

Tesis de Posgrado

Síntesis y análisis conformacional de oligosacáridos aniónicos

Leit, Silvana Marcela

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:

Leit, Silvana Marcela. (1998). Síntesis y análisis conformacional de oligosacáridos aniónicos. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3053_Leit.pdf

Cita tipo Chicago:

Leit, Silvana Marcela. "Síntesis y análisis conformacional de oligosacáridos aniónicos". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1998.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3053_Leit.pdf



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

SÍNTESIS Y ANÁLISIS CONFORMACIONAL DE
OLIGOSACÁRIDOS ANIÓNICOS

Director de Tesis
DRA ALICIA FERNÁNDEZ CIRELLI

TESIS DOCTORAL
Para optar al título de
DOCTOR EN CIENCIAS DE LA UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
presenta

SILVANA MARCELA LEIT

Departamento de Química Orgánica. FCEN

-1998-

Nº 3

5 2

A Oscar por su incondicional apoyo siempre

A mi dulce Julieta

A mis padres Nelly y Angel

*Mi agradecimiento a la Dra. Alicia Fernández Cirelli
por su interés en mi formación científica,
su constante estímulo, su colaboración,
su apoyo y su invalorable afecto.*

Mi agradecimiento también:

A la Universidad de Buenos Aires por las becas que me han otorgado y que facilitaron el desarrollo de éste trabajo.

Al Departamento de Química Orgánica (FCEN-UBA) el haberme concedido el lugar de trabajo.

A la UMYMFOR (CONICET-FCEN) por el equipo técnico suministrado y en particular a la Lic. M. Marcote por los microanálisis realizados.

Al Instituto de Química Orgánica General, CSIC, Madrid, España y en la Universidad Autónoma de Madrid por el equipo técnico suministrado.

Al Dr. J. Jiménez-Barbero del Instituto de Química Orgánica General, CSIC, Madrid, España por haberme facilitado la infraestructura y el entrenamiento para la realización de los cálculos teóricos de modelado molecular y los espectros de RMN y por sus valiosas enseñanzas, su gran interés y esfuerzo.

Al Lic. M. Martín-Pastor del Instituto de Química Orgánica General, CSIC, Madrid, España por su gran ayuda y su esfuerzo en enseñarme las técnicas utilizadas para el estudio de los cálculos teóricos de modelado molecular.

A la Dra. A. Poveda por los espectros realizados en la Universidad Autónoma de Madrid.

Al Sr. G. Arabeheby por los espectros de FAB.

Al Dr. O. M. Moradei, a la Lic. C. Tettamanzi y a la Lic. G. García Liñares por los espectros de RMN realizados.

A Pupe, Mariano, Judith, Cristina M., Hernán S., Hernán O., Cristián y Elena por su amistad y los gratos momentos compartidos.

A Pupe por su ayuda en la compaginación final de esta tesis.

A mis compañeros de laboratorio: Oscar Moradei, Mariano Castro, Cecile du Mortier, Víctor Conzonno, José Kovensky y Javier Covián por los gratos momentos compartidos.

A Patricia Zunszain, María Laura Uhrig, Alejandro Nin, Daniel Murgida, Cecilia Carro y Jorge Macareno por los gratos momentos compartidos.

A todo el personal del Departamento de Química Orgánica por su colaboración permanente y disposición constante, en especial a Don López y María del Carmen Ares.

SÍNTESIS Y ANÁLISIS CONFORMACIONAL DE OLIGOSACÁRIDOS ANIÓNICOS

Se sintetizaron y caracterizaron espectroscópicamente derivados aniónicos de metil β -laminarabiósido, metil β -laminatriósido y metil β -maltósido, sustituidos en los grupos hidroxilos primarios. Se prepararon también derivados sulfatados de laminara-oligosacáridos ($DP \geq 5$).

Se estudió la influencia de los sustituyentes aniónicos en el enlace glicosídico. Los derivados 6,6'-di-*O*-sulfato (**36** y **38**), 6,6'-di-*O*-fosfato (**52** y **53**), 6,6'-di-*O*-succinato (**56** y **57**) del metil β -laminarabiósido (**13**) y metil β -maltósido (**17**), respectivamente, y los correspondiente uronatos (**60** y **61**), así como, el derivado neutro (**5**) y sulfatado (**35**) de laminara-oligosacáridos se eligieron como compuestos modelo.

La conformación de oligosacáridos aniónicos en solución se estudió mediante técnicas de espectroscopía de RMN y cálculos de mecánica molecular usando los campos de fuerza MM2 (ϵ : 78, ϵ :1 D y modelo continuo de agua), MM3 (ϵ : 78 D) y AMBER (ϵ : 78 D). Las evidencias experimentales de NOEs basadas en experimentos de NOESY y ROESY fueron comparadas con los resultados obtenidos por cálculos de mecánica molecular. Los derivados aniónicos se compararon con el compuesto neutro de partida.

Las mayores diferencias se observaron para los derivados fosfatados y sulfatados, tanto en maltósidos como laminarabiósidos. Resultados cualitativos sugieren para laminara-oligosacáridos mayor restricción de movimientos internos para los derivados sulfatados.

Palabras claves: síntesis de oligosacáridos aniónicos; cálculos de mecánica y dinámica molecular; RMN; análisis conformacional.

SYNTHESIS AND CONFORMATIONAL ANALYSIS OF ANIONIC OLIGOSACCHARIDES

Anionic derivatives of methyl β -laminarabioside, methyl β -laminaratrioside and methyl β -maltoside, substituted in the primary hydroxyl groups, were synthesized and characterized spectroscopically. Sulfated laminara-oligosaccharides ($DP \geq 5$) were also prepared.

The influence of anionic substituents on the glycosidic linkage was studied 6,6'-di-*O*-sulfated (**36** and **38**), 6,6'-di-*O*-phosphated (**52** and **53**), 6,6'-di-*O*-succinilated (**56** and **57**) derivatives of methyl β -laminarabioside (**13**) and methyl β -maltoside (**17**) and the corresponding uronates (**60** and **61**), as well as unsulfated (**5**) and sulfated (**35**) derivatives of laminara-oligosaccharides were chosen as oligosaccharides models.

The solution conformation of anionic oligosaccharides has been studied through NMR spectroscopy and molecular mechanics calculations using the MM2 (ϵ : 78, ϵ : 1 D and continuum water model), MM3 (ϵ : 78 D) and AMBER (ϵ : 78 D) force fields. All the experimental evidences from the NOEs based on NOESY and ROESY experiments have been assisted with molecular mechanics calculations. The anionic derivatives, were compared with the parent compounds

Major differences were found for phosphated and sulfated derivatives, both in maltosides and laminarabiosides. Qualitative results for laminara-oligosaccharides suggest internal motion major restriction for sulfated derivatives.

Keywords: synthesis of anionic oligosaccharides; molecular mechanics and dynamics calculations ; NMR; conformational analysis.

INDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
BIBLIOGRAFÍA	5
2. SÍNTESIS DE OLIGOSACÁRIDOS ANIÓNICOS	7
2.1 Introducción	7
2.2 Descripción y discusión de los resultados obtenidos	8
2.2.1 Preparación de derivados de laminara-oligosacáridos y de maltosa	8
2.2.1.a Obtención de metil glicósidos	8
2.2.1.a.1 Acetólisis del curdlano	10
2.2.1.a.2 Acetilación de la maltosa	11
2.2.1.a.3 Glicosidaciones	12
2.2.1.a.4 Desacetilaciones	13
2.2.1.b Obtención de oligosacáridos con los grupos hidroxilos primarios libres	13
2.2.1.b.1 Tritilaciones	16
2.2.1.b.2 Bencilaciones	17
2.2.1.b.3 Destritilaciones	18
2.2.1.c Obtención de derivados con los grupos hidroxilos secundarios libres	19
2.2.1.c.1 Derivados del metil β -laminarabiósido.	20
2.2.1.c.2 Estudios de desacilación parcial.	21
2.2.2 Preparación de derivados aniónicos de laminara-oligosacáridos y de	23

maltosa	
2.2.2.a Derivados sulfatados	30
2.2.2.a.1 Diferentes procedimientos empleados en reacciones de sulfatación	33
2.2.2.a.2 Reacciones de sulfatación directa	36
2.2.2.a.3 Reacciones de sulfatación sobre sustratos convenientemente protegidos	40
2.2.2.a.4 Diferentes procedimientos en reacciones de hidrogenólisis	42
2.2.2.b Derivados fosfatados	43
2.2.2.b.1 Diferentes procedimientos en reacciones de fosfatación	44
2.2.2.b.2 Reacciones de fosfatación sobre sustratos convenientemente protegidos	44
2.2.2.b.3 Reacciones de hidrogenólisis	45
2.2.2.c Derivados succinilados	47
2.2.2.c.1 Reacciones de succinilación sobre sustratos convenientemente protegidos	47
2.2.2.c.2 Reacciones de hidrogenólisis	48
2.2.2.d Derivados de ácidos urónicos	49
2.2.2.d.1 Reacciones de oxidación sobre sustratos convenientemente protegidos	50
2.2.2.d.2 Reacciones de hidrogenólisis	51
2.3 Parte experimental	52
2.3.1 Consideraciones Generales	52
2.3.2 Métodos Cromatográficos	53

2.3.2.a Cromatografía en capa delgada	53
2.3.2.b Cromatografía en columna	53
2.3.2.c Cromatografía en capa preparativa	54
2.3.2.d Cromatografía en geles	54
2.3.2.e Cromatografía líquida de alta resolución	54
2.3.3 Solventes	55
2.3.4 Reactivos generales	55
2.3.5 Síntesis de oligosacáridos aniónicos	57
2.3.5.a Preparación de derivados de laminara-oligosacáridos y de maltosa	57
2.3.5.a.1 Obtención de metil glicósido	57
2.3.5.a.1.1 Acetólisis del curdlano	57
2.3.5.a.1.2 Acetilación de la maltosa	59
2.3.5.a.1.3 Glicosidaciones	59
2.3.5.a.1.4 Desacetilaciones	62
2.3.5.a.2 Obtención de oligosacáridos con los grupos hidroxilos primarios libres	64
2.3.5.a.2.1 Tritilaciones	64
2.3.5.a.2.2 Bencilaciones	66
2.3.5.a.2.3 Destritilaciones	68
2.3.5.a.3 Obtención de derivados con los grupos hidroxilos secundarios libres	71
2.3.5.a.3.1 Derivados del metil β -laminarabiósido.	71
2.3.5.a.3.2 Estudios de desacilación parcial.	72
2.3.5.b Preparación de derivados aniónicos de laminara-oligosacáridos y de maltosa	74
2.3.5.b.1 Derivados sulfatados	74

	<i>Indice</i>
2.3.5.b.1.1 Diferentes procedimientos empleados en reacciones de sulfatación	74
2.3.5.b.1.2 Reacciones de sulfatación directa	76
2.3.5.b.1.3 Reacciones de sulfatación sobre sustratos convenientemente protegidos	79
2.3.5.b.1.4 Diferentes procedimientos en reacciones de hidrogenólisis	81
2.3.5.b.1.5 Determinación de sulfato total	83
2.3.5.b.2 Derivados fosfatados	83
2.3.5.b.2.1 Diferentes procedimientos en reacciones de fosfatación	84
2.3.5.b.2.2 Reacciones de fosfatación sobre sustratos convenientemente protegidos	85
2.3.5.b.2.3 Reacciones de hidrogenólisis	86
2.3.5.b.3 Derivados succinilados	88
2.3.5.b.3.1 Reacciones de succinilación sobre sustratos convenientemente protegidos	88
2.3.5.b.3.2 Reacciones de hidrogenólisis	90
2.3.5.b.4 Derivados de ácidos urónicos	91
2.3.5.b.4.1 Reacciones de oxidación sobre sustratos convenientemente protegidos	91
2.3.5.b.4.2 Reacciones de hidrogenólisis	92
BIBLIOGRAFIA	94
3. ANÁLISIS CONFORMACIONAL DE OLIGOSACÁRIDOS ANIÓNICOS	99
3.1 Introducción	99

3.2 Estudio de las conformaciones del metil β -maltósido y sus derivados aniónicos en solución.	107
3.2.1 Aplicación del campo de fuerzas MM-2 y MM-3	112
3.2.2 Aplicación del campo de fuerzas AMBER	120
3.2.3 Aplicación del método Monte Carlo	124
3.2.4 Resultados de RMN	125
3.2.5 Comparación entre los valores experimentales de NOE y los cálculos teóricos	130
3.2.6 Conclusiones	135
3.3 Estudio de las conformaciones del metil β -laminaribiosido y sus derivados aniónicos en solución. Estudio de la estructura tridimensional de laminara-oligosacárido y su derivado sulfatado en solución.	137
3.3.1 Aplicación del campo de fuerzas MM-2 y MM-3	139
3.3.2 Aplicación del campo de fuerzas AMBER	150
3.3.3 Aplicación del método Monte Carlo	154
3.3.4 Cálculos de dinámica molecular	156
3.3.5 Resultados de RMN. Análisis realizado en disacáridos derivados de laminarabiosa	158
3.3.6 Comparación entre los valores experimentales de NOE y los cálculos teóricos	163
3.3.7 Comparación de la influencia de sustituyentes aniónicos sobre los enlaces glicosídicos α -(1 \rightarrow 4) y β -(1 \rightarrow 3)	170
3.3.8 Resultados de RMN. Análisis realizado derivados de laminara-oligosacáridos	171
3.3.9 Conclusiones	176
3.4 Parte experimental	177
3.4.1 Experimentos de RMN	177
3.4.2 Cálculo de mecánica y dinámica molecular	178
BIBLIOGRAFÍA	182

4. RESUMEN

5. ANEXO. ESPECTROS DE RMN

Abreviaturas y acrónimos

Ac	acetilo
AcOH	ácido acético
Å	angström
Ar	arilo
anh.	anhidro(s)
atm	atmósfera(s)
Bn	bencilo
BnOH	alcohol bencílico
Bz	benzoílo
nBu ó Bu	n-butilo
c	concentración
°C	grados centígrados
ccd	cromatografía en capa delgada
CLAR	cromatografía líquida de alta resolución
d	doblete
2D	bidimensional
DBU	1,8-diazabicyclo{5.4.0}undec-7-eno
dd	doble doblete
DEPT	espectroscopía de transferencia de polarización
DMAP	4-dimetilaminopiridina
DMF	<i>N,N</i> -dimetilformamida
dt	doble triplete
eq	equivalente molar
Et	etilo
EtOAc	acetato de etilo
g	gramo
h	hora
HSO ₃ Cl	ácido clorosulfónico
Hz	Hertz
IR	infrarrojo
K	kilobytes

kPa	kiloPascal
Lit.	literatura
m	multiplete
M	molar
Me	metilo
MHz	MegaHertz
µg	microgramos
µl	microlitros
µm	micrometros
mg	miligramo
ml	mililitro
mm	milímetro
min	minuto
MeOH	metanol
nm	nanometro
NMP	<i>N</i> -metilpirrolidina
p.f.	punto de fusión
Ph	fenilo
ppm	partes por millón
Py	piridina
RMN	resonancia magnética nuclear
s	singulete
ss	solución saturada
solv.	Solvente
SO ₃ .NEt ₃	complejo trióxido de azufre-trietilamina
SO ₃ .Py	complejo trióxido de azufre-piridina
t	tripleto
t.a.	temperatura ambiente
TEA	trietilamina
THF	tetrahidrofurano
Tr	trifenilmetilo (tritilo)
UV	ultravioleta

1. Introducción

Los hidratos de carbono, una de las biomoléculas más abundante en la naturaleza, existen en forma de oligo- y polisacáridos complejos, unidos covalentemente a lípidos y proteínas, tanto en la superficie de las células, como en los fluidos biológicos. Hasta fines de los años 60 se pensaba que los hidratos de carbono desempeñaban, de manera exclusiva, funciones estructurales (como la celulosa o la quitina) o energéticas (como la glucosa o el almidón). Sin embargo, en los últimos años, el papel que ha tenido mayor interés es el que ejercen como marcadores del reconocimiento celular^[91CO741]. Participan en procesos tales como la eliminación de glicoproteínas y células del sistema circulatorio, la fagocitosis no inmune, el desarrollo embrionario, los procesos de adhesión microbiana, el reconocimiento de antígenos, la metástasis celular, la fertilización, etc^[89LC1]. La capacidad de supervivencia de un organismo infectado por una bacteria se basa, en gran medida, en la respuesta inmunológica a los polisacáridos de la pared celular bacteriana, que actúan como punto de anclaje del organismo invasor. Por lo general, más del 70% de los anticuerpos obtenidos frente a células enteras presenta reacción frente a estructuras oligosacáridicas.

La longitud de estos polisacáridos implicados en procesos de reconocimiento esenciales para la vida, en la mayoría de los casos, es inferior a las 20 unidades. Sin embargo, las distintas posibilidades de configuración anomérica, de puntos de unión, de estados de oxidación o reducción y de sustitución, dan lugar a un gran abanico de topologías que la naturaleza utiliza como un amplio y sofisticado vocabulario. Los azúcares tienen una gran capacidad de almacenar información.

En particular, los polisacáridos aniónicos son agentes antitrombóticos y antilipémicos, además afectan el crecimiento celular y tienen actividad antitumor inmunosupresora, y actividad anti-VIH. Entre los polisacáridos sulfatados naturales podemos citar la agarosa sulfato, toda la familia de carragenanos y la de glicosaminoglicuronanos (heparina, condroitín sulfato, dermatán sulfato, etc.). En 1936, Bergstrom^[36ZPC163] encontró que la actividad de la heparina estaba relacionada con la presencia de los grupos sulfatos en la cadena glicosídica. En 1958, Gerber^[58PM590] reportó que los polisacáridos sulfatados inhibían la replicación viral. En 1986, De Clercq^[86JMC1561] anticipó que los compuestos polianiónicos tales como el dextran sulfato o polisacáridos sulfatados serían posibles drogas contra el síndrome de inmunodeficiencia adquirido (SIDA). Debido a la importancia farmacológica y/o industrial que revisten, han sido y son extensamente estudiados. En bibliografía, se describe la preparación de derivados sulfatados de dextrano, chintino, xilofurananos, ribofurananos, curdlanos, alquil laminara-oligosacáridos y alquil malto-oligosacáridos, obteniéndose

derivados con importante actividad anti-VIH^[97MA3224, 98CAR427]. En particular, el curdlano y los alquil laminara-oligosacáridos y malto-oligosacáridos sulfatados presentan ventajas terapéuticas debido a su baja actividad anticoagulante^[87JJC1164, 94CAR51, 97MA3224].

Las interacciones iónicas entre macromoléculas biológicas cargadas han sido analizadas, por ejemplo, la heparina con la antitrombina III^[83JBC9826]. La carga negativa del pentasacárido activo de la heparina reaccionaría con la zona helicoidal de la antitrombina III que posee 3 residuos de lisinas cargados en una posición espacial apropiada para la interacción. Más recientemente, Uryu y colaboradores^[92BP2385, 97MA1997] proponen que el efecto inhibitor del curdlano sulfatado en la infección de VIH puede deberse a la interacción de la carga positiva de la glicoproteína (gp120) del virus con la carga negativa del polisacárido sulfatado. Esta interacción probablemente cause cambios en la conformación de la glicoproteína y estos cambios inhibirían la unión de gp120 con los receptores CD4 de los linfocitos T^[89J11149, 94V735].

Los hidratos de carbono son moléculas bastante flexibles y existen en solución como una mezcla compleja de distintos conformeros^[95CO591]. Un conocimiento del rol de los hidratos de carbono en los sistemas biológicos requiere del análisis de la distribución en el equilibrio de los conformeros en solución acuosa.

La estructura tridimensional juega un papel fundamental. En la actualidad existen diferentes técnicas que pueden permitir el conocimiento de dicha estructura:

- La difracción de rayos X constituye uno de los métodos más utilizados en la determinación de la estructura de biomoléculas. El análisis del patrón de rayos X proporciona una información extremadamente detallada de la conformación adoptada en estado sólido. Desafortunadamente, el entorno de la biomolécula en un cristal es bastante distinto al entorno de dicha molécula en el medio biológico y, por lo tanto, la estructura determinada por difracción de rayos X puede presentar desviaciones considerables con respecto a la estructura tridimensional en solución. Por otra parte, el empaquetarse para formar un cristal, el azúcar tiende a adoptar conformaciones únicas. Sólo cristaliza uno de los conformeros presentes en solución y se pierde toda la información relativa a la flexibilidad molecular. Un problema adicional radica en la carencia de información sobre hidratos de carbono que actualmente existe en los bancos de datos de estructuras cristalográficas.

- El conocimiento de la estructura tridimensional del oligosacárido en solución, sólo puede obtenerse mediante técnicas de resonancia magnética nuclear, basadas fundamentalmente en las medidas de efecto nuclear Overhauser^[89RB]. En general, la ausencia relativa de restricciones experimentales (escasos números de NOEs), así como la flexibilidad

de determinadas uniones glicosídicas, hacen imprescindible la utilización de cálculos teóricos de mecánica y dinámica molecular para interpretar los datos experimentales^[90ACS]. La fiabilidad de dichos cálculos se apoya, fundamentalmente, en la validez de los parámetros utilizados por la superficie de potencial empírica (campo de fuerza). Un problema en este tipo de cálculos es la ausencia, hasta la fecha, de un conjunto de parámetros de validez general, suficientemente acorde con los datos experimentales. El problema en los hidratos de carbono es que hasta 1990 no existía ningún campo de fuerzas especialmente parametrizado para tratar con estas biomoléculas. A pesar de estos problemas, la combinación de estudios de resonancia magnética nuclear con cálculos teóricos proporciona, en la mayoría de los casos, una información extraordinariamente valiosa sobre la estructura de los hidratos de carbono en solución.

La interacción iónica de polisacáridos aniónicos con proteínas es responsable de diferentes actividades biológicas^[83JBC9826], como fuera mencionado anteriormente. Su estudio requiere, en primer lugar, del análisis de la estructura tridimensional de los oligosacáridos libres en solución. Estos datos permitirían estudiar la interacción proteína-carbohidrato, analizando el oligosacárido asociado a la proteína por técnicas de RMN. Este estudio podría dar respuesta a interrogantes tales como: cómo se obtiene la especificidad; cómo se complementan las zonas polares y no polares del hidrato de carbono y la superficie de la proteína; si es posible aplicar el modelo llave cerradura inicialmente propuesto por Fisher; hasta qué grado son flexibles los oligosacáridos en solución y, si lo son, cómo pueden reconocerse con tan gran especificidad; cuál es el papel del solvente.

En estudios previos en nuestro laboratorio sobre β -(1 \rightarrow 3)-glucanos con actividad antitumor (anti sarcoma 180), se ha encontrado que por sulfatación la actividad disminuye, fundamentalmente por el cambio conformacional inducido por la presencia de grupos cargados. Sin embargo, si se varían las condiciones de sulfatación, los glucanos sulfatados obtenidos retienen la actividad antitumoral, con la ventaja adicional de que los derivados aniónicos son solubles en agua, mientras que el polisacárido nativo no lo es, lo que mejora su aplicabilidad terapéutica^[89CAR329, 91JP256]. Por otra parte, los derivados sulfatados de alquil oligosacáridos con uniones glicosídicas β -(1 \rightarrow 3) y α -(1 \rightarrow 4) presentan potente actividad anti-VIH^[94MA6695, 94CAR51, 95MA6697], equivalente al curdlano sulfatado^[97MA1997, 97MA3224], como se mencionara anteriormente.

Debido a la importancia biológica que presentan los oligosacáridos aniónicos con uniones glicosídicas β -(1 \rightarrow 3) y α -(1 \rightarrow 4), resultó de interés estudiar la conformación en solución de estas moléculas.

El objetivo de la presente tesis fue la síntesis y el estudio conformacional de oligosacáridos aniónicos con uniones glicosídicas β -(1 \rightarrow 3) y α -(1 \rightarrow 4).

En la etapa sintética, se desarrolló una metodología estándar, que permitió la obtención de derivados a través de una secuencia sintética en común. Esta secuencia para la derivatización regioselectiva en el hidroxilo primario (sulfatación, fosfatación, succinilación y oxidación a ácidos urónicos) se basó en métodos tradicionales: tritilación, bencilación, destritilación, derivatización y hidrogenólisis. La derivatización directa, que es preferencial en el hidroxilo primario, se ensayó sólo para la sulfatación de metil β -maltósido, metil β -laminarabiósido y laminara-oligosacáridos.

El estudio de la estructura tridimensional en solución de los derivados aniónicos de laminarabiosa, laminara-oligosacáridos y maltosa, se realizó en forma sistemática mediante resonancia magnética nuclear, asistida por cálculos de mecánica y dinámica molecular, habiéndose utilizado distintos campos de fuerzas para los disacáridos. En los oligosacáridos, se analizaron los datos de relajación heteronuclear para detectar la presencia de movimientos internos.

Los resultados obtenidos pueden servir de base para el estudio de interacciones carbohidrato-proteína, implicadas en procesos biológicos.

BIBLIOGRAFÍA

ACS	American Chemical Society	JP	J. Pharmacobio Dynamics
CAR	Carbohy. Res.	LC	Lectins and Cancer
BP	Biochem. Pharmacol.	MA	Macromolecules
CO	Curr. Opin. Struct. Biol.	PM	Proc. Soc. Exp. Biol. Med.
JBC	J. Biol. Chem.	RB	Reference book
JI	J. Immunol.	V	Virology
JMC	J. Med. Chem.	ZPC	Z. Physiol. Chem.
JJC	Jpn. J. Cancer Res.		

36ZPC163 S. Bergstrom, *Z. Physiol. Chem.*, **1936**, 238, 163.

58PM590 P. Gerber, J. Dutcher, E. Adams y J. Sherman, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **1958**, 99, 590.

83JBC9826 U. Lindahl, G. Backstrom, L. Thungberg, *J. Biol. Chem.*, **1983**, 258, 9826.

86ABC2415 T. Yanaki, W. Itoh y K. Tabata, *Agric. Biol. Chem.*, **1986**, 50, 2415.

86JMC1561 E. De Clercq, *J. Med. Chem.*, **1986**, 29, 1561.

87JJC1164 H. Nakashima, O. Yoshida, T. Tochikura, T. Yoshida, T. Mimura, Y. Kido, Y. Motoki, Y. Kaneco, T. Uryu y N. Yamamoto, *Jpn. J. Cancer Res.*, **1987**, 78, 1164.

89CAR329 A. F. Fernández Cirelli, J. Covián, N. Ohno, Y. Adachi y T. Yadomae, *Carbohydr. Res.*, **1989**, 190, 329.

89JI1149 S. Lederman, R. Gulick, L. Chess, *J. Immunol.*, **1989**, 143, 1149.

89LC1 H. J. Gabius y S. Gabius, *Lectins and Cancer*. Springer Verlag, Berlin, **1989**, 1.

89RB D. Neuhaus y M. P. Williamson, *The Nuclear Overhauser Effect in Structural and Conformational Analysis*. VCH Publisher, New York, **1989**.

90ACS A. D. French, J. W. Brady, *Computer Modeling of Carbohydrate Molecules*. ACS Symposium Series 430; American Chemical Society: Washington D. C., **1990**.

91CO741 N. Sharon y H. Lis, *Curr. Op. Struct Biol.*, **1991**, 1, 741.

91JP256 T. Suzuki, N. Ohno, Y. Adachi, A. Fernández Cirelli, J. Covián y T. Yadomae, *J. Pharmacobio Dynamics*, **1991**, 14, 256.

- 92BP2385 T. Uryu, N. Ikushima, K. Katsuraya, T. Shoji, N. Takahashi, T. Yoshida, K. Kanno, T. Murakami, H. Nakashima y N. Yamamoto, *Biochem. Pharmacol.*, **1992**, 43, 2385-2392.
- 94CAR51 K. Katsuraya, N. Ikushima, N. Takahashi, T. Shoji, H. Nakashima, N. Yamamoto, T. Yoshida y T. Uryu, *Carbohyd. Res.*, **1994**, 260, 51.
- 94V735 P. Jagodzinski, R. wiaderkiewicz., G. Kurzawski, M. Kloczewiak, H. Nakashima, E. Hyjek, N. Yamamoto, T. Uryu, Y. Kaneco, M. R. Posner, D. Kozbor, *Virology*, **1994**, 202, 735.
- 94MA6695 K. Katsuraya , T. Shoji, K. Inazawa, H. Nakashima, N. Yamamoto y T. Uryu, *Macromolecules*, **1994**, 27, 6695.
- 95CO591 R. J. Woods, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **1995**, 5, 591.
- 95MA6697 K. Katsuraya , T. Shibuya, K. Inazawa, H. Nakashima, N. Yamamoto y T. Uryu, *Macromolecules*, **1995**, 28, 6697.
- 97MA1997 K. Jeon, K. Katsuraya, Y. Kaneco, T. Mimura y T. Uryu, *Macromolecules*, **1997**, 30, 1997-2001.
- 97MA3224 Y. Gao, A. Fukuda, K. Katsuraya, Y. Kaneco, T. Mimura, H. Nakashima, y T. Uryu, *Macromolecules*, **1997**, 30, 3224-3228.
- 98CAR427 S. Nishimura, H. Kai, K. Shinada, T. Yoshida, S. Tokura, K. Kurita, H. Nakashima, N. Yamamoto y T. Uryu, *Carbohyd. Res.*, **1998**, 306, 427.

2. Síntesis de oligosacáridos aniónicos

2.1 Introducción:

El objetivo primario de la etapa sintética fue la obtención de derivados aniónicos de maltosa, laminarabiosa y oligosacáridos relacionados, para lo cual se desarrolló una metodología estándar que permitió la obtención de los diversos derivados a partir de una secuencia sintética en común.

Se utilizó la maltosa de origen comercial, mientras que laminarabiosa y oligosacáridos superiores se prepararon por acetólisis del curdlano. Esta vía degradativa resultó más eficiente que la síntesis por condensación de derivados de glucosa convenientemente protegidos.

En todos los casos se obtuvieron los derivados peracetilados que sirvieron de sustratos en la síntesis de los respectivos metil glicósidos a través de reacciones de Koenigs-Knorr. El bloqueo de los centros anoméricos de los extremos reductores tuvo por finalidad la síntesis de compuestos con mayor estabilidad y diastereoméricamente puros.

Los metil glicósidos acetilados fueron total o parcialmente desacetilados con el objeto de introducir los grupos funcionales aniónicos. La remoción total de grupos acetilos proveyó sustratos que sirvieron para investigar la introducción regioselectiva de grupos sulfatos en oligosacáridos (ensayadas sobre metil maltósido, laminarabiósido y laminara-oligosacáridos); mientras que la desacetilación parcial tuvo por finalidad investigar la remoción selectiva de grupos acetatos, para después funcionalizar el grupo hidroxilo libre.

Cuando se pretende transformar selectivamente un determinado grupo funcional en un compuesto que es polifuncionalizado, los demás sitios reactivos deben ser temporalmente bloqueados, salvo que el reactivo empleado reaccione selectivamente con dicho grupo con buen rendimiento. Como antecedente puede mencionarse que diversos agentes sulfatantes reaccionan con hexosas (o derivados) para dar inicialmente 6-*O*-sulfatos, aunque pueden obtenerse compuestos de mayor grado de sulfatación. No se encontraron diferencias significativas en la selectividad de varios reactivos (ClSO₃H/Py; SO₃.Py/Py ó DMF), aunque con SO₃.Py en DMF la polisulfatación de la glucosa fue minimizada^[61JOC1248]. Durante el presente trabajo de tesis, se logró la sulfatación selectiva de los grupos hidroxilos primarios en metil maltósido, laminarabiósido y laminara-oligosacáridos; sin embargo, la separación del producto de reacción se logró en forma parcial y con dificultades, por esto, los métodos directos se discontinuaron como metodología preparativa.

Al ser los sustratos empleados compuestos polihidroxilados, la vía más eficaz para la derivatización regioselectiva (sulfatación, fosfatación, succinilación y oxidación a ácidos

urónicos) se basó en las diferencias de reactividad de los grupos hidroxilos frente a determinados grupos protectores. De este modo se empleó la secuencia: tritilación de los hidroxilos primarios, bencilación, destritilación, derivatización en los grupos hidroxilos primarios y debencilación. Esta metodología no sólo permitió la derivatización selectiva, sino que permitió la purificación y aislamiento de los productos en forma sencilla. En forma análoga, la *O*-sulfatación regioselectiva de los grupos hidroxilos C-2, C-2' y C-3' de laminarabiosa, se logró luego de bloquear los grupos hidroxilos C-4 y C-6 con bencilidén acetal, el cual fue finalmente removido.

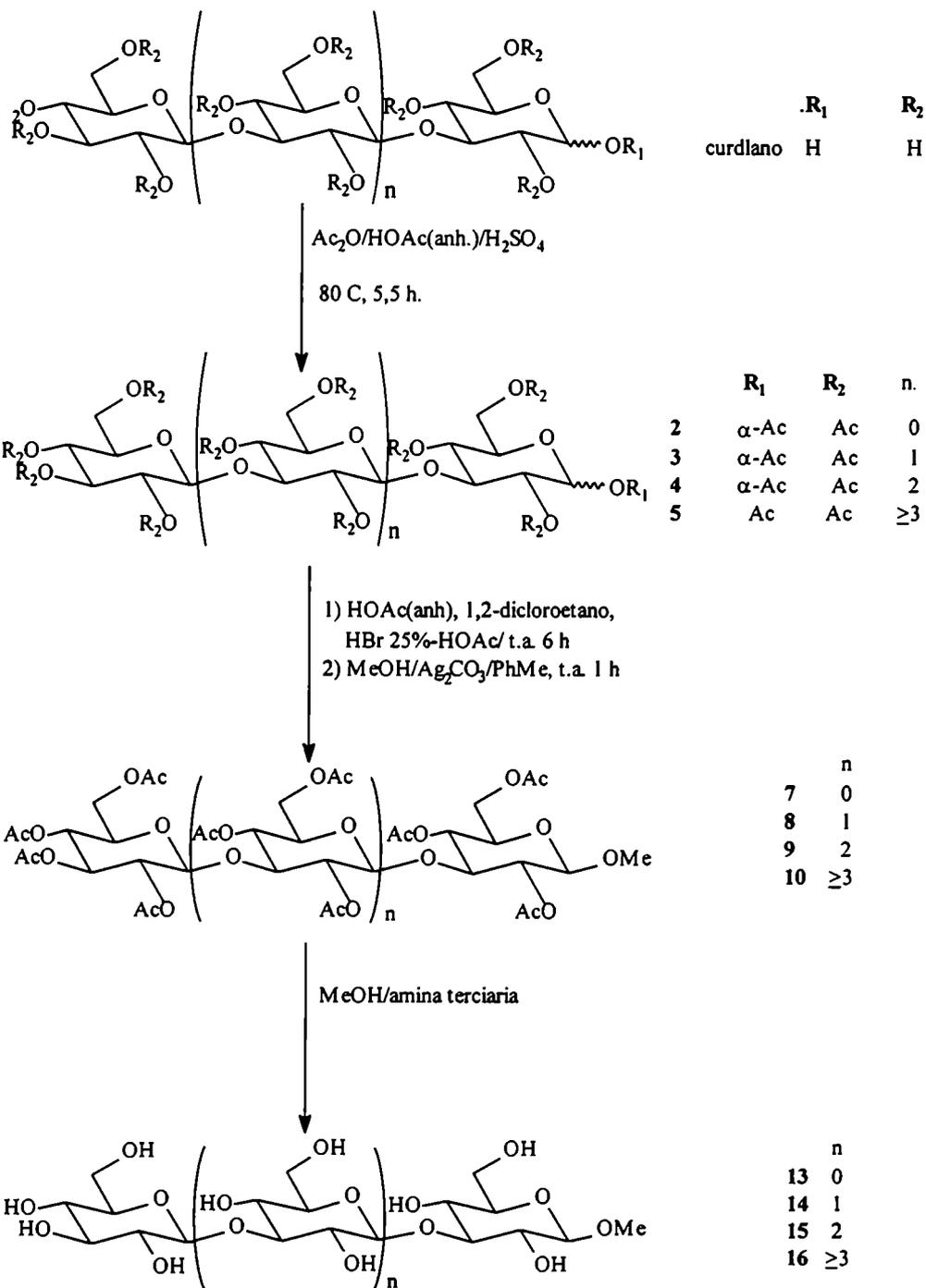
2.2 Descripción y discusión de los resultados obtenidos:

2.2.1 Preparación de derivados de laminara-oligosacáridos y de maltosa:

La preparación de sustratos convenientemente protegidos permitió la síntesis regioselectiva de los derivados aniónicos (sulfatos, fosfatos, succinatos y uronatos) de laminara-oligosacáridos y de maltosa.

2.2.1.a Obtención de metil glicósidos:

Los metil glicósidos de la serie de laminara-oligosacáridos se obtuvieron a través de la secuencia acetólisis del curdlano, posterior glicosidación por el método de Koenigs-Knorr y desacetilación. El metil β -maltósido a partir de D-maltosa comercial a través de la secuencia peracetilación, glicosidación y desacetilación. Las secuencias de obtención de metil β -laminara-oligosacáridos y metil β -maltósido pueden observarse en las figuras 1 y 2 respectivamente.



Figural

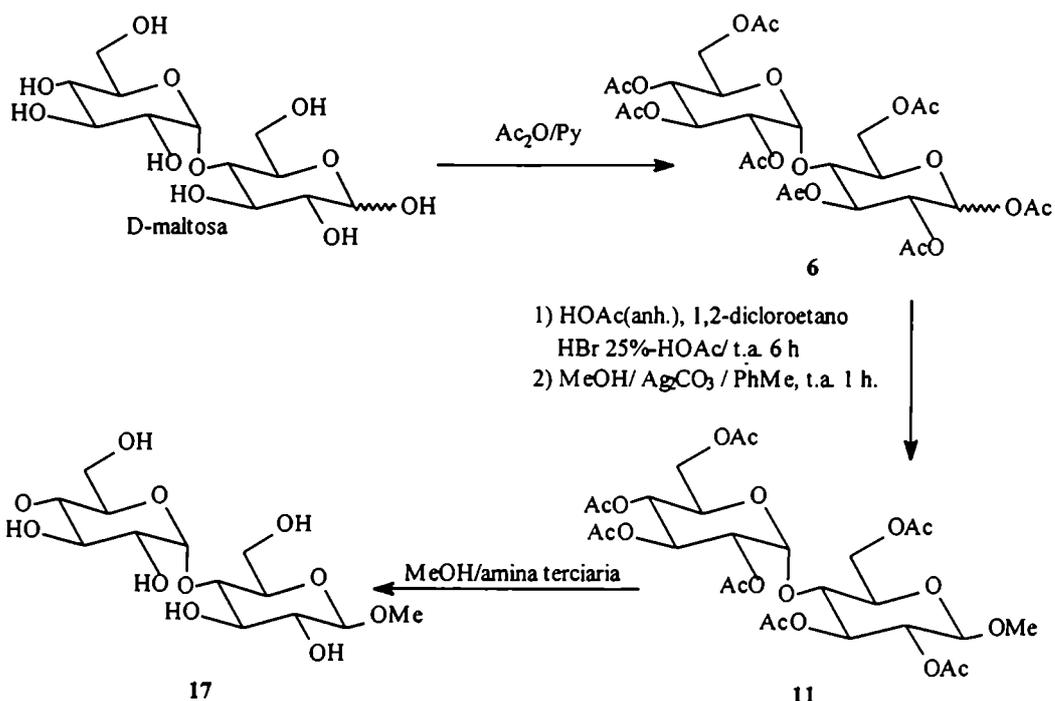


Figura 2

2.2.1.a.1 Acetólisis del curdlano:

Laminarabiosa (1), α -laminarabiosa octaacetato (2), α -laminaratriosa peracetilada (3), α -laminaratetraosa peracetilada (4) y laminara-oligosacáridos (5) pueden ser obtenidos por síntesis o por degradación química o enzimática a partir de polisacáridos que posean uniones β -(1 \rightarrow 3)-glucosídicas.

Los métodos sintéticos no superan rendimientos del 45 al 60% en la reacción de condensación de acetobromoglucosa con 2-*O*-bencil-4,6-*O*-bencilidén- α -D-glucopiranosido^[90AJC665] o de 2-*O*-benzoil-4,6-*O*-bencilidén- α -D-glucopiranosido^[79CAR245, 52JCS12243] para obtener un derivado de laminarabiosa. La obtención de laminara-oligosacáridos requiere de más pasos y los rendimientos son pobres^[93CAR81].

La serie de laminara-oligosacáridos acetilados puede obtenerse por acetólisis de curdlano^[91CAR133, 94MA6695], laminarano, pachyman^[77JC305] y escleroglucano^[96BMC1849] con rendimientos entre 23 y 30% para el disacárido. También pueden obtenerse por acetilación de los oligosacáridos provenientes de la hidrólisis ácida de laminarano^[62MCC328], pachyman^[62MCC330] y curdlano^[94MA6695] con rendimientos de ~10% o hidrólisis enzimática de curdlano en la cual se reportan los rendimientos más elevados (50%)^[91CAR133].

De los posibles métodos se eligió la acetólisis, ya que es particularmente simple, permite obtener en una sola reacción y por posterior purificación la familia de laminara-oligosacáridos y se dispuso de curdlano comercial. En cambio la síntesis de enlaces glicosídicos insumen mayor tiempo y se obtienen, en general, bajos rendimientos. Por último, los métodos enzimáticos, si bien son más eficientes, tienen como desventaja la disponibilidad de la enzima.

Por acetólisis del curdlano con anhídrido acético:ácido acético:ácido sulfúrico (2:2:0.1) durante 5:30 h, a 80°C se obtuvo^[97CAR1] α -laminarabiosa octaacetato (**2**) con un 24% de rendimiento y 15% de α -D-glucopiranosido pentaacetilado (**1**), 18% de α -laminaratriosa undecaacetato (**3**), 8% α -laminaratetraosa peracetato (**4**), 10% de laminara-oligosacáridos de aproximadamente 5 a 10 unidades de glucosa (**5**) (este rendimiento aumenta al 40% si la reacción se realiza a temperatura ambiente por 24 h) y un 25% de oligosacáridos de mayor peso molecular, Los rendimientos son similares a los reportados en bibliografía^[91CAR133]. Además, se modificaron las condiciones de reacción para obtener mayor rendimiento de oligosacáridos de mayor peso molecular, ya que eran necesarios para nuestro estudio. De acuerdo con bibliografía^[77JC305, 91CAR133, 94MA6695] se obtienen los acetatos anoméricos α .

En la mezcla de laminara-oligosacáridos el número de unidades de glucosa es igual ó mayor que 5 unidades ya que en la obtención de la misma se separaron puros hasta laminaratetraosa y las fracciones posteriores se utilizaron como mezcla de oligosacáridos.

Los puntos de fusión y poderes rotatorios de los productos **1**^[63MCC211], **2**^[77JC305] y **3**^[79CB1046] se correspondieron con los publicados en bibliografía.

Los espectros de RMN-¹H y ¹³C para laminarabiosa peracetilada **2** son acordes con los publicados^[79CB1046]. Los espectros de la serie de laminara-oligosacáridos peracetilados **3**, **4** y **5** se asignaron por comparación con el precursor de la serie de oligosacáridos acetilados **2**.

2.2.1.a.2 Acetilación de la maltosa:

La 2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- α -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 4)-1,2,3,6-tetra-*O*-acetil- α -D-glucopiranososa (**6**) fue obtenida a partir de maltosa comercial, de acuerdo con técnicas de bibliografía^[62MCC326, 62MCC211, 49JA3175]. Se trató D-maltosa en presencia de exceso de anhídrido acético-piridina durante un día a temperatura ambiente obteniéndose en estas condiciones mayoritariamente el anómero α . El compuesto cristalino se caracterizó como 2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- α -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 4)-1,2,3,6-tetra-*O*-acetil-D-glucopiranososa (octa-*O*-acetil α -

maltosa) (**6**) con un rendimiento del 80%. Las propiedades físicas del compuesto **6** coinciden con las reportadas en bibliografía^[15JA1276].

2.2.1.a.3 Glicosidaciones:

El extremo reductor fue glicosidado para evitar la mezcla de anómeros permitiendo el uso de sustratos diastereoisoméricamente homogéneos, además de protegerlo en las posteriores etapas de modificación del resto de la molécula.

Los metil glicósidos peracetilados de laminarabiosa, laminaratriosa, laminaratetraosa, laminara-oligosacáridos y maltosa **7-11** fueron obtenidos empleando el método de Koenigs Knor^[79CB10467]. La activación del extremo reductor se llevó a cabo sintetizando el bromuro de glicosilo a partir de los derivados de maltosa y laminara-oligosacáridos peracetilados **2-6**, con HBr 30% en ácido acético glacial y en 1,2-dicloroetano. Los productos formados poseían el átomo de bromo en la posición axial, fuertemente favorecida por efecto endoanomérico^[65JOC3387]. Los bromuros obtenidos se emplearon sin posterior purificación y por tratamiento con metanol en presencia de Ag₂CO₃ fueron transformados en los β-metil glicósidos **7-11** con rendimientos del 85, 80, 75, 89 y 90%, respectivamente. La estereoespecificidad observada en la glicosidación se correlaciona con la formación del ión acetiloxonio para dar 1,2 trans glicósidos. Para los compuestos **7** y **11** se obtuvieron rendimientos superiores a los descritos en bibliografía (80% en ambos metil glicósidos^[52JCS1243, 74JCS88]). Los metil glicósidos **8** y **9** fueron obtenidos con altos rendimientos en dos pasos de reacción. En bibliografía^[93CAR81] se reporta la síntesis química de dichos compuestos con más pasos de reacción y con menor rendimiento. La mezcla **10** compuesta por metil laminara-oligosacáridos se caracterizó por comparación de su espectro de RMN-¹³C con los correspondientes a laminara-oligosacáridos peracetilados y los metil β-glicósidos **8** y **9**. Los carbonos anoméricos aparecen aproximadamente a 89 ppm en los compuestos peracetilados **2, 3, 4** y **5**, y a 100 ppm aproximadamente en los metil glicósidos. Por otra parte, se observó la señal de OCH₃ a 56 ppm.

Las propiedades físicas (punto de fusión y poder rotatorio) de los compuestos **7**^[52JCS1243], **8**^[93CAR81], **9**^[93CAR81] y **11**^[66JOC2227] se correspondieron con las publicadas.

En la sección experimental 2.3.5.a.1.3 se muestran las asignaciones espectrales (RMN-¹H y ¹³C) para los compuestos **7**^[97JCS2383], **8**^[93CAR81], **9**^[93CAR81] y **11**^[74JCS88, 77CAR299], que coinciden con los datos de bibliografía.

2.2.1.a.4 Desacetilaciones:

Se utilizó un procedimiento desarrollado en nuestro laboratorio^[93JCC13]. La reacción se llevó a cabo empleando metanol-amina terciaria (triethylamina o *N*-metilpirrolidina) a temperatura ambiente para desacetilar la mezcla de laminara-oligosacáridos peracetilados (**5**) y los metil glicósidos peracetilados **7-11**. La metodología es ventajosa ya que los reactivos y subproductos son eliminados por simple evaporación, pudiéndose emplear el producto sin posterior purificación. Así, se obtuvieron cuantitativamente laminara-oligosacáridos (**12**) y los metil β-glicósidos de laminarabiosa, laminatriosa, laminaratetraosa, laminara-oligosacáridos y maltosa (**13-17**). En bibliografía^[93CAR81] se describe la obtención de **13**, **14** y **15** empleando NaOMe/MeOH con altos rendimientos pero resulta más tedioso el aislamiento debido a que la interrupción de la reacción requiere del agregado de ácido y un posterior proceso de purificación con Bio Gel P-2.

En la sección experimental (2.3.5.a.1.4) se describen las propiedades físicas y los espectros de RMN-¹H y/o ¹³C que se corresponden con los publicados para los compuestos **13**^[52JCS1243, 93CAR81], **14**^[93CAR81], **15**^[93CAR81] y **17**^[52JCS1243, 77CAR299]. La asignación de los espectros correspondientes a laminara-oligosacáridos (**12**) y metil β-laminara-oligosacáridos (**16**) se realizó por comparación con los correspondientes a los compuestos **13-15**.

2.2.1.b Obtención de oligosacáridos con grupos hidroxilos primarios libres:

Se sintetizaron derivados de laminarabiosa, laminatriosa y maltosa con sus grupos hidroxilos primarios libres, que posteriormente fueron esterificados con grupos aniónicos u oxidados. Este método indirecto es más laborioso pero tiene la ventaja que es posible derivatizar los hidroxilos primarios sin emplear reacciones quimioselectivas, ni utilizar cantidades estequiométricas de reactivo. Por otra parte, se aumenta la solubilidad en solventes orgánicos facilitando la purificación.

Entre las posibles secuencias descritas en bibliografía para obtener derivados con hidroxilos primarios libres, con procesos sencillos y altos rendimientos, se pueden mencionar:

En la sección experimental 2.3.5.a.1.3 se muestran las asignaciones espectrales (RMN- ^1H y ^{13}C) para los compuestos **7**^[97JCS2383], **8**^[93CAR81], **9**^[93CAR81] y **11**^[74JCS88, 77CAR299], que coinciden con los datos de bibliografía.

2.2.1.a.4 Desacetilaciones:

Se utilizó un procedimiento desarrollado en nuestro laboratorio^[93JCC13]. La reacción se llevó a cabo empleando metanol-amina terciaria (trietilamina o *N*-metilpirrolidina) a temperatura ambiente para desacetilar la mezcla de laminara-oligosacáridos peracetilados (**5**) y los metil glicósidos peracetilados **7-11**. La metodología es ventajosa ya que los reactivos y subproductos son eliminados por simple evaporación, pudiéndose emplear el producto sin posterior purificación. Así, se obtuvieron cuantitativamente laminara-oligosacáridos (**12**) y los metil β -glicósidos de laminarabiosa, laminaratriosa, laminaratetraosa, laminara-oligosacáridos y maltosa (**13-17**). En bibliografía^[93CAR81] se describe la obtención de **13**, **14** y **15** empleando NaOMe/MeOH con altos rendimientos pero resulta más tedioso el aislamiento debido a que la interrupción de la reacción requiere del agregado de ácido y un posterior proceso de purificación con Bio Gel P-2.

En la sección experimental (2.3.5.a.1.4) se describen las propiedades físicas y los espectros de RMN- ^1H y/o ^{13}C que se corresponden con los publicados para los compuestos **13**^[52JCS1243, 93CAR81], **14**^[93CAR81], **15**^[93CAR81] y **17**^[52JCS1243, 77CAR299]. La asignación de los espectros correspondientes a laminara-oligosacáridos (**12**) y metil β -laminara-oligosacáridos (**16**) se realizó por comparación con los correspondientes a los compuestos **13-15**.

2.2.1.b Obtención de oligosacáridos con grupos hidroxilos primarios libres:

Se sintetizaron derivados de laminarabiosa, laminaratriosa y maltosa con sus grupos hidroxilos primarios libres, que posteriormente fueron esterificados con grupos aniónicos u oxidados. Este método indirecto es más laborioso pero tiene la ventaja que es posible derivatizar los hidroxilos primarios sin emplear reacciones quimioselectivas, ni utilizar cantidades estequiométricas de reactivo. Por otra parte, se aumenta la solubilidad en solventes orgánicos facilitando la purificación.

Entre las posibles secuencias descritas en bibliografía para obtener derivados con hidroxilos primarios libres, con procesos sencillos y altos rendimientos, se pueden mencionar:

-Tritilación, esterificación (acetatos o benzoatos), destritilación [81CAR157, 63MCC168].

-Tritilación, eterificación (bencilos), destritilación [56JCS3459].

Cuando los grupos protectores son ésteres, en la etapa de destritilación se han obtenido frecuentemente productos de migración de dichos sustituyentes [82JCC311, 63JCS3970]. Son conocidas las migraciones de acetatos o benzoatos hacia los hidroxilos primarios, en medio básico u ácido; que están favorecidas por la ayuda anquimérica de los grupos vecinos. El remplazo de los grupos ésteres por éteres evitan la migración. Entonces, se siguió la metodología de tritilación, bencilación y destritilación. Se eligió el grupo bencilo ya que se puede clivar fácilmente por hidrogenólisis.

Esta secuencia de reacciones se realizó con metil β-laminarabiósido (13), metil β-laminaratriósido (14) y metil β-maltósido (17) como puede observarse en las figuras 3, 4 y 5, respectivamente.

Esta secuencia de protecciones y desprotecciones, en la cual los grupos cargados son introducidos hacia el final de la preparación, emplea compuestos solubles en solventes orgánicos, fácilmente purificables por cromatografía en columna de sílica gel.

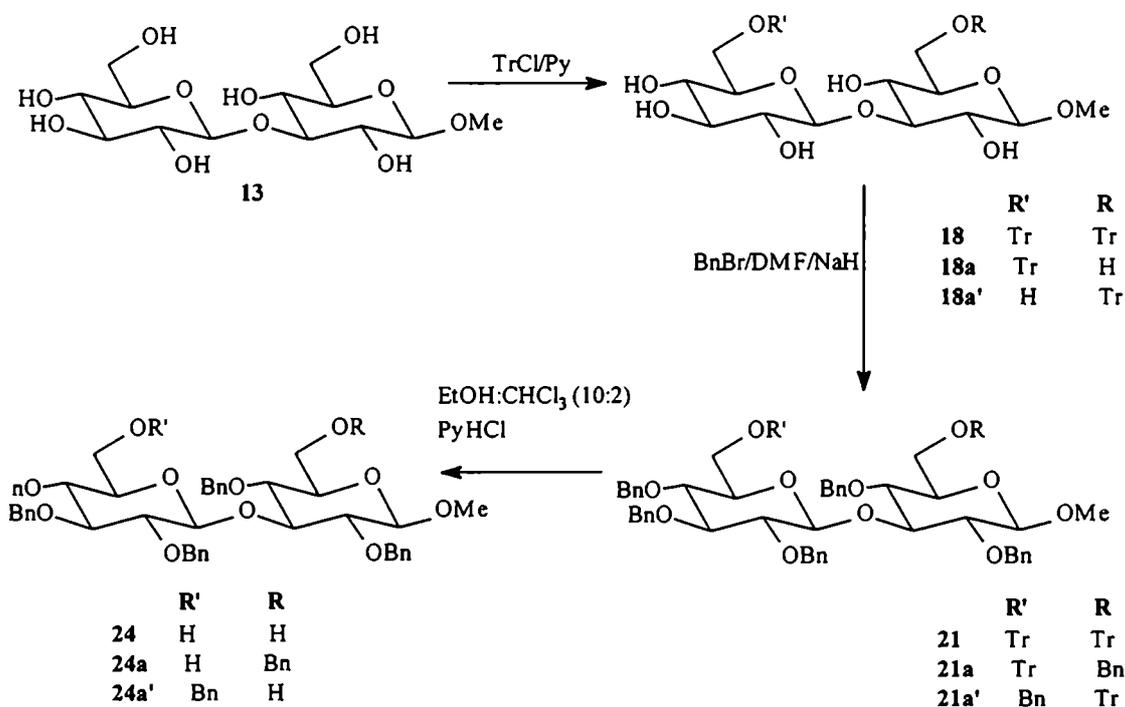


Figura 3

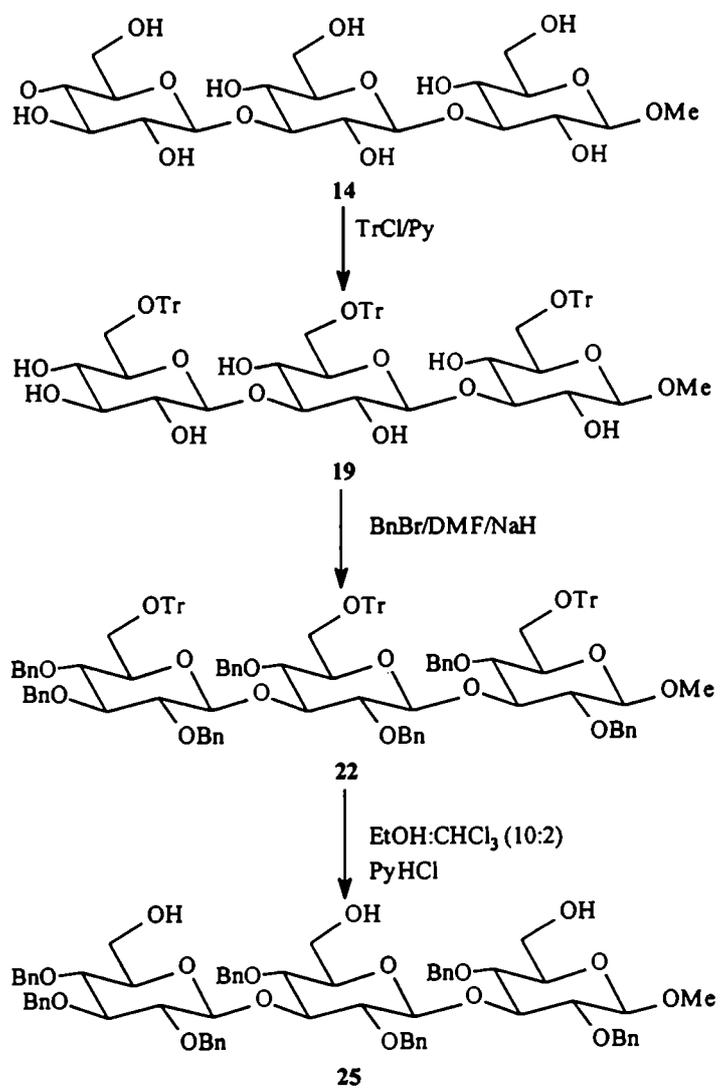


Figura 4

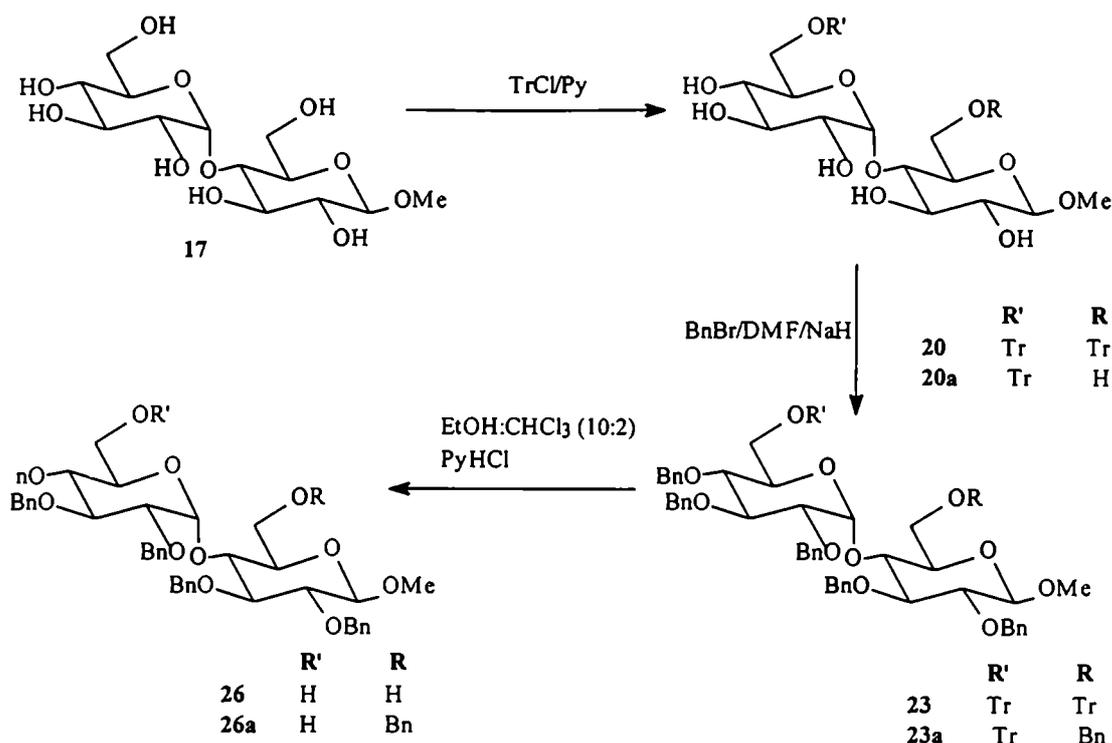


Figura 5

2.2.1.b.1 Tritilaciones:

Una eterificación selectiva muy conocida es la formación de tritil-éter, en la cual, un grupo hidroxilo primario es mucho más reactivo que uno secundario. En la maltosa los dos grupos hidroxilos primarios muestran diferente reactividad, como ejemplifica la mono-tritilación de β -maltosa^[67JOC656] o bencil β -maltósido^[53ANN106], los que rinden mayoritariamente el 6'-*O*-tritil derivado. La gran diferencia de reactividad de los hidroxilos primarios de la maltosa y sus derivados ha sido atribuido a que el ambiente estereoelectrónico de cada hidroxilo es diferente^[66CJC1094]. Modelos moleculares de la maltosa y de su metil glicósido indican que las posiciones 2', 3 y 6 presentan mayor impedimento estérico^[70JA5834]. En bibliografía, se reporta la tritilación del metil β -laminarabiósido con 1.1 equivalente de cloruro de tritilo y obtuvieron una mezcla del 6-*O*-tritil y 6'-*O*-tritil derivado de muy difícil separación^[81CAR157].

Se tritilaron metil β -laminarabiósido (13), metil β -laminaratriósido (14) y metil β -maltósido (17) con 2 equivalentes de cloruro de tritilo por hidroxilo primario en piridina. El empleo de agua para destruir el exceso de cloruro de tritilo y extraer las sales fue mucho menos eficiente que cuando se empleó metanol (formación de TrOMe) seguido de la

eliminación de sales ácidas con resina de intercambio iónico y purificación cromatográfica (sílica gel) en presencia de NH_4OH ^[62JCS4770] o TEA para evitar destritolación. Los disacáridos tritolados resultaron sólidos amorfos caracterizados por espectroscopía como 6,6'-di-*O*-tritol derivado de laminarabiosa (**18**) y maltosa (**20**) con rendimientos de 70 y 54%, respectivamente (entrada 1 y 4 tabla 2.2.1.b), que mostraron actividad óptica ($[\alpha]_{\text{D}}=+5,5^\circ$ y $+38,6^\circ$ respectivamente). Sólo forzando las condiciones de reacción (excesos de TrCl y varios días de reacción) se lograba tritolación completa; pero bajo las condiciones empleadas se obtuvieron, con bajos rendimientos, derivados monotritolados: para laminarabiosa se obtuvo 7% de la mezcla 6-*O*-tritol (**18a'**) y 6'-*O*-tritol (**18a**) (relación 1:4,8), mientras que en la maltosa se obtuvo un 9% del derivado 6'-*O*-tritol (**20a**) ($[\alpha]_{\text{D}}=+34,8^\circ$), caracterizados por espectroscopía. Puede observarse una mayor diferencia de reactividad de los hidroxilos primarios de la maltosa respecto de laminarabiosa; en ambos azúcares la posición 6' es la más libre de impedimento y la más reactiva, mientras que la posición 6 en el metil β -laminarabiósido se encuentra menos impedida que en el metil β -maltósido, de acuerdo con resultados de bibliografía^[70JA5834, 81CAR157]. Los rendimientos aumentaron cuando se benciló el derivado tritolado sin purificación cromatográfica.

El metil 6,6',6''-tri-*O*-tritol- β -laminaratriósido (**19**) fue empleado sin purificación en la posterior etapa de bencilación.

El análisis elemental de los compuestos **18**, **20** y **20a** se corresponden con su fórmula molecular.

Los espectros de RMN- ^1H y ^{13}C se determinaron en comparación con el metil glicósido precursor y metil 6-*O*-tritol glucopiranósido. La asignación completa de los espectros se describe en la parte experimental.

2.2.1.b.2 Bencilaciones:

Los derivados bencilados se obtuvieron por tratamiento de los sustratos correspondientes con bromuro de benciló en presencia de hidruro de sodio^[84TL4303].

La bencilación de metil 6,6'-di-*O*-tritol- β -maltósido (**20**) permitió la obtención del correspondiente 6,6'-di-*O*-tritol-pentabencil derivado (**23**) con 80% de rendimiento luego de purificación cromatográfica (entrada 1, tabla 2.2.1.b) y un rendimiento global del 43% luego de la secuencia tritolación-bencilación, que sólo se mejoró ligeramente (48%) cuando el derivado tritolado **20** fue bencilado sin purificación previa (entrada 2, tabla 2.2.1.3.b). En este

último caso se obtuvo además el metil 6'-*O*-tritol-hexabencil- β -maltósido (**23a**) con 8% de rendimiento global.

El metil 6,6'-di-*O*-tritol- β -laminarabiósido pentabencilado (**21**) se obtuvo por bencilación de su precursor **18** y fue empleado sin purificación en la posterior etapa de destritolación.

Por último, por bencilación de metil 6,6',6''-tri-*O*-tritol- β -laminatriósido (**19**) se obtuvo metil 2,3,4-tri-*O*-bencil-6-*O*-tritol- β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 3)-2,4-di-*O*-bencil-6-*O*-tritol- β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 3)-2,4-di-*O*-bencil-6-*O*-tritol- β -D-glucopiranosido (**22**) cristalino, con 72% de rendimiento (a partir del metil β -laminatriósido (**14**)).

El análisis elemental de los compuestos **22** y **23** fue satisfactorio.

Los espectros de RMN- ^1H y/o ^{13}C de los compuestos **22** y **23**, **23a** fueron asignados en comparación con los sustratos de partida correspondientes, y se describen en la parte experimental.

2.2.1.b.3 Destritilaciones:

Se llevaron a cabo por solvólisis (reflujo de etanol) catalizada por clorhidrato de piridina. Esta metodología fue desarrollada en nuestro laboratorio^[97TL3995]. Este método se aplicó a los derivados protegidos de laminaratriosa (**22**) y maltosa (**23**) obteniéndose en ambos casos con 80% de rendimiento los compuestos destritolados, caracterizados por espectroscopía de RMN como metil 2,3,4-tri-*O*-bencil- β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 3)-2,4-di-*O*-bencil- β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 3)-2,4-di-*O*-bencil- β -D-glucopiranosido (**25**) (entrada 6 tabla 2.2.1.b, rendimiento total de 57,6%) y metil 2,3,4-tri-*O*-bencil- α -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 4)-2,3-di-*O*-bencil- β -D-glucopiranosido (**26**) (entrada 1 tabla 2.2.1.b), respectivamente.

Como se mencionó anteriormente para los metil β -glicósidos de laminarabiosa (**13**) y maltosa (**17**) se ensayó la secuencia tritolación, bencilación y destritolación con un único paso de purificación cromatográfica al final. De este modo, se obtuvieron metil 2,3,4-tri-*O*-bencil- β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 3)-2,4-di-*O*-bencil- β -D-glucopiranosido (**24**, 60%) y un 7% de la mezcla de metil 2,3,4-tri-*O*-bencil- β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 3)-2,4,6-tri-*O*-bencil- β -D-glucopiranosido (**24a**) y metil 2,3,4,6-tetra-*O*-bencil- β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 3)-2,4-di-*O*-bencil- β -D-glucopiranosido (**24a'**) y para los derivados de maltosa se obtuvo un 42% del compuesto **26** y metil 2,3,4-tri-*O*-bencil- α -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 4)-2,3,6-tri-*O*-bencil- β -D-

glucopiranosido (**26a**, 6%) caracterizados por espectroscopía de RMN. El rendimiento global de los compuestos **24** y **26** fueron de 60 y 42%, respectivamente (entrada 5 y 3, tabla 2.2.1.b).

Los mejores rendimientos se obtuvieron cuando se purificó en el último paso de reacción.

En los espectros de IR de los compuestos **24** (**24a** y **24a'**), **25** y **26** (**26a**) se distinguían la señal ancha a 3560 cm^{-1} que indicaba la presencia del grupo hidroxilo.

En la sección experimental se informan los correspondientes poderes rotatorios y análisis elementales de los compuestos **24**, **25**, **26** y **26a**.

Los espectros de RMN- ^1H y/o ^{13}C de los compuestos **24** (**24a** y **24a'**), **25** y **26** (**26a**) se asignaron por comparación con los sustratos tritilados y bencilados correspondiente y se describen en la parte experimental.

Tabla 2.2.1.b. Rendimiento de las reacciones de tritilación, bencilación y destritilación.

En tra da	Tritilación			Bencilación			R%	Destritilación		R%	
	R%			R%			Parcial	R%		Global	
	6,6'-di- O-tritil	6 y/o 6'- O-tritil	R% Tritila ción	6,6'- di-O- tritil	6 y/o 6'-O- tritil	R% bencila ción		6,6' OH	6 y/o 6'- OH		
1	17	54	9	63	80	-	80	43	80	-	34,5
	(20)	(20a)		(23)			(23)	(23)	(26)		(26)
2	17	-	-	-	48	8	56	48	80	-	38
					(23)	(23a)		(23)	(26)		(26)
3	17	-	-	-	-	-	-	-	42	6	42
									(26)	(26a)	(26)
4	13	70	7	77	-	-	-	-	-	-	-
		(18)	(18a,a')								
5	13	-	-	-	-	-	-	-	60	7	60
									(24)	(24a,a')	(24)
6	14	-	-	-	72	-	72	72	80	-	57.6
					(22)		(22)	(22)	(25)		(25)

En la entrada 6 se considera los hidroxilos de las posiciones 6, 6' y 6''.

R%: rendimiento en %

() número de compuesto.

2.2.1.c Obtención de derivados con grupos hidroxilos secundarios libres:

2.2.1.c.1 Derivados del metil β -laminarabiósido:

El objetivo fue sintetizar un derivado del metil β -laminarabiósido con hidroxilos secundarios libres para luego esterificarlos con sustituyentes aniónicos. La secuencia utilizada fue preparación de bencilidén derivado, acetilación y desacetilación (figura 6).

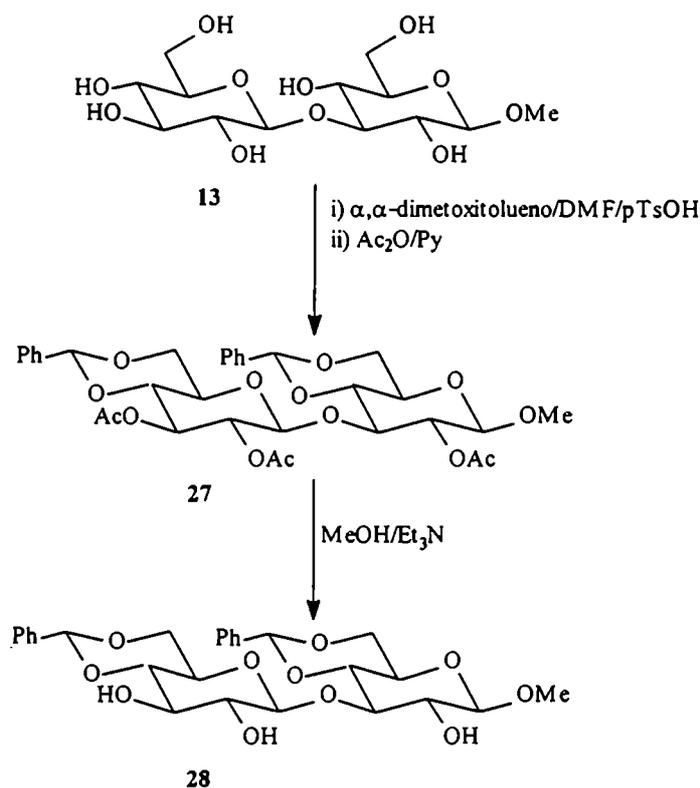


Figura 6

Por tratamiento de metil β -laminarabiósido (13) con α, α -dimetoxitolueno y ácido p -toluensulfónico en dimetilformamida, se observó por ccd la formación de un componente mayoritario. Posteriormente se acetiló en el mismo medio de reacción^[91JCC349] por agregado de anhídrido acético-piridina durante de 24 h a temperatura ambiente; Luego de aislar el producto y purificarlo por columna cromatográfica, se obtuvo un derivado que pudo ser recristalizado con un rendimiento del 80% y se caracterizó espectroscópicamente por RMN como metil 2,3-di-*O*-acetil-(*R*)-4,6-*O*-benciliden- β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 3)-2-acetil-(*R*)-4,6-*O*-benciliden- β -D-glucopiranosido (27).

Para que la reacción de formación del bencilidén derivado evolucionara era necesario concentrar el sistema evacuando el solvente con vacío a 60°C. Sólo se pudo aislar el producto con alto rendimiento cuando se acetiló (de acuerdo con bibliografía^[79CB1046]).

El compuesto **27** se desacetiló con metanol anhidro-trietilamina^[93JCC13] a temperatura ambiente y en el transcurso de 24 h precipitó un sólido blanco, se filtró y se recristalizó, obteniéndose con 90% de rendimiento un producto caracterizado como metil (*R*)-4,6-*O*-benciliden-β-D-glucopiranosil-(1→3)-(R)-4,6-*O*-benciliden-β-D-glucopiranosido (**28**) en comparación con el análogo bencil derivado^[79CB1046]. Este compuesto se empleó como sustrato en reacciones de sulfatación.

El análisis elemental se correspondía con la fórmula molecular para los compuestos cristalinos **27** y **28**. Se determinaron poderes rotatorios y puntos de fusión.

Los espectros de RMN-¹H y ¹³C de **27** y **28** se asignaron en comparación con el metil (*R*)-4,6-*O*-bencilidén-β-D-glucopiranosido diacetilado y libre, con el espectro de RMN-¹H del bencil 2,3-di-*O*-acetil-(*R*)-4,6-*O*-bencilidén-β-D-glucopiranosil-(1→3)-2-*O*-acetil-(*R*)-4,6-*O*-bencilidén-β-D-glucopiranosido^[79CB1046] y con el producto de partida **13**. Dichos espectros muestran señales características de bencilidén derivado y en el compuesto **27** además señales de acetato. Se describen en la parte experimental.

2.2.1.c.2 Estudios de desacilación parcial:

El método desarrollado en nuestro laboratorio^[93JCC13] para desacilación total utilizando NMP en metanol anhidro es útil para la remoción de grupos acetilo en derivados de hidratos de carbono con fines sintéticos. Sin embargo, los derivados benzoilados reaccionan lentamente acumulándose durante el transcurso de la reacción una variedad de intermediarios parcialmente esterificados. Este hecho experimental sirvió como base para suponer que podrían obtenerse selectivamente glicósidos parcialmente protegidos. Así, el objetivo era encontrar condiciones que permitieran la desacilación parcial y selectiva con el fin de disponer de hidratos de carbono con un único hidroxilo secundario libre (ya que es conocido que los grupos acilos migran en medio ácido o básico hacia el hidroxilo primario) para obtener derivados aniónicos sustituidos en dicho hidroxilo.

Trabajos previos de Capek y colaboradores^[85CCC1039, 85CCC2191] describen reacciones en fase heterogénea para la desacilación parcial de octa-*O*-acetato de sacarosa, donde obtienen derivados de sacarosa con diferente grado de acilación, trabajando con sistemas

K_2CO_3 /alúmina básica. Se ensayó esta metodología sobre metil 2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- α -D-glucopiranosido (**30**) y sobre los disacáridos peracilados de metil β -laminarabiósido (**7**) y metil β -maltósido (**11**), pero en todos los casos los intermediarios parcialmente acetilados se encontraban en muy baja proporción, obteniéndose mayoritariamente el sustrato de partida sin modificaciones y el producto de desacetilación completa.

Se ensayaron entonces reacciones de transesterificación (figura 7), utilizándose como modelo el metil α -D-glucopiranosido (**29**) comercial como aceptor de grupo acilo y su derivado peracetilado (**30**) como donador. Como solvente se utilizó dimetilformamida y catálisis básica de DBU que resultó más eficiente que la catálisis nucleofílica. Este método fue desarrollado en nuestro laboratorio^[97AQA87].

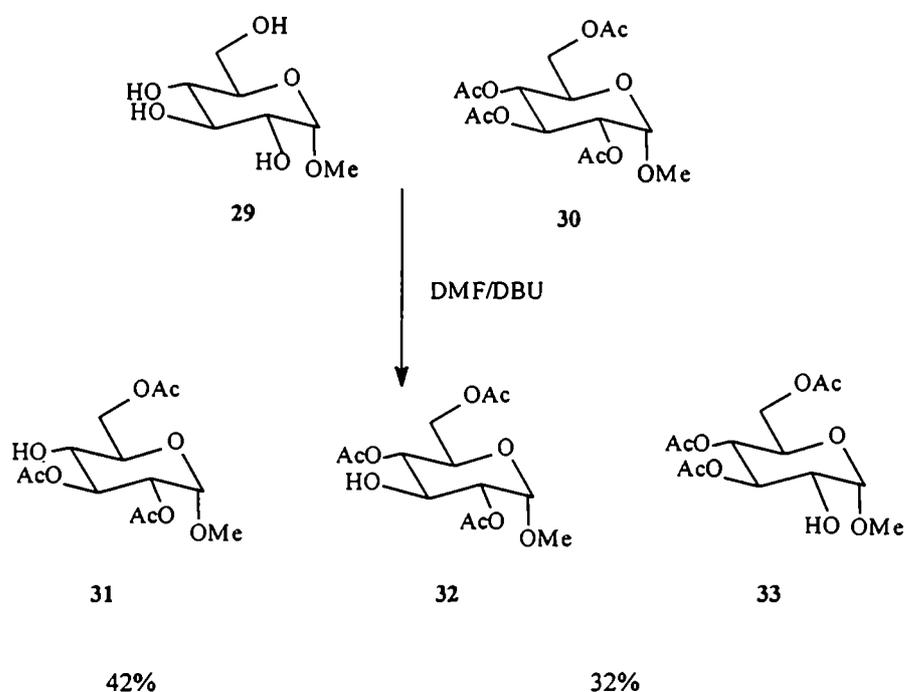


Figura 7

La mezcla se dejó evolucionar hasta que la migración de grupos acilos intra e intermolecular llegara al equilibrio, que se alcanzó después de 28 h a 40°C (no se observaron cambios por ccd). Luego de la extracción y purificación por columna cromatográfica se aislaron los productos, que fueron caracterizados por espectroscopía como metil 2,3,6-tri-*O*-

- α -D-glucopiranosido (**31**, $[\alpha]_D^{20}=+102,9^\circ$) con 42% y la mezcla metil 2,4,6-tri-O- α -D-glucopiranosido (**32**) y metil 3,4,6-tri-O- α -D-glucopiranosido (**33**) con 32% de rendimiento.

Los espectros del compuesto **31** (RMN- ^1H y ^{13}C) fueron reasignados sobre la base de reportes previos de bibliografía^[93CAR2295] y experiencias de 2D-COSY. Se asignó por RMN ^1H la mezcla de **32** y **33**.

En metil α -D-glicósidos de glucosa, manosa y galactosa^[97AQA87], se obtuvieron derivados acetilados con el hidroxilo de C-4 libre con rendimientos mayores que el 40 % después de la purificación cromatográfica. La menor reactividad del grupo hidroxilo de C-4 en la serie gluco y mano es atribuida a la interacción gauche entre el hidroximetilo de C-5 y el grupo hidroxilo (o acetoxi) de C-3 generando una congestión estérica en el hidroxilo de C-4^[76ACC11]. Además en bibliografía^[83JCC279] se reporta que en una solución de metil 2,3,6-tri-O-acetil- α -D-glucopiranosido en agua /piridina la migración se produce con alto rendimiento de O-4 a O-6.

También se ensayaron estas reacciones en disacáridos, en el metil β -laminarabiósido (**13**) y en el metil β -maltósido (**17**), pero no resultaron satisfactorias ya que se obtuvieron mezclas complejas.

A pesar que esta metodología no resultó satisfactoria en los disacáridos, cabe mencionarla ya que es de gran utilidad en monosacáridos. Es un método simple y más económico que los métodos de acetilación regioselectiva que se describen en bibliografía (el método de estannilación en monosacáridos^[81T2363, 93CAR2295] y polialcoholes^[85T643]). Emplea el mismo glicósido no protegido como aceptor de acetilo y en un solo paso de reacción permitió obtener derivados de azúcares parcialmente protegidos.

2.2.2 Preparación de derivados aniónicos de laminara-oligosacáridos y de maltosa:

El objetivo sintético fue la preparación de disacáridos aniónicos 6 o 6'-mono-O-sustituídos y 6,6'-di-O-sustituídos de metil β -laminarabiósido y metil β -maltósido; así como, la preparación de derivados de metil β -laminarabiósidos sulfatados en los hidroxilos secundarios (C-2, C-2' y/o C-3') y también la obtención de laminara-oligosacáridos sulfatados. Estos compuestos fueron utilizados para estudios conformacionales por espectroscopía de RMN y cálculos de modelado molecular.

La sustitución en los hidroxilos primarios puede obtenerse por reacción directa y regioselectiva sobre los metil glicósidos o sobre sustratos convenientemente protegidos con sus hidroxilos primarios libres.

El método directo tiene la ventaja que emplea un sólo paso de reacción, pero se obtiene generalmente una mezcla de productos de difícil separación.

En el método de protecciones y desprotecciones, se bloquean todos los grupos hidroxilos secundarios, pero esta metodología necesita tres pasos de reacción como mínimo para obtener los hidroxilos primarios libres y luego dos pasos más para obtener el derivado deseado, de modo que es más laborioso y disminuye el rendimiento global.

En nuestro estudio se eligieron ambos procedimientos, como se resumen en las figuras 8-15.

Se realizaron sulfataciones directas de laminara-oligosacáridos y los metil β -glicósidos de laminarabiosa, laminara-oligosacáridos y maltosa (figuras 8-11).

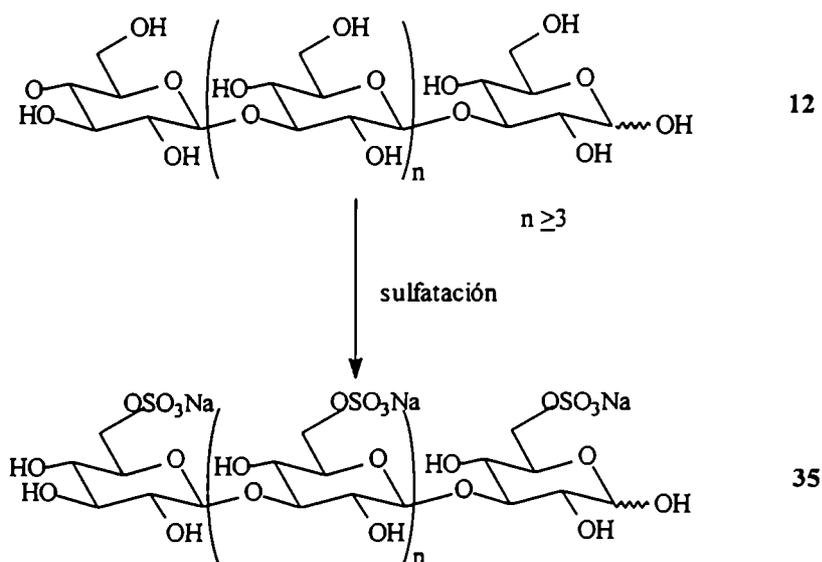


Figura 8. Sulfatación directa de laminara-oligosacárido (12).

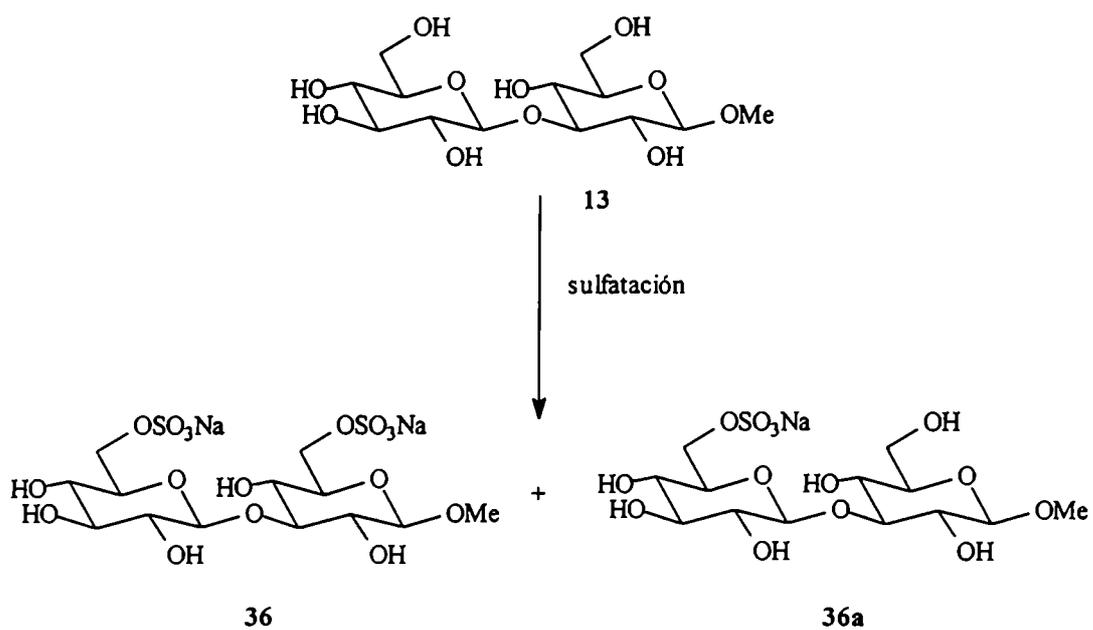


Figura 9. Sulfatación directa de metil β -laminarabiósido (13).

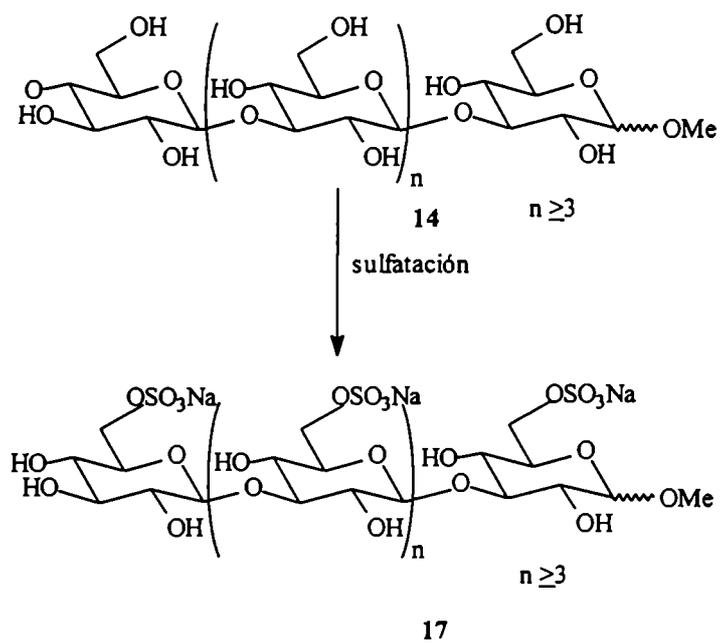


Figura 10. Sulfatación directa de metil laminara-oligosacáridos (14).

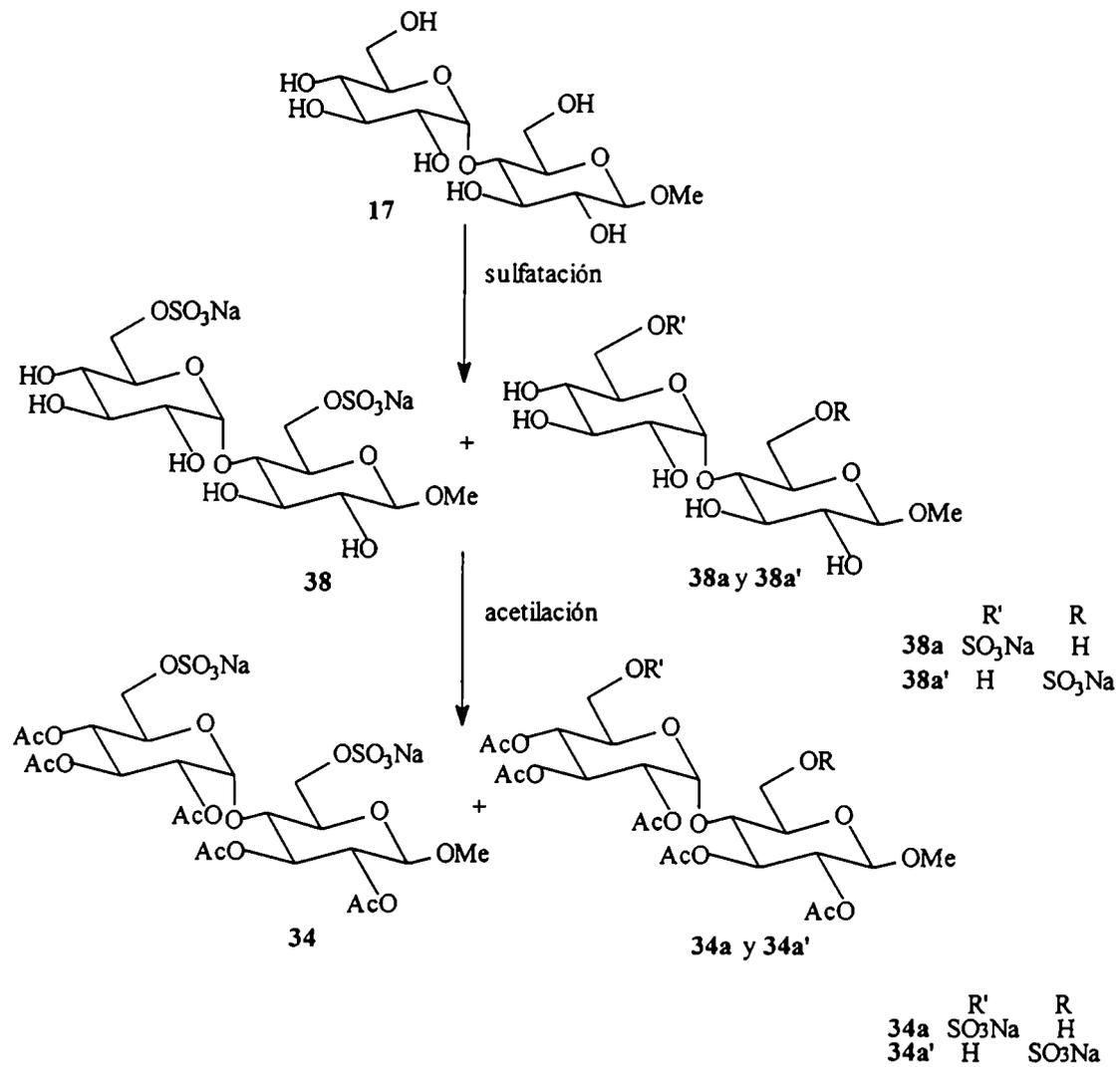


Figura 11. Sulfatación directa de metil β -maltósido (17).

También se obtuvieron los derivados aniónicos (sulfato, fosfato, succinato y uronato) a través de protecciones y desprotecciones; empleando benciléter como grupo protector (figura 12-14).

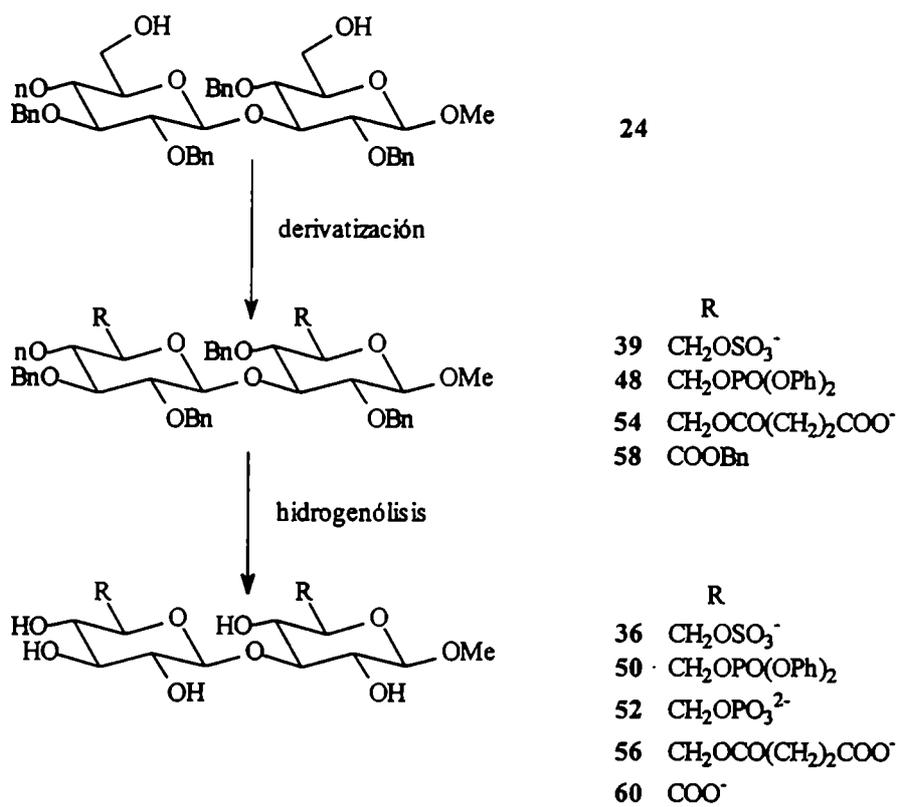


Figura 12. Derivatización de metil β -laminarabiósido pentabencilado (24).

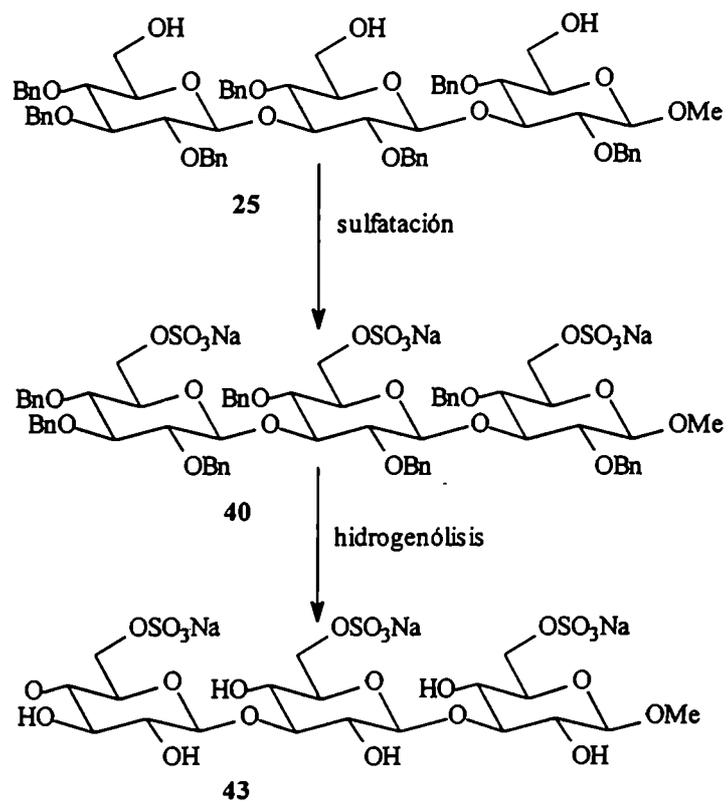


Figura 13. Sulfatación de metil β -laminaratriósido heptabencilado (25).

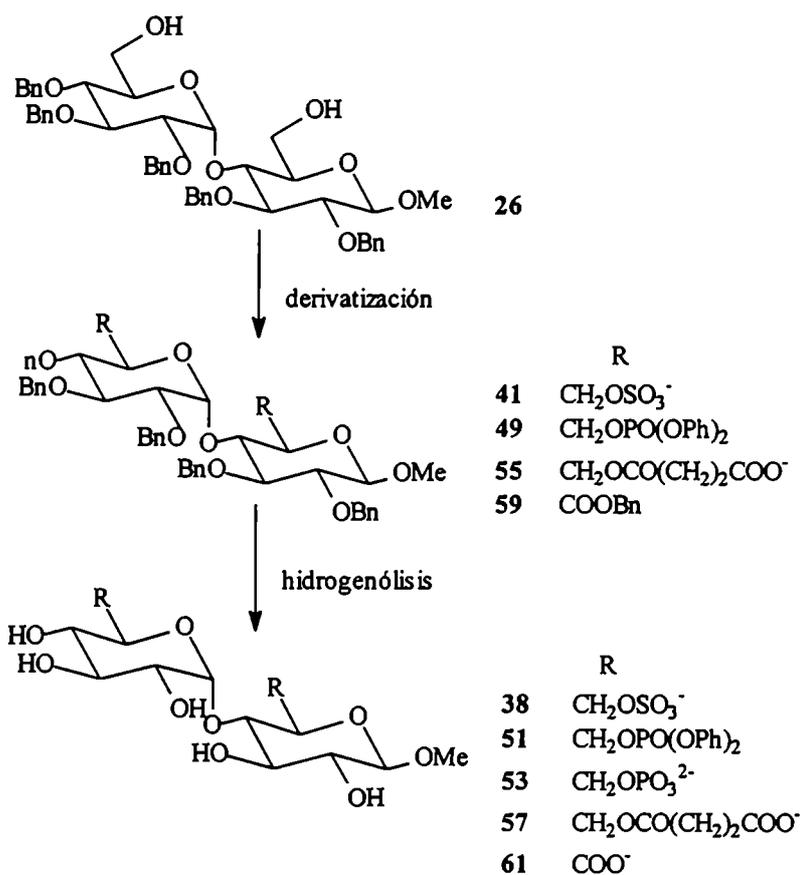


Figura 14. Derivatización de metil β-maltósido pentabencilado (26).

La sulfatación en los grupos hidroxilos C-2 y/o C-3, requirió la protección previa de los grupos hidroxilos C-4 y C-6, como muestra la figura 15.

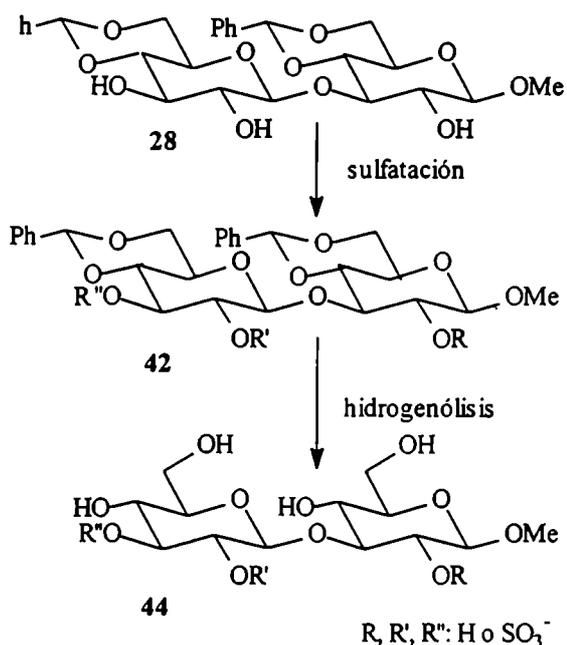


Figura 15. Sulfatación de metil β-laminarabiósido 4,6-4',6'-O-dibencilidén (28).

2.2.2.a Derivados sulfatados:

Los reactivos usuales de sulfatación^[65ACC183] de azúcares son HSO₃Cl en piridina o complejos formados por SO₃-amina terciaria (SO₃-Py, SO₃-NEt₃, etc.) y los solventes usuales son Py o DMF. Estos reactivos se encuentran en suspensión en el medio de reacción^[95CAR425]. Entre otros reactivos, se puede mencionar piperidina-*N*-ácido sulfónico en DMSO empleado en polisacáridos, ya que brinda un medio homogéneo de reacción^[72CAR420, 90MA3717]. Debido a que los reactivos de sulfatación son ineficientes, no es posible trabajar con cantidades estequiométricas y es necesario agregar exceso de los mismos para sulfatar^[76CAR175, 79BJ387, 92CAR245].

El HSO₃Cl tiene como desventaja que libera iones cloruro en la mezcla de reacción, pero da mezclas de azúcares sulfatos menos complejas que el complejo SO₃-Py^[65ACC183]. Como ejemplos de sulfatación en β-(1→3)-glucanos, se pueden mencionar: la derivatización de laminarina empleando HSO₃Cl sobre el glucano disuelto en piridina^[55CJC1097] y la sulfatación de curdlano, aunque con este reactivo se requiere un gran exceso del mismo para obtener alto grado de sulfatación, debido a que, probablemente el medio heterogéneo de la reacción hace que se retenga la estructura de hélice^[95CAR425].

El complejo $\text{SO}_3\text{-Py}$ en Py en general se utiliza para obtener monosulfatación, aunque da mezclas complejas de separar^[60BJ478, 60JCS4761, 79BJ387, 92CAR245]. También es utilizado exceso de este complejo en polisacáridos para obtener azúcares polisulfatados^[92CAR245] y se obtienen así, derivados con alto grado de sulfatación sin degradación de las cadenas glicosídicas^[95MA6697].

El complejo $\text{SO}_3\text{-NEt}_3$ en DMF es utilizado para la polisulfatación en la síntesis de análogos de heparina^[97CAR119] y también en la sulfatación de disacáridos convenientemente protegidos análogos del chondroitín sulfato^[91CAR261, 91CAR279]. Los complejos de SO_3 son relativamente estables.

Como se mencionó anteriormente, piperidina-*N*-ácido sulfónico en DMSO brinda un medio homogéneo en la sulfatación de polisacáridos y permite obtener una distribución homogénea de los grupos sulfatos^[72CAR420].

Como ejemplos de sulfatación en $\alpha\text{-(1}\rightarrow\text{4)}$ y $\beta\text{-(1}\rightarrow\text{3)}$ -glucanos se puede mencionar: la sulfatación de curdlano^[95CAR425] empleando el complejo $\text{SO}_3\text{-Py}$ que da igual resultado que empleando HSO_3Cl ; la sulfatación del curdlano en medio homogéneo empleando el complejo $\text{SO}_3\text{-Py}$ en DMSO^[97MA3224] o piperidina-*N*-ácido sulfónico en DMSO^[90MA3717, 95CAR425], la polisulfatación de alquil laminara- y malto-oligosacáridos de 5 a 9 unidades de glucosa^[92BP2385, 95MA6697] y la monosulfatación de tetraalquil β -maltósido^[92CAR245] empleando el complejo $\text{SO}_3\text{-Py}$. La sulfatación de $\beta\text{-(1}\rightarrow\text{3)}$ -glucanos de *Cyttaria harioi* Fischer se realizó en nuestro laboratorio utilizando $\text{HSO}_3\text{Cl -Py}$ ^[89CAR329, 91JP256].

Como solvente de la sulfatación, la Py no es eficiente para azúcares simples sulfatados y puede ser dificultosa su remoción de los productos de reacción. La DMF es un buen solvente para azúcares y sus derivados incluyendo los sulfatados^[65ACC183].

La sulfatación directa de azúcares permite obtener los productos en un sólo paso de reacción pero forma una mezcla de compuestos que en general son de difícil separación. La preparación de un isómero en particular por sulfatación directa sobre metil glicósidos presenta dificultades, ya que debido a la ineficiencia del reactivo es necesario agregar exceso de reactivo para completar la reacción.

Las propiedades que determinan la reactividad de un grupo hidroxilo son la acidez, la nucleofilicidad (ambas dependen, a su vez de factores electrónicos, como proximidad al centro anomérico, tipo de sustituyentes vecinales y posibilidad de formación de puente hidrógeno) y los factores estéricos (sí es primario, secundario o terciario; si es axial o ecuatorial y su relación espacial *cis* o *trans* con sustituyentes vecinos). Estos factores

dependen, además, de la estructura (constitución, configuración y conformación) del azúcar en cuestión por lo que no existe un orden de reactividad en común a todos los azúcares.

Los métodos descritos en bibliografía, para la separación de mezclas de productos sulfatados, son:

1- Solubilidad y precipitación fraccionada: en general precipitan mezclas, estos métodos se describen para oligo y polisacáridos sulfatados como la obtención del curdlano sulfatado^[90MA3717] y laminara y malto-oligosacáridos sulfatados^[94CAR51, 94MA6695] que precipitan de acetona.

2- Filtración en geles: es utilizado para determinar la masa molecular relativa de laminara-oligosacáridos sulfatados^[92BP2385]. Bio-Gel P-2 es utilizado para separar sales inorgánicas que impurifiquen la mezcla de productos sulfatados.

3- Intercambio iónico: entre las resinas comerciales más empleadas en la separación de azúcares sulfatados pueden mencionarse: Dowex 1-X8^[79BJ387]; Amberlite CG400^[65ACC183], S-Shepharosa (Na⁺)^[91CAR261, 91CAR279]; DEAE-Celulosa^[76CAR175]. El Dionex-Pad permite separar con alta selectividad hidratos de carbono débilmente ácidos; minimiza la preparación de la muestra ya que permite la inyección directa de la muestra y los componentes de la matriz pueden ser neutros o básicos y si ellos se degradan eluyen con el volumen muerto.

4- CLAR: la cromatografía líquida de alta resolución permite separar azúcares sulfatados. Un ejemplo, es la separación de dodecil α - y β -glucósido monosulfatados y tetradecil β -maltósido monosulfato, que fueron separados en columnas de fase reversa de sílicagel RP-2 y Nucleosil 100 RP-2; los grupos alquilo disminuyen la polaridad del compuesto por lo que incrementan la interacción con la fase. Los dodecil β -glucósidos disulfatados fueron acetilados y posteriormente purificados por CLAR^[92CAR245].

5- Electroforesis: con electroforesis en papel se pueden separar azúcares mono y disulfatados, pero la cantidad que puede separarse por éste método puede ser limitada y deberían emplearse columnas electroforéticas^[65ACC183]. La electroforesis por zona en columna de celulosa permite la separación de azúcares mono, disulfatados y el azúcar libre, pero este método es muy laborioso y no separa isómeros monosulfatados^[65ACC183].

6- Cromatografía en columna abierta: se han empleado columnas de celulosa^[69CAR174, 65ACC183] y de sílica gel^[91CAR261, 91CAR279].

En general, los métodos de cromatografía en columna pueden ser usados si las mezclas a separar son relativamente simples. Las mezclas más complejas requieren una separación fina, que puede ser realizada en CLAR o Dionex-Pad. Es frecuentemente más

conveniente el uso de métodos sintéticos de protección y desprotección para obtener luego un isómero en particular.

2.2.2.a.1 Diferentes procedimientos empleados en reacciones de sulfatación:

Se ensayó en primer lugar la sulfatación directa ya que involucró un sólo paso de reacción. La dificultad que presentaba era la ineficiencia del reactivo que implicaba usar un exceso del mismo y como consecuencia rindió una mezcla de azúcares sulfatados que hizo necesaria su separación.

Debido a diversas metodologías de sulfatación descritas en bibliografía^[60BJ478, 83CAR199, 87AQA13, 92CAR245] se realizaron estudios preliminares de sulfatación selectiva de los hidroxilos primarios sobre metil β -maltósido (17) para encontrar las mejores condiciones de reacción y luego se ensayó sobre metil β -laminaribiósido (13).

La preparación se realizó disolviendo el azúcar en el solvente anhidro y posterior agregado del reactivo sulfatante, bajo atmósfera de nitrógeno. Las diferentes variables ensayadas fueron:

- a) el solvente (Py; DMF),
- b) el reactivo ($\text{SO}_3\text{-Py}$; $\text{SO}_3\text{-NEt}_3$; HSO_3Cl),
- c) la relación reactivo : sustrato (3:1; 3,5:1; 4:1),
- d) el orden de agregado de los reactivos,
- e) la temperatura de mezcla de reactivos (-78°C , 10°C , 0°C , t.a.), luego se dejó evolucionar la reacción a temperatura ambiente.
- f) El tiempo de reacción (5 h a 4 días)

En la tabla descrita en la sección experimental (2.3.5.b.1.1) se resumen los ensayos realizados, tendientes a ajustar las mejores condiciones de obtención de derivados sulfatados de 13 y 17. La elección de una condición en particular se basó en el grado de conversión lograda (detección o no de material de partida por ccd y espectroscopía) y en la limpieza del material crudo sintetizado, evaluada fundamentalmente por la calidad de los espectros obtenidos. Se observó que en ausencia completa de piridina la reacción era demasiado lenta (entrada 1), pero cuando se usó $\text{SO}_3\text{-Py}$ (entrada 2) ó bien el solvente era piridina, la reacción se completaba en 24 h (entrada 2-4), por lo tanto, el sistema reactivo/solvente elegido fue $\text{SO}_3\text{-Py/Py}$, condiciones usuales en la monosulfatación^[60JCS4761, 92CAR245]. Cuando los reactivos se mezclaron a -78°C se lograron productos de reacción más limpios (entrada 4-7),

mientras que la relación óptima de reactivo sulfatante fue de 3.5 mmol por mmol de disacárido; con menor cantidad se detectaba material de partida sin reaccionar y una mayor relación incrementaba la formación de subproductos de mayor grado de sulfatación. Sin embargo las mejores condiciones halladas para **17** y **13** (entradas 10 y 11) fueron aún mejoradas cuando se llevaron a cabo en presencia de HSO_3Cl como reactivo sulfatante (entradas 12 y 13).

Bajo estas condiciones, el producto bruto de la reacción mostró por ccd de sílicagel la formación de un componente mayoritario junto con una mancha de mayor movilidad y que luego de la purificación fueron caracterizados espectroscópicamente como los derivados 6,6'-di-*O*-sulfatados y los regioisómeros 6 y/o 6'-mono-*O*-sulfatados.

Se ensayaron diferentes formas de interrumpir la reacción tendientes a lograr la eliminación de impurezas (sales) que interferían en los espectros de RMN:

Se acetiló el producto bruto de reacción con el fin de facilitar su aislamiento, purificación cromatográfica y permitir además la obtención de espectros con señales menos superpuestas, de acuerdo con bibliografía^[92CAR245].

Se neutralizó el exceso de reactivo sulfatante con MeOH, Na(OH) o Ba(OH)₂ de acuerdo con bibliografía^[79BJ387, 92CAR245].

Cuando se interrumpió la reacción con Ba(OH)₂, posterior eliminación del BaSO₄, evaporación de la piridina y finalmente se disolvió en metanol-agua y se eliminó el exceso de Ba²⁺ con CO₂ (se separó BaCO₃) y se evaporó del solvente, la mezcla de reacción mostró espectros sin señales espúreas, a diferencia de las anteriores metodologías.

Se ensayaron distintas condiciones de purificación publicadas en bibliografía:

Se utilizó cromatografía de filtración en geles: Bio-Gel P-2 fue empleado para separar sales inorgánicas que de la mezcla de azúcares sulfatados; sin embargo, por espectroscopía de RMN ¹³C se observaban señales correspondientes a sales de piridonio.

Columna o placa preparativa de sílicagel: la mezcla bruta de reacción derivada de los compuestos **13** y **17** mostró por ccd de sílicagel desarrollada con EtOAc:MeOH la formación de un componente mayoritario, junto con una mancha de mayor movilidad que el componente mayoritario pero menor que la del producto de partida. Cuando se realizó la separación en escala preparativa en columna o placa preparativa sólo se pudo separar el compuesto de partida de la mezcla de productos sulfatados. Cuando el compuesto metil β-

maltósido (17) se sulfató, se acetiló y se purificó empleando esta metodología se obtuvo la separación de los derivados 6,6'-*O*-disulfato pentaacetilado (34) y la mezcla de los regioisómeros 6 y 6'-*O*-monosulfatados (34a y 34a') que fueron caracterizados por espectroscopía de RMN ¹³C.

El compuesto 34 mostró por RMN ¹³C las señales de C-6 y 6' desplazadas a campos bajos, como es característico en el C-6-sulfato, comparada con C-6 y 6' del compuesto metil β-maltósido peracetilado (11). Se observó el mismo comportamiento en la mezcla de isómeros 34a y 34a'. Los espectros se resumen en la tabla 2.2.2.a.1.I.

Los resultados de la purificación no fueron reproducibles y se obtuvieron bajos rendimientos.

Tabla 2.2.2.a.1.I. Asignación de espectros de RMN-¹³C de 11 y 34 y la mezcla 34a y 34a'.

	C-1	C-1'	C-2, C-3, C-4, C-5, C-2', C-3', C-4', C-5'	C-6, C-6'	OCH ₃	C=O	OCH ₃
34	101,75	96,21	75,60; 74,72; 73,21; 71,21; 69,22; 68,71	66,48	58,18	171,41-169,30	21,11-20,04
34a 34a'	101,63 101,12	95,84 95,29	75,16; 73,81; 72,82; 72,29; 72,08; 71,35; 70,45; 70,10; 69,59; 68,72; 68,50; 68,12	66,81 63,47 62,01	58,03; 57,87	170,79-169,72	20,81-20,55
11	101,09	95,55	75,43; 72,78 ; 72,14; 70,02; 69,38; 68,50; 68,07	62,83 61,57	56,94	170,41-169,35	20,80-20,53

Cromatografía líquida de alta resolución (CLAR): acorde a datos de bibliografía de separación de alquil glucósidos disulfatados y acetilados utilizando CLAR^[92CAR245], se buscó separar la mezcla de isómeros 34a y 34a' en columnas de fase reversa, fase amino y fase nitrilo pero no se logró la separación de dichos isómeros.

Columna de celulosa: se ensayó en ccd de celulosa y se encontraron los solventes adecuados para la separación de los productos de sulfatación del compuesto 17 pero luego no se pudieron reproducir las condiciones en columna de celulosa.

Cromatografía de intercambio iónico: los productos de sulfatación del compuesto 17 fueron purificados en columna de DEAE-Sephacel (forma HO⁻) y luego DEAE-Sephacel

(forma borato)^[76CAR175] aunque solo se logró separar el producto de partida sin reaccionar de la mezcla de productos sulfatados.

Columna de sílicagel con solventes típicos de cromatografía de partición: se realizó una metodología simple para separar los componentes monosulfatados y disulfatados, aunque no pudo lograrse la separación de isómeros monosulfatados. Se separaron los productos de sulfatación del compuesto **13** y **17** en sílicagel y se utilizó como solventes EtOAc:HOAc:H₂O=3:2:1, los productos obtenidos se caracterizaron espectroscópicamente como los derivados 6,6'-di-*O*-sulfato y 6'-mono-*O*-sulfato de metil β-laminaribiósido y los derivados 6,6'-di-*O*-sulfato y la mezcla de isómeros 6 y 6'-mono-*O*-sulfato de metil β-maltósido (estos compuestos son caracterizados en la siguiente sección).

2.2.2.a.2 Reacciones de sulfatación directa:

Las mejores condiciones para la sulfatación de metil β-laminaribiósido (**13**) y metil β-maltósido (**17**) en función de los diversos ensayos realizados se obtuvieron cuando se empleó HSO₃Cl (reactivo sulfatante:hidroxilo primario: 1,75:1) en Py a -78°C y luego de 24 h a temperatura ambiente se neutralizó el exceso de reactivo con Ba(OH)₂. Entre los diversos ensayos de purificación, el mejor método resultó la purificación en columna cromatográfica de sílicagel desarrollada con AcOEt:AcOH:H₂O=3:2:1.

Cuando soluciones de laminara-oligosacáridos (**12**) o metil β-laminaribiósido (**13**), laminara-oligosacáridos (**16**) o maltósido (**17**) se disolvieron en piridina anhidra y se trataron a -78°C con HSO₃Cl y se dejó reaccionar a temperatura ambiente por 24 h, se observó la formación de dos fases que, luego de agregar agua, se homogeneizaron y se ajustó el pH con Ba(OH)₂ (pH:8-9). Luego de la purificación en columna cromatográfica de los disacáridos y precipitación en acetona de los oligosacáridos y posterior tratamiento con resina de intercambio catiónica Bio-Rex 70 (forma sodio) en MeOH, filtración y evaporación se obtuvieron sólidos blancos caracterizados espectroscópicamente como: laminara-oligosacárido sulfatado (**35**); metil β-D-glucopiranosil 6-sulfato de sodio-(1→3)-β-D-glucopiranosido 6-sulfato de sodio (**36**) y metil β-D-glucopiranosil 6-sulfato de sodio-(1→3)-β-D-glucopiranosido (**36a**); metil laminara-oligosacárido sulfatado (**37**); metil α-D-glucopiranosil 6-sulfato de sodio-(1→4)-β-D-glucopiranosido 6-sulfato de sodio (**38**), metil

α -D-glucopiranosil 6-sulfato de sodio-(1 \rightarrow 4)- β -D-glucopiranosido (**38a**) y metil α -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 4)- β -D-glucopiranosido 6-sulfato de sodio (**38a'**) respectivamente.

Los regioisómeros monosulfatados fueron determinados por experiencias de RMN mono y bidimensionales (TOCSY, COSY, etc). Se pudieron caracterizar los derivados 6 y 6'-mono-*O*-sulfato en el metil β -maltósido (**38a** y **38a'**) y 6'-mono-*O*-sulfato en el metil β -laminarabiósido (**36a**).

Cuando laminara-oligosacáridos fueron sulfatados, se obtuvo la mezcla **35**. El contenido de azufre fue determinado colorimétricamente por un método descrito en bibliografía^[71AB471] y dio un grado de sustitución de 0,92. El espectro de RMN-¹³C mostró señales características de grupo sulfato en C-6, el cual aparece a campos más bajos comparado con el correspondiente al del oligosacárido libre (diferencia de 6,5 ppm); comparable con datos de bibliografía^[92CAR29, 95CAR425] para curdlano y curdlano sulfatado, donde el C-6 sulfatado aparece desplazado 6-8 ppm respecto del grupo hidroximetilo. Este dato sumado al grado de sustitución cercano a uno es indicativo que sólo se sulfato C-6. La comparación del espectro de RMN-¹³C del laminara-oligosacárido (**12**) y el derivado sulfatado **35** se presenta en la tabla 2.2.2.a.2.I.

En el curdlano la mayor reactividad del grupo hidroxilo del C-6 se explica por disponerse hacia el exterior de la estructura helicoidal mientras que el hidroxilo de C-2 se dispone hacia el interior formando uniones hidrógeno y quedar poco expuestos^[92CAR29].

Tabla 2.2.2.a.2.I. Asignación de espectros de RMN-¹³C de laminara-oligosacárido (**12**) y laminara-oligosacárido sulfatado (**35**).

	C-1, C-1n	C-3, C-3n-1	C-2, C-4, C-5, C-2n, C-3n, C-4n, C-5n	C-6, C-6n
35	103,77; 103,55	85,46	76,60; 74,36; 74,11; 68,87	68,21
12	103,40	85,31	76,89; 76,52; 74,42; 74,16; 70,55; 69,06	61,67

Los compuestos metil β -D-glucopiranosil 6-sulfato de sodio-(1 \rightarrow 3)- β -D-glucopiranosido 6-sulfato de sodio (**36**) y metil β -D-glucopiranosil 6-sulfato de sodio-(1 \rightarrow 3)- β -D-glucopiranosido (**36a**), se obtuvieron, luego de purificación cromatográfica, como sólidos blancos, ópticamente activos, y el análisis elemental se correspondió con la fórmula molecular de los derivados. Los rendimientos obtenidos fueron del 35% para el 6,6'-di-*O*-sulfato y del 28% para el 6'-mono-*O*-sulfato. Los bajos rendimientos pueden atribuirse a la retención de los compuestos en la columna. Se obtuvo un único regioisómero monosulfatado.

En la tabla 2.2.2.a.2.II se muestra las asignaciones espectrales (RMN-¹³C) de los compuestos **36**, **36a** y la comparación con el espectro correspondiente a metil β-laminarabiósido (**13**). El espectro de RMN-¹³C mostró señales características de grupo sulfato en C-6, desplazadas aproximadamente en 6 ppm respecto del grupo hidroxilo en C-6 libre. Se observa mayor variación de los carbonos correspondientes a los hidroxilos secundarios en el compuesto disulfatado **36** que en el monosulfatado **36a** respecto de **13**. El espectro de RMN-¹H se describe en la parte experimental (sección 2.3.5.b.1.2) y se discute en el capítulo de análisis conformacional (sección 3.3.5).

En el espectro de IR se distinguían las bandas a 1253 cm⁻¹ (S=O) y 833 cm⁻¹ (C-O-S) del grupo sulfato y una señal ancha a 3475 cm⁻¹ que indica la presencia del grupo hidroxilo.

Además la estructura fue confirmada realizando espectros de FABMS para iones positivos.

Tabla 2.2.2.a.2.II. Asignación de los espectros de RMN-¹³C de metil β-laminarabiósido **13**, metil β-laminarabiósido 6,6'-di-O-sulfato **36** y metil β-laminarabiósido 6'-mono-O-sulfato **36a**.

	C-1, C-1'	C-3	C-2, C-4, C-5, C-2', C-3', C-4', C-5'	C-6, C-6'	OCH ₃
36	103,91; 103,76	85,50	76,26; 74,70; 74,27; 73,54; 70,04; 68,72	67,91	58,23
36a	104,21; 103,82	85,60	76,89; 76,46; 74,60; 73,90; 70,48; 70,13	67,85; 61,64	58,18
13	103,72; 103,69	85,61	76,90 (C-5'); 76,45 (C-5; C-3'); 74,39 (C-2'); 73,63 (C-2); 70,50 (C-4'); 69,10 (C-4)	61,64	58,08

La sulfatación de metil laminara-oligosacárido rindió la mezcla **37** con similares resultados a los obtenidos con laminara-oligosacárido sulfatado **35**. El grado de sustitución en este caso fue de 0,89. El espectro de RMN-¹³C mostró señales características de grupo sulfato en C-6, el cual aparece a campos más bajos comparado con el oligosacárido libre (diferencia de 6,7 ppm). Estos datos indican que sólo se sulfató C-6. La comparación del espectro de RMN-¹³C del metil laminari-oligosacárido **16** y el derivado sulfatado **37** se presenta en la tabla 2.2.2.a.2.III.

Tabla 2.2.2.a.2.III. Asignación de espectros de RMN-¹³C de metil laminara-oligosacárido 16 y metil laminara-oligosacárido sulfatado 37.

	C-1, C-1n	C-3, C-3n-1	C-2, C-4, C-5, C-2n, C-3n, C-4n, C-5n	C-6, C-6n	OCH ₃
37	103,77	85,68	76,8; 74,55; 72,82; 71,00; 69,54	68,38	58,65
16	103,72; 103,41	85,30	76,88 (C-5 _n); 76,51 (C-3 _n , C-5, C-5 _{n-1}); 74,42 (C-2 _n); 74,15 (C-2 ₂ , C-2 _{n-1}); 73,67 (C-2); 70,53 (C-4 _n); 69,08 (C-4, C-4 _{n-1});	61,66	58,09

Cuando el metil β-maltósido (17) fue sulfatado se obtuvieron, luego de la purificación cromatográfica, dos fracciones, una minoritaria (25%) correspondiente al derivado 6,6'-di-O-sulfatado (38) y otra, con 30% de rendimiento, y que correspondió a la mezcla de isómeros monosulfatados metil α-D-glucopiranosil 6-sulfato de sodio-(1→4)-β-D-glucopiranosido (38a) y metil α-D-glucopiranosil-(1→4)-β-D-glucopiranosido 6-sulfato de sodio (38a'). El compuesto 38 se obtuvo como un sólido blanco, ópticamente activo, y cuyo análisis elemental fue satisfactorio.

En la tabla 2.2.2.a.2.IV se muestra las asignaciones espectrales (RMN-¹³C) de los compuestos 38, 38a, 38a' y la comparación con el espectro del compuesto 17. El C-6 se encuentra a campos mas bajos (~ 6 ppm) respecto de hidroxilo en C-6 libre. El espectro de RMN-¹H se describe en la parte experimental (sección 2.3.5.b.1.2) y se discute en el capítulo de análisis conformacional (sección 3.2.4). Los protones H-6 dan señales a campos bajos (0,4 a 0,6 ppm) que cuando el hidroxilo de C-6 está libre.

Tabla 2.2.2.a.2.IV. Asignación de espectros de RMN-¹³C de metil β-maltósido 17, metil β-maltósido 6,6'-di-O-sulfato 38 y metil β-maltósido 6 y 6'-mono-O-sulfato 38a y 38a'.

	C-1	C-1'	C-4	C-2, C-3, C-5, C-2n, C-3n, C-4n, C-5n	C-6, C-6n	OCH ₃
38	104,00	99,93	77,16	76,36; 73,83; 73,49; 73,26; 72,38; 71,46; 69,52	67,91; 67,36	58,18
38a 38a'	103,97	100,68 100,30	78,20	77,08; 75,40; 73,76; 73,62; 73,51; 72,59; 72,44; 71,68; 70,07	68,0; 67,96; 61,63; 61,13	58,11; 58,08
17	104,59	101,09	78,36	77,78 (C-3); 76,09 (C-5); 74,52 (C-2); 74,42 (C-3'); 74,24 (C-2'); 73,22 (C-5'); 70,91(C-4')	62,31, 62,07	58,70

En las reacciones de sulfatación los grupos hidroxilos primarios presentan diferente reactividad en los derivados de maltosa y laminarabiosa. En el metil β-maltósido se obtuvo la

mezcla de los regioisómeros monosulfatados **38a** y **38a'** en relación 1:1 determinada por RMN-¹H; sin embargo, al tritilar se identificó solamente el 6'-*O*-tritol. Podría concluirse que la posición C-6 está más impedida estéricamente que la posición C-6', pero estas posiciones presentan el mismo entorno estereoelectrónico frente a la sulfatación. En los productos de sulfatación del metil β-laminarabiósido se identificó un único derivado monosulfatado (en la posición C-6'); mientras que en la tritilación se obtuvieron ambos derivados monotritilados (en las posiciones C-6 y C-6'). Este hecho indica que las posiciones C-6 y C-6' presentan diferentes efectos estereoelectrónicos frente a la sulfatación y a la tritilación.

2.2.2.a.3 Reacciones de sulfatación sobre sustratos convenientemente protegidos:

Continuando con la secuencia de la sulfatación de oligosacáridos se sintetizó metil β-laminaratriósido 6,6',6''-tri-*O*-sulfato. Debido a que la sulfatación directa forma una mezcla de compuestos de difícil separación y procede con bajos rendimientos, la síntesis se realizó a través de la secuencia tritilación-bencilación-destitilación-sulfatación y desbencilación (figuras 13). También se aplicó esta secuencia en los disacáridos de laminarabiosa y maltosa y como permitió obtener derivados más puros, esta modalidad fue luego empleada en la obtención de derivados fosfatados, succinilados y uronatos (figura 12 y 14).

También se obtuvieron derivados sulfatados en los hidroxilos secundarios de metil β-laminarabiósido, utilizando para ello el 4,6- y 4',6' -*O*-bencilidén derivado (figura 15). En este caso, se trabajó con la mezcla de derivados sulfatados ya que para el estudio conformacional sólo se querían obtener resultados cualitativos (debido a que los hidroxilos secundarios del polisacárido están sulfatados en una muy baja proporción); además cada compuesto podía ser estudiado particularmente a través de secuencias de RMN (TOCSY y NOESY), eximiendo en parte la purificación.

Procedimiento general:

Los derivados bencilados **24**, **25** y **26** con los hidroxilos primarios libres, provenientes del metil β-laminarabiósido, laminaratriósido y maltósido se sulfataron con cinco equivalentes molares del complejo SO₃-Py. Se obtuvieron luego de purificación por placa preparativa metil 2,3,4-tri-*O*-bencil-β-D-glucopiranosil 6-sulfato de sodio-(1→3)-2,4-di-*O*-bencil-β-D-glucopiranosido 6-sulfato de sodio (**39**), metil 2,3,4-tri-*O*-bencil-β-D-

glucopiranosil 6-sulfato de sodio-(1→3)-2,4-di-*O*-bencil-β-D-glucopiranosil 6-sulfato de sodio-(1→3)-2,4-di-*O*-bencil-β-D-glucopiranosido 6-sulfato e sodio (40) y metil 2,3,4-tri-*O*-bencil-α-D-glucopiranosil 6-sulfato de sodio-(1→4)-2,3-di-*O*-bencil-β-D-glucopiranosido 6-sulfato de sodio (41), que fueron caracterizados espectroscópicamente y los rendimientos fueron 80, 86 y 79%, respectivamente.

El metil (*R*)-4,6-*O*-benciliden-β-D-glucopiranosil-(1→3)-(*R*)-4,6-*O*-benciliden-β-D-glucopiranosido (28) se sulfató por el mismo procedimiento obteniéndose una mezcla de productos sulfatados 42 (figura 15).

Los espectros de IR de los compuestos 39, 40, 41 y 42 mostraban absorciones a 1248 (S=O) y 820 (C-S-O) cm⁻¹ correspondiente al grupo sulfato.

La estructura de los compuestos 39 y 41 también fue confirmada por FABMS iones positivos y dieron como ión principal [M+Na]. Para el compuesto 40 el análisis elemental estaba de acuerdo con la estructura propuesta.

En la tabla 2.2.2.a.3.I se muestran las asignaciones espectrales realizadas para los espectros de RMN-¹³C de los compuestos 39 y 41. Los espectros de RMN-¹³C de los compuestos 40 y la mezcla 42 se describen en la parte experimental. Los espectros de RMN-¹³C de los compuestos 39, 40 y 41 presentaron señales características del grupo sulfato en C-6 desplazadas a campos bajos (4 a 6 ppm) respecto del grupo hidroximetilo libre. El espectro de 42 mostró una mezcla de compuestos di- y tri- sulfatados y no se observaron derivados monosulfatados por espectroscopía.

Tabla 2.2.2.a.3.I. Asignación de espectros de RMN- ¹³C de los compuestos 39 y 41.

	C-1,	C-1'	C-2, C-3, C-4, C-5, C-2', C-3', C-4', C-5'	C-6, C-6'	CH ₂ Ph	OCH ₃	C _{arilico}
39	104,1 y 102,84		84,62; 83,12; 82,45; 80,47; 77,64; 75,65; 73,74	66,38; 65,9	74,84; 74,65; 74,40; 74,07	56,45	129,79 - 127,21
41	104,45	98,69	84,18; 81,9; 81,69; 80,45; 79,02; 78,00; 70,90	67,36; 66,68	74,96; 74,45; 74,18; 72,60	56,53	139,90 - 139,00 128,38 - 127,08

2.2.2.a.4 Diferentes procedimientos en reacciones de hidrogenólisis:

El esquema sintético se completa con la remoción de los grupos bencilos y bencilidén por reducción catalítica en presencia de paladio^[40RTC1123] o hidróxido de paladio para obtener el derivado aniónico deseado. Esta metodología tiene la ventaja que los subproductos y reactivos de la reacción se separan por simple evaporación y no es necesario una purificación posterior. Si bien, los compuestos preparados son compatibles con la hidrogenólisis, existen ejemplos donde los grupos sulfatos interfieren en la reacción. Por ejemplo la destrilación de metil 2,3-di-*O*-bencil-6-*O*-tritol-β-D-galactopiranosido 4-sulfato usando paladio como catalizador^[62JCS2119] procede sólo parcialmente.

Se ensayaron diferentes procedimientos:

-Una solución de metil β-maltósido pentabencilado 6,6'-di-*O*-sulfato (41) en MeOH se trató con H₂ bajo una presión de 350 kPa (medida a temperatura ambiente), en presencia de Pd 10%/C o Pd(OH)₂ 20%/C con agitación energética en un equipo Parr para baja presiones. Al cabo de 24 y 12 h, respectivamente, cualquiera sea el catalizador no se observaron cambios por ccd.

-Los compuestos 39 (derivados de metil β-laminarabiósido) y 41 en solución metanólica se trataron con Pd(OH)₂ 20% bajo una presión de 3500 kPa, con agitación energética, en un equipo para altas presiones. Al cabo de 5 h a temperatura ambiente se observó por ccd la formación de dos manchas y no se detectó producto de partida. Luego de aislar la mezcla de productos de reacción se caracterizaron espectroscópicamente y se observó que estaba compuesta por derivados mono y disulfatados de metil β-laminarabiósido y metil β-maltósido, respectivamente. Estas condiciones producían desulfatación parcial.

-Una solución del compuesto 41 en MeOH:HOAc (1:2) se trató con H₂ bajo una presión de 350 kPa, en presencia de Pd(OH)₂ 20%/C como catalizador, con agitación energética en un equipo Parr para baja presiones, a temperatura ambiente. Al cabo de 6 h, se observó un único producto por ccd y no se detectó compuesto de partida. Luego de filtración del catalizador y evaporación, el producto se caracterizó como metil β-maltósido 6,6'-di-*O*-sulfato (38) por espectroscopía y el análisis elemental se correspondió con la fórmula molecular del derivado. Los rendimientos fueron cuantitativos.

Esta última metodología de hidrogenólisis se ensayó también en los compuestos 39, metil β-laminarabiósido heptabencilados 6,6',6''-tri-*O*-sulfato (40) y la mezcla metil β-laminarabiósido dibencilidén sulfatado (42). Se obtuvieron cuantitativamente los productos

que se caracterizaron espectroscópicamente como metil β -laminarabiósido 6,6'-di-*O*-sulfato (**36**), metil β -laminatriósido 6,6',6''-tri-*O*-sulfato (**43**) y la mezcla de derivados di- o tri-sulfatado del metil β -laminarabiósido (**44**) en las posiciones C2, C2' y/o C3', respectivamente. Los análisis elementales de **36** y **43** se correspondieron con las fórmulas moleculares de los respectivos derivados.

En los espectros de IR de **43** y **44** se distinguían bandas a 1253 (S=O) y 833 cm^{-1} (C-O-S) del grupo sulfato y una banda ancha a 3480 cm^{-1} que indica la presencia del grupo hidroxilo.

En parte experimental se detalla la asignación de espectros de RMN- ^{13}C del compuesto **43** y la mezcla **44**. El compuesto **43**, ópticamente activo, presentó señales características del grupo sulfato en C-6 desplazada a campos bajos (~ 6 ppm). El espectro de RMN- ^1H de **44** se describe y discute en el capítulo de análisis conformacional (sección 3.3.5) y el compuesto **43** se describe en la parte experimental.

Utilizando la metodología de protecciones y desprotecciones el rendimiento global en la obtención de **36** y **38** fue de 48 y 33 % respectivamente, significativamente mayor que la metodología de sulfatación directa. Para el trisacárido **43** el rendimiento global fue de 49%.

2.2.2.b Derivados fosfatados:

Entre los ésteres inorgánicos de hidratos de carbono, los de fosfato son los más importantes por estar vinculados con el metabolismo de azúcares. Su importancia como componentes de ácidos nucleicos y varias coenzimas ha inducido al estudio de los azúcares fosfatados tanto desde el punto de vista de la preparación como de sus propiedades. También, resulta importante mencionar los estudios de propiedades inmunobiológicas^[96CIM392] y estructurales de glucanos solubles en agua como los glucanos fosfatados con uniones glicosídicas β -(1 \rightarrow 3)^[98CAR559]. Estos estudios han involucrado la preparación de derivados *O*-fosfatados de mono, disacáridos y polisacáridos. Se han descrito diferentes metodologías de preparación de derivados fosfatados, como por ejemplo:

- oxicloruro de fosforo en piridina^[95CAR71].
- cloruro de difeniloxifosforilo^[92CAR263].
- cloruro de dibenciloxifosforilo^[45JCS382, 92CAR65].

La fosfatación directa de azúcares da una mezcla muy difícil de separar, por lo que, se obtuvieron los derivados fosfatados a través de la secuencia de protecciones y desprotecciones.

Se ensayaron diferentes reactivos de fosfatación utilizando como sustrato de prueba el metil α -D-glucopiranosido. Se procedió a la fosfatación de los derivados bencilados de metil β -laminarabiósido (**24**) y metil β -maltósido (**26**).

2.2.2.b.1 Diferentes procedimientos en reacciones de fosfatación:

Se ensayaron diferentes reacciones de esterificación del metil α -glucopiranosido con los tres reactivos de fosfatación mencionados anteriormente. En el caso del cloruro de dibenciloxifosforilo sólo se observó producto de partida por ccd luego de 20 h y utilizando oxiclورو de fosforo o cloruro de difeniloxifosforilo se obtuvo una mezcla de productos fosfatados iónicos o protegidos con el grupo fenilo, respectivamente. Se eligió el cloruro de difeniloxifosforilo porque permite una purificación más simple debido a su menor polaridad.

2.2.2.b.2 Reacciones de fosfatación sobre sustratos convenientemente protegidos:

La preparación se realizó por tratamiento de un equivalente de los derivados bencilados de metil β -laminarabiósido (**24**) o maltósido (**26**) en CH_2Cl_2 y en presencia de TEA y DMAP y dos equivalentes de $(\text{OPh})_2\text{P}(\text{O})\text{Cl}$, de acuerdo con las condiciones empleadas en bibliografía^[92CAR263]. Luego de 12 h a temperatura ambiente no se detectó material de partida por ccd. Las mezclas de reacción fueron purificadas por cromatografía en capa delgada de sílicagel, se aislaron los productos y a través de evidencias espectrales (RMN- ^1H y ^{13}C) se caracterizaron como metil 2,3,4-tri-*O*-bencil-6-*O*-difenilfosfonato- β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 3)-2,4-di-*O*-bencil-6-*O*-difenilfosfonato- β -D-glucopiranosido (**48**) y metil 2,3,4-tri-*O*-bencil-6-*O*-difenilfosfonato- α -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 4)-2,3-di-*O*-bencil-6-*O*-difenilfosfonato- β -D-glucopiranosido (**49**), con 80 y 91% de rendimiento, respectivamente.

En los espectros de IR de **48** y **49** se distinguían bandas 1189 y 1190 (P=O) y 1069 y 1072 cm^{-1} (C-O-P), correspondientes al grupo fosfato.

La estructura de los compuestos **48** y **49** también fue confirmada por FABMS de iones positivos, donde el ión principal fue $[\text{M}+\text{Na}]$.

Las asignaciones espectrales (RMN- ^{13}C) de los compuestos **48** y **49** se muestran en la tabla 2.2.2.b.2.I. En los espectros de RMN- ^{13}C se observó la señal del C-6 desplazada 5-6 ppm hacia campos más bajos respecto de las correspondientes a los precursores **24** y **26**, acorde con la fosforilación en dicho centro. Además los C-6 y C-5 aparecieron como dobletes debido a los acoplamientos $^{13}\text{C-O-}^{31}\text{P}$ y $^{13}\text{C-C-O-}^{31}\text{P}$ respectivamente^[77CJC604]. Los espectros de RMN- ^1H se describen en la parte experimental (sección 2.3.5.b.2.1)

Tabla 2.2.2.b.2.I. Asignación de espectros de RMN- ^{13}C de los compuestos **48** y **49**.

	C-1	C-1'	C-2, C-3, C-4, C-2', C-3', C-4'	C-5, C-5'	C-6, C-6'	CH ₂ Ph	OCH ₃	C _{arilico}
48	104,20; 102,50		84,77; 82,99; 82,84; 80,23; 77,38	73,74; 73,28 d J _{C,P} =7,7	68,26; 67,74 d J _{C,P} =6,9	75,73; 75,23; 75,00; 74,64	57,04	150,60 - 120,22
49	104,13	96,57	84,28; 81,85; 81,63; 79,21; 77,04; 73,15; 72,56; 70,70	73,13; 72,44; 70,83; 70,68 d; J _{C,P} =4,07	67,87; 67,64 d; J _{C,P} = 4,07	75,55; 75,22; 74,56; 73,76; 73,42	56,67	150,65 - 120,11

2.2.2.b.3 Reacciones de hidrogenólisis:

Los métodos descritos en bibliografía^[56JA1659, 56JA2336] para hidrogenólisis de grupos fenilo emplean PtO₂ como catalizador. Se consideró más conveniente la remoción secuencial de grupos bencilo y fenilo, por lo que se procedió primero a clivar los grupos bencilos con Pd(OH)₂ y posteriormente los grupos fenilos con PtO₂.

Hidrogenólisis de grupos bencilo:

Los compuestos pentabencilados 6,6'-di-*O*-difenilfosfato de metil β-laminarabiósido (**48**) y metil β-maltósido (**49**) se hidrogenaron (bajo una presión inicial de 210 kPa) en presencia de Pd(OH)₂. Luego de 12 h a temperatura ambiente con agitación mecánica se obtuvo desbencilación parcial, por lo que se dejó reaccionar luego en un reactor de alta presión (3400 kPa de H₂) obteniéndose un único producto mayoritario (cuantitativo) en cada

caso. Por RMN- ^{13}C los productos se caracterizaron como 6,6'-di-*O*-fosfato de fenilo de metil β -laminarabiósido (**50**) y de metil β -maltósido (**51**).

En la tabla 2.2.2.b.3.I se muestran las asignaciones de espectros de RMN- ^{13}C de los compuestos **50** y **51** donde puede observarse que las señales correspondientes al C-6 y C-6' se desplazan a campos más bajos (2-4 ppm) respecto de los metil β -glicósidos desprotegidos **13** y **17**. En este caso sólo el compuesto **51** presentó acoplamiento vecinal $^{13}\text{C-O-}^{31}\text{P}$.

Tabla 2.2.2.b.3.I. Asignación de espectros de RMN- ^{13}C de los compuestos **50** y **51**.

	C-1,	C-1'	C-2, C-3, C-4, C-5, C-2', C-3', C-4', C-5'	C-6, C-6'	OCH ₃	C _{arilico}
50	103,73		85,84; 76,32; 74,34; 73,43; 70,08; 68,86	65,86	58,12	150,80; 130,72; 125,2; 121,08
51	103,84	99,94	77,11; 76,89; 74,13; 73,84; 73,42; 72,49; 69,53	66,04; 65,32 d; J _{C,P} =2,0	58,07	150,90; 130,66; 125,13; 121,03

Hidrogenólisis de grupos fenilo:

Por último se procedió a la hidrogenólisis del fenilo. Es conocido el uso de PtO₂^[56JA1659, 56JA2336] como catalizador en la hidrogenólisis de fosfato de fenilo.

La hidrogenólisis de los compuestos **50** y **51** en solución metanólica con PtO₂ como catalizador (H₂, 350Kpa, temperatura ambiente) y resina forma sódica no fue efectiva. Cuando los sustratos se disolvieron en MeOH:HOAc= 1:1 en las mismas condiciones anteriores y sin resina sódica la reacción se completó en 5 h (ccd). Luego de su aislamiento se convirtieron en las respectivas sales sódicas, por tratamiento con resina. Después de aislados mostraron poderes rotatorios *levo* y *dextrorotatorio* respectivamente. Por espectroscopía de RMN- ^1H y ^{13}C se caracterizaron como los derivados de 6,6'-di-*O*-fosfato de sodio de metil β -laminarabiósido (**52**) y de metil β -maltósido (**53**). Los rendimientos fueron cuantitativos.

Los espectros infrarrojos mostraban una señal ancha e intensa a 3400 cm⁻¹ correspondiente a los grupos OH, mientras que los grupos fosforilo (P=O) se caracterizaban por las señales a 1119 y 981 cm⁻¹ en el compuesto **52** y 1150 y 990cm⁻¹ en el compuesto **53**.

Los espectros de RMN- ^{13}C de los compuestos **52** y **53** mostraron un corrimiento de las señales de C-6 de 1,8 y 1,2 ppm a campos más bajos comparados con los correspondientes metil β -glicósidos, de acuerdo con bibliografía^[92CAR115, 95CAR71] (tabla 2.2.2.b.3.II).

Por otra parte, los espectros de RMN-¹H resultaron más simples que sus correspondientes metil β-glicósidos y la asignación completa se encuentra detallada en la parte experimental (sección 2.3.5.2.3) y se discute en el capítulo de análisis conformacional (sección 3.2.4 y 3.3.5).

Los espectros FABMS iones positivos de los compuestos **52** y **53** dieron como ion principal [M+Na].

El análisis elemental de los compuestos **52** y **53** coincidió con el calculado para C₁₃H₂₂O₁₇P₂Na₄.

Tabla 2.2.2.b.3.II. Asignación de espectros de RMN- ¹³C de los compuestos **52** y **53**.

	C-1	C-1'	C-3	C-2, C-4, C-5, C-2n, C-3n, C-4n, C-5n	C-6, C-6n	OCH ₃
52	103,47	104,06	84,17	75,93; 74,57; 73,97; 69,80; 68,43	63,47	58,31
53	103,97	98,84	76,77; 75,93; 74,50; 74,05; 73,86; 73,23; 72,67; 69,66		63,31	58,29

2.2.2.c Derivados succinilados:

Los polisacáridos succinilados se emplean industrialmente como agentes espesantes, agentes para la suspensión de sólidos en solución, como vehiculizante de drogas y se han estudiado sus propiedades reológicas.^[86MAC125, 90JMB195, 90JBM201]

Los derivados *O*-succinilados se preparan empleando anhídrido succínico bajo diversas condiciones experimentales^[86MAC125].

Catalizadores de acilación: piridina, DMAP o 1-metil-imidazol.

Solventes: DMF, DMSO, Py.

Son conocidas las propiedades de la DMAP^[70TL1521] como catalizador de acilación. En las reacciones de succinilación descritas en bibliografía^[86MAC125], el sistema DMF/DMAP resultó ser el más eficiente, por lo tanto los derivados succinilados se prepararon con anhídrido succínico, DMAP y DMF de acuerdo con la técnica descrita por Vermeersch y Schacht^[86MAC125].

2.2.2.c.1 *Reacciones de succinilación sobre sustratos convenientemente protegidos:*

La succinilación de los derivados parcialmente bencilados metil β-laminarabiósido (**24**) y maltósido (**26**) con anhídrido succínico y DMAP en DMF condujo luego del

aislamiento como sal sódica a metil 2,3,4-tri-*O*-bencil- β -D-glucopiranosil 6-succinato de sodio-(1 \rightarrow 3)-2,4-di-*O*-bencil- β -D-glucopiranosido 6-succinato de sodio (**54**, 85% de rendimiento) y metil 2,3,4-tri-*O*-bencil- α -D-glucopiranosil 6-succinato de sodio-(1 \rightarrow 4)-2,3-di-*O*-bencil- β -D-glucopiranosido 6-succinato de sodio (**55**, 82% de rendimiento).

En los espectros infrarrojos de los compuestos **54** y **55** se distinguían señales del carbonilo del grupo éster a 1740 y 1736 cm^{-1} y carbonilo del grupo carboxilato 1610 y 1608 cm^{-1} .

Los espectros de FAB masa para iones positivos presentaban como ion principal $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

La asignación de los espectros de RMN- ^{13}C de los compuestos **54** y **55** se hizo por simple comparación con los correspondientes a los espectros de los sustratos de la reacción. Puede observarse las señales de C-carbónico de éster y C-carbónico de ácido. La asignación completa se encuentra en la tabla 2.2.2.c.1.I.

Tabla 2.2.2.c.1.I. Asignación de espectros de RMN- ^{13}C de los compuestos **54** y **55**.

	C-1,	C-1'	C-2, C-3, C-4, C-5, C-2', C- 3', C-4', C-5'	C-6, C-6'	CH_2Ph	OCH_3	$\text{C}_{\text{alq.}}$	$\text{C}_{\text{arilico}}$	C- éster COO^-
54	105,68; 102,95		85,30 – 70,42	62,60	73,80 - 73,27	55,24	29,16- 28,71	138,20- 126,43	174,80 171,85 171,63
55	102,95	96,38	82,82; 80,65; 80,35; 78,61; 76,70; 75,11; 68,96	62,58; 62,16	73,81; 73,40; 72,69; 72,68; 71,64	55,00	29,16- 28,71	138,14- 125,69	174,83 174,81 171,97 171,74

2.2.2.c.2 Reacciones de hidrogenólisis:

Cuando soluciones de **54** y **55** en HOAc (glc) :MeOH= 4:3 se trataron con H_2 bajo una presión inicial de 210 kPa en presencia de $\text{Pd}(\text{OH})_2 / \text{C}$ se obtuvieron productos de desbencilación parcial. Sin embargo, un posterior tratamiento en un equipo para altas presiones (40atm) por 6 h produjo desbencilación total. El producto de reacción fue tratado con resina Dowex (forma H^+) y luego de eliminar el HOAc el residuo sólido se convirtió en la correspondiente sal sódica por tratamiento con resina de intercambio iónico. Se obtuvieron

cuantitativamente los compuestos caracterizados por espectroscopía de RMN-¹³C como los derivados ópticamente activos 6,6'-di-O-succinato de sodio de metil β-laminarabiósido (**56**) y maltósido (**57**), respectivamente.

Los análisis elementales coincidieron con los calculados para los productos de hidrogenólisis.

Los espectros de absorción infrarroja mostraban una banda característica del carbonilo del éster a 1740 y 1736 cm⁻¹ para **56** y **57** respectivamente y de carbonilo del ácido carboxílico a 1571 y 1439 cm⁻¹ (**56**) y 1580 y 1441 cm⁻¹ (**57**), además de una banda ancha a ~3400 cm⁻¹ correspondiente a los grupos OH.

Los espectros de FAB masa de iones positivos dieron como ión principal [M+Na]⁺ para el compuesto **56** y [M+H-2Na]⁺ para el compuesto **57**.

En la tabla 2.2.2.c.2.I se muestran las asignaciones de los espectros de RMN-¹³C de los compuestos **56** y **57**. Los correspondientes espectros de RMN-¹H se describen en la parte experimental (sección 2.3.5.b.3.2) y se discuten en el capítulo de análisis conformacional (sección 3.2.4 y 3.3.5). Los espectros de RMN-¹H y ¹³C fueron muy similares a los correspondientes de los metil β-glicósidos precursores. Presentaron las señales características de éster y carboxilato del grupo succinato de C-6 en el espectro de carbono y en el espectro protónico los hidrógenos metilénicos de la cadena alquílica.

Tabla 2.2.2.c.2.I. Asignación de espectros de RMN-¹³C de los compuestos **56** y **57**.

	C-1	C-1'	C-2, C-3, C-4, C-5, C-2', C-3', C-4', C-5'	C-6, C-6'	OCH ₃	C _{alq.}	C-éster COO ⁻
56	103,86		85,63 (C-3); 76,86; 76,46; 74,02; 73,66; 70,54; 69,09	61,62	58,14	35,08; 32,86; 31,29; 31,28	182,29; 181,94; 178,20; 177,80
57	103,91	100,95	78,75; 76,89; 75,29; 73,89; 73,66; 73,52; 72,68; 70,33	61,45 61,18	57,27	32,48; 30,72	182,50; 181,99; 178,25; 177,90

2.2.2.d Derivados de ácidos urónicos:

Los policarboxilatos naturales^[97CAR117] (alginatos, pectinas) son usados en varios procesos industriales por sus propiedades espesantes, gelificantes y secuestrantes de metales.

Entre los métodos de oxidación selectiva de los grupos hidroxilos primarios en hidratos de carbono, se pueden citar:

Hipoclorito de sodio; utilizando como catalizador el radical TEMPO (2,2,6,6-tetrametilpiperidina-1-oxil) y bromuro de sodio^[95CAR89]. En algunos polisacáridos, se necesitan tiempos prolongados de reacción con la consiguiente descomposición, debido a la β -eliminación y a degradación oxidativa.

Oxidos de nitrógeno^[97CAR117]. La reacción no es completamente selectiva y los hidroxilos secundarios pueden oxidarse.

Oxígeno molecular, utilizando platino sobre carbón^[97CAR175] como catalizador.

Una metodología particularmente conveniente es el empleo del reactivo de Jones en la oxidación del grupo hidroximetilo de derivados convenientemente protegidos en los grupos hidroxilos secundarios. Luego de la bencilación del ácido resultante, la purificación se simplifica sustancialmente^[83JOC4404, 83JOC1469, 87BCJ1529]. Esta última alternativa fue adoptada en el presente trabajo de tesis, ya que los derivados convenientemente protegidos estaban preparados.

2.2.2.d.1 Reacciones de oxidación sobre sustratos convenientemente protegidos:

Los derivados parcialmente bencilados de metil β -laminarabiósido (**24**) y metil β -maltósido (**26**) en acetona se trataron con el reactivo de Jones durante 4 h a temperatura ambiente. Se prepararon los correspondientes ésteres bencílicos por tratamiento con bromuro de bencilo en DMF en presencia de K_2CO_3 y nBu_4NI . Se obtuvieron el (2,3,4-tri-*O*-bencil- β -D-glucopiranosil)uronato de bencilo-(1 \rightarrow 3)-(metil 2,4-di-*O*-bencil- β -D-glucopiranosil)uronato de bencilo (**58**, 70% de rendimiento) y (2,3,4-tri-*O*-bencil- α -D-glucopiranosil)uronate de bencilo-(1 \rightarrow 4)-(metil 2,3-di-*O*-bencil- β -D-glucopiranosil)uronato de bencilo (**59**, 75% de rendimiento).

Los espectros de IR presentaban bandas de carbonilo del ester a 1750 cm^{-1} .

Los espectros de FAB masa para iones positivos presentaron como ión principal el de relación m/z igual a 1038 $[M+Na]^+$.

Los espectros de RMN- ^{13}C mostraban las señales típicas de éster en 170-168ppm. La asignación completa se encuentra en la tabla 2.2.2.d.1.I.

Tabla 2.2.2.d.1.I. Asignación de espectros de RMN-¹³C de los compuestos 58 y 59.

	C-1	C-1'	C-2, C-3, C-4, C-5, C-2', C-3', C-4', C-5', CH ₂ Ph [*]	OCH ₃	Ph CH ₂ COO	C _{arilico}	COOBn
58	104,67 y 102,99		83,98; 82,47; 82,25; 80,08; 79,67; 75,73; 75,24; 75,10; 74,94; 74,65; 74,48	59,29	67,34; 67,05	138,26- 127,64	168,50; 168,15
59	104,81	97,82	83,36; 81,42; 80,96; 80,01; 78,80; 76,57; 75,70*; 75,12*; 74,88; 74,65*; 73,30*; 71,31	57,28	67,65; 67,42	138,68 - 127,09	169,55; 168,30

2.2.2.d.2 Reacciones de hidrogenólisis

La hidrogenólisis de los compuestos **58** y **59** en HOAc (glc) se realizó a temperatura ambiente en presencia de Pd(OH)₂ 20%/C (presión inicial 340kPa de H₂). La reacción se monitoreó por ccd. Cuando no se observó producto de partida, se separó el catalizador y los productos se convirtieron en las correspondientes sales sódicas. Se obtuvieron con rendimiento cuantitativo los productos caracterizados como (β-D-glucopiranosil)uronato de sodio-(1→3)-(metil β-D-glucopiranosil)uronato de sodio (**60**) y (α-D-glucopiranosil)uronato de sodio-(1→4)-(metil β-D-glucopiranosil)uronato de sodio (**61**). El análisis elemental de los compuestos coincidió con el calculado para esa estructura.

Se observó al ión [M+Na]⁺ como el principal por espectroscopía FAB masa para iones positivos.

Los espectros de infrarrojo mostraban una señal ancha correspondiente al HO a ~3450 cm⁻¹ además de la señal de C=O a 1560 cm⁻¹ del carboxilato.

La asignación de los espectros de RMN-¹³C se encuentran en las tablas 2.2.2.d.1.I. Los espectros presentaron las señales características del grupo carboxilato. El espectro de RMN-¹H se encuentra descrito en la parte experimental (sección 2.3.5.b.4.2) y se discute en el capítulo de análisis conformacional (sección 3.2.4 y 3.3.5).

Tabla 2.2.2.d.1.I. Asignación de espectros de RMN-¹³C de los compuestos 60 y 61.

	C-1,	C-1'	C-2, C-3, C-4, C-5, C-2', C-3', C-4', C-5'	OCH ₃	COO ⁻
60	103,76; 103,16		84,36; 77,02; 76,59; 76,22; 74,15; 73,72; 72,60; 71,14	58,16	176,64; 176,37
61	104,02	98,58	77,26; 77,07; 76,88; 73,95; 73,25; 72,87; 72,25	58,19	177,76; 175,94

2.3 Parte experimental

2.3.1 Consideraciones Generales

Los puntos de fusión se determinaron con un aparato Fisher-Johns y no fueron corregidos.

Los poderes rotatorios se midieron en un polarímetro Perkin Elmer model 341, 341LC, empleando una fuente a 589 nm; en microceldas de 1,00 dm de longitud, a temperatura ambiente, en solventes y concentraciones indicadas en cada caso.

Los espectros de absorción ultravioleta (UV) fueron realizados en un espectrómetro Jasco modelo 7850 con celdas de cuarzo y empleando el solvente indicado en cada caso.

Los espectros de absorción infrarroja (IR) fueron realizados en un espectrómetro Nicolet Magna 550 en film o en pastilla de KBr.

Los espectros de resonancia magnética nuclear protónica (RMN-¹H) y de núcleos de ¹³C (RMN-¹³C) se realizaron con espectrometros Bruker AC 200, VarianXL-300 y Varian Unity 500, según se indica en cada caso; todos los espectros de RMN-¹³C se obtuvieron totalmente desacoplados por irradiación simultánea de los núcleos de ¹H.

En ambos casos los desplazamientos químicos (δ) se expresan en partes por millón (ppm) respecto del tetrametilsilano (TMS). En la mayoría de los casos se usó TMS como referencia interna o cuando el solvente empleado no contenía TMS se empleó la señal del solvente como referencia o la calibración propia del equipo para cada solvente.

En todos los casos las mediciones se efectuaron usando tubos de 5 mm, a 30 °C aproximadamente y trabajando en el modo FT.

Las constantes de acoplamiento (J) se expresan en Hz y sus valores se midieron considerando a los multipletes como si fueran de primer orden. Las abreviaturas usadas en la

descripción de los espectros son: s (singulete); d (doblete); t (tripleto); dd (doble doblete); ddd (doble doble doblete); dt (doble tripleto); o (octeto) y m (multiplete).

Los espectros de resonancia magnética nuclear en dos dimensiones (RMN-2D) de correlación homonuclear (COSY y NOESY) y heteronuclear (HETCOSY) fueron realizados a las frecuencias indicadas empleando el software estándar del equipo correspondiente.

Los espectros de masas FAB se realizaron en un espectrómetro ZAB-SEQ (BEqQ) (VG Analytical) utilizando el tercer detector de tercera región libre de campo (LANAIS, CONICET, UBA). Se utilizaron matrices de TIO-TEA (tioglicerol-trietanolamina).

Los análisis elementales fueron efectuados por la Lic. Marta Marcote (UMYMFOR, CONICET), por personal técnico del INQUIMAE (CONICET) y en el Departamento de Análisis y Técnicas Instrumentales del Instituto de Química Orgánica General (CSIC), y se expresan en tanto por ciento.

Las muestras para microanálisis se secaron previamente a presión reducida (aproximadamente 0,02 kPa) en presencia de P₂O₅ y a temperaturas entre 40 °C y 110 °C de acuerdo al punto de fusión, estado físico y estabilidad de las mismas.

Todos los solventes fueron purificados por destilación fraccionada. Las evaporaciones se realizaron a presión reducida a temperaturas menores de 45 °C, salvo en los casos específicamente indicados. Los extractos de solventes orgánicos fueron previamente secados sobre sulfato de magnesio ó de sodio anhidros. Las mezclas de solventes están expresadas en relaciones de volúmenes (V/V).

2.3.2 Métodos cromatográficos

2.3.2.a Cromatografía en capa delgada (ccd)

En todos los casos se utilizó la técnica ascendente en placas de aluminio o de vidrio (en el caso de placas de alta resolución) (Merck) cubiertas con sílicagel 60 PF 254 de 0,1 mm de espesor y 6.6 cm de longitud. Los solventes de desarrollo se indican en cada caso. Las placas se visualizaron por iluminación con luz ultravioleta (254 nm) y luego por inmersión en una solución de H₂SO₄ 5 % v/v en etanol y posterior calefacción a 150 °C, o por exposición a vapores de I₂.

2.3.2.b Cromatografía en columna (cc)

a- Se utilizaron los siguientes rellenos para las cromatografías en columna: sílicagel 60, malla 230-400 (Merck); sílicagel H (Merck); tamaño de partícula 10-40. Los solventes de desarrollo se indican en cada caso.

b- En todos los casos se utilizó la técnica ascendente en placas de aluminio cubiertas con celulosa F. Los solventes de elución se indican en cada caso. Como reactivo de revelado se utilizó nitrato de plata / hidróxido de sodio: una solución saturada de nitrato de plata (0,1 ml) se agregó a 20 ml de acetona. El precipitado de nitrato de plata obtenido se redisolvió por agregado de la mínima cantidad de agua. Los cromatogramas se pulverizaron con la solución anterior y se secaron a temperatura ambiente. Después de 3 ó 4 min se pulverizaron con una solución de hidróxido de sodio 0,5 M en etanol 50 %. Los azúcares reductores y polialcoholes revelan como manchas color marrón oscuro, que se fijan en una solución acuosa de tiosulfato de sodio 5 %. La cantidad mínima detectada de azúcares reductores es de 2 a 20 µg. También se utilizó I₂ como revelador.

2.3.2.c Cromatografía en capa preparativa

Se realizaron en cromatoplasmas preparadas con sílica gel 60 GF₂₅₄ como fase estacionaria de 1mm de espesor (Kieselgel 60 GF₂₅₄), tamaño 20 x 20 y observándola luego de su desarrollo con luz ultravioleta a 254 nm. Los solventes de desarrollo y desorción se indican en cada caso.

2.3.2.d Cromatografía en geles

DEAE-Shephacel Pharmacia: (forma HO⁻), eluyendo con una solución de NH₄OH 1 M; (forma borato), eluyendo con buffer borato 0,1 M (pH 10).

Bio-Gel P-2 Fine 45-90 µm comercial (BIO-RAP), eluyendo con H₂O. La presencia de azúcar se determinó por ccd.

2.3.2.e Cromatografía líquida de alta resolución (CLAR)

La cromatografía líquida de alta resolución se realizó con los siguientes equipos

a. Analíticas: cromatógrafo líquido LKB Pharmacia modelo LCC 2252, de dos bombas LKB 2150 con mezclado de solventes a alta presión.

b. Semipreparativas: cromatógrafo líquido Knauer 64.

En ambos casos se emplearon como detectores (según se indique) los siguientes equipos:

Detector UV variable LKB Pharmacia modelo VWM 2141

Refractómetro diferencial Knauer semipreparativo

Los cromatogramas fueron registrados simultáneamente con:

Integrador automático LKB Pharmacia 2221

Registrador Knauer.

Cuando corresponda se indican los sistemas cromatográficos empleados.

2.3.3 Solventes

Los solventes anhidros fueron preparados de la siguiente manera:

El diclorometano; el cloroformo y el 1,2-dicloroetano se secaron por reflujo sobre P_2O_5 , destilaron y guardaron sobre tamices moleculares de 4 Å, salvo el cloroformo que se guardó sobre alúmina básica (Woelm, grado 1).

El metanol se reflujo sobre torneaduras de magnesio en presencia de I_2 durante cuatro horas, luego se destiló y se guardó sobre tamices moleculares de 3 Å.

La piridina (Py) fue reflujo sobre CaH_2 bajo atmósfera de N_2 seco, destilada y guardada sobre tamices moleculares de 4 Å.

El tetrahidrofurano (THF), el éter etílico, el benceno, el tolueno y el n-hexano (previamente desolefinado por destilación sobre ácido sulfúrico concentrado, neutralización con solución saturada en bicarbonato de sodio y posterior destilación simple) se reflujo primero sobre hidróxido de sodio en lentejas y luego sobre cintas de sodio en presencia de benzofenona bajo atmósfera de N_2 seco, finalmente fueron destilados justo antes de ser usados.

La dimetilformamida (DMF) y el dimetilsulfóxido (DMSO) empleados se adquirieron comercialmente con grado analítico ó anhidros y se trataron con sucesivos lechos de tamices moleculares de 3 Å (previamente activados) durante una semana y guardaron sobre el mismo desecante.

El ácido acético glacial se obtuvo a partir del producto comercial (grado analítico) por cristalización, filtrado y usado inmediatamente luego de fundir.

2.3.4 Reactivos generales

El alcohol bencílico se trató con 0,2 % p/v de sodio metálico y se destiló bajo presión reducida.

El anhídrido acético (reactivo comercial, grado analítico) se trató con exceso de CaCl_2 bajo atmósfera de N_2 seco, a temperatura ambiente y agitación vigorosa durante 12 h, se separó por decantación y se destiló en atmósfera de N_2 seco.

El cloruro de benzoilo (reactivo comercial, Aldrich, pureza superior al 99 %) se guardó bajo N_2 seco y fue usado sin destilar.

El carbonato de plata se preparó a partir del mezclado de soluciones acuosas saturadas de 62,0 g de nitrato de plata y 31,0 g de bicarbonato de sodio. El precipitado amarillo se filtró rápidamente lavando con agua y finalmente con acetona y se guardó en desecador de vacío en oscuridad por no más de una hora previo a su uso.

La *N*-metilpirrolinina y la trietilamina fueron refluadas sobre hidróxido de potasio durante 6 h y luego se destiló sobre hidróxido de potasio; finalmente se destiló en atmósfera de nitrógeno en presencia de 2 % de fenilisocianato. El destilado se guardó bajo atmósfera de nitrógeno sobre tamices moleculares de 4 Å.

Los tamices moleculares (en pellets o en polvo) fueron activados en mufla a 320 °C durante seis horas, enfriados en desecador y guardados bajo atmósfera de N_2 seco.

El curdlano (reactivo comercial, Wako Pure Chemical Industries, Ltd), maltosa (reactivo comercial, Sigma) y metil α -D-glucopiranosido (reactivo comercial, Aldrich) se usaron sin tratamiento previo.

El metil 2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- α -D-glucopiranosido fue obtenido acorde a los métodos publicados en bibliografía^[62MCC326, 62MCC211].

El $\text{SO}_3\cdot\text{Py}$ se preparó agregando gota a gota 4,1 ml (62 mmoles) de ácido clorosulfónico a 10 ml (124 mmoles) de piridina anhidra con agitación vigorosa enfriando exteriormente con hielo- NaCl (-10 a -15°C), acorde a métodos publicados en la bibliografía^[83CAR199].

Para la síntesis del complejo $\text{SO}_3\cdot\text{NEt}_3$ se siguió el procedimiento desarrollado en bibliografía^[87OPP466]. Sobre una solución de 60,6 g de trietilamina en 200 ml de diclorometano, se agregó gota a gota y agitando desde una ampolla de decantación una solución de 34,8 g de ácido clorosulfónico en 100 ml de diclorometano a 0 °C; la adición duró 1 h. Se observó la separación de un precipitado de clorhidrato de trietilamina y una reacción vigorosa; se interrumpió la reacción volcando la mezcla sobre agua helada (150 ml). La fase orgánica se separó y se lavó con agua, se secó con Na_2SO_4 anhidro, se filtró y se evaporó a presión reducida. El sólido obtenido se recristalizó de de diclorometano:hexano (1:1 v/v). P.F.: 91-92 °C (35,14 g). (bibliografía^[83B1264] p.f.:91,5°C).

El reactivo de Jones: se preparó agregando a 3 ml de una solución 3,5 M de H₂SO₄ se le agregó a 0 °C, 682 mg de Cr₂O₃.

El (PhO)₂P(O)Cl (reactivo comercial Aldrich) se usó sin tratamiento previo.

2.3.5 Síntesis de oligosacáridos aniónicos

2.3.5.a Preparación de derivados de laminara-oligosacáridos y de maltosa

2.3.5.a.1 Obtención de metil glicósidos

2.3.5.a.1.1 Acetólisis del curdlano

Se adaptaron las técnicas descritas en literatura^[77JC305, 91CAR133]. A una suspensión de curdlano (90%, 1,00 g.) en anhídrido acético (6 ml) se agregó ácido acético glacial (6 ml) y ácido sulfúrico (c) (0,3 ml) manteniendo la temperatura en 25 °C y con agitación magnética. Se calentó la mezcla a 80 °C durante 5,5 h. Se neutralizó por agregado de piridina (15 ml) a 0 °C y posterior agregado de metanol, manteniendo la agitación durante 10 min. Se concentró la solución codestilando la piridina con tolueno. El residuo resultante se disolvió en diclorometano y se lavó sucesivamente con KHSO₄ 10 % p/v; NaHCO₃ (ss) y NaCl 10 % p/v; luego de secar (Na₂SO₄), filtrar y concentrar bajo presión reducida se purificó en columna cromatográfica de sílica gel desarrollada con tolueno:acetona (9:1 v/v). Se productos obtenidos e identificados fueron:

1,2,3,4,6-Penta-O-acetil- α -D-glucopiranososa (1).

154 mg (15%). Sólido blanco.

Punto de Fusión: 112-113° (etanol), (bibliografía^[63MCC211] p.f.:112-113°C).

$[\alpha]_D$: +101.5° (c:1, CHCl₃), (bibliografía^[63MCC211] $[\alpha]_D$: +102° (CHCl₃)).

2,3,4,6-Tetra-O-acetil- β -D-glucopiranosil-(1→3)-1,2,4,6-tetra-O-acetil- α -D-glucopiranososa (octa-O-acetil α -laminarabiosa) (2).

240 mg (24%). Sólido blanco.

Punto de Fusión: 82-83 °C (iPr₂O), (bibliografía^[77JC305] p.f.: 82,5 °C).

$[\alpha]_D$: +22° (c:1, CHCl₃), (bibliografía^[77JC305] $[\alpha]_D$: +21.9° (c:1, CHCl₃)).

RMN-¹³C (50,1 MHz; CDCl₃); δ (ppm): 170,75-168,73 (C=O, acetatos); 100,92 (C-1'); 89,29 (C-1); 77,84 (C-3); 73,02; 71,76; 71,49; 71,38; 70,06; 68,24; 67,61 (C-2, C-4, C-5, C-2', C-3', C-4', C-5'); 61,85 (C-6, C-6'); 22,97-20,68 (CH₃CO, acetilo).

RMN-¹H (200,1 MHz; CDCl₃); δ (ppm): Acorde con datos de bibliografía^[79CB1046]. 6,21 (d; 1H; J_{1,2} = 3,7 Hz, H-1); 5,10 (t; 1H; J_{3,2'} = 9,0 Hz; J_{3,4'} = 9,1 Hz; H-3'); 5,06 (m; 3 H; H-2, H-4, H-4'); 4,86 (t; 1H; J_{1,2'} = 8,2 Hz; H-2'); 4,63 (d; 1H; H-1'); 4,35 (dd; 1H; J_{6'b,5'} = 4,0 Hz, J_{6'b,6'a} = 12.5 Hz; H-6'b); 4,15-3,99 (m; 5 H; H-3, H-5, H-6a, H-6b, H-6'a); 3,70 (m; 1H; H-5'); 2,15-1,90 (7s; 3Hc/u; acetiloxi).

2,3,4,6-Tetra-O-acetil-β-D-glucopiranosil-(1→3)-2,4,6-tri-O-acetil-β-D-glucopiranosil-(1→3)-1,2,4,6-tetra-O-acetil-α-D-glucopiranososa (undeca-O-acetil α-laminaratriosa) (3).

180 mg (18 %). Sólido cristalino.

Punto de Fusión: 104-105 °C (EtOH), (bibliografía^[79CB1046] p.f.: 105 °C).

[α]_D: -5,2° (c:1, CHCl₃), (bibliografía^[79CB1046] [α]_D: -5.4° (c:1, CH₂Cl₂)).

RMN-¹³C (50,1 MHz; CDCl₃); δ (ppm): 170,74-169,41 (C=O, acetatos); 101,19; 101,18 (C-1', C-1''); 89,36 (C-1); 79,02; 75,77 (C-3, C-3'); 73,03; 71,75; 71,13; 70,17; 68,35 (C-2, C-2', C-2'', C-3'', C-4, C-4', C-4'', C-5, C-5', C-5''); 62,68; 61,92 (C-6, C-6', C-6''); 23,01 - 20,75 (CH₃CO, acetilo).

RMN-¹H (200,1 MHz; CDCl₃); δ (ppm): 6,21 (d; 1H; J_{1,2} = 3.6 Hz; H-1); 5,10 (d; 1H; J_{1,2''} = 8,4 Hz; H-1''*); 4,49 (d; 1H; J_{1,2'} = 8,0 Hz; H-1'*); 5,02 - 3,59 (m; 18 H; H-2,2',2'', H-3,3',3'', H-4, 4',4'', H-5,5',5'', H-6a,6'a,6''a, H-6b, 6'b,6''b); 1,90 - 2,32 (11s; 33 H; acetiloxi).

*señales pueden intercambiarse.

Tetradeca-O-acetil α-laminaratetraosa (4).

80 mg (8%). Sólido amorfo.

RMN-¹³C (50,1 Mhz; CDCl₃); δ (ppm): 170,75-169,31 (C=O, acetatos), 101,37; 100,91; 100,89 (C-1', C-1'', C-1'''); 89,90 (C-1); 79,30; 75,80 (C-3, C-3', C-3''); 73,12; 71,82; 71,10; 70,12; 68,41; 67,80 (C-2, C-2', C-2'', C-2''', C-3''', C-4', C-4'', C-4''', C-5, C-5', C-5'', C-5'''); 62,23; 61,95; 61,75; 61,65 (C-6, C-6', C-6'', C-6'''); 23,01-20,75 (CH₃CO, acetilo).

Laminara-oligosacáridos peracetilados (5).

Se obtuvieron dos fracciones luego de la separación por cromatografía en columna de sílica gel desarrollada con tolueno:acetona (9:1 v/v):

a) oligosacáridos con 5 o más unidades de glucosa.

100 mg (10%). Sólido amorfo.

RMN-¹³C (50,1 MHz; CDCl₃); δ (ppm): 170,81; 170,36 (C=O, acetatos); 100,97 (C-1, C-1_n); 89,26 (C-1), 78,89; 72,13; 70,52; 69,06; 68,81 (C-2, C-2_n, C-3, C-3_n, C-4, C-4_n, C-5, C-5_n); 61,65 (C-6, C-6_n); 21,48 (CH₃CO, acetilo).

b) Oligosacáridos de mayor peso molecular. Se obtuvieron con un 25% de rendimiento.

Las condiciones de acetólisis pueden variarse para obtener mayores rendimientos de los oligosacáridos de mayor peso molecular. Cuando se hizo la reacción a temperatura ambiente por 24 h se obtuvieron laminara-oligosacáridos peracetilados (5) con un 40% de rendimiento.

Los rendimientos de la reacción de acetólisis se calcularon tomando como masa molecular al compuesto 1 como es usual en la bibliografía de bibliografía^[77CAR305, 79CB1046].

2.3.5.a.1.2 Acetilación de la maltosa

Se realizó según técnicas de la bibliografía^[62MCC326, 62MCC211, 49JA3175]. A una solución de D-maltosa comercial (3,00 g, 8,76 mmoles) en 80 ml de piridina anhidra se agregaron lentamente, bajo atmósfera de N₂ seco, con agitación y manteniendo la temperatura en -5 °C (hielo-sal), 26,4 ml de anhídrido acético. Luego de reaccionar durante 2 h a -5 °C y durante 22 h a temperatura ambiente, se destruyó el exceso de reactivo acilante por agregado (a 0 °C) de 30 ml de metanol. Después de 20 min se concentró bajo presión reducida codestilando la piridina con exceso de tolueno; el residuo se disolvió en diclorometano y se lavó sucesivamente con KHSO₄ 15 % p/v; NaHCO₃ (ss) y finalmente con H₂O; se secó con Na₂SO₄ y se concentró en evaporador rotatorio.

2,3,4,6-Tetra-O-acetil-α-D-glucopiranosil-(1→4)-1,2,3,6-tetra-O-acetil-D-glucopiranososa (octa-O-acetil α-maltosa) (6).

4,8 g (80%). Sólido cristalino blanco.

Punto de Fusión: 126-127 °C (iPr₂O), (bibliografía^[15JA1276] p.f.: 125 °C).

[α]_D: +122° (c:1, CHCl₃), (bibliografía^[15JA1276] [α]_D: +122.8° (c:1, CHCl₃)).

IR: ν máx = 1740 cm⁻¹ (C=O acetato).

2.3.5.a.1.3 Glicosidaciones

Procedimiento general para las reacciones de glicosidación

Se adaptó una técnica descrita en bibliografía^[79CB1046]. A una solución del compuesto 2 o 6 (1g., 1.47 mmoles) o 3, 4 o 5 (100 mg), en 1,2 dicloroetano seco (2.44 ml) y ácido acético glacial (4.87 ml), se agregaron bajo atmósfera de N₂ seco, a 0 °C y al resguardo de la luz, 1.5 ml de solución de HBr 30% en ácido acético glacial. Luego de 1 h de reacción a temperatura ambiente, se volcó la mezcla de reacción sobre hielo-H₂O y se extrajo con cloroformo; se lavó con NaHCO₃ (ss) y con H₂O; se secó sobre Na₂SO₄ anhidro. Al concentrar en evaporador rotatorio se obtuvo un sólido cristalino blanco. Sin purificar, el bromuro de glicosilo se disolvió tolueno anhidro (8ml), se agregó metanol anhidro (60 mmoles) y Ag₂CO₃ (550 mg), se dejó con agitación a temperatura ambiente, bajo atmósfera de N₂ y en la oscuridad. Luego de 1 h de reacción se filtraron las sales de plata y se concentró en evaporador rotatorio; el residuo obtenido se disolvió en etanol. Se obtuvieron los compuestos 7-11.

Metil **2,3,4,6-tetra-O-acetil-β-D-glucopiranosil-(1→3)-2,4,6-tri-O-acetil-β-D-glucopiranosido (7).**

812 mg (85%). Sólido blanco.

Punto de Fusión: 163-164 °C (EtOH), (bibliografía^[52JCS1243] p.f.:164-165 °C, bibliografía^[97JCS2383] p.f.:165 °C).

[α]_D: -44° (c:1, CHCl₃), (bibliografía^[52JCS1243] [α]_D : -45,5° (c:1, CHCl₃), bibliografía^[97JCS2383] [α]_D : -42,8° (c:1, CHCl₃)).

RMN-¹³C (50,1 MHz; CDCl₃); δ (ppm):170,71; 170,41; 170,28; 169,36; 169,21; 168,85 (C=O, acetatos); 101,47 (C-1'); 100,88 (C-1); 78,88 (C-3); 72,91; 72,53; 71,80; 71,66; 71,01; 68,29; 68,07 (C-2, C-4, C-5, C-2', C-3', C-4', C-5'); 62,10; 61,69 (C-6, C-6'); 56,56 (OCH₃); 20,90; 20,68; 20,56; 20,45; 20,28 (CH₃CO, acetilo).Acorde con datos de bibliografía^[97JCS2383].

RMN-¹H (200,1 MHz; CDCl₃); δ (ppm): 5,05 (t; 1H; J_{3',2'} = 9,1 Hz; J_{3',4'} = 9,2 Hz; H-3'); 4,97 (t; 1H; J_{4,5'} = 9,5 Hz, J_{4,3'} = 9,5 Hz; H-4); 4,90 (dd; 1H; J_{2,1'} = 8,1 Hz, J_{2,3'} = 9,5 Hz; H-2); 4,87 (t; 1H; J_{4',5'} = 9,8 Hz; H-4'); 4,81 (t; 1H; J_{1',2'} = 8,3 Hz; H-2'); 4,52 (d; 1H; H-1'); 4,30 (dd; 1H; J_{6'b,5'} = 4,4 Hz, J_{6'b,6'a} = 12.5 Hz; H-6'b); 4,22 (d; 1H; H-1); 4,11 (m; 2H; H-6a, 6b); 3,97 (dd; 1H; J_{6'a,5'} = 2,3 Hz; H-6'a); 3,79 (t; 1H; H-3); 3,58 (m; 2 H; H-5, 5'); 3,38 (s; 3H; OCH₃); 2,05; 2,00; 1,99; 1,95; 1,93; 1,92; 1,89 (7s; 3Hc/u; acetiloxi). Acorde con datos de bibliografía^[97JCS2383].

Metil 2,3,4,6-tetra-O-acetil-β-D-glucopiranosil-(1→3)-2,4,6-tri-O-acetil-β-D-glucopiranosil-(1→3)- 2,4,6-tri-O-acetil-β-D-glucopiranososa (8).

78 mg (80%), sólido amorfo.

[α]_D: -50° (c:1,9; CHCl₃). (bibliografía^[93CAR81] [α]_D : -51° (c:1,2; CHCl₃)).

RMN-¹³C (50,1 MHz; CDCl₃); δ (ppm): 170,81; 170,32; 170,20; 169,45; 169,31; 168,87 (C=O, acetatos); 101,43; 100,99; 100,73 (C-1, C-1', C-1''); 79,10; 78,47 (C-3, C-3'); 72,90; 72,59; 71,87; 71,71; 70,95; 68,41; 68,09 (C-2, C-2', C-2'', C-3'', C-4, C-4', C-4'', C-5, C-5', C-5''); 62,26; 62,02; 61,71 (C-6, C-6', C-6''); 56,58 (OCH₃); 21,38; 21,00; 20,65; 20,57; 20,44 (CH₃CO, acetilo). Acorde con datos bibliográficos^[93CAR81].

Metil 2,3,4,6-tetra-O-acetil-β-D-glucopiranosil-(1→3)-bis[2,4,6-tri-O-acetil-β-D-glucopiranosil-(1→3)]- 2,4,6-tri-O-acetil-β-D-glucopiranososa (9).

73 mg (75%), sólido amorfo.

[α]_D: -56° (c:1,9; CHCl₃), (bibliografía^[93CAR81] [α]_D : -57° (c:1,1; CHCl₃)).

RMN-¹³C (50,1 MHz; CDCl₃); δ (ppm): 170,61; 170,53; 170,25; 169,35; 169,80; 168,97 (C=O, acetatos); 101,37; 100,91; 100,89; 100,81 (C-1, C-1', C-1'', C-1'''); 79,01; 78,44 (2C) (C-3, C-3', C-3''); 72,82; 71,75; 71,61; 70,90; 68,35; 67,99 (C-2, C-2', C-2'', C-2''', C-3''', C-4, C-4', C-4'', C-4''', C-5, C-5', C-5'', C-5'''); 62,23; 62,02; 61,95; 61,66 (C-6, C-6', C-6'', C-6'''); 56,58 (OCH₃); 21,38; 21,00; 20,65; 20,57; 20,44 (CH₃CO, acetilo). Acorde con datos bibliográficos^[93CAR81].

Metil laminara-oligosacáridos peracetilados (10).

80 mg (rendimiento promedio 89%). Sólido blanco.

RMN-¹³C (50,1 MHz; CDCl₃); δ (ppm): 170,32; 168,90; 168,66 (C=O, acetatos); 100,50 (C-1, C-1_n); 78,13 (C-3, C-3_{n-1}); 72,70; 71,58; 70,31; 67,92 (C-2, C-2_n, C-3_n, C-4, C-4_n, C-5, C-5_n); 61,84 (C-6, C-6_n); 56,09 (OCH₃); 20,46; 20,24 (CH₃CO, acetilo).

Metil 2,3,4,6-tetra-O-acetil-α-D-glucopiranosil-(1→4)-2,3,6-tri-O-acetil-β-D-glucopiranosido (11).

860 mg (90%). Sólido cristalino blanco.

Punto de Fusión: 121-123 °C (etanol), (bibliografía^[66JOC2227] p.f.: 122-124 °C).

[α]_D: +54° (c:1, CHCl₃), (bibliografía^[66JOC2227] [α]_D : +53° (c:1, CHCl₃)).

RMN-¹³C (50,1 MHz; CDCl₃); δ (ppm): 170,41; 170,10; 169,89; 169,58; 169,35 (C=O, acetatos); 101,09 (C-1); 95,55 (C-1'); 75,43 (C-4'); 72,78 ; 72,14; 70,02; 69,38; 68,50; 68,07

(C-2, C-3, C-4, C-5, C-2', C-3', C-5') ; 62,83 (C-6); 61,57 (C-6'); 56,94 (OCH₃); 20,80; 20,53 (CH₃CO, acetilo). Acorde con datos de bibliografía^[77CAR299].

RMN-¹H (200,1 MHz; CDCl₃); δ (ppm): 5,33 (d; 1H; J_{1',2'} = 3,8 Hz; H-1'); 5,29 (t; 1H; J_{2',3'} = 10,4 Hz; J_{3',4'} = 9,6 Hz; H-3'); 5,28 (t; 1H; J_{3,2} = 8,9 Hz; J_{3,4} = 9,0 Hz H-3); 4,97 (t; 1H; J_{4',5'} = 9,8 Hz; H-4'); 4,79 (dd; 1H; H-2'); 4,74 (dd; 1H; J_{2,1} = 7,8 Hz; H-2); 4,43 (dd; 1H; J_{6a,5} = 2,8 Hz, J_{6a,6b} = 12,0 Hz; H-6a); 4,38 (d; 1H; H-1); 4,17 (dd; 1H; J_{6'a,6'b} = 12,1 Hz, J_{6'a,5'} = 2,6 Hz; H-6'a); 4,11 (dd; 1H; J_{6b,5} = 1,7 Hz, H-6b); 4,01-3,89 (m; 3H; H-4, 5', 6'b); 3,62 (m, 1H, H-5); 3,41 (s; 3H; OCH₃); 2,06; 2,04; 2,02; 2,00; 1,96; 1,94; 1,92 (7s; 3Hc/u; acetiloxi). Acorde con datos de bibliografía^[74JCS88].

2.3.5.a.1.4 Desacetilaciones

Procedimiento general para reacciones de desacetilación

Se siguió un procedimiento desarrollado en nuestro laboratorio^[93JCC13]. A soluciones de los compuestos **5**, **7**, **8**, **9**, **10** o **11** (1 mmol) en 5 ml de metanol anhidro, se agregó 0,5 ml (5 mmol) *N*-metilpirrolidina o trietilamina, se agitó la mezcla en atmósfera de nitrógeno a temperatura ambiente y se siguió el curso de la reacción por ccd. Luego de 24 h la mezcla de reacción se concentró en evaporador rotatorio y los productos cristalinos obtenidos fueron, respectivamente, **12**, **13**, **14**, **15**, **16** y **17**. Los rendimientos fueron cuantitativos.

Laminara-oligosacáridos (12).

Este compuesto contiene 5 o más unidades de glucosa.

Sólido blanco.

RMN-¹³C (50,1 MHz; HDO); δ (ppm): 103,40 (C-1, C-1_n); 85,31 (C-3, C-3_{n-1}); 76,89; 76,52; 74,42; 74,16; 70,55; 69,06 (C-2, C-2_n, C-3_n, C-4, C-4_n, C-5, C-5_n); 61,67 (C-6, C-6_n).

Metil β-D-glucopiranosil-(1→3)-β-D-glucopiranosido (13).

Sólido blanco.

Punto de Fusión: 166 °C (etanol), (bibliografía^[52JCS1243] p.f.:165-166 °C).

[α]_D: -29° (c:1, H₂O), (bibliografía^[52JCS1243] [α]_D : -28° (c: 2,5; H₂O).

RMN-¹³C (50,1 MHz; D(OH)); δ (ppm): 103,72; 103,69 (C-1; C-1'); 85,61 (C-3); 76,90 (C-5'); 76,45 (C-5; C-3'); 74,39 (C-2'); 73,63 (C-2); 70,50 (C-4'); 69,10 (C-4); 61,64 (C-6; C-6'); 58,08 (OCH₃). Acorde con datos bibliográficos^[93CAR81].

RMN-¹H (200,1 MHz; D₂O); δ (ppm): 4,72 (d; 1H; J_{1,2}=7,9 Hz; H-1'); 4,42 (d; 1H; J_{1,2}=8,0 Hz; H-1); 3,96 (m; 2H; H-6a, 6'a); 3,77 (m; 3H; H-3, 6b, 6'b); 3,59 (s; 3H; OMe); 3,54-3,37 (m; 7H, H-2, 4, 5, 2', 3', 4', 5'). Acorde a los datos bibliográficos^[74CAR105].

Metil β-D-glucopiranosil-(1→3)-β-D-glucopiranosil-(1→3)-β-D-glucopiranosido (metil β-laminaratriosa) (14).

Sólido blanco.

Punto de Fusión: 239-241 °C (etanol), (bibliografía^[93CAR81] p.f.:240-242 °C).

[α]_D: -29,5° (c:1, H₂O). (bibliografía^[93CAR81] [α]_D : -29° (c: 1,1; H₂O).

RMN-¹³C (50,1 MHz; D(OH)); δ (ppm): 103,76; 103,73 (C-1; C-1''); 103,44 (C-1'); 85,70; 85,49 (C-3; C-3''); 76,86 (C-5''); 76,51 (C-5; C-5', C-3''); 74,39 (C-2''); 74,04 (C-2'); 73,63 (C-2); 70,53 (C-4''); 69,10 (C-4; C-4'); 61,70 (C-6; C-6'; C-6''); 58,04 (OCH₃). Acorde con datos bibliográficos^[93CAR81].

Metil β-D-glucopiranosil-(1→3)-bis[β-D-glucopiranosil-(1→3)]-β-D-glucopiranosido (metil β-laminaratetrosa) (15).

Sólido amorfo.

[α]_D: -26,5° (c:1, H₂O), (bibliografía^[93CAR81] [α]_D : -27° (c: 1,5; H₂O); bibliografía^[97JCS2383] [α]_D : -33° (c: 0,8; H₂O)) .

RMN-¹³C (50,1 MHz; D(OH)); δ (ppm): 103,76; 103,73 (C-1, C-1'''); 103,50; 103,44 (C-1', C-1''); 85,70 (C-3); 85,49 (C-3'); 85,45 (C-3''); 76,86 (C-5'''); 76,53 (C-5; C-5'; C-5''; C-3'''); 74,38 (C-2'''); 74,04 (C-2'; C-2''); 73,60 (C-2); 70,53 (C-4'''); 69,10 (C-4; C-4'', C-4'''); 61,70 (C-6; C-6', C-6''; C-6'''); 58,04 (OCH₃). Acorde con datos bibliográficos^[93CAR81].

Metil β-laminara-oligosacáridos (16).

Este compuesto contiene 5 o más unidades de glucosa.

Sólido amorfo.

RMN-¹³C (50,1 MHz; D(OH)); δ (ppm): 103,72; 103,41 (C-1, C-1_n); 85,30 (C-3, C-3_{n-1}); 76,88 (C-5_n); 76,51 (C-3_n, C-5, C-5_{n-1}); 74,42 (C-2_n); 74,15 (C-2₂, C-2_{n-1}); 73,67 (C-2); 70,53 (C-4_n); 69,08 (C-4, C-4_{n-1}); 61,66 (C-6, C-6_n); 58,09 (OCH₃).

Metil α-D-glucopiranosil-(1→4)-β-D-glucopiranosido (17).

Sólido cristalino.

Punto de Fusión: 107-109 °C (etanol), (bibliografía^[52JCS1243] p.f.: 108-109 °C).

[α]_D: +79° (c:1.0, H₂O), (bibliografía^[52JCS1243] [α]_D : +78° (c:1.0 ;H₂O)).

RMN-¹³C (50,1 MHz; D(OH)); δ (ppm): 104,59 (C-1); 101,09 (C-1'); 78,36 (C-4); 77,78 (C-3); 76,09 (C-5); 74,52 (C-2*); 74,42 (C-3'*); 74,24 (C-2'); 73,22 (C-5'); 70,91 (C-4'); 62,31, 62,07 (C-6; C-6'); 58,70 (OCH₃). Acorde a los datos bibliográficos^[77CAR299, 73JCS2425].

RMN-¹H (200,1 MHz; D₂O); δ (ppm): 5,35 (d; 1H; J_{1,2'}=2,6 Hz; H-1'); 4,42 (d; 1H; J_{1,2}=7,5 Hz; H-1); 3,95 (dd; 1H; H-6a); 3,87 (dd; 1H; H-6'a); 3,78 (m; 1H; H-6b); 3,77 (m; 1H; H-6'b); 3,59 (s; 3H; OMe); 4,00 - 3,30 (m; 12 H, H-2, 3, 4, 5, 6a, 6b, 2', 3', 4', 5', 6'a, 6'b). Acorde con datos bibliográficos^[77CAR299].

*pueden intercambiarse.

2.3.5.a.2 Obtención de oligosacáridos con los grupos hidroxilos primarios libres

2.3.5.a.2.1 Tritilaciones

Procedimiento general para reacciones de tritilación

Se adaptó una técnica descrita en bibliografía^[79TL95]. Una solución de **13**, **14** o **17** (0.42 mmoles) y cloruro de tritilo (2 mmoles/HO primario) en 20 ml piridina anhidra se dejó reaccionar a temperatura ambiente bajo atmósfera de nitrógeno seco con agitación durante dos días. Se monitoreó por ccd (sílicagel, acetato de etilo:metanol (3:1 v/v)). El exceso de reactivo se destruyó por agregado de 1 ml de metanol seco. Luego se agregó resina de intercambio iónico Bio-Rex 70 (tipo carboxílica, forma sodio), se filtró y se concentró en evaporador rotatorio. Los productos obtenidos fueron **18**, **19** y **20**, además de los subproductos monotritilados **18a**, **18a'** y **20a**, luego de purificación por cromatografía en columna desarrollada con gradientes de acetato de etilo-metanol. Se observó además que la purificación cromatográfica disminuía el rendimiento; con lo cual los productos de la tritilación de los compuestos **13**, **14** y **17** fueron también utilizados sin purificar en la reacción de bencilación.

Metil 6-O-tritil-β-D-glucopiranosil-(1→3)-6-O-tritil-β-D-glucopiranosido (18), **metil 6-O-tritil-β-D-glucopiranosil-(1→3)-β-D-glucopiranosido (18a)** y **metil β-D-glucopiranosil-(1→3)-6-O-tritil-β-D-glucopiranosido (18a')**.

247 mg (70 %) de **18**. Sólido amorfo

[α]_D **18**: +5,5° (c:1,1; MeOH).

RMN-¹³C (50,1 MHz; Me₂CO-*d*⁶) de **18**; δ (ppm): 144,67; 144,26 (C-1_{arilico}); 128,97; 128,03; 127,26; 127,24 (C_{arilico}); 104,61; 103,86 (C-1, C-1'); 89,18 (C-3); 87,00; 86,50 (Ph₃C_O);

76,57; 75,94; 75,46; 74,10; 72,69; 70,62; 69,56 (C-2; C-4; C-5; C-2'; C-3'; C-4' y C-5'), 63,99; 63,77 (C-6 y C-6'), 56,25 (OMe).

RMN-¹H (200,1 MHz; Me₂CO-*d*⁶) de **18**; δ (ppm): 7,5-7,0 (m, 30 H, H_{arilicos}); 4,53 (d; 1H; J_{1,2}=8,0 Hz; H-1'); 4,47 (d; 1H; J_{1,2}=8,0 Hz; H-1); 4,20- 4,10 (m; 12 H; H-2, 3, 4, 5, 6a,b, 2', 3', 4', 5', 6'a,b); 3,60 (s; 3 H; OMe).

Análisis elemental calculado para **18**: C₅₁H₅₂O₁₁: %C: 72,84; %H: 6,23

encontrado: %C: 73,22; %H: 6,12

17,6 mg (7 %) correspondiente a **18a** y **18a'** (relación 4,8:1 respectivamente, medidas por áreas de los H-1' en RMN-¹H).

RMN-¹³C (50,1 MHz; Me₂CO-*d*⁶) para **18a** y **18a'**; δ (ppm): 145,00; 144,60 (C-1_{arilico}), 129,06; 128,86; 128,27; 128,06; 127,88; 127,34; 127,26; 127,16 (C_{arilico}); 103,94; 103,65 (C-1 a y a', C-1'a y a'); 88,00; 82,00 (Ph₃C=O); 87,06 (C-3a y a'); 76,97; 76,49; 76,30; 74,26; 73,10; 70,44; 69,46 y 69,08 (C-2; C-4; C-5; C-2'; C-3'; C-4' y C-5' a y a'); 61,57; 63,99 (C-6 a y a' y C-6'a' y a); 56,81(OMe a y a').

RMN-¹H (200,1 MHz; Me₂CO-*d*⁶) para **18a** y **18a'**; δ (ppm): 7.50-7.00 (m, 15 H, H_{arilicos}); 4,65; 4,62 (2d; 2 H; H-1'a y a'); 4,32 (d; 2 H; H-1a y a'); 4,10-3,00 (m; 24 H; H-2, 3, 4, 5, 6a,b, 2', 3', 4', 5', 6'a,b a y a'); 3,55 (s; 6 H; OMe a y a').

Metil 6-O-tritil-β-D-glucopiranosil-(1→3)-6-O-tritil-β-D-glucopiranosil-(1→3)-6-O-tritil-β-D-glucopiranosido (19).

Se aisló el compuesto y sin purificación cromatográfica se utilizó en la reacción de bencilación.

Metil 6-O-tritil-α-D-glucopiranosil-(1→4)-6-O-tritil-β-D-glucopiranosido (20) y metil 6-O-tritil-α-D-glucopiranosil-(1→4)-β-D-glucopiranosido (20a).

191 mg (54 %) de **20**. Sólido amorfo.

[α]_D **20**: +38,6° (c: 1,1 ; MeOH).

RMN-¹³C (50,13 MHz, CCl₃D) para **20**; δ (ppm): 143,82; 143,75 (C-1_{arilico}); 128,57; 127,81; 127,62; 127,02; 126,82 (C_{arilico}); 103,14 (C-1); 100,98 (C-1'); 86,71; 86,43 (Ph₃C=O); 80,17 (C-4); 76,36; 74,41; 73,35; 72,64; 70,99 (C-2; C-3; C-5; C-2'; C-3'; C-4'; C-5'); 63,17 (C-6; C-6'); 56,52 (OMe).

RMN-¹H (200,1 MHz, CCl₃D) para **20**; δ (ppm): 7,54 -7,12 (m; 30 H; H_{arilicos}); 5,03 (d; 1H; J_{1,2}=2,2 Hz; H-1'); 4,30 (d; 1 H; J_{1,2}=7,0 Hz; H-1); 3,70 - 3,2 (m; 12 H; H-2, 3, 4, 5, 6a,b, 2', 3', 4', 5', 6'a,b); 3,62 (s; 3 H; OMe).

Análisis elemental calculado para **20**: C₅₁H₅₂O₁₁: %C: 72,84; %H: 6,23

encontrado: %C: 72,72; %H: 6,17.

23 mg (9 %) de **20a**. Sólido amorfo.

[α]_D **20a**: +34,8° (c: 0.4; MeOH).

RMN-¹³C (50,1 MHz, Pyd₅) de **20a**; δ (ppm): 144,85 (C-1_{arilico}); 129,24; 128,03; 127,09 (C_{arilico}); 105,25 (C-1); 103,04 (C-1'); 86,84 (Ph₃C_O); 81,62 (C-4); 77,52; 76;81; 75;11; 74,37; 74,15; 73.85; 71.83 (C-2; C-3; C-5; C-2'; C-3; C-4'; C-5'); 65,26 (C-6'); 62,00 (C-6); 56,59 (OMe).

RMN-¹H (200,13MHz, Pyd₅) de **20a**; δ (ppm): 7,50 -7,18 (m; 15 H; H_{arilicos}); 5,87 (d; 1 H; J_{1,2}=3,0 Hz; H-1'); 4,50 (d; 1; J_{1,2}=8,0 Hz; H-1); 4,70 - 3,69 (m; 12 H; H-2, 3, 4, 5, 6a,b, 2', 3', 4', 5', 6'a,b); 3,59 (s; 3 H; OMe).

Análisis elemental calculado para **20a**: C₃₂H₅₈O₁₁: %C: 64,20 ; %H: 6,40.

encontrado: %C: 64,14; %H: 6,41.

2.3.5.a.2.2 Bencilaciones

Procedimiento general para reacciones de bencilación

Se realizó acorde a una técnica de la bibliografía^[87TL4303]. A una solución de **18** o **20** (0.72 mmoles) en 10 ml de DMF anhidra, se agregó bajo atmósfera de nitrógeno seco, con agitación, bromuro de bencilo (1,3 mmoles/HO libre); manteniendo la temperatura a 0 °C se adicionó además NaH (1,3 mmoles/HO libre). La reacción se monitoreó por ccd desarrollada con ciclohexano:acetato de etilo (1:9 v/v). Luego de reaccionar 8 h a temperatura ambiente se destruyó el exceso de reactivos por agregado de 15 ml de MeOH a 0 °C. Después de 20 min se concentró bajo presión reducida; el residuo se disolvió en diclorometano y se lavó con KHSO₄ al 10% p/v y con H₂O; se secó con Na₂SO₄; se filtró y se concentró en evaporador rotatorio; obteniéndose respectivamente **21** y **23**. El compuesto **23** se purificó en columna cromatográfica de sílicagel desarrollada en ciclohexano:acetato de etilo (9:1 v/v).

Esta metodología de bencilación se aplicó también a los compuestos **13**, **14** y **17** que se tritilaron y sin purificación cromatográfica se bencilaron; obteniéndose respectivamente los compuestos **21** (**21a** y **21a'**); **22** y **23** (**23a**). El compuesto **23** (**23a**) se purificó por columna cromatográfica de sílicagel desarrollada con ciclohexano:acetato de etilo (9:1 v/v). El compuesto **22** precipitó al destruir el exceso de reactivo con metanol; se filtró y se recristalizó de metanol.

Metil 2,3,4-tri-*O*-bencil-6-*O*-tritol-β-D-glucopiranosil-(1→3)-2,4-di-*O*-bencil-6-*O*-tritol-β-D-glucopiranosido (21), metil 2,3,4-tri-*O*-bencil-6-*O*-tritol-β-D-glucopiranosil-(1→3)-2,4,6-tri-*O*-bencil-β-D-glucopiranosido (21a) y metil 2,3,4,6-tetra-*O*-bencil-β-D-glucopiranosil-(1→3)-2,4-di-*O*-bencil-6-*O*-tritol-β-D-glucopiranosido (21a').

Estos derivados no fueron purificados y se procedió a la destilación de la mezcla.

Metil 2,3,4-tri-*O*-bencil-6-*O*-tritol-β-D-glucopiranosil-(1→3)-2,4-di-*O*-bencil-6-*O*-tritol-β-D-glucopiranosil-(1→3)-2,4-di-*O*-bencil-6-*O*-tritol-β-D-glucopiranosido (22).

581 mg (72%); el rendimiento está referido al compuesto 14. Sólido amorfo.

$[\alpha]_D$: +10,8° (c:1,3; CHCl₃).

RMN-¹³C (50,1 MHz; CDCl₃); δ (ppm): 144,19; 144,18; 143,81 (C-1_{arilico}tritol); 139,15; 138,35; 138,32; 138,11 (C-1_{arilico}bencilo); 128,95; 128,35; 128,24; 128,02; 127,81; 127,02; 126,91 (C_{arilico}); 104,32; 102,30; 101,65 (C-1; C-1'; C-1''); 86,57; 86,43 (2C) (Ph₃C=O); 84,97; 84,32; 83,63; 79,07; 78,06; 76,02; 75,01; 74,53; 74,33 (C-2, C-2', C-2'', C-3, C-3', C-3'', C-4, C-4', C-4'', C-5, C-5', C-5'', CH₂-bencilo), 63,62; 62,77 (C-6; C-6'; C-6''), 56,70 (OMe).

RMN-¹H (200,1 Mhz; CDCl₃); δ (ppm): 7,5-6,8 (m, 80 H, H_{arilicos}); 5,29-3,28 (m; 21 H; H-1, 2, 3, 4, 5, 6a,b, 1', 2', 3', 4', 5', 6'a,b, 1'', 2'', 3'', 4'', 5'', 6''a,b); 3,56 (s; 3 H; OMe).

Análisis elemental calculado: C₁₂₅H₁₁₈O₁₆: %C: 80,02; %H: 6,34.

encontrado: %C: 80,50; %H: 6,81.

Metil 2,3,4-tri-*O*-bencil-6-*O*-tritol-α-D-glucopiranosil-(1→4)-2,3-di-*O*-bencil-6-*O*-tritol-β-D-glucopiranosido (23) y metil 2,3,4-tri-*O*-bencil-6-*O*-tritol-α-D-glucopiranosil-(1→4)-2,3,6-tri-*O*-bencil-β-D-glucopiranosido (23a).

744 mg (80%) de 23 a partir del compuesto 20 puro.

El compuesto 17 fue tritolado y bencilado y luego se purificó; rindió 260 mg (48 %) de 23 y 8 % de 23a.

23 sólido amorfo.

$[\alpha]_D$ 23: +26,7° (c:3,3; CHCl₃).

RMN-¹³C (50,13 MHz, CCl₃D) de 23; δ (ppm): 144,32; 144,10 (C-1_{arilico}tritol); 139,07; 138,77; 138,55; 138,50; 138,29 (C-1_{arilico}bencilo); 130,11-126,25 (C_{arilico}); 104,79 (C-1); 94,95 (C-1'); 86,67; 86,40 (Ph₃C=O), 85,42; 82,58; 82,11; 79,99; 78,23; 74,49; 71,17; 70,91 (C-2, C-3, C-4, C-5, C-2', C-3', C-4', C-5'); 75,95; 75,19; 74,68; 73,27; 72,98 (CH₂-bencilo); 64,09; 62,28 (C-6, C-6'), 56,81 (OMe).

RMN-¹H (200,13MHz, CCL₃D) de **23**; δ (ppm): 7,5-7,0 (m, 55 H, H_{arilicos}); 5,94 (d; 1 H; J_{1',2'}=2,0 Hz; H-1'); 4,38 (d; 1 H; J_{1,2}=7,5 Hz; H-1); 5,20-3,43 (m; 12 H; H-2, 3, 4, 5, 6a,b, 2', 3', 4', 5', 6'a,b); 3,61 (s; 3 H; OMe).

Análisis elemental calculado **23**: C₈₆H₈₂O₁₁: %C: 79,97; %H: 6,40.

encontrado: %C:79,53 ; %H: 6,18 .

23a sólido amorfo.

[α]_D**23a**: +24,5° (c: 1,5; CHCl₃).

RMN-¹³C (50,13 MHz, CCl₃D) de **23a**; δ (ppm): 143,89 (C-1_{arilico}trilito), 138,91; 138,64; 138,42; 138,21; 138,06; 138,10 (C-1_{arilico}bencilo); 128,76-126,70 (C_{arilico}); 104,46 (C-1); 96,10 (C-1'); 86,25 (Ph₃C=O); 84,74; 82,14; 80,11; 78,20; 74,85; 71,38 (C-2, C-3, C-4, C-5, C-2', C-3', C-4', C-5'); 75,88; 75,08; 74,63; 73,69; 73,37; 73,16 (CH₂ bencilo); 62,49 (C-6, C-6'); 56,75 (OMe).

RMN-¹H (200,13MHz, CCL₃D) de **23a**; δ (ppm): 7,46-6,80 (m; 55 H; H_{arilicos}); 5,60 (d; 1 H; J_{1',2'}=3,5 Hz; H-1'); 4,96-3,46 (m; 13 H; H-1, 2, 3, 4, 5, 6a,b, 2', 3', 4', 5', 6'a,b); 3,55 (s; 3 H; OMe).

2.3.5.a.2.3 Destritilaciones

Procedimiento general para reacciones de destritilación

Se siguió un procedimiento desarrollado en nuestro laboratorio^[97TL3995]. A soluciones de **22** y **23** (0,60 mmoles) en 10 ml de etanol:cloroformo (10:2 v/v), se agregó 0.5 ml de cloruro de piridonio a temperatura ambiente; luego de reaccionar 18 horas a reflujo, se concentró en evaporador rotatorio. Se diluyó con acetato de etilo y se filtró. Luego de purificar en columna de sílicagel con gradientes de hexano: acetato de etilo se obtuvieron los compuestos **25** y **26** respectivamente.

Esta metodología de destritilación se aplicó también a los compuestos **13**, **14** y **17** que fueron tritilados, bencilados y sin purificación cromatográfica se destritilaron; obteniéndose respectivamente los compuestos **24** (**24a** y **24a'**), **25** y **26** (**26a**). Se purificaron en columna de sílicagel con gradientes de hexano: acetato de etilo.

Metil 2,3,4-tri-O-bencil-β-D-glucopiranosil-(1→3)-2,4-di-O-bencil-β-D-glucopiranosido (24), metil 2,3,4-tri-O-bencil-β-D-glucopiranosil-(1→3)-2,4,6-tri-O-bencil-β-D-glucopiranosido (24a) y metil 2,3,4,6-tetra-O-bencil-β-D-glucopiranosil-(1→3)-2,4-di-O-bencil-β-D-glucopiranosido(24a').

El compuesto **13** fue tritilado, bencilado y destritilado; se purificó en el último paso rindiendo 203 mg (60 %) de **24** y 19 mg (7 %) de **24a** y **a'**.

24 sólido amorfo.

$[\alpha]_D$ **24**: +24,6° (*c*:1,5; CHCl₃).

IR. **24**: $\nu_{\text{máx}}$ KBr(cm⁻¹): 3563 (HO).

RMN-¹³C (50.1 MHz, Me₂CO-*d*⁶) de **24**; δ (ppm): 139,87; 139,80; 139,69; 139,56; 139,51 (C-1_{arilico}); 129,48; 129,17; 128,82; 128,52; 128,34; 128,13; 128,02 (C_{arilico}); 105,10; 103,43 (C-1, C-1'); 85,62; 84,24; 83,80; 81,25; 79,12; 77,19; 76,77; 76,38 (C-2, C-3, C-4, C-5, C-2', C-3', C-4', C-5'); 75,94; 75,55; 75,25; 75,20; 75,04 (CH₂ bencilo); 62,37 (C-6, C-6'); 57,05 (OMe).

RMN-¹H (200.1 MHz, Me₂CO-*d*⁶) de **24**; δ (ppm): 7,51-7,31 (m; 25 H; H_{arilicos}); 5,10 (d; 1 H; $J_{1,2}=7,5$ Hz; H-1'); 5,09-3,25 (m; 13 H; H-1, 2, 3, 4, 5, 6a,b, 2', 3', 4', 5', 6'a,b); 3,52 (s; 3 H; OMe).

Análisis elemental calculado **24**: C₄₈H₅₄O₁₁: %C: 71,45; %H: 6,74.

encontrado: %C: 71,12; %H: 6,53.

Los compuestos **24a** y **24a'** no fueron fraccionados. Se recuperaron como una mezcla sólida blanca.

IR. **24a, a'**: $\nu_{\text{máx}}$ KBr(cm⁻¹): 3560 (HO).

RMN-¹³C (50.1 MHz, Me₂CO-*d*⁶) de **24a, a'**; δ (ppm): 139,85 - 138,57 (C-1_{arilico}); 128,99 - 126,51 (C_{arilico}); 104,79; 102,92 (C-1, C-1'); 86,84 - 59,66 (C-2, C-3, C-4, C-5, C-6, C-2', C-3', C-4', C-5', C-6'; CH₂ bencilo); 56,77; 56,80 (OMe).

RMN-¹H (200.1 MHz, Me₂CO-*d*⁶) de **24a, a'**; δ (ppm): 7,60-7,31 (m; H_{arilicos}); 5,56-3,36 (m; 14 H; H-1, 2, 3, 4, 5, 6a,b, 1', 2', 3', 4', 5', 6'a,b); 3,60; 3,52 (s; 3 H c/uno; OMe).

Metil 2,3,4-tri-O-bencil- β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 3)-2,4-di-O-bencil- β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 3)-2,4-di-O-bencil- β -D-glucopiranosido (25).

566 mg (80%), el rendimiento está referido al compuesto **22**. Sólido amorfo.

$[\alpha]_D$: +23,5° (*c*:1,2; CHCl₃).

IR.: $\nu_{\text{máx}}$ KBr(cm⁻¹): 3560 (HO).

RMN-¹³C (50.1 MHz, CCl₃D); δ (ppm): 138,61-138,33 (C-1_{arilico}); 128,52; 128,38; 128,26; 127,91; 127,66; 127,55 (C_{arilico}); 104,57; 102,76; 102,36 (C-1, C-1', C-1''); 84,70; 83,57; 83,22; 83,14; 80,77; 80,55; 78,10; 75,79; 75,75; 75,16; 74,81 (C-2, C-3, C-4, C-5, C-2', C-3', C-4', C-5', C-2'', C-3'', C-4'', C-5''); CH₂ bencilo); 61,98 (C-6, C-6', C-6''); 57,26 (OMe).

RMN-¹H (200.1 MHz, CCl₃D); δ (ppm): 7,41-7,27 (m; 35 H; H_{arilicos}); 5,30-3,22 (m; 21 H; H-1, 2, 3, 4, 5, 6a,b, 1', 2', 3', 4', 5', 6'a,b, 1'', 2'', 3'', 4'', 5'', 6''a,b); 3,61 (s; 3 H; OMe).

Análisis elemental calculado : C₆₈H₇₆O₁₆: %C: 71,06; %H: 6,60.

encontrado: %C: 70,95; %H: 6,70.

Metil 2,3,4-tri-O-bencil-α-D-glucopiranosil-(1→4)-2,3-di-O-bencil-β-D-glucopiranosido (26) y metil 2,3,4-tri-O-bencil-α-D-glucopiranosil-(1→4)-2,3,6-tri-O-bencil-β-D-glucopiranosido (26a).

El compuesto 17 fue tritilado, bencilado y destritilado; se purificó en el último paso rindiendo 142 mg (42 %) de 26 y 23 mg (6 %) de 26a.

Cuando se efectuó la destritilación de 23 se obtuvo 26 con 80 % de rendimiento.

26 sólido amorfo.

[α]_D de 26: +24,7° (c:5,8; CHCl₃).

IR. 26: ν_{máx} KBr(cm⁻¹): 3560 (HO).

RMN-¹³C (50.1 MHz, CCl₃D) de 26; δ (ppm): 138,99; 138,82; 138,43; 138,20; 138,08 (C-1_{arilico}), 128,61; 128,47; 128,41; 128,27; 128,03; 127,86; 127,77; 127,27; 126,62 (C_{arilico}), 104,87 (C-1); 96,95 (C-1'); 84,89; 82,47; 82,06; 79,54; 78,40; 74,90; 72,51; 71,76 (C-2, C-3, C-4, C-5, C-2', C-3', C-4', C-5'); 75,62; 75,27; 74,73; 73,99; 73,52 (CH₂ bencilo); 62,18; 61,36 (C-6, C-6'); 57,33 (OMe).

RMN-¹H (200.1 MHz, CCl₃D) de 26; δ (ppm): 7,39-7,24 (m; 25 H; H_{arilicos}); 5,86 (d; 1 H; J_{1,2}=3,8 Hz; H-1'); 4,50 (d; 1 H; J_{1,2}=7,7 Hz; H-1); 5,00-3,52 (m; 12 H; H-2, 3, 4, 5, 6a,b, 2', 3', 4', 5', 6'a,b); 3,65 (s; 3 H; OMe).

Análisis elemental calculado 26: C₄₈H₅₄O₁₁: %C: 71,45; %H: 6,74.

encontrado: %C: 71,03; %H: 6,42.

26a Sólido amorfo.

[α]_D de 26a: 23,4° (c:7; CHCl₃).

IR.26a: ν_{máx} KBr (cm⁻¹): 3560 (HO).

RMN-¹³C (50.1 MHz, Me₂CO-*d*⁶) de 26a; δ (ppm): 140,03; 140,00; 139,87; 139,49; 139,38 (C-1_{arilico}); 129,30; 128,95; 128,90; 128,55; 128,48; 128,31; 128,17; 127,77; 127,66; 127,53 (C_{arilico}); 105,12 (C-1); 97,10 (C-1'); 85,52; 83,01; 82,42; 80,69; 78,66; 75,36; 73,36 (C-2, C-3, C-4, C-5, C-2', C-3', C-4', C-5'); 75,29; 74,65; 74,51; 73,66; 73,60; 73,36 (CH₂ bencilo); 61,58; 59,87 (C-6, C-6'); 56,78 (OMe).

RMN-¹H (200.1 MHz, Me₂CO-*d*⁶) de **26a**; δ (ppm): 7,47-7,27 (m; 30 H; H_{arilicos}); 5,66 (d; 1 H; J_{1,2}=3,1 Hz; H-1'); 4,60 (d; 1 H; J_{1,2}=8,0 Hz; H-1); 4,90-3,40 (m; 12 H; H-2, 3, 4, 5, 6a,b, 2', 3', 4', 5', 6'a,b); 3,54 (s; 3 H; OMe).

Análisis elemental calculado **26a**: C₅₅H₆₀O₁₁: %C: 73,64; %H: 6,74.

encontrado: %C: 73,20; %H: 6,60.

2.3.5.a.3 Obtención de derivados con los grupos hidroxilos secundarios libres

2.3.5.a.3.1 Derivados del metil β-laminarabiósido

Obtención de bencilidén derivados triacetilado

Se adaptó la técnica descrita en bibliografía^{[91]CC349}. Una solución de **13** (215 mg, 0,6 mmoles) en 3 ml de DMF anhidra, se trató con α,α-dimetoxitolueno (0,23 ml, 1,5 mmoles) y 0,35 mg de ácido p-toluensulfónico. con agitación bajo atmósfera de nitrógeno. La solución se llevó a 60 °C y se hizo vacío. Luego de 4 h se evaporó el solvente y por ccd desarrollada con acetato de etilo:metanol (3:1 (v/v)) se observó un componente mayoritario. Se disolvió en 2 ml de piridina anhidra y se agregaron lentamente, bajo atmósfera de nitrógeno seco, con agitación y manteniendo la temperatura en -5 °C (hielo-sal) 6 ml de anhídrido acético. Luego de reaccionar durante 2 h a -5 °C y durante 24 h a temperatura ambiente, se destruyó el exceso de reactivo acilante por agregado (a 0 °C) de 20 ml de metanol. Después de 20 min se concentró bajo presión reducida codestilando la piridina con exceso de tolueno. Los componentes de la mezcla bruta de reacción se aislaron por purificación en columna cromatográfica de sílicagel desarrollada con tolueno: acetato de etilo: 9:1 (v/v) para dar el compuesto cristalino **27**.

Metil 2,3-di-O-acetil-(R)-4,6-O-benciliden-β-D-glucopiranosil-(1→3)-2-acetil-(R)-4,6-O-benciliden-β-D-glucopiranosido (27).

316 mg (80 %). Sólido blanco.

Punto de Fusión: 65-67 °C.

[α]_D: -62,2° (c: 1,1; CHCl₃).

RMN-¹³C (50,1 MHz; CDCl₃); δ (ppm): 169,95; 169,44; 168,94 (C=O, acetatos); 137,07; 136,68 (C-1_{arilico}); 128,98; 128,88; 128,03; 126,03; 125,91; 125,16 (C_{arilico}); 102,16; 101,21; 100,99; 100,61 (C-1, C-1', 2 PhCH); 78,78; 78,24; 77,83; 72,69; 72,42; 71,96; 66,38; 66,08

(C-2, C-3, C-4, C-5, C-2', C-3', C-4', C-5'); 68,38 (C-6, C-6'); 56,69 (OMe); 20,71; 20,58; 20,38 ($\underline{\text{C}}\text{H}_3\text{CO}$, acetilo).

RMN- ^1H (200,1 MHz; CDCl_3); δ (ppm): 7,52 - 7,16 (m, 10 H, $\text{H}_{\text{arilicos}}$); 5,54; 5,36 (s; 1 H c/u; PhCH); 5,20 (t; 1 H; $J_{3,2'}=J_{3,4'}=9,14$ Hz; H-3'); 5,02 (m; 2 H; H-2, H-2'); 4,81 (d; 1 H; $J_{1,2'}=7,34$ Hz; H-1'); 4,40 (d; 1 H; $J_{1,2}=7,9$ Hz; H-1); 4,32 (m; 2 H; H-6a, H-6'a); 4,00 (t; 1 H; $J_{3,2}=J_{3,4}=9,0$ Hz; H-3); 3,75 (m; 2 H; H-4', H-6'b); 3,67 (m; 2 H; H-4, H-6b); 3,49 (s; 3 H; OMe); 3,43 (m, 2H, H-5; H-5'); 2,09; 2,08; 2,04 (3s; 9 H; acetiloxi).

Análisis elemental calculado: $\text{C}_{33}\text{H}_{38}\text{O}_{14}$: %C: 60,18; %H: 5,82.

encontrado: %C: 60,52; %H: 5,85

Desacetilación

Se siguió un procedimiento desarrollado en nuestro laboratorio^[93JCC13]. A una solución del compuesto **27** (300 mg, 0,46 mmoles) en 5 ml de metanol anhidro, se agregó 0,5 ml (5 mmol) trietilamina, se agitó la mezcla en atmósfera de nitrógeno a temperatura ambiente. En el transcurso de 24 h precipitó un sólido blanco; se filtró y se lavó con metanol y se caracterizó como:

Metil (R)-4,6-O-benciliden- β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 3)-(R)-4,6-O-benciliden- β -D-glucopiranosido (28).

220 mg (90 %). Sólido blanco.

Punto de Fusión: 166-168 °C (metanol).

$[\alpha]_{\text{D}}$: -82,9° (c: 0.3; Py).

RMN- ^{13}C (50,1 MHz; Pyd^{d}); δ (ppm): 138,40 (C-1 $_{\text{arilico}}$); 128,88; 128,77; 128,11; 128,02; 126,83; 126,48 (C $_{\text{arilico}}$); 106,32; 105,35 (Ph $\underline{\text{C}}\text{H}$); 101,77; 100,72 (C-1, C-1'); 83,56; 82,01; 79,56; 76,65; 74,79; 74,03; 66,99; 66,73 (C-2, C-3, C-4, C-5, C-2', C-3', C-4', C-5'); 69,00; 68,72 (C-6, C-6'); 56,77 (OMe).

RMN- ^1H (200,1 MHz; Pyd^{d}); δ (ppm): 7,81-7,18 (m, 10 H, $\text{H}_{\text{arilicos}}$); 5,62; 5,56 (s; 2 H; PhCH); 5,34 (d; 1 H; $J_{1,2'}=7,19$ Hz; H-1'); 4,70 (d; 1 H; $J_{1,2}=7,44$ Hz; H-1); 4,60-3,50 (m; 12 H; H-2, 3, 4, 5, 6a,b, 2', 3', 4', 5', 6'a,b); 3,56 (s; 3 H; OMe).

Análisis elemental calculado: $\text{C}_{27}\text{H}_{32}\text{O}_{11}$: %C: 60,88; %H: 6,06.

encontrado: %C: 61,22; %H: 6,08.

2.3.5.a.3.2 Estudios de desacilación parcial. Obtención de derivados convenientemente protegidos

Se siguió un procedimiento desarrollado en nuestro laboratorio^[97AQA87]. A una solución de metil α -D-glucopiranosido (**29**) (112 mg, 0.58 mmoles) y metil 2,3,4,6-tetra-O-acetil- α -D-glucopiranosido (**30**) (420 mg, 1.16 mmoles) en 10 ml de DMF anhidra, se agregó, bajo atmósfera de nitrógeno seco y con agitación, 94 μ l de DBU. Se colocó la mezcla a 40 °C. La reacción se monitoreó por ccd (hexano:acetato de etilo 1:1). Se dejó evolucionar hasta que no se observaron mas cambios por ccd (28 h). Se diluyó con acetato de etilo y se lavó sucesivamente con KHSO₄ 10 % p/v; NaCl 10 % p/v y H₂O. Luego de secar (MgSO₄) y filtrar la fase orgánica, se concentraron por separado ambas fases y se purificaron por columna cromatográfica de sílicagel desarrollada con hexano:acetato de etilo (3:2 v/v) separandose el sustrato de partida y los productos. Se obtuvieron **31** y la mezcla **32** y **33**.

Metil 2,3,6-tri-O-acetil- α -D-glucopiranosido (31).

234 mg (42%). Sólido amorfo.

$[\alpha]_D$: +102,9° (c:0,8; CHCl₃). (bibliografía^[83JCC279] $[\alpha]_D$ +100,8° (c:3,08, CHCl₃), bibliografía^[90CAR67] $[\alpha]_D$: +104° (c:2,3, CHCl₃)).

RMN-¹³C (50,1 MHz; CDCl₃); δ (ppm): 171,40; 171,20; 170,10 (C=O, acetatos); 96,80 (C-1); 72,80 (C-3); 70,60 (C-2); 69,60 (C-5); 69,20 (C-4); 62,80 (C-6); 55,10 (OMe); 20,72; 20,62 (CH₃CO, acetilo).

RMN-¹H (200,1 MHz; CDCl₃, COSY); δ (ppm): 5,23 (dd; 1 H; J_{2,3}=9,8, J_{3,4}=9,2 Hz; H-3); 4,83 (d; 1 H; J_{1,2}=3,7 Hz; H-1); 4,78 (dd; 1 H; H-2); 4,36 (dd; 1 H; J_{6a,5}=4,5, J_{6a,6b}=12,1 Hz; H-6a); 4,30 (dd; J_{6b,5}=2,4 Hz; H-6b); 3,77 (m; 1 H; J_{5,4}=9,9 Hz; H-5); 3,50 (m; 1 H; J_{4,OH}=4,8 Hz; H-4); 3,34 (s; 3 H; OCH₃); 3,16 (d; 1 H; OH); 2,05; 2,02; 2,01 (s; 3 H; acetiloxi).

Acorde a los datos de bibliografía^[90CAR67].

Metil 2,4,6-tri-O-acetil- α -D-glucopiranosido (32) y metil 3,4,6-tri-O-acetil- α -D-glucopiranosido (33).

178 mg (32%) de la mezcla de **32** y **33**.

RMN-¹H (200,1 Mhz; CDCl₃) de la mezcla de **32** y **33**; δ (ppm): 5,16 (t; 1 H; H-3 (**33**)); 4,98 - 4,82 (m; 3 H; H-4 (**33**), H-1, H-4 (**32**)); 4,76 - 4,69 (m; 2 H; H-1 (**33**), H-2 (**32**)); 4,25 - 4,16 (m; 2 H; H-6'(**33**), H-6'(**32**)); 4,11 - 3,81 (m; 5 H; H-6, H-5 (**33**), H-3, H-5, H-6 (**32**)); 3,61 (m; 1 H; H-2 (**33**)); 3,41 (s; 3 H; OCH₃ (**33**)); 3,34 (s; 3 H; OCH₃ (**32**)); 2,61 (m; 1 H; OH); 2,08-1,96 (6s; 3 H c/u; acetiloxi).

2.3.5.b Preparación de derivados aniónicos de laminara-oligosacáridos y de maltosa**2.3.5.b.1 Derivados sulfatados****2.3.5.b.1.1 Diferentes procedimientos empleados en reacciones de sulfatación**

Se adaptaron técnicas descritas en bibliografía^[60BJ478, 83CAR199, 87AQA13, 92CAR245].

A soluciones de **13** y **17** (1 mmol) en 4 ml de solvente anhidro, bajo atmósfera de nitrógeno, en baño de hielo (0 °C), hielo-sal (-10 °C), acetona-CO₂ (-78 °C) o temperatura ambiente y con agitación se agregó el complejo SO₃/amina terciaria (piridina o trietilamina) o ácido clorosulfónico (3; 3,5 o 4 mmoles). También se ensayó el agregado del sustrato disuelto en el solvente anhidro al reactivo sulfatante. Luego se dejó a temperatura ambiente. Las condiciones de reacción fueron:

entrada	sustrato	Solvente	reactivo sulfatante	relación sust:react.	Temp.	Tiempo (h)
1	17	DMF	SO ₃ /NEt ₃	1:4	0 °C	96
2	17	DMF	SO ₃ /Py	1:4	0 °C	24
3	17	Py	SO ₃ /NEt ₃	1:4	0 °C	24
4	17	Py	SO ₃ /Py	1:4	0 °C	24
5	17	Py	SO ₃ /Py	1:4	t.a.	24
6	17	Py	SO ₃ /Py	1:4	-10 °C	24
7	17	Py	SO ₃ /Py	1:4	-78 °C	24
8	13	Py	SO ₃ /Py	1:4	-78 °C	5
9	17	Py	SO ₃ /Py	1:3	-78 °C	72
10	17	Py	SO ₃ /Py	1:3,5	-78 °C	21
11	13	Py	SO ₃ /Py	1:3,5	-78 °C	5
12	17	Py	HSO ₃ Cl	1:3,5	-78 °C	24
13	13	Py	HSO ₃ Cl	1:3,5	-78 °C	5

Se siguió el curso de la reacción por ccd (AcOEt:MeOH 3:1, AcOEt:Py:H₂O 3:2:1 y AcOEt:AcOH:H₂O 3:2:1). En las condiciones descritas en la entrada 1 no se observó reacción por ccd luego de 96 h; en la entrada 2-13 se observó un producto mayoritario por ccd. Los mejores resultados se obtuvieron en las condiciones descritas en las entradas 10, 11, 12 y 13.

La reacción se interrumpió de diferentes formas:

a-Agregado de metanol.

b-Acetilación (con Py y Ac₂O) seguido de agregado de metanol.

c-Neutralización con NaOH 1 M hasta pH: 8-9, dilución con agua y metanol y luego concentración en evaporador rotatorio.

d-Neutralización con Ba(OH)₂ hasta pH: 9, precipitación del exceso de bario con CO₂ (s), filtración y concentración en evaporador rotatorio.

e-Neutralización con Ba(OH)₂ hasta pH: 9, se separó el BaSO₄ por centrifugación y decantación, se concentró en evaporador rotatorio. Se disolvió en agua y se agregó CO₂ (s), se filtró el BaCO₃ y se concentró nuevamente.

En cada caso se realizó espectroscopía de RMN-¹H y ¹³C donde se observaron señales típicas de azúcares sulfatados. Se observó principalmente la señal de C-6 ya que al sulfatarse se desplaza a campos bajos en 3 a 7 ppm respecto del compuesto sin sulfatar.

Al interrumpir la reacción acorde al ítem e la mezcla bruta de reacción dio un espectro con menos impurezas por RMN-¹³C.

Se ensayaron diferentes purificaciones:

- Bio-Gel P-2: el compuesto **17** sulfatado acorde a la tabla (entrada 12); se interrumpió la reacción acorde al ítem c, se realizó un desalado parcial con el gel Bio-Gel P-2 eluyendo con H₂O.

- Columna o placa preparativa de silicagel : los compuestos **13** y **17** sulfatados según las condiciones de entrada 13 y 12 respectivamente e interrumpiendo la reacción acorde al ítem a y posterior purificación en columna de silicagel desarrollada con gradiente de EtOAc:MeOH o placa preparativa en EtOAc:MeOH (3:1 v/v). No se obtuvo separación de los azúcares con distinto grado de sulfatación. Solo se pudo separar el compuesto de partida inalterado de la mezcla de productos sulfatados.

El compuesto **17** fue sulfatado bajo las condiciones indicadas en la entrada 12 de la tabla y se interrumpió la reacción acorde al ítem b, se purificó en columna o placa preparativa de silicagel desarrollada con gradiente de EtOAc:MeOH o EtOAc:MeOH (3:1 v/v) respectivamente. Se obtuvo la separación de **34** y la mezcla de **34a** y **34a'** caracterizados por espectroscopía de RMN-¹³C.

-CLAR: Se adaptaron procedimientos descritos en bibliografía para azúcares sulfatados^[92CAR245]. La mezcla **34a** y **34a'** se cromatografió empleando una columna de fase amino Nucleosil NH₂ (Knauer, 5 mm, 200 x 4 µm) con gradientes de CH₃CN:H₂O; columna de fase nitrilo Econosphere CN (Alltech, 250 x 4,6 mm) con gradientes de AcOEt:MeOH y

columna fase ODS C-18 sílicagel (5 μ m, 250 x 4 mm) con gradiente de H₂O:MeOH. No se logró la separación de la mezcla de isómeros monosulfatados.

-Columna celulosa: el compuesto 17 se sulfató acorde a la entrada 12 de la tabla e interrumpiendo la reacción acorde al ítem c. En ccd de celulosa, el solvente que dió mejores resultados fue butanol:etanol:H₂O 3:1:2 (v/v). Sin embargo, en columna de celulosa desarrollada con dicho solvente no se logró separación.

-Cromatografía de intercambio iónico: Se adaptaron procedimientos descriptos en bibliografía para monosacáridos sulfatados^[76CAR175]. El compuesto 17 fue sulfatado según las condiciones de la entrada 12 de la tabla y se interrumpió la reacción acorde al ítem e. Luego de percolar los productos a través de una columna de DEAE-Sephacel (forma HO⁻) eluyendo con solución de NH₄(OH) 1M, se obtuvieron 100 fracciones de 5 ml y se analizaron por UV a 260 nm. Luego por una columna de DEAE-Sephacel (forma borato) eluída con buffer borato 0,1M (pH 10), de donde se obtuvieron 50 fracciones de 1ml que se analizaron por UV a 260 nm y luego se cromatografiaron por ccd (AcOEt:Py:AcOH:H₂O 4:2,5:0,5:2 v/v). Nuevamente el sistema cromatográfico resultó ineficaz.

-Columna de sílicagel con solventes típicos de cromatografía de partición: Los compuestos 13 y 17 se sulfataron bajo las condiciones de entrada 13 y 12 respectivamente y se interrumpió la reacción acorde al ítem e. Se purificaron en columna de sílicagel eluída con EtOAc:HOAc:H₂O 3:2:1 y se obtuvo la separación de los azúcares monosulfatados y disulfatados. La mezcla de isómeros monosulfatados fue acetilada y purificada en las mismas condiciones anteriores, pero no se logró separarlas.

En todos los casos un primer criterio de pureza de las fracciones obtenidas fue mediante espectros de RMN ¹H y ¹³C.

Metil 2,3,4-tri-O-acetil- α -D-glucopiranosil 6-sulfato de sodio-(1 \rightarrow 4)-2,3-di-O-acetil- β -D-glucopiranosido 6-sulfato de sodio (34), metil 2,3,4-tri-O-acetil- α -D-glucopiranosil 6-sulfato de sodio-(1 \rightarrow 4)-2,3,6-tri-O-acetil β -D-glucopiranosido (34a) y metil 2,3,4,6-tetra-O-acetil- α -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 4)-2,3-tetra-O-acetil- β -D-glucopiranosido 6-sulfato de sodio (34a').

RMN-¹³C (50,1 MHz; D₂O) de 34 y de 34a y 34a': se describen la parte de resultados y discusión (sección 2.2.2.a.1, tabla 2.2.2.a.1.I).

2.3.5.b.1.2 Reacciones de sulfatación directa

Procedimiento general para las reacciones de sulfatación

A soluciones de **12**, **13**, **16** y **17** (1mmol) en piridina anhidra (10ml), se agregó bajo atmósfera de nitrógeno seco, con agitación a $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$, HSO_3Cl (1,75 mmoles por grupo HO primario). Se formó un sólido blanco que se disolvió a temperatura ambiente. La reacción se dejó evolucionar a temperatura ambiente por 24 h y se observaron dos fases. Se siguió el curso de la reacción por ccd (EtOAc:HOAc:H₂O 3:2:1). Se adicionó 1 ml de H₂O y se formó una solución homogénea. Luego se ajustó la solución a pH: 8-9 con Ba(OH)₂ y se procedió acorde al ítem e; se obtuvo **35**, **36** (**36a**), **37** y **38** (**38a** y **38a'**) respectivamente. Los laminara-oligosacáridos precipitaron de acetona. Los productos crudos **36** (**36a**) y **38** (**38a** y **38a'**) fueron purificados a través de una columna cromatográfica (sílicagel, EtOAc:HOAc:H₂O 3:2:1) obteniéndose la separación de los disacáridos monosulfatados y disulfatados; se obtuvo **36** y **36a** para el derivado de laminarabiosa; **39** y la mezcla **39a** y **39a'** para el derivado de maltosa. Los productos se disolvieron en H₂O y se trataron con exceso de resina de intercambio iónico Bio-Rex 70 (tipo carboxílica, forma sodio), se filtró y se concentró en evaporador rotatorio.

Laminara-oligosacárido sulfatado (sal de sodio) (35).

RMN-¹³C (50,1 MHz; D(OH)); δ (ppm): 103,77; 103,55 (C-1, C-1n); 85,46; 76,60; 74,36; 74,11; 68,87 (C-2, C-3, C-4, C-5, C-2n, C-3n, C-4n, C-5n); 68,21* (C-6, C-6n).

*aparece con fase invertida en la secuencia DEPT 135.

En el capítulo de análisis conformacional se muestra el espectro de RMN-¹³C de la mezcla **35** a 500MHz.

Metil β -D-glucopiranosil 6-sulfato de sodio-(1 \rightarrow 3)- β -D-glucopiranosido 6-sulfato de sodio (36) y metil β -D-glucopiranosil 6-sulfato de sodio-(1 \rightarrow 3)- β -D-glucopiranosido (36a).

196,14 mg (35%) de **36**. Sólido cristalino blanco.

$[\alpha]_D$ de **36**: $-7,5^{\circ}$ (c : 0,8; MeOH).

IR. **36**: $\nu_{\text{máx}}$ KBr (cm^{-1}): 3475 (HO); 1253 (S=O); 833 (C-O-S).

RMN-¹³C (50,1 MHz; D(OH)) de **36**; δ (ppm): 103,91; 103,76 (C-1' y C-1); 85,50 (C-3); 76,26; 74,70; 74,27; 73,54; 70,04 (C-2, C-2', C-3', C-5 y C-5'); 68,72 (C-4, C-4'); 67,91* (C-6 y C-6'); 58,23 (OMe).

RMN-¹H (500 MHz; D₂O) de **36**; δ (ppm): 4,77 (d; 1 H; H-1'); 4,45 (d; 1 H; H-1); 4,38 (m; 2 H, H-6a, 6a'); 4,24 (m; 2 H; H-6b, 6b'); 3,78 (t; 1 H; H-3); 3,72 (m; 1 H; H-5); 3,70 (m; 1 H;

H-5'); 3,60 (s; 3 H; OMe); 3,58 (t; 1 H; H-4); 3,56 (t; 1 H; H-3'); 3,52 (t; 1 H; H-4'); 3,50 (t; 1 H; H-2); 3,40 (t; 1 H; H-2').

EMBR (*m/z*) de **36**: fab de iones positivos (matriz tio-tea) 539 [M-Na+2H]⁺, 459 [M-Na+2H-SO₃]⁺.

Análisis elemental de **36**, calculado: C₁₃H₂₂O₁₇Na₂S₂: %C: 27,86; %H: 3,96.

encontrado: %C: 27,51; %H: 3,45.

128 mg (28%) de **36a**. Sólido cristalino blanco.

[α]_D de **36a**: 18,7° (*c*: 0,9; H₂O).

IR. **36a**: ν_{máx} KBr(cm⁻¹): 3475 (HO); 1253 (S=O); 833 (C-O-S).

RMN-¹³C (50,1 MHz; D(OH)) de **36a**; δ (ppm): 104,21; 103,82 (C-1, C-1'); 85,60 (C-3); 76,89; 76,46; 74,60; 73,90 (C-2, C-2', C-3', C-5 y C-5'); 70,48; 70,13 (C-4, C-4'); 67,85* (C-6'); 61,64* (C-6); 58,18 (OMe).

RMN-¹H (500 MHz; D₂O) de **36a**; δ (ppm): 4,75 (d; 1 H; H-1'); 4,44 (d; 1 H; H-1); 4,02 (dd; 1 H; H-6a); 4,35 (dd; 1 H; H-6'a); 4,23 (dd; 1 H; H-6'b); 3,77 (t; 1 H; H-3); 3,74 (dd; 1 H; H-6b); 3,69 (m; 1 H; H-5'); 3,59 (s; 3 H; OMe); 3,57 (t; 1 H; H-4); 3,55 (t; 1 H; H-3'); 3,53 (m; 1 H; H-5); 3,50 (m; 2 H; H-2 y H-4'); 3,39 (t; 1 H; H-2').

Análisis elemental de **36a**, calculado: C₁₃H₂₃O₁₄Na₁S₁: %C: 34,07; %H: 5,06.

encontrado: %C: 33,95; %H: 5,01.

*aparecen con fase invertida en la secuencia DEPT 135.

Metil laminara-oligosacárido sulfatado (sal de sodio) (37).

(70%) de **37**, precipita de acetona. Mezcla solida blanco.

RMN-¹³C (50,1 MHz; D(OH)); δ (ppm): 103,77 (C-1, C-1n); 85,68; 76,8; 74,55; 72,82; 71,00; 69,54 (C-2, C-3, C-4, C-5, C-2n, C-3n, C-4n, C-5n); 68,38 (C-6, C-6n); 58,65 (OCH₃).

Metil α-D-glucopiranosil 6-sulfato de sodio-(1→4)-β-D-glucopiranosido 6-sulfato de sodio (38), metil α-D-glucopiranosil 6-sulfato de sodio-(1→4)-β-D-glucopiranosido (38a) y metil α-D-glucopiranosil-(1→4)-β-D-glucopiranosido 6-sulfato de sodio (38a').

140,1 mg (25%) de **38**. Sólido cristalino blanco.

[α]_D de **38**: +28,6° (*c*: 1,0; MeOH).

IR. **38**: ν_{máx} KBr(cm⁻¹): 3475 (HO); 1253 (S=O); 833 (C-O-S).

RMN-¹³C (50,1 MHz; D(OH)) de **38**; δ (ppm): 104,00 (C-1); 99,93 (C-1'); 77,16 (C-4); 76,36; 73,83; 73,49; 73,26; 72,38; 71,46; 69,52 (C-2, C-3, C-5, C-2', C-3', C-4', C-5'); 67,91*; 67,36* (C-6, C-6'); 58,18 (OMe).

RMN-¹H (500 MHz; D₂O) de **38**; δ (ppm): 5,53 (d; 1 H; H-1'); 4,41 (d; 1 H; H-1); 4,40 (dd; 1 H; H-6a); 4,39 (dd; 1 H; H-6'a); 4,33 (dd; 1 H; H-6'b); 4,24 (dd; 1 H; H-6b); 3,94 (m; 1 H; H-5'); 3,84 (m; 2 H; H-3 y H-5); 3,80 (t; 1 H; H-4'); 3,75 (t; 1 H; H-4); 3,63 (m; 2 H; H-2' y H-3'); 3,61 (s; 3 H; OMe); 3,37 (t; 1 H; H-2).

EMBR (*m/z*) de **38**: fab de iones positivos (matriz tio-tea) 583 [M+Na]⁺, 459 [M-Na+2H-SO₃]⁺.

Análisis elemental de **38**, calculado: C₁₃H₂₂O₁₇Na₂S₂: %C: 27,86; %H: 3,96; %S: 11,44.

encontrado: %C: 27,47; %H: 3,60.

Sólido cristalino blanco.

(30%) de **38a** y **38a'**. Relación **38a** a **38a'** es 1:1 medidas por áreas de los H1' en RMN-¹H.

IR. **38a** y **38a'**: ν_{máx} KBr (cm⁻¹): 3475 (HO); 1253 (S=O); 833 (C-O-S).

RMN-¹³C (50,1 MHz; D(OH)) de **38a** y **38a'**; δ (ppm): 103,97 (C-1 **38a** y **38a'**); 100,68; 100,30 (C-1' **38a** y **38a'**); 78,20; 77,08; 75,40; 73,76; 73,62; 73,51; 72,59; 72,44; 71,68; 70,07 (C-2, C-3, C-4, C-5, C-2', C-3', C-4' y C-5' **38a** y **38a'**); 68,01*; 67,96* (C-6, C-6' **38a** y **38a'**); 61,63*; 61,13* (C-6', C-6 **38a** y **38a'**); 58,11; 58,08 (OMe **38a** y **38a'**).

RMN-¹H (500 MHz; D₂O) de **38a** y **38a'**; δ (ppm): 5,42 (d; 1 H; H-1' **38a'**); 5,34 (d; 1 H; H-1' **38a**); 4,39 (m; 2 H; H-1 **38a** y **a'**); 4,38 (dd; 1 H; H-6a **38a'**); 4,28 (dd; 1 H; H-6'a **38a**); 4,20 (dd; 1 H; H-6'b **38a**); 4,18 (dd; 1 H; H-6b **38a'**); 3,96 (dd; 1 H; H-6a **38a**); 3,86 (dd; 1 H; H-6'a **38a'**); 3,77 (m; 2 H; H-6b **38a** y H-6'b **38a'**); 3,56 (s; 6 H; OMe **38a** y **a'**).

EMBR (*m/z*, %) de **38a** y **38a'**: fab de iones positivos (matriz tio-tea) 573 [M]⁺, se realizó el fab de sobre la mezcla de producto conteniendo bario como contraión.

*aparecen con fase invertida en la secuencia DEPT 135.

2.3.5.b.1.3 Reacciones de sulfatación sobre sustratos convenientemente protegidos

Procedimiento general para las reacciones de sulfatación

En un vial cónico de 10 ml se agregó, bajo atmósfera de nitrógeno, con agitación, 2 ml de piridina anhidra, se adicionó a -30 °C HSO₃Cl (relación ClSO₃H:HO 5:1). Se formó un sólido blanco que se disolvió a temperatura ambiente. Luego de 40 min se agregaron soluciones de **24**, **25**, **26** o **28** (0,160 mmoles) en 2 ml de piridina anhidra. Después de 12 h de reacción a temperatura ambiente se formaron dos fases. Se agregaron 2 ml de agua formándose una solución homogénea y se concentró en evaporador rotatorio codestilando la piridina con exceso de tolueno; el residuo se disolvió en metanol y se trató con exceso de

resina de intercambio iónico Bio-Rex 70 (tipo carboxílica, forma sodio), se filtró y se concentró en evaporador rotatorio. Se obtuvieron 39, 40, 41 y 42 respectivamente. Los compuestos 39, 40 y 41 se purificaron en placa preparativa desarrollado con acetato de etilo:metanol (3:1) y se desorbió con gradientes de acetona:metanol.

Metil 2,3,4-tri-*O*-bencil-β-D-glucopiranosil 6-sulfato de sodio-(1→3)-2,4-di-*O*-bencil-β-D-glucopiranosido 6-sulfato de sodio (39).

129,41 mg (80%). Sólido blanco.

$[\alpha]_D$: -12,5° (*c*: 0,4; MeOH).

IR.: $\nu_{\text{máx}}$ KBr (cm^{-1}): 1248 (S=O); 820 (C-O-S).

RMN-¹³C (50,1 MHz; secuencia DEPT 135; Pyd₅): este espectro se describe en la sección de resultados y discusión (sección 2.2.2.a.3)

RMN-¹H (200,1 MHz; Pyd₅); δ (ppm): 7,55-6,90 (m; 25 H; H_{arilicos}); 4,92 (d; 1H; $J_{1,2}=7,5$ Hz; H-1'); 4,24 - 3,23 (m; 13 H; H-1, 2, 3, 4, 5, 6a,b, 2', 3', 4', 5', 6'a,b); 3,50 (s; 3H; OMe).

EMBR (*m/z*): fab de iones positivos (matriz tio-tea) 1033 [M+Na]⁺, 931 [M+Na-NaSO₃+H]⁺, 829 [M+Na-2NaSO₃+2H]⁺.

Metil 2,3,4-tri-*O*-bencil-β-D-glucopiranosil 6-sulfato de sodio-(1→3)-2,4-di-*O*-bencil-β-D-glucopiranosil 6-sulfato de sodio-(1→3)-2,4-di-*O*-bencil-β-D-glucopiranosido 6-sulfato de sodio (40).

204 mg (86%). Sólido blanco.

$[\alpha]_D$: +1,6° (*c*: 1,3; MeOH).

IR.: $\nu_{\text{máx}}$ KBr (cm^{-1}): 1248 (S=O); 820 (C-O-S).

RMN-¹³C (50,1 MHz; secuencia DEPT 135; Pyd₅); δ (ppm): 129,41-128,34 (C_{arilico}); 103,15; 102,94 (C-1, C-1' y C-1''); 83,38 - 73,62 (C-2, C-4, C-3, C-5, C-2', C-3', C-4', C-5', C-2'', C-3'', C-4'' y C-5''); 74,90 - 74,10 (CH₂ bencilo); 67,35 (C-6, C-6', C-6''); 56,95 (OMe).

Análisis elemental, calculado: C₆₈H₇₃O₂₅Na₃S₃: %C: 56,12; %H: 5,06.

encontrado: %C: 56,15; %H: 5,01.

Metil 2,3,4-tri-*O*-bencil-α-D-glucopiranosil 6-sulfato de sodio-(1→4)-2,3-di-*O*-bencil-β-D-glucopiranosido 6-sulfato de sodio (41).

128 mg (79%). Sólido blanco.

$[\alpha]_D$: +24,1° (*c*: 0,6; MeOH).

IR.: $\nu_{\text{máx}}$ KBr (cm^{-1}): 1248 (S=O); 820 (C-O-S).

RMN-¹³C (50,1 MHz; Pyd₅): este espectro se describe en la sección de resultados y discusión (sección 2.2.2.a.3).

RMN-¹H (200,1 MHz; Pyd₅); δ (ppm): 7,61-7,23 (m; 25 H; H_{arilicos}); 5,12-3,48 (m; 14 H; H-1, 2, 3, 4, 5, 6a,b, 1', 2', 3', 4', 5', 6'a,b); 3,48 (s; 3H; OMe).

EMBR (*m/z*): fab de iones positivos (matriz tio-tea) 1033 [M+Na]⁺, 931 [M+Na-NaSO₃+H]⁺, 829 [M+Na-2NaSO₃+2H]⁺.

Metil (R)-4,6-O-benciliden-β-D-glucopiranosil-(1→3)-(R)-4,6-O-benciliden-β-D-glucopiranosido x-sulfato(42).

Sólido blanco. Se trabajó con la mezcla de compuestos sulfatados.

IR.: ν_{máx} KBr (cm⁻¹): 1248 (S=O); 820 (C-O-S).

RMN-¹³C (50,1 Mhz; D(OH)); δ (ppm) mezcla de productos sulfatados: 139,06 (C-1_{arilico}); 129,76;129,13; 128,99; 128,79 (C_{arilico}); 105,81; 105,57; 105,41; 105,06 (PhCH); 104,84; 104,29; 102,97; 100,96 (C-1, C-1'); 86,27; 82,79; 82,22; 81,47; 81,28; 80,99; 79,85; 78,97; 77,91; 77,59; 74,70; 73,95; 71,12; 70,55 (C-2, C-3, C-4, C-2', C-3', C-4'); 68,58; 68,07 (C-6, C-6'); 66,34 (C-5, C-5'); 58,51; 58,30 (OMe).

2.3.5.b.1.4 Diferentes procedimientos en reacciones de hidrogenólisis

A soluciones de **39** o **41** (0,15 mmoles) en 20 ml de solvente (metanol y/o ácido acético (glc)) fueron tratadas con H₂ (350 kPa o 3500 kPa; aproximadamente 3,4 o 34 atmósferas respectivamente) en presencia del catalizador (Pd 10% o Pd(OH)₂ 20% sobre carbón). La reacción se dejó con agitación a temperatura ambiente. El curso de la reacción se siguió por ccd (acetato de etilo:metanol 3:1). Luego se separó el catalizador por filtración y se concentró el filtrado en evaporador rotatorio. Los resultados se analizaron por RMN ¹H y ¹³C. En el cuadro se detallan las diferentes condiciones ensayadas:

Entrada	Sustrato	catalizador	solvente	presión (atm)	Tiempo de reacción	Resultados
1	41	Pd 10%/C	MeOH	3,4	24 h	no hubo reacción
2	41	Pd(OH) ₂ 20%/C	MeOH	3,4	12 h	no hubo reacción
3	41	Pd(OH) ₂ 20%/C	MeOH	34	5 h	se obtuvo mezcla de mono y disulfato
4	39	Pd(OH) ₂ 20%/C	MeOH	34	5 h	se obtuvo mezcla de mono y disulfato
5	41	Pd(OH) ₂ 20%/C	MeOH:HOAc	3,4	6 h	Se obtuvo 38

Se utilizaron la condiciones de reaccion descriptas en la entrada 5 para las reacciones de hidrogenólisis.

Procedimiento general para las reacciones de hidrogenólisis

A 150 mg de Pd(OH)₂ 20% sobre carbón se suspendieron en 10 ml de HOAc glacial y se agitó la mezcla durante 30 min bajo 210 kPa (aproximadamente 2,1 atm) de H₂; luego se agregaron soluciones de **39**, **40**, **41** y **42** (0,15 mmoles) en 8 ml de metanol:HOAc (3:1). Se dejó reaccionar en un reactor Parr bajo 340 kPa (3,4 atm.) de H₂ a temperatura ambiente, con agitación mecánica durante 5 h, luego de los cuales no se observó producto de partida por ccd (sílicagel, EtOAc:MeOH 3:1). Se separó el catalizador por filtración (embudo de vidrio sinterizado) y se concentró el filtrado en evaporador rotatorio codestilando el HOAc con tolueno. Se obtuvieron **36**, **43**, **38** y **44** respectivamente. Los rendimientos fueron cuantitativos.

Metil β-D-glucopiranosil 6-sulfato de sodio-(1→3)-β-D-glucopiranosido 6-sulfato de sodio (36).

Sólido blanco. El compuesto **36** esta descripto en la seccion 2.3.5.b.1.2.

Metil β-D-glucopiranosil 6-sulfato de sodio-(1→3)-β-D-glucopiranosil 6-sulfato de sodio-(1→3)-β-D-glucopiranosido 6-sulfato de sodio (43).

Sólido blanco.

[α]_D: -5,7° (c: 0,6; MeOH).

IR.: ν_{máx} KBr (cm⁻¹): 3480 (HO); 1253 (S=O); 833 (C-O-S).

RMN-¹³C (50,1 MHz; D(OH)); δ (ppm): 103,79; 103,66; 103,42 (C-1, C-1' y C-1''); 85,41; 85,12 (C-3, C-3'); 76,28; 74,58; 74,24; 73,95; 73,51 (C-2, C-2', C-2'', C-3'', C-5, C-5', C-5''); 70,05; 68,7 (C-4, C-4', C-4''); 67,90 (C-6, C-6' y C-6''); 58,20 (OMe).

RMN-¹H (200,1 Mhz; D₂O); δ (ppm): 4,71 (d; 1 H; J_{1'',2''}=3,5 Hz; H-1''); 4,36 -3,26 (m; 20 H; H-1, 2, 3, 4, 5, 6a,b, 1', 2', 3', 4', 5', 6'a,b, 2'', 3'', 4'', 5'', 6''a,b); 3,49 (s; 3 H; OMe).

Análisis elemental de , calculado: C₁₉H₃₁O₂₅Na₃S₃: %C: 27,68; %H: 3,79.

encontrado: %C: 28,15; %H: 3,98.

Metil α-D-glucopiranosil 6-sulfato de sodio-(1→4)-β-D-glucopiranosido 6-sulfato de sodio (38).

Sólido blanco. El compuesto **38** se encuentra descripto en la seccion 2.3.5.b.1.2.

Metil β-D-glucopiranosil-(1→3)-β-D-glucopiranosido sulfatado (44).

Sólido blanco. Mezcla de azúcares sulfatados en las posiciones 2, 3' y 3'..

IR.: $\nu_{\text{máx}}$ KBr (cm^{-1}): 3480 (HO); 1253 (S=O); 833 (C-O-S).

RMN- ^{13}C (50,1 MHz; D(OH)); δ (ppm): 103,69; 102,87; 102,61(C-1' y C-1); 84,63; 84,51; 84,39; 82,42; 81,42; 79,81; 78,38; 78,28; 76,42; 76,27; 76,09; 72,95; 69,64; 69,43; 69,31; 68,66 (C-2, C-3, C-4, C-5, C-2', C-3', C-4', C-5'); 61,55 (C-6 y C-6'); 58,31 (OMe).

RMN- ^1H (200,1 Mhz; D $_2$ O): se describe y discute en el capítulo de análisis conformacional (sección 3.3.5).

EMBR (m/z): fab de iones positivos (matriz tio): rindió el $[\text{M}+\text{Na}]^+$ correspondiente al derivado di (583 $[\text{M}+\text{Na}]^+$) y trisulfatado (662 $[\text{M}+\text{Na}]^+$).

2.3.5.b.1.5 Determinación de sulfato total

Se determinó el contenido de sulfato en las muestras 35 y 37.

Se hidrolizó el grupo sulfato en los compuestos analizados (HCl 4N; 16 h; 100 °C) y se determinó sulfato por el método colorimétrico descrito en la bibliografía^[71AB471]. Se empleó buffer de cloruro de bario y solución de rodizonato de sodio.

Reactivos: Buffer de cloruro de bario: 10 ml de ácido acético 2 M, 2 ml de cloruro de bario 0,005M y 8 ml de bicarbonato de sodio 0,02 M se llevan a 100 ml con etanol absoluto. Solución de rodizonato: 5 mg de rodizonato de sodio se disuelven en 20 ml de agua, se agregan 100 mg de ácido L-ascórbico agitando hasta disolución y se lleva a 100 ml con etanol.

Procedimiento: A 0,5 ml de una solución conteniendo 2 y 12 μg de sulfato (testigo sulfato de sodio) se agregaron 2,0 ml de etanol; 1,0 ml de buffer de cloruro de bario y 1,5 ml de solución de rodizonato. Se agitó bien y se dejó reposar 10 min. en la oscuridad a temperatura ambiente. Se leyó la absorbancia a 520 nm, determinándose la masa de sulfato total (m_{SO_4}) en las muestras por referencia a una curva patrón preparada simultáneamente (solución patrón de sulfato de sodio, 1 mg/ml). El color rojo es estable durante 30 min.. Se determinó sulfato en las muestras 35 y 37 sin hidrolizar y se restó del valor encontrado después de la hidrólisis (sulfato inorgánico).

El porcentaje de azufre se calculó por la siguiente expresión:

$$\% \text{ S} = m_{\text{SO}_4} \times 32 \times 100 \times (\text{masa de muestra} \times 142)^{-1}$$

El grado de sustitución se calculó por la siguiente ecuación :

$$\text{G. S.} = 162 \times \% \text{ S} (3200 - 103 \times \% \text{ S})^{-1}$$

Los G. S. fueron: muestra 35: G. S.:0,92 y muestra 37: G. S.:0,89.

2.3.5.b.2 Derivados fosfatados

2.3.5.b.2.1 Diferentes procedimientos en reacciones de fosfatación

Se ensayaron diferentes condiciones utilizando como sustrato modelo metil α -D-glucopiranosido (**45**):

P(O)Cl₃/Py:

Método a: Se adaptó la técnica descrita en bibliografía^[95CAR71]. En un balón de 50 ml se agregaron 0,14 ml de oxiclورو de fósforo (1.5 mmoles), 3,24 ml de agua y 30 ml de piridina a 0 °C con agitación. Luego de 5 min se agregó una solución de **45** (870 mg; 4,5 mmoles) en 5 ml de MeCN.

Método b: Se ensayó la reacción disolviendo **45** (4,5 mmoles) en 30 ml de piridina y se agregaron 0,14 ml de oxiclورو de fósforo a 0 °C.

En ambos casos la reacción procedió por 2 h a 0 °C y luego a temperatura ambiente, monitoreándose por ccd. Luego de 12 h no se detectó producto de partida y se agregaron 10 ml de metanol. Se concentraron en evaporador rotatorio. Se purificó en columna de sílicagel (AcOEt:AcOH:H₂O 3:2:1). Por RMN ¹³C se observaron mezclas de productos fosfatados (**46**).

Metil α -D-glucopiranosido fosfatado (46**).**

RMN-¹³C (50,1 MHz; D₂O:H₂O:1:1); δ (ppm): 100,00; 98,39; 97,80 (C-1); 76,78; 73,45; 69,98 (C-2, C-3, C-4, C-5); 66,88 (C-6*); 55,86; 55,09; 55,01 (OMe).

*aparecen con fase invertida en la secuencia DEPT 135.

-(PhCH₂O)₂P(O)Cl /Py:

Reactivo: en un tubo de hidrólisis de 10 ml se agregaron 5 ml de piridina y 0,65 ml de P(O)Cl₃ (7,2 mmoles) a 0 °C. Luego de 10 min se agregó 1,8 ml de BnOH. Se dejó con agitación 1 h a temperatura ambiente. Se corroboró la formación del reactivo por RMN de ¹³C (PhCH₂OP).

A una solución de **45** (1,43 mmoles) en 10 ml de piridina a 0 °C se agregó el reactivo. Luego de 48 h con agitación a temperatura ambiente solo se observó producto de partida.

-(PhO)₂P(O)Cl /NEt₃/DMAP/Py:

Se adaptó un método descrito en bibliografía^[92CAR263]. A una solución de **45** (930 mg; 4,8 mmoles) y 0,005 g (0,41 mmoles) DMAP en 40 ml de piridina anhidra, bajo atmósfera de nitrógeno seco, se agregaron 2,2 ml de TEA y 0,99 ml (4,8 mmoles) de ClP(O)(OPh)₂. Se dejó con agitación a temperatura ambiente. Se siguió el curso de la reacción por ccd

(AcOEt:MeOH 3:1) observándose una única mancha de Rf mayor que el producto de partida luego de 3 días de reacción. Se agregó 1 ml de agua; se concentró en evaporador rotatorio y se purificó en columna de silicagel con gradientes de AcOEt:MeOH. Por RMN de ^{13}C se obtuvo una mezcla de productos fosfatados 47.

Metil α -D-glucopiranosido fosfato de fenilo (47).

RMN- ^{13}C (50,1 MHz; secuencia DEPT 135; $\text{Me}_2\text{CO}-d^6$); δ (ppm): 130,20; 125,81; 120,33; 120,24 ($\text{C}_{\text{arilico}}$); 100,65 (C-1); 74,56; 74,34; 73,20; 72,89; 72,63; 71,24; 71,10; 70,64 (C-2, C-3, C-4, C-5); 69,51; 69,39; 62,11(C-6); 55,10; 55,01 (OMe).

2.3.5.b.2.2 Reacciones de fosfatación sobre sustratos convenientemente protegidos

Procedimiento general para reacciones de fosfatación

Se empleó como método de fosfatación $(\text{PhO})_2\text{P}(\text{O})\text{Cl}/\text{NEt}_3/\text{DMPA}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$. A soluciones de 24 o 26 (128 mg, 0,15 mmoles) en 4,3 ml de CH_2Cl_2 se agregaron a 0°C , bajo atmósfera de nitrógeno seco, TEA (0,15 ml; 1,1 mmoles), DMAP (3,3mg; 0,03 mmoles) y $\text{ClP}(\text{O})(\text{OPh})_2$ (66 μl ; 0,32 mmoles). Se dejó reaccionar a temperatura ambiente con agitación, al resguardo de la luz y se monitoreó la reacción por ccd (acetato de etilo:ciclohexano 3:2). Luego de 12 h de reacción se agregó 0,5 ml de agua, se diluyó con CH_2Cl_2 (30 ml) y se lavó sucesivamente con KHSO_4 al 10% p/v (30 ml), $\text{NaHCO}_3(\text{ss})$ (30 ml) y con NaCl 10% en H_2O p/v (2 x 20 ml); se secó con Na_2SO_4 ; se filtró y se concentró bajo presión reducida. Se purificó por placa preparativa con acetato de etilo:ciclohexano 1:2. Se obtuvieron 48 y 49 respectivamente.

Metil 2,3,4-tri-O-bencil-6-O-difenilfosfonato- β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 3)-2,4-di-O-bencil-6-O-difenilfosfonato- β -D-glucopiranosido (48).

152 mg (80%). Sólido amorfo.

$[\alpha]_{\text{D}}: +12,5^\circ$ (c: 0,8; CHCl_3).

IR.: $\nu_{\text{máx}}$ KBr (cm^{-1}): 1189 (P=O); 1069 (P-O-C).

RMN- ^{13}C (50,1 MHz; CCl_3D); δ (ppm): 150,60 ($\text{C1}_{\text{arilico}}$ de fenilo); 138,95; 138,54; 138,43; 138,08; 137,90 ($\text{C1}_{\text{arilico}}$ de bencilo); 129,83 ($\text{C3}_{\text{arilico}}$ de fenilo); 128,90; 128,74; 128,46; 128,19; 127,86; 127,17 ($\text{C}_{\text{arilico}}$ de bencilo); 125,41 ($\text{C4}_{\text{arilico}}$ de fenilo); 120,32; 120,28; 120,22 ($\text{C2}_{\text{arilico}}$ de fenilo); 104,20; 102,50 (C-1, C-1'); 84,77; 82,99; 82,84; 80,23; 77,38 (C-2; C-3; C-4; C-2'; C-3'; C-4'); 75,73; 75,23; 75,00; 74,64 (CH_2 bencilo*); 73,74; 73,28 (d; $\text{J}_{\text{C,P}}=7,7$; C-5, C-5'); 68,26; 67,74 (d; $\text{J}_{\text{C,P}}=6,9$; C-6, C-6'*); 57,04 (OMe).

RMN-¹H (200,1 MHz; CCl₃D); δ (ppm): 7,5- 7,0 (m; 45 H; H_{arilicos}); 5,10 (d; 1 H; J_{1,2}=7,8 Hz; H-1'); 5,10 - 3,25 (m; 13 H; ; H-1, 2, 3, 4, 5, 6a,b, 2', 3', 4', 5', 6'a,b); 3,50 (s; 3 H; OMe).

EMBR (*m/z*): fab de iones positivos (matriz tio-tea) 1292 [M+Na]⁺.

Metil 2,3,4-tri-O-bencil-6-O-difenilfosfonato-α-D-glucopiranosil-(1→4)-2,3-di-O-bencil-6-O-difenilfosfonato-β-D-glucopiranosido (49).

173 mg (91%). Sólido amorfo.

[α]_D: +33,2° (c: 0,7; CHCl₃).

IR.: ν_{máx} KBr (cm⁻¹): 1190 (P=O); 1072 (P-O-C).

RMN-¹³C (50,1 MHz; CCl₃D); δ (ppm): 150,65 (C_{1arilico} de fenilo); 138,85; 138,64; 138,34; 138,04; 137,91 (C_{1arilico} de bencilo); 129,87 (C_{3arilico} de fenilo); 128,47; 128,06; 127,75; 127,31 (C_{arilico} de bencilo); 126,64; 125,41 (C_{4arilico} de fenilo); 120,34; 120,25; 120,11 (C_{2arilico} de fenilo); 104,13 (C-1); 96,57 (C-1'); 84,28; 81,85; 81,63; 79,21; 77,04; 73,15; 72,56; 70,70 (C-2, C-3, C-4, C-2', C-3', C-4'); 75,55; 75,22; 74,56; 73,76; 73,42 (CH₂ bencilo*); 73,13; 72,44; 70,83; 70,68 (d; J_{C,P}=4,07 y 2,71; C-5, C-5'); 67,87 y 67,64 (d; J_{C,P}=4,07 y 2,71; C-6* y C-6'*); 56,67 (OMe).

*aparece invertido en la secuencia DEPT 135.

RMN-¹H (200,1 MHz; CCl₃D); δ (ppm): 7,3 - 7,1 (m; 45 H; H_{arilicos}); 5,66 (d; 1 H; J_{1,2}=3,6 Hz; H-1'); 4,40 (d; 1 H; J_{1,2}=7,6 Hz; H-1); 5,10 - 3,30 (m; 12 H; H-2, 3, 4, 5, 6a,b, 2', 3', 4', 5', 6'a,b); 3,57 (s; 3 H; OMe).

EMBR (*m/z*): fab de iones positivos (matriz tio-tea) 1292 [M+Na]⁺, 1217 [M+Na-Ph+H]⁺.

2.3.5.b.2.3 Reacciones de hidrogenólisis

Hidrogenólisis de gupos bencilos

Pd(OH)₂ 20% sobre carbón (200 mg) se suspendieron en 10 ml de MeOH y la mezcla se agitó durante 30 min bajo 210 kPa (aproximadamente 2,1 atm) de H₂; luego se agregaron soluciones de 48 y 49 (140 mg, 0,11 mmoles) en 8 ml de EtOAc. Se dejó reaccionar en un autoclave de baja presión a 210 kPa por 12 h. Como la hidrogenólisis era parcial, luego se colocó a alta presión bajo 3400 kPa (aproximadamente 34 atm.) de H₂ a temperatura ambiente, con agitación magnética durante 5 h; luego de los cuales no se observó producto de partida por ccd (sílicagel, EtOAc:MeOH 5:1). Se separó el catalizador por filtración (embudo

de placa sinterizada) y se concentró el filtrado en evaporador rotatorio. Se obtuvieron **50** y **51** respectivamente. El rendimiento para cada producto fue cuantitativo.

Metil β-D-glucopiranosil 6-fosfato de fenilo-(1→3)-β-D-glucopiranosido 6-fosfato de fenilo (50).

Aceite traslúcido incoloro.

RMN-¹³C (50,1 MHz; D(OH)); δ (ppm): 150,80 (C₁_{arilico} de fenilo); 130,72 (C₃_{arilico} de fenilo); 125,25 (C₄_{arilico} de fenilo); 121,08 (C₂_{arilico} de fenilo); 103,73 (C-1' y C-1); 85,84; 76,32; 74,34; 73,43; 70,08; 68,86 (C-2, C-4, C-3, C-5, C-2', C-3', C-4' y C-5'); 65,86 (C-6 y C-6'*); 58,12 (OMe).

Metil α-D-glucopiranosil 6-fosfato de fenilo-(1→4)-β-D-glucopiranosido 6-fosfato de fenilo(51).

Aceite traslúcido incoloro.

RMN-¹³C (50,1 MHz; D(OH)); δ (ppm): 150,90 (C₁_{arilico} de fenilo); 130,66 (C₃_{arilico} de fenilo); 125,13 (C₄_{arilico} de fenilo); 121,03 (C₂_{arilico} de fenilo); 103,84 (C-1); 99,94 (C-1'); 77,11; 76,89; 74,13; 73,84; 73,42; 72,49; 69,53 (C-2, C-4, C-3, C-5, C-2', C-3', C-4' y C-5'); 66,04; 65,32 (d; J_{C,P}=2,0; C-6 y C-6'*); 58,07 (OMe).

*aparece invertido en la secuencia DEPT 135.

Hidrogenólisis de fenilos

Se adaptaron técnicas descritas en bibliografía^[56JA1659, 56JA2336].

Método a: A soluciones del compuesto **50** o **51** (90,3 mg, 0,11 mmoles) en 10 ml de metanol se agregaron 30 mg de catalizador de Adams y 100 mg de Bio-Rex 70 (tipo carboxílica, forma sodio). Se dejó reaccionar a una presión de 350 kPa (aproximadamente 3,4 atm.) de H₂ a temperatura ambiente, con agitación mecánica, luego de 24 h, por análisis por ccd no se observó reacción (sílicagel, EtOAc:MeOH 5:1).

Método b: A soluciones del compuesto **50** o **51** (90,3 mg, 0,11 mmoles) en 7 ml de HOAc y 7 ml de metanol, se agregaron 30 mg de catalizador de Adams, se dejó reaccionar bajo una presión de 350 kPa (aproximadamente 3,4 atm.) de H₂ a temperatura ambiente, con agitación mecánica durante 5 h, luego de los cuales no se observó producto de partida por ccd (sílicagel, EtOAc:MeOH 1:1). Se separó el catalizador por filtración (embudo de placa porosa) y se concentró el filtrado en evaporador rotatorio, codestilando el HOAc con tolueno. El residuo se disolvió en metanol y se trató con exceso de resina de intercambio iónico Bio-Rex 70 (tipo carboxílica, forma sodio), se filtró y se concentró en evaporador rotatorio. Se obtuvieron **52** y **53** respectivamente. Los rendimientos fueron cuantitativos.

Metil β-D-glucopiranosil 6-fosfato de sodio-(1→3)-β-D-glucopiranosido 6-fosfato de sodio (52).

Sólido blanco.

$[\alpha]_D$: -7,5° (c: 1; H₂O).

IR.: $\nu_{\text{máx}}$ KBr (cm⁻¹): 3401 (OH); 1119 (P=O); 981 (P=O).

RMN-¹³C (50,1 MHz; D(OH)); δ (ppm): este espectro se describe en la sección de resultados y discusión (sección 2.2.2.b.3).

RMN-¹H (500 MHz; D₂O); δ (ppm): 4,77 (d; 1 H; H-1'); 4,40 (d; 1 H; H-1); 4,01 (m; 3 H; H-6a, H-4', H-6'a); 3,78 (t; 1 H; H-3); 3,66 (m; 2 H; H-4, H-6b); 3,59 (t; 1 H; H-3'); 3,58 (dd; 1 H; H-6'b); 3,57 (s; 3 H; OMe); 3,50 (m; 2 H; H-2; H-5'); 3,48 (m; 1 H; H-5); 3,38 (t; 1 H; H-2').

EMBR (*m/z*): fab de iones positivos (matriz tio-tea) 627 [M+Na]⁺; 605 [M+H]⁺.

Análisis elemental, calculado: C₁₃H₂₂O₁₇P₂Na₄: %C: 25,84; %H: 3,67.

encontrado: %C: 26,32; %H: 3,80.

Metil α-D-glucopiranosil 6-fosfato de sodio-(1→4)-β-D-glucopiranosido 6-fosfato de sodio (53).

Sólido blanco.

$[\alpha]_D$: +16,6° (c: 0,8; H₂O).

IR.: $\nu_{\text{máx}}$ KBr (cm⁻¹): 3403 (OH); 1150 (P=O); 990 (P=O).

RMN-¹³C (50,1 MHz; D(OH)); δ (ppm): este espectro se describe en la sección de resultados y discusión (sección 2.2.2.b.3).

RMN-¹H (300 MHz; D₂O); δ (ppm): 5,48 (d; 1 H; H-1'); 4,40 (d; 1 H; H-1); 4,10 (dd; 1 H; H-6a); 3,93 (dd; 1 H; H-6b); 3,85 (m; 3 H; H-5', H-6'a, H-6'b); 3,8 (t; 1 H; H-3); 3,77 (t; 1 H; H-3'); 3,72 (m; 2 H; H-4, H-5); 3,60 (dd; 1 H; H-2'); 3,58 (t; 1 H; H-4'); 3,58 (s; 3 H; OMe); 3,30 (t; 1 H; H-2).

EMBR (*m/z*): fab de iones positivos (matriz tio-tea) 627 [M+Na]⁺; 605 [M+H]⁺.

Análisis elemental, calculado: C₁₃H₂₂O₁₇P₂Na₄: %C: 25,84; %H: 3,67.

encontrado: %C: 26,35; %H: 3,60.

2.3.5.b.3 Derivados succinilados

2.3.5.b.3.1 Reacciones de succinilación sobre sustratos convenientemente protegidos

Procedimiento general para reacciones de succinilación

Se siguió la técnica descrita por Vermeersch y Schacht^[86MAC125]. En un vial de 5 ml se pesaron, bajo atmósfera de nitrógeno, 149mg (0,19 mmoles) de **24** y **26**; 92.8 mg (0,93 mmoles) de anhídrido succínico y 24 mg (0.19 mmoles) de DMAP. A la mezcla sólida se le agregó 0,7 ml de DMF, se dejó reaccionar durante 2 días con agitación a temperatura ambiente, bajo atmósfera de nitrógeno. La reacción se monitoreó por ccd (sílicagel, MeOH). Se diluyó con acetato de etilo (30 ml) y se lavó con KHSO₄ al 10% p/v, se secó con Na₂SO₄; se filtró y se concentró bajo presión reducida. El residuo de evaporación se trató con exceso de resina de intercambio iónico Bio-Rex 70 (tipo carboxílica, forma sodio), se filtró y se concentró en evaporador rotatorio. Se purificó en placa preparativa con MeOH. Se obtuvieron **54** y **55** respectivamente.

Metil 2,3,4-tri-O-bencil-β-D-glucopiranosil 6-succinato de sodio-(1→3)-2,4-di-O-bencil-β-D-glucopiranosido 6-succinato de sodio (54).

169 mg (85%). Sólido blanco.

[α]_D: +6,1° (c: 0,4; MeOH).

IR.: ν_{máx} KBr (cm⁻¹): 1740 (C=O ester); 1610 (COO⁻).

RMN-¹³C (50,1 MHz; Pyd₅): este espectro se describe en la sección de resultados y discusión (sección 2.2.2.c.1).

EMBR (m/z): fab de iones positivos (matriz tio-tea) 1073 [M+Na]⁺; 1051 [M+H]⁺; 1029 [M-Na+2H]⁺; 951 [M-anh. succinico+H]⁺; 929 [M-Na+2H-anh. succinico]⁺.

Metil 2,3,4-tri-O-bencil-α-D-glucopiranosil 6-succinato de sodio-(1→4)-2,3-di-O-bencil-β-D-glucopiranosido 6-succinato de sodio (55).

164 mg (82%). Sólido blanco.

[α]_D: +43,8° (c: 0,4; MeOH).

IR.: ν_{máx} KBr (cm⁻¹): 1736 (C=O ester); 1608 (COO⁻)

RMN-¹³C (50,1 MHz; Pyd₅): este espectro se describe en la sección de resultados y discusión (sección 2.2.2.c.1).

RMN-¹H (200,1 MHz; Pyd₅); δ (ppm): 7,6 - 7,2 (m; 25 H; H_{arilicos}); 5,83 (d; 1 H; J_{1,2}=3 Hz; H-1'); 5,25-3,50 (m; 12H; H-2, 3, 4, 5, 6a,b, 2', 3', 4', 5', 6'a,b); 3,57 (s; 3 H; OMe); 3,00 (8 H; H_{alquilticos}).

EMBR (m/z): fab de iones positivos (matriz tio-tea) 1073 [M+Na]⁺; 1051 [M+H]⁺; 1029 [M-Na+2H]⁺; 951 [M-anh. succinico+H]⁺; 929 [M-Na+2H-anh. succinico]⁺.

2.3.5.b.3.2 Reacciones de hidrogenólisis

Pd(OH)₂ 20% sobre carbón (150 mg) se suspendieron en 6 ml de MeOH y se agitó la mezcla durante 30 min bajo 210 kPa (aproximadamente 2,1 atm) de H₂; luego se agregaron soluciones de **54** y **55** (150 mg, 0,14 mmoles) en 8 ml de HOAc (g). Se dejó reaccionar en primer lugar en un equipo de bajas presiones a 240KPa después de 12 h la reacción no se completó, luego se colocó en un autoclave de alta presión bajo 40 atm. de H₂ a temperatura ambiente, con agitación magnética durante 6 h, luego de los cuales no se observó producto de partida por ccd (silicagel, EtOAc:MeOH 3:1). Se separó el catalizador por filtración (embudo de placa porosa); se agregó resina Dowex w 50 (H⁺), se dejó reaccionar por 60 min.; se filtró; se concentró en evaporador rotatorio codestilando el HOAc con exceso de tolueno. El residuo se trató con exceso de resina de intercambio iónico Bio-Rex 70 (tipo carboxílica, forma sodio), se filtró y se concentró en evaporador rotatorio. Se obtuvieron **56** y **57** respectivamente. Los rendimientos fueron cuantitativos.

Metil β-D-glucopiranosil 6-succinato de sodio-(1→3)-β-D-glucopiranosido 6-succinato de sodio (56).

Sólido blanco.

[α]_D: -2,9° (c: 0,6; H₂O).

IR.: ν_{máx} KBr (cm⁻¹): 3432 (OH); 1740 (C=O ester); 1571 (COO⁻); 1439 (COO⁻).

RMN-¹³C (50,1 MHz; D(OH)): este espectro se describe en la sección de resultados y discusión (sección 2.2.2.c.2).

RMN-¹H (500 MHz; D₂O); δ (ppm): 4,73 (d; 1 H; H-1'); 4,41 (d; 1 H; H-1); 3,93 (m; 2 H; H-6a, H6'a); 3,74 (dd; 1 H; H-6b); 3,74 (t; 1 H; H-3); 3,71 (dd; 1 H; H-6'b); 3,51 (m; 2 H; H-5'; H-3'); 3,60 (s; 3 H; OMe); 3,47 (m; 3 H; H-2; H-4; H-5); (t; 1 H; H-4); 3,38 (t; 1 H; H-4'); 3,37 (t; 1 H; H-2');); 2,50 (t; 6 H; H_{alquílicos}); 2,60 (t; 6 H; H_{alquílicos}).

EMBR (m/z): fab de iones positivos (matriz tio-tea) 623 [M+Na]⁺; 557 [M+3H-2Na]⁺.

Análisis elemental, calculado: C₂₁H₃₀O₁₇Na₂: %C: 42,01; %H: 5,04.

encontrado: %C: 41,82; %H: 4,90.

Metil α-D-glucopiranosil 6-succinato de sodio-(1→4)-β-D-glucopiranosido 6-succinato de sodio (57).

Sólido blanco.

[α]_D: +8,7° (c: 0,4; H₂O).

IR.: ν_{máx} KBr (cm⁻¹): 3425 (OH); 1736 (C=O ester); 1580 (COO⁻); 1441 (COO⁻).

RMN-¹³C (50,1 MHz; D(OH)): este espectro se describe en la sección de resultados y discusión (sección 2.2.2.c.2).

RMN-¹H (500 MHz; D₂O); δ (ppm): 5,39 (d; 1 H; H-1'); 4,39 (d; 1 H; H-1); 3,95 (dd; 1 H; H-6a); 3,86 (dd; 1 H; H-6'a); 3,77 (dd; 1 H; H-6'b); 3,71 (dd; 1 H; H-6b); (m; 1 H; H-5'); 3,79 (t; 1 H; H-3); 3,70 (m; 2 H; H-3'; H-5'); 3,63 (m; 2 H; H-4; H-5); 3,59 (t; 1 H; H-2'); 3,58 (s; 3 H; OMe); 3,31 (t; 1 H; H-2); 3,43 (t; 1 H; H-4'); 2,47 (t; 6 H; H_{alquílicos}); 2,60 (t; 6 H; H_{alquílicos}).

EMBR (*m/z*, %): fab de iones negativos (matriz tea) 555 [M+H-2Na]⁻; 277 [M -2Na]²⁻.

Análisis elemental, calculado: C₂₁H₃₀O₁₇Na₂: %C: 42,01; %H: 5,04.

encontrado: %C: 41,94; %H: 5,01.

2.3.5.b.4 Derivados de ácidos urónicos

2.3.5.b.4.1 Reacciones de oxidación sobre sustratos convenientemente protegidos

Procedimiento general para reacciones de oxidación

Se siguió la técnica descrita en la literatura^[83JOC1469, 83JOC4404, 87BCJ1529].

Oxidación: A una solución de **24** o **26** (129 mg, 0,16 mmoles) en 5 ml de acetona manteniendo la temperatura en 0 °C, se agregó gota a gota 0,37 ml de una solución de reactivo de Jones, preparada a partir de 83 mg (0,83 mmoles) de Cr₂O₃ y 0,37 ml (1,28 mmoles) de H₂SO₄ 3,5 M. Se dejó reaccionar a temperatura ambiente, con agitación. Se siguió el curso de la reacción por ccd (CH₂Cl₂:MeOH 1:1). Al cabo de 4 h se volcó sobre hielo:agua (1:1) y se extrajo con CH₂Cl₂ (3 x 20 ml); se secó con Na₂SO₄, se filtró y se concentró.

Esterificación: El residuo se disolvió en 6 ml de DMF. Se adicionó K₂CO₃ (139 mg; 1 mmol), tBu₄NI (295 mg, 0,8 mmoles) y bromuro de bencilo (0,06 ml, 0,48 mmoles) a temperatura ambiente con agitación. Al cabo de 24 h no se observó compuesto de partida ccd (ciclohexano: AcOEt 8:2). Se extrajo con CH₂Cl₂ (3 x 20 ml); se secó con Na₂SO₄, se filtró y se concentró. Se purificó en columna de silicagel con gradientes de ciclohexano:AcOEt. Se obtuvieron **58** y **59** respectivamente.

(2,3,4-tri-O-bencil-β-D-glucopiranosil)uronato de bencilo-(1→3)-(metil 2,4-di-O-bencil-β-D-glucopiranosil)uronato de bencilo (58).

114 mg (70%). Sólido blanco.

[α]_D: -10,9° (c: 0,4; CHCl₃).

IR.: $\nu_{\text{máx}}$ KBr (cm^{-1}): 1750 (C=O, ester)

RMN- ^{13}C (50,1 MHz; CDCl_3): este espectro se describe en la sección de resultados y discusión (sección 2.2.2.d.1).

RMN- ^1H (200,1 MHz; CDCl_3); δ (ppm): 7,38 - 7,06 (m; 40 H; $\text{H}_{\text{arílicos}}$); 5,19; 5,05 (2 s; 2 H c/u; PhCH_2COO); 5,01 - 4,67 (m, 10 H, PhCH_2O); 4,50 (d; 1H; $J_{1,2}=10$ Hz; H-1'); 4,50 - 3,40 (m, 8 H, H-2, H-3, H-4, H-5, H-2', H-3', H-4', H-5'); 4,30 (d; 1H; $J_{1,2}=8$ Hz; H-1); 3,52 (s; 3H; OMe).

EMBR (m/z): fab de iones positivos (matriz tio-tea) 1038 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

(2,3,4-tri-O-bencil- α -D-glucopiranosil)uronato de bencilo-(1 \rightarrow 4)-(metil 2,3-di-O-bencil- β -D-glucopiranosil)uronato de bencilo (59).

121 mg (75%). Sólido blanco.

$[\alpha]_{\text{D}}$: +3,1 $^\circ$ (c: 1,5; CHCl_3).

IR.: $\nu_{\text{máx}}$ KBr (cm^{-1}): 1750 (C=O, ester).

RMN- ^{13}C (50,1 MHz; CDCl_3): este espectro se describe en la sección de resultados y discusión (sección 2.2.2.d.1).

RMN- ^1H (200,1 MHz; CDCl_3); δ (ppm): 7,41 - 7,16 (m; 40 H; $\text{H}_{\text{arílicos}}$); 5,58 (d; 1 H; $J_{1,2}=3,4$ Hz; H-1'); 5,16; 4,49 (2 s; 2 H c/u; PhCH_2COO); 5,31 - 3,63 (m; 19 H; PhCH_2O , H-1, H-2, H-3, H-4, H-5, H-2', H-3', H-4', H-5'); 3,61 (s; 3H; OMe).

EMBR (m/z , %): fab de iones positivos (matriz tio-tea) 1038 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

2.3.5.b.4.2 Reacciones de hidrogenólisis

Procedimiento general para reacciones de hidrogenólisis

$\text{Pd}(\text{OH})_2$ 20% sobre carbón (150 mg) se suspendieron en 5 ml de AcOH y se agitó la mezcla durante 30 min bajo 210 kPa (aproximadamente 2,1 atm) de H_2 ; luego se agregaron soluciones de **58** y **59** (102 mg; 0,10 mmoles) en 10 ml de HOAc (g). Se dejó reaccionar en un equipo Parr bajo 340 kPa (aproximadamente 3,4 atm) de H_2 a temperatura ambiente, con agitación magnética durante 14 h, luego de los cuales no se observó producto de partida por ccd (sílicagel, EtOAc:MeOH 9:1). Se separó el catalizador por filtración (embudo de placa porosa), se agregó resina Dowex w 50 (H^+), se dejó reaccionar por 60 min.; se filtró y se concentró en evaporador rotatorio codestilando el HOAc con exceso de tolueno. El residuo se disolvió en agua y se trató con exceso de resina de intercambio iónico Bio-Rex 70 (tipo

carboxílica, forma sodio), se filtró y se concentró en evaporador rotatorio. Se obtuvieron **60** y **61** respectivamente. Los rendimientos fueron cuantitativos.

(β-D-glucopiranosil)uronato de sodio-(1→3)-(metil β-D-glucopiranosil)uronato de sodio (60).

Sólido blanco.

$[\alpha]_D$: -30,3° (c: 1; H₂O).

IR.: $\nu_{\text{máx}}$ KBr (cm⁻¹): 3450 (OH), 1560 (COO⁻).

RMN-¹³C (50,1 MHz; D(OH)): este espectro se describe en la sección de resultados y discusión (sección 2.2.2.d.2).

RMN-¹H (500 MHz; D₂O); δ (ppm): 4,78 (d; 1 H; $J_{1,2}$ =7,7 Hz; H-1'); 4,40 (d; 1 H; $J_{1,2}$ =8,0 Hz; H-1); 3,78 (t; 1 H; H-3); 3,73 (d; 2 H; H-5; H-5'); 3,61 (t; 1 H; H-4); 3,60 (s; 3 H; OMe); 3,51 (m; 2 H; H-3'; H-4'); 3,50 (t; 1 H; H-2); 3,39 (t; 1 H; H-2').

EMBR (m/z , %): fab de iones positivos (matriz tio-tea) 451 [M+Na]⁺.

Análisis elemental, calculado: C₁₃H₁₈O₁₃Na₂: %C: 36,46; %H: 4,24.

encontrado: %C: 36,03; %H: 4,12.

(α-D-glucopiranosil)uronato de sodio-(1→4)-(metil β-D-glucopiranosil)uronato de sodio (61).

Sólido blanco.

$[\alpha]_D$: +24,5° (c: 2; H₂O).

IR.: $\nu_{\text{máx}}$ KBr (cm⁻¹): 3448 (OH), 1560 (COO⁻).

RMN-¹³C (50,1 MHz; D(OH)): este espectro se describe en la sección de resultados y discusión (sección 2.2.2.d.2).

RMN-¹H (500 MHz; D₂O); δ (ppm): 5,54 (d; 1 H; $J_{1,2}$ =3 Hz; H-1'); 4,38 (d; 1 H; $J_{1,2}$ =7,8 Hz; H-1); 3,97 (d; 1 H; H-5'); 3,81 (t; 1 H; H-3); 3,80 (d; 1 H; H-5); 3,78 (t; 1 H; H-4); 3,72 (t; 1 H; H-3'); 3,59 (s; 3 H; OMe); 3,55 (t; 1 H; H-2'); 3,42 (t; 1 H; H-4'); 3,34 (t; 1 H; H-2).

EMBR (m/z , %): fab de iones positivos (matriz tio-tea) 451 [M+Na]⁺.

Análisis elemental, calculado: C₁₃H₁₈O₁₃Na₂: %C: 36,46; %H: 4,24.

encontrado: %C: 35,99; %H: 4,04.

BIBLIOGRAFÍA

AB	Analyt. Biochem.	JA	J. Am. Chem. Soc.
AC	Angew. Chem.	JC	J. Chromatogr.
ACC	Adv. Carbohydr. Chem.	JCC	J. Carbohydr. Chem.
AJC	Aust. J. Chem.	JCP	J. Chem. Soc. Perkin Trans II
ANN	Ann.	JCS	J. Chem. Soc. Perkin Trans I
AQA	Anales de la Asoc. Quím. Argentina.	JOC	J. Org. Chem.
B	Ber.	JP	J. Pharmacobio Dynamics
BCJ	Bull. Chem. Soc. Jpn.	MA	Macromolecules
BJ	Biochem. J.	MAC	Makromol. Chem.
BMC	Bioorg. Med. Chem.	MCC	Methods in Carbohydr. Chem.
CAR	Carbohydr. Res.	OPP	Organic Prepn. Proc. Int.
CB	Chem. Ber.	RTC	Rec. Trav. Chim.
CCC	Coll. Czechoslovak. Chem. Commun.	T	Tetrahedron
CIM	Clin. Immunother.	TL	Tetrahedron Lett.
CJC	Can J. Chem.		

- 15JA1276 C. S. Hudson and J. M. Johnson, *J. Am. Chem. Soc.*, **1915**, 37, 1276.
- 40RTC1123 P. E. Verkade, W. D. Cohen y A. K. Vroege, *Rec. Trav. Chim.*, **1940**, 59, 1123.
- 45JCS382 F. Atherton, H. Openshw y A Todd, *J. Chem. Soc.*, **1945**, 382.
- 49JA3175 M. L. Wolfrom y H. B. Wood Jr, *J. Am. Chem. Soc.*, **1949**, 71, 3175.
- 52JCS1243 P. Bachli and E. G. V. Percival, *J. Chem. Soc.*, **1952**, 1243.
- 53ANN106 B. Helferich and W. Speicher, *Ann.*, **1953**, 579, 106.
- 55CJC1097 A. O'Neill, *Can. J. Chem.*, **1955**, 33, 1097.
- 56JA1659 C. Ballou y H. Fischer, *J. Am. Chem. Soc.*, **1956**, 78, 1659.
- 56JA2336 B. Griffin y A. Burger, *J. Am. Chem. Soc.*, **1956**, 78, 2336.
- 56JCS3459 A. M. Michelson y A. Todd, *J. Chem. Soc.*, **1956**, 3459.
- 60BJ478 A. G. Lloyd, *Biochem. J.*, **1960**, 75, 478.
- 60JCS4761 S. Peat, J. Turvey, M. Clancy y T. Williams, *J. Chem. Soc.*, **1960**, 4761.
- 61JOC1248 K. B. Guiseley y P. M. Ruoff, *J. Org. Chem.*, **1961**, 26, 1248.
- 62JCS2119 J. R. Turvey y T. P. Williams, *J. Chem. Soc.*, **1962**, 2119.
- 62JCS4770 J. G. Buchanan y J. C. P. Schwarz, *J. Chem. Soc.*, **1962**, 4770.

- 62MCC211 M. L. Wolfrom y J. Thompson, *Methods in Carbohydr. Chem.*, **1962**, 2, 211.
- 62MCC326 G. N. Bollenbach, *Methods in Carbohydr. Chem.*, **1962**, 2, 326.
- 62MCC328 V. Barry y J. Mc Cormick, *Methods in Carbohydr. Chem.*, **1962**, 1, 328.
- 62MCC330 W. Whelan, *Methods in Carbohydr. Chem.*, **1962**, 1, 330.
- 63JCS3970 D. R. Strobach y L. Szabo, *J. Chem. Soc.*, **1963**, 3970.
- 63MCC168 G. R. Barker, *Methods in Carbohydr. Chem.*, **1963**, 2, 168.
- 63MCC211 M. L. Wolfrom and A. Thompson, *Methods in Carbohydr. Chem.*, **1963**, 2, 211-215.
- 65ACC183 J. Turvey, *Adv. Carbohydr. Chem.*, **1965**, 21, 183.
- 65JOC3387 D. Horton y W. N. Turner, *J. Org. Chem.*, **1965**, 30, 3387.
- 66CJC1094 G. Dutton y K. Slessor, *Can J Chem.*, **1966**, 44, 1094.
- 66JOC2227 M. L. Wolfrom, Y. L. Hung, P. Chakravarty, G. U. Yuen and D. Horton, *J. Org. Chem.*, **1966**, 31, 2227.
- 67JOC656 M. L. Wolfrom and K. Koizumi, *J. Org. Chem.*, **1967**, 32, 656.
- 70JA5834 G. Quigley, A. Sarko y H. Marchessault, *J. Am. Chem. Soc.*, **1970**, 92, 834.
- 70TL1521 M. Wakselman, E. Guibe-Jampe, *Tetrahedron Lett.*, **1970**, 1521.
- 71AB471 T. Terho y K. Hartiala, *Analyt. Biochem.*, **1971**, 41, 471.
- 72CAR420 K. Nagasawa, H. Harada, S. Hayashi y T. Misawa, *Carbohydr. Res.*, **1972**, 21, 420.
- 73JCS2425 T. Usui, N. Yamaoka, K. Matsuda, K. Tuzimura and S. Seto, *J. Chem. Soc. Trans. Perkin I*, **1973**, 2425.
- 74CAR105 T. Usui, M. Yokoyama, N. Yamaoka y K. Tuzimura, *Carbohydr. Res.*, **1974**, 33, 105.
- 74JCS88 P. Durette, L. Hough y A. Richardson, *J. Chem. Soc. Trans. Perkin I*, **1974**, 88.
- 76ACC11 A. H. Haines, *Adv. Carbohydr. Chem*, **1976**, 33, 11.
- 76CAR175 P. F. Forrester, P. F. Lloyd y C. H. Stuart, *Carbohydr. Res.*, **1976**, 49, 175.
- 77CAR299 A. Parfondry, N. Cyr y A. Perlin, *Carbohydr. Res.*, **1977**, 59, 299.
- 77CJC604 G. Buchanan y J. Bowen, *Can J. Chem.*, **1977**, 55, 604.
- 77JC305 J. Thiem, A. Sievers y H. Karl, *J. Chromatogr.*, **1977**, 130, 305.
- 78AC602 G. Hofle, W. Steglich, H. Vorbruggen, *Angew. Chem.*, **1978**, 90, 602.
- 79BJ387 N. Miam, C. Anderson y P. Kent, *Biochem. J.*, **1979**, 181, 387.
- 79CAR245 K. Takeo, *Carbohydr. Res.*, **1979**, 77, 245.
- 79CB1046 J. Thiem y H. Karl, *Chem. Ber.*, **1979**, 112, 1046.

- 79TL95 S. K. Chaudhary y O. Hernandez, *Tetrahedron Lett*, **1979**, 2, 95.
- 81CAR157 K. Takeo, *Carbohydr. Res.*, **1981**, 93, 157.
- 81CAR177 P. Archibald, M. Fenn y A. Roy, *Carbohydr. Res.*, **1981**, 93, 177.
- 81T2363 T. Ogawa y M. Matsui, *Tetrahedron*, **1981**, 37, 2363.
- 82JCC311 M. Sharma y W. Korytnyk, *J. Carbohydr. Chem.*, **1982**, 1, 311.
- 83B1264 F. Beilstein y E. Wiegand, *Ber.*, **1983**, 16, 1264.
- 83CAR199 K. Inoue, K. Kawamoto, H. Nakajima, M. Kohno, S. Kadoya y D. Mizuno, *Carbohydr. Res.*, **1983**, 115, 199.
- 83JCC279 R. Albert, K. Dax, A. Stutz y H. Weidmann, *J. Carbohydrate Chemistry*, **1983**, 2, 279.
- 83JOC1469 H. Schmidhammer y A. Brossi, *J. Org. Chem.*, **1983**, 48, 1469.
- 83JOC4404 J. C. Millar, A. C. Oehlschlager y J. W. Wong, *J. Org. Chem.*, **1983**, 48, 4404.
- 85CCC1039 K. Capek, T. Vydra, J. Capkova, M. Ranny, M. Blahova y P. Sedmera, *Coll. Czechoslovak Chem. Commun.*, **1985**, 50, 1039.
- 85CCC2191 K. Capek, T. Vydra, M. Ranny y P. Sedmera, *Coll. Czechoslovak Chem. Commun.*, **1985**, 50, 2191.
- 85T643 S. David y B. Hanessian, *Tetrahedron*, **1985**, 41, 643.
- 86MAC125 J. Vermeersch y E. Schacht, *Makromol. Chem.*, **1986**, 187, 125.
- 87AQA13 A. Fernández Cirelli, E. Oliva y J. Covián, *Anales de la Asoc. Quím. Argentina*, **1987**, 217, 13.
- 87BCJ1529 K. Kanai, I. Sakamoto, S. Owaga y T. Suami, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **1987**, 60, 1529.
- 87OPP466 V. Nair y S. Bernstein, *Organic Prepn. Proc. Int.*, **1987**, 19, 466.
- 87TL4303 A. Fukuzawa, H. Sato y T. Masamune, *Tetrahedron Lett*, **1987**, 28, 4303.
- 88JCC583 I. Leder, *J. Carbohydr. Chem.*, **1988**, 7, 583.
- 89CAR329 A. F. Fernández Cirelli, J. Covián, N. Ohno, Y. Adachi y T. Yadomae, *Carbohydr. Res.*, **1989**, 190, 329.
- 90AJC665 E. Rodriguez y R. Stick, *Aust. J. Chem.*, **1990**, 43, 665.
- 90CAR67 S. Hanessian y M. Kagotani, *Carbohydr. Res.*, **1990**, 202, 67.
- 90JBM195 G. Gravanis, M. Milas, M. Rinaudo y A. Clauke-Sturman, *J. Biol. Macromol.*, **1990**, 12, 195.
- 90MA3717 T. Yoshida, K. Hatanaka y T. Uryu, *Macromolecules*, **1990**, 23, 3717.
- 91CAR133 L. Wang, N. Sakairi y H. Kuzuhara, *Carbohydr. Res.*, **1991**, 219, 133.

- 91CAR261 M. Zsiska y B. Meyer, *Carbohydr. Res.*, **1991**, 215, 261.
- 91CAR279 M. Zsiska y B. Meyer, *Carbohydr. Res.*, **1991**, 215, 279.
- 91JCC349 L. Wang, N. Sakairi y H. Kuzuhara, *J. Carbohydrate Chemistry.*, **1991**, 10, 349.
- 91JP256 T. Suzuki, N. Ohno, Y. Adachi, A. Fernández Cirelli, J. Covián y T. Yadomae, *J. Pharmacobio Dynamics*, **1991**, 14, 256.
- 92BP2385 T. Uryu, N. Ikushima, K. Katsuraya, T. Shoji, N. Takahashi, T. Yoshida, K. Kanno, T. Murakami, H. Nakashima y N. Yamamoto, *Biochem. Pharmacol.*, **1992**, 43, 2385.
- 92CAR245 T. Bocker, T. K. Lindhorst, J. Thiem y V. Vill, *Carbohydr. Res.*, **1992**, 230, 245.
- 92CAR263 M. Russell, E. Raymond y D. Billington, *Carbohydr. Res.*, **1992**, 234, 263.
- 92CAR29 H. Miyano, R. Nakagawa, E. Suzuki y T. Uryu, *Carbohydr. Res.*, **1992**, 235, 29.
- 92CAR65 J. Marecek, V. Estevez y G. Prestwich, *Carbohydr. Res.*, **1992**, 234, 65.
- 93CAR2295 K. Koch y R. Chambers, *Carbohydr. Res.*, **1993**, 241, 2295.
- 93CAR81 K. Takeo, K. Maki, Y. Wada y S. Kitamura, *Carbohydr. Res.*, **1993**, 245, 81.
- 93JCC13 O. Moradei, S. Leit, C. du Mortier, A. F. Cirelli and J. Thiem, *J. Carbohydrate Chemistry*, **1993**, 12, 13.
- 94MA6695 K. Katsuraya, T. Shoji, K. Inazawa, H. Nakashima, N. Yamamoto y T. Uryu, *Macromolecules*, **1994**, 27, 6695.
- 95CAR425 T. Yoshida, Y. Yasuda, T. Mimura, K. Kaneko, H. Nakashima, N. Yamamoto y T. Uryu, *Carbohydr. Res.*, **1995**, 276, 425.
- 95CAR71 K. B. Kim y E. J. Behrman, *Carbohydr. Res.*, **1995**, 270, 71.
- 95CAR89 A. Nooy, A. Besemer y H. van Bekkum, *Carbohydr. Res.*, **1995**, 269, 89.
- 95MA6697 K. Katsuraya, T. Shibuya, K. Inazawa, H. Nakashima, N. Yamamoto y T. Uryu, *Macromolecules*, **1995**, 28, 6697.
- 96BMC1849 V. Moreau, J. Viladot, E. Samain, A. Planas y H. Driguez, *Bioorg. Med. Chem.*, **1996**, 4, 1849.
- 96CIM392 D. L. Williams, A. Mueller y W. Browder, *Clin. Immunother.*, **1996**, 5, 392.
- 97AQA87 S. Leit, O. Moradei, C. du Mortier y A. F. Cirelli, *Anales de la Asoc. Quím. Argentina*, **1997**, 85, 87.

- 97CAR1 Los compuestos fueron nombrados siguiendo la nomenclatura de A. D. McNaught, *Carbohydr. Res.*, **1997**, 297, 1. Los primados corresponden al extremo no reductor.
- 97CAR117 A. Nooy, M. Pagliaro, H. van Bekkum y A. Besemer, *Carbohydr. Res.*, **1997**, 304, 117.
- 97CAR175 J. Vleeming, B. Kuster y G. Marin, *Carbohydr. Res.*, **1997**, 303, 175.
- 97CAR119 J. Kovensky y A. F. Cirelli, *Carbohydr. Res.*, **1997**, 303, 119.
- 97JCS2383 J. Viladot, V. Moreau, A. Planas y H. Driguez, *J. Chem. Soc. Trans Perkin I*, **1997**, 2383.
- 97MA3224 Y. Gao, A. Fukuda, K. Katsuraya, Y. Kaneco, T. Mimura, H. Nakashima, y T. Uryu, *Macromolecules*, **1997**, 30, 3224.
- 97TL3995 M. Castro, J. Kovensky y A. Fernández Cirelli, *Tetrahedron Lett.*, **1997**, 38, 3995.
- 98CAR559 D. Lowman, H. Ensley y D. Williams, *Carbohydr. Res.*, **1998**, 306, 559.

3. Análisis conformacional de oligosacáridos aniónicos

3.1 Introducción

Los polisacáridos están involucrados en una amplia variedad de procesos biológicos. Los oligo- y polisacáridos aniónicos son agentes antitrombóticos y antilipémicos, además afectan el crecimiento celular y presentan actividad antitumor e inmunosupresora; actualmente es un tema de creciente interés, ya que inhiben la infección por el virus de inmunodeficiencia humano (VIH) y podrían ser posibles drogas para el síndrome de inmunodeficiencia adquirido (SIDA). En particular, el curdlano y los aquil laminara- y malto-oligosacáridos sulfatados presentan actividad anti-VIH^[94CAR51, 94MA6693, 97MA1997, 97MA3224]. Diferentes actividades biológicas de polisacáridos aniónicos pueden explicarse por la interacción iónica del polisacárido con la proteína, como por ejemplo la interacción entre la heparina y la antitrombina III^[83JBC9826]. El estudio de esta interacción requiere, en primer lugar, el análisis de la estructura tridimensional de oligosacáridos en solución. Debido a la importancia biológica que presentan los oligosacáridos aniónicos con uniones glicosídicas β -(1→3) y α -(1→4), resultó de interés estudiar la conformación de estas moléculas en solución.

El objetivo de la presente Tesis es la investigación de las preferencias conformacionales en solución de disacáridos aniónicos de glucosa con uniones glicosídicas β -(1→3) y α -(1→4) y su comparación con los mismos disacáridos sin carga, y utilizar los resultados obtenidos en los laminarabiósidos para estudiar la estructura tridimensional de β -(1→3)-oligosacáridos en solución.

Meyer^[96CAR11] propone que las preferencias conformacionales de la maltosa pueden explicar la estructura de la amilosa y sus propiedades físicas y químicas. Esta hipótesis ya había sido manifestada por el mismo autor para oligosacáridos sulfatados relacionados con heparina y otros glicosaminoglicuronanos. El estudio conformacional de disacáridos aniónicos con uniones β -(1→3) y β -(1→4) sirven como modelo de unidades repetitivas de chondroitin sulfato^[93CAR225]. Sin embargo, Balaji y colaboradores^[94GB497] sugieren que el estudio conformacional de oligosacáridos basado en la conformación preferencial de fragmentos de disacáridos no siempre es satisfactorio, en base a estudios realizados con oligosacáridos de manosa con uniones α -(1→3) y α -(1→6))

Existen diferentes técnicas que se pueden utilizar para la obtención de datos estructurales de las moléculas en estudio. La difracción de rayos X se utilizó ampliamente en proteínas, ácidos nucleicos y mono- y disacáridos proporcionando datos estructurales de

mucha relevancia. Sin embargo, los oligosacáridos, bien libres o formando parte de glicoconjugados, son difíciles de cristalizar.

La información relativa a la conformación adoptada por los hidratos de carbono en solución es accesible mediante el uso de técnicas de resonancia magnética nuclear^[90JA7762, 90BC9843, 83PAC605, 96CO710]. El primer paso del estudio estructural de estas biomoléculas es la asignación completa del espectro protónico. Debido a que en los azúcares la mayor parte de las señales aparecen en una región comprendida entre 3 y 4 ppm, los espectros no se pueden asignar directamente, siendo preciso el uso de técnicas bidimensionales. Una vez completado el proceso de asignación, se procede al estudio de los parámetros que contienen la información estructural. La espectroscopía de RMN proporciona, al menos, tres parámetros que pueden usarse en el análisis conformacional de oligosacáridos:

-Los desplazamientos químicos (δ). Estos sufren la influencia de un número de efectos estructurales, químicos y magnéticos, que suelen ser difíciles de predecir^[93S1491].

-Las constantes de acoplamiento (J), tanto homo- como heteronucleares están relacionadas con los ángulos de torsión correspondientes, mediante ecuaciones del tipo Karplus^[63JA2870, 80T2783]. En ocasiones también se utilizan las constantes de acoplamiento heteronucleares a un enlace ($^1J_{CH}$) para los pares C-H situados a ambos lados de los enlaces interglucosídicos^[92JBR421]. Estas constantes se relacionan con el valor de los ángulo de torsión adoptados por dichos enlaces.

-Los efectos Nuclear Overhauser (NOE)^[89RB] se corresponden, normalmente, con distancias interprotónicas cortas ($<4.0 \text{ \AA}$). La medida de estos efectos es fundamental en el análisis conformacional, puesto que pueden relacionarse con la proximidad de los átomos en el espacio y, por lo tanto, con la estructura tridimensional.

El proceso de determinación estructural se ve, sin embargo, complicada por diversos problemas:

-La determinación de la estructura tridimensional de proteínas y ácidos nucleicos en solución por RMN se basa, fundamentalmente en la asignación de un gran número de NOEs (generalmente varios cientos) que, a su vez traducidos a restricciones de distancia, se introducen en programas de cálculo (algoritmo de geometría de distancias o métodos de dinámica molecular), que permiten generar un número de estructuras compatibles con los datos experimentales. En general, el gran número de restricciones experimentales, permite definir en forma inambigua, la estructura de la proteína o del ácido nucleico. A diferencia de las proteínas, los azúcares tienden a presentar estructuras lineales o ramificadas y generalmente sólo se observan uno o dos NOEs entre residuos consecutivos (NOEs

secuenciales). El número de NOEs a media y larga distancia (es decir, aquellos que imponen una restricción mayor) es escaso, siendo nulo en ocasiones.

Por lo tanto, la estructura tridimensional completa de los hidratos de carbono ha de definirse, en general, en base a un reducido número de NOEs secuenciales. Esta escasez de restricciones experimentales, que se deriva de la propia naturaleza de las estructuras oligosacáridicas, ha supuesto tradicionalmente un serio problema en el proceso de determinación estructural, y constituye una de las razones por las que la utilización de los cálculos teóricos (de mecánica y dinámica molecular, fundamentalmente) es esencial para la interpretación cuantitativa de los datos espectroscópicos. Ambas aproximaciones al estudio de la estructura de estas biomoléculas son complementarias. El RMN nos ofrece un número reducido de restricciones, insuficiente para permitir una determinación inequívoca de la conformación de los hidratos de carbono. Por su parte, los cálculos teóricos nos proporcionan un conjunto de estructuras de energía similar. En principio, no podemos distinguir cuáles de ellas son realmente representativas de la estructura real de la biomolécula en solución, dada la limitada exactitud de las funciones empíricas de energía utilizadas en dichos cálculos. Las restricciones de distancia, derivadas del estudio por RMN, permiten excluir conformeros de energía similar, que no son compatibles con los datos experimentales. Los cálculos de mecánica molecular permiten excluir aquellas estructuras que siendo compatibles con los datos de resonancia, no son razonables desde el punto de vista energético.

-La flexibilidad potencial de los oligosacáridos constituye un problema adicional. Esta característica de las uniones interglucosídicas ha sido objeto de controversia durante mucho tiempo. Los primeros estudios sobre la conformación de hidratos de carbono se realizaron usando los oligosacáridos determinantes de los grupos sanguíneos y se deben a Lemieux y col^[80CJC631, 82CJC44, 87CJC213]. Estos autores propusieron estructuras rígidas dictadas por el controvertido efecto exo-anomérico^[87CJC213]. La supuesta rigidez de estas estructuras se basaba en una interpretación cualitativa de los desplazamientos químicos, así como los NOEs medidos experimentalmente. Los cálculos iniciales de mecánica molecular se basan en considerar anillos piranosícos rígidos (método de esferas duras^[82CJC44]), dejando las torsiones interglucosídicas como único grado de libertad variable. Dichos cálculos predecían en la mayoría de los casos la existencia de conformaciones únicas. De esta forma, los primeros esfuerzos en la determinación de la estructura del hidrato de carbono tenían, como principal objetivo, la obtención de una conformación única, compatible con todos los datos experimentales y teóricos. Sin embargo a medida que los cálculos teóricos de mecánica molecular se fueron refinando, permitieron la relajación de todos los grados de libertad

existentes en la molécula durante el proceso de minimización^[88NJC941, 88BP1519, 88BP1927, 89BP679, 89JCO205, 89IJB265], y se hizo más evidente que el espacio conformacional accesible a estas biomoléculas era muy superior al que se había asumido hasta el momento. La idea sobre la flexibilidad de ciertas uniones interglucosídicas se vio apoyada por diversos estudios en los que se demostró que la interpretación de todos los datos experimentales en base a una conformación única era imposible. En ocasiones la interpretación de los datos de RMN conduce a una “conformación virtual”^[87BC6664, 93PAC763, 80BBA227], en general distorsionada, que no coincide con ninguna de las estructuras reales existentes en solución. Actualmente se sabe que, en contra de las teorías inicialmente aceptadas que consideraban a los hidratos de carbono como estructuras esencialmente rígidas, estas biomoléculas son relativamente flexibles y, en ocasiones, existen en solución como mezclas complejas de distintos conformeros. La señal detectada en experimentos de NOE está modulada por todos los movimientos internos y las fluctuaciones conformacionales existentes en la molécula. Los valores determinados experimentalmente son valores promedio para todo el conjunto de conformeros existente en solución. Si aceptamos que los oligosacáridos son flexibles, el objetivo de cualquier elucidación estructural debe ser la obtención de un conjunto de diferentes conformeros que justifiquen todos los datos experimentales. Para introducir la flexibilidad en la interpretación de los datos de RMN se recurre, en la mayoría de los casos, a cálculos de mecánica y dinámica molecular. Mediante dichos cálculos, es posible generar distribuciones de conformeros, y a partir de éstos, se calculan propiedades espectroscópicas que se comparan con las experimentales^[88NJC941, 88BP1519, 88BP1927, 89BP679, 89JCO205, 89IJB265].

Los cálculos teóricos^[90RB1] permitieron paliar, en cierta medida, la ausencia de restricciones experimentales e introducir la flexibilidad en la interpretación de las mismas. A continuación se presentan las características generales de los cálculos de mecánica y dinámica molecular:

-*Mecánica molecular* (MM). En este tipo de cálculos^[90RB1] se considera a la molécula como un conjunto de masas puntuales sometidas a un campo de fuerzas empírico, de tipo conservativo, que sólo depende de las coordenadas instantáneas de dichas masas puntuales. Existen diferentes algoritmos que permiten minimizar la energía (para un campo de fuerzas dado) de una estructura determinada, variando sistemáticamente las posiciones de los átomos hasta llegar a un mínimo relativo. Sin embargo, la tarea de encontrar las estructuras de más baja energía es difícil en moléculas complejas como los hidratos de carbono^[88NJC941, 88BP1519, 88BP1927, 89BP679, 89JCO205, 89IJB265]. En general, las hipersuperficies de potencial para moléculas con muchos grados de libertad se caracterizan por tener un gran número de mínimos locales.

Los algoritmos de minimización suelen converger a un mínimo relativamente cercano a la estructura de la cual se partió. En principio no hay modo de saber si se ha llegado a un mínimo absoluto, o si, por el contrario, la estructura final es un mínimo relativo de alta energía. El resultado del cálculo está determinado por la selección de la estructura inicial. Este problema se conoce habitualmente con el nombre de “*problema de mínimos múltiples*”^[90RB1] y su solución pasa necesariamente por la realización de una búsqueda conformacional lo suficientemente amplia.

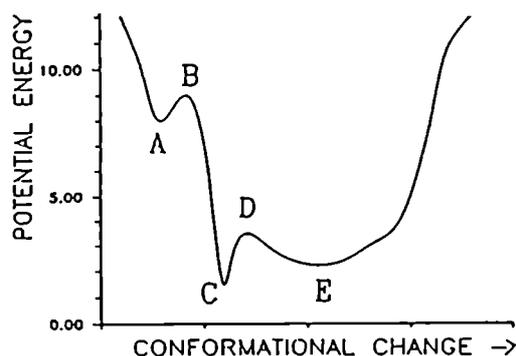


Figura 1. Representación esquemática del problema de mínimos múltiples. En principio, no hay modo de saber si se ha llegado al mínimo absoluto (C) o la estructura resultante de la minimización es un mínimo relativo de alta energía (A).

Los métodos de búsqueda conformacional pueden clasificarse en dos grandes grupos: métodos estocásticos y métodos sistemáticos. En los métodos estocásticos (tales como el método Montecarlo) se realiza una búsqueda conformacional mediante la variación *al azar* de aquellos grados de libertad más relevantes para las moléculas en cuestión. Las conformaciones generadas son rechazadas o bien incluidas en el análisis siguiendo criterios de energía. Esta aproximación se ha utilizado en el análisis conformacional de oligosacáridos^[93CAR49], y en el de macrociclos que contienen fragmentos de disacáridos^[94JA11198]. Sin embargo, en vez de recolectar y comparar diferentes estructuras generadas al azar, es más útil determinar cómo varía la energía total al cambiar, de forma *sistemática*, uno o más parámetros estructurales importantes de la molécula objeto de estudio. De este modo se genera una superficie de energía potencial. Esta metodología se denota habitualmente con las siglas SGS (systematic grid search). En hidratos de carbono, en general, los parámetros estructurales más relevantes (los que suelen usarse para generar estas superficies) son los ángulos diedros interglucosídicos, habitualmente designados con las letras griegas ϕ y ψ . Se generan superficies de potencial por rotación sistemática de ϕ y ψ , entre -180° y 180° , utilizando un incremento determinado. Si para cada punto de la superficie se

calcula la energía, sin optimización de los grados de libertad, el mapa resultante se denomina mapa rígido (ésta era la aproximación utilizada en los primeros estudios teóricos de hidratos de carbono^[80CJC631, 82CJC44, 87CJC213]). Si la variación de ϕ y ψ va acompañada de una optimización del resto de los grados de libertad (manteniendo fijo en cada punto el valor de ϕ y ψ), el resultado se conoce con el nombre de mapa relajado^[88NJC941, 88BP1519, 88BP1927, 89BP679, 89JCO205, 89IJB265]. A partir de los mapas así obtenidos pueden calcularse distribuciones de probabilidad y, a partir de ellas, propiedades promedio, tales como los NOEs o constantes de acoplamiento^[88NJC941, 88BP1519, 88BP1927, 89BP679, 89JCO205, 89IJB265, 90RB1].

-*Dinámica molecular* (MD): De acuerdo con la mecánica clásica, la fuerza que actúa sobre un átomo cualquiera en la molécula viene dada por:

$$\mathbf{F} = -\nabla E(\mathbf{x}, \mathbf{y}, \mathbf{z})$$

Las fuerzas pueden ser sustituidas en la ecuación de Newton e integradas numéricamente, proporcionando una descripción completa del movimiento de cada átomo del sistema en función del tiempo (para un conjunto de posiciones y velocidades inicialmente dadas). En una simulación típica de dinámica molecular, se selecciona una estructura inicial (en ocasiones a partir de datos cristalográficos). A cada átomo se le asigna una velocidad inicial al azar de acuerdo con la distribución de Maxwell-Boltzmann a una temperatura dada. La integración de la ecuación de movimiento se realiza en forma numérica, pudiéndose utilizar diferentes algoritmos (el más común es el de Verlet^[67PR98, 87RB2]). El paso de integración debe ser corto (debido a las simplificaciones asumidas en la integración de las ecuaciones) en relación al movimiento atómico más rápido que tenga lugar en el sistema (vibración C-H), lo que implica que la simulación durante un período de tiempo largo, generalmente requiere un número elevado de pasos de integración. En la práctica las simulaciones no suelen sobrepasar unos pocos nanosegundos. Si la temperatura es lo suficientemente alta, la simulación de dinámica molecular tiene la ventaja de permitir el salto de barreras energéticas entre zonas de baja energía y pueden usarse para realizar búsquedas conformacionales. Este tipo de cálculos permite el estudio de propiedades dependientes del tiempo. La dinámica molecular se utiliza también para comprobar la fiabilidad de un mínimo obtenido por mecánica molecular.

La fiabilidad de los cálculos de mecánica y dinámica molecular está en función de la validez de los parámetros utilizados por el campo de fuerzas en cuestión. En el caso de los hidratos de carbono hace muy poco tiempo se empezaron a desarrollar campos de fuerzas

parametrizados para estas biomoléculas. Este es el caso del campo de fuerzas AMBER^[84JA765] ampliado para hidratos de carbono por Homans^[90BC9110].

Entre los factores que determinan la estructura tridimensional de los oligosacáridos (y que deberían ser considerados en la parametrización de campos de fuerzas) cabe mencionar los controvertidos efectos anomérico y exo-anomérico^[93RB3]. El término “efecto anomérico” fue propuesto por Lemieux^[80CJC631, 82CJC44, 87CJC213] para designar la mayor estabilidad de la orientación axial, sobre la ecuatorial, de los sustituyentes situados en la posición 1 de anillos de piranosa (en contra de lo previsible en base a interacciones estéricas). De entre las múltiples explicaciones propuestas para justificar este fenómeno, la más aceptada se basa en efectos estereoelectrónicos^[59JCS2954, 69TS39]. De acuerdo con ésta, la mayor estabilidad de las orientaciones axiales, sobre las ecuatoriales, tienen su origen en la deslocalización hiperconjugativa de un par de electrones, no enlazantes, del O₅ del anillo de piranosa hacia el orbital σ^* del enlace C-O contiguo. Para que dicha interacción sea posible, el O₅ debe tener un par de electrones antiperiplanar a dicho enlace (lo cual es únicamente posible para la orientación axial del sustituyente en 1). (Figura2)

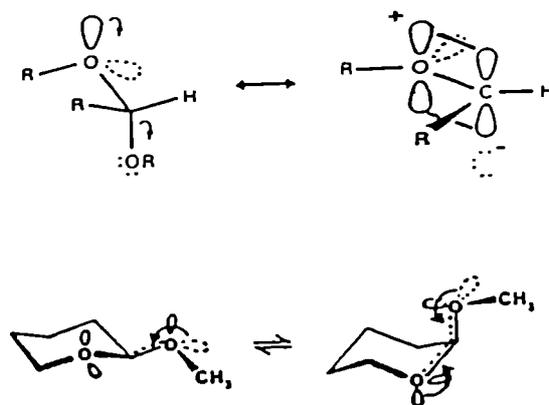


Figura 2. Representación esquemática de las interacciones responsables de los efectos anoméricos y exo-anomérico.

El efecto exo-anomérico constituye la extensión lógica del efecto anomérico a la porción de la función acetálica. De acuerdo con él, estarían especialmente favorecidas aquellas orientaciones del enlace glicosídico ($\phi = \text{H}_1\text{-C}_1\text{-O}_1\text{-C}_x$) que permitiesen las interacciones entre un par electrónico del O₁ y el orbital σ^* del enlace C₁-O₅ ($\phi = 180^\circ$ o 60° para las formas β , y 60° o -60° para las formas α). Si bien la importancia real de estas interacciones, en términos de energía, no se conoce con exactitud, la idea sobre la rigidez de estas biomoléculas están basadas en su existencia.

A continuación se presentan los estudios de las estructuras en solución de los compuestos:

-El metil β -maltósido (17) y sus derivados metil α -D-glucopiranosil 6-sulfato de sodio-(1 \rightarrow 4)- β -D-glucopiranosido 6-sulfato de sodio (38), metil α -D-glucopiranosil 6-sulfato de sodio-(1 \rightarrow 4)- β -D-glucopiranosido (38a) y metil α -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 4)- β -D-glucopiranosido 6-sulfato de sodio (38a'), metil α -D-glucopiranosil 6-fosfato de sodio-(1 \rightarrow 4)- β -D-glucopiranosido 6-fosfato de sodio (53), metil α -D-glucopiranosil 6-succinato de sodio-(1 \rightarrow 4)- β -D-glucopiranosido 6-succinato de sodio (57), (α -D-glucopiranosil)uronato de sodio-(1 \rightarrow 4)-(metil β -D-glucopiranosil)uronato de sodio (61)

-El metil β -laminarabiósido (13) y sus derivados metil β -D-glucopiranosil 6-sulfato de sodio-(1 \rightarrow 3)- β -D-glucopiranosido 6-sulfato de sodio (36), metil β -D-glucopiranosil 6-sulfato de sodio-(1 \rightarrow 3)- β -D-glucopiranosido (36a), metil β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 3)- β -D-glucopiranosido 6-sulfato de sodio (36a'), metil β -D-glucopiranosil 2-sulfato de sodio-(1 \rightarrow 3)- β -D-glucopiranosido 44a, metil β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 3)- β -D-glucopiranosido 2-sulfato de sodio 44b, metil β -D-glucopiranosil 6-fosfato de sodio-(1 \rightarrow 3)- β -D-glucopiranosido 6-fosfato de sodio (52), metil β -D-glucopiranosil 6-succinato de sodio-(1 \rightarrow 3)- β -D-glucopiranosido 6-succinato de sodio (56) y (β -D-glucopiranosil)uronato de sodio-(1 \rightarrow 3)-(metil β -D-glucopiranosil)uronato de sodio (60).

-Laminara-oligosacáridos y su derivado sulfatado.

El estudio se realizó mediante medidas de RMN y cálculos de mecánica y dinámica molecular. Los campos de fuerza utilizados fueron MM2^[82ACS177], MM3* (una versión modificada en el tratamiento del término electrostático del campo de fuerzas original MM3^[89JA8551]) y AMBER^[84JA765] ampliado por Homans^[90BC9110] para hidratos de carbono^[95IJ137] integrados en el programa Macromodel^[90JC0440].

3.2 Estudio de las conformaciones del metil β -maltósido y sus derivados aniónicos en solución

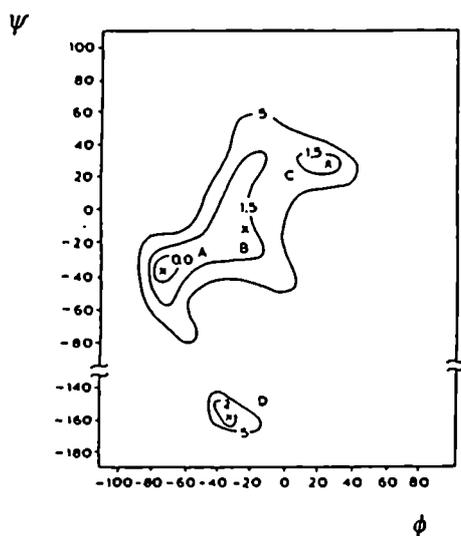
Para realizar el estudio conformacional de los derivados aniónicos del metil β -maltósido es necesario conocer la conformación de este último como punto de referencia para el estudio conformacional.

La estructura tridimensional de la maltosa ha sido objeto de interés y controversia desde los años 80. Su estructura cristalina se resolvió en 1970^[70JA5834] y se refinó en 1977^[77AC2490]. Estudios estructurales posteriores en disolución mediante RMN^[84CAR1, 86CAR175] o cálculos de mecánica molecular^[88BP1927, 89BP679] y dinámica molecular^[93JPC958, 96CAR11] pusieron de manifiesto la existencia de distintas conformaciones, algunas muy distintas a las obtenidas por rayos X. A partir de estos estudios se pusieron para la maltosa cuatro diferentes conformaciones en equilibrio, a las que se denominan A, B, C y D, y cuyas poblaciones varían dependiendo del solvente y método computacional utilizado en el cálculo. Las conformaciones A y B parecen las más pobladas en disolución acuosa, mientras que la C, menos poblada, es similar a la conformación encontrada en estado sólido para la maltosa^[70JA5834, 77AC2490].

Las conformaciones A y B se caracterizan por ángulos diedros interglucosídicos, ϕ ($H_1-C_1-O_4-C_4$) y ψ ($C_1-O_4-C_4-H_4$), de valores medios $-70^\circ/-35^\circ$ y $-20^\circ/-20^\circ$ respectivamente. La conformación B posee enlace de hidrógeno entre los hidroxilos OH_3 y OH_2' , mientras que la conformación A carece de él. Por otro lado, la conformación C presenta ángulos ϕ y ψ de aproximadamente $30^\circ/25^\circ$ respectivamente, más parecidos a los valores encontrados en estado sólido, para ϕ y ψ de $4.8^\circ/13.3^\circ$ ^[77AC2490]. Al igual que en la estructura cristalina, existe en esta conformación un enlace de hidrógeno entre los hidroxilos OH_2' y OH_3 .

Todos estos estudios indican que la maltosa, al igual que otros oligosacáridos, posee una flexibilidad conformacional influenciada por la naturaleza del solvente y por otros factores. Dependiendo de las interacciones que la rodean podría adoptar una u otra conformación preferente, dando a la molécula de la que forma parte una estructura tridimensional distinta (por ejemplo B-amilosa, V-amilosa, etc).

La figura 3 muestra un mapa conformacional señalando los mínimos de energía encontrados para el metil β -maltósido.

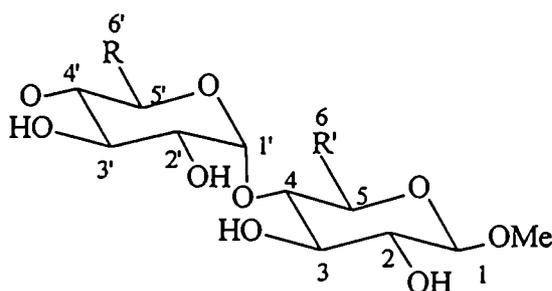


Valores de ϕ y ψ de los mínimos calculados para el metil β -maltósido^(86CAR175)

	ϕ	ψ
Mínimo A	-70	-40
Mínimo B	-30	-20
Mínimo C	20	20
Mínimo D	-30	-160

Figura 3. Mapa conformacional de metil β -maltósido calculado por mecánica molecular.

La estructura de metil β -maltósido (17), metil α -D-glucopiranosil 6-sulfato de sodio-(1 \rightarrow 4)- β -D-glucopiranosido 6-sulfato de sodio (38), metil α -D-glucopiranosil 6-sulfato de sodio-(1 \rightarrow 4)- β -D-glucopiranosido (38a) y metil α -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 4)- β -D-glucopiranosido 6-sulfato de sodio (38a'), metil α -D-glucopiranosil 6-fosfato de sodio-(1 \rightarrow 4)- β -D-glucopiranosido 6-fosfato de sodio (53), metil α -D-glucopiranosil 6-succinato de sodio-(1 \rightarrow 4)- β -D-glucopiranosido 6-succinato de sodio (57), (α -D-glucopiranosil)uronato de sodio-(1 \rightarrow 4)-(metil β -D-glucopiranosil)uronato de sodio (61) se muestran en la figura 4, junto con los números utilizados para la asignación de los átomos.



	R	R'
17	CH ₂ OH	CH ₂ OH
38	CH ₂ OSO ₃ Na	CH ₂ OSO ₃ Na
38a	CH ₂ OSO ₃ Na	CH ₂ OH
38a'	CH ₂ OH	CH ₂ OSO ₃ Na
53	CH ₂ OPO ₃ Na ₂	CH ₂ OPO ₃ Na ₂
57	CH ₂ OCOCH ₂ CH ₂ COONa	CH ₂ OCOCH ₂ CH ₂ COONa
61	COONa	COONa

Figura 4. Representación esquemática de la estructura de los compuestos 17, 38, 38a, 38a', 53, 57, 61, junto con la numeración utilizada para designar los átomos.

Los índices prima designan a los átomos del residuo de glucosa “no reductor”, mientras que el residuo de glucosa “reductor” carece de los mismos. Como se mencionó anteriormente, uno de los mayores problemas en la aplicación de cálculos de mecánica molecular en el análisis conformacional de moléculas complejas, como los hidratos de carbono, es la existencia de un gran número de mínimos relativos en la hipersuperficie de potencial. Dicho problema puede resolverse mediante la realización de una búsqueda conformacional lo más amplia posible. En nuestro caso, hemos realizado el método sistemático de búsqueda conformacional. El protocolo es básicamente el siguiente:

a.- Geometría inicial: Se han seleccionado en principio 9 geometrías iniciales para los compuestos 17 y 38, que difieren en la orientación del hidroximetilo y sulfoniloximetilo, respectivamente, considerando una misma orientación de todos los hidroxilos secundarios. En principio son posibles tres orientaciones alternadas, caracterizados por los valores de ángulos diedros $O_5-C_5-C_6-O_6$ de -60° , 60° y 180° . Dichas orientaciones se designan de un modo sencillo, como gg (gauche-gauche), gt (gauche-trans) y tg (trans-gauche) (figura 5). La primera letra hace referencia a la disposición relativa de O_6 y O_5 , y la segunda hace referencia a la disposición relativa de O_6 y C_4 .

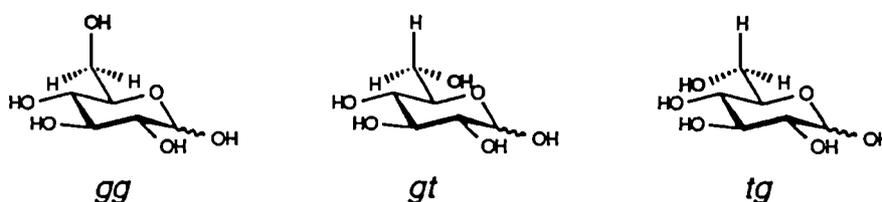


Figura 5. Representación de las 3 posibles orientaciones (gg, gt y tg) para el hidroximetilo de un monosacárido.

Puesto que tenemos 3 orientaciones alternadas posibles para cada uno de los hidroximetilos, en principio debería tenerse en cuenta para el análisis las 9 combinaciones existentes. Sin embargo, de estas 9 combinaciones, no todas tienen la misma importancia relativa desde un punto de vista energético. Para residuos de glucosa se consideran las orientaciones gg y gt^[94CAR513], desechándose la tg. Esta última orientación del hidroximetilo conlleva a la existencia de interacciones 1:3 diaxiales, desestabilizantes, entre el O_6 y O_4 (efecto Hassel-Ottar)^[47ACS929]. Nunca se detectó dicha orientación en estado sólido^[79BP2369]. A su vez, las medidas de las constantes de acoplamiento entre H_5 y los H_6 indican una

participación prácticamente nula de esta conformación en solución. En la tabla 1, se presentan valores teóricos de las constantes de acoplamiento calculadas para hexopiranosas. Estudios espectroscópicos por RMN en monosacáridos^[94JCC513] indican que la orientación preferencial del grupo hidroximetilo depende de efectos estéricos, efectos de solvente, efectos electrónicos y efectos de enlace hidrógeno.

Tabla 1. Valores teóricos de las constantes de acoplamiento^[94JCC513] del hidroximetilo calculados para hexopiranosas.

	gg ^a	gt ^a	tg ^a
J _{5,6r}	0.9	10.7	5.0
J _{5,6s}	2.8	3.1	10.7

a- Valores teóricos para las orientaciones gg, gt y tg del hidroximetilo en piranosas, obtenidas a partir de la ecuación de Haasnot-Altona^[80T2783].

En el caso de α -maltosa se obtuvo por cálculos de dinámica molecular^[96CAR11] una relación gg:gt:tg de 70:23:6 para el residuo reductor y 55:38:6 para el residuo no reductor. En literatura se describe que la sulfatación en la posición 6 de la glucosa no afecta la conformación de C₅-C₆^[90JOC902]. La estructura cristalina determinada por rayos X de la sacarosa octasulfato no mostró ninguna desviación significativa de la estructura cristalina determinada por rayos X de la sacarosa^[73AC790].

En nuestro caso, los resultados experimentales de las constantes de acoplamiento (H₅, H_{6a} y H₅, H_{6b}) de los compuestos **17**, **38**, **38a**, **38a'**, **53**, **57**, **61** en D₂O dieron valores bajos, sugiriendo la orientación gggg como mayoritaria. De esta forma, se consideró para todos los compuestos una única orientación de las 9 consideradas en un principio, que puede designarse de un modo sencillo: gggg (las dos primeras letras se refieren al residuo no reductor y las dos segundas, al residuo reductor).

La orientación de cada uno de los hidroxilos secundarios también debe tenerse en cuenta en el análisis conformacional^[90RB1]. Si bien estos últimos no son determinantes en cálculos con constantes dieléctricas (ϵ) elevadas, sí juegan un papel importante (especialmente los OH situados en las proximidades de los enlaces interglucosídicos) en cálculos *in vacuo* o con ϵ baja. Puesto que para cada hidroxilo hay, en principio, tres conformaciones alternadas posibles, el número de combinaciones existentes es de 3⁵=243. Sin embargo, es posible simplificar, considerando únicamente aquellas orientaciones más representativas desde un punto de vista energético. Así, solamente se seleccionaron aquellas

combinaciones que dan lugar a un mayor número de enlaces hidrógeno cooperativos (son aquellas que resultan de la participación simultánea de un grupo OH como donador y aceptor de enlaces hidrógeno) alrededor de cada anillo de piranosa. Las dos orientaciones que se pueden considerar se muestran en la figura 6 y pueden designarse como “c” (clockwise) o “r” (reverse clockwise) según la orientación en la que apunten los vectores O-H de los hidroxilos secundarios con respecto al anillo de piranosa. Por lo tanto existen cuatro posibles orientaciones: cc, cr, rc, rr. En el presente estudio, se trabajó con constante dieléctrica elevada ($\epsilon=78$), por lo cual, la orientación de los hidroxilos secundarios no es determinante en los cálculos como se describe en bibliografía^[95IJB137]. Únicamente se tuvo en cuenta una posibilidad para cada anillo (cc o rr). Por lo tanto se consideró las orientaciones ggggcc o ggggr.

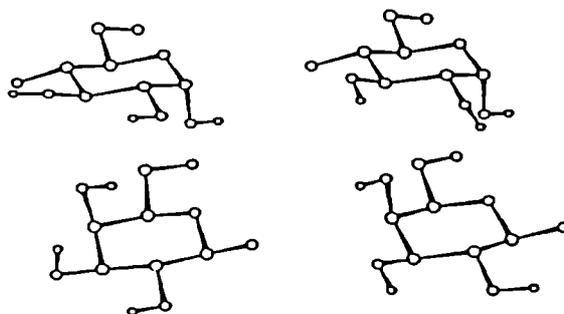


Figura 6. Orientaciones de los hidroxilos secundarios consideradas para cada uno de los anillos de piranosa.

Para ambos residuos, únicamente se consideró la conformación 4C_1 de los residuos de los anillos de piranosa en base a las medidas de constantes de acoplamiento correspondientes a protones vecinales de cada anillo.

Por último, sólo se consideró aquella orientación del grupo O-Me, situado en la posición 1 del anillo, caracterizada por un valor del ángulo diedro Me-O₁-C₁-O₅ de 60°, por tratarse de una orientación estable compatible con el efecto exoanomérico.

b.-Obtención de la superficie de energía potencial. Para cada estructura inicial, se generó un mapa rígido por rotación sistemática de ϕ y ψ , entre -180° y 180°, usando intervalos regulares de 18°. En un segundo paso, se procedió a la obtención de los mapas relajados, mediante una minimización sistemática de cada una de la estructuras integrantes del mapa rígido, manteniendo fijo, en cada caso el valor de ϕ y ψ (minimización restringida). Se obtuvieron así los mapas relajados^[88NJC941, 88BP1519, 88BP1927, 89BP679, 89JCO205, 89IJB265] para cada compuesto.

c.- Cálculo de poblaciones. A su vez, a partir del mapa relajado se calcularon las poblaciones existentes para cada valor de ϕ y ψ a una temperatura de 300 K. Dichas poblaciones se utilizaron para calcular propiedades espectroscópicas (tales como NOEs estacionarios y NOESY), que se compararon con los valores experimentales correspondientes.

Se investigaron las preferencias conformacionales en solución de los derivados aniónicos del metil β -maltósido, siguiendo el protocolo descrito. Se realizó también, el análisis de metil β -maltósido sin sustituir para tener esta estructura como parámetro de comparación, ya que en bibliografía se puso de manifiesto la existencia de distintas conformaciones.

Este protocolo se usó para los diferentes campos de fuerzas (MM2, AMBER) y constante dieléctrica $\epsilon=78$, con la finalidad de obtener las conformaciones preferenciales de cada compuesto en solución. Se utilizó también, el campo de fuerza MM3 pero sólo para los compuestos 17 y 61, ya que dicho campo no está parametrizado para sulfato y fosfato.

3.2.1. Aplicación del campo de fuerzas MM-2 y MM-3

A.-Campo de fuerza MM2 con $\epsilon=78$: Los mapas relajados de los compuestos 17, 38, 38a, 38a', 53, 57, 61, obtenidos con el campo de fuerzas MM2 con $\epsilon=78$ se muestran en la figura 7, junto con la representación (mediante curvas de nivel) de las distancias interprotónicas relevantes (acorde con los datos de NOEs), en función de ϕ y ψ , superpuestas con la distribución de probabilidad correspondiente. Las orientaciones de los enlaces C₅-C₆ se consideraron gggg como se mencionó en la sección anterior. Las curvas de nivel están dibujadas cada 1 Kcal/mol a partir del punto de mínima energía en cada caso. En cada superficie hay representadas 10 curvas de nivel, cubriéndose así un rango de 10 Kcal/mol. De modo general, todas las superficies se componen de una zona central, los mínimos de energía más baja presentan geometrías análogas en todos los compuestos. La zona central se dividió en cuatro regiones para una mejor visualización de los datos, en función de los NOE observados para los compuestos, que se describen y discuten en la sección de RMN. Una región I que se corresponde con distancias H₁'-H₄ cortas (menores que 2.5 Å), una región II con distancias H₁'-H₄ entre 2.5 y 3 Å, una región III que se corresponde con distancias H₁'-H₃ menores que 3 Å y una última región IV donde las distancias mencionadas son mayores que 3 Å. Las regiones que se corresponden con las distancias H₁'-H₄ y H₁'-H₃ cortas (menores 3

Å), coinciden con dos de los mínimos observados para la maltosa, conocidos como los mínimos A y B.

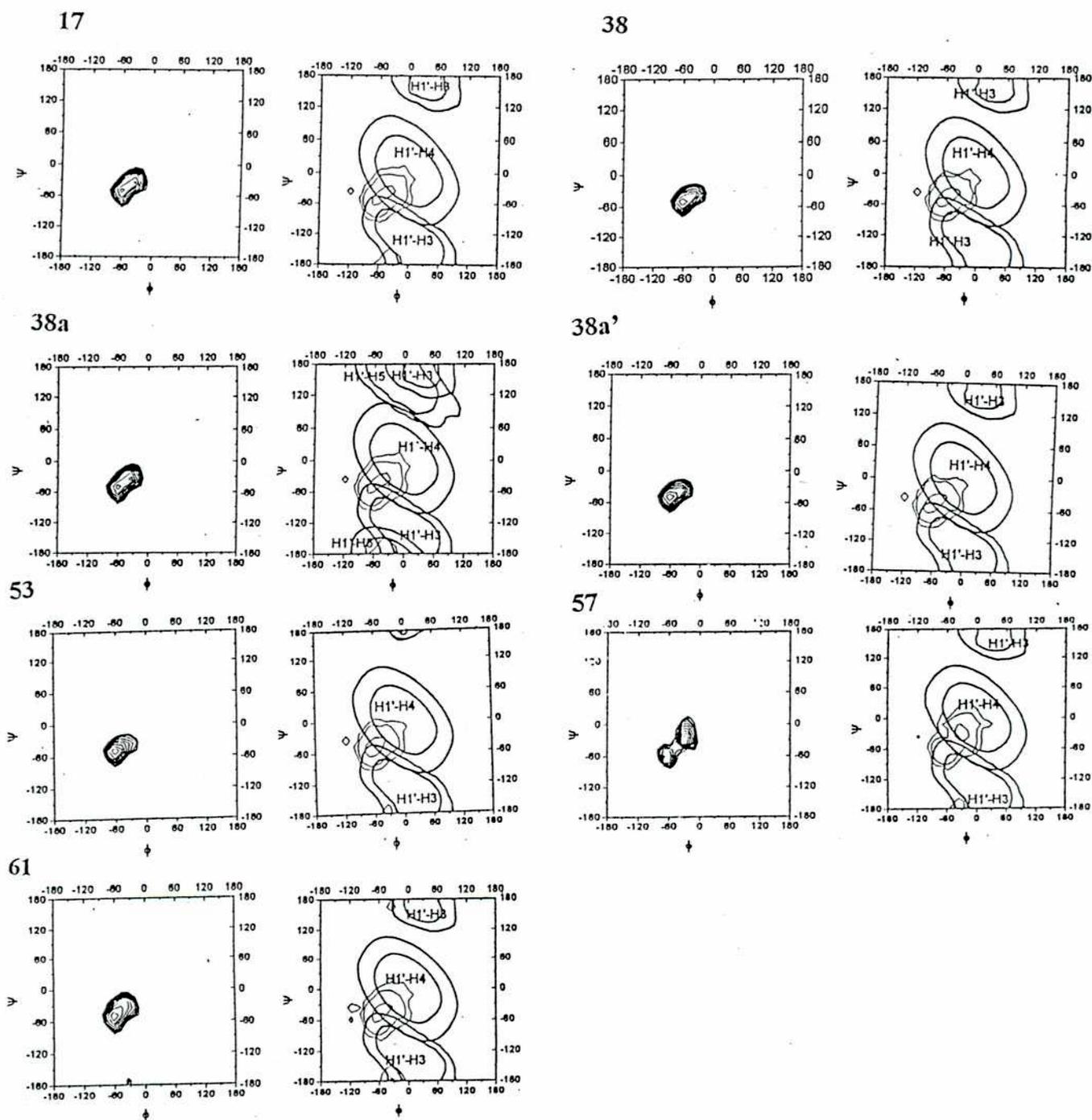


Figura 7. Representación de mapas relajados de los compuestos 17, 38, 38a, 38a', 53, 57, 61, calculados con el campo de fuerzas MM2 ($\epsilon=78$), junto con la distribución de probabilidad correspondiente superpuestas a las curvas de nivel de las distancias interprotónicas relevantes. En todos los casos, ϕ se representa en el eje horizontal y ψ en el eje vertical. Las curvas de nivel se disponen cada 1 Kcal/mol en las superficies de energía. En la distribución de probabilidad se muestran las curvas de nivel para poblaciones del 10%, 1% y 0.1%. En las curvas de nivel de las distancias se disponen entre 2.5 y 3 Å.

En la figura 8 se muestran los mapas relajados, obtenidos con $\epsilon=78$, correspondientes a 3 estructuras iniciales (gggtcc, ggtgcc, gggcc) consideradas para el compuesto sulfatado 38. Puede apreciarse cómo las superficies presentan baja sensibilidad a la geometría inicial. Este resultado sumado a los datos experimentales de constantes de acoplamiento de H_5 y los H_6 pequeñas, validan considerar como geometría inicial la estructura gggg cuando se realizan los cálculos con ϵ altas. Por lo tanto, las estructuras gggt, gtgt y gtgg no se tuvieron en cuenta.

Para el compuesto 57, debido al alto número de ángulos de torsión que presenta la cadena sustituyente se utilizó el método estocástico para la conformación de mínima energía en la cadena lateral, que se obtuvo por análisis de mecánica molecular empleando el método de Monte Carlo (sección 3.2.3).

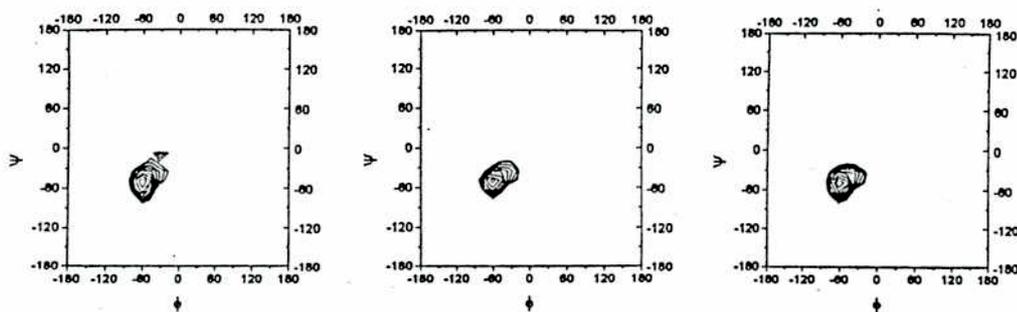


Figura 8. Representación de mapas relajados del compuesto 38 calculadas con el campo de fuerzas MM2 ($\epsilon=78$). En todos los casos, ϕ se representa en el eje horizontal y ψ en el eje vertical. Cada mapa proviene de estructuras con distinta orientación del enlace C_5-C_6 (gggtcc, ggtgcc y gggcc).

En los mapas relajados de cada compuesto, en general, las zonas de baja energía presentan valores de ϕ acordes con la operatividad del efecto exo-anomérico. A partir de dichos mapas, se obtuvieron para cada compuesto 12 mínimos locales. Estos conformeros de mínima energía se ubicaron dentro de las cuatro regiones mencionadas anteriormente. En cada región se consideró el conformero de menor energía, ya que los mínimos locales de cada región presentaron geometrías análogas al conformero de mínima energía de dicha región (los valores de ϕ y ψ difieren de 0° a 17°). Los valores de los ángulos diedros ϕ y ψ correspondientes a los mínimos globales de cada región, así como sus energías relativas (se consideró para cada región el mínimo global y el mínimo local de mayor energía) y las poblaciones de las zonas de baja energía, se indican en la tabla 2. En la figura 9 se muestran las geometrías de tres estructuras de energía más baja correspondiente a cada región I, II y III, para los compuestos 17, 38 y 57 y el mínimo global para los compuestos 38a, 38a', 53 y 61.

Tabla 2. Energías y poblaciones para las conformaciones de mínima energía de los compuestos 17, 38, 38a, 38a', 53, 57, 61 de acuerdo con el campo de fuerzas MM2 con $\epsilon=78$.

		Región I	Región II	Región III	Región IV
	Confórmero	1	2	3	4
	ϕ	-19 a -36	-36 a -54	-54 a -71	-71
	ψ	-19 a -36	-36 a -54	-54 a -71	-37
	ϕ/ψ	-36/-36	-54/-36	-71/-54	-71/-37
17	ΔE	0.0-4.3	0.4-5.6	0.3-3.9	3.3
	PPP%	35.9	24.8	34.2	5.1
38	ΔE	0.6-4.9	0.0-5.9	0.1-8.4	2.5
	PPP%	23.5	40.4	28.2	7.9
38a	ΔE	0.0-5.8	0.4-4.3	0.4-4.1	3.4
	PPP%	34.9	27.6	32.6	4.9
38a'	ΔE	1.0-5.5	0.3-6.4	0.0-4.8	2.6
	PPP%	20.9	39.4	31.7	8.0
53	ΔE	2.1-7.8	0.9-7.7	0.0-4.9	2.7
	PPP%	14.5	31.0	45.7	8.8
57	ΔE	0-5.7		1.4-3.8	7.4
	PPP%	67.4	>1	30.6	1.0
61	ΔE	1.1-8.0	0.0-5.85	0.3-6.2	1.8
	PPP%	26.3	34.4	29.9	9.4

PPP%: porcentaje de las poblaciones promedio.

Los ΔE : el primer valor corresponde al confórmero de más baja energía de cada región, el segundo valor corresponde al mínimo local de mayor energía de dicha región.

La población promedio se calculó sumando las probabilidades correspondientes a todos los puntos de los mapas incluidos en cada una de las cuatro regiones de baja energía.

La zona central de baja energía se define por valores de ϕ comprendidos entre -19° y -75° y valores de ψ entre -19° y -70° , y supone aproximadamente el 3% del área total de la superficie de energía potencial. Estudios teóricos como experimentales, realizados sobre maltosa indican la existencia de conformaciones mayoritarias en la zona central correspondientes a los mínimos conocidos como A y B. Pero también indican la presencia minoritaria de conformaciones en la zona central positiva y zona sur del mapa, que no se obtuvieron en estos cálculos.

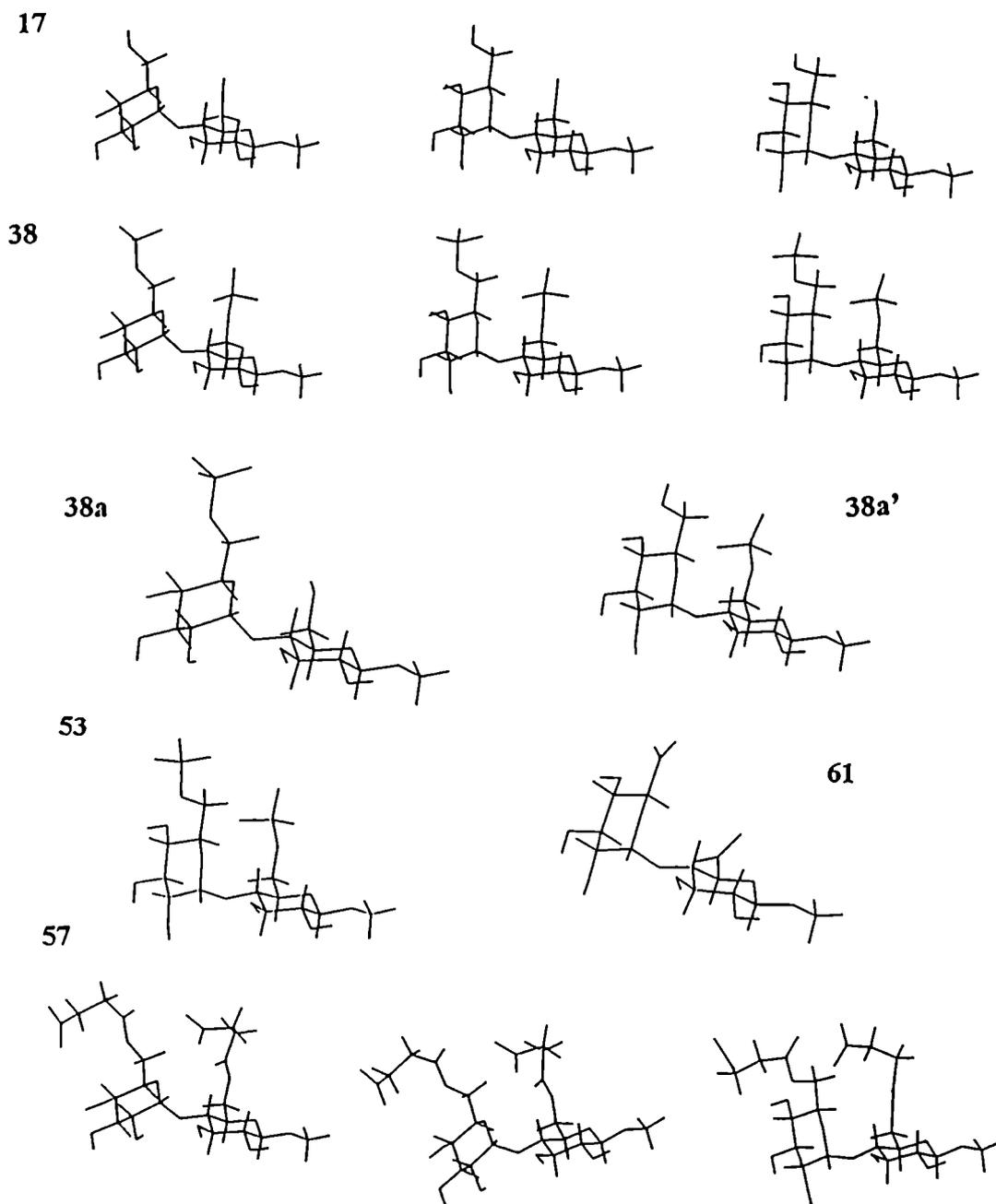


Figura 9. Representación de tres estructuras de mínima energía (zona central) para los compuestos 17, 38 y 57, y la estructura del mínimo global para los compuestos 38a, 38a', 53 y 61 obtenidas con el campo de fuerzas MM2.

Todos los mínimos que se encuentran situados en la región I y II (zona central) del mapa relajado, presentan enlace de hidrógeno interresiduo entre los hidroxilos 2' y 3. El ángulo interglucosídico de la glucosa no reductora (α) adopta para todos los compuestos valores de ϕ que están de acuerdo con el efecto exo-anomérico. Todas las unidades de

glucosa adoptan las conformaciones *silla* 4C_1 . El metil β -maltósido (17) y los derivados aniónicos 38, 38a, 38a', 53, 57, 61 presentan orientación C₅-C₆ gg en cada residuo de glucosa.

La distribución de probabilidad correspondiente a los compuestos 17, 38, 38a, 38a', 53, 57 y 61 se muestra en la figura 7. De acuerdo con ellas, todos los compuestos presentan el 100% de la población concentrada en la zona central del mapa, dividida en cuatro regiones (tabla 2):

-región I que se corresponde distancias H₁'-H₄ (menores que 2.5 Å), con ángulos ϕ : -19 a -36 y ψ : -19 a -36, la población en esta zona es 35.9 % para el compuesto 17, 23.5% para 38, 34.9 % 38a, 20.9 % para 38a', 14.5 % para 53, 67.4 % para 57, 26.3 % para 61.

-región II se corresponde con distancias H₁'-H₄ (entre 2.5 y 3 Å), con ángulos ϕ : -36 a -54 y ψ : -36 a -54, la población en esta zona es 24.8 % para el compuesto 17, 40.4 % para 38, 27.6 % 38a, 39.4 % para 38a', 31.0 % para 53, menor que el 1 % para 57, 34.4 % para 61.

-región III corresponde con distancias H₁'-H₃ (menores que 3 Å), con ángulos ϕ : -54 a -71 y ψ : -54 a -71, la población en esta zona 34.2 % para el compuesto 17, 28.2 % para 38, 32.6 % 38a, 31.7 % para 38a', 45.7 % para 53, 30.6 % para 57, 29.9 % para 61.

-región IV presenta distancias H₁'-H₄ y H₁'-H₃ mayores que 3 Å, con ángulo ϕ : -71 y ψ : -37, la población en esta zona es la población en esta zona es 5.1 % para el compuesto 17, 7.9 % para 38, 4.9 % 38a, 8.0 % para 38a', 8.8 % para 53, 1 % para 57, 9.4 % para 61.

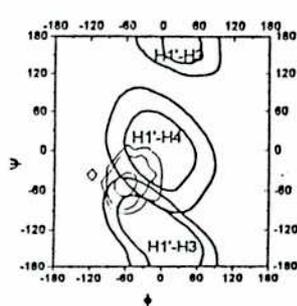
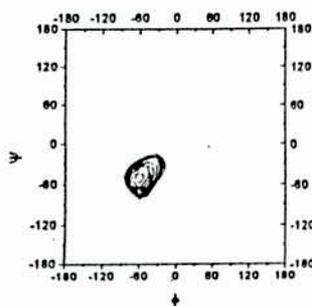
Los valores de efecto NOE entre los protones mencionados son sensibles a las poblaciones conformacionales existentes en dichas regiones de baja energía como se indicará en la sección 3.2.4.

Los mínimos de energía más baja (obtenidos por cálculo) localizados en cada región de la zona central para los compuestos aniónicos 38, 38a, 38a', 53, 57 y 61 presentan geometrías análogas a la descrita para el metil β -maltósido 17. Estos compuestos presentan diferentes porcentajes de población promedio en cada región (tabla 2). Puede observarse que la región que se corresponde con distancias H₁'-H₃, en todos los casos, presenta intersección con el mapa de probabilidad en la zona de baja energía correspondiente al mínimo 3 y el porcentaje de poblaciones conformacionales de los diferentes compuestos presentan

variaciones entre 28 y 46 %. De forma análoga, las distancias $H_{1'}-H_4$ serán representativas de poblaciones conformacionales localizadas en la región I y II; los compuestos 17, 38a y 57 muestran mayor porcentaje de poblaciones conformacionales en la región I, mientras que el resto de los compuestos lo hace en la región II. La región IV, en la cual las distancias $H_{1'}-H_4$ y $H_{1'}-H_3$ son mayores de 3 Å, presenta poblaciones menores al 10%. Puede observarse también, que en el porcentaje de las poblaciones conformacionales de los compuestos sulfatados (38, 38a y 38a') y el metil β -maltósido (17), la sulfatación en C-6' presenta resultados similares al compuesto sin sulfatar, mientras que la sulfatación en C-6 lo hace con el compuesto disulfatado, como podría esperarse debido a la mayor cercanía del C-6 al enlace glicosídico. La correlación de estos resultados con los datos espectroscópicos experimentales se describen en la sección 3.2.4.

B.-Campo de fuerza MM3 con $\epsilon=78$: Los cálculos con el campo de fuerzas MM3 se realizaron también con $\epsilon=78$ para los compuestos 17 y 61. En la figura 10 se muestran los mapas relajados junto con la representación de las distancias interprotónicas ($H_{1'}-H_4$ y $H_{1'}-H_3$), superpuesta con la distribución de probabilidad. En cada caso, las curvas de nivel se disponen cada 1 Kcal/mol a partir del punto de mínima energía. En la distribución de probabilidad se presentan las curvas de nivel para poblaciones del 10%, 1% y 0.1%. En las curvas de nivel las distancias se disponen entre 2.5 y 3 Å. Los valores de ϕ y ψ de los mínimos, así como sus energías se encuentran en la tabla 3. Las geometrías correspondientes al mínimo global para los dos compuestos se representan en la figura 11. Al igual que con el campo de fuerzas MM2, la distribución de probabilidad indica la existencia del 100% de población en la zona central del mapa y las geometrías son casi idénticas en ambos campos de fuerza. Por lo tanto, el campo de fuerzas MM3 predice un comportamiento similar al descrito previamente para el campo de fuerzas MM2. Es decir, se divide en las cuatro mismas regiones, pero en el campo de fuerzas MM3 la población se desplaza hacia la región III aumentando a valores mayores del 50% y la región I presenta menor población que la región II para ambos compuestos.

17



61

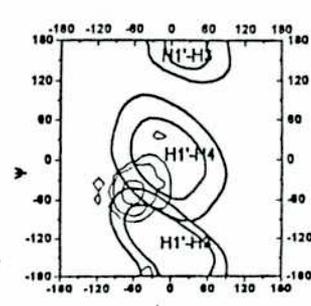
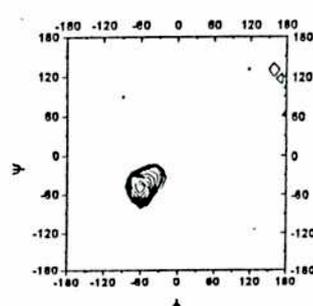


Figura 10. Representación de mapas relajados de los compuestos 17 y 61, calculados con el campo de fuerzas MM3 ($\epsilon=78$), junto con la distribución de probabilidad correspondiente superpuestas a las curvas de nivel de las distancias interprotónicas. En todos los casos, ϕ se representa en el eje horizontal y ψ en el eje vertical. Las curvas de nivel se disponen cada 1 Kcal/mol en las superficies de energía.

Tabla 3. Energía y poblaciones para las conformaciones de mínima energía de los compuestos 17 y 61 de acuerdo con el campo de fuerzas MM3 con $\epsilon=78$.

		Región I	Región II	Región III	Región IV
Confórmero		1	2	3	4
ϕ/ψ		-36/-36	-54/-36	-71/-54	-71/-37
17	ΔE	6.9	1.2-7.8	0.0-8.4	2.4
	PPP%	1.7	26.2	61.6	10.5
61	ΔE	6.1	0.8-6.7	0.0-4.5	1.0
	PPP%	2.1	26.3	54.8	16.8

PPP%: porcentaje de las poblaciones promedio.

Los ΔE el primer valor corresponde al confórmero de más baja energía de cada región, el segundo valor corresponde al mínimo local de mayor energía de dicha región.

La población promedio se calculó sumando las probabilidades correspondientes a todos los puntos de los mapas incluidos en cada una de las tres regiones de baja energía.

17



61



Figura 11. Representación de la estructura de mínima energía (mínimo global) para los compuestos 17 y 61 obtenidas con el campo de fuerzas MM3.

3.2.2. Aplicación del campo de fuerzas AMBER

Los mapas relajados obtenidos con el campo de fuerzas AMBER ($\epsilon=78$) se muestran en la figura 12, junto con la distribución de probabilidad correspondiente, superpuesta con las distancias interprotónicas ($H_1\cdots H_4$ y $H_1\cdots H_3$) para los compuestos **17**, **38**, **38a**, **38a'**, **53**, **57** y **61**. La geometría inicial de la orientación del C_5-C_6 y los hidroxilos secundarios fue ggggcc o ggggr. Al igual que en el campo de fuerzas MM2, todos los compuestos presentan entre sí similares mapas de energía potencial con una zona central de baja energía; pero AMBER presenta además, en esta zona central de baja energía una región con valores de ψ positivos y también presenta poblaciones de mínima energía en la zona sur. Los confórmeros de mínima energía presentan geometrías análogas en todos los compuestos, variando en porcentaje de población conformacional para cada uno de ellos. En la tabla 4 se informan, para cada compuesto, los mínimos obtenidos a partir de los mapas, así como las energías relativas y el porcentaje de poblaciones conformacionales. En la figura 13 se muestran algunas de las geometrías de mínima energía para cada compuesto. La distribución de probabilidad obtenida en estos cálculos indica la existencia de un 99 % de población en la zona central del mapa para los compuestos **38**, **38a'**, **57** y **61** (en torno a los mínimos 1,2, 3 y 5), situándose una población inferior al 1 % en la zona sur de baja energía. Los compuestos **17**, **38a** y **53** presentan un 54, 60 y 86 % de la población, respectivamente, situada en la zona central y el porcentaje restante en la zona sur (en torno al mínimo 4).

La región central de baja energía se encuentra comprendida por valores de ϕ entre -11 y -74 y valores de ψ entre $+18$ y -54 , lo cual supone, aproximadamente, un 4 % del área total de la superficie de energía potencial. La zona sur constituye menos de 0.1 % adicional de la superficie total. Es preciso mencionar que la mayoría de los estudios tanto teóricos como experimentales, realizados con maltosa indican la existencia de conformaciones en la zona sur (mínimo D de la maltosa) y en la zona central positiva (mínimo C de la maltosa que se corresponde con la estructura de rayos X) y el campo de fuerzas AMBER incluye confórmeros de baja energía próximos a dichas zonas.

Se obtuvieron para cada compuesto numerosos mínimos locales. Estos confórmeros de mínima energía se ubicaron dentro de cinco regiones para una mejor comparación entre los distintos compuestos en función de las distancias $H_1\cdots H_4$, $H_1\cdots H_3$ y $H_1\cdots H_2$. En cada región se consideró el confórmero de menor energía, ya que los mínimos locales de cada región

presentan geometrías análogas al mínimo de dicha región. Al igual que en MM2, los diferentes compuestos presentan conformeros análogos.

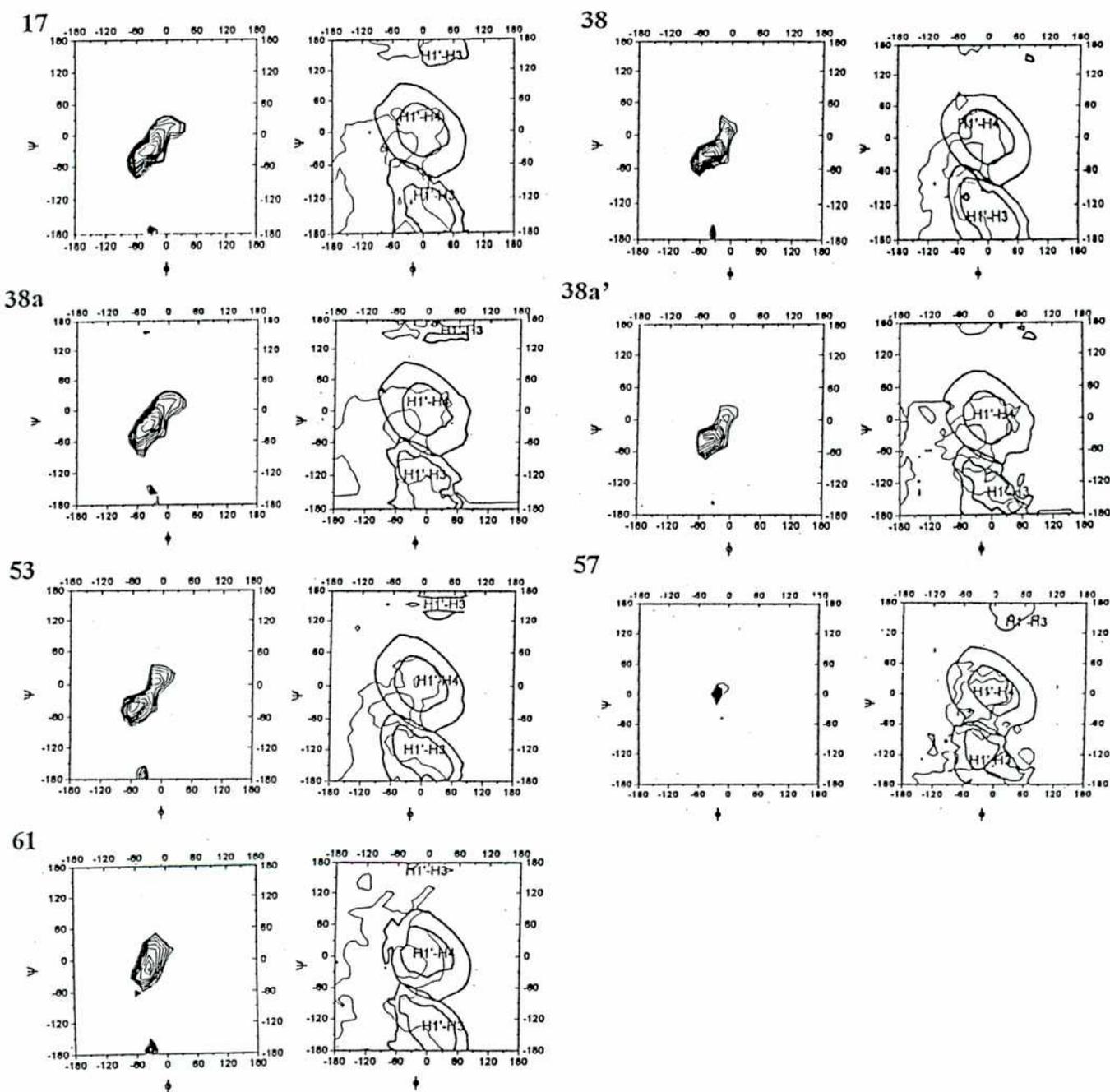


Figura 12. Representación de mapas relajados de los compuestos 17, 38, 38a, 38a', 53, 57 y 61, calculados con el campo de fuerzas AMBER ($\epsilon=78$), junto con la distribución de probabilidad correspondiente superpuestas a las curvas de nivel de las distancias interprotónica. En todos los casos, ϕ se representa en el eje horizontal y ψ en el eje vertical. Las curvas de nivel se disponen cada 1 Kcal/mol en las superficies de energía. En la distribución de probabilidad se muestran las curvas de nivel para poblaciones del 1% y 0.1%. En las curvas de nivel de las distancias se disponen entre 2.5 y 3 Å.

Tabla 4. Energía y poblaciones para las conformaciones de mínima energía de los compuestos 17, 38, 38a, 38a', 53, 57, 61 de acuerdo con el campo de fuerzas AMBER con $\epsilon=78$.

		Región Ia	Región Ib	Región II	Región III	Región IV
	Confórmero	1	2	3	4	5
	ϕ	-11 a -36	-11 a -41	-29 a -63	-34 a -39	-52 a -74
	ψ	0 a 18	-0. A -36	-18 a -37	-162 a -180	-36 a -54
	ϕ/ψ	-16/+17	-34/-19	-40/-35	-36/-162	-66/-54
17	ΔE		0.2-2.7	0.0-2.7	1.1-2.3	1.1-2.2
	PPP%	<1	21.4	17.5	45.6	14.6
38	ΔE	4.0-4.6	0.6-3.2	0.0-4.4		2.0-4.1
	PPP%	9.2	21.6	40.2	<1	28.0
38a	ΔE		0.1-2.5	0.0-2.3	1.0-2.5	1.2-2.3
	PPP%	<1	22.2	21.1	40.7	15.1
38a'	ΔE		1.3-4.4	0.0-3.9		1.0-3.6
	PPP%	<1	16.6	32.9	<1	48.5
53	ΔE	3.3-3.5	3.7-4.0	0.0-1.4	3.5-4.2	0.6-2.9
	PPP%	10.4	3.5	33.5	14.9	37.7
57	ΔE	2.4-3.8	0.0-3.1			
	PPP%	27.6	69.4	<1	<1	<1
61	ΔE	2.6-3.4	0.0-2.0	1.7-3.4		
	PPP%	8.6	72.3	17.1	<1	<1

PPP%: porcentaje de las poblaciones promedio.

Los ΔE el primer valor corresponde al confórmero de más baja energía de cada región, el segundo valor corresponde al mínimo local de mayor energía de dicha región.

La poblaciones promedio se calculó sumando las probabilidades correspondientes a todos los puntos de los mapas incluidos en cada una de las cuatro regiones de baja energía.

La diferencia del campo de fuerzas AMBER y MM2 es la región que corresponde a las distancias H_1-H_3 . En el primer campo de fuerzas presenta intersección con la zona sur y en MM2 con la zona central. Además, AMBER en la zona central presenta valores de ψ positivo, que no se observan en MM2.

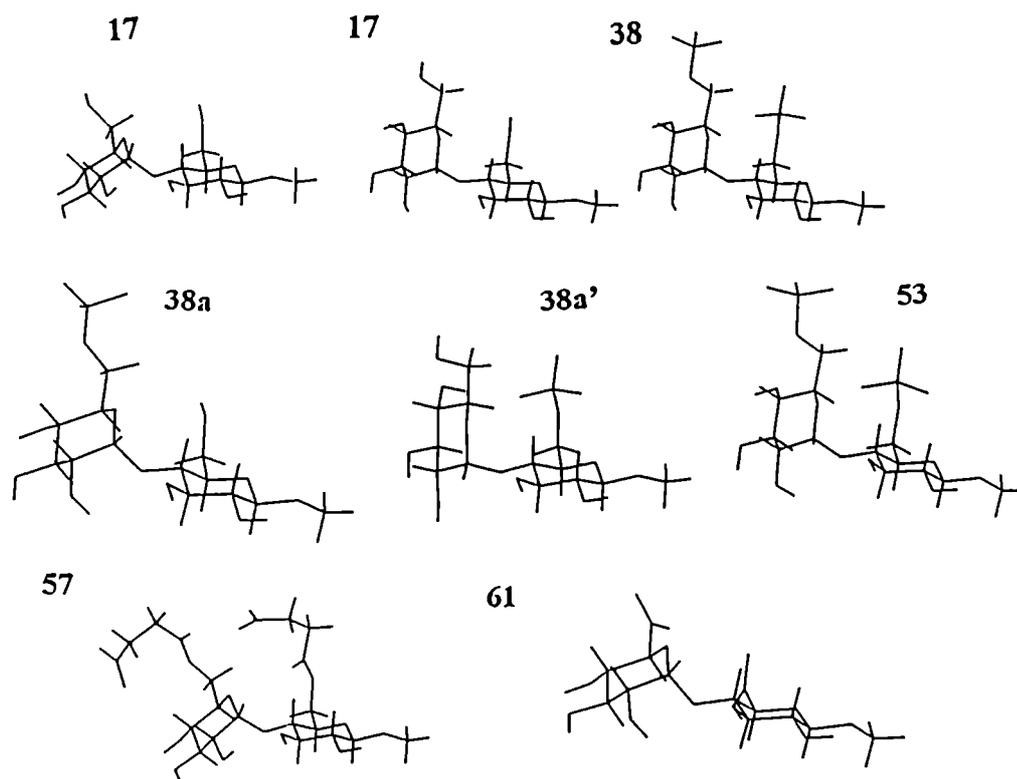


Figura 13. Representación de la estructura de mínima energía para los compuestos 17, 38, 38a, 38a', 53, 57, 61 obtenidas con el campo de fuerzas AMBER..

Una comparación de los compuestos aniónicos con el metil β -maltósido puede observarse en la tabla 4:

El 6'-monosulfato 38a presenta porcentajes de poblaciones promedio similares al compuesto 17 en los cinco mínimos de baja energía. Al igual que en el campo de fuerzas MM2, la monosulfatación en el C-6' predice resultados similares al metil β -maltósido. En estos compuestos (17 y 38a) el 45 % y el 40%, respectivamente, de la población se sitúa en la zona sur del mapa (mínimo 4). Los derivados aniónicos 6,6'-di-O-sustituídos tienen una población entre 9 y 25 % en la zona definida por el mínimo 1, mientras que 17 presenta una población inferior al 1% al igual que 38a y 38a'. En los mínimos 2 y 3 de los compuestos 17, 38a, 38a' y 53 se sitúa del 38 al 50% de la población; mientras que 38, 57 y 61 presentan valores mayores al 60 %. En la zona sur los derivados aniónicos 38, 38a', 57 y 61 muestran una población inferior al 1%, mientras el derivado fosfatado 53 presenta una población del 15%. En la región IV (definida por el mínimo 5) presentan poblaciones entre 14 y 48%, para los compuestos sulfatados, fosfatado y el metil β -maltósido (17). Estos datos son de utilidad para la interpretación de los valores de efecto NOE entre los protones que presentan dicho

efecto y serán sensibles a las poblaciones conformacionales existentes en cada zona de baja energía (sección 3.2.4).

3.2.3. Aplicación del método Monte Carlo

El alto número de ángulos de torsión de la cadena de succinato del compuesto **57** hizo que se utilizara un método estocástico para la búsqueda conformacional de dicha cadena y luego utilizar los ángulos torsionales obtenidos en este método en la estructura de partida para construir el mapa relajado por el método sistemático. Se utilizó el método Monte Carlo instalado en el programa MACROMODEL^[90JCO440]. El campo de fuerzas elegido fue el MM2 ($\epsilon=78$). La elección de MM2 se debió a que en los cálculos de mecánica molecular describen bien a los mínimos A y B de la maltosa.

Se tomaron como estructura de partida los mínimos 1-3 encontrados para el metil β -maltósido con el campo de fuerzas MM2, y se agregaron las cadenas de succinato a cada mínimo. La orientación del enlace C₅-C₆ se dispuso en la orientación gggg y tgtg. Esta última orientación es la menos favorecida por poseer interacciones desestabilizantes entre el O₄ y O₆, pero se eligió para no predeterminedar la orientación de C₅-C₆ en gg o gt y para que evolucionara a gg o gt durante la minimización. Se analizaron 6 estructuras de partida.

En un primer paso, la geometría inicial se minimizó para obtener una estructura de baja energía. Cada conformero se utilizó como punto de partida en la búsqueda conformacional. El protocolo seguido fue el siguiente: en cada paso de Monte Carlo se cambiaron 10 ángulos torsionales al azar (figura 14), se fijó el ángulo en el ϕ y ψ en el valor de cada mínimo (mínimo 1, 2 y 3) encontrado para el metil β -maltósido y se minimizó la estructura obtenida.

Los resultados obtenidos para los 6 conformeros fueron similares. Se encontraron entre 500 y 600 conformeros para cada estructura de partida. Se tomaron los conformeros que estaban dentro de la ventana de energía de 10 Kcal/mol por encima del mínimo de más baja energía, encontrándose 12 mínimos para cada estructura de partida. Para las unidades de glucosa y los enlaces glicosídicos se obtienen resultados similares al campo de fuerzas MM2 para cada mínimo. La orientación C₅-C₆ mayoritaria fue gg para todas las estructuras de partida analizadas. Los valores de los ángulos torsionales analizados considerados para ser utilizado en la estructura de partida para obtener el mapa relajado son los siguientes ω_{11} : 180°, ω_{12} : -180°, ω_{13} : -60°, ω_{14} : -60°, ω_{15} : -90°, ya que resultaron ser los mayoritarios.

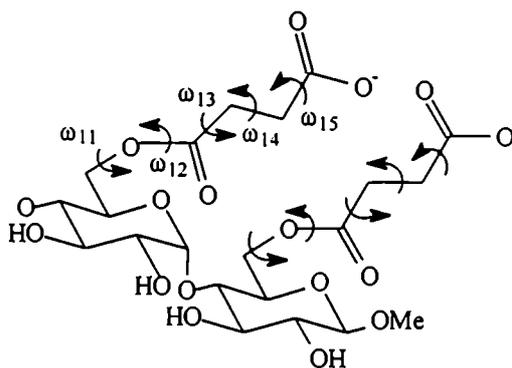


Figura 14. Representación gráfica de los ángulos torsionales elegidos para mover al azar durante la búsqueda conformacional de los mínimos 1, 2 y 3.

3.2.4 Resultados de RMN

Con la finalidad de determinar la validez de las predicciones hechas por cada campo de fuerzas y para cada compuesto se realizaron diversas medidas de RMN: constantes de acoplamiento y efecto NOE (NOE estacionario y NOESY).

El primer paso para el estudio conformacional de los derivados aniónicos **38**, **38a**, **38a'**, **53**, **57** y **61**, fue la asignación de los espectros protónicos en agua. También se asignó el espectro del compuesto **17** para compararlo con los compuestos aniónicos, bajo las mismas condiciones experimentales, pero se obtuvo solapamiento parcial de señales. Con la combinación de técnicas de 2-D RMN tanto homo- (TOCSY, COSY), como heteronucleares (HMQC) se asignaron las resonancias de ^1H . Los valores de los desplazamientos químicos (δ_{H}) de todos los compuestos en solución acuosa se muestran en la tabla 5.

Las constantes de acoplamiento están de acuerdo con la existencia de una conformación $^4\text{C}_1$ para ambos anillos de piranosa en todos los compuestos y, en particular las $^3\text{J}_{\text{H5-H6}}$ indican una distribución gg mayoritaria.

Un problema en el análisis conformacional de los disacáridos **17**, **57** y **61** es el solapamiento parcial entre los protones H_2 y H_4 en el primer y el segundo compuesto y H_3 y H_4 en el compuesto **61**. Todos esos núcleos presentan NOE potencial con H_1 . La medida de estos efectos NOE interresiduo constituye una de las principales fuentes de información en el análisis conformacional de oligosacáridos. Los derivados aniónicos sulfato y fosfato no presentaron solapamientos.

A partir de los desplazamientos químicos (δ_{H}) podemos obtener información de los efectos de apantallamiento o desapantallamiento de los diferentes grupos aniónicos comparándolos con el compuesto neutro. A partir de los espectros de RMN- ^1H de los

derivados aniónicos 38, 38a, 38a', 53, 57, 61 y del compuesto 17, podemos observar de una manera más gráfica el δ_H y $\Delta\delta$ en la tabla 5.

Tabla 5. Desplazamientos químicos de los compuestos 17, 38, 38a, 38a', 53, 57, 61 en D_2O a $37^\circ C$ (referencia HDO).

	17	38	38a	38a'	53	57	61
H1	4.39	4.41 (0.04)	4.39 (0.00)	4.39 (0.00)	4.40 (0.01)	4.39 (0.00)	4.38 (-0.01)
H2	3.30	3.37 (0.07)	3.28 (-0.02)	3.42 (0.12)	3.30 (0.00)	3.31 (0.01)	3.34 (0.04)
H3	3.80	3.84 (0.04)	3.75 (-0.05)	3.76 (-0.04)	3.80 (0.00)	3.79 (-0.01)	3.81 (0.01)
H4	3.61	3.75 (0.14)	3.57 (-0.04)	3.65 (0.04)	3.72 (0.11)	3.63 (0.02)	3.78 (0.17)
H5	3.59	3.84 (0.25)	3.70 (0.01)	3.75 (0.16)	3.72 (0.13)	3.62 (0.03)	3.80 (0.21)
H6a	3.95	4.40 (0.45)	3.96 (0.01)	4.38 (0.43)	4.10 (0.15)	3.95 (0.00)	--
H6b	3.72	4.24 (0.52)	3.77 (0.05)	4.18 (0.46)	3.93 (0.21)	3.71 (-0.01)	--
H1'	5.37	5.53 (0.16)	5.34 (-0.03)	5.42 (0.05)	5.48 (0.11)	5.39 (0.02)	5.54 (0.17)
H2'	3.57	3.64 (0.07)	3.58 (0.01)	3.55 (-0.02)	3.60 (0.03)	3.59 (0.02)	3.55 (-0.02)
H3'	3.69	3.62 (-0.07)	3.67* (-0.02)	3.70* (0.01)	3.77 (0.08)	3.70* (0.01)	3.72 (0.03)
H4'	3.65	3.80 (0.15)	3.43* (-0.22)	3.44* (-0.21)	3.58 (-0.07)	3.43* (-0.22)	3.42 (-0.23)
H5'	3.72	3.94 (0.22)	3.90 (0.18)	3.70 (-0.02)	3.85 (0.13)	3.70 (-0.02)	3.97 (0.25)
H6'a	3.85	4.39 (0.54)	4.28 (0.43)	3.86 (0.01)	3.85 (0.00)	3.86 (0.01)	--
H6'b	3.75	4.33 (0.58)	4.20 (0.45)	3.77 (0.02)	3.85 (0.10)	3.77 (0.02)	--

() $\Delta\delta = \delta_{\text{compuesto}} - \delta_H$.

* pueden estar intercambiados.

Las diferencias esenciales entre los desplazamientos químicos de los compuestos sulfatados (**38**, **38a** y **38a'**) y fosfatados (**53**) con el compuesto **17** se encuentran en los protones geminales del grupo hidroxilo derivatizado (sulfatado o fosfatado) que muestran un desplazamiento a campos más bajos de ~ 0.45 y ~ 0.15 respectivamente; mientras que el $H_{1'}$ muestra un desplazamiento con la misma orientación de 0.16 y 0.11 en los compuestos **38** y **53**, respectivamente. Los H_4 y H_5 presentan diferencias menos significativas en los desplazamientos químicos de todos estos compuestos.

En cuanto a las diferencias en δ_H entre **61** y **17**, los protones $H_{1'}$, H_4 , H_5 y H_5' muestran un desplazamiento a campos más bajos y H_4' lo hace a campos más altos.

Por otro lado, el compuesto **57** no muestra diferencias significativas en desplazamiento químico respecto de **17**.

Como se mencionó anteriormente, el efecto nuclear Overhauser es otro parámetro experimental muy importante, ya que relaciona directamente distancias entre dos protones a través del espacio y puede utilizarse para determinar la proximidad o separación de dos núcleos en el espacio, lo que da idea tridimensional de una molécula.

En nuestro caso, los NOEs más informativos para el análisis conformacional de los compuestos **17**, **38**, **38a**, **38a'**, **53**, **57** y **61** son los NOEs entre protones de las unidades interglicosídicas.

Los resultados de las medidas experimentales NOESY de los compuestos **17**, **38**, **38a**, **38a'**, **53**, **57**, **61** en D_2O se muestran en la tabla 6. Se realizaron también experimentos de T-ROESY^[92JA3157]. El NOE $H_{1'}$ - H_4 obtenido para el compuesto **17** a 300 MHz presenta variación con los valores publicados a 500 MHz^[86CAR175], aunque la medida de este NOE a 300 MHz puede estar levemente subestimado, ya que al presentar un solapamiento parcial de H_4 con H_2' dificulta las medidas de áreas. Respecto a las diferencias de NOEs a diferentes campos (300 y 500 MHz) para un mismo compuesto, en bibliografía se reportan estudios sobre disacáridos donde la relación de NOEs da prácticamente el mismo valor^[95IJ137], en cambio, otros estudios realizados por Carver y colaboradores^[92BC10018] encuentran diferentes valores de NOEs.

Tabla 6. Valores experimentales y teóricos de NOESY para los compuestos 17, 38, 38a, 38a', 53 y 57 en D₂O a 37°C, a 300 y 500 MHz. NOE estacionarios medidos y calculados para 17 en D₂O a 37°C, a 500 MHz.

		Intensidad %		
		H1'-H2'	H1'-H4	H1'-H3
17	Exp 500MHz ^[86CAR175]	7.9 (1.00)	5.9 (0.75)	1.0 (0.13)
	MM2	8.0 (1.00)	3.8 (0.48)	1.9 (0.24)
	AMBER	7.9 (1.00)	3.4 (0.43)	2.5 (0.32)
	MM3	7.5 (1.00)	2.1 (0.28)	2.6 (0.35)
	Exp 300MHz	10.5 (1.00) ^b	5.3 (0.51) ^{b,c}	1.7 (0.16)
	MM2	9.7 (1.00)	5.5 (0.58)	2.3 (0.23)
	AMBER	10.4 (1.00)	4.7 (0.45)	3.5 (0.34)
	MM3	9.3 (1.00)	3.0 (0.32)	3.2 (0.34)
38	Exp 500MHz	6.0 (1.00)	6.3 (1.05)	1.7 (0.28)
	MM2	5.3 (1.00)	2.6 (0.50)	1.2 (0.23)
	AMBER	6.1 (1.00)	3.3 (0.54)	1.1(0.18)
38a	Exp 500MHz ^a	7.8 (1.00) ^b	7.8 (1.00) ^b	2.0 (0.25)
	MM2	5.8 (1.00)	3.5 (0.60)	1.4 (0.24)
	AMBER	6.7 (1.00)	3.3 (0.49)	2.9 (0.43)
38a'	Exp 500MHz ^a	7.1(1.00)	6.8 (0.96)	1.7 (0.24)
	MM2	5.7 (1.00)	2.5 (0.44)	1.4 (0.25)
	AMBER	6.2 (1.00)	2.6 (0.42)	1.5 (0.24)
53	Exp 300MHz	12.0 (1.00)	12.0 (1.00)	4.0 (0.33)
	MM2	12.4 (1.00)	3.1 (0.25)	2.4 (0.19)
	AMBER	11.3 (1.00)	4.7 (0.42)	3.0 (0.26)
57	Exp 500MHz	5.7 (1.00) ^b	4.1 (0.72) ^b	2.5 (0.44)
	MM2	6.1 (1.00)	5.9 (0.97)	1.3 (0.21)
	AMBER	6.9 (1.00)	8.8 (1.28)	----
61	Exp 500MHz	4.7 (1.00)	6.6 (1.40) ^d	
	MM2	5.0 (1.00)	4.1 (0.82)	0.6 (0.12)
	AMBER	4.8 (1.00)	6.2 (1.30)	
	MM3	5.1 (1.00)	1.7 (0.33)	1.8 (0.35)

En los cálculos teóricos se utilizaron valores de $\tau c = 4.6 \cdot 10^{-10}$ para 17, $9 \cdot 10^{-11}$ para 38, $1.2 \cdot 10^{-10}$ para 38a y 38a', $1.2 \cdot 10^{-10}$ para 53, $1.3 \cdot 10^{-10}$ para 57 y 61.

() NOEs relativos a H₁'-H₂'.

La constante dieléctrica de los diferentes campos de fuerzas es $\epsilon = 78$.

^a Presentan también NOEs H₁'-H₃', H₁'-H₄', H₁'-H₅', H₁'-H₂' menores al 1%.

^b Solapamiento parcial de señales.

^c NOE relativo a H₁'-H₂' posiblemente subestimado.

^d Solapamiento de señales.

En las figuras 15-21 (se encuentran en el anexo de espectros de RMN) se muestran los espectros de RMN-¹H en D₂O a 37°C y/o TOCSY y la representación de los cortes correspondientes al H_{1'} de los experimentos de NOESY de **17, 38, 38a, 38a', 53, 57 y 61** en D₂O. Todos los NOEs interresiduos observados para dichos derivados se encuentran dentro de los NOEs esperados para derivados de maltosa.

En las figuras 7, 10 y 12 (sección 2.3.2 y 2.3.3) se muestran las representaciones de las distancias interprotónicas H_{1'}-H₃ y H_{1'}-H₄ (acorde con los NOEs encontrados experimentalmente), superpuestas con la distribución de probabilidad, en función de ϕ y ψ para los compuestos **17, 38, 38a, 38a', 53, 57 y 61** con el campo de fuerzas MM2 y AMBER y los compuestos **17 y 61** con el campo de fuerzas MM3.

Los valores de efecto NOE entre los protones H_{1'}-H₃ y H_{1'}-H₄ serán sensibles a las poblaciones conformacionales existentes en las zonas de baja energía. Así, puede observarse que la región que se corresponde con distancias H_{1'}-H₃ cortas (<3 Å) presentan, en todos los compuestos, una intersección con la zona de baja energía correspondiente al mínimo 3 (zona central) para los campos de fuerzas MM2 y MM3 y en AMBER lo hace en la zona sur (mínimo 4). De forma análoga, el NOE H_{1'}-H₄ será representativo de las poblaciones conformacionales localizadas en la zona central del mapa (mínimos 2 y 3 en MM2 y MM3 y mínimos 1, 2 y 3 en AMBER). El mínimo 4 en MM2 y MM3 y el mínimo 5 en AMBER indican la presencia de otro NOE que no se detectó experimentalmente, con lo cual, en principio, la existencia de población en dicha zona debería ser muy pequeña o nula.

A partir de los cálculos de mecánica molecular efectuados para los compuestos **17, 38, 38a, 38a', 53, 57 y 61** se obtuvieron los NOEs teóricos (tabla 6), empleando para ello una aproximación cuantitativa que utiliza una matriz de relajación completa, tal como se describe en la sección experimental. Se utilizó un modelo simple, tanto desde el punto de vista computacional, como de la derivación del NOE, pues se utilizaron las aproximaciones de cuerpo rígido y de movimiento isotrópico. El cálculo de los valores teóricos de NOE se realizó utilizando un $\tau_c=9\cdot 10^{-11}$ s para el compuesto **17** y $5\cdot 10^{-10}$ s para **38, 38a, 38a', 53, 57 y 61**, se ajustó el NOE H_{1'}-H_{2'} que permitió un mejor ajuste de los NOEs teóricos intraresiduos a los valores experimentales).

Si comparamos los NOEs experimentales de los compuestos **17, 38, 38a, 38a', 53, 57 y 61** con los calculados a partir de los cálculos de mecánica molecular (tabla 6) dio un

acuerdo cualitativo. Este análisis cualitativo puede proporcionar una idea del comportamiento conformacional de los compuestos analizados en solución. Así, la existencia de NOE entre los protones H_{1'}-H₄ indica que estos compuestos pasan gran parte del tiempo en la zona central de baja energía. Este hecho está en concordancia con los resultados encontrados por Ott y Meyer^[96CAR11] para la maltosa. Dicho NOE es más intenso en los compuestos aniónicos que en el compuesto neutro. Esta conclusión está, a su vez, apoyada por la existencia de NOE entre el H_{1'} y H₃ (población en la zona central), siendo también más intenso este NOE en los compuestos aniónicos. También el NOE entre los protones H_{1'} y H₃, demuestra que la zona central del mapa no es la única poblada en solución, estando también presente el mínimo 4 como describe AMBER en la zona sur, aunque en forma minoritaria. Los mínimos 4 (en MM2 y MM3) y el mínimo 5 en AMBER, en principio, no estarían poblados, como se mencionó anteriormente. De acuerdo con estos datos, los compuestos 17, 38, 38a, 38a', 53, 57, 61 existen en solución como una mezcla de dos poblaciones conformacionales diferentes, definidas por los mínimos 1, 2 y 3 de cada campo de fuerzas en la zona central y el mínimo 4 descrito por AMBER en la zona sur. Como puede observarse los diferentes derivados presentan resultados similares pero varían los porcentajes de poblaciones conformacionales de cada zona.

3.2.5 Comparación entre los valores experimentales de NOE y los cálculos teóricos.

Si observamos los valores experimentales y teóricos de NOE (tabla 6), podemos sacar las siguientes conclusiones para cada compuesto:

Metil β-maltósido (17): El análisis de los datos se realizó sobre la base del NOE experimental a 500MHz^[86CAR175], ya que, como se mencionó anteriormente, existe un solapamiento parcial del H_{2'} y H_{4'}, lo que dificulta obtener una medida exacta de los NOEs analizados a 300MHz.

-Campo de fuerzas MM2: El valor de NOE teórico H_{1'}-H₄ es inferior a su valor experimental. A su vez, los valores H_{1'}-H₃ están sobrestimados. De acuerdo con esto, cabe esperar que los valores de las poblaciones existentes en torno a los mínimo 1 y 2 (zona central del mapa) sean superiores al 60% que predice MM2. Asimismo, la población en torno al mínimo 3 está claramente sobrestimada, su valor real debe ser inferior al 34%. Por último, la población en el mínimo 4 debería ser casi nula ya que no pertenece a las zonas que describen los NOEs experimentales.

-Campo de fuerzas MM3: El valor teórico del NOE H_1-H_3 es claramente superior al experimental. De acuerdo con esto, la población en torno al mínimo 3 debería ser inferior al 61%. El valor teórico del NOE H_1-H_4 es muy inferior al medido, lo cual indica que los cálculos realizados subestiman, en gran medida, la población conformacional existente en torno a los mínimos 1 y 2 y la población en dichos mínimos debería ser superior al 28%. La población en torno al mínimo 4 debería ser casi nula (véase igual análisis que para MM2).

-Campo de fuerzas AMBER: Puede observarse cómo los valores teóricos para el NOE H_1-H_3 son superiores al experimental. Las poblaciones para la zona sur del mapa (mínimo 4) deberían ser muy inferiores a 45%. El NOE H_1-H_4 está subestimado y las poblaciones deberían, en principio, ser mayores a 39% (corresponden a los mínimos 1, 2 y 3). Por último, la población en torno al mínimo 5 debería ser casi nula (véase igual análisis que MM2).

Metil α -D-glucopiranosil 6-sulfato de sodio-(1 \rightarrow 4)- β -D-glucopiranosido 6-sulfato de sodio (38):

-Campo de fuerzas MM2: El valor de H_1-H_3 es ligeramente inferior al valor experimental. La población calculada para esta zona (mínimo 3, zona central), debería, en principio, ser algo superior al 28%. La población en torno al mínimo 4 debería ser nula, ya que dicha zona no explica los NOEs experimentales. El valor del NOE H_1-H_4 calculado está aún más subestimado respecto del experimental, comparándolo con el compuesto neutro 17 en el campo de fuerzas MM2; cabe esperar que la población existente en torno a los mínimos 1 y 2 sea superior al 64%. Como la población en los mínimos 1, 2 y 3 debería aumentar (llegando a más del 100%), entonces un aumento de NOE entre los protones H_1 y H_4 podría lograrse aumentando la población en el mínimo 1 y disminuyendo en el mínimo 2, ya que el primer mínimo presenta distancias entre dichos protones menores a 2.5 Å y así sobrestima el NOE H_1-H_4 .

-Campo de fuerzas AMBER: El valor teórico H_1-H_4 es inferior al experimental. La población en torno a los mínimos 1, 2 y 3 debería, en principio, aumentar. A su vez, el valor de NOE H_1-H_3 está subestimado y la población en la zona sur del mapa debería ser superior al 1%. Los valores teóricos predicen una población del mínimo 5 de 28% y la población en torno a ese mínimo debería ser casi nula para ser compatible con los datos experimentales.

Metil α -D-glucopiranosil 6-sulfato de sodio-(1 \rightarrow 4)- β -D-glucopiranosido (38a):

-Campo de fuerzas MM2: El valor de NOE H_1-H_4 teórico es inferior al experimental, al igual que en 17 en el campo de fuerzas MM2 la población debe ser superior al 62%. El

NOE H₁-H₃ es, al igual que en **38** (campo de fuerzas MM2), ligeramente inferior al experimental. Cabe esperar un valor algo superior al 32% en torno al mínimo 3. Por último, la población en el mínimo 4 debe ser casi nula.

-Campo de fuerzas AMBER: El análisis de los datos para el compuesto **38a** es similar al del compuesto **17** en este campo de fuerzas.

Metil α -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 4)- β -D-glucopiranosido 6-sulfato de sodio (**38a'**):

-Campo de fuerzas MM2: Puede realizarse el mismo análisis que para el compuesto **38** en este campo de fuerzas.

-Campo de fuerzas AMBER: La población en torno al mínimo 5 estaría incorrectamente reproducida (el valor es de 48%) y debería ser casi nula ya que dicha zona no explica los NOEs experimentales. Sin embargo, el valor teórico del NOE H₁-H₃ coincide con el experimental. Por último, el valor teórico del NOE H₁-H₄ es inferior al medido, lo cual indica que los cálculos realizados subestiman, en gran medida, la población conformacional existente en torno a los mínimos 1, 2 y 3. El valor real debería ser superior al 50%.

Metil α -D-glucopiranosil 6-fosfato de sodio-(1 \rightarrow 4)- β -D-glucopiranosido 6-fosfato de sodio (**53**):

-Campo de fuerzas MM2: El valor teórico H₁-H₄ es claramente muy inferior al experimental. La población en torno al mínimo 1 estaría, en principio, muy subestimada y debería ser mucho mayor que el 14% que predice el valor teórico (véase el mismo análisis que para el compuesto **38** en el mismo campo de fuerzas). Así, los mínimos 1 y 2 deberían ser mayores que un 45%. También los valores de NOE H₁-H₃ están subestimados; el cálculo teórico predice un 45%, tendría que explicar un valor más alto. Este valor es el más alto comparando con los otros compuestos para el campo de fuerzas MM2, con lo cual el mínimo 3 no puede ser el único mínimo que explique dicho NOE, pudiendo estar poblada alguna zona que no explica MM2. La población en torno al mínimo 4 debería ser casi nula.

-Campo de fuerzas AMBER: La población en torno al mínimo 5 estaría incorrectamente reproducida (el valor es de 37%) y debería ser casi nula. El valor teórico del NOE H₁-H₃ es inferior al medido, indicando que la población conformacional en torno al mínimo 3 debe ser mayor al 15%. Por último, el valor teórico del NOE H₁-H₄ es inferior al medido, lo cual indica que los cálculos realizados subestiman, en gran medida, la población conformacional existente en torno a los mínimos 1, 2 y 3. El valor real debería ser superior al 47%.

Metil α -D-glucopiranosil 6-succinato de sodio-(1 \rightarrow 4)- β -D-glucopiranosido 6-succinato de sodio (57):

-Campo de fuerzas MM2: Predice correctamente la población en torno al mínimo 4 (menor al 1%). El valor del NOE H₁-H₄ calculado es superior al valor experimental. De acuerdo con esto, la población en torno al mínimo 1 debería, en principio, ser inferior al 67% y no predice población en el mínimo 2. Por último, el valor teórico del NOE H₁-H₃ es inferior al calculado y la población en torno al mínimo 3 debería ser superior a 30%.

-Campo de fuerzas AMBER: Predice correctamente la población existente en torno al mínimo 5 (<1%). El valor del NOE H₁-H₄ es superior al valor experimental. De acuerdo con esto, la población en torno a los mínimos 1, 2 y 3 debería, en principio, ser inferior al 95% o desplazarse la población del mínimo 1 y el mínimo 2 hacia 3. El campo de fuerzas AMBER no predice NOE H₁-H₃; por lo tanto, de acuerdo con el valor experimental, la población en la zona sur debería ser mayor al 1%.

(α -D-glucopiranosil)uronato de sodio-(1 \rightarrow 4)-(metil β -D-glucopiranosil)uronato de sodio (61):

Experimentalmente sólo se pudo determinar para el compuesto 61 la suma de los NOEs H₁-H₃ y H₁-H₄ debido al solapamiento de señales. Con lo cual, no se puede predecir la población en cada mínimo.

-Campo de fuerzas MM2: Los valores teóricos de los NOEs H₁-H₃ más H₁-H₄ son ligeramente inferiores al experimental (mínimos 1, 2 y 3) la población en el mínimo 4, debería ser casi nula.

-Campo de fuerzas MM3: La suma de los valores teóricos del NOE H₁-H₃ más H₁-H₄ es claramente inferior al experimental (mínimos 1, 2 y 3). La población en el mínimo 4 debería ser casi nula.

-Campo de fuerzas AMBER: La suma de los NOE H₁-H₃ y H₁-H₄ teóricos en la zona central (mínimos 1, 2, 3 y 4), es ligeramente inferior al valor medido. De acuerdo con esto, debería aumentar la población en el mínimo 4 (para aumentar el NOE H₁-H₃). Predice correctamente la población en torno al mínimo 5 (<1%).

Las poblaciones obtenidas para cada campo de fuerzas y para cada región en la zona central y la zona sur del mapa, junto con los valores que se estiman sobre la base de los datos experimentales para cada compuesto se resumen en la tabla 7.

Los datos estimados experimentalmente abarcan un rango muy amplio de porcentaje de población, lo que no permite realizar una comparación cuantitativa de los diferentes porcentajes de población en cada región de los derivados aniónicos y con el compuesto neutro.

Tabla 7. Poblaciones atribuidas por cada campo de fuerzas a cada una de las regiones de baja energía junto con los valores estimados experimentalmente para los compuestos 17, 38, 38a, 38a', 53, 57 y 61.

		Zona central			Zona sur	
		Región I	Región II	Región IV	Región III	Región III
		%	%	%	%	%
17	MM2 ($\epsilon=78$)	35.9	24.8	5.1	34.2	-
	MM3 ($\epsilon=78$)	1.7	26.2	10.5	61.6	
	AMBER ($\epsilon=78$)	22.4	17.5	14.6		45.6
	Exp*	mayor 35	mayor 26	menor 1	menor 34	
38	MM2 ($\epsilon=78$)	23.5	40.4	7.9	28.2	-
	AMBER ($\epsilon=78$)	30.8	40.2	28.0		<1
	Exp*	mayor 30	menor 41	menor 1	mayor 28	
38a	MM2 ($\epsilon=78$)	34.9	27.6	4.9	32.6	-
	AMBER ($\epsilon=78$)	23.2	21.1	15.1		40.7
	Exp*	mayor 34	menor 21	menor 1	~32	
38a'	MM2 ($\epsilon=78$)	20.9	39.4	8.0	31.7	-
	AMBER ($\epsilon=78$)	17.6	32.9	48.5		<1
	Exp*	mayor 21	menor 33	menor 1	~32	
53	MM2 ($\epsilon=78$)	14.5	31.0	8.8	45.7	-
	AMBER ($\epsilon=78$)	13.9	33.5	37.7		14.9
	Exp*	mayor 14	menor 31	menor 1	mayor 45	
57	MM2 ($\epsilon=78$)	67.4	<1	1.0	30.6	-
	AMBER ($\epsilon=78$)	97.0	<1	<1		<1
	Exp*	menor 67	~1	menor 1	mayor 31	
61	MM2 ($\epsilon=78$)	26.3	34.4	9.4	29.9	-
	MM3 ($\epsilon=78$)	2.1	26.3	16.8	54.8	
	AMBER ($\epsilon=78$)	81.4	17.1	<1		<1
	Exp*	a	a	menor 1	a	a

*Los valores experimentales (Exp) son posibles estimaciones para aproximar el valor teórico al experimental.

a- no me permite predecir valores experimentales por el solapamiento de señales.

Para completar el 100% de población en cada compuesto (4% en 17, 12% en 38a, 13% en 38a', 9% en 53) debería aumentar el porcentaje de población en las regiones que sobrestimen aquellos NOEs cuyos valores calculados fueron inferiores a los experimentales (región I y II para 17, región I para 38a y 38a' y región I y III para 53).

Los valores experimentales de los NOEs interresiduos de los derivados aniónicos (**38**, **38a**, **38a'**, **53**, **57** y **61**) pueden compararse con los del compuesto neutro **17** de forma análoga a lo descrito por Meyer^[93CAR225]. Esta comparación, considerando además las poblaciones conformacionales en zonas de baja energía que aportan los datos teóricos de mecánica molecular, permite llegar a las siguientes conclusiones:

-La presencia de los grupos 6,6'-di-*O*-sulfato en **38**, 6'-*O*-mono-sulfato en **38a**, 6-*O*-mono-sulfato en **38a'** y 6,6'-di-*O*-fosfato en **53** incrementan el NOE H_{1'}-H₄ respecto del compuesto neutro **17**, indicando distancias promedio más cortas entre los H_{1'} y H₄. El incremento es mayor cuando el grupo es fosfato que cuando es sulfato. De acuerdo con esto, es de esperar que el valor de la población existente, en especial en la región I y en menor medida la región II (zona central), sea superior en el compuesto **53**, luego en **38**, **38a** y **38a'** y menor en el compuesto **17**. El grupo 6,6'-di-*O*-succinato en el compuesto **57** presenta valores similares a **17** y, por lo tanto, es de esperar el mismo porcentaje de población en la zona central (región I y II). El compuesto **61** no puede analizarse debido al solapamiento de señales entre el H₄ y H₃.

-El valor experimental del NOE H_{1'}-H₃ en el metil β-maltósido (**17**) es más pequeño que en los derivados aniónicos **38**, **38a**, **38a'**, **53** y aún más que el compuesto succinilado **57**. Esto indicaría distancias promedio más cortas entre los H_{1'} y el H₃ en los derivados aniónicos. De acuerdo con esto, la población en torno a la región III (zona central y sur del mapa) debería, en principio, ser superior en **57**, luego en los compuestos sulfatados (**38**, **38a**, **38a'**) y fosfatados (**53**) y menor en el compuesto neutro **17**.

-El porcentaje de población en la región I será más sensible a la carga del sustituyente, mientras que la región III será influida en mayor medida por el efecto estérico.

3.2.6 Conclusiones

Se han establecido las conformaciones más probables en agua para los compuestos **17**, **38**, **38a**, **38a'**, **53**, **57** y **61**, sobre la base de desplazamientos químicos, efecto nuclear Overhauser y cálculos de mecánica molecular.

El metil β-maltósido (**17**) adopta preferentemente las conformaciones con ángulos interglucosídicos próximos a los mínimos A y B (zona central del mapa) encontrados para el mismo compuesto en bibliografía^[86CAR175, 96CAR111]. Una menor población adopta la conformación con ángulos interglucosídicos próximos al mínimo D (zona sur del mapa).

El análisis conformacional realizado sobre los compuestos aniónicos (**38**, **38a**, **38a'**, **53**, **57** y **61**) permite concluir que dichos compuestos existen en solución como una mezcla de poblaciones conformacionales en torno a la zona central y zona sur del mapa y sus conformeros son similares al compuesto neutro, variando el porcentaje de población en cada mínimo para cada compuesto. La zona más poblada es la zona central del mapa (mínimos 1, 2 y 3), adoptando preferentemente la conformación con ángulos interglucosídicos próximos al mínimo B (mínimo 1 en MM2 y mínimo 2 en AMBER) de la maltosa. También está poblada en menor proporción la zona sur. Este hecho sólo lo explica el campo de fuerzas AMBER (mínimo 4). La población en torno al mínimo 4 en MM2 o el mínimo 5 en AMBER es, probablemente, despreciable.

Los resultados obtenidos a partir de los cálculos de mecánica molecular son claramente dependientes de la parametrización del campo de fuerzas utilizado. Si bien es preciso mencionar que los campos de fuerzas estudiados (MM2, MM3 y AMBER) no proporcionan una reproducción exacta de todos los resultados experimentales.

Estos campos de fuerzas proporcionan resultados que concuerdan cualitativamente, siendo complementarios para el estudio de las poblaciones conformacionales en solución de los compuestos analizados.

El hecho que la región I y en menor medida la región II estén más pobladas para el derivado fosfatado que para el resto de los derivados aniónicos, indicaría una mayor dependencia de la carga para esa población conformacional. Por otra parte, la población conformacional de la región III sería más sensible al efecto estérico, ya que está más poblada para el derivado succinilado que para los restantes derivados aniónicos.

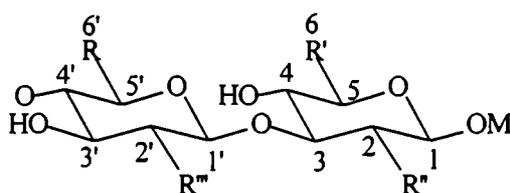
3.3 Estudio de las conformaciones del metil β -laminarabiósido y sus derivados aniónicos en solución. Estudio de la estructura tridimensional de laminara-oligosacáridos y sus derivados sulfatados en solución

Para abordar el estudio conformacional de los β -(1 \rightarrow 3)-glucanos, el punto de referencia fue la conformación de metil β -laminarabiósido.

Las estructuras cristalinas del metil β -laminarabiósido^[92CAR33] y de la β -laminarabiosa^[77CAR137] se resolvieron por rayos X. Dichas conformaciones se caracterizan por ángulos diedros interglucosídicos ϕ (H_{1'}-C_{1'}-O₃-C₃) y ψ (C_{1'}-O₃-C₃-H₃) de valores 43/-52 y 28/-38, respectivamente. Las estructuras cristalinas presentan un enlace hidrógeno intramolecular entre el protón del hidroxilo OH₄ y el oxígeno O_{5'} de la glucosa no reductora. En estudios conformacionales de β -laminarabiosa empleando sólo cálculos de mecánica molecular^[92CAR15], utilizando el campo de fuerzas MM3 con constante dieléctrica 4, se encontró que el ángulo torsional interglucosídico de la conformación de más baja energía obtenida por cálculo ($\phi/\psi=35/-42$) presenta un buen acuerdo con la estructura cristalina; Otros tres mínimos encontrados en estos cálculos se caracterizan por ángulos diedros ϕ/ψ de valores 48/-9, 36/169 y 177/12. Debe tenerse en cuenta que en esta referencia trabajan sólo con cálculos teóricos y a baja constante dieléctrica, como fuera mencionado tiene mucha influencia en la geometría inicial. Otros estudios, realizados β -galactopiranosil-(1 \rightarrow 3)-xilopiranosido^[94T6417] presentaron ángulos ϕ/ψ de 48/7 para el confórmero mayoritario y 23/171, 166/8, -23/-22 y 20/-35 para los confórmeros que se encuentran en menor porcentaje.

Las estructuras del metil β -laminarabiósido (13) y sus derivados aniónicos: metil β -D-glucopiranosil 6-sulfato de sodio-(1 \rightarrow 3)- β -D-glucopiranosido 6-sulfato de sodio (36), metil β -D-glucopiranosil 6-sulfato de sodio-(1 \rightarrow 3)- β -D-glucopiranosido (36a), metil β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 3)- β -D-glucopiranosido 6-sulfato de sodio (36a'), metil β -D-glucopiranosil 2-sulfato de sodio-(1 \rightarrow 3)- β -D-glucopiranosido (44a), metil β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 3)- β -D-glucopiranosido 2-sulfato de sodio (44b), metil β -D-glucopiranosil 6-fosfato de sodio-(1 \rightarrow 3)- β -D-glucopiranosido 6-fosfato de sodio (52), metil β -D-glucopiranosil 6-succinato de sodio-(1 \rightarrow 3)- β -D-glucopiranosido 6-succinato de sodio (56) y (β -D-glucopiranosil)uronato de sodio-(1 \rightarrow 3)-(metil β -D-glucopiranosil)uronato de sodio (60) se muestran en la figura 22, junto con los números utilizados para designar a los átomos. El protocolo seguido en el estudio de las conformaciones de estos compuestos fue análogo al

anteriormente descrito para el caso del metil β -maltósido y sus derivados aniónicos. Se utilizaron los campos de fuerzas MM2 (agua, $\epsilon=78$, 1 D y modelo continuo de agua) y AMBER ($\epsilon=78$) en los cálculos de mecánica molecular para todos los compuestos mencionados y MM3 ($\epsilon=78$) para los compuestos **13** y **60**. El alto número de ángulos de torsión en el compuesto succinilado **56** hizo que se utilizara un método estocástico para la búsqueda conformacional. En concreto, se utilizó el método Monte Carlo para determinar la conformación de la cadena de succinato, y a su vez, esta conformación fue utilizada en la búsqueda conformacional empleando el método sistemático.



	R	R'	R''	R'''
13	CH ₂ OH	CH ₂ OH	OH	OH
36	CH ₂ OSO ₃ Na	CH ₂ OSO ₃ Na	OH	OH
36a	CH ₂ OSO ₃ Na	OH	OH	OH
36a'	OH	CH ₂ OSO ₃ Na	OH	OH
44a	OH	OH	OH	OSO ₃ Na
44b	OH	OH	OSO ₃ Na	OH
52	CH ₂ OPO ₃ Na ₂	CH ₂ OPO ₃ Na ₂	OH	OH
56	CH ₂ OCO(CH ₂) ₂ COONa	CH ₂ OCO(CH ₂) ₂ COONa	OH	OH
60	COONa	COONa	OH	OH

Figura 22. Representación de la estructura del metil β -laminarabiósido(**13**) y sus derivados aniónicos (**36**, **36a**, **36a'**, **44a**, **44b**, **52**, **56** y **60**), junto con los números utilizados para designar los átomos.

Los índices prima designan los átomos del residuo de glucosa no reductor y los que carecen de los mismos describen el residuo reductor.

En cambio, en los oligosacáridos, debido al alto número de ángulos de torsión se utilizó dinámica molecular para la búsqueda conformacional. La estructura de laminara-oligosacáridos y sus derivados sulfatados se muestran en la figura 23.

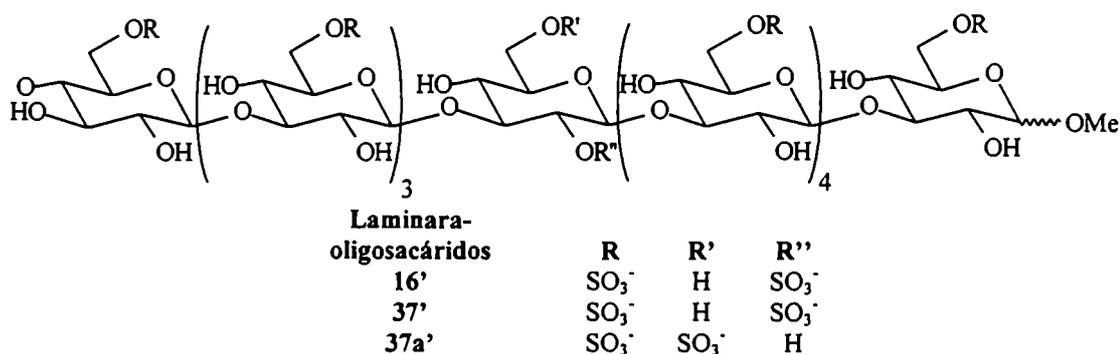


Figura 23. Representación de la estructura laminara-oligosacáridos (16') y sus derivados sulfatados (37' y 37a').

El objetivo es la investigación de las preferencias conformacionales en solución del metil β -laminarabiósido (13) y sus derivados aniónicos (36, 36a, 36a', 44a, 44b, 52, 56 y 60), así como el estudio de la influencia de los sustituyentes aniónicos en el enlace glicosídico y su comparación con el compuesto neutro. También se utilizaron los resultados obtenidos en metil β -laminarabiósido y sus derivados aniónicos para estudiar la estructura tridimensional de β -(1 \rightarrow 3)oligosacáridos en solución.

3.3.1. Aplicación del campo de fuerzas MM-2 y MM-3

Campo de fuerzas MM2 ($\epsilon=78$, en agua y $\epsilon=1$):

A.-Campo de fuerzas MM2 con $\epsilon=78$:

Los mapas relajados de los compuestos 13, 36, 36a, 36a', 44a, 44b, 52, 56 y 60 obtenidos con el campo de fuerzas MM2 ($\epsilon=78$) se muestran en la figura 24, junto con la representación (mediante curvas de nivel) de las distancias interprotónicas relevantes (acorde con los datos de NOEs), en función de ϕ y ψ , superpuestas con la distribución de probabilidad correspondiente. Las conformaciones del enlace glicosídico C₅-C₆ se consideraron gggg para cada compuesto. Las curvas de nivel están dibujadas cada 1 Kcal/mol a partir del punto de mínima energía en cada caso. En cada superficie hay representadas 10 curvas de nivel, cubriéndose así un rango de 10 Kcal/mol. De modo general, las superficies se componen de una zona central, los mínimos de energía más baja de cada compuesto presentan geometrías análogas. Algunos compuestos presentan además una zona lateral con muy bajo porcentaje de población. La zona central se dividió en cuatro regiones para una mejor visualización de los datos y acorde con los datos de NOEs experimentales: una región

la que se corresponde con distancias $H_1\cdots H_3$ cortas (menores que 2.5 Å), una región Ib con distancias $H_1\cdots H_3$ entre 2.5 y 3 Å, una región Ic que se corresponde con distancias $H_1\cdots H_2$ menores que 3 Å y una última región Id donde las distancias entre los protones $H_1\cdots H_3$ y los protones $H_1\cdots H_2$ son mayores que 3 Å. Las regiones Ia y Ib que se corresponden con las distancias $H_1\cdots H_3$ cortas (menores 3 Å) presentan conformeros con ψ negativos; estos conformeros presentan ángulos ϕ y ψ parecidos a los valores encontrados en estado sólido para metil β -laminarabiósido y β -laminarabiosa.

En la figura 25 se muestran los mapas relajados y los mapas de curva de nivel de las distancias interprotónicas relevantes, superpuestas con la distribución de probabilidad correspondiente en función de ϕ y ψ , obtenidos con $\epsilon=78$ en el mismo campo de fuerzas, correspondientes a tres estructuras iniciales (gggtcc, gtgtcc, gtggcc) consideradas para el compuesto sulfatado 36. Puede apreciarse cómo las superficies presentan baja sensibilidad a la geometría inicial; la orientación gggt muestra un mapa de energía diferente pero su mapa de probabilidad coincide con las otras estructuras consideradas. Este resultado sumado a los datos experimentales de constantes de acoplamiento ${}^3J_{H5,H6}$ pequeñas, validan considerar como geometría inicial la estructura gggg cuando se realizan los cálculos con ϵ altas para todos los compuestos analizados. En el compuesto 56, debido al alto número de ángulos torsionales de la cadena lateral, la estructura de dicha cadena se obtuvo por análisis de mecánica molecular empleando el método Monte Carlo; los datos obtenidos en este análisis se emplearon para construir la geometría inicial del mapa relajado (sección 3.3.3).

Las zonas de baja energía en los mapas relajados, para cada compuesto, presentan generalmente valores de ϕ próximos a 60° , acordes con la operatividad del efecto exo-anomérico. A partir de dichos mapas, se obtuvieron para cada compuesto entre 15 y 17 mínimos locales. Estos conformeros de mínima energía se ubicaron dentro de las cuatro regiones en la zona central y una región en la zona lateral, mencionadas anteriormente. En cada región se consideró el conformero de menor energía, ya que los mínimos locales de cada región presentan geometrías análogas a ese conformero de mínima energía de dicha región. Los valores de los ángulos diedros ϕ y ψ correspondientes a cada región y los ángulos ϕ y ψ correspondientes a los mínimos de cada región, así como sus energías relativas del mínimo global de cada región y el mínimo local de mayor energía de la misma región y las poblaciones de las zonas de baja energía, se indican en la tabla 8. En la figura 26 se muestran las geometrías de energía más baja correspondiente a cada compuesto, en distintas orientaciones.

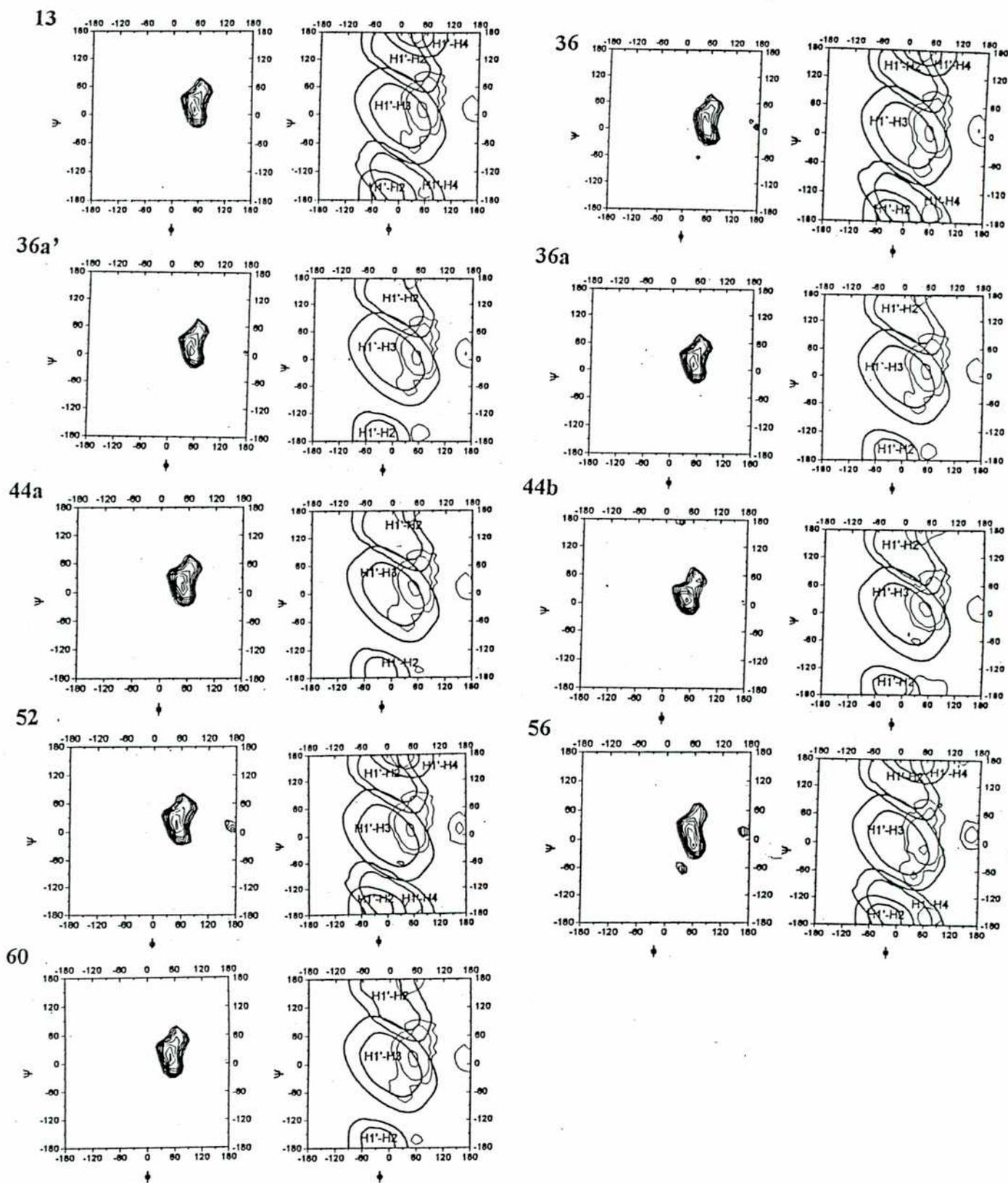


Figura 24. Representación de mapas relajados de los compuestos 13, 36, 36a, 36a', 44a, 44b, 52, 56 y 60 calculados con el campo de fuerzas MM2 ($\epsilon=78$), junto con la distribución de probabilidad correspondiente superpuesta a las curvas de nivel de las distancias interprotónicas relevantes. En todos los casos, ϕ se representa en el eje horizontal y ψ en el eje vertical. Las curvas de nivel se disponen cada 1 Kcal/mol en las superficies de energía. En la distribución de probabilidad se muestran las curvas de nivel para poblaciones del 10%, 1% y 0.1%. En las curvas de nivel las distancias se disponen entre 2.5 y 3 Å.

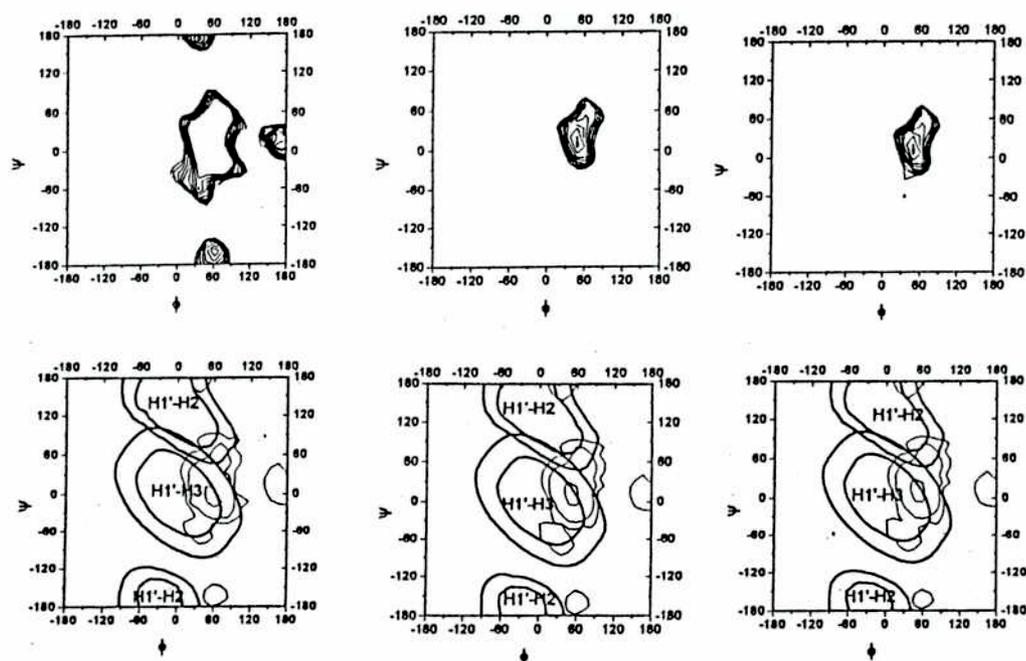


Figura 25. Representación de mapas relajados y la distribución de probabilidad superpuesta con las curvas de nivel de las distancias interprotónicas del compuesto 36 calculadas con el campo de fuerzas MM2 ($\epsilon=78$). En todos los casos, ϕ se representa en el eje horizontal y ψ en el eje vertical. Cada mapa proviene de estructuras con distinta orientación del grupo sulfoniloximetilo (gggt, gtgg, gtgt).

Tabla 8. Energías y poblaciones para las conformaciones de mínima energía de los compuestos 13, 36, 36a, 36a', 44a, 44b, 52, 56 y 60 de acuerdo con el campo de fuerzas MM2 en H_2O y con $\epsilon=78$ y 1.

		Zona central				Zona Lateral	
		Región Ia	Región Ib	Región Ic	Región Id	Región II	
13	MM2 ($\epsilon=78$ D) ^a	ϕ	19 a 54	54 a 71	55 a 71	71 a 89	-
		ψ	-17 a 36	-17 a 54	54 a 71	36 a 54	
	Mínimo ϕ/ψ	54/ 0	54/ 18	71/ 54	71/ 36		
	ΔE	0.00-6.68	0.27-6.18	3.68-4.68	5.58-7.08		
	PPP%	<u>50.8</u>	<u>38.1</u>	<u>7.8</u>	<u>3.3</u>		
	Total	100%				0%	
	MM2 (H_2O) ^b	ϕ	-54 a 54	36 a 53	55 a 71	54	-
ψ	-54 a 36	17 a 52	54 a 71	54			
Mínimo ϕ/ψ	36/ 18	36/ 35	54/ 71	54/ 54			
ΔE	0.00-7.2	1.00-7.3	6.10-6.90	5.70			
PPP%	<u>53.0</u>	<u>39.0</u>	<u>5.5</u>	<u>2.5</u>			
Total	100%				0%		
MM2 ($\epsilon=1$ D) ^c	ϕ	19 a 54	53 a 70	-	-	-	
	ψ	-17 a 35	-17 a 35				
	Mínimo ϕ/ψ	54/ 0	35/ 17				
	ΔE	0.00-7.60	3.50-7.10				
	PPP%	<u>88.0</u>	<u>12.0</u>				
	Total	100%				0%	

36	MM2 ($\epsilon=78$ D) ^d	ϕ	36 a 54	54 a 71	71 a 72	71	162
		Ψ	-17 a 35	-17 a 54	54 a 71	36	17
		Mínimo ϕ/Ψ	54/ 0	54/ 18	72/ 54	71/ 36	162/ 17
		ΔE	0.00-4.30	1.00-6.90	4.70-5.60	6.60	6.40
		PPP%	<u>52.7</u>	<u>37.6</u>	<u>6.2</u>	<u>1.7</u>	<u>1.8</u>
		Total	98.2%				1.8%
		MM2 (H ₂ O) ^e	ϕ	-54 a 54	36 a 53	54 a 71	54
Ψ	-53 a 35	35 a 52	54 a 71	54			
Mínimo ϕ/Ψ	36/ 18	36/ 35	54/ 71	54/ 54			
ΔE	0.00-7.3	1.00-7.20	5.70-6.30	2.30			
PPP%	<u>58.0</u>	<u>30.9</u>	<u>7.9</u>	<u>3.2</u>			
Total	100%				0%		
36a	MM2 ($\epsilon=78$ D) ^f	ϕ	36 a 54	53 a 71	71 a 72	71	162
		Ψ	-17 a 35	-17 a 53	54 a 71	36	18
		Mínimo ϕ/Ψ	54/ 0	54/ 18	72/ 54	71/ 36	162/ 18
		ΔE	0.00-4.20	1.10-6.90	4.80-5.70	6.60	6.50
		PPP%	<u>53.3</u>	<u>37.1</u>	<u>6.1</u>	<u>1.7</u>	<u>1.8</u>
		Total	98.2%				1.8%
		MM2 ($\epsilon=78$ D) ^g	ϕ	19 a 54	53 a 71	70 a 71	71 a 88
Ψ	-17 a 35	-17 a 53	53 a 54	36 a 54			
Mínimo ϕ/Ψ	54/ 0	54/ 18	71/ 54	71/ 36			
ΔE	0.00-6.70	0.30-6.20	3.70-4.70	5.60-7.00			
PPP%	<u>48.7</u>	<u>40.7</u>	<u>7.3</u>	<u>3.3</u>			
Total	100%				0%		
44a	MM2 ($\epsilon=78$ D) ^h	ϕ	18 a 54	54 a 71	71 a 72	71	-
		Ψ	-17 a 35	-17 a 54	54 a 71	36	
		Mínimo ϕ/Ψ	54/ 0	54/ 18	71/ 54	71/ 36	
		ΔE	0.00-6.90	0.00-6.70	4.00-4.90	6.00	
		PPP%	<u>58.1</u>	<u>33.7</u>	<u>6.5</u>	<u>1.7</u>	
		Total	100%				0%
		MM2 ($\epsilon=78$ D) ⁱ	ϕ	18 a 53	53 a 70	55 a 72	71 a 88
Ψ	-16 a 35	-17 a 35	54 a 71	36 a 71	180		
Mínimo ϕ/Ψ	54/ 0	54/ 18	72/ 54	88/ 54	36/ 180		
ΔE	0.00-7.20	0.50-6.70	3.20-7.30	6.50-7.00	6.8		
PPP%	<u>55.7</u>	<u>27.7</u>	<u>12.3</u>	<u>2.9</u>	<u>1.4</u>		
Total	98.6%				1.4%		
52	MM2 ($\epsilon=78$ D) ^j	ϕ	19 a 36	53 a 71	55 a 72	71 a 88	162
		Ψ	-17 a 36	-18 a 53	54 a 71	36 a 54	18
		Mínimo ϕ/Ψ	54/ 0	54/ 18	72/ 54	71/ 36	162/ 18
		ΔE	0.00-6.20	0.01-5.60	2.40-5.80	4.60-5.50	4.8
		PPP%	<u>43.3</u>	<u>37.1</u>	<u>12.8</u>	<u>4.5</u>	<u>2.3</u>
		Total	97.7%				2.3%
		MM2 (H ₂ O) ^m	ϕ	-53 a 53	36 a 53	54 a 71	54 a 71
Ψ	-17 a 37	18 a 53	54 a 71	36 a 54			
Mínimo ϕ/Ψ	37/ 18	36/ 35	70/ 71	54/ 54			
ΔE	0.01-7.00	0.00-5.00	4.00-4.02	4.00-7.00			
PPP%	<u>42.8</u>	<u>43.0</u>	<u>11.5</u>	<u>2.7</u>			
Total	100%				0%		
56	MM2 ($\epsilon=78$ D) ⁿ	ϕ	36 a 54	36 a 71	71 a 72	71	162
		Ψ	-17 a 35	-71 a 54	54 a 71	36	18
		Mínimo ϕ/Ψ	54/ -17	54/ 18	72/ 54	71/ 36	162/ 18
		ΔE	0.00-5.70	0.80-6.90	5.20-6.30	6.3	3.30
		PPP%	<u>43.9</u>	<u>45.3</u>	<u>4.0</u>	<u>1.6</u>	<u>5.2</u>
		Total	94.8%				5.2%

60	MM2 ($\epsilon=78$ D) ^a	ϕ	19 a 54	53 a 71	55 a 71	71 a 88	-
		Ψ	-17 a 35	-18 a 54	54 a 71	36 a 54	
		Mínimo ϕ/Ψ	54/ 0	53/ 18	71/ 54	71/ 36	
		ΔE	0.00-6.41	0.19-6.11	3.41-6.71	5.31-6.91	
		PPP%	<u>49.9</u>	<u>37.3</u>	<u>9.3</u>	<u>3.5</u>	
		Total	100%				0%

PPP%: porcentaje de las poblaciones promedio.

Los ΔE : el primer valor corresponde al conformero de más baja energía de cada región y el segundo valor corresponde al mínimo local de mayor energía de dicha región.

La población promedio se calculó sumando las probabilidades correspondientes a todos los puntos del mapa incluido en cada una de las cinco regiones de baja energía.

La región Ia corresponde a conformeros cuyas distancias $H_{1i}-H_3$ son menores que 2,5 Å.

La región Ib corresponde a conformeros cuyas distancias $H_{1i}-H_3$ se encuentran entre 2,5 y 3 Å.

La región Ic corresponde a conformeros cuyas distancias $H_{1i}-H_2$ son menores que 3 Å.

La región Id y la región II corresponde a conformeros cuyas distancias $H_{1i}-H_3$ y $H_{1i}-H_2$ son mayores que 3 Å. El compuesto 44b la región II es zona norte con distancias $H_{1i}-H_2$ menores que 3.

Los porcentajes de población con ψ negativos en la zona central para cada compuesto a constante dieléctrica de 78 y 1 D son a 13%, 17%^c para el compuesto 13, 20%^{d, f} para los compuestos 36 y 36a, 12%^{g, h} para 36a' y 44a, 2%ⁱ para 44a, 9%^j y 100%^k para 44b, 11%^l para 52, 40%ⁿ para 56 y 12%ⁿ para 60 de la población.

El porcentaje de la población con ϕ y ψ negativos para el campo de fuerzas MM2 en agua es 2.9%^b para el compuesto 13, 3.4%^c para el compuesto 36, 6.3%^m para 52, .

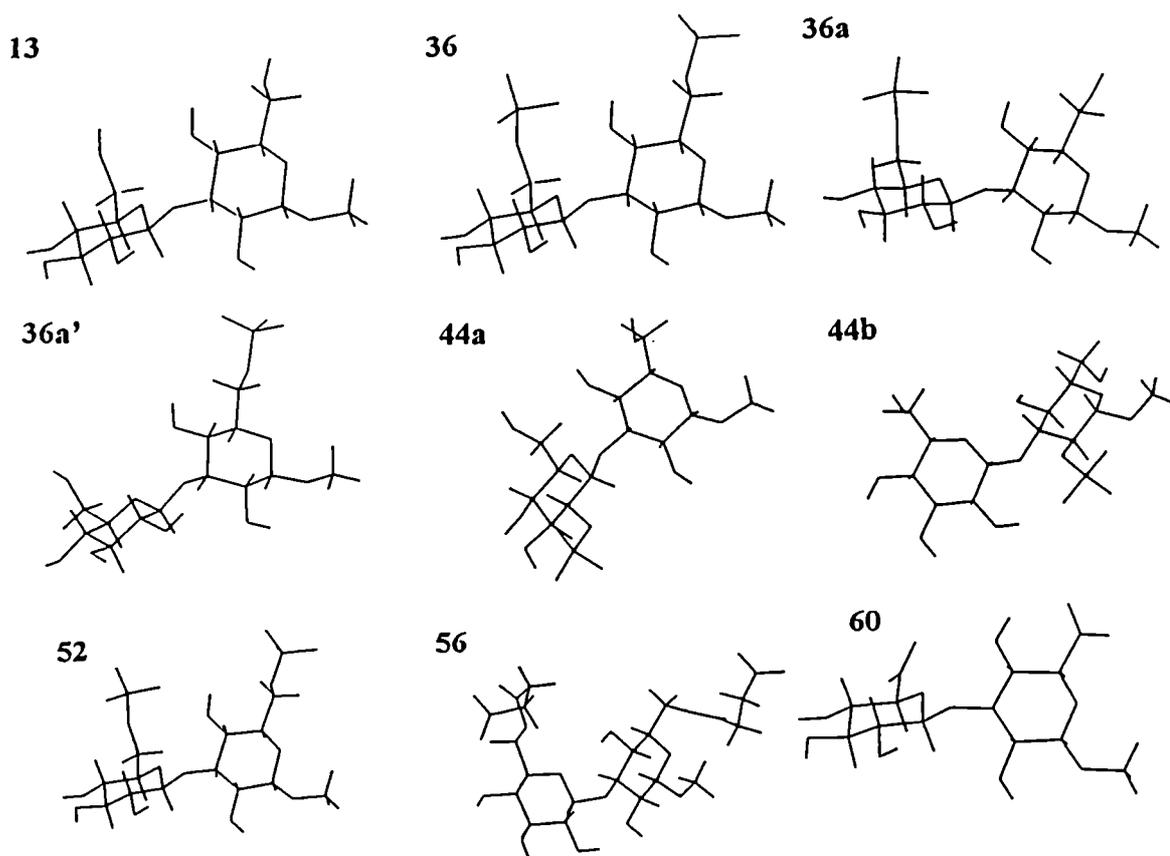


Figura 26. Representación de distintas orientaciones de las estructuras de mínima energía para cada compuesto (13, 36, 36a, 36a', 44a, 44b, 52, 56 y 60) obtenidas con el campo de fuerzas MM2 ($\epsilon=78$).

La zona central de baja energía se define por valores de ϕ comprendidos entre 19° y 90° y valores de ψ entre -17° y 71° , aproximadamente, para cada compuesto. Este hecho supone, aproximadamente, el 5% del área total de la superficie de energía potencial.

Estudios teóricos realizados con los derivados di- o tri-sulfatados en los hidroxilos secundarios en las posiciones 2, 2' y/o 3' del disacárido, dieron los mismos resultados que con los derivados monosulfatados en la posición 2 (44b) o en la posición 2' (44a). Se continuó el análisis total con los compuestos 44a y 44b y sus datos se presentan en la tabla 8.

Los mínimos situados en la zona central (región Ia y Ib) del mapa relajado, presentan enlace de hidrógeno interresiduo entre los hidroxilos OH₄ y O₅'. Los ángulos glicosídicos de la glucosa reductora (β -OMe) adoptan ϕ próximos que están de acuerdo con el efecto exo-anomérico. Todas las unidades de glucosa adoptan las conformaciones *silla* 4C_1 . El metil β -laminarabiósido (13) y los derivados aniónicos (36, 36a, 36a', 44a, 44b, 52, 56 y 60) presentan la conformación del enlace C₅-C₆ gg en cada residuo de glucosa.

En la distribución de probabilidad correspondiente al compuesto 13 y los derivados aniónicos 36, 36a, 36a', 44a, 44b, 52, 56 y 60 que se muestran en la figura 24, puede observarse que los compuestos 13, 36a', 44a y 60 presentan el 100% de la población concentrada en la zona central del mapa; mientras que los compuestos 36, 36a, 44b, 52 y 56 presentan entre el 94 y 98% de la población en dicha zona y un 2 a 6% en la zona lateral del mapa. Los valores de NOE entre los H₁'-H₃ y H₁'-H₂ serán sensibles a las poblaciones conformacionales en dichas regiones de baja energía (región Ia y Ib para el primer caso y región Ic para el segundo caso). En la sección 3.3.5 se muestran los datos experimentales y la comparación con los datos teóricos para cada compuesto.

Los mínimos de energía más baja localizados en cada región de la zona central descrita para los compuestos aniónicos 36, 36a, 36a', 44a, 44b, 52, 56 y 60 presentan geometrías análogas a las descritas para el compuesto 13. Estos compuestos presentan pequeñas diferencias en el porcentaje de población promedio en cada región (tabla 8). Puede observarse que la región que se corresponde con distancias cortas H₁'-H₃, en todos los casos, presenta intersección con la zona de baja energía correspondiente a las regiones Ia y Ib y el porcentaje de poblaciones conformacionales de los diferentes compuestos presentan variaciones entre 43 y 58 %. De forma análoga, las distancias H₁'-H₂ serán representativas de poblaciones conformacionales localizadas en la región Ic y presentan variaciones entre 4 y 12 %. La región Id minoritaria, no presenta intersección con distancias cortas H₁'-H₃ y H₁'-H₂.

Una comparación del porcentaje de las poblaciones conformacionales de los compuestos sulfatados (36, 36a, 36a') y el metil β -laminarabiósido (13) muestra en todos los casos resultados similares, pero la sulfatación en C-6 presenta los mismos valores que el compuesto sin sulfatar, mientras que la sulfatación en C-6' se corresponde con el compuesto disulfatado.

B.-Campo de fuerzas MM2 en agua:

Los mapas relajados obtenidos en agua^[90JA6127] con el campo de fuerzas MM2 para los compuestos 13, 36 y 52, se muestran en la figura 27, junto con la representación (mediante curvas de nivel) de las distancias interprotónicas relevantes (acorde con los datos de NOEs), en función de ϕ y ψ , superpuestas con la distribución de probabilidad correspondiente. También se consideró las orientaciones del enlace C₅-C₆ gggg. Las curvas de nivel de energía, la distribución de probabilidad y las curvas de nivel de las distancias se disponen igual que en el caso anterior. Puede apreciarse cómo, en general, las formas de las superficies son similares a las observadas con constante dieléctrica 78.

Los mínimos de energía más baja presentan geometrías análogas a las descritas para $\epsilon=78$. Sus energías relativas, ángulos y porcentaje de población se muestran en la tabla 8. De acuerdo con la distribución de probabilidad obtenida para cada compuesto, la población de la zona central es del 100%, repartiéndose en cuatro regiones. Presentan valores de porcentaje de población similares a los descritos para $\epsilon=78$; en agua presentan también un bajo porcentaje de confórmeros con valores de ϕ y ψ negativos (tabla 8). En la figura 28 se muestran las representaciones de las estructuras de mínima energía para los compuestos 13, 36, 36a y 52.

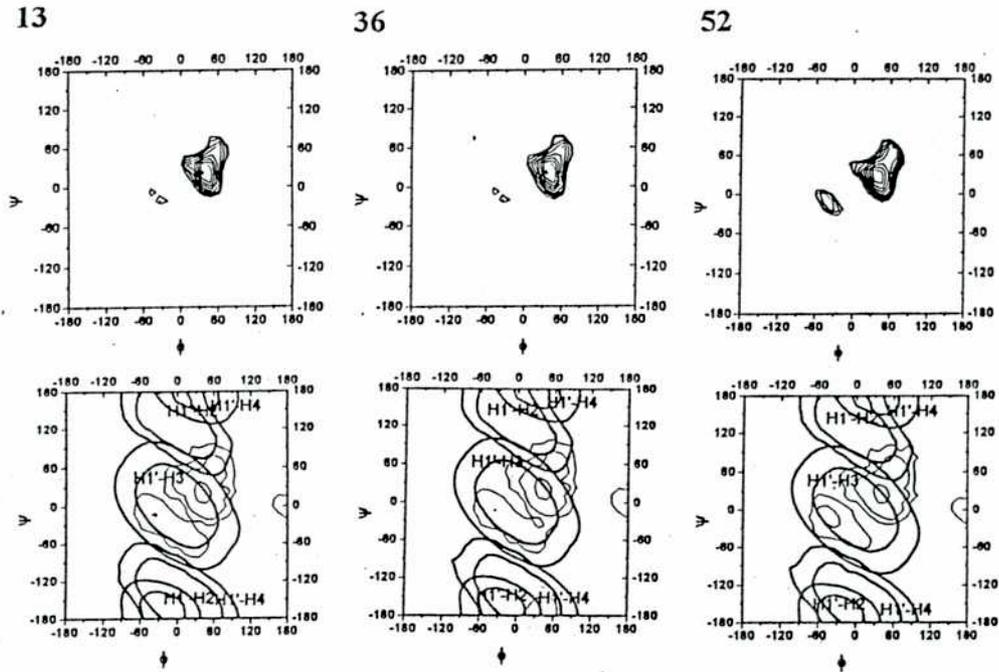


Figura 27. Representación de mapas relajados de los compuestos 13, 36 y 52 calculados con el campo de fuerzas MM2 en agua, junto con la distribución de probabilidad correspondiente superpuestas a las curvas de nivel de las distancias interprotónicas relevantes. En todos los casos, ϕ se representa en el eje horizontal y ψ en el eje vertical. Las curvas de nivel de energía, la distribución de probabilidad y las curvas de nivel de las distancias se disponen igual que en la figura 24.

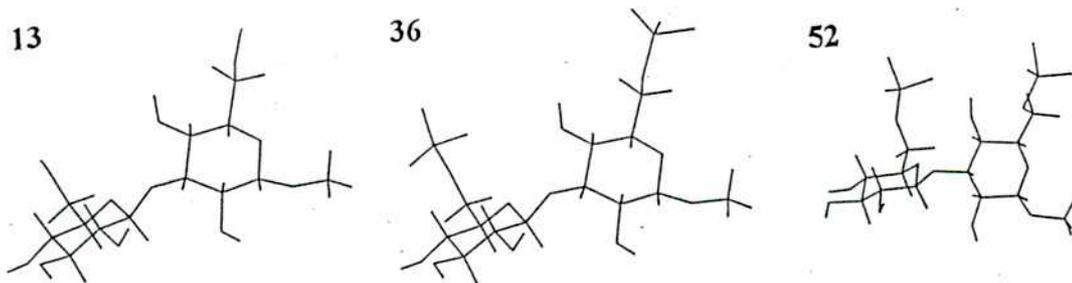


Figura 28. Representación de distintas orientaciones de las estructuras de mínima energía para cada compuesto (13, 36 y 52) obtenidas con el campo de fuerzas MM2 en agua.

C.-Campo de fuerzas MM2 con $\epsilon=1$:

Para el compuesto 13 se realizaron cálculos con el campo de fuerzas MM2 y constante dieléctrica 1. La estructura de partida se consideró la misma que en los casos anteriores (ggggcc). Para constantes dieléctricas bajas las formas de las superficies son muy dependientes de la orientación de los hidroxilos secundarios y de los hidroximetilos^[95]JB137],

es necesario tener la mayor cantidad de estructuras iniciales de partida para realizar los cálculos. Así, este resultado es sólo cualitativo, aunque presenta una parcial concordancia con los datos experimentales (sección 3.3.5). El mapa relajado obtenido con $\epsilon=1$ y la representación de la distribución de probabilidad superpuesta con las curvas de nivel de las distancias, se muestran en la figura 29 junto con la representación de la estructura de mínima energía. Los valores de los ángulos diedros ϕ y ψ correspondientes a los mínimos, así como sus energías relativas y las poblaciones de las regiones de baja energía, se indican en la tabla 8. Las dos regiones de energía más baja presentan geometrías análogas a las ya descritas para $\epsilon=78$. La población en la zona central del mapa es del 100% repartiéndose un 88% en la región Ia y 12% en la región Ib.

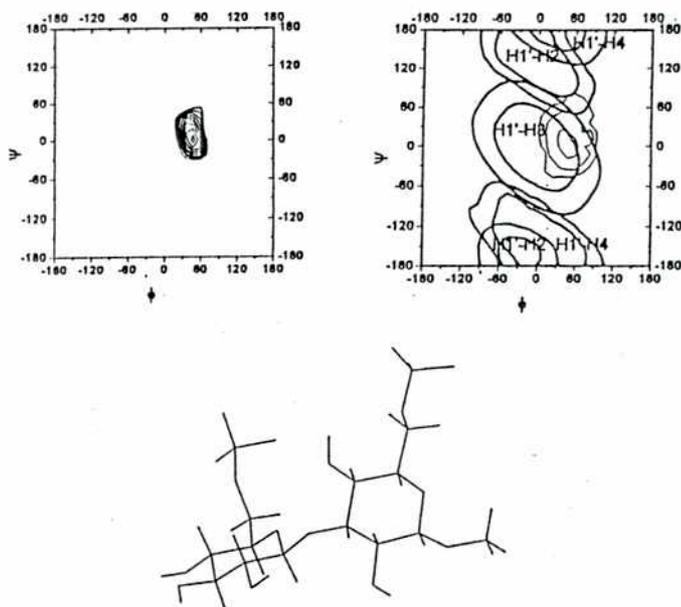


Figura 29. Representación del mapa relajado del compuesto 13 calculado con el campo de fuerzas MM2 ($\epsilon=1$), junto con la distribución de probabilidad correspondiente superpuesta a las curvas de nivel de las distancias interprotónicas relevantes. Representación de las estructuras de mínima energía.

D.-Campo de fuerzas MM3 con $\epsilon=78$:

Los cálculos con el campo de fuerzas MM3 se realizaron con $\epsilon=78$ para los compuestos 13 y 60. Los mapas relajados se muestran en la figura 30 junto con la representación de las distancias interprotónicas ($H_{1'}-H_3$ y $H_{1'}-H_2$), superpuesta con la distribución de probabilidad. Las curvas de nivel de energía, la distribución de probabilidad y las curvas de nivel de las distancias se disponen igual que en los casos anteriores. Los valores de los ángulos diedros ϕ y ψ de las regiones de mínima energía, sus energías relativas y los

porcentajes de población se encuentran en la tabla 9. Las geometrías correspondientes a un mínimo de cada compuesto (13 y 60) se representan en la figura 31. Al igual que el campo de fuerzas MM2 en agua, la distribución de probabilidad indica la existencia del 100% de la población en la zona central del mapa, los mínimos de energía más baja presentan geometrías análogas a las descritas con MM2 en agua y $\epsilon=78$. Las diferencias con estos campos son en la distribución de la población en las diferentes regiones de la zona central. En MM3 la población en la región Ib es mayor que en la región Ia para ambos compuestos, mientras que en MM2 es mayor la población en la región Ia; el porcentaje de población en la región Ic con MM3 es mayor que en MM2. Es de esperar diferentes valores de NOE para el campo de fuerzas MM2 y MM3.

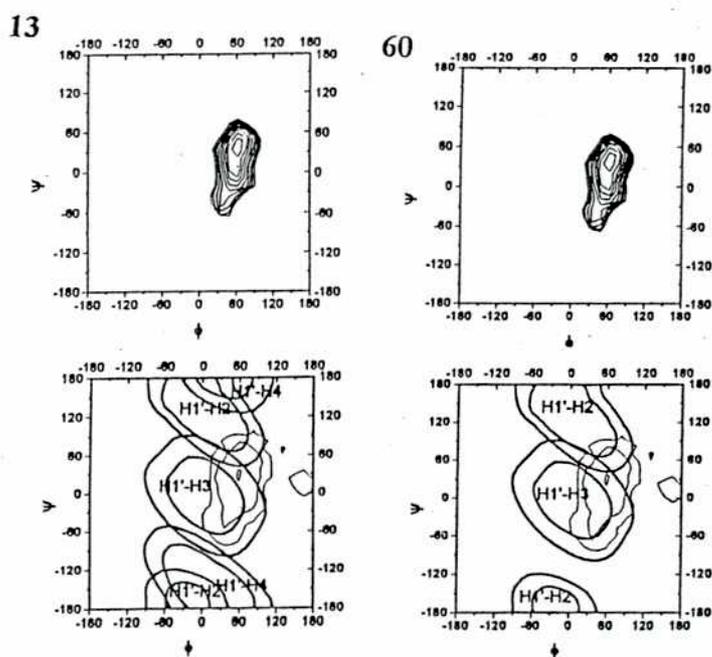


Figura 30. Representación de los mapas relajados de los compuestos 13 y 60 calculados con el campo de fuerzas MM3 ($\epsilon=78$), junto con la distribución de probabilidad correspondiente superpuesta a las curvas de nivel de las distancias interprotónicas relevantes.

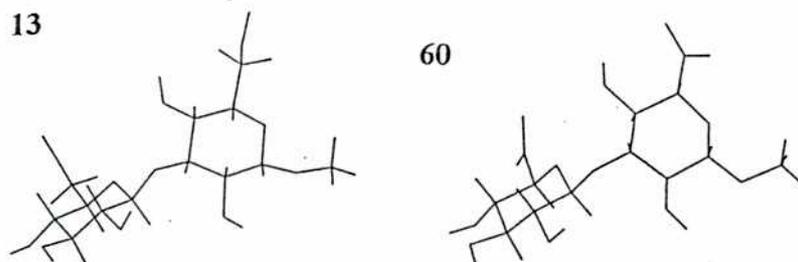


Figura 31. Representación de distintas orientaciones de las estructuras de mínima energía para los compuestos 13 y 60 obtenidas con el campo de fuerzas MM3.

Tabla 9. Energías y poblaciones para las conformaciones de mínima energía de los compuestos 13 y 60 de acuerdo con el campo de fuerzas MM3 con $\epsilon=78$.

		Zona central				Zona lateral	
		Región Ia	Región Ib	Región Ic	Región Id	Región II	
	ϕ	36 a 54	36 a 71	54 a 88	89	-	
	ψ	-53 a 18	-17 a 35	54 a 71	36		
	Mínimo ϕ/ψ	54/ 0	54/ 18	71/ 54	89/ 36		
13	MM3 ($\epsilon=78$ D)	ΔE	0.90-6.00	0.00-3.60	0.50-5.50	5.5	-
		PPP%	<u>23.7</u>	<u>52.1</u>	<u>22.8</u>	<u>1.4</u>	
		Total	100%				0%
60	MM3 ($\epsilon=78$ D)	ΔE	1.10-6.10	0.00-4.10	0.30-5.40	5.30	
		PPP%	<u>22.7</u>	<u>51.3</u>	<u>24.4</u>	<u>1.6</u>	
		Total	100%				0%

Los porcentajes de población con ψ negativos en la zona central son 12 y 10% respectivamente.

3.3.2. Aplicación del campo de fuerzas AMBER

Los cálculos con el campo de fuerzas AMBER para los compuestos 13, 36, 36a, 36a', 44a, 44b, 52, 56 y 60 se realizaron con $\epsilon=78$. En la figura 32 se muestran los mapas relajados para cada compuesto, junto con la distribución de probabilidad correspondiente superpuesta con las distancias interprotónicas ($H_1 \cdots H_3$, $H_1 \cdots H_2$ y $H_1 \cdots H_4$) para dichos compuestos.

Para cada compuesto la geometría inicial de la conformación del enlace C_5-C_6 y de los hidroxilos secundarios fue ggggcc o ggggrt para construir los mapas relajados.

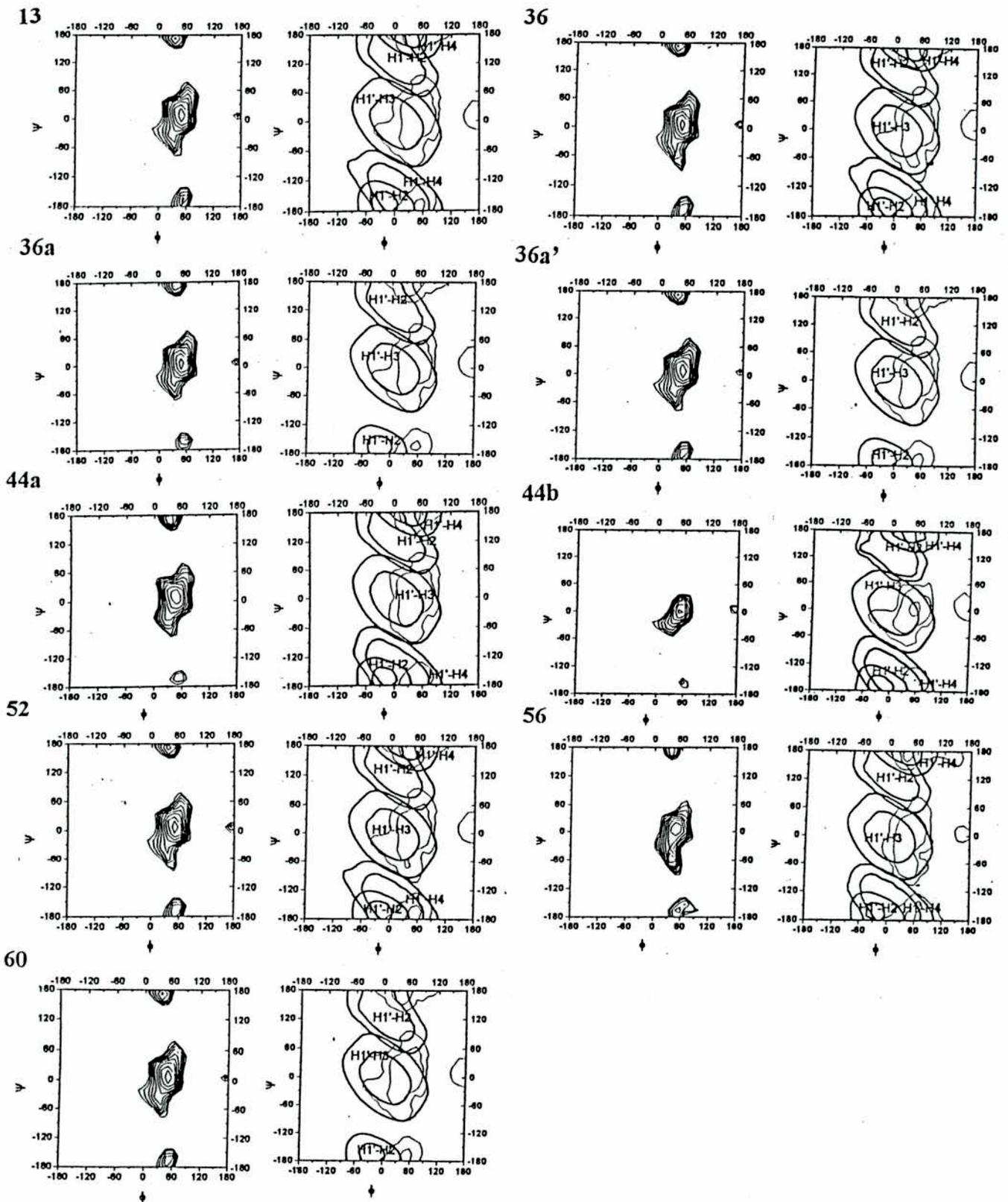


Figura 32. Representación de mapas relajados de los compuestos 13, 36, 36a, 36a', 44a, 44b, 52, 56 y 60 calculados con el campo de fuerzas AMBER ($\epsilon=78$), junto con la distribución de probabilidad (curvas de nivel de 1% y 0,1%) correspondiente superpuesta a las curvas de nivel de las distancias interprotónicas relevantes.

Todos los compuestos presentan similares mapas de energía potencial; la distribución de probabilidad indica la existencia de un 86 a 95% de la población en la zona central del mapa para estos derivados y además el porcentaje restante para cada caso se ubica en una zona norte-sur a diferencia de MM2 y MM3. Los conformeros de mínima energía presentan geometrías análogas entre todos los compuestos, variando el porcentaje de población para cada mínimo. Se obtuvieron numerosos mínimos locales que se ubicaron en tres regiones en la zona central para una mejor visualización de los datos y acorde con los datos de NOE experimental, comparación entre los distintos compuestos y correlación posterior con los datos experimentales: una región Ia que se corresponde con distancias H_1-H_3 cortas (menores que 2.5 Å), una región Ib con distancias H_1-H_3 entre 2.5 y 3 Å y una última región Id donde las distancias entre los protones H_1-H_3 son mayores que 3 Å. Las tres regiones mencionadas son análogas a las descritas en MM2. También las regiones Ia y Ib que se corresponden con las distancias H_1-H_3 cortas (menores 3 Å) presentan conformeros con ψ negativos; estos conformeros presentan ángulos ϕ y ψ parecidos a los valores encontrados en estado sólido para metil β -laminarabiósido. La zona norte-sur se dividió en dos regiones IIIa con distancias H_1-H_2 y H_1-H_4 menores que 3 Å (zona norte) y la región IIIb con distancias H_1-H_4 menores que 3 Å (zona sur). En la tabla 10 se informan los ϕ y ψ de cada región, los porcentajes de población y las energías relativas, y los mínimos globales obtenidos en cada región, ya que los mínimos locales de cada región presentan geometrías análogas al mínimo global. La geometría correspondiente al mínimo global de cada compuesto se muestra en la figura 33.

Tabla 10. Energías y poblaciones para las conformaciones de mínima energía de los compuestos 13, 36, 36a, 36a', 44a, 44b, 52, 56 y 60 de acuerdo con el campo de fuerzas AMBER con $\epsilon=78$.

	Mínimo ϕ/ψ	Zona central			Zona norte/sur	
		Región Ia 54/ 0	Región Ib 54/ 18	Región Id 71/ 36	Región IIIa 36/ 162	Región IIIb 54/ -162
13	ϕ	18 a 54	36 a 71	54 a 71	18 a 36	54
	ψ	-54 a 35	-17 a 35	36 a 54	162 a 180	-162 a -180
	ΔE	0.00-5.97	0.20-4.48	4.57-6.02	3.55-6.02	4.97-5.09
	PPP%	<u>52.4</u>	<u>30.8</u>	<u>5.5</u>	<u>7.5</u>	<u>3.8</u>
	Total	88.7%			11.3%	
36	ϕ	18 a 54	36 a 71	71	18 a 53	54 a 71
	ψ	-54 a 35	-72 a 35	36 a 54	162 a 180	-162 a -180
	ΔE	0.00-6.11	0.55-5.39	4.99-5.22	3.43-5.90	4.52-6.01
	PPP%	<u>49.4</u>	<u>32.1</u>	<u>3.6</u>	<u>9.1</u>	<u>5.8</u>
	Total	85.1%			14.9%	

36a	ϕ	18 a 54	36 a 71	71	18 a 54	54
	Ψ	-54 a 35	-17 a 35	36 a 54	162 a 180	-162
	ΔE	0.00-5.96	0.59-4.66	5.08-5.34	3.69-6.23	4.86
	PPP%	<u>51.9</u>	<u>30.7</u>	<u>3.8</u>	<u>11.4</u>	<u>2.2</u>
	Total	86.4%			13.6%	
36a'	ϕ	18 a 54	36 a 71	54 a 71	18 a 36	54
	Ψ	-54 a 35	-71 a 35	36 a 54	162 a 180	-162 a -180
	ΔE	0.00-5.96	0.20-6.03	4.56-5.99	3.40-5.49	4.67-4.92
	PPP%	<u>51.4</u>	<u>31.3</u>	<u>5.4</u>	<u>7.9</u>	<u>4.0</u>
	Total	88.1%			11.9%	
44a	ϕ	18 a 54	36 a 71	71	18 a 53	54
	Ψ	-54 a 35	-17 a 35	36 a 54	162 a 180	-162
	ΔE	0.00-4.83	0.23-4.83	4.77-4.84	2.68-5.68	1.01
	PPP%	<u>59.7</u>	<u>24.7</u>	<u>3.2</u>	<u>11.3</u>	<u>1.1</u>
	Total	87.6%			12.4%	
44b	ϕ	18 a 54	54 a 71	-	-	54
	Ψ	-35 a 17	-17 a 35			-145 a -162
	ΔE	0.00-5.82	0.88-6.05			6.84-7.52
	PPP%	<u>64.7</u>	<u>31.2</u>			<u>4.1</u>
	Total	95.9%			4.1%	
52	ϕ	18 a 54	36 a 71	71	18 a 54	54
	Ψ	-54 a 18	-71 a 35	36 a 54	162 a 180	-162 a -180
	ΔE	0.00-5.49	0.33-5.28	4.64-4.84	3.07-5.61	4.29-4.35
	PPP%	<u>48.1</u>	<u>32.2</u>	<u>4.2</u>	<u>10.5</u>	<u>5.0</u>
	Total	84.5%			15.5%	
56	ϕ	18 a 54	36 a 71	-	36	54 a 89
	Ψ	-54 a 17	-88 a 35		162 a 180	-145 a -180
	ΔE	0.00-5.60	0.96-6.09		4.81-4.96	4.65-5.08
	PPP%	<u>53.2</u>	<u>35.0</u>		<u>3.9</u>	<u>7.9</u>
	Total	88.2%			11.8%	
60	ϕ	18 a 54	36 a 71	54 a 71	18 a 36	54
	ψ	-54 a 35	-17 a 35	36 a 54	162 a 180	-162 a -180
	ΔE	0.00-6.01	0.24-4.37	4.56-6.00	3.26-5.54	4.71-4.79
	PPP%	<u>52.6</u>	<u>29.8</u>	<u>5.5</u>	<u>8.1</u>	<u>4.0</u>
	Total	87.9%			12.1%	

Los porcentajes de población con ψ negativos en la zona central para los compuestos 13, 36, 36a, 36a', 44a, 44b, 52, 56 y 60 son: 25%, 30%, 27%, 26%, 25%, 38%, 23%, 51% y 18% respectivamente.

La región central de baja energía representa el 5% del área total de la superficie de potencial, mientras que la zona norte-sur, sólo el 1% de dicha área. Estudios teóricos y experimentales sobre derivados con unión interglucosídica β -(1 \rightarrow 3)^[94T6417] indican la existencia minoritaria de conformaciones en la zona norte-sur y el campo de fuerzas AMBER incluye estos conformeros, con lo cual, los campos descritos en el estudio (MM2, MM3 y AMBER) son complementarios.

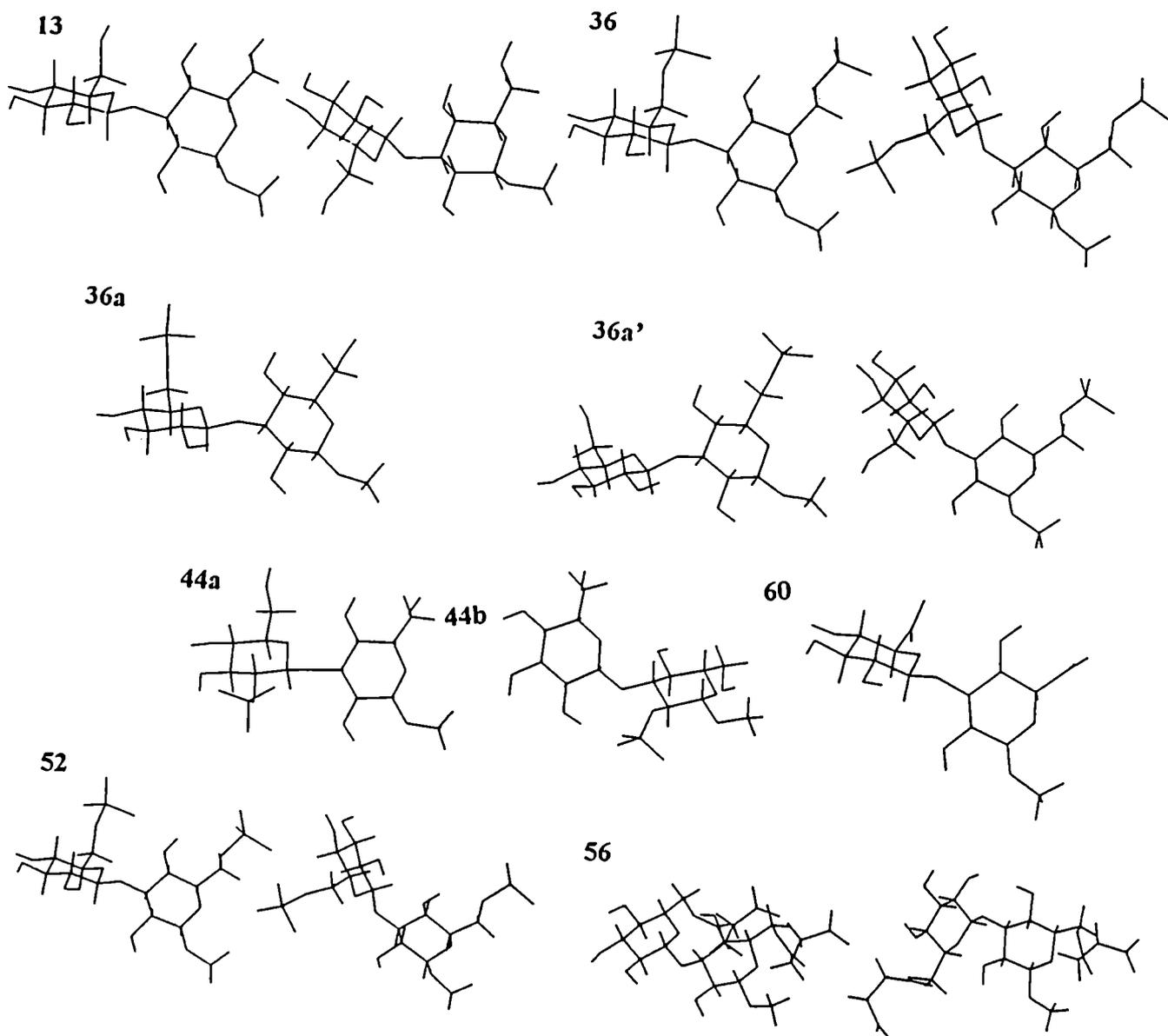


Figura 33. Representación esquemática de distintas orientaciones de la geometría de mínima energía de la zona central de los compuestos los 13, 36, 36a, 36a', 44a, 44b, 52, 56 y 60 y zona norte-sur de los compuestos 13, 36, 36a', 52, 56 para el campo de fuerzas AMBER..

3.3.3. Aplicación del método Monte Carlo

Para el compuesto succinilado 56 debido al alto número de ángulos de torsión de la cadena de succinato se utilizó un método estocástico para la búsqueda conformacional de dicha cadena y luego utilizar los ángulos torsionales obtenidos en la estructura de partida para construir el mapa relajado por el método sistemático. Se utilizó el método Monte Carlo

instalado en el programa MACROMODEL^[90JCO440]. El campo de fuerzas elegido fue el MM2 ($\epsilon=78$) ya que la zona central del mapa es la más poblada en diversos estudios sobre disacáridos con uniones β -(1 \rightarrow 3)^[92CAR15, 94T6417].

La estructura de partida considerada fue el primer mínimo obtenido para el metil β -laminarabiósido con el campo de fuerzas MM2, y se agregaron las cadenas de succinato; en este caso se consideró sólo un mínimo porque los sustituyentes están más alejados del enlace glicosídico y generan menos impedimento estérico en dicho enlace que en el metil β -maltósido, y además en este último compuesto todas las estructuras de partidas consideradas dieron resultados similares. La conformación del enlace de C₅-C₆ se dispuso en la orientación gggg ya que resultó ser la mayoría en metil β -maltósido.

En un primer paso, la geometría inicial se minimizó para obtener una estructura de baja energía. El conformero minimizado se utilizó como punto de partida en la búsqueda conformacional. El protocolo seguido fue el siguiente: en cada paso de Monte Carlo se cambiaron 10 ángulos torsionales al azar, se fijó el ángulo en el ϕ y ψ en el valor del mínimo encontrado para el metil β -laminarabiósido y se minimizó la estructura obtenida (figura 34).

Se encontraron 520 conformeros. Se tomaron los conformeros que están dentro de la ventana de energía de 10 KJ/mol por encima del mínimo de más baja energía. Se obtienen resultados similares al campo de fuerzas MM2 para las unidades de glucosa y los enlaces glicosídicos. La conformación del enlace C₅-C₆ mayoritaria fue en gg. Los valores de los ángulos torsionales analizados considerados para ser utilizados en la estructura de partida para obtener el mapa relajado con los campos de fuerzas MM2 y AMBER son los siguientes: ω_{11} : 90°, ω_{12} : -180°, ω_{13} : -60°, ω_{14} : -60°, ω_{15} : 90°, ya que resultaron ser los mayoritarios.

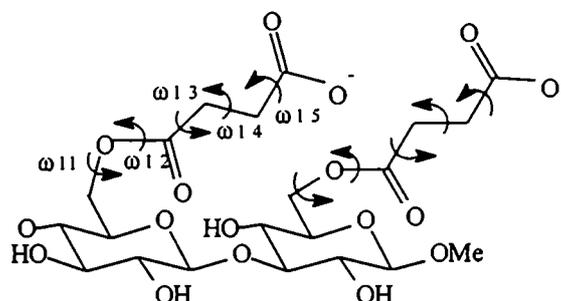


Figura 34. Representación gráfica de los ángulos torsionales elegidos para mover al azar durante la búsqueda conformacional para el compuesto 56.

3.3.4 Cálculos de dinámica molecular

Se realizaron simulaciones de dinámica molecular para obtener información acerca del espacio conformacional accesible para los ángulos de torsión glicosídicos de la serie de metil laminara-oligosacárido (**16'**) y sus derivados sulfatados (**37'** y **37a'**). Se consideró un oligosacárido de 10 unidades denominado **16'**, un derivado sulfatado en 6, denominado **37'** y un derivado que además presenta un sulfato en O-2 en la unidad 5, denominado **37a'**. Las numeraciones **16'** y **37'** se corresponden con las mezclas de los oligosacáridos **16** y **37**, respectivamente, que serán utilizados para las comparaciones con datos experimentales. Las estructuras de dichos compuestos se muestran en la figura 23. Las simulaciones se llevaron a cabo manteniendo la temperatura en 300 K; se realizaron en presencia explícita de moléculas de agua^[90JA6127], utilizando el campo de fuerzas MM2, ya que describía cualitativamente bien la zona central del mapa de energía potencial en los disacáridos derivados de laminarabiosa. La conformación de partida para el compuesto neutro **16'** se construyó como bloques de disacáridos a partir del mínimo global obtenidos para metil β -laminarabiósido (**13**) con el campo de fuerzas MM2 y se minimizó nuevamente en agua con el campo de fuerzas MM2. Para el compuesto sulfatado **37'** se utilizó el mínimo global del derivado 6,6'-di-O-sulfato del metil β -laminarabiósido (**36**) empleando la misma secuencia que para el compuesto neutro. Para el compuesto **37a'** se construyó a partir de **37'**, se modificó la unidad 5 y se minimizó para obtener una estructura de baja energía. Estos conformeros minimizados se utilizaron como punto de partida para la búsqueda conformacional. Se seleccionaron los átomos del enlace glicosídico y del enlace C₅-C₆ para asignarle una velocidad inicial durante la búsqueda conformacional con dinámica molecular. Se realizaron para cada compuesto (**16'**, **37'** y **37a'**) simulaciones de 233, 206 y 218 ps, respectivamente.

También, se realizaron los análisis de metil β -laminatriósido (**14**), su derivado sulfatado (**43**) y metil β -laminaratetraósido (**15**). Se obtuvieron los mismos resultados que para la serie laminara-oligosacáridos, por lo cual se presentan solamente los resultados de los oligosacáridos con 10 unidades de glucosa.

Los mínimos obtenidos para los tres oligosacáridos (**16'**, **37'** y **37a'**) parecen muy estables; apenas existen variaciones en los ángulos interglicosídicos (figura 35) y en los tres oligosacáridos tanto ϕ como ψ oscilan en $30 \pm 30^\circ$. Los resultados de dinámica molecular empleando MM2 no muestran diferencias entre el derivado neutro, y los derivados sulfatados. Los datos de los ángulos interglicosídicos obtenidos para los oligosacáridos con el campo de fuerzas MM2 son similares a los disacáridos de laminarabiosa con el mismo campo de

fuerzas. En los tres oligosacáridos todas las conformaciones del enlace C_5-C_6 fueron *gg* y *gt*, siendo la primera conformación mayoritaria. Todas las unidades de glucosa adoptaron las conformaciones tipo *silla* 4C_1 . En la figura 36 se muestra la representación de las estructuras de mínima energía global obtenidas para los tres oligosacáridos.

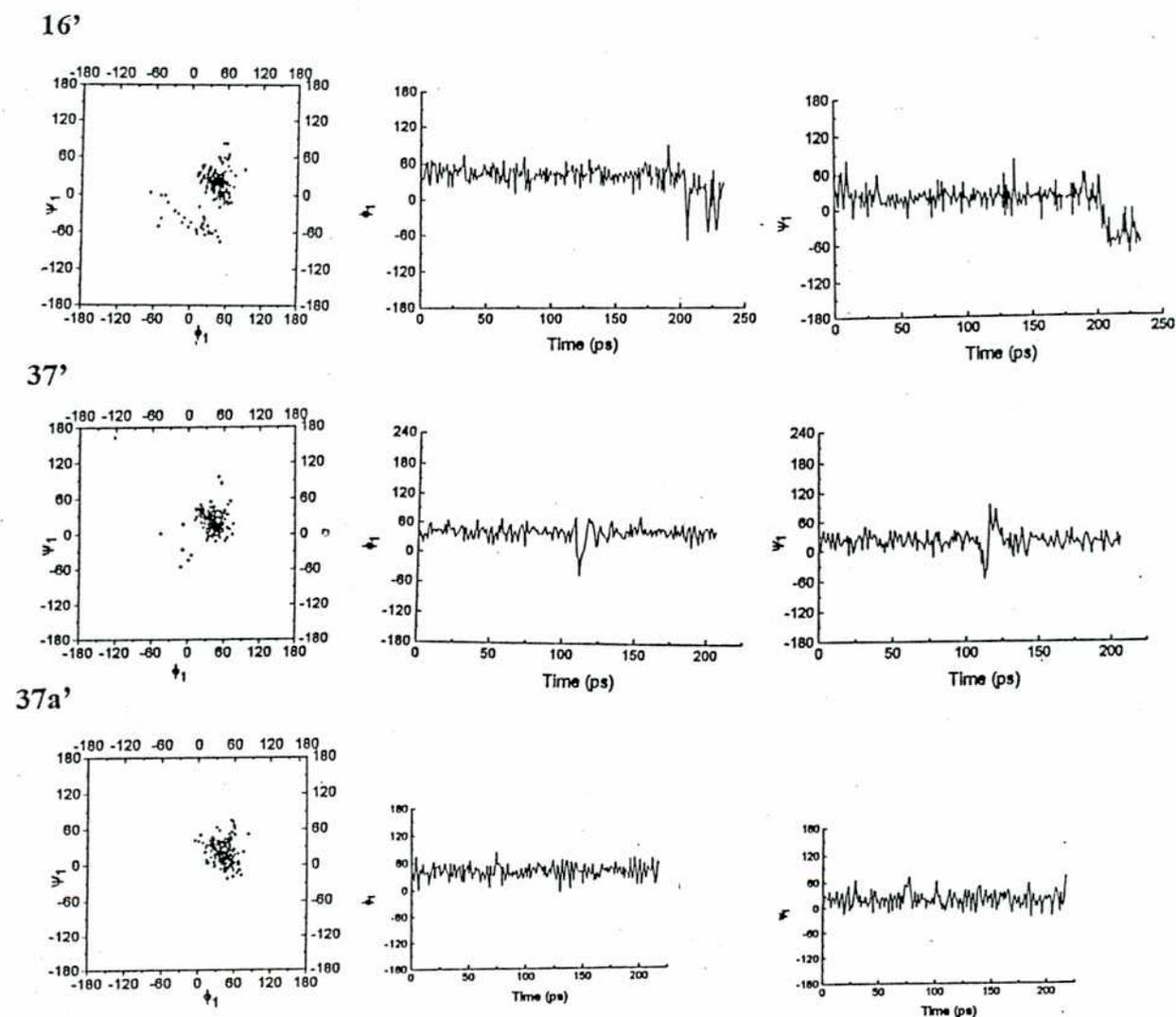


Figura 35. Representación gráfica de la variación de los ángulos interglucosídicos ϕ_1 vs ψ_1 , ϕ_1 vs t y ψ_1 vs t de los oligosacáridos 16', 37' y 37a' durante la simulación de dinámica molecular a 300 K, con el campo de fuerzas MM2 en presencia explícita de agua.

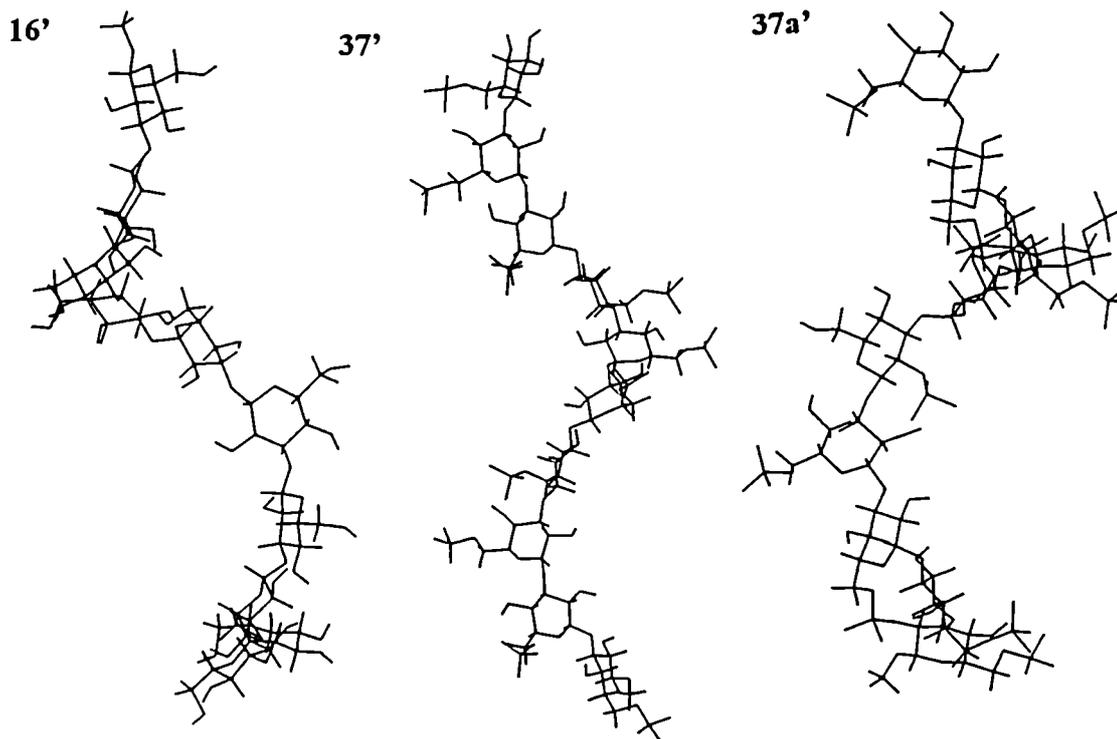


Figura 36. Representación de conformeros de mínima energía de los oligosacáridos 16', 37' y 37a' obtenidas en la simulación de dinámica molecular con el campo de fuerzas MM2.

3.3.5 Resultados de RMN. Análisis realizado en disacáridos derivados de laminarabiosa:

Se realizaron medidas de RMN: constantes de acoplamiento y NOESY para determinar la validez de los cálculos realizados con mecánica molecular.

En la tabla 11 se muestran los valores de δ_H del metil β -laminarabiósido (13) y sus derivados aniónicos 36, 36a, 52, 56 y 60 en solución acuosa. El compuesto 36a' fue analizado por mecánica molecular pero no se tienen datos experimentales ya que no fue sintetizado. Con la combinación de técnicas de 2-D RMN se asignaron las resonancias de 1H al igual que en los derivados de maltosa.

Los compuestos sulfatados en los hidroxilos secundarios (en las posiciones 2, 2' o 3') se analizaron por técnicas de RMN como mezcla de dichos compuestos ya que no fueron aislados. Por análisis de espectroscopía de masa, la mezcla rindió los derivados trisulfato y disulfato. Por espectroscopía de RMN se observaron tres señales (5.22, 5.00 y 4.81 ppm) correspondientes a H_1 en relación 5.5: 1.0: 15.0 que podrían corresponderse con el

compuesto trisulfatado y dos señales con los compuestos disulfatados. La combinación de técnicas de 2-D RMN permitió asignar los dos compuestos mayoritarios que se corresponderían con el metil β -D-glucopiranosil 2,3-disulfato de sodio-(1 \rightarrow 3)- β -D-glucopiranosido 2-sulfato de sodio (**44c**) y con el metil β -D-glucopiranosil 3-sulfato de sodio-(1 \rightarrow 3)- β -D-glucopiranosido 2-sulfato de sodio (**44d**). En el análisis de mecánica molecular se presentaron los compuestos monosulfatados en la posición 2' (**44a**) y en la posición 2 (**44b**) por simplicidad y rapidez en el análisis, ya que cálculos preliminares para los compuestos di o trisulfatados daban resultados análogos.

La distribución gg mayoritaria fue determinada por medidas de constantes de acoplamiento $^3J_{H_5H_6}$ y los NOEs de los protones H_6 para cada residuo de glucosa en todos los compuestos analizados. Las constantes de acoplamiento $^3J_{H-H}$ observadas están de acuerdo con la conformación 4C_1 para los dos anillos de piranosa en todos los compuestos.

Un problema importante en el análisis conformacional de estos disacáridos es el solapamiento parcial de señales entre los protones H_2 , H_4 , H_3' , H_5' en los compuestos **13** y **56**, H_2 , H_4 y H_3' en **36a**, H_4 y H_5' en **44c** y **44d**, H_2 y H_5' en **52** y H_2 y H_3' en **60**. En ningún caso presentaron solapamiento los protones H_2' y H_3 . Todos estos núcleos presentan NOE potencial con H_1' , la medida de estos efectos NOEs interresiduos constituye una fuente de información en el análisis conformacional. Para los protones que presentan solapamiento parcial se consideró la equivalencia de los dos residuos de glucosa, con lo cual, los NOEs H_1 - H_2 + H_1 - H_3 + H_1 - H_5 = H_1' - H_2' + H_1' - H_3' + H_1' - H_5' y permitió resolver parcialmente los problemas de solapamiento. El compuesto **36** no presentó solapamiento.

El espectro de RMN- 1H nos brinda información de las diferencias de desplazamiento químico de los derivados aniónicos **36**, **36a**, **44c**, **44d**, **52**, **56** y **60** comparado con el compuesto neutro **13**.

La sulfatación en la posición 6 en los compuestos **36** y **36a** muestra un desplazamiento a campos más bajos de aproximadamente 0.4 a 0.5 ppm en α ; También se observa un desplazamiento a campos bajos en los protones H_5 , menor efecto presentan los protones H_4 . Los compuestos **44c** y **44d** muestran un corrimiento en α a campos bajos de \sim 1 ppm y también se observan desplazamientos menores a campos bajos en las posiciones β . Los desplazamientos observados en los compuestos sulfatados están de acuerdo con datos publicados en bibliografía^[92CAR29, 92CAR245, 93CAR225]. El compuesto fosfatado **52**, el compuesto succinilado **56** y el oxidado **60** muestran diferencias de δ_H menores respecto del compuesto neutro **13**.

Tabla 11. Desplazamientos químicos de los compuestos 13, 36, 36a, 44c, 44d, 52, 56 y 60 en D₂O a 37° C (referencia HDO).

	13	36	36 ^a	44c	44d	52	56	60
H1	4.41	4.45 (0.04)	4.44 (0.03)	a	a	4.40 (-0.01)	4.41 (0.01)	4.40 (-0.01)
H2	3.46	3.50 (0.04)	3.50 (0.04)	4.42 (0.96)	4.27 (0.81)	3.50 (0.04)	3.47 (0.01)	3.50 (0.04)
H3	3.74	3.78 (0.04)	3.77 (0.03)	4.19 (0.45)	4.03 (0.29)	3.78 (0.04)	3.74 (0.00)	3.78 (0.04)
H4	3.49	3.58 (0.09)	3.57 (0.08)	3.71 (0.22)	3.70 (0.21)	3.66 (0.17)	3.47 (-0.02)	3.61 (0.12)
H5	3.49	3.72 (0.23)	3.53 (0.04)	a	a	3.50 (0.01)	3.47 (-0.02)	3.73 (0.24)
H6a	3.93	4.38 (0.45)	4.02 (0.09)	a	a	4.01 (0.08)	3.93 (0.00)	-
H6b	3.74	4.24 (0.50)	3.74 (0.00)	a	a	3.66 (-0.08)	3.72 (-0.02)	-
H1'	4.72	4.77 (0.05)	4.75 (0.03)	5.24 (0.83)	4.83 (0.42)	4.77 (0.05)	4.73 (0.01)	4.78 (0.06)
H2'	3.36	3.40 (0.04)	3.39 (0.03)	4.36 (1.00)	3.61 (0.25)	3.38 (0.02)	3.37 (0.01)	3.39 (0.03)
H3'	3.49	3.56 (0.07)	3.55 (0.06)	4.55 (1.06)	4.45 (0.96)	3.59 (0.10)	3.51 (0.02)	3.51 (0.02)
H4'	3.50	3.52 (0.02)	3.50 (0.00)	3.67 (0.17)	3.74 (0.24)	4.01 (0.51)	3.38 (-0.12)	3.51 (0.01)
H5'	3.51	3.70 (0.19)	3.69 (0.18)	3.67 (0.16)	3.67 (0.16)	3.48 (-0.03)	3.51 (0.00)	3.73 (0.22)
H6'a	3.92	4.37 (0.45)	4.35 (0.43)	4.02 (0.10)	4.01 (0.09)	4.01 (0.09)	3.93 (0.01)	-
H6'b	3.72	4.24 (0.52)	4.23 (0.51)	3.88 (0.16)	3.83 (0.11)	3.60 (-0.12)	3.71 (-0.01)	-

a Las señales H₁, H₅, H_{6a} y H_{6b} en los compuestos 44c y 44d aparecen entre 3.6 y 4.1 ppm.

*Los H₂' y H₃' del compuesto 44c pueden estar intercambiados.

() $\Delta\delta = \delta_{\text{compuesto}} - \delta_{\text{H}}$.

Los resultados de las medidas experimentales de NOESY en D₂O a 37°C de los compuestos 13, 36, 36a, 44c, 44d, 52, 56 y 60 se muestran en la tabla 12. En nuestro caso, los NOEs que brindan mayor información para el análisis conformacional de estos compuestos son los NOEs entre protones de las unidades interglucosídicas H₁'-H₃, H₁'-H₂ y H₁'-H₄.

También se realizaron espectros de ROESY y T-ROESY que condujeron a resultados similares que el NOESY.

Tabla 12. Valores experimentales de NOESY para los compuestos 13, 36, 36a, 44c, 44d, 52, 56 y 60 en D₂O a 37° C, a 300 y 500 MHz y valores teóricos de los compuestos 13, 36, 36a, 52, 56 y 60.

		Intensidad %					
		H1'-H2'	H1'-H3	H1'-H2	H1'-H4	H1'-H3'	H1'-H5'
13	Exp 300 MHz	1.4 (1.00)	8.6 (6.14)	8.3 (5.92) ^a	Con H2	8.2 (5.86) ^a	Con H3'
	MM2 (ε=78)	1.6 (1.00)	5.3 (1.60)			4.1 (2.56)	5.6 (3.50)
	MM2 (H ₂ O)	1.6 (1.00)	5.9 (3.69)			4.1 (2.56)	5.6 (3.50)
	MM2 (ε=1)	1.6 (1.00)	6.7 (4.19)			3.9 (2.44)	4.9 (3.06)
	MM3 (ε=78)	1.6 (1.00)	3.9 (2.44)			3.7 (2.31)	5.5 (3.44)
	AMBER (ε=78)	1.7 (1.00)	4.2 (2.47)			4.6 (2.70)	5.1 (3.00)
36	Exp 500 MHz	2.2 (1.00)	8.1 (3.68)	4.8 (2.18)	5.1 (2.32)	3.7 (1.68)	7.4 (3.36)
	MM2 (ε=78)	1.4 (1.00)	5.3 (3.78)			3.6 (2.55)	5.8 (4.82)
	MM2 (H ₂ O)	1.3 (1.00)	5.5 (4.23)			3.6 (2.77)	5.8 (4.46)
	AMBER (ε=78)	1.6 (1.00)	4.3 (2.6)	1.0 (0.63)	1.7 (1.06)	4.5 (2.81)	6.0 (3.75)
36a	Exp 500 MHz	1.3 (1.00)	6.2 (4.77)		6.6 (5.08) ^a		5.7 (4.38)
	MM2 (ε=78)	1.4 (1.00)	5.4 (3.86)			3.6 (2.57)	5.8 (4.14)
	AMBER (ε=78)	1.6 (1.00)	4.5 (2.81)	1.0 (0.63)	1.6 (1.00)	4.5 (2.81)	6.0 (3.75)
44c	Exp 500 MHz	0.9 (1.00)*	2.8 (3.11)	0.9 (1.00)	5.2 (5.78) ^a	2.2 (2.44)	Con H ₄ ^a
44d	Exp 500 MHz	1.6 (1.00)	4.6 (2.87)	0.7 (0.44)	6.4 (4.00) ^a	2.7 (1.68)	Con H ₄ ^a
52	Exp 500 MHz	1.9 (1.00)	2.6 (1.37)	2.6 (1.37) ^a	0.9 (0.47)	0.4 (0.21)	0.8 (0.42) ^a
	MM2 (ε=78)	1.4 (1.00)	4.5 (3.21)			3.6 (2.57)	5.8 (4.14)
	MM2 (H ₂ O)	1.3 (1.00)	5.1 (3.92)			3.7 (2.85)	6.0 (4.61)
	AMBER (ε=78)	1.6 (1.00)	4.2 (2.62)	1.1 (0.69)	1.8 (1.13)	4.5 (2.81)	6.0 (3.75)
56	Exp 500 MHz	2.1 (1.00)	9.0 (4.29)		11.0(5.24) ^a		
	MM2 (ε=78)	1.4 (1.00)	5.0 (3.57)			3.5 (2.50)	5.6 (4.00)
	AMBER (ε=78)	1.6 (1.00)	4.2 (2.62)		1.3 (0.81)	4.3 (2.69)	5.9 (3.67)
60	Exp 500 MHz	0.57 (1.00)	2.56 (4.49)	1.6 (2.80) ^a	0.4 (0.70)	Con H2 ^a	2.0 (3.50)
	MM2 (ε=78)	0.60 (1.00)	2.0 (3.33)			1.5 (2.52)	2.1 (3.50)
	MM3 (ε=78)	0.60 (1.00)	1.4 (2.33)			1.4 (2.34)	2.1 (3.50)
	AMBER (ε=78)	0.61 (1.00)	1.5 (2.46)			1.6 (2.63)	1.8 (2.95)

En los cálculos teóricos se utilizaron valores de $\tau_c=4.0 \cdot 10^{-10}$ para 13 y 1.2 a $1.4 \cdot 10^{-10}$ para los compuestos restantes.

() NOEs relativos a H₁'-H₂'.

^a Solapamiento de señales. El solapamiento se produce entre los protones H₂, H₄, H₃', H₅' en 13, H₂, H₄ y H₃' en 36a, H₄ y H₅' en 44c y 44d, H₂ y H₅' en 52, H₂, H₄, H₃' y H₅' en 56 y H₂ y H₃' en 60.

^a Solapamiento parcial de señales.

NOE relativo a H₁'-H₂' posiblemente subestimado.

En las figuras 37-43 (estas figuras se encuentran en el anexo de RMN) se muestran los espectros de RMN- ^1H en D_2O a 37°C y/o TOCSY y la representación de los cortes correspondientes al H_1 de los experimentos de NOESY de los compuestos **13**, **36**, **36a**, **44c**, **44d**, **52**, **56** y **60**. Todos los NOEs interresiduos observados para estos compuestos se encuentran dentro de los NOEs esperados para derivados con uniones β - $(1\rightarrow3)$ ^[93CAR225, 94T6417].

En las figuras 24, 27, 29, 30 y 32 (sección 3.3.2 y 3.3.3) se muestran los mapas de distribución de probabilidad en función de ϕ y ψ superpuesta con la representación de las distancias interprotónicas H_1 - H_3 , H_1 - H_2 y en los mapas que poseen población en la zona norte-sur muestran la distancia H_1 - H_4 (acorde a los NOE interresiduos encontrados experimentalmente) para todos los compuestos (**13**, **36**, **36a**, **36a'**, **44a**, **44b**, **52**, **56** y **60**) analizados con el campo de fuerzas MM2 y AMBER con constante dieléctrica 78; para los compuestos **13**, **36** y **52** con MM2 en agua; para **13** con MM2 y constante dieléctrica 1 y en el caso del campo de fuerzas MM3 sólo para los compuestos **13** y **60**.

Los valores de NOE entre los protones H_1 - H_3 y H_1 - H_2 serán sensibles a las poblaciones conformacionales existentes en la zona central del mapa. Más concretamente, el valor de NOE H_1 - H_2 debe ser sensible a la existencia de poblaciones conformacionales en la parte superior de la zona central ($\psi > 54^\circ$). Los valores de NOE entre los protones H_1 - H_4 y H_1 - H_2 serán representativos de las poblaciones de baja energía en la zona norte-sur. Así, puede observarse que la región que se corresponde con distancias H_1 - H_3 cortas (menor que 3 Å) presenta, en todos los compuestos, una intersección con la zona de baja energía correspondiente a la región Ia y Ib en los campos de fuerzas MM2, MM3 y AMBER. De forma análoga, el NOE H_1 - H_2 será representativo de las poblaciones conformacionales localizadas en la región Ic de los campos de fuerzas MM2 y MM3 de la zona central y en la región IIIa en la zona norte del campo de fuerzas AMBER. El NOE H_1 - H_4 será representativo de las zonas de baja energía de la región IIIa y IIIb de la zona norte-sur en el campo de fuerzas AMBER. Los mínimos correspondientes a la región Id en la zona central en los tres campos de fuerzas y los mínimos de la región II en la zona lateral en el campo de fuerzas MM2 indican la presencia de algún NOE que no se detectó experimentalmente y, en principio, la población en dichas zonas debería ser muy pequeña o nula.

De acuerdo con esto, un análisis cualitativo de las medidas de NOE puede proporcionar una idea del comportamiento conformacional de cada compuesto en solución. Todos los compuestos presentan las mismas zonas pobladas, con lo cual, permite realizar un

análisis cualitativo general para todos ellos. La existencia de NOE intenso entre los H₁'-H₃ indica que pasan gran parte del tiempo en la zona central de baja energía. Esta conclusión está, a su vez, apoyada por la existencia de NOE entre el H₁' y H₂. La existencia de NOE H₁'-H₄ demuestra que la zona central del mapa no es la única poblada en solución, estando también presentes conformeros en la zona norte-sur y también, en este caso, esta conclusión esta apoyada por la existencia de NOE H₁'-H₂, que puede estar representado por la zona norte-sur. Los mínimos de la región Id y de la zona lateral, en principio, no estarían poblados. Como conclusión, los compuestos **13**, **36**, **36a**, **44c**, **44d**, **52**, **56** y **60** existen en solución como una mezcla de dos poblaciones conformacionales diferentes definidas por una zona central mayoritaria y una zona norte-sur minoritaria.

En la tabla 12 se muestran los valores de NOEs teóricos calculados para cada campo de fuerzas a las constantes dieléctricas utilizadas en cada caso para cada compuesto (**13**, **36**, **36a**, **52**, **56** y **60**). En el cálculo de los valores teóricos de NOE se utilizaron $\tau_c=1.2$ a $4 \cdot 10^{-10}$ s (ver tabla 12) dependiendo del compuesto. Se eligió aquel valor que permitió un mejor ajuste de los NOEs teóricos intraresiduos a los valores experimentales, se consideró H₁'-H₂'. En la tabla 12 se presentan entre paréntesis los NOEs relativos al H₁'-H₂' ya que se tomó como referencia dicho NOE; el solapamiento que poseen los protones H₃' y H₅' en algunos compuestos, impide usar dichos protones como referencia.

3.3.6 Comparación entre los valores experimentales de NOE y los cálculos teóricos

La comparación entre los valores teóricos y experimentales de NOE brinda los siguientes resultados para cada compuesto:

Metil β-laminarabiósido (13): Los protones H₂, H₄, H₃' y H₅' presentaron un solapamiento parcial, con lo cual, no permitió sacar conclusiones cuantitativas del NOE interresiduo H₁'-H₂ y H₁'-H₄. Este solapamiento se observó en el espectro de NOESY realizado a 300 MHz e igual que a 500 MHz y la relación de NOEs inter e intraresiduos es prácticamente la misma en ambos campos. En cambio sí permite el análisis de NOE H₁'-H₃.

-Campo de fuerzas MM2 en agua, con $\epsilon=1$ o 78: El valor del NOE teórico H₁'-H₃ está claramente subestimado. Este efecto es mayor para $\epsilon=78$, luego en agua y el valor teórico que más se aproxima al valor experimental es cuando se usó $\epsilon=1$, pero en este caso se partió de

una única estructura inicial para realizar los cálculos y, a baja constante dieléctrica, los resultados son muy dependientes de la geometría inicial. De acuerdo con esto, cabe esperar que el valor de la población existente en la región Ia sea superior al 53% que predice MM2 en agua. El campo de fuerzas MM2 no da NOE H₁-H₂, por lo tanto, la población en torno a la región Ic debe tener un valor muy superior al 8%. Este campo de fuerzas no explica tampoco el NOE H₁-H₄, pero no existen regiones pobladas que expliquen dicho NOE. Por último, la población en la región Id debería ser nula.

-Campo de fuerzas MM3 ($\epsilon=78$): Se realizó el mismo análisis que para el campo de fuerzas MM2. Las poblaciones en torno a la región Ia y Ic tienen que ser mayores al 24 y 22%, respectivamente, y para ello es necesario que disminuya la población en la región Ib (que sea mucho menor al 52%).

-Campo de fuerzas AMBER ($\epsilon=78$): Puede realizarse el mismo análisis que en los campos de fuerzas anteriores. Pero en este campo de fuerzas el NOE H₁-H₂ lo describe conformeros de la zona norte y no de la zona central como MM2. También describe conformeros en la zona norte-sur de baja energía que se corresponden con distancias H₁-H₄ cortas, por lo tanto, el efecto NOE será sensible a las poblaciones en dicha zona y esto no lo describe MM2. Por lo tanto, la población en la zona norte-sur debe ser superior al 12%. Por último, para aumentar el valor teórico del NOE H₁-H₃, la población conformacional debe ser superior al 53% en la región Ia y menor al 30% en la región Ib.

Metil β -D-glucopiranosil 6-sulfato de sodio-(1 \rightarrow 3)- β -D-glucopiranosido 6-sulfato de sodio (36): En este compuesto se pudieron determinar todos los NOEs, ya que no presentó solapamiento entre los distintos protones analizados.

-Campo de fuerzas MM2 en agua y con $\epsilon=78$: No predice población que explique el NOE H₁-H₄, puede verse el mismo análisis para el compuesto 13 (MM2). El valor teórico del NOE H₁-H₃ con $\epsilon=78$ predice aproximadamente bien la población en la región Ia y Ib. De acuerdo con esto, la población en dicha región es del 52 y 37%, respectivamente. El valor teórico para dicho NOE en agua es ligeramente superior al experimental. Por último, el valor teórico del NOE H₁-H₂ fue cero, lo cual indica que la población conformacional existente en la región Ic debe ser muy superior al 8% o existen otras zonas pobladas que no son explicadas por MM2, al igual que sucede con el NOE H₁-H₄. La población en torno a la región Id debería ser nula, al igual que en la zona lateral de baja energía.

-Campo de fuerzas AMBER ($\epsilon=78$): Explica los tres NOEs interresiduos: $H_1\cdots H_3$, $H_1\cdots H_2$ y $H_1\cdots H_4$. El valor teórico de NOE $H_1\cdots H_3$ es algo inferior a su valor experimental. A su vez, el valor de NOE $H_1\cdots H_2$ está subestimado. De acuerdo con esto, cabe esperar que el valor de la población existente en las regiones IIIa y IIIb sea superior al 15% que predice AMBER. Asimismo, la población en torno a la región Ia debe tener un valor superior al 50% y la población en la región Ib debe ser menor al 32%, para que puedan incrementarse las poblaciones en las regiones que expliquen los NOEs interresiduo. La población en Id debería ser nula.

Metil β -D-glucopiranosil 6-sulfato de sodio-(1 \rightarrow 3)- β -D-glucopiranosido (36a): Los protones H_2 , H_4 presentan un solapamiento parcial al igual que en el compuesto neutro 13, con lo cual, no fue posible sacar conclusiones cuantitativas del NOE interresiduo $H_1\cdots H_2$ y $H_1\cdots H_4$.

-Campo de fuerzas MM2 ($\epsilon=78$): El valor del NOE teórico $H_1\cdots H_3$ es algo inferior a su valor experimental. Así, la población en torno a la región Ia debe ser algo superior al 53%. También debería ser muy superior al 6% la población en torno a la región Ic, para que los NOE $H_1\cdots H_2$ obtenidos por cálculo se aproximen al valor experimental. Este campo de fuerzas no explica el NOE $H_1\cdots H_4$ (véase igual análisis que para el compuesto 13 en MM2). La población en las regiones Id y en la región II deberían ser nulas al igual que en el compuesto 36.

-Campo de fuerzas AMBER ($\epsilon=78$): Se obtienen los tres NOEs interresiduos: $H_1\cdots H_3$, $H_1\cdots H_2$ y $H_1\cdots H_4$. El valor teórico del NOE $H_1\cdots H_3$ es inferior al valor experimental, por lo que la población en torno a la región Ia debe ser mayor al 52%. El solapamiento de las señales no permite sacar conclusiones respecto de los NOE $H_1\cdots H_2$ y $H_1\cdots H_4$ y de las poblaciones en la zona norte-sur y la región Ib. Por último, la población en torno a la región Id debería ser nula.

Metil β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 3)- β -D-glucopiranosido 6-sulfato de sodio (36a'): Sólo se disponen datos de cálculos de mecánica molecular. Los porcentajes de poblaciones son similares al compuesto neutro 13 en los campos de fuerzas MM2 ($\epsilon=78$) y AMBER ($\epsilon=78$). La carencia de datos experimentales impide sacar conclusiones.

Metil β -D-glucopiranosil 2,3-disulfato de sodio-(1 \rightarrow 3)- β -D-glucopiranosido 2-sulfato de sodio (44c), metil β -D-glucopiranosil 3-sulfato de sodio-(1 \rightarrow 3)- β -D-glucopiranosido 2-sulfato de sodio (44d): Para estos compuestos se dispone sólo de los datos experimentales, ya que en los cálculos de mecánica molecular se realizó el análisis completo de los monosulfatados 44a y 44b. Como los compuestos tri y disulfatados (44c y 44d) dieron mapas

de distribución de población similares a los monosulfatados mencionados, puede concluirse que las zonas pobladas serían la zona central y la zona norte-sur.

Metil β -D-glucopiranosil 6-fosfato de sodio-(1 \rightarrow 3)- β -D-glucopiranosido 6-fosfato de sodio (52):

-Campo de fuerzas MM2 en agua y con $\epsilon=78$, puede apreciarse como los valores teóricos para el NOE H_1-H_3 son muy superiores al valor experimental (principalmente en agua). Las poblaciones calculadas para la zona central del mapa estarían sobrestimadas y deberían ser menores a 43 y 37 % en la regiones Ia y Ib, respectivamente. La población en la región Ic debería ser mayor que 12% para que los valores calculados para el NOE H_1-H_2 reproduzcan los valores experimentales. Estos cálculos no reproducen poblaciones en zonas de baja energía que expliquen el NOE H_1-H_4 . Los valores en la región Id y en la zona lateral deberían ser nulos.

-Campo de fuerzas AMBER ($\epsilon=78$): Reproduce los tres NOEs interresiduos pero sus valores teóricos son superiores al experimental para los NOEs H_1-H_3 y H_1-H_4 e inferiores para el NOE H_1-H_2 . De acuerdo a esto, las poblaciones en las regiones Ia y Ib y IIIb deberían ser inferiores al 48, 32 y 5%, respectivamente, y en la región IIIa debería ser mayor al 10%. Por último, en la región Id debería ser nula.

Metil β -D-glucopiranosil 6-succinato de sodio-(1 \rightarrow 3)- β -D-glucopiranosido 6-succinato de sodio (56): Los protones H_2 , H_4 presentan un solapamiento parcial, al igual que en los compuestos 13 y 36a, con lo cual no pueden sacarse conclusiones cuantitativas del NOE interresiduo H_1-H_2 y H_1-H_4 .

-Campo de fuerzas MM2 ($\epsilon=78$), El valor del NOE teórico H_1-H_3 es ligeramente inferior a su valor experimental. No reproduce los valores de NOE H_1-H_2 y H_1-H_4 . De acuerdo con esto, la población en torno a la región Ia debería aumentar, así como la región Ic, con lo cual, para incrementar las poblaciones en esas regiones debería disminuir la población en Ib. Las poblaciones en torno a la región Id y la zona lateral deberían ser nulas.

-Campo de fuerzas AMBER ($\epsilon=78$): El valor del NOE teórico H_1-H_3 es inferior al experimental. Las poblaciones calculadas para la zona central (región Ia) deberían ser superiores al 53%. Predice correctamente que la población en la región Id debe ser nula. El valor teórico del NOE H_1-H_2 es nulo, por lo tanto la población en la zona norte-sur debería aumentar. No permite concluir cuantitativamente sobre el valor teórico del NOE H_1-H_4 debido al solapamiento que sufre el H_4 .

(β -D-Glucopiranosil)uronato de sodio-(1 \rightarrow 3)-(metil β -D-glucopiranosil)uronato de sodio (60):

-Campo de fuerzas MM2 ($\epsilon=78$): Puede apreciarse cómo los valores teóricos para el NOE $H_1\text{-}H_3$ son inferiores al valor experimental. Este campo de fuerzas no describe los NOEs $H_1\text{-}H_2$ y $H_1\text{-}H_4$. En el primer caso, describe una zona de baja energía que explica dicho NOE, pero en el segundo caso, no describe poblaciones de baja energía que expliquen dicho NOE. De acuerdo con esto la población en la región Ia (50%) y Ic (9%) debe aumentar. Para que se pueda producir dicho aumento, debería disminuir la población en Ib. La población en Id debería ser nula.

-Campo de fuerzas MM3 ($\epsilon=78$): Puede realizarse el mismo análisis que para el campo de fuerzas MM2. Pero en este caso, las poblaciones en torno a la región Ia y Ic tienen que ser mayores al 24 y 22%, respectivamente, y para ello, es necesario que disminuya la población en la región Ib (que sea mucho menor al 52%). En la región Id la población debería ser nula.

-Campo de fuerzas AMBER ($\epsilon=78$): Los valores teóricos de NOE $H_1\text{-}H_3$ son también inferiores al experimental. Por lo tanto, la población en la región Ia debe aumentar en detrimento de la población en la región Ib. Este campo de fuerzas describe zonas de baja energía que explican los NOEs $H_1\text{-}H_2$ y $H_1\text{-}H_4$, pero su valor teórico fue cero. De acuerdo con esto, la población en la zona norte-sur debería ser mayor que un 12%. La población en la región Id debería ser nula.

En la tabla 13 se muestran las poblaciones obtenidas para cada campo de fuerzas, para cada región en la zona central, la zona lateral y la zona norte-sur del mapa, junto con los valores que se estiman sobre la base de los datos experimentales para cada compuesto.

Tabla 13. Poblaciones atribuidas por cada campo de fuerzas a cada una de las regiones de baja energía junto con los valores estimados experimentalmente para los compuestos 13, 36, 36a, 52, 56 y 60.

		Zona						
		Central			Lateral	Norte-sur		
		Ia %	Ib%	Ic %	Id %	II %	IIIa %	IIIb %
13	MM2 ($\epsilon=78$)	50.8	38.1	7.8	3.3	-	-	-
	MM2 (H ₂ O)	53.0	39.0	5.5	2.5			
	MM2 ($\epsilon=1$)	88.0	12.0					
	MM3	23.7	52.1	22.8	1.4			
	AMBER	52.4	30.8		5.5		7.5	3.8
	Exp*	>53	<12	>23			>12	
36	MM2 ($\epsilon=78$)	52.7	37.6	6.2	1.7	1.8	-	-
	MM2 (H ₂ O)	58.0	30.9	7.9	3.2			
	AMBER	49.4	32.1		3.6		9.1	5.8
	Exp*	>52	<25	>8	-	-	>15	
36a	MM2 ($\epsilon=78$)	53.3	37.1	6.1	1.7	1.8	-	-
	AMBER	51.9	30.7		3.8		11.4	2.2
	Exp*	>53	<26	>7	-	-	>14	
52	MM2 ($\epsilon=78$)	43.3	37.1	12.8	4.5	2.3	-	-
	MM2 (H ₂ O)	42.8	43.0	11.5	2.7			
	AMBER	48.1	32.2		4.2		10.5	5.0
	Exp*	<43	<29	>13	-	-	>10	<5
56	MM2 ($\epsilon=78$)	43.9	45.3	4.0	1.6	5.2	-	-
	AMBER	53.2	35.0				3.9	7.9
	Exp*	~44	<40	>4	-	-	>12	
60	MM2 ($\epsilon=78$)	49.9	37.3	9.3	3.5	-	-	-
	MM3	22.7	51.3	24.4	1.6			
	AMBER	52.6	29.8		5.5		8.1	4.0
	Exp*	>53	>11	>24	-	-	>12	

Los campos de fuerzas AMBER y MM3 se realizaron con constante dieléctrica 78.

*Los valores experimentales son estimados.

Ninguno de los campos de fuerzas estudiados proporciona una reproducción exacta de los datos experimentales. Los resultados de los campos de fuerzas son complementarios para dar explicación a los datos experimentales. Así, pueden estimarse las poblaciones existentes en cada zona:

-La población en la zona norte-sur para todos los compuestos analizados debería ser mayor al 12%, mientras que el porcentaje restante de población se encontraría en la zona central del mapa, repartido en tres regiones Ia, Ib y Ic.

-La población en la región Ia de baja energía es próxima al 43% para los compuestos **52** y **60**, mientras que para el resto de los compuestos la población en dicha región debería ser mayor al 53%. La población de la región Ic debería aumentar en todos los compuestos. Para que puedan aumentar las poblaciones en las regiones Ia, Ic y en la zona norte sur, sería necesaria que las poblaciones en Ib sean menores.

-Todos los compuestos analizados poseen poblaciones de baja energía en las mismas regiones del mapa, con pequeñas diferencias en el porcentaje de población de cada región.

Si comparamos los valores experimentales de los NOEs interresiduos de los derivados aniónicos (**36**, **36a**, **44c**, **44d**, **52**, **56** y **60**) con los del compuesto neutro **13** y, además, tenemos en cuenta las poblaciones conformacionales en zonas de baja energía que aportan los datos teóricos de mecánica molecular, se puede llegar a las siguientes conclusiones:

-La presencia de los grupos 6,6'-di-*O*-sulfato en **36**, 6,6'-di-*O*-fosfato en **52**, 6,6'-di-*O*-succinato en **56**, y carboxilato en **60** conduce a una disminución del NOE H_1-H_3 en 41, 78, 31 y 27% respectivamente, comparado con el compuesto neutro (**13**) lo cual indica un incremento en la distancia promedio H_1-H_3 en los derivados aniónicos. La población en la zona central, en especial en la región Ia, que sobrestima el valor de NOE H_1-H_3 , debe ser mayor en el compuesto neutro, menor en los compuestos dianiónicos (sulfato, succinato y oxidado) y aun menor en el compuesto fosfatado. Los cálculos teóricos obtenidos con mecánica molecular consideran al compuesto **52** con menor población en la región Ia, aunque el valor de NOE teórico no reproduce bien el valor experimental.

-La presencia de 6'-*O*-sulfato en el compuesto **36a** disminuye el NOE H_1-H_3 en 21%, situación intermedia entre el compuesto neutro (**13**) y el disulfatado (**36**). La sulfatación en los hidroxilos secundarios produce una disminución mayor que la sulfatación en los hidroxilos primarios en dicho NOE, indicando una mayor influencia del grupo aniónico en las posiciones cercanas al enlace glicosídico sobre la disposición espacial. Se esperaría entonces que los compuestos **44c** y **44d** tengan menor población en la zona central que **13** y que **36**.

-Una comparación entre los compuestos **36**, **52** y **60** muestra que el NOE H_1-H_4 es mayor en el compuesto sulfatado, lo que indica distancias más cortas entre los H_1 y H_4 para éste. La población en la zona norte-sur debería ser mayor en el compuesto **36**. El solapamiento del H_4 en el compuesto neutro (**13**) impide compararlo, ya que no se pudo determinar el valor experimental del NOE H_1-H_4 .

-Los H₂ también presentan señales solapadas, con lo cual no se pudo determinar el NOE H₁-H₂, excepto para el derivado disulfatado (36).

3.3.7 Comparación de la influencia de sustituyentes aniónicos sobre los enlaces glicosídicos α -(1→4) y β -(1→3).

Las conformaciones preponderantes en maltósidos (enlaces glicosídicos α -(1→4)) presentan ángulos ϕ/ψ negativos (principales mínimos: -54/-36 y -36/-36), mientras que en laminarabiósidos (enlaces glicosídicos β -(1→3)) los ángulos ϕ/ψ tienen valores positivos (principales mínimos: 54/0 y 54/18).

El análisis conformacional realizado sobre compuestos aniónicos de maltósidos y laminarabiósidos y su comparación con los correspondientes derivados neutros permite concluir que dichos compuestos existen en solución como una mezcla de poblaciones conformacionales en torno a la zona central, principalmente, variando el porcentaje de población en cada mínimo para cada compuesto.

En maltósidos, también se observa población, aunque en mucho menor proporción en la zona sur. Esta zona estaría aumentada en los derivados aniónicos. En laminarabiósidos, también se observa una población en bajo porcentaje en la zona norte-sur. En este caso no se pueden comparar los derivados aniónicos con el compuesto neutro debido al solapamiento en la señal del H₄ que impide el cálculo de NOE H₁-H₄, que explica la población en esta zona.

Las medidas de NOEs interresiduos constituyen una de las principales fuentes de información en el análisis conformacional. Los valores de NOE experimentales H₁-H₄ para los maltósidos aumenta para los derivados aniónicos, indicando distancias promedio más cortas entre H₁ y H₄. El incremento es mayor cuando el sustituyente es fosfato que cuando es sulfato. El compuesto succinilado 57 presenta valores cercanos al compuesto neutro, mientras que en el uronato no pudo analizarse debido al solapamiento de la señal correspondiente al H₄.

Los valores de NOE experimental interresiduo H₁-H₃ para laminarabiósidos muestran una disminución mayor para fosfato que para sulfato, succinato y uronato, indicando un incremento de la distancia promedio H₁-H₃ para los derivados aniónicos. De forma análoga a lo observado en maltósidos, la variación de NOE es mayor para el derivado fosfatado que para el sulfatado. Lowman y colaboradores^[98CAR559] realizaron estudios de RMN sobre β -

(1→3)-glucanos fosfatados y sugieren que la conformación de los polisacáridos en solución acuosa puede estar influenciada por la presencia del grupo fosfato. Nosotros observamos en disacáridos una influencia mayor en los derivados fosfatados respecto del compuesto neutro.

La menor distancia entre los hidrógenos involucrados en la unión glicosídica permitiría una mejor disposición de los sustituyentes cargados en maltósidos, mientras que los conformeros favorecidos en laminarabiósidos serán aquellos que presentan una mayor distancia entre los H₁ y H₃.

3.3.8 Resultados de RMN. Análisis realizado en laminara-oligosacáridos.

Se realizaron medidas de RMN: COSY y NOESY para determinar la validez de los cálculos realizados con dinámica molecular.

Se utilizó una mezcla de laminara-oligosacáridos (el número de unidades de glucosa fue mayor o igual a 5) obtenida por acetólisis del curdlano. Así, se realizaron espectros de laminara-oligosacárido (**5**) y metil laminara-oligosacárido (**16**) en D₂O a 37°C. En la figura 44 se muestran los espectros de RMN de ¹H, ¹³C y los NOEs observados como consecuencia de la irradiación en H₁ de laminara-oligosacárido (**5**). Se analizaron por espectroscopía de RMN el laminara-oligosacárido sulfatado (**35**) y el metil laminara-oligosacárido sulfatado (**37**). En la figura 45 se muestran los espectros de RMN-¹³C y los NOESY de **35** en D₂O a 37°C. En principio, se realizó el análisis con los metil glicósidos para obtener espectros de mayor pureza, pero los resultados fueron similares al compuesto con el extremo reductor libre, con lo cual, se continuó el estudio con estos últimos compuestos (**5** y **35**). Los espectros fueron asignados por experimentos de COSY H-H y C-H y también, por comparación con datos de bibliografía^[90MA3717]. Como los espectros presentan un rango de señales correspondientes a cada H o C, la asignación se encuentra sobre los espectros (figuras 44a, 44b y 45, estos espectros se encuentran en el anexo de RMN). La sulfatación se produce en la posición 6 de cada residuo de glucosa ya que la señal de C-6 se desplaza a campos bajos en el oligosacárido sulfatado respecto del libre (de 63 ppm a 69 ppm). Considerando los datos de RMN, no se observa sulfatación en las posiciones 2 y 4 ya que ambas señales se desplazarían a campos bajos (81 ppm) acorde a la bibliografía^[90MA3717, 92CAR29, 95CAR425] y no se observan picos en dicha zona. Por otra parte, el grado de sulfatación determinado para **35** (D. S. 0.92) indicaría también que sólo estarían esterificadas las posiciones 6.

Un problema importante para realizar el análisis de los NOEs de la serie de laminara-oligosacáridos es el solapamiento que existe en el H₃ tanto inter- como intraresiduo, y estas medidas de NOEs interresiduos constituyen una de las principales fuentes de información en el análisis conformacional. Los espectros sólo permiten determinar la existencia de NOE H₁-H₃ en los dos compuestos (**5** y **35**), pero no se pueden determinar la intensidad de dichos NOEs, ni los NOEs interresiduo con otros protones.

De acuerdo con los datos de NOE y los resultados de la dinámica molecular, un análisis cualitativo puede, en principio, proporcionar una idea del comportamiento conformacional de laminara-oligosacáridos (**5**) y los derivados sulfatados **35** en solución. La región correspondiente a distancias cortas H₁-H₃ (<3 Å) presenta, al igual que en los derivados de laminarabiosa, intersección con la zona central de baja energía y los valores de NOE entre estos protones serán sensibles a la población conformacional existente en dicha zona de baja energía. Tanto el compuesto neutro como el compuesto sulfatado, presentarían poblaciones en la región central del mapa, ya que, en ambos casos, todos los ángulos de torsión interglucosídicos de los oligosacáridos oscilan entre 30±30 en ϕ y ψ .

Como el análisis de los NOEs protón sólo permitió una valoración muy cualitativa de la conformación de dichos compuestos en solución, se realizaron estudios para detectar la presencia de movimientos internos en dichos oligosacáridos.

En los últimos años, ha cobrado importancia el análisis de los datos de relajación heteronuclear para detectar la presencia de movimientos internos en biomoléculas en general^[93CO748], y en hidratos de carbono^[94CAR13, 94JA4006, 95ACC63, 95JPC13334, 97CAR219] en particular. Para los oligosacáridos **5** y **35** se obtuvieron los tiempos de relajación longitudinal T₁ y transversal, T₂, así como, los NOEs heteronucleares, según se describe en la tabla 14 a un campo magnético de 125MHz y a 300 K.

El siguiente paso consistió en comparar los datos de RMN-¹³C con los resultados de dinámica molecular para extraer parámetros de orden generalizados, S², y tiempos de correlación globales τ_0 (ver sección experimental 3.3.7). En literatura, se propusieron distintos modelos de movimiento con este objetivo^[95JBR79]. En este caso, se eligió un modelo I, que considera el movimiento de un rígido isotrópico, con un único tiempo de correlación global (τ_0). También se consideró la aproximación libre del modelo de Lipari y Szabo (tanto para los datos de RMN-¹H como para los de RMN-¹³C), así como diferentes aproximaciones basadas en este modelo, de acuerdo con Lommerse y colaboradores^[95JBR79]. Las funciones que describen los dos modelos se encuentran en la sección experimental.

Para el ajuste de los datos experimentales a los modelos^[85JCI30], se utilizó un algoritmo basado en el método Simplex. Así, se definió una función, R_w ^[91JMR659], que representa la desviación entre los datos de relajación experimentales y los cálculos empleados en la función de densidad espectral de cada modelo. El valor de R_w es cero en el caso de ajuste exacto.

Para el análisis de los datos es preciso considerar por separado los datos de los carbonos que constituyen el anillo de piranosa (carbonos 1-5) y los carbonos exocíclicos (carbonos 6), ya que tienen diferente grado de libertad y por ello presentan comportamientos diferentes en cuanto a la relajación. Se midieron los parámetros de relajación heteronucleares, T_1 , T_2 y NOE para detectar la existencia de movimientos internos en el compuesto neutro **5** y en el derivado sulfatado **35**. Dichos datos se encuentran en la tabla 14, donde se presentan los valores para los residuos internos (core) y los externos (terminales) y además se hace un promedio de los datos de relajación de esos residuos. Analizando los datos de cada residuo (core y terminal) para los compuestos **5** y **35**, se observan valores más altos de T_1 , T_2 y NOE^[93CO748] en los residuos terminales de ambos compuestos, indicando que presentan menor restricción al movimiento que los residuos internos, que presentan menores valores.

Tabla 14. Tiempos de relajación, T_1 y T_2 (s) y NOE heteronuclear de los carbonos de laminara-oligosacárido **5** y del derivado sulfatado **35**, a 125MHz y a 300 K.

comp	Átomo de carbono	T_1	T_2	NOE
5	Core C-1	0.34	1.56	0.32
	C-2	0.32	1.42	0.06
	C-3	0.35	1.49	0.06
	C-4	0.34	1.47	0.15
	C-5	0.36	1.47	0.07
	promedio	0.34	1.48	0.13
	terminal C-1	0.53	1.73	0.22
	C-2	0.54	1.40	0.30
	C-3	0.44	1.46	0.20
	C-4	0.41	1.57	0.14
	C-5	0.37	1.46	0.15
promedio	0.46	1.52	0.20	

35	core C-1	0.33	1.36	0.04
	C-2	0.31	1.31	0.11
	C-3	0.34	1.38	0.15
	C-4	0.32	1.31	0.04
	C-5	0.34	1.36	0.04
	promedio	0.33	1.34	0.08
5	terminal C-1	0.31	1.40	0.04
	C-2	0.38	1.40	0.08
	C-3	0.43	1.35	0.05
	C-4	0.39	1.35	0.08
	C-5	0.45	1.33	0.35
	promedio	0.39	1.36	0.12
5	Core C-6	0.21	1.77	0.09
	Terminal C-6	0.48	1.76	0.12
35	Core C-6	0.17	1.43	0.04
	Terminal C-6	0.45	1.54	0.08

Los datos de relajación se analizaron con el modelo I, considerando movimiento de un rígido isotrópico y la aproximación de Lipari-Szabo (modelo II). Se analizaron los carbonos del anillo C-1 a C-5. Los resultados se presentan en la tabla 15, donde se muestran los valores de los parámetros de orden (S^2_{exp}) y los tiempos de correlación (τ_0 y τ_{int}); se presentan también los valores del factor residual R_w , obtenido al ajustar los datos de relajación de ^{13}C a los modelos I y II.

Tabla 15. Parámetros de movimientos promedio, tiempos de correlación (ps) y parámetro de orden S^2 , de los grupos metinos de los compuestos 5 y 35, obtenidos a partir de los datos de relajación de RMN- ^{13}C a 300K, utilizando el modelo I y II.

Comp	residuo	método	τ_0	τ_{int}	S^2_{exp}	R_w
5	core	I	693	-	-	0.120
		II	2111	91	0.67	0.053
	terminal	I	651	-	-	0.236
		II	962	28	0.52	0.119
35	core	I	1039	-	-	0.098
		II	2768	207	0.87	0.031
	terminal	I	985	-	-	0.165
		II	2711	75	0.74	0.060

Puede observarse en la tabla 15 que los valores de tiempos de correlación de ambos compuestos son menores en los residuos terminales, indicando que la movilidad de los residuos externos es mayor que la de los internos. Cuando se aplica el modelo II a los datos de C-1 a C-5 se obtienen tiempos de correlación global menores que 2800 ps para ambos compuestos. Los anillos presentan un movimiento local significativo, con tiempos de correlación menores que 210 ps. Los valores de S^2 de los compuestos **5** y **35** son menores en los residuos terminales, indicando que los residuos externos presentan también una menor restricción al movimiento que los internos.

En cuanto al ajuste de los datos de relajación de ^{13}C de los modelos I y II, hay que mencionar que éste es mejor cuando se aplica la densidad espectral completa de Lipari-Szabo, que cuando se aplica la función simplificada del método I. Desde el punto de vista físico, este hecho significa que los movimientos internos están contribuyendo a los parámetros de relajación de manera apreciable, tal como es de esperar cuando existen escalas de tiempo de movimientos de reorganización interna menores que los de reorganización global.

Por último, se aplicó este análisis a los átomos de carbono exocíclicos C-6; se utilizó únicamente el modelo II y se calcularon τ_{int} y S^2 . Los resultados se muestran en la tabla 16. Puede observarse que el grupo hidroximetilo en el compuesto **5** y el grupo sulfoniloximetilo en **35** presentan valores mayores de S^2 y de τ_{int} en los residuos internos indicando mayor restricción al movimiento en dichos residuos comparados con los residuos externos.

Tabla 16. Parámetros de movimiento promedio, tiempo de correlación (ps) y S^2 , para los grupos metileno de los oligosacáridos **5** y **35**, obtenidos con el método II.

comp	Residuo	τ_{int}	S^2_{exp}
5	Core	73	0.41
	Terminal	12	0.26
35	Core	121	0.78
	Terminal	66	0.60

Con este análisis, pueden considerarse movimientos de diferente naturaleza para el compuesto neutro **5** y para el compuesto sulfatado **35**. Los movimientos más rápidos, comprendidos en la escala de tiempo de movimientos internos rápidos (del orden de cientos de picosegundos), estarán relacionados probablemente con movimientos del anillo de

piranosa^[93JA9196] y/o reorientaciones del enlace glicosídico, como se observara para estudios similares en otros oligosacáridos neutros^[97CAR219].

Estos movimientos internos estarían más restringidos en el derivado sulfatado que en el compuesto neutro. De manera indirecta, este resultado indica que los puentes de hidrógeno que pueden formarse a través del hidroxilo primario no son determinantes para la conformación, reforzando resultados obtenidos en estudios de curdlano, donde la estructura helicoidal^[90JBP1689] estaría mantenida por uniones hidrógeno a través del hidroxilo 2.

3.3.9 Conclusiones

El análisis conformacional realizado sobre el metil β -laminarabiósido y sus derivados aniónicos **36**, **36a**, **44c**, **44d**, **52**, **56** y **60** permite concluir que dichos compuestos existen en solución como una mezcla de dos poblaciones conformacionales distintas, definidas por la zona central (los mínimos en las regiones Ia, Ib y Ic) y en la zona norte-sur de baja energía (región IIIa y IIIb). La zona norte-sur del mapa debe tener una población mayor que el 12% y la población restante se encuentra en la zona central. Los datos de NOEs experimentales y la comparación con los datos teóricos permite concluir que las diferencias entre los derivados es la variación en los porcentajes de población de cada región.

La presencia de los sustituyentes aniónicos no restringe la flexibilidad de la unión glicosídica β -(1 \rightarrow 3) en disacáridos, obteniéndose los mismos conformeros en los derivados aniónicos y en el compuesto neutro. Esto permitiría concluir que los grupos cargados en un disacárido (en la posición 6) no necesariamente dominan la estructura tridimensional.

Los resultados de dinámica molecular y medidas de NOEs protón en laminara-oligosacáridos neutro y sulfatado sólo permitió un *análisis cualitativo* debido al solapamiento de protones interresiduos. Estos resultados cualitativos son similares a los obtenidos para los correspondientes disacáridos.

Los estudios realizados de movimientos internos de ambos oligosacáridos (libre y sulfatado) permite predecir que los residuos externos tienen mayor movilidad que los residuos internos, siendo mayor la movilidad en el oligosacárido libre que en el sulfatado. Sin embargo, en los disacáridos el sustituyente aniónico en las posiciones 6 no restringe la flexibilidad. Así, los estudios realizados sobre la conformación preferencial del metil β -laminarabiósido y sus derivados aniónicos sirven como punto de partida para el estudio

conformacional de laminara-oligosacáridos en solución, pero no nos permitiría sacar una conclusión sobre la conformación del oligosacárido.

Los resultados obtenidos a partir de los cálculos de mecánica molecular son claramente dependientes de la parametrización del campo de fuerzas utilizado, y sería necesario intensificar la investigación de parámetros apropiados para grupos sulfatos y fosfatos. Los campos de fuerzas estudiados (MM2, MM3, AMBER) no proporcionan una reproducción exacta de todos los resultados experimentales, siendo complementarios para concluir sobre las poblaciones conformacionales en solución de los compuestos analizados.

3.4 Parte experimental

3.4.1. Experimentos de RMN

Los espectros de RMN se realizaron en espectrómetro Varian XL-300 y Varian Unity 500 a 37° C. El solvente utilizado fue D₂O (99.8 % de pureza, Merck) y se liofilizaron las muestras dos veces. Los desplazamientos químicos de protón están referidos a la señal residual de HDO a δ 4.61 ppm.

Los experimentos de 2D-NOE en el sistema rotatorio (ROESY, CAMELSPIN)^[92JA3157] se realizaron en modo sensible a la fase, a 500 MHz. El período de bloqueo de spines consistió en un tren de pulsos de 30° (2.5 μ s) separados por tiempo de espera de 50 μ s. Los tiempos de mezcla totales se fijaron en 600 ms. La posición del transmisor se fijó a δ 6 ppm con el fin de minimizar los efectos espúreos Hartmann-Hahn.

Los experimentos de T-ROESY se llevaron a cabo a 300 y 500 MHz, usando tiempos de mezcla de 300, 400 y 600 ms. La intensidad del campo durante el bloqueo fue de 7.5 KHz y la posición del transmisor se fijó en la señal de agua. Este experimento se utilizó con el fin de minimizar los efectos espúreos Hartmann-Hahn^[85JMR207].

Los experimentos de 2D-NOESY se realizaron a 300 y 500 MHz con tiempos de mezcla de 600 ms.

Los experimentos de NOE estacionario se llevaron a cabo a 300 y 500 MHz por medio de una técnica diferencial, usando tiempos de saturación de 10 s.

Los experimentos de absorción pura de correlación a un enlace protón-carbono se realizó con detección en ¹H, usando la secuencia HMQC a 300 y 500 MHz.

Los experimentos de 2D-TOCSY se llevaron a cabo en el modo sensible a la fase, usando MLEV-17 para la mezcla isotrópica. El tiempo de mezcla se fijó en 90 ms.

Los tiempos de relajación longitudinal (T_1): se midieron por métodos habituales de inversión-recuperación por detección directa de ^{13}C bajo desacoplamiento protónico.

Los tiempos de relajación transversal (T_2): este parámetro puede estimarse directamente observando ^{13}C mediante experimentos de eco de spin (*spin echo*), o CPMG (Carr-Purcell-Meiboom-Gill), en condiciones de desacoplamiento protónico o inversión de protones en medio de la secuencia de eco spin.

Medidas de NOE heteronuclear: se pueden realizar comparando las intensidades de las líneas de resonancia de dos espectros de RMN- ^{13}C obtenidos con y sin desacoplamiento protónico durante el período de demora entre pulso y pulso.

Estos experimentos fueron realizados en el Instituto de Química Orgánica General, CSIC, Madrid, España y en la Universidad Autónoma de Madrid.

3.4.2. Cálculo de mecánica y dinámica molecular

Todos los cálculos se llevaron a cabo en una *Silicon Graphics*, donde se encuentra instalado el programa *Macromodel*. Los cálculos de mecánica molecular se realizaron usando los campos de fuerzas MM2, MM3 y AMBER.

Las estructuras de partida para los cálculos de los derivados de maltosa 17, 38, 38a, 38a', 51, 57, 61 y los derivados de laminarabiosa 13, 36, 36a, 36a', 44a, 44b, 52, 56 y 60 se construyeron como se describió en el capítulo 3 con el módulo gráfico del programa *Macromodel*. Para cada una de ellas, se genera un mapa rígido por rotación sistemática de ϕ y ψ , entre -180° y 180° , utilizando un incremento de 18° en cada caso. En el segundo paso, se procedió a la minimización sistemática de cada una de las estructuras integradas en el mapa rígido generando el mapa relajado. Para ello se utilizaron 200 iteraciones de minimización con el algoritmo *steepest descent* seguido de 1500 iteraciones con gradientes conjugados. Con el objeto de mantener fijos ϕ y ψ , para cada estructura del mapa se impuso a estos ángulos una restricción de $2500 \text{ Kcal/mol rad}^2$. A partir de los mapas relajados se obtuvo la distribución de probabilidad para cada campo de fuerza y para cada constante dieléctrica. Se asumió que la diferencia de entropía entre conformeros es despreciable. A partir de los datos de energía se pudieron obtener los mapas de probabilidad. Se analizaron 400 puntos por mapa.

La distribución de probabilidad fue utilizada para calcular distancias promedio, obteniéndose así mapas de distancias.

Los valores de NOE estacionario y NOESY fueron calculados mediante la resolución del sistema de ecuaciones propuesto por Noggle y Schrimmer^[71RB4] utilizando la constante de relajación cruzada promedio obtenida a partir de los valores de $\langle r^{-6} \rangle$. En los cálculos de NOE estacionario y NOESY se asumió la existencia de movimiento isotrópico rígido, para el sistema estudiado. Se utilizó en todos los casos un valor de τ_c de 0.01 a 0.05 ns (aquel que permitió obtener un mejor ajuste entre NOEs teóricos y experimentales ya que los NOEs son muy dependientes de dicho tiempo). Los espectros de NOESY fueron simulados mediante el protocolo de la matriz de relajación completa, utilizando el método propuesto por Cagas y Bush^[90BP1123]. El programa utilizado para la simulación del experimento de NOESY ha sido desarrollado en el grupo de trabajo del Dr J. Jimenez-Barbero.

Los derivados succinilados **56** y **57** se analizaron por el método de Monte Carlo. Las estructuras de partida se construyeron tomando los confórmeros de menor energía de metil β -laminarabiósido y metil β -maltósido, respectivamente, encontrados previamente con el programa MM2 y fueron modificados para obtener el compuesto deseado (derivados succinilado) y se sometieron a una minimización adicional. En cada compuesto se definieron diversos ángulos diedros como se describe en el capítulo 3. Se realizó la búsqueda de conformación global de 500 pasos de Monte Carlo para cada compuesto. En cada paso se llevaron a cabo 2000 iteraciones de minimización con el algoritmo *PR conjugate gradient* (gradiente conjugado de Polak y Ribiere). Se tomaron las orientaciones gg y tg. Se impuso una restricción torsional a los enlaces interglucosídicos con una constante de fuerzas de 1000 KJ/mol.

Se comprobó la duplicación de estructuras minimizadas con criterio de convergencia de 0.4 Å. Se eligió una ventana de 50 KJ/mol para aceptar una conformación minimizada.

El número de confórmeros encontrados durante la búsqueda fue de 500 a 600. Se estableció un criterio de 12 KJ/mol por encima del mínimo global, para seleccionar el conjunto de confórmeros a estudiar. De este modo, el número de confórmeros seleccionados para los derivados fue entre 15 y 20.

En los cálculos realizados en agua, se usó el modelo continuo equilibrado de solvente (modelo GB/SA) desarrollado por Still y colaboradores^[90JA6127] para MACROMODEL, y considera una superficie de van der Waals de la molécula como punto de partida. Este modelo simula adecuadamente el medio acuoso en hidratos de carbono durante la búsqueda conformacional^[95JCP713].

Se realizaron simulaciones de dinámica molecular para laminara-oligosacáridos y su derivado sulfatado. Se utilizó el campo de fuerzas MM2. La simulación se realizó en agua.

La temperatura se mantuvo a 300 K mediante acoplamiento a un baño de temperatura. Las estructuras de las trayectorias se guardaron cada 0.2 picosegundos, durante 500 ps que duró la dinámica. Se obtuvieron 500 estructuras.

Para la serie de laminara-oligosacáridos se realizaron medidas de relajación heteronuclear para deducir las propiedades dinámicas de estas moléculas. Por ello, se midieron:

- Los tiempos de relajación longitudinal (T_1)
- Los tiempos de relajación transversal (T_2)
- Medidas de NOE heteronuclear

La comparación de los datos de RMN con los resultados de dinámica molecular permite obtener parámetros de orden generalizados (S^2) y tiempos de correlación global (τ_0) e internos τ_{int} . El parámetro de orden S^2 de los carbonos de las distintas unidades de monosacáridos permiten determinar la rigidez de la molécula. Cuanto mayor es S^2 mayor es la rigidez. El tiempo de correlación de los distintos residuos permite determinar la movilidad de los mismos, a mayor tiempo de correlación menor movilidad. En bibliografía, se han propuesto diferentes modelos de movimiento^[95ACC63, 95JBR79] con el objeto de determinar los parámetros de orden y los tiempos de correlación.

Para cualquier modelo de movimiento molecular que se proponga existe una expresión para la función de correlación y, por lo tanto, para su correspondiente función de densidad espectral. Dependiendo de la complejidad del modelo empleado, la función $J(\omega)$ contiene uno o más parámetros que describen las velocidades, amplitudes y orientaciones de los distintos movimientos presentes. Estos pueden ser comparados con los valores experimentales con el objeto de comprobar si el modelo y/o los parámetros son adecuados. La función $J(\omega)$ se relaciona directamente con los parámetros de relajación observables tales como el tiempo de relajación longitudinal (T_1), tiempo de relajación transversal (T_2) y el NOE.

Los modelos utilizados fueron:

- modelo I: movimiento de un rígido isotrópico, con un único tiempo de correlación global τ_0 .

$$J_n(\omega) = \tau_0^n / [1 + (n \omega \tau_0)^2]$$

- modelo II: en este caso se considera la aproximación libre del modelo de Lipari y Szabo (tanto para los datos de RMN- ^1H como para los de RMN- ^{13}C), así como diferentes aproximaciones basadas en este modelo, de acuerdo con Lommerse y colaboradores^[95JBR79].

En la ecuación que describe este modelo el tiempo de correlación interno τ_{int} representa un único tiempo de correlación que describe los movimientos internos.

$$J_n(\omega) = \left\{ S^2 \tau_0 / [1 + (n \omega \tau_0)^2] + ((1 - S^2) \tau_{eff} / [1 + (n \omega \tau_{eff})^2]) \right\}$$

$$\tau_{eff} = \tau_0 \tau_{int} / (\tau_0 + \tau_{int})$$

Para el ajuste de los datos experimentales a los modelos^[85JCI30], se utilizó un algoritmo basado en el método Simplex. Así, se definió una función, R_w ^[91JMR659], que representa la desviación entre los datos de relajación experimentales y los cálculos empleados en la función de densidad espectral de cada modelo ($R_w=0$ en el caso de ajuste exacto).

La infraestructura necesaria para la realización de estos cálculos fue provista por el Instituto de Química Orgánica General, CSIC, Madrid, España y los realicé durante mi estadía en el mencionado Instituto.

BIBLIOGRAFÍA

AB	Analyt. Biochem.	JC	J. Chromatogr.
AC	Acta Cryst.	JCC	J. Carbohydr. Chem.
ACC	Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.	JCI	J. Chem. Inf. Comput. Chem.
ACH	Acta Chem. Scand.	JCO	J. Comput Chem.
ACS	American Chemical Society	JCP	J. Chem. Soc. Perkin Trans II
AQA	Anales de la Asoc. Quím. Argentina.	JCS	J. Chem. Soc. Perkin Trans I
B	Ber.	JMR	J. Magn. Reson.
BBA	Biochim. Biophys. Acta.	JOC	J. Org. Chem.
BC	Biochemistry	JPC	J. Phys. Chem.
BJ	Biochem. J.	MA	Macromolecules
BP	Biopolymers	MAC	Makromol. Chem.
CAR	Carbohydr. Res.	MCC	Methods in Carbohydr. Chem.
CB	Chem. Ber.	NJC	New J. Chem.
CJC	Can. J. Chem.	P	Publication
CO	Curr. Opin. Struct. Biol.	PAC	Pure & Appl. Chem.
GB	Glycobiology	PR	Phys. Rev.
IJB	Int. J. Biol. Macromol.	RB	Reference book
JA	J. Am. Chem. Soc.	S	Science
JBC	J. Biol. Chem.	T	Tetrahedron
JBP	J. Biopolymers	TL	Tetrahedron Lett.
JBR	J. Biomol. NMR	TS	Top. Stereochem.

- 47ACH929 O.Hassel y B. Ottar, *Acta Chem. Scand.*, **1947**, 1, 929.
- 59JCS2954 E. A. Lucken, *J. Chem. Soc.*, **1959**, 2954.
- 63JA2870 M. Karplus, *J. Am. Chem. Soc.*, **1963**, 85, 2870.
- 67BC6664 D. Cumming y J. P. Carver, *Biochemistry*, **1987**, 26, 6664.
- 67PR98 L. Verlet, *Phys. Rev.*, **1967**, 159, 68.
- 69TS39 C. Romers, C. Altona, H. Buys y E. Havinga, *Top. Stereochem.*, **1969**, 4, 39.
- 70JA5834 G. J. Quigley, A. Sarko y R. H. Marchessault, *J. Am. Chem. Soc.*, **1970**, 92, 5834.
- 71RB4 J. H. Noggle y R. E. Schirmer, *The Nuclear Overhauser Effect: Chemical Applications*. Academic Press, New York, **1971**, pp 90-93.

- 73AC790 G. M. Brown y H. A. Levy, *Acta Crystallogr. Sect B*, **1973**, 29, 790.
- 77AC2490 E. M. Gress y G. A. Jeffrey, *Acta Cryst.*, **1977**, B33, 2490.
- 77CAR137 H. Takeda, N. Yasuoka y N. Kasai, *Carbohydr. Res.*, **1977**, 53, 137-152.
- 79BP2369 R. H. Marchessault y S. Perez, *Biopolymers*, **1979**, 18, 2369.
- 80BBA227 O. Jardetzki, *Biochim. Biophys. Acta*, **1980**, 621, 227.
- 80CJC631 R. U. Lemieux, K. Bock, L. Delbaere, S. Koto y V. S. Rao, *Can. J. Chem.*, **1980**, 58, 631.
- 80T2783 C. A. Haasnoot, F. A. Leeuw y C. Altona, *Tetrahedron*, **1980**, 36, 2783.
- 82ACS177 U. Burkert y N. L. Allinger, ACS, Monogr., **1982**, 177.
- 82CJC44 H. Thogersen, R. U. Lemieux, K. Bock y B. Mayer, *Can. J. Chem.*, **1982**, 60, 44.
- 83JBC9826 U. Lindahl, G. Backstrom, L. Thunberg, *J. Biol. Chem.*, **1983**, 258, 9826.
- 83PAC605 K. Bock, *Pure & Appl. Chem.*, **1983**, 55, 605.
- 84CAR1 G. M. Pipkind, V. E. Verovsky y N. K. Kochetkov, *Carbohydr. Res.*, **1984**, 133, 1.
- 84JA765 S. Weiner, P. A. Kollman, D. Case, U. Singh, C. Ghio y G. Alagona, *J. Am. Chem. Soc.*, **1984**, 106, 765.
- 85JCI30 D. J. Craik, A. Kumar, G. C. Levy, *J. Chem. Inf. Comput. Chem.*, **1983**, 23, 30
- 85JMR207 A. Bax y D. G. Davis, *J. Magn. Reson.*, **1985**, 63, 207.
- 86CAR175 A. S. Shaskov, G. M. Pipkind y N. K. Kochetkov, *Carbohydr. Res.*, **1986**, 147, 175.
- 87CJC213 J. P. Praly y R. U. Lemieux, *Can. J. Chem.*, **1987**, 65, 213.
- 87RB2 S. C. Harvey y J. A. McCammon, *Dynamics of Proteins and Nucleic Acids*, Cambridge University Press, Cambridge, **1987**.
- 88BP1519 A. D. French, *Biopolymers*, **1988**, 27, 1519.
- 88BP1927 S. N. Ha, L. J. Madsen y J. W. Brady, *Biopolymers*, **1988**, 27, 1927.
- 88NJC941 J. Jimenez-Barbero, O. Noble, C. Pfeffer y S. Perez, *New J. Chem.*, **1988**, 12, 941.
- 89BP679 V. Tran, A. Buleon, A. Imberty y S. Perez, *Biopolymers*, **1989**, 28, 679.
- 89IJB265 J. Jimenez-Barbero, C. B. Roupe, C. Rochas y S. Perez, *Int. J. Biol. Macromol.*, **1989**, 11, 265.
- 89JA8551 N. Allinger, H. Yuh, J. H. Lii, *J. Am. Chem. Soc.*, **1989**, 111, 8551.
- 89JCO205 A. Imberty, V. Tran y S. Perez, *Int. J. Biol. Macromol.*, **1989**, 11, 265.

- 89RB D. Neuhaus y M. P. Williamson, *The Nuclear Overhauser Effect in Structural and Conformational Analysis*. VCH Publisher, New York, **1989**.
- 90BC9110 S. W. Homans, *Biochemistry*, **1990**, 29, 9110.
- 90BC9843 J. N. Scardale, J. H. Prestegard y R. K. Yu, *Biochemistry*, **1990**, 29, 9843.
- 90BP1123 P. Cagas y C. A. Bush, *Biopolymers*, **1990**, 50, 1123.
- 90JBP1689 H. Saito, Y. Yoshioka, M. Yokoi y J. Yamada, *J. Biopolymers*, **1990**, 29, 1689.
- 90JA6127 W. C. Still, A. Tempczyk, R. C. Hawley y T. Hendrickson, *J. Am. Chem. Soc.*, **1990**, 112, 6127.
- 90JA7762 L. Poppe, C. W. van der Lieth y J. Dabrowski, *J. Am. Chem. Soc.*, **1990**, 112, 7762.
- 90JCO440 F. Mohamadi, N. G. Richards, W. C. Guida, R. Liskamp, C. Caufield, G. Chang, T. Hendrickson y W. C. Still, *Macromodel V3.5x*, *J. Comput. Chem.*, **1990**, 11, 440.
- 90JOC902 B. Meyer y R. Stuike-Prill, *J. Org. Chem.*, **1990**, 55, 902.
- 90MA3717 T. Yoshida, K. Hatanaka, T. Uryu, Y. Kaneko, E. Suzuki, H. Miyano, T. Minura, O. Yoshida y N. Yamamoto, *Macromolecules*, **1990**, 23, 3717-3722.
- 90RB1 A. D. French y J. W. Brady, *Computer Modeling of Carbohydrate Molecules*. ACS Symposium Serie 430; American Chemical Society. Washington D. CC. **1990**.
- 91JMR659 C. Gonzalez, J. A. C. Rullman, R. Boelens y R. Kaptein, *J. Magn. Reson.*, **1991**, 91, 659.
- 92BC10018 M. Hricovini, R. N. Shah y J. P. Caver, *Biochemistry*, **1992**, 31, 10018.
- 92CAR15 M. Dowd, A. French y P. Reilly, *Carbohydr. Res.*, **1992**, 233, 15.
- 92CAR245 T. Bocker, T. K. Lindhorst, J. Thiem, *Carbohydr. Res.*, **1992**, 233, 245.
- 92CAR29 H. Miyano, R. Nakagawa, E. Suzuki y T. Uryu, *Carbohydr. Res.*, **1992**, 235, 29-39.
- 92CAR33 K. Noguchi, K. Okuyama, S. Kitamura y K. Takeo, *Carbohydr. Res.*, **1992**, 237, 33.
- 92JA3157 T. L. Hwang, A. J. Shaka, *J. Am. Chem. Soc.*, **1992**, 114, 3157.
- 92JBR421 I. Tvaroska y F. R. Taravel, *J. Biomol. NMR*, **1992**, 2, 421.
- 93CAR225 M. Zsiska y B. Meyer, *Carbohydr. Res.*, **1993**, 243, 225.
- 93CAR49 T. Peters, B. Meyer, R. Stuike-Prill, R. Somorjai, J. R. Brisson, *Carbohydr. Res.*, **1993**, 238, 49.
- 93CO748 G. Wagner, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **1993**, 3, 748.

- 93JA9196 P. J. Hajduk, D. A. Horita y L. Lerner, *J. Am. Chem. Soc.*, **1993**, 115, 9196.
- 93JPC958 J. W. Brady y R. K. Schmidt, *J. Phys. Chem.*, **1993**, 97, 958.
- 93PAC763 J. P. Carver, *Pure & Appl. Chem.*, **1993**, 65, 763.
- 93RB3 G. R. Thatcher, *The Anomeric Effect and Associated Stereoelectronic Effects*, **1993**, A. C. S., Washington.
- 93S1491 A. C. de Dios, J. G. Pearson y E. Oldfield, *Science*, **1993**, 260, 1491.
- 94CAR13 P. Dais, *Carbohydr. Res.*, **1994**, 263, 13.
- 94CAR51 K. Katsuraya, N. Ikushima, N. Takahashi, T. Shoji, H. Nakashima, N. Yamamoto, T. Yoshida y T. Uryu, *Carbohydr. Res.*, **1994**, 260, 51.
- 94CAR513 K. Bock, J. O. Duus, *Carbohydr. Res.*, **1994**, 13 (4), 513.
- 94GB497 P. Balaji, P. Qasba y V. Rao, *Glycobiology*, **1994**, 4, 497.
- 94JA11198 J. Jimenez-Barbero, E. Junquera, M. Martin-Pastor, S. Sharma, C. Vicent, S. Penades., *J. Am. Chem. Soc.*, **1995**, 117, 11198.
- 94JA4006 R. Abseher, S. Ludemann, H. Schreiber y O. Steinhauser, *J. Am. Chem. Soc.*, **1994**, 116, 4006.
- 94JCC513 K. Bock y J. Duus, *J. Carbohydr. Chem.*, **1994**, 13 (4), 513.
- 94MA6695 K. Katsuraya, T. Shoji, K. Inazawa, H. Nakashima, N. Yamamoto y T. Uryu, *Macromolecules*, **1994**, 27, 6695.
- 94T6417 J. L. Asencio, R. Lopez, A. Fernandez-Mayoralas y J. Jimenez-Barbero, *Tetrahedron*, **1994**, 50, 6417.
- 95ACC63 P. Dais, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, **1995**, 51, 63.
- 95CAR425 T. Yoshida, Y. Yasuda, T. Mimura, K. Kaneko, H. Nakashima, N. Yamamoto y T. Uryu, *Carbohydr. Res.*, **1995**, 276, 425-436.
- 95IJB137 J. L. Asencio, J. Jimenez-Barbero y M. Martin-Pastor, *Int. J. Biol. Macromol.*, **1995**, 17, 137.
- 95JBR79 J. P. M. Lommerse, L. M. J. Kroon-Batenburg y J. P. G. Vliegthart, *J. Biomol. NMR*, **1995**, 5, 79.
- 95JCP713 M. Martín-Pastor, J. L. Asencio, R. López y J. Jiménez-Barbero, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2*, **1995**, 713.
- 95JPC13334 S. B. Engelsen, C. Herve du Penhoat y S. Perez, *J. Phys. Chem.*, **1995**, 99, 13334.
- 96CAR11 K. Ott y B. Meyer, *Carbohydr. Res.*, **1996**, 281, 11.
- 96CO710 T. Peters y B. M. Pintos, *Curr. Op. Struct. Biol.*, **1996**, 6, 710.

- 97CAR219 A. Poveda, M. Santamaría, M. Bernabé, A. Rivera, J. Corzo, J. Jiménez-Barbero, *Carbohydr. Res.*, **1997**, 304, 219.
- 97MA1997 K. Jeon, K. Katsuraya, Y. Kaneco, T. Mimura y T. Uryu, *Macromolecules*, **1997**, 30, 1997-2001.
- 97MA3224 Y. Gao, A. Fukuda, K. Katsuraya, Y. Kaneco, T. Mimura, H. Nakashima, y T. Uryu, *Macromolecules*, **1997**, 30, 3224-3228.
- 98CAR559 D. Lowman, H. Ensley y D. Williams, *Carbohydr. Res.*, **1998**, 306, 559.

4. Resumen

El estudio de oligo- y polisacáridos aniónicos es un tema de creciente interés, ya que estos compuestos inhiben la infección por el virus de inmunodeficiencia humano (VIH) y podrían ser posibles drogas para el síndrome de inmunodeficiencia adquirido (SIDA).

En particular, derivados sulfatados de curdlano o alquil oligosacáridos con uniones glicosídicas β -(1 \rightarrow 3) y α -(1 \rightarrow 4) presenta potente actividad anti-VIH y además presentan ventajas terapéuticas debido a su baja actividad anticoagulante. Diferentes actividades biológicas de polisacáridos aniónicos pueden explicarse por la interacción iónica del polisacárido con la proteína. El estudio de esta interacción requiere, en primer lugar, el análisis de la estructura tridimensional de oligosacáridos en solución.

Debido a la importancia biológica que presentan los oligosacáridos aniónicos con uniones glicosídicas β -(1 \rightarrow 3) y α -(1 \rightarrow 4), resultó de interés estudiar la conformación de estas moléculas en solución.

El objetivo primario de la etapa sintética fue la obtención de derivados aniónicos de maltosa, laminarabiosa y oligosacáridos relacionados, para lo cual se desarrolló una metodología estándar que permitió la obtención de los diversos derivados a partir de una secuencia sintética en común.

Se utilizó la maltosa de origen comercial, mientras que laminarabiosa y oligosacáridos superiores se prepararon por acetólisis del curdlano. Esta vía degradativa resultó más eficiente que la síntesis por condensación de derivados de glucosa convenientemente protegidos.

En todos los casos, se obtuvieron los derivados peracetilados que sirvieron de sustratos en la síntesis de los respectivos metil glicósidos a través de reacciones de Koenigs-Knorr. El bloqueo de los centros anoméricos de los extremos reductores tuvo por finalidad la síntesis de compuestos con mayor estabilidad y diastereoméricamente puros.

Los metil glicósidos acetilados fueron total o parcialmente desacetilados con el fin de introducir los grupos funcionales aniónicos. La remoción total de grupos acetilos proveyó sustratos que sirvieron para investigar la introducción regioselectiva de grupos sulfatos en oligosacáridos (ensayadas sobre metil maltósido, laminarabiósido y laminara-oligosacáridos); mientras que la desacetilación parcial tuvo por finalidad investigar la remoción selectiva de grupos acetatos, para después funcionalizar el grupo hidroxilo libre.

Cuando se pretende transformar selectivamente un determinado grupo funcional en un compuesto que es polifuncionalizado, los demás sitios reactivos deben ser temporalmente bloqueados, salvo que el reactivo empleado reaccione selectivamente con dicho grupo con buen rendimiento. Durante el presente trabajo de tesis, se logró la sulfatación selectiva de los grupos hidroxilos primarios en metil maltósido, laminarabiósido y laminara-oligosacáridos; sin embargo, la separación del producto de reacción se logró en forma parcial y con dificultades. Por esto, los métodos directos se discontinuaron como metodología preparativa.

Al ser los sustratos empleados compuestos polihidroxiados, la vía más eficaz para la derivatización regioselectiva (sulfatación, fosfatación, succinilación y oxidación a ácidos urónicos) se basó en las diferencias de reactividad de los grupos hidroxilos frente a determinados grupos protectores. De este modo se empleó la secuencia: tritilación de los hidroxilos primarios, bencilación, destritilación, derivatización en los grupos hidroxilos primarios y desbencilación. Esta metodología no sólo permitió la derivatización selectiva, sino que permitió la purificación y aislamiento de los productos en forma sencilla. En forma análoga, la *O*-sulfatación regioselectiva de los grupos hidroxilos C-2, C-2' y C-3' de laminarabiosa, se logró luego de bloquear los grupos hidroxilos C-4 y C-6 con bencilidén acetal, el cual fue finalmente removido.

Así, se sintetizaron los siguientes oligosacáridos que se eligieron como modelo para el estudio de la estructura tridimensional en solución:

a.-El metil β -maltósido (17) y sus derivados metil α -D-glucopiranosil 6-sulfato de sodio-(1 \rightarrow 4)- β -D-glucopiranosido 6-sulfato de sodio (38), metil α -D-glucopiranosil 6-sulfato de sodio-(1 \rightarrow 4)- β -D-glucopiranosido (38a) y metil α -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 4)- β -D-glucopiranosido 6-sulfato de sodio (38a'), metil α -D-glucopiranosil 6-fosfato de sodio-(1 \rightarrow 4)- β -D-glucopiranosido 6-fosfato de sodio (53), metil α -D-glucopiranosil 6-succinato de sodio-(1 \rightarrow 4)- β -D-glucopiranosido 6-succinato de sodio (57), (α -D-glucopiranosil)uronato de sodio-(1 \rightarrow 4)-(metil β -D-glucopiranosil)uronato de sodio (61)

b.-El metil β -laminarabiósido (13) y sus derivados metil β -D-glucopiranosil 6-sulfato de sodio-(1 \rightarrow 3)- β -D-glucopiranosido 6-sulfato de sodio (36), metil β -D-glucopiranosil 6-sulfato de sodio-(1 \rightarrow 3)- β -D-glucopiranosido (36a), la mezcla de derivados sulfatados en las posiciones 2, 2', 3' (44), metil β -D-glucopiranosil 6-fosfato de sodio-(1 \rightarrow 3)- β -D-glucopiranosido 6-fosfato de sodio (52), metil β -D-glucopiranosil 6-succinato de sodio-(1 \rightarrow 3)- β -D-glucopiranosido 6-succinato de sodio (56) y (β -D-glucopiranosil)uronato de sodio-(1 \rightarrow 3)-(metil β -D-glucopiranosil)uronato de sodio (60).

c.-Laminara-oligosacáridos (5) y laminara-oligosacáridos sulfatados (35).

La conformación se estudió mediante técnicas de espectroscopía de RMN y cálculos de mecánica molecular usando los campos de fuerza MM2 (ϵ : 78, ϵ :1 D y modelo continuo de agua), MM3 (ϵ : 78 D) y AMBER (ϵ : 78 D). Las evidencias experimentales de NOEs basadas en experimentos de NOESY y ROESY se compararon con los resultados obtenidos por cálculo de mecánica molecular, estableciéndose las conformaciones más probables en solución para los compuestos citados anteriormente.

Los resultados obtenidos por cálculos de mecánica molecular en los distintos campos de fuerzas permite hacer el siguiente análisis:

Las conformaciones preponderantes en *maltósidos* (enlace glicosídicos α -(1 \rightarrow 4)) presentan ángulos ϕ/ψ negativos (principales mínimos:-54/-36 y -36/-36), mientras que en *laminarabiósidos* (enlace glicosídicos β -(1 \rightarrow 3)) los ángulos ϕ/ψ tienen valores positivos (principales mínimos: 54/0 y 54/18).

La existencia de NOE entre los protones H₁-H₄ en *maltósidos* indica que estos compuestos pasan gran parte del tiempo en la zona central de baja energía. Dicho NOE es más intenso en los compuestos aniónicos que en el compuesto neutro. Esta conclusión está, a su vez, apoyada por la existencia de NOE entre el H₁ y H₃ (población en la zona central), siendo también más intenso este NOE en los compuestos aniónicos. Además, el NOE entre los protones H₁ y H₃, demuestra que la zona central del mapa no es la única poblada en solución, estando también presente el mínimo 4 (ϕ/ψ : -36/-162) como describe AMBER en la zona sur, aunque en forma minoritaria. El mínimo 4 (ϕ/ψ : -71/-37) en MM2 y MM3 y el mínimo 5 (ϕ/ψ : -66/-54) en AMBER, en principio no estarían poblados. De acuerdo con estos datos, los compuestos 17, 38, 38a, 38a', 53, 57, 61 existen en solución como una mezcla de dos poblaciones conformacionales diferentes, definidas por los mínimos 1, 2 y 3 de cada campo de fuerzas en la zona central (ϕ/ψ : -36/-36, -54/-36 y -71/-54, respectivamente, para MM2 y MM3 y ϕ/ψ : -16/17, -34/-19, -40/-35, respectivamente, par AMBER) y el mínimo 4 descrito por AMBER en la zona sur. Los diferentes derivados presentan resultados similares pero varían los porcentajes de poblaciones conformacionales de cada zona. Así, los

maltósidos adoptan preferentemente conformaciones con ángulos interglucosídicos próximos a los mínimos de la zona central descritos en bibliografía para la maltosa.

La existencia de NOE intenso entre los $H_{1\cdot}$ - H_3 en *laminarabiósidos* indica que pasan gran parte del tiempo en la zona central de baja energía. Esta conclusión está, a su vez, apoyada por la existencia de NOE entre el $H_{1\cdot}$ y H_2 . La existencia de NOE $H_{1\cdot}$ - H_4 demuestra que la zona central del mapa no es la única poblada en solución, estando también presentes conformeros en la zona norte-sur y además, en este caso, esta conclusión está apoyada por la existencia de NOE $H_{1\cdot}$ - H_2 que puede estar representado en dicha zona. Los mínimos de la región Id y de la zona lateral, en principio, no estarían poblados. Los compuestos **13**, **36**, **36a**, **44**, **52**, **56** y **60** existen en solución como una mezcla de dos poblaciones conformacionales diferentes definidas por una zona central mayoritaria por valores de ϕ entre 19 y 90° y valores de ψ entre -17 y 71° y una zona norte-sur (ϕ : 18 a 54 y ψ : 162 a 180 y ϕ : 54 a 89 y ψ : 145 a 180 para la zona norte y sur, respectivamente).

Los valores experimentales de los NOEs interresiduos de los derivados aniónicos (**38**, **38a**, **38a'**, **53**, **57**, **61**) pueden compararse con los del *metil β -maltósido* (**17**). Esta comparación, considerando además las poblaciones conformacionales en zonas de baja energía que aportan los datos teóricos de mecánica molecular, permite llegar a las siguientes conclusiones:

-La presencia de los grupos 6,6'-di-*O*-sulfato en **38**, 6'-*O*-mono-sulfato en **38a**, 6-*O*-mono-sulfato en **38a'** y 6,6'-di-*O*-fosfato en **53** incrementan el NOE $H_{1\cdot}$ - H_4 respecto del compuesto neutro **17**, indicando distancias promedio más cortas entre los $H_{1\cdot}$ y H_4 para los derivados aniónicos. El incremento es mayor cuando el grupo es fosfato que cuando es sulfato. De acuerdo con esto, es de esperar que el valor de la población existente en especial en la región I y en menor medida en la región II (zona central) sea superior en el compuesto **53**, luego en **38**, **38a** y **38a'** y menor en el compuesto **17**. El grupo 6,6'-di-*O*-succinato en el compuesto **57** presenta valores similares a **17** y, por lo tanto, es de esperar el mismo porcentaje de población en la zona central (región I y II). El compuesto **61** no puede analizarse debido al solapamiento de señales de H_4 y H_3 .

-El valor experimental del NOE $H_{1\cdot}$ - H_3 en el metil β -maltósido (**17**) es más pequeño que en los derivados aniónicos **38**, **38a**, **38a'**, **53** y aún más que el compuesto succinilado **57**. Esto indicaría distancias promedio más cortas entre los $H_{1\cdot}$ y el H_3 en los derivados aniónicos.

De acuerdo con esto, la población en torno a la región III (zona central y sur del mapa) debería, en principio, ser superior en **57**, luego en los compuestos sulfatados (**38**, **38a**, **38a'**) y fosfatados (**53**) y menor en el compuesto neutro **17**.

-El porcentaje de población en la región I será más sensible a la carga del sustituyente, mientras que la región III será influida en mayor medida por el efecto estérico.

La comparación entre los valores experimentales de los NOEs interresiduos de los derivados aniónicos (**36**, **36a**, **44**, **52**, **56** y **60**) y los del *metil β-laminarabiósido* (**13**), considerando además las poblaciones conformacionales en zonas de baja energía que aportan los cálculos de mecánica molecular, permiten llegar a las siguientes conclusiones:

-La presencia de los grupos 6,6'-di-*O*-sulfato en **36**, 6,6'-di-*O*-fosfato en **52**, 6,6'-di-*O*-succinato en **56**, 6,6'-di-*O* carboxilato de ácidos urónicos en **60** conduce a una disminución del NOE H₁-H₃ (mayor diferencia para fosfato) comparado con el compuesto neutro (**13**), lo cual indica un incremento en la distancia promedio H₁-H₃ en los derivados aniónicos. La población en la zona central, en especial en la región Ia que sobreestima el valor de NOE H₁-H₃, debe ser mayor en el compuesto neutro, menor en los compuestos dianiónicos (sulfato, succinato y derivado oxidado) y aún menor en el compuesto fosfatado. Cálculos teóricos obtenidos con mecánica molecular consideran al compuesto **52** con menor población en la región Ia, aunque el valor teórico no reproduce correctamente el experimental.

-La presencia de 6'-*O*-sulfato en el compuesto **36a** disminuye el NOE H₁-H₃ y dio una situación intermedia entre el compuesto neutro (**13**) y el disulfatado (**36**). La sulfatación en los hidroxilos secundarios produce una disminución mayor que la sulfatación en los hidroxilos primarios en dicho NOE. Los compuesto sulfatados en los hidroxilos secundarios (posiciones 2' principalmente) tendrían menor población en la zona central que **13** y que **36**. Como era de esperar, la sulfatación en hidroxilos secundarios tienen una mayor influencia en el enlace glicosídico.

-Una comparación entre los compuestos **36**, **52** y **60** muestra que el NOE H₁-H₄ es mayor en el compuesto sulfatado, lo que indica distancias más cortas entre los H₁ y H₄ para éste. La población en la zona norte-sur debería ser mayor en el compuesto **36**. El solapamiento del H₄ en el compuesto neutro **13** impide compararlo.

-Los H₂ también presentan solapamiento, con lo cual no se pudo determinar el porcentaje de NOE H₁-H₂, excepto para el derivado disulfatado (**36**).

Tanto en los derivados aniónicos de *maltósidos* como de *laminarabiósidos*, la comparación de los NOEs con su correspondiente derivado neutro presenta mayor variación cuando el sustituyente es fosfato.

La menor distancia entre los hidrógenos involucrados en la unión glicosídica permitiría una mejor disposición de los sustituyentes cargados en *maltósidos*, mientras que los conformeros favorecidos en *laminarabiósidos* serán aquellos que presentan una mayor distancia entre los H₁ y H₃.

El solapamiento de los H₃ en *laminara-oligosacáridos* no permitió determinar la intensidad del NOE. Los estudios de dinámica molecular brindaron un análisis cualitativo, que indicaría que hay población conformacional en la zona central con ángulos de torsión interglicosídicos que oscilan entre 30±30 para ϕ y ψ tanto para el derivado neutro como para el aniónico.

El análisis de datos de relajación heteronuclear para *laminara-oligosacáridos* permitió determinar que los residuos externos tienen mayor movilidad que los internos, siendo mayor la movilidad en el oligosacárido libre que en el sulfatado. Este resultado indicaría, de manera indirecta, que los puentes hidrógeno que pueden formarse a través del hidroxilo primario no son determinantes para la conformación, reforzando resultados obtenidos en estudios de curdlano, donde la estructura helicoidal estaría mantenida por uniones puente hidrógeno a través del hidroxilo en C-2.

Los resultados obtenidos a partir de los cálculos de mecánica molecular son claramente dependientes de la parametrización del campo de fuerzas utilizado, y sería necesario intensificar la investigación de parámetros apropiados para grupos sulfatos y fosfatos. Los campos de fuerzas estudiados (MM2, MM3, AMBER), no reproducen con exactitud todos los resultados experimentales, siendo complementarios para concluir sobre las poblaciones conformacionales en solución de los compuestos analizados.

Parte de este trabajo de Tesis dio origen a las siguientes publicaciones:

“Amine-Induced Deacylation of Carbohydrate Derivates under Anhydrous Conditions”.

O. Moradei, S. Leit, C. du Mortier, A. F. Cirelli y J. Thiem.
J. Carbohydrate Chemistry, 12 13 (1993).

“A simple route for the preparation of partially acylated sugar derivatives”.

S. Leit, O. Moradei, C. du Mortier y A. F. Cirelli.
Anales de la Asociación Química Argentina, 85 87 (1997).

“Synthesis of anionic derivatives of methyl laminara-oligosaccharides and methyl β -maltoside”

S. Leit y A. Fernández Cirelli.
Anales de la Asociación Química Argentina, en prensa.

Resultados preliminares del análisis conformacional fueron presentados a un congreso internacional:

EUROCARB1997. Utrecht1997.

“Conformational studies of anionic derivatives of methyl β -D-maltoside and methyl β -D-laminaribioside”.

Silvana M. Leit, Alicia Fernández Cirelli, Manuel Martín-Pastor, Ana Poveda y Jesús Jiménez-Barbero.



5. Anexo. Espectros de RMN

Figura 15. Corte del espectro NOESY por el H_1 del compuesto 17 en D_2O a $37^\circ C$. (300MHz)

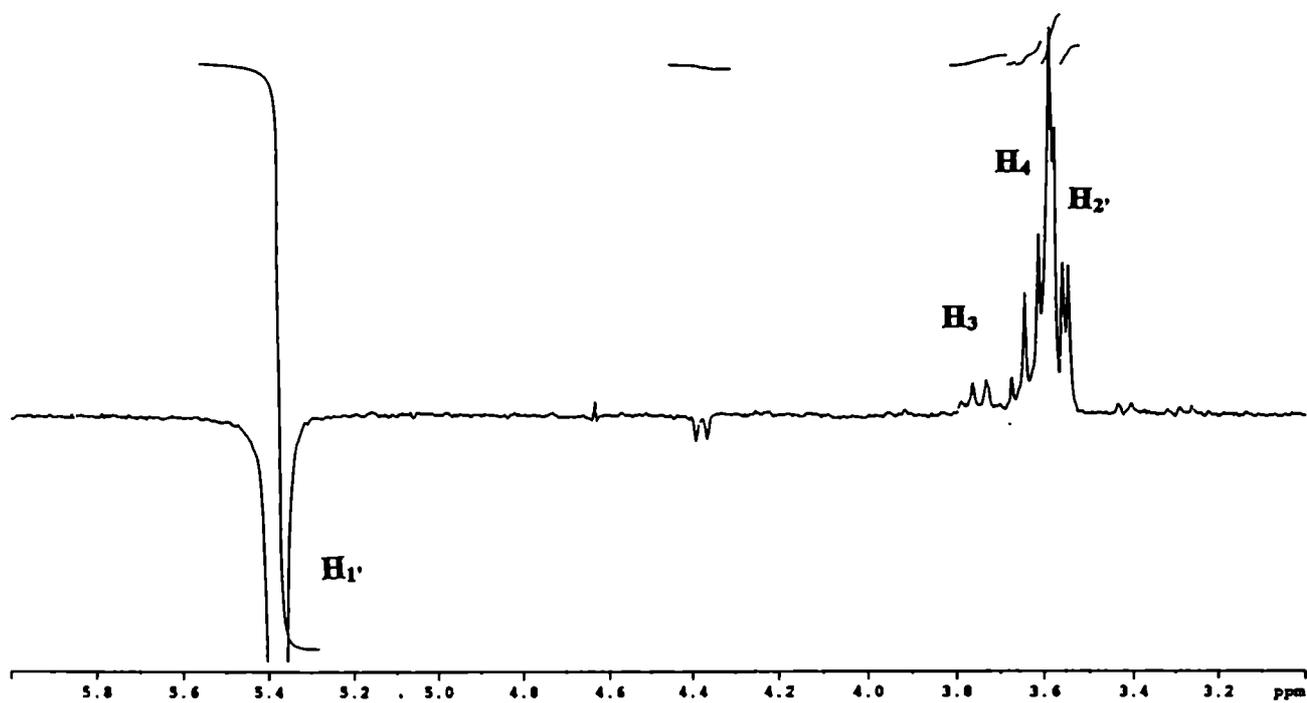


Figura 16. Espectro de RMN- ^1H y corte del espectro NOESY por el H_1 del compuesto 38 en D_2O a 37°C . (500MHz)

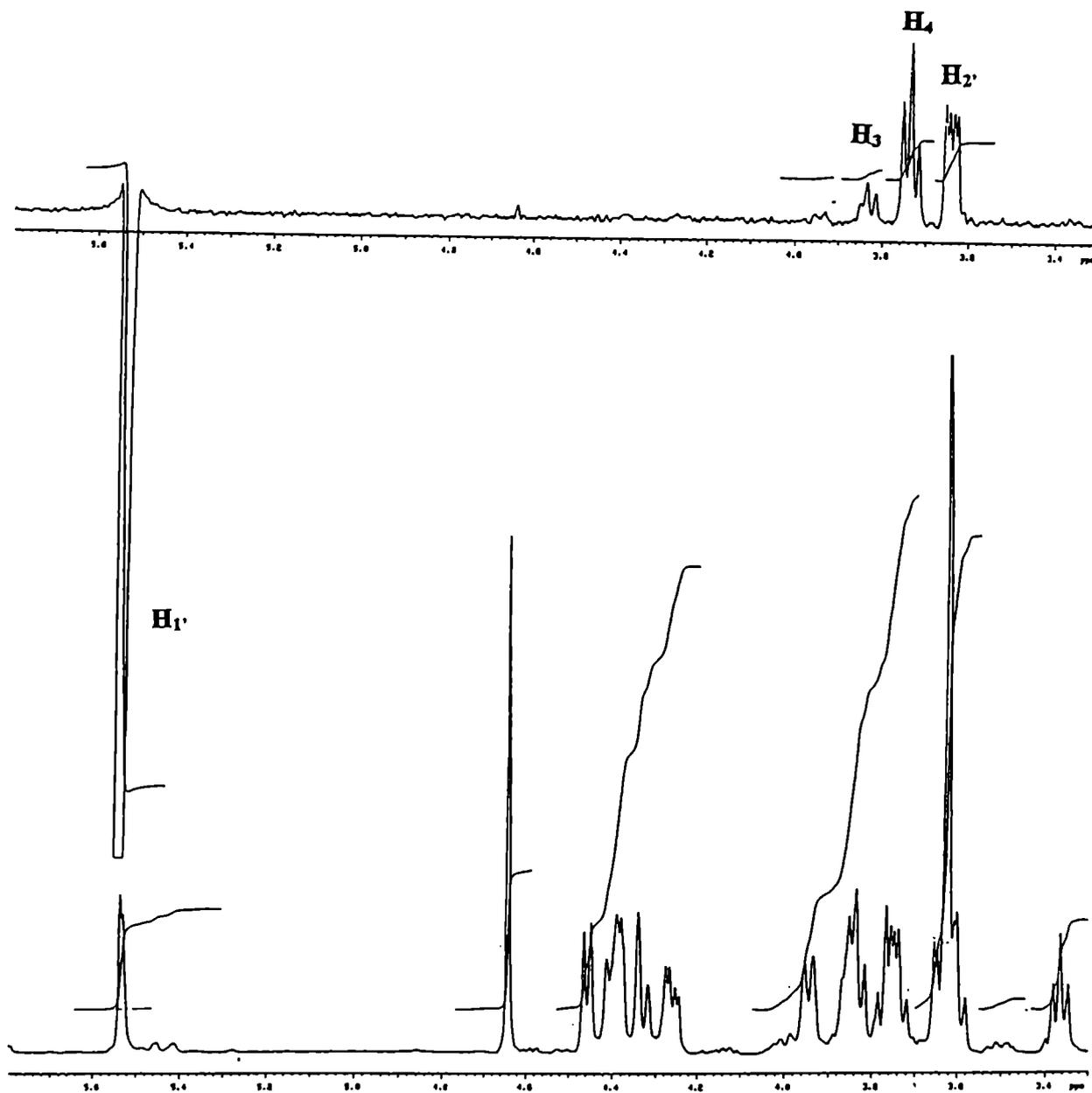


Figura 17. Espectro TOCSY (H_1) y corte del espectro NOESY por el H_1 del compuesto 38a en D_2O a $37^\circ C$. (500 MHz)

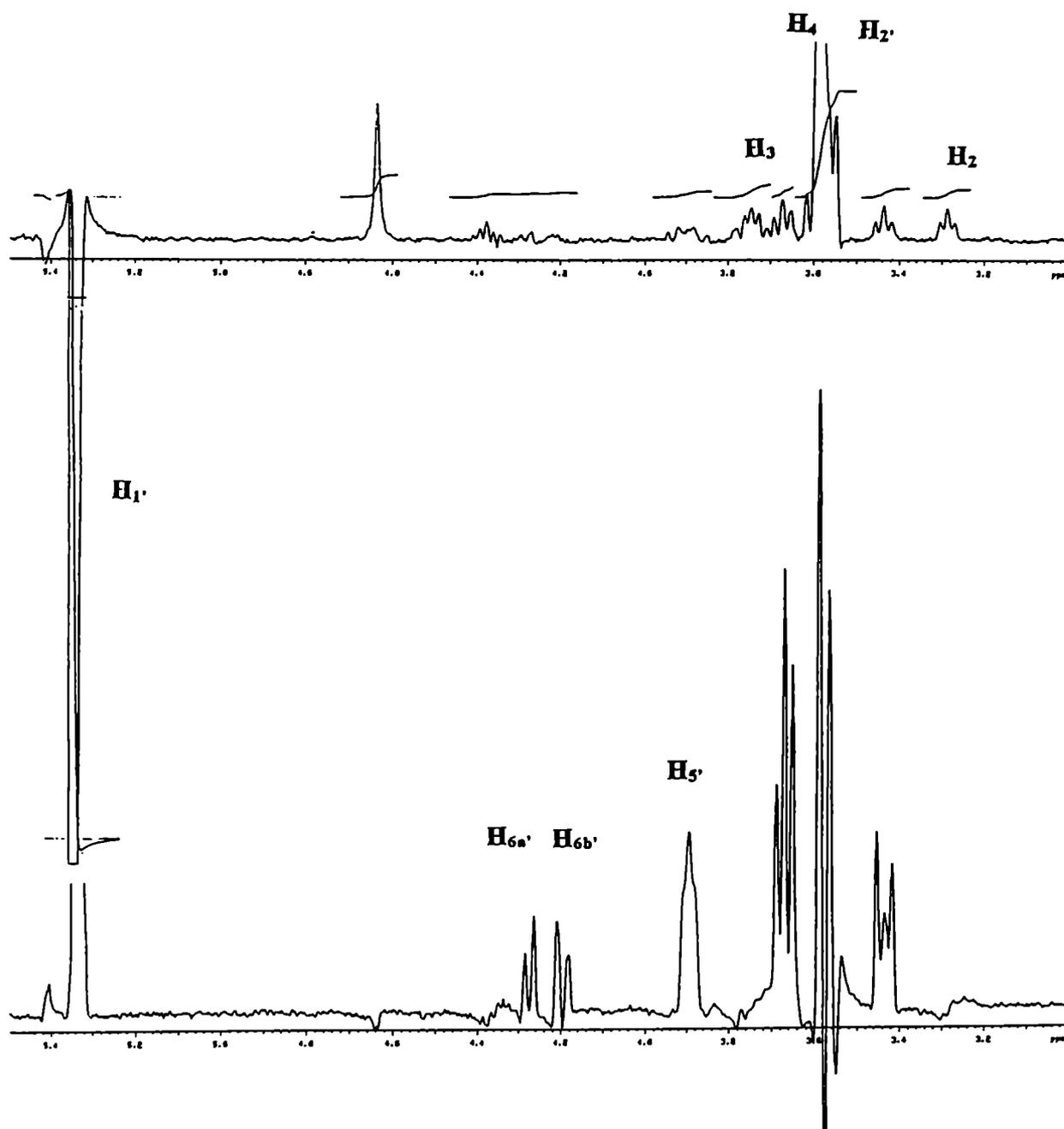


Figura 18. Espectro TOCSY ($H_{1'}$) y corte del espectro NOESY por el $H_{1'}$ del compuesto 38a' en D_2O a $37^\circ C.$ (500 MHz)

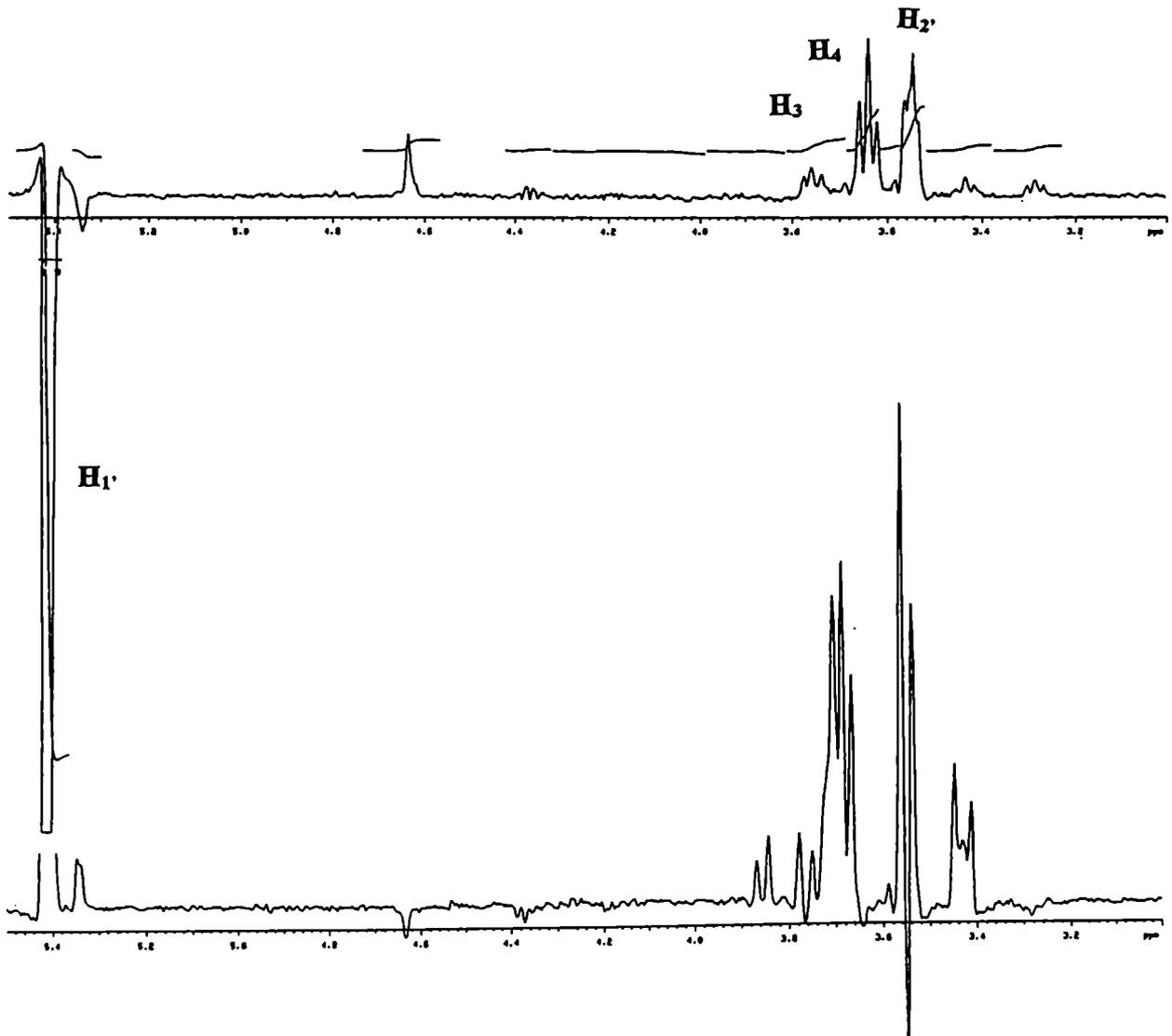


Figura 19. Espectros TOCSY (H_1) y corte del espectro NOESY por el H_1 del compuesto 53 en D_2O a $37^\circ C$. (300 MHz).

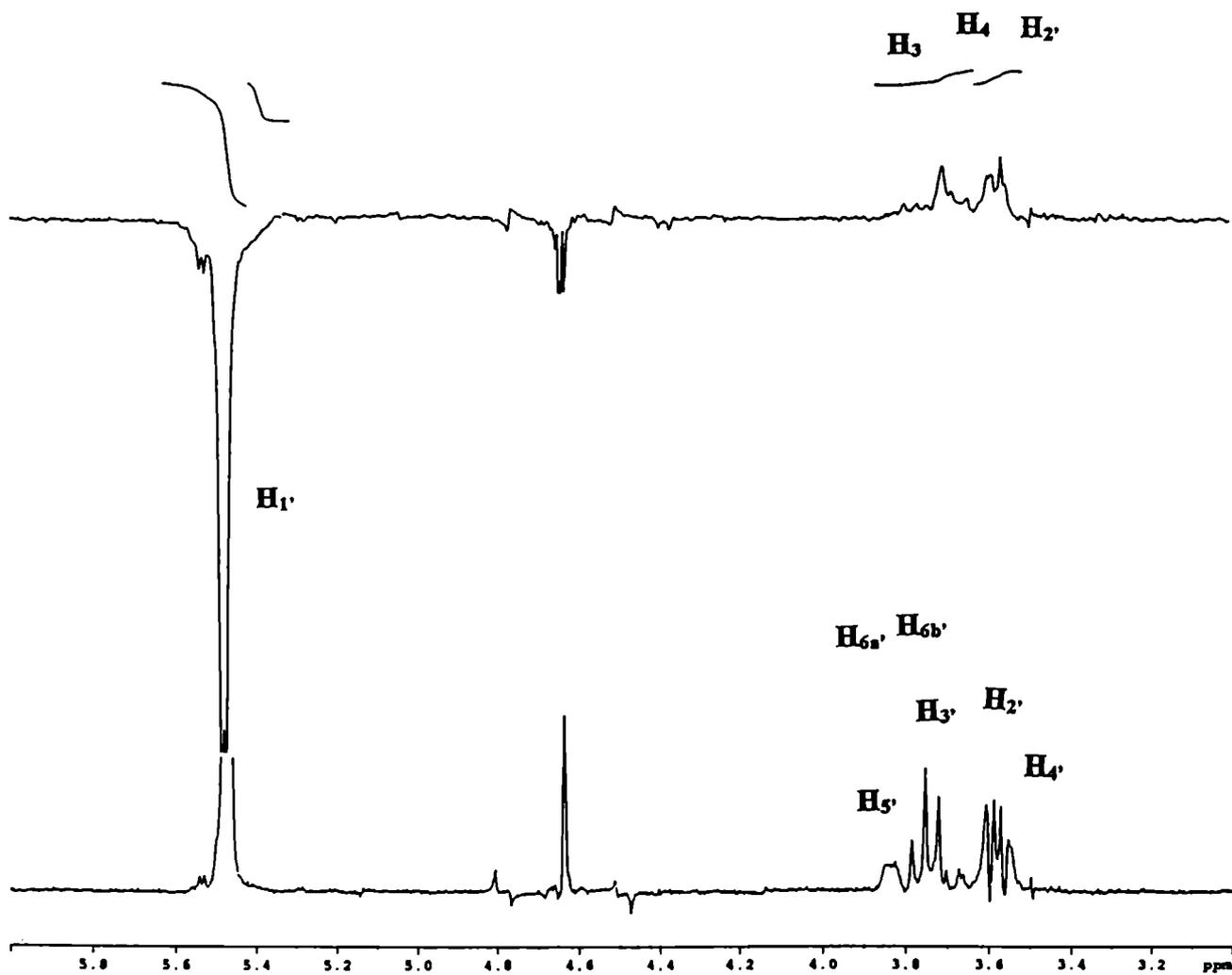


Figura 20. Espectro de RMN-¹H y corte del espectro NOESY por el H1' del compuesto 57 D₂O a 37°C. (500 MHz).

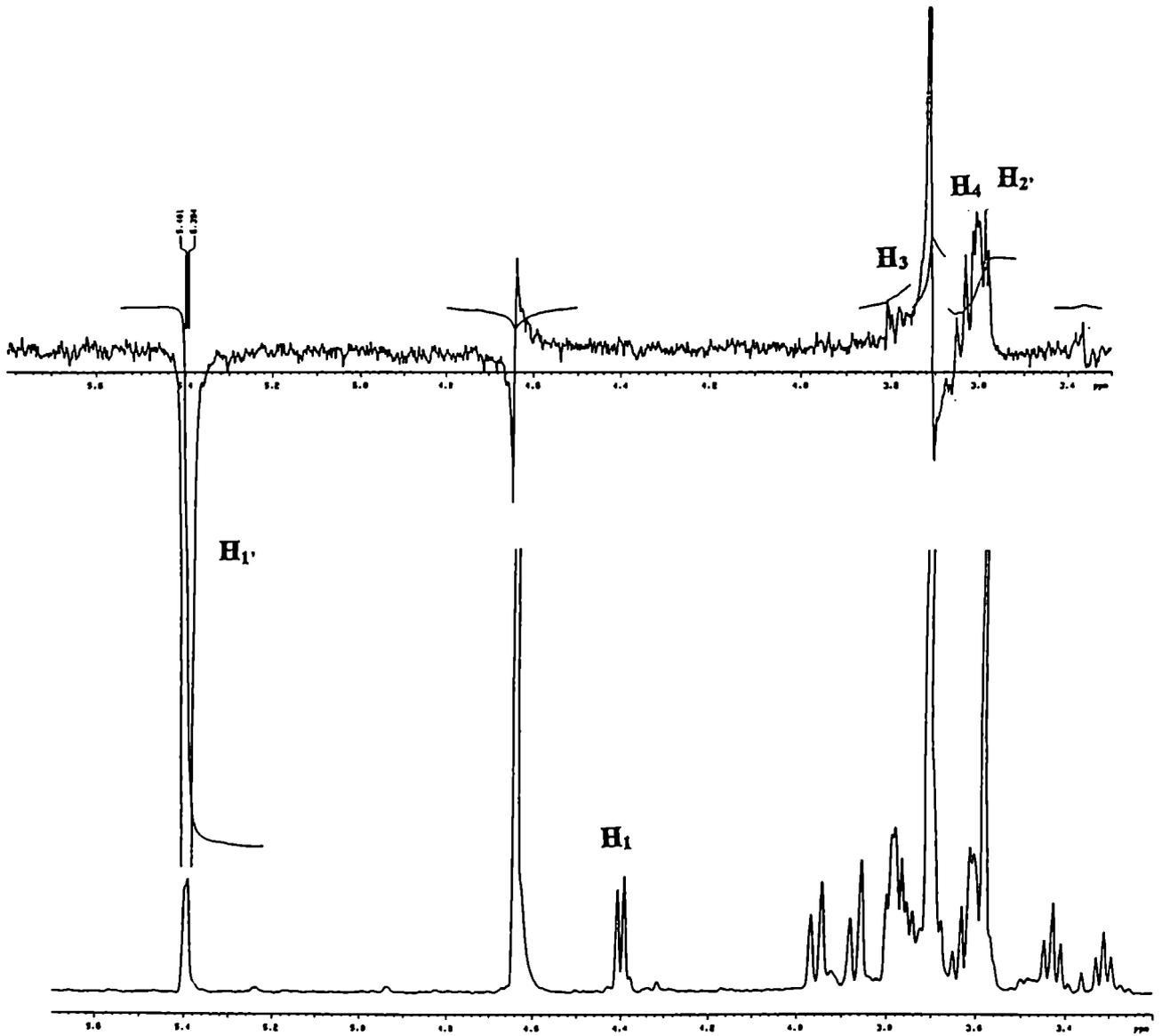


Figura 21. Espectro de RMN-¹H y corte del espectro NOESY por el H₁ del compuesto 61 en D₂O a 37°C. (500 MHz).

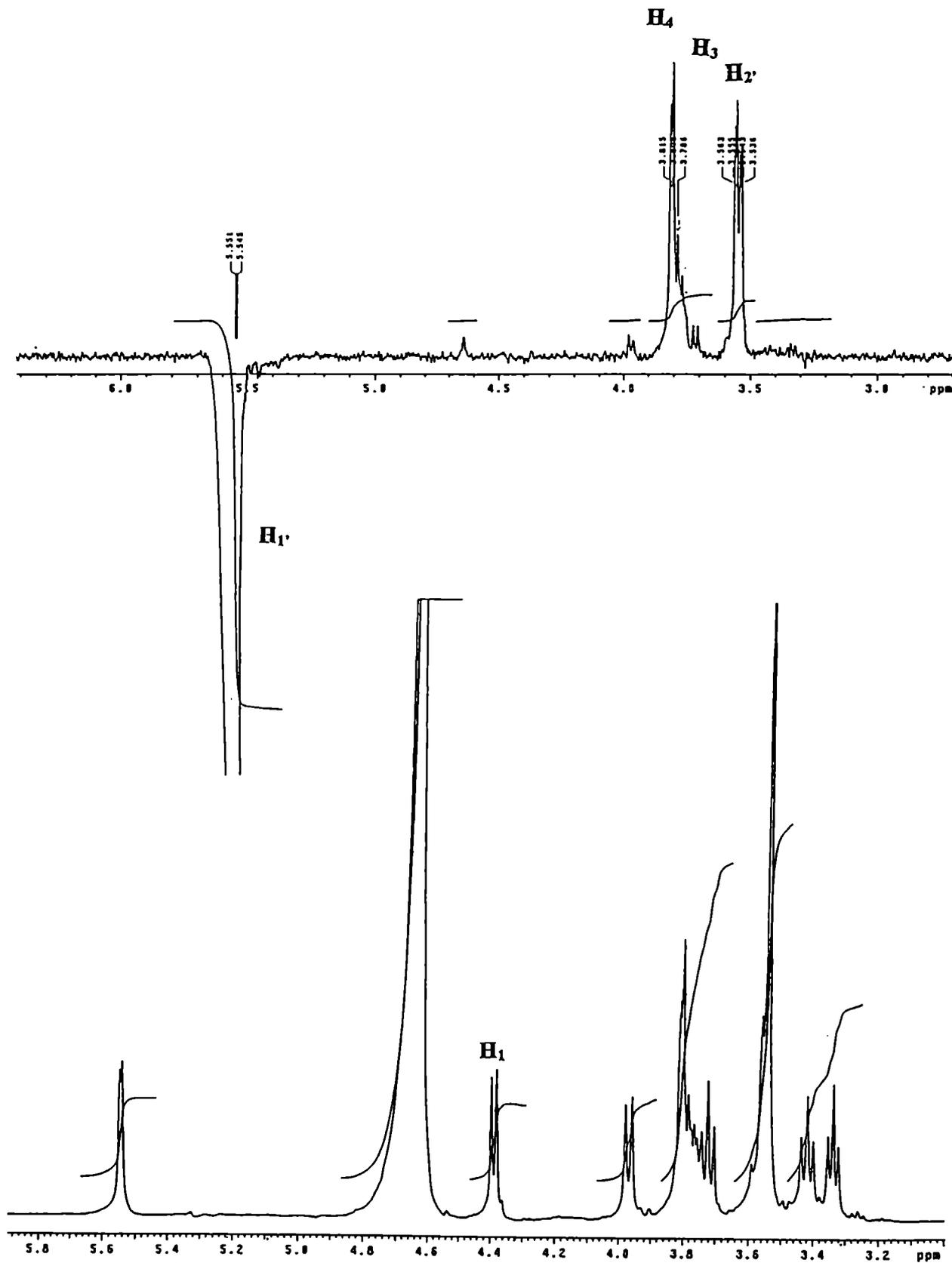


Figura 37. Espectro de RMN-¹H y corte del espectro de NOESY por el H₁' del compuesto 13 en D₂O a 37°C. (300MHz).

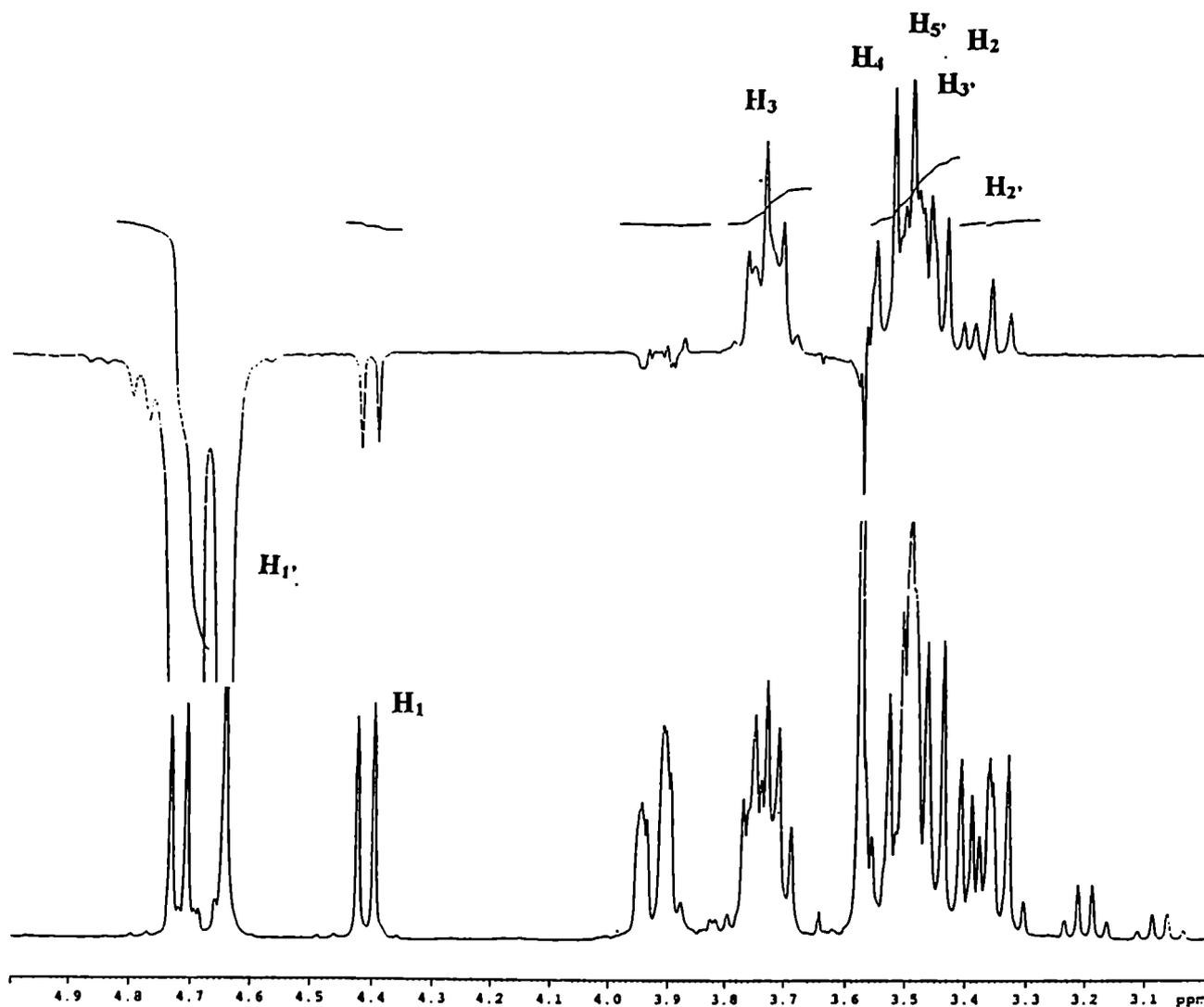


Figura 38. Espectro de RMN-¹H, espectros de TOCSY (H₁ y H₁) y corte del espectro de NOESY por el H₁ del compuesto 36 en D₂O a 37°C. (500MHz).

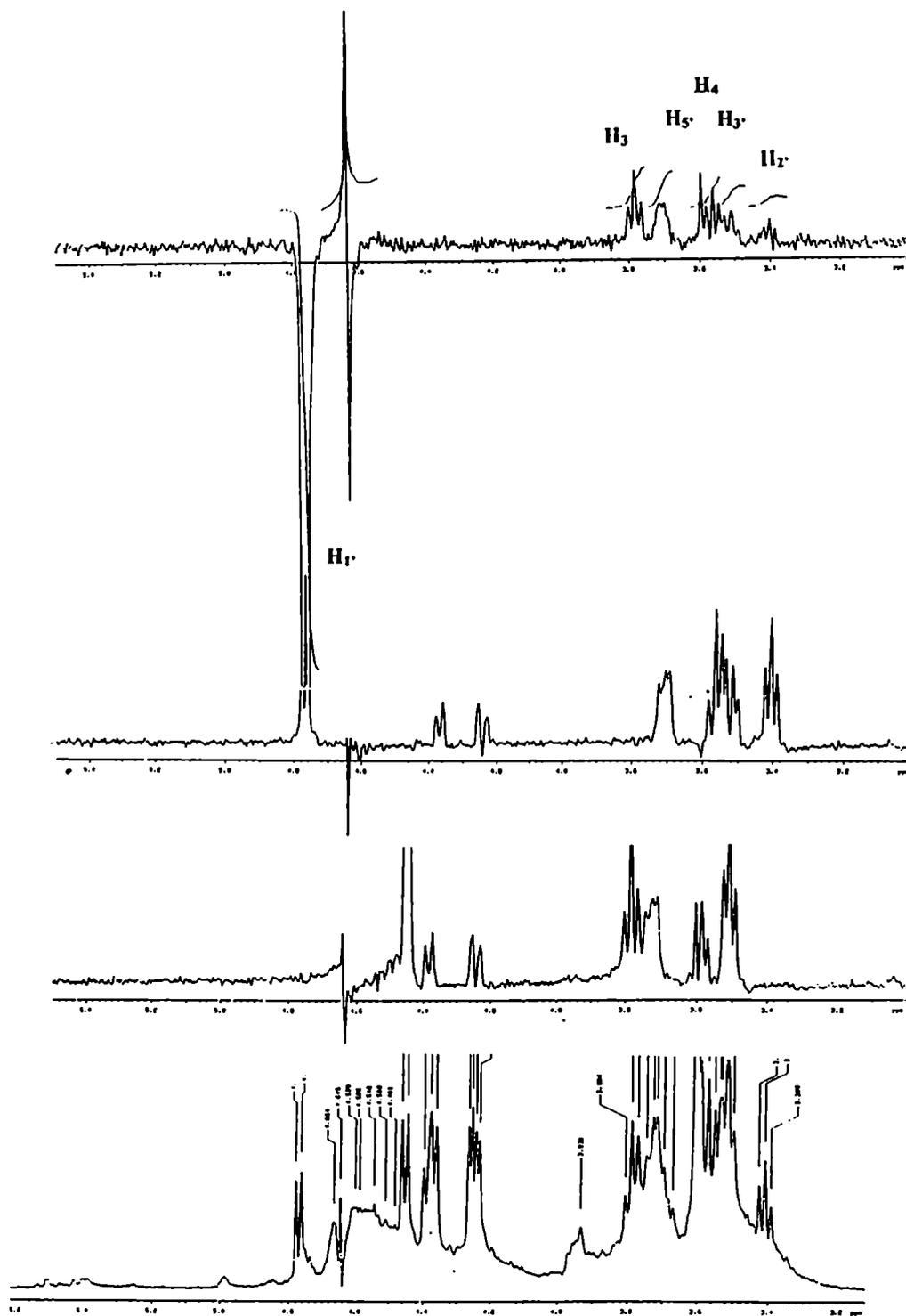


Figura 39. Espectro de RMN- ^1H y corte del espectro de NOESY por el H_1 del compuesto 36a en D_2O a 37°C . (500MHz).

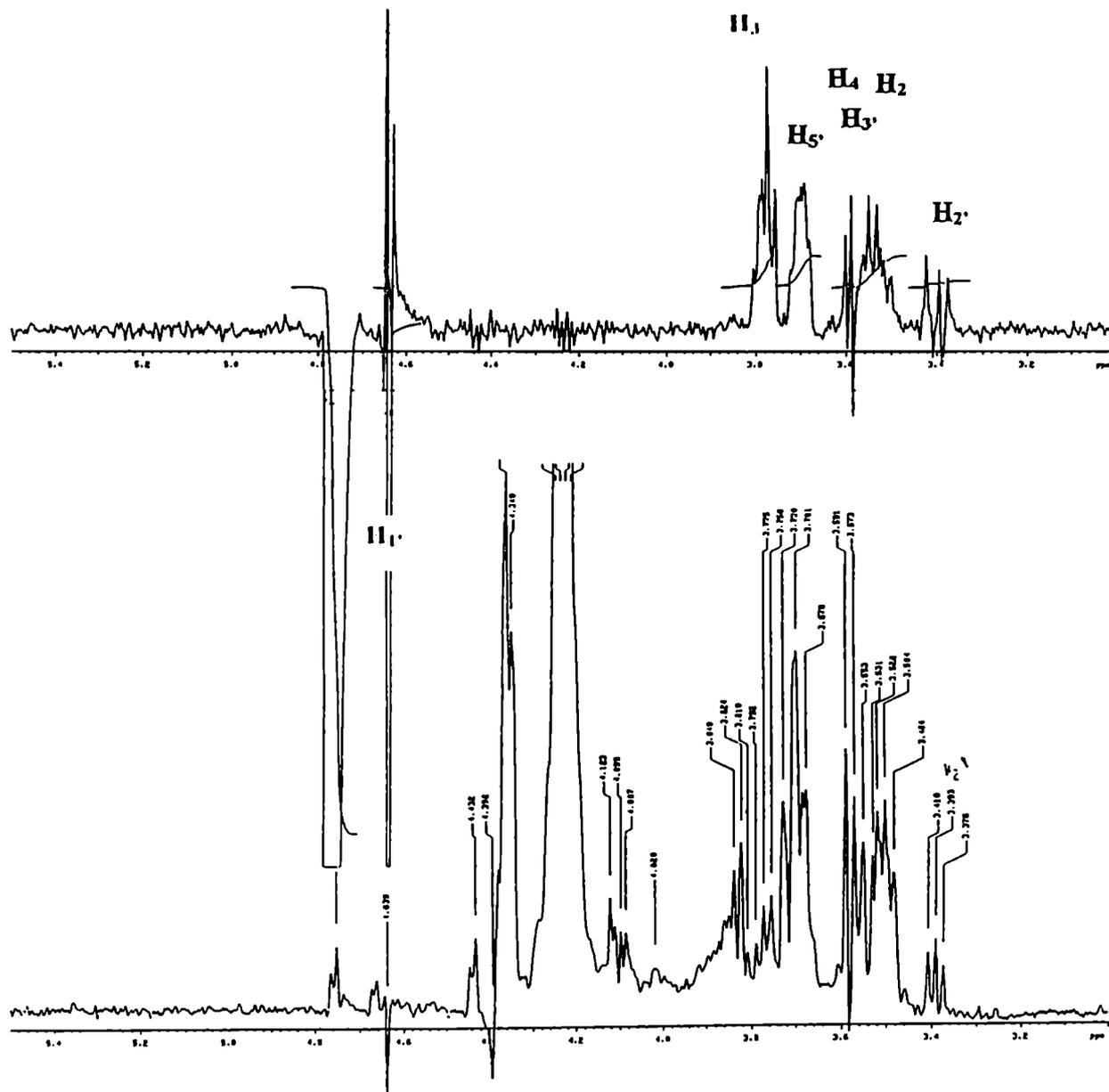


Figura 41. Espectro de RMN-¹H y corte del espectro de NOESY por el H₁ del compuesto 52 en D₂O a 37°C. (500MHz).

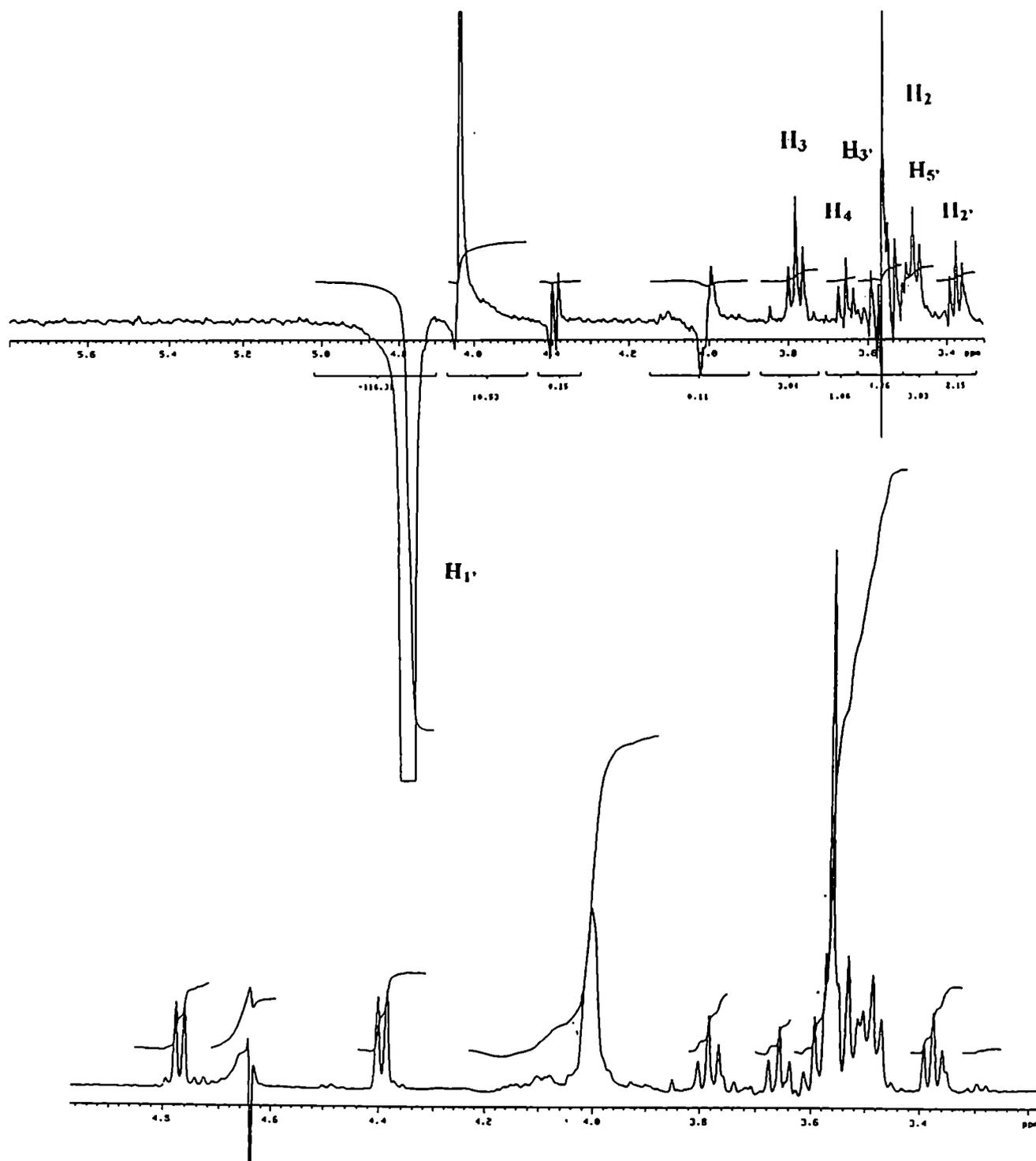


Figura 42. Espectro de RMN-¹H y corte del espectro de NOESY por el H₁' del compuesto 56 en D₂O a 37°C. (500MHz).

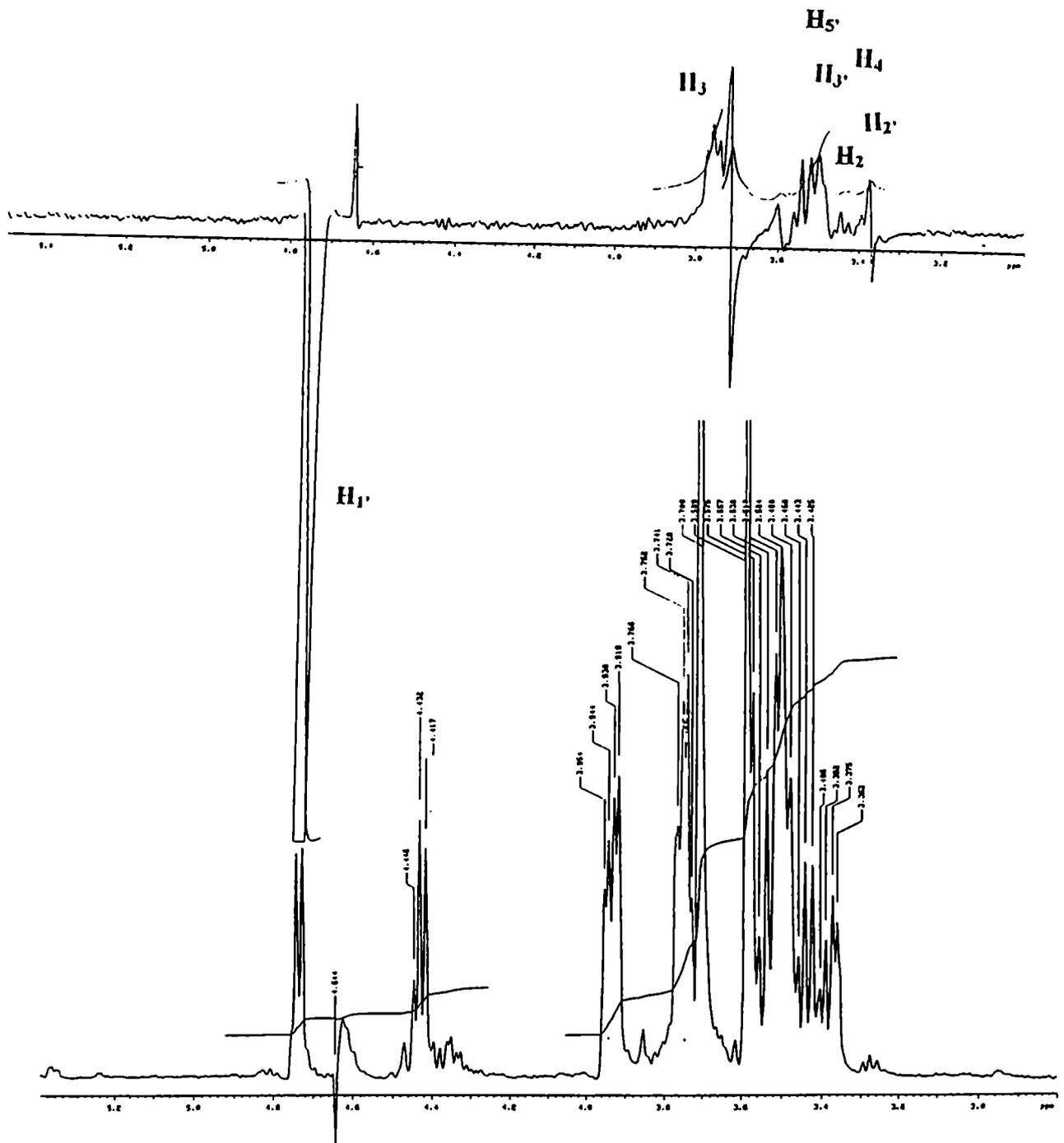


Figura 43. Espectro de RMN-¹H y corte del espectro de NOESY por el H₁ del compuesto 60 en D₂O a 37°C. (500MHz).

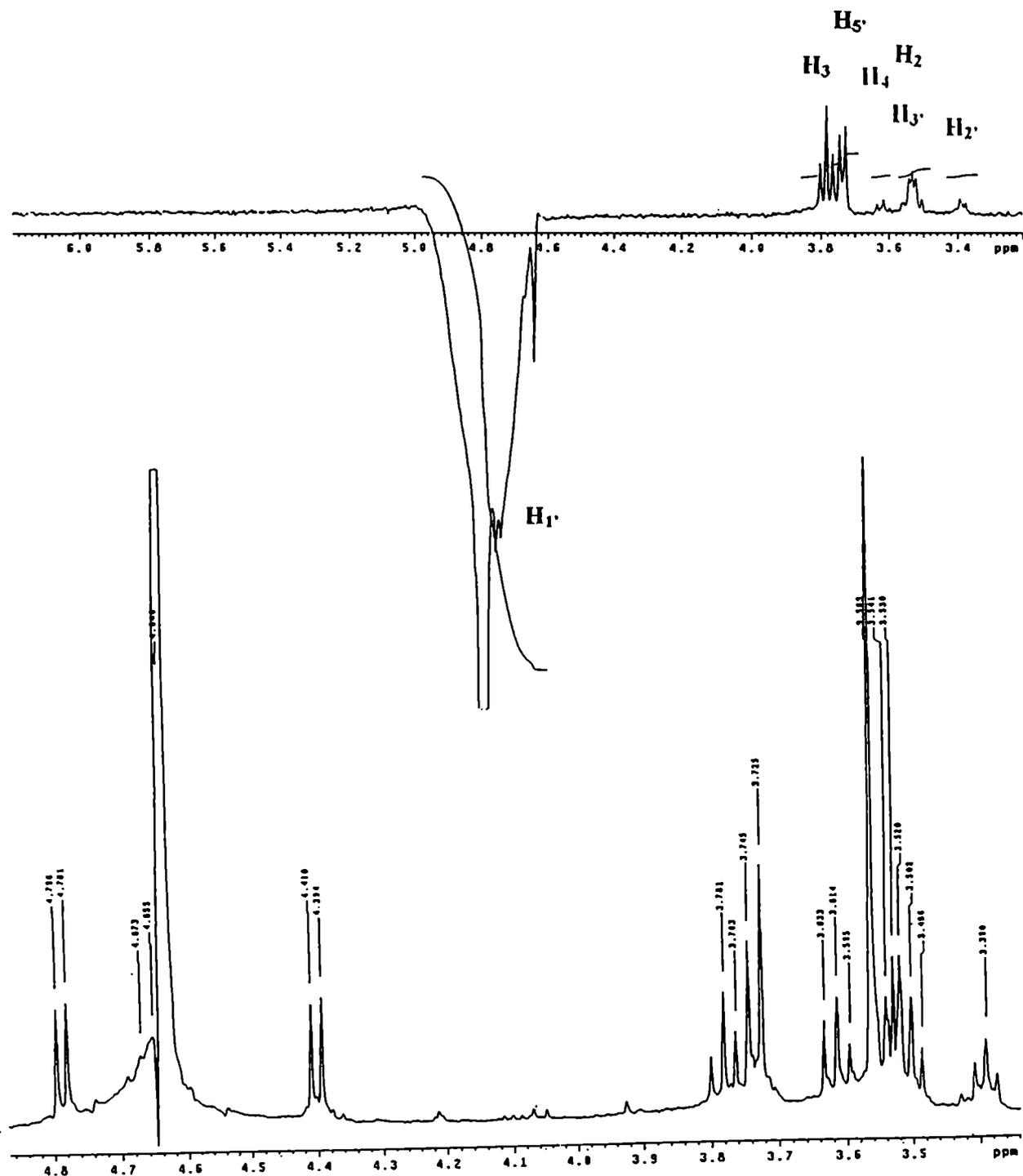


Figura 44a. Representación del espectro de RMN-¹H del compuesto 5 en D₂O a 37°C y NOEs observados como consecuencia de la irradiación del H₁.

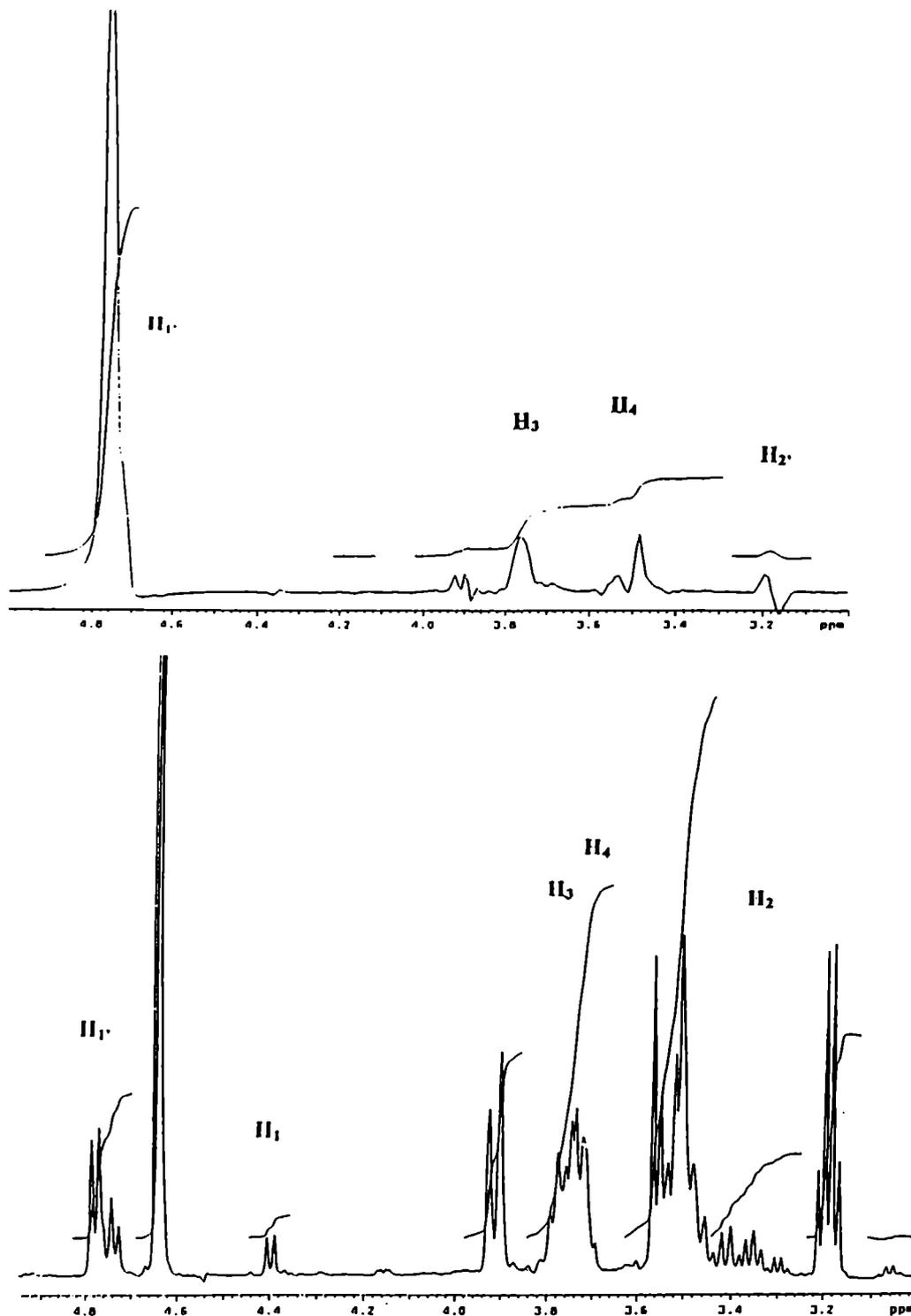


Figura 44b. Representación del espectro de RMN- ^{13}C del compuesto 5 en D_2O a 37°C .

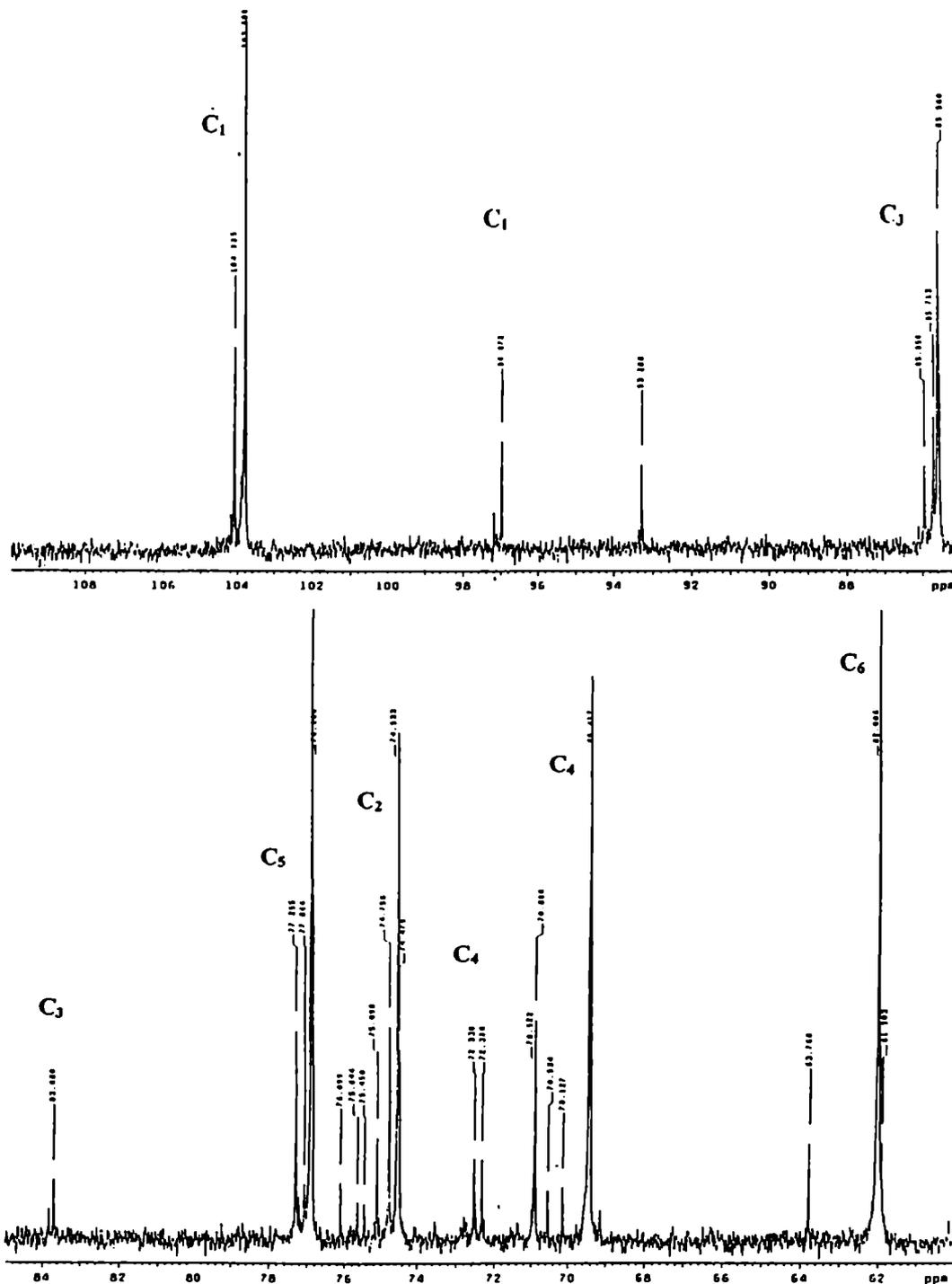


Figura 45. Representación del espectro de RMN-¹H y -¹³C del compuesto 35 en D₂O a 37°C.

