



Grado en Química

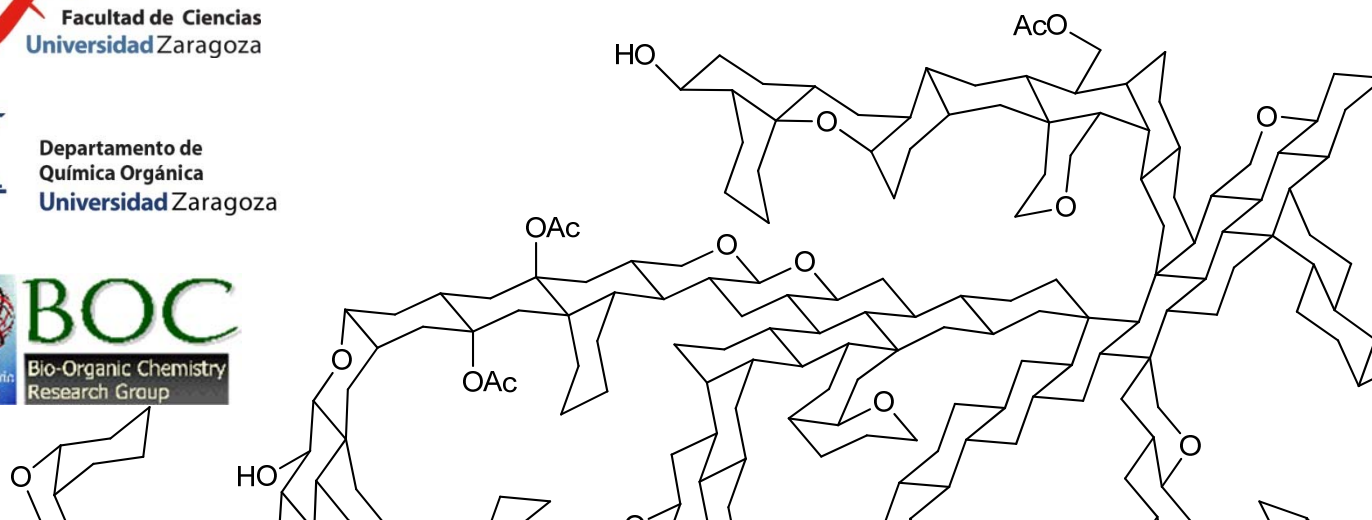
Trabajo Fin de Grado

Síntesis de Inhibidores Enzimáticos

Jose Manuel Pedrón Laserna

Directores:
Prof. Dr. Tomás Tejero
Dr. Ignacio Delso

Departamento de Química Orgánica
Grupo de Química Bioorgánica
Zaragoza, Junio 2017



Agradecimientos:

Primero agradecer a mis directores, Iñaki Delso y Tomás Tejero, que me hayan permitido realizar este proyecto, y disfrutar de él. Puede que sólo sea un pequeño trabajo de fin de grado, pero ha sido una de las experiencias más formativas y enriquecedoras de toda la carrera, y aun así igual me quedo corto.

En especial, agradecer a un “ente”, un “algo”, que siempre ha estado ahí, aunque muchos dudan de su existencia y debaten sobre si es real o no; yo puedo asegurar que existe, y es muy grande. Sí... gracias a la paciencia de Iñaki.

Segundo, dar las gracias a mis compañeros de laboratorio, a los que perduran, y a los que ya se fueron, porque sin vuestros consejos, vuestra atención, y vuestra solidaridad, este trabajo tampoco hubiera sido posible. En especial mencionar a Vero Juste y Mattia Girardello, que han demostrado que a día de hoy los doctorandos aún dan prácticas de laboratorio a los estudiantes de grado.

Como olvidarme de la familia y los amigos, que no sólo han aguantado los altibajos que han surgido durante el desarrollo de este proyecto, sino que llevan aguantando 4 años ya mis batallitas de química (me gustaría añadir que “en silencio”, pero no sería verdad).

Y por último pero no menos importante (como suele decirse) a Marta. Has hecho que me replantee el significado de la famosa frase de Arquímedes. Contigo de apoyo sí sería capaz de mover el mundo. Gracias.

Gracias a todos.

SINTESIS DE INHIBIDORES ENZIMÁTICOS

Resumen:

La transglicosilasa de membrana Gas2 presente en *Saccharomyces Cerevisiae* (ScGas2) es una enzima esencial en mantenimiento y el desarrollo de la pared celular de dicho hongo. Esta enzima pertenece a una familia ampliamente extendida en multitud de hongos, y guarda gran similitud con transglicosilasas pertenecientes a ciertas especies patógenas como *Aspergirus fumigatus* ó *Candida albicans*. Estas enzimas, debido a su papel fundamental en la constitución de la pared celular fúngica poseen un gran potencial como dianas para el tratamiento de infecciones de carácter micótico. El desarrollo de inhibidores para ScGas2 presenta un amplio interés para obtener información acerca del sitio activo de la enzima y sus mecanismos de interacción, siendo estos resultados extrapolables a las enzimas de especies patógenas. Esto podría conducir finalmente al desarrollo de nuevos fármacos contra estas infecciones.

Este trabajo se enmarca en la síntesis de estos potenciales inhibidores para ScGas2, y está basado en un proyecto que se estaba desarrollando ya en el grupo de investigación, en el que se trataba de mejorar la estabilidad de estos inhibidores frente a otras enzimas micóticas presentes en el medio celular.

SINTHESYS OF ENZYME INHIBITORS

Abstract:

The membrane transglycosilase Gas2, which is present in *Saccharomyces Cerevisiae* (ScGas2), is an essential enzyme in the maintenance and the development of the cellular wall on this fungus. This enzyme belongs to a large family very extended in many funguses, and keeps a great similarity with others transglycosilases present in certain pathogenic species such as *Aspergirus fumigates* or *Candida albicans*. Those enzymes, due to its fundamental role in the constitution of the fungal cellular wall keep a large potential as targets for the treatment of fungal infections. Therefore the development of ScGas2 inhibitors presents a great interest for obtain information about the active site of the enzyme and its interaction mechanisms, with the feasibility of extend these results to pathogenic species enzymes. This could reach, finally, to the development of new drugs against these infections.

This project forms part of a research focus on the synthesis of these potential inhibitors of ScGas2, and it's based on a project with was developing in the investigation group. The plan was improve the stability of this kind of inhibitors against other fungus enzymes, presents in the cell medium.

Lista de abreviaturas:

- **Ac** Acetilo
- **Bn** Bencilo
- **DMF** Dimetilformamida
- **DMSO** Dimetilsulfóxido
- **Et** Etilo
- **G.S.** Grupo saliente
- **Me** Metilo
- **Py** Piridina
- **RMN** Resonancia Magnética Nuclear
- **Sat** Saturado/a
- **Tf** Trifluorometansulfonato
- **[α]_D** Rotación específica

ÍNDICE

1.	Introducción	11
2.	Antecedentes	13
3.	Objetivos	17
4.	Resultados y discusión	18
4.1.	Propuesta Sintética	18
4.2.	Síntesis de 2,3,4,6-tetra-O-acetil-1-tio-β-D-glucopiranosa (A)	19
4.3.	Síntesis de (1,2,4,6)-Tetra-O-Acetil-3-O-trifluorometanosulfonil-alopiranososa (B')	20
4.4.	Síntesis de (1,2:5,6)-di-O-isopropiliden-3-O-trifluorometanosulfonil- α-D-alofuranosa (B)	25
4.5.	Síntesis de (2,3,4,6)-Tetra-O-acetil- β-D-glucopiranosil-(1→3)-(1,2:5;6)-di-O-isopropiliden-3-desoxi-3-tio-β-D-glucofuranosa (C)	26
4.6.	Síntesis de (2,3,4,6)-Tetra-O-acetil- β-D-glucopiranosil-(1→3)-(1,2,4,6)-tetra-O-acetil-3-desoxi-3-tio-β-D-glucopiranosa (D)	26
5.	Conclusiones	27
5.1.	Conclusiones experimentales	27
5.2.	Conclusiones formativas	27
6.	Parte experimental	28
6.1.	Consideraciones experimentales e instrumentales generales	28
6.2.	Síntesis y caracterización	28
7.	Anexos	35
7.1.	Espectros de caracterización	35

1. Introducción

Las infecciones micóticas constituyen, ya desde la antigüedad, un problema grave en la salud mundial. Alrededor de 8,1 millones de personas sufren infecciones fúngicas cada año en España, lo que supone un 17% de su población.¹ Dentro de estas afecciones, un pequeño grupo, las enfermedades fúngicas crónicas e invasivas (comúnmente denominadas como IFIs) representan un problema más serio, como consecuencia de su alto índice de mortalidad, que ronda el 50%.

Hay que señalar que estas infecciones ocurren principalmente en pacientes ya inmunodeprimidos, como aquellos que acaban de recibir un trasplante, están recibiendo quimioterapia ó enfermos de SIDA.

Las células micóticas, al igual que las humanas, son células eucariotas, delimitadas por una membrana celular, cuyo interior alberga tanto sus diversos orgánulos como su material genético. La composición de ésta es similar a cualquier otra membrana eucariota, formada por fosfolípidos, proteínas y esteroides (entre ellos el ergosterol, molécula que juega un papel similar al colesterol de las células animales). Sin embargo, una diferencia radical y que va a ser clave en el desarrollo de este trabajo, es la presencia de una pared celular, similar a la que presentan las células vegetales. Esta estructura protege a la célula de agentes externos y del estrés osmótico. Su composición se basa en 2 polisacáridos principales, la quitina: un polímero de N-acetil glucosamina; y el glucano: polímero de glucosa.

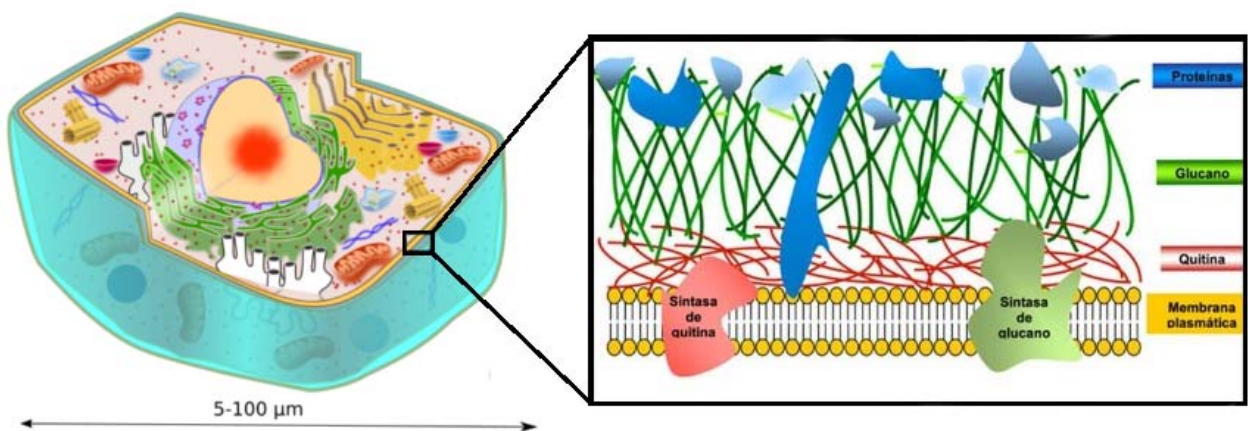


Figura1: Esquema de una célula fúngica

Actualmente se han descrito unas 100.000 especies de hongos, pero se estima que su número podría ascender hasta 1,5 millones. Dentro de esa tremenda variedad se conocen alrededor de unas 300 especies que son patógenas para el ser humano, entre las cuales se pueden destacar *Candida*, *Aspergillus*, *Pneumocystis* y *Cryptococcus*.

¹ J.L. Rodríguez Tudela, A. Astraluey Izquierdo, S. Gago, M. Cuenca-Estrella, C. León, J. M. Miro, A. Nuñez Boluda, I. Ruiz Camps, A. Sole D.W. Denning, *Burden of serious fungal infections in Spain*, 2014.

Los medicamentos más comercializados para el tratamiento de estas infecciones tienen como diana el ergosterol, ya sea afectando a su estructura molecular² (anfotericina B, nistatina A1) o interfiriendo en su mecanismo de biosíntesis (fluconazol, miconazol). Sin embargo el reducido número de fármacos disponibles, su baja efectividad sobre infecciones fúngicas internas, y el desarrollo de resistencia de muchos hongos a estos fármacos, hacen de su estudio un tema de gran interés, y con un gran potencial en los próximos años.³

Otro grupo de fármacos, aunque bastante menos desarrollado, son los que interfieren en la biosíntesis de la pared celular. Esta estructura, al ser exclusiva de las células fúngicas nos abre una enorme ventana terapéutica, y un amplio campo de investigación.

En el mantenimiento y desarrollo de dicha pared intervienen diversas enzimas como glucanosintasas (que alargan las cadenas de polisacárido), glicosil-hidrolasas (que hidrolizan enlaces glicosídicos, acortando estas cadenas) y transglicosilasas (que combinan las propiedades de las sintasas y las glicosil-hidrolasas).⁴ Muchas de estas enzimas son esenciales para la supervivencia de la célula, y al ser exclusivas de las células micóticas las convierte en dianas ideales para el desarrollo de nuevos fármacos.

Una de las líneas de investigación que se están desarrollando en el grupo de investigación es la síntesis de inhibidores de estas enzimas de la pared celular, concretamente de la familia de las transglicosilasas. Este proyecto quedará enmarcado dentro de la síntesis de estos inhibidores. Como modelo se utilizó la enzima Gas2, una transglicosilasa proveniente de *Saccharomyces cerevisiae*, que, aunque sea proveniente de un hongo no patógeno, su estructura tridimensional es conocida⁵, y presenta muchas similitudes con Gel y Phr/Pga, las cuales sí están presentes en hongos patógenos como *Aspergillus fumigatus* y *Candida albicans* respectivamente.

Los inhibidores que se sintetizarán tendrán una estructura similar al sustrato original de estas enzimas, es decir, serán análogos de carbohidratos: Glicomiméticos.

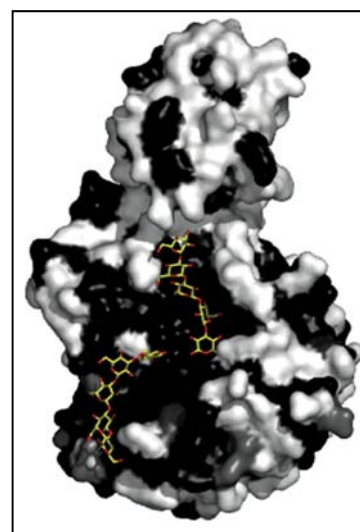


Figura 2: Comparación de las secuencias de ScGas2 y AfGel4. En negro secuencias 100% idénticas, en blanco identidad <50%. En el interior: Sustrato de laminaripentaosa (amarillo).

² Odds, F. C.; Brown, A. J.; Gow, N. A. *Trends Microbiol.* **2003**,*11*, 272-279;(b) Ostrosky-Zeichner, L.; Casadevall, A.; Galgiani, J. N.; Odds, F. C.; Rex, J. H. *Nat. Rev. Drug Discovery* **2010**,*9*, 719-727

³ D.W. Denning, M.J. Bromley, *ScienceMag*; **2015**,*347*, 1414 - 1416

⁴Bissaro, B.; Monsan, P.; Fauré, R.; O'Donohue, M. J. *Biochem. J* **2015**,*467*, 17-35; Frankova, L.; Fry, S. C. *J. Exp. Bot.* **2013**,*64*, 3519-3550

⁵ R. Hurtado-Gerrero, A.W. Schüttelkopf, I. Mouyna, A.F.M. Ibrahim, S. Sheperd, T. Fontaine, J.-P. Latgé, D.M.F. van Aalten, *Journal of Biological Chemistry*, **2009**, *284*, 8461 - 8569

2. Antecedentes

El conocimiento de la estructura de la enzima ScGas2, comparable a transglucosilasas de especies patógenas, especialmente en el sitio activo, ya que se disponía de estructuras cristalinas tanto de su forma libre, como del complejo enzima-sustrato, había permitido hacer un diseño racional de inhibidores que condujo al desarrollo de glicomiméticos con afinidad por el enzima.

Cuando este proyecto dio comienzo se estaba desarrollando una tesis doctoral en la que se estudiaba el uso como inhibidores de compuestos que presentaban como fórmula general la mostrada en la figura 3.⁶

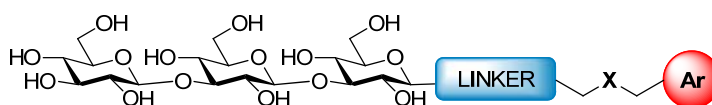


Figura 3: Esquema general de inhibidores de ScGas2

El inhibidor contaba con una cadena de 3 glucosas unidas por enlace β -1,3 (laminaritríosa), que ayudaba al reconocimiento por parte de la enzima; un linker, de tipo triazol, y un anillo aromático, que reforzaba la interacción de la enzima por el inhibidor.

Con este tipo de sustratos se consiguieron constantes de afinidad enzima-ligando muy buenas, algunas de ellas están representadas en la tabla 1.

X	Ar	$K_D(\mu\text{M})$
-O-		200
-O-		3.7
-CH ₂ -		67

Tabla 1: Constantes de afinidad (K_D) de diferentes derivados con la enzima ScGas2

⁶Fernando Gomollón Bel. Tesis Doctoral. Universidad de Zaragoza, Mayo de 2017

Sin embargo, a pesar de que algunos de los inhibidores sintetizados presentaban altas afinidades por la enzima aislada, se comprobó que estos ligandos eran susceptibles de hidrólisis por otras enzimas hidrolíticas presentes en hongos, como las las β -1,3 endoglucanasas. Este hecho hace que los productos sintetizados hasta el momento fueran inviables para las pruebas de actividad con células vivas de hongo.

Ante esta situación se buscaron diversas alternativas que impidieran la hidrólisis de la cadena de laminaritriosa. La más interesante resultó ser la sustitución de los átomos de oxígeno de los enlaces glicosídicos por átomos de azufre. Aunque los enlaces S-glicosídicos han sido menos explorados que los análogos O-glicosídicos, existen estudios que demuestran que los enlaces S-glicosídicos son más flexibles y presentan mayor libertad conformacional que sus análogos de oxígeno.⁷ Además la sustitución del oxígeno por azufre afecta a la geometría del enlace, alargándolo por un lado, pero reduciendo el ángulo de enlace por otro, haciendo que ambos efectos se compensen, produciendo sólo un alargamiento del enlace C-S-C de unos 0,3-0,4 Å.⁸

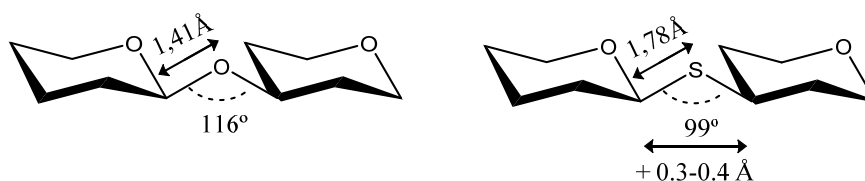


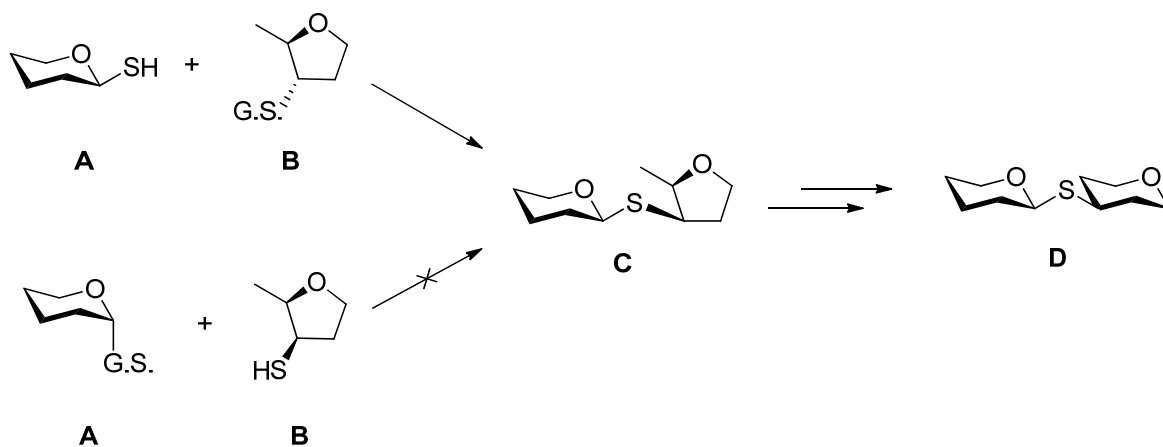
Figura 4: Comparación estructural de los enlaces O-glicosídico y S-glicosídico

Para la síntesis del enlace tio-glicosídico se utilizaron varias aproximaciones, entre ellas se estudió introducir un grupo tiol nucleófilo en el carbono anomérico del primer monosacárido (A), y un grupo saliente en el carbono 3 del segundo (B), y viceversa; un grupo tiol en el carbono 3 de (B), y un grupo

⁷ (a) Bock, K.; Defaye, J.; Driguez, H.; Barguilloux, E. *Eur. J. Biochem.* **1983**,131, 595-600;(b) Bock, K.; Duus, J. O.; Hindsgaul, O.; Lindh, I. *Carbohydr. Res.* **1992**,228, 1-20;(c) Tvaroska, I.; Perez, S.; Marchessault, R. H. *Carbohydr. Res.* **1978**,61, 97-106;(d) Aguilera,

⁸ Perez, S.; Vergelati, C. *Acta Crystallogr. B; Struct. Sci.* **1984**,40, 294-299.

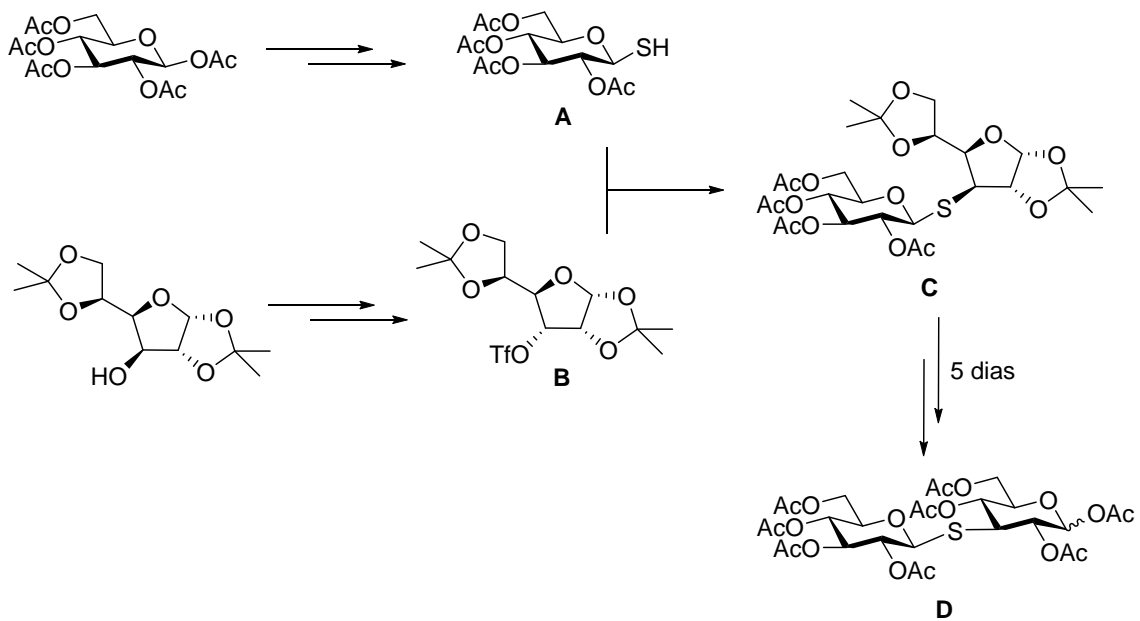
saliente en alfa en el carbono anomérico de (A). De estas dos aproximaciones, la segunda dio lugar a bajos rendimientos, especialmente a la hora de preparar el trisacárido.⁶



Esquema 1: Aproximaciones sintéticas a enlace S-glicosídico

El método que se disponía para la primera aproximación era el que se muestra en el esquema 3, y que se ha denominado como método 1. El producto A se preparaba a partir de peracetilglucosa, mientras que para la preparación del compuesto B, se partía de glucofuranosa acetalizada en 1,2 y 4,5 y se invertía la configuración del carbono 3, para finalmente transformar el grupo hidroxilo obtenido en un buen grupo saliente.

La unión de A y B daba como resultado el disacárido C. A esto, seguía una secuencia de desprotección-reprotección que duraba 4-5 días con la que se obtenía el disacárido D con todos los grupos hidroxilo protegidos con grupos acetilo.



Esquema 2: Método 1 de síntesis del disacárido

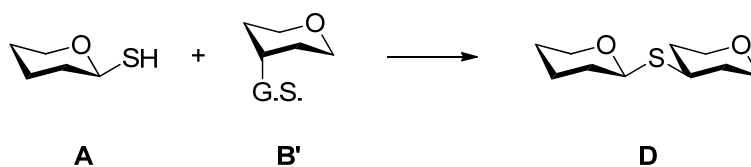
Para la preparación del trisacárido el esquema sería equivalente, solo que en la preparación del nuevo A (el nucleófilo) partiríamos del compuesto D, en el que habría que introducir del mismo modo el grupo tiol y, tras esto, se añadiría otra unidad B a la cadena. Obtendríamos así un trisacárido con la estructura similar a C, que habría que desproteger y proteger nuevamente con grupos acetilo.

3. Objetivos

Los objetivos principales de este trabajo son, por un lado estudiar métodos alternativos de la síntesis del enlace tio-glicosídico, y por otro, corroborar los resultados que se estaban obteniendo en el laboratorio con los métodos anteriores.

El principal problema del método 1 es el elevado tiempo requerido. La secuencia de desprotección y reprotección dura unos 4 ó 5 días, y como el método se ha de repetir por duplicado para la preparación del trisacárido el tiempo resultante para la síntesis es excesivo.

En este trabajo, se plantea como alternativa la obtención, en un primer momento, del segundo miembro (B), ya en forma de piranosa, y realizar la sustitución sobre esta estructura. Este mismo producto podría reutilizarse para la obtención del trisacárido, ahorrándonos la segunda secuencia de desprotección-reprotección, y acortando considerablemente el tiempo de síntesis.

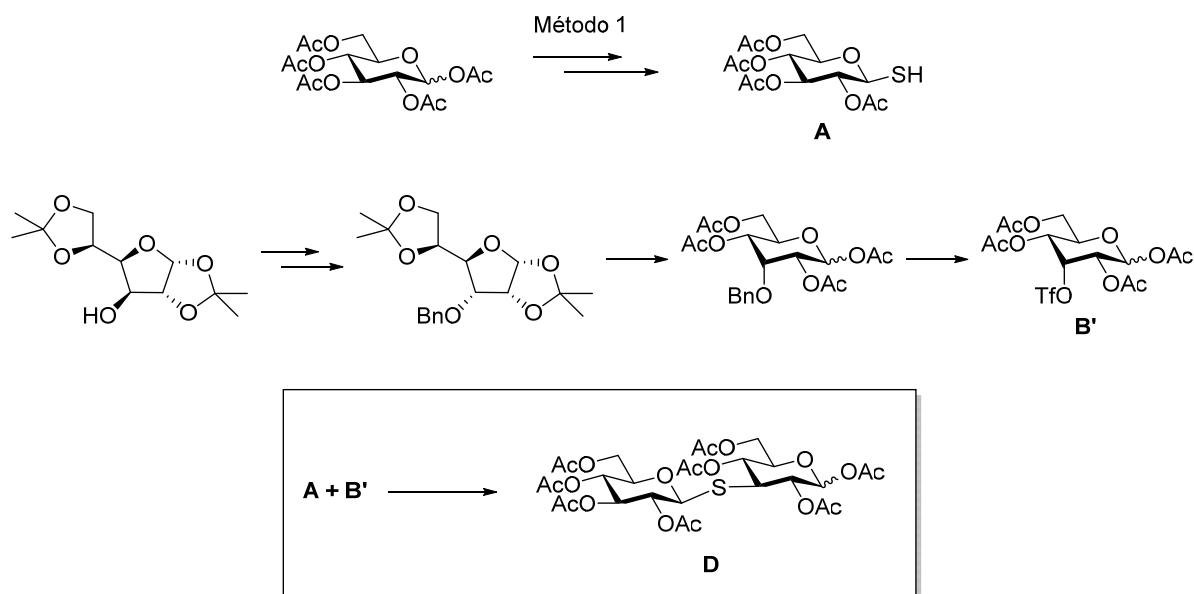


Esquema 3: Nueva aproximación sintética para la preparación de tio-disacárido.

4. Resultados y Discusión

4.1. Propuesta sintética

Como mencionábamos en el apartado anterior, la diferencia de este segundo método con respecto al primer método radica en la síntesis del segundo monosacárido (B'). Por lo tanto la síntesis del primer miembro (A) permanece inalterada. Para la preparación de B' se parte de nuevo de glucosa acetalizada, en forma de furanosa, y la configuración del carbono 3 se invierte de la misma forma que en el método 1, con una secuencia de oxidación-reducción. En este caso la introducción del grupo saliente se realiza después de la secuencia de desprotección-reprotección, estando ya en forma de piranosa. Para ello, primero se bencila la posición 3, de manera que introduciendo grupos protectores ortogonales, podemos desproteger y reproteger selectivamente sin perder la funcionalización en el carbono 3. A pesar de que este paso requiere de tiempos de reacción elevados, ahora sólo será necesario hacer dicha secuencia una vez, y reutilizar este mismo producto para el trisacárido. Es ahora, con nuestro sustrato ya en forma de furanosa, cuando se desproteje el carbono 3, y se transforma dicho hidroxilo en un buen grupo saliente, dando como resultado el nuevo miembro B' de nuestro disacárido, con el que llegaremos directamente al producto D sin pasar por C (método 2).



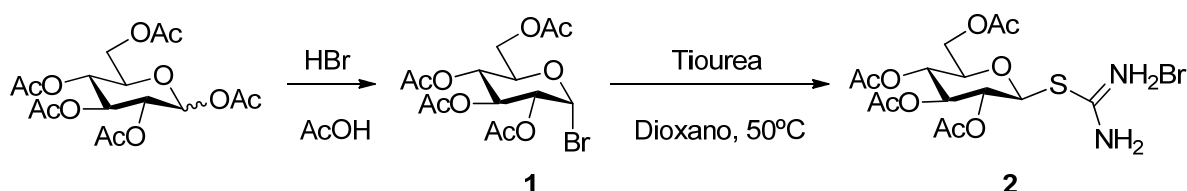
Esquema 4: Método 2 de la síntesis del disacárido

4.2. Síntesis de 2,3,4,6-tetra-O-acetil-1-tio-β-D-glucopiranososa (A)

Para la síntesis del primer fragmento de nuestra cadena, partimos de peracetilglucosa comercial, con la cual, mediante una bromación con HBr en ácido acético obtenemos el derivado **1** de manera cuantitativa.

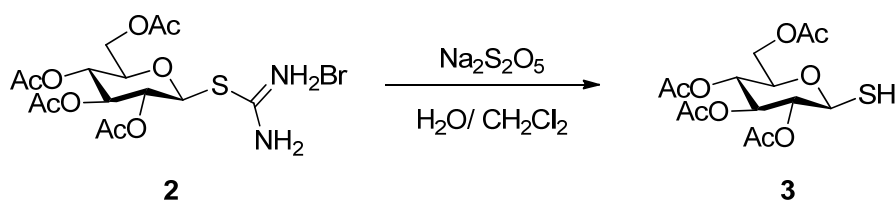
Como puede observarse, a partir de una mezcla de anómeros, α y β , obtenemos sólo el α - bromomonosacárido.⁹ Esto se debe a que los anillos de glucopiranososa α son más estables termodinámicamente que los β . Esta situación se conoce como efecto anomérico.

El siguiente paso es la sustitución del átomo de bromo con tiourea para introducir el átomo de azufre. El resultado es una sal de isotiouronio **2**, estable y soluble en agua, con un rendimiento del 70,5% y que no requiere purificación.



Esquema 5: Preparación del bromuro de isotiouronio

El último paso es la reducción de la sal de isotiouronio a tiol con metabisulfito de sodio. Gracias a la solubilidad de ambos reactivos en agua, y la insolubilidad del producto final, la reacción puede llevarse a cabo en un sistema bifásico, pasando el producto reducido a la fase orgánica y obteniéndose la tio-peracetilglucosa **3** con un buen rendimiento y sin ninguna clase de purificación durante todo el proceso, dando un rendimiento global del 55%.



Esquema 6: Preparación de 1-tio-peracetilglucosa

⁹ Contour-Galcera, M. O.; Guillot, J. M.; Ortiz-Mellet, C.; Pflieger-Carrara, F.; Defaye, J.; Gelas, J. *Carbohydr. Res.* **1996**, *281*, 99-118

Es necesario el almacenamiento del producto **3** a baja temperatura, pues a temperatura ambiente el grupo tiol reacciona consigo mismo formando un puente disulfuro. Esta situación hace que lentamente vayamos perdiendo producto **3**, transformándose en un derivado sintéticamente inactivo. Este hecho se demuestra a partir del ^1H -RMN del producto **3**, un mes después de su síntesis. En él, puede observarse que junto a la señal del H anomérico aparece un doblete que se corresponde con el H anomérico del dímero. Al perder el H del grupo tiol el protón anomérico pasa de triplete a doblete.

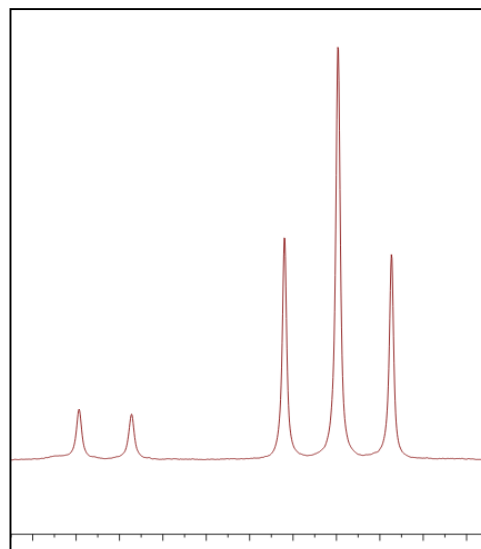
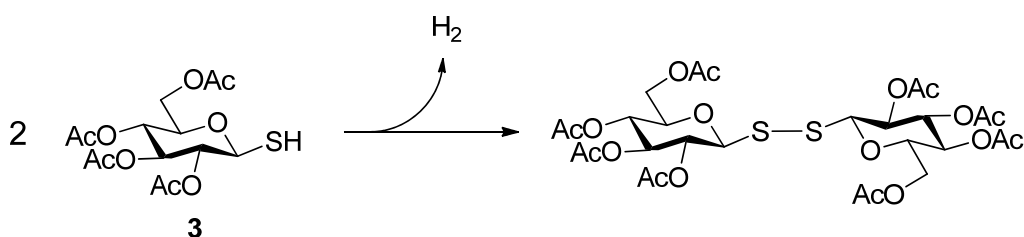


Figura 5: Revisión producto 3: 4.62-4.42 ppm



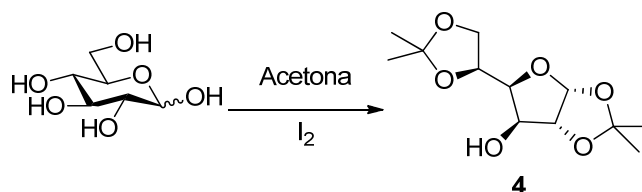
Esquema 7: Dimerización de 1-tio-peracetilglucosa

4.3. Síntesis de (1,2,4,6)-Tetra-O-Acetil-3-O-trifluorometanosulfonil-alopiranosas (B')

Para la preparación de este derivado se parte en primer lugar de 1,2:5,6-di-O-isopropiliden- α -D-glucofuranosa **4** comercial disponible en el laboratorio, pero debido a la antigüedad del reactivo, este producto estaba parcialmente hidrolizado y requiso una purificación previa. La purificación se lleva a cabo disolviendo el producto parcialmente hidrolizado en éter dietílico. La disolución turbia resultante se filtra, y se añade hexano a las aguas madres, para disminuir aún más la solubilidad en el medio del compuesto parcialmente hidrolizado. La mezcla de disolventes se evapora parcialmente a presión reducida para enriquecer la disolución en hexano. La mezcla se deja reposar a temperatura ambiente unos minutos hasta la aparición de un precipitado. La disolución se vuelve a filtrar, y el proceso se repite hasta que deja de observarse precipitado. En este momento se evapora totalmente el disolvente a presión reducida y se obtiene el producto **4** purificado.

Al repetir la síntesis del derivado de alosa, se decidió partir directamente de glucosa libre y protegerla usando acetona y yodo (que polariza el doble enlace de la acetona, y facilita la primera adición). De

esta manera se puede obtener una mayor cantidad de glucofuranosa protegida que purificando el comercial.



Esquema 8: Síntesis de glucofuranosa acetalizada

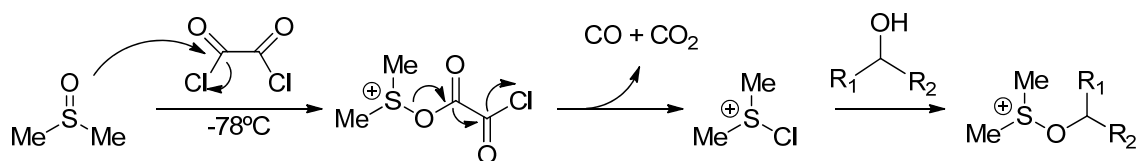
Una vez se tiene la glucosa protegida en forma de furanosa, se lleva a cabo la inversión del C₃ mediante una secuencia de oxidación-reducción. La oxidación de **4** se realiza mediante una reacción de Swern, a baja temperatura, tras cual obtenemos la correspondiente cetona **5**.



Esquema 9: Oxidación de Swern

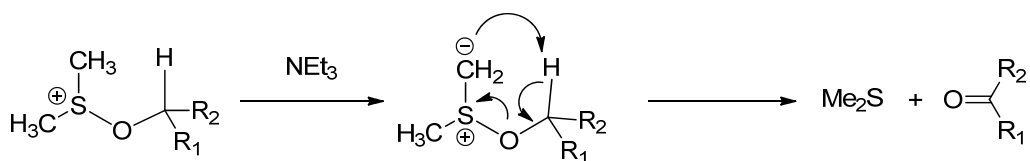
La oxidación de Swern es una alternativa que permite la oxidación selectiva de alcoholes a cetonas o aldehídos, en condiciones muy suaves y de manera muy eficiente. Esta reacción usa como reactivos DMSO, cloruro de oxalilo y una base, generalmente trietilamina, y debe realizarse a baja temperatura (-78°C), ya que a temperatura ambiente reacciona de forma explosiva.

El primer paso es el ataque nucleófilo del oxígeno del DMSO al carbono carbonílico del cloruro de oxalilo. El derivado formado descompone dando lugar a una sal de clorosulfonio, muy electrófila, que será atacada por el alcohol.



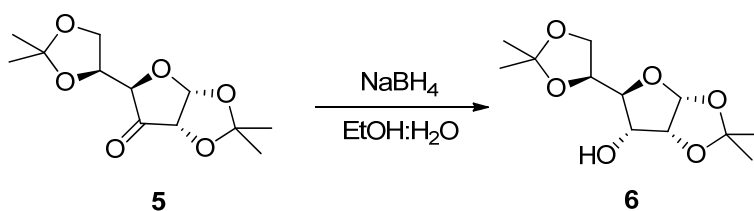
Esquema 10: Primera etapa de la reacción de Swern

El segundo paso es la adición de una base, trietilamina normalmente, que arranca un protón de los metilos del azufre, permitiendo la evolución del producto hasta el carbonilo deseado.



Esquema 11: Segunda etapa de la reacción de Swern

Tras la oxidación del carbono 3 de nuestra glucofuranosa, éste se reduce *one pot* usando borohidruro de sodio. La clave de esta reacción es su alta estereoselectividad la cual mejoramos al llevar a cabo la reacción a baja temperatura. Como muestra la figura 6, debido al impedimento estérico de los grupos colindantes el hidruro ataca a la cetona mayoritariamente por la cara menos impedida, dando como resultado **6**, nuestro derivado con el C₃invertido (esquema 12).



Esquema 12: Preparación de 1,2:5,6-di-o-isopropiliden- α -D-alofuranosa

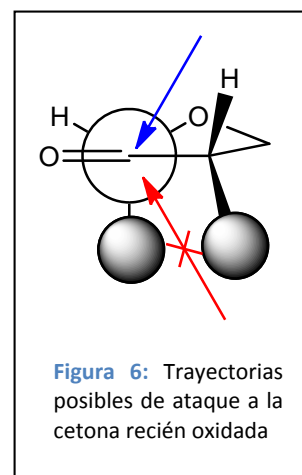
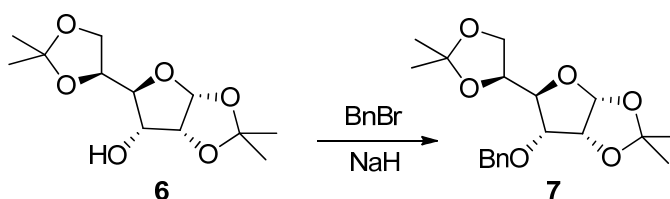


Figura 6: Trayectorias posibles de ataque a la cetona recién oxidada

La preparación de este producto partiendo desde alosa no se estudió, debido al alto precio de la misma.¹⁰

A continuación, se lleva a cabo la protección ortogonal de la alofuranosa **6**, la cual es bencilada usando hidruro de sodio como base para desprotonar el alcohol, obteniendo el derivado **7** con un rendimiento del 84,5%. Así usando grupos protectores ortogonales, es posible desproteger única y selectivamente los acetilos (para pasar de furanosa a piranosa), y mantener en todo momento la funcionalización sobre C₃.



Esquema 13: Bencilación del hidroxilo en 3 de la alofuranosa

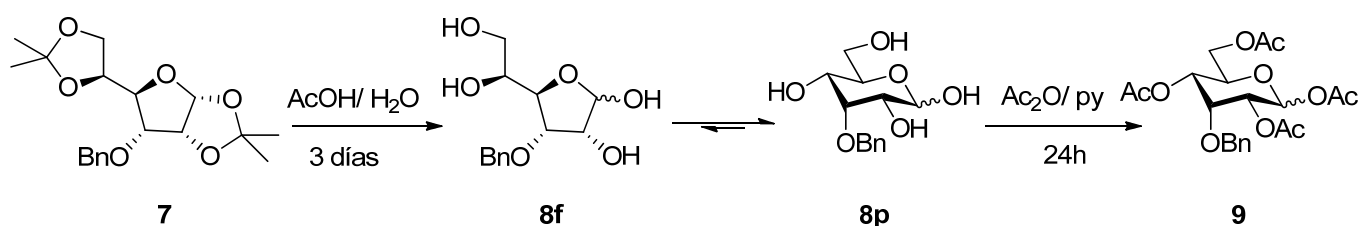
¹⁰ Alosa: 57€/gramo; Glucosa: 0,11€/gramo (Fuente: Carbosynth)

Posteriormente, se eliminan los grupos acetilo de **7** por tratamiento con ácido acético en agua durante 3 días. Tras la desprotección se obtiene la 3-bencil-D-alosa de forma cuantitativa, que está en equilibrio entre su forma furanosa (**8f**) y su forma piranosa (**8p**), siendo esta última la mayoritaria en disolución.

11

El siguiente paso es reprotger los grupos hidroxilo libres de **8** en forma de acetato, por reacción con una base y anhídrido acético. El ataque nucleófilo de los grupos hidroxilo, a los carbonos carbonílicos del anhídrido acético da como resultado el producto **9** que se purifica por columna cromatográfica (esquema 14).

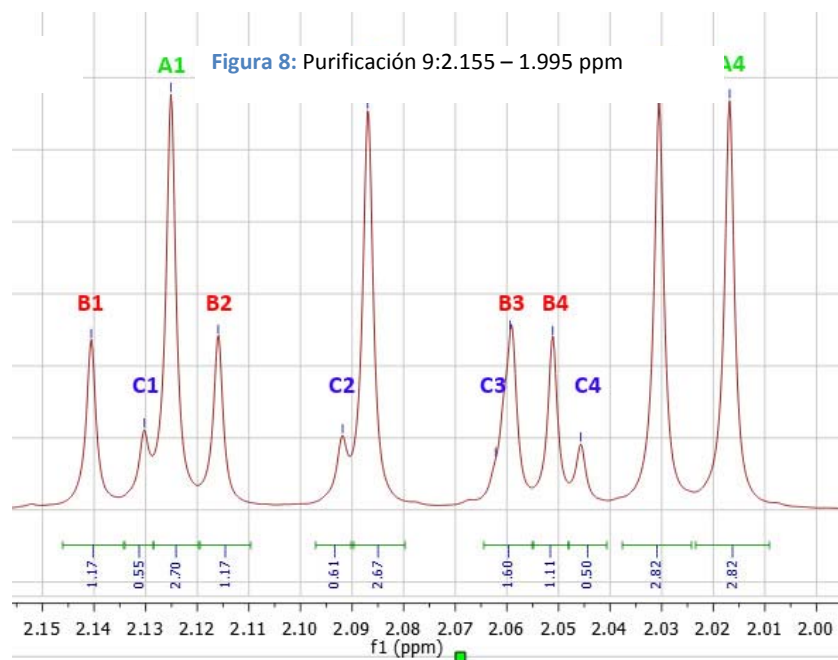
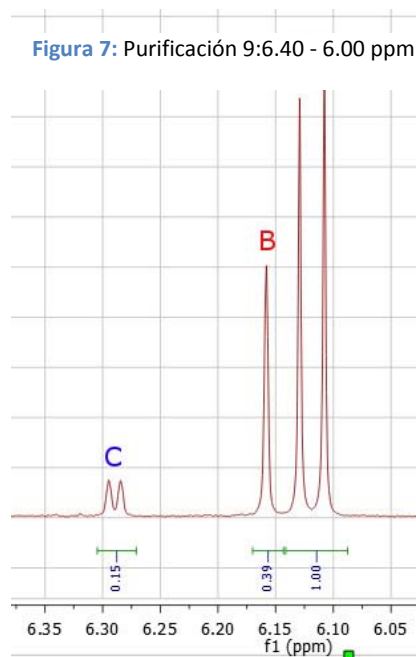
Debido a que **8** se presenta como un equilibrio que pasa por la forma abierta, la estereoquímica del carbono anomérico se pierde, y obtenemos **9** como una mezcla de anómeros α y β .



Esquema 14: Síntesis de 1,2,4,6-tetra-O-acetil-3-O-bencil-D-alopiranososa (B')

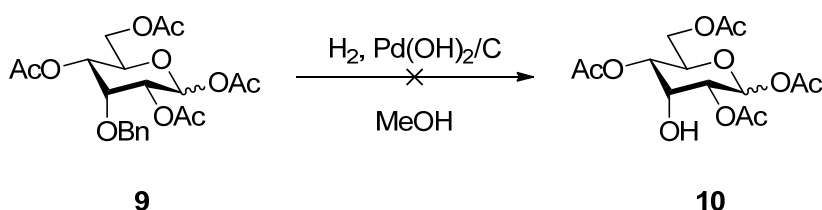
¹¹L.Sinnott, M., *Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, 2007, 14.

El resultado de esta reacción conduce a un crudo en el que son observables hasta 4 productos distintos derivados de azúcares, ninguno de ellos el producto inicial. Tras la purificación cromatográfica, 3 de ellos eluyen juntos. Podemos observar sus señales en $^1\text{H-RMN}$, tanto en la parte de las señales de protones anoméricos (**Figura 7**), como en la parte de los metilos de los grupos acetilo (**Figura 8**). Por simplicidad, designaremos a los tres productos como **A**, **B** y **C**:



Como puede verse, las integraciones de la figura 7 se corresponden con la integración de las señales de la ilustración 8 por 3 (3H por acetilo). Viendo los valores de las constantes de acoplamiento de las señales de la figura 7, podemos afirmar que **A** es el producto **9** en disposición β , **C** es su anómero, en disposición α , y **B** se corresponde con un producto de identidad desconocida.

A pesar de las señales desconocidas presentes en **9**, se decide desproteger el hidroxilo en 3 con el método habitual de desprotección de grupos bencilo. Se lleva a cabo la reducción con hidrógeno usando como catalizador Pd(OH)₂ soportado sobre carbono. Tras 24 horas de hidrogenación, el crudo se filtra para eliminar el catalizador y se evapora el disolvente a presión reducida. Se recupera únicamente una pequeña cantidad de producto, que resulta ser una mezcla compleja que no fue posible resolver, como puede verse en la figura 9, en el espectro de RMN de 1H aparecen numerosas señales en la región de los grupos metilo de los acetilos.



Esquema 15: Desprotección del grupo bencilo

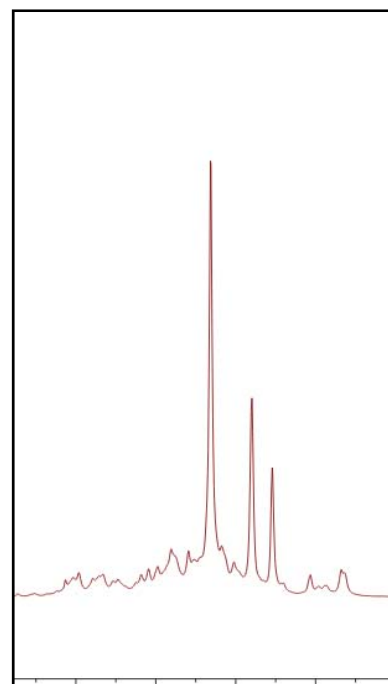


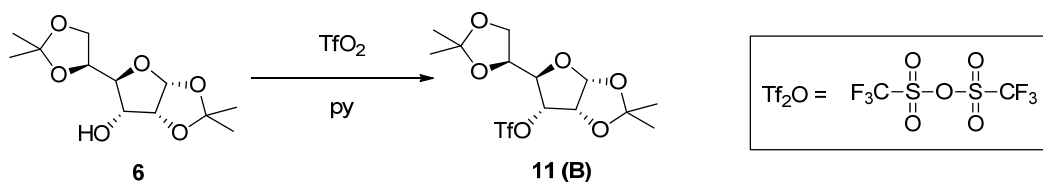
Figura 9: Crudo 10:2.15-1.90 ppm

Este resultado se puede explicar por la labilidad que presentan los grupos acetilo en presencia de hidroxilos libres, ya que pueden transesterificar entre sí, de manera que se obtendrían productos parcialmente acetilados en varias posiciones.

Tras repetir nuevamente esta aproximación, obteniendo el mismo resultado, se decide no continuar por esta vía, por lo que se procede a sintetizar el disacárido con la primera ruta. Afortunadamente ambas aproximaciones comparten varios pasos y productos.

4.4. Síntesis de (1,2:5,6)-di-O-isopropiliden-3-O-trifluorometanosulfonyl- α -D-alofuranosa (**B**)

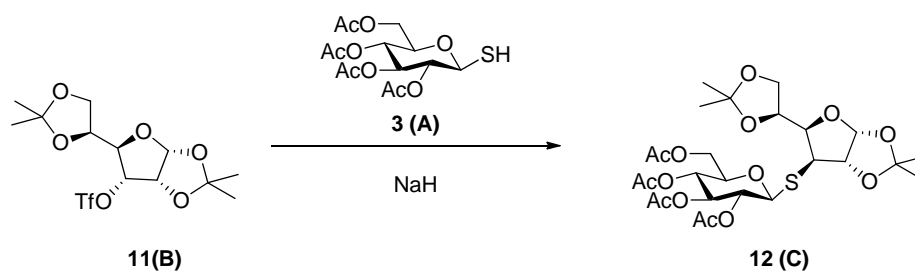
Se parte de la glucofuranosa ya invertida en posición 3 (alofuranosa) **6**, y se transforma el grupo hidroxilo libre en un buen grupo saliente formando un triflato. La reacción es una sustitución nucleófila en medio básico, en la que el hidroxilo desprotonado de la alofuranosa ataca al azufre electrófilo del anhídrido tífico. Se obtiene el producto **11**, el cual, debido a su inestabilidad, se utiliza sin purificar para la preparación de **12**.



Esquema 16: Preparación del monosacárido B

4.5. Síntesis de (2,3,4,6)-Tetra-O-acetil- β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 3)-(1,2:5;6)-di-O-isopropiliden-3-desoxi-3-tio- β -D-glucofuranosa (C)

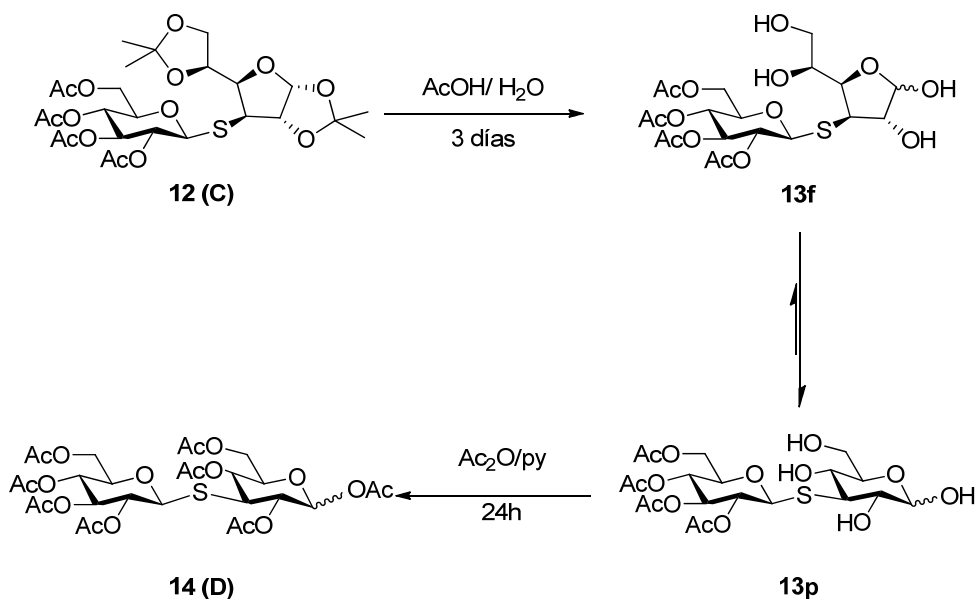
Para este paso se aprovecha el producto **3** (A, según la nomenclatura de los antecedentes), que actúa como agente nucleófilo en medio básico, donde su grupo $-SH$ desprotonado ataca al C_3 de nuestro recién sintetizado producto **11** (B), invirtiendo su configuración y actuando el triflato como el grupo saliente (**esquema 17**).



Esquema 17: Preparación del tio-disacárido (C)

4.6. Síntesis de (2,3,4,6)-Tetra-O-acetil- β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 3)-(1,2,4,6)-tetra-O-acetil-3-desoxi-3-tio- β -D-glucopiranososa (D)

Finalmente se procede a la desprotección y reprotención del disacárido **12** por el método utilizado anteriormente. Primero la desprotección de los acetales en medio ácido, con ácido acético y agua, y después la reprotención de los hidroxilos en medio básico con anhídrido acético (**esquema 18**). De nuevo se observa la pérdida de la estereoquímica en el carbono anomérico, por la misma razón que antes. Por este motivo se obtiene una mezcla de anómeros α y β .



Esquema 18: Desprotección-reprotección del tio-disacárido

5. Conclusiones

5.1. Conclusiones experimentales

La baja estabilidad en el medio de reacción del derivado de alosa parcialmente acetilado, teóricamente solo libre en la posición 3, hace que el método propuesto sea inviable para la obtención de los tio-oligosacáridos objetivo.

Por otra parte, se ha podido confirmar, como el más adecuado por el momento, el método desarrollado inicialmente en el grupo de investigación para la formación de tio-disacárido.

5.2. Conclusiones formativas

En cuanto al trabajo desarrollado, ha sido una de las actividades más formativas realizadas a lo largo del grado (sino la que más). He podido trabajar en diferentes condiciones experimentales, desde atmósferas de argón con disolventes totalmente secos, hasta reacciones a baja temperatura. Además, se han aprendido el uso de diferentes instrumentos, como Combiflash o el sistema de purificación de disolventes SDS, y se ha ganado práctica con el material común del laboratorio, como rotavapores, columnas cromatográficas o líneas de vacío entre tantas otras.

Además, no solo he adquirido conocimientos sobre manejo habitual en un laboratorio, sino que he aprendido mucho sobre búsqueda de información y publicaciones y sobre la importancia de una buena organización, ya no sólo del trabajo y del cuaderno, sino de la organización intrínseca del laboratorio.

6. Parte experimental

6.1. Consideraciones experimentales e instrumentales generales

Los disolventes utilizados comerciales fueron usados sin purificación previa. Se emplearon como eluyentes en columna cromatográfica de calidad HPLC Multisolvent. El CH₂Cl₂ fue secado en un sistema SPS innovative. Como DMF anhidro se empleó un disolvente anhidro comercial almacenado con tamiz molecular de 4 Å.

En la obtención de espectros de RMN se emplearon diferentes equipos: Bruker AVANCE-II de 300MHz, Bruker AVANCE de 400MHz y Bruker AVANCE de 500MHz.

En la disolución de las muestras se usaron disolventes deuterados comerciales. Los valores de desplazamiento químico se expresan en ppm (δ), y los valores de las constantes de desplazamiento (J) están expresadas en Hz.

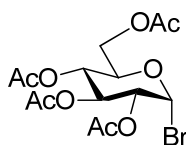
Los poderes ópticos rotatorios fueron medidos en un polarímetro Jasco DIP-370 a la temperatura indicada, en celdas de 1 dm, utilizando como disolvente cloroformo de calidad HPLC.

Las cromatografías en capa fina se realizaron con placas silicagel Polygram[®] SILG/UV254 (Macherey-Nagel) sobre base de aluminio. Para observar las manchas se usó luz UV de 254 nm y/o revelador compuesto de ácido fosfomolibdico en etanol al 2%. Para las cromatografías en columna se empleó silicagel Chromagel (SDS, 40-60 μ m y 70-230 μ m).

En la caracterización de todos los derivados sintetizados, ya sea en sus formas furanósicas o piranósicas se ha seguido la numeración habitual para azúcares. En el caso de los disacáridos la nomenclatura será la equivalente, comenzando a numerar por el extremo reductor, es decir, el monosacárido cuyo anómero no forma un enlace glicosídico.

6.2. Síntesis y caracterización

6.2.1. 1-Bromo-(2,3,4,6)-tetra-O-acetil- α -D-glucopiranosa(1):

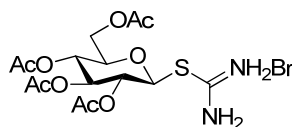


Se disuelve peracetil-D-glucopiranosa (3.375 g, 8.65 mmol) en 5 ml de disolución de HBr en ácido acético al 33% en peso. Se agita durante 15 minutos, el crudo se vierte sobre una mezcla de agua/hielo y se neutraliza con NaOH/ NaHCO₃ (sat) hasta pH neutro. A continuación se extrae con CH₂Cl₂ (3x70 ml), el combinado de fases orgánicas se seca con MgSO₄ anhidro, se filtra y se evapora el disolvente a presión reducida. El producto **1** se obtuvo como una resina amarillenta que no requirió purificación adicional. (3.5g, 98%).

¹H-RMN (400MHz, CDCl₃) δ 6.61(d, J=4.0Hz, 1H, H₁), 5.56 (t, J=9.7Hz, 1H, H₃), 5.16 (t, J=9.5Hz, 1H, H₄), 4.84 (dd, J=10.0, 4.1Hz, 1H, H₂), 4.36 – 4.27 (m, 2H, H₅ y H₆), 4.17 – 4.09 (m, 1H, H_{6'}), 2.10 (s, 3H, H_{Ac}), 2.10 (s, 3H, H_{Ac}), 2.05 (s, 3H, H_{Ac}), 2.04 (s, 3H, H_{Ac}).

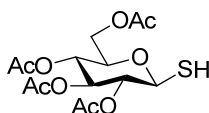
$^{13}\text{C-RMN}$ (100MHz, CDCl_3) δ 170.5(CO_{Ac}), 169.8(CO_{Ac}), 169.78 (CO_{Ac}), 169.4 (CO_{Ac}), 86.6 (C_1), 72.1 (C_5), 70.6(C_2), 70.1 (C_3), 67.2(C_4), 60.9(C_6), 20.7(C_{Ac}), 20.7(C_{Ac}), 20.6 (C_{Ac}), 20.5 (C_{Ac}).

6.2.2. Bromuro de (2,3,4,6)-tetra-O-acetil- β -D-glucopiranosil-1-isotiuronio (2):



Se disuelve el bromuro de peracetilglucosa **1** (3.5 g, 8.51 mmol), en dioxano (16 ml) y se añade tiourea (993 mg, 13.04 mmol). La mezcla de reacción se pone a reflujo (50°C, 18h). Pasado este tiempo se observa la aparición de un sólido blanco. Éste se separó por filtración y el producto se utilizó sin ninguna purificación adicional (2.923 g, 6.00 mmol, 70.5%).

6.2.3. (2,3,4,6)-Tetra-O-acetil-1-tio- β -D-glucopiranososa (3):



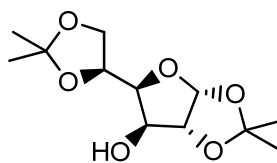
La sal de isotiuronio **2** (1.604 g, 3.36 mmol) se disuelve en 20 ml de una mezcla $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{H}_2\text{O}$ (2:1). Se añade a la mezcla de reacción $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ y se calienta a reflujo (50°C, 23h). Tras este tiempo se enfría la mezcla a temperatura ambiente y se separan las fases. La fase acuosa se extrae con CH_2Cl_2 (4x10 ml). El combinado de las fases orgánicas se seca con MgSO_4 , se filtra y se evapora el disolvente a presión reducida. El producto se obtiene puro (958 mg, 2.62 mmol, 78 %) como un sólido blanco.

MS-HR (ESI+TOF) calculado para $\text{C}_{14}\text{H}_{20}\text{O}_9\text{S}$ ($\text{M}+\text{Na}$) $^+$, 387.0721; encontrada 387.0730

$^1\text{H-RMN}$ (400MHz, CDCl_3) δ 5.15 (t, $J=9.4$ Hz, 1H, H_3), 5.06 (dd, $J=9.4$, 9.9Hz, 1H, H_4), 4.93 (t, $J=9.4$ Hz, 1H, H_2), 4.52 (t, $J=9.9$ Hz, 1H, H_1), 4.21 (dd, $J=12.5$, 4.8Hz, 1H, H_6), 4.08 (dd, $J=12.5$, 2.2Hz, 1H, H_6'), 3.70 (ddd, $J=9.9$, 4.8, 2.2Hz, 1H, H_5), 2.30 (d, $J=9.9$ Hz, 1H, H_5), 2.05 (s, 3H, H_{Ac}), 2.04 (s, 3H, H_{Ac}), 1.98 (s, 3H, H_{Ac}), 1.97 (s, 3H, H_{Ac}).

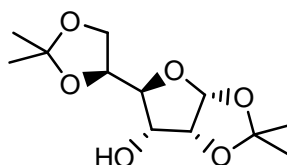
$^{13}\text{C-RMN}$ (100MHz, CDCl_3) δ 170.6(CO_{Ac}), 170.0(CO_{Ac}), 169.5 (CO_{Ac}), 169.3 (CO_{Ac}), 78.7(C_1), 76.3 (C_5), 73.5 (C_2), 73.5 (C_3), 68.1 (C_4), 62.0 (C_6), 20.7 (C_{Ac}), 20.7(C_{Ac}), 20.5 (C_{Ac}), 20.5 (C_{Ac}).

6.2.4. (1,2:5,6)-Di-O-isopropiliden- α -D-glucofuranosa (4):



Se disuelve yodo (3.0 g, 12 mmol) en acetona anhidra (400 ml) y se añade D-glucosa (10.0 g, 55.5 mmol). La mezcla de reacción se agita en baño de agua a 30°C durante 1h. Se añade una disolución de tiosulfato de sodio hasta la decoloración parcial del crudo. Se destila la misma parcialmente y se añade CH₂Cl₂ (120 ml) y una disolución saturada de NaCl (100 ml). Se separa la fase orgánica y la fase acuosa se extrae con CH₂Cl₂ (2 x 100 ml). Los extractos orgánicos se juntan, se secan con MgSO₄, se filtran y se evapora el disolvente a presión reducida. El producto se obtiene como un sólido blanco (11,6 g, 80%).

6.2.5. (1,2:5,6)-Di-O-isopropiliden- α -D-alofuranosa (6):



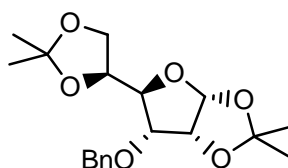
Se disuelve cloruro de oxalilo (3.6 ml, 40.84 mmol), en CH₂Cl₂anhidro (50 ml) y se enfría la mezcla a -78°C. A continuación se añade gota a gota y bajo atmósfera inerte una disolución de DMSO (6 ml, 84.47 mmol) en CH₂Cl₂anhidro (15 ml). Se agita la mezcla durante 2 horas a -78 °C y se añade gota a gota una disolución de 1,2:5,6-di-O-isopropiliden- α -D-glucofuranosa⁴ (3.60 g, 13.83 mmol) en CH₂Cl₂anhidro (90 ml). Tras agitar durante 2 horas a -78°C se añade trietilamina (14,5 ml, 104.03 mmol). Tras 5 minutos se añade una disolución de NaBH₄ (1.00 g, 26.57 mmol) disuelto en 70 ml de Etanol/ agua 8:2. La reacción se deja atemperar (16h) y a continuación se añaden 100 ml de disolución saturada de NaCl y se extrae con CH₂Cl₂ (3 x 100 ml). Las fases orgánicas se combinan, se secan con MgSO₄, se filtra, y se evapora el disolvente a presión reducida. El producto se redisuelve en éter y se filtra de nuevo. Las aguas madres se evaporan a presión reducida y el sólido resultante se purificó por columna cromatográfica 7:3 Hexano/Acetato de etilo. El producto se obtuvo como un sólido blanco (1.73 g, 47.9%).

$[\alpha]_D^{25} = +36$ (c=0.28; CHCl₃)

¹H-RMN (400MHz, CDCl₃) δ 5.81 (d, J=3.8Hz, 1H, H₁), 4.61 (dd, J=5.2, 3.8Hz, 1H, H₂), 4.31 (td, J=6.6, 4.6 Hz, 1H, H₅), 4.10-3.99 (m, 3H, H₃ y H₆), 3.82 (dd, J=8.5, 4.6Hz, 1H, H₄), 2.65 (s, 1H, H_{OH}), 1.58 (s, 3H, H_{Ac}), 1.46 (s, 3H, H_{Ac}), 1.38 (s, 3H, H_{Ac}), 1.37 (s, 3H, H_{Ac}).

¹³C-RMN(100MHz, CDCl₃) δ 112.8 (C_{Cuat.Acetal}), 109.8 (C_{Cuat.Acetal}), 103.9 (C₁), 79.8(C₄), 79.0 (C₂), 75.6 (C₅), 72.5 (C₃), 65.9(C₆), 26.6(C_{Ac}), 26.5 (C_{Ac}), 26.3 (C_{Ac}), 25.3(C_{Ac}).

6.2.6. 3-Bencil-(1,2:5,6)-di-O-isopropiliden- α -D-alofuranosa (7):



Se disuelve el producto **6** (922 mg, 3.54 mmol) en 60 ml de DMF anhidra, bajo atmósfera inerte y se enfría en baño de hielo. A continuación se añade lentamente NaH en aceite mineral al 60% (155.8 mg, 3.89 mmol) y la mezcla de reacción se deja en agitación a 0°C durante una hora. Seguidamente se adiciona BnBr (0.5 ml, 4.20 mmol), se retira el baño de hielo, y se deja avanzar la reacción, bajo atmósfera inerte (26 h). Tras este tiempo se añade NaOMe (96.3 mg, 1.78 mmol) y se agita durante otra hora. Pasado este tiempo se añade agua (20 ml), y disolución acuosa saturada de NH₄Cl (50 ml). Después, se extrae con hexano (4 x 50 ml), la fase orgánica se seca con MgSO₄, se filtra y se evapora el disolvente a presión reducida (1048 mg, 2.99 mmol, 84.5%).

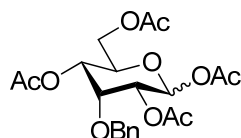
$[\alpha]_D^{25} = +112$ (c=0.28; CHCl₃)

MS-HR (ESI+TOF) calculado para C₁₉H₂₆O₆ (M+Na)⁺, 373.1622; encontrada 373.1626

¹H-RMN (400MHz, CDCl₃) δ 7.43-7.31 (m, 5H, H_{Ar}), 5.77 (d, J=3.7Hz, 1H, H₁), 4.70 (dd, J=55.33, 11.71Hz, 2H, H_{Benz}), 4.59 (dd, J=4.35, 3.7 Hz, 1H, H₂), 4.38 (td, J=7.0, 3.1Hz, 1H, H₅), 4.16 (dd, J=8.7, 3.2Hz, 1H, H₄), 4.05-3.95 (m, 2H, H₆), 3.90 (dd, J=8.7, 4.5Hz, 1H, H₃), 1.61 (s, 3H, H_{Ac}), 1.41 (s, 3H, H_{Ac}), 1.38 (s, 3H, H_{Ac}), 1.37 (s, 3H, H_{Ac}).

¹³C-RMN (100MHz, CDCl₃) δ 137.5 (C_{ipso}), 128.4 (C_{Ar}), 128.2 (C_{Ar}), 128.0 (C_{Ar}), 112.9 (C_{Cuat.Ac}), 109.6 (C_{Cuat.Ac}), 103.9 (C₁), 78.0 (C₄), 77.8 (C₂), 77.5 (C₃), 74.8 (C₅), 72.2 (C_{Benz}), 65.0 (C₆), 26.8 (C_{Ac}), 26.6 (C_{Ac}), 26.2 (C_{Ac}), 25.1 (C_{Ac}).

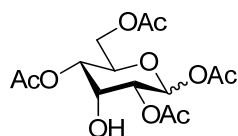
6.2.7. (1,2,4,6)-Tetra-O-acetil-3-O-bencil-D-alopiranososa (9):



Se disuelve el producto **7** (622.8 mg, 1.78 mmol) en 90 ml de una mezcla AcOH/H₂O 6:4 y se agita a 60°C durante 72 horas. Tras ese tiempo se evapora el disolvente a presión reducida y el producto resultante se disuelve en 20 ml de una mezcla Ac₂O/piridina 1:1. Se agita la reacción a temperatura ambiente durante 24 horas y se evaporan de nuevo los disolventes a presión reducida. El crudo se disuelve en 75 ml de CH₂Cl₂ y se lava la fase orgánica con una disolución de HCl 1M (3 x 50 ml), con una disolución saturada de NaHCO₃ (3 x 50 ml) y finalmente con agua (3 x 50 ml). Tras los lavados, se seca la fase orgánica con MgSO₄, se filtra y se evapora el disolvente a presión reducida.

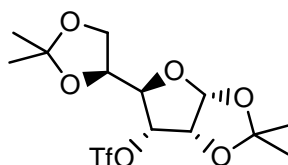
El producto se purifica por columna cromatográfica (Hexano/Acetato de etilo 8:2 a 7:3), y el producto se obtiene como una mezcla de anómeros más un producto desconocido B ($\alpha / \beta / B = 1: 6,7: 2,6$)

6.2.8. (1,2,4,6)-Tetra-O-acetil-D-alopiranososa (10):



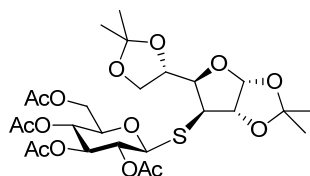
Partiendo del producto **9** (344 mg, 0.78 mmol), éste se disuelve en 10 ml de metanol y se añaden 20 mg de catalizador de Pd(OH)₂ soportado sobre Carbono. La mezcla se introduce en el hidrogenador a 50 bares durante 24h. Pasado este tiempo, la mezcla se filtra y se recogen las aguas madres. Se evapora a presión reducida el disolvente obteniéndose una mezcla compleja de productos.

6.2.9. (1,2:5,6)-Di-O-isopropiliden-3-O-trifluorometanosulfonil- α -D-alofuranosa (11):



Se disuelve el producto **6** (376.5 mg, 1.44 mmol) en CH₂Cl₂ anhidro (30 ml), y se enfría la mezcla en un baño de hielo/sal. A continuación se añaden bajo atmósfera inerte piridina (0.45 ml, 5.59 mmol), y anhídrido triflórico (0.30 ml, 1.79 mmol), y se agita la mezcla de reacción durante 2 horas. Pasado este tiempo se vierte sobre 50 ml de disolución saturada de NaHCO₃/hielo. Se extrae con CH₂Cl₂ (3 x 50 ml), las fases orgánicas se combinan, se secan con MgSO₄, se filtran y se evapora el disolvente a presión reducida. El producto crudo **11** se obtiene en forma de un aceite amarillo y sin ninguna purificación adicional debido a su inestabilidad (562 mg, 99%).

6.2.10. (2,3,4,6)-Tetra-O-acetil-β-D-glucopiranosil-(1→3)-(1,2:5;6)-di-O-isopropiliden-3-desoxi-3-tio-β-D-glucofuranosa (12):



Se disuelve **3** (450 mg, 1.23 mmol) en 25 ml de DMF anhidra y se añade NaH en aceite mineral al 60% (55.3 mg, 2.30 mmol). Cuando cesa el desprendimiento de hidrógeno se añade **10** (562 mg, 1.43 mmol) disuelto en 5 ml de DMF anhidra. La mezcla se agita bajo atmósfera inerte (18h), tras lo que se evapora el disolvente a presión reducida. El crudo se disuelve en 50 ml de CH₂Cl₂ y se lava con agua (3 x 50 ml). La fase orgánica se seca con MgSO₄, se filtra y se evapora el disolvente a presión reducida. El producto se purifica por columna cromatográfica (Hexano/ Acetato de etilo 7:3) para dar **12** como un sólido blanco cristalino (371 mg, 49,7%).

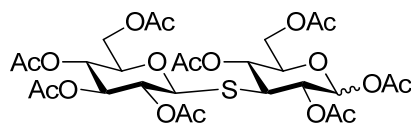
$[\alpha]_D^{25} = -30$ (c=0.23; CHCl₃)

MS-HR (ESI+TOF) calculado para C₂₆H₃₈O₁₄S (M+Na)⁺, 629.1880; encontrada 629.1874

¹H-RMN (400MHz, CDCl₃) δ 5.83 (d, J=3.5 Hz, 1H, H₁), 5.22 (t, J=9.3 Hz, 1H, H₉), 5.09 (t, J=9.7 Hz, 1H, H₁₀), 5.05 (t, J=9.9 Hz, 1H, H₈), 4.84 (d, J=3.5 Hz, 1H, H₂), 4.73 (d, J=10.1 Hz, 1H, H₇), 4.32 (ddd, J= 8.6, 5.7, 4.5 Hz, 1H, H₅), 4.25(dd, J=8.7,3.5Hz, 1H, H₄)4.20 (d, J=2.5 Hz, 1H, H₁₂), 4.18(d, J=4.9 Hz, 1H, H_{12'}), 4.16-4.09 (m, 1H, H₆), 4.02 (dd, J=8.8, 4.4 Hz, 1H, H_{6'}), 3.69 (ddd, J=10.1, 4.9, 2.5 Hz, 1H, H₁₁), 3.55 (d, J= 3.9 Hz, 1H, H₃), 2.09(s, 3H, H_{COCH₃}), 2.07 (s, 3H, H_{COCH₃}), 2.04 (s, 3H, H_{COCH₃}), 2.01 (s, 3H, H_{COCH₃}), 1.51 (s, 3H, H_{(CH₃)₂C}), 1.43(s, 3H, H_{(CH₃)₂C}), 1.33 (s, 3H, H_{(CH₃)₂C}), 1.32 (s, 3H, H_{(CH₃)₂C}).

¹³C-RMN (100MHz, CDCl₃) δ170.5 (CO_{Ac}), 170.2 (CO_{Ac}), 169.3 (CO_{Ac}), 169.1 (CO_{Ac}), 111.9 (C_{Cuat. Acetal}), 109.5 (C_{Cuat.Acetal}),104.8 (C₁), 86.1 (C₂), 82.6 (C₇), 80.0 (C₄), 76.3(C₁₁), 73.8 (C₉), 73.7 (C₅), 70.0 (C₈), 68.0 (C₁₀), 67.4(C₆), 62.0 (C₁₂), 50.0 (C₃), 26.9 (C_{COCH₃}), 26.6 (C_{COCH₃}), 26.3 (C_{COCH₃}), 25.3 (C_{COCH₃}), 20.7(C_{C(CH₃)₂}), 20.6 (C_{C(CH₃)₂}), 20.6(C_{C(CH₃)₂}), 20.5 (C_{C(CH₃)₂}).

6.2.11. (2,3,4,6)-Tetra-O-acetil-β-D-glucopiranosil-(1→3)-(1,2,4,6)-tetra-O-acetil-3-desoxi-3-tio-β-D-glucopiranososa (14):



Se disuelve **12** (371 mg, 0.61 mmol) en 30 ml de una mezcla AcOH/ H₂O 60:40 y se agita a 60°C durante 72 horas. A continuación se evapora el disolvente a presión reducida, y el producto resultante se disuelve de nuevo en 10 ml de una mezcla Ac₂O/piridina 1:1. Se agita la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 24 horas y se evaporan de nuevo los disolventes a presión reducida. El crudo se disuelve en 50 ml de CH₂Cl₂ y se lava la fase orgánica con una disolución de HCl 1M (3 x 30 ml), con una disolución saturada de NaHCO₃ (3 x 30 ml) y finalmente con agua (3 x 30 ml). Tras los lavados, se seca la fase orgánica con MgSO₄, se filtra y se evapora el disolvente a presión reducida. El producto se purifica por columna cromatográfica y **14** se obtiene como una mezcla de anómeros (α/ β= 1.4:1) (376 mg, 82%).

MS-HR (ESI+TOF) calculado para C₂₈H₃₈O₁₈S (M+Na)⁺, 717.1677; encontrada 717.1671

¹H-RMN (400MHz, CDCl₃) δ 6.29 (d, *J* = 3.5 Hz, 1H, H_{1α}), 5.64 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, H_{1β}), 5.22 (t, *J* = 9.9 Hz, 1H, H_{9α}), 5.20 (t, *J*=7.1 Hz, 1H, H_{9β}), 5.20-5.15 (m, 1H, H_{2β}), 5.11 (dd, *J* = 11.3, 3.9 Hz, 1H, H_{2α}), 5.11-4.98 (m, 3H, H_{10β}, H_{4α}, H_{4β}), 4.96 – 4.90 (m, 2H, H_{8α} y H_{8β}), 4.79 (d, *J* = 10.1 Hz, 1H, H_{7α}), 4.70 (d, *J* = 10.2 Hz, 1H, H_{7β}), 4.32- 4.22 (m, 2H, H_{6'α} y H_{12'α}), 4.16 (dd, *J* = 12.7, 2.1 Hz, 2H, H_{6β} y H_{12β}), 4.10 (dd, *J* = 12.6, 2.0 Hz, 2H, H_{6α} y H_{12α}), 4.09 -4.05 (m, 3H, H_{5α}, H_{6β'} y H_{12β'}), 3.83 (ddd, *J* = 9.4, 4.6, 2.3Hz, 1H, H_{5β}), 3.79-3.70 (m, 2H, H_{11α} y H_{11β}), 3.24 (t, *J* = 11.4 Hz, 1H, H_{3α}), 3.05 (t, *J* = 10.8 Hz, 1H, H_{3β}), 2.20 (s, 3H, H_{Ac}), 2.13 (s, 3H, H_{Ac}), 2.12 – 2.08 (m, 27H, H_{Ac}), 2.04 (s, 3H, H_{Ac}), 2.03(s, 3H, H_{Ac}), 2.03 (s, 3H, H_{Ac}), 2.02 (s, 3H, H_{Ac}), 2.02 (s, 3H, H_{Ac}).

¹³C-RMN (100MHz, CDCl₃) δ 170.7(CO_{Ac}), 170.6 (CO_{Ac}), 170.5 (4· CO_{Ac}), 170.2(CO_{Ac}), 170.1 (CO_{Ac}), 169.4(CO_{Ac}), 169.3 (CO_{Ac}), 169.3 (CO_{Ac}), 169.3(CO_{Ac}), 169.2 (CO_{Ac}), 169.1 (CO_{Ac}), 168.6 (CO_{Ac}), 93.1 (C_{1β}), 88.8 (C_{1α}), 83.8 (C_{7β}), 82.9(C_{7α}), 75.7(C_{11α}), 75.6 (C_{11β}), 75.4(C_{5β}), 73.7 (C_{9β}), 73.7(C_{9α}), 71.7(C_{2β}), 70.9(C_{5α}), 70.6 (C_{2α}), 70.1 (C_{8α}), 70.1 (C_{8β}), 68.1 (C_{10α}), 68.0 (C_{10β}), 66.1(C_{4α}), 65.6 (C_{4β}), 62.00 (C_{6α}), 61.8 (C_{12β}), 61.8 (C_{6β}), 50.1 (C_{3β}), 46.5(C_{3α}), 20.9 (C_{COCH3}), 20.9(C_{COCH3}), 20.7 (C_{COCH3}), 20.7 (C_{COCH3}), 20.7 (C_{COCH3}), 20.6 (C_{COCH3}), 20.6(C_{COCH3}), 20.5(C_{COCH3}), 20.5(C_{COCH3}), 20.5(C_{COCH3}), 20.4 (C_{COCH3}).

7. Anexos

7.1. Espectros de caracterización

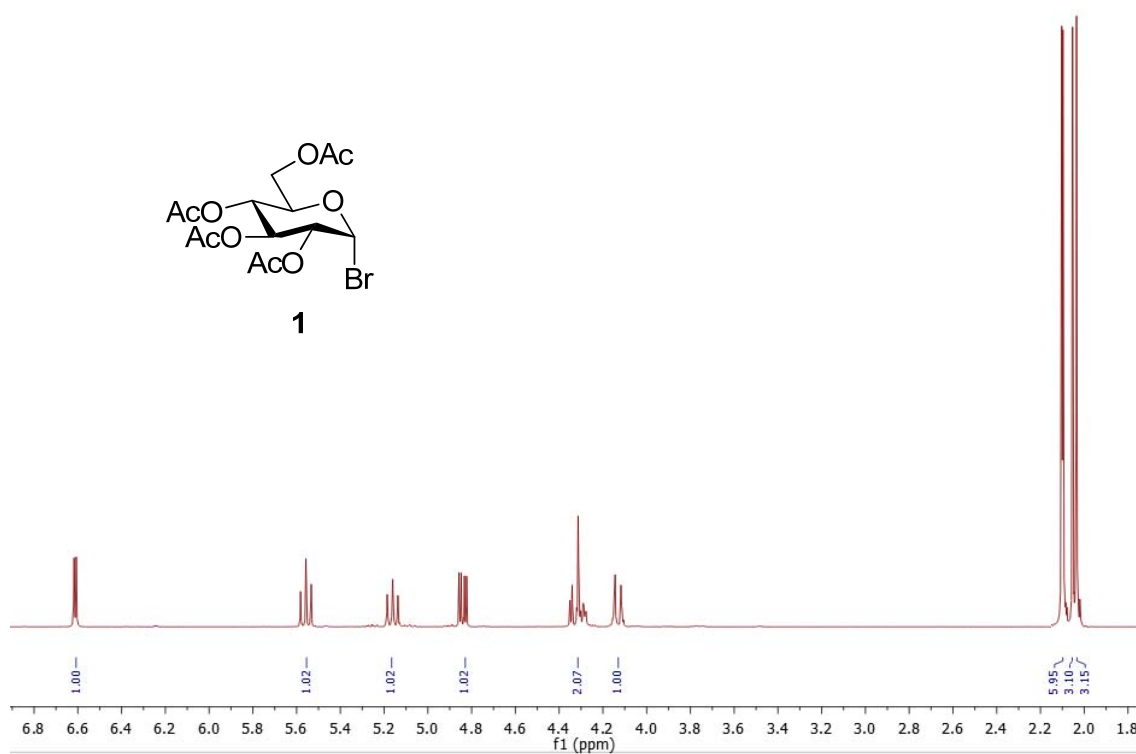


Ilustración 1A: $^1\text{H-NMR}$ (400MHz, CDCl_3)

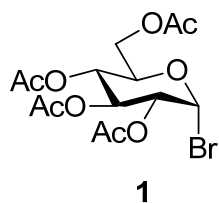


Ilustración 1B: $^{13}\text{C-NMR}$ (100MHz, CDCl_3)

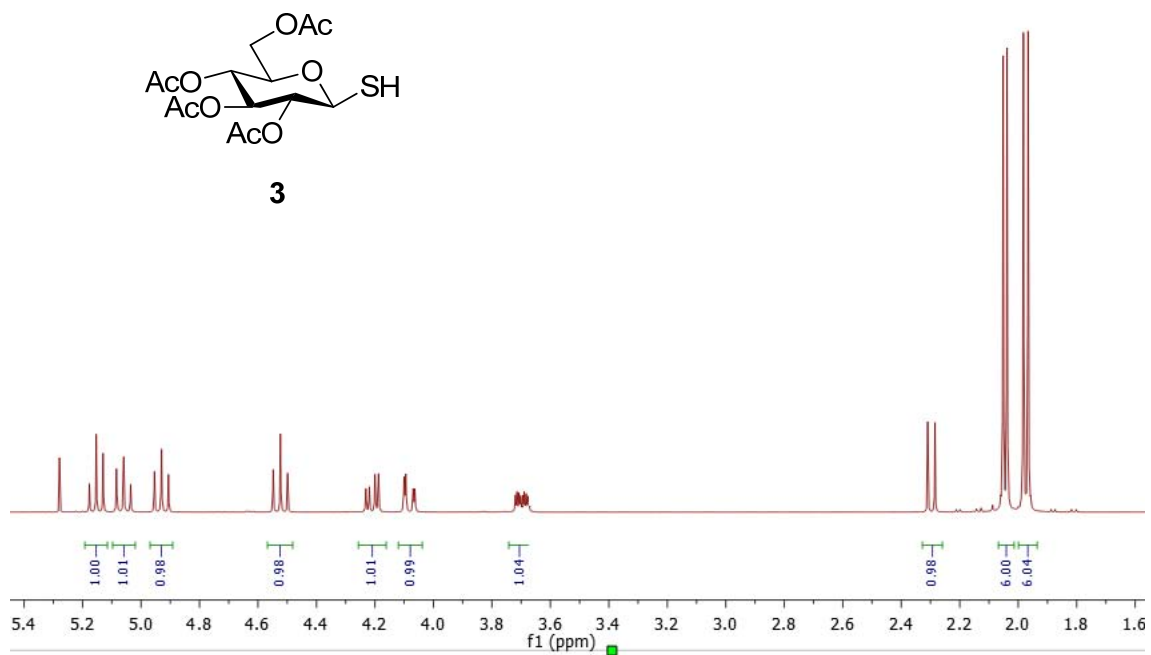


Ilustración 2A: ^1H -RMN (400MHz, CDCl_3)

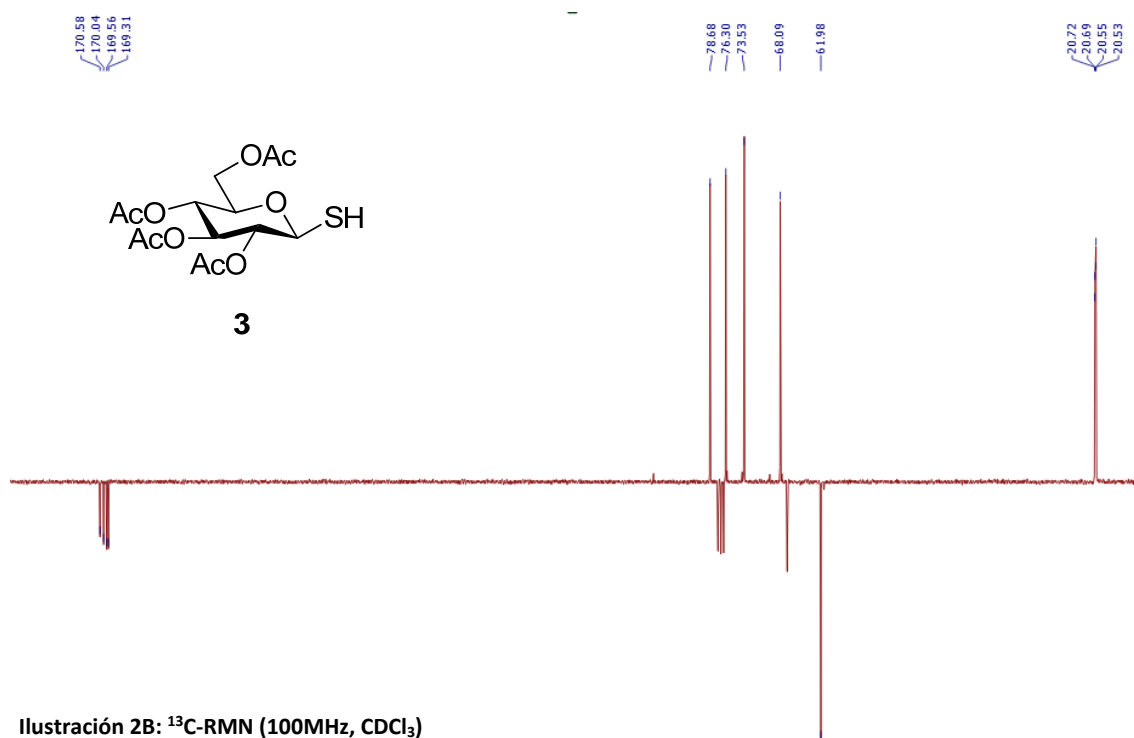


Ilustración 2B: ^{13}C -RMN (100MHz, CDCl_3)

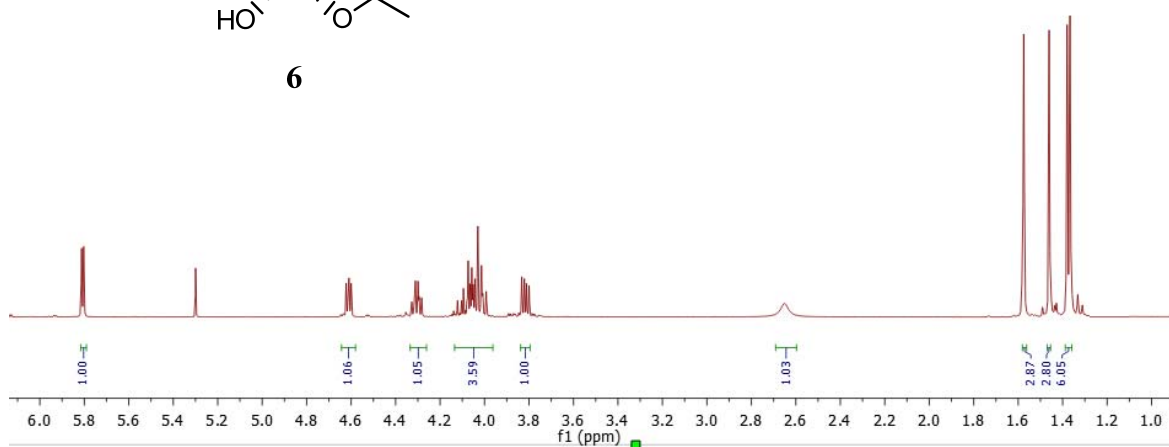
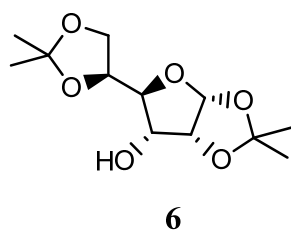


Ilustración 3A: ^1H -RMN (400MHz, CDCl_3)

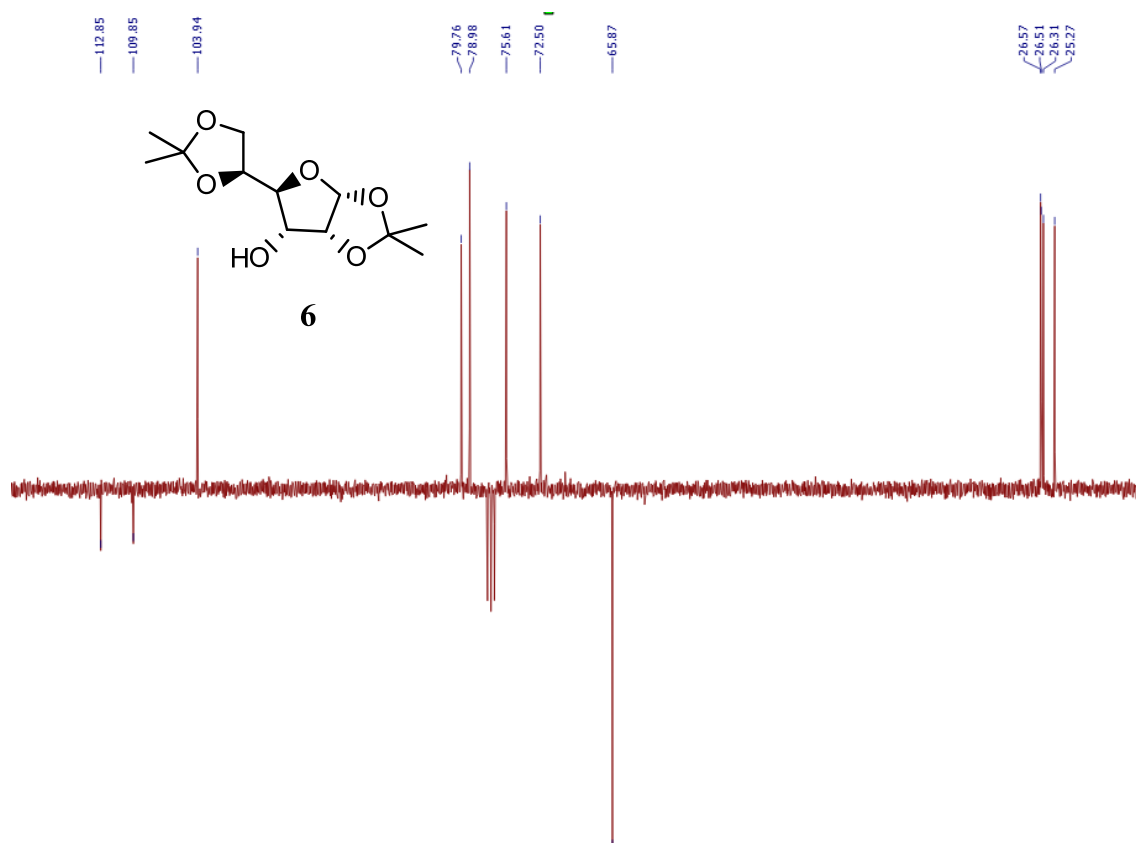


Ilustración 3B: ^{13}C -RMN (100MHz, CDCl_3)

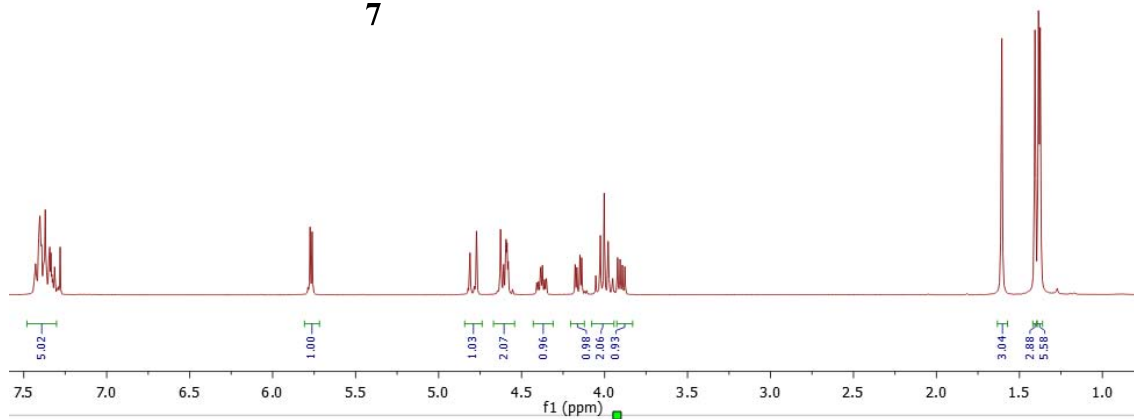
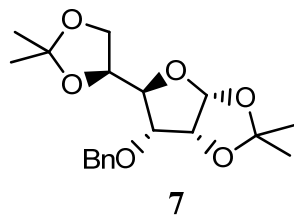


Ilustración 4A: ^1H -RMN (400MHz, CDCl_3)

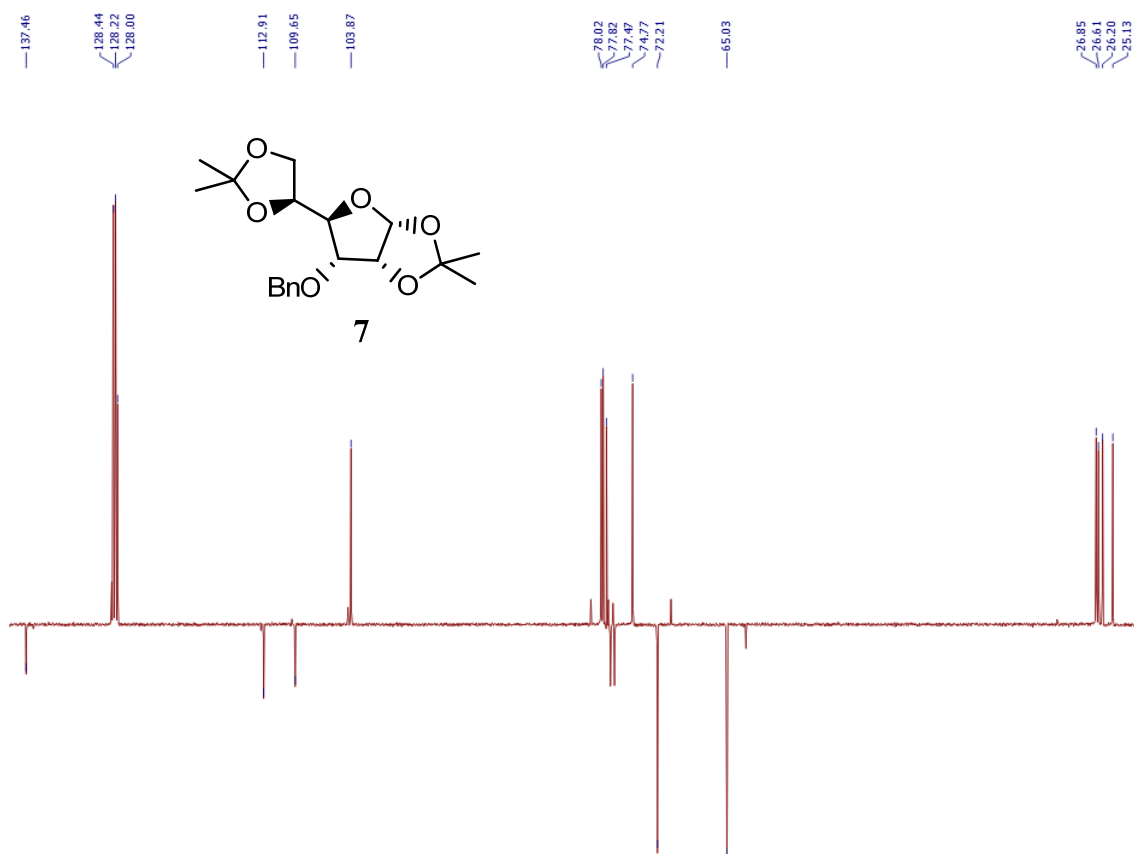
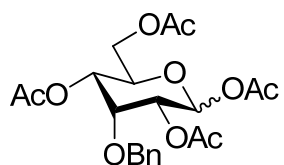


Ilustración 4B: ^{13}C -RMN (100MHz, CDCl_3)



9 (Anómeros + B)

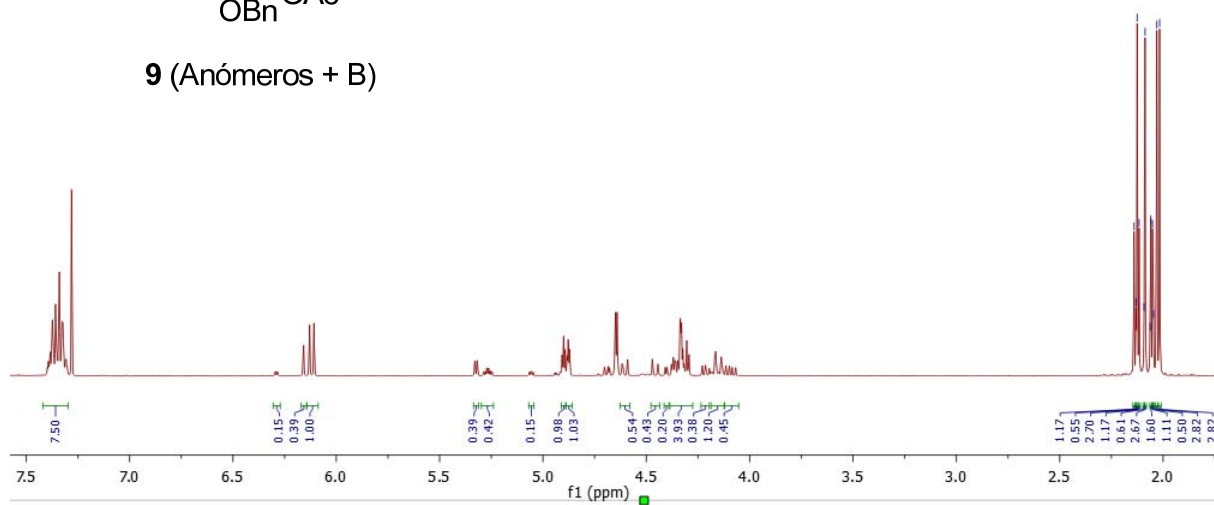


Ilustración 5: ^1H -RMN (400MHz, CDCl_3)

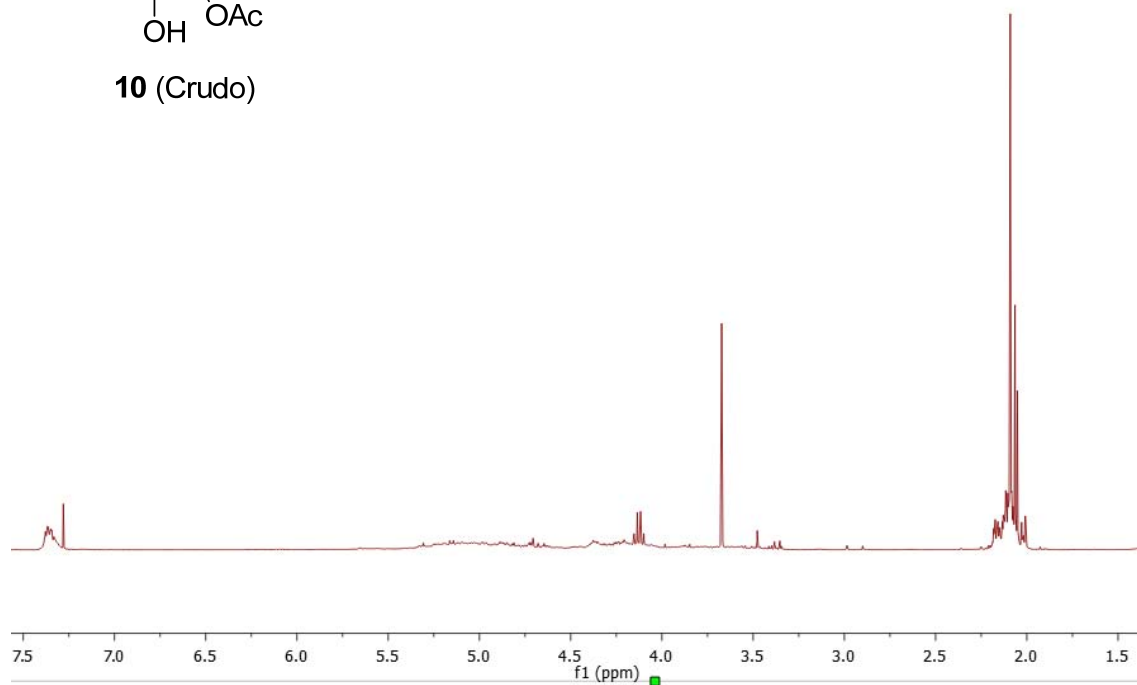
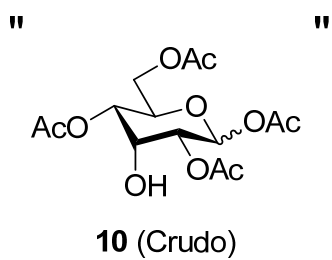


Ilustración 6: ^1H -RMN (400MHz, CDCl_3)

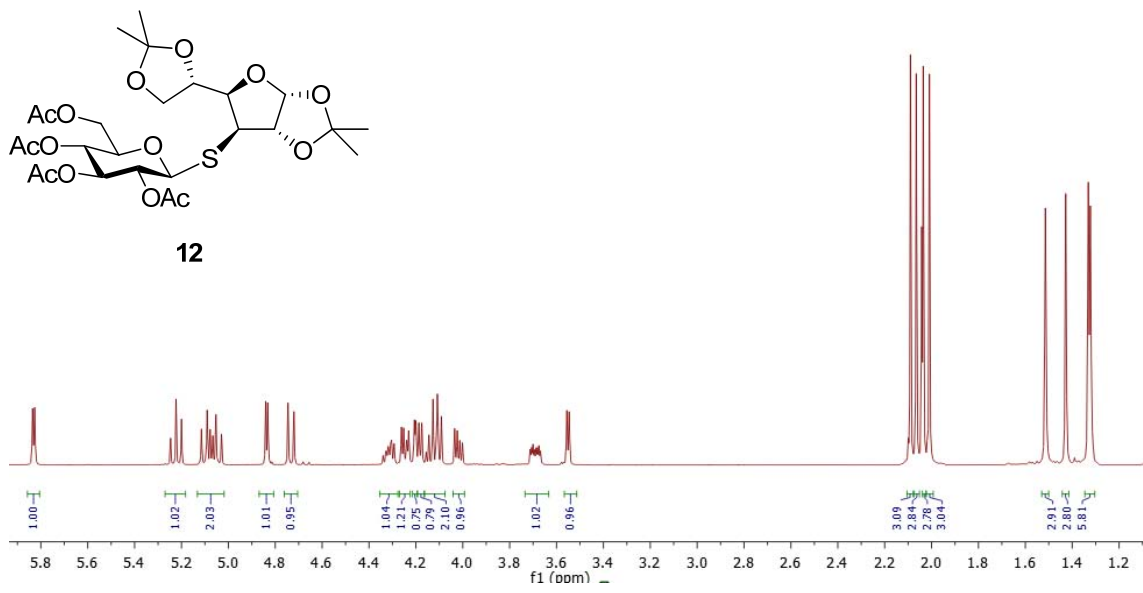


Ilustración 7A: ¹H-RMN (400MHz, CDCl₃)

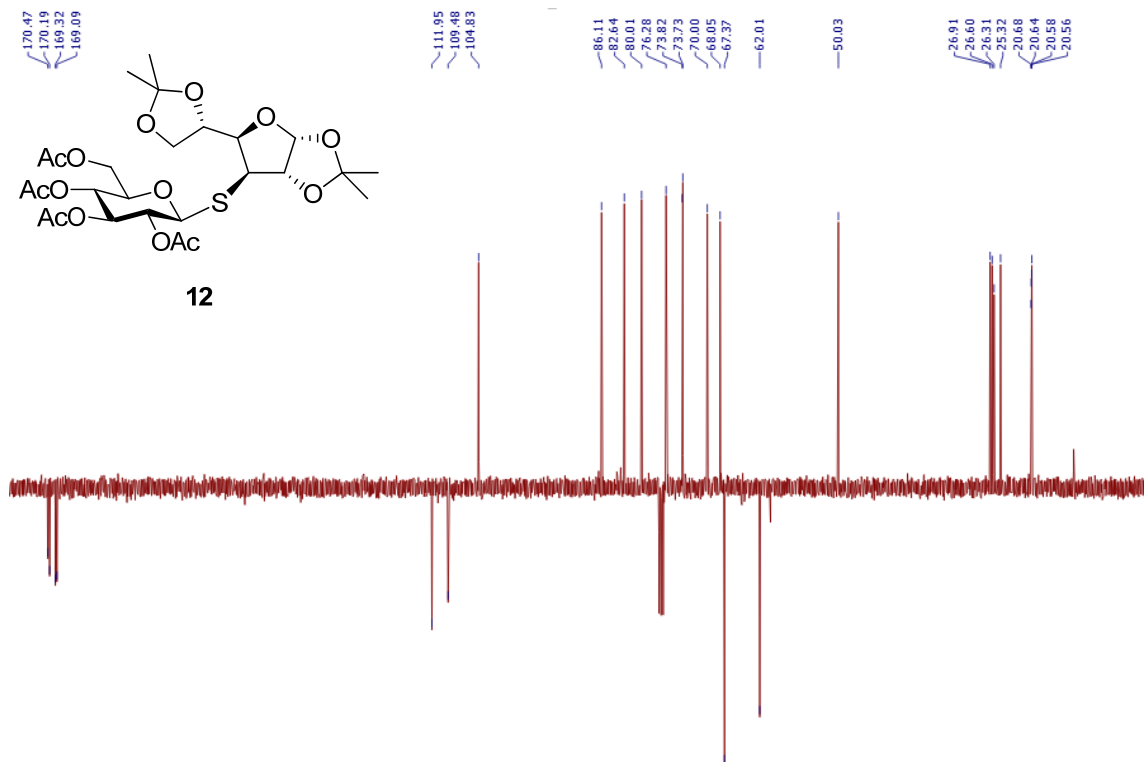
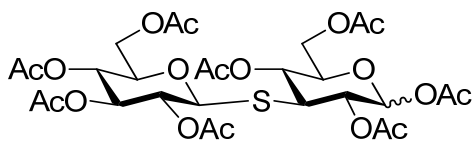


Ilustración 7B: ¹³C-RMN (100MHz, CDCl₃)



14

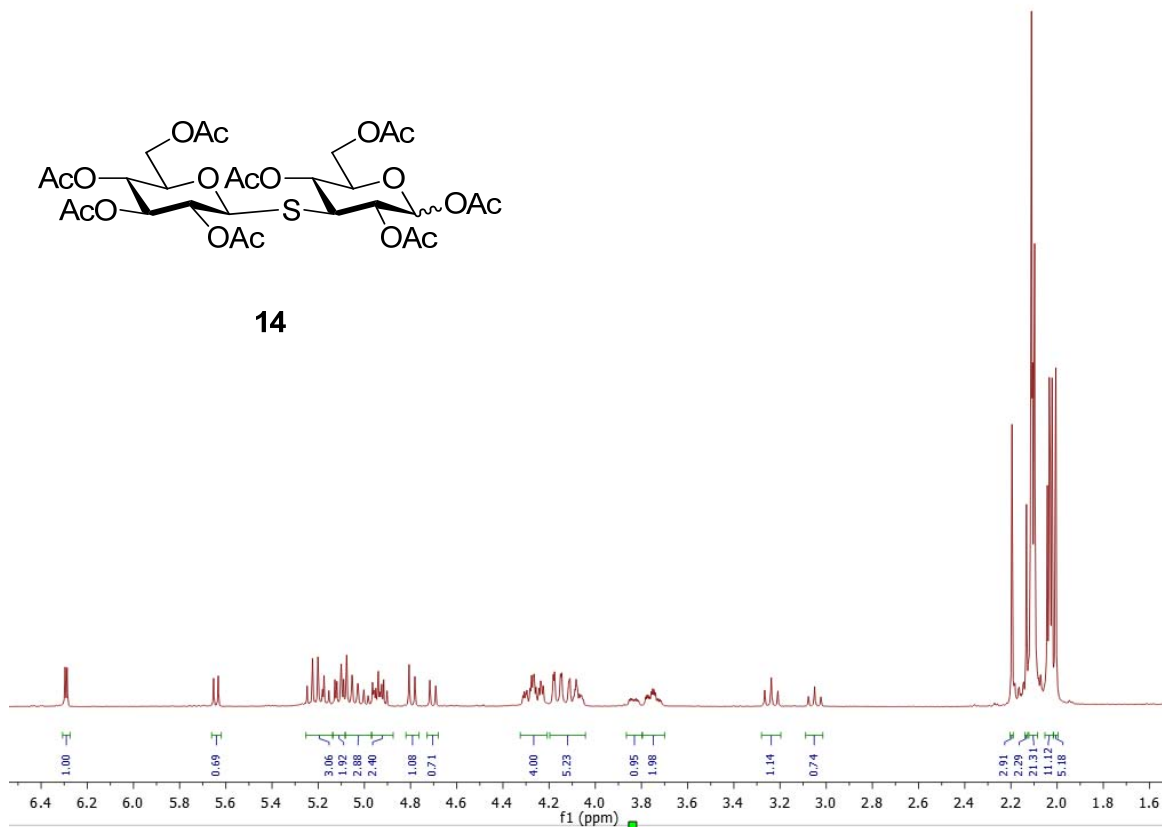
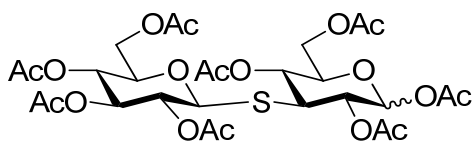


Ilustración 8A: ¹H-RMN (400MHz, CDCl₃)



14

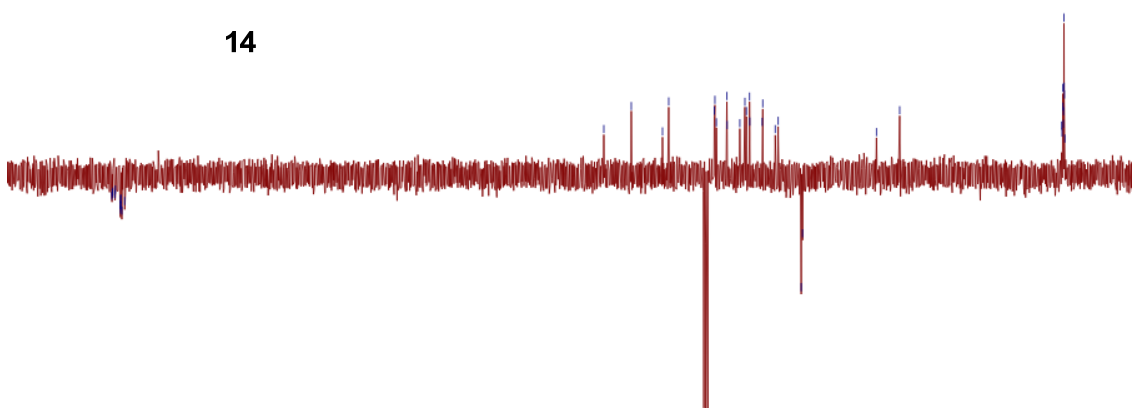


Ilustración 8B: ¹³C-RMN (100MHz, CDCl₃)