

Tesis de Posgrado

Síntesis de desoxi- β -D-galactofuranósidos. Su uso para estudios de especificidad de exo β -D-galactofuranosidasa

Chiocconi, Alejandro Andrés

2003

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

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

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

Cita tipo APA:

Chiocconi, Alejandro Andrés. (2003). Síntesis de desoxi- β -D-galactofuranósidos. Su uso para estudios de especificidad de exo β -D-galactofuranosidasa. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3618_Chioconi.pdf

Cita tipo Chicago:

Chiocconi, Alejandro Andrés. "Síntesis de desoxi- β -D-galactofuranósidos. Su uso para estudios de especificidad de exo β -D-galactofuranosidasa". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2003.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3618_Chioconi.pdf

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

**Síntesis de desoxi- β -D-galactofuranósidos.
Su uso para estudios de especificidad
de exo β -D-galactofuranosidasa.**

Alejandro Andres Chioconi

Directora de Tesis

Dra. Rosa M. de Lederkremer

3618

**Tesis presentada para optar al título de
Doctor de la Universidad de Buenos Aires**

Agosto de 2003

**Dedico esta Tesis a Andrea, Gabriel y Tatiana
mis tres amores por siempre.**

**A mis padres, Juan Carlos y Beatriz
y a mis hermanos Fabián y Mariano.**

**Agradezco a la Dra. Rosa M. De Lederkremer,
por su confianza, su interés y su invaluable apoyo
para la realización del presente trabajo de Tesis.
Su constancia y amor por la ciencia son y serán
para mí un ejemplo a imitar.**

Le agradezco especialmente a la Dra. Carla Marino por su constante dedicación y ayuda en mi trabajo.

**Le agradezco especialmente al Dr. Oscar Vareia
por su afecto, sus consejos y enseñanzas.**

EL PEQUEÑO FESTEJO

“Tomo una botella de vino y voy a beberla entre las flores.
Siempre somos tres, contando a mi Sombra, mi amiga la brillante Luna y a mí.
Felizmente la Luna nada sabe de beber, y mi Sombra nunca está sedienta.
Cuando canto, la Luna me escucha en silencio. Cuando bailo, mi sombra baila también.
Luego de toda fiesta los invitados deben partir; esta tristeza no conozco,
Pues, cuando regreso a casa, la Luna me acompaña y mi Sombra me sigue.”

Li-Po, siglo 8vo, D. C.

A todos mis amigos, gracias por brillar a mi lado y siempre acompañarme en esta fiesta que es la vida.

AGRADECIMIENTOS

A mis amigos Darío, Itín, Gustavo, Stella, Román, Cecilia, Pedro, Majo, Hernán, Patricia, Marcelo, Horacio, y a todos sus hijos, por todos los hermosos momentos compartidos, por tantos buenos deseos que siempre han tenido para conmigo, y por su fiel amistad.

A Norma, Roberto, Marcelo, Paula, Virginia, Horacio, Martín, Javier y Camila, por todo el cariño y confianza que constantemente me expresan.

A mis primos Alicia y Carlitos por su estímulo, interés y cariño.

Al Dr. Daniel Perez del Departamento de Geología, por su amistad, su generosidad y su ejemplo de trabajo y dedicación.

A la Dra. Carla Marino especialmente, por su empeño y esfuerzo al ayudarme cada día.

A mis compañeros de Laboratorio Carla Marino, Carlos Lima, Carola Gallo, Laura Bertello, Karina Mariño, Lucía Gandolfi, Verónica Mendoza, Rosalía Agustí, María Laura Urigh, Laura Salto, Pablo Barrios y Leonardo Iglesias, por tantos momentos gratos compartidos.

A todos mis compañeros del Departamento, en especial a Alberto Ghini, Diego Navarro, José Kovensky, Cristina Tettamanzi, Eduardo Sproviero y Leonardo Iglesias por su interés y por compartir tantos buenos momentos.

A la Dra. Carla Marino, Dra. Carola Gallo, Dr. Oscar Varela, Dra. Cristina Tettamanzi y Dra. Andrea Bruttomesso por los espectros de RMN realizados.

A la memoria del Dr. Eduardo G. Gros, por su confianza, su interés, sus enseñanzas y su amor por la ciencia y la investigación.

A la memoria de la Dra. Alicia M. Seldes, por la oportunidad y ayuda que me brindara.

A la Dra. Norma D'Accorso por facilitarme una muestra de 2-desoxi-D-galactosa.

A la Lic. Marta Marcote por los microanálisis realizados.

A Gustavo Arabehty y Jorge Aznarez por sus enseñanzas desinteresadas.

A todo el personal directivo, docente y no docente del Departamento de Química Orgánica. Al Sr. Eduardo Lopez y a la memoria del Dr. Bassi.

A todo el personal de mantenimiento y talleres por haberme permitido aprender tantas cosas, y complementar también mi formación.

A todo aquel que, sin yo saberlo, ni él decírmelo, me haya brindado su ayuda y sus buenas intenciones en todos estos años en el Departamento y en la Facultad. A los que no, también les doy las gracias.

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

Síntesis de desoxi- β -D-galactofuranósidos. Su uso para estudios de especificidad de exo β -D-galactofuranosidasa.

La síntesis de desoxiazúcares es un tema de gran interés no sólo por ser éstos componentes de productos naturales, sino por considerarlos como herramientas para estudios relacionados con la actividad de enzimas.

La bibliografía es extensa en desoxiazúcares piranósicos, que han sido utilizados para determinar la especificidad de glicosidasas y glicosiltransferasas, y por su potencial como inhibidores de esas enzimas.

Los monosacáridos más comunes como glucosa, galactosa y manosa se encuentran sólo en configuración piranósica en células de mamíferos, de ahí el interés por la síntesis de desoxiazúcares en esa configuración. Sin embargo en las últimas décadas se ha encontrado que la β -D-galactofuranosa es constituyente de glicoconjugados muy importantes de la superficie de microorganismos patógenos, entre ellos *Trypanosoma cruzi* y *Mycobacterium tuberculosis*.

Las enzimas responsables del metabolismo de la galactofuranosa, como las galactofuranosidasas y las galactofuranosiltransferasas son un buen blanco para el diseño de inhibidores que afectarían la viabilidad de los microorganismos sin afectar al mamífero infectado que no tiene glicoconjugados con galactofuranosa.

En este trabajo de tesis de doctorado se han sintetizado por primera vez β -D-galactofuranósidos desoxigenados en las posiciones 2, 3 ó 6, y se ha utilizado como compuesto de partida a la D-galactono-1,4-lactona, que es un producto comercial, buen precursor del anillo furanósico y da lugar a sustituciones selectivas. Se han caracterizado los desoxiazúcares y sus precursores y se han utilizado los β -D-glicósidos para investigar su capacidad de actuar como sustratos de una exo β -D-galactofuranosidasa de *Penicillium fellutanum*. Esta enzima es un buen modelo pues es secretada al medio por un microorganismo no patógeno, y la producción y purificación de la enzima se han optimizado en nuestro laboratorio.

Se ha determinado en este trabajo de tesis que ninguno de los derivados desoxigenados es sustrato de la enzima, o sea que los hidroxilos de C-2, C-3 y C-6 de la D-galactofuranosa son importantes para la interacción con el sitio activo.

Palabras Clave: galactofuranosa, desoxigalactofuranosil glicósidos, galactono-1,4-lactona, galactofuranosidasa.

Synthesis of deoxy- β -D-galactofuranosides. Their use for specificity studies of exo β -D-galactofuranosidase.

The synthesis of deoxysugars is an area of great interest as components of natural products and as tool for studies related with the activity of enzymes.

The common monosaccharides, glucose, mannose and galactose are present in mammal cells only in the pyranosic configuration, thus the interest for the synthesis of deoxysugars in this configuration. However, in the last decades it was reported that β -D-galactofuranose is constituent of important glycoconjugates of the surface of pathogenic microorganisms such as *Trypanosoma cruzi* and *Mycobacterium tuberculosis*.

The enzymes responsible for the metabolism of galactofuranose, like galactofuranosidases and galactofuranosyltransferases are good targets for the design of inhibitors that would affect the viability of the microorganisms without effect on the infected mammal, who lacks glycoconjugates with galactofuranose.

In the present doctoral thesis, β -D-galactofuranosides deoxygenated in positions 2, 3 or 6 have been synthesized for the first time. As starting material, D-galactono-1,4-lactone, commercially available, that may be selectively substituted, was used as a good precursor of the furanose ring.

The deoxysugars and their precursors have been characterized, and the β -D-glycosides have been used to study their suitability as substrates for the exo β -D-galactofuranosidase of *Penicillium fellutanum*. This enzyme is a good model because *P. fellutanum* is a non pathogenic microorganism, the enzyme is secreted to the medium and its production and purification have been optimized in our laboratory.

It was found that none of the deoxygenated compounds are substrates for the enzyme, that is that the hydroxyls of C-2, C-3 and C-6 of D-galactofuranose are important for interaction with the active site.

Key Words: galactofuranose, deoxygalactofuranosyl glycosides, galactono-1,4-lactone, galactofuranosidase.

INDICE

INTRODUCCION

| | |
|--|----|
| Capítulo 1 : | |
| Antecedentes de estudios de especificidad enzima-sustrato. | 1 |
| Capítulo 2 : | |
| Características de la enzima exo β -D-galactofuranosidasa de <i>Penicillium fellutanum</i> . | 4 |
| Capítulo 3 : | |
| Síntesis de desoxiglicósidos | 8 |
| Métodos de obtención de 2-desoxiglicósidos. | 14 |

RESULTADOS Y DISCUSION

| | |
|--|-----|
| Capítulo 4 : | |
| Síntesis de 2-desoxi-D- <i>lixo</i> -hexono-1,4-lactona (2-desoxi-D-galactono-1,4-lactona) y de 2-desoxi-D- <i>lixo</i> -hexofuranósidos (2-desoxi-D-galactofuranósidos). | 28 |
| Capítulo 5 : | |
| Síntesis de 3-desoxi- β -D- <i>xilo</i> -hexofuranósidos (3-desoxi- β -D-galactofuranósidos) y 3-desoxi- β -D- <i>xilo</i> -hexofuranosil(1 \rightarrow 3)-D-Manp (3-desoxi- β -D-galactofuranosil(1 \rightarrow 3)-D-Manp). | 60 |
| Capítulo 6 : | |
| Síntesis de 6-desoxi- β -D-galactofuranósidos (β -D-fucofuranósidos) y 6-desoxi- β -D-galactofuranosil(1 \rightarrow 3)-D-Manp (β -D-fucofuranosil(1 \rightarrow 3)-D-Manp). | 91 |
| Capítulo 7 : | |
| Estudio de Especificidad de β -D-galactofuranosidasa. Utilización de análogos de sustratos desoxigenados. | 116 |

PARTE EXPERIMENTAL

Capítulo 8 :

Instrumental y métodos generales.

120

Reactivos generales

121

Purificación de solventes

123

Detalles experimentales

125

RESUMEN

161

BIBLIOGRAFIA

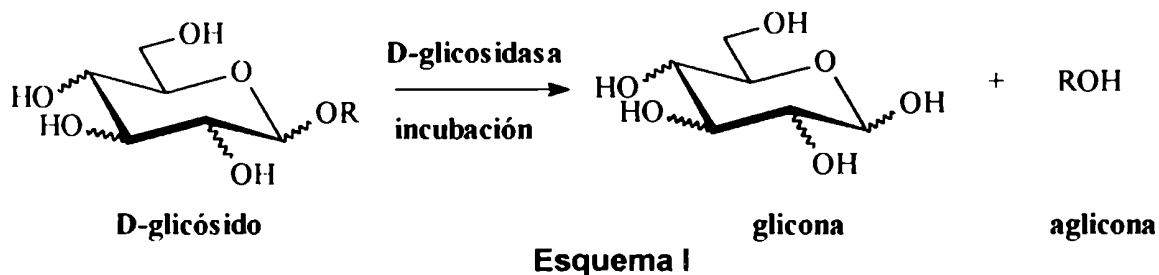
167

INTRODUCCION

INTRODUCCION

Capítulo 1: Antecedentes de estudios de especificidad enzima-sustrato.

Las glicosidasas actúan sobre el enlace glicosídico escindiéndolo y liberando las dos porciones que constituían el glicósido, según se muestra a continuación (**Esquema I**).



Numerosas α -D-glicosidasas como α -D-glucosidasas, α -D-manosidasas y α -D-galactosidasas se han aislado y purificado a partir de mamíferos, plantas y microorganismos, y además han sido caracterizadas según su especificidad hacia el sustrato correspondiente.

En la mayoría de los casos los estudios de especificidad de sustrato se refieren a la variedad de agliconas y a la posición de unión cuando la aglicona es un azúcar (el sustrato es en esos casos un oligosacárido). Sin embargo los estudios de especificidad le han dedicado poca atención a la porción de la glicona en sí misma y a variaciones estructurales sobre ella.

Se acepta generalmente que las glicosidasas tienen gran variabilidad sobre la aglicona (poca especificidad), pero son en cambio muy específicas en lo que a la estructura de la glicona se refiere (poca variabilidad o ninguna). La configuración de los hidroxilos de la glicona en el sustrato es muy importante para la afinidad y la especificidad de las glicosidasas (Chiba, 1988; Snaith *et al*, 1973; Dey *et al*, 1972). Se han realizado sin embargo muchos estudios de especificidad con la β -glucosidasa

aislada a partir de almendras, y en estos estudios se ha investigado no sólo sobre la porción de la aglicona sino también sobre la glicona, hallándose que dicha enzima cataliza también la hidrólisis de glicósidos como β -D-galactopiranosidos (Heyworth *et al.*, 1962; Walker *et al.*, 1978), 2-desoxi- β -D-glucopiranosidos (Legler, 1975) y β -D-xilopiranosidos (Kiss *et al.*, 1981). Se han realizado también sobre la β -glucosidasa aislada a partir de almendras estudios de afinidad entre dicha enzima y distintos azúcares o derivados de azúcares, midiendo la inhibición de la actividad enzimática al incubarla en presencia de cada azúcar. En estos estudios se demostró que la enzima no presentaba mucha especificidad frente a la estructura de la glicona. También se pudo observar que si se reemplazaba un hidroxilo por un sustituyente aniónico entonces se reducía la afinidad, mientras que si en cambio se reemplazaba un hidroxilo por un sustituyente catiónico la afinidad se incrementaba (Dale *et al.*, 1985).

Existen algunos estudios de la actividad hidrolítica de las enzimas sobre derivados monodesoxigenados de la glicona correspondiente, con el objeto de determinar la importancia de los distintos hidroxilos del azúcar en la interacción del sustrato con el sitio activo de la enzima. Se observó en algunos casos la persistencia de una débil actividad enzimática a pesar de las diferencias estructurales del sustrato. Varios trabajos han empleado como modelo D-glucosidasas (Lemieux *et al.*, 1994; Bock *et al.*, 1987; Roeser *et al.*, 1981; Namchuk *et al.*, 1995; Brekle *et al.*, 1981; Mega *et al.*, 1983; McCarter *et al.*, 1992), otros α -D-galactosidasas (Suzuki *et al.*, 1970; Weiser *et al.*, 1992). Se ha visto en un estudio sobre α -manosidasa aislada de jack bean y de almendras que ambas enzimas hidrolizaban el 4-nitrofenil α -D-ramnopiranosido a una velocidad muy similar a la observada en el caso del 4-nitrofenil α -D-manopiranosido (Nishio *et al.*, 1996), o sea que la desoxigenación en C-6 no afectaba la actividad enzimática.

Se han realizado estudios de actividad de α -D-glucosidasas sobre desoxiazúcares como el 4-nitrofenil 2-desoxi- α -D-glucopiranosido observándose la hidrólisis del mismo (Canellakis *et al.*, 1994). Otros estudios han demostrado que la α -D-glucosidasa de *Aspergillus niger* tiene actividad sobre la 2-desoxi-D-glucosa en reacciones de condensación (Nakano *et al.*, 1995). Inclusive la α -D-glucosidasa de

Aspergillus niger aislada en forma cristalina tiene actividad catalítica en la hidratación de D-glucal, demostrando que no se requiere la presencia de un HO en C-2 (Chiba *et al*, 1988). Este hecho experimental también se ha observado con la α -D-galactosidasa aislada a partir de granos de café verde, la cual catalizó la hidratación de D-galactal (Weiser *et al*, 1992). Se sugiere en algunos estudios que las α -D-galactosidasas presentan en general una actividad hidrolítica sobre los 2-desoxi-D-galactopiranosidos (Nishio *et al*, 2000). El grupo hidroxilo en C-2 del sustrato actuaría estabilizando el estado de transición al ser reconocido por una β -D-glucosidasa (Notenboom *et al*, 1998), mientras que con las α -D-galactosidasas y las α -D-glucosidasas no sería tan necesaria la presencia del hidroxilo de C-2 (Hakamata *et al*, 2000) para que la enzima reconozca al sustrato en cuestión.

Capítulo 2: Características de la enzima exo β -D-galactofuranosidasa de *Penicillium fellutanum*.

Hacia mediados de los años '70 se aisló por primera vez la exo β -D-galactofuranosidasa proveniente del hongo *Penicillium charlessii* (Rietschel-Berst *et al*, 1977), más tarde reclasificado como *P. fellutanum*. En ese momento se empleó para su purificación permeación por geles y cromatografía de afinidad, usando como adsorbente Sephadex 4B al que se le había unido covalentemente un péptidofosfogalactomanano. Se observó que la enzima así aislada catalizaba la hidrólisis de metil y etil β -D-galactofuranósidos y también de 6-O- β -D-galactofuranosil-D-galactosa y de residuos de 5-O- β -D-galactofuranosa unidos a péptidofosfogalactomananos presentes en cultivos del hongo. En todos los casos se detectó la liberación de galactosa por la medición del incremento en la absorbancia a 410 nm luego de la reacción de oxidación de la cupla galactosa/o-cresol con las enzimas galactosaoxidasa y peroxidasa, respectivamente (Fisher *et al*, 1964).

También se confirmó la especificidad de la enzima al comprobar que la misma no hidrolizaba al metil α -D-galactofuranósido ni a los metil D-galactopiranósidos, según puede verse en el siguiente cuadro de especificidades :

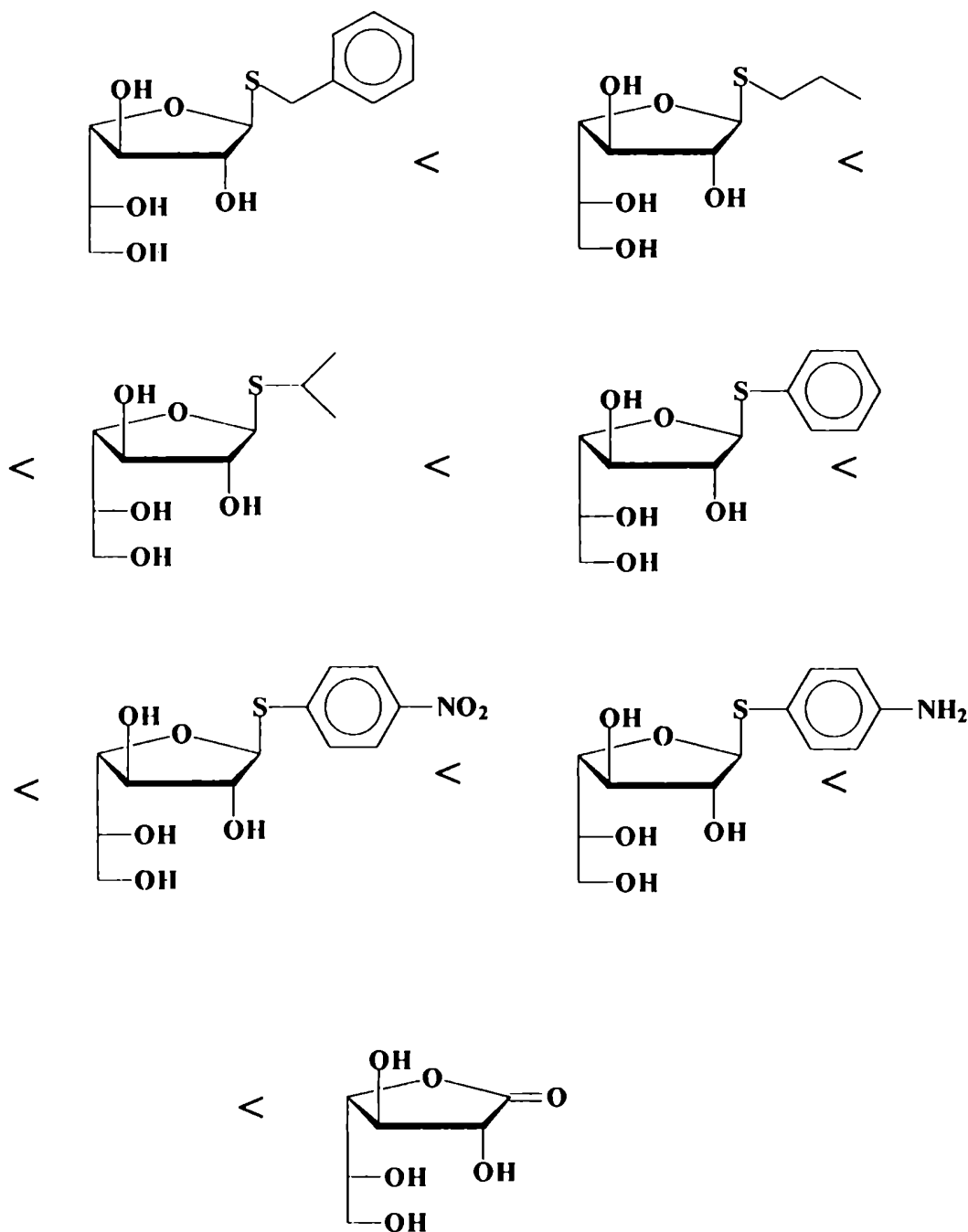
| Sustrato | galactosa liberada (μmoles) |
|--|---|
| Péptidofosfogalactomanano | 0,33 |
| Etil- β -D-galactofuranósido | 0,29 |
| Metil- β -D-galactofuranósido | 0,086 |
| Metil- α -D-galactofuranósido | 0,01 |
| Metil- β -D-galactopiranósido | 0,00 |
| Metil- α -D-galactopiranósido | 0,00 |
| 6-O- β -D-galactofuranosil-D-galactosa | 0,09 |
| 4-O-D-galactopiranosil-D-glucosa | 0,00 |

En los estudios se estableció que las condiciones óptimas para los ensayos de hidrólisis se lograban a pH 4, y que la enzima se mantenía estable a ese pH y a temperatura ambiente durante una semana, soportando además operaciones reiteradas de congelamiento y descongelamiento, necesarias para su estudio, manipulación y almacenamiento, sin perder actividad.

En nuestro laboratorio se introdujo el cultivo del *P. fellutanum*, y desde hace algunos años se realizaron estudios con la exo β -D-galactofuranosidasa proveniente del mismo. En ese sentido se sintetizó, por primera vez y mediante un método muy eficiente, el 4-nitrofenil β -D-galactofuranósido (Varela *et al*, 1986), que resultó un sustrato conveniente y específico para realizar estudios de determinación de la actividad enzimática de la exo β -D-galactofuranosidasa de *P. fellutanum*. El uso de nitrofenil glicósidos como sustratos cromogénicos está ampliamente difundido para estudios de cinética y especificidad de diversas glicosidasas. Sin embargo en lo que respecta a la exo β -D-galactofuranosidasa de *P. fellutanum* se había empleado hasta ese momento metil β -D-galactofuranósido como sustrato, debiéndose dosar la galactosa liberada en la hidrólisis enzimática, como se mencionó anteriormente. El 4-nitrofenil β -D-galactofuranósido se comportó como un sustrato muy útil y sencillo de manejar por sus características cromogénicas aplicables a la espectrofotometría visible (Marino *et al*, 1998 a).

Siguiendo con los estudios, en nuestro laboratorio se sintetizaron varios 1-tio- β -D-galactofuranósidos con el objetivo de hallar un inhibidor de la exo β -D-galactofuranosidasa de *P. fellutanum*. Era conocido el hecho que varios tioglicopiranosidos demostraron actividad como inhibidores competitivos de glicosidasas (Steers *et al*, 1971; Blanc-Muesser *et al*, 1978) y también como ligandos para cromatografía de afinidad (Pazur *et al*, 1981). Fue así que se sintetizó estereoselectivamente, entre otros compuestos, 4-aminofenil 1-tio- β -D-galactofuranósido y se lo evaluó como inhibidor de la enzima utilizando 4-nitrofenil β -D-galactofuranósido como sustrato cromogénico, resultando el mejor de una serie de compuestos sintéticos (Marino *et al*, 1998 a). En este trabajo se demostró también que la D-galactono-1,4-lactona es un muy buen inhibidor de la β -D-galactofuranosidasa. Análogos de β -D-galactofuranosil nucleósidos también

resultaron inhibidores de la enzima (Marino *et al*, 2001). Los diferentes 1-tio- β -D-galactofuranósidos que se sintetizaron se muestran a continuación (**Esquema II**) ordenados de menor a mayor según su capacidad de inhibición competitiva :

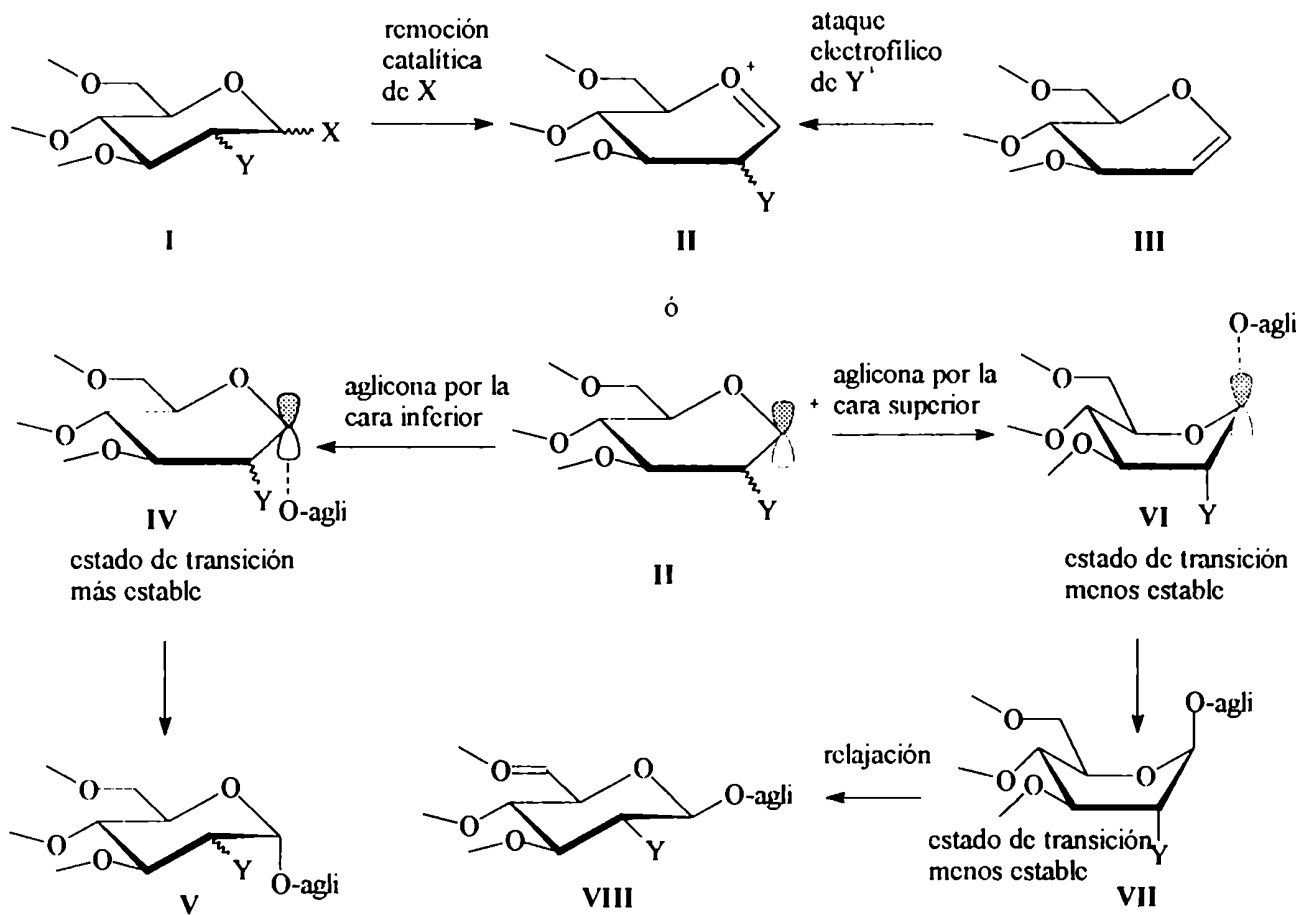
**Esquema II**

Una vez sintetizado el 4-aminofenil 1-tio- β -D-galactofuranósido y evaluada su capacidad como inhibidor competitivo se encaró la preparación de una fase para utilizar en columnas cromatográficas de afinidad. Para ello se acopló 4-aminofenil 1-tio- β -D-galactofuranósido a CH-Sefarosa 4B.

La fase así preparada se empacó en una columna cromatográfica, se equilibró con buffer de acético/acetato a pH 4,0. Luego de sembrar el cultivo conteniendo la enzima pre purificada se lavó primeramente y luego se eluyó la columna de afinidad con una solución diluida de D-galactono-1,4-lactona, dado que este compuesto se comportaba como ya se mencionó como el inhibidor más competitivo, y fue capaz de eluir la enzima purificada de la columna (Miletti *et al*, 1999). Este método permitió concentrar β -D-galactofuranosidasa de *Trypanosoma cruzi*, agente del Mal de Chagas (Miletti *et al*, 2003). La acción *in vivo* de inhibidores de la enzima fue también estudiada utilizando cultivos de *P. fellutanum*. Se encontraron modificaciones drásticas en la secreción de la enzima, del peptidogalactomanano y a nivel morfológico (Mariño *et al*, 2002).

Capítulo 3: Síntesis de 2-desoxiglicósidos.

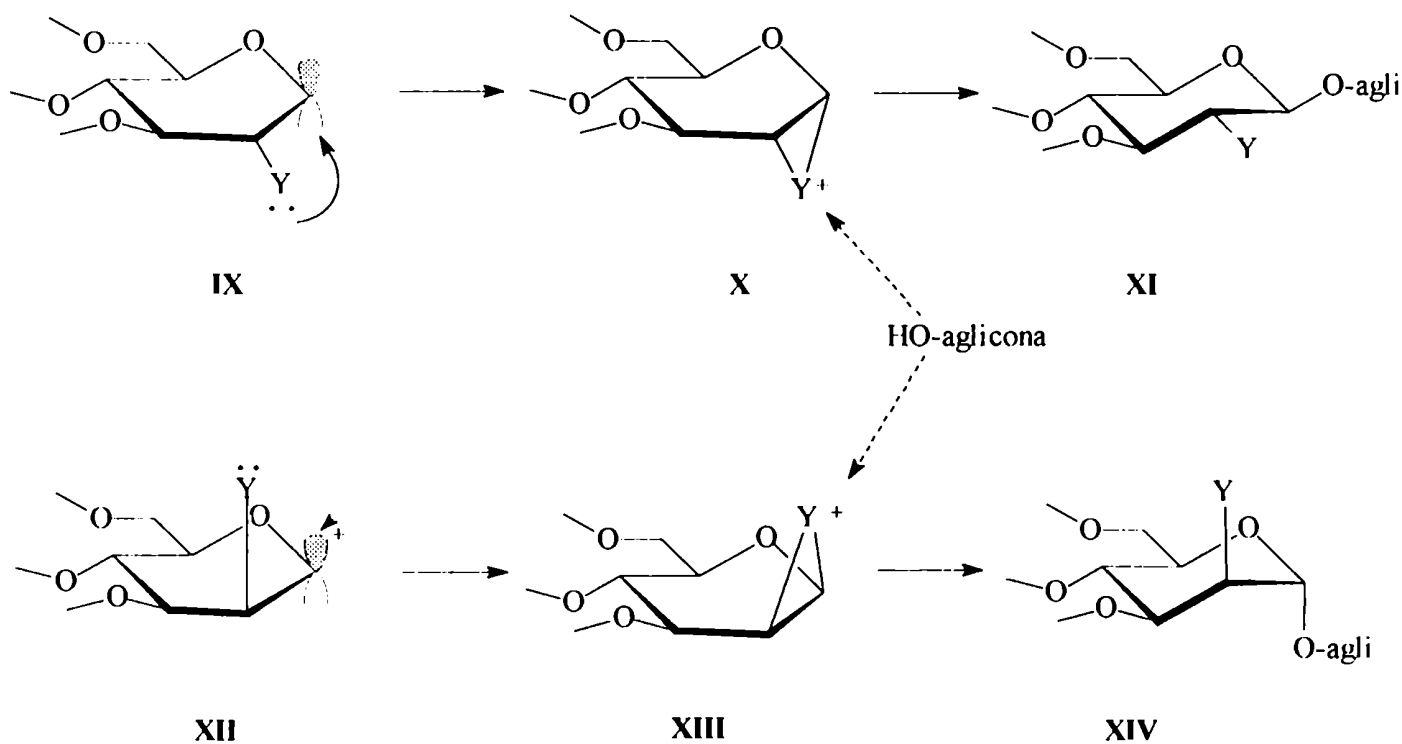
Cuando se considera el caso general en la secuencia de formación del crucial enlace glicosídico se puede visualizar un hidrato de carbono intermediario **II** que posee un C-1 electrofílico y esencialmente trigonal (**Esquema III**). La electrofilicidad es normalmente inducida por la separación en **I** de un grupo saliente de C-1 ó por el ataque electrofílico sobre el enlace doble C1-C2 (si se tratase del glical **III**). En cuanto a la configuración del enlace glicosídico (α ó β), dependerá de la combinación de varios factores de control. Uno de éstos es el comúnmente denominado efecto cinético anomérico. También está el efecto anomérico (efecto termodinámico) en tetrahidropiranos que favorece la unión axial de grupos funcionales electronegativos sobre C-1. Se asume así que este efecto termodinámico ejerce su influencia en el estado de transición para formar la unión al carbono electrofílico C-1, que ha de ser axial (α).



Esquema III

De hecho, la preferencia axial para el nucleófilo entrante puede verse mejor desde el punto de vista general del efecto estereoelectrónico que favorece el ataque axial a cualquier anillo de seis miembros. Así, cuando el carbono electrofílico C-1 es atacado por la "cara axial" el estado de transición debe parecerse a la forma **IV** para terminar en el glicósido α **V**. Cuando el mismo carbono electrofílico C-1 es atacado por la "cara ecuatorial", el estado de transición deberá parecerse a la forma bote **VI**, que es 5 kcal/mol más alta en energía que la forma silla. Sólo luego de formarse la unión tipo axial, como en **VII**, es que podrá relajarse la forma bote a una forma silla con un sustituyente ecuatorial **VIII** para terminar en el glicósido β . Todos estos argumentos de tipo estereoelectrónico son sólo válidos si asumimos que las geometrías de los productos serán parecidas a los estados de transición en su etapa tardía.

Un segundo elemento de control sobre C-1 es el efecto de grupo vecino participante o también llamado asistencia anquimérica que puede actuar como una base de Lewis (dador de electrones) hacia el C-1 deficiente en electrones. Si el grupo en C-2 es ecuatorial como en **IX** (configuración *gluco* o *galacto*), entonces este grupo interactuará con C-1 de modo de bloquear la cara α como se ve en **X**, favoreciendo así el ataque por la cara β del nucleófilo atacante (**Esquema IV**).



Esquema IV

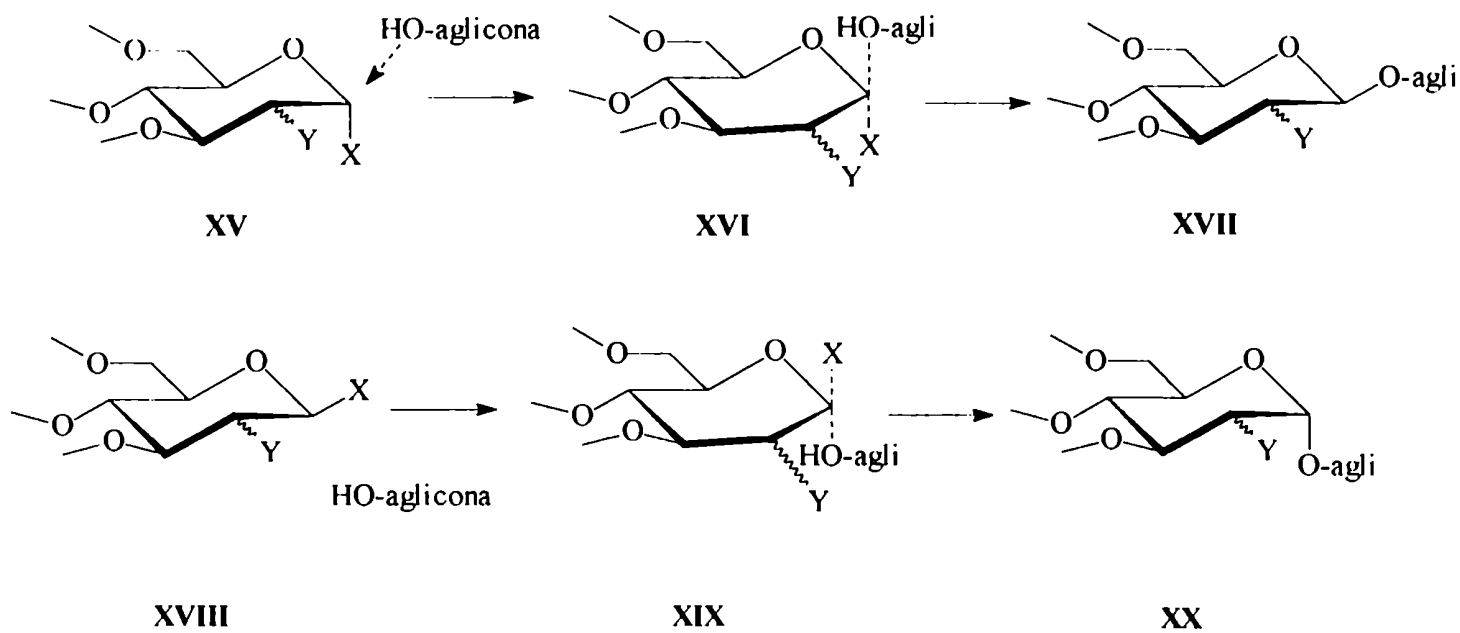
Si se tratase en cambio de tener un grupo axial en C-2 como en **XII** (configuración *mano*), éste interactuaría con C-1 de modo de bloquear la cara β como se muestra en **XIII**, favoreciendo así la formación de un glicósido de configuración α .

Puede notarse que algunos intermediarios del tipo **X** ó **XIII** en el **Esquema IV** pueden también formarse directamente por el ataque de electrófilos sobre un glicol.

Por último cabe mencionar que este efecto de grupo participante puede observarse también con grupos situados sobre otras posiciones en el anillo del

hidrato de carbono distintas a C-2, como, por ejemplo, en el caso de tener un sustituyente 4-metoxibenzoato ubicado en C-3 que actúa sobre C-1 bloqueando alguna de las dos caras posibles de atacar dependiendo de la configuración del HO-3.

El último elemento de control que puede mencionarse, y al mismo tiempo el menos común e invocado, es el que se basa en suponer que la electrofilicidad de C-1 puede controlarse a través de las condiciones de reacción de manera que el carbono en cuestión (C-1, electrofílico) permanezca en su forma tetraédrica (**XV** ó **XVIII**) y sea sustituido en una forma similar a la SN_2 (**XVI** ó **XIX**), para obtenerse luego de la reacción una inversión neta de la configuración (**XVII** ó **XX**) como se muestra en el **Esquema V**.



Esquema V

Métodos de obtención de 2-desoxiglicósidos.

Existen numerosas estrategias que han sido desarrolladas para sintetizar desoxiazúcares. El siguiente material ha reunido algunas metodologías y cita ejemplos que las reflejan. Básicamente pueden dividirse en dos grupos, uno que sintetiza el desoxiazúcar "di novo" a partir de estructuras de configuración adecuada, y otro que parte de un azúcar y modifica su esqueleto para obtener el desoxiazúcar buscado (metodología aplicada por nosotros en el trabajo de Tesis).

Se puede afirmar que la síntesis de 2-desoxiglicósidos es, dentro del campo de los hidratos de carbono, un nicho, pequeño pero muy importante y desafiante, como puede ejemplificarse en el caso de importantes familias de antibióticos (Barresi *et al*, 1994; Barresi *et al*, 1995 a; Barresi *et al*, 1995 b) y otros compuestos de interés biológico.

El problema sintético con el que uno se encuentra para la glicosidación de 2-desoxiazúcares es que no se puede dirigir la reacción para la obtención selectiva del anómero β por asistencia anquimérica del sustituyente en C-2. Se han desarrollado distintos métodos para la obtención de 2-desoxi-D-glicósidos, algunos de los cuales se ejemplifican a continuación.

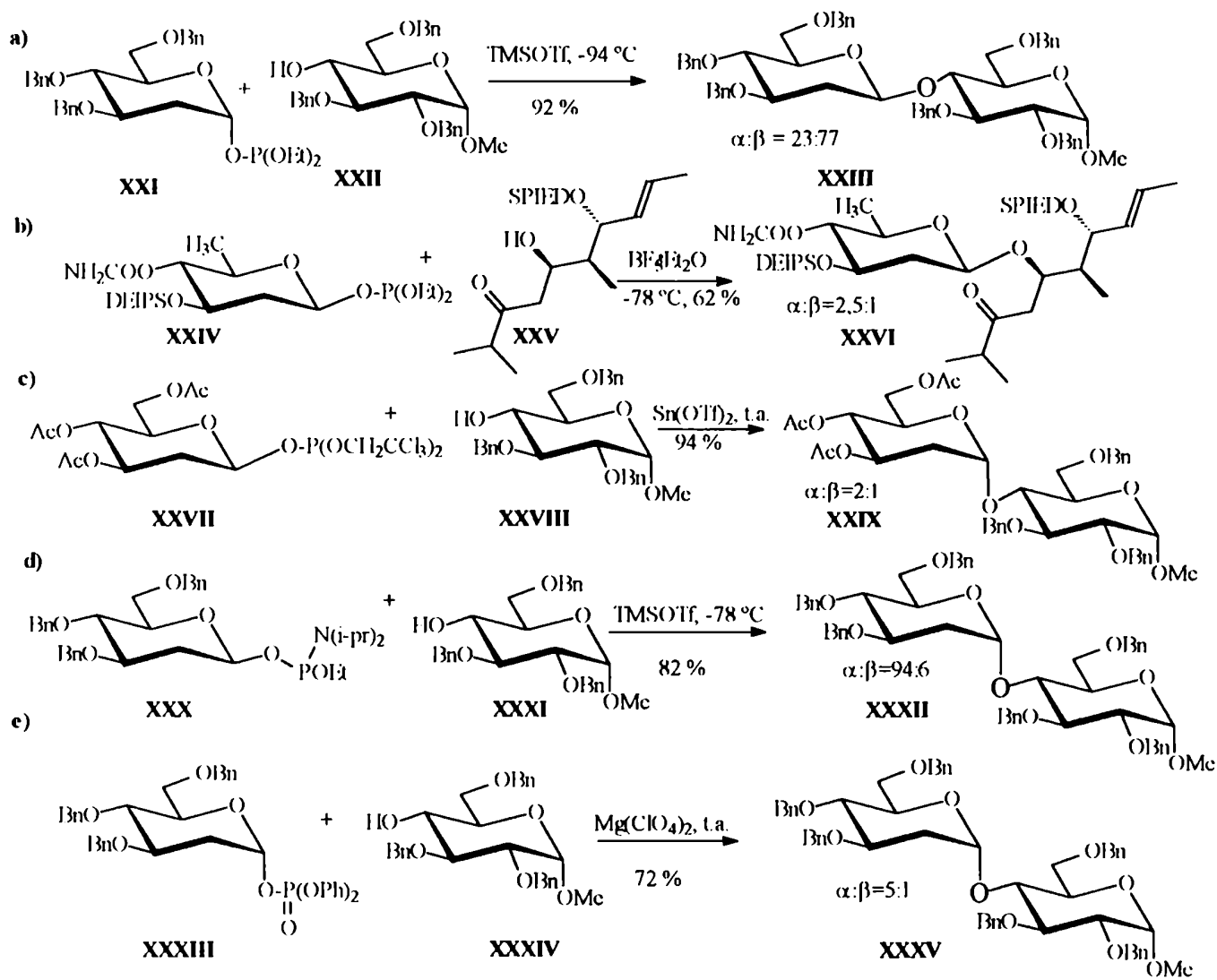
a) Los fosfitos glicosídicos se han empleado como dadores de 2-desoxiglicosilo. En un estudio se sintetizaron fosfitos de dietilo de cinco diferentes piranosas, obteniéndose principalmente α -fosfitos. Luego sobre éstos, y mediante la catálisis de TMSOTf, se logró la transferencia de glicosilo con buenos rendimientos, favoreciendo en la serie de glucosa como dador a los productos de configuración β con varios aceptores, salvo con el fenol como aceptor en donde el anómero α prevaleció ($\alpha:\beta=71:29$). Se observaron también desviaciones en la selectividad respecto del anómero β cuando se trabajó con la galactosa como dador empleando un aceptor impedido derivado de glucosa ($\alpha:\beta=69:31$), o con fucosa como dador con un aceptor no impedido de glucosa ($\alpha:\beta=67:33$) (Hashimoto *et al*, 1995) (**Esquema VI a**). Empleando una idea similar sobre fosfito de dietilo de 2,6-didesoxiglicosilos como

dadores de glicosilo, con diferentes grupos protectores y catálisis de $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$, se obtuvieron con modestas selectividades glicósidos de configuración α al prepararse un sintón de la concanamicina (Paterson *et al*, 1995) (**Esquema VI b**).

También se ha encontrado poca selectividad en el anómero β al llevarse a cabo la fosfitilación de triacetil-2-desoxiglucosa y galactosa con fosfocloridito de tricloroetilo, para producir mezclas de fosfitos en proporción $\alpha:\beta=2:1$ y $\alpha:\beta=5:1$. Estos fueron luego activados catalíticamente con $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ a temperatura ambiente, y $\text{Sn}(\text{OTf})_2$ o TMSOTf a bajas temperaturas, y acoplados con tres diferentes aceptores de glicosilo, obteniéndose principalmente disacáridos de configuración α (Muller *et al*, 1994) (**Esquema VI c**).

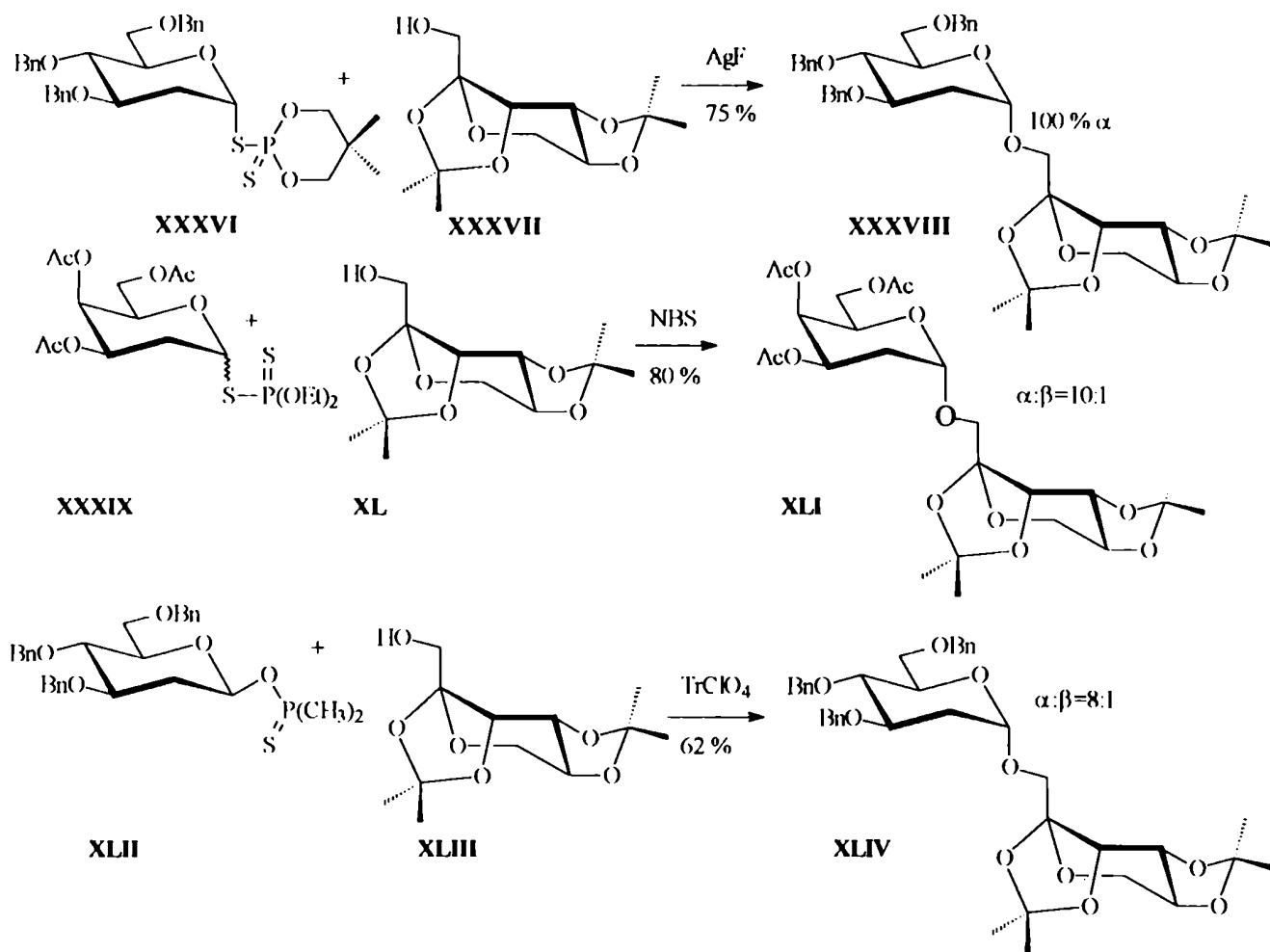
Sobre una variación de esta metodología se examinaron los fosforamiditos de tribencil-2-desoxiglucosa y galactosa. Estos fosforamiditos, luego de ser activados con TMSOTf a bajas temperaturas, se acoplaron limpiamente con tres diferentes aceptores de glicosilo para dar disacáridos de configuración α con altos rendimientos y selectividad anomérica de $\alpha:\beta=99:1$ a $\alpha:\beta=91:9$ (Li *et al*, 1997) (**Esquema VI d**).

A partir de un reordenamiento novedoso se generó el difenilfosfato de tribencil-2-desoxiglucosilo como dador, siendo una especie muy reactiva que produjo disacáridos de configuración α con buenos rendimientos y moderada selectividad de $\alpha:\beta=4,5:1$ a $\alpha:\beta=1:1$. Se empleó para esta reacción MgClO_4 anhidro como catalizador acortando los tiempos de reacción de 24 horas a 15 minutos sin y con catálisis respectivamente (Koch *et al*, 1993) (**Esquema VI e**).



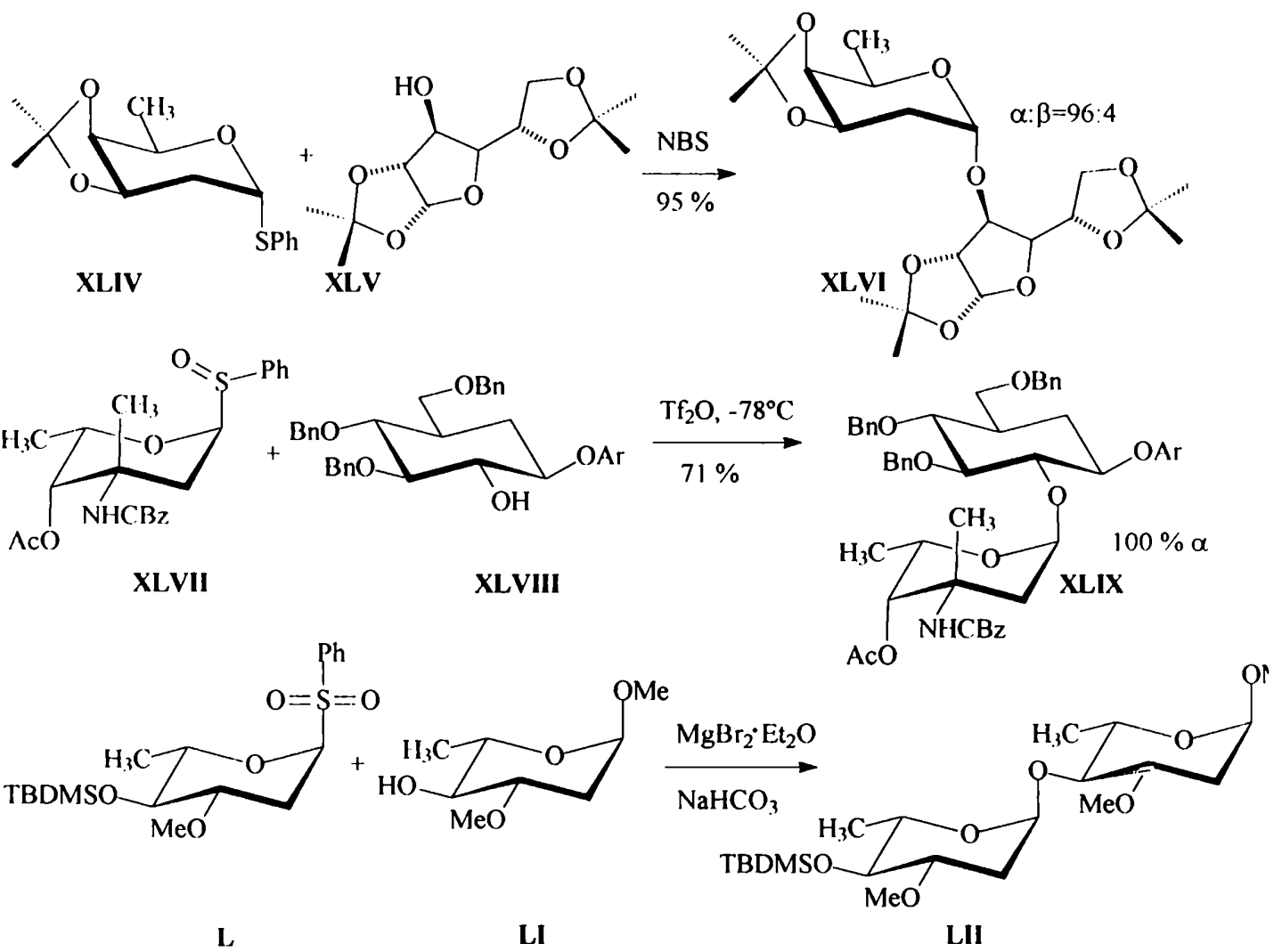
Esquema VI

Los fosforoditioatos se presentan como un novedoso grupo saliente para el uso en reacciones de transferencia de glicosilo. Se han realizado estudios sobre triacetil-2-desoxiglucosa o galactosa como dadores así como con tribencil-2-desoxiglucosa, con diferentes aceptores de glicosilo, empleando AgF como catalizador en solventes como acetonitrilo y diclorometano. En todos los casos la selectividad del anómero α fue muy alta y varió desde 100% hasta $\alpha:\beta=92:8$ (Bielawska *et al*, 1991). También se ha empleado NBS, NIS o $I(\text{sym-colidina})_2\text{ClO}_4$ como catalizador, con selectividades que mejoraron la observada con AgF ($\alpha:\beta=55:45$), por ejemplo al emplear NIS se obtuvo el resultado $\alpha:\beta=91:9$ (Laupichler *et al*, 1992). Un derivado relacionado, el fosfinotioato, se ha preparado sobre tribencil-2-desoxiglucosa, catalizando la reacción con perclorato de tritilo en benceno, y empleando varios aceptores de glicosilo. La selectividad fue desde $\alpha:\beta=20:1$ hasta $\alpha:\beta=5:1$ (Yamanoi *et al*, 1990) (**Esquema VII**).



Esquema VII

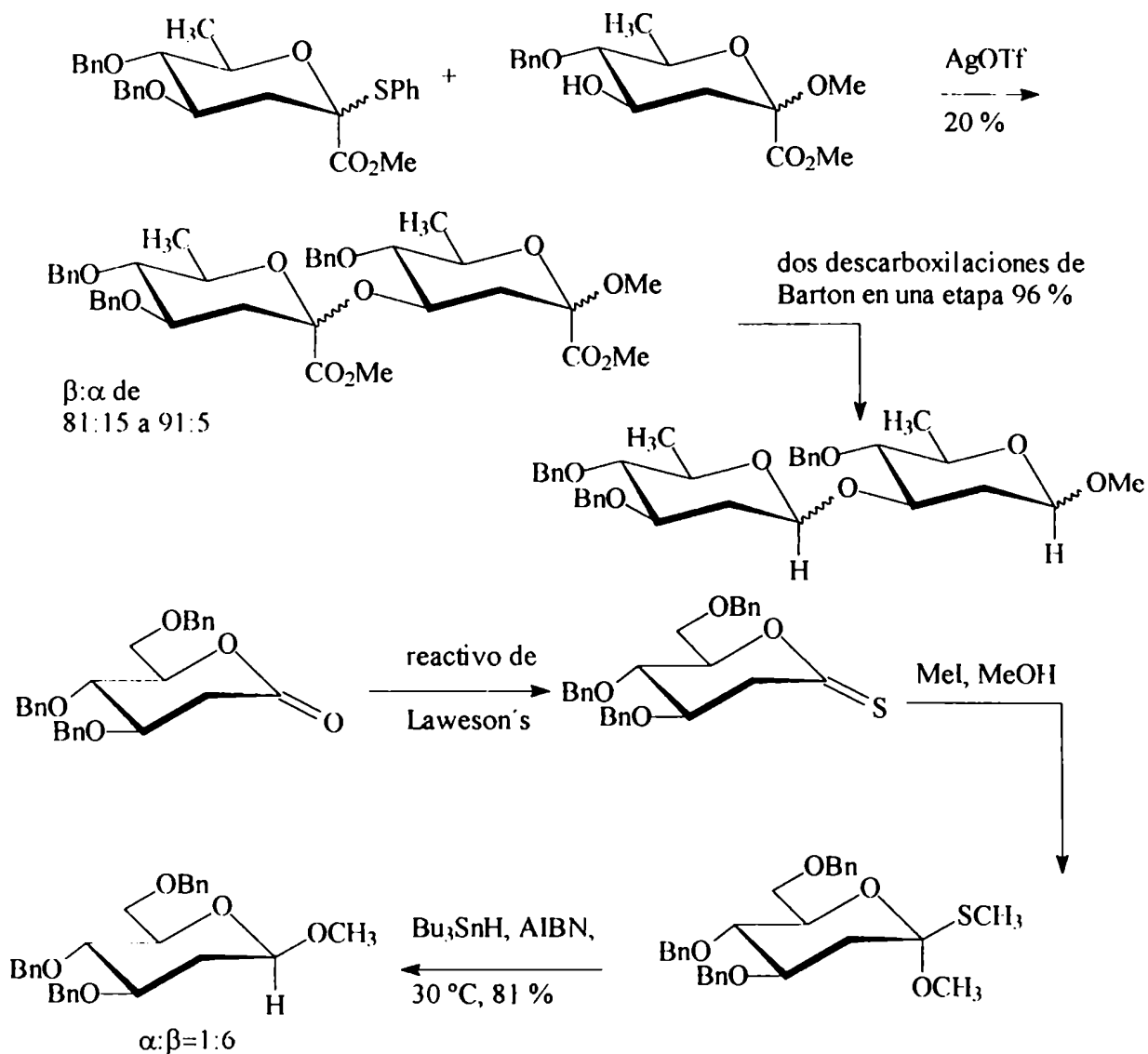
b) Se han desarrollado metodologías a partir de tioglicósidos que son activados con NBS. Se ha ensayado con varias 2,6-di-desoxihexosas como dadores, y con el diisopropiliden derivado de la glucosa como aceptor, con excelentes rendimientos y selectividades (Toshima *et al*, 1991). Se ha desarrollado a partir de glicósidos de fenilsulfóxido como dadores de 2,6-di-desoxiazúcares una poderosa metodología de glicosidación que se llama la ruta de activación del sulfóxido, y se ha aplicado con éxito a la síntesis del disacárido vancomicina, obteniéndose tras la activación con anhídrido triflico altos rendimientos y glicósidos de configuración α (Ge *et al*, 1998). Sobre el grupo fenilsulfonilo se ha desarrollado también una metodología de transferencia de glicosilo, aplicada a la 2,6-di-desoxiglucosa, empleando $MgBr_2 \cdot Et_2O$ anhidro como catalizador, para obtener buenos rendimientos y glicósidos de configuración α , fundamentalmente (Brown *et al*, 1991) (**Esquema VIII**).



Esquema VIII

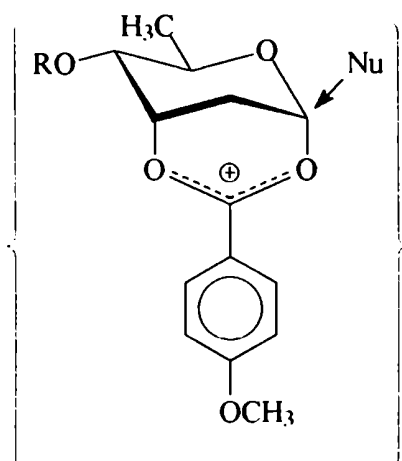
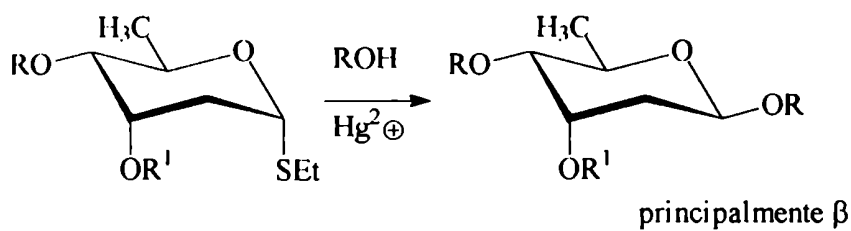
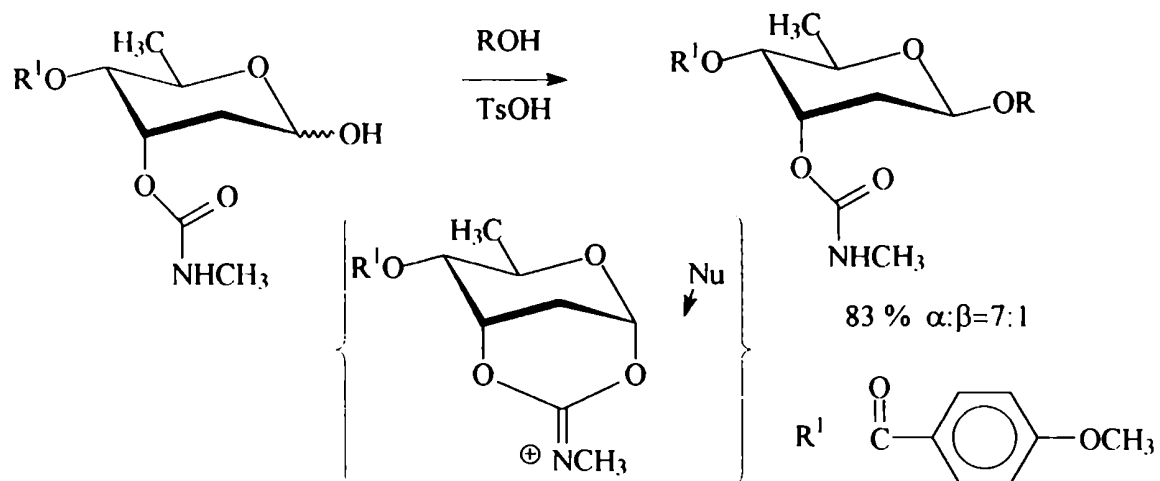
c) En la búsqueda de glicósidos β se desarrolló una metodología basada en la introducción de un hidrógeno anomérico *vía* la química de radicales como el último paso, en una secuencia sintética donde la unión glicosídica entre el oxígeno anomérico y la aglicona ya ha sido previamente formada. La metodología de Crich comienza con la preparación no estereocontrolada de glicósidos de ácidos ulosónicos. Luego por descarboxilación de Barton se forma un radical anomérico que reacciona con un átomo de hidrógeno de una especie dadora para obtener un glicósido β . Esta metodología es aplicable a glicósidos de 2-desoxiglucosa y 2-desoxigalactosa, con agliconas como colesterol, fenoles e hidratos de carbono. La proporción β : α mínima que se obtuvo fue de 8:1 y en general excedió 10:1. El único punto discutible de esta estrategia sintética es la dificultad de contar con los precursores de ácido ulosónico (Crich *et al*, 1988; 1989; 1990; 1993).

En cuanto a la metodología de Kahne se parte de una 2-desoxilactona que se convierte a la tionolactona, y a partir de ella se obtiene el monotio *orto* éster glicósido por adición de yoduro de metilo y metanol. Luego por reducción con hidruro de tributil estaño se obtiene el glicósido β selectivamente. La limitación en el método de Kahne es la síntesis del monotio *orto* éster y su precursor tionolactona (Kahne *et al*, 1988) (**Esquema IX**).



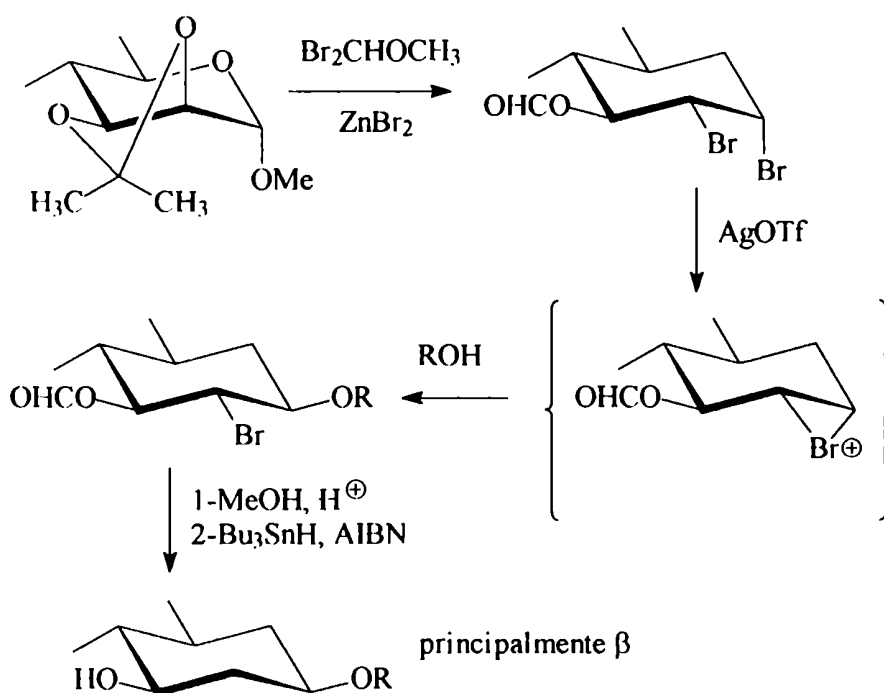
Esquema IX

d) Una metodología muy interesante para la síntesis de glicósidos de configuración β se ha desarrollado a partir de 2-desoxiazúcares sustituidos en C-3 con derivados de ésteres benzoicos o uretanos. Es obvio que no cualquier 2-desoxiazúcar, aunque esté convenientemente sustituido en C-3, servirá para inducir glicósidos de configuración β , deberá tener un grupo hidroxilo en C-3 de configuración opuesta a la que hallamos en las series *gluco* o *galacto* (Brinkley *et al*, 1988). Tanto un éster benzoico como un uretano en C-3 pueden estabilizar un centro anomérico cargado, bloqueando así la cara α en el paso de glicosidación. Se puede hablar en este caso de asistencia anquimérica 1,3 (Tsai *et al*, 1984; Wiesner *et al*, 1985) (**Esquema X**).

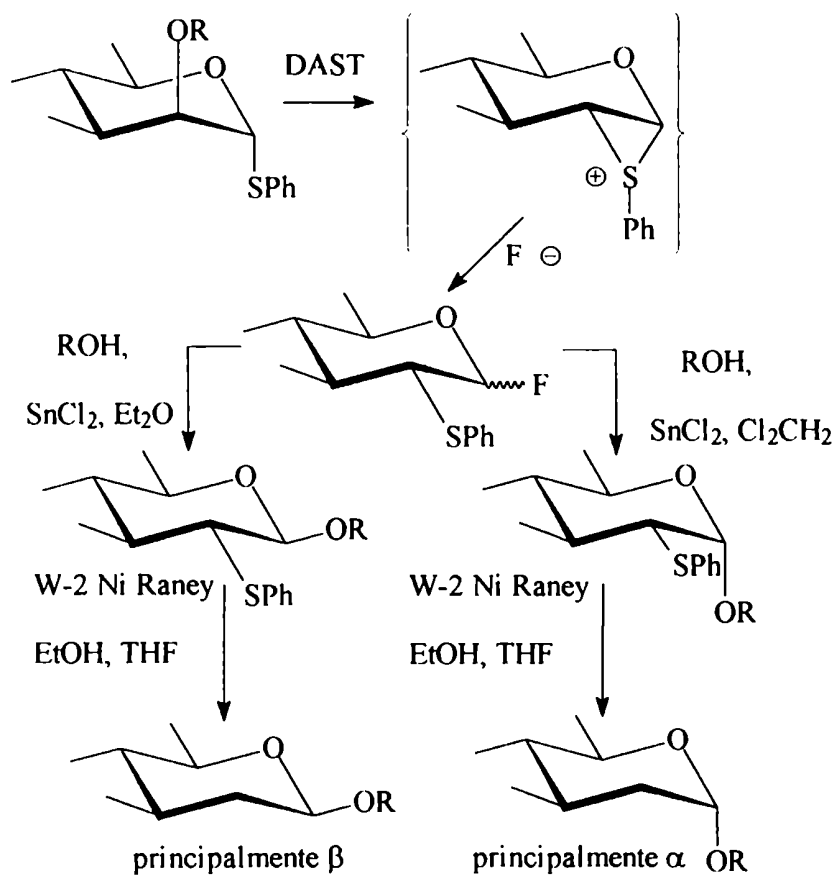


Esquema X

e) Se han desarrollado una serie de métodos que comparten una idea común a todos basada en la introducción de un heteroátomo ecuatorialmente en C-2 como sustituyente, que guía el curso estereoquímico de la glicosidación por asistencia anquimérica, y que luego es removido por reducción para obtener glicósidos de configuración β (Thiem *et al*, 1979, 1982, 1985, 1987 a, 1987 b; Beau *et al*, 1989; Ogawa *et al*, 1987; Frank *et al*, 1990, 1992, 1993; Nicolau *et al*, 1986, 1991; van Boom *et al*, 1993). En los trabajos de Thiem se introducen estereoselectivamente dos átomos de bromo en C-1 y C-2 respectivamente como paso clave, formándose bromuros de 2-bromo-2-desoxiglicosilo, que son glicosidados usando AgOTf como catalizador para dar fundamentalmente glicósidos de configuración β luego de una debromación reductiva sobre C-2 (**Esquema XI**). Nicolaou en cambio demostró que los feniltioglicósidos poseen una gran facilidad y selectividad para dar migraciones 1,2 en presencia de fluoruro de dietilamino sulfuro (DAST) obteniéndose fluoruros de 2-desoxi-2-feniltio-glicosilo. Luego pueden seguirse dos alternativas, por catálisis de SnCl₂ en Cl₂CH₂ se obtienen preferencialmente glicósidos de configuración α , mientras que si se cambia el solvente por éter etílico se logran preferencialmente glicósidos de configuración β (**Esquema XII**).



Esquema XI



Esquema XII

f) Otra alternativa ha sido la glicosidación enzimática para la obtención de 2-desoxiglicósidos. Si bien no se dispone de muchas glicosiltransferasas de origen microbiano que transfieran específicamente desoxiazúcares, estos sustratos se han transferido con éxito mediante el uso de galactosiltransferasas (GalT) como biocatalizadores. También se han ensayado fucosiltransferasa (FucT) y N-acetil glucosaminil-1-transferasa (GnT-I) con desoxiazúcares como aceptores de glicosilo. En muchos casos se ha demostrado que estas enzimas reconocen tanto a los dadores de glicosilo como a los aceptores (Gokhale *et al*, 1990; Srivastava *et al*, 1990; Kajihara *et al*, 1995).

Se realizó un estudio de glicosidación de galactopiranósidos desoxigenados alternativamente en C-3, C-4 y C-6, empleando como enzima de transferencia de glicosilo una fucosiltransferasa clonada, y se observó que algunos desoxiazúcares eran reconocidos y glicosidados, como los análogos 6-desoxi. Otros se comportaban como inhibidores, como los análogos 3-desoxi y otros en cambio actuaban como sustrato e inhibidor, como los análogos 4-desoxi (Hindsgaul *et al*, 1994; 1996).

También se han realizado estudios de especificidad de sustrato sobre galactosiltransferasas en términos de dadores y aceptores de glicosilo en procesos de glicosidación enzimática (Hindsgaul *et al*, 1993; Kajihara *et al*, 1995; Whitesides *et al*, 1982).

El grupo de Thiem y Wiemann logró transferir un desoxiazúcar análogo (2-desoxigalactosa) del sustrato natural (galactosa) empleando la enzima comercial $\beta(1\rightarrow4)$ -D-galactosiltransferasa (GalT) como agente glicosidante. Prepararon 2'-desoxi-N-acetilglucosamina por glicosidación con UDP-2-desoxi-D-galactosa de N-acetilglucosamina en presencia de GalT. Este ejemplo es particularmente importante ya que la glicosiltransferasa logró convertir un sustrato análogo 2-desoxigenado en un glicósido de configuración β con alta eficiencia y sin participación de grupo alguno en C-2 (Thiem *et al*, 1991; 1992). También se han realizado estudios para evaluar los parámetros cinéticos de la UDP-2-desoxigalactosa y se ha hallado que son idénticos a los del sustrato natural UDP-galactosa (Srivastava *et al*, 1993).

RESULTADOS Y DISCUSION

CAPITULO 4

Síntesis de 2-desoxi-D-*lixo*-hexono-1,4-lactona (2-desoxi-D-galactono-1,4-lactona) y de 2-desoxi-D-*lixo*-hexofuranósidos (2-desoxi-D-galactofuranósidos).

Los desoxiglicósidos, análogos de glicósidos, son útiles para llevar a cabo estudios de especificidad de glicosidasas y glicosiltransferasas. Estos análogos desoxigenados pueden comportarse como sustratos o como inhibidores, o pueden no interactuar con la enzima en cuestión. En todos los casos estarán brindando información sobre la importancia del HO faltante en la interacción proteína-sustrato. Las galactofuranosidasas y las galactofuranosiltransferasas son en particular de gran interés, debido a que están involucradas tanto en el metabolismo como en la construcción de glicoconjugados importantes en bacterias patógenas, protozoos y hongos (Lederkremer y Colli, 1995). Debido a que la galactosa no se halla presente en la configuración furanósica en glicoconjugados de mamíferos, estas enzimas constituyen un buen blanco para el desarrollo de agentes antimicrobianos. En base a lo recién expuesto, en nuestro grupo de trabajo se han estudiado diferentes aspectos de la exo β -D-galactofuranosidasa de *P. fellutanum*, con el propósito de entender el mecanismo de interacción enzima-sustrato. Se han sintetizado sustratos (Varela *et al*, 1986; Marino *et al*, 1995), inhibidores (Marino *et al*, 1998; 2001), y recientemente se ha estudiado la influencia de los inhibidores en el cultivo de microorganismos (Mariño *et al*, 2002). Además se ha diseñado un sistema de purificación de la enzima basado en la cromatografía de afinidad (Miletti *et al*, 1999).

En relación a su especificidad resultaba interesante conocer el comportamiento de los 2-desoxigalactofuranósidos como sustratos o inhibidores de la β -D-galactofuranosidasa dado que el metil 2'-desoxi- β -lactósido es un potente inhibidor de la β -D-galactopiranosidasa (Bock *et al*, 1990).

En trabajos anteriores se obtuvo la per-O-benzoil- α,β -D-galactofuranosa como derivado cristalino por benzoilación directa a alta temperatura de D-galactosa y

posterior cristalización (D'Accorso *et al*, 1983). La mezcla de benzoatos furanósicos obtenida se utilizó para la preparación de glicósidos y disacáridos de galactofuranosilo (Lederkremer *et al*, 1990). La sencillez del procedimiento nos impulsó a intentar la benzoilación de 2-desoxi-D-galactosa comercial con el objetivo de lograr los benzoatos furanósicos. Sin embargo, y a diferencia de los resultados obtenidos con la D-galactosa, en cuyo caso se obtuvo mayoritariamente un derivado furanósico, en el caso de la 2-desoxi-D-galactosa el resultado no fue de utilidad, ya que se obtuvo una baja proporción de formas furanósicas, un 30 % aproximadamente según pudo estimarse por datos de espectros de RMN ^{13}C (Figura 1). Este resultado nos motivó a planear una estrategia alternativa para sintetizar los glicósidos de 2-desoxi- β -D-galactofuranosa.

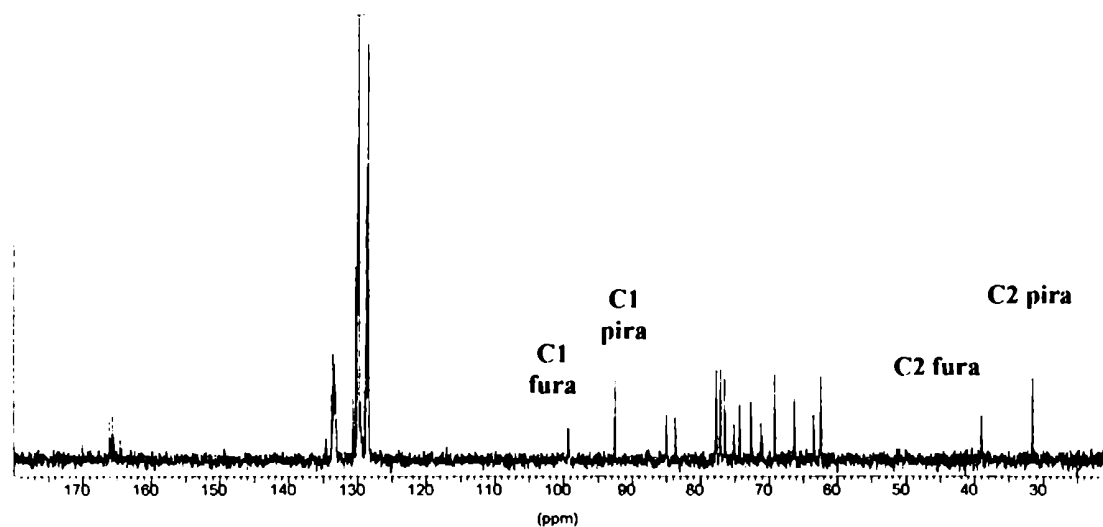


Figura 1. Espectro de RMN de ^{13}C de 2-desoxi-D-galactosa benzoilada.

La estrategia se basó en emplear D-galactono-1,4-lactona (1) como precursor del anillo furanósico, aprovechando la reactividad diferencial del HO-2 respecto de los otros grupos HO, debido al efecto inductivo β del grupo carbonilo. Es bien conocido el orden de reactividad en las aldohexosas, siendo el HO-6 el más reactivo de todos. En cambio, en las aldono-1,4-lactonas la reactividad de HO-2 es bastante similar a la presentada por HO-6, mientras que el resto de los HO se muestran

menos reactivos, y en particular en la configuración D-galactofuranosa el HO-3 es aparentemente el menos reactivo de todos frente a las reacciones de acilación. La selectividad entre HO-2 y HO-6 presentó un problema dado que no es posible diferenciar entre estos dos grupos con los protectores más comunes, como el grupo benzoilo. Nuestro objetivo era obtener un derivado de **1** con el HO-2 sustituido selectivamente y diferenciado del HO-6 para generar más tarde la posición desoxigenada sobre C-2. Se evaluaron varios grupos y estrategias protectoras que permitieran diferenciar a ambos hidroxilos, y que además soportaran las condiciones de reacción subsiguientes. La más prometedora se basó en la protección de los HO-5 y HO-6 como isopropilidén derivado. Estos hidroxilos se hallan dispuestos fuera del ciclo en la D-galactono-1,4-lactona (**1**) y presentan entonces una mayor reactividad por estar poco afectados por el impedimento estérico del resto de la molécula. Además, los hidroxilos de C-2 y C-3 muestran una disposición relativa *trans*, dificultando así la formación de un derivado isopropilidén en esa posición. Se procedió entonces a tratar D-galactono-1,4-lactona (**1**) con una mezcla 1:1 de 2,2-dimetoxipropano:acetona con catálisis ácida de H₂SO₄ (c). La 5,6-di-O-isopropilidén-D-galactono-1,4-lactona (**2**) se obtuvo con buen rendimiento y con propiedades concordantes con las descritas (Fleet *et al*, 1988) (**Esquema 1**). Se logró así diferenciar a HO-2 de HO-6, y proteger simultáneamente HO-5. El crudo de la reacción se podía emplear directamente para la derivatización selectiva del HO-2.

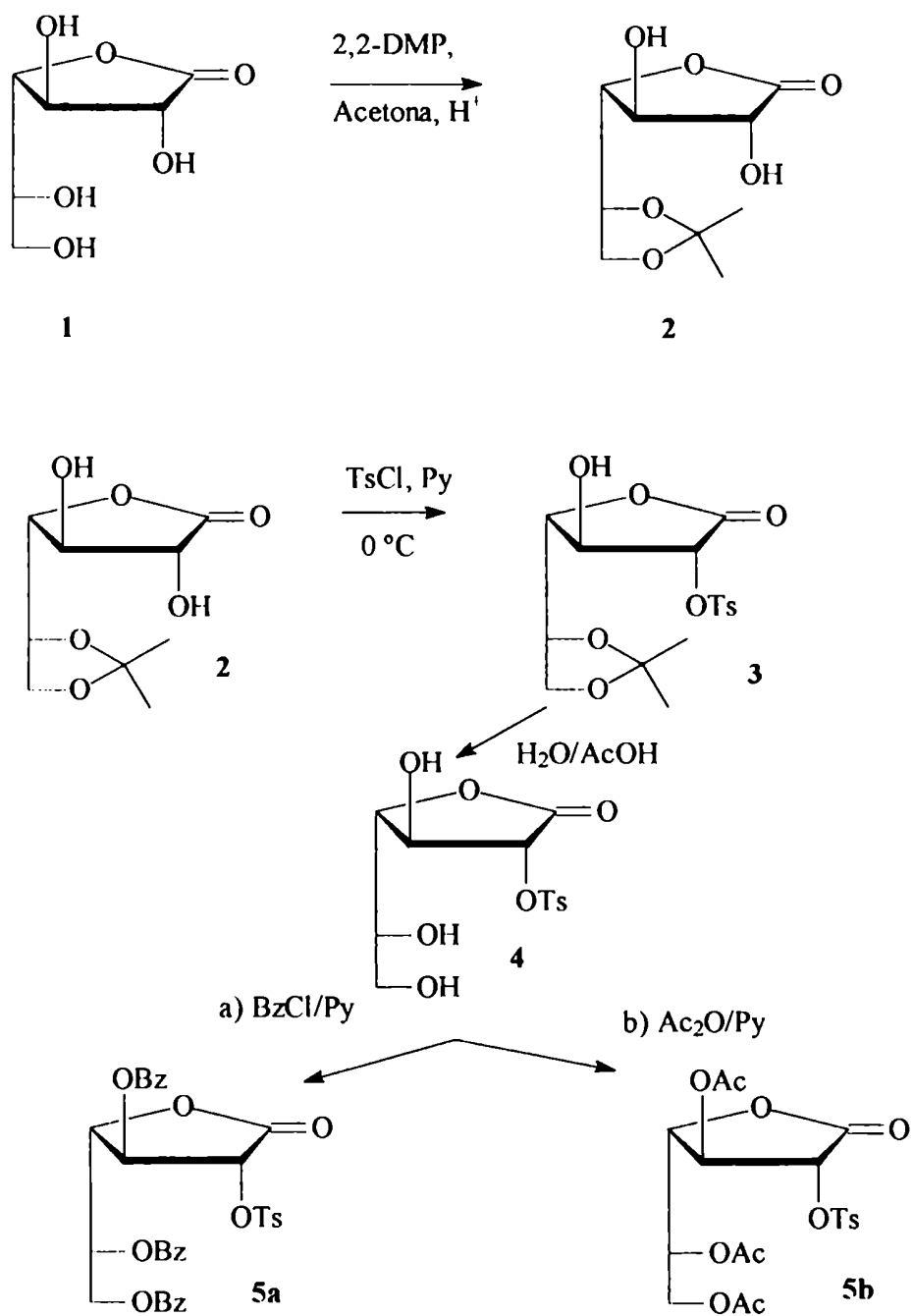
Era necesario convertir dicho HO en un grupo que fuera fácilmente reemplazable, pensando en una futura reacción de desoxigenación sobre C-2, y que además no interfiriera con la estabilidad de la lactona parcialmente protegida. El derivado 2-desoxi-2-bromado, que sería un precursor de 2-desoxiazúcar, no se puede obtener dado que los HO-2 y HO-3 se hallan relativamente en posición *trans*, y como requisito para esta sustitución se necesita que ambos hidroxilos se hallen en posición relativa *cis*, cosa que no ocurre para la configuración D-*galacto* (Bock *et al*, 1979).

Probamos también una estrategia que se basaba en la desoxigenación *vía* radicales libres. En la literatura se ha empleado esta metodología para sintetizar desoxiazúcares con buenos resultados, en particular derivados desoxigenados en C-

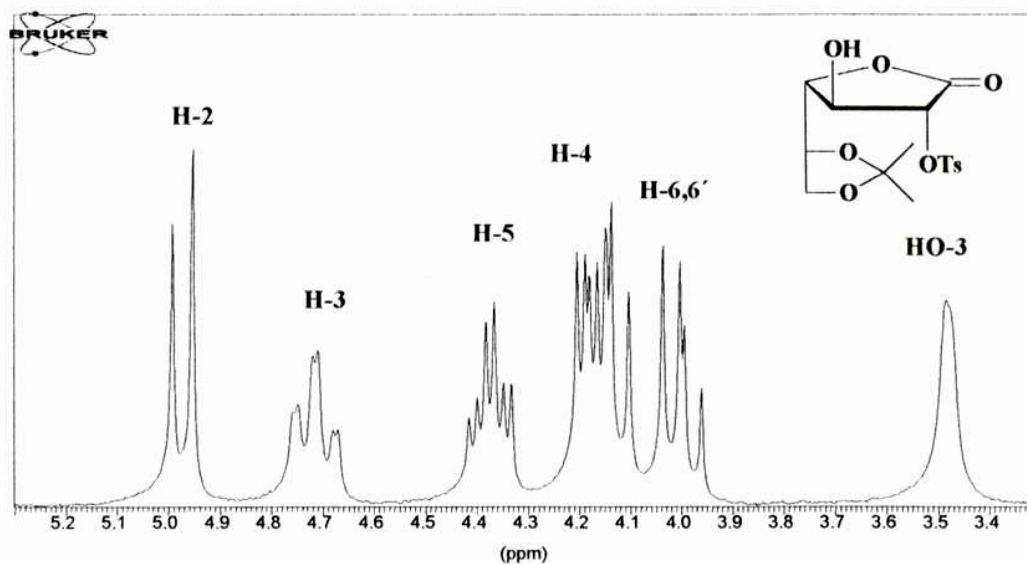
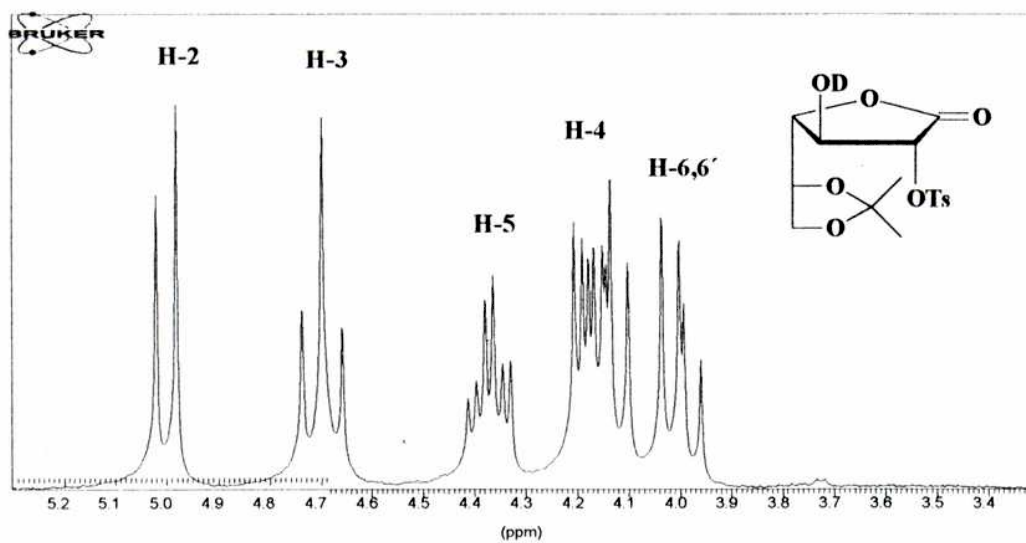
2 de D-galactopiranososa (Barton *et al*, 1993). Se intentó sintetizar un derivado de D-galactono-1,4-lactona (**1**) sustituido con un grupo xantato en C-2, a partir del isopropiliden derivado de la D-galactono-1,4-lactona. Fue imposible obtener un derivado monoxantilado en C-2, aislando siempre mezclas complejas de derivados mono sustituidos en C-2 ó C-3, y el derivado disustituído en ambos carbonos.

Se evaluó entonces la conveniencia de transformar dicho HO en un O-tosil derivado, considerando que éste se comportaría como buen grupo saliente. Se trató **2** disuelto en piridina con un equivalente de cloruro de 4-toluensulfonilo disuelto en acetona a 0 °C, y se procedió en forma similar al tratamiento seguido para las benzoilaciones. Como producto mayoritario de esta reacción se obtuvo regioselectivamente el derivado tosilado únicamente en HO-2 (**3**), sin detectarse productos de tosilación en HO-3 ni de ditosilación (**Esquema 1**).

Este hecho era de esperar debido a la diferencia de reactividad de ambos hidroxilos HO-2 y HO-3. Este resultado se pudo comprobar a partir de los datos de RMN ¹H (**Figuras 2 y 3**). La señal correspondiente a H-3 (4,69 ppm) se observaba acoplada ($J_{3,HO}$ 2,9 Hz) con la observada a 3,5 ppm correspondiente al HO-3, además este acoplamiento desapareció por el intercambio con D₂O. Las constantes de acoplamiento entre H-2 y H-3 no se habían modificado en **3** respecto de **2**. No se apreciaba epimerización en C-2, hecho que podría haber ocurrido debido a la acidez de H-2 al estar el C-2 sustituido tanto por un carbonilo de lactona como por un grupo O-tosilo, ambos muy electronegativos, capaces de ayudar a soportar una carga negativa en C-2.



Esquema 1

Figura 2. Espectro de RMN de ^1H de 3.Figura 3. Espectro de RMN de ^1H de 3 intercambiado con D_2O .

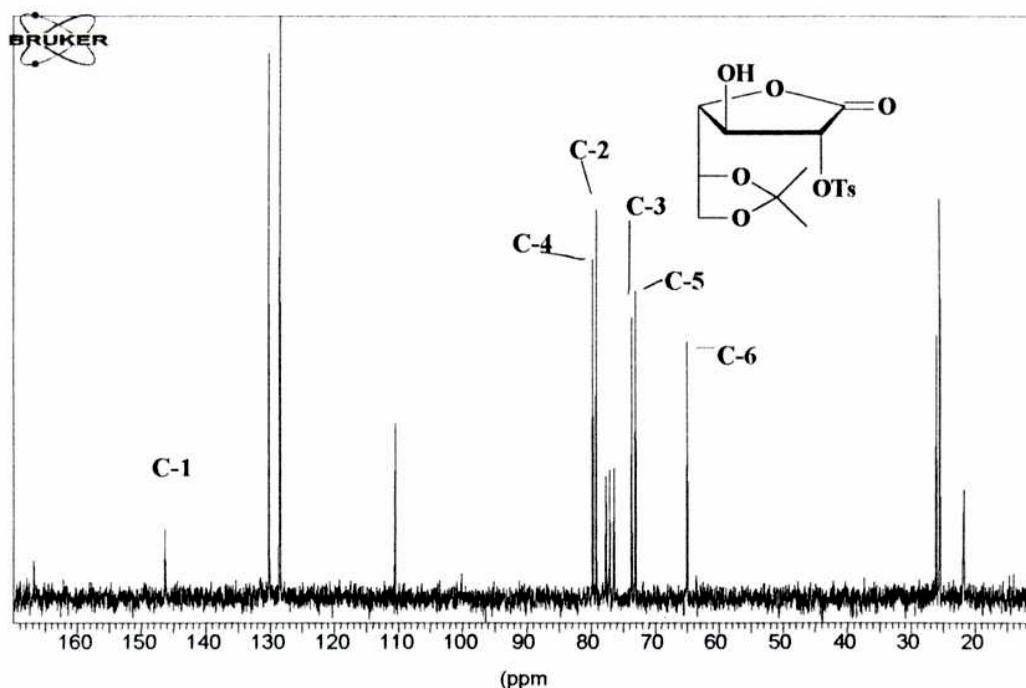
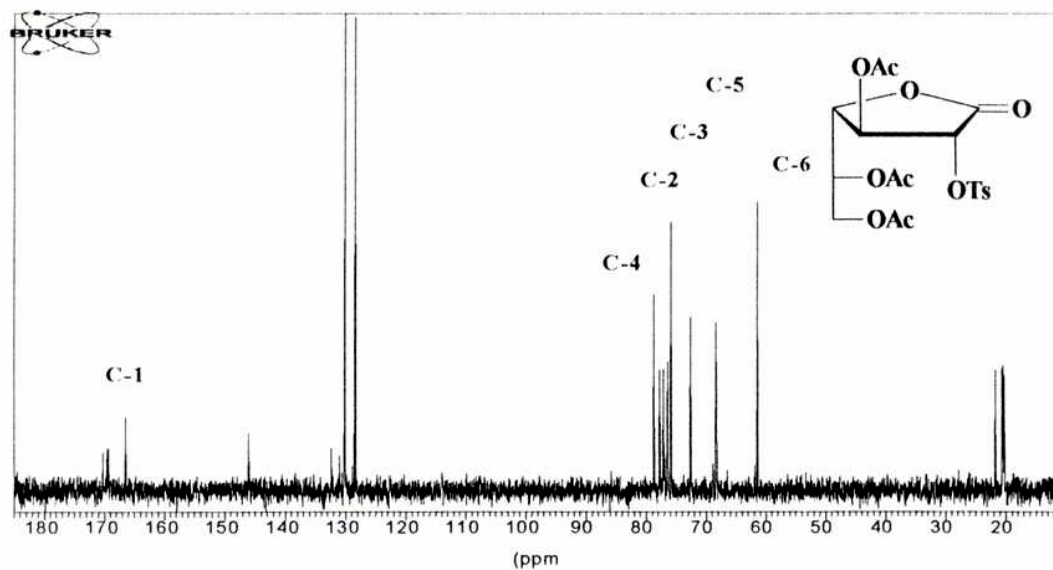
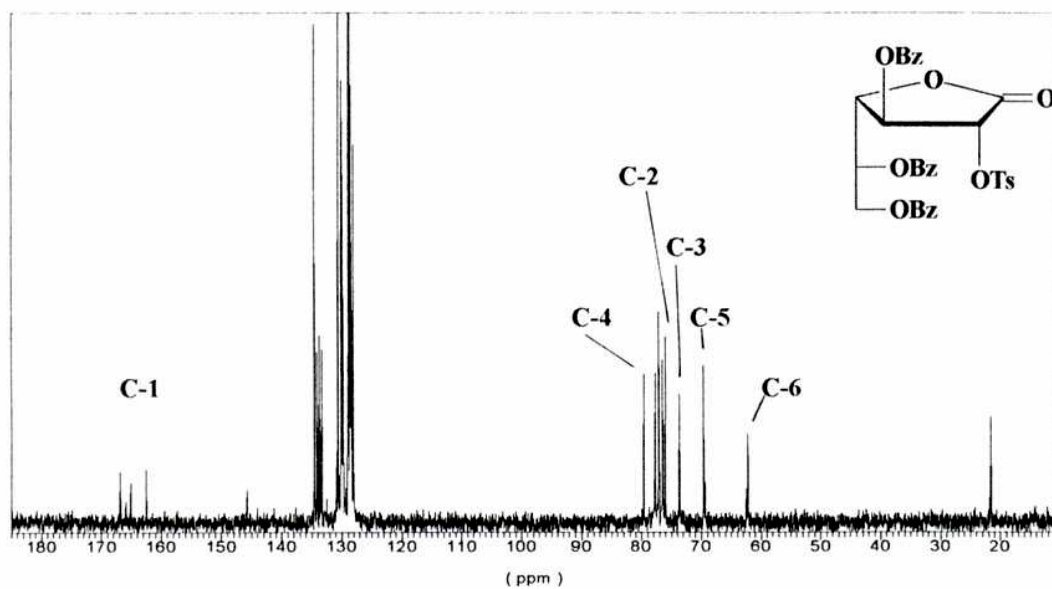


Figura 4. Espectro de RMN de ^{13}C de **3**.

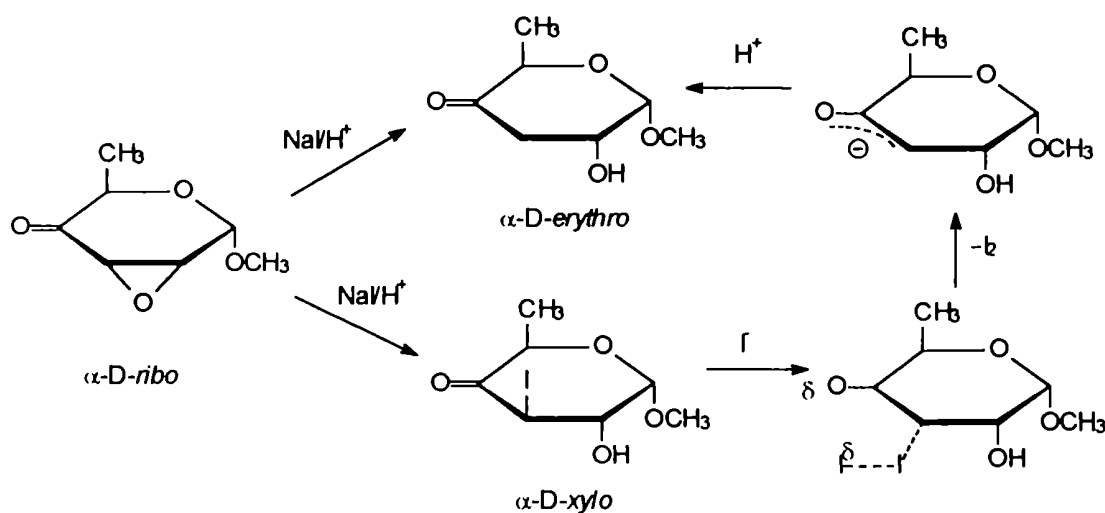
En cuanto a lo observado en el espectro de RMN ^{13}C de **3** (Figura 4) la señal correspondiente al C-2 se desplazaba a campos más bajos (79,1 ppm) con respecto a la señal de C-2 del compuesto **2** (74,6 ppm) debido al hecho de estar sustituido con el grupo 4-toluensulfonilo.

La lactona **3** nos permitía ahora fácilmente diferenciar y proteger al resto de los hidroxilos (HO-3, HO-5 y HO-6) para poder seguir adelante con la estrategia de desoxigenación. Se hidrolizó el grupo isopropilidén de **3** empleando ácido acético acuoso. Los hidroxilos libres (HO-3, HO-5, HO-6) se benzoilaron o acetilaron, según el caso, por reacción con cloruro de benzoilo o anhídrido acético en piridina, obteniéndose los compuestos peracilados **5a,b**, respectivamente, cuyos espectros de RMN ^{13}C se muestran en las Figuras 5 y 6.

Figura 5. Espectro de RMN de ^{13}C 5b.Figura 6. Espectro de RMN de ^{13}C de 5a.

Los derivados 2-O-tosilados de D-galactono-1,4-lactona (**5a,b**) ofrecían la posibilidad de generar un anión en C-2 que daría lugar a la desoxigenación vía la protonación del enolato.

En la literatura se había descrito la transformación de α , β -epoxiulosas en α -desoxiulosas, por acción de ioduro de sodio en acetona-ácido trifluoroacético, como se describe en el **Esquema 2** (Paulsen y Eberstein, 1976).

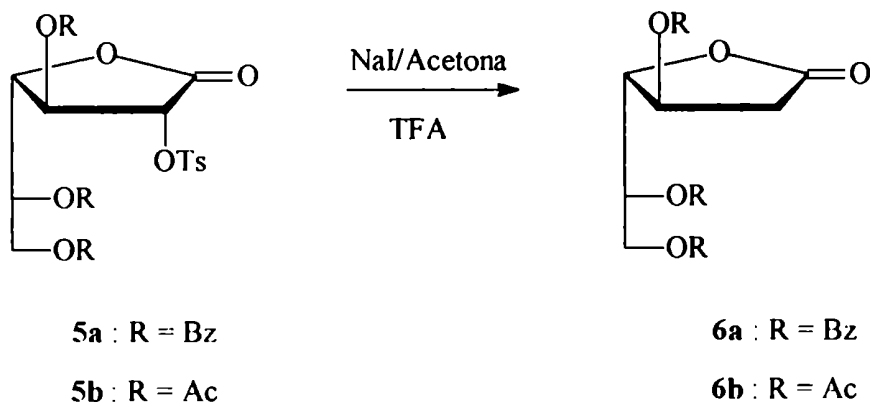


Esquema 2

Según Paulsen y Eberstein, el epóxido es abierto por un átomo de yoduro, dando origen a un intermediario tipo iodohidrina. Este yodo derivado es reducido al desoxi compuesto por la acción de un segundo yoduro para dar origen a una molécula de yodo y un anión enolizable, que se protona en el medio de ácido trifluoroacético. Como resultado de esta secuencia se logra desoxigenar la posición α al carbonilo que ocupaba previamente el oxígeno del grupo epóxido.

Se decidió someter a condiciones de reacción análogas a los derivados **5a,b**, asumiendo que el grupo tosilato se comportaría como un mejor grupo saliente en comparación con la apertura del epóxido.

Nuestra intención fue extender esta reacción a los derivados 2-O-tosilados de D-galactono-1,4-lactona **5a,b** para obtener así las 2-desoxilactonas correspondientes (**6a,b**) (**Esquema 3**).



Esquema 3

Se trató entonces a los compuestos **5a,b** con ioduro de sodio en presencia de ácido trifluoroacético (TFA) en solución de acetona y se obtuvieron las 2-desoxilactonas **6a,b** con un rendimiento del 70 %. Se observaba la aparición de yodo en el medio de reacción, confirmando que la reacción había transcurrido según lo esperado. El grupo tosilo en los compuestos **5a,b** se habría sustituido con yodo a través del ataque nucleofílico de un ioduro para transformarse en un 2-desoxi-2-yodo derivado, que por el ataque de un segundo ioduro con la liberación de yodo produjo en C-2 un anión α al carbonilo, que se estabilizó por enolización. La protonación en C-2 daba origen al derivado 2-desoxigenado (**Esquema 4**).

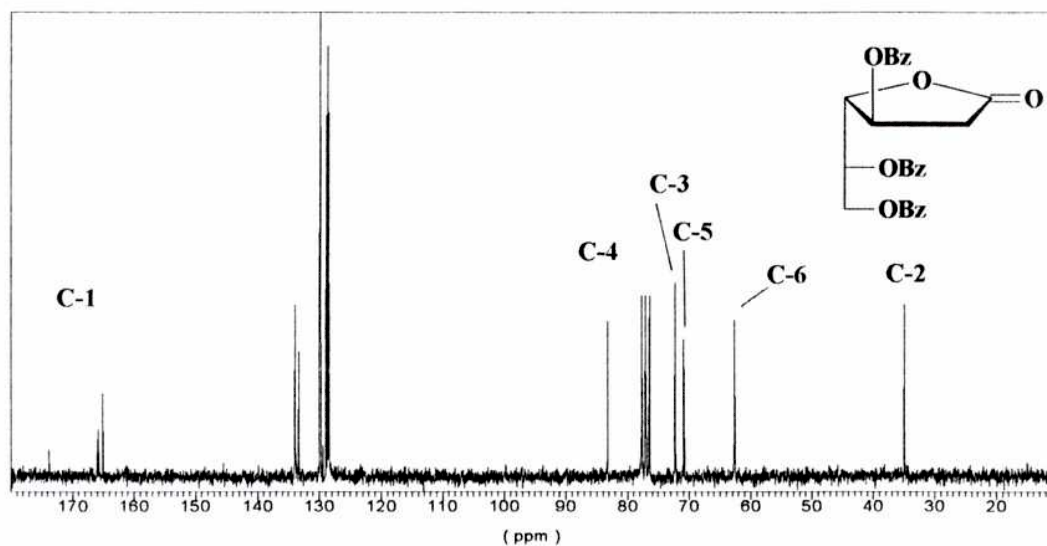


Figura 7. Espectro de RMN de ^{13}C de 6a

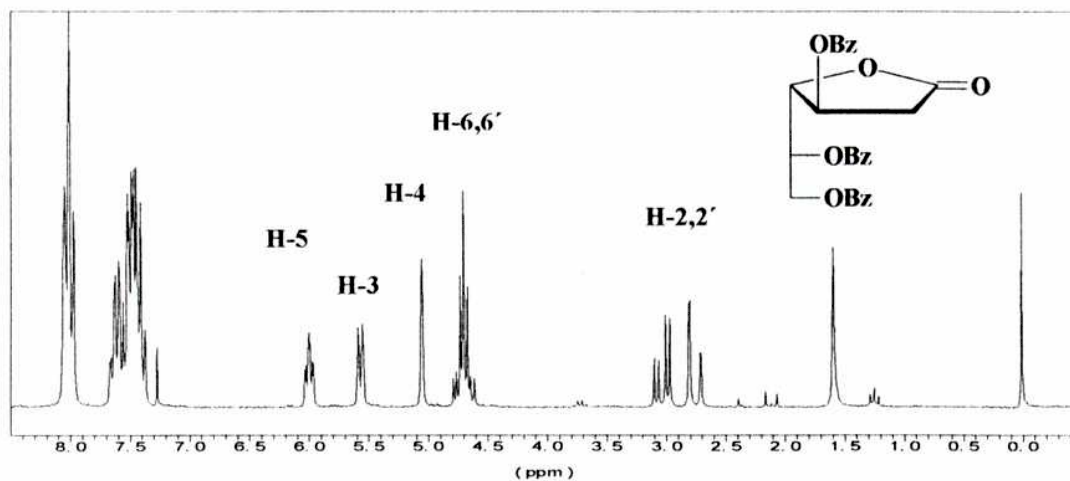
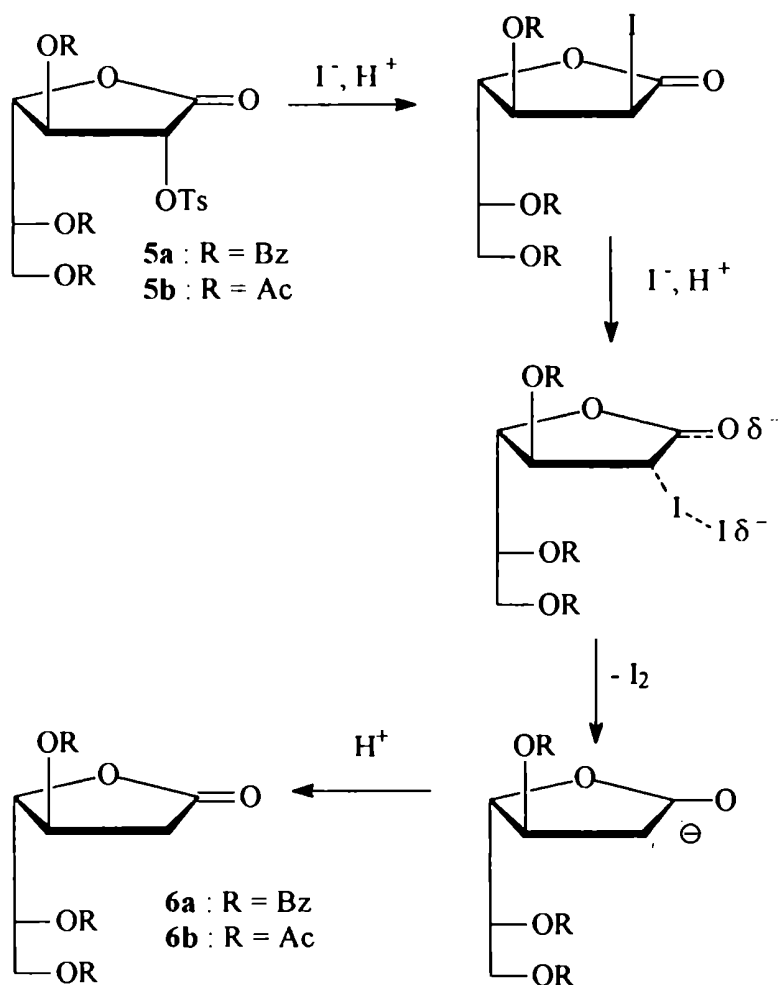


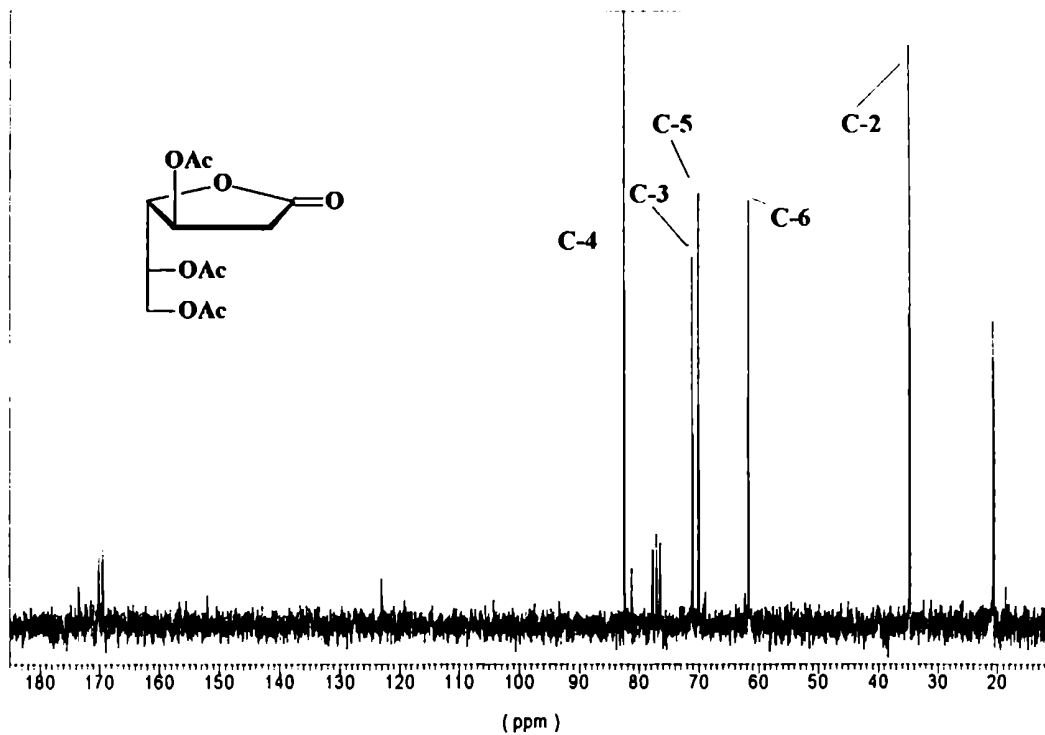
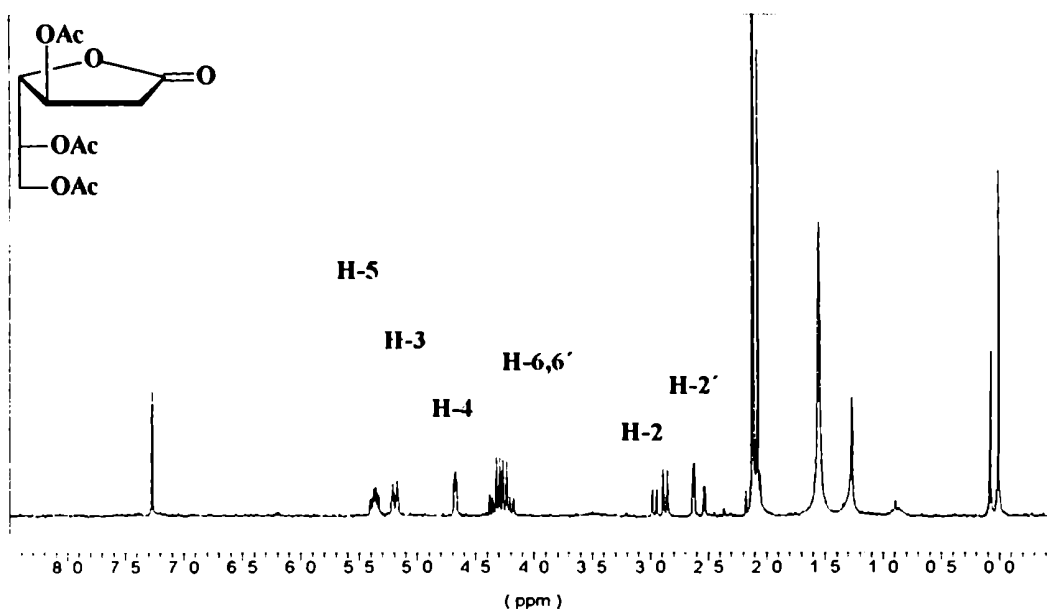
Figura 8. Espectro de RMN de ^1H de 6a

El análisis de los espectros de RMN ^1H nos permitió observar la presencia de dos dobles dobletes a campos altos, correspondientes a H-2,2', que presentaban una constante de acoplamiento característica ($J_{\text{gem}} \sim 18 \text{ Hz}$) (Tabla 1) (Figuras 8 y

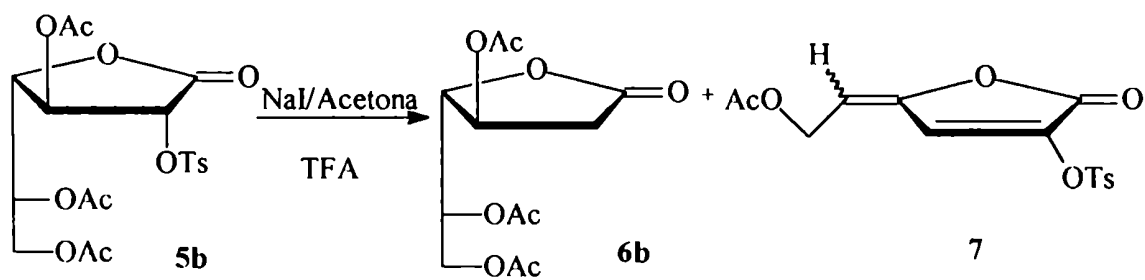
10). En el espectro de RMN ^{13}C las señales a 34,9 y 34,6 ppm correspondientes a C-2 (Tabla 2, Figuras 7 y 9) confirmaron las estructuras de las desoxilactonas **6a,b**.



Esquema 4

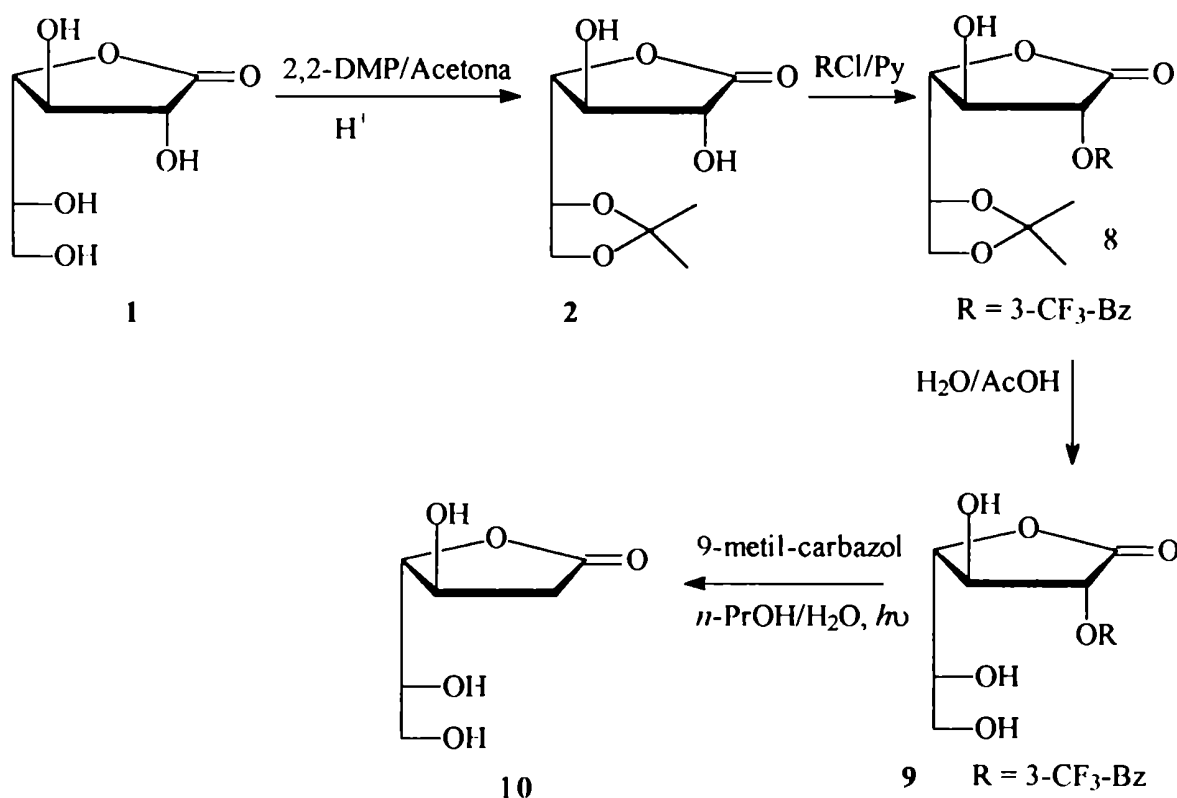
Figura 9. Espectro de RMN de ^{13}C de 6bFigura 10. Espectro de RMN de ^1H de 6b

En el caso del compuesto acetilado **5b** se obtuvo también el compuesto de β -eliminación **7**, identificado sobre la base de espectros de RMN ^{13}C de enonolactonas análogas (Marino *et al*, 1991) (**Esquema 5**).



Esquema 5

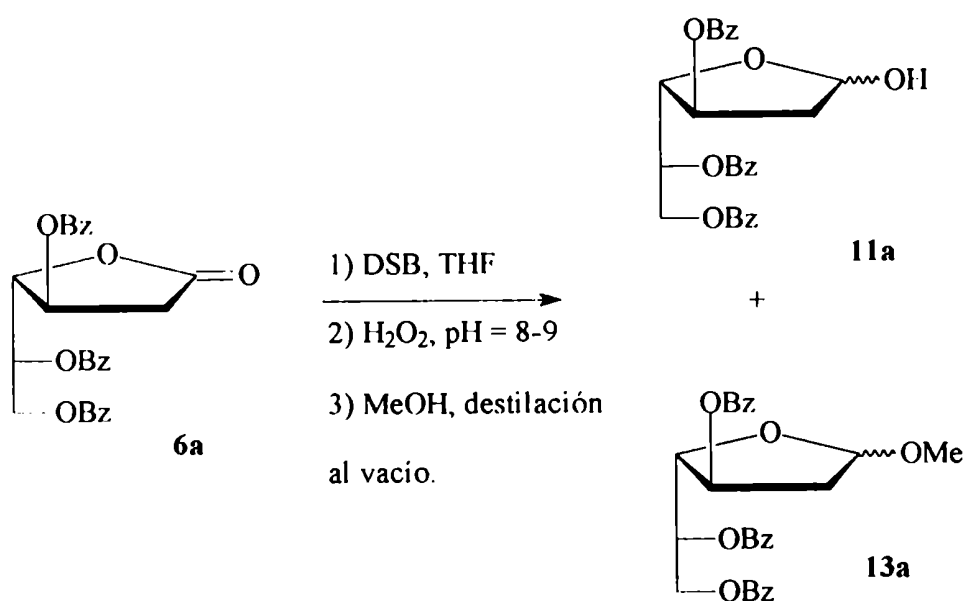
En nuestro laboratorio se llevó a cabo en forma paralela a este trabajo la desoxigenación de D-galactono-1,4-lactona (**1**) por una reacción de transferencia electrónica fotoinducida (PET) sobre el derivado sustituido en HO-2 por 3-(trifluorometil)-benzoato (**9**). Se utilizó 9-metil carbazol como fotosensibilizador y se obtuvo la 2-desoxi-D-galactono-1,4-lactona (**10**) con 88% de rendimiento (Chiocconi *et al*, 2002) (**Esquema 6**).



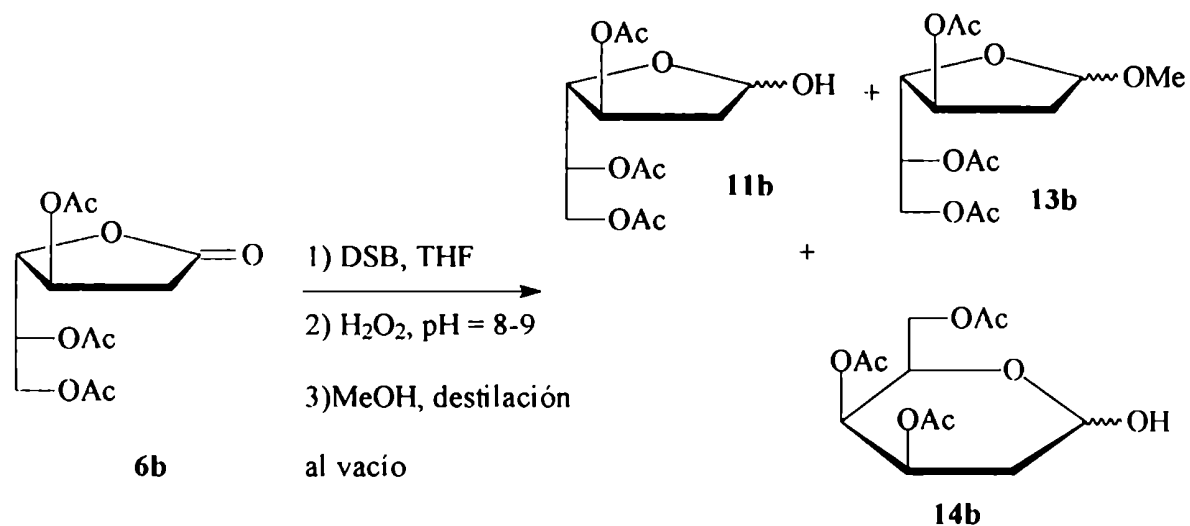
Esquema 6

El próximo paso en la estrategia consistió en la reducción de las lactonas **6a,b** para obtener los correspondientes lactoles **11a,b**, empleando diisoamilborano como reductor (Lerner, 1972). La reacción se trató como de costumbre, y el ácido bórico se eliminó por sucesivas evaporaciones con metanol. Al analizar la mezcla cruda por cromatografía en capa delgada se observó la presencia del lactol libre como producto principal y la aparición de un producto minoritario de menor polaridad, que fue aislado cromatográficamente y se caracterizó como la mezcla anomérica de los metil glicósidos **13a,b** (Figura 11) (15 %) (Esquema 7).

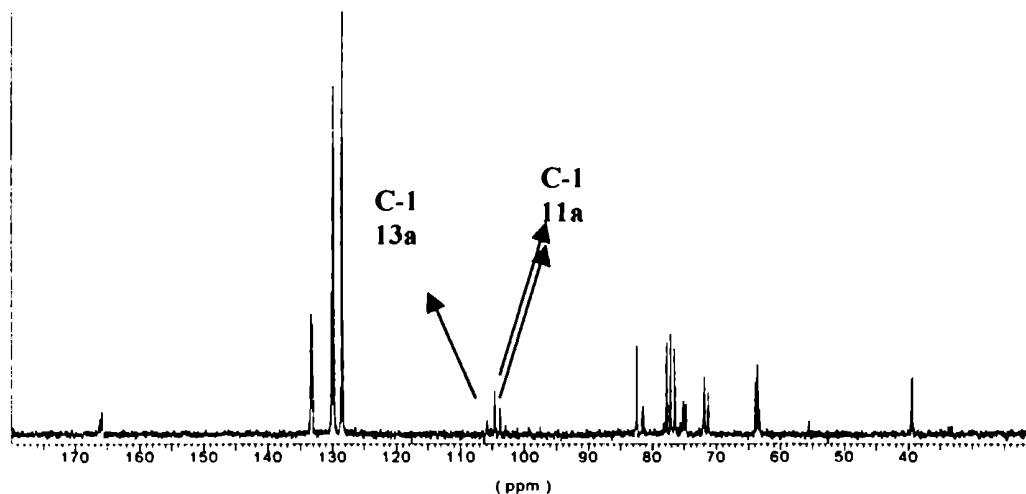
Cuando se redujo la lactona acetilada **6b** se observó el reordenamiento al lactol piranósico **14b** (Esquema 8) que ocurría en el proceso de corte de la reacción de reducción por migración del grupo acetato de C-5 a C-4. Además se podía observar que aparecía algo de metil glicósido (**13b**) como en el caso de la lactona benzoilada.



Esquema 7

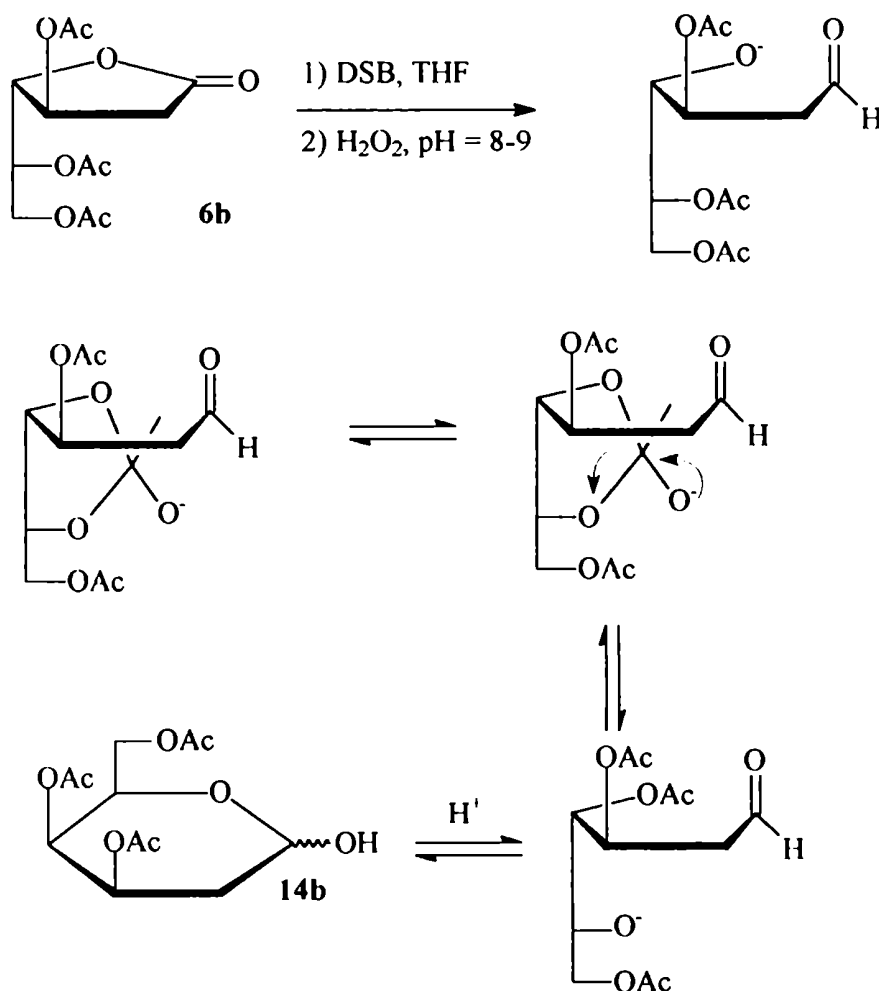


Esquema 8

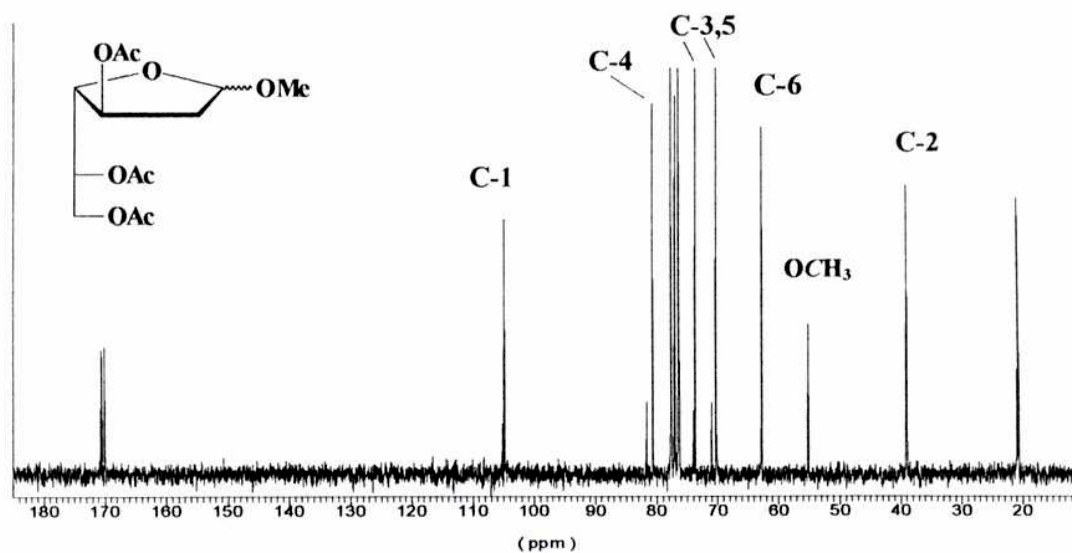
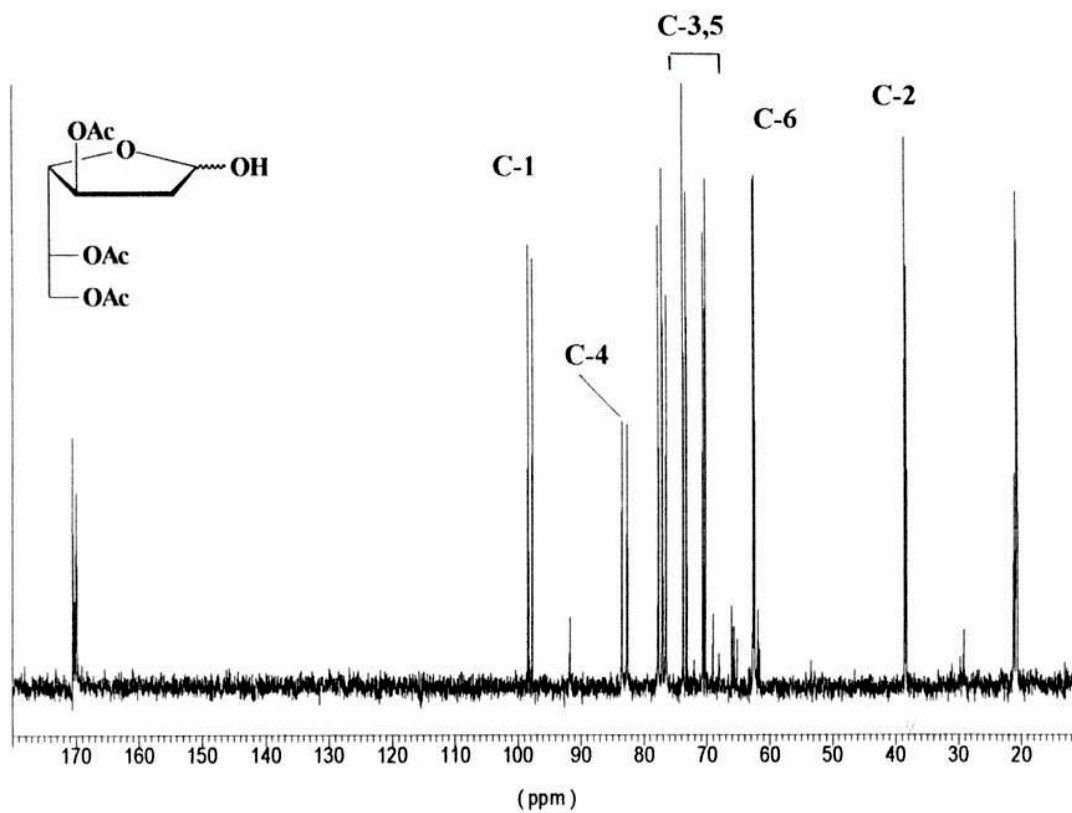
Figura 11. Espectro de RMN de ¹³C del producto de reducción de 6a con DSB

Estas migraciones suelen observarse en acetatos pero no es tan común observarlas en benzoatos (Esquema 9).

El crudo de la reducción se separó cromatográficamente en columna de sílica gel, eluyendo con una mezcla de tolueno:AcOEt (95:5). Se aislaron tres fracciones principales. Una primera fracción poco polar de mayor movilidad que las otras que correspondía a la mezcla de los metil glicósidos furanósicos acetilados (**13b**) (**Figura 12**),



Esquema 9

Figura 12. Espectro de RMN de ¹³C de 13b α y 13b β Figura 13. Espectro de RMN de ¹³C de 11b

otra fracción más polar, que eluía luego del metil glicósido anterior (**13b**), y que a juzgar por los espectros de RMN ^{13}C de la misma se trataba de la mezcla anomérica de configuración furanósica del lactol, obtenido por reducción (**11b**) (**Figura 13**). El compuesto se obtenía en una proporción menor al 40 %. Por último se aisló una fracción más polar que las anteriores, en proporción semejante a la correspondiente a la fracción de furanosas, que por análisis de los espectros de RMN ^{13}C correspondientes indicó que se trataba de las piranosas (**14b**) (**Figura 14**).

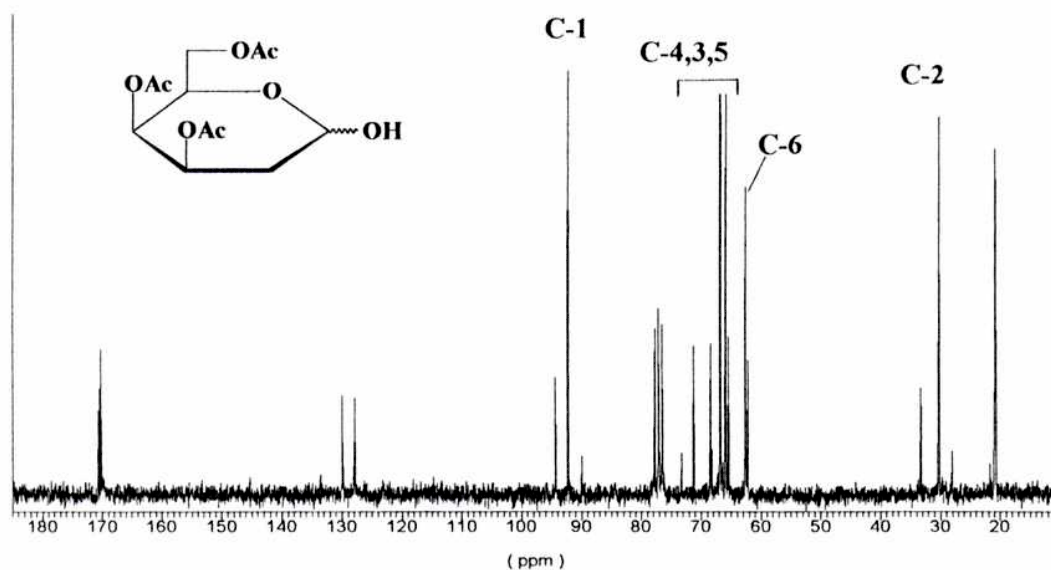
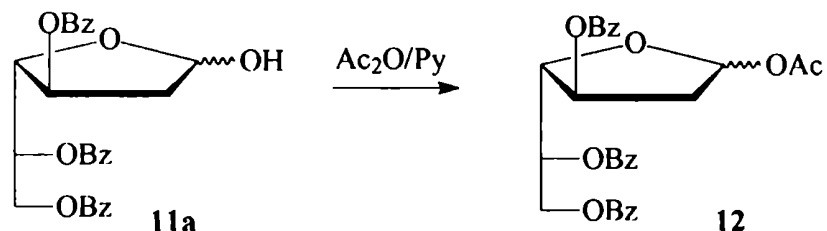


Figura 14. Espectro de RMN de ^{13}C (200 MHz) de **14b**.

Tanto este hecho, como así también la β -eliminación de **5b** durante la reducción con NaI, nos llevaron a escoger la ruta de los derivados benzoilados como la mejor secuencia sintética en lugar de la que se basaba en los análogos acetilados.

El lactol **11a** se acetiló en condiciones standard con anhídrido acético-piridina para dar **12** (**Esquema 10**) con el propósito de activar al hidroxilo anomérico para la

glicosidación. El compuesto **12** obtenido como mezcla anomérica se caracterizó por RMN ^{13}C (Tabla 2).

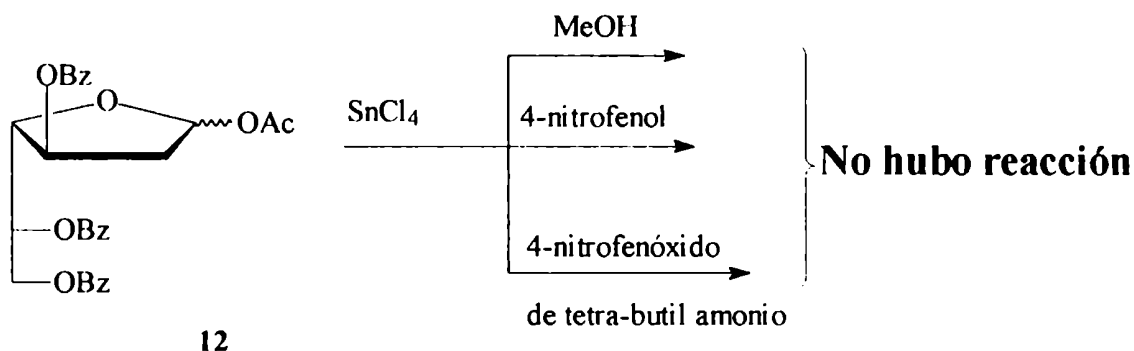


Esquema 10

Nuestro propósito ahora era obtener los glicósidos β , y para ello debíamos considerar que el sustrato sobre el cual íbamos a realizar la glicosidación era un 2-desoxi y carecía por lo tanto de un grupo participante en C-2. Por esta razón no se podía predecir la estereoselectividad de la reacción de glicosidación (**Esquema 11**).

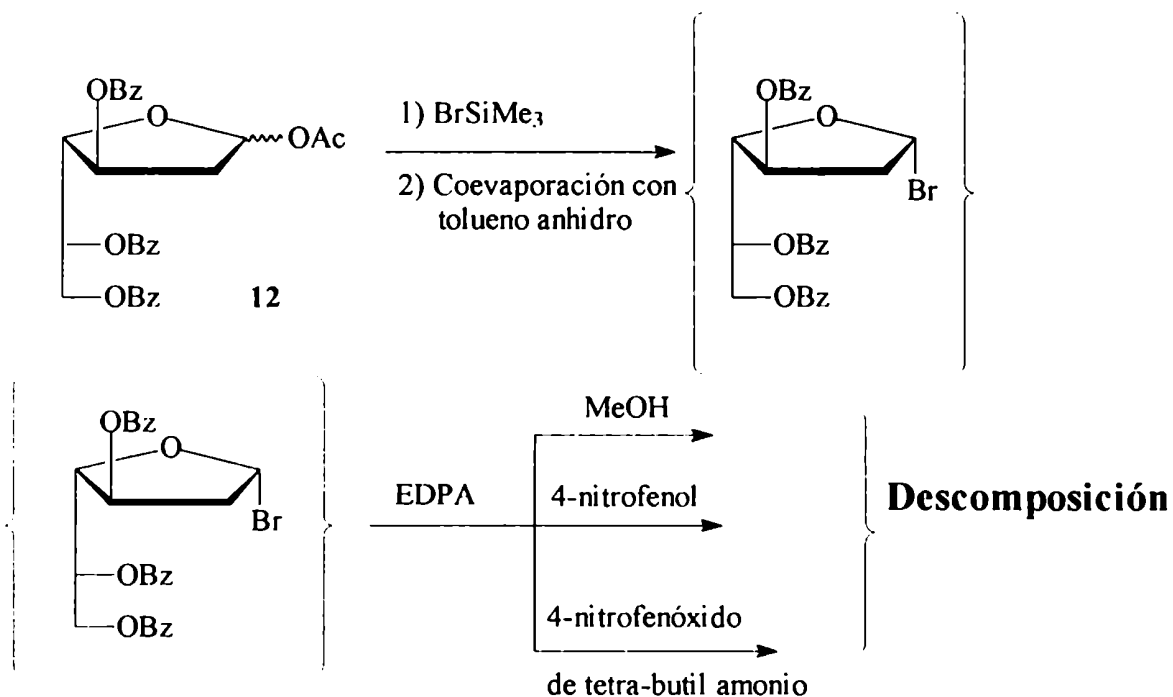
Se probaron los métodos de glicosidación *vía* SnCl_4 (Varela *et al*, 1986) y *vía* BrSiMe_3 (Marino *et al*, 1997), respectivamente. Ambos métodos habían sido usados ampliamente en nuestro laboratorio, y nos ofrecían una herramienta conocida y muy útil para obtener glicósidos de configuración β . Para la glicosidación se requería en ambos casos transformar al hidroxilo anomérico en el O-acetato **12**. Se intentó obtener el 4-nitrofenil glicósido para comparar la actividad de la enzima β -D-galactofuranosidasa con respecto al sustrato 4-nitrofenil 2-desoxi- β -D-galactofuranósido. Se trató el acetato anomérico **12** disuelto en Cl_2CH_2 con SnCl_4 , y luego se agregó el 4-nitrofenol. La reacción no mostró producto de glicosidación. Se probaron variantes en tiempo y cantidad de reactivos, pero no se logró hacer reaccionar al sistema. Decidimos entonces hacer más reactiva a la aglicona, y para ello trabajamos con la sal de tetrabutylamonio del anión 4-nitrofenóxido (Marino *et al*, 1995), en lugar de fenol, pensando que el anión iba a ser más reactivo, sin embargo no pudimos detectar productos de glicosidación. Podíamos concluir que el SnCl_4 no

era buen promotor para glicosidar **12**. Era evidente que la falta de asistencia anquimérica del sustituyente en C-2 disminuía notoriamente la reactividad del OH anomérico.



Esquema 11

Se probó entonces la glicosidación a través del bromuro de glicosilo. Para ello se hizo reaccionar **12** disuelto en Cl_2CH_2 con BrSiMe_3 (**Esquema 12**). Luego del aislamiento del bromuro de glicosilo se lo trató de glicosidar con 4-nitrofenol como aglicona y etil-diisopropil-amina (EDPA) como base para neutralizar el ácido bromhídrico liberado. Desafortunadamente el sistema resultaba muy inestable y se descomponía durante la reacción. Cuando se probó con la sal de tetrabutylamonio del 4-nitrofenóxido en lugar del 4-nitrofenol se obtuvieron resultados similares. Este hecho nos llevó a considerar otras alternativas sintéticas para la glicosidación.



Esquema 12

Previamente mencionamos que habíamos observado que al cortar la reducción con diisoamilborano en la obtención del lactol **11a,b**, y específicamente al arrastrar con metanol el ácido bórico, se formaba la mezcla anomérica de los metil glicósidos (**13a,b**). Era interesante la elevada reactividad del derivado furanósico hacia la glicosidación en condiciones similares a las del método de Fischer. Este hecho fortuito nos hizo pensar en la posibilidad de emplear trifluoruro de boro como catalizador de la glicosidación, y decidimos tratar directamente el producto de la reducción con el reactivo trifluoruro de boro-metanol ($\text{BF}_3 \cdot \text{MeOH}$), que incluía al

metanol como solvente y reactivo. Obtuvimos entonces, por una reacción en condiciones suaves, la mezcla anomérica de los metil glicósidos acilados buscados **13a** con un rendimiento del 90% y una proporción 1:1 de α : β como se determinó por el espectro de RMN ^{13}C (Figura 15, Esquema 13).

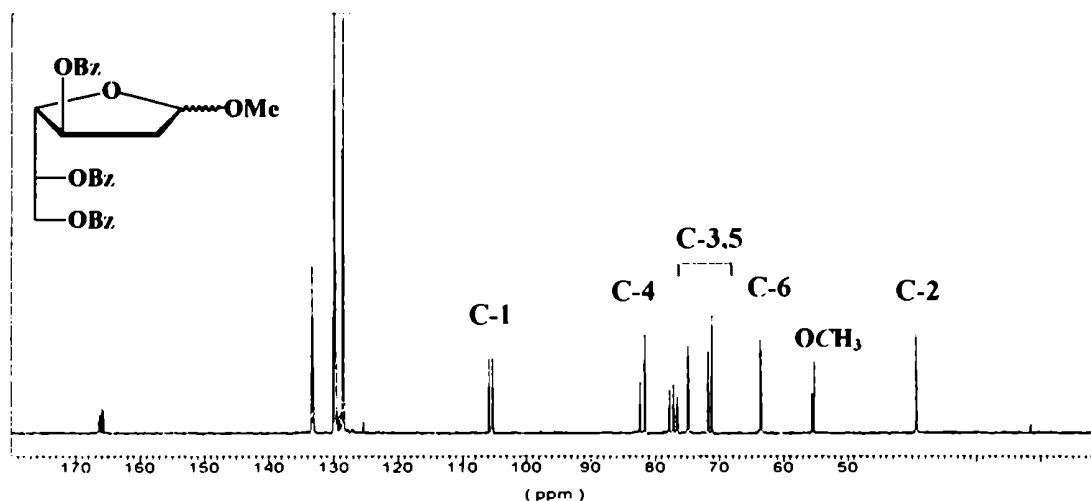
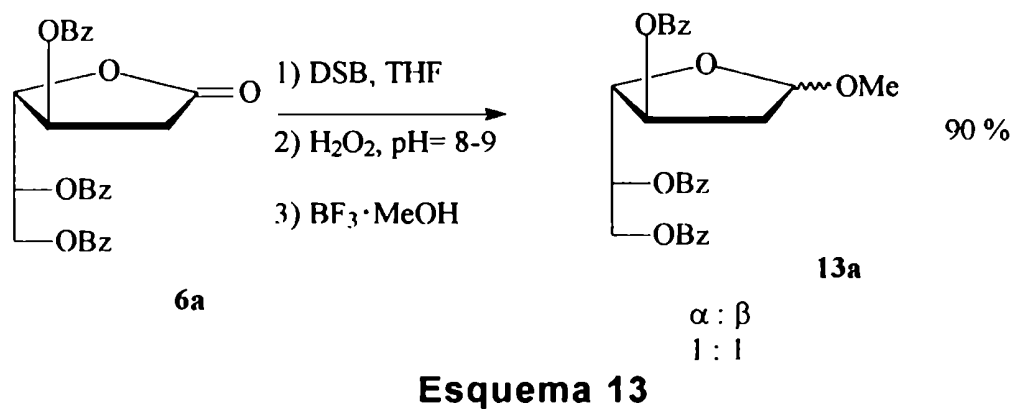
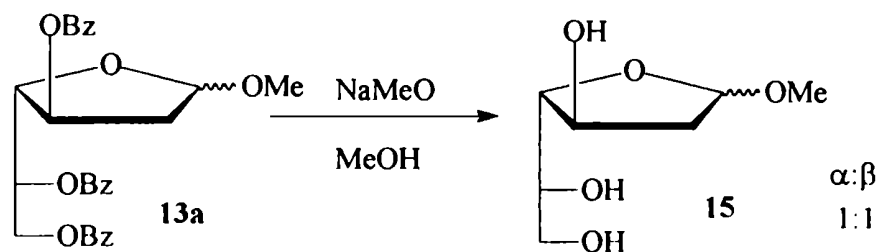


Figura 15. Espectro de RMN de ^{13}C de **13a**

La ausencia de estereoselectividad en esta reacción de glicosidación era esperable debido a la falta de grupo vecino participante que daría lugar sólo al anómero β . Por tratarse **13a** de una mezcla cromatográficamente homogénea no se pudo resolver como mezcla de benzoatos, mientras que **13b** (mezcla de acetatos) sí

pudo resolverse por cromatografía en columna. Aunque los espectros de RMN ^1H de ambos anómeros de **13b** eran casi idénticos debido a la ausencia de sustituyente en C-2, se pudo asignar satisfactoriamente la configuración anomérica sobre la base de las constantes de acoplamiento observadas en los espectros de RMN ^1H (**Tabla 1**).

La mezcla anomérica **13a** se desbenzoiló según las condiciones de Zemplen empleando metóxido de sodio en metanol para obtener la mezcla de anómeros de los glicósidos libres **15 α** y **15 β** (**Esquema 14**), que mostraban un comportamiento cromatográfico adecuado para separarlos por columna de sílica gel empleando AcOEt:MeOH 19:1 como solvente de elución. Durante la separación se descompusieron parcialmente los glicósidos debido a la hidrólisis del enlace glicosídico, muy inestable en esta familia de 2-desoxi-glicofuranósidos, hecho que se reveló por la aparición de 2-desoxi-D-galactosa como fracción cromatográfica más polar. Se aislaron dos fracciones de glicósidos. La más polar, con un 48% de rendimiento mostraba un $[\alpha]_D -65^\circ$, lo que sugería una configuración β del centro anomérico, confirmada por sus constantes de acoplamiento en el espectro de RMN ^1H (**Figura 16**), se trataba del metil 2-desoxi- β -D-lixo-hexofuranósido (metil 2-desoxi- β -D-galactofuranósido) (**15 β**) (**Tabla 1**). En efecto el H-2', dispuesto en una relación *trans* con ambos hidrógenos H-3 y H-1, nos indicaba que estos hidrógenos se hallaban orientados hacia la misma cara del anillo, de modo que la configuración no podía ser otra que β para este anómero. Mientras tanto, la fracción menos polar correspondía al metil 2-desoxi- α -D-lixo-hexofuranósido (metil 2-desoxi- α -D-galactofuranósido) (**15 α**), que se aisló con un 48% de rendimiento y dió un valor de $[\alpha]_D 40^\circ$ (**Figura 17**).



Esquema 14

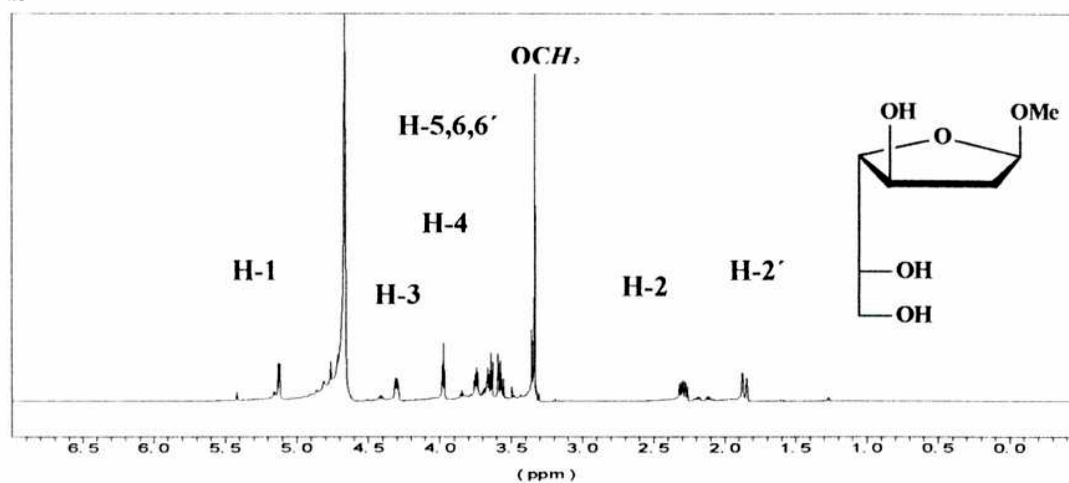


Figura 16. Espectro de RMN de ^1H (500 MHz) de 15β

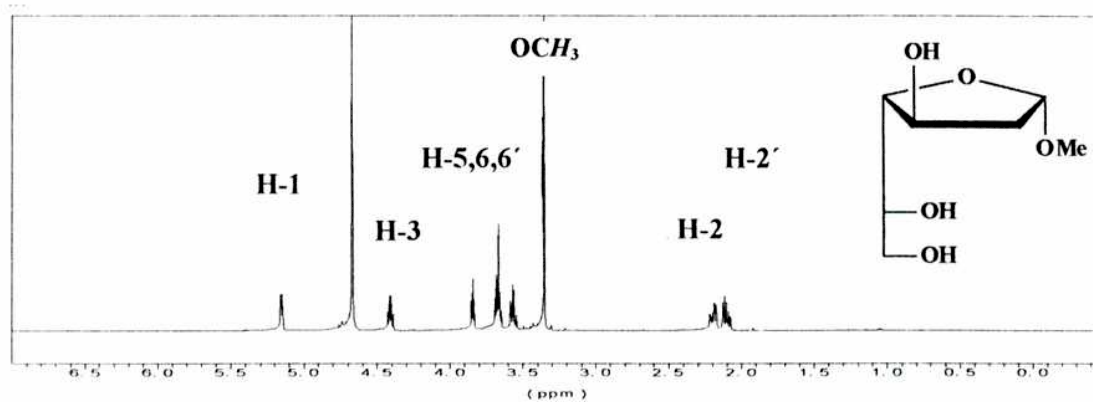
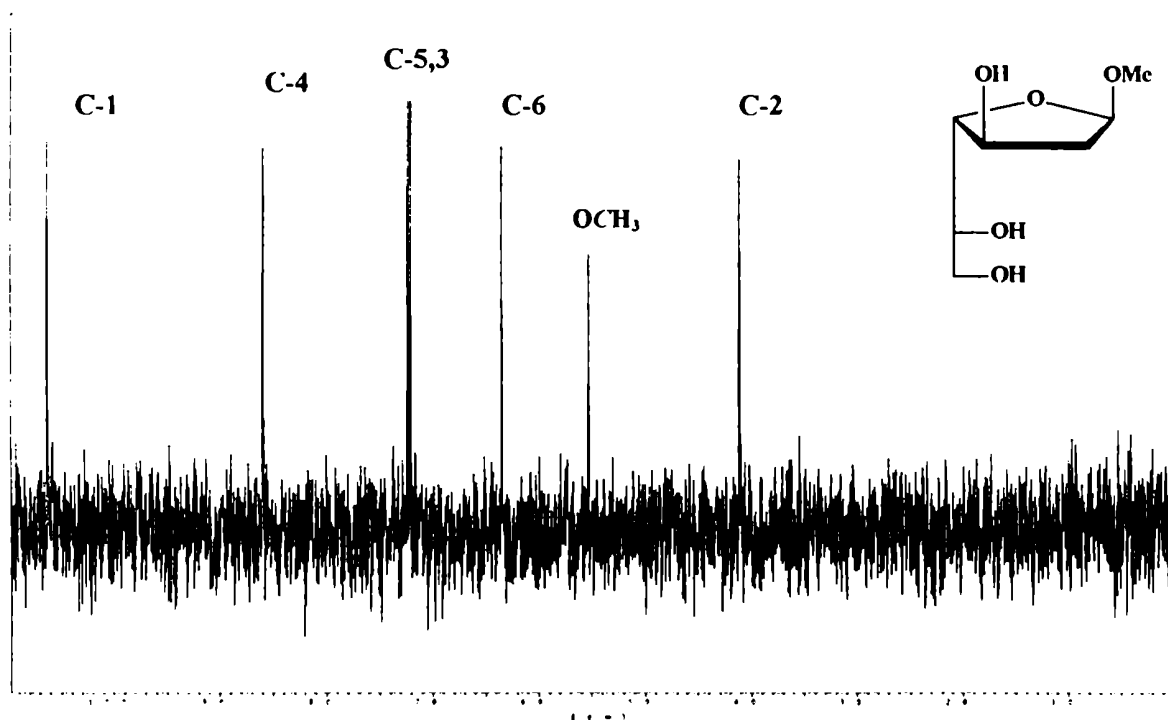
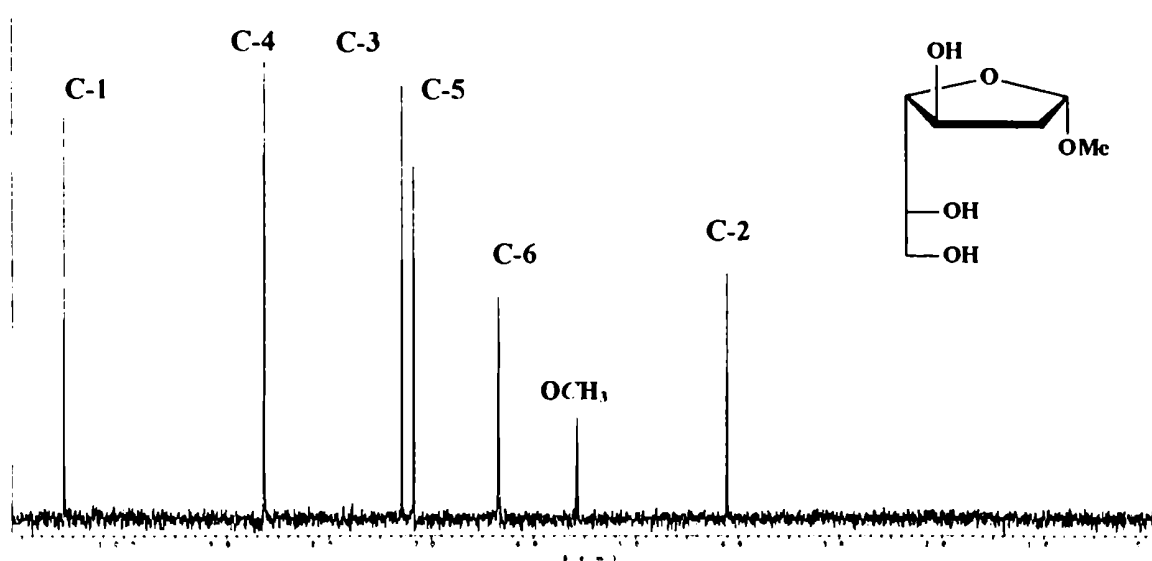
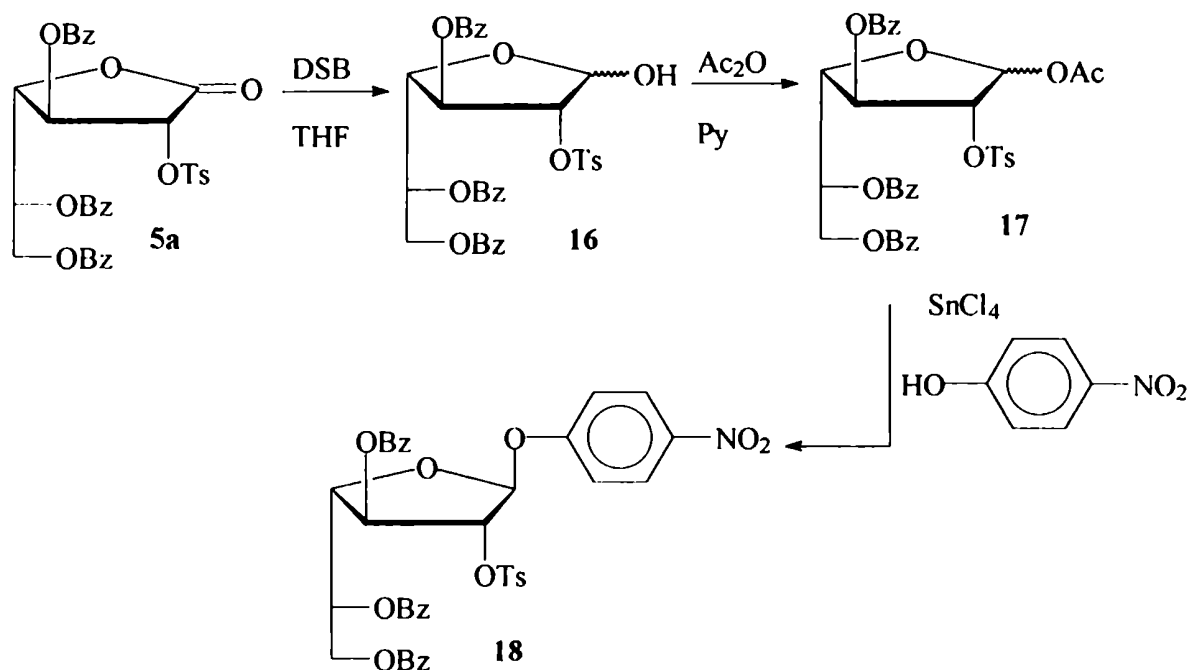


Figura 17. Espectro de RMN de ^1H (500 MHz) de 15α

Figura 18. Espectro de ^{13}C RMN (125 MHz) de 15β Figura 19. Espectro de ^{13}C RMN (125 MHz) de 15α .

Se había logrado sintetizar el glicósido de configuración deseada, pero nos quedaba un punto sin resolver que era la falta de estereoselectividad anomérica en el producto de glicosidación. Se consideró como alternativa sintética realizar la desoxigenación luego de la reducción de la lactona y de la glicosidación, de modo de poder contar con la asistencia anquimérica del grupo sustituyente en HO-2 (que sería un grupo O-tosilo), y poder así dirigir la estereoquímica de la glicosidación a la configuración β (**Esquema 15**).



Esquema 15

Los resultados fueron satisfactorios en principio, ya que se logró la glicosidación exclusivamente en configuración β , demostrando la efectividad del

grupo *O*-tosilo como generador de un intermediario tipo oxonio que induce la glicosidación por la cara β , empleando SnCl_4 como catalizador (**Figura 20**).

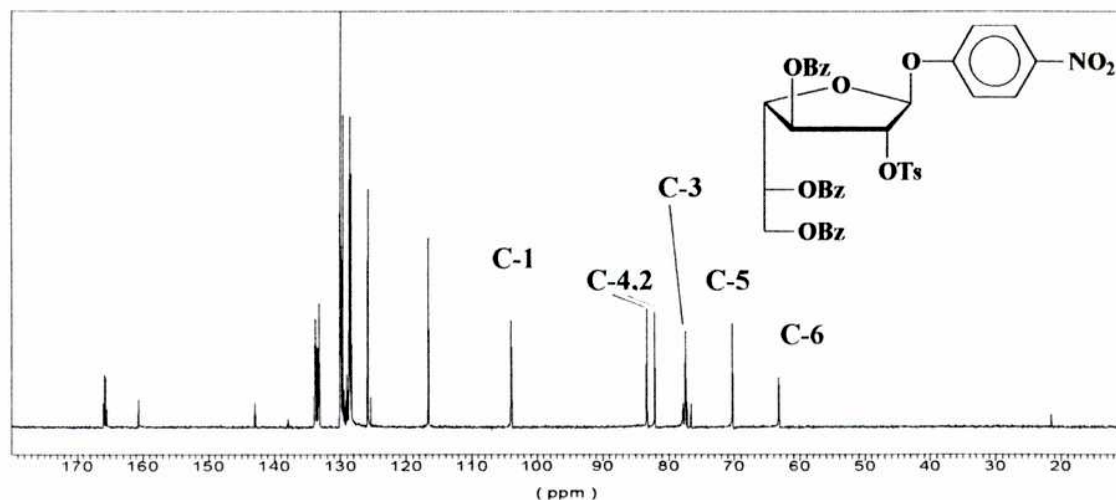
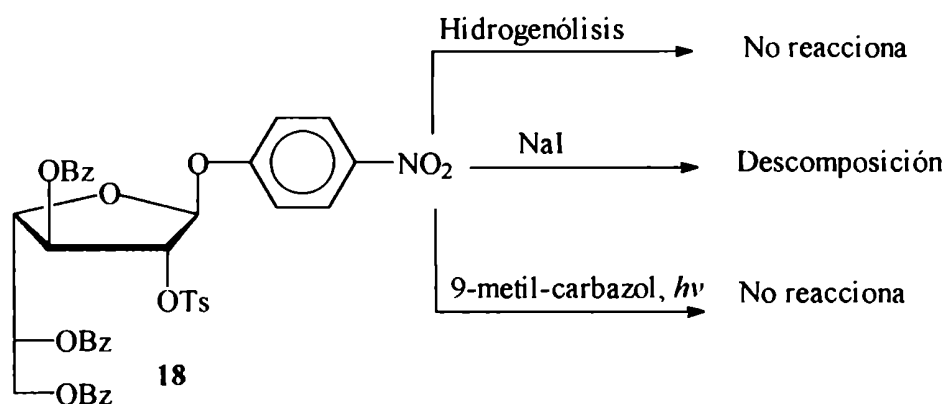


Figura 20. Espectro de RMN de ^{13}C de 18

Se intentaron varios métodos de desoxigenación, aplicando condiciones descritas para desoxigenar *O*-tosilos. Por ejemplo, la hidrogenólisis en diferentes condiciones, no dió resultados positivos recuperando inalterado el glicósido tosilado. Se probaron también condiciones más enérgicas como la sustitución del tosilato por yodo, con la idea de desoxigenar luego *vía* hidrogenólisis, pero se observó descomposición del compuesto de partida. Cuando se probaron las condiciones de desoxigenación fotoquímica sobre el glicósido β , que habían conducido exitosamente a la desoxilactona en nuestro laboratorio (Chiocconi *et al*, 2002), tampoco se pudo obtener el producto de la desoxigenación (**Esquema 16**).



Esquema 16

Estos resultados indicaron que la estrategia basada en la desoxigenación de un derivado lactónico, seguida de la reducción al azúcar correspondiente, y finalmente la glicosidación, era más apropiada, a pesar de la falta de estereoselectividad del último paso.

Tabla 1. RMN ¹H. Desplazamientos químicos y constantes de acoplamiento $J_{H,H}$

| <i>Comp.</i> | <i>H-1</i> ($J_{1,2}$)($J_{1,2}$) | <i>H-2</i> ($J_{2,3}$) | <i>H-2'</i> ($J_{2,3}$)($J_{2,2}$) | <i>H-3</i> ($J_{3,4}$) | <i>H-4</i> ($J_{4,5}$) | <i>H-5</i> ($J_{5,6}$) | <i>H-6</i> | <i>H-6'</i> ($J_{5,6}$)($J_{6,6'}$) |
|---|--|-----------------------------|---|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|---------------|--|
| 3 | | 4,99 (7,9) | | 4,69 (8,2) | 4,17 (3,3) | 4,36 (6,8) | 4,13 | 4,00 (7,0)(8,8) |
| 5a | | 5,63* | | 5,63* (5,12) | 4,91 (2,19) | 5,91 | | 4,66* |
| 5b | | 5,23 (5,84) | | 5,42 (5,48) | 4,54 (2,2) | 5,32 (5,20) | 4,28 | 4,20 (6,2)(11,7) |
| 6a | | 3,01 (7,7) | 2,75 (1,8)(17,8) | 5,55 | 5,04 (2,2) | 5,98 (5,1) | 4,72 | 4,64 (7,0)(11,7) |
| 6b | | 2,91 (7,3) | 2,54 (2,2)(18,6) | 5,19 | 4,67 | 5,36 (5,5) | 4,33 | 4,21 (6,6)(11,7) |
| 13bα^a | 5,09 (2,2)(5,4) | 2,37 (7,2) | 2,07 (-)(13,5) | 5,21 | 4,17* (3,2) | 5,25 (4,1) | 4,34 | 4,17* (6,4)(11,8) |
| 13bβ^a | 5,09 (1,1)(5,5) | 2,37 (8,4) | 1,95 (2,5)(14,5) | 4,97 (4,5) | 4,23 (3,9) | 5,29 (4,4) | 4,32 | 4,21 (7,1)(11,6) |
| 15α^a | 5,15 (2,4)(5,4) | 2,19 (6,8) | 2,10 (6,5)(13,8) | 4,40 | 3,84 (5,0) | 3,66* | | 3,56 |
| 15β^a | 5,12 (5,5)(1,2) | 2,29 (7,5) | 1,85 (2,5)(14,4) | 4,30 | 3,97 (3,7) | 3,75 (4,6) | 3,65 (7,8) | 3,57 (7,8)(11,7) |

^a 500 MHz. * centro de un multiplete complejo

Tabla 2. RMN ¹³C. Desplazamientos químicos.

| <i>Comp.</i> | <i>C-1</i> | <i>C-2</i> | <i>C-3</i> | <i>C-4</i> | <i>C-5</i> | <i>C-6</i> |
|----------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| 3 | 166.7 | 79.1 | 73.6 | 79.6 | 73.0 | 64.9 |
| 5a | 166.7 | 76.0 | 73.6 | 79.5 | 69.5 | 62.1 |
| 5b | 166.5 | 75.8 | 72.6 | 78.7 | 68.3 | 61.4 |
| 6a | 173.7 | 34.9 | 72.1 | 83.2 | 70.8 | 62.3 |
| 6b | 173.7 | 34.6 | 71.0 | 82.4 | 70.5 | 61.5 |
| 7 Z | | 138.6 | 124.5 | 146.5 | 110.7 | 58.6 |
| E | | 140.3 | 121.0 | 146.9 | 109.8 | 58.3 |
| 11a α,β | 104.4 | 39.4 | 75.1 | 82.3 | 71.8 | 63.9 |
| | 103.7 | 39.3 | 74.6 | 82.3 | 71.1 | 63.4 |
| 12 α,β | 98.5 | 38.4 | 74.1 | 83.2 | 70.8 | 63.1 |
| | 97.9 | 38.5 | 74.6 | 84.3 | 71.0 | 63.1 |
| 13b α,β | 105.2 | 39.0 | 73.9 | 81.6 | 70.9 | 62.8 |
| | 104.9 | 39.1 | 73.7 | 80.6 | 70.2 | 62.8 |
| 15α* | 105.9 | 41.0 | 73.0 | 86.3 | 71.7 | 63.4 |
| 15β* | 106.3 | 41.2 | 72.2* | 86.1 | 72.4* | 63.6 |

²D₂O. * señales intercambiables

CAPITULO 5

Síntesis de 3-desoxi- β -D-xilo-hexofuranósidos (3-desoxi- β -D-galactofuranósidos) y 3-desoxi- β -D-xilo-hexofuranosil(1 \rightarrow 3)-D-Manp (3-desoxi- β -D-galactofuranosil(1 \rightarrow 3)-D-Manp).

Normalmente la galactofuranosa se encuentra en los microorganismos como unidades terminales no reductoras (Lederkremer *et al*, 1995), aunque en algún caso, como en las formas promastigote de *Leishmania*, se lo ha hallado en el lipofosfoglicano (LPG) como unidad interna Galp(α 1 \rightarrow 3)Galf(β 1 \rightarrow 3)Manp (Turco y Descoteaux, 1992). Cuando se trabajó con células mutantes de *Leishmania donovani*, que carecían del paso biosintético que introducía la galactofuranosa interna, se comprobó que dichas células eran destruidas por macrófagos, confirmando el rol fundamental de la galactofuranosa en la supervivencia del parásito en el medio interno (Turco *et al*, 1993).

Las glicosil-lactonas se habían usado previamente en nuestro laboratorio como precursores de disacáridos conteniendo residuos de galactofuranosa (Marino *et al*, 1989; Lederkremer *et al*, 1990). Es posible obtener aldonolactonas selectivamente sustituidas que pueden usarse como aceptores de glicosilo en reacciones de glicosidación (Fernandez Cirelli *et al*, 1983; Gallo *et al*, 1993). La porción lactónica del disacárido puede ser reducida al azúcar furanósico, y la desprotección resulta en la isomerización del extremo reductor a la configuración piranósica más estable.

Considerando estos hechos se encaró la síntesis de derivados de 3-desoxi- β -D-galactofuranosa, empleando como material de partida D-galactono-1,4-lactona (**1**), y como estrategia para generar la posición desoxi en C-3 utilizamos una reacción de β -eliminación e hidrogenación catalítica (Lederkremer y Varela, 1994). Estos derivados desoxigenados de D-galactofuranosa, careciendo del HO-3, podrían ser útiles para estudios de especificidad en el reconocimiento de sustratos por parte de

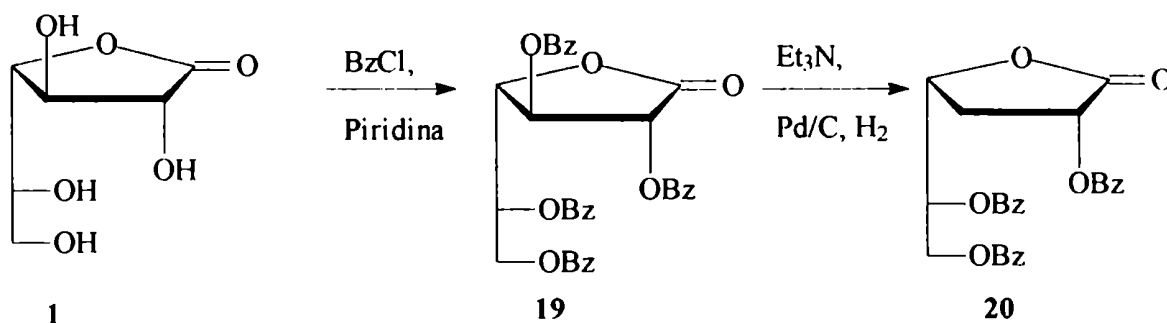
la β -D-galactofuranosidasa, o de inhibición de la glicosiltransferasa involucrada en la construcción del LPG de *Leishmania*.

Se han utilizado derivados de desoxiazúcares para definir la importancia de cada hidroxilo de un azúcar en la interacción azúcar-proteína (Lemieux, 1989).

Como primer paso se llevó a cabo la síntesis de alquil 3-desoxi- β -D-galactofuranósidos.

Obtención de 2-propil 3-desoxi- β -D-galactofuranósido (25) y 1-butil 3-desoxi- β -D-galactofuranósido (26).

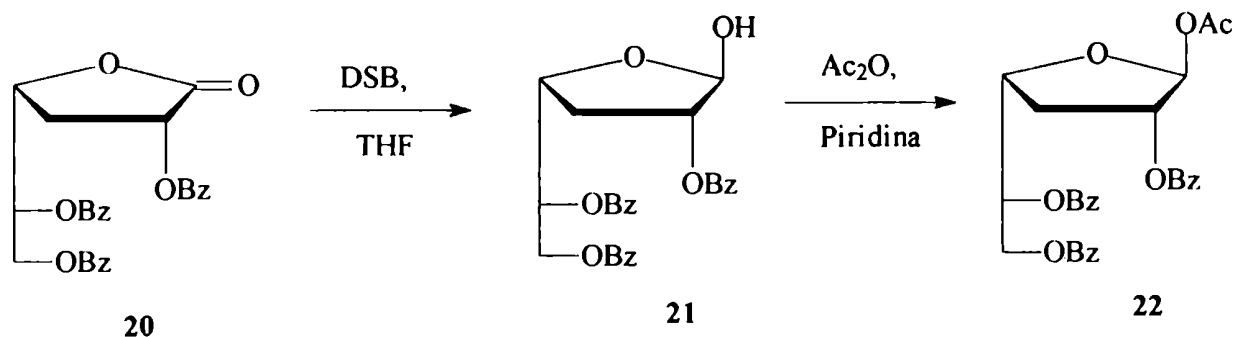
Por benzoilación total de D-galactono-1,4-lactona (1) en piridina se había obtenido previamente el derivado perbenzoilado 2,3,5,6-tetra-O-benzoil-D-galactono-1,4-lactona (19) (Lederkremer *et al*, 1971) con muy buen rendimiento (87 %). Este derivado lactónico nos permitía generar la posición desoxigenada en C-3 (one pot) a través de una reacción de β -eliminación. Así, la hidrogenación de 2,3,5,6-tetra-O-benzoil-D-galactono-1,4-lactona (19) en presencia de trietilamina y Pd/C como catalizador nos permitía obtener 2,5,6-tri-O-benzoil-3-desoxi-D-galactono-1,4-lactona (20) estereoselectivamente y con alto rendimiento (95 %) como un producto cristalino (Esquema 17).



Esquema 17

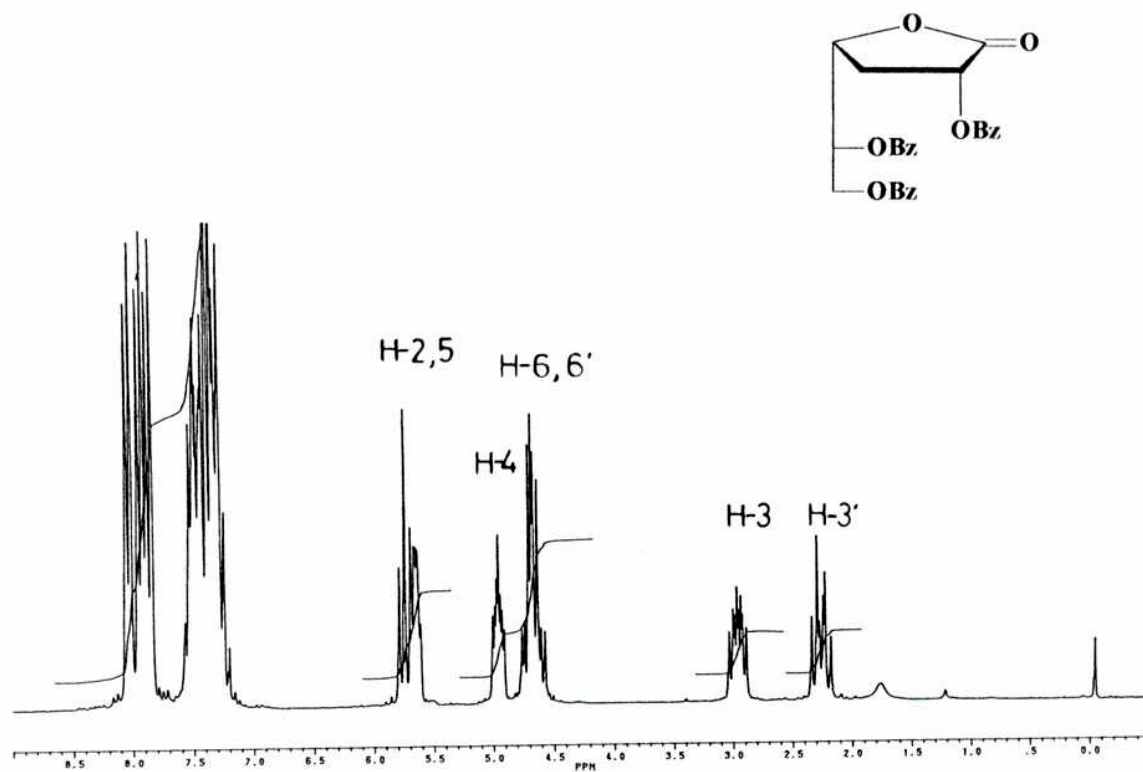
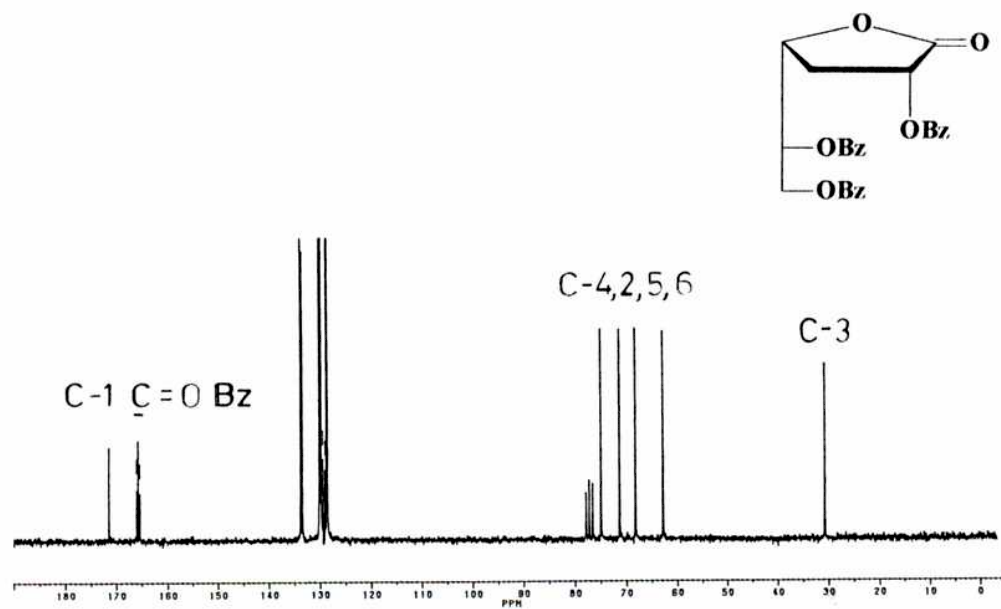
La trietilamina promovía la β -eliminación del grupo benzoiloxi en C-3, de manera que la 2-enonolactona resultante se hidrogenaba rápidamente evitando sucesivas eliminaciones (Bock *et al*, 1981; Moradei *et al*, 1991). Si analizábamos los valores de las constantes de acoplamiento entre los hidrógenos H-3,3' con H-2 ($J_{2,3} \sim 9,3$ Hz; $J_{2,3'} \sim 9,5$ Hz) y H-4 ($J_{3,4} \sim 6,5$ Hz; $J_{3',4} \sim 9,5$ Hz) (Tabla 4) (Figuras 21 y 22) se podía concluir que la estereoquímica de C-2 resultaba ser R, como se describió para 3-desoxi-1,4-lactonas 2-O-sustituidas análogas (Hussain *et al*, 1975; Lederkremer y Varela, 1994), en las que existía la relación *cis* para los

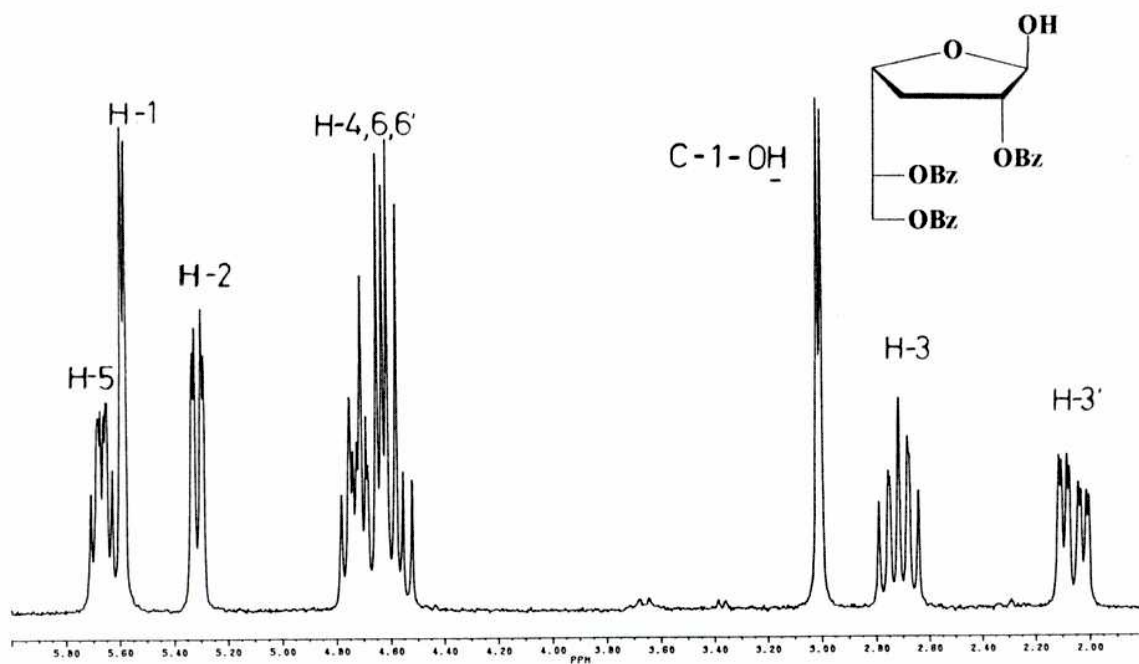
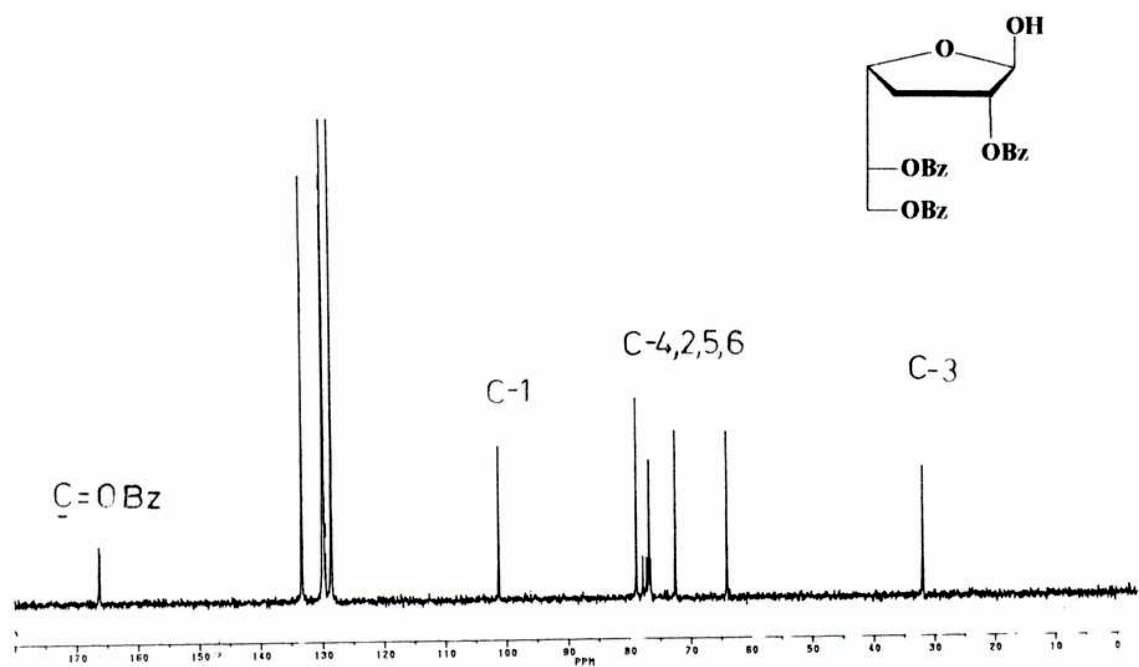
La acetilación de la posición anomérica por métodos convencionales con anhídrido acético y piridina dió la 1-O-acetil-2,5,6-tri-O-benzoil-3-desoxi- β -D-galactofuranosa (**22**) como un sólido cristalino, con un rendimiento de 96 % (Esquema 19). En el espectro RMN ^1H de **22** (Figura 26) podía observarse que la señal anomérica se desplazaba a campos más bajos (de δ 5,56 ppm a δ 6,46 ppm) por efecto de la acilación. En cuanto al espectro de RMN ^{13}C (Figura 27) se podía ver un leve desplazamiento de la señal anomérica de C-1 a campos más altos (de δ 101,2 ppm a δ 100.1 ppm).



Esquema 19

La 1-O-acetil-2,5,6-tri-O-benzoil-3-desoxi- β -D-galactofuranosa (**22**) se utilizó para obtener los glicósidos de configuración β . En nuestro laboratorio ya se había empleado SnCl_4 como catalizador para la síntesis de glicofuranósidos de configuración β (Moradei *et al*, 1991; Varela *et al*, 1986) y oligosacáridos (Marino *et al*, 1989; Lederkremer *et al*, 1990).

Figura 21. Espectro de RMN de ¹H de 20.Figura 22. Espectro de RMN de ¹³C de 20.

Figura 23. Espectro de RMN de ^1H de 21.Figura 24. Espectro de RMN de ^{13}C de 21.

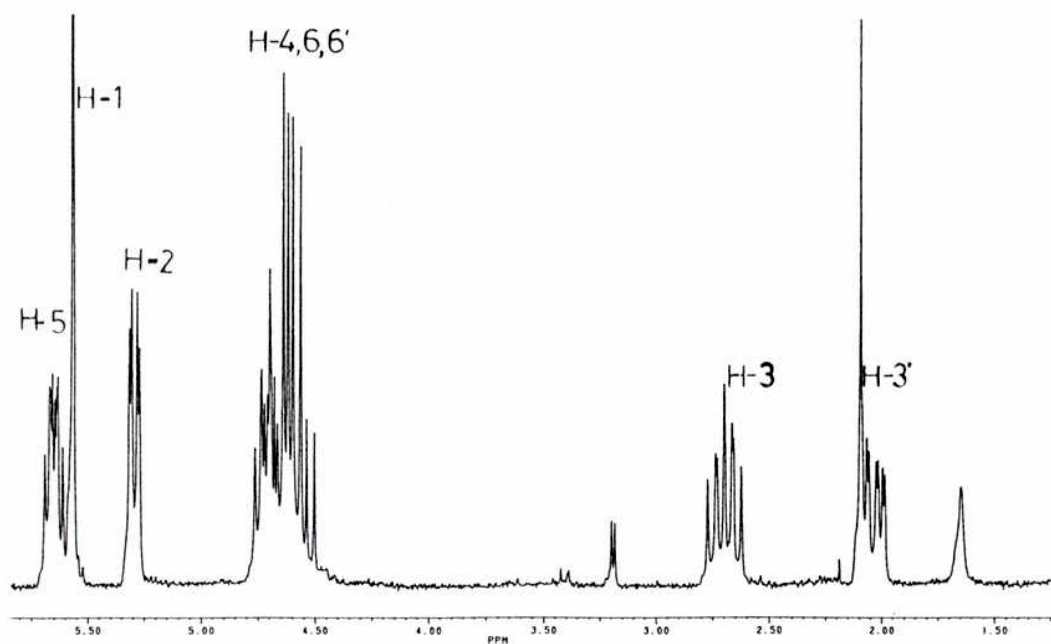
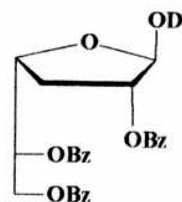
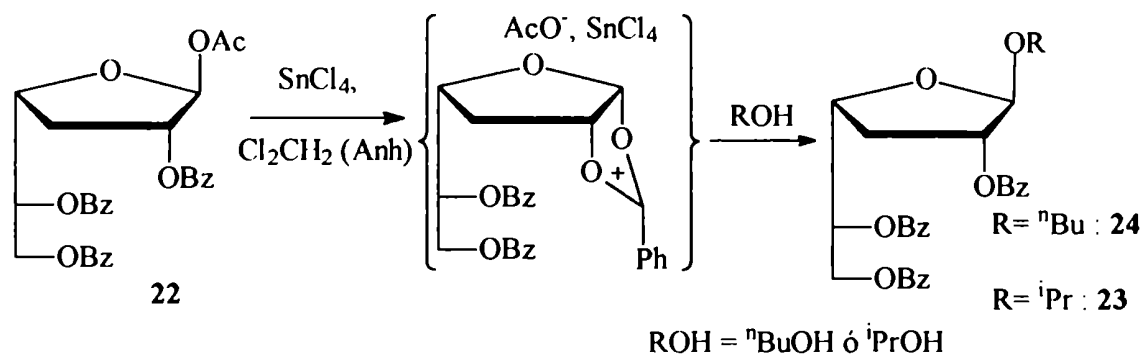


Figura 25. Espectro de RMN de ^1H de 21 intercambiado con D_2O .

Esta metodología presenta ventajas con respecto a los métodos que emplean las condiciones de Koenigs-Knorr o variaciones de éstas, ya que se emplean derivados peracilados como sustrato de la glicosidación con SnCl_4 , que son muy estables, fáciles de manipular y pueden conservarse por el tiempo que fuere necesario. El centro anomérico es activado por acción del ácido de Lewis, que provoca la ruptura de la unión C-1—O exocíclica, con formación de un ión aciloxonio que bloquea el acceso a la molécula por la cara α , dejando únicamente la cara β para ser atacada por la molécula de alcohol, generando estereoselectivamente el glicósido β (Hanesian *et al*, 1977; 1980).

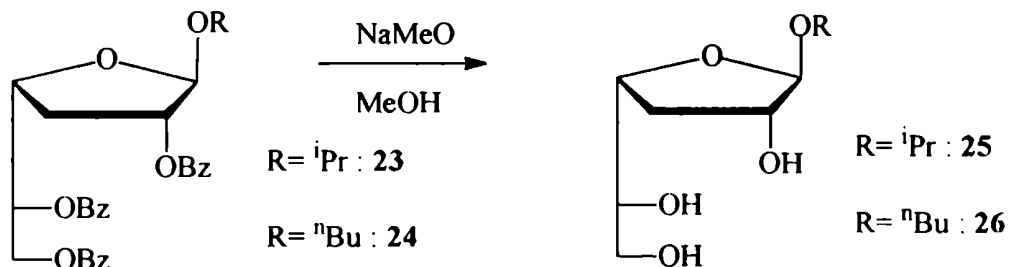
La glicosidación de **22**, con 1-butanol ó 2-propanol, se realizó en Cl_2CH_2 anhidro como solvente, utilizando SnCl_4 como promotor de la reacción a 0 °C durante 10 minutos antes del agregado del alcohol, obteniendo el 2-propil 2,5,6-tri-O-benzoil-3-desoxi- β -D-xilo-hexofuranósido (**23**) y el 1-butil 2,5,6-tri-O-benzoil-3-desoxi- β -D-xilo-hexofuranósido (**24**) (Esquema 20), respectivamente. El espectro de RMN ^{13}C de **23** (Figura 28) mostró un desplazamiento a campos más bajos para C-1, de δ 100,1 ppm a δ 104,4 ppm, y en el caso de **24** (Figura 29) el desplazamiento para C-1 era de δ 100,1 ppm a δ 106,2 ppm. Si analizáramos los espectros de RMN ^1H podíamos observar un desplazamiento de la señal de H-1 en ambos glicósidos a campos más altos, con respecto al 1-O-acetato. Para **23** (Figura 30) se observaba que el desplazamiento cambiaba de δ 6,46 ppm a δ 5,36 ppm, mientras que para **24** (Figura 31) se observaba que el desplazamiento cambiaba de δ 6,46 ppm a δ 5,16 ppm. Para ambos glicósidos se podía observar un acoplamiento en la señal de H-1 con H-2 ($J_{1,2} \sim 0,5$ Hz) que indicaba una relación 1,2-*trans*. Estas observaciones nos indicaban que la estructura de ambos compuestos correspondían a la configuración β furanósica. La reacción había transcurrido con un alto rendimiento y sin dificultades en el proceso de aislamiento y purificación. Para 2-propil 2,5,6-tri-O-benzoil-3-desoxi- β -D-xilo-hexofuranósido (**23**) el rendimiento fue de 85 % y dio un producto que se aisló como un jarabe transparente, mientras que el 1-butil 2,5,6-tri-O-benzoil-3-desoxi- β -D-xilo-hexofuranósido (**24**) se obtuvo con 88 % de rendimiento como un producto cristalino.



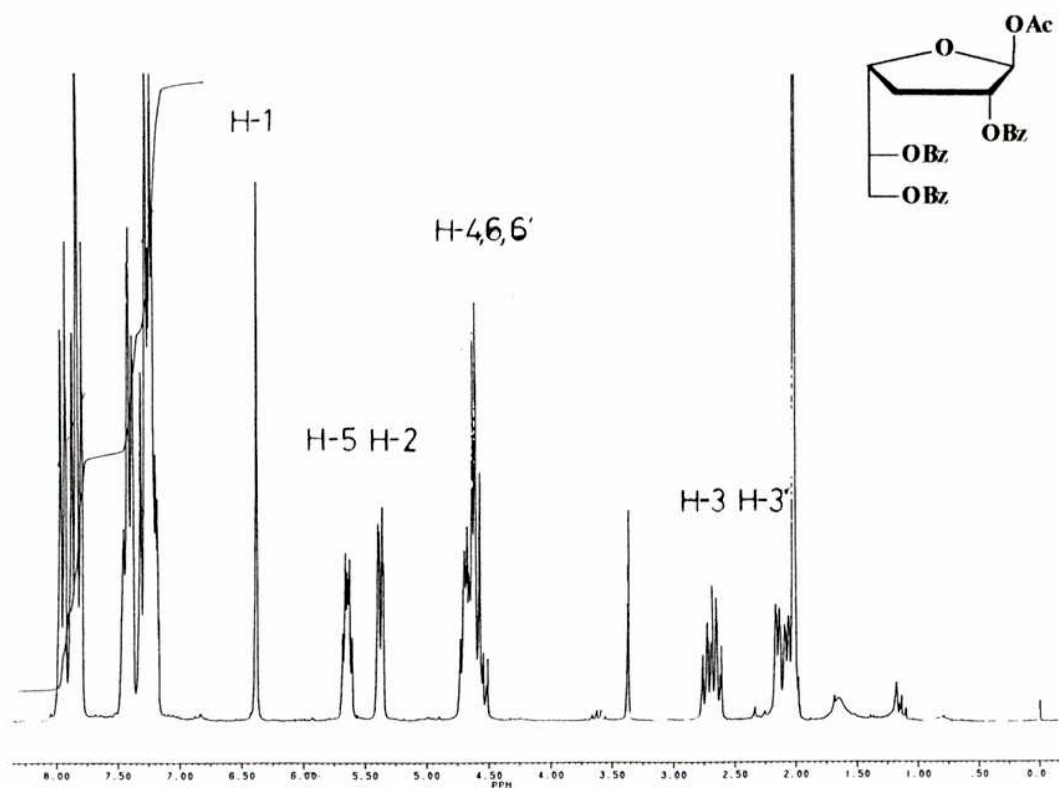
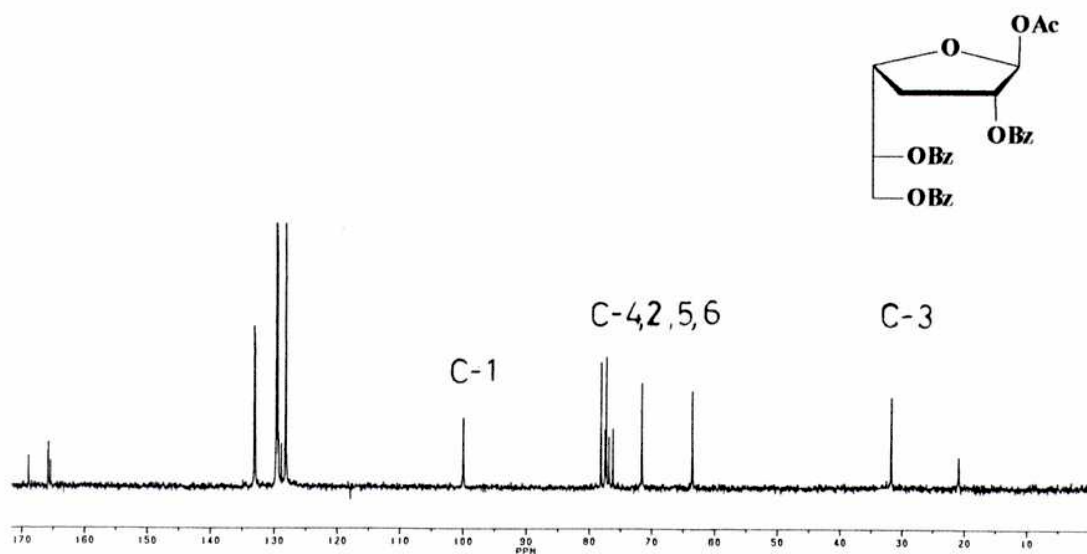
Esquema 20

Los glicósidos benzoilados **23** y **24** se desacilaron para obtener los glicósidos libres, utilizando una solución 0,5 M de metóxido de sodio en metanol. Se obtuvieron 2-propil 3-desoxi- β -D-*xilo*-hexofuranósido (2-propil 3-desoxi- β -D-galactofuranósido, **25**), y 1-butil 3-desoxi- β -D-*xilo*-hexofuranósido (1-butil 3-desoxi- β -D-galactofuranósido, **26**) como jarabes con más del 90% de rendimiento (**Esquema 21**).

Al analizar los espectros de RMN ^{13}C (**Tabla 3**) podíamos observar que en los glicósidos desprotegidos la señal de C-1 se desplazaba a campos más bajos. La diferencia para **25** (**Figura 32**) era de 2.9 ppm, mientras que para **26** (**Figura 33**) el cambio era de 2,7 ppm. El resto de las señales correspondientes a los demás carbonos estaban de acuerdo a lo esperado.



Esquema 21

Figura 26. Espectro de RMN de ^1H de 22.Figura 27. Espectro de RMN de ^{13}C de 22.

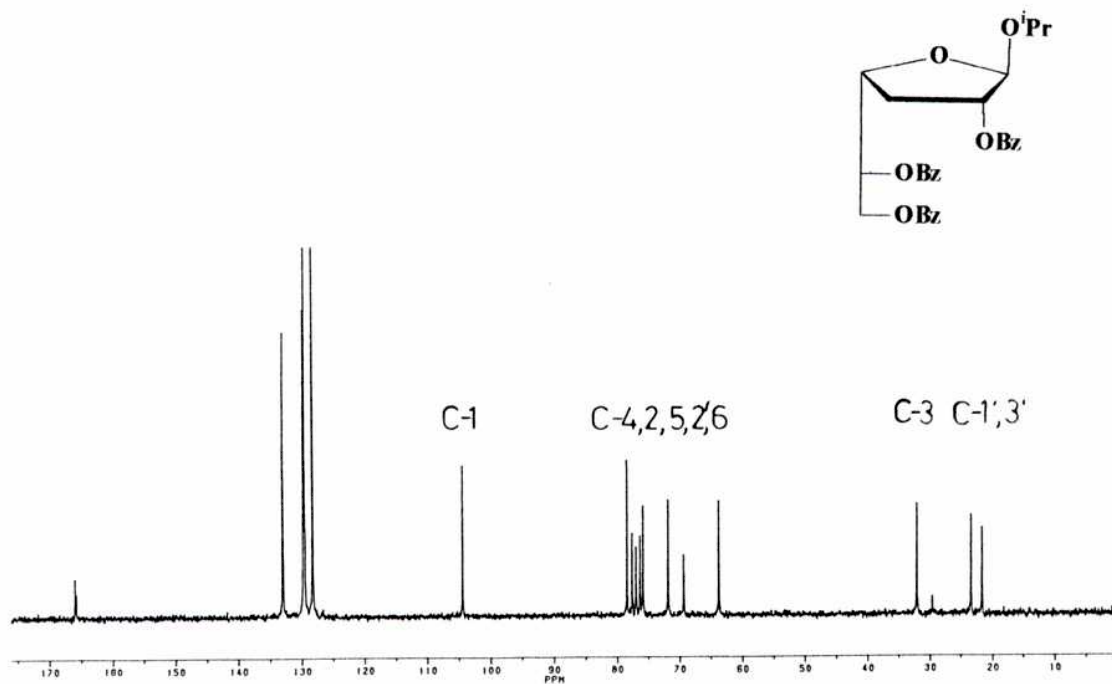


Figura 28. Espectro de RMN de ¹³C de 23.

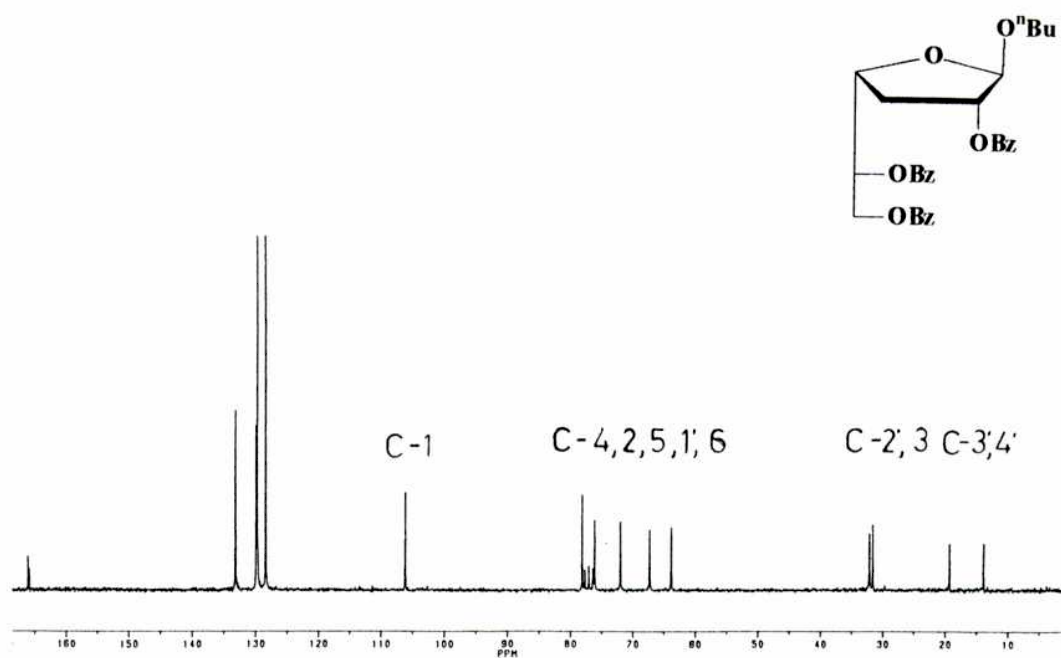
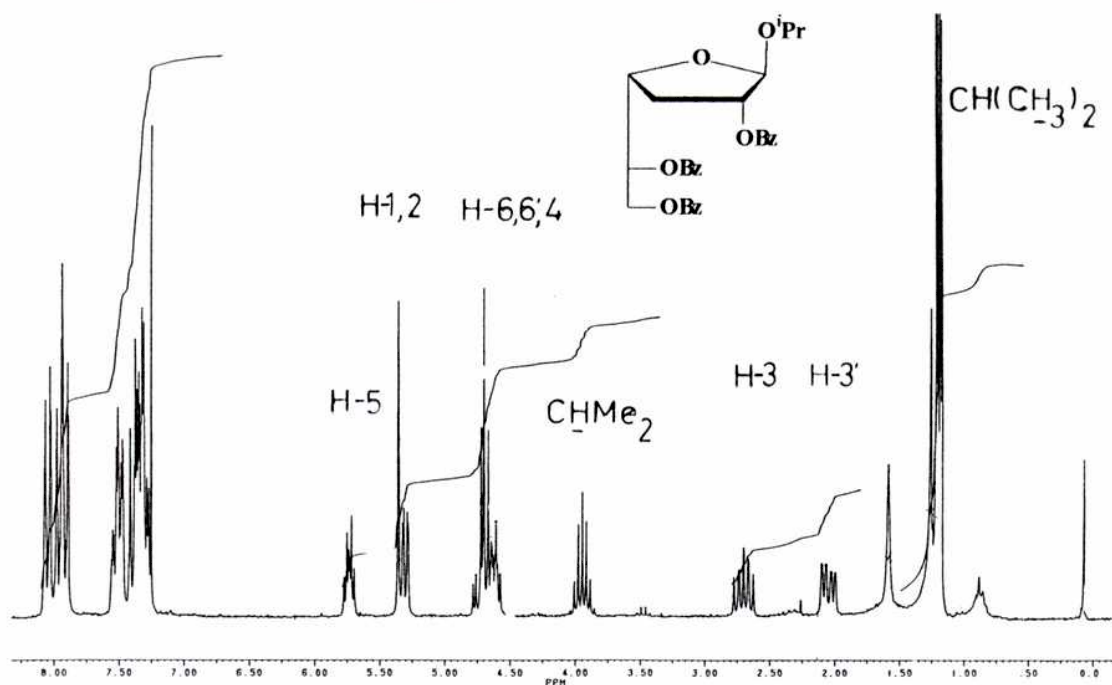
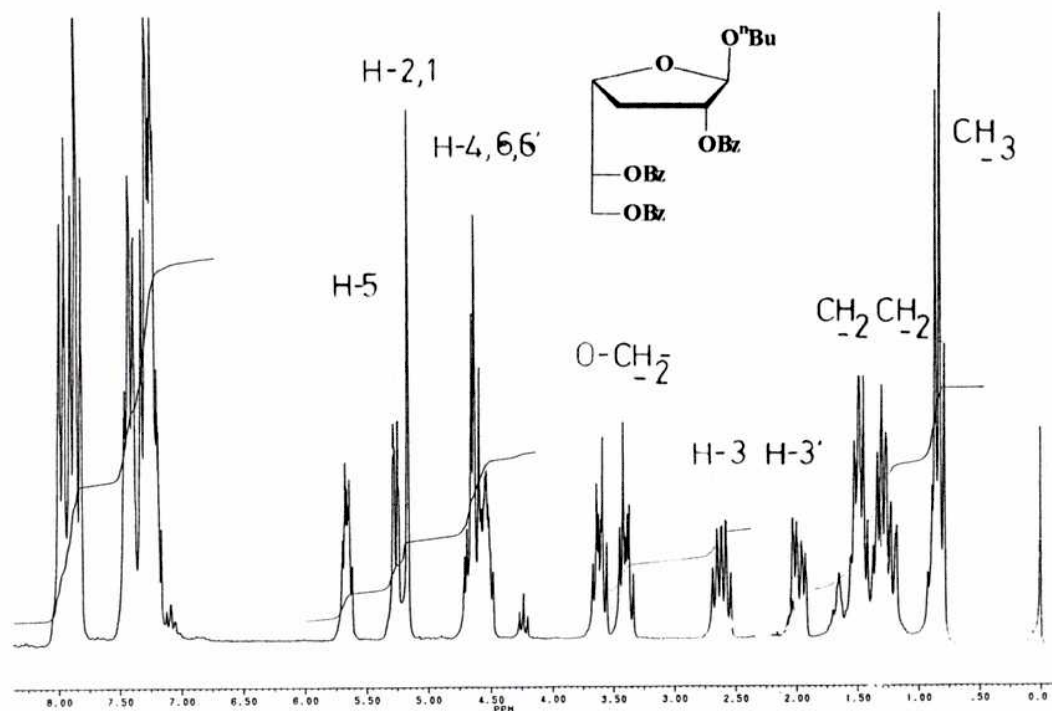


Figura 29. Espectro de RMN de ¹³C de 24

Figura 30. Espectro de RMN de ^1H de 23.Figura 31. Espectro de RMN de ^1H de 24.

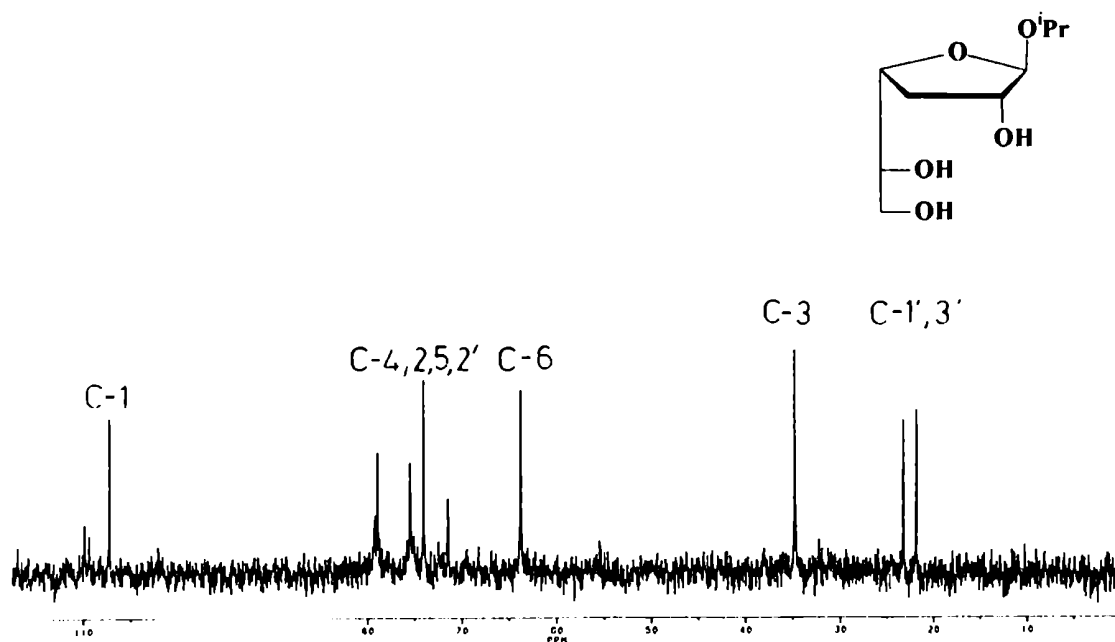
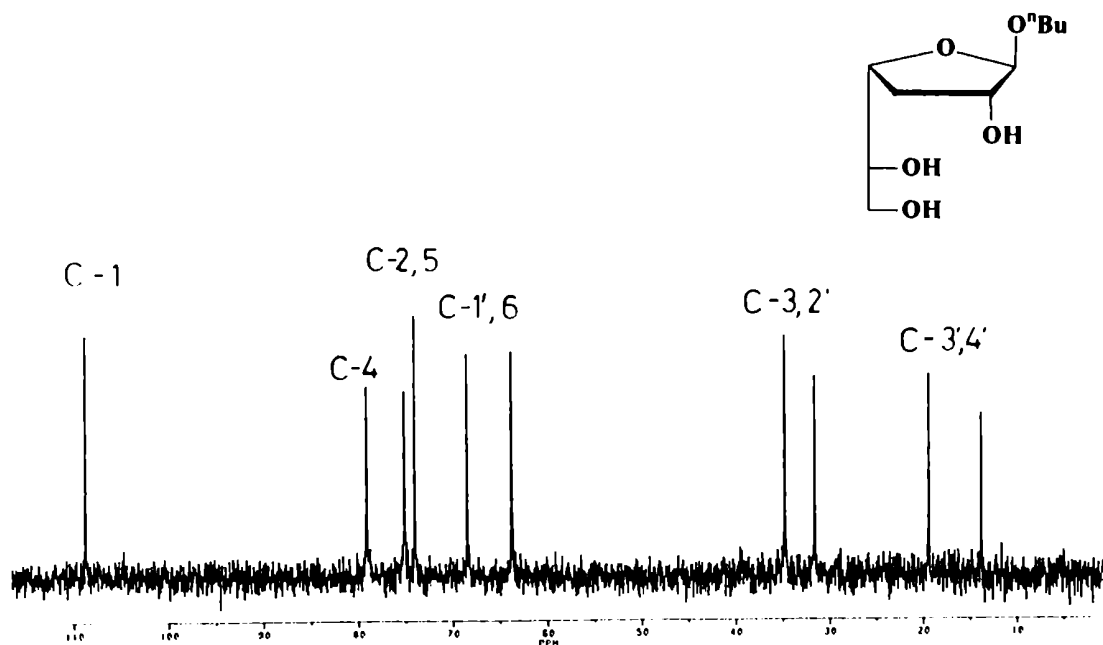
Figura 32. Espectro de RMN de ¹³C de 25.Figura 33. Espectro de RMN de ¹³C de 26.

Tabla 3 de RMN ¹³C.

| Comp | δ C-Azúcar (ppm) | | | | | | δ C-Aglicona (ppm) | | | |
|-----------------------|------------------|------|-------|------|------|------|--------------------|-------|-------|------|
| | C-1 | C-2 | C-3 | C-4 | C-5 | C-6 | C-1' | C-2' | C-3' | C-4' |
| 20^a | 171,4 | 68,2 | 30,7 | 74,9 | 71,3 | 62,7 | | | | |
| 21^a | 101,2 | 76,7 | 31,8 | 78,9 | 72,4 | 64,0 | | | | |
| 22^a | 100,1 | 77,5 | 31,9 | 78,3 | 71,7 | 63,7 | | | | |
| 24^a | 106,2 | 76,2 | 31,7' | 78,2 | 72,1 | 63,9 | 67,4 | 32,2' | 19,4 | 13,9 |
| 26^b | 108,9 | 75,2 | 34,9' | 79,2 | 74,1 | 63,9 | 68,6 | 31,7' | 19,5 | 13,9 |
| 23^a | 104,4 | 75,9 | 32,0 | 78,4 | 71,9 | 63,7 | 23,3' | 69,4 | 21,6' | |
| 25^b | 107,3 | 75,6 | 34,8 | 79,0 | 74,1 | 63,8 | 23,2' | 71,5 | 21,8' | |

^aEn CDCl₃. ^bEn D₂O. 'Las asignaciones pueden estar intercambiadas.

Al analizar las señales de los espectros de RMN ¹H (**Tabla 4**) de ambos glicósidos libres se observaba que todas sufrían desplazamientos a campos altos (disminuían todos los valores de desplazamiento químico) como efecto de la desacilación.

Tabla 4 de RMN ^1H .

| Comp | δ H (ppm) | | | | | | | |
|-----------------------|------------------------------------|------------------------------------|-------------------------------------|--------------------------------------|---|------------------------------------|------------------------------------|--------------------------------------|
| | <i>J</i> (Hz) | | | | | | | |
| | H-1 (<i>J</i> _{1,2}) | H-2 (<i>J</i> _{2,3}) | H-3 (<i>J</i> _{3,3'}) | H-3' (<i>J</i> _{2,3'}) | H-4 (<i>J</i> _{3,4}) (<i>J</i> _{3',4}) | H-5 (<i>J</i> _{4,5}) | H-6 (<i>J</i> _{5,6}) | H-6' (<i>J</i> _{5,6'}) |
| 20^a | | 5,74 (9,3) | 2,95 (13,1) | 2,25 (9,5) | 4,95 (6,5) (9,5) | 5,65 (3,5) | 4,72 (4,9) | 4,61 (6,4) |
| 21^a | 5,56 (<0,5) | 5,29 (6,9) | 2,69 (14,5) | 2,04 (2,0) | 4,71 (8,3) (6,0) | 5,65 (5,8) | 4,65 (4,0) | 4,54 (6,9) |
| 22^a | 6,46 (<0,5) | 5,46 (7,0) | 2,77 (14,7) | 2,19 (1,9) | 4,75 (8,0) (6,0) | 5,72 (5,8) | 4,73 (4,3) | 4,64 (6,8) |
| 23^a | 5,16 (<0,5) | 5,26 (6,8) | 2,61 (14,2) | 1,98 (1,7) | 4,60 ^c | 5,65 | ←4,60 ^c → | |
| 26^b | 4,96 (<0,5) | 4,18 ^c (6,5) | 2,38 (14,0) | 1,68 (2,7) | 3,60 ^{c,d} (8,2) (6,0) | 4,18 ^c | ←3,60 ^{c,d} → | |
| 24^a | 5,36 (<0,5) | 5,31 (6,9) | 2,71 (14,5) | 2,04 (1,8) | 4,63 (8,2) (6,4) | 5,74 (7,0) | 4,75 (4,3) | 4,65 (6,9) |
| 25^b | 5,07 (<0,5) | 4,19 ^c (6,6) | 2,39 (13,9) | 1,68 (2,9) | 3,63 ^c (8,0) (6,2) | 4,19 ^c | ←3,63 ^c → | |

^aEn CDCl_3 . ^bEn D_2O . ^cCentro de un multiplete complejo. ^dSuperpuesto con $\text{OCH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_3$.

Obtención de 3-O-(β -D-galactofuranosil)-D-manosa (33) y de 3-O-(3-desoxi- β -D-xilo-hexofuranosil)-D-manosa (3-O-(3-desoxi- β -D-galactofuranosil)-D-manosa) (36).

Se encaró la síntesis de β -D-Galf(1 \rightarrow 3)-D-Manp (33), unidad externa en glicoinositolfosfolípidos de *Trypanosoma cruzi* (Lederkremer y Colli, 1995), e interna en el lipofosfoglicano (LPG) de *Leishmania*. También se sintetizó 3-desoxi- β -D-xilo-hexofuranosil(1 \rightarrow 3)-D-Manp (36), que al no tener el HO-3 al cual está ligado α -D-Galp en el LPG (Turco *et al*, 1992), puede ser útil para estudios de inhibición de la glicosiltransferasa involucrada en la construcción del LPG. En ambos casos se utilizó el método de la glicosil-aldonolactona (Marino *et al*, 1989, Lederkremer *et al*, 1990).

Contábamos con la manonolactona parcialmente benzoilada (27) (Fernández Cirelli *et al*, 1983), con el HO-3 libre para actuar como aceptor de glicosilo en una reacción catalizada por SnCl₄, así que planteamos la condensación de 2,5,6-tri-O-benzoil-D-manono-1,4-lactona (27) primero con 1,2,3,4,5-penta-O-benzoil-D-galactofuranosa (28). Obtuvimos el disacárido lactónico 2,5,6-tri-O-benzoil-3-O-(2,3,5,6-tetra-O-benzoil- β -D-galactofuranosil)-D-manono-1,4-lactona (29) con 85 % de rendimiento. La configuración del centro anomérico en la unión glicosídica se estableció como β al analizar el espectro de RMN ¹H de 29, que mostraba las señales de H-1' y H-2' como singuletes anchos, de acuerdo con una configuración 1,2-*trans*. El espectro de RMN ¹³C mostraba señales a δ 106,7 ppm para C-1', 83,9 ppm para C-4' y 81,3 ppm para C-2', correspondientes a la unidad de β -D-galactofuranosa, mientras que las señales de los carbonos correspondientes a la porción lactónica del disacárido podían asignarse por comparación con las señales de la 2,5,6-tri-O-benzoil-D-manono-1,4-lactona (27). En particular, la señal de C-3 aparecía desplazada 4,6 ppm a campos más bajos, como era de esperar por la glicosidación de HO-3. El disacárido lactónico 29 se redujo con borohidruro de sodio para obtener, luego de desproteger con metóxido de sodio en metanol, el alditol 3-O-(β -D-galactofuranosil)-D-manitol (30) en forma cristalina. El compuesto 30 fue aislado previamente del líquen *Peltigera horizontalis* por extracción con metanol (Lindberg *et*

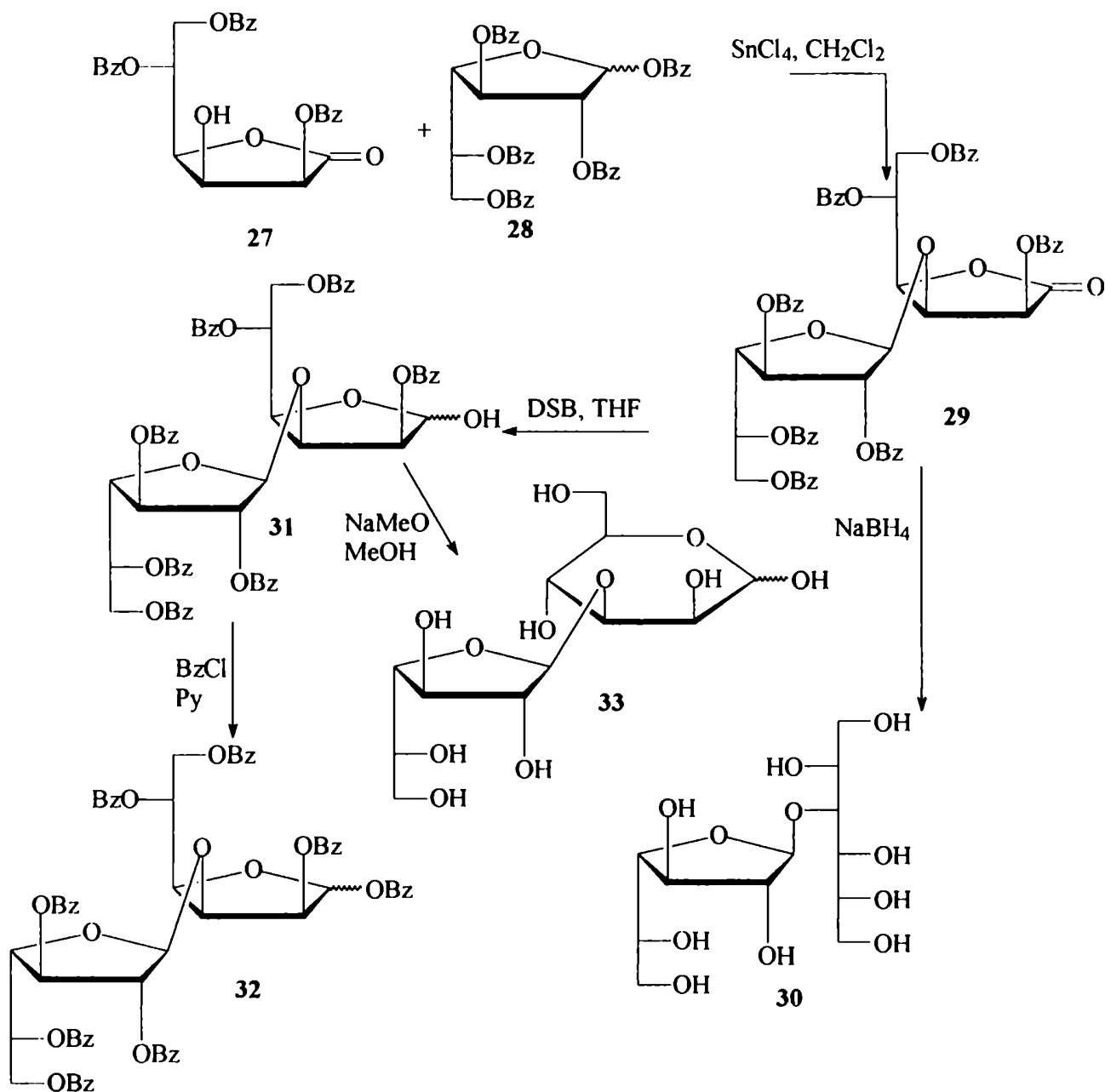
al, 1964), siendo la nuestra la primera síntesis y caracterización espectroscópica del mismo. El compuesto **30** mostró en el espectro RMN ^1H un singulete ancho a δ 5,12 ppm ($J_{1,2} < 1\text{Hz}$) y en el espectro RMN ^{13}C la señal de carbono anomérico aparecía a δ 109,1 ppm. Se observaban también las dos señales de C-4' y C-2' (83,7 y 82,1 ppm, respectivamente) a campos más bajos que las otras señales del anillo, característica de glicósidos furanósicos, y tres señales para los $\text{CH}_2\text{-OH}$ a 63,9, 63,6 y 63,4 ppm.

Luego encaramos la reducción del disacárido lactónico **29** con diisoamilborano (Lerner 1972, Varela *et al*, 1979) para obtener 2,5,6-tri-O-benzoil-3-O-(2,3,5,6-tetra-O-benzoil- β -D-galactofuranosil)-D-manofuranosa (**31**) con 88 % de rendimiento. Al analizar el espectro de RMN ^{13}C observábamos en la región anomérica las señales de C-1 para la unidad de Gal-*f* en 106,6 y 106,4 ppm, y de C-1 para Man-*f* a 99,9 ppm para el anómero β y a 95,6 ppm para el anómero α , estando estos dos en relación $\alpha:\beta$ 1,4:1 de acuerdo a la intensidad relativa de las señales. La benzoilación del hidroxilo anomérico libre se llevó a cabo en condiciones usuales para obtener la mezcla de diastereómeros **32 α** y **32 β** , que pudieron separarse cromatográficamente por columna y caracterizarse individualmente. Así, la región anomérica del espectro de RMN ^1H de **32 α** se hallaba centrada a 6,77 ppm con $J_{1,2}$ de 2,4 Hz, confirmando la configuración α de este anómero, mientras que el mismo análisis sobre **32 β** mostraba un valor similar de desplazamiento, centrado a 6,82 ppm, pero el valor de $J_{1,2}$ de 4,8 Hz indicaba que la configuración de este anómero era β . Además, los datos de desplazamientos químicos para C-1 en los espectros de RMN ^{13}C de ambos anómeros estaban de acuerdo con los datos observados para los derivados per-O-benzoilados de la pentosa análoga correspondiente, D-*lixo*-furanosa, (Stevens y Fletcher Jr., 1968; Bock *et al*, 1983).

Por desbenzoilación de **31** con NaMeO en MeOH se obtuvo el disacárido **33** con un rendimiento total del 70 % (**Esquema 22**). Al estar libre el azúcar reductor se produce la isomerización a la configuración piranósica más estable de la manosa, para dar **33**.

Al analizar el espectro de RMN ^1H se observaron en la región anomérica singuletes anchos, a 5,15 ppm que correspondían a H-1', y a 5,10 ppm y 4,86 ppm

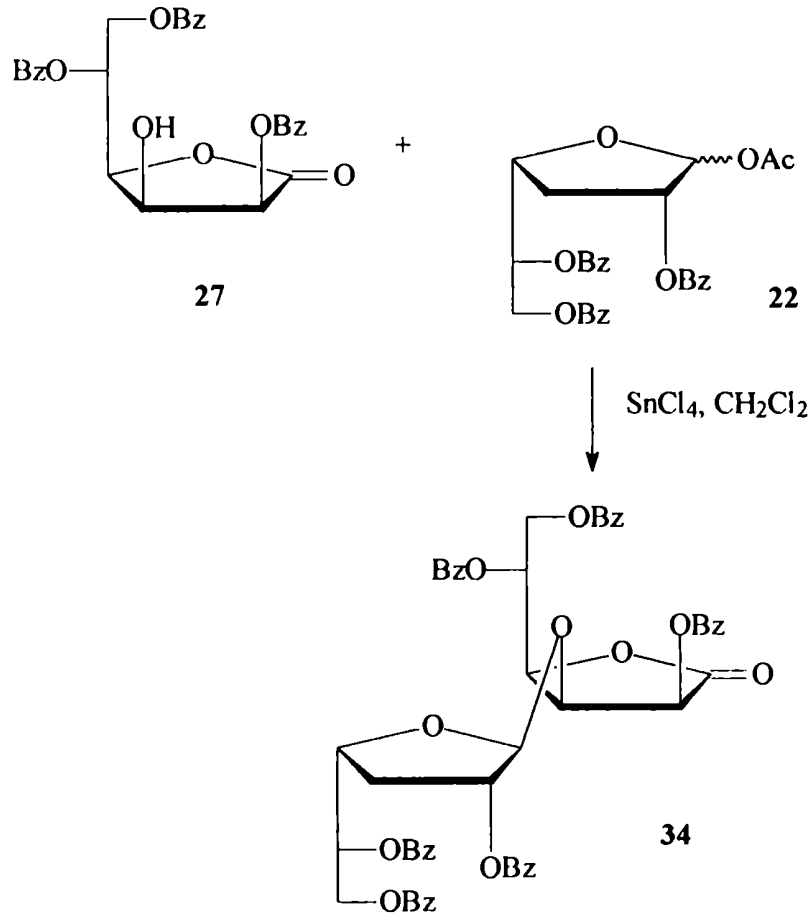
correspondientes a H-1 α y H-1 β . Habíamos logrado sintetizar un disacárido presente como unidad terminal en la cadena glicosídica del LPPG aislado de formas epimastigote de *T. cruzi* (Lederkremer *et al*, 1993; Previato *et al*, 1990). Esta unidad Gal β -(1 \rightarrow 3)-D-Man α también se hallaba presente en el oligosacárido de LPG de *Leishmania*, pero en este caso se encontraba en el medio de la cadena (Turco *et al*, 1992). Esta constituía la primer síntesis del disacárido **33** libre. En trabajos anteriores se había sintetizado el metil glicósido (Gorin *et al*, 1981) y el 8-metoxicarboniloctil derivado (Tsui *et al*, 1986).



Esquema 22

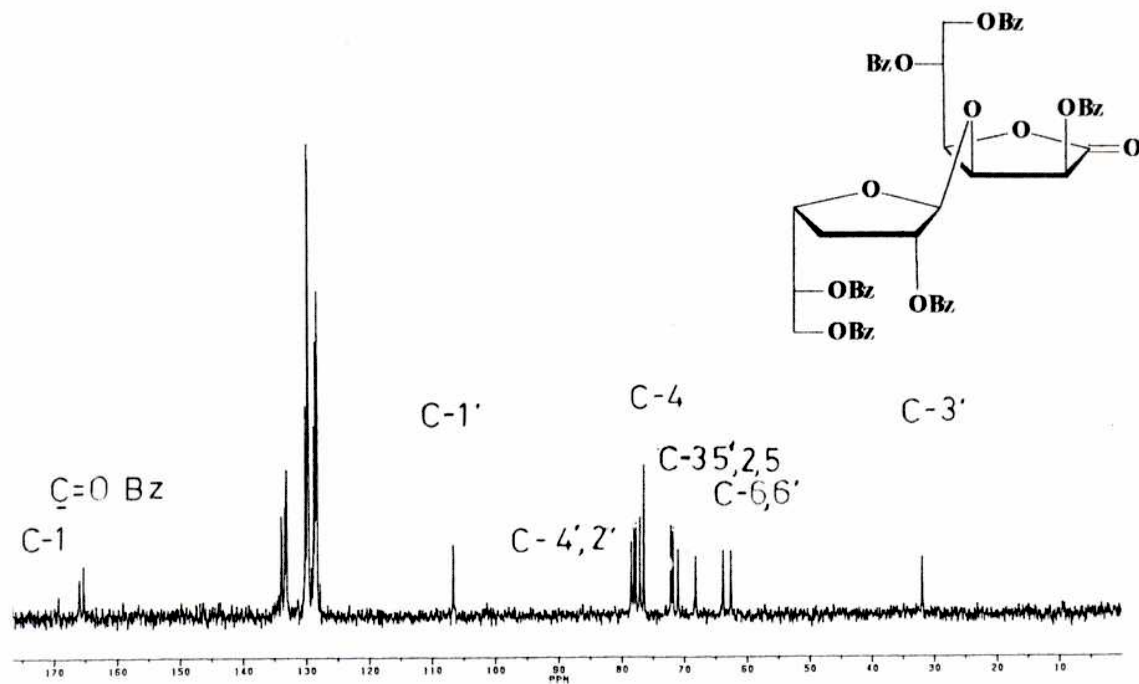
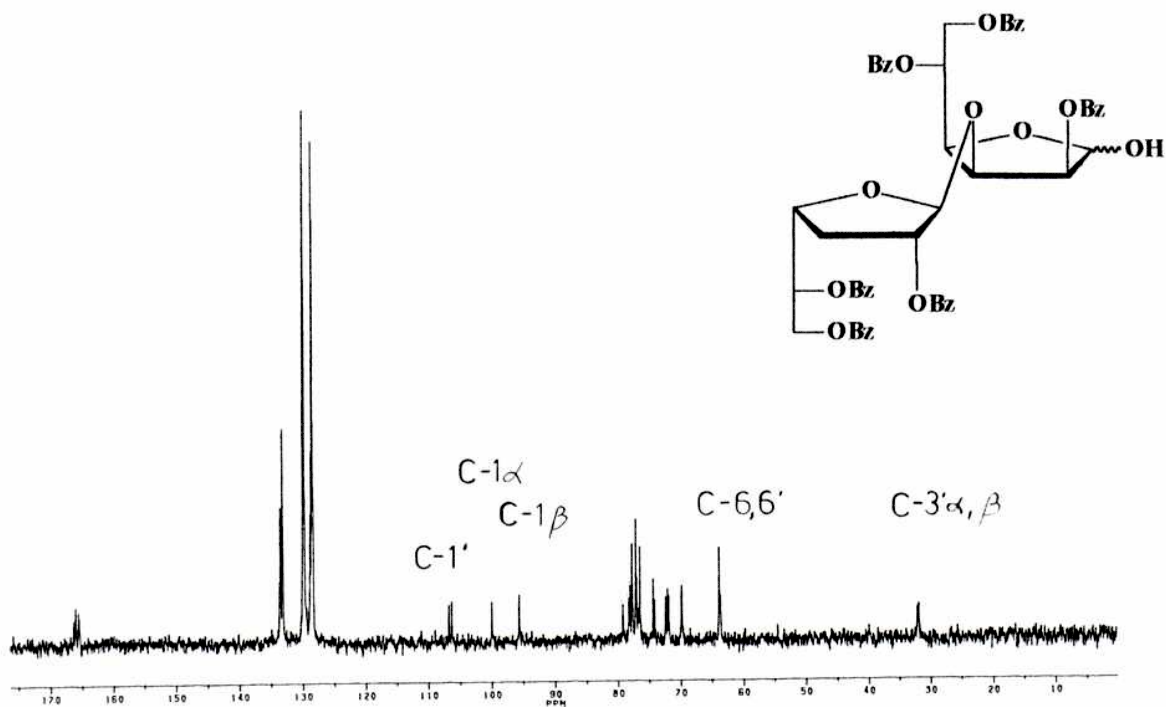
Un camino similar fue utilizado para sintetizar el 3'-desoxidisacárido **36**.

La condensación de 2,5,6-tri-O-benzoil-D-manono-1,4-lactona (**27**) con 1-O-acetil-2,5,6-tri-O-benzoil-3-desoxi- β -D-galactofuranosa (**22**), en presencia de SnCl₄ como catalizador, dió el disacárido lactónico 2,5,6-tri-O-benzoil-3-O-(2,5,6-tri-O-benzoil-3-desoxi- β -D-galactofuranosil)-D-manono-1,4-lactona (**34**) con 85 % de rendimiento (**Esquema 23**). La configuración anomérica del enlace glicosídico fue establecida como β por el espectro de RMN ¹H, que mostraba la señal para H-1' como singlete ancho, en concordancia con una configuración 1,2-*trans*. El espectro de RMN ¹³C (**Tabla 5**) (**Figura 34**) mostraba señales a δ 106,5 (C-1'), 78,4 (C-4') y 77,8 (C-2'), correspondientes a la configuración β de la unidad de galactofuranosa, mientras que las señales de la porción lactónica se correspondían con las de la lactona aceptora **27**. En particular la resonancia de C-3 aparecía unas 4,6 ppm a campos más bajos, como era de esperar por la glicosidación de HO-3. Aparecía la señal de C-3' desoxi a 31,7 ppm. El disacárido lactónico **34** se pudo cristalizar de etanol con un 65 % de rendimiento.

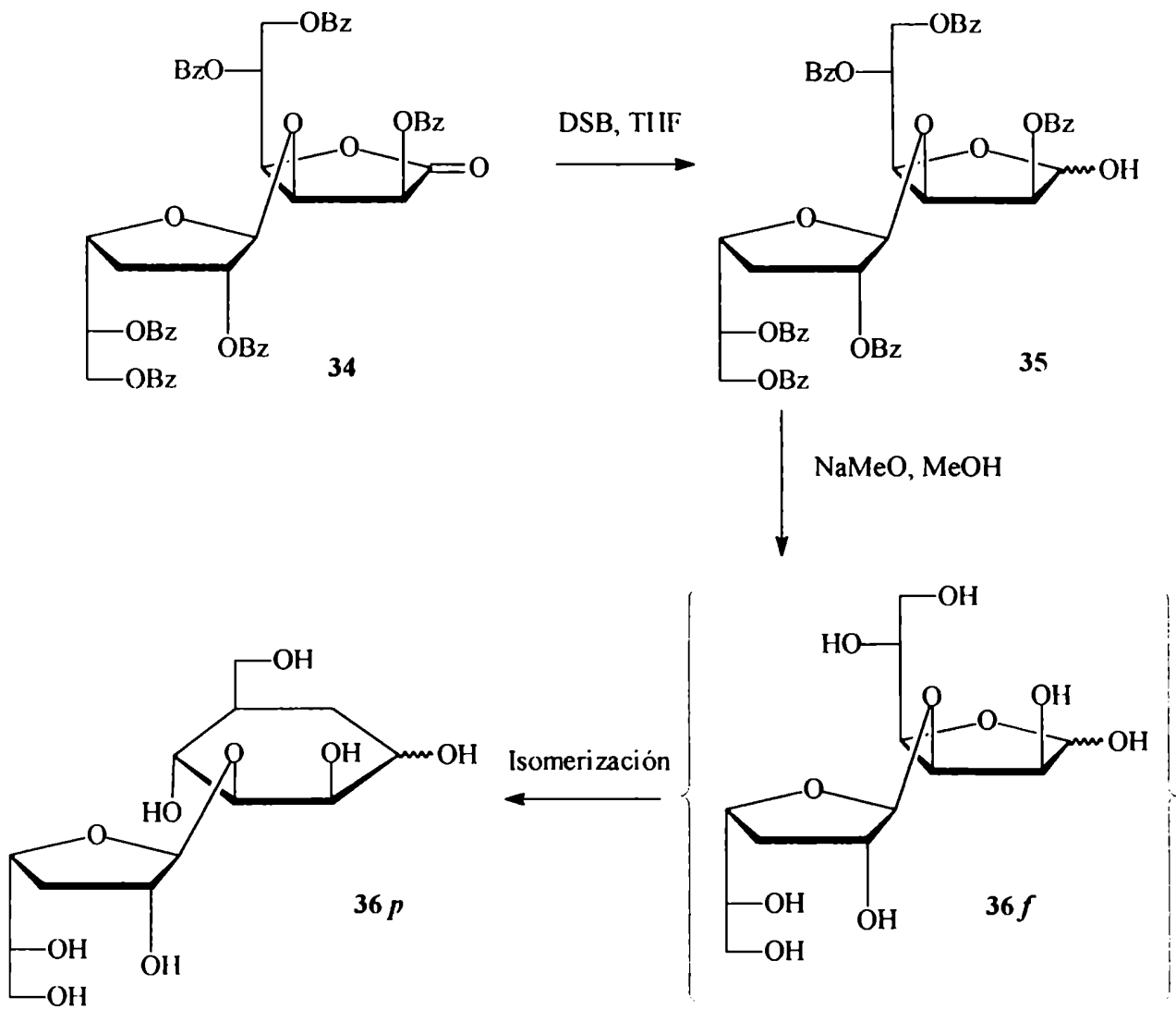


Esquema 23

El próximo paso consistía en la reducción de la función lactona de **34** a lactol **35**, para lo cual empleamos diisoamilborano (Lerner, 1972; Varela *et al*, 1979), que nos permitió obtener el disacárido protegido 2,5,6-tri-O-benzoil-3-O-(2,5,6-tri-O-benzoil-3-desoxi- β -D-galactofuranosil)-D-manofuranosa (**35**) con un rendimiento del 90 %. La región anomérica del espectro de RMN ^{13}C (Tabla 5, Figura 35) del disacárido **35** mostraba resonancias para C-1' β -Gal f de 106,6 ppm (α -Man) y 106,1 ppm (β -Man), y para C-1 de 99,8 ppm (β -Man f) y de 95,4 ppm (α -Man f). La relación α : β era aproximadamente de 1:1.

Figura 34. Espectro de RMN de ^{13}C de 34.Figura 35. Espectro de RMN de ^{13}C de 35.

La desbenzoilación de **35** con NaMeO en MeOH nos permitió obtener el disacárido libre 3-O-(3-desoxi- β -D-galactofuranosil)-D-manosa (**36**) con un rendimiento de 92 % (**Esquema 24**). El análisis espectroscópico nos permitió observar en el RMN ^1H de **36** la aparición de un singulete ancho a 5,10 ppm correspondiente a los hidrógenos H'-1 de β -Gal f y H-1 de α -Man p , y otro singulete ancho a 4,81 ppm correspondiente a H-1 de β -Man p . En cuanto al análisis del espectro de RMN ^{13}C (**Tabla 5, Figura 36**) se observaba la aparición de dos señales a 105,9 ppm y 105,6 ppm correspondientes a C-1' de β -Gal f para α -Man p y β -Man p , mientras que aparecían dos señales a 94,9 ppm y 94,7 ppm correspondientes a C-1 de α -Man p y β -Man p . Se observaba la señal de C-4' a 79,3 ppm confirmando la configuración furanósica del residuo de galactosa, y se observaba también la señal a 34,8 ppm correspondiente al C-3' de la desoxigalactofuranosa. Todas las señales de los espectros de RMN, así como también la composición anomérica del disacárido libre, se asemejaban a las de su análogo 3-O- β -D-galactofuranosil-D-manosa (**33**).



Esquema 24

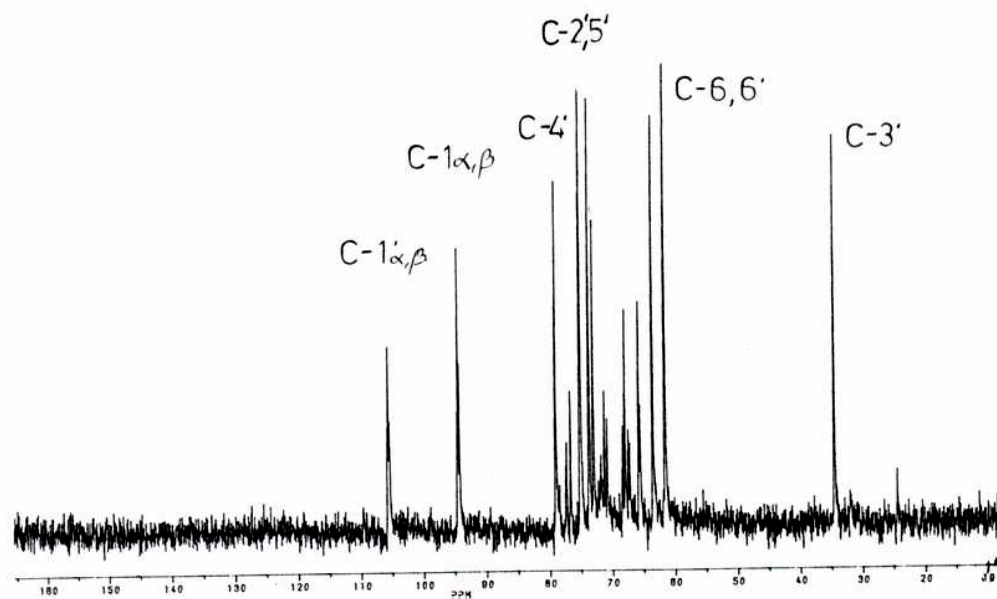
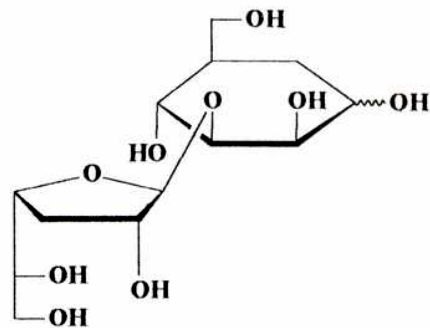


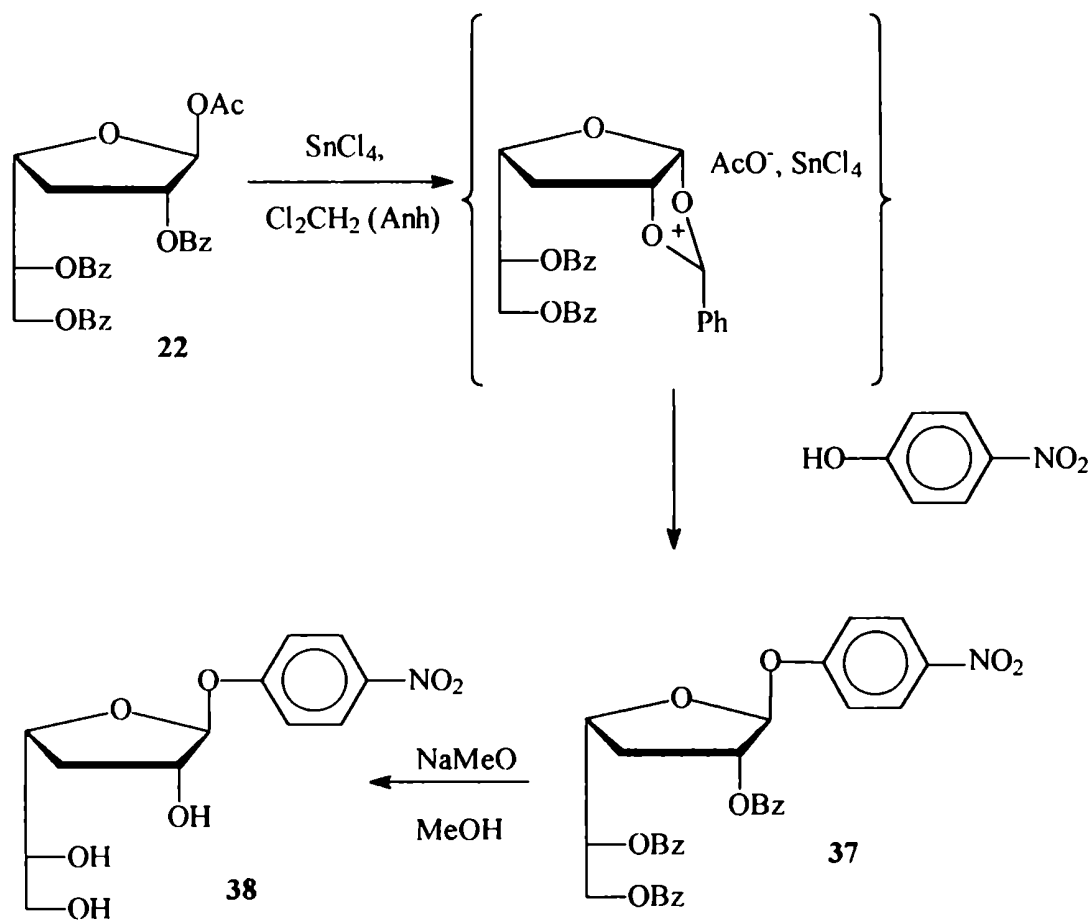
Figura 36. Espectro de RMN de ^{13}C de 36.

Obtención de 4-nitrofenil 3-desoxi- β -D-xilo-hexofuranósido (38) (4-nitrofenil 3-desoxi- β -D-galactofuranósido).

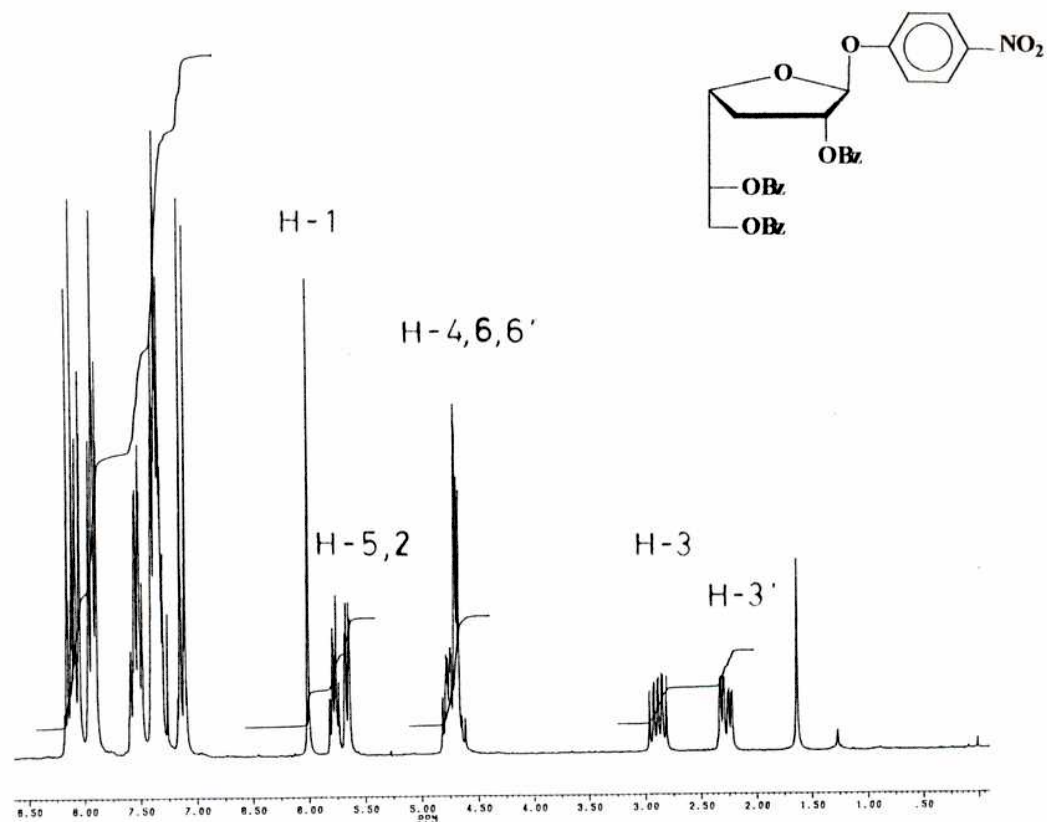
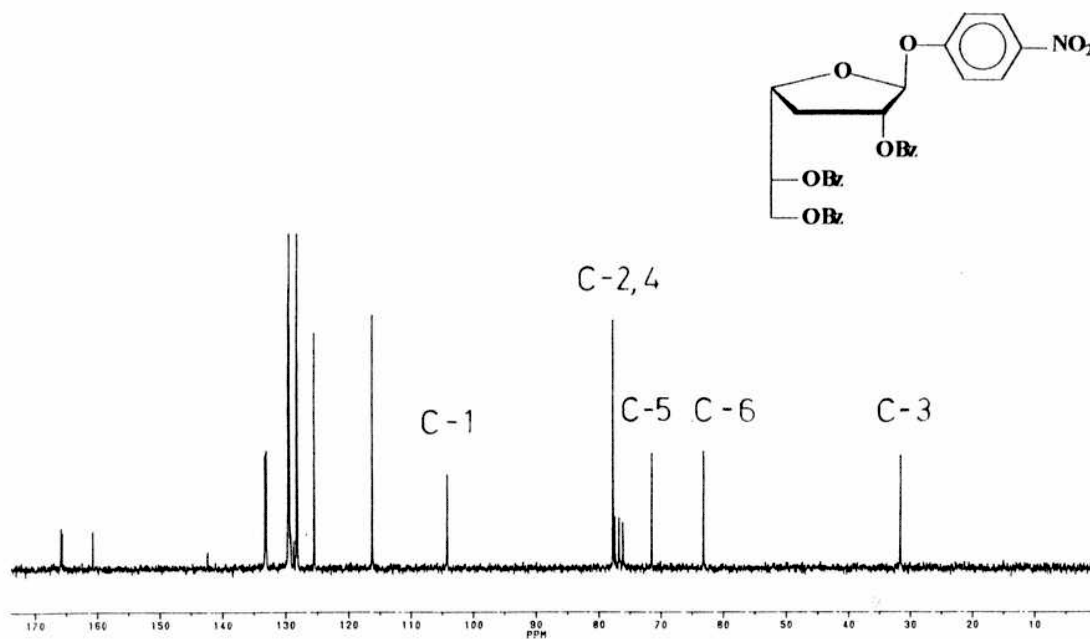
Con el objetivo de llevar a cabo ensayos de especificidad de la exo β -D-galactofuranosidasa decidimos sintetizar el 4-nitrofenil 3-desoxi- β -D-galactofuranósido (**38**), que resultaría un sustrato particularmente útil pues al ser hidrolizado liberaría una aglicona medible por UV.

Para sintetizar el glicósido buscado se utilizó el mismo dador de glicosilo previamente sintetizado, 1-O-acetil-2,5,6-tri-O-benzoil-3-desoxi- β -D-galactofuranosa (**22**), catalizando la reacción de glicosidación con SnCl₄, usando 4-nitrofenol como aceptor de glicosilo. Se obtuvo el glicósido **37**, protegido, con un rendimiento del 86 % de manera estereoselectiva. En el espectro de RMN ¹H (**Figura 37**) se observaba un singulete ancho a 6.02 ppm con una constante de acoplamiento muy pequeña que coincidía con la esperada para una relación 1,2-*trans* de los hidrógenos de un glicósido de configuración β . El resto de las señales, y el espectro de RMN ¹³C, estaba de acuerdo con las esperadas para los 3-desoxi-D-xilo-hexofuranósidos (**Figura 38**).

La desacilación de **37**, bajo las condiciones de Zemplén, dió el glicósido libre **38** con un rendimiento de 95 % (**Esquema 25**). Al analizar el espectro de RMN ¹³C (**Tabla 5, Figura 39**) observamos una señal a 106,5 ppm correspondiente al C-1 de configuración β . Además se apreciaba la señal de C-4 a 79,7 ppm, lo cual indicaba que el anillo conservaba su configuración furanósica. Se podía observar también la señal de C-3 a 34,0 ppm correspondiente al carbono desoxigenado. Al analizar el espectro de RMN ¹H se podía observar una señal como un singulete ancho a 5,81 ppm, correspondiente al H-1. El resto de las señales coincidían con las esperadas para este glicósido.



Esquema 25

Figura 37. Espectro de RMN de ^1H de 37.Figura 38. Espectro de RMN de ^{13}C de 37.

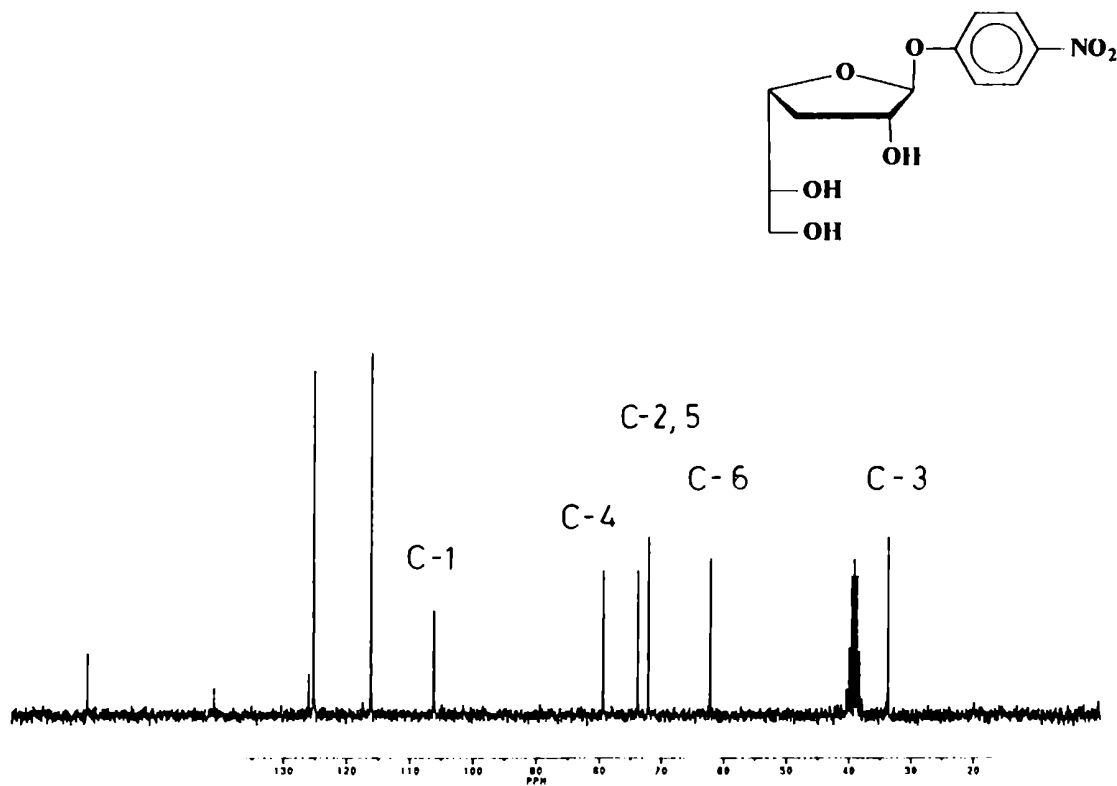


Figura 39. Espectro de RMN de ¹³C de 38.

Tabla 5 de RMN ^{13}C .

| Compuesto | δ C (ppm) | | | | | |
|-----------------------|-------------------------------|-------|-----------|------|-------|------|
| | C-1 | C-2 | C-3 | C-4 | C-5 | C-6 |
| 34^a | | | | | | |
| Galf | 106,5 | 77,8 | 31,7 | 78,4 | 71,7 | 62,4 |
| Manlac | 169,3 | 70,9 | 72,0 | 76,4 | 68,1 | 63,7 |
| 35^a | | | | | | |
| Galf | 106,6 α /106,1 β | | 32,0/31,8 | | | 63,7 |
| Manf | 95,4 α /99,8 β | (74,2 | | | 69,7) | 63,7 |
| 36^b | | | | | | |
| Galf | 105,9 α /105,6 β | | 34,8 | 79,3 | | 61,8 |
| Manp | 94,9 α /94,7 β | (75,4 | | | 66,0) | 63,8 |
| 37^a | 104,4 | 78,0 | 32,8 | 78,0 | 71,7 | 63,4 |
| 38^a | 106,5 | 74,1 | 34,0 | 79,7 | 72,5 | 62,5 |

^aHecho en CDCl_3 , ^bHecho en D_2O .

CAPITULO 6

**Síntesis de 6-desoxi- β -D-galactofuranósidos
(β -D-fucofuranósidos) y
6-desoxi- β -D-galactofuranosil(1 \rightarrow 3)-D-Manp)
(β -D-fucofuranosil(1 \rightarrow 3)-D-Manp).**

La síntesis de derivados de fucosa (6-desoxigalactosa) ofrece gran interés para la química de los hidratos de carbono. El enantiómero más abundante en la naturaleza es la L-fucosa, y se lo ha encontrado únicamente en la forma piranósica. En cambio el otro enantiómero, la D-fucosa, se ha encontrado tanto en la forma piranósica como así también en la forma furanósica. En particular el anómero α se halla presente en la pared celular del antígeno de *Eubacterium saburreum* L 452 (Hoffman *et al*, 1977), y en la porción O-antigénica de diversos miembros de *Pseudomonas syringae* (Osman *et al*, 1988; Knirel *et al*, 1988). Se ha encontrado β -D-fucofuranosa como un glicósido sulfatado en el pez estrella *Dermaterias imbricata* (Bruno *et al*, 1990).

Se han preparado β -D y β -L-fucofuranósidos de alcoholes secundarios y terciarios, a partir del derivado peracetilado de la fucofuranosa correspondiente, con el objeto de determinar la configuración absoluta de dichos alcoholes por técnicas de RMN (Kobayashi, 1997, 1998).

En los últimos años se han logrado sintetizar varios oligosacáridos conteniendo residuos de L-fucopiranososa. Sin embargo muy pocos avances se han logrado en la síntesis de fucofuranósidos (Kobayashi, 1997, 1998), motivo por el cual se hace más interesante y necesario desarrollar metodologías sintéticas en esa dirección. El trabajo que hemos desarrollado representa un aporte a ese campo de la síntesis de derivados de hidratos de carbono.

La síntesis de glicofuranósidos implica disponer previamente de un precursor sintético con el tamaño adecuado del anillo heterocíclico. Se ha intentado generar simultáneamente las dos funcionalidades que interesan, es decir, el anillo furanósico y la función glicosídica. El trabajo de Gardiner y Percival (Gardiner y Percival, 1958)

logró mediante la reacción de glicosidación de L-fucosa con cloruro de hidrógeno en metanol anhidro (0.8 %) a temperatura ambiente, una mezcla de productos de glicosidación piranósicos y furanósicos en proporciones similares, separados luego por cromatografía en columna de sílica gel. Al elevar la temperatura de la reacción el resultado obtenido fue un aumento en la proporción de las formas piranósicas.

Previamente se describió que la benzoilación de D-galactosa, en caliente y en solución de piridina, producía un aumento en la proporción de las formas furanósicas respecto de las piranósicas (D'Accorso *et al*, 1983; Marino *et al*, 1989). La mezcla de benzoatos furanósicos se separaba por cristalización fraccionada, y se usaba directamente en reacciones de glicosidación para obtener disacáridos de galactofuranosilo (Marino *et al*, 1989; Lederkremer *et al*, 1990). Dada la facilidad que la aplicación del método presentaba, decidimos probarlo sobre D-fucosa, el desoxiazúcar en C-6 análogo de la D-galactosa. La idea era benzoilar en caliente en medio de piridina, y obtener una mayor proporción del azúcar perbenzoilado en las formas furanósicas. Sin embargo, cuando se realizó la benzoilación en las mismas condiciones que para la D-galactosa se observó que la forma más abundante era la piranósica. La observación de las intensidades relativas de las señales del espectro de RMN ^1H nos permitió evaluar que las formas α,β -furanósicas se obtenían en apenas un 12 % del total. Las señales para el H-1 se asignaron por comparación directa con las correspondientes a las de los derivados perbenzoilados de la D-galactosa, y fueron 6.89 ppm (α -p, $J_{1,2}$ 3.6 Hz), 6.86 ppm (α -f, $J_{1,2}$ 4.8 Hz), 6.81 ppm (β -f, $J_{1,2}$ <1 Hz), y 6.33 ppm (β -p, $J_{1,2}$ 8.3 Hz).

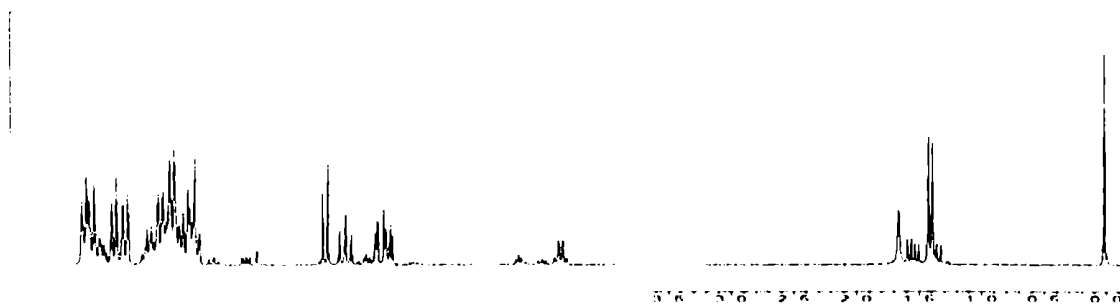


Figura 40. Espectro de ^1H RMN de fucosa benzoilada en caliente

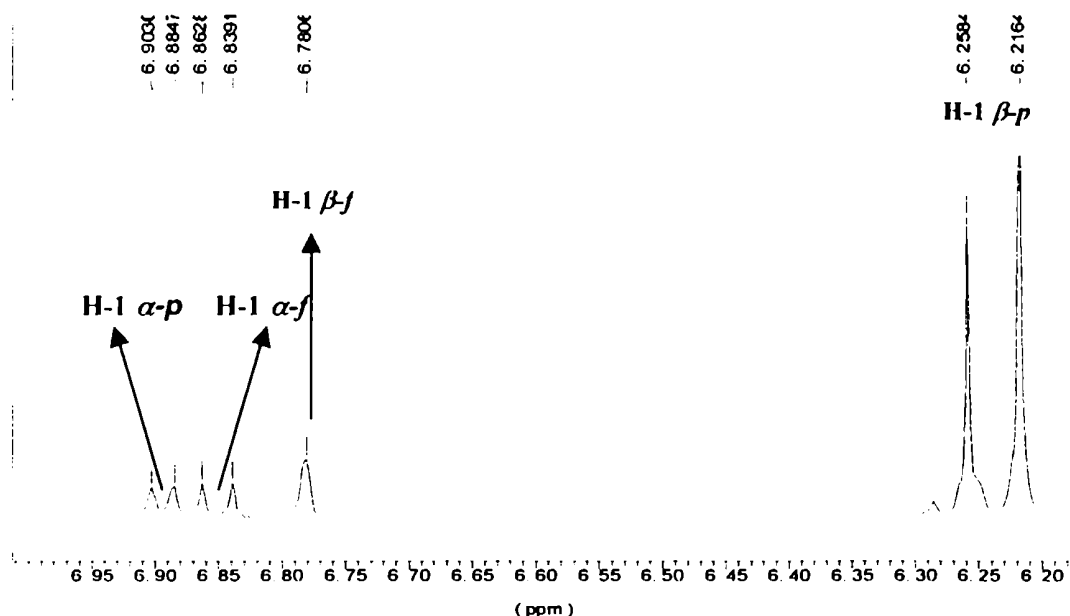


Figura 41. Espectro de ^1H RMN ampliado en la zona anomérica de fucosa benzoilada en caliente.

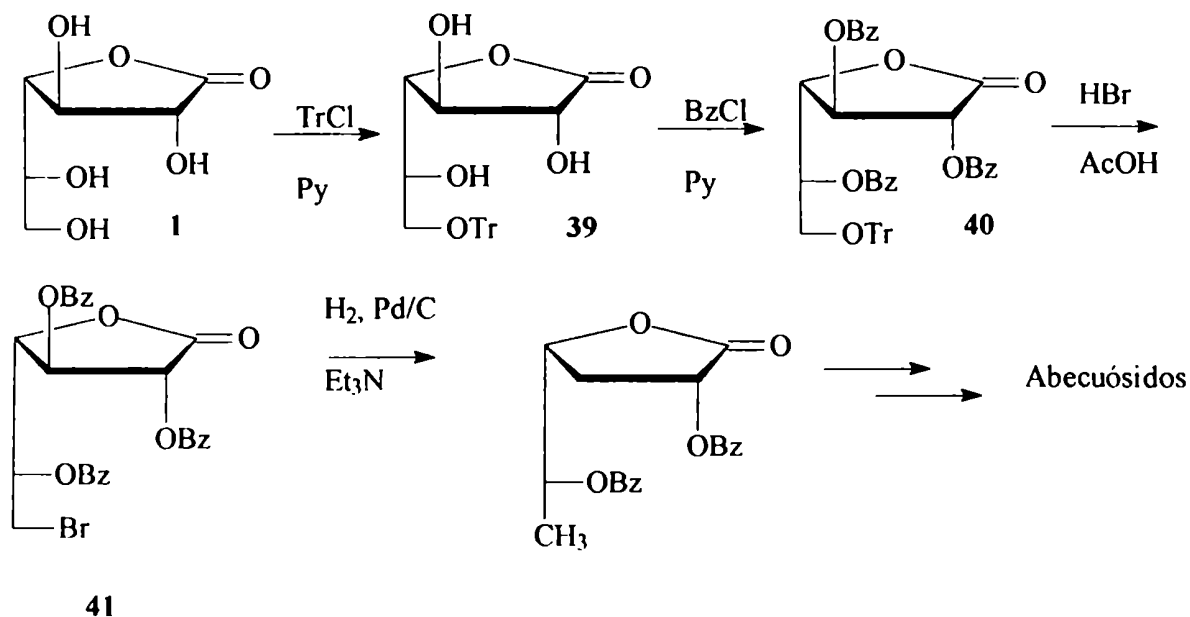
El resultado experimental demostró que el comportamiento de la D-fucosa en la benzoilación a 60 °C era diferente del de la D-galactosa. Se probó también la benzoilación a temperatura ambiente. En este caso se observaba que la forma α -piranósica abundaba como es usual, y las formas furanósicas se formaban en un 22 %. Se verificaba que las formas furanósicas se obtenían en proporción similar a la informada cuando se llevaba a cabo la acetilación de D-fucosa empleando anhídrido acético y acetato de sodio (Prihar *et al*, 1977).

En cualquiera de los dos casos las mezclas pudieron resolverse satisfactoriamente por cromatografía en columna, sin embargo el método no resultaba conveniente para preparar un producto de partida, es decir, la β -perbenzoil-D-fucofuranosa.

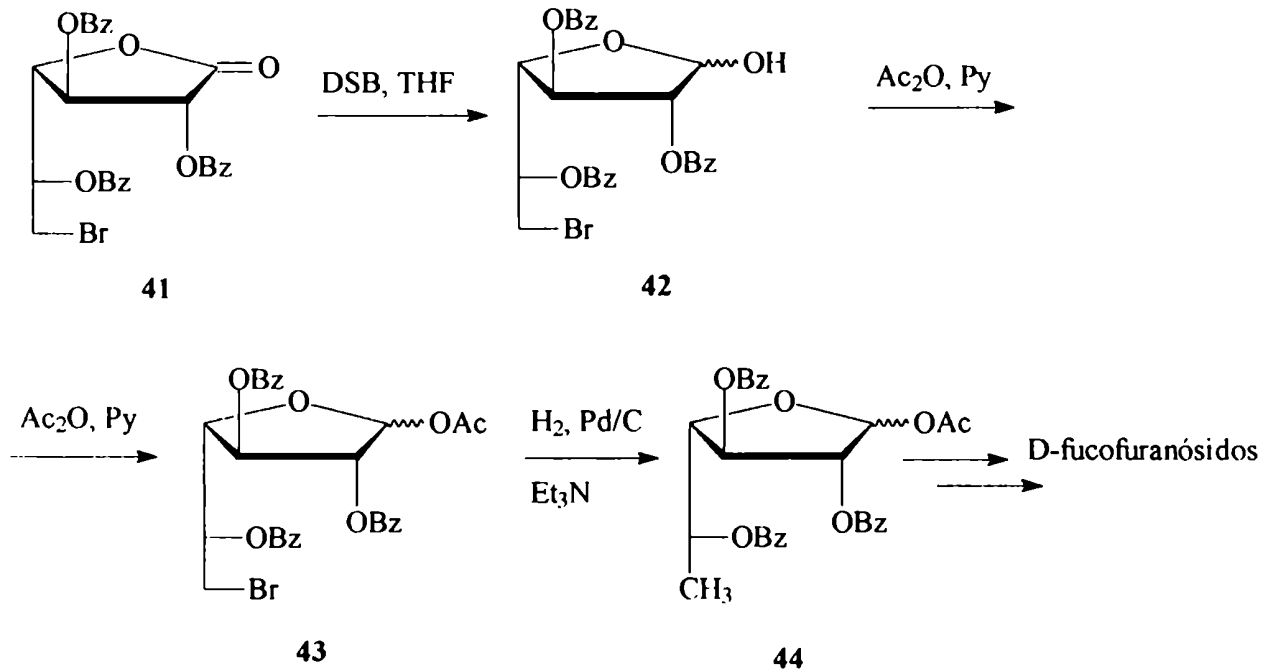
Nuestro trabajo previo, como se describió en los capítulos anteriores, había demostrado la utilidad de las aldono-1,4-lactonas como precursor en la síntesis de derivados de azúcares como glicofuranósidos. Se decidió entonces utilizar D-galactono-1,4-lactona como producto de partida y precursor del anillo furanósico.

Obtención de 2,3,5-tri-O-benzoil-6-bromo-6-desoxi-D-galactofuranosa (42).

Con el objetivo de sintetizar los derivados de D-fucofuranosa (6-desoxi-D-galactofuranosa) consideramos la posibilidad de funcionalizar selectivamente la posición de C-6. En nuestro laboratorio se había sintetizado anteriormente 2,3,5-tri-O-benzoil-6-bromo-6-desoxi-D-galactono-1,4-lactona (41) (Moradei *et al*, 1991) con un rendimiento del 90% como un intermediario en la síntesis de la abequosa (3,6-didesoxi-D-xylo-hexosa) y de sus glicofuranósidos (Esquema 26).



En este trabajo de tesis se utilizó el compuesto 41 como un precursor conveniente para la síntesis de derivados furanósicos de D-fucosa (Esquema 27).



Esquema 27

Se procedió como primer paso a reducir 2,3,5-tri-O-benzoil-6-bromo-6-desoxi-D-galactono-1,4-lactona (**41**) con diisamilborano (Lerner, 1972; Varela *et al*, 1979) en THF, con lo cual se obtuvo la mezcla anomérica de 2,3,5-tri-O-benzoil-6-bromo-6-desoxi-D-galactofuranosas (**42**), con un rendimiento del 95%. Al analizar el espectro de RMN ^{13}C (**Figura 42**) del producto de reducción se podía apreciar la presencia de dos señales en la zona anomérica, con desplazamientos químicos de δ 100.0 y 95.6 ppm, asignables al C-1 de los anómeros β y α , respectivamente. La relación entre ambos era aproximadamente de $\beta/\alpha \sim 2.2$. Se observaban también dos señales a δ 29.6 y 29.2 ppm respectivamente, que correspondían al C-6 de ambos anómeros. Podía observarse también como se había modificado la señal de C-2 respecto del compuesto lactónico. En cuanto a la señal de C-4 (82,9 ppm), podíamos observar que se había mantenido alrededor de las 80 ppm, lo cual nos permitía confirmar dos cosas, por un lado que no había habido migración de grupo acilo en el proceso de reducción, hecho que habría transformado al azúcar a su forma piranósica,

observando la señal de C-4 en la zona de 75 ppm, aproximadamente, y por el otro que el anillo de la galactosa se mantenía en su forma furanósica como necesitábamos. El resto de las señales guardaban la semejanza lógica con galactofuranósidos descritos en la literatura (Marino *et al*, 1989, Lederkremer *et al*, 1990). Con respecto al espectro de RMN ^1H era destacable la modificación que había sufrido la señal de H-2, que se había desplazado a campos altos con un δ de 5,52 ppm, y aparecía mostrando una partición más compleja con respecto al precursor lactónico (doblete, 6,11 ppm, $J_{2,3} \sim 6$ Hz). Todas estas evidencias confirmaban la estructura de los productos de la reducción con diisoamilborano.

Obtención de 1-O-acetil-2,3,5-tri-O-benzoil-6-bromo-6-desoxi- α,β -D-galactofuranosa (43).

Como próximo paso llevamos adelante la acilación del hidroxilo anomérico del producto de reducción para transformarlo en un grupo saliente apropiado para la reacción de glicosidación. Se emplearon condiciones clásicas de acetilación en piridina, dado que los acetatos anoméricos resultan ser mejor grupo que los benzoatos para la glicosidación y ofrecen menos dificultades para su purificación. Se pudo aislar la 1-O-acetil-2,3,5-tri-O-benzoil-6-bromo-6-desoxi- α,β -D-galactofuranosa (43) como mezcla de los acetatos anoméricos con un rendimiento de 95% y una relación $\beta/\alpha \sim 3,3$, según pudo estimarse de las intensidades relativas de las señales de los espectros de RMN ^1H y RMN ^{13}C (Figura 43). Analizando las señales que aparecían en el espectro de RMN ^1H se observaba un singulete ancho a δ 6,51 ppm que correspondía al H-1 del anómero β , mientras que el anómero α presentaba una señal que aparecía como un doblete a 6,64 ppm, con una constante de acoplamiento de 4,7 Hz. En ambos casos se podía apreciar que las señales anoméricas se habían desplazado a campos bajos respecto de las del producto con el hidroxilo anomérico libre.

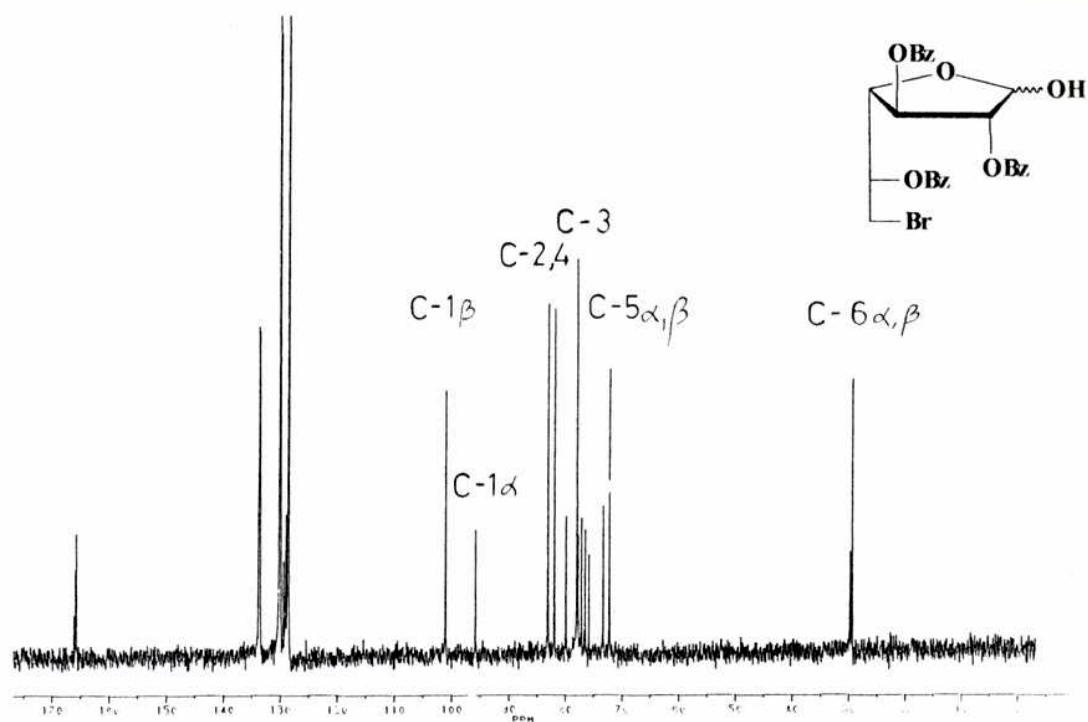


Figura 42. Espectro de RMN de ¹³C de 42.

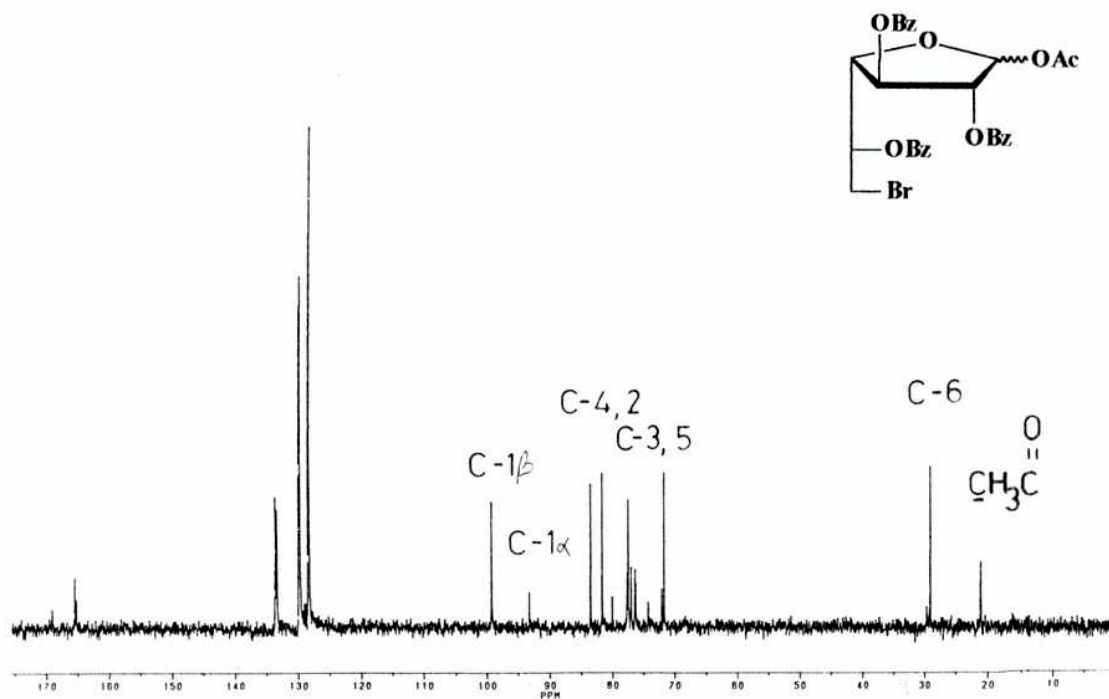
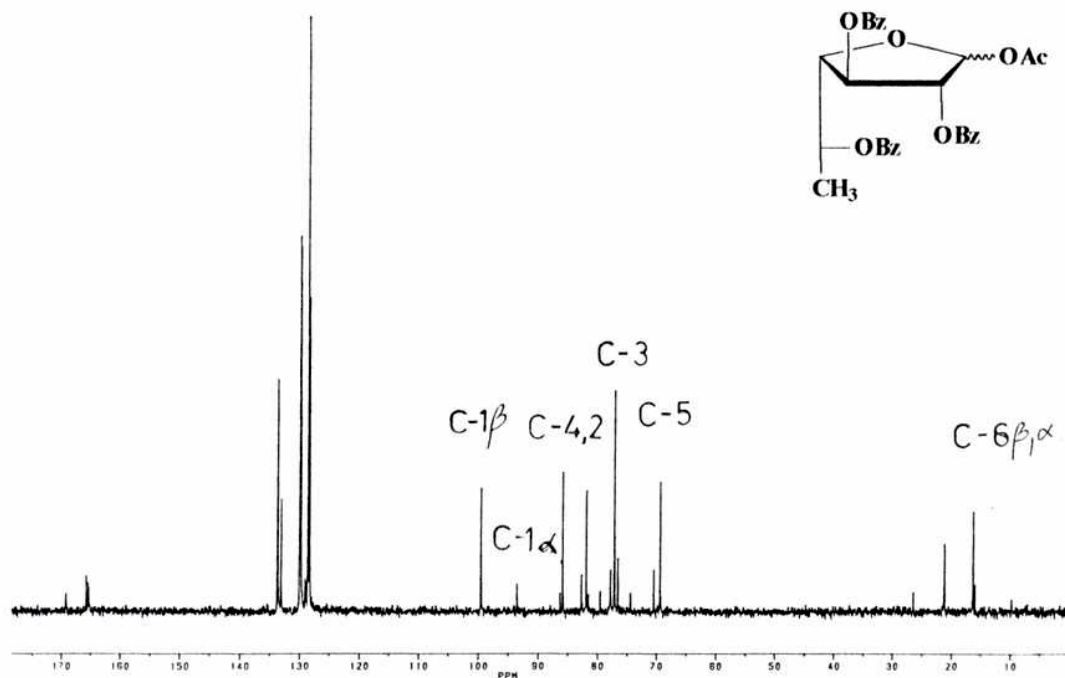
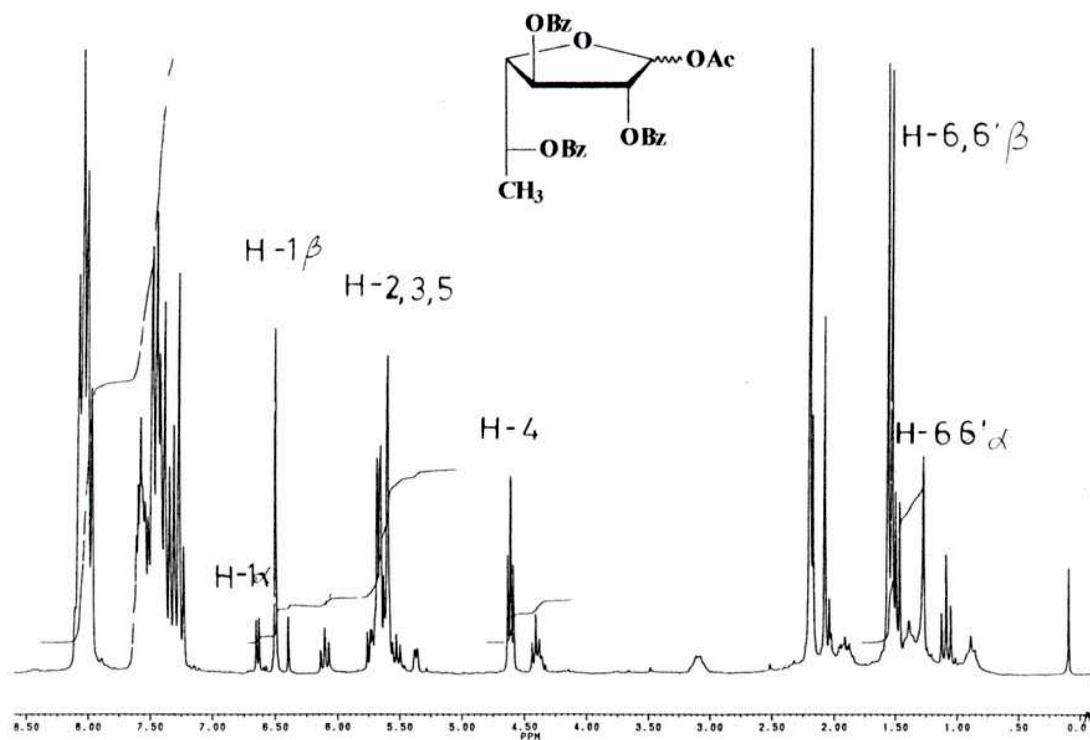


Figura 43. Espectro de RMN de ¹³C de 43.

El próximo paso consistía en generar el metilo en C-6 que se hallaba sustituido con bromo para lograr sintetizar la 1-O-acetil-2,3,5-tri-O-benzoil-6-desoxi- α,β -D-galactofuranosa (**44**). Esto se podía lograr mediante una reacción de hidrogenólisis, como ya se había realizado en nuestro laboratorio en la síntesis de la abecuesa y los abecuósidos (Moradei *et al*, 1991). En nuestro caso, al tener reducida la lactona, no se producirían reacciones de β eliminación y reducción posterior al 3,6-didesoxi--azúcar. La hidrogenólisis catalítica de 1-O-acetil-2,3,5-tri-O-benzoil-6-bromo-6-desoxi- α,β -D-galactofuranosa (**43**) se llevó a cabo empleando Pd sobre carbón 10% como catalizador, en acetato de etilo como solvente y en presencia de trietilamina como base, para neutralizar el ácido bromhídrico que se libera en el proceso de la hidrogenación, manteniendo la presión de hidrógeno en valores de 45 psi, aproximadamente. Se obtuvo 1-O-acetil-2,3,5-tri-O-benzoil-6-desoxi- α,β -D-galactofuranosa (**44**) como una mezcla anomérica, con un rendimiento de 95%. El análisis del espectro de RMN ^{13}C (**Figura 44**) nos permitía observar un desplazamiento a campos altos de la señal de C-6, que aparecía ahora a 15,7 ppm para el anómero β , y a 16,1 ppm para el anómero α , mientras que en el derivado 6-bromado (**43**) aparecían a 29,2 ppm para el anómero β , y 29,5 ppm para el anómero α , respectivamente (Espectro de RMN ^1H **Figura 45**).

Habíamos logrado sintetizar la mezcla de D-fucofuranosas aciladas (**44**) para ser utilizadas en el próximo paso de glicosidación, con un rendimiento de 81% a partir de D-galactono-1,4-lactona (**1**), y por un método conveniente.

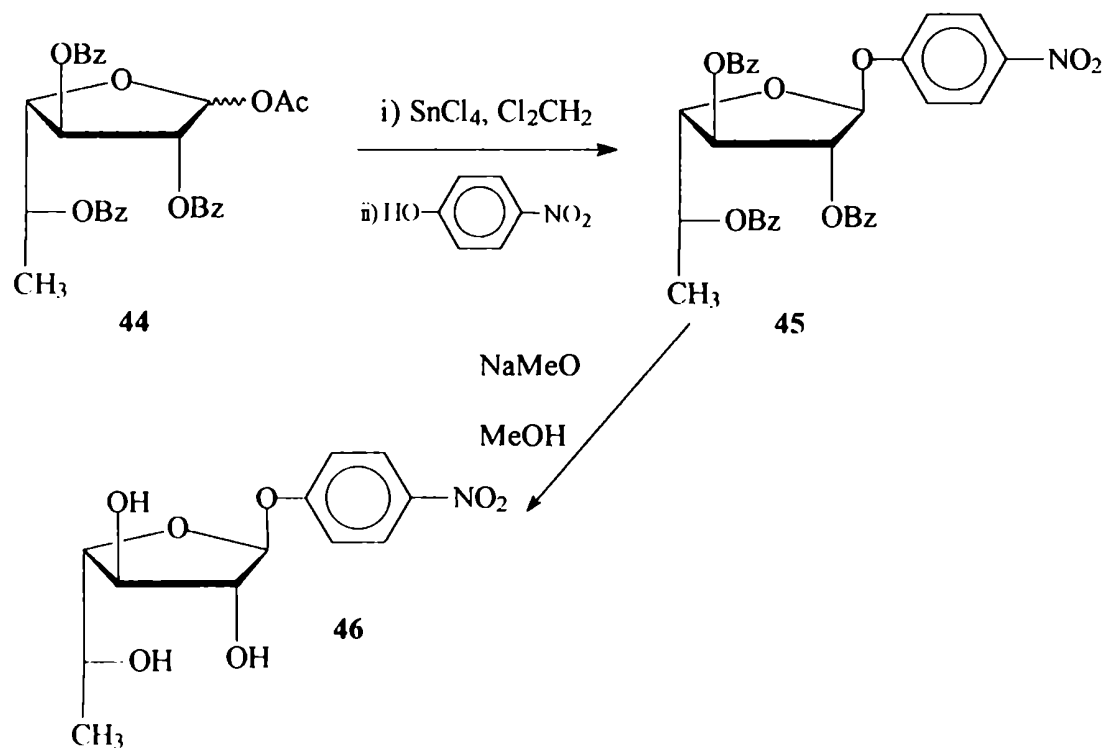
Desde el punto de vista de la conveniencia económica resultaba muy favorable la estrategia de la lactona, producto comercial de menor costo que la D-fucosa utilizada por otros autores para obtener derivados furanósicos (Kobayashi 1997, 1998).

Figura 44. Espectro de RMN de ^{13}C de 44.Figura 45. Espectro de RMN de ^1H de 44.

Reacciones de glicosidación sobre 1-O-acetil-2,3,5-tri-O-benzoil-6-desoxi- α,β -D-galactofuranosa (**44**).

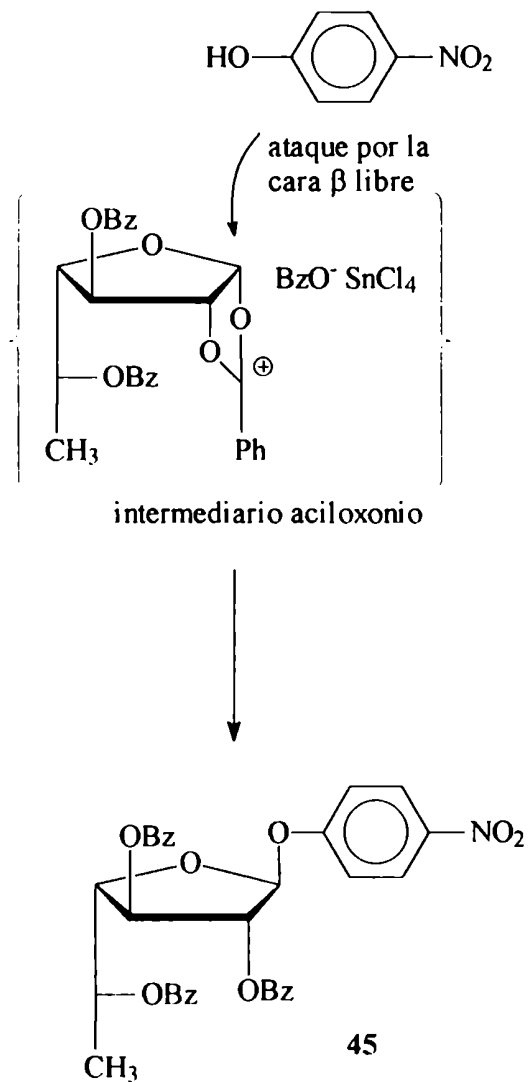
Obtención de 4-nitrofenil β -D-fucofuranósido (**46**)

El trabajo se centraba ahora en obtener los productos de glicosidación de configuración β , a partir del derivado de D-fucofuranosa, la 1-O-acetil-2,3,5-tri-O-benzoil-6-desoxi- α,β -D-galactofuranosa (**44**). En el laboratorio ya se había sintetizado en forma estereoselectiva varios O- y S-glicósidos de derivados de β -D-galactofuranosa (Marino *et al*, 1989; Lederkremer *et al*, 1990, Marino *et al*, 1998) empleando SnCl_4 como catalizador. Por este método, por condensación de 1-O-acetil-2,3,5-tri-O-benzoil-6-desoxi- α,β -D-galactofuranosa (**44**) con 4-nitrofenol se obtuvo el 4-nitrofenil 2,3,5-tri-O-benzoil- β -D-fucofuranósido (**45**) (Esquema 28).



Esquema 28

La asistencia anquimérica del grupo participante en C-2 era responsable de la inducción en la configuración del centro anomérico para dar exclusivamente el anómero β . El mecanismo transcurriría según el **Esquema 29**:

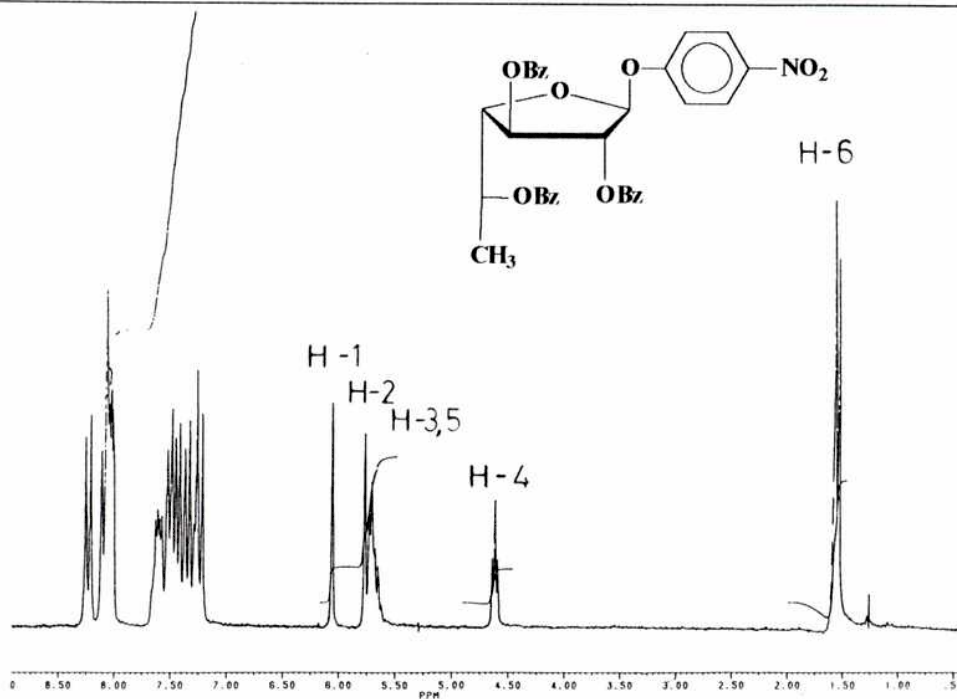
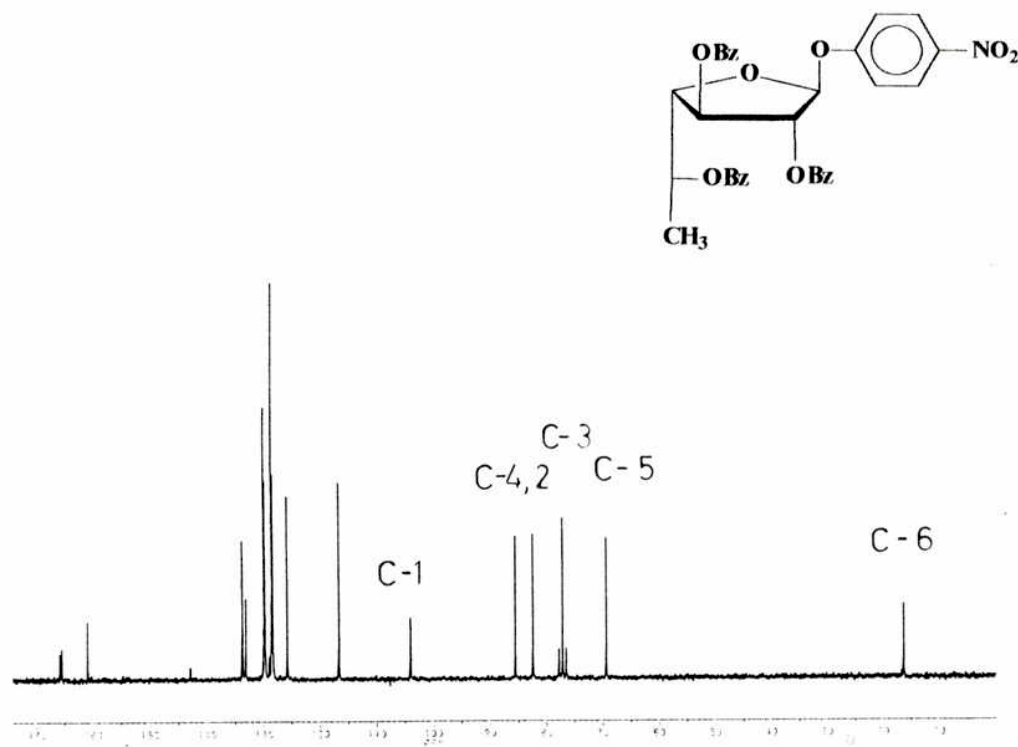


Esquema 29

El análisis de los datos del espectro de RMN ^1H de **45** (Figura 46) confirmó que se trataba del anómero de configuración β , y era semejante a los del glicósido análogo de la D-galactofuranosa, el 4-nitrofenil 2,3,4,5-tetra-O-benzoil- β -D-galactofuranósido (Marino *et al*, 1989), con las diferencias esperadas por la desoxigenación en C-6.

Se podía apreciar que las señales de H-1 y H-2 aparecían como singuletes anchos, típico de sistemas con configuración 1,2-*trans*, como en el caso de la serie β -D-galactofuranosa. Las señales de los H-5 y H-6 se habían desplazado hacia campos altos, debido a la ausencia del átomo de oxígeno en C-6, al igual que ocurre en **44**.

En cuanto a las señales del espectro de RMN ^{13}C de **45** (Figura 47) se pudo observar que la señal de C-1 aparecía a 104,0 ppm, confirmando la configuración β del producto, y las señales de C-2 y C-4 se ubicaban por encima de 80 ppm, indicando que el anillo conservaba la estructura de furanosa.

Figura 46. Espectro de RMN de ¹H de 45.Figura 47. Espectro de RMN de ¹³C de 45.

Se llevó a cabo la desacilación de 4-nitrofenil 2,3,5-tri-O-benzoil- β -D-fucofuranósido (**45**) por el método de Zemplen, empleando una solución de metóxido de sodio 0,5 M en metanol. Se pudo aislar el producto de desacilación 4-nitrofenil β -D-fucofuranósido (**46**, **Esquema 28**) luego de desionizar la solución metanólica pasándola a través de una columna de intercambio catiónico (Dowex 50 H⁺).

El glicósido 4-nitrofenil β -D-fucofuranósido (**46**), se obtuvo con un rendimiento de 51 % a partir de D-galactono-1,4-lactona (**1**).

Los datos espectroscópicos de RMN ¹³C (**Figura 49**, **Tabla 6**), correspondientes a **46**, se mostraban de acuerdo con los informados por Kobayashi para otros glicósidos del tipo β -D-fucofuranósidos (Kobayashi, 1997, 1998). Se podía observar la señal de C-1 que aparecía a 106,2 ppm y las señales correspondientes a C-2 y C-4 a 82.1 ppm y 89.5 ppm respectivamente, indicando la estructura furanósica del anillo.

Con respecto al espectro de RMN ¹H (**Figura 48**) de 4-nitrofenil β -D-fucofuranósido (**46**), fueron totalmente asignadas sus señales (**Tabla 7**). Se podía observar para **46** que la señal de H-1, que aparecía a 5,71 ppm como un doblete, presentaba un valor $J_{1,2}$ de 1,4 Hz, correspondiente a una relación 1,2-*trans*, confirmando la configuración β del centro anomérico.

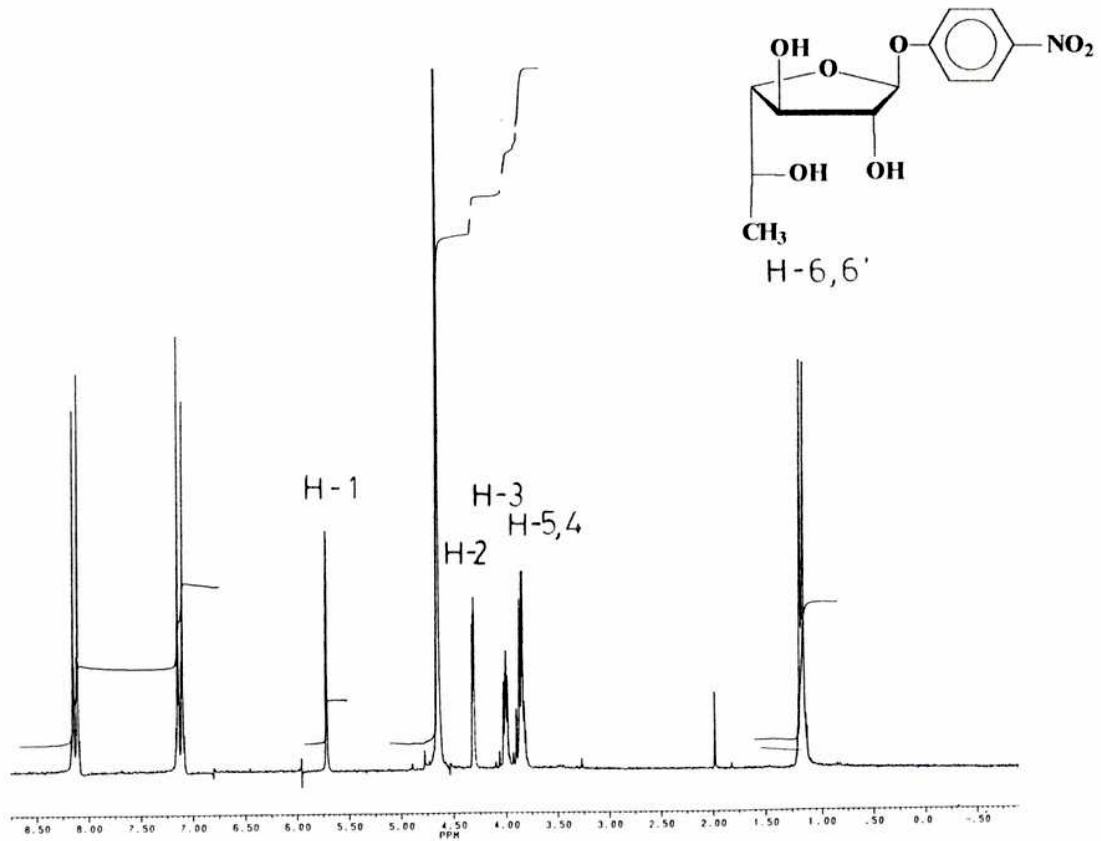
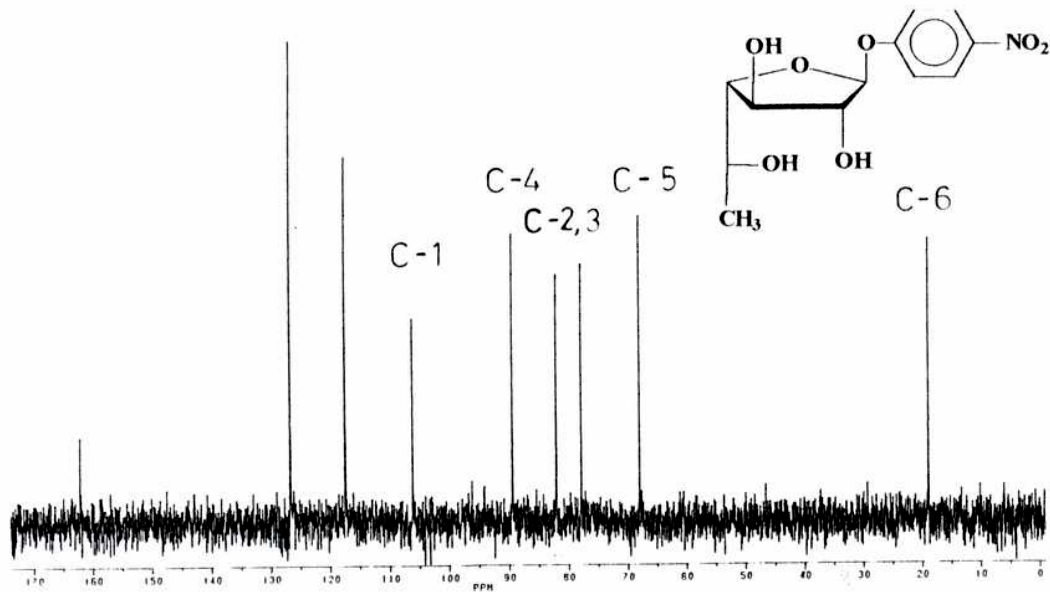
Figura 48. Espectro de RMN de ^1H de 46.Figura 49. Espectro de RMN de ^{13}C de 46.

Tabla 6 de RMN ^{13}C .

| Compuesto. | $\delta \text{ C}$ | | | | | | |
|-----------------------|--------------------|-----------------------------|----------|-------|-------|-----------|-----------|
| | C-1 | C-2 | C-3 | C-4 | C-5 | C-6 | |
| 42^a | 100,0 | 81,8 | 77,6 | 82,9 | 72,1 | 29,2 | |
| 43^a | 99,3 | 81,8 | 77,7 | 83,6 | 71,8 | 29,2 | |
| 44^a | 99,3 | 81,7 | 77,0 | 85,7 | 69,2 | 15,7 | |
| 45^a | 104,0 | 82,4 | 77,0 | 85,5 | 69,3 | 16,3 | |
| 46^b | 106,2 | 82,1 | 77,9 | 89,5 | 68,1 | 19,0 | |
| 47^a | Galf | 105,9 | 81,5 | 76,1 | 85,5 | 70,6 | 15,5 |
| | Manlac | 168,7 | 69,2 | 71,8 | 77,0 | 67,9 | 61,8 |
| 48^a | Galf | 106,0 | | | | | 15,9/15,4 |
| | Manf | 99,9 α /95,5 β | | | | | |
| 49^b | Galf | 105,1/104,8 | 82,4 | 78,3 | 88,1 | 68,3 | 19,1/16,4 |
| | Manp | 94,9 α /94,7 β | (75,9--- | ----- | ----- | ----66,0) | 61,6 |

^aHecho en CDCl_3 . ^bHecho en D_2O . *Las asignaciones pueden estar intercambiadas.

Tabla 7 de RMN ¹H.

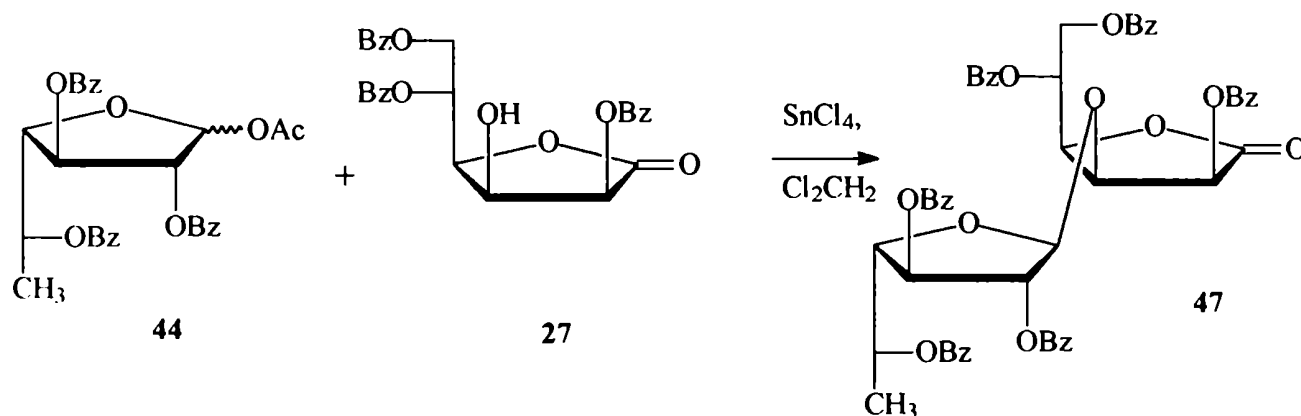
| Comp | H-1 (<i>J</i> _{1,2}) | H-2 (<i>J</i> _{2,3}) | H-3 (<i>J</i> _{3,4}) | H-4 (<i>J</i> _{4,5}) | H-5 (<i>J</i> _{5,6}) | H-6,6' (<i>J</i> _{5,6}) |
|-----------------------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|---------------------------------------|
| 41^a | | 6,10 (6,0) | 5,80 | 5,20 (6,0) | 5,80 (2,5) | 3,73 |
| 42^a | 5,72 (<0,5) | 5,52 | 5,52 | 4,95 (4,3) | 4,45 (6,2) | 3,78 (8,4) |
| 43^a | 6,51 (<0,5) | 5,61 | 5,61 (3,2) | 4,88 (4,6) | 5,83 | 3,77 |
| 44^a | 6,50 (<0,5) | 5,60 (<1) | 5,64 (4,6) | 4,61 (4,5) | 5,55 (6,5) | 1,55 |
| 45^a | 6,05 (<0,5) | 5,76 (<1) | 5,68 ^b | 4,60 (4,8) | 5,68 ^b | 1,55 |
| 46^c | 5,71 (<1,4) | 4,30 (<2,9) | 4,00 (5,2) | 3,85 ^b | 3,85 (6,2) | 1,16 |

^aHecho en CDCl₃. ^bCentro de un multiplete complejo. ^cHecho en D₂O.

Obtención de 3-O-β-D-fucofuranosil-D-manosa (49)

Se encaró también la síntesis de un disacárido derivado de la D-fucofuranosa, la 3-O-β-D-fucofuranosil-D-manosa (**49**), para ensayar la especificidad frente a la exo β-D-galactofuranosidasa aislada a partir de *P. fellutanum*.

Para ello se empleó la metodología de la glicosil-aldonolactona. A tal efecto se utilizó 1-O-acetil-2,3,5-tri-O-benzoil-6-desoxi-α,β-D-galactofuranosa (**44**) como dador de glicosilo, y 2,5,6-tri-O-benzoil-D-manono-1,4-lactona (**27**) como aceptor (**Esquema 30**).



Esquema 30

El producto de glicosidación, la 2,5,6-tri-O-benzoil-3-O-(2,3,5-tri-O-benzoil-β-D-fucofuranosil)-D-manono-1,4-lactona (**47**), se aisló como un producto cristalino con un rendimiento de 65 %.

Los espectros de RMN ^1H (**Figura 50**) y de RMN ^{13}C (**Figura 51**) de **47** fueron asignados por comparación con los correspondientes al 4-nitrofenil 2,3,5-tri-O-benzoil-β-D-fucofuranósido (**45**). Se podía observar que el hidrógeno anomérico H-1' aparecía a 5,53 ppm, y mostraba un valor de acoplamiento $J_{1,2}$ menor a 0,5 Hz, lo que nos indicaba una relación 1,2-*trans*, o sea que el enlace glicosídico tenía

configuración β (Bundle *et al*, 1976). Por otra parte los hidrógenos de C-6' (la posición desoxigenada del aceptor de glicosilo) seguían apareciendo como un doblete centrado en 1,13 ppm, presentando una constante de acoplamiento con H-5' de 6 Hz, aproximadamente. En cuanto a los datos observados en el espectro de RMN ^{13}C , se podía observar la presencia de dos señales a 85,5 y 81,5 ppm, correspondientes a C-4' y C-2', respectivamente, indicándonos que el anillo conservaba su estructura furanósica. Se observaba la señal a 105,9 ppm de C-1, confirmando la configuración β del centro anomérico.

Todas las señales observadas para la unidad fucofuranosilo de **47** guardaban semejanza con las correspondientes a 4-nitrofenil 2,3,5-tri-O-benzoil- β -D-fucofuranósido (**45**). Las señales de la porción lactónica de la glicosil-lactona se observaban muy similares a las correspondientes a la 2,5,6-tri-O-benzoil-D-manono-1,4-lactona (**27**).

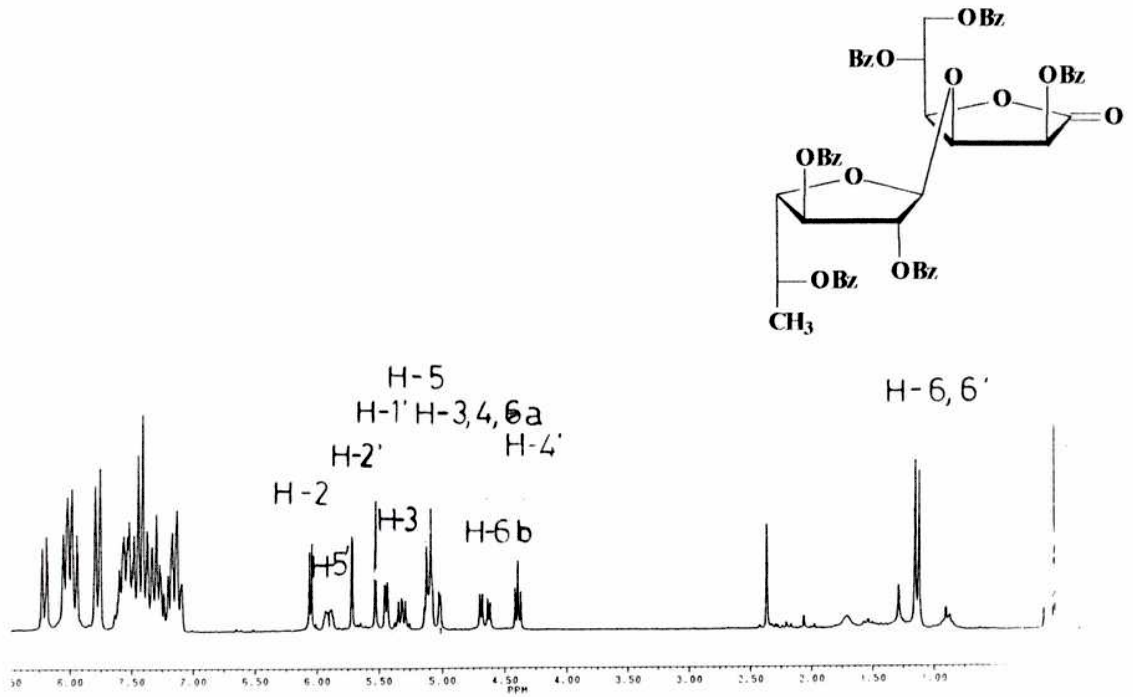


Figura 50. Espectro de RMN de ¹H de 47.

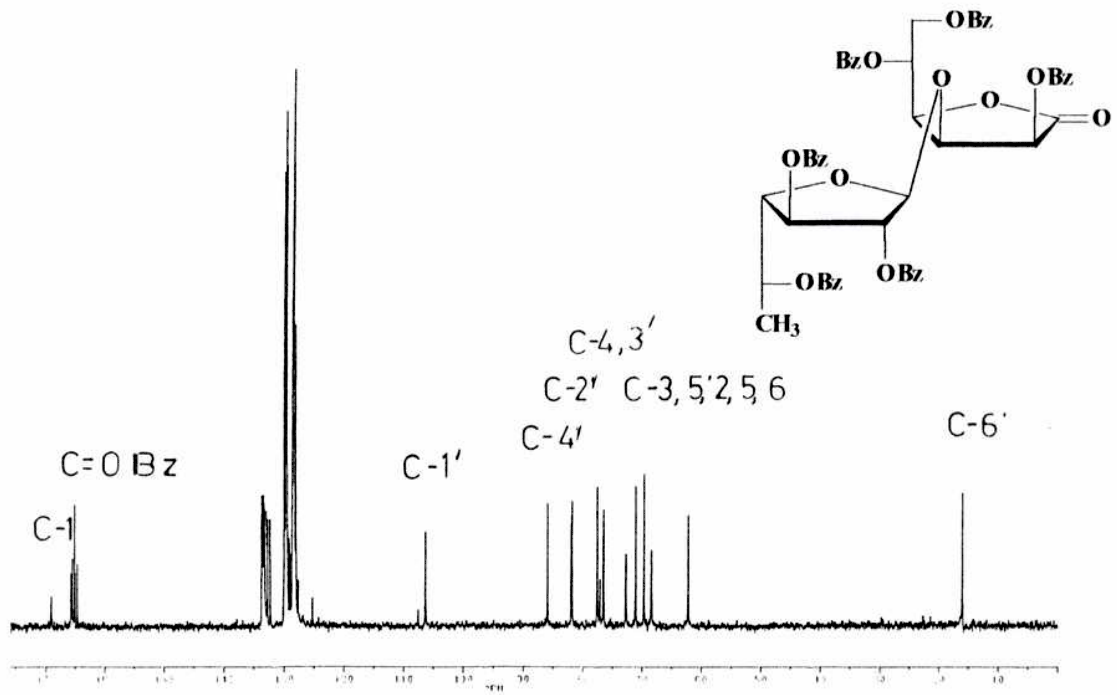
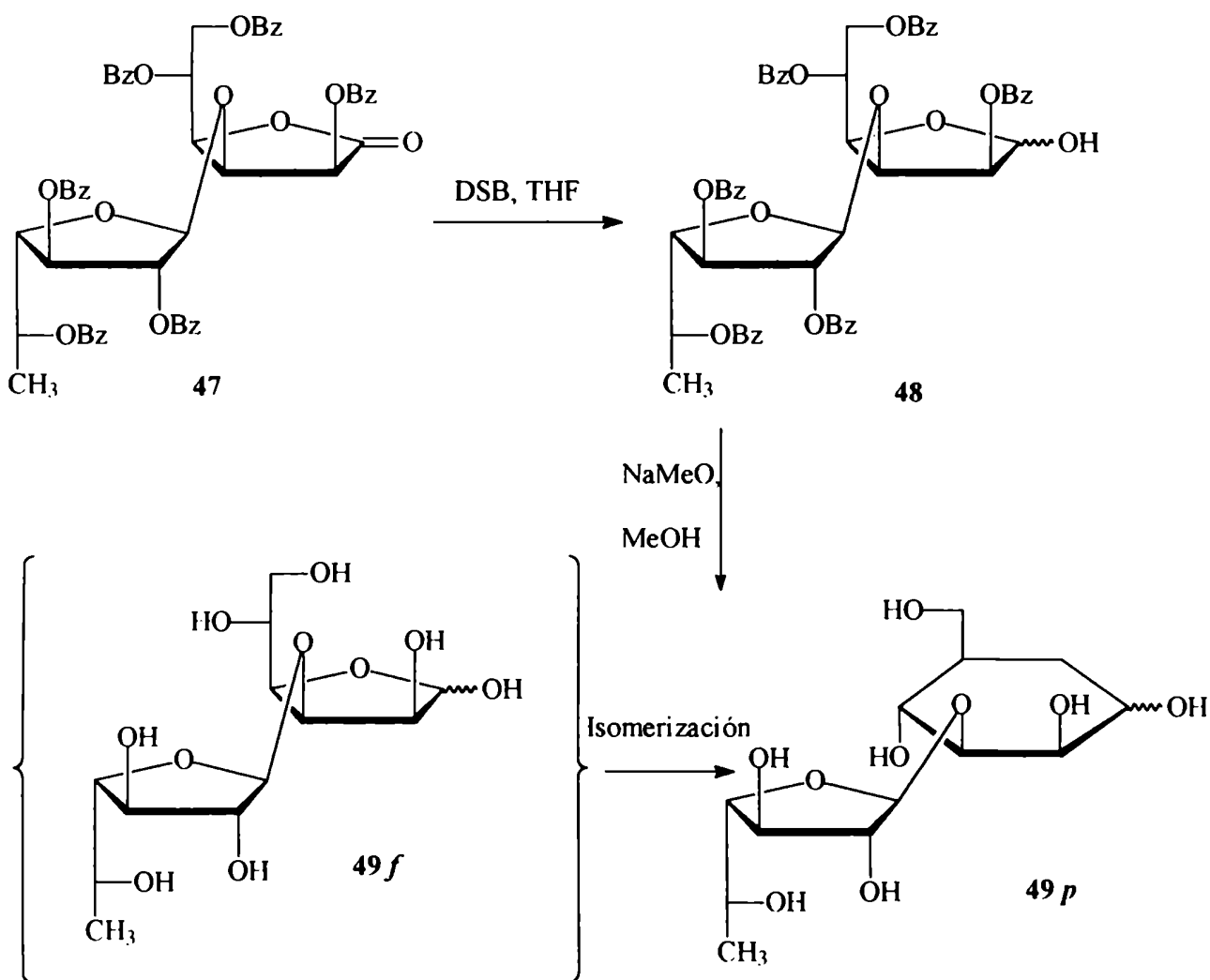


Figura 51. Espectro de RMN de ¹³C de 47.

Nuestro próximo paso, de acuerdo a la metodología aplicada de la glicosil-lactona, consistía en la reducción de la lactona **47** al lactol **48**. Al tratar 2,5,6-tri-O-benzoil-3-O-(2,3,5-tri-O-benzoil- β -D-fucofuranosil)-D-manono-1,4-lactona (**47**) con diisoamilborano obtuvimos 2,5,6-tri-O-benzoil-3-O-(2,3,5-tri-O-benzoil- β -D-fucofuranosil)-D-manofuranosa (**48**), como una mezcla de los dos anómeros (**Esquema 31**).



Esquema 31

Al analizar los datos del espectro de RMN ^{13}C de **48** (Figura 52) observábamos una señal a δ 95,5 ppm correspondiente a C-1 del anómero β , y otra señal a δ 99,9 ppm correspondiente a C-1 del anómero α . La proporción entre ambos anómeros era $\beta/\alpha \sim 2$, según podía apreciarse de la relación entre las señales correspondientes a C-6'.

La desacilación de 2,5,6-tri-O-benzoil-3-O-(2,3,5-tri-O-benzoil- β -D-fucofuranosil)-D-manofuranosa (**48**) con metóxido de sodio en metanol 0,5 M nos permitió obtener el disacárido libre 3-O- β -D-fucofuranosil-D-manosa (**49**). Se observaba que la porción reductora del disacárido había sufrido una expansión tautomérica, es decir que la manosa se había reordenado a la forma piranósica más estable (Esquema 31), según pudo apreciarse en el espectro de RMN ^{13}C (Figura 53), donde aparecían las señales correspondientes a C-1 a δ 94,9 ppm y δ 94,7 ppm, correspondientes al anómero α y β , respectivamente, mostrando una relación $\alpha/\beta \sim 1,7$. Cabe destacar que estos valores de desplazamientos químicos están en buen acuerdo con los que presenta la manopiranososa. Por otro lado se apreciaban las señales para el C-1' correspondiente al residuo β -D-fucofuranosa a δ 105,1 ppm y δ 104,8 ppm de los anómeros α y β , respectivamente. Con respecto a las señales de C-6', aparecían a δ 19,1 ppm y δ 16,4 ppm, correspondiendo a ambos anómeros. La influencia de estos carbonos desoxigenados sobre el C-4' se manifestaba en un desplazamiento de la señal de este carbono a campos más bajos, mientras que las señales correspondientes a C-5' se desplazaban a campos más altos. Este mismo efecto se había descrito para las señales correspondientes de la D-galactopiranososa desoxigenada en C-6 (D-fucopiranososa) (Bock *et al*, 1983).

En cuanto a las señales del espectro de RMN ^1H (Figura 54) de 3-O- β -D-fucofuranosil-D-manosa (**49**), la señal de H-1' del residuo β -D-fucofuranosa resultaba influenciada por la configuración anomérica del residuo de D-manopiranososa. Se podían observar dos dobletes cercanos, uno a δ 5,14 ppm ($J_{1,2}$, 1,5 Hz) correspondiente al disacárido 3-O- β -D-fucofuranosil- β -D-manopiranososa (**49 β**) y el otro a δ 5,12 ppm ($J_{1,2}$, 1,2 Hz) correspondiente al disacárido 3-O- β -D-fucofuranosil- α -D-manopiranososa (**49 α**). En cuanto a las señales del residuo de D-manopiranososa, se

podían observar dos dobletes, uno a δ 5,18 ppm ($J_{1;2'}$, 1,3 Hz) correspondiente a la α -D-manopiranososa, y el otro a δ 4.87 ppm ($J_{1;2'}$, 0.7 Hz) correspondiente a la β -D-manopiranososa. Estas señales estaban de acuerdo con las correspondientes al disacárido 3-O- β -D-galactofuranosil-D-manopiranososa (**33**).

Los compuestos **46** y **49** serían análogos 6-desoxigenados de 4-nitrofenil β -D-galactofuranósido (**50**) y de 3-O- β -D-galactofuranosil-D-manopiranososa (**33**) respectivamente, adecuados para estudiar la influencia del HO-6 del azúcar en la actividad enzimática de la exo β -D-galactofuranosidasa de *P. fellutanum*. Si los compuestos **46** y **49** actuaran como sustratos se liberaría la aglicona y la reacción se podría seguir espectrofotométricamente en el caso de **46**, o por HPLC-DIONEX en el caso de **49**. Estos estudios se describen en un capítulo posterior.

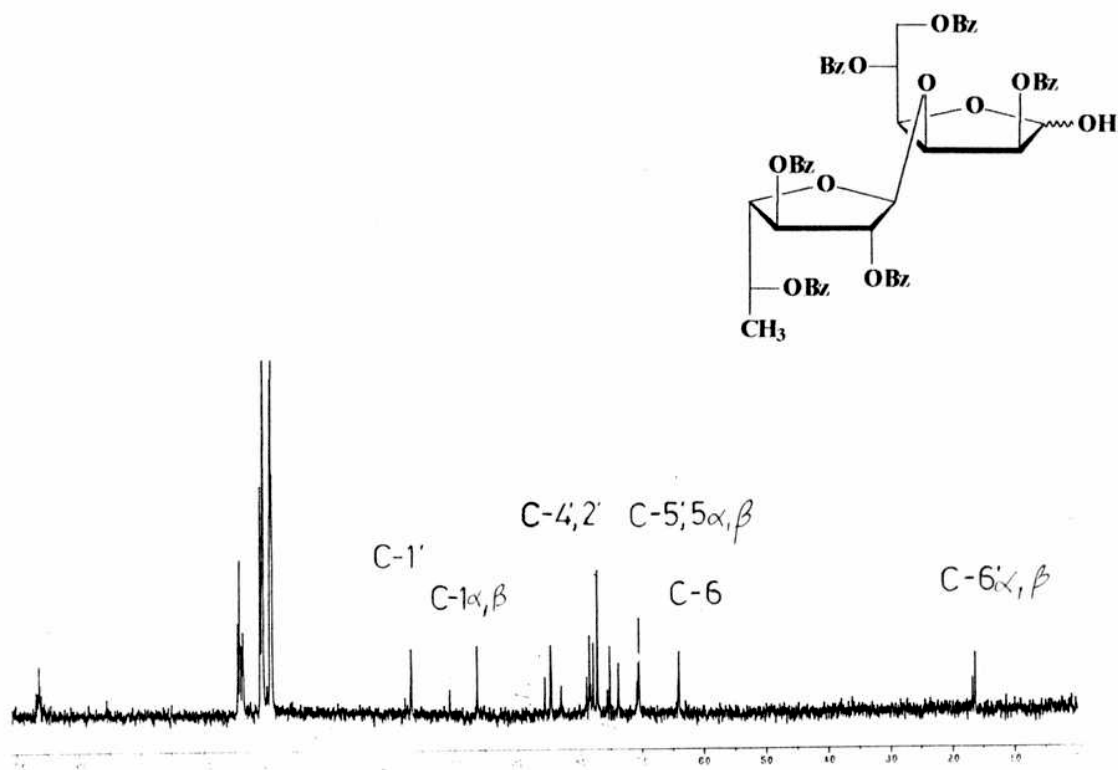


Figura 52. Espectro de RMN de ¹³C de 48.

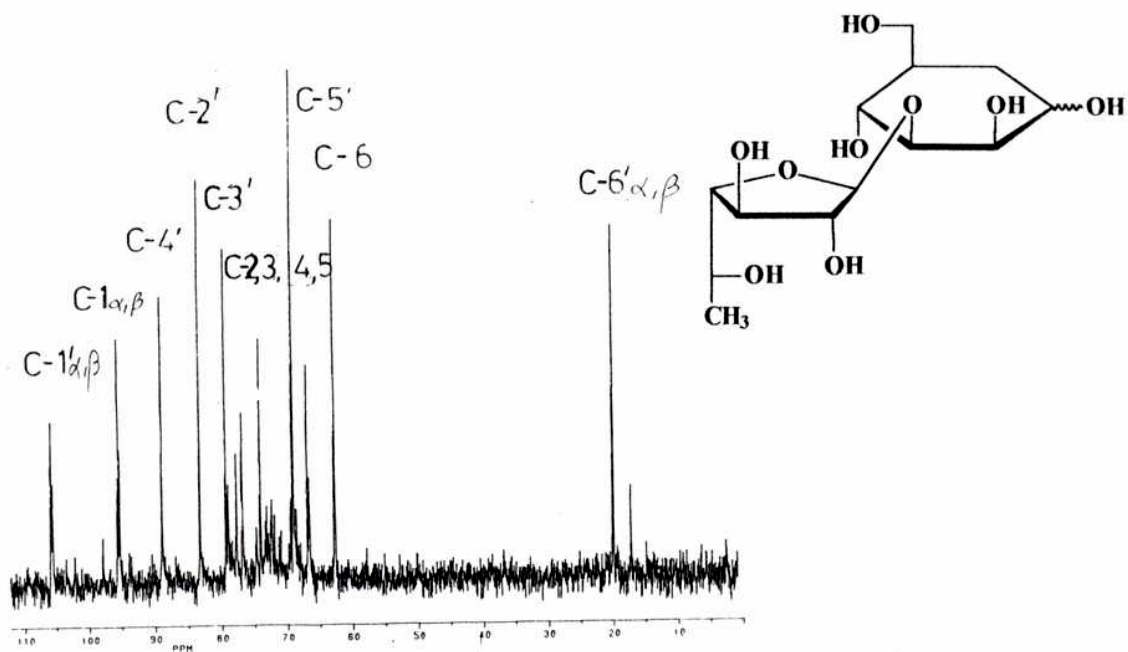
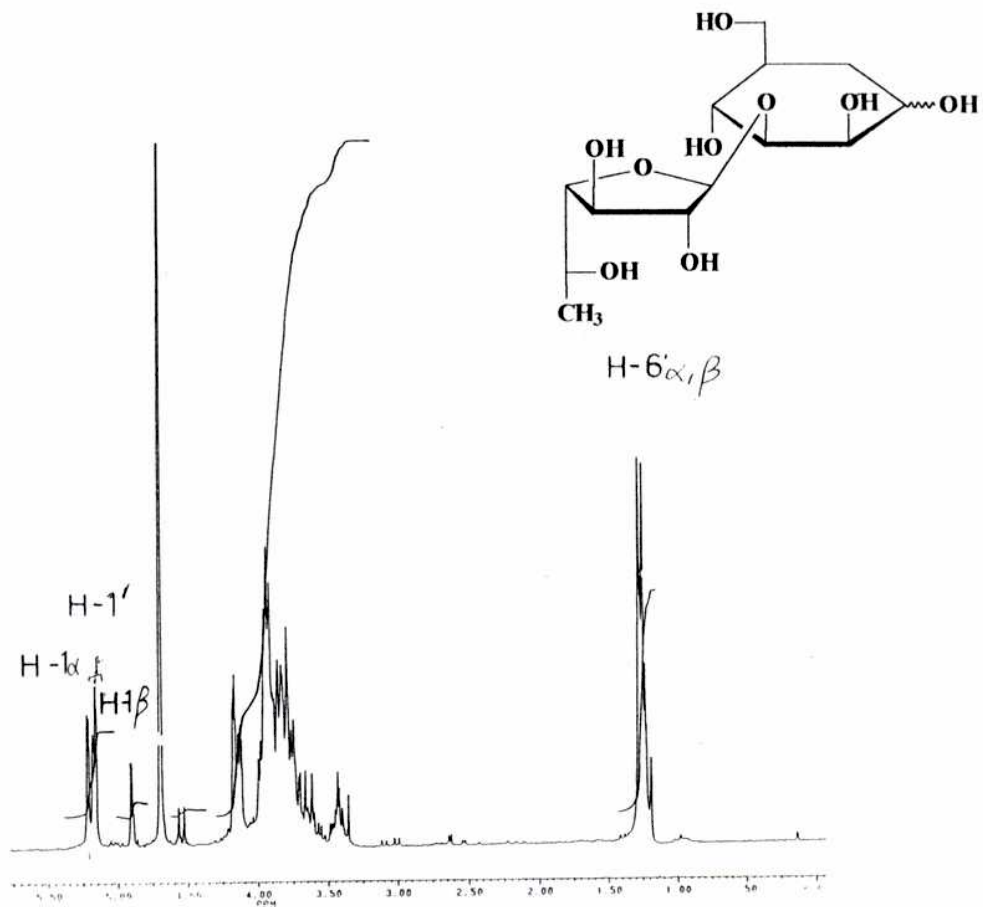


Figura 53. Espectro de RMN de ¹³C de 49.



CAPITULO 7

Estudio de especificidad de β -D-galactofuranosidasa. Utilización de análogos de sustratos desoxigenados

Los análogos desoxigenados de glicósidos son herramientas útiles para el estudio de las interacciones sustrato-enzima de glicosidasas y glicosiltransferasas. Brindan información referente a la especificidad de la enzima, como así también, en algunos casos, se comportan como inhibidores (Bock *et al*, 1990). Se ha observado que las uniones hidrógeno entre los grupos hidroxilos del sustrato y los del sitio activo de las enzimas son fundamentales en la formación del complejo enzima-sustrato, de modo que disponer de análogos de sustrato desoxigenados en distintas posiciones permite analizar la contribución de cada HO a la estabilidad de dicho complejo. Con este objetivo se han sintetizado derivados desoxigenados en C-2,3,4 y 6 de 4-nitrofenil α -D-glucopiranosido para estudiar la importancia de cada hidroxilo en la interacción con α -glucosidasas de distintos orígenes, observándose que las glucosidasas de *Aspergillus niger* hidroliza el análogo desoxigenado en C-2 con una actividad sustancialmente mayor que al sustrato oxigenado. La glucosidasa de *Bacillus stearothermophilus* no presenta actividad frente a este compuesto (Nishio *et al*, 2002). Análogamente, se sintetizaron derivados desoxigenados de manósidos para estudios referentes a diferentes manosidasas (Hakamata *et al*, 2000). Estudios similares se realizan con análogos desoxifluorados (Namchuk *et al*, 2000). Las diferencias de actividad de los sustratos desoxigenados o modificados frente a diferentes enzimas se atribuye a diferencias estéricas o hidrofóbicas, y brindan información a cerca de la topología del sitio activo. En los casos en que la enzima de interés se ha secuenciado, es posible clonarla y modificarla de manera de reemplazar aminoácidos del sitio activo y obtener mutantes. Los estudios cinéticos de las mutantes frente a sustratos y a análogos permiten saber qué aminoácidos están involucrados en el reconocimiento de los sustratos y en la catálisis (Mulichak *et al*, 2001).

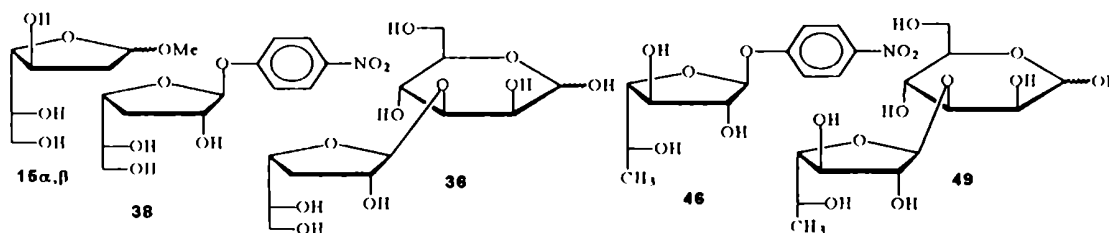
El interés de este laboratorio en aspectos glicobiológicos de la galactosa furanósica motivó el desarrollo de la síntesis de los 2, 3 y 6-desoxi-galactofuranósidos descritos en esta tesis, los cuales se utilizaron para estudios de especificidad de la exo β -D-galactofuranosidasa de *P. fellutanum*. Esta enzima fue por primera vez estudiada por Gander (Rietschel-Berst *et al*, 1977), y en nuestro laboratorio se sintetizaron sustratos e inhibidores (Marino *et al*, 1986, 1998, 2001), como así también se estudió el efecto del desarrollo de cultivos de *P. fellutanum* en presencia de dichos inhibidores (Mariño *et al*, 2002). Se logró también desarrollar una fase cromatográfica por afinidad que permitió la purificación de la enzima (Miletti *et al*, 1999). Cabe destacar que no se conoce la secuencia de aminoácidos de esta enzima, ni tampoco se la ha cristalizado.

Para estudiar las interacciones biológicas de los desoxigalactofuranósidos se realizaron incubaciones con la enzima obtenida a partir del medio luego de 8 días de cultivo del *P. fellutanum*, el cual fue filtrado, dializado y purificado por cromatografía de afinidad utilizando la fase desarrollada a tal fin (Miletti *et al*, 1999). Todos los ensayos se realizaron utilizando 100 μ L (20 μ g de proteína) del extracto enzimático, realizando las incubaciones en las condiciones óptimas para la enzima según se habían establecido previamente en este laboratorio (Marino *et al*, 1998).

Para comprobar si los compuestos **15 α** , **15 β** , **30**, **33**, **36**, **38**, **46**, **49** se comportaban como sustrato de la enzima, se incubaron en concentración 5 mM con la misma. La evaluación de la hidrólisis de la unión glicosídica se realizó, según el caso, espectrofotométricamente midiendo la aglicona liberada (**38**, **46**), ó por cromatografía de intercambio aniónico de alta resolución con detección por pulso amperométrico (HPAEC-PAD, sistema DIONEX) (**15 α** , **15 β** , **30**, **33**, **36**, **49**), midiendo la cantidad de monosacárido liberado. Solamente se observó acción hidrolítica de la enzima sobre el disacárido **33** y el alditol **30**. Luego de la incubación los extractos se diluyeron convenientemente con agua y se observó por HPAEC-PAD que el disacárido **33** (t_r 23.17) se había hidrolizado dando galactosa (t_r 3.62 min) y manosa (t_r 4.02 min). Análogamente se observó que el alditol disacárido **30** (t_r 9.45 min) rindió galactosa y el correspondiente manitol.

El sustrato natural de esta enzima es el péptidofosfogalactomanano (pPGM) que presenta un "core" de manosas sustituidas por grupos fosfato y ramificado por cadenas de longitud variable de unidades de β -D-galactofuranosas unidas 1-5 entre sí (Rietschel-Berst *et al*, 1977). La unión presente en los compuestos **33**, **36**, es la que se observa en la unidad terminal del lipopéptidofosfoglicano (LPPG) de *T. cruzi* (Lederkremer *et al*, 1995), y ya se había demostrado que era la responsable de la reacción cruzada con anticuerpos para varios hongos. Los resultados obtenidos en esta tesis indican que esta enzima no es específica sólo para la unión Gal β 1-5Gal β presente en el sustrato natural, sino que admite variaciones en la aglicona.

En **15 α** , **15 β** , **36**, **38**, **46**, **49**, todos ellos desoxigenados en alguna posición, no se observó la ruptura del enlace glicosídico, aún luego de 24 horas de incubación con la enzima, estableciéndose que no se comportan como sustrato.



Para evaluar la actividad inhibitoria de los compuestos sintetizados, se incubaron con la enzima utilizando 4-nitrofenil β -D-galactofuranósido (**50**) como sustrato (Marino *et al*, 1986), de manera análoga a como se habían evaluado otros inhibidores (Marino *et al*, 1998, 2001). Se observó que la presencia de **15 α** , **15 β** , **36**, **38**, **46**, **49** no afectaba la actividad de la enzima frente a **50**. Experimentos análogos, pero realizando la pre-incubación de los compuestos **15 α** , **15 β** , **36**, **38**, **46**, **49** con la enzima, antes del agregado del sustrato, tampoco alteraron la hidrólisis de **50**.

Cabe destacar que se encontraron condiciones adecuadas para separar por HPAEC-PAD los compuestos sintetizados. Así por ejemplo, según se muestra en la **Figura 55**, se pudieron resolver 2-deoxigalactosa y los metil glicósidos **15 α** y **15 β** . Luego de incubar la enzima con **15 α** ó **15 β** , no se observa la formación de 2-deoxigalactosa.

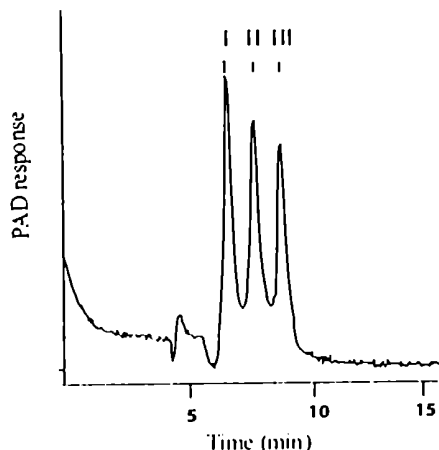


Figura 55. Separación de 2-desoxi-D-*lixo*-hexosa (I), metil 2-desoxi- β -D-*lixo*-hexofuranósido (II ó 15 β) y metil 2-desoxi- α -D-*lixo*-hexofuranósido (III ó 15 α), mediante HPAEC-PAD empleando una columna de intercambio aniónico Carbo-Pac MA-10

En estudios con otras glicosidasas se encontró una especificidad amplia, y los diferentes análogos desoxigenados presentaban actividad como sustratos, cada uno con una cinética particular, que permitió evaluar la importancia del HO ausente en la interacción con la proteína. En el caso de la *exo* β -D-galactofuranosidasa de *P. fellutanum*, se concluyó que presenta una especificidad muy estricta en cuanto a la porción glicosídica, y que los HO-2, 3, y 6 son esenciales para la interacción con la enzima.

PARTE EXPERIMENTAL

CAPITULO 8

Instrumental y Métodos Generales

Los puntos de fusión (pf) se determinaron en un aparato Fisher-Johns, y no fueron corregidos.

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

Los espectros de resonancia magnética nuclear de ^1H se realizaron a 200 MHz y los de ^{13}C se realizaron a 50,3 MHz en un equipo Bruker ACE-200. En los casos en que se indique expresamente los espectros de resonancia magnética nuclear de ^1H se llevaron a cabo a 500 MHz, y los de ^{13}C a 125 MHz. Los desplazamientos químicos para ^1H RMN se expresan en todos los casos en la escala δ , en ppm respecto de la resonancia del tetrametilsilano utilizado como referencia interna (0,00 ppm). Las constantes de acoplamiento se expresan en Hertz (Hz). Las señales se indican en cada caso como singulete (s), doblete (d), doblete ancho (da), doblete (dd), doblete ancho (da), doblete ancho (da), triplete (t) o multiplete (m). Los desplazamientos químicos para ^{13}C RMN se expresan en todos los casos en la escala δ , en ppm respecto de la resonancia del cloroformo- D_1 utilizado como referencia interna (77,00 ppm, banda central), salvo que se haya utilizado otro solvente.

Las cromatografías en placa delgada (ccd) se realizaron sobre placas de aluminio cubiertas de sílica gel F254 (Merck) de 0,2 mm de espesor. Las manchas se revelaron por iluminación con luz ultravioleta de 254 nm y/o inmersión en una solución de H_2SO_4 5%, anisaldehído 0,01% en etanol, y posterior calentamiento a 150 °C. Los solventes de desarrollo se indican en cada caso.

Las cromatografías en columna se realizaron sobre sílica gel 60 Å, malla 200-400 (Aldrich), y los solventes de elusión utilizados fueron purificados previamente por destilación fraccionada y se indican en cada caso específicamente.

Reactivos Generales

Tetracloruro de estaño (SnCl₄) :

Se lo destiló a presión reducida sobre granallas de Sn⁰ desengrasadas y secas, en condiciones anhidras y en un equipo adecuado para esta operación. El destilado se recogió en ampollas de vidrio conteniendo pequeños trozos de Sn⁰ desengrasado y seco, y fueron luego selladas con mechero bajo corriente de nitrógeno seco.

Bromotrimetilsilano (BrSiMe₃) :

Se lo destiló a presión atmosférica y en condiciones anhidras en un equipo adecuado para esta operación. El destilado se recogió en ampollas de vidrio que fueron luego selladas con mechero bajo corriente de nitrógeno seco.

Borano en THF (BH₃•THF) :

Se preparó básicamente según la técnica descrita por Brown (1974). A una suspensión de borohidruro de sodio (NaBH₄, 14,82 g; 0,391 mol) en bis(2-metoxietil) éter (diglima, 120 mL), en un balón de tres bocas, se agregó lentamente desde una ampolla compensada trifluoruro de boro·etil eterato (BF₃•Et₂O, 62 mL; 0,512 mol) a temperatura ambiente y con agitación. El agregado duró 2 h mientras se burbujeaba en la suspensión N₂ seco y libre de oxígeno (para lograr esto se lo hacía pasar a través de una solución alcalina acuosa de pirogalol, luego por hidróxido de potasio, ácido sulfúrico, hidróxido de potasio nuevamente, y por último a través de una columna de tamices moleculares de 3 Å. En el balón se generaba mientras tanto diborano gaseoso (B₂H₆), insoluble en la diglima, que era arrastrado y se hacía burbujear por un frasco lavador conteniendo una suspensión de NaBH₄ (0,4 g) en diglima (12 mL), para eliminar restos de BF₃. Luego el gas se recogía en frascos lavadores conteniendo THF anhidro (120 mL) enfriado a -20 °C para formar el

complejo $\text{BH}_3\cdot\text{THF}$. Luego de finalizado el agregado en el balón, éste se calentaba suavemente en baño de agua a $60\text{ }^\circ\text{C}$ para desplazar los restos de diborano que pudieran haber quedado disueltos en la diglima.

Para determinar la molaridad de la solución resultante, se tomó 1,0 mL de la solución y se la volcó sobre 10 mL de acetona anhidra, se agregaron luego 10 mL de H_2O y 0,7 g de manitol. La solución resultante se agitó y tituló con hidróxido de sodio 0,1 M valorado, usando fenolftaleína como indicador. La concentración de la solución de borano obtenido variaba entre 2,0 y 2,4 M en diferentes preparaciones.

Con el objetivo de obtener preparaciones de borano más concentradas se introdujo en esta tesis una variación en la preparación que consistió en sustituir la diglima (dimetil éter del dietilenglicol) por otro éter (dietil éter del dietilenglicol) en el que el diborano era más insoluble y se recuperaba por lo tanto en mayor medida. Se empleó este solvente en lugar de la diglima y los resultados obtenidos fueron soluciones de borano en THF que alcanzaron valores de hasta 3,7 M.

Bis(2-butil-3-metil)borano (diisoamilborano) :

En un balón seco se inyectó 2-metil-2-buteno (2 equivalentes) bajo atmósfera de nitrógeno y se enfrió entre -10 y $-20\text{ }^\circ\text{C}$. Se agregó lentamente y con agitación una solución de borano en THF (1 equivalente). Una vez finalizado el agregado, la mezcla se agitó por 6 h a $0\text{ }^\circ\text{C}$ y se empleó para reducir el compuesto indicado en cada caso particular (una aldonolactona protegida).

Trifluoruro de boro·etil eterato ($\text{BF}_3\cdot\text{Et}_2\text{O}$) :

A un volumen de solución de trifluoruro de boro·etil eterato guardada en la heladera se le agregó otro volumen de éter etílico anhidro y se destiló, se descartó la cabeza que consistía en éter etílico, y se recogió la fracción que destiló a $126\text{ }^\circ\text{C}$, formada por el complejo. Se usó inmediatamente en la preparación del diborano.

Cloruro de benzoilo :

A un volumen de cloruro de benzoilo se agregó otro volumen igual de cloruro de tionilo (Cl_2SO). Se reflujo la solución durante 1 h, y luego se destiló con columna de fraccionamiento y se descartó la cabeza, recogiendo luego el cloruro de benzoilo puro, libre de ácido benzoico.

Cloruro de tosilo :

Se disuelve 1 g en 10 mL de hexano a ebullición. Se filtra el ácido 4-toluensulfónico, y se deja cristalizar el cloruro de 4-toluensulfonilo. Se filtra, seca y se emplea en las reacciones de tosilación.

Purificación de solventes

Todos los solventes se purificaron por destilación fraccionada. En algunos casos se les aplicó un tratamiento especial para ser luego empleados en reacciones que lo requerían.

Cloruro de metileno (CH_2Cl_2) :

Se lo secó e hizo anhidro por reflujo sobre P_2O_5 y posterior destilación. El destilado se guardó sobre tamices moleculares de 4 Å bajo atmósfera de N_2 .

Metanol (CH_3OH) :

Se lo reflujo sobre virutas de magnesio metálico recientemente activado. Luego se lo guardó protegido del aire y la humedad, y se lo destiló inmediatamente antes de ser utilizado. Una vez destilado puede ser guardado por un tiempo sobre tamices moleculares de 4 Å bajo atmósfera de N_2 .

Etanol ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$), 1-Butanol ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$), y 2-Propanol ($(\text{CH}_3)_2\text{CHOH}$) :

Se procedió de manera semejante al metanol.

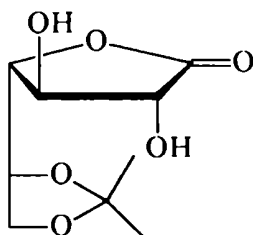
Éter etílico ($(\text{CH}_3\text{CH}_2)_2\text{O}$), Diglima ó bis(2-metoxietil)éter ($(\text{CH}_3\text{OCH}_2\text{CH}_2)_2\text{O}$), Bis(2-etoxietil)éter ($(\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2)_2\text{O}$), Tetrahidrofurano (THF) :

Se pasó el producto comercial por una columna de alúmina básica (100 g de alúmina por cada 10 L de solvente) para eliminar los peróxidos y la mayor parte del agua. El solvente se dejó sobre hidróxido de sodio en lentejas durante un día para retener el agua remanente. Luego se filtró y se reflujo sobre cinta de sodio metálico con el objeto de eliminar las trazas de agua que aún contenía el éter. Se destiló el éter y se volvió a colocar sobre cinta de sodio metálico, se le agregó benzofenona como indicador y se reflujo hasta que la solución adquirió la coloración azul o violeta (según el éter en cuestión) correspondiente al di-anión radical de la benzofenona. El solvente así preparado se conservaba tapado y mantenía su condición anhidra evidenciada por el color que había adquirido y conservaba. Se destilaba en condiciones anhidras inmediatamente antes de ser utilizado. Con respecto al Bis(2-etoxietil)éter ($(\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2)_2\text{O}$) cabe mencionar que el color azul intenso no se mantenía luego de la destilación, y debía reflujoarse cada vez antes de su utilización.

Piridina ($\text{C}_5\text{H}_5\text{N}$):

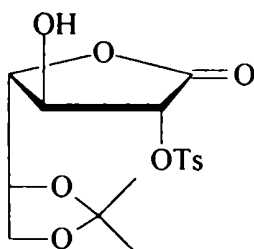
Se reflujo sobre KOH en lentejas y se destiló. El destilado se conservó sobre lentejas de KOH bajo atmósfera de N_2 .

5,6-Di-O-isopropiliden-D-galactono-1,4-lactona (2)



Se suspenden 5,0 g (28 mmoles) de D-galactono-1,4-lactona (1) en 60 mL de una mezcla de acetona:2,2-dimetoxipropano (5:1). Se enfría a 0 °C, y agitando se agregan 30 μ l de H₂SO₄ (c). Luego de 30 minutos de agitación manteniendo la temperatura a 0 °C se neutraliza con NH₄OH. La suspensión resultante se filtra y se evapora a presión reducida. Se obtiene un jarabe que se purificó por cromatografía en columna (sílica gel) eluyendo con EtOAc para obtener 5.8 g (26 mmoles, 95 %) de un producto que muestra las características cromatográficas y espectroscópicas descritas para 5,6-di-O-isopropiliden-D-galactono-1,4-lactona (2), $[\alpha]_D -46,3^\circ$ (c 1, acetona), lit. -46° (c 1, acetona, Copeland *et al*, 1978).

5,6-Di-O-isopropiliden-2-O-tosil--D-galactono-1,4-lactona (3)



Se disuelven 5,8 g (26 mmoles) de 5,6-di-O-isopropiliden-D-galactono-1,4-lactona (2) en 25 mL de piridina anhidra, se enfría a 0 °C y agitando se agregan 5,6 g (1.1 equiv, 29 mmoles) de cloruro de 4-toluensulfonilo disueltos en 12 mL de acetona anhidra durante 1 h. Se agita a 0 °C durante 4 h., y luego se deja en heladera hasta el día siguiente. El crudo se vuelca sobre 300 mL de hielo-agua. Se extrae con Cl₂CH₂ (3x100 mL). La fase orgánica se lava con HCl (5 %) frío (2x100 mL), NaCl (ss) (2x100 mL), NaHCO₃ (ss) (100 mL) y H₂O (2x100 mL). Se seca con MgSO₄ anh.,

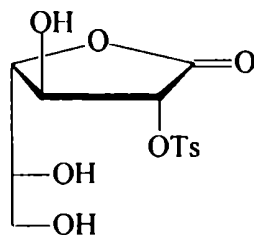
se evapora y se obtienen 8 g de un producto oscuro que se recristaliza de tolueno para dar 6,8 g (18 mmoles, 70 %) de 5,6-di-O-isopropiliden-2-O-tosil-D-galactono-1,4-lactona (3). El compuesto recristalizado presentó un punto de fusión de 140-141 °C; $[\alpha]_D -94^\circ$ (c 1, CHCl₃).

RMN ¹H: Tabla 1, Figuras 2 y 3.

RMN ¹³C: Tabla 2, Figura 4.

Microanálisis calculado para C₁₆H₂₀O₈S C, 51,61; H, 5,41. Encontrado :C, 51,85; H, 5,23.

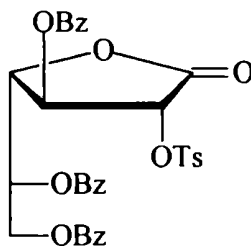
2-O-Tosil-D-galactono-1,4-lactona (4)



A una solución de 2 g (5,4 mmoles) de 5,6-di-O-isopropiliden-2-O-tosil-D-galactono-1,4-lactona (3) en AcOH (16 mL) a 60 °C se agregan lentamente 4 mL de H₂O, y se agita. Luego de 30 minutos se evapora el solvente para dar 1,7 g (5,1 mmoles, 96 %) de un sólido blanco correspondiente a 2-O-tosil-D-galactono-1,4-lactona (4). Por recristalización de etanol se obtuvo un punto de fusión 151-152 °C; $[\alpha]_D -58^\circ$ (c 1, acetona).

Microanálisis calculado para C₁₃H₁₆O₈S C, 46,98; H, 4,85. Encontrado :C, 46,70; H, 4,63.

3,5,6-Tri-O-benzoil-2-O-tosil-D-galactono-1,4-lactona (5a)

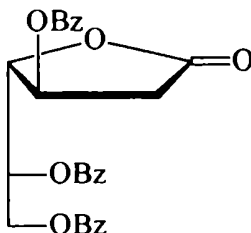


Se disuelven 1,5 g (4,5 mmoles) de 2-O-tosil-D-galactono-1,4-lactona (**4**) en 10 mL de una mezcla de piridina:cloruro de benzoilo (1:1) enfriada a 0 °C. Se agita durante 2 horas y se vuelca en 100 mL de agua-hielo. Luego de macerar el producto y lavarlo repetidas veces con agua helada se extrae con Cl_2CH_2 (3x50 mL). La fase orgánica se lava con HCl 5 % frío (2x50 mL), NaCl (ss) (2x50 mL), NaHCO_3 (ss) (50 mL) y H_2O (2x50 mL). Se seca con MgSO_4 anh y se evapora para dar un jarabe que se purificó por disolución en 10 mL de éter etílico y agregado de 10 mL de n-hexano. El jarabe obtenido se somete al mismo procedimiento una vez más, con lo cual queda libre de ácido benzoico. Se seca en desecador y se obtienen 2,3 g (4,1 mmoles, 90 %) de 3,5,6-tri-O-benzoil-2-O-tosil-D-galactono-1,4-lactona (**5a**). El producto obtenido presenta $[\alpha]_D^{+38} \text{ } (c 1, \text{CHCl}_3)$.

RMN ^{13}C : Tabla 2, Figura 6.

Microanálisis calculado para $\text{C}_{34}\text{H}_{28}\text{O}_{11}\text{S}$ C, 63,35; H, 4,38. Encontrado :C, 63,10; H, 4,50.

3,5,6-Tri-O-benzoil-2-desoxi-D-lixo-hexono-1,4-lactona (6a) (3,5,6-Tri-O-benzoil-2-desoxi-D-galactono-1,4-lactona)



Se disuelve 1,0 g (1,6 mmoles) de 3,5,6-tri-O-benzoil-2-O-tosil-D-galactono-1,4-lactona (**5a**) en 20 mL de una mezcla de acetona:ácido trifluoroacético 18:2, se

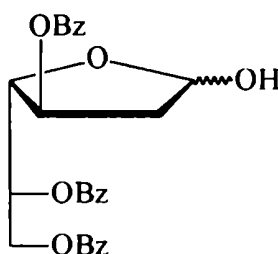
agregan 5 g (33 mmoles) de NaI y se agita a temperatura ambiente durante 16 h. Al cabo de dicho tiempo se vuelca la mezcla de intenso color marrón-verdoso en 100 mL de Cl_2CH_2 y se lava la fase orgánica con NaHSO_3 (ss) (3x30 mL), NaCl (ss) (50 mL), NaHCO_3 (ss) (3x 50 mL), H_2O (2x 50 mL). La fase orgánica se seca y se evapora obteniéndose un jarabe formado principalmente por la desoxilactona benzoilada (R_f 0.25, solvente tolueno:AcOEt 20:1). Se purifica el crudo por columna de sílica gel, eluyendo con una mezcla de tolueno:acetato de etilo 20:1. Se obtienen 530 mg (1,1 mmoles, 70 %) de 3,5,6-tri-*O*-benzoil-2-desoxi-D-galactono-1,4-lactona (**6a**) como un jarabe que cristaliza de etanol, y por recristalización del mismo solvente dio un punto de fusión de 137-138 °C, $[\alpha]_D -35^\circ$ (c 1, CHCl_3).

RMN ^1H : Tabla 1, Figura 8.

RMN ^{13}C : Tabla 2, Figura 7.

Microanálisis calculado para $\text{C}_{27}\text{H}_{22}\text{O}_8$ C, 68,35; H, 4,67. Encontrado :C, 68,50; H, 4,80.

3,5,6-Tri-*O*-benzoil-2-desoxi-D-lixo-hexosa (11a) (3,5,6-Tri-*O*-benzoil-2-desoxi-D-galactofuranosa)



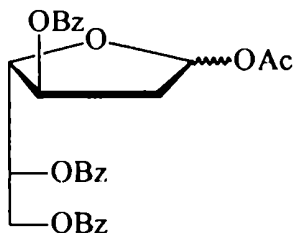
A una solución recién preparada de diisoamilborano en THF (5,6 mmoles, 2,5 mL) a 0 °C se agregan 660 mg (1,4 mmoles) de 3,5,6-tri-*O*-benzoil-2-desoxi-D-galactono-1,4-lactona (**6a**) y se deja reaccionar a temperatura ambiente durante 16 h en condiciones anhidras y con agitación. Al cabo de dicho tiempo se enfría la reacción a 0 °C y se procede a cortar la misma agregándole 1 mL de agua, dejando reaccionar el exceso de diisoamilborano hasta que no se desprendan mas burbujas. Se procede a agregar 1 mL de H_2O_2 (30 %), manteniendo el pH en 8-9, por agregado de NaOH 3 M y se agita durante 30 minutos a 0 °C. Luego se evapora el THF y se

disuelve el crudo en 100 mL de Cl_2CH_2 , se lava la fase orgánica con H_2O (2x50 mL), y se seca con NaSO_4 (anh). Se filtra y se evapora. Se purifica por columna cromatográfica eluyendo con tolueno:AcOEt (10:1). Se obtiene la mezcla anomérica de 3,5,6-tri-O-benzoil-2-desoxi-D-galactofuranosa (**11a**) como un sólido amorfo cromatográficamente puro (0,63 g, 95 %), que presentó las siguientes características, $[\alpha]_D -19^\circ$ (c 1, CHCl_3).

RMN ^{13}C : Tabla 2, Figura 11.

Microanálisis calculado para $\text{C}_{27}\text{H}_{24}\text{O}_8$ C, 68,06; H, 5,08. Encontrado :C, 68,30; H, 4,90.

1-O-Acetil-3,5,6-tri-O-benzoil-2-desoxi-D-lixo-hexosa (12)
(1-O-Acetil-3,5,6-tri-O-benzoil-2-desoxi-D-galactofuranosa)

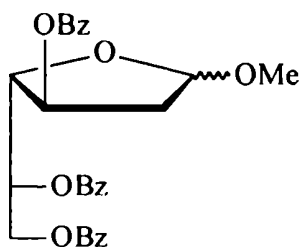


Se disuelve la 3,5,6-tri-O-benzoil-2-desoxi-D-galactofuranosa (**11a**) (1.4 mmoles, 667 mg) en 5 mL de piridina anhidra 0°C , se agregan 5 mL de anhídrido acético, y se agita a temperatura ambiente por 16 h. La mezcla cruda se vuelca sobre 100 mL de agua-hielo, y tras macerar el producto se obtiene un jarabe que se separa y se disuelve en 50 mL de Cl_2CH_2 . Se lava la fase orgánica con HCl (5 %) (3x50 mL), NaCl (ss) (2x50 mL), NaHCO_3 (ss) (3x50 mL), H_2O (50 mL), se seca sobre Na_2SO_4 (anh), filtra, evapora y se obtienen 700 mg de 1-O-acetil-3,5,6-tri-O-benzoil-2-desoxi-D-lixo-hexosa (**12**) (1,35 mmoles, 96 %) como mezcla anomérica de proporciones 1:1, aproximadamente. La mezcla presentó las siguientes características, $[\alpha]_D -26^\circ$ (c 1, CHCl_3).

RMN ^{13}C : Tabla 2.

Microanálisis calculado para $\text{C}_{29}\text{H}_{26}\text{O}_9$ C, 67,18; H, 5,05. Encontrado :C, 67,04; H, 5,16.

Metil 3,5,6-tri-*O*-benzoil-2-desoxi-D-*lixo*-hexofuranósido (13a)
(Metil 3,5,6-tri-*O*-benzoil-2-desoxi-D-galactofuranósido)



A partir de 3,5,6-tri-*O*-benzoil-2-desoxi-D-*lixo*-hexofuranosa (11a)

A) Mediante la coevaporación con metanol anhidro

El crudo de la reducción con diisobutilborano de la 3,5,6-tri-*O*-benzoil-2-desoxi-D-galactono-1,4-lactona (**6a**), luego de extraer, lavar la fase orgánica y evaporar, se coevapora con metanol anhidro repetidas veces (4x30 mL) con el propósito de eliminar el ácido bórico como borato de metilo. Se cromatografía el producto obtenido en columna de sílica gel, eluyendo con una mezcla de tolueno:acetato de etilo y se aislan dos fracciones, correspondiendo la minoritaria a la 3,5,6-tri-*O*-benzoil-2-desoxi-D-galactofuranosa (**11a**) pura de *r_f* 0,15 (tolueno:AcEot, 4:1) y la fracción mayoritaria de *r_f* 0,55 (tolueno:AcEot, 4:1) que corresponde a la mezcla de metil glicósidos de la 3,5,6-tri-*O*-benzoil-2-desoxi-D-galactofuranosa (**13a**), y que se encuentran en proporciones iguales como se determinó por RMN ¹³C.

B) Reacción con el complejo BF₃•MeOH

Al crudo de la reducción con diisobutilborano de la 3,5,6-tri-*O*-benzoil-2-desoxi-D-galactono-1,4-lactona (**6a**), luego de extraer, lavar la fase orgánica y evaporar, se lo seca en desecador y se lo hace reaccionar con 25 mL de solución de BF₃•MeOH, durante 16 h. en atmósfera de nitrógeno. Luego de evaporar el crudo de la reacción se extrae con 50 mL de Cl₂CH₂, lavando la fase orgánica con NaHCO₃(ss) (2x50 mL), NaCl (ss) (50 mL), y por último H₂O (50 mL). Se seca la fase orgánica y se

evapora obteniéndose 665 mg (95 %) de la mezcla de los dos glicósidos (**13a**) y no se detecta azúcar libre.

El crudo se cromatografía en columna de sílica gel eluyendo con una mezcla de tolueno:acetato de etilo (95:5) y se aislan las fracciones correspondientes a los dos metil glicósidos de la 3,5,6-tri-O-benzoil-2-desoxi-D-galactofuranosa (**13a**). La mezcla presentó las siguientes características, $[\alpha]_D -10^\circ$ (c 1, CHCl₃).

RMN ¹³C: Tabla 2, Figura 15.

Microanálisis calculado para C₂₈H₂₆O₈ C, 68,56; H, 5,34. Encontrado C, 68,67; H, 5,20.

A partir de 1-O-acetil-3,5,6-tri-O-benzoil-2-desoxi-D-galactofuranosa (**12**)

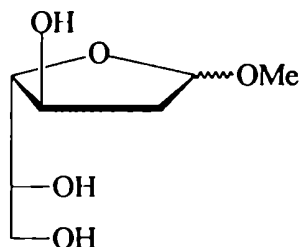
A un balón conteniendo 500 mg (0,98 mmoles) de 1-O-acetil-3,5,6-tri-O-benzoil-2-desoxi-D-galactofuranosa **12** se agregan 20 mL del complejo BF₃•MeOH, y se agita en atmósfera de nitrógeno durante 16 h. Luego de evaporar el crudo de la reacción se toma con 50 mL de Cl₂CH₂, lavando la fase orgánica con NaHCO₃ (ss) (2x50 mL), NaCl (ss) (50 mL), y por último H₂O (50 mL). Se seca la fase orgánica y se obteniéndose 450 mg de un jarabe formado por los dos glicósidos (**13a**) y no se detecta azúcar libre.

El crudo se cromatografía en columna de sílica gel eluyendo con una mezcla de tolueno:acetato de etilo 20:1 y se aislan las fracciones correspondientes a la mezcla anomérica de metil 3,5,6-tri-O-benzoil-2-desoxi- α -D-galactofuranósido (**13a α**) y de metil 3,5,6-tri-O-benzoil-2-desoxi- β -D-galactofuranósido (**13a β**) que tras evaporar el solvente dio 420 mg (90 %). La mezcla presentó las siguientes características, $[\alpha]_D -12^\circ$ (c 1, CHCl₃).

RMN ¹³C: Tabla 2, Figura 15.

Microanálisis calculado para C₂₈H₂₆O₈ : C, 68,56; H, 5,34. Encontrado C, 68,44; H, 5,16.

Metil 2-desoxi- α -D-lixo-hexofuranósido (15 α**) (metil 2-desoxi- α -D-galactofuranósido) y metil 2-desoxi- β -D-lixo-hexofuranósido (**15 β**) (metil 2-desoxi- β -D-galactofuranósido).**



Se disuelven 200 mg de la mezcla de metil 3,5,6-tri-O-benzoil-2-desoxi- α,β -D-galactofuranósido (**13a α** y **13a β**) en 5 mL de una solución 0.5 M de NaMeO en MeOH, se mantiene la temperatura a 0 °C y se agita durante 2 h. hasta la desaparición total del producto de partida. Se neutraliza la solución pasándola a través de una columna que contiene resina de intercambio iónico Dowex 50WX8-200, previamente activada y convenientemente lavada. Se eluye la columna con 100 mL de metanol, se evapora el solvente y se elimina el benzoato de metilo por sucesivas evaporaciones con agua. Se obtienen 80 mg de un jarabe correspondiente a la mezcla de metil 2-desoxi- α -D-galactofuranósido (**15 α**) y metil 2-desoxi- β -D-galactofuranósido (**15 β**); no se detecta 2-desoxi-D-galactosa libre.

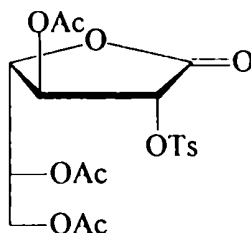
La mezcla se separa mediante cromatografía en columna de sílica-gel, eluyendo con AcOEt:MeOH (95:5) una fracción de rf 0.4, correspondiente al glicósido α (**15 α**) (40 mg, 0.2 mmoles), $[\alpha]_D^{40}$ ° (c 0.34, H₂O) y otra de rf 0.3, correspondiente al glicósido β (**15 β**) (30 mg, 0.2 mmoles), $[\alpha]_D^{-65}$ ° (c 0.26, H₂O).

RMN ¹H: Tabla 1, Figuras 16 y 17 (**15 β** y **15 α** , respectivamente).

RMN ¹³C: Tabla 2, Figuras 18 y 19 (**15 β** y **15 α** , respectivamente).

Microanálisis calculado para C₇H₁₄O₅ C, 47,19; H, 7,92. Encontrado C, 46,41; H, 8,09.

3,5,6-Tri-O-acetil-2-O-tosil-D-galactono-1,4-lactona (5b)



Se disuelven 1,5 g (4,0 mmoles) de 2-O-tosil-D-galactono-1,4-lactona (4) en 5 mL de piridina anhidra, se enfría a 0 °C y agitando bajo atmósfera de nitrógeno se agregan lentamente 5 mL (53 mmoles) de anhídrido acético en un período de 15 minutos aproximadamente. Se deja agitar a temperatura ambiente durante 4 h, se vuelca la mezcla sobre 100 mL de agua-hielo y se agita hasta destruir el anhídrido en exceso. Se forma un sólido blanco que se filtra y se lava repetidas veces con agua helada. El producto sólido (1,76 g, 3.8 mmoles, 96 %) corresponde al compuesto acetilado (5b), y se recristaliza de etanol, para obtener un compuesto puro de punto de fusión 155-156 °C, que dio un $[\alpha]_D +15^\circ$ (c 1, CHCl₃).

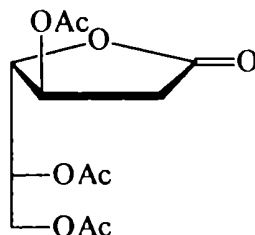
RMN ¹³C: Tabla 2, Figura 5.

RMN ¹H: Tabla 1.

Microanálisis calculado para C₁₉H₂₂O₁₁S : C, 49,78; H, 4,84. Encontrado : C, 49,61; H, 4,69.

3,5,6-Tri-O-acetil-2-desoxi-D-lixo-hexono-1,4-lactona (6b)

(3,5,6-Tri-O-acetil-2-desoxi-D-galactono-1,4-lactona)



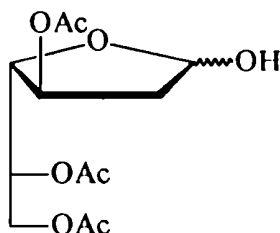
Se disuelven 1,0 g (2,2 mmoles) de 3,5,6-tri-O-acetil-2-O-tosil-D-galactono-1,4-lactona (5b) en 20 mL de una mezcla de acetona:ácido trifluoroacético 18:2, se agregan 5 g (33 mmoles) de NaI y se agita a temperatura ambiente durante 16 h. Al

cabo de dicho tiempo se vuelca la mezcla de intenso color marrón-verdoso en 100 mL de Cl_2CH_2 y se lava la fase orgánica con NaHSO_3 (ss) (3x30 mL), NaCl (ss) (50 mL), NaHCO_3 (ss) (3x 50 mL), H_2O (2x 50 mL). La fase orgánica se seca y se evapora, obteniéndose un jarabe formado principalmente por la desoxilactona acetilada, contaminado con productos de eliminación (Marino *et al*, 1991), y sin producto de partida. Se purifica el crudo por columna de sílica gel, eluyendo con una mezcla de tolueno:acetato de etilo 20:1. Se obtienen 380 mg (1,3 mmoles, 60 %) de 3,5,6-tri-O-acetil-2-desoxi-D-galactono-1,4-lactona (**6b**) (Bock *et al*, 1984) como un jarabe que no pudo cristalizarse.

RMN ^{13}C : Tabla 2, Figura 9.

RMN ^1H : Tabla 1, Figura 10.

3,5,6-Tri-O-acetil-2-desoxi-D-lixo-hexofuranosa (**11b**) (3,5,6-Tri-O-acetil-2-desoxi-D-galactofuranosa)

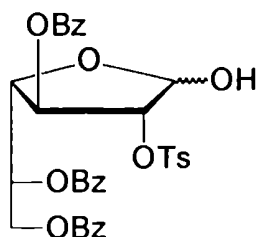


A 5,2 mmoles de diisamilborano en THF a 0 °C se agregan 380 mg (1,3 mmoles) de 3,5,6-tri-O-acetil-2-desoxi-D-galactono-1,4-lactona (**6b**). Se deja reaccionar a temperatura ambiente durante 16 h. Al cabo de dicho tiempo se enfría a 0 °C y se procede a cortar la reacción como se describió previamente. Se obtiene un jarabe de 3,5,6-tri-O-acetil-2-desoxi-D-galactofuranosa (**11b**) que se halla contaminado con metil 3,5,6-tri-O-acetil-2-desoxi-D-galactofuranosido (**13b**), con 3,4,6-tri-O-acetil-2-desoxi-D-galactopiranososa (**14b**) y con ácido bórico. Se aíslan las tres fracciones por columna cromatográfica eluyendo con tolueno:AcOEt (95:5).

RMN ^{13}C : Tabla 2, Figuras 12, 13 y 14 (**13b**, **11b** y **14b**, respectivamente).

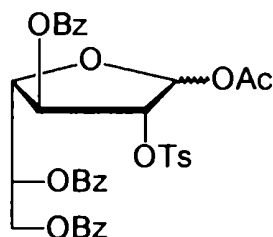
RMN ^1H : Tabla 1 (**13b**).

3,5,6-Tri-O-benzoil-2-O-tosil-D-galactofuranosa (16)

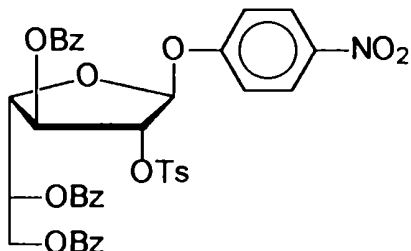


A 5.2 mmoles de diisoamilborano en THF, se enfría a 0 °C y se agregan luego 1 g (2.2 mmoles) de 3,5,6-tri-O-benzoil-2-O-tosil-D-galactono-1,4-lactona (**5a**). Se deja reaccionar a temperatura ambiente durante 16 h. Al cabo de dicho tiempo se enfría a 0 °C y se procede a tratar la reacción como de costumbre. Se obtiene un jarabe formado por la mezcla anomérica de 3,5,6-tri-O-benzoil-2-O-tosil-D-galactofuranosa (**16**) contaminado con ácido bórico. Este producto no se purifica sino que se usa tal cual en el próximo paso de síntesis.

1-O-Acetil-3,5,6-tri-O-benzoil-2-O-tosil-D-galactofuranosa (17)



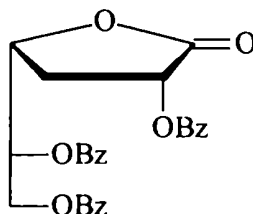
Se disuelve 3,5,6-tri-O-benzoil-2-O-tosil-D-galactofuranosa (**16**) (2.2 mmoles) en 5 mL de piridina anhidra y se enfría a 0 °C. Luego se agregan 1 mL de anhídrido acético (10 mmoles), y se continúa agitando a temperatura ambiente por un espacio de 16 h. La mezcla cruda se vuelca sobre 100 mL de agua-hielo, y tras macerar el producto se obtiene un jarabe, que se disuelve en 50 mL de Cl₂CH₂, se lava la fase orgánica con HCl (5 %) (3x50 mL), NaCl (ss) (2x50 mL), NaHCO₃ (ss) (3x50 mL), H₂O (50 mL), se seca sobre Na₂SO₄ (anh), se filtra, y se obtienen 1.06 g (2.1 mmoles, 95 %) del producto 1-O-acetilado **17** como mezcla anomérica de proporciones 1:1, aproximadamente.

4-Nitrofenil 3,5,6-tri-O-benzoil-2-O-tosil-β-D-galactofuranósido (18)

Se disuelve 1,0 g (2,1 mmoles) de 1,3,5,6-tetra-O-benzoil-2-O-tosil-D-galactofuranosa (**17**) en Cl₂CH₂ anhidro (15 mL) y se enfría a 0 °C. Se agrega luego con jeringa 0,27 mL (2,1 mmoles) de SnCl₄, y se agita durante 10 minutos. Se agregan entonces 320 mg (2,3 mmoles) de 4-nitrofenol. Se agita durante 16 h, siguiendo por ccd la desaparición del producto de partida. La mezcla de reacción se diluye con 20 mL de Cl₂CH₂ y se vuelca con agitación sobre 80 mL de NaHCO₃ (ss). La fase orgánica se lava con NaHCO₃ (ss) (2 x 20 mL), NaCl (ss) (2 x 20 mL), H₂O (2 x 20 mL), y se seca sobre Na₂SO₄ anhidro. Se filtra y se evapora la fase orgánica, obteniéndose 0,78 g (1,6 mmoles, 64 %) de un jarabe de color amarillo pálido, correspondiente al 4-nitrofenil 3,5,6-tri-O-benzoil-2-O-tosil-β-D-galactofuranósido (**18**).

RMN ¹³C: Figura 20.

2,5,6-Tri-O-benzoil-3-desoxi-D-xilo-hexono-1,4-lactona (20)
(2,5,6-Tri-O-benzoil-3-desoxi-D-galactono-1,4-lactona)



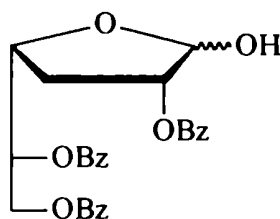
Se disuelve 2,3,5,6-tetra-O-benzoil-D-galactono-1,4-lactona (**19**) (1,5 g, 2.5 mmoles) en 15 mL de AcOEt. La mezcla se hidrogena a 45 psi de presión en presencia de trietilamina (1 mL) empleando Pd-C al 10 % como catalizador. Después de 4 h. de agitación se filtra y se lava el catalizador con Cl_2CH_2 (3x20 mL). El filtrado se lava con HCl 4M (3x25 mL), NaHCO_3 (ss) (3x25 mL), H_2O (2x25mL), se seca la fase orgánica con MgSO_4 , se filtra y se evapora. Se obtiene un jarabe denso (1,14 g, 95 %) que se cristaliza de EtOH, y se recrystaliza del mismo solvente, obteniéndose un producto cristalino correspondiente a **20**, que presenta punto de fusión 125-126 °C, $[\alpha]_D -19.7^\circ$ (c 2, CHCl_3).

RMN ^{13}C : Tabla 3, Figura 22.

RMN ^1H : Tabla 4, Figura 21.

Microanálisis calculado para $\text{C}_{27}\text{H}_{22}\text{O}_8$: C, 68,35; H, 4,67. Encontrado :C, 68,15; H, 4,73.

2,5,6-Tri-O-benzoil-3-desoxi-D-xilo-hexofuranosa (21)
(2,5,6-Tri-O-benzoil-3-desoxi-D-galactofuranosa)



Se prepara una solución fresca de diisoamilborano en THF (10,0 mmol, 5mL), y se la enfría a 0 °C. A la solución resultante se agrega 2,5,6-tri-O-benzoil-3-desoxi-D-

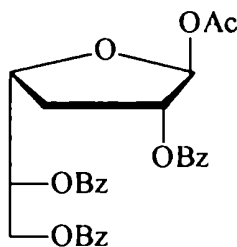
galactono-1,4-lactona (**20**) (1.22 g, 2.5 mmol), y se agita durante 16 h a temperatura ambiente. Al cabo de dicho tiempo se enfría la reacción a 0 °C y se procede a cortar la reacción como se describió antes. Luego se evapora el THF y se disuelve el crudo en 100 ml de Cl_2CH_2 , se lava la fase orgánica con H_2O (2x50 ml), y se seca con NaSO_4 (anh). Se filtra y por evaporación se obtiene 3,5,6-tri-O-benzoil-3-desoxi- β -D-galactofuranosa (**21**) (1,16 g, 95 %) que cristaliza de EtOH, y recristalizado dió punto de fusión 104-105 °C, $[\alpha]_D -8^\circ$ (c 1.4, CHCl_3).

RMN ^1H : Tabla 4, Figuras 23 y 25.

RMN ^{13}C : Tabla 3, Figura 24.

Microanálisis calculado para $\text{C}_{27}\text{H}_{24}\text{O}_8$: C, 68,06; H, 5,08. Encontrado :C, 68,20; H, 5,05.

1-O-Acetil-2,5,6-tri-O-benzoil-3-desoxi- β -D-xilo-hexofuranosa (**22**) (1-O-Acetil-2,5,6-tri-O-benzoil-3-desoxi- β -D-galactofuranosa)



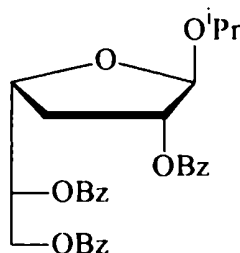
A una solución de 2,5,6-tri-O-benzoil-3-desoxi- β -D-xilo-hexofuranosa (**21**) (1,0 g, 2,1 mmol) en 3 mL de piridina se agregan 2 mL de anhídrido acético y la solución se agita durante 12 h. a temperatura ambiente. La mezcla se vuelca sobre 50 mL de hielo-agua. Precipita un sólido que corresponde al producto 1-O-acetil-2,5,6-tri-O-benzoil-3-desoxi- β -D-xilo-hexofuranosa (**22**), se filtra, se lava y se recristaliza de etanol, para dar punto de fusión 96-98 °C, $[\alpha]_D -22^\circ$ (c 1.6, CHCl_3).

RMN ^{13}C : Tabla 3, Figura 27.

RMN ^1H : Tabla 4, Figura 26.

Microanálisis calculado para $\text{C}_{29}\text{H}_{26}\text{O}_9$: C, 67,18; H, 5,05. Encontrado :C, 67,32; H, 5,22.

2-Propil 2,5,6-tri-O-benzoil-3-desoxi- β -D-xilo-hexofuranósido (23)
(2-Propil 2,5,6-tri-O-benzoil-3-desoxi- β -D-galactofuranósido)



A una solución de 1-O-acetil-2,5,6-tri-O-benzoil-3-desoxi- β -D-xilo-hexofuranosa (**22**) (0,20 g, 0,39 mmol) en CH_2Cl_2 , enfriada a 0 °C y bajo atmósfera de nitrógeno, se le agrega SnCl_4 (50 μL , 0,42 mmol). La solución se agita durante 10 minutos a 0 °C, y se le agrega con jeringa 2-propanol (32 μL , 0,42 mmol). Luego de 3 h de agitación a temperatura ambiente, se diluye la solución con Cl_2CH_2 (50 mL), y se extrae la fase orgánica con NaHCO_3 (ss) (3x10 mL), y NaCl (ss) (3x10 mL). La fase orgánica se seca con MgSO_4 (anh), se filtra y se evapora. Se obtiene un jarabe formado por el producto de glicosidación y trazas de 2,5,6-tri-O-benzoil-3-desoxi- β -D-xilo-hexofuranosa (**21**). La mezcla se cromatografía en columna de sílica, eluyendo con tolueno:acetato de etilo 20:1. Se obtiene 2-propil 2,5,6-tri-O-benzoil-3-desoxi- β -D-xilo-hexofuranósido (**23**) (0,17 g, 85 %) como un jarabe incoloro, que dió $[\alpha]_{\text{D}} -17^\circ$ (c 1.8, CHCl_3).

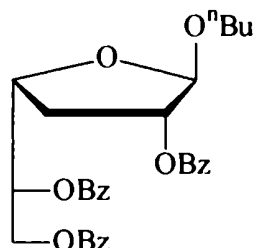
RMN ^{13}C : Tabla 3, Figura 28.

RMN ^1H : Tabla 4, Figura 30.

Microanálisis calculado para $\text{C}_{30}\text{H}_{30}\text{O}_8$: C, 69,49; H, 5,83. Encontrado :C, 69,39; H, 5,92.

La 2,5,6-tri-O-benzoil-3-desoxi-D-xilo-hexofuranosa (**21**) se recupera en la cromatografía y luego de ser reacetilada se vuelve a utilizar como precursor en la glicosidación.

1-Butil 2,5,6-tri-O-benzoil-3-desoxi- β -D-xilo-hexofuranósido (24)
(1-Butil 2,5,6-tri-O-benzoil-3-desoxi- β -D-xilo-hexofuranósido)



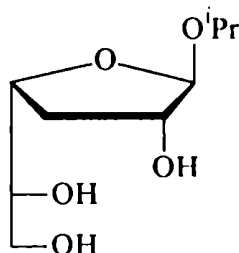
La glicosidación de 1-O-acetil-2,5,6-tri-O-benzoil-3-desoxi- β -D-xilo-hexofuranosa (**22**) (0,20 g, 0,39 mmol) con 1-butanol se llevó a cabo en las mismas condiciones utilizadas para la obtención de **23**. Se obtiene un jarabe formado por el producto de glicosidación **24** y trazas de 2,5,6-tri-O-benzoil-3-desoxi- β -D-xilo-hexofuranosa (**21**). Por purificación en columna de sílica, se obtiene 1-butil 2,5,6-tri-O-benzoil-3-desoxi- β -D-xilo-hexofuranósido (**24**) (0,18 g, 88 %) que por recristalización de etanol da punto de fusión 103.5-105 °C, $[\alpha]_D -19,5^\circ$ (c 1,7, CHCl₃).

RMN ¹³C: Tabla 3, Figura 29.

RMN ¹H: Tabla 4, Figura 31.

Microanálisis calculado para C₃₁H₃₂O₈: C, 69,91; H, 6,06. Encontrado :C, 69,85; H, 5,98.

2-Propil 3-desoxi- β -D-xilo-hexofuranósido (25)
(2-Propil 3-desoxi- β -D-galactofuranósido)



A una suspensión de 2-propil 2,5,6-tri-O-benzoil-3-desoxi- β -D-xilo-hexofuranósido (**23**) (0,17 g, 0,32 mmol) en MeOH (3mL) se agrega una solución

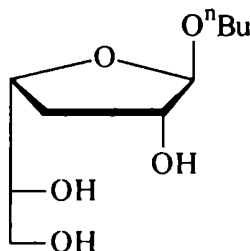
recién preparada de NaMeO en MeOH (3mL, 0,5 M). La mezcla se agita a temperatura ambiente durante 4 h, hasta la desaparición total del producto de partida. La solución se neutraliza pasando a través de una columna de Dowex 50W (H⁺), empleando metanol (3x15mL) y luego agua (3x15mL) como eluyente. Por evaporación de la solución se obtiene 2-propil 3-desoxi-β-D-xilo-hexofuranósido (**25**) como jarabe (0,061g, 93 %), que presenta un valor de $[\alpha]_D -101^\circ$ (c 0,7, MeOH).

RMN ¹³C: Tabla 3, Figura 32.

RMN ¹H: Tabla 4.

Microanálisis calculado para C₉H₁₈O₅: C, 52,41; H, 8,80. Encontrado :C, 52,55; H, 8,95.

1-Butil 3-desoxi-β-D-xilo-hexofuranósido (**26**) (1-Butil 3-desoxi-β-D-galactofuranósido)



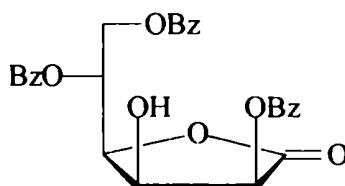
La desacilación de 1-butil 2,5,6-tri-O-benzoil-3-desoxi-β-D-xilo-hexofuranósido (**24**) (0,17 g, 0,32 mmol) con NaMeO en MeOH (3 mL, 0,5 M) se llevó a cabo en las mismas condiciones que utilizamos para la obtención de **25**. Se obtiene 1-butil 3-desoxi-β-D-xilo-hexofuranósido (**26**) (0,066 g, 94 %) que presenta un valor de $[\alpha]_D -118^\circ$ (c 1.0, MeOH).

RMN ¹³C: Tabla 3, Figura 33.

RMN ¹H: Tabla 4.

Microanálisis calculado para C₁₀H₂₀O₅: C, 54,53; H, 9,15. Encontrado :C, 54,65; H, 9,22.

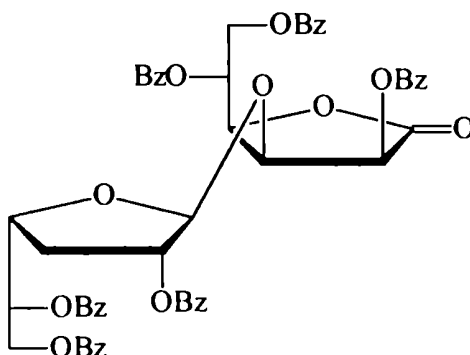
2,5,6-Tri-O-benzoil-D-manono-1,4-lactona (27)



A una solución de D-manono-1,4-lactona (1,0 g, 5,62 mmol) en piridina (7,5 mL), enfriada en baño de hielo-agua, se agregó cloruro de benzoilo (2,0 mL, 17,04 mmol) en porciones. La mezcla se agitó durante 1,5 h a 0 °C, y se volcó sobre hielo-agua (200 mL). Luego de 2 h se decantó el jarabe formado, y se disolvió en Cl_2CH_2 (100 mL). La fase orgánica se lavó con NaHCO_3 (ss) (2x50 mL) y con NaCl (ss) (2x50 mL) y se secó sobre MgSO_4 (anh). Por evaporación a presión reducida del solvente se obtuvo un sólido amorfo, que por agregado de benceno (80 mL) cristalizó para dar 2,5,6-tri-O-benzoil-D-manono-1,4-lactona (27) (1,93 g, 70 %), que se recrystalizó de etanol dando un producto sólido cristalino de punto de fusión 135-136 °C, literatura 136-138 °C (Fernández Cirelli et al, 1983).

2,5,6-Tri-O-benzoil-3-O-(2,5,6-tri-O-benzoil-3-desoxi- β -D-xilo-hexofuranosil)-D-manono-1,4-lactona (34)

(2,5,6-Tri-O-benzoil-3-O-(2,5,6-tri-O-benzoil-3-desoxi- β -D-galactofuranosil)-D-manono-1,4-lactona)

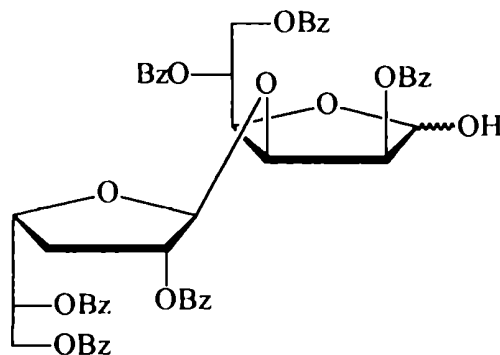


A una solución de 1-O-acetil-2,5,6-tri-O-benzoil-3-desoxi- β -D-xilo-hexofuranosa (**22**) (0,57 g, 1,1 mmol) en Cl_2CH_2 anhidro (5 mL) enfriada a 0 °C se agregó SnCl_4 (0,16 mL, 1,3 mmol). Luego de 15 min de agitación se agregó 2,5,6-tri-O-benzoil-D-manono-1,4-lactona (**27**) (0,59 g, 1,2 mmol) disuelta en Cl_2CH_2 anhidro (2 mL). La mezcla se dejó agitando por 16 h a temperatura ambiente. La solución se volcó sobre NaHCO_3 (ss) (50 mL). Se extrajo con Cl_2CH_2 (3 x 15 mL), y la fase orgánica se lavó con H_2O (2 x 15 mL), se secó con MgSO_4 (anh.), se filtró y evaporó. El residuo de la evaporación se purificó por cromatografía en columna de sílica gel, empleando como solvente una mezcla de tolueno:AcOEt (19:1). Las fracciones cromatográficas correspondientes al producto de condensación se juntaron y evaporaron. Se obtuvo un jarabe que se cristalizó de EtOH (0.66 g, 65 %). Este producto se recrystalizó del mismo solvente para dar 2,5,6-tri-O-benzoil-3-O-(2,5,6-tri-O-benzoil-3-desoxi- β -D-galactofuranosil)-D-manono-1,4-lactona (**34**), punto de fusión de 152-153 °C y $[\alpha]_D -71^\circ$ (c 1,0, CHCl_3).

RMN ^{13}C : Tabla 5, Figura 34.

Microanálisis calculado para $\text{C}_{54}\text{H}_{44}\text{O}_{16}$ C, 68,34; H, 4,68. Encontrado C, 68,45; H, 4,89.

2,5,6-Tri-O-benzoil-3-O-(2,5,6-tri-O-benzoil-3-desoxi- β -D-xilo-hexofuranosil)-D-manofuranosa (35**)**
(2,5,6-Tri-O-benzoil-3-O-(2,5,6-tri-O-benzoil-3-desoxi- β -D-galactofuranosil)-D-manofuranosa)

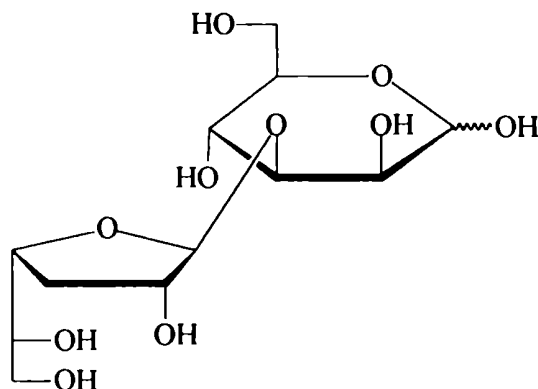


A una solución fresca de diisoamilborano en THF (4,2 mmol, 4,4 mL), enfriada a 0 °C, se agregó 2,5,6-tri-O-benzoil-3-O-(2,5,6-tri-O-benzoil-3-desoxi-β-D-xilo-hexofuranosil)-D-manono-1,4-lactona (**34**) (1,0 g, 1,05 mmol), disuelto en THF (6 mL). La solución se agitó durante 16 h a temperatura ambiente. Al cabo de dicho tiempo se enfrió a 0 °C y se procedió a cortar la reacción de la manera acostumbrada. Luego se evaporó el THF y se disolvió el residuo en 50 ml de Cl₂CH₂, se lavó la fase orgánica con H₂O (2x25 ml), y se secó con Na₂SO₄ (anh). Se filtró y evaporó en evaporador rotatorio. Se eliminó el ácido bórico por co-evaporaciones con MeOH. Se obtuvo 2,5,6-tri-O-benzoil-3-O-(2,5,6-tri-O-benzoil-3-desoxi-β-D-xilo-hexofuranosil)-D-manofuranosa (**35**) (0,90 g, 90 %) como un jarabe, que cristalizó de EtOH, obteniéndose un producto cristalino de punto de fusión 148-149 °C, que presentó un poder rotatorio de $[\alpha]_D -59^\circ$ (c 0,8, CHCl₃).

RMN ¹³C: Tabla 5, Figura 35.

Microanálisis calculado para C₅₄H₄₆O₁₆ : C, 68,20; H, 4,88. Encontrado : C, 68,48; H, 5,00.

3-O-(3-Desoxi-β-D-xilo-hexofuranosil)-D-manosa (36)
(3-O-(3-Desoxi-β-D-galactofuranosil)-D-manosa)



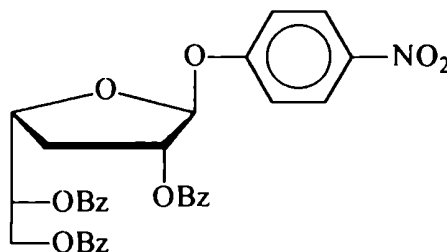
Se suspendió por agitación 2,5,6-tri-O-benzoil-3-O-(2,5,6-tri-O-benzoil-3-desoxi-β-D-xilo-hexofuranosil)-D-manofuranosa (**35**) (0,50 g, 0,52 mmol) en una solución de NaMeO en MeOH 0,5 M (10 mL). La agitación se continuó hasta la total disolución del sólido y la desaparición del compuesto de partida. Se neutralizó

pasando la solución a través de resina Dowex 50 (H^+) contenida en una columna y se lavó la misma con MeOH (25 mL) y luego H_2O (10 mL). Se juntaron los lavados con el eluido y se evaporó al vacío en evaporador rotatorio. Luego de eliminar el benzoato de metilo por sucesivas co-evaporaciones con H_2O se obtuvo 3-O-(3-desoxi- β -D-xilo-hexofuranosil)-D-manosa (**36**) (0,15 g, 89 %), como un jarabe que presentó un valor de poder rotatorio de $[\alpha]_D -130^\circ$ (c 1,0, H_2O).

RMN ^{13}C : Tabla 5, Figura 36.

Microanálisis calculado para $C_{12}H_{22}O_{10} \cdot 2H_2O$: C, 39,78; H, 7,23. Encontrado : C, 40,50; H, 7,18.

4-Nitrofenil 2,5,6-tri-O-benzoil-3-desoxi- β -D-xilo-hexofuranósido (**37**) (4-Nitrofenil 2,5,6-tri-O-benzoil-3-desoxi- β -D-galactofuranósido)



A una solución de 1-O-acetil-2,5,6-tri-O-benzoil-3-desoxi- β -D-xilo-hexofuranosa (**22**) (0,57 g, 1,1 mmol) en Cl_2CH_2 anhidro (5 mL) enfriada a $0^\circ C$ se agregó $SnCl_4$ (0,16 mL, 1,3 mmol). Luego de 15 min de agitación se agregó 4-nitrofenol (0,17 g, 1,2 mmol). La mezcla se dejó agitando por 16 h a temperatura ambiente. La solución se volcó sobre $NaHCO_3$ (ss) (25 mL). Se extrajo con Cl_2CH_2 (3 x 10 mL), y la fase orgánica se lavó con H_2O (2 x 10 mL), se secó con $MgSO_4$ (anh), se filtró y evaporó. El residuo de la evaporación se cristalizó de EtOH y por recristalización del mismo solvente dio 4-nitrofenil 2,5,6-tri-O-benzoil-3-desoxi- β -D-xilo-hexofuranósido (**37**) (0,54 g, 86 %), punto de fusión de $57-59^\circ C$ y $[\alpha]_D -80^\circ$ (c 1,0, $CHCl_3$).

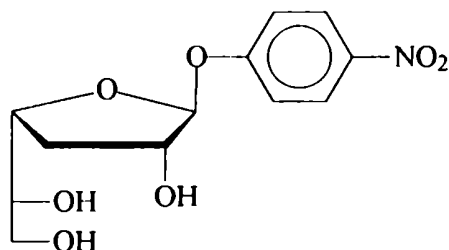
RMN 1H : Figura 37.

RMN ^{13}C : Tabla 5, Figura 38.

Microanálisis calculado para $C_{33}H_{27}NO_{10}$: C, 66,33; H, 4,55. Encontrado : C, 66,06; H, 4,55.

4-Nitrofenil 3-desoxi- β -D-*xilo*-hexofuranósido (38)

(4-Nitrofenil 3-desoxi- β -D-galactofuranósido)

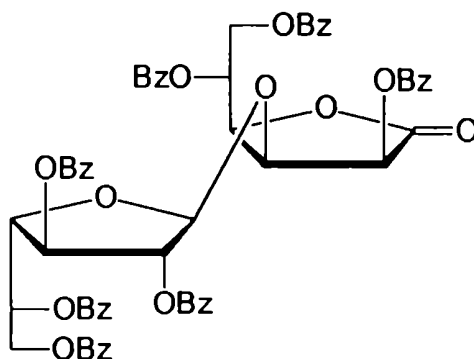


Se suspendió por agitación 4-nitrofenil 2,5,6-tri-O-benzoil-3-desoxi- β -D-*xilo*-hexofuranósido (**37**) (0.60 g, 0.85 mmol) en una solución de NaMeO en MeOH 0.5 M (10 mL). La agitación se continuó por 2 h y se trató en la forma usual. Se obtuvo 4-nitrofenil 3-desoxi- β -D-*xilo*-hexofuranósido (**38**) (0,23 g, 95 %), como un jarabe de $[\alpha]_D -170^\circ$ (c 1,0, H₂O).

RMN ¹³C: Tabla 5, Figura 39.

Microanálisis calculado para C₁₂H₁₅NO₇ : C, 50.53; H, 5.30. Encontrado : C, 50,62; H, 5,23.

2,5,6-Tri-O-benzoil-3-O-(2,3,5,6-tetra-O-benzoil- β -D-galactofuranosil)-D-manono-1,4-lactona (29)

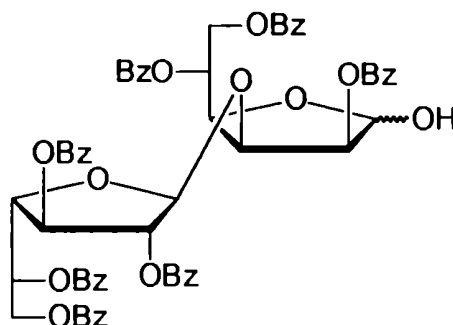


A una solución de 1,2,3,5,6-penta-O-benzoil-D-galactofuranosa (**28**) (0.35 g, 0.50 mmol) en Cl₂CH₂ anhidro (10 mL) enfriada a 0 °C se agregó SnCl₄ (0.08 mL, 0.66 mmol). Luego de 10 min de agitación se agregó 2,5,6-tri-O-benzoil-D-manono-1,4-lactona (**27**) (0.25 g, 0.50 mmol) disuelta en Cl₂CH₂ anhidro (2 mL). La mezcla se

dejó agitando 16 h a temperatura ambiente y se volcó sobre NaHCO_3 (ss) (25 mL). Se extrajo con Cl_2CH_2 (3 x 10 mL), y la fase orgánica se lavó con H_2O (2 x 10 mL), se secó con MgSO_4 (anh), se filtró y se evaporó. El residuo de la evaporación se purificó por cromatografía en columna de sílica gel, empleando como solvente una mezcla de tolueno:AcOEt (19:1). Las fracciones cromatográficas con r_f 0.62 (tolueno:AcOEt, 9:1) se juntaron y evaporaron. Se obtuvo un residuo cristalino que se recrystalizó de EtOH para dar 2,5,6-tri-O-benzoil-3-O-(2,3,5,6-tri-O-benzoil- β -D-galactofuranosil)-D-manono-1,4-lactona (**29**) (0,45 g, 85 %), punto de fusión 92-93 °C y $[\alpha]_D -42^\circ$ (c 1,0, CHCl_3).

Microanálisis calculado para $\text{C}_{61}\text{H}_{48}\text{O}_{18}$: C, 68,54; H, 4,53. Encontrado : C, 68,76; H, 4,75.

2,5,6-Tri-O-benzoil-3-O-(2,3,5,6-tetra-O-benzoil- β -D-galactofuranosil)-D-manofuranosa (31)

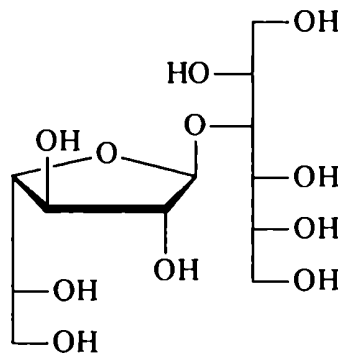


A una solución recién preparada de diisoamilborano en THF (1.9 mmol, 2.0 mL), enfriada a 0 °C, se agregó 2,5,6-tri-O-benzoil-3-O-(2,3,5,6-tri-O-benzoil- β -D-galactofuranosil)-D-manono-1,4-lactona (**29**) (0.50 g, 0.47 mmol), disuelto en THF (3 mL). La solución se agitó durante 16 h a temperatura ambiente. Al cabo de dicho tiempo se enfrió a 0 °C y se procedió a cortar la reacción de la manera acostumbrada. Luego se evaporó el THF en evaporador rotatorio y se disolvió el jarabe en 25 ml de Cl_2CH_2 , se lavó la fase orgánica con H_2O (2x15 ml), y se secó con Na_2SO_4 (anh). Se filtró y se evaporó en evaporador rotatorio. Se eliminó el ácido bórico por co-evaporaciones con MeOH. Se obtuvo un jarabe que se purificó por

columna cromatográfica de sílica gel eluyendo la misma con una mezcla tolueno:AcOEt (19:1). Las fracciones con r_f : 0.22 (tolueno:AcOEt, 9:1) se juntaron y evaporaron para dar un jarabe correspondiente a 2,5,6-tri-O-benzoil-3-O-(2,3,5,6-tetra-O-benzoil- β -D-galactofuranosil)-D-manofuranosa (**31**) (0,44 g, 88 %), que presentó un poder rotatorio de $[\alpha]_D -35^\circ$ (c 1,0, CHCl_3).

Microanálisis calculado para $\text{C}_{61}\text{H}_{50}\text{O}_{18}$: C, 68,40; H, 4,70. Encontrado : C, 68,25; H, 4,48.

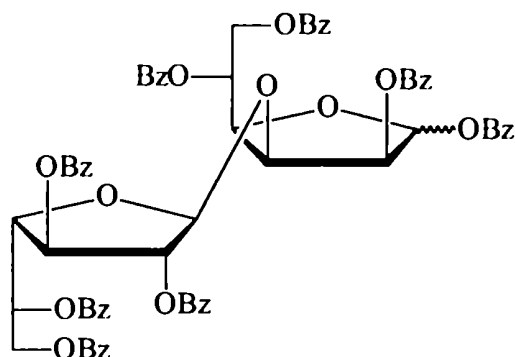
β -D-Galactofuranosil-(1 \rightarrow 3)-D-manitol (**30**)



Se suspendió 2,5,6-tri-O-benzoil-3-O-(2,3,5,6-tetra-O-benzoil- β -D-galactofuranosil)-D-manono-1,4-lactona (**29**) (0,32g, 0,3 mmol) en MeOH (10 mL), y se agregó NaBH_4 (0,20 g, 5,3 mmol). Se dejó agitando a temperatura ambiente durante 16 h y se agregó una solución 0,5 M de NaMeO en MeOH (5 mL). Se continuó la agitación por 3 h más hasta que por cromatografía en capa delgada mostró una sola mancha (r_f 0.28, r_{gal} 1; 1-PrOH- NH_3 - H_2O , 7:1:2). La solución se desionizó por pasaje en columna de resina Dowex 50 (H^+) y la misma se lavó con MeOH (15 mL) y H_2O (15 mL). El eluido y los lavados se evaporaron, y el jarabe obtenido se co-evaporó con H_2O (2x20 mL) para eliminar el benzoato de metilo. El jarabe se cristalizó de $^i\text{PrOH}$ -EtOH para obtener β -D-galactofuranosil-(1 \rightarrow 3)-D-manitol (**30**) (0,089, 89 %), que mostró un punto de fusión de 150-151 $^\circ\text{C}$ y un valor de poder rotatorio de $[\alpha]_D -55^\circ$ (c 1,0, H_2O), $[\alpha]_D^{\text{lit}} -61^\circ$ (c 2,0, H_2O) (Lindberg *et al*, 1964)

Microanálisis calculado para $\text{C}_{12}\text{H}_{24}\text{O}_{11}$ C, 41.86; H, 7.03. Encontrado : C, 41.69; H, 6.87.

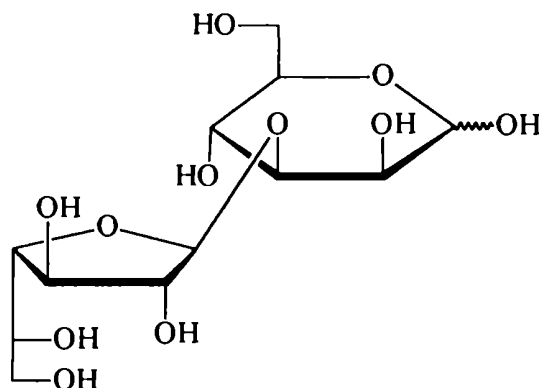
1,2,5,6-Tetra-O-benzoil-3-O-(2,3,5,6-tetra-O-benzoil- β -D-galactofuranosil)- α -D-manofuranosa (32 α**)
y 1,2,5,6-tetra-O-benzoil-3-O-(2,3,5,6-tetra-O-benzoil- β -D-galactofuranosil)- β -D-manofuranosa (**32 β**)**



Se disolvió 2,5,6-tri-O-benzoil-3-O-(2,3,5,6-tetra-O-benzoil- β -D-galactofuranosil)-D-manofuranosa (**31**) (0,20 g, 0,19 mmol) en piridina (2 mL), y se agregó lentamente cloruro de benzoilo (1 mL, 8,6 mmol). Luego de 2 h de agitación a temperatura ambiente se examinó la mezcla de reacción por cromatografía en capa delgada (tolueno:AcOEt, 9:1), mostrando dos productos principales, que luego de tratar la reacción por los métodos convencionales fueron separados por cromatografía en columna de sílica gel, eluyendo con una mezcla de tolueno:AcOEt, 49:1. Se aislaron dos fracciones cromatográficas una con r_f 0.43 y otra con r_f 0.50 (tolueno:AcOEt, 9:1). La fracción más polar, (0,09 g, 41 %) mostró un valor de poder rotatorio de $[\alpha]_D -59^\circ$ (c 1,0, CHCl_3), y correspondió al anómero β (**32 β**). Mientras que al evaporar la fracción menos polar se obtuvo otro jarabe (0,07 g, 37 %) que mostró un valor de poder rotatorio de $[\alpha]_D +12^\circ$ (c 1,0, CHCl_3), y correspondió al anómero α (**32 α**).

Microanálisis calculado para $\text{C}_{68}\text{H}_{54}\text{O}_{19}$: C, 69,50; H, 4,63. Encontrado C, 69,79; H, 4,61.

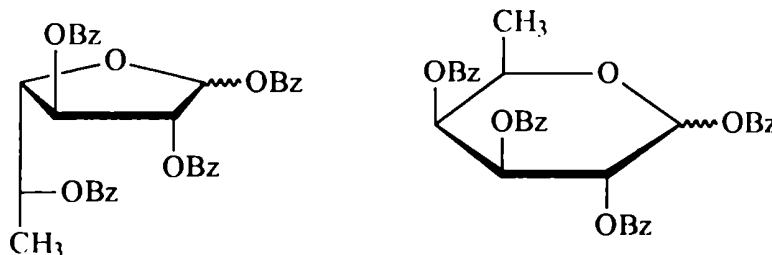
3-O-β-D-Galactofuranosil-D-manosa (33)



Se suspendió 2,5,6-tri-O-benzoil-3-O-(2,3,5,6-tetra-O-benzoil-β-D-galactofuranosil)-D-manofuranosa (**31**) (0,40 g, 0,37 mmol) en una solución de NaMeO en MeOH 0,5 M (10 mL). La agitación se continuó hasta total disolución y desaparición del compuesto de partida, mostrando por cromatografía en capa delgada de sílica la aparición de un único producto con r_f 0.32 (1-PrOH-NH₃-H₂O, 7:1:2). Se neutralizó pasando la solución a través de resina Dowex 50 (H⁺) y se lavó la misma con MeOH (25 mL) y luego H₂O (10 mL). Se juntaron los lavados con el eluido y se evaporó el solvente. Luego de eliminar el benzoato de metilo por sucesivas co-evaporaciones con H₂O se obtuvo 3-O-β-D-galactofuranosil-D-manosa (**33**) (0.12 g, 94 %), como un jarabe que presentó un valor de poder rotatorio de $[\alpha]_D -47^\circ$ (c 1,0, H₂O).

Microanálisis calculado para C₁₂H₂₂O₁₁ : C, 42,11; H, 6,48. Encontrado : C, 42,36; H, 6,61.

Benzoilación de D-fucosa



Reacción a 60 °C

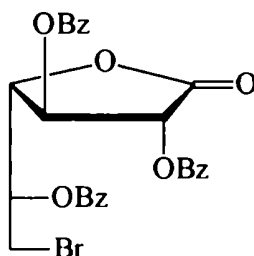
El procedimiento previamente descrito para la preparación de penta-O-benzoil- α,β -D-galactofuranosa se adapta para la D-fucosa. Una solución de D-fucosa (0,5 g, 2,77 mmoles) en 7 mL de piridina anhidra se agita durante 2 h a 100 °C. Luego se enfría rápidamente a 60 °C, y se agregan 3 mL de cloruro de benzoilo (10 mmoles) manteniendo la temperatura constante. Luego de 1,5 h se vuelca la mezcla en 100 mL de agua-hielo. Se macera la mezcla y se disuelve el jarabe que decanta en 100 mL de Cl₂CH₂. Se lava la fase orgánica con HCl 5 % (3 x 50 mL), NaHCO₃ (ss) (1 x 50 mL), H₂O (2 x 50 mL), se seca con Na₂SO₄ (anh), se filtra y evapora. Se obtiene un jarabe que se analiza por RMN y presenta en su composición 88 % de piranosas y 12 % de furanosas.

RMN ¹H: Figuras 40 y 41.

Reacción a temperatura ambiente

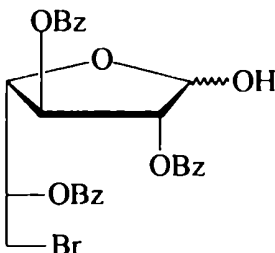
Se prepara una solución de 0,5 g de D-fucosa (2,77 mmoles) en 7 mL de piridina. Se agita y se le agregan 2 mL de cloruro de benzoilo (17 mmoles). Se continúa agitando durante 2 h, y luego se vuelca sobre 100 mL de agua-hielo y se procesa de manera análoga al proceso a 60 °C. Se analiza espectroscópicamente la mezcla y se observa que está compuesta por 78 % de piranosas y 22 % de furanosas.

2,3,5-Tri-O-benzoil-6-bromo-6-desoxi-D-galactono-1,4-lactona (41)



Se prepara según se describe en la literatura (Moradei *et al*, 1991).

2,3,5-Tri-O-benzoil-6-bromo-6-desoxi-D-galactofuranosa (42)

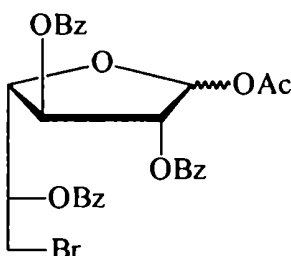


Se prepara una solución fresca de diisooamilborano en THF (36,8 mmoles en 2,0 mL), enfriada a 0 °C. Se agrega esta solución a la 2,3,5-tri-O-benzoil-6-bromo-6-desoxi-D-galactono-1,4-lactona (**41**) (2,55 g, 4,6 mmoles). Se deja reaccionar durante 16 h a temperatura ambiente, y se procede luego a tratar la reacción según el procedimiento ya descrito para las reducciones de lactonas con diisooamilborano. Se obtienen 2.42 g (4.4 mmoles, 95 %) de 2,3,5-tri-O-benzoil-6-bromo-6-desoxi-D-galactofuranosa (**42**) como un sólido amorfo, $[\alpha]_D -10^\circ$ (c 1, CHCl₃).

RMN ¹³C: Tabla 6, Figura 42.

RMN ¹H: Tabla 7.

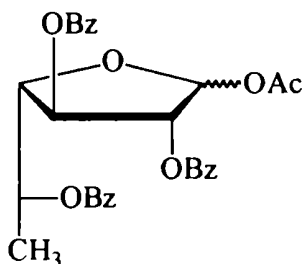
Microanálisis calculado para C₂₇H₂₃BrO₈: C, 58,39, H, 4,17. Encontrado: C, 58,23, H, 4,30.

1-O-Acetil-2,3,5-tri-O-benzoil-6-bromo-6-desoxi-D-galactofuranosa**(43)**

Se disuelven 2,0 g (3,61 mmoles) de 2,3,5-tri-O-benzoil-6-bromo-6-desoxi-D-galactofuranosa (**42**) en 3,5 mL de piridina, se enfría a 0 °C y se agregan lentamente 3,5 mL de anhídrido acético. Se mantiene agitando a temperatura ambiente durante 16 h. Luego se vuelca la mezcla sobre 100 mL de agua-hielo, y tras macerar el producto se disuelve en 50 mL de Cl_2CH_2 , se lava la fase orgánica con HCl (5 %) (3x50 mL), NaCl (ss) (2x50 mL), NaHCO_3 (ss) (3x50 mL), H_2O (50 mL), se seca sobre Na_2SO_4 (anh), se filtra, se evapora y se obtienen 2,07 g (3,43 mmoles, 95 %) del producto. Por cristalización de etanol dio 1-O-acetil-2,3,5-tri-O-benzoil-6-bromo-6-desoxi-D-galactofuranosa (**43**), de punto de fusión de 135-136 °C, $[\alpha]_D -10^\circ$ (c 1, CHCl_3).

RMN ^{13}C : Tabla 6, Figura 43.

Microanálisis calculado para $\text{C}_{29}\text{H}_{25}\text{BrO}_9$: C, 58,30, H, 4,22, Encontrado : C, 58,10, H, 4,21.

1-O-Acetil-2,3,5-tri-O-benzoil- α,β -D-fucofuranosa (44)

Se prepara una solución de 1,0 g (1,68 mmoles) de 1-O-acetil-2,3,5-tri-O-benzoil-6-bromo-6-desoxi-D-galactofuranosa (**43**) en 10 mL de acetato de etilo a la

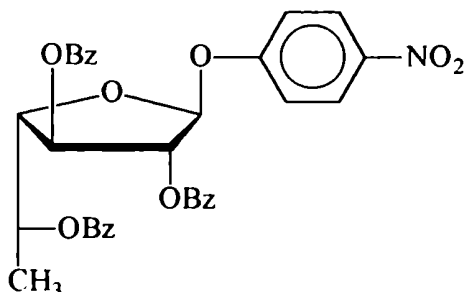
que se le agrega 1.0 mL de trietilamina. Se hidrogena la mezcla en presencia de 10 % Pd-C (0.15 g) a una presión de 45 psi (3 atm) durante 3 h, bajo agitación mecánica. Se filtra para remover el catalizador que se lava (3x10 mL) para recuperar el sustrato adsorbido, y el filtrado y los líquidos de lavado se juntan y se lavan con HCl 5 % (3x30 mL), NaHCO₃ ss (3x30 mL), NaCl ss (1x30 mL). La fase orgánica se seca con Na₂SO₄, se filtra y se evapora. Se obtienen 0,83 g (95 %) de un jarabe, que fue cristalizado de etanol para dar 1-O-acetil-2,3,5-tri-O-benzoil- α,β -D-fucofuranosa (**44**) de punto de fusión de 99-100 °C, $[\alpha]_D -19^\circ$ (c 1, CHCl₃).

RMN ¹³C: Tabla 6, Figura 44.

RMN ¹H: Tabla 7, Figura 45.

Microanálisis calculado para C₂₉H₂₆O₉ : C, 67,18; H, 5,05. Encontrado C, 67,06; H, 5,14.

4-Nitrofenil 2,3,5-tri-O-benzoil- β -D-fucofuranósido (**45**)



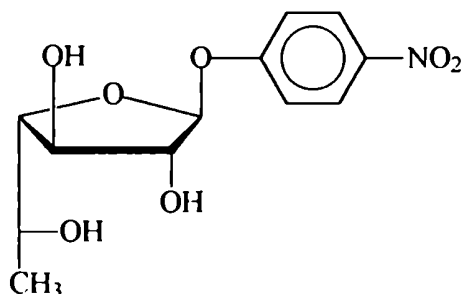
Se prepara una solución de 1,0 g (1,68 mmoles) de 1-O-acetil-2,3,5-tri-O-benzoil- α,β -D-fucofuranosa (**44**) en 10,0 mL de Cl₂CH₂ anhidro, y se enfría la solución a 0 °C. Se agregan 250 μ l de SnCl₄ (2,0 mmoles) con jeringa y bajo atmósfera inerte. Se mantiene la solución a 0 °C y se agita durante 10 minutos. Luego se agregan 0,3 g (2,4 mmoles) de 4-nitrofenol, y la mezcla se agita durante 3 h a temperatura ambiente. Se diluye con 20 mL de Cl₂CH₂, y la mezcla se vuelca sobre 50 mL de NaHCO₃ (ss), se extrae la fase orgánica, se lava con NaCl (ss), se seca con MgSO₄ (anh), se filtra y evapora. El producto obtenido se purifica por columna eluyendo con tolueno:AcOEt (19:1), para obtener 0,7 g (1,2 mmoles, 60 %) de 4-nitrofenil 2,3,5-tri-O-benzoil- β -D-fucofuranósido (**45**), como un jarabe de $[\alpha]_D -97^\circ$ (c 1, CHCl₃).

RMN ^{13}C : Tabla 6, Figura 47.

RMN ^1H : Tabla 7, Figura 46.

Microanálisis calculado para $\text{C}_{33}\text{H}_{27}\text{NO}_{10}$: C, 66,33; H, 4,55. Encontrado C, 66,52; H, 4,70.

4-Nitrofenil β -D-fucofuranósido (46)



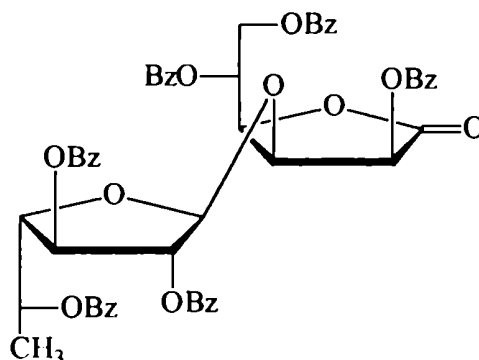
Se suspenden 0,35 g de 4-nitrofenil 2,3,5-tri-O-benzoil- β -D-fucofuranósido (**45**) (0,6 mmoles) en 10 mL de una solución recién preparada de NaMeO en MeOH 0,5 M, y se agita durante 2 h, tiempo en el que se disuelve y reacciona totalmente el producto de partida. La solución se pasa a través de una columna conteniendo resina Dowex 50 (H^+) y se lava con 50 mL de MeOH para recuperar totalmente el compuesto desbenzoilado. Se evapora la solución metanólica y se coevapora el residuo con agua (3x20 mL), hasta eliminar el benzoato de metilo. Se obtienen 0,16 g de 4-nitrofenil β -D-fucofuranósido (**46**) (0,56 mmoles, 94 %), $[\alpha]_{\text{D}} -145^\circ$ (c 1,4, CH_3OH).

RMN ^{13}C : Tabla 6, Figura 48.

RMN ^1H : Tabla 7, Figura 49.

Microanálisis calculado para $\text{C}_{12}\text{H}_{15}\text{NO}_7$: C, 50,53; H, 5,30. Encontrado : C, 50,32; H, 5,45.

2,5,6-Tri-O-benzoil-3-O-(2,3,5-tri-O-benzoil-β-D-fucofuranosil)-D-manono-1,4-lactona (47)



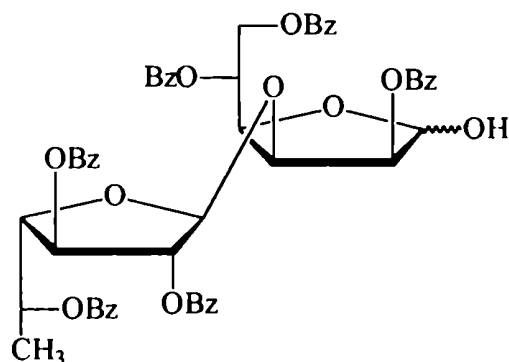
1-O-Acetil-2,3,5-tri-O-benzoil- α,β -D-fucofuranosa (**44**) (0,57 g, 1,1 mmoles) se disolvió en CH_2Cl_2 (10 mL), se agregó SnCl_4 (0,14 mL, 1,21 mmol) con jeringa y bajo atmósfera inerte, y la mezcla se agitó durante 10 min, manteniendo la temperatura a 0°C . Se agregó entonces la 2,5,6-tri-O-benzoil-D-manono-1,4-lactona (**27**) (0,58 g, 1,2 mmol), y se mantuvo la agitación durante 3 h a temperatura ambiente. Luego de dicho período se diluyó la mezcla de reacción con 20 mL de Cl_2CH_2 , se volcó sobre 50 mL de NaHCO_3 (ss), se extrajo la fase orgánica y se lavó con NaCl (ss). Se secó la fase orgánica con MgSO_4 (anh), se filtró y se evaporó. El producto obtenido se purificó por columna eluyendo la misma con tolueno:AcOEt (19:1), para dar la 2,5,6-tri-O-benzoil-3-O-(2,3,5-tri-O-benzoil- β -D-fucofuranosil)-D-manono-1,4-lactona (**47**) (0,68 g, 65 %), que fue cristalizado de etanol, y luego de recrystalizar dió un pf de $182\text{-}183^\circ\text{C}$ y $[\alpha]_D: -47^\circ$ (c 1, CHCl_3).

RMN ^{13}C : Tabla 6, Figura 51.

RMN ^1H : Figura 50.

Microanálisis calculado para $\text{C}_{54}\text{H}_{44}\text{O}_{16}$: C, 68,35; H, 4,67. Encontrado : C, 68,64; H, 4,45.

2,5,6-Tri-O-benzoil-3-O-(2,3,5-tri-O-benzoil- β -D-fucofuranosil)-D-manofuranosa (48)

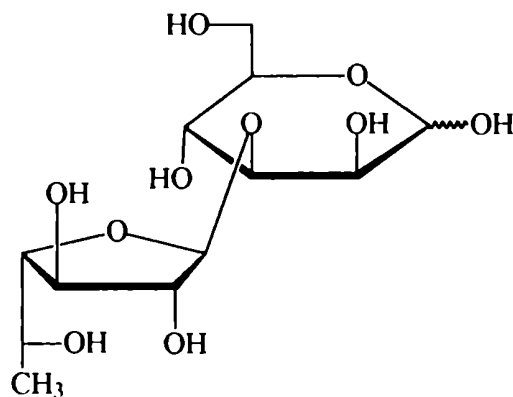


2,5,6-Tri-O-benzoil-3-O-(2,3,5-tri-O-benzoil- β -D-fucofuranosil)-D-manono-1,4-lactona (**47**) (0,6 g, 0,63 mmol) se agregó a una solución recién preparada de diisoamilborano en THF (2,6 mmol, 5 mL), y se dejó reaccionar durante 16 h a temperatura ambiente con agitación. Luego se procedió a tratar la mezcla como ya se describió para las reducciones de lactonas con diisoamilborano. Se obtuvo un jarabe que fue purificado en columna de sílica gel, eluyendo con tolueno:Acetato de Etilo (19:1). Luego de evaporar se obtuvo el producto de reducción **48** como un jarabe (0,57 g, 95 %) de $[\alpha]_D : -75^\circ$ (c 1, CHCl_3).

RMN ^{13}C : Tabla 6, Figura 52.

Microanálisis calculado para $\text{C}_{54}\text{H}_{46}\text{O}_{16}$: C, 68,20; H, 4,82. Encontrado : C, 68,41; H, 4,99.

3-O- β -D-Fucofuranosil-D-manosa (49)



2,5,6-Tri-O-benzoil-3-O-(2,3,5-tri-O-benzoil- β -D-fucofuranosil)-D-manofuranosa (**48**) (0,30 g, 0,32 mmol) se suspende en una solución de NaMeO en MeOH 0,5 M (10 mL), y se agita hasta que se disuelve completamente (aproximadamente 2 h). La solución se pasa a través de una columna conteniendo resina Dowex 50W (H^+) y se neutraliza. El benzoato de metilo se elimina por repetidas coevaporaciones con agua. Se obtiene 3-O- β -D-fucofuranosil-D-manosa (**49**) (0,10 g, 97 %) como un jarabe. El mismo presentó $[\alpha]_D : -13^\circ$ (c 0,9, H_2O).

RMN ^{13}C : Tabla 6, Figura 53.

RMN 1H : Figura 54.

Microanálisis calculado para $C_{12}H_{22}O_{10}$: C, 44,17; H, 6,80. Encontrado C, 44,41; H, 7,04.

Parte experimental de los estudios de especificidad.

Condiciones de cultivo de *Penicillium fellutanum*.

Los cultivos se realizaron a partir de un inóculo conservado en medio agar Czapek-Dox (Cluterbuck *et al*, 1932) a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, inoculando las esporas en medio Raulin-Thom (Cluterbuck *et al*, 1934) conteniendo 0.5 % de glucosa como fuente de carbono y se agitaron a 180 rpm en presencia de luz a $24\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Obtención de la enzima.

Luego de 8 días de cultivo se filtró el micelio sobre papel de filtro y el filtrado se concentró por liofilización, se dializó y se liofilizó nuevamente. Este se utilizó como fuente de la enzima, crudo o purificado por cromatografía de afinidad (Miletti *et al* 1998), controlando su contenido proteico por el método de Bradford (Bradford, 1976) y su actividad con 4-nitrofenil β -D-galactofuranósido (**50**) como sustrato (Varela *et al*, 1986; Marino *et al*, 1998).

Ensayos enzimáticos

Ensayos de **15 α** , **15 β** , **30**, **33**, **36**, **38**, **46**, **49** como sustratos.

En tubos de hemólisis se colocaron 100 μL de extracto enzimático (29 μg de proteína), 31 μL de soluciones 5 mM de los sustratos ensayados (**15 α** , **15 β** , **30**, **33**, **36**, **38**, **46**, **49**), 100 μL de buffer NaAcO 66 mM (pH 4), y se llevó el volumen final a 500 μL con agua. Se realizó la incubación durante 1,5 h a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Para detener la reacción enzimática se utilizaron 2 procedimientos diferentes. En el caso de los potenciales sustratos cromogénicos **38** y **46** se agregó 1 mL de buffer carbonato de sodio 0.25 M (pH 9), y se midió el 4-nitrofenol liberado

espectrofotométricamente a 410 nm. En el caso de tratarse de **15 α** , **15 β** , **30**, **33**, **36**, **49** las mezclas incubadas se calentaron a 80 °C durante 2 minutos, se centrifugaron a través de filtros Ultrafree-MC (corte MW 5000) y se diluyeron convenientemente con agua para analizarlas por HPAEC-PAD.

Ensayos de inhibición.

En tubos de hemólisis se colocaron 100 μ L de extracto enzimático (29 μ g de proteína), 31 μ L de solución 5mM de 4-nitrofenil β -D-galactofuranósido (**50**), 0.31 μ mol de los sustratos ensayados (**15 α** , **15 β** , **30**, **33**, **36**, **38**, **46**, **49**), 100 μ L de buffer NaAcO 66 mM (pH 4), y se llevó el volumen final a 500 μ L con agua. Se realizó la incubación durante 1,5 h a 37 °C. Se agregó 1 mL de buffer carbonato de sodio 0.25 M (pH 9), y se midió el 4-nitrofenol liberado espectrofotométricamente a 410 nm.

Condiciones de análisis por cromatografía de intercambio aniónico de alta presión con detección por pulso amperométrico (HPAE-PAD)

Se utilizó un aparato Dionex DX 300, equipado con un detector por pulso amperométrico y ajustado a 30 nA con potenciales $E_1=+0,05$ V, $E_2=+0,60$ V y $E_3=-0,60$ V. La columna empleada fue una CarboPac MA-10 (4x250 mm) de intercambio aniónico, analítica, equipada con guarda columna MA-10 (4x50 mm). Las eluciones cromatográficas se llevaron a cabo isocráticamente empleando NaOH 70 mM, bajo un flujo de 0,4 mL por minuto.

RESUMEN

Resumen

La glicobiología de galactofuranosa es un tema de interés creciente. Es sabido que no se halla presente en mamíferos, mientras que sí lo está en parásitos, protozoos, y hongos. En particular, la galactosa está presente en configuración furanósica en un glicoconjugado (LPPG) de *T. cruzi*, agente del mal de Chagas. Este hecho la convierte en un posible blanco para diseñar análogos modificados estructuralmente que conserven su anillo furanósico y que actúen bloqueando o inhibiendo la acción de enzimas fundamentales en el metabolismo del parásito que involucren a la galactofuranosa en sus procesos biosintéticos, como podría ser la exo β -D-galactofuranosidasa. Con esta idea se desarrolló el presente trabajo, que empleó como organismo modelo a un hongo, el *P. fellutanum*, que se cultivó en nuestro laboratorio y del cual se extrajo y obtuvo la exo β -D-galactofuranosidasa correspondiente. Recientemente se ha detectado tal enzima en *T. cruzi*, lo que da más interés al trabajo desarrollado en nuestro laboratorio.

Se planteó sintetizar análogos desoxigenados de D-galactofuranósidos con configuración β en el carbono anomérico, en particular sintetizar 2-desoxi, 3-desoxi y 6-desoxi derivados de β -D-galactofuranósidos. Estábamos interesados en emplear la metodología de las aldonolactonas para lograr estos objetivos, metodología que se ha venido desarrollando en nuestro grupo con éxito en los últimos años. La idea era ensayar esos compuestos frente a la exo β -D-galactofuranosidasa de *P. fellutanum* y analizar su comportamiento como sustratos de la enzima. Estos ensayos nos permitirían obtener información acerca de la enzima y de sus requerimientos estructurales en cuanto al sustrato.

Para la síntesis de glicósidos de 2-desoxi- β -D-galactofuranósidos (2-desoxi- β -D-*lixo*-hexofuranósidos), partimos de D-galactono-1,4-lactona (**1**) y sintetizamos el isopropiliden derivado 5,6-di-O-isopropiliden-D-galactono-1,4-lactona (**2**). Por tosilación regioselectiva de **2** con cloruro de tosilo en piridina se obtuvo 5,6-di-O-isopropiliden-2-O-tosil-D-galactono-1,4-lactona (**3**) con 70 % de rendimiento. Por desprotección en medio acuoso ácido de **3** obtuvimos 2-O-tosil-D-galactono-1,4-

lactona (**4**) con 96 % de rendimiento y por benzoilación en condiciones clásicas se obtuvo 3,5,6-tri-O-benzoil-2-O-tosil-D-galactono-1,4-lactona (**5a**) con 90 % de rendimiento. A partir de **5a** y por reacción con NaI en acetona-ácido trifluoroacético obtuvimos 3,5,6-tri-O-benzoil-2-desoxi-D-galactono-1,4-lactona (3,5,6-tri-O-benzoil-2-desoxi-D-*lixo*-hexono-1,4-lactona, **6a**) con 70 % de rendimiento. Por reducción de **6a** con DSB obtuvimos 3,5,6-tri-O-benzoil-2-desoxi-D-galactofuranosa (3,5,6-tri-O-benzoil-2-desoxi-D-*lixo*-hexofuranosa, **11a**), y, por las condiciones de procesamiento de la reacción, obtuvimos inesperadamente la mezcla de metil glicósidos de la 3,5,6-tri-O-benzoil-2-desoxi-D-galactofuranosa (metil glicósidos de la 3,5,6-tri-O-benzoil-2-desoxi-D-*lixo*-hexofuranosa, **13a**). La misma serie de reacciones aplicada sobre el derivado acetilado 3,5,6-tri-O-acetil-2-O-tosil-D-galactono-1,4-lactona (**5b**) condujo a 3,5,6-tri-O-acetil-2-desoxi-D-galactofuranosa (3,5,6-tri-O-acetil-2-desoxi-D-*lixo*-hexofuranosa, **11b**), impurificado con la mezcla anomérica de los metil glicósidos de la 3,5,6-tri-O-acetil-2-desoxi-D-galactofuranosa (metil glicósidos de la 3,5,6-tri-O-acetil-2-desoxi-D-*lixo*-hexofuranosa, **13b**), y con 2-desoxi-3,4,6-tri-O-acetil-D-*lixo*-hexopiranososa (2-desoxi-3,4,6-tri-O-acetil-D-*lixo*-hexopiranososa, **14b**), producido por la apertura del anillo furanósico en la reducción.

La acetilación en forma clásica de **11a** condujo a 1-O-acetil-3,5,6-tri-O-benzoil-2-desoxi-D-galactofuranosa (1-O-acetil-3,5,6-tri-O-benzoil-2-desoxi-D-*lixo*-hexofuranosa, **12**) con 96 % de rendimiento. A partir de **12** y por reacción con BF₃•MeOH se obtuvieron los metil glicósidos de la 3,5,6-tri-O-benzoil-2-desoxi-D-galactofuranosa (metil glicósidos de la 3,5,6-tri-O-benzoil-2-desoxi-D-*lixo*-hexofuranosa, **13a**) como mezcla anomérica con 90 % de rendimiento. También se obtuvo **13a** por reacción de **11a** con BF₃•MeOH o con MeOH anhidro. Luego por desprotección con NaMeO en MeOH se obtuvieron los glicósidos libres metil 2-desoxi- α -D-galactofuranósido (metil 2-desoxi- α -D-*lixo*-hexofuranósido, **15 α**) y metil 2-desoxi- β -D-galactofuranósido (metil 2-desoxi- β -D-*lixo*-hexofuranósido, **15 β**) en proporción 1:1, con 33 % de rendimiento a partir de D-galactono-1,4-lactona (**1**).

Se intentó realizar la desoxigenación en la posición 2 luego de la glicosidación, para obtener en forma selectiva el glicósido β por asistencia anquimérica del sustituyente en C-2. Por reducción de **5a** con DSB se obtuvo 3,5,6-tri-O-benzoil-2-O-

tosil-D-galactofuranosa (**16**), que fue luego acetilado con anhídrido acético en piridina para dar 1-O-acetil-3,5,6-tri-O-benzoil-2-O-tosil-D-galactofuranosa (**17**). Se llevó a cabo la glicosidación de **17** con 4-nitrofenol promovida por SnCl₄ que dio el 4-nitrofenil 3,5,6-tri-O-benzoil-2-O-tosil-β-D-galactofuranósido (**18**) con 64 % de rendimiento. Sin embargo este glicósido no se pudo desoxigenar cuando se le aplicó el método utilizado previamente para obtener el derivado de la 2-desoxilactona.

Los glicósidos de 3-desoxi-β-D-galactofuranosa (3-desoxi-β-D-*xilo*-hexofuranosa) se sintetizaron también a partir de D-galactono-1,4-lactona (**1**). A partir del derivado perbenzoilado 2,3,5,6-tetra-O-benzoil-D-galactono-1,4-lactona (**19**) por hidrogenólisis en presencia de trietilamina e H₂ sobre Pd se obtuvo el 2,5,6-tri-O-benzoil-3-desoxi-D-galactono-1,4-lactona (2,5,6-tri-O-benzoil-3-desoxi-D-*xilo*-hexono-1,4-lactona, **20**). Siguiendo el mismo método utilizado para la reducción de la 2-desoxigalactonolactona y acetilación posterior del HO anomérico se obtuvo 1-O-acetil-2,5,6-tri-O-benzoil-3-desoxi-β-D-galactofuranosa (1-O-acetil-2,5,6-tri-O-benzoil-3-desoxi-β-D-*xilo*-hexofuranosa, **22**), compuesto conveniente para reacciones de glicosidación. Utilizando SnCl₄ como agente activante del carbono anomérico se sintetizaron por glicosidación selectiva 1-butil 2,5,6-tri-O-benzoil-3-desoxi-β-D-galactofuranósido (1-butil 2,5,6-tri-O-benzoil-3-desoxi-β-D-*xilo*-hexofuranósido, **24**), y 2-propil 2,5,6-tri-O-benzoil-3-desoxi-β-D-galactofuranósido (2-propil 2,5,6-tri-O-benzoil-3-desoxi-β-D-*xilo*-hexofuranósido, **23**). La desprotección de los glicósidos con NaMeO en MeOH dió 1-butil 3-desoxi-β-D-galactofuranósido (1-butil 3-desoxi-β-D-*xilo*-hexofuranósido, **26**) con 70% y 2-propil 3-desoxi-β-D-galactofuranósido (2-propil 3-desoxi-β-D-*xilo*-hexofuranósido, **25**) con 67% de rendimiento, en ambos casos respecto de **1**. Se prosiguió luego con la síntesis de disacáridos conteniendo la unidad β-D-galactofuranosa ó 3-desoxi-β-D-galactofuranosa (3-desoxi-β-D-*xilo*-hexofuranosa). En particular se sintetizó β-D-Galf(1→3)-D-Man_p que se encuentra como unidad terminal en el lipopéptidofosfoglicano (LPPG) de *T. cruzi* e interna en el lipofosfoglicano (LPG) de *Leishmania*. Como en este último caso la Galf está ligada por su posición 3, se sintetizó también el 3-desoxiderivado del disacárido, 3-desoxi-β-

D-Galf(1→3)-D-Manp, que podría utilizarse en ensayos de inhibición de la glicosiltransferasa involucrada en la construcción del LPG en *Leishmania*.

Se encaró la síntesis de 3-O-(β-D-galactofuranosil)-D-manosa (**33**). Para ello se sintetizó 2,5,6-tri-O-benzoil-D-manono-1,4-lactona (**27**) a partir de D-manosa con 70% de rendimiento. Por reacción de este aceptor de glicosilo con el derivado perbenzoilado de D-galactofuranosa (**28**), empleando SnCl₄ como promotor, se sintetizaron los compuestos conteniendo la unidad β-D-galactofuranosa. Así se logró sintetizar el disacárido lactónico 2,5,6-tri-O-benzoil-3-O-(2,3,5,6-tetra-O-benzoil-β-D-galactofuranosil)-D-manono-1,4-lactona (**29**). Luego se lo redujo con diisoamilborano para obtener 2,5,6-tri-O-benzoil-3-O-(2,3,5,6-tetra-O-benzoil-β-D-galactofuranosil)-D-manofuranosa (**31**), que fue desprotegido con NaMeO en MeOH lográndose el producto buscado, 3-O-β-D-galactofuranosil-D-manosa (**33**). A partir de **29** se sintetizó, por reacción con NaBH₄, β-D-galactofuranosil-(1→3)-D-manitol (**30**), y a partir de **31** se sintetizó por benzoilación 1,2,5,6-tetra-O-benzoil-3-O-(2,3,5,6-tetra-O-benzoil-β-D-galactofuranosil)-α-D-manofuranosa (**32α**) y 1,2,5,6-tetra-O-benzoil-3-O-(2,3,5,6-tetra-O-benzoil-β-D-galactofuranosil)-β-D-manofuranosa (**32β**).

Por el mismo método se hizo reaccionar 2,5,6-tri-O-benzoil-D-manono-1,4-lactona (**27**) con 1-O-acetil-2,5,6-tri-O-benzoil-3-desoxi-β-D-galactofuranosa (1-O-acetil-2,5,6-tri-O-benzoil-3-desoxi-β-D-xilo-hexofuranosa, **22**) empleando nuevamente SnCl₄, obteniéndose el disacárido lactónico 2,5,6-tri-O-benzoil-3-O-(2,5,6-tri-O-benzoil-3-desoxi-β-D-galactofuranosil)-D-manono-1,4-lactona (2,5,6-tri-O-benzoil-3-O-(2,5,6-tri-O-benzoil-3-desoxi-β-D-xilo-hexofuranosil)-D-manono-1,4-lactona, **34**). Luego se lo redujo con diisoamilborano para obtener 2,5,6-tri-O-benzoil-3-O-(2,5,6-tri-O-benzoil-3-desoxi-β-D-galactofuranosil)-D-manofuranosa (2,5,6-tri-O-benzoil-3-O-(2,5,6-tri-O-benzoil-3-desoxi-β-D-xilo-hexofuranosil)-D-manofuranosa, **35**), que fue desprotegido con NaMeO en MeOH lográndose el producto buscado, 3-O-(3-desoxi-β-D-galactofuranosil)-D-manosa (3-O-(3-desoxi-β-D-xilo-hexofuranosil)-D-manosa, **36**). Toda la secuencia arrojó un 44% de rendimiento respecto de **1** y **26**.

Luego se encaró la síntesis de glicósidos de 3-desoxi-β-D-galactofuranosa (3-desoxi-β-D-xilo-hexofuranosa), conteniendo la aglicona cromogénica 4-nitrofenilo,

para probarlos como sustrato con la exo β -D-galactofuranosidasa de *P. fellutanum*. Para ello, se hizo reaccionar 1-O-acetil-2,5,6-tri-O-benzoil-3-desoxi- β -D-galactofuranosa (1-O-acetil-2,5,6-tri-O-benzoil-3-desoxi- β -D-xilo-hexofuranosa, **22**) con 4-nitrofenol en presencia de SnCl₄, lográndose obtener 4-nitrofenil 2,5,6-tri-O-benzoil-3-desoxi- β -D-galactofuranósido (4-nitrofenil 2,5,6-tri-O-benzoil-3-desoxi- β -D-xilo-hexofuranósido, **37**). Por desprotección con NaMeO en MeOH se obtuvo 4-nitrofenil 3-desoxi- β -D-galactofuranósido (4-nitrofenil 3-desoxi- β -D-xilo-hexofuranósido, **38**) con 69 % de rendimiento respecto de **1**.

Por último se sintetizaron análogos desoxigenados en C-6 de galactofuranosa. Así, a partir de 2,3,5-tri-O-benzoil-6-bromo-6-desoxi-D-galactono-1,4-lactona (**41**) se obtuvo por reducción con DSB 2,3,5-tri-O-benzoil-6-bromo-6-desoxi-D-galactofuranosa (**42**) con 95 % de rendimiento. Luego por acetilación en condiciones clásicas obtuvimos 1-O-acetil-2,3,5-tri-O-benzoil-6-bromo-6-desoxi-D-galactofuranosa (**43**) con 95 % de rendimiento, el cual por hidrogenólisis con H₂ sobre Pd/C en presencia de trietilamina en AcEOt como solvente dió 1-O-acetil-2,3,5-tri-O-benzoil- α,β -D-fucofuranosa (**44**) con 95 % de rendimiento. La glicosidación con 4-nitrofenol, empleando SnCl₄ como promotor, dió 4-nitrofenil 2,3,5-tri-O-benzoil- β -D-fucofuranósido (**45**) con 60 % de rendimiento, y su desacilación con NaMeO en MeOH condujo al 4-nitrofenil β -D-fucofuranósido (**46**) con 94 % de rendimiento. La glicosidación de **44** con 2,5,6-tri-O-benzoil-D-manono-1,4-lactona (**27**) en presencia de SnCl₄, dió 2,5,6-tri-O-benzoil-3-O-(2,3,5-tri-O-benzoil- β -D-fucofuranosil)-D-manono-1,4-lactona (**47**) con 65 % de rendimiento, y la reducción con DSB dió 2,5,6-tri-O-benzoil-3-O-(2,3,5-tri-O-benzoil- β -D-fucofuranosil)-D-manofuranosa (**48**) con 95 % de rendimiento. Por último, se desaciló **48** con NaMeO en MeOH para obtener 3-O- β -D-fucofuranosil-D-manosa (**49**) con 97 % de rendimiento.

Los compuestos **15 α** , **15 β** , **36**, **38**, **46**, **49** no resultaron ser ni inhibidores ni sustratos cuando se ensayaron frente a la enzima exo β -D-galactofuranosidasa de *P. fellutanum*, utilizando como control positivo el 4-nitrofenol β -D-galactofuranósido (**50**). Esto indicó que los hidroxilos 2, 3 y 6 de la D-galactofuranosa son necesarios para

que la exo β -D-galactofuranosidasa de *P. fellutanum* reconozca a la estructura del azúcar.

Parte de este trabajo de tesis dio lugar a las siguientes publicaciones :

1) " Stereoselective synthesis of alkyl 3-deoxy β -D-galactofuranosides "

Alejandro A. Chioconni, Oscar Varela and Rosa M. de Lederkremer^{*}.

Carbohydrate Letters, 2, 1996, 115-122.

2) "The glycosyl-aldonolactone approach for the synthesis of β -D-Galf-(1 \rightarrow 3)-D-Manp and 3-deoxy- β -D-xilo-hexofuranosyl-(1 \rightarrow 3)-D-Manp"

Carla Marino, Alejandro A. Chioconni, Oscar Varela and Rosa M. de Lederkremer^{*}.

Carbohydrate Research, 311, 1998, 183-189.

3) "Synthesis of 4-nitrophenyl β -D-fucofuranoside and β -D-fucofuranosyl-(1 \rightarrow 3)-D-mannopyranose: modified substrates for studies on catalytic requirements of β -D-galactofuranosidase"

Alejandro A. Chioconni, Carla Marino and Rosa M. de Lederkremer^{*}.

Carbohydrate Research, 323, 2000, 7-13.

4) "Photoinduced electron transfer and chemical α -deoxygenation of D-galactono-1,4-lactone. Synthesis of 2-deoxy-D-lixo-hexofuranosides"

Alejandro A. Chioconni, Eugenio Otal, Carla Marino and Rosa M. de Lederkremer^{*}.

Carbohydrate Research, 337, 2002, 2119-2126.

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

- Arshava, B. M.; Markin, S. M.; Raifeld, Y. E. Zilberg, L. L. *J. Org. Chem.* 1984, **20**, 189.
- Arshava, B. M.; Raifeld, Y. E.; Nikitenko, A. *Tetrahedron* 1993, **49**, 2509.
- Babine, R. E. *Tetrahedron Lett.* 1986, **27**, 5791.
- Barresi, F., Hindsgaul, O. *J. Carbohydr. Chem.* 1995 a, **14**, 1043-1087.
- Barresi, F., Hindsgaul, O., *Chemically Synthesised Oligosaccharides* 1994.
- Barresi, F., Hindsgaul, O., *Modern Synthetic Methods* 1995 b, 281-330.
- Barton, D. H. R., Jang, D. O. Jaszberenyi, J. C. *J. Org. Chem.* 1993, **58**, 6838-6842.
- Beau, J-M, Perez, M., *Tetrahedron Lett.* 1989, **30**, 75.
- Berti, G.; Caroti, P.; Catelani, G.; Monti, L. *Carbohydr. Res.* 1983, **124**, 35.
- Bielawska, H., Michalska, M., *J. Carbohydr. Chem.* 1991, **10**, 107-112.
- Bishop, D. F., Calhoun, D. H., Bernstein, H. S., Hantzopoulos, P., Quinn, M., Desnick, R. J., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1986, **83**, 4859-4863.
- Blanc-Muesser, M., Defaye, J., Driguez, H. *Carbohydr. Res.* 1978, **67**, 305-328.
- Bock, K., Adelhorst, K., *Carbohydr. Res.* 1990, **200**, 131-149.
- Bock, K., Lundt, I., Pedersen, C., *Acta. Chem. Scand Ser B* 1981, **35**, 155-162.
- Bock, K., Pedersen, C., *Acta Chem. Scand. B* 1987, **41**, 617-628.
- Bock, K., Pedersen, C., *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem* 1983, **41**, 27-66.
- Bock, K., Pedersen, C., *Carbohydr. Res.* 1979, **68**, 313-319.
- Boeckman Jr, R. K.; Potenza, J. C.; Enholm, E. J. *J. Org. Chem.*, 1987, **52**, 469.
- Bradford, M., *Anal. Biochem.*, 1976, **72**, 248-254.
- Branquet, E.; Durand, P.; Vo-Quang, L.; Legoffic, F. *Nat. Prod. Lett.* 1992, **1**, 239.
- Brekle, A., Mersmann, G., *Biochim. Biophys. Acta* 1981, **675**, 322-327.

- Brinkley, R. W., Koholic, D. J., *J. Carbohydr. Chem.* 1988, **7**, 487.
- Brown, D. S., Ley, S. V., Vile, S., Thomson, M., *Tetrahedron* 1991, **47**, 1329-1342.
- Brown, H. C. "Organic Synthesis *via* Boranes", Wiley Interscience, New York, 1974.
- Bruno, I., Minkle, L., Riccio, R., *J. Nat. Prod.* 1990, **53**, 366-374.
- Bundle, D. R., Lemieux, R. U., *Methods Carbohydr. Chem.* 1976, **7**, 79-86.
- Burland, V., Plunkett III, G., Soña, H. J., Daniels, D. L., Blattner, F. R., *Nucleic Acids. Res.* 1995, **23**, 2105-2119.
- Canellakis, Z. N., Bondy, P. K., May Jr, J. A., Myers-Robfogel, M. K., Sartorelli, A. C., *Eur. J. Biochem.* 1984, **143**, 159-163.
- Chiba, S., "Handbook of Amylase and Related Enzymes", editado por la "Amylase Research Society of Japan", Pergamon Press, Oxford, 1988, 104-116.
- Chiba, S., Brewer, C. F., Okada, G., Matsui, H., Hehre, E. J., *Biochemistry* 1988, **27**, 1564-1569.
- Chiocconi, A., Marino, C., Lederkremer, R. M., *Carbohydr. Res.* 2000, **323**, 7-13.
- Cluterbuck, P. W., Haworth, W. N., Raistrick, H., Smith, G., Stacey, M., *Biochem. J.*, 1934, **28**, 94-110.
- Cluterbuck, P. W., Oxford, A. E., Raistrick, H., Smith, G., *Biochem. J.*, 1932, **26**, 1441-1458.
- Copeland, C., Stick, R., *Aust. J. Chem.* 1978, **31**, 1371.
- Crich, D., Hermann, F., *Tetrahedron Lett.*, 1993, **34**, 3385-3388.
- Crich, D., Ritchie, T. J., *Chem. Commun.* 1988, 1461-1463.
- Crich, D., Ritchie, T. J., *J. Carbohydr. Res.* 1989, **190**, c3-c6.
- Crich, D., Ritchie, T. J., *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* 1990, 945-954.
- D'Accorso, N. B., Thiel, I. M. E., Schüller, M., *Carbohydr. Res.* 1983, **124**, 177-184.

- Dale, M. P., Ensley, H. E., Kern, K., Sastry, K. A. R., Byers, L. D. *Biochemistry* 1985, **24**, 3530-3539.
- Danishefsky, S. J.; Bednarski, M. *J. Am. Chem. Soc.* 1983, **105**, 3716.
- Danishefsky, S. J.; Denimo, M. P. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* 1987, **26**, 15.
- Danishefsky, S. J.; Maring, Clarence, J. *J. Am. Chem. Soc.* 1985, **107**, 1269.
- Dey, P. M., Pridham, J. B., *Adv. Enzymol.*, 1972, **36**, 91-130.
- Dondoni, A.; Fantin, G.; Fogagnolo, M.; Merino, P. *Tetrahedron*, 1990, **46**, 6167.
- Drueckhammer, D. G.; Duncan, R. *J. Org. Chem.* 1996, **61**, 438.
- Dupradeau, F.-Y.; Prandi, J.; Beau, J.-M. *Tetrahedron* 1995, **51**, 3205.
- Fernández Cirelli, A., Jeroncic, L., Sznajdman, M., Lederkremer, R. M., *J. Carbohydr. Chem.* 1983, **2**, 167-176.
- Fessner, W. -D.; Goße, C.; Jaeschke, G.; Eyrisch, O. *Eur. J. Org. Chem.* 2000, 125.
- Fischer, W., Zapf, J., *Z. Physiol. Chem.* 1964, **337**, 186-195.
- Fleet, G. W. J., Son, J. C., *Tetrahedron* 1988, **44**, 2637-2647.
- Franck, RW, Kaila, N., *Carbohydr. Res.* 1993, **239**, 71.
- Franck, RW, Kaila, N., Grewal, G., *J. Org. Chem.* 1992, **57**, 2084.
- Franck, RW, Ramesh, S., Kaila, N., Grewal, G., *J. Org. Chem.* 1990, **55**, 5.
- Fronza, G.; Fuganti, C.; Grasselli, P. *Tetrahedron Lett.* 1980, **21**, 2999.
- Fronza, G.; Fuganti, C.; Grasselli, P.; Marinoni, G. *Tetrahedron Lett.* 1979, 3883.
- Fuganti, C.; Fronza, G.; Graselli, P.; Pedrocchi-Fantoni, G. *Carbohydr. Res.* 1985, **136**, 115.
- Fuganti, C.; Fronza, G.; Graselli, P.; Pedrocchi-Fantoni, G.; Zirotti, C. *Tetrahedron Lett.* 1982, **23**, 4143.
- Fuganti, C.; Fronza, G.; Pizzi, D.; Servi, S. *J. Carbohydr. Chem.* 1990, **9**, 317.

- Fuganti, C.; Grasselli, P.; Pedrocchi-Fantoni, G. *Tetrahedron Lett.*, 1981, **22**, 4017.
- Gallo, C., Jeroncic, L., Varela, O., Lederkremer, R. M., *J. Carbohydr. Chem.* 1993, **12**, 841-851.
- Gander, J.E., Tuekam, B. A., Park, Y. –I. Unkefer, C. J., *Appl. Enviromen. Microbiol.* 2001, **67**, 4648-4656.
- Gardiner, J.G., Percival, E.E., *J. Chem. Soc.* 1958, 1414-1418.
- Ge, M. Thomson, C., Kahne, D., *J. Am. Chem. Soc.* 1998, **120**, 11014-11015.
- Gokhale, U. B., Hindsgaul, O., Palcic, M. M., *Can. J. Chem.* 1990, **68**, 1063.
- Gorin, P. A. J., Barreto-Berger, E. M., Da Cruz, F. S., *Carbohydr. Res.*, 1981, **88**, 177-188.
- Guanti, G.; Banfi, L.; Narisano, E.; Riva, R.; *Tetrahedron Lett.*, 1992, **33**, 2221.
- Hakamata, W., Nishio, T., Oku, T., *Carbohydr. Res.* 2000, **324**, 107-115.
- Hamada, Y.; Kawai, A.; Shioiri, T. *Chem. Pharm. Bull.* 1985, **33**, 5601.
- Hanessian, S., Banoub, J., *Carbohydr. Res.* 1977, **53**, C13-C16.
- Hanessian, S., Banoub, J., *Methods Carbohydr. Chem.* 1980, **8**, 247-250.
- Hashimoto, S. –I., Sano, A., Sakamoto, H., Nakajima, Y., Yanagiya, Y., Ikegami, S., *Synlett* 1995, 1271-1273.
- Hatakeyama, S.; Sakurai, K.; Takano, S. *Heterocycles* 1984, **24**, 633.
- Henrissat, B., Bairoch, A., *Biochem. J.* 1993, **293**, 781-788.
- Henrissat, B., Bairoch, A., *Biochem. J.* 1996, **316**, 695-696.
- Henrissat, B., *Biochem. J.* 1991, **280**, 309-316.
- Herczegh, P.; Kovács, I.; Sztaricskai, F. J. *Tetrahedron* 1991, **47**, 1541.
- Herder, I. F., Mateo Rosell, A. M., Zuilen, C. M., Punt, P. J., Hondel, C. A. M. J. J., *Mol. Gen. Genet.* 1992, **233**, 404-410.
- Heyworth, R., Walker, P. G., *Biochem. J.* 1962, **83**, 331-335.
- Hindsgaul, Du, M., *Carbohydr. Res.* 1994, 286, 287.
- Hindsgaul, O., Lowary, T. L., *Carbohydr. Res.* 1993, **249**, 163.
- Hindsgaul, O., Lowary, T. L., Swiedler, S. J., *Carbohydr. Res.* 1994, 256, 257.

- Hirama, M.; Shigemoto, T.; Itô, S., *J. Org. Chem* 1987, **52**, 3342.
- Hirama, M.; Shigemoto, T.; Itô, S.; Yamazaki, Y., *Tetrahedron Lett.* 1985, **26**, 4133.
- Hiyama, T.; Kobayashi, K.; Nishide, K. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 1987, **60**, 2127.
- Hoffman, J., Lindberg, B., Hofstad, T., Lygu, H., *Carbohydr. Res.* 1977, **58**, 439-442.
- Hussain, S. A. M. T., Ollis, W. D., Smith, C., Stoddart, J. F., *J Chem. Soc. Perkin Trans. I* 1975, 1480-1492.
- Jung, M. E.; Gardiner, J. M. *J. Org. Chem.* 1991, **56**, 2614.
- Jurczak, J.; Golebiowski, A.; Bauer, T. *Synthesis* 1985, 928.
- Jurczak, J.; Golebiowski, A.; Raczko, J. *Tetrahedron Lett.* 1988, **29**, 5975.
- Jurczak, J.; Kozak, J.; Golebiowski, A. *Tetrahedron* 1992, **48**, 4231.
- Kahne, D., Yang, D., Lim, J., J., Miller, R., Paguaga, E., *J. Am. Chem. Soc.* 1988, **110**, 8716-8717.
- Kajihara, Y., Endo, T., Ogasawara, H., Kodama, H., Hashimoto, H., *Carbohydr. Res.* 1995, **269**, 273.
- Kamiyama, K.; Urano, Y.; Kobayashi, S.; Ohno, M. *Tetrahedron Lett.* 1987, **28**, 3123.
- Kaneko, R., Kusakabe, I., Ida, E., Murakami, K., *Agric. Biol. Chem.* 1991, **55**, 109-115.
- Kelly, T. R.; Kaul, P. N. *J. Org. Chem.* 1983, **48**, 2775.
- Kihlberg, J.; Vuljanic, T.; Somfail, P. *Tetrahedron Lett.* 1994, **35**, 6937.
- Kirschning, A.; Bechthold, A.; Rohr, J. *Top. Curr. Chem.* 1997, **188**, 1.
- Kiss, L., Berki, L. K., Nanasi, P., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1981, **98**, 792-799.
- Knirel, Yu. A., Zdrovenko, G. M., Shashkov, A. S., Gubanova, L. M., Yakovleva, L. M., Gvozdyak, R. I., *Bioorg. Khim.* 1988, **14**, 92-97.
- Kobayashi, M., *Tetrahedron* 1997, **53**, 5973-5994.
- Kobayashi, M., *Tetrahedron* 1998, **54**, 10987-10998.

- Koch, A., Lamberth, C., Wetterich, F., Giese, B., *J. Org. Chem.* 1993, **58**, 1083-1089.
- Koga, K., Taniguchi, M., Yamada, S. -i. *Tetrahedron Lett.* 1971, 263.
- Koga, K.; Yamada, S.-i.; Yoh, M.; Mizoguchi, T. *Carbohydr. Res.* 1974, **36**, C9.
- Koskinen, A. M. P.; Otsomaa, L. A. *Tetrahedron*, 1997, **53**, 6473.
- Laupichler, L., Sajus, H., Thiem, J., *Synthesis* 1992, 1133-1136.
- Lederkremer, R. M., Colli, W. *Glycobiology* 1995, **5**, 547-552.
- Lederkremer, R. M., Litter, M. I., *Carbohydr. Res.* 1971, **20**, 442-444.
- Lederkremer, R. M., Marino, C., Varela, O., *Carbohydr. Res.* 1990, **200**, 227-235.
- Lederkremer, R. M., Varela, O.; *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* 1994, **50**, 125-209.
- Lee, Y. C., *Methods Enzymol.* 1972, **28**, 699-702.
- Legler, G., *Acta Microbiol. Acad. Sci. Hung.* 1975, **22**, 403-409.
- Lemieux, R. U., *Chem. Soc. Rev.*, 1989, **18**, 347-374.
- Lemieux, R. U., Spohr, U., *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* 1994, **50**, 1-20.
- Lerner, L. M., *Methods Carbohydr. Chem.* 1972, **6**, 131-134.
- Li, H., Chan, M., Zhao, K., *Tetrahedron Lett.* 1997, **38**, 6143-6144.
- Li, Y. -T., Li, S. -C., *Methods Enzymol.* 1972, **28**, 702-713.
- Lindberg, B., Silvander, B. G., Wachtmeister, C. A., *Acta Chem. Scand.*, 1964, **18**, 213-216.
- Marco, J. L. *Synth. Commun.* 1989, **19**, 485.
- Marino, C., Lederkremer, R. M., Cancio, M. J., Varela, O., *Carbohydr. Res.* 1995, **276**, 209-213.
- Marino, C., Lederkremer, R. M., Herczegh, P., *Carbohydr. Res.* 2001, **333**, 123-128.
- Marino, C., Lederkremer, R. M., Mariño, K., Miletti, L., Manso Alves, M. J., Colli, W., *Glycobiology* 1998 a, **8**, 901-904.
- Marino, C., Varela, O., Lederkremer, R. M., *Carbohydr. Res.* 1989, **190**, 65-76.

- Marino, C., Varela, O., Lederkremer, R. M., *Carbohydr. Res.* 1991, **220**, 145-153.
- Marino, C., Varela, O., Lederkremer, R. M., *Tetrahedron* 1997, **53**, 16009-16016.
- Marino, C., Varela, O., Lederkremer, R. M., *Carbohydr. Res.* 1998 b, **311**, 123-128.
- Mariño, K., Lima, C., Maldonado, S., Marino, C., Lederkremer, R. M., *Carbohydr. Res.* 2002, **337**, 891-897.
- McCarter, J. D., Adam, M. J., Withers, S. G., *Biochem. J.* 1992, **286**, 721-727.
- Mega, T., Matsushita, Y., *J. Biochem.* 1983, **94**, 1637-1647.
- Miletti, L., Marino, C., Mariño, K., Manso Alves, M. J., Colli, W., Lederkremer, R. M., *Carbohydr. Res.* 1999, **320**, 176-182.
- Moradei, O., du Mortier, C., Varela, O., Lederkremer, R. M., *J. Carbohydr. Chem.* 1991, **10**, 469-479.
- Mukaiyama, T.; Yamada, T.; Suzuki, K. *Chem. Lett.* 1983, **5**.
- Mulichak A. M., Losey H. C., Walsh C. T. and Garavito R. M., *Structure*, 2001, **9**, 547-557.
- Muller, T., Schneider, R., Schmidt, R. R., *Tetrahedron Lett.* 1994, **35**, 4763-4766.
- Nakano, H., Hamayasu, K., Fujita, K., Hara, K., Ohi, M., Yoshizumi, H., Kitahara, S., *Biosci. Biotech. Biochem.* 1995, **59**, 1732-1736.
- Namchuk, M. N., Withers, S. G., *Biochemistry* 1995, **34**, 16194-16202.
- Namchuk, M. N., Withers, S. G., *J. Am. Chem. Soc.* 2000, **122**, 1270.
- Nicolaou, K. C., Hummel, C. W., Bockovich, N. J., Wong, C-H, *J. Chem. Soc. Chem. Comm.* 1991, 870.
- Nicolaou, K. C., Ladduwahetty, T., Randall, J. L., Chucholowsky, A., *J. Am. Chem. Soc.* 1986, **108**, 2466.
- Nicolaou, K. C.; Groneberg, R. D.; Stylianides, N. A.; Miyasaki, T. J., *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 1990, 1275.

- Nishio, T., Miyake, Y., Tsujii, H., Hakamata, W., Kadokura, K., Oku, T., *Biosci. Biotech. Biochem.* 1996, **60**, 2038-2042.
- Nishio, T.; Hakamata, W.; Oku, T. *Carbohydr. Res.* 2000, **324**, 107.
- Notenboom, V., Birsan, C., Nitz, M., Rose, D. R., Warren, R. A. J., Withers, S. G., *Nature Struct. Biol.* 1998, **5**, 812-818.
- Oberbeeke, N., Fellinger, A. J., Toonen, M. Y., Wassenaar, D., Verrips, C. T., *Plant. Mol. Biol.* 1989, **13**, 541-550.
- Ogawa, T., Ito, Y., *Tetrahedron Lett.* 1987, **28**, 2723.
- Opoku, J. A., Tao, L., Ferretti, J. J., Russell, R. R. B., *J. Gen. Microbiol.* 1991, **137**, 757-764.
- Osman, S.F., Fett, W.F., Hicks, K.B., *Carbohydr. Res.* 1988, **176**, 205-210.
- Paterson, I., McLeod, M. D., *Tetrahedron Lett.* 1995, **36**, 9065-9068.
- Paulsen, H., Eberstein, K., *Chem Ber.* 1976, **109**, 3907-3914.
- Pazur, J. H. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* 1981, **39**, 405-447.
- Prihar, H. S., Tsai, J. H., Wanamaker, S. R., Duber, S. J., Behrman, E. J., *Carbohydr. Res.* 1977, **56**, 315-324.
- Rapoport, H.; Maurer, P. J.; Knudsen, C. G.; Palkowitz, A. D. *J. Org. Chem.* 1985, **50**, 325.
- Rietschel-Berst, M., Gander, J.E., Jentoft, N. H.; Rick, P.D., Pletcher, C., Fang, F., *J. Biol. Chem.* 1977, **252**, 3219-3226.
- Roeser, K. -R., Legler, G., *Biochim. Biophys. Acta* 1981, **657**, 321-333.
- Roush, W. R. *Trends in Carbohydrate Chemistry* 1989, 242-277.
- Roush, W. R.; Follows, B. C. *Tetrahedron Lett.* 1994, **35**, 4935.
- Roush, W. R.; Gustin, D. *Tetrahedron Lett.* 1994, **35**, 4931.
- Roush, W. R.; Lin, X.; Straub, J. A. *J. Org. Chem.* 1991, **56**, 1649.
- Roush, W. R.; Straub, J. A.; VanNieuwenzhe, M. S. *J. Org. Chem.* 1991, **56**, 1636.
- Sames, D.; Polt, R. *J. Org. Chem.* 1994, **59**, 4596.
- Sato, T.; Fujisawa, T.; Itoh, T.; Kojima, E. *Tetrahedron Lett.* 1985, **26**, 6089.

- Sato, T.; Fujisawa, T.; Itoh, T.; Nakai, M. *Tetrahedron Lett.* 1985, **26**, 771.
- Schlessinger, R. H.; Graves, D. D. *Tetrahedron Lett.* 1987, **28**, 4381.
- Schomburg, D., Salzmann, M., *Alpha-galactosidase, Enzyme Handbook* 1991, Vol 4, Springer-Verlag, Berlin.
- Shibuya, H., Kobayashi, H., Kasamo, K., Kusakabe, I., *Biosci. Biotech. Biochem.* 1995, **59**, 1345-1348.
- Shibuya, H., Kobayashi, H., Sato, T., Kim, W. -S., Yoshida, S., Kaneko, S., Kasamo, K., Kusakabe, I., *Biosci. Biotech. Biochem.* 1997, **61**, 592-598.
- Smith, M. S., Bozzato, R. P., Skipper, N., Davis, R. W., Hopper, J. E., *Gene* 1985, **36**, 333-340.
- Snaith, S. M., Levvy, G. A., *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, 1973, **28**, 401-405.
- Srivastava, G., Alton, G., Hindsgaul, O., *Carbohydr. Res.* 1990, **207**, 259.
- Srivastava, G., Hindsgaul, O., Palcic, M. M., *Carbohydr. Res.* 1993, **245**, 137.
- Steers, E., Cuatrecasas, P., Pollard, H. B. *J. Biol. Chem.* 1971, **246**, 196-200.
- Stevens, J. D., Fletcher Jr, H. G., *J. Org. Chem.*, 1968, **33**, 1799-1805.
- Suzuki, H., Li, S.-C., Li, Y. -T., *J. Biol. Chem.* 1970, **245**, 781-785.
- Szarek, W. A.; Vyas, D. M.; Chen, L. -Y. *Carbohydr. Res.* 1977, **53**, C1.
- Takano, S.; Hatakeyama, S.; Sakurai, K. *Tetrahedron Lett.* 1986, **27**, 4485.
- Taniguchi, M., Koga, K., Yamada, S. *Tetrahedron* 1974, **30**, 3547.
- Thiem, J., Bock, K., Pedersen, M., *Carbohydr. Res.* 1979, **73**, 85.
- Thiem, J., Gerken, M., Bock, K., *Liebigs Ann. Chem.* 1985, 462.
- Thiem, J., Gerken, M., *J. Carbohydr. Res.* 1982, **1**, 229.
- Thiem, J., Gerken, M., *J. Org. Chem.* 1985, **50**, 954.
- Thiem, J., Gerken, M., Schöttmer, B., Weigand, J., *Carbohydr. Res.* 1987 a, **164**, 327.
- Thiem, J., Schöttmer, B., *Angew. Chem.* 1987 b, **99**, 591; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 1987, **26**, 555.

- Thiem, J., Wiemann, T., *Ange. Chem.* 1991, **103**, 1184; *Angew. Chem. Int. Ed. Eng.* 1991, **30**, 1163.
- Thiem, J., Wiemann, T., *Synthesis* 1992, 141.
- Toshima, K., Nozaki, Y., Tatsuka, K., *Tetrahedron Lett.* 1991, **32**, 6887-6890.
- Tsai, TYR, Jin, H., Wiesner, K. *Can. J. Chem.* 1984, **62**, 1403.
- Tsui, D. S., Gorin, P. A. J., *Carbohydr. Res.*, 1986, **156**, 1-8.
- Turco, S. J., Descoteaux, A., *Annu. Rev. Microbiol.*, 1992, **46**, 65-94.
- Turco, S. J., Huang, C., *J. Biol. Chem.*, 1993, **268**, 24060-24066.
- Van Boom, JH, Zuurmond, HM, van der Klein, PAM, van der Marel, GA, *Tetrahedron* 1993, **49**, 6501.
- Varela, O., Chioconni, A., Lederkremer, R. M., *Carbohydr. Lett.* 1996, **2**, 115-122.
- Varela, O., Fernandez Cirelli, A., Lederkremer, R. M., *Carbohydr. Res.* 1979, **70**, 27-35.
- Varela, O., Marino, C., Lederkremer, R. M., *Carbohydr. Res.* 1986, **155**, 247-251.
- Varela, O., Nin, A. P., Lederkremer, R. M., *Tetrahedron Lett.* 1994, **35**, 9359-9362.
- Walker, D. E., Axelrod, B., *Arch. Biochem. Biophys.* 1978, **187**, 102-107.
- Wang, Z., Prudhomme, D.R., Buck, J.R., Minnied, P., Rizzo, C., *J. Org. Chem.* 2000, **65**, 5969-5985.
- Weiser, W., Lehmann, J., Matsui, H., Brewer, C. F., Hehre, E. J., *Arch. Biochem. Biophys.* 1992, **292**, 493-498.
- Whitesides, G. M.; Waldman, H.; Saito, T.; Lees, W.; Kim, M.-J.; Fessner, M.-D.; Bischofberger, N.; Simon, E. S.; Bednarski, M. D. *J. Am. Chem. Soc.* 1989, **111**, 627.
- Whitesides, GM, Hayne, SL, Wong, C-H, *J. Org. Chem.* 1982, **47**, 5416.
- Wiesner, K., Tsai, TYR, Jin, H., *Helv. Chim. Acta* 1985, **68**, 300.
- Wong, C-H, Wang, R., Ichikawa, Y, *J. Org. Chem.* 1992, **57**, 4343.

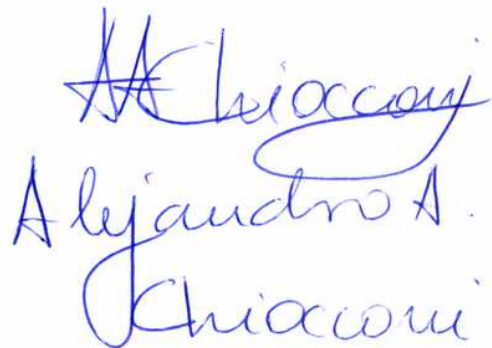
Wuts, P. G. M.; Bigelow, S. S. *J. Org. Chem.* 1983, **48**, 3489.

Yamanoi, T., Inazu, T., *Chem. Lett.* 1990, 849-852.

Zhu, A., Goldstein, J., *Gene* 1994, **140**, 227-231.



Dr. ROSA M. de LEDERKREMER



Alejandro A.
Chiacconi