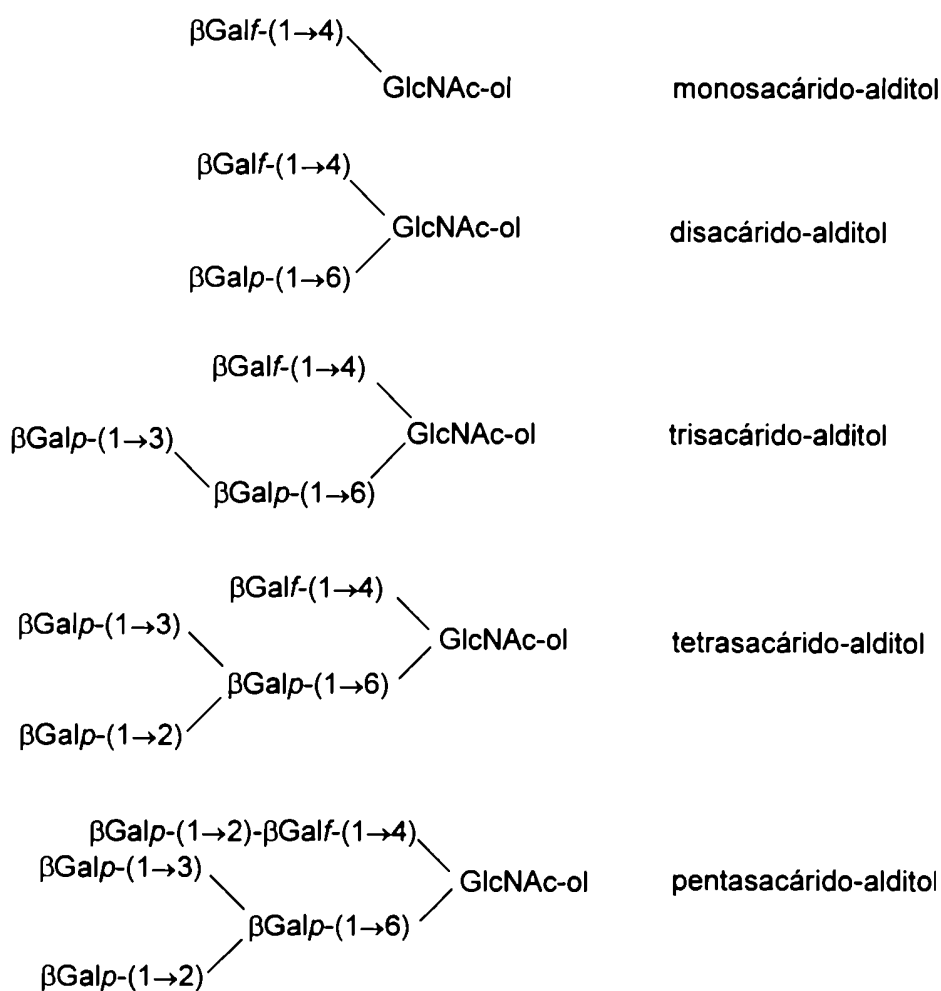
Se han detectado residuos de galactofuranosa en cadenas *N*-glicosídicas de glicoproteínas de 80-90 kDa del estadio infectante tripomastigote de *T. cruzi* (De Arruda *et al.*, 1989). Sin embargo, no se determinaron las uniones glicosídicas en las mismas.

Recientemente, se han identificado oligosacáridos de distinto tamaño que son liberados como alditoles por β -eliminación, en la glicoproteína anclada de 38-43 kDa de la superficie celular de *Trypanosoma cruzi* (cepa G) (Previato *et al.*, 1994; Acosta Serrano *et al.*, 1995; Esquema 1). Estos oligosacáridos, a diferencia de los anteriores, se encuentran unidos *O*-glicosídicamente a la proteína a través de GlcNAc. Este tipo de glicoproteínas se denominaron "mucinas" en analogía con las mucinas de animales donde los oligosacáridos se unen *O*-glicosídicamente a los residuos de treonina o serina de la proteína, pero a través de GalNAc. En mamíferos, se ha encontrado GlcNAc como azúcar único en unión *O*-glicosídica en glicoproteínas nucleares y citoplasmáticas (Hart *et al.*, 1989; Kearse & Hart, 1991). En organismos parasitarios como *Trypanosoma brucei* (Haltiwanger *et al.*, 1992), *Schistosoma mansoni* (Nyame *et al.*, 1987) y *Plasmodium falciparum* (Dieckman-Schuppert *et al.*, 1993) también se han encontrado glicoproteínas que contienen una única *O*-GlcNAc.

En el caso de las glicoproteínas de *T. cruzi* (cepa G), la GlcNAc está sustituida en la posición 4 por una Gal. Todos estos oligosacáridos presentan este disacárido particular $\beta\text{-Gal}(1\rightarrow4)\text{GlcNAc}$, y además la GlcNAc puede estar nuevamente sustituida en 6 por una unidad de Galp y continuar la cadena en forma lineal o ramificada. Solo en uno de los oligosacáridos la Gal se encuentra sustituida

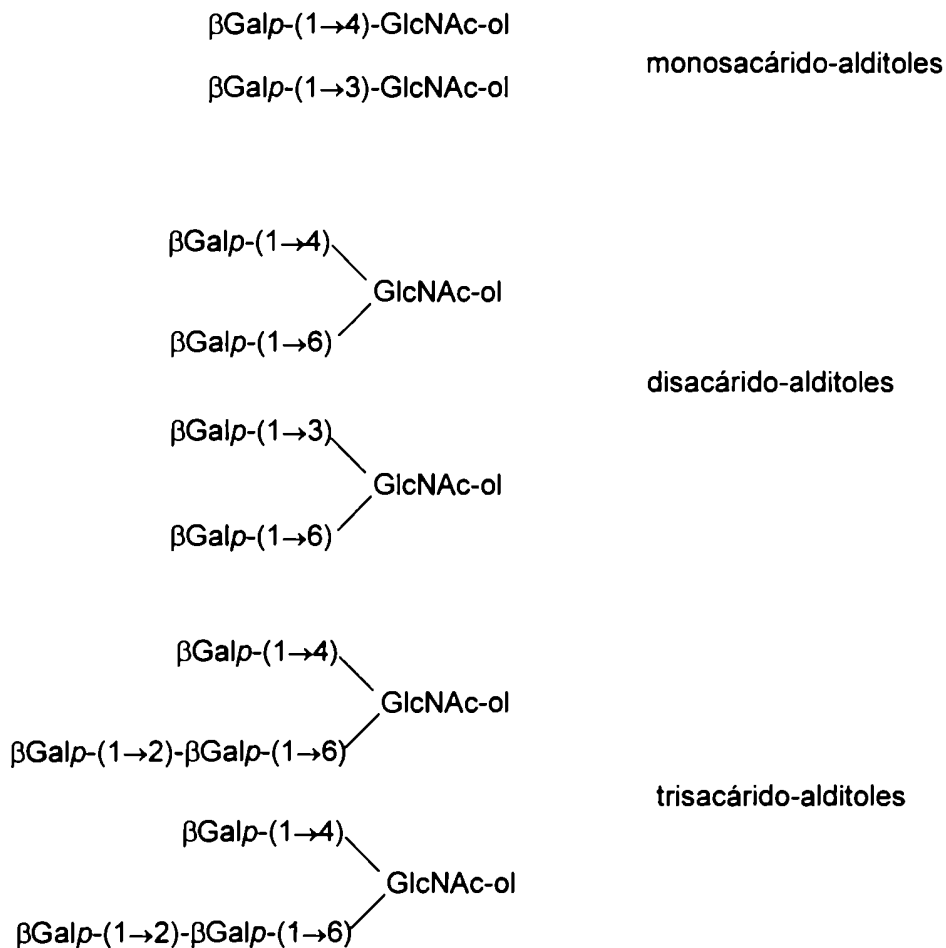
por otra Galp (Esquema 1). Es de señalar que todas estas constituyen estructuras nuevas tanto en glicoproteínas, como desde el punto de vista de síntesis. Su caracterización se había realizado por espectroscopía de RMN ^1H de alta resolución de los oligosacáridos alditos obtenidos en la reacción de β -eliminación reductiva (Esquema 1).

Esquema 1. Estructuras de oligosacáridos alditos aislados de glicoproteínas de *T. cruzi* (Cepa G) por β -eliminación reductiva.



De las glicoproteínas de 40–45 kDa de la cepa Y de *T. cruzi* (Previato *et al.*, 1995), también se han aislado oligosacáridos unidos a través de O-GlcNAc. Sin embargo, difieren de los de la cepa G recién mencionados pues son más cortos y no contienen galactofuranosa. Por β -eliminación se encontraron dos series de mono, di y trisacáridos alditoles donde se mantiene el core β Galp(1 \rightarrow 6)GlcNAc pero la segunda ramificación de la GlcNAc ocurre en la posición 3 o 4, generando así dos series de mono, di y trisacáridos alditoles (Esquema 2).

Esquema 2. Estructuras de oligosacáridos alditoles aislados de glicoproteínas de *T. cruzi* (Cepa Y) por β -eliminación reductiva.



T. cruzi no biosintetiza ácido siálico pero expresa una *trans*-sialidasa que transfiere ácido siálico de glicoproteínas y glicoconjugados del mamífero huésped a la posición 3 de residuos de Galp terminal de aceptores en la superficie del parásito (Colli, 1993; Cross & Takle, 1993; Schenkman *et al.*, 1994). Tanto las glicoproteínas de ambas cepas recién mencionadas, como sus oligosacáridos alditoles aislados (Acosta-Serrano *et al.*, 1995) son aceptores de ácido siálico, aunque no se han realizado estudios comparativos entre los oligosacáridos. El ácido siálico es imprescindible para la entrada del parásito a la célula de mamíferos por medio de procesos de adhesión (Piras *et al.*, 1987; Schenkman *et al.*, 1991).

La presencia de β Galp en las glicoproteínas de *T. cruzi* (cepa G) constituye un importante sitio de reconocimiento de anticuerpos como se demostró previamente en otro glicoconjugado de *T. cruzi* llamado lipopéptidofosfoglicano (LPPG) utilizando suero de conejo (Mendoza-Previato *et al.*, 1983) y humano (Schnaidman *et al.*, 1986).

B. Galactofuranosa en glicoinositolfosfolípidos (GIPLs)

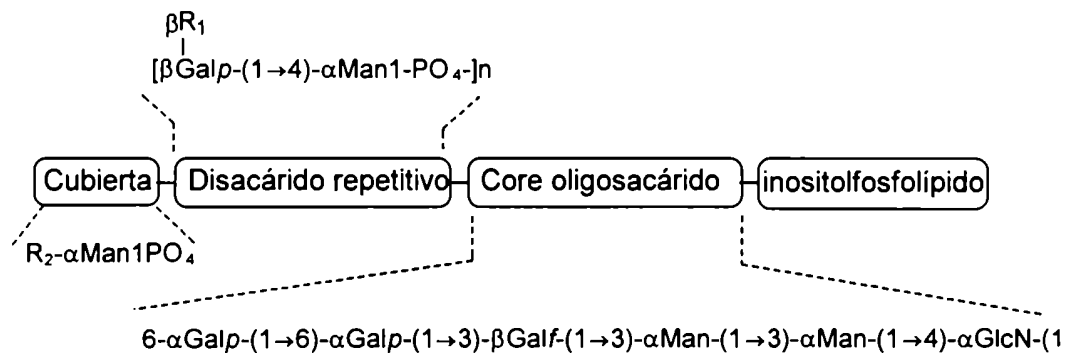
En los últimos años los GIPLs han despertado gran interés pues actúan como anclas de proteínas de membrana de células eucarióticas (Cross, 1990; McConville & Ferguson, 1993) y de un fosfosacárido en especies de *Leishmania* (Turco & Descoteaux, 1992). Se han descrito GIPLs libres que no se encuentran unidos a proteína, que contienen galactofuranosa en *T. cruzi* (Lederkremer *et al.*, 1980, 1991, 1993; Previato *et al.*, 1990), *Leishmania* (McConville *et al.*, 1990, 1993), *Leptomonas samueli* (Previato *et al.*, 1992) y en *Endotrypanum schaudinni* (Wait *et al.*, 1994).

leishmaniasis (Turco & Descoteaux, 1992). Las cepas deficientes en LPG no sobreviven en el mosquito vector (Schlein *et al.*, 1990) y no pueden infectar a los macrófagos de mamíferos (Handman *et al.*, 1986; Elhay *et al.*, 1990; McNeely & Turco, 1990). Estas dos funciones se reestablecen parcialmente por inserción exógena de LPG en la membrana plasmática.

El LPG consta de cuatro regiones: a) el ancla lipídica de fosfatidilinositol, b) un core fosfohexasacárido, c) una región de fosfoglicano disperso que tiene unidades repetitivas y d) una cubierta (cap) de oligosacáridos pequeños (Esquema 4).

En particular, el core glicosídico consiste en glucosamina, dos manosas, galactosa-6-fosfato, galactopiranososa y galactofuranosa. A semejanza con el LPPG la galactofuranosa está unida a la posición 3 de la manosa ($\beta\text{Gal}f-(1\rightarrow3)-\alpha\text{Man}$), pero en *Leishmania* se encuentra interna y no como extremo terminal no reductor. Una $\alpha\text{Gal}p$ sustituye la posición 3 de la *Gal*f ($\alpha\text{Gal}p-(1\rightarrow3)-\beta\text{Gal}f$).

Esquema 4. Estructura del LPG de *Leishmania*



$R_1 = \text{H, Glc, Gal}$ o un oligosacárido corto.
 $R_2 = \alpha\text{Man}-(1\rightarrow2)$ o un oligosacárido corto

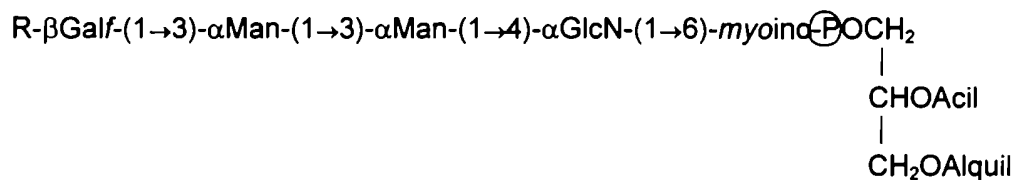
Una línea celular mutante de *Leishmania donovani* no podía biosintetizar LPG porque no adicionaba *Gal*f (Huang & Turco, 1993). La identidad de la actividad

enzimática que está ausente en la mutante no se conoce aún, pero se ha determinado el gen que codifica para esta proteína (Ryan *et al.*, 1993).

Glicoinositolfosfolípidos (GIPLs) libres en Leishmania

Los GIPLs libres son muy abundantes en la membrana plasmática de *Leishmania*. Se han identificado tres líneas distintas de GIPLs que varían marcadamente en distintas especies y estadios de desarrollo (McConville & Ferguson, 1993). Los GIPLs del tipo 1 y 2 contienen parte del core del LPG. En particular los GIPLs del tipo 2 de la especie *L. major* y *L. mexicana* son altamente inmunogénicos (McConville & Bacic, 1989; McConville *et al.*, 1990b) y contienen la unidad $\alpha\text{Galp}-(1\rightarrow3)-\beta\text{Gal}f-(1\rightarrow3)-\alpha\text{Man}$ en donde la *Gal*f se encuentra interna (Esquema 5). Es interesante observar que los GIPLs de *L. donovani* no contienen *Gal*f (McConville & Blackwell, 1991).

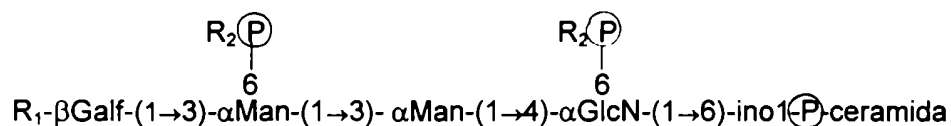
Esquema 5. GIPLs de tipo 2 de especies de *Leishmania*



| R | GIPL | Parásito |
|---|--------|--------------------------------------|
| H | GIPL-1 | <i>L. major</i> |
| $\alpha\text{Galp}-(1\rightarrow3)$ | GIPL-2 | <i>L. major</i> y <i>L. mexicana</i> |
| $\alpha\text{Galp}-(1\rightarrow6)-\alpha\text{Galp}-(1\rightarrow3)$ | GIPL-3 | <i>L. major</i> y <i>L. mexicana</i> |
| $\beta\text{Galp}-(1\rightarrow3)-\alpha\text{Galp}-(1\rightarrow3)$ | GIPL-A | <i>L. major</i> |

Glicoinositolfosfoceramida (GIPC) en otros protozoarios

Se han caracterizado GIPCs de *Leptomonas samueli* (Paviato et al., 1992; Esquema 6) cuyo oligosacárido contiene parte del core de LPG de *Leishmania* (β Galf-(1→3)- α Man-(1→3)- α Man-(1→4)-GlcN) y tanto en este caso como en el LPPG de *T. cruzi*, la Galf se encuentra como extremo terminal no reductor. En cambio en *Endotrypanum schaudinni* (Wait et al., 1994), la Galf se encuentra interna y su posición 3 está sustituida por una Galp cuya configuración anomérica no se ha establecido.

Esquema 6. GIPLs que contienen Galf de *Leptomonas samueli* y *Endotrypanum schaudinni**Leptomonas samueli*

R₁ = H
R₂ = H₂N-CH₂-CH₂-

Endotrypanum schaudinni

R₁ = α Arap-(1→2)- β Galp-(1→3)-Galp-(1→3)
R₂ = H₂N-CH₂-CH₂-O

INTRODUCCIÓN

CAPÍTULO 2

Síntesis de glicósidos.

Método del tricloroacetamido.

Los métodos existentes para la formación del enlace glicosídico consisten, generalmente, en la activación del centro anomérico (*paso de activación*) y luego, en presencia de un promotor o catalizador, estas especies liberan el donador de glicosilo para formar con el aceptor el enlace glicosídico (*paso de activación*). En principio, se distinguen dos enfoques diferentes para el paso de activación:

A. Activación a través de reacciones que involucran el intercambio del oxígeno anomérico

B. Activación con retención del oxígeno anomérico.

A. Activación a través de intercambio de O-anomérico

Método de Fischer-Helferich

Es el procedimiento de glicosilación más simple que existe (Esquema 7, A). Los O-glicósidos se obtienen a partir de hemiacetales y alcoholes por medio de una reacción catalizada por ácido como variante de la reacción de formación de acetales (Wulff & Röhle, 1974). Este método resulta muy útil y de preferencia en la síntesis de alquil glicósidos utilizados como material de partida para la síntesis de oligosacáridos y sintones quirales (Hanessian, 1983). Se emplea un exceso de aceptor (alcohol) inhibiendo la autocondensación de las unidades de azúcares que no están protegidos y actuando a la vez como solvente de reacción. Sin embargo, debido al medio ácido, al exceso de aceptor requerido y a la reversibilidad del método, no es conveniente para la síntesis de oligosacáridos y glicoconjugados. Para este fin, se requieren métodos irreversibles que consisten en la preactivación del O-anomérico

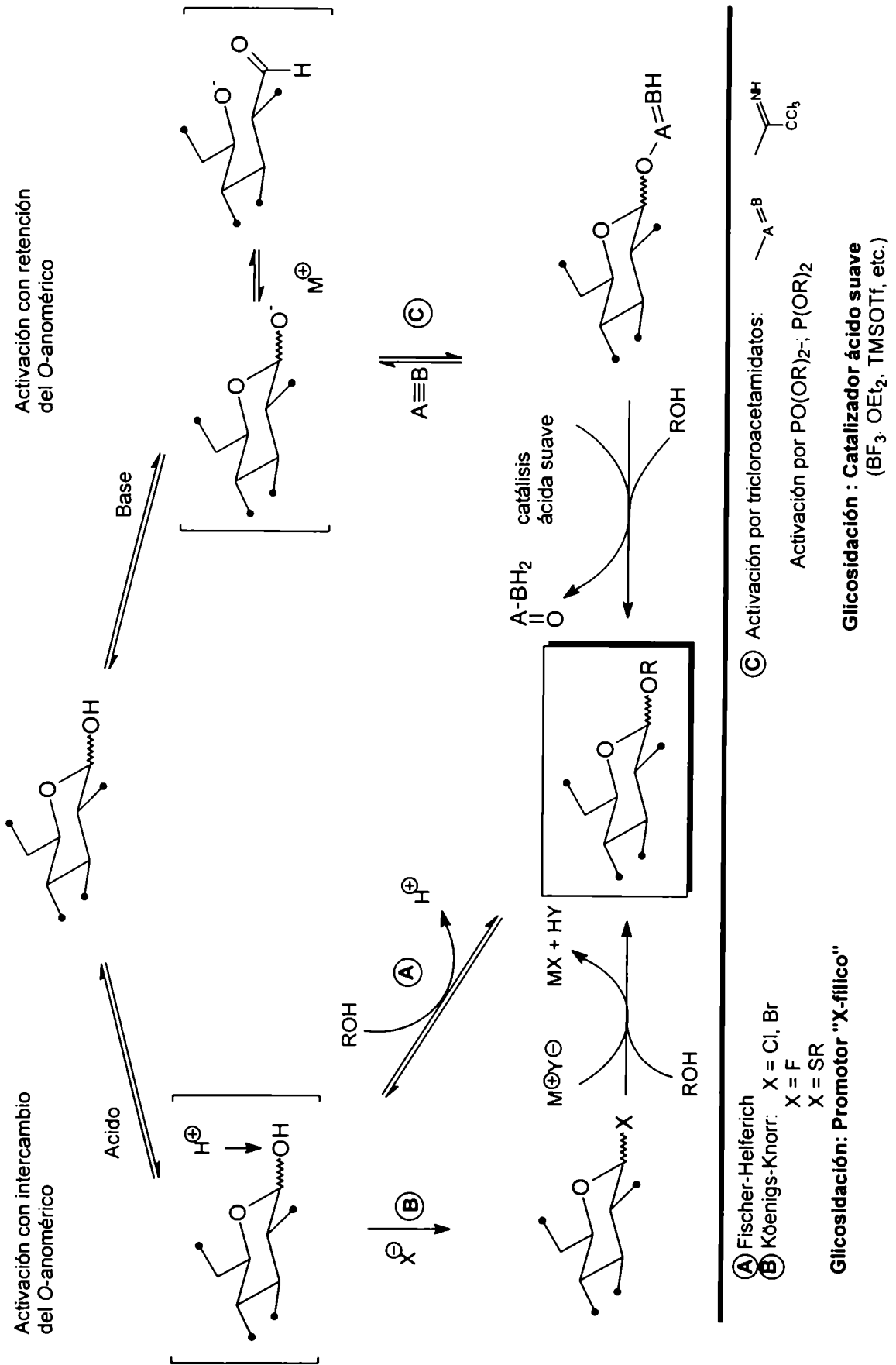
generando un donador de glicosilo cuando se encuentra en presencia de promotores o catalizadores.

Método de Köenigs-Knorr

El intercambio del hidroxilo anomérico por bromo o cloro conduce a un donador de glicosilo con fuertes propiedades donoras de la especie activada (Esquema 7, **B**). El α -haloéter generado es activado en el paso de glicosidación por promotores halofílicos, por ejemplo, sales de metales pesados y así el donador se transfiere al aceptor irreversiblemente. Este método ha sido de suma importancia para la síntesis de oligosacáridos complejos y glicoconjugados, y ha sido tratado extensamente (Paulsen, 1982 y 1990). Además, se continúa desarrollándolo y se aplica ampliamente para la síntesis de glicósidos 1,2-*trans* por el método triflato de plata - trimetilurea (Hanessian & Banoub, 1977a, 1980). A pesar de la generalidad de este método, el requerimiento de por lo menos un equivalente del promotor y por consiguiente, los problemas para la eliminación de este material, son los factores limitantes para llevar a cabo preparaciones a gran escala resultando de interés procedimientos alternativos.

Métodos relacionados con Köenigs-Knorr

Se han investigado extensamente otras reacciones de intercambio de O-anomérico en el paso de activación. Por ejemplo, la introducción de fluor (Esquema 7, **B**; X = F) como grupo saliente genera donadores de glicosilo intermediarios más estables debido al enlace C-F (Kunz, 1987; Mukaiyama *et al.*, 1981; Hashimoto *et al.*, 1984; Nicolaou *et al.*, 1984; Kunz & Sager, 1985). Debido a la diferencia de halofilicidad de flúor comparada con las del bromo y cloro, se encontraron, además de las sales de platas, otros promotores útiles para el paso de glicosidación. Sin embargo, los fluoruros de glicosilo poseen propiedades donoras pobres y también



requieren de un equivalente de promotor, por lo que estos intermediarios no muestran ventajas reales sobre los bromuros o cloruros de glicosilo.

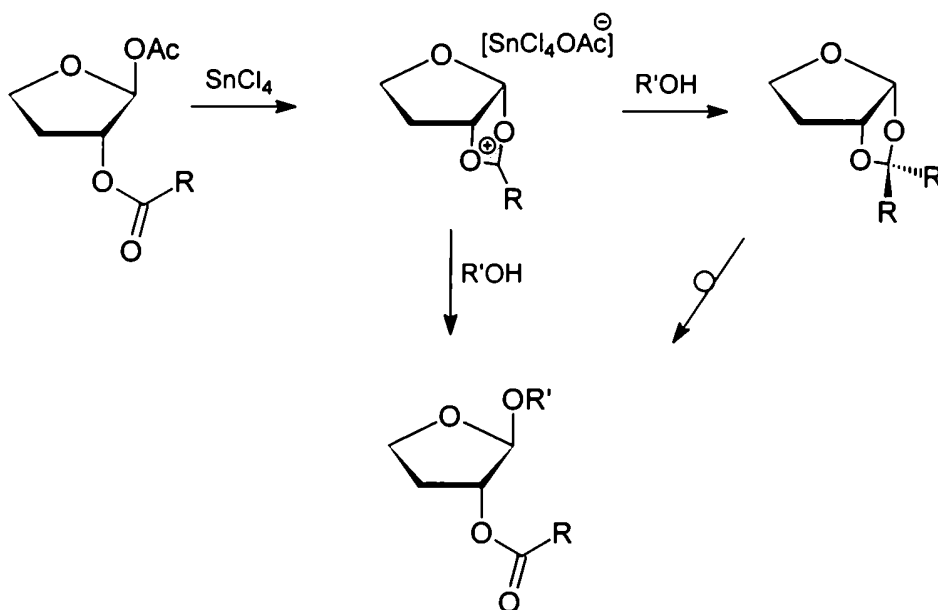
Los tioglicósidos, donde el O-anomérico se reemplaza por grupos tioalquil o tioaril, también se utilizan como donores de glicosilo (Paulsen, 1990; Fügedi *et al.*, 1987; Norberg & Walding, 1988) y presentan la ventaja que se pueden efectuar transformaciones sobre el donador de glicosilo sin afectar el centro anomérico (Esquema 7, B; X = SR). Las sales de metales pesados se han empleado como promotores de la glicosidación sin embargo, existen otras alternativas. Los iones bromonio y cloronio son altamente tiofílicos, pero con contraiones como cloruro o bromuro, se genera el haluro de glicosilo y la reacción es del tipo Köenigs-Knorr. Se requiere de un contraión que sea poco nucleofílico como la *N*-bromosuccinimida y que permita una reacción directa con el aceptor como nucleófilo. De todas maneras, debido a que los tioglicósidos necesitan una fuerte activación se obtienen bajas selectividades α/β cuando no se ven involucrados grupos participantes (Hanessian *et al.*, 1987; Nicolaou *et al.*, 1983) y especialmente con azúcares con propiedades donoras pobres. Debido a la nucleofilidad del átomo de azufre se ha empleado también triflato de metilo para la activación de los tioglicósidos (Lönn, 1985), pero se obtuvo baja estereoselectividad, y teniendo en cuenta que se requiere al menos de un equivalente de este peligroso reactivo que además conduce a subproductos de metilación y ataca a otros centros nucleofílicos, se ha cambiado por el triflato de dimetil metiltiosulfonio (DMTST) obteniéndose mejores resultados (Fügedi *et al.*, 1987)

Método de activación por SnCl₄

Dentro de los métodos generales es interesante mencionar el de activación por SnCl₄ pues es de gran utilidad para la síntesis de glicósidos de galactofuranosa y en particular, es uno de los métodos de glicosidación que se utilizan en este trabajo.

Hanessian y Banoub (1977b) describieron la preparación de glicósidos 1,2-*trans* a partir de azúcares peracilados, promovida por SnCl_4 . El derivado acilado forma, en este medio de reacción, un intermediario 1,2-aciloxonio muy estabilizado por el contraión que el promotor forma por asociación con el grupo saliente del C-anomérico (Esquema 8). El ataque nucleofílico ocurre necesariamente por la cara opuesta a la del sustituyente en C-2, y en eso se basa la estereoselectividad de este método. Por otra parte, también es posible que la reacción transcurra a través de la formación inicial de un ortoéster bajo control cinético, el que en presencia de SnCl_4 sufre un reordenamiento al glicósido de configuración 1,2-*trans* (Esquema 8).

Esquema 8



Este ácido de Lewis resulta muy útil para la activación del centro anomérico de galactofuranosas peraciladas (Marino *et al.*, 1989; Lederkremer *et al.*, 1990). El procedimiento tiene como ventaja que el precursor de la parte no reductora del disacárido es una galactofuranosa peracilada y no un haluro de galactofuranosilo

muy inestable que es empleado en la condensación de Koenigs-Knorr (Haynes & Newth, 1955) y además involucra un solo paso de reacción.

B. Activación con retención del O-anomérico

Para que la síntesis de glicósidos sea efectiva, tanto el rendimiento como la estereoselectividad deben ser altos, y debe poder llevarse a cabo a gran escala y por consiguiente, la cantidad de productos a eliminar debe ser mínima. Esto último se cumple si el proceso de glicosidación es catalítico. Los métodos mencionados anteriormente no cumplen con todos estos requerimientos, aunque la estrategia general para la formación del enlace glicosídico resulta conveniente.

Conclusión:

1. El primer paso debe consistir en la activación del centro anomérico para formar un donador de glicosilo estable (*paso de activación*).
2. El segundo paso (*paso de glicosidación*) debe consistir en una transferencia de glicosilo al aceptor de tal manera que se obtengan altos rendimientos, y donde la diastereoselectividad esté controlada por la configuración anomérica del donador de glicosilo (tanto por inversión o retención), por asistencia anquimérica, por influencia del solvente, etc.

Para el paso de activación, se decidió investigar la activación por bases, en vez de la activación por ácidos que se utiliza en los métodos anteriores.

Método del tricloroacetamido

Me referiré a este método más extensamente pues fue utilizado en este trabajo de tesis y por primera vez en el laboratorio.

Cuando un azúcar protegido que presenta el O-anomérico libre se trata con una base, se forma un óxido anomérico. Este puede utilizarse para generar un donador

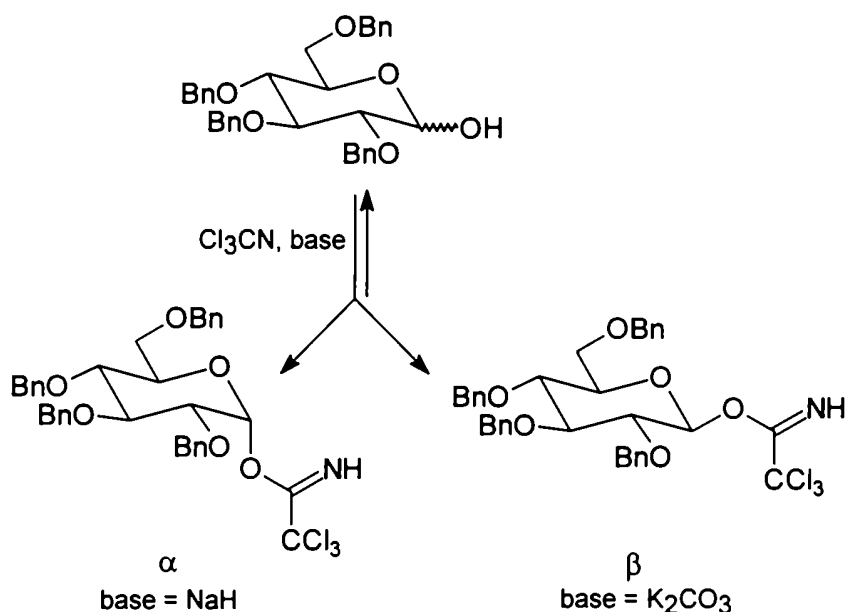
de glicosilo por adición a un sistema de triple enlace $A \equiv B$. Los métodos más convenientes que se desarrollaron son el de tricloroacetamido (Esquema 7, C; $A=BH : C(CCl_3)=NH$) (Schmidt, 1986, 1991; Schmidt & Kinzy, 1994) y el de formación de fosfato y fosfito ($A=BH : PO(OR)_2, P(OR)_2$) (Martin & Schmidt, 1992). Lo interesante de estos procedimientos es que la naturaleza tiene el mismo mecanismo para la generación de donores glicosídicos, como es la formación de fosfatos de glicosilo para el *paso de activación* y catálisis ácida para el *paso de glicosidación*. Como se detallará más adelante, el paso de activación del método del tricloroacetamido consiste en una adición del O-anomérico al tricloroacetoniitrilo catalizada por base y el paso de glicosidación requiere solo de cantidades catalíticas de un ácido de Lewis.

1. Formación de tricloroacetamido (*Paso de activación*)

Los nitrilos deficientes en electrones como, por ejemplo, tricloroacetoniitrilo o trifluoroacetoniitrilo pueden adicionar alcoholes al triple enlace por catálisis básica reversiblemente para dar O-alkil tricloroacetamidatos (Nef, 1895; Schmidt, 1986). Se puede transformar el O-anomérico en un buen grupo saliente por adición de tricloroacetoniitrilo en presencia de base, pero debe tenerse en cuenta la anomerización para controlar la adición estereoselectivamente. Debido a la reversibilidad de este paso, tanto por control termodinámico como cinético, es posible obtener uno u otro anomero. En un estudio detallado de adición de tricloroacetoniitrilo a 2,3,4,6-tetra-O-bencil-D-glucopiranososa (Schmidt & Michel, 1984) se observa que a partir de una mezcla de α y β -óxido utilizando K_2CO_3 como base, se obtiene preferencialmente el β -tricloroacetamido ecuatorial (Esquema 9). Este producto se anomeriza lentamente al α -tricloroacetamido, en donde el grupo atractor de electrones se encuentra en una disposición axial más estable termodinámicamente, por efecto anomérico. El producto de anomerización α se

genera a través de retroreacción, anomerización al ion 1-óxido α y posterior adición de tricloroacetoniitrilo, y la velocidad de reacción puede aumentar utilizando una base más fuerte. De esta manera, se obtienen uno u otro anómero O-activados con altos rendimientos dependiendo de la base empleada (K_2CO_3 , $CaCO_3$, NaH , DBU).

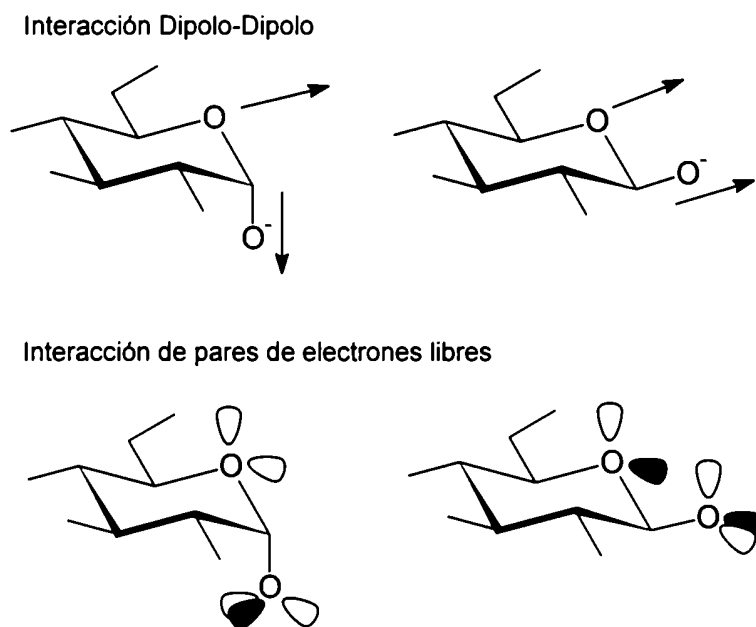
Esquema 9. Formación de tricloroacetamido



La alta nucleofilicidad del ion β -óxido se atribuye a factores estéricos y estereoelectrónicos, este último proviene de repulsiones de par de electrones y dipolo-dipolo (Esquema 10, Efecto anomérico cinético). Este efecto se encuentra mucho más pronunciado en iones β -óxidos que en azúcares β -piranósicos, pues el ion negativo presenta un par adicional de electrones libres.

La O-activación anomérica estereoselectiva de azúcares a través de tricloroacetamidatos de O-glicosilo es extensiva a todas las hexosas de importancia (Glc, Gal, Man, Fuc, Rha, GlcN, GalN) tanto como a ácidos glucurónicos, murámico y oligosacáridos (Schmidt & Kinzy, 1994).

Esquema 10. Nucleofilicidad pronunciada de β -óxidos
(Efecto anomérico cinético)



2. Reacción de glicosidación (paso de glicosidación)

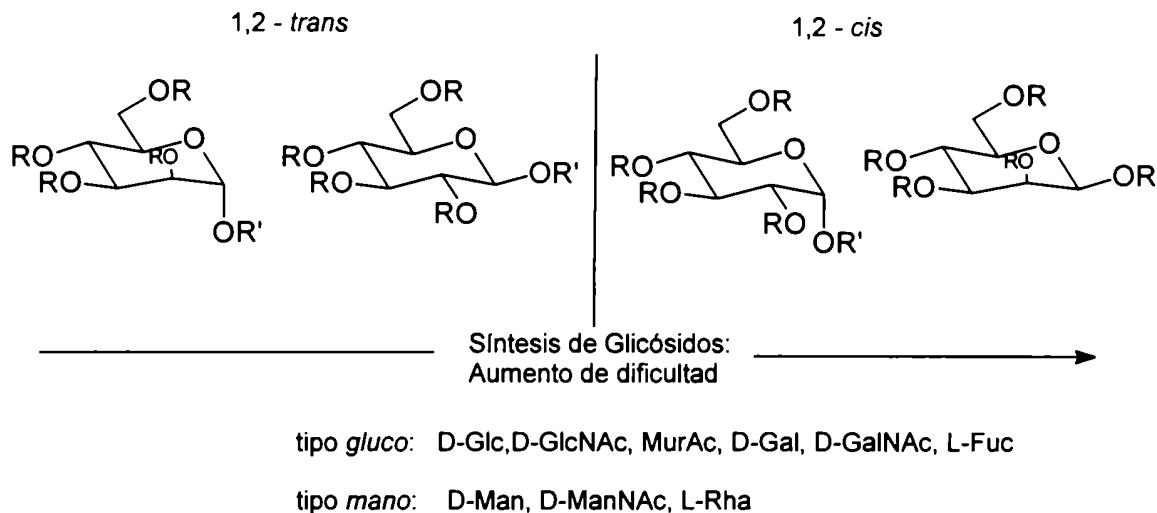
La formación del intermediario anomérico activado por catalisis básica, requiere un sistema diferente de catálisis para generar la propiedad donora de glicosilo en el paso de activación. Se necesita de una catálisis ácida suave en presencia del aceptor y así obtener el glicósido irreversiblemente bajo las condiciones de reacción. La función tricloroacetamidato es excelente grupo saliente pues se libera como molécula de tricloroacetonitrilo. El agua que se libera cuando se forma el glicósido se transfiere en dos pasos a las especies activantes $A \equiv B = CCl_3CN$ formándose tricloroacetamida que es estable y no básica ($O=A-BH_2 = CCl_3CONH_2$) siendo ésta la fuerza propulsora de la reacción (Esquema 7, C). Como consecuencia, el ácido actúa como un verdadero catalizador. La importancia de los

tricloroacetamidatos de O-glicosilo reside en que actúan como donores fuertes bajo catálisis ácida suave.

Selectividad α/β

La facilidad para formar los diferentes enlaces anoméricos depende mayormente de la fuerza del efecto anomérico, que es mayor en los azúcares del tipo α -mano que en los α -gluco, y en la participación o no del grupo protector en C-2 (participación anquimérica o de grupo vecino). Por consiguiente, la dificultad para construir dicha unión aumenta desde azúcares del tipo α -mano > β -gluco >> α -gluco >> β -mano (Esquema 11).

Esquema 11

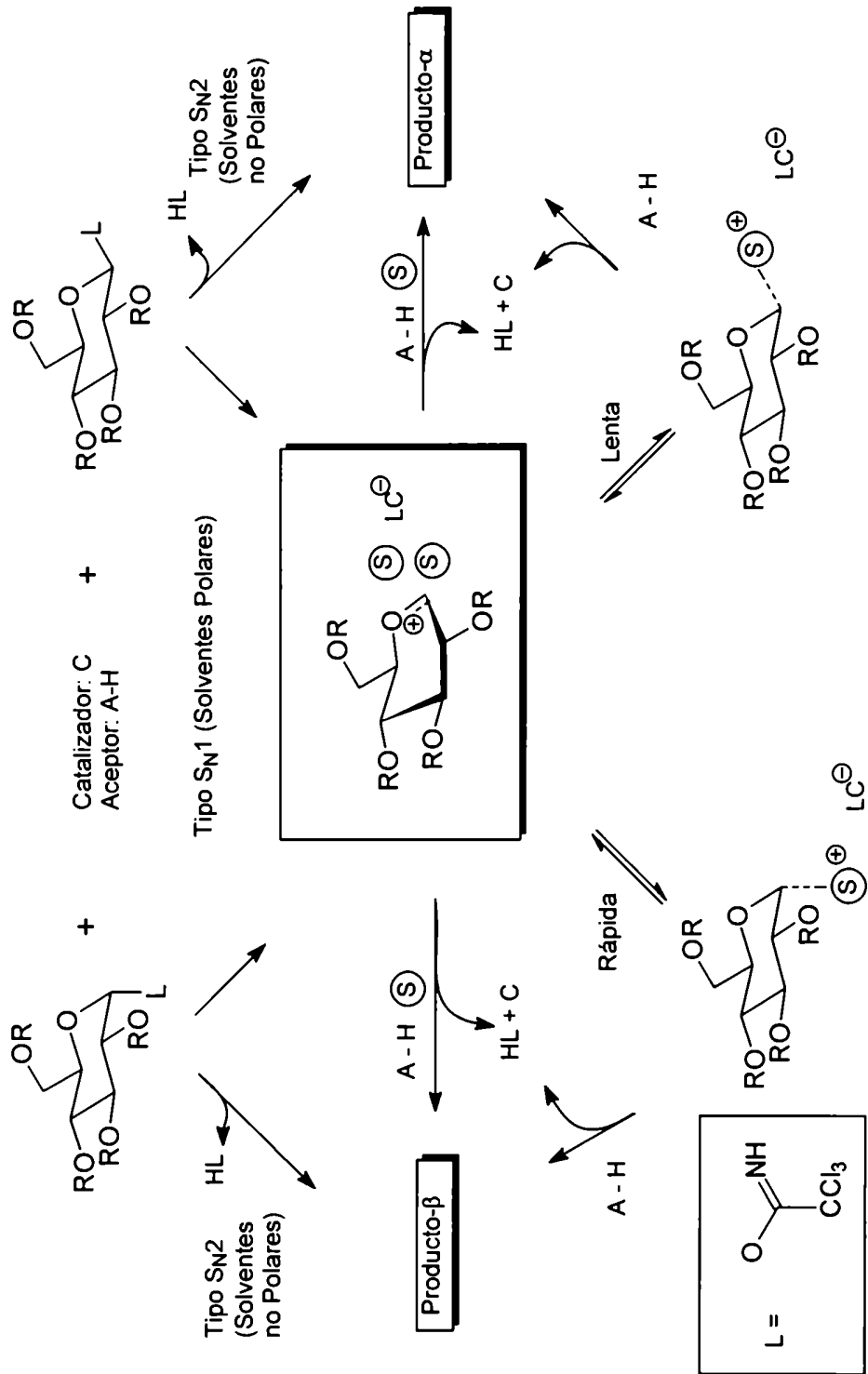


La participación de grupos protectores como 2-O-acil (o 2-N-acil) en el método del tricloroacetamido es fundamental en la estereoselectividad de la glicosidación, obteniéndose glicósidos del tipo α -mano y β -gluco. En ausencia de grupos participantes, cuando el solvente de reacción es no polar, a bajas temperaturas y en presencia de ácidos de Lewis relativamente suaves ($\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$) como catalizador, las

reacciones siguen un mecanismo del tipo S_N2 y así β -tricloroacetamidos conducen a glicósidos α y viceversa (Esquema 12).

En cambio, ácidos de Lewis más fuertes (TMSOTf) y a mayores temperaturas en solventes más polares, favorecen la formación del producto más estable termodinámicamente. El tricloroacetamido de O-glicosilo se transforma en un oxonio que se encuentra como semisilla (Esquema 12), y por razones estereoelectrónicas el ataque se produce por la cara axial α conduciendo al producto α que es el termodinámicamente más estable. Por consiguiente, bajo condiciones del tipo S_N1 se forman preferentemente los glicósidos del tipo α -mano y α -gluco. En particular, si el solvente es éter, se genera con participación de este solvente un ion oxonio ecuatorial por efecto anomérico reverso (Lemieux, 1971) favoreciendo la formación del producto α axial, termodinámicamente más estable.

Bajo estas mismas condiciones y con nitrilos como solvente se obtienen glicósidos β independientemente de la configuración anomérica del donador. Se postula que la reacción está controlada por la formación de un intermediario conjugado nitrilo-nitrilio. En presencia de TMSOTf como catalizador y a bajas temperaturas (-80 °C), se genera el ion oxonio, que es atacado por moléculas de nitrilo preferencialmente por la cara axial α para formar conjugados α -nitrilio-nitrilo axiales conduciendo al producto ecuatorial β . Sin embargo, el conjugado β -nitrilio-nitrilo es termodinámicamente más estable por el efecto anomérico reverso y favorecería la formación del producto α . Este equilibrio sería mucho más lento para solventes como nitrilos que para éteres, obteniéndose casi exclusivamente el producto β . Este procedimiento es muy importante pues permite construcciones glicosídicas difíciles como es la del tipo β -mano (Schmidt *et al.*, 1990).



Esquema 12

Conclusion

Este método reúne todos los requerimientos para que una glicosidación sea eficiente.

Las características del *paso de activación* son: (1) formación de tricloroacetamido catalizada por base; (2) obtención de los donores α o β controlada por la elección de la base; (3) estabilidad térmica de los tricloroacetamidos α y β a temperatura ambiente.

Las características del *paso de glicosidación* son : (1) catálisis por un ácido de Lewis bajo condiciones suaves; (2) reacción irreversible; (3) no se afectan otros enlaces glicosídicos; (4) generalmente el rendimiento es alto; (5) la estereoselectividad del enlace formado es buena a excelente: (a) grupos participantes dan glicopiranosidos 1,2-*trans*, es decir, glicósidos β de Glc, GlcN, Mur, Gal, GalN y glicósidos α de Man y Rha; (b) con grupos no participantes, $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ como catalizador en solventes no polares a bajas temperaturas se favorece la inversión de la configuración anomérica; (c) el éter favorece bajo condiciones del tipo $\text{S}_{\text{N}}1$ la formación de α -glicósidos, y los nitrilos los β -glicósidos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

CAPÍTULO 3

Síntesis de β -D-Galf-(1 \rightarrow 4)-GlcNAc (9)

Por β -eliminación de glicoproteínas de *T. cruzi*, se han aislado recientemente oligosacáridos de distinto tamaño que están unidos O-glicosídicamente por la unidad β -D-Galf-(1 \rightarrow 4)GlcNAc a la proteína (Previato *et al.*, 1994; Acosta Serrano *et al.*, 1995). Este tipo de unión es novedosa pues los oligosacáridos de proteínas de membrana se encuentran normalmente unidos a la proteína por GalNAc. Además, la presencia de Galf podría estar relacionada con la antigenicidad de la glicoproteína (De Arruda *et al.*, 1989). Dicho disacárido (9) aparece ramificado con un número variable de unidades de Galp, que convierten a la cadena de azúcares en aceptora de ácido siálico. La glicosidación con este ácido es catalizada por una transsialidasa, que había sido caracterizada en *T. cruzi* (Ferrero-García *et al.*, 1993; Vandekerckhove *et al.*, 1993). Esta reacción está relacionada con la infectividad del parásito (Piras *et al.*, 1987; Schenkman *et al.*, 1991, Franchin *et al.*, 1997).

La presencia de Galf en estas glicoproteínas de *T. cruzi*, aceptoras de ácido siálico, depende de la cepa. Por ejemplo, los oligosacáridos de la superficie celular de la cepa Y no contienen Galf (Previato *et al.*, 1995).

Debido a que los oligosacáridos que contienen Galf podrían ser útiles tanto para la identificación de cepas como también en estudios de la biosíntesis de estas cadenas O-glicosídicas, y considerando que la preparación del disacárido 9 no estaba descrita, se llevó a cabo su síntesis.

Para la síntesis de 9, era necesario partir de un derivado de N-acetilglucosamina convenientemente protegido, y con el OH-4 libre. Este aceptor sería luego glicosidado con un derivado adecuado de Galf. Para ello, se necesitaba

obtener el derivado OH-4 libre de la *N*-acetilglucosamina en el menor número de pasos posibles, y estos grupos deberían ser luego eliminados fácilmente.

Protección selectiva de bencil N-acetilglucosamina. Obtención de bencil 2-acetamido-3,6-di-O-benzoil-2-desoxi- α -D-glucopiranosido (3)

Benzoilaciones selectivas, bajo distintas condiciones, de metil α -D-glucopiranosido (Ogawa & Matsui, 1981; Williamson & Richardson, 1967), indicaban una menor reactividad para el OH-4. Williamson & Richardson (1967) obtuvieron metil 2,3,6-tri-O-benzoil- α -D-glucopiranosido con un 67 % de rendimiento por tratamiento de metil α -D-glucopiranosido con cloruro de benzoilo en piridina a -40 °C. Además se encontró que en esterificaciones selectivas de D-glucosa (Batey *et al.*, 1975), 6-desoxi-D-glucosa (Kondo *et al.*, 1973) y 2-desoxi-D-*arabino*-hexosa (Fiandor & De Las Heras, 1986), el OH-4 presentaba una menor reactividad.

Por otra parte, para la acilación parcial de azúcares, no solamente se han utilizado cloruros de ácido o anhídridos sino también otros derivados de ácidos como los *N*-acilimidazoles (Haines, 1976). La química de los *N*-acilimidazoles ha sido desarrollada por Staab (1962). Se ha descrito la acilación de metil α -D-glucopiranosido con *N*-(tri-O-metilgaloil)imidazol (Birkofer & Idel, 1974) y, en particular, cuando la relación de glicósido-acilante era 1:4, se obtenía el 2,3,6-triéster con un 65% de rendimiento.

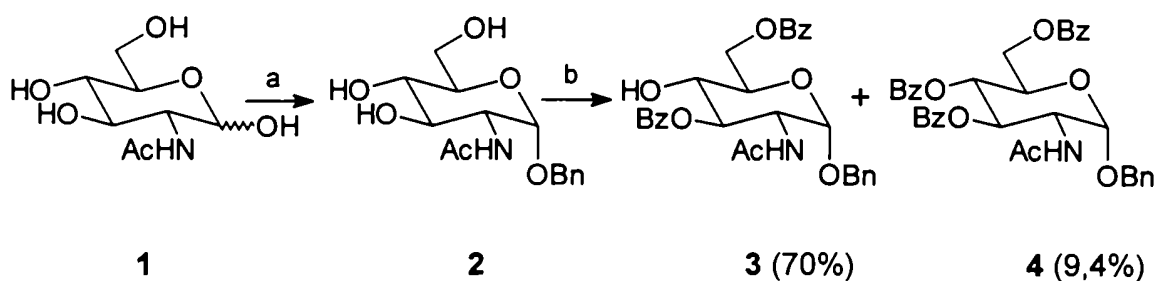
La mayor selectividad en la acilación de hidratos de carbono de los *N*-acilimidazoles comparados con los haluros de ácido en piridina podría deberse a que los primeros son menos reactivos, requiriendo varias horas a temperaturas mayores de 60 °C para completar la reacción, en contraste con la acilación en piridina que puede llevarse a cabo a bajas temperaturas.

Por otra parte, entre los distintos *N*-acilimidazoles, el *N*-benzoilimidazol había resultado más efectivo para la protección selectiva de distintos azúcares (Horton *et*

al., 1985; Carey & Hodgson, 1970). En nuestro laboratorio, se encontró que la benzoilación parcial con *N*-benzoilimidazol en acetonitrilo a reflujo de metil α -D-glucopiranosido daba como producto mayoritario el 2,3,6-tri-*O*-benzoato (71 % de rendimiento) y como productos minoritarios el 2,4,6-tri-*O*-benzoato (2,7 %), el perbenzoato (10,6 %) y el 2,6-di-*O*-benzoato (13,2 %). Estos resultados indicaban que el orden prioritario de sustitución de los OH era OH-6 > OH-2 > OH-3 >> OH-4 (Varela *et al.*, 1989).

Se eligió trabajar con el α -bencil glicósido de *N*-acetilglucosamina, debido a que, en principio, podría ser benzoilado selectivamente por las razones antes descritas y además el bencilo podría ser eliminado fácilmente al concluir la glicosilación, por hidrogenación catalítica. El tratamiento de *N*-acetilglucosamina (1, 2-acetamido-2-desoxi-D-glucopiranososa) con alcohol bencílico saturado con HCl a 150 °C, condujo al bencil 2-acetamido-2-desoxi- α -D-glucopiranosido (2, Esquema 13) Este compuesto se obtuvo fácilmente en escala multigramo siguiendo el procedimiento de Kuhn & Baer (1958) y presentó las mismas características físicas que el descripto.

Esquema 13.



Reactivos: a) BnOH, HCl (43 %); b) *N*-benzoilimidazol, CH₃CN, reflujo

El compuesto **2** se sometió a protección parcial por tratamiento con 2,4 equivalentes de *N*-benzoilimidazol en acetonitrilo a reflujo (Esquema 13). Se obtuvo una mezcla de derivados benzoilados que se separaron por cromatografía en columna de sílica gel. El producto principal de la reacción fue el bencil 2-acetamido-3,6-di-*O*-benzoil-2-desoxi- α -D-glucopiranosido (**3**) que se obtuvo con 70% de rendimiento. También, como producto minoritario se aisló el perbenzoato **4** con un 9,4 % de rendimiento confirmando la menor reactividad de OH-4 frente a *N*-benzoilimidazol.

Un experimento de correlación homonuclear permitió asignar el espectro de RMN ^1H de **3** que no se encontraba descrito en literatura (Figura 1 y 2). La estructura de **3** se estableció por comparación de sus datos espectroscópicos con los del perbenzoato **4**. Así, la señal del H-4 (δ 3,85) en **3** se desplazaba \sim 1,9 ppm a campos bajos por benzoilación del OH-4. Las señales de los protones vecinos H-3 y H-5 aparecían a campos más bajos, en menos de 0,5 ppm, en el compuesto perbenzoilado, indicando también que el OH-4 de **3** se encontraba libre. Este resultado también se confirmó por RMN ^{13}C . Como se observa en distintos derivados de azúcares parcialmente benzoilados (Bock & Pedersen, 1983), la benzoilación de un dado grupo hidroxilo causa un desplazamiento para el C- α (generalmente a campos bajos) y un desplazamiento a campos altos para el C- β ; es decir, los C- β a un hidroxilo resuenan a campos más bajos que los C- β a un benzoilo.

La señal del C-4 de **4** (Figura 3, Tabla 1) se desplazó 0,4 ppm a campos más bajos con respecto al C-4 de **3** que había sido identificado por un experimento 2D-COSY heteronuclear. Además, las señales correspondientes al C-3 y C-5 de **4** aparecieron a campos más altos (2,9 ppm y 1,5 ppm) comparados con las mismas señales de **3** (Figura 3, Tabla 1). Estos desplazamientos se justificaban si la benzoilación del OH-libre de **3** correspondía al que se ubica en el C-4.

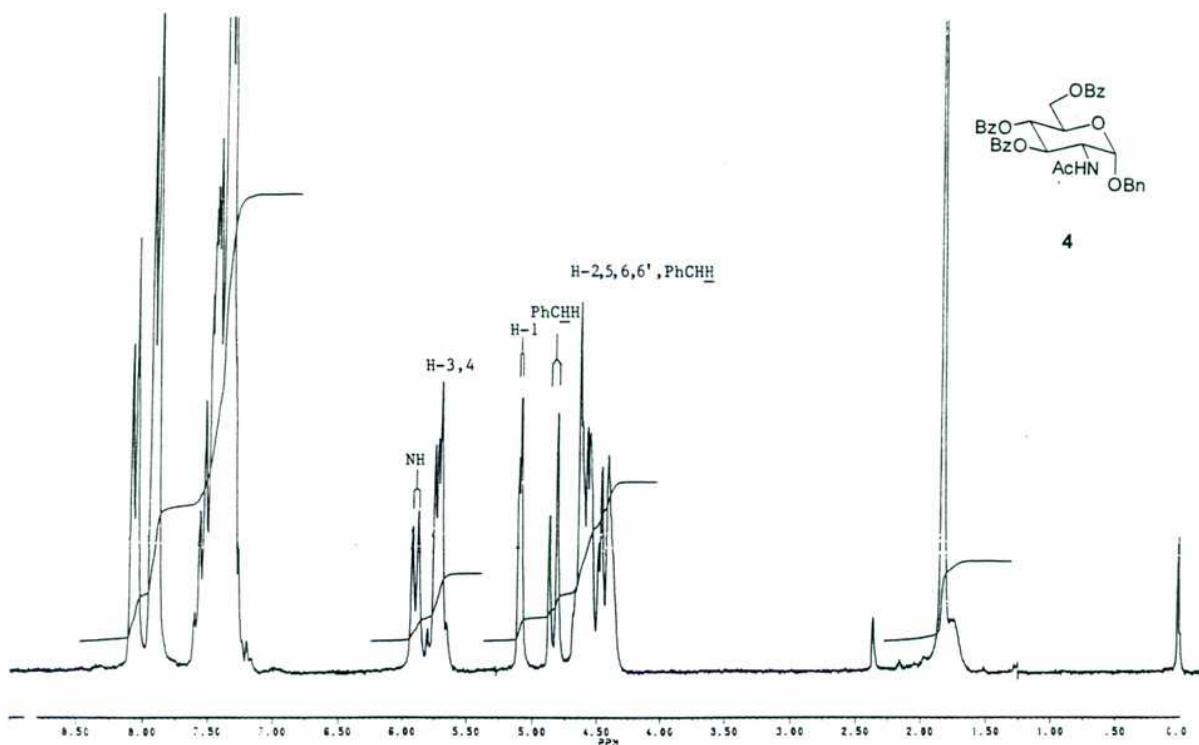
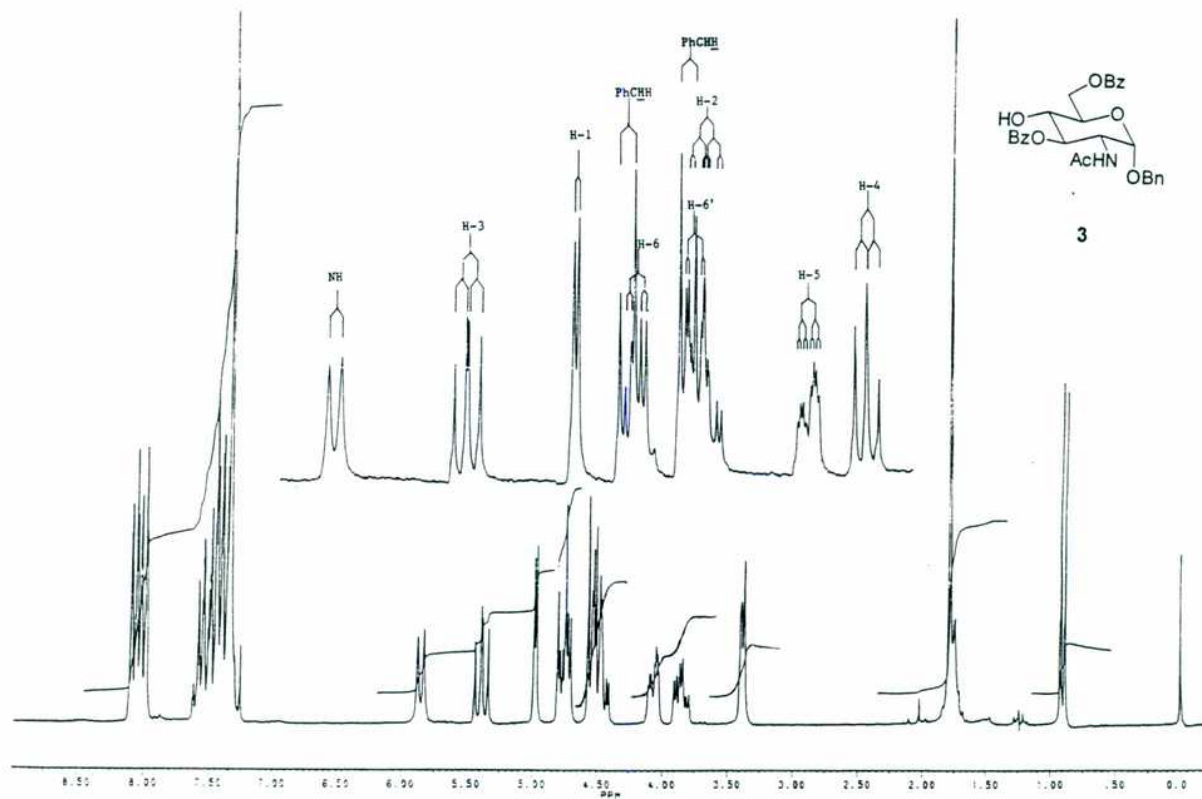
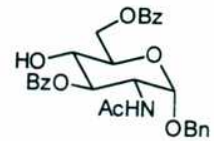


Figura 1. Espectros de RMN ^1H de los compuestos 3 y 4



3

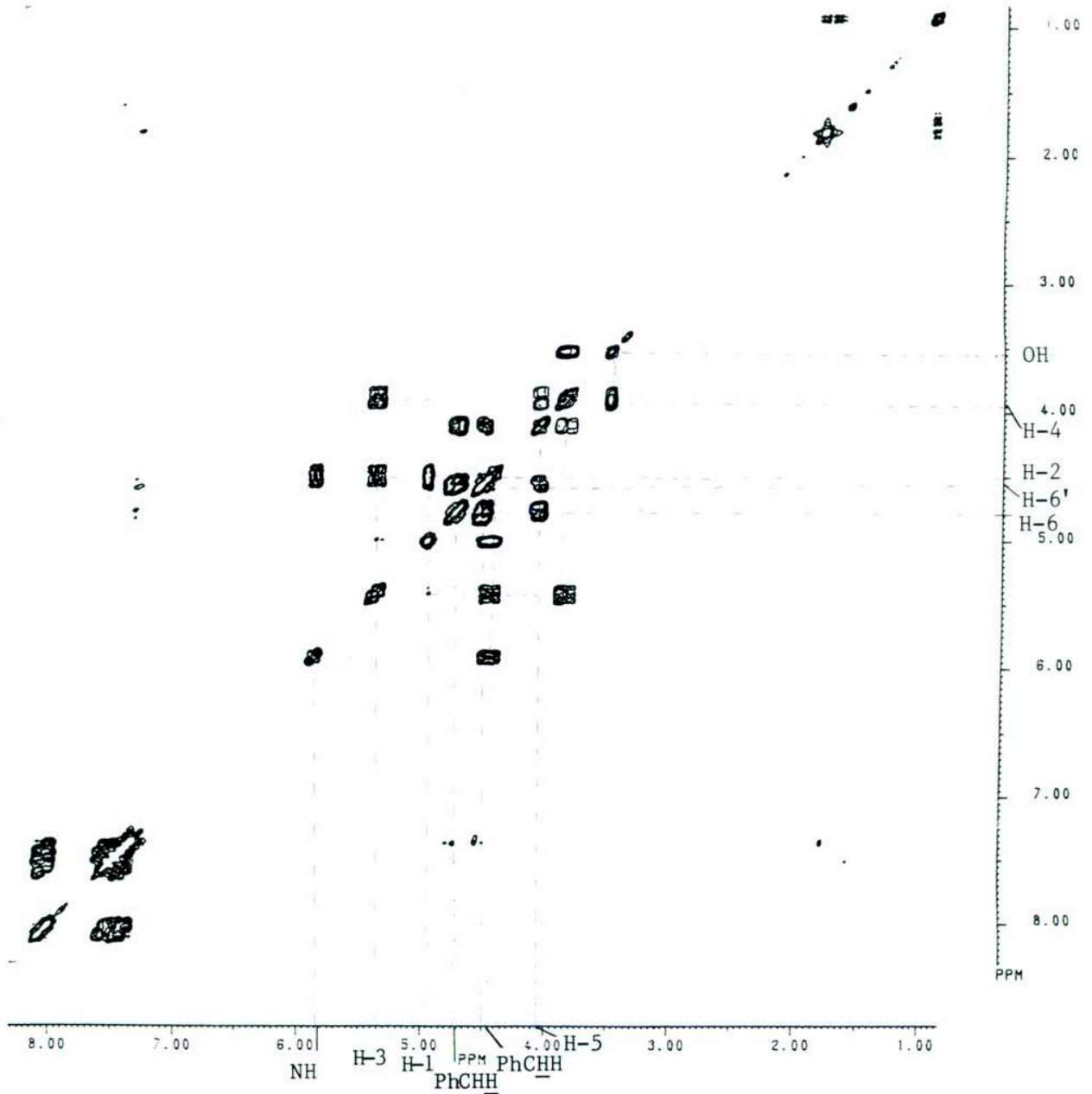


Figura 2. Espectro de correlación homonuclear (COSY) del compuesto 3.

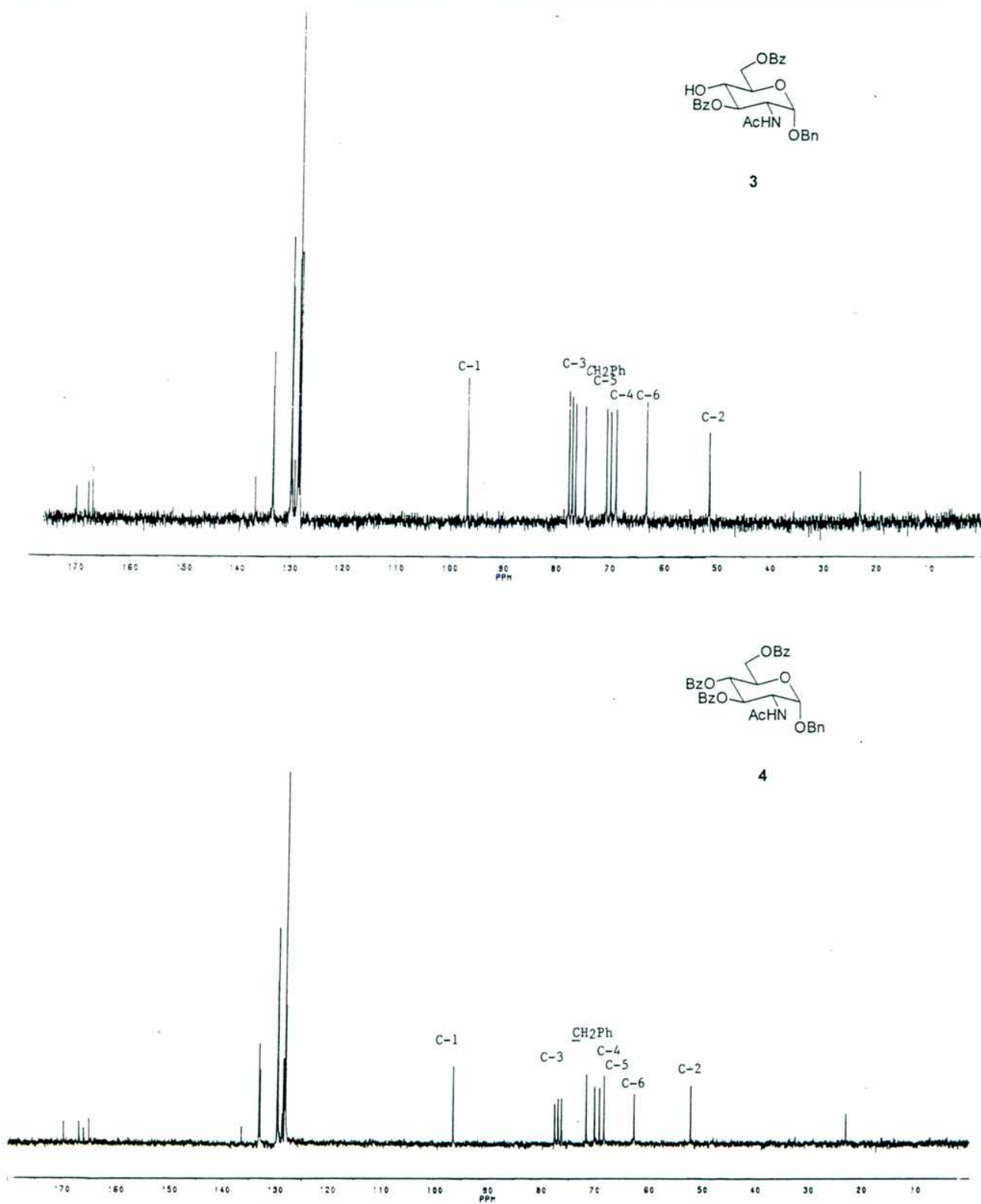


Figura 3. Espectros de RMN ^{13}C de los compuestos 3 y 4.

Glicosidación. Obtención de bencil (2,3,5,6-tetra-O-benzoil- β -D-galactofuranosil)-(1 \rightarrow 4)-2-acetamido-3,6-di-O-benzoil-2-desoxi- α -D-glucopiranosido (6)

Teniendo el aceptor **3**, era necesario efectuar la glicosidación con un derivado de galactofuranosa. La formación de enlaces glicosídicos a partir de penta-O-benzoil- α,β -galactofuranosa catalizada por SnCl₄ resultaba un procedimiento conveniente. Hannessian y Banoub (1977b) describieron el uso de SnCl₄ como promotor en la preparación de glicósidos 1,2-*trans* a partir de azúcares peracilados.

Las condiciones suaves de reacción han permitido la preparación de glicósidos piranósicos (Du Mortier *et al.*, 1989) y furanósicos (Jeroncic *et al.*, 1987; Varela *et al.*, 1986), inclusive con agliconas con sensibilidad térmica o hidrolítica como es el caso de los β -ribofuranósidos del carbazol (Wanner *et al.*, 1986). Posteriormente se demostró la utilidad de este ácido de Lewis en la activación del centro anomérico de galactofuranosas peraciladas (Marino *et al.*, 1989; Lederkremer *et al.*, 1990), conduciendo a la formación del enlace glicosídico con configuración 1,2-*trans*, utilizando como aceptores derivados de galactono-1,4-lactona.

La alta estereoselectividad encontrada en la glicosidación puede atribuirse a la participación anquimérica del sustituyente en C-2 en la estabilización de la carga positiva en C-1, generada por fragmentación del enlace del sustituyente anomérico por el ácido de Lewis. El catión aciloxonio resultante (o bien un intermediario ortoéster) (Hannessian & Banoub, 1977b) bloquea una de las caras del C-1 e induce el ataque del aceptor glicosídico por el lado no impedido, conduciendo así a un glicósido de configuración 1,2-*trans*.

Este procedimiento tiene como ventaja adicional que el precursor de la parte no reductora del disacárido es una galactofuranosa peracilada y no un derivado inestable de galactofuranosa, como por ejemplo un haluro, que es empleado en las condensaciones de Koenigs-Knorr (Haynes & Newth, 1955). Además, la utilización

de galactofuranosa peracilada constituye un método sencillo que involucra un solo paso de reacción en comparación con la preparación de haluros de glicosilo.

En este trabajo se empleó como agente glicosidante perbenzoil- α,β -D-galactofuranosa (5) que se obtuvo fácilmente y en escala multigramo por benzoilación de galactosa en piridina a alta temperatura (D'Accorso *et al.*, 1983).

La condensación de 3 con 5 promovida por SnCl_4 condujo estereoselectivamente al bencil (2,3,5,6-tetra-O-benzoil- β -D-galactofuranosil)-(1 \rightarrow 4)-2-acetamido-3,6-di-O-benzoil-2-desoxi- α -D-glucopiranosido (6) con 85% de rendimiento (Esquema 14). El espectro de RMN ^{13}C de este disacárido (Figura 4) presentaba señales que confirmaban la presencia de la unidad GlcNAc y de Galf. Así por ejemplo, los C-2 y C-1 de la GlcNAc resonaban a 52,2 ppm y 96,7 ppm, respectivamente. Con respecto a la unidad furanósica, el C-1' resonaba a campos bajos (δ 107,0) similar a los observados para el carbono anomérico de β -galactofuranósidos, indicando una configuración β para el C-1'. Además, las señales a 83,3 y 82,7 ppm correspondientes al C-4' y C-2', son también características de β -galactofuranósidos. Adicionalmente, la configuración anomérica de la unidad furanósica se confirmó como β , debido a que, en el espectro de RMN ^1H , el H-1' aparecía como un singulete ancho a 5,46 ppm ($J_{1',2'} < 1\text{Hz}$) indicando una relación *trans* entre H-1' y H-2' (Figura 4). Un experimento de correlación homonuclear (COSY) permitió asignar parcialmente las señales del espectro protónico (Figura 5).

Obtención de (2,3,5,6-tetra-O-benzoil- β -D-galactofuranosil)-(1 \rightarrow 4)-2-acetamido-3,6-di-O-benzoil-2-desoxi- α,β -D-glucopiranosida (7)

A efectos de obtener el disacárido libre, se procedió a eliminar los grupos protectores. Primeramente, se intentó eliminar el grupo bencilo por hidrogenación catalítica bajo distintas condiciones, tanto a presión atmosférica como a 3 atm, en presencia de Pd/C, pero en todos los casos la reacción era extremadamente lenta.

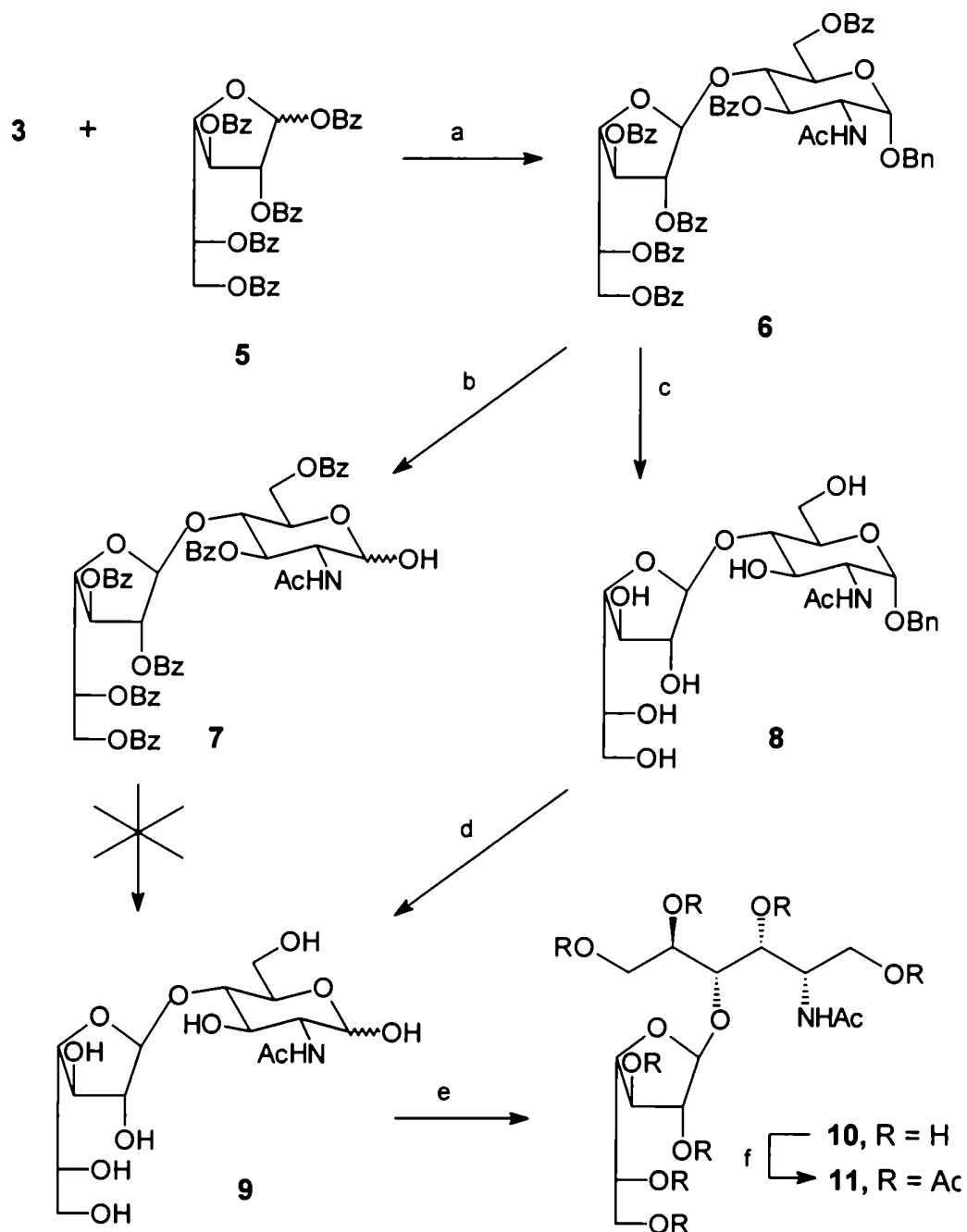
El mejor resultado se obtuvo cuando se utilizó como catalizador hidróxido de paladio seguido de Pd/C 10% y la hidrogenación se llevaba a cabo a presión atmosférica por 10 días. Sin embargo, sólo se lograba hidrogenólisis parcial, ya que luego de separar por columna cromatográfica, se obtenía (2,3,5,6-tetra-O-benzoil- β -D-galactofuranosil)-(1 \rightarrow 4)-2-acetamido-3,6-di-O-benzoil-2-desoxi- α,β -D-glucopiranososa (**7**) con rendimiento de ~77 % y se recuperaba un 11 % de **6** sin reaccionar (Esquema 14).

El espectro de RMN ^{13}C de **7** (Tabla 1, Figura 6) presentaba la señal correspondiente al C-1 a 97,7 ppm, lo cual indicaba que se encontraba en la configuración α piranosa y se confirmó la ausencia de bencilo ya que no se observaron las señales características a ~137 y ~70 ppm.

*Obtención de bencil β -D-galactofuranosil-(1 \rightarrow 4)-2-acetamido-2-desoxi- α -D-glucopiranosido (**8**)*

Para obtener **9** libre se sometió **7** a la O-desbenzoilación con NaMeO en MeOH. Sin embargo este procedimiento, incluso a baja temperatura, producía descomposición del material de partida. Por ello, se decidió desarrollar el camino inverso. Así, por desbenzoilación con NaMeO en MeOH de **6**, se obtuvo el bencil β -D-galactofuranosil-(1 \rightarrow 4)-2-acetamido-2-desoxi- α -D-glucopiranosido (**8**) como un producto cristalino con 97% de rendimiento. El compuesto **8** presentó en su espectro de RMN ^{13}C (Tabla 1, Figura 6) una señal a 108,7 ppm que correspondía al C-1' confirmando la configuración β furanósica, y en la zona de carbonilo solo se observó señal a 175,1 ppm correspondiente al N-acetilo, y resultaba evidente que la desbenzoilación había sido total.

Esquema 14



Reactivos: a) SnCl_4 , Cl_2CH_2 (85 %); b) H_2 (1 atm), 10 % $\text{Pd}(\text{OH})_2/\text{C}$ y 10 % Pd/C , EtOAc (77 %); c) NaOMe en MeOH 0,55 M (97 %); d) HCO_2NH_4 , 10 % Pd/C , MeOH, 65 C (98 %); e) NaBH_4 (100%); f) $(\text{AcO})_2\text{O}$, $\text{C}_5\text{H}_5\text{N}$ (96 %)

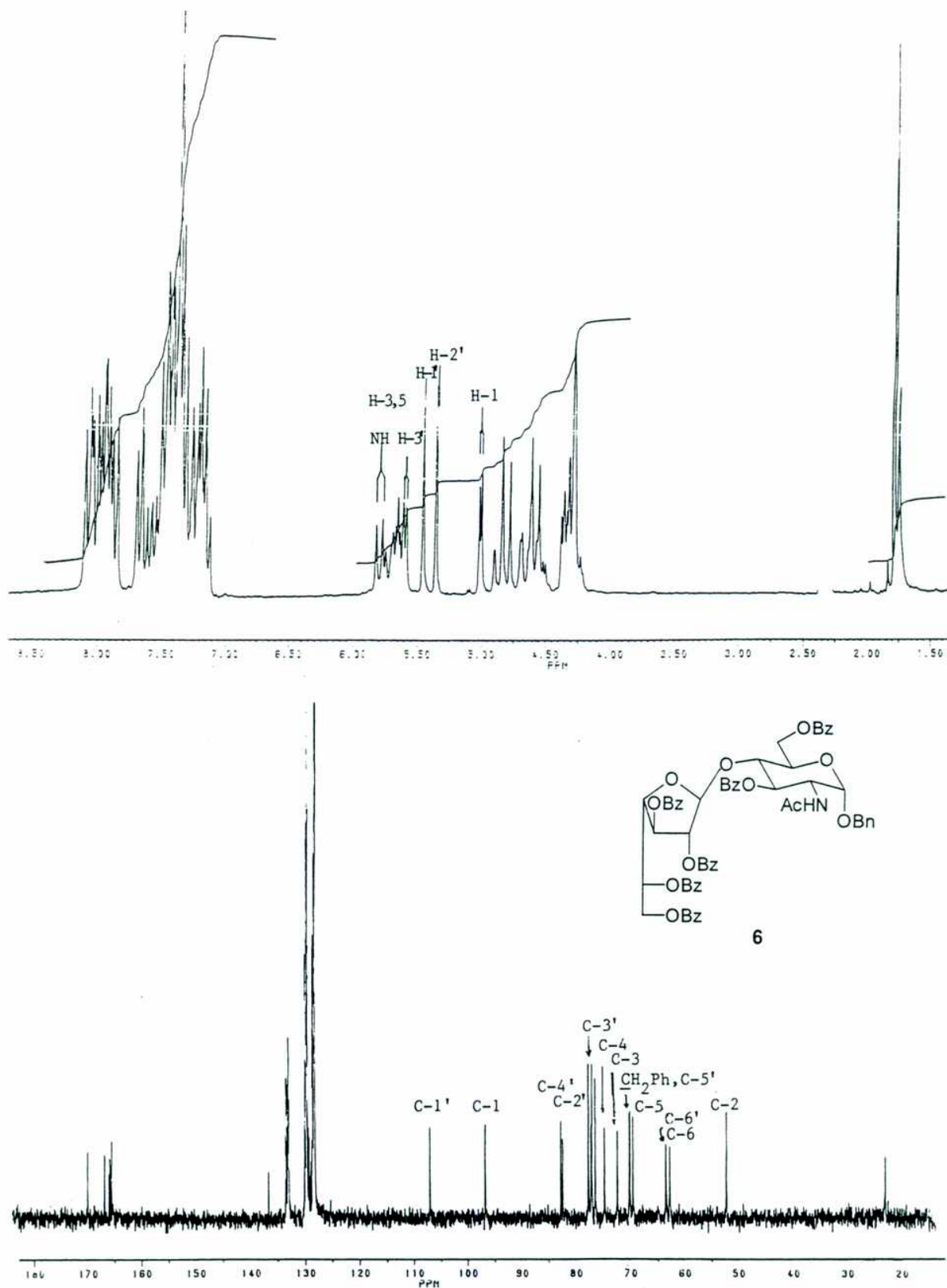


Figura 4. Espectros de RMN ^1H y ^{13}C del compuesto 6

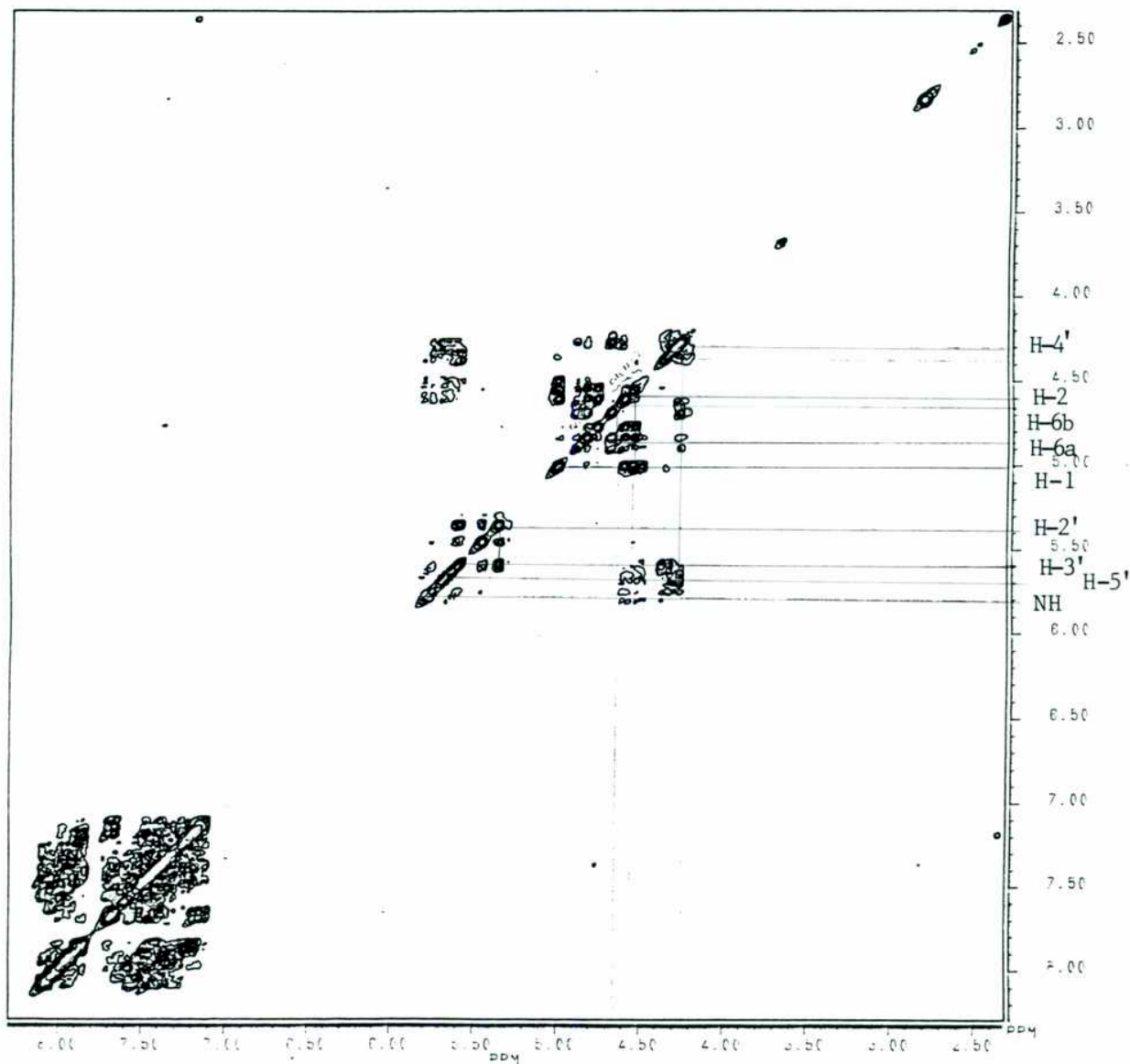
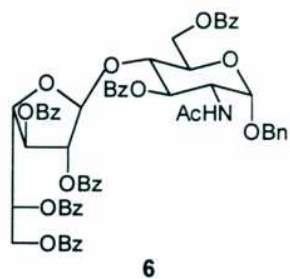


Figura 5. Espectro de correlación homonuclear (COSY) del compuesto **6**

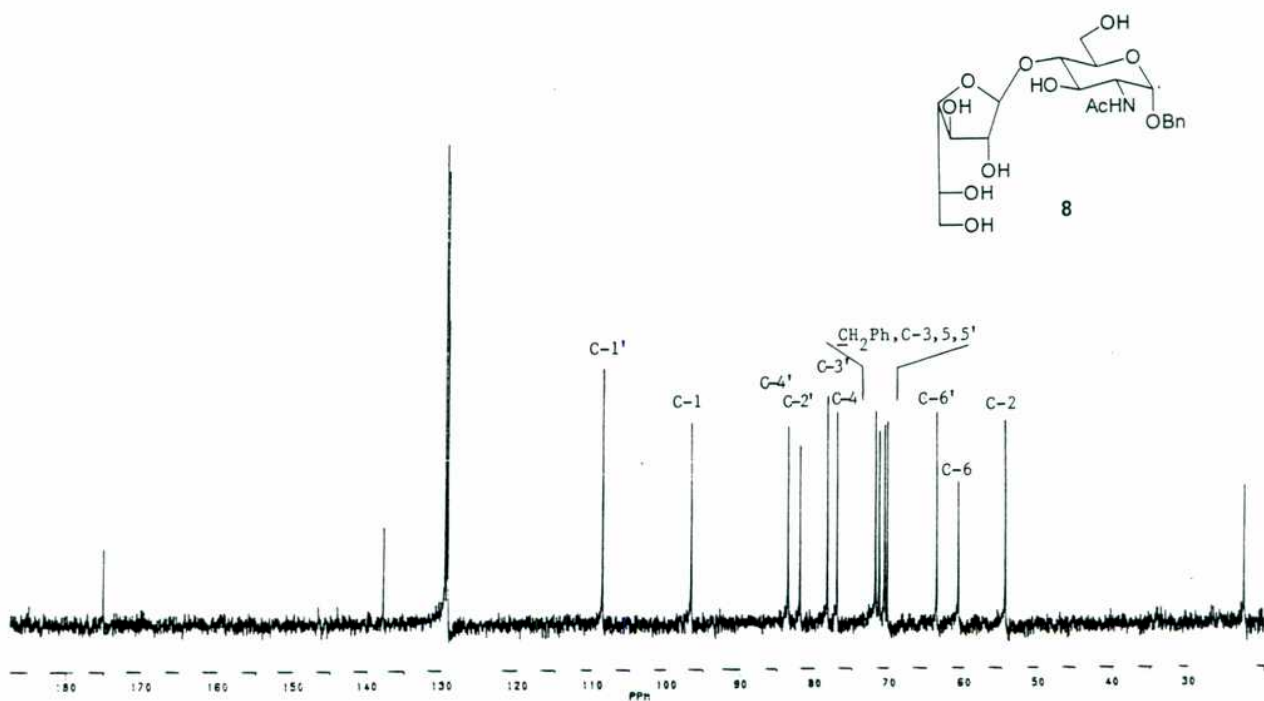
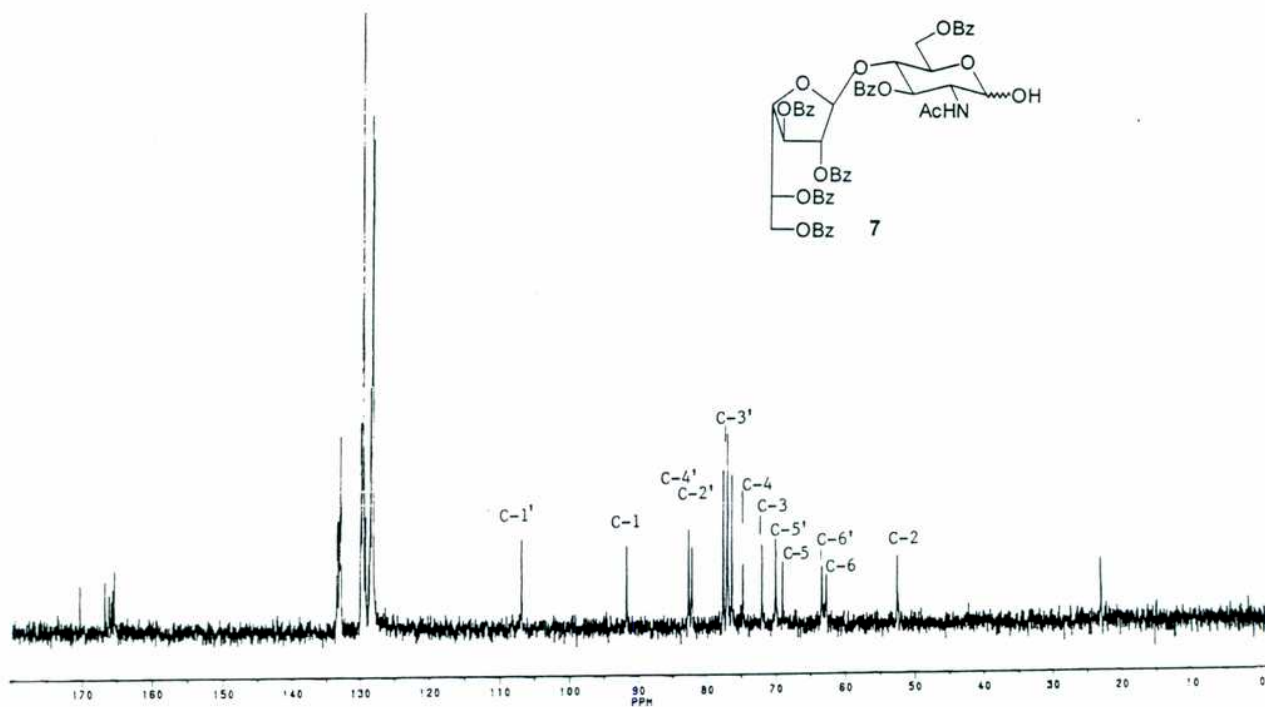


Figura 6. Espectros de RMN ^{13}C de los compuestos 7 (Cl₃CD) y 8 (D₂O).

Tabla 1. Desplazamientos químicos de RMN ^{13}C de los compuestos **2-4**, **6-11**.

| Compuesto | δ (ppm) | | | | | | |
|---|----------------------------------|------|-------|-------|-------|------|--------------------|
| | C-1 | C-2 | C-3 | C-4 | C-5 | C-6 | CH ₂ Ph |
| 2^a | 96,7 | 54,5 | 71,7 | 70,9* | 72,9 | 61,4 | 70,5* |
| 3^b | 96,8 | 51,6 | 74,6 | 68,9 | 69,9 | 63,4 | 70,7 |
| 4^b | 96,7 | 52,3 | 71,7 | 69,3 | 68,4 | 62,9 | 70,2 |
| 6^b GlcNAc | 96,7 | 52,2 | 72,3 | 74,7 | 69,5 | 62,7 | 70,0 |
| Galf | 107,0 | 82,3 | 77,1 | 82,7 | 70,1 | 63,4 | |
| 7^b GlcNAc | 91,7 | 52,6 | 72,1 | 74,8 | 69,0 | 62,7 | |
| Galf | 106,9 | 82,2 | 77,1 | 82,7 | 70,1 | 63,4 | |
| 8^a GlcNAc | 96,6 | 54,5 | 71,8* | 77,0 | 71,3* | 60,8 | 70,2 |
| Galf | 108,7 | 81,9 | 78,3 | 83,6 | 70,6* | 63,6 | |
| 9^a GlcNAc^c | 91,5(α);95,8(β) | 54,9 | 71,3* | 77,0 | 71,3* | 60,9 | |
| Galf | 108,6 | 81,9 | 78,5 | 83,5 | 70,0* | 63,6 | |
| 10^a GlcNAc-ol | 61,8 | 53,6 | 69,4 | 78,8 | 72,1* | 62,9 | |
| Galf | 109,0 | 82,1 | 77,2 | 83,8 | 71,4* | 63,8 | |
| 11^b GlcNAc-ol | 61,6 | 47,9 | 70,4# | 75,4* | 69,5# | 62,3 | |
| Galf | 106,9 | 80,9 | 75,9* | 81,6 | 69,8# | 62,7 | |

^a D₂O, ^b CDCl₃, ^c anómero α . * · # Las señales pueden ser intercambiadas.

Obtención de β -D-galactofuranosil- (1 \rightarrow 4)-2-acetamido-2-desoxi- α,β -D-glucopiranososa (9)

Así como había ocurrido con **6**, la hidrogenación catalítica de **8**, tanto en presencia de Pd/C o Pd(OH)₂ resultaba incompleta y en este caso, la separación del producto bencilado y el disacárido libre era dificultosa, por lo cual el procedimiento era poco viable.

En la literatura se describía un método alternativo para la desbencilación de nucleósidos o compuestos que contienen N, el cual consistía en la hidrogenólisis catalítica heterogénea de transferencia. Utilizando el método descrito por Beaupere *et al.* (1988) levemente modificado, el tratamiento de **8** con formiato de amonio en presencia de Pd/C 10 % en MeOH a 65°C, condujo al disacárido β -D-galactofuranosil-(1 \rightarrow 4)-2-acetamido-2-desoxi- α,β -D-glucopiranososa (**9**) con un excelente rendimiento y en corto tiempo. Este compuesto cristalizó lentamente de MeOH. Su espectro de RMN ^{13}C (Tabla 1, Figura 7) mostró los carbonos anoméricos de Galf (108,6 ppm) y GlcNAc (91,5 y 95,8 ppm para el anómero α y β respectivamente).

El disacárido **9** constituye el "core" de los oligosacáridos con Galp unidos a serina o treonina en las glicoproteínas de *T. cruzi* de 38/43 kDa (Previato *et al.*, 1994, Acosta-Serrano *et al.*, 1995).

*Reducción. Obtención de β -Galf(1 \rightarrow 4)GlcNAc-ol (**10**)*

Considerando que en la reacción de β -eliminación/reducción de las glicoproteínas se obtienen los alditos de los oligosacáridos, se procedió a reducir **9** con borohidruro de sodio. Se obtuvo el alditol cristalino β -Galf(1 \rightarrow 4)GlcNAc-ol (**10**) que mostró en su espectro de RMN ^{13}C (Tabla 1, Figura 7) las señales diagnósticas similares a las informadas para el "alditol disacárido" (Previato *et al.*, 1994) aislado por β -eliminación de las proteínas de *T. cruzi*: C-anomérico 109,0 ppm; C-1 y C-4 de GlcNAc-ol 61,8 y 78,8 ppm.

Por protección de **10** con anhídrido acético en piridina se obtuvo 2,3,5,6-tetra-O-acetil- β -D-galactofuranosil-(1 \rightarrow 4)-2-acetamido-1,3,5,6-tetra-O-acetil-2-desoxi-D-glucitol (**11**) al cual se le realizaron los espectros de RMN ^1H y ^{13}C (Tabla 1).

Con esta síntesis, se confirmó la estructura del disacárido natural interesante desde el punto de vista biológico β -Galf(1 \rightarrow 4)GlcNAc (**9**) cuya síntesis no

se había descrito anteriormente. El rendimiento total de esta ruta sintética fue del 55 % a partir de **2**.

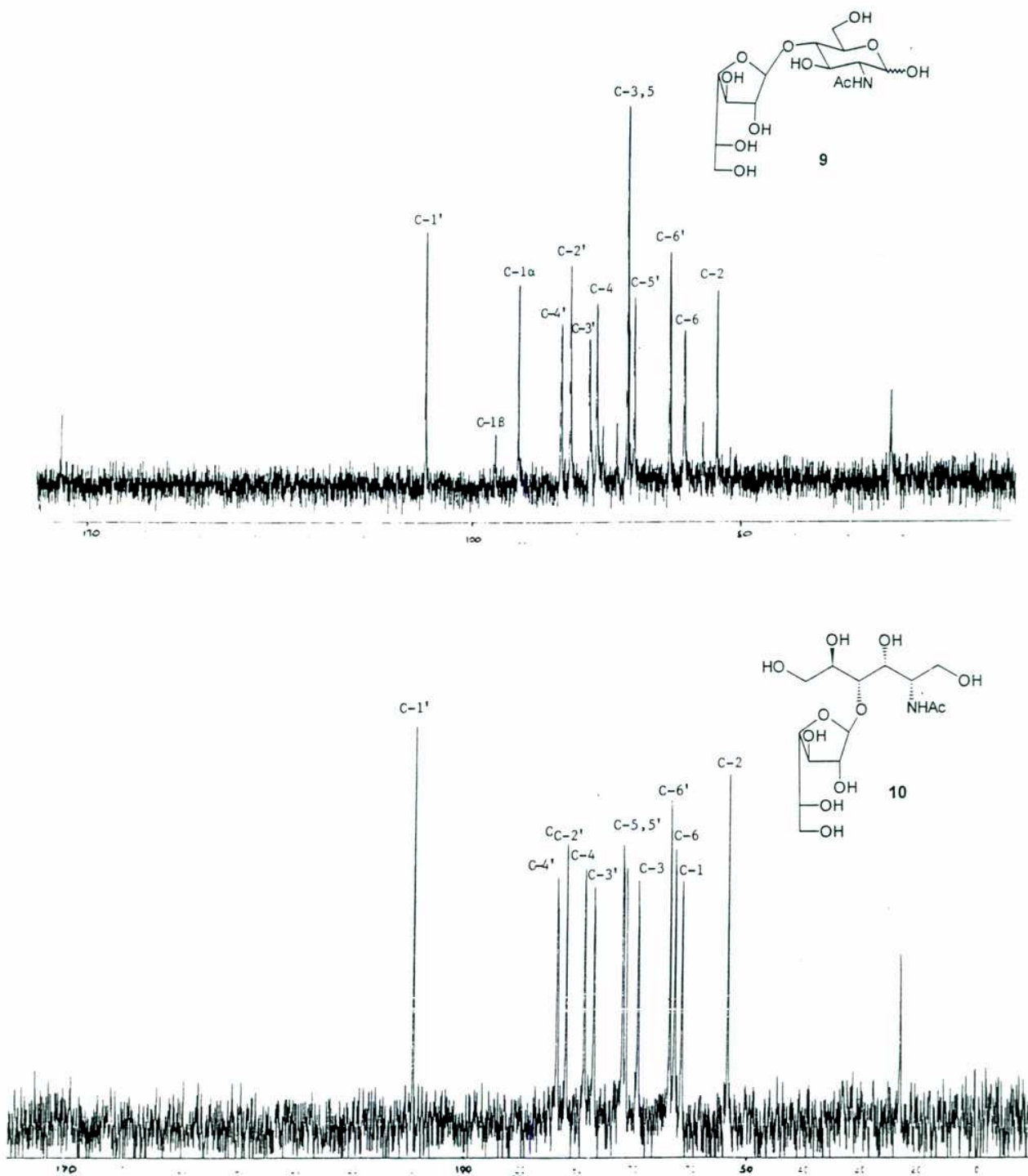


Figura 7. Espectros de RMN ^{13}C de los compuestos **9** y **10**

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

CAPÍTULO 4

Síntesis de β -D-Galf(1→4)[β -D-Galp(1→6)]GlcNAc (23)

Una vez sintetizado el disacárido β -D-Galf(1→4)GlcNAc (9), resultaba interesante la síntesis del trisacárido β -D-Galf(1→4)[β -D-Galp(1→6)]GlcNAc (23) que representa el oligosacárido más simple que puede ser aceptor de ácido siálico (NANA), en la reacción de trans-sialidación (Ferrero-García *et al.*, 1993; Vandekerckhove *et al.*, 1993) que tiene lugar en *Trypanosoma cruzi* (Figura 8). Como se mencionó, dicho trisacárido se encontró por primera vez en unión O-glicosídica en las glicoproteínas del parásito y se liberó como alditol en una reacción de β -eliminación reductiva utilizada habitualmente en el estudio de estructuras de glicoproteínas (Dell *et al.*, 1993). El trisacárido 23 o su alditol no han sido sintetizados previamente.

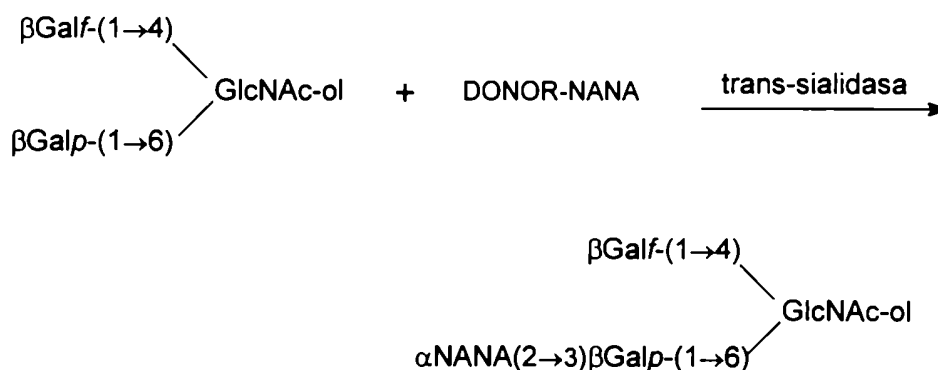


Figura 8. Reacción de trans-sialidación

Como precursor para la síntesis de β -D-Galf(1→4)[β -D-Galp(1→6)]GlcNAc (23) podría partirse de un derivado de GlcNAc, convenientemente protegido con los OH-6 y OH-4 libres. Se estudiaría luego la posibilidad de efectuar una glicosidación

selectiva del OH-6 con un derivado de Galp, para luego glicosidar el hidroxilo restante con un derivado de galactofuranosa.

Obtención de bencil 2-acetamido-3-O-benzoil-2-desoxi- α -D-glucopiranosido (14)

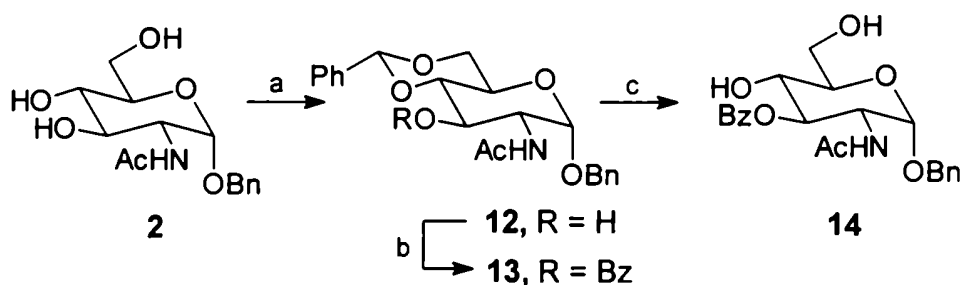
Para ensayar la ruta propuesta se empleó el bencil 2-acetamido-3-O-benzoil-2-desoxi- α -D-glucopiranosido (14), el cual había sido preparado por Kuhn & Baer (1958) a partir del bencil 2-acetamido-2-desoxi- α -D-glucopiranosido (2) con un rendimiento total del 36 % (Esquema 15). En el presente trabajo, se desarrolló un método alternativo que aumentó considerablemente el rendimiento (68 %). Para ello, se realizó la bencilidenación de 2 de acuerdo a Evans (1972). El compuesto 2 se trató con α,α -dimetoxitolueno en DMF, en presencia de trazas de ácido *p*-toluensulfónico como catalizador a 60 °C, mientras se eliminaba el MeOH formado por destilación al vacío. Se obtuvo así el bencil 2-acetamido 4,6-O-bencilidén-2-desoxi- α -D-glucopiranosido (12) con 88 % de rendimiento. Este compuesto había sido preparado convencionalmente (Kuhn & Baer, 1958) empleando benzaldehído y ZnCl₂.

Los espectros de RMN ¹H y ¹³C de 12 no se encontraban descriptos. El espectro de RMN ¹H mostró entre otras señales, un singulete (δ 5,58) que correspondía al H acetálico confirmando la presencia del bencilidén. En la zona anomérica del espectro de RMN ¹³C (alrededor de 100 ppm) resonaban además del C-1 (97,3 ppm) el carbono acetálico (100,5 ppm). Por otra parte, las señales a 82,0 y 67,7 ppm se atribuyeron al C-4 y C-6 (Tabla 2), respectivamente, teniendo en cuenta que la formación de un anillo 1,3-dioxolano produce un corrimiento a campos más bajos de hasta 10 ppm para dichos carbonos (Bock *et al.*, 1984).

Por benzoilación de 12 en piridina, se obtuvo el bencil 2-acetamido 4,6-O-bencilidén-3-O-benzoil-2-desoxi- α -D-glucopiranosido (13) como un producto cristalino con 95% de rendimiento. El espectro de RMN ¹H de 13 mostró que el H-3

resonaba a 5,64 ppm, y que se había desplazado a campos bajos (\sim 1,3 ppm) respecto de la misma señal en **12**, confirmando que la benzoilación había ocurrido sobre el OH-3. El espectro de RMN ^{13}C de **13** se pudo asignar totalmente comparando con el espectro de **12** y teniendo en cuenta el efecto desprotector para el C- α y protector para los C- β , ocasionados por la benzoilación de un grupo OH como se discutió anteriormente. En particular, la señal a 70,8 ppm que correspondía al C-3, se encontraba más desprotegida (2,3 ppm) que el mismo núcleo en **12**; y las señales de los C-2 y C-4 se corrieron a campos más altos (1,9 y 2,7 ppm, respectivamente) (Tabla 2).

Esquema 15



Reactivos: a) α,α -dimetoxitolueno, ácido *p*-toluensulfónico, DMF, 60 °C (88 %);
 b) $\text{C}_6\text{H}_5\text{COCl}$, $\text{C}_5\text{H}_5\text{N}$ (95 %); c) $\text{AcOH-H}_2\text{O}$, 100 °C (81 %).

Por hidrólisis de **13** con ácido acético acuoso, se obtuvo en forma cristalina el bencil 2-acetamido-3-O-benzoil-2-desoxi- α -D-glucopiranosido (**14**) con 81% de rendimiento. Los espectros de RMN ^{13}C y ^1H de **14** no se encontraban descriptos en literatura y eran de importancia para la comparación en el seguimiento de la síntesis del trisacárido blanco.

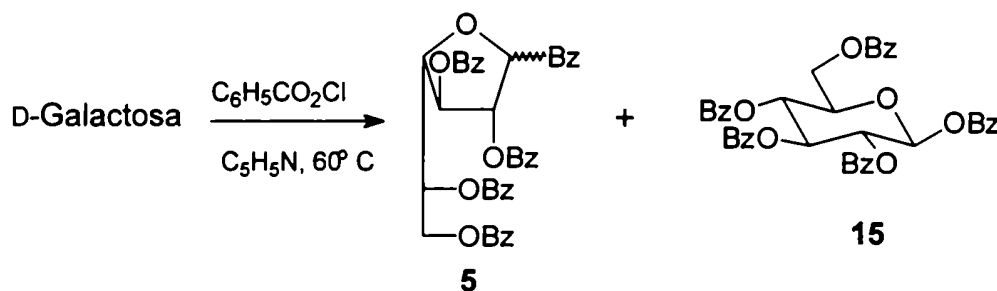
Al comparar el espectro de RMN ^{13}C de **14** con el 3,6-di-O-benzoato **3**, se observó que la benzoilación en C-6 de **14** provoca, como era de esperar, un

corrimiento del C-6 a campos bajos (1,4 ppm) y un desplazamiento del C-5 (2,2 ppm) a campos altos (Tabla 2).

Obtención de penta-O-benzoil- β -D-galactopiranososa (**15**).

Dado que el aceptor de glicosilo **14** se pudo obtener por una ruta directa y simple, y con buen rendimiento, se procedió a preparar las unidades de galactosa, convenientemente derivatizadas para la glicosidación. Como se mencionó anteriormente, la penta-O-benzoil-D-galactofuranosa se obtenía fácilmente por benzoilación de D-galactosa a alta temperatura (D'Accorso *et al.*, 1983). El producto crudo de la reacción se trataba con EtOH caliente cristalizando la mezcla de anómeros de per-O-benzoil-D-galactofuranosa. Sin embargo, se encontró que si se dejaban las aguas madres de la cristalización por más de 10 días a temperatura ambiente, se obtenía una segunda cosecha de cristales de un compuesto que no estaba descrito y que se identificó como penta-O-benzoil- β -D-galactopiranososa (**15**) (Esquema 16).

Esquema 16



En el espectro RMN¹³C de **15**, el C-1 resonaba a 93,1 ppm y además no se observaron señales en la región de resonancia de los C-2 y C-4 (75-85 ppm) de las galactofuranosas benzoiladas (Figura 9).

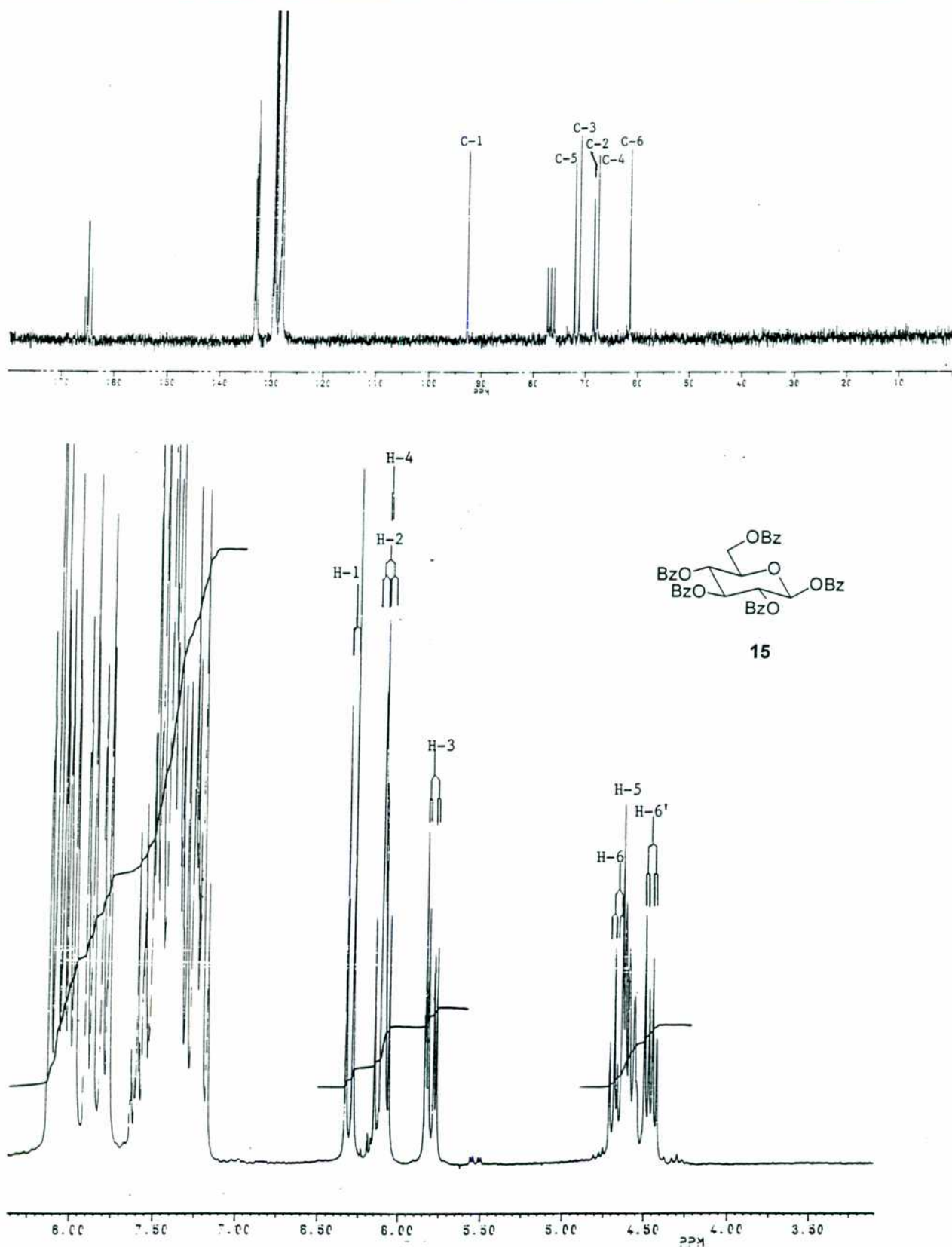


Figura 9. Espectros de RMN ^1H y ^{13}C del compuesto 15

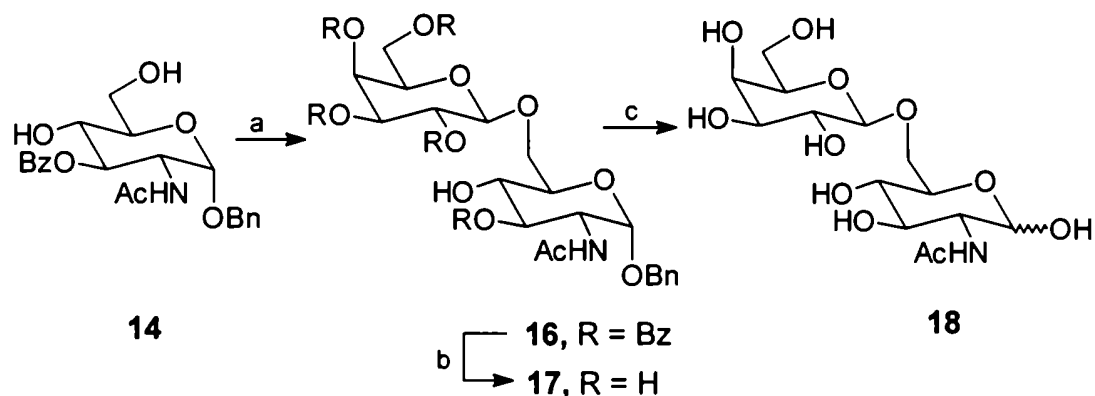
En el espectro de RMN ^1H se observó un doblete correspondiente al H-1 con un valor alto de su constante de acoplamiento ($J_{1,2}$ 8,3 Hz) que indicaba una relación 1,2-*trans* para esos H y por ende, una configuración β -piranósica (Figura 9). En concordancia con ésta, se observó también un alto valor de $J_{2,3}$ (10,2 Hz), debido a una disposición anti entre H-2 y H-3. Las señales en el espectro de RMN ^{13}C de **15** se asignaron por comparación con las del correspondiente compuesto acetilado (Bock & Pedersen, 1983).

Glicosidación selectiva. Obtención del bencil (2,3,4,6-tetra-O-benzoil- β -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 6)-2-acetamido-3-O-benzoil-2-desoxi- α -D-glucopiranosido (16).

El compuesto **14** tiene dos grupos hidroxilos libres, OH-6 y OH-4, que pueden diferenciarse químicamente por ser primario y secundario, respectivamente. Considerando que el precursor del disacárido **10**, bencil 2-acetamido-4,6-di-O-benzoil-2-desoxi- α -D-glucopiranosido, había resultado estable a las condiciones de glicosidación con SnCl_4 , se procedió a glicosidar **14** con per-O-benzoil- β -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 6)-2-acetamido-3-O-benzoil-2-desoxi- α -D-glucopiranosido (**16**) que se aisló fácilmente por cristalización del crudo de reacción con 80 % de rendimiento (Esquema 17). Esta reacción resultó altamente regio y estereoselectiva. El espectro de RMN ^{13}C de **16** presentaba señales que confirmaban la presencia de la unidad GlcNAc como ser el C-2 a 51,2 ppm y el C-1 a 96,4 ppm. La señal a δ 102,2 correspondía a la resonancia del C-1' de la unidad de Galp. La señal del C-6 de **16** se encontraba desplazada (\sim 6 ppm) a campos más bajos respecto de la misma señal en **14**, confirmando que el OH-6 se había glicosidado regioselectivamente. El espectro de RMN ^1H mostró un doblete para el

H-1' con una constante de acoplamiento alta ($J_{1,2}$ 7,8 Hz) que indicaba una configuración β para el nuevo centro anomérico formado (Figura 10).

Esquema 17



Reactivos: a) SnCl_4 , Cl_2CH_2 (80 %); b) NaOMe en MeOH 0,5 M (98 %); d) HCO_2NH_4 , 10 % Pd/C, MeOH, 65 C (96 %)

La estructura de **16** se confirmó unívocamente por desprotección para obtener el disacárido libre β -D-Galp(1 \rightarrow 6)GlcNAc (**18**) que había sido sintetizado anteriormente (Khun *et al.*, 1955). La desprotección de **16** se llevó a cabo según la secuencia antes desarrollada para el disacárido **9**. Por desbenzoilación con NaOMe en MeOH, se obtuvo el bencil glicósido **17** cristalino con 98 % de rendimiento. En su espectro de RMN ^{13}C , se observó una sola señal en la región de carbonilo que correspondía al *N*-acetilo indicando que la desbenzoilación había sido total. Las señales se asignaron comparando con el metil β -galactopiranosido y **2**, teniendo en cuenta que el C-6 se desplazó a campos bajos por glicosidación con respecto a la misma señal en **2** (Figura 11, Tabla 2).

Por hidrogenólisis catalítica heterogénea de **17** con formiato de amonio y Pd/C 10 % en metanol caliente, se obtuvo β -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 6)-2-acetamido-2-desoxi- α,β -D-glucopiranososa (**18**). Este disacárido presentó el mismo $[\alpha]_D$ que el

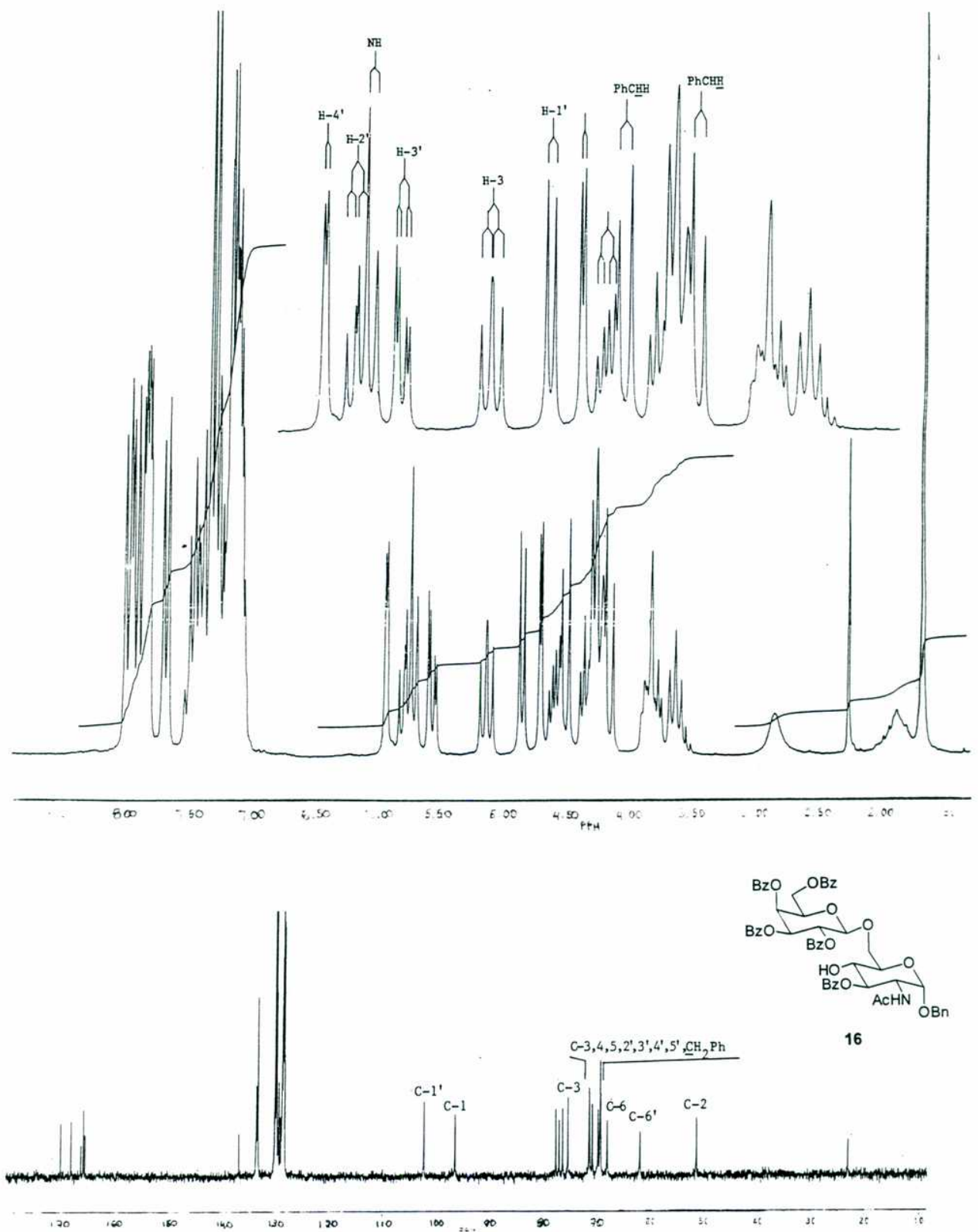


Figura 10. Espectros de RMN ^1H y ^{13}C del compuesto 16.

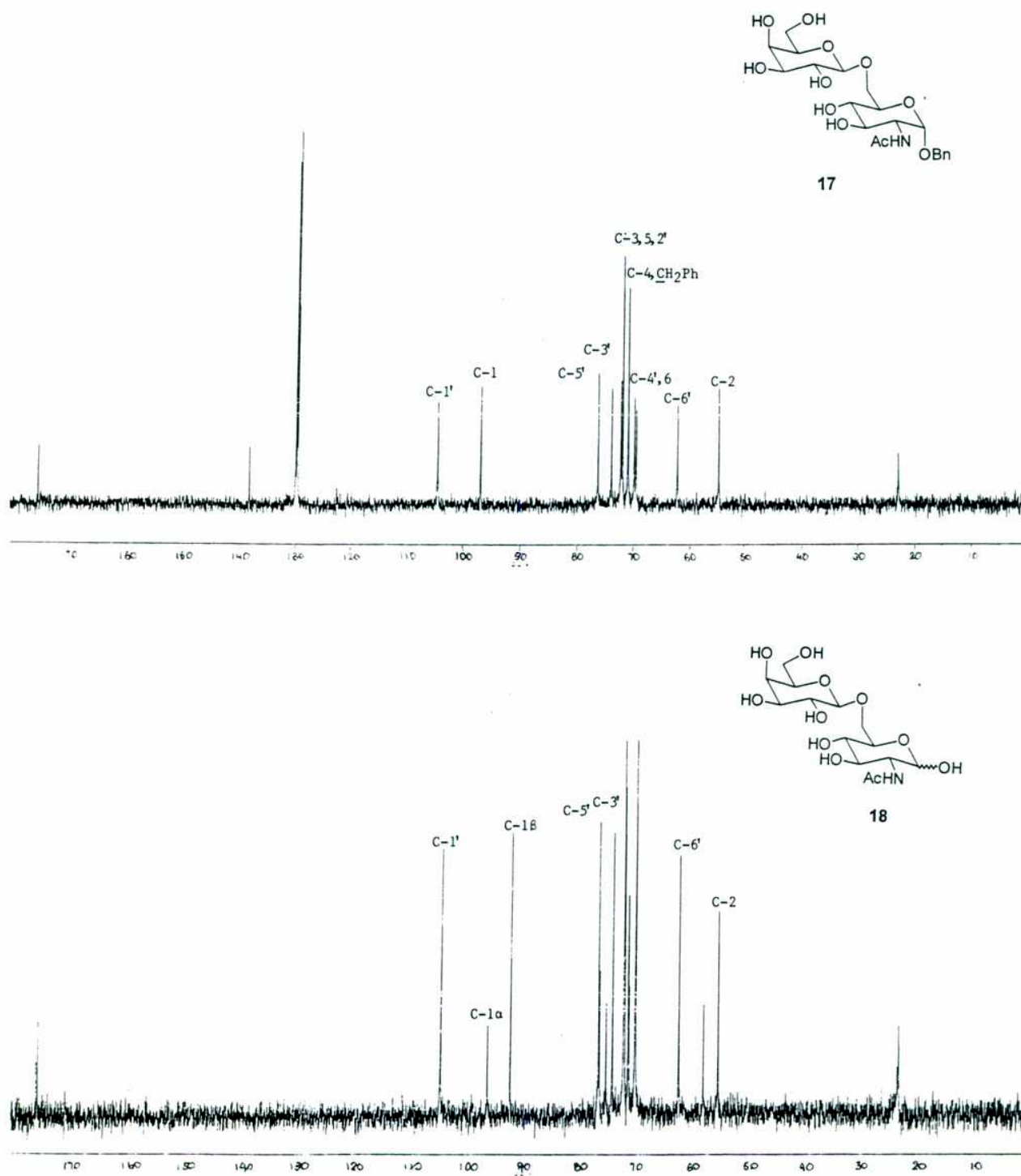


Figura 12. Espectros de RMN ^{13}C del compuestos 17 y 18.

descripto (Kuhn *et al.*, 1955) pero en este caso cristalizó lentamente de una mezcla EtOH-MeOH. En el espectro de RMN ^{13}C , se observó la señal (δ 104,2) correspondiente al C-1' de la unidad de Galp y las señales a 91,8 y 95,5 ppm correspondían a los anómeros α y β del C-1, respectivamente, en una relación de intensidades $\sim 2,5 : 1$ (Figura 11, Tabla 2). El espectro de RMN ^1H mostró una composición similar de acuerdo a la integración de las señales del H-1 del anómero α ($J_{1,2}$ 3,4 Hz) y del anómero β ($J_{1,2}$ 7,4 Hz).

*Glicosidación. Obtención de bencil (2,3,5,6-tetra-O-benzoil- β -D-galactofuranosil)-(1 \rightarrow 4)-[2,3,4,6-tetra-O-benzoil- β -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 6)]-2-acetamido-3-O-benzoil-2-desoxi- α -D-glucopiranosido **19***

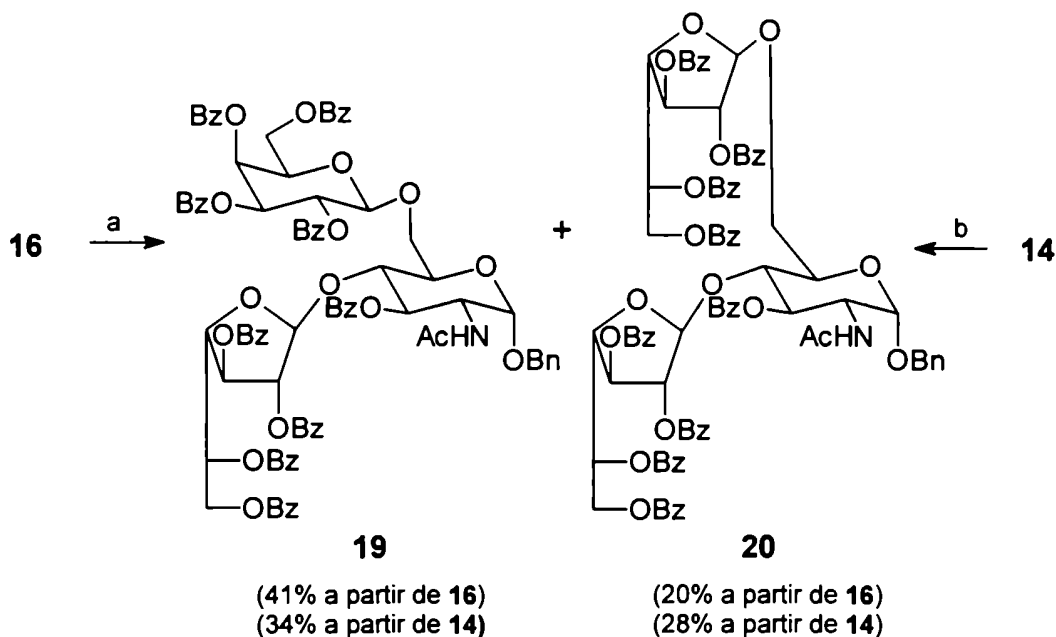
Como se ha mencionado, la alta regioselectividad encontrada en la glicosidación del OH-6 de **14** era esperable ya que el OH-6 primario se encuentra menos impedido estéricamente que el OH-4. Por otra parte, resulta interesante destacar que cuando se trató tanto **16** como **14** con un exceso de perbenzoil- β -D-galactopiranososa (**15**) en presencia de SnCl_4 , el OH-4 no pudo ser glicosilado. Sin embargo, cuando se trató **16** con un exceso de penta-O-benzoil- α,β -D-galactofuranosa (**5**) en SnCl_4 , se obtuvo como producto principal el bencil (2,3,5,6-tetra-O-benzoil- β -D-galactofuranosil)-(1 \rightarrow 4)-[2,3,4,6-tetra-O-benzoil- β -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 6)]-2-acetamido-3-O-benzoil-2-desoxi- α -D-glucopiranosido **19** como un sólido amorfo con 41 % de rendimiento (Esquema 18).

El espectro de RMN ^{13}C de **19** presentaba las señales anoméricas características de las unidades de GlcNAc (δ 96,4) y de Galp (δ 101,7). La señal a 107,0 ppm se atribuyó a la resonancia del C-1 de la unidad furanósica en la configuración β , similar a la observada para el mismo carbono en el disacárido **6**. Además, las señales a campos bajos (80,9 y 82,5 ppm) eran características de las resonancias de C-2 y C-4 de β -galactofuranósidos. El resto de las señales se

asignaron comparando con el disacárido **6** y el disacárido **16**, teniendo en cuenta que la señal del C-4 en **19** se desplazó a campos más bajos respecto de la misma señal en **16** debido a la glicosilación del OH-4 (Figura 13).

Por otra parte, los valores de las constantes de acoplamiento ($J_{1,2}$) de los H-1 de las tres unidades constituyentes del trisacárido **19** confirmaron sus configuraciones anoméricas. Así, el H-1 presentaba $J_{1,2}$ 3,6 Hz indicando la configuración α y para el H-1' ($J_{1,2}$ 7,7 Hz) la configuración β . La presencia de un singlete ancho a 5,08 ppm ($J_{1,2}$ <1Hz) confirmó la configuración β de la unidad furanósica. También se pudieron distinguir otras señales correspondientes a la unidad furanósica como ser el multiplete característico del H-5'' y el doblete correspondiente al H-2'' ($J_{2,3}$ ~1Hz). Un experimento 2D-COSY permitió asignar las señales parcialmente (Figuras 13 y 14).

Esquema 18



Reactivos: a) **5**, SnCl₄, 0 °C → 20°C, 37 h; b) **15**, SnCl₄, 18 h, luego **5**, SnCl₄, 24 h.

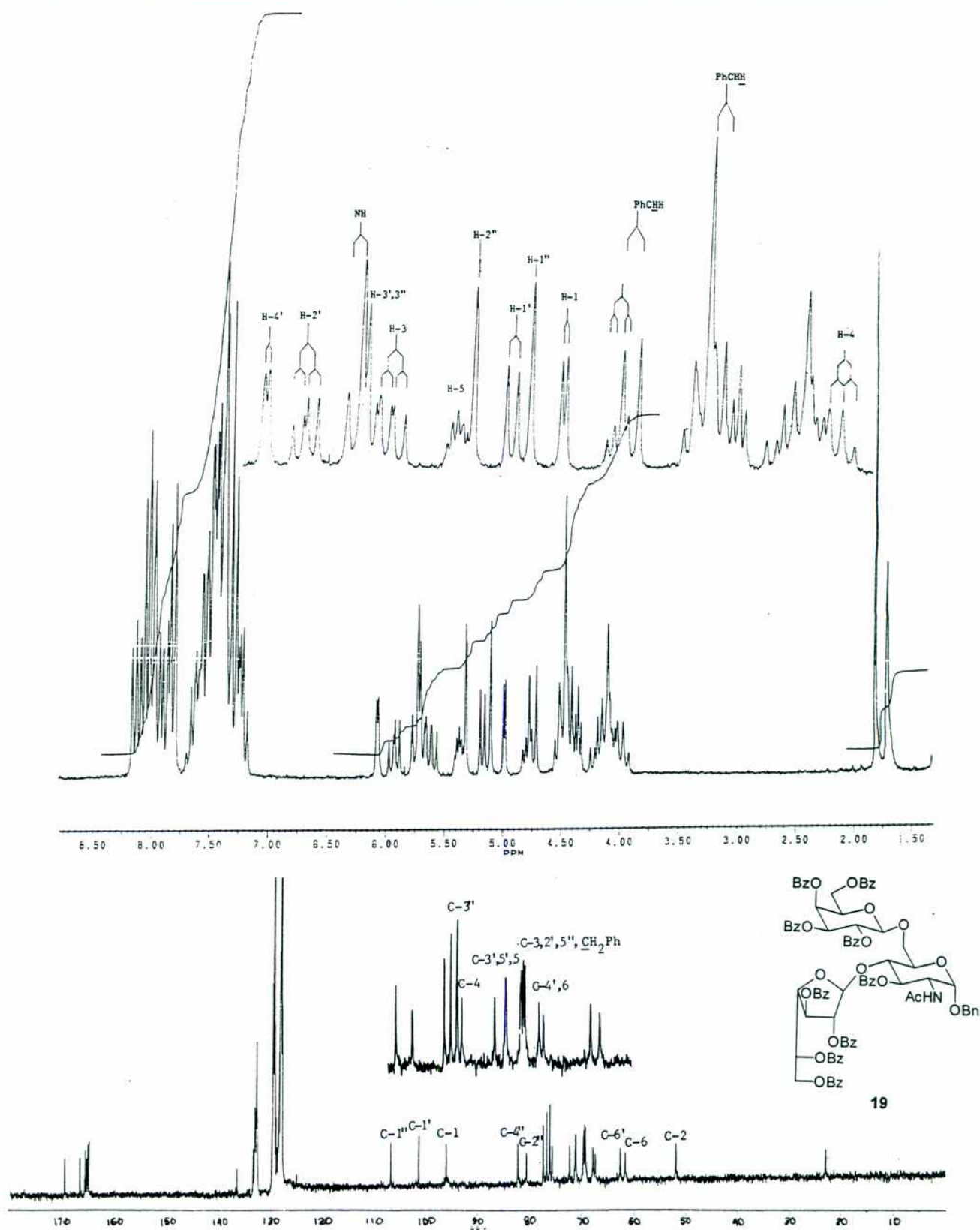


Figura 13. Espectros de RMN ^1H y ^{13}C del compuesto 19.

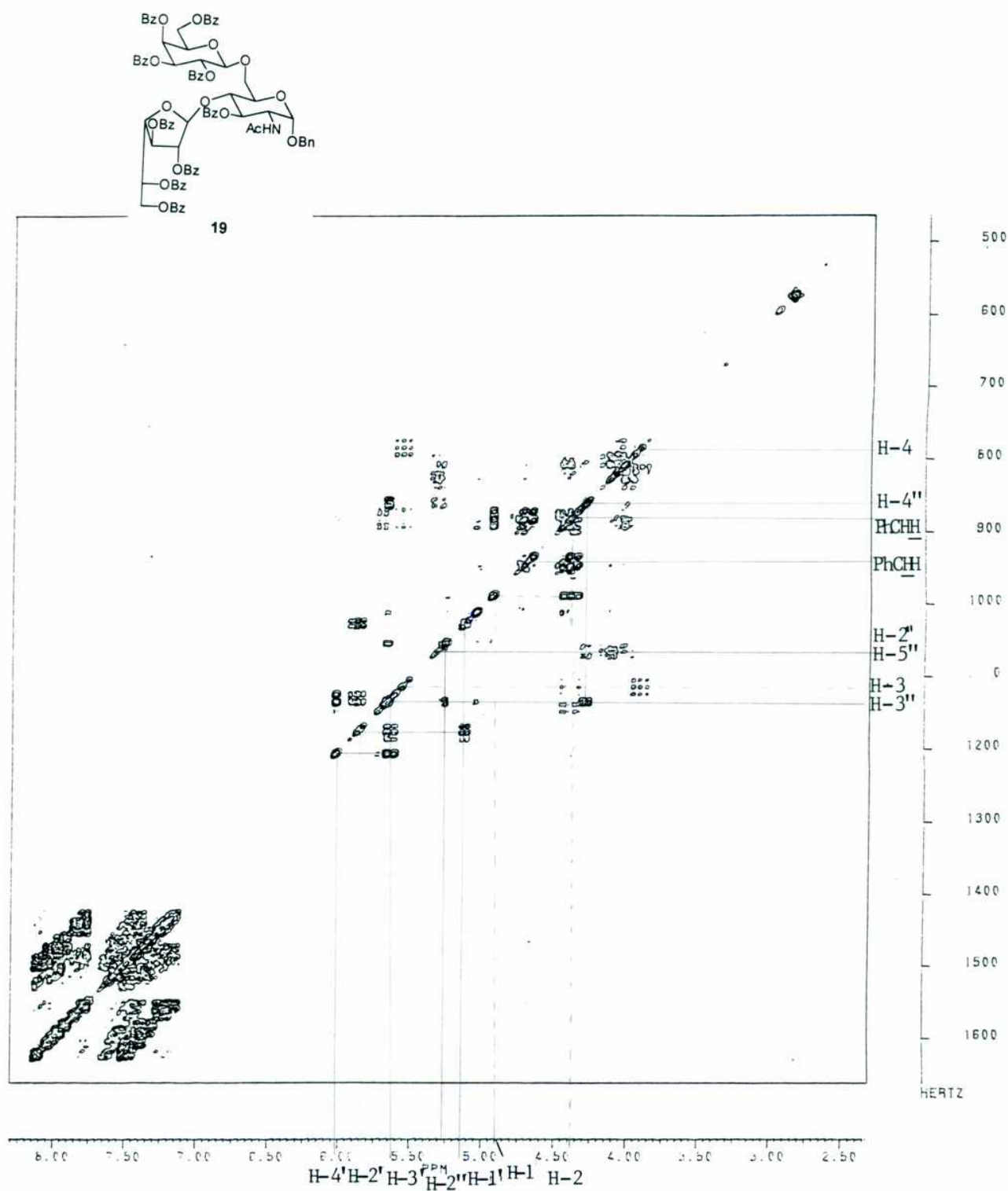


Figura 14. Espectro de correlación homonuclear (COSY) del compuesto 19

En la glicosidación de **16** con penta-O-benzoil- α,β -galactofuranosa utilizando SnCl_4 como promotor, se obtuvo además de **19**, un producto secundario que se aisló por columna cromatográfica con 20 % de rendimiento (Esquema 18). Este compuesto presentaba en su espectro de RMN ^{13}C (Figura 15), una señal a 97,0 ppm que correspondía al C-1 de la unidad de GlcNAc y dos señales a 106,4 y 105,3 ppm que sugerían la presencia de dos unidades de Galf. Además, se observaron cuatro señales en la zona donde resuenan los C-2 y C-4 de β -galactofuranósidos (\sim 80ppm), confirmando que nos encontrábamos ante un producto de transglicosidación: 4,6-di-O-(2,3,5,6-tetra-O-benzoil- β -D-galactofuranosil)-2-acetamido-3-O-benzoil-2-desoxi- α -D-glucopiranosido (**20**). En su espectro de RMN ^1H se distinguieron las resonancias del H-1 como un doblete (δ 5,43) y del H-5" como un multiplete muy desprotegido (δ 6,11). Los dos singuletes a 5,46 y 5,27 ppm correspondían a las resonancias de los H-1'y H-1"de las unidades de Galf y el doblete centrado a 5,43 ppm ($J_{1,2}$ 1,2 Hz) a uno de los H-2 de las unidades furanósicas.

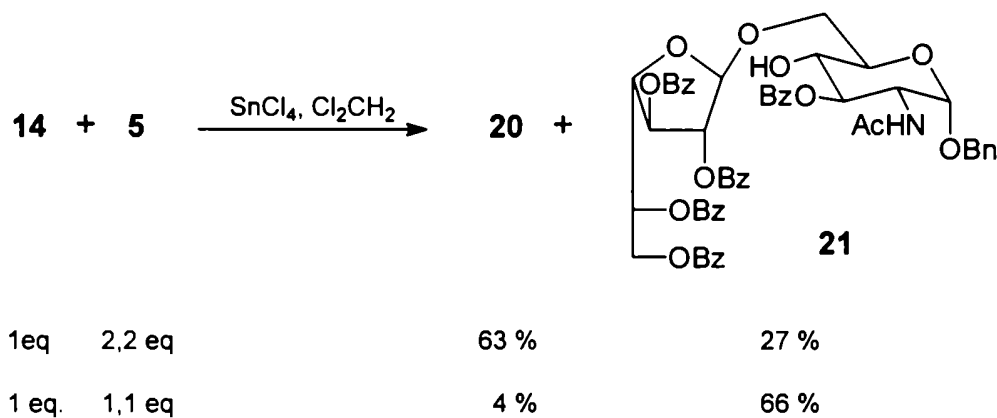
*Glicosidación. Obtención de 4,6-di-O-(2,3,5,6-tetra-O-benzoil- β -D-galactofuranosil)-2-acetamido-3-O-benzoil-2-desoxi- α -D-glucopiranosido (**20**) como producto principal.*

Asímismo, se confirmó la estructura de **20** por una síntesis directa e independiente (Esquema 19). Por glicosidación de **14** con **5** utilizando SnCl_4 como promotor, se obtuvo **20** como producto principal que se purificó por cromatografía en columna (63 % de rendimiento). Este producto presentó las mismas características físicas y espectroscópicas que el producto previamente obtenido como producto secundario por transglicosidación. También se aisló un compuesto (**21**) de menor movilidad cromatográfica con 27 % de rendimiento. En su espectro de RMN ^{13}C , además de las señales de GlcNAc, se podían distinguir las señales a 106,5; 81,2 y 82,5 ppm que correspondían a los C-1, C-2 y C-4 de una unidad β -D-Galf (Figura

15). Teniendo en cuenta que además el C-6 se encontraba desprotegido (5 ppm) con respecto a la misma señal en **14**, se confirmó que el OH-6 de **14** se había glicosilado y que nos encontrábamos ante el producto de monoglicosilación: bencil 2,3,5,6-tetra-O-benzoil- β -D-galactofuranosil(1 \rightarrow 6)-2-acetamido-3-O-benzoil-2-desoxi- α -D-glucopiranosido (**21**). El pequeño valor encontrado para la constante de acoplamiento del H-1' ($J_{1,2} < 1$ Hz) confirmó la configuración β para la unidad furanósica.

La estructura del disacárido **21** también se confirmó por síntesis. Así, el tratamiento de **14** con 1,1 equivalentes de **5** permitió obtener **21** con 66 % de rendimiento con las mismas propiedades que el descrito anteriormente (Esquema 19).

Esquema 19



*Obtención de bencil (2,3,5,6-tetra-O-benzoil- β -D-galactofuranosil)-(1 \rightarrow 4)-[2,3,4,6-tetra-O-benzoil- β -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 6)]-2-acetamido-3-O-benzoil-2-desoxi- α -D-glucopiranosido **19** en un solo paso ("one pot")*

Como resultado de estos trabajos se concluyó que tanto la conversión de **14** al disacárido **16** y de **16** al trisacárido **19** eran promovidas por SnCl_4 en las mismas

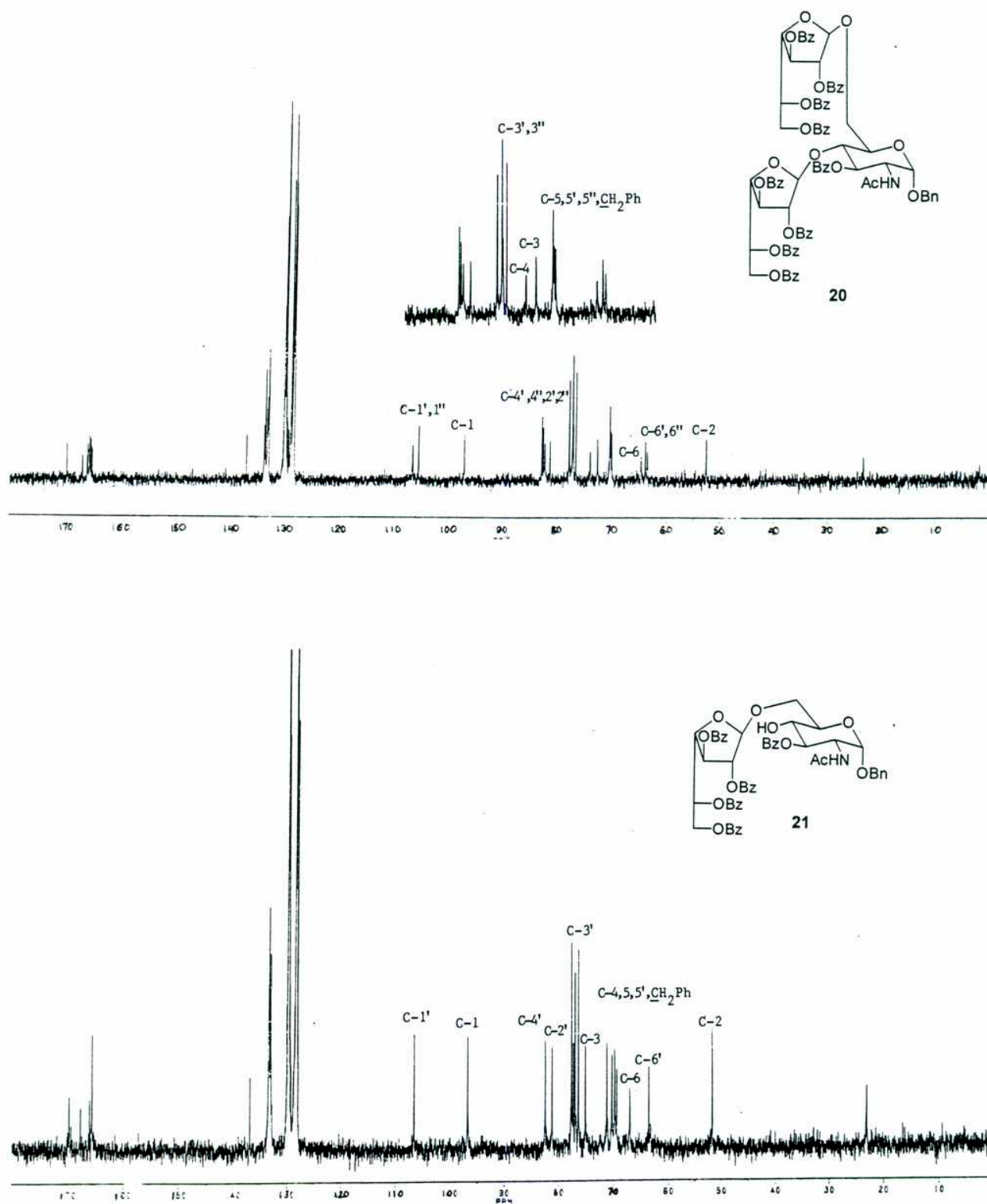


Figura 15. Espectros de RMN ^{13}C de los compuestos 20 y 21.

condiciones de reacción y que además el OH-4 de **16** no podía ser glicosidado por **15**. Estos dos hechos sugirieron que la síntesis de **19** podía ser simplificada mediante un procedimiento en un solo paso ("one-pot"). Para ello era necesario controlar meticulosamente el desarrollo de la reacción por ccd, ya que si quedara algo de **14** sin reaccionar, una vez agregado **5**, se incrementaría la cantidad de **20**.

De esta manera, **14** se trató con 1,1 equivalentes de penta-O-benzoil- β -D-galactopiranososa (**15**) en presencia de SnCl₄. Una vez que **14** se había consumido según el seguimiento por ccd (~18h), se agregó una solución de penta-O-benzoil- α,β -D-galactofuranosa (**5**) activada con SnCl₄ en Cl₂CH₂ (Esquema 18). Luego de 27 h de reacción se aisló el trisacárido **19** con un rendimiento (34 %) comparable con el de la síntesis de pasos sucesivos.

Este procedimiento, a pesar de que no significó un aumento en el rendimiento total de **19**, resulta directo y sencillo, ya que conduce a **19** utilizando galactosas perbenzoiladas como precursores, evitando la purificación de los productos intermedios. Otra ventaja es que las galactosas perbenzoiladas, **5** y **15**, se obtienen de manera sencilla por cristalización fraccionada y en la misma reacción de benzoilación.

*Obtención de bencil β -D-galactofuranosil-(1 \rightarrow 4)-[β -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 6)]-2-acetamido-2-desoxi- α -D-glucopiranosido (**22**)*

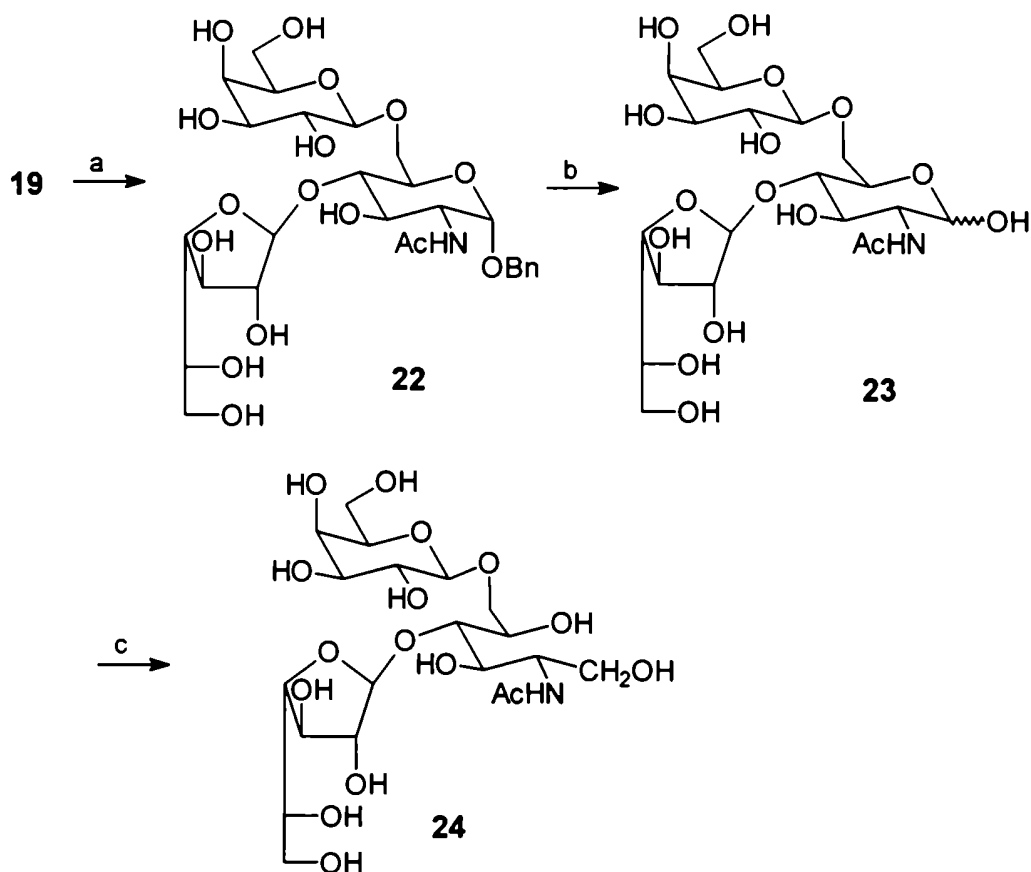
A efectos de obtener el trisacárido libre β -D-Galp(1 \rightarrow 4)[β -D-Galp(1 \rightarrow 6)]GlcNAc (**23**), objetivo de la síntesis, se procedió a eliminar los grupos protectores teniendo en cuenta, que para la desprotección del disacárido, se había encontrado que convenía primero desbenzoilar y luego desbencilar.

Se procedió, pues, a tratar **19** con NaOMe en MeOH, reacción que condujo al bencil β -D-galactofuranosil-(1 \rightarrow 4)-[β -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 6)]-2-acetamido-2-

desoxi- α -D-glucopiranosido (**22**) como un compuesto cristalino con 99 % de rendimiento (Esquema 20).

En el espectro de RMN ^{13}C de **22** se observó una única señal en la zona de resonancia de C-carbónicos que correspondía al *N*-acetilo. Los carbonos anoméricos resonaban a 108,5; 104,1; y 96,7 correspondientes a las unidades de β -Galp, β -Galp y α -GlcNAc, respectivamente (Figura 16). En el espectro de RMN ^1H se observaron las resonancias de los tres hidrógenos anoméricos cuyos valores de *J* confirmaron la configuración α para el H-1 ($J_{1,2}$ 2,1 Hz), β -piranosico para H-1' ($J_{1,2'}$ 7,2 Hz) y β -furanosico para el H-1'' ($J_{1,2''}$ < 1 Hz).

Esquema 20



Reactivos: a) NaOMe en MeOH 0,5 M (99 %); b) HCO_2NH_4 , 10 % Pd/C, MeOH, 65 °C (99 %);
c) NaBH_4 (97 %)

Tabla 2. Desplazamientos químicos de RMN ^{13}C de los compuestos 12-24.

| Compuesto | δ (ppm) | | | | | | | |
|-------------------------------------|----------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|--------------------|-------|
| | C-1 | C-2 | C-3 | C-4 | C-5 | C-6 | CH ₂ Ph | CHPh |
| 12 ^c GlcNAc | 97,3 | 54,6 | 68,5* | 82,0 | 63,1 | 67,7 | 69,3* | 101,5 |
| 13 ^b GlcNAc | 97,5 | 52,7 | 70,8* | 79,3 | 63,4 | 68,9 | 70,2* | 101,6 |
| 14 ^b GlcNAc | 96,9 | 51,9 | 75,0 | 69,3* | 72,1 | 62,0 | 70,0* | |
| 15 ^b Galp | 93,1 | 68,8 | 71,6 | 68,0 | 72,5 | 61,8 | | |
| 16 ^b GlcNAc | 96,4 | 51,3 | 75,4 | 69,4* | 69,8* | 68,1 | 70,9* | |
| Galp | 102,2 | 69,4* | 71,5* | 69,4* | 71,5* | 62,0 | | |
| 17 ^a GlcNAc | 96,8 | 54,5 | 71,7* | 70,7 | 72,0* | 69,2# | 70,7 | |
| Galp | 104,3 | 71,7* | 73,6 | 69,6# | 76,0 | 61,9 | | |
| 18 ^a GlcNAc ^e | 91,8(α),95,9(β) | 54,9 | 71,3* | 71,5* | 72,9* | 69,5 | | |
| Galp | 104,2 | 71,6* | 73,6 | 70,8 | 76,0 | 61,9 | | |
| 19 ^b GlcNAc | 96,4 | 52,0 | 69,9* | 75,9 | 71,4# | 67,4† | 69,9* | |
| Galp | 101,7 | 69,5* | 71,5# | 68,1† | 72,6# | 61,9 | | |
| Galf | 107,0 | 80,9 | 76,4 | 82,5 | 69,7* | 62,9 | | |
| 20 ^a GlcNAc | 97,0 | 52,6 | 72,6 | 73,9 | 70,4* | 64,6 | 70,0* | |
| Galf | 106,4 | 82,2 | 77,0 | 82,8 | 70,4* | 63,5 | | |
| Galf | 105,3 | 81,3 | 77,1 | 82,5 | 70,2* | 63,9 | | |
| 21 ^a GlcNAc | 96,8 | 51,8 | 75,1 | 69,3* | 71,2* | 67,0 | 69,8* | |
| Galf | 106,5 | 81,2 | 77,3 | 82,5 | 70,2* | 63,5 | | |
| 22 ^b GlcNAc | 96,7 | 54,4 | 69,6* | 78,0 | 70,3* | 68,3* | 70,8* | |
| Galp | 104,1 | 71,5* | 73,6 | 70,6* | 76,0 | 61,9 | | |
| Galf | 108,5 | 81,9 | 76,9 | 83,5 | 71,4* | 63,7 | | |
| 23 ^a GlcNAc ^e | 91,6(α),95,9(β) | 54,8 | 69,5* | 78,1 | 70,1* | 68,6* | | |
| Galp | 104,0 | 71,4* | 73,5 | 70,1* | 76,0 | 61,8 | | |
| Galf | 108,5 | 81,7 | 76,8 | 83,5 | 71,4* | 63,6 | | |
| 24 ^a GlcNAc-ol | 61,6 | 53,5 | 69,1 | 78,6 | 70,6 | 71,2 | | |
| Galp | 104,1 | 71,7 | 73,5 | 69,5 | 76,0 | 61,9 | | |
| Galf | 108,9 | 82,1 | 77,1 | 83,5 | 71,4 | 63,8 | | |

^a D₂O, ^b CDCl₃, ^c d₆-DMSO. *, #, † Las señales pueden estar intercambiadas.

Obtención de β -D-galactofuranosil-(1 \rightarrow 4)-[β -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 6)]-2-acetamido-2-desoxi- α,β -D-glucopiranososa (**23**)

Por hidrogenólisis del grupo bencilo de **22** con formiato de amonio - 10 % Pd/C en metanol caliente, se obtuvo el trisacárido libre β -D-galactofuranosil-(1 \rightarrow 4)-[β -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 6)]-2-acetamido-2-desoxi- α,β -D-glucopiranososa (**23**) como sólido amorfo con 99 % de rendimiento.

El espectro de RMN ^{13}C de **23** presentaba las resonancias de C-1 de Galf (108,5 ppm); Galp (104,0 ppm) y GlcNAc (91,6 y 95,9 ppm), estos últimos valores correspondientes a los anómeros α y β respectivamente (Figura 17). El trisacárido **23** representa una nueva estructura de oligosacáridos unidos a la proteína por residuos de treonina o serina, encontrados únicamente en glicoproteínas de *T. cruzi*.

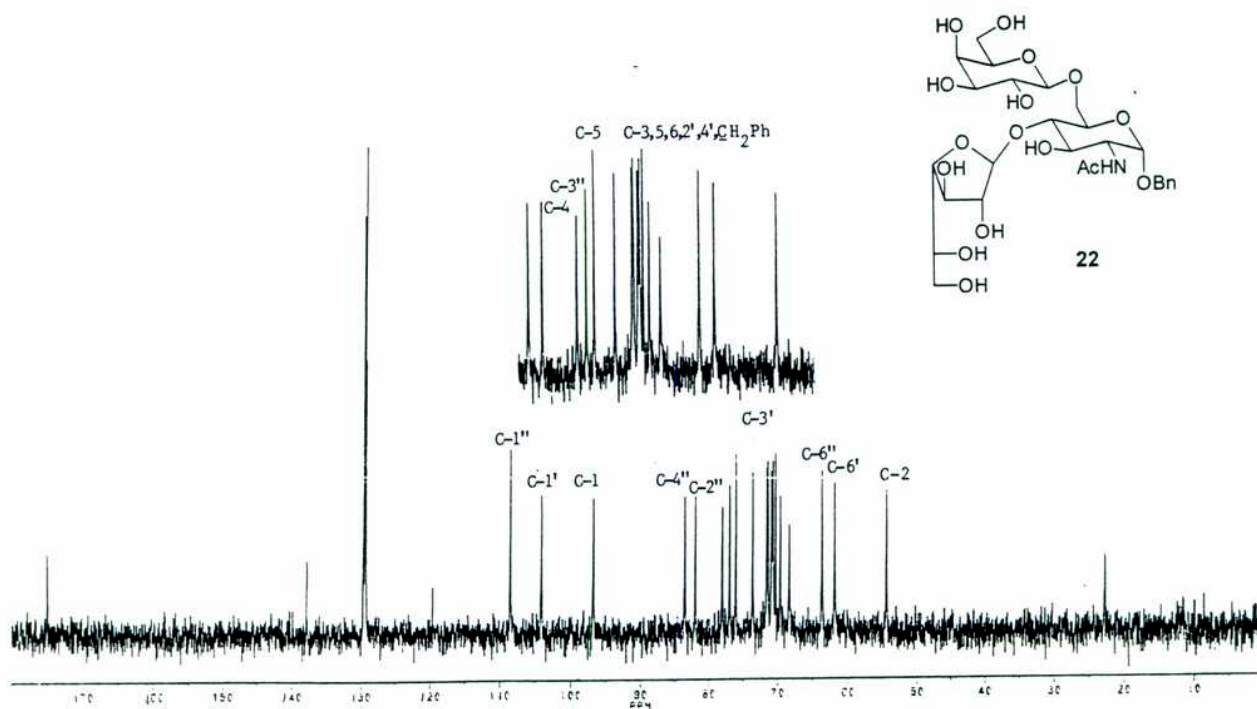


Figura 16. Espectro de RMN ^{13}C del compuesto **22** (D_2O).

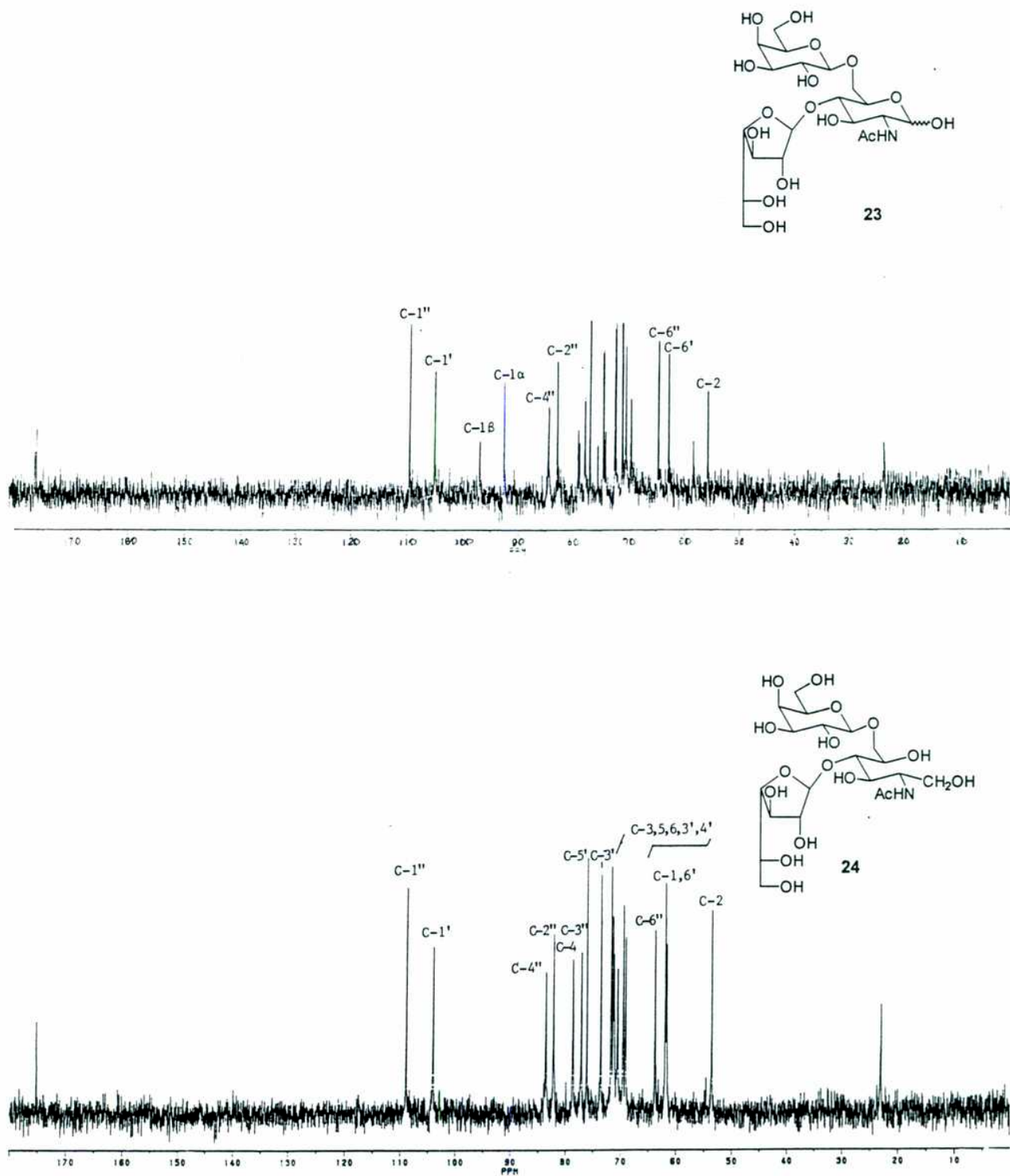


Figura 17. Espectro de RMN ^{13}C de los compuestos 23 y 24 (D_2O).

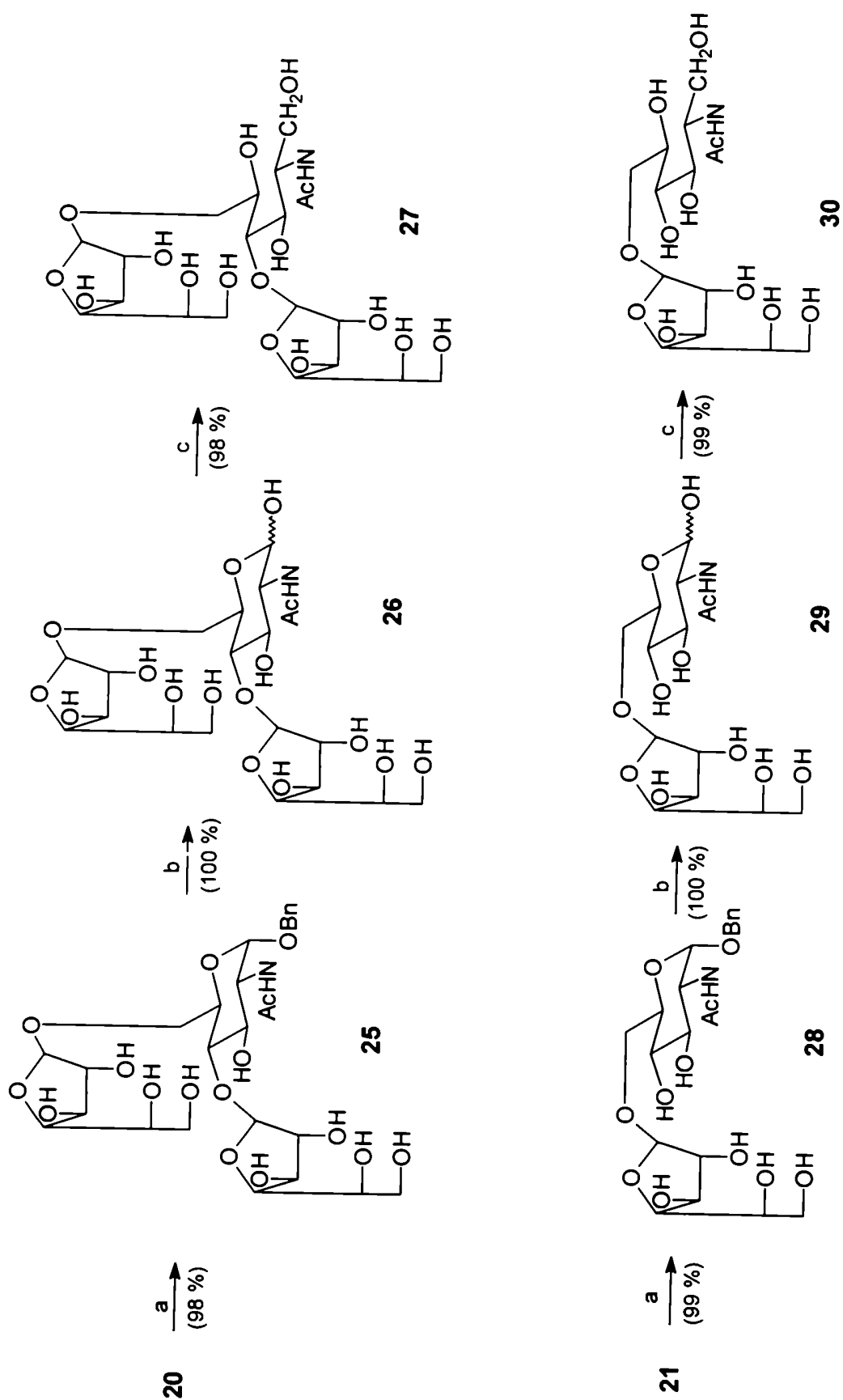
Obtención de β -D-Galf-(1 \rightarrow 4)-[β -D-Galp(1 \rightarrow 6)]GlcNAc-ol (24)

La reducción de **23** con borohidruro de sodio condujo al alditol β -D-Galf-(1 \rightarrow 4)-[β -D-Galp(1 \rightarrow 6)]GlcNAc-ol (**24**) con 97 % rendimiento. Los espectros de ^1H y ^{13}C (Figura 17, Tabla 2) de **24** obtenido sintéticamente, resultaron idénticos a los informados para el alditol disustituido liberado de mucinas de *T. cruzi* de la cepa G por β -eliminación reductiva (Previato *et al.*, 1994 ; Acosta-Serrano, 1995).

Obtención de bencil 4,6-di-O- β -D-galactofuranosil-2-acetamido-2-desoxi- α -D-glucopiranosido (25), 4,6-di-O- β -D-galactofuranosil-2-acetamido-2-desoxi- α,β -D-glucopiranososa (26) y 4,6-di-O- β -D-galactofuranosil-2-acetamido-2-desoxi-D-glucitol (27).

Dado que el tipo de unión a proteína por GlcNAc y la presencia de Galf resultaban novedosos y teniendo en cuenta que se obtuvieron por síntesis los productos secundarios **20** y **21**, resultaba interesante su conversión a los alditoles correspondientes pues resultaban útiles en estudios sobre la influencia de la Galf en la cromatografía líquida de intercambio aniónico (Dionex).

Se procedió a la desbenzoilación de **20** con NaOMe en MeOH, obteniéndose el bencil 4,6-di-O- β -D-galactofuranosil-2-acetamido-2-desoxi- α -D-glucopiranosido (**25**) como producto cristalino con 98 % rendimiento. En su espectro de RMN ^{13}C se diferenciaban claramente las señales correspondientes a las unidades Galf y GlcNAc. El C-1 resonaba a 96,7 ppm y las señales a 108,8 y 108,5 ppm se atribuyeron a los C-1' y C-1'' de las galactosas con configuración β -furanósica. Muchas señales de las unidades furanósicas aparecían superpuestas salvo los C-3' y 3'' y los C-5' y 5'' (Figura 18, Tabla 3). El espectro de RMN ^1H corroboró las configuraciones de los H anoméricos, ya que se observaron dos singuletes anchos ($J < 1$ Hz) correspondientes a los H-1' y 1'', y un doblete ($J_{1,2}$ 2,9 Hz) para el H-1 con configuración α .



Esquema 21

Reactivos: a) NaOMe en MeOH 0.5 M ; b) HCO₂NH₄, 10 % Pd/C, MeOH, 65 °C (99 %); c) NaBH₄ (97 %)

Por desbencilación de **25** con formiato de amonio-10% Pd/C en metanol caliente se obtuvo 4,6-di-O- β -D-galactofuranosil-2-acetamido-2-desoxi- α,β -D-glucopiranososa (**26**) como una mezcla de anómeros α,β según indicaban las señales a 95,9 y 91,6 ppm en el espectro de RMN ^{13}C (Figura 18). Los C-1 de las unidades furanósicas resonaban a 108,8 y 108,6 ppm. En el espectro de RMN ^1H , los valores de las constantes de acoplamiento de los H-1' y 1" ($J < 1$ Hz) confirmaron la configuración β -furanósica y, respecto de la parte reductora del trisacárido, solo se distinguía la señal para el anómero α que integraba para 0,7 H. La señal del anómero β se encontraba solapada con la de DHO.

La reducción de **26** con borohidruro de sodio condujo al 4,6-di-O- β -D-galactofuranosil-2-acetamido-2-desoxi-D-glucitol (**27**), cromatográficamente puro con 98 % de rendimiento. En el espectro de RMN ^{13}C , se observaban sólo dos señales anoméricas (δ 109,1 y 108,3) correspondientes a los C-1'y 1" en la configuración β -furanósica. El C-1 primario resonaba a 61,8 ppm. En la región anomérica del espectro de RMN ^1H solo aparecían dos singuletes ($J < 1$ Hz) que indicaban la resonancia de los H-1' y 1" en una configuración β -furanósica, y además, que la reducción había sido total.

*Obtención de bencil β -D-galactofuranosil-(1 \rightarrow 6)-2-acetamido-2-desoxi- α -D-glucopiranosido (**28**), β -D-galactofuranosil-(1 \rightarrow 6)-2-acetamido-2-desoxi-D-glucopiransa (**29**) y β -D-galactofuranosil-(1 \rightarrow 6)-2-acetamido-2-desoxi-D-glucitol (**30**)*

Se procedió a desbenzoilar el disacárido **21**, por tratamiento con NaOMe en MeOH, obteniéndose el bencil β -D-galactofuranosil-(1 \rightarrow 6)-2-acetamido-2-desoxi- α -D-glucopiranosido (**28**) cristalino con 99 % rendimiento. En el espectro de RMN ^{13}C , las resonancias a 96,8 y 108,8 ppm correspondían a los C-1 y C-1' respectivamente (Figura 19, Tabla 3). En la zona de los carbonilos se observó una sola señal que

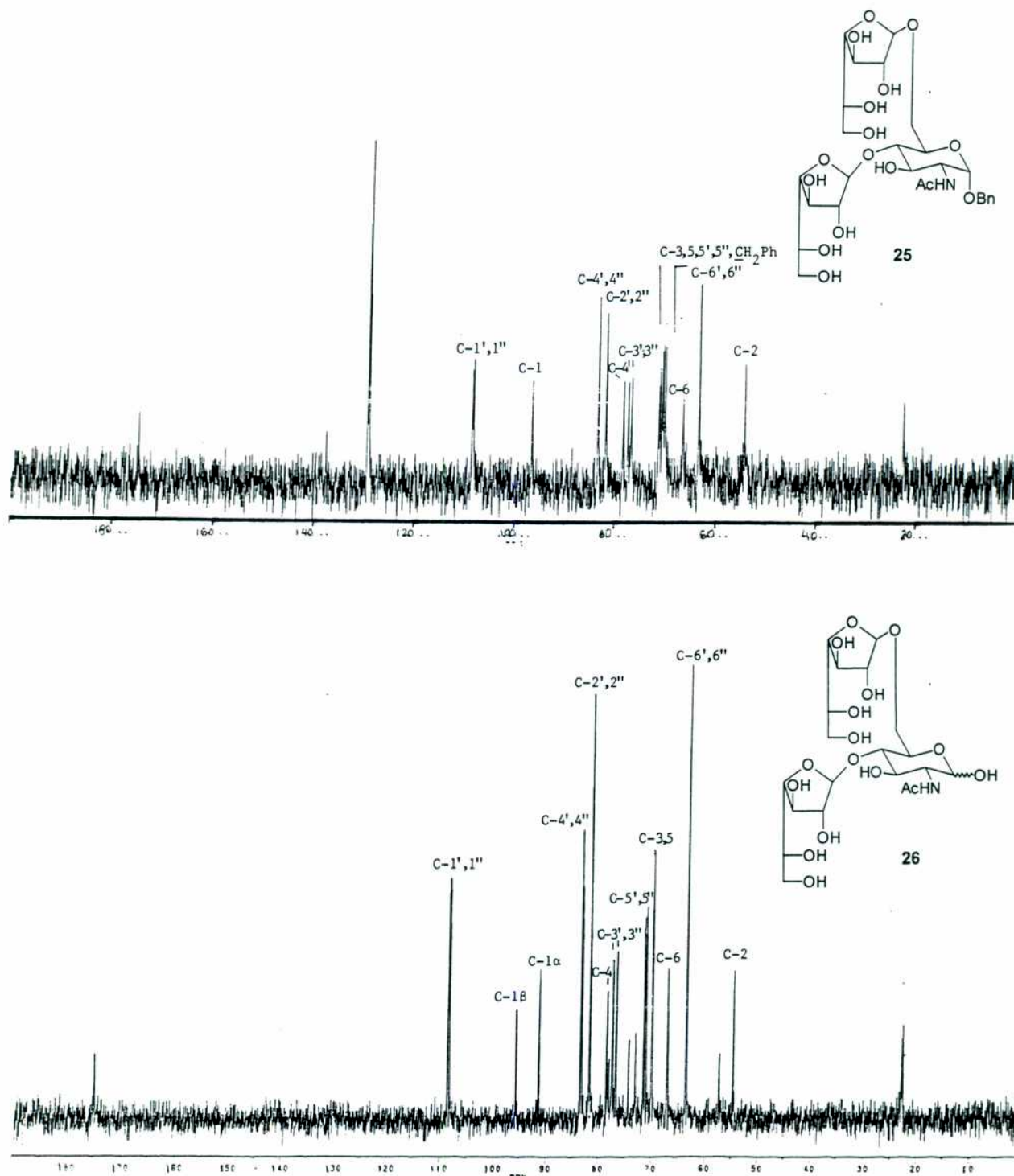


Figura 18. Espectros de RMN ^{13}C de los compuestos 25 y 26 (D_2O).

correspondía al *N*-Ac, lo que indicaba que la desbenzoilación había sido total. En la zona anomérica del espectro de RMN ^1H se observaron un singulete a δ 4,98 ($J < 1$ Hz) confirmando una configuración β para la unidad de Galf y un doblete ($J_{1,2}$ 3,2 Hz) que indicaba una configuración α para la GlcNAc.

Tabla 3. Desplazamientos químicos de RMN ^{13}C de los compuestos **25-30** (D_2O).

| Compuesto | δ (ppm) | | | | | | |
|-------------------------------|----------------------------------|------|-------|-------|-------|-------|------------------------|
| | C-1 | C-2 | C-3 | C-4 | C-5 | C-6 | CH_2Ph |
| 25 GlcNAc | 96,7 | 54,4 | 70,9* | 78,4 | 70,7* | 66,7 | 70,3* |
| Galf | 108,8 | 81,9 | 77,5 | 83,4 | 71,3 | 63,7 | |
| Galf | 108,5 | 81,9 | 76,9 | 83,4 | 71,5 | 63,7 | |
| 26 GlcNAc ^a | 91,6(α);95,9(β) | 54,8 | 70,1 | 78,5 | 70,1 | 67,2 | |
| Galf | 108,8 | 81,7 | 77,6 | 83,6 | 71,7 | 63,7 | |
| Galf | 108,6 | 81,7 | 76,7 | 83,5 | 71,3 | 63,7 | |
| 27 GlcNAc-ol | 61,8 | 53,6 | 69,1* | 78,9 | 69,1* | 71,3* | |
| Galf | 109,1 | 82,0 | 77,7 | 83,8 | 71,3* | 63,7 | |
| Galf | 108,3 | 82,0 | 77,2 | 83,4 | 71,7 | 63,7 | |
| 28 GlcNAc | 96,8 | 54,5 | 71,7* | 70,9# | 72,0* | 67,6 | 70,7# |
| Galf | 108,8 | 81,9 | 77,6 | 83,6 | 71,7* | 63,7 | |
| 29 GlcNAc ^a | 91,8(α);95,9(β) | 54,9 | 71,6* | 71,2 | 71,5* | 68,0 | |
| Galf | 108,9 | 81,9 | 77,7 | 83,7 | 71,7* | 63,7 | |
| 30 GlcNAc-ol | 61,8 | 54,6 | 70,8* | 70,0* | 71,7* | 69,3* | |
| Galf | 108,7 | 81,9 | 77,6 | 83,8 | 71,7 | 63,7 | |

^a anómero α , *, # Las señales pueden ser intercambiadas.

La hidrogenólisis de **28** con formiato de amonio condujo al disacárido libre β -D-galactofuranosil-(1 \rightarrow 6)-2-acetamido-2-desoxi-D-glucopiransa (**29**) que cristalizó de MeOH. Las señales a 91,8 y 95,9 ppm en el espectro de RMN ^{13}C indicaban una mezcla de anómeros α y β en la unidad de GlcNAc y la señal a 108,9 ppm correspondía al C-1' característico de una configuración β -galactofuranósica (Figura

20, Tabla 3). En el espectro de RMN ^1H también se podían distinguir las resonancias del H-1' (δ 4,96; $J_{1',2'}$ 1Hz) y del H-1 en la configuración α piranósica (δ 5,11; $J_{1,2}$ 3,3 Hz) que integraba para 0,7 H. La señal correspondiente anómero β se encontraba solapada por la señal de DHO.

Por reducción de **29** con borohidruro de sodio, se obtuvo β -D-galactofuranosil-(1-6)-2-acetamido-2-desoxi-D-glucitol (**30**) con 99 % de rendimiento. En la zona anomérica del espectro de RMN ^1H se observó una sola señal (δ 5,02) correspondiente al H-1' ($J_{1',2'} < 1$ Hz) en la configuración β furanósica. En el espectro de RMN de ^{13}C , se observaron, entre otras señales, el C-anomérico a 108,9 ppm, y el C-1 primario de la unidad de GlcNAc que resonaba a 61,8 ppm (Figura 20, Tabla 3).

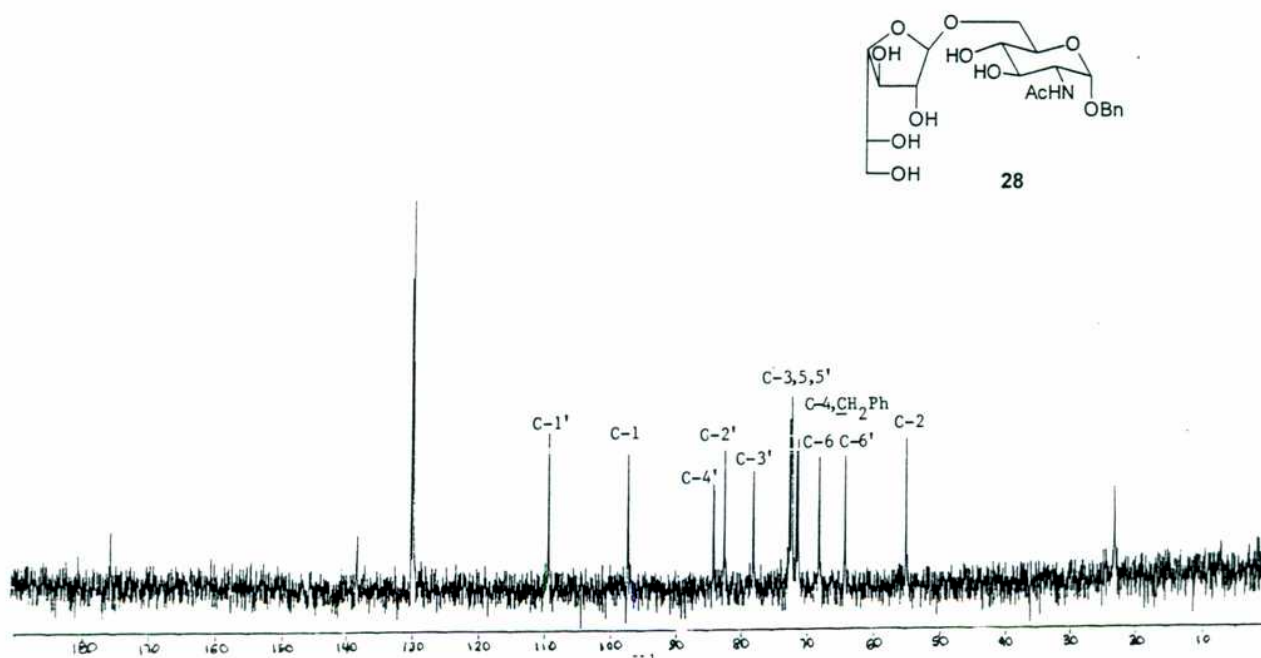


Figura 19. Espectro de RMN ^{13}C del compuesto **28** (D_2O).

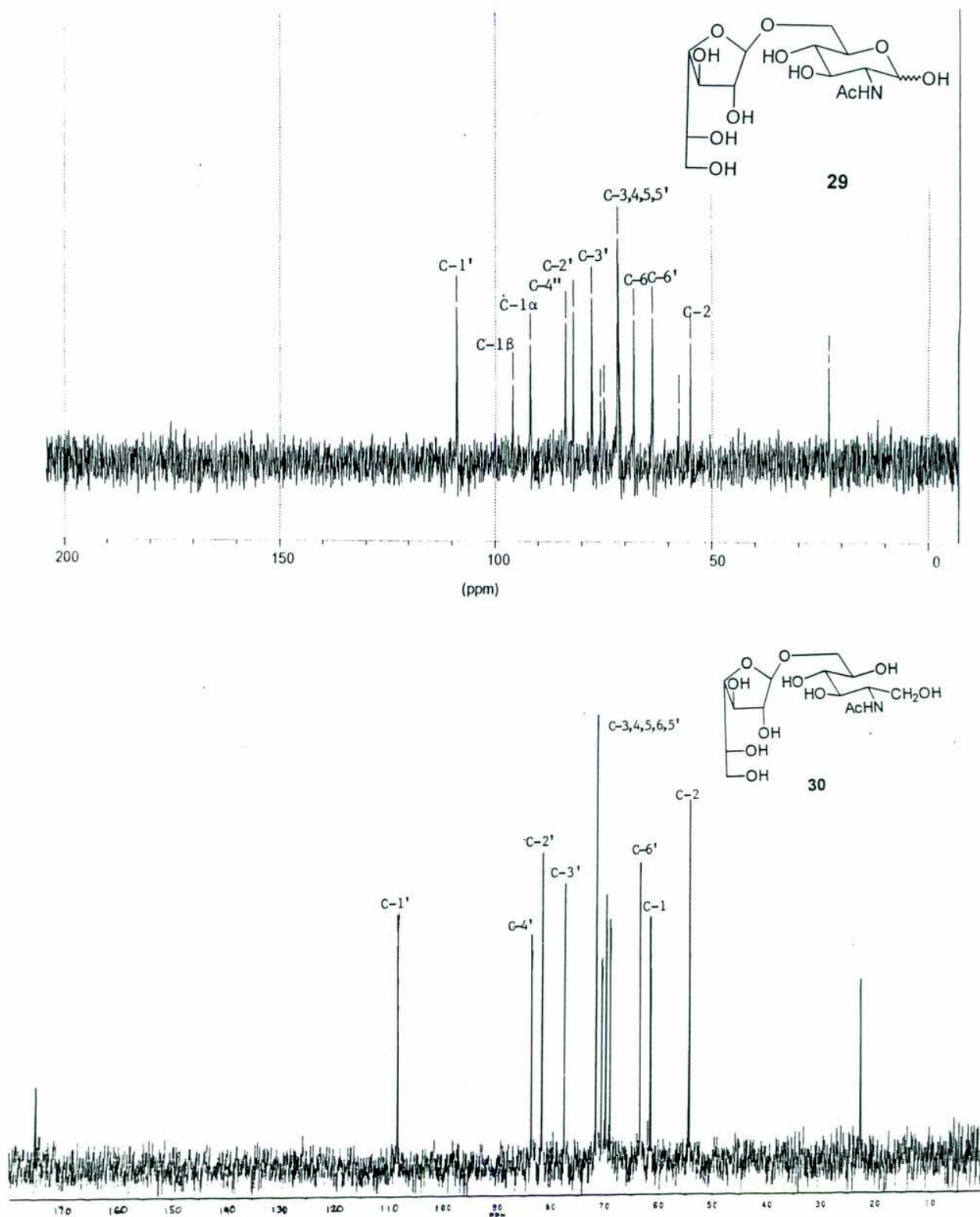


Figura 20. Espectros de RMN ^{13}C de los compuestos 29 y 30 (D_2O).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

CAPÍTULO 5

Pivaloilación selectiva de aldono-1,4-lactonas

Hasta ahora, se ha descrito la síntesis de di y trisacáridos que contienen galactofuranosas terminales, en un extremo no reductor, como es el caso de los glicoconjugados de *T. cruzi* mencionados anteriormente. Sin embargo, se han encontrado oligosacáridos en distintos tripanosomátidos y bacterias, que también contienen galactofuranosa, pero no terminal, sino interna unida a distintas unidades de azúcar.

En particular, se han aislado oligosacáridos que contienen la unidad α -D-Galp-(1→3)-D-Galf en el lipofosfoglicano (Turco & Descoteaux, 1992) y en los glicoinositolfosfolípidos (McConville *et al.*, 1990b, McConville & Ferguson, 1993) de *Leishmania* y la unidad β -D-Galp-(1→3)-D-Galf en el polisacárido de la bacteria *Streptococcus pneumoniae* serotipo 35A (Beynon *et al.*, 1997).

Para la introducción de una Galf interna, una metodología interesante consiste en construir el bloque requerido utilizando D-galactono-1,4-lactona, pues luego, esta puede reducirse al azúcar furanósico de interés. El primer objetivo para la síntesis de compuestos que contengan galactofuranosa sustituida en el OH-3 involucra la obtención un derivado de galactono-1,4-lactona con el OH-3 libre. Teniendo en cuenta que los grupos acilos son muy estables a las condiciones de glicosidación generales, y que sería conveniente obtener este derivado en un solo paso de reacción, se procedió a estudiar la acilación parcial de la D-galactono-1,4-lactona con cloruro de pivaloílo.

La D-galactono-1,4-lactona se encuentra tanto en solución (Horton & Walaszek, 1982) como en estado cristalino (Jeffrey *et al.*, 1967) en una conformación $E_3(D)$ (Figura 21), donde el OH-3 se encuentra ecuatorial y en una relación *trans* respecto del OH-2 y de la cadena lateral en el C-4. Era de esperar para la acilación parcial, en principio, una pobre selectividad debido a la

estereoquímica relativa del OH-3. Por ejemplo, por benzoilación parcial de esta lactona con 3,3 equivalentes de cloruro de benzoilo en piridina a 0 °C, se obtuvieron los productos 2,3,5,6-tetra-O-benzoil; 2,5,6- y 2,3,6-tri-O-benzoil y 2,6-di-O-benzoil-D-galactono-1,4-lactona con 47 %, 16,4 %, 8 % y 14 % respectivamente (Jeronicic, 1988), demostrando poca selectividad en favor del derivado con el OH-3 libre. Sin embargo, dado que el grupo pivaloilo es muy voluminoso y que rendimientos bajos pero en un solo paso de reacción constituyen una ventaja en la síntesis del producto de partida, se estudió la pivaloilación parcial de esta lactona.

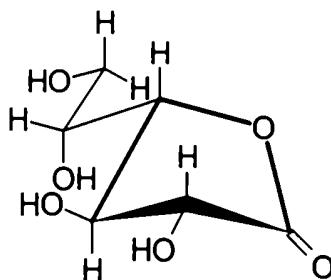


Figura 21.

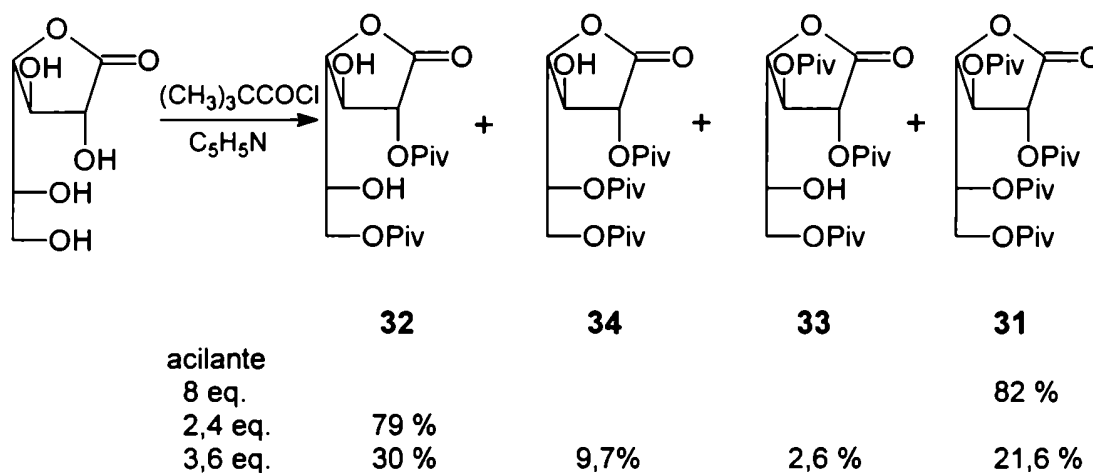
Se procedió inicialmente a preparar el 2,3,5,6-tetra-O-pivaloil y el 2,6-di-O-pivaloil derivados para ser utilizados, posteriormente, como testigos.

Así, por tratamiento de D-galactono-1,4-lactona con un exceso de cloruro de pivaloilo en piridina, se obtuvo 2,3,5,6-tetra-O-pivaloil-D-galactono-1,4-lactona (**31**) como un producto cristalino con 82 % de rendimiento (Esquema 22). Las señales en el espectro de RMN ^{13}C de **31** se asignaron por comparación con el espectro de su análogo peracetilado (Bock *et al.*, 1981). Así, la señal a 167,8 ppm correspondía a la resonancia del C-1 lactónico. Del resto de las señales del azúcar, el C-4 resonaba a campos más bajos (δ 77,3) y las señales más protegidas a 68,1 y 61,8 ppm se atribuyeron al C-5 por ser secundario fuera del ciclo y al C-6 por ser primario. Las resonancias de los C-2 y C-3 aparecían superpuestas a 71,9 ppm (Tabla 4). En

cuanto a las resonancias del grupo protector, los carbonilos de los pivaloilos resonaban entre 176,5 y 177,5, los carbonos cuaternarios a ~38,8 ppm y los carbonos de acetilo a ~27,0 ppm. Estas señales características de pivaloilos, se observarán siempre en estos derivados, y en adelante no se mencionarán.

En el espectro de RMN ^1H de **31** se observó primeramente cuatro señales (~1,2 ppm) que integraban para 36 H correspondientes a los metilos de los pivaloilos y además la ausencia de OH, indicaban que **31** se encontraba perpivaloilado. La señal más desprotegida aparecía como un doblete con $J_{2,3}$ 7,5 Hz y se asignó al H-2. También aparecían desprotegidos el H-3 y el H-5 como dd (δ 5,39) y ddd (δ 5,31), respectivamente. Por último, se observaron resueltos el H-4 y los H-6 y 6' (Tabla 5).

Esquema 22



Los hidroxilos más reactivos de la D-galactono-1,4-lactona son el OH-6 por ser primario y el OH-2 que se encuentra activado por efecto inductivo del grupo lactónico vecino. Lederkremer *et al.* (1990) habían obtenido la 2,6-di-O-benzoil-D-galactono-1,4-lactona tratando la lactona con 2,2 equivalentes de cloruro de benzoilo a -23 °C con 67 % de rendimiento. Siguiendo un procedimiento similar, el tratamiento de la D-

galactono-1,4-lactona con 2,2 equivalentes de cloruro de pivaloilo en las mismas condiciones de reacción, condujo a la 2,6-di-O-pivaloil-D-galactono-1,4-lactona (**32**) que cristalizó de hexano del crudo de reacción con 79 % de rendimiento.

El espectro de RMN ^{13}C de **32** presentaba la señal del C-1 lactónico a 168,8 ppm. Las señales a campos más altos (64,9 y 68.2 ppm) se atribuyeron al C-6 y C-5, respectivamente. Por otra parte, la señal más desprotegida (80,7 ppm) correspondía al C-4. Por irradiación del H-2 a 533 cps, se observó que la señal a 76,3 aumentaba en intensidad por efecto nuclear Overhauser, confirmando que se trataba del C-2 y por ende, la señal restante a 72,4 ppm se atribuyó al C-3. Si se comparan los espectros de RMN ^{13}C del derivado perpivaloilado (**31**) y 2,6-di-O-pivaloilado (**32**), al acilar los C-3 y C-5, se produce un desplazamiento hacia campos más altos de los C-2, C-4 y C-6 (4,4; 3,4; y 3,1 ppm, respectivamente)(Tabla 4).

El espectro de RMN ^1H de **32** (Figura 22) indicaba que se trataba de un compuesto dipivaloilado debido a la integración de las señales de metilos (18 H) y a la presencia de dos singuletes anchos que se intercambiaban con D_2O (δ 3,66 y 2,70). Además, las señales correspondientes al H-3 y H-5 se habían desplazado hacia campos altos (0,8 y 1,2 ppm, respectivamente) con respecto a las mismas señales en el derivado perpivaloilado (**31**), indicando que el compuesto **32** estaba 2,6-di-O-sustituido. Su espectro de RMN ^1H se asignó completamente (Tabla 5).

Una vez sintetizados los dos testigos **31** y **32**, se procedió a realizar la protección parcial de la D-galactono-1,4-lactona con el fin de obtener el derivado con el OH-3 libre. Para ello, se trató la lactona con 3,3 equivalentes de cloruro de pivaloilo en piridina a $-20\text{ }^\circ\text{C}$, dando lugar a una mezcla de productos con R_f 0,57; 0,45; 0,41 y 0,25 (hexano-EtOAc 2:1) según el monitoreo por ccd (Esquema 22). Las manchas de mayor y menor movilidad presentaban el mismo R_f que testigos de **31** y **32**. Dado que en la síntesis de **32**, este se purificaba directamente por cristalización de hexano, se agregó este solvente al crudo de reacción y cristalizó el compuesto

más polar que tenía las mismas características físicas y espectroscópicas que 2,6-di-O-pivaloil-D-galactono-1,4-lactona (**32**) con 30 % de rendimiento. Las aguas madres se concentraron y la mezcla resultante se separó por cromatografía en columna. Primero eluyó la 2,3,5,6-tetra-O-pivaloil-D-galactono-1,4-lactona (**31**, R_f 0,57) que se obtuvo con 21,6 % de rendimiento y presentó las mismas propiedades físicas que la muestra obtenida anteriormente. Luego se aislaron sucesivamente los compuestos tripivaloilados: **33** y **34** (R_f 0,45 y 0,41) cuyas estructuras se establecieron según sus datos espectroscópicos.

En el espectro de RMN ^1H del compuesto tripivaloilado menos polar (R_f 0,45), la señal del H-5 aparecía desplazada a campos más altos (1,3 ppm) respecto de la misma señal en el derivado perpivaloilado **31**, indicando que el OH-5 se encontraba libre (Tabla 5). Además, la resonancia del H-3 se corrió a campos más bajos (1,05 ppm) respecto de la misma señal en el derivado 2,6-di-O-pivaloilado (**32**), indicando que el OH-3 se encontraba pivaloilado. Este compuesto se identificó, entonces, como 2,3,6-tri-O-pivaloil-D-galactono-1,4-lactona (**33**) y se obtuvo cristalino con 2,6 % de rendimiento.

Por otra parte, al comparar el espectro de RMN ^{13}C de **33** con el 2,6-di-O-pivaloil derivado (**32**), se observó que las señales de los C-2 y C-4 sufrieron desplazamientos a campos altos (3,7 y 1,5 ppm, respectivamente), confirmando que el OH-3 se había protegido, en cambio, no hubo desplazamientos sustanciales en C-6 o C-5 (Tabla 4).

El siguiente tri-O-pivaloil-derivado (R_f 0,41) se identificó como 2,5,6-tri-O-pivaloil-D-galactono-1,4-lactona (**34**) y se obtuvo cristalino con 9,6 % de rendimiento. La estructura de **34** se determinó unívocamente por comparación de sus datos espectroscópicos con los per y 2,6-di-O derivados **31** y **32**. Así, en el espectro de RMN ^1H de **34**, el H-3 resonaba a campos más altos (1,2 ppm) con respecto a la misma resonancia del derivado perpivaloilado **31**, indicando que el OH-3 se

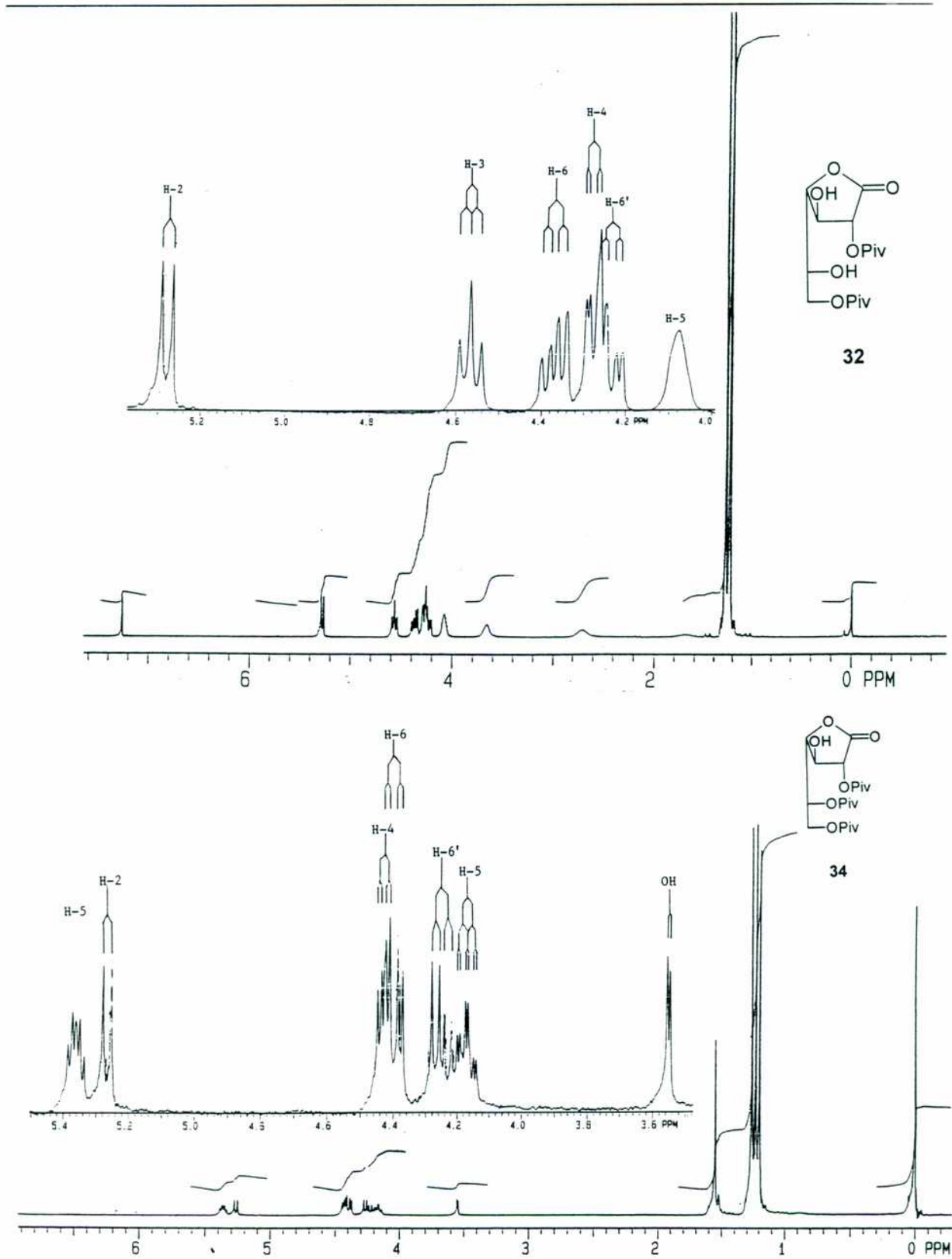


Figura 22. Espectros de RMN ¹H de los compuestos 32 y 34 (300 MHz).

encontraba libre (Figura 22). Por otra parte, la señal del H-5 de **34** aparecía desprotegida (1,28 ppm) respecto de la misma señal en el derivado 2,6-di-O-pivaloilado (**32**), confirmando que el OH-5 de **34** se encontraba acilado (Tabla 5).

El espectro de RMN ^{13}C se asignó totalmente (Tabla 4). La señal a 62,2 ppm se atribuyó al C-6 y se encontraba protegida (2,7 ppm) respecto del derivado 2,6 di-O-pivaloilado (**32**), confirmando que el OH-5 se había pivaloilado. Las señales a 68,8 y 79,3 ppm se asignaron al C-5 y C-4 respectivamente. Al irradiar a 533 cps (resonancias del H-2 y H-5), se observó que las señales de 68,8 y 75,9 aumentaron en intensidad y por ende, se trataba del C-5 y C-2, respectivamente, permitiendo asignar la señal restante (72,9 ppm) al C-3.

Los bajos rendimientos obtenidos en la síntesis de 2,5,6-tri-O-pivaloil-D-galactono-1,4-lactona (**34**), sumado a su tediosa purificación demostraron que este método de protección parcial no resultaba conveniente para obtener el derivado de galactono-1,4-lactona con el 3-OH libre y que era necesario desarrollar una ruta alternativa, como se verá más adelante.

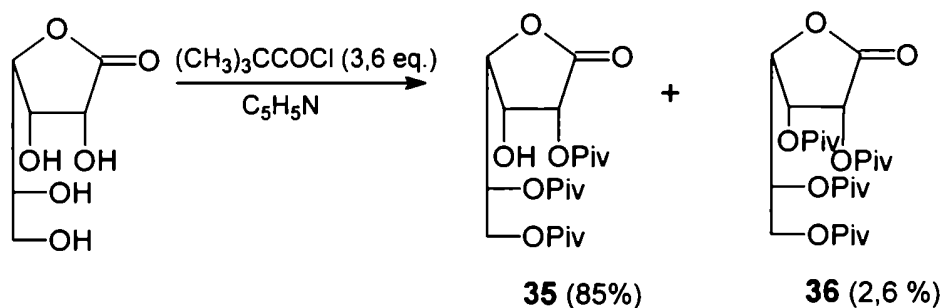
Sin embargo, resultaba interesante continuar el estudio de la pivaloilación parcial de lactonas, en particular para ver la influencia de la relación estereoquímica entre OH-2 y OH-3. Se estudió entonces la reacción para D-gulono-1,4-lactona y D-manono-1,4-lactona donde sus OH-3 y OH-2 se encuentran en relación *cis*.

La benzoilación parcial de la D-gulono-1,4-lactona (Jeronicic, 1988) con 3,3 equivalentes de cloruro de benzoilo en piridina conducía a 2,5,6-tri-O-benzoil-D-gulono-1,4-lactona con 79 % de rendimiento y además al derivado perbenzoilado como producto secundario (4,5 %).

En este caso, la pivaloilación de D-gulono-1,4-lactona con 3,6 equivalentes de cloruro de pivaloilo también resultó altamente regioselectiva, obteniéndose 2,5,6-tri-O-pivaloil-D-gulono-1,4-lactona (**35**) que cristalizó de la mezcla de reacción con 85 %

de rendimiento. También se aisló el derivado perpivaloilado **36** como producto minoritario (2,6 %) (Esquema 23).

Esquema 23



Los espectros de RMN ^1H de **35** y **36** confirmaron sus estructuras y se resolvieron en su totalidad (Tabla 5). Por ejemplo, el H-3 de **35** resonaba a campos más altos (1,1 ppm) que la misma señal del derivado perpivaloilado **36**, indicando que el OH-3 de **35** se encontraba libre (Figura 23).

En el espectro de RMN de ^{13}C de **36**, el C-4 resonaba a 76,5 ppm (76,2 ppm para el análogo peracetilado (Bock *et al.*, 1981) y el C-6 a 60,7 ppm. De las tres señales restantes (68,4, 69,2 y 69,0 ppm) se asignó la resonancia del C-2 a 68,4 ppm por comparación con el derivado análogo perbenzoilado (Jeronicic, 1988) (Tabla 4).

Asimismo, el C-4 y el C-6 de **35** resonaban a 78,5 y 61,9 ppm. Por comparación con el espectro del derivado perpivaloilado **36**, se pudo asignar las señales restantes de **35**. Por ejemplo, el C-2 y el C-4 debían aparecer a campos más bajos ya que el OH-3 estaba libre. Esto se comprobó para el C-4 que experimentó un desplazamiento a campos más bajos (2 ppm) y permitió asignar al C-2 que en este caso resonaba a 70 ppm, y también se corrió a campos más bajos (1,8 ppm) al encontrarse libre el C-3 vecino. Sin embargo, debido a la proximidad de esta última

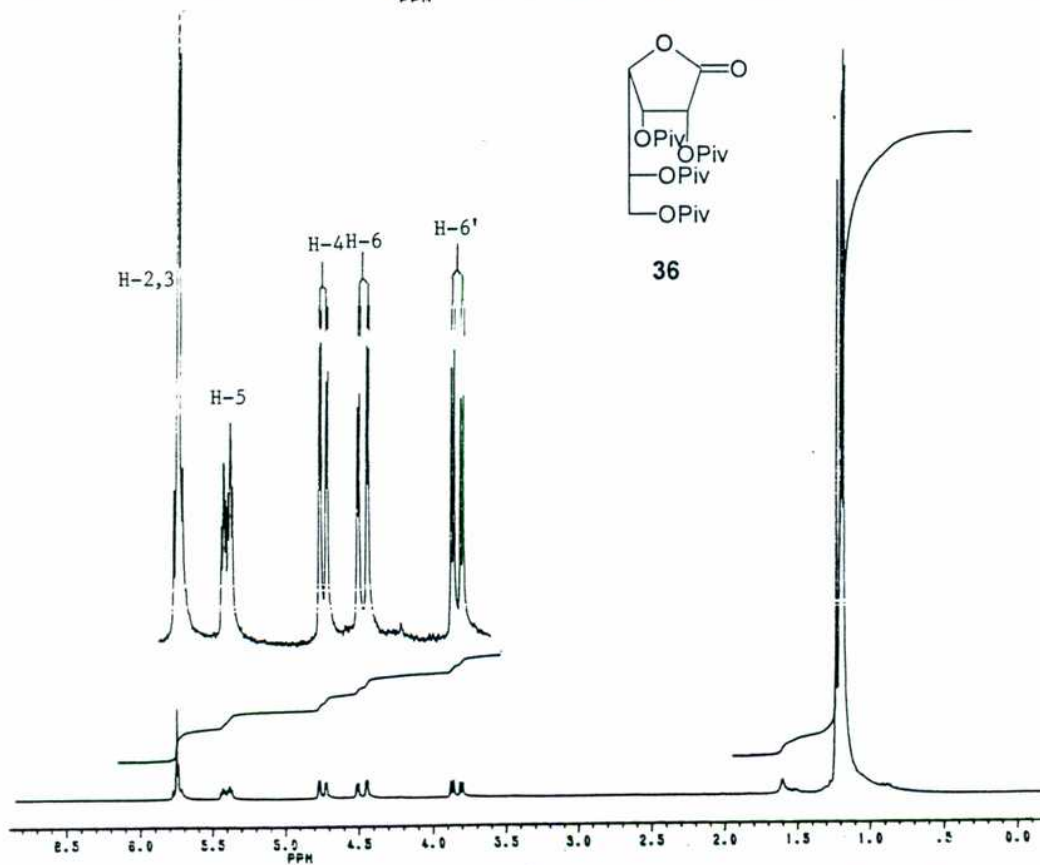
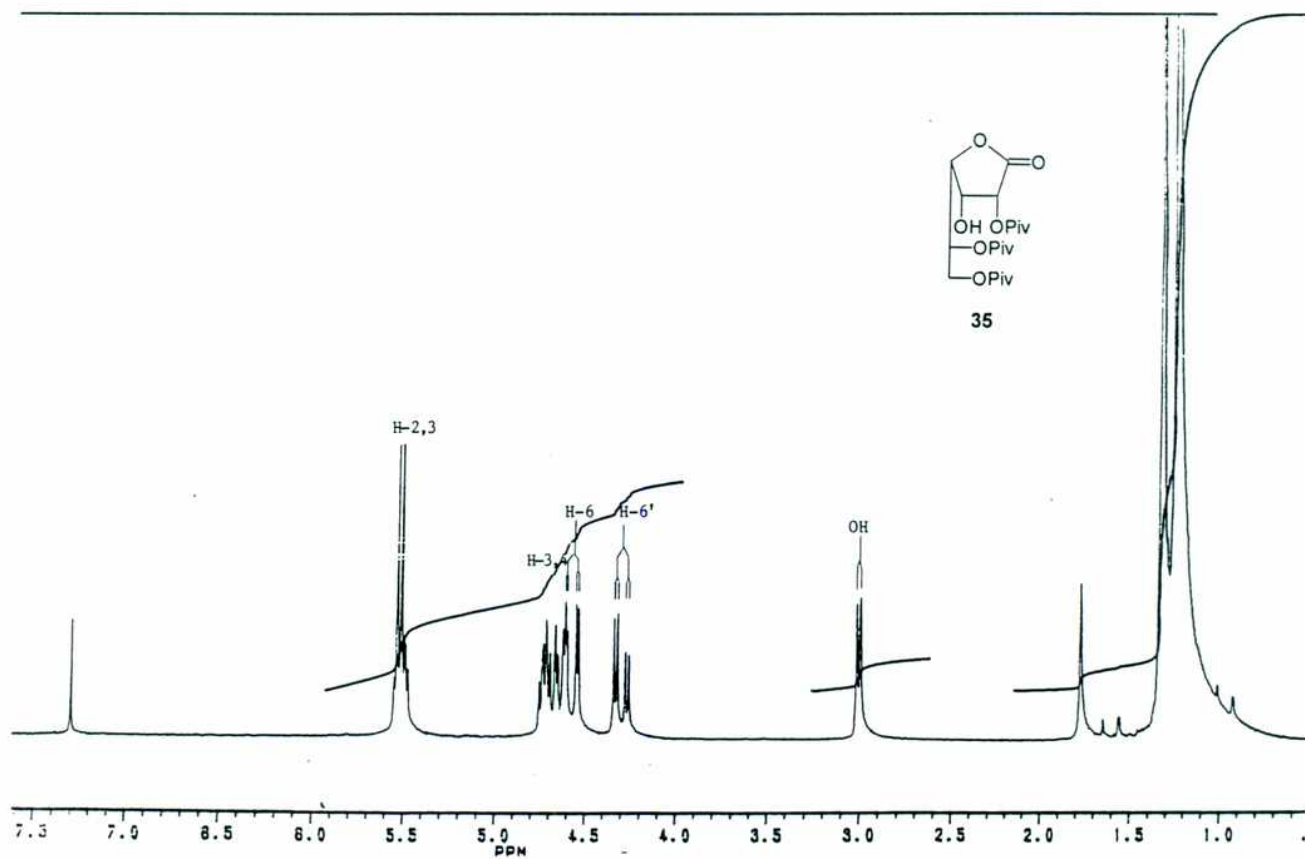


Figura 23. Espectros de RMN ^1H de los compuestos 35 y 36.

señal con la del C-5, dichas asignaciones podían estar intercambiadas. El C-3 de **35**, se asignó por comparación con el derivado 2,5,6-tri-O-benzoilado cuyos valores de δ eran similares a los encontrados para **35** (Tabla 4).

La baja reactividad del OH-3 tanto en la benzoilación como en la pivaloilación de D-gulono-1,4-lactona, puede atribuirse a las interacciones de tipo *gauche* entre el OH-3 y OH-2, y el OH-3 y la cadena lateral en C-4. Esta lactona se encuentra casi exclusivamente en una conformación $E_3(D)$ tanto en solución (Horton & Walaszek, 1982) como en estado cristalino (Berman *et al.*, 1971), en donde el OH-3 se encuentra en una disposición axial o pseudoaxial (Figura 24) y de esta manera, es menor su reactividad (Haines, 1976).

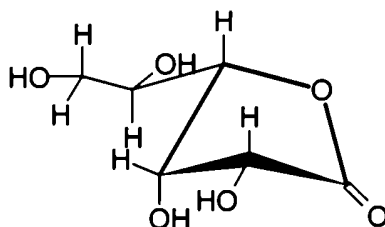


Figura 24

Las mismas interacciones *gauche* entre OH-3 y OH-2 y entre OH-3 y la cadena lateral en C-4 sumada a la disposición axial del OH-3, se observan en L-manono-1,4-lactona en su conformación preferencial $E_3(L)$ (Horton & Walaszek, 1982). Se encuentra descrito (Fernandez Cirelli *et al.*, 1983) que la benzoilación parcial de D-manono-1,4-lactona conducía, luego de separación cromatográfica, al 2,5,6-tri-O-benzoato y al perbenzoato en 60 y 25 % de rendimiento, respectivamente.

En este caso, la pivaloilación parcial de L-manono-1,4-lactona con 3,6 equivalentes de cloruro de pivaloilo en piridina a 0 °C condujo a 2,5,6-tri-O-pivaloil-L-manono-1,4-lactona (**37**) que cristalizó del crudo de reacción con 50% de

rendimiento (Esquema 24). La ccd reveló que las aguas madres de cristalización aún contenían **37** mayoritariamente. Sin embargo, no se logró recuperar por cromatografía en columna el resto de **37** pues se descomponía. Solo se pudo aislar una pequeña cantidad de 2,3,5,6-tetra-O-pivaloil-L-manono-1,4-lactona (**38**).

Esquema 24

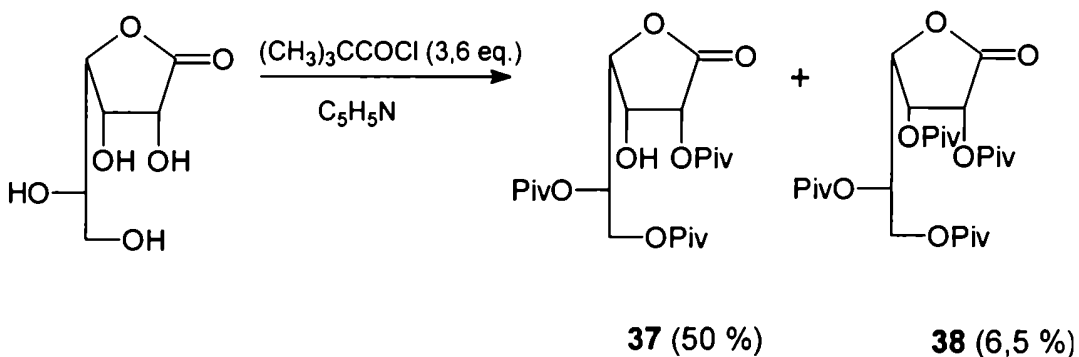


Tabla 4. Desplazamientos químicos de RMN ^{13}C de los compuestos **31-38**

| Compuesto | C-1 | C-2 | C-3 | C-4 | C-5 | C-6 |
|-----------------------|-------|-------|-------|------|-------|------|
| 31^b | 167,8 | 71,9 | 71,9 | 77,3 | 68,1 | 61,8 |
| 32^b | 168,8 | 76,3 | 72,4 | 80,7 | 68,2 | 64,9 |
| 33^b | 168,4 | 72,6* | 72,0* | 79,2 | 68,2 | 64,4 |
| 34^b | 168,1 | 75,9 | 72,9 | 79,3 | 68,8 | 62,2 |
| 35^c | 170,0 | 70,2* | 68,2 | 78,5 | 70,0* | 61,9 |
| 36^c | 168,8 | 68,4 | 69,2* | 76,5 | 69,0* | 60,7 |
| 37^b | a | 70,1 | 67,9 | 76,8 | 67,8 | 62,1 |
| 38^c | a | 68,5 | 68,5 | 74,6 | 66,9 | 61,3 |

a. Señal no observada en las condiciones del espectro, b. 100 MHz, c. 200 MHz

* Las señales pueden intercambiarse

Tabla 5. Datos espectroscópicos de RMN ^1H de los compuestos **31-38**.

| Comp. | H-2 ($J_{2,3}$) | H-3 ($J_{3,4}$) | H-4 ($J_{4,5}$) | H-5 ($J_{5,6}$) | H-6a ($J_{5,6}$) | H-6b ($J_{6,6'}$) | OH |
|-----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|-----------------------|------------------------|------------|
| 31^a | 5,62 (7,5) | 5,39 (7,2) | 4,57 (3,2) | 5,31 (4,9) | 4,40 (6,7) | 4,18 (11,8) | |
| 32^b | 5,28 (7,8) | 4,57 (7,6) | 4,28 (2,5) | 4,08 (6,3) | 4,37 (4,4) | 4,23 (11,9) | 3,66, 2,70 |
| 33^b | | 5,62 (6,7) | 4,38 (2,2) | 4,04 (6,4) | 4,34 (5,0) | 4,19 (11,6) | 2,64 |
| 34^b | 5,27 (7,6) | 4,17 (7,8) | 4,43 (3,7) | 5,36 (4,4) | 4,40 (7,0) | 4,25 (11,9) | 3,55 |
| 35^b | 5,52 (4,8) | 4,72 (2,8) | 4,63 (8,8) | 5,50 (2,5) | 4,57 (3,9) | 4,30 (12,5) | 3,00 |
| 36^c | | ~5,81 (2,2) | 4,80 (9,4) | 5,46 (2,5) | 4,57 (3,8) | 3,89 (12,7) | |
| 37^b | 5,44 (4,4) | 4,49 (2,5) | 4,42 (9,2) | 5,30 (2,2) | 4,67 (4,6) | 4,24 (12,5) | 3,32 |
| 38^c | 5,81 (4,5) | 5,73 (2,7) | 4,78 (9,8) | 5,23 (2,3) | 4,73 (3,2) | 4,15 (12,7) | |

a. 100 MHz, b. 300 MHz, c. 200 MHz

Los espectros de RMN ^1H de **37** y **38** se asignaron totalmente (Tabla 5, Figura 25) y en particular, la señal del H-3 del 2,5,6-tri-O-pivaloil derivado **37** se desplazó a campos más altos (1,2 ppm) compada con la misma señal de **38**, indicando que el OH-3 estaba sin sustituir.

Las señales del espectro de RMN ^{13}C de **37** se asignaron mediante un experimento 2D-COSY heteronuclear. Como era de esperar, las señales a 76,8 y 62,1 ppm correspondían a las resonancias del C-4 y C-6, respectivamente. La señal a 70,1 ppm correlacionaba con el H-2 (δ 5,44) y correspondía a la resonancia del C-2

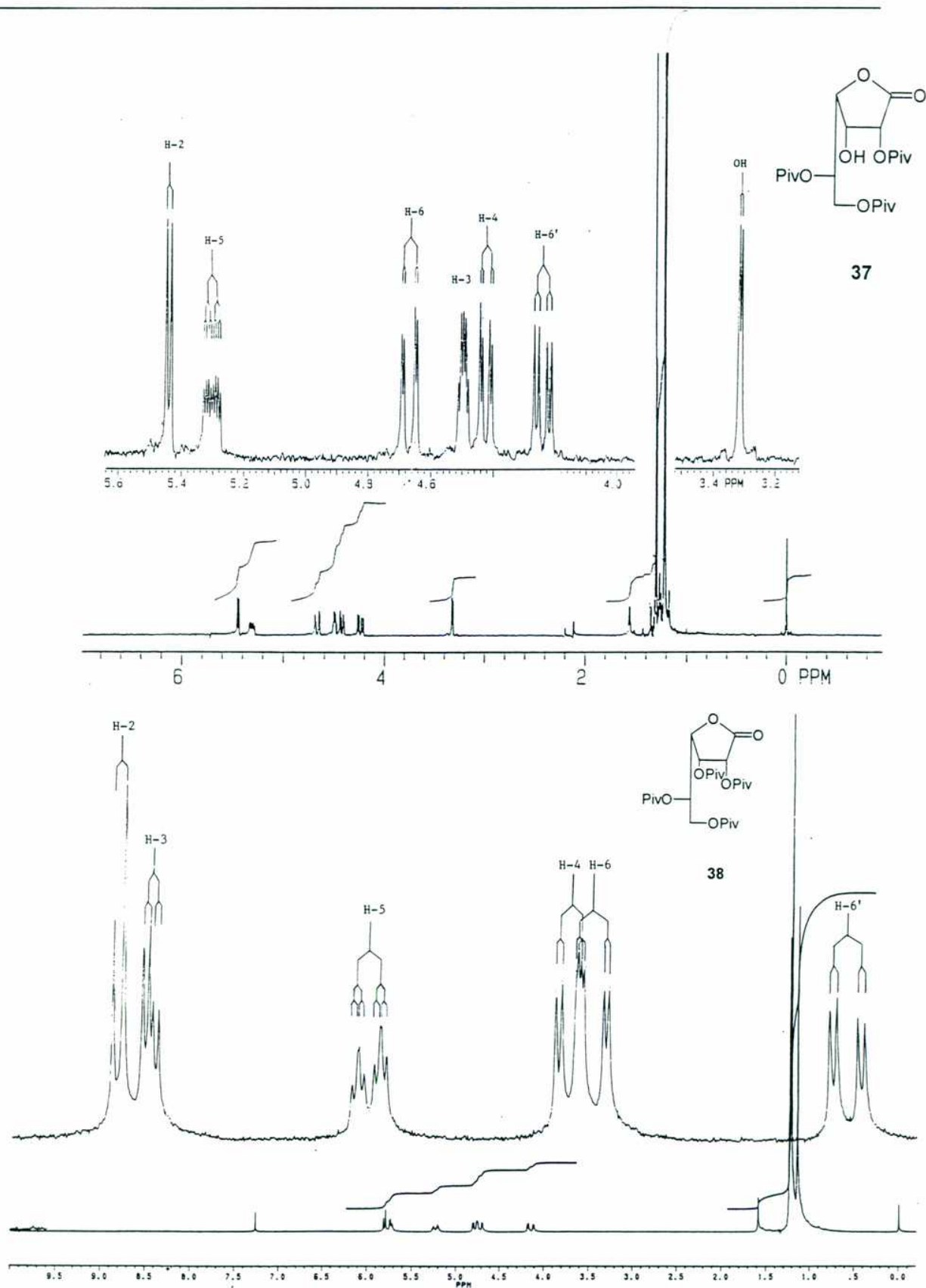


Figura 25. Espectros de RMN ^1H de los compuestos 37(300 MHz) y 38.

Las señales a 67,9 y 67,8 ppm correlacionaban con el H-5 (δ 5,30) y H-3 (δ 4,49) confirmando que se trataba de las resonancias del C-5 y C-3, respectivamente

Teniendo en cuenta estos datos y el efecto protector en el C- β de la acilación, y además considerando el espectro de RMN ^{13}C de la perbenzoil-D-manono-1,4-lactona que había sido asignado (Fernández Cirelli *et al.*, 1983), se logró asignar el espectro de RMN ^{13}C del perpivaloil derivado (**38**) (Tabla 4). Así, la señal a 61,3 ppm correspondía al C-6. A 66,9 ppm resonaba el C-5 y a 74,6 ppm el C-4. En esta última señal se observa un desplazamiento a campos más altos (2,2 ppm) por pivaloilación en OH-3. La señal a 68,5 ppm correspondía a las resonancias de los C-2 y C-3 superpuestas. Como se observa, el C-2 se desplazó a campos más altos (1,6 ppm) por la acilación del OH-3 respecto de la misma señal de **37**.

Como resultado de estos estudios de tri-O-pivaloilaciones selectivas de D-gulono, L-manono y D-galactono-1,4-lactona, se concluyó que se pueden obtener derivados tri-O-pivaloilados con el 3-OH libre a partir de aquellas lactonas que posean configuraciones gulo y mano, con altos rendimientos y en forma cristalina. Sin embargo, como se mencionó anteriormente, este método no es conveniente para el caso de la D-galactono-1,4-lactona ya que se obtiene grandes cantidades de los derivados di y per pivaloilados, y el 2,5,6-tri-O-pivaloato se recupera, después de una ardua separación cromatográfica con bajos rendimientos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

CAPÍTULO 6

Sintones para la introducción de Galf en la síntesis de oligosacáridos

Síntesis del sintón de β -D-Galp(1→3)-D-Galf

Aunque la galactofuranosa se encuentra generalmente como extremo terminal, se ha identificado una serie de glicolípidos en tripanosomátidos y polisacáridos en bacterias, en donde la Galf se encuentra interna y no en el extremo no reductor como en el caso de los compuestos **9** y **23** ya sintetizados en este trabajo.

Por ejemplo la unidad α -D-Galp-(1→3)-D-Galf está presente en el lipofosfoglicano (Esquema 4, Turco & Descoteaux, 1992) y en glicoinositolfosfolípidos (Esquema 5, McConville *et al.*, 1990b, McConville & Ferguson, 1993) aislados de *Leishmania* y la unidad β -D-Galp-(1→3)-D-Galf en polisacáridos capsulares de *Streptococcus pneumonia* (Beynon *et al.*, 1997).

Resultaba interesante estudiar la síntesis de los disacáridos β -D-Galp-(1→3)-D-Galf y α -D-Galp(1→3)-D-Galf convenientemente protegidos como sintones para la introducción de Galf interna en la construcción de los oligosacáridos mencionados.

Las aldono-1,4-lactonas convenientemente protegidas se han utilizado como precursores de los azúcares furanósicos (Varela *et al.*, 1979, 1980). Particularmente, se ha descrito la condensación de derivados de D-galactonolactona tanto con azúcares piranósicos peracilados (Du Mortier *et al.*, 1989) como con azúcares furanósicos peracilados (Marino *et al.*, 1989; Lederkremer *et al.*, 1990) utilizando en estos casos SnCl₄ como promotor.

Este método tiene la ventaja que durante la etapa de glicosidación, el C-anomérico del extremo reductor se encuentra como la lactona precursora del anillo furanósico. Una vez formado el enlace glicosídico, la reducción de la lactona

conduce al disacárido con el OH anomérico libre y así se transforma en un sintón para la construcción de un posterior oligosacárido.

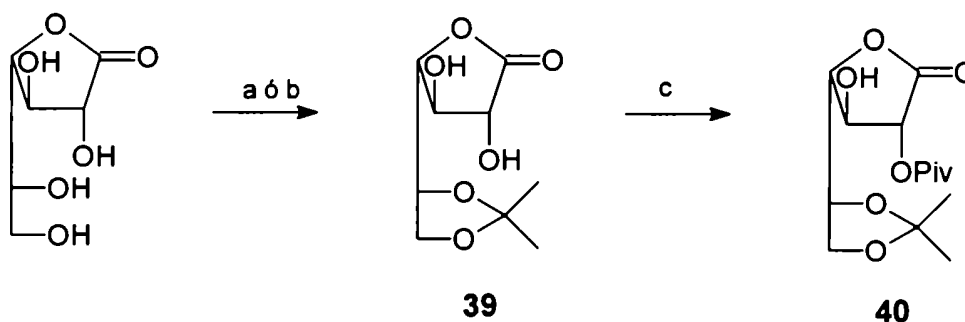
Obtención de 5,6-O-isopropilidén-2-O-pivaloil-D-galactono-1,4-lactona (40)

Para obtener los disacáridos blanco, se necesitaba un derivado de D-galactono-1,4-lactona con el OH-3 libre, que luego sería glicosidado con un derivado conveniente de Galp. Considerando que la acilación selectiva de D-galactono-1,4-lactona conducía al 2,5,6-tri-O-acil derivado con bajo rendimiento, se analizó una estrategia alternativa. Si se partiera de un derivado con los OH-5 y OH-6 protegidos como, por ejemplo, la 5,6-O-isopropilidén-D-galactono-1,4-lactona (Copeland & Stick, 1978), podría luego acilarse selectivamente el OH-2 frente al OH-3, debido a la gran reactividad que presenta el OH-2 por efecto inductivo del carbonilo.

Por tratamiento de D-galactono-1,4-lactona con acetona y H₂SO₄ (c) como catalizador, por 24 h y posterior purificación por cromatografía, se obtuvo la 5,6-O-isopropilidén-D-galactono-1,4-lactona (**39**) con 81 % de rendimiento cuyo α_D era similar al descripto (Copeland & Stick, 1978). Por pivaloilación parcial de **39** con 1,3 equivalentes de cloruro de pivaloilo en piridina a temperatura ambiente, se obtuvo 5,6-O-isopropilidén-2-O-pivaloil-D-galactono-1,4-lactona (**40**) que cristalizó de la mezcla de reacción con 79 % de rendimiento (Esquema 25).

El espectro de RMN ¹H de **40** mostró dos singuletes (δ 1,44 y 1,39) que integraban cada uno para 3H que correspondían a las resonancias de los metilos del isopropilidén y un singulete (δ 1,29) que integraba para 9H que correspondía a los metilos del pivaloilo, indicando que se trataba de un producto de monopivaloilación (Figura 26). A δ 3,50 resonaba el OH como un doblete y estaba acoplado con la señal a δ 4,42 que correspondía al H-3. Si se comparan las resonancias de los H-5 y H 6 y 6' de **40** con las del derivado 2,5,6-tri-O-pivaloilado (**34**) se observa que se encuentran más protegidos en **40** por efecto del anillo isopropilidén.

Esquema 25



Reactivos: a) $(\text{CH}_3)_3\text{CO}$, H_2SO_4 (trazas), 24 h, 81 %; b) 2,2-dimetoxipropano- $(\text{CH}_3)_3\text{CO}$, H_2SO_4 (trazas), 0,5 h; c) $(\text{CH}_3)_3\text{CCOCl}$ (1,3 eq.), $\text{C}_5\text{H}_5\text{N}$, 79 %

Por otra parte, la señal del H-2 de **40** se desplazó a campos más bajos ($\sim 0,8$ ppm) respecto de la misma señal en el 5,6-O-isopropilidén derivado **39** (Fleet & Son, 1988) indicando que el OH-2 se había pivaloiloado.

Los valores altos de $J_{2,3}$ y $J_{3,4}$ (7,4 y 7,3 Hz, respectivamente) de **40**, similares a los de los derivados pivaloiloados de la lactona (**31**, **32** y **34**), indicaban una conformación del tipo $\text{E}_3(\text{D})$.

En la zona de resonancia de carbonilo en el espectro de RMN ^{13}C de **40** (Tabla 6, Figura 26) se observaron dos señales correspondientes a la lactona (172,4 ppm) y al pivaloilo (179,4 ppm) más desprotegido. La presencia del isopropilidén se confirmó por la señal del carbono acetálico (110,4 ppm) y sus metilos (26,0 y 25,5 ppm). El carbono cuaternario del grupo pivaloilo resonaba a 38,9 ppm, así como sus metilos equivalentes a 27,0 ppm. El resto de las señales se asignaron por comparación con el derivado 2,5,6-tri-O-pivaloiloado **34**. Así, el C-4 y el C-2 resonaban a 79,8 y 76,8 ppm. El C-6 (65,0 ppm) se encontraba desprotegido (3,2 ppm) por la incorporación del anillo acetálico y el C-5 también debía sufrir desprotección y se asignó a la señal a 74,1 ppm. La señal de C-3 restante (73,4 ppm), no sufriría mucha variación con respecto al compuesto **34**.

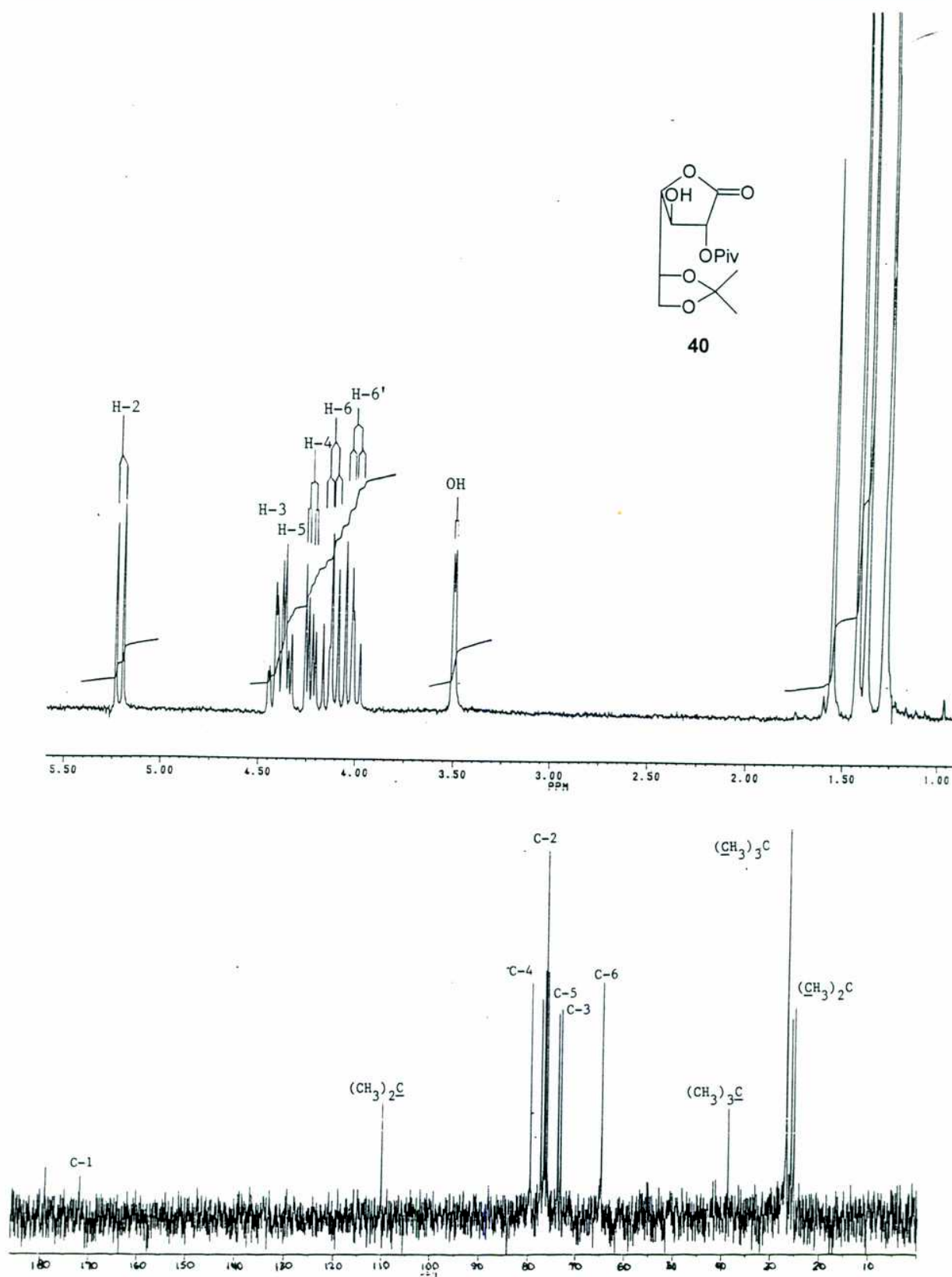


Figura 26. Espectros de RMN ^1H y ^{13}C del compuesto 40.

Dado que los tiempos de la acetonidación eran largos y que, además, no se llegaba a consumir la lactona de partida, se llevó a cabo un método alternativo para obtener el isopropilidén **39** y su posterior acilación evitando la purificación de **39**. Para ello, se trató D-galactono-1,4-lactona con una mezcla de 2,2-dimetoxipropano - acetona 1:5 en presencia de trazas de H₂SO₄. Después de 30 min, una ccd mostró que la lactona de partida se había consumido totalmente y se había formado un solo producto con la misma movilidad que **39**. Luego de neutralizar y filtrar la solución, se evaporó a seco y se trató con 1,3 equivalentes de cloruro de pivaloilo en piridina, obteniéndose **40** con 67 % de rendimiento luego de cristalización. De esta manera, se simplificó el procedimiento que permitió obtener **40** en escala multigramo.

*Glicosidación. Obtención de 2,3,4,6-tetra-O-acetil- β -D-galactopiranosil-(1-3)-5,6-O-isopropilidén-2-O-pivaloil-D-galactono-1,4-lactona (**44**)*

Una vez obtenido el aceptor deseado **40**, era necesario efectuar la glicosidación con un derivado de galactosa piranósica. Dada la labilidad del isopropilidén frente al SnCl₄, y teniendo en cuenta que se querían obtener los enlaces glicosídicos en las configuraciones α y β , se decidió utilizar el procedimiento del tricloroacetamidato para la activación del oxígeno anomérico de la galactosa convenientemente protegida (Schmidt, 1986,1991; Schmidt & Kinzy, 1994).

Como primer intento, se decidió obtener el disacárido derivado de β -D-Galp-(1 \rightarrow 3)-D-Galf. Se podía partir de galactosa peracetilada ya que, una vez transformada en el tricloroacetamidato correspondiente, su glicosidación con el aceptor **40** en presencia del catalizador (un ácido de Lewis) daría lugar al glicósido β por efecto del grupo participante en el O-2, como se discutió en la introducción. En este caso, no era necesario partir de un determinado tricloroacetamidato α o β , sino que podría ser una mezcla de ambos.

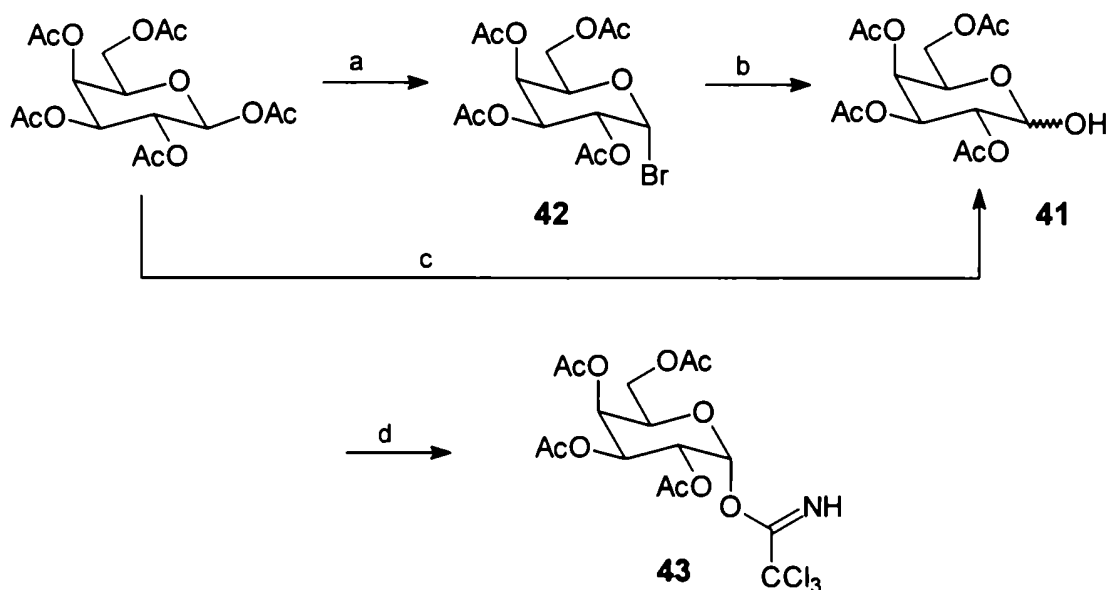
Con el fin de obtener el derivado de galactosa acilada con el anomérico libre, primeramente se ensayó la hidrólisis del acetilo anomérico de la pentaacetil- β -D-galactopiranososa en presencia de SnCl_4 y H_2O . Luego de la separación cromatográfica, se obtuvo 2,3,4,6-tetra-O-acetil- α,β -D-galactopiranososa (**41**) con 55 % de rendimiento. Este procedimiento era sencillo, pero el rendimiento era moderado e involucraba una separación cromatográfica, por lo que se decidió llevar a cabo la síntesis tradicional (Allen, 1962) que consiste en la formación del bromuro de glicosilo y su posterior hidrólisis con la ayuda de sales de Ag. De esta manera, por tratamiento de pentaacetil- β -D-galactopiranososa con 32 % HBr en AcOH, se obtuvo el bromuro de tetra-O-acetil- α -D-galactopiranosilo cristalino (**42**). La hidrólisis de **42** en presencia de Ag_2CO_3 condujo a **41** con 99 % de rendimiento (Esquema 26).

Una vez obtenido **41**, era necesario convertirlo al derivado tricloroacetamido utilizando tricloroacetnitrilo y una base. Se encontraba descrito que si se utilizaba NaH como base y luego de 5 h de reacción, conducía a mezclas anoméricas α/β en una relación 39:45 (Schmidt & Stumpp, 1983; Amwam-Zollo & Sinay, 1986) que podían separarse por cromatografía en columna. Como se mencionó anteriormente, la utilización de mezclas anoméricas de tricloroacetamidatos de galactopiranosilo acetilados conduciría al glicósido β por asistencia anquimérica del acetilo en O-2. Sin embargo, actualmente se está empleando DBU como base que conduce a α -tricloroacetamidatos en tiempos muy cortos de reacción debido a que acelera notablemente el equilibrio hacia el anómero termodinámicamente más estable (Schmidt & Kinzy, 1994). Como se mencionó en la introducción, el control diastereomérico en la formación de tricloroacetamido β ecuatorial, se basa en la elevada nucleofilicidad del átomo de oxígeno ecuatorial debido tanto a efectos estéricos como estereoelectrónicos (efecto anomérico cinético). La reacción de adición es rápida y reversible, y el producto se anomeriza lentamente en una reacción catalizada por base, que puede hacerse más rápida utilizando bases más

fuerzas, a través de una retroreacción, anomerización del 1-óxido y adición de tricloroacetnitrilo para formar el α -tricloroacetamido axial, termodinámicamente más estable.

Se trató, entonces, el compuesto **41** con Cl_3CCN y un equivalente de DBU por 30 minutos. Luego de extracción y filtrado por sílica, se obtuvo el tricloroacetamido de 2,3,4,6-tetra-O-acetil- α -D-galactopiranosilo (**43**) como un compuesto cristalino con 80% de rendimiento (Esquema 26).

Esquema 26



Reactivos: a) 32 % HBr/AcOH; b) AgCO_3 , $(\text{CH}_3)_3\text{CO-H}_2\text{O}$, 99 %; c) SnCl_4 , H_2O , 55 %; d) DBU Cl_3CCN , 0,5 h, 80 %

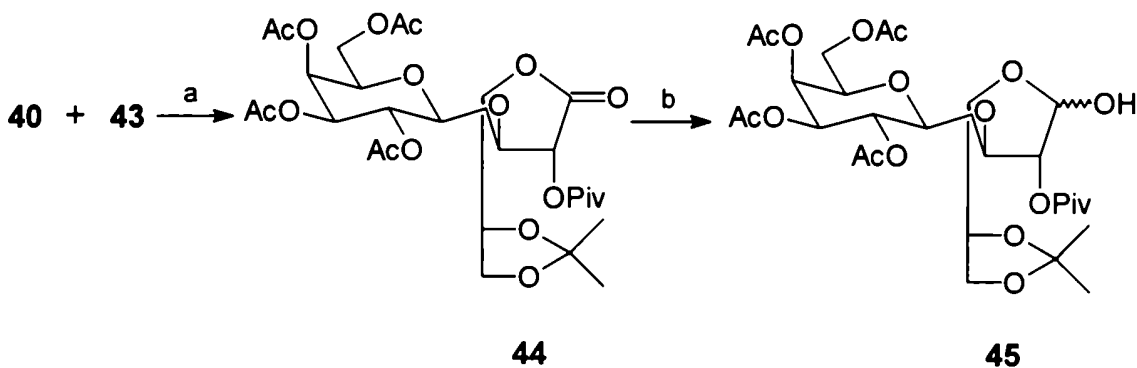
El espectro de RMN ^1H de **43** se encontraba descrito en literatura (Amwam-Zollo & Sinay, 1986) con un campo menor y por ende, no estaba resuelto. El espectro protónico a 200 MHz, mostró una señal a campos muy bajos (δ 8,65)

correspondiente al H del acetamido. La señal del H-1 se encontraba muy desprotegida (δ 6,55) con una $J_{1,2}$ 3,1 Hz, que indicaba una configuración anomérica α . Las señales restantes se asignaron fácilmente por la correlación de sus constantes de acoplamiento.

En el espectro de RMN ^{13}C de **43** se distinguieron, además de los carbonilos de los acetilos, la señal del C-sp 2 del acetamido a 160,8 ppm. Las señales a 93,5 y 93,4 ppm correspondían al C-1 y al CCl_3 y podían estar intercambiadas. También se pudieron asignar el C-6 (61,1 ppm) y los metilos de acetilos (20,4 ppm).

Para formar el enlace glicosídico β , se condensó el aceptor **40** con el tricloroacetamido **43**, utilizando triflato de trimetilsililo (TMSOTf) como catalizador y se obtuvo 2,3,4,6-tetra-O-acetil- β -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 3)-5,6-O-isopropilidén-2-O-pivaloil-D-galactono-1,4-lactona (**44**) como un sólido amorfo con 84 % de rendimiento (Esquema 27).

Esquema 27



Reactivos: a) TMSOTf, Cl_2CH_2 , -20°C , 84 %; b) diisamilborano, THF, 92 %.

En el espectro de RMN ^{13}C de **44** (Figura 27) se distinguieron las resonancias de los C de los grupos protectores. En la zona de resonancia de carbono carbonílicos, se observaron cinco señales que correspondían al carbonilo del

pivaloilo (176,7 ppm), de la lactona (170,1 ppm) y de los acetilos (169,9-168,7 ppm). El carbono cuaternario del isopropilidén resonaba a 110,2 ppm y sus metilos a 25,8 y 25,6 ppm. Así también las señales a 38,7 y 26,9 ppm indicaban la presencia de pivaloilo. Los metilos de acetilo de la unidad galactopiranososa resonaban a 20,5 ppm. La señal del C-1' aparecía a 100,9 ppm e indicaba una configuración β -piranósica si se compara con los metilglicósidos acetilados relacionados. Por ejemplo, el carbono anomérico del metil tetra-O-acetil- β -D-galactopiranósido resuena a 101,5 ppm, mientras que el C-1 del glicósido α resuena a 96,5 ppm, es decir, 5 ppm más protegido (Bock & Pedersen, 1983). Por comparación con el metil 2,3,4,6-tetra-O-acetil- β -D-galactopiranósido, se asignaron las señales de la unidad Galp de **44** (Tabla 6). El resto de las señales se asignaron por comparación con la lactona de partida (**40**). Así, el C-6 resonaba a 65,0 ppm y el C-5 a 73,6 ppm debido al isopropilidén. El C-4 se encontraba desprotegido a 79,2 ppm. De las dos señales restantes, la señal más desprotegida (73,0 ppm) se asignó al C-3 y la señal a 71,0 ppm al C-2 que se desplazó a campos altos.

Tabla 6. Desplazamientos químicos de RMN ^{13}C de los compuestos **40** y **44**.

| Compuesto | C-1 | C-2 | C-3 | C-4 | C-5 | C-6 |
|----------------------------|-------|------|-------|------|-------|------|
| Me tetra-Ac- β -Galp | 101,5 | 68,5 | 70,2 | 66,8 | 70,6 | 61,0 |
| 40 | 172,4 | 76,8 | 73,5* | 79,8 | 74,1* | 65,0 |
| 44 Gal-1,4-lactona | 170,1 | 71,0 | 73,0 | 79,2 | 73,6 | 65,0 |
| Galp | 100,9 | 68,3 | 70,5 | 66,8 | 70,5 | 61,1 |

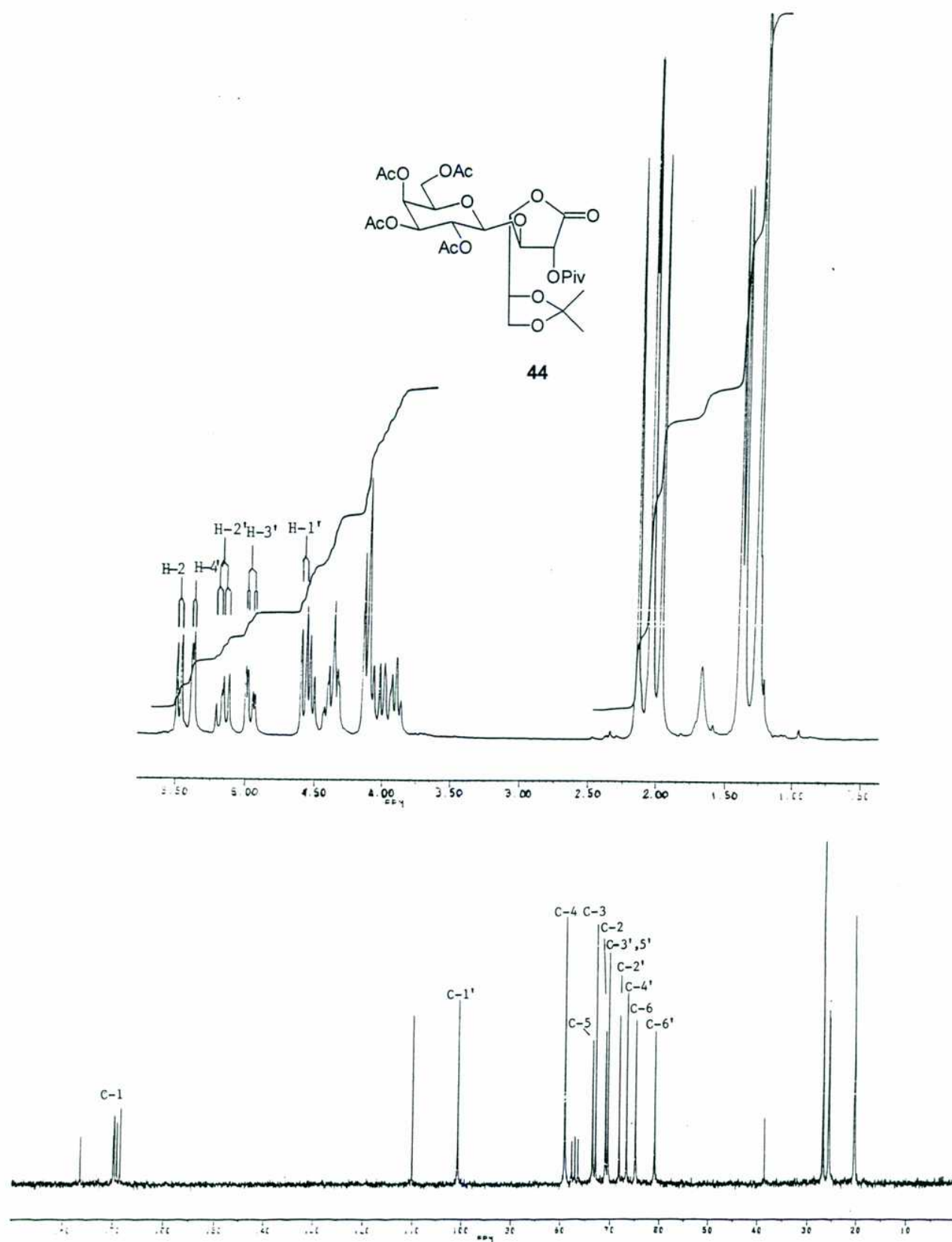


Figura 27. Espectros de RMN ^1H y ^{13}C del compuesto 44.

En el espectro de RMN ^1H de **44** (Figura 27), además de las resonancias de los H de los metilos del isopropilidén, pivaloil y acetilos, se distinguió un doblete desprotegido (δ 5,49) correspondiente al H-2 de la unidad lactónica. Por otra parte, la constante de acoplamiento del H-1' (δ 4,59) tenía un valor de 7,8 Hz, con lo que se confirmó la configuración β -piránosica del centro anomérico. El doblete observado para la resonancia del H-2', también confirmó esta configuración. Se observaron señales características de la unidad β -galctopiránosica como ser el H-4' (δ 5,39), el H-2' (δ 5,18) y el H-3' (δ 4,97).

Estos resultados indicaron que la condensación de **40** con **43** para obtener el disacárido lactónico fue altamente diastereoselectiva en favor del anómero β . Por primera vez, se comprobó que los derivados de lactonas son buenos aceptores en las reacciones de glicosidación utilizando el método del tricloroacetamido para la activación del O-anomérico.

*Reducción. Obtención del sintón 2,3,4,6-tetra-O-acetil-galactopiranosil- β -(1 \rightarrow 3)-5,6-O-isopropilidén-2-O-pivaloil-D-galactofuranosa (**45**)*

Se procedió a reducir **44** con el fin de obtener el disacárido para utilizarlo como sintón para la introducción de Galf interna en una futura síntesis de oligosacáridos. Por tratamiento de **44** con disiamilborano, se obtuvo 2,3,4,6-tetra-O-acetil-galactopiranosil- β -(1 \rightarrow 3)-5,6-O-isopropilidén-2-O-pivaloil-D-galactofuranosa (**45**) como un sólido amorfo con 92 % de rendimiento (Esquema 27).

El espectro de RMN ^{13}C de **45** mostró que se trataba de una mezcla de anómeros en el extremo reductor (Figura 28). En la zona anomérica, resonaba el C-1' de la unidad β Galp a 100,8 ppm, mientras que el C-1 de la unidad furánosica β resonaba a 99,7 ppm y el C-1 α a 94,5 ppm, en una relación de intensidades de 3,4:1. Como era de esperar, las señales correspondientes a los metilos del isopropilidén y del pivaloil se veían duplicadas. Por comparación con el metil

2,3,4,6-tetra-O-acetil- β -D-galactopiranosido, se asignaron las señales de la unidad de Galp de **45**, sin embargo, debido a la complejidad del espectro de la mezcla anomérica, sólo se pudieron asignar de la unidad β -furanósica el C-6 (65,4 ppm) y los C-4 (83,8 ppm) y C-2 y C-3 (81,4 y 82,5 ppm) que pueden estar intercambiados. El C-3 se encuentra desprotegido por estar glicosilado. El rendimiento total del sintón de Galf interna **45**, objeto de síntesis fue del 55 %.

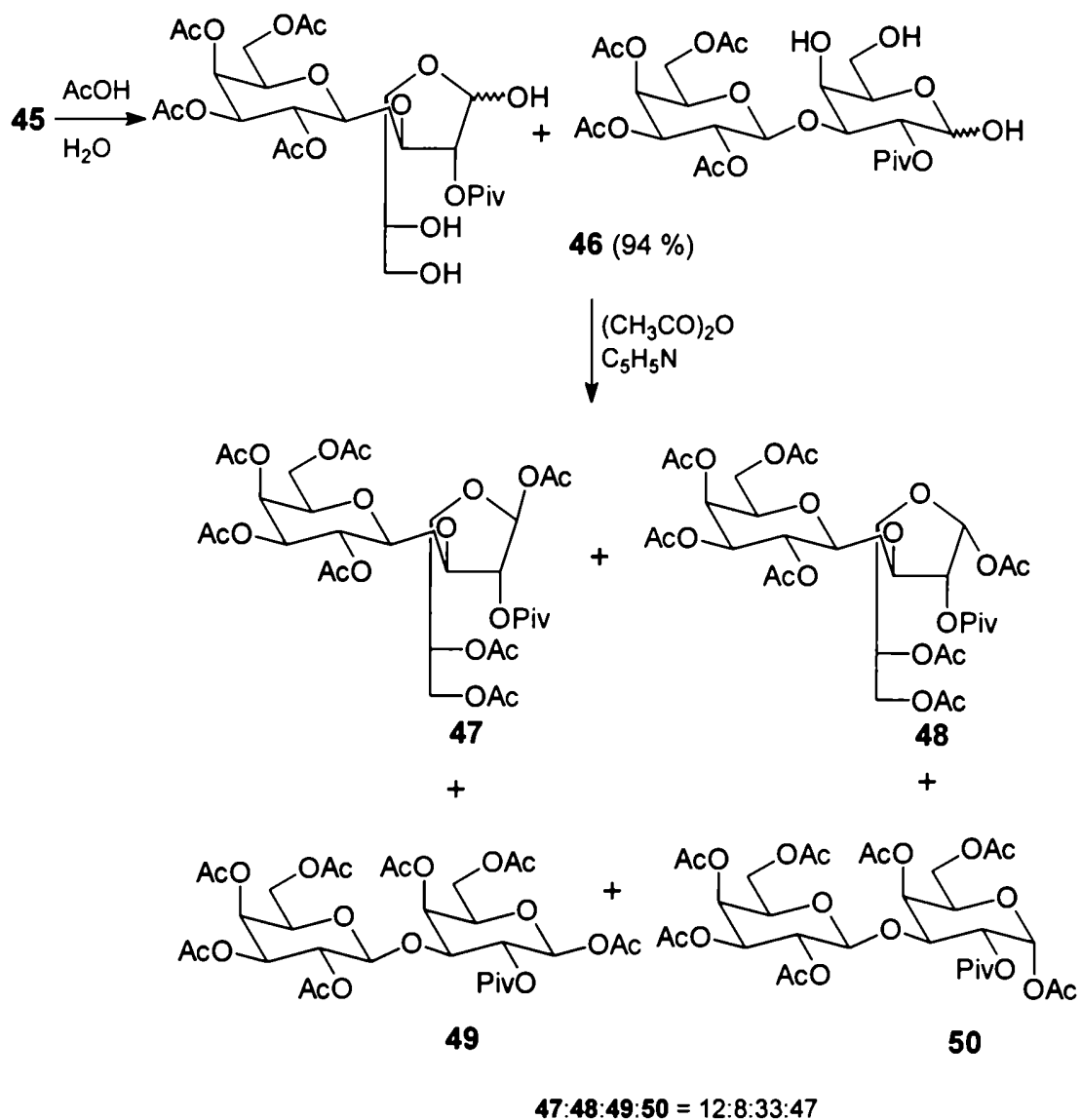
*Obtención de 2,3,5,6-tetra-O-acetil- β -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 3)-2-O-pivaloil-D-galactosa (**46**), acetilación y obtención del sintón β -D-Galp(1 \rightarrow 3)Galp.*

Debido a que la ruta desarrollada para la obtención de **45** era simple y teniendo en cuenta que la remoción de su isopropilidén permitiría la isomerización al derivado en la configuración piranósica, se esbozó la posibilidad de que **45** fuera precursor de β -D-Galp-(1 \rightarrow 3)-D-Galp y de esta manera, obtener los dos sintones por una misma ruta sintética. Por hidrólisis de **45** con AcOH acuoso, se obtuvo 2,3,5,6-tetra-O-acetil- β -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 3)-2-O-pivaloil-D-galactosa (**46**) como un sólido amorfo con 94 % de rendimiento (Esquema 28). El espectro de RMN ^{13}C de **46** era complejo, pero se observó la ausencia de la señal del C cuaternario del isopropilidén (~110 ppm) así como las de sus metilos (~26 ppm). La zona anomérica presentaba varias señales a 90,1 ppm resonaba el C-1 en la configuración α -piranósica; a 93,7 ppm el C-1 β -piranósico; a 96,0 el C-1 α -furanósico, y a 100,2 ppm el C-1 β -furanósico con una relación de intensidades 4:1:1,8:1,2 y al llegar al equilibrio estas intensidades habían variado a 3: 1,5:1,5:1 (Figura 28).

Se peracetiló la mezcla **46** con anhídrido acético en piridina a 5 °C (Esquema 28). Al crudo de reacción, que mostraba 3 manchas por ccd de R_f 0,59; 0,53 y 0,42, se le hizo un espectro de RMN ^{13}C . En la zona anomérica, se observaron las señales a 100,8 y 100,5 ppm que correspondían a las resonancias de los C-1' de la unidad Galp y cuatro señales más (99,0; 93,4; 91,8 y 89,0 ppm) que correspondían, en

principio a los C-1 en las configuraciones β -furanósica, α -furanósica, β -piranósica y α -piranósica, respectivamente. También se realizó un espectro protónico de la mezcla que se analizó posteriormente, luego de la identificación de los productos como se detalla más adelante.

Esquema 28



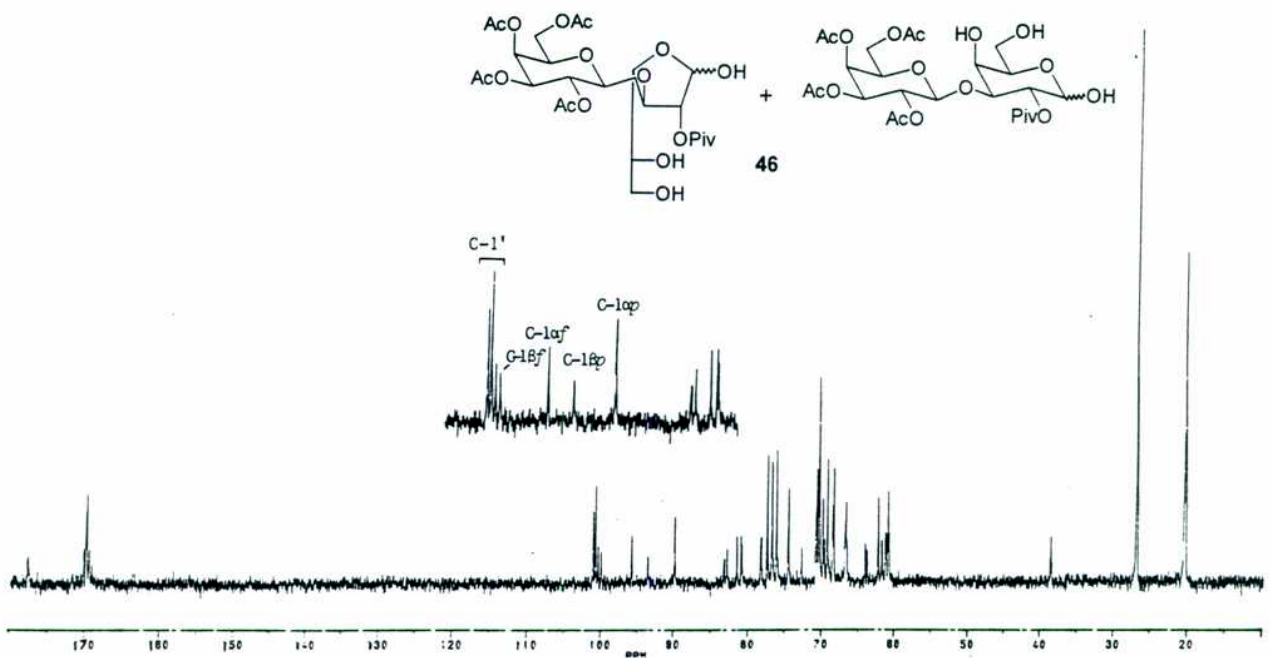
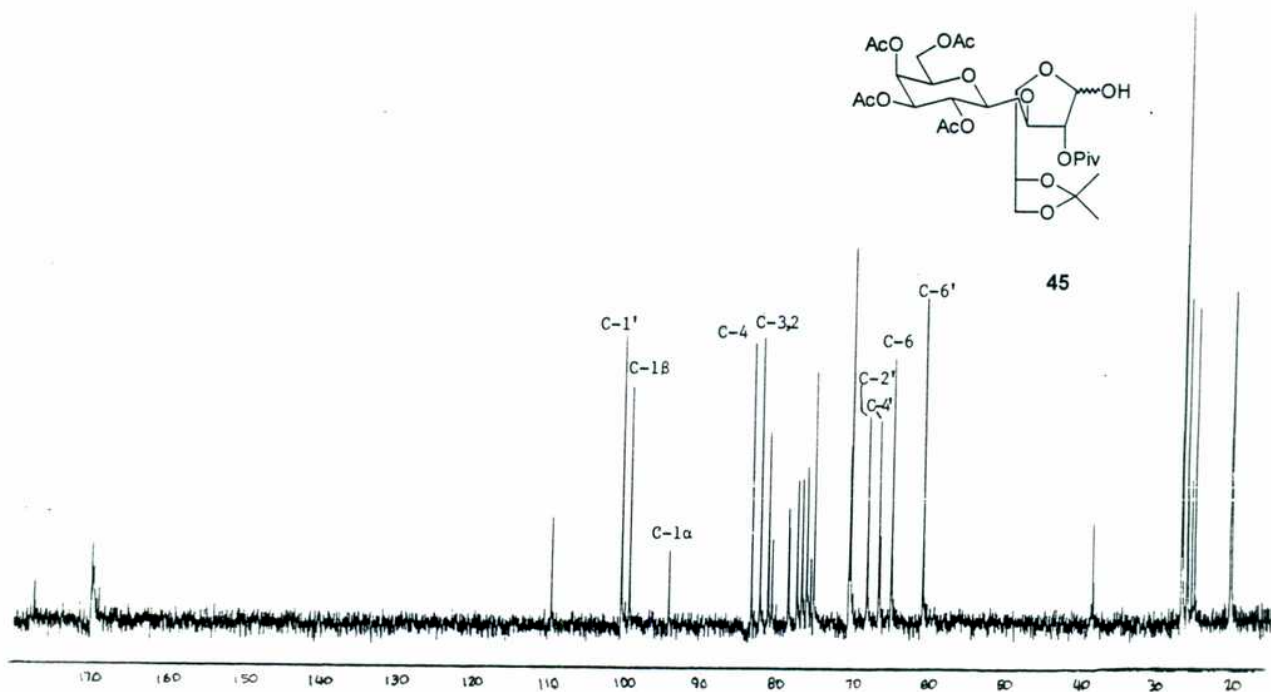


Figura 28. Espectros de RMN ^{13}C de los compuestos 45 y 46.

El crudo de reacción se separó parcialmente por cromatografía en columna. Se obtuvo el producto de R_f 0,59 (14 %), una mezcla de productos de R_f 0,59 y 0,53 (6 %), un producto de R_f 0,53 (23 %), una mezcla de productos de R_f 0,53 y 0,42 (13 %) y finalmente, el producto de R_f 0,42 (30 %). El rendimiento total de la acetilación fue del 86 %.

El espectro de RMN ^{13}C del producto de mayor movilidad (**47**, R_f 0,59) mostraba en la zona anomérica una señal a 101,0 ppm que correspondía al C-1' de la unidad de Galp y otra señal más a 99,1 ppm (Figura 29, Tabla 7). Comparando este valor con los valores de resonancia de los C-1 de las galactosas piranósicas y furanósicas aciladas (Bock & Pedersen, 1983 ;D'Accorso *et al.*, 1983), se observó que la galactosa en el extremo reductor se encuentra en la configuración β furanósica y además, es consistente con las resonancias observadas para los C-2 y C-4 a $\delta > 80$ ppm, características de esta configuración; por lo tanto se trataba de 2,3,4,6-tetra-O-acetil- β -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 3)-1,5,6-tri-O-acetil-2-O-pivaloil- β -D-galactofuranosa (**47**). El espectro de **47** se asignó por comparación con las señales del metil 2,3,4,6-tetra-O-acetil- β -D-galactopiranosido y de la per-benzoil- β -D-galactofuranosa, teniendo en cuenta que el C-3 de esta última unidad aparecería a campos más bajos debido a la glicosidación sobre este carbono (Tabla 7).

La resonancia del H-1 anomérico en el espectro de RMN ^1H de **47** confirmó esta configuración, pues aparecía como un singulete ancho ($J_{1,2} < 1$ Hz) desprotegido (δ 6,13) por encontrarse el OH-1 acetilado (Figura 29). También se observaron señales características de esta configuración, como ser el H-2 (δ 4,95 $J_{2,3}$ 1,1 Hz), y el multiplete correspondiente al H-5 (δ 5,40). La señal del H-1' presentaba una $J_{1',2}$ 7,7 Hz, indicando una configuración β -piranósica de la unidad Galp y los valores de las constantes de acoplamiento de los H-2, H-3 e H-4 confirmaban esta configuración

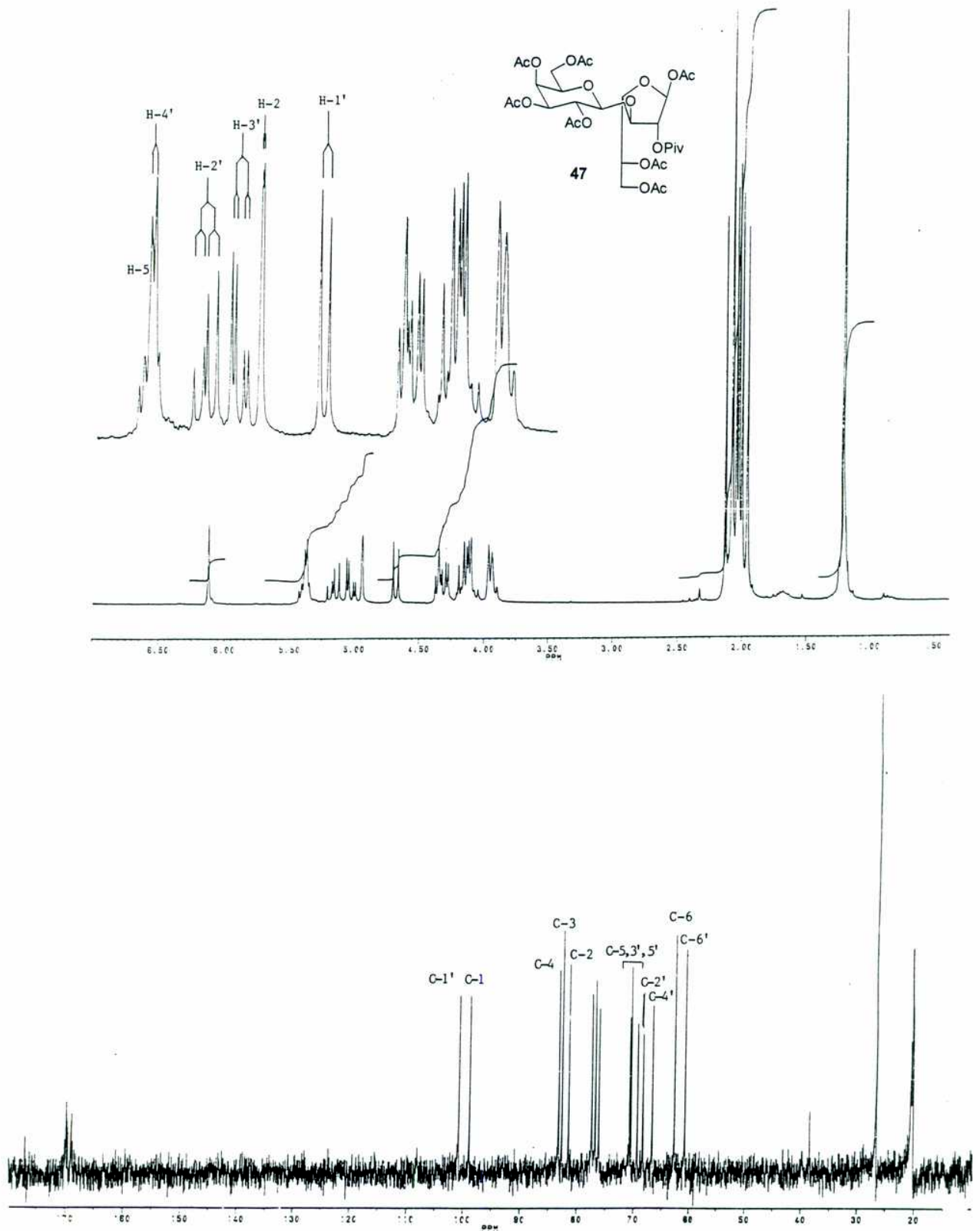


Figura 29. Espectros de RMN ^1H y ^{13}C del compuesto 47.

Tabla 7. Desplazamientos químicos de RMN ^{13}C de **47** comparado con galactosas peraciladas en las cuatro configuraciones (Bock & Pedersen, 1983; D'Accorso *et al.*, 1983)

| | C-1 | C-2 | C-3 | C-4 | C-5 | C-6 |
|------------------------------|-------|------|-------|------|-------|------|
| per-O-Ac- α -Galp | 89,5 | 67,2 | 67,2 | 66,2 | 68,5 | 61,0 |
| per-O-Ac- β -Galp | 91,8 | 67,8 | 70,6 | 66,8 | 71,5 | 61,0 |
| per-O-Bz- α -Galf | 94,2 | 76,2 | 74,1 | 79,7 | 70,5 | 63,1 |
| per-O-Bz- β -Galf | 99,8 | 81,0 | 77,3 | 84,2 | 70,3 | 63,5 |
| Me tetra-O-Ac- β -Galp | 101,5 | 68,5 | 70,2 | 66,8 | 70,6 | 61,0 |
| 47 Galf | 99,1 | 81,6 | 82,8 | 83,5 | 69,6# | 63,0 |
| Galp | 101,0 | 68,6 | 70,7# | 67,0 | 70,9# | 61,0 |

Las señales pueden estar intercambiadas.

Luego se analizó espectroscópicamente la fracción de R_f 0,53. El espectro de RMN ^{13}C en su zona anomérica mostró una señal a 101,0 ppm correspondiente al C-1', una señal a 93,2 ppm de baja intensidad y otra señal a 92,0 ppm que triplicaba la intensidad de la anterior. Además, las señales correspondientes a los carbonos del pivaloilo aparecían dobles (38,8 y 38,6 ppm el carbono cuaternario; 27,1 y 27,0 ppm los metilos). Se trataba, entonces de una mezcla de productos. Las señales de muy baja intensidad a $\delta > 77$ ppm (zona de resonancia de C-2 y C-4 de α -furanosas peraciladas) sugerían que el compuesto de menor proporción se encontraba en una configuración α -furanósica y podía tratarse de 2,3,4,6-tetra-O-acetil- β -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 3)-1,5,6-tri-O-acetil-2-O-pivaloil- α -D-galactofuranosa (**48**). El otro

compuesto podría estar en una configuración β -piranósica según el bajo valor del δ del C-1 pero esto debía ser confirmado por RMN ^1H . Efectivamente, en la zona de resonancia de los H anoméricos del extremo reductor (desprotegidos por encontrarse acetilados), se observaron dos dobletes en relación 1,5:4 según sus integraciones. El primero (δ 6,30) presentaba una $J_{1,2}$ 4,6 Hz y estaba de acuerdo con la configuración α -furanósica. El segundo doblete aparecía a δ 5,65 con $J_{1,2}$ 8,2 Hz que confirmaba la configuración β -piranósica. Por recristalización lenta de EtOH-H₂O, se logró aislar y caracterizar el compuesto mayoritario: 2,3,4,6-tetra-O-acetil- β -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 3)-1,5,6-tri-O-acetil-2-O-pivaloil- β -D-galactopiranososa (**49**). El espectro de RMN ^{13}C presentaba las señales anoméricas correspondientes al C-1' y C-1 a 101,0 y 92,0 ppm. Se asignaron además los C-6 y 6' (61,8 y 61,0 ppm) y el C-3 (74,6 ppm) por ser la señal más desprotegida al estar glicosidado en esta posición. El resto de las señales se encontraban muy próximas (Figura 30).

En el espectro de RMN ^1H de **49** se observaron los dobletes correspondientes al H-1 y H-1' (δ 5,65 y 5,35) cuyos altos valores de las constantes de acoplamiento ($J_{1,2}$ 8,4 Hz y $J_{1,2'}$ 7,8 Hz) confirmaban la configuración β -piranósica para las dos unidades de azúcar constituyentes de este disacárido (Figura 30).

La última fracción de R_f 0,42 resultó ser un compuesto cristalino que se caracterizó como 2,3,4,6-tetra-O-acetil- β -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 3)-1,5,6-tri-O-acetil-2-O-pivaloil- α -D-galactopiranososa (**50**). En la zona de resonancia de C anoméricos en su espectro de RMN ^{13}C se observaron las señales a 100,6 ppm correspondiente al C-1' y la señal a 89,2 ppm correspondiente al C-1 en la configuración α -piranósica. Como se observa al comparar con los derivados peracilados de galactosa, el C-1 en la configuración α -piranósica es el que resuena a campos más bajos (Tabla 7). Por comparación con peracetil- α -D-galactopiranososa y metil 2,3,4,6-tetra-O-acetil- β -D-galactopiranosido, se asignó parcialmente las señales de RMN ^{13}C de **50**: C-6 y C-6' (61,9 y 60,9 ppm), C-4 (66,5 ppm) y el grupo de señales más desprotegidas se

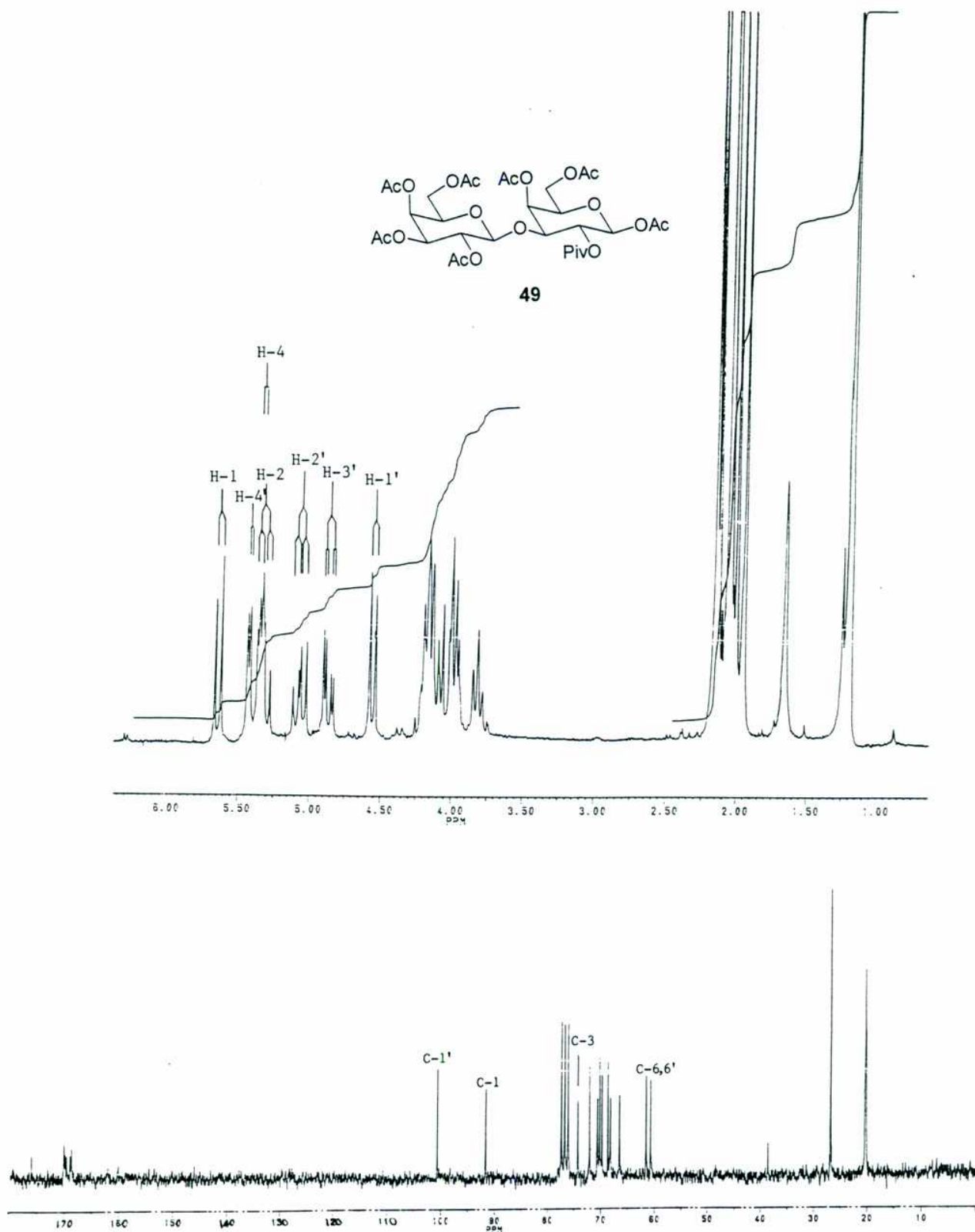


Figura 30. Espectros de RMN ^1H y ^{13}C del compuesto 49.

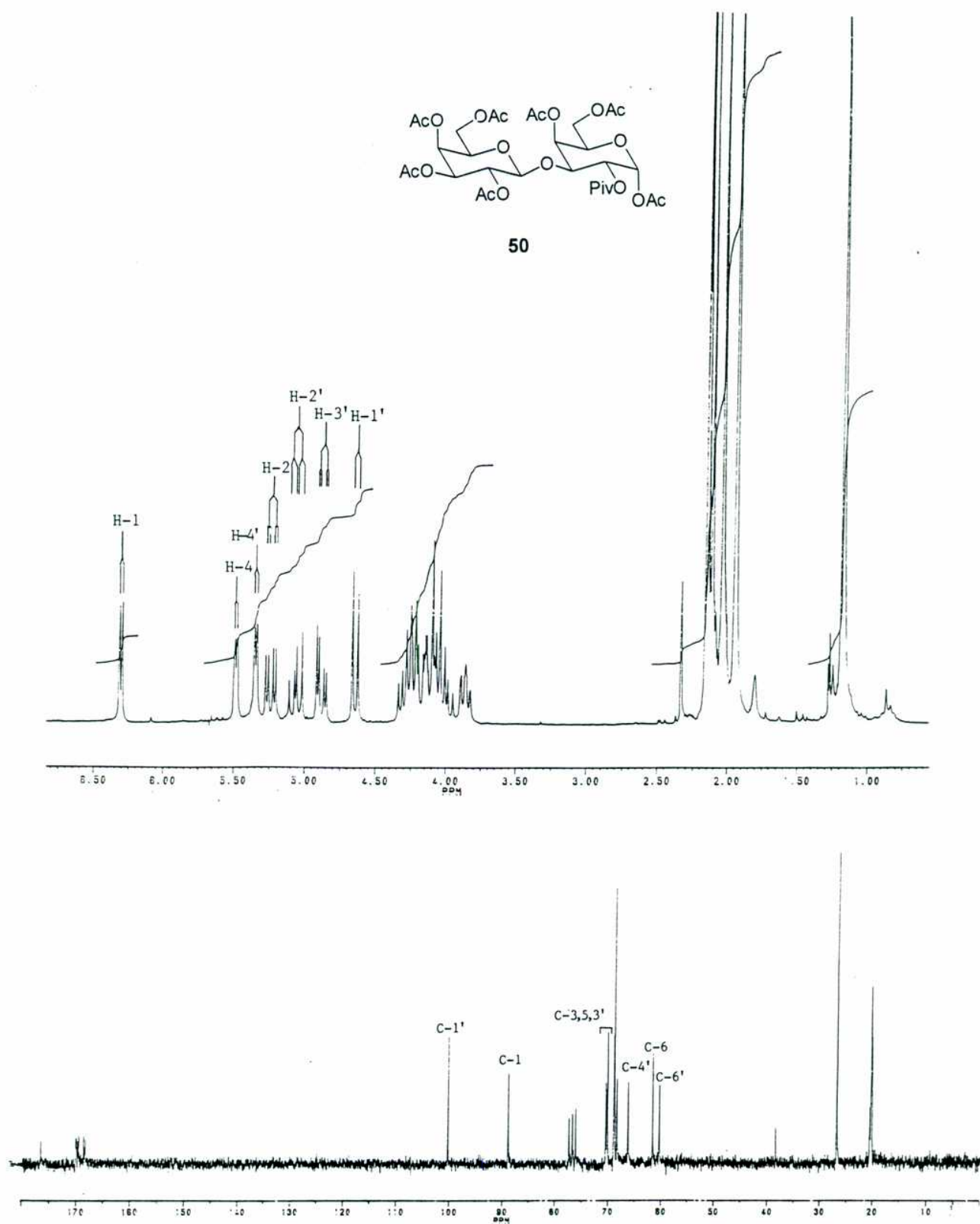


Figura 31. Espectros de RMN ^1H y ^{13}C del compuesto 50.

asignaron al C-5' y C-3' y al C-3 que es de esperar que se desplace a campos más bajos por estar glicosidado (Figura 31).

El valor de la constante de acoplamiento ($J_{1,2}$ 3,8 Hz) del H-1 (δ 6,33) en el espectro de RMN ^1H de **50** confirmó la configuración α -piranósica para el extremo reductor acetilado, consistente con la señal del H-2. El H-1' aparecía como un doblete con $J_{1',2'}$ 7,7 Hz que indicaba una configuración β -piranósica (Figura 31).

Una vez que se identificaron los compuestos de la reacción de acetilación de **46**, se procedió a calcular su composición en base a las señales de los H anoméricos del crudo de reacción. Las integrales de estas señales indicaban que la mezcla consistía en una relación 12:8:33:47 de los derivados β -furanósicos (**47**), α -furanósicos (**48**); β -piranósicos (**49**) y α -piranósicos (**50**), respectivamente.

Dado que por hidrólisis del isopropilidén de **45** y posterior acetilación se obtuvo la mezcla de disacáridos **47,48, 49** y **50** en un 80 % en favor de la configuración piranósica, esta mezcla podría utilizarse sin purificar como sintón para la introducción de β -D-Galp(1 \rightarrow 3)-D-Galp en síntesis de oligosacáridos o glicoconjugados. En particular, debido a su simplicidad, este procedimiento sería una ventaja con respecto a los métodos existentes dado que estos involucran acilaciones parciales con formación de productos de difícil separación. Por ejemplo, a partir de 1,6-anhidro-galactosa se obtienen mezclas de 2,3- y 2,4-di-O-acetil derivados. Este último es el aceptor en condensaciones de Koenigs-Knorr (Chacón-Fuentes & Martín-Lomas, 1975), en donde no se ha obtenido alta estereoselectividad en la glicosidación. Por otra parte, está descrito el uso de alil 4,6-O-bencilidén-2-O-acetil- β -D-galactopiranósido como aceptor en condensaciones de Koenigs-Knorr. Nuevamente, este aceptor se obtiene por acilación parcial del bencilidén derivado, conduciendo a mezclas de difícil separación (Lee & Lee, 1994).

Obtención de β -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 3)-D-galactitol (**51**)

Por otra parte, el compuesto **46** se redujo con NaBH_4 y por posterior agregado de NaOMe en MeOH , se obtuvo el β -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 3)-D-galactitol (**51**) como un sólido cristalino con 98 % de rendimiento (Esquema 29). En el espectro de RMN ^{13}C se observó una única señal anomérica correspondiente al C-1' de la unidad de β -D-Galp cuyo valor era idéntico al correspondiente de metil β -D-galactopiranosido y demostraba que el compuesto se había reducido totalmente. Las demás señales se asignaron por comparación con el metil β -D-galactopiranosido y galactitol teniendo en cuenta que el C-3 aparece a campos más bajos con respecto a la misma señal del galactitol por encontrarse glicosilado (Tabla 8, Figura 32). El espectro de RMN ^1H mostró en la zona anomérica, un doblete (δ 4,46) con un valor de $J_{1,2}$ 7,3 Hz que confirmaba la configuración β -piranósica de la unidad de Galp.

Esquema 29

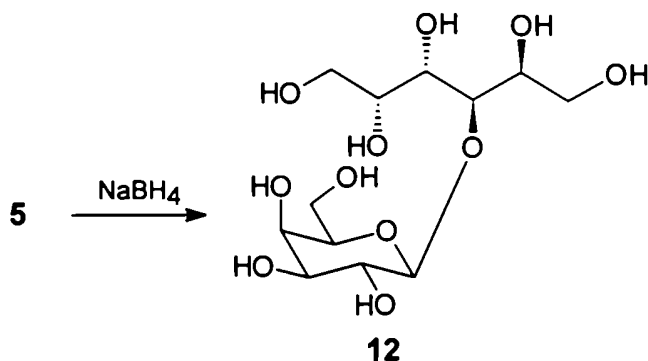
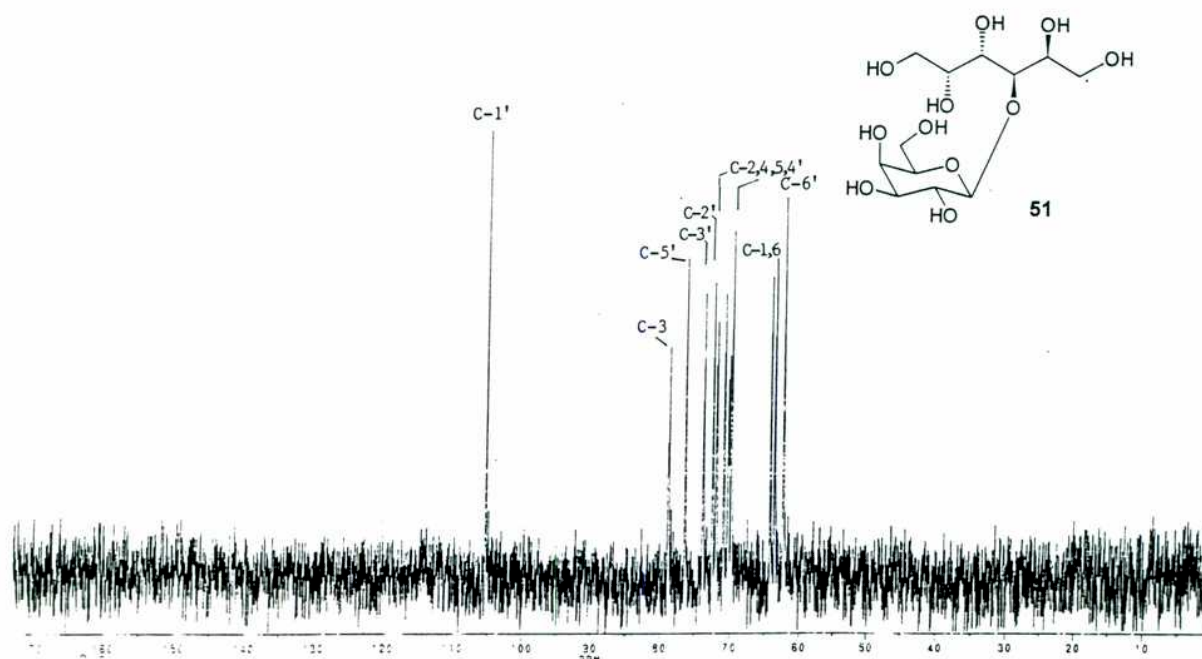


Tabla 8. Desplazamientos químicos de RMN ^{13}C de **51** (D_2O).

| | C-1 | C-2 | C-3 | C-4 | C-5 | C-6 |
|------------------|-------|-------|------|-------|-------|-------|
| Galactitol | 64,5 | 71,5 | 70,7 | 70,7 | 71,5 | 64,5 |
| Me β -Galp | 104,5 | 71,7 | 73,8 | 69,7 | 76,0 | 62,0 |
| 51 Gal-ol | 63,8* | 71,4# | 78,2 | 69,7# | 70,4# | 63,1* |
| β -Galp | 104,8 | 72,0 | 73,3 | 69,3# | 75,9 | 61,9 |

*,# Las señales pueden intercambiarse

Figura 32. Espectro de RMN ^1H del compuesto **51** (D_2O).

Síntesis del sintón de α -D-Galp-(1→3)-D-Galf

La construcción del precursor de β -D-Galp(1→3)-D-Galf, además de la importante utilidad como sintón, sirvió para adquirir experiencia en el uso de tricloroacetamidatos como activantes del C-anomérico ya que esta técnica no había sido utilizada previamente en nuestro laboratorio. En cuanto a la diastereoselectividad de la formación del enlace glicosídico en la reacción de **40** con **43**, esta debía resultar alta, pues por asistencia anquimérica se obtenía el glicósido β .

La facilidad al construir las diferentes uniones glicosídicas depende mayoritariamente de la fuerza del efecto anomérico que es mayor en los azúcares del tipo α -mano que en los del tipo α -gluco y en la posible participación del grupo protector en C-2. En la síntesis de glicósidos, la dificultad en la construcción de estos enlaces aumenta desde los azúcares del tipo α -mano, β -gluco, hacia α -gluco y finalmente β -mano.

La construcción del precursor α -D-Galp(1→3)Galf involucra la formación de un enlace de tipo α -gluco, 1,2 *cis*. Es decir, se debe elegir un derivado de galactopiranososa que posea un grupo no participante en C-2. Además, cuando se utilizan solventes no polares y bajas temperaturas, las reacciones de glicosidación utilizando el método del tricloroacetamidato, transcurren por un mecanismo del tipo S_N2 , es decir, a partir de un tricloroacetamidato de α -glicosilo se obtiene el glicósido β y viceversa (Schmidt & Kinzy, 1994).

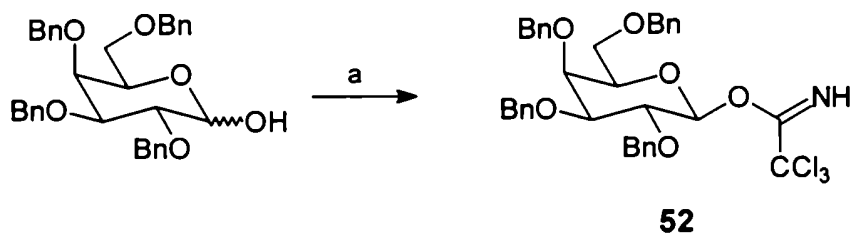
Por otra parte, el uso de ácidos fuertes como catalizadores (p.ej. triflato de trimetilsililo) a temperaturas algo mayores y en solventes más polares, conduce a la formación del producto termodinámicamente más estable, como son los glicósidos del tipo α -gluco y α -mano. Se forma un ion carbonio que, por razones

estereoelectrónicas, es atacado preferentemente por la cara axial α y conduce cinéticamente al anómero α que presenta una configuración que es también la favorecida termodinámicamente. Así, bajo condiciones de reacción del tipo S_N1 , tanto por consideraciones cinéticas como termodinámicas, se forma el glicósido del tipo α -mano o α -gluco.

En particular, la influencia del éter, a través del efecto anomérico reverso resulta en la generación de un ion oxonio ecuatorial que nuevamente favorece la formación del producto α axial más estable termodinámicamente.

Se obtuvieron buenos resultados para la construcción de la unión α -D-Galp(1 \rightarrow utilizando tricloroacetamido de O-2,3,4,6-tetra-O-bencil- β -D-galactopiranosilo (**52**) como donador y catalizada por triflato de trimetilsililo (TMSOTf) a baja temperatura (Wegman & Schmidt, 1987; Schaubach *et al.*, 1991). El precursor **52** se obtuvo siguiendo el procedimiento de Wegman & Schmidt (1987). Se trató 2,3,4,6-tetra-O-bencil-D-galactopiranososa con Cl_3CCN utilizando K_2CO_3 como base por 5 h, obteniéndose **52** con 69 % de rendimiento después de recristalización (Esquema 30).

Esquema 30



Reactivos: a) Cl_3CCN , K_2CO_3 (anh), 5 h, 69 %.

El producto de partida posee el OH anomérico libre y se encuentra en equilibrio de sus 2 configuraciones piranósicas. Sin embargo, el oxígeno ecuatorial (configuración β) es más nucleofílico favoreciendo cinéticamente la formación del β -tricloroacetamido y dado que la base utilizada no es tan fuerte, la anomerización al producto termodinámicamente más estable (α) se produce lentamente.

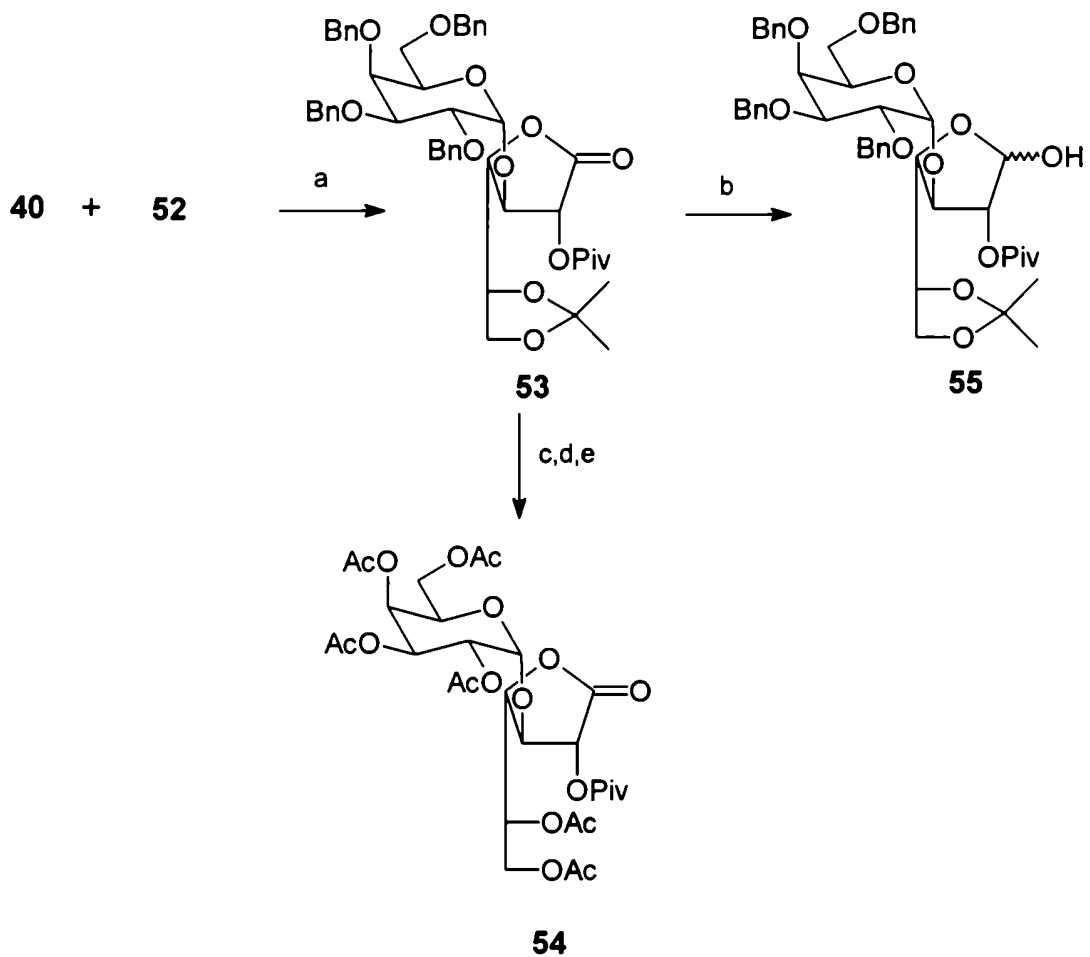
El espectro protónico de **52** resultó idéntico al descrito en literatura. En particular, el alto valor de la constante de acoplamiento de H-1 ($J_{1,2}$ 7,9 Hz) indicaba una configuración β para el centro anomérico. El espectro de RMN ^{13}C de **52**, que no se hallaba descrito, mostró dos señales a 161,5 y 98,7 ppm que correspondían al C-sp² y al C-sp³ del acetamido, respectivamente, mientras que el carbono anomérico resonaba a 82,2 ppm, confirmando que se había formado el acetamido.

*Glicosidación. Obtención de 2,3,4,6-tetra-O-bencil- α -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 3)-5,6-O-isopropilidén-2-O-pivaloil-D-galactono-1,4-lactona (**53**).*

Se ensayó, luego, la glicosidación de la lactona **40** con el β -tricloroacetamido **52** utilizando triflato de trimetilsililo como catalizador y éter como solvente a 0° C ya que a menor temperatura, precipitaban los compuestos de partida. Luego de 2 hs de reacción, se observó por ccd la aparición de un compuesto mayoritario que se aisló por cromatografía en columna como un sólido amorfo **53** con 74 % de rendimiento (Esquema 31). En su espectro de RMN ^1H se distinguieron pocas señales. El doblete a δ 5,61 correspondía a la resonancia del H-2 indicando la presencia de la unidad lactónica. Además se observaron las señales correspondientes a los grupos protectores de esta unidad. Los singletes a δ 1,47 y 1,40 que integraban ambos para 3H correspondían a los metilos no equivalentes del isopropilidén y el singlete a δ 1,26 que integraba para 9 H correspondía a los metilos del pivaloilo. Por otra parte, el multiplete en la zona aromática integraba para 20 H indicando la presencia de los cuatro grupos bencilo. Era de esperar una gran

complejidad del espectro protónico pues los 8 H sobre el C-sp³ de los bencilos resuenan superpuestos a los H del azúcar y en especial sobre el H-1' y H-2' que son las señales diagnósticas para decidir sobre la estereoselectividad de la reacción de glicosidación.

Esquema 31



Reactivos: TMSOTf, éter etílico, 0 °C, 2 h, 74 %; b) diisamiborano, 88 %; c) H₂, 10 % Pd/C, d) AcOH-H₂O, 50 °C, 20 min, e) (CH₃CO)₂O, C₅H₅N.

El uso de bencilos como grupos protectores también complica la interpretación del espectro de RMN ¹³C pues los C-sp³ de estos grupos resuenan

alrededor de 70 ppm superponiéndose con los C de los azúcares. En el espectro de RMN de ^{13}C de **53**, se distinguieron las resonancias características de los grupos protectores de la lactona que se utilizaron en este trabajo (Figura 33). Así las señales a 25,9; 25,4 y 110,2 ppm correspondían a los C del isopropilidén y las señales a 26,9; 38,6 y 176,7 ppm a los C del pivaloilo como se discutió anteriormente. Además, a 169,1 ppm resonaba el C-1 lactónico y junto con la señal a 64,9 ppm correspondiente al C-6, indicaban la presencia de la unidad lactónica. Por otra parte, en la zona aromática (δ 138,5-127,3) aparecían señales que correspondían a los C aromáticos de los bencilos de la unidad de Galp. Además el C-1' de esta unidad resonaba a 99,3 ppm y, en principio, indica una configuración α para la unidad de galactopiranosil bencilada. Los C-1 de los glicósidos de galactopiranosil bencilada en la configuración β resuenan a $\delta > 102,5$ ppm (Wegman & Schmidt, 1987). Estos datos indicaban que el compuesto **53** podría ser 2,3,4,6-tetra-O-bencil- α -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 3)-5,6-O-isopropilidén-2-O-pivaloilo-D-galactono-1,4-lactona.

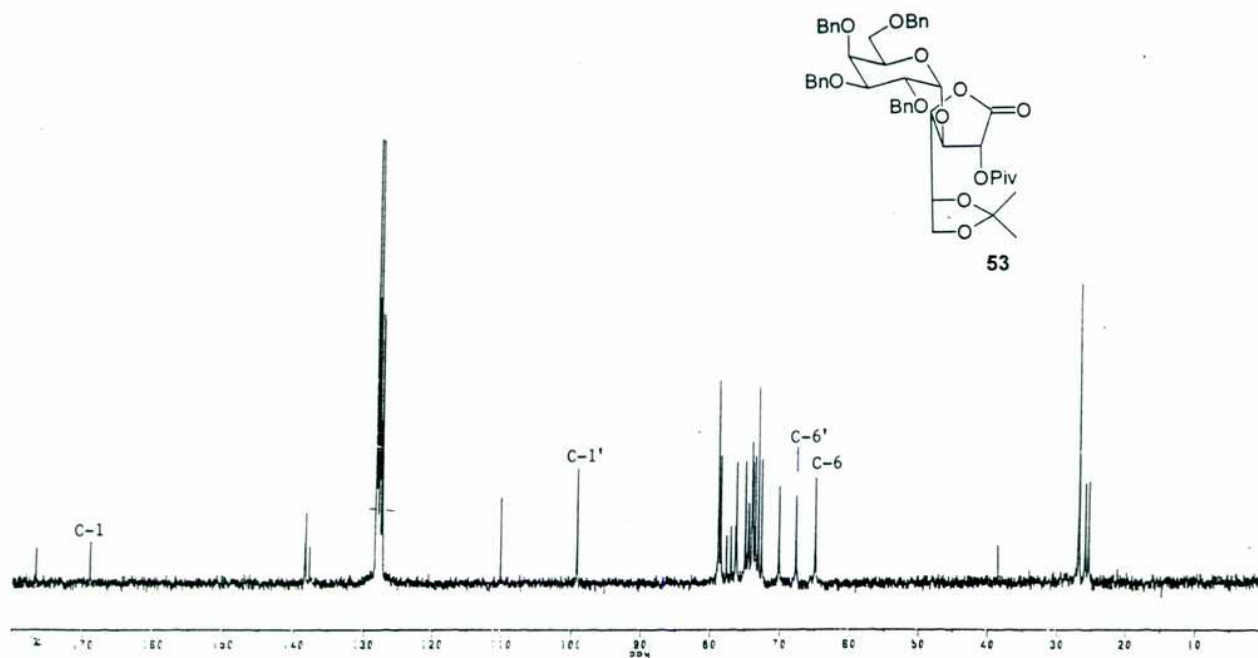


Figura 33. Espectro de RMN ^{13}C del compuesto **53**.

Sin embargo, con el fin de confirmar la configuración anomérica del disacárido lactónico, era necesario desbencilar **53** y así, en ausencia de grupos bencilos, se podrían distinguir los H-1' y H-2' en el espectro protónico. De esta manera, por hidrogenación catalítica de **53**, tratamiento con ácido acético acuoso y posterior acetilación con anhídrido acético en piridina, se obtuvo 2,3,4,6-tetra-O-acetil- α -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 3)-5,6-di-O-acetil-2-O-pivaloil-D-galactono-1,4-lactona (**54**), (Esquema 31). La ausencia de señal a ~110 ppm en el espectro de RMN ^{13}C de **54** señaló que el isopropilidén se había hidrolizado (Figura 34). El C-1' resonaba a 98,3 ppm y estaba de acuerdo con una configuración α -piranósica de la unidad de galactopiranosil acetilada. A 79,2 ppm resonaba el C-4 de la unidad lactónica y del resto de las señales, la más desprotegida (73,4 ppm) se asignó al C-3 por encontrarse glicosidado. Las señales a 61,9 y 60,7 ppm correspondían a los C-6 y 6'. Entre 68,3 y 66,9 ppm aparecían el resto de las señales, C-2 y C-5 y los C-2',3',4' y 5', estas últimas en concordancia con las mismas señales del metil 2,3,4,6-tetra-O-acetil- α -D-galactopiranosido (Tabla 9).

Tabla 9. Desplazamientos químicos de RMN ^{13}C del compuesto **54**.

| | C-1 | C-2 | C-3 | C-4 | C-5 | C-6 |
|-------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|------|
| Me tetra-O-Ac- α -Galp | 96,5 | 67,6 | 67,6 | 67,0 | 65,7 | 61,2 |
| 54 Gal-1,4-lactona | 170,3 | 68,3* | 73,4 | 79,2 | 68,1* | 61,9 |
| α -Galp | 98,3 | 67,4# | 67,7# | 67,4# | 66,9 | 60,7 |

*,# Las señales pueden intercambiarse.

Las señales de los H-1' y H-2' en el espectro de RMN¹H de **54** confirmaron inequívocamente la configuración α de la unidad de galactopiranososa (Figura 34). Así, el H-1' aparecía como un doblete (δ 5,08) con una constante de acoplamiento ($J_{1,2'}$ 3,6 Hz) que evidenciaba una disposición de hidrógenos ecuatorial-axial con el H-2' que aparecía como un doblete (δ 5,14). También se asignaron los H-4' y H-3' de esta unidad. Con respecto a la unidad lactónica, el H-2 aparecía como un doblete ($J_{1,2}$ 7,9 Hz). También se asignaron el H-4 y el multiplete característico correspondiente al H-5 que se encontraba parcialmente superpuesto con el H-3' (Tabla 10)

Tabla 10. Datos espectroscópicos de RMN ¹H del compuesto **54**.

| | H-1 ($J_{1,2}$) | H-2 ($J_{2,3}$) | H-3 ($J_{3,4}$) | H-4 ($J_{4,5}$) | H-5 ($J_{5,6b}$) | H-6a ($J_{5,6a}$) | H-6b ($J_{6a,6b}$) |
|---------------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|-----------------------|------------------------|-------------------------|
| 54 Gal-1,4-lactona | | 5,41 (7,9) | 4,29-4,17 (7,9) | 4,51 (2,7) | 5,38-5,30 (5,4) | 4,38 | 4,29-4,17 (11,6) |
| α -Galp | 5,08 (3,6) | 5,14 (10,7) | 5,30 (3,2) | 5,45 (<1) | 4,29-4,17 (7,5) | 4,07 (6,2) | 4,00 (10,9) |

Reducción de 53. Obtención del sintón de α -Galp(1 \rightarrow 3)Galf (55)

Una vez comprobada la alta diastereoselectividad de la glicosidación que condujo al disacárido lactónico α **53**, se procedió a reducir la función lactona y así obtener el sintón objeto de síntesis. Por tratamiento de **53** con diisoamilborano se obtuvo 2,3,4,6-tetra-O-bencil- α -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 3)-5,6-O-isopropilidén-2-O-pivaloil-D-galactofuranosa (**55**) como un sólido amorfo con 88 % de rendimiento (Esquema 31).

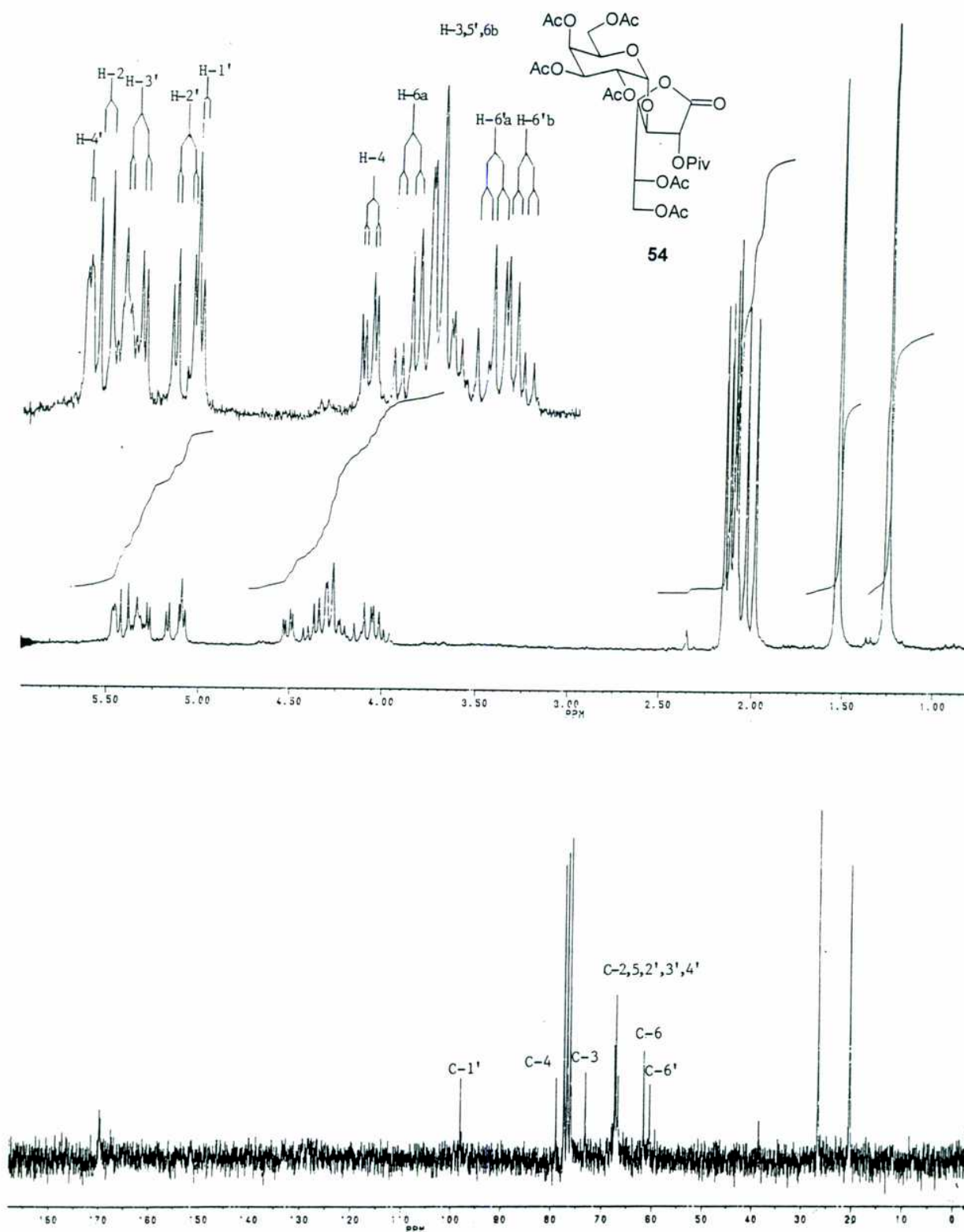


Figura 34. Espectros de RMN ^1H y ^{13}C del compuesto 54.

El espectro de RMN ^1H de **55** era muy complejo ya que se trataba de una mezcla de anómeros α,β en el extremo reductor. Con respecto a los grupos protectores, mientras que los metilos no equivalentes del isopropilidén aparecían como 2 singuletes (δ 1,45 y 1,38), la resonancia de los H de los metilos del pivaloilo aparecían como dos singuletes (δ 1,20 y 1,21) y estaba de acuerdo con la presencia de una mezcla de anómeros. Por otra parte, por agregado de D_2O , el doble doblete deformado y desprotegido (δ 5,46) se simplificaba a un doblete con $J_{1,2}$ 4,5 Hz indicando que esta señal correspondía al H-1 de la conformación α -furanósica. La señal a δ 5,23 aparecía como un singulete e indicaba que se trataba de la resonancia del H-1 en la conformación β -furanósica y esto estaba avalado por un singulete ancho contiguo a esta señal (δ 5,19) que es característico del H-2 de derivados β furanósicos. Por integración de los H anoméricos, esta mezcla se encontraba en relación aproximada 1:1 de sus anómeros α y β .

El espectro de RMN ^{13}C de **55** confirmó la presencia de una mezcla de anómeros α y β furanósicos, pues las señales de los grupos protectores aparecían dobles y también en una relación aproximada 1:1 (Figura 35). Por ejemplo, a 38,6 y 38,5 ppm resonaban los C cuaternarios del pivaloilo y a 27,0 y 27,1 ppm los C de los metilos equivalentes del pivaloilo. Los metilos del isopropilidén aparecían como cuatro señales. En la zona anomérica se observaron cuatro señales. La más desprotegida correspondía al C-1 en la configuración β -furanósica y la más protegida (δ 95,2) al C-1 en la configuración α -furanósica. Las dos señales restantes (98,1 y 97,2 ppm) se debían a las resonancias del C-1' de la unidad α -Galp bencilada. Así mismo, las señales a $\delta > 80$ ppm confirmaban la presencia de unidades furanósicas. Por ejemplo, el C-4 β resuena a 83,4 ppm y los C-2 β y C-3 β resuenan a 81,8 y 81,4 ppm, estas últimas pueden estar intercambiadas debido a su proximidad.

De esta manera, se sintetizó el sintón α -D-Galp(1 \rightarrow 3)-D-Galf (**55**) que se encuentra presente en el lipopeptidofosfoglicano (LPG, Esquema 4, Turco &

Descoteaux, 1992) y glicoinositolfosfolípidos (Esquema 5, McConville *et al.*, 1990b, McConville & Ferguson, 1993) aislados de *Leishmania*. Es interesante que en mutantes defectuosas en la introducción de Galf no se expresa el LPG. Las cepas deficientes en LPG no sobreviven en el mosquito vector ni pueden infectar a los macrófagos de los mamíferos. El compuesto **55** podría ser utilizado para la construcción de los oligosacáridos del LPG y de los GIPLs y para el estudio de su importancia en las propiedades biológicas de los glicoconjugados.

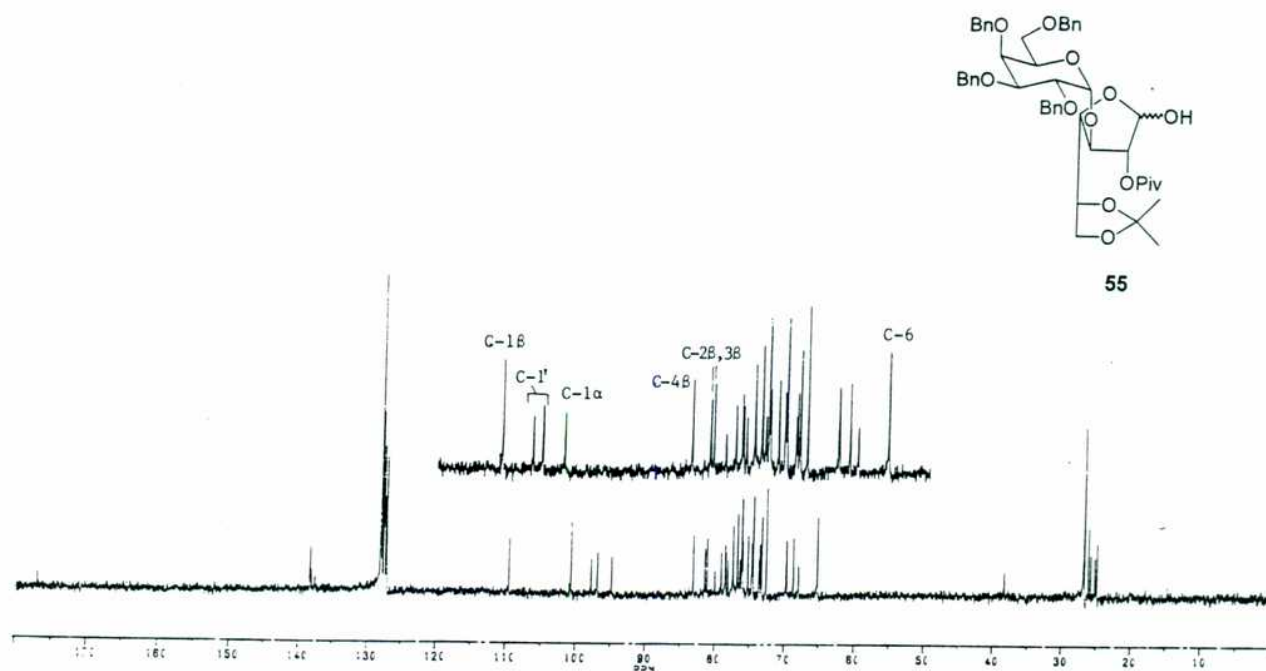


Figura 35. Espectro de RMN ^{13}C del compuesto **55**.

Síntesis de β -D-Galf(1 \rightarrow 3)-D-Gal-1,4-lactona, precursor del sintón de β -D-Galf(1 \rightarrow 3)-D-Galf.

La obtención de disacárido lactónico **44** (Esquema 27) no se pudo realizar utilizando SnCl_4 como promotor pues en el caso de los azúcares piranósicos la activación por formación del oxonio es mucho más lenta que en el caso de los azúcares furanósicos, y se produce la eliminación del grupo isopropilidén antes que tenga lugar la condensación en O-3. Por esta razón, se obtienen mezclas difíciles de separar y tuvo que llevarse a cabo la condensación por el método de tricloroacetamidato. Sin embargo, la condensación del perbenzoato furanósico **5** con el mismo derivado **40** en presencia de SnCl_4 tuvo lugar exitosamente como se describe a continuación.

*Obtención de 2,3,5,6-tetra-O-benzoil- β -D-galactofuranosil-(1 \rightarrow 3)-2-O-pivaloil-D-galactono-1,4-lactona (**56**)*

Cuando se trató el derivado de D-galactono-1,4-lactona **40** con 1,2 equivalentes de penta-O-benzoil- α,β -galactofuranosa (**5**) en presencia de SnCl_4 a 0 °C, al cabo de 6 h de reacción se observó por ccd una mancha principal de mucha menor movilidad que la lactona de partida y que además revelaba al UV. Este hecho sugería que si la glicosidación había ocurrido, el isopropilidén había sido removido, pues el compuesto por ser más polar que **40** debería tener al menos algún OH libre más. Luego de cromatografía en columna, se aisló el compuesto **56** cristalino con 58 % de rendimiento y cuya estructura se determinó por espectroscopía y protección del mismo como se verá a continuación (Esquema 32).

El espectro de RMN ^{13}C de **56** mostró la ausencia de señal característica de isopropilidén, es decir ~ 110 ppm para el C cuaternario y 2 señales para los metilos no equivalentes (Figura 36). Sin embargo, se observaban las resonancias

correspondientes a los C del pivaloilo y benzoilos. En la zona entre 60 y 110, se encontraban 11 señales que correspondían al esqueleto del disacárido lactónico formado y el C-1 de la lactona aparecía a 168,7 ppm. En la zona anomérica, aparecía una señal a 105,7 ppm que correspondía al C-1' y demostraba que la glicosidación había sido β -diastereoselectiva. Además, las señales a 82,4 y 82,2 ppm eran características de los C-4' y C-2' de β -furanósidos y la señal a 79,9 ppm se debía a la resonancia del C-4 lactónico. Los C-6 y 6' resonaban a 63,1 y 63,3 y podrían estar intercambiados (Tabla 12). Este espectro no daba información directa sobre el lugar donde había ocurrido la glicosidación.

El espectro de RMN ^1H de **56**, también confirmó la ausencia de isopropilidén y además mostraba un singulete ancho que integraba para 2 H y correspondía a 2 OH libres (Figura 37). El H-2 aparecía como un doblete a δ 5,64 ($J_{1,2}$ 7,9 Hz). La señal correspondiente al H-1' aparecía como un singulete ancho y el H-2' aparecía como un doblete con J pequeña ($J_{2,3} < 1\text{Hz}$) confirmando la configuración β -furanosica del disacárido lactónico (Tabla 11). Las resonancias de los H-6a y 6b y H-5 aparecían a campos altos (δ 3,80; 3,73 y 4,02, respectivamente) y sugería que tanto el OH-5 como el OH-6 de la unidad lactónica se encontrarían libres. Sin embargo esto debía ser confirmado.

Tabla 11. Datos espectroscópicos de RMN ^1H del compuesto **56**.

| | H-1 ($J_{1,2}$) | H-2 ($J_{2,3}$) | H-3 ($J_{3,4}$) | H-4 ($J_{4,5}$) | H-5 ($J_{5,6b}$) | H-6a ($J_{5,6a}$) | H-6b ($J_{6a,6b}$) |
|---------------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|-----------------------|------------------------|-------------------------|
| 56 Gal-1,4-lactona | | 5,64 (7,9) | 4,96 (7,4) | 4,48 (2,6) | 4,02 (5,6) | 3,80 (6,2) | 3,73 (11,3) |
| β -Galf | 5,44 | 5,49 (1,4) | 5,67 (5,2) | 4,75-4,60 | 6,01 (6,3) | 4,82 (4,6) | 4,70 (11,9) |

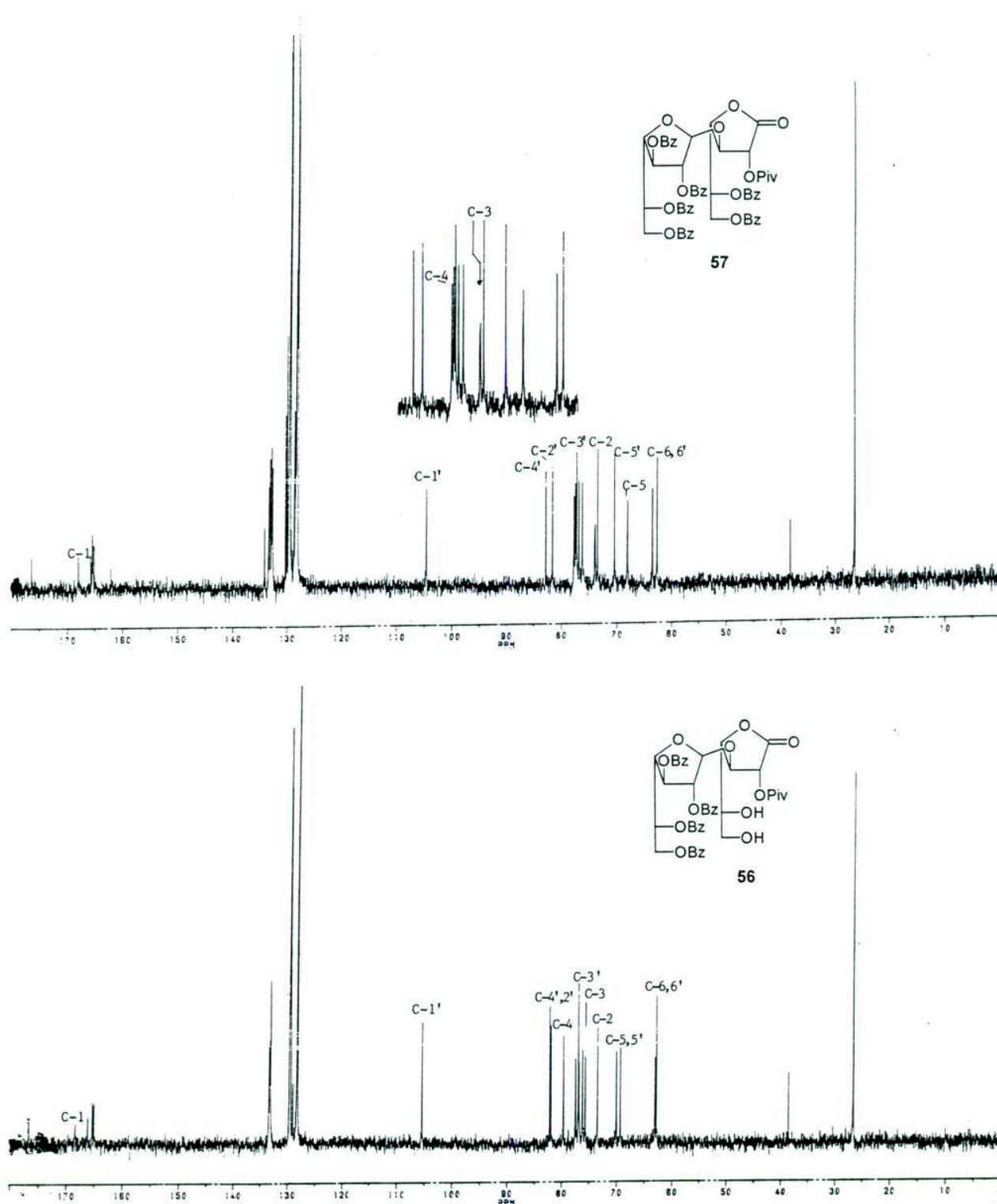


Figura 36. Espectros de RMN ^{13}C de los compuestos 56 y 57.

Los datos indicaban que el aceptor **40** había sido glicosidado y que el isopropilidén había sido removido. Si la glicosidación ocurrió después de la remoción del isopropilidén, se obtendría un disacárido con unión β (1 \rightarrow 6), pues al encontrarse libres los OH 3, 5 y 6 de la lactona, el OH-6 sería glicosilado preferencialmente por ser primario. En cambio, si la glicosidación es el primer paso de reacción y luego se remueve el isopropilidén, entonces se obtendría 2,3,5,6-tetra-O-benzoil- β -D-galactofuranosil-(1 \rightarrow 3)-2-O-pivaloil-D-galactono-1,4-lactona como producto.

Con el fin de identificar el compuesto **56** obtenido, se lo benzoiló con un exceso de cloruro de benzoílo en piridina, a baja temperatura para evitar posible descomposición del producto por β -eliminación. De esta manera, se obtuvo el compuesto **57** cristalino con 99 % de rendimiento (Esquema 32).

El espectro de RMN ^1H de **57** (Figura 37) mostró señales en la zona aromática que integraban para 30 H, indicando que el compuesto de partida **56**, que presentaba 2 OH libres, se había benzoilado totalmente. Por otra parte, las señales correspondientes a H-6a y H-6b se habían desplazado a campos más bajos (\sim 0,9 ppm) respecto de las mismas señales de **56**. Lo mismo ocurrió con la señal correspondiente al H-5 que se desplazó a campos más bajos (\sim 1,7ppm). Estos dos hechos confirmaron unívocamente que tanto el OH-6 como el OH-5 se habían benzoilado, por lo tanto en el compuesto de partida **56** se encontraban libres, o sea se trataba de 2,3,5,6-tetra-O-benzoil- β -D-galactofuranosil-(1 \rightarrow 3)-2-O-pivaloil-D-galactono-1,4-lactona (**56**). El compuesto **57** se identificó como 2,3,5,6-tetra-O-benzoil- β -D-galactofuranosil-(1 \rightarrow 3)-5,6-di-O-benzoil-2-O-pivaloil-D-galactono-1,4-lactona.

Es decir, por tratamiento de **40** con **5** en presencia de SnCl_4 , primero ocurre la glicosidación y luego la remoción del isopropilidén. Este método resulta muy interesante, pues se obtiene este precursor de un sintón de β -D-Galf(1 \rightarrow 3)-D-Galf que a su vez, al poseer la lactona el OH-6 libre, sirve como aceptor para una

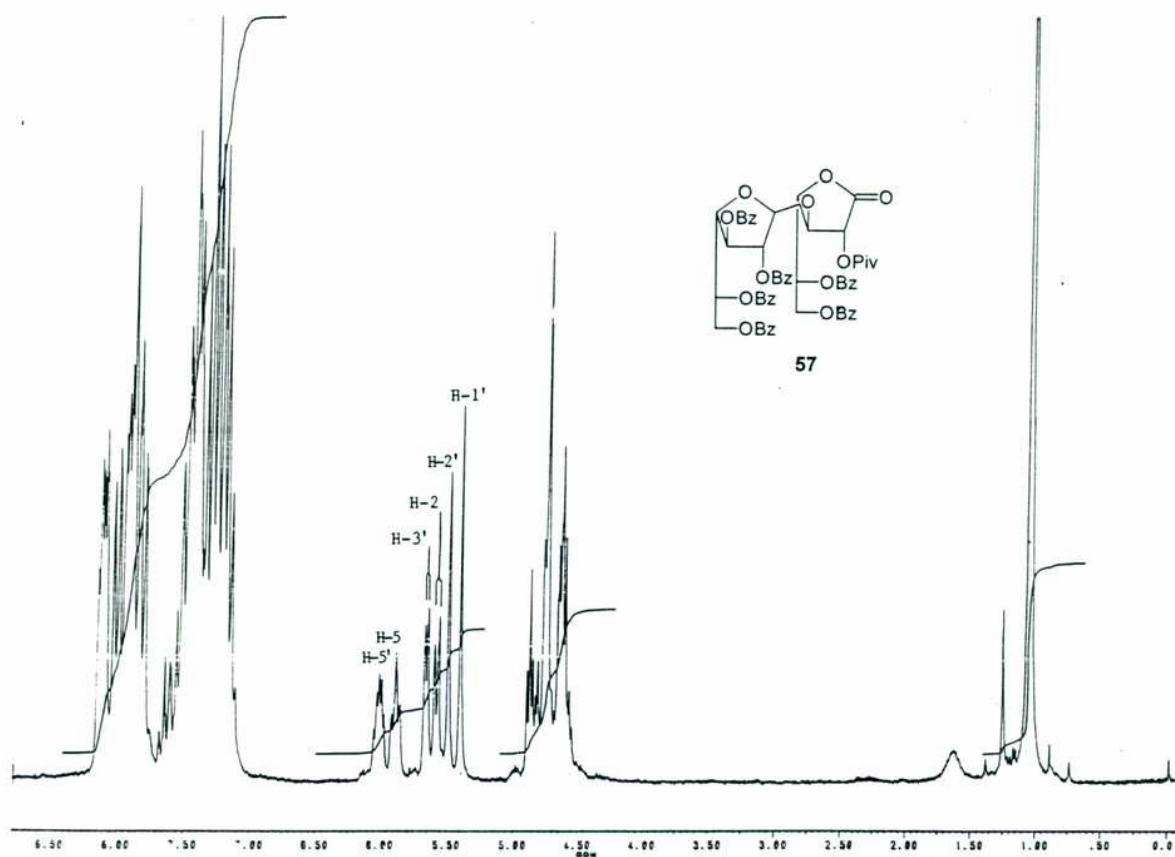
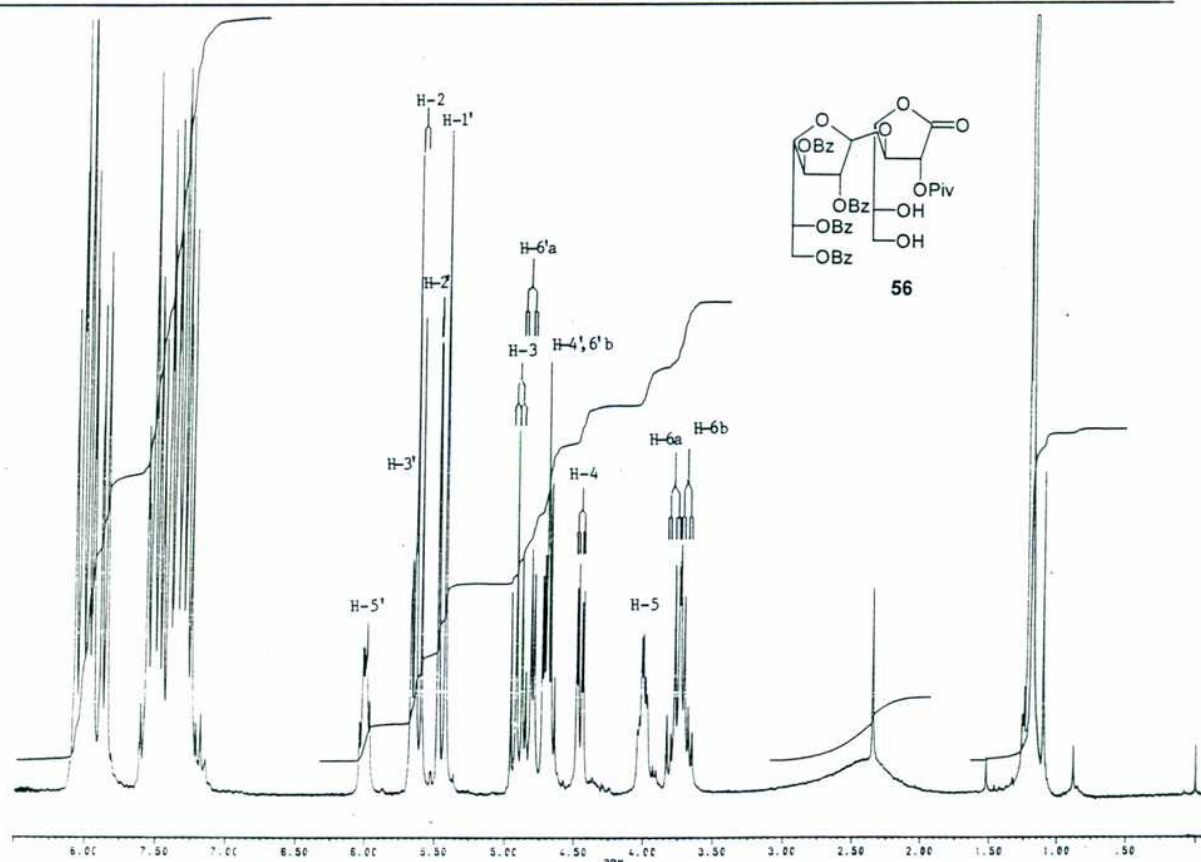


Figura 37. Espectros de RMN ^1H de los compuestos 56 y 57.

posterior glicosidación. Es decir, que podría transformarse en β Galf(1 \rightarrow 3)[R(1 \rightarrow 6)]Galf, siendo R cualquier unidad de azúcar. Si el OH-5 restante estuviera libre, la reducción de la lactona al azúcar correspondiente conduciría a una galactopiranososa en el extremo reductor del trisacárido, mientras que si el OH-5 estuviera protegido, la reducción de la lactona conduciría a una galactofuranosa en el extremo reductor del trisacárido.

Los espectros de RMN de ^{13}C de **56** y **57** se asignaron por comparación con los de metil 2,3,5,6-tetra-O-benzoil- β -D-galactofuranósido y de la galactono-1,4-lactona perpivaloilada **31** (Tabla 12).

Tabla 12. Desplazamientos químicos de RMN ^{13}C de los compuestos **56** y **57**.

| | | C-1 | C-2 | C-3 | C-4 | C-5 | C-6 |
|-----------|-----------------|-------|-------|------|-------|-------|--------|
| 56 | Gal-1,4-lactona | 168,7 | 73,7 | 75,9 | 79,9 | 69,6* | 63,3** |
| | β -Galf | 105,7 | 82,2# | 77,2 | 82,4# | 70,3* | 63,1** |
| 57 | Gal-1,4-lactona | 168,2 | 73,7 | 74,1 | 77,9 | 68,3 | 63,8* |
| | β -Galf | 107,6 | 81,8 | 77,4 | 83,1 | 70,7 | 62,9* |

*,# Las señales pueden intercambiarse.

Obtención de β -D-galactofuranosil-(1 \rightarrow 3)-D-galactitol (**58**)

Por tratamiento de **56** con NaBH_4 y posterior agregado de NaOMe en MeOH, se obtuvo β -D-galactofuranosil-(1 \rightarrow 3)-D-galactitol (**58**) como un sólido cristalino con 95 % de rendimiento (Esquema 32). La zona anomérica del espectro de RMN ^1H de **58** mostró un singulete ancho (δ 5,02) que correspondía a la resonancia del H-1 en la configuración β -furanósica. Esto también se confirmó según el espectro de RMN ^{13}C

en donde el C-1' resonaba a 109,8 ppm, característico de esta configuración. El resto de las señales se asignaron por comparación con el metil β -D-galactofuranósido y galactitol teniendo en cuenta que el C-3 de este último se desplazó a campos bajos por encontrarse glicosidado (Figura 38, Tabla 13).

Tabla 13. Desplazamientos químicos de RMN ^{13}C del compuesto **58** (D_2O).

| | C-1 | C-2 | C-3 | C-4 | C-5 | C-6 |
|------------------|-------|-------|------|-------|-------|-------|
| Galactitol | 64,5 | 71,5 | 70,7 | 70,7 | 71,5 | 64,5 |
| Me β -Galf | 109,0 | 81,6 | 77,5 | 83,8 | 71,8 | 63,6 |
| 58 Gal-ol | 63,3* | 71,3# | 78,5 | 70,8# | 69,9# | 63,5* |
| β -Galf | 109,8 | 81,9 | 76,8 | 83,5 | 71,4# | 63,9* |

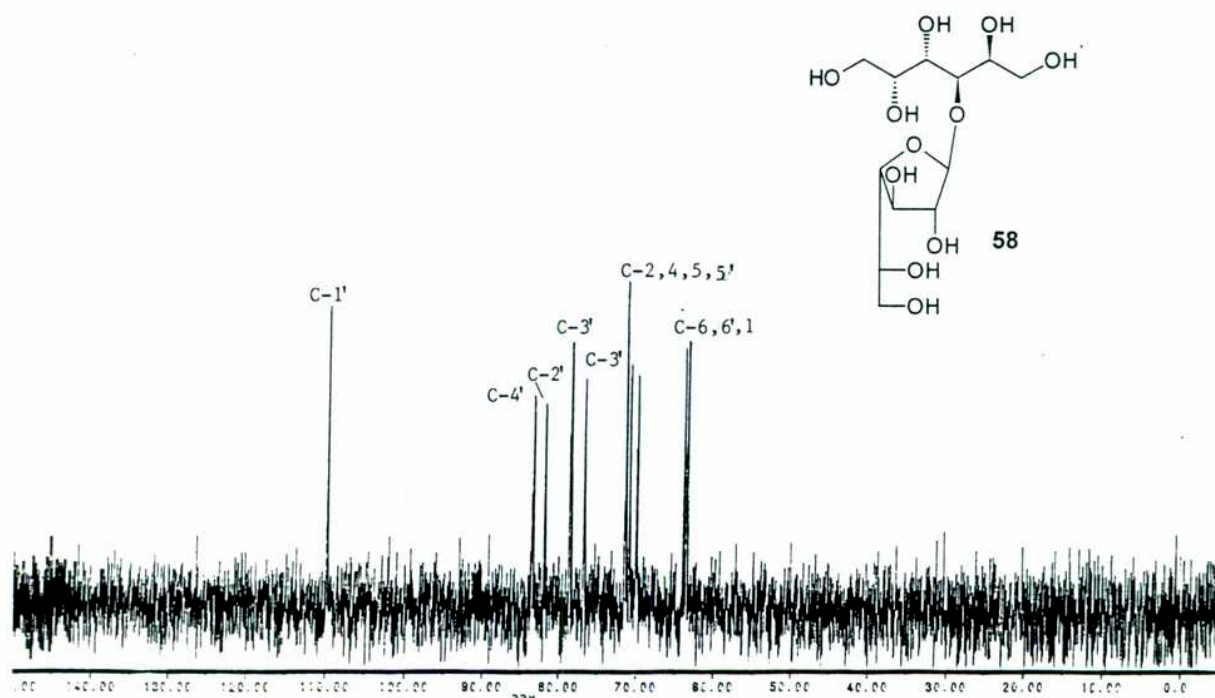
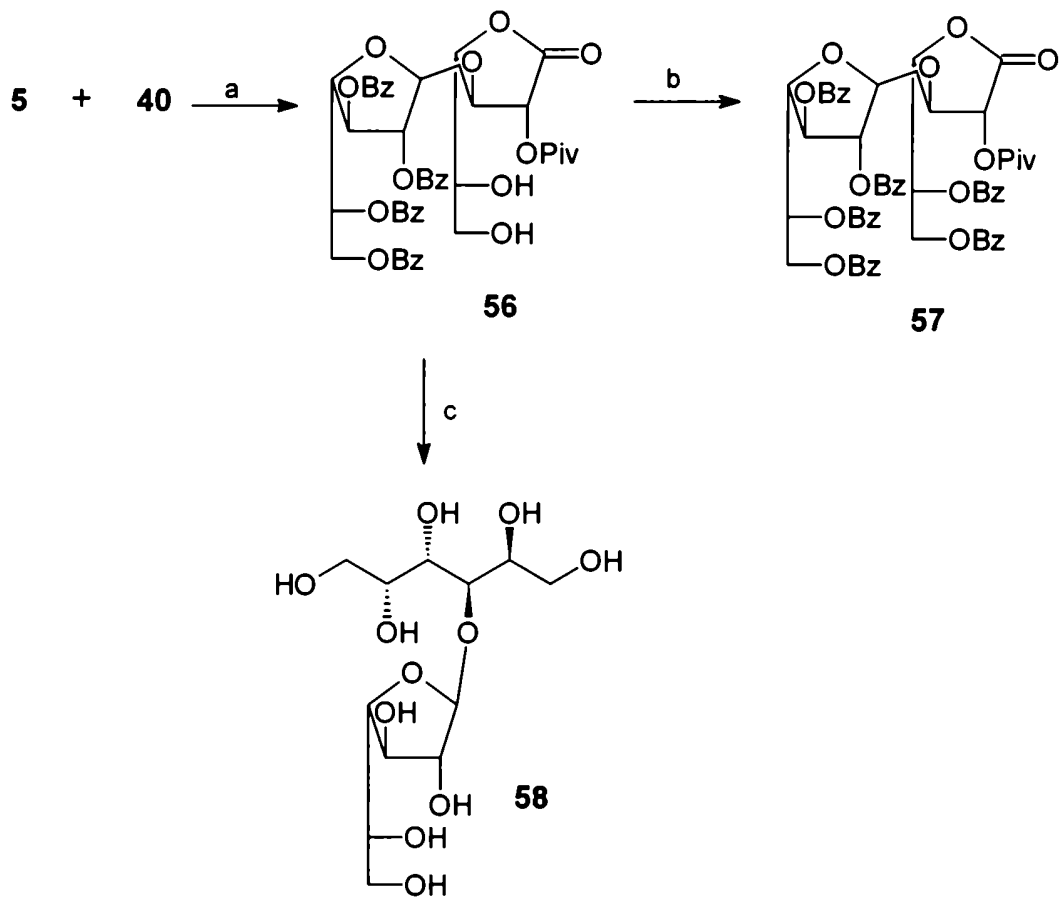


Figura 38. Espectro de RMN ^{13}C del compuesto **58**.

Esquema 32



Reactivos: a) SnCl_4 , Cl_2CH_2 , 6 h, 58 %; b) $\text{C}_6\text{H}_5\text{COCl}$, $\text{C}_5\text{H}_5\text{N}$, 99 %; c) NaBH_4 , NaOMe , 95 %.

PARTE EXPERIMENTAL

CAPÍTULO 7

Instrumental y Métodos Generales

Los puntos de fusión (pf) se determinaron en aparatos Thomas-Hoover o Fisher-Johns y no están corregidos.

Los poderes rotatorios se determinaron en polarímetros Perkin-Elmer 141 o Perkin-Elmer 343 en microceldas de 1 dm de longitud a temperatura ambiente, utilizando el solvente y la concentración que se indican en cada caso.

Los espectros de resonancia magnética nuclear protónica (RMN ^1H) se realizaron utilizando espectrómetros Varian XL-100, Bruker AC 200 o Varian 300 Gemini; a 100, 200 o 300 MHz, respectivamente. Las constantes de acoplamiento aparentes (expresadas en Hz) se determinaron por medición directa de la separación de las líneas en el espectro de RMN ^1H . Los espectros de resonancia magnética nuclear de carbono 13 (RMN ^{13}C) se realizaron en equipos Varian XL-100 ó Bruker AC 200, a 25,2 y 50,3 MHz respectivamente, y se adquirieron por desacoplamiento de banda ancha. Los desplazamientos químicos (δ) se expresan en partes por millón (ppm) respecto del tetrametilsilano (TMS). Los espectros se realizaron en Cl_3CD salvo que se indique lo contrario. Los espectros de RMN ^1H y RMN ^{13}C presentados se realizaron a 200 y 50,3 MHz a menos que se indique de otra manera.

En algunos casos, la asignación de los de ^{13}C o espectros protónicos de los compuestos se realizó utilizando una combinación de técnicas mono y bidimensionales, como ser experimentos de correlación correlación heteronuclear (HETCOSY) y/o homonuclear (COSY-45) (Sanders & Hunter, 1993).

Las cromatografías en placa delgada (ccd) se realizaron sobre placas de aluminio cubiertas de sílica gel 60 F254 (Merck) de 0,2 mm de espesor. Las manchas se revelaron por iluminación con luz ultravioleta de 254 nm y/o inmersión

en una solución de H₂SO₄ 5%-anisaldehído 0,01% en EtOH y posterior calentamiento a 150 °C. Los solventes de desarrollo se indican en cada caso.

Las cromatografías en columna se realizaron sobre sílica gel 60 Å, malla 200-400 (Aldrich) y los solventes de elución se indican en cada caso.

Reactivos Generales

Tetracloruro de estaño (SnCl₄): Se destiló a presión reducida sobre granallas de Sn°.

Borano (BH₃.THF): Se preparó según la técnica descrita por Brown (1974). A una mezcla de borohidruro de sodio (NaBH₄, 14,82 g; 0,391 mol) y de bis(2-metoxietil)éter (diglima, 120 ml) en un balón de tres bocas, se agregó lentamente desde una ampolla de compensación trifluoruro de boro-etil eterato (62 ml; 0,512 mol) a temperatura ambiente y con agitación. El agregado duró 2 h y se realizó bajo corriente de nitrógeno, purificado previamente por pasaje sucesivo a través de solución alcalina de pirogalol, hidróxido de potasio, ácido sulfúrico concentrado, hidróxido de potasio y una columna de tamices moleculares de 3 Å.

El diborano generado, arrastrado por el nitrógeno, se burbujeó a través de una solución diluida de NaBH₄ (0,4 g) en bis(2-metoxietil)éter (12 ml) para eliminar el trifluoruro de boro contaminante y se recogió sobre 180 ml de THF enfriado a -20°C. Una vez finalizado el agregado de trifluoruro de boro, el balón se calentó a 60°C durante 1 h para arrastrar el diborano residual.

Para determinar la molaridad de la solución resultante, se tomó 1,0 ml de la solución en 10 ml de acetona, se agregaron 10 ml de H₂O y 0,7 g de manitol. La solución se tituló con hidróxido de sodio 0,1 M valorado usando fenolftaleína como

indicador. La concentración de la solución de borano obtenido varió entre 2 y 3,7 M en distintas preparaciones.

Bis(2-butil-3-metil)borano (disiamilborano): Se preparó según la técnica descrita (Kohn & al, 1965).

En un balón seco se colocó 2-metil-2-buteno (2 equivalentes) bajo atmósfera de nitrógeno y se enfrió en baño de hielo-sal entre -10 y -20 °C. Se agregó lentamente y con agitación una solución valorada de borano en THF (1 equivalente). Una vez finalizado el agregado, la mezcla se agitó por 6 h a 0°C y se empleó para reducir el compuesto indicado en cada caso particular.

Trifluoruro de boro-etil eterato: Se agregó éter etílico y se destiló a presión reducida sobre hidruro de calcio.

N-benzoilimidazol: Se preparó según la técnica descrita (Staab, 1962). Se disolvió imidazol (2 equivalentes) en cloroformo secado sobre alúmina y se agregó lentamente cloruro de benzoilo (1 equivalente). La suspensión resultante se filtró, y el filtrado se concentró a presión reducida. El residuo se disolvió en acetonitrilo y se utilizó crudo en la reacción de benzoilación selectiva.

Tricloroacetoneitrilo (Cl₃CCN): Se secó por reflujo sobre P₂O₅ y destilación.

Purificación de solventes

Todos los solventes se purificaron por destilación. En algunos casos requirieron un tratamiento adicional para poder emplearlos en reacciones determinadas.

Diclorometano (CH₂Cl₂): Se secó por reflujo sobre P₂O₅ y destilación. Se guardó sobre tamices moleculares de 4 Å.

Acetonitrilo (CH₃CN): Se secó por reflujo sobre P₂O₅ y destilación. Se guardó sobre tamices moleculares de 4 Å.

Piridina (C₅H₅N): Se reflujo sobre KOH y se destiló, conservándola sobre KOH.

Metanol (CH₃OH): Se secó por reflujo sobre torneaduras de magnesio, se destiló y se guardó sobre tamices moleculares de 4 Å.

Eter etílico, bis(2metoxietil)éter (diglima) y tetrahidrofurano (THF): Se pasaron por alúmina, se secaron y se liberaron de oxígeno por reflujo sobre sodio-benzofenona bajo atmósfera de nitrógeno purificado, y luego se destilaron de la solución azul, momentos antes de ser empleados

Bencil 2-acetamido-2-desoxi- α -D-glucopiranosido (2)

Se procedió según la técnica de Kuhn y Baer (1958) con ligeras modificaciones.

A una mezcla de *N*-acetilglucosamina (10,0 g; 45,2 mmol) en alcohol bencílico (40 ml) enfriada a -12 °C en baño de hielo-sal, se burbujeó HCl gaseoso por 20 min. La suspensión se calentó por 30 min a 140-150 °C hasta desaparición del compuesto de partida (R_f 0,26 y 0,32; AcOEt-EtOH-H₂O-NH₄OH 7:2:1:0,5). La solución marrón oscuro se enfrió y se agregó éter etílico (200 ml) lentamente y con agitación. El sólido formado se filtró, se secó y posteriormente se recristalizó de EtOH (60 ml) para obtener **2** (6,1 g; 43 %). R_f 0,66 (AcOEt-EtOH-H₂O-NH₄OH 7:2:1:0,5); pf 182-184 °C (EtOH), lit.183-184 °C (Kuhn & Baer, 1958); $[\alpha]_D$ 168,6° (c 1, H₂O), lit.168,5° (Kuhn & Baer, 1958).

RMN ¹H (D₂O): región anomérica δ 4,86 (d, 1H, $J_{1,2} = 3,3$ Hz, H-1).

RMN ¹³C (D₂O): δ 175,1 (CONH); 137,9; 129,6-129,2 (aromáticos); 96,7 (C-1); 72,9 (C-5); 71,7 (C-3); 70,9; 70,5 (C-4, CH₂); 61,4 (C-6); 54,5 (C-2); 22,7 (CH₃).

Bencil 2-acetamido-3,6-di-O-benzoil-2-desoxi- α -D-glucopiranosido (3).

A una suspensión de bencil 2-acetamido-2-desoxi- α -D-glucopiranosido (**2**; 1,5 g; 4,8 mmol) en acetonitrilo anhidro (38 ml) a reflujo, se agregó una solución de *N*-benzoilimidazol (2 g; 11,5 mmol) en acetonitrilo anhidro (10 ml) y se continuó el calentamiento por 17 h. La solución resultante se enfrió a temperatura ambiente, se agregó H₂O (1 ml) y se agitó durante 0,5 h. El solvente se evaporó al vacío y el residuo se lavó con agua fría por decantación (2 x 15 ml) y luego se disolvió en Cl₂CH₂ (100 ml). La solución se extrajo con HCl 5 %, NaCl (sol.sat.), NaHCO₃ (sol.

sat.), H₂O, se secó (MgSO₄) y concentró. El residuo obtenido se purificó por cromatografía en columna (sílica gel) eluyendo con una mezcla de hexano-EtOAc 2:1. El compuesto de mayor movilidad (R_f 0,48; tolueno-EtAcO 2:1) se identificó como bencil 2-acetamido-3,4,6-tri-O-benzoil-2-desoxi- α -D-glucopiranosido (**4**; 0,28 g; 9,4%), el cual se recristalizó de EtOH: pf 159-160 °C, $[\alpha]_D +61^\circ$ (c 1, CHCl₃).

RMN ¹H: δ 8,15-7,25 (m, 20H), 5,91 (d, 1H, $J_{NH,2} = 9,2$ Hz, NH), 5,81-5,71 (m, 2H, H-3, H-4), 5,10 (d, 1H, $J_{1,2} = 3,4$ Hz, H-1), 4,85 (d, 1H, $J_{gem} = 11,7$ Hz, PhCHH), 4,64-4,62 (m, 5H, H-2,5,6,6', PhCHH), 1,85 (s, 3H, CH₃) (Figura 1).

RMN ¹³C: Tabla 1, Figura 3

Anal. Calculado C₃₆H₃₃NO₉: %C 69,32; %H 5,34; %N 2,25. Encontrado: %C 69,01; %H 5,21; %N 2,16.

La siguiente fracción de la columna (R_f 0,35; tolueno-EtAcO 2:1) condujo al compuesto **3** (1,70 g; 70,3 %) como un sólido amorfo: $[\alpha]_D +120^\circ$ (c 1, CHCl₃).

RMN ¹H : δ 8,15-7,25 (m, 15H), 5,85 (d, 1H, $J_{NH,2} = 9,6$ Hz, NH), 5,39 (dd, 1H, $J_{3,4} = 9,1$ Hz, H-3), 4,98 (d, 1H, $J_{1,2} = 3,6$ Hz, H-1), 4,78 (d, 1H, $J = 11,8$ Hz, PhCHH), 4,75 (dd, 1H, $J_{6,6'} = 12,2$ Hz, H-6), 4,54 (d, 1H, $J = 11,8$ Hz, PhCHH), 4,50 (dd, 1H, $J_{5,6'} = 2,1$ Hz, H-6'), 4,47 (ddd, 1H, $J_{2,3} = 10,7$ Hz, H-2), 4,07 (ddd, 1H, $J_{5,6} = 4,2$ Hz, H-5), 3,85 (ddd, 1H, $J_{4,5} = 9,8$ Hz, H-4), 3,38 (d, 1H, $J_{OH,4} = 4,4$ Hz, OH), 1,79 (s, 3H, CH₃) (Figura 1).

RMN ¹³C : Tabla 1, Figura 3.

Anal. Calculado C₂₉H₂₉NO₈: %C 67,03; %H 5,63; %N 2,70. Encontrado: %C 67,08; %H 5,56; %N 2,47.

1,2,3,5,6-Penta-O-benzoil- α,β -D-galactofuranosa (5) y 1,2,3,4,6-penta-O-benzoil- β -D-galactopiranososa (15).

Una suspensión de D-galactosa (5 g; 0,028 mol) en piridina anhidra (70 ml) se calentó en un baño de agua hirviendo por 2 h bajo exclusión de humedad. La mezcla se enfrió a 60 °C y se agregó lentamente cloruro de benzoilo (20 ml; 0,17 mol). Luego de agitar a 60 °C por 1,5 h, se agregó H₂O (10 ml) y la agitación se continuó por 0,5 h a temperatura ambiente. La solución se vertió lentamente y con agitación sobre un baño de agua-hielo (500 g) para obtener un sólido amorfo. El líquido se decantó y el sólido remanente se lavó 5 veces con H₂O. El producto se disolvió en EtOH hirviendo (800 ml) y se dejó cristalizar lentamente a temperatura ambiente. Después de dos días, se filtró la solución obteniéndose cristales de 1,2,3,5,6-penta-O-benzoil- α,β -D-galactofuranosa (**5**; 6,4 g; 34 %; R_f 0,60 y 0,54 tolueno-EtOAc 9:1). Las aguas madres se dejaron a temperatura ambiente por 10 días y se filtró una segunda cosecha de cristales de un compuesto puro que fue caracterizado como 1,2,3,4,6-penta-O-benzoil- β -D-galactopiranososa (**15**; 7,2 g; 37 %; R_f 0,58 tolueno-EtOAc 9:1). Pf 129-131 °C (EtOH); $[\alpha]_D +89,8^\circ$ (c 1, CHCl₃).

RMN ¹H: δ 8,15-7,15 (m, 25H), 6,33 (d, 1H, $J_{1,2} = 8,3$ Hz, H-1), 6,12 (dd, 1H, $J_{2,3} = 10,2$ Hz, H-2), 6,11 (d, 1H, $J_{3,4} = 3,4$ Hz, H-4), 5,82 (dd, 1H, H-3), 4,69 (dd, 1H, $J_{6,6'} = 9,4$ Hz, $J_{6,5} = 6,0$ Hz, H-6), 4,52-4,68 (m, 1H, H-5), 4,47 (dd, 1H, $J = J_{6',5} = 5,1$ Hz, H-6'), Figura 9.

RMN ¹³C: Tabla 2, Figura 9.

Anal. Calculado para C₄₁H₃₂NO₁₁: %C 70,28; %H 4,57. Encontrado: %C 70,15; %H 4,70.

Bencil (2,3,5,6-tetra-O-benzoil-β-D-galactofuranosil)-(1→4)-2-acetamido-3,6-di-O-benzoil-2-desoxi-α-D-glucopiranosido (6).

A una solución de 1,2,3,5,6-penta-O-benzoil-α,β-D-galactofuranosa (**5**; 0,61 g; 0,87 mmol) en Cl₂CH₂ anhidro (5 ml) enfriada a 0 °C, se agregó SnCl₄ (0,11 ml; 0,93 mmol). Luego de 10 min de agitación a 0 °C, se agregó lentamente una solución de bencil 2-acetamido-3,6-di-O-benzoil-2-desoxi-α-D-glucopiranosido (**3**; 0,30 g; 0,578 mmol) en Cl₂CH₂ anhidro (5 ml) y se continuó la agitación por 20 h a temperatura ambiente. La mezcla se diluyó con Cl₂CH₂ (40 ml) y se volcó lentamente y con agitación vigorosa sobre NaHCO₃ (sol. sat.). La fase orgánica se separó, y la fase acuosa se extrajo nuevamente con Cl₂CH₂ (2 x 30 ml). Los extractos orgánicos combinados se lavaron con H₂O hasta neutralidad, se secaron (MgSO₄), se filtraron y concentraron. El monitoreo del residuo por ccd reveló un producto principal de R_f 0,50 (tolueno-EtAcO 2:1). Este producto se aisló mediante una columna cromatográfica (silica gel) eluyendo primero con una mezcla de tolueno-EtOAc 9:1 y luego tolueno-EtOAc 5:1 obteniéndose 0,54 g (85%) de un sólido amorfo que se identificó como bencil (2,3,5,6-tetra-O-benzoil-β-D-galactofuranosil)-(1→4)-2-acetamido-3,6-di-O-benzoil-2-desoxi-α-D-glucopiranosido (**6**), [α]_D +63° (c 0,9, CHCl₃).

RMN ¹H : δ 8,15-7,10 (m, 35H), 5,80 (d, 1H, J_{NH,2} = 9,6 Hz, NH), 5,70-5,64 (m, 2H, H-3, H-5'), 5,60 (d, 1H, J_{3',4'} = 4,8 Hz, H-3'), 5,46 (s, 1H, H-1'), 5,36 (d, 1H, J_{2',3'} = 0,9 Hz, H-2'), 5,01 (d, 1H, J_{1,2} = 3,7 Hz, H-1), 4,87 (d, 1H, J_{6a,6b} = 13,1 Hz, H-6a), 4,81 (d, 1H, J_{gem} = 11,9 Hz, PhCHH), 4,64 (d, 1H, J_{6a,6b} = 13,1 Hz, H-6b), 4,58 (d, 1H, J_{gem} = 11,9 Hz, PhCHH), 4,70-4,45 (m, 1H, H-2), 4,40-4,20 (m, 5H, H-4, 5, 4', 6a', 6b'), 1,76 (s, 3H, CH₃)(Figura 4).

RMN ¹³C : Tabla 1, Figura 4.

Anal. Calculado para $C_{63}H_{55}NO_{17}$: %C 68,91; %H 5,05; %N 1,28.
Encontrado: %C 69,00; %H 5,19; %N 1,32.

(2,3,5,6-Tetra-O-benzoil- β -D-galactofuranosil)-(1 \rightarrow 4)-2-acetamido-3,6-di-O-benzoil-2-desoxi- α,β -D-glucopiranososa (7).

Una suspensión de 10 % $Pd(OH)_2/C$ (0,10 g) en EtOAc (2 ml) se enfrió a 0° C y se hidrogenó a 1 atm por 1 h. Se agregó luego una solución de bencil (2,3,5,6-tetra-O-benzoil- β -D-galactofuranosil)-(1 \rightarrow 4)-2-acetamido-3,6-di-O-benzoil-2-desoxi- α -D-glucopiranosido (**6**; 0,70 g; 0,64 mmol) en EtOAc (7 ml). La mezcla se hidrogenó por 3 días a presión atmosférica, cuando se observó por ccd la aparición de 2 manchas de mayor polaridad (R_f 0,31 y 0,19; tolueno-EtAcO 1:2) y además que no se había consumido totalmente el material de partida (R_f 0,75; tolueno-EtAcO 1:2). Se filtró el catalizador, se agregó 10 % Pd/C (0,10 g) al filtrado. La mezcla se hidrogenó a 1 atm por otros 7 días y se filtró. El filtrado se concentró y el jarabe resultante se purificó por una columna cromatográfica de sílica gel, eluyendo primeramente con tolueno-EtOAc 1:1. Se recuperó así el compuesto de partida **6** (0,08g; 11%; R_f 0,75; tolueno-EtAcO 1:2). La siguiente fracción se eluyó con tolueno-EtOAc 1:2, y después de concentrar, se obtuvieron 0,497 g (77 %) de una mezcla de los productos de R_f 0,31 y 0,19 (tolueno-EtOAc 1:1), la cual se identificó como (2,3,5,6-tetra-O-benzoil- β -D-galactofuranosil)-(1 \rightarrow 4)-2-acetamido-3,6-di-O-benzoil-2-desoxi- α,β -D-glucopiranososa (**7**). Este compuesto se recristalizó de EtOH-H₂O 9:1, y dio pf 199-202 °C, $[\alpha]_D +46,3^\circ$ (c 0,9, CHCl₃).

RMN ¹³C : Tabla 1, Figura 6.

Anal. Calculado para $C_{56}H_{49}NO_{17}$: %C 66,73; %H 4,90; %N 1,39.
Encontrado: %C 66,98; %H 5,17; %N 1,23.

Bencil β -D-galactofuranosil-(1 \rightarrow 4)-2-acetamido-2-desoxi- α -D-glucopiranosido (8).

A una suspensión de bencil (2,3,5,6-tetra-O-benzoil- β -D-galactofuranosil)-(1 \rightarrow 4)-2-acetamido-3,6-di-O-benzoil-2-desoxi- α -D-glucopiranosido (**6**; 1,7 g; 1,55 mmol) en MeOH anhidro (20 ml) enfriada a 0 °C, se agregó lentamente una solución 0,55 M de MeONa en MeOH (18,6 ml). Luego de 1h de agitación, la mezcla de reacción se llevó a temperatura ambiente. Se mantuvo la agitación por 1h más y se agregó H₂O (1 ml). La solución se pasó a través de una columna (1,5 cm x 6 cm) conteniendo resina BioRad AG 50W-X12 (forma H⁺) y la columna se lavó con MeOH-H₂O 20:1 (60 ml). El solvente se evaporó y el benzoato de metilo resultante se eliminó por sucesivas coevaporaciones con H₂O (5 x 5 ml) para dar **8** (0,71 g, 97 %; R_f 0,68 nPrOH-EtOH-H₂O 7:1:1) como un sólido blanco cristalino, que recristalizó de EtOAc-MeOH 2:1; pf 196,5-197,5 °C; [α]_D +58° (c 1, H₂O).

RMN ¹H (D₂O) región anomérica δ 5,03 (sa, 1H, H-1'), 4,88 (d, 1H, J_{1,2} = 2,8 Hz, H-1).

RMN ¹³C (D₂O): Tabla 1, Figura 6.

Anal. Calculado para C₂₁H₃₁NO₁₁.H₂O: %C 51,32; %H 6,77; %N 2,85. Encontrado: %C 51,77; %H 7,17; %N 2,90.

 β -D-Galactofuranosil-(1 \rightarrow 4)-2-acetamido-2-desoxi- α,β -D-glucopiranososa (9).

A una solución de bencil β -D-galactofuranosil-(1 \rightarrow 4)-2-acetamido-2-desoxi- α -D-glucopiranosido (**8**; 0,30 g, 0,63 mmol) en MeOH (30 mL), se agregó 10 % Pd/C (60 mg) y formiato de amonio (0,10 g; 1,59 mmol). La mezcla se calentó en un baño de agua a 65 °C mientras se desprendían gases. Luego de 1h de agitación, la ccd

mostró la consumición total del material de partida. Se llevó a temperatura ambiente y se filtró. El filtrado se concentró, el producto resultante se secó al vacío a 50 °C por 10 min. El sólido amorfo obtenido se disolvió en MeOH (2 mL) y la solución se pasó a través de una columna que contenía resina mixta BioRad AG 501-X8. La evaporación del solvente condujo al compuesto **9** puro (0,253 g; 98 %) que cristalizó lentamente de MeOH. Pf 191-192 °C, $[\alpha]_D -48^\circ$ (c 1, H₂O), R_f 0,52 y 0,47 (nPrOH-EtOH-H₂O 7:1:1) para los anómeros α y β , respectivamente.

RMN ¹H (D₂O) región anomérica δ 5,15 (d, $J_{1,2} = 2,8$ Hz, H-1 anómero α), 5,05 (sa, 1H, H-1'). La señal del anómero β de GlcNAc estaba solapada junto con la señal de DHO.

RMN ¹³C (D₂O): Tabla 1, Figura 7.

Anal. Calculado para C₁₄H₂₅NO₁₁: %C 43,86; %H 6,57; %N 3,65.
Encontrado: %C 44,00; %H 6,45; %N 3,57.

β -D-Galactofuranosil-(1→4)-2-Acetamido-2-desoxi-D-glucitol (10).

A una solución de β -D-galactofuranosil-(1→4)-2-acetamido-2-desoxi- α,β -D-glucopiranososa (**9**; 91,5 mg; 0,24 mmol) en una mezcla de MeOH-H₂O 9:1 (10 ml), se agregó NaBH₄ (90,2 mg; 2,34 mmol) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente por 18 h. La solución se descationizó eluyendo a través de una columna de resina BioRad AG 50W-X12 (forma H⁺). El solvente se evaporó y el ácido bórico se eliminó por sucesivas coevaporaciones con MeOH y finalmente por una columna de cromatografía de intercambio iónico sobre resina BioRad AG 501-X8. Por evaporación del solvente se obtuvieron 92 mg (100 %) de un jarabe incoloro y homogéneo (R_f 0,34; nPrOH-EtOH-H₂O 7:1:1) que cristalizó lentamente de MeOH y

se identificó como β -D-galactofuranosil-(1 \rightarrow 4)-2-acetamido-2-desoxi-D-glucitol (**10**), pf 161-162 °C; $[\alpha]_D -42^\circ$ (c 0,8, H₂O).

RMN ¹H (D₂O) región anomérica δ 5,21 (sa, 1H, H-1').

RMN ¹³C (D₂O): Tabla 1, Figura 7.

Anal. Calculado para C₁₄H₂₇NO₁₁: %C 43,63; %H 7,06; %N 3,63.

Encontrado: %C 43,90; %H 7,01; %N 3,77.

2,3,5,6-Tetra-O-acetil- β -D-galactofuranosil-(1 \rightarrow 4)-2-acetamido-1,3,5,6-tetra-O-acetil-2-desoxi-D-glucitol (11**)**

A una solución de β -D-galactofuranosil-(1 \rightarrow 4)-2-acetamido-2-desoxi-D-glucitol (**10**, 10 mg, 0,026 mmol) en piridina anhidra (0,5 ml), se agregó anhídrido acético (0,5 ml), con agitación. Luego de 4 h a temperatura ambiente, se llevó a 0 °C, se agregó MeOH (1 ml) y la solución se agitó por 0,5 h más. Se llevó a sequedad y el residuo se coevaporó con tolueno (3 x 1 ml) y se filtró rápidamente sobre sílica gel (tolueno-EtOAc 1:9) para obtener el jarabe **11** (18 mg, 96 %).

RMN ¹H : δ 5,86 (d, 1H, $J_{NH,2} = 9,5$ Hz, NH), 5,33 (dt, 1H, $J_{5',6a'} = J_{5',6b'} = 6,8$ Hz $J_{4',5'} = 4,4$ Hz, H-5'), 5,16 (sa, 1H, H-1), 5,18-5,01 (m, 4H), 4,63 (m, 1H), 4,51 (dd, 1H, $J = 12,5, 3,2$ Hz), 4,44-3,94 (m, 8H), 2,08-1,95 (9 s, Ac).

RMN ¹³C : Tabla 1

Bencil 2-acetamido-4,6-O-bencilidén-2-desoxi- α -D-glucopiranosido (12**).**

Un balón que contenía una suspensión de bencil 2-acetamido-2-desoxi- α -D-glucopiranosido (**2**; 4 g; 12,9 mmol), α,α -dimetoxitolueno (1,93 ml; 12,9 mmol) y

ácido *p*-toluensulfónico (6,5 mg) en DMF anhidra (10 ml) se rotó al vacío a 60 °C por 2,5 h mientras refluja la DMF. Se llevó a seco elevando la temperatura del baño a 100 °C y se dejó enfriar. El sólido formado se maceró con una solución de NaHCO₃ 2% (20 ml) a temperatura ambiente y luego se calentó a 100 °C para completar la maceración. La mezcla se enfrió a 0 °C, se filtró, y el sólido cristalino obtenido se lavó con H₂O. Se obtuvo 4,5 g del compuesto **12** puro (88 %) que recristalizó de EtOH: pf 260-262 °C (EtOH), lit. 260-261 °C (piridina-H₂O) (Khun & Baer, 1958); R_f 0,33 (EtOAc)

RMN ¹H : δ 7,52-7,36 (m, 10H), 5,82 (d, 1H, $J_{NH,2} = 9,3$ Hz, NH), 5,58 (s, 1H, PhCH), 4,95 (d, 1H, $J_{1,2} = 3,8$ Hz, H-1), 4,77, 4,51 (d, 2H, $J_{gem} = 11,8$ Hz, PhCH₂), 4,31-4,19 (m, 2H, H-2, H-3), 4,01-3,57 (m, 4H, H-6,6',4,5), 3,02 (sa, 1H, OH), 2,00 (s, 3H, CH₃).

RMN ¹³C: Tabla 2.

Bencil 2-acetamido-3-O-benzoil-4,6-O-bencilidén-2-desoxi- α -D-glucopiranosido (13).

A una suspensión de bencil 2-acetamido-4,6-O-bencilidén-2-desoxi- α -D-glucopiranosido (**12**; 2,0 g; 5,0 mmol) en piridina anhidra (17 ml), se agregó lentamente y con agitación cloruro de benzoilo (1,16 ml; 10 mmol). Luego de agitar 3 h a temperatura ambiente, la solución se volcó lentamente sobre agua-hielo (200 g) obteniéndose un precipitado blanco que se filtró y se lavó con H₂O (2 x 30 ml). El sólido se disolvió en Cl₂CH₂ (100 ml) y se extrajo sucesivamente con NaHCO₃ (sol. sat.) (2 x 100 ml), H₂O (2 x 100 ml), se secó (MgSO₄) y filtró. La evaporación del solvente condujo al compuesto **13** (2,4 g; 95 %), que recristalizó de EtOH para dar: pf 233-234 °C, lit. 218-220 °C (piridina-H₂O, Kuhn & Baer, 1958)

RMN ^1H : δ 8,03 (d, 2H, $J = 7,3$ Hz), 7,60-7,28 (m, 13H), 5,90 (d, 1H, $J_{\text{NH},2} = 9,2$ Hz, NH), 5,64 (t, 1H, $J_{3,2} = 9,3$ Hz, H-3), 5,58 (s, 1H, PhCH), 5,01 (d, 1H, $J_{1,2} = 3,5$ Hz, H-1), 4,80 (d, 1H, $J_{\text{gem}} = 11,8$ Hz, PhCH₂), 4,56 (m, 2H, PhCH₂, H-2), 4,30 (dd, 1H, $J_{6,5} = 4,3$, $J_{6,6'} = 10,1$ Hz, H-6), 4,04 (dt, 1H, $J_{5,6} = 4,3$ Hz, $J_{4,5} = 9,3$ Hz, H-5), 3,91 (t, 1H, $J_{4,3} = 9,3$ Hz, H-4), 3,83 (t, 1H, $J_{5,6'} = 10,1$ Hz, H-6'), 1,82 (s, 3H, CH₃).

RMN ^{13}C : Tabla 2

Bencil 2-acetamido-3-O-benzoil-2-desoxi- α -D-glucopiranosido (14).

Se suspendió bencil 2-acetamido-3-O-benzoil-4,6-O-bencilidén-2-desoxi- α -D-glucopiranosido (**13**; 1,5 g; 3,0 mmol) en HOAc (40 ml) y se calentó en baño de agua hirviendo hasta disolución. Se agregó H₂O (25 ml) lentamente y se continuó el calentamiento por 1 h. La mezcla se enfrió, se concentró y el residuo se coevaporó con H₂O (4 x 10 ml) y luego con tolueno (2 x 10 ml). El jarabe resultante se recrystalizó de tolueno para obtener **14** (1,0 g; 81 %): R_f 0,33 (tolueno-EtOAc 1:3); pf 113-115 °C, lit. 95-97 °C (C₆H₆, Khun & Baer, 1958).

RMN ^1H : δ 8,03 (d, 2H, $J = 8,7$ Hz), 7,59-7,31 (m, 8H), 5,90 (d, 1H, $J_{\text{NH},2} = 9,6$ Hz, NH), 5,64 (dd, 1H, $J_{3,4} = 9,0$ Hz, H-3), 4,95 (d, 1H, $J_{1,2} = 3,6$ Hz, H-1), 4,74, 4,50 (d, 2H, $J_{\text{gem}} = 11,8$ Hz, PhCH₂), 4,42 (ddd, 1H, $J_{2,3} = 10,7$ Hz, H-2), 3,98 (t, 1H, $J_{4,5} = 9,0$ Hz, H-4), 3,85-3,79 (m, 3H, H-5,6,6'), 3,41 (sa, 1H, OH), 2,30 (sa, 1H, OH), 1,78 (s, 3H, CH₃).

RMN ^{13}C : Tabla 2

Bencil (2,3,4,6-tetra-O-benzoil-β-D-galactopiranosil)-(1→6)-2-acetamido-3-O-benzoil-2-desoxi-α-D-glucopiranosido (16)

A una solución de 1,2,3,4,6-penta-O-benzoil-β-D-galactopiranososa (**6**; 1,21 g; 1,73 mmol) en Cl₂CH₂ anhidro (12 ml) enfriada a 0 °C, se agregó SnCl₄ (0,25 ml; 2,14 mmol). Luego de agitar 15 min a 0 °C, se agregó una solución de bencil 2-acetamido-3-O-benzoil-2-desoxi-α-D-glucopiranosido (**14**; 0,60 g; 1,42 mmol) en Cl₂CH₂ - CH₃CN 1:1 (12 ml). La solución resultante se agitó a temperatura ambiente por 16 h. El análisis por ccd mostró que no había más producto de partida (R_f 0,33 tolueno-EtOAc 1:3) y la aparición de un producto mayoritario (R_f 0,76). La mezcla se diluyó con Cl₂CH₂ (75 ml) y se volcó lentamente y con agitación vigorosa sobre una solución de NaHCO₃ (sol. sat, 30 ml) y luego se extrajo. La fase acuosa se extrajo nuevamente con Cl₂CH₂ (2 x 50 ml) y los extractos orgánicos combinados se lavaron con H₂O hasta pH 7, se secaron (MgSO₄), filtraron y concentraron. El sólido amorfo resultante cristalizó de EtOH (10 ml) para dar 1,0 g del compuesto **16** puro (70 %). Las aguas madres se evaporaron y por cromatografía en columna de sílica gel eluyendo con tolueno-EtOAc 9:1 y luego 5:1, se pudieron separar 0,15 g adicionales (80 % de rendimiento total). Pf 207-208 °C (EtOH); [α]_D +106° (c 1, CHCl₃).

RMN ¹H (Figura 10): δ 8,05-7,00 (m, 30H), 5,92 (d, 1H, J_{3',4'} = 3,2 Hz, H-4'), 5,78 (dd, 1H, J_{2',3'} = 10,3 Hz, J_{1',2'} = 7,8 Hz, H-2'), 5,71 (d, 1H, J_{NH,2'} = 9,5 Hz, NH), 5,54 (dd, 1H, J_{2',3'} = 10,3 Hz, J_{3',4'} = 3,2 Hz, H-3'), 5,14 (dd, 1H, J = 10,4, 9,3 Hz, H-3), 4,86 (d, 1H, J_{1',2'} = 7,8 Hz, H-1'), 4,71 (d, 1H, J_{1,2} = 3,6 Hz, H-1), 4,60 (dd, 1H, J = 10,6, 5,8 Hz), 4,51, 4,16 (2d, 2H, J_{gem} = 11,8 Hz, PhCH₂), 4,40-4,20 (m, 3H), 3,88-3,70 (m, 2H), 3,63 (dd, 1H, J = 9,2 Hz), 2,85 (sa, 1H, OH), 1,66 (s, 3H, CH₃).

RMN ¹³C : Tabla 2, Figura 10.

Anal. Calculado para C₅₆H₅₁NO₁₆: %C 67,65; %H 5,14; %N 1,41.
Encontrado: %C 67,43; %H 5,19 ; %N 1,44.

Bencil β -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 6)-2-acetamido-2-desoxi- α -D-glucopiranosido (17)

A una suspensión de bencil (2,3,4,6-tetra-O-benzoil- β -D-galactopiranosil)-(1 \rightarrow 6)-2-acetamido-3-O-benzoil-2-desoxi- α -D-glucopiranosido (**16**, 0,88 g; 0,89 mmol) en MeOH anhidro (25 ml) enfriada a 0 °C, se agregó una solución de NaOMe en MeOH 0,5 M (10,6 ml). Luego de 0,5 h de agitación, se llevó a temperatura ambiente y al cabo de 1h el sólido se disolvió totalmente. La solución se agitó por 0,5 h más y se comprobó la desaparición del producto de partida por ccd. Se agregó H₂O (2 ml), la solución se pasó por una columna (1,5 x 6 cm) conteniendo resina BioRad AG 50W-X12 (forma H⁺) y se eluyó con MeOH-H₂O 20:1 (20 ml). El solvente se evaporó y el benzoato de metilo se arrastró por sucesivas coevaporaciones con H₂O (5 x 10 ml) para dar 0,41 g de un sólido blanco cristalino que fue identificado como **17** (98 %) y que recristalizó de EtOH, pf 234-235 °C; $[\alpha]_D^{+117}$ (c 1, H₂O).

RMN ¹H (D₂O): región anomérica δ 4,88 (d, 1H, $J_{1,2} = 3,0$ Hz, GlcNAc), 4,39 (d, 1H, $J_{1,2} = 7,1$ Hz Galp).

RMN ¹³C (D₂O): Tabla 2, Figura 12.

Anal. Calculado para C₂₁H₃₁NO₁₁: %C 53,27; %H 6,60; %N 2,96.
Encontrado: %C 53,08; %H 6,62; %N 3,25.

 β -D-Galactopiranosil-(1 \rightarrow 6)-2-acetamido-2-desoxi-D-glucopiranosa (18)

A una suspensión de bencil β -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 6)-2-acetamido-2-desoxi- α -D-glucopiranosido (**17**, 150 mg; 0,317 mmol) en MeOH (15 ml), se agregaron Pd/C 10 % (60 mg) y formiato de amonio (60 mg; 0,951 mmol). La mezcla se calentó en

baño de agua a 65 °C por 1 h, se filtró y se concentró. El jarabe resultante se disolvió en MeOH (2 ml) y se pasó por una columna de resina mixta BioRad AG 501-X8. Por evaporación del solvente se obtuvieron 116 mg del compuesto **18** puro (96 %) que cristalizó lentamente de una mezcla EtOH-MeOH: pf 144-148 °C; $[\alpha]_D -30,4^\circ$ (c 1, H₂O), lit. $-30,9^\circ$ (c 1, H₂O, Khun *et al*, 1955).

RMN ¹H (D₂O): región anomérica δ 5,12 (d, 0,7H, $J_{1,2} = 3,4$ Hz, α-GlcNAc), 4,37 (d, 0,3H, $J_{1,2} = 7,4$ Hz, β-GlcNAc), 4,34 (d, 1H, $J_{1,2} = 7,4$ Hz, Galp).

RMN ¹³C (D₂O): Tabla 2, Figura 12.

Bencil (2,3,5,6-tetra-O-benzoil-β-D-galactofuranosil)-(1→4)-[2,3,4,6-tetra-O-benzoil-β-D-galactopiranosil-(1→6)]-2-acetamido-3-O-benzoil-2-desoxi-α-D-glucopiranosido (19)

Método a) A partir de bencil (2,3,4,6-tetra-O-benzoil-β-D-galactopiranosil)-(1→6)-2-acetamido-3-O-benzoil-2-desoxi-α-D-glucopiranosido (16)

A una solución de 1,2,3,5,6-penta-O-benzoil-α,β-D-galactofuranosa (**5**; 0,63 g; 0,90 mmol) en Cl₂CH₂ anhidro (6 ml) enfriada a 0 °C, se agregó SnCl₄ (0,13 ml; 1,08 mmol). Luego de agitar por 15 min a 0 °C, se agregó lentamente una solución de **16** (0,70 g; 0,705 mmol) en Cl₂CH₂ (4 ml) y se adicionó CH₃CN (2 ml). La mezcla se agitó por 16 h a temperatura ambiente y una ccd mostró la aparición de dos nuevas manchas R_f 0,35 y 0,19 (tolueno-EtOAc 9:1) además del compuesto **16**. Por otra parte, se observó que se había consumido **5** (R_f 0,60 y 0,54) totalmente, por lo que se agregó una cantidad adicional de SnCl₄ (0,13 ml; 1,08 mmol) y una solución de **5** (0,8 g; 1,1 mmol) en CH₃CN (10 ml), y se continuó la agitación por 21 h más. La mezcla se diluyó con Cl₂CH₂ (100 ml) y se volcó lentamente y con agitación vigorosa sobre una solución de NaHCO₃ (sol. sat., 100 ml) y luego se extrajo. La

fase acuosa se extrajo nuevamente con Cl_2CH_2 (2 x 75 ml) y los extractos orgánicos combinados se lavaron con H_2O hasta pH 7, se secaron (MgSO_4), se filtraron y concentraron. El producto resultante se purificó mediante una columna cromatográfica (sílica gel) eluyendo primeramente el exceso de compuesto **5** y subproductos poco polares con una mezcla de tolueno-EtOAc 9:1 y luego con 5:1. La primera fracción con este solvente (R_f 0,35, tolueno-EtOAc 4:1) condujo a un sólido amorfo que se identificó como bencil 4,6-di-O-(2,3,5,6-tetra-O-benzoil- β -D-galactofuranosil)-2-acetamido-3-O-benzoil-2-desoxi- α -D-glucopiranosido (**20**, 0,2 g; 20 %). $[\alpha]_D +37^\circ$ (c 1, CHCl_3).

RMN ^1H : δ 8,25-6,90 (m, 50H), 6,11 (m, 1H), 5,85-5,58 (m, 6H), 5,46 (s, 1H), 5,43 (d, 1H, $J = 1,2$ Hz), 5,27 (s, 1H), 4,99 (d, 1H, $J_{1,2} = 3,7$ Hz, H-1), 4,93-4,73 (m, 3H), 4,76, 4,52 (2d, 2H, $J_{\text{gem}} = 11,8$ Hz, PhCH_2), 4,60-4,10 (m, 8H), (s, 3H, CH_3).

RMN ^{13}C : Tabla 2, Figura 15.

Anal. Calculado para $\text{C}_{90}\text{H}_{77}\text{NO}_{25}$: %C 68,73; %H 4,94; %N 0,89.
Encontrado: %C 68,86; %H 5,22 ; %N 0,99.

La siguiente fracción (R_f 0,19; tolueno-EtOAc 4:1) condujo al compuesto **19** (0,44 g; 41 %) como un sólido amorfo: $[\alpha]_D +56,2^\circ$ (c 1, CHCl_3).

RMN ^1H (Figura 13): δ 8,15-7,00 (m, 50H), 6,03 (d, 1H, $J_{3',4'} = 3,2$ Hz, H-4'), 5,88 (dd, 1H, $J_{1',2'} = 7,7$ Hz, $J_{2',3'} = 10,3$ Hz, H-2'), 5,70 (d, 1H, $J_{\text{NH},2} = 9,8$ Hz, NH), 5,66-5,63 (m, 2H, H-3', H-3''), 5,56 (dd, 1H, $J_{2,3} = 10,7$ Hz, $J_{3,4} = 8,7$ Hz, H-3), 5,33 (m, 1H, H-5''), 5,30 (d, 1H, $J = 1$ Hz, H-2''), 5,13 (d, 1H, $J_{1',2'} = 7,7$ Hz, H-1'), 5,08 (s, 1H, H-1''), 4,93 (d, 1H, $J_{1,2} = 3,6$ Hz, H-1), 4,74 (dd, 1H, $J = 9,9, 4,3$ Hz), 4,70, 4,39 (d, 2H, $J_{\text{gem}} = 12,0$ Hz, PhCH_2), 4,50-4,28 (m, 5H), 4,19-3,99 (m, 4H), 3,92 (t, 1H, $J = 9,9$ Hz, H-4), 1,76 (s, 3H, CH_3).

RMN ^{13}C : Tabla 2, Figura 13.

Anal. Calculado para $C_{90}H_{77}NO_{25}$: %C 68,73; %H 4,94; %N 0,89.
Encontrado: %C 68,70; %H 5,20 ; %N 0,88.

Método b). A partir de *bencil 2-acetamido-3-O-benzoil-2-desoxi- α -D-glucopiranosido (14)*

A una solución de 1,2,3,4,6-penta-O-benzoil- β -D-galactopiranososa (**15**; 0,746 g; 1,07 mmol) en Cl_2CH_2 anhidro (7 ml) enfriada a 0 °C, se agregó $SnCl_4$ (0,15 ml; 1,28 mmol). Luego de agitar por 15 min a 0 °C, se agregó lentamente una solución de **14** (0,385 g; 0,93 mmol) en Cl_2CH_2 (2 ml) y CH_3CN (3 ml) y la solución se agitó a temperatura ambiente. Cuando no se detectó más compuesto **14** por ccd (R_f 0,33 tolueno-EtOAc 1:3) (alrededor de 18 h de reacción), se agregó una solución de **5** (1,12 g; 1,6 mmol) en Cl_2CH_2 anhidro (6 ml) que había sido previamente tratada con $SnCl_4$ (0,224 ml; 1,92 mmol) a 0 °C por 15 min. Luego de 24 h de agitación a temperatura ambiente la mezcla se trató y separó como en el *Método a)* permitiendo obtener **20** (0,41 g; 27,8 %) y **19** (0,5 g; 34 %), y **16** sin reaccionar (0,15 g; 16 %) que presentaron las mismas características físicas y espectroscópicas antes descriptas.

Bencil 4,6-di-O-(2,3,5,6-tetra-O-benzoil- β -D-galactofuranosil)-2-acetamido-3-O-benzoil-2-desoxi- α -D-glucopiranosido (20).

A una solución de 1,2,3,5,6-penta-O-benzoil- α,β -D-galactofuranosa (**5**; 1,61 g; 2,3 mmol) en Cl_2CH_2 anhidro (14 ml) enfriada a 0 °C, se agregó $SnCl_4$ (0,32 ml; 2,8 mmol) . Luego de 15 min de agitación a 0 °C, se agregó lentamente una solución de *bencil 2-acetamido-3-O-benzoil-2-desoxi- α -D-glucopiranosido (14*; 0,40 g; 0,96 mmol) en CH_3CN anhidro (6 ml). La mezcla se agitó por 27 h a temperatura ambiente y se

procesó como se describió antes. El jarabe resultante se purificó por columna cromatográfica (sílica gel) utilizando primero una mezcla de tolueno-EtOAc 9:1 para eluir rápidamente el exceso de **5** y subproductos. Continuando la elución con tolueno-EtOAc 6:1 se aisló el compuesto **20** (R_f 0,35, tolueno-EtOAc 4:1; 0,96 g; 63 %) que mostró propiedades espectroscópicas y físicas idénticas a las descritas anteriormente..

La siguiente fracción de la columna (R_f 0,23 tolueno-EtOAc 4:1) condujo a bencil 2,3,5,6-tetra-*O*-benzoil- β -D-galactofuranosil-(1 \rightarrow 6)-2-acetamido-3-*O*-benzoil-2-desoxi- α -D-glucopiranosido (**21**; 0,25 g, 27 %) como un sólido amorfo : $[\alpha]_D^{+44,1^\circ}$ (c 1, CHCl₃).

RMN ¹H: δ 8,15-7,80 (m, 10H), 7,65-7,15 (m, 20 H), 6,06 (m, 1H, H-5'), 5,81 (d, 1H, $J_{NH,2} = 9,6$ Hz, NH), 5,70 (d, 1H, $J_{3',4'} = 5,4$ Hz, H-3'), 5,51 (d, 1H, $J = 1,3$ Hz, H-2'), 5,40 (s, 1H, H-1'), 5,38 (m, H-3), 4,96 (d, 1H, $J_{1,2} = 3,7$ Hz, H-1), 4,85-4,71 (m, 4H), 4,53-4,42 (m, 2H), 4,12-3,85 (m, 4H), 3,12 (sa, 1H, OH), 1,82 (s, 3H, CH₃).

RMN ¹³C : Tabla 2, Figura 15.

Anal. Calculado para C₅₆H₅₁NO₁₆: %C 67,65; %H 5,17. Encontrado: %C 67,86; %H 5,33.

Bencil 2,3,5,6-tetra-*O*-benzoil- β -D-galactofuranosil-(1 \rightarrow 6)-2-acetamido-3-*O*-benzoil-2-desoxi- α -D-glucopiranosido (21**)**

A una solución de 1,2,3,5,6-penta-*O*-benzoil- α,β -D-galactofuranosa (**5**; 0,649 g; 0,92 mmol) en Cl₂CH₂ anhidro (14 ml) enfriada a 0 °C, se agregó SnCl₄ (0,107 ml; 0,93 mmol) Luego de 15 min de agitación a 0 °C, se agregó lentamente una solución de bencil 2-acetamido-3-*O*-benzoil-2-desoxi- α -D-glucopiranosido (**14**; 0,35 g; 0,84 mmol) en CH₃CN anhidro (1 ml). La mezcla se agitó por 15 h a temperatura

ambiente y se procesó como se describió antes. El producto se purificó por columna cromatográfica (sílica gel) utilizando una mezcla de tolueno-EtOAc 9:1 y tolueno-EtOAc 6:1 que permitió aislar en la primera fracción 60 mg (4 %) de **20** (R_f 0,35, tolueno-EtOAc 4:1) que mostró propiedades espectroscópicas y físicas idénticas a las descritas anteriormente.

De la siguiente fracción de la columna (R_f 0,23, tolueno-EtOAc 4:1) se obtuvieron 550 mg de **21** (66 %) y presentaba las mismas propiedades que las descritas anteriormente.

Bencil β -D-galactofuranosil-(1 \rightarrow 4)-[β -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 6)]-2-acetamido-2-deoxi- α -D-glucopiranosido (22**)**

A una suspensión de bencil (2,3,5,6-tetra-O-benzoil- β -D-galactofuranosil)-(1 \rightarrow 4)-[2,3,4,6-tetra-O-benzoil- β -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 6)]-2-acetamido-3-O-benzoil-2-desoxi- α -D-glucopiranosido (**19**; 0,40 g; 0,25 mmol) en MeOH anhidro enfriada a 0 °C, se agregó una solución de NaOMe en MeOH 0,5 M (5,5 ml). Luego de 1,5 h de agitación a temperatura ambiente, se agregó H₂O (1 ml), y la solución resultante se pasó por una columna (1,5 cm x 6 cm) con resina BioRad AG 50W-X12 (forma H⁺) que se lavó con una solución de MeOH-H₂O 20:1. El solvente se evaporó y el residuo se coevaporó varias veces con H₂O hasta eliminación del benzoato de metilo formado, para obtener 0,16 g de **22** como un sólido cristalino (99 %), R_f 0,65 (nPrOH-EtOH-H₂O 7:1:2). Recristalizado de MeOH dio: pf 142-144 °C; $[\alpha]_D +48,5^\circ$ (c 1, H₂O).

RMN ¹H (D₂O): región anomérica δ 5,07 (sa, 1H, Gal β), 4,85 (d, 1H, $J_{1,2} = 2,1$ Hz, GlcNAc), 4,33 (d, 1H, $J_{1,2} = 7,2$ Hz, Gal β).

RMN ¹³C (D₂O): Tabla 2, Figura 16

Anal. Calculado para $C_{27}H_{41}NO_{16} \cdot 1H_2O$: %C 49,61; %H 6,63; %N 2,14.
Encontrado: %C 49,84; %H 6,45; %N 2,26.

β -D-Galactofuranosil-(1 \rightarrow 4)-[β -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 6)]-2-acetamido-2-desoxi-D-glucopiranososa (23).

A una suspensión de bencil β -D-galactofuranosil-(1 \rightarrow 4)-[β -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 6)]-2-acetamido-2-desoxi- α -D-glucopiranosido (**22**; 85 mg; 0,134 mmol) en MeOH (8 ml), se agregó Pd/C 10 % (30 mg) y formiato de amonio (25 mg; 0,40 mmol). La mezcla se agitó en un baño de agua a 65 °C por 20 min hasta desaparición del compuesto de partida, se dejó enfriar a temperatura ambiente, se filtró y evaporó. Luego de someter al residuo a alto vacío por 1 h, se disolvió en MeOH (2 ml) y se pasó por una columna de resina mixta BioRad AG 501-X8. La evaporación del solvente condujo a un sólido incoloro e higroscópico que se identificó como la mezcla de anómeros α, β de **23** (72 mg, 99 %): R_f 0,48 y 0,38 (nPrOH-EtOH-H₂O 7:1:2) para los anómeros α y β ; $[\alpha]_D^{-20}(c 1, H_2O)$

RMN ¹H (D₂O): región anomérica δ 5,14 (d, 0,6H, $J_{1,2} = 2,9$ Hz, α -GlcNAc), 5,09 (s, 1H, Gal f), 4,37 (d, 0,4H, $J_{1,2} = 7,4$ Hz, β -GlcNAc), 4,36 (d, 1H, $J_{1,2} = 7,2$ Hz, Gal p),

RMN ¹³C (D₂O): Tabla 2, Figura 17.

Anal. Calculado para $C_{20}H_{35}NO_{16}$ %C 44,02; %H 6,47. Encontrado: %C 44,16; %H 6,76.

β -D-Galactofuranosil-(1 \rightarrow 4)-[β -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 6)]-2-acetamido-2-desoxi-D-glucitol (24).

A una solución de β -D-galactofuranosil-(1 \rightarrow 4)-[β -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 6)]-2-acetamido-2-desoxi-D-glucopiranososa (**23**; 70 mg; 0,128 mmol) en MeOH (7 ml), se agregó NaBH₄ (50 mg; 1,3 mmol) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante la noche. La solución se descationizó a través de una columna de resina protónica BioRad AG 50W-X12 (H⁺). El solvente se evaporó y el ácido bórico se eliminó por coevaporaciones sucesivas con MeOH, y finalmente, por cromatografía de intercambio iónico sobre resina mixta BioRad AG 501-X8. La evaporación del solvente condujo a 68 mg (97 %) de un vidrio homogéneo (R_f 0,40 nPrOH-EtOH-H₂O 7:1:2) que fue identificado como **24**: [α]_D -17° (c 1, H₂O).

RMN ¹H (D₂O): región anomérica δ 5,14 (s, 1H, Galf), 4,36 (d, 1H, J_{1,2} = 7,3 Hz, Galp).

RMN ¹³C (D₂O): Tabla 2, Figura 17.

Anal. Calculado para C₂₀H₃₅NO₁₆.H₂O: %C 42,48; %H 6,95. Encontrado: %C 42,15; %H 7,06.

Bencil 4,6-di-O- β -D-galactofuranosil-2-acetamido-2-desoxi- α -D-glucopiranosido (25).

Se suspendió bencil 4,6-di-O-(2,3,5,6-tetra-O-benzoil- β -D-galactofuranosil)-2-acetamido-3-O-benzoil-2-desoxi- α -D-glucopiranosido (**20**; 900 mg; 0,57 mmol) en una solución de NaOMe en MeOH 0,5 M (11,3 ml; 5,64 mmol) enfriada a 0 °C. Luego de 3h a temperatura ambiente, el sólido se había solubilizado totalmente y una ccd mostró la aparición de un solo compuesto de R_f 0,59 (nPrOH-EtOH-H₂O

7:1:1). Se agregó H₂O (1 ml) y la solución se pasó por una columna de resina protónica BioRad AG 50W-X12 que se lavó posteriormente con MeOH (3 x 10 ml). El eluido se llevó a sequedad y se coevaporó con tolueno (4 x 10 ml) para obtener 358 mg del compuesto **25** (98 %) que se recristalizó de MeOH : pf 173-175 °C; $[\alpha]_D^{25} +19,3^\circ$ (c 1, H₂O)

RMN ¹H (D₂O): región anomérica δ 5,05 (s, 1H, Galf), 5,00 (s, 1H, Galf), 4,91 (d, 1H, $J_{1,2} = 2,9$ Hz, GlcNAc).

RMN ¹³C (D₂O): Tabla 3, Figura 18.

Anal. Calculado para C₂₇H₄₁NO₁₆·0,5 H₂O: %C 50,31; %H 6,57. Encontrado: %C 50,00; %H 6,74.

4,6-Di-O-β-D-galactofuranosil-2-acetamido-2-desoxi-α,β-D-glucopiranososa (26).

A una suspensión de bencil 4,6-di-O-β-D-galactofuranosil-2-acetamido-2-desoxi-α-D-glucopiranosido (**25**; 177 mg; 0,28 mmol) en MeOH (8 ml) se agregó Pd/C 10 % (100 mg) y formiato de amonio (60 mg; 0,92 mmol). La mezcla se agitó vigorosamente en baño de agua a 65 °C por 30 min donde una ccd mostró la desaparición del compuesto de partida. Se dejó alcanzar temperatura ambiente, se filtró y el filtrado se llevó a sequedad para obtener 151 mg de **26** (100 %; R_f 0,47 y 0,34 nPrOH- MeOH-H₂O 7:1:1; anómeros α,β). Se recristalizó de MeOH y dio: pf 187-188 °C; $[\alpha]_D^{25} -60,8^\circ$ (c 1, H₂O)

RMN ¹H (D₂O): región anomérica δ 5,21 (d, 0,7H, $J_{1,2} = 2,9$ Hz, α-GlcNAc), 5,11 (s, 1H, Galf), 5,05 (s, 1H, Galf). La señal del anómero β estaba solapada con la señal de DHO.

RMN ¹³C (D₂O): Tabla 3, Figura 18.

Anal. Calculado para C₂₀H₃₅NO₁₆. H₂O: %C 42,63; %H 6,62. Encontrado: %C 42,50; %H 6,44.

4,6-Di-O-β-D-galactofuranosil-2-acetamido-2-desoxi-D-glucitol (27).

A una solución de 4,6-di-O-β-D-galactofuranosil-2-acetamido-2-desoxi-α,β-D-glucopiranososa (**26**; 72 mg; 0,132 mmol) en MeOH (3 ml), se agregó NaBH₄ (60 mg; 1,6 mmol) y se agitó a temperatura ambiente. Luego de 16 h, se agregó H₂O (0,5 ml) y se pasó la solución por una columna con resina protónica Dowex 50X8-400 (2 x 0,5 cm) y se lavó con MeOH-H₂O 9:1 (3 ml). Los eluidos se concentraron y se coevaporaron con MeOH (5 x 1 ml) para obtener 71 mg de **27** (98 %) como un sólido (vidrio). R_f 0,35 (nPrOH-MeOH-H₂O 7:1:1), [α]_D -62,4° (c 1, H₂O)

RMN ¹H (D₂O): región anomérica δ 5,06 (s, 1H, Galf), 4,94 (s, 1H, Galf).

RMN ¹³C (D₂O): Tabla 3.

Bencil β-D-galactofuranosil-(1→6)-2-acetamido-2-desoxi-α-D-glucopiranosido (28).

A un balón que contenía 2,3,5,6-tetra-O-benzoil-β-D-galactofuranosil-(1→6)-2-acetamido-3-O-benzoil-2-desoxi-α-D-glucopiranosido (**21**; 450 mg; 0,45 mmol) se agregó una solución de NaOMe en MeOH 0,5 M (5 ml; 2,5 mmol) a temperatura ambiente y con agitación. Luego de 2,5 h se observó por ccd la aparición de un único compuesto de R_f 0,68 (nPrOH-EtOH-H₂O 7:1:1). Se agregó H₂O (0,5 ml) y la solución se pasó por una columna BioRad AG 50W-X12 (1,5 x 3 cm) y se lavó la columna varias veces con MeOH. El eluido se concentró y se coevaporó con tolueno

(5 x 6 ml) para eliminar el benzoato de metilo, obteniéndose 212 mg de **28** (99 %). Recristalizado de una mezcla MeOH -EtOH dio: pf 107-108 °C ; $[\alpha]_D +74,4^\circ$ (c 1, H₂O)

RMN ¹H (D₂O): región anomérica δ 4,98 (sa, 1H, Galf), 4,86 (d, 1H, $J_{1,2} = 3,2$ Hz, GlcNAc)

RMN ¹³C (D₂O): Tabla 3, Figura 19.

Anal. Calculado para C₂₇H₄₁NO₁₆.0,5 H₂O: %C 52,28; %H 6,68. Encontrado: %C 52,06; %H 6,60.

β -D-Galactofuranosil-(1→6)-2-acetamido-2-desoxi- α,β -D-glucopiranososa (29)

A una solución de bencil β -D-galactofuranosil-(1→6)-2-acetamido-2-desoxi- α -D-glucopiranosido (**28**, 103 mg; 0,218 mmol) en MeOH (4 ml), se agregó Pd/C 10% (50 mg) y formiato de amonio (40 mg). La mezcla se calentó a 65 °C por 15 min y una ccd mostró la desaparición del producto de partida. Se llevó a temperatura ambiente, se filtró y el filtrado se evaporó y se secó con alto vacío. Se obtuvieron 85 mg de un sólido amorfo que se identificó como la mezcla anomérica de **29** (100 %) que recristalizó de MeOH. R_f 0,52 y 0,40 (nPrOH-EtOH-H₂O 7:1:1, anómeros α y β) ; pf 159-160 °C ; $[\alpha]_D -27,6^\circ$ (c 0,6, H₂O).

RMN ¹H (D₂O): región anomérica δ 5,11 (d, 0,7H, $J_{1,2} = 3,3$ Hz, α -GcNAc), 4,96 (sa, 1H, Galf). La señal del anómero β estaba solapada por la señal de DHO.

RMN ¹³C (D₂O): Tabla 3, Figura 20.

Anal. Calculado para C₁₄H₂₅NO₁₁.H₂O: %C 41,90; %H 6,78. Encontrado: %C 42,03; %H 6,53.

β -D-Galactofuranosil-(1 \rightarrow 6)-2-acetamido-2-desoxi-D-glucitol (30)

A una solución de β -D-galactofuranosil-(1 \rightarrow 6)-2-acetamido-2-desoxi- α -D-glucopiranososa (**29**, 42 mg; 0,11 mmol) en MeOH (2 ml), se agregó NaBH₄ (30 mg; 0,8 mmol) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente por 16 h. Luego de enfriar a 0 °C, se agregó H₂O (0,2 ml) y la solución se pasó por una columna con resina protónica Dowex 50X8-400 (2 x 0,5 cm) y se lavó con MeOH-H₂O 9 :1 (2 ml). Los eluidos se concentraron y se coevaporaron con MeOH (5 x 1 ml) para obtener **30** (42 mg, 99 %) como un sólido (vidrio). *R_f* 0,40 (nPrOH-MeOH-H₂O 7:1:1), [α]_D -56,6° (c 1, H₂O)

RMN ¹H (D₂O): región anomérica δ 5,02 (s, 1H, Galf)

RMN ¹³C (D₂O): Tabla 3, Figura 20.

2,3,5,6-Tetra-O-pivaloil-D-galactono-1,4-lactona (31)

A una mezcla de cloruro de pivaloilo (0,59 ml; 4,8 mmol) en piridina anhidra (0,45 ml) enfriada a 0 °C, se agregó lentamente D-galactono-1,4-lactona (106 mg; 0,6 mmol). Luego de 2 h a 0 °C, se llevó a temperatura ambiente y se dejó agitando 1h más. Se volcó sobre agua-hielo (50 g) agitando vigorosamente, y el jarabe resultante se decantó, se lavó dos veces con agua fría y se disolvió en CH₂Cl₂. La solución se lavó sucesivamente con HCl 1 N (15 ml), H₂O (20 ml), NaHCO₃ (sol. sat.) (20 ml) y H₂O (2 x 20 ml), se secó (Na₂SO₄) y se evaporó para obtener 253 mg del compuesto **31** (82 %) que se recristalizó de MeOH-H₂O. *R_f* 0,57 (hexano-EtOAc 2:1); *mp* 95-96 °C; [α]_D -22,8° (c 1, CHCl₃).

RMN ¹H (100 MHz): Tabla 5.

RMN ¹³C (100 MHz): Tabla 4.

Anal. Calculado para $C_{26}H_{42}O_{10}$: %C 60,68; %H 8,23. Encontrado: %C 60,87; %H 8,37.

2,6-Di-O-pivaloil-D-galactono-1,4-lactona (32)

A una solución de D-galactono-1,4-lactona (534 mg; 3,0 mmol) en piridina anhidra (10 ml) enfriada a $-23\text{ }^{\circ}\text{C}$ (CCl_4/CO_2), se agregó con agitación cloruro de pivaloilo (0,89 ml; 7,2 mmol) en porciones de 0,2 ml cada 0,5 h. Una vez finalizado el agregado, se dejó agitando por 3 h más a $-23\text{ }^{\circ}\text{C}$ y la suspensión resultante se volcó lentamente sobre agua-hielo (100 g). El jarabe obtenido se decantó, se lavó con H_2O (3x 50 ml), se disolvió en CH_2Cl_2 (150 ml) y se extrajo sucesivamente con NaHCO_3 (sol. sat.) (50 ml) y H_2O (3 x 50 ml), se secó (Na_2SO_4) y se concentró. El residuo se trató con hexano (10 ml) y cristalizaron 820 mg (79%) de producto que se caracterizó como 2,6-di-O-pivaloil-D-galactono-1,4-lactona (**32**) y se recrystalizó de $\text{MeOH-H}_2\text{O}$: pf $133\text{-}134\text{ }^{\circ}\text{C}$; $[\alpha]_D -63,7^{\circ}$ (c 1, CHCl_3); R_f 0,25 (hexano-EtOAc 2:1).

RMN ^1H (300 MHz): Tabla 5.

RMN ^{13}C (100 MHz): Tabla 4, Figura 22.

Anal. Calculado para $C_{16}H_{26}O_8$: %C 55,48; %H 7,57. Encontrado: %C 55,09; %H 7,17.

Pivaloilación parcial de D-galactono-1,4-lactona . Síntesis de 2,3,5,6-tetra-O-pivaloil-D-galactono-1,4-lactona (31); 2,5,6-tri-O-pivaloil-D-galactono-1,4-lactona (34); 2,3,6-tri-O-pivaloil-D-galactono-1,4-lactona (33) y 2,6-di-O-pivaloil-D-galactono-1,4-lactona (32).

A una solución de D-galactono-1,4-lactona (1,07 g; 6,0 mmol) en piridina anhidra (20 ml) enfriada a -15 °C (etilenglicol-CO₂(s)), se agregó lentamente y con agitación cloruro de pivaloilo (2,66 ml; 21,6 mmol) en porciones de 0,3 ml durante 2 h. La mezcla de reacción se agitó a 0 °C por 2 h más y luego se volcó lentamente sobre agua-hielo (200 g). El jarabe formado se decantó, se disolvió en CH₂Cl₂ (150 ml) y se extrajo sucesivamente con HCl 1N (75 ml), H₂O (75 ml), NaHCO₃ (sol. sat.) (100 ml) y H₂O (3 x 50 ml), se secó (Na₂SO₄) y se concentró. El residuo siruposo se trató con hexano (30 ml) y cristalizaron 0,62 g de un compuesto puro que mostró propiedades físicas y espectroscópicas idénticas a 2,6-di-O-pivaloil-D-galactono-1,4-lactona (**32**, 30%).

Las aguas madres, que mostraron por ccd (hexano-EtOAc 2:1) tres manchas principales de R_f 0,57; 0,45 y 0,41, se concentraron y se cromatografiaron por columna de sílica gel eluyendo con hexano-EtOAc 6:1. La primera fracción contenía 2,3,5,6-tetra-O-pivaloil-D-galactono-1,4-lactona (**31**; 0,67 g; 21,6%).

De la segunda fracción (R_f 0,45) se aislaron 66 mg de un compuesto que se identificó como 2,3,6-tri-O-pivaloil-D-galactono-1,4-lactona (**33**; 2,6%) que recrystalizó de MeOH-H₂O y dio: pf 113-114 °C, [α]_D -34,8° (c 1, CHCl₃).

RMN ¹H (300 MHz): Tabla 5

RMN ¹³C (100 MHz): Tabla 4

Anal. Calculado para C₂₁H₃₄O₉: %C 58,59; %H 7,96. Encontrado: %C 58,67; %H 7,48.

De la última fracción (R_f 0,41) se obtuvieron 0,25 g de un compuesto que se caracterizó como 2,5,6-tri-*O*-pivaloil-D-galactono-1,4-lactona (**34**; 9,7%) y que recristalizado de MeOH-H₂O dio: pf 95-96 °C, $[\alpha]_D$ -18,9° (c 1, CHCl₃).

RMN ¹H (300 MHz): Tabla 5, Figura 22.

RMN ¹³C (100 MHz): Tabla 4

Anal. Calculado para C₂₁H₃₄O₉: %C 58,59; %H 7,96. Encontrado: %C 58,88; %H 7,90.

Pivaloilación parcial de D-gulono-1,4-lactona. Síntesis de 2,3,5,6-tetra-*O*-pivaloil-D-gulono-1,4-lactona (36**) y 2,5,6-tri-*O*-pivaloil-D-gulono-1,4-lactona (**35**).**

A una solución de D-gulono-1,4-lactona (0,53 g; 3,0 mmol) en piridina anhidra (10 ml) enfriada en baño de hielo-sal (entre -15 y -20 °C), se agregó lentamente cloruro de pivaloil (1,33 ml; 10,8 mmol) en porciones de 0,2 ml durante 2 h. La mezcla de reacción se agitó a 0 °C por 3 h y luego a temperatura ambiente por 20 h. La mezcla se volcó lentamente sobre agua-hielo (100 g). Luego de 4 h, el jarabe formado se decantó, se disolvió en Cl₂CH₂ (100 ml) y se lavó sucesivamente con HCl 1M (2 x 50 ml), NaCl (sol. sat.) (50 ml), NaHCO₃ (sol. sat.) (2 x 50 ml), H₂O (50 ml), y se secó (MgSO₄). Luego de concentrar, el residuo sólido resultante se maceró en hexano caliente (50 ml), y al enfriar cristalizó un sólido cromatográficamente homogéneo (R_f 0,45 hexano-EtOAc 2:1) que se caracterizó como 2,5,6-tri-*O*-pivaloil-D-gulono-1,4-lactona (**35**; 1,10 g; 84,5%). que recristalizó de MeOH-H₂O: pf 146-148 °C, $[\alpha]_D$ -53° (c 1, CHCl₃).

RMN ¹H (300 MHz): Tabla 5, Figura 23.

RMN ¹³C: Tabla 4.

Anal. Calculado para $C_{21}H_{34}O_9$: %C 58,59; %H 7,96. Encontrado: %C 59,04; %H 7,73.

Las aguas madres de la cristalización de hexano se concentraron (~10 ml) y cristalizaron 40 mg de un compuesto en forma de agujas que se identificó como 2,3,5,6-tetra-O-pivaloil-D-gulono-1,4-lactona (**36**; 2,6%): R_f 0,54 (hexano-EtOAc 2:1), pf 175-177 °C, $[\alpha]_D -24,2^\circ$ (c 1, $CHCl_3$).

RMN 1H : Tabla 5, Figura 23.

RMN ^{13}C : Tabla 4.

Anal. Calculado para $C_{26}H_{42}O_{10}$: %C 60,68; %H 8,23. Encontrado: %C 60,87; %H 8,37.

Pivaloilación parcial de L-manono-1,4-lactona. Síntesis de 2,3,5,6-tetra-O-pivaloil-L-manono-1,4-lactona (38**) y 2,5,6-tri-O-pivaloil-L-manono-1,4-lactona (**37**).**

A una solución de L-manono-1,4-lactona (0,53 g; 3,0 mmol) en piridina anhidra (10 ml) enfriada a 0 °C, se agregó lentamente cloruro de pivaloilo (1,33 ml, 10,8 mmol) en porciones de 0,2 ml durante 2 h y la mezcla de reacción se agitó a 0 °C por 3 h. Luego de 20 h de agitación a temperatura ambiente, la mezcla se volcó lentamente sobre agua-hielo (100 g). El jarabe obtenido se decantó y se disolvió en Cl_2CH_2 (100 ml) y se lavó sucesivamente con HCl 1M (2 x 50 ml), NaCl (sol. sat.) (50 ml), $NaHCO_3$ (sol. sat.) (2 x 50 ml), H_2O (50 ml), se secó ($MgSO_4$) y se evaporó. El residuo resultante se trató con hexano caliente y se dejó a 5°C toda la noche mientras cristalizaba lentamente un compuesto de R_f 0,54 (hexano-EtOAc 2:1) que se filtró y se caracterizó como 2,5,6-tri-O-pivaloil-L-manono-1,4-lactona (**37**; 0,64 g;

50 %). Luego de recristalizar de MeOH-H₂O dio: pf 126-128 °C, $[\alpha]_D -61,2^\circ$ (c 1, CHCl₃)

RMN ¹H : Tabla 5, Figura 25.

RMN ¹³C: Tabla 4.

Anal. Calculado para C₂₁H₃₄O₉: %C 58,59; %H 7,96. Encontrado: %C 58,55; %H 7,96.

Las aguas madres de la cristalización de **37** se concentraron y el residuo se cromatografió en una columna de sílica gel eluyendo con tolueno-EtOAc 19:1. Se obtuvo 0,10 g de un compuesto de mayor movilidad (R_f 0,67 hexano-EtOAc 2:1) que se identificó como 2,3,5,6-tetra-O-pivaloil-L-manono-1,4-lactona (**38**; 6,5%) y recristalizó de MeOH-H₂O: pf 159-161 °C, $[\alpha]_D -17,4^\circ$ (c 1, CHCl₃).

RMN ¹H (300 MHz): Tabla 5, Figura 25.

RMN ¹³C (100 MHz): Tabla 4.

Anal. Calculado para C₂₆H₄₂O₁₀: %C 60,68; %H 8,23. Encontrado: %C 60,97; %H 8,06.

No se pudieron aislar otros derivados pivaloilados de manono-1,4-lactona dado que en contacto con la sílica se descomponían.

5,6-O-Isopropilidén-D-galactono-1,4-lactona (39)

A una suspensión de D-galactono-1,4-lactona (1,12 g; 6,3 mmol) en acetona anhidra (30 ml), se agregó lentamente H₂SO₄ (c) (60 µl) con agitación. Luego de 22 h a temperatura ambiente, se neutralizó agregando lentamente NH₄OH y se secó con MgSO₄. La suspensión se filtró sobre lecho de celite y se evaporó para obtener un jarabe que se purificó por cromatografía en columna (sílica gel) eluyendo con

EtOAc para obtener **39** (1,12 g; 81 %), R_f 0,43 (EtOAc) $[\alpha]_D -46,3^\circ$ (c 1, acetona), lit. -46° (c 1, acetona, Copeland & Stick, 1978).

5,6-O-Isopropilidén-2-O-pivaloil-D-galactono-1,4-lactona (**40**)

A partir de 5,6-O-isopropilidén-D-galactono-1,4-lactona (**39**):

A una suspensión de 5,6-O-isopropilidén-D-galactono-1,4-lactona (**39**, 1,1 g; 5,0 mmol) en piridina anhidra (20 ml) enfriada a 0°C , se agregó con agitación cloruro de pivaloilo (0,68 ml; 5,5 mmol) en porciones de 0,2 ml cada 20 min. Luego se llevó a temperatura ambiente y a las 4 h de iniciada la reacción se agregó otros 0,12 ml de acilante y se agitó 1 h más. Se volcó lentamente la mezcla sobre agua-hielo (300 g) y se dejó agitando por 1 h. Se extrajo con Cl_2CH_2 (2 x 50 ml) y la fase orgánica se lavó sucesivamente con HCl 5%, H_2O , NaHCO_3 (ss) y H_2O . Se secó (MgSO_4) y se evaporó para obtener 1,2 g de 5,6-O-isopropilidén-2-O-pivaloil-D-galactono-1,4-lactona (**40**) como un sólido amorfo (79 %) que se recristalizó de hexano-EtOAc, R_f 0,5 (tolueno-EtOAc 1:1); pf $127-128^\circ\text{C}$; $[\alpha]_D -73,3^\circ$ (c 1, Cl_3CH).

RMN ^1H (Figura 26): δ 5,22 (d, 1 H, $J_{2,3} = 7,4$ Hz; H-2); 4,42 (ddd; 1 H; $J_{3,4} = 7,3$ Hz; H-3); 4,38 (ddd, 1 H, $J_{5,6} = 6,7$ Hz; H-5); 4,24 (dd; 1 H; $J_{4,5} = 3,3$ Hz; H-4); 4,14 (dd; 1 H; $J_{6,6'} = 8,5$ Hz; H-6); 4,02 (dd, 1 H; $J_{5,6'} = 6,6$ Hz; H-6'); 3,51 (d; 1 H; $J = 2,1$ Hz; OH); 1,44 (s, 3 H; CH_3C); 1,39 (s, 3 H; CH_3C); 1,29 (s; 9 H, $(\text{CH}_3)_3\text{C}$).

RMN ^{13}C (Figura 26, Tabla 6): δ 179,4 ($(\text{CH}_3)_3\text{CCO}$); 172,4 (C-1); 110 ($(\text{CH}_3)_2\text{C}$); 79,8 (C-4); 76,8 (C-2); 74,1; 73,4 (C-3; C-5); 65,0 (C-6); 38,9 ($(\text{CH}_3)_3\text{CCO}$); 27,0 ($(\text{CH}_3)_3\text{CCO}$); 26,0; 25,5 ($(\text{CH}_3)_2\text{C}$).

Anal. Calculado para $\text{C}_{14}\text{H}_{22}\text{O}_7$: %C 55,62; %H 7,33. Encontrado: %C 55,76; %H 7,53.

A partir de *D*-galactono-1,4-lactona:

A una suspensión de *D*-galactono-1,4-lactona (5,0 g; 28,1 mmol) en una mezcla de acetona - 2,2-dimetoxipropano 5:1 (60 ml) enfriada a 0°C, se agregó H₂SO₄ (c) (30 ml). Luego de 30 min de agitación, la solución resultante se llevó a pH neutro adicionando NH₄OH. La suspensión se filtró y el filtrado se evaporó a presión reducida. El jarabe obtenido se disolvió en piridina anhidra (25 ml) y la solución se enfrió a 0°C. Se agregó lentamente y con agitación cloruro de pivaloilo (4,2 ml; 33,7 mmol), se llevó a temperatura ambiente por 3 h, y luego de agregar otros 0,4 ml (3 mmol) de acilante, se agitó por 1 h más. La mezcla resultante se volcó sobre agua-hielo (300 g) y se extrajo con Cl₂CH₂ (2 x 100 ml). La fase orgánica se lavó sucesivamente con HCl 5% (3 x 100 ml), NaCl (ss) (2 x 100 ml), NaHCO₃ (ss) (100 ml) y H₂O (3 x 100 ml), se secó (MgSO₄), filtró y se evaporó para obtener **40** (5,7 g; 67 %) que fue recristalizado de hexano-EtOAc y presentó las mismas propiedades físicas y espectroscópicas que el descrito anteriormente.

Bromuro de 2,3,4,6-tetra-O-acetil- α -D-galactopiranosilo (42)

A un balón seco con penta-O-acetil- β -D-galactopiranososa anhidra (1,0 g; 2,56 mmol) se agregó HBr/AcOH glacial 32 % (2,3 ml) y la suspensión se agitó a temperatura ambiente por 1,5 h al abrigo de la luz. La solución se concentró al vacío y luego se coevaporó con tolueno (5 x 5 ml). Al jarabe obtenido se le adicionó éter secado sobre alúmina y luego hexano, precipitando un sólido blanco que se filtró rápidamente y se lavó con éter etílico-hexano 1:4. Se secó rápidamente al vacío y al abrigo de la luz y se dejó en freezer a -20°C, *R_f* 0,30 (tolueno-EtOAc 9:1).

2,3,4,6-Tetra-O-acetil-D-galactopiranososa (41)

A partir de penta-O-acetil-β-D-galactopiranososa:

A una solución de penta-O-acetil-β-D-galactopiranososa (200 mg; 0,51 mmol) en Cl₂CH₂ anhidro (5 ml) enfriada a 0°C, se agregó SnCl₄ (71 μl, 0,61 mmol). Luego de 20 min, se agregó H₂O (70 μl; 3,9 mmol) y se formó un precipitado que se disolvió al agregar CH₃CN (0,3 ml). La solución se llevó a temperatura ambiente y luego de 20 h, se diluyó con Cl₂CH₂ y se agregó NaHCO₃ (ss) (5 ml) y se agitó por 30 min.

La fase orgánica se separó y se lavó con H₂O hasta pH 7. Se secó, se evaporó y el jarabe se purificó por columna cromatográfica eluyendo con hexano-EtOAc 3:2 para obtener **41** (97 mg, 55 %). R_f 0,31 y 0,20 (hexano-EtOAc 1:1), 0,32 y 0,45 (hexano-EtOAc 2:3) para los dos anómeros.

A partir de bromuro de 2,3,4,6-tetra-O-acetil-α-D-galactopiranosilo (42):

A una solución de bromuro de 2,3,4,6-tetra-O-acetil-α-D-galactopiranosilo (**42**, 1,0 g; 2,43 mmol) en acetona (3 ml), se agregó H₂O (0,2 ml; 11,1 mmol) y se agitó a temperatura ambiente por 5 min. Se agregó Ag₂CO₃ recién preparado (600 mg; 2,18 mmol) y se agitó vigorosamente por 15 min a temperatura ambiente y luego otros 15 min a 35°C. La suspensión se filtró sobre lecho de celite y el filtrado se evaporó para obtener **41** (0,84 g; 99 %) con las mismas propiedades que la muestra preparada por el método anterior.

Tricloroacetamidato de O-(2,3,4,6-tetra-O-acetil- α -D-galactopiranosilo) (43)

A una solución de 2,3,4,6-tetra-O-acetil-D-galactopiranososa (**41**, 0,84 g; 2,41 mmol) en Cl_2CH_2 anhidro (15 ml), enfriada a 0°C se agregó Cl_3CCN (0,73 ml; 7,28 mmol) y posteriormente, 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-eno (DBU; 0,36 ml; 2,41 mmol) y se dejó agitando por 30 min. La solución roja se diluyó con Cl_2CH_2 (100 ml) y se extrajo sucesivamente con HCl 2% (100 ml); H_2O (3 x 100 ml), se secó (MgSO_4) y se evaporó. El residuo mostró por ccd un compuesto principal de R_f 0,59 (hexano-EtOAc 1:1) levemente impurificado con otro compuesto de menor movilidad, que no pudo ser purificado por recristalización. Por cromatografía en columna de sílica gel eluyendo con hexano-EtOAc 5:2, se aisló **43** (0,94 g; 79 %) que cristalizó de una mezcla de hexano-tolueno. $[\alpha]_D^{25} +114,9^\circ$; lit, $[\alpha]_D^{25} = +115,5^\circ$ (c 1 Cl_3CH , Amwam-Zollo & Sinay, 1986); pf $122-123^\circ\text{C}$, lit, $122-123^\circ\text{C}$ (benceno-hexano, Amwam-Zollo & Sinay, 1986).

RMN ^1H : δ 8,65 (s, 1 H, NH); 6,55 (d, 1 H, $J_{1,2} = 3,1$ Hz; H-1); 5,51 (dd; 1 H, $J_{4,5} = 1,6$ Hz; H-4); 5,38 (dd, 1 H; $J_{3,4} = 2,8$ Hz; H-3); 5,30 (dd, 1 H; $J_{2,3} = 10,7$ Hz; H-2); 4,40 (ddd, 1 H, $J_{5,6} = 6,4$ Hz; H-5); 4,13 (dd, 1 H; $J_{6,6'} = 11,3$ Hz; H-6); 4,03 (dd, 1 H; $J_{5,6'} = 6,8$ Hz; H-6'); 2,19; 1,98; 1,96 (3s, 12 H, CH_3CO).

RMN ^{13}C : δ 170,1; 169,9; 169,8 (CO); 160,8 (OC=N); 93,5;93,4 (C-1, CCl_3); 68,9; 67,4; 67,3; 66,8; 61,1 (C-6); 20,4 (CH_3)

2,3,4,6-Tetra-O-acetil- β -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 3)-5,6-O-isopropiliden-2-O-pivaloil-D-galactono-1,4-lactona (44)

A una solución de 5,6-O-isopropiliden-2-O-pivaloil-D-galactono-1,4-lactona (**40**; 2,0 g; 6,6 mmol) y tricloroacetamidato de O-(2,3,4,6-tetra-O-acetil- α -D-

galactopiranosilo) (**43**, 4,2 g; 8,5 mmol) en Cl_2CH_2 anhidro recién destilado (35 ml), se agregaron tamices moleculares pulverizados de 4 Å (2,0 g) recién activados y se agitó vigorosamente bajo atmósfera de nitrógeno por 1 h. La suspensión se enfrió a -20°C en baño de etilenglicol- $\text{CO}_2(\text{s})$, se agregó lentamente triflato de trimetilsililo (0,31 ml; 1,70 mmol) y se agitó por espacio de 3 h. Luego de 16 h en freezer a -20°C , una ccd mostró que tanto el tricloroacetamido **43** (R_f 0,66, tolueno-EtOAc 1:1) como la lactona **40** (R_f 0,50, tolueno-EtOAc 1:1) se habían consumido. La suspensión se neutralizó con *N*-diisopropiletilamina y se filtró sobre lecho de celite. El filtrado se diluyó con Cl_2CH_2 (100 ml), se lavó con H_2O , se secó (MgSO_4) y se evaporó. Por cromatografía en columna (7 x 4 cm, sílica gel) eluyendo con tolueno-EtOAc 5:1 se obtuvo un sólido amorfo (3,5 g; 84 %) que fue caracterizado como 2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- β -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 3)-5,6-*O*-isopropiliden-2-*O*-pivaloil-D-galactono-1,4-lactona (**44**), R_f 0,57 (tolueno-EtOAc 1:1); $[\alpha]_D -27,5^\circ$ (c 1, Cl_3CH).

RMN ^1H (Figura 27): δ 5,49 (d; 1 H; $J_{2,3} = 6,0$ Hz; H-2); 5,39 (d, 1 H, $J_{3',4'} = 3,3$ Hz; H-4'); 5,18 (dd, 1 H, $J_{2',3'} = 10,4$ Hz, $J_{1',2'} = 7,8$ Hz; H-2'); 4,97 (dd, 1 H, $J_{2',3'} = 10,4$; $J_{3',4'} = 3,3$ Hz; H-3'); 4,59, (d, 1 H, $J_{1',2'} = 7,8$ Hz; H-1'); 4,54-4,51 (m, 1H), 4,43-4,33 (m, 2 H), 4,15-3,87, (m, 5 H); 2,15; 2,06; 1,98 (3s, 12 H; CH_3CO); 1,41; 1,38 (2s; 6 H; $(\text{CH}_3)_2\text{C}$), 1,28 (s, 9 H, $(\text{CH}_3)_3\text{CCO}$)

RMN ^{13}C : Tabla 6, Figura 27.

Anal. Calculado para $\text{C}_{28}\text{H}_{40}\text{O}_{16}$: %C 53,16; %H 6,37. Encontrado: %C 53,03; %H 6,81.

2,3,4,6-Tetra-O-acetil- β -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 3)-5,6-O-isopropilidén-2-O-pivaloil-D-galactofuranosa (45)

A una solución de bis(2-butil-3-metil)borano (20,5 mmol) en THF (5,5 ml) enfriada a 0°C y bajo atmósfera de nitrógeno, se agregó una solución de 2,3,4,6-tetra-O-acetil- β -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 3)-5,6-O-isopropilidén-2-O-pivaloil-D-galactono-1,4-lactona (**44**, 2,6 g; 4,1 mmol) en THF anhidro (8 ml). Al cabo de 16 h de agitación a temperatura ambiente, una ccd reveló que **44** se había consumido totalmente (R_f 0,57, tolueno:EtOAc 1:1) y mostraba un único producto de R_f 0,45 (tolueno-EtOAc 1:1). Se enfrió la solución a 0 °C y se dejó destapada por 15 min y se agregó muy lentamente H₂O (5 ml). A los 15 min se agregó H₂O₂ 30 % (8 ml) en porciones de 0,5 ml mientras se ajustaba el pH de la fase acuosa a 8 con KOH 2,5 M. Una vez finalizado el agregado, se dejó agitando a 0 °C por 1h. Se adicionó H₂O (30 ml) y se extrajo con Cl₂CH₂ (3 x 100 ml). La fase orgánica se lavó con H₂O, se secó (MgSO₄) y se concentró obteniéndose un jarabe que se coevaporó con MeOH (5 x 20 ml) para eliminar el ácido bórico. Una columna rápida de sílica gel, eluyendo con tolueno-EtOAc 4:1 permitió aislar 2,3,4,6-tetra-O-acetil- β -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 3)-5,6-O-isopropilidén-2-O-pivaloil-D-galactofuranosa (**45**, 2,4 g; 92 %) como un sólido amorfo. $[\alpha]_D -23,8^\circ$ (c 1, Cl₃CH)

RMN ¹³C (Figura 28): δ 177,6 ((CH₃)₃CCO), 170,2; 169,9; 109,9 ((CH₃)₂C); 100,8 (C-1'); 99,7 (C-1 β); 94,5 (C-1 α); 83,6 (C-4 β); 82,5* (C-2 β); 81,4* (C-3 β); 80,9; 78,8; 78,7; 75,8; 70,9; 70,7 ; 68,5 (C-2'), 67,0 (C-4'), 66,8; 65,3 (C-6); 61,2 (C-6'); 38,8 y 38,6 ((CH₃)₃CCO); 27,0 y 26,9 ((CH₃)₃CCO); 26,2; 26,1; 25,6 y 25,2 ((CH₃)₂C); 20,5 (CH₃CO).

formado y la mezcla se volcó lentamente sobre agua-hielo (200 g). El sólido amorfo resultante se decantó, se lavó con H₂O, se disolvió en Cl₂CH₂ (30 ml), se lavó con H₂O (2 x 30 ml), se secó (MgSO₄) y se evaporó. El producto de reacción presentaba por ccd 3 manchas de R_f 0,42; 0,53 y 0,59 (tolueno-EtOAc 1:1). La mezcla se separó parcialmente por cromatografía en columna eluyendo con tolueno-EtOAc 9:2 y se obtuvieron 63,5 mg (14 %) del producto de R_f 0,59; 28 mg (6%) de una mezcla de productos de R_f 0,59 y 0,53; 106 mg (23%) del producto de R_f 0,53; 61 mg (13 %) de una mezcla de productos de R_f 0,53 y 0,42; y por último 137 mg (30%) del compuesto de R_f 0,42 (86 % rendimiento total).

El producto de R_f 0,59 resultó ser un sólido amorfo que se identificó como: 2,3,4,6-tetra-O-acetil-β-D-galactopiranosil-(1→3)-1,5,6-tri-O-acetil-2-O-pivaloil-β-D-galactofuranosa (**47**), [α]_D -26,8° (c 1, Cl₃CH)

RMN ¹H (Figura 29): δ 6,13 (s, 1 H; H-1); 5,40 (m, 1 H, H-5), 5,39 (d, 1 H; J_{3',4'} = 3,3 Hz; H-4') ; 5,17 (dd, 1 H, J_{1',2'} = 7,7 Hz J_{2',3''} = 10,4 Hz; H-2') ; 5,04 (dd, 1 H ; J_{3',4'} = 3,3 Hz J_{2',3'} = 10,4 Hz ; H-3') ; 4,95 (d, 1 H ; J_{2,3} = 1,1 Hz ; H-2) ; 4,69 (d, 1 H ; J_{1',2'} = 7,7 Hz, H-1') ; 4,38-3,91 (m, 7 H) ; 2,14 ; 2,09 ; 2,06 ; 2,04 ; 2,01 ; 1,97 (6s, 21 H ; CH₃CO) ; 1,22 (s, 9 H ; (CH₃)₃CCO)

RMN ¹³C : Tabla 7, Figura 29.

Anal. Calculado para C₃₁H₄₄O₁₉: %C 51,67; %H 6,15. Encontrado: %C 51,68; %H 6,24.

La mancha cromatográfica de R_f 0,53 resultó ser una mezcla de productos y luego de recristalizar de EtOH-H₂O, se aisló 2,3,4,6-tetra-O-acetil-β-D-galactopiranosil-(1→3)-1,4,6-tri-O-acetil-2-O-pivaloil-β-D-galactopiranososa (**49**): pf 81-83 °C; [α]_D 9,6° (c 1, Cl₃CH).

RMN ¹H (Figura 30): δ 5,65 (d, 1 H; J_{1,2} = 8,4 Hz, H-1); 5,44 (d, 1 H; J_{3',4'} = 3,4 Hz; H-4') ; 5,37 (d, 1 H; J_{3,4} = 3,6 Hz; H-4), 5,33 (dd, 1 H, J_{1,2} = 8,4 Hz J_{2,3'} = 9,5 Hz;

H-2), 5,08 (dd, 1 H, $J_{1,2'} = 7,8$ Hz $J_{2,3''} = 10,6$ Hz; H-2') ; 4,87 (dd, 1 H ; $J_{3,4'} = 3,4$ Hz $J_{2,3'} = 10,6$ Hz ; H-3') ; 4,57 (d, 1 H ; $J_{1,2'} = 7,8$ Hz, H-1') ; 4,26-3,75 (m, 7 H) ; 2,18 ; 2,08 ; 2,06 ; 2,02 ; 1,96 (5s, 21 H ; CH₃CO) ; 1,23 (s, 9 H ; (CH₃)₃CCO)

RMN ¹³C (Figura 30): δ 176,3 ((CH₃)₃CCO) ; 170,3 ; 169,8 ; 169,2 ; 168,9 ; 101,0 (C-1') ; 92,0 (C-1) ; 74,6 (C-3) ; 72,4 ; 70,9 ; 70,5 ; 70,0 ; 68,9 ; 68,4 ; 66,7 ; 61,8* (C-6') ; 61,0 (C-6) ; 38,8 ((CH₃)₃CCO) ; 27,1 ((CH₃)₃CCO) ; 20,6 ; 20,5 (CH₃CO).

Anal. Calculado para C₃₁H₄₄O₁₉: %C 51,67; %H 6,15. Encontrado: %C 51,52; %H 6,03.

La última fracción de R_f 0,42 cristalizó de EtOH y fue caracterizada como 2,3,4,6-tetra-O-acetil-β-D-galactopiranosil-(1→3)-1,4,6-tri-O-acetil-2-O-pivaloil-α-D-galactopiranososa (**50**): pf 179-181 °C; [α]_D +48,5° (c 1, Cl₃CH).

RMN ¹H (Figura 31): δ 6,33 (d, 1 H, $J_{1,2} = 3,8$ Hz ; H-1) ; 5,50 (d, 1 H, $J_{3,4} = 3,4$; H-4) ; 5,37 (dd ; 1 H, $J_{3,4'} = 3,4$; $J_{4,5'} = 0,9$ Hz ; H-4') ; 5,26 (dd, 1 H, $J_{2,3} = 10,4$; $J_{1,2} = 3,8$ Hz ; H-2) ; 5,08 (dd ; 1 H ; $J_{2,3'} = 10,6$; $J_{1,2'} = 7,7$ Hz ; H-2') ; 4,90 (dd ; 1 H, $J_{2,3'} = 10,6$; $J_{3,4'} = 3,4$ Hz ; H-3') ; 4,66 (d, 1H ; $J_{1,2'} = 7,7$ Hz; H-1') ; 4,35-3,84 (m, 7 H) ; 2,18 ; 2,17 ; 2,14 ; 2,06 ; 1,97 ; 1,96 (6s, 21H, CH₃CO) ; 1,20 (s, 9 H, (CH₃)₃CCO).

RMN ¹³C (Figura 31): δ 176,9 ((CH₃)₃CCO) ; 170,3 ; 170,0 ; 169,8 ; 168,9 ; 168,6 ; 100,6 (C-1') ; 89,2 (C-1), 70,8 ; 70,6 ; 70,4 ; (C-3, C-5', C-3') ; 69,3 ; 9,2 ; 68,7 ; 66,5 (C-4') ; 61,9 (C-6) ; 60,6 (C-6').

Anal. Calculado para C₃₁H₄₄O₁₉: %C 51,67; %H 6,15. Encontrado: %C 51,69; %H 6,13.

β -D-Galactopiranosil-(1 \rightarrow 3)-D-galactitol (51)

A una solución de 2,3,4,6-tetra-O-acetil- β -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 3)-2-O-pivaloil-D-galactosa (**46**, 240 mg; 0,40 mmol) en MeOH anhidro (4 ml) se agregó NaBH₄ (120 mg; 3,2 mmol) a temperatura ambiente. Luego de 16 h de agitación se observó la precipitación de un sólido. Se enfrió a 0 °C, se agregó NaOMe en MeOH 0,5 M (6 ml; 3 mmol) y se llevó a temperatura ambiente. Luego de 2 h, la mezcla se había solubilizado totalmente y una ccd mostró un único producto de R_f 0,32 (n-PrOH-EtOH-H₂O 7:1:1). Se agregó H₂O (1 ml), y se pasó por una columna de resina protónica Amberlite IR-120(plus) (3 x 1,5 cm). Se concentró y el residuo se coevaporó con MeOH (3 x 3 ml) y con H₂O (3 x 3 ml) para obtener un jarabe incoloro (**51**; 135 mg; 98 %) que cristalizó de EtOH, pf 103-104 °C; [α]_D -11,0° (c 1, H₂O).

RMN ¹H (D₂O) : zona anomérica δ 4,46 (d, 1H, $J_{1,2}$ = 7,3 Hz, H-1')

RMN ¹³C (D₂O) : Tabla 8, Figura 32.

Anal. Calculado para C₁₂H₂₄O₁₁.H₂O: %C 39,78; %H 7,23. Encontrado: %C 39,84; %H 7,25.

Tricloroacetamidato de O-(2,3,4,6-tetra-O-bencil- β -D-galactopiranosilo) (52)

Se empleó el procedimiento de Wegmann & Schmidt (1987).

A una solución de 2,3,4,6-tetra-O-bencil-D-galactosa (400 mg; 0,74 mmol) en Cl₂CH₂ anhidro (4 ml), se agregó K₂CO₃ anhidro (400 mg) y Cl₃CCN (0,3 ml; 3,0 mmol) y se agitó vigorosamente. Al cabo de 5 h, la suspensión se filtró sobre lecho de celite y se lavó el lecho con Cl₂CH₂ (5 ml). El filtrado se evaporó y el residuo aceitoso cristalizó de una mezcla éter de petróleo: éter 1:1 para dar tricloroacetamidato de O-(2,3,4,6-tetra-O-bencil- β -D-galactopiranosilo) (**52**, 350 mg,

69%). R_f 0.40 (hexano-EtOAc 4:1), pf 87-88 °C, lit, 87 °C (Wegmann & Schmidt, 1987)

RMN ^1H : δ 8,67 (s, 1H, NH), 7,36-7,28 (20 H, C_6H_5); 5,80 (d, 1H $J_{1,2} = 7,9$ Hz, H-1); 4,98-3,53 (m, 14 H).

RMN ^{13}C : δ 161,5 (O-C=N); 138,5-127,5 (C-aromáticos); 98,7 (CCl_3); 82,2 (C-1); 78,1; 75,2; 74,8; 74,4; 73,4; 73,0; 68,1 (C-6).

2,3,4,6-Tetra-O-bencil- α -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 3)-5,6-O-isopropilidén-2-O-pivaloil-D-galactono-1,4-lactona (53)

Sobre una mezcla de tricloroacetamidato de O-(2,3,4,6-tetra-O-bencil- β -D-galactopiranosilo) (**52**, 300 mg; 0,44 mmol), 5,6-O-isopropiliden-2-O-pivaloil-D-galactono-1,4-lactona (**40**, 141 mg; 0,47 mmol) y tamices moleculares en polvo de 4 Å recién activados, se destiló éter anhidro (4 ml) sobre atmósfera de nitrógeno. La suspensión se agitó fuertemente a 0 °C. Luego de 20 min, se agregó lentamente triflato de trimetilsililo (25 μl , 0,14 mmol) y se continuó la agitación por 2 h a 0 °C y bajo nitrógeno. La suspensión se neutralizó con diisopropiletilamina y se filtró sobre lecho de celite que se lavó con Cl_2CH_2 (2 ml). El filtrado se llevó a sequedad obteniéndose un jarabe que por ccd mostraba un compuesto mayoritario de R_f 0,34 (tolueno-EtOAc 9:1). Por columna cromatográfica (sílica gel) eluyendo con tolueno EtOAc 20:1 se obtuvo 2,3,4,6-tetra-O-bencil- α -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 3)-5,6-O-isopropilidén-2-O-pivaloil-D-galactono-1,4-lactona (**53**, 269 mg, 74 %). $[\alpha]_D^{20} +31,5^\circ$ (c 1, Cl_3CH).

RMN ^1H : δ 7,42-7,23 (m, 20 H, C_6H_5); 5,61 (d, 1 H, $J_{2,3} = 7,5$ Hz; H-2); 5,00-3,45 (m, 20 H); 1,47, 1,40 (2s, 6 H, $(\text{CH}_3)_2\text{C}$); 1,26 (s, 9 H, $(\text{CH}_3)_3\text{C}$)

RMN ^{13}C (Figura 33): δ 176,7 ($(\text{CH}_3)_3\text{CCO}$), 169,1 (C-1); 138,5-127,3 (C-aromáticos); 110,2 ($(\text{CH}_3)_2\text{C}$); 99,3 (C-1'); 78,8; 78,4; 76,2; 75,0; 74,4; 74,0; 73,9; 73,5; 73,1; 72,6; 70,1; 67,7 (C-6'); 64,9 (C-6); 38,6 ($(\text{CH}_3)_3\text{CCO}$); 26,9 ($(\text{CH}_3)_3\text{CCO}$); 25,9; 25,4 ($(\text{CH}_3)_2\text{C}$).

2,3,4,6-Tetra-O-acetil- α -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 3)-5,6-di-O-acetil-2-O-pivaloil-D-galactono-1,4-lactona (54)

Una suspensión de 2,3,4,6-tetra-O-bencil- α -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 3)-5,6-O-isopropilidén-2-O-pivaloil-D-galactono-1,4-lactona (**53**, 40 mg, 0,048 mmol) y 10 % Pd/C (30 mg) en EtAcO (2 ml) se hidrogenó a 1 atm .por 24 h. Se filtró el catalizador y el filtrado se llevó a sequedad. Se agregó AcOH acuoso 80 % (1,5 ml) y se calentó la solución a 50 °C por 20 min. Se evaporó el solvente, se agregó piridina (0,5 ml), se enfrió la solución a 0 °C y se agregó anhídrido acético (0,5 ml). Luego de 5 h, se agregó MeOH y se dejó agitando por 0,5 h más. Se llevó a sequedad y el residuo se purificó por cromatografía en columna para dar 23 mg de **54** (70 %) como un sólido amorfo. $[\alpha]_D^{20}$ (c 0,3, Cl_3CH).

RMN ^1H : Tabla 10, Figura 34

RMN ^{13}C : Tabla 9, Figura 34.

2,3,4,6-Tetra-O-bencil- α -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 3)-5,6-O-isopropilidén-2-O-pivaloil-D-galactofuranosa (55)

A una solución de bis(2-butil-3-metil)borano (1,6 mmol) en THF anhidro (0,8 ml) enfriada a 0°C y bajo atmósfera de nitrógeno, se agregó una solución de 2,3,4,6-

tetra-O-bencil- α -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 3)-5,6-O-isopropilidén-2-O-pivaloil-D-galactono-1,4-lactona (**53**, 132 mg; 0,16 mmol) en THF anhidro (1,5 ml). Luego de 20 h de agitación a temperatura ambiente, una ccd mostró la desaparición del producto de partida (R_f 0,71 tolueno:EtOAc 5:1) y la aparición de un único producto (R_f 0,33 tolueno:EtOAc 5:1). La solución se enfrió a 0 °C y se agregó lentamente H₂O (0,2 ml). A los 30 min de agitación, se agregó H₂O₂ 30 % (0,5 ml) mientras se ajustaba el pH de la fase acuosa a 8 con KOH 2,5 M. Una vez finalizado el agregado, se dejó agitando a 0°C por 1 h. Se adicionó H₂O (10 ml) y se extrajo con Cl₂CH₂ (2 x 40 ml). Los extractos orgánicos se lavaron con H₂O (2 x 20 ml), se secaron (MgSO₄) y se concentraron. El jarabe resultante se coevaporó con MeOH (5 x 3 ml) para eliminar el ácido bórico. Por cromatografía en columna de sílica gel, eluyendo con tolueno-EtOAc 7:1 se aisló 2,3,4,6-tetra-O-bencil- α -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 3)-5,6-O-isopropilidén-2-O-pivaloil-D-galactofuranosa (**55**, 117 mg; 88 %) como un sólido amorfo, $[\alpha]_D^{25}$ 43,3° (c 1, Cl₃CH).

RMN ¹H (Cl₃CD, D₂O) : δ 7,36,-7,29 (m, 20 H, C₆H₅); 5,46 (d, 0,5 H, $J_{1,2} = 4,5$ Hz; H-1 α); 5,23 (s, 0,5 H, H-1 β); 5,18 (sa, 1H, H-2 β); 5,01-3,45 (m), 1,45, 1,37 (2s, 6 H, (CH₃)₂C); 1,21;1,20 (2s, 9 H, ((CH₃)₃C)

RMN ¹³C (Figura 35) : δ 177,2 ((CH₃)₃CCO); 138,6-127,4 (C-aromáticos) ; 109,8 ((CH₃)₂C); 101,0 (C-1 β); 98,1; 97,2 (C-1') ; 95,2 (C-1 α); 83,4 (C-4 β); 81,7* (C-2 β); 81,4* (C-3 β); 80,2; 79,3; 78,8; 78,6; 78,4; 76,6; 76,2; 75,5; 74,9; 74,7; 73,9; 73,8; 73,5; 72,9;70,0;69,0;68,2;65,6 (C-6); 38,6; 38,5 ((CH₃)₃CCO); 27,1; 27,0 ((CH₃)₃CCO); 26,4;26,1; 25,5; 25,2 ((CH₃)₂C).

Anal. Calculado para C₄₈H₅₈NO₁₂: %C 69,71; %H 7,07. Encontrado: %C 69,57; %H 7,15.

2,3,4,6-Tetra-O-benzoil- β -D-galactofuranosil-(1 \rightarrow 3)-2-O-pivaloil-D-galactono-1,4-lactona (56)

A una solución de perbenzoil- α,β -D-galactofuranosa (**5**, 0,55 g; 0,79 mmol) en Cl_2CH_2 anhidro (4 ml) enfriada a 0 °C, se agregó SnCl_4 (92 μl , 0,79 mmol). Se continuó la agitación por 10 min y se agregó 5,6-O-isopropiliden-2-O-pivaloil-D-galactono-1,4-lactona (**40**, 0,2 g; 0,66 mmol). Luego de 6 h de reacción, se observó por ccd que **40** se había consumido totalmente y además mostraba una mancha principal de mucha menor movilidad (R_f 0,38, tolueno-EtOAc 3:2). La mezcla de reacción se diluyó con Cl_2CH_2 (20 ml) y se volcó lentamente sobre NaHCO_3 (ss) (50 ml). Se extrajo la fase orgánica, y la fase acuosa se extrajo nuevamente con Cl_2CH_2 (2 x 30 ml). Los extractos orgánicos combinados se lavaron con NaCl (ss) y H_2O hasta neutralidad, se secaron (MgSO_4) y se evaporaron. Por cromatografía en columna (sílica gel) eluyendo primero con tolueno-EtOAc 9:1 y luego con tolueno-EtOAc 7:2, se obtuvo el compuesto 2,3,4,6-tetra-O-benzoil- β -D-galactofuranosil-(1 \rightarrow 3)-2-O-pivaloil-D-galactono-1,4-lactona (**56**, 0,32 g; 58%) que cristalizó de hexano-EtOAc: pf 163-165 °C; $[\alpha]_D -15,5^\circ$ (c 1, Cl_3CH).

RMN ^1H : Tabla 11, Figura 37

RMN ^{13}C : Tabla 12, Figura 36.

Anal. Calculado para $\text{C}_{45}\text{H}_{44}\text{O}_{16}$: %C 64,28; %H 5,27. Encontrado: %C 64,00; %H 5,24.

2,3,4,6-Tetra-O-benzoil- β -D-galactofuranosil-(1 \rightarrow 3)-5,6-di-O-benzoil-2-O-pivaloil-D-galactono-1,4-lactona (57)

A una solución de 2,3,4,6-tetra-O-benzoil- β -D-galactofuranosil-(1 \rightarrow 3)-2-O-pivaloil-D-galactono-1,4-lactona (**56**, 123 mg; 0,146 mmol) en piridina anhidra (1,5 ml) enfriada a 0 °C, se agregó cloruro de benzoilo (75 μ l; 0,67 mmol) y se dejó a 5°C por 15 h. Se volcó lentamente sobre agua-hielo (50 g) y el jarabe resultante se decantó, se lavó con agua fría (3 x 30 ml), y se disolvió en Cl₂CH₂ (20 ml). La solución se extrajo con NaHCO₃ (ss) (20 ml), luego con H₂O (3 x 30 ml), se secó (MgSO₄) y se evaporó para obtener 2,3,4,6-tetra-O-benzoil- β -D-galactofuranosil-(1 \rightarrow 3)-5,6-di-O-benzoil-2-O-pivaloil-D-galactono-1,4-lactona (152 mg; 99 %) que cristalizó de EtOAc-EtOH: pf 159-160 °C; [α]_D -22,5° (c 1, Cl₃CH)

RMN ¹H (Figura 37) : δ 8,17-7,17 (m, 30 H) ; 6,03 (m, 1 H, H-5') ; 5,90 (t, 1 H ; J = 5,7 Hz ; H-5) ; 5,68 (d, 1 H ; J_{3,4'} = 4,4 Hz ; H-3') ; 5,60 (d, 1 H ; J_{2,3} = 6,9 Hz, H-2) ; 5,51 (s ; 1 H, H-2') ; 5,42 (s, 1 H ; H-1') ; 4,91-4,59 (m, 7 H) ; 1,08 (s, 9 H ; (CH₃)₃C).

RMN ¹³C: Tabla 12, Figura 36.

Anal. Calculado para C₅₉H₅₂O₁₈: %C 67,55; %H 5,00. Encontrado: %C 67,90; %H 5,41.

β -D-Galactofuranosil-(1 \rightarrow 3)-D-galactitol (58)

A una suspensión de 2,3,4,6-tetra-O-benzoil- β -D-galactofuranosil-(1 \rightarrow 3)-2-O-pivaloil-D-galactono-1,4-lactona (**56**, 168 mg ; 0,20 mmol) en MeOH anhidro (3 ml), se agregó NaBH₄ (80 mg, 2,1 mmol) a temperatura ambiente y con agitación con disolución de la mezcla. Luego de 20 h de agitación, la suspensión resultante se

enfrió a 0 °C y se trató con una solución de NaOMe en MeOH 0,5 M (2,6 ml; 1,3 mmol) y se dejó alcanzar temperatura ambiente. Luego de 3 h de agitación, la mezcla se había solubilizado totalmente y una ccd mostró un único producto de R_f 0,46 (n-PrOH-EtOH-H₂O 7:1:1). Se agregó H₂O (0,5 ml) y se pasó por una columna de resina protónica Amberlite IR-120(plus) (3 x 1,5 cm). Se concentró y el residuo se coevaporó con MeOH (5 x 5 ml) y luego con H₂O (5 x 5 ml) para obtener un jarabe incoloro (**58**; 65 mg; 95%) que cristalizó de EtOH: pf 160-162 °C; $[\alpha]_D$ -83,6° (c 1, H₂O)

RMN ¹H (D₂O) : δ zona anomérica 5,02 (s, 1 H, H-1')

RMN ¹³C (D₂O) : Tabla 13, Figura 38.

Anal. Calculado para C₁₂H₂₄O₁₁: %C 41,86; %H 7,03. Encontrado: %C 41,75; %H 6,91.

RESUMEN

La glicobiología de la galactofuranosa (*Galf*) es un tema de creciente interés. Dicho monosacárido es constituyente de glicoconjugados de bacterias, protozoarios y hongos, pero el mamífero huésped aparentemente no biosintetiza glicoconjugados con *Galf*. Recientemente se han identificado oligosacáridos de diferente tamaño, los cuales se liberan de glicoproteínas de *T. cruzi* por reacciones de β -eliminación. Todos estos oligosacáridos se encuentran ligados *O*-glicosídicamente a la proteína a través del disacárido β -D-*Galf*-(1→4)-GlcNAc (**9**). Dicho disacárido aparece luego ramificado con un número variable de unidades de Galp, que convierten a la cadena de azúcares en aceptora de ácido siálico a través de una reacción de *trans*-sialidación. En particular, el trisacárido β -D-*Galf*-(1→4)-[β -D-Galp-(1→6)]-GlcNAc (**23**) representa el oligosacárido más simple de esta serie que puede ser aceptor de ácido siálico. Tanto **9** como **23** no habían sido sintetizados previamente y sólo se habían obtenido como los alditos correspondientes por β -eliminación reductiva de las glicoproteínas.

Por otra parte, aunque la galactofuranosa se encuentra generalmente como extremo terminal, se ha identificado una serie de glicoconjugados en donde la *Galf* se encuentra interna. Por ejemplo, el "core" del lipofosfoglicano (LPG) de especies de *Leishmania* así como los GIPLs del tipo 2 de *L. major* y *L. mexicana* presentan la unidad α -D-Galp-(1→3)-D-*Galf*. Esta misma unidad es constituyente de bacterias patógenas, mientras que la unidad β -D-Galp-(1→3)-D-*Galf* se encontró en polisacáridos capsulares de *Streptococcus pneumoniae*. Sintones para la introducción de estos dos disacáridos no habían sido sintetizados.

En este trabajo se presentan:

1. Una revisión de la distribución de galactofuranosa en tripanosomatídeos
2. Un resumen del método de glicosidación por tricloroacetamidatos.

3. Una descripción detallada de las reacciones que se realizaron en este trabajo de investigación y la discusión de los resultados obtenidos.

4. Una descripción del trabajo experimental desarrollado.

Para la síntesis de β -D-Galf-(1 \rightarrow 4)-GlcNAc (**9**), el compuesto de partida de la secuencia desarrollada fue el bencil 2-acetamido-2-desoxi- α -D-glucopiranosido (**2**), el cual se benzoiló regioselectivamente en HO-3 y HO-6 con *N*-benzoilimidazol para dar **3** (70 % rendimiento). El derivado perbenzoilado **4** se obtuvo como subproducto minoritario (9 % rendimiento). La condensación promovida por SnCl₄ de la penta-*O*-benzoil-D-galactofuranosa (**5**) con **3** condujo al disacárido **6** (85 % rendimiento) con formación altamente diastereoselectiva del enlace anomérico (configuración β). A efectos de obtener el disacárido libre, se procedió a eliminar los grupos protectores. Inicialmente, se intentó eliminar el grupo bencilo por hidrogenación catalítica bajo distintas condiciones y el mejor resultado se obtuvo cuando se utilizó Pd(OH)₂ como catalizador a 1 atmósfera de H₂ por 10 días. Se lograba así una hidrogenólisis parcial conduciendo a **7** con 77 % de rendimiento y se recuperaba un 11 % de **6** sin reaccionar. Cuando se trató de desbenzoilar **7** con NaOMe en MeOH se descomponía el material de partida por lo cual se optó por el camino inverso para la desprotección total de **6**. Por desbenzoilación de **6** con metóxido de sodio en metanol se obtuvo el bencil glicósido del disacárido deseado (**8**) con 97 % de rendimiento. Así como ocurrió con **6**, la desbencilación de **8** por hidrogenación catalítica con Pd/C o Pd(OH)₂/C como catalizadores, resultaba extremadamente lenta y no se conseguía completar la reacción. Sin embargo **8** experimentó hidrogenólisis cuantitativa por transferencia catalítica heterogénea (Pd/C) de hidrógeno, utilizando formiato de amonio en metanol caliente obteniéndose el disacárido libre β -D-Galf(1 \rightarrow 4)GlcNAc (**9**), cristalino con excelente rendimiento (55 % de rendimiento total a partir de **2**). La reducción de **9** con NaBH₄ condujo al alditol

cristalino (**10**) que mostró señales diagnósticas (C-anomérico 109,0 ppm, C-1 y C-4 de GlcNAc 61,8 y 78,8 respectivamente) casi idénticas a las informadas para el "disacárido alditol" aislado de glicoproteínas de *T. cruzi*. De esta manera se confirmó por síntesis la estructura de este disacárido natural, interesante desde el punto de vista biológico.

Para la síntesis de β -D-Galf-(1 \rightarrow 4)-[β -D-Galp-(1 \rightarrow 6)]-GlcNAc (**23**) el compuesto de partida de la secuencia desarrollada fue el bencil 2-acetamido-3-O-benzoil-2-desoxi- α -D-glucopiranosido (**14**), que se preparó fácilmente a partir de un procedimiento que aumentó el rendimiento total (68 %) con respecto al anteriormente descrito (36 %). Para ello, se trató **2** con α,α -dimetoxitolueno según el procedimiento de Evans obteniéndose **12** con 88 % de rendimiento, que luego se benzoiló con cloruro de benzoilo en piridina para dar **13** con 95 % de rendimiento. La remoción del bencilidén según la técnica descrita condujo a **14** con 81 % de rendimiento.

Por benzoilación de D-galactosa con cloruro de benzoilo en piridina a alta temperatura se obtuvo la mezcla de anómeros de la perbenzoil- α,β -D-galactofuranosa (**5**) informada, y además se aisló la perbenzoil- β -D-galactopiranososa (**15**) que no había sido descrita.

La condensación promovida por SnCl₄ del compuesto **14** con 1,2 equivalentes de penta-O-benzoil- β -D-galactopiranososa (**15**) condujo al disacárido **16** (80 % rendimiento) con formación altamente diastereoselectiva del enlace anomérico (configuración β). La estructura de **16** se confirmó inequívocamente por desprotección total. Por desbenzoilación de **16** con NaOMe en MeOH se obtuvo el bencil glicósido **17** cristalino (98 %). La hidrogenólisis catalítica heterogénea de **17** con formiato de amonio y 10 % Pd/C condujo al disacárido libre **18** que presentó el mismo $[\alpha]_D$ que el descrito en literatura y en este caso cristalino.

La alta regioselectividad en favor del HO-6 era esperable, debido a que este hidroxilo primario se encuentra menos impedido que el HO-4 secundario. Además, se encontró que el HO-4 no podía ser glicosidado cuando se trataba tanto **14** como **16** con un exceso de **15** en presencia de SnCl₄. Sin embargo, la glicosidación del HO-4 del disacárido **16** con un exceso de penta-O-benzoil- α,β -D-galactofuranosa (**5**) condujo al trisacárido protegido **19** con 41 % de rendimiento. En esta reacción también se aisló otro compuesto correspondiente al producto de transglicosidación, es decir, el derivado perbenzoilado de β -D-Galf-(1 \rightarrow 4)-[β -D-Galf-(1 \rightarrow 6)]-GlcNAc (**20**). La estructura de **20** se confirmó por una síntesis directa e independiente. Por glicosidación de **14** con un exceso de **5** utilizando SnCl₄ como promotor se obtuvo **20** con 63 % de rendimiento y presentó las mismas características físicas y espectroscópicas que el producto obtenido previamente. También se aisló el disacárido **21** con 27 % de rendimiento. El compuesto **21** se obtuvo con mayor rendimiento (66 %) por tratamiento de **14** con 1,1 equivalentes de **5** en presencia de SnCl₄.

Dado que tanto la conversión de **14** al disacárido **16** y de **16** al trisacárido **19** eran promovidas por SnCl₄ en las mismas condiciones de reacción, se simplificó la síntesis de **19** mediante un procedimiento en un solo paso ("one-pot"). Así, a partir de **14** por adición secuencial de **15** y **5** se obtuvo **19** con formación altamente diastereoselectiva de los dos centros anoméricos de configuración β con 34 % de rendimiento.

Este procedimiento, a pesar de que no significó un aumento en el rendimiento total de **19**, resulta directo y sencillo, ya que conduce a **19** utilizando galactosas perbenzoiladas como precursores, evitando la purificación de los productos intermedios. Otra ventaja es que las galactosas perbenzoiladas, **5** y **15**, se obtienen de manera sencilla en la misma reacción por cristalización fraccionada.

A efectos de obtener el trisacárido libre β -D-Galf(1 \rightarrow 4)[β -D-Galp(1 \rightarrow 6)]GlcNAc (**23**), objetivo de la síntesis, se procedió a eliminar los grupos protectores teniendo en cuenta que, para la desprotección del disacárido **6**, se había encontrado que convenía primero desbenzoilar y luego desbencilar. La desbenzoilación de **19** con NaOMe en MeOH condujo al bencil glicósido del trisacárido deseado **22** con 99 % de rendimiento. Por hidrogenólisis del grupo bencilo de **22** utilizando formiato de amonio-10% Pd/C en metanol caliente se obtuvo el trisacárido libre **23** (99%). El trisacárido **23** representa una nueva estructura de oligosacáridos unidos a proteína por residuos de treonina o serina encontrados únicamente en glicoproteínas de *T. cruzi*.

La reducción de **23** con NaBH₄ condujo al alditol **24** (97 %) cuyos RMN ¹³C y ¹H mostraron ser idénticos a los informados para el alditol disustituido liberado por β -eliminación reductiva de las mucinas de la cepa G de *T. cruzi*.

Dado que el tipo de unión a proteína por GlcNAc y la presencia de Galf resultaban novedosos y teniendo en cuenta que se obtuvieron por síntesis los productos secundarios **20** y **21**, resultaba interesante su conversión a los alditoles correspondientes. Estos resultaban útiles en estudios sobre la influencia de la Galf en la cromatografía líquida de intercambio aniónico (Dionex) que forma parte de otro proyecto del laboratorio sobre determinación de estructuras de mucinas de *T. cruzi*.

Se procedió pues a la desbenzoilación de **20** con NaOMe en MeOH obteniéndose **25** como producto cristalino con 98 % rendimiento. La desbencilación de **25** con formiato de amonio-10% Pd/C en metanol caliente condujo a **26** como una mezcla de anómeros α,β . La reducción de **26** con borohidruro de sodio dio **27** con 98 % de rendimiento. Siguiendo la misma secuencia de desprotección descrita, se obtuvieron los compuestos **28**, **29** y **30**.

Para realizar la primera síntesis de sintones de los disacáridos β -D-Galp-(1 \rightarrow 3)-D-Galf y α -D-Galp-(1 \rightarrow 3)-D-Galf para la introducción de Galf interna en la

construcción de oligosacáridos de glicoconjugados, la estrategia fue utilizar como precursor de galactofuranosa un derivado de D-galactono-1,4-lactona con el OH-3 libre, que luego sería glicosidado con un derivado conveniente de Galp. Teniendo en cuenta que los grupos acilos son muy estables a las condiciones de glicosidación generales, y que sería conveniente obtener este derivado en un solo paso de reacción, se procedió a estudiar la acilación parcial de la D-galactono-1,4-lactona con cloruro de pivaloilo. Por tratamiento de esta lactona con un exceso de cloruro de pivaloilo en piridina se obtuvo el perpivaloil derivado **31** con 82 % de rendimiento. Asimismo, cuando se realizó la reacción con 2,2 equivalentes del reactivo acilante, se obtuvo el 2,6-di-O-pivaloil derivado **32**, pues estas posiciones son las más reactivas debido a que el OH-6 es primario y el OH-2 se encuentra activado por efecto inductivo del carbonilo. Una vez sintetizados los dos testigos **31** y **32**, se procedió a realizar la protección parcial de la D-galactono-1,4-lactona con 3,3 equivalentes de cloruro de pivaloilo. Se obtuvo una mezcla de **31**; 2,3,6-tri-O-pivaloil (**33**) y 2,5,6-tri-O-pivaloil (**34**) derivados; y **32** con 21,6; 2,6; 9,6 y 30 % de rendimiento, respectivamente. La pobre selectividad en la acilación parcial, aun con un grupo protector voluminoso como el pivaloilo, se debe a que el OH-3 se encuentra pseudo-ecuatorial y en una relación *trans* respecto del OH-2 y de la cadena lateral en el C-4. El bajo rendimiento obtenido para **34** sumado a la tediosa purificación demostraron que este método de protección parcial no resultaba conveniente y era necesario desarrollar una ruta alternativa. Sin embargo, se continuó el estudio de pivaloilación parcial de lactonas que presentaran una relación *cis* entre OH-2 y OH-3. La pivaloilación de D-gulono-1,4-lactona con 3,6 equivalentes de cloruro de pivaloilo resultó altamente regioselectiva en favor del 2,5,6-tri-O-pivaloil derivado (**35**, 85 %) lo cual confirmaba la influencia de la configuración relativa de OH-2 y OH-3. También se aisló el perpivaloil derivado **36** como producto minoritario (2,6 %). A partir de D-manono-1,4-lactona en las mismas condiciones de

reacción, cristalizó del crudo de reacción el 2,5,6-tri-O-pivaloil derivado **37** con 50 % de rendimiento. Se aisló además una pequeña cantidad del producto perpivaloilado **38**.

Considerando que la acilación selectiva de D-galactono-1,4-lactona conducía al 2,5,6-tri-O-acil derivado con bajo rendimiento, se pivaloiló selectivamente el OH-2 de la 5,6-O-isopropilidén-D-galactono-1,4-lactona (**39**) para obtener 5,6-O-isopropilidén-2-O-pivaloil-D-galactono-1,4-lactona (**40**) cristalina con 79 % de rendimiento

Una vez obtenido el aceptor deseado **40**, era necesario efectuar la glicosidación con un derivado de galactosa piranósica. Dada la labilidad del isopropilidén frente al SnCl_4 , y teniendo en cuenta que se querían obtener los enlaces glicosídicos en las configuraciones α y β , se decidió utilizar el procedimiento del tricloroacetamido para la activación del oxígeno anomérico de la galactosa convenientemente protegida.

Para la síntesis del sintón de β -D-Galp-(1 \rightarrow 3)-D-Galf se trató 2,3,4,6-tetra-O-acetil- α,β -D-galactopiranososa con Cl_3CCN y un equivalente de DBU por 30 minutos y se obtuvo el β -tricloroacetamido **43** como un compuesto cristalino con 80% de rendimiento.

Para formar el enlace glicosídico β , se condensó el aceptor **40** con el tricloroacetamido **43**, utilizando triflato de trimetilsililo (TMSOTf) como catalizador y se obtuvo el disacárido lactónico β **44** como un sólido amorfo con 84 % de rendimiento. La reacción fue altamente estereoselectiva como era de esperar debido a la asistencia anquimérica del acilo en C-2 de **40**. La reducción de **44** con disiamilborano condujo a **45** como un sólido amorfo con 92 % de rendimiento. El rendimiento total del sintón de Galf interna **45**, objeto de síntesis fue del 55 %.

Debido a que la ruta desarrollada para la obtención de **45** era simple y teniendo en cuenta que la remoción de su isopropilidén conduciría al derivado en la

configuración piranósica, se esbozó la posibilidad de que **45** fuera precursor también de β -D-Galp-(1 \rightarrow 3)-D-Galp. Por hidrólisis de **45** con AcOH acuoso, se obtuvo **46** como un sólido amorfo con 94 % de rendimiento. Se peracetiló **46** con anhídrido acético en piridina a 5 °C, obteniéndose una mezcla de los derivados β -furanósico **47**, α -furanósico **48**; β -piranósico **49** y α -piranósico **50**, en relación 12:8:33:47, respectivamente, y un 80 % en favor de la configuración piranósica, por lo tanto, esta mezcla podría utilizarse sin purificar para la introducción de β -D-Galp-(1 \rightarrow 3)-D-Galp en síntesis de oligosacáridos. Esta síntesis, por su simplicidad y rendimiento, se compara favorablemente con los métodos descritos. Se aislaron y caracterizaron los compuestos **47**, **49** y **50**.

Por otra parte, el compuesto **44** se redujo con NaBH₄ y por posterior agregado de NaOMe en MeOH, se obtuvo β -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 3)-D-galactitol (**51**) como un sólido cristalino con 98 % de rendimiento.

Para la síntesis del sintón de α -D-Galp-(1 \rightarrow 3)-D-Galp se empleó un derivado de galactopiranosil que posee un grupo no participante en C-2 como el tricloroacetamido de O-(2,3,4,6-tetra-O-bencil- β -D-galactopiranosilo) (**52**) que se obtuvo cristalino con 69 % de rendimiento siguiendo el procedimiento descrito.

La condensación de la lactona **40** con el β -tricloroacetamido **52** utilizando triflato de trimetilsililo como catalizador y éter como solvente a 0 °C condujo al disacárido lactónico α **53** como un sólido amorfo con 74 % de rendimiento. Por hidrogenación catalítica de **53**, tratamiento con ácido acético acuoso y posterior acetilación con anhídrido acético en piridina, se obtuvo 2,3,4,6-tetra-O-acetil- α -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 3)-5,6-di-O-acetil-2-O-pivaloil-D-galactono-1,4-lactona (**54**) confirmando la configuración anomérica de su precursor **53**.

Una vez comprobada la alta diastereoselectividad de la glicosidación que condujo al disacárido lactónico α **53**, se procedió a reducir lactona y así obtener el

sintón objeto de síntesis. Por tratamiento de **53** con diisoamilborano se obtuvo **55** como un sólido amorfo con 88 % de rendimiento.

La obtención del disacárido lactónico **44** no se pudo realizar utilizando SnCl_4 como promotor y penta-O-benzoil- β -D-galactopiranososa (**15**). Sin embargo, en las mismas condiciones, en presencia de SnCl_4 y penta-O-benzoil- α,β -D-galactofuranosa, se obtuvo **56** cristalino con 58 % de rendimiento. Con el fin de confirmar la posición en donde ocurrió la glicosidación, se benzoiló **56** con cloruro de benzoilo en piridina y se obtuvo 2,3,5,6-tetra-O-benzoil- β -D-galactofuranosil-(1 \rightarrow 3)-5,6-di-O-benzoil-2-O-pivaloil-D-galactono-1,4-lactona (**57**), confirmando la estructura de su precursor.

Por tratamiento de **56** con NaBH_4 y posterior agregado de NaOMe en MeOH, se obtuvo β -D-galactofuranosil-(1 \rightarrow 3)-D-galactitol (**58**) como un sólido cristalino con 95 % de rendimiento.

En este trabajo de tesis se han sintetizado 57 compuestos, de los cuales 46 (**3, 4, 6-11, 15-17, 19-38, 40, 44-47, 49-51, 53-58**) no se encontraban descritos en literatura.

Parte de esta tesis dio lugar a las siguientes publicaciones:

"Regioselective acylations of aldono-1,4-lactones"

Carola Gallo, Lucio O. Jeroncic, Oscar Varela and Rosa M. de Lederkremer.

J. Carbohydr. Chem. **1993**, *12*, 841.

"First synthesis of β -D-Galp(1 \rightarrow 4)GlcNAc, a structural unit attached O-glycosidically in glycoproteins of *Trypanosoma cruzi*"

Carola Gallo-Rodriguez, Oscar Varela and Rosa M. de Lederkremer

J. Org. Chem. **1996**, *61*, 1886-1889

"One-pot synthesis of β -D-Galp(1 \rightarrow 4)[β -D-Galp(1 \rightarrow 6)]GlcNAc, a "core" trisaccharide linked O-glycosidically in glycoproteins of *Trypanosoma cruzi*"

Carola Gallo-Rodriguez, Oscar Varela y Rosa M. de Lederkremer

Carbohydr. Res., **1997**. En prensa.

Carola Gallo
C. GALLO

Rosa M. de Lederkremer

Dr. ROSA M. de LEDERKREMER

BIBLIOGRAFÍA

- Acosta Serrano, A.; Schenkman, S.; Yoshida, N.; Mehlert, A.; Richardson, J. M.; Ferguson, M. A. J. *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 27244.
- Allen, P. Z. "Methods of Carbohydrate Chemistry" Vol 1; Whistler & Wolfrom eds.; Academic Press. New York, **1962**, p372.
- Amwam-Zollo, P. H.; Sinaÿ, P. *Carbohydr. Res.* **1986**, *150*, 199.
- Barreto-Bergter, E. M., Travassos, R. L., Gorin, P. A. J. *Carbohydr. Res.* **1980**, *86*, 273.
- Batey, J. F.; Bullock, C.; O'Brien, E.; Williams, J. M. *Carbohydr. Res.* **1975**, *43*, 43.
- Beaupere, D.; Boutbaiba, I.; Demailly, G.; Uzan, R. *Carbohydr. Res.* **1988**, *180*, 152.
- Berman, H. M.; Rosenstein, R. D.; Southwick, J. *Acta Crystallogr Sect. B* **1971**, *27*, 7.
- Beynon, L. M.; Richards, J. C.; Perry, M. B. *Eur. J. Biochem.* **1997**, *250*, 163.
- Birkofer, L.; Indel, K. *Ann.* ,**1974**, 1-14.
- Bock K., Lundt, I., Pedersen, C. *Acta Chem. Scand.* **1981**, *B35*, 155.
- Bock, K.; Pedersen, C. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **1983**, *41*, 27.
- Brown, H. C. "Organic Synthesis via Boranes", Wiley Interscience, New York, 1974
- Carey, F. A.; Hodgson, K. O. *Carbohydr. Res.*, **1970**, *12*, 463.
- Chacón-Fuertes, M. E.; Martín-Lomas, M. *Carbohydr. Res.* **1975**, *43*, 51.
- Colli, W. *FASEB J.* **1993**, *7*, 1257.
- Copeland, C.; Stick R. *Austr. J. Chem.* **1978**, *31*, 1371.
- Cross, G. A. M. *Annu. Rev. Cell. Biol.* **1990**, *6*, 1.
- Cross, G. A. M. Takle, G. B. *Annu. Rev. Microbiol.* **1993**, *46*, 385.
- D'Accorso, N. B.; Thiel, I. M. E., Schüller, M. *Carbohydr. Res.* **1983**, *124* , 177.
- De Arruda, M. V.; Colli, W. ; Zingales, B. *Eur. J. Biochem.* **1989**, *182* , 413.
- Dell, A.; Khoo, K.-M.; Pamico, M.; McDowell, R. A.; Etienne, A. T.; Reason, A. J.; Morris, H. *Glycobiology. A Practical Approach.* Fukuda & Kobata Eds. **1993** Oxford University Press, Oxford, p211.
- Dieckman-Schuppert, A., Bause, E., Schwartz, T. *Eur. J. Biochem.* **1993**, *216*, 779.

- Du Mortier, C.; Varela, O.; Lederkremer, R. M. *Carbohydr. Res.*, **1989**, *189*, 79.
- Elhay, M. J.; Kelleher, M. Bacic, A.; McConville, M. J.; Tolson, D. L. *Mol. Biochem. Parasitol.* **1990**, *40*, 255.
- Fernández Cirelli, A.; Sznaidman, M.; Jeroncic, L.; Lederkremer, R. M. *J. Carbohydr. Chem.* **1983**, *2*, 167.
- Ferrero-Garcia, M. A.; Trombetta, S. E.; Sanches, D. O.; Reglero, A.; Frasc, A. C. C.; Parodi, A. J. *Eur. J. Biochem.* **1993**, *213*, 765.
- Fiandor, J.; De Las Heras, F. G. *Carbohydr. Res.*, **1986**, *153*, 325.
- Fleet, G. W. J.; Son, J. C. *Tetrahedron* **1988**, *44*, 2637.
- Franchin, G.; Pereira-Chioccola, V. L.; Schenkman, S.; Rodrigues; M. M. *Infect. Immun.* **1997**, p2548.
- Fügedi, P.; Garegg, P. J.; Lönn, H.; Norberg, T.; Walding M. *Glycoconjugate J.* **1987**, *4*, 97.
- Fukuda, M. En "*Molecular Glycobiology*"; Fukuda, M. Hindsgaul, Eds. ; Oxford University Press ; New York **1994** ; 1-52
- Gerwig, G. J., Kamerling, J. P., Vliegenthart, J. F. G., Morag, E., Lamed, R., Bayer, E. A. J. Biol. Chem. **1993**, *268*, 26956.
- Groisman, J. F., Lederkremer, R. M. *Eur. J. Biochem.* **1987**, *165*, 327.
- Haines, A. H. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, **1976**, *33*, 11.
- Haltiwanger, R. S., Kelly, W. G. K., Roquemore, E. R., Blomberg, M. M., Dong, L.-Y. D., Kreppel, L., Chod, T.-Y., Hart, T. W. *Biochem. Soc. Trans.* **1992**, *20*, 264.
- Handman, E.; Schnur, L. F.; Spithill, T. W.; Mitchell, G. F. *J. Immunol.* **1986**, *137*, 3608.
- Hanessian, S. "Total synthesis of Natural Products. The Chiron Approach", Pergamon Press, Oxford, **1983**.
- Hanessian, S.; Bacquet, C.; Lehong, N. *Carbohydr. Res.* **1980**, *80*, C17.

- Hanessian, S.; Banoub, J. "Methods of Carbohydrate Chemistry" Vol 8; Whistler & BeMiller eds.; Academic Press. New York, **1980**, p247.
- Hanessian, S.; Banoub, J. *Carbohydr. Res.* **1977a**, *53*, C13.
- Hanessian, S.; Banoub, J. *Carbohydr. Res.* **1977b**, *59*, 261.
- Hart, G. W., Haltiwanger, R. S., Holt, G. D., Kelly, W. G. *Ann. Rev. Biochem.* **1989**, *58*, 851.
- Hashimoto, S.; Hayashi, M.; Noyori, R. *Tetrahedron Lett.* **1984**, *25*, 1379.
- Haynes, L. J.; Newth, F. H. *Adv. Carbohydr. Chem.* **1955**, *10*, 207.
- Horton, D.; Priebe, W.; Varela, O. *Carbohydr. Res.*, **1985**, *144*, 317.
- Horton, D.; Walaszek, Z. *Carbohydr. Res.* **1982**, *105*, 111.
- Huang, C.; Turco, S. J. *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 24060.
- Jeffrey, G. A.; Rosenstein, R. D.; Vlasse, M. *Acta Crystallogr.* **1967**, *22*, 725.
- Jeronicic, L. O. Tesis Doctoral, **1988**, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA
- Jeronicic, L. O.; Fernandez Cirelli, A.; Lederkremer, R. M. *Carbohydr. Res.*, **1987**, *167*, 175.
- Kearse, K. P.; Hart, G. W. *Arch. Biochem. Biophys.* **1991**, *290*, 543.
- Khun, R., Baer, H. H. *Ann.* **1958**, *611*, 236.
- Khun, R., Baer, H. H., Gauche, A. *Chem. Ber.* **1955**, *88*, 1713.
- Kinzy, W.; Schaubach, R. J. *Carbohydr. Chem.* **1995**
- Kohn, P. Samaritano, R. H., Lerner, L. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1965**, *87*, 5475.
- Kondo, Y.; Mujahara, K.; Kashimura, N. *Can. J. Chem.* **1973**, *51*, 3272.
- Kuhn, R.; Baer, H. H. *Ann.* **1958**, *611*, 236.
- Kunz, H. *Angew. Chem., Int. Ed. Eng.* **1987**, *26*, 294.
- Kunz, H.; Sager, H. *Helv. Chim. Acta* **1985**, *68*, 283.
- Lederkremer, R. M.; Alves, M. J. M.; Fonseca, C. G.; Colli, W. *Biochim. Biophys. Acta* **1976**, *444*, 85.
- Lederkremer, R. M.; Casal, O. L., Alves, M. J. M.; Colli, W. *FEBS Lett.* **1980**, *116*, 25.

- Lederkremer, R. M.; Colli, W. *Glycobiology* **1995**, *5*, 547.
- Lederkremer, R. M.; Lima, C. ; Ramirez, M. I.; Ferguson, M. A. J.; Homans, S. W.; Thomas-Oates, J. *J. Biol.Chem.* **1991**, *266* , 23670.
- Lederkremer, R. M.; Lima, C. ; Ramirez, M. I.; Gonçalves, M. F.; Colli, W. *Eur. J. Biochem.* **1993**, *218* , 929.
- Lederkremer, R. M.; Marino, C.; Varela, O. *Carbohydr. Res.* **1990**, *200* , 227.
- Lee, W. L., Lloyd, J. O. *Arch. Biochem. Biophys.* **1975**, *171*, 613.
- Lemieux, R. U. *Pure Appl. Chem.* **1971**, *25*, 527.
- Lönn, H. *Carbohydr. Res.* **1985**, *139*, 115.
- Marino, C.; Varela, O.; Lederkremer, R. M. *Carbohydr. Res.* **1989**, *190* , 65.
- Martin, T. J.; Schmidt, R. R. *Tetrahedron Lett.* , **1992**, *33*, 6123.
- Mc Conville, M. J.; Blackwell, J. M. *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 5855.
- Mc Neil, M.; Wallner, S. J.; Hunter, S. W.; Brennan, P. J. *Carbohydr. Res.* **1987**, *166*, 299.
- McConville, M. J.; Bacic, A. *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 757.
- McConville, M. J.; Collidge, T. A. C.; Ferguson, M. A. J.; Schneider, P. *J. Biol.Chem.* **1993**, *268* , 15595.
- McConville, M. J.; Ferguson, M. A. J. *Biochem. J.* **1993**, *294*, 305.
- McConville, M. J.; Homans, S. W.; Thomas-Oates, J. E.; Dell, A.; Bacic, A. *J. Biol.Chem.* **1990**, *265* , 7385.
- McConville, M. J.; Thomas-Oates, J. E.; Ferguson, M. A. J.; Homans, S. W. *J. Biol.Chem.* **1990b**, *265* , 19611.
- McNeely, T. B.; Turco, S. J. *Immunol.* **1990**, *144*, 2745.
- Mendelzon, D. H., Parodi, A. J. *J. Biol. Chem.* **1986**, *261*, 2129.
- Mendoça-Previato, L., Gorin, P. A. J., Braga, A. F., Scharftein, J. Previato, J. O. *Biochemistry* **1983**, *22*, 4980.
- Mendoça-Previato, L., Gorin, P. A. J., Travassos, R. L. *Infect. Immun.* **1980**, *29*, 934.

- Moraes, C. T., Bosch, M., Parodi, A. J. *Biochemistry* **1988**, *27*, 1543.
- Mukaiyama, T.; Murai, Y.; Shoda, S. *Chem. Lett.* **1981**, p 431.
- Nef, J. U. *Liebigs Ann. Chem.* **1895**, *287*, 265.
- Nicolaou, K. C.; Chucholowski, A.; Dolle, R. E.; Randall, J. L. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1984**, p 1155.
- Nicolaou, K. C.; Seitz, S. P.; Papahatjis, D. P. *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, *105*, 2430.
- Norberg, T.; Walding M. *Glycoconjugate J.* **1988**, *5*, 137.
- Notermans, S., Veeneman, G. H., Van Zuylen, C. W. E. M., Hoogerhout, P., Van Boom, J. H. *Mol. Immunol.* **1988**, *25*, 975.
- Nyame, K., Cummings, R. D., Damian, R. T. *J. Biol. Chem.* **1987**, *262*, 7990.
- Ogawa, T.; Matsui, M. *Tetrahedron*, **1981**, *37*, 2369.
- Paulsen, H. *Angew. Chem., Int. Ed. Eng.* **1982**, *21*, 155.
- Paulsen, H. *Angew. Chem., Int. Ed. Eng.* **1990**, *29*, 823.
- Piras, M. M., Henriquez, D., Piras, R. *Mol. Biochem. Parasitol.* **1987**, *22*, 135.
- Previato, J. O., Gorin, P. A.; Mazurek, M.; Xavier, M. T.; Fournet B.; Mendonça-Previato, L. *J. Biol. Chem.* **1990**, *265*, 2518.
- Previato, J. O., Mendonça-Previato, L., Jones, C.; Wait, R.; Fournet B. *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 24279.
- Previato, J. O.; Jones, C.; Gonçalves, L. P. B.; Wait, R.; Travassos, L. R.; Mendonça-Previato, L. *Biochem. J.* **1994**, *301*, 151.
- Previato, J. O.; Jones, C.; Xavier, M. T.; Wait, R.; Travassos, L. R.; Parodi, A. J.; Mendonça-Previato, L. *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 7241.
- Richards, J. C.; Perry, M. B.; Carlo, D. T. *Can. J. Biochem. Cell. Biol.* **1983**, *61*, 178.
- Ryan, K. A.; Garraway, R. A.; Descoteaux, A.; Turco, S. J.; Beverley, S. M. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, *90*, 8609.
- Sanders, J. K. M.; Hunter, B. K. *Modern NMR Spectroscopy. A Guide for Chemists.* 2da Ed. **1993**, Oxford University Press, Nueva York.

- Schaubach R.; Hemberger, J.; Kinzy, W. *Liebig Ann. Chem.* **1991**, 607.
- Schenkman, S., Eichinger, D., Pereira, M. E. A., Nessenzweig, V. *Annu. Rev. Microbiol.* **1994**, *48*, 499.
- Schenkman, S., Jiang M.-S., Hart, G. W., Nessenzweig, V. *Cell* **1991**, *65*, 1117.
- Schlein, Y.; Schnur, L. F.; Jacobson, R. L. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **1990**, *84*, 353.
- Schmidt, R. R. *Angew. Chem., Int. Ed. Eng.* **1986**, *25*, 212.
- Schmidt, R. R.; Behrendt, M.; Toepfer, A. *Synlett* **1990**, 694.
- Schmidt, R. R.; Kinzy, W. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **1994**, *50*, 21.
- Schmidt, R. R.; Michel, J. *Tetrahedron Lett.* , **1984**, *25*, 821.
- Schmidt, R. R.; Reichrath, M. *Angew. Chem., Int. Ed. Eng.* **1979**, *18*, 466.
- Schmidt, R. R.; Stumpp, M. *Liebigs Ann. Chem.* **1983**, 1249.
- Schmidt, R.R. En "Comprehensive Organic Synthesis", Trost, B. M., Fleming, I., Winterfeldt, E. Eds.; Pergamon Press, Oxford, **1991**, Vol 6, p 33.
- Schnaidman, B. B., Yoshida, N., Gorin, P. A. J., Travassos, L. R. *J. Protozool.* **1986**, *33*, 186.
- Staab, H. A. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1962**, *1*, 351.
- Towbin, H.; Rosenfelder, G.; Weislander, J.; Avila, J. L.; Rojas, M. *J. Expl. Med.* **1987**, *166*, 419.
- Turco, S. J., Descoteaux, A. *Annu. Rev. Microbiol.* **1992**, *46*, 65.
- Unkefer, C. J., Gander, J. *J. Biol. Chem.* **1990**, *265*, 685.
- Vandekerckhove, F.; Schenkman, S.; Carvalho, L. P.; Tomlinson, S.; Kiso, M.; Yoshida, M.; Hasegawa, A.; Nussenzweig, V. *Glycobiology* **1993**, *2*, 541.
- Varela, O., Cicero, D., Lederkremer, R. M. *J. Org. Chem.* **1989**, *54*, 1884.
- Varela, O.; Marino, C.; Lederkremer, R. M. *Carbohydr. Res.* **1986**, *155*, 247.
- Wait, R.; Jones, C.; Previato, J. O.; Mendonça-Previato, L. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **1994**, *27*, 203.

Wanner, M. J.; Koomen, G. J.; Pandit, U. K. *Tetrahedron*, **1986**, *39*, 3673.

Wegman B.; Schmidt, R. R. *J. Carbohydr. Chem.* **1987**, *6*, 357.

Williamson, J. M.; Richardson, A. C. *Tetrahedron*, **1967**, *23*, 1369.

Wulff, G.; Röhle, H. *Angew. Chem. , Int. Ed. Eng.* **1974**, *13*, 157.