

Tesis Doctoral

Herramientas sintéticas para la caracterización de glicofuranosidasas. Desoxigenación fotoinducida por transferencia electrónica en derivados de hidratos de carbono

Bordoni, Andrea Verónica

2010

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:

Bordoni, Andrea Verónica. (2010). Herramientas sintéticas para la caracterización de glicofuranosidasas. Desoxigenación fotoinducida por transferencia electrónica en derivados de hidratos de carbono. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Bordoni, Andrea Verónica. "Herramientas sintéticas para la caracterización de glicofuranosidasas. Desoxigenación fotoinducida por transferencia electrónica en derivados de hidratos de carbono". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2010.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Química Orgánica

HERRAMIENTAS SINTÉTICAS PARA LA CARACTERIZACIÓN DE GLICOFURANOSIDASAS. DESOXIGENACIÓN FOTOINDUCIDA POR TRANSFERENCIA ELECTRÓNICA EN DERIVADOS DE HIDRATOS DE CARBONO.

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

Andrea Verónica Bordoni

Directora de Tesis: **Dra. María Carla Marino**
Consejero de Estudios: **Dra. María Carla Marino**

Lugar de Trabajo: **Departamento de Química Orgánica, FCEyN.
CIHIDECAR-CONICET**

Buenos Aires, 2010

"HERRAMIENTAS SINTÉTICAS PARA LA CARACTERIZACIÓN DE GLICOFURANOSIDASAS.
DESOXIGENACIÓN FOTOINDUCIDA POR TRANSFERENCIA ELECTRÓNICA EN DERIVADOS DE
HIDRATOS DE CARBONO."

La desoxigenación de alcoholes es una transformación importante en síntesis orgánica, especialmente en el área de la química de productos naturales. Desde su desarrollo en 1975, el método de desoxigenación de Barton-McCombie ha sido muy utilizado. Sin embargo, esta estrategia involucra el uso de hidruros de estaño, los cuales son tóxicos, costosos y difíciles de eliminar. Por este motivo, es deseable el desarrollo de procedimientos alternativos, libres de hidruros metálicos.

En este trabajo de Tesis, se estudió una reacción por transferencia electrónica fotoinducida (PET) para la reducción de grupos hidroxilos en posición- α a carbonilos de grupos ésteres y lactonas. La eficiencia de esta reacción reside en la estabilización del radical intermediario producto de la ruptura homolítica de dicho hidroxilo, derivatizado adecuadamente. La desoxigenación PET se utilizó como reacción clave en la síntesis de 2-desoxi y 5-desoxiazúcares.

La glicobiología de D-Galf es un tema de gran interés ya que éste azúcar únicamente se encuentra en glicoconjugados de bacterias, protozoarios y hongos, muchos de ellos patógenos, mientras que en mamíferos se presenta sólo en configuración piranósica. Por lo tanto, la caracterización de las enzimas relacionadas con la biosíntesis y el metabolismo de D-Galf son consideradas blancos importantes para el desarrollo de agentes terapéuticos. En este contexto, los 5-desoxigalactofuranósidos sintetizados fueron evaluados como sustrato y/o inhibidores de la *exo* β -D-galactofuranosidasa de *Penicillium fellutanum*, y mostraron que la ausencia de HO-5 disminuye drásticamente la interacción con la enzima.

Por otro lado, se desarrolló una secuencia muy directa para la síntesis de galactofuranósidos marcados radioactivamente, como herramientas sensibles para la detección de α - y β -D-galactofuranosidasas.

Palabras claves: desoxigenación PET, desoxiazúcares, galactofuranósidos, galactofuranosidasas, aldonolactonas, ácidos glicurónicos.

The deoxygenation of alcohols is an important process in organic synthesis, especially in the area of natural product chemistry. Since its development in 1975, the Barton-McCombie deoxygenation method has been widely employed. However, this procedure involves the use of organotin compounds, which are toxic, expensive and difficult to remove. Therefore, the development of alternative procedures avoiding the use of metal hydrides is a desired achievement.

In this Thesis, a photoinduced electron-transfer (PET) reaction for the reduction of hydroxyl groups vicinal to the carbonyl functions of lactones or esters is studied. The effectiveness of this reaction relies on the stabilization by the vicinal carbonyl group of the intermediate radical formed by homolytic cleavage of the hydroxyl group, conveniently derivatized. The PET deoxygenation was employed as key step in the synthesis of 2-deoxy- and 5-deoxy sugars.

The glycobiology of D-Galf is a topic of great interest since its presence is restricted to glycoconjugates of bacteria, protozoa and fungi, many of them pathogenic, whereas in mammals is found only in the pyranose form. Therefore, the enzymes involved in the biosynthesis and metabolism of D-Galf are considered important targets for the development of therapeutic agents. In this framework, the 5-deoxy galactofuranosides synthesized were evaluated against the *exo* β -D-galactofuranosidase from *Penicillium fellutanum*, showing that the absence of HO-5 drastically diminishes the affinity for the enzyme.

In addition, a straightforward procedure for the synthesis of radiolabeled galactofuranosides, as sensitive tools for detection of α - and β -D-galactofuranosidases, was developed.

Key Words: PET deoxygenation, deoxysugars, galactofuranosides, galactofuranosidases, aldonolactones, glicuronic acids.

*A **Nico**, el amor de mi vida, por darme la fuerza necesaria para seguir adelante en los momentos más difíciles, por apoyarme en todas mis decisiones y por sobre todas las cosas por haber construido conmigo lo más importante de mi vida*
“Nuestra Familia”

"ESOS LOCOS BAJITOS"

A menudo los hijos se nos parecen,
así nos dan la primera satisfacción;
esos que se menean con nuestros gestos,
echando mano a cuanto haya su alrededor.
Esos locos bajitos que se incorporan
con los ojos abiertos de par en par,
sin respeto al horario ni a las costumbres
y a los que, por su bien, hay que domesticar.

Niño, deja ya de joder con la pelota.
Niño, que eso no se dice,
que eso no se hace,
que eso no se toca.

Cargan con nuestros dioses y nuestro idioma,
nuestros rencores y nuestro porvenir.
Por eso nos parece que son de goma
y que les bastan nuestros cuentos para dormir.

Nos empeñamos en dirigir sus vidas
sin saber el oficio y sin vocación.
Les vamos trasmitiendo nuestras frustraciones
con la leche templada y en cada canción.

Niño, deja ya de joder con la pelota...

Nada ni nadie puede impedir que sufran,
que las agujas avancen en el reloj,
que decidan por ellos, que se equivoquen,
que crezcan y que un día nos digan adiós

Joan Manuel Serrat

*A **Lara** por haberme enseñado a ser madre
y hacerme conocer el amor más puro e incondicional
A **Julián** porque con su risa hizo aún más alegre mi vida*

Y a los tres por hacerme feliz

Los amo

*A **mamá**, por haberme enseñado que con esfuerzo y constancia todo se logra.*

*A **papá**, por haberme enseñado a ver el lado positivo de todas las cosas.*

*A ambos por enseñarme qué es lo importante de la vida y
por haberme apoyado en todas mis decisiones.*

*A **Mariana**, hermana, amiga y compañera.*

A los tres por su ayuda infinita

A mis abuelos, por haber sido ABUELOS

A **Carla**, por haberme dado la oportunidad de realizar esta Tesis a "pesar de mis años".
Por brindarme su confianza, conocimiento y experiencia.
Por haberme guiado, apoyado, acompañado, en todo momento con integridad, cariño y por permitirme trabajar con libertad

Quiero agradecer además a todos aquellos que de alguna manera contribuyeron de a la realización de esta Tesis:

A la familia Pregi por toda la ayuda prestada a los largo de todos estos años.

A Pablo por su eterna y valiosa amistad.

A mis amigas del secundario que poco saben de química pero mucho de amistad y paciencia.

A Paula, Gisela, Diego P y Andi por su amistad y el tiempo compartido en la facultad.

A Karina Mariño, por haber encontrado en ella una amiga con la que pude compartir de todo, desde ciencia hasta detalles de la vida.

A Luli, Veruska y Lucía por brindarme su amistad y hacer de la rutina laboral algo divertido.

A la Dra Rosa M de Lederkremer y al Dr. Oscar Varela por su ayuda prestada durante estos años.

A Charly por haberme ayudado con la síntesis de los compuestos marcados y con los ensayos con *P. varians*.

A todos mis compañeros del Laboratorio: Carola, Rosi, Charly, Euge, Mariano, Gaby, Gus y Malena por hacerme grata la tarea cotidiana.

A Rosi y Euge por haberme enseñado a usar el DIONEX con mucha paciencia.

A Pupe y Ele por las charlas y los almuerzo de todos los días.

A Fer, Carla S., Olga, María E., Vale E., Verónica Manzano, Eva, Adriana K, Malena Landoni, por las infinitas charlas de pasillo, los consejos, las terapias grupales y más que nada brindarme su amistad.

A Gernot Eskuche sin cuya dedicación no hubieran sido posibles algunos de los espectros más importantes de esta Tesis.

A la Lic. María de las Mercedes Rivero (UMYMFOR) por los numerosos microanálisis realizados y por compartir su pasión por el Quilt.

A todo el plantel docente del Departamento de Química Orgánica, por hacer amena y entretenida la docencia.

A todo el personal no docente del mismo, en particular Maripí, Mabel, Sergio y Nancy, por su amabilidad y ayuda desinteresada.

A CONICET, por la beca de Postgrado otorgada para realizar mi labor experimental.

Abreviaturas

AgOTf	triflato de plata
AIBN	azobisisobutironitrilo
Anal.	análisis elemental
Anh.	anhidro
Bz	benzoílo
<i>c</i>	concentración
ccd	cromatografía en capa delgada
CI	ionización química
COSY	espectro de correlación homonuclear H-H
cpm	cuentas por minuto
DMECZ	3,6-dimetil-9-etilcarbazol
DMSO	dimetilsulfóxido
DMF	<i>N,N</i> -dimetilformamida
EtOAc	acetato de etilo
ESI+	ionización por electrospray en modo positivo
FAB	bombardeo por átomos rápidos
GS	grupo saliente
HOAc	ácido acético
HPAEC-PAD	cromatografía de intercambio aniónico de alta presión con detección por pulso amperométrico
HSQC	espectro de correlación heteronuclear C-H
K_m	constante de Michaelis-Menten
LPS	lipopolisacáridos
Lit.	literatura
M^+	ión molecular
MCZ	9-metilcarbazol
MeOH	metanol
<i>m/z</i>	relación masa/carga
NaOMe	metóxido de sodio
NIS	<i>N</i> -iodosuccinimida
PCC	clorocromato de piridonio
PET	transferencia electrónica fotoinducida

pf	punto de fusión
pPGM	peptidofosfogalactomanano
ppm	partes por millón
Q-TOF	Quadrupolo/Tiempo de vuelo
s.s.	solución saturada
TBDMSCl	cloruro de <i>tert</i> -butildimetilsililo
TFA	trifluoacético
TFMBzCl	cloruro de (3-trifluorometil)benzoílo
TFMBz	3-trifluorometilbenzoílo
THF	tetrahidrofurano
Ts	tosilo ((4-metilbencen)sulfonato)
UDP-Galf	uridinadifosfo- α -D-galactofuranosa
UDP-Galp	uridinadifosfo- α -D-galactopiranososa

INDICE

CAPÍTULO 1

Métodos generales de desoxigenación de hidratos de carbono

Importancia biológica los desoxiazúcares	1
Métodos generales para la desoxigenación de monosacáridos	5
1. Reducción de haloazúcares	5
2. Reducción de sulfonatos	7
3. Desoxigenación mediada por radicales libres	11
3.1. Reacciones radicalarias de derivados azufrados:	11
3.1.1. Método de Barton y McCombie	11
3.1.2. Reducción radicalaria con hipofosfito de <i>N</i> -etilpiperidina	15
3.1.3. Reordenamiento de <i>S</i> -tolil glicósidos con apertura de 2,3-epóxidos	17
3.1.4. Reducción de xantatos utilizando alquilborano/H ₂ O como fuente de hidrógeno	17
3.2. Reducción de derivados de fosfitos	19
3.3. Reducción de <i>O</i> -bencilidén acetales catalizada por tioles	20
4. Reducción promovida por yoduro de samario(II)	23
5. Adición a derivados de azúcares insaturados	24

CAPÍTULO 2

Caracterización de la *exo* β-D-galactofuranosidasa de *Penicillium fellutanum*

31

CAPÍTULO 3

Desoxigenación por transferencia electrónica fotoinducida (PET)

Antecedentes y consideraciones generales	43
Primera descripción de la fotólisis reductiva de ésteres	43
Aspectos generales de los procesos de transferencia electrónica fotoinducidos (PET)	45
Reacción de desoxigenación de ésteres por transferencia electrónica fotoinducida ó fotosensibilizada	46

Síntesis de derivados parcialmente acilados de D-glucono-1,5-lactona y D-glucono-1,4-lactona	52
Desoxigenación PET de los derivados de D-glucono-1,4-lactona	59
Determinación de los tiempos óptimos de irradiación para la desoxigenación de los derivados 106 y 109	59
Conclusiones	71

CAPÍTULO 4

Síntesis de 5-desoxiglicofuranósidos

Introducción	75
Una estrategia química para la síntesis de 5-desoxi-D-galactofuranósidos	75
Síntesis del aldehído 124 , sustrato de la reacción PET	77
Síntesis de derivados furanósicos de ácido D-galacturónico.	78
Determinación de los tiempos de irradiación adecuados para la desoxigenación de 127β .	80
Síntesis de derivados acilados de D-glucurono-6,3-lactona (129)	87
Determinación de los tiempos óptimos de irradiación para la desoxigenación de los derivados 131 , 133 y 134 .	90
Reducción de los derivados desoxigenados 135 , 136 y 138	96
Conclusiones	98

CAPÍTULO 5

Síntesis de 5-desoxi- β -D-galactofuranósidos como herramientas para la caracterización de *exo* β -D-galactofuranosidasas

Introducción	103
Evaluación biológica de metil 5-desoxi-L- <i>arabino</i> -hexofuranósido (118α) y otros intermediarios	104
Evaluación de 118α como sustrato	104
Evaluación de 118α , 126α , 126β y 128α como inhibidores	105
Síntesis del sustrato cromogénico 4-nitrofenil 5-desoxi-L- <i>arabino</i> -hexofuranósido (143α)	105
Evaluación biológica del sustrato cromogénico 143α	114

Síntesis de 4-metilfenil 1-tio- β -D-galactofuranósido (152β) y del análogo desoxigenado 4-metilfenil 5-desoxi-1-tio- α -L- <i>arabino</i> -hexofuranósido (154α)	116
Evaluación de 152β y 154α como inhibidores	121
Conclusiones	122

CAPÍTULO 6

Síntesis de sustratos radioactivos para la detección de galactofuranosidasas

Introducción	125
Antecedentes en la marcación de D-galactosa y de D-galactofuranósidos. Síntesis de metil β -D-[6- ³ H]galactofuranósido (61β*) y de UDP- β -D-[6- ³ H]Gal f	126
Síntesis del metil β -D-[6- ³ H]galactofuranósido (61β*) y metil α -D-[6- ³ H]galactofuranósido (61α*)	128
Evaluación de la actividad enzimática de los extractos de cultivos de <i>Penicillium varians</i> .	132
Conclusiones	134

CAPÍTULO 7

Parte experimental

Instrumental y métodos generales	139
Desoxigenación por transferencia electrónica fotoinducida (PET)	142
Reducciones con NaBH ₄ /I ₂	143
Ensayos enzimáticos	143
Síntesis y caracterización	146

RESUMEN	195
----------------	-----

CAPÍTULO 1

Métodos generales de desoxigenación de hidratos de carbono

Importancia biológica los desoxiazúcares

Desde hace varias décadas se ha reconocido que los hidratos de carbono no sólo son estructuras de sostén, como la quitina en los artrópodos y la celulosa en los vegetales, o de reserva de energía como el glucógeno en los animales y el almidón en los vegetales, sino que también cumplen roles de gran importancia en procesos de reconocimiento celular. Los hidratos de carbono interactúan específicamente con numerosos receptores,¹ muchos de ellos proteínas, regulando fenómenos tan distintos como el desarrollo neuronal, la fertilización, la embriogénesis y el transporte de hormonas, enzimas ó anticuerpos.^{2,3} La respuesta inmunológica del organismo frente a un agente externo también depende de la interacción de carbohidratos con proteínas.^{4,5} Como consecuencia de ello, se ha desarrollado una nueva disciplina cuyo objetivo es el estudio de los procesos biológicos en los que intervienen los hidratos de carbono, y que se ha denominado glicobiología.⁶

Los oligosacáridos se presentan en la superficie externa de las células formando glicoconjugados, que pueden ser glicoproteínas o glicolípidos, dependiendo de la naturaleza de la aglicona unida al azúcar.⁷

Los oligosacáridos son excelentes portadores de información debido a su extraordinaria diversidad estructural. Ésta se basa, no sólo en la variedad de monosacáridos, sino también en la posición de cada uno, la posición y configuración del enlace glicosídico, la presencia de ramificaciones y modificaciones en los monosacáridos como desoxigenaciones, presencia de grupos amino ó grupos carboxilos, etc.

Dentro de la glicobiología, los desoxiazúcares representan una clase importante de hidratos de carbono, ya que se encuentran presentes en una gran cantidad de biomoléculas y participan en múltiples procesos biológicos. Por ejemplo, la L-fucosa (**1**, 6-desoxi-L-galactosa) es constituyente del oligosacárido sialilLewis X (sLe^x), que actúa como molécula de reconocimiento.⁴ Al producirse una infección, las células endoteliales de los capilares sanguíneos son estimuladas para expresar en su superficie E- y P-selectinas, las cuales reconocen al oligosacárido sLe^x presente en la membrana exterior de los glóbulos blancos, posibilitando la fijación de los mismos (Figura 1-1).

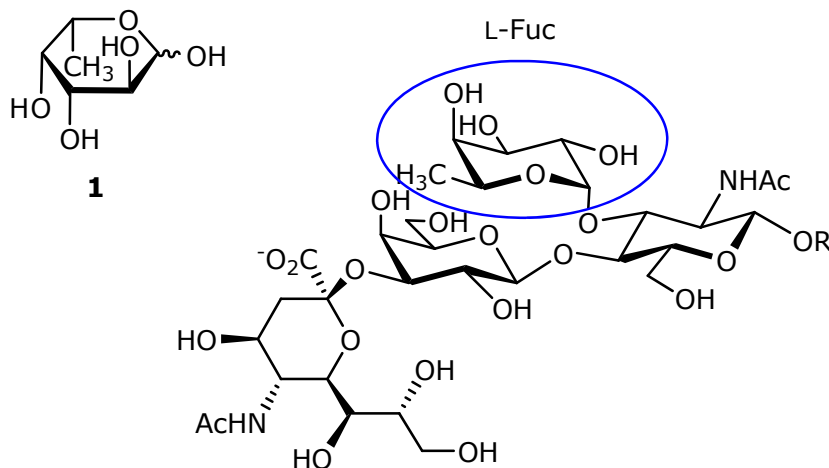


Figura 1-1. Estructura del oligosacárido sialilLewisX.

Por otra parte, el reconocimiento específico de carbohidratos es la causa de un alto número de procesos infecciosos e inflamatorios, ya que éstos pueden ser receptores de toxinas, virus y bacterias.

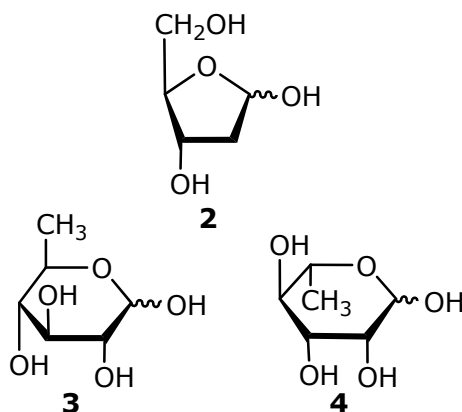


Figura 1-2. Ejemplos de desoxiazúcares.

El ejemplo de desoxiazúcares más difundido es la 2-desoxi-D-eritropentosa, más conocida como la 2-desoxi-D-ribosa (**2**), que se encuentra presente en el ADN formando el esqueleto de carbohidrato de esta biomolécula tan relevante (Figura 1-2). Otros ejemplos menos conocidos de azúcares monodesoxigenados aislados de productos naturales son: la 6-desoxi-D-glucosa (**3**, quinovosa) y la 6-desoxi-L-manosa (**4**, L-ramnosa). También se han encontrado azúcares di y tridesoxigenados. Algunos ejemplos son: D- y L-olivosa (**5**, **6**; 2,6-didesoxi-D/L-*arabino*-hexosa), D- y L-oliosa (**7**, **8**; 2,6-didesoxi-D/L-*lixo*-hexosa), 3,6-didesoxi-D-*xilo*-hexosa (**9**) y 3,6-didesoxi-D-*arabino*-hexosa (**10**), 3,6-didesoxi-L-*arabino*-hexosa (**11**, Figura

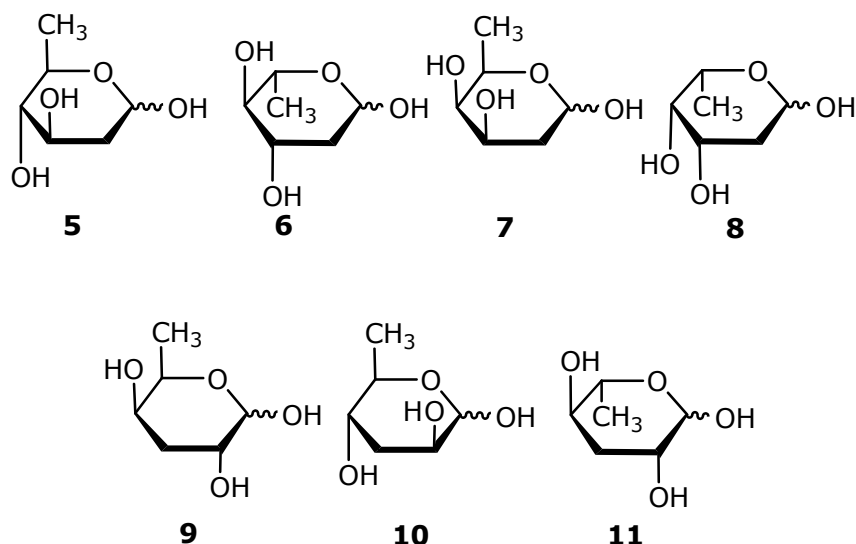
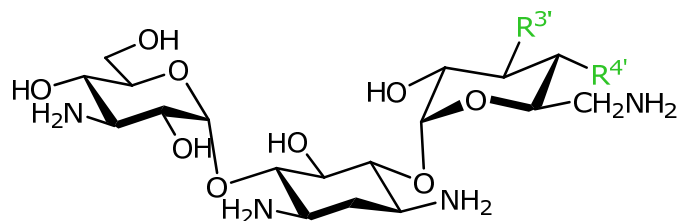


Figura 1-3. Estructuras de algunos 2,6- y 3,6-didesoxiazúcares.

1-3). Estas 3,6-didesoxihexosas fueron aisladas en conjunto en muchos lipopolisacáridos (LPS) de bacterias Gram negativas y suelen ser responsables de la respuesta inmune del organismo.⁸

En el metabolismo de los glicoconjugados actúan las glicosidasas, y glicosiltransferasas, enzimas responsables de la ruptura y formación de enlaces glicosídicos, respectivamente. La caracterización de estas enzimas es uno de los intereses de la glicobiología y para ello es necesario disponer de sustratos, inhibidores y compuestos análogos. Los azúcares desoxigenados resultan útiles para llevar a cabo estudios de especificidad de estas enzimas. Estos desoxiazúcares, análogos de los sustratos naturales, pueden comportarse como sustratos, inhibidores, ó pueden no interactuar con la enzima. En todos los casos brindan información sobre la importancia del hidroxilo faltante en la interacción enzima-sustrato. Por estas razones se han dedicado numerosos esfuerzos al desarrollo de metodologías para la reducción de grupos hidroxilos, tanto en hidratos de carbono, como en el área de los productos naturales en general.⁸⁻¹⁰

La desoxigenación de azúcares es especialmente importante en el campo de los antibióticos aminoglicosídicos. Por ejemplo, los desoxiderivados de aminoglicósidos **13** y **14** muestran una gran eficacia contra determinadas cepas bacterianas, mientras que el alcohol precursor **12** es inactivo (Figura 1-4).¹¹



- 12** $R^{3'}=OH$; $R^{4'}=OH$ kanamicina
13 $R^{3'}=H$; $R^{4'}=OH$ 3'-desoxi-kanamicina
14 $R^{3'}=R^{4'}=H$ 3',4'-didesoxi-kanamicina B

Figura 1-4. Estructura de algunos antibióticos aminoglicosídicos y análogos desoxigenados.

De igual manera, varios desoxiazúcares como los 2,6-didesoxipiranosidos son constituyentes esenciales de esteroides glicosídicos, antibióticos, agentes antitumorales, etc.⁹ Por ejemplo, se encuentran presentes en el agente antiapoptótico apoptolidina (**15**),¹² en drogas anticancerígenas como la daunomicina (**16**)^{13,14} y en la olivomicina A (**17**),¹⁵ miembros de la familia de los antibióticos antitumorales del ácido aurélico (Figura 1-5).¹⁶

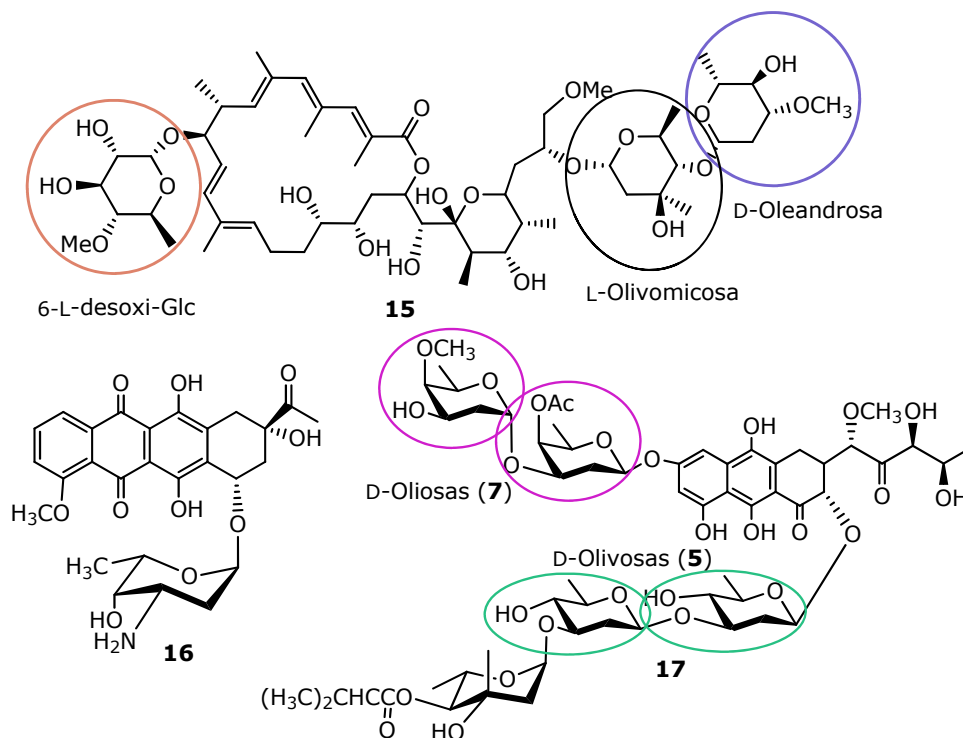


Figura 1-5. Estructuras de la apoptolidina (**15**), daunomicina (**16**) y olivomicina A (**17**).

El desarrollo de métodos de desoxigenación ha sido muy valioso, no solo para introducir modificaciones sobre las estructuras de antibióticos ya

conocidas, con el propósito de desarrollar y/o potenciar su acción, sino también para la búsqueda de actividad biológica similar, pero en estructuras diferentes, como una forma de solucionar los problemas relacionados con las resistencia bacteriana a los antibióticos.¹⁷

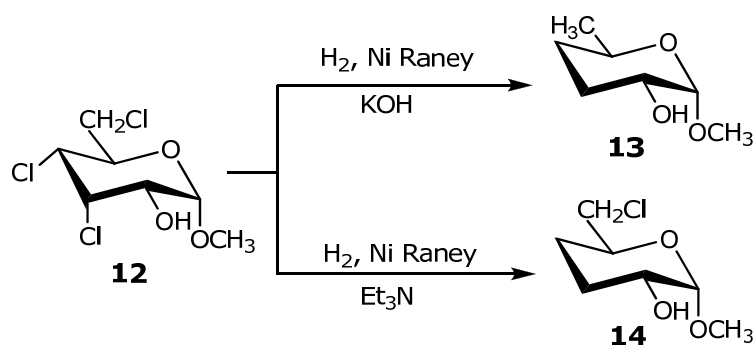
Métodos generales para la desoxigenación de monosacáridos

Los métodos más empleados para la desoxigenación de hidroxilos en productos naturales implican su conversión en buenos grupos salientes (halogenuros, mesilatos, tosilatos, etc.), los cuales son posteriormente hidrogenados ó reducidos mediante el uso de hidruros. Este proceso transcurre a través una reacción S_N2 , eficaz para alcoholes con bajo impedimento estérico, y por tanto sólo aplicable a alcoholes primarios y secundarios poco impedidos. Por otro lado, los alcoholes terciarios pueden ser fácilmente deshidratados y por hidrogenación de las olefinas resultantes conducen a los correspondientes derivados desoxigenados. Esta última situación no se presenta en los azúcares.

1. Reducción de haloazúcares

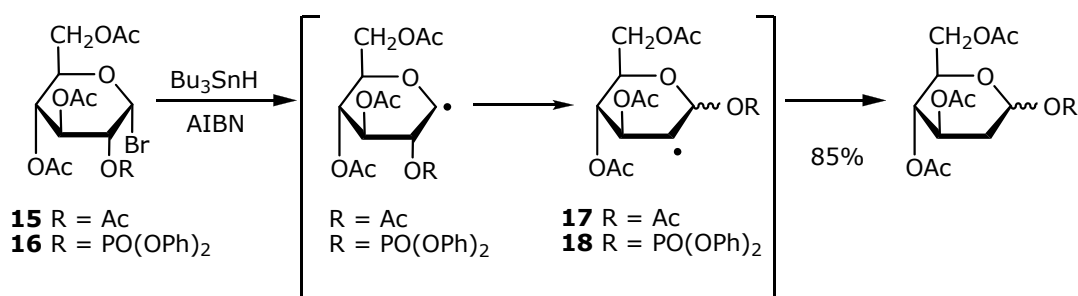
Una de las estrategias para la síntesis de desoxiazúcares, es la reducción de haloazúcares. Si bien es posible sintetizar derivados de cualquier halógeno, los derivados del cloro, son más estables que los de bromo y de yodo. Estos derivados pueden ser deshalogenados por una gran variedad de agentes reductores.

La reducción de derivados clorados con Ni/Raney en medio alcalino fue una de las primeras metodologías desarrolladas (Esquema 1-1).

Esquema 1-1. Síntesis del compuesto **13** y **14**.

En derivados policlorados, es posible realizar la reducción selectiva de halogenuros secundarios en presencia de un halogenuro primario variando las condiciones de reacción. Así, cuando el derivado **12** se trató con hidrógeno y Ni/Raney en medio alcalino fuerte se logró la desoxigenación de las tres posiciones halogenadas, obteniéndose el compuesto **13**. Sin embargo, cuando la reacción se realizó en medio básico más suave, se logró la desoxigenación selectiva de los cloruros secundarios, obteniéndose **14** (Esquema 1-1).^{18,19} Una de las limitaciones de esta estrategia, es la labilidad en medio alcalino de algunos derivados.

La reducción selectiva de cloruros secundarios también puede realizarse bajo condiciones radicalarias clásicas utilizando hidruros de estaño y AIBN como iniciador.²⁰ Un caso particular es el desarrollado por Giese y col. utilizando halogenuros de glicosilo como precursores para la obtención de 2-desoxiazúcares mediante una reducción con hidruros de estaño en bajas concentraciones. Esta reacción ocurre en derivados con el HO-2 protegido con grupos con capacidad de producir una migración 1,2-*cis*, como lo son los grupos acetilo (**15**),²¹ benzoílo y fosfatos (**16**, Esquema 1-2).²²

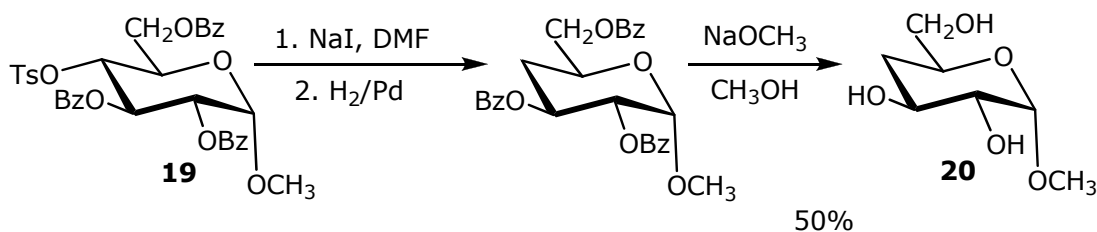


Esquema 1-2. Síntesis de 2-desoxiazúcares por reducción de halogenuros de glicosilo con AIBN y tributilestaño.

La fuerza impulsora de este reordenamiento es la formación de un nuevo enlace C-O en C-1 y ésto produce la migración selectiva 1,2-*cis* del acetato en **15** ó del fosfato en **16**, a través de los radicales intermediarios estabilizados en C-2 **17** y **18**.²³

2. Reducción de sulfonatos

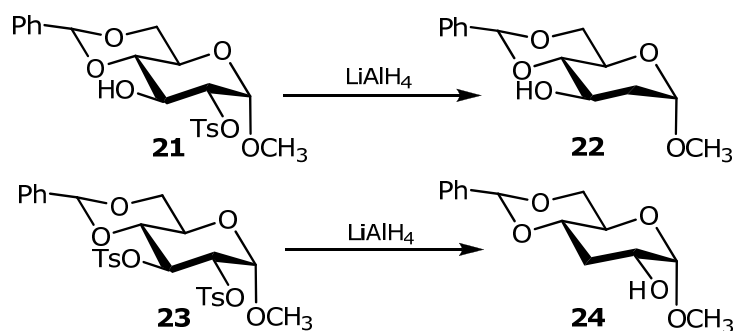
La derivatización de los HO del azúcar para convertirlos en buenos grupos salientes como mesilatos y tosilatos, también es una estrategia muy utilizada para lograr desoxigenaciones selectivas. Existen dos variantes muy difundidas. Una de ellas es la sustitución tipo S_N2 de estos grupos por halogenuros y su posterior reducción mediante los reactivos descritos en la metodología anterior. Por ejemplo, la desoxigenación del C-4 de la D-glucosa se realizó a partir del tosilato **19**, que en condiciones clásicas de sustitución nucleofílica bimolecular, condujo al yodo derivado. Por reducción con hidrógeno y paladio y posterior desprotección se obtuvo el compuesto desoxigenado **20** (Esquema 1-3).²⁴



Esquema 1-3. Síntesis de 4-desoxi-D-glucosa.

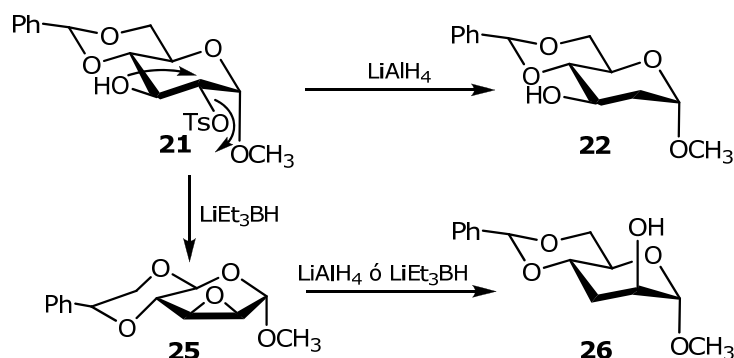
Un estrategia similar utilizaron Sennyey y col., pero llevando a cabo la desoxigenación en condiciones radicalarias clásicas con tributilestaño y AIBN.²⁵

Otra manera de utilizar los tosilatos como precursores de azúcares desoxigenados es a través de la reducción directa del grupo tosilo con reductores como hidruro de aluminio y litio (LAH) ó borohidruro de trietililitio (LTBH). El mecanismo y los productos varían dependiendo del agente reductor, la sustitución y la configuración relativa del azúcar. Cuando la



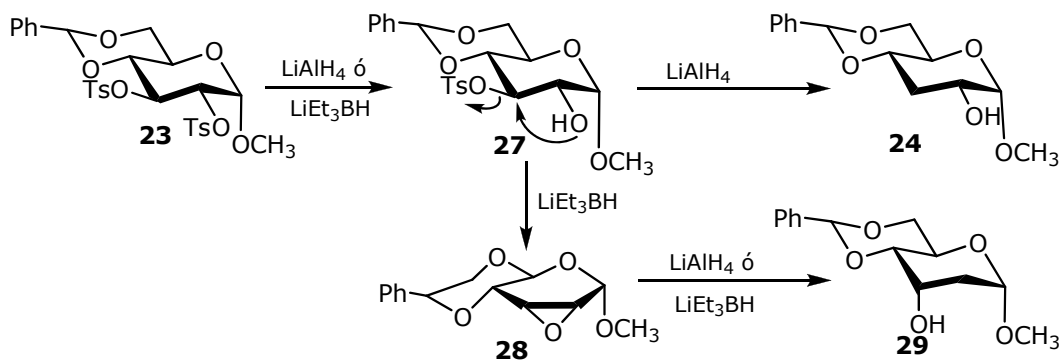
Esquema 1-4. Reducción de derivados tosilados de 4,6-*O*-bencilidén-D-GlcP con hidruro de aluminio y litio.

reducción se hace con LAH sobre el derivado mono tosilado **21**, se obtiene el compuesto desoxigenado en C-2 **22**, mientras que la reducción del derivado ditosilado **23** conduce al producto **24**, desoxigenado en el C-3 (Esquema 1-4). Sin embargo, cuando la reducción del compuesto **21** se hace con LTBH, la desoxigenación ocurre a través del epóxido intermediario **25** conduciendo a **26**, desoxigenado en C-3 y con inversión de la configuración de C-2. (Esquema 1-5).^{26,27}



Esquema 1-5. Reducción de derivados tosilados de 4,6-*O*-bencilidén-D-GlcP con borohidruro de trietilitio.

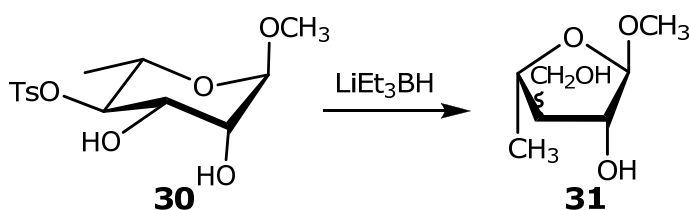
Esto se debe a que ocurre la apertura diaxial del epóxido **25**, de acuerdo con la regla de Fürst-Plattner,²⁸ y con ataque del hidruro en el carbono menos impedido, independientemente del agente reductor utilizado, para dar **26** (Esquema 1-5). Así mismo, cuando al derivado ditosilado **23** se trata con LTBH, se obtiene el producto de desoxigenación en C-2 **29**, como consecuencia nuevamente de la apertura diaxial del epóxido intermediario



Esquema 1-6. Reducción de derivados tosilados de 4,6-O-bencilidén-D-Glcp con borohidruro de trietillitio y comparación con la reducción usando LAH.

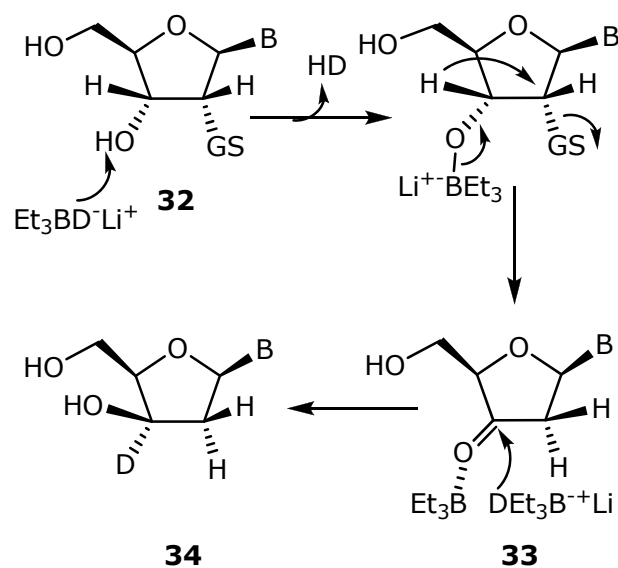
28, formado por desulfoniloxilación del tosionato en C-2 y posterior ataque nucleofílico de dicho HO sobre el C-3 (Esquema 1-6).²⁹

Sin embargo, la estructura del producto que se obtiene por reducción de tosيلات hexopiranosidos con LTBH depende de muchos factores, como la configuración del azúcar, la presencia o ausencia de 4,6-O-bencilidén y la cantidad y posición de grupos tosيلات. Por ejemplo, por tratamiento de **30** con LTBH, en lugar de producirse la reducción por apertura de un epóxido intermediario, se obtiene la desoxigenación con contracción del anillo dando C-hidroximetilpentafuranósidos (**31**, Esquema 1-7).^{29,30}



Esquema 1-7. Reducción de derivados tosilados sin la presencia de O-bencilidén acetales con borohidruro de trietillitio.

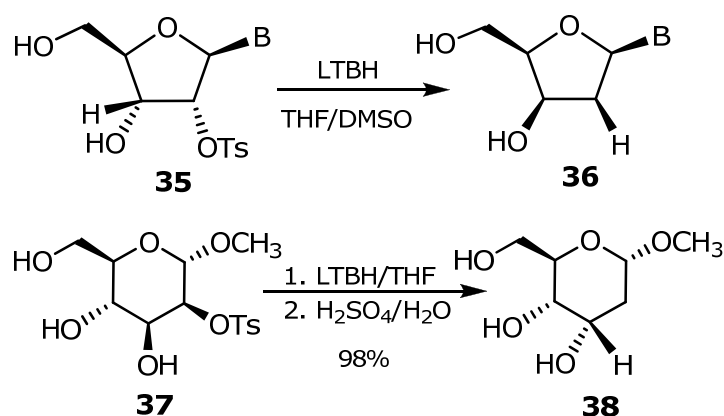
Por otro lado, se observó que para hidroxilos en configuración 1,2-*cis* (configuración tipo manosa) con uno de los HO sustituido con un grupo tosilo, la reducción con LTBH ocurre a través de un reordenamiento [1,2] de hidruro. Utilizando experimentos de marcación isotópica se demostró el mecanismo de la transferencia, probando que ocurre con doble inversión de la configuración de los carbonos C-2 y C-3 (Esquema 1-9).³¹



Esquema 1-9. Mecanismo del reordenamiento [1,2] de hidruro en azúcares con configuración 1,2-*cis*.

El mecanismo que proponen estos autores sugiere que una primera molécula del LTBH abstrae el protón del HO de **32**, produciendo la coordinación del trietilborano con el oxígeno, y la pérdida de una molécula de hidrógeno. La formación de la cetona intermediaria **33** se produce con la transferencia de hidruro del C-3 al C-2 y la consecuente expulsión del grupo tosilo (GS). La cetona **33** se reduce por la cara menos impedida con el exceso de agente reductor. En el producto desoxigenado **34** se observa una inversión en la configuración del C-3, junto con la marca isotópica.

Para verificar este mecanismo, se sintetizaron varios derivados monotosilados en posición 2. Por ejemplo, derivados de ribosa con la estructura **35**



Esquema 1-10. Reducción de tosilos con reordenamiento [1,2] de hidruro.

y de manosa con la estructura **37**, condujeron con buenos rendimientos y regioselectividades a los 2-desoxi-D-*eritro* nucleósidos **36** y al metil 2-desoxi- α -D-*ribo*-hexapiranosido (**38**, Esquema 1-10). Los autores sintetizaron derivados con diferentes nucleobases, e inclusive otros grupos salientes, como Br⁻ y Cl⁻, y éstos parecen no afectar el curso estereoquímico del reordenamiento.³¹

3. Desoxigenación mediada por radicales libres

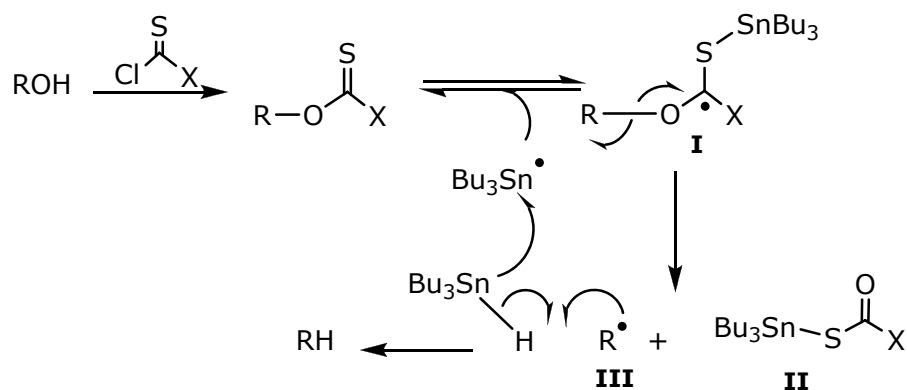
Como se mencionó anteriormente, la desoxigenación de alcoholes secundarios impedidos estéricamente, en los que la reacción S_N2 no está favorecida, resulta más dificultosa. La deshidratación tampoco es una buena alternativa, ya que este proceso ocurre a través de carbocationes, los cuales pueden dar reordenamientos y migraciones.

Desde su introducción, el método radicalario introducido por Barton y McCombie³² en 1975 suele ser el método más utilizado para la desoxigenación de alcoholes secundarios, no sólo en azúcares, sino también en una gran variedad de moléculas.

3.1. Reacciones radicalarias de derivados azufrados:

3.1.1. Método de Barton y McCombie

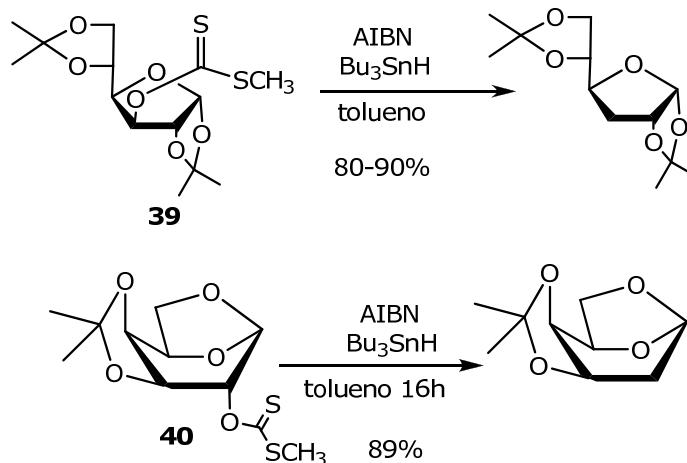
En esta metodología el alcohol a desoxigenar es transformado en el derivado tionocarbonato, que posteriormente se desoxigena con Bu₃SnH/AIBN mediante un proceso radicalario, para dar el correspondiente alcano (Esquema 1-11). Esta estrategia, ofrece la posibilidad de reducir el grupo hidroxilo en condiciones neutras y suaves, compatibles con un gran número de grupos funcionales.³²



Esquema 1-11. Mecanismo general de la reacción de desoxigenación de Barton y McCombie.

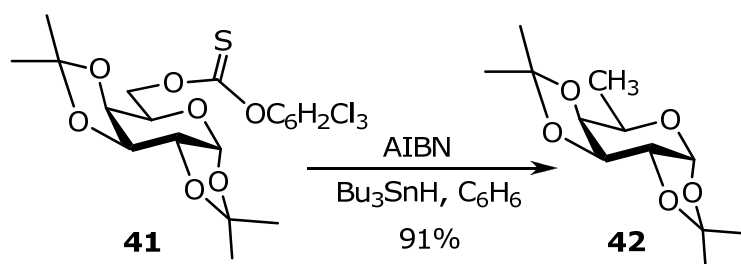
El proceso de reducción se inicia con la abstracción del hidrógeno de tributilestano por un iniciador, generándose el radical tri-butilestagnano. La gran afinidad del estaño por el azufre hace que se produzca una adición reversible de este radical sobre el grupo tiocarbonilo, generando el intermediario radicalario **I** (Esquema 1-11). Este radical puede atrapar un átomo de hidrógeno del Bu₃SnH y revertir al alcohol de partida; ó bien puede fragmentarse para dar **II** y el radical **III**.³³ Esta fragmentación está favorecida por la formación del grupo carbonilo. Además, las altas temperaturas a la que se suele llevar a cabo la reacción favorecen la fragmentación frente a la abstracción de hidrógeno del reactivo. Otros factores que influyen son la concentración de Bu₃SnH en el medio, la estabilidad del radical alquilo **III** y la naturaleza de X. Para favorecer la fragmentación normalmente se utilizan técnicas de dilución. Respecto a la naturaleza de X, los grupos más comúnmente usados son xantatos (X=SMe³²), tionocarbonatos de imidazoilo (X = 1-imidazoíl³²), tionocarbonatos (X = OPh,³⁴ OMe³⁵) y tionocarbamatos (X = NHPh³⁶).

En el campo de los hidratos de carbono esta reacción fue utilizada por primera vez para la desoxigenación de los xantatos secundarios de D-glucosa furanósica **39** y D-galactosa piranósica **40**, entre otros (Esquema 1-12).³²



Esquema 1-12. Desoxigenación por el método de Barton y McCombie de xantatos derivados de D-Glcf y D-Galp.

Originalmente la reacción de Barton y McCombie fue diseñada para desoxigenar alcoholes secundarios, pero luego, gracias al gran interés que despertó esta reacción en el ambiente científico, se logró extender a alcoholes primarios³⁷, terciarios³⁸ y a la desoxigenación de dioles vecinales.^{39,40} En el esquema 1-13 se muestra una aplicación a la desoxigenación de hidroxilos primarios en azúcares. El tiocarbonato derivado de D-Galp **41** se desoxigena en las condiciones usuales de Barton y McCombie para dar el derivados de D-fucosa **42**.⁴¹

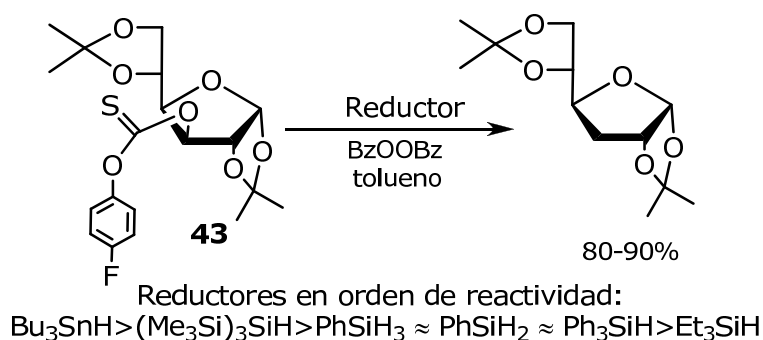


Esquema 1-13. Desoxigenación de hidroxilo primario por el método de Barton y McCombie en D-Glcf y D-Galp.

A pesar de los excelentes resultados y la gran variedad de grupos funcionales que toleran las condiciones suaves de esta reacción, la metodología trae aparejada una serie de inconvenientes, principalmente en el uso de hidruros de estaño como agente donador de hidrógeno. Sumado a esto, la toxicidad de los derivados organoestagnosos, los costos y la dificultad para remover los residuos de estaño, han impulsado al desarrollo de sistemas

catalíticos o procesos alternativos libres de estaño para llevar a cabo estas reacciones radicalarias.

Una de las alternativas ha sido el uso de silanos y entre ellos el tris(trimetilsilil)silano,⁴² que resultó ser uno de los más eficientes. Se buscaron alternativas mas económicas, como los arilsilanos^{43,44,45} y trialquilsilanos.⁴⁶ En estudios comparativos sobre la capacidad de transferencia de hidrógeno entre varios aquil o arilsilanos y tributilestaño, utilizando el derivado de D-Glcf **43** como compuesto sustrato para la desoxigenación, se estableció el orden de reactividad indicado en el Esquema 1-14.

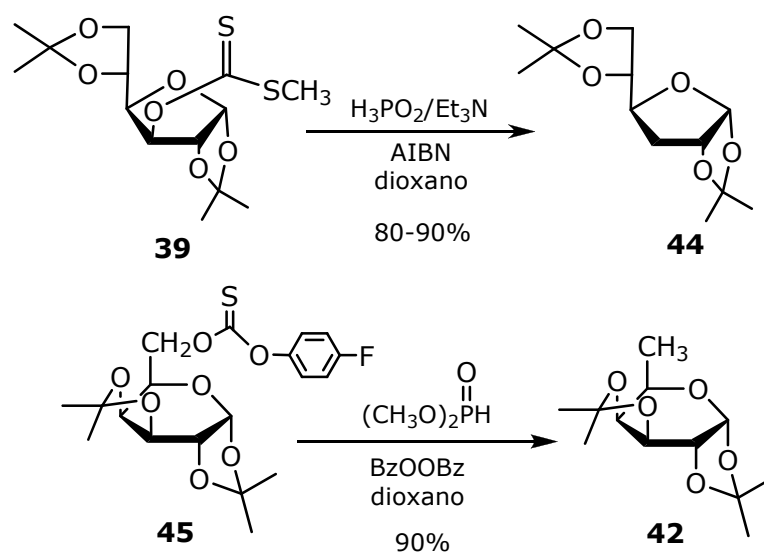


Esquema 1-14. Reacción competencia entre diferentes agentes donores de hidrógeno en la desoxigenación tipo Barton y McCombie utilizando.

Si bien el enlace Si-H en los arilsilanos es más fuerte que en el tris(trimetilsilil)silano y que el enlace Sn-H en el tributilestaño, éstos pueden ser usados de manera eficiente controlando las condiciones de la reacción de iniciación. En todos los casos resultó más eficiente la reacción con peróxido de benzoílo como iniciador en lugar de AIBN, y con algunos silanos fue necesario la utilización de un equivalente del mismo, en lugar de cantidades catalíticas, para que la desoxigenación ocurra. Desde el punto de vista práctico el uso del trietilsilano y el fenilsilano a escala de laboratorio facilita la purificación de los productos desoxigenados por sus bajos puntos de ebullición. Además son menos tóxicos y más económicos en comparación con tris(trimetilsilil)silano y tributilestaño. Sin embargo, los silanos no son una alternativa suficientemente económica como para utilizarlos a gran escala.^{43,44,47}

3.1.2. Reducción radicalaria con hipofosfito de *N*-etilpiperidina

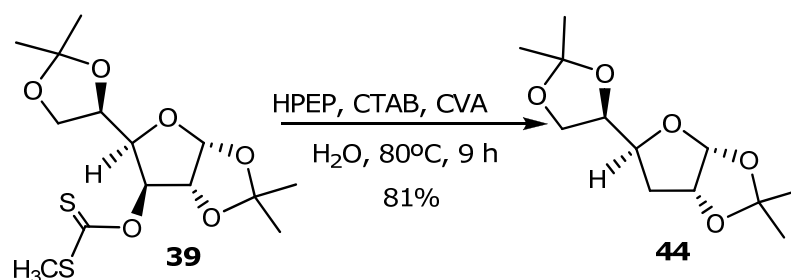
En busca de reductores alternativos al Bu_3SnH , el mismo Barton propuso en 1992 la utilización de ácido hipofosforoso y derivados de dialquilfosfitos comerciales como fuente de hidrógeno viable, económica, y factibles de ser usados en reacciones a gran escala (Esquema 1-15).^{48,49}



Esquema 1-15. Desoxigenación de xantatos usando derivados de fósforo como fuente de hidrógeno.

Esta modificación se probó en una gran variedad de alcoholes en los que la metodología tradicional de Barton y McCombie funcionaba eficientemente, por ejemplo los compuestos **39** y **45**, obteniéndose los productos desoxigenados **44** y **42** con muy buenos rendimientos. El uso de estos derivados de fósforo resulta una solución alternativa debido a su bajo costo, inocuidad y a la facilidad con que se separan los subproductos cuando se requiere hacer una reacción a gran escala. El uso de dialquilfosfitos implica condiciones de reacción neutras, pero requiere peróxido de benzoílo como iniciador. Por otro lado, el ácido hipofosforoso funciona muy bien con AIBN, pero supone condiciones incompatibles con ciertos grupos lábiles en medio ácido. Una buena alternativa es neutralizar el ácido hipofosforoso con trietilamina ó *n*-tributilamina, o sí es necesario desarrollar la reacción en condiciones anhidras, utilizar la sal cristalina que se obtiene al neutralizar el ácido y *N*-etilpiperidina.

Jang y col. propusieron una leve modificación a la metodología desarrollada por Barton, que consistía en el uso de hipofosfito de *N*-etilpiperidina (HPEP) como agente reductor, y agua como un solvente más benigno, dado el carácter carcinogénico de dioxano.⁵⁰ Al igual que en la metodología anterior, el monosacárido se derivatizaba como el xantato



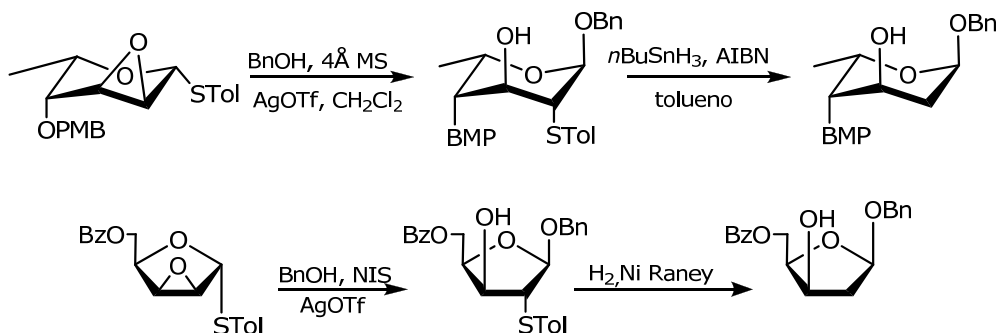
Esquema 1-16. Reacción de desoxigenación de derivados azufrados utilizando hipofosfito de *N*-etilpiperidina como agente reductor.

correspondiente, por ejemplo **39** (Esquema 1-16). La escasa solubilidad en agua hacía necesario el uso de bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB) como surfactante y de un iniciador radicalario soluble en fase acuosa, como el 4,4'-azobis(4-ácido cianoaléxico) (CVA). Bajo estas condiciones los autores obtuvieron el producto desoxigenado **44** con buen rendimiento. En ausencia del surfactante se producía la hidrólisis del ditiocarbonato **39**. Una limitación de esta metodología es la escasa solubilidad que presentan algunos de los sustratos, haciendo necesario el uso de grandes cantidades de surfactantes. Los autores realizaron pruebas en mezclas agua/metanol y agua/etanol como solventes, que condujeron con éxito a los productos desoxigenados. Igualmente la necesidad de usar solventes tan polares limita bastante la aplicación de esta metodología.

A pesar de todas las variantes desarrolladas, el Bu₃SnH continúa siendo el agente reductor más utilizado cuando esta reacción se hace a escala de laboratorio.⁵¹

3.1.3. Reordenamiento de *S*-tolil glicósidos con apertura de 2,3-epóxidos

Una variante desarrollada recientemente por el grupo de Lowary, utiliza como sustratos para la desoxigenación radicalaria derivados azufrados provenientes de tioglicósidos 2,3-anhidro derivados piranósicos⁵² y furanósicos.⁵³ En el proceso de glicosidación con alcohol bencílico en presencia de NIS y AgOTf se produce la migración del grupo *S*-tolilo al C-2 con apertura del epóxido (Esquema 1-17).⁵⁴ La desoxigenación del grupo azufrado se puede llevar a cabo tanto con hidruros metálicos como con hidrógeno y Ni/Raney.

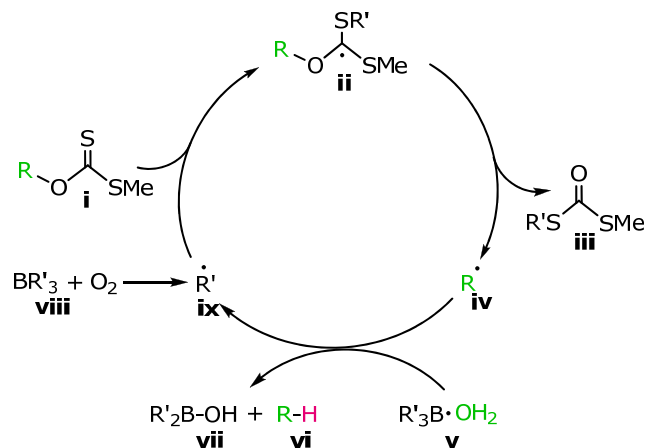


Esquema 1-17. Síntesis de 2-desoxiazúcares partiendo de 2,3-anhidro-furanosil y piranosil tioglicósidos.

3.1.4. Reducción de xantatos utilizando alquilborano/H₂O como fuente de hidrógeno

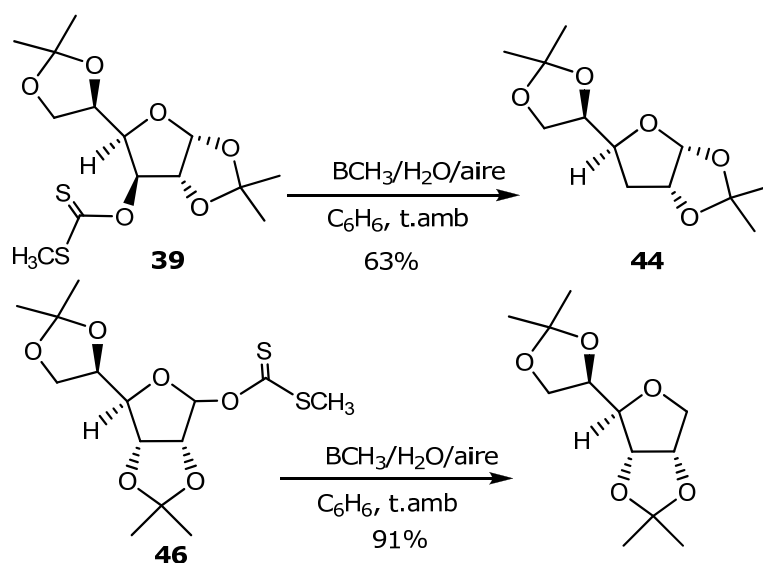
Wood y col. propusieron la utilización de complejos alquilborano/agua como fuente de hidrógeno, como una alternativa libre de estaño a la metodología de Barton y McCombie.⁵⁵ Al igual que en los casos anteriores, utilizaron el alcohol derivatizado como el xantato **i**. En el mecanismo propuesto, la reacción se inicia por la oxidación del alquilborano **viii** al burbujear aire a la mezcla de reacción que libera un radical alquilo **ix**. Éste reacciona con el xantato **i** para dar el intermediario **ii**, que se descompone para dar el compuesto carbonílico **iii** y el radical **iv**. Cuando este radical reacciona abstrayendo un hidrógeno del complejo R'₃B·OH₂ (**v**) se obtiene el

producto de desoxigenación del alcohol **vi**, el ácido dialquilborónico **vii** y el radical R' (**ix**) capaz de propagar la cadena (Esquema 1-18).



Esquema 1-18. Mecanismo propuesto para la reducción de xantatos utilizando complejos de alquilborano-H₂O.

Esta metodología se aplicó a una serie de alcoholes y entre los ejemplos en azúcares se desoxigenaron los derivados **39** y **46** (Esquema 1-19).

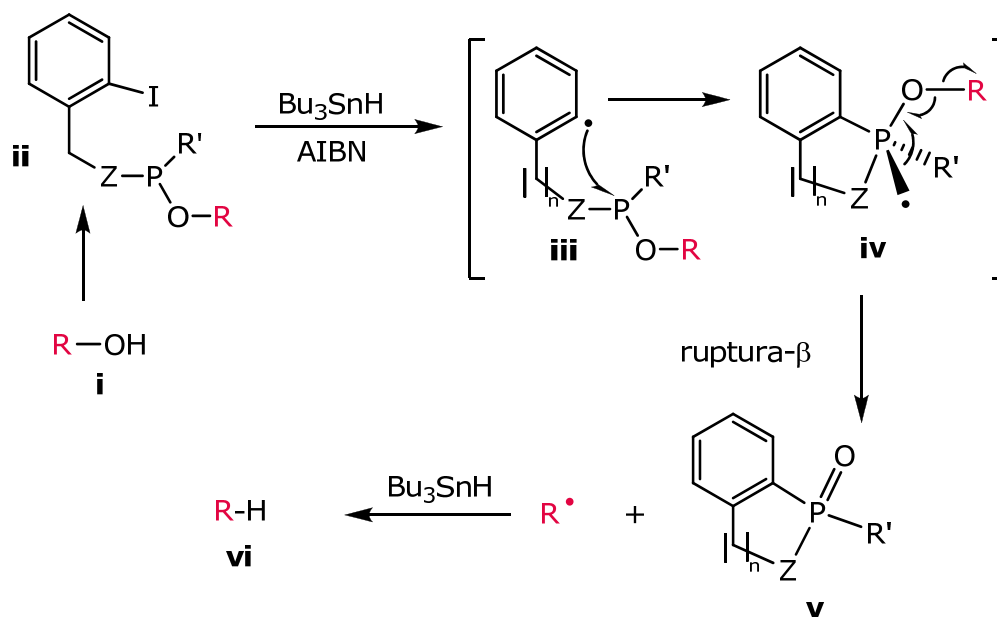


Esquema 1-19. Desoxigenación de xantatos con alquilboranos.

Uno de los inconvenientes de este método es que al tener que burbujear el metilborano gaseoso, en algunos casos se observaba una cierta irreproducibilidad de los resultados. Se probó entonces sustituirlo por trietilborano ó tributilborano, pero los rendimientos de las reacciones fueron menores.⁵⁵

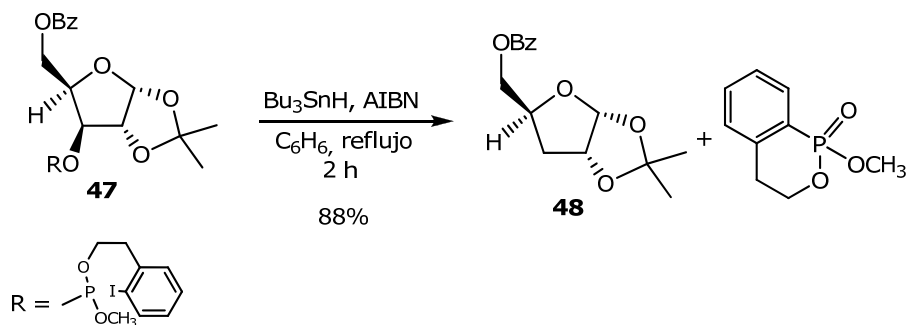
3.2. Reducción de derivados de fosfitos

Intentando mejorar la metodología de Barton y McCombie, el grupo de Koreeda desarrolló un método de desoxigenación en el cual, el alcohol **i** se convierte en un derivado de fósforo(III) **ii**; que cuando es sometido a condiciones clásicas de reducción radicalaria produce la desoxigenación del alcohol.⁵⁶ Los radicales fosforanilos ($R'_3P^{\bullet}-XR$, **iv**), se generan fácilmente por adición de un radical al P(III) del intermediario **iii**, y dependiendo de la naturaleza de los sustituyentes estos radicales pueden sufrir una ruptura- β homolítica. De manera general, cuando $Z=O$ la ruptura- β de la unión $Z-R$, produce la consecuente oxidación de P(III) a P(V) dando **v**, pero lo que es más importante es que conduce a la desoxigenación del alcohol **i** para dar el correspondiente alcano **vi** (Esquema 1-20).



Esquema 1-20. Mecanismo propuesto para la ruptura- β en alcoholes derivatizados como fosfitos.

Esta metodología se aplicó a una variedad de alcoholes, y en el campo de los hidratos de carbono se realizó sobre el derivado **47**, que condujo al derivado desoxigenado **48** con muy buen rendimiento (Esquema 1-21).



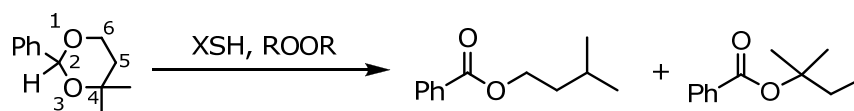
Esquema 1-21. Desoxigenación del C-3 de glucosa por el método del fosfito.

Los autores probaron esta metodología a una serie de alcoholes modelos en los cuales la desoxigenación de Barton y McCombie no había resultado eficiente. Una ventaja de esta metodología es que a diferencia de los xantatos de alcoholes terciarios, estos fosfitos son térmicamente estables y los productos de la reducción son fácilmente recuperables. La principal desventaja continúa siendo el uso de hidruros de estaño como agentes de transferencia de hidrógeno.⁵⁵

3.3. Reducción de *O*-bencilidén acetales catalizada por tioles.

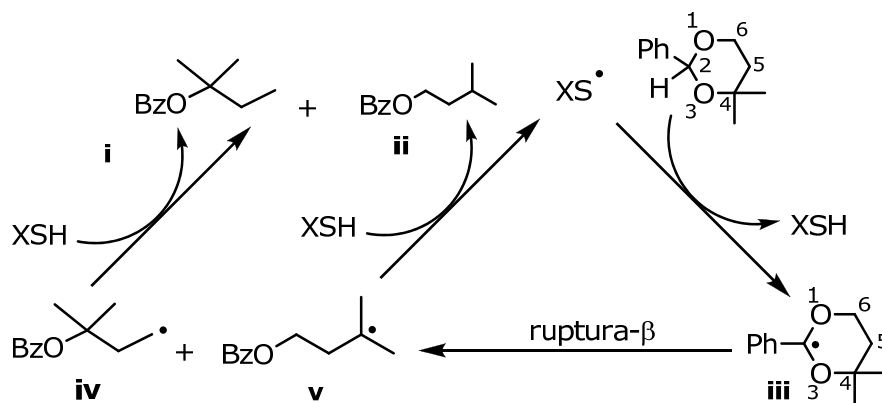
Otra metodología alternativa para la desoxigenación de hidratos de carbono es aquella que usa derivados *O*-bencilidén acetales. El grupo de Roberts mostró que en ciertas condiciones, estos derivados son capaces de sufrir un reordenamiento redox catalizado por tioles a través de una reacción radicalaria en cadena.⁵⁷⁻⁵⁹

Por protección de 1,2- ó 1,3-dioles se obtienen los *O*-bencilidén acetales cíclicos de 5 ó 6 miembros. Por tratamiento con un tiol, como $(t\text{-BuO})_3\text{SiSH}$ (TBST) ó $(i\text{-Pr})_3\text{SiSH}$ (TIPS), y peróxido de di-terbutilo ó 2,2-bis(*ter*-butilperoxi)butano, resulta la desoxigenación de uno de los hidroxilos del diol y la formación de un grupo benzoato en el otro (Esquema 1-22).



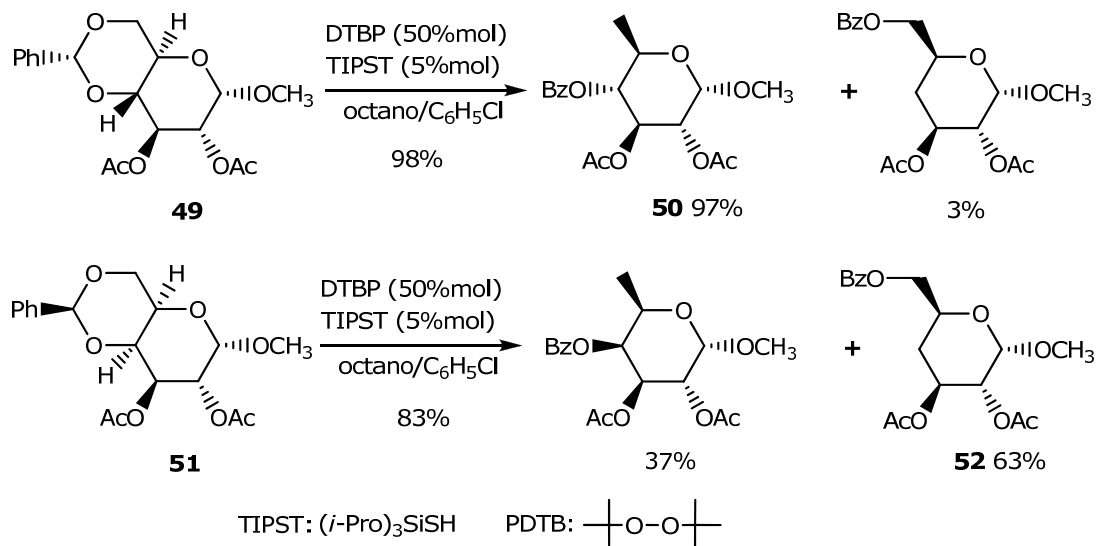
Esquema 1-22. Reacción general del reordenamiento redox de *O*-bencilidénacetales.

En esta reacción el tiol actúa como catalizador prótico de polaridad inversa, ya que promueve la abstracción del hidrógeno acetálico mediante la formación de un radical alquílico nucleofílico. La ruptura- β asimétrica del radical 2-fenil-1,3-dioxanilo (**iii**) da lugar a dos radicales benzoiloxalquil posibles **iv** y **v**, por lo que la regioselectividad del proceso total de desoxigenación está directamente relacionada con la regioselectividad de la ruptura- β (Esquema 1-23).



Esquema 1-23. Mecanismo general del reordenamiento radicalario redox en cadena catalizado por tioles.

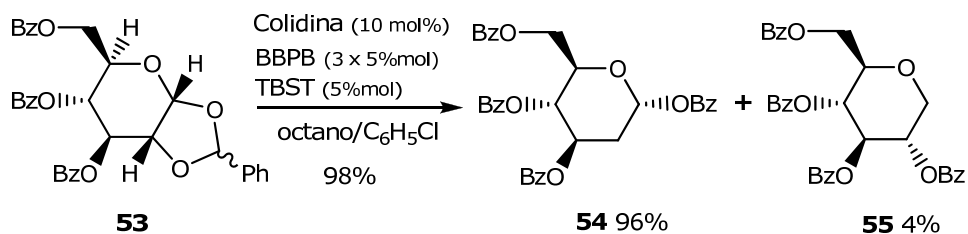
En el Esquema 1-23, se puede ver que sí el radical dioxanilo **iii** sufre selectivamente una ruptura β en la cual el enlace que se rompe es el que corresponde a la unión entre C(4)-O(3), se forma el radical terciario **v** con prioridad al primario **iv** que se formaría por ruptura del enlace C(6)-O(1). Sin embargo, no siempre estas rupturas homolíticas competitivas siguen el orden termodinámico esperado, sino que muchas veces existen otros factores que influyen en la regioselectividad de la ruptura- β , obteniéndose el producto de desoxigenación proveniente del radical menos estable **iv**. Esta diferencia se observa cuando se tratan en iguales condiciones los 4,6-*O*-bencilidén derivados de D-Glc **49** y D-Gal **51** (Esquema 1-24).



Esquema 1-24. Reducción de 4,6-*O*-bencilidén acetales de D-Glc y D-Gal catalizada por tioles.

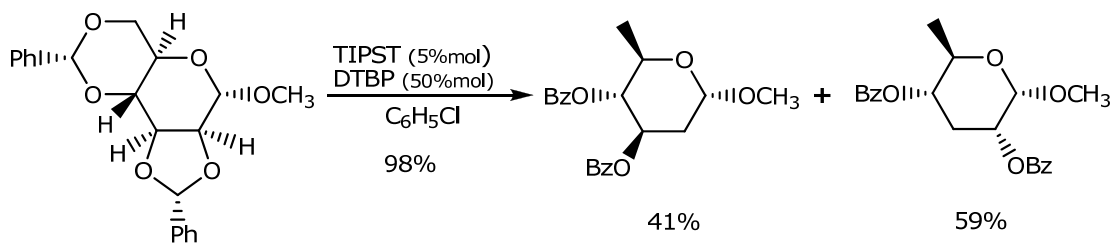
En el caso del derivado de **49**, se obtiene mayoritariamente el producto de desoxigenación del C-primario **50**, termodinámicamente menos favorecido, mientras que para el derivado análogo de D-Gal **51**, se observa la regioselectividad inversa, obteniéndose mayoritariamente el producto **52**, proveniente del radical terciario. La ruptura- β en **49** está influenciada por la tensión angular de la estructura bicíclica fusionada.⁵⁹

En la desoxigenación de los 1,2-*O*-bencilidén derivados, como por ejemplo **53**, se obtiene mayoritariamente el producto desoxigenación en C-2 **54**. Esta regioselectividad se debe a la gran estabilidad del radical formado en C-2 en comparación con el que se forma en C-1, para dar el producto **55** (Esquema 1-25).

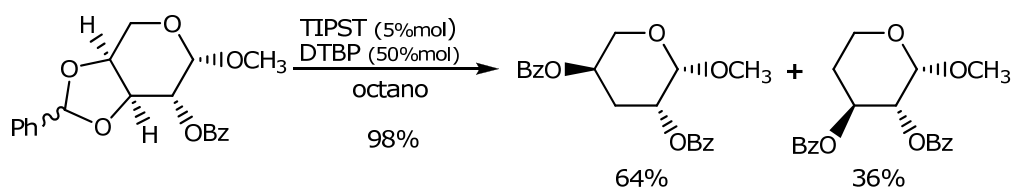


Esquema 1-25. Reducción de 1,2-*O*-bencilidén acetales catalizada por tioles.

En la desoxigenación de derivados 2,3-*O*-bencilidén (Esquema 1-26) y 3,4-*O*-bencilidén acetales (Esquema 1-27) por este procedimiento, se obtienen mezclas con cantidades similares de productos desoxigenados en



Esquema 1-26. Reducción de 2,3:4,6-*O*-bencilidén acetales catalizada por tioles.



Esquema 1-27. Reducción de 3,4-*O*-bencilidén acetales catalizada por tioles.

C-2 ó C-3 y C-3 ó C-4 respectivamente, debido a la estabilidad similar de los radicales secundarios intermediarios.

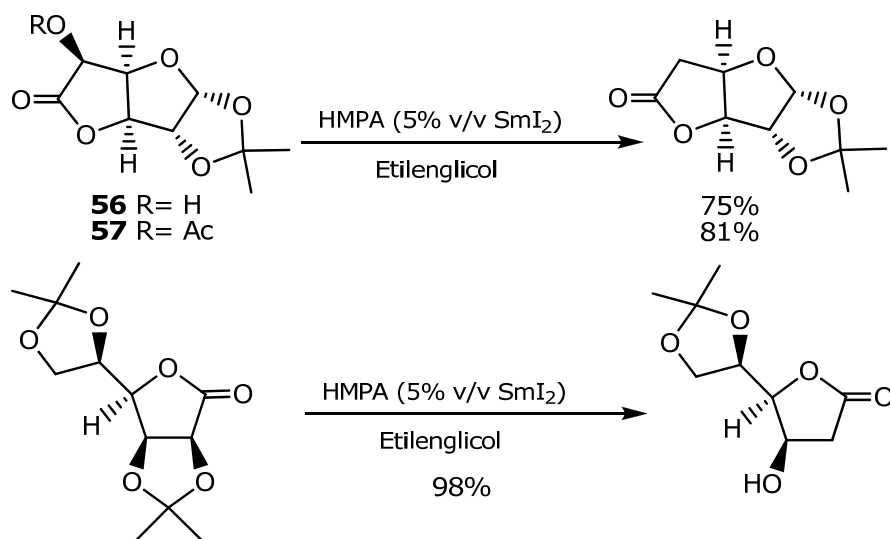
El reordenamiento radicalario redox de *O*-bencilidén acetales catalizado por tioles provee un método simple para la desoxigenación de azúcares, y tiene la ventaja adicional de producir una nueva funcionalización en el HO donde no ocurrió la desoxigenación. Por otro lado, al igual que muchos otros métodos de desoxigenación, los productos obtenidos dependen de muchos factores y no son fácilmente predecibles.

4. Reducción promovida por yoduro de samario(II).

Una estrategia muy utilizada para la síntesis de desoxiazúcares, está relacionada con el uso de lactonas como precursores, ya que la presencia del grupo carbonilo lactónico produce una reactividad diferencial sobre el HO en posición α . Esta reactividad diferencial permite la protección selectiva de este HO y mantiene al hidroxilo anomérico virtualmente protegido como grupo lactona.

El grupo de Hanessian explota esta selectividad diferencial para reducir selectivamente la posición α de una serie de 1,4-lactonas utilizando como método de reducción una reacción con yoduro de samario (Esquema 1-28). El

mismo procedimiento se aplicó en 1,5-lactonas obteniéndose también muy buenos resultados.⁶⁰



Esquema 1-28. Desoxigenación de lactonas con SmI₂.

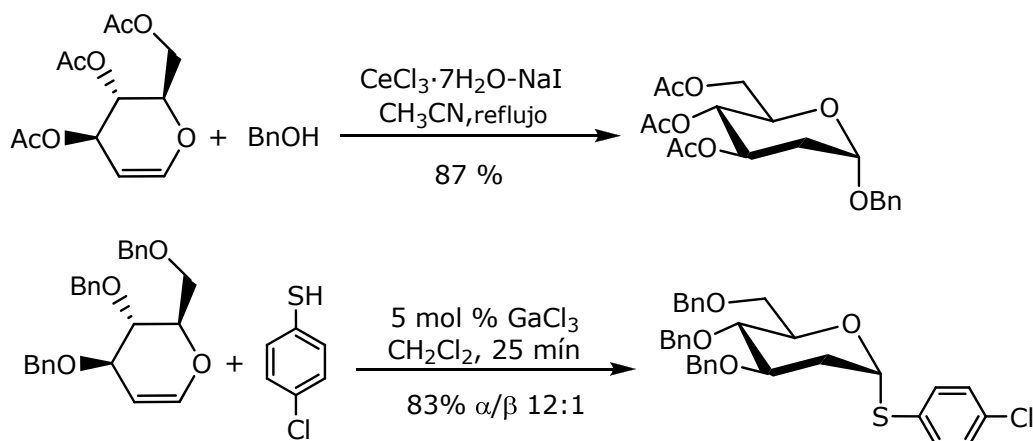
En este estudio los autores probaron que la reducción puede realizarse incluso con las α -hidroxilactonas con el HO libre, prácticamente con la misma eficiencia que derivatizados. Para lograr la reducción del HO libre en **56** fue necesario el uso de HMPA (hexametilfosforamida) como aditivo y se requirieron 2-4 h de reacción, mientras que para el derivado **57**, donde el hidroxilo se protegió como acetato, la reducción ocurrió casi instantáneamente (sin agregado de HMPA).

Se demostró que esta metodología de α -desoxigenación es eficiente en una gran variedad de lactonas libres ó protegidas, pero presenta el inconveniente de no poder realizarse sobre lactonas peracetiladas ya que éstas sufren polidesoxigenación y conducen a derivados lactónicos insaturados como producto de la β -eliminación del grupo ester.⁶⁰

5. Adición a derivados de azúcares insaturados.

Los azúcares insaturados han sido materiales de partida muy utilizados para la síntesis de mono y didesoxiazúcares. Particularmente, la adición electrofílica al doble enlace de glicales (insaturados entre C-1 y C-2) es una

estrategia muy difundida para la síntesis de 2-desoxiglicósidos. Se ha usado una gran variedad de ácidos de Brønsted y de Lewis para activar a los glicales en presencia de alcoholes para obtener 2-desoxiglicósidos.¹⁰ Un ejemplo del uso de ácidos de Lewis es el desarrollado por Yadav y colaboradores, que utilizaron el sistema $\text{CeCl}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O} \cdot \text{NaI}$ para la obtención de *O*-glicósidos⁶¹ y GaCl_3 para la obtención de tioglicósidos⁶² (Esquema 1-29).



Esquema 1-29. Síntesis de 2-desoxiglicósidos a partir de glicales utilizando $\text{CeCl}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O} \cdot \text{NaI}$ y GaCl_3 .

En el primer caso se probó la reacción con una gran variedad de glicales (D-glucal, D-galactal y D-xilal) y de alcoholes como aceptores (arílico, bencílico, n-octanol, entre otros) para determinar el alcance de la reacción, obteniéndose muy buenos rendimientos (78-90%). En ausencia de NaI, sin embargo, se producía el reordenamiento de Ferrier, dando como producto mayoritario el hexapiranósido 2,3-insaturado. Utilizando GaCl_3 , y tiofenoles y tionaftoles como aceptores, la reacción también resultó muy eficiente, y no se observaba el reordenamiento. En ambos casos se trata de condiciones de reacción muy suaves, y para la serie D se forman preferentemente los glicósidos de configuración α .

1. Yarema, K. J.; Bertozzi, C. R. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1998**, *2*, 49-61.
2. Sears, P.; Wong, C. H. *Cell. Mol. Life Sci.* **1998**, *54*, 223-252.
3. Varki, A. *Glycobiology* **1993**, *3*, 97-130.
4. Varki, A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **1994**, *91*, 7390-7397.
5. Meldal, M.; Mouritsen, S. r.; Bock, K. In *Carbohydr. Antigens*; Am. Chem. Soc.: Washington, DC, 1993; pp. 19-33.
6. Dwek, R. A. *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 683-720.
7. Davis, B. G. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1999**, 3215-3238.
8. Marzabadi, C. H.; Franck, R. W. *Tetrahedron* **2000**, *56*, 8385-8417.
9. Lederkremer, R. M.; Marino, C. In *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*; **2007**; *61*; 143-216.
10. Hou, D.; Lowary, T. L. *Carbohydr. Res.* **2009**, *344*, 1911-1940.
11. Umezawa, S. *Pure Appl. Chem.* **1978**, *50*, 1453-1476.
12. Hayakawa, Y.; Kim, J. W.; Adachi, H.; Shin-ya, K.; Fujita, K.-i.; Seto, H. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 3524-3525.
13. Arcamone, F.; Franceschi, G.; Orezzi, P.; Cassinelli, G.; Barbieri, W.; Mondelli, R. *J. Am. Chem. Soc.* **1964**, *86*, 5334-5335.
14. Arcamone, F.; Cassinelli, G.; Orezzi, P.; Franceschi, G.; Mondelli, R. *J. Am. Chem. Soc.* **1964**, *86*, 5335-5336.
15. Berlin, Y. A.; Esipov, S. E.; Kolosov, M. N.; Shemyakin, M. M. *Tetrahedron Lett.* **1966**, *7*, 1643-1647.
16. Lombó, F.; Menéndez, N.; Salas, J. A.; Méndez, C. *Appl. Microb. Biotech.* **2006**, *73*, 1-14.
17. Green, K. D.; Chen, W.; Houghton, J. L.; Fridman, M.; Garneau-Tsodikova, S. *ChemBioChem* **2010**, *11*, 119-126.
18. Szarek, W. A.; Zamojski, A.; Gibson, r. A. R.; Vyas, D. M.; Jones, J. K. N. *Can. J. Chem.* **1976**, *54*, 3783-3793.
19. Szarek, W. A.; Kong, X. In *Preparative Carbohydrate Chemistry*; Hanessian, S. Ed.; Marcel Dekker, Inc: New York, 1997; pp. 105-126.
20. Arita, H.; Ueda, N.; Matsushima, Y. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1972**, *45*, 567-569.

21. Giese, B.; Gilges, S.; Gröninger, K. S.; Lamberth, C.; Witzel, T. *Liebigs Ann. Chem.* **1988**, 1988, 615-617.
22. Koch, A.; Lamberth, C.; Wetterich, F.; Giese, B. *J. Org. Chem.* **1993**, 58, 1083-1089.
23. Schleyer, P. V. R.; Jemmis, E. D.; Spitznagel, G. W. *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, 107, 6393-6394.
24. Sierwert, v. G.; Westphal, O. *Liebigs Ann. Chem.* **1968**, 720, 161-170.
25. David, S.; de Sennyey, G. *Carbohydr. Res.* **1979**, 77, 79-97.
26. Baer, H. H.; Hanna, H. R. *Carbohydr. Res.* **1982**, 110, 19-41.
27. Baer, H. H.; Mekarska-Falicki, M. *Can. J. Chem.* **1985**, 63, 3043-3052.
28. Fürst, A.; Plattner, P. A. *Helv. Chim. Acta* **1949**, 32, 275.
29. Baer, H. H.; Astles, D. J. *Carbohydr. Res.* **1984**, 126, 343-347.
30. Baer, H. H.; Astles, D. J.; Chin, H.-C.; Siemsen, L. *Can. J. Chem.* **1985**, 63, 432-439.
31. Robins, M. J.; Nowak, I.; Wnuk, S. F.; Hansske, F.; Madej, D. *J. Org. Chem.* **2007**, 72, 8216-8221.
32. Barton, D. H. R.; McCombie, S. W. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1.* **1975**, 1574 - 1585.
33. Zard, S. Z. In *Radicals in Organic Synthesis*; Renaud, P.; Sibi, M. P. Eds.; WILEY-VCH.: Weinheim, 2001; pp. 91-108.
34. Robins, M. J.; Wilson, J. S.; Hansske, F. *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, 105, 4059-4065.
35. Prisbe, E. J.; Martin, J. C. *Synth. Commun.* **1985**, 15, 401 - 409.
36. Chong, Y.; Chu, C. K. *Carbohydr. Res.* **2002**, 337, 397-402.
37. Barton, D. H.; Motherwell, W. B.; Stange, A. *Synthesis* **1981**, 743.
38. Barton, D. H. R.; Hartwig, W.; Hay Motherwell, R. S.; Motherwell, W. B.; Stange, A. *Tetrahedron Lett.* **1982**, 23, 2019-2022.
39. Barrett, A. G. M.; Barton, D. H. R.; Bielski, R. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1.* **1979**, 2378 - 2381.
40. Barrett, A. G. M.; Barton, D. H. R.; Bielski, R.; McCombie, S. W. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1977**, 866.
41. Barton, D. H. R.; Blundell, P.; Dorchak, J.; Jang, D. O.; Jaszberenyi, J. C. *Tetrahedron* **1991**, 47, 8969-8984.

42. Chatgialiloglu, C. *Acc. Chem. Res.* **1992**, *25*, 188-194.
43. Barton, D. H. R.; Jang, D. O.; Jaszberenyi, J. C. *Tetrahedron* **1993**, *49*, 7193-7214.
44. Barton, D. H. R.; Jang, D. O.; Jaszberenyi, J. C. *Tetrahedron* **1993**, *49*, 2793-2804.
45. Barton, D. H. R.; Jang, D. O.; Jaszberenyi, J. C. *Synlett* **1991**, *1991*, 435-438.
46. Kirwan, J. N.; Roberts, B. P.; Willis, C. R. *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 5093-5096.
47. Barton, D. H. R.; Jang, D. O.; Jaszberenyi, J. C. *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 2311-2314.
48. Barton, D. H. R.; Jang, D. O.; Jaszberenyi, J. C. *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 6838-6842.
49. Barton, D. H. R.; Ok Jang, D.; Jaszberenyi, J. C. *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 5709-5712.
50. Jang, D. O.; Cho, D. H. *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 5921-5924.
51. Lin, F. L.; van Halbeek, H.; Bertozzi, C. R. *Carbohydr. Res.* **2007**, *342*, 2014-2030.
52. Hou, D.; Lowary, T. L. *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 2278-2289.
53. Gadikota, R. R.; Callam, C. S.; Lowary, T. L. *Org. Lett.* **2001**, *3*, 607-610.
54. Hou, D.; Lowary, T. L. *Org. Lett.* **2007**, *9*, 4487-4490.
55. Spiegel, D. A.; Wiberg, K. B.; Schacherer, L. N.; Medeiros, M. R.; Wood, J. L. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 12513-12515.
56. Zhang, L.; Koreeda, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 13190-13191.
57. Roberts, B. P.; Smits, T. M. *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 137-140.
58. Roberts, B. P.; Smits, T. M. *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 3663-3666.
59. Dang, H.-S.; Roberts, B. P., Sekhon Jasmeetand ; Smits, T. M. *Org. Biomol. Chem.* **2003**, *1*, 1330-1341.
60. Hanessian, S.; Girard, C.; Chiara, J. L. *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 573-576.
61. Yadav, J. S.; Reddy, B. V. S.; Reddy, K. B.; Satyanarayana, M. *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 7009-7012.

62. Yadav, J. S.; Subba Reddy, B. V.; Vijaya Bhasker, E.; Raghavendra, S.; Narsaiah, A. V. *Tetrahedron Lett.* **2007**, 48, 677-680.

CAPÍTULO 2

Caracterización de la *exo* β -D-galactofuranosidasa de *Penicillium fellutanum*

Los glicoconjugados son biomoléculas de gran importancia porque están involucrados en numerosos eventos de comunicación entre la célula y su entorno, como adhesión, reconocimiento y diferenciación celular, control del crecimiento, señalización, respuesta inmune e inflamación.¹ En la mayor parte de los casos, las hexosas componentes de los glicoconjugados se encuentran en configuración piranósica. En este aspecto, la D-galactosa es un azúcar muy particular, ya que en muchos microorganismos se presenta en forma furanósica (D-Galf), mientras que en eucariotas superiores y entre ellos en mamíferos, adopta exclusivamente la forma piranósica (D-Galp). Muchos de los microorganismos que presentan D-Galf son importantes patógenos, como las bacterias *Mycobacterium tuberculosis* y *Mycobacterium leprae*,²⁻⁴ los protozoarios *Trypanosoma cruzi* y *Leishmania*,⁵⁻⁸ y el hongo *Paracoccidioides brasiliensis*,⁹ y son responsables de patologías que causan estragos a una gran parte de la humanidad. En algunos casos se ha demostrado que las unidades de D-Galf son esenciales para la supervivencia y virulencia de estos microorganismos^{10,11} y como este azúcar sólo se encuentra en mamíferos en configuración piranósica, la posibilidad de modular a las enzimas relacionadas con la glicobiología de D-Galf, constituye una aproximación de gran actualidad para el desarrollo de nuevos agentes terapéuticos.¹²

Las enzimas relacionadas con D-Galf son tres (Figura 2-1). En la construcción de unidades de D-Galf está involucrada una mutasa, la UDP-galactopiranosílmutasa (EC 5.4.99.9),^{13,14} que convierte uridinadifosfo- α -D-galactopiranososa (UDP-Galp) en uridinadifosfo- α -D-galactofuranosa (UDP-Galf). Este último es el sustrato de la enzima UDP-galactofuranosíltransferasa, responsable de la incorporación de unidades β -D-Galf a los glicoconjugados en formación.¹⁵⁻¹⁷

Por otro lado, en *T. cruzi* el contenido *in vivo* de D-Galf de los glicoconjugados es variable. Por ejemplo, la mayor diferencia estructural entre los epimastigotes y la forma infectiva trypomastigotes, es el contenido de galactofuranosa de los glicoinositolfosfolípidos (GIPLs), componentes mayoritarios de las membranas. También en las mucinas de *T. cruzi*, el número de unidades de D-Galf depende del tipo de cepa.¹⁸ Estas variaciones estructurales podrían atribuirse a la acción de galactofuranosidasas.

En algunos microorganismos, como en las especies *Penicillium* y *Aspergillus*¹⁹ y en *Helminthosporium saccharide*²⁰ se han caracterizado *exo* β -D-galactofuranosidasas (EC 3.2.1.146). Particularmente la *exo* β -D-galactofuranosidasa de *Penicillium fellutanum*, es una de las que más se ha estudiado.²¹ El sustrato natural de esta enzima es un glicopéptido extracelular llamado peptidofosfogalactomanano (pPGM), que contiene unidades terminales de β -D-Galf. Este glicoconjugado constituye una reserva de fosfato, colina e hidratos de carbono, que son liberados por acción de varias enzimas, entre ellas la *exo* β -D-galactofuranosidasa. Hasta el momento, el gen que codifica esta enzima no ha sido identificado, ni tampoco se ha determinado la secuencia de aminoácidos.

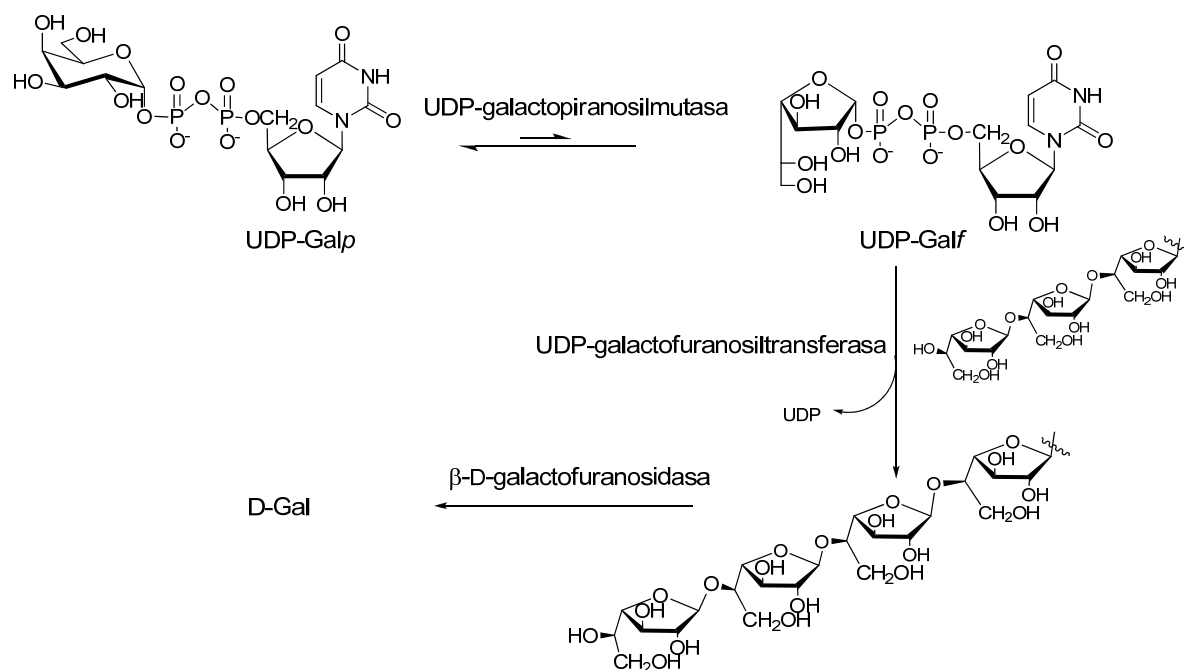


Figura 2-1. Enzimas participantes en la biosíntesis y metabolismo de glicoconjugados de D-Galf.

El progreso en el desarrollo de estrategias y métodos de síntesis eficientes y selectivos, permite acceder a carbohidratos y análogos que son de gran utilidad en el estudio del rol que cumplen las enzimas como bases moleculares de múltiples procesos biológicos. Durante los últimos años se ha llevado a cabo en el laboratorio, un proyecto dirigido al desarrollo de modelos y herramientas sintéticas para contribuir a la elucidación de los mecanismos

moleculares de acción y función de las enzimas relacionadas con la glicobiología de D-Galf y a su caracterización. En este proyecto se utiliza como modelo biológico el *P. fellutanum*.²¹ Este hongo filamentoso, no patógeno y de fácil cultivo, ha permitido disponer de la maquinaria enzimática para realizar las pruebas biológicas de los compuestos sintetizados. La exo β -D-galactofuranosidasa es liberada al medio de cultivo cuando los nutrientes se agotan, por lo cual, mediante la filtración del medio de cultivo, diálisis y liofilización se dispone de un extracto de esta enzima.²¹ Por fraccionamiento de un lisado celular se obtienen las membranas celulares, que contienen la UDP-galactopiranosilmutasa y la UDP-galactofuranosiltransferasa.²² El objetivo de este proyecto ha sido optimizar con este hongo el uso de las herramientas sintéticas desarrolladas, para luego poder utilizarlas para el estudio de enzimas análogas de otros microorganismos. Así, se sintetizaron glicósidos que permitieron medir la actividad de las enzimas con distinta sensibilidad (Figura 2-2). Por ejemplo, se sintetizó el sustrato cromogénico 4-nitrofenil β -D-galactofuranósido (**58**)²³ que fue muy utilizado en los estudios posteriores de la enzima,²⁴ y bencil β -D-galactofuranósido (**59**) cuyos parámetros cinéticos reflejaron una menor afinidad por la enzima.²⁵ Con el propósito de disponer de un sustrato más sensible se sintetizó el 4-metilcumarin-7-il β -D-galactofuranósido (**60**), potencialmente fluorogénico,²⁶ pero se observó que no se comportaba como sustrato, lo que se atribuyó al tamaño de la aglicona.²⁷ Comenzó a evidenciarse la gran sensibilidad de esta enzima a modificaciones estructurales en los sustratos. También se sintetizaron sustratos radioactivos, no sólo para la galactofuranosidasa como el metil β -D-[6-³H]galactofuranósido (**61 β ***),^{28,22} sino también para la galactosiltransferasa, como UDP- α -D-[6-³H]galactofuranosa (**62**).²² Ambos sustratos permitieron realizar estudios con mucha sensibilidad.

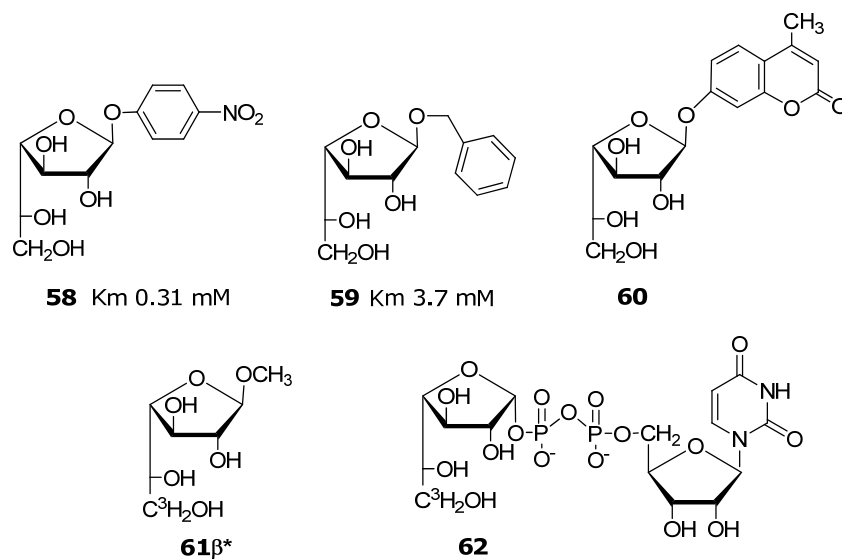


Figura 2-2. Sustratos de la enzima exo β -D-galactofuranosidasa y transferasa.

La inhibición de la galactofuranosidasa es un aspecto de interés considerando que durante la diferenciación del *T. cruzi* del estadio invasivo al infectivo, la cantidad de D-Galf presente en los glicoconjugados disminuye notablemente. El primer inhibidor que se encontró fue la D-galactono-1,4-lactona (**63**, IC_{50} 20 μ M),²⁴ cuya actividad biológica se previó considerando la similitud estructural, plano trigonal en torno al C-1, con el ion oxonio intermediario propuesto para la hidrólisis enzimática de glicósidos, y por lo tanto con el correspondiente estado de transición.^{29,30}

Los tioglicósidos, análogos de los sustrato, se comportan como inhibidores reversibles en muchos sistemas enzimáticos.³¹ La actividad inhibitoria se atribuye a la similitud estructural con el sustrato, que les permite interactuar con el sitio activo, y a la estabilidad hidrolítica característica de la unión C-S, debida a la baja afinidad del S por el protón, que desfavorece la "partida del grupo saliente" en condiciones de catálisis ácida.³² Con el objeto de disponer de otros inhibidores de la β -D-galactofuranosidasa, se sintetizaron tioglicósidos alquílicos, arílicos,²⁴ heteroarílicos²⁷ y tiodisacáridos.³³ Las diferencias en el grado de inhibición que presentaron los distintos derivados permitieron nuevamente observar la gran sensibilidad de la enzima a factores estéricos y de polaridad. El tioglicósido **64** resultó un inhibidor moderado, mientras que **65**, su precursor sintético, resultó mucho menos efectivo, poniéndose de manifiesto la

susceptibilidad de la enzima a la polaridad. Mediante la inmovilización de **64** en una matriz sólida (Sepharosa CH 4B) y utilizando la lactona **63** como eluyente, se desarrolló un sistema de cromatografía de afinidad específico para β -D-galactofuranosidasas.³⁴ Una vez optimizadas las condiciones para la purificación cromatográfica y utilizando también otras herramientas desarrolladas para la galactofuranosidasa de *P. fellutanum*, enzima modelo, se logró detectar por primera vez actividad de galactofuranosidasa en *T. cruzi*.³⁵

También se sintetizó el tiouretano **66**, y el nucleósido **67**, que no presentaron actividad biológica, y los nucleósidos **68** y **69** que se comportaron como inhibidores de diferente efectividad, poniendo nuevamente de manifiesto la sensibilidad de la enzima al tamaño, polaridad y flexibilidad de la aglicona (Figura 2-3).³⁶

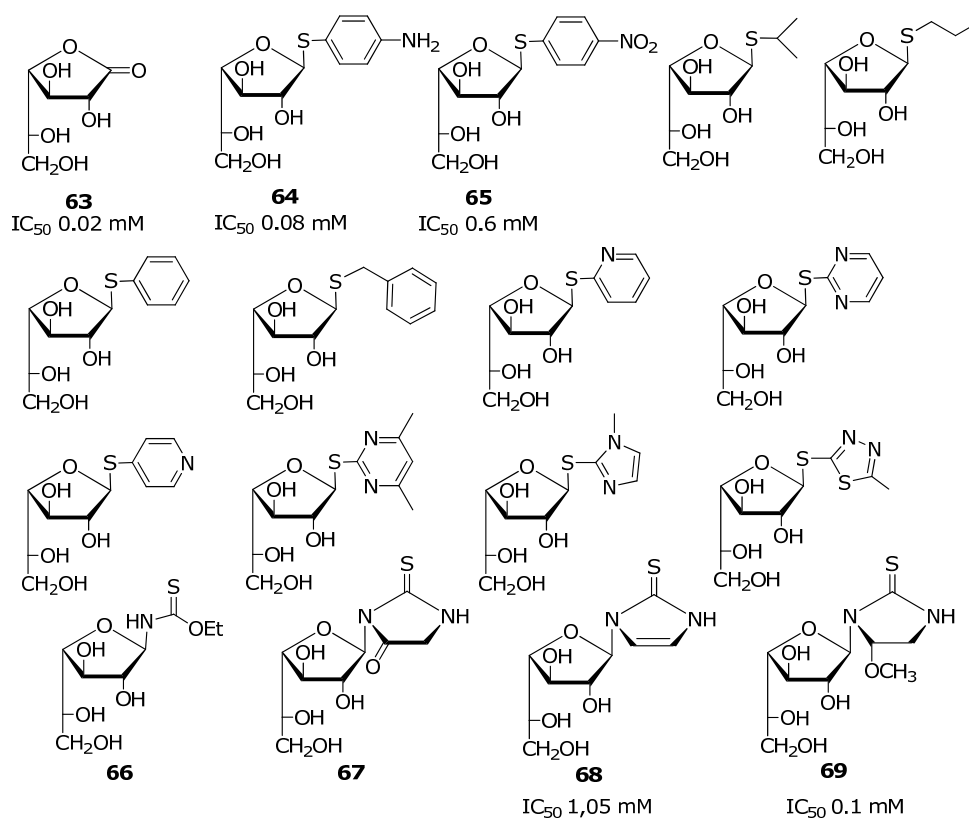


Figura 2-3. Inhibidores sintéticos de la *exo* β -D-galactofuranosidasa sintetizados en el laboratorio.

El estudio de la especificidad de una enzima requiere disponer de análogos de los sustratos, no sólo en lo que se refiere a la aglicona, sino

también con variaciones en la porción del azúcar. Así, para la evaluación de muchas glicoenzimas se han sintetizado análogos desoxigenados en diferentes posiciones, a fin de evaluar la importancia de cada hidroxilo en la interacción con la proteína. También son de utilidad los derivados fluorados,³⁷ los epímeros³⁸ y los homólogos de mayor y menor peso molecular de los sustratos.²¹

Con el objeto de estudiar la especificidad de la *exo* β -D-galactofuranosidasa, en nuestro laboratorio se sintetizaron β -D-galactofuranósidos desoxigenados en C-2,³⁹ C-3⁴⁰ y C-6⁴¹ (**70-72**, Figura 2-4), para evaluar la importancia de cada hidroxilo en la interacción con la enzima. La síntesis de cada uno de ellos requirió una estrategia particular, que tuvieron la característica en común de partir de D-galactono-1,4-lactona (**63**) como precursor del anillo furanósico. Además, los HO-5 y 6, exocíclicos, pueden protegerse selectivamente mediante la formación de un acetónido.⁴² Mediante estas dos estrategias se pueden diferenciar todos los HO, manteniendo el hidroxilo anomérico virtualmente protegido como grupo lactona.

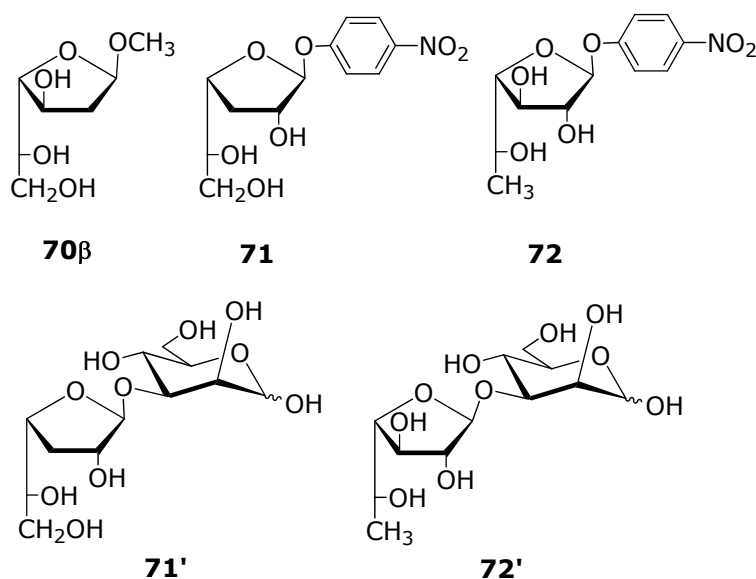
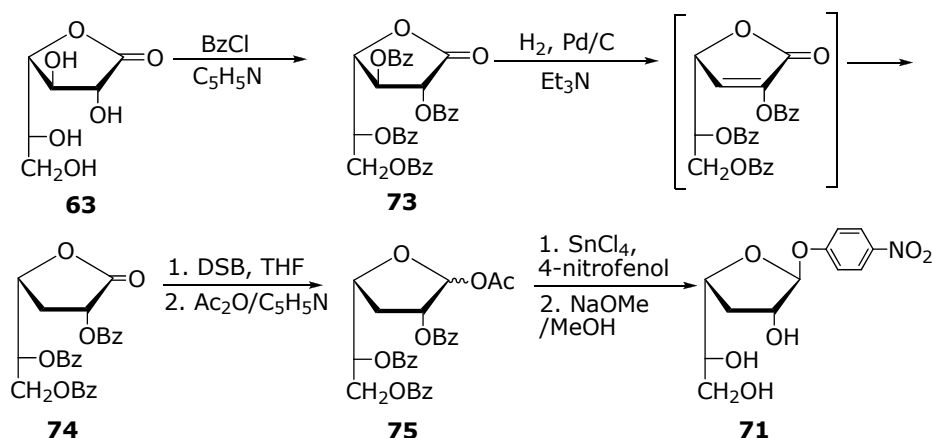


Figura 2-4. Desoxygalactofuranósidos sintetizados.

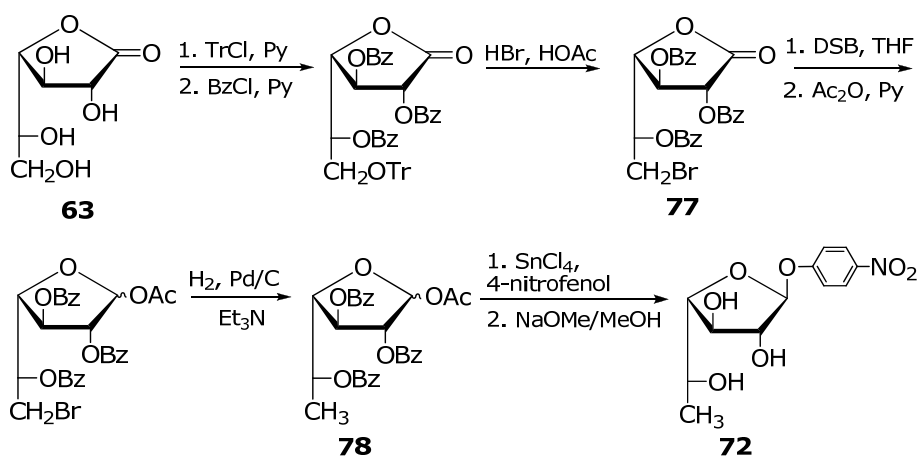
La síntesis de análogos de galactofuranósidos desoxigenados en C-3 (3-desoxi- β -D-xylo-hexofuranósidos) se basó en una reacción de β -eliminación e hidrogenación catalítica que había sido muy estudiada en el laboratorio.^{43,44} Así, el derivado per-*O*-benzoílado **73** conducía a la lactona

desoxigenada **74** por hidrogenación catalizada por Pd/C, en presencia de Et₃N (Esquema 2-1).



Esquema 2-1. Síntesis de 3-desoxi-D-galactofuranósidos

Disponiendo de la 3-desoxilactona **74**, se realizó la reducción con diisoamilborano del carbonilo lactónico, obteniéndose el lactol, y se activó el C-anomérico por acetilación, obteniéndose la aldosa desoxigenada **75**. Por glicosidación de **75** con 4-nitrofenol promovida por SnCl₄, y posterior desacetilación, se obtuvo el glicósido **71**. También se obtuvieron otros glicósidos sencillos⁴⁰ y el disacárido 3-desoxi-β-D-xylohexofuranosil-(1→3)-D-manosa (**71'**, Figura 2-4).⁴⁵

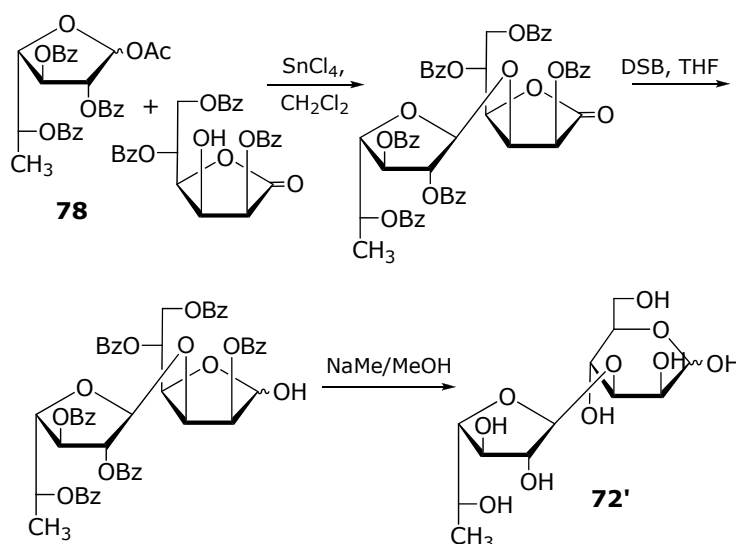


Esquema 2-2. Síntesis de D-fucofuranósidos (**72**).

Para la síntesis de D-fucofuranósidos (6-desoxi-α-L-arabino-hexofuranósidos), el compuesto clave fue el derivado bromado **77**, obtenido

mediante una secuencia de tritilación de la posición primaria, benzoilación del resto de los hidroxilos, destritilación⁴⁶ y posterior bromación.⁴⁷ Por reducción de la lactona **77** con diisoamilborano, acetilación del HO anomérico, e hidrogenólisis catalítica del Br en C-6, se obtuvo el fucósido 1-*O*-acetilado **78**, activado para la obtención de glicósidos. Por glicosidación con 4-nitrofenol promovida por SnCl₄ y posterior desacetilación se obtuvo **72** (Esquema 2-2).⁴¹

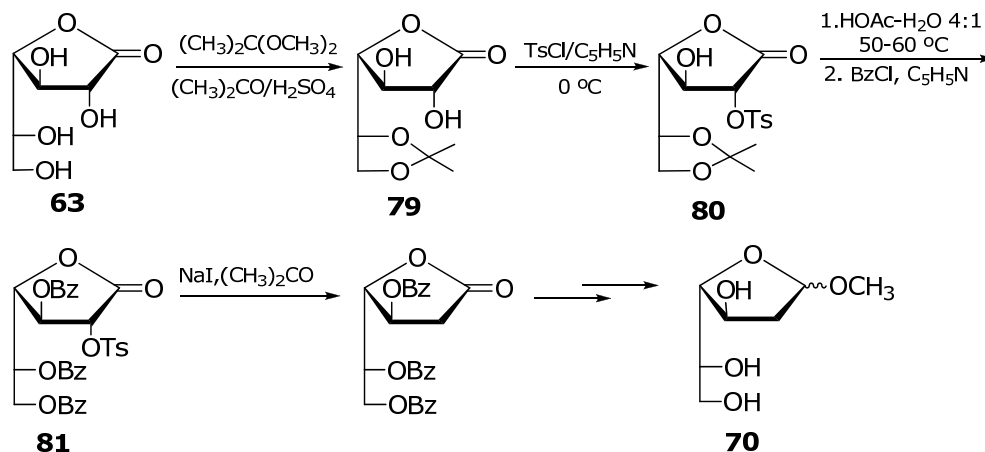
Alternativamente, por glicosidación de **78** con 2,5,6-tri-*O*-benzoíl-D-manono-1,4-lactona y posterior reelaboración del extremo reductor, se obtuvo el disacárido β-D-fucofuranosíl-(1→3)-D-manopiranososa (**72'**, Esquema 2-3).⁴¹



Esquema 2-3. Síntesis de 3-desoxi-β-D-xylohexofuranosíl-(1→3)-D-manosa (**72'**).

Para la síntesis de 2-desoxi-D-lixo-hexofuranósidos (2-desoxi-D-galactofuranósidos) se desarrollaron dos rutas alternativas. Una de las estrategias involucró la reducción del derivado 2-*O*-tosilado **81** (Esquema 2-4). Para obtener este derivado se preparó el acetónido **79**, que permitió diferenciar los HO-2 y HO-6 en la reacción posterior de tosilación. Así, se obtuvo regioselectivamente el derivado **80** con muy buen rendimiento. La desoxigenación se realizó por tratamiento del derivado **81** con NaI en acetona, condiciones bajo las cuales se forma un intermediario iodado en C-2, el cual se reduce por acción de otro ioduro. Esta reacción está favorecida por la estabilización que el grupo carbonilo lactónico produce sobre la carga

negativa que se desarrolla sobre C-2. Posteriormente, se realizó la reducción al lactol correspondiente, activación y glicosidación, como en la síntesis de los otros glicósidos desoxigenados.³⁹



Esquema 2-4. Síntesis de 2-desoxi-D-galactofuranósidos.

La otra estrategia desarrollada para la síntesis de 2-desoxi-D-galactofuranósidos utilizó como reacción clave una desoxigenación fotoinducida por transferencia electrónica (PET). La profundización en el estudio de esta reacción motivó el desarrollo de este trabajo de Tesis, y se describirá en los próximos Capítulos.

La evaluación biológica de los compuestos desoxigenados sintetizados frente a la *exo* β -D-galactofuranosidasa de *P. fellutanum*, mostró que son resistentes a la actividad hidrolítica de la misma. No se comportaron ni como sustratos, ni como inhibidores. Esto significa que la enzima es muy selectiva también en lo que respecta a la glicona, y que los hidroxilos 2, 3 y 6 son indispensables para la interacción con la misma.

La síntesis de derivados de β -D-Galf desoxigenados en C-5 completaría estos estudios de caracterización de la *exo* β -D-galactofuranosidasa, y ha sido uno de los objetivos del presente trabajo de Tesis.

1. Hölemann, A.; Seeberger, P. H. *Curr. Opin. Biotech.* **2004**, *15*, 615-622.
2. Crick, D. C.; Mahapatra, S.; Brennan, P. J. *Glycobiology* **2001**, *11*, 107R-118.
3. Besra, G. S.; Khoo, K.-H.; McNeil, M. R.; Dell, A.; Morris, H. R.; Brennan, P. J. *Biochemistry* **1995**, *34*, 4257-4266.
4. Bhamidi, S.; Scherman, M. S.; Rithner, C. D.; Prenni, J. E.; Chatterjee, D.; Khoo, K.-H.; McNeil, M. R. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 12992-13000.
5. Lederkremer, R. M.; Colli, W. *Glycobiology* **1995**, *5*, 547-552.
6. McConville, M. J.; Collidge, T. A.; Ferguson, M. A.; Schneider, P. J. *Biol. Chem.* **1993**, *268*, 15595-15604.
7. Turco, S. J.; Descoteaux, A. *Ann. Rev. Microbiology* **1992**, *46*, 65-92.
8. Peltier, P.; Euzen, R.; Daniellou, R.; Nugier-Chauvin, C.; Ferrières, V. *Carbohydr. Res.* **2008**, *343*, 1897-1923.
9. Ahrazem, O.; Prieto, A.; San-Blas, G.; Leal, J. A.; Jimenez-Barbero, J.; Bernabe, M. *Glycobiology* **2003**, *13*, 743-747.
10. Pedersen, L. L.; Turco, S. J. *Cell. Mol. Life Sci.* **2003**, *60*, 259-266.
11. Kremer, L.; Dover, L. G.; Morehouse, C.; Hitchin, P.; Everett, M.; Morris, H. R.; Dell, A.; Brennan, P. J.; McNeil, M. R.; Flaherty, C.; Duncan, K.; Besra, G. S. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 26430-26440.
12. Tam, P.-H.; Lowary, T. L. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2009**, *13*, 618-625.
13. Nassau, P.; Martin, S.; Brown, R.; Weston, A.; Monsey, D.; McNeil, M.; Duncan, K. *J. Bacteriol.* **1996**, *178*, 1047-1052.
14. Sanders, D. A. R.; Staines, A. G.; McMahon, S. A.; McNeil, M. R.; Whitfield, C.; Naismith, J. H. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2001**, *8*, 858-863.
15. Fullerton, S. W. B.; Daff, S.; Sanders, D. A. R.; Ingledew, W. J.; Whitfield, C.; Chapman, S. K.; Naismith, J. H. *Biochemistry* **2003**, *42*, 2104-2109.
16. Zhang, L.; Koreeda, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 13190-13191.
17. Soltero-Higgin, M.; Carlson, E. E.; Gruber, T. D.; Kiessling, L. L. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2004**, *11*, 539-543.
18. Lederkremer, R. M.; Agusti, R. In *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*; **2009**; *62*; 311-366.

19. Cousin, M. A.; Notermans, S.; Hoogerhout, P.; Van Boom, J. H. *J. Appl. Microbiology* **1989**, *66*, 311-317.
20. Daley, L. S.; Strobel, G. A. *Plant Science. Lett.* **1983**, *30*, 145-154.
21. Rietschel-Berst, M.; Jentoft, N. H.; Rick, P. D.; Pletcher, C.; Fang, F.; Gander, J. E. *J. Biol. Chem.* **1977**, *252*, 3219-3226.
22. Mariño, K.; Marino, C.; Lima, C.; Baldoni, L.; M., L. R. *Eur. J. Org. Chem.* **2005**, 2958-2964.
23. Marino, C.; Varela, O.; Lederkremer, R. M. *Carbohydr. Res.* **1989**, *190*, 65-76.
24. Marino, C.; Marino, K.; Miletti, L.; Manso Alves, M.; Colli, W.; Lederkremer, R. M. *Glycobiology* **1998**, *8*, 901-904.
25. Mariño, K.; Baldoni, L.; Marino, C. *Carbohydr. Res.* **2006**, *341*, 2286-2289.
26. Marino, C.; Cancio, M. J.; Varela, O.; Lederkremer, R. M. *Carbohydr. Res.* **1995**, *276*, 209-213.
27. Mariño, K.; Marino, C. *ARKIVOC* **2005**, *xii*, 341 - 351.
28. Mariño, K.; Marino, C.; Lederkremer, R. M. *Anal. Biochem.* **2002**, *301*, 325-328.
29. Huber, R. E.; Brockbank, R. L. *Biochemistry* **1987**, *26*, 1526-1531.
30. Leaback, D. H. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1968**, *32*, 1025-1030.
31. Driguez, H. *ChemBioChem* **2001**, *2*, 311-318.
32. Yip, V. L. Y.; Withers, S. G. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 6179-6182.
33. Repetto, E.; Marino, C.; Uhrig, M. L.; Varela, O. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 2703-2711.
34. Miletti, L. C.; Marino, C.; Mariño, K.; Lederkremer, R. M.; Colli, W.; Alves, M. J. M. *Carbohydr. Res.* **1999**, *320*, 176-182.
35. Miletti, L. C.; Mariño, K.; Marino, C.; Colli, W.; Alves, M. J. M.; Lederkremer, R. M. *Mol. Biochem. Parasitol.* **2003**, *127*, 85-88.
36. Marino, C.; Herczegh, P.; Lederkremer, R. M. *Carbohydr. Res.* **2001**, *333*, 123-128.
37. Barlow, J. N.; Blanchard, J. S. *Carbohydr. Res.* **2000**, *328*, 473-480.
38. Tam, P. H.; Lowary, T. L. *Org. Biomol. Chem* **2010**, *8*, 181-192.

39. Chiocconi, A.; Marino, C.; Otal, E.; Lederkremer, R. M. *Carbohydr. Res.* **2002**, *337*, 2119-2126.
40. Chiocconi, A.; Varela, O.; Lederkremer, R. M. *Carbohydr. Lett.* **1996**, *2*, 115-122.
41. Chiocconi, A.; Marino, C.; Lederkremer, R. M. *Carbohydr. Res.* **1999**, *323*, 7-13.
42. Fleet, G. W. J.; Son, J. C. *Tetrahedron* **1988**, *44*, 2637-2647.
43. Litter, M. I.; Lederkremer, R. M. *Carbohydr. Res.* **1973**, *26*, 431-434.
44. Jeroncic, L. O.; Varela, O. J.; Fernandez Cirelli, A.; Lederkremer, R. M. *Tetrahedron* **1984**, *40*, 1425-1430.
45. Marino, C.; Chiocconi, A.; Varela, O.; Lederkremer, R. M. *Carbohydr. Res.* **1998**, *311*, 183-189.
46. du Mortier, C.; Varela, O.; Lederkremer, R. M. *Carbohydr. Res.* **1989**, *189*, 79-86.
47. Moradei, O.; du Mortier, C.; Varela, O.; Lederkremer, R. M. *J. Carbohydr. Chem.* **1991**, *10*, 469 - 479.

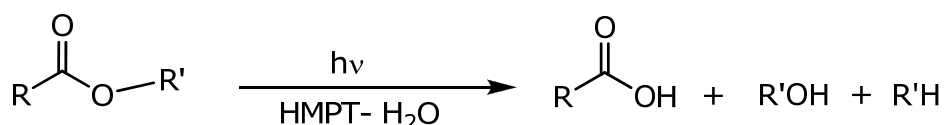
CAPÍTULO 3

Desoxigenación por transferencia electrónica fotoinducida (PET)

Antecedentes y consideraciones generales

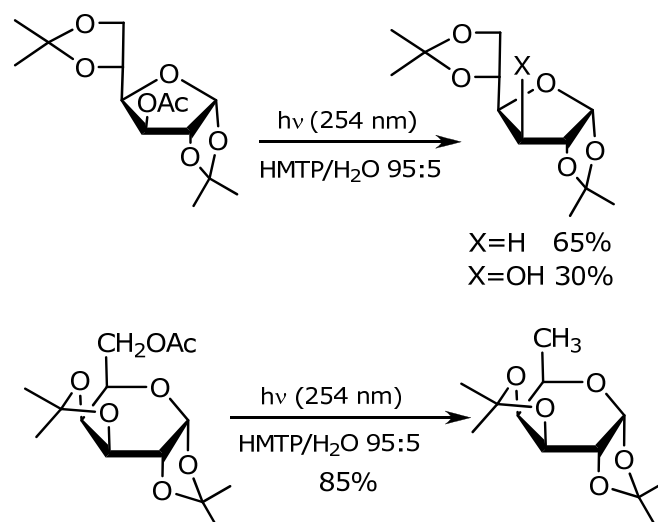
Primera descripción de la fotólisis reductiva de ésteres

En el año 1976 el grupo de Portella, describió en una comunicación que los ésteres, además de presentar las reacciones fotoquímicas características de los compuestos carbonílicos (Norrish tipo I y tipo II), en ciertas condiciones presentan una reactividad fotoquímica específica diferente del resto de los compuestos carbonílicos (aldehídos y cetonas). En este trabajo describieron que mientras intentaban hallar condiciones para hacer la fotohidrólisis de diversos ésteres derivados del colestano aislaban una proporción importante del producto de reducción del grupo alcoholilo del éster, y que la proporción variaba en función de la cantidad de agua que había presente en el solvente de irradiación, siendo óptimos valores entre 5-10% (Esquema 3-1).^{1,2}



Esquema 3-1. Reacción fotoquímica general para ésteres utilizando HMPT/agua como solvente.

A partir de estos resultados, comenzaron a estudiar la aplicación de esta reacción a la reducción de ésteres de distinta naturaleza, entre ellos, de hidratos de carbono. La reacción se ensayó en derivados muy diversos: azúcares esterificados en el hidroxilo primario, secundario ó anomérico, en derivados furanósicos y piranósicos, e incluso sobre derivados de azúcares previamente desoxigenados, como D-ramnosa y D-fucosa. Los rendimientos de las reacciones de desoxigenación fueron de moderados a buenos, observándose en algunos casos la hidrólisis del éster correspondiente como subproducto (Esquema 3-2).



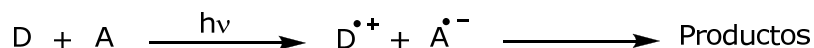
Esquema 3-2. Aplicación de la reacción de fotodesoxigenación en hidratos de carbono.

Cuando la reacción se usaba para desoxigenar el HO anomérico de un derivado 1-O-acetilado, solamente se recuperaba el producto con el HO-1 libre. Otro inconveniente se observaba cuando la molécula presentaba otro cromóforo, ya que conducía a mezclas complejas de difícil separación. Por otro lado, la utilización de solventes de alto punto de ebullición como la hexametilfosfotriamida (HMPT) hacía dificultosa la recuperación de los productos de reducción, especialmente si el producto obtenido presentaba cierto grado de volatilidad, como ocurría con azúcares que ya tenían alguna posición desoxigenada.^{3,4} Los mismos autores publicaron en el año 1984 el estudio completo de esta reacción de reducción de ésteres, donde probaron que la metodología era general y que podía ser usada tanto en moléculas simples, como derivados del ciclohexanol, como en moléculas complejas: derivados del colestano, derivados de hidratos de carbono, etc. El mecanismo propuesto consistía en una transferencia electrónica desde una molécula de HMPT fotoexcitada al correspondiente éster. Luego mediante una ruptura β -homolítica conduciría a la formación del producto desoxigenado.

Aspectos generales de los procesos de transferencia electrónica fotoinducidos (PET)

Las reacciones de transferencia electrónica han sido estudiadas de manera extensa en química y la aproximación fotoquímica a este tipo de reacciones se ha convertido en algo familiar en química orgánica.

Los procesos de transferencia electrónica fotoinducidos (PET) involucran dos especies neutras, un donador (**D**) y un aceptor (**A**), y la excitación electrónica de una de estas especies. La producción de iones-radicales (**D**^{•+} y **A**^{•-}) depende del potencial de oxidación $E^{\text{ox}}_{1/2}(\mathbf{D})$, del potencial de reducción de $E^{\text{red}}_{1/2}(\mathbf{A})$ y de la energía electrónica de excitación E_{00} , según la ecuación de Rehm-Weller. En esta ecuación, el término relacionado con la interacción Coulómbica puede, en un primera aproximación ser despreciado, cuando la reacción se realiza en solventes polares como acetonitrilo y alcoholes. Cuando una PET es termodinámicamente favorable ($\Delta G < 0$), la transferencia electrónica ocurre a velocidades cercanas al control difusional.⁵ Sin embargo, la suerte del par ión-radical (**D**^{•+}—**A**^{•-}) producido por esta transferencia depende fuertemente de la naturaleza del solvente y de la velocidad de la reacción inversa de la transferencia del electrón primaria, para dar nuevamente **D** y **A** en su estado fundamental. El uso de solventes polares favorece la formación de iones separados por solvente (SSIP, single solvent ion pair), que pueden luego estar separados por más moléculas de solvente y convertirse finalmente en "iones libres" solvatados. Este proceso limita la reacción inversa de la transferencia electrónica.⁶



En general, los aniones-radicales generados por PET pueden estar involucrados directamente en reacciones de mecanismo radicalario, como reacciones de acoplamiento, reducción, etc. Sin embargo, una diferencia entre los aniones-radicales y los cationes-radicales es que estos últimos no suelen estar involucrados en reacciones radicalarias análogas hasta que no se convierten en radicales (Figura 3-1).⁶

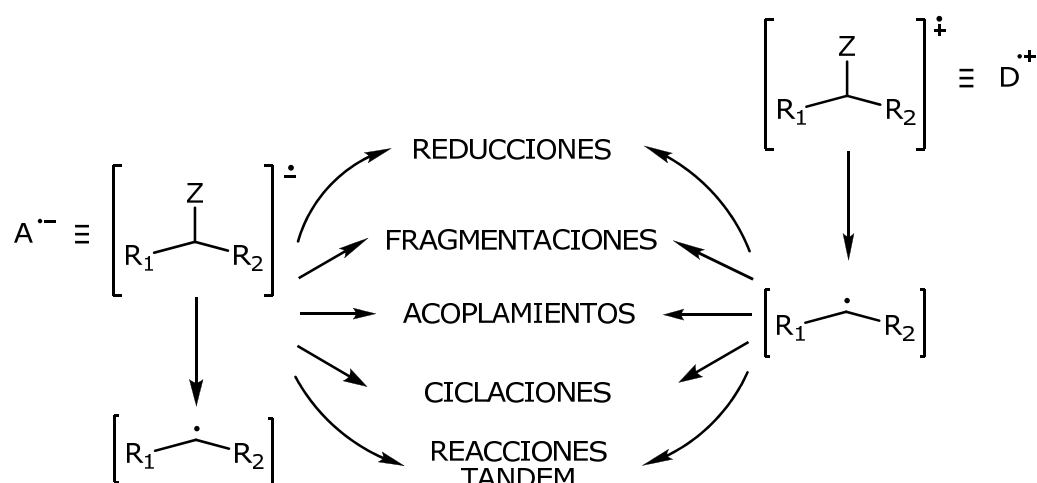
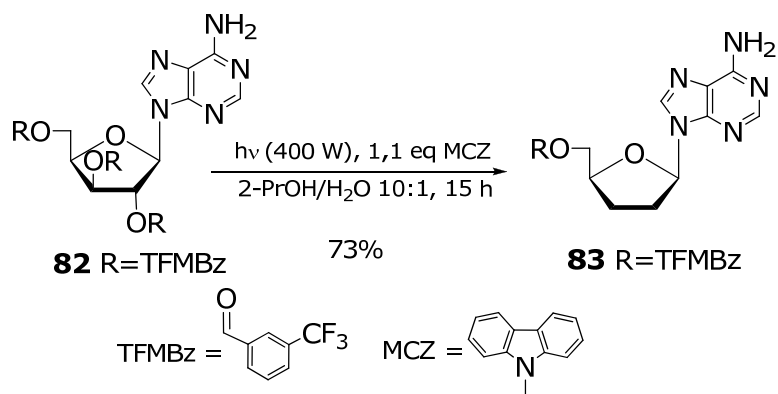


Figura 3-1.

Otro aspecto importante a tener en cuenta, es que algunos compuestos pueden actuar tanto como donores o aceptores, y ésto depende de qué otro compuesto se halla presente en el momento de la irradiación. En general, las aminas actúan como agentes reductores cuando están en presencia de cetonas, ésteres y enonas, entre otros.⁶

Reacción de desoxigenación de ésteres por transferencia electrónica fotoinducida ó fotosensibilizada

Tiempo después de estos resultados, el grupo de Saito inspirado en los resultados de Portella,¹ publicó una metodología sencilla y general de desoxigenación de alcoholes secundarios derivatizados como benzoatos, en la cual utilizaba una reacción de desoxigenación PET para la obtención de desoxiribonucleósidos. Por ejemplo, la irradiación durante 15 h del derivado perbenzoilado de adenosina **82**, en presencia de 1,1 eq de 9-metilcarbazol (MCZ) como fotosensibilizador en una mezcla de 2-PrOH/H₂O (10:1) como solvente, produjo la desoxigenación de las dos posiciones secundarias, manteniendo inalterada la posición primaria, obteniéndose la 2,3-didesoxiadenosina **83** (Esquema 3-3). Se evaluó la reducción de distintos ésteres aromáticos (4-clorobenzoílo, benzoílo y 3-trifluorometilbenzoílo) y se observó que el 3-trifluorometilbenzoílo conducía a los productos desoxigenados con mejores rendimientos.⁷



Esquema 3-3. Desoxigenación regioselectiva de alcoholes secundarios derivatizados como benzoatos mediante la reacción de transferencia electrónica fotoinducida.

En este trabajo Saito propuso de manera general, que la reacción de desoxigenación PET de ésteres estaría ocurriendo por el siguiente mecanismo: por fotoexcitación del sensibilizador **D** alcanzaría su estado excitado **i**, y por transferencia de un electrón de esta especie al éster aromático **ii**, se obtendría el catión radical **iii** y el anión radical **iv** del correspondiente éster aromático. Formadas estas especies, y en solvente acuoso, se formaría el radical terciario **v** por protonación del anión radical **iv**. Si el éster proviene de un alcohol secundario o terciario, el radical **v** podría sufrir una ruptura- β homolítica para producir un radical **vi**, secundario ó terciario, que por sustracción de un hidrógeno del solvente conduciría al producto desoxigenado **vii** (Figura 3-2).⁷ En este caso, la transferencia electrónica estaría ocurriendo desde el singulete excitado del *N*-metilcarbazol (fotosensibilizador) al éster aromático de los azúcares derivatizados.

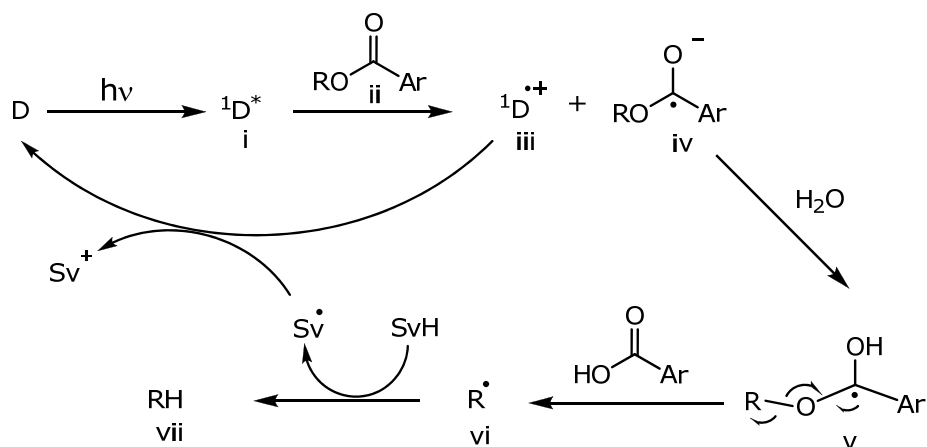
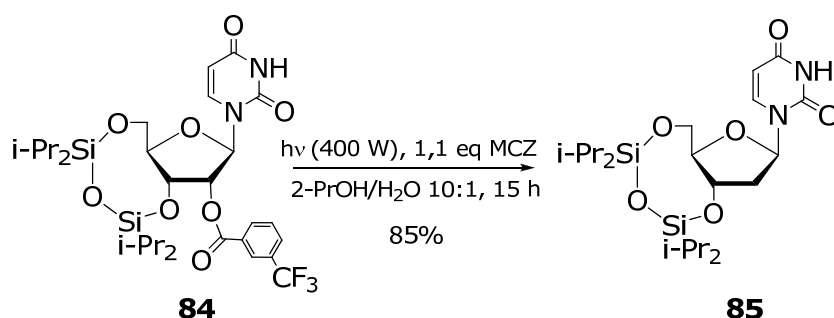


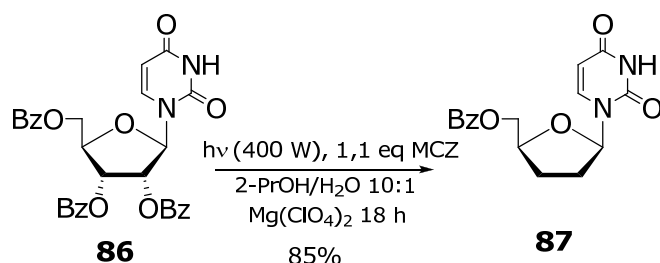
Figura 3-2. Mecanismo propuesto para la desoxigenación PET de ésteres.

Saito utilizó también esta reacción para obtener el derivado de 2-desoxiuridina **85**, partiendo del derivado convenientemente protegido **84** (Esquema 3-4).



Esquema 3-4.

Con el propósito de desarrollar un método aún más conveniente desde el punto de vista económico, propuso la utilización de ésteres de benzoílo en lugar de usar los ésteres de 3-trifluorometilbenzoílo. Cuando hizo la irradiación del derivado de tri-*O*-benzoíluridina **86**, observó que luego de 24 h de irradiación bajo las mismas condiciones en las que se habían irradiado los ésteres del 3-trifluorometilbenzoílo, la reacción procedió muy lentamente y los rendimientos fueron muy bajos.

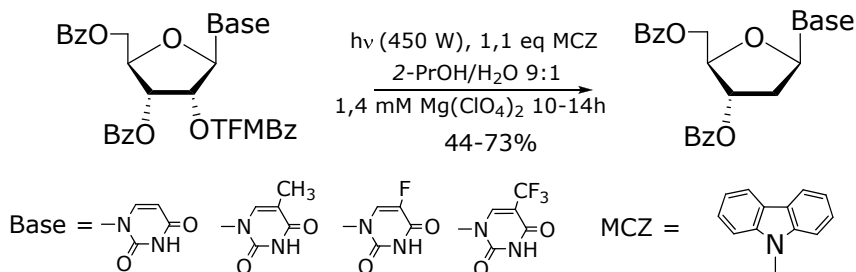


Esquema 3-5. Utilización de ésteres de benzoílo en la reacción de desoxigenación PET, para la obtención del derivado de uridina **87**.

Sin embargo, cuando a la mezcla de irradiación se le agregó $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$ ⁸ la fotoreducción se aceleró y luego de 18 h de irradiación se obtuvo el derivado **87** con un 85% de rendimiento (Esquema 3-5). De esta manera Saito y colaboradores aportaron una metodología alternativa muy interesante para la desoxigenación de alcoholes secundarios y terciarios en condiciones acuosas, selectiva respecto a alcoholes primarios, suave, y por sobre todas las cosas, una metodología libre de hidruros de estaño.

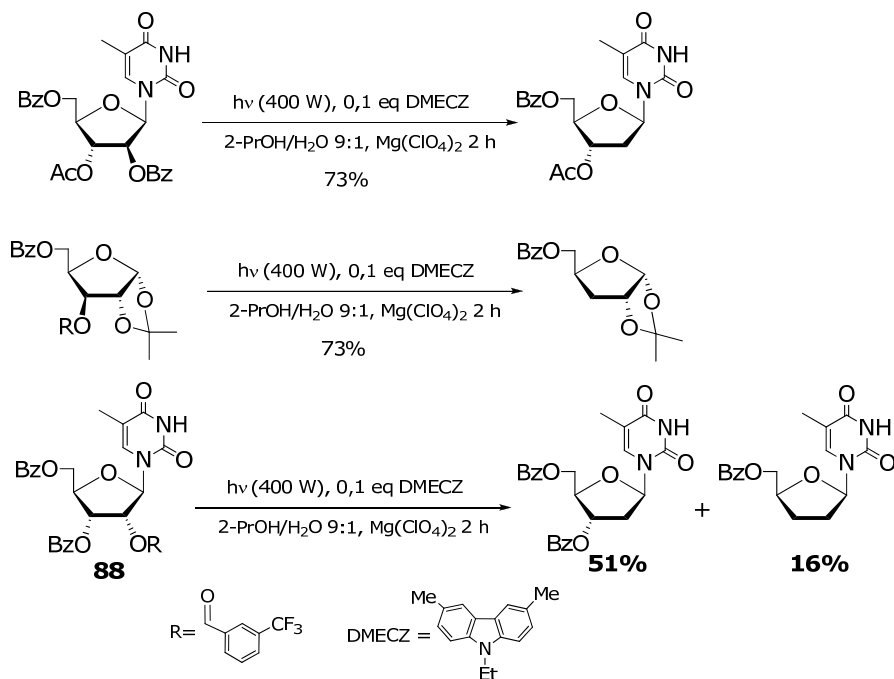
Años después, el grupo de Rizzo utilizó esta reacción para obtener una serie de desoxiribonucleósidos de interés como agentes antivirales en la cual

el hidroxilo a reducir se derivatizaba como el 3-trifluorometilbenzoílo y el resto de los HO como benzoílos, observando una excelente quimioselectividad. La reacción requería 10 a 14 h de irradiación y 1-1,2 equivalente del MCZ (Esquema 3-6).⁹



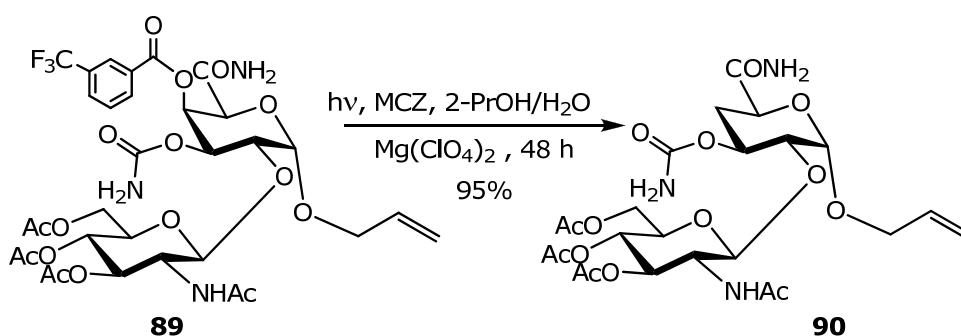
Esquema 3-6. Reacción de desoxigenación PET sobre una serie de ribonucleósidos.

Posteriormente, Rizzo introdujo el 3,6-dimetil-9-etilcarbazol (DMECZ) como donador de electrones el cual resultó ser muy eficiente, pudiéndose utilizar en cantidades subestequiométricas (atribuible al "turn over" del fotosensibilizador), y reduciendo significativamente los tiempos de irradiación. Sin embargo, en algunos casos como por ejemplo en **88**, se perdía quimioselectividad entre los grupos benzoílos y el 3-trifluorometilbenzoílo por la eficiencia de este fotosensibilizador (Esquema 3-7).¹⁰⁻¹²



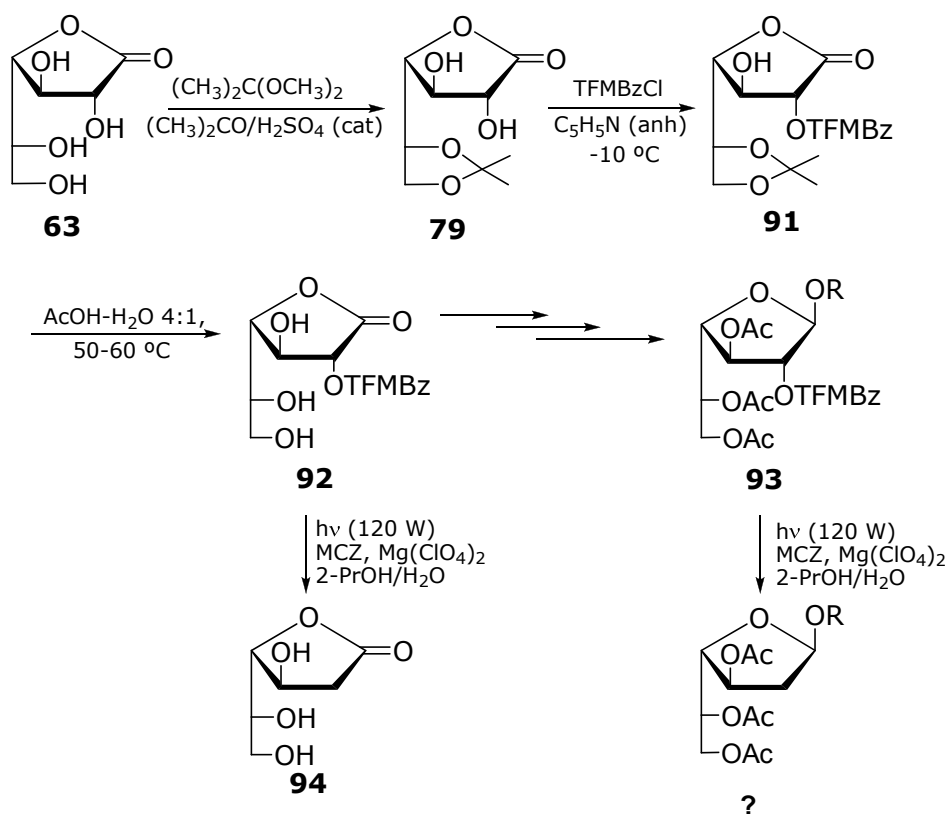
Esquema 3-7. Reacciones de desoxigenación PET sobre derivados pentofuranósidos utilizando DMECZ como donador de electrones.

Un ejemplo interesante de esta reacción PET es su utilización para efectuar la reducción del HO-4 derivado de moenomicina A **89**, para poder evaluar la importancia de este hidroxilo en la interacción con la transglicosidasa bacteriana PBP1b, una enzima clave en la biosíntesis de péptidoglicanos bacterianos. El método de Barton y McCombie no había resultado eficiente y la purificación del producto era compleja. Por fotólisis de **89** en las condiciones establecidas por Saito, se obtuvo **90** con muy buen rendimiento (Esquema 3-8).¹³



Esquema 3-8. Reacción de desoxigenación PET sobre el derivado de moenomicina A **89**.

En base a estos antecedentes y en el marco del proyecto de síntesis de desoxigalactofuranósidos para la caracterización de la *exo* β -D-galactofuranosidasa, se consideró que sería interesante utilizar esta reacción para sintetizar los derivados 2-desoxigenados de D-Galf, utilizando D-galactono-1,4-lactona (**63**) como precursor del anillo furanósico. Se aprovecharían las ventajas que presenta esta lactona para la sustitución selectiva de los distintos hidroxilos y se obtendría un derivado diferencialmente sustituido en el HO-2, como por ejemplo **92**. Utilizando una secuencia sintética desarrollada anteriormente se obtendría **93**, apropiado para la reacción de desoxigenación PET. De este modo se explotaría el efecto anquimérico del grupo TFMBz para obtener glicósidos de configuración β y luego se efectuaría la desoxigenación (Esquema 3-9).



Esquema 3-9.

Así, los HO-5 y 6, exocíclicos, se protegieron selectivamente, mediante la formación del acetónido **79**.¹⁴ La activación del HO-2 por efecto inductivo del carbonilo vecino y por ser estéricamente accesible, permitió la acilación selectiva frente al HO-3 obteniéndose **91**. Por desprotección de los HO-5 y HO-6 se obtuvo **92**. En esta etapa se consideró que **92** sería un derivado interesante para someterlo a la desoxigenación PET. Así, por irradiación del derivado **92**, se obtuvo 2-desoxi-D-lixo-hexono-1,4-lactona (**93**, "2-desoxi-D-galactono-1,4-lactona") luego de sólo 1 h de irradiación (Esquema 3-9). Evidentemente, el carbonilo lactónico favorecía la reacción fotoquímica, probablemente por estabilización por conjugación del radical intermediario.¹⁵

Como se mencionó en el Capítulo 1, el desarrollo de métodos específicos de desoxigenación de hidratos de carbono es importante para la preparación de azúcares de relevancia biológica. Mas allá de la variedad de métodos desarrollados, la reacción de Barton y McCombie sigue siendo la opción más utilizada en hidratos de carbono,¹⁶ aunque es deseable el desarrollo de metodologías libres de hidruros de estaño. Por este motivo, nos propusimos el estudio de esta reacción de desoxigenación PET, no sólo para derivados de

D-galactono-1,4-lactona, si no también para otros azúcares como D-glucono 1,5-lactona (**95**), y así establecer un protocolo eficiente que podría extenderse luego a la desoxigenación selectiva de hidroxilos en distintas posiciones (Figura 3-3).

Para el estudio de esta reacción de desoxigenación fotoinducida PET, lo primero que teníamos que desarrollar era la síntesis eficiente de los distintos sustratos.

Síntesis de derivados parcialmente acilados de D-glucono-1,5-lactona y de D-glucono-1,4-lactona.

En base a la experiencia adquirida en el laboratorio para la preparación de los derivados de **63**, se intentó preparar derivados análogos de D-glucono-1,5-lactona (**96**, **97** y **98**, **99**), que nos permitieran evaluar la influencia del tamaño del anillo y la regioselectividad de la reacción PET (Figura 3-3).

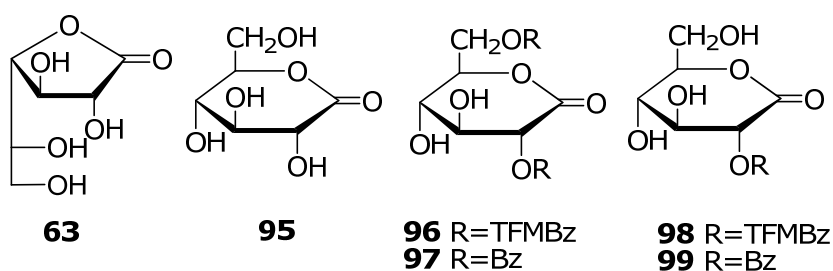
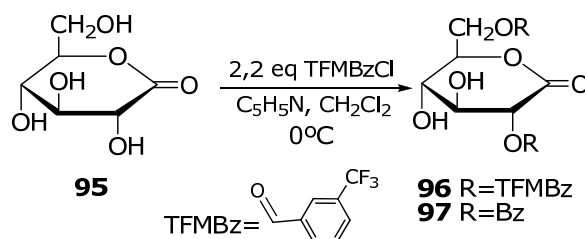


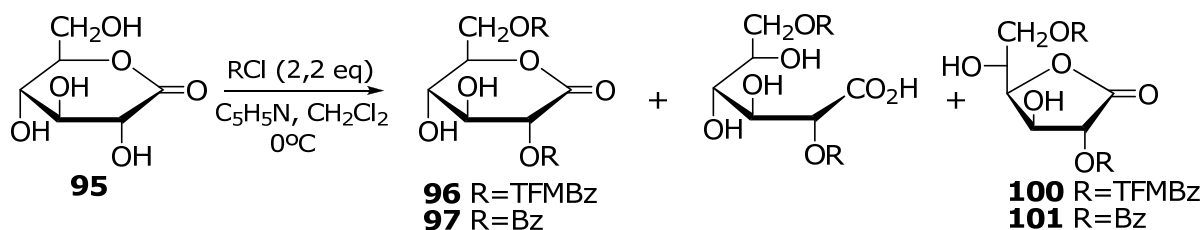
Figura 3-3.

Por analogía con la D-galactono-1,4-lactona (**63**) se consideró inicialmente que los derivados **96** y **97** podrían obtenerse tratando a la lactona **95** con cantidades limitantes de los reactivos acilantes. Así, se hizo reaccionar D-glucono-1,5-lactona comercial (**95**) con 2,2 equivalentes de cloruro de 3-trifluorometilbenzoílo (TFMBz) ó cloruro de benzoílo en piridina/ CH_2Cl_2 anhidra a baja temperatura. Para mantener baja la concentración del reactivo benzoilante se hizo el agregado en alícuotas, esperando 30 min entre cada agregado y además se trabajó en condiciones básicas suaves a fin de minimizar los productos de β -eliminación (Esquema 3-10).¹⁷



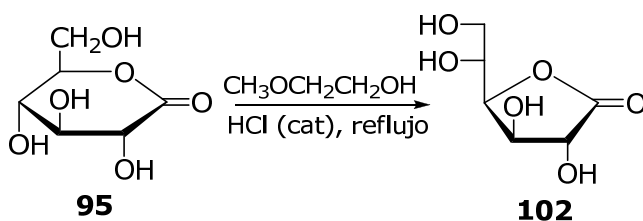
Esquema 3-10.

Sin embargo, la gran facilidad de **95** para dar productos de apertura y contracción del anillo condujo a una mezcla compleja de productos de difícil separación (Esquema 3-11).

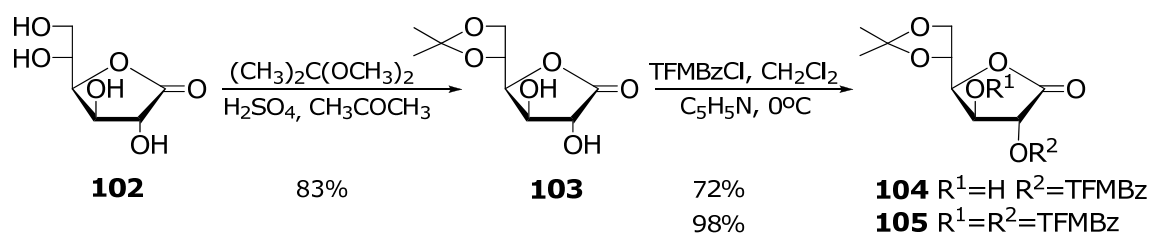


Esquema 3-11.

Aún así, se obtuvieron los derivados dibenzoilados **96** y **97** con bajos rendimientos y se probó la reacción de desoxigenación PET sobre ellos. La apertura y contracción del anillo también se producía durante la irradiación, lo cual se evidenciaba por la aparición de las señales de los C del grupos C=O correspondientes al ácido y las lactonas de 4 y 5 miembros a 176,5 ppm, 169,2 ppm y 170,4 ppm, respectivamente, en el espectro de RMN ^{13}C . Se decidió entonces estudiar la reacción de desoxigenación PET sobre derivados de la D-glucono-1,4-lactona (**102**), que resultaron más estables en las condiciones de la reacción de desoxigenación PET. Para disponer de la lactona **102**, se realizó una reacción de isomerización del anillo lactónico de 6 miembros al de 5 miembros (Esquema 3-12).¹⁸

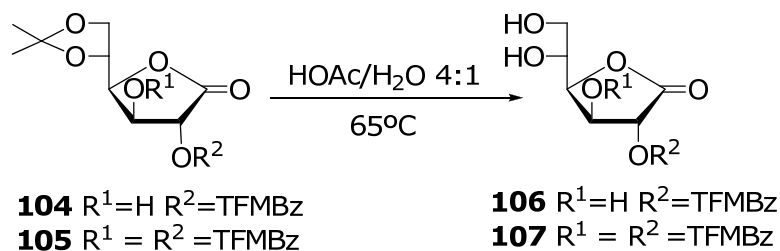
Esquema 3-12. Isomerización de D-glucono-1,5-lactona (**95**) a 1,4-lactona (**102**).

De esta manera, por calentamiento de D-glucono-1,5-lactona (**95**) comercial en 2-metoxietanol con HCl (c) en cantidades catalíticas, se obtuvo la D-glucono-1,4-lactona (**102**). Este compuesto cristalino se obtuvo muy fácilmente con 65% de rendimiento en la escala del multigramo y presentó las mismas características fisicoquímicas que el descripto¹⁸ (Esquema 3-11). Disponiendo de **102**, se utilizó la misma estrategia de síntesis que había sido previamente usada para la obtención de los 2-desoxi-D-galactofuranósidos.¹⁵



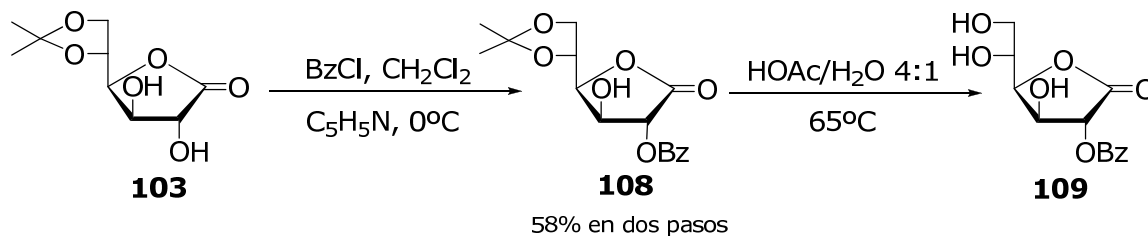
Esquema 3-13.

Por reacción de **102** con 2,2-dimetoxipropano en acetona y cantidades catalíticas de H_2SO_4 (c) a 0 °C, se obtuvo 5,6-O-isopropilidén-D-glucono-1,4-lactona (**103**) con 85 % de rendimiento, cuyas propiedades físico químicas coincidieron con las previamente descritas.¹⁸ Por benzoilación selectiva del HO-2 usando 1,2 equivalentes de cloruro de TFMBz ó cloruro de benzoílo en una mezcla de diclorometano y piridina anhidros a baja temperatura se obtuvo **104**. Al igual que para los derivados **96** y **97**, se trabajó bajo condiciones diluidas de los reactivos acilantes. Cuando **103** se trató en iguales condiciones pero con exceso de cloruro de TFMBz (3 equivalentes), se obtuvo el compuesto **105** (Esquema 3-13). Las estructuras de **104** y **105** se confirmaron por medio de espectroscopía de RMN 1H y ^{13}C (Tablas 3-1; 3-2). En el espectro de RMN 1H de **104** se observó que el doblete correspondiente al H-2 era la señal más desprotegida. Para el compuesto **105**, la señal correspondiente al H-3, que en el compuesto **104** resonaba a 4,74 ppm, sufrió un corrimiento a δ 6,11 por efecto de la acilación (Tabla 3-1).



Esquema 3-14.

Con el fin de obtener los derivados con los HO-5 y HO-6 libres, se removi6 el grupo isopropilid6n de los compuestos **104** y **105** por tratamiento con 6cido ac6tico acuoso a 65 °C, obteni6ndose los derivados libres **106** y **107** (Esquema 3-14).



Esquema 3-15.

Para obtener el derivado mono acilado **109**, se utiliz6 la misma secuencia de reacciones (Esquema 3-15). En la preparaci6n de una muestra de **108** para el an6lisis elemental cuantitativo, se producía sistem6ticamente la descomposici6n durante el secado, por lo que solamente se lo pudo caracterizar espectrosc6picamente. Una vez realizada la desprotecci6n de **108**, por posterior evaporaci6n de la soluci6n de ac6tico acuoso, se obtuvo un jarabe que por recristalizaci6n con tolueno-EtOAc 3:7 condujo al compuesto **109** como un s6lido cristalino, con 58% de rendimiento en dos pasos (Esquema 3-15).

El an6lisis de los espectros de RMN 1H de **106**, **107** y **109** mostr6 un corrimiento a campos altos en las se~ales correspondientes a los H-6, H-6' y H-5 por efecto de la desprotecci6n (Tabla 3-1).

Tabla 3-1. Señales de RMN ¹H de los compuestos **102-109**.

	H-2 (J _{2,3})	H-3 (J _{3,4})	H-4 (J _{4,5})	H-5 (J _{5,6})	H-6 (J _{6,6'})	H-6' (J _{5,6'})
102^a	4,52 ^e -	4,53 ^e	4,63 (4,5)	4,04 ^e (3,8)	3,76 (12,0)	3,73 (5,9)
103^a	4,39 (5,5)	4,52 ^e	4,76 (6,1)	4,52 ^e (6,7)	4,17 (9,0)	3,98 (5,9)
104^b	5,42 (4,6)	4,74 (6,0)	4,65 (7,3)	4,51 (6,5)	4,22 (9,1)	4,11 (4,6)
105^b	5,99 (6,6)	6,11 (6,8)	4,90 (8,1)	4,51 (6,1)	4,21 (9,1)	4,06 (5,1)
106^b	5,62 (5,6)	4,86 ^d	4,73 ^d	4,18 (3,7)	3,93 (11,6)	3,88 (5,1)
107^b	5,90 (4,9)	6,07 (6,0)	5,02 (7,6)	4,12 (3,6)	3,81 (11,1)	3,89 (5,1)
108^b	5,42 (3,8)	4,69 (5,7)	4,65 (7,2)	4,49 (6,3)	4,20 (9,1)	4,10 (4,9)
109^c	5,29 (8,8)	3,99 ^d	3,77 ^d	4,14 (2,2)	3,73 (12,4)	3,66 (3,1)

^aD₂O, ^bCDCl₃, ^cMe₃SO-d₆, ^dintercambiable, ^ecentro de multiplete complejo.

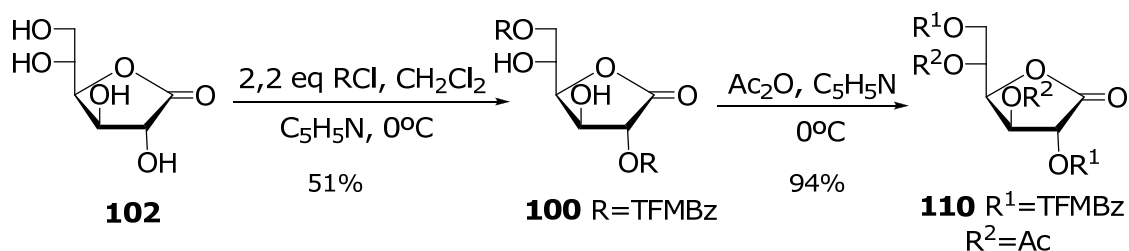
A continuación en la Tabla 3-2 se presentan los desplazamientos químicos de las señales de RMN ¹³C de los compuestos **102-109**.

Tabla 3-2. Señales de RMN ¹³C de los compuestos **102-109**.

	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6
102^a	177,7	73,3	73,8 ^d	80,5	71,1 ^d	63,1
103^b	175,3	73,6 ^d	73,4 ^d	80,3	73,1 ^d	66,4
104^b	169,7	75,5	73,4 ^d	79,9	72,2 ^d	66,6
105^b	168,1	73,3	72,7 ^d	77,6	71,8 ^d	66,6
106^b	170,7	75,2	72,1 ^d	79,2	71,2	62,9
107^b	168,8	73,8	72,3	77,6	71,0	62,8
108^b	170,2	75,4	73,3 ^d	80,3	72,2 ^d	66,6
109^c	171,5	74,4	72,2 ^d	79,9	71,4 ^d	62,5

^aD₂O, ^bCDCl₃, ^cMe₃SO-d₆, ^dintercambiable.

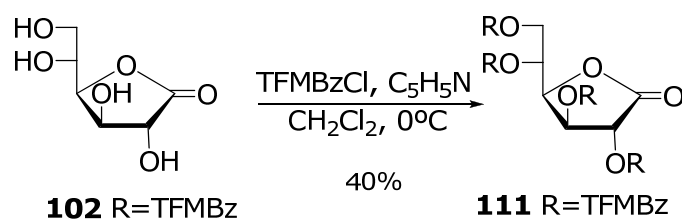
Anteriormente se había observado que la reacción de desoxigenación PET ocurría quimioselectivamente sobre HO- secundarios y terciarios. Esta selectividad se ejemplificó en el esquema 3-5.⁷ Para estudiar este aspecto de la reacción en derivados lactónicos, se prepararon los derivados dibenzoilados **100** y **110** (Esquema 3-16).



Esquema 3-16.

El derivado 2,6-disustituídos **100** se obtuvo por benzoilación¹⁹ selectiva de **102** con 2,2 equivalentes de cloruro de 3-trifluorometilbenzoílo. Por maceración del producto crudo de reacción con tolueno y sonicación se obtuvo el compuesto **100** en forma cristalina, con un rendimiento del 51% (Esquema 3-16). La estructura de **100** se confirmó por medio de espectroscopía de RMN ¹H y ¹³C. La señal del H-2 que resonaba a 4,52 ppm en la lactona **102**, sufrió un corrimiento hacia campos bajos (5,65 ppm) indicando la protección del HO-2 (Tabla 3-3). En el espectro de RMN ¹³C las señales de los C-2 y C-6 sufrieron un corrimiento a campos bajos como consecuencia de la derivatización de los HO correspondientes, mientras que las señales de C-3, C-4 y C-5 sufrieron el corrimiento inverso, a campos altos, como producto de la acilación de los HO-2 y HO-6, en concordancia con datos previamente descritos (Tabla 3-4).¹⁹

Por acetilación del compuesto **100** se obtuvo **110** como único producto (94%). El espectro de RMN ¹H de **110** mostró un corrimiento significativo a campos bajos de las señales correspondientes a los H-3, H-5 respecto del espectro de **100**, como producto de la acetilación de dichos hidroxilos (Tabla 3-3).



Esquema 3-17.

El derivado perbenzoilado de la D-glucono-1,4-lactona (**111**), se obtuvo por tratamiento de una solución de la lactona **102** en diclorometano anhidro y piridina anhidra con cloruro de 3-trifluorometilbenzoílo en exceso, a 0 °C durante 2 h (Esquema 3-17). Por purificación por cromatografía en columna se obtuvo el **111** como un sólido amorfo con 40% de rendimiento. El espectro de RMN ^1H se pudo asignar completamente y resultó ser similar al espectro del análogo per-*O*-acetilado, mostrando la señal correspondiente al H-3 como la señal más desprotegida, como se había observado previamente.²⁰ En las tablas 3-3 y 3-4 se muestran los desplazamientos correspondientes a las señales de los ^1H y ^{13}C correspondientes a los compuestos **100**, **102**, **110** y **111**.

Tabla 3-3. Señales de RMN ^1H de los compuestos **100**, **102**, **110** y **111**.

	H-2 ($J_{2,3}$)	H-3 ($J_{3,4}$)	H-4 ($J_{4,5}$)	H-5 ($J_{5,6}$)	H-6 ($J_{6,6'}$)	H-6' ($J_{5,6'}$)
100 ^a	5,65 (5,9)	4,89 (6,9)	4,79 (~6,2)	4,47 (3,7)	4,72 (12,1)	4,68 (6,1)
102 ^b	4,52 ^c -	4,53 ^c	4,63 (4,5)	4,04 (3,8)	3,76 (12,0)	3,73 (5,9)
110 ^a	5,52 (3,7)	5,84 (5,8)	5,17 (8,2)	5,60 (2,9)	4,87 (12,4)	4,47 (5,5)
111 ^a	5,96 (6,0)	6,26 (6,8)	5,49 (9,3)	5,97 (2,9)	5,06 (12,5)	4,66 (5,1)

^aCDCl₃, ^bD₂O, ^ccentro de multiplete complejo.

Tabla 3-4. Señales de RMN ^{13}C de los compuestos **100**, **102**, **110** y **111**.

	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6
100 ^a	169,2	76,1	73,1 ^b	78,1	70,3 ^b	66,3
102 ^a	177,7	73,3	73,8 ^b	80,5	71,1 ^b	63,1
110 ^a	169,1	72,7	70,8 ^b	76,4	67,6 ^b	63,2
111 ^a	170,6	72,4	71,8 ^b	74,6	69,0 ^b	63,2

^aCDCl₃, ^bintercambiables.

Desoxigenación PET de los derivados de D-glucono-1,4-lactona.

En esta etapa se disponían de los derivados benzoilados **106**, **107**, **109**, **100**, **110** y **111**, adecuados para estudiar la reacción de desoxigenación PET. De manera general, la reacción se llevó a cabo utilizando una lámpara de mercurio de media presión de 450 W, emplazada en un reactor de cuarzo de simetría cilíndrica de 500 ml de capacidad, provisto de una camisa refrigerante a través de la cual circulaba una corriente de agua que nos permitió mantener constante la temperatura durante los periodos de irradiación. Se prepararon soluciones con 1,50 mM de los sustrato en 2-propanol/agua 9:1 como solvente, con 9-metilcarbazol (0,15 mM) como fotosensibilizador y Mg(ClO₄)₂ (0,3 mM) para disminuir la reacción inversa de la transferencia electrónica.⁸ Estas mezclas se sonicaron durante 15 min ó hasta disolución total de los compuestos. Las soluciones resultantes se desgasificaron con argón durante 30 minutos previamente a la irradiación y se mantuvo la atmósfera inerte durante las irradiaciones de los compuestos.

Determinación de los tiempos óptimos de irradiación para la desoxigenación de los derivados **106** y **109**

Con el propósito de establecer las condiciones óptimas de esta metodología y maximizar los rendimientos se determinó el tiempo de irradiación adecuado para cada uno de los derivados. Cuando el derivado 2-

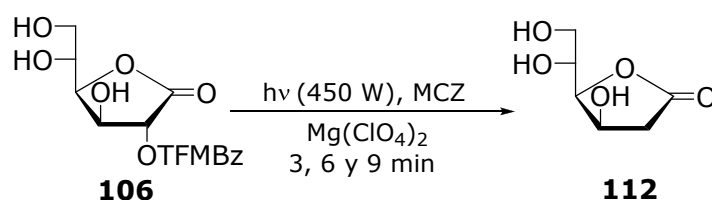
O-(3-trifluometil)benzoíl-D-galactono-1,4-lactona (**92**) se había irradiado con una lámpara de características similares pero de menor potencia (120 watts), se requirió 1h de irradiación para lograr la conversión total del material de partida al producto desoxigenado.

Tabla 3-5.

	Compuesto	Producto	Potencia (Watt)	t (min)	Conversión ^a (%)	Rendimiento ^b (%)
1	106	112	450	9	100	15
2	106	112	450	6	100	64
3	106	112	450	3	100	70
4	107	113	450	3	100	59
5	109	112	450	3	16	10
6	109	112	450	6	68	46
7	100	114	450	3	100	23
8	110	115	450	3	100	67
9	111	116	450	3	100	78

^aDeterminado por RMN ¹³C en base a la desaparición de la señal de C-4 del compuesto irradiado,
^bproducto aislado por cromatografía en columna.

Con este dato y como punto de partida se decidió irradiar el derivado **106** durante 9 minutos (Tabla 3-5, entrada 1), que era el máximo tiempo que el sistema de refrigeración nos permitía mantener la lámpara encendida (Esquema 3-18).



Esquema 3-18.

El monitoreo por ccd de la reacción era difícil debido a la dilución en que se efectuaba la reacción y a la aparición de productos de polimerización del solvente, que revelaban intensamente (en el análisis por ccd). Se decidió evaluar el grado de avance de la reacción por espectroscopía de RMN ¹³C del crudo de reacción concentrado. En el espectro de RMN ¹³C del producto de

irradiación de **106** durante 9 min, se observó la aparición de la señal correspondiente a la desoxigenación de C-2 a 39,5 ppm. Por partición de la mezcla de reacción en H₂O/CH₂Cl₂ y posterior purificación por cromatografía en columna de la fase acuosa se obtuvo **112** con 15 % de rendimiento. Como la conversión había sido total se decidió realizar una nueva irradiación pero durante menos tiempo a fin de reducir la descomposición de solvente y ver si así era posible detectar el producto por ccd. El análisis por ccd de la solución de **106**, irradiada durante 6 minutos, efectivamente permitió visualizar a **112** (Tabla 3-5, entrada 2). El espectro de RMN ¹³C permitió observar que nuevamente la conversión había sido completa, aunque la recuperación del producto luego de una extracción con H₂O/CH₂Cl₂ y posterior purificación por cromatografía en columna condujo solamente a un 60% de rendimiento. Se realizó la fotólisis de **106**, pero ahora durante 3 minutos. Bajo estas condiciones y disponiendo de un testigo del producto **112**, fue fácil la identificación del producto por ccd (R_f 0,32; EtOAc-MeOH 9:1). Cuando el crudo de reacción fue analizado por espectroscopía de RMN ¹³C, nuevamente se observó la desaparición total del material de partida y la aparición de la señal característica del C-2 desoxigenado a 38,5 ppm. Por purificación de la fase acuosa se obtuvo el compuesto **112** con 70% de rendimiento (Tabla 3-5, entrada 3). Las propiedades físico químicas de **112** coincidieron con los datos previamente descriptos.^{21,22} El análisis del espectro de RMN ¹³C de **112** mostró el corrimiento a campos altos del C-2, que pasó de resonar a 75,2 ppm en **106** a 39,5 ppm en **112**, como resultado de la desoxigenación. Otra de las señales fuertemente afectada fue la correspondiente a C-1, que sufrió un corrimiento a campos bajos, pasando de δ 170,7 en **106** a δ 180,1 en **112** (Figura 3-4). En el espectro RMN ¹H de **112** se observó la presencia de las señales que corresponden a los dos H-2 como dos doble dobles a δ 2,53 y δ 3,01 con una constante de acoplamiento geminal grande ($J_{gem} = 18,3$ Hz, Figura 3-5).

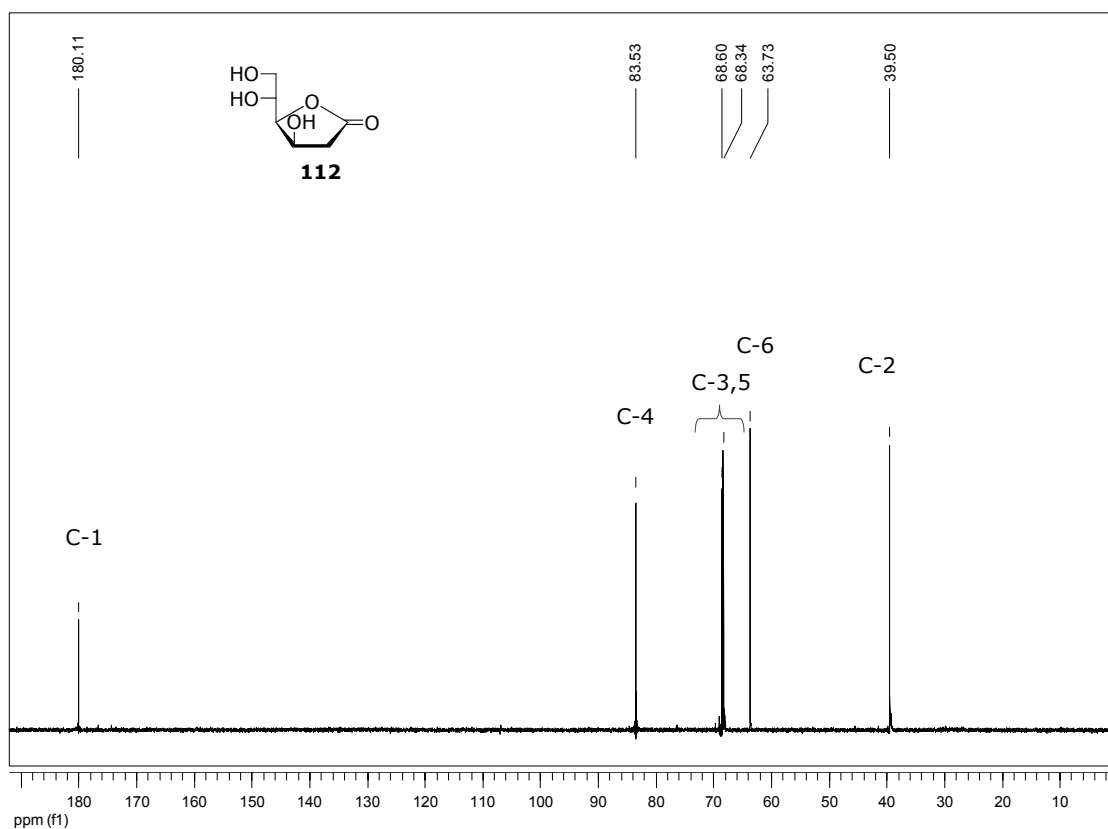


Figura 3-4. Espectro de RMN ^{13}C de **112** (D_2O , 50,3 MHz).

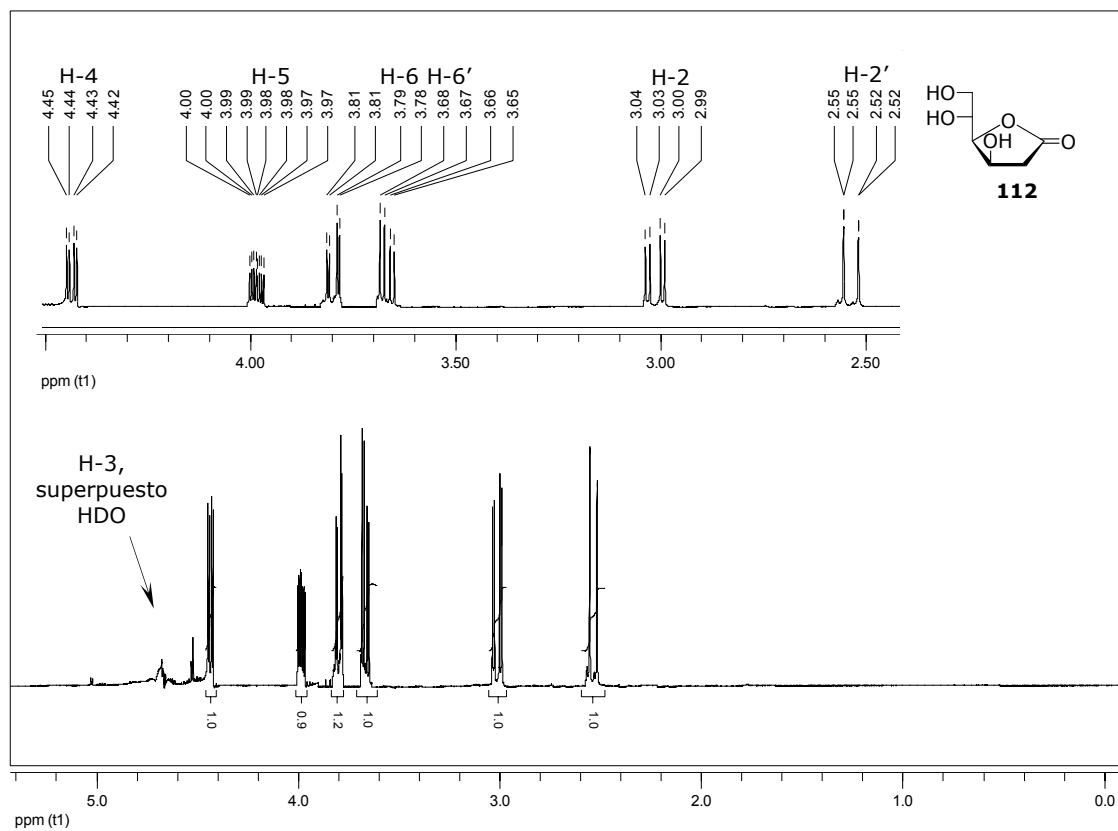
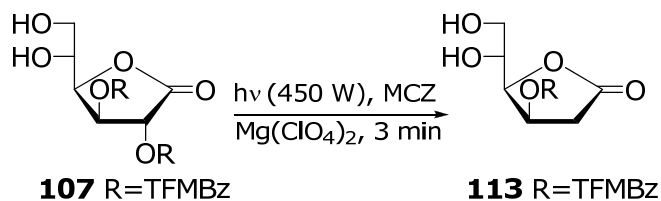
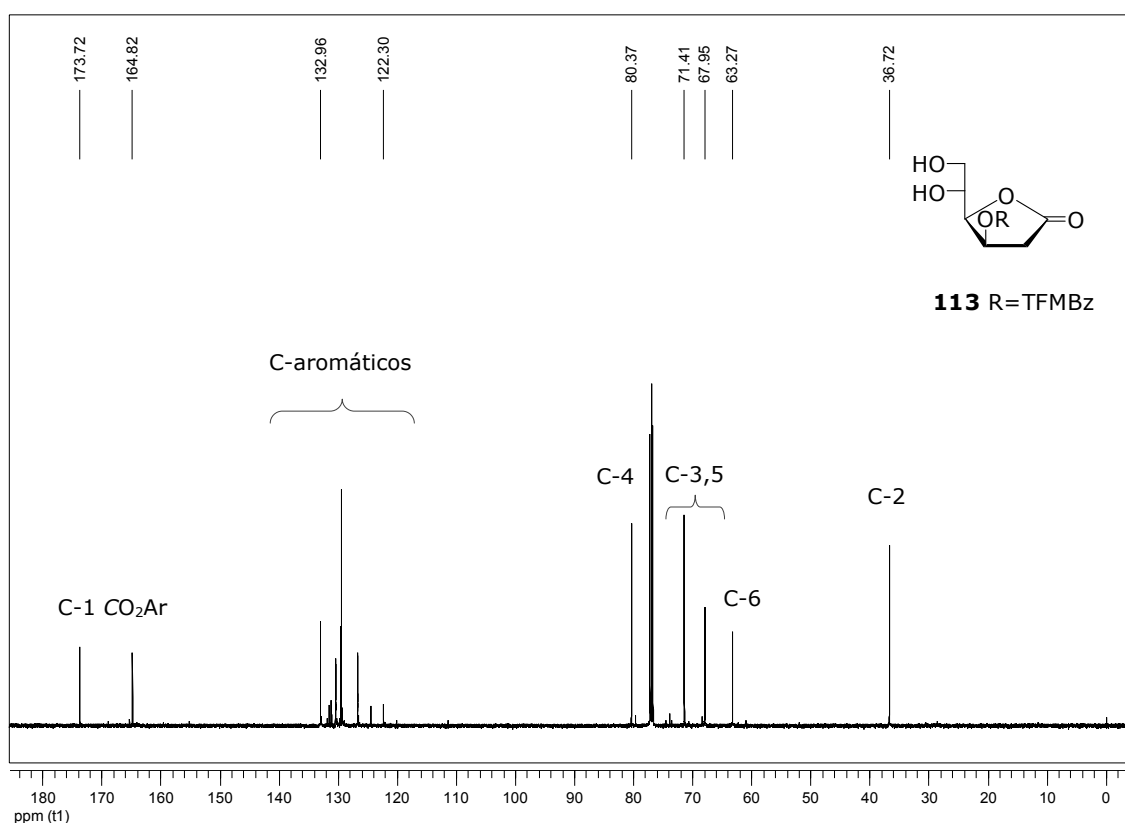


Figura 3-5. Espectro de RMN ^1H de **112** (D_2O , 500 MHz).



Esquema 3-19.

En base al tiempo óptimo de irradiación determinado para **106**, se efectuó la irradiación del derivado **107** durante 3 minutos (Tabla 3-5, entrada 4). El análisis por ccd de la reacción de fotólisis reveló la desaparición total del compuesto de partida y la aparición de un compuesto mayoritario de menor movilidad (R_f 0,23; tolueno-EtOAc 1:2). Por purificación por cromatografía en columna se obtuvo el compuesto **113** como un sólido amorfo con 59% de rendimiento.

Figura 3-6. Espectro de RMN ^{13}C del compuesto **113** (CDCl_3 , 125,8 MHz).

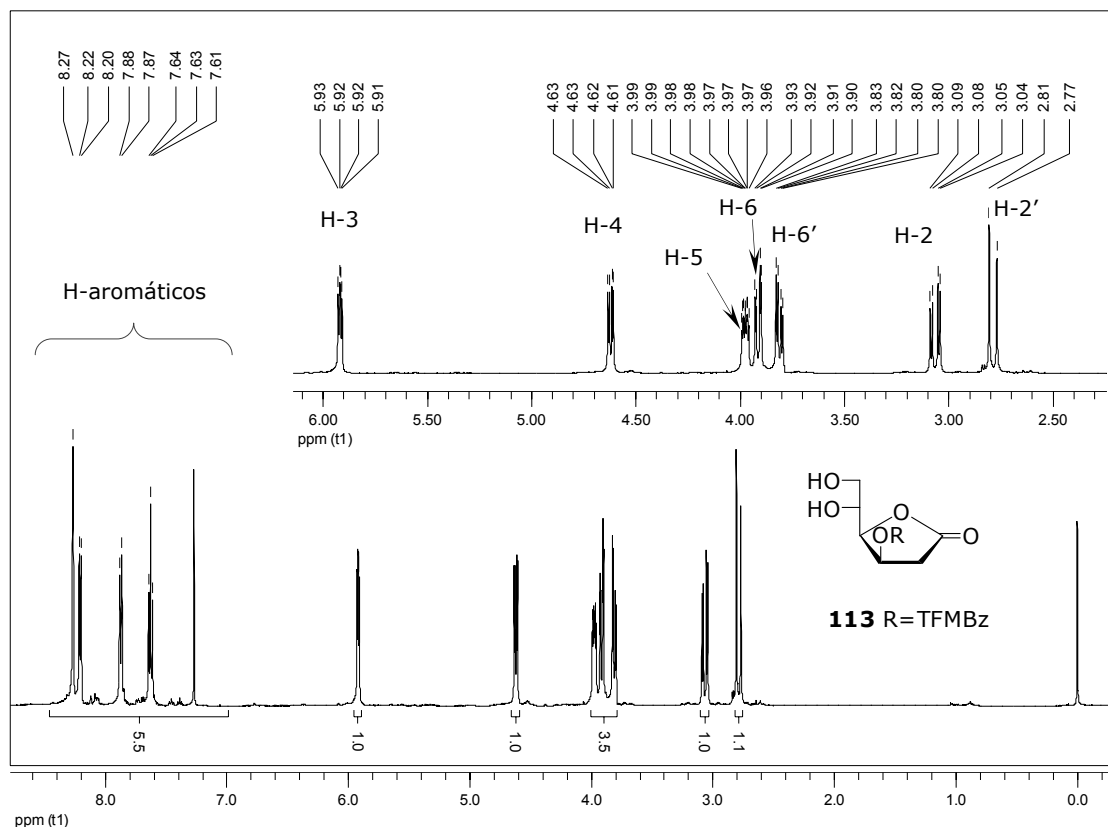
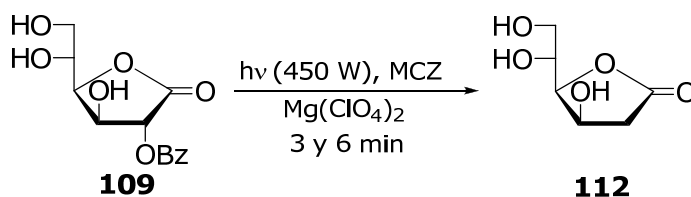


Figura 3-7. Espectro de RMN ¹H del compuesto **113** (CDCl₃, 500 MHz).

En el espectro de RMN ¹³C de **113** se observó una única señal correspondiente a C-desoxigenados a 36,8 ppm y que se asignó al C-2. La señal de C-1 se había desplazado de 168,1 ppm en el derivado oxigenado **107**, y a 173,8 ppm en el compuesto desoxigenado **113** (Figura 3-6). En el espectro de RMN ¹H se observó la presencia a campos altos solamente de un doblete y un doblete que se asignaron a H-2 y H-2', a 3.07 ppm y 2,79 ppm, con una constante de acoplamiento geminal grande ($J_{gem} = 18,3$ Hz, Figura 3-7). La presencia de una única señal de ¹³C desoxigenado y de los carbonos aromáticos, indicaba que sólo se desoxigenó el C-2, favorecido por la presencia del grupo carbonilo en la posición vecina, verificando que en estas condiciones es posible desoxigenar quimiosselectivamente el HO-secundario en posición- α al grupo carbonilo lactónico.

Uno de los objetivos que nos habíamos planteado era determinar la eficiencia del grupo benzoílo en la reacción de desoxigenación y evaluar si era posible hallar condiciones en la cuales funcionara eficientemente para así evitar el uso de su análogo trifluorometilado, más costoso. Para ello el

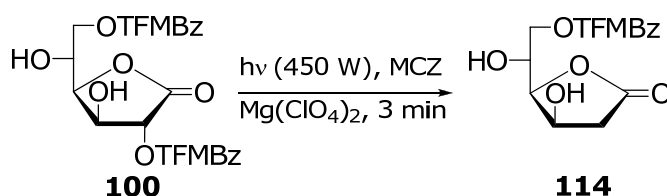
derivado **109** se irradió bajo las mismas condiciones y durante los tiempos establecidos para el análogo **106** (Esquema 3-20).



Esquema 3-20.

En el espectro RMN ^{13}C del crudo de la fotólisis durante 3 minutos de **109** se observaba la señal a 74,4 ppm correspondiente a C-2 oxigenado y la aparición de la señal correspondiente al C-2 desoxigenado a 39,5 ppm. La integración de estas señales nos indicaba un 16% de conversión. Si bien la integración de las señales de RMN ^{13}C no es estrictamente correcta, nos permitía comparar las diferencias que producían distintas condiciones de reacción, ya que los espectros de RMN ^1H de los crudos de reacción eran complejos. Por purificación de la mezcla de la reacción de fotólisis se pudo aislar el compuesto **112** con un 10% de rendimiento (Tabla 3-5, entrada 5). Una nueva irradiación durante 6 minutos produjo una conversión al compuesto **112** de 68%. Por partición de la mezcla de reacción en $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ y purificación por cromatografía en columna de la fase acuosa se obtuvo **112** con 46% de rendimiento (Tabla 3-5, entrada 6).

Cabe recordar que, Saito y colaboradores habían observado que los HO-secundarios se reducían quimiosselectivamente frente a los HO-primarios.⁷ La irradiación del derivado **100** nos permitiría verificar esta la selectividad en los derivados lactónicos (Esquema 3-21).



Esquema 3-21.

Basándonos en las condiciones anteriores, el derivado **100** se irradió durante 3 minutos. El análisis por ccd de la mezcla de reacción mostró la desaparición del material de partida (R_f 0,69) y la aparición de un producto

mayoritario de menor movilidad (R_f 0,23; tolueno-EtOAc 1:1). La desoxigenación de C-2 fue confirmada mediante el análisis del espectro de RMN ^{13}C del crudo de irradiación, que mostró la desaparición de la señal correspondiente al C-2 oxigenado a 76,1 ppm y la aparición de una única señal a 38,3 ppm, región donde resuenan los carbonos desoxigenados. Por partición de la mezcla de reacción en $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ y posterior purificación por cromatografía en columna de la fase acuosa, se obtuvo el compuesto **114** con 23 % de rendimiento. El análisis del espectro de RMN ^{13}C mostró la desoxigenación selectiva del HO secundario, ya que se observaba la desaparición de la señal correspondiente al C-2 en la región correspondiente a los carbonos oxigenados, mientras que la señal del C-6 resonaba en la zona de los C-primarios oxigenados (Figura 3-8). En el espectro de RMN ^1H se observó la aparición de un doble doblete y un doblete a campos altos correspondientes a los H-2 y H-2', respectivamente, con una constante de acoplamiento geminal grande ($J= 17,9$ Hz). Para los H-6 y H-6' se observó un singulete a δ 4,38, valor característico para un metileno oxigenado. También se observaban las señales correspondientes a los hidrógenos aromáticos del grupo 3-trifluorometilbenzoílo esterificando al HO-6 (Figura 3-9).

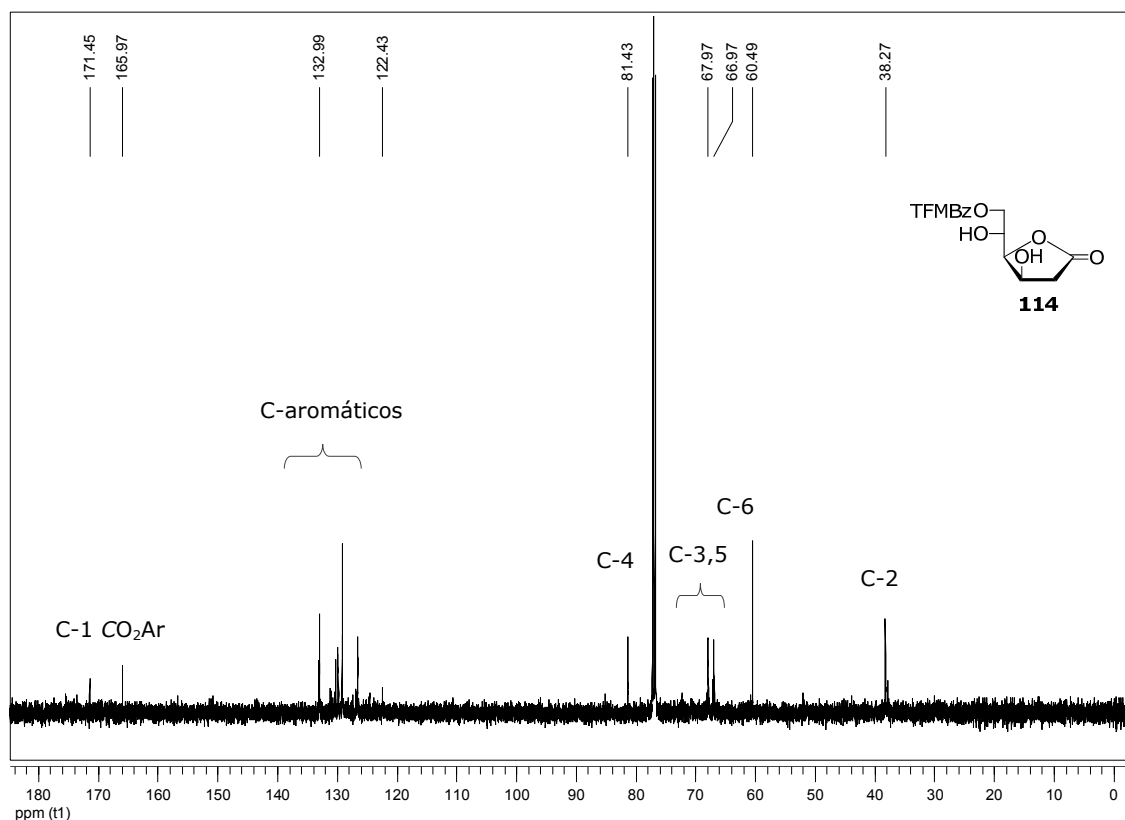


Figura 3-8. Espectro de RMN ^{13}C del compuesto **114** (CDCl_3 , 125,8 MHz).

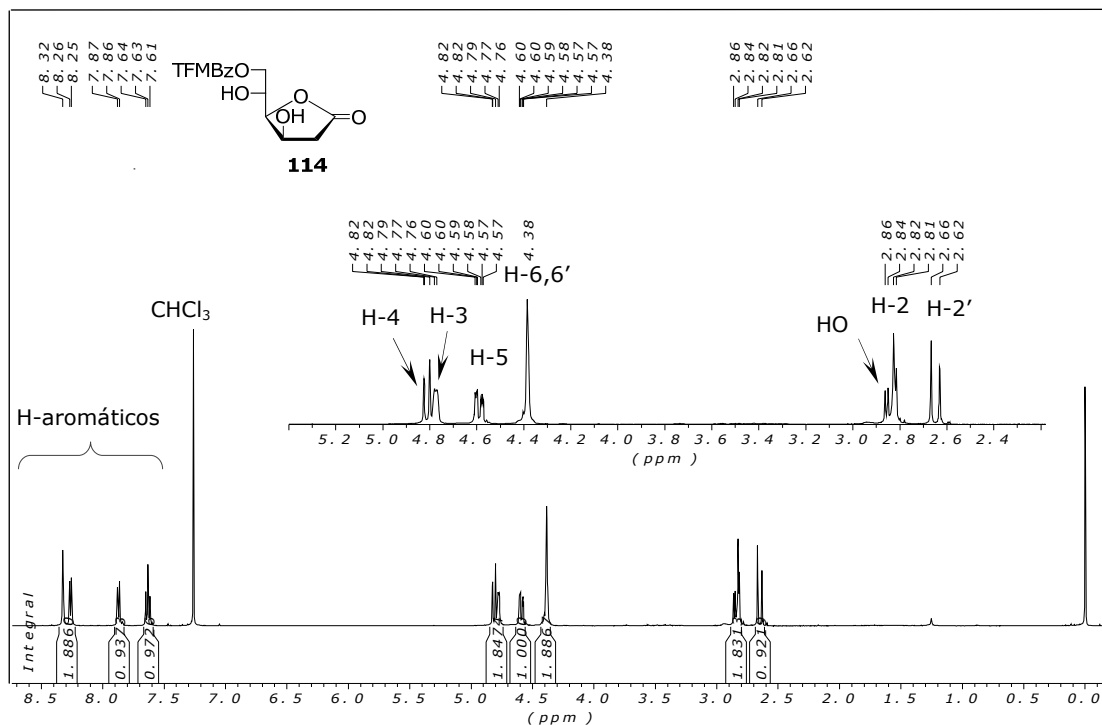
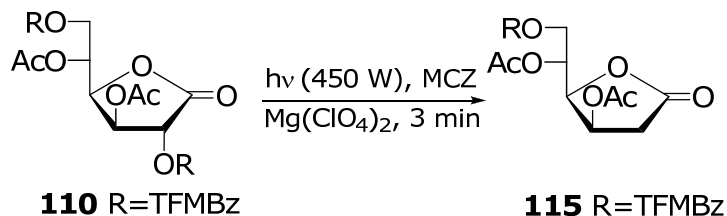


Figura 3-9. Espectro de RMN de ^1H del compuesto **114** (CDCl_3 , 500 MHz).

Si bien la conversión del compuesto **100** ocurría con 100% de eficiencia, solamente se logró aislar el compuesto desoxigenado **114** con 23%. Se pensó entonces que este bajo rendimiento podría deberse a que el producto desoxigenado fuera parcialmente soluble en la fase de CH_2Cl_2 . Esto se resolvería si se protegían los HO-3 y HO-5, por lo cual se sintetizó **110**, el cual se irradió durante 3 minutos (Esquema 3-22).



Esquema 3-22.

El análisis por ccd de la mezcla de reacción mostró la desaparición total del material de partida (R_f 0,45) y la aparición un producto mayoritario de

menor movilidad (R_f 0,33; hexano-EtOAc 5:2). También se confirmó la conversión por espectroscopía de RMN ^{13}C . El compuesto **115** se obtuvo por purificación por cromatografía en columna y recristalización en MeOH de las fracciones de R_f 0,33 (hexano-EtOAc 5:2), como un sólido cristalino con 67% de rendimiento. En el espectro de RMN ^{13}C se observaron, entre otras, la presencia del C-2 desoxigenado a 36,4 ppm, y las señales correspondientes a 4 carbonos carbonílicos: el más desprotegido correspondiente al C-1 lactónico, dos correspondientes a los acetatos y uno más protegido correspondiente al C=O del grupo 3-trifluorometilbenzoílo del HO-6 (Figura 3-10).

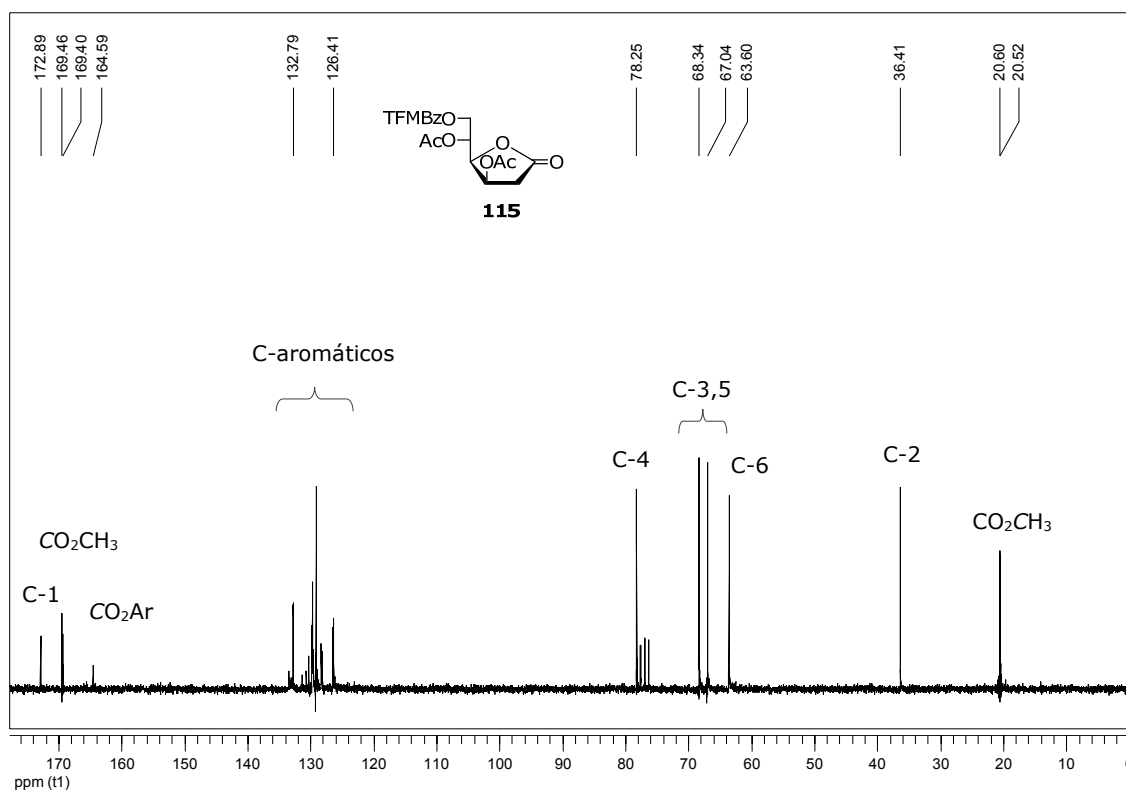


Figura 3-10. Espectro de RMN ^{13}C del compuesto **115** (CDCl_3 , 50,3 MHz).

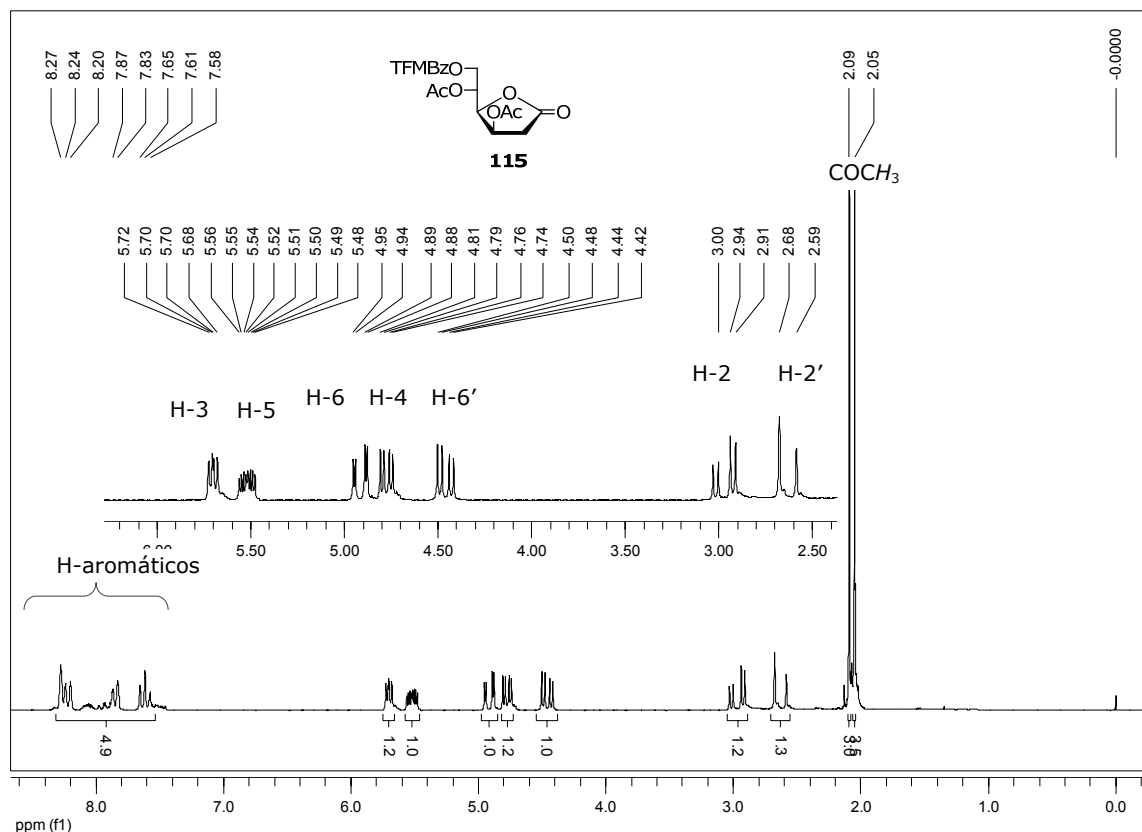
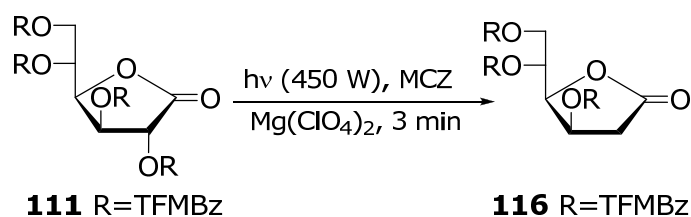


Figura 3-11. Espectro de RMN ^1H del compuesto **115** (CDCl_3 , 500 MHz).

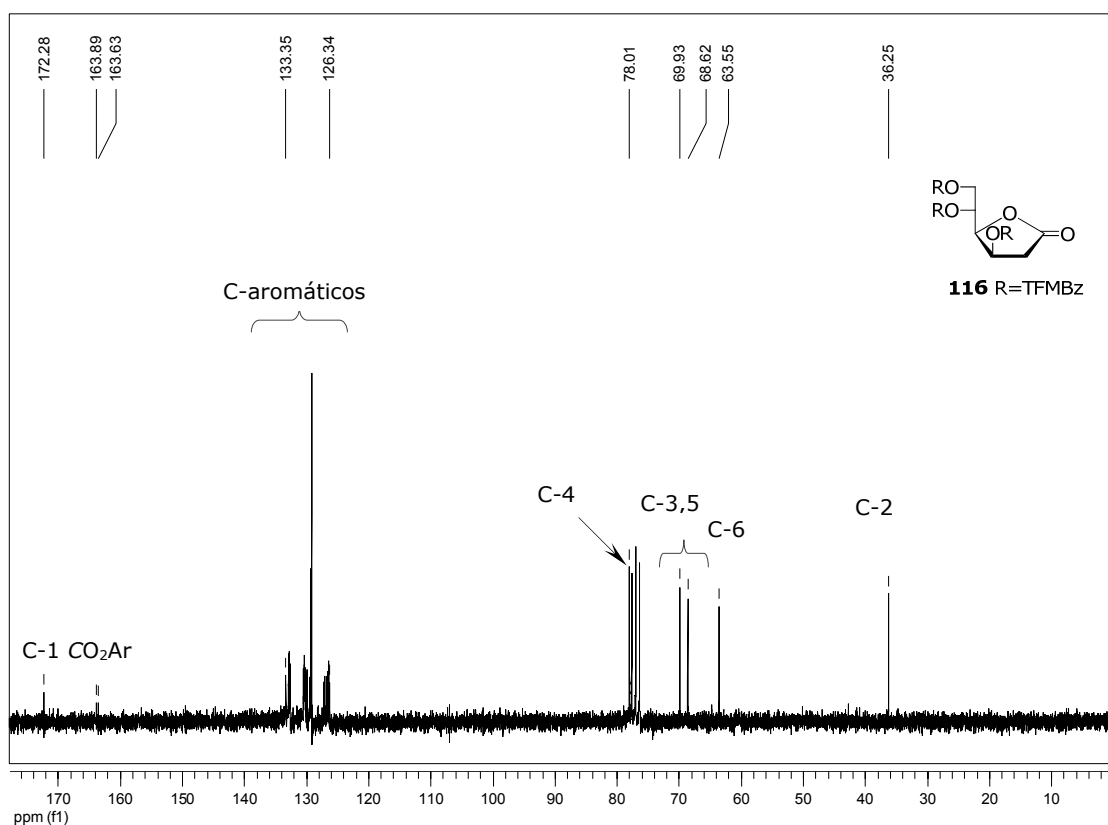
En el espectro de RMN ^1H de **115** se reconocieron las señales típicas de la desoxigenación de C-2, un doble doblete a 2,94 ppm y un doblete a 2,60 ppm con una constante de acoplamiento geminal grande ($J = 18,3$ Hz). Se observaron además, las señales correspondientes a los ^1H aromáticos a campos bajos y ^1H de los acetatos a campos altos, lo que nos permitió confirmar que no hubo hidrólisis de los grupos protectores durante la irradiación (Figura 3-11).

Por último, se realizó la irradiación durante 3 minutos del derivado **111**. El análisis por ccd de la mezcla de irradiación mostró la desaparición total del material de partida (R_f 0,59; tolueno-EtOAc 9:1) y la aparición de un producto mayoritario de menor movilidad (R_f 0,36; Esquema 3-23). El análisis del espectro de RMN ^{13}C del crudo de irradiación mostró un 100% de conversión, ya que se observó la desaparición de la señal correspondiente al C-2 oxigenado y la aparición de una única señal a δ 36,2. Por purificación por cromatografía en columna, combinación de las fracciones de R_f 0,36 y evaporación del solvente se obtuvo **116** amorfo, con 78% de rendimiento.



Esquema 3-23.

En el espectro de RMN ^{13}C de **116**, se observó la presencia de una única señal correspondiente a C-desoxigenado a 36,2 ppm (Figura 3-12). El espectro de RMN ^1H mostró la presencia de dos dobles dobletes a campos altos correspondientes a los H-2 y H-2' (Figura 3-13).

Figura 3-12. Espectro de RMN ^{13}C del compuesto **116** (CDCl_3 , 125,8 MHz).

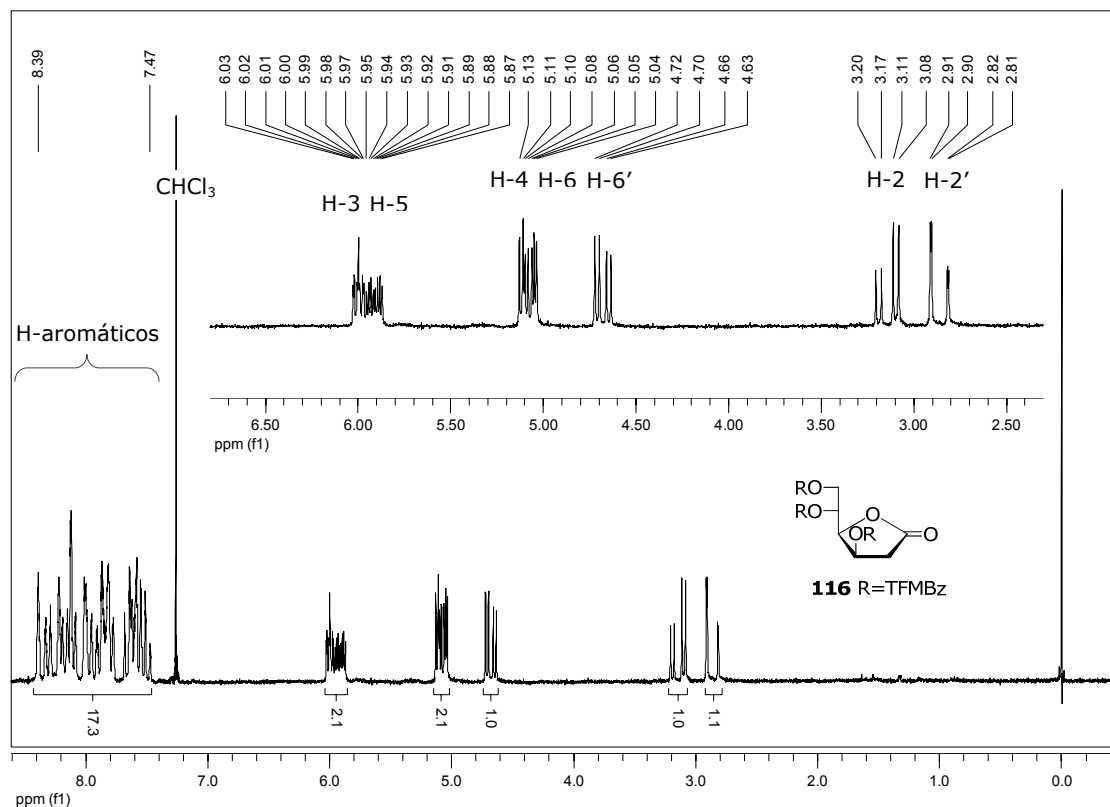


Figura 3-13. Espectro de RMN ^1H del compuesto **116** (CDCl_3 , 500 MHz).

Conclusiones

En esta primera parte del trabajo de Tesis se sintetizaron los derivados **106**, **107**, **109-111** de manera simple y con rendimientos aceptables. Disponer de estos derivados nos permitió determinar las condiciones adecuadas para la desoxigenación PET de derivados de aldonolactonas. Se demostró que la presencia del grupo carbonilo facilita la desoxigenación del éster en posición α , probablemente como consecuencia de la estabilización por conjugación del radical intermediario. Esta estabilización permite reducir notablemente los tiempos de irradiación (de 3 a 6 minutos vs. 10-18 h).

Otra evidencia de esta estabilización, es la reducción selectiva del HO-2 frente al HO-3, ambos secundarios, en el intermediario **107** (Esquema 3-19), y la posibilidad de utilizar el fotosensibilizador en concentración 10% mol en lugar de condiciones equimoleculares, ya que se produce el "turn-over" del mismo.⁷ Además, se observó quimioselectividad entre HO-primarios y secundarios, en el derivado **110** (Esquema 3-22). La presencia de los grupos acetatos en el derivado **110**, no trajo ningún inconveniente al realizar la

desoxigenación de C-2, sin embargo, facilitó notablemente la recuperación y purificación del producto desoxigenado (Esquema 3-30)

1. Portella, C.; Deshayes, H.; Pete, J. P.; Scholler, D. *Tetrahedron* **1984**, *40*, 3635-3644.
2. Portella, C.; Pete, J. P. *Tetrahedron Lett.* **1985**, *26*, 211-214.
3. Pete, J.-P.; Portella, C.; Monneret, C.; Florent, J.-C.; Khuong-Huu, Q. *Synthesis* **1977**, 774-776.
4. Pete, J. P.; Portella, C.; Scholler, D. *J. Photochem.* **1984**, *27*, 128-129.
5. Kavarnos, G. J.; Turro, N. J. *Chem. Rev.* **1986**, *86*, 401-449.
6. Cossy, J. In *Radicals in Organic Synthesis*; Philippe-Renaud;; Sibi, M. P. Eds.; Wiley-VCH: Weinheim, 2001; pp. 229-243.
7. Saito, I.; Ikehira, H.; Kasatani, R.; Watanabe, M.; Matsuura, T. *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 3115-3117.
8. Mizuno, K.; Ichinose, N.; Otsuji, Y. *Chem. Lett.* **1984**, *14* 455-458.
9. Park, M.; Rizzo, C. J. *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 6092-6093.
10. Prudhomme, D. R.; Wang, Z.; Rizzo, C. J. *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 8257-8260.
11. Wang, Z.; Rizzo, C. J. *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 8177-8180.
12. Wang, Z.; Prudhomme, D. R.; Buck, J. R.; Park, M.; Rizzo, C. J. *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 5969-5985.
13. Riedel, S.; Donnerstag, A.; Hennig, L.; Welzel, P.; Richter, J.; Hobert, K.; Müller, D.; van Heijenoort, J. *Tetrahedron* **1999**, *55*, 1921-1936.
14. Fleet, G. W. J.; Son, J. C. *Tetrahedron* **1988**, *44*, 2637-2647.
15. Chioconni, A.; Marino, C.; Otal, E.; Lederkremer, R. M. *Carbohydr. Res.* **2002**, *337*, 2119-2126.
16. Lin, F. L.; van Halbeek, H.; Bertozzi, C. R. *Carbohydr. Res.* **2007**, *342*, 2014-2030.
17. Lederkremer, R. M.; Varela, O. In *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **1994**, *50*, 125-209.
18. Chittenden, G. J. F. *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas* **1998**, *107*, 455-458.

19. Marino, C.; Varela, O.; Lederkremer, R. M. *Carbohydr. Res.* **1989**, *190*, 65-76.
20. Nelson, C. R. *Carbohydr. Res.* **1982**, *106*, 155-159.
21. Kawakishi, S.; Namiki, M. *Carbohydr. Res.* **1973**, *26*, 252-254.
22. Barrett, A. G. M.; Barton, D. H. R.; Bielski, R. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1.* **1979**, 2378 - 2381.

CAPÍTULO 4

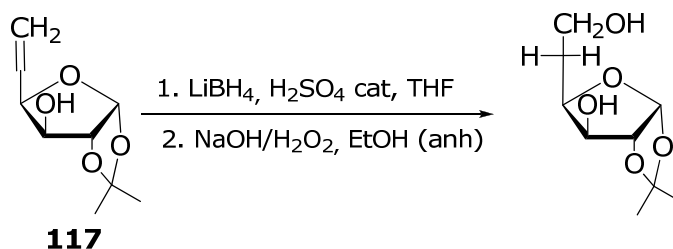
Síntesis de 5-desoxiglicofuranósidos

Introducción

Para completar la caracterización de la *exo* β -D-galactofuranosidasa de *Penicillium fellutanum* en cuanto a los HO del azúcar, era interesante disponer de derivados de 5-desoxi-D-Galf, para lo cual se plantearon dos alternativas. Por un lado, una estrategia involucrando una reacción de desoxigenación por vía química, y por otro lado se planeó extender la metodología de desoxigenación PET a la obtención de 5-desoxiglicósidos.

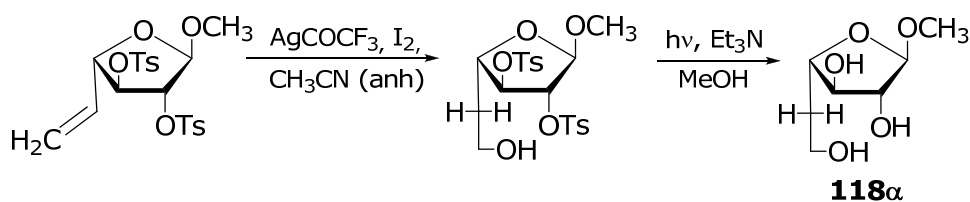
Una estrategia química para la síntesis de 5-desoxi-D-galactofuranósidos

La primera síntesis de 5-desoxiglicofuranósidos fue desarrollada por Wolfrom¹ y colaboradores, e involucraba la hidratación anti-Markonicov del derivado insaturado en C-5 y 6 (**117**, Esquema 4-1).



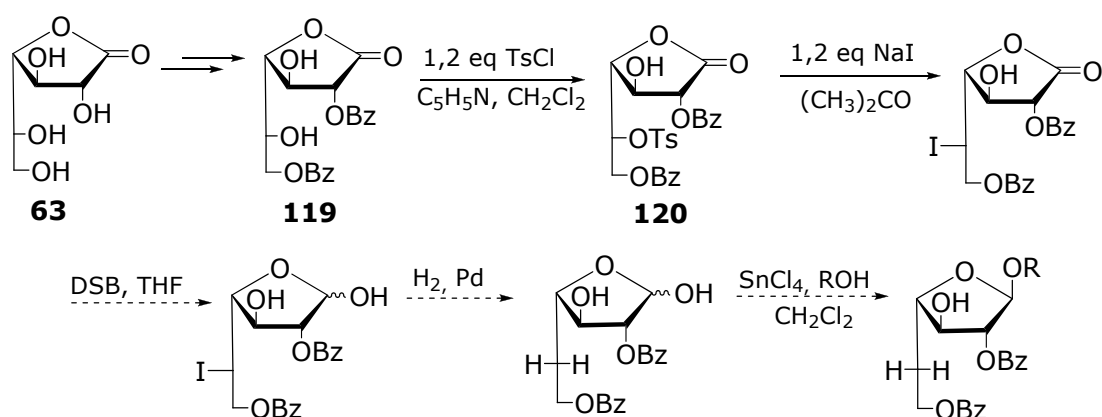
Esquema 4-1. Síntesis de 5-desoxi-1,2-*O*-isopropilidén- α -D-xilo-hexofuranosa.

Esta metodología fue utilizada por distintos autores², y entre otros Szarek y col. utilizaron una variante para sintetizar por primera vez el metil 5-desoxi- α -L-arabino-hexofuranósido (**118 α** , Esquema 4-2).³



Esquema 4-2. Síntesis de 5-desoxi- α -L-arabino-hexofuranósido (**118 α**).

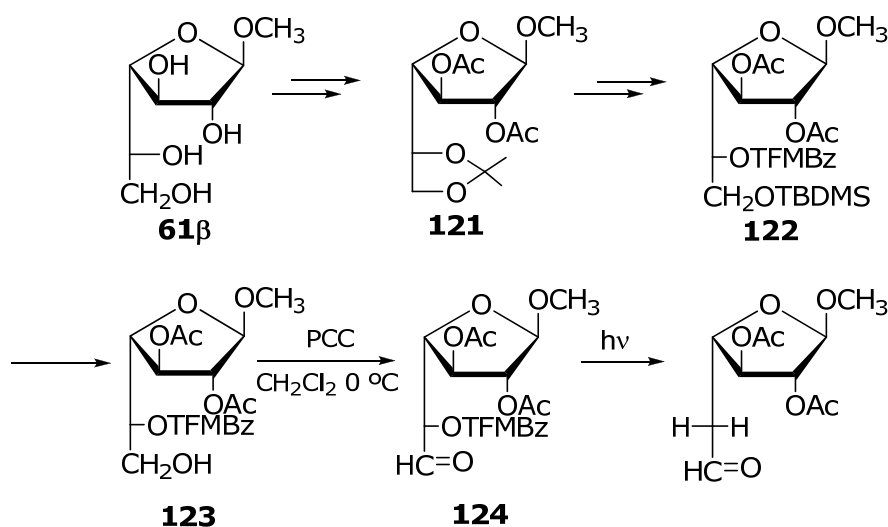
La estrategia que inicialmente nos propusimos en nuestro laboratorio para la síntesis química de 5-desoxi-galactofuranósidos implicaba el uso de D-galactono-1,4-lactona (**63**), como precursor del anillo furanósico, la introducción selectiva de un sustituyente en el HO-2, que dirigiera por participación anquimérica las reacciones de glicosidación posteriores hacia la formación de glicósidos de configuración 1,2-*trans*, y un grupo en C-5 susceptible de ser reducido. Se planeó entonces la síntesis del derivado tosilado en C-5 **120** (Esquema 4-3). Para ello, se trató a **119**^{4,5} con 1,2



Esquema 4-3. Estrategia química planteada para la síntesis 5-desoxi-D-galactofuranósidos.

equivalentes de cloruro de tosilo en condiciones similares a otras acilaciones parciales. Sin embargo, la reacción no prosperaba y el derivado **120** se aisló con solo 10% de rendimiento. El aumento de la cantidad de agente acilante conducía al derivado per-O-sustituído. Paralelamente, se avanzaba con menos dificultades con la estrategia optativa involucrando la desoxigenación fotoquímica, por lo cual se abandonó esta ruta.

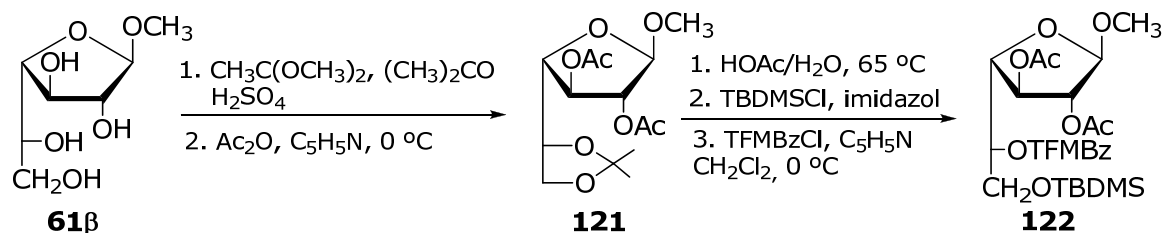
En base a los resultados obtenidos utilizando la reacción de desoxigenación PET para la α -desoxigenación de aldonolactonas, pensamos extender esta reacción a la obtención de 5-desoxigalactofuranósidos. Para ello se requeriría un derivado con un grupo carbonilo en C-6. Así, se planificó la síntesis de **124** mediante la secuencia de reacciones detallada en el esquema 4-4. En el laboratorio teníamos experiencia en la reacción de oxidación de C-6 y posterior reducción, estrategia que se había utilizado para la síntesis de un derivado marcado con ³H en C-6.⁶



Esquema 4-4.

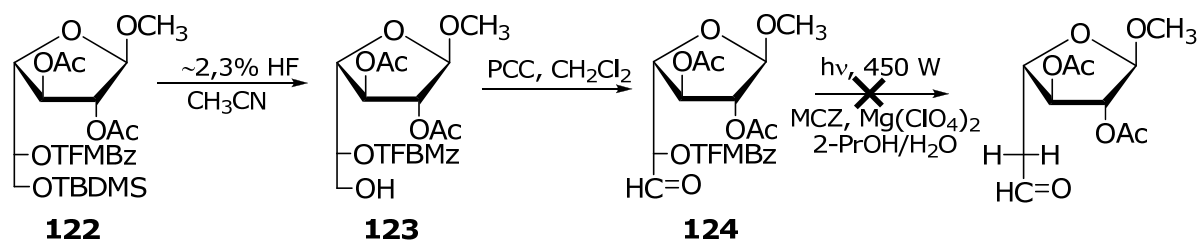
Síntesis del aldehído **124**, sustrato de la reacción PET.

Por isopropilidación del metil β -D-galactofuranósido (**61 β**) y posterior acetilación se obtuvo el acetónido **121**. Luego de la remoción del grupo isopropilidén, y para diferenciar el HO-6 del HO-5, se introdujo el grupo voluminoso TBDMS en el HO-primario por tratamiento con 1,2 equivalentes de cloruro de *t*-butil-di-metilsililo en DMF (Esquema 4-5).



Esquema 4-5.

El producto crudo de reacción se trató con 1,5 equivalentes de cloruro de 3-trifluorometilbenzoílo en una solución de CH_2Cl_2 y piridina, obteniéndose el compuesto **122**. Por desprotección selectiva del HO-6 con HF en acetonitrilo se obtuvo el derivado **123**, que por oxidación con PCC condujo a **124** (Esquema 4-6).



Esquema 4-6.

Sin embargo, al irradiar al compuesto **124** en las condiciones previamente establecidas para la desoxigenación de aldonolactonas (3 minutos, 450 W, MCZ, $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$), se observó que la reacción PET ocurría en forma parcial. En el espectro de RMN ^{13}C del crudo de reacción concentrado se observaba la presencia de una señal a campos altos compatible con un C-5 desoxigenado y las señales correspondientes al compuesto de partida. La irradiación de **124** durante 8 minutos, nuevamente mostró señales del material de partida y del compuesto desoxigenado. Esto podría deberse a que en las condiciones de reacción (2-PrOH/ H_2O 9:1) **124** se encuentra en gran proporción en equilibrio con el hidrato correspondiente, ó a que el aldehído no produce la estabilización del radical intermediario y por lo tanto no asiste a la desoxigenación.

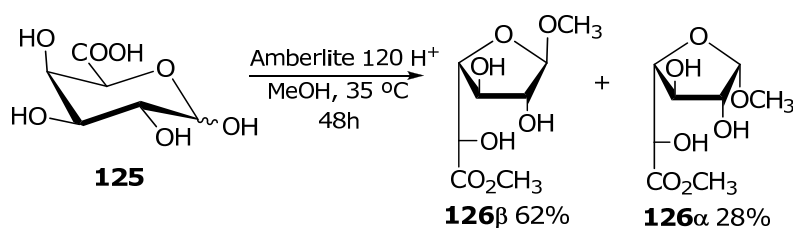
En búsqueda de otra alternativa, consideramos la posibilidad de utilizar ácido D-galacturónico (**125**) comercial como precursor de los 5-desoxi-D-galactofuranósidos. La utilización de **125** nos permitiría partir de un compuesto con la posición 6 previamente oxidada.

Síntesis de derivados furanósicos de ácido D-galacturónico.

Con el fin de preparar derivados de **125** apropiados para la reacción de desoxigenación PET, la primera transformación que se planteó fue la esterificación del grupo carboxilo para luego buscar condiciones que permitieran obtener un derivado furanósico protegido. Se había descrito que por tratamiento de **125** con MeOH/HCl a reflujo se obtenía una mezcla compleja de las formas α, β -piranósicas.⁷ Sin embargo, cuando se trataba **125** con metanol en presencia de una resina de intercambio catiónica (forma H^+)

a reflujo, se aislaba el metil α -galactopiranosiduronato de metilo, y si la reacción se llevaba a cabo durante 8 h a temperatura ambiente, se obtenía el D-galacturonato de metilo.⁸

En nuestro caso, encontramos que por tratamiento de **125** con metanol en presencia de resina Amberlite IR-120 (H^+) a 35 °C, a tiempos cortos de reacción se observaba la formación del D-galactopiranosiluronato de metilo. Luego de 48 h, el análisis por espectroscopía de RMN ^{13}C del crudo de reacción mostró la presencia únicamente de dos señales anoméricas a δ 108,9 ppm y 102,6 ppm, que indicaban la presencia de formas furanósicas. Todas las señales avalaban la formación de **126** como una mezcla de anómeros en relación β/α 7:3, y no se observaron señales correspondientes a las formas piranósicas.

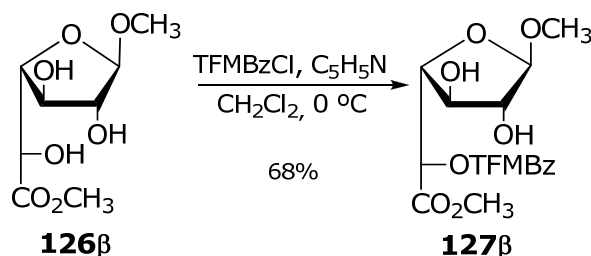


Esquema 4-7.

Una vez establecidas las condiciones para la obtención de **126**, la reacción se hizo a escala de multigramo, y por purificación por cromatografía en columna se obtuvo **126 β** (62%) como un sólido amorfo, con iguales características físico químicas que las descritas previamente.⁷ El compuesto **126 α** , recristalizado de hexano-EtOAc se obtuvo con 28% de rendimiento, y también presentó las mismas propiedades físico químicas que el producto descrito en la literatura.⁷

Por analogía con la síntesis de **104** (Capítulo 3), pensamos que el HO-5 exocíclico, y en posición α al carbonilo del éster metílico, estaría activado para la acilación selectiva. A tal fin, se trató a **126 β** con 1,2 equivalentes de cloruro de 3-trifluorometilbenzoílo en una mezcla de CH_2Cl_2 y piridina a baja temperatura. El análisis por ccd de la mezcla de reacción mostró la aparición de un producto mayoritario de R_f 0,63 (tolueno-EtOAc, 9:1) y la presencia de una pequeña cantidad del material de partida. Luego de la purificación por

cromatografía en columna, se obtuvo **127 β** como un sólido amorfo con un 68% de rendimiento (Esquema 4-8).



Esquema 4-8.

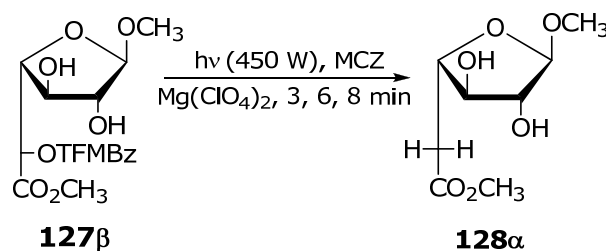
El análisis del espectro de RMN ^{13}C de **127 β** mostró el corrimiento correspondiente al C-5 de 70,0 ppm a 72,3 ppm como consecuencia de la acilación, mientras que las señales correspondientes a C-4 y C-6 se protegieron respecto a las mismas señales de **126 β** . El análisis del espectro de RMN ^1H mostró un corrimiento hacia campos bajos de la señal de H-5, pasando de resonar a δ 4,50⁷ para **126 β** , a 5,53 ppm para **127 β** . Una vez sintetizado **127 β** , disponíamos de un sustrato adecuado para estudiar las condiciones de la reacción de desoxigenación PET.

Determinación de los tiempos de irradiación adecuados para la desoxigenación de **127 β** .

En esta etapa del trabajo de tesis, ya habíamos adquirido experiencia en la desoxigenación PET de aldonolactonas utilizando una lámpara de 450 W. Basándonos en los datos anteriores decidimos como punto de partida irradiar el compuesto **127 β** en las mismas condiciones que habíamos logrado la desoxigenación de **106**, ésto es 450 W, 3 minutos de irradiación, en presencia de 0,15 mM de MCZ y 0,3 mM de $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$ (Tabla 4-1, entrada 1). El monitoreo por ccd de la reacción mostró que aún había material de partida (R_f 0,72; tolueno EtOAc 1:9) y la aparición de un producto de R_f 0,47. El análisis por espectroscopía de RMN ^{13}C del crudo de reacción mostró la presencia de una señal característica de un C-secundario desoxigenado a 37,4 ppm. Sin embargo, se observó también la presencia de las señales correspondientes al compuesto **127 β** . La integración de las señales

correspondientes a los carbonos anoméricos nos indicó que hubo un 60% de conversión al compuesto **128 α** (R_f 0,47; tolueno-EtOAc 1:9), aunque la recuperación del producto, luego de una extracción con H_2O/CH_2Cl_2 y posterior purificación por cromatografía en columna, condujo a un 42% de rendimiento (Tabla 4-1, entrada 1).

Tabla 4-1.



	Compuesto	Producto	Potencia (Watt)	t (min)	Conversión ^a (%)	Rendimiento ^b (%)
1	127β	128α	450	3	60	42
2	127β	128α	450	6	90	66
3	127β	128α	450	8	100	25

^adeterminada por espectroscopía de RMN ^{13}C en base a la integración de la señal de C-2 del compuesto irradiado, ^brefiere al producto aislado.

Como la conversión no había sido completa se realizó una irradiación de **127 β** durante 6 minutos. El monitoreo de la reacción por ccd mostró la presencia de **127 β** residual, **128 α** como producto mayoritario y un tercer compuesto de menor polaridad (0,24; tolueno-EtOAc 1:9). El espectro de RMN ^{13}C del crudo de reacción concentrado permitió confirmar que la conversión había sido del 90% (Tabla 4-1, entrada 2). Además, se pudo observar en la región de los C-anoméricos la presencia de 3 señales. Por purificación por cromatografía en columna de la fase acuosa de la fotólisis de **127 β** durante 6 minutos, se obtuvo **128 α** como un sólido amorfo con 66% de rendimiento. Se realizó una nueva irradiación durante 8 minutos para ver si lográbamos obtener el 100% de conversión. El análisis por ccd mostró entonces la desaparición total del material de partida. En el espectro de RMN ^{13}C del crudo de reacción se observó la desaparición de la señal del C-5 de **127 β** y la presencia de una única señal en la región de los C-desoxigenados (37,4 ppm). Sin embargo, se observó nuevamente la presencia de una señal

de baja intensidad en la región de los metilenos oxigenados (70,0 ppm), que correspondió al C-5 del producto de hidrólisis fotoquímica del grupo 3-trifluorometilbenzoílo de **127 β** y que se correspondía con el producto de R_f 0,24 (tolueno-EtOAc 9:1). Si bien la conversión de **127 β** había sido del 100% la recuperación de **128 α** fue solamente del 25%.

Tabla 4-2. Señales de RMN ¹³C de los compuestos **118 α** , **126-128 α** .

	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	OCH ₃	COCH ₃
126β^a	109,0	84,1 ^c	76,3	81,0 ^c	70,0	174,2	55,6	53,5
126α^a	102,6	76,5	73,8	82,3	70,9	174,3	56,1	53,4
127β^b	108,6	81,2	77,7	83,1	72,3	168,1	55,2	53,0
128α^a	109,1	80,5	80,2	81,4	38,6	174,3	55,4	53,2
118α^a	108,7	81,6 ^c	81,3 ^c	80,8	35,8	59,0	55,4	-

^a D₂O, ^b CDCl₃, ^cintercambiable.

Tabla 4-3. Señales de RMN ¹H de los compuestos **118 α** , **126-128 α** .

	H-1 (J _{1,2})	H-2 (J _{2,3})	H-3 (J _{3,4})	H-4 (J _{4,5})	H-5 (J _{5,4})	H-5' (J _{5',6})	H-6 (J _{6,5})	H-6' (J _{6',6})	OCH ₃ (J _{5,5'})	COCH ₃
126β^a	4,89 (1,9)	4,03 (3,9)	4,18 (6,5)	4,29 -	4,50 (2,7)	- -	-	-	3,38	3,81
126α^a	4,85 (4,8)	4,14 (8,4)	4,18 (7,5)	4,12 -	4,41 (3,8)	-	-	-	3,41 -	3,80
127β^b	4,92 -	4,11 ^c	4,11 ^c (4,5)	4,48 ^d -	5,53 (4,2)	-	-	-	3,36	3,79
128α^a	4,89 (0,5) ^e	4,04 (3,3)	3,89 (5,3)	4,30 (8,7)	2,86 (4,4)	2,72	-	-	3,36 (16,0)	3,73
118α^a	4,89	4,03 ^c	4,03 ^c	3,89	1,96	1,87	3,75	3,71	3,39	-

^a D₂O, ^b CDCl₃, ^ccentro de multiplete complejo, ^daparente triplete, ^econstante a 4 enlaces.

El análisis del espectro de RMN ¹³C de **128 α** mostró el corrimiento de la señal de C-5 a campos altos, que pasó de 72,3 ppm en **127 β** a 38,6 ppm en

128 α , como consecuencia de la desoxigenación. Otra de las señales que se vió fuertemente afectada fue la correspondiente a C-6, que sufrió un corrimiento a campos bajos respecto **127 β** (Tabla 4-2, Figura 4-1). Este mismo efecto se había observado para C-1 en la desoxigenación de las aldonolactonas (Capítulo 3).

En el espectro de RMN ^1H de **128 α** se observaron señales complejas como consecuencia de constantes de acoplamiento a larga distancia. La señal del H-3 se observó como un ddd, presentando dos 3J , y una constante pequeña a cuatro enlaces con H-1 ($^4J = 0,4$ Hz). Se observó la presencia de las señales correspondientes a los dos H-5 como dos dobles dobletes a δ 2,86 y 2,72 con una constante de acoplamiento geminal grande ($J_{gem} = 16,0$ Hz, Figura 4-2).^{9,10}

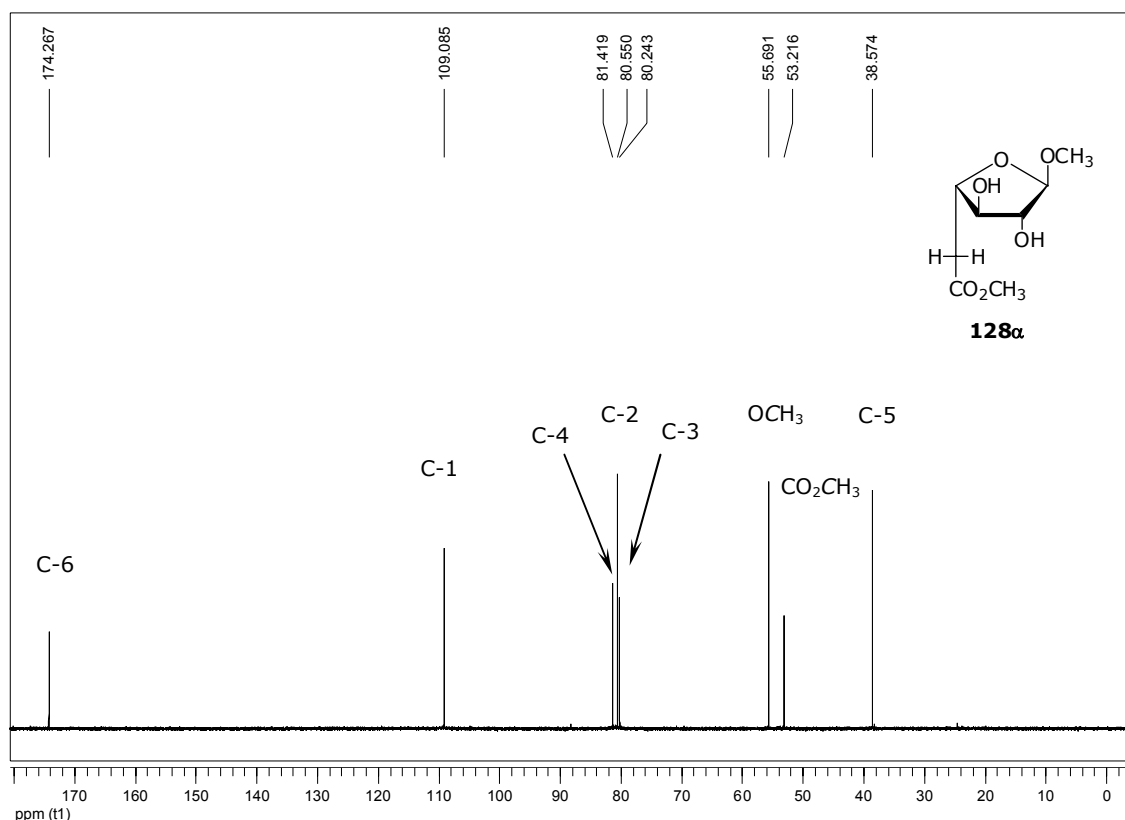


Figura 4-1. Espectro de RMN ^{13}C del compuesto **128 α** (D_2O , 125,8 MHz).

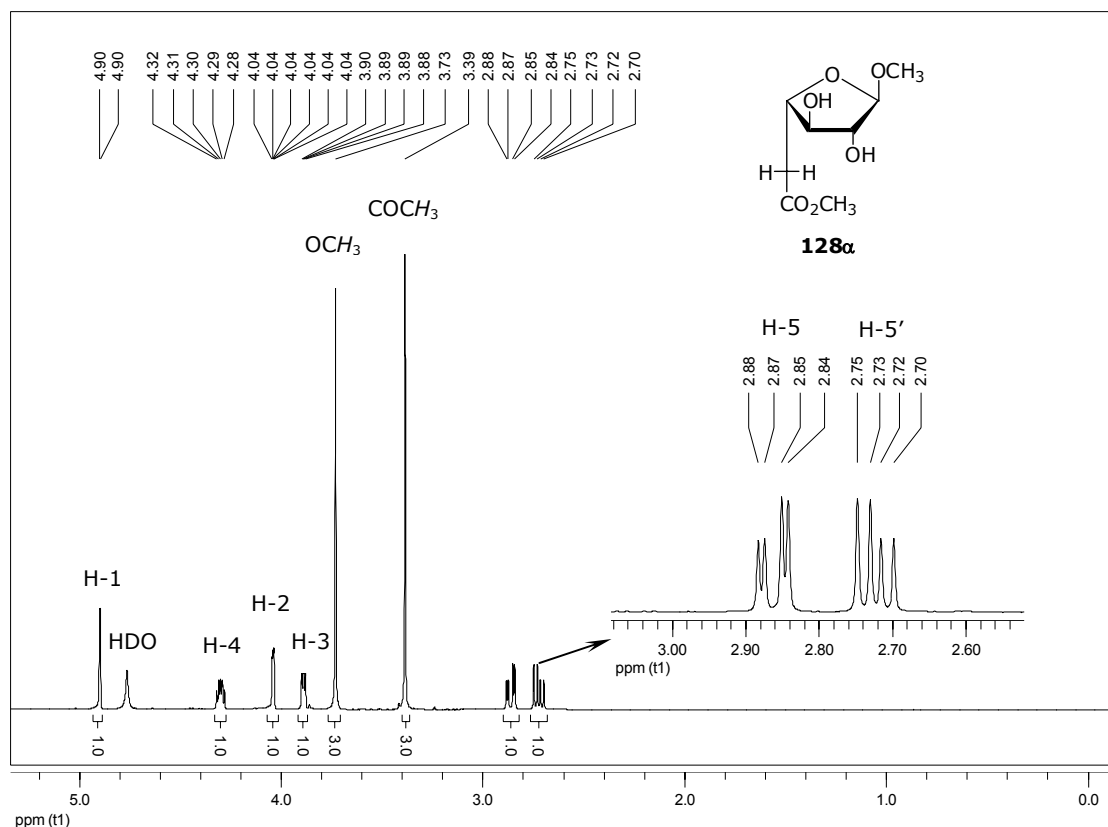
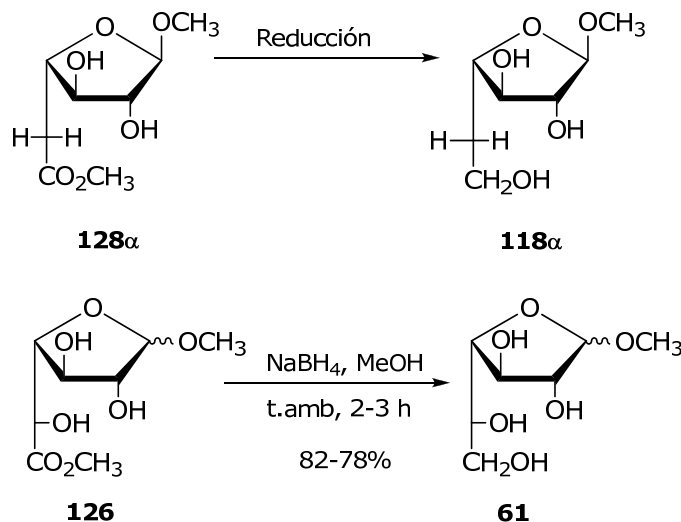


Figura 4-2. Espectro de RMN ^1H del compuesto **128 α** (D_2O , 500 MHz).

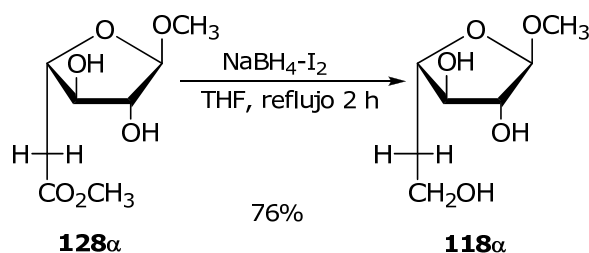
El próximo paso para la obtención del metil 5-desoxi- α -L-arabino-hexofuranósido (**118 α** , metil 5-desoxi- β -D-galactofuranósido) era la reducción del éster metílico de **128 α** (Esquema 4-9). Es conocido que la reducción de ésteres carboxílicos con borohiruro de sodio es muy lenta. Sin embargo la presencia de un α -heteroátomo facilita la reacción.¹¹ Así, cuando



Esquema 4-9.

el éster metílico **126** se trató con exceso de NaBH_4 en metanol a temperatura ambiente durante 3 h, el análisis por ccd mostró la desaparición total del material de partida y la aparición de dos productos de menor movilidad. Por purificación por cromatografía en columna, se obtuvo la mezcla anomérica del metil D-galactofuranósido (**61**) con excelente rendimiento. Cuando el éster metílico **128 α** , se sometió a iguales condiciones no se produjo la reducción, confirmando el efecto del HO en posición vecina sobre la reducción (Esquema 4-9). Si bien para la reducción del compuesto **128 α** se podrían haber utilizado otros agentes reductores fuertes, estábamos interesados en la utilización NaBH_4 con el objetivo luego de poder extender la metodología al uso de NaB^3H_4 , y así introducir una marca isotópica que nos permitiría obtener una sonda sensible para ensayos glicobiológicos.⁶

La reducción de **128 α** se realizó utilizando $\text{NaBH}_4\text{-I}_2$,¹² obteniéndose **118 α** como un sólido amorfo con 76% de rendimiento (Esquema 4-10).



Esquema 4-10.

El análisis del espectro de RMN ^{13}C de **118 α** confirmó la reducción del grupo metil éster, ya que se observó de la desaparición de la señal de C-6 carbonílico (174,3 ppm) y la aparición de una señal a 59,0 ppm, región característica de los hidroximetilenos primarios. Otra confirmación de que la reducción había ocurrido fue la desaparición de la señal a 53,2 ppm correspondiente al metilo del éster (Figura 4-3, Tabla 4-2). El análisis del espectro de RMN ^1H mostró la presencia de señales complejas para los H-5, H-5', H-6, H-6'. Las señales correspondientes a H-5 y H-5' sufrieron una protección, como consecuencia de la reducción del grupo éster vecino. La señal del H-4 también sufrió un corrimiento a campos altos y se observó la presencia de las señales correspondientes a H-6 e H-6' que resonaron conjuntamente como una señal compleja a δ 3,72 (Figura 4-4, Tabla 4-3). Las propiedades físico químicas de **118 α** coincidieron con los datos previamente descriptos.³

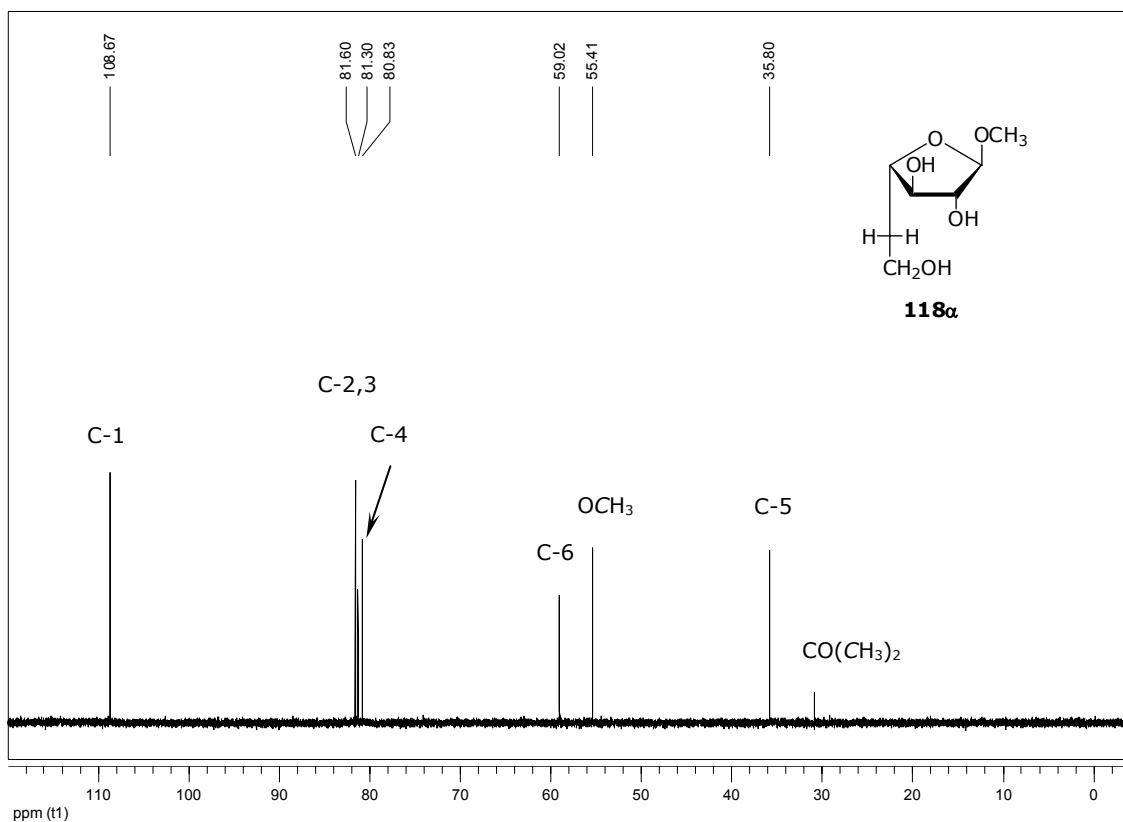


Figura 4-3. Espectro de RMN ¹³C de **118α** (D₂O, 125,8 MHz).

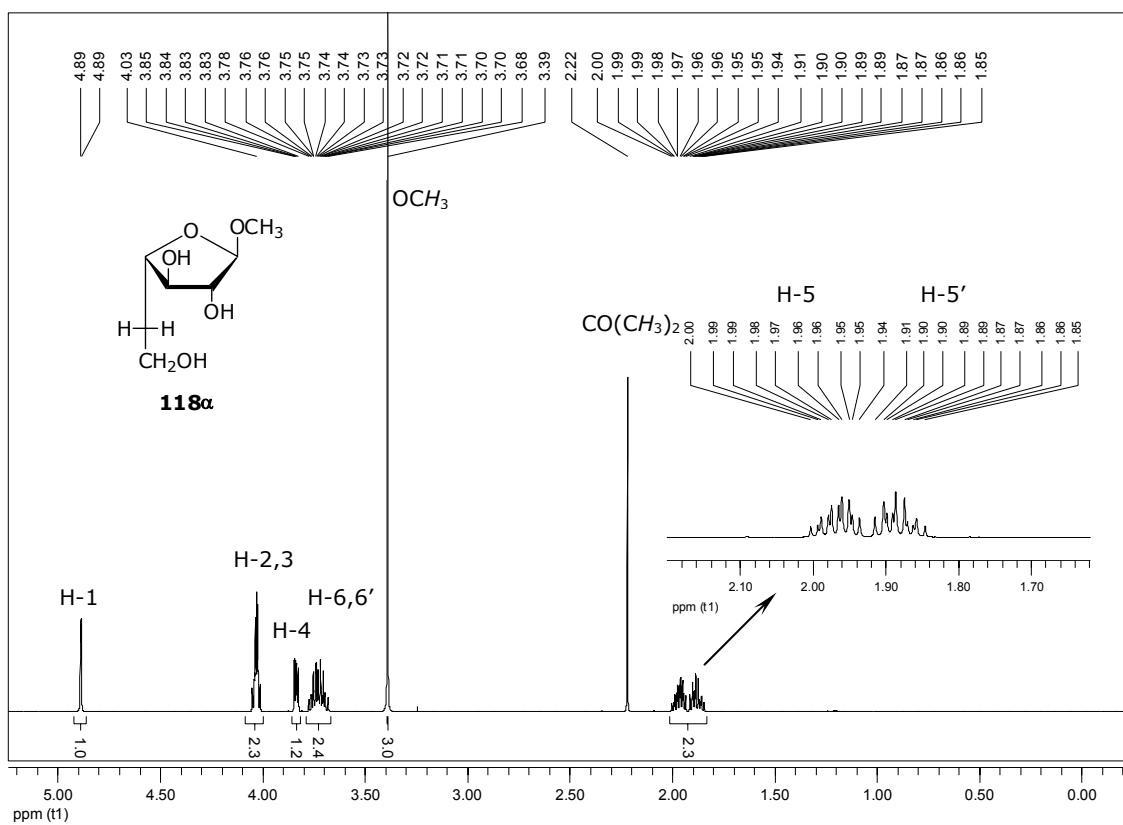
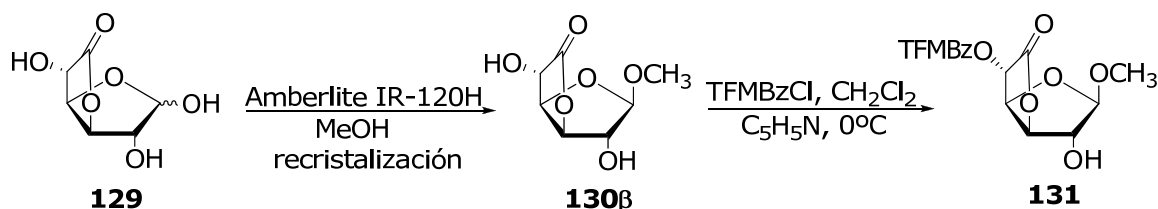


Figura 4-4. Espectro de RMN ¹H de **118α** (D₂O, 500 MHz).

Síntesis de derivados acilados de D-glucurono-6,3-lactona (129)

En base a los resultados obtenidos para la desoxigenación PET de **127**, decidimos extender la reacción a derivados de D-glucurono-6,3-lactona (**129**), también comercial, para obtener así derivados de 5-desoxi-D-glucofuranosa que resultan importantes para la caracterización de glucosidasas y glucoisomerasas.² Recientemente se ha descrito la obtención de 4-desoxiglucopiranosídeos utilizando **129** como precursor.¹³

Por tratamiento de **129** con metanol en presencia de resina Amberlite IR-120 (H⁺) a 35 °C durante 48 h, se obtuvo **130** como un sólido cristalino y cromatográficamente homogéneo. Sin embargo, cuando el crudo de reacción se analizó por espectroscopía de RMN ¹H se observó que correspondía a una mezcla anomérica en relación α/β 1:4. Por recristalización en CHCl₃ se obtuvo **130 β** con 71% de rendimiento (Esquema 4-11), cuyas propiedades físico químicas coincidieron con las previamente descritas para el producto obtenido por un procedimiento similar, pero a reflujo y que conducía a la mezcla anomérica.⁸



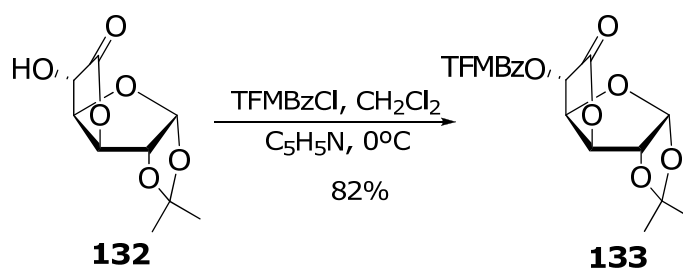
Esquema 4-11.

Basándonos en la regioselectividad observada en la sustitución del HO vecinal al grupo carbonílico en lactonas,^{5,9,10} pensamos que **130 β** podría esterificarse selectivamente en C-5. Efectivamente, cuando **130 β** se trató con 1,2 equivalentes de cloruro de 3-trifluorometilbezoílo en una mezcla de CH₂Cl₂ y piridina a baja temperatura se obtuvo **131** regioselectivamente, como un sólido amorfo con 75% de rendimiento. El análisis de los espectros de RMN permitió confirmar la posición de acilación. El espectro de RMN ¹³C mostró el corrimiento hacia campos altos de la señal correspondiente al C-6 lactónico, como consecuencia de la acilación del HO-5 (Tabla 4-4). En el

espectro de RMN ^1H se observó un doblete a δ 4,47 correspondiente al H-2 acoplado con el HO ($J_{\text{H,OH}} = 4,95$ Hz). La señal se simplificó por intercambio isotópico con D_2O , confirmando nuevamente que la sustitución había ocurrido en el HO-5.

Con el objetivo de evaluar la eficiencia de la reacción de desoxigenación PET en presencia de diferentes grupos protectores, se preparó el acetónido **132**,¹⁴ y por reacción de **132** con 1,2 equivalentes de cloruro 3-trifluorometilbenzoílo en una mezcla de CH_2Cl_2 y piridina a 0°C y posterior purificación por cromatografía en columna, se obtuvo **133** como un sólido amorfo y 82% de rendimiento (Esquema 4-12).

Los valores de δ de los espectros de RMN de **132** y **133** se muestran en las tablas 4-4 y 4-5.



Esquema 4-12.

Tabla 4-4. Señales de RMN ^{13}C para los compuestos **130 β -134**.

	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	OCH ₃
130β ^a	110,0	76,8	84,0	78,6	69,6	178,0	55,9
131 ^b	109,7	75,5	83,8	77,5	70,8	170,1	55,7
132 ^a	106,6	82,9 ^c	81,3 ^c	78,1	70,5	173,7	
133 ^b	107,0	82,3 ^c	80,2 ^c	77,0	70,6	169,2	
134 ^d	103,6	75,2	85,1	77,5	70,8	171,3	

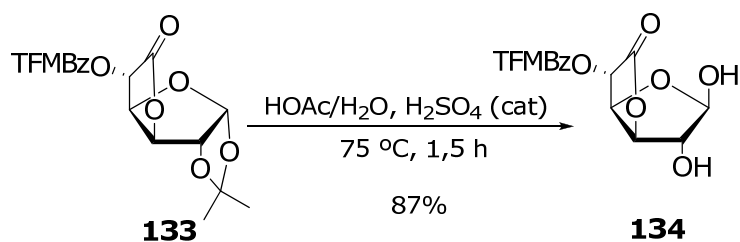
^a D_2O , ^b CDCl_3 , ^cintercambiable, ^d DMSO-d_6 .

Tabla 4-5. Señales de RMN ¹H para los compuestos **130-134**β.

	H-1 (<i>J</i> _{1,2})	H-2 (<i>J</i> _{2,3})	H-3 (<i>J</i> _{3,4})	H-4 (<i>J</i> _{4,5})	H-5	OCH ₃
131 ^a	4,98 -	4,47 (4,9)	5,02 (4,9)	5,34 (6,8)	5,52	3,38
132 ^b	6,00 (3,5)	4,85 ^d	4,56 (4,4)	4,96 (2,9)	4,85 ^d	-
133 ^b	6,06 (3,7)	4,89 -	4,07 (2,9)	4,92 (4,4)	5,04	5,75
134 ^c	4,89	4,03 ^d	4,03 ^d	3,89	1,96	3,39

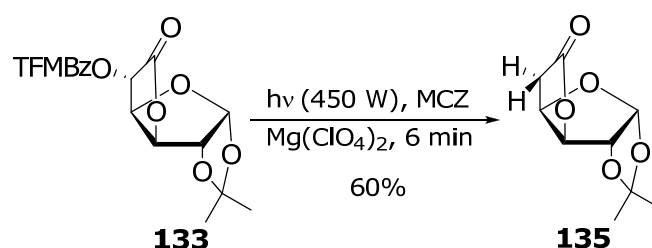
^a D₂O, ^b CDCl₃, ^c DMSO-*d*₆, ^d centro de multiplete complejo.

Por otra parte, la hidrólisis del isopropilidén acetal de **133**, nos permitiría acceder al derivado **134**, con el HO-5 acilado pero con los HO-2 y HO-1 libres. La desoxigenación y posterior reducción **134** conduciría al "5-desoxiglucitol" (2-desoxi-L-xilo-hexitol). Con el fin de remover el grupo isopropilidén, el compuesto **133** se trató con acético acuoso en iguales condiciones que los isopropilidén derivados de D-glucono-1,4-lactona (**105**, **106** y **108**). Sin embargo luego de 5 h el análisis por ccd mostró que la reacción no había evolucionado. Una nueva reacción con cantidades catalíticas de H₂SO₄(c), produjo la rápida hidrólisis del acetónido **133**. Por evaporación a presión reducida de la mezcla ácido acético/agua y posteriores coevaporaciones con agua para eliminar el ácido residual, se obtuvo **134** como un producto cristalino (87%, Esquema 4-13). El análisis del espectro de RMN ¹³C de este producto mostró que se trataba mayoritariamente del anómero β (Tabla 4-4).



Esquema 4-13.

Determinación de los tiempos óptimos de irradiación para la desoxigenación de los derivados **131**, **133** y **134**.



Esquema 4-14.

Por analogía con las aldonolactonas, pensamos que la irradiación durante 3 minutos de **133** sería suficiente para obtener el 100% de conversión. Sin embargo, el monitoreo por ccd del crudo de la irradiación mostró la presencia de **133** sin reaccionar (R_f 0,76) y dos compuestos más, uno mayoritario de R_f 0,60 y el otro de menor movilidad (R_f 0,25; hexano-EtOAc 1:1). El análisis del espectro de RMN ^{13}C de la mezcla cruda de reacción mostró en la región de los carbonos anoméricos la presencia de 3 señales (107,0 ppm; 106,3 ppm y 106,2 ppm), la más desprotegida correspondiente a **133**. A campos altos se observó una única señal asociada a un C-desoxigenado (35,8 ppm) y en la región donde resuenan los C-5 oxigenados dos señales, una a δ 70,5 y otra a δ 70,3. Por purificación por cromatografía en columna se obtuvieron dos fracciones. Por combinación de las fracciones de R_f 0,60 se obtuvo el compuesto **135**, como un sólido amorfo con 60% de rendimiento. Por combinación de la fracciones de R_f 0,25 se obtuvo **132** con 32% de rendimiento. En el espectro de RMN ^{13}C de **135** se observó un corrimiento a campos bajos de la señal de C-6 (174,2 ppm) respecto a la misma señal de **133** (169,2 ppm). El C-1 sufrió el efecto inverso, desplazándose de 107,0 ppm a 106,2 ppm. La señal correspondiente al C-5 desoxigenado se observó a 35,8 ppm (Figura 4-5). En el espectro de RMN ^1H se observó la presencia de un doblete y un doblete fuertemente acoplados a campos altos, correspondientes a las señales de los H-5 y H-5', con una constante de acoplamiento geminal grande (Figura 4-6).

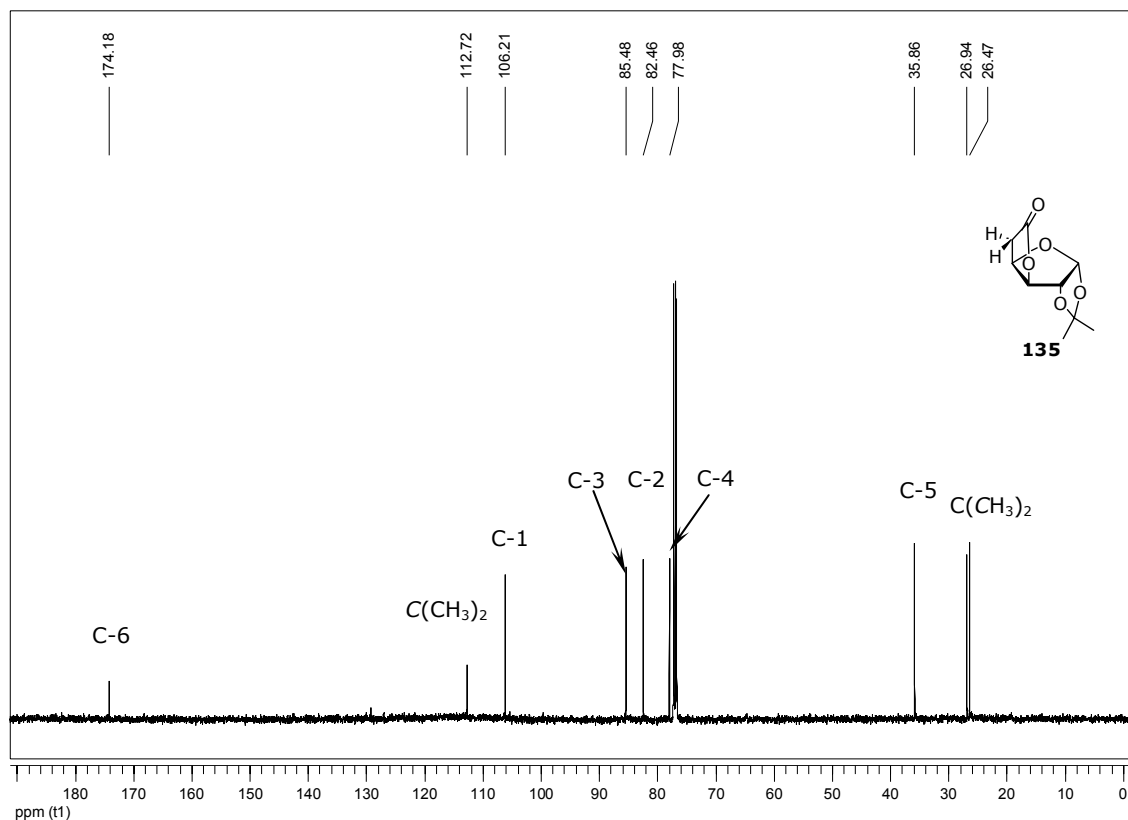


Figura 4-5. Espectro de RMN ^{13}C de **135** (CDCl_3 , 125,8 MHz).

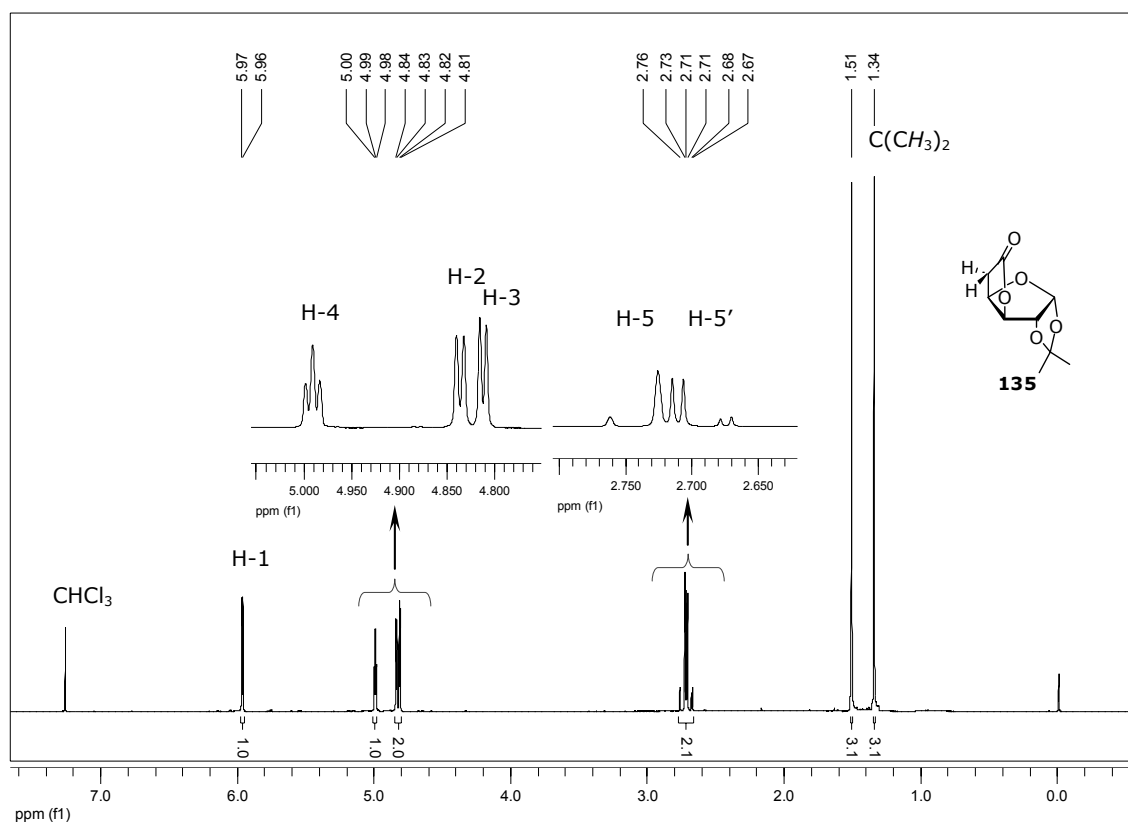
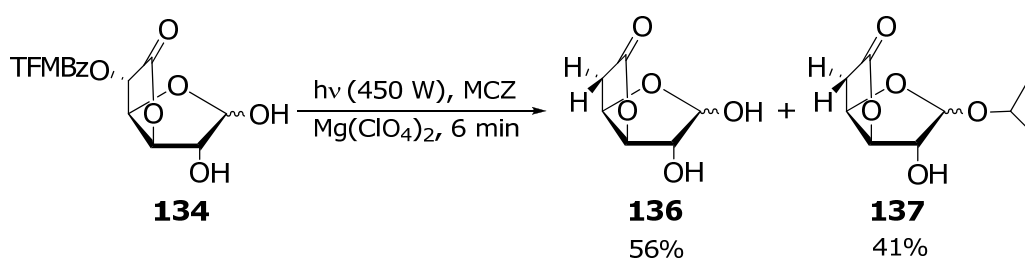


Figura 4-6. Espectro de RMN ^1H de **135** (CDCl_3 , 500 MHz).

El análisis por ccd de la irradiación de **133** durante 6 minutos mostró la desaparición total del material de partida (R_f 0,76) y nuevamente la presencia de los productos **132** (R_f 0,25) y **135** (R_f 0,60; hexano-EtOAc 1:1).

El compuesto **134** también se irradió durante 3 y 6 minutos. El análisis por ccd de la fotólisis durante 3 minutos mostró la conversión parcial del material de partida (R_f 0,75) y la presencia de dos productos, uno de R_f 0,60 y otro de menor movilidad (R_f 0,38; AcOEt). El análisis del espectro de RMN ^{13}C del crudo de reacción mostró la conversión de más del 85% del material de partida. En la región de los C-anoméricos se observó la presencia de 3 señales a 108,3; 105,6 y 101,0 ppm. Por purificación por cromatografía en columna se obtuvo una fracción menos polar, mayoritaria, que luego del análisis por espectroscopía de RMN ^{13}C y ^1H se identificó como el producto de glicosidación de **136** con isopropanol (**137**, Esquema 4-15). La evaporación de las fracciones de menor movilidad condujo a **136** como un sólido amorfo, en una relación β/α de 5:1 y 27% de rendimiento.



Esquema 4-15.

El análisis del espectro de RMN ^{13}C de la mezcla de irradiación de **134** durante 6 minutos, mostró la conversión del 100% del material de partida. Sin embargo, y a pesar de que se realizó la evaporación del solvente de reacción a temperatura ambiente, nuevamente se observó la presencia de **137**. Se observaron además las señales correspondientes a los C-anoméricos de **136 β** (102,1 ppm) y **136 α** (97,5 ppm). Los C-5 resonaron a δ 38,1 y a δ 36,1, respectivamente. Por purificación por cromatografía en columna nuevamente se obtuvieron dos fracciones. La de mayor movilidad condujo a

137 con 41% de rendimiento y la fracción de menor movilidad condujo a **136** con 56% de rendimiento.

El análisis del espectro de RMN ^{13}C de **136** mostró un corrimiento hacia campos bajos de la señal de C-6, que pasó de resonar a 171,3 ppm en **134** a resonar a 180,0 ppm en **136 β** y 179,7 ppm en **136 α** (Figura 4-7). El análisis del espectro de RMN ^1H mostró la presencia de un doble doblete y un doblete (3,06 ppm y 2,73 ppm) correspondientes a los H-5 y H-5'. Las señales correspondientes al anómero α se encontraban parcialmente superpuestas, ligeramente más protegidas. En la región característica de los H-anoméricos se observó la presencia de un doblete a δ 5,50 correspondiente al anómero α y un singulete a δ 5,46, correspondiente al anómero β . La integración de estas dos señales indicó una relación β/α de 5 a 1 (Figura 4-8).

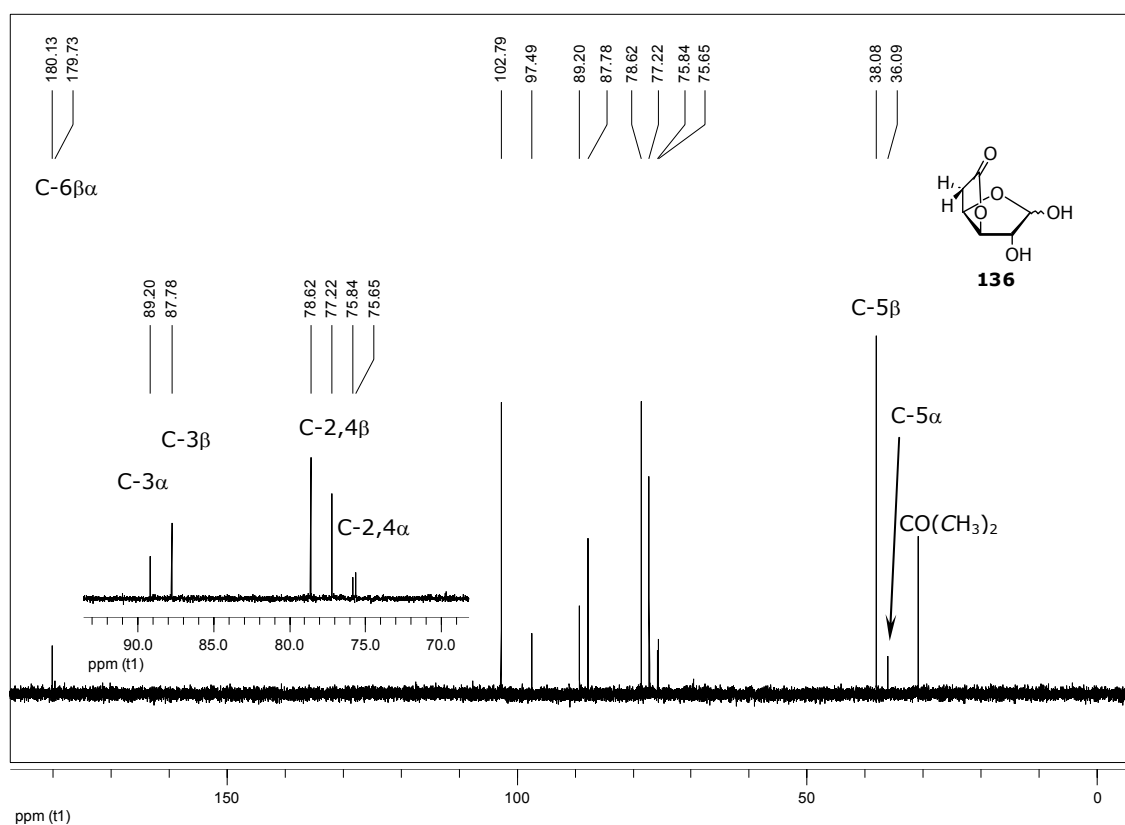


Figura 4-7. Espectro de RMN ^{13}C de **136** (D₂O, 125,8 MHz).

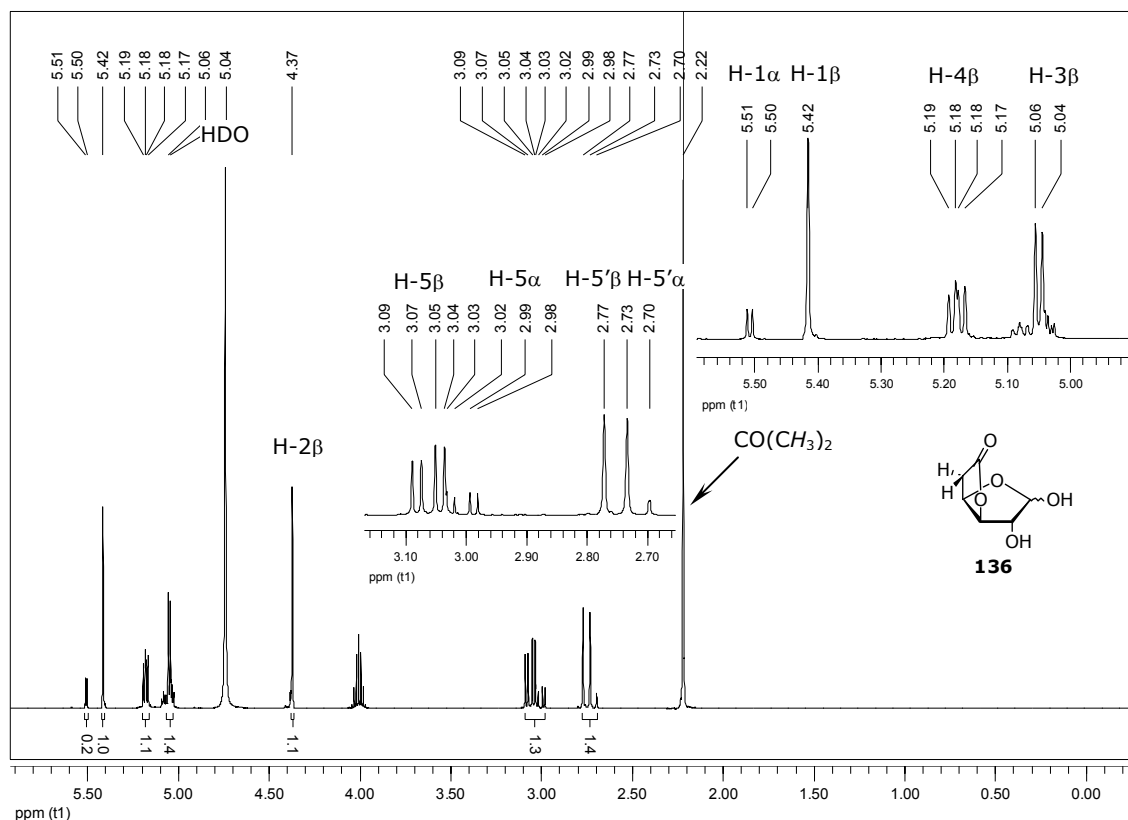
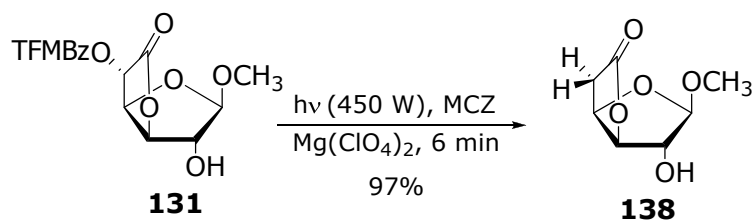


Figura 4-8. Espectro de RMN ^1H de **136** (D_2O , 500 MHz).

El compuesto **131** se irradió únicamente durante 6 minutos; el monitoreo de la reacción mostró la desaparición total del material de partida (R_f 0,68; AcOEt) y la aparición de un único producto de menor polaridad (R_f 0,45; AcOEt, Esquema 4-16). El análisis del espectro de RMN ^{13}C del crudo de reacción confirmó el 100% de conversión del compuesto **131**, observándose la desaparición total de la señal correspondiente al C-5 oxigenado y la presencia de una única señal a campos altos, correspondiente al C-5 desoxigenado.



Esquema 4-16.

Por purificación por cromatografía en columna del crudo de reacción, se obtuvo **138** como un sólido amorfo y 97% de rendimiento. En el espectro de RMN ^{13}C se observó la desprotección de la señal correspondiente a C-6 que pasó de resonar a 170,2 ppm en **131** a resonar a 175,9 ppm en **138**. Mostró además la desprotección de H-3, y el corrimiento de la señal de C-5 a campos altos (37,0 ppm, Figura 4-9). El análisis del espectro de RMN ^1H mostró la presencia de un doblete y un doblete a campos altos correspondientes a los H-5 y H-5', que presentaron una constante de acoplamiento geminal grande ($J_{gem} = 18,9$ Hz, Figura 4-10).

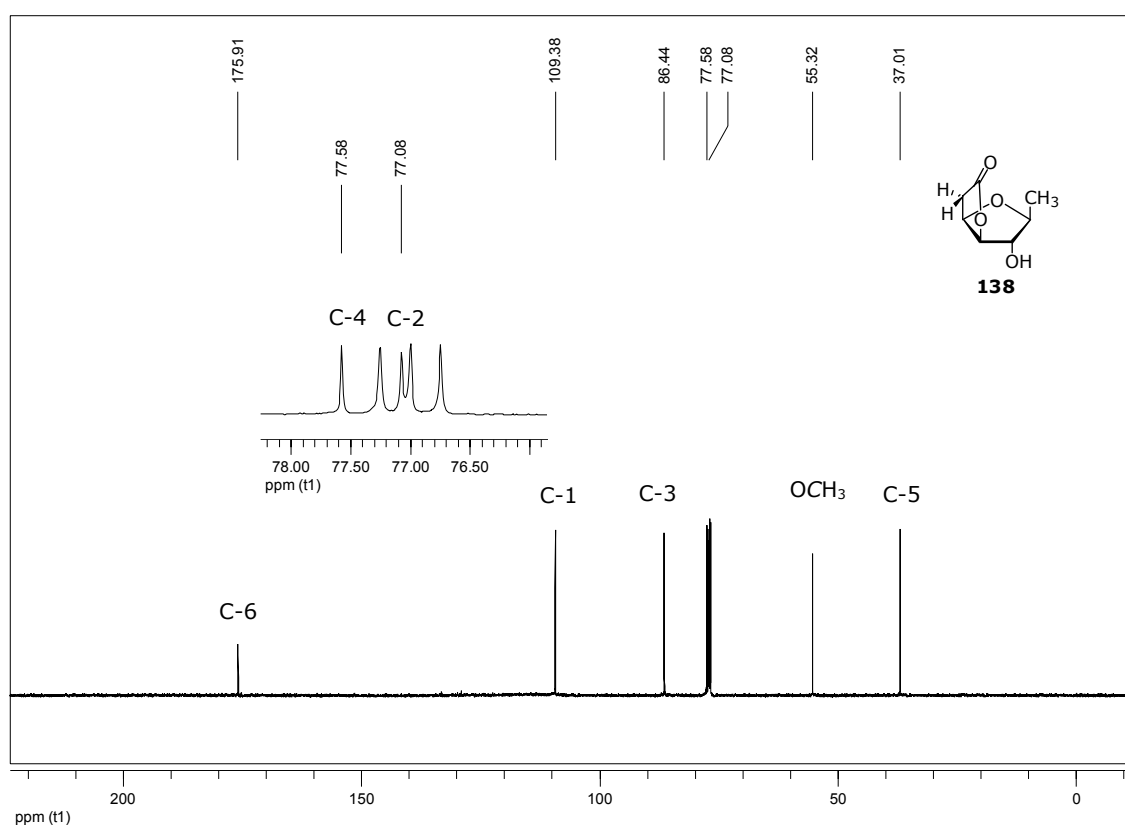


Figura 4-9. Espectro de RMN ^{13}C del compuesto **138** (CDCl_3 , 125,8 MHz).

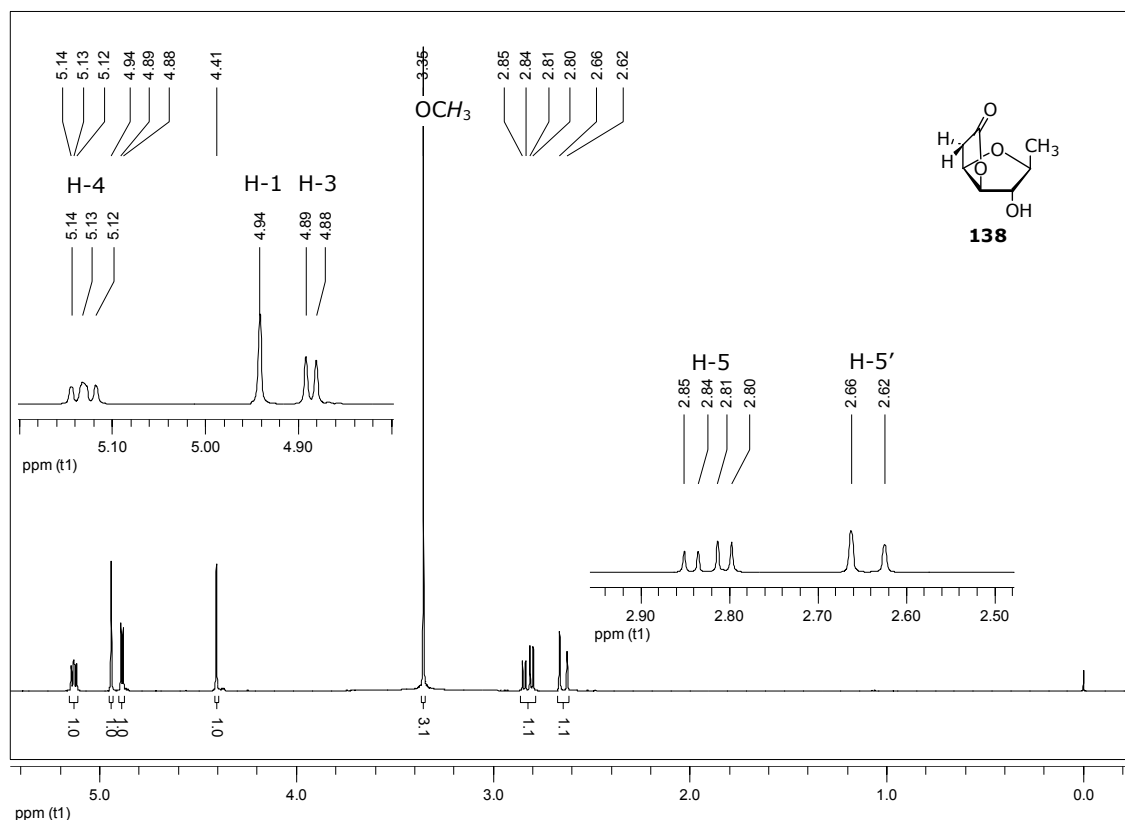
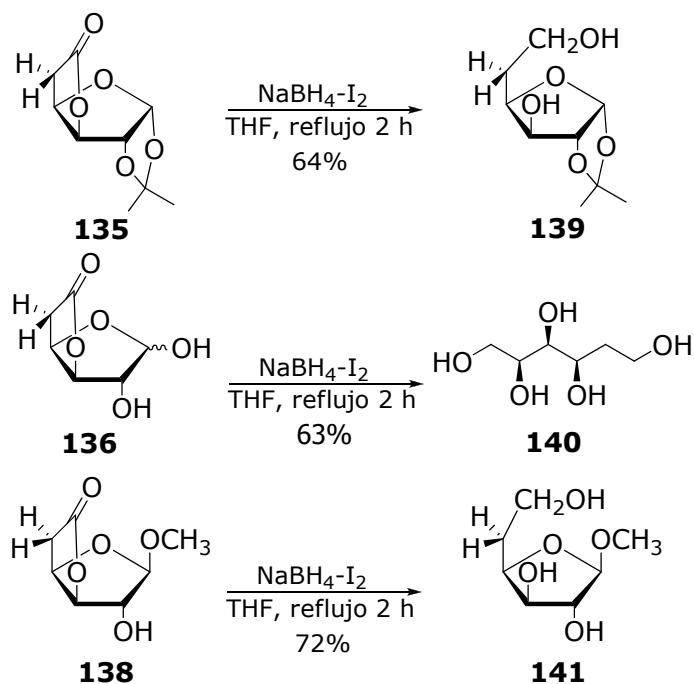


Figura 4-10. Espectro de RMN ^1H del compuesto **138** (CDCl_3 , 500 MHz).

Reducción de los derivados desoxigenados **135**, **136** y **138**

La reducción de aldonolactonas con NaBH_4 está ampliamente descrita en la literatura.¹¹ Sin embargo, cuando se trató **135** con NaBH_4 la reducción no procedió, incluso luego de utilizar grandes cantidades de este reactivo. Es posible que la ausencia del heteroátomo en el C- α al grupo lactónico afecte la reducción. En cambio, cuando **135** se trató con $\text{NaBH}_4\text{-I}_2$ se produjo la reducción obteniéndose **139** como un sólido cristalino con 64% de rendimiento, de iguales características físico químicas que las previamente descritas (Esquema 4-17).¹⁵



Esquema 4-17.

El compuesto **139** había sido previamente sintetizado por el método de Barton y McCombie¹⁶ y fue utilizado como intermediario en la síntesis de halocondrinas¹⁷ y de (+)-cardiobutenólidos.¹⁸

Por tratamiento de **136** con NaBH₄-I₂ y posterior purificación de la mezcla de reacción, se obtuvo el alditol **140** como un sólido amorfo con 63% de rendimiento (Esquema 4-17). El análisis del espectro de RMN ¹³C mostró la desaparición de la señal correspondiente al C-6 lactónico, y la aparición de una señal a δ 59,1 correspondiente al C-6 hidroxilado. Se observó el corrimiento de los C-1 $\beta\alpha$ a campos altos, que pasaron de resonar a 102,7 ppm y 97,4 ppm a 63,4 ppm. El espectro de RMN ¹H mostró la presencia de señales complejas a campos altos para los H-5 y H-5' y el corrimiento de todas las señales hacia campos altos ($\delta < 4$ ppm).

El tratamiento de **138** con NaBH₄-I₂ condujo al metil 5-desoxi- β -D-xilo-hexafuranósido (**141**, "metil 5-desoxi- β -D-glucofuranósido") como un sólido amorfo con 72% de rendimiento. Por hidrólisis de la unión glicosídica de **141** o del grupo isopropilidén de **139**, se podría obtener 5-desoxi-D-xilo-hexafuranosa ("5-desoxiglucosa"). Sin embargo cuando se trató **139** en condiciones clásicas de hidrólisis (TFA 4N, reflujo), la reacción efectivamente ocurría, pero durante las etapas de aislamiento y purificación el producto se

glicosidaba con mucha facilidad con el metanol utilizado para coevaporar el TFA. Así aislamos nuevamente **141**.

Conclusiones

En resumen, se obtuvieron muy buenos resultados para la reacción de desoxigenación PET del compuesto **127 β** . Se demostró que el grupo metil éster en posición α también facilita la desoxigenación PET (Tabla 4-6, entrada 3-5), ya que ocurre en tiempos comparables a los de la desoxigenación PET de aldonolactonas (Tabla 4-6, entrada 1), y mucho menores que los tiempos utilizado para la desoxigenación de derivados que no presentan este grupo en la posición vecina (Tabla 4-6, entrada 2). Al igual que en derivados de aldonolactonas, el aumento de la reactividad permite la utilización de MCZ en cantidades subestequiométricas. Sin embargo, la conversión total del producto requiere tiempos levemente mayores. Al disminuir la velocidad de la desoxigenación, probablemente da tiempo a que se produzca la fotohidrólisis del grupo TFMBz, formando **126 β** (~19%), el cual no se desoxigena.

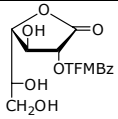
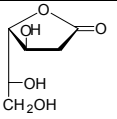
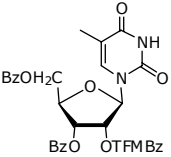
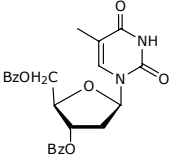
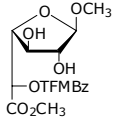
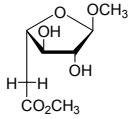
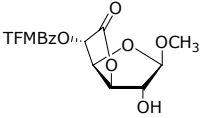
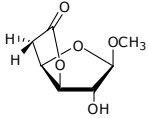
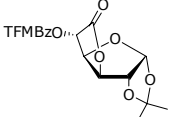
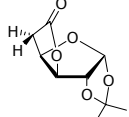
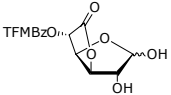
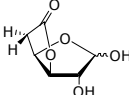
Por reducción de **128 α** con NaBH₄-I₂ se obtuvo **118 α** . La secuencia sintética desarrollada para obtener **118 α** a partir del ácido D-galacturónico involucró 4 pasos de reacción y resultó ser más corta y más eficiente en términos de rendimiento que la descrita previamente.³ Se pudieron asignar completamente los espectros de RMN de **128 α** .

Se sintetizaron tres derivados de D-glucurono-6,3-lactona, que nos permitieron evaluar la compatibilidad de distintos sustituyentes con la reacción de desoxigenación PET.

La desoxigenación de **133** requirió 6 minutos (Tabla 4-6, entradas 7,8) y a diferencia de lo observado en las irradiaciones de **131** y **134**, se aisló el producto de fotohidrólisis en cantidades apreciables (~30%). Ésto indicaría que en el derivado **133** la fotohidrólisis del éster es una vía competitiva (Tabla 4-6, entrada 7,8). Sin embargo, **133** presenta la ventaja respecto de **131** y **134**, de que al no tener HO libre el aislamiento y la purificación del producto desoxigenado resulta más simple.

En la irradiación de **131**, la conversión fue del 100 % a los 6 minutos y el aislamiento de **132** fue simple y con muy buen rendimiento (Tabla 4-6, entrada 6). En este caso no se observó producto de fotohidrólisis.

Tabla 4-6.

	Compuesto.	Producto	Tiempo	Conversión (%)	Aislamiento ^b (%)
1			3 min.	100	73 ⁹
2			12-15 h	-	50-70 ¹⁹
3			3 min	60	42
	127β	128α			
4	127β	128α	6 min	90	66
5	127β	128α	8 min	100	25
6			6 min.	100	60
	131	132			
7			3 min.	78	46
	133	135			
8	133	135	6 min.	100	60
9			3 min.	95	27
	134	136			
10	134	136	6 min.	100	56

^aConversión determinada por espectroscopía de RMN ¹³C entre señales del sustrato y producto desoxigenado. ^bRefiere al compuesto aislado.

Al irradiar **134** se observó una conversión muy avanzada a los 3 minutos y total a los 6 minutos, sin formación del producto de hidrólisis fotoquímica

del grupo TFMBz. Sin embargo, la recuperación del producto libre fue muy baja (Tabla 4-6, entradas 9,10) debido a la facilidad con que el producto desoxigenado se glicosidaba con 2-propanol (o con cualquier alcohol) durante la etapa de aislamiento y purificación. Esta facilidad de los compuestos desoxigenados para glicosidarse, aún en ausencia de medio ácido, se había observado previamente en el laboratorio cuando se realizó la síntesis de 2-desoxi-D-galactofuranósidos.⁹

En conclusión, en los compuestos con el carbono anomérico sustituido, como **131** y **133**, resultó más sencilla la purificación de los productos desoxigenados. En el caso de **133**, probablemente por la presencia de 3 ciclos fusionados, la fotohidrólisis resultó ser una vía competitiva que redujo notablemente el rendimiento de la reacción de desoxigenación.

Por otra parte, se optimizó la metodología de reducción de ésteres y lactonas utilizando $\text{NaBH}_4\text{-I}_2$, eficiente en compuestos carentes de un heteroátomo en posición α en los cuales el NaBH_4 no es efectivo.¹¹

1. Wolfrom, M. L.; Matsuda, K.; Komitsky, F.; Whiteley, T. E. *J. Org. Chem.* **1963**, *28*, 3551-3553.
2. Lederkremer, R. M.; Marino, C.; Derek, H. In *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **2007**, *61*, 143-216.
3. Szarek, W. A.; George, R.; Ritchie, S.; Vyas, D. M. *Carbohydr. Res.* **1978**, *62*, 89-103.
4. Lederkremer, R. M.; Marino, C.; Varela, O. *Carbohydr. Res.* **1990**, *200*, 227-235.
5. Gallo, C.; Jeroncic, L. O.; Varela, O.; Lederkremer, R. M. *J. Carbohydr. Chem.* **1993**, *12*, 841 - 851.
6. Mariño, K.; Marino, C.; Lederkremer, R. M. *Anal. Biochem.* **2002**, *301*, 325-328.
7. Matsuhiro, B.; Zanolungo, A. B.; Dutton, G. G. S. *Carbohydr. Res.* **1981**, *97*, 11-18.
8. Cadotte, J. E.; Smith, F.; Spriestersbach, D. J. *Am. Chem. Soc.* **1952**, *74*, 1501-1504.

9. Chiocconi, A.; Marino, C.; Otal, E.; Lederkremer, R. M. *Carbohydr. Res.* **2002**, *337*, 2119-2126.
10. Bordoni, A.; Lederkremer, R. M.; Marino, C. *Carbohydr. Res.* **2006**, *341*, 1788-1795.
11. Banfi, L.; Narisano, E.; Riva, R. *Handbook of Reagents for Organic Synthesis. Oxidizing and Reducing Agents*; Wiley & Sons: Chichester, UK., 1999.
12. Prasad, A. S. B.; Kanth, J. V. B.; Periasamy, M. *Tetrahedron* **1992**, *48*, 4623-4628.
13. Stanford, D.; Stachulski, A. V. *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 2361-2364.
14. Bashyal, B. P.; Chow, H.-F.; Fellows, L. E.; Fleet, G. W. J. *Tetrahedron* **1987**, *43*, 415-422.
15. Klausener, A.; Müller, E.; Runsink, J.; Scharf, H.-D. *Carbohydr. Res.* **1983**, *116*, 295-302.
16. Ye, J.; Bhatt, R. K.; Falck, J. R. *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*, 8007-8010.
17. Choj, H.; Demeke, D.; Kang, F.-A.; Kishi, Y.; Nakajima, K.; Nowak, P.; Z.-K., W.; Xie, C. *Pure Appl. Chem.* **2003**, *75*, 1-17.
18. Matsuura, D.; Takabe, K.; Yoda, H. *Tetrahedron Lett.* **2006**, *47*, 1371-1374.
19. Park, M.; Rizzo, C. J. *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 6092-6093.

CAPÍTULO 5

Síntesis de 5-desoxi- β -D-galactofuranósidos como herramientas para la caracterización de *exo* β -D-galactofuranosidasas

Introducción

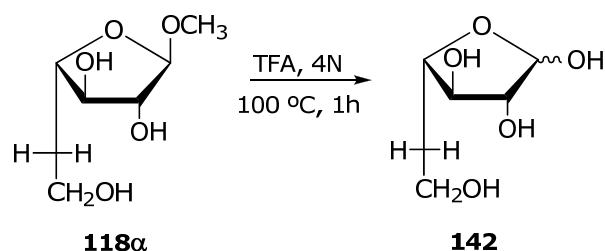
En el capítulo 2 se describieron las estrategias de síntesis de diferentes derivados de D-Galf desoxigenados en C-2, C-3 y C-6 (Figura 2-4). Estos compuestos no presentaron actividad frente a la enzima *exo* β -D-galactofuranosidasa de *Penicillium fellutanum*, demostrando que cada uno de esos HO- son necesarios para la interacción enzima-azúcar. Sin embargo, todavía no se había evaluado la importancia del HO-5.

En este capítulo se presentará la evaluación biológica de algunos de los derivados sintetizados utilizando la reacción PET, según se describió en el capítulo 4, y el uso de la misma estrategia para la obtención del derivado cromogénico 4-nitrofenil 5-desoxi- β -D-galactofuranósido (**143 α**), también de utilidad para la caracterización de *exo* β -D-galactofuranosidasas.

Evaluación biológica de metil 5-desoxi-L-arabino-hexofuranósido (**118 α**) y otros intermediarios

Evaluación de **118 α** como sustrato

La evaluación de la hidrólisis enzimática de **118 α** presentaba la dificultad de que no produciría la formación de un cromóforo, fácil de dosar espectroscópicamente, por lo cual fue necesario realizar determinaciones cromatográficas (HPAED-PAD). Para disponer de un patrón del producto de la reacción enzimática se sometió a **118 α** a condiciones clásicas de hidrólisis química, obteniéndose una muestra de 5-desoxi-D-Galf (5-desoxi-L-arabino-hexofuranosa, **142**) cuyas propiedades físico químicas coincidieron con las descritas en literatura (Esquema 5-1).¹ Se realizó la caracterización por HAEPC-PAD, utilizando una columna MA-10 e NaOH 600 mM como solvente, estableciéndose condiciones de elución adecuadas para la resolución de los compuestos **118 α** (t_r 13,7 min), **142** (t_r 24,1 min) y D-Gal (t_r 20,2 min).



Esquema 5-1.

Como fuente de enzima se utilizó el medio de 5-8 días de cultivo de *P. fellutanum*, filtrado y dializado. Los ensayos se realizaron incubando 20 μl del extracto enzimático (4 μg de proteína)² con **118 α** en concentraciones que variaron desde 0,3 mM a 1 mM, en buffer NaOAc/HOAc de pH 4,9, a 37 $^\circ\text{C}$ durante 24 h.³

Si bien se establecieron condiciones adecuadas para la resolución de los compuestos involucrados, cuando se realizó el análisis de las reacciones enzimáticas por HPAED-PAD los resultados fueron dudosos. Se observó la presencia de picos residuales provenientes del medio de cultivo, con tiempos de retención muy similares a los de **142** y cierto grado de hidrólisis química de **118 α** en las condiciones de incubación y/o cromatográficas. Dado que si existía cierta afinidad de la enzima por **118 α** , ésta no era grande, resultaba difícil determinar en estas condiciones si realmente se comportaba como sustrato de la enzima.

Evaluación de **118 α** , **126 α** , **126 β** y **128 α** como inhibidores

Para realizar la evaluación de los derivados desoxigenados en C-5 como inhibidores de *P. fellutanum*, se realizaron incubaciones de 20 μl de extracto enzimático (4 μg de proteínas) en presencia de 15 μl de una solución 2,5 mM de 4-nitrofenil β -D-galactofuranósido (**58**)⁴ como sustrato. Los compuestos **118 α** , **126 α** , **126 β** y **128 α** se agregaron en cantidades necesarias para alcanzar concentraciones finales entre 0,2 a 2,5 mM (Figura 5-1). Las incubaciones se llevaron a cabo en buffer NaOAc/HOAc de pH 4,9 a 37 $^\circ\text{C}$ durante 1,5 h, y en todos los casos se produjo la misma proporción de hidrólisis de **58**, que en ausencia de los compuestos desoxigenados. Este

resultado indicaba que la presencia del grupo carboximetil éster en C-6, la falta del HO-5 o ambas modificaciones simultáneamente, impiden la interacción de los furanósidos con la enzima.

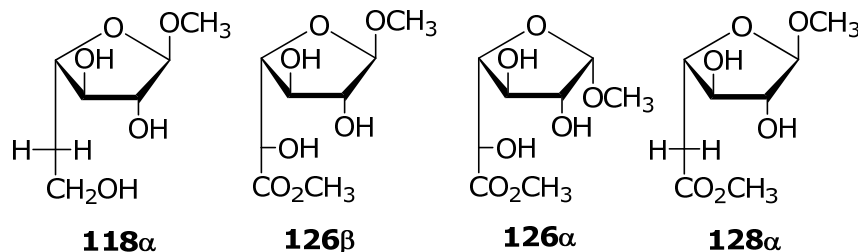
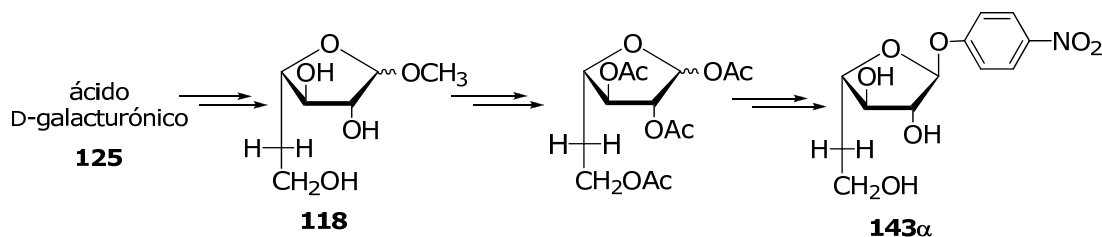


Figura 5-1.

Síntesis del sustrato cromogénico 4-nitrofenil 5-desoxi-L-arabino-hexofuranósido (**143 α**)

Debido a la dificultad para poder determinar si **118 α** se comportaba como sustrato y dada la alta afinidad de la enzima por el sustrato cromogénico **58** (K_m 0.31 mM),⁵ se planeó la síntesis de **143 α** a partir de **128 α** (Esquema 5-2). Este compuesto permitiría evaluar más fácilmente el carácter como sustrato de 5-desoxi- β -D-galactofuranósidos.

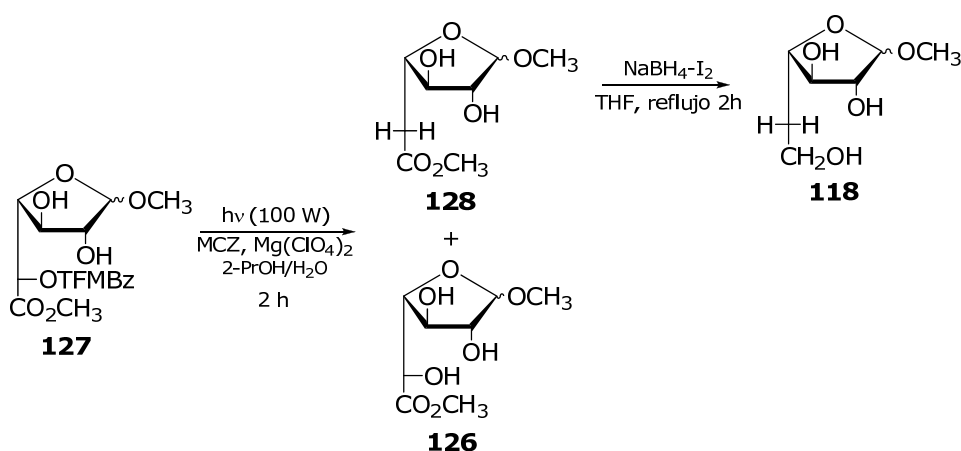


Esquema 5-2. Estrategia sintética propuesta para la obtención del derivado cromogénico **143 α** .

Como se observa en el Esquema 5-2, se decidió utilizar la ruta sintética ya desarrollada para obtener **118**, e introducir la aglicona aromática luego de la desoxigenación PET. Ésto se debe a que se había descrito que la presencia de otro cromóforo (además del grupo -TFMBz) en la molécula a desoxigenar, generaba durante la irradiación vías competitivas que conducían

a la formación de subproductos, disminuyendo el rendimiento de la desoxigenación y produciendo mezclas complejas de difícil separación.⁶ Por otro lado, en el laboratorio se había observado que durante la fotólisis de 4-nitrofenil 2-(3-trifluorometilbenzoíl)-D-galactofuranósido y de **93**, luego de transcurridas 8 h de irradiación a 120 W, se producía la hidrólisis del grupo 4-nitrofenilo y no se observaban productos de desoxigenación. Por otro lado, para la síntesis de **143α** no era necesaria la separación de los metil glicósidos **127**, como se había hecho para disponer de **128α** (Capítulo 4), ya que en este caso el sustituyente anomérico se hidrolizaría en etapas posteriores, durante la activación del C-anomérico por acetólisis.

En esta etapa del trabajo de Tesis se adquirió en el laboratorio una lámpara de características similares a la 450 W utilizada hasta el momento, pero de menor potencia (100 W). Como en la desoxigenación PET de **127β** a 450 W, se obtenía un 17 % de **126β**, producto de la fotohidrólisis de grupo TFMBz, se pensó que reducir la potencia de la irradiación minimizaría esta reacción competitiva (Esquema 5-3).

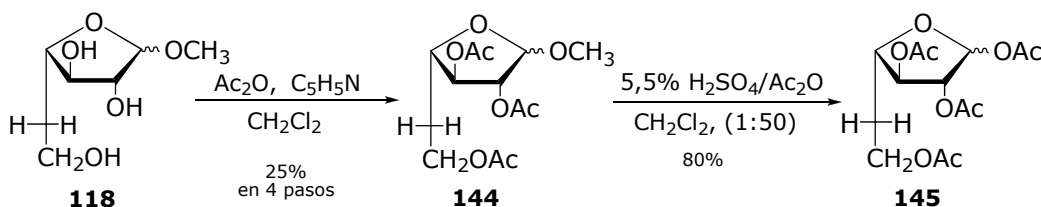


Esquema 5-3.

Así, una vez obtenida la mezcla anomérica **127**, se sometió a las condiciones de la reacción PET a 100 W, y el monitoreo por ccd luego de 2,5 h mostró la desaparición del material de partida (R_f 0,72; tolueno-EtOAc 1:9) y la presencia de **128** como producto mayoritario. De todos modos se observó la formación de una pequeña cantidad de **126** (8%). El análisis por espectroscopía de RMN ¹³C nos permitió confirmar lo observado por ccd. El producto crudo concentrado a presión reducida, se sometió a una extracción

con $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ y la fase acuosa concentrada, sin purificación alguna, se redujo con $\text{NaBH}_4\text{-I}_2$, obteniéndose así la mezcla de anómeros **118** (Esquema 5-3).

El paso siguiente sería la protección de **118** con grupos capaces de dirigir anquiméricamente la posterior glicosidación. Se eligió la acetilación, ya que se planeaba realizar luego una acetólisis para activar la posición anomérica, y se había observado que esta reacción en derivados benzoilados conducía a productos de transesterificación en distintas posiciones, llevando a la dispersión del producto.⁷ Por tratamiento de **118** con una solución de anhídrido acético y piridina en CH_2Cl_2 se obtuvo **144** como un sólido amorfo con 97% de rendimiento (Esquema 5-4).



Esquema 5-4.

Disponiendo de **144**, se buscaron condiciones para la acetólisis. Con el fin de evitar las condiciones drásticas de la clásica reacción de acetólisis se probaron distintos métodos de hidrólisis del grupo metilo anomérico, en condiciones más suaves. Recientemente se había descrito el uso del tetrafluoroborato de tritilo (Ph_3CBF_4) para la hidrólisis de una variedad de metil glicósidos, incluyendo pentofuranósidos.⁸ Sin embargo, este método no resultó efectivo, y la hidrólisis de **144** resultaba incompleta, aún aumentando la concentración de reactivo y el tiempo de reacción. Lo mismo se observaba cuando se utilizaba SnCl_4 en las condiciones descritas para la sustitución del grupo benzoiloxi anomérico de *per-O-Bz- α,β -D-Galf* por el grupo acetiloxi.⁹ También se ensayó el tratamiento de **144** con anhídrido acético y ácido trifluoroacético,¹⁰ y si bien se obtenía **145**, el rendimiento también era muy bajo. Finalmente, se realizó la acetólisis de **144** utilizando anhídrido acético y cantidades catalíticas de H_2SO_4 en una solución muy diluida de CH_2Cl_2 , obteniéndose un único producto de menor movilidad (R_f 0,39; hexano-EtOAc 3:2) que **144**.^{7,11} El análisis del espectro de RMN ^1H de la fracción de R_f 0,39

obtenida por purificación por cromatografía en columna, mostró al isómero *1,2-trans* (anómero- α) como componente mayoritario. La integración de las señales correspondientes a los H-1 (anómero- α : 6,10 ppm, $J_{1,2} < 0,5$ Hz, anómero- β : 6,32 ppm, $J_{1,2} = 4,2$ Hz) reveló que se trataba de una mezcla anomérica en una relación α/β 3:1 (Tabla 5-2). Por purificación por cromatografía en columna y combinación de las fracciones de R_f 0,39 se obtuvo **145** como un sólido amorfo con 80% de rendimiento (Esquema 5-4). El análisis del espectro de RMN ^{13}C de las **145** mostró nuevamente que se trataba de la mezcla de anómeros. Las señales correspondientes a los C-1 se observaron a campos más altos, respecto de las señales anoméricas de **144 α** y **144 β** , como era de esperar, y las señales correspondientes a los C-5 desoxigenados eran prácticamente iguales a las de **144 $\alpha\beta$** (Tabla 5-1). El espectro de RMN ^1H de **145** mostró la desprotección de las señales correspondientes al H-1 de ambos anómeros. Se observó la superposición de las señales de los H-5 y H-5' con los metilos de los grupos acetatos (Tabla 5-2).

Tabla 5-1. Señales de RMN ^{13}C de los compuestos **143 α** , **144-146**.

	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	OCH ₃
144α ^a	106,3	81,8	80,1	78,8	32,1	61,0	54,7
144β ^a	101,1	77,1	78,7	78,1	34,6	61,1	55,4
145α ^a	99,0	80,8	79,4	81,3	32,0	60,6	
145β ^a	93,8	78,8 ^c	75,5 ^c	79,2	33,7	60,6	
146α ^a	103,9	81,4	78,5	80,9	32,0	60,6	
146β ^a	98,1	76,7	78,1	79,3	34,1	60,5	
143α ^b	108,5	84,9	83,5	83,6	38,2	60,5	

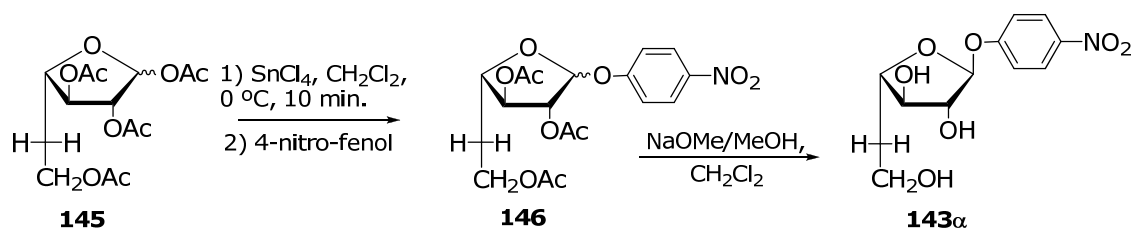
^a CDCl₃, ^b CD₃OD, ^cintercambiable.

Tabla 5-2. Señales de RMN ^1H de los compuestos **143 α** , **144-146**.

	H-1 ($J_{1,2}$)	H-2 ($J_{2,3}$)	H-3 ($J_{3,4}$)	H-4 ($J_{4,5'}$)	H-5 ($J_{5,4}$)	H-5' ($J_{5',6}$)	H-6 ($J_{6,5}$)	H-6' ($J_{6',6}$)	($J_{5,5'}$)	($J_{6',5'}$) ($J_{6',5}$)
144α^a	4,84	5,01 (1,5)	4,88 (5,8)	4,10 (8,5) ^d	2,13 ^{bc} (1,5) ^d	2,01 ^{bc}	4,25 ^b	4,16 ^b		
144β^a	5,27	5,05 ^c	5,05 ^c	3,97	2,13 ^{bc}	2,10 ^{bc}	4,25 ^b	4,16 ^b		
145α^a	6,14	5,18 (1,9)	4,98 (2,4)	4,26	2,09 ^{bc}	2,09 ^{bc}	4,26 ^b	4,16 ^b		
145β^a	6,36 (4,0)	5,31 ^c	5,31 ^c	4,14 ^c	2,09 ^{bc}	2,09 ^{bc}	4,26 ^b	4,16 ^b		
146α^a	5,71	5,34 (1,8)	5,03 (5,1)	4,07 ^b	2,10 ^{bc}	2,08 ^{cb}	4,22 ^b	4,12 ^b		
146β^a	5,94 (4,5)	5,22 (1,8)	5,45 (5,4)	4,12 ^c	2,08 ^c	1,90 ^b	4,07 ^b	3,97 ^b		
143α^d	5,64 (1,6)	5,58 (4,3)	3,82 (7,0)	4,08 ^c (8,1)	1,96 ^c (4,7)	1,87 ^b (5,2)	3,71 ^b (6,9)	3,64 ^b (10,8)	(14,0)	(6,2) (7,9)

^aCDCl₃, ^bcentro de multiplete complejo, ^cseñales superpuestas, ^dCD₃OD, ^eintercambiable.

El paso siguiente consistía en la glicosidación de **145** con 4-nitrofenol (Esquema 5-5). En nuestro laboratorio se había utilizado SnCl₄ como promotor de la glicosidación de derivados de D-Galf en numerosas ocasiones, para la obtención de glicofuranósidos,^{12,13} tioglicósidos,³ disacáridos,^{12,13} tiodisacáridos⁹ y oligosacáridos.^{14,15} Por tratamiento de **145** con SnCl₄ y 1,2



Esquema 5-5

equivalentes de 4-nitrofenol y posterior purificación por cromatografía en columna, se obtuvo **146** como un sólido amorfo con 84 % de rendimiento (Esquema 5-5). El análisis por RMN ^{13}C de **146** mostró que se trataba de la

mezcla de anómeros. Las señales correspondientes a los C-1 se encontraban significativamente más protegidas que la señal anomérica del alquil glicósido **128**, como es de esperar para glicósidos con una aglicona aromática (Tabla 5-1).¹⁶ En el espectro de RMN ¹H se observó un doblete a δ 5,93 correspondiente al H-1 del diasterómero 1,2-*cis* y un singulete a 5,71 ppm correspondiente al diasterómero 1,2-*trans* en relación 1:5 (Tabla 5-2).

La desprotección de **146** se realizó en condiciones suaves utilizando NaOMe/MeOH en CH₂Cl₂ anhidro. Por recristalización de agua se obtuvo **143 α** como un sólido cristalino, amarillento, y con 67% de rendimiento. El análisis del espectro de RMN ¹H de este sólido indicó que correspondía al glicósido de configuración 1,2-*trans*. La señal del H-anomérico se observó como un singulete a 5,64 ppm ($J < 0.5$ Hz) y los H-5 diasterotópicos se observaron como señales complejas a campos altos (1,87 ppm y 1,96 ppm, Figura 5-2). En el espectro de RMN ¹³C de **143 α** se observaron como señales características, las correspondientes a C-1 y C-5 a δ 108,5 y 38,2, respectivamente (Figura 5-3, Tabla 5-1).

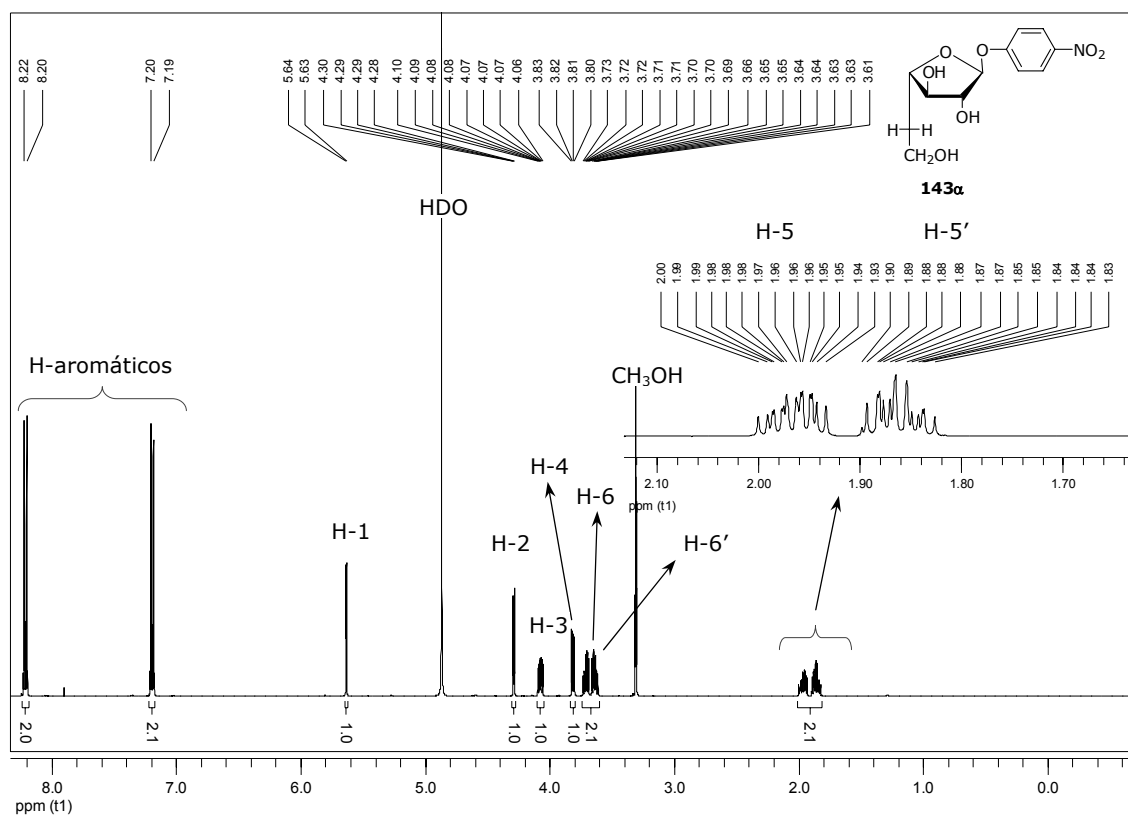


Figura 5-2. Espectro de RMN ¹H del compuesto **143 α** (CD₃OD, 500 MHz).

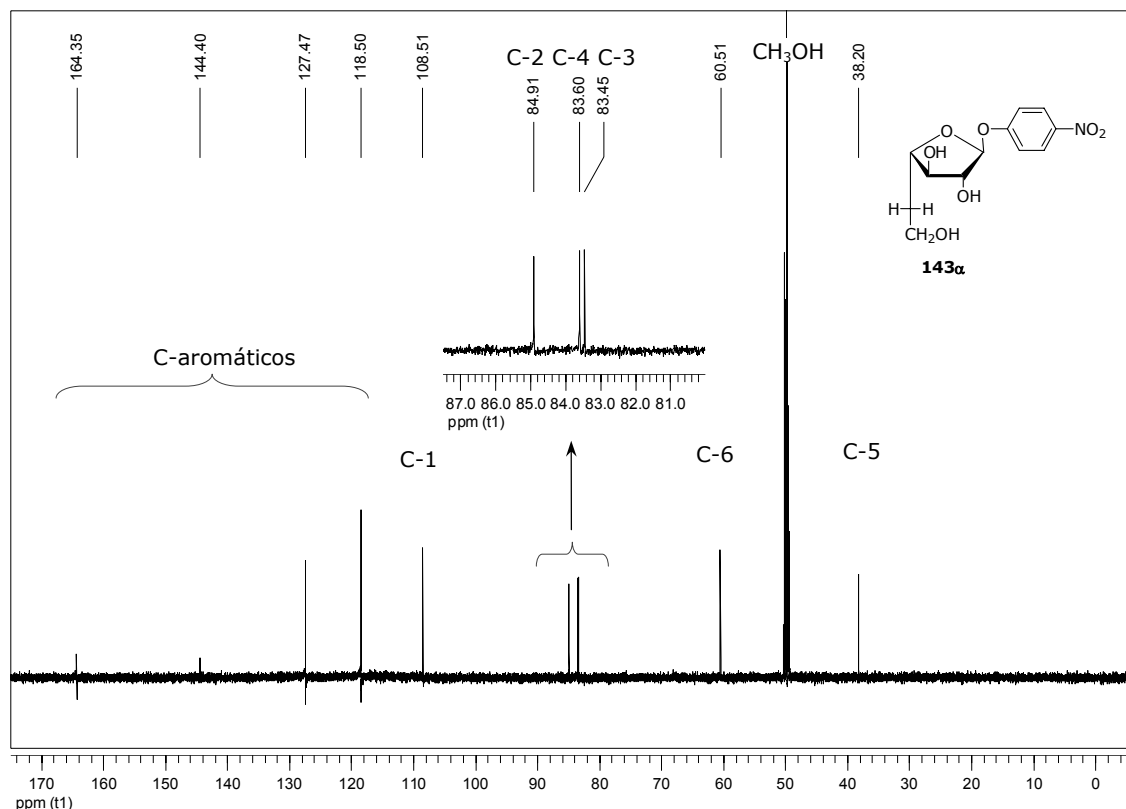
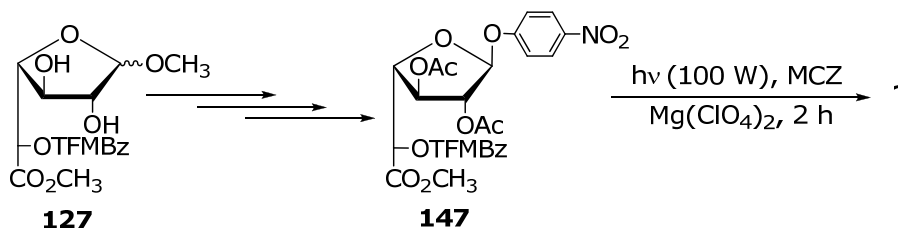


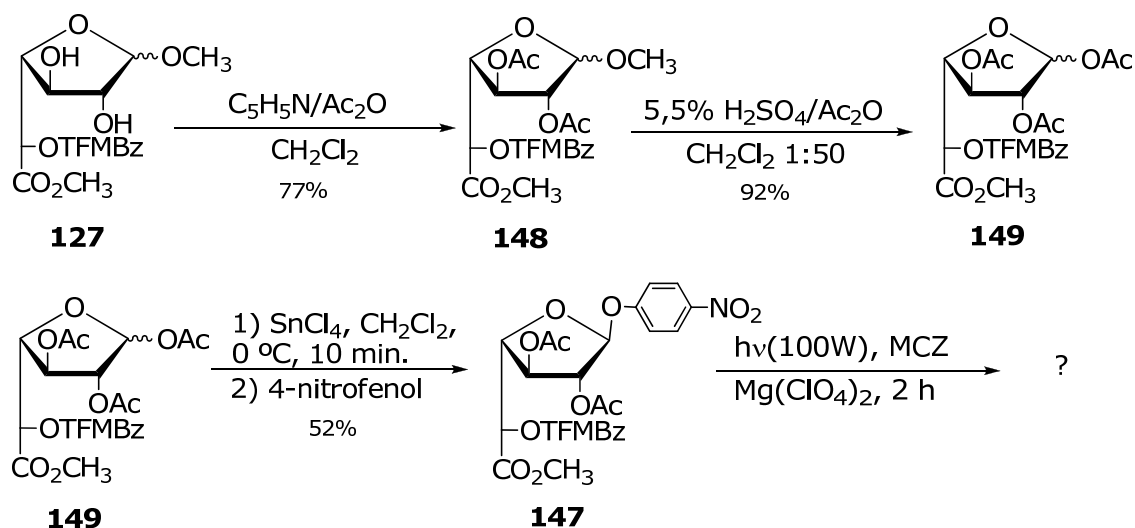
Figura 5-3. Espectro de RMN ¹³C del compuesto **143α** (CD₃OD, 125,8 MHz).

Así, se desarrolló la síntesis de **143α** mediante una estrategia en la cual la reacción de desoxigenación PET se realizó sobre el alquil glicósido **127**, y no sobre un precursor con la aglicona aromática “definitiva”, en base al antecedente de que esta reacción no era eficiente cuando la molécula presentaba otro cromóforo, además del sustituyente -TFMBZ sobre el hidroxilo a reducir (pag. 105). Sin embargo, se decidió sintetizar el derivado **147** con el propósito de verificar si la presencia de la aglicona 4-nitrofenilo también reduciría el rendimiento de la desoxigenación cuando el grupo a desoxigenar se encuentra “activado” por un grupo carboxilo en posición-α (Esquema 5-6).



Esquema 5-6.

Para la síntesis de **147** se partió de **127**, y se realizaron sucesivamente las reacciones de acetilación, acetólisis y glicosidación con 4-nitrofenol (Esquema 5-7), en las condiciones establecidas para la obtención de **143 α** a partir de **118** (Esquema 5-2).



Los compuestos **148** (77 %), **149** (92 %) y **147** (52%) se caracterizaron por espectroscopía de RMN y las señales correspondientes se describen en las Tablas 5-3 y 5-4.

Tabla 5-3. Señales de RMN ^{13}C de los compuestos **127 β** , **147 β** -**149**.

	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	OCH ₃	COCH ₃
127β ^a	108,6	81,2	77,7	83,1	72,3	168,1	55,2	53,0
148β ^a	106,7	81,5 ^b	77,1	81,3 ^b	71,6	170,4	54,9	52,9
148α ^a	101,4	76,3	74,7	79,3	72,7	169,7	54,9	52,9
179β ^a	99,3	80,6	77,0	83,8	71,5	170,2	-	53,0
179α ^a	92,3	75,1	74,2	80,2	72,5	169,4	-	52,9
147β ^a	103,9	71,4	83,1	76,9	81,4	170,3	-	53,0

^aCDCl₃, ^bintercambiable.

Tabla 5-4. Señales de RMN ¹H de los compuestos **127β**, **147β**-**149**.

	H-1 (<i>J</i> _{1,2})	H-2 (<i>J</i> _{2,3})	H-3 (<i>J</i> _{3,4})	H-4 (<i>J</i> _{4,5})	H-5	OCH ₃	COCH ₃	AcO
127β ^a	4,92 -	4,11 ^b	4,11 ^b (4,5)	4,48 ^b -	5,53 (4,2)	3,36	3,79	-
148β ^a	5,04 -	5,14 (1,2)	5,10 (5,5)	4,63 (2,7)	5,77	3,39	3,83	2,12 2,02
148α ^a	5,18 (4,8)	5,12 ^c (7,7)	5,57 (6,1)	4,53 (3,0)	5,61	3,40	3,81	2,11 2,04
149β ^a	6,31 -	5,27 (~1,9)	5,14 (4,9)	4,77 (3,0)	5,77	3,40	3,81	2,105 2,098/2,05
149α ^a	6,45 (5,0)	5,44 (7,1)	5,60 (5,8)	4,61 (4,2)	5,62	-	3,80	2,144 2,138/1,98
147β ^a	5,87 -	5,81 (2,8)	4,79 (5,1)	5,24 (1,4)	5,47	-	3,79	2,17 2,05

^aCDCl₃, ^bcentro de multiplete complejo, ^cseñal superpuesta con H-2β, H-3β.

Luego de irradiar a **147β** durante 2 h a 100 W se observó que la mezcla de reacción había tomado una coloración amarilla, probablemente como consecuencia de la hidrólisis del grupo 4-nitrofenilo anomérico. El análisis por ccd de la mezcla cruda de irradiación mostró la presencia de material de partida (*R_f* 0,64; tolueno-EtOAc 8:2) y de varios compuestos de menor movilidad. El análisis de espectro de RMN ¹³C de la mezcla cruda concentrada mostró la presencia de varias señales anoméricas, entre ellas la correspondiente a **147β**. A campos altos se observó la presencia de una señal compatible con un producto desoxigenado en C-5, pero la purificación de la mezcla por cromatografía en columna no permitió aislar ninguno de los productos en la cantidad necesaria como para poder identificarlos.

Este resultado confirmó que la presencia de la aglicona aromática activa otras vías de reacción, como la fotohidrólisis de la unión glicosídica, aún cuando el grupo a reducir está en presencia de un grupo carboxilo en posición-α.

Evaluación biológica del sustrato cromogénico **143 α**

En estudios anteriores utilizando β -D-galactofuranósidos simples como sustratos se observó que la *exo* β -D-galactofuranosidasa de *P. fellutanum* presenta una alta sensibilidad respecto a la estructura de la aglicona. Los estudios cinéticos mostraron que 4-nitrofenil β -D-Galf (**58**)^{4,5} es un buen sustrato (K_m 0,31 mM) y permitieron establecer que la reacción enzimática puede ser descrita por el modelo de Michaelis-Menten a bajas concentraciones de sustrato (velocidad de catálisis lineal y proporcional a la concentración de sustrato). El bencil β -D-Galf (**59**), con una aglicona de tamaño similar pero menor polaridad, resultó tener menor afinidad (K_m 3,7 mM).¹⁷ Por otra parte, el 4-metilcumarin-7-il β -D-Galf (**60**), con una aglicona más voluminosa, ni siquiera resultó hidrolizado. El metil β -D-Galf (**61 β** , K_m 2,6 mM),¹⁸ con una aglicona pequeña, es hidrolizado por la enzima pero con menor velocidad, indicando que también presenta una baja afinidad por la enzima. Por otra parte, la enzima también mostró una gran especificidad en cuanto a las variaciones que admite sobre la porción del azúcar. Los compuesto carentes de los HO-2,¹⁹ HO-3²⁰ o HO-6,²¹ o del hidroximetileno,²² fueron resistentes a la acción hidrolítica de la enzima, indicando que esos grupos son esenciales para el reconocimiento entre la enzima y el sustrato. Frecuentemente, las glicopiranosidasas son más promiscuas y aceptan mayor variación sobre la estructura del sustrato. Por ejemplo, las α -manosidasas presentes en porotos y almendras, hidrolizan al 4-nitrofenil α -D-manopiranosido y al 4-nitrofenil α -D-ramnopiranosido (análogo desoxigenado en C-6), prácticamente con la misma velocidad.²³

Para evaluar la habilidad como sustrato de **143 α** , análogo de **58** desoxigenado en C-5, se realizaron los ensayos colorimétricos, midiendo la cantidad de 4-nitrofenol liberada.

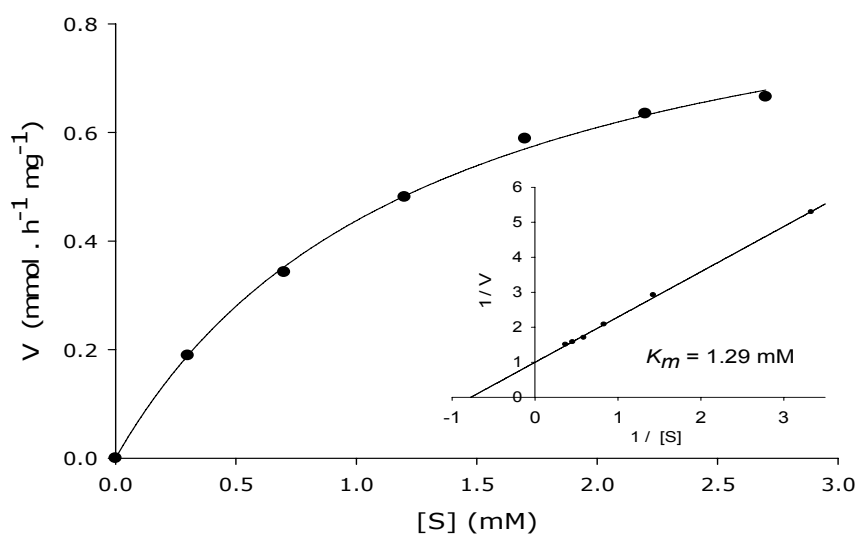


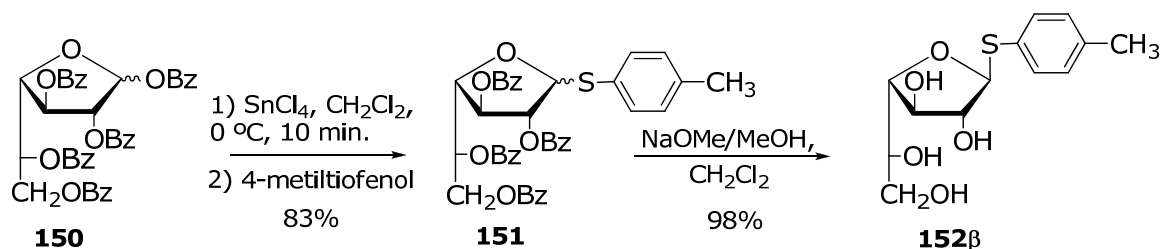
Figura 5-4. Gráfico de velocidad vs. Concentración **143 α** para la exo β -D-galactofuranosidasa de *P. fellutanum*. Inset: gráfico de las inversas (Lineweaver-Burk) para la determinación de $V_{\text{máx}}$ y K_m de **143 α** .

Un ensayo control, en el cual **143 α** se incubó en las condiciones de la reacción pero sin enzima, mostró que se producía cierto grado de hidrólisis química, a diferencia de **58** que es estable en esas condiciones. Esta diferencia no es sorprendente, ya que es conocida la gran labilidad de la unión glicosídica que presentan los desoxiazúcares.²⁴ Por otro lado, también se observó hidrólisis enzimática de **143 α** . El análisis cinético, considerando la hidrólisis química en cada punto, dió un valor de $K_m = 1,29 \text{ mM}$ para **143 α** (Figura 5-4). La diferencia de afinidad entre el metil glicósido **128 α** , que no fue hidrolizado y el aril glicósido **143 α** , un sustrato con baja afinidad, se correlaciona con las diferencias observadas en la afinidad de la enzima por los sustratos oxigenados **61 β** ($K_m = 2,60 \text{ mM}$) y **58** ($K_m = 0,31 \text{ mM}$). La diferencia entre **58** y **143 α** , indica que la ausencia del HO-5 disminuye considerablemente la interacción con la enzima.

Síntesis de 4-metilfenil 1-tio- β -D-galactofuranósido (152 β) y del análogo desoxigenado 4-metilfenil 5-desoxi-1-tio- α -L-arabino-hexofuranósido (154 α)

Con el objeto de evaluar el efecto del HO-5 en la actividad inhibitoria de tioglicósidos^{3,9} se sintetizaron los compuestos **152 β** (Esquema 5-9) y su

análogo desoxigenado en C-5 **154 α** (Esquema 5-10), y se realizaron los ensayos biológicos correspondientes.



Para la obtención de **152 β** se utilizó el derivado perbenzoilado **150**²⁵ como material de partida, y por glicosidación con 4-metiltiofenol promovida por SnCl₄, en las condiciones previamente descritas para la síntesis de tioglicósidos,³ se obtuvo **151** como una mezcla anomérica con 83 % de rendimiento (Esquema 5-9). Por integración de las señales correspondientes a los H-5 en el espectro de RMN ¹H se determinó que la relación entre los anómeros era de 9:1 (β/α). En las Tablas 5-5 y 5-6 se describen las señales correspondientes los compuestos **151 β** y **151 α** .

Tabla 5-5. Señales de RMN ¹³C de los compuestos **151-152 β** .

	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	PhCH ₃
151β ^a	91,6	82,3	77,9	81,4	70,3	63,4	21,08
151α ^a	90,0	78,1	77,0	81,6	70,6	63,4	21,13
152β ^b	90,9	80,3	76,1	82,0	70,9	63,4	20,9

^aCDCl₃, ^bD₂O.

Tabla 5-6. Señales de RMN ¹H de los compuestos **151-152 β** .

	H-1 (J _{1,2})	H-2 (J _{2,3})	H-3 (J _{3,4})	H-4 (J _{4,5})	H-5 (J _{6,5})	H-6 (J _{6',6})	H-6' (J _{5,6'})	PhCH ₃
151β ^a	5,78 ^c -	5,65 -	5,69 (~4,8)	4,96 (4,5)	6,10 ^d (~4,5)	4,71 (11,8)	4,76 ^c (4,5)	2,35
151α ^a	5,78 ^c -	5,92 ^d -	5,92 ^d -	4,54 (4,8)	6,02 ^d -	4,86 (12,0)	4,76 ^c (4,1)	2,37
152β ^b	5,21 (5,9)	4,02 (~5,95)	4,14 (7,8)	3,88 (3,3)	3,80 (4,7)	3,67 (11,7)	3,62 (13,0)	2,34

^aCDCl₃, ^bD₂O, ^cseñales superpuestas, ^dcentro de multiplete complejo.

Por desprotección de **151** con NaOMe/MeOH en CH₂Cl₂ y posterior recristalización de hexano/EtOAc (1:1) se obtuvo **152β** como un sólido cristalino, anoméricamente puro, con 90 % de rendimiento. En el espectro de RMN ¹³C se observó la señal correspondiente a C-1 a 90,1 ppm, valor similar al observado para otros tiogalactofuranósidos de configuración β (Figura 5-5).³ En el espectro de RMN ¹H se observó la señal correspondiente al H-anomérico como un doblete a 5,21 ppm con una constante de acoplamiento grande ($J_{1,2} = 5,9$ Hz, Figura 5-6). Este aumento de la $J_{1,2}$ que se produce al desproteger los tioglicósidos 1,2-*trans*, se había observado previamente y está asociado a un cambio conformacional, en el que el azufre anomérico se ubica en una posición cuasi-ecuatorial,³ como consecuencia del menor efecto anomérico.²⁶

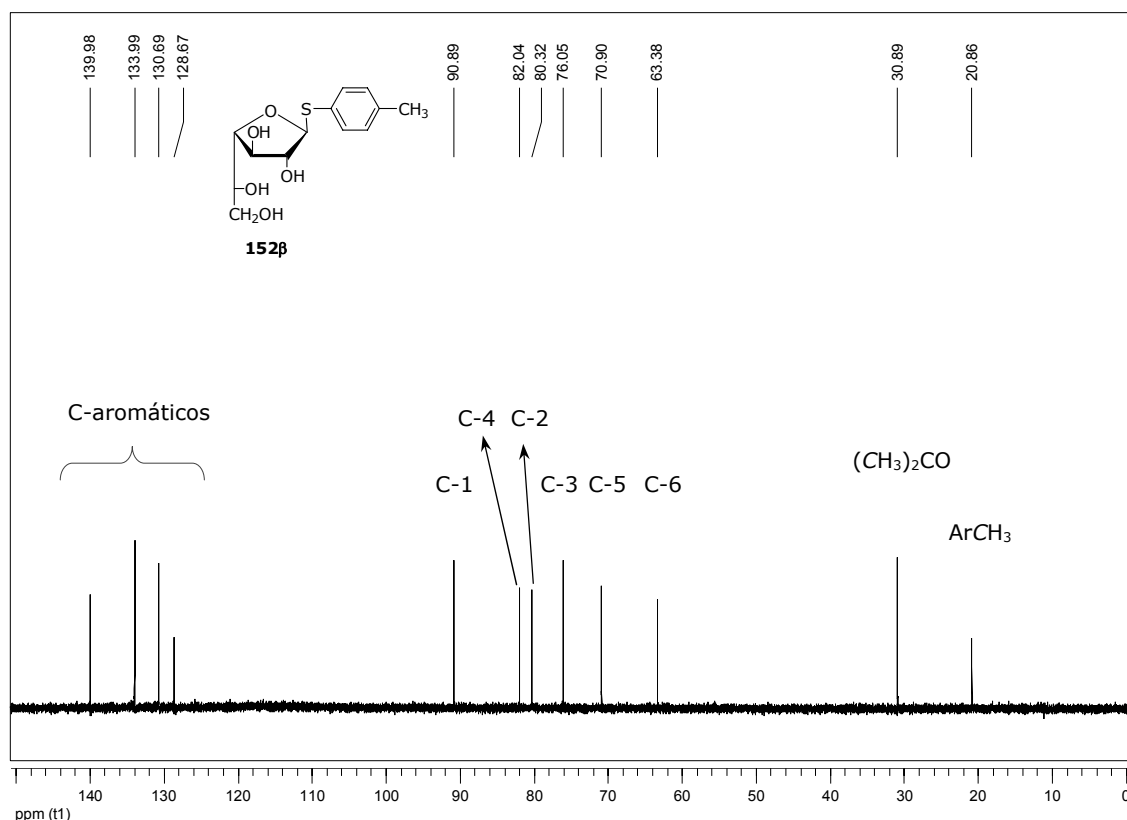


Figura 5-5. Espectro de RMN ¹³C del compuesto **152β** (D₂O, 125,8 MHz).

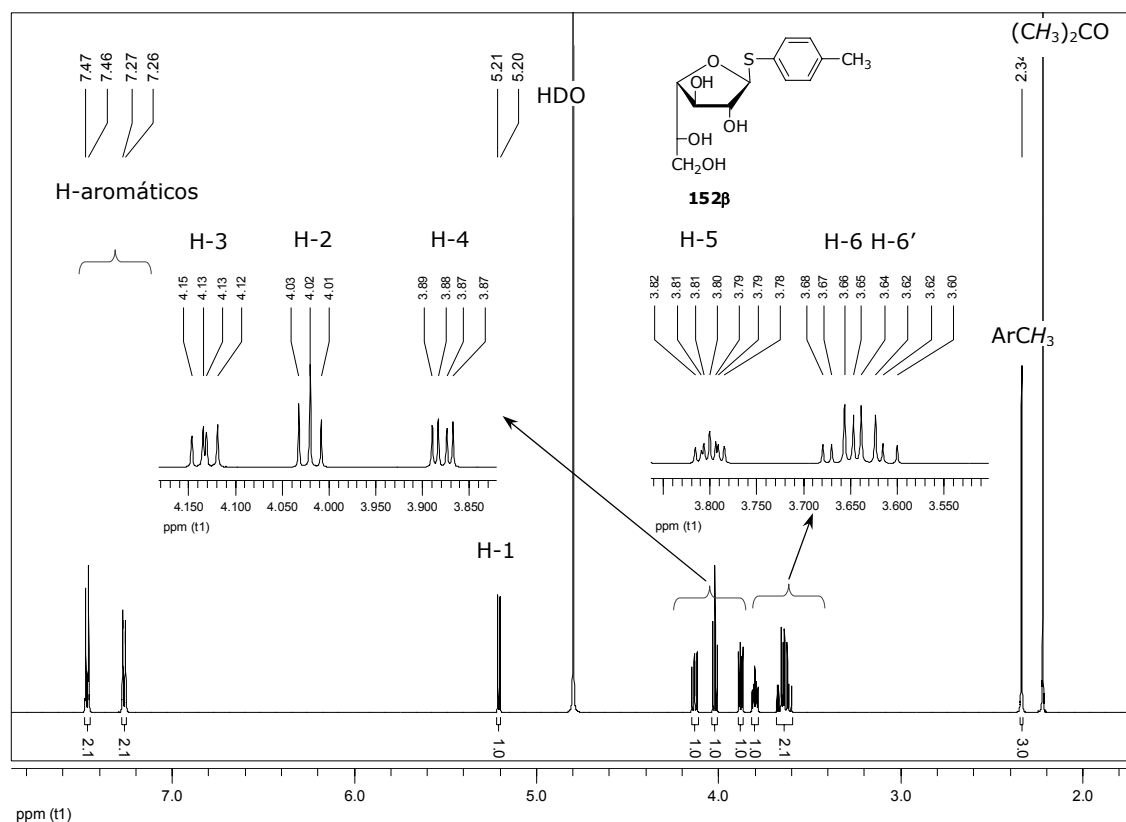
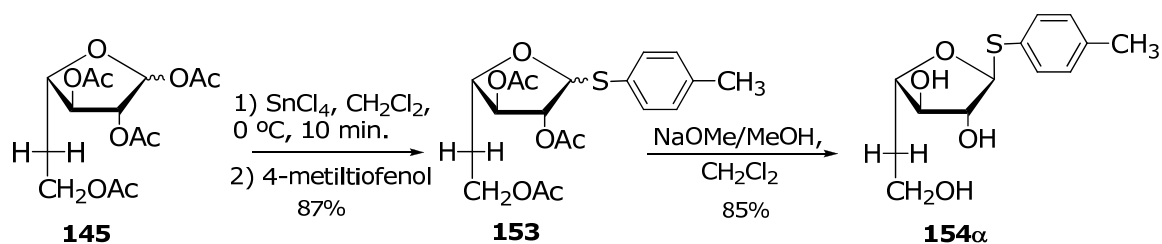


Figura 5-6. Espectro de RMN ^1H del compuesto **152 β** (D_2O , 500 MHz).

Para sintetizar el compuesto **154 α** se partió del compuesto **145**, intermediario previamente obtenido para la síntesis de **143 α** . Por glicosidación de **145** con 4-metilfenol promovida por SnCl_4 , se obtuvo **153** como un sólido amorfo (87%, Esquema 5-10).



Esquema 5-10.

El análisis del espectro de RMN ^{13}C de **153** mostró en la región anomérica la presencia de dos señales a δ 90,8 y δ 89,5 correspondientes a los glicósidos α y β , respectivamente, similar a los valores observados para otros tiogalactofuranósidos.^{3,27} En el espectro de RMN ^1H se observaron dos señales anoméricas, una a 5,39 ppm ($J_{1,2} = 2,0$ Hz) asignada al diastereómero 1,2-*trans*, y otra a 5,53 ppm ($J_{1,2} = 4,9$ Hz) correspondiente al diastereómero 1,2-*cis*. La integración de estas señales indicaba que los anómeros se

encontraban en cantidades similares (10:9). El menor diastereocontrol observado para la glicosidación de **153**, respecto de **150**^{12,13,3} se atribuyó a la menor eficiencia del efecto anquimérico en derivados acetilados.

En las Tablas 5-7 y 5-8 se describen las señales de RMN correspondientes a los compuestos **153β** y **153α**.

Tabla 5-7. Señales de RMN ¹³C de los compuestos **153αβ** y **154α**.

	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	PhCH ₃
153α ^a	90,8	82,0	80,01 ^c	78,5	32,7	60,9	2
153β ^a	89,5	77,6	80,04 ^c	80,5	31,4	61,1	
154α ^b	93,9	84,5	83,1	80,9	37,6	60,7	21,9

^aCDCl₃, ^bCD₃OD, ^cintercambiables.

Tabla 5-8. Señales de RMN ¹H de los compuestos **153αβ** y **154α**.

	H-1 (J _{1,2})	H-2 (J _{2,3})	H-3 (J _{3,4})	H-4 (J _{4,5})	H-5 (J _{5,4})	H-5' (J _{5',6})	H-6 (J _{6,5})	H-6' (J _{6',6})	PhCH ₃ (J _{5,5'})	(J _{6',5'}) (J _{6',5})
153α ^a	5,39 (2,0)	5,22 (~2,3)	4,96 (5,9)	4,38 (8,5)	2,10 ^{cd} (4,6)	2,10 ^c	4,21 ^c	4,16 ^c	2,33	
153β ^a	5,53	5,46 (1,5)	5,09 (5,8)	3,99 (8,5) ^f	2,05 ^{cd} (1,5) ^f	2,05 ^c	4,27 ^c	4,21 ^c	2,33	
154α ^b	5,19 (4,5)	3,99 (4,3)	3,72 (7,0)	4,01 (8,1)	1,99 (4,7)	1,84 (6,2)	3,76 (5,2)	3,69 (10,8)	2,30 (13,0)	(6,3) (7,7)

^aCDCl₃, ^bCD₃OD, ^ccentro de multiplete complejo, ^dseñales superpuestas, ^fintercambiables.

Por tratamiento de **153** con NaOMe/MeOH en CH₂Cl₂ anhidro, purificación por cromatografía en columna (85%) y recristalización (hexano-EtOAc 3:2) se obtuvo **154α** (Esquema 5-10), anoméricamente puro de acuerdo a su espectro de RMN ¹³C. La señal correspondiente al C-5 desoxigenado se observó a 37,6 ppm (Tabla 5-7; Figura 5-7). En el espectro de RMN ¹H se observó la señal anomérica a 5,19 ppm, como un doblete con una constante de acoplamiento de 4,5 Hz, compatible con la configuración 1,2-*trans* en tiogalactofuranósidos. A campos altos se observaron las señales correspondientes a los H-5 diastereotópicos como dos dddd a δ 1,84 y δ 1,99 (Tabla 5-8; Figura 5-8).

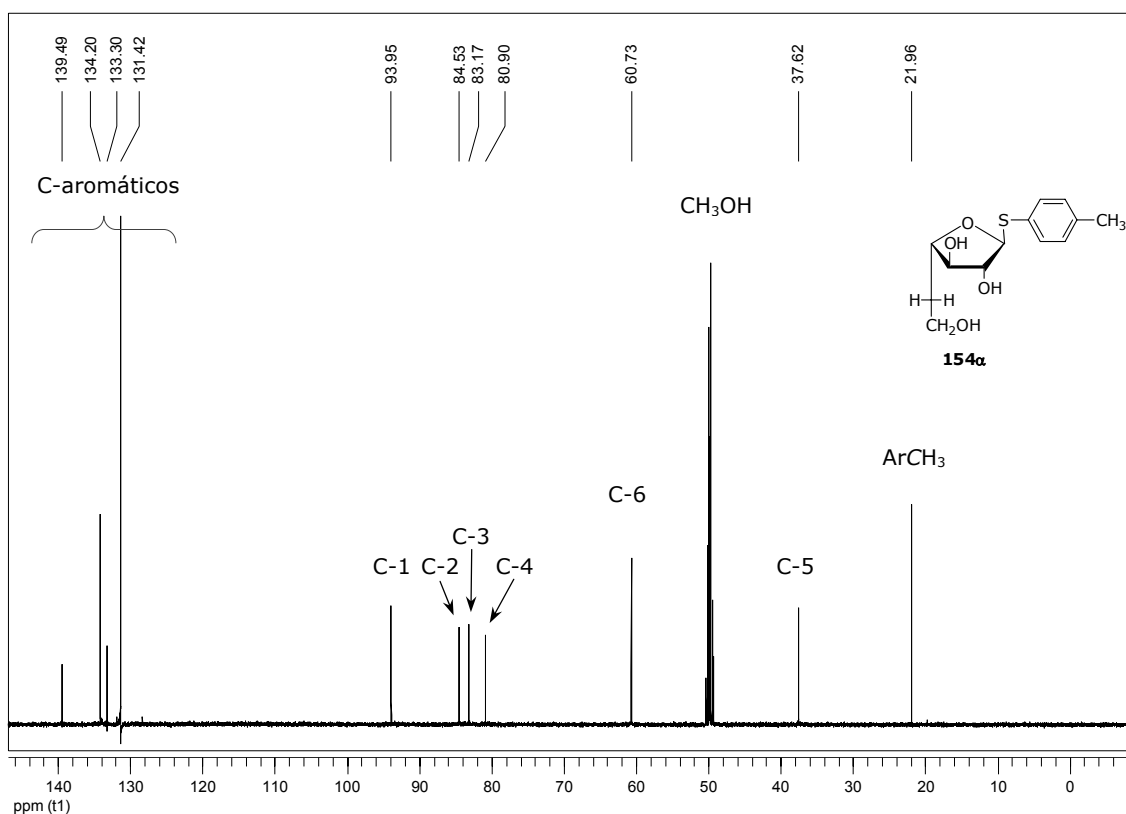


Figura 5-7. Espectro de RMN ¹³C del compuesto **154α** (CD₃OD, 125,8 MHz).

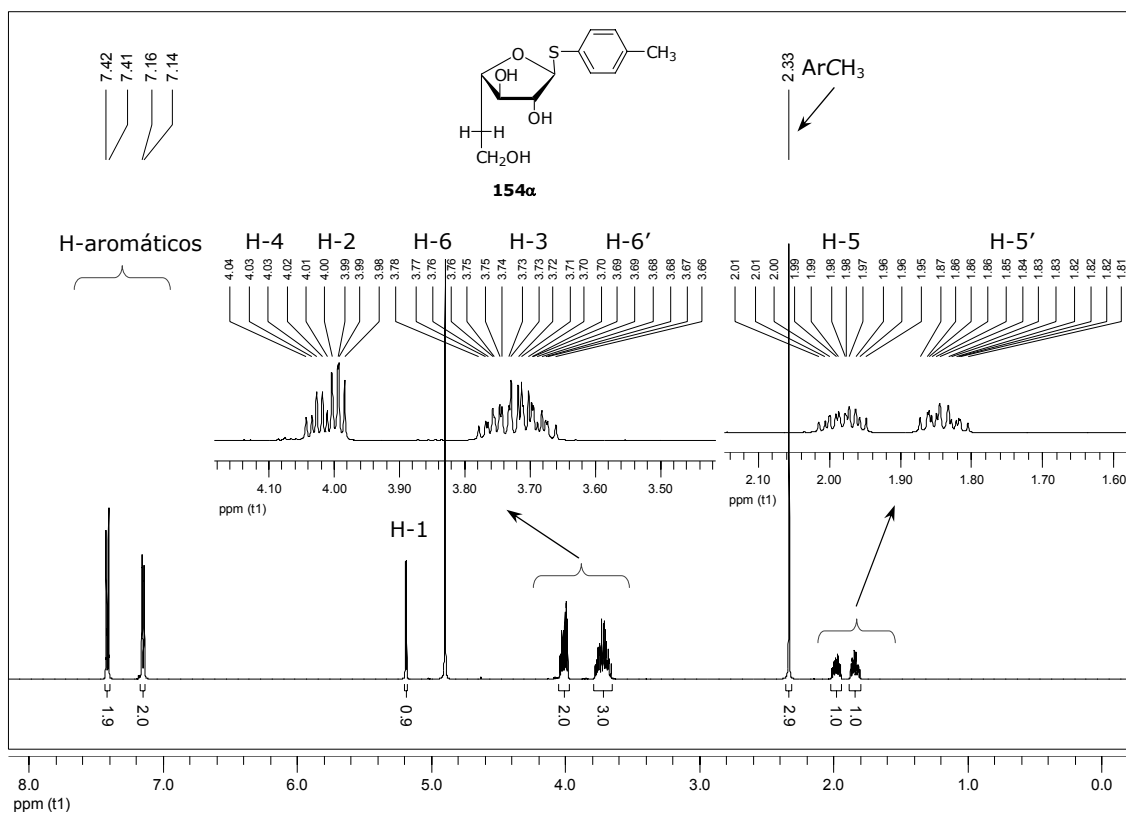


Figura 5-8. Espectro de RMN ¹H del compuesto **154α** (CD₃OD, 500 MHz).

Evaluación de **152 β** y **154 α** como inhibidores

Para estudiar la influencia del HO-5 en la actividad inhibitoria de tiogalactofuranósidos, se evaluaron los compuestos **152 β** y **154 α** . Los mismos se incorporaron en distintas concentraciones (0,2 mM a 2,5 mM) a la reacción enzimática, utilizando 4-nitrofenil β -D-galactofuranósido (**58**) como sustrato y D-galactono-1,4-lactona (**63**) como inhibidor de referencia (Figura 5-9), del mismo modo que se había hecho para los compuestos **118 α** , **126 α** , **126 β** y **128 α** .

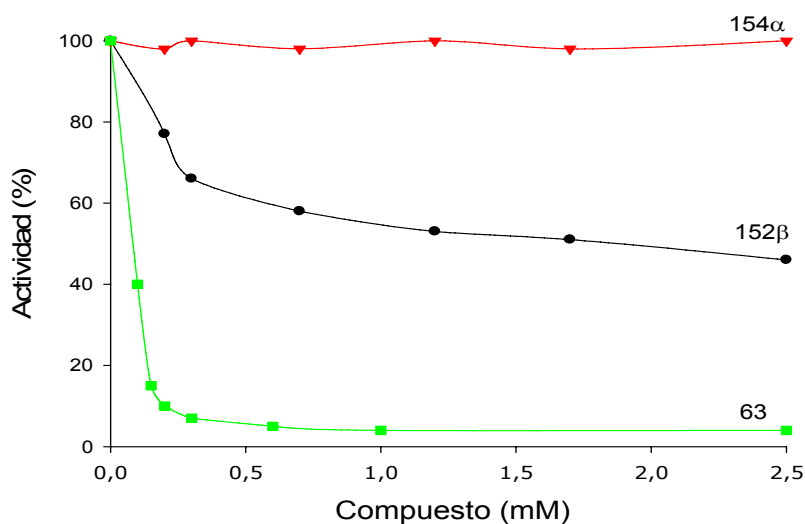


Figura 5-9. Efecto de la concentración de **63**, **152 β** y **154 α** sobre la hidrólisis de 4-nitrofenil β -D-galactofuranósido (**58**) por la enzima *exo* β -D-galactofuranosidasa de *P. fellutanum*. La actividad se evaluó por espectroscopía UV (410 nm), midiendo la cantidad de 4-nitrofenol liberada.

El compuesto **152 β** se comportó como un inhibidor débil, produciendo un 30% de inhibición a una concentración de 0,25 mM. Este resultado estaba de acuerdo con el poder inhibitorio observado para tiogalactofuranósidos con agliconas de similar tamaño y polaridad.^{3,27} El análogo desoxigenado **154 α** , en cambio, fue inactivo, no presentando efecto inhibitorio en el rango de concentraciones ensayadas (Figura 5-9). Entonces, la remoción del HO-5 del tioglicósido **152 β** eliminó el efecto inhibitorio debido al S anomérico.

Conclusiones

Se sintetizaron derivados de β -D-Galf desoxigenados en C-5 mediante una estrategia previamente desarrollada, para evaluarlos como sustrato y/o inhibidores de la *exo* β -D-galactofuranosidasa de *P. fellutanum*. Se comprobó la necesidad de realizar la reacción de desoxigenación PET sobre un intermediario con una aglicona "temporaria" no aromática, como el compuesto **127**, para evitar reacciones adicionales a la reducción, e introducir luego la aglicona "definitiva" que dé la potencialidad cromogénica al sustrato.

Los compuestos **118 α** , **126 β** , **126 α** , **128 α** , **152 β** y **154 α** fueron evaluados como inhibidores. Los derivados **118 α** , **126 β** y **128 α** no presentaron actividad inhibitoria, demostrando que la presencia del grupo carboximetil éster en el C-6, ó la ausencia del HO-5, ó ambas modificaciones simultáneamente, afectan la interacción con la enzima. El compuesto **152 β** se comportó como un inhibidor moderado, sin embargo la eliminación del HO-5 suprimió dicha actividad en **154 α** , poniendo nuevamente de manifiesto la gran especificidad de esta enzima en cuanto a la estructura de la porción del azúcar.

Los compuesto **118 α** y **143 α** fueron evaluados como sustratos. El compuesto **118 α** no presentó actividad, poniendo nuevamente en evidencia la importancia del HO-5 en la interacción azúcar-enzima. La presencia de la aglicona 4-nitrofenilo en **143 α** , aumenta la interacción con la enzima del mismo modo que en los derivados totalmente oxigenados, comportándose este compuesto como un sustrato de baja afinidad.

1. Szarek, W. A.; George, R.; Ritchie, S.; Vyas, D. M. *Carbohydr. Res.* **1978**, *62*, 89-103.
2. Bradford, M. M. *Anal. Biochem.* **1976**, *72*, 248-254.
3. Marino, C.; Marino, K.; Miletto, L.; Manso Alves, M.; Colli, W.; Lederkremer, R. M. *Glycobiology* **1998**, *8*, 901-904.
4. Varela, O.; Marino, C.; Lederkremer, R. M. *Carbohydr. Res.* **1986**, *155*, 247-251.

5. Miletti, L. C.; Marino, C.; Mariño, K.; Lederkremer, R. M.; Colli, W.; Alves, M. J. M. *Carbohydr. Res.* **1999**, *320*, 176-182.
6. Portella, C.; Deshayes, H.; Pete, J. P.; Scholler, D. *Tetrahedron* **1984**, *40*, 3635-3644.
7. Mariño, K.; Marino, C.; Lima, C.; Baldoni, L.; Lederkremer, R. M. *Eur. J. Org. Chem.* **2005**, 2958-2964.
8. Kumar, A.; Doddi, V. R.; Vankar, Y. D. *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 5993-5995.
9. Repetto, E.; Marino, C.; Uhrig, M. L.; Varela, O. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 2703-2711.
10. Witczak, Z. J.; Chhabra, R.; Chen, H.; Xie, X.-Q. *Carbohydr. Res.* **1997**, *301*, 167-175.
11. Gelin, M.; Ferrières, V.; Plusquellec, D. *Eur. J. Org. Chem.* **2000**, *2000*, 1423-1431.
12. Lederkremer, R. M.; Marino, C.; Varela, O. *Carbohydr. Res.* **1990**, *200*, 227-235.
13. Marino, C.; Varela, O.; Lederkremer, R. M. *Carbohydr. Res.* **1989**, *190*, 65-76.
14. Gandolfi-Donadío, L.; Gallo-Rodriguez, C.; Lederkremer, R. M. *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 6928-6934.
15. Mendoza, V. M.; Kashiwagi, G. A.; Lederkremer, R. M.; Gallo-Rodriguez, C. *Carbohydr. Res.*, **2010**, 385-396.
16. Bock, K.; Pedersen, C.; Tipson, R. S. In *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **1983**, *41*, 27-66.
17. Mariño, K.; Baldoni, L.; Marino, C. *Carbohydr. Res.* **2006**, *341*, 2286-2289.
18. Tuekam, B. A.; Park, Y.-I.; Unkefer, C. J.; Gander, J. E. *Appl. Environ. Microbiol.* **2001**, *67*, 4648-4656.
19. Chiocconi, A.; Marino, C.; Otal, E.; Lederkremer, R. M. *Carbohydr. Res.* **2002**, *337*, 2119-2126.
20. Chiocconi, A.; Varela, O.; Lederkremer, R. M. *Carbohydr. Lett.* **1996**, *2*, 115-122.
21. Chiocconi, A.; Marino, C.; Lederkremer, R. M. *Carbohydr. Res.* **1999**, *323*, 7-13.
22. Rietschel-Berst, M.; Jentoft, N. H.; Rick, P. D.; Pletcher, C.; Fang, F.; Gander, J. E. *J. Biol. Chem.* **1977**, *252*, 3219-3226.

-
23. Oku, T. N., T;; Miyake, Y.; Tsujii, H.; Hakamata, W.; Kadukura, K. *Biosci. Biotech. Biochem* **1996**, *60* 2038-2042.
 24. Bemiller, J. N.; Melville, L. W.; Tipson, R. S. In *Adv. Carbohydr. Chem.* **1967**, *22*, 25-108.
 25. Marino, C.; Gandolfi-Donadío, L.; Gallo-Rodriguez, C.; Bai, Y.; Lederkremer, R. M. In *Carbohydrate Chemistry: Proven Methods*; Kovac, P. Ed. En prensa.
 26. Zunszain, P.; Varela, O. *J. Chem. Res.* **1995**, (S) 486, (M) 2910-2923.
 27. Mariño, K.; Marino, C. *ARKIVOC* **2005**, *xii*, 341 - 351.

CAPÍTULO 6

Síntesis de sustratos radioactivos para la detección de galactofuranosidas

Introducción

La presencia de unidades de β -D-Galf en glicoconjugados de microorganismos patógenos,^{1,2} generó un gran interés en los mecanismos de biosíntesis y degradación de esas moléculas. Así, numerosos estudios han estado dirigidos a la caracterización de UDP-D-galactopiranosilmutasa, D-galactofuranosiltransferasa, y también D-galactofuranosidasas.

La maquinaria de biosíntesis y metabolismo de α -D-Galf, en cambio, aún no se conoce. Sin embargo, la caracterización de las enzimas relacionadas resultaría importante, pues estas unidades, si bien son menos frecuentes, también se presentan en algunos microorganismos patógenos y no se encuentran en mamíferos. Se ha descrito la presencia de unidades de α -D-Galf en bacterias como *Escherichia coli*,³ *Streptococcus pneumoniae*⁴ y *Hafnia alvei*⁵ y hongos, como *Paracoccidioides brasiliensis*.⁶

Penicillium varians es un hongo filamentoso no patogénico, que sintetiza el polisacárido extracelular conocido como varianosa, y presenta como unidad repetitiva la unidad estructural **I** (Figura 6-1).⁷

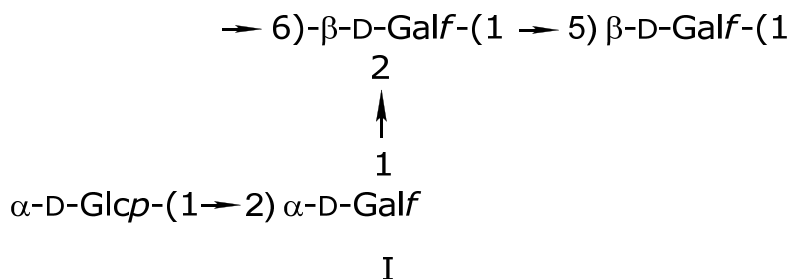


Figura 6-1. Estructura de la unidad repetitiva del polisacárido extracelular varianosa (**I**), producido por el hongo *Penicillium varians*.

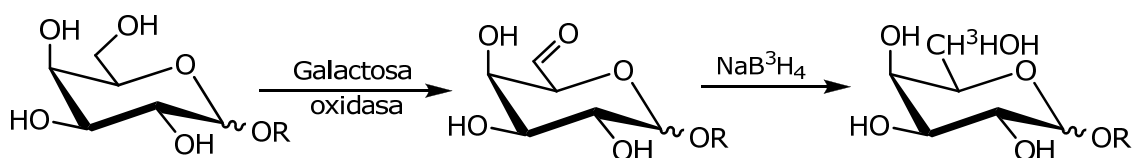
El rol de la varianosa durante el crecimiento del hongo no se conoce. Sin embargo, en *Penicillium fellutanum*, el glicopéptido extracelular péptidofosfogalactomanano (pPGM) se comporta como fuente de reserva de fosfato, colina, e hidratos de carbono.⁸ Cuando el medio de cultivo se empobrece, luego de varios días de cultivo, estos nutrientes son liberados por despolimerización catalizada por varias enzimas, y entre las hidrolasas que intervienen en este proceso, se encuentra involucrada la *exo* β -D-galactofuranosidasa.⁹ Por analogía con el rol fisiológico del pPGM en *P.*

fellutanum, se podría postular la participación de enzimas específicas para la degradación del polisacárido varianosa en *P. varians*. En el año 1989, Cousin y col. detectaron actividad de β -D-galactofuransidasa en *Penicillium funiculosum*,¹⁰ luego clasificado como *P. varians*.¹¹ En base a la estructura de la varianosa, podrían estar involucradas en su degradación una α -D-galactofuranosidasa y una α -D-glucosidasa. Para poder investigar ésto es necesario disponer de sustratos sensibles que permitan monitorear la presencia de estas enzimas.

Una de las estrategias que históricamente ha sido de gran utilidad para el estudio de procesos biosintéticos y metabólicos es el uso de compuestos radioactivos. Ésto se debe a que presentan la misma afinidad por las enzimas que los sustratos no marcados y que se pueden detectar con mucha sensibilidad. Un compuesto que sería útil para estudiar la existencia de una enzima con actividad de α -D-galactofuranosidasa, sería el metil α -D-[6-³H]galactofuranósido (**61 α ***).

Antecedentes en la marcación de D-galactosa y de D-galactofuranósidos. Síntesis de metil β -D-[6-³H]galactofuranósido (**61 β ***) y de UDP- β -D-[6-³H]Galf

Para la obtención de los compuestos [6-³H]-galactopiranósicos una estrategia muy difundida ha sido el uso de D-galactosa oxidasa (EC 1.1.3.9). Esta enzima oxida el alcohol primario de C-6 al aldehído correspondiente, que luego es reducido con NaB³H₄, introduciendo así la marca de tritio (³H) en el C-6 (Esquema 6-1).^{12,13}

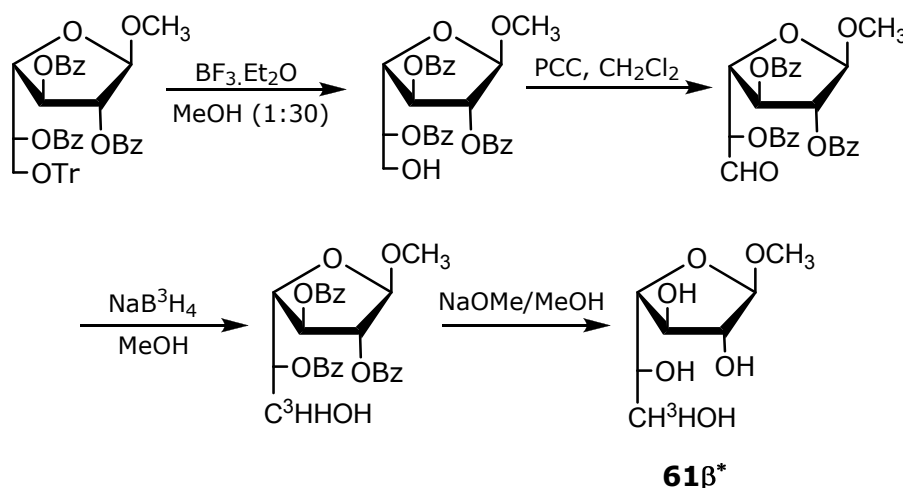


Esquema 6-1. Marcación de D-galactopiranósidos por vía enzimática.

Este método no es aplicable a D-galactofuranósidos, pues no se dispone de una enzima análoga que oxide derivados de D-Galf. El único derivado

radioactivo de D-Galf que se sintetizó mediante una estrategia enzimática fue UDP- β -D-[6- 3 H]Galf. Para ello se partió de D-[6- 3 H]Galp, que por acción de la UDP-D-galactopiranosilmutasa (EC 5.4.99)¹⁴ se convirtió en UDP- β -D-[6- 3 H]Galf (Figura 2-1). La reacción se realizó *in vitro*, y resultó muy poco eficiente en términos de rendimiento (8%).¹⁵

En nuestro laboratorio se desarrolló un método químico para la marcación específica en posición 6 de derivados de D-Galf. La reacción clave de la estrategia fue la oxidación del C-6 de un derivado desprotegido en esa posición con clorocromato de piridonio (PCC). Posteriormente se redujo el aldehído correspondiente con NaB^3H_4 y por desprotección se obtuvo **61 β^*** , luego de 4 pasos de reacción (Esquema 6-2).¹⁶



Esquema 6-2. Secuencia sintética para la obtención del metil β -D-[6- 3 H]-galactofuranósidos (**61 β^***).¹⁶

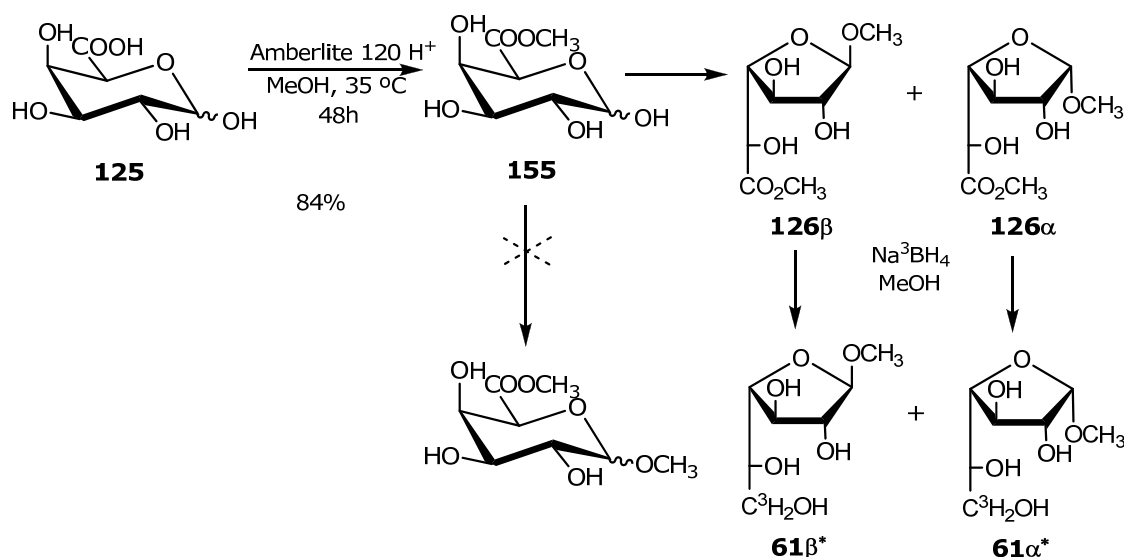
La incorporación del radionucleído se realizó en el anteúltimo paso, teniendo que manipular el material marcado durante la posterior reacción de desbenzoilación. Esta secuencia luego fue utilizada para realizar la primera síntesis química de UDP-[6- 3 H]-D-Galf.¹⁷

Se demostró la utilidad de **61 β^*** como sonda sensible, utilizándolo para detectar actividad de *exo* β -D-galactofuranosidasa en *P. fellutanum*. En combinación con otras herramientas sintéticas, como un sistema específico de cromatografía de afinidad, **61 β^*** permitió detectar por primera vez la actividad de *exo* β -D-galactofuranosidasa en *Trypanosoma cruzi*.¹⁸ La disponibilidad de un sustrato radioactivo fue esencial, ya que el material

biológico era coloreado y los niveles de enzima muy bajos, con lo cual los ensayos colorimétricos utilizando 4-nitrofenil β -D-galactofuranósido (**58**) habían resultado dudosos.¹⁸

Síntesis del metil β -D-[6-³H]galactofuranósido (**61 β ***) y metil α -D-[6-³H]galactofuranósido (**61 α ***)

Para la síntesis de **61 α *** consideramos que un precursor adecuado sería el ácido D-galacturónico (**125**). En el capítulo 4, se describió obtención de la mezcla de anómeros de **126**, por tratamiento de **125** con metanol en presencia Amberlite IR-120H (H⁺), a 35 °C durante de 48 h. Sin embargo, se había descrito que el mismo tratamiento a temperatura ambiente durante 8 h, conducía a la formación de **155**. Para hacer una mejor descripción de la reacción, se realizó el análisis por espectroscopía de RMN ¹H y ¹³C del crudo de reacción luego de 8 h. Los espectros mostraron que se trataba de una mezcla compuesta por **126 α** y **126 β** en relación de 3:1 y una gran proporción de **155** sin glicosidar (Esquema 6-3). Un nuevo análisis por espectroscopía de RMN ¹H y ¹³C del crudo de reacción luego 48 h, mostró la presencia de la mezcla de anómeros de **126** en relación α/β 1:2,6 y no se detectaron formas piranósicas (Tabla 6-1, entrada 1).



Esquema 6-3.

Tabla 6-1. Metil glicósidos formados por el procedimiento de catálisis con resina (H⁺).

Entrada	Monosacárido	Distribución de productos (%)			
		β -f	α -f	β -p	α -p
1	Ácido D-galacturónico	71 ^a	29 ^a	-	-
		62 ^b	28 ^b		
2	D-Galactosa	68 ^a	17 ^a	6 ^a	9 ^a
		60 ^b			
3	D-Glucosa ^c	27 ^a		29 ^{ad}	10 ^a
4	D-Manosa	11 ^a	3 ^a	20 ^a	66 ^a

^a Determinado por espectroscopía de RMN ¹³C y ¹H, ^bProducto aislado por purificación por cromatografía en columna, ^cSe observó 34% sin reaccionar, ^dCorresponde a la integración de las señales de los metilglicósidos α -f y β -p, señales no resueltas.

Estos resultados sugerían que la esterificación del grupo carboxílico, que ocurre con mayor velocidad que la reacción de glicosidación,¹⁹⁻²¹ podría favorecer la formación del anillo furanósico, por motivos estéricos. Para investigar ésto, se realizó el mismo procedimiento con D-galactosa. El análisis de los espectros de RMN ¹³C y ¹H del crudo de reacción concentrado mostró la presencia del metil β -D-galactofuranósido (**61 β**) como producto mayoritario y de los metil glicósidos α -D-Galf (**61 α**) y α,β -D-Galp en menor proporción (Tabla 1, entrada 2). Por purificación por cromatografía en columna se aisló **61 β** con 60% de rendimiento. La tendencia de D-galactosa para formar glicósidos furanósicos en medio ácido es bien conocida.²² Por tratamiento de D-galactosa en las condiciones clásicas de glicosidación de Fisher (MeOH, HCl) se obtenía, luego de una purificación por cromatografía en columna, el metil β -D-galactofuranósido (**61 β**) con 53% de rendimiento.²² Si bien el procedimiento con la resina no conduce a un rendimiento mucho mayor, el aislamiento de **61 β** resulta más sencillo. El desarrollo de esta metodología tan simple resulta importante, considerando que **61 β** es muy utilizado como material de partida en la síntesis de compuestos con residuos de D-Galf.²³⁻²⁷ Por tratamiento de D-glucosa con Amberlite IR-120H (H⁺) durante 48 h, se observó por espectroscopía de RMN ¹³C y ¹H del crudo de reacción la formación de los cuatro glicósidos y 34% de material de partida sin reaccionar (Tabla 6-1, entrada 3). En el caso de D-manosa, como era de

prever, se observó la presencia del metil α -D-Manp como producto mayoritario (Tabla 6-1, entrada 4).

Si bien en el caso de **125** la tendencia a la formación de furanosas es mayor que para D-Gal, estos resultados indicarían que es la configuración del C-4 la responsable de esto, más que el impedimento estérico que ofrece el grupo carboximetiléster.

Para la síntesis de los glicósidos con alcoholes de cadena larga de ácidos D-glicofuranosilurónicos y D-glicofuranósidos, se había desarrollado un procedimiento que involucraba la complejación de los hidroxilos de C-5 y C-6 con cationes de metales alcalinotérreos.^{28,29} Sin embargo, nuestros resultados mostraron que no es necesaria, al menos con metanol, la complejación del diol para favorecer la formación de las formas furanósicas.

Los compuestos **61 α** y **61 β** se analizaron por HPAEC-PAD y se establecieron condiciones adecuadas de resolución (gráficos A y B, Figura 6-2).

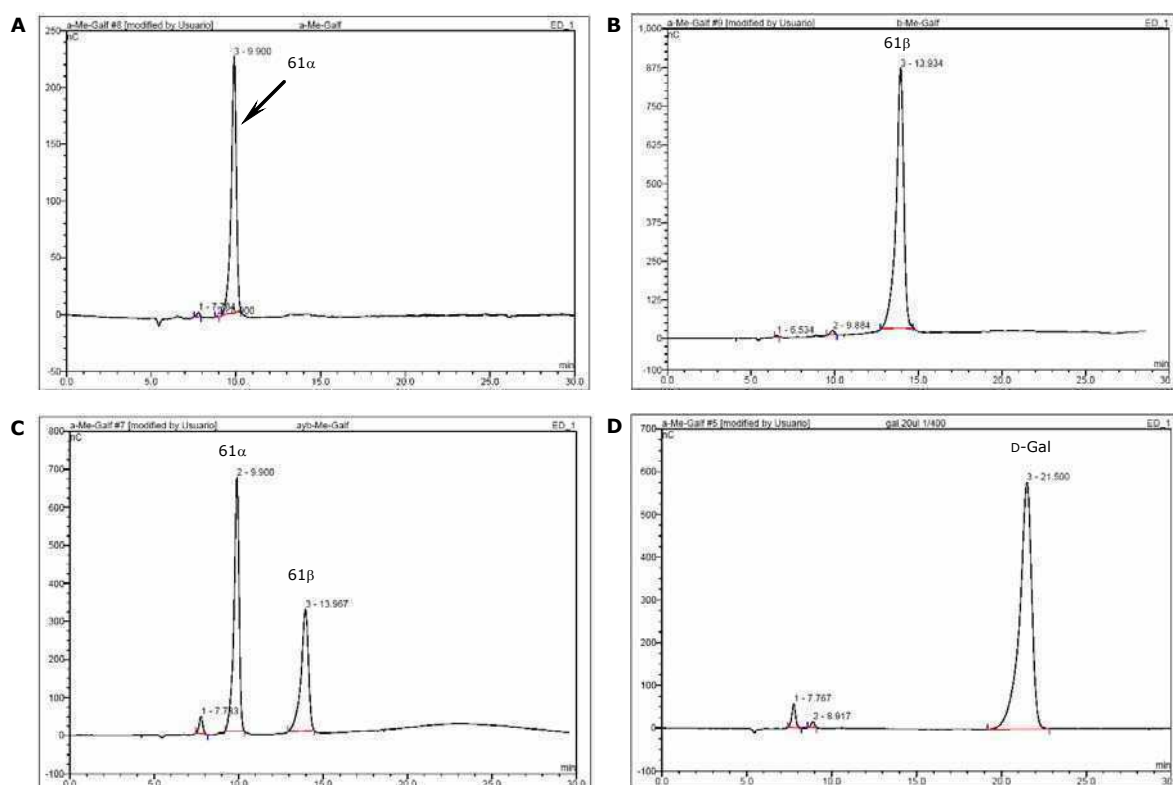
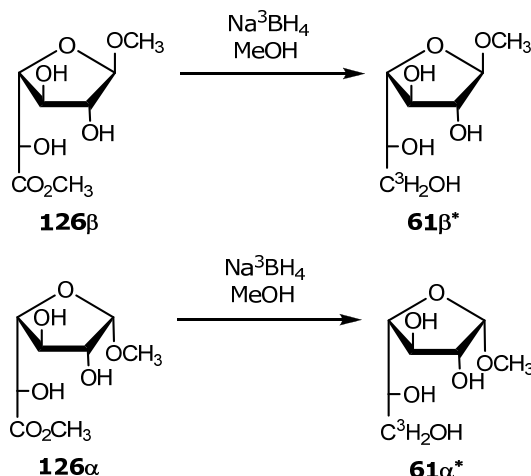


Figura 6-2. **A:** testigo del **61 α** . **B:** testigo del **61 β** . **C:** mezcla de ambos anómeros. **D:** testigo de galactosa.

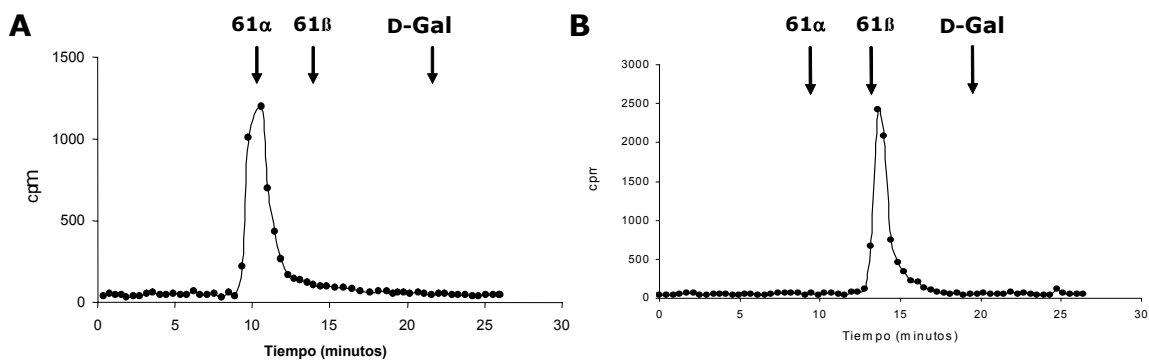
La simplicidad del procedimiento para la preparación de **126 α** y **126 β** , nos llevó a considerarlos muy convenientes para la obtención de metil α - y β -D-galactofuranósidos marcados con tritio, por reducción con NaB³H₄ del éster metílico.

La síntesis de sustratos radioactivos difiere en muchos aspectos de la de los compuestos análogos sin radiomarcación. En primer lugar, la misma secuencia de reacciones que involucra la incorporación del radioisótopo se suele realizar en paralelo con los compuestos no marcados, de manera tal de poder verificar la identidad y la estabilidad de los intermediarios y productos, ya sea por espectroscopía o por otras técnicas. Otro aspecto a tener en cuenta es que las reacciones se realizan a microescala con el objetivo de manipular poca cantidad de reactivos radioactivos y cuidar la seguridad del operador. Ésto requiere, muchas veces, la modificación de algunas etapas, por ejemplo las correspondientes al "work-up". Además, las reacciones sólo pueden monitorearse por ccd-fluorografía ó por centelleo líquido, por lo cual no se cuenta con métodos inmediatos para determinar, por ejemplo, el final de una reacción. Así, se establecieron previamente las condiciones para la reducción en frío de **126 α** y **126 β** con NaB³H₄, y luego se repitió el procedimiento con el reductor radioactivo. Se prepararon soluciones de **126 α** y **126 β** (~2,2 mg) en metanol, a las que les se agregó NaB³H₄ (10 mCi, en 0,1M KOH/MeOH). Luego de 16 h de reacción a temperatura ambiente, se agregó NaBH₄, como se describe en el capítulo experimental. La desionización de las soluciones se realizó por eluciones sucesivas través de columnas de resina Amberlite IR-120H (forma H⁺) y resina IWT TMD-8 (forma mixta). Para eliminar los boratos se realizaron varias coevaporaciones a presión reducida con metanol (Esquema 6-4).



Esquema 6-4. Reacción de incorporación de tritio en C-6.

La identidad de los productos de reacción se estableció por HPAEC-PAD (Figura 6-3). En el cromatograma A se observa la elución de un pico con radiación β (t_r 9,9 min) coincidente con **61 α** frío y el cromatograma B presentó un pico con radiación β a t_r 13,9 min, coincidente con **61 β** frío (B, Figura 6-2).

Figura 6-3. Análisis por HPAEC-PAD de **61 α^*** y **61 β^*** . **A**: patrón del **61 α^*** . **B**: patrón del **61 β^*** .

Evaluación de la actividad enzimática de los extractos de cultivos de *Penicillium varians*

Disponiendo de **61 α^*** como un nuevo sustrato para la detección de α -D-galactofuranosidas, y utilizando otros sustratos previamente desarrollados, investigamos la actividad enzimática de los medios de cultivo de *P. varians*.

Los medios de cultivos de distintas edades fueron previamente filtrados, concentrados por liofilización y dializados. La actividad de β -D-galactofuranosidasa se evaluó utilizando 4-nitrofenil β -D-galactofuranósido (**58**) como sustrato,³⁰ observándose la actividad hidrolítica de acuerdo con los estudios previamente descritos (Figura 6-4).¹⁰ Paralelamente, utilizando 4-nitrofenil α -D-glucopiranosido como sustrato,³¹ se investigó la presencia de α -D-glucopiranosidasa, pero no se observó actividad (Figura 6-4).

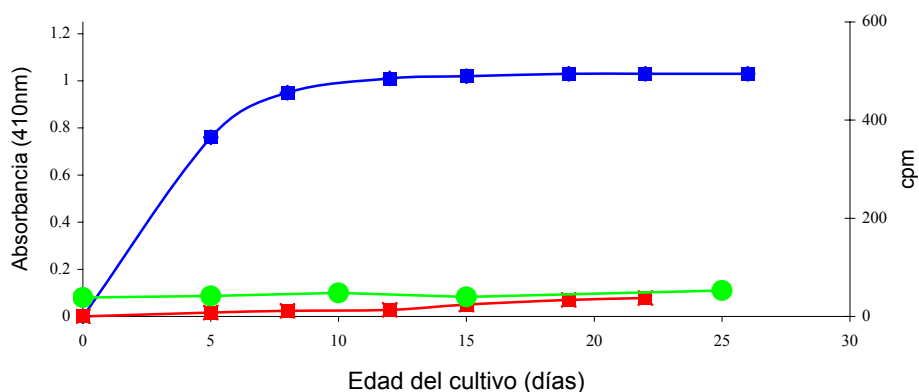


Figura 6-4. Evaluación de la actividad enzimática en extractos del medio de cultivo de *P. varians*. -■- Actividad de β -D-galactofuranosidasa: determinada utilizando 4-nitrofenil β -D-galactofuranósido. -●- Actividad de α -D-glucopiranosidasa: determinada utilizando 4-nitrofenil α -D-glucopiranosido. -■- Actividad de α -D-galactofuranosidasa: determinada utilizando **61 α ***.

Los compuestos **61 α *** y **61 β *** se incubaron con extractos del medio de cultivo de *P. varians* (20 μ l, 50 μ g de proteínas totales) en buffer NaOAc/HOAc de pH 5, durante 24 h y a 37 °C. La actividad enzimática se monitoreó por HPEAC-PAD (ver capítulo 7).

El cromatograma C, corresponde a la incubación de **61 α *** con el extracto del medio de cultivo de *P. varians* de 30 días de edad, en las mismas condiciones en las que se realizó el ensayo con **61 β ***. El análisis del cromatograma mostró la presencia de un único pico radioactivo con un tiempo de retención que coincide con **61 α** (C, Figura 6-5). La ausencia del pico correspondiente a D-Gal radioactiva nos indicaría que en las condiciones en que se realizó el ensayo no hubo hidrólisis enzimática de **61 α ***. Los ensayos se repitieron con extractos del cultivo de 5, 10 15 días de edad, en todos los casos los resultados fueron negativos (Figura 6-4).

De todos modos, la utilidad de los sustratos radioactivos sintetizados quedó demostrada, mediante la detección de la actividad de *exo* β -D-galactofuranosidasa (D, Figura 6-5). El análisis por HPAEC-PAD de los productos de incubación de **61 β *** con un extracto del medio de cultivo de 30 días de edad, reveló la presencia de dos fracciones activas, una con tiempo de retención correspondiente al metil β -D-Galf (t_r 13,9 min, B Figura 6-5) y otra coincidente D-Gal (t_r 21,5 min, D Figura 6-5).

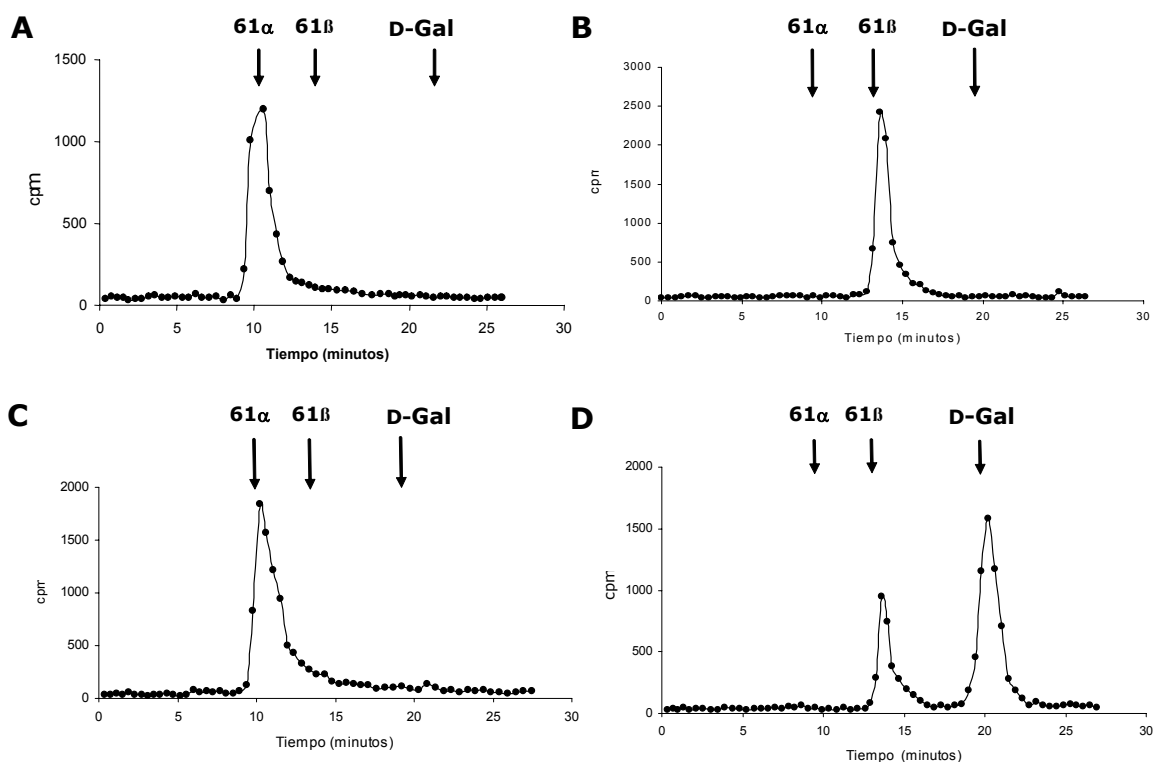


Figura 6-5. Análisis por HPAEC-PAD de **61 α *** y **61 β ***. **A**: testigo de **61 α ***. **B**: testigo de **61 β ***. **C**: ensayo enzimático con medio de cultivo de *P.varians* de 25 días de edad, utilizando **61 α *** como sustrato. **D**: ensayo enzimático con medio de cultivo de *P.varians* de 30 días de edad, utilizando **61 β *** como sustrato.

Conclusiones

Se establecieron condiciones simples para la obtención de los metil glicósidos furanósicos de ácido D-galacturónico y D-galactosa por tratamiento de los azúcares libre con metanol, en presencia de una resina de intercambio catiónico (H^+). La simplicidad de este método, combinada con la reducción

con NaB^3H_4 , nos permitió obtener **61 β *** mediante una secuencia de reacciones más corta que la desarrollada en el laboratorio previamente y sin utilizar PCC como oxidante,¹⁶ lo cual es beneficioso desde el punto de vista ambiental. Por otra parte, si bien la estereoselectividad para la obtención de **121 α** es baja, la separación por cromatografía en columna y la recristalización nos permitió disponer de un precursor que conduce a **61 α *** utilizando una ruta de síntesis muy simple.

La utilidad de los sustratos radioactivos se demostró mediante la detección de actividad de β -D-galactofuranosidasa en el medio de cultivo de *P. varians*.

Los estudios realizados no evidenciaron actividad de α -D-galactofuranosidasa ni de α -D-glucopiranosidasa. Sin embargo, no son suficientes como para descartar la existencia de una enzima de ese tipo, ya que ésta podría requerir otras condiciones de pH, temperatura, o podría estar presente en extractos del cultivo de otras edades. Inclusive, si hubiera una *endo* enzima con actividad de α -D-galactofuranosidasa, no podría ser detectada con el sustrato **61 α ***.

1. Lederkremer, R. M.; Colli, W. *Glycobiology* **1995**, *5*, 547-552.
2. Houseknecht, J. B.; Lowary, T. L. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2001**, *5*, 677-682.
3. Linnerborg, M.; Wollin, R.; Widmalm, G. *Eur. J. Biochem.* **1997**, *246*, 565-573.
4. Richards, J. C.; Perry, M. B.; Knisker, P. J. *Can. J. Chem.* **1989**, *67*, 1038-1050.
5. Petersson, C.; Jachymek, W.; Kenne, L.; Niedziela, T.; Lugowski, C. *Carbohydr. Res.* **1997**, *298*, 219-227.
6. Ahrazem, O.; Prieto, A.; San-Blas, G.; Leal, J. A.; Jimenez-Barbero, J.; Bernabe, M. *Glycobiology* **2003**, *13*, 743-747.

7. Jansson, P.-E.; Lindberg, B. *Carbohydr. Res.* **1980**, *82*, 97-102.
8. Gander, J. E.; Jentoft, N. H.; Drewes, L. R.; Rick, P. D. *J. Biol. Chem.* **1974**, *249*, 2063-2072.
9. Rietschel-Berst, M.; Jentoft, N. H.; Rick, P. D.; Pletcher, C.; Fang, F.; Gander, J. E. *J. Biol. Chem.* **1977**, *252*, 3219-3226.
10. Cousin, M. A.; Notermans, S.; Hoogerhout, P.; Van Boom, J. H. *J. Appl. Microbiology* **1989**, *66*, 311-317.
11. database., S. f. G. S., <http://www.speciesfungorum.org>.
12. Avigad, G.; Asensio, C.; Amaral, D.; Horecker, B. L. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1961**, *4*, 474-477.
13. Gabriel, O.; Ashwell, G. *Glycobiology* **1992**, *2*, 437-443.
14. Nassau, P.; Martin, S.; Brown, R.; Weston, A.; Monsey, D.; McNeil, M.; Duncan, K. *J. Bacteriol.* **1996**, *178*, 1047-1052.
15. Lee, R.; Monsey, D.; Weston, A.; Duncan, K.; Rithner, C.; McNeil, M. *Anal. Biochem.* **1996**, *242*, 1-7.
16. Mariño, K.; Marino, C.; Lederkremer, R. M. *Anal. Biochem.* **2002**, *301*, 325-328.
17. Mariño, K.; Marino, C.; Lima, C.; Baldoni, L.; Lederkremer, R. M. *Eur. J. Org. Chem.* **2005**, 2958-2964.
18. Miletto, L. C.; Mariño, K.; Marino, C.; Colli, W.; Alves, M. J. M.; Lederkremer, R. M. *Mol. Biochem. Parasitol.* **2003**, *127*, 85-88.
19. Jansen, E. F.; Jang, R. *J. Am. Chem. Soc.* **1946**, *68*, 1475-1477.
20. Larsson, K.; Petersson, G. *Carbohydr. Res.* **1974**, *34*, 323-329.
21. Vlahov, J.; Snatzke, G. *Liebigs Ann. Chem.* **1983**, *1983*, 570-574.
22. Augestad, I.; Berner, E. *Acta Chem. Scand.* **1954**, *8*, 251-256.
23. Bai, Y.; Lowary, T. L. *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 9672-9680.
24. Bai, Y.; Lowary, T. L. *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 9658-9671.
25. Kovensky, J.; McNeil, M.; Sinay, P. *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 6202-6205.
26. Choudhury, A. K.; Roy, N. *Carbohydr. Res.* **1998**, *308*, 207-211.
27. Pathak, A. K.; Pathak, V.; Maddry, J. A.; Suling, W. J.; Gurcha, S. S.; Besra, G. S.; Reynolds, R. C. *Bioorg. Med. Chem.* **2001**, *9*, 3145-3151.

-
28. Bertho, J.-N.; Ferrières, V.; Plusquellec, D. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1995** 1391 - 1393.
 29. Ferrières, V.; Bertho, J.-N.; Plusquellec, D. *Carbohydr. Res.* **1998**, *311*, 25-35.
 30. Marino, C.; Marino, K.; Miletto, L.; Manso Alves, M. J.; Colli, W.; Lederkremer, R. M. *Glycobiology* **1998**, *8*, 901-904.
 31. Oliveira, D. E.; Santos Neto, A. L. C.; Panek, A. D. *Anal. Biochem.* **1981**, *113*, 188-192.

CAPÍTULO 7

Parte experimental

Instrumental y métodos generales

Punto de Fusión

Se determinaron con un aparato Fisher-Johns y no están corregidos.

Cromatografía en capa delgada (ccd)

Se realizaron sobre placas de aluminio cubiertas de sílica gel 60 F₂₅₄ (Merck) de 0,2 mm de espesor. Los sistemas de solventes empleados se indican en cada caso.

Métodos de revelado:

El revelado se efectuó por exposición a la luz ultravioleta ($\lambda = 254 \text{ nm}$) y/o inmersión en una solución de H₂SO₄ 5% (v/v) en etanol con 0,01% de *p*-anisaldehído y posterior calentamiento a 150 °C.

Para autorradiografía: Placas de rayos X (Kodak-X-Omat AR) se expusieron a las placas que contenían muestras radioactivas, rociadas con EN³HANCE (NEN) en oscuridad y se mantuvieron a -70 °C durante 5 a 10 días, de acuerdo a la cantidad de radioactividad presente. Para el revelado, las placas fotográficas en la oscuridad y a temperatura ambiente se sumergieron durante 2-3 min sucesivamente en:

- a- Solución reveladora: Na₂SO₃, 72 g; metol, 2,2 g; hidroquinona, 8,8 g; KBr, 4g; Na₂CO₃(anhidro), 48 g; H₂O, 1000 ml.
- b- Solución de lavado: ácido acético 2% en H₂O.
- c- Solución fijadora: Se usaron soluciones fijadoras comerciales Kodak.
- d- Lavado final en agua y H₂O destilada.

Cromatografía en columna

Se realizaron sobre sílica gel 60 Å, malla 200-400 (MerckTM y AldrichTM) y los solventes de elución se indicaron en cada caso.

Poder rotatorio

Se midieron con un polarímetro Perkin-Elmer modelo 343, en celdas de 1 dm de longitud, a temperatura ambiente y empleando una lámpara de sodio ($\lambda = 589$ nm). Los solventes y concentraciones utilizadas se indicaron en cada caso.

Resonancia Magnética Nuclear

Los espectros de resonancia magnética nuclear protónica (RMN ^1H) se adquirieron con un espectrómetro Bruker AC-200 y AM-500 a 200 y 500 MHz, respectivamente. Las constantes de acoplamiento aparentes (expresadas en Hz) se determinaron por medición directa de la separación de las líneas en el espectro de RMN ^1H . Los espectros de RMN ^{13}C se realizaron en equipos Bruker AC-200 y AM-500 a 50,3 MHz y 125,8 MHz, respectivamente, y se adquirieron por desacoplamiento de banda ancha. El solvente utilizado se indica en cada caso. Los desplazamientos químicos (δ) se expresan en partes por millón (ppm) respecto al tetrametilsilano (TMS) cuando se realizaron en CDCl_3 . Cuando los espectros se realizaron en D_2O , se utilizó acetona como estándar interno y los desplazamientos químicos fueron asignados en relación a la señal del metilo de acetona a δ 2,22 ppm y a δ 30,89 ppm, para RMN ^1H y ^{13}C respectivamente.¹

La asignación completa de los espectros de RMN ^{13}C y RMN ^1H de los compuestos se realizó utilizando técnicas monodimensionales, y se indica en los casos que se usó técnicas bidimensionales de experimentos de correlación heteronuclear (HSQC) y/o homonuclear (COSY-45).

Microanálisis

Los microanálisis fueron realizados por la Lic. María de las Mercedes Rivero en el laboratorio de microanálisis de UMYMFOR (CONICET-FCEN).

Espectros de Masa de Alta Resolución

Los Espectros de Masa de alta resolución fueron realizados con un espectrómetro de masa de VG ZAB2SE (1996) ó VG 7070 (1984) y una

estación Alpha V3.1 y DEC 3000, equipado con una fuente de ionización por EI/FAB/DCI ó con un espectrómetro Agilent LCTOF (2006) provisto de un analizador de masa HR-TOF con Windows XP y fuente de ionización APCI/ESI en la Universidad de California (Riverside-EEUU). Alternativamente, se utilizó un espectrómetro Bruker micrOTOF-Q II con una fuente de ionización electrospray (ESI+), en el UMYMFOR (CONICET-UBA-FCEyN).

Cromatografía de intercambio aniónico de alta presión con detección por pulso amperométrico (HPAEC-PAD)

El análisis de los monosacáridos y de las reacciones enzimáticas se realizó por HPAEC, utilizando un equipo HPLC DIONEX ICS-3000, con detector de pulso amperométrico (PAD) y electrodo de oro, empleando una columna de intercambio aniónico CarboPac MA-10 (4 x 250 mm) equipada con guardacolumna CarboPac MA-10 (4 x 50 mm). Se utilizó el siguiente programa de elución: programa isocrático de 600 mM NaOH con un flujo de 0,4 ml/min.

Detección de radioactividad

Solución centelladora

Para la determinación de radioactividad por centelleo líquido se utilizó la siguiente solución centelladora para muestras acuosas: PPO (2,5-difeniloxazol), 4 g; POPOP (1,4-bis(5-feniloxazol-2-il)benceno), 40 mg; Arkopal X-100, 250 ml; tolueno, 750 ml.

Las fracciones líquidas con radioactividad fueron contadas en un contador de centelleo líquido Wallack 1214 Rack-Beta.

Cuantificación de las muestras radioactivas

Una alícuota de la muestra en solución a cuantificar se mezcló con la solución centelladora y se cuantificó en un contador de centelleo líquido (Wallac 1214 Rack-Beta).

Purificación de solventes

Todos los solventes se purificaron por destilación. En algunos casos requirieron un tratamiento adicional para emplearlos en reacciones que requerían estrictas condiciones anhidras.

Diclorometano anhidro (CH₂Cl₂)

Se secó por reflujo sobre P₂O₅ y se destiló inmediatamente antes de su uso, ó se guardó sobre tamices moleculares de 4 Å, activados.

Acetona (C₃H₆O)

Se secó por reflujo sobre P₂O₅ y se destiló inmediatamente antes de su uso, ó se guardó sobre tamices moleculares de 4 Å, activados.

Acetonitrilo anhidro (CH₃CN)

Se secó por reflujo sobre P₂O₅ y se destiló inmediatamente antes de su uso, ó se guardó sobre tamices moleculares de 4 Å, activados.

Piridina anhidra (C₅H₅N)

Se reflujo sobre lentejas de NaOH y se destiló. Se conservó sobre NaOH.

Metanol anhidro (CH₃OH)

Se reflujo sobre virutas de magnesio, se destiló y se guardó sobre tamices moleculares de 4 Å, activados.

THF anhidro

Se pasó por alúmina, se secó y se liberó de oxígeno por reflujo sobre sodio-benzofenona bajo atmósfera de nitrógeno, y luego se destiló a partir de la solución azul, inmediatamente antes de ser empleado.

Desoxigenación por transferencia electrónica fotoinducida (PET)

Las reacciones de desoxigenación por transferencia electrónica fotoinducida (PET) se realizaron en un reactor de 500 ml de Pyrex equipado

con un dedo frío y una lámpara de mercurio de presión media de 450 W ó 100 W ($\lambda_{\text{ecs}} > 300 \text{ nm}$) según se describe en cada caso. Las soluciones preparadas para la fotólisis fueron de concentración 1,5 mM del sustrato, 0,15 mM de 9-metilcarbazol (MCZ) y 0,3 mM de $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$ en una mezcla 9:1 de 2-propanol/ H_2O como solvente. Las soluciones fueron desgasificadas previamente durante 30 minutos con argón y las fotólisis se realizaron bajo las mismas condiciones, mientras que la temperatura se mantuvo constante mediante la circulación de un baño de agua. Después de cada irradiación la mezcla de reacción fue concentrada a presión reducida y tratada según se describe en cada caso.

Reducciones con NaBH_4/I_2

El reactivo se preparó según la técnica descrita por Prasad y col.² con algunas modificaciones. A una suspensión de NaBH_4 en THF anhidro contenida en un balón de dos bocas, al cual se adaptó en una de las bocas un refrigerante con una trampa de CaCl_2 anhidro y la otra se cerró con un septum, se enfrió a 0 °C. Se agregó lentamente durante de 1 h una solución de I_2 en THF bajo atmósfera de Ar y agitación. Al reactivo reductor generado se le agregó una solución del compuesto a reducir en THF anhidro mediante cánula, utilizando presión positiva de argón. La mezcla se dejó reaccionar a reflujo con agitación vigorosa hasta la desaparición del compuesto de partida.

Después de cada reducción, la mezcla de reacción se llevó a temperatura ambiente y se agregó gota a gota una solución de HCl 5% para neutralizar el borohidruro en exceso. La solución resultante se particionó con una mezcla $\text{H}_2\text{O}/\text{CHCl}_3$ y la fase acuosa se lavó 3 veces con CHCl_3 para eliminar completamente el I_2 . La fase acuosa se desionizó por elución a través de una columna de resina de intercambio mixta IWT[®] TMD-8, se llevó a sequedad a presión reducida y luego se coevaporó con MeOH (3 x 5 ml).

Ensayos enzimáticos

Para los ensayos de actividad enzimática se utilizaron dos fuentes de enzimas, una proveniente del cultivo de *Penicillium fellutanum*³ y otra proveniente del cultivo de *Penicillium varians*.⁴

Obtención del extracto enzimático de P. fellutanum

Para la obtención del extracto enzimático el medio de cultivo de *P. fellutanum* se procedió según se describió en la Tesis de K. Mariño. Se filtró el miscelio luego de 5-8 días de cultivo a través de papel Whatman nº 1, y el filtrado se concentró a la quinta parte, aproximadamente, por liofilización. La solución obtenida se dializó a través de una membrana UltraPore (MW 3500 Da) a 25 °C durante 24 h. El extracto se conservó a -20 °C durante varios meses. La determinación de la cantidad de proteínas totales se determinó por el método de Bradford.⁵

Obtención del extracto enzimático de P. varians

P. varians (CBS 386.48) se cultivó según lo descrito previamente⁴ con 5% de D-glucosa como fuente de carbono, a 25 °C con agitación y luz constante.

El medio de cultivo de diferentes edades se separó del miscelio por filtración a través de papel Whatman nº 1. Los filtrados se dializaron a través de una membrana MWCO (8000 Da) y se concentraron por liofilización a la quinta parte, aproximadamente. El extracto se conservó a -20 °C durante varios meses. La determinación de la cantidad de proteínas totales se determinó por el método de Bradford.⁵

Ensayos enzimáticos con exo β-D-galactofuranosidasa

Para los ensayos de inhibición de exo β-D-galactofuranosidasa de *P. fellutanum* se utilizó 4-nitrofenil β-D-galactofuranósido⁶ 5 mM (15 μl) como sustrato, buffer NaOAc/HOAc 66 mM pH 4,5 (50 μl) y medio de cultivo (20 μl; 50 μg de proteína).⁵ Los compuestos **118α**, **126α**, **126β**, **152β** y **154α** se agregaron en la cantidad requerida para llegar a concentraciones finales de 0-2.5 mM y se llevó a un volumen final de 0,5 ml. Después de 1,5 h a 37 °C, la reacción se detuvo por agregado de 0,5 ml de buffer Na₂CO₃ 0,25 M/NaHCO₃ 0,25 M. Se utilizó como inhibidor de referencia D-galactono 1,4-lactona (**63**). La cantidad de 4-nitrofenol liberado se determinó espectrofotométricamente a 410 nm.⁷

Para la evaluación de **118α** y **143α** como sustratos se agregó al medio de cultivo (20 μl), buffer NaOAc/HOAc 66 mM pH 4,5 (50 μl), una solución 5

mM en cantidades variables para alcanzar concentraciones finales de 0-2,7 mM y se llevó a un volumen final de 0,5 ml. Después de 1,5 h a 37 °C, la reacción se detuvo por agregado de 0,5 ml de buffer Na₂CO₃ 0,25 M/NaHCO₃ 0,25 M. La cantidad de 4-nitrofenol liberado se determinó espectrofotométricamente a 410 nm.⁷

Para el cálculo de la concentración de 4-nitrofenol liberado se utilizó una curva de calibración, y 1 unidad enzimática se definió como 1 mmol de 4 nitrofenol liberado por hora por mg de proteína.

Ensayos enzimáticos con el extracto de P. varians

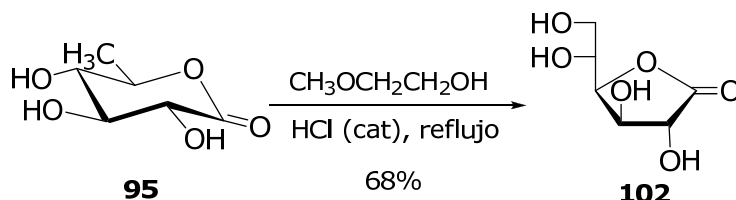
Para los ensayos de actividad enzimática de la *exo* β-D-galactofuranosidasa de *P. varians* se utilizó 4-nitrofenil β-D-galactofuranósido⁶ como sustrato, en las mismas condiciones que para la enzima proveniente de *P. fellutanum*.

Para los ensayos de actividad enzimática de α-D-glucopiranosidasa se utilizó 4-nitrofenil α-D-glucopiranosido 5 mM (1 ml) como sustrato, buffer fosfato 5 mM pH 6,0 y medio de cultivo (50 μl; 125 μg de proteína).⁵ Después de 1 h a 30 °C, la reacción se detuvo por agregado de 1 ml Na₂CO₃ 0,1 M.⁸ La cantidad de 4-nitrofenol liberado se determinó espectrofotométricamente a 410 nm.

En el caso de los ensayos enzimáticos realizados con [6-³H]-β,α-D-galactofuranósido (**61***) como sustrato, se utilizaron 40000 cpm, 20 μl de medio de cultivo de *P. varians* como extracto enzimático (conteniendo 50 μg de proteína total),⁵ 15 μl de buffer NaOAc/HOAcO 66 mM pH 4,5 y se llevó a un volumen final de 80 μl. La mezcla se incubó 24 h a 37 °C, y el producto de reacción se centrifugó sobre un filtro Ultrafree-MC (MW 5000) durante 40 min a 10000 g, para luego ser analizado por HPAEC-PAD.

Síntesis y caracterización

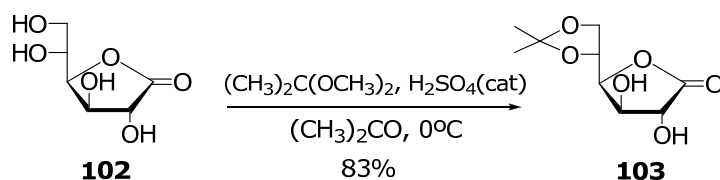
D-Glucono-1,4-lactona (**102**)



Se siguió el procedimiento descrito por Chittenden G. J. F. y col. con leves modificaciones.⁹

A una solución de D-glucono-1,5-lactona (**95**; 10 g; 56,14 mmol) en 2-metoxietanol (22 ml) con agitación se agregó 3 gotas de ácido clorhídrico concentrado y se llevó a reflujo en un baño de arena a 125 °C. Luego de 3 h, se llevó a temperatura ambiente y se redujo el volumen a presión reducida en baño de agua a 45 °C, hasta aproximadamente un tercio del volumen inicial. En esas condiciones comenzó a observarse la aparición de un precipitado blanco. Se enfrió la suspensión a 0 °C, obteniéndose un precipitado fino. Éste se filtró al vacío, se lavó con 2-metoxietanol frío (5 ml) y el sólido se secó en bomba de vacío y se recristalizó de dioxano, obteniéndose **102** (6,8 g; 68%); pf 134-134 °C, $[\alpha]_D +67^\circ$ (c 1; H₂O). Lit. pf 131-134 °C, $[\alpha]_D +65,5^\circ$ (c 1; H₂O)⁹

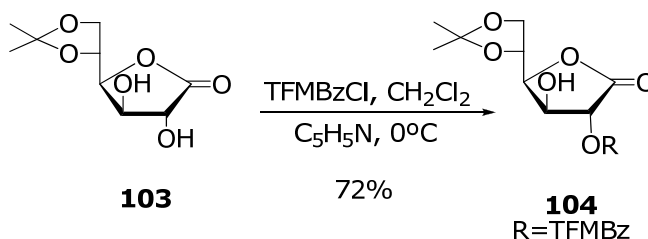
5,6-O-Isopropilidén-D-glucono-1,4-lactona (**103**)



A una suspensión de D-glucono-1,4-lactona (**102**; 0,71 g; 4,00 mmol) en una mezcla de acetona/2,2-dimetoxipropano 5:1 (8,4 ml) enfriada a 0 °C, se agregó H₂SO₄ concentrado (4,2 µl). Luego de agitar durante 30 min, la reacción se monitoreó por ccd y se observó la desaparición total del material

de partida (R_f 0,15) y la aparición de un único producto de R_f 0,56 ($n\text{PrOH-NH}_3\text{-H}_2\text{O}$ 7:1:2). La mezcla de reacción se neutralizó con unas gotas de una solución de NH_4OH y se evaporó a presión reducida. Por maceración del jarabe en tolueno se obtuvo **103** (0,72 g; 83%) como un sólido blanco cristalino, cromatográficamente puro (R_f 0,56; $n\text{PrOH-NH}_3\text{-H}_2\text{O}$ 7:1:2); pf 108-110 °C; $[\alpha]_D + 80^\circ$ (c 1, acetona). Lit. pf 107-110 °C, $[\alpha]_D + 84^\circ$ (c 1; H_2O).⁹

5,6-*O*-Isopropilidén-2-*O*-(3-trifluorometil)benzoíl-D-glucono-1,4-lactona (**104**)



Una solución de 5,6-*O*-isopropilidén-D-glucono-1,4-lactona (**103**; 1,28 g, 5,86 mmol) en CH_2Cl_2 anhidro (20 ml) y piridina anhidra (2 ml) se enfrió a 0 °C y se le agregó 1,06 ml (7,01 mmoles) de cloruro de (3-trifluorometil)benzoílo en 4 alícuotas durante el transcurso de 2 h. Después del último agregado se continuó la agitación durante 30 min a 0 °C, y se continuó agitando a temperatura ambiente durante 1 h más. La mezcla de reacción se diluyó con CH_2Cl_2 (500 ml), y se lavó sucesivamente con HCl 10% (3 x 150 ml), H_2O (2 x 150 ml), NaHCO_3 2,5% (3 x 150 ml) y H_2O hasta neutralidad. La fase orgánica se secó con Na_2SO_4 (anh) y se concentró a presión reducida obteniéndose un jarabe, que se secó al vacío. El análisis por ccd del crudo de reacción mostró la presencia de un compuesto mayoritario de R_f 0,41 y uno minoritario de R_f 0,73 (tolueno-EtOAc 3:1). El jarabe se purificó por cromatografía en columna (tolueno-EtOAc 9:1) y por combinación de las fracciones de R_f 0,41 (tolueno-EtOAc 3:1) se obtuvo **104** (1,64 g; 72%), como un sólido amorfo, $[\alpha]_D + 55^\circ$ (c 1, CHCl_3).

RMN ^1H (CDCl_3 , 500 MHz): δ 8,31-7,58 (m, 4H, H-Ar); 5,52 (d, 1H, $J = 4,6$ Hz, H-2); 4,74 (dd, 1H, $J = 6,0; 4,6$ Hz, H-3); 4,65 (dd, 1H, $J = 7,3; 6,0$ Hz,

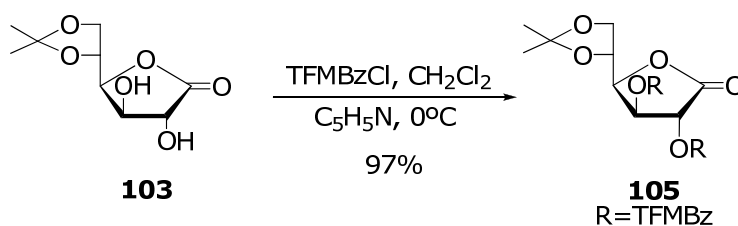
H-4); 4,51 (ddd, 1H, $J = 7,3; 6,5; 4,6$ Hz, H-5); 4,22 (dd, 1H, $J = 9,1; 6,5$ Hz, H-6); 4,11 (dd, 1H, $J = 9,1; 4,6$ Hz, H-6'), 1,51; 1,40 (2s, 6H, C(CH₃)₂).

RMN ¹³C (CDCl₃, 50,3 MHz): δ 169,8 (C-2); 164,4 (CO₂Ar); 133,3-127,3 (C-aromáticos); 110,6 (C(CH₃)₂); 79,9 (C-4); 75,5 (C-2); 73,4; 72,2 (C-3,5); 66,6 (C-6); 26,6; 24,7 (C(CH₃)₂).

Anal. Calculado para C₁₇H₁₇O₇F₃ (%): C 52,31; H 4,39. Encontrado: C 52,27; H: 4,34.

El producto de R_f 0,73 (tolueno-EtOAc 3:1) se identificó espectroscópicamente como el 5,6-*O*-isopropilidén-2,3-di-*O*-(3-trifluorometil)benzoíl-D-glucono-1,4-lactona.

5,6-*O*-Isopropilidén-2,3-di-*O*-(3-trifluorometil)benzoíl-D-glucono-1,4-lactona (**105**)



Una solución de 5,6-*O*-isopropilidén-D-glucono-1,4-lactona (**103**; 1,48 g, 6,78 mmol) en CH₂Cl₂ anhidro (10 ml) y piridina anhidra (10 ml) se enfrió a 0 °C y se agregó lentamente 2,6 ml (17,24 mmoles) de cloruro de (3-trifluorometil)benzoílo. Luego de 2 h de agitación el análisis por ccd de la mezcla de reacción mostró la desaparición total del material de partida (R_f 0,06) y la aparición de un único producto de R_f 0,68 (tolueno-EtOAc 4:1). La mezcla de reacción se diluyó con CH₂Cl₂ (550 ml) y se lavó sucesivamente con HCl 10% (3 x 150 ml), H₂O (2 x 150 ml), NaHCO₃ 2,5% (3 x 150 ml) y H₂O hasta neutralidad. La fase orgánica se secó con Na₂SO₄ (anh) y se concentró a presión reducida obteniéndose un jarabe, que se secó al vacío. El jarabe se purificó por cromatografía en columna con tolueno y por combinación de las fracciones de R_f 0,68 (tolueno-EtOAc 4:1), se obtuvo **105** como un sólido amorfo (3,45 g; 97%), [α]_D +96° (*c* 1, CHCl₃).

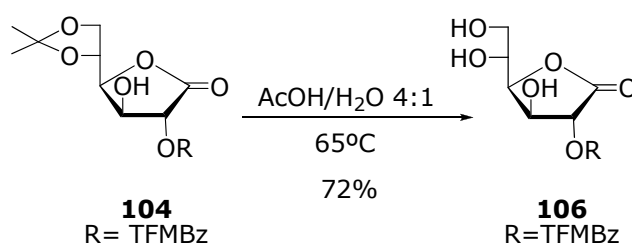
RMN ¹H (CDCl₃, 500 MHz): δ 8,35-7,18 (m, 8H, H-Ar); 6,11 (dd, 1H, $J = 6,8; 6,6$ Hz, H-3); 5,99 (d, 1H, $J = 6,6$ Hz, H-2); 4,90 (dd, 1H, $J = 8,1; 6,8$

Hz, H-4); 4,51 (ddd, 1H, $J = 8,1; 6,5; 5,1$ Hz, H-5); 4,21 (dd, 1H, $J = 9,1; 6,5$ Hz, H-6); 4,06 (dd, 1H, $J = 9,1; 5,1$ Hz, H-6'), 1,38; 1,21 (2s, 6H, $C(CH_3)_2$).

RMN ^{13}C ($CDCl_3$, 50,3 MHz): δ 168,1 (C-2); 164,4; 164,0 (CO_2Ar); 133,4-126,8 (C-aromáticos); 110,7 ($C(CH_3)_2$); 77,6 (C-4); 73,3 (C-2); 72,7; 71,8 (C-3,5); 66,6 (C-6); 26,3; 24,6 ($C(CH_3)_2$).

Anal. Calculado para $C_{25}H_{20}O_8F_6$ (%): C 52,67; H 2,56. Encontrado: C 52,86; H 2,89.

2-O-(3-Trifluorometil)benzoíl-D-glucono-1,4-lactona (**106**)



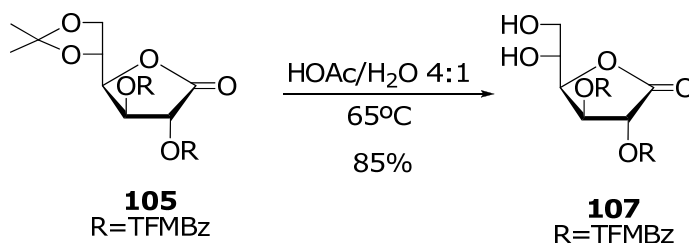
El crudo de reacción de obtención de 5,6-*O*-isopropilidén-2-*O*-(3-trifluorometil)benzoíl-D-glucono-1,4-lactona (**104**; 2,24 g; 5,74 mmol) se disolvió en una mezcla de HOAc/ H_2O 4:1 (41 ml) y se calentó a reflujo en un baño de glicerina a 65 °C con agitación. Luego de 1,5 h, el análisis por ccd mostró la desaparición total del material de partida (R_f 0,90) y la aparición de un producto mayoritario de R_f 0,55 (EtOAc). La mezcla se dejó enfriar y se concentró a presión reducida. El jarabe obtenido se coevaporó sucesivamente con H_2O (3 x 15 ml) y tolueno (3 x 10 ml) para eliminar el ácido acético. Por purificación por cromatografía en columna (tolueno-EtOAc 1:3) y combinación de las fracciones de R_f 0,55 (EtOAc) se obtuvo **106** (1,45 g, 72%) como un sólido amorfo, $[\alpha]_D +76^\circ$ (c 1, acetona).

RMN 1H ($CDCl_3$, 500 MHz): δ 8,33-7,62 (m, 4H, H-Ar); 5,62 (d, 1H, $J = 5,6$ Hz, H-2); 4,86; 4,73 (t, 2H, H-3,H-4); 4,18 (dd, 1H, $J = 5,1; 3,7$ Hz, H-5); 3,93 (dd, 1H, $J = 11,6; 3,7$ Hz, H-6); 3,88 (dd, 1H, $J = 11,6; 5,1$ Hz, H-6').

RMN ^{13}C ($CDCl_3$, 50,3 MHz): δ 170,7 (C-1); 164,8 (CO_2Ar); 133,2-126,7 (C-aromáticos); 79,2 (C-4); 75,2 (C-2); 72,1; 71,2 (C-3,5); 62,9 (C-6).

Anal. Calculado para $C_{14}H_{13}O_7F_3$ (%): C 48,01; H 3,74. Encontrado: C 48,25; H: 3,93.

2,3-Di-O-(3-trifluorometil)benzoíl-D-glucono-1,4-lactona (**107**)

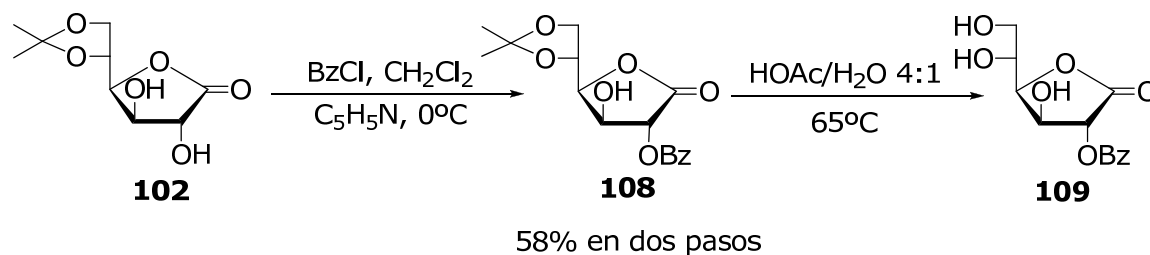


Una solución 5,6-O-isopropilidén-2,3-O-(3-trifluorometil)benzoíl-D-glucono-1,4-lactona (**105**; 3,45 g; 6,13 mmol) en una mezcla HOAc-H₂O 4:1 (35 ml) se calentó a reflujo en baño de glicerina a 65 °C con agitación. Luego de 1,5 h, el análisis por ccd mostró la desaparición total del material de partida (R_f 0,68) y la aparición de un producto mayoritario (R_f 0,18; tolueno-EtOAc 4:1). La mezcla se llevó a temperatura ambiente, se concentró a presión reducida y luego se coevaporó sucesivamente con H₂O (3 x 15 ml) y tolueno (3 x 10 ml) para eliminar el ácido acético. El jarabe obtenido se secó al vacío y se purificó por cromatografía en columna (tolueno-EtOAc 9:1). Por combinación y evaporación de las fracciones de R_f 0,18 (tolueno-EtOAc 4:1) se obtuvo **107** (2,72 g; 85%) como un sólido amorfo.

RMN ¹H (CDCl₃, 500 MHz): δ 8,32-7,57 (m, 8H, H-Ar); 6,07 (dd, 1H, $J = 6,0; 4,9$ Hz, H-3); 5,90 (d, 1 H, $J = 4,9$ Hz, H-2); 5,02 (dd, 1H, $J = 7,6; 6,0$ Hz, H-4); 4,12 (ddd, 1H, $J = 7,6; 5,1; 3,6$ Hz, H-5); 3,89 (dd, 1H, $J = 11,1; 5,1$ Hz, H-6); 3,85 (dd, 1H, $J = 11,1; 3,6$ Hz, H-6').

RMN ¹³C (CDCl₃, 50,3 MHz): δ 168,8 (C-1); 165,0; 164,4 (CO₂Ar); 133,1-127,0 (C-aromáticos); 77,6 (C-4); 73,8 (C-2); 72,3 (C-3); 71,0 (C-5); 62,8 (C-6).

Anal. Calculado para $C_{22}H_{16}O_8F_6$ (%): C 50,59; H 3,09. Encontrado: C 50,64; H 3,38.

2-O-Benzoíl-D-glucono-1,4-lactona (109)

A una solución de 5,6-*O*-isopropilidén-D-glucono-1,4-lactona (**102**; 1,28 g; 5,86 mmol) en CH₂Cl₂ anhidro (16 ml) y piridina anhidra (1,6 ml) enfriada a 0°C, se agregó 0,81 ml (7,01 mmol) de cloruro de benzoílo en 4 alícuotas durante el transcurso de 2 h. Después del último agregado se continuó la agitación durante 30 min a 0°C, y a temperatura ambiente durante 1 h más. La mezcla de reacción se diluyó con CH₂Cl₂ (450 ml), y se lavó sucesivamente con HCl 10% (3 x 150 ml), H₂O (2 x 150 ml), NaHCO₃ 2,5% (3 x 150 ml), H₂O (150 ml) hasta neutralidad. La fase orgánica se secó con Na₂SO₄ (anh) y se concentró a presión reducida obteniéndose un jarabe, el cual fue secado al vacío. El análisis por ccd del crudo de reacción mostró la presencia de dos compuestos. El compuesto mayoritario de R_f 0,44 (tolueno-EtOAc 3:1) se identificó espectroscópicamente como **108** y no se caracterizó. El jarabe se disolvió en una mezcla HOAc/H₂O 4:1 (40 ml) y se calentó a reflujo en un baño de glicerina a 65 °C con agitación. Luego de 1,5 h, el análisis por ccd mostró la desaparición total del material de partida (R_f 0,81) y la aparición de un producto mayoritario (R_f 0,37; EtOAc). La mezcla se llevó a temperatura ambiente y se concentró a presión reducida. Luego se coevaporó sucesivamente con H₂O (3 x 15 ml) y tolueno (3 x 10 ml) para eliminar el ácido acético. El residuo obtenido se secó al vacío y luego se maceró con tolueno-EtOAc 3:7, separándose un precipitado cristalino blanco que se identificó como **109** (0,95 g; 58%); pf 130-131,5 °C; [α]_D +89° (c 1, acetona).

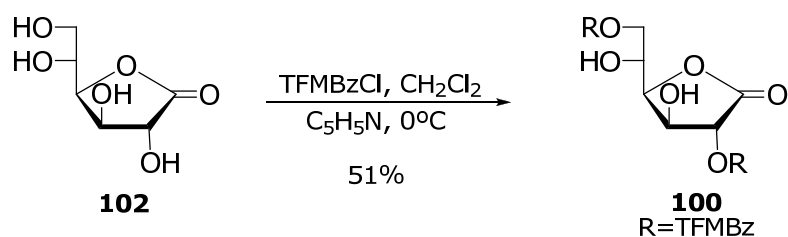
RMN ¹H (Me₂SO-*d*₆, 500 MHz): δ 8,02-7,52 (m, 4H, H-Ar); 5,29 (d, 1H, J = 7,0 Hz, H-2); 4,86 (t, 1H, J = 7,0, H-3); 4,78 (dd, 1H, J = 6,9; 3,7 Hz; H-4)

4,01 (dd, 1H, $J = 3,1; 2,2$ Hz, H-5); 3,73 (dd, 1H, $J = 12,4; 2,2$ Hz, H-6); 3,66 (dd, 1H, $J = 12,4; 3,1$ Hz, H-6').

RMN ^{13}C ($\text{Me}_2\text{SO}-d_6$, 50,3 MHz): δ 171,5 (C-1); 165,1 (CO_2Ph); 134,0-128,4 (C-aromáticos); 79,9 (C-4); 74,3 (C-2); 72,2; 71,4 (C-3,5); 62,5 (C-6).

Anal. Calculado para $\text{C}_{13}\text{H}_{14}\text{O}_7$ (%): C 55,32; H 4,10. Encontrado: C 55,33; H 5,09.

2,6-Di-O-3-(trifluorometil)benzoíl-D-glucono-1,4-lactona (**100**)



A una solución de D-glucono-1,4-lactona (**102**; 0,64 g; 3,56 mmoles) en piridina anhidra (5 ml) a 0 °C, se agregó 1,3 ml (8,62 mmoles) de cloruro de (3-trifluorometil)benzoílo en 4 alícuotas durante 2 horas. Después del último agregado se continuó la agitación durante 30 min a 0 °C, y se agitó a temperatura ambiente durante 1 h más. La solución se vertió lentamente y con agitación sobre un baño de agua-hielo (150 ml), separándose un sólido amorfo que se lavó por decantación varias veces con H_2O . El sólido obtenido se disolvió en CH_2Cl_2 (300 ml), y se lavó sucesivamente con HCl 10% (3 x 100 ml), H_2O (2 x 100 ml), NaHCO_3 2,5% (3 x 100 ml) y H_2O (100 ml) hasta neutralidad. La fase orgánica se secó con Na_2SO_4 (anh) y el filtrado se concentró a presión reducida obteniéndose un jarabe, el cual se secó al vacío. El análisis por ccd de la mezcla de reacción mostró la aparición de dos compuestos, uno mayoritario de R_f 0,55 (tolueno-EtOAc) y otro de R_f 0,60 (tolueno-EtOAc 3:2). El jarabe obtenido se maceró con tolueno obteniéndose un precipitado fino blanco. El precipitado se filtró y se recrystalizó de CHCl_3 para dar **100** (0,73g; 51 %) cromatográficamente puro; R_f 0,55 (tolueno-EtOAc 3:2); pf 141-142 °C; $[\alpha]_D^{20} +77^\circ$ (c 1, acetona).

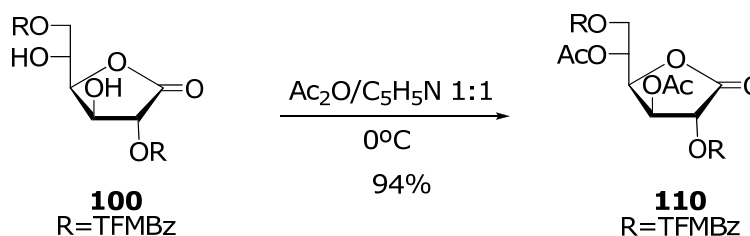
RMN ^1H (CDCl_3 , 500 MHz): δ 8,32-7,59 (m, 8H, H-Ar); 5,65 (d, 1H, $J = 5,9$ Hz, H-2); 4,89 (dd, 1H, $J = 6,9; 5,9$ Hz, H-3); 4,79 (dd, 1H, $J = 6,9; 6,2$ Hz,

H-4); 4,72 (dd, 1H, $J = 12,1; 3,7$ Hz, H-6); 4,68 (dd, 1H, $J = 12,1; 6,1$ Hz, H-6'); 4,47 (aparente dt, 1H, $J = 6,2; 6,1; 3,7$ Hz, H-5).

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 125,8 MHz): δ 169,2 (C-1); 165,8; 165,4 (CO_2Ar); 133,4-126,7 (C-aromáticos); 78,1 (C-4); 76,1 (C-2); 73,1; 70,3 (C-3,5); 66,3 (C-6).

Anal. Calculado para $\text{C}_{26}\text{H}_{20}\text{O}_6\text{F}_6$ (%): C 50,59; H 3,09. Encontrado: C 50,52; H 3,24.

3,5-Di-O-acetil-2,6-di-O-(3-trifluorometil)benzoíl-D-glucono-1,4-lactona (**110**)



Una solución de 2,6-O-di-3-(trifluorometil)benzoíl-D-glucono-1,4-lactona (**100**; 0,31 g; 0,59 mmol) en piridina anhidra (0,5 ml) se enfrió en baño de hielo con agitación y se le agregó anhídrido acético (0,5 ml). Luego de 1,5 h el análisis por ccd de la mezcla de reacción mostró la desaparición total del material de partida (R_f 0,25) y la aparición de un único producto de R_f 0,52 (tolueno-EtOAc 18:3). La solución se volcó lentamente en un baño de agua-hielo (150 ml), separándose un sólido amorfo que se lavó por decantación varias veces con agua. Luego, se disolvió el sólido en CH_2Cl_2 (300 ml), y se lavó sucesivamente con HCl 10% (3 x 100 ml), H_2O (2 x 100 ml), NaHCO_3 2,5% (3 x 100 ml) y H_2O (100 ml) hasta neutralidad. La fase orgánica se secó con Na_2SO_4 (anh) y se concentró a presión reducida obteniéndose un jarabe que se secó al vacío. El análisis por ccd del mismo mostró la presencia de un único producto (R_f 0,52; tolueno-EtOAc 18:3). El sólido amorfo obtenido se caracterizó como **110** (0,34 g; 94%), $[\alpha]_D^{20} +70^\circ$ (c 1, acetona).

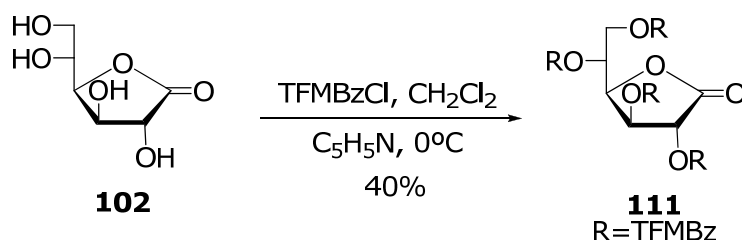
RMN ^1H (CDCl_3 , 200 MHz): δ 8,22-7,50 (m, 8H, H-Ar); 5,84 (dd, 1H, $J = 5,8; 3,7$ Hz, H-3); 5,60 (ddd, 1H, $J = 8,2; 5,5; 2,9$ Hz, H-3); 5,52 (d, 1H, $J = 3,7$ Hz, H-2); 5,17 (dd, 1H, $J = 8,2; 5,8$ Hz, H-4); 4,87 (dd, 1H, $J = 12,4;$

2,9 Hz, H-6); 4,47 (dd, 1H, $J = 12,4$; 5,5 Hz, H-6'), 2,09; 2,01 (2s, 6H, CO_2CH_3).

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 50,3 MHz): δ 169,1 (C-2); 168,9; 168,4; 164,5; 163,6 (CO_2Ar ; CO_2CH_3); 133,1-126,0 (C-aromáticos); 76,4 (C-4); 72,7 (C-2); 70,8; 67,6 (C-5,3); 63,2 (C-6); 20,3; 20,1 (CO_2CH_3).

Anal. Calculado para $\text{C}_{26}\text{H}_{20}\text{O}_{10}\text{F}_6$ (%): C 51,50; H 3,32. Encontrado: C 51,35; H 3,20.

2,3,5,6-Tetra-O-(3-trifluorometil)benzoíl-D-glucono-1,4-lactona (111).



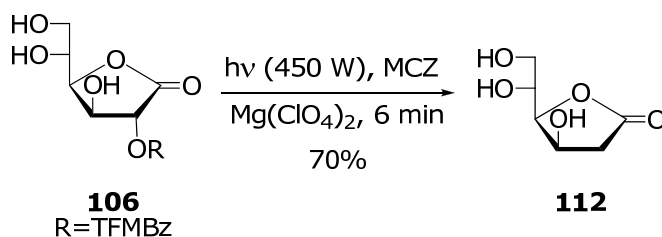
A una solución de D-glucono-1,4-lactona (**102**; 0,60 g; 3,36 mmol) en piridina anhidra (3 ml) y CH_2Cl_2 anhidro (6 ml) enfriada a 0 °C, se agregó lentamente y con agitación cloruro de (3-trifluorometil)benzoílo (2,5 ml, 16,8 mmol). Luego de 2 h de agitación el análisis por ccd mostró la desaparición total del material de partida (R_f 0,01) y la aparición de un único producto de R_f 0,59 (tolueno-EtOAc 9:1). La mezcla de reacción se diluyó con CH_2Cl_2 (150 ml) y se lavó sucesivamente con HCl 10% (3 x 90 ml), H_2O (2 x 90 ml), NaHCO_3 2,5% (3 x 90 ml) y H_2O (90 ml) hasta neutralidad. La fase orgánica se secó con Na_2SO_4 (anh) y se concentró a presión reducida. El jarabe obtenido se purificó por cromatografía en columna (tolueno) y por evaporación de las fracciones de R_f 0,53 (tolueno-EtOAc 9:1) se obtuvo **111** (0,34 g, 40%) como un sólido amorfo, $[\alpha]_D^{+16}$ (c 1, CHCl_3).

RMN ^1H (CDCl_3 , 200 MHz): δ 8,39-7,60 (m, 20H, H-Ar); 6,26 (dd, 1H, $J = 9,3$; 6,8 Hz, H-3); 5,97 (ddd, 1H, $J = 9,3$; 5,1; 2,9 Hz, H-5); 5,96 (d, 1H, $J = 6,0$ Hz, H-2); 5,06 (dd, 1H, $J = 12,5$; 2,9 Hz, H-6); 4,66 (dd, 1H, $J = 12,5$; 5,1 Hz, H-6').

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 50,8 MHz): δ 170,6(C-1); 164,6; 163,9; 163,7 (CO_2Ar); 133,4-127,0 (C-aromáticos); 74,6 (C-4); 72,4 (C-2); 71,8; 69,0 (C-3, 5); 63,6 (C-6).

Anal. Calculado para $\text{C}_{38}\text{H}_{20}\text{O}_{10}\text{F}_8$ (%): C 52,67; H 2,56. Encontrado: C 52,86; H 2,89.

2-Desoxi-D-arabino-hexono-1,4-lactona (**112**, a partir **106**)



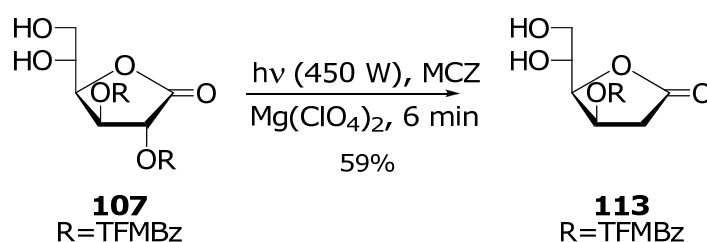
Por fotólisis a 450 W de una solución de 2-O-(3-trifluorometil)benzoíl-D-glucono-1,4-lactona (**106**; 0,26 g; 0,75 mmol) durante 3 min, según las condiciones generales de desoxigenación, se obtuvo el compuesto **112**. El análisis por ccd del residuo obtenido luego de la evaporación del solvente mostró la desaparición total del material de partida (R_f 0,51) y la presencia de dos productos, uno de R_f 0,88 y otro de R_f 0,13 (EtOAc). El de mayor movilidad correspondía al MCZ y a los productos de descomposición del MCZ. El residuo obtenido se diluyó en H_2O y se hizo una partición con CH_2Cl_2 . La fase acuosa se evaporó a presión reducida y se purificó por cromatografía en columna (EtOAc). Por combinación de las fracciones de R_f 0,32 (EtOAc-MeOH 9:1) se obtuvo **112** (0,08 g; 70%), $[\alpha]_D +58^\circ$ (c 1, H_2O). Lit. $[\alpha]_D +68^\circ$ (c 1, H_2O).¹⁰

RMN ^1H (D_2O , 500 MHz): δ 4,66 (dd, 1H, $J = 5,3; 3,6$ Hz, H-3); 4,44 (dd, 1H, $J = 9,2; 3,6$ Hz, H-4); 3,98 (ddd, 1H, $J = 9,2; 5,3; 2,7$ Hz, H-5); 3,80 (dd, 1H, $J = 12,2; 2,7$ Hz, H-6); 3,66 (dd, 1H, $J = 12,2; 5,3$, H-6'); 3,01 (dd, 1H, $J = 18,3; 5,3$ Hz, H-2); 2,53 (d, 1H, $J = 18,3$ Hz, H-2').

RMN ^{13}C (D_2O , 50,3 MHz): δ 180,1 (C-1); 83,5 (C-4); 68,6; 68,4 (C-3, 5); 63,7 (C-6); 39,5 (C-2).

HRMS (CI+) m/z calculado para $C_6H_{10}O_5$ $[M+NH_4]^+$: 180,0914. Encontrado: 180,0878.

2-Desoxi-3-O-(3-trifluorometil)benzoíl-D-arabino-hexono-1,4-lactona (113)

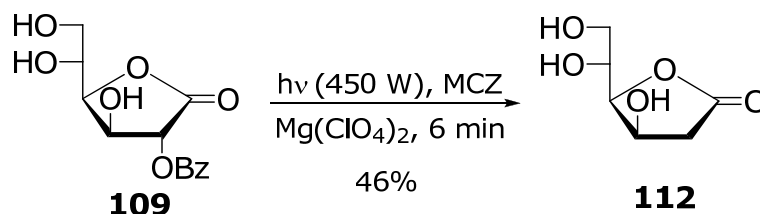


Por fotólisis a 450 W de una solución de 2,3-di-O-(3-trifluorometil)benzoíl-D-glucono-1,4-lactona (**107**; 0,39 g; 0,75 mmol) durante 3 min, según las condiciones generales de desoxigenación, se obtuvo el compuesto **113**. El análisis por ccd del residuo obtenido luego de la evaporación del solvente a presión reducida mostró la aparición de dos productos, un compuesto mayoritario de R_f 0,23 y otro minoritario R_f 0,89 (tolueno-EtOAc 1:2). El de mayor movilidad correspondió al MCZ y a los productos de descomposición de MCZ. El residuo se purificó por cromatografía en columna (tolueno-EtOAc 7:3 a 5:5) y por combinación de las fracciones de R_f 0,23 (tolueno-EtOAc 1:2) se obtuvo **113** (0,15 g; 59%) como un sólido amorfo, $[\alpha]_D +3^\circ$ (c 1, acetona).

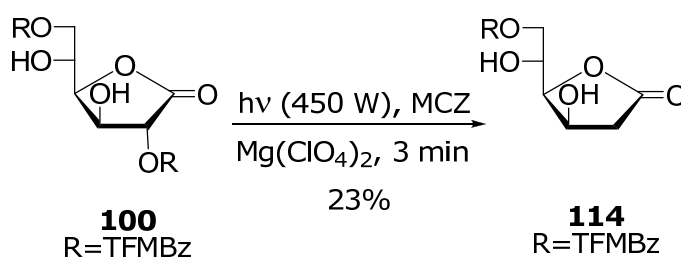
RMN 1H ($CDCl_3$, 500 MHz): δ 8,27-7,61 (m, 4H, H-Ar); 5,92 (dd, 1H, $J = 5,4; 3,6$ Hz, H-3); 4,62 (dd, 1H, $J = 9,4; 3,6$ Hz, H-4); 3,98 (ddd, 1H, $J = 9,4; 4,5; 2,8$ Hz, H-5); 3,92 (dd, 1H, $J = 11,7; 2,8$ Hz, H-6); 3,85 (dd, 1H, $J = 11,7; 4,5$ Hz, H-6').

RMN ^{13}C ($CDCl_3$, 125,8 MHz): δ 173,8 (C-1); 164,8 (CO_2Ar); 133,0-122,3 (C-aromáticos); 80,4 (C-4); 71,4; 68,0 (C-3, 5); 63,4 (C-6); 36,8 (C-2).

HRMS (CI+) m/z calculado para $C_{14}H_{13}O_6F_3$ $[M+NH_4]^+$: 352,1002. Encontrado: 352,1014.

2-Desoxi-D-arabino-hexono-1,4-lactona (112 a partir de 109)

Por fotólisis a 450 W de una solución de 2-*O*-benzoíl-D-glucono-1,4-lactona (**109**; 0,21 g; 0,75 mmol) durante 6 min, según las condiciones generales de desoxigenación, se obtuvo el compuesto **112**. El análisis por ccd del residuo obtenido mostró la presencia de tres productos de R_f 0,94; 0,63 y 0,32 (EtOAc-MeOH 9:1). El producto de mayor movilidad correspondía al MCZ y sus productos de descomposición, el de R_f 0,63 correspondiente a **109** y el producto de menor movilidad se identificó como 2-desoxi-D-*arabino*-hexono-1,4-lactona (**112**). El residuo se purificó por cromatografía en columna (EtOAc) y por combinación de las fracciones de R_f 0,32 (EtOAc-MeOH 9:1) se obtuvo **112** (56 mg; 46%), con las mismas propiedades que las del producto obtenido a partir de **106**.

2-Desoxi-6-O-(3-trifluorometil)benzoíl-D-arabino-hexono-1,4-lactona (114)

Por fotólisis a 450 W de una solución de 2,6-di-*O*-4-(trifluorometil)benzoíl-D-glucono-1,4-lactona (**100**; 0,39 g; 0,75 mmol) durante 3 min, según las condiciones generales de desoxigenación, se obtuvo el compuesto **114**. El análisis por ccd del residuo obtenido mostró la aparición de dos productos. Un producto mayoritario de R_f 0,24 y otro de R_f 0,90 (tolueno-EtOAc 1:1). El residuo se purificó por cromatografía en

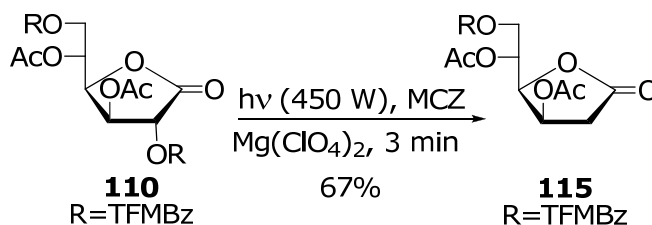
columna (tolueno–EtOAc 2:1 a 1:1). Por espectroscopía de RMN se observó que el producto de mayor movilidad correspondía al MCZ y sus productos de descomposición. Por combinación de las fracciones de R_f 0,24 (tolueno–EtOAc 1:1) se obtuvo **114** (0,06 g; 23%) que se recristalizó de CHCl_3 ; pf 121-124 °C; $[\alpha]_D +42^\circ$ (c 1, acetona).

RMN ^1H (CDCl_3 , 500 MHz): δ 8,32-7,61 (m, 4H, H-Ar); 4,82 (dd, 1H, $J = 12,3$; 2,6 Hz, H-4); 4,78 (dd, 1H, $J = 5,9$; 2,6 Hz, H-3); 4,58 (dd, 1H, $J = 12,3$; 4,9 Hz, H-5); 4,38 (m, 2H, H-6, H-6'); 2,83 (dd, 1H, $J = 17,9$; 5,9 Hz, H-2); 2,64 (d, 1H, $J = 17,9$ Hz, H-2').

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 125,8 MHz): δ 171,5 (C-2); 166,0; 163,9 (CO_2Ar); 133,2-126,6 (C-aromáticos); 81,4 (C-4); 67,9; 66,9 (C-3,5); 60,5 (C-6); 38,3 (C-5).

Anal. Calculado para $\text{C}_{14}\text{H}_{13}\text{O}_6\text{F}_3 \cdot \frac{1}{2}\text{H}_2\text{O}$ (%): C 48,99; H 4,11. Encontrado: C 49,33; H 3,82.

3,5-Di-O-acetil-2-desoxi-6-O-(3-trifluorometil)benzoíl-D-arabino-hexono-1,4-lactona (**115**)



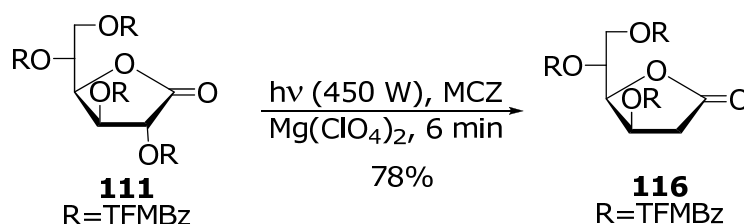
Por fotólisis a 450 W de una solución de 3,5-di-O-acetil-2,6-di-O-(3-trifluorometil)benzoíl-D-glucono-1,4-lactona (**110**; 0,45 g; 0,75 mmol) durante 3 min, según las condiciones generales de desoxigenación. El análisis por ccd del residuo obtenido mostró la presencia de dos productos, un compuesto mayoritario de R_f 0,33 y otro minoritario R_f 0,74 (hexano–EtOAc 5:2). El residuo se purificó por cromatografía en columna (hexano–EtOAc 85:15 a 80:20). El producto de mayor movilidad correspondió al MCZ y a los productos de descomposición del MCZ. Por combinación de las fracciones de R_f 0,33 (hexano–EtOAc 5:2) se obtuvo **115** (0,21 g; 67%) que se recristalizó de metanol, pf 110-113 °C, $[\alpha]_D +70^\circ$ (c 1, CHCl_3).

RMN ^1H (CDCl_3 , 500 MHz): δ 8,27-7,58 (m, 4H, H-Ar); 5,70 (dd, 1H, $J = 5,5$; 3,6 Hz, H-3); 5,52 (ddd, 1H, $J = 9,5$; 5,2; 2,2 Hz, H-5); 4,91 (dd, 1H, $J = 12,5$; 2,2 Hz, H-6); 4,77 (dd, 1H, $J = 9,5$; 3,6 Hz, H-4); 4,46 (dd, 1H, $J = 12,5$; 5,2 Hz, H-6'); 2,95 (dd, 1H, $J = 18,3$; 5,5 Hz; H-2); 2,64 (d, 1H, $J = 18,3$ Hz; H-2'); 2,06; 2,05 (2s, 6H, CO_2CH_3).

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 50,3 MHz): δ 172,9 (C-2); 169,5; 169,4; 164,6 (CO_2CH_3 ; CO_2Ar); 132,8-126,4 (C-aromáticos); 78,3 (C-4); 68,3; 67,0 (C-5,3); 63,6 (C-6); 36,4 (C-2); 20,6; 20,5 (CO_2CH_3).

Anal. Calculado para $\text{C}_{18}\text{H}_{17}\text{O}_8\text{F}_3$ (%): C 51,68; H 4,10. Encontrado: C 51,27; H 4,36.

2-Desoxi-3,5,6-tri-O-(3-trifluorometil)benzoíl-D-arabino-hexono-1,4-lactona (**116**)



Por fotólisis a 450 W de una solución de 2,3,5,6-tetra-O-(3-trifluorometil)benzoíl-D-glucono-1,4-lactona (**111**; 0,65 g; 0,75 mmol) durante 3 min se obtuvo el compuesto **116**, según las condiciones generales de desoxigenación. El residuo obtenido luego de la evaporación se particionó en una mezcla $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{H}_2\text{O}$. La fase orgánica se secó con Na_2SO_4 (anh) y se concentró, a presión reducida. El análisis por ccd del jarabe obtenido mostró la presencia de dos productos, uno mayoritario de R_f 0,36 y otro de R_f 0,84 (tolueno-EtOAc 9:1). El de mayor movilidad correspondió al MCZ y a sus productos de descomposición. El residuo se purificó por cromatografía en columna (tolueno EtOAc 100:0 a 96:4) y por combinación de las fracciones de R_f 0,36 (tolueno-EtOAc 9:1) se obtuvo **116**, como un sólido amorfo (0,40 g; 78%), $[\alpha]_D -83^\circ$ (c 1, CHCl_3).

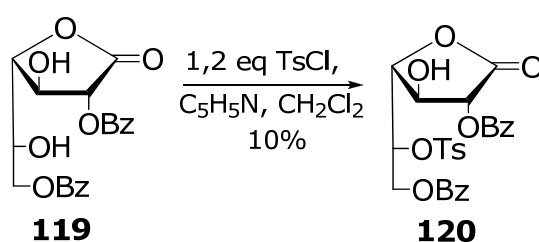
RMN ^1H (CDCl_3 , 500 MHz): δ 8,39-7,47 (m, 12H, H-Ar); 5,99 (ddd, 1H, $J = 5,9$; 4,2; 1,2 Hz, H-3); 5,91 (dd, 1H, $J = 4,9$; 2,6 Hz, H-5); 5,11 (dd, 1H, $J = 7,6$; 4,2 Hz, H-4); 5,05 (dd, 1H, $J = 12,6$; 2,6 Hz, H-6); 4,98 (dd, 1H, $J =$

12,6; 4,9, H-6'), 3,14 (dd, 1H, $J = 18,6; 5,9$ Hz, H-2); 2,86 (dd, 1H, $J = 18,6; 1,2$ Hz, H-2').

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 125,8 MHz): δ 172,3 (C-1); 164,4; 163,9; 163,6 (CO_2Ar); 133,4-126,3 (C-aromáticos); 78,0 (C-4); 69,9; 68,6 (C-3,5); 63,6 (C-6); 36,2 (C-2).

HRMS (FAB+) m/z calculado para $\text{C}_8\text{H}_{18}\text{NO}_6$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 679,1009. Encontrado: 679,1018.

2,6-Di-O-benzoil-5-O-tosil-D-galactono-1,4-lactona (**120**)

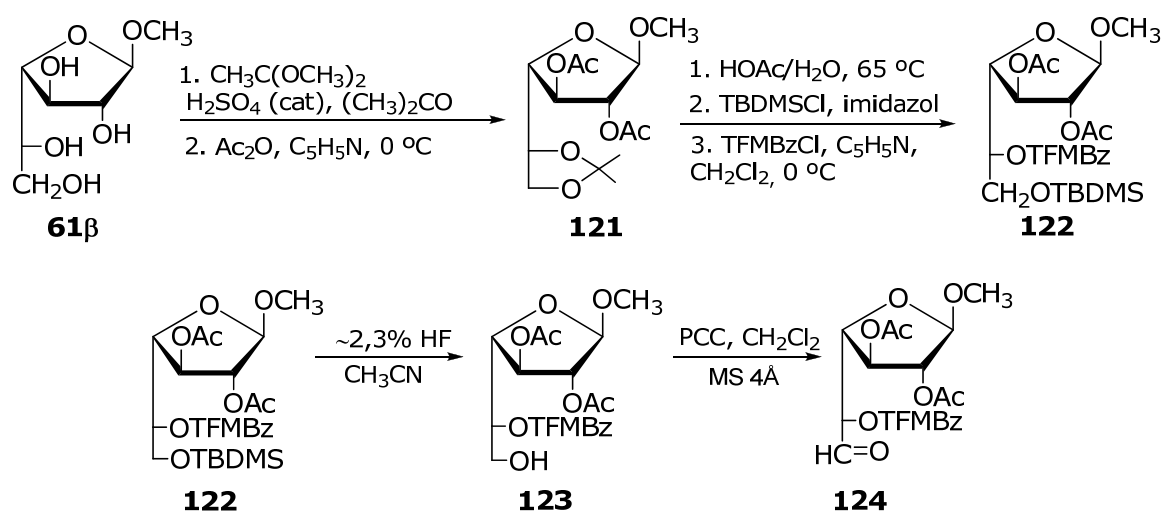


A una solución de 2,6-di-O-benzoil-D-galactono-1,4-lactona¹¹ (**119**; 0,49 g; 1,27 mmol) en CH_2Cl_2 anhidro (7 ml) y piridina anhidra (1 ml), enfriada a 0 °C se agregó cloruro de 4-toluensulfonilo (0,31 g; 2,64 mmol) y se dejó reaccionando con agitación durante 2 h. El análisis por ccd mostró la presencia del material de partida (R_f 0,21) y la aparición de tres productos de mayor movilidad, de los cuales el correspondiente al R_f 0,34 (tolueno-EtOAc 4:1) era mayoritario. La mezcla de reacción se diluyó con CH_2Cl_2 (150 ml) y la solución resultante de extrajo sucesivamente con HCl 5% (3 x 75 ml), H_2O (2 x 75 ml), NaHCO_3 ss (3 x 75 ml) y H_2O hasta neutralidad. La fase orgánica se secó con Na_2SO_4 (anh) y se concentró a presión reducida obteniéndose un sólido blanco-rosado, que por ccd se identificó como **119**. El compuesto **119** se recuperó por recristalización de éter etílico (70%). El jarabe obtenido por evaporación a presión reducida de las aguas madres, se purificó por cromatografía en columna (tolueno-EtOAc 98:2 a 93:7) y por combinación de las fracciones de R_f 0,34 se obtuvo el compuesto **120** (0,07 g; 10%) como un sólido amorfo.

RMN ^1H (CDCl_3 , 200 MHz): δ 8,13-7,16 (14H, H-Ar); 6,64 (d, 1H, $J = 7,6$ Hz, H-2); 5,26 (m, 1H, H-5); 4,55 (m, 4H, H-6, H-6' H-4, H-3); 2,27 (s, 3H, CH_3).

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 50,3 MHz): δ 167,8 (C-1); 165,9 (CO_2Ph); 145,6-127,8 (C-aromáticos); 78,6 (C-4); 75,9; 75,3 (C-2, C-3); 72,5 (C-5); 62,3 (C-6); 21,6 (CH_3Ar).

Metil 2,3-di-O-acetil-5-O-(3-trifluorometil)benzoil- β -D-galactodialdo-1,4-furanósido (124)



A una solución de metil β -D-galactofuranósido (61 β ; 0,31 g; 1,60 mmol) en acetona/2,2-dimetoxipropano 5:1 (16,8 ml) enfriada a $0\text{ }^\circ\text{C}$, se agregó H_2SO_4 concentrado (3 μl). Luego de agitar durante 30 min, la reacción se monitoreó por ccd y se observó la desaparición total del material de partida (R_f 0,15) y la aparición de un único producto de R_f 0,56 ($n\text{PrOH-NH}_3\text{-H}_2\text{O}$ 7:1:2). La mezcla de reacción se neutralizó con unas gotas de una solución de NH_4OH y se evaporó a presión reducida. Por purificación por cromatografía por columna (hexano-EtOAc 7:3) y evaporación de las fracciones de R_f 0,79 se obtuvo el metil 5,6-O-isopropilidén- β -D-galactofuranósido (0,16 g; 42%) que se identificó como tal por espectroscopía de RMN ^1H y ^{13}C .

Se disolvió metil 5,6-O-isopropilidén- β -D-galactofuranósido (0,16 g; 0,68 mmol) en piridina/anhídrido acético 1:1 (2,5 ml) a $0\text{ }^\circ\text{C}$. El análisis por ccd luego de 1,5 h de reacción mostró la desaparición total del material de

partida (R_f 0,07) y la aparición de un producto mayoritario de R_f 0,35 (hexano-EtOAc 3:1). Por evaporación a presión reducida y coevaporación con tolueno (3 x 7 ml) para eliminar la piridina y el exceso de anhídrido acético, se obtuvo un jarabe que se secó al vacío durante 8 hs, para ser usado sin purificación en la siguiente reacción. Se identificó espectroscópicamente como **121** y no se caracterizó.

El jarabe de la reacción anterior se disolvió en una mezcla HOAc/H₂O/CH₃CN 3:1:6 (17,5 ml) y se calentó a reflujo en un baño de glicerina, a 65 °C, con agitación. Luego de 1 h de reacción, el análisis por ccd mostró la desaparición total del material de partida (R_f 0,64; hexano-EtOAc 2:1) y la aparición de un producto mayoritario de menor movilidad (R_f 0,45; EtOAc). La mezcla se llevó a temperatura ambiente, se concentró a presión reducida y luego se coevaporó sucesivamente con H₂O y tolueno para eliminar el ácido acético. El jarabe obtenido se secó al vacío y se utilizó sin purificación en la siguiente reacción. Una fracción de la mezcla cruda se purificó por cromatografía en columna y el producto de R_f 0,45 (EtOAc) se identificó espectroscópicamente como el metil 2,3-di-*O*-acetil- β -D-galactofuranósido.

El crudo de la reacción anterior se disolvió en DMF anhidro (2 ml) y se le agregó imidazol (1,3 eq) y cloruro de *t*-butildimetilsililo (1 eq), bajo atmósfera de Ar a 0 °C. Luego de 1 h, el análisis por ccd mostró la desaparición del material de partida (R_f 0,20) y la aparición de un producto mayoritario de mayor movilidad (R_f 0,89; EtOAc). La mezcla de reacción se diluyó con CH₂Cl₂, se lavó rápidamente con H₂O, se secó con Na₂SO₄ (anh), se evaporó a presión reducida y se secó al vacío.

El jarabe anterior se disolvió en piridina anhidra, se llevó a 0 °C y se trató con cloruro de 3-(trifluorometil)benzoílo (1 eq). Luego de 16 h, el análisis por ccd mostró la desaparición del material de partida (R_f 0,31) y la aparición de único producto de mayor movilidad (R_f 0,44; tolueno-EtOAc 9:1). La mezcla de reacción se diluyó con CH₂Cl₂ y la solución resultante se extrajo sucesivamente con HCl 5%, NaHCO₃ ss y H₂O hasta neutralidad. La fase orgánica se secó con Na₂SO₄ (anh) y se concentró a presión reducida. Se obtuvo un jarabe que se secó al vacío y se utilizó sin purificación en la

siguiente reacción. El compuesto de R_f 0,44 (tolueno-EtOAc 9:1) se identificó espectroscópicamente como **122**.

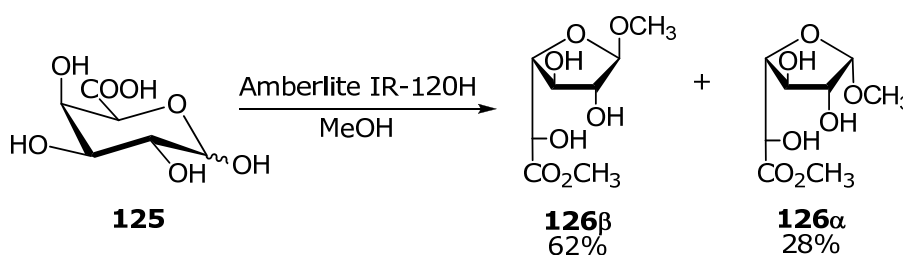
La desprotección de **122** (0,68 mmol) se realizó utilizando HF (48%) en una concentración final de 2,3% en acetonitrilo anhidro (26 ml). Luego de 1,5 h de reacción el análisis por ccd mostró la desaparición del material de partida y la aparición de un producto mayoritario de menor movilidad. La mezcla de reacción se diluyó con CH_2Cl_2 y se extrajo con NaHCO_3 (ss) y H_2O hasta neutralidad. La fase orgánica se secó con Na_2SO_4 (anh) y se concentró a presión reducida. La identidad de **123** se estableció por espectroscopia de RMN ^1H y ^{13}C .

A una solución de **123** (0,69 g; 0,74 mmol) en CH_2Cl_2 anhidro (10 ml), se agregaron tamices moleculares 4\AA (0,5 g) y PCC (0,46 g), y se dejó reaccionar a temperatura ambiente durante 4 h, con agitación. El análisis por ccd mostró la desaparición total del material de partida (R_f 0,28) y la aparición de un único producto de R_f 0,21 (tolueno-EtOAc 3:1). La mezcla de reacción se filtró sobre lecho de celite y el filtrado se concentró a presión reducida. El jarabe resultante se purificó por cromatografía en columna (tolueno-EtOAc 8:2) y por combinación de las fracciones de R_f 0,21 (tolueno-EtOAc 3:1) se obtuvo el compuesto **124** (0,13 g; 42%) como un sólido amorfo, identificado por espectroscopía de RMN ^1H y ^{13}C .

RMN ^1H (CDCl_3 , 200 MHz): δ 9,67 (s, 1H, CHO); 5,73 (d, 1H, $J = 2,5$ Hz, H-3); 4,15 (m, 2H, H-2, H-5); 5,02 (s, 1H, H-1); 4,67 (dd, 1H, $J = 5,5; 2,5$ Hz, H-4); 3,40 (s, 3H, OCH_3); 2,13; 2,02 (2s, 6H, CO_2CH_3).

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 50,3 MHz): δ 195,1 (C-6); 170,4; 169,6; 164,4 (CO_2CH_3 ; CO_2Ar); 133,3-126,7 (C-aromáticos); 106,7 (C-1); 80,9 (C-4); 80,6 (C-2); 77,5 (C-3); 77,1 (C-5); 54,9 (OCH_3); 20,6; 20,4 (CO_2CH_3).

Metil α,β -D-galactofuranosiduronato de metilo (**126**)



Una suspensión de ácido D-galacturónico (**125**; 1 g; 5,15 mmol) en MeOH (20 ml) con 1 g de resina Amberlite IR-120H se agitó a 35 °C durante 48 hs. El análisis por ccd mostró la aparición de un producto mayoritario de R_f 0,48 y otro de R_f 0,36 (EtOAc, doble desarrollo). Por filtración y evaporación del solvente a presión reducida se obtuvo un residuo (1,11 g) que se purificó por cromatografía en columna (tolueno-EtOAc 49:1). Las fracciones de R_f 0,48 condujeron al compuesto **126 β** (0,71 g; 62%) como un sólido amorfo; $[\alpha]_D -125^\circ$ (c 1, MeOH). Lit $[\alpha]_D -112^\circ$ (c 1,38; MeOH).¹²

RMN ^1H (D_2O , 500 MHz): δ 4,89 (d, 1H, $J = 1,9$ Hz, H-1); 4,50 (d, 1H, $J = 2,7$ Hz, H-5); 4,29 (dd, 1H, $J = 6,5; 2,7$ Hz, H-4); 4,18 (dd, 1H, $J = 3,9; 1,9$ Hz, H-2); 3,81 (s, 3H, OCH_3); 3,38 (s, 3H, CO_2CH_3).

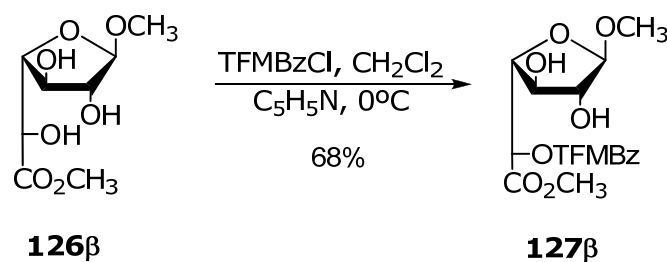
RMN ^{13}C (D_2O , 50,3 MHz): δ 174,2 (C-6); 109,0 (C-1); 84,1; 81,0 (C-2,4); 76,3 (C-3); 70,0 (C-5); 55,6; 53,5 (CO_2CH_3 ; OCH_3).

Por combinación de las fracciones de R_f 0,36 se obtuvo el compuesto **126 α** (0,31 gr; 28%) que se recristalizó de hexano-EtOAc 1:1; pf 63-64 °C; $[\alpha]_D +95^\circ$ (c 1, MeOH). Lit. pf 64-65 °C; $[\alpha]_D +93^\circ$ (c 1,38, MeOH).¹²

RMN ^1H (D_2O , 500 MHz): δ 4,85 (d, 1H, $J = 4,8$ Hz, H-1); 4,41 (d, 1H, $J = 3,8$ Hz, H-5); 4,18 (aparente t, 1H, $J = 3,8$ Hz, H-5); 4,14 (dd, 1H, $J = 8,4; 4,7$ Hz, H-2); 4,12 (dd, $J = 7,5; 3,8$ Hz, H-4); 3,80 (s, 3H, OCH_3); 3,41 (s, 3H, CO_2CH_3).

RMN ^{13}C (D_2O , 125,8 MHz): δ 174,4 (C-6); 102,6 (C-1); 82,3 (C-4); 0 76,5 (C-2); 73,8 (C-3); 70,9 (C-5); 56,1 (CO_2CH_3); 53,6 (OCH_3).

Metil 5-O-(3-trifluorometil)benzoí- β -D-galactofuranosiduronato de metilo (**127 β**)



A una solución de metil β -D-galactofuranosiduronato de metilo (**126 β** ; 0,5 g; 2,25 mmol) en CH_2Cl_2 anhidro (10 ml) y piridina anhidra (5 ml), enfriada a 0 °C, se agregó una solución de cloruro de 3-(trifluorometil)benzoílo (0,39 ml; 2,64 mmol) en CH_2Cl_2 anhidro (5 ml), en 3 alícuotas durante 1,5 h. Después del último agregado se continuó la agitación durante 1 h a 0 °C. El análisis por ccd mostró la aparición de un producto mayoritario de R_f 0,63 (tolueno-EtOAc 9:1) y una pequeña proporción de material de partida. La mezcla de reacción se diluyó con CH_2Cl_2 (150 ml) y la solución resultante se extrajo sucesivamente con HCl 5% (3 x 75 ml), H_2O (2 x 75 ml), NaHCO_3 ss (3 x 75 ml) y H_2O hasta neutralidad. La fase orgánica se secó con Na_2SO_4 (anh) y se concentró a presión reducida. El jarabe resultante se purificó por cromatografía en columna (tolueno-EtOAc 3:2) y por combinación de las fracciones de R_f 0,69 se obtuvo el compuesto **127 β** (0,58 g; 68%) como un sólido amorfo; $[\alpha]_D -66$ °(c 1; CHCl_3).

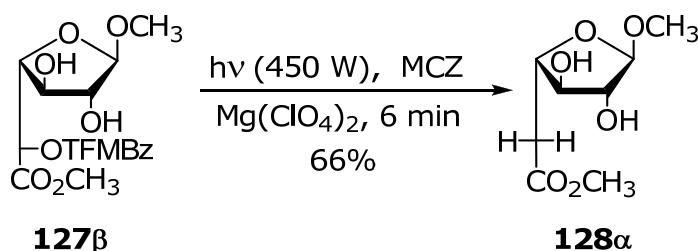
RMN ^1H (CDCl_3 , 500 MHz): δ 8,37-7,58 (4H, H-Ar); 5,53 (d, 1H, $J = 4,2$ Hz, H-5); 4,92 (s, 1H, H-1); 4,48 (t, 1H, $J = 4,5$ Hz, H-4); 4,11 (m, 2H, H-2, H-3); 3,79 (s, 3H, CO_2CH_3); 3,76 (s, 3H, OCH_3).

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz): δ 168,1(C-6); 164,8 (CO_2Ar); 133,1-122,5 (C-aromáticos); 108,9 (C-1); 83,1 (C-4); 81,1 (C-2); 77,7 (C-3); 72,3 (C-5); 55,2 (OCH_3); 53,0 (CO_2CH_3) .

Las asignaciones espectroscópicas se realizaron utilizando experimentos de correlación heteronuclear (HSQC).

Anal. Calculado para $\text{C}_{16}\text{H}_{17}\text{O}_7\text{F}_3$ (%): C 48,74; H 4,35. Encontrado: C 49,01; H 4,48.

Metil 5-desoxi- β -L-arabino-hexafuranosiduronato de metilo (**128 α**)



Por fotólisis a 450 W de una solución de metil 5-O-(3-trifluorometil)benzoíl- β -D-galactofuranosiduronato de metilo (**127 β** ; 0,29 g; 0,75 mmol) durante 6 min, según las condiciones generales de desoxigenación, se obtuvo el compuesto **128 α** . El análisis por ccd de la crudo concentrado de reacción mostró la presencia de tres productos, un compuesto mayoritario de R_f 0,47 (tolueno-EtOAc 1:9), y otros dos minoritarios. Uno de ellos de mayor movilidad (movilidad) (R_f 0,95) correspondiente al MCZ y sus productos de descomposición y el otro R_f 0,24 (tolueno-EtOAc 9:1). El residuo se particionó en H_2O/CH_2Cl_2 . La fase acuosa se concentró a presión reducida obteniéndose un jarabe que se purificó por cromatografía en columna (tolueno-EtOAc 3:97) y por evaporaron de las fracciones de R_f 0,40 (tolueno-EtOAc 1:9) se obtuvo **128 α** (0,10 g; 66%) como un sólido amorfo; $[\alpha]_D -68^\circ$ (c 1, $CHCl_3$). De acuerdo a los espectros de RMN de 1H y ^{13}C las fracciones de R_f 0,24 (tolueno-EtOAc 1:9) correspondieron a **126 β** , que se obtuvo como producto de la hidrólisis fotoquímica de 3-trifluorometilbenzoato.¹³

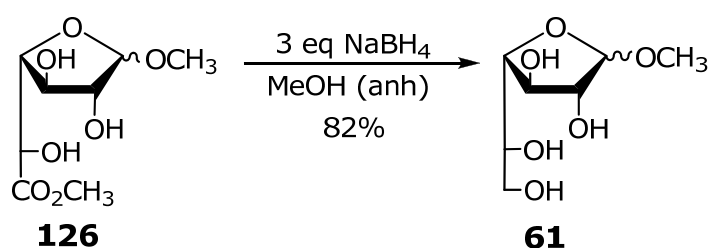
RMN 1H (D_2O , 500 MHz): δ 4,89 (d, 1H, $J = 0,5$ Hz, H-1); 4,30 (m, 1H, H-4); 4,04 (m, 1H, H-2); 3,89 (ddd, 1H, $J = 5,3; 3,3; 0,4$ Hz, H-3); 3,73 (s, 3H, CO_2CH_3); 3,36 (s, 3H, OCH_3); 2,86 (dd, 1H, $J = 16,0; 4,4$ Hz, H-5); 2,72 (dd, 1H, $J = 16,0; 8,7$ Hz, H-5').

RMN ^{13}C (D_2O , 125,8 MHz): δ 174,3 (C-6); 109,1 (C-1); 81,4 (C-4); 80,5 (C-2); 80,2 (C-3); 55,4 (CO_2CH_3); 52,2 (OCH_3); 38,6 (C-5).

Las asignaciones espectroscópicas se realizaron utilizando experimentos de correlación heteronuclear (HSQC).

HRMS (ESI+) m/z calculado para $C_8H_{18}NO_6$ $[M+NH_4]^+$: 224,1929. Encontrado: 224,2234.

Metil α,β -D-galactofuranósido (**61**)

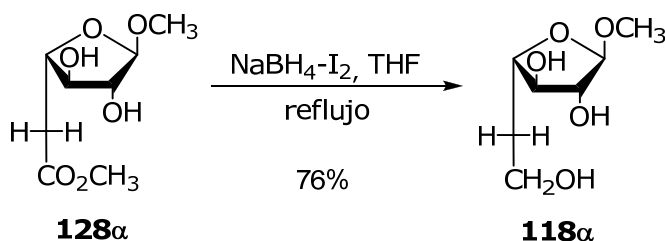


A una solución de metil α,β -D-galactofuranosiduronato de metilo (**126**; 120 mg; 0,54 mmol) en metanol (2 ml) a temperatura ambiente, se agregó NaBH_4 (61 mg; 1,62 mmol) en cuatro porciones, cada 30 min. Luego del último agregado se continuó la agitación durante 1 h. El análisis por ccd de la mezcla de reacción mostró la desaparición total del material de partida (R_f 0,43) y la aparición de dos productos, de R_f 0,32 y de R_f 0,25 ($n\text{PrOH-NH}_3\text{-H}_2\text{O}$ 14:1:1). La mezcla de reacción se desionizó por cromatografía de intercambio iónico (Amberlite IR-120H) eluyendo con metanol. El eluido se concentró a presión reducida y se coevaporó con MeOH (3 x 10 ml). El jarabe obtenido se purificó por cromatografía en columna (EtOAc-MeOH 100:7) y por combinación de las fracciones de R_f 0,32 ($n\text{PrOH-NH}_3\text{-H}_2\text{O}$ 14:1:1) se obtuvo **61 β** (86 mg; 82%) como un sólido amorfo, cromatográficamente homogéneo de igual movilidad que una muestra auténtica de **61 β** , cuyas propiedades espectroscópicas y físico químicas coincidieron con los valores de literatura^{14,15}

Por combinación de las fracciones de R_f 0,25 ($n\text{PrOH-NH}_3\text{-H}_2\text{O}$ 14:1:1) se obtuvo **61 α** (82 mg; 78%) como un sólido amorfo, cuyas propiedades espectroscópicas y físico químicas coincidieron con los valores de literatura.^{15,16}

Ambos anómeros se caracterizaron por HPAEC-PAD y se obtuvieron los siguientes tiempos de retención: **61 α** 9,9 min, **61 β** 13,6 min.

Metil 5-desoxi- α -L-arabino-hexafuranósido (**118 α**)



La reducción del compuesto **128 α** se realizó siguiendo la metodología general para la reducción con NaBH_4/I_2 .

A una suspensión de NaBH_4 (0,13 g; 3,34 mmol) en THF anh (6,7 ml) a 0 °C bajo atmósfera de argón y con agitación, se agregó lentamente una

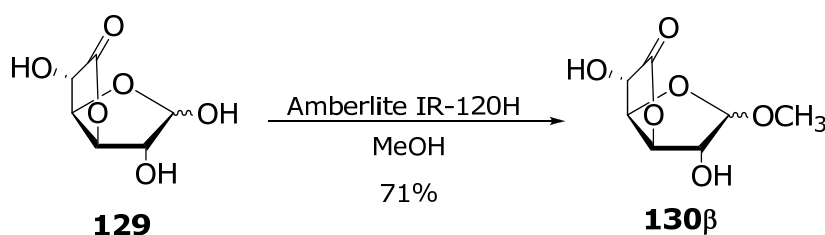
solución de I₂ (0,34 g; 1,34 mmol) en THF anh (2 ml). Se agregó una solución de metil 5-desoxi- α -L-arabino-hexafuranosíduronato de metilo (**128 α** ; 0,08 g; 0,39 mmol) en THF anhidro (2 ml). Se calentó a reflujo con agitación vigorosa durante 1,5 h. Una vez finalizada la reacción se llevó a temperatura ambiente y se trató según lo descrito en la metodología general. El residuo se disolvió en H₂O mili-Q y se pasó a través de un cartucho de fase reversa C8 (Alltech). Por evaporación del solvente a presión reducida se obtuvo **118 α** (0,05 g; 76%) como un sólido amorfo, $[\alpha]_D -141^\circ$ (c 1, MeOH). Lit. $[\alpha]_D -137^\circ$ (c 1, MeOH).¹⁷

RMN ¹H (D₂O, 500 MHz): δ 4,89 (d, 1H, $J = 1,4$ Hz, H-1); 4,03 (m, 2H, H-2, H-3); 3,83 (ddd, 1H, $J = 7,1; 3,4; 0,5$ Hz, H-4); 3,75 (ddd, 1H, $J = 11,1; 6,9; 5,7$ Hz, H-6); 3,71 (ddd, 1H, $J = 11,1; 7,4; 6,4$ Hz, H-6'); 3,39 (s, 3H, OCH₃); 1,96 (dddd, 1H, $J = 14,2; 9,3; 7,2; 4,8$ Hz, H-5); 1,87 (dddd, 1H, $J = 14,2; 8,3; 6,3; 5,7$ Hz, H-5').

RMN ¹³C (D₂O, 125,8 MHz): δ 108,7(C-1); 81,6; 81,3(C-2,3); 80,8 (C-4); 59,4 (C-6); 55,4 (OCH₃); 35,8 (C-5).

Las asignaciones espectroscópicas se realizaron utilizando experimentos de correlación heteronuclear (HSQC).

Metil β -D-glucufuranosidurono-6,3-lactona (**130 β**)

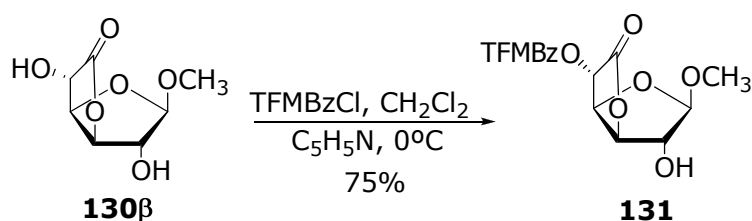


Una suspensión de D-glucurono-6,3-lactona (**129**; 2 gr; 1,15 mmol) en MeOH anhidro (15 ml) con 1,25 gr de resina Amberlite IR-120H se agitó a 35 °C durante 48 hs. El análisis por ccd mostró la desaparición total de material de partida (R_f 0,22) y la aparición de un único producto de R_f 0,51 (n PrOH-NH₃-H₂O 14:1:1). Por filtración y evaporación del solvente a presión reducida se obtuvo un precipitado cuyo análisis por RMN ¹H mostró una relación 4:1 de los anómeros α/β de **130**. Por recristalización con CHCl₃ de la

mezcla se obtuvo el compuesto **130 β** (1,54 g; 71%); pf 140-141 °C; $[\alpha]_D -52^\circ$ (c 1,1; H₂O). Lit. pf 139 °C; $[\alpha]_D -56^\circ$ (c 1,4; H₂O).¹⁸

RMN ¹³C (D₂O, 50,8 MHz): δ 178,0 (C-6); 110,0 (C-1); 84,0 (C-3); 78,6 (C-4); 76,8 (C-2); 69,6 (C-5); 55,9 (OCH₃).

Metil 5-O-(3-trifluorometil)benzoíl- β -D-glucofuranosidurono-6,3-lactona (**131**)



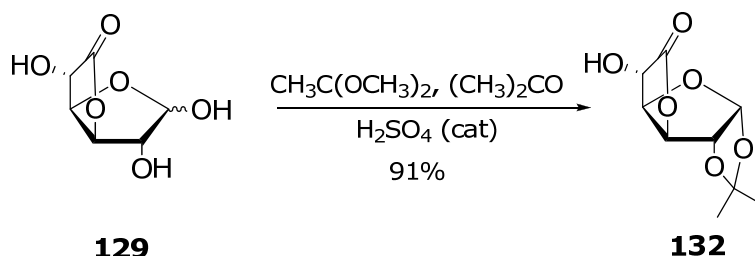
A una solución de metil β -D-glucofuranosidurono-6,3-lactona (**130 β** ; 0,75 g; 3,96 mmol) en CH₂Cl₂ anhidro (7 ml) y piridina anhidra (7 ml), enfriada a 0°C se agregó una solución de cloruro de 3-(trifluorometil)benzoílo (0,70 ml, 4,64 mmol) en CH₂Cl₂ (2 ml), en tres alícuotas durante 1,5 hs. Después del último agregado se continuó la agitación a 0°C durante 0,5 h y luego a temperatura ambiente durante 1 h. El análisis por ccd de la reacción mostró la formación de un producto mayoritario de R_f 0,50 y uno minoritario de R_f 0,72 (tolueno-EtOAc 7:3). La mezcla de reacción se diluyó con CH₂Cl₂ (250 ml) y la solución resultante de extrajo sucesivamente con HCl 5% (3 x 75 ml), H₂O (2 x 50 ml), NaHCO₃ ss (3 x 75 ml) y H₂O hasta neutralidad. La fase orgánica se secó con Na₂SO₄ (anh) y se concentró a presión reducida y el jarabe resultante se purificó por cromatografía en columna (tolueno-EtOAc 4:1). La evaporación de las fracciones de R_f 0,50 condujeron al compuesto **131** (1,07g; 75%) como un sólido amorfo; $[\alpha]_D +33^\circ$ (c 1, CHCl₃).

RMN ¹H (CDCl₃, 200 MHz): δ 8,44-7,68 (m, 4H, CH-Ar); 5,52 (d, 1H, J = 6,8 Hz, H-5); 5,34 (dd, 1H, J = 6,8; 4,9 Hz, H-4); 5,02 (d, 1H, J = 4,9 Hz, H-3); 4,98 (s, 1H, H-1); 4,47 (d, 1H, J = 4,94, H-2), 3,38 (s, 3H, OCH₃); 2,56 (d, 1H, OH).

RMN ¹³C (CDCl₃, 50,8 MHz): δ 170,1(C-6); 163,9 (CO₂Ar); 133,8-127,2 (C-aromáticos); 109,7 (C-1); 83,8 (C-3); 77,4 (C-4); 75,5 (C-2); 70,0 (C-5); 55,7 (OCH₃).

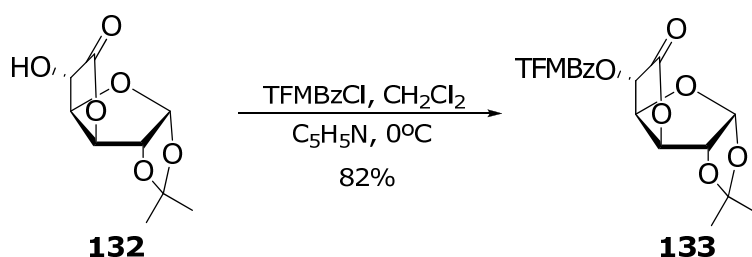
Anal. Calculado para $C_{15}H_{13}O_7F_3$ (%): C 49,73; H 3,62. Encontrado: C 50,03; H 3,59.

1,2-O-Isopropilidén- α -D-glucofuranosilurono-6,3-lactona (**132**)



A una suspensión de D-glucono-6,3-lactona (**129**, 0,50 g, 2,84 mmol) en una mezcla de acetona/2,2-dimetoxipropano 5:1 (6 ml) enfriada a 0 °C, se agregó H_2SO_4 concentrado (3 μl). Luego de agitar durante 1 h se monitoreó por ccd y se observó la desaparición total de material de partida (R_f 0,20) y la formación de un único producto de R_f 0,64 (EtOAc, doble desarrollo). La mezcla de reacción se neutralizó con unas gotas de una solución NH_4OH . Por evaporación del solvente a presión reducida se obtuvo **132** (0,56 g, 91%) como un sólido, blanco y cristalino cromatográficamente homogéneo. Las propiedades espectroscópicas (Tablas 4-4 y 4-5) y fisicoquímicas fueron coincidentes con las descriptas.¹⁹

1,2-O-Isopropilidén-5-O-(3-trifluorometil)benzoíl- α -D-glucofuranosilurono-6,3-lactona (**133**)



A una solución de 1,2-O-isopropilidén- α -D-glucofuranosilurono-6,3-lactona (**132**; 1,30 g, 6,15 mmol) en CH_2Cl_2 anhidro (15 ml) y piridina anhidra (7,5 ml), enfriada a 0°C se agregó una solución de cloruro de 3-

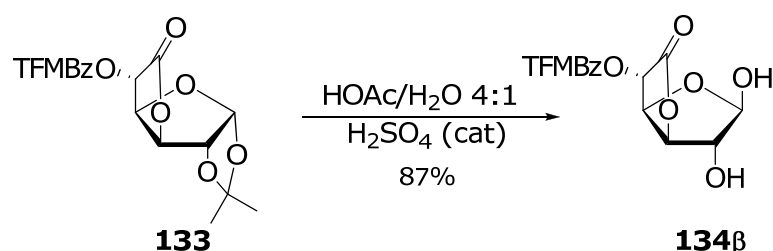
(trifluorometil)benzoílo (0,70 ml; 4,64 mmol) en CH_2Cl_2 anhidro, en tres alícuotas durante 1,5 h. El análisis por ccd luego de 1 h del último agregado, mostró la aparición de un único producto de R_f 0,65 (hexano-EtOAc 3:1). La mezcla de reacción se diluyó con CH_2Cl_2 (200 ml), la solución resultante se extrajo sucesivamente con HCl 10% (3 x 125 ml), H_2O (2 x 125 ml), NaHCO_3 ss (3 x 125 ml) y H_2O hasta neutralidad. La fase orgánica se secó con Na_2SO_4 (anh) y se concentró a presión reducida. El jarabe resultante se purificó por cromatografía en columna (tolueno-EtOAc 95:5) y se combinaron las fracciones de R_f 0,65 (hexano-EtOAc 3:1). Por recristalización de metanol se obtuvo el compuesto **133** (1,97 g; 82%), como un sólido cristalino, pf 102-103 °C; $[\alpha]_D +62^\circ$ (c 1, CHCl_3).

RMN ^1H (CDCl_3 , 200 MHz): δ 8,42-7,15 (m, 4H, H-Ar); 6,06 (dd, 1H, $J = 3,7$ Hz, $^4J = 0,5$ Hz, H-1); 5,76 (d, 1H, $J = 4,4$ Hz, H-5); 5,20 (ddd, 1H, $J = 4,4$; 2,9 Hz, $^4J = 0,5$ Hz, H-4); 4,97 (d, 1H, $J = 2,9$ Hz, H-3); 4,89 (d, 1H, $J = 3,7$ Hz, H-2), 1,52; 1,36 (2s, 6H, $\text{C}(\text{CH}_3)_2$).

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 50,3 MHz): δ 169,2 (C-6); 165,5 (CO_2Ar); 133,5-127,1 (C-aromáticos); 113,6 ($\text{C}(\text{CH}_3)_2$); 107,0 (C-1); 82,6; 82,3 (C-2,3); 77,0 (C-4); 70,6 (C-5); 26,9; 26,5 ($\text{C}(\text{CH}_3)_2$).

Anal. Calculado para $\text{C}_{17}\text{H}_{15}\text{O}_7\text{F}_3$ (%): C 52,58; H 3,89. Encontrado: C 52,46; H: 4,05.

5-O-(3-Trifluorometil)benzoíl- β -D-glucofuranosurono-6,3-lactona (134)



Una solución de 1,2-di-O-isopropilidén-5-O-(3-trifluorometil)benzoíl- β -D-glucofuranosílorono-6,3-lactona (**133**; 2,07 g; 5,33 mmol) en una mezcla de HOAc/ H_2O 4:1 (15 ml) y H_2SO_4 concentrado (72 μl ; 1,3 mmol) se calentó a reflujo en un baño de glicerina a 65 °C con agitación. Luego de 2 h, el

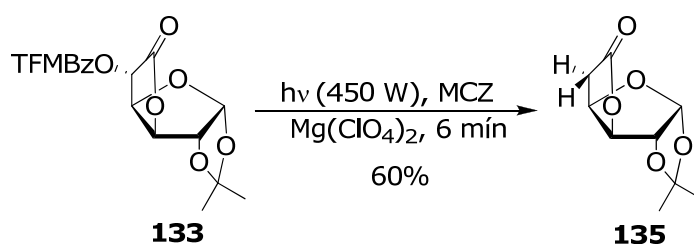
análisis por ccd mostró la desaparición total del material de partida (R_f 0,86) y la aparición de un único producto (R_f 0,31; hexano-EtOAc 1:1). La mezcla de reacción se concentró a presión reducida y el jarabe obtenido se maceró con H_2O desionizada en baño de hielo. Lentamente cristalizó el compuesto **134** (R_f 0,31; hexano-EtOAc 1:1). Se dejó cristalizar durante 2 h, se filtró y el sólido se lavó exhaustivamente con H_2O . El análisis por espectroscopía de RMN ^{13}C y 1H confirmó la configuración β de **134** y mostró pequeñas cantidades del anómero α (9:1). Por recristalización con $CHCl_3$ se obtuvo **134 β** anomericamente puro (1,15 g, 87%), pf 162-164 °C; $[\alpha]_D +64^\circ$ (c 1, acetona).

RMN 1H (DMSO- d_6 , 500 MHz): δ 8,36-7,81 (m, 4H, H-Ar); 6,74 (d, 1H, $J = 4,0$ Hz, OH); 5,71 (d, 1H, $J = 6,8$ Hz, H-5); 5,71 (d, 1H, $J = 4,0$ Hz, OH); 5,18 (d, 1H, $J = 4,0$ Hz, H-1); 5,04 (dd, 1H, $J = 6,8; 4,8$ Hz, H-4); 4,92 (d, $J = 4,8$ Hz, H-3), 4,07 (d, 1H, $J = 4,0$ Hz, H-2).

RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 50,3 MHz): δ 171,3 (C-6); 163,8 (CO_2Ar); 134,1-126,1 (C-aromáticos); 103,6 (C-1); 85,1 (C-3); 77,5 (C-4); 75,6 (C-3); 70,8 (C-5).

Anal. Calculado para $C_{14}H_{11}O_7F_3$ (%): C 48,29; H 3,18. Encontrado: C 48,34; H 3,26.

5-Desoxi-1,2-O-isopopilidén- α -D-xilo-hexofuranosilurono-6,3-lactona (**135**)



Por fotólisis a 450 W de una solución de metil 1,2-O-isopopilidén-5-O-(3-trifluorometil)benzoíl- α -D-glucofuranosilurono-6,3-lactona (**133**; 0,29 g; 0,75 mmol) durante 6 min, según las condiciones generales de desoxigenación, se obtuvo el compuesto **135**. El análisis por ccd del residuo obtenido mostró la formación de tres productos, un compuesto mayoritario de R_f 0,60 y otros dos minoritarios, uno de R_f 0,98 correspondientes al MCZ y sus productos de descomposición y otro de R_f 0,25 (hexano-EtOAc 1:1). El

residuo se purificó por cromatografía en columna (tolueno-EtOAc 8:1). Por combinación de las fracciones de R_f 0,60 (hexano-EtOAc 1:1) se obtuvo **135** (0,09 g; 60%) como un sólido cristalino de pf 89-90 °C; $[\alpha]_D^{20} +73^\circ$ (c 1, CHCl_3). Lit. pf 90-92 °C.²⁰

Las fracciones de R_f 0,25 (hexano-EtOAc 1:1) correspondieron al compuesto **132**, que se obtuvo como producto de la hidrólisis fotoquímica del grupo 3-trifluorometilbenzoato (32%).¹³

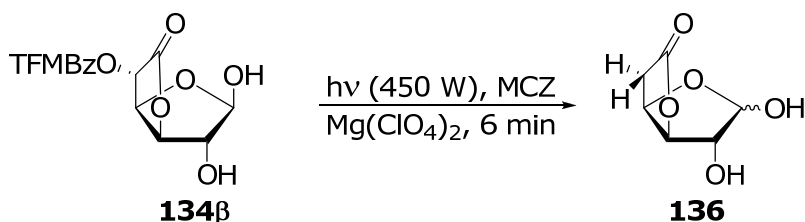
RMN ^1H (CDCl_3 , 500 MHz): δ 5,97 (d, 1H, $J = 3,8$ Hz, H-1); 5,00 (dd, 1H, $J = 4,2; 3,3$ Hz, H-4); 4,84 (d, 1H, $J = 3,8$ Hz, H-2); 2,70 (s, 1H, H-2); 4,81 (d, 1H, $J = 3,3$ Hz, H-3); 2,75 (d, 1H, $J = 18,0$ Hz, H-5); 2,70 (dd, 1H, $J = 18,0; 4,2$ Hz, H-5'); 1,52; 1,35 (2s, 6H, $\text{C}(\text{CH}_3)$).

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 125,8 MHz): δ 174,2 (C-6); 112,7 ($\text{C}(\text{CH}_3)_2$); 106,2 (C-1); 85,5 (C-3); 82,4 (C-2); 77,9 (C-4); 35,8 (C-5); 26,9; 26,5 ($\text{C}(\text{CH}_3)_2$).

Las asignaciones espectroscópicas se realizaron utilizando experimentos de correlación heteronuclear (HSQC).

HRMS (ESI+) m/z calculado para $\text{C}_9\text{H}_{16}\text{NO}_5$ $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$: 218,1023. Encontrado: 218,1025.

5-Desoxi- α,β -D-xilo-hexofuranosurono-6,3-lactona (**136**)



Por fotólisis a 450 W de una solución de 5-O-(3-trifluorometil)benzoil- β -D-glucofuranosurono-6,3-lactona (**134 β** ; 0,26 g; 0,75 mmol) durante 6 min, según las condiciones generales de desoxigenación, se obtuvo el compuesto **136**. El análisis por ccd del residuo obtenido por evaporación del solvente mostró la presencia de tres productos, uno minoritario de R_f 0,93 y otros dos de R_f 0,60 y R_f 0,38 (tolueno-EtOAc 1:9). El residuo concentrado se particionó en $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ y el análisis por ccd de la fase acuosa mostró la presencia de los dos productos de menor movilidad (R_f 0,60 y R_f 0,38; tolueno-EtOAc 1:9). El compuesto de mayor movilidad R_f 0,93 se extrajo en

la fase orgánica y correspondió al MCZ y sus productos de descomposición. La purificación de la fase acuosa por cromatografía en columna (tolueno-EtOAc 1:99) permitió aislar los otros dos compuestos. Por combinación de la fracción de R_f 0,60 se obtuvo isopropil 5-desoxi- α,β -D-xilo-hexafuranosidurono-6,3-lactona (**137**, 62 mg, 41%), identificado por espectroscopía de RMN de ^{13}C .

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 25,3 MHz): sólo se listan las señales para el anómero mayoritario de **137** δ 176,1 (C-6); 105,6 (C-1); 86,6 (C-3); 78,6; 77,2 (C-2,4); 69,1 ($\text{CH}(\text{CH}_3)_2$) 38,1 (C-5); 22,73; 22,77 ($\text{CH}(\text{CH}_3)_2$).

Por combinación de las fracciones de R_f 0,38 se obtuvo a **136 $\alpha\beta$** como una mezcla de anómeros en relación α/β 1:5 (78 mg; 56%).

RMN ^1H (D_2O , 500 MHz): **136 β** δ 5,42 (s, 1H, H-1); 5,18 (dd, 1H, $J = 7,7$; 5,3 Hz, H-4); 4,04 (d, 1H, $J = 5,3$ Hz, H-3); 4,37 (s, 1H, H-2); 3,06 (dd, 1H, $J = 19,2$; 7,7 Hz, H-5); 2,75 (d, 1H, $J = 19,2$ Hz, H-5').

RMN ^{13}C (D_2O , 125,8 MHz): **136 β** δ 180,1 (C-6); 102,8 (C-1); 87,8 (C-3); 78,6; 77,2 (C-2,4); 38,1 (C-5).

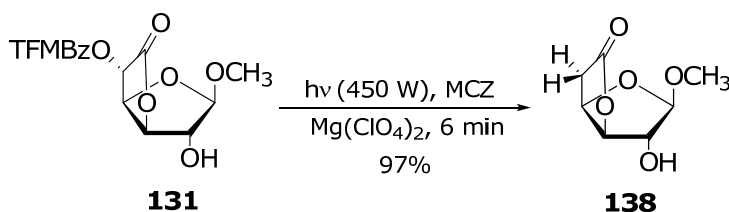
RMN ^1H (D_2O , 500 MHz): **136 α** , entre otras, δ 5,50 (d, 1H, $J = 4,0$ Hz; H-1); 3,01 (dd, 1H, $J = 18,9$; 6,5 Hz, H-5); 2,71 (d, 1H, $J = 18,9$ Hz, H-5').

RMN ^{13}C (D_2O , 125,8 MHz): **136 α** δ 179,7 (C-6); 97,5 (C-1); 89,2 (C-3); 75,9; 75,6 (C-2,3); 36,1 (C-5).

HRMS (ESI+) m/z calculado para $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{NO}_5$ $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$: 178,0715.

Encontrado: 178,0714.

Metil 5-desoxi- β -D-xilo-hexafuranosidurono-6,3-lactona (**138**)



Por fotólisis a 450 W de una solución de metil 5-O-(3-trifluorometil)benzoil- β -D-glucofuranosidurono-6,3-lactona (**131**; 0,35 g, 0,85 mmol) durante 6 min, según las condiciones generales de desoxigenación, se obtuvo el compuesto **138**. El análisis por ccd del residuo

obtenido por evaporación del solvente a presión reducida mostró la aparición de dos productos, un compuesto mayoritario de R_f 0,45 y otro minoritario de R_f 0,91 (EtOAc). El producto de mayor movilidad correspondió al MCZ y sus productos de descomposición. El residuo se purificó por cromatografía en columna (tolueno-EtOAc 2:1) y por combinación de las fracciones de R_f 0,45 (EtOAc) se obtuvo **138** (0,16 g; 97%) como un sólido amorfo; $[\alpha]_D -53^\circ$ (c 1, CHCl_3).

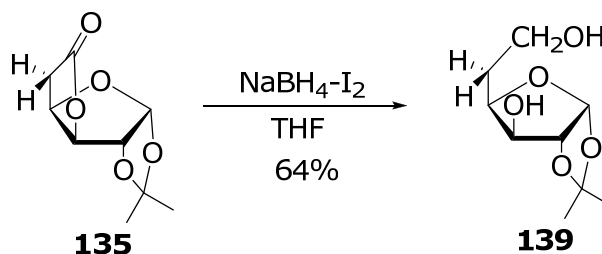
RMN ^1H (CDCl_3 , 500 MHz): δ 5,13 (dd, 1H, $J = 7,9; 5,2$ Hz, H-4); 4,94 (s, 1H, H-1); 4,88 (d, 1H, $J = 5,2$ Hz, H-3); 4,40 (s, 1H, H-2); 3,35 (s, 3H, OCH_3); 2,82 (dd, 1H, $J = 18,9; 7,9$ Hz, H-5); 2,64 (d, 1H, $J = 18,2$ Hz, H-5').

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 125,8 MHz): δ 175,9 (C-6); 109,4 (C-1); 86,4 (C-3); 77,6 (C-4); 77,1 (C-2); 55,3 (OCH_3); 37,0 (C-5).

Las asignaciones espectroscópicas se realizaron utilizando experimentos de correlación heteronuclear (HSQC).

HRMS (APCI) m/z calculado para $\text{C}_7\text{H}_{14}\text{NO}_5$ $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$: 192,0866. Encontrado: 192,0867.

5-Desoxi-1,2-O-isopropilidén- α -D-xilo-hexofuranosa (**139**)



La reducción del compuesto **135** se realizó siguiendo las condiciones generales para la reducción con NaBH_4/I_2 .

A una suspensión de NaBH_4 (76 mg; 2,00 mmol) y I_2 (203 mg; 0,80 mmol) en THF anhidro (5 ml) a 0°C , bajo atmósfera de argón y agitación, se agregó una solución de 1,2-O-isopropilidén-5-desoxi- α -D-xilo-hexofuranosilurono-6,3-lactona (**135**; 0,16 g; 0,80 mmol) en THF anhidro (2 ml). Se calentó a reflujo con agitación vigorosa durante 1,5 h, luego de lo cual el análisis por ccd mostró la desaparición total del material de partida (R_f 0,60) y la formación de un único producto de R_f 0,12 (hexano-EtOAc 1:1). La

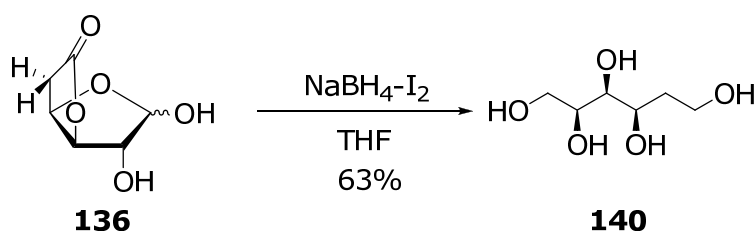
mezcla se trató según lo descrito en la metodología general. El residuo obtenido se disolvió en H₂O bidestilada (2 ml) y la solución se pasó por un cartucho de fase reversa C8 (Alltech). El eluido se concentró a presión reducida y por agregado de metanol cristalizó lentamente el compuesto **139** (104 mg; 64%); pf 91-92 °C; $[\alpha]_D -10^\circ$ (c1, H₂O). Lit. pf 93-94,5 °C; $[\alpha]_D -10,5^\circ$ (c 1,7; CHCl₃).²¹

RMN ¹H (D₂O, 500 MHz): δ 5,98 (d, 1H, $J = 3,9$ Hz, H-1); 4,68 (d, 1H, $J = 3,9$ Hz, H-2); 4,30 (aparente dt, 1H, $J = 6,8; 2,6$ Hz, H-4); 4,14 (d, 1H, $J = 2,6$ Hz, H-3); 3,71 (m, 2H, H-6,6'); 1,88 (c, 2H, $J = 6,7$ Hz, H-5, 5'), 1, 51; 1,35 (2s, 6H, C(CH₃)₂).

RMN ¹³C (D₂O, 125,8 MHz): δ 112,9 (C(CH₃)₂); 104,6 (C-1); 85,2 (C-2); 78,8 (C-4); 75,1 (C-3); 59,3 (C-6); 30,6 (C-5); 26,0; 25,6 (C(CH₃)₂).

Las asignaciones espectroscópicas se realizaron utilizando experimentos de correlación heteronuclear (HSQC).

2-Desoxi-L-xilo-hexitol (**140**)



La reducción del compuesto **136** se realizó siguiendo la metodología general para la reducción con NaBH₄/I₂

A una suspensión de NaBH₄ (0,12 g; 3,17 mmol) y I₂ (0,32 g; 1,27 mmol) en THF anhidro (5 ml) a 0 °C, bajo atmósfera de argón, con agitación, se agregó una solución de 5-desoxi- α,β -D-xilo-hexofuranosurono-6,3-lactona (**136**; 0,10 g; 0,62 mmol) en THF anhidro (2 ml). Se dejó reaccionar a reflujo durante 2 h con agitación vigorosa. Finalizada la reacción, la mezcla se trató según lo descrito en la metodología general. El residuo obtenido se disolvió en H₂O bidestilada, y la solución se pasó por un cartucho de fase reversa C8 (Alltech). El análisis por ccd del eluido mostró un único producto de R_f 0,33 (*n*PrOH-NH₃-H₂O 14:1:1). Por evaporación del solvente a presión

reducida se obtuvo **140** (66 mg; 63%), como un sólido amorfo, $[\alpha]_D +14^\circ$ (c 1; CH₃OH).

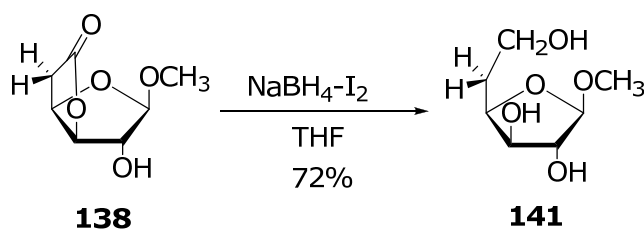
RMN ¹H (D₂O, 500 MHz): δ 3,91 (m, 2H, H-2,4); 3,70 (m, 3H, H-1, 6, 6'); 3,62 (dd, 1H, $J = 11,7; 6,8$ Hz, H-1'); 3,49 (t, 1H, $J = 4,5$ Hz, H-3); 1,78 (m, 2H, H-5,5').

RMN ¹³C (D₂O, 125,8 MHz): δ 74,1 (C-4); 72,6 (C-5); 69,3 (C-3); 63,3 (C-6); 59,1 (C-1); 35,8 (C-2).

Las asignaciones espectroscópicas se realizaron utilizando experimentos de correlación heteronuclear (HSQC).

Anal. Calculado para C₆H₁₄O₅ (%): C 43,37; H 8,49. Encontrado: C 43,18; H 8,63.

Metil 5-desoxi- β -D-xilo-hexafuranósido (**141**)



La reducción del compuesto **138** se realizó siguiendo las condiciones generales para la reducción con NaBH₄/I₂

A una suspensión de NaBH₄ (0,11 g; 2,93 mmol) y I₂ (0,23g; 0,91 mmol) en THF anhidro (4 ml) a 0 °C, bajo atmósfera de argón, con agitación, se agregó una solución de metil 5-desoxi- β -D-xilo-hexafuranosíduron-6,3-lactona (**138**; 0,10 mg; 0,57 mmol) en THF anhidro (2 ml). Se calentó a reflujo con agitación vigorosa durante 1,5 h, luego de lo cual el análisis por ccd mostró la aparición de un único producto de R_f 0,36 y la desaparición total del material de partida (R_f 0,76; EtOAc-MeOH 9:1). La mezcla de reacción se trató según lo descrito en la metodología general. El residuo obtenido se purificó por cromatografía en columna (EtOAc) y por combinación de las fracciones de R_f 0,36 (EtOAc) se obtuvo **141** (73 mg; 72%) como un sólido amorfo; $[\alpha]_D -69^\circ$ (c 1, MeOH).

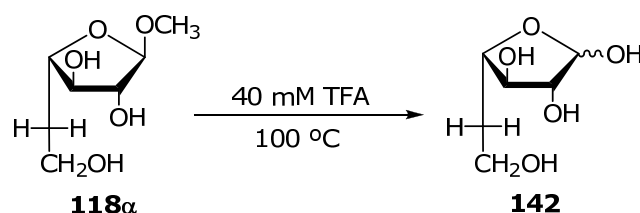
RMN ¹H (D₂O, 500 MHz): δ 4,85 (s, 1H, H-1); 4,37 (ddd, 1H, $J = 8,1; 5,7; 8,1$ Hz, H-4); 4,12 (d, 1H, $J = 1,6$ Hz, H-2); 4,10 (dd, 1H, $J = 4,5; 1,6$ Hz,

H-3); 3,75 (m, 1H, H-6); 3,73 (m, 1H, H-6'); 3,37 (s, 3H, OCH₃); 1,89 (m, 1H, H-5, 5').

RMN ¹³C (D₂O, 125,8 MHz): δ 109,2 (C-1); 80,5 (C-2,4); 74,9 (C-3); 59,5 (C-6); 55,9 (OCH₃); 32,5 (C-5).

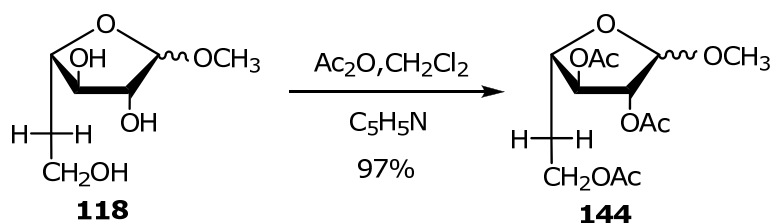
Anal. Calculado para C₇H₁₄O₅ (%): C 47,18; H 7,92. Encontrado: C 47,25; H: 7,82.

5-Desoxi-β,α-L-arabino-hexafuranosa (142)



Una solución acuosa de metil 5-desoxi-α-L-arabino-hexafuranósido (**118 α** ; 25 mg; 0,14 mmol) en 40mM de TFA (100 μl) en un tubo de hidrólisis cerrado se calentó a 100°C en estufa durante 1 h. Por evaporación del solvente con nitrógeno, se obtuvo **142**, cuyas propiedades físico químicas coincidieron con las informadas en literatura [α]_D -16° (c 1, H₂O). Lit. [α]_D -18° (c 1, H₂O).¹⁷ Esta muestra se utilizó como patrón para HPAEC-PAD.

Metil 2,3,6-tri-O-acetil-5-desoxi-β,α-L-arabino-hexofuranósido (144)



A una solución de metil 5-desoxi-β,α-L-arabino-hexofuranósido (**118**; 0,41 g; 2,30 mmol) en CH₂Cl₂ anhidro (30 ml) enfriada a 0 °C, se agregó piridina anhidra (1,6 ml; 19,8 mmol) y anhídrido acético (1,7 ml; 18,0 mmol). Luego de agitar durante 8 h a temperatura ambiente, la reacción se llevó a 4° C durante 16 h. El análisis por ccd de la reacción mostró la

desaparición total del material de partida (R_f 0,11) y la aparición de un único producto de R_f 0,75 (tolueno-EtOAc 8:2). Por evaporación a presión reducida y coevaporación con tolueno (4 x 10 ml) para eliminar la piridina y el exceso de anhídrido acético, se obtuvo un jarabe que se secó al vacío durante 8 hs para ser usado sin purificación en la siguiente reacción.

Para la caracterización espectroscópica, una muestra anómicamente pura de **144** se purificó por cromatografía en columna (hexano-EtOAc 7:3), por combinación de las fracciones de R_f 0,75 se obtuvo **144 α** (0,68 g; 97%).

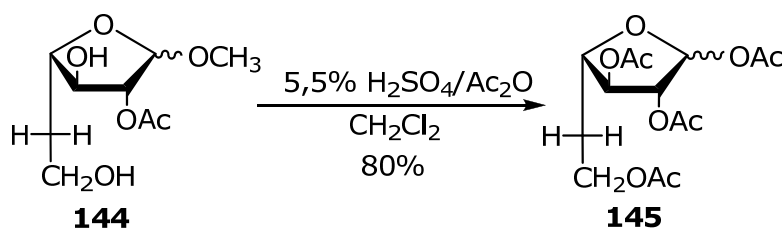
RMN ^1H (CDCl_3 , 500 MHz): **144 α** δ 5,01 (d, 1H, $J = 1,5$ Hz, H-2); 4,88 (dd, 1H, $J = 5,8; 1,5$ Hz, H-3); 4,84 (s, 1H, H-1); 4,25 (m, 1H, H-6); 4,16 (m, 1H, H-6'); 4,10 (ddd, 1H, $J = 8,5; 5,5; 1,5$ Hz, H-4); 3,36 (s, 3H, OCH_3); 2,13 (m, 1H, H-5); 2,09 (s, 6H, CO_2CH_3); 2,04 (s, 3H, CO_2CH_3); 2,00 (m, 1H, H-5').

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 125,8 MHz): **144 α** δ 170,9; 170,3; 169,8 (CO_2CH_3); 106,3 (C-1); 81,8 (C-2); 80,1 (C-3); 78,8 (C-4); 61,0 (C-6); 54,7 (OCH_3); 32,1 (C-5); 20,9; 20,8; 20,7 (CO_2CH_3).

Las asignaciones espectroscópicas se realizaron utilizando experimentos de correlación heteronuclear (HSQC) y homonuclear (COSY).

HRMS (ESI+) m/z calculado para $\text{C}_{13}\text{H}_{20}\text{O}_8\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 327,10504. Encontrado: 327,10526.

1,2,3,6-Tetra-O-acetil-5-desoxi- α,β -L-arabino-hexofuranosa (145)



Se procedió según la técnica descrita por Gelin, M. y col. levemente modificada.²²

Una solución de metil 2,3,6-tri-O-acetil-5-desoxi- β,α -L-arabino-hexofuranósido (**144**; 0,30 g; 1,68 mmol) en CH_2Cl_2 anhidro (18 ml), se enfrió a 0 °C y se le agregó anhídrido acético (0,33 ml; 3,50 mmol) y H_2SO_4 concentrado (21 μl ; 0,38 mmol). Se dejó agitando a temperatura ambiente

durante 8 h y luego se llevó a 4 °C durante 16 h. El análisis por ccd mostró la desaparición total del material de partida (R_f 0,50) y la aparición de un único producto de R_f 0,39 (hexano-EtOAc 3:2). A la mezcla enfriada a 0 °C, se le agregó H₂O (5 ml) y luego de 15 minutos de agitación, se diluyó con CH₂Cl₂ (50 ml). La solución resultante se extrajo con NaHCO₃ ss (3 x 20 ml) y se lavó con H₂O hasta neutralidad. La fase orgánica se secó con Na₂SO₄ (anh) y concentró a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía en columna (hexano-EtOAc 85:15) y por combinación de las fracciones de R_f 0,39 (hexano-EtOAc 3:2) se obtuvo **145** (0,26g; 80%) como un sólido amorfo y mezcla de anómeros α/β en relación 1:6.

Para el anómero mayoritario 1,2-*trans*:

RMN ¹H (CDCl₃, 500 MHz): **145 α** δ 6,14 (s, 1H, H-1); 5,18 (dd, 1H, J = 1,9; 0,5 Hz, H-2); 4,98 (ddd, 1H, J = 2,4; 1,9; 0,5 Hz, H-3); 4,26 (m, 2H, H-4, H-6); 4,16 (m, 1H, H-6'); 2,13-2,05 (m, 14 H, 4 CO₂CH₃, H-5, H-5').

RMN ¹³C (CDCl₃, 125,8 MHz): **145 α** δ 170,8; 169,9; 169,3; 169,2 (CO₂CH₃); 99,0 (C-1); 81,3 (C-4); 80,8 (C-2); 79,4 (C-3); 60,6 (C-6); 32,0 (C-5); 20,9; 20,8; 20,7; 20,5 (4 CO₂CH₃).

Para el anómero minoritario 1,2-*cis*:

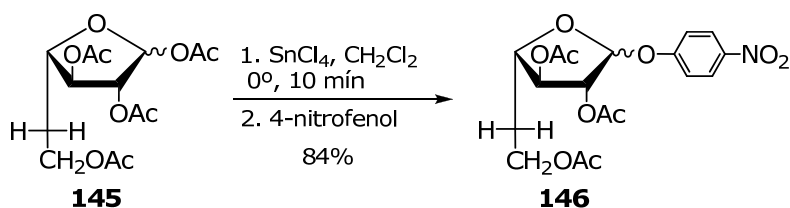
RMN ¹H (CDCl₃, 500 MHz): **145 β** δ 6,36 (d, 1H, J = 4,0 Hz, H-1); 5,31 (m, 2H, H-2, H-3); 4,26 (m, 1H, H-6); 4,16 (m, 2H, H-4, H-6); 2,11; 2,13-2,05 (4s, 14H, 4 CO₂CH₃, H-5, H-5').

RMN ¹³C (CDCl₃, 125,8 MHz): **145 β** δ 170,3; 169,9; 169,4; 169,2 (CO₂CH₃); 93,8 (C-1); 79,2 (C-4); 77,8; 75,5 (C-2, C-3); 60,6 (C-6); 33,7 (C-5); 20,9; 20,8; 20,7; 20,5 (CO₂CH₃).

Las asignaciones espectroscópicas se realizaron utilizando experimentos de correlación heteronuclear (HSQC) y homonuclear (COSY).

HRMS (ESI+) m/z calculado para C₁₄H₂₀O₉Na [M+Na]⁺: 355,09995. Encontrado: 355,10041.

4-Nitrofenil 2,3,6-tri-O-acetil-5-desoxi- α,β -L-arabino-hexofuranósido (146)



Se siguió la técnica descrita por Marino C. y col. con algunas modificaciones.¹⁴

A una solución de 1,2,3,6-tetra-O-acetil-5-desoxi- α,β -L-arabino-hexonofuranosa (**145**; 84,2 mg; 0,25 mmol) en CH_2Cl_2 anhidro (2 ml) enfriada a 0 °C, con agitación, se agregó SnCl_4 (30 μl ; 0,4 mmol). A los 10 min, se agregó 4-nitrofenol (42,3 mg; 0,3 mmol) y la solución se llevó a temperatura ambiente. Luego de agitar durante 3,5 h se enfrió 0°C y el análisis por ccd de la mezcla mostró la formación de un producto mayoritario de R_f 0,63 (hexano-EtOAc 1:1). La mezcla se diluyó con CH_2Cl_2 (40 ml) y se lavó sucesivamente con NaHCO_3 2,5% (4 x 15 ml) y H_2O hasta neutralidad. La fase orgánica se secó con Na_2SO_4 (anh) y se concentró a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía en columna (hexano-EtOAc 7:3) y por combinación de las fracciones de R_f 0,63 (hexano-EtOAc 1:1) se obtuvo compuesto **146** (86 mg; 84%) como un sólido amorfo y una mezcla de anómeros α/β en relación 5:1.

Para el anómero mayoritario 1,2-*trans*:

RMN ^1H (CDCl_3 , 500 MHz): **146 α** δ 8,18 (d; 2H, $J = 9,2$ Hz, H-Ar); 7,11 (d, $J = 9,2$ Hz, 2H, H-Ar); 5,71 (s, 1H, H-1); 5,34 (d, 1H, $J = 1,8$ Hz, H-2); 5,03 (dd, 1H, $J = 5,1; 1,8$ Hz, H-3); 4,27 (m, 1H, H-4); 4,22 (m, 1H, H-6); 4,12 (m, 1H, H-6'); 2,14; 2,12 (2s, 9H, 2 CO_2CH_3); 2,05 (m, 2H, H-5, H-5'); 1,99 (s, 3H, CO_2CH_3).

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 125,8 MHz): **146 α** δ 170,7; 170,07; 169,6 (CO_2CH_3); 160,9 (C-Ar); 142,6 (C-Ar); 125,7 (C-Ar); 116,5 (C-Ar); 103,9 (C-1); 81,4 (C-2); 80,9 (C-4); 78,5 (C-3); 60,6 (C-6); 32,0 (C-5); 20,8; 20,7; 20,6 (CO_2CH_3).

Para el anómero minoritario 1,2-*cis*:

RMN ^1H (CDCl_3 , 500 MHz): **146 β** δ 8,18 (d, 2H, $J = 9,2$ Hz, H-Ar); 7,11(d, $J = 9,2$ Hz, 2H, H_{Ar}); 5,94 (d, 1H, $J = 4,5$ Hz, H-1); 5,45 (dd, 1H, $J = 6,7$; 5,4 Hz, H-3); 5,22 (dd, 1H, $J = 4,5$; 6,7 Hz, H-2); 4,12 (m, 1H, H-4); 4,07 (m, 1H, H-6); 3,97 (m, 1H, H-6'); 2,13; 2,12 (2s, 9H, 2 CO_2CH_3); 2,05 (m, 1H, H-5); 1,99 (s, 3H, CO_2CH_3); 1,90 (m, 1H, H-5').

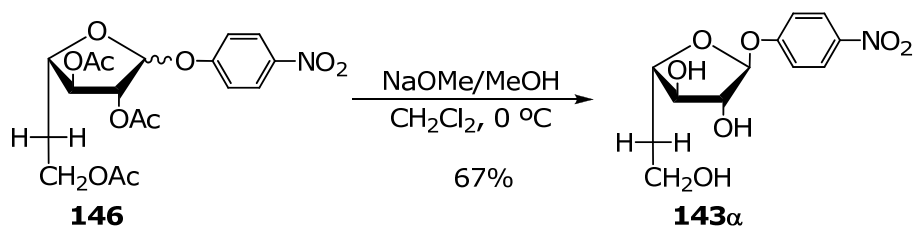
RMN ^{13}C (CDCl_3 , 125,8 MHz): **146 β** δ 170,3; 170,16; 170,02 (CO_2CH_3), 161,1 (C-Ar); 142,7 (C-Ar); 125,8 (C-Ar); 116,6 (C-Ar); 98,1 (C-1); 79,3 (C-4); 78,1 (C-3); 76,65 (C-2); 60,5 (C-6); 34,1 (C-5); 20,8; 20,7; 20,6 (CO_2CH_3).

Las asignaciones espectroscópicas se realizaron utilizando experimentos de correlación heteronuclear (HSQC) y homonuclear (COSY).

HRMS (ESI+) m/z calculado para $\text{C}_{14}\text{H}_{20}\text{O}_9\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 434,10632.

Encontrado: 434,10584.

4-Nitrofenil 5-desoxi- α -L-arabino-hexofuranósido (**143 α**)



Se procedió según la técnica descrita por Mariño, K. y col. levemente modificada.²³

A una solución de 4-nitrofenil 2,3,6-tri-O-acetil-5-desoxi- α,β -L-arabino-hexofuranósido (**146**; 40 mg; 0,10 mmol) en CH_2Cl_2 anhidro (3 ml) enfriada a 0 $^\circ\text{C}$, con agitación, se agregó una solución de NaOMe 0,35 M (1 ml) en metanol anhidro. Luego de 30 min el análisis por ccd, mostró la desaparición total del material de partida (R_f 0,63; hexano-EtOAc 1:1) y la aparición de un producto mayoritario de R_f 0,33 (EtOAc). La reacción se diluyó con metanol (5 ml) y se concentró a presión reducida a dos tercios del volumen. La solución resultante se desionizó por elución a través de una resina Amberlite IR-120H plus, eluyendo con MeOH. El eluido se concentró a presión reducida y se purificó por cromatografía en columna (tolueno-EtOAc 95:5). Por combinación de las fracciones de R_f 0,33 (EtOAc) se obtuvo un sólido que por

recristalización de H₂O condujo a **143α**, anoméricamente puro (19,2 mg; 67%); pf 90-92 °C; $[\alpha]_D -105^\circ$ (c 0,3; MeOH).

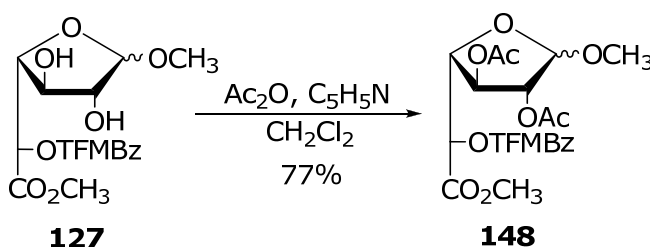
RMN ¹H (CD₃OD, 500 MHz): δ 8,21(ddd, 2H, *J* = 10,4; 5,8; 3,3 Hz, H-Ar); 7,19 (ddd, 2H, *J* = 10,4; 5,8; 3,3 Hz, H-Ar); 5,64 (s, 1H, H-1); 4,58 (dd, *J* = 4,3; 1,8 Hz, H-2); 4,08 (dd, 1H, *J* = 8,1; 7,0; 4,7 Hz, H-4); 3,82 (dd, 1H, *J* = 7,0; 4,3 Hz, H-3); 3,71 (ddd, 1H, *J* = 10,8; 6,9; 5,2 Hz, H-6); 3,64 (ddd, 1H, *J* = 10,8; 7,9; 6,2 Hz, H-6'); 1,96 (dddd, 1H, *J* = 14,0; 7,9; 6,9; 4,7 Hz; H-5'); 1,87 (dddd, 1H, *J* = 14,0; 8,1; 6,2; 5,2 Hz, H-5').

RMN ¹³C (CD₃OD, 125,8 MHz): δ 164,4 (C-Ar); 144,4 (C-Ar); 127,5 (C-Ar); 118,5 (C-Ar); 108,5 (C-1); 84,9 (C-2); 83,6 (C-4); 83,5 (C-3); 60,5 (C-6); 54,7 (OCH₃); 38,2 (C-5).

Las asignaciones espectroscópicas se realizaron utilizando experimentos de correlación heteronuclear (HSQC) y homonuclear (COSY).

HRMS (ESI+) *m/z* calculado para C₁₂H₁₅NO₇Na [M+Na]⁺: 308,07407. Encontrado: 308,07459

Metil 2,3-di-*O*-acetil-5-*O*-(3-trifluorometil)benzoíl-β,α-D-galactofuranosíduronato de metilo (**148**).



A una solución de metil 5-*O*-(3-trifluorometil)benzoíl-β,α-D-galactofuranosiduronato de metilo (**127**; 0,90 g; 2,29 mmol) en CH₂Cl₂ anhidro (22 ml), enfriada a 0 °C, se agregó piridina anhidra (1,1 ml; 13,7 mmol) y anhídrido acético (1,1 ml; 11,5 mmol) y se agitó a temperatura ambiente durante 16 h. El análisis por ccd mostró la desaparición total del material de partida (*R_f* 0,38) y la aparición de un único producto de *R_f* 0,73 (tolueno-EtOAc 1:1). La mezcla de reacción se llevó a seco a presión reducida y el residuo se coevaporó con tolueno (4 x 15 ml) para eliminar la piridina y el exceso de anhídrido acético. El residuo obtenido se secó al vacío y se

purificó por cromatografía en columna (tolueno-EtOAc 95:5). Por combinación de las fracciones de R_f 0,73 (tolueno-EtOAc 1:1) se obtuvo el compuesto **148** (0,85 g; 77%) como un sólido amorfo.

Para el anómero mayoritario 1,2-*trans*:

RMN ^1H (CDCl_3 , 500 MHz): **148 β** δ 8,37-7,62 (4H, H-Ar); 5,77 (d, 1H, $J = 2,7$ Hz, H-5); 5,14 (d, 1H, $J = 1,3$ Hz, H-5); 5,14 (dd, 1H, $J = 5,4; 1,3$ Hz, H-2); 5,04 (s, 1H, H-1); 4,63 (dd, 1H, $J = 5,5; 2,7$ Hz, H-4); 3,83 (s, 3H, CO_2CH_3); 3,39 (s, 3H, OCH_3); 2,12; 2,02 (2s, 6H, CO_2CH_3).

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 125,8 MHz): **148 β** δ 170,4; 169,7; 167,3 (C-6, CO_2CH_3); 164,2 (CO_2Ar); 133,3-126,8 (C-aromáticos); 106,7 (C-1); 81,5; 81,3 (C-2, C-4); 77,1 (C-3); 54,9 (OCH_3); 52,9 (OCH_3); 20,6; 20,5 (CO_2CH_3).

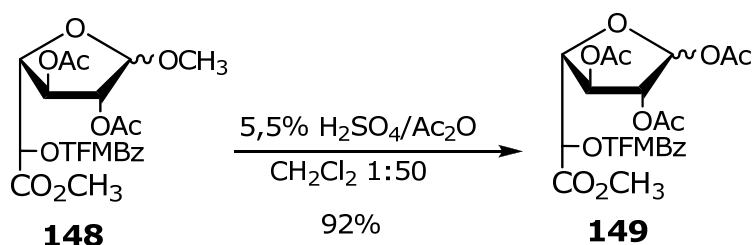
Para el anómero minoritario 1,2-*cis*:

RMN ^1H (CDCl_3 , 500 MHz): **148 α** δ 8,37-7,62 (4H, H-Ar); 5,61 (m, 1H, H-5); 5,57 (dd, 1H, $J = 7,7; 6,1$ Hz, H-3); 5,18 (d, 1H, $J = 4,8$ Hz, H-1); 5,12 (m, 1H, H-2); 4,53 (dd, 1H, $J = 6,1; 3,0$ Hz, H-4); 3,81 (s, 3H, CO_2CH_3); 3,40 (s, 3H, OCH_3); 2,11; 2,04 (2s, 6H, CO_2CH_3).

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 125,8 MHz): **148 α** δ 170,4; 169,7; 167,3 (C-6, CO_2CH_3); 164,2 (CO_2Ar); 133,3-126,8 (C-aromáticos); 101,4 (C-1); 79,3 (C-4); 76,3 (C-2); 74,7 (C-3); 72,7 (C-5); 54,9 (OCH_3); 52,9 (OCH_3); 20,6; 20,5 (CO_2CH_3).

Las asignaciones espectroscópicas se realizaron utilizando experimentos de correlación heteronuclear (HSQC).

1,2,3-Tri-O-acetil-5-O-(3-trifluorometil)benzoil- β,α -D-galactofuranosíduronato de metilo (**149**)



Se procedió según la técnica descrita por Gelin, M. y col. levemente modificada.²²

Una solución de metil 2,3-di-*O*-acetil-5-*O*-(3-trifluorometil)benzoíl- β,α -D-galactofuranosíduronato de metilo (**148**; 0,73 g; 1,53 mmol) en CH₂Cl₂ anhidro (16 ml) se enfrió a 0 °C con agitación y se le agregó anhídrido acético (0,58 ml; 6,12 mmol) y H₂SO₄ concentrado (32,6 μ l; 0,6 mmol). La mezcla se llevó a temperatura ambiente y se continuó agitando durante 16 hs. El análisis por ccd mostró la desaparición total del material de partida (R_f 0,28) y la aparición de un único producto de R_f 0,20 (tolueno-EtOAc 9:1). Se enfrió la mezcla nuevamente a 0 °C, se agregó H₂O (10 ml) y luego de 15 minutos de agitación, se diluyó con CH₂Cl₂ (100 ml). La solución resultante se extrajo con NaHCO₃ ss (3 x 60 ml) y se lavó con H₂O hasta neutralidad. La fase orgánica se secó Na₂SO₄ (anh), se filtró y concentró a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía en columna (tolueno-EtOAc 95:5) y por combinación de las fracciones de R_f 0,53 (tolueno-EtOAc 8:2) se obtuvo **149** (0,71 g; 92%); como un sólido amorfo, en una relación de anómeros β/α 20:3. Para el anómero mayoritario 1,2-*trans*:

RMN ¹H (CDCl₃, 500 MHz): **149 β** δ 7,48-7,27 (m, 4H, H-Ar); 6,31 (s, 1H, H-1); 5,77 (d, 1H, $J = 3,0$ Hz, H-5); 5,28 (s, 1H, H-3); 5,14 (d, 1H, $J = 4,9$ Hz, H-4); 4,77 (dd, 1H, $J = 4,9; 3,0$, H-4); 3,81 (s, 3H, OCH₃); 2,105; 2,098; 2,05 (3s, 9H, CO₂CH₃).

RMN ¹³C (CDCl₃, 125,8 MHz): **149 β** δ 170,2; 169,4; 168,9; 167,0 (C-6, CO₂CH₃); 133,3-125,2 (C-aromáticos); 99,3 (C-1); 83,8 (C-4); 80,1 (C-2); 77,0 (C-3); 71,5 (C-5); 53,0 (OCH₃); 21,0; 20,5; 20,3 (CO₂CH₃).

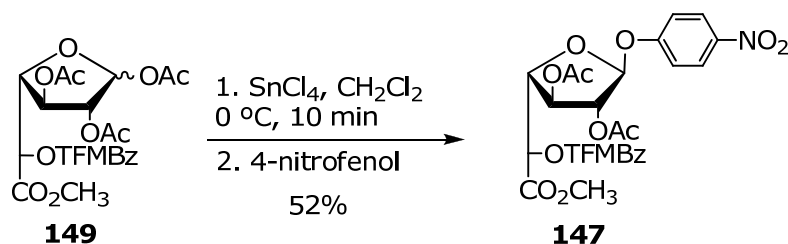
Para el anómero minoritario 1,2-*cis*:

RMN ¹H (CDCl₃, 500 MHz): **149 α** δ 7,48-7,27 (m, 4H, H-Ar); 6,45 (d, 1H, $J = 5,0$ Hz, H-1); 5,62 (m, 1H, H-5); 5,44 (dd, 1H, $J = 7,1; 5,0$ Hz, H-2); 4,61 (dd, 1H, $J = 5,8; 4,2$ Hz, H-4); 3,80 (s, 3H, OCH₃); 2,144; 2,138; 1,98 (3s, 9H, CO₂CH₃).

RMN ¹³C (CDCl₃, 125,8 MHz): **149 α** δ 169,4; 168,9; 167,0 (C-6, CO₂CH₃), 133,3-125,2 (C-aromáticos); 92,9 (C-1); 80,2 (C-4); 75,1 (C-2); 74,2 (C-3); 72,5 (C-5); 52,9 (CO₂CH₃); 21,0; 20,5; 20,3 (CO₂CH₃).

Las asignaciones espectroscópicas se realizaron utilizando experimentos de correlación heteronuclear (HSQC).

4-Nitrofenil 2,3-di-O-acetil-5-O-(3-trifluorometil)benzoíl-β-D-galactofuranosiduronato de metilo (147)



Se siguió la técnica descrita por Marino, C. y col. levemente modificada.¹⁴

A una solución de 1,2,3-tri-O-acetil-5-O-(3-trifluorometil)benzoíl-β,α-D-galactofuranosiluronato de metilo (**149**; 0,71 g; 1,40 mmol) en CH₂Cl₂ anhidro (10 ml) enfriada a 0 °C, con agitación, se agregó SnCl₄ (0,17 ml; 2,2 mmol). Luego de 10 min, se agregó 4-nitrofenol (0,25 gr; 1,80 mmol) y la solución resultante se llevó a temperatura ambiente. Después de agitar durante 3 h se llevó nuevamente a 0 °C y el análisis por ccd de la mezcla mostró la formación de un producto mayoritario de R_f 0,51 y la desaparición total del material de partida (R_f 0,40; tolueno-EtOAc 9:1). La mezcla se diluyó con CH₂Cl₂ (150 ml) y se lavó sucesivamente con NaHCO₃ 2,5% (4 x 80 ml), NaHCO₃ ss (3 x 60 ml) y H₂O hasta neutralidad. La fase orgánica se secó con Na₂SO₄ (anh) y se concentró a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía en columna (tolueno-EtOAc 97:3) y por combinación de las fracciones de R_f 0,64 (tolueno-EtOAc 8:2) se obtuvo el compuesto **147** (0,43 g; 52 %) como un sólido amorfo.

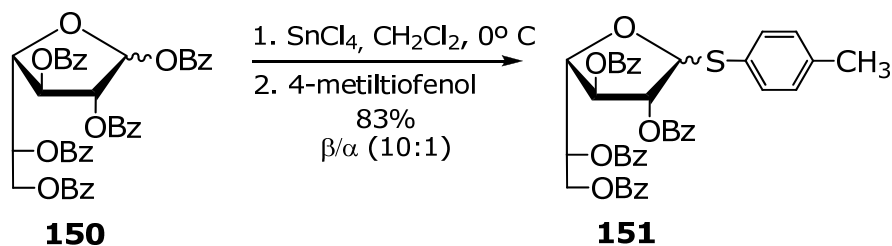
RMN ¹H (CDCl₃, 500 MHz): δ 8,40-7,17 (m, 8H, H-Ar); 5,87 (s, 1H, H-1); 5,81 (d, 1H, J = 2,8 Hz, H-2); 5,47 (d, 1H, J = 1,4 Hz; H-5); 5,24 (dd, 1H, J = 5,1; 1,4 Hz, H-4); 4,79 (dd, 1H, ³J = 5,1; 2,8 Hz; ⁴J = 0,6 Hz, H-3); 3,75 (s, 3H, OCH₃), 2,17; 2,05 (s, 6H, CO₂CH₃).

RMN ¹³C (CDCl₃, 125,8 MHz): 170,3; 169,6; 166,8; 164,1 (C-6, 3 CO₂CH₃); 160,6-129,3 (C-aromáticos); 103,9 (C-1); 83,1 (C-3); 81,4 (C-5); 76,9 (C-4); 71,4 (C-2); 53,0 (OCH₃); 20,5; 20,4 (CO₂CH₃).

Las asignaciones espectroscópicas se realizaron utilizando experimentos de correlación heteronuclear (HSQC) y homonuclear (COSY).

HRMS (ESI+) m/z calculado para $C_{25}H_{22}F_3NO_{12}Na$ $[M+Na]^+$: 608,09863.
Encontrado: 608,09663.

**4-Metilfenil 2,3,4,6-tetra-O-benzoil-1-tio- β -D-galactofuranósido
(151)**



Se siguió la técnica descrita por Marino C. y col. con algunas modificaciones.⁷

A una solución de 1,2,3,4,6-tetra-O-benzoil- α,β -D-galactofuranosa²⁴ (**150**; 0,72 gr; 1,03 mmol) en CH_2Cl_2 anhidro (25 ml) enfriada a 0 °C con agitación, se agregó SnCl_4 (0,15 ml; 1,9 mmol). Luego de 10 min, se agregó 4-metiltiofenol (0,17 g, 1,36 mmol) y la solución resultante se llevó a temperatura ambiente. Después de agitar durante 3 h se llevó nuevamente a 0°C por 15 min; el análisis por ccd de la mezcla mostró la desaparición del material de partida (R_f 0,65), la desaparición parcial del 4-metiltiofenol (R_f 0,93; tolueno-EtOAc 9:1) y la formación de un producto de R_f 0,72 (tolueno-EtOAc 9:1). La mezcla se diluyó con CH_2Cl_2 (400 ml) y se lavó sucesivamente con NaHCO_3 2,5% (2 x 125 ml), NaHCO_3 ss (2 x 125 ml) y H_2O hasta neutralidad. La fase orgánica se secó con Na_2SO_4 (anh) y se concentró a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía en columna (tolueno) y por combinación de las fracciones de R_f 0,72 (tolueno-EtOAc 9:1) se obtuvo el compuesto **151** (0,60 g, 83%), como un sólido amorfo, en una relación de anómeros α/β de 1:5.

Para el anómero mayoritario 1,2-*trans*:

RMN ^1H (CDCl_3 , 500 MHz): **151 β** δ 8,08-7,04 (24H; H-Ar); 6,10 (t, 1H, $J = \sim 4,5$ Hz, H-5); 5,78 (s, 1H, H-1); 5,69 (d, 1H, $J = 5,0$ Hz, H-3); 5,65 (s, 1H, H-2); 4,96 (t, 1H, $J = 4,4$ Hz, H-4); 4,76 (dd, 1H, $J = 11,8; 4,5$ Hz, H-6); 4,71 (dd, 1H, $J = 11,8; 6,9$ Hz, H-6'); 2,35 (s, 3H, CH_3Ar).

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 125,8 MHz): **151 β** , δ 166,0; 165,7; 165,3; 165,2 (CO_2Ph); 138,3-125,3 (C-aromáticos); 91,6 (C-1); 82,3 (C-2); 81,4 (C-4); 77,9 (C-3); 70,3 (C-5); 63,4 (C-6); 21,1 (CH_3Ar).

Para el anómero minoritario 1,2-*cis*:

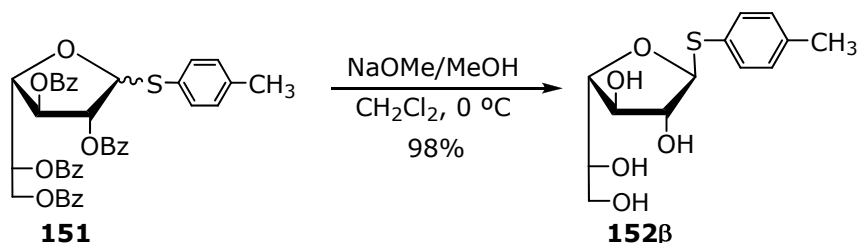
RMN ^1H (CDCl_3 , 500 MHz): **151 α** , δ 8,08–7,04 (24H; H-Ar); 6,02 (m, 1H, H-5); 5,92 (m, 2H, H-2,3); 5,78 (m, 1H, H-1); 4,86 (dd, $J = 12,0$; 4,1 Hz; 1H, H-6); 4,76 (m, 1H, H-6'); 4,54 (t, 1H, $J = 4,8$ Hz, H-4); 2,37 (s, 3H, CH_3Ar).

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 125,8 MHz): **151 α** , δ 166,0; 165,5; 165,3; 165,2 (CO_2Ph); 138,3-125,3 (C-aromáticos); 90,0 (C-1); 81,6 (C-4); 78,1 (C-2); 77,0 (C-3); 70,6 (C-5); 63,4 (C-6); 21,1 (CH_3Ar).

Las asignaciones espectroscópicas se realizaron utilizando experimentos de correlación heteronuclear (HSQC) y homonuclear (COSY).

Anal. Calculado para $\text{C}_{41}\text{H}_{34}\text{O}_9\text{S}$ (%): C 70,07; H 4,88. encontrado: C 69,80; H 4,78.

4-Metilfenil 1-tio- β -D-galactofuranósido (**152 β**)



A una solución de 4-metilfenil 2,3,4,6-tetra-*O*-benzoíl-1-tio- β,α -D-galactofuranósido (**151**; 0,39 g; 0,55 mmol) en CH_2Cl_2 anhidro (15 ml), enfriada a 0 °C, con agitación, se agregó una solución de NaOMe 1,4 M en metanol (1,25 ml). Luego de agitar durante 50 min el análisis por ccd mostró la desaparición total del material de partida (R_f 0,72; hexano-EtOAc) y la presencia de un único producto de R_f 0,39 (EtOAc-MeOH 9:1). La mezcla de reacción se diluyó con metanol (15 ml) y se concentró a presión reducida a dos tercios del volumen. La solución resultante se desionizó por elución a través de una columna de resina Amberlite IR-120H plus, eluyendo con MeOH. El eluido se concentró a presión reducida y se coevaporó varias veces

con H₂O (4 x 10 ml) para eliminar el benzoato de metilo, obteniéndose el compuesto **152β** (0,16 g; 98%) que se recristalizó de hexano-EtOAc 1:1; pf 124-126 °C; $[\alpha]_D^{25} -253^\circ$ (c 0,3; MeOH).

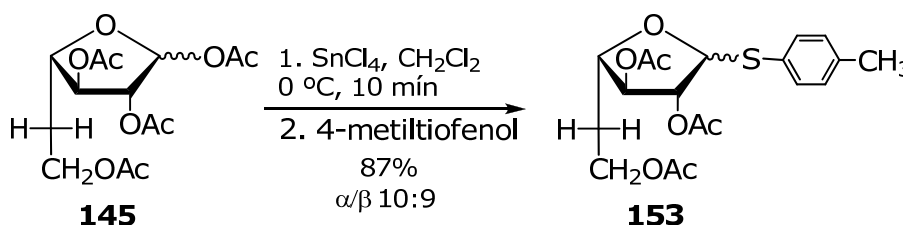
RMN ¹H (D₂O, 500 MHz): δ 7,48 (d, 2H, J = 8,8 Hz, H-Ar); 7,27 (d, 2H, J = 8,8 Hz, H-Ar); 5,21 (d, 1H, J = 5,9, H-1); 4,44 (dd, J = 7,8; 6,0 Hz, H-3); 4,02 (t, 1H, J = 5,9 Hz, H-2); 3,88 (dd, 1H, J = 7,8; 3,3 Hz, H-4); 3,80 (ddd, 1H, J = 7,6; 4,7; 3,3 Hz, H-5); 3,67 (dd, 1H, J = 11,7; 4,7 Hz, H-6); 3,62 (d, 1H, J = 11,7; 7,6 Hz; H-6'); 2,34 (s, 3H, CH₃Ar).

RMN ¹³C (D₂O, 125,8 MHz): δ 140,0 (C-Ar); 134,0 (C-Ar); 130,7 (C-Ar); 128,7 (C-Ar); 90,9 (C-1); 82,0 (C-4); 80,3 (C-2); 76,1 (C-3); 70,9 (C-5); 63,4 (C-6); 20,9 (CH₃Ar).

Las asignaciones espectroscópicas se realizaron utilizando experimentos de correlación heteronuclear (HSQC) y homonuclear (COSY).

Anal. Calculado para C₁₃H₁₈O₅S (%): C 54,53; H 6,34. encontrado: C 54,47; H 6,21.

4-Metilfenil 2,3,6-tri-O-acetil-5-desoxi-1-tio- α,β -L-arabino-hexofuranosa (**153**)



Se siguió la técnica descrita por Marino y col. con algunas modificaciones.⁷

A una solución de 1,2,3,6-tetra-O-acetil-5-desoxi- α,β -L-arabino-hexofuranosa (**145**; 0,15 g; 0,45 mmol) en CH₂Cl₂ anhidro (4 ml) enfriada a 0 °C con agitación, se agregó SnCl₄ (55 μ l; 0,7mmol). Luego de 10 min, se agregó 4-metiltiofenol (0,07 g; 0,55 mmol) y la solución resultante se agitó a temperatura ambiente durante 1 h. El análisis por ccd de la reacción mostró entonces la desaparición total del material de partida (R_f 0,36) y la presencia de un producto mayoritario de R_f 0,53 (hexano-EtOAc 6:4) y otro de R_f 0,67 correspondiente al 4-metiltiofenol. La mezcla se diluyó con CH₂Cl₂ (150 ml) y se lavó sucesivamente con NaHCO₃ 2,5% (2 x 50 ml); NaHCO₃ ss (50 ml) y

H₂O hasta neutralidad. La fase orgánica se secó con Na₂SO₄ (anh) y se concentró a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía en columna (hexano-EtOAc 85:15) y por combinación de las fracciones de R_f 0,53 (hexano-EtOAc 6:4) se obtuvo al compuesto **153** (0,16 g; 87%), como un sólido amorfo, con una relación anomérica α/β de 10:9.

Para el anómero 1,2-*trans*:

RMN ¹H (CDCl₃, 500 MHz): **153 α** δ 7,40 (d; 2H, $J = 9,2$ Hz, H-Ar); 7,38(d, $J = 9,2$ Hz, 2H, H-Ar); 5,39 (dd, 1H, $^3J = 2,0$ Hz, $^4J = 0.6$ Hz, H-1); 5,22 (t, 1H, $J = 2,2$ Hz, H-2); 4,96 (ddd, 1H, $J = 5,9$; 2,4, $^4J = 0.6$ Hz, H-3); 4,38 (ddd, 1H, $J = 8,5$; 5,8; 4,6 Hz, H-4); 4,21 (m, 1H, H-6); 4,16 (m, 1H, H-6'); 2,33 (s, 3H; Ar); 2,17; 2,12; 2,09; (3s, 9H, CO₂CH₃); 2,05 (m, 2H, H-5, H-5').

RMN ¹³C (CDCl₃, 125,8 MHz): **153 α** δ 170,9; 170,2; 169,7; (CO₂CH₃); 137,9 (C-Ar); 132,4 (C-Ar); 130,7 (C-Ar); 129,8 (C-Ar); 90,8 (C-1); 82,0 (C-2); 80,0 (C-3); 78,5 (C-4); 60,9 (C-6); 32,7 (C-5); 21,1; 21,0; 20,8; 20,7 (CO₂CH₃; CH₃Ar).

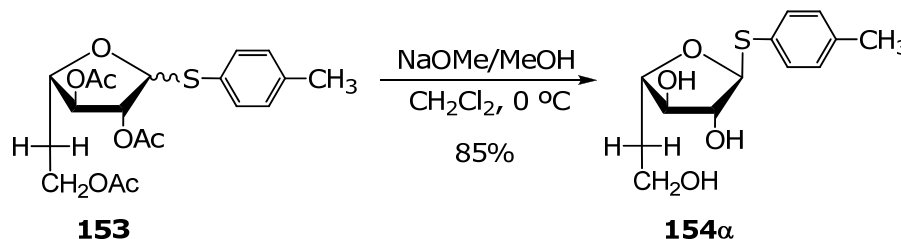
Para el anómero 1,2-*cis*:

RMN ¹H (CDCl₃, 500 MHz): **153 β** δ 7,40 (d, 2H, $J = 9,2$ Hz, H-Ar); 7,11(d, $J = 9,2$ Hz, 2H, H-Ar); 5,53 (d, 1H, $J = 4,9$ Hz, H-1); 5,46 (dd, 1H, $J = 4,9$; 3,0 Hz, H-2); 5,09 (dd, 1H, $J = 3,7$; 3,0 Hz, H-3); 4,27 (m, 1H, H-6); 4,21 (m, 1H, H-6'); 3,99 (dd, 1H, $J = 8,0$; 5,0; 3,9 Hz, H-4); 2,33 (s, 3H, CO₂CH₃); 2,09; 2,07; 2,03 (3s, 9H, CO₂CH₃); 2,05 (m, 1H, H-5); 1,90 (m, 1H, H-5').

RMN ¹³C (CDCl₃, 125,8 MHz): **153 β** δ 170,9; 170,2; 169,7 (3 CO₂CH₃); 138,1 (C-Ar), 132,8 (C-Ar); 130,1 (C-Ar); 129,9 (C-Ar); 89,5 (C-1); 80,5 (C-4); 80,0 (C-3); 77,6 (C-2); 61,1 (C-6); 31,4 (C-5); 21,1; 21,0; 20,8; 20,8 (CO₂CH₃; CH₃Ar).

Las asignaciones espectroscópicas se realizaron utilizando experimentos de correlación heteronuclear (HSQC) y homonuclear (COSY).

HRMS (ESI+) m/z calculado para C₁₉H₂₄O₇SNa [M+Na]⁺: 419,11409. Encontrado: 419,11349.

4-Metilfenil 5-desoxi-1-tio- α -L-arabino-hexofuranósido (154 α)

Se procedió según la técnica descrita por Mariño, K. y col. levemente modificada.²³

A una solución de 4-metilfenil 2,3,6-tri-O-acetil-5-desoxi-1-tio- α,β -L-arabino-hexofuranósido (**153**, 0,14 g; 0,35 mmol) en CH_2Cl_2 anhidro (10 ml) enfriada a 0 °C, con agitación, se agregó una solución de NaOMe 1,4 M (0,75 ml) en metanol. El análisis por ccd después de 30 min, mostró la desaparición total del material de partida (R_f 0,53; hexano-EtOAc 6:4) y la aparición de un producto mayoritario de R_f 0,48 (EtOAc). La mezcla de reacción se diluyó con metanol (15 ml) y se concentró a presión reducida a dos tercios del volumen. La solución resultante se desionizó con metanol a través de una resina Amberlite IR-120H plus, y el eluido se llevó a sequedad por evaporación del solvente a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía en columna (tolueno-EtOAc 15:85) y por combinación de las fracciones de R_f 0,48 se obtuvo el compuesto **154 α** (0,08 g; 85%), que se recristalizó de hexano-EtOAc 3:2; pf 89-91 °C; $[\alpha]_D -312^\circ(c\ 1; \text{MeOH})$.

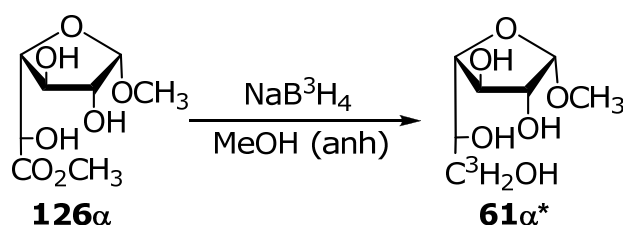
RMN ^1H (CD_3OD , 500 MHz): δ 7,41 (d, 2H, $J = 8,6$ Hz, H-Ar); 7,15 (d, 2H, $J = 8,6$ Hz, H-Ar); 5,19 (d, 1H, $J = 4,5$ Hz, H-1); 4,01 (ddd, 1H, $J = 12,5; 8,1; 5,4$ Hz, H-4); 3,99 (dd, 1H, $J = 5,2; 4,5$ Hz, H-2); 3,76 (ddd, 1H, $J = 12,2; 10,8; 4,3$ Hz, H-6); 3,69 (ddd, 1H, $J = 10,8; 7,7; 5,2$ Hz, H-6); 3,72 (ddd, 1H, $J = 10,8; 7,9; 6,2$ Hz, H-6'); 2,34 (s, 3H, CH_3Ar); 1,99 (dddd, 1H, $J = 13,8; 12,2; 7,7; 4,5$ Hz; H-5); 1,84 (dddd, 1H, $J = 13,8; 8,2; 6,4; 5,2$ Hz, H-5').

RMN ^{13}C (CD_3OD , 125,8 MHz): δ 139,5 (C-Ar); 134,2 (C-Ar); 133,3 (C-Ar); 131,4 (C-Ar); 93,9 (C-1); 84,5 (C-2); 83,2 (C-3); 80,9 (C-4); 60,7 (C-6); 37,6 (C-5); 22,0 (CH_3Ar).

Las asignaciones espectroscópicas se realizaron utilizando experimentos de correlación heteronuclear (HSQC) y homonuclear (COSY).

HRMS (ESI+) m/z calculado para $C_{13}H_{19}O_4SNa^+$ $[M+Na]^+$: 293,08267.
Encontrado: 293,08180.

Metil 6- $[^3H]$ - α -D-galactofuranósido (61 α^***) y metil 6- $[^3H]$ - β -D-galactofuranósido (**61 β^***)**



A una solución de metil α -D-galactofuranosiduronato de metilo (**126 α** ; 2,2 mg; 9,9 μmol) en metanol bidestilado (300 μl) se agregó KOH 0,1 M (1 μl) y se trató con NaB^3H_4 (10 mCi; 10 μl) en KOH 0,1M. Luego de 16 h de agitación a temperatura ambiente se agregó NaBH_4 sólido (2 mg; 0,05 mmol) y se continuó agitando durante 4 h. La solución metanólica se desionizó por elución a través de una columna de resina Amberlite IR-120H, y el eluido se concentró a presión reducida. El residuo se disolvió en 2 ml de MeOH bidestilado y la solución se pasó por un cartucho de fase reversa C8 (Alltech) El eluido se concentró a presión reducida y el residuo resultante se disolvió en H_2O mili-Q (600 μl) y se desionizó en una columna de resina mixta IWT TMD-8, para eliminar las sales. Por liofilización del eluido se obtuvo **61 α^*** (40000 cpm), que por cromatografía en capa delgada (ccd) y autorradiografía mostró un comportamiento idéntico al de una muestra de metil α -D-galactofuranósido (**61 α**).

Para la síntesis de metil 6- $[^3H]$ - β -D-galactofuranósido (**61 β^***) se siguió el mismo procedimiento utilizando como compuesto de partida el metil β -D-galactofuranosiduronato de metilo (**126 β** ; 1,8 mg; 9,3 μmol).

Ambos anómeros se caracterizaron HPAEC-PAD y los tiempos de retención coincidieron con los de las muestras frías.

1. Gottlieb, H. E.; Kotlyar, V.; Nudelman, A. *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 7512-7515.
2. Prasad, A. S. B.; Kanth, J. V. B.; Periasamy, M. *Tetrahedron* **1992**, *48*, 4623-4628.
3. Gander, J. E.; Jentoft, N. H.; Drewes, L. R.; Rick, P. D. *J. Biol. Chem.* **1974**, *249*, 2063-2072.
4. Haworth, W. N.; Raistrick, H.; Stace, M. *Biochem. J.* **1935**, *29*, 2668-2678.
5. Bradford, M. M. *Anal. Biochem.* **1976**, *72*, 248-254.
6. Varela, O.; Marino, C.; Lederkremer, R. M. *Carbohydr. Res.* **1986**, *155*, 247-251.
7. Marino, C.; Marino, K.; Miletta, L.; Manso Alves, M. J.; Colli, W.; Lederkremer, R. M. *Glycobiology* **1998**, *8*, 901-904.
8. Oliveira, D. E.; Santos Neto, A. L. C.; Panek, A. D. *Anal. Biochem.* **1981**, *113*, 188-192.
9. Chittenden, G. J. F. *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas* **1998**, *107*, 455-458.
10. Cobett, W. M. In *Methods Carbohydr. Chem.*, 1963; pp. 18-20.
11. Gallo, C.; Jeroncic, L. O.; Varela, O.; Lederkremer, R. M. *J. Carbohydr. Chem.* **1993**, *12*, 841 - 851.
12. Matsuhira, B.; Zanlungo, A. B.; Dutton, G. G. S. *Carbohydr. Res.* **1981**, *97*, 11-18.
13. Portella, C.; Deshayes, H.; Pete, J. P.; Scholler, D. *Tetrahedron* **1984**, *40*, 3635-3644.
14. Marino, C.; Varela, O.; Lederkremer, R. M. *Carbohydr. Res.* **1989**, *190*, 65-76.
15. Bock, K.; Pedersen, C.; Tipson, R. S. In *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **1983**, *41*, 27-66.
16. Augestad, I.; Berner, E. *Acta Chem. Scand.* **1954**, *8*, 251-256.
17. Szarek, W. A.; George, R.; Ritchie, S.; Vyas, D. M. *Carbohydr. Res.* **1978**, *62*, 89-103.
18. Cadotte, J. E.; Smith, F.; Spriestersbach, D. *J. Am. Chem. Soc.* **1952**, *74*, 1501-1504.

19. Bashyal, B. P.; Chow, H.-F.; Fellows, L. E.; Fleet, G. W. J. *Tetrahedron* **1987**, *43*, 415-422.
20. Choi, H.; Demeke, D.; Kang, F.-A.; Kishi, Y.; Nakajima, K.; Nowak, P.; Z.-K., W.; Xie, C. *Pure Appl. Chem.* **2003**, *75*, 1-17.
21. Klausener, A.; Müller, E.; Runsink, J.; Scharf, H.-D. *Carbohydr. Res.* **1983**, *116*, 295-302.
22. Gelin, M.; Ferrières, V.; Plusquellec, D. *Eur. J. Org. Chem.* **2000**, *2000*, 1423-1431.
23. Mariño, K.; Marino, C.; Lima, C.; Baldoni, L.; Lederkremer, R. M. *Eur. J. Org. Chem.* **2005**, 2958-2964.
24. Marino, C.; Gandolfi-Donadío, L.; Gallo-Rodriguez, C.; Bai, Y.; Lederkremer, R. M. In *Carbohydrate Chemistry: Proven Methods*; Kovac, P. Ed. En prensa.

RESUMEN

La desoxigenación de alcoholes es una transformación valiosa en síntesis orgánica, especialmente en el área de la química de productos naturales. Desde su desarrollo en 1975, el método de desoxigenación de Barton-McCombie ha sido muy utilizado. Sin embargo, esta estrategia involucra el uso de hidruros de estaño, los cuales son tóxicos, costosos y difíciles de eliminar. Por este motivo, es deseable el desarrollo de procedimientos alternativos, libres de hidruros metálicos.

La síntesis de desoxiazúcares, en particular, es un tópico de relevancia, ya que éstos se encuentran presentes en una gran variedad de productos naturales y además son de utilidad como herramientas para los estudios relacionados con la actividad y especificidad de las enzimas. La glicobiología de D-Galf es un tema de gran interés ya que únicamente se encuentra en glicoconjugados de bacterias, hongos y protozoarios, muchos de ellos patógenos, mientras que en mamíferos sólo se presenta en configuración piranósica. Por lo tanto, las enzimas relacionadas con la biosíntesis y el metabolismo de D-Galf son consideradas blancos importantes para el desarrollo de agentes terapéuticos.

En base a estos antecedentes se desarrolla en el laboratorio un proyecto en el cual se sintetizan sustratos, inhibidores y otros modelos sintéticos útiles para la caracterización de las enzimas relacionadas con la glicobiología de D-Galf. Se utiliza como modelo biológico *Penicillium fellutanum*, un hongo que produce glicoconjugados con unidades terminales de β -D-Galf. Este microorganismo, no patogénico y de fácil cultivo, permite disponer de la maquinaria enzimática para realizar las pruebas biológicas de los compuestos sintetizados. En este contexto, se desarrolló la síntesis galactofuránosidos desoxigenados en distintas posiciones, para evaluar la importancia de cada hidroxilo en la interacción con la enzima. Se utilizaron distintas estrategias de desoxigenación y particularmente, en este trabajo de Tesis, se estudió una reacción por transferencia electrónica fotoinducida (PET), para la reducción de grupos hidroxilos en posición- α a carboxilos de grupos ésteres y lactonas. La eficiencia de esta reacción reside en la estabilización de un intermediario radicalario producto de la ruptura homolítica del hidroxilo, derivatizado como 3-trifluorometilbenzoato. La desoxigenación PET se utilizó como reacción clave en la síntesis de 2-desoxi y 5-desoxiazúcares.

En la primera parte de este trabajo de Tesis se sintetizaron los derivados de D-glucono-1,4-lactona **106**, **107** y **109-111**, de manera simple y con buenos rendimientos. Se estudió la desoxigenación PET de estos derivados, determinándose las condiciones óptimas para la desoxigenación del C-2. Se demostró que la presencia del grupo carboxilo facilita la desoxigenación, permitiendo reducir notablemente los tiempos de irradiación. Utilizando las condiciones óptimas se obtuvo eficientemente 2-desoxi-D-*arabino*-hexono-1,4-lactona (**112**), precursor útil para la síntesis de 2-desoxi-D-glucósidos. La efectividad de la reacción de desoxigenación, en combinación con la ventaja que ofrecen las aldonolactonas para la preparación de derivados selectivamente sustituidos, provee una estrategia muy conveniente para la síntesis de derivados de 2-desoxi-D-glucosa.

Para la obtención de 5-desoxi-D-glucofuranósidos se utilizó de D-glucurono-6,3-lactona (**129**) como material de partida y se sintetizaron los derivados **131-133**. Utilizando la reacción de desoxigenación PET en las condiciones optimizadas para estos derivados, se obtuvieron los compuestos desoxigenados en C-5 **135**, **136** y **138**. Para los compuestos con el carbono anomérico sustituido, como **131** y **133**, el aislamiento de los productos desoxigenados resultó más sencillo.

Para la síntesis de 5-desoxi-D-galactofuranósidos se utilizó ácido D-galacturónico (**125**) como material de partida y se estudió la reacción con metanol en presencia de una resina de intercambio iónico (forma H⁺) para obtener muy eficientemente el precursor metil galactofuranosiduronato de metilo (**126**). La acilación selectiva del HO-5, activado por el grupo carboxilo, seguida de la reacción de desoxigenación PET, constituyeron una estrategia muy directa para la síntesis de metil 5-desoxi-D-galactofuranósido (**118**). A partir de **128** se sintetizaron los derivados **118 α** , **143 α** y **154 α** como modelos para la caracterización de *exo* β -D-galactofuranosidasas.

Por otra parte, se optimizó la metodología de reducción de ésteres y lactonas utilizando NaBH₄-I₂, reactivo eficiente para compuestos carboxílicos carentes de un heteroátomo en posición α , para los cuales el NaBH₄ no es efectivo.

Se realizó la evaluación biológica de los 5-desoxi-D-galactofuranósidos sintetizados, frente a la *exo* β -D-galactofuranosidasa de *P. fellutanum*. Los

compuestos **118 α** , **126 β** , **126 α** , **128 α** , **152 β** y **154 α** fueron evaluados como inhibidores. Los derivados **118 α** , **126 β** y **128 α** no presentaron actividad inhibitoria, demostrando que la presencia del grupo carboximetil éster en el C-6, la ausencia del HO-5, ó ambas modificaciones simultáneamente, afectan la interacción con la enzima. El compuesto **152 β** se comportó como un inhibidor moderado, sin embargo la eliminación del HO-5 suprimió dicha actividad en **154 α** .

Los compuesto **118 α** y **143 α** fueron evaluados como sustratos. El compuesto **118 α** no presentó actividad, poniendo nuevamente en evidencia la importancia del HO-5 en la interacción azúcar-enzima. La introducción de la aglicona 4-nitrofenilo en **143 α** aumentó la interacción con la enzima, del mismo modo que en los derivados totalmente oxigenados. Este compuesto se comportó como un sustrato de baja afinidad.

Se establecieron condiciones simples para la obtención de los metil glicósidos furanósicos de ácido D-galacturónico y D-galactosa por tratamiento de los azúcares libres con metanol en presencia de una resina de intercambio catiónico (H⁺). La simplicidad de este método combinada con la reducción con NaB³H₄ permitió obtener **61 β *** y **61 α *** de una manera muy directa. La utilidad de los sustratos radioactivos se ejemplificó mediante la detección de actividad de β -D-galactofuranosidasa en el medio de cultivo de *Penicillium varians*, un microorganismo que produce glicoconjugados que contienen simultáneamente, unidades de α - y β -D-Galf. Los estudios realizados no evidenciaron actividad de α -D-galactofuranosidasa.

En conclusión, en este trabajo de Tesis se presentó:

- Un resumen de los métodos de desoxigenación más utilizados para la obtención de desoxiazúcares.
- Una descripción de la importancia de los desoxiazúcares, análogos de sustratos naturales de enzimas, como herramientas para la caracterización de éstas.
- La evaluación biológica de los derivados de 5-desoxi-D-Galf sintetizados, que permitieron avanzar en la caracterización de la enzima *exo* β -D-galactofuranosidasa de *P. fellutanum*, y el uso de los metil glicósidos

marcados isotópicamente **61 β *** y **61 α *** para el monitoreo de galactofuranosidasas en el medio de cultivo de *P. varians*.

- Una descripción detallada de las reacciones que se realizaron durante este trabajo de investigación, la caracterización espectroscópica de los productos sintetizados y la discusión de los resultados obtenidos.

Este trabajo de Tesis dio lugar a las siguiente publicaciones:

1. Photoinduced electron-transfer α -deoxygenation of aldonolactones. Efficient synthesis of 2-deoxy-D-*arabino*-hexono-1,4-lactone.
Andrea Bordoni, Rosa M. de Lederkremer, Carla Marino.
Carbohydrate Research, **2006**, 341, 1788-1795.
2. 5-Deoxy glycofuranosides by carboxyl group assisted photoinduced electron-transfer deoxygenation.
Andrea Bordoni, Rosa M. de Lederkremer, Carla Marino.
Tetrahedron, **2008**, 64, 1703-1710.
3. Facile synthesis of methyl α - and β -D-[6-³H]galactofuranosides from D-galacturonic acid. Substrates for the detection of galactofuranosidasas.
Andrea Bordoni, Carlos Lima, Karina Mariño, Rosa M. de Lederkremer, Carla Marino.
Carbohydrate Research, **2008**, 343, 1863-1869.
4. Synthesis of 5-deoxy- β -D-galactofuranosides as tools for the characterization of β -D-galactofuranosidasas.
Andrea Bordoni, Rosa M. de Lederkremer, Carla Marino.
Bioorganic & Medicinal Chemistry, **2010**, 18, 5339-5345.