



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

# **Síntesis de *N*-glucosilaminoácidos empleando el anhídrido cíclico del ácido propilfosfónico T3P<sup>®</sup> como agente acoplante**

**Sandra Milena Pinzón Martín**

Universidad Nacional de Colombia  
Facultad de Ciencias, Departamento de Química  
Ciudad, Colombia

2016



# **Síntesis de *N*-glucosilaminoácidos empleando el anhídrido cíclico del ácido propilfosfónico T3P<sup>®</sup> como agente acoplante**

**Sandra Milena Pinzón Martín**

Tesis de maestría presentada como requisito parcial para optar al título de:

**Magister en Ciencias - Química**

Director:

PhD., Javier Eduardo García Castañeda

Línea de Investigación:

Síntesis de glicoaminoácidos

Grupo de Investigación:

Síntesis y aplicación de moléculas peptídicas (SAMP)

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias, Departamento de Química

Bogotá, Colombia

2016



*Dedicatoria*

*A la persona más importante de mi vida.*



## Agradecimientos

A la Universidad Nacional de Colombia-Sede Bogotá y al grupo de investigación Síntesis y Aplicación de Moléculas Peptídicas (SAMP), por permitirme desarrollar esta tesis de maestría.

A la Vicerrectoría académica y al programa de maestría en ciencias química por el financiamiento otorgado durante mis estudios, a través de la beca asistente docente.

A la División de Investigación Sede Bogotá por el financiamiento del proyecto "*Diseño y síntesis química de péptidos y glicoconjugados y evaluación de la actividad antibacteriana contra Escherichia coli ATCC 25922.*", código 34828 de la convocatoria nacional de proyectos para el fortalecimiento de la investigación, creación e innovación de la Universidad Nacional de Colombia 2016-2018.

Al profesor Javier García director de este trabajo por su colaboración, acompañamiento incondicional, paciencia, comprensión y disposición constante a orientarme y enseñarme.

A la profesora Zuly Rivera por su orientación y apoyo durante la realización de este trabajo.

A mis padres Darier y María del Carmen, mis hermanos Jaime y Paola por su apoyo, paciencia, comprensión y la fortaleza que me dieron durante los momentos más difíciles en el desarrollo de mi maestría. Gracias por cada palabra de apoyo, cada aliento, cada abrazo y beso que llenaron mi corazón con la fuerza que necesitaba.

A los laboratoristas que en algún momento colaboraron en el desarrollo de este proyecto: Héctor Castillo del laboratorio de Orgánica y Rigoberto Pedreros del laboratorio de Análisis instrumental del departamento de Farmacia. En especial quiero agradecer a Katherine Jaramillo del laboratorio de RMN por la colaboración brindada.

A Alejandro Lara por todo el apoyo y la colaboración que me brindó durante gran parte de la realización de este proyecto.

A mi amigo Jicli Rojas quien me acompañó y apoyó durante este proceso.

Finalmente, a las personas que en algún momento me acompañaron, enseñaron y aportaron a este proyecto.



## Resumen

Se realizó la síntesis y caracterización por Resonancia Magnética Nuclear y cromatografía RP-HPLC de los *N*-glucosilaminoácidos: Fmoc-Phe-O-(2,3,4,6-tetra-O-Acetil- $\beta$ -D-*N*-glucopiranosil), Fmoc-Leu-O-(2,3,4,6-tetra-O-Acetil- $\beta$ -D-*N*-glucopiranosil), Fmoc-Lys-(Boc)-O-(2,3,4,6-tetra-O-Acetil- $\beta$ -D-*N*-glucopiranosil), Fmoc-Asp-(OtBu)-O-(2,3,4,6-tetra-O-Acetil- $\beta$ -D-*N*-glucopiranosil), L-Phe-O- $\beta$ -1*N*(D-glucopiranosil), L-Leu-O- $\beta$ -1*N*(D-glucopiranosil), L-Lys-O- $\beta$ -1*N*(D-glucopiranosil) y Asp-O- $\beta$ -1*N*(D-glucopiranosil). La síntesis de estos *N*-glucosilaminoácidos no ha sido reportada hasta el momento. Se diseñó e implementó la ruta sintética utilizando metodologías más amigables con el medio ambiente. Fue posible identificar los puntos críticos de la ruta sintética y buscar estrategias de mejora.

Los resultados obtenidos muestran que la metodología empleada puede ser considerada como una alternativa viable y novedosa para la obtención de glucoconjugados aminoácido-carbohidrato. Este trabajo contribuirá al diseño y obtención de *N*-glucosilaminoácidos que pueden ser considerados para estudios de la inhibición de la adhesión de *Pasteurella Multocida* a tejido epitelial de conejo.

**Palabras clave:** T3P®, glicoconjugados, *N*-glucosilaminoácidos, enlace glicosídico, glicosilaminas, glicosil azidas.

## Abstract

The synthesis and characterization by Nuclear Magnetic Resonance and RP-HPLC chromatography of N-glycosyl amino acids were performed. The N-glycosyl amino acids obtained were: Fmoc-Phe-(2,3,4,6-tetra-O-acetyl- $\beta$ -D-N-glucopyranose), Fmoc-Leu--(2,3,4,6-tetra-O-acetyl- $\beta$ -D-N-glucopyranose), Fmoc-Lys-(Boc)-O-(2,3,4,6-tetra-O-acetyl- $\beta$ -D-N-glucopyranose), Fmoc-Asp-(OtBu)-O-(2,3,4,6-tetra-O-Acetil- $\beta$ -D-N-glucopyranose), L-Phe-O- $\beta$ -1N(D-glucopyranose), L-Leu-O- $\beta$ -1N(D-glucopyranose), L-Lys-O- $\beta$ -1N(D-glucopyranose) and Asp-O- $\beta$ -1N(Dglucopyranose). Until now, the synthesis of these N-glycosyl amino acids has not been reported in literature. The synthetic route was designed and performed using environmentally-friendlier methodologies. It was possible to identify the critical points in the synthetic route and to look for improvement strategies.

The obtained results showed that the methodology carried out can be considered as a viable and novel alternative for the obtention of glicoconjugates amino acid-carbohydrate. The present work will contribute to the design and obtention of N-glucosyl amino acids that could be used to evaluate adhesion inhibition of *Pasteurella multocida* to rabbit epithelial tissue.

**Keywords:** T3P®, glicoconjugate, N-glucosyl amino acids, glycosidic bond, glucosylamines, glucosylazide.

# Contenido

<b>Resumen</b>	.....	<b>9</b>
<b>Lista de figuras</b>	.....	<b>XIII</b>
<b>Lista de tablas</b>	.....	<b>XVI</b>
<b>Lista de Símbolos y abreviaturas</b>	.....	<b>XVII</b>
<b>Introducción</b>	.....	<b>21</b>
<b>1. Referente conceptual</b>	.....	<b>25</b>
1.1	Importancia de los carbohidratos en las glicoproteínas y glicoconjugados.....	25
1.2	Carbohidratos como mediadores de la interacción célula-patógeno en procesos infecciosos .....	26
1.3	Síntesis química de glicoconjugados aminoácido-carbohidrato .....	29
<b>2. Materiales y métodos</b>	.....	<b>35</b>
2.1	Disolventes y reactivos.....	35
2.2	Instrumentación .....	35
2.2.1	Espectroscopía infrarroja (FT-IR) .....	35
2.2.2	Resonancia magnética nuclear .....	35
2.2.3	Punto de fusión (p.f.).....	36
2.2.4	Cromatografía líquida.....	36
<b>3. Sección experimental</b>	.....	<b>37</b>
3.1	Síntesis de 1,2,3,4,6-penta-O-acetil- $\alpha$ -D-glucopiranososa (1) .....	38
3.2	Síntesis de 2,3,4,6-tetra-O-acetil- $\beta$ -D-glucopiranosilazida (2).....	39
3.3	Síntesis de 2,3,4,6-tetra-O-acetil- $\beta$ -D-glucopiranosilamina .....	40
3.4	Síntesis de N-glucosilaminoácidos.....	41
3.4.1	Determinación de las condiciones óptimas para la síntesis de N-glucosilaminoácidos .....	41
3.4.2	Fmoc-Phe-O-(2,3,4,6-tetra-O-Acetil- $\beta$ -D-N-glucopiranosil) (4) (C <sub>38</sub> H <sub>40</sub> N <sub>2</sub> O <sub>12</sub> , PM: 716.22 g/mol).....	42
3.4.3	Fmoc-Leu-O-(2,3,4,6-tetra-O-Acetil- $\beta$ -D-N-glucopiranosil) (5) (C <sub>35</sub> H <sub>42</sub> N <sub>2</sub> O <sub>12</sub> , PM: 682,3 g/mol) .....	43
3.4.4	Fmoc-Lys-(Boc)-O-(2,3,4,6-tetra-O-Acetil- $\beta$ -D-N-glucopiranosil) (6) (C <sub>40</sub> H <sub>51</sub> N <sub>3</sub> O <sub>14</sub> , PM: 797,34 g/mol).....	43
3.4.5	Fmoc-Asp-(OtBu)-O-(2,3,4,6-tetra-O-Acetil- $\beta$ -D-N-glucopiranosil) (7) (C <sub>37</sub> H <sub>44</sub> N <sub>2</sub> O <sub>14</sub> , PM: 740.28 g/mol).....	44
3.5	Esquema de desprotección N-glucosilaminoácidos .....	44
3.5.1	Asp-O- $\beta$ -1-N(D-glucopiranosil) (11).....	45
3.5.2	L-Phe-O- $\beta$ -1N(D-glucopiranosil) (8).....	46
3.5.3	L-Leu-O- $\beta$ -1N(D-glucopiranosil) (9).....	46

3.5.4	L-Lys-O- $\beta$ -1N(D-glucopiranosil) (11).....	46
3.5.5	Cromatografía analítica .....	47
3.5.6	Purificación mediante RP-SPE.....	47
3.5.7	Test de Kaiser .....	47
<b>4.</b>	<b>Resultados y Discusión.....</b>	<b>49</b>
4.1	Síntesis de 1,2,3,4,6-penta-O-acetil- $\alpha$ -D-glucopiranososa (1).....	51
4.2	Síntesis de 2,3,4,6-tetra-O-acetil- $\beta$ -D-glucopiranosilazida (2) .....	55
4.3	Síntesis de N-glucosilaminoácidos.....	59
4.3.1	Determinación de las condiciones óptimas para el monitoreo de las reacciones por RP-HPLC. ....	59
4.3.2	Determinación de las condiciones óptimas para la purificación de los N-glucosilaminoácidos (4 a 7) .....	64
4.3.3	Determinación de las condiciones óptimas para la síntesis de N-glucosilaminoácidos (4 a 7) .....	67
4.3.4	Síntesis de Fmoc-Phe-O-(2,3,4,6-tetra-O-Acetil- $\beta$ -D-N-glucopiranosil) (4) .....	76
4.3.5	Síntesis de Fmoc-Leu-O-(2,3,4,6-tetra-O-Acetil- $\beta$ -D-N-glucopiranosil) (5) .....	84
4.3.6	Síntesis de Fmoc-Lys(Boc)-O-(2,3,4,6-tetra-O-Acetil- $\beta$ -D-N-glucopiranosil) (6) .....	87
4.3.7	Síntesis de Fmoc-Asp(OtBu)-O-(2,3,4,6-tetra-O-Acetil- $\beta$ -D-N-glucopiranosil) (7) .....	90
4.4	Síntesis de N-glucosilaminoácidos desprotegidos (8), (9), (10), (11). .....	94
4.4.1	Síntesis de Asp-O- $\beta$ -1N-(D-glucopiranosil) (11) .....	94
4.4.2	Síntesis de Phe- $\beta$ -D-N-glucopiranosil .....	103
4.4.3	Síntesis de Lys- $\beta$ -D-N-glucopiranosil).....	106
4.4.4	Síntesis de Leu- $\beta$ -D-N-glucopiranosil) .....	108
4.4.5	Aspectos generales síntesis de N-glucosilaminoácidos .....	110
<b>5.</b>	<b>Conclusiones y recomendaciones.....</b>	<b>113</b>
5.1	Conclusiones.....	113
<b>A.</b>	<b>Anexo: Caracterización química de 1,2,3,4,6-penta-O-acetil-<math>\alpha</math>-D-glucopiranososa ...</b>	<b>117</b>
<b>B.</b>	<b>Anexo: Caracterización química de 2,3,4,6-tetra-O-acetil-<math>\beta</math>-D-glucopiranosilazida</b>	<b>121</b>
<b>C.</b>	<b>Anexo: Determinación de las condiciones óptimas para la síntesis de N-glucosilaminoácidos .....</b>	<b>126</b>
<b>D.</b>	<b>Anexo: Caracterización química de N-glucoaminoácido derivado de Leu.....</b>	<b>129</b>
<b>E.</b>	<b>Anexo: Caracterización química de N-glucoaminoácido derivado de Lys.....</b>	<b>141</b>
<b>F.</b>	<b>Anexo: Caracterización química de N-glucoaminoácido derivado de Asp .....</b>	<b>156</b>
<b>G.</b>	<b>Anexo: Caracterización química de N-glucoaminoácido derivado de Phe .....</b>	<b>165</b>
<b>Bibliografía</b>	<b>.....</b>	<b>181</b>

## Lista de figuras

Figura 1. Ruta sintética para obtención de N-glucosilaminoácidos .....	37
Figura 2. Reacción de acetilación con D-glucosa utilizando ácido perclórico y anhídrido acético.....	38
Figura 3. Reacción de síntesis de (2) utilizando TMSN <sub>3</sub> y SnCl <sub>4</sub> en condiciones anhidras y atmósfera inerte .....	39
Figura 4. Reacción de síntesis de (3) utilizando Pd/C en condiciones anhidras y atmósfera de hidrógeno.....	40
Figura 5. Reacción de formación del bloque aminoácido-carbohidrato.....	42
Figura 6. Esquema de desprotección de N-glucosilaminoácidos .....	44
Figura 7. Estructura de (1) (C <sub>16</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub> ) .....	51
Figura 8. Espectro FT-IR para D- Glucosa .....	51
Figura 9. Espectro FT-IR para (1).....	52
Figura 10. Espectro RMN <sup>1</sup> H para (1).....	53
Figura 11. Espectro RMN <sup>13</sup> C para (1).....	54
Figura 12. Espectro RMN <sup>13</sup> C DEPT 135 para (1) .....	54
Figura 13. Estructura de (2) (C <sub>14</sub> H <sub>19</sub> N <sub>3</sub> O <sub>9</sub> ).....	55
Figura 14. Espectro <sup>1</sup> H- <sup>1</sup> H COSY para (2).....	56
Figura 15. Perfil cromatográfico Fmoc-Asp(OtBu)-OH 5%ACN .....	60
Figura 16. Perfil cromatográfico Fmoc-Asp(OtBu)-OH 15%ACN .....	60
Figura 17. Gradientes cromatográficos columna empacada.....	61
Figura 18. Análisis cromatográfico de (7) en columna empacada.....	62
Figura 19. Análisis cromatográfico de (7) en columna monolítica .....	63
Figura 20. Gradientes cromatográficos utilizados en la columna monolítica .....	63
Figura 21. Esquema de purificación y cromatogramas de algunas fracciones obtenidas para (4) .....	66
Figura 22. Perfil cromatográfico formación de (4) empleando TBTU/HOBt/DIPEA, 2 h de reacción.....	67
Figura 23. Perfil cromatográfico formación de (5) empleando TBTU/HOBt/DIPEA, 2 h de reacción.....	68
Figura 24. Perfil cromatográfico formación de (6) empleando TBTU/HOBt/DIPEA, 2 h de reacción .....	68
Figura 25. Perfil cromatográfico formación de (7) empleando TBTU/HOBt/DIPEA, 2 h de reacción .....	68
Figura 26. Perfil cromatográfico de Fmoc-Phe-OH .....	69

Figura 27. Perfil cromatográfico formación de (4) empleando TBTU/HOBt/DIPEA, 0 h de reacción .....	70
Figura 28. Perfil cromatográfico formación de (4) empleando TBTU/HOBt/DIPEA, 16 h de reacción .....	70
Figura 29. Perfil cromatográfico formación de (4) empleando Fmoc-Phe-OH/DIC, 0 h de reacción .....	72
Figura 30. Perfil cromatográfico formación de (4) empleando Fmoc-Phe-OH/DIC, 16 h de reacción .....	72
Figura 31. Perfil cromatográfico formación de (4) empleando Fmoc-Phe-OH/T3P®/DIPEA, 0 h de reacción .....	73
Figura 32. Perfil cromatográfico formación de (4) empleando Fmoc-Phe-OH/T3P®/DIPEA, 16 h de reacción .....	74
Figura 33. Estructura de (4) (C <sub>38</sub> H <sub>40</sub> N <sub>2</sub> O <sub>12</sub> ) .....	76
Figura 34. Perfil cromatográfico de Fmoc-Phe-OH .....	77
Figura 35. Perfil cromatográfico formación de (4) empleando Fmoc-Phe-OH/T3P®/DIPEA, 0 h de reacción .....	77
Figura 36. Perfil cromatográfico formación de (4) empleando Fmoc-Phe-OH/T3P®/DIPEA, 16 h de reacción. Columna empacada .....	77
Figura 37. Perfil cromatográfico formación de (4) empleando Fmoc-Phe-OH/T3P®/DIPEA, 16 h de reacción. Columna monolítica .....	78
Figura 38. Perfil cromatográfico formación de (4) purificado por RP-SPE. Columna monolítica .....	78
Figura 39. Espectro RMN <sup>1</sup> H para (4) .....	79
Figura 40. Ampliación espectro RMN <sup>1</sup> H para (4) .....	79
Figura 41. Ampliación espectro RMN <sup>1</sup> H de (4) .....	81
Figura 42. Espectro <sup>13</sup> C RMN para (4) .....	81
Figura 43. Espectro <sup>13</sup> C DEPT 135 para (4) .....	82
Figura 44. Espectro <sup>1</sup> H- <sup>1</sup> H COSY RMN para (4) .....	82
Figura 45. Estructura química de (5). (C <sub>35</sub> H <sub>42</sub> N <sub>2</sub> O <sub>12</sub> ) .....	84
Figura 46. Estructura de (6) (C <sub>40</sub> H <sub>51</sub> N <sub>3</sub> O <sub>14</sub> ) .....	87
Figura 47. Estructura de (7) (C <sub>37</sub> H <sub>44</sub> N <sub>2</sub> O <sub>14</sub> ) .....	90
Figura 48. Estructura de N-glucosilaminoácido (8) desprotegido .....	94
Figura 49. Perfil cromatográfico (7) .....	95
Figura 50. Perfil cromatográfico de (7a) producto obtenido de la desprotección de la cadena lateral de (7) .....	95
Figura 51. Perfil cromatográfico del producto de la reacción de remoción del grupo Fmoc de (7a) para obtener (7b) monitoreada a 210 nm .....	96
Figura 52. Perfil cromatográfico del producto de la reacción de remoción del grupo Fmoc de (7a) para obtener (7b) monitoreada a 302 nm .....	96
Figura 53. Producto de la reacción de desacetilación de (7b) para obtener (11) .....	97
Figura 54. Producto (11) purificado por RP-SPE .....	97
Figura 55. Espectro RMN <sup>1</sup> H para (11) .....	98
Figura 56. Espectro <sup>1</sup> H- <sup>1</sup> H COSY RMN para (11) .....	99

---

Figura 57. Espectro $^{13}\text{C}$ RMN para (11).....	100
Figura 58. Espectro $^{13}\text{C}$ DEPT 135 para (11).....	100
Figura 59. Espectro $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ HMQC para (11).....	101
Figura 60. Espectro $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ RMN HMBC para (11) .....	101

## Lista de tablas

Tabla 1. Comparación de los tiempos de corrida y los tiempos de retención para los compuestos (4 a 7) utilizando la columna empacada y la columna monolítica .....	62
Tabla 2. Comparación ventajas agentes acoplantes para SPFS .....	74
Tabla 3. Desplazamientos químicos (ppm) para N-glucosilaminoácidos protegidos.....	93
Tabla 4. Comparación desplazamiento químicos (ppm) $^{13}\text{C}$ para (5) y (9) .....	109
Tabla 5. Porcentaje de rendimiento para compuestos obtenidos .....	110
Tabla 6. Comparación desplazamientos química ppm RMN $^1\text{H}$ para las moléculas obtenidas .....	111
Tabla 7. Comparación señales RMN $^{13}\text{C}$ (ppm) para los N-glucosilaminoácidos desprotegidos .....	112

## Lista de Símbolos y abreviaturas

### Símbolos con letras latinas

Símbolo	Término	Unidad SI	Definición
$T$	Temperatura	K	$DF$
$H$	Hora	s	$DF$
$Hz$	Frecuencia	Hz	$1/t$
$cm^{-1}$	Número de onda	$cm^{-1}$	$1/\lambda$
$Mg$	Miligramos	Kg	<i>Masa</i>
$ml$	Mililitros	$m^3$	
$Mmol$	Milimol	mol	$1 \times 10^{-3} mol$
$J$	Constante de acoplamiento	Hz	$1/t$
ppm	Partes por millón		

### Símbolos con letras griegas

Símbolo	Término	Unidad SI	Definición
$\alpha_{\square\square}$	Configuración - nomenclatura		
$\beta_{\square}$	Configuración - nomenclatura		
$\mu$	Micro	$m^3$	
$\lambda$	Longitud de onda	m	

### Abreviaturas

Abreviatura	Término
ACN	Acetonitrilo
Asp	Ácido aspártico
Boc	tert-butiloxycarbonilo
CCF	Cromatografía en capa fina

---

COSY	Correlation spectroscopy
CDCI	Cloroformo deuterado
DCC	1,3-Diciclohexilcarbodiimida
DCM	Diclorometano
DEPT	Distortionless enhancement polarization transfer
DIC	Diisopropilcarbodiimida
DIPEA	Diisopropiletanolamina
DMF	N,N-Dimetilformaamida
EtOH	Etanol
Fmoc	9-Fluorenilmetoxicarbonilo
FT-IR	Espectroscopia Infrarroja (Fourier Transform Infrared Spectroscopy)
GlcNac	N-acetil glucosilamina
HATU	N-óxido-N-[(Dimetilamino)-1H-1,2,3-triazol[4,5b]piridino-1-il-metilen]-N-metil-metano amonium hexafluorofosfato
HMBC	Heteronuclear multiple bond correlation
HMQC	Hetronuclear correlation through multiple quantum
HOAt	1-Hidroxi-7-azabenzotriazol
HOBT	1-Hidroxibenzotriazol
KCN	Cianuro de potasio
Leu	Leucina
Phe	Fenil alanina
RMN	Resonancia magnética nuclear
Rf	Factor de retención
d	Doblete
dd	Doble doblete
t	Triplete
m	Multiplete
s	Singlete
Ac	Grupo acetil
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
RP-HPLC	Cromatografía líquida en fase reversa (Reverse Phase High Performance Liquid Chromatography)
rpm	Revoluciones por minuto

---

RP-SPE Extraction)	Extracción en fase sólida en fase reversa (Reverse Phase Solid Phase
SPFS	Síntesis en fase sólida de péptidos
TA	Temperatura ambiente
t-Boc	terbutiloxicarbonilo
TBTU	2-(1H-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium tetrafluoroborate
tBu	Terbutilo
T3P®	
TFA	Ácido trifluoro acético
TMSN <sub>3</sub>	Trimetilsililazida
t <sub>R</sub>	Tiempo de retención



# Introducción

Los animales de crianza son importantes ya que constituyen una fuente importante de alimentos (productos lácteos, cárnicos y huevos que aportan proteínas, vitaminas y otros nutrientes). Además proporcionan materias primas para otros renglones de la economía como la industria textil, del calzado, entre otros.<sup>1</sup> En Colombia los animales de crianza son parte importante de la economía, ya que varias especies son criadas y explotadas para producir alimentos y materias primas (ganadería, piscicultura, avicultura, cunicultura, etc.). La Organización de las Naciones Unidas para la alimentación y la agricultura FAO considera en la cunicultura una alternativa viable para solucionar los problemas nutricionales de la población en los países en desarrollo. La FAO y otras organizaciones, han apoyado los proyectos de cunicultura en estos países porque responden perfectamente a los criterios de sostenibilidad.<sup>2</sup>

La cunicultura es viable debido a que los conejos tienen alta prolificidad y aprovechan mejor los forrajes de plantas en su alimentación. El conejo puede asimilar parte de las proteínas contenidas en las plantas ricas en celulosa, transformando hasta el 20% de las proteínas absorbidas en carne comestible. La producción de carne de conejo es valiosa porque provee alto rendimiento en el suministro de proteínas.<sup>2</sup> Sin embargo la rentabilidad económica de la industria de la cunicultura se ve afectada por la mortalidad en las cadenas de producción asociada a infecciones bacterianas. Las enfermedades respiratorias producidas por bacterias son una de las mayores causas de morbilidad y mortalidad en las líneas de producción de animales para consumo humano.<sup>1,3</sup> Los tratamientos de estas enfermedades son muy costosos y el sacrificio de los animales en las líneas de producción genera pérdidas significativas.<sup>4,5</sup> Uno de los organismos causantes de enfermedades infecciosas en las vías respiratorias es *Pasteurella Multocida*, una bacteria que afecta animales de crianza como ganado ovino, caprino, porcinos, aves y conejos, etc.<sup>6</sup> *P. multocida* es un microorganismo que hace parte de la flora orofaríngea de los conejos.<sup>3,6,7,8</sup> Sin embargo, bajo ciertas condiciones ambientales, esta bacteria prolifera indiscriminadamente en el tracto respiratorio causando infecciones que conllevan a

procesos de inflamación y enfermedades respiratorias como rinitis, neumonía, otitis media, mertritis, orquitis, abscesos subcutáneos y la muerte.<sup>3,9</sup> Se ha demostrado que la adhesión del patógeno a los tejidos del hospedero es el prerequisite para que ocurra la infección, en el caso de *P. Multocida* esta adhesión es mediada por lectinas de la superficie bacteriana. Las lectinas se unen a los carbohidratos de las glicoproteínas y glicolípidos de la superficie de los tejidos del hospedero.<sup>10</sup> Teniendo en cuenta el mecanismo de adhesión bacteriana, se ha planteado el enfoque de la “terapia anti-adhesiva” (aproximación ecológica), donde se busca retirar la bacteria del tracto respiratorio de los animales sin destruirla. Esta aproximación consiste en prevenir la unión o adhesión de la bacteria a los tejidos del hospedero. Estudios han mostrado que los carbohidratos pueden inhibir la adhesión bacteriana y se considera que estas moléculas son ideales para este propósito ya que presentan baja toxicidad y no inducen respuestas inmunes, porque se encuentran normalmente en los organismos. En algunos estudios ha sido demostrado el potencial clínico de los carbohidratos como agentes profilácticos o para tratar infecciones mediadas por los mecanismos de adhesión.<sup>11</sup>

El grupo de investigación de patobiología veterinaria de la Facultad de Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional de Colombia ha realizado ensayos de inhibición de la adhesión de *P. multocida* en explantes de septo nasal de conejo utilizando N-acetilglucosamina y N-acetilgalactosamina. Los resultados obtenidos han sido positivos ya que muestran que estos monosacáridos son capaces de inhibir la adhesión de la bacteria al tejido epitelial (septo nasal). Los conejos tratados con estos azúcares presentaron menor sintomatología, sugiriendo que es posible prevenir y/o tratar infecciones bacterianas utilizando monosacáridos. Estos estudios están en concordancia con lo reportado por Glorioso,<sup>7</sup> que sugiere que la inhibición de la adhesión de *P. multocida* producida por N-acetil-D-glucosamina esta mediada por la unión con el receptor de adhesina en células Hela y células hospederas de la faringe.<sup>7</sup> Aunque estos resultados son alentadores, es necesario desarrollar moléculas con mayor actividad inhibitoria de la adhesión bacteriana, que tengan mayor tiempo de vida media (estabilidad a las condiciones fisiológicas, resistentes a la degradación proteolítica y que no sean eliminadas rápidamente), que no desarrollen una respuesta inmune y que puedan ser administrados a grandes poblaciones.

Los grupos de investigación de Patobiología Veterinaria y SAMP se propusieron diseñar y sintetizar glicoconjugados que puedan ser utilizados como agentes terapéuticos que inhiban la adhesión de *P. multocida* en ensayos *ex vivo* e *in vivo* en conejos. Teniendo en cuenta las características particulares del patógeno, el hospedero y el proceso de infección, se fijaron los siguientes parámetros que deberían tenerse en cuenta en el diseño de los glicoconjugados:

- 1.- *La molécula debería contener un monosacárido (D-glucosa, D-manosa o D-galactosa)*
- 2.- *La molécula debería ser pequeña para no inducir una respuesta inmune del hospedero.*
- 3.- *La molécula debería facilitar la administración a grandes poblaciones de animales por medio de aspersión o administración intranasal.*
- 4.- *La obtención de esta molécula no debería representar tantos gastos económicos.*

Los glicoconjugados deberían estar formados por moléculas que no generen resistencia bacteriana y que sean amigables y seguras. Se propuso sintetizar glicoconjugados formados por un monosacárido y un aminoácido, ya que ambas moléculas no son extrañas para el hospedero. Se plantea entonces el macro proyecto que contiene las siguientes etapas:

- 1.- Estudiar la viabilidad de la síntesis química de glicoconjugados aminoácido-monosacárido utilizando como modelo experimental la D-glucosa y cuatro aminoácidos que tienen diferentes propiedades fisicoquímicas (L-Fenilalanina, L-Ácido aspártico, L-Lisina y L-Leucina).
- 2.- Una vez establecidas las condiciones y la ruta sintética de los glicoconjugados de glucosa sintetizar los análogos con D-manosa y D-galactosa.
- 3.- Los glicoconjugados obtenidos serán evaluados en ensayos *ex-vivo* con explantes de conejo y las moléculas que presenten mayor actividad serán utilizados en ensayos *in vivo*. Estas metodologías están estandarizadas y son de la experticia del grupo Patobiología Veterinaria.

En este trabajo se realizó la etapa 1, se sintetizaron y caracterizaron los siguientes glicoconjugados derivados de D-glucosa (empleando aminoácidos de naturaleza polar y

no polar-hidrofóbico): L-Phe-O- $\beta$ -1N(D-glucopiranosil), L-Leu-O- $\beta$ -1N(D-glucopiranosil), y L-Lys-O- $\beta$ -1N(D-glucopiranosil) y L-Asp-(OH)-O- $\beta$ -1N(D-glucopiranosil).

# 1. Referente conceptual

## 1.1 Importancia de los carbohidratos en las glicoproteínas y glicoconjugados

Los carbohidratos forman un grupo de biomoléculas complejas con diversas funciones biológicas, siendo las fuentes primarias de energía de los sistemas biológicos y los principales componentes estructurales de las plantas.<sup>12</sup> Tradicionalmente, los carbohidratos se consideraron exclusivamente como moléculas que almacenaban energía y como componentes estructurales. Sin embargo, esta hipótesis fue reevaluada en 1963 cuando se evidenció que la proteína aislada de *Canavalia ensiformis* fue capaz de unirse a eritrocitos y que esta unión estaba mediada por carbohidratos. En 1982, la primera proteína unida a un carbohidrato fue identificada, lo que despertó interés en los roles que podían ejercer estas moléculas en los sistemas biológicos.<sup>13</sup>

Actualmente se sabe que los carbohidratos se pueden encontrar en forma libre en el medio extracelular o unidos a otras moléculas formando glicoconjugados como glicopéptidos, glicolípidos, glicoproteínas, nucleótidos, ácidos nucleicos, etc.<sup>13</sup> La posibilidad de formar gran variedad de estructuras con tan sólo un pequeño número de unidades hace posible generar moléculas con conformaciones particulares que se relacionan con actividades biológicas.<sup>12,14</sup>

Los carbohidratos están relacionados con procesos biológicos, como diferenciación celular, señalización, marcación biológica, rutas metabólicas, adhesión celular, y en las interacciones receptor-ligando en los procesos de infección causado por bacterias, parásitos, hongos y virus. También están involucrados en el reconocimiento inmunológico de células tumorales y tejidos extraños, entre otras.<sup>12</sup> Los carbohidratos y los aminoácidos son usados como unidades de bloques para construir un vasto grupo de biomoléculas; pueden unirse para formar nuevas moléculas, naturales o no.<sup>15</sup> Los glicoconjugados son las moléculas más diversas en la naturaleza, tanto en estructura como en funcionalidad. Se ha establecido que las proteínas y los lípidos que contienen sacáridos tienen roles esenciales en procesos biológicos como fertilización, embriogénesis, desarrollo neuronal, actividad hormonal, proliferación de células y en la formación de tejidos.<sup>16</sup> También se ha

descrito que la glicosilación aumenta la absorción de los péptidos en el intestino delgado, disminuye la excreción y provee protección contra la degradación enzimática.<sup>17</sup> Lo anterior ha motivado el aislamiento, estudio estructural, diseño y síntesis de glicoconjugados como herramientas para el estudio fundamental de la glicobiología; ya que han sido considerados como candidatos para el desarrollo de agentes terapéuticos.<sup>14</sup>

## 1.2 Carbohidratos como mediadores de la interacción célula-patógeno en procesos infecciosos

En las últimas décadas, estudios han sugerido que los carbohidratos de la superficie celular están involucrados en procesos de reconocimiento y unión de moléculas y microorganismos. También los carbohidratos de las glicoproteínas de los patógenos pueden mediar el reconocimiento y la unión de estos durante los procesos de infección. Estudios han demostrado que los carbohidratos están involucrados en el reconocimiento y unión de patógenos como *E. coli*, *H. pylori*, *S. typhimurium*, *N. gonorrhoeae*, Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH), Virus del Ébola, Virus de la Hepatitis C, Virus de la Influenza, Parvovirus, Rotavirus, *Candida albicans*, *Plasmodium falciparum*, *Tripanosoma cruzi*, *Entamoeba histolytica*, *Cryptosporidium parvum*, entre otros.<sup>10,11,14</sup>

En el proceso de adhesión, proteínas de la superficie bacteriana (adhesinas) se unen a receptores específicos del tejido celular o la matriz extracelular.<sup>18</sup> En muchos casos estos receptores son carbohidratos asociados a proteínas de la superficie celular y se ha descrito que estas interacciones son específicas. Se han identificado adhesinas de *E. Coli*, que han sido asociadas con las infecciones del tracto urinario. Estas proteínas de adhesión exhiben afinidad por “manosidos  $\alpha$ ” como Gal $\alpha$ 1-4Gal (galabiosa) y GalNAc $\beta$ 1-4Gal. Patógenos pulmonares presentes en pacientes con fibrosis quística como *P. aeruginosa*, *H. influenzae*, *S. aureus*, *S. pneumoniae* y *K. pneumoniae*, se unen a GalNAc $\beta$ 1-4Gal, que es considerada como la secuencia mínima de adhesión.<sup>18</sup>

Los carbohidratos son utilizados en el tratamiento de enfermedades y algunos de estos medicamentos causan impacto en cáncer, diabetes, SIDA, influenza, infecciones

bacterianas y artritis reumatoidea.<sup>13</sup> Un ejemplo de estos medicamentos es la Eritromicina A (macrólido aislado de *S. erytherus*), usado para tratar infecciones respiratorias causadas por patógenos respiratorios que es ampliamente utilizado en niños. Se han identificado otros macrólidos de segunda generación que presentan menos efectos secundarios como: Roxitromicina, Telitromicina, Azitromicina y Ditromicina.<sup>19</sup>

Aminoglucósidos como Neomicina, Estreptomina y Gentamicina hacen parte de los antibióticos más antiguos conocidos.<sup>19</sup> En estos compuestos, el azúcar es relevante en el mecanismo de acción del medicamento.<sup>20</sup> Otro de los medicamentos más comunes es la Vancomicina, un glicopéptido que consta de una cadena peptídica de siete aminoácidos que forma una estructura tricíclica unida a un disacárido compuesto por Vancosamina y Glucosa. Otro medicamento es la Teicoplanina (teicomina A2), que es una mezcla de glicopéptidos que contienen un heptapéptido lineal, D-manosa y D-glucosamina, y un residuo acilo unido a ácidos grasos. Estos dos medicamentos tienen amplia actividad contra microorganismos Gram-positivos como los estafilococos.<sup>20</sup>

Algunos medicamentos utilizados clínicamente son: la Auranofina, un carbohidrato que contiene oro y es usado para el tratamiento de la artritis reumatoidea. Este fármaco se encuentra en etapas de investigación para ser aplicado en la reducción de la carga viral del VIH en las células T que permanece a pesar del tratamiento con terapia antiretroviral. La Vidarabina, un nucleósido arabinosilo, es un medicamento usado para tratar infecciones causadas por virus como Herpes simple y Varicela zoster.<sup>19</sup>

Otro ejemplo son las estrategias para el tratamiento del cáncer basadas en los carbohidratos presentes en la superficie de células cancerosas. Algunos antígenos celulares que contienen carbohidratos se han empleado para producir vacunas contra el cáncer. Los resultados han mostrado que generalmente inducen respuestas inmunes débiles, pero se sugiere la posibilidad de conjugarlos con otros antígenos para mejorar esta respuesta.<sup>21</sup>

La superficie del VIH posee carbohidratos que pueden enmascarar los antígenos virales, que pueden ser blanco del sistema inmune. Los glicanos en la superficie del virus son producidos por la célula hospedera, haciendo que el virus aparezca como componente del cuerpo, por lo tanto no puede ser atacado por el sistema inmune. Un posible enfoque para

---

la prevención de la infección del VIH se basa en utilizar lectinas como posibles agentes terapéuticos.<sup>21</sup>

Se ha reportado que oligosacáridos presentes en la leche materna protegen a los bebés de agentes infecciosos.<sup>11</sup> La adhesión bacteriana es el prerrequisito para que la infección ocurra y esta adhesión está mediada por lectinas de las superficies de las bacterias, la adhesión puede ser inhibida por mono y oligosacáridos que son específicos para las lectinas. De este modo es posible desarrollar una estrategia de protección contra infecciones causadas por bacterias portadoras de lectinas.<sup>22</sup> Así mismo se ha encontrado que monosacáridos como manosa pueden prevenir la adhesión de *E. coli* a líneas celulares obtenidas de vejiga humana. La administración de metil- $\alpha$ -manosido, manosa, N-acetilglucosamina, presentan inhibición de la adhesión de *E. coli* tipo 1, *S. flexneri* tipo 1 y *S. pneumoniae* respectivamente. Moléculas derivadas de manosa pueden ser potentes inhibidores de fimbriae tipo 1 mediador de adhesión bacteriana.<sup>23</sup> Otros estudios muestran que también se puede inhibir la adhesión de *E. coli* a células epiteliales humanas, mediante carbohidratos ricos en manosa.<sup>24</sup> Así mismo se muestra que la neumonía causada en ratones y ratas jóvenes por *S. pneumoniae* puede ser reducida significativamente mediante administración intranasal e intratraqueal de oligosacáridos libres.<sup>11</sup>

Los carbohidratos son moléculas involucradas en varios procesos biológicos por lo que pueden ser considerados como potenciales candidatos para el diseño y desarrollo de agentes terapéuticos. El interés en la investigación aplicada al desarrollo de medicamentos basados en carbohidratos para la prevención y tratamiento de enfermedades ha aumentado, por este motivo se han centrado estudios en su síntesis, análisis y aplicación con fines terapéuticos.<sup>21</sup> El diseño de moléculas como potenciales agentes terapéuticos busca la obtención de moléculas pequeñas, que no generen reacciones inmunes adversas ni efectos secundarios, que no sean tóxicas, ni fácilmente eliminadas del cuerpo, que se requieran dosis pequeñas para una alta actividad terapéutica, etc. La glicobiología es considerada como un área de mucha riqueza para la investigación ya que puede ofrecer alternativas para la búsqueda de agentes terapéuticos.

### 1.3 Síntesis química de glicoconjugados aminoácido-carbohidrato

Los carbohidratos son aldehídos o cetonas polihidroxiladas, que contienen grupos carbonilo e hidroxilo. En la glucosa un grupo hidroxilo interacciona con el grupo aldehído formando una estructura cíclica hemiacetálica, siendo las piranosas las formas predominantes. Cuando se forma la piranosa se crea un nuevo estereocentro en el carbono 1 (centro anomérico), ya que el OH puede tener configuración axial o ecuatorial.<sup>25</sup> Las piranosas presentan diferentes reactividades en función del azúcar, la reactividad decrece en el orden Fucosa>Galactosa>Glucosa>Manosa. También los carbonos del anillo de piranosa tienen diferentes reactividades siendo el carbono anomérico el de mayor reactividad, mientras que las otras posiciones difieren en la reactividad dependiendo del carbohidrato, por ejemplo en la Galactosa el orden decreciente de reactividad es C4>C3>C2>C6 y en la Manosa es C2>C6>C4>C3.<sup>26</sup> En la glucosa los sustituyentes unidos al centro anomérico favorecerán la posición axial (anómero  $\alpha$ ) para sustituyentes con átomos pesados, debido principalmente a que el par de electrones no enlazantes del oxígeno hemiacetálico presentará mayor repulsión con los electrones de los sustituyentes en posición ecuatorial. La reactividad del centro anomérico se evidencia en la glucosa pentaacetilada, donde el grupo acetoxi unido al C1 es más reactivo que los demás grupos y se puede sustituir selectivamente.<sup>25</sup> En la acetilación de la glucosa la reactividad de las posiciones cambia dependiendo de la reacción, cuando se realiza con cloruro de acetilo favorece la reacción de la posición 2, mientras que si se realiza con anhídrido acético la posición 3 es la más reactiva.<sup>27</sup> La química de los carbohidratos es particular y compleja debido al gran número de conformaciones posibles, lo que requiere esquemas de protección que permitan realizar reacciones estereoselectivas. Las reacciones requieren condiciones extremas como ausencia de humedad, lo que exige atmósferas inertes y reactivos en muchos casos tóxicos y de difícil manejo. Los procesos de purificación de los productos intermedios y finales son demandantes debido a que estos son susceptibles de descomposición lo que compromete los rendimientos.

Los glicopéptidos están formados por una cadena peptídica que tiene unido un carbohidrato por enlaces O ó N-glicosídicos. La N-glicosilación ocurre por la unión de un carbohidrato a la cadena lateral de la Asparagina (Asn) que hace parte del motivo Asn-X-

Ser/Thr donde X es cualquier aminoácido, mientras que la O-glicosilación ocurre sobre la cadena lateral de Serina (Ser) o Treonina (Thr). Ha sido descrito que los glicopéptidos son responsables de muchas funciones vitales y son usados como modelos simples en estudios de la actividad biológica de las glicoproteínas.<sup>28</sup> Las dos estrategias generalmente utilizadas para sintetizar glicopéptidos son la síntesis convergente y la síntesis de construcción por bloques. La primera estrategia se basa en unir el carbohidrato a la cadena lateral de un aminoácido protegido selectivamente luego de que el péptido se ha sintetizado y purificado. La estrategia de construcción por bloques se basa en la síntesis de péptidos en fase sólida (SPFS), donde el carbohidrato es previamente acoplado a la cadena lateral de un aminoácido para formar un bloque aminoácido-carbohidrato, que luego es unido a la cadena creciente del péptido, este método ha sido ampliamente empleado para sintetizar una gran variedad de glicopéptidos ya que posibilita incorporar el bloque en cualquier parte de la cadena peptídica.<sup>29</sup> El punto crítico de esta metodología es la obtención del bloque aminoácido-carbohidrato ya que implica la formación de un enlace glicosídico entre el carbohidrato y un grupo funcional del aminoácido, que puede ser el grupo alfa amino, la cadena lateral o el grupo alfa carboxilo. La unión del carbohidrato al aminoácido puede ser realizada por la formación de diferentes tipos de enlace, como son carbono-carbono, carbono-oxígeno, formación de puentes disulfuro y formación de enlaces amida, entre otros. La formación del enlace glicosídico involucra reacciones en el centro anomérico de la piranosa para formar una especie reactiva que permita reacciones estereoselectivas. Estudios han mostrado la dificultad para formar el enlace glicosídico entre el carbohidrato y el grupo carboxilo del aminoácido.<sup>27</sup>

Existen varios métodos para obtener las glicosilaminas, donde los más comunes son (i) tratamiento del carbohidrato acetilado con bicarbonato de amonio ( $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ ), esta metodología no requiere condiciones de reacción extremas, es más sencilla de realizar; presenta como desventajas: rendimientos bajos y la obtención del producto puro es más dispendiosa.<sup>30</sup> (ii) La glicosilamina se obtiene a partir de la glicosilazida formada por tratamiento del carbohidrato acetilado con ácidos de Lewis como  $\text{FeCl}_3$ ,  $\text{SnCl}_4$  o  $\text{BF}_3\text{-Et}_2\text{O}$ .<sup>29</sup> La reducción catalítica de la glicosil azida produce la glicosil amina, aunque se requiere atmósfera inerte y reducción catalítica con Hidrógeno, los rendimientos son mayores y se obtiene la glicosil amina con mayor pureza.<sup>31,32</sup>

El método propuesto en este trabajo es la formación del enlace glicosídico a partir de la glicosilamina y el grupo  $\alpha$ -carboxilo del aminoácido.<sup>32,31</sup> La glucosilazida se obtiene por tratamiento del monosacárido acetilado con trimetilsililazida y cloruro de estaño (IV) ( $\text{SnCl}_4$ ). Esta reacción involucra la formación de complejos monosacárido- $\text{SnCl}_4$  y monosacárido- $\text{Sn-N}_3$  como intermediarios.<sup>33</sup> Los factores que influyen la estereoselectividad de la reacción son el tipo de monosacárido, los grupos protectores, el promotor ( $\text{SnCl}_4$ ), el solvente de reacción, etc. La glicosilamina luego es acoplada a los grupos carboxilo de los aminoácidos mediante la utilización de activadores como las carbodiimidas,<sup>34,35</sup> las sales de fosfonio o las sales de uronio<sup>36,37</sup> y otras metodologías.<sup>38,39,40,29,31,41</sup> Sin embargo la formación del enlace amida se ve afectado por el tipo de monosacárido, los grupos protectores del monosacárido, el agente acoplante, el grupo carboxilo, el medio de reacción y la estabilidad de la glicosilamina.<sup>25</sup>

Los grupos carboxilo pueden ser activados formando haluros de acilo, azidas de acilo, imidazoles de acilo, anhídridos, ésteres, etc. El enlace amida se puede formar a partir del éster activo previamente purificado y posterior reacción con la glicosilamina o por la reacción *in situ* del éster activo y la glicosilamina. Los ésteres activos aromáticos generalmente son fáciles de hidrolizar y reaccionan con una amplia variedad de nucleófilos en condiciones suaves.<sup>42</sup>

La utilización de las carbodiimidas como agentes acoplantes es muy popular debido a su bajo costo. Los agentes más utilizados son la Diciclohexilcarbodiimida (DCC), Diisopropilcarbodiimida (DIC) y la 1-etil 3(3'dimetilamino) carbodiimida (EDC). El mecanismo de reacción involucra la formación de un éster activo del aminoácido la O-acilurea (éster simple) que luego por un ataque nucleofílico de la glicosilamina forma el enlace amida. Sin embargo, esta metodología presenta como principal desventaja que el aminoácido es proclive a la racemización debido a la alta reactividad del éster simple, que puede formar 5(4H)-Oxazolonas. La enolización de esta, conlleva a la abstracción del protón unido al carbono alfa.<sup>43</sup> Para evitar este inconveniente se incorpora un agente modificador como el 1-hidroxi-2-clorobenzotriazol (Cl-HOBt) que reacciona con el éster simple altamente reactivo para formar otro éster (éster modificado) que es menos reactivo y que minimiza el riesgo de racemización del aminoácido. Otros modificadores que pueden ser utilizados son el 1-hidroxibenzotriazol (HOBt), Hidroxi-3,4-dihidro-4-oxo-1,2,3-benzotriazina (HODhbt) y 1-hidroxi-7-azabenzotriazol (HOAt). Otra desventaja de este

método es que cuando se forma la O-acilurea ocurre un rearrreglo interno, formándose otra especie la N-acilurea. La O-acilurea forma el éster simple mientras que la N-acilurea no es reactiva, esto hace que la mitad del aminoácido no reaccione, requiriéndose mayores cantidades del mismo.<sup>43,44</sup>

Las sales de uronio son agentes acoplantes, siendo los más representativos el Tetrafluoroborato de O-(benzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio (TBTU), Hexafluorofosfato N-[(dimetilamino)-1H-1,2,3-triazolo-[4,5-b]piridin-1-il-metileno] (HATU) y el Hexafluorofosfato de O-(1H-benzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio (HBTU). Las sales de uronio son derivados del HOBt y reaccionan directamente con el grupo carboxilo para formar un éster intermediario que reacciona con el OBt<sup>-</sup> liberado, para luego formar el éster modificado. Las reacciones utilizando sales de uronio son rápidas y requieren menos cantidad de aminoácido comparadas con las carbodimidas.<sup>45</sup> Se debe tener cuidado en el orden de adición de los reactantes ya que el grupo amino y la sal de uronio pueden formar un subproducto que contiene el grupo guanidino.<sup>44</sup>

Otro agente acoplante es el anhídrido cíclico del ácido n-propilfosfónico (T3P®) también conocido como 1,3,5,2,4,6-trioxatrisforinano, 2,4,6-trióxido de 2,4,6-tripropil, anhídrido cíclico del n-propilfosfónico (PPACA) y anhídrido del ácido propano fosfónico (PPAA), por sus siglas en inglés.<sup>46</sup> El T3P® está disponible en soluciones al 50% en diferentes solventes que son de fácil manejo y estables en el tiempo.<sup>47</sup> El T3P® es un reactivo excepcional para la formación de enlaces amida, es fácil de usar, presenta excelente selectividad, baja epimerización, obtención de productos de alta pureza y rendimientos. Este reactivo no requiere de aditivos peligrosos y es considerado como un reactivo no tóxico, ni alergénico. Sus sales son solubles en agua y no son peligrosas, por lo que sus reacciones son consideradas parte de la química “verde”.<sup>48</sup> El subproducto formado es el ácido propanofosfónico que es fácilmente removido con lavados acuosos.<sup>49</sup> El T3P® es ideal para acoplar aminoácidos formando el enlace amida en medios de reacción relativamente suaves, con mínima formación de subproductos y menor posibilidad de descomposición de los mismos. Se han reportado algunas reacciones de acoplamiento empleando T3P®, en las que otros activadores como las carbodimidas y las sales de uronio tuvieron resultados infructuosos.<sup>49,47</sup>

---

En este trabajo se sintetizaron *N*-glucosilaminoácidos derivados de L-Leucina, L-Fenilalanina, L-Ácido aspártico y L-Lisina mediante enlaces amida entre la glicosil amina y el grupo  $\alpha$ -carboxi de los Fmoc-aminoácidos. Se evaluaron tres metodologías para la formación del *N*-glucosilaminoácido mediante la utilización de carbodiimidas (DIC), sales de uronio (TBTU) y T3P<sup>®</sup>. Las reacciones fueron monitoreadas y los productos intermediarios y finales caracterizados por Cromatografía en capa fina (CCF), cromatografía RP-HPLC, Resonancia Magnética Nuclear (RMN), y Espectroscopía FT-IR.



## 2. Materiales y métodos

### 2.1 Disolventes y reactivos

Los reactivos empleados en este trabajo fueron: acetato de etilo (AcOEt), ciclohexano, etanol absoluto (EtOH), metanol (MeOH), N,N-dimetilformamida (DMF), éter etílico y acetonitrilo grado HPLC (ACN), D-glucosa, anhídrido acético, ácido perclórico, bicarbonato de sodio, sulfato de magnesio anhidro (MgSO<sub>4</sub>), pentóxido de fósforo, trimetilsililazida (TMSN<sub>3</sub>), cloruro de estaño IV (SnCl<sub>4</sub>), catalizador de paladio 5% en carbón activado tetrafluoroborato de O-(Benzotriazol-1-il)-N,N,N'-N' tetrametiluronio (TBTU), 2-cloro-hidroxibenzotriazol (Cl-HOBt), N,N,N,N'-diisopropilcarbodiimida (DIC), diisopropiletilamina (DIPEA), anhídrido cíclico del ácido n-propilfosfónico (T3P<sup>®</sup>), ninhidrina, cianuro de potasio, fenol, hidróxido de hidracina, p-anisaldehído, Fmoc-Phe-OH Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Lys-(Boc)-OH, Fmoc-Asp-(OtBu)-OH, ácido trifluoroacético (TFA), 4-metilpiperidina, hidrógeno, argón, nitrógeno, agua deuterada (D<sub>2</sub>O), cloroformo deuterado (CDCl<sub>3</sub>). Los reactivos obtenidos comercialmente, se usaron sin purificaciones posteriores.

### 2.2 Instrumentación

#### 2.2.1 Espectroscopía infrarroja (FT-IR)

Los espectros de infrarrojo se tomaron en un espectrofotómetro Nicolet iS10, por el método de pastilla de bromuro de potasio KBr.

#### 2.2.2 Resonancia magnética nuclear

Los experimentos <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, DEPTs, COSY, HMBC y HMQC de los compuestos obtenidos en este trabajo se realizaron en un espectrómetro (Bruker Avance 400) de 400 MHz, equipado con sondas BBI y BBO, utilizando TMS como referencia interna.

### **2.2.3 Punto de fusión (p.f.)**

Los puntos de fusión se determinaron mediante capilares de vidrio abiertos en un fusiómetro Electrothermal MEL-TEMP y se presentan sin corrección.

### **2.2.4 Cromatografía líquida**

Los análisis por RP-HPLC se realizaron en dos cromatógrafos líquidos: Agilent technologies 1260 Infinity y Shimadzu primaide.

### 3. Sección experimental

La ruta sintética (Figura 1) que se llevó a cabo para obtener los *N*-glucosilaminoácidos consistió inicialmente en realizar la acetilación de la D-glucosa, formando la especie totalmente acetilada.<sup>50</sup> El grupo acetilo fue escogido como grupo protector, ya que es muy fácil de obtener y modificar, así mismo por su gran estabilidad en diferentes condiciones.<sup>51</sup> Haciendo uso de la selectividad del centro anomérico se formó el derivado de azida,<sup>52</sup> que posteriormente fue sometido a reducción catalítica para obtener la glucosilamina.<sup>53</sup> El producto crudo de la glucosilamina se acopló al grupo  $\alpha$ -carboxi de los Fmoc-aminoácidos (Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Asp(OtBu)-OH y Fmoc-Phe-OH) empleando T3P®. El esquema de desprotección se realizó empleando TFA<sup>54</sup> para retirar los grupos protectores de las cadenas laterales, el grupo Fmoc fue retirado con 4-metilpiperidina<sup>55</sup> y la desacetilación fue realizada con hidróxido de hidracina<sup>56</sup>.

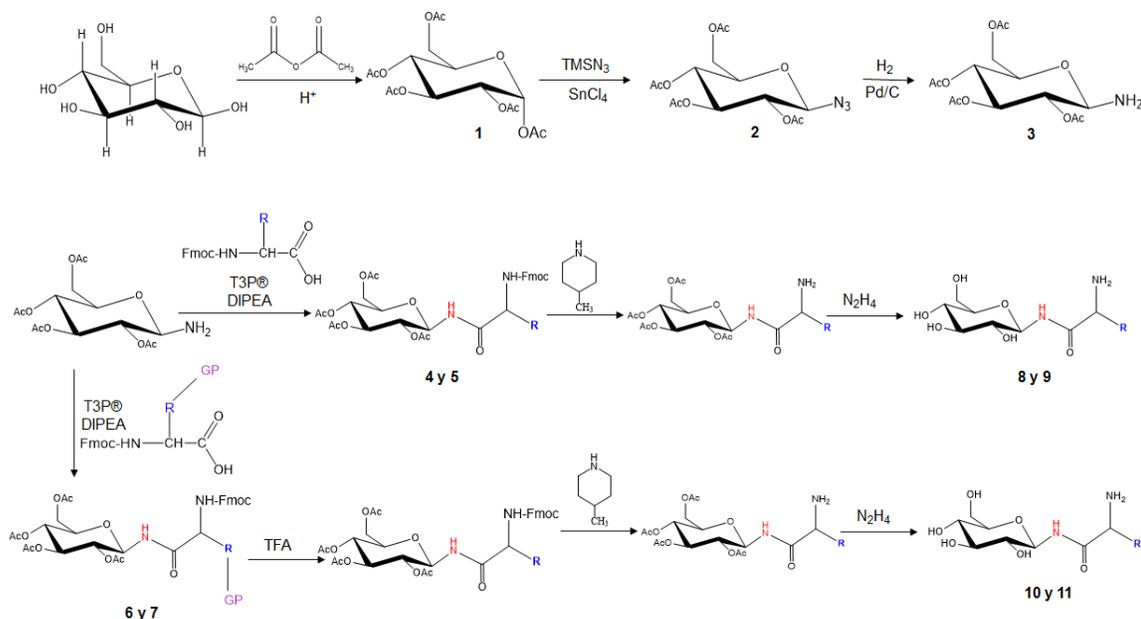


Figura 1. Ruta sintética para obtención de *N*-glucosilaminoácidos

### 3.1 Síntesis de 1,2,3,4,6-penta-O-acetil- $\alpha$ -D-glucopiranososa (1)

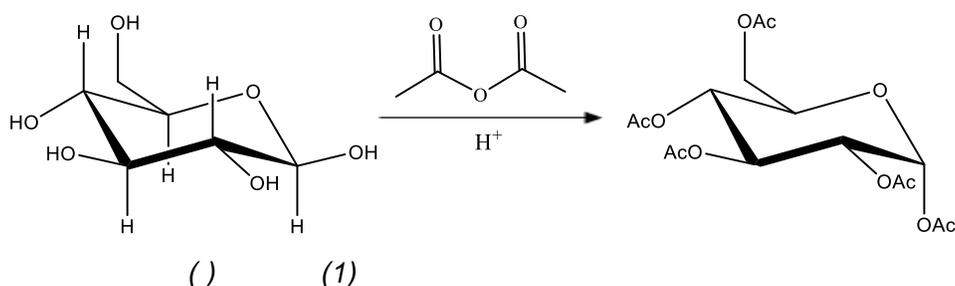


Figura 2. Reacción de acetilación con D-glucosa utilizando ácido perclórico y anhídrido acético

En un baño de hielo se colocaron 15 mL de anhídrido acético, se adicionaron dos gotas de ácido perclórico ( $\text{HClO}_4$ ),<sup>50,57</sup> hasta coloración amarilla. Luego se adicionó lentamente D-glucosa (hasta completar 4 g, 0,014 mol), evitando que la temperatura fuera superior a 40°C. Posteriormente, la mezcla de reacción se dejó en agitación constante por 2h a temperatura ambiente (TA). La reacción se monitoreó por cromatografía en capa fina (CCF) utilizando como fase móvil acetato de etilo: ciclohexano (1:1 v/v), la reacción se consideró finalizada cuando el reactivo de partida desapareció. Luego se adicionaron 25 mL de Diclorometano (DCM), y se lavó la mezcla de reacción con agua (3 x 25 mL), solución saturada de bicarbonato de sodio ( $\text{NaHCO}_3$ ), (3 x 25 mL) y nuevamente con agua (3 x 25 mL). El extracto orgánico se secó con sulfato de magnesio anhidro ( $\text{MgSO}_4$ ) y se evaporó a presión reducida hasta sequedad. El producto se purificó por cromatografía en columna de sílica gel 60, utilizando como fase móvil acetato de etilo: ciclohexano (1:1 v/v).<sup>58</sup> El compuesto se caracterizó como un sólido blanco con punto de fusión 109–111°C, se obtuvieron 7,7932 g (rendimiento del 95%). FT-IR (Pastilla de KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): estiramientos simétricos 1742, 1225.

**RMN  $^1\text{H}$**  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 6.45 (d,  $^3J = 3.7$  Hz, 1H, CH), 5.83 (d,  $^3J = 8.3$  Hz, 1H, CH), 5.59 (t,  $^3J = 9.9$  Hz, 1H, CH), 5.31 – 5.16 (m, 2H, CH), 4.39 (dd, 1H  $^3J = 12.6, 4.1$  Hz, 1H,  $\text{CH}_2$ ), 4.28 – 4.15 (m, 2H,  $\text{CH}_2$  y CH), 2.19 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 2.11 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 2.05 (9H, 3 $\text{CH}_3$ ).

**RMN  $^{13}\text{C}$**  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 170.6 (C=O), 170.2 (C=O), 169.6 (C=O), 169.3 (C=O), 168.7 (C=O), 89.0 (CH), 69.8 (CH), 69.2 (CH), 67.9 (CH), 61.4 (CH), 20.85 ( $\text{CH}_3$ ), 20.67 ( $\text{CH}_3$ ), 20.63 ( $\text{CH}_3$ ), 20.54 ( $\text{CH}_3$ ), 20.42 ( $\text{CH}_3$ ).

### 3.2 Síntesis de 2,3,4,6-tetra-O-acetil- $\beta$ -D-glucopiranosilazida (2)

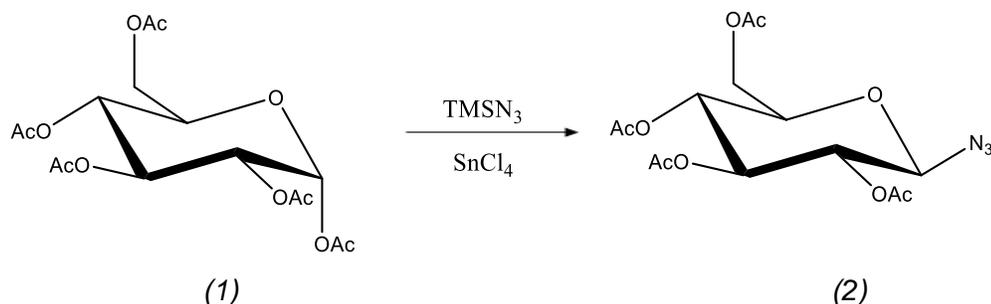


Figura 3. Reacción de síntesis de (2) utilizando  $\text{TMSN}_3$  y  $\text{SnCl}_4$  en condiciones anhidras y atmosfera inerte

El compuesto (1) (2,0 g – 0,011 mol) se disolvió en 5 mL DCM anhidro y se burbujeó Argón (Ar). Se adicionaron 720  $\mu\text{L}$  (0,007 mol) de Trimetilsilazida ( $\text{TMSN}_3$ ) disueltos en 5 mL de DCM anhidro y después de 5 min se adicionaron directamente 440  $\mu\text{L}$  (0,004 mol) de Cloruro de estaño IV ( $\text{SnCl}_4$ ). La mezcla de reacción se dejó a TA y agitación constante durante toda la noche, se monitoreó por CCF utilizando como fase móvil acetato de etilo: ciclohexano 1:1 (v/v) y se consideró terminada cuando el reactivo de partida desapareció. Posteriormente se adicionaron 25 mL de DCM y la fase orgánica se lavó con agua (3 x 25 mL), solución saturada de  $\text{NaHCO}_3$  (3 x 25 mL) y agua (2 x 25 mL), se secó con  $\text{MgSO}_4$  anhidro y se removió el solvente al vacío. El producto se purificó por cromatografía flash en columna utilizando sílica gel 60 y acetato de etilo: ciclohexano (1:1 v/v) como fase móvil.

El producto se caracterizó como un sólido blanco con punto de fusión 126–128°C, se obtuvo 3,0629 g (rendimiento del 85%). FT-IR (Pastilla de KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): estiramiento asimétrico N=N=N: 2118, 1756, estiramiento simétrico N=N=N: 1240.

**RMN  $^1\text{H}$**  (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 5.26 (t,  $^3J = 9.4$  Hz, 1H, CH), 5.15 (t,  $^3J = 9.8$  Hz, 1H, CH), 5.00 (t,  $^3J = 9.2$  Hz, 1H, CH), 4.68 (d,  $^3J = 8.8$  Hz, 1H, CH), 4.32 (dd,  $^3J = 12.4$  Hz y 4.8, 1H,  $\text{CH}_2$ ), 4.21 (dd,  $^3J = 12.4$  Hz y 2.4, 1H,  $\text{CH}_2$ ), 3.84 (m, 1H, CH), 2.12 (6H, 2 $\text{CH}_3$ ), 2.05 (6H, 2 $\text{CH}_3$ ).

**RMN  $^{13}\text{C}$**  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 170.6 (C=O), 170.1 (C=O), 169.3 (C=O), 169.2 (C=O), 87.9 (CH), 74.0 (CH), 72.6 (CH), 70.7 (CH), 67.9 (CH), 61.7 (CH), 20.67 ( $\text{CH}_3$ ), 20.54 ( $\text{CH}_3$ ), 20.52 ( $\text{CH}_3$ ).

### 3.3 Síntesis de 2,3,4,6-tetra-O-acetil- $\beta$ -D-glucopiranosilamina

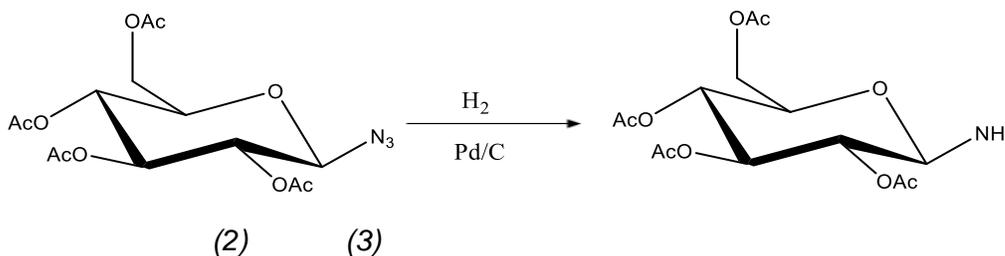


Figura 4. Reacción de síntesis de (3) utilizando Pd/C en condiciones anhidras y atmósfera de hidrógeno

El compuesto **(2)** (0,5172 g - 0,0015 mol) se mezcló con Pd 5% en carbón activado (0,046 g), en un balón de reacción seco y atmósfera de Argón. Se adicionaron 30 mL de MeOH absoluto y se burbujeó hidrógeno, la mezcla de reacción se dejó en agitación constante a TA por 2 h y se monitoreó por CCF (Acetato de etilo: Ciclohexano 1:1) y test de Kaiser. La reacción se consideró terminada cuando el reactivo de partida desapareció, la solución se filtró sobre papel y se removió el solvente al vacío. El compuesto obtenido no fue purificado debido a su labilidad a la hidrólisis. El producto crudo (glicosil amina) se acopló mediante un enlace glicosídico con los aminoácidos Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Asp(OtBu)-OH y Fmoc-Phe-OH.

## 3.4 Síntesis de *N*-glucosilaminoácidos

### 3.4.1 Determinación de las condiciones óptimas para la síntesis de *N*-glucosilaminoácidos

Se evaluaron tres metodologías para obtener los *N*-glucosilaminoácidos mediante la formación del enlace amida entre la glicosilamina y el grupo  $\alpha$ -carboxi de los aminoácidos, empleando: (I) diisopropilcarbodiimida (DIC) (II) sales de uronio TBTU/HOBt y (III) T3P<sup>®</sup>. Las reacciones fueron estandarizadas y monitoreadas utilizando Fmoc-Phe-OH. La cadena lateral de este aminoácido posibilita el monitoreo durante el avance de la reacción y la caracterización de los productos intermedios y finales mediante cromatografía RP-HPLC.

Método I: El producto crudo de la glicosilamina (1 mmol) y Fmoc-Phe-OH (1 mmol) se disolvieron en DCM, luego se adicionó DIC (1 mmol) y se dejó en reacción durante 16 h, la reacción se monitoreó mediante RP-HPLC. Se eliminó el solvente de la mezcla de reacción mediante evaporación al vacío y luego se disolvió en DCM, la mezcla se lavó con agua (25 mL x 3), 25 mL de solución saturada de NaHCO<sub>3</sub> y agua (25 mL x 3), la fase orgánica se secó con MgSO<sub>4</sub> anhidro y se removió el solvente al vacío.

Método II: Fmoc-Phe-OH (1 mmol) se disolvió en DMF, se activó empleando HOBt (1 mmol), TBTU (1 mmol) y DIPEA (3 mmol); después de 15 min se adicionó la glicosilamina, se dejó en reacción durante 16 h. La reacción se monitoreó por RP-HPLC. Se eliminó el solvente de la mezcla de reacción mediante evaporación al vacío y luego se disolvió en DCM, la mezcla se lavó con agua (25 mL x 3), 25 mL de solución saturada de NaHCO<sub>3</sub> y agua (25 mL x 3), la fase orgánica se secó con MgSO<sub>4</sub> anhidro y se removió el solvente al vacío.

Método III: El Fmoc-aminoácido (0,65 mmol) se disolvió en DCM y se adicionó DIPEA (2 mmol), se colocó en un baño de hielo y posteriormente se adicionó el T3P<sup>®</sup> (1,5 mmol) y se dejó en reacción durante 16 h. La reacción se monitoreó por cromatografía RP-HPLC y test de Kaiser hasta prueba negativa para aminas primarias. Luego se adicionaron 30 mL

de acetato de etilo y se lavó la fase orgánica con 25 mL de agua, 25 mL de solución saturada de NaHCO<sub>3</sub> y agua (25 mL x 3), se secó con MgSO<sub>4</sub> anhidro y se removió el solvente al vacío. El producto obtenido se purificó por cromatografía RP-SPE.

Al comparar los resultados obtenidos por las tres metodologías se seleccionó la metodología III, en la que se emplea el T3P® para la formación del bloque (Ver discusión de resultados sección 5.4).

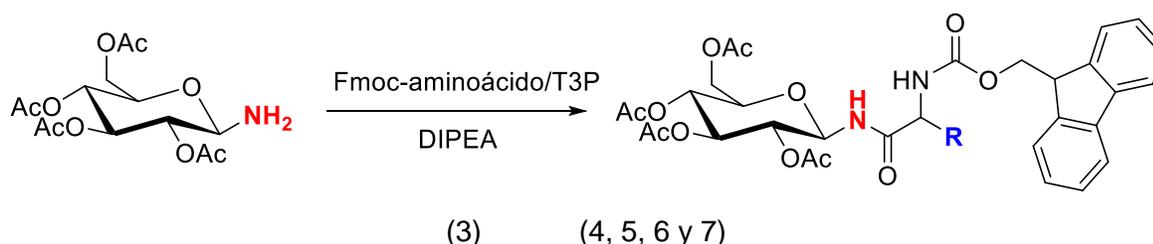


Figura 5. Reacción de formación del bloque aminoácido-carbohidrato

### 3.4.2 Fmoc-Phe-O-(2,3,4,6-tetra-O-Acetil-β-D-N-glucopiranosil) (4) (C<sub>38</sub>H<sub>40</sub>N<sub>2</sub>O<sub>12</sub>, PM: 716.22 g/mol)

Partiendo de Fmoc-Phe-OH (139,8 mg; 0,36 mmol) y glicosilamina (231,4 mg; 0,66 mmol) se obtuvo un sólido blanco. 195,2 mg (0,27 mmol; rendimiento 75%)

**RMN <sup>1</sup>H** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.79 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H), 7.59 – 7.50 (m, 2H), 7.43 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 7.31 (dt, *J* = 10.5, 6.0 Hz, 6H), 7.18 (d, *J* = 5.0 Hz, 1H), 6.80 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H), 5.32 (t, *J* = 9.5 Hz, 1H), 5.24 (t, *J* = 9.2 Hz, 1H), 5.17 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H), 5.07 (t, *J* = 9.7 Hz, 1H), 4.87 (t, *J* = 9.5 Hz, 1H), 4.41 (dd, *J* = 29.5, 7.4 Hz, 2H), 4.31 (dd, *J* = 12.8, 3.5 Hz, 1H), 4.22 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H), 4.13 (d, *J* = 11.6 Hz, 1H), 3.84 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 3.12 (s, 2H), 2.11 (s, 3H), 2.04 (d, *J* = 9.4 Hz, 6H), 1.93 (s, 3H).

**RMN <sup>13</sup>C** (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm): 171.3 (C=O), 171.0 (C=O), 170.6 (C=O), 169.9 (C=O), 143.6 (CH), 141.3 (CH), 129.4 (CH), 128.8 (CH), 127.8 (CH), 127.2 (CH), 125.1 (CH), 120.0 (CH), 78.2 (CH), 73.6 (CH), 72.6 (CH), 70.5 (CH), 68.1 (CH), 67.3 (CH<sub>2</sub>), 61.7 (CH<sub>2</sub>), 56.1 (CH), 47.1 (CH), 37.3 (CH<sub>2</sub>), 20.7 (CH<sub>3</sub>), 20.6 (CH<sub>3</sub>).

### 3.4.3 Fmoc-Leu-O-(2,3,4,6-tetra-O-Acetil- $\beta$ -D-N-glucopiranosil) (5) (C<sub>35</sub>H<sub>42</sub>N<sub>2</sub>O<sub>12</sub>. PM: 682,3 g/mol)

Partiendo de Fmoc-Leu-OH (231,9 mg; 0,65 mmol), Glicosilamina (425,7 mg; 1,22 mmol) se obtuvo un sólido blanco. 253,1 mg (0,37 mmol; rendimiento 56%)

**RMN <sup>1</sup>H** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  7.79 (d, <sup>3</sup>J = 7.6 Hz, 2H, H-Ar), 7.61 (d, <sup>3</sup>J = 6.9 Hz, 2H, H-Ar), 7.43 (t, <sup>3</sup>J = 7.4 Hz, 2H, H-Ar), 7.34 (t, <sup>3</sup>J = 7.3 Hz, 2H, H-Ar), 6.86 (d, <sup>3</sup>J = 8.9 Hz, 1H, NH), 5.34 – 5.23 (m, 2H, 2CH), 5.09 (t, J = 10 1H, CH), 5.04, 4.94 (m, 2H, CH), 4.50 (t, <sup>3</sup>J = 10, 1H, CH<sub>2</sub>), 4.4 (t, <sup>3</sup>J = 8.0 1H, CH<sub>2</sub>), 4.33 (dd, J = 12.6, 3.3 Hz, 1H, CH), 4.25 (t, J = 6.8 Hz, 1H, CH), 4.09 (d, J = 12.4 Hz, 2H, CH<sub>2</sub> CH), 3.83 (d, J = 7.4 Hz, 1H, CH), 2.10 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.04 (d, J = 5.8 Hz, 7H, CH<sub>3</sub>), 1.99 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.82 – 1.62 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 1.27 (s, 1H, CH), 0.99 – 0.91 (m, 6H, CH<sub>3</sub>).

**RMN <sup>13</sup>C** (101MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm): 172.7 (C=O), 171.0 (C=O), 170.6 (C=O), 169.9 (C=O), 169.5 (C=O), 156.2 (C-C), 143.7, 141.3, 127.8, 127.1, 125.1, 120.1, 120.0 (CH-Ar), 78.2, 73.7, 72.7, 70.5, 68.1 (CH), 67.2(CH<sub>2</sub>), 61.6 (CH<sub>2</sub>), 53.6 (CH), 47.1 (CH), 40.4 (CH<sub>2</sub>), 24.6 (CH), 23.1 (CH<sub>3</sub>), 21.7(CH<sub>3</sub>), 20.6 (CH<sub>3</sub>).

### 3.4.4 Fmoc-Lys-(Boc)-O-(2,3,4,6-tetra-O-Acetil- $\beta$ -D-N-glucopiranosil) (6) (C<sub>40</sub>H<sub>51</sub>N<sub>3</sub>O<sub>14</sub>, PM: 797,34 g/mol)

Partiendo de Fmoc-Lys-(Boc)-OH (247,8 mg; 0,53 mmol) y Glicosilamina (339,1 mg; 0,97 mmol) se obtuvo sólido blanco. 389,2 mg (0,48 mmol; rendimiento 92%)

**RMN <sup>1</sup>H** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  7.78 (d, J = 7.5 Hz, 2H, H-Ar), 7.62 (d, J = 7.2 Hz, 2H, H-Ar), 7.42 (t, J = 7.4 Hz, 2H, H-Ar), 7.34 (t, J = 7.4 Hz, 2H, H-Ar), 6.99 (d, J = 9.0 Hz, 1H, NH), 5.36 – 5.21 (m, 2H, 2CH), 5.15 – 5.03 (m, 1H, CH), 4.99 – 4.91 (m, 1H, CH), 4.40 (m, 1H, CH<sub>2</sub>), 4.34 – 4.20 (m, 3H, CH<sub>2</sub>, CH), 4.12 (m, 2H, CH<sub>2</sub>, CH), 3.83 (d, J = 8.2 Hz, 1H, CH), 2.10 (m, 5H, CH<sub>2</sub>, CH<sub>3</sub>), 2.07 – 2.00 (m, 9H, 3CH<sub>3</sub>), 1.99 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.45 (s, 10H, CH<sub>3</sub>), 1.27 (s, 3H, CH<sub>2</sub>).

**RMN <sup>13</sup>C** (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm): 172.3 (C=O), 170.9 (C=O), 170.8 (C=O), 170.6 (C=O), 170.1 (C=O), 169.9 (C-O), 169.5 (C-O), 156.2 (C-O), 143.7 (CH), 141.3 (CH), 127.8 (CH), 127.1 (CH), 125.14 (CH), 120.0 (CH), 90.2 (C), 78.2 (CH), 73.3 (CH), 70.5 (CH), 68.1 (CH), 67.2 (CH<sub>2</sub>), 61.9 (CH<sub>2</sub>), 55.1 (CH), 47.1 (CH), 34.1(CH<sub>2</sub>), 32.0 (CH<sub>3</sub>), 31.0 (CH<sub>3</sub>), 29.6 (CH<sub>3</sub>), 28,4 (CH<sub>3</sub>), 20.6 (CH<sub>2</sub>), 20.5 (CH<sub>2</sub>).

### 3.4.5 Fmoc-Asp-(OtBu)-O-(2,3,4,6-tetra-O-Acetil-β-D-N-glucopiranosil) (7) (C<sub>37</sub>H<sub>44</sub>N<sub>2</sub>O<sub>14</sub>, PM: 740.28 g/mol)

Partiendo de Fmoc-Asp-(OtBu)-OH (395,7 mg; 0,96 mmol) y glicosilamina (253,8mg; 0,73mmol) se obtuvo un sólido blanco. 405,5 mg (0,55 mmol, rendimiento 57%)

**RMN <sup>1</sup>H** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.80 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H, H-Ar), 7.68 (t, *J* = 7.7 Hz, 2H, H-Ar), 7.44 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H, H-Ar, NH), 7.35-7.28 (m, 2H, H-Ar), 5.36 (t, *J* = 9.5 Hz, 1H, CH), 5.22 (t, *J* = 9.2 Hz, 1H, CH), 5.10 (t, *J* = 9.7 Hz, 1H, CH), 4.99 (t, *J* = 9.4 Hz, 1H, CH), 4.56 – 4.48 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 4.34 – 4.27 (m, 2H, CH<sub>2</sub>, CH), 4.17 – 4.08 (m, 1H, CH<sub>2</sub>), 3.85 (d, *J* = 9.9 Hz, 1H, CH), 3.09 (d, *J* = 16.5 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>), 2.59 (d, *J* = 16.8 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>), 2.13 – 2.05 (m, 12H, 4CH<sub>3</sub>), 1.46 (s, 9H, 3 CH<sub>3</sub>).

**RMN <sup>13</sup>C** (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm): 171.6 (C=O), 170.9 (C=O), 170.1 (C=O), 169.7 (C=O), 156.2 (C=O), 143.6 (CH), 141.3 (CH), 127.8 (CH), 127.2 (CH), 127.1 (CH), 125.2 (CH), 120.1 (CH), 82.0 (C), 78.4 (CH), 73.6 (CH), 72.5 (CH), 70.5 (CH), 68.1 (CH), 67.7 (CH<sub>2</sub>), 61.6 (CH<sub>2</sub>), 51.3 (CH), 47.0 (CH), 36.5 (CH<sub>2</sub>), 28.0 (CH<sub>3</sub>), 20.8 (CH<sub>3</sub>), 20,7 (CH<sub>3</sub>), 20.6 (CH<sub>3</sub>), 20.5 (CH<sub>3</sub>).

## 3.5 Esquema de desprotección N-glucosilaminoácidos

El esquema de desprotección de los N-glucosilaminoácidos consiste en la remoción de los grupos protectores de las cadenas laterales del aminoácido, la remoción del grupo Fmoc y la desacetilación del carbohidrato.

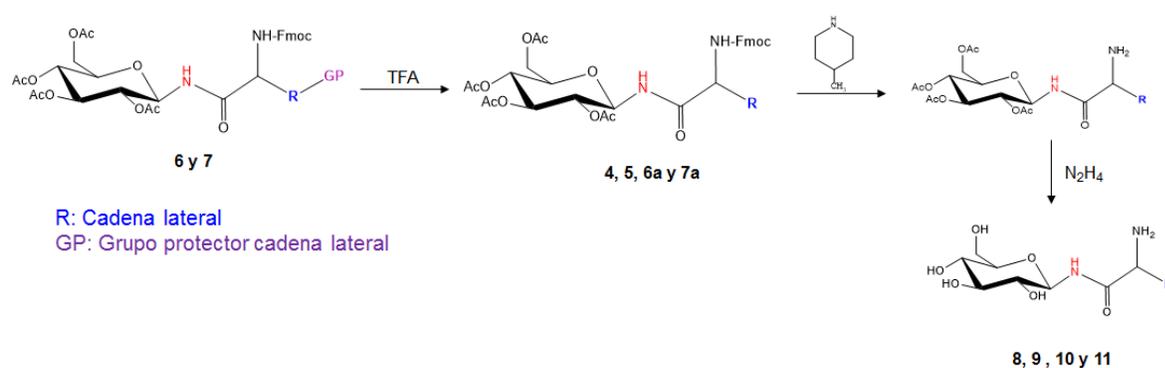


Figura 6. Esquema de desprotección de N-glucosilaminoácidos

En el esquema de desprotección para **(6)** y **(7)** se debe remover el grupo protector de la cadena lateral. Luego se elimina el grupo Fmoc y se desacetila el anillo de piranosa. (Figura 6)

Para remover los grupos Boc y tBu de **(6)** y **(7)** respectivamente, se realizó tratamiento con ácido trifluoroacético (TFA) al 55% en DCM durante 2 h a TA. La reacción se monitoreó por RP-HPLC. Cuando finalizó la reacción, el solvente de la mezcla se evaporó al vacío hasta sequedad. La remoción del grupo Fmoc de **(4)**, **(5)**, **(6a)**, y **(7a)** se realizó por tratamiento con 2 mL de 4-metilpiperidina al 25% en DMF, durante 2 h a TA. La reacción fue monitoreada por RP-HPLC, luego de terminada la reacción se eliminó el disolvente al vacío. Los grupos acetilo fueron removidos con hidróxido de hidracina al 20% en agua, se agitó durante 6 h a TA, la mezcla se dejó a 4°C por 36 h, se adicionaron 4 volúmenes de acetona en frío, y se filtró por membrana de 0,22  $\mu\text{m}$ , luego se eliminó el solvente por evaporación al vacío y la muestra se purificó por cromatografía RP-SPE. La fracción más enriquecida fue cristalizada en etanol absoluto.

Se obtuvieron las siguientes moléculas **(8)** L-Phe-O- $\beta$ -1N(D-glucopiranosil) **(9)** L-Leu-O- $\beta$ -1N(D-glucopiranosil), **(10)** L-Lys-O- $\beta$ -1N(D-glucopiranosil) **(11)** L-Asp-O- $\beta$ -1N(D-glucopiranosil).

### 3.5.1 Asp-O- $\beta$ -1-N(D-glucopiranosil) (11)

Partiendo de **(7)** (0.0697 mg; 0.094 mmol) se obtuvo un sólido blanco. 5.6 mg (0.019 mmol, rendimiento 20%) Se eliminó el solvente de la mezcla de reacción mediante evaporación al vacío

**RMN  $^1\text{H}$**  (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  (ppm) 4.93 (d,  $J = 9.1$  Hz, 1H), 4.25 (dd,  $J = 8.2, 4.7$  Hz, 1H), 3.78 (d,  $J = 13.9$  Hz, 1H), 3.62 (dd,  $J = 12.4, 5.2$  Hz, 1H), 3.49 – 3.40 (m, 2H), 3.33 (t,  $J = 8.9$  Hz, 2H), 2.91 (dd,  $J = 17.7, 4.6$  Hz, 1H), 2.79 (dd,  $J = 17.7, 8.3$  Hz, 1H).

**RMN  $^{13}\text{C}$**  (101 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  (ppm): 174.3 (C=O), 170.1 (C=O), 79.3 (CH), 77.6 (CH), 76.3 (CH), 71.7 (CH), 69.1 (CH), 60.4 ( $\text{CH}_2$ ), 50.2 (CH), 35.7 ( $\text{CH}_2$ )

### 3.5.2 L-Phe-O-β-1N(D-glucopiranosil) (8)

Partiendo de (4) (71.5 mg; 0.099 mmol) se obtuvo un sólido blanco. 6 mg (0.018 mmol, rendimiento 18%)

**RMN <sup>1</sup>H** (400 MHz, D<sub>2</sub>O) δ (ppm): 4.91 (d, *J* = 9.2 Hz, 1H), 4.21 – 4.11 (m, 1H), 3.99 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H), 3.83 – 3.79 (m, 2H) 3.46 – 3.41 (m, 2H), 3.36 – 3.29 (m, 3H), 3.35 – 3.30 (m, 3H), 3.31 (dt, *J* = 19.2, 9.7 Hz, 4H), 3.20 ( m 2H), 3.06 ( m 2H).

**RMN <sup>13</sup>C** (101 MHz, D<sub>2</sub>O) δ (ppm): 171.3 (C=O), 129.6 (CH), 129.0 (CH), 127.9 (CH), 79.1 (CH), 77.5 (CH), 76.4 (CH), 71.7 (CH), 69.1 (CH), 60.5 (CH<sub>2</sub>), 54.5 (CH), 36.9 (CH<sub>2</sub>)

### 3.5.3 L-Leu-O-β-1N(D-glucopiranosil) (9)

Partiendo de (5) (80.3mg; 0.275 mmol) se obtuvo un sólido blanco. 28,9 mg (0.099 mmol)

**RMN <sup>1</sup>H** (400 MHz, D<sub>2</sub>O) δ (ppm): 5.34 (m, 1H), 5.06 – 4.97 (m, 1H), 4.95 – 4.86 (m, 1H), 4.27 (dd, *J* = 12.7, 4.1 Hz, 1H), 4.18 (dd, *J* = 12.7, 2.2 Hz, 1H), 4.08 – 3.93 (m, 1H), 3.03 (s, 1H), 2.10 (s, 4H), 2.00 (m, 15H).

**RMN <sup>13</sup>C** (101 MHz, D<sub>2</sub>O) δ (ppm): 183.1 (C=O), 173.6 (C=O), 173.3 (C=O), 172.8 (C=O), 172.7 (C=O), 73.2 (CH), 70.7 (CH), 68.4 (CH), 66.7 (CH), 64.8 (CH), 62.1 (CH<sub>2</sub>), 51.6 (CH<sub>2</sub>), 23.9 (CH), 20.1 (CH<sub>3</sub>), 15.1 (CH<sub>3</sub>).

### 3.5.4 L-Lys-O-β-1N(D-glucopiranosil) (11)

Partiendo de (6) (42.9 mg; 0.079 mmol) se obtuvo un sólido blanco. 12,9 mg (0.039 mmol, rendimiento 73%)

**RMN <sup>1</sup>H** (400 MHz, D<sub>2</sub>O) δ (ppm): 4.94 (d, *J* = 9.2 Hz, 1H), 3.99 (t, *J* = 6.4 Hz, 1H), 3.79 (d, *J* = 14.3 Hz, 1H), 3.61 (m, 1H), 3.52 – 3.40 (m, 2H), 3.34 (m 2H), 2.94 – 2.90 (m, 2H), 1.87 (m, 3H), 1.63 (m, 3H), 1.49 – 1.33 (m, 3H).

**RMN <sup>13</sup>C** (101 MHz, D<sub>2</sub>O) δ (ppm): 170.9 (C=O), 79.4 (CH), 77.8 (CH), 76.4 (CH), 71.8 (CH), 60.5 (CH<sub>2</sub>), 53.2 (CH), 39.0 (CH<sub>2</sub>), 30.1 (CH<sub>2</sub>), 26.3 (CH<sub>2</sub>), 21.09 (CH<sub>2</sub>).

### 3.5.5 Cromatografía analítica

Los análisis de los productos se realizaron empleando dos columnas: Columna Eclipse XDB-C18 (3,5  $\mu\text{m}$ , 4.6 mm  $\times$  150 mm); columna monolítica Chromolith High resolution Rp-18e 50-4.6 nm. El análisis se realizó empleando elución en gradiente. A ( $\text{H}_2\text{O}$  con TFA 0,05%) y B (ACN con TFA 0,05%). La detección se realizó a 210 nm y/o 302 nm.

### 3.5.6 Purificación mediante RP-SPE

La purificación de los glucosilaminoácidos fue realizada por el método desarrollado en nuestro laboratorio para la purificación de péptidos sintéticos. La purificación se realizó en cartuchos Supelclean LC-18. Se analizó el perfil cromatográfico obtenido por RP-HPLC de cada glucosilaminoácido impuro y se estableció el porcentaje de ACN que se requería para separar las impurezas del glucosilaminoácido. La mezcla impura fue cargada sobre el cartucho y eluida con concentraciones crecientes de ACN con 0,05% de TFA. Las fracciones obtenidas fueron analizadas por cromatografía RP-HPLC y las fracciones puras se liofilizaron.

### 3.5.7 Test de Kaiser

Se prepararon tres soluciones: (i) 40 g de Fenol disuelto en 10 mL de Etanol (EtOH) absoluto; (ii) 0,65 mg de Cianuro de potasio (KCN), 1,0 mL de agua y 49,0 mL de Piridina; (B) 1.25 g de Ninhídrina en 25 mL de EtOH absoluto. Las soluciones (i) y (ii) son mezcladas (Solución A). Para realizar la prueba se tomó una fracción de la muestra y se le adicionaron 300  $\mu\text{L}$  de A y B en proporción 2:1 (v/v). La mezcla fue homogenizada, se calentó a 105°C durante 5 min, y se verificó coloración. Coloración azul (prueba positiva para grupos aminos libres) y coloración amarilla (prueba negativa).



## 4. Resultados y Discusión

Como se mencionó anteriormente, los *N*-glucosilaminoácidos pueden obtenerse mediante diferentes metodologías.<sup>36,37</sup> En el desarrollo de esta investigación se ajustaron algunas de las metodologías reportadas para obtener los derivados del carbohidrato **(1)**, **(2)** y **(3)**,<sup>50,52,53</sup> mientras que las reacciones para la obtención de los *N*-glucosilaminoácidos protegidos **(4)**, **(5)**, **(6)** y **(7)** (agentes acoplantes TBTU, DIC y T3P®) y la estrategia de desprotección **(8)**, **(9)**, **(10)** y **(11)**<sup>54,55,56</sup> se desarrollaron y estandarizaron en el presente trabajo. El ajuste y desarrollo de estos métodos permitió obtener los compuestos mediante reacciones estereoselectivas, más sencillas, reduciendo pasos de reacción y utilizando reacciones amigables con el ambiente. Así mismo este trabajo aporta la estandarización de algunas metodologías que no estaban reportadas en la literatura. Se desarrollaron métodos cromatográficos por RP-HPLC para el monitoreo de reacciones y caracterización de productos intermedios y finales. Se diseñaron e implementaron metodologías de purificación por cromatografía RP-SPE, que facilitaron de manera significativa la purificación.

La metodología para realizar el acople entre el aminoácido y la glucosilamina fue estandarizada en el laboratorio del grupo de investigación SAMP, teniendo en cuenta algunos reportes generales para la formación de enlaces amida, ya que en la revisión bibliográfica no se encontró reporte previo del acople entre carbohidratos y aminoácidos empleando T3P®. Así mismo se logró la obtención de *N*-glucosilaminoácidos protegidos **(4)**, **(5)**, **(6)**, **(7)** y desprotegidos **(8)**, **(9)**, **(10)**, **(11)**, que no están publicados en la literatura revisada, realizando los acoples de una manera no convencional (extremo  $\alpha$ -carboxilo). En la literatura se encuentran reportadas metodologías para acoples de glicosilaminas a las cadenas laterales de Asp (carboxilo de la cadena lateral) y Thr (grupo hidroxilo en la cadena lateral).<sup>38,34,36,40,39</sup>

La estandarización del monitoreo de las reacciones mediante RP-HPLC permitió identificar los reactantes, los productos de reacción deseados y no deseados, este análisis cualitativo posibilitó establecer la presencia de especies con  $t_R$  muy cercanos. Así mismo la implementación de métodos de purificación por RP-SPE, permitió la reducción significativa de los tiempos de purificación y cantidad de solventes empleados, comparado con los tiempos en purificaciones en columna de sílica gel.

Otro aspecto importante para resaltar es la implementación de una metodología de síntesis y purificación que puede ser considerada parte de la química verde, ya que esta metodología plantea reacciones menos peligrosas, porque se emplean catalizadores y reactivos más seguros durante la síntesis. Asimismo al emplear  $\text{SnCl}_4$  se reduce el uso de reactivos que son peligrosos o nocivos y que aumentan los pasos de la ruta sintética (ejemplo, formación del bromoderivado acetilado). La purificación mediante RP-SPE y la caracterización mediante RP-HPLC permite el uso en forma mayoritaria de un solvente seguro como es el agua, de ese modo no se generan gases volátiles que contaminan el ambiente y que a su vez son nocivos para el experimentador. La reacción realizada para la formación de los *N*-glucosilaminoácidos empleando T3P®, se caracteriza por la obtención de subproductos que son fácilmente eliminados mediante lavados acuosos, lo que implica que la síntesis sea menos peligrosa comparada con otros reactivos. Así mismo la mayoría de las reacciones son realizadas a TA, minimizando de ese modo los requerimientos energéticos. Finalmente, los compuestos obtenidos no son tóxicos para el medio ambiente o para los seres vivos, ya que éstas forman parte de las moléculas que se encuentran en estos organismos.

## 4.1 Síntesis de 1,2,3,4,6-penta-O-acetil- $\alpha$ -D-glucopiranososa (1)

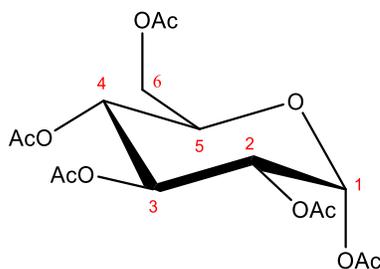


Figura 7. Estructura de (1) ( $C_{16}H_{22}O_{11}$ )

El análisis de (1) (Figura. 7) por espectroscopia FT-IR muestra una banda aguda de intensidad fuerte en  $1742\text{ cm}^{-1}$  que corresponde al estiramiento simétrico de los grupos carbonilo C=O. La banda aguda de intensidad media en  $1225\text{ cm}^{-1}$  corresponde al estiramiento simétrico del enlace C-O-C. Los estiramientos corresponden a los grupos acetilo, así mismo se evidencia la desaparición de la banda de los grupos OH observados en el espectro IR de la D-glucosa (Figura 8), indicando que todos los grupos hidroxilos fueron acetilados, lo que está de acuerdo con la estructura de (1) (Figura 9).

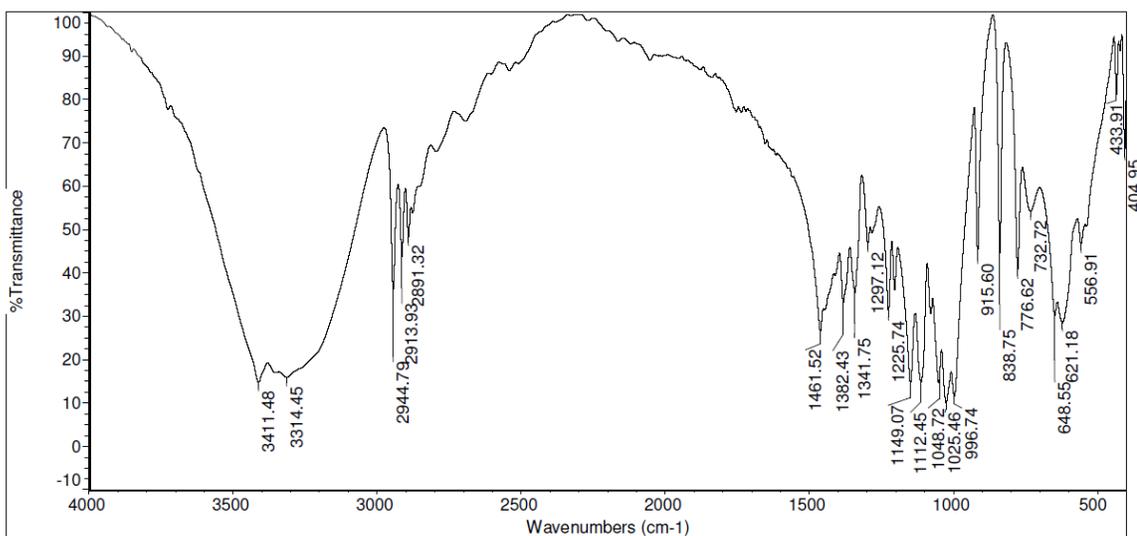


Figura 8. Espectro FT-IR para D- Glucosa

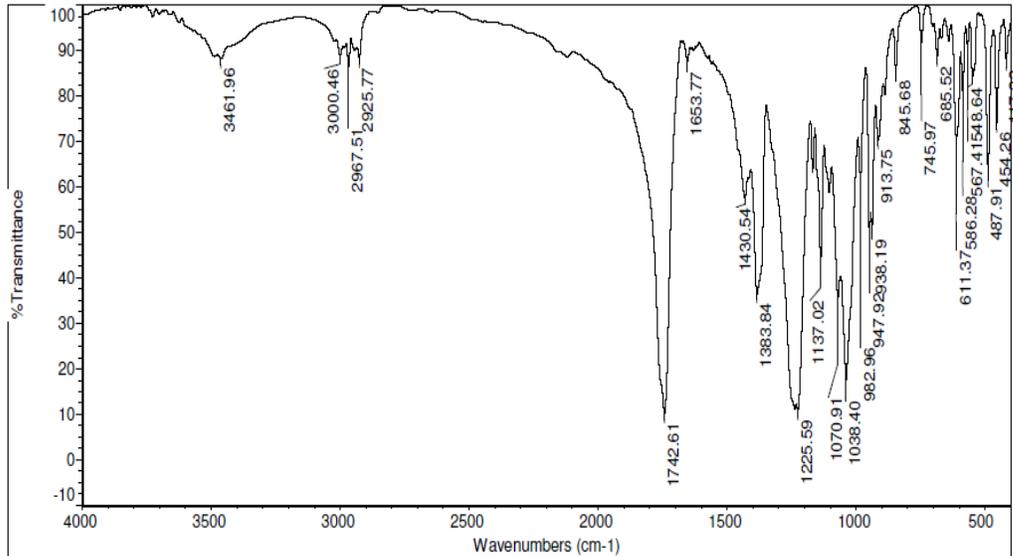


Figura 9. Espectro FT-IR para (1)

El espectro RMN-<sup>1</sup>H de (1) (Figura 10) presenta las siguientes señales: doblete en 6.35 ppm (Anexo B – 1.4) que integra para un protón, con  $J_{H-H} = 3.6$  Hz que corresponde al protón anomérico H-1, teniendo en cuenta el valor de la constante y la curva de Karplus se determina que H-1 está en configuración ecuatorial (anómero  $\alpha$ ). El anómero  $\beta$  se evidencia como otro doblete correspondiente al H'-1 en configuración axial, con un desplazamiento de 5.74 ppm y  $J_{H-H} = 8.4$  Hz. En 5.51 ppm se observa un triplete con  $J_{H-H} = 9.8$  Hz que corresponde al H-3 en configuración axial. Se observa un multiplete que integra para dos protones en la región 5.18–5.09 ppm que corresponde a H-2 y H-4. En 4.30–4.26 ppm se observa un doblete con  $J_{H-H} = 12.4$  y 4.2 Hz que integra para un protón y corresponde a H-6 a/b. En 4.15 ppm – 4.08 ppm se observa un multiplete que integra para dos protones H-5 y H-6 a/b. En la región comprendida entre 2.19 ppm – 2.03 ppm (Anexo A – 1.4) se observan cinco singletes que integran para tres protones cada uno; estas señales corresponden a los grupos metilo de los grupos acetilos del compuesto. (Anexo A – 1.5)

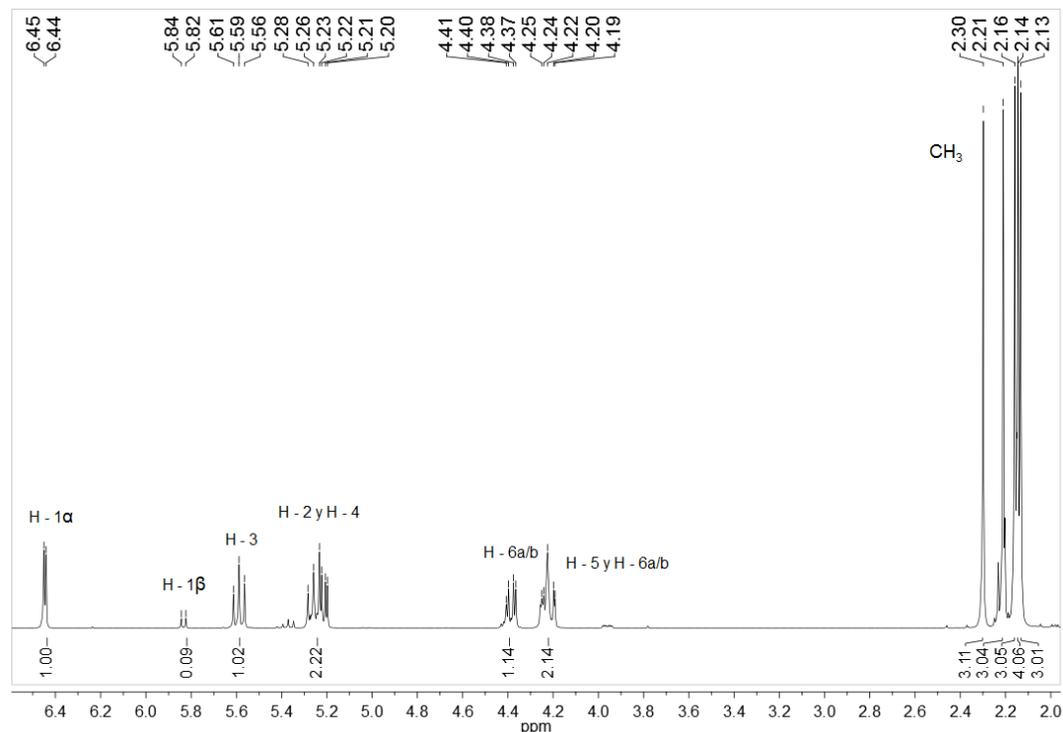


Figura 10. Espectro RMN <sup>1</sup>H para (1)

Los espectros RMN-<sup>13</sup>C (Figura 11) y DEPT 135 (Figura 12) indican que el producto posee el número de átomos de carbono esperados y fue posible identificar las señales correspondientes a carbonos cuaternarios y los carbonos de los grupos CH, CH<sub>2</sub> y CH<sub>3</sub> (Anexo A – 1.7 y 1.8). En la región comprendida entre 170.6 ppm – 168.7 ppm, se encuentran 5 señales que corresponden a los carbonos carbonílicos de los cinco grupos acetilos. La señal presente en 89.0 ppm corresponde al C-1 del anómero  $\alpha$ , mientras que la señal correspondiente al anómero  $\beta$  C-1 se observa como una señal de menor intensidad en 91.3 ppm, las señales entre 69.8 ppm y 67.9 ppm corresponden a los 5 grupos CH del anillo de piranosa. La señal en 61.4 ppm corresponde al C-6 (CH<sub>2</sub>), lo que se confirma mediante el experimento DEPT 135, ya que esta señal se encuentra en fase negativa (Figura 12). Las 5 señales que se encuentran entre 20.8 ppm – 20.4 ppm corresponden a los 5 carbonos de los grupos metilo.

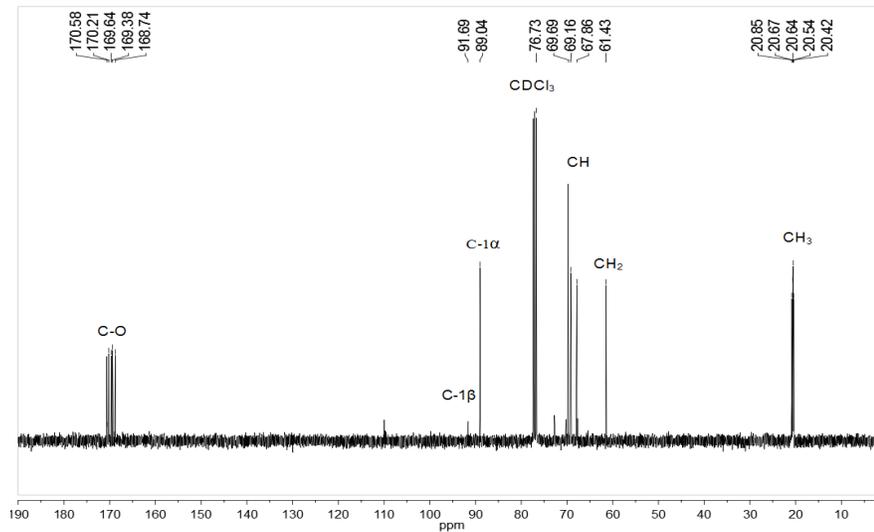


Figura 11. Espectro RMN <sup>13</sup>C para (1)

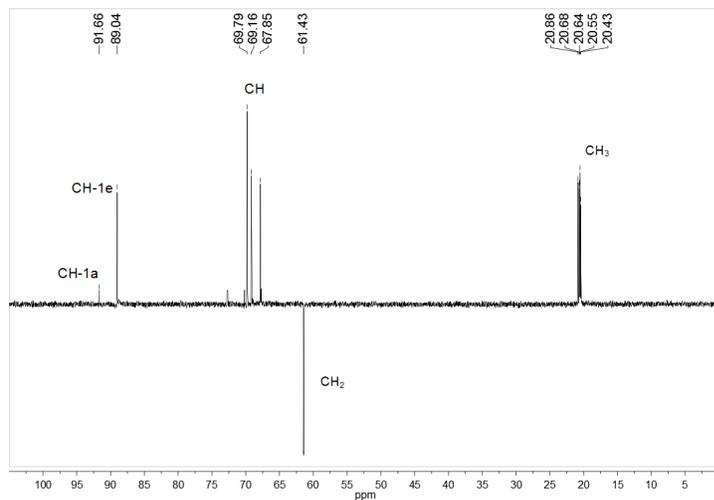


Figura 12. Espectro RMN <sup>13</sup>C DEPT 135 para (1)

El análisis por RMN-<sup>1</sup>H permite concluir que (1) está formado por una mezcla anomérica, siendo el anómero α la especie mayoritaria. Teniendo en cuenta el valor del área bajo la curva de los dos dobletes se determina que el anómero α corresponde al 87% y el anómero β al 13%. El anómero β es la forma anomérica de la glucosa que predomina en forma libre. Sin embargo el producto obtenido está formado principalmente por el anómero α, posiblemente debido a las condiciones de reacción (temperatura, solventes, ácidos, etc). Esto está de acuerdo con reportes que sugieren que dependiendo de las condiciones de reacción se puede favorecer la formación de un anómero en particular.<sup>59</sup> Los resultados obtenidos también concuerdan con el reporte de Painter<sup>60</sup> quien muestra que el equilibrio

entre los anómeros de la D-glucosa pentaacetilada en presencia de ácido sulfúrico o ácido perclórico, se desplaza favoreciendo la formación del anómero  $\alpha$  (anómero  $\alpha$  87% y el anómero  $\beta$  13%). En reportes encontrados para el compuesto obtenido, según Bonner et al la proporción fue de 83,5% para el anómero  $\alpha$  y 16,5% para el anómero  $\beta$  y Jungius reportó que la proporción fue de 90% para el anómero  $\alpha$  y 10% para el anómero  $\beta$  <sup>60</sup>

## 4.2 Síntesis de 2,3,4,6-tetra-O-acetil- $\beta$ -D-glucopiranosilazida (2)

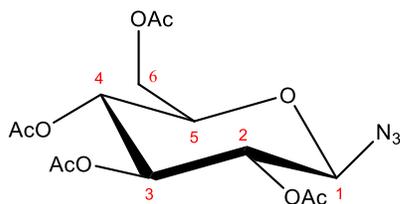


Figura 13. Estructura de (2) ( $C_{14}H_{19}N_3O_9$ )

La reacción para formar el derivado de azida se realizó partiendo de (1) y empleando el ácido de Lewis  $SnCl_4$ , que induce la formación estereoselectiva del anómero  $\beta$ .<sup>33,61</sup> Esta reacción ocurre sin necesidad de formar el bromo derivado como se reporta comúnmente en la bibliografía,<sup>32,62,63</sup> lo que implica la disminución de un paso en la síntesis del compuesto. Aunque este método se encuentra reportado en la literatura, son pocos los trabajos en los que relacionan la formación del derivado de azida mediante esta metodología para obtener *N*-glucosilaminoácidos.

El análisis de (2) por FT-IR muestra estiramientos en  $1750\text{ cm}^{-1}$  y  $1225\text{ cm}^{-1}$  que corresponden a enlaces  $C=O$  y  $C-O$  de los grupos acetilo. Se observa una banda aguda intensa en  $2118\text{ cm}^{-1}$  producida por un estiramiento asimétrico que corresponde a grupos funcionales  $X=Y=Z$  y que absorben en esa región. También se evidencia un estiramiento simétrico, señal débil en  $1240\text{ cm}^{-1}$  característico de la función azida, sugiriendo que (2) tiene el grupo  $N_3$ . (Anexo B – 2.3)

El espectro RMN-<sup>1</sup>H de (2) (Anexo B – 2.3) presenta las siguientes señales: triplete en 5.26 ppm - 5.21 ppm que integra para un protón, con  $J_{H-H} = 9.2\text{ Hz}$ ; que corresponde al H-3. Teniendo en cuenta la curva de Karplus, esta constante indica que el protón está en posición axial ((Anexo B – 2.4). En 5.15 ppm se observa un triplete  $J_{H-H} = 9.8\text{ Hz}$  que

corresponde al H-4 posición axial, así mismo se observa un triplete en 4.99 ppm con  $J_{H-H} = 9.2$  Hz, que corresponde al H-2 posición axial. En 4.67 ppm se observa un doblete con  $J_{H-H} = 8.8$  Hz, este corresponde al protón anomérico. Teniendo en cuenta el valor de la constante se determina que está en configuración axial (anómero  $\beta$ ). En 4.32 ppm - 4.27 ppm se observa un doblete con  $J_{H-H} = 12.4$  y 4.8 Hz, en 4.21 ppm - 4.17 ppm se encuentra otro doblete con  $J_{H-H} = 12.4$  y 2.4 Hz; estas señales corresponden a los protones H-6 a/b. En 3.83 ppm - 3.79 ppm se observa un multiplete que integra para un protón y corresponde al H-5. En la región comprendida entre 2.12 ppm - 2.02 ppm se observan cuatro singletes que integran para tres protones cada uno; estas señales corresponden a los grupos metilo de los grupos acetilo.

El experimento COSY permite determinar a qué protones corresponden los tripletes que se encuentran entre 5.26 ppm y 5.10 ppm. (Figura 14).

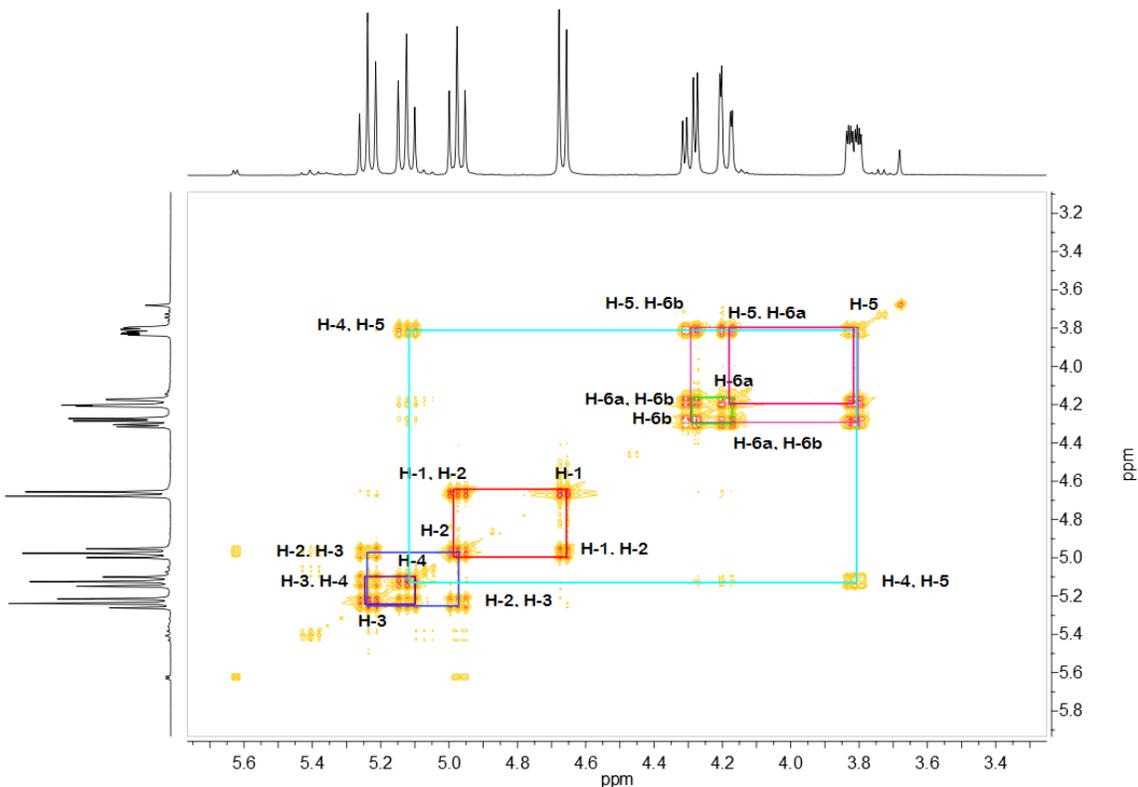


Figura 14. Espectro  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY para (2)

Los espectros de RMN- $^{13}\text{C}$  permitieron corroborar la cantidad de átomos de carbono y la identidad de cada uno de ellos se analizó mediante los experimentos DEPT 135 y 90.

(Anexo B – 2.8 y 2.9). Entre 170.6 ppm - 169.2 ppm se observan cuatro señales que corresponden a los carbonos cuaternarios de los grupos acetilo. La señal en 87.9 ppm corresponde al C-1, las señales entre 74.1 ppm y 67.9 ppm corresponden a los C2, C3, C4 y C5. La señal en 61.6 ppm corresponde al C-6, lo que se confirma en el experimento DEPT 135, ya que esta señal se encuentra en fase negativa (Anexo B - 2.9). Las cuatro señales que se observan entre 20.67 ppm – 20.62 ppm corresponden a los grupos metilo de los cuatro grupo acetilos.

Los resultados muestran que se obtuvo **(2)** con alta pureza y rendimiento, se puede establecer que no hay mezcla anomérica y solamente se obtuvo el anómero  $\beta$ , que era lo que se esperaba debido a las condiciones de reacción. El análisis de **(2)** por IR mostró que las señales correspondientes al estiramiento asimétrico de N=N=N en  $2118\text{ cm}^{-1}$  y  $1756\text{ cm}^{-1}$ ; y el estiramiento simétrico de N=N=N en  $1240\text{ cm}^{-1}$ , concuerdan con Mohammed et al.<sup>64</sup>, quienes reportan las siguientes señales IR para **(2)**:  $2118\text{ (N-N)}$ ,  $1754$  y  $1732\text{ (C=O)}$ . Se puede observar que la señal para N=N=N correspondiente al estiramiento asimétrico coincide con nuestros resultados. El análisis por RMN- $^1\text{H}$  de **(2)** muestra que la señal en 4.67 ppm (d,  $J_{H-H} = 8.8\text{ Hz}$ ) corresponde al protón anomérico en configuración axial. Este resultado concuerda con lo reportado por Mohammed et al.,<sup>64</sup> quienes reportan para **(2)** la señal del protón anomérico en 4.65 ppm (d,  $J_{H-H} = 8.8\text{ Hz}$ ). Mientras que la señal del C1 para **(2)** está en 87.96 ppm y para C-1 un desplazamiento de 87,9 ppm.<sup>64</sup>

La formación de un anómero o de la mezcla de anómeros de las glicosilazidas depende de las condiciones de reacción como son: el promotor, el medio de reacción, solvente, temperatura, entre otros. En este caso el promotor  $\text{SnCl}_4$  y el grupo protector acetilo dirigen la reacción hacia la formación del anómero  $\beta$ .<sup>59</sup> Esto se debe al mecanismo de reacción, implicando que solo el anómero  $\alpha$  de **(1)** reacciona para formar el derivado de azida. Teniendo en cuenta los rendimientos y que solo el anómero  $\alpha$  de **(1)** reacciona para formar **(2)** se sugiere que esta reacción procede de forma cuantitativa. Es importante indicar que se deseaba obtener el anómero  $\beta$  de la glucosilazida con el fin de obtener el anómero  $\beta$  de la glucosilamina y de esta forma obtener también el mismo anómero de los glucosilaminoácidos con el fin de evitar la formación de mezclas anoméricas en los bloques **(4)**, **(5)**, **(6)**, **(7)**, **(8)**, **(9)**, **(10)** y **(11)**.

La ruta sintética planteada para la obtención de **(1)**, **(2)** y **(3)**, se realiza a condiciones normales de temperatura y presión, emplea catalizadores en cada paso de la reacción, lo

que implica reacciones estereoselectivas que reducen el número de especies formadas y los pasos de la ruta sintética, evidenciándose de ese modo el cumplimiento de los principios 6, 8 y 9 de la química verde.<sup>65</sup>

## 4.3 Síntesis de *N*-glucosilaminoácidos

### 4.3.1 Determinación de las condiciones óptimas para el monitoreo de las reacciones por RP-HPLC.

Las reacciones que involucran la obtención de los *N*-glucosilaminoácidos **(4)**, **(5)**, **(6)** y **(7)** fueron monitoreadas por cromatografía RP-HPLC debido a que las moléculas contienen el grupo Fmoc que absorbe en la región UV. El seguimiento de las reacciones por CCF fue realizada. Sin embargo por la naturaleza hidrofóbica de los compuestos y los subproductos de la reacción no fue posible establecer un sistema de elución que permitiera evaluar de forma cualitativa el número de especies presentes en la mezcla de reacción. Se realizaron diferentes experimentos para establecer el sistema cromatográfico óptimo, en los cuales se determinó (i) la composición de la fase móvil, (ii) las condiciones óptimas para la elución por gradiente ( $\Delta\%B$ ,  $T_G$ ) (iii) flujo, (iv) columna, (v) longitud de onda, y (vi) cantidad de muestra a analizar.

Los primeros análisis mediante RP-HPLC se realizaron partiendo de un bajo %B, lo que involucraba tiempos largos de análisis debido a la hidrofobicidad de las moléculas obtenidas. Por este motivo fue necesario realizar modificaciones en el gradiente y disminuir los tiempos de análisis, ahorrando así solventes y tiempo de trabajo del equipo. A manera de ejemplo: en la figura 15 se muestra el perfil cromatográfico del aminoácido Fmoc-Asp(OtBu)-OH con  $t_R$ :36.8 min, y el gradiente tiene un %B inicial de 5%. El  $t_R$  hacía que la corrida fuera de 70 min teniendo en cuenta el lavado y el equilibrio de la columna. Lo anterior llevó a cambiar el gradiente de elución comenzando con %B inicial de 15% (figura 16).

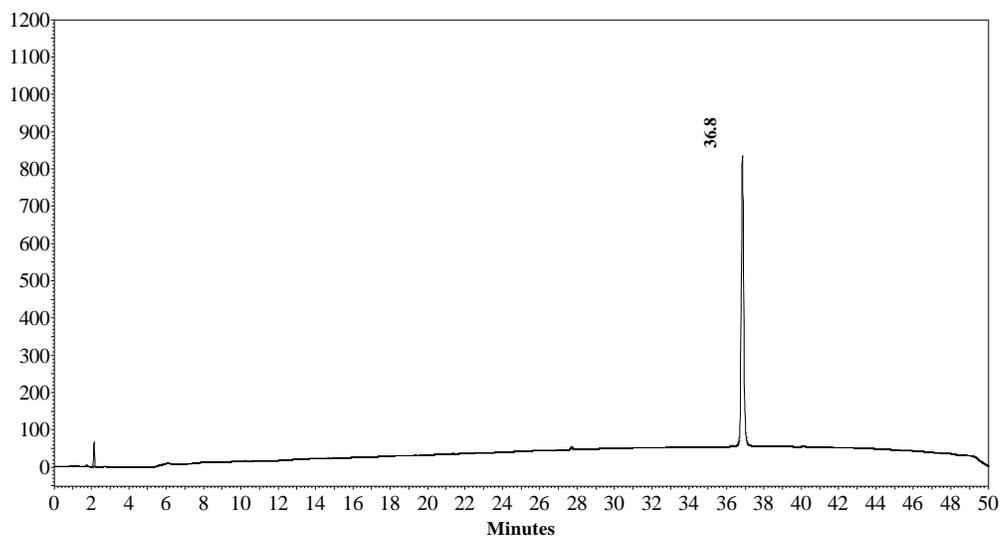


Figura 15. Perfil cromatográfico *Fmoc-Asp(OtBu)-OH* 5%ACN

La figura 16 muestra el perfil cromatográfico para el mismo aminoácido, con  $t_R$ : 27.7min, lo que redujo los tiempos de análisis, sin afectar la separación de manera drástica. Como se puede apreciar se redujo en 10 min el  $t_R$  y la cantidad de disolventes empleados.

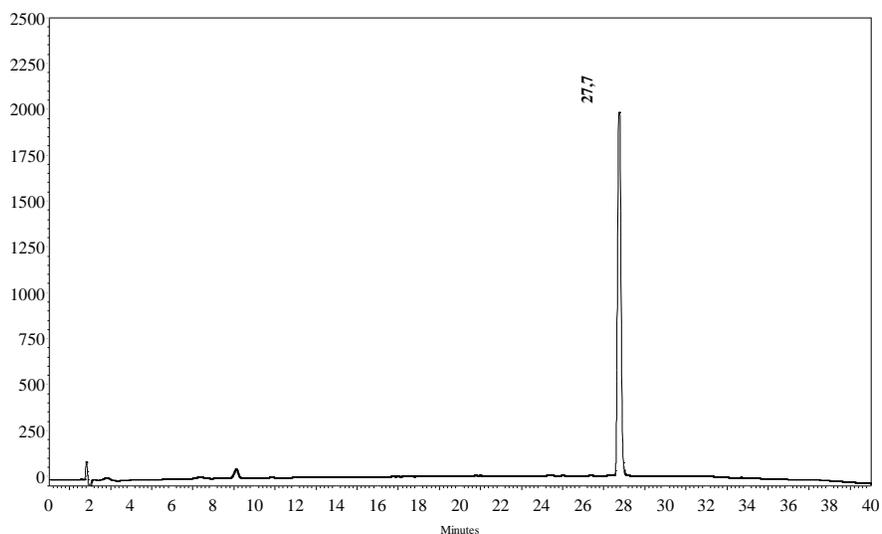


Figura 16. Perfil cromatográfico *Fmoc-Asp(OtBu)-OH* 15%ACN

Luego de realizar varios ajustes, el sistema cromatográfico óptimo para monitorear las reacciones de formación de los *N*-glucosilaminoácidos **(4)**, **(5)**, **(6)**, y **(7)**, las reacciones de desprotección de la cadena lateral **(6a)**, **(7a)** y la remoción del grupo Fmoc empleando la columna empacada Eclipse XDB-C18 (3,5  $\mu$ m; 4.6  $\times$  150 mm) fue: solvente A: (Agua con

TFA 0,05%), solvente B: (ACN con TFA 0,05%), elución con gradiente 15/100/100/15 %B en 2/47/54/64 min (Figura 17, línea sólida). Flujo: 1 mL/min, longitud de onda 302 y 210 nm, inyección 10  $\mu$ L (0,1 mg/mL *N*-glucosilaminoácido).

El sistema cromatográfico óptimo para monitorear las reacciones de desacetilación de los *N*-glucosilaminoácidos empleando la columna empacada Eclipse XDB-C18 (3,5  $\mu$ m; 4,6  $\times$  150 mm) fue: solvente A: (Agua con TFA 0,05%), solvente B: (ACN con TFA 0,05%), elución con gradiente 5/100/100/5 %B en 2/55/63/73 min (Figura 17, línea punteada). Flujo: 1 mL/min, longitud de onda 302 y 210 nm, inyección 10  $\mu$ L (0,1 mg/mL *N*-glucosilaminoácido).

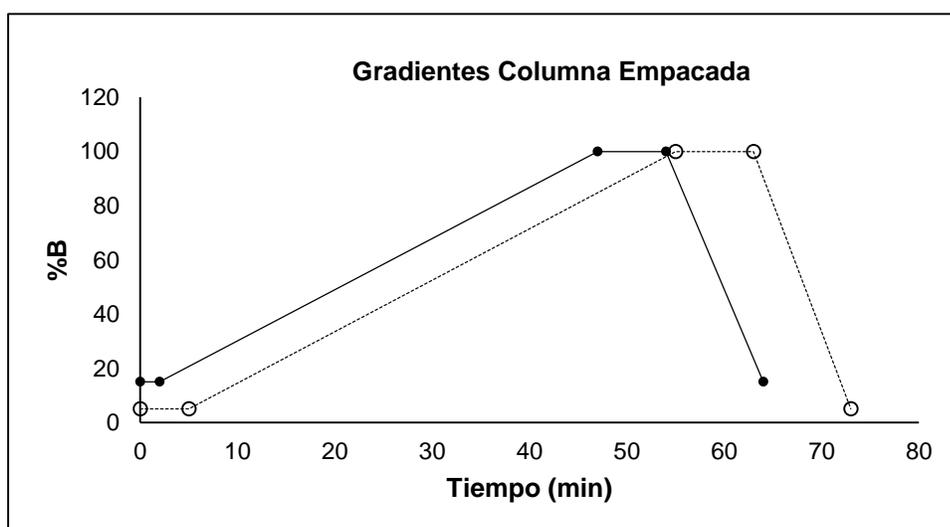


Figura 17. Gradientes cromatográficos columna empacada

En el grupo de investigación se realizó la transferencia de los métodos cromatográficos realizados en columnas empacadas C-18 para la caracterización de péptidos sintéticos a columnas monolíticas. Los resultados obtenidos evidenciaron que era posible reducir los tiempos de corrida hasta cuatro veces sin afectar significativamente los parámetros cromatográficos.

Por este motivo se decidió hacer la misma transferencia de la columna para el análisis de *N*-glucosilaminoácidos. La tabla 1 muestra las comparaciones hechas para el  $t_R$ , tiempo de análisis y volumen de ACN empleado en cada corrida. Se evidencia que los tiempos de

corrida disminuyen casi cuatro veces y que se reduce la cantidad de ACN empleada para cada corrida en 49%. Por estos motivos y pensando en economizar recursos y el uso de sustancias nocivas, se decidió continuar con el análisis para los *N*-glucosilaminoácidos utilizando la columna monolítica.

Tabla 1. Comparación de los tiempos de corrida y los tiempos de retención para los compuestos (4 a 7) utilizando la columna empacada y la columna monolítica

Comp.	Columna empacada eclipse XDB - C18			Columna monolítica Chromolith High resolution RP - 18e		
	t <sub>R</sub> (min)	tiempo análisis (min)	mL de ACN utilizados	t <sub>R</sub> (min)	tiempo análisis (min)	mL de ACN utilizados
4	31.2			8.6		
5	31.2	64	33,5	8.7	18	17
6	31.0			8.6		
7	32.2			8.8		

Las figuras 18 y 19 muestran el perfil cromatográfico para (7) en las dos columnas. Se evidencia que no se altera el perfil cromatográfico de la molécula. Teniendo en cuenta los resultados, para realizar el monitoreo de las purificaciones de los compuestos obtenidos, se empleó la columna monolítica.

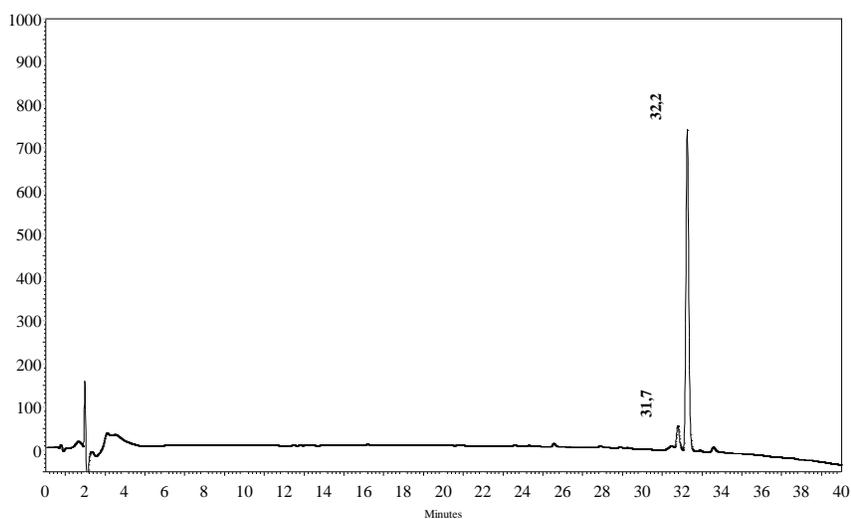


Figura 18. Análisis cromatográfico de (7) en columna empacada

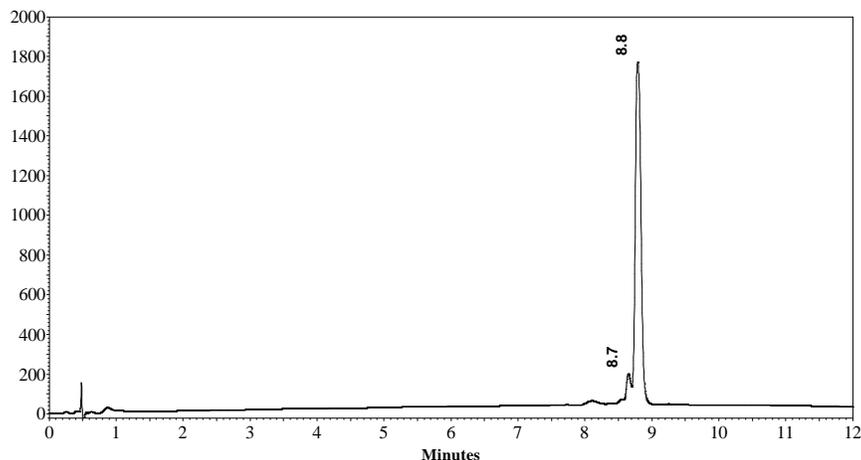


Figura 19. Análisis cromatográfico de (7) en columna monolítica

El sistema cromatográfico óptimo para realizar el monitoreo de las fracciones obtenidas en el proceso de purificación por cromatografía RP-SPE y el monitoreo de las reacciones de desprotección de las cadenas laterales y remoción del grupo Fmoc, empleando la columna monolítica Chromolith High resolution Rp-18e fue: solvente A: (Agua con TFA 0,05%), solvente B: (ACN con TFA 0,05%), elución con gradiente 15/75/75/15 %B en 1/11.5/13.5/17.5 min (figura 20 línea sólida). Flujo: 2 mL/min, longitud de onda 302 y 210 nm, inyección 10 uL (0,1 mg/mL *N*-glucosilaminoácido).

El sistema cromatográfico óptimo para realizar el monitoreo de las reacciones de desacetilación, empleando la columna monolítica Chromolith High resolution Rp-18e fue: solvente A: (Agua con TFA 0,05%), solvente B: (ACN con TFA 0,05%), elución con gradiente 5/75/75/5 %B en 1/13.5/15.5/19.5 min (figura 20 línea punteada). Flujo: 2 mL/min, longitud de onda 302 y 210 nm, inyección 10 uL (0,1 mg/mL *N*-glucosilaminoácido).

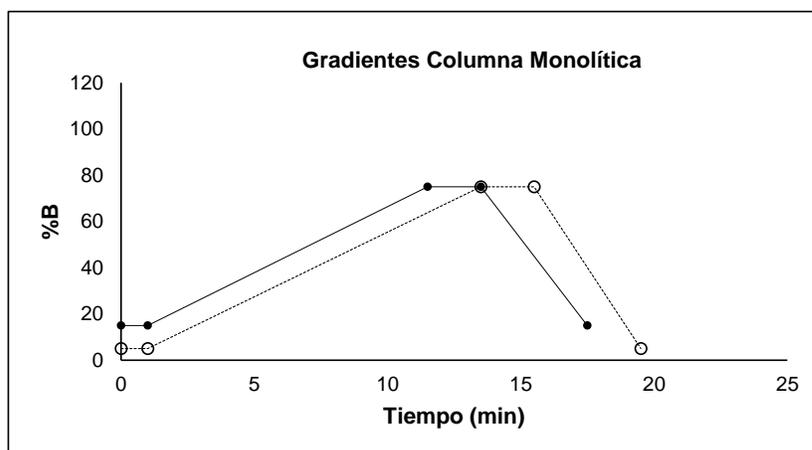


Figura 20. Gradientes cromatográficos utilizados en la columna monolítica

### 4.3.2 Determinación de las condiciones óptimas para la purificación de los *N*-glucosilaminoácidos (4 a 7)

Una vez obtenidos los productos de reacción (4), (5), (6) y (7) se procedió a purificarlos utilizando el método convencional de cromatografía columna en silica gel utilizando flash cromatografía. Inicialmente se purificó (5) utilizando como eluyente DCM, obteniéndose un producto con alta pureza, pero con bajos rendimientos. Utilizando la misma metodología se purificó (6). Sin embargo, no se obtuvo ninguna fracción con el *N*-glucosilaminoácido derivado de Lys a pesar que se eluyó con grandes volúmenes de DCM. Se decidió eluir con solventes de diferente polaridad como Acetato de etilo, mezclas de Acetato de etilo/ Ciclohexano y Ciclohexano y no fue posible recuperar (6).

Los bajos rendimientos obtenidos en la purificación de (5) y la pérdida de (6) pueden ser posiblemente atribuibles a que los aminoácidos sufren alguna descomposición cuando se utiliza Silica gel. Se intentó utilizar columnas más cortas con eluciones más rápidas y diferentes eluentes pero no fue posible estandarizar una metodología que permitiera purificar los glucosilaminoácidos (4), (5), (6), y (7) con altos rendimientos. Los glucosilaminoácidos están totalmente protegidos, por este motivo su naturaleza es hidrofóbica; teniendo en cuenta esta característica estructural se consideró que la cromatografía en fase normal no era la más apropiada, por lo que se decidió realizar purificación por cromatografía en fase reversa. En el laboratorio se cuenta con columnas RP-SPE así que se decidió evaluar la purificación de estos compuestos utilizando esta técnica. Los eluentes utilizados fueron los mismos que se utilizaban en RP-HPLC, las muestras se eluyeron con concentraciones altas del solvente B (ACN con 0,05% de TFA) y fue posible obtener los bloques puros.

Es importante resaltar que en la cromatografía RP-SPE empleada en este trabajo solamente fue necesario utilizar ACN con TFA 0,05% y agua con TFA 0,05% lo que facilita el tratamiento y disposición final de los residuos. El consumo de ACN para purificar 200mg de producto impuro fue de 138 mL. De acuerdo a nuestra experiencia, purificar esa cantidad por cromatografía RP-HPLC semipreparativa requiere aproximadamente 900 mL de ACN. Lo anterior muestra que esta metodología requirió cantidades bajas de solvente, reduciendo 6 veces la cantidad de ACN empleado mediante otra técnica, además no se utilizan mezclas de solventes orgánicos nocivos para el ser humano y el ambiente. Lo

anterior muestra que es posible implementar métodos de separación y purificación utilizando la RP-SPE para compuestos que son lábiles a la descomposición, que es un método rápido, no requiere equipos costosos y sobre todo que es una metodología amigable con el medio ambiente y reduce el impacto negativo causado a los seres vivos, cumpliéndose de ese modo los principios 3 y 5 de la química verde.<sup>65</sup>

La Figura 21 muestra algunos cromatogramas del monitoreo de las fracciones obtenidas durante la purificación de (4). Así mismo se muestra la tabla con las fracciones realizadas durante la elución.

La estandarización de los métodos cromatográficos empleando dos columnas diferentes (empacada y la monolítica), para el monitoreo y caracterización de las moléculas, y la purificación de los *N*-glucosilaminoácidos protegidos mediante RP-SPE representan otro aporte al conocimiento de estas metodologías, ya que no se encuentra literatura en la que se reporte la purificación de moléculas de este tipo mediante estos protocolos.

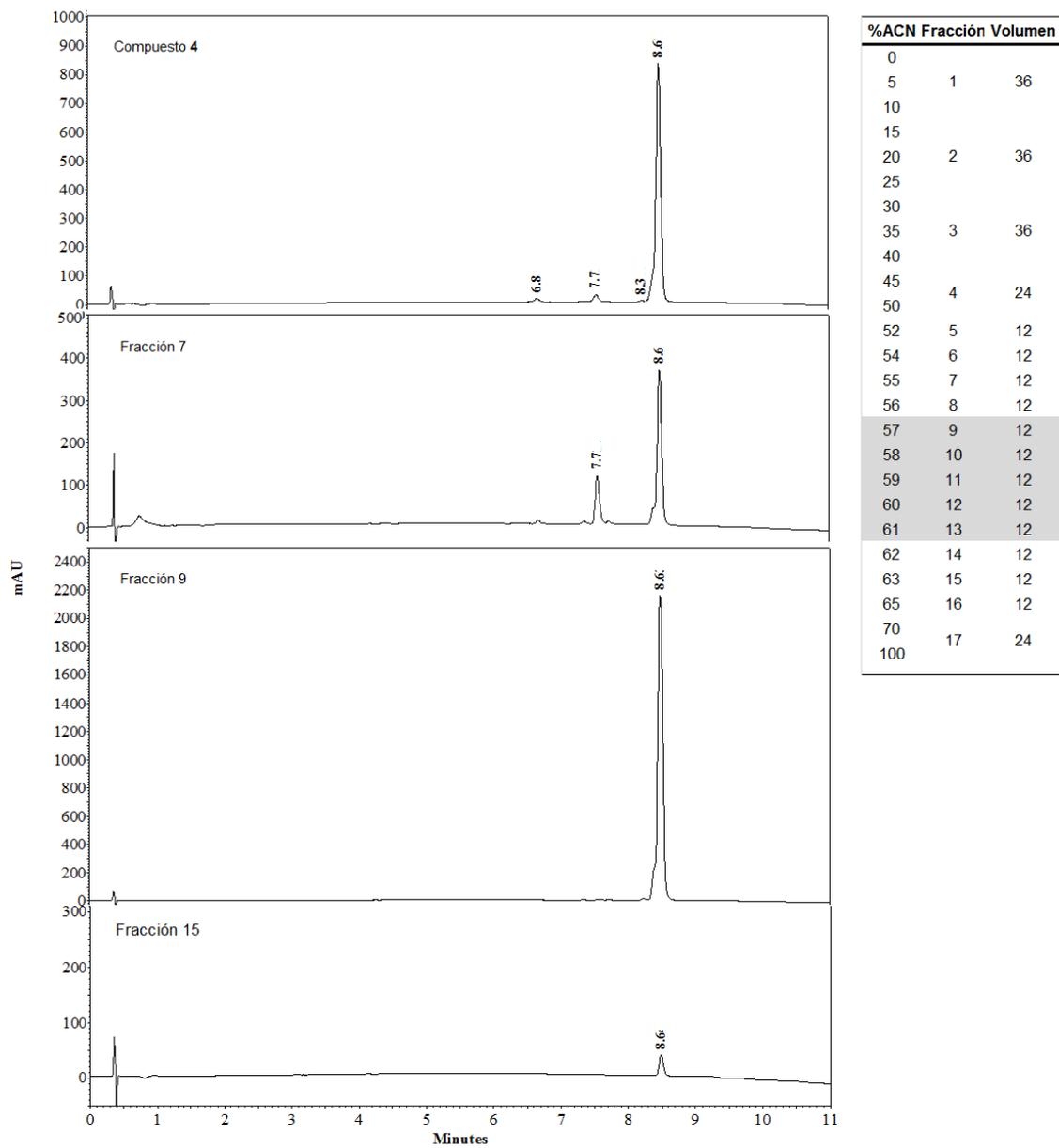


Figura 21. Esquema de purificación y cromatogramas de algunas fracciones obtenidas para (4)

### 4.3.3 Determinación de las condiciones óptimas para la síntesis de *N*-glucosilaminoácidos (4 a 7)

Para establecer las condiciones óptimas para la síntesis de glucosilaminoácidos se realizaron reacciones variando las condiciones para las tres metodologías evaluadas: En el caso de las metodologías en que se utilizó carbodiimidas y las sales de uronio se partió de los protocolos establecidos en nuestro laboratorio para la SPFS.

La obtención de los *N*-glucosilaminoácidos (4), (5), (6), (7) se realizó por formación del enlace amida entre el producto crudo de la glucosilamina y el grupo alfa carboxi de los aminoácidos. La glucosilamina no fue purificada debido a su labilidad a la hidrolisis y a su posible descomposición durante el proceso de purificación utilizando silica gel.<sup>66,67</sup>

Método de las sales de uronio (2h reacción). Se realizó la reacción de acople entre la *N*-glucosilamina y el Fmoc-aminoácido empleando sales de uronio (Fmoc-aminoácido/TBTU/HOBt/DIPEA 1:1:1:3 equiv en DMF, 2 h, TA). Los perfiles cromatográficos de las figuras 22-25 muestran el monitoreo de la reacción.

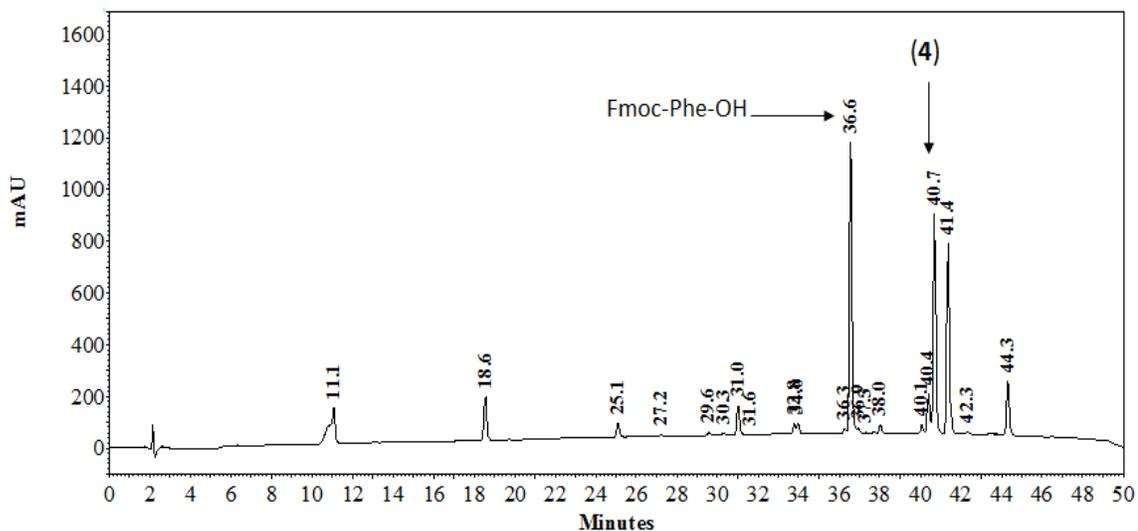


Figura 22. Perfil cromatográfico formación de (4) empleando TBTU/HOBt/DIPEA, 2 h de reacción.

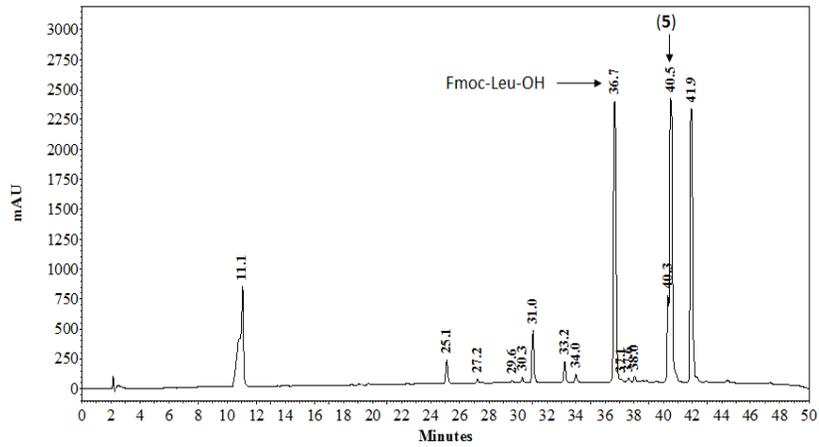


Figura 23. Perfil cromatográfico formación de (5) empleando TBTU/HOBt/DIPEA, 2 h de reacción.

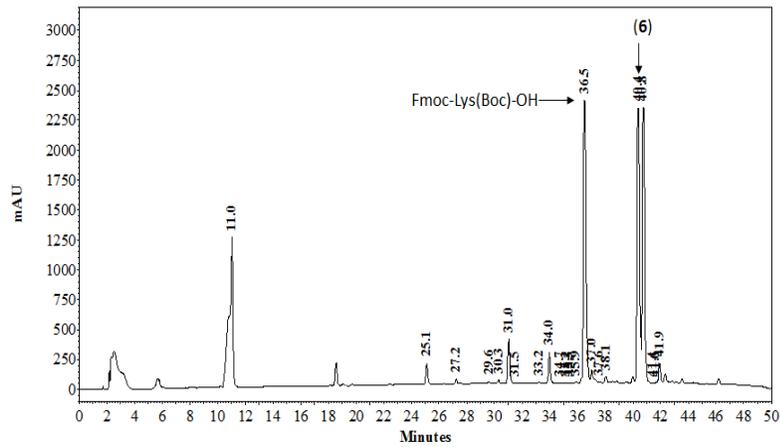


Figura 24. Perfil cromatográfico formación de (6) empleando TBTU/HOBt/DIPEA, 2 h de reacción

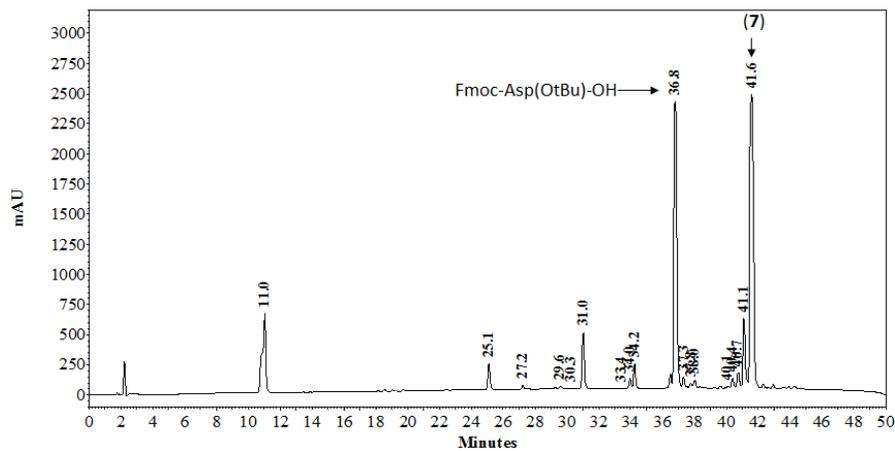


Figura 25. Perfil cromatográfico formación de (7) empleando TBTU/HOBt/DIPEA, 2 h de reacción

Los perfiles cromatográficos de las figuras 22-25 muestran que después de 2 h de reacción el Fmoc-aminoácido no ha sido consumido en su totalidad indicando que la reacción fue incompleta. En todos los casos se observan otras señales que posiblemente se deben a subproductos de reacción. La señal del producto esperado se encuentra con  $t_R = 41$  min. Sin embargo se observa otra señal de un subproducto con un tiempo de retención muy cercano, lo que dificultó la purificación y afectó los rendimientos. Aunque la metodología empleada funciona para el acople entre aminoácidos en la SPFS, se observó que el tiempo de reacción no aplica para la síntesis de *N*-glucosilaminoácidos y que la mezcla de reacción presenta muchas especies no deseadas. Teniendo en cuenta los reportes de Paolini,<sup>37</sup> se incrementó el tiempo de reacción y el protocolo utilizado fue cambiado a 16 h de reacción para determinar si se consumía en su totalidad el Fmoc-aminoácido.

Método de las sales de uronio (16h): Se mezclaron Fmoc-aminoácido/Glicosilamina/TBTU/HOBt/DIPEA (1:1:1:1:3 equiv), se disolvieron en DMF y se dejaron en reacción durante 16 h con agitación constante y a TA. Los perfiles cromatográficos de las figuras 24-26 muestran el monitoreo de la reacción de formación de (4).

En la Figura 26 se muestra el perfil cromatográfico del aminoácido protegido Fmoc-Phe-OH con  $t_R$ : 27,3 min.

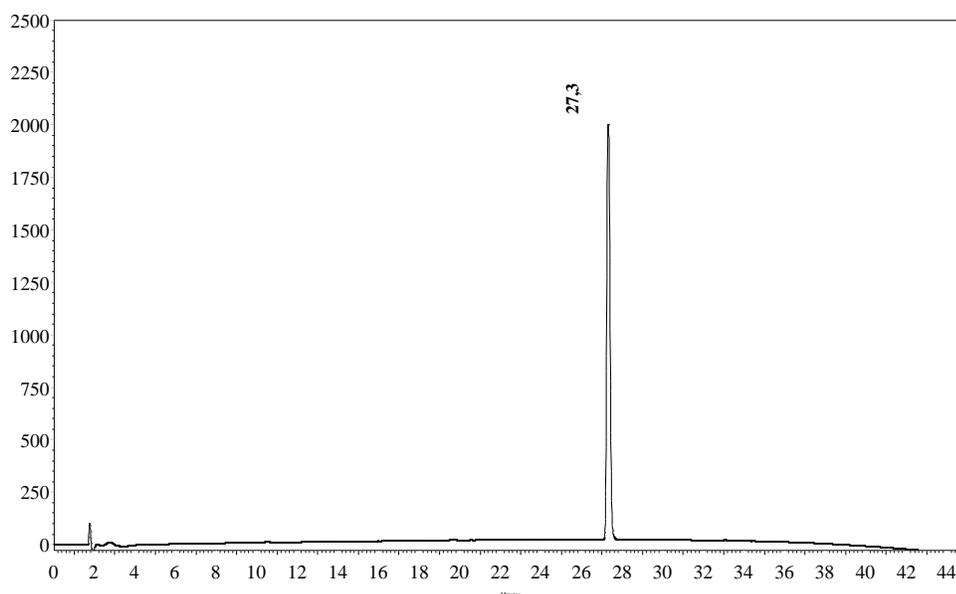


Figura 26. Perfil cromatográfico de Fmoc-Phe-OH

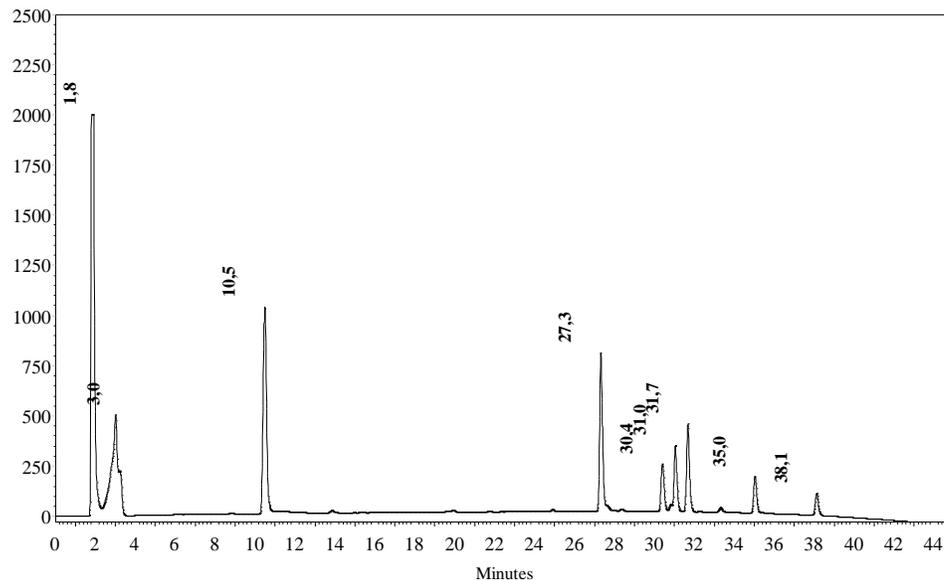


Figura 27. Perfil cromatográfico formación de (4) empleando TBTU/HOBt/DIPEA, 0 h de reacción

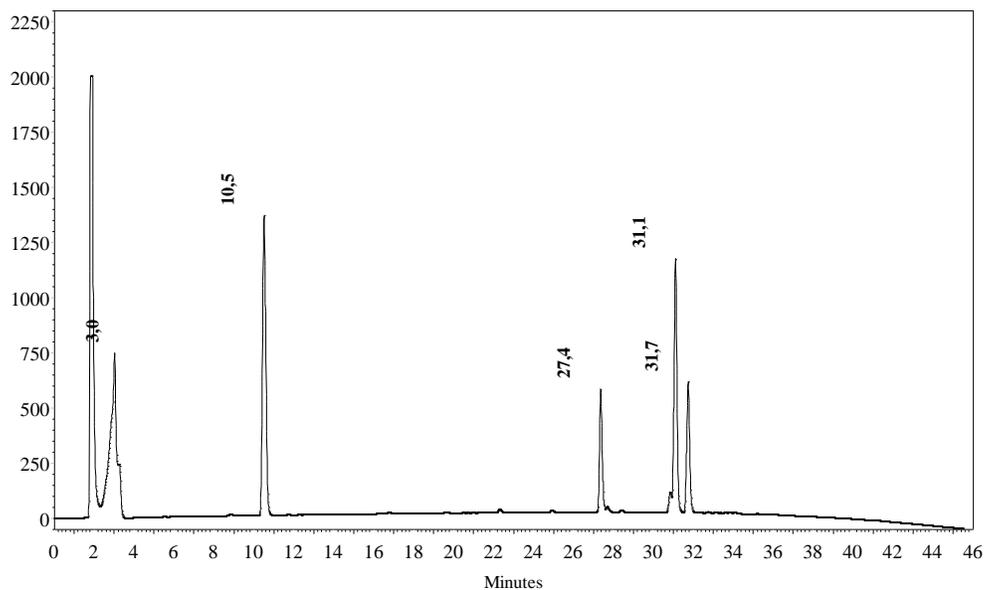


Figura 28. Perfil cromatográfico formación de (4) empleando TBTU/HOBt/DIPEA, 16 h de reacción

La Figura 28 muestra el perfil cromatográfico de la mezcla de reacción en  $t = 16$  h, se evidencia la formación de una especie con  $t_R$ : 31,1 min, que corresponde a (4), también se encuentra un pico con  $t_R$ : 27,4 min, que corresponde al reactivo de partida indicando que

este no se consumió totalmente. Además se evidencia la formación de varias especies no deseadas ( $t_R$ : 1,8 min; 3,0 min; 10,5 min; 31,7 min) .

Aunque se aumentó el tiempo de reacción empleando TBTU los resultados mostraron que la reacción no fue completa y con presencia de varias especies no deseadas. La purificación de la mezcla de reacción fue dispendiosa, obteniendo baja pureza y rendimientos bajos. Por lo que se decidió explorar otras posibilidades para la formación del enlace amida utilizando diisopropilcarbodiimida (DIC) y un agente acoplante novedoso que ha sido reportado en diferentes reacciones de síntesis orgánica: (T3P®).

Método de las carbodiimidias: En esta metodología se utilizó el protocolo establecido para la SPFS desarrollado en nuestro laboratorio. Se mezclaron Fmoc-aminoácido/DIC (1:1 equiv) y se disolvieron en DCM, se dejaron por 15 min en reacción con agitación constante y TA. Luego se adicionó la glucosilamina (1 equiv) y la mezcla de reacción se dejó 16 h, en agitación constante a TA.

La Figura 29 muestra el perfil cromatográfico para la mezcla del Fmoc-Phe-(OH) y DIC, se evidencia la formación de tres especies, se observa el pico correspondiente a (**4**) con  $t_R$ : 31,1 min, indicando que la formación de (**4**) es inmediata. Se observan dos especies con  $t_R$ : 27,4 min y  $t_R$ : 34,2 min, que corresponden al aminoácido de partida y un producto de reacción no deseado.

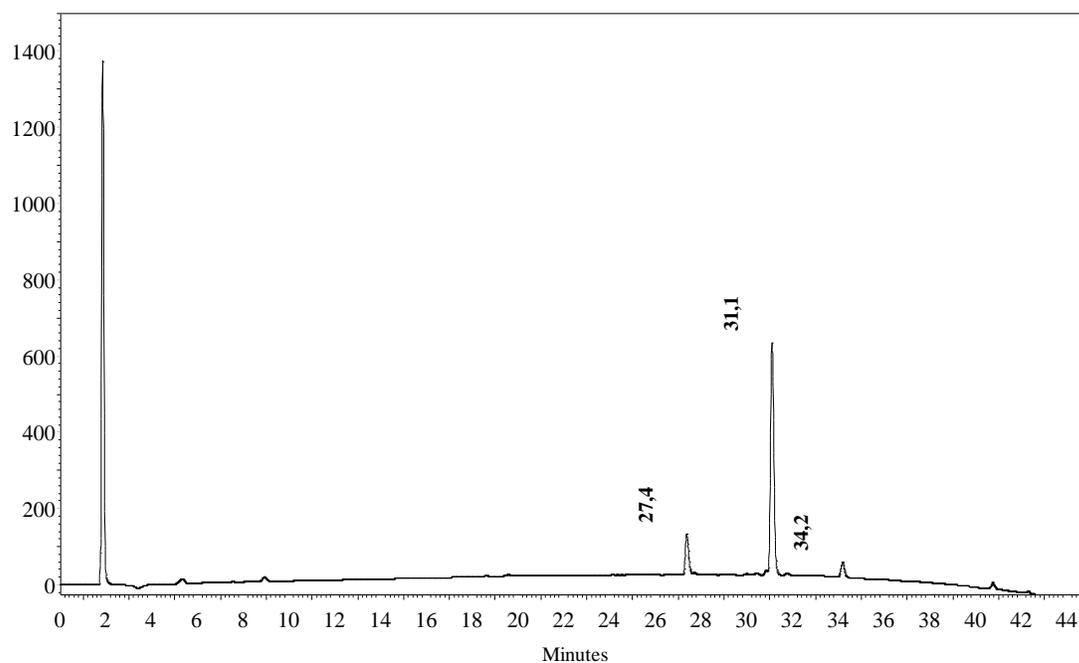


Figura 29. Perfil cromatográfico formación de (4) empleando *Fmoc-Phe-OH/DIC*, 0 h de reacción.

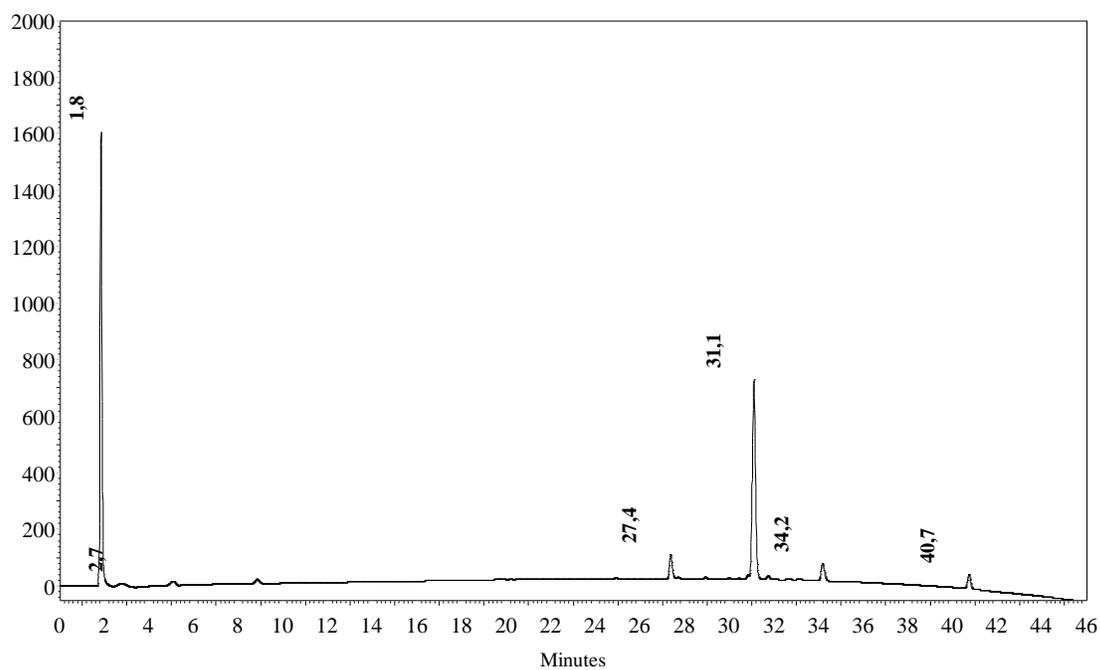


Figura 30. Perfil cromatográfico formación de (4) empleando *Fmoc-Phe-OH/DIC*, 16 h de reacción.

El perfil cromatográfico de la figura 30 corresponde a la mezcla de reacción después de 16 h, se observa el aminoácido de partida con  $t_R = 27,1$  min, indicando que este no se ha consumido completamente. También se evidencia una señal correspondiente a **(4)** con  $t_R$ : 31,1 min y una especie no deseada con  $t_R$ : 40,7 min. Al comparar las figuras 28 y 30 se puede observar que la reacción utilizando DIC presenta menos especies en la mezcla de reacción después de 16 h de reacción. Los resultados muestran que la reacción de formación de **(4)** utilizando DIC es más conveniente ya que facilitó el proceso de purificación obteniéndose **(4)** más puro y con mayores rendimientos cuando se compara con la reacción con TBTU.

Método empleando T3P®: Esta metodología fue estandarizada en nuestro laboratorio en cuanto a cantidades de reactantes de partida, tiempos de reacción, temperatura, etc. Se mezclaron Fmoc-aminoácido/T3P®/glicosilamina/DIPEA (0,65:1,5:1,2:2 equiv) y se dejó en reacción con agitación constante durante 16 h y TA. La reacción se monitoreó empleando RP-HPLC.

En la figura 31 se observa el perfil cromatográfico para la mezcla de reacción  $t = 0$  min, se observa la formación de dos especies con  $t_R$ : 27,4 min y  $t_R$ : 31,2 min, las cuales corresponden al aminoácido activado y a **(4)** que empieza a formarse. En la Figura 32 se observa el perfil cromatográfico de la mezcla de reacción a  $t = 16$  h, donde se observa una especie predominante con  $t_R$ : 31,2 min que corresponde a **(4)** y tres especies en muy baja concentración.

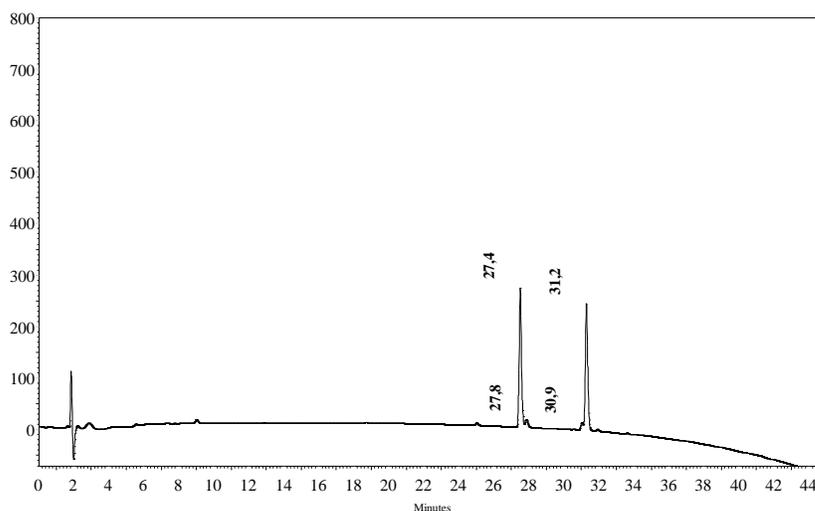


Figura 31. Perfil cromatográfico formación de **(4)** empleando Fmoc-Phe-OH/ T3P®/DIPEA, 0 h de reacción.

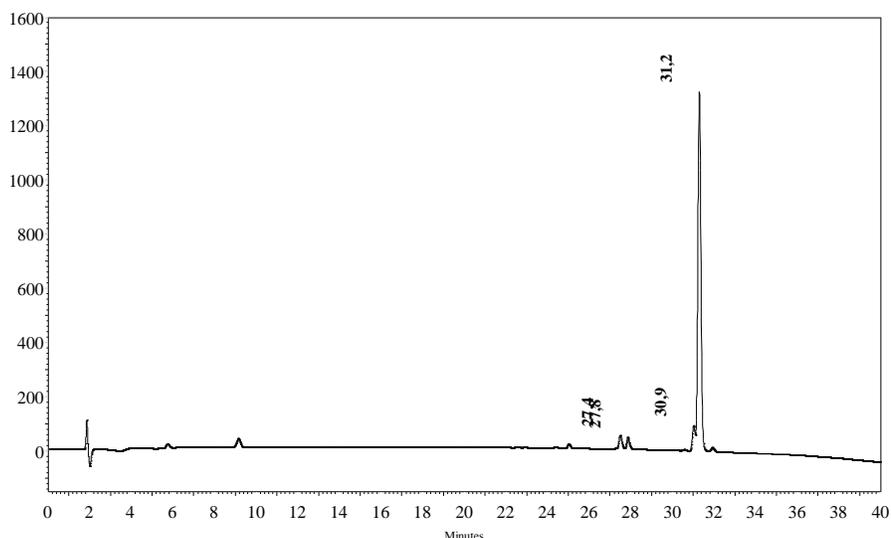


Figura 32. Perfil cromatográfico formación de (4) empleando Fmoc-Phe-OH/ T3P®/DIPEA, 16 h de reacción.

Después de analizar los resultados obtenidos en las tres metodologías, se observa que el mejor método es en el que se emplea el T3P® como agente acoplante, ya que la mezcla de reacción después de 16 h de reacción presenta menor número de especies no deseadas y en baja concentración. Los subproductos de la reacción son solubles en agua (ácido propilfosfónico), por lo que la mezcla de reacción después de los lavados presenta menos impurezas y en bajas concentraciones comparadas con los otros dos métodos, haciendo que el proceso de purificación sea menos laborioso y se obtengan mejores rendimientos. Nuestros resultados están de acuerdo con reportes acerca de que el T3P® ofrece ciertas ventajas con respecto a otros activadores empleados en la SPFS. La tabla 2 muestra el resumen de las características de los agentes acoplantes en SPFS.<sup>68</sup>

Tabla 2. Comparación ventajas agentes acoplantes para SPFS

Reactivo	Purificación	Rendimiento	Epimerización	Toxicidad	Precio por gramo
T3P®	fácil	alto	baja	baja	medio
TBTU/HBTU	difícil	alto	baja	medio	medio
DCC	muy difícil	bajo	alta	alta	bajo

Teniendo en cuenta los resultados y las ventajas en la purificación, altos rendimientos, baja epimerización y toxicidad, se seleccionó el método III (agente acoplante T3P®) para la obtención de (4), (5), (6) y (7).

Las condiciones de reacción utilizando T3P para la formación de los bloques hacen que esta metodología sea amigable con el medio ambiente, considerándose el uso del T3P como parte de la química verde, cumpliendo con el principio 3 planteado en esta.

#### 4.3.4 Síntesis de Fmoc-Phe-O-(2,3,4,6-tetra-O-Acetil-β-D-N-glucopiranosil) (4)

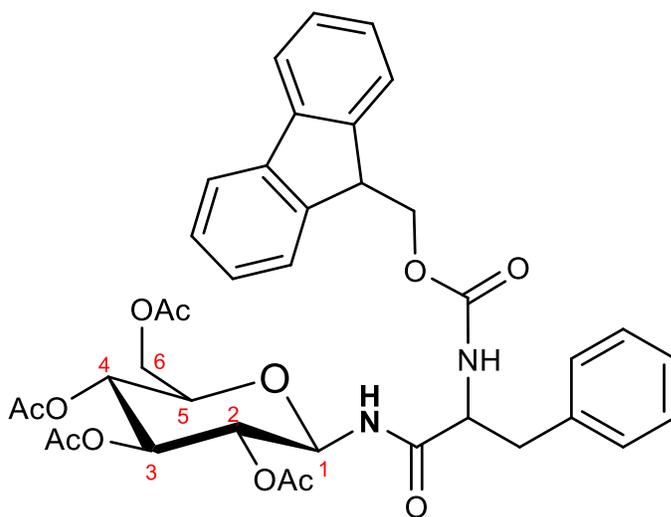


Figura 33. Estructura de (4) ( $C_{38}H_{40}N_2O_{12}$ )

En la figura 33 se observa el perfil cromatográfico del Fmoc-Phe-OH con  $t_R$ : 27,4 min. La figura 34 muestra el perfil cromatográfico de los reactivos de partida ( $t= 0$  h) Fmoc-Phe-OH, T3P y DIPEA. La especie con  $t_R$ : 27,8 min puede atribuirse al éster activo y la especie  $t_R$ : 31,2 min corresponde a (4). El perfil cromatográfico de la mezcla de reacción ( $t= 16$  h) se observa en las figuras 36 y 37, se observa la desaparición del reactivo de partida, indicando que la reacción terminó. En la figura 38 se observa el perfil cromatográfico de (4) purificado empleando RP-SPE, donde se observa una especie mayoritaria y se evidencia la eliminación de las especies no deseadas observadas en la mezcla de reacción.

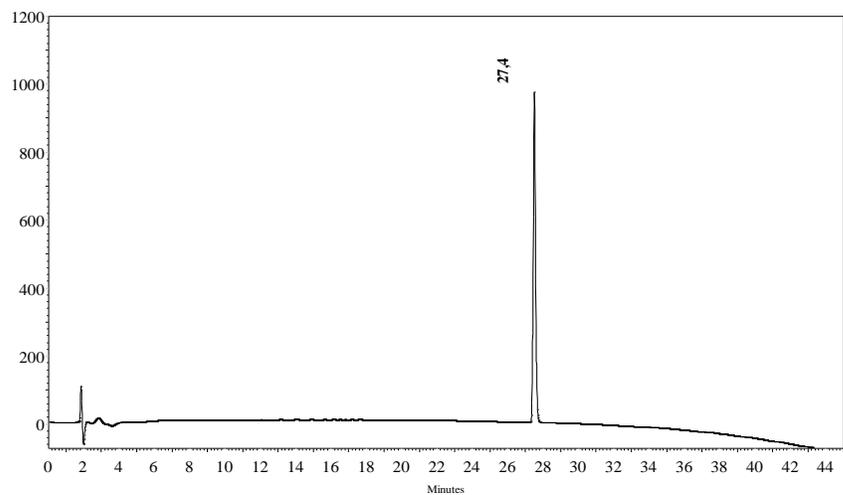


Figura 34. Perfil cromatográfico de Fmoc-Phe-OH.

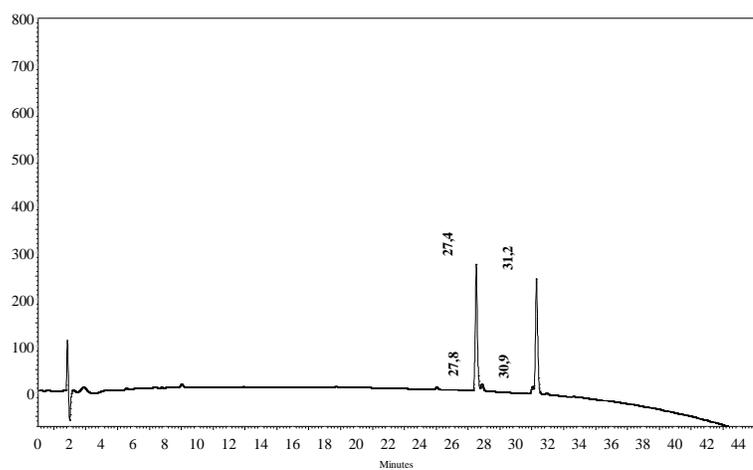


Figura 35. Perfil cromatográfico formación de (4) empleando Fmoc-Phe-OH/ T3P®/DIPEA, 0 h de reacción.

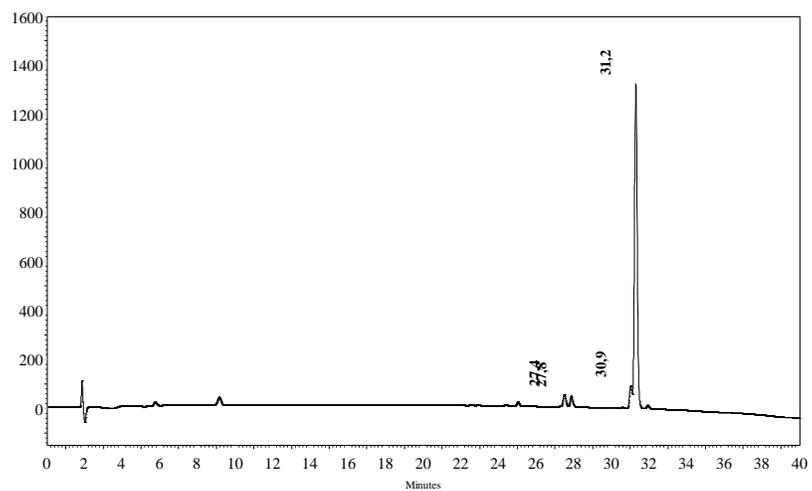


Figura 36. Perfil cromatográfico formación de (4) empleando Fmoc-Phe-OH/ T3P®/DIPEA, 16 h de reacción. Columna empacada.

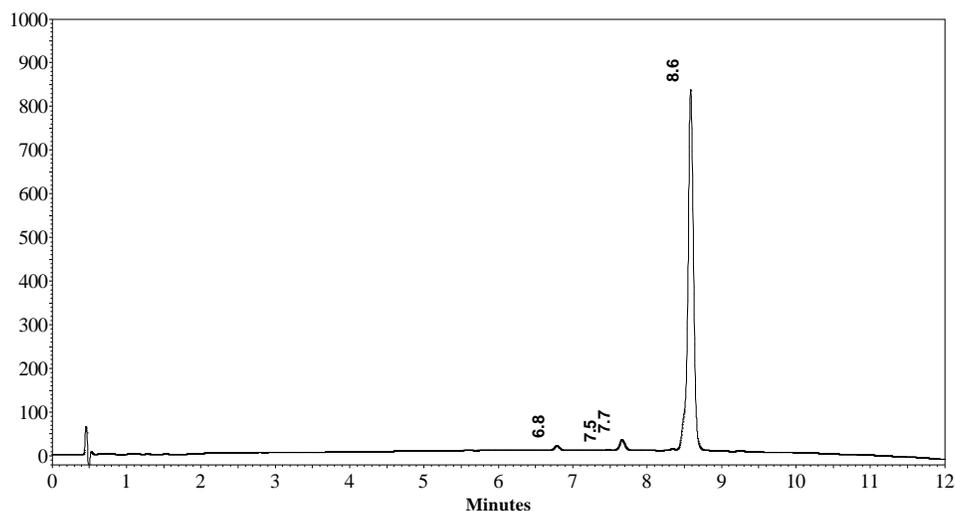


Figura 37. Perfil cromatográfico formación de (4) empleando *Fmoc-Phe-OH*/ T3P®/DIPEA, 16 h de reacción. Columna monolítica

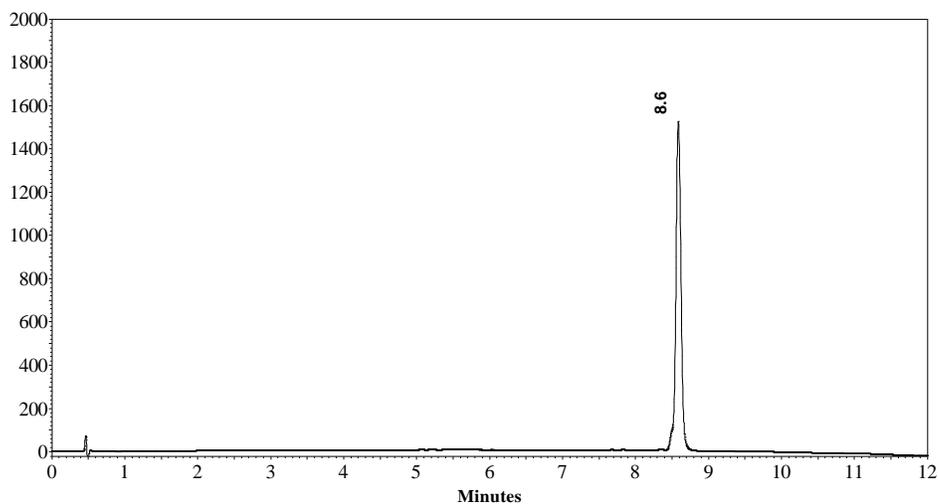


Figura 38. Perfil cromatográfico formación de (4) purificado por RP-SPE. Columna monolítica

En la caracterización de (4) por RMN para el espectro RMN-<sup>1</sup>H (figura 39) se observan las siguientes señales características: en 7.79 ppm se observa un doblete con  $J= 7.5$  Hz que integra para dos protones; en 7.59 ppm un multiplete con que integra para dos protones y que corresponden a los protones aromáticos del grupo Fmoc (Anexo G - 7.7). En 7.43 ppm se observa un triplete con  $J= 7.4$  Hz que integra para dos protones, en esta señal se asigna a dos protones del grupo Fmoc, en 7.31 ppm se encuentra un multiplete que integra para seis protones, que corresponden a dos protones del grupo Fmoc y cuatro protones del

anillo aromático de la cadena lateral de la Phe, en 7.18 ppm se encuentra un triplete que integra para un protón y corresponde a un protón del anillo aromático de la Phe. En 6.80 ppm se encuentra un doblete con  $J = 7.4$  Hz que integra para un protón y corresponde al protón del grupo NH del enlace amida de unión al carbohidrato.

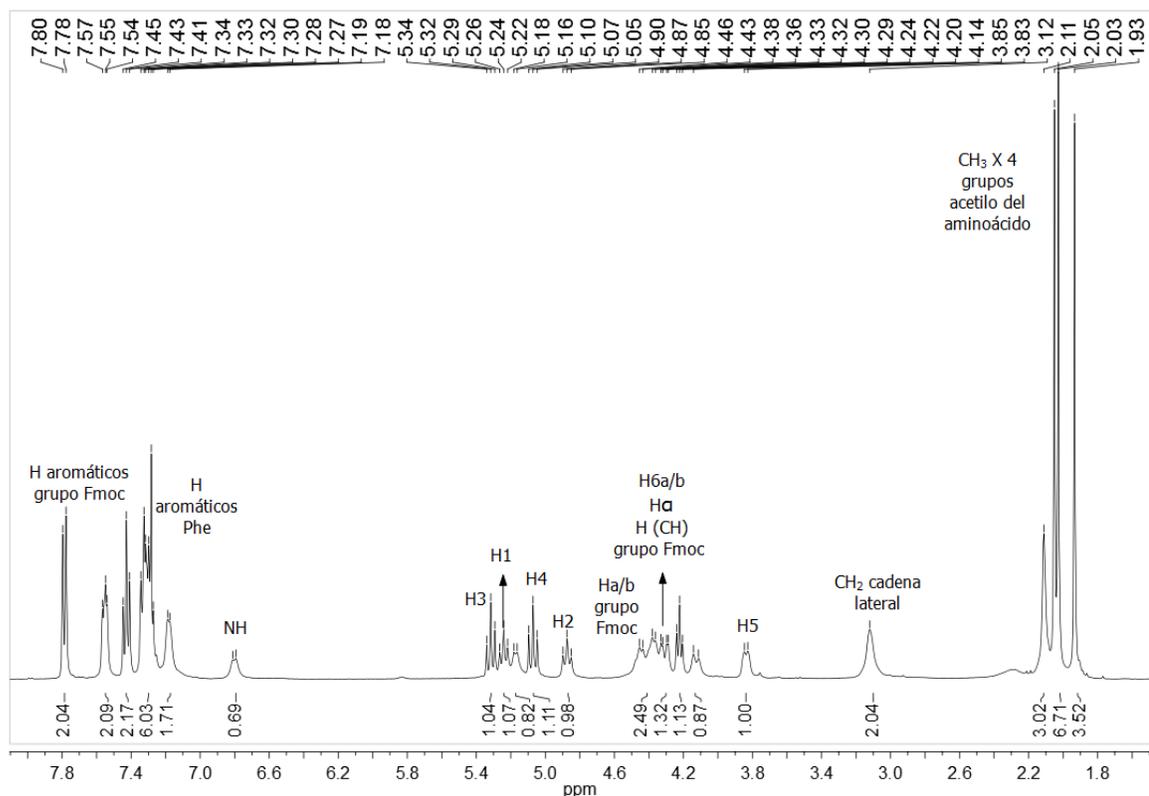


Figura 39. Espectro RMN  $^1H$  para (4)

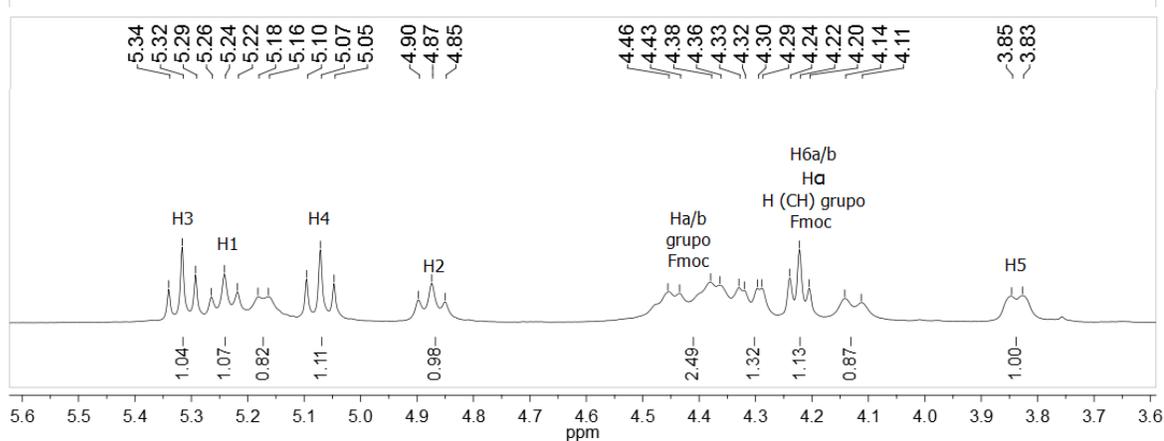


Figura 40. Ampliación espectro RMN  $^1H$  para (4)

En 5.32 ppm (figura 40) se observa un triplete con  $J= 9.5$  Hz que integra para un protón y corresponde al protón H3 del carbohidrato acetilado. En 5.24 ppm se observa un triplete con  $J= 9.2$  Hz y que corresponde al protón H1 del carbohidrato, la constante de acoplamiento indica que el protón se encuentra en configuración axial, se puede concluir que el grupo amida se encuentra en posición ecuatorial, formando solamente el anómero  $\beta$  (figura 40). En 5.17 ppm se encuentra un triplete con  $J= 7.5$  Hz que integra para un protón y corresponde al protón H4, el triplete que se encuentra en 5.07 ppm, integra para un protón y corresponde al protón H2 del carbohidrato. Teniendo en cuenta la curva de Karplus se puede concluir que las constantes de acoplamiento indican que los protones H1, H2, H3 y H4 están en configuración axial.

En la región 4.46 ppm - 4.36 ppm se encuentra un multiplete que integra para dos protones y corresponde a los dos protones del grupo CH<sub>2</sub> del grupo Fmoc. Entre 4.36 ppm – 4.28 ppm se encuentra un doble doblete que integra para un protón y corresponde a uno de los protones del grupo CH<sub>2</sub> del anillo de piranosa. El triplete que se encuentra en 4.24 ppm integra para un protón y corresponde al protón del grupo CH del grupo Fmoc. El doblete presente en 3.85 ppm, integra para un protón y corresponde al H5 del carbohidrato, este protón también se encuentra en configuración axial. En 3.12 ppm (figura 40) se encuentra un singlete que integra para dos protones y corresponde a los hidrógenos del grupo CH<sub>2</sub> de la cadena lateral de la Phe. En la región de 2.11 ppm - 1.93 ppm (figura 41) se encuentran dos singletes y un doblete que en total integran para doce protones, que corresponden a los protones de los cuatro grupos acetilo del carbohidrato.

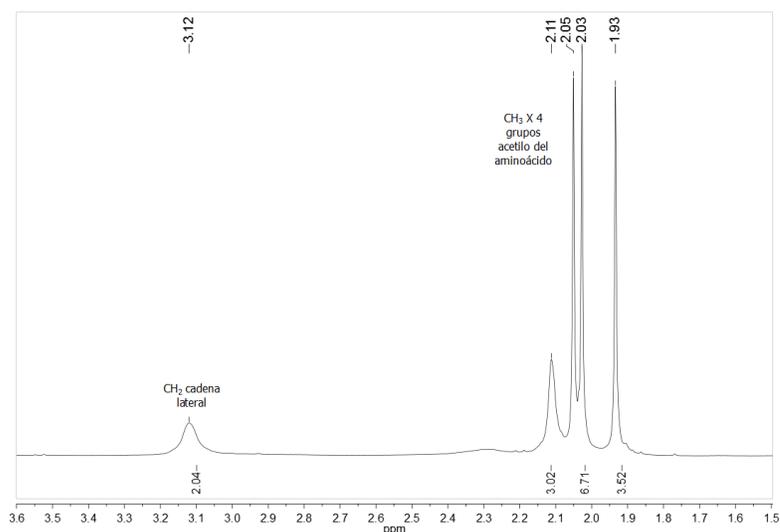


Figura 41. Ampliación espectro RMN  $^1\text{H}$  de (4)

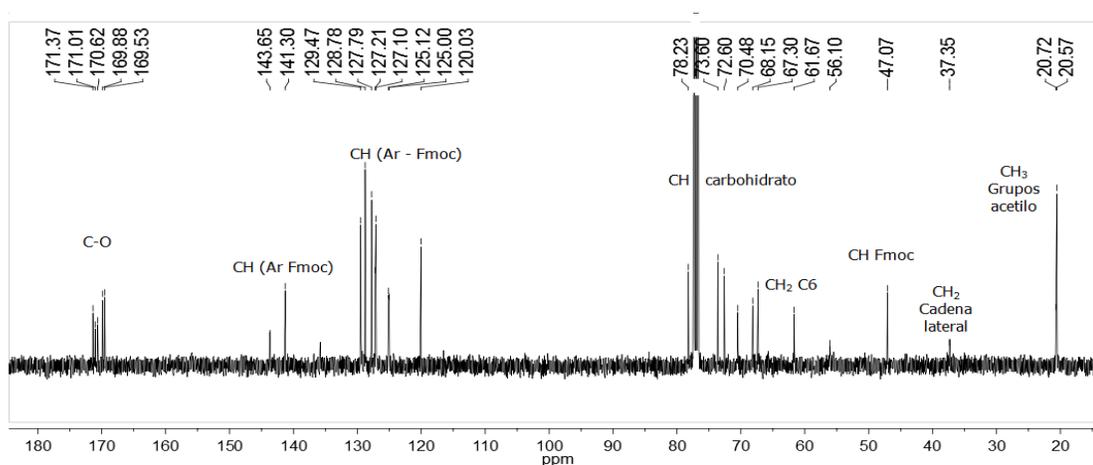


Figura 42. Espectro  $^{13}\text{C}$  RMN para (4)

En el espectro RMN- $^{13}\text{C}$  (figura 42), en la región 171.3 ppm - 169.7 ppm se observan cinco señales que corresponden a los carbonos carbonílicos del *N*-glucosilaminoácido, la señal que se encuentra en 156.2 ppm corresponde al carbono cuaternario del grupo Fmoc. Mediante los experimentos DEPT 90 (Anexo G – 7.11) y DEPT 135 (figura 43) se confirma la naturaleza de cada carbono y se asignan los grupos CH, CH<sub>2</sub> y CH<sub>3</sub>. En la región comprendida entre 143.6 ppm - 120.1 ppm se encuentran los carbonos (CH) de los anillos aromáticos del grupo Fmoc y del anillo aromático de la Phe. Los carbonos CH del carbohidrato, se encuentran entre 76.4 ppm - 68.1 ppm. En el experimento DEPT 135 en fase negativa se encuentran los grupos CH<sub>2</sub>, las señales con desplazamiento 67.3 ppm,

61.7 ppm y 37.3 ppm corresponden a las señales de los grupos CH<sub>2</sub> del grupo Fmoc, del carbohidrato y de la cadena lateral de la Phe, respectivamente. La señal de los grupos CH<sub>3</sub> de los grupos acetilo se encuentran en campos alto, en 20.7 ppm.

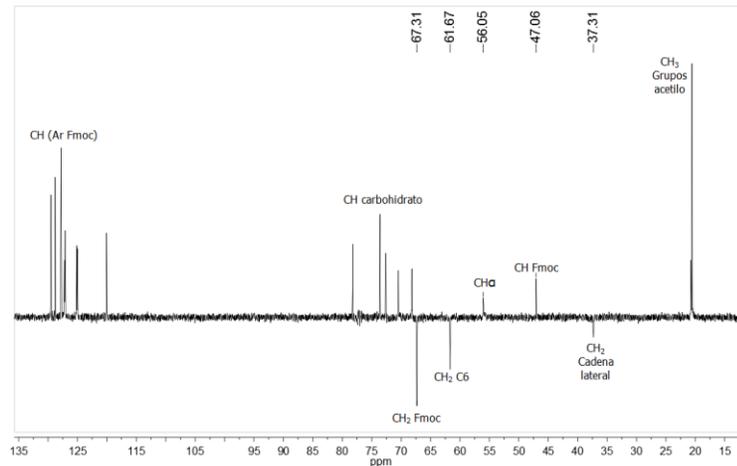


Figura 43. Espectro <sup>13</sup>C DEPT 135 para (4)

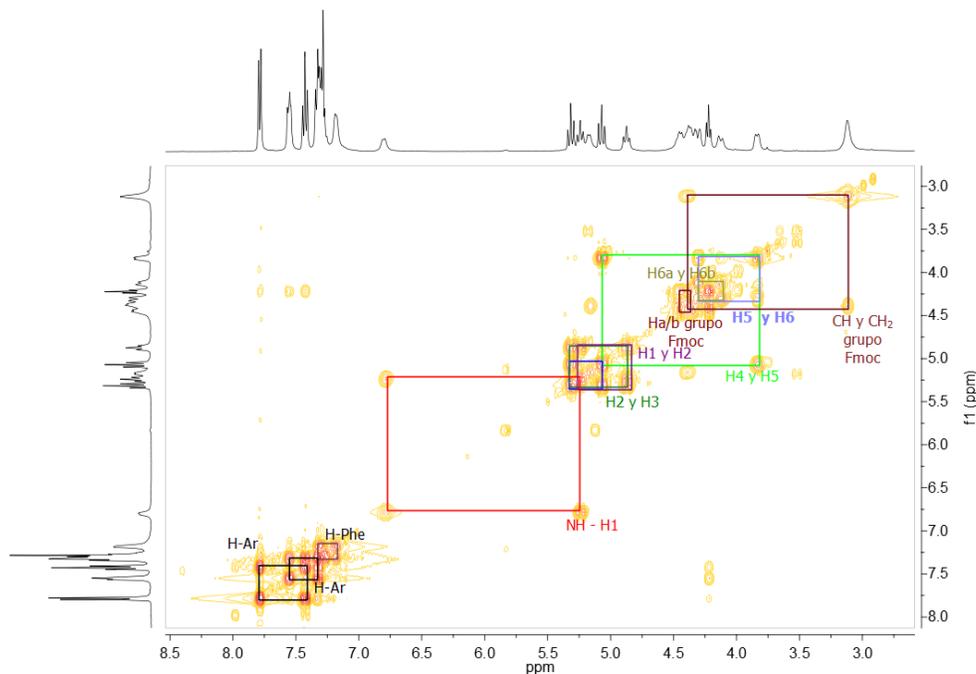


Figura 44. Espectro <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY RMN para (4)

El experimento COSY (figura 44) muestra las interacciones escalares de los protones, de este modo se asignan todos los protones, se identifican las interacciones entre NH ↔ H1 (6.76 ppm - 5.75 ppm), H1 ↔ H2 (5.25 ppm - 4.88 ppm), H2 ↔ H3 (4.88 ppm, 5.35 ppm), H3 ↔ H4 (5.35 ppm, 5.08 ppm), H4 ↔ H5 (5.06 ppm, 3.82 ppm), H5 ↔ H6a/b (3.82 ppm -

4.33 ppm). El experimento HMQC presenta las interacciones escalares C – H a un enlace de distancia, asignando de este modo cada carbono.

La discusión de los resultados para los glucosilaminoácidos **(5)**, **(6)** y **(7)** se realiza a continuación. Los perfiles cromatográficos y los espectros de RMN están en los anexos para facilitar la lectura del documento.

#### 4.3.5 Síntesis de Fmoc-Leu-O-(2,3,4,6-tetra-O-Acetil-β-D-N-glucopiranosil) (5)

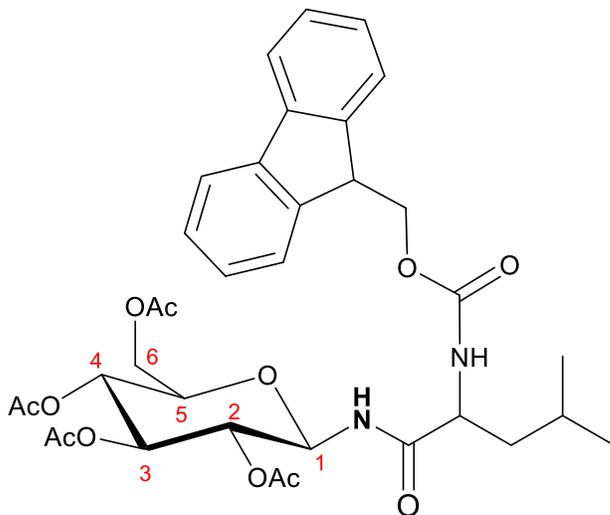


Figura 45. Estructura química de (5). ( $C_{35}H_{42}N_2O_{12}$ ).

En el anexo D – 4.1 se observa el perfil cromatográfico de Fmoc-Leu-OH donde se observa un pico con  $t_R$ : 26,8 min. El perfil cromatográfico de la mezcla de reacción  $t=0$  h (Fmoc-Leu-OH/T3P®/DIPEA), evidencia la formación de una especie con  $t_R$ : 30,4 min que corresponde a (5), también se observa la señal correspondiente al aminoácido de partida. Lo anterior indica que la formación de (5) es inmediata. En el perfil cromatográfico de la mezcla de reacción ( $t=16$  h) (anexo D – 4.3), se observa la señal del aminoácido de partida, indicando que la reacción no fue completa y en el anexo D – 4.4 se muestra el perfil cromatográfico para el bloque purificado.

El espectro RMN- $^1H$  para (5), (Anexo D – 4.5) presenta las siguientes señales: En 7.80 ppm se observa un doblete con  $J=7.6$  Hz que integra para dos protones; en 7.63 ppm un doblete con  $J=6.9$  Hz que integra para dos protones y que corresponden a los protones aromáticos del grupo Fmoc (Anexo D – 4.6). En 7.45 ppm se observa un triplete con  $^3J=7.4$  Hz que integra para dos protones, en esta señal se asigna a dos protones del grupo Fmoc, en 7.35 ppm se encuentra otro triplete con  $^3J=7.3$  Hz que integra para dos protones, que corresponden a los protones del grupo Fmoc (Anexo D – 4.6). En 6.97 ppm se encuentra un doblete con  $J=8.9$  Hz que integra para un protón y corresponde al protón del grupo NH del enlace amida unido al carbohidrato.

Entre 5.34 ppm - 5.23 ppm (Anexo D – 4.7) se observa un multiplete que integra para dos protones, en esta señal se encuentran solapadas las señales de los protones H1 y H3 de la piranosa. Entre 5.12 ppm - 5.04 ppm se observa un multiplete que integra para un protón y que corresponde al protón H4 de la piranosa. Entre 4.99 ppm y 4.94 ppm se observa un multiplete que integra para un protón y corresponde al protón H2 de la piranosa.

En la región 4.53 ppm - 4.38 ppm (Anexo D – 4.7) se encuentran dos multipletes que integran para un protón cada uno y corresponden a los dos protones del CH<sub>2</sub> del grupo Fmoc. Entre 4.35 ppm - 4.31 ppm se observa un doble doblete que integra para un protón, y corresponde a un protón del grupo CH<sub>2</sub> de la piranosa (H6a/b). En 4.26 ppm se observa un triplete con  $J = 6.8$  Hz, que integra para un protón y corresponde al hidrógeno del grupo CH del grupo Fmoc. El multiplete que se encuentra entre 4.15 ppm – 4.08 ppm integra para dos protones y corresponde al otro protón del grupo CH<sub>2</sub> de la piranosa (H6a/b) y al protón del grupo CH $\alpha$  de la Leucina. El doblete en 3.84 ppm con  $J = 7.4$  Hz, integra para un protón y corresponde al H5 del carbohidrato, este protón se encuentra en configuración axial.

Entre 2.10 ppm - 1.99 ppm (Anexo D – 4.8) se encuentra un singlete que integra para 2 protones, un doblete que integra para siete protones y un singlete que integra para tres protones, estos doce protones corresponden a los protones de los cuatro grupos acetilo del carbohidrato. Las señales de los protones para la cadena lateral de Leucina (CH, CH<sub>2</sub> y CH<sub>3</sub>), se encuentran como doblete en 1.75 ppm que integra para dos protones (CH<sub>2</sub>), un singlete en 1.31 ppm que integra para un protón (CH) y un triplete que integra para 6 protones, que corresponden a los protones de los dos grupos CH<sub>3</sub>.

En el espectro <sup>13</sup>C RMN (Anexo D – 4.10) en la región 172.7 ppm - 169.5 ppm se presentan cinco señales que corresponden a los carbonos carbonílicos de los grupos acetilo y al del enlace amida, la señal que se encuentra en 156.2 ppm corresponde al carbono cuaternario del grupo Fmoc. Mediante el experimento APT (Anexo D – 4.11) se confirma la naturaleza de cada carbono y se asignan los grupos CH, CH<sub>2</sub> y CH<sub>3</sub>. Entre 143.7 ppm - 120.1 ppm se encuentran los carbonos (CH) de los anillos aromáticos del grupo Fmoc. Los carbonos CH de la piranosa, se encuentran entre 78.3 ppm - 68.1 ppm en fase negativa. En el experimento APT (Anexo D – 4.11) en fase positiva se encuentran los grupos CH<sub>2</sub>, las señales en 67.1 ppm, 61.6 ppm y 40.4 ppm corresponden a las señales de los grupos CH<sub>2</sub> del grupo Fmoc, de la piranosa y de la cadena lateral del aminoácido, respectivamente. La

señal para el C $\alpha$  se encuentra en 53.6 ppm. Las señales de los carbonos (CH y CH<sub>3</sub>) de la cadena lateral del aminoácido se encuentran en fase negativa en 24.6 ppm y 23.1 ppm. Las señales de los grupos CH<sub>3</sub> se encuentran en campo alto en 20.7 ppm, la señal para los carbonos de los grupos acetilo se encuentra como una sola señal de gran intensidad en 20.6 ppm.

El experimento bidimensional COSY (Anexo D – 4.9) muestra las interacciones de los protones, de este modo se asignan todos los hidrógenos, se identifican las interacciones entre el grupo NH  $\leftrightarrow$  H1 (6.97 ppm, 5.34 ppm), H1 $\leftrightarrow$ H2 $\leftrightarrow$ H3 (5.34 ppm - 4.99), H3 $\leftrightarrow$ H4 (5.34 ppm - 5.12 ppm), H4 $\leftrightarrow$ H5 (5.12 ppm - 3.84 ppm), H6a $\leftrightarrow$  H6b (4.05 ppm – 4.35 ppm), Ha grupo Fmoc $\leftrightarrow$  Hb grupo Fmoc (4.39 ppm – 4.51 ppm). El experimento HMQC presenta las interacciones C – H a un enlace, asignando de este modo cada carbono. (Anexo D – 4.12, 4.13, y 4.14).

Los resultados de los análisis realizados por cromatografía RP-HPLC nos permite concluir que (5) fue obtenido con alta pureza y buenos rendimientos.

### 4.3.6 Síntesis de Fmoc-Lys(Boc)-O-(2,3,4,6-tetra-O-Acetil- $\beta$ -D-N-glucopiranosil) (6)

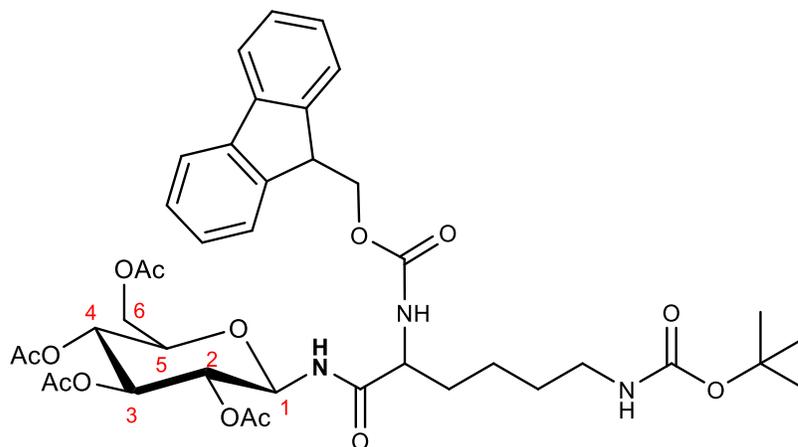


Figura 46. Estructura de (6) ( $C_{40}H_{51}N_3O_{14}$ )

En el anexo E - 5.1 se observa el perfil cromatográfico de (6) con  $t_R$ : 26,8 min. El anexo E - 5.2 muestra el perfil cromatográfico de los reactivos de partida ( $t = 0$  h) Fmoc-Lys(Boc)-OH/ T3P/DIPEA. El perfil cromatográfico de la mezcla de reacción ( $t = 1$  min), muestra la formación de dos nuevas especies con  $t_R$ : 27,3 min y  $t_R$ : 30,4 min. La especie con  $t_R$ : 27,3 min puede atribuirse al éster activo del aminoácido y la especie con  $t_R$ : 30,4 min correspondería a (6). El perfil cromatográfico de la mezcla de reacción ( $t = 16$  h) (Anexo E - 5.3) muestra la desaparición de la Fmoc-Lys-(Boc)-OH, indicando que la reacción terminó. En el anexo E - 5.5 se observa el producto después de un mes de almacenamiento, se observa la formación de una especie con  $t_R$ : 6,0 min, por este motivo se purifica mediante RP-SPE y se muestra el perfil cromatográfico de la fracción más pura (Anexo E - 5.6).

El espectro RMN- $^1H$  (Anexo E - 5.7) para (6), presenta las siguientes señales: En 7.79 ppm se observa un doblete con  $J = 7.5$  Hz que integra para dos protones; en 7.63 ppm un doblete con  $J = 7.2$  Hz que integra para dos protones y que corresponden a los protones aromáticos del grupo Fmoc (Anexo E - 5.8). En 7.44 ppm se observa un triplete con  $^3J = 7.4$  Hz que integra para dos protones, en esta señal se asigna a dos protones del grupo Fmoc, en 7.35 ppm se encuentra otro triplete con  $J = 7.2$  Hz que integra para dos protones, que corresponden a los protones del grupo Fmoc (Anexo E - 5.8). En 7.00 ppm se

encuentra un doblete con  $J = 9.0$  Hz que integra para un protón y corresponde al protón del grupo NH unido al carbohidrato. Entre 5.33 ppm y 5.23 ppm (Anexo E – 5.9) se observa un multiplete que integra para dos protones, en esta señal se encuentran solapadas las señales de los protones H1 y H3 del carbohidrato. Entre 5.11 ppm y 5.03 ppm se observa un multiplete que integra para un protón y que corresponde al protón H4 del carbohidrato. Entre 4.99 ppm y 4.91 ppm se observa un multiplete que integra para un protón y corresponde al protón H2 del radical glucopiranosil,

En la región 4.42 ppm - 4.38 ppm (Anexo E – 5.9) se encuentra un multiplete que integra para dos protones y corresponde a los dos protones del grupo Fmoc. Entre 4.30 ppm - 4.26 ppm se observa otro multiplete que integra para tres protones y corresponden al protón del grupo CH del grupo Fmoc y un protón del grupo CH<sub>2</sub> del carbohidrato (H6). En 4.31 ppm se observa un multiplete que integra para dos protones, en esta señal se encuentran solapadas las señales para un protón del CH<sub>2</sub> del grupo Fmoc y uno de los protones del grupo CH<sub>2</sub> presente en el carbohidrato, el multiplete que se encuentra entre 4.16 ppm – 4.09 ppm integra para dos protones y corresponde al otro protón del grupo CH<sub>2</sub> del carbohidrato y para el protón del grupo CH $\alpha$  de la Lys. El doblete presente en 3.84 ppm con  $^3J = 8.5$  Hz, integra para un protón y corresponde al H5 del carbohidrato, este protón se encuentra en configuración axial (Anexo E – 5.9). Entre 2.11 ppm y 2.09 ppm se encuentra un multiplete que integra para 5 protones y corresponde a algunos protones de la cadena lateral del aminoácido. (Anexo E - 5.10). En la región de 2.05 ppm - 1.99 ppm se encuentra un doblete que integra para 9 protones y un singlete que integra para tres protones, que corresponden a los protones de los cuatro grupos acetilo del carbohidrato. El singlete en campo alto 1.45 ppm integra para nueve protones y corresponde a los protones del grupo Boc; protector de la cadena lateral de la Lys, finalmente en 1.27 ppm se encuentra un singlete que integra para 4 protones y corresponde a los protones faltantes de los grupo CH<sub>2</sub> de la cadena lateral de la Lys.

En el espectro <sup>13</sup>C (Anexo E - 5.13) en la región 172.3 ppm y 169.5 ppm se presentan seis señales que corresponden a los carbonos carbonílicos del *N*-glucosilaminoácido y del carbono que forma el enlace amida, la señal que se encuentra en 156.2 ppm corresponde al carbono cuaternario del grupo Fmoc. Mediante los experimentos DEPT 90 y 135 (Anexo E - 5.14 y 5.15) se confirma la naturaleza de cada carbono y se asignan los grupos CH,

CH<sub>2</sub> y CH<sub>3</sub>. En la región comprendida entre 143.7 ppm - 120.1 ppm se encuentran los carbonos (CH) de los anillos aromáticos del grupo Fmoc. La señal que se encuentra en 90.16 ppm corresponde al carbono del grupo protector Boc de la cadena lateral de la Lys. Los carbonos CH del carbohidrato, se encuentran entre 78.3 ppm - 68.1 ppm, aunque se observan otras señales en el espectro, no presentan acoplamientos con protones en el espectro HMQC, por tal motivo se asignan como impurezas que pueda tener el compuesto obtenido. En el experimento DEPT 135 (Anexo E – 5.15) en fase negativa se encuentran los grupos CH<sub>2</sub>, las señales con desplazamiento 67.2 ppm, 61.9 ppm y 29.6 ppm corresponden a las señales de los grupos CH<sub>2</sub> del grupo Fmoc, del carbohidrato y de la cadena lateral de la Lys, respectivamente. Las señales de los grupos CH<sub>3</sub> se encuentran en campos alto, la señal para los carbonos acetilo se observa como una sola señal de gran intensidad en 28.42 ppm y las señales de los carbonos del grupo tBu, se encuentran entre 20.7 ppm - 20.5 ppm.

El experimento bidimensional COSY (Anexo E – 5.11 y 5.12) muestra las interacciones de los protones, de este modo se asignan todos los protones, se identifican las interacciones entre el grupo NH ↔ H1 (7.00 ppm - 5.23 ppm), H1 ↔ H2 ↔ H3 (7.00 ppm - 5.23 ppm), H3 ↔ H4 (5.31 ppm – 5.07 ppm), H4 ↔ H5 (5.06 ppm – 3.83 ppm), H5 ↔ H6a/b (3.83 ppm – 4.89 ppm), Ha grupo Fmoc ↔ Hb grupo Fmoc (4.23 ppm – 4.44 ppm). El experimento HMQC (Anexo E – 5.16, 5.17 y 5.18.) presenta las interacciones C – H a un enlace de distancia, asignando de este modo cada carbono.

El análisis de los resultados obtenidos por cromatografía RP-HPLC y RMN indica que se obtuvo (**6**) con altos rendimientos y que el producto presenta algunas pequeñas impurezas observadas por RMN, pero que no fue posible identificar.

### 4.3.7 Síntesis de Fmoc-Asp(OtBu)-O-(2,3,4,6-tetra-O-Acetil-β-D-N-glucopiranosil) (7)

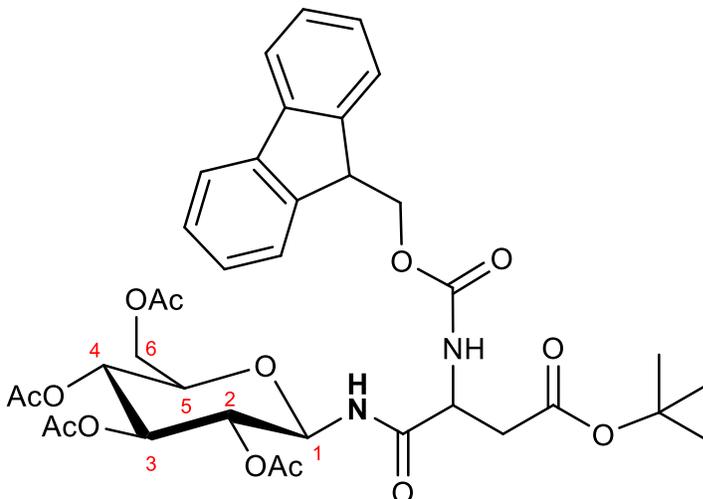


Figura 47. Estructura de (7) ( $C_{37}H_{44}N_2O_{14}$ )

En el anexo F - 6.1 se observa el perfil cromatográfico de (7) con  $t_R$ : 27,7 min. El anexo F - 6.2 muestra el perfil cromatográfico de los reactivos de partida ( $t = 0$  h) Fmoc-Asp(OtBu)-OH/ T3P/DIPEA. El perfil cromatográfico de la mezcla de reacción ( $t = 1$  min), muestra la formación de tres especies con  $t_R$ : 28,1 min,  $t_R$ : 31,6 min y  $t_R$ : 32,1 min. La especie con  $t_R$ : 28,1 min puede atribuirse al éster activo del aminoácido y la especie  $t_R$ : 32,1 min corresponde a (7). El perfil cromatográfico (Anexo F - 6.3) de la mezcla de reacción ( $t = 16$  h) muestra la desaparición del Fmoc-Asp(OtBu)-OH, indicando que la reacción ya terminó. El anexo F - 6.4 muestra el análisis por RP-HPLC empleando una columna monolítica para el *N*-glucosilaminoácido, se observan tres especies no deseadas. Por lo tanto se realizó purificación por RP-SPE, el Cromatograma en el anexo F - 6.5 muestra el perfil cromatográfico del producto purificado.

El espectro RMN- $^1H$  (Anexo F - 6.6) para (7), presenta las siguientes señales: En 7.80 ppm se observa un doblete con  $J = 7.5$  Hz que integra para dos protones; en 7.70 ppm un triplete con  $J = 7.7$  Hz que integra para dos protones y que corresponden a los protones aromáticos del grupo Fmoc (Anexo F - 6.7). En 7.46 ppm se observa un triplete que integra para tres protones, en esta señal se encuentran solapados dos protones del grupo Fmoc y el protón

del grupo NH, en 7.37 ppm se encuentra un multiplete que integra para dos protones, que corresponden a los protones del grupo Fmoc (Anexo F - 6.7).

En 5.36 ppm se observa un triplete con  $J= 9,5$  Hz que integra para un protón y corresponde al protón H3 del carbohidrato acetilado. En 5.24 ppm se observa un triplete con  $J= 9,2$  Hz y que corresponde al protón H1 del carbohidrato, la constante de acoplamiento indica que el protón se encuentra en configuración axial, de lo que puede concluirse que el grupo amida se encuentra en posición ecuatorial, formando solamente el anómero  $\beta$  (Anexo F - 6.8). En 5.13 ppm se encuentra un triplete con  $J= 9,7$  Hz que integra para un protón y corresponde al protón H4, finalmente el triplete que se encuentra en 5.01 ppm, integra para un protón y corresponde al protón H2 del carbohidrato. Teniendo en cuenta la curva de Karplus se puede concluir que las constantes de acoplamiento indican que los protones H1, H2, H3 y H4 están en configuración axial. En la región 4.62 ppm - 4.65 ppm se encuentra un multiplete que integra para un protón y corresponde al protón H $\alpha$  del aminoácido. Entre 4.44 ppm y 4.45 ppm, hay otro multiplete que integra para un protón y corresponde al protón del grupo CH presente en el grupo Fmoc.

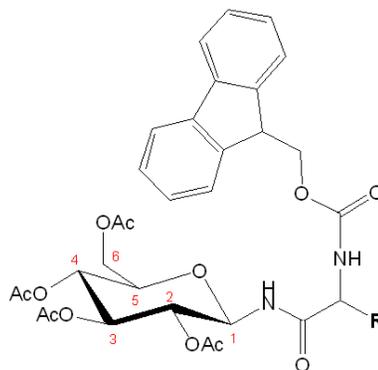
En 4.31 ppm se observa un multiplete que integra para dos protones, en esta señal se encuentran solapadas las señales para un protón del CH<sub>2</sub> del grupo Fmoc y uno de los hidrógenos del grupo CH<sub>2</sub> del carbohidrato, el multiplete que se encuentra entre 4.19 ppm – 4.06 ppm integra para un protón y corresponde al otro protón del grupo CH<sub>2</sub> del carbohidrato. El doblete presente en 3.85 ppm, integra para un protón y corresponde al H5 del carbohidrato, este protón también se encuentra en configuración axial (Anexo F - 6.8). En 3.09 ppm - 2.59 ppm se encuentran dos dobletes con  $^3J= 16.5$  Hz y  $^3J= 18.5$  Hz que integran cada uno para un protón, (Anexo F - 6.9) estas dos señales corresponden a los hidrógenos del grupo CH<sub>2</sub> de la cadena lateral del Asp. En la región de 2.13 ppm - 2.05 ppm se encuentra un triplete que integra para doce protones, que corresponden a los protones de los cuatro grupos acetilo del carbohidrato. La señal en campo alto 1.46 ppm integra para nueve protones, que corresponden a los nueve protones del grupo tBu; protector de la cadena lateral del Asp.

En el espectro <sup>13</sup>C (Anexo F - 6.10) en la región 171.6 ppm y 169.7 ppm se presentan seis señales que corresponden a los carbonos carbonílicos del *N*-glucosilaminoácido, el

carbono del enlace amida y de la cadena lateral de Asp, la señal que se encuentra en 156.2 ppm corresponde al carbono cuaternario del grupo Fmoc. Mediante los experimentos DEPT 90 y 135 (Anexo F - 6.11 y 6.12) se confirma la naturaleza de cada carbono y se asignan los grupos CH, CH<sub>2</sub> y CH<sub>3</sub>. En la región comprendida entre 143.6 ppm y 120.1 ppm se encuentran los carbonos (CH) de los anillos aromáticos del grupo Fmoc. La señal que se encuentra en 82.05 ppm corresponde al carbono del grupo protector tBu de la cadena lateral del Asp. Los carbonos CH del carbohidrato, se encuentran entre 76.4 ppm – 68.1 ppm. En el experimento DEPT 135 (Anexo F – 6.12) en fase negativa se encuentran los grupos CH<sub>2</sub>, las señales con desplazamiento 67.7 ppm, 61.5 ppm y 36.4 ppm corresponden a las señales de los grupos CH<sub>2</sub> del grupo Fmoc, del carbohidrato y de la cadena lateral del Asp, respectivamente. Las señales de los grupos CH<sub>3</sub> se encuentran en campo alto, la señal para los carbonos acetilo se encuentran como una sola señal de gran intensidad en 28.03 ppm y las señales de los carbonos del grupo tBu, se encuentran entre 20.8 ppm y 20.6 ppm. El experimento bidimensional COSY (Anexo F – 6.13) muestra las interacciones de los protones a tres enlaces, de este modo se asignan todos los protones, se identifican las interacciones entre el grupo NH ↔ H1 (7.49 ppm – 5.23 ppm), H1↔H2 (5.23 ppm – 4.99 ppm), H2↔H3 (4.99 ppm – 5.38 ppm), H3↔H4 (5.38 ppm – 5.11 ppm), H4↔H5 (5.11 ppm – 3.85 ppm), H5↔ H6a/b (3.85 ppm – 4.36 ppm), Ha grupo Fmoc↔ Hb grupo Fmoc (4.38 ppm – 4.54 ppm). El experimento HMQC (Anexo F - 6.15, 6.16 y 6.17.) presenta las interacciones escalares C – H a un enlace de distancia, asignando de este modo cada carbono.

El análisis de los resultados de los cromatogramas y espectros RMN de (**7**) indican que se obtuvo el glucosilaminoácido con buenos rendimientos y alta pureza.

Tabla 3. Desplazamientos químicos (ppm) para N-glucosilaminoácidos protegidos



Compuesto	C 1	C 2	C 3	C 4	C 5	C 6	C $\alpha$	C $\beta$	C=O	C Ar Fmoc	C Ac Glc	CH Fmoc	CH <sub>2</sub> Fmoc
4	78.2	70.4	72.6	68.1	73.6	61.7	56.0	37.3	170.6	143.6	20.7	47.1	67.3
5	78.2	70.5	72.7	68.2	73.7	61.6	47.1	40.4	170.6	143.7	20.7	47.2	67.2
6	78.2	70.5	72.7	68.1	73.7	61.5	54.9	29.9	170.6	143.7	22.3	47.1	67.2
7	78.4	70.5	72.5	68.1	73.6	61.6	51.3	36.4	170.7	143.6	20.7	47.0	67.7

La tabla 3 contiene el resumen de los desplazamientos químicos ( $\delta$  ppm) de los carbonos de (4), (5) (6) y (7), se puede observar que los carbonos del monosacárido no presentan diferencias significativas en los desplazamientos, mientras que los desplazamientos del C $\alpha$ , si varían dependiendo del aminoácido al que se encuentran unidos, posiblemente debido a la influencia de la cadena lateral.

## 4.4 Síntesis de *N*-glucosilaminoácidos desprotegidos (8), (9), (10), (11).

Los glucosilaminoácidos (8), (9), (10) y (11) fueron obtenidos a partir de (4), (5), (6), y (7) respectivamente. El esquema de desprotección se realizó en tres etapas (I) Remoción de los grupos protectores de las cadenas laterales de (6) y (7) (Boc y tBu respectivamente) mediante tratamiento ácido. (II) Remoción del grupo protector del Nα amino (Fmoc) con 4-metilpiperidina. (III) Desacetilación del carbohidrato empleando hidróxido de hidracina.

### 4.4.1 Síntesis de Asp-O-β-1N-(D-glucopiranosil) (11)

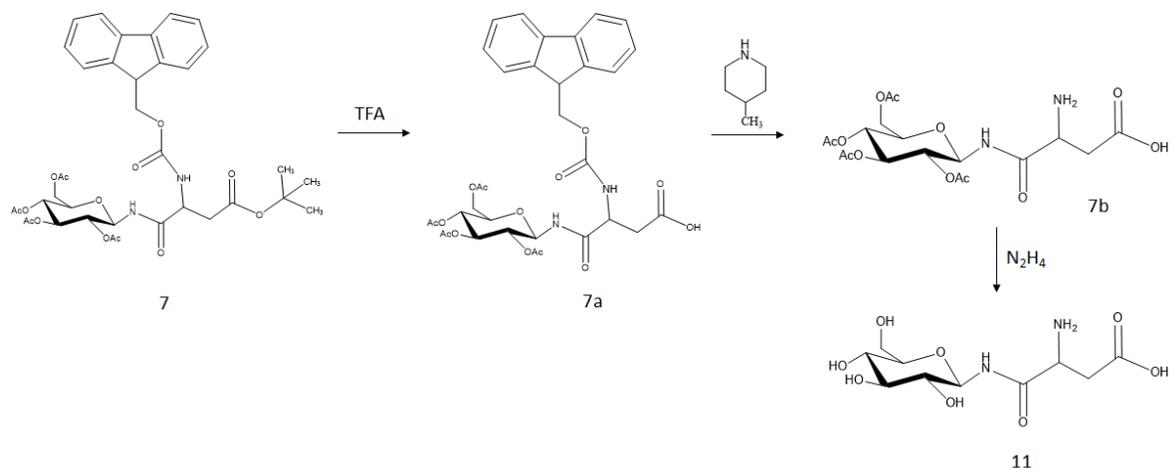


Figura 48. Estructura de *N*-glucosilaminoácido (8) desprotegido

La figura 49 muestra el perfil cromatográfico de (7) y la figura 50 muestra el perfil cromatográfico después de 3 h de reacción con TFA/DCM (55%). Se observa la formación de una especie con  $t_R = 6.8$  min que corresponde a (7a) (figura 50), la desaparición de la señal correspondiente a (7),  $t_R = 8,8$  min, indica que el reactivo de partida se consumió totalmente.

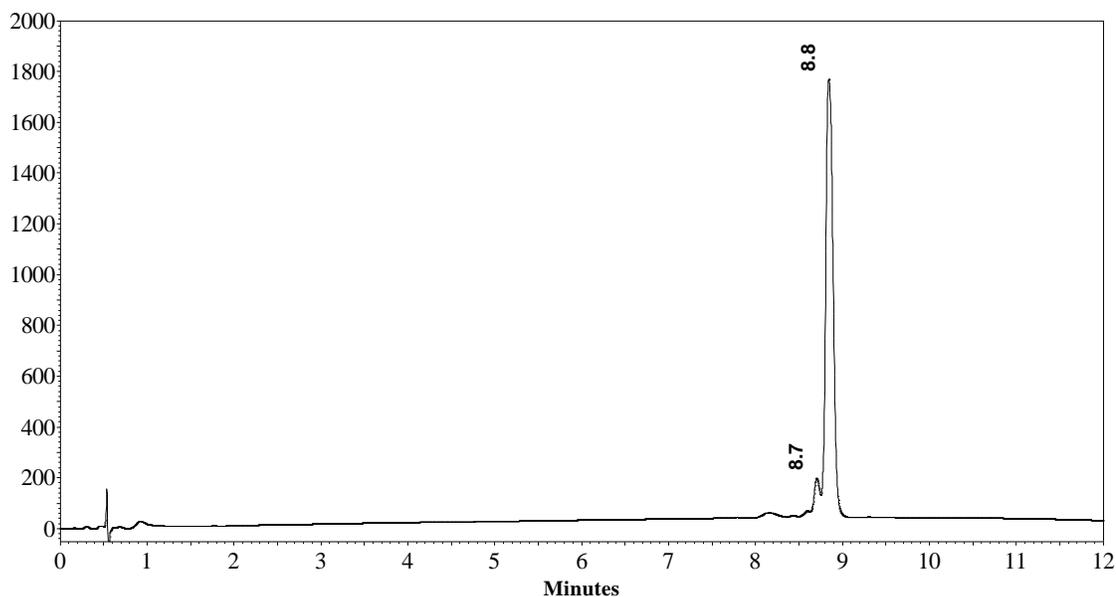


Figura 49. Perfil cromatográfico (7)

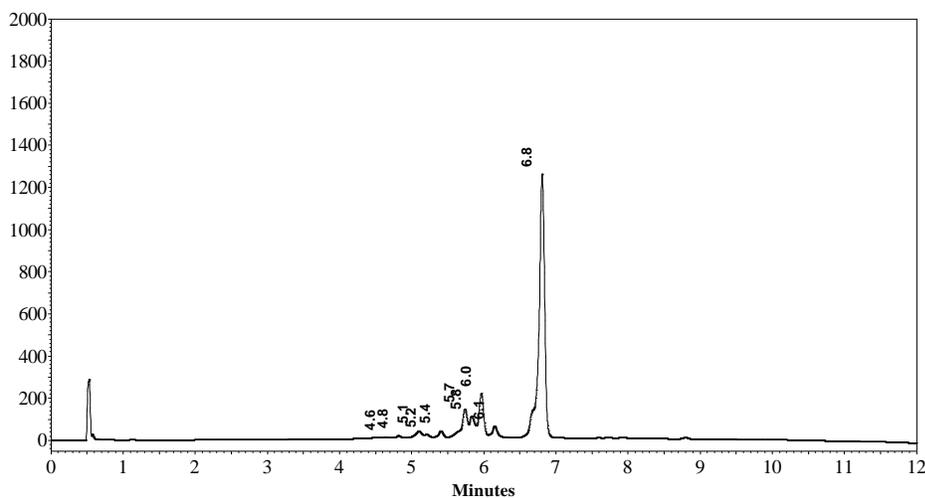


Figura 50. Perfil cromatográfico de (7a) producto obtenido de la desprotección de la cadena lateral de (7)

El *N*-glucosilaminoácido (7a) se sometió a tratamiento con 4-metilpiperidina durante 2h. El Cromatograma (Figura 51) muestra el perfil cromatográfico del producto obtenido. Debido a la remoción del grupo Fmoc que contenía dos anillos aromáticos que absorben en la región UV, el monitoreo de la reacción no se puede hacer de manera directa, ya que las especies formadas no absorben en la región UV. Por este motivo se realizó un monitoreo indirecto, analizando la desaparición de (7a) y la formación de una señal que corresponde al aducto formado entre la 4-metilpiperidina y el grupo Dibenzofulveno (DBF). Debido a la baja hidrofobicidad de (7b), ésta eluye con el frente del solvente, la especie presenta  $t_R=$

0,5 min, la especie con  $t_R= 4.4$  min corresponde al aducto mencionado. Esto se puede constatar mediante el análisis a 302 nm, región de absorción específica para el grupo DBF, en donde solamente se observa el pico para la especie con  $t_R= 4.4$  min (Figura 51).

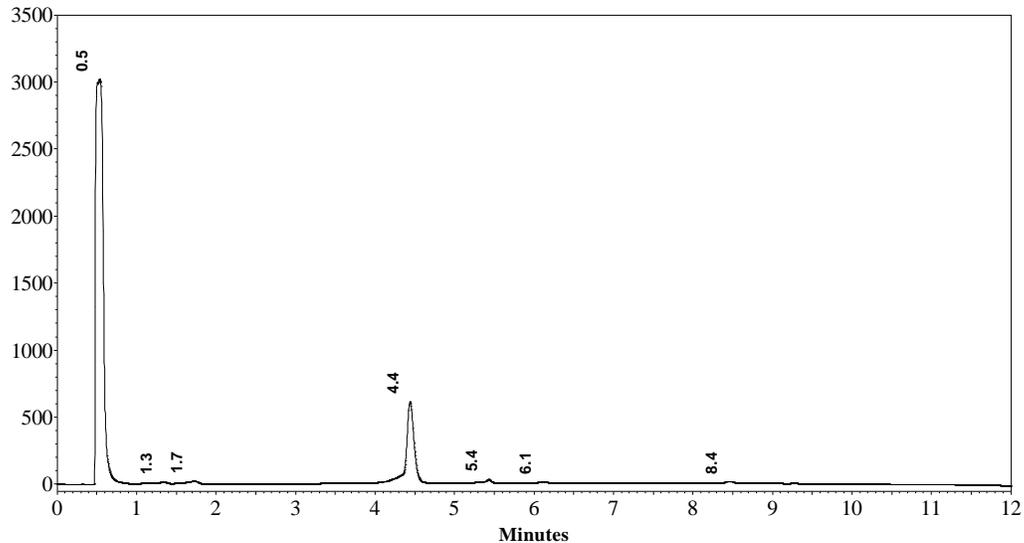


Figura 51. Perfil cromatográfico del producto de la reacción de remoción del grupo Fmoc de (7a) para obtener (7b) monitoreada a 210 nm

Como se observa en el cromatograma (figura 52), la especie con  $t_R= 0,5$  min no absorbe en esta longitud de onda, solamente se evidencia una señal, que se atribuye al aducto formado en  $t_R= 4.4$  min.

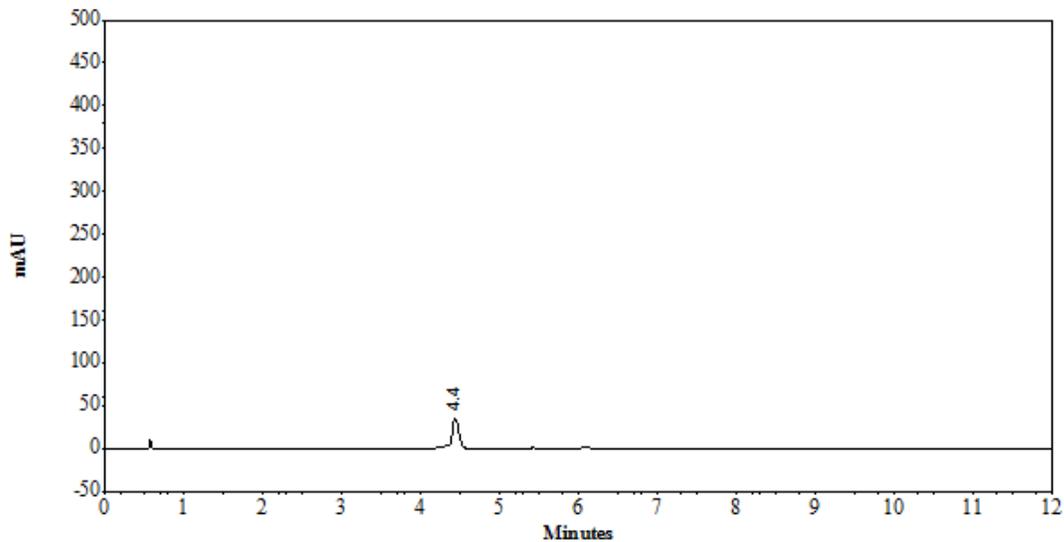


Figura 52. Perfil cromatográfico del producto de la reacción de remoción del grupo Fmoc de (7a) para obtener (7b) monitoreada a 302 nm.

El producto obtenido se trató con Hidróxido de hidracina. El Cromatograma (Figura 53) muestra el producto de reacción. Para eliminar las especies no deseadas se realizó purificación mediante RP-SPE, el perfil cromatográfico de la fracción obtenida se muestra en la figura 54.

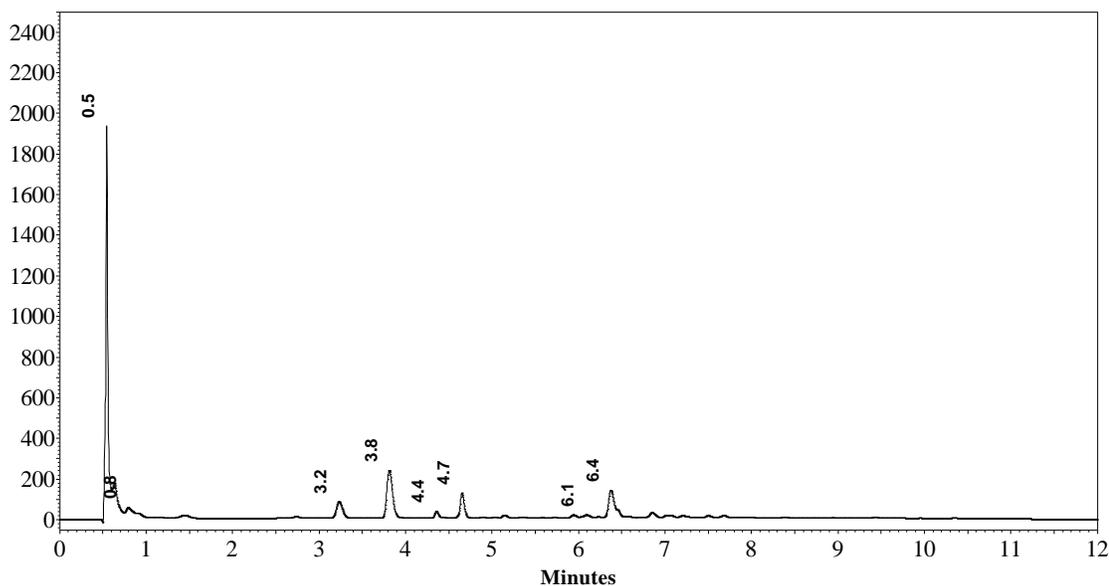


Figura 53. Producto de la reacción de desacetilación de (7b) para obtener (11)

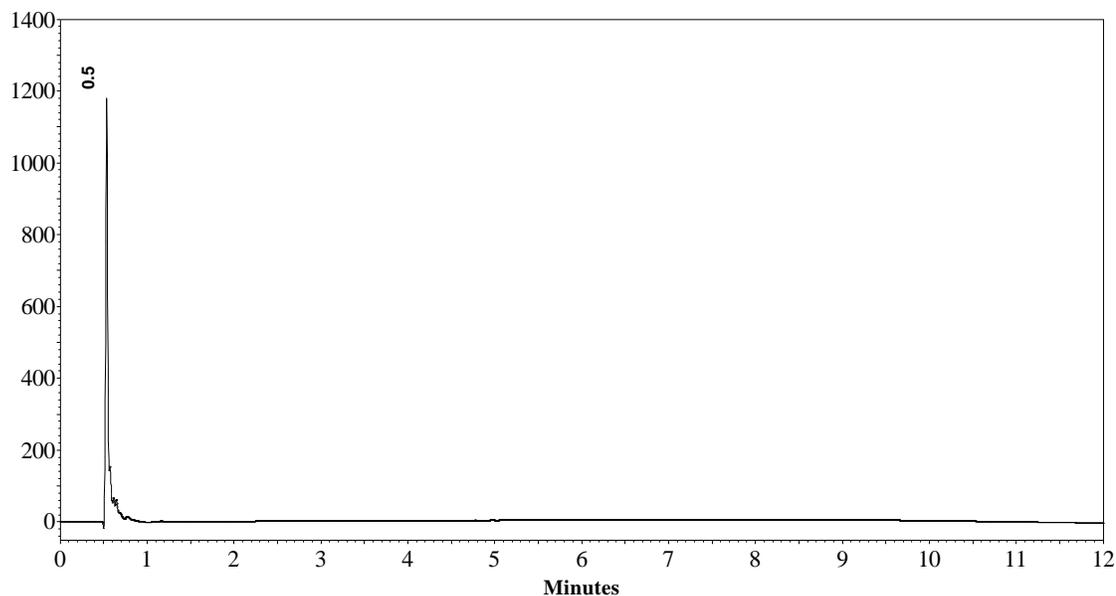


Figura 54. Producto (11) purificado por RP-SPE

La figura 54 muestra el perfil cromatográfico de la fracción obtenida después de realizar la purificación mediante RP-SPE. Cuando se realizó el análisis mediante RMN, se evidencia

contaminación de la muestra con 4-metilpiperidida. Por este motivo, fue necesario cristalizar la muestra en EtOH absoluto.

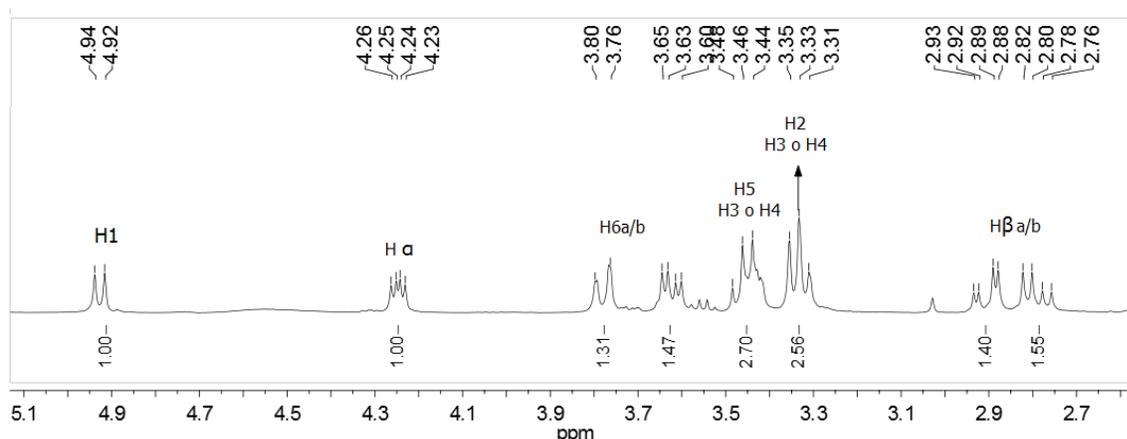


Figura 55. Espectro RMN  $^1\text{H}$  para (11)

El espectro RMN- $^1\text{H}$  (Figura 55) para (11), presenta las siguientes características: En 4.94 ppm se observa un doblete con  $J = 9.1$  Hz que integra para un protón, esta señal corresponde al protón anomérico, teniendo en cuenta la constante de acoplamiento y la curva de Karplus, se determina que este protón se encuentra en orientación axial, por lo tanto se forma el anómero  $\beta$  de (11). Entre 4.26 ppm - 4.23 ppm se encuentra un multiplete que integra para un protón y corresponde al  $\text{H}\alpha$  del aminoácido. El doblete que se encuentra en 3.80 ppm integra para un protón y corresponde a uno de los protones del grupo  $\text{CH}_2$  de carbohidrato, el otro protón se encuentra como un doblete entre 3.65 ppm - 3.60 ppm. Los tripletes que se observan en 3.48 ppm - 3.35 ppm corresponden a los protones H2, H3, H4 y H5 del carbohidrato. Como las señales se encuentran solapadas, es posible asignar solamente dos de estas señales: 3.48 ppm (H5), 3.35 ppm (H2). En campo alto se observa dos dobles dobles, cada uno integra para un protón y corresponden a los dos hidrógenos del grupo  $\text{CH}_2$  de la cadena lateral del aminoácido ( $\text{H}\beta$ ). Mediante el espectro bidimensional  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY (figura 56) se pudo realizar la asignación de todos hidrógenos, en la figura 54 se observan los acoplamientos para H1-H2 (4.96 ppm – 3.32 ppm),  $\text{H}\alpha$  –  $\text{H}\beta\alpha$  (4.26 ppm – 2.87 ppm),  $\text{H}\alpha$  –  $\text{H}\beta\beta$  (4.26 ppm – 2.77 ppm), H6a - H6b (3.60 ppm – 3.61 ppm) y las interacciones entre las señales solapadas de los protones H2, H3, H4 y H5 (3.46 ppm – 3.31 ppm).

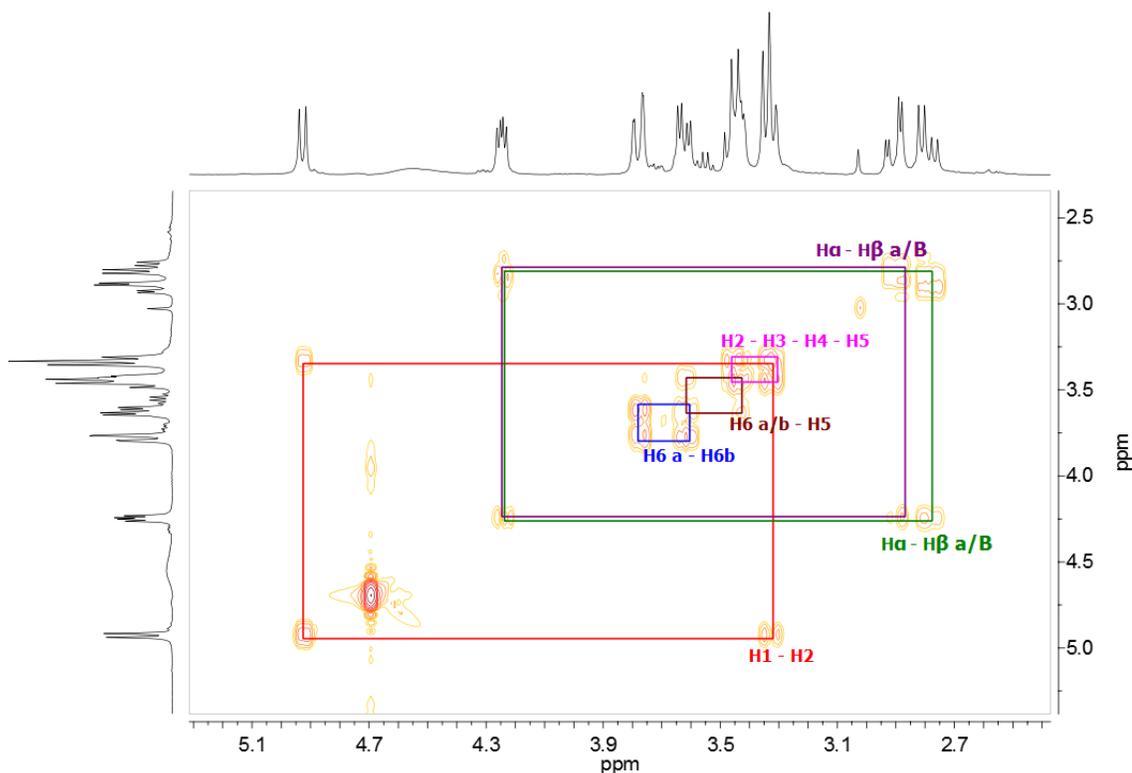


Figura 56. Espectro  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY RMN para (11)

En el espectro  $^{13}\text{C}$  RMN (figura 57) se observan dos señales en campo bajo 174.3 ppm - 170.1 ppm que corresponden a los carbonos cuaternarios del enlace amida y del grupo carboxilo de la cadena lateral. Mediante el experimento DEPT 135 (figura 58) se pudieron asignar las señales dependiendo de la naturaleza de los carbonos. En 79.4 ppm se observa la señal para el carbono anomérico, las señales en 77.7 ppm, 76.4 ppm, 71.7 ppm y 69.1 ppm corresponden a los carbonos C5, C3, C2 y C4 de los grupos CH del carbohidrato. La señal en 60.4 ppm, se observa en fase negativa y corresponde al  $\text{CH}_2$  del carbohidrato, la señal en 50.2 ppm corresponde al grupo  $\text{CH}_\alpha$  del aminoácido, la señal en 35.7 ppm en fase negativa corresponde al grupo  $\text{CH}_2$  del aminoácido  $\text{C}_\beta$ . Mediante los experimentos bidimensionales (HMQC) (figura 59) y (HMBC) (figura 60) se realizó la asignación de los grupos CH del carbohidrato, se analizaron las interacciones escalares para H1, H2 y H5 que pudieron ser asignados mediante el experimento bidimensional  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY.

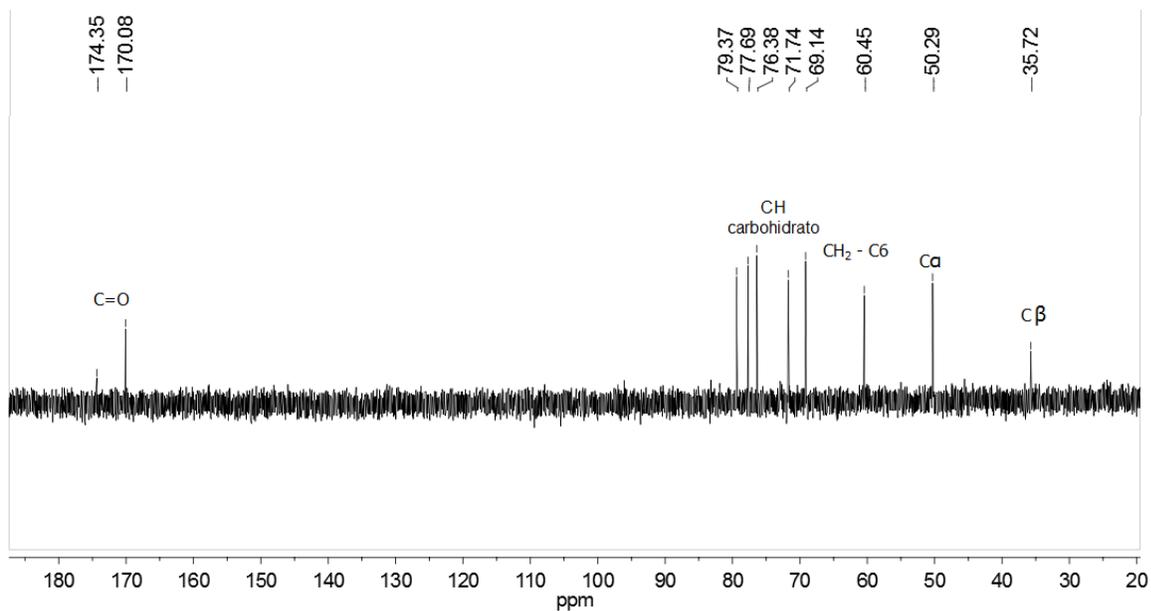


Figura 57. Espectro <sup>13</sup>C RMN para (11)

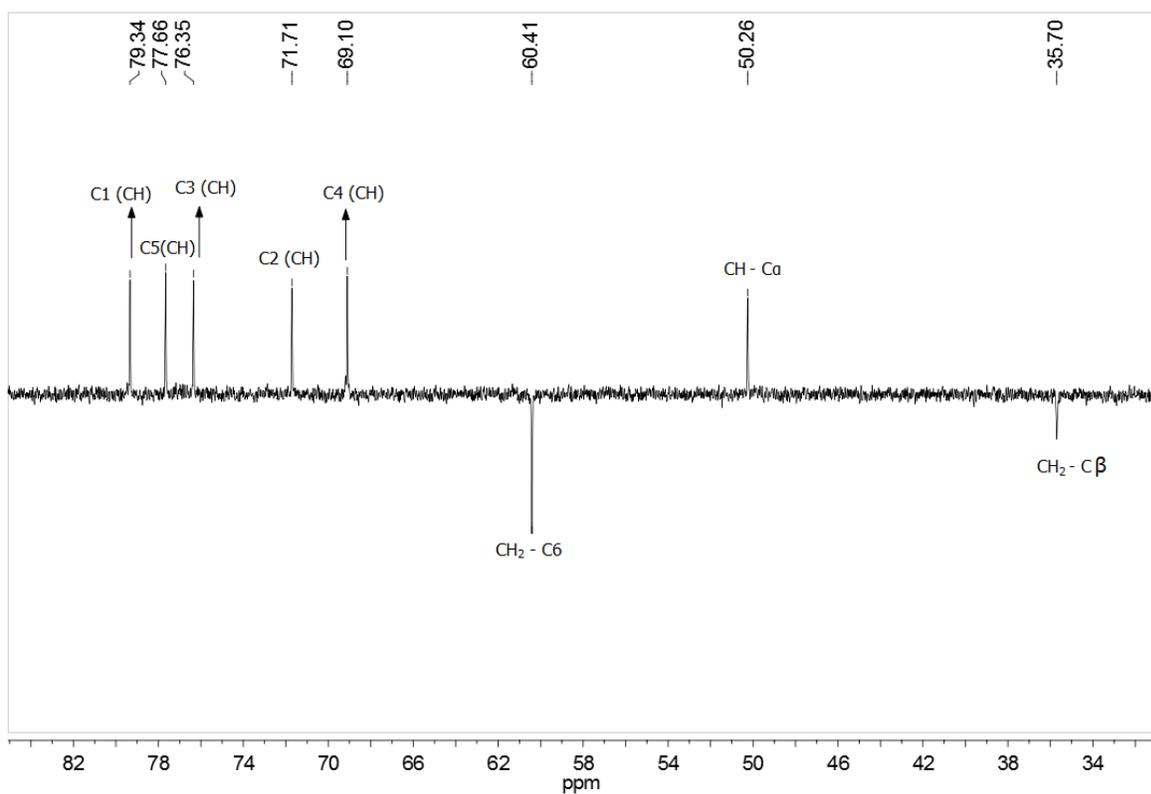


Figura 58. Espectro <sup>13</sup>C DEPT 135 para (11)

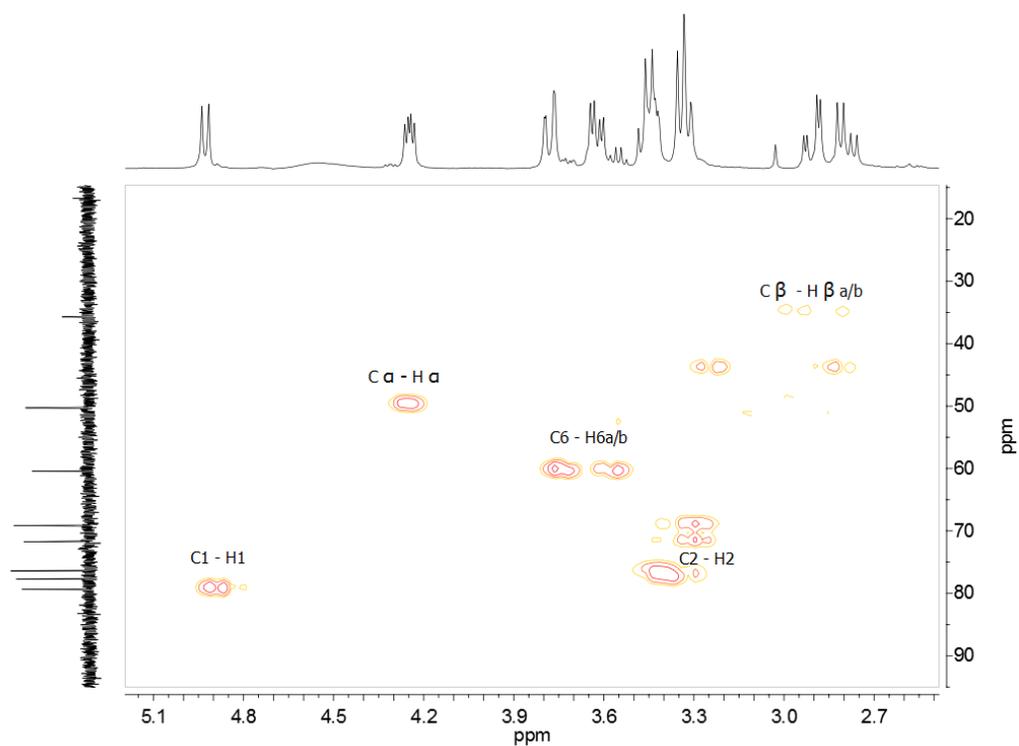


Figura 59. Espectro  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMQC para (11)

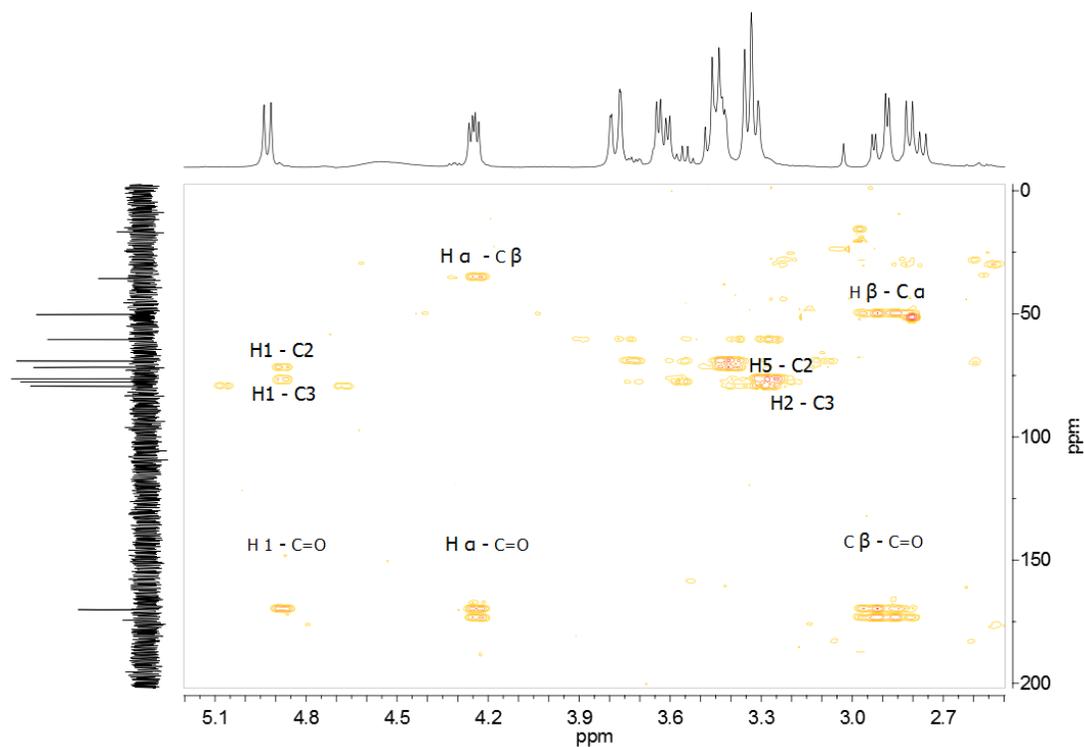


Figura 60. Espectro  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  RMN HMBC para (11)

Las señales que presentan los espectros de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  RMN, coinciden con el número de protones y carbonos esperados. Así mismo analizando las interacciones escalares entre protones (COSY) y entre carbonos e hidrógenos (HMQC y HMBC) se puede concluir que el compuesto obtenido corresponde a (**11**), además que el producto fue obtenido con alta pureza.

#### 4.4.2 Síntesis de Phe- $\beta$ -D-N-glucopiranosil

En el anexo G – 7.18 se observa el perfil cromatográfico de (**4**) y la figura 7.19 (Anexo G) muestra el perfil cromatográfico después de 2h de reacción con 4-metilpiperidina. Aunque se removió el grupo Fmoc a diferencia de los otros *N*-glucosilaminoácidos, el monitoreo de la reacción se puede hacer de manera directa, ya que la cadena lateral del aminoácido absorbe en la región UV. En la figura 7.19 (Anexo G) se observa una señal con  $t_R$ : 18.6min, la desaparición de (**4**) y la formación de dos especies que corresponden al aducto formado entre la 4-metilpiperidina y el grupo Dibenzofulveno (DBF) con  $t_R$ = 23.5 min y 39,5 min (Anexo G – 7.19). La señal con  $t_R$ = 18.6 puede atribuirse a un subproducto de reacción o al *N*-glucosilaminoácido sin el grupo Fmoc. Esto se puede constatar mediante el análisis a 302 nm, región de absorción específica para el grupo DBF, en donde solamente se observa el pico para las especies con  $t_R$ = 23.5 min y 39.5 min (Anexo G – 7.20).

El producto obtenido se trató con Hidróxido de hidracina, durante 4h (Anexo G – 7.21), se evidencia que la reacción no fue completa, por esto se dejó reaccionando hasta completar 36h. El perfil cromatográfico para el producto obtenido, analizado en la columna monolítica se observa en el anexo G – 7.22 Para eliminar las especies no deseadas se realizó purificación mediante RP-SPE.

El Anexo G – 7.22 muestra el perfil cromatográfico de la fracción obtenida después de realizar la purificación mediante RP-SPE. Cuando se realizó el análisis mediante RMN, se evidencia contaminación de la muestra con trazas de 4-metilpiperidida. Por este motivo, fue necesario cristalizar la muestra en EtOH absoluto.

El espectro RMN- $^1H$  (Anexo G – 7.23) para (**8**), presenta las siguientes características: En 4.91 ppm se observa un doblete con  $J$ = 9.2 Hz que integra para un protón, esta señal corresponde al protón anomérico. Teniendo en cuenta la constante de acoplamiento y la curva de Karplus, se determina que este protón se encuentra en orientación axial, por lo tanto se forma el anómero  $\beta$  de (**8**). Entre 4.21 ppm - 4.11 ppm se encuentra un multiplete que integra para un protón y corresponde al  $H_\alpha$  del aminoácido. El doblete que se

encuentra en 3.81 ppm integra para un protón y corresponde a uno de los protones del grupo CH<sub>2</sub> de carbohidrato, el otro protón se encuentra como un multiplete entre 3.68 ppm - 3.64 ppm. Los multipletes que se observan en 3.46 ppm - 3.18 ppm corresponden a los protones H<sub>2</sub>, H<sub>3</sub>, H<sub>4</sub> y H<sub>5</sub> del carbohidrato. Como las señales se encuentran solapadas, es posible asignar solamente dos de estas señales: 3.46 ppm (H<sub>5</sub>), 3.35 ppm (H<sub>2</sub>). En campo alto se observan dos dobles dobletes, cada uno integra para un protón y corresponden a los dos hidrógenos del grupo CH<sub>2</sub> de la cadena lateral del aminoácido (H<sub>β</sub>). Mediante el espectro bidimensional <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY (figura 54) se pudo realizar la asignación de todos hidrógenos, en el anexo G – 7.24 se observan los acoplamientos para H<sub>1</sub>-H<sub>2</sub> (4.94 ppm – 3.35 ppm), H<sub>α</sub> – H<sub>βa</sub> (3.17 ppm – 4.19 ppm), H<sub>α</sub> – H<sub>βb</sub> (3.05 ppm – 4.16 ppm), H<sub>6a</sub> - H<sub>6b</sub> (3.62 ppm – 3.85 ppm) y las interacciones entre las señales solapadas de los protones H<sub>2</sub>, H<sub>3</sub>, H<sub>4</sub> y H<sub>5</sub>.

En el espectro <sup>13</sup>C RMN (Anexo G – 7.25) se observa una señal en campo bajo 171.4 ppm que corresponde al carbono cuaternario del enlace amida. Mediante los experimentos DEPT 90 y 135 (Anexo G – 7.26 y 7.27) se pudieron asignar las señales dependiendo de la naturaleza de los carbonos. En 79.1 ppm se observa la señal para el carbono anomérico, las señales en 77.5 ppm, 76.4 ppm, 71.7 ppm y 69.1 ppm corresponden a los carbonos C<sub>5</sub>, C<sub>3</sub>, C<sub>2</sub> y C<sub>4</sub> de los grupos CH del carbohidrato, respectivamente. La señal en 60.5 ppm, se observa en fase negativa y corresponde al CH<sub>2</sub> del carbohidrato, la señal en 54.5 ppm corresponde al grupo CH<sub>α</sub> del aminoácido, la señal en 36.9 ppm en fase negativa corresponde al grupo CH<sub>2</sub> del aminoácido C<sub>β</sub>. Mediante los experimentos bidimensionales a un enlace (HMQC) (Anexo G – 7.28) y a dos y tres enlaces (HMBC) (Anexo G – 7.29 y 7.30) se realizó la asignación de los grupos CH del carbohidrato, se analizaron las interacciones escalares para H<sub>1</sub>, H<sub>2</sub> y H<sub>5</sub> que pudieron ser asignados mediante el experimento bidimensional <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY.

El espectro de RMN evidencia algunas señales que no pueden ser asignadas, ya que no presentan acoplamientos claros en los espectros bidimensionales. La señal que se encuentra en 89.5 ppm y que acopla con la especie que se encuentra a 3.99 ppm, podría atribuirse a una mezcla de la molécula esperada (**8**) con trazas de un carbohidrato parcialmente desprotegido. Se sugiere que la especie no se trata de un anómero de (**4**) debido a que el doblete con desplazamiento 3.99 ppm, presenta una constante de acoplamiento <sup>3</sup>J= 9.0 Hz.

---

Las señales que presentan los espectros de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  RMN, coinciden con el número de protones y carbonos esperados. Así mismo analizando las interacciones escalares entre protones (COSY) y entre carbonos e hidrógenos (HMQC y HMBC) se puede concluir que el compuesto obtenido corresponde a **(8)**.

#### 4.4.3 Síntesis de Lys- $\beta$ -D-*N*-glucopiranosil)

El anexo E – 5.19 muestra el perfil cromatográfico de (6), la figura 5.20 muestra el perfil cromatográfico después de 3 h de reacción con TFA/DCM (55%). Se observa la formación de una especie con  $t_R$ = 6.8 min que corresponde a (6a) (Anexo E – 5.20), la desaparición de la señal correspondiente a (6),  $t_R$ = 8,8 min, indica que el reactivo de partida se consumió totalmente.

El *N*-glucosilaminoácido (6a) se sometió a tratamiento con 4-metilpiperidina durante 2h. El Cromatograma (Anexo G – 5.21) muestra el perfil cromatográfico del producto obtenido. Debido a la remoción del grupo Fmoc que contenía dos anillos aromáticos que absorben en la región UV, el monitoreo de la reacción no se puede hacer de manera directa, ya que las especies formadas no absorben en la región UV. Por este motivo se realizó un monitoreo indirecto, analizando la desaparición de (6a) y la formación de una señal que corresponde al aducto formado entre la 4-metilpiperidina y el grupo Dibenzofulveno (DBF). Debido a la baja hidrofobicidad de (6b), ésta eluye con el frente del solvente, la especie presenta  $t_R$ = 0,5 min, las especies con  $t_R$ = 4.4 min corresponde al aducto mencionado. Esto se puede constatar mediante el análisis a 302 nm, región de absorción específica para el grupo DBF, en donde solamente se observa el pico para la especie con  $t_R$ = 4.4 min (Anexo E – 5.22).

Como se observa en el cromatograma (Anexo E – 5.22), la especie con  $t_R$ = 0,6 min no absorbe en esta longitud de onda, solamente se evidencia una señal, que se atribuye al aducto formado en  $t_R$ = 4.4 min.

El producto obtenido se trató con Hidróxido de hidracina. El Cromatograma (Anexo E - 5.23) muestra el producto de reacción. Para eliminar las especies no deseadas se realizó purificación mediante RP-SPE.

El perfil cromatográfico de la fracción obtenida después de purificar mediante RP-SPE se muestra en el anexo E – 5.24.}. Cuando se realizó el análisis mediante RMN, se evidencia

contaminación de la muestra con trazas de 4-metilpiperidida. Por este motivo, fue necesario cristalizar la muestra en EtOH absoluto.

El espectro RMN- $^1\text{H}$  (Anexo E – 5.25) para (**10**), presenta las siguientes características: En 4.95 ppm se observa un doblete con  $J = 9.2$  Hz que integra para un protón, esta señal corresponde al protón anomérico, teniendo en cuenta la constante de acoplamiento y la curva de Karplus, se determina que este protón se encuentra en orientación axial, por lo tanto se forma el anómero  $\beta$  de (**10**). Entre 4.00 ppm – 3.97 ppm se encuentra un multiplete que integra para un protón y corresponde al  $\text{H}_\alpha$  del aminoácido. El doblete que se encuentra en 3.80 ppm integra para un protón y corresponde a uno de los protones del grupo  $\text{CH}_2$  de carbohidrato, el otro protón se encuentra como un multiplete entre 3.65 ppm - 3.60 ppm. Los multipletes que se observan en 3.46 ppm - 3.29 ppm corresponden a los protones  $\text{H}_2$ ,  $\text{H}_3$ ,  $\text{H}_4$  y  $\text{H}_5$  del carbohidrato. Como las señales se encuentran solapadas, es posible asignar solamente dos de estas señales: 3.48 ppm ( $\text{H}_5$ ), 3.35 ppm ( $\text{H}_2$ ). En campo alto se observa dos dobles dobletes, cada uno integra para un protón y corresponden a los dos hidrógenos del grupo  $\text{CH}_2$  de la cadena lateral del aminoácido ( $\text{H}_\beta$ ). Mediante el espectro bidimensional  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY (Anexo E – 5.26) se pudo realizar la asignación de todos hidrógenos, se observan los acoplamientos para  $\text{H}_1$ - $\text{H}_2$  (4.90 ppm – 3.31 ppm),  $\text{H}_6\text{a}$  -  $\text{H}_6\text{b}$  (3.80 ppm – 3.65 ppm) y las interacciones entre las señales solapadas de los protones  $\text{H}_2$ ,  $\text{H}_3$ ,  $\text{H}_4$  y  $\text{H}_5$ . (3.45 ppm – 3.28 ppm)

En el espectro  $^{13}\text{C}$  RMN (Anexo E – 5.27) se observan una señal en campo bajo 170.9 ppm que corresponde al carbonos cuaternarios del enlace amida. Mediante los experimentos DEPT 135 (Anexo E – 5.28 y 5.29) se pudieron asignar las señales dependiendo de la naturaleza de los carbonos. En 79.4 ppm se observa la señal para el carbono anomérico, las señales en 77.8 ppm, 76.5 ppm, 71.8 ppm y 69.3 ppm corresponden a los carbonos  $\text{C}_5$ ,  $\text{C}_3$ ,  $\text{C}_2$  y  $\text{C}_4$  de los grupos  $\text{CH}$  del carbohidrato. La señal en 60.5 ppm, se observa en fase negativa y corresponde al  $\text{CH}_2$  del carbohidrato, la señal en 53.1 ppm corresponde al grupo  $\text{CH}_\alpha$  del aminoácido, la señal en 39.0 ppm en fase negativa corresponde al grupo  $\text{CH}_2$  del aminoácido  $\text{C}_\beta$ . Mediante los experimentos bidimensionales a un enlace (HMQC) (Anexo E - 5.30) y (HMBC) (Anexo E – 5.31) se realizó la asignación de los grupos  $\text{CH}$  del carbohidrato, se analizaron las interacciones

escalares para H1, H2 y H5 que pudieron ser asignados mediante el experimento bidimensional  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY.

Aunque se pueden asignar las señales para cada protón, la integración no corresponde a la esperada, esto puede atribuirse a residuos de 4-metilpiperidina que no pudieron ser retirados mediante la cristalización; por este motivo no pudieron asignarse todos los protones de la cadena lateral. Sin embargo, fue posible asignar la mayoría de las señales de **(10)**.

Aunque las señales que presentan los espectros de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  RMN, no coinciden con el número de protones y carbonos esperados, se puede concluir que el compuesto obtenido corresponde a **(10)**, ya que las interacciones escalares corresponden a las esperadas. Es posible que deban optimizarse los procesos de purificación para mejorar la pureza del compuesto.

#### **4.4.4 Síntesis de Leu- $\beta$ -D-*N*-glucopiranosil)**

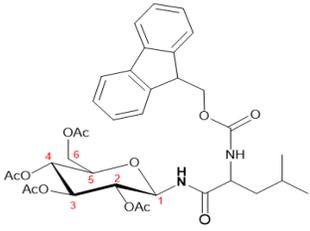
En el anexo D – 4.15 se observa el perfil cromatográfico de **(5)** y la figura 4.16 (Anexo D) muestra el perfil cromatográfico después de 2h de reacción con 4-metilpiperidina. Debido a la remoción del grupo Fmoc que contenía dos anillos aromáticos que absorben en la región UV, el monitoreo de la reacción no se puede hacer de manera directa, ya que las especies formadas no absorben en la región UV. Por este motivo se realizó un monitoreo indirecto, analizando la desaparición de **(5)** y la formación de una señal que corresponde al aducto formado entre la 4-metilpiperidina y el grupo Dibenzofulveno (DBF) (Anexo d – 4.16). Debido a la baja hidrofobicidad de **(5a)**, ésta eluye con el frente del solvente, la especie presenta  $t_R = 0,5$  min, la especie con  $t_R = 4.4$  min corresponde al aducto mencionado. Esto se puede constatar mediante el análisis a 302 nm, región de absorción específica para el grupo DBF, en donde solamente se observa el pico para la especie con  $t_R = 4.4$  min (Anexo D – 4.16).

El producto obtenido se trató con Hidróxido de hidracina. El Cromatograma (Anexo D – 4.17) muestra el producto de reacción. Para eliminar las especies no deseadas se realizó purificación mediante RP-SPE, el perfil cromatográfico de la fracción obtenida se muestra en la Anexo D – 4.17). Cuando se realizó el análisis mediante RMN, se evidencia

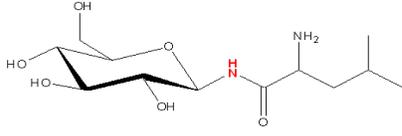
contaminación de la muestra con 4-metilpiperidida y posiblemente con mezclas de (5) parcialmente desprotegidas.

En los espectros de RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  (Anexo D 4.19 y 4.21) se observan las señales para (9), los espectros muestran que la molécula presenta una contaminación significativa. Realizando el análisis general de las especies mayoritarias, sin poder realizar una asignación específica se encuentra que varias de las señales que se presentan en el experimento  $^{13}\text{C}$  para (9) coinciden con las que presenta (5). La tabla 4 muestra los desplazamientos en ppm para cada molécula.

Tabla 4. Comparación desplazamiento químicos (ppm)  $^{13}\text{C}$  para (5) y (9)



5



9

Compuesto	C 1	C 2	C 3	C 4	C 5	C 6	C $\alpha$	C $\beta$	C=O
5	78.2	70.5	72.7	68.2	73.7	61.6	47.1	40.4	170.6
9		70.7	72.6	68.3	73.2	62.0		51.6	172.7

Las señales que se presentan para (9) coinciden con las que presenta la especie protegida (5) (C2, C3, C4 y C5), además se evidencian varias señales alrededor de 170 ppm indicando la presencia de carbonos cuaternarios que pueden corresponder a grupos acetilo que no fueron removidos.

Aunque se realizó el mismo tratamiento para todos los *N*-glucosilaminoácidos, en el caso de Leucina, no se obtuvieron los resultados esperados. Mediante los análisis de RMN no es posible determinar si la molécula mantiene su identidad. Es necesario realizar otros experimentos y revisar la ruta sintética específicamente para este aminoácido. Lo anterior indica que para la obtención de (9) se debe diseñar una estrategia de desprotección diferente a la utilizada para obtener (8), (10) y (11). Los resultados obtenidos indican que

las características particulares del aminoácido influyen significativamente en las reacciones de formación y desprotección utilizadas para la obtención de (9).

#### 4.4.5 Aspectos generales síntesis de *N*-glucosilaminoácidos

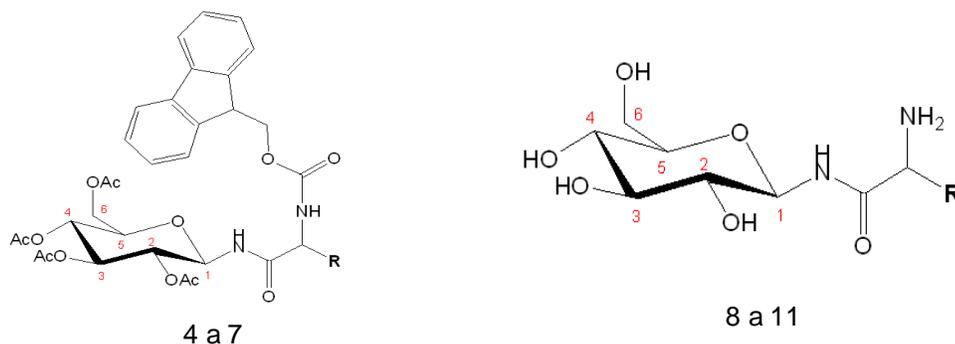
La tabla 5 muestra el resumen de los porcentajes de rendimiento de las reacciones realizadas. Se puede observar que el punto crítico de la ruta sintética se encuentra en el esquema de desprotección, ya que los rendimientos disminuyen de manera significativa, además mediante análisis por Resonancia Magnética Nuclear se concluye que se obtienen especies con trazas de 4-metilpiperidina, lo que afecta la pureza del compuesto.

Tabla 5. Porcentaje de rendimiento para compuestos obtenidos

Compuesto	Monosacárido		N-glucosilaminoácidos protegidos				N-glucosilaminoácidos desprotegidos				
	1	2	4	5	6	7	8	9	10	11	
Monosacárido	Ac <sub>5</sub> Glc	Ac <sub>4</sub> Glc-N <sub>3</sub>	Ac <sub>4</sub> Glc-NH <sub>2</sub>	Ac <sub>4</sub> Glc-NH <sub>2</sub>	Ac <sub>4</sub> Glc-NH <sub>2</sub>	Ac <sub>4</sub> Glc-NH <sub>2</sub>	Ac <sub>4</sub> Glc-NH <sub>2</sub>				
Aminoácido	-----	-----	Fmoc-Phe-OH	Fmoc-Leu-OH	Fmoc-Lys(Boc)-OH	Fmoc-Asp(OtBu)-OH	Phe-O-	Leu-O-	Lys-O-	Asp-(OH)-O-	
Cadena lateral	-----	-----									
% Rendimiento	95	80	75	56	92	57	18	84	73	20	
% Rendimiento general	-----	-----	-----	-----	-----	-----	10	36	51	9	

La última fila de la tabla 5 contiene el porcentaje de rendimiento total para la ruta sintética empleada. Los rendimientos para la obtención de (8) y (11) son similares, de lo que podría concluirse que el rendimiento total de la síntesis es cercano al 10%. Aunque este rendimiento es bajo, es importante resaltar que de once moléculas esperadas, diez lograron obtenerse, lo que implica un planteamiento correcto en la ruta de síntesis. Al ser el primer reporte de esta metodología de acople y desprotección se espera que los rendimientos puedan ser mejorados. Se pudo establecer que la obtención de estos compuestos es viable y que deben mejorarse algunos procesos para de ese modo mejorar los rendimientos obtenidos.

Tabla 6. Comparación desplazamientos química ppm RMN 1H para las moléculas obtenidas

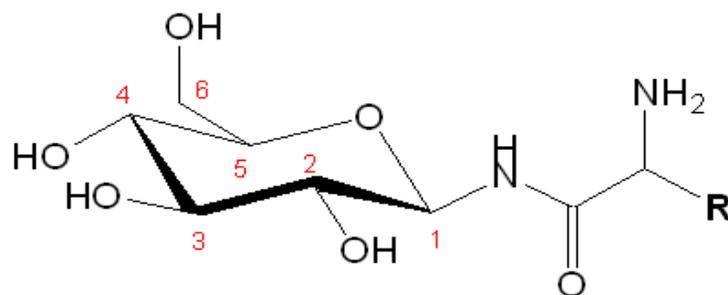


Compuesto	H1	H2	H3	H4	H5	H6a/b	H6a/b	NH	H( $\alpha$ )	H( $\beta$ )
1	6.45	5.28	5.61	5.28	4.25	4.41	4.24	---	---	---
2	4.68	4.99	5.26	5.15	3.83	4.31	4.21	---	---	---
4	5.26	4.90	5.34	5.10	3.85	4.30	4.46	6.81	4.24	
5	5.34	4.99	5.34	5.12	3.84	4.38	4.11	6.87	4.11	1.75
6	5.33	4.99	5.33	5.11	3.84	4.30	4.16	7.00	4.16	2.11
7	5.24	5.01	5.38	5.13	3.86	4.30	4.17	7.46	4.56	3.08
8	4.93	3.33	3.46	3.33	3.46	3.82	3.68	N.O	4.17	2.93
9	5.36	4.95	5.05	N.O	5.05	4.28	4.12	N.O	N.O	3.03
10	4.95	3.34	3.45	3.34	3.45	3.80	3.65	N.O	4.00	2.93
11	4.94	3.35	3.48	3.35	3.48	3.80	3.65	N.O	4.26	2.93

N.O: Señales no observadas en el espectro

En la tabla 7 se relacionan los desplazamientos de los protones de las moléculas obtenidas en este trabajo. Se puede observar que el desplazamiento del protón anomérico no presenta variabilidad para la mayoría de los *N*-glucosilaminoácidos, a excepción de (1) que se encuentra en una configuración diferente (ecuatorial - anómérico  $\alpha$ ) y (9), sin embargo para (4), (6) y (7) no hay variación. Los desplazamientos químicos observados para los protones coinciden en la mayoría de los casos para los *N*-glucosilaminoácidos protegidos y desprotegidos; lo que confirma la obtención eficiente de los compuestos esperados. Es importante resaltar que el desplazamiento del protón anomérico de (9) es similar al desplazamiento de los protones anoméricos de (4), (6) y (7), corroborando que (5) no fue desprotegido eficientemente.

Tabla 7. Comparación señales RMN  $^{13}\text{C}$  (ppm) para los N-glucosilaminoácidos desprotegidos



Compuesto	C 1	C 2	C 3	C 4	C 5	C 6	C=O	C $\alpha$	C $\beta$
8	79.2	71.7	76.5	69.1	77.5	60.5	171.4	54.5	36.9
9		70.7	72.6	68.3	73.2	62.0	172.7		51.6
10	79.4	71.7	76.4	69.2	77.8	60.5	170.9	53.1	39.0
11	79.3	71.7	76.3	69.1	77.7	60.4	170.1	50.2	35.7

En la tabla 6 se puede observar que los desplazamientos en los carbonos para (9) difieren significativamente de los desplazamientos químicos para (8), (10) y (11), corroborando el comportamiento observado en la tabla 7, analizado previamente.

## 5. Conclusiones y recomendaciones

### 5.1 Conclusiones

Se sintetizaron y caracterizaron ocho glucoaminoácidos mediante el acople de 2,3,4,6-tetra-O-acetil- $\beta$ -D-glucopiranosilamina y el  $\alpha$ -carboxi de cuatro Fmoc-aminoácidos de diferente naturaleza.

La metodología para formar el enlace amida se realizó empleando T3P<sup>®</sup>, los resultados obtenidos muestran que este agente acoplante es eficiente para realizar la formación del enlace amida comparado con los agentes acoplantes tradicionales DIC y TBTU. El T3P<sup>®</sup> es un reactivo amigable con el medio ambiente, que además permite la obtención de productos con buenos rendimientos y alta pureza.

Fue posible establecer mejoras, superar los inconvenientes presentados en la ruta sintética y detectar los puntos críticos que se encuentran en el esquema de desprotección, remoción del grupo Fmoc y desacetilación del carbohidrato.

Se diseñaron e implementaron técnicas analíticas amigables con el medio ambiente para la caracterización y purificación de los compuestos obtenidos, empleando dos tipos de columnas (empacada y monolítica). Estos procesos de síntesis, caracterización y purificación pueden ser catalogados como metodologías de química verde, ya que se redujo la cantidad de solventes orgánicos utilizados y se trabajó con un solvente seguro como es el agua.

Se evidenció que la eficiencia de las reacciones, los rendimientos y la pureza de los productos obtenidos está influenciada por la naturaleza del aminoácido.

## **Recomendaciones**

Se recomienda optimizar los procesos de purificación de los *N*-glucosilaminoácidos y emplear técnicas como RP-HPLC acoplado a detector de índice de refracción y HPLC-MS para la caracterización de las moléculas obtenidas.

Se debe diseñar e implementar una metodología que reemplace el esquema de desprotección del grupo Fmoc y la desacetilación que sea más amigable con el medio ambiente y que presente mejores resultados, sobre todo en el caso de la obtención de **(9)**, mejorando de ese modo los rendimientos totales de la reacción.

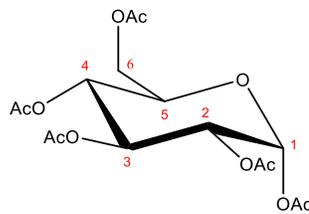
Se recomienda realizar síntesis de otros *N*-glucosilaminoácidos utilizando aminoácidos de diferente naturaleza hidrofóbica como Alanina, Valina, Isoleucina y Triptófano para verificar si se presenta el mismo comportamiento observado en la Leucina.



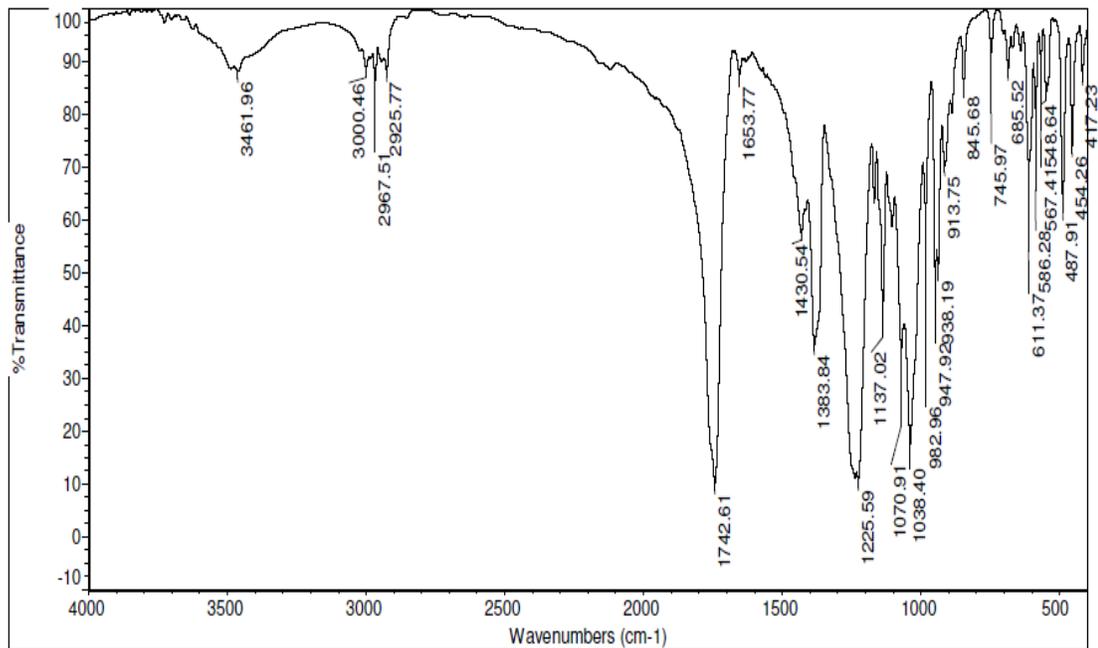


# A. Anexo: Caracterización química de 1,2,3,4,6-penta-O-acetil- $\alpha$ -D-glucopiranososa

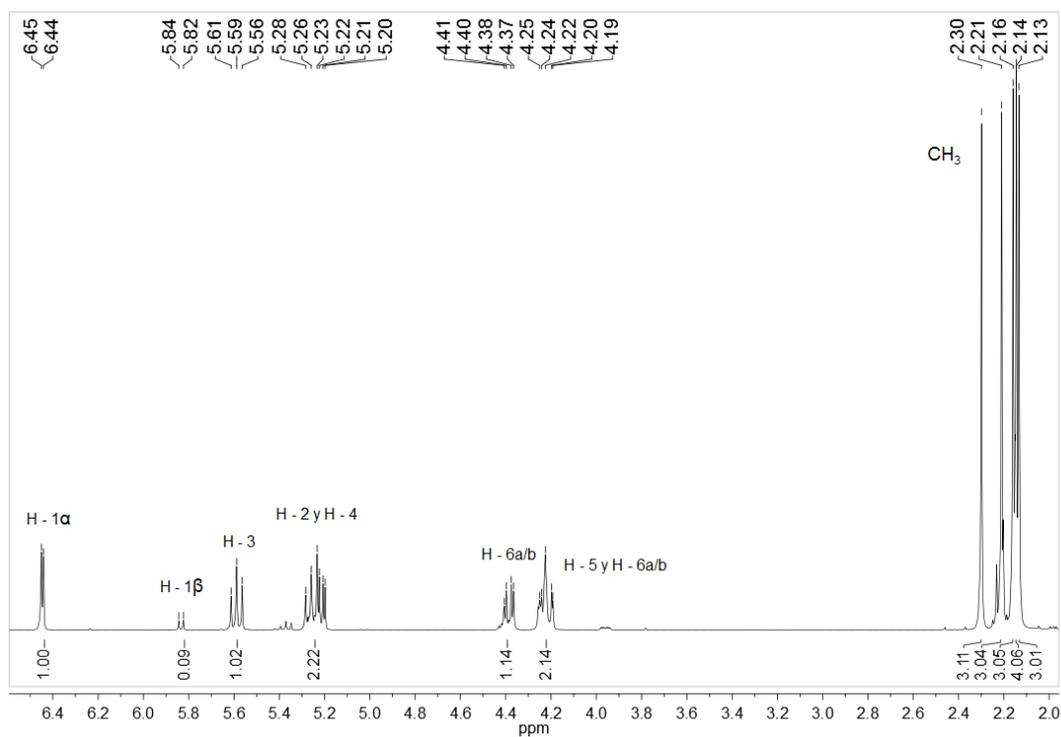
## 1.1 Estructura de 1



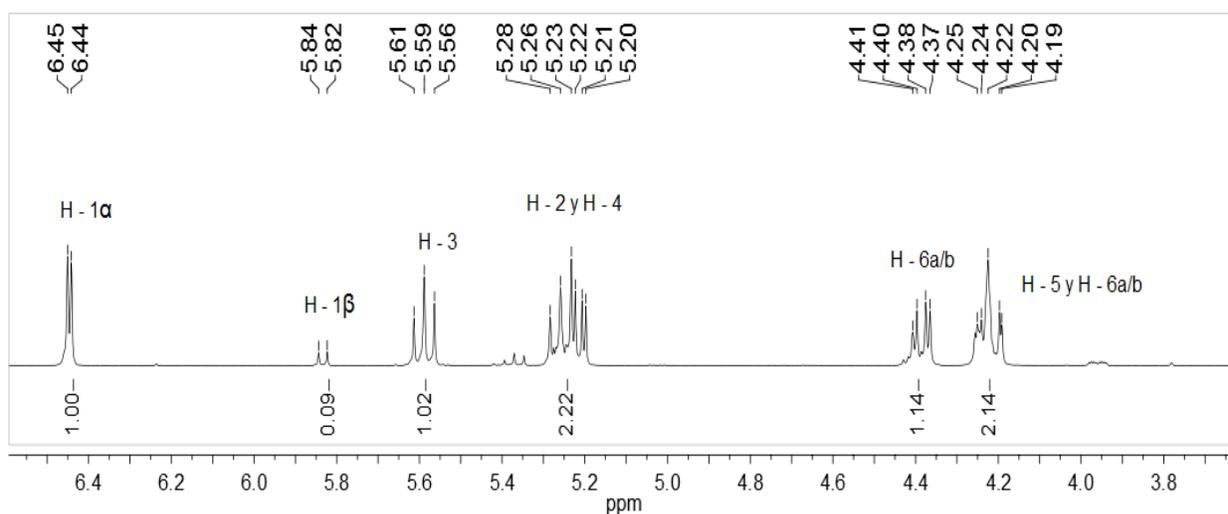
## 1.2 Espectro FT – IR de 1



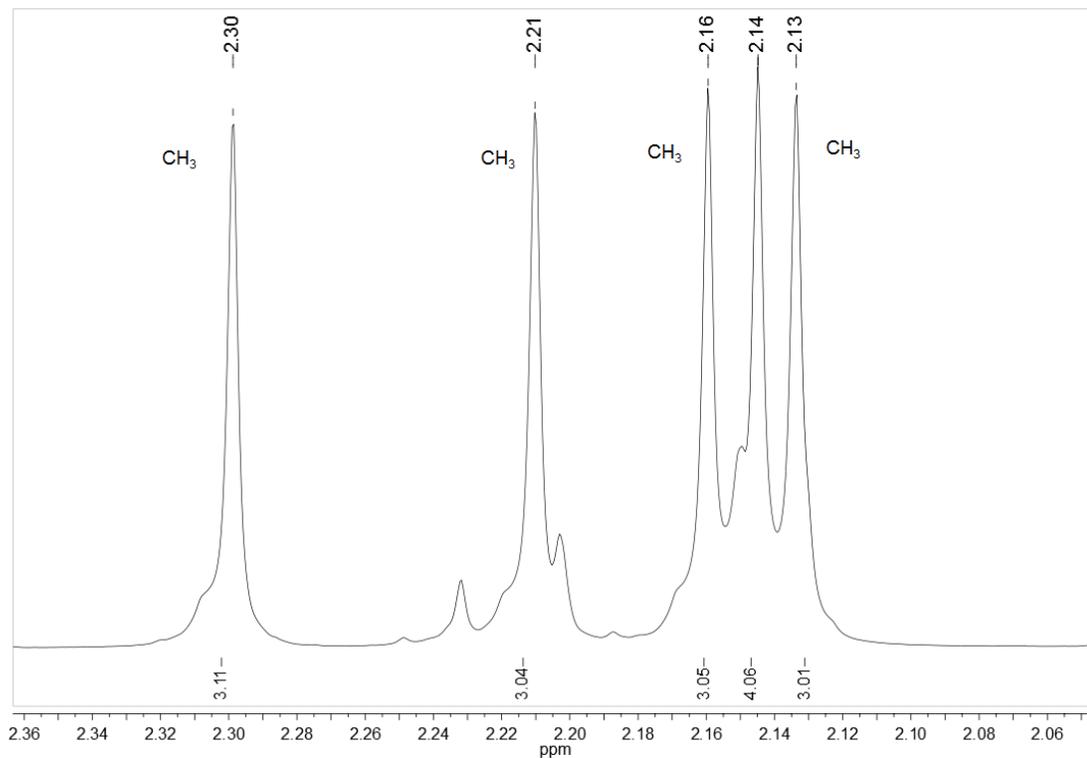
## 1.3 Espectro RMN-<sup>1</sup>H de 1 (400MHz, CDCl<sub>3</sub>)



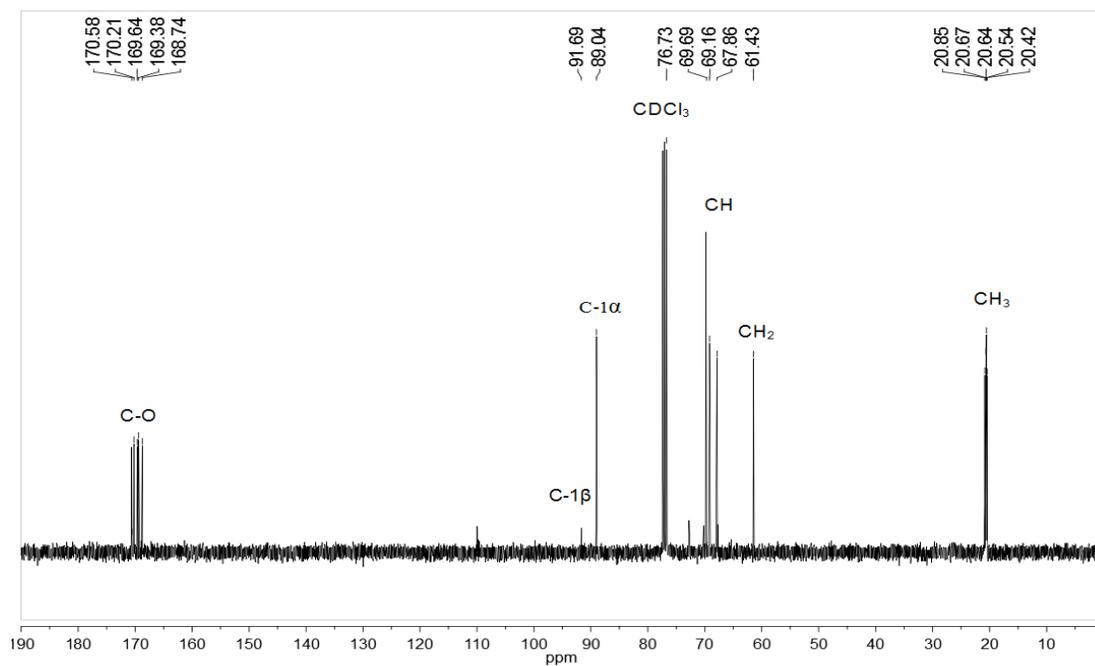
#### 1.4 Ampliación espectro RMN-<sup>1</sup>H de 1 (400MHz, CDCl<sub>3</sub>)



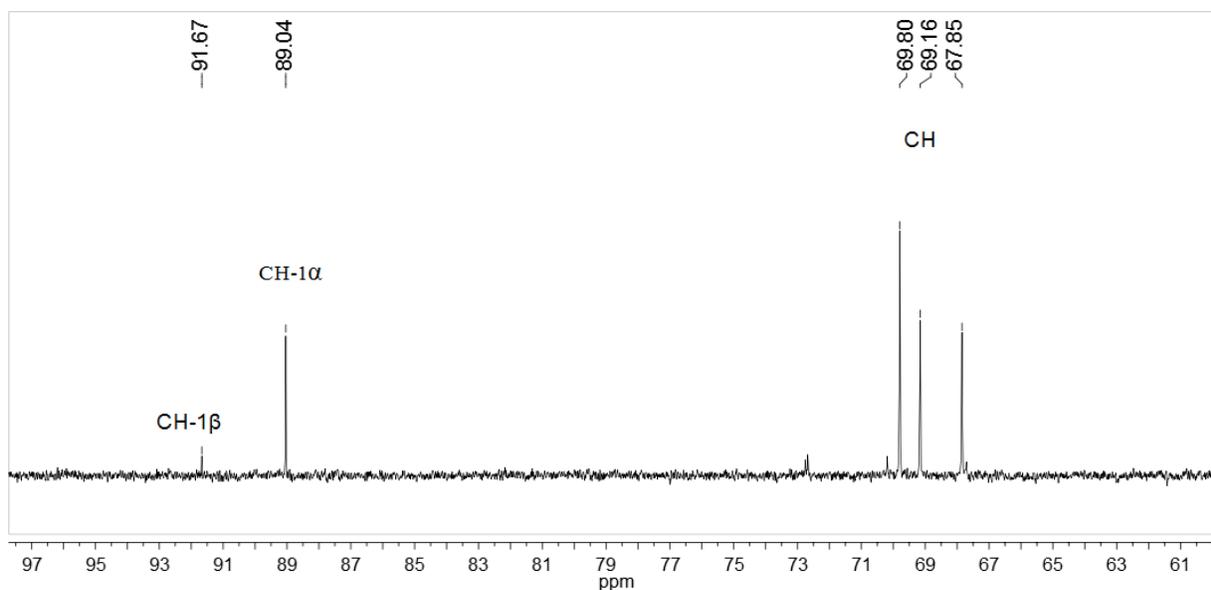
### 1.5 Ampliación espectro RMN-<sup>1</sup>H de 1 (400MHz, CDCl<sub>3</sub>)



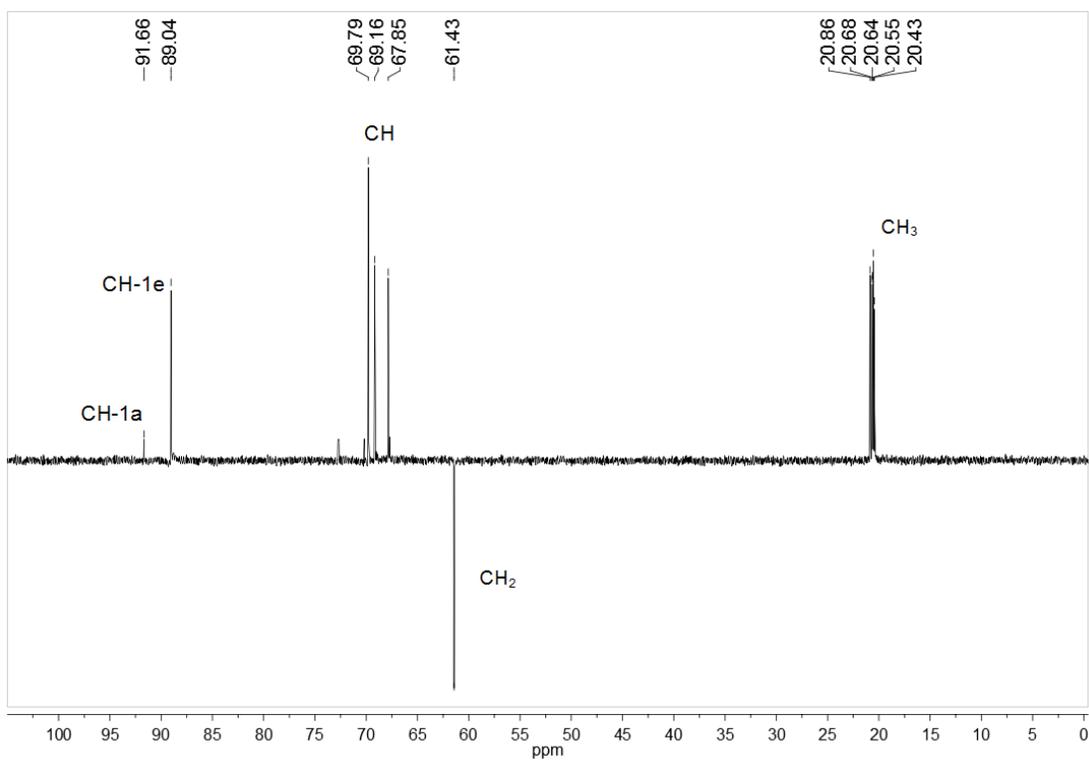
### 1.6 Espectro <sup>13</sup>C- RMN de 1 (101MHz, CDCl<sub>3</sub>)



### 1.7 Espectro $^{13}\text{C}$ - DEPT 90° RMN de 1 (101MHz, $\text{CDCl}_3$ )

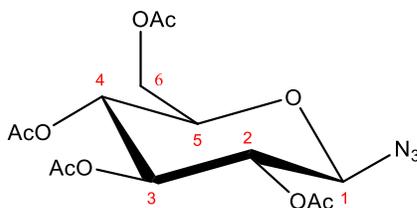


### 1.8 Espectro $^{13}\text{C}$ - DEPT 135° RMN de 1

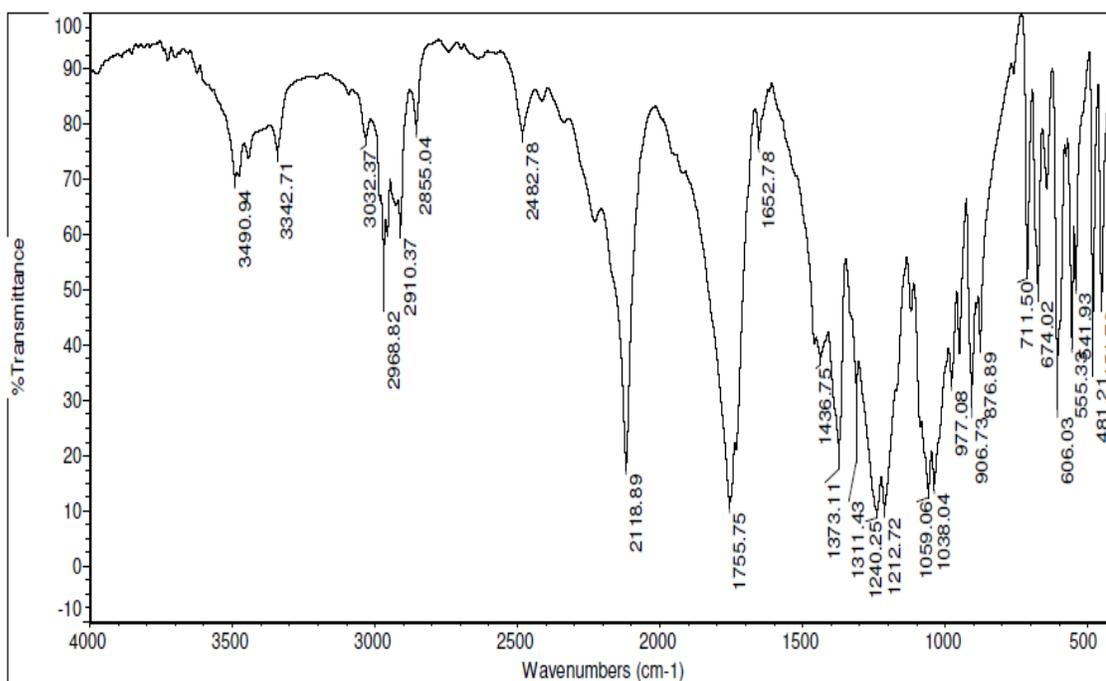


## B. Anexo: Caracterización química de 2,3,4,6-tetra-O-acetil- $\beta$ -D-glucopiranosilazida

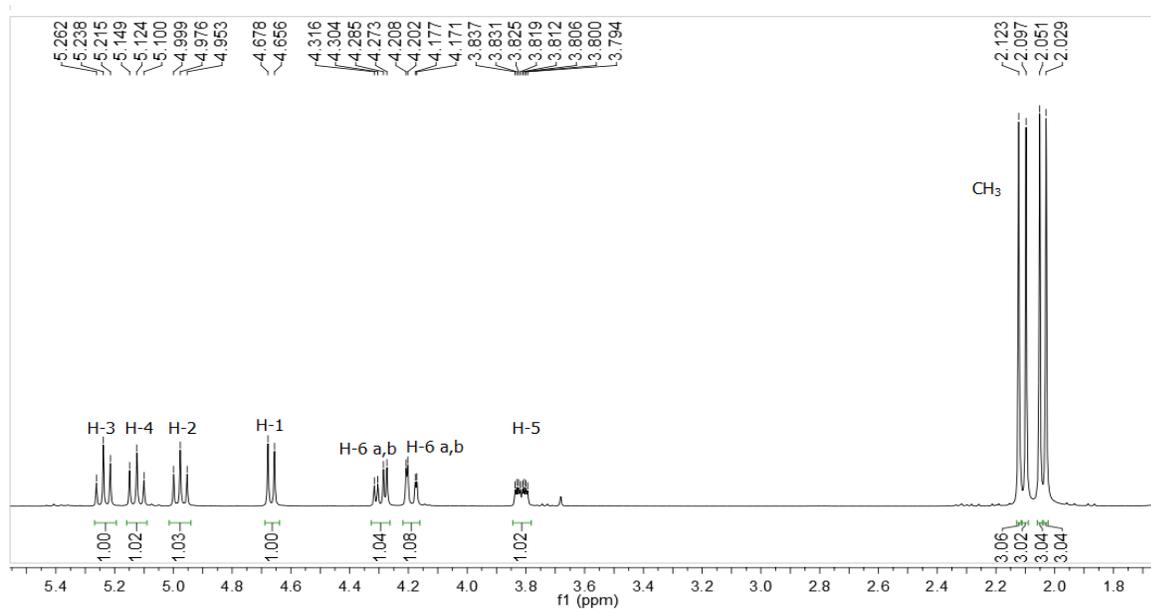
### 2.1 Estructura de 2



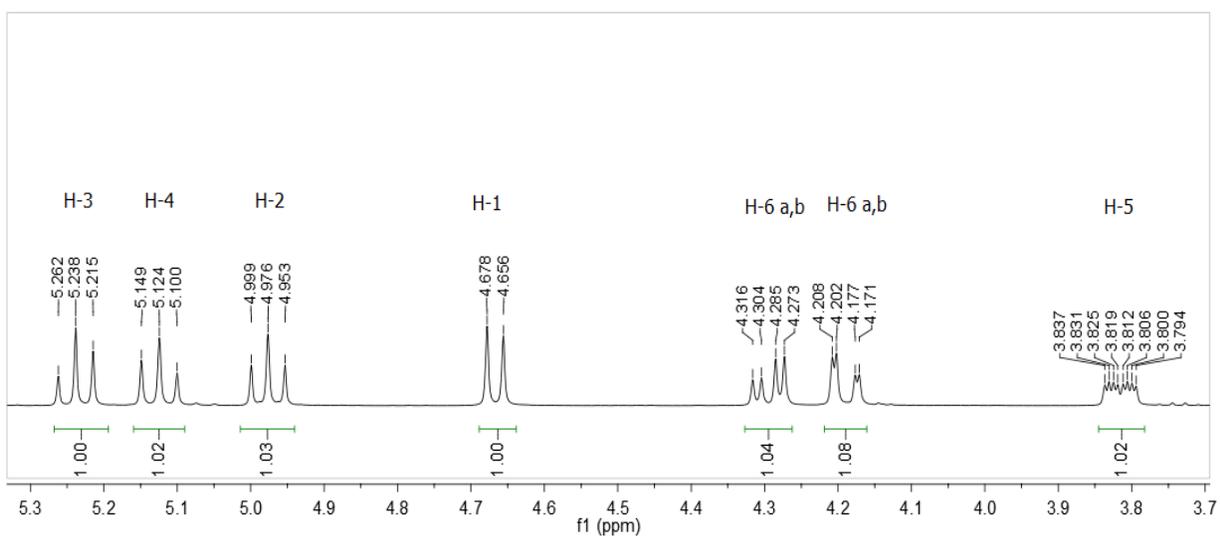
### 2.1 Espectro FT-IR de 2



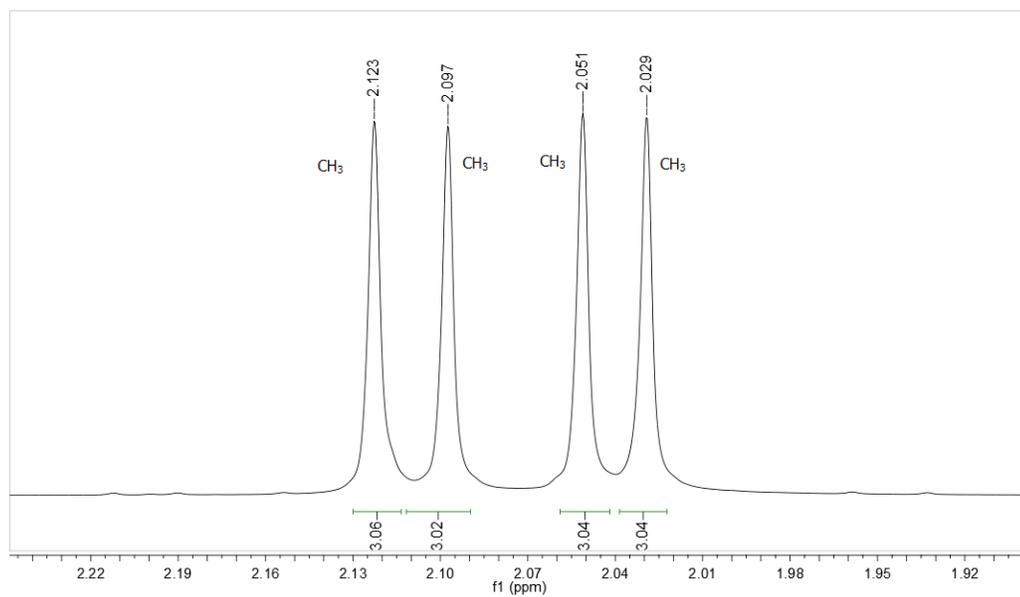
## 2.1 Espectro de RMN $^1\text{H}$ de 2



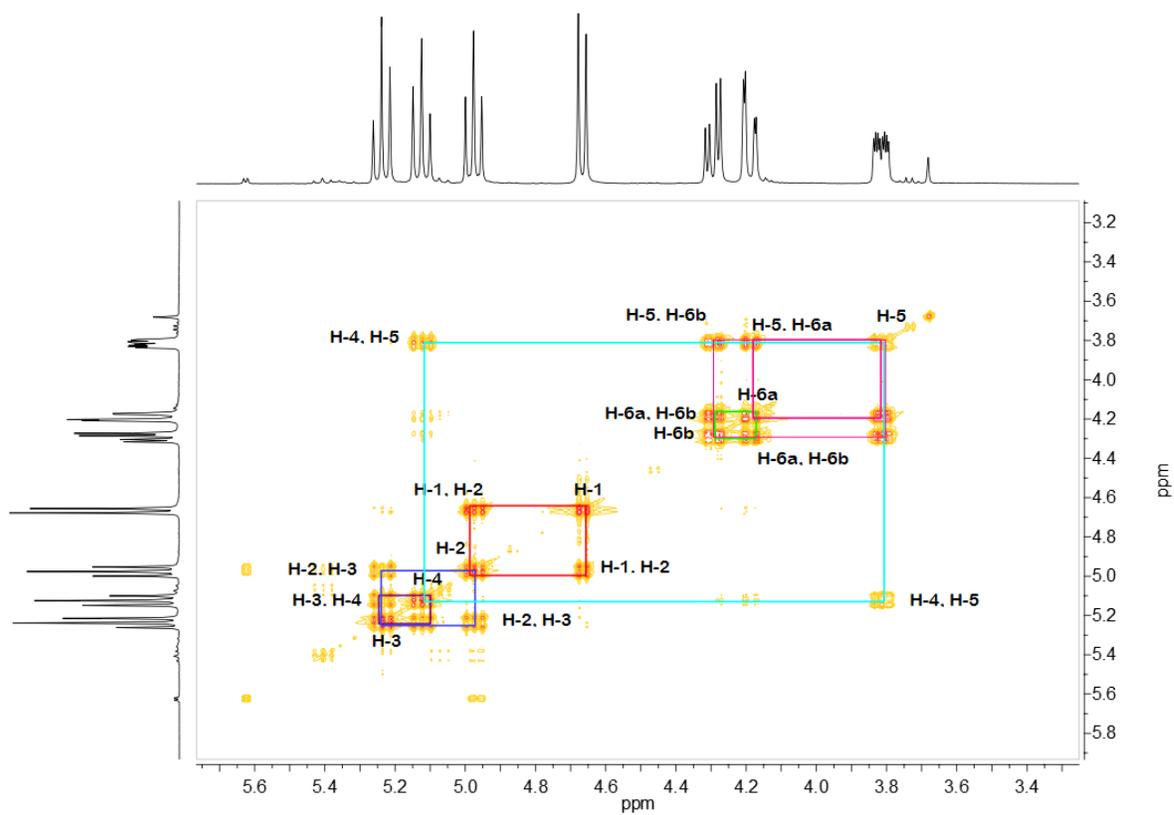
## 2.2 Ampliación espectro de RMN $^1\text{H}$ de 2



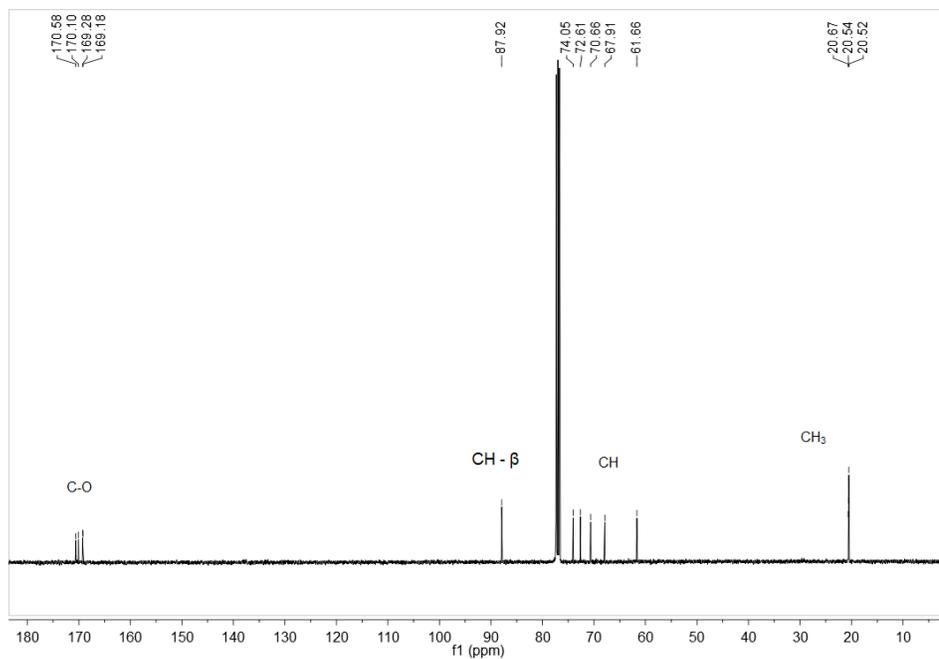
## 2.3 Ampliación espectro de RMN $^1\text{H}$ de 2



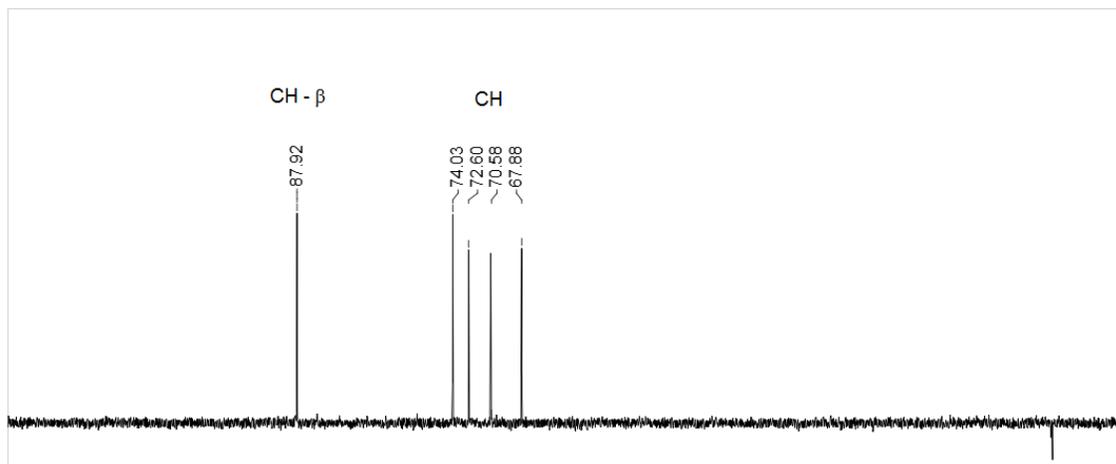
## 2.4 Espectro $^1\text{H}$ COSY de 2

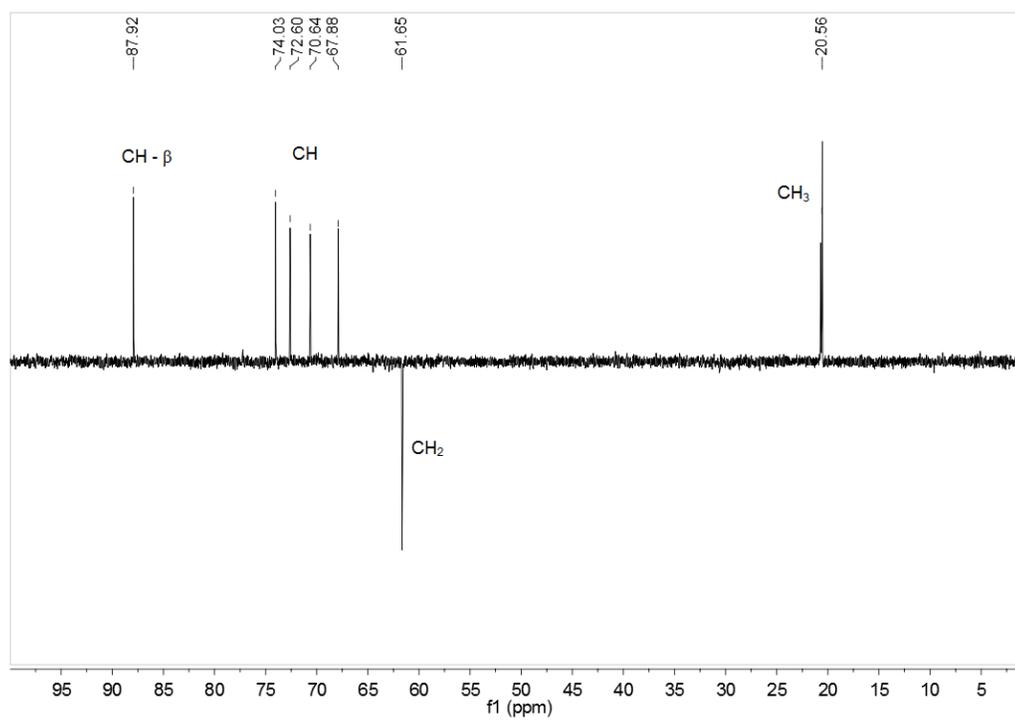


## 2.5 Espectro $^{13}\text{C}$ RMN de 2



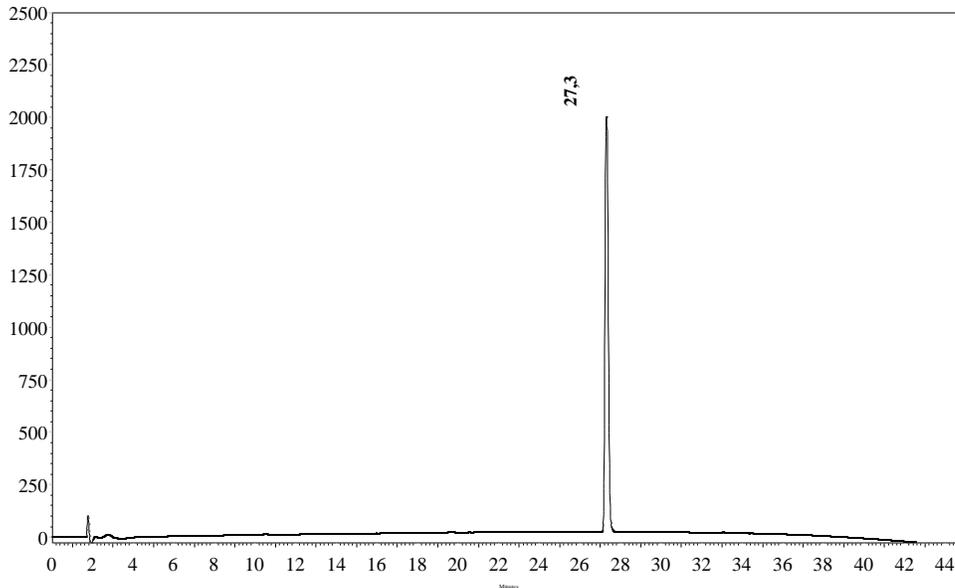
## 2.6 Espectro $^{13}\text{C}$ DEPT 90 RMN de 2



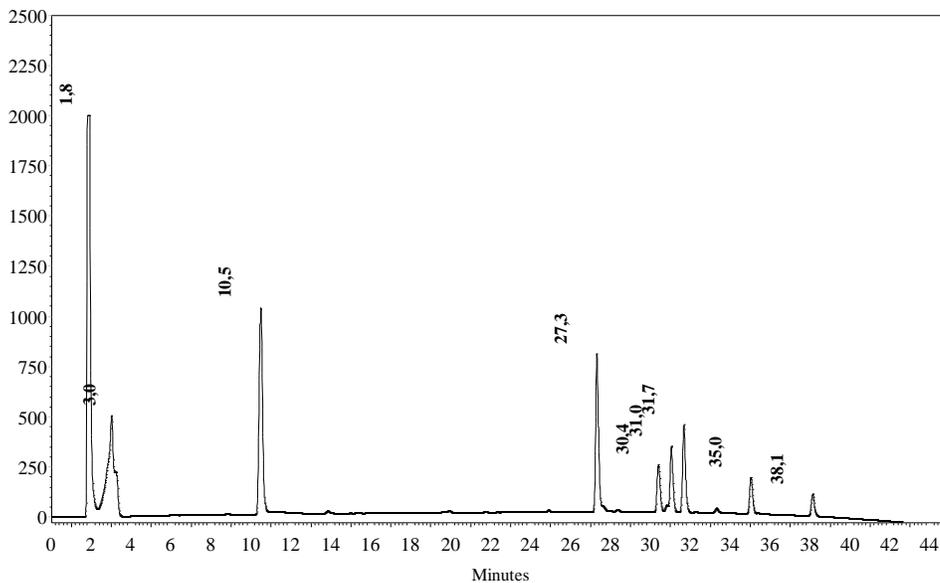
**2.7 Espectro  $^{13}\text{C}$  DEPT 135 RMN de 2**

## C. Anexo: Determinación de las condiciones óptimas para la síntesis de N-glucosilaminoácidos

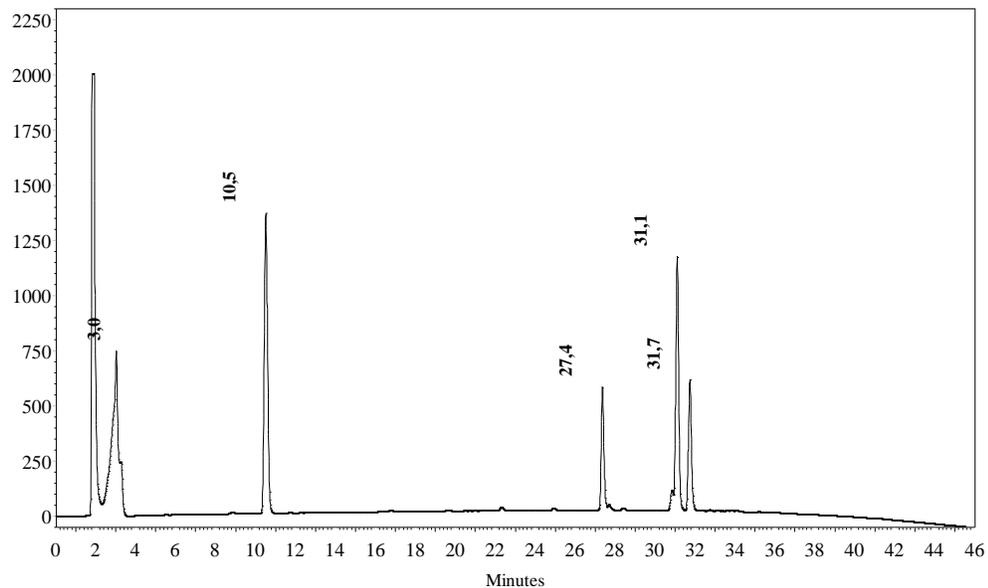
### 3.1 Cromatograma RP-HPLC Fmoc-Phe-OH



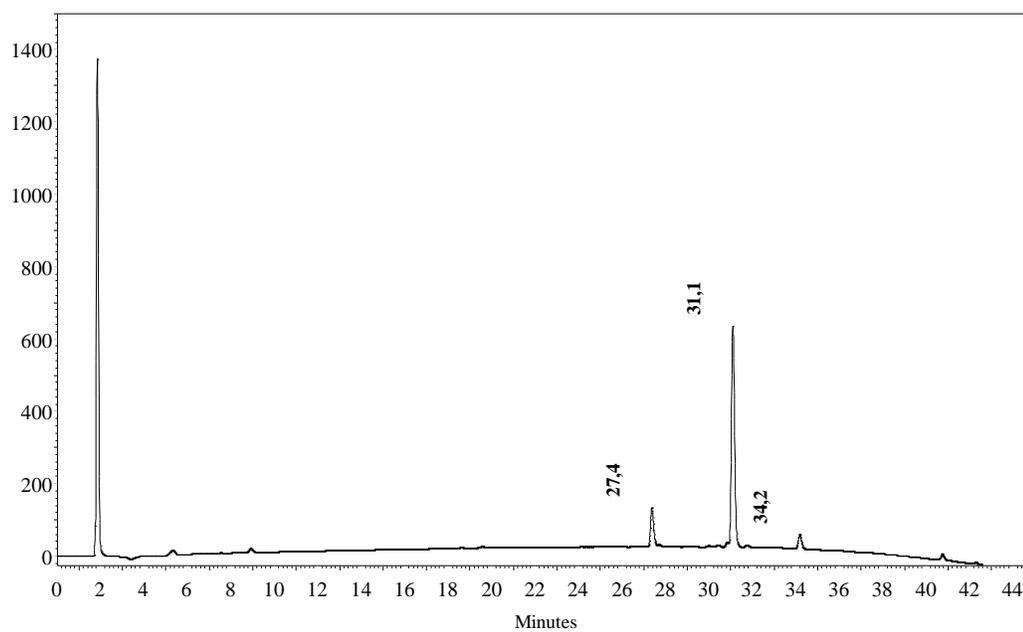
### 3.2 Cromatograma RP-HPLC mezcla de reacción Fmoc-Phe-OH, TBTU; y HOBt



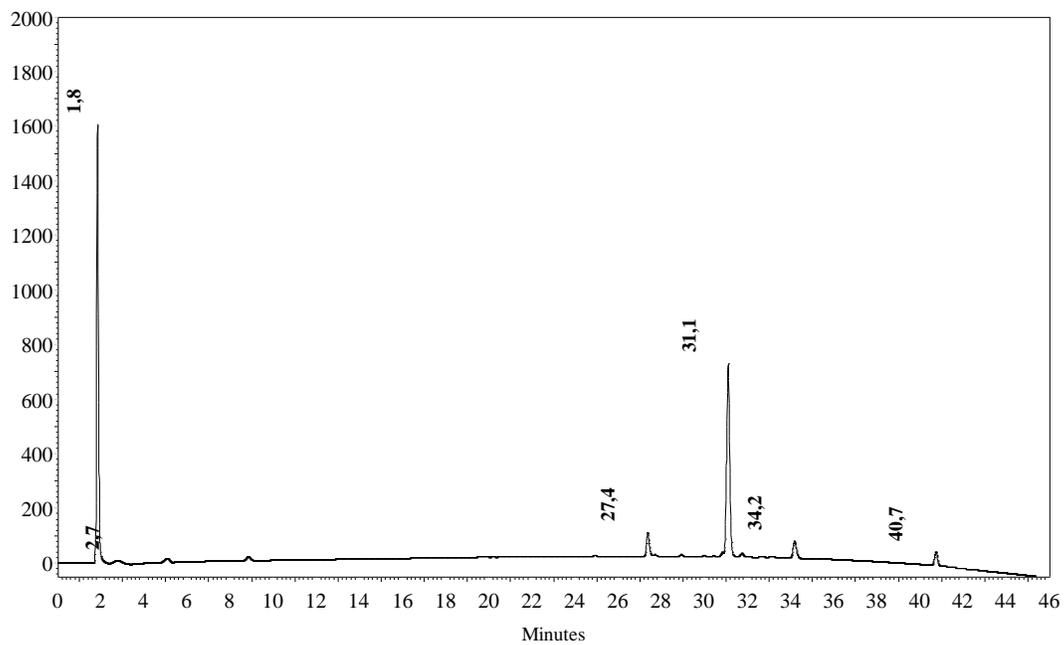
### 3.3 Cromatograma RP-HPLC producto reacción empleando sales de uronio



### 3.4 Cromatograma RP-HPLC mezcla de reacción Fmoc-Phe-OH y DIC

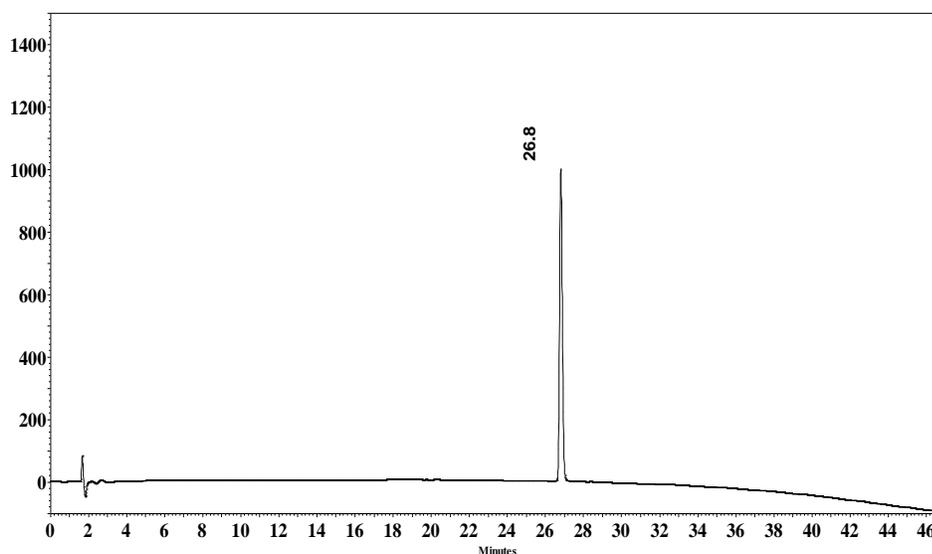


### 3.5 Cromatograma RP-HPLC producto de reacción empleando carbodiimidas

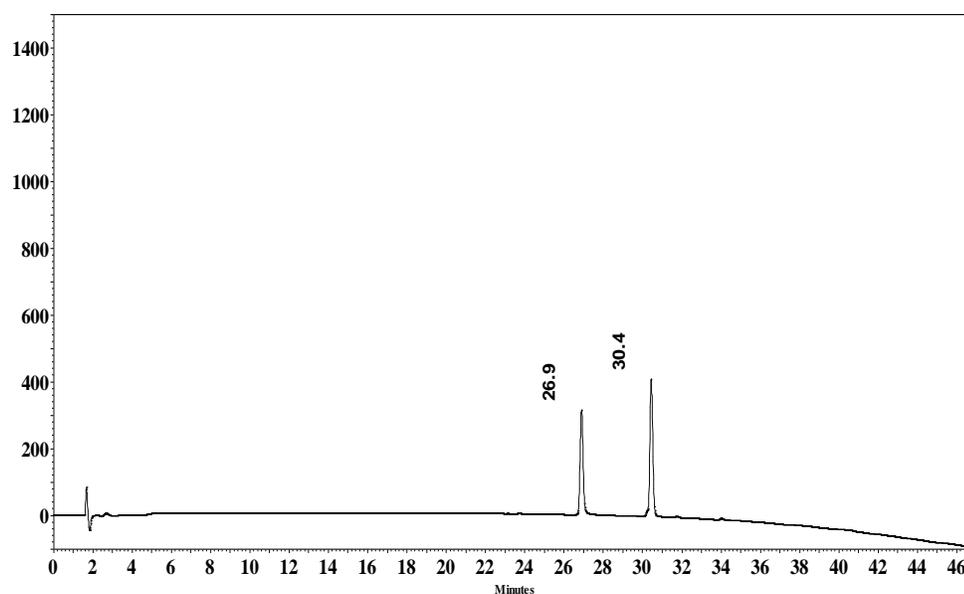


## D. Anexo: Caracterización química de *N*-glucoaminoácido derivado de Leu

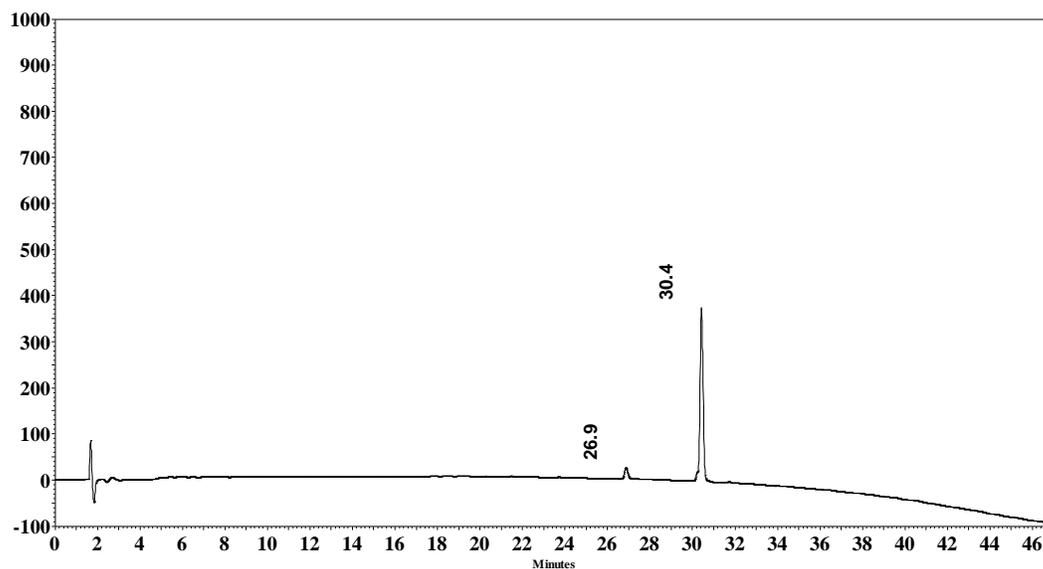
### 4.1 Cromatograma RP-HPLC Fmoc-Leu-OH



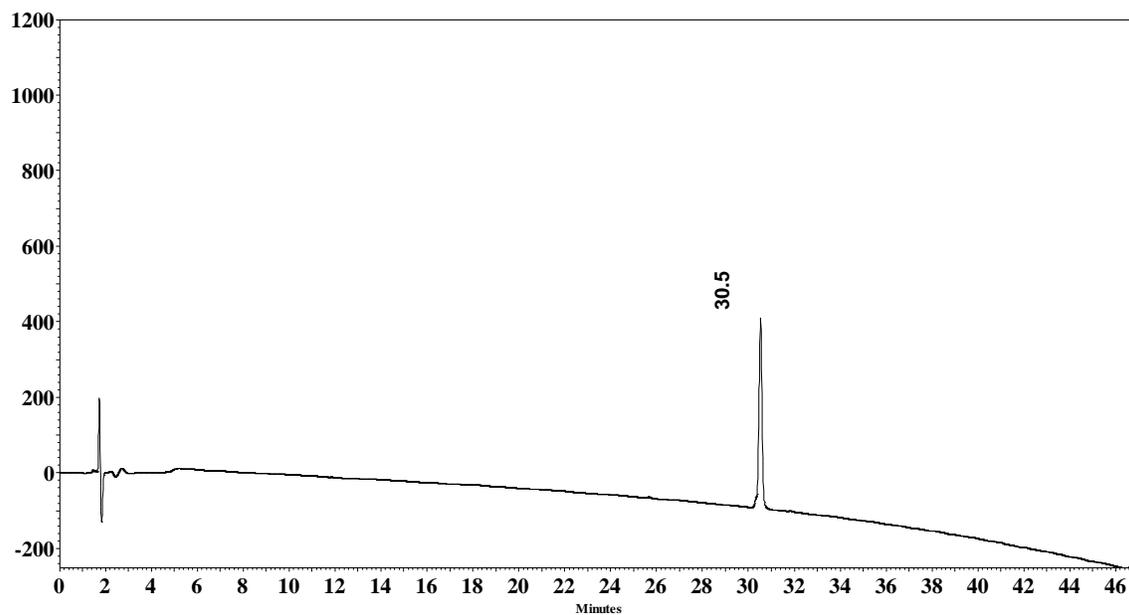
### 4.2 Cromatograma RP-HPLC Mezcla de reacción t=0



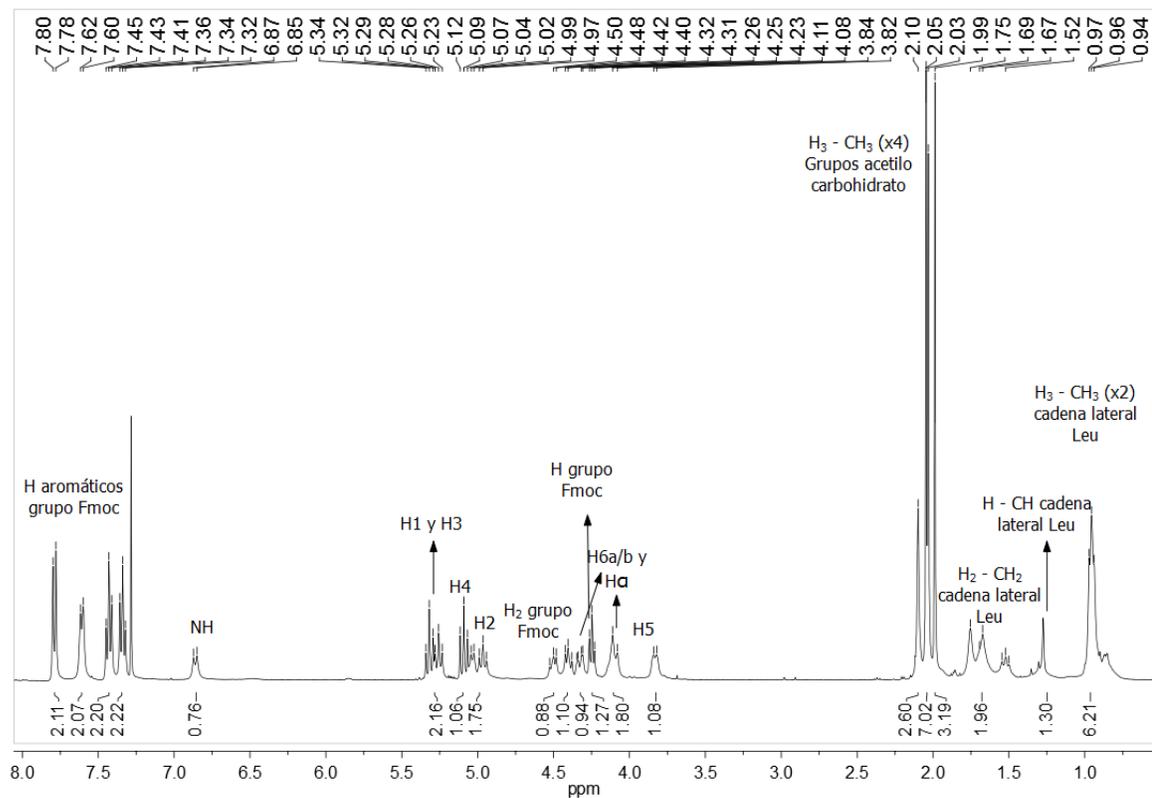
### 4.3 Cromatograma RP-HPLC fin de reacción formación de 5



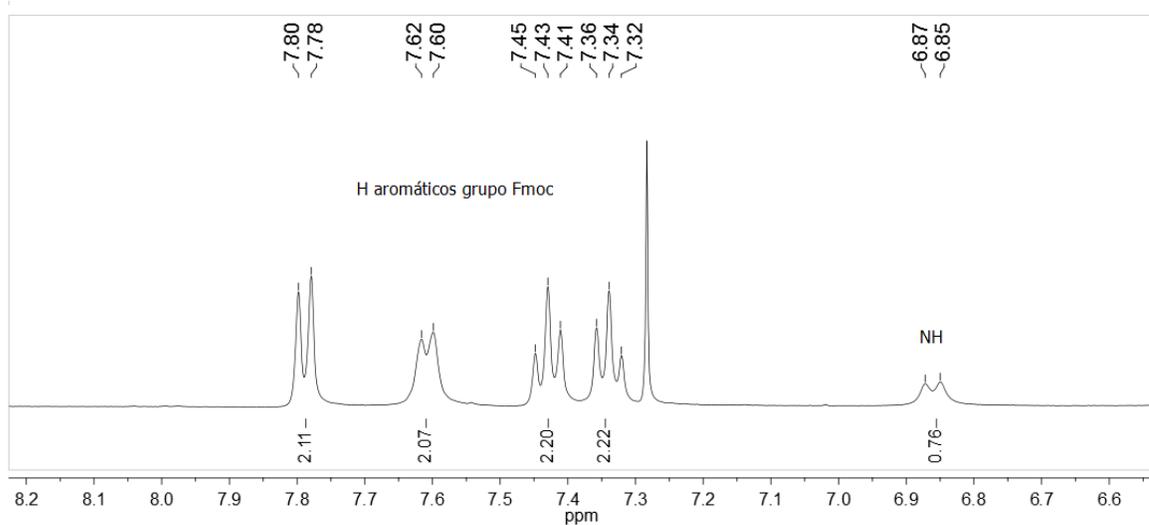
### 4.4 Cromatograma RP-HPLC producto purificado 5



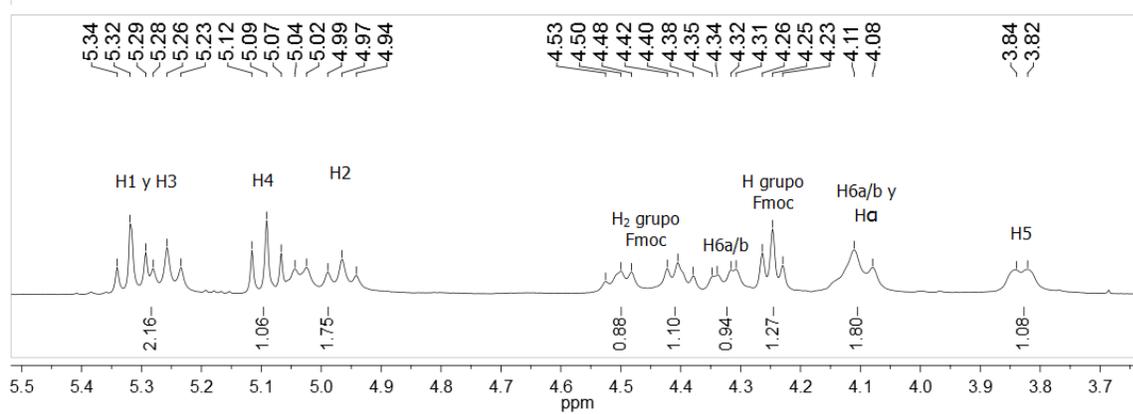
#### 4.5 Espectro de RMN $^1\text{H}$ de 5



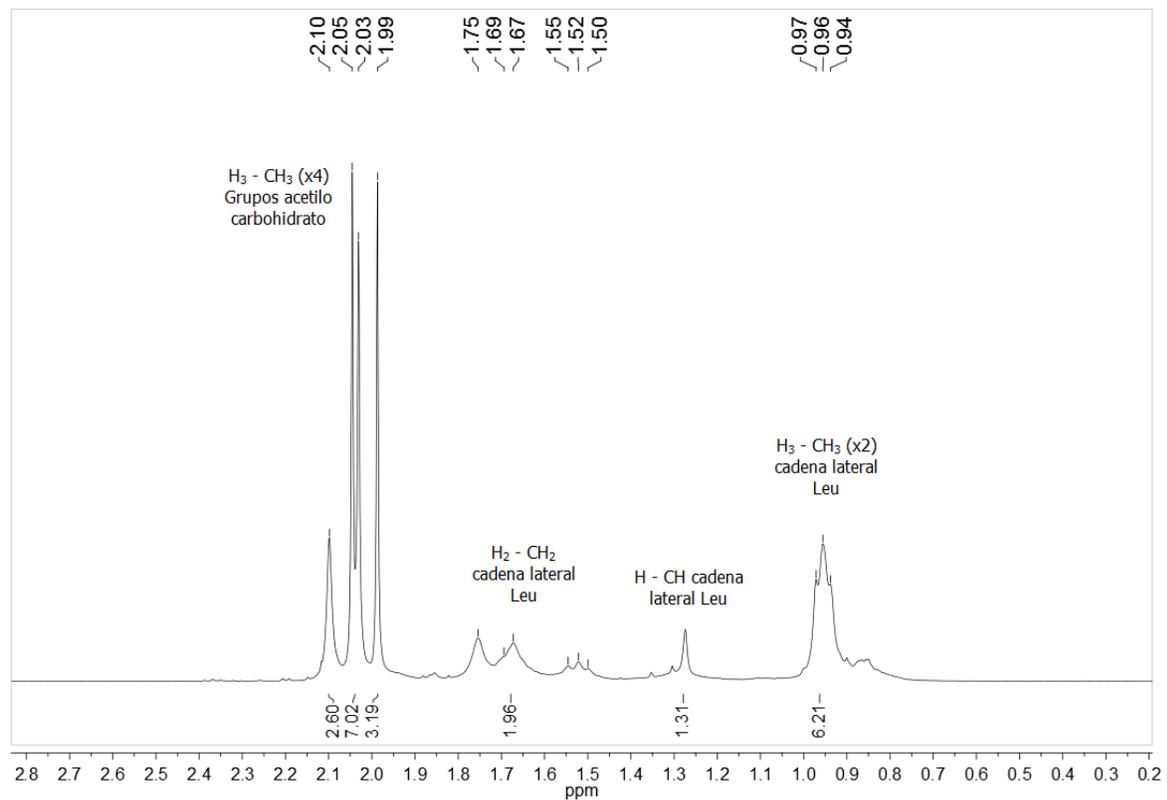
#### 4.6 Ampliación espectro de RMN $^1\text{H}$ de 5



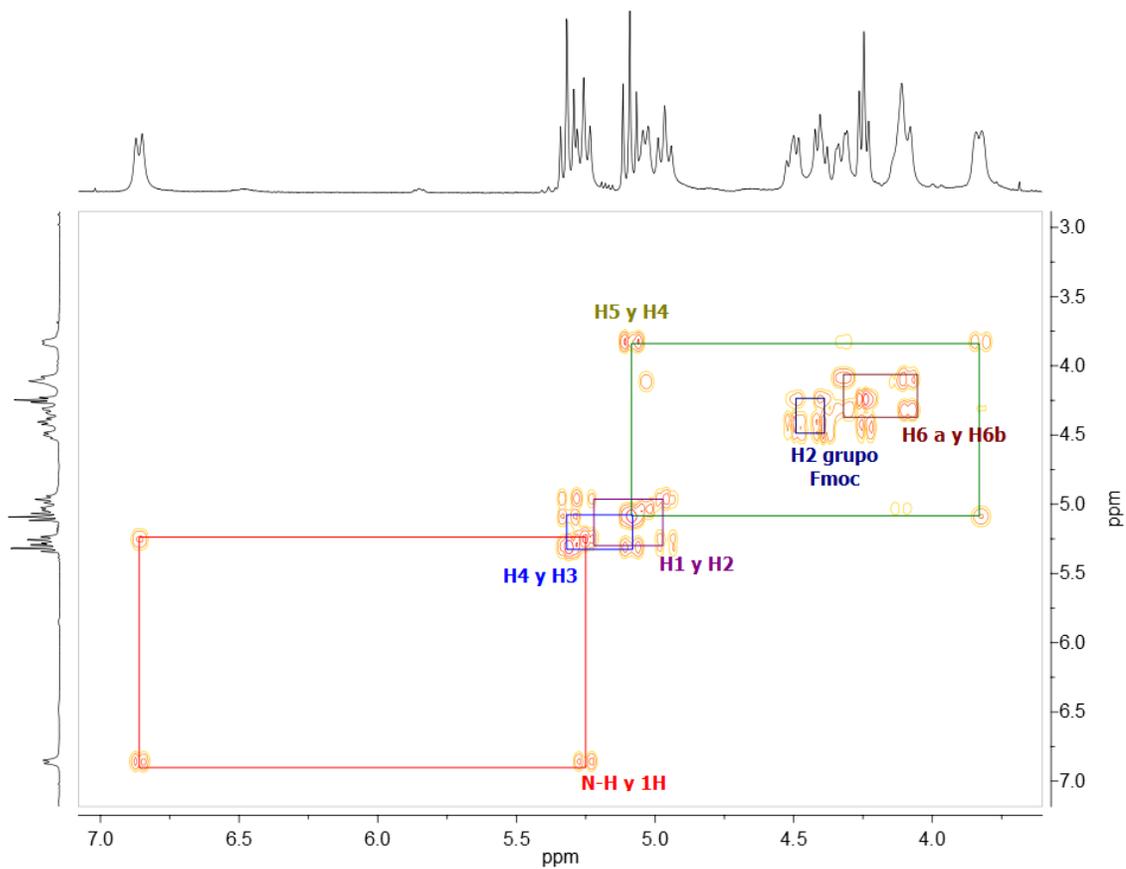
#### 4.7 Ampliación espectro de RMN <sup>1</sup>H de 5



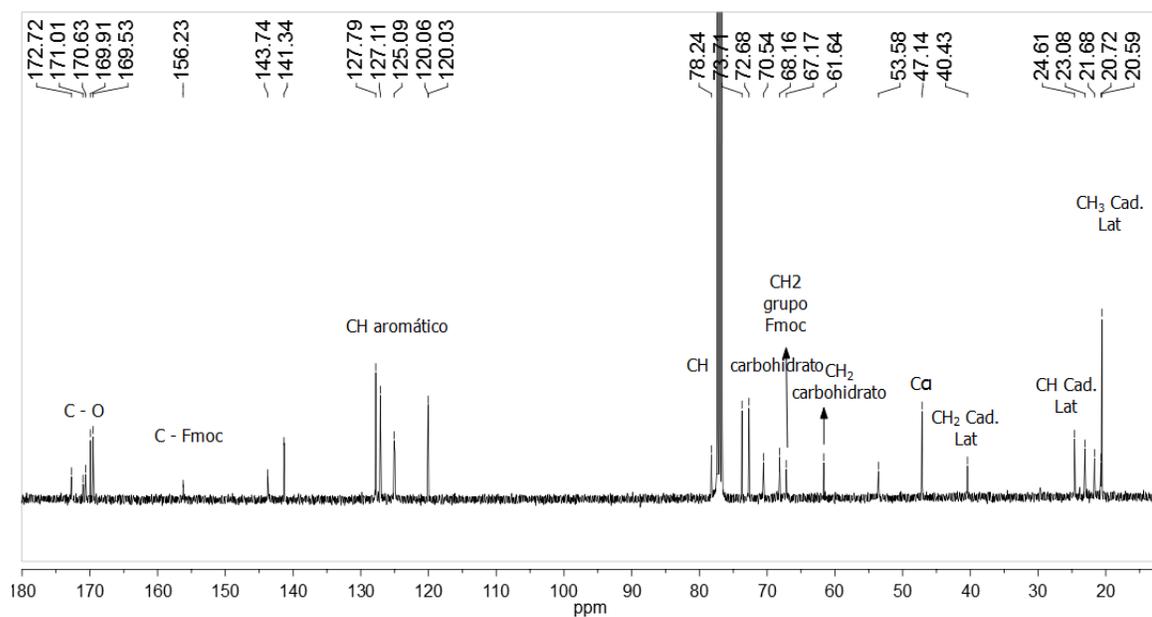
#### 4.8 Ampliación espectro de RMN <sup>1</sup>H de 5



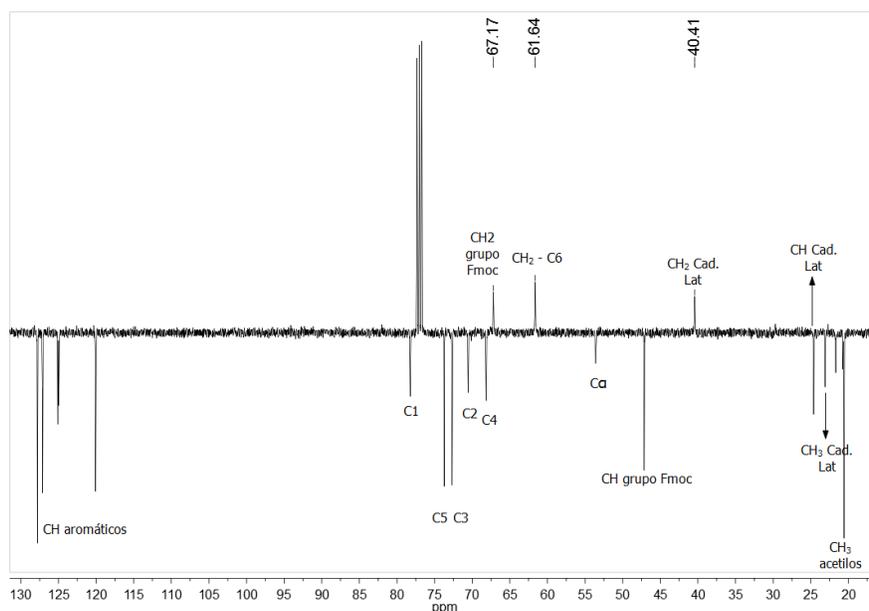
#### 4.9 Espectro $^1\text{H}$ COSY RMN de 5



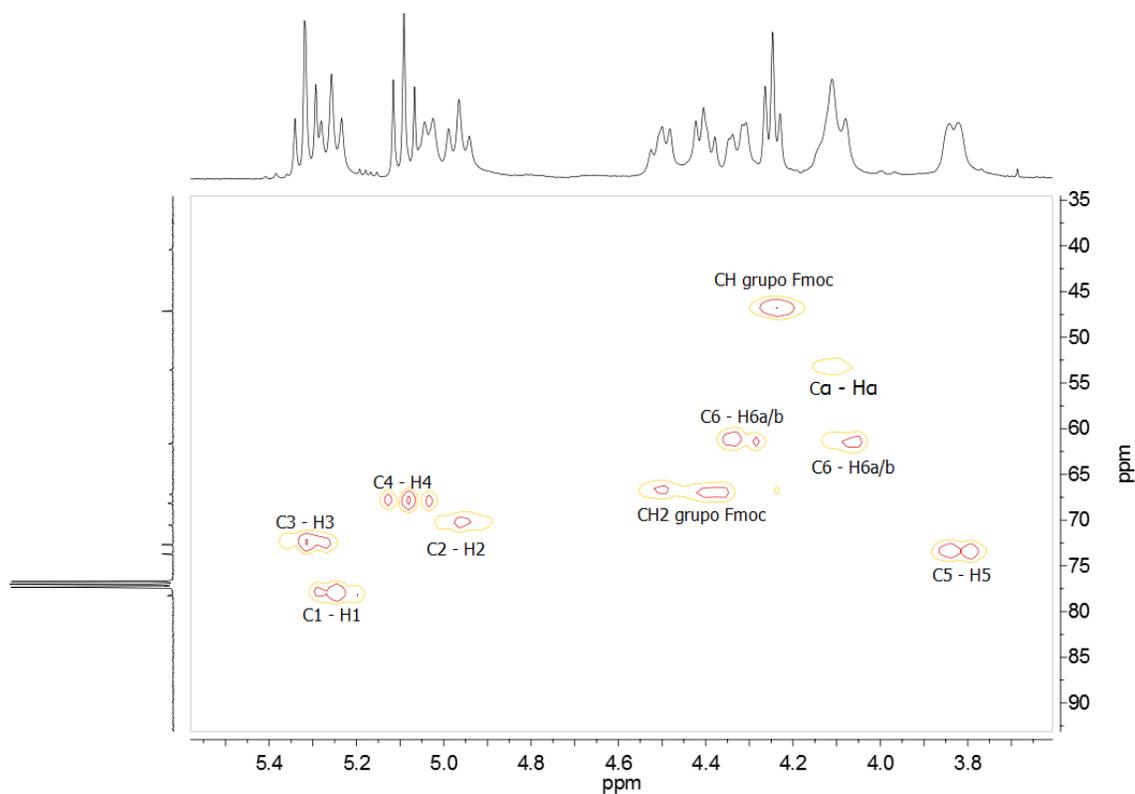
#### 4.10 Espectro $^{13}\text{C}$ RMN de 5



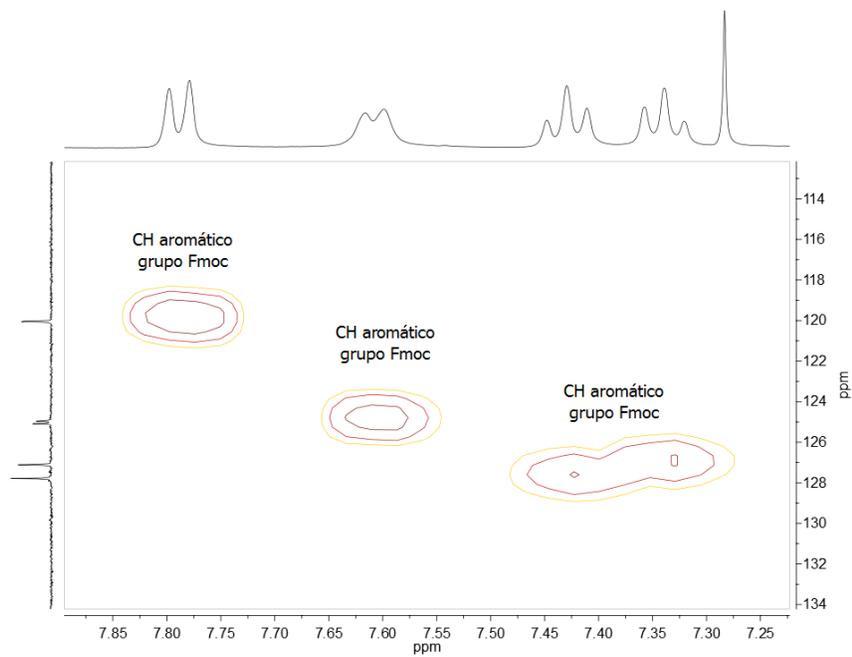
#### 4.11 Espectro APT de 5



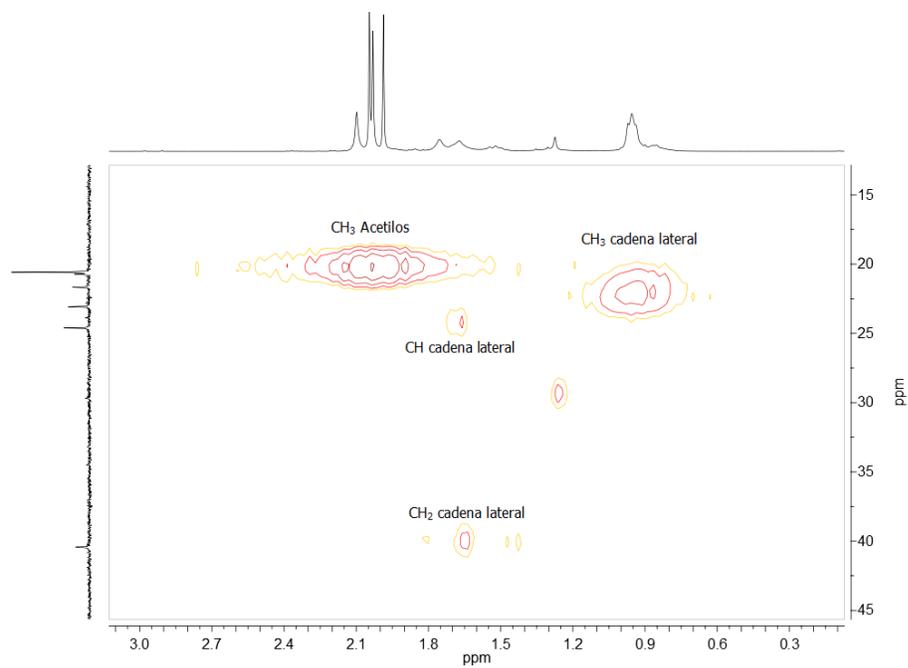
#### 4.12 Espectro $^1\text{H}$ $^{13}\text{C}$ HMQC RMN de 5



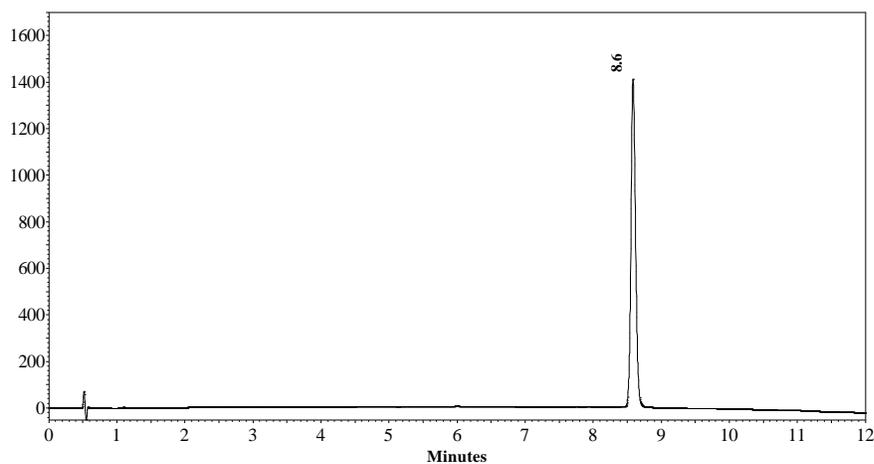
#### 4.13 Espectro $^1\text{H}$ $^{13}\text{C}$ HMQC RMN de 5



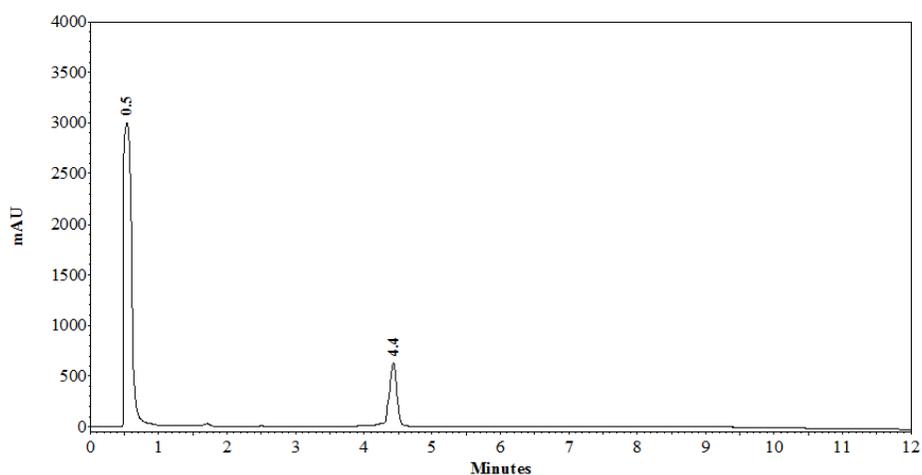
#### 4.14 Espectro $^1\text{H}$ $^{13}\text{C}$ HMQC RMN de 5



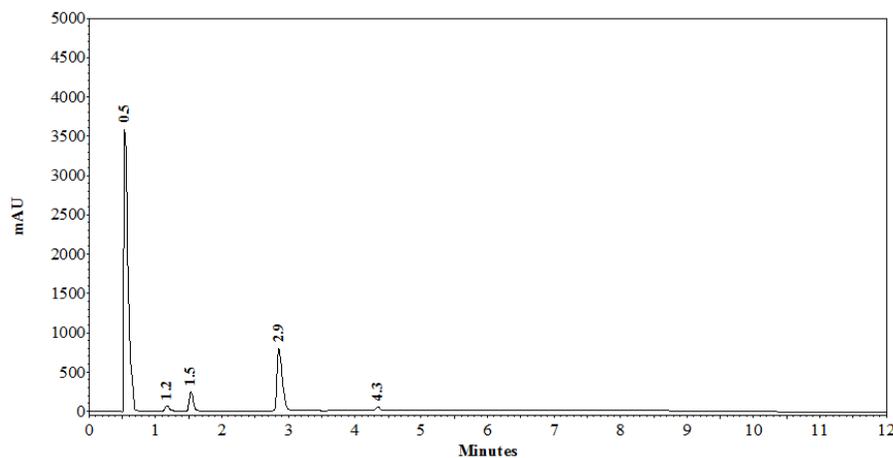
#### 4.15 Perfil cromatográfico (5)



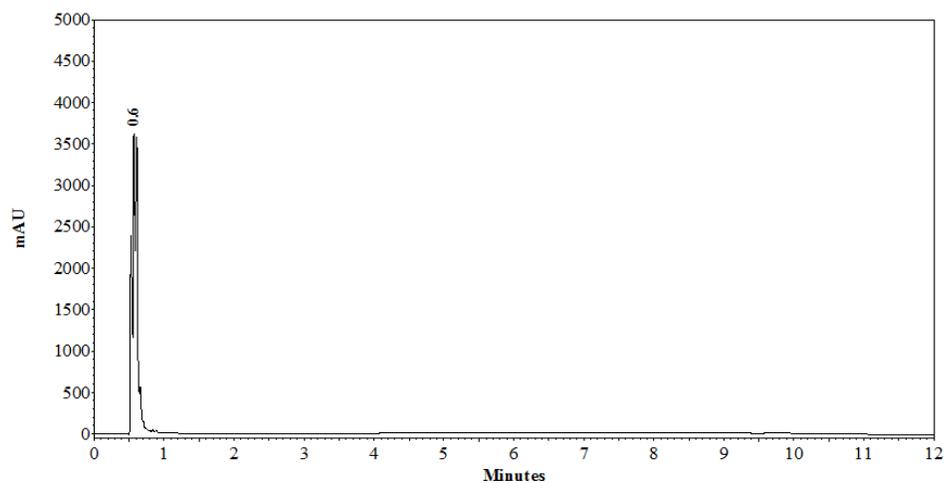
#### 4.16 Perfil cromatográfico del producto de la reacción de remoción del grupo Fmoc de (5) para obtener (9a) monitoreada a 210 nm



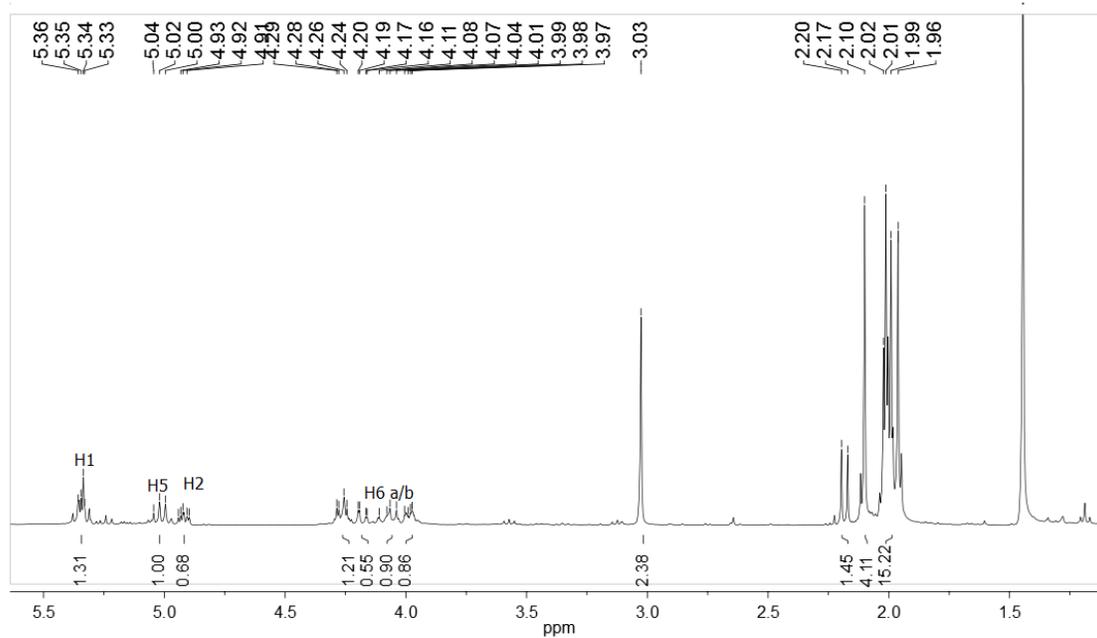
#### 4.17 Producto de la reacción de desacetilación de (5) para obtener (9)



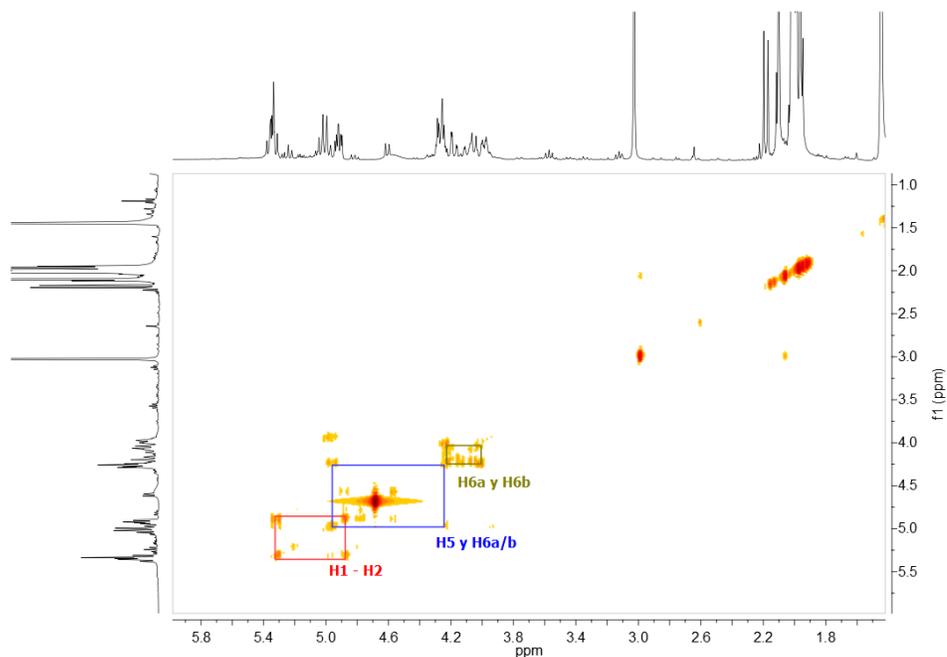
#### 4.18 Producto (8) purificado por RP-SPE



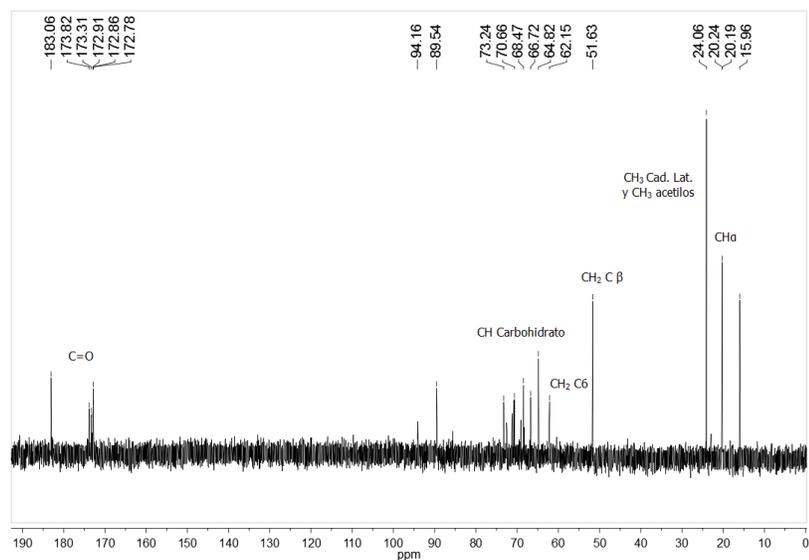
#### 4.19 Espectro RMN $^1\text{H}$ para (9)

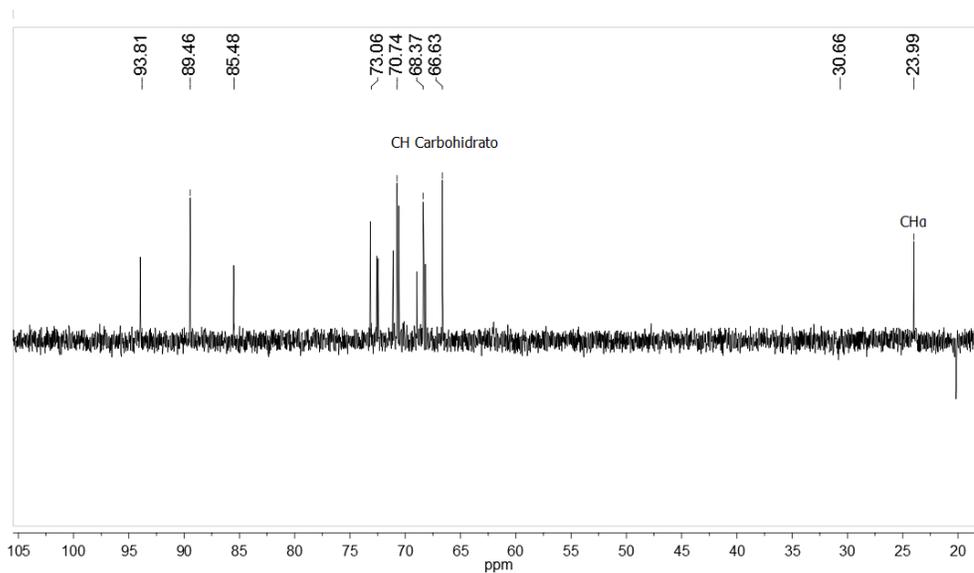
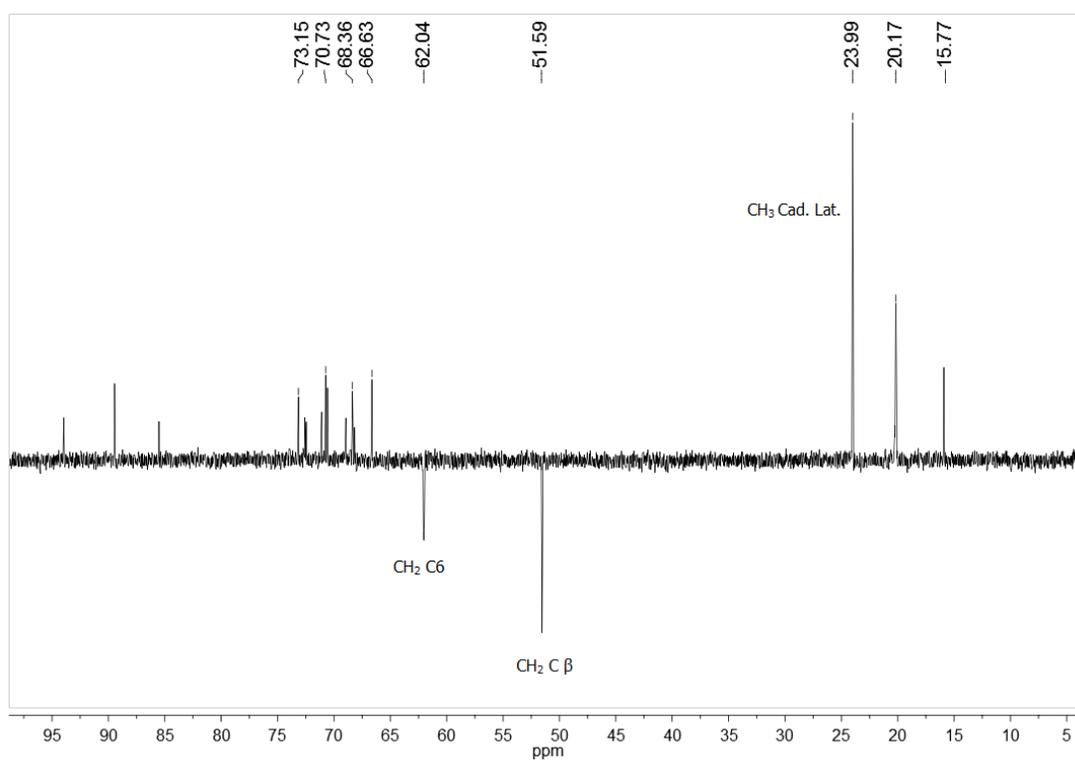


#### 4.20 Espectro $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ COSY RMN para (9)

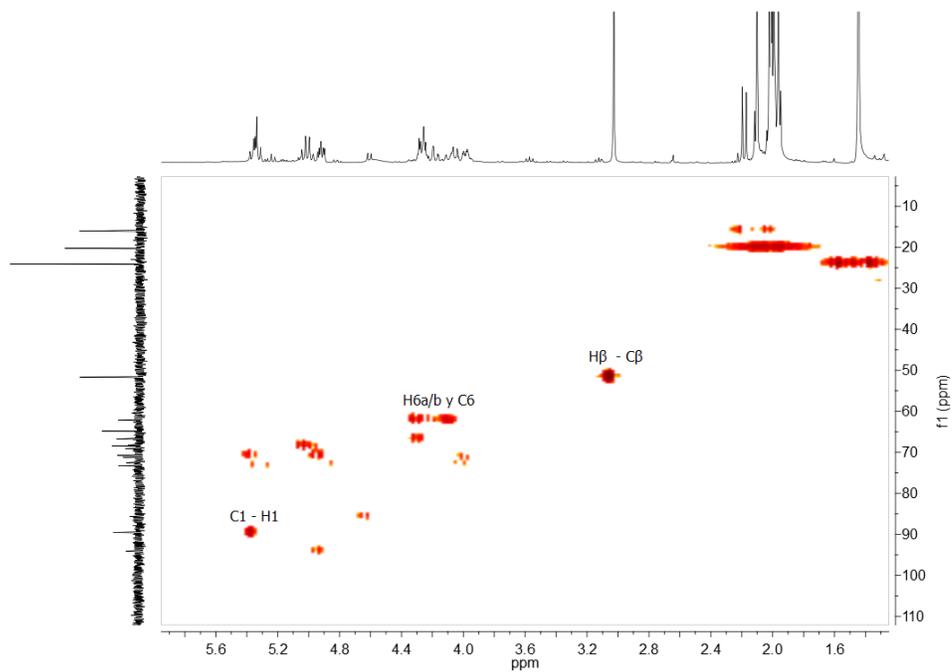


#### 4.21 Espectro $^{13}\text{C}$ RMN para (9)



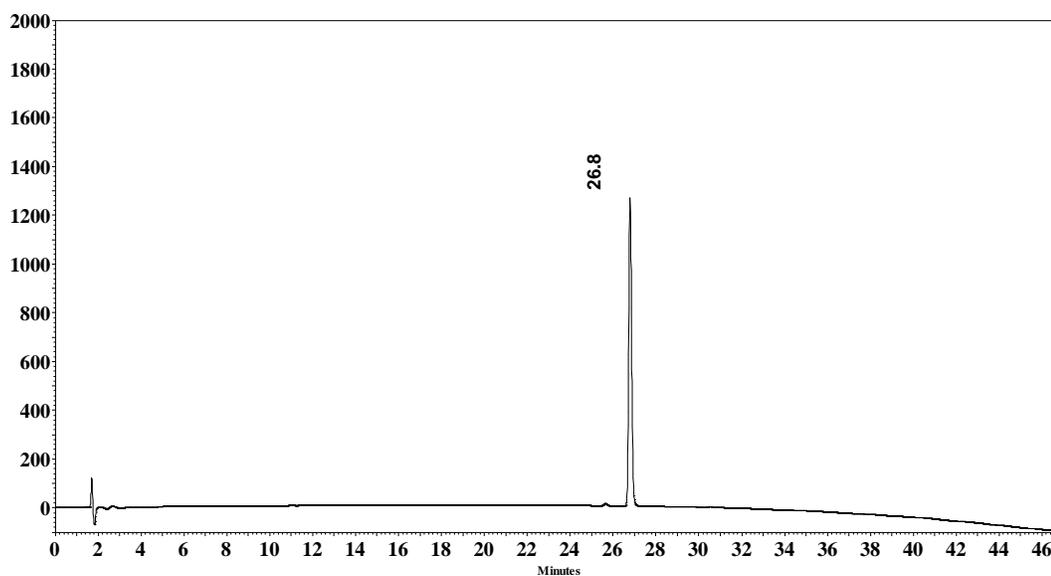
4.22 Espectro  $^{13}\text{C}$  RMN DEPT 90 para (9)4.23 Espectro  $^{13}\text{C}$  RMN DEPT 135 para (9)

#### 4.24 Espectro $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ RMN HMQC para (9)

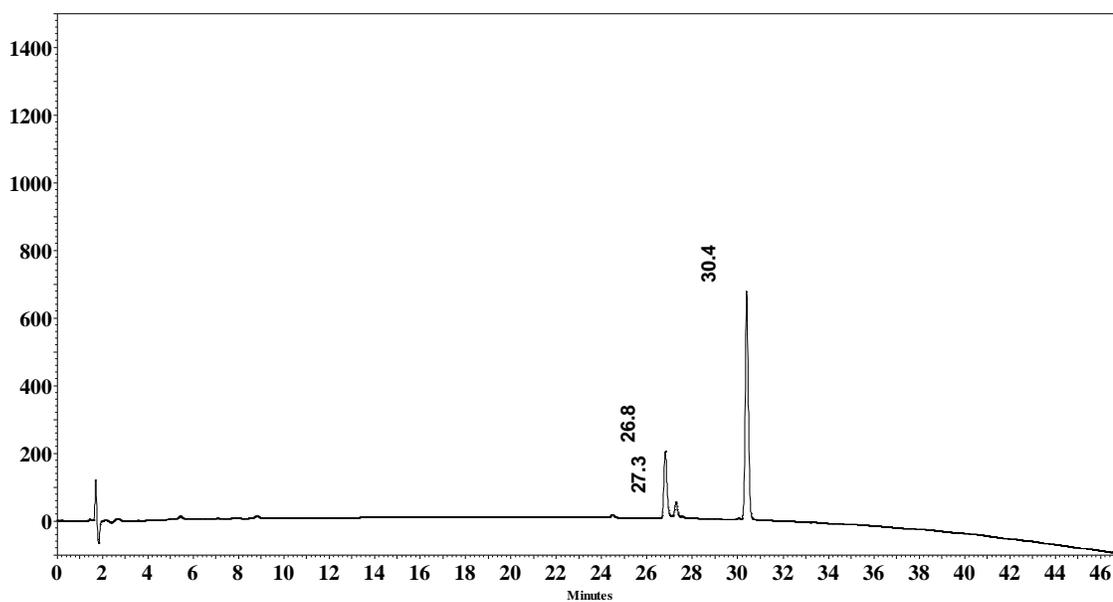


## E. Anexo: Caracterización química de *N*-glucoaminoácido derivado de Lys

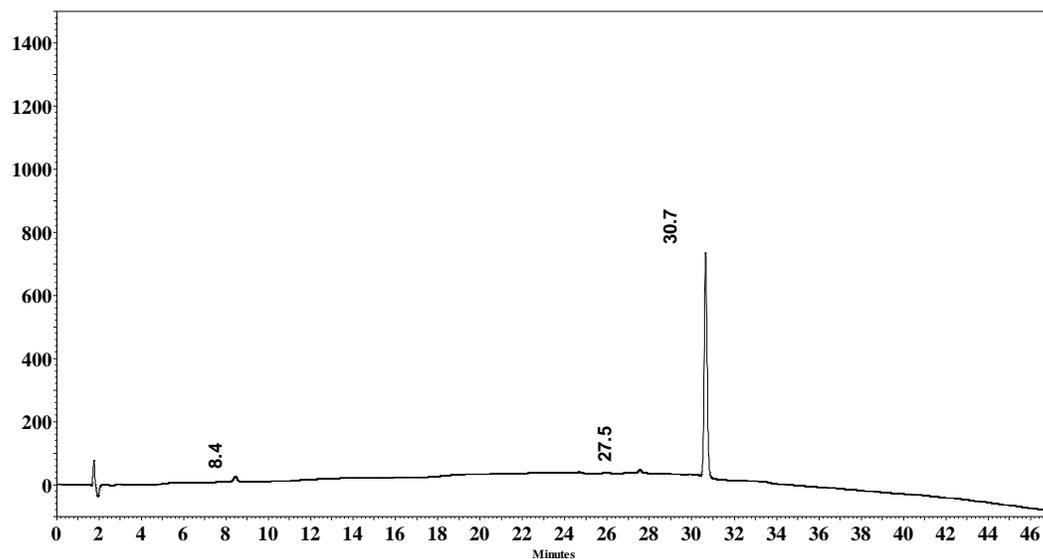
### 5.1 Cromatograma RP-HPLC patrón Fmoc-Lys(Boc)-OH



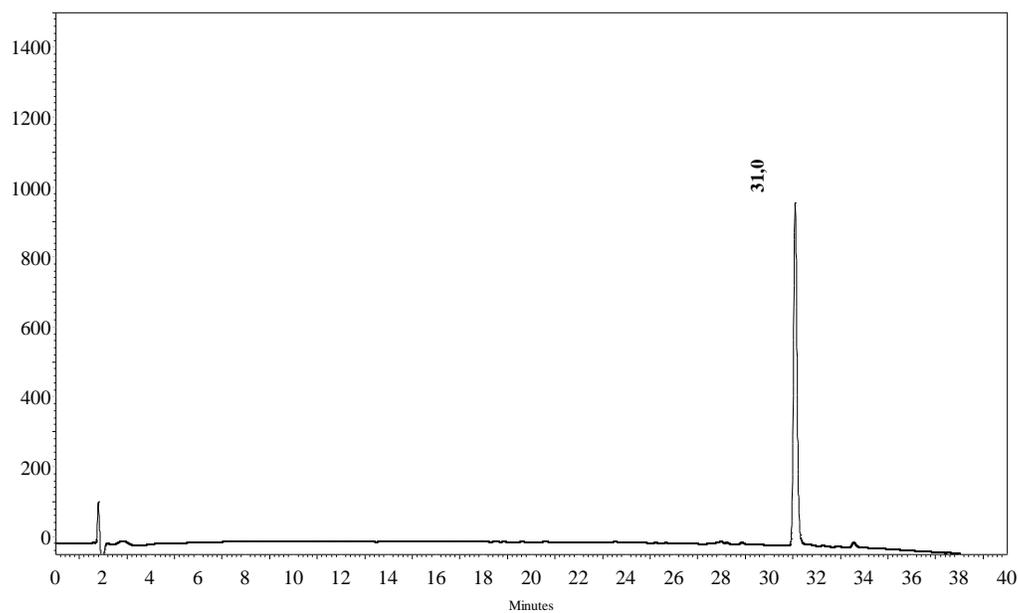
### 5.2 Cromatograma RP-HPLC mezcla de reacción a t=0



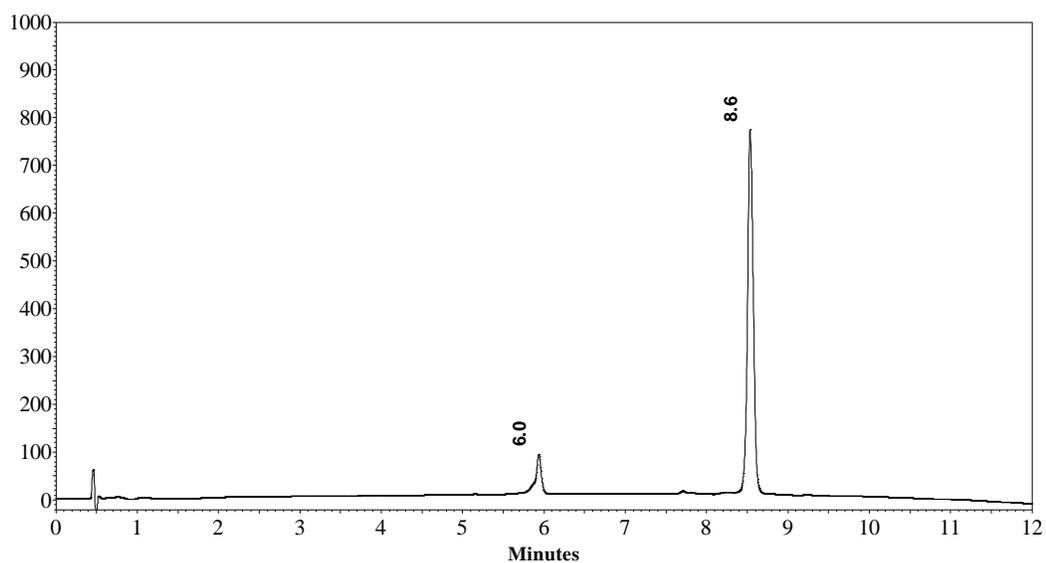
### 5.3 Cromatograma RP-HPLC fin de reacción formación 5



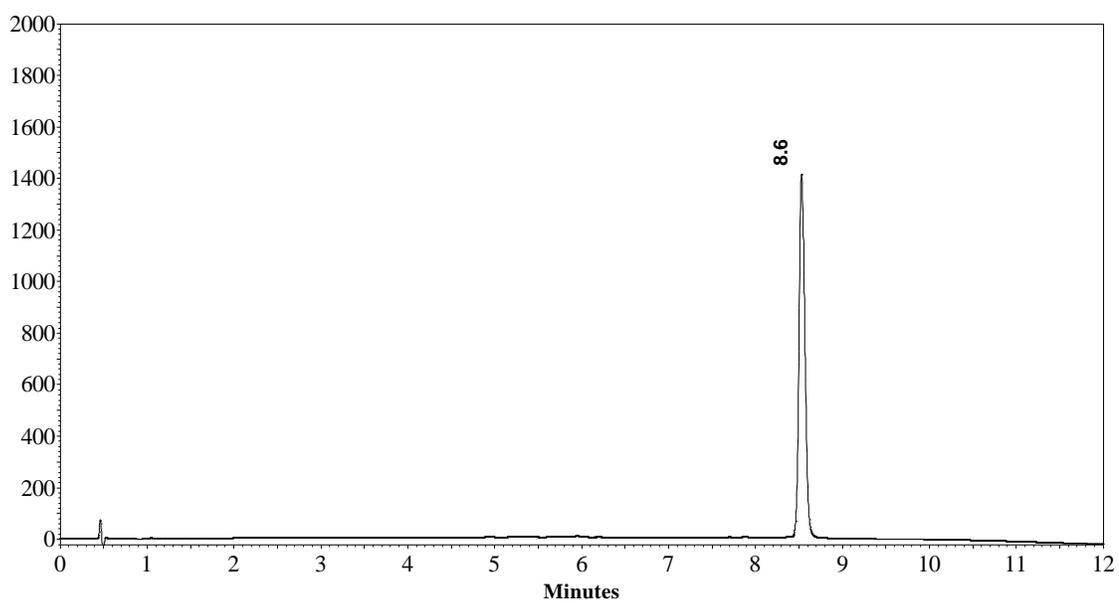
### 5.4 Cromatograma RP-HPLC N-glucoaminoácido lavado 5



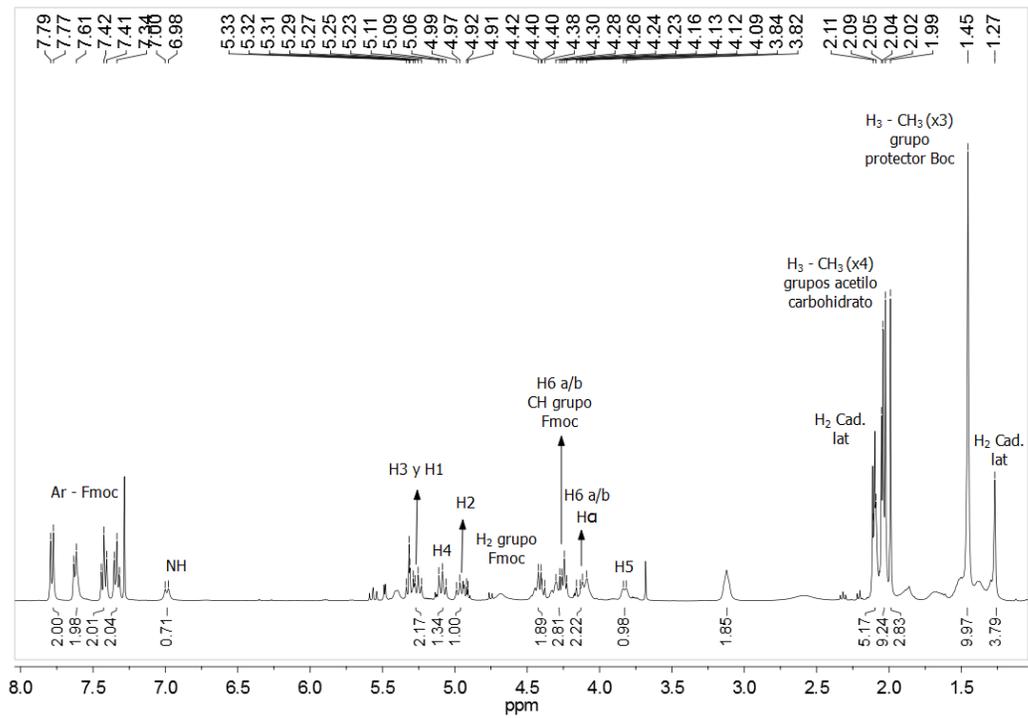
### 5.5 Cromatograma RP-HPLC producto 5 para purificar por SPE



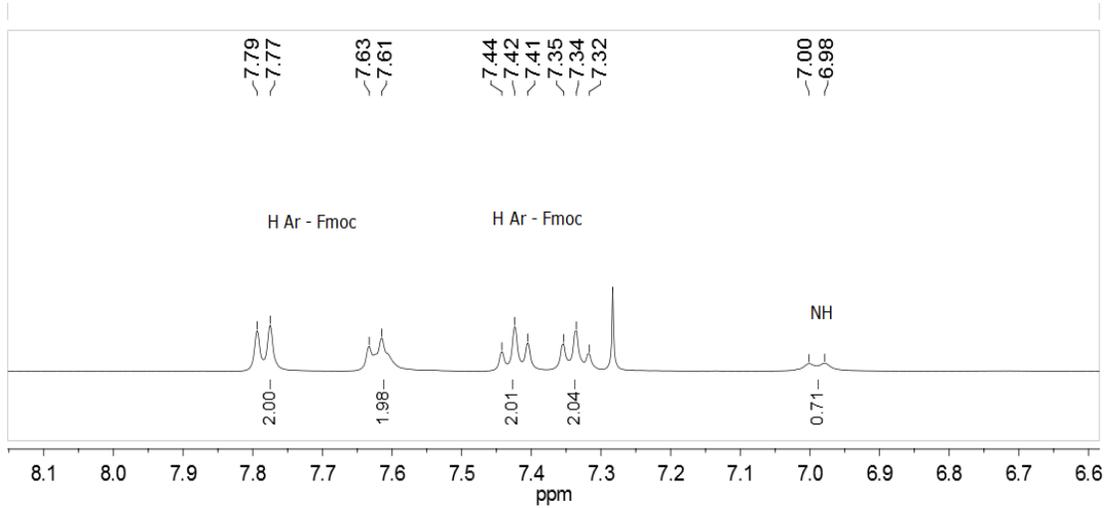
### 5.6 Cromatograma RP-HPLC producto 5 purificado por SPE



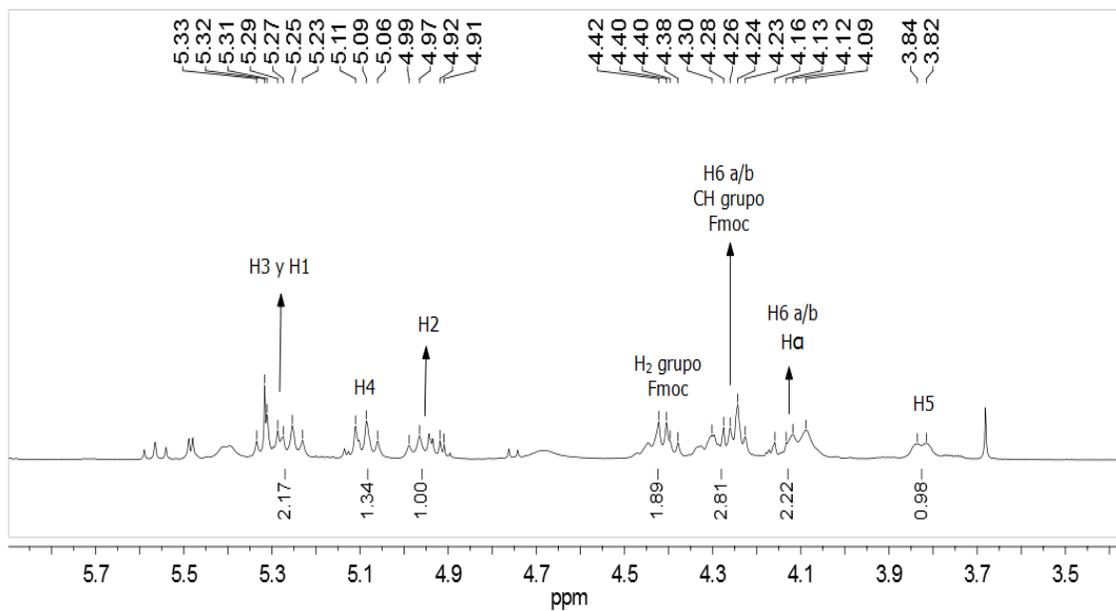
### 5.7 Espectro RMN <sup>1</sup>H de 5



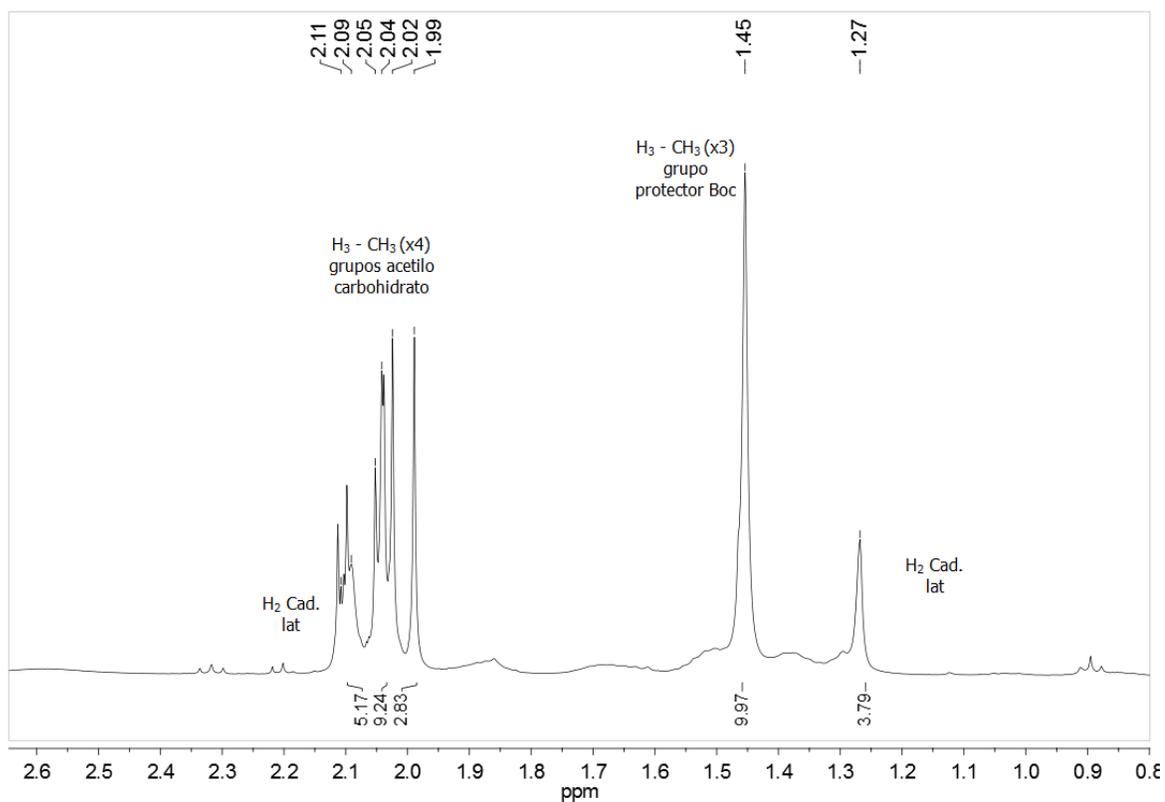
### 5.8 Ampliación espectro RMN <sup>1</sup>H de 5



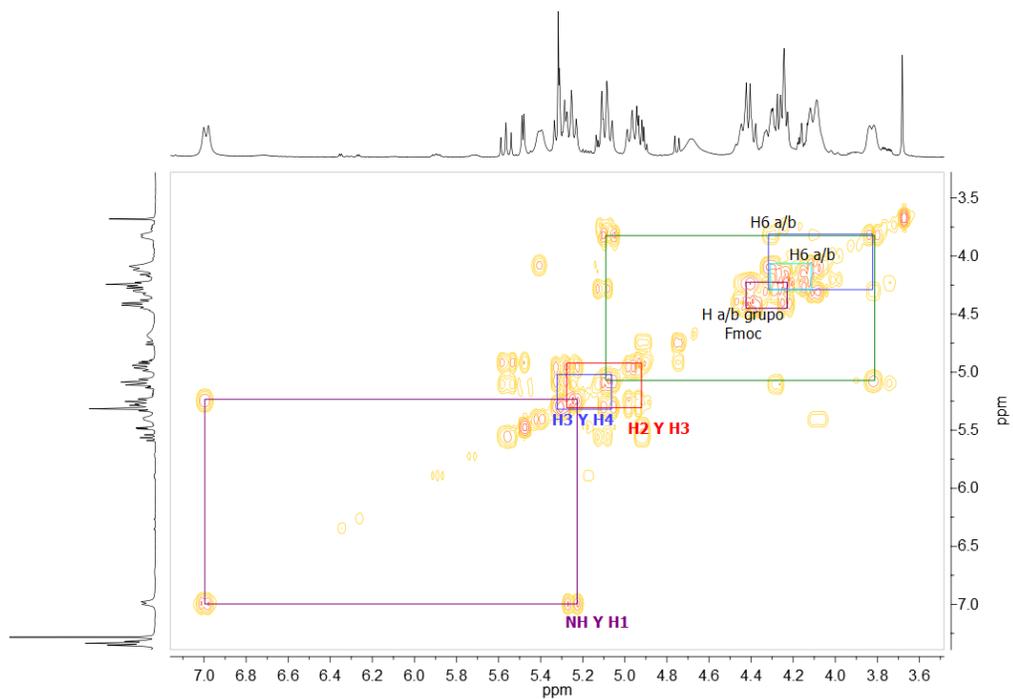
### 5.9 Ampliación espectro RMN $^1\text{H}$ de 5



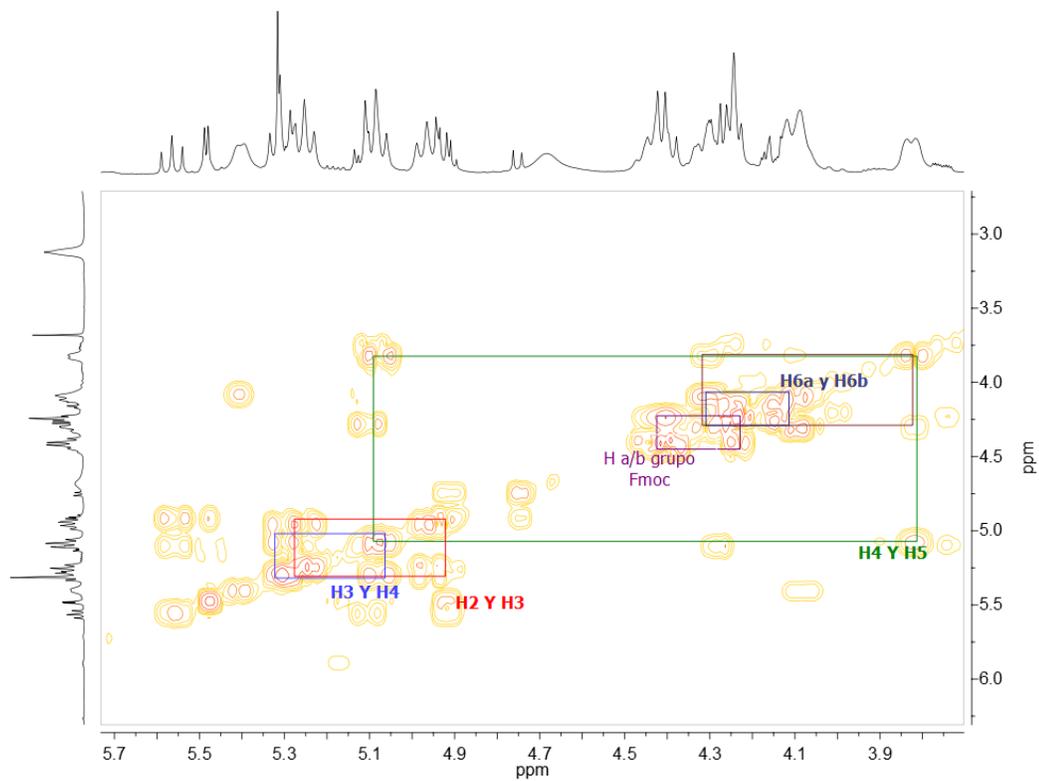
### 5.10 Ampliación espectro RMN $^1\text{H}$ de 5



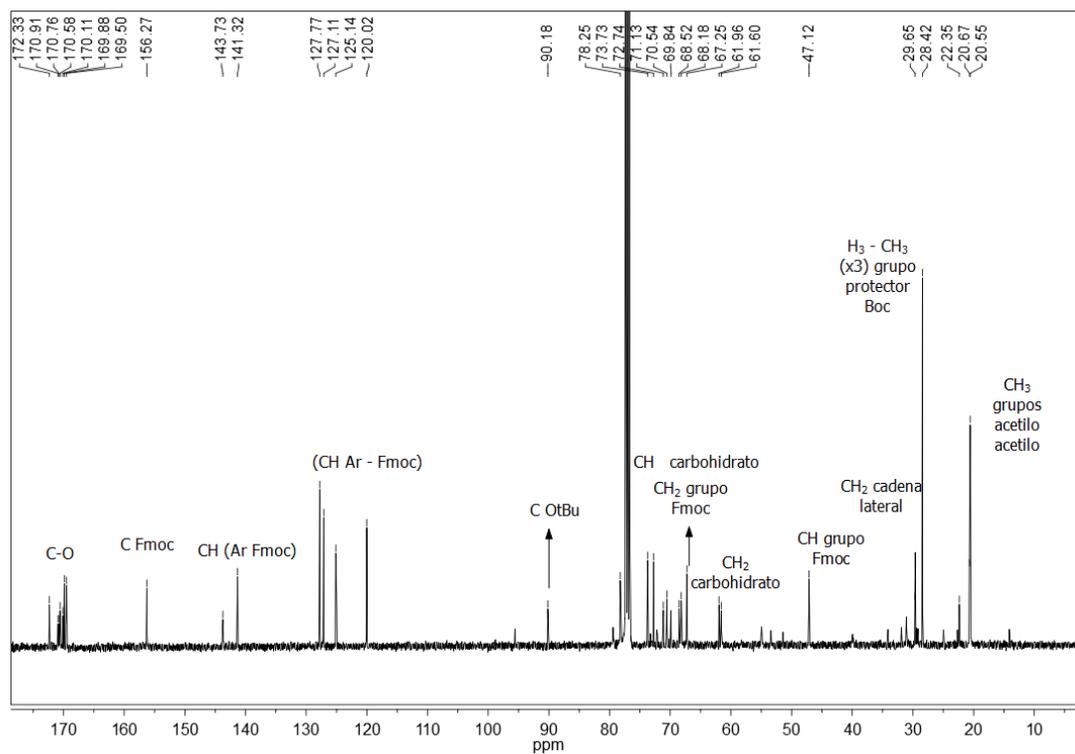
### 5.11 Espectro $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ COSY RMN de 5



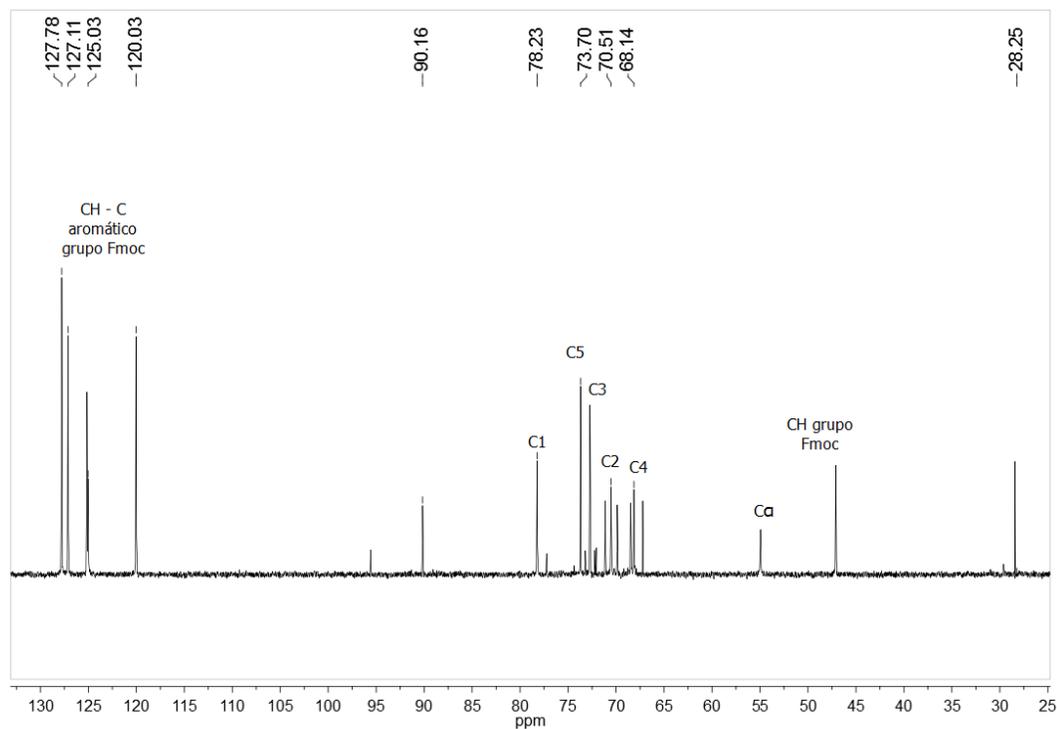
### 5.12 Ampliación espectro $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ COSY RMN de 5



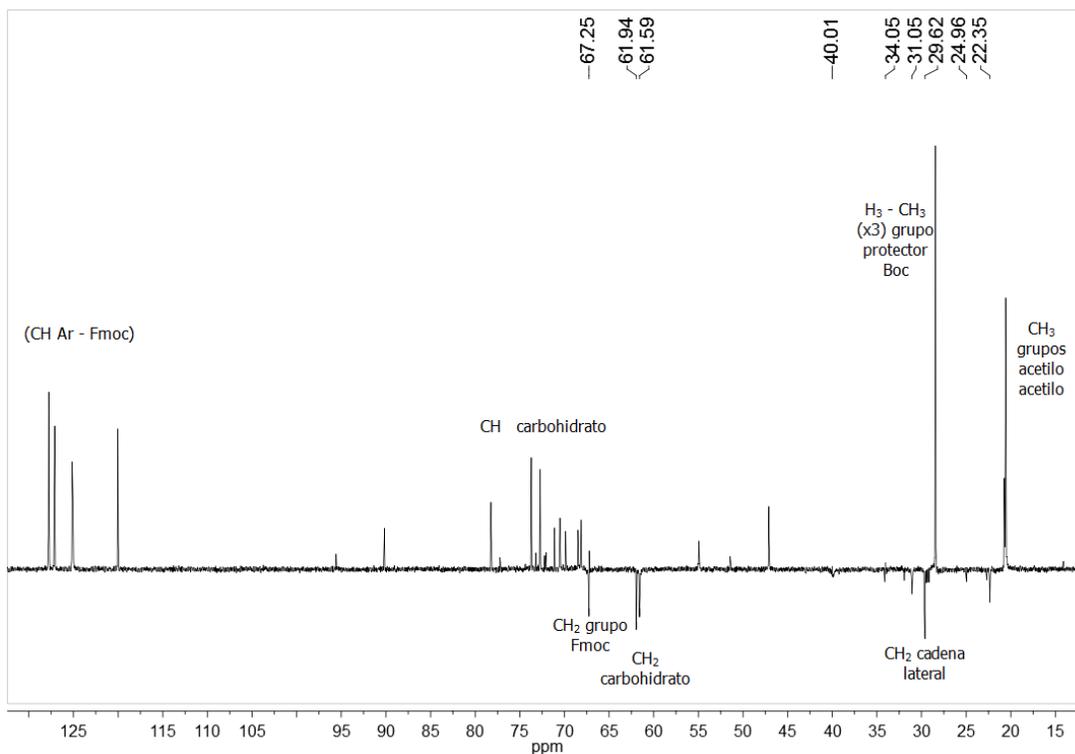
### 5.13 Espectro $^{13}\text{C}$ RMN de 5



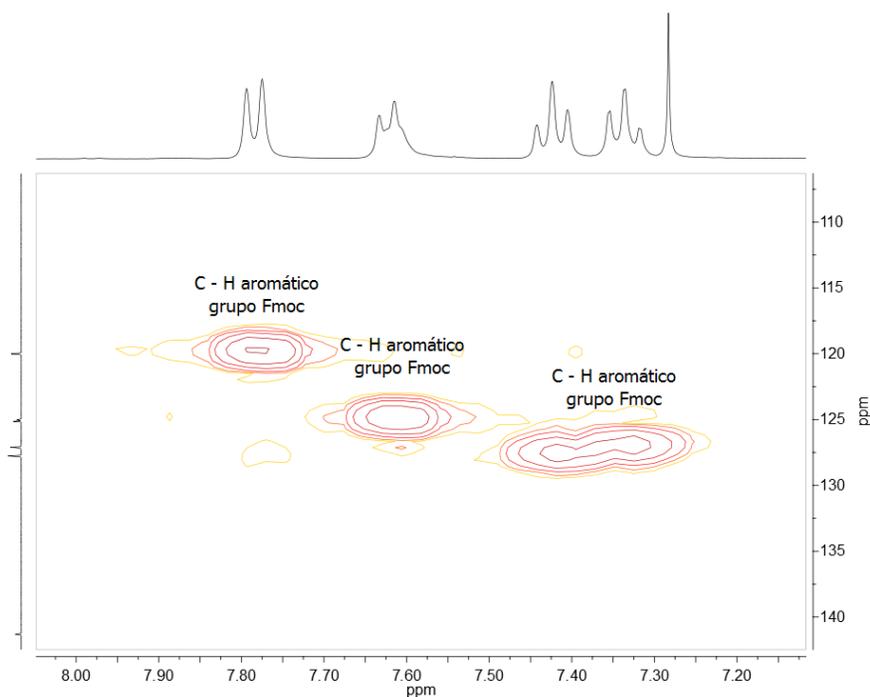
### 5.14 Espectro $^{13}\text{C}$ 90 DEPT RMN de 5



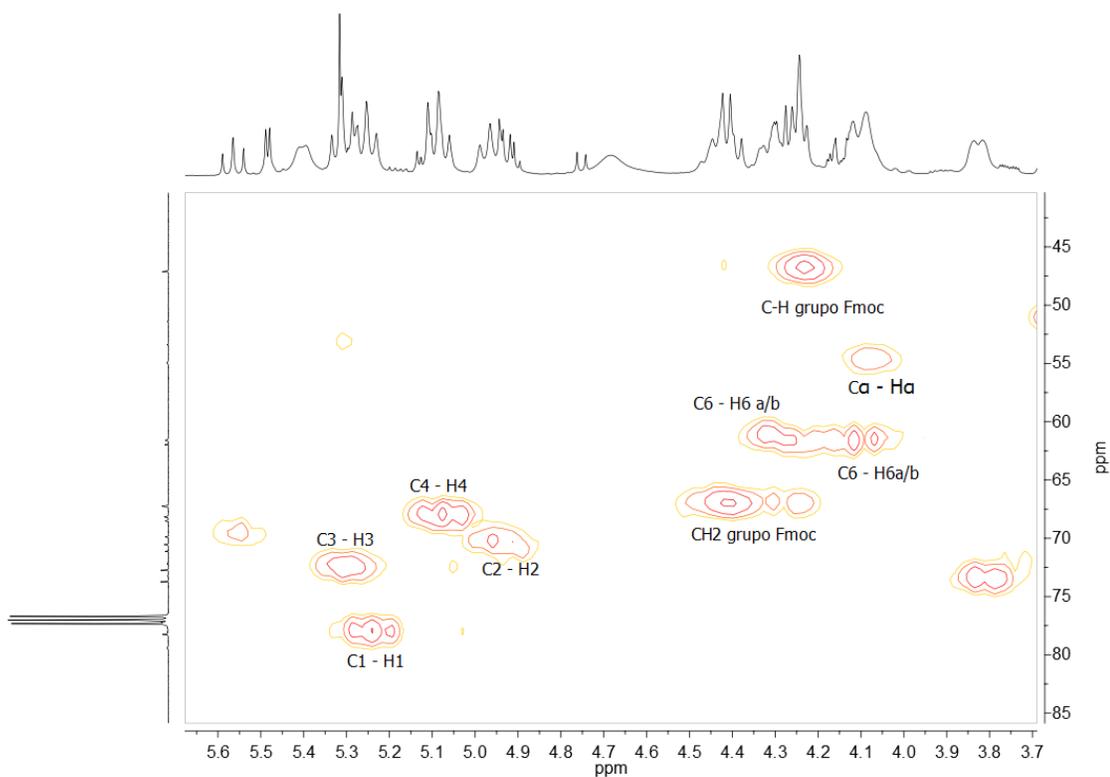
### 5.15 Espectro $^{13}\text{C}$ 135 DEPT RMN de 5



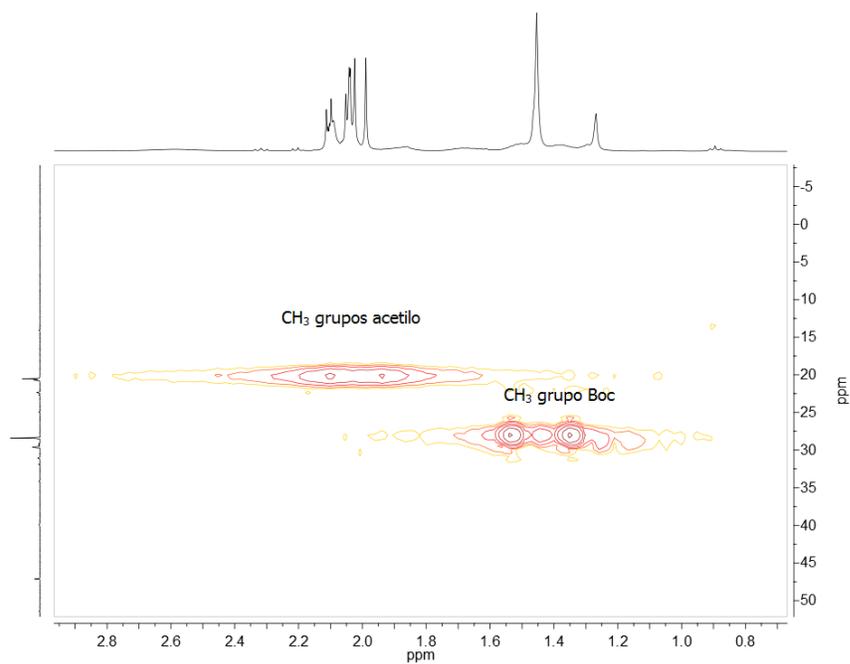
### 5.16 Ampliación espectro $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ HMQC RMN de 5



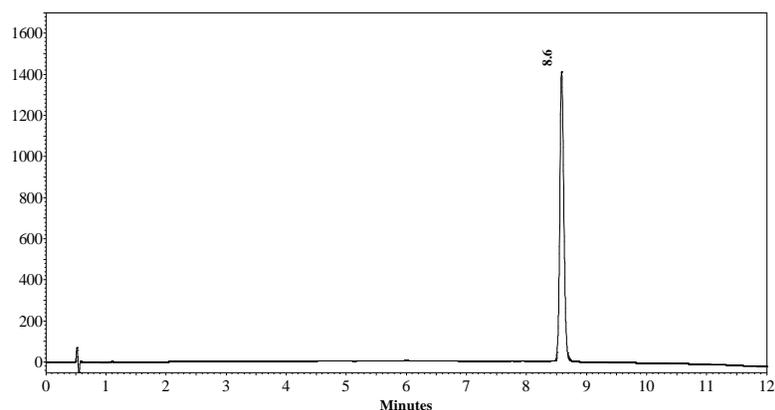
### 5.17 Ampliación espectro $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ HMQC RMN de 5



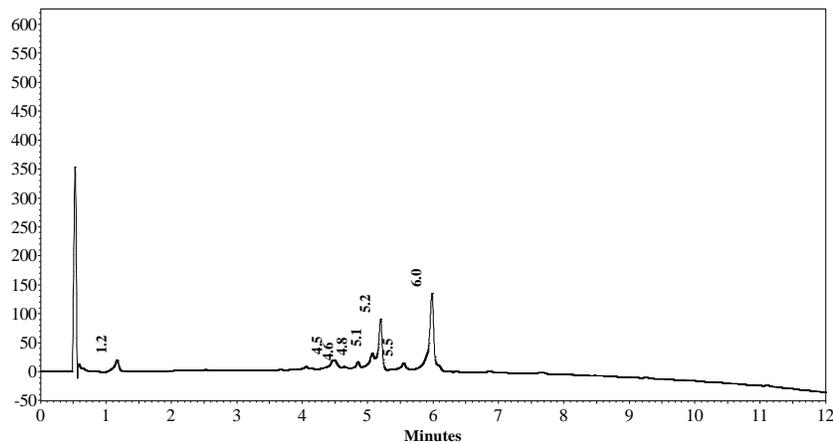
### 5.18 Ampliación espectro $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ HMQC RMN de 5



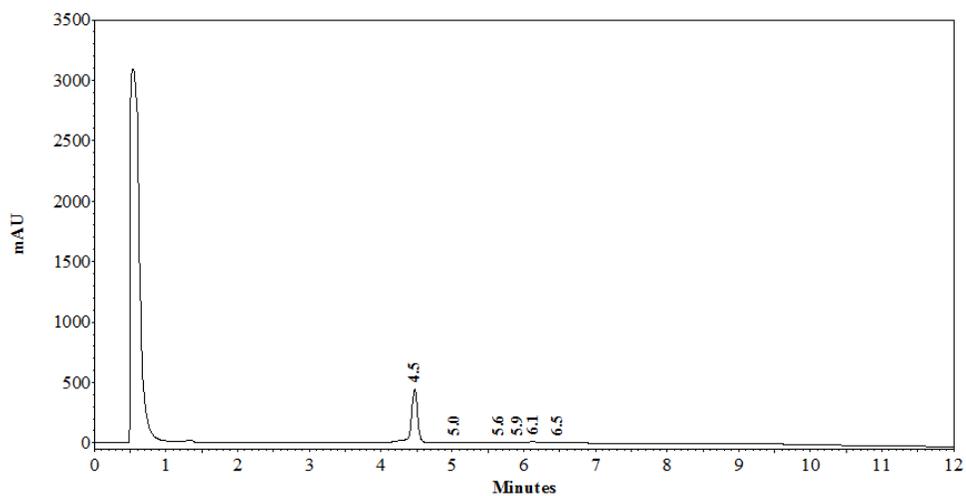
### 5.19 Perfil cromatográfico (5)



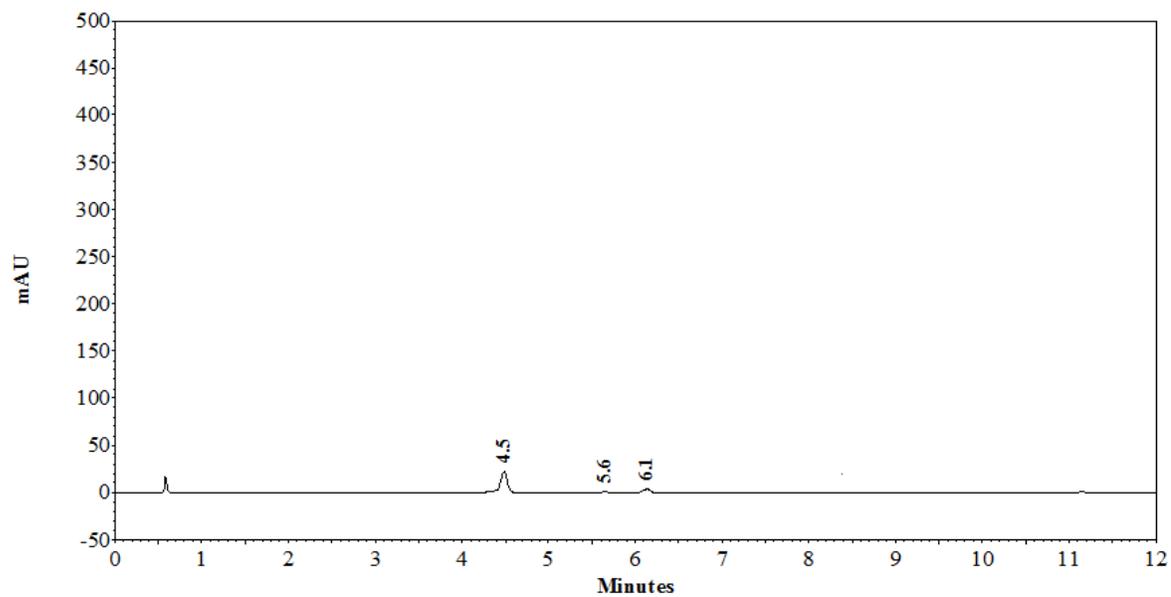
### 5.20 Perfil cromatográfico del producto de la reacción (5a)



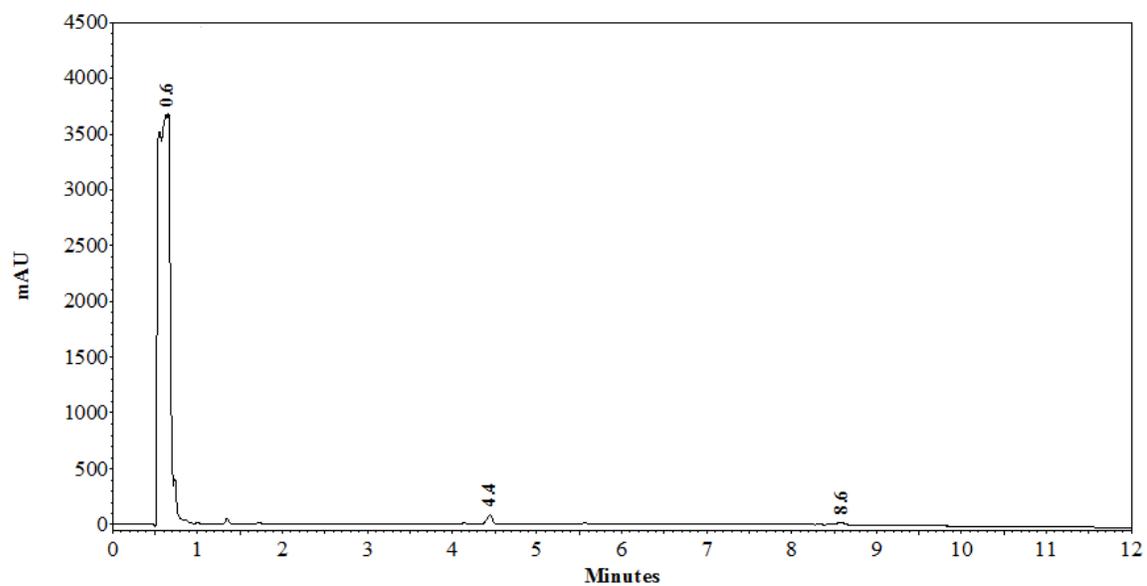
### 5.21 Perfil cromatográfico del producto de la reacción de remoción del grupo Fmoc de (5a) para obtener (5b) monitoreada a 210 nm



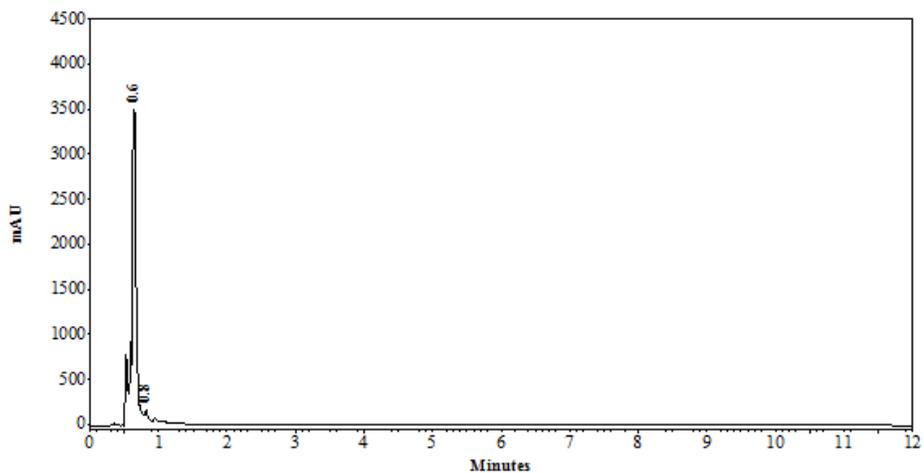
**5.22 Perfil cromatográfico del producto de la reacción de remoción del grupo Fmde (5a) para obtener (5b) monitoreada a 302 nm**



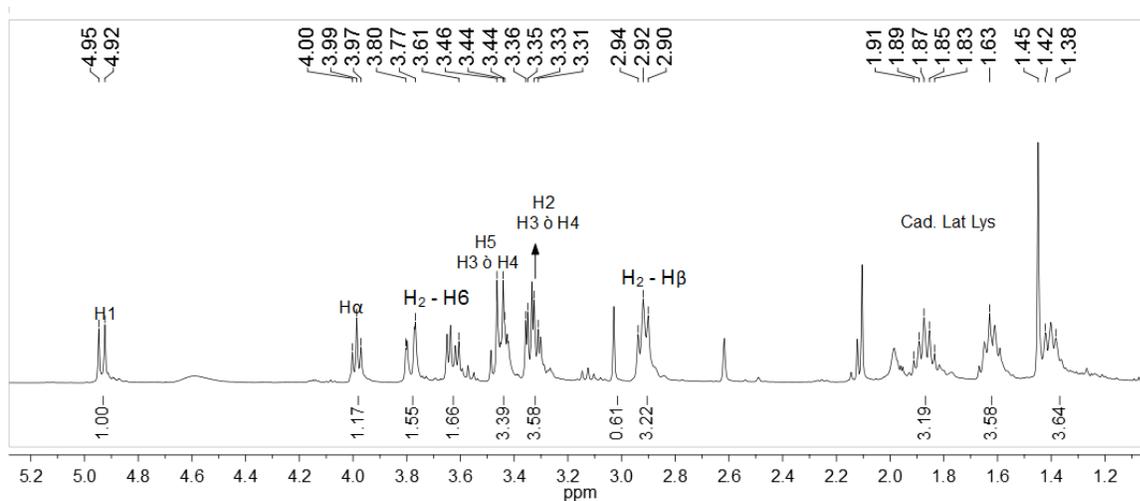
**5.23 Producto de la reacción de desacetilación de (5b) para obtener (9)**

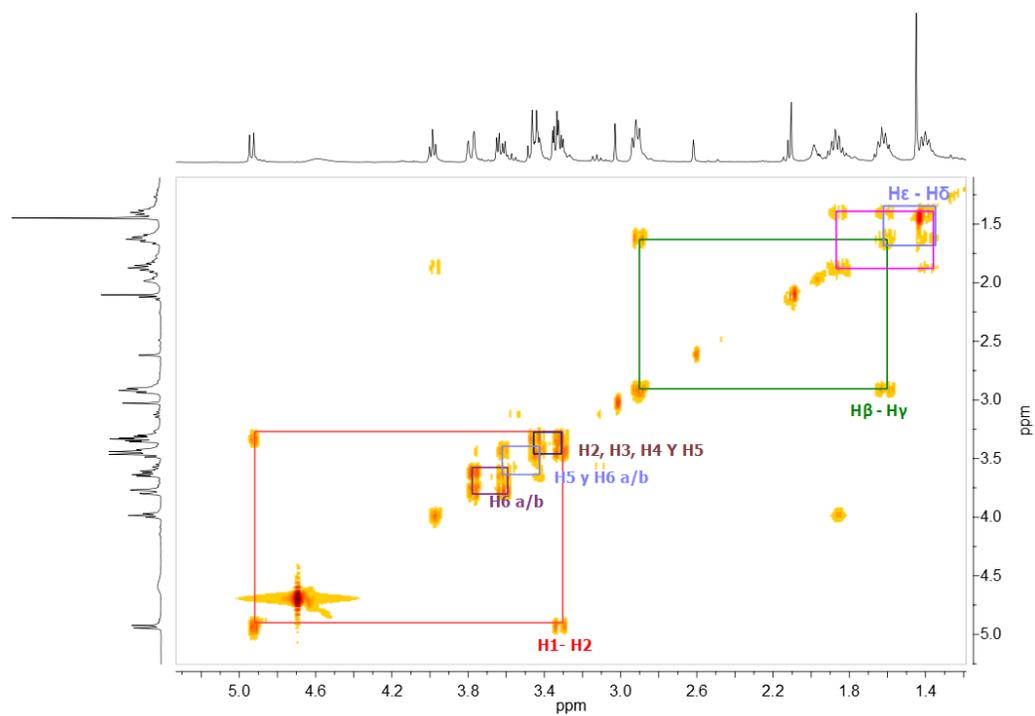
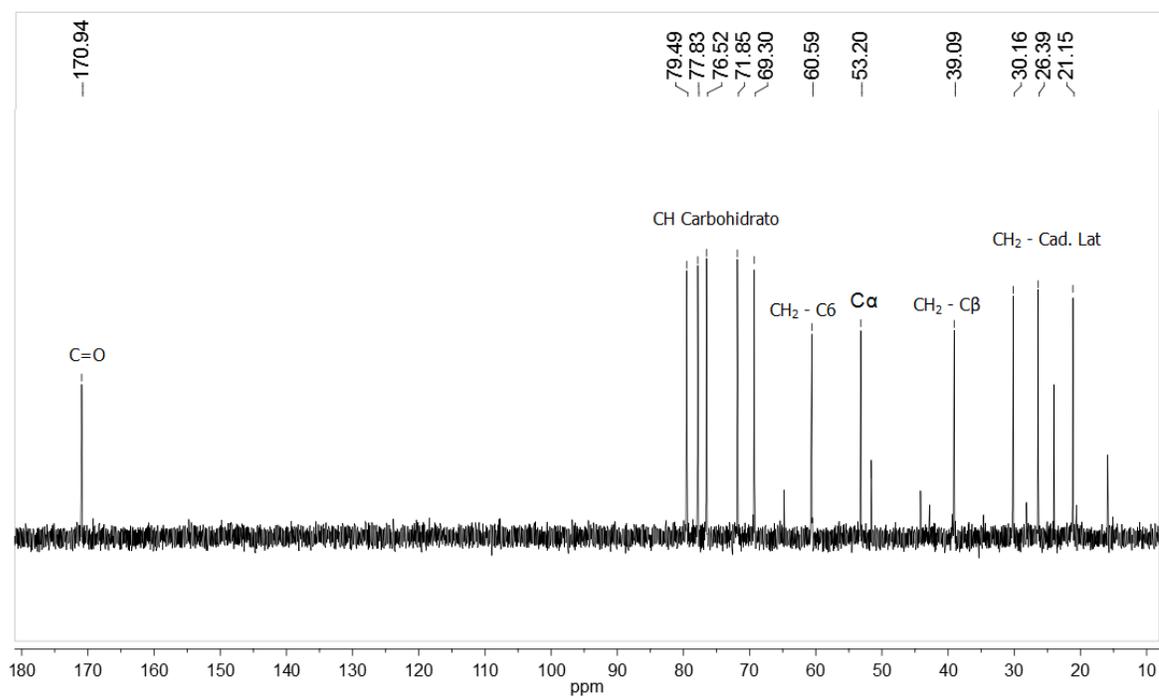


## 5.24 Producto (9) purificado por RP-SPE

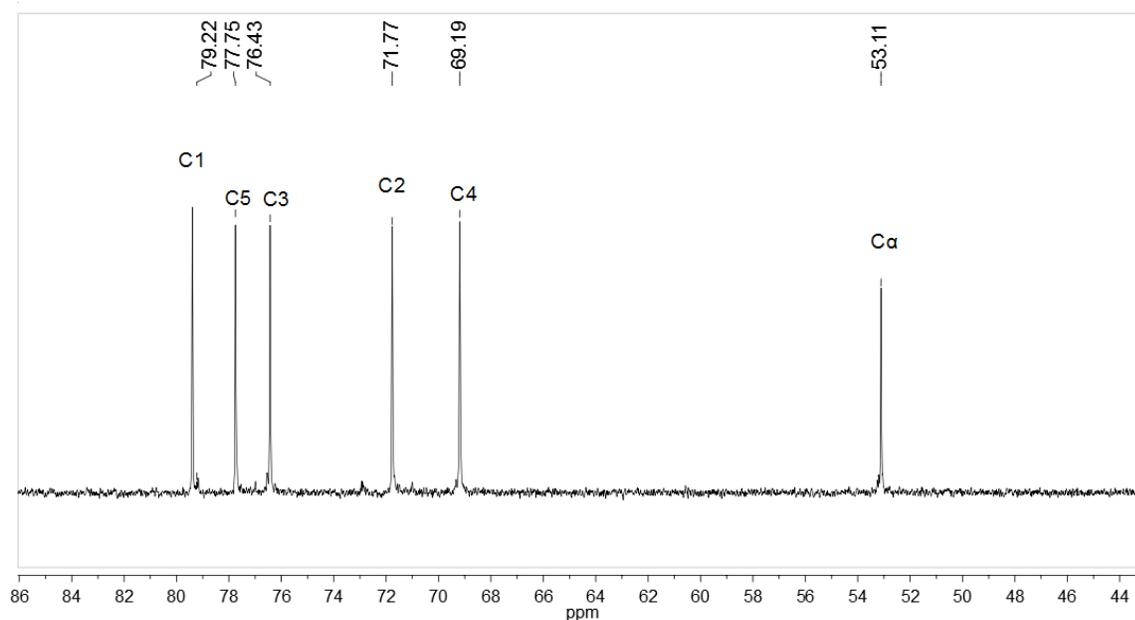


## 5.25 Espectro RMN <sup>1</sup>H para (9)

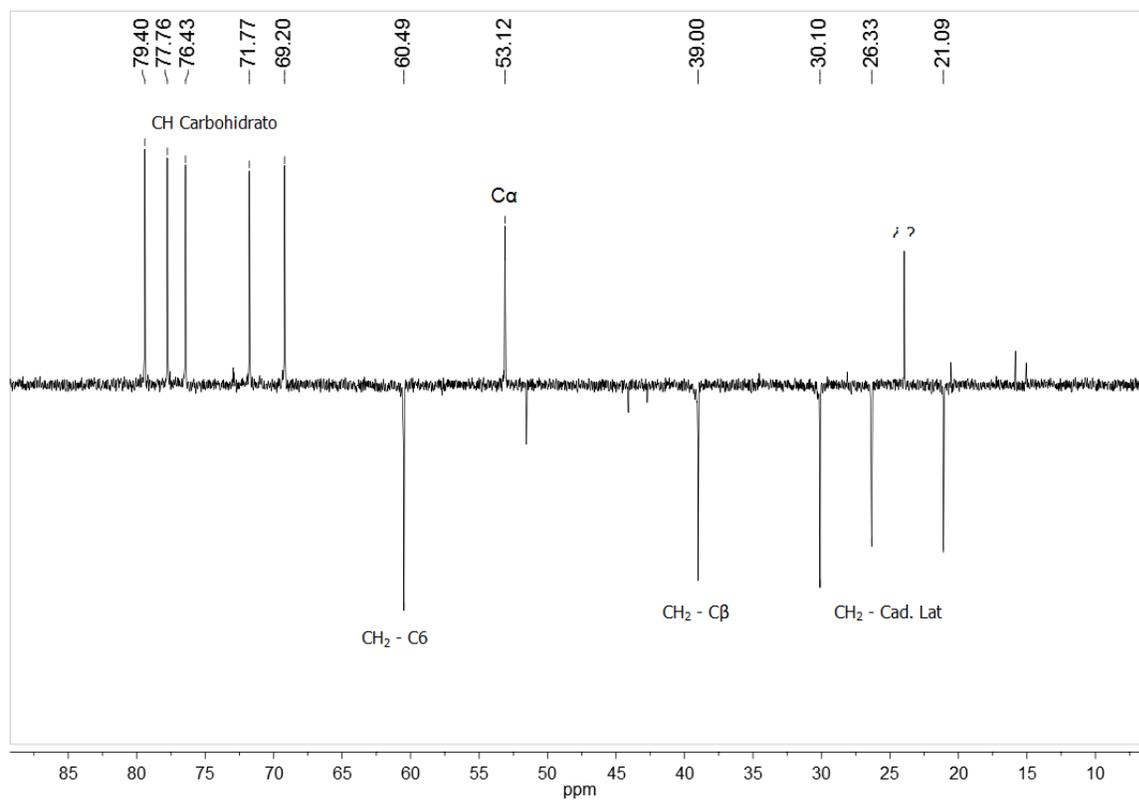


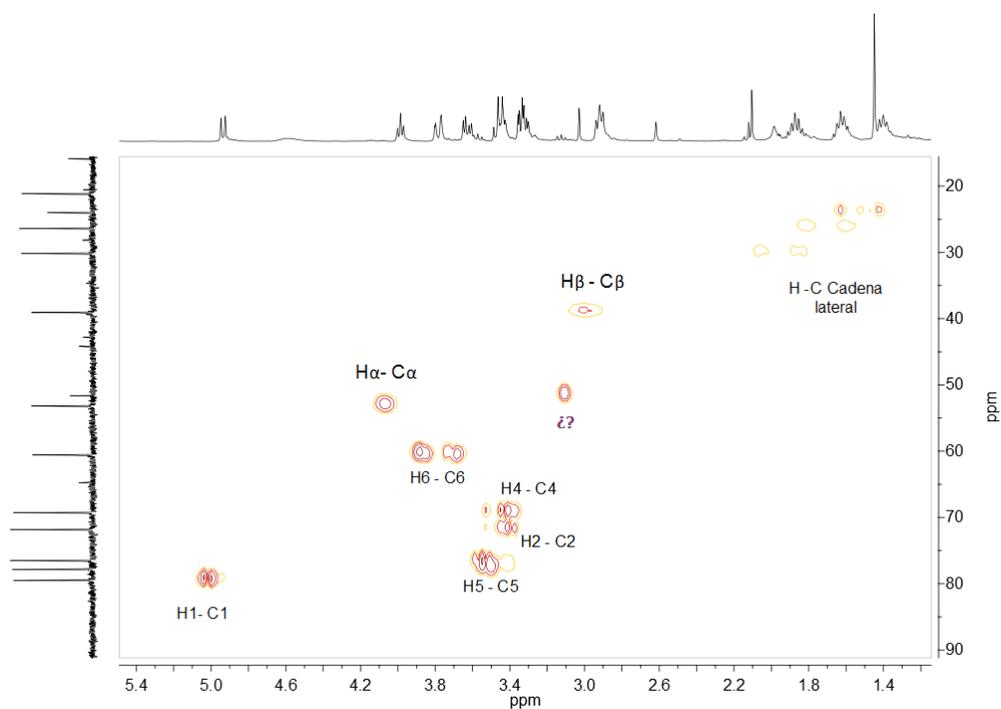
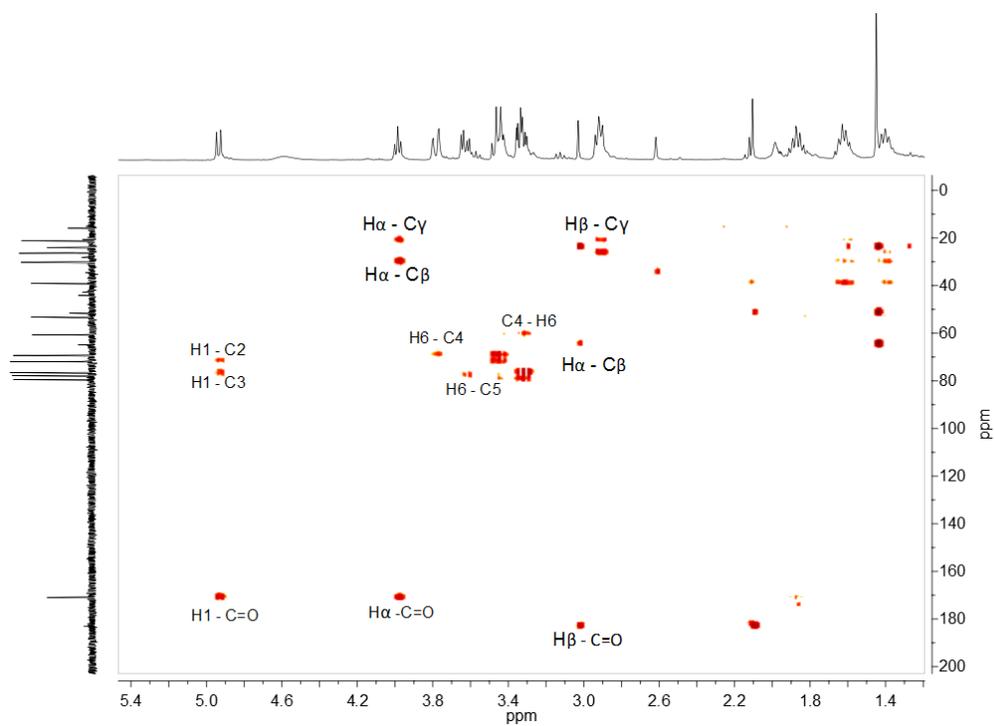
5.26 Espectro  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY RMN para (9)5.27 Espectro  $^{13}\text{C}$  RMN para (9)

### 5.28 Espectro $^{13}\text{C}$ RMN DEPT 90 para (9)



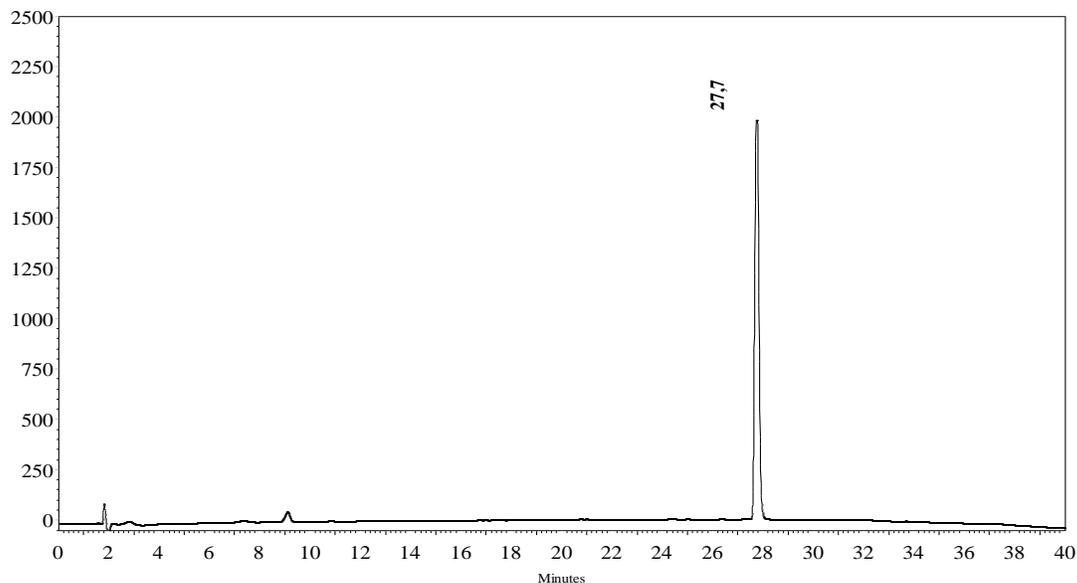
### 5.29 Espectro $^{13}\text{C}$ RMN DEPT 135 para (9)



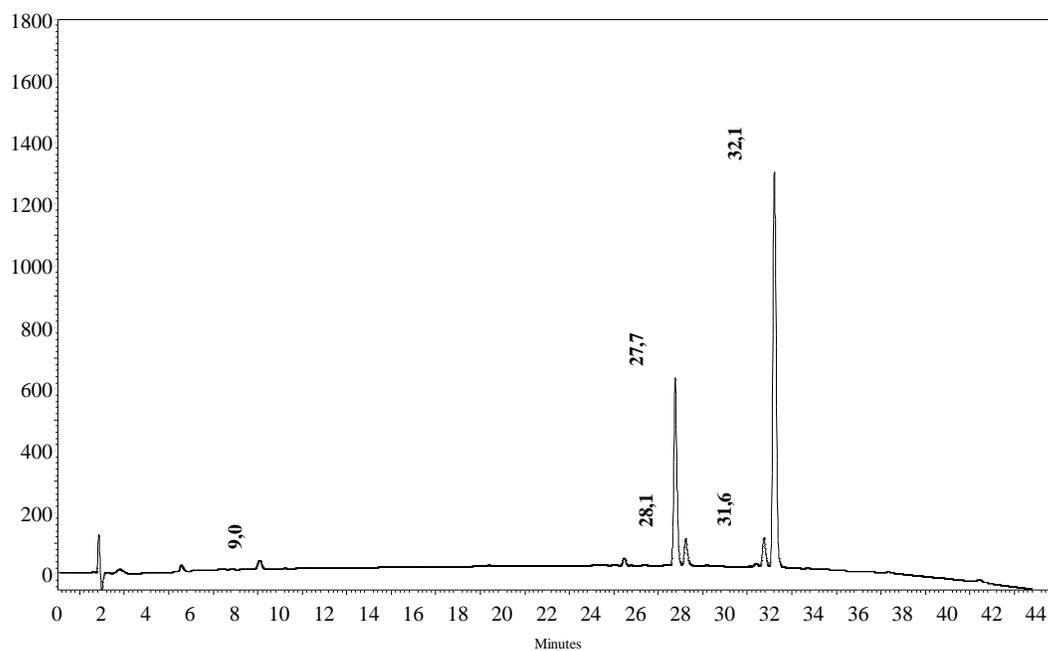
5.30 Espectro  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  RMN HMQC para (9)5.31 Espectro  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  RMN HMBC para (9)

## F. Anexo: Caracterización química de N-glucoaminoácido derivado de Asp

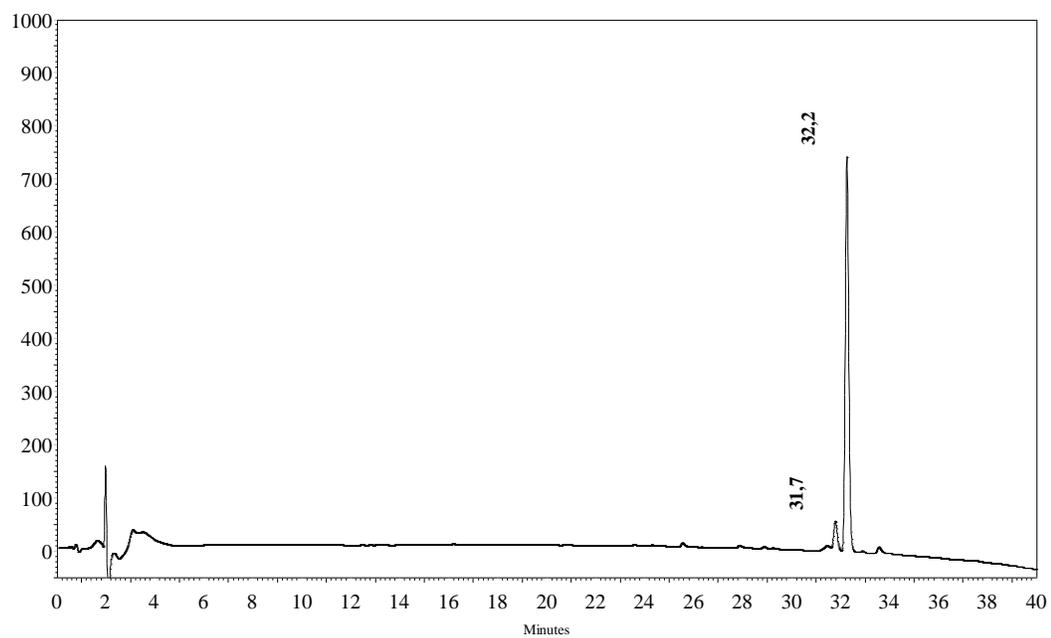
### 6.1 Cromatograma RP-HPLC patrón Fmoc-Asp(OtBu)-OH



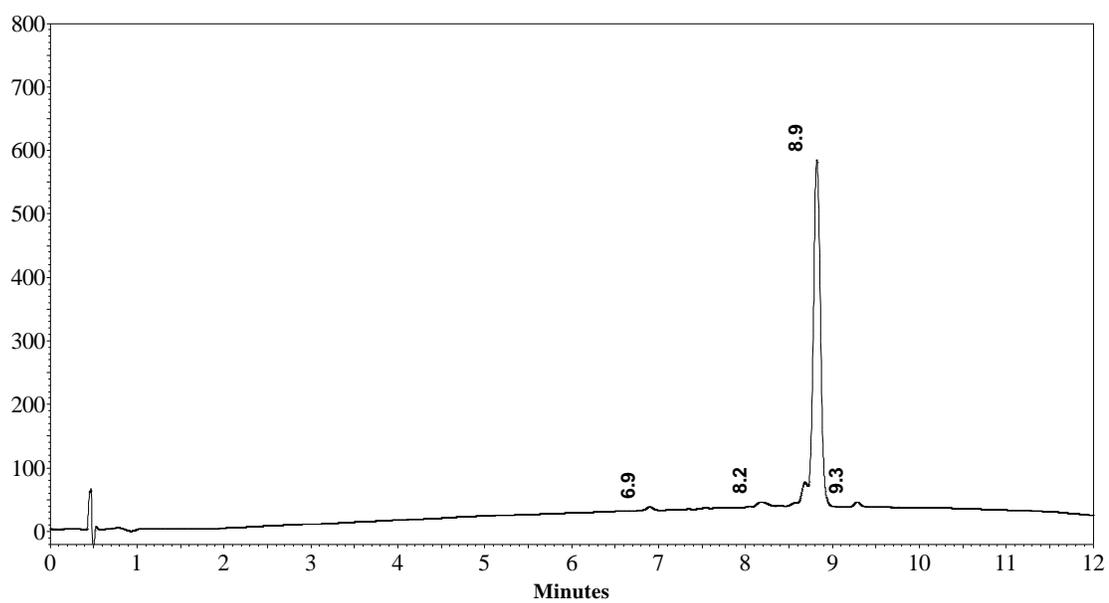
### 6.2 Cromatograma RP-HPLC mezcla reacción t=0



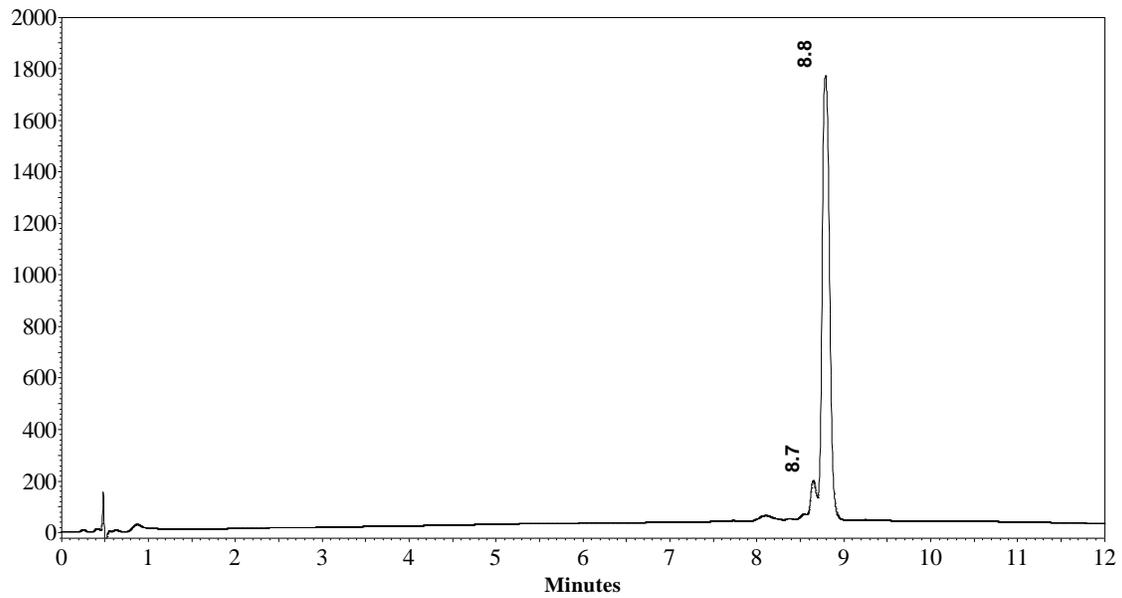
### 6.3 Cromatograma RP-HPLC fin de reacción formación 6



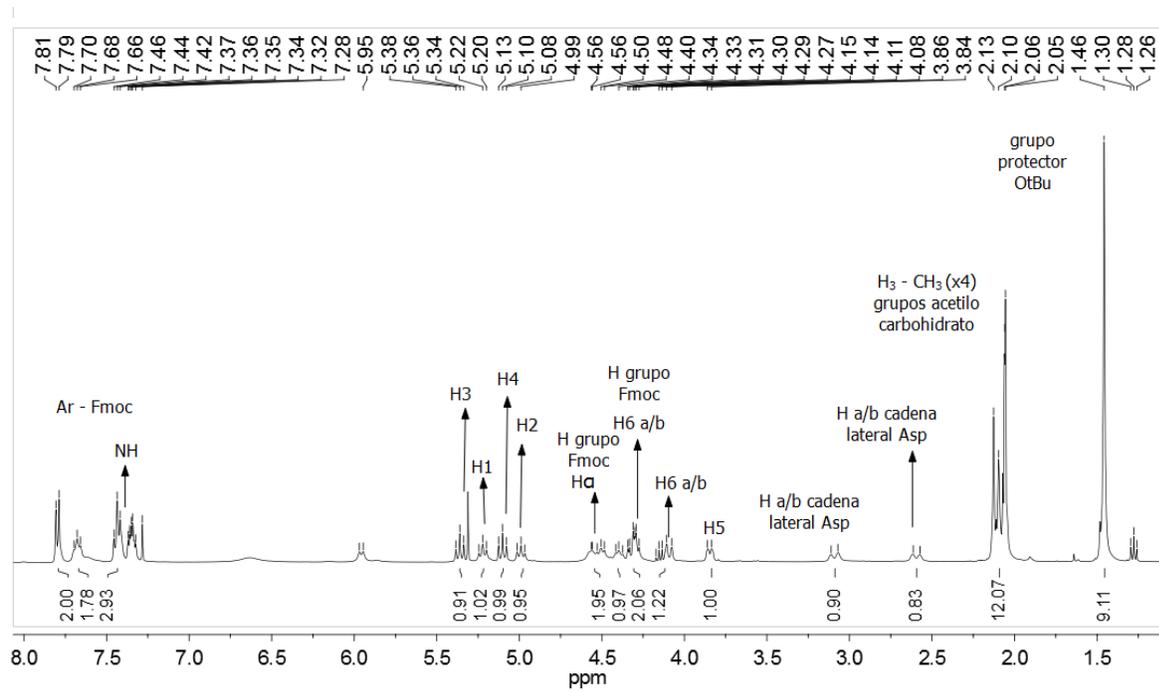
### 6.4 Cromatograma RP-HPLC producto 6 para purificar por SPE



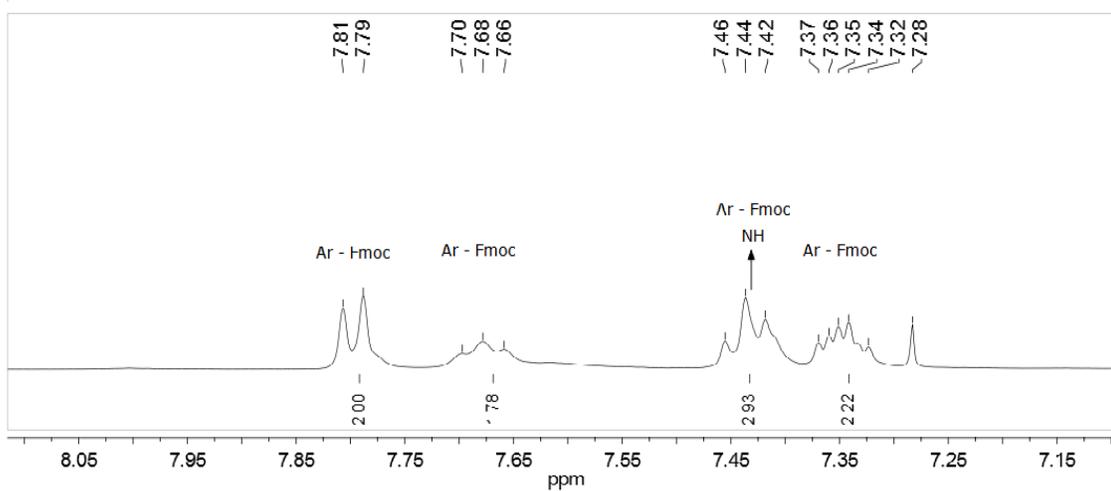
### 6.5 Cromatograma RP-HPLC producto 6 purificado por SPE



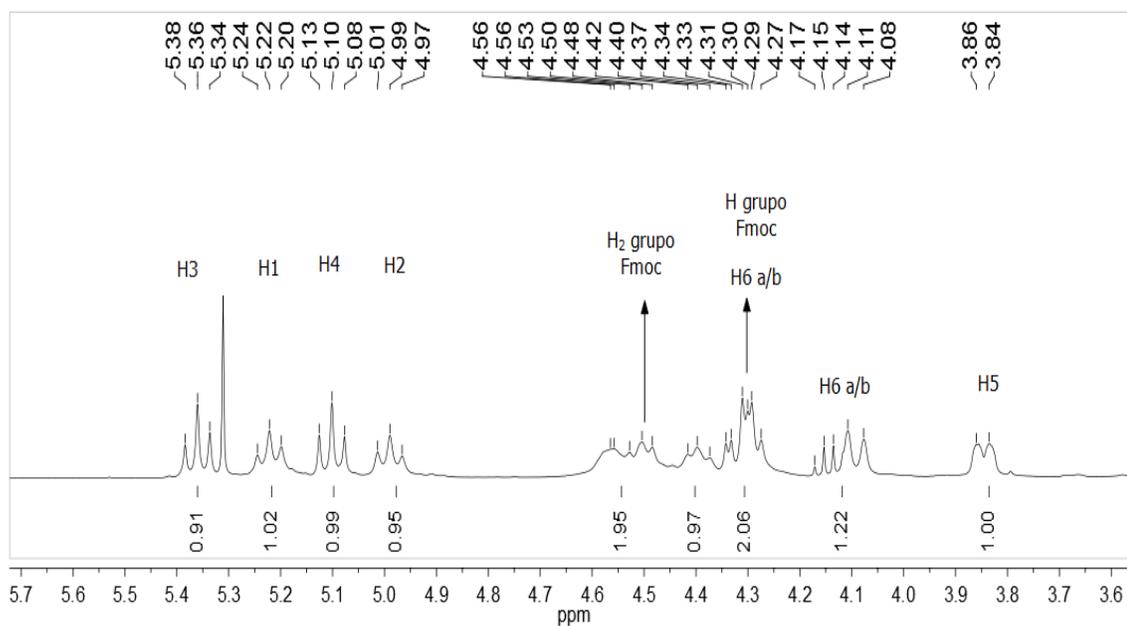
### 6.6 Espectro RMN <sup>1</sup>H de 6



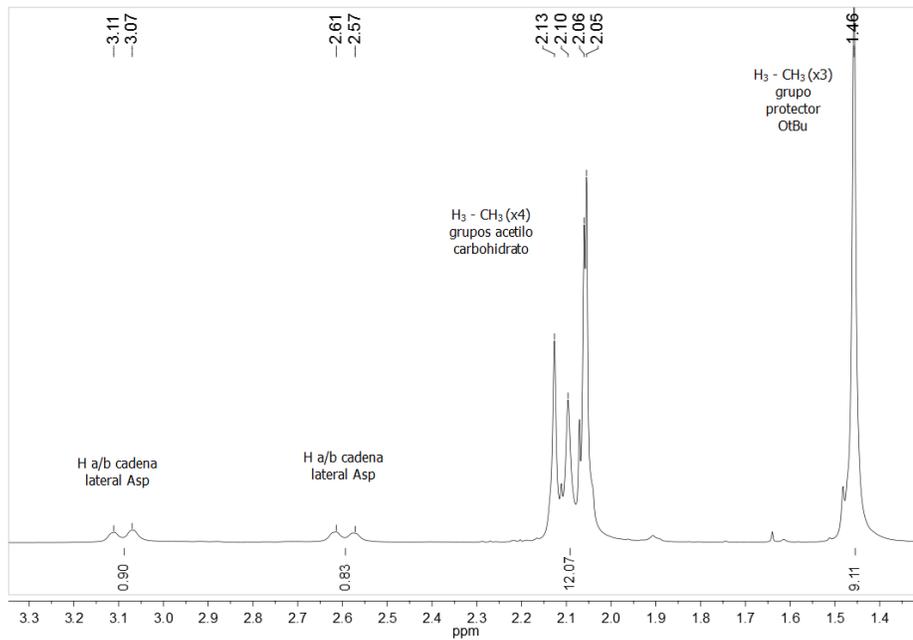
### 6.7 Ampliación espectro RMN $^1\text{H}$ de 6



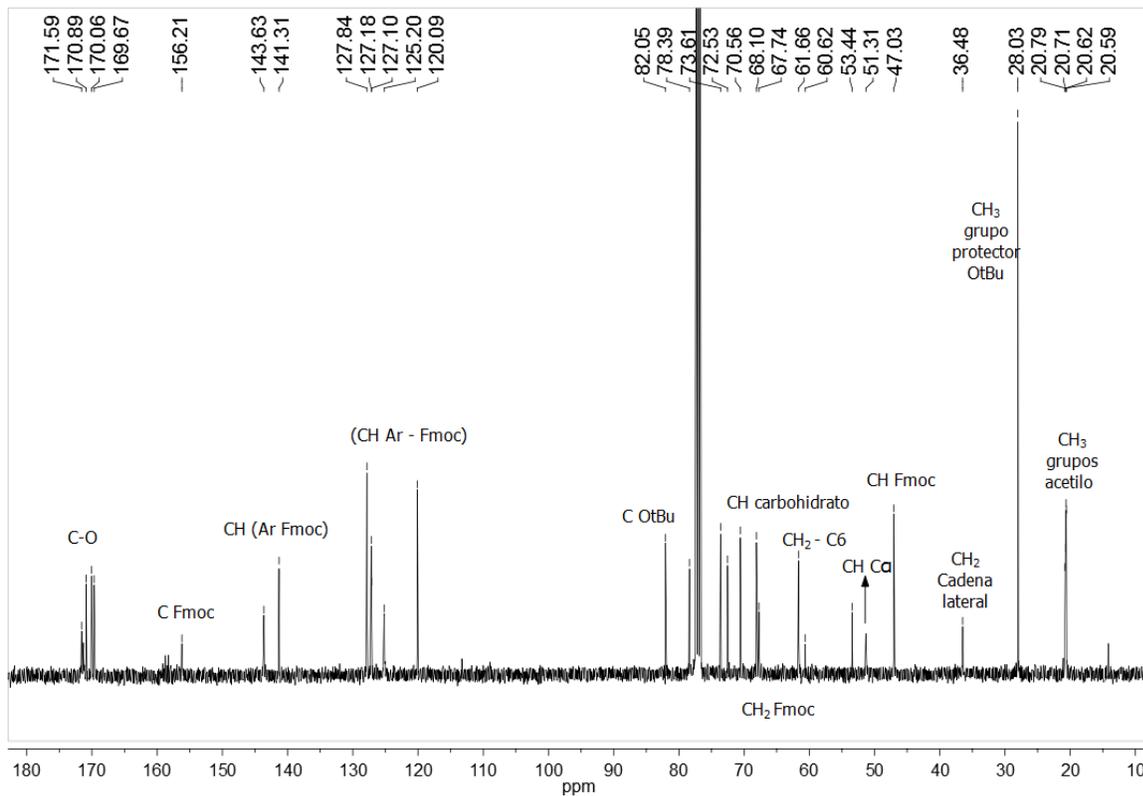
### 6.8 Ampliación espectro RMN $^1\text{H}$ de 6



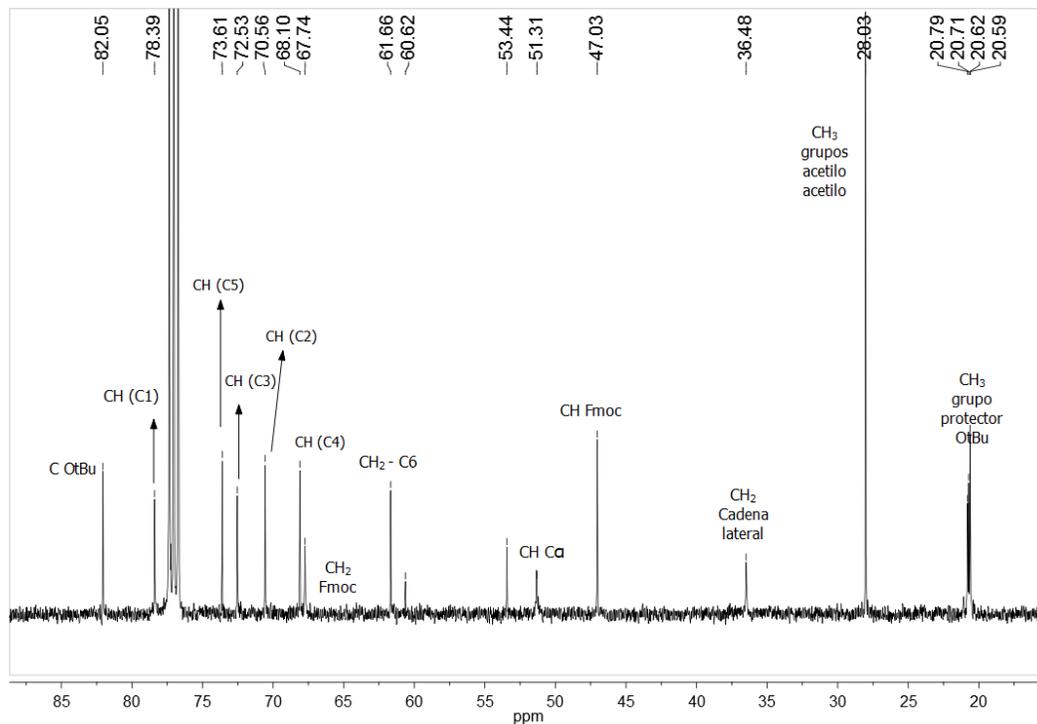
### 6.9 Ampliación espectro RMN <sup>1</sup>H de 6



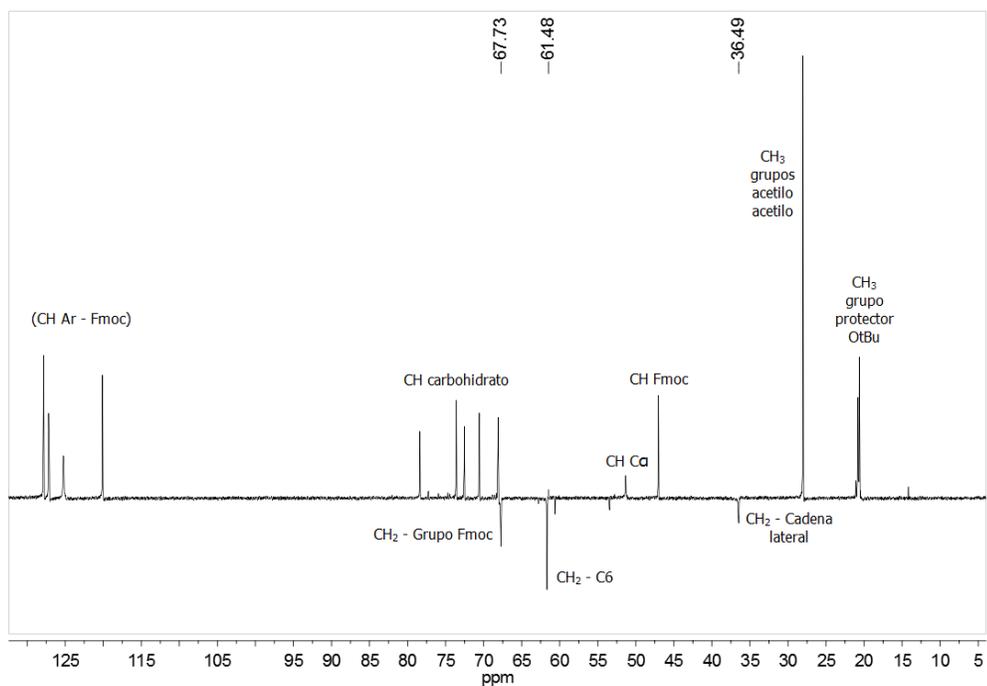
### 6.10 Espectro <sup>13</sup>C RMN de 6



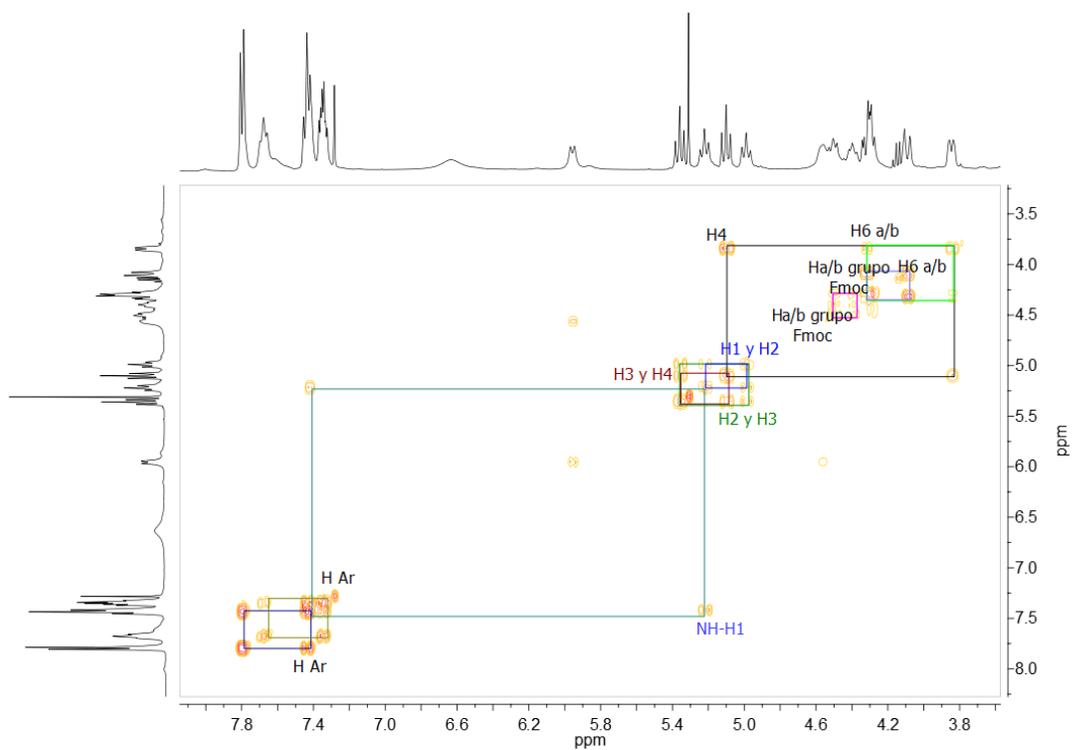
### 6.11 Ampliación espectro $^{13}\text{C}$ RMN de 6



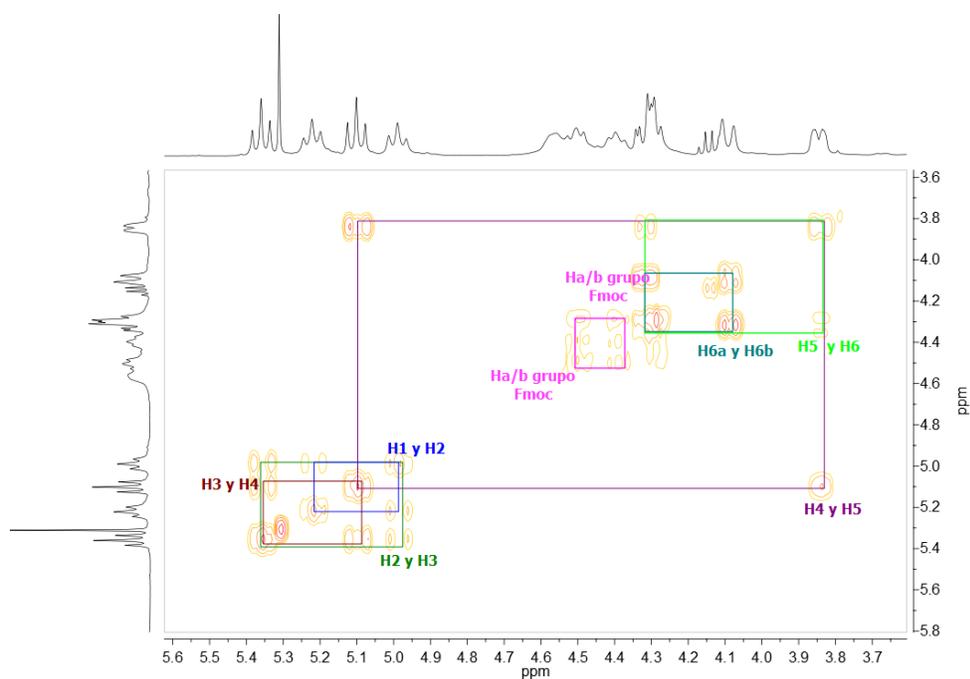
### 6.12 Espectro $^{13}\text{C}$ DEPT 135 RMN de 6



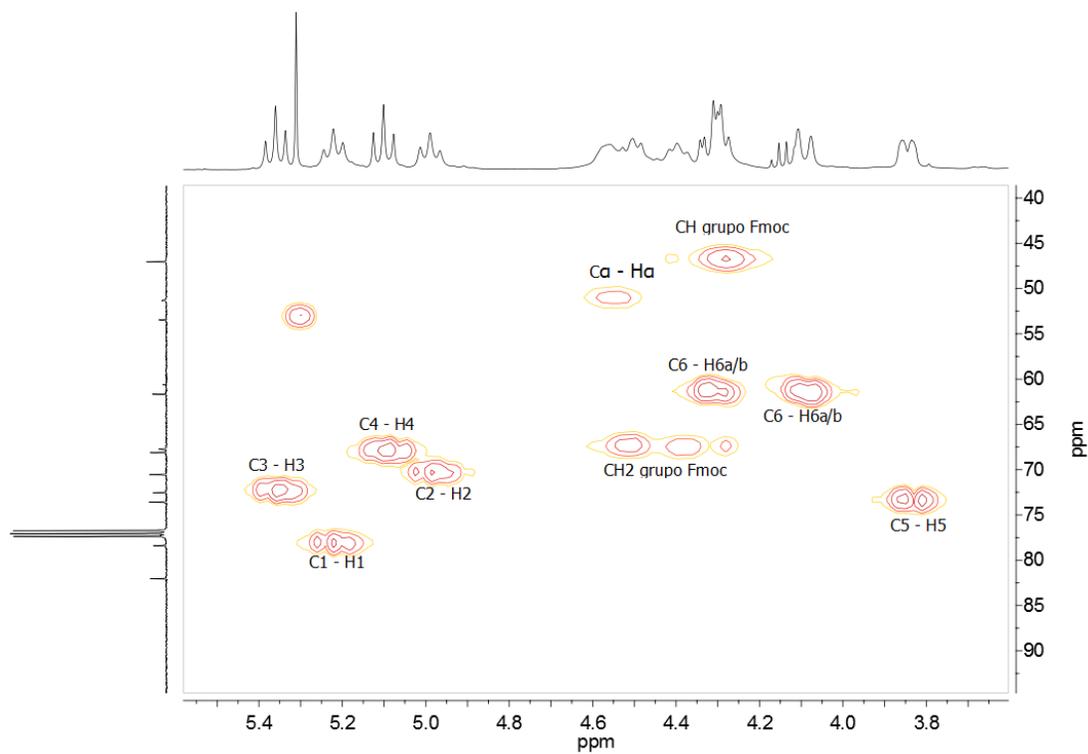
### 6.13 Espectro $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ COSY RMN de 6



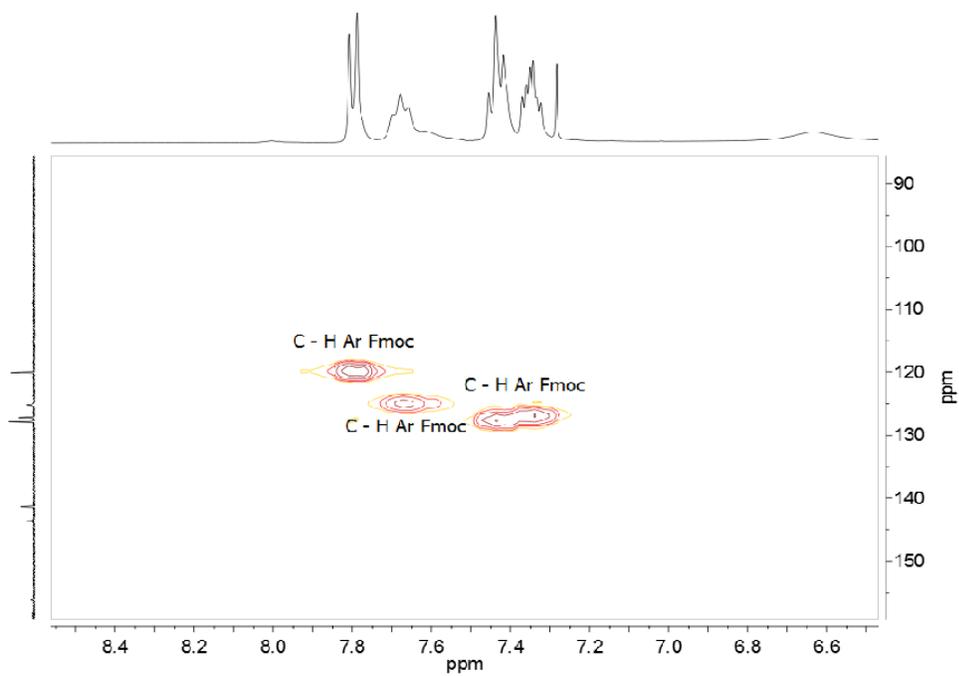
### 6.14 Ampliación espectro $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ COSY RMN de 6



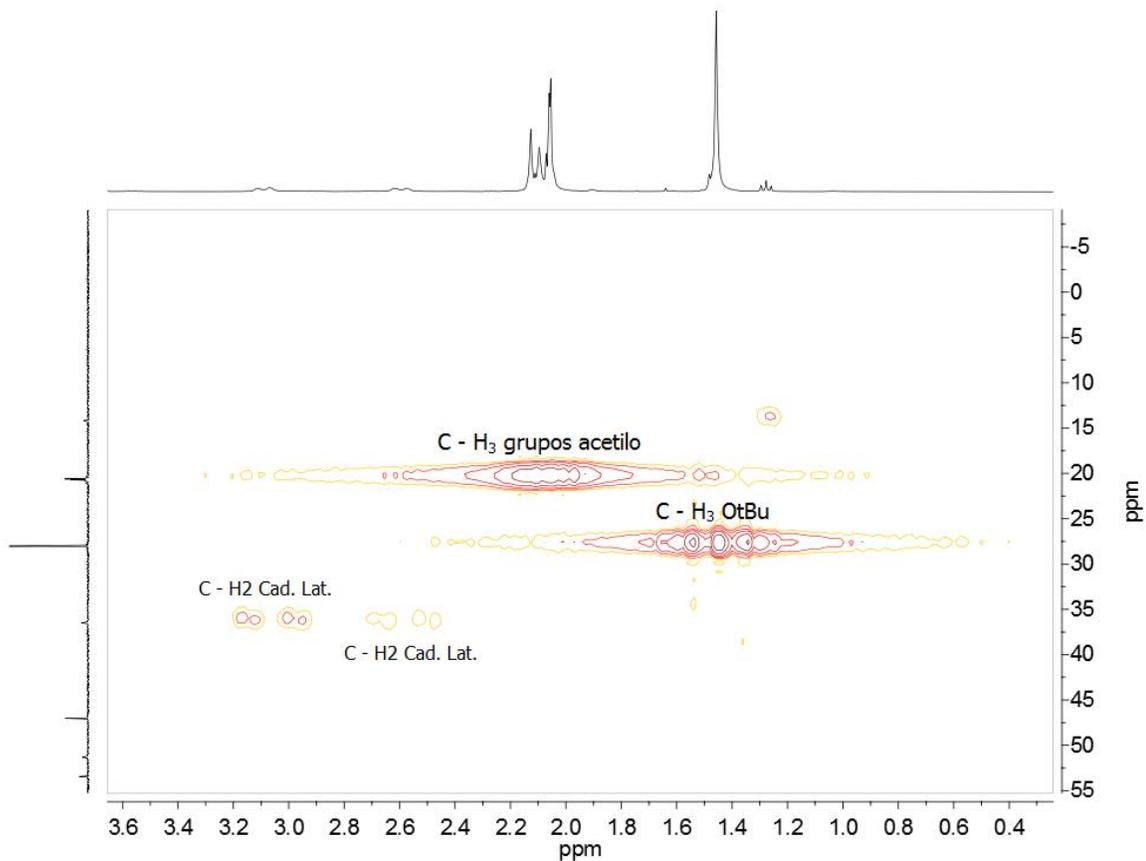
### 6.15 Espectro $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ HMQC RMN de 6



### 6.16 Ampliación espectro $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ HMQC RMN de 6

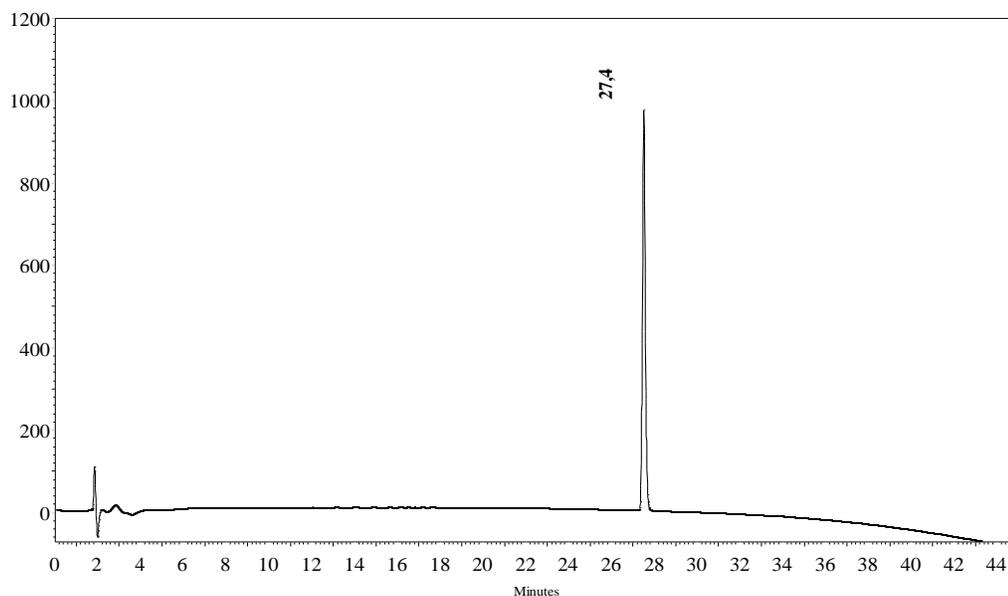


### 6.17 Ampliación espectro $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ HMQC RMN de 6

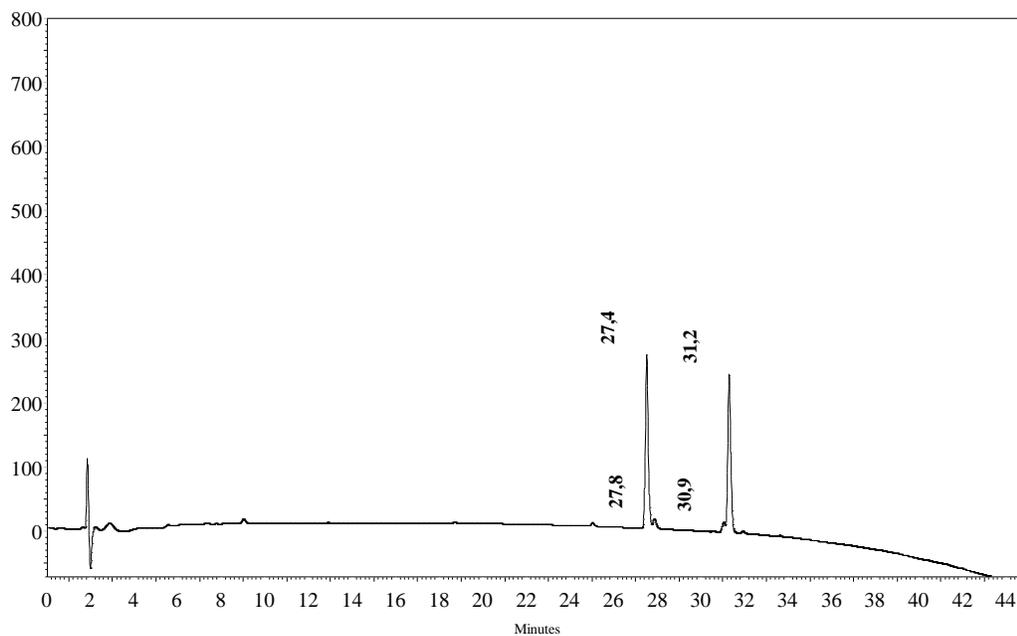


## G. Anexo: Caracterización química de *N*-glucoaminoácido derivado de Phe

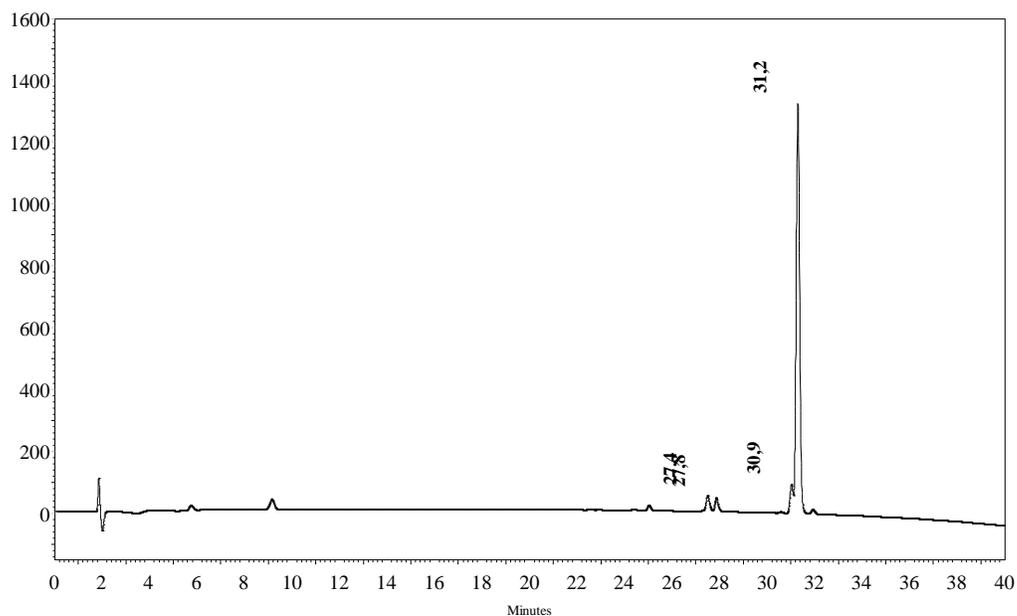
### 7.1 Cromatograma RP-HPLC reactivo Fmoc-Phe-OH



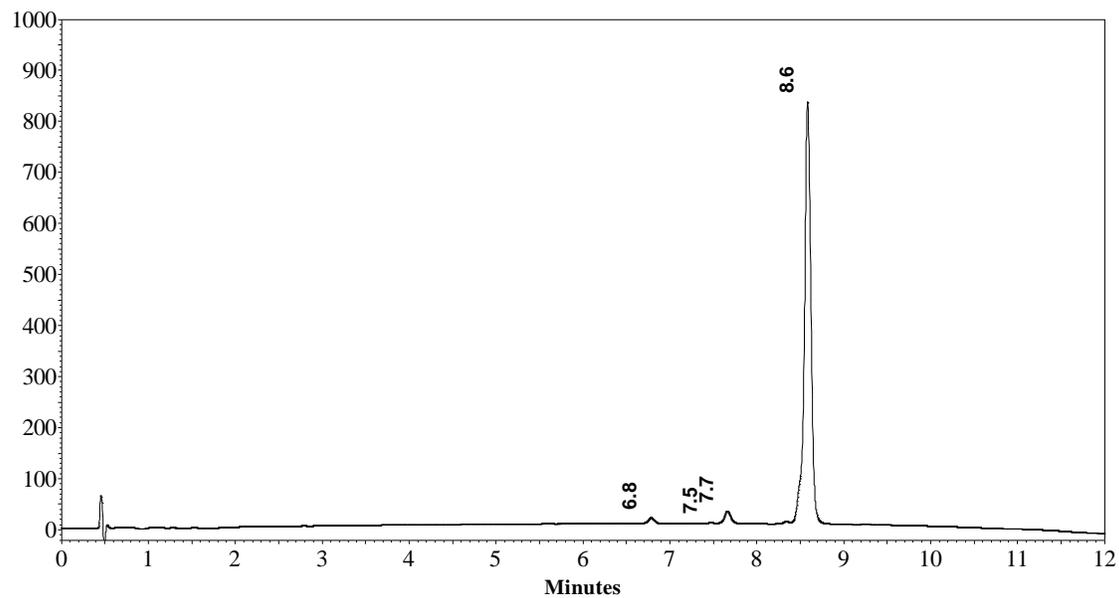
### 7.2 Cromatograma mezcla de reacción t=0



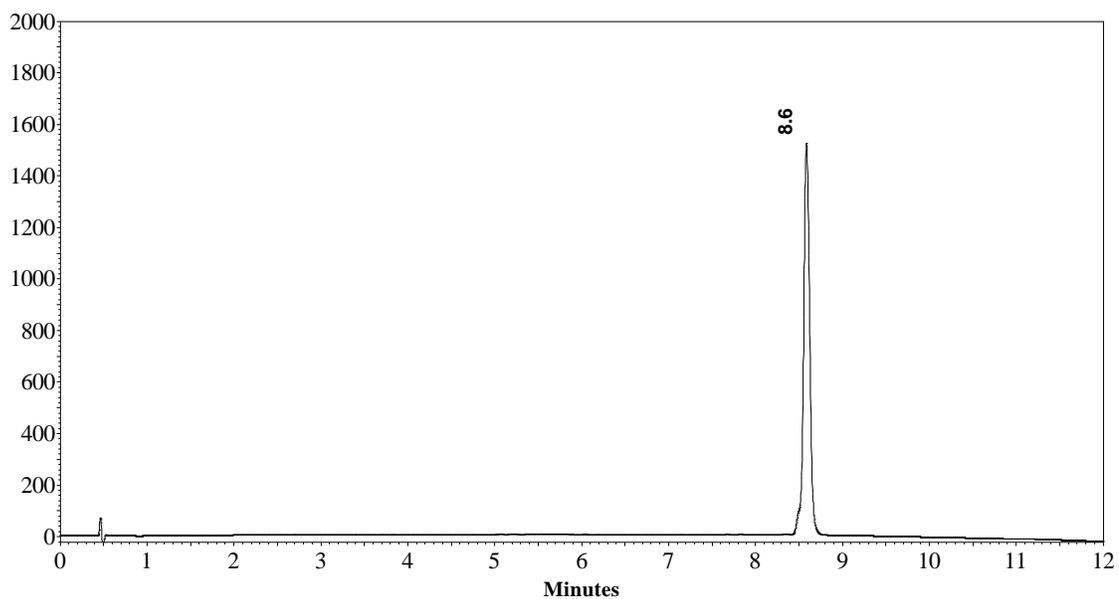
### 7.3 Cromatograma fin de reacción formación de 7



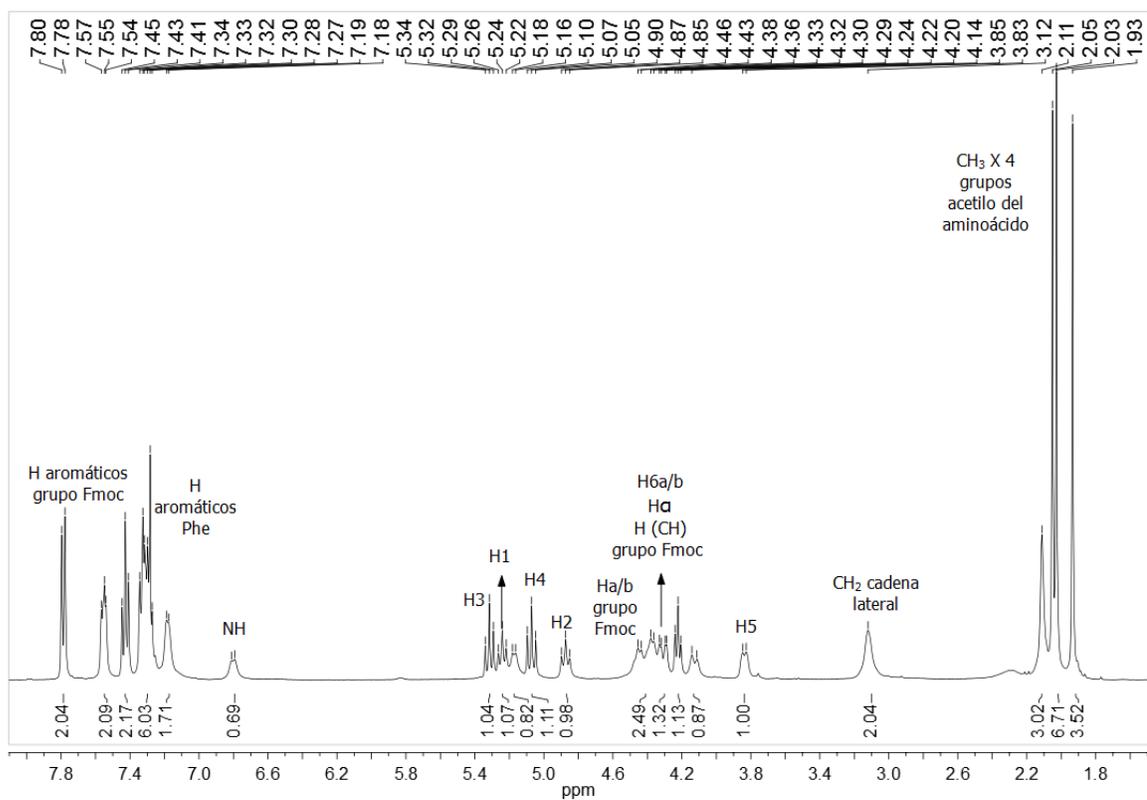
### 7.4 Cromatograma producto 7 para purificación



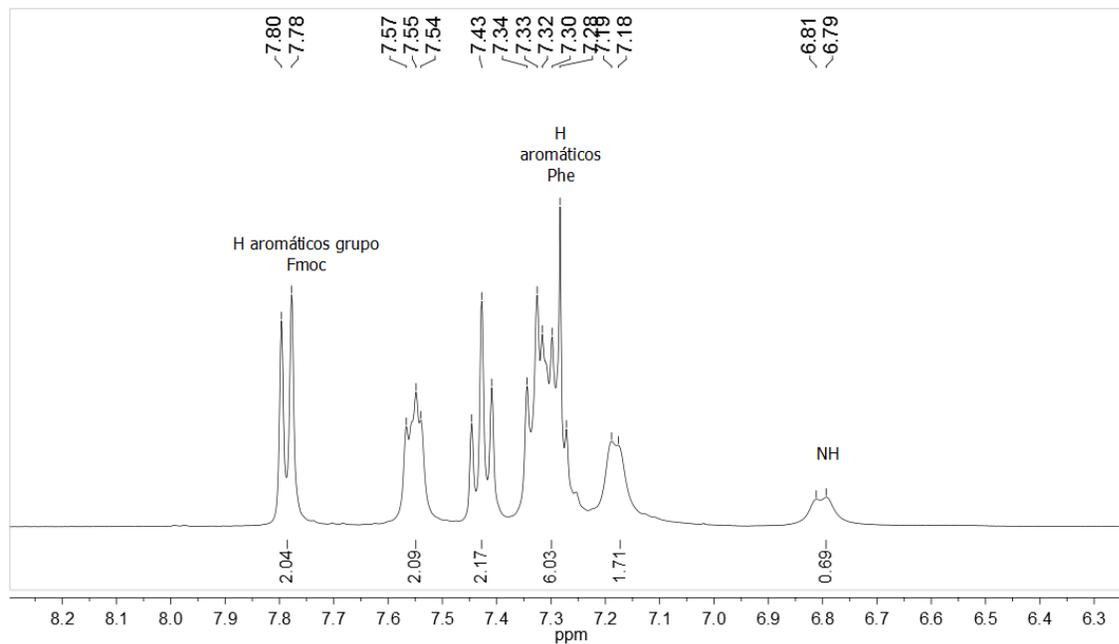
## 7.5 Cromatograma producto 7 purificado



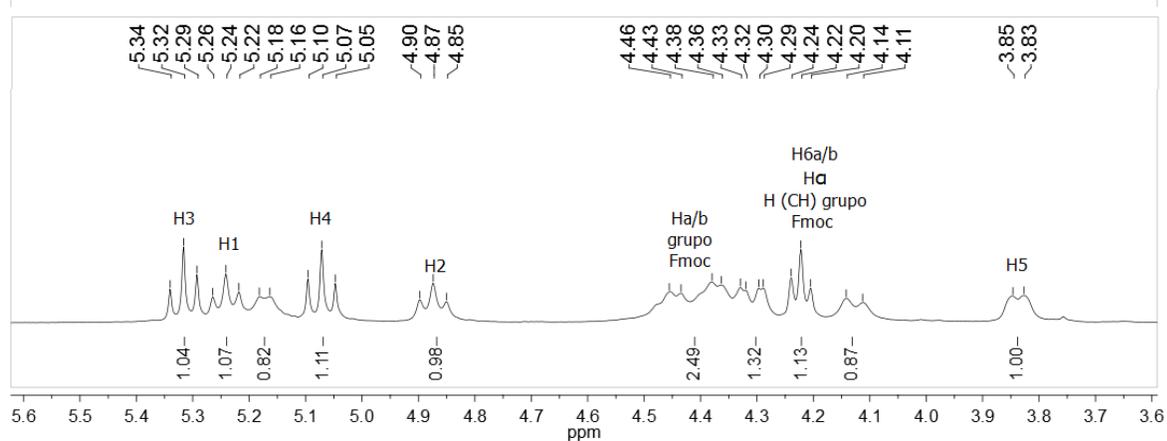
## 7.6 Espectro RMN $^1\text{H}$ para 7



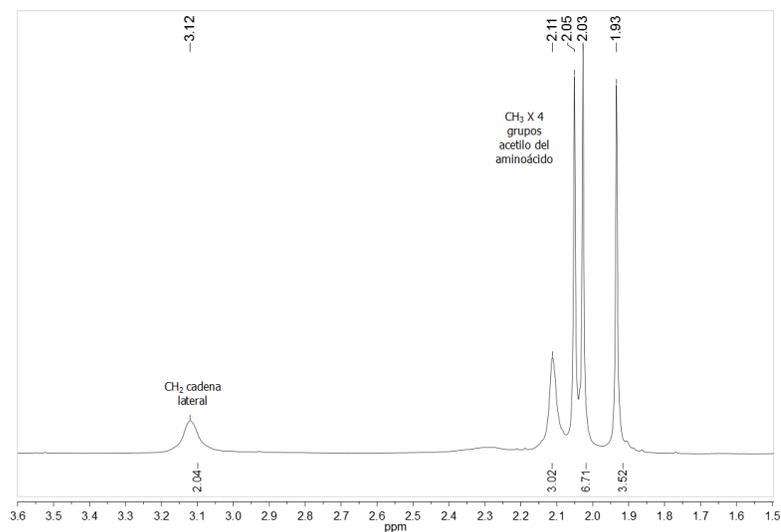
### 7.7 Ampliación espectro RMN $^1\text{H}$ para 7



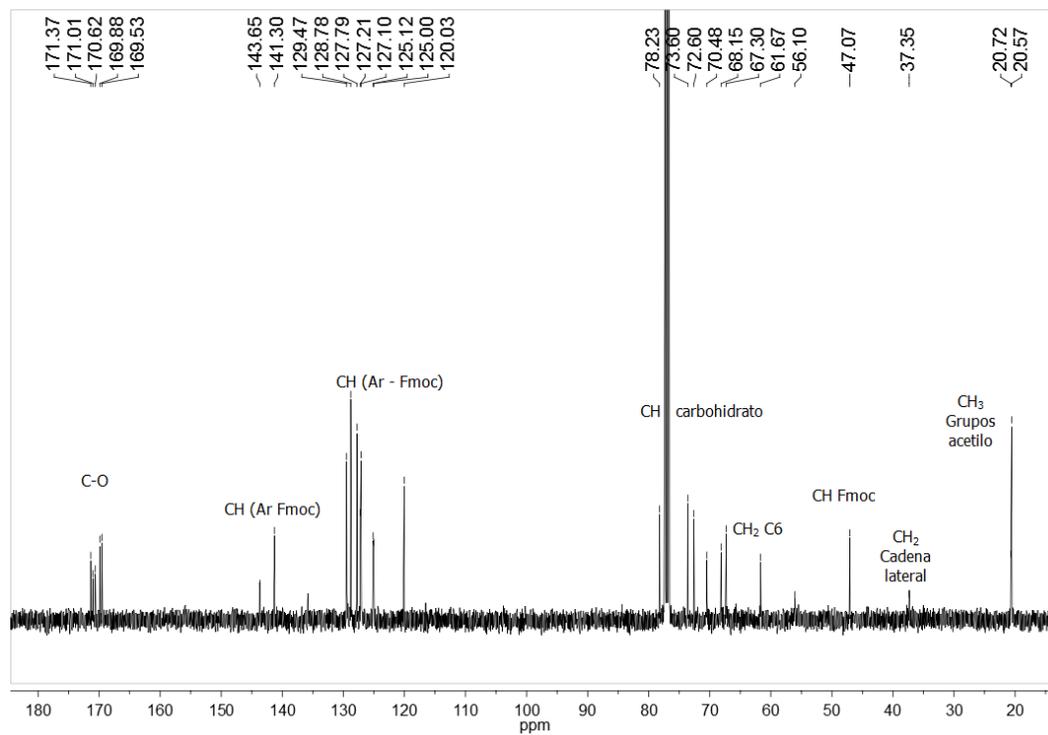
### 7.8 Ampliación espectro RMN $^1\text{H}$ para 7



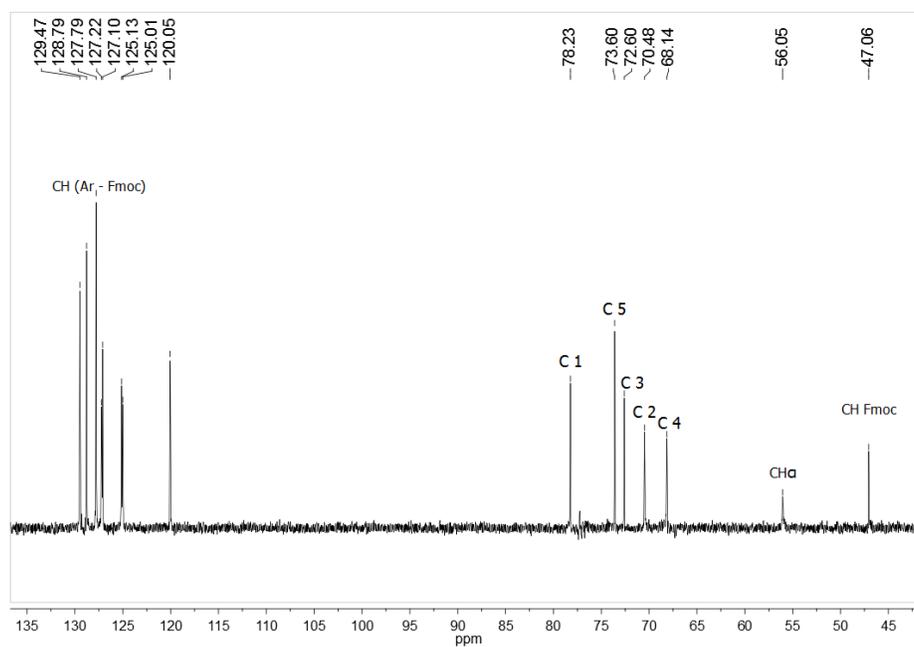
## 7.9 Ampliación espectro RMN $^1\text{H}$ para 7



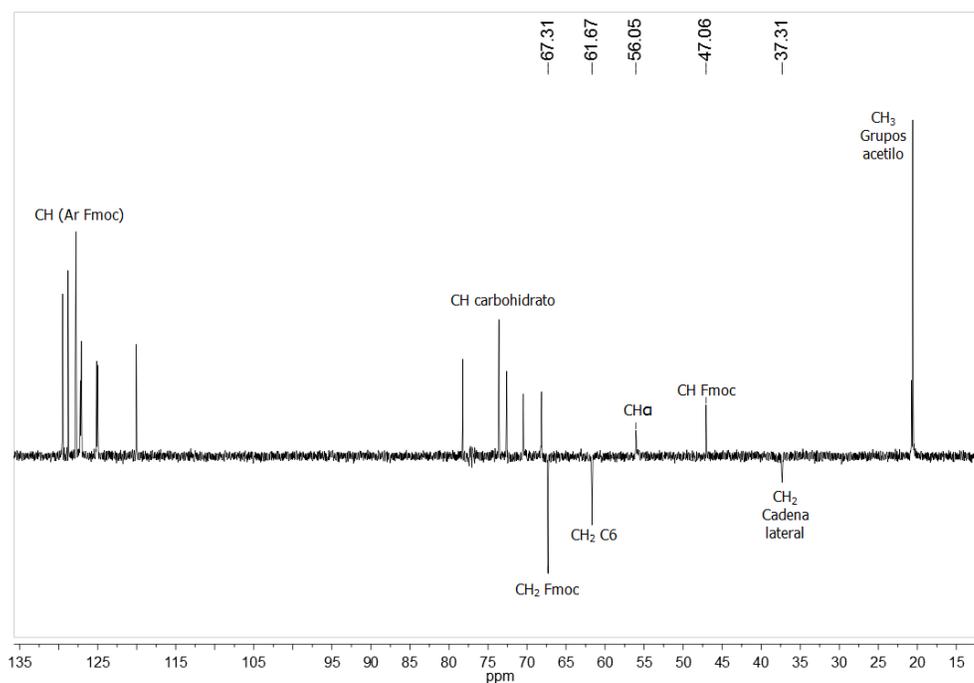
## 7.10 Espectro $^{13}\text{C}$ RMN de 7



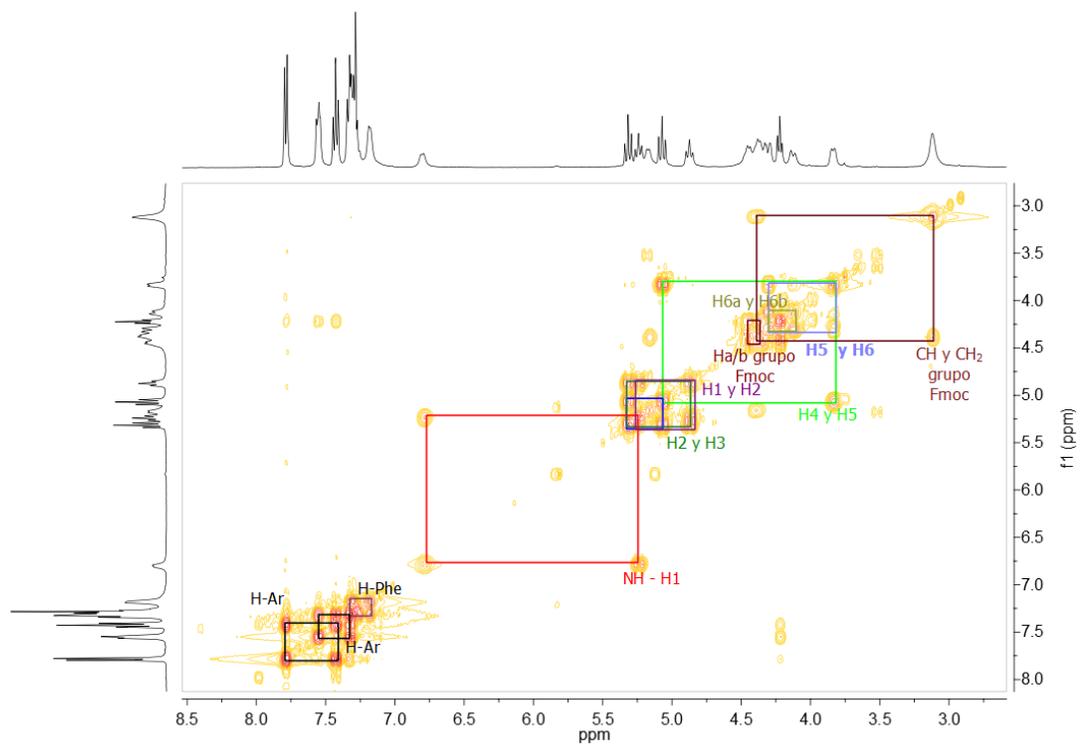
### 7.11 Espectro $^{13}\text{C}$ DEPT 90 RMN de 7



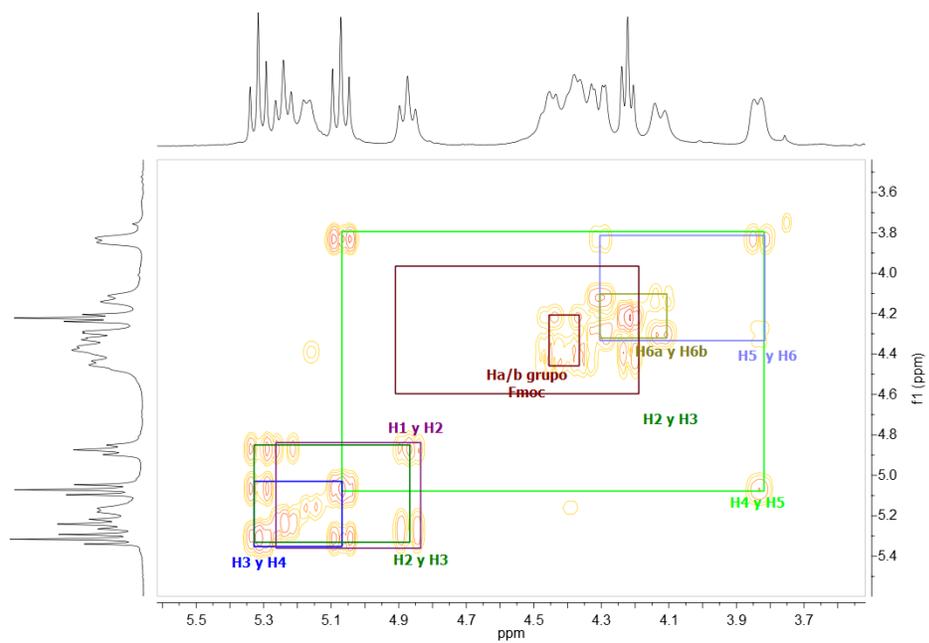
### 7.12 Espectro $^{13}\text{C}$ DEPT 135 RMN de 7



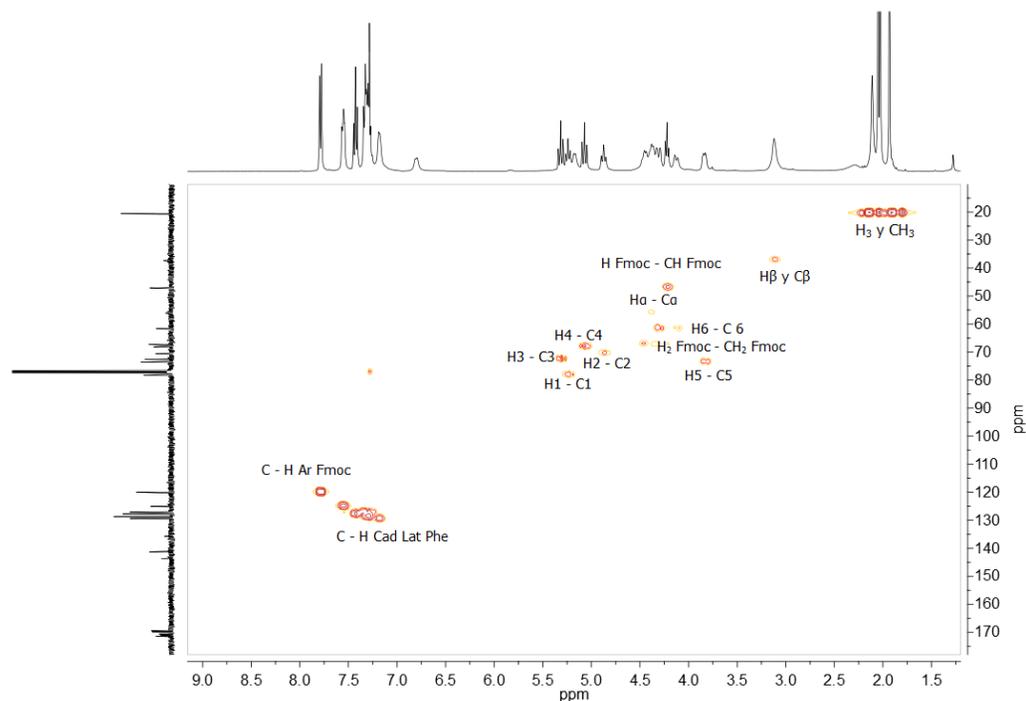
### 7.13 Espectro $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ COSY RMN para 7



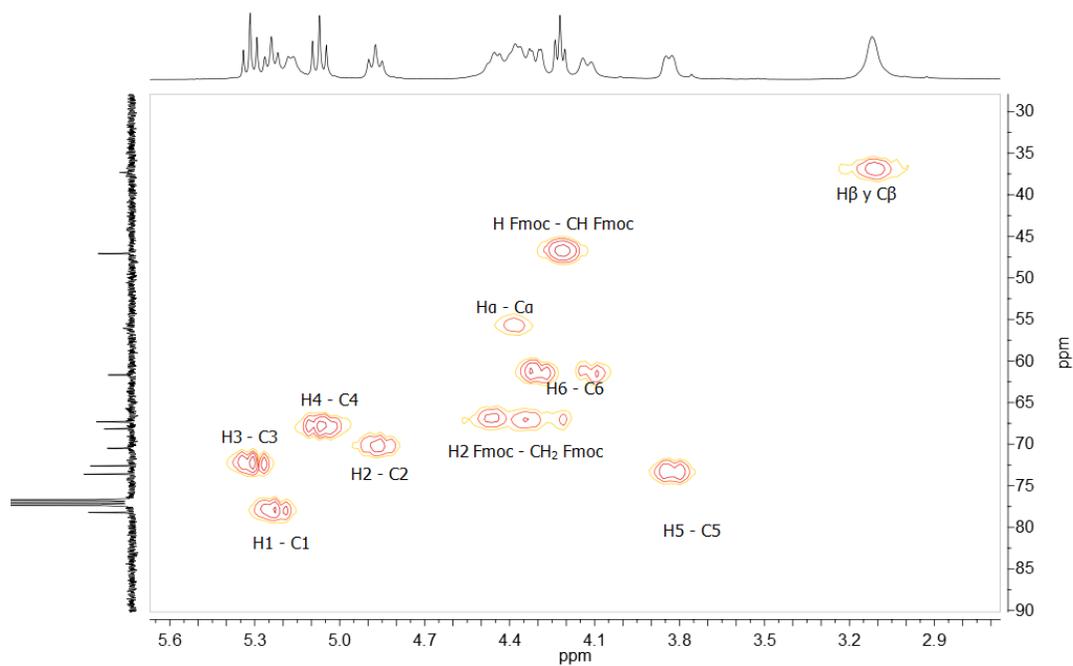
### 7.14 Ampliación espectro $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ COSY RMN para 7



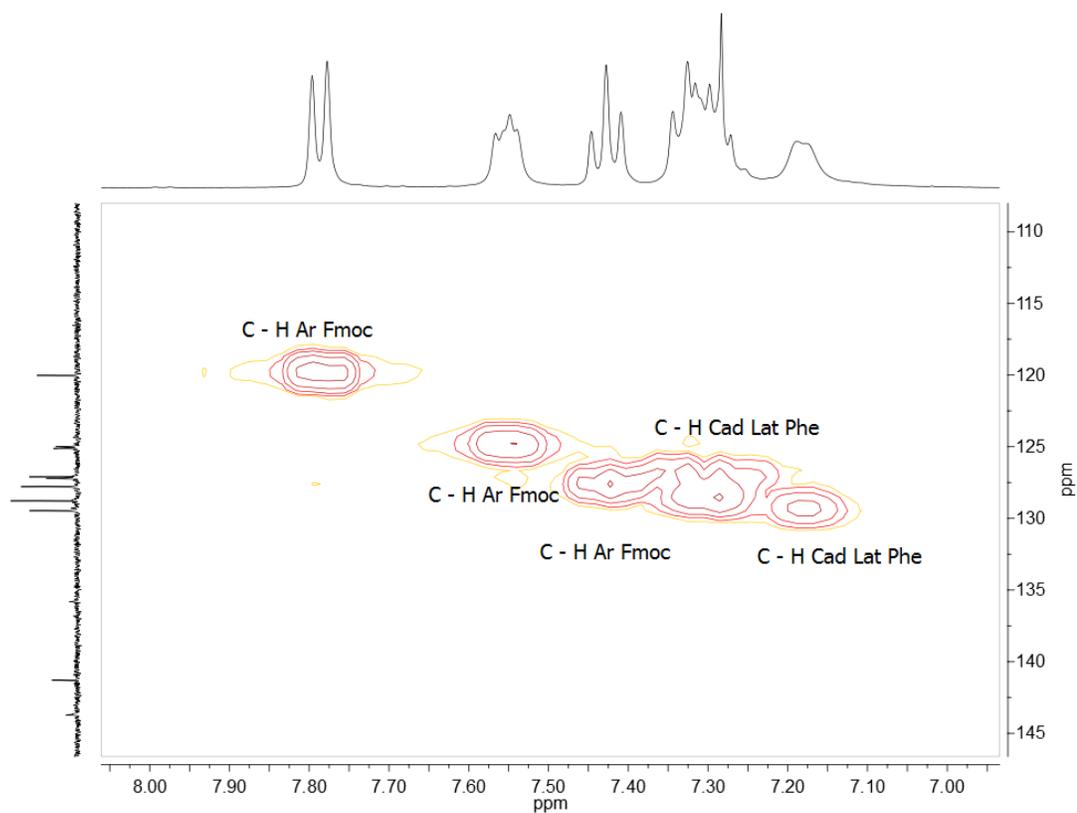
### 7.15 Espectro $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ HMQC RMN para 7



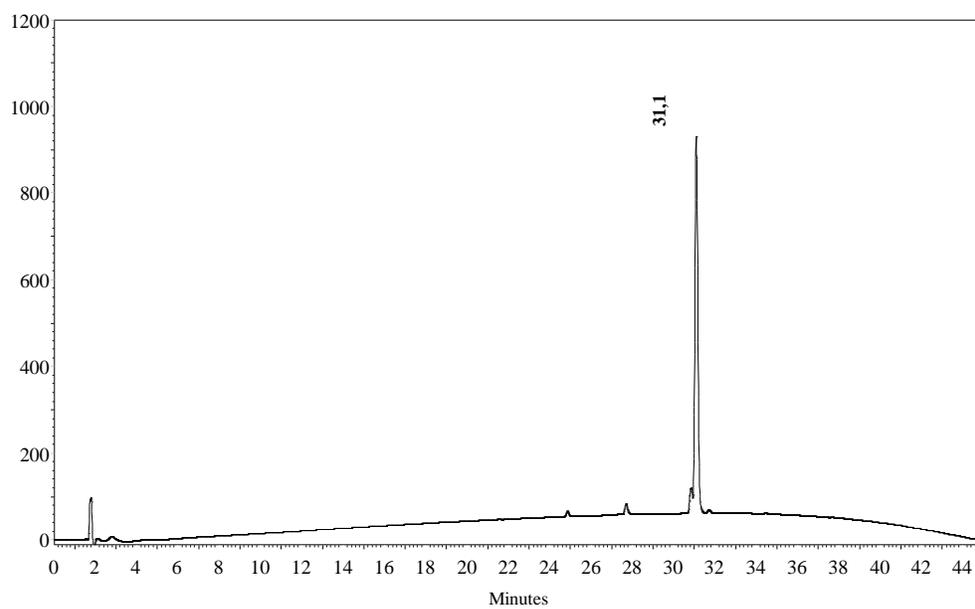
### 7.16 Ampliación espectro $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ HMQC RMN para 7



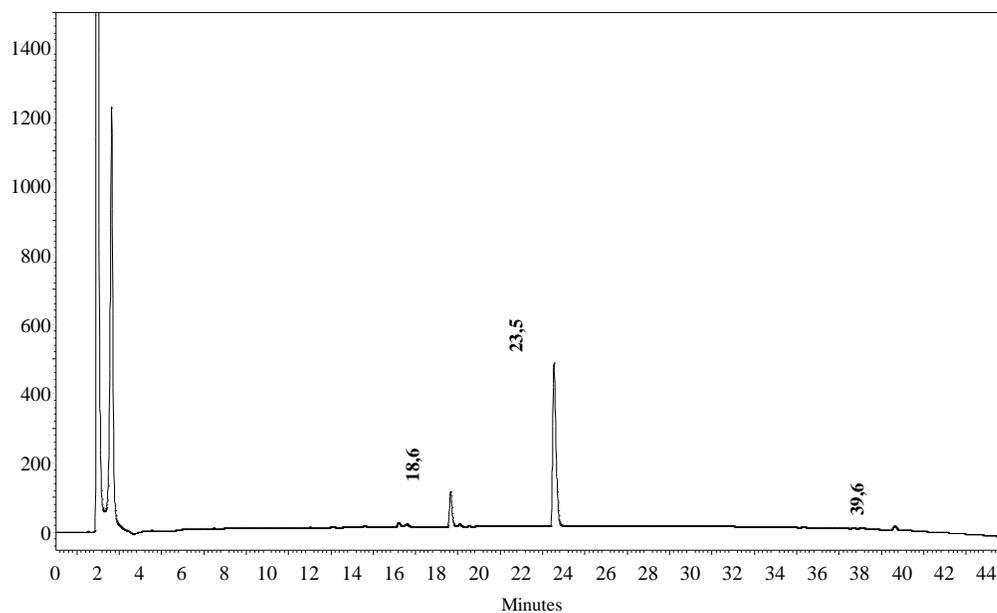
### 7.17 Ampliación espectro $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ HMQC RMN para 7



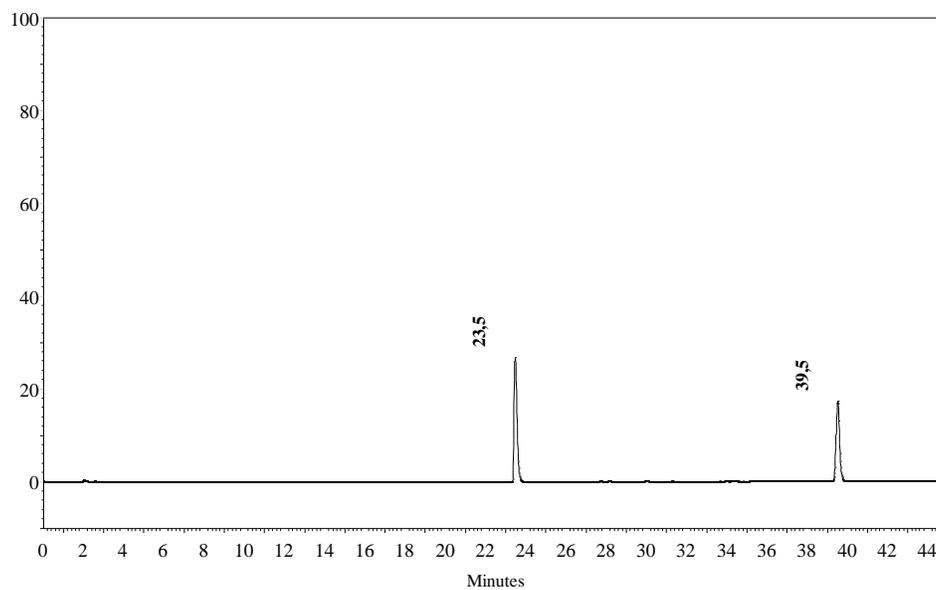
### 7.18 Perfil cromatográfico (4)

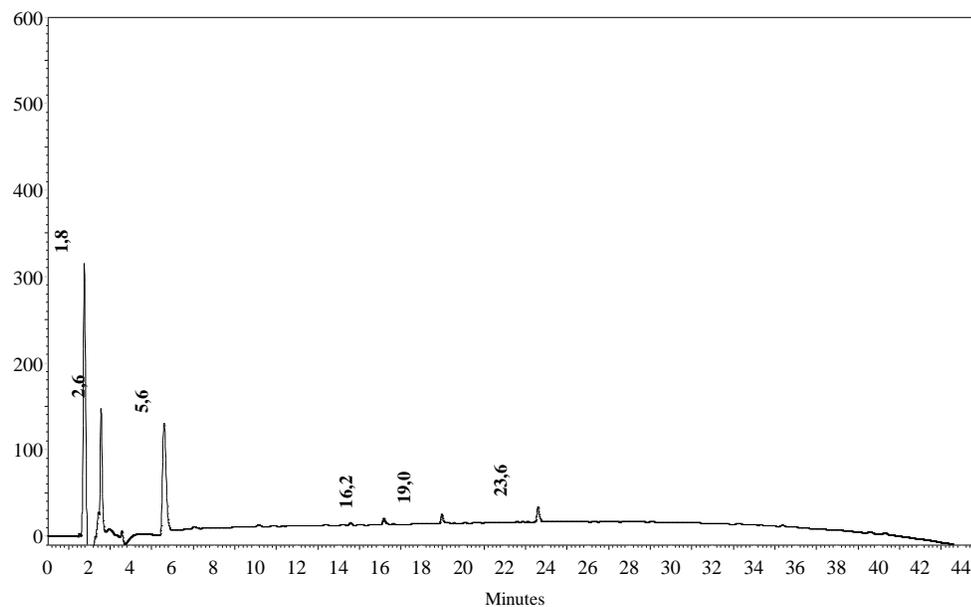
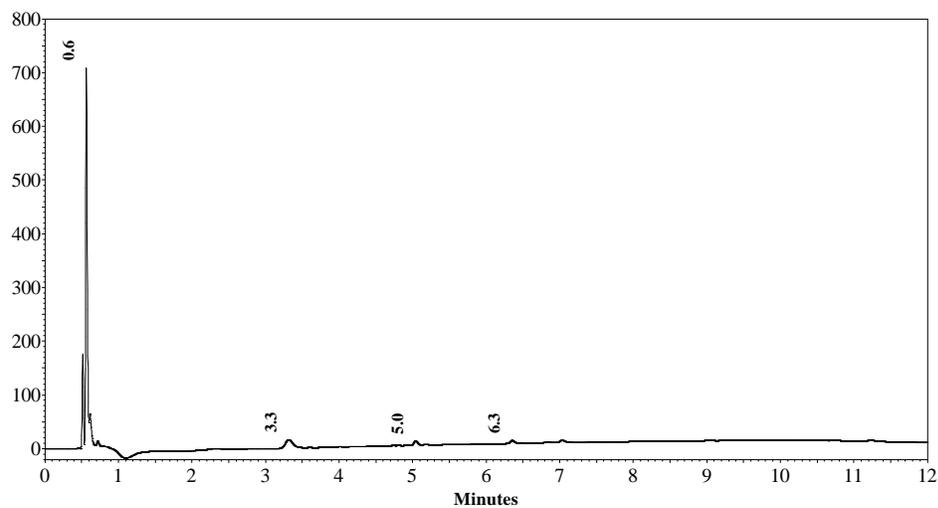


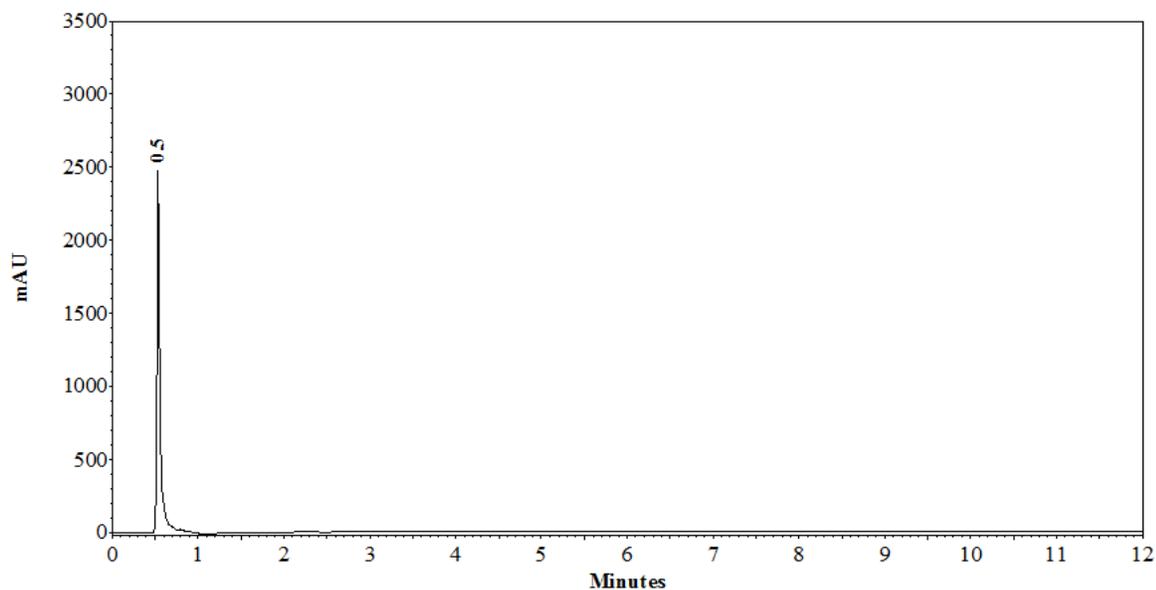
**7.19 Perfil cromatográfico del producto de la reacción de remoción del grupo Fmoc de (4) para obtener (4a) monitoreada a 210 nm**



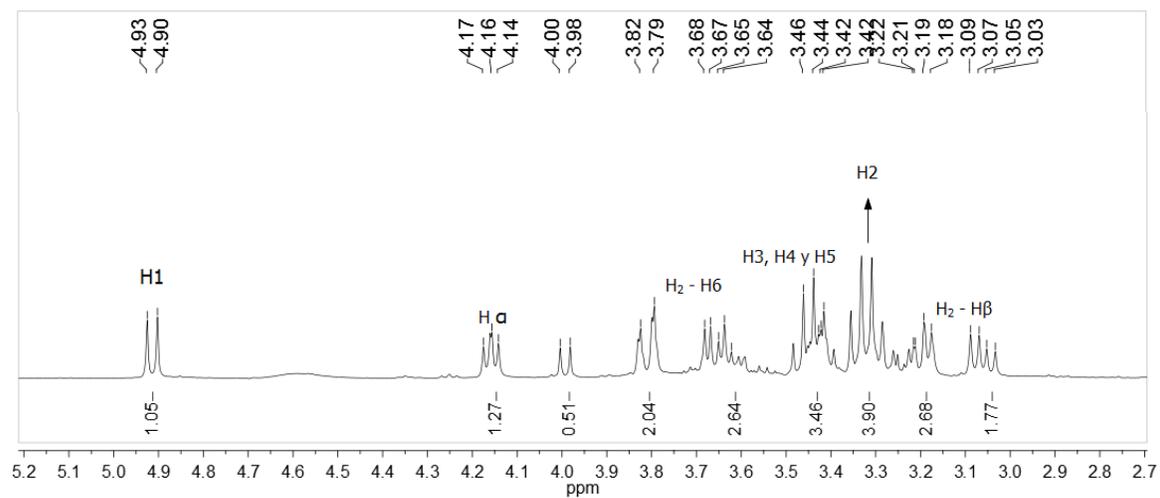
**7.20 Perfil cromatográfico del producto de la reacción de remoción del grupo Fmoc de (4) para obtener (4a) monitoreada a 302 nm**



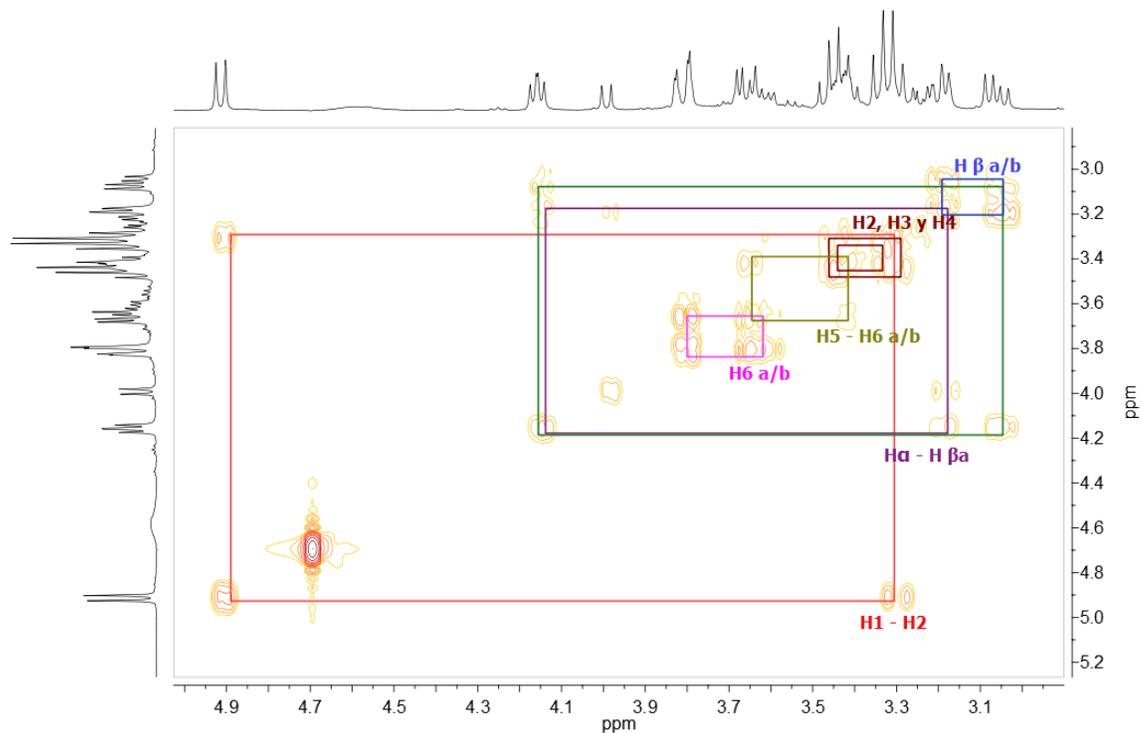
**7.21 Producto de la reacción de desacetilación de (4a) para obtener (8) a 24 h****7.22 Producto de la reacción de desacetilación completa de (4a) para obtener (8)**



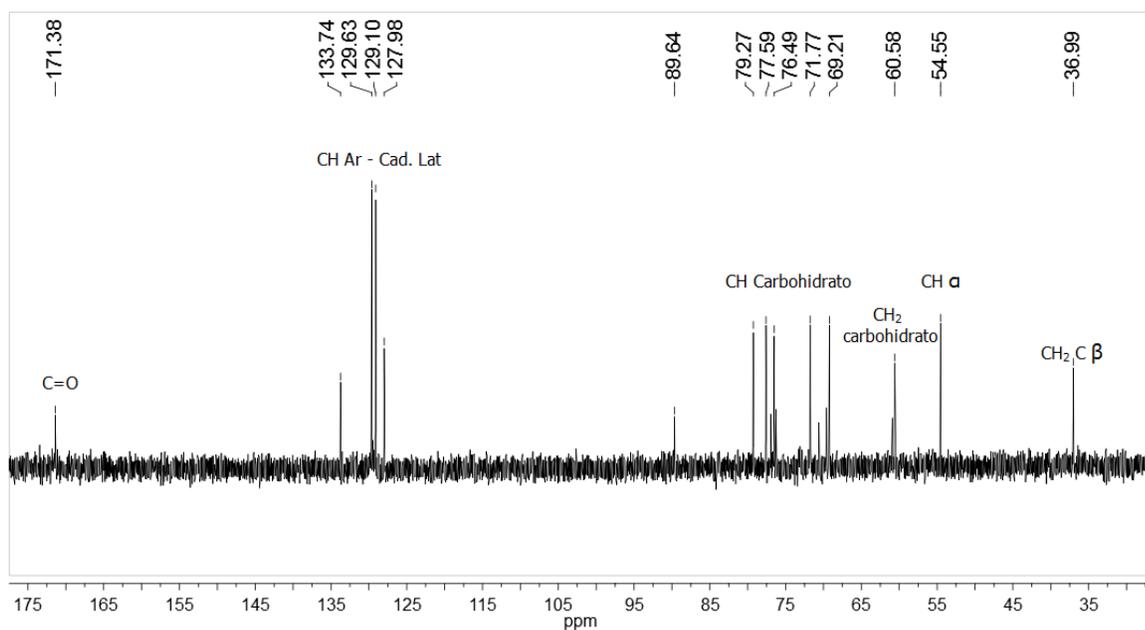
### 7.23 Espectro RMN $^1\text{H}$ para (**8**)



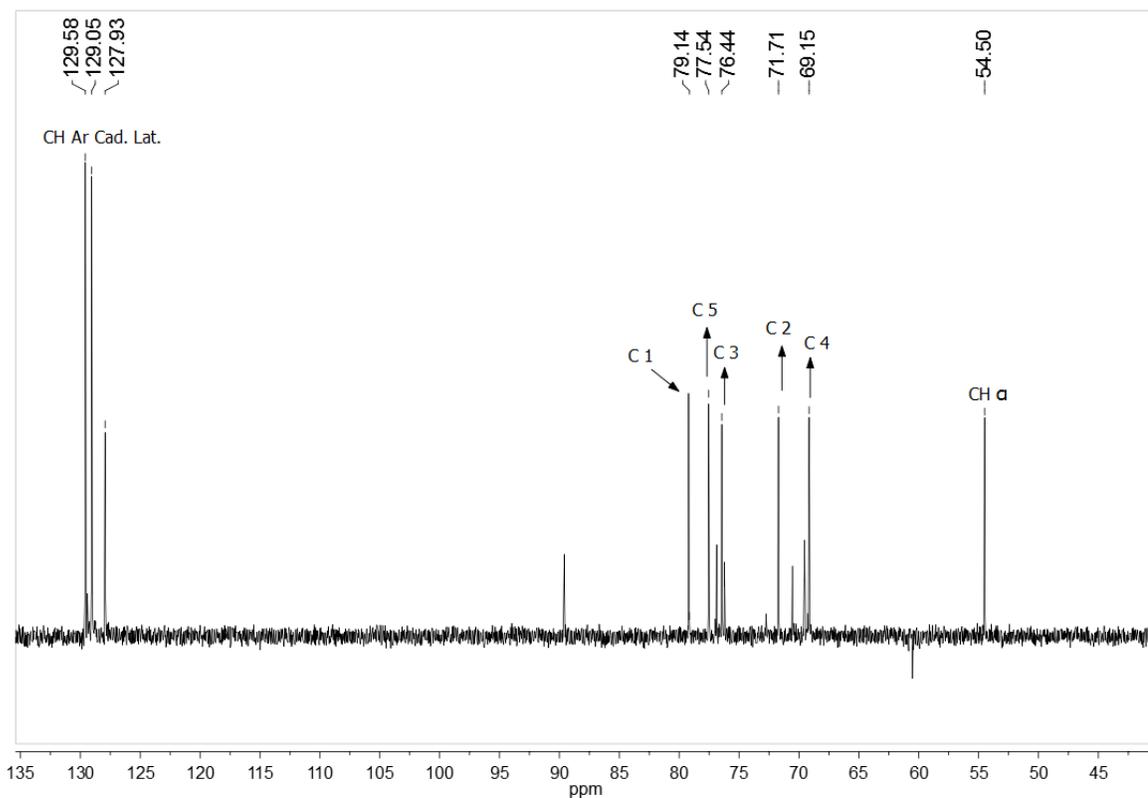
### 7.24 Espectro $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ COSY RMN para (8)



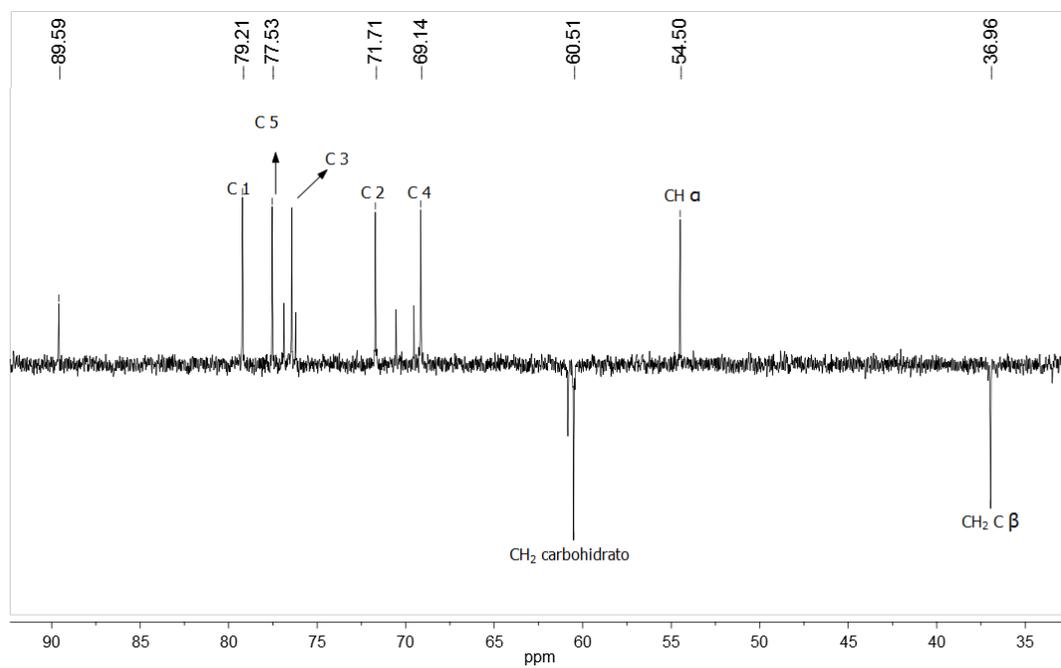
### 7.25 Espectro $^{13}\text{C}$ RMN para (8)

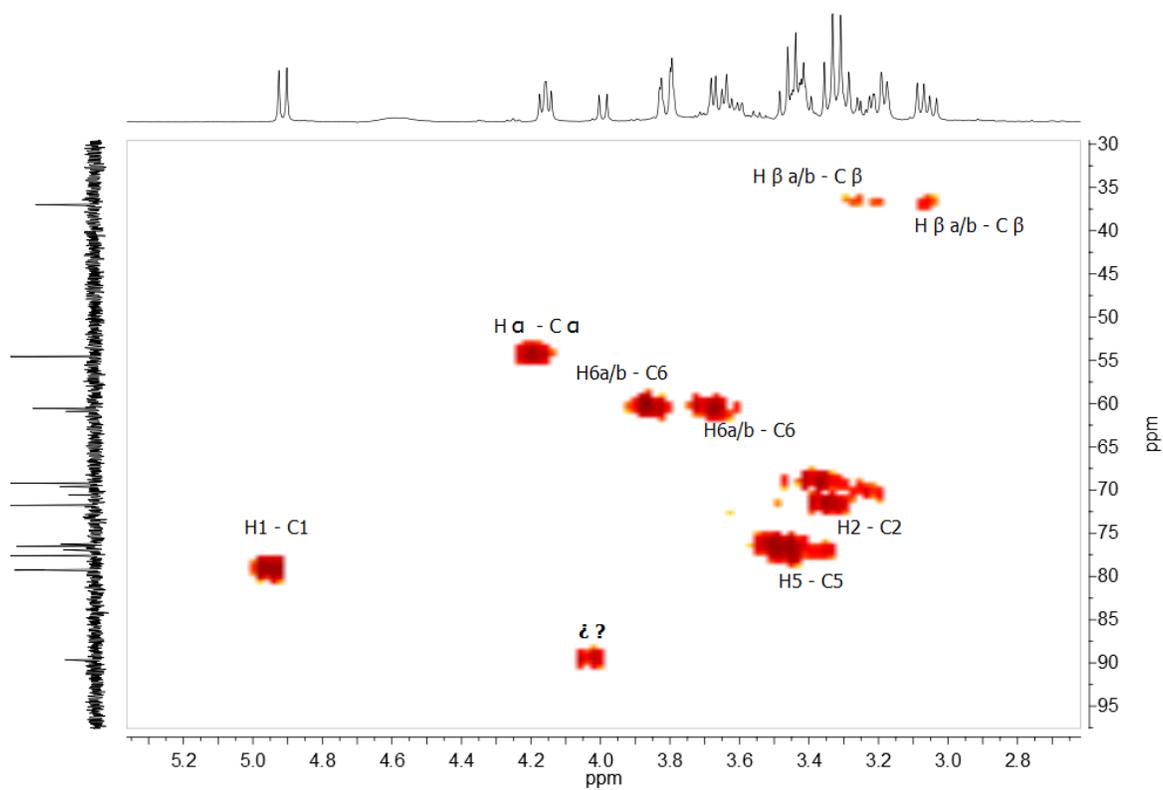
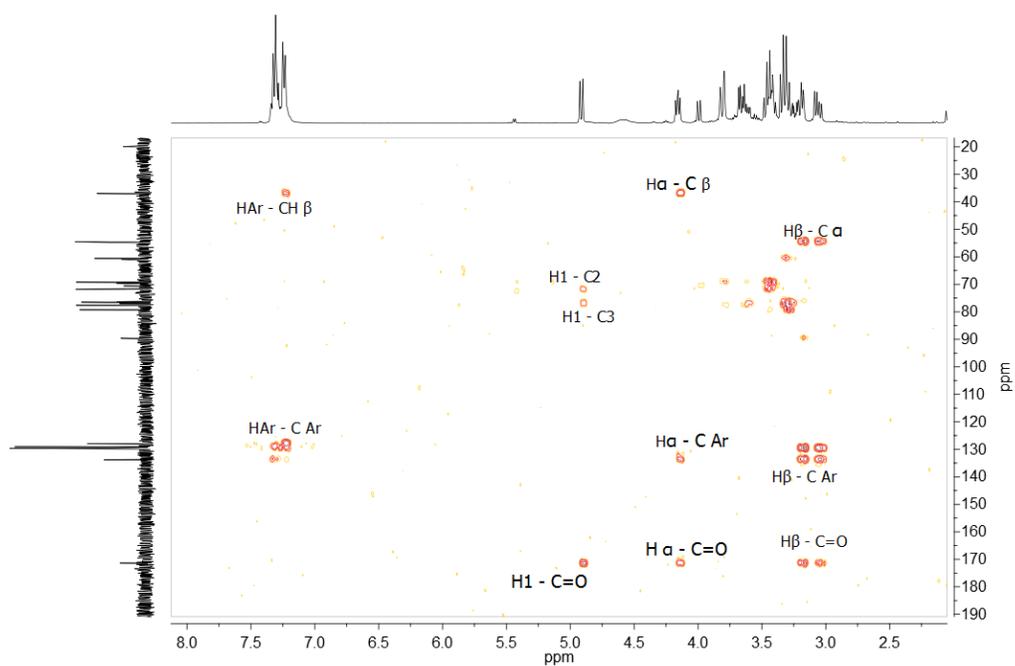


### 7.26 Espectro $^{13}\text{C}$ RMN DEPT 90 para (8)

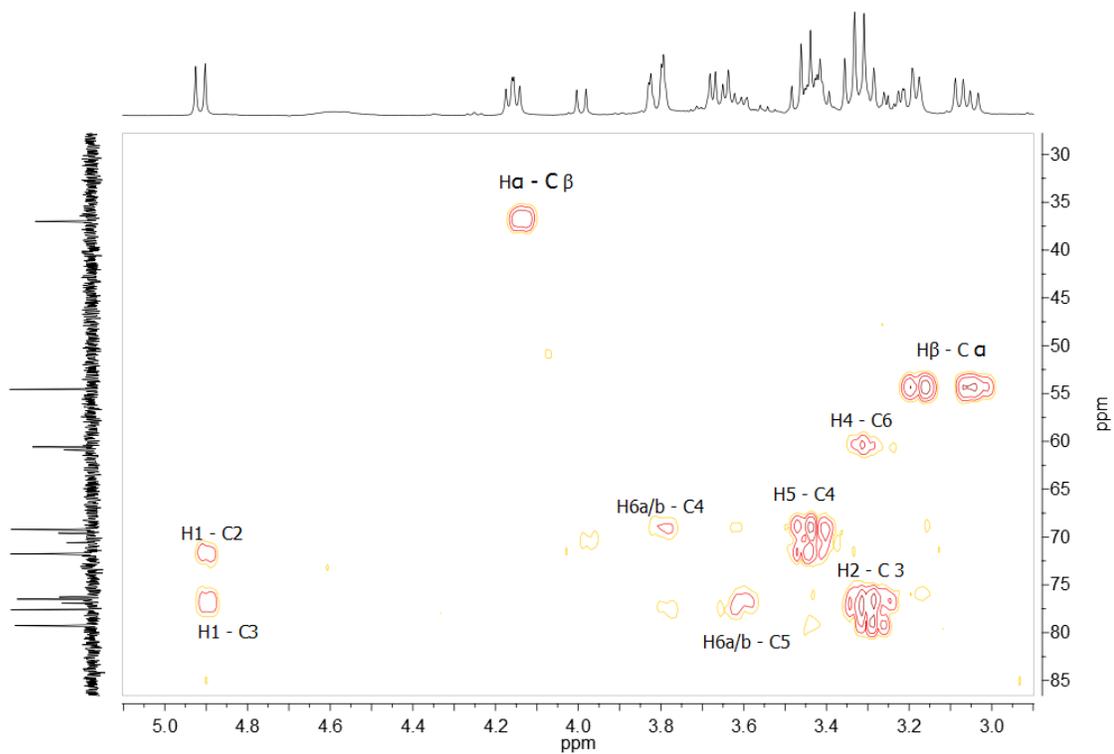


### 7.27 Espectro $^{13}\text{C}$ RMN DEPT 135 para (8)



7.28 Espectro  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  RMN HMQC para (8)7.29 Espectro  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  RMN HMBC para (8)

7.30 Ampliación espectro  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  RMN HMBC para (8)



## Bibliografía

1. Ahmad, T. A.; Rammah, S. S.; Sheweita, S. A.; Haroun, M.; El-Sayed, L. H., Development of immunization trials against *Pasteurella multocida*. *Vaccine* **2014**, 32 (8), 909-917.
2. FAO, *El conejo cría y patología*. 1996; Vol. N°. 19.
3. Ringler, D. H.; Peter, G. K.; Chrisp, C. E.; Keren, D. F., Protection of rabbits against experimental pasteurellosis by vaccination with a potassium thiocyanate extract of *Pasteurella multocida*. *Infection and Immunity* **1985**, 49 (3), 498-504.
4. Griffin, D., Economic Impact Associated with Respiratory Disease in Beef Cattle. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice* **1997**, 13 (3), 367-377.
5. Bureau, F.; Michaux, C.; Coghe, J.; Uystepuyst, C.; Leroy, P. L.; Lekeux, P., Spirometric performance in Belgian Blue calves: II. Analysis of environmental factors and estimation of genetic parameters. *Journal of animal science* **2001**, 79 (5), 1162-1165.
6. Harper, M.; Boyce, J. D.; Adler, B., *Pasteurella multocida* pathogenesis: 125 years after Pasteur. *FEMS Microbiology Letters* **2006**, 265 (1), 1-10.
7. Glorioso, J. C.; Jones, G. W.; Rush, H. G.; Pentler, L. J.; Darif, C. A.; Coward, J. E., Adhesion of type A *Pasteurella multocida* to rabbit pharyngeal cells and its possible role in rabbit respiratory tract infections. *Infection and Immunity* **1982**, 35 (3), 1103-1109.
8. Boyce, J. D.; Chung, J. Y.; Adler, B., *Pasteurella multocida* capsule: composition, function and genetics. *Journal of Biotechnology* **2000**, 83 (1-2), 153-160.
9. Davies, R. L.; MacCorquodale, R.; Reilly, S., Characterisation of bovine strains of *Pasteurella multocida* and comparison with isolates of avian, ovine and porcine origin. *Veterinary Microbiology* **2004**, 99 (2), 145-158.
10. Sharon, N.; Ofek, I., Safe as mother's milk: Carbohydrates as future anti-adhesion drugs for bacterial diseases. *Glycoconjugate Journal* **2000**, 17 (7), 659-664.
11. Zopf, D.; Roth, S., Oligosaccharide anti-infective agents. *The Lancet* **1996**, 347 (9007), 1017-1021.
12. Varki, A., Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct. *Glycobiology* **1993**, 3 (2), 97-130.

13. Osborn, H. M. I.; Evans, P. G.; Gemmell, N.; Osborne, S. D., Carbohydrate-based therapeutics. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* **2004**, 56 (6), 691-702.
14. Yarema, K. J.; Bertozzi, C. R., Chemical approaches to glycobiology and emerging carbohydrate-based therapeutic agents. *Current Opinion in Chemical Biology* **1998**, 2 (1), 49-61.
15. Tian, G.-Z.; Wang, X.-L.; Hu, J.; Wang, X.-B.; Guo, X.-Q.; Yin, J., Recent progress of sugar amino acids: Synthetic strategies and applications as glycomimetics and peptidomimetics. *Chinese Chemical Letters* **2015**, 26 (8), 922-930.
16. Boons, G.-J., Strategies in Oligosaccharide Synthesis. *Tetrahedron* **1996**, 52 (4), 1095-1121.
17. Salvador, L. A.; Elofsson, M.; Kihlberg, J., Preparation of building blocks for glycopeptide synthesis by glycosylation of Fmoc amino acids having unprotected carboxyl groups. *Tetrahedron* **1995**, 51 (19), 5643-5656.
18. Linke, D.; Goldman, A., *Bacterial Adhesion Chemistry, Biology and Physics*. 2011; p 373.
19. Tripathi, R.; Upadhyaya, K.; Singh, K.; Tiwari, N. K., Recent Developments on Carbohydrate-based Anti-infective Agents. *Trends In Carbohydrate Research*, **2015**, 7 (4), 1-21.
20. Gentilli, M.; Francesconi, O., Carbohydrate-based drugs on the market: overview and future directions. In *Carbohydrate Chemistry: State of the Art and Challenges for Drug Development*, Cipolla, L., Ed. Imperial College Press: London, 2016; Vol. 1, pp 481 - 499.
21. Oppenheimer, S. B.; Alvarez, M.; Nnoli, J., Carbohydrate-based experimental therapeutics for cancer, HIV/AIDS and other diseases. *Acta Histochemica* **2008**, 110 (1), 6-13.
22. Carrillo, M.; Martinez, N.; Patiño, P.; Iregui, C., Inhibition of *Pasteurella multocida* adhesion to rabbit respiratory epithelium using lectins. *Veterinary Medicine International* **2015**, 2015, 1 - 10.
23. Hartmann, M.; Papavlassopoulos, H.; Chandrasekaran, V.; Grabosch, C.; Beiroth, F.; Lindhorst, T. K.; Röhl, C., Inhibition of bacterial adhesion to live human cells: Activity and cytotoxicity of synthetic mannosides. *FEBS Letters* **2012**, 586 (10), 1459-1465.

24. Al-Ghazzewi, F. H.; Tester, R. F., Inhibition of the adhesion of *Escherichia coli* to human epithelial cells by carbohydrates. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre* **2014**, *4* (1), 1-5.
25. Seyhan, E., *Química Orgánica Estructura y reactividad*. España, 2004; Vol. 2.
26. Seeberger, P. H.; Haase, W.-C., Solid-Phase Oligosaccharide Synthesis and Combinatorial Carbohydrate Libraries. *Chemical Reviews* **2000**, *100* (12), 4349-4394.
27. -S., H. D. N., *Chemical modification of lignocellulosic materials*. New York, 1996.
28. K. Kochetkov, N., Solid-phase synthesis of oligosaccharides and glycoconjugates. *Russian Chemical Reviews* **2000**, *69* (9), 795-820.
29. Yao, N.; Fung, G.; Malekan, H.; Ye, L.; Kurth, M. J.; Lam, K. S., Facile synthesis of glycosylated Fmoc amino acid building blocks assisted by microwave irradiation. *Carbohydrate Research* **2010**, *345* (15), 2277-2281.
30. Kallin, E.; Lönn, H.; Norberg, T.; Elofsson, M., Derivatization Procedures for Reducing Oligosaccharides, Part 3: Preparation of Oligosaccharide Glycosylamines, and Their Conversion Into Glycosaccharide - Acrylamide Copolymers. *Journal of Carbohydrate Chemistry* **1989**, *8* (4), 597-611.
31. Arsequell, G.; Valencia, G., O-glycosyl  $\alpha$ -amino acids as building blocks for glycopeptide synthesis. *Tetrahedron: Asymmetry* **1997**, *8* (17), 2839-2876.
32. Jarrahpour, A. A.; Alvand, P.; Arab, R.; Beheshti, A., Synthesis of N-(2-hydroxy-3-methoxybenzylidene) - 2, 3, 4, 6-tetra-O-acetyl - $\beta$ -D galactopyranosylamine as a new chiral Schiff base for asymmetric [2+2] cycloadditions. *Molbank* **2005**, *4*, 1-2.
33. Goebel, M.; Nothofer, H.-G.; Roß, G.; Ugi, I., A facile synthesis of per-O-alkylated glycono- $\delta$ -lactones from per-O-alkylated glycopyranosides and a novel ring contraction for pyranoses. *Tetrahedron* **1997**, *53* (9), 3123-3134.
34. Kornhauser, A.; Keglević, D., Glycosyl esters of amino acids. *Carbohydrate Research* **1969**, *11* (3), 407-411.
35. Wang, L. F.; Kong, L. Q.; Fan, L.; Yang, D. C., Facile synthesis of chiral N-glycosylated amino acids. *Research on Chemical Intermediates* **2010**, *36* (3), 237-243.

36. Bejugam, M.; Flitsch, S. L., An Efficient Synthetic Route to Glycoamino Acid Building Blocks for Glycopeptide Synthesis. *Organic Letters* **2004**, 6 (22), 4001-4004.
37. Paolini, I.; Nuti, F.; de la Cruz Pozo-Carrero, M.; Barbetti, F.; Kolesinska, B.; Kaminski, Z. J.; Chelli, M.; Papini, A. M., A convenient microwave-assisted synthesis of N-glycosyl amino acids. *Tetrahedron Letters* **2007**, 48 (16), 2901-2904.
38. van Ameijde, J.; Albada, H. B.; Liskamp, R. M. J., A convenient preparation of several N-linked glycoamino acid building blocks for efficient solid-phase synthesis of glycopeptides. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1* **2002**, (8), 1042-1049.
39. Valentekovic, S.; Keglević, D., Syntheses and rearrangements of d-glucosyl esters of aspartic acid linked through the 1- or 4-carboxyl group. *Carbohydrate Research* **1976**, 47, 35-48.
40. Real-Fernández, F.; Nuti, F.; Bonache, M. A.; Boccalini, M.; Chimichi, S.; Chelli, M.; Papini, A. M., Microwave-assisted reaction of glycosylamine with aspartic acid. *Amino Acids* **2010**, 39 (2), 599-604.
41. Kröger, L.; Henkensmeier, D.; Schäfer, A.; Thiem, J., Novel O-glycosyl amino acid mimetics as building blocks for O-glycopeptides act as inhibitors of galactosidases. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2004**, 14 (1), 73-75.
42. Montalbetti, C. A. G. N.; Falque, V., Amide bond formation and peptide coupling. *Tetrahedron* **2005**, 61 (46), 10827-10852.
43. Hudson, D., Methodological implications of simultaneous solid-phase peptide synthesis. 1. Comparison of different coupling procedures. *The Journal of Organic Chemistry* **1988**, 53 (3), 617-624.
44. Valeur, E.; Bradley, M., Amide bond formation: beyond the myth of coupling reagents. *Chemical Society Reviews* **2009**, 38 (2), 606-631.
45. Madeleine, M. J.; Kenneth, M. L., Evolution of amide bond formation. *Archive for organic chemistry* **2010**, 8, 189-250.
46. Basavaprabhu; Vishwanatha, T. M.; Panguluri, N. R.; Sureshbabu, V. V., Propanephosphonic Acid Anhydride (T3P®) - A Benign Reagent for Diverse Applications Inclusive of Large-Scale Synthesis. *Synthesis* **2013**, 45 (12), 1569-1601.
47. Dunetz, J. R.; Xiang, Y.; Baldwin, A.; Ringling, J., General and Scalable Amide Bond Formation with Epimerization-Prone Substrates Using T3P and Pyridine. *Organic Letters* **2011**, 13 (19), 5048-5051.

48. Llanes, G. A., T3P: A Convenient and Useful Reagent in Organic Synthesis. *Synlett* **2007**, 8, 1328-1329.
49. Waghmare, A. A.; Hindupur, R. M.; Pati, H. N., Propylphosphonic anhydride (T3P®): An expedient reagent for organic synthesis. *Review Journal of Chemistry* **2014**, 4 (2), 53-131.
50. Mukhopadhyay, B.; Russell, D. A.; Field, R. A., One-pot acetalation–acetylation of sugar derivatives employing perchloric acid immobilised on silica. *Carbohydrate Research* **2005**, 340 (6), 1075-1080.
51. Nekkinda, J. Preparation of Organocatalysts Derived from Monosaccharides. CHARLES UNIVERSITY IN PRAGUE, Prague, 2012.
52. Park, J.; Rader, L. H.; Thomas, G. B.; Danoff, E. J.; English, D. S.; DeShong, P., Carbohydrate-functionalized cationic surfactant vesicles: preparation and lectin-binding studies. *Soft Matter* **2008**, 4 (9), 1916-1921.
53. Xavier, N. M.; Rauter, A. P.; Queneau, Y., Carbohydrate-Based Lactones: Synthesis and Applications. In *Carbohydrates in Sustainable Development II*, Rauter, A. P.; Vogel, P.; Queneau, Y., Eds. Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 2010; pp 19-62.
54. Blondelle. Sylvie, E.; Houghten. Richard, A., Comparison of 55% TFA/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> and 100% TFA for Boc group removal during solid-phase peptide synthesis. *International Journal of Peptide and Protein Research* **1993**, 41, 522 - 527.
55. Vergel, C.; Rivera, Z.; Rosas, J.; García, J., Efficient Synthesis of Peptides with 4-Methylpiperidine as Fmoc Removal Reagent by Solid Phase Synthesis. *Journal of the Mexican Chemical Society* **2014**, 58 (4), 386 - 392.
56. Khan, R.; Konowicz, P.; Gardossi, L.; Matulová, M.; de Gennaro, S., Regioselective deacetylation of fully acetylated mono- and disaccharides with hydrazine hydrate. *Australian Journal of Chemistry* **1996**, 49, 293 - 298.
57. Fritz, J. S.; Schenk, G. H., Acid-Catalyzed Acetylation of Organic Hydroxyl Groups. *Analytical Chemistry* **1959**, 31 (11), 1808-1812.
58. Wang, Z.; Matin, M.; Sheikh, S., Facile Preparation of Peracetates and Per-3-bromobenzoates of  $\alpha$ -Mono- and Disaccharides. *Molecules* **2005**, 10 (10), 1325.
59. Farrell, M.; Zhou, J.; Murphy, P. V., Regiospecific Anomerisation of Acylated Glycosyl Azides and Benzoylated Disaccharides by Using TiCl<sub>4</sub>. *Chemistry – A European Journal* **2013**, 19 (44), 14836-14851.

60. Painter, E. P., The Anomerization of Sugar Acetates. Glucose Pentaacetates in Acetic Acid—Acetic Anhydride Mixtures Catalyzed by Sulfuric and Perchloric Acids. *Journal of the American Chemical Society* **1953**, 75 (5), 1137-1146.
61. Soli, E.; Manoso, A.; Patterson, M.; DeShong, P., Azide and Cyanide Displacements via Hypervalent Silicate Intermediates. *The Journal of Organic Chemistry* **1999**, 64 (9), 3171 - 3177.
62. Dupuis, S. N.; Robertson, A. W.; Veinot, T.; Monro, S. M. A.; Douglas, S. E.; Syvitski, R. T.; Goralski, K. B.; McFarland, S. A.; Jakeman, D. L., Synthetic diversification of natural products: semi-synthesis and evaluation of triazole jadomycins. *Chemical Science* **2012**, 3 (5), 1640-1644.
63. Wen, S.; Guo, Z., Unprotected Oligosaccharides as Phase Tags: Solution-Phase Synthesis of Glycopeptides with Solid-Phase Workups. *Organic Letters* **2001**, 3 (23), 3773-3776.
64. Mohammed, A.; Jwad, R., Synthesis and NMR Study of Some Important Glucopyranosyl Derivatives. *Journal of Kerbala University* **2011**, 9 (1), 43 - 48.
65. Anastas, P.; Eghbali, N., Green chemistry: principles and practice. *Chemical Society Reviews* **2010**, 39, 301 - 312.
66. Panda, H., *The Complete Book on Water Soluble Gums and Resins*: . New Delhi, India, 2011; Vol. 1.
67. Meinjohanns, E.; Meldal, M.; Paulsen, H.; A. Dwek, R.; Bock, K., Novel sequential solid-phase synthesis of N-linked glycopeptides from natural sources. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1* **1998**, (3), 549-560.
68. Euticalis, T3P - Propane Phosphonic Acid Anhydride The coupling agent of the future. Euticalis, Ed. 2012.