

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**



TESIS DOCTORAL

**Estudios sobre la síntesis de algunos disacáridos de interés  
biológico**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR  
PRESENTADA POR

**María Encarnación Chacón Fuertes**

DIRECTOR:

**M Martín López**

Madrid, 2015

CHA



**ESTUDIOS SOBRE LA SINTESIS DE  
ALGUNOS DISACARIDOS  
DE INTERES BIOLOGICO**

X-53-053826-0

**MEMORIA**

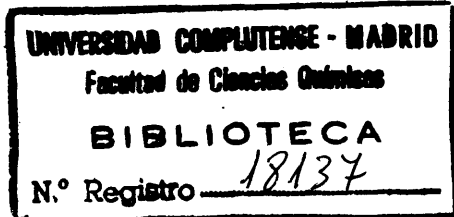
*Presentada en la  
Universidad Complutense para  
optar al grado de doctor en Ciencias  
Químicas, por:*

**M<sup>a</sup> ENCARNACION CHACON FUERTES**

Instituto de Productos Lácteos

Instituto de Química Orgánica General

C.S.I.C.



Madrid, diciembre, 1975

Este trabajo se ha realizado en el Laboratorio de Química Biológica del Instituto de Productos Lácteos y en la Sección de Enzimoquímica del Instituto de Química Orgánica, del Consejo Superior de Investigaciones Científicas, bajo la dirección del Investigador Científico Dr. M. Martín Lomas, a quien expreso mi más sincero agradecimiento.

Quiero, asimismo, expresar mi gratitud al Prof. J. L. Soto, Catedrático de Química Orgánica de la Facultad de -- Ciencias de la Universidad Complutense, por haber aceptado ser ponente de esta Tesis; al Prof. A. Alemany, a la Srta. M<sup>a</sup> D. Casado y al Sr. J. Prieto del Instituto de Química - Orgánica por su colaboración en el cálculo de los espectros el registro de los mismos y los análisis elementales res-- pectivamente; y a la Dr. J. Bellanato del Instituto Daza - de Valdés por los espectros IR.

Igualmente agradezco, al director del Instituto de -- Productos Lácteos Prof. D. Martín, al director del Institu-- to de Química Orgánica Prof. F. Fariñas, al Jefe del Depar-- tamento de Enzimoquímica Prof. E. Fernández Alvarez y al - personal de estos centros la colaboración prestada en todo momento.

## INDICE

1. INTRODUCCION	1
2. RESULTADOS Y DISCUSION	19
2.1. LAS REACTIVIDADES RELATIVAS DE LOS GRUPOS HI DROXILO DE LA 1,6-ANHIDRO- $\beta$ - <u>D</u> -GALACTOPIRANO- SA y 2- <u>O</u> -ACETIL-1,6-ANHIDRO- $\beta$ - <u>D</u> -GALACTOPIRA- NOSA EN REACCIONES DE ACETILACION	20
2.1.1. Introducci3n	20
2.1.2. La acetilaci3n parcial de la 1,6-anhi dro- $\beta$ - <u>D</u> -galactopiranososa	25
2.1.3. La acetilaci3n parcial de la 2- <u>O</u> -ace- til-1,6-anhidro- $\beta$ - <u>D</u> -galactopiranososa	36
2.1.4. Estudio de las reactividades relati-- vas de los grupos hidroxilos en la - 1,6-anhidro- $\beta$ - <u>D</u> -galactopiranososa y 2- <u>O</u> - -acetil-1,6-anhidro- $\beta$ - <u>D</u> -galactopirano- sa. Migraci3n de grupos acetilo en de- rivados parcialmente acetilados	40
2.1.5. Consideraciones sobre los espectros - de RMN de los derivados acetilados de la 1,6-anhidro- $\beta$ - <u>D</u> -galactopiranososa	47

2.2. SINTESIS QUIMICA Y ESTUDIO ESTRUCTURAL DE LOS DISACARIDOS 4-O- $\alpha$ - y - $\beta$ -D-GALACTOPIRANOSIL-D- GALACTOSA y 3-O- $\alpha$ - y - $\beta$ -D-GALACTOPIRANOSIL-D- GALACTOSA	53
2.2.1. Introducci3n	53
2.2.2. Condensaci3n del bromuro de 2,3,4,6-te tra-O-acetil- $\alpha$ -D-galactopiranosilo con 2,3-di-O-acetil-1,6-anhidro- $\beta$ -D-galac- topiranosil-D-galactosa y 4-O- $\beta$ -D-ga-- lactopiranosil-D-galactosa	53
2.2.3. Condensaci3n del bromuro de 2,3,4,6-te tra-O-acetil- $\alpha$ -D-galactopiranosilo con 2,4-di-O-acetil-1,6-anhidro- $\beta$ -D-galac- topiranosil-D-galactosa y 3-O- $\beta$ -D-ga-- lactopiranosil-D-galactosa	68
2.2.4. Condensaci3n del bromuro de 2,3,4,6-te tra-O-acetil- $\alpha$ -D-galactopiranosilo con 2-O-acetil-1,6-anhidro- $\beta$ -D-galactopira nosa. Sntesis de 3-O- $\beta$ -D-galactopira- nosil-D-galactosa	75
2.2.5. Espectros de RMN de los derivados pera cetilados de los disac3ridos 4-O- $\alpha$ - y - $\beta$ -D-galactopiranosil-D-galactosa y - 3-O- $\alpha$ - y - $\beta$ -D-galactopiranosil-D-galac tosa	79

2.3. EL MECANISMO DE LAS REACCIONES DE GLICOSILACION EN PRESENCIA DE CATALIZADORES SOLUBLES. ESTRUCTURA Y FUNCION DE LOS CIANO DERIVADOS FORMADOS EN GLICOSILACIONES CATALIZADAS POR CIANUROS METALICOS	92
2.3.1. Introducci3n	92
2.3.2. La reacci3n del bromuro de 2,3,4,6,-tetra-O-acetil- $\alpha$ -D-glucopiranosilo con cianuro de plata en xileno	98
2.3.3. La reacci3n del bromuro de 2,3,4,6,-tetra-O-acetil- $\alpha$ -D-galactopiranosilo con cianuro merc3rico en nitrometano	114
2.3.4. La reacci3n del bromuro de 2,3,4,6,-tetra-O-acetil- $\alpha$ -D-galactopiranosilo con cianuro de plata en xileno	121
2.3.5. La reacci3n del bromuro de 2,3,4,6,-tetra-O-acetil- $\alpha$ -D-glucopiranosilo con cianuro merc3rico en nitrometano	127
2.3.6. Discusi3n	131
2.3.7. Desacetilaci3n de los ciano derivados	135
3. PARTE EXPERIMENTAL	150
3.1. PROCEDIMIENTOS GENERALES	151

3.2. ACETILACIONES PARCIALES DE LA 1,6-ANHIDRO- $\beta$ - <u>D</u> -GALACTOPIRANOSA y 2-O-ACETIL-1,6-ANHIDRO-- $\beta$ - <u>D</u> -GALACTOPIRANOSA. ESTUDIO DE LAS REACTIVIDADES RELATIVAS DE LOS GRUPOS HIDROXILO	153
3.2.1. Bromuro de 2,3,4,6-tetra-O-acetil- $\alpha$ - <u>D</u> -galactopiranosilo	153
3.2.2. 1,6-anhidro- $\beta$ - <u>D</u> -galactopiranososa	154
3.2.3. 3,4-O-isopropiliden-1,6-anhidro- $\beta$ - <u>D</u> --galactopiranososa	155
3.2.4. 2-O-acetil-3,4-O-isopropiliden-1,6-anhidro- $\beta$ - <u>D</u> -galactopiranososa	156
3.2.5. 2-O-acetil-1,6-anhidro- $\beta$ - <u>D</u> -galactopiranososa	156
3.2.6. La acetilación parcial de la 1,6-anhidro- $\beta$ - <u>D</u> -galactopiranososa	157
3.2.7. La acetilación parcial de la 2-O-acetil-1,6-anhidro- $\beta$ - <u>D</u> -galactopiranososa	161
3.2.8. Migración de grupos acetilo en la 2,3 y 2,4-di-O-acetil-1,6-anhidro- $\beta$ - <u>D</u> -galactopiranosas	162
3.2.8.1. Por adsorción de una placa de gel de sílice	162
3.2.8.2. Por adsorción en columna de gel de sílice	163

3.2.8.3. Por gel de sílice en solución de cloroformo	163
3.2.8.4. En medio alcalino	163
3.2.8.5. Espontaneamente	164
3.2.8.6. En solución de cloroformo	164
3.2.9. Estudio de las reactividades relativas de los grupos hidroxilo en la 1,6-anhidro-β-D-galactopiranososa	164
3.2.10. Estudio de las reactividades relativas de los grupos hidroxilo en la 2-O-acetil-1,6-anhidro-β-D-galactopiranososa	166
3.3. SINTESIS QUIMICA DE LOS DISACARIDOS 4-O-α- y -β-D-GALACTOPIRANOSIL-D-GALACTOSA y 3-O-α- y -β-D-GALACTOPIRANOSIL-D-GALACTOSA	167
3.3.1. Condensación del bromuro de 2,3,4,6-tetra-O-acetil-α-D-galactopiranosilo con 2,3-di-O-acetil-1,6-anhidro-β-D-galactopiranososa	167
3.3.2. 4-O-α-D-galactopiranosil-D-galactopiranososa	170
3.3.3. 4-O-β-D-galactopiranosil-D-galactosa	171

3.3.4. Condensación del bromuro de 2,3,4,6-tetra-O-acetil-D-galactopiranosilo - con 2,4-di-O-acetil-1,6-anhidro-β-D-galactopiranososa	172
3.3.5. 3-O-β-galactopiranosil-D-galactosa	175
3.3.6. 3-O-α-galactopiranosil-D-galactosa	175
3.3.7. 1,2,4,6-tetra-O-acetil-3-O-(2,3,4,6-tetra-O-acetil-α-D-galactopiranosil) -β-D-galactopiranososa	176
3.3.8. Condensación del bromuro de 2,3,4,6-tetra-O-acetil-α-D-galactopiranosilo con 2-O-acetil-1,6-anhidro-β-D-galactopiranososa	177
 3.4. LAS REACCIONES DE LOS BROMUROS DE 2,3,4,6-TETRA-O-ACETIL-α-D-GLUCOPIRANOSILO Y 2,3,4,6-TETRA-O-ACETIL-β-D-GALACTOPIRANOSILO CON CIANUROS METALICOS	 179
3.4.1. Preparación de cianuro de 2,3,4,6-tetra-O-acetil-β-D-galactopiranosilo	179
3.4.2. Condensación del bromuro de 2,3,4,6-tetra-O-acetil-α-D-galactopiranosilo con cianuro mercurico en nitrometano. Aislamiento de productos secundarios	180

3.4.3. Condensación del bromuro de 2,3,4,6-tetra- <u>O</u> -acetil- $\beta$ - <u>D</u> -galactopiranosilo con cianuro de plata en xileno	183
3.4.4. Preparación de 3,4,6-tri- <u>O</u> -acetil-1,2- <u>O</u> -(1-cianoetiliden)- $\alpha$ - <u>D</u> -glucopiranososa	184
3.4.5. Condensación del bromuro de 2,3,4,6-tetra- <u>O</u> -acetil- $\alpha$ - <u>D</u> -glucopiranosilo - con cianuro de plata en xileno. Aislamiento de productos secundarios	186
3.4.6. Preparación de cianuro de 2,3,4,6-tetra- <u>O</u> -acetil- $\beta$ - <u>D</u> -glucopiranosilo	188
3.4.7. Desacetilación de los ciano derivados	189
3.4.7.1. Desacetilación del cianuro de 2,3,4,6-tetra- <u>O</u> -acetil- $\beta$ - <u>D</u> -galactopiranososa	189
3.4.7.2. Desacetilación de la 3,4,6-tri- <u>O</u> -acetil-1,2- <u>O</u> -(1-cianoetiliden)- $\alpha$ - <u>D</u> -glucopiranososa	191
4. CONCLUSIONES	193
BIBLIOGRAFIA	203

## 1. INTRODUCCION

En esta Tesis, se desarrollan las síntesis químicas de algunos disacáridos de interés biológico dentro de un programa general dirigido a la elucidación de la estructura y función, en sistemas vivos, de moléculas compuestas por hidratos de carbono<sup>1</sup>. La síntesis de estos disacáridos ha implicado la preparación de nuevos derivados específicamente bloqueados de monosacáridos y con la idea de encontrar las mejores condiciones de síntesis, se ha realizado también un estudio de algunas reacciones relacionadas.

Los oligosacáridos, (para revisiones en relación con este tipo de sustancias ver referencias 2-25), son productos típicos de degradación parcial de polisacáridos, forman parte de otras importantes macromoléculas, conjugados carbohidrato-proteína<sup>26</sup> y carbohidrato-lípido<sup>27</sup>, en los seres vivos, y, algunos de ellos, como la trehalosa<sup>19,20</sup>, los oligosacáridos del tipo de la sacarosa<sup>2,3,6,7,12,13,19</sup> y los oligosacáridos de la leche<sup>8,9,11,15,18,19</sup>, se comportan como metabolitos independientes en sistemas biológicos.

Las macromoléculas compuestas por hidratos de carbono han sido objeto de considerable atención en la pasada década. La mayor parte de estas investigaciones han estado dirigidas al estudio de la estructura y los mecanismos de biosíntesis de peptidoglicanos y lipopolisacáridos de las paredes de células bacterianas<sup>28-32</sup> y a la elucidación del metabolismo y la estructura de glicoproteínas<sup>26</sup>, glicolípidos<sup>27,33</sup> y glicosaminoglicanos<sup>34</sup> en mamíferos.

Muchos de estos carbohidratos complejos están asociados con la superficie celular y es un área de creciente interés el estudio de la estructura de las membranas celulares, particularmente la organización y las interacciones de los lípidos, proteínas y carbohidratos que las componen. Trabajos recientes<sup>35</sup>, sugieren que glicoproteínas y glicoesfingolípidos constituyen la parte más externa de la membrana plasmática de células de mamíferos, con sus oligosacáridos situados hacia el exterior de la compacta estructura lipoproteica que constituye la membrana, formando estructuras relativamente rígidas y con una conformación dependiente en alto grado de los monosacáridos presentes, las posiciones en que estos se hallan unidos y la configuración de los enlaces glicosílicos. Esta rigidez estructural parece estar relacionada con la gran especificidad de las reacciones de estos complejos con aglutininas, virus, anticuerpos, enzimas, y con su actividad antigénica.

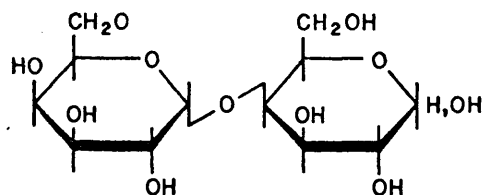
Por otra parte, las sustancias específicas de los grupos sanguíneos que se encuentran en los fluidos de los tejidos y en las secreciones, son macromoléculas compuestas por hidratos de carbono unidos covalentemente a proteína<sup>36</sup>. Aunque la estructura de estas moléculas no ha sido aún establecida, sus propiedades parecen indicar que están formadas por una serie de oligosacáridos, ramificando un esqueleto peptídico. Estas estructuras, cuya formación está genéticamente controlada, confieren a las moléculas un alto grado de especificidad inmunológica y existen hechos que permiten concluir que esta especificidad viene determinada por la secuencia de azúcares en el extremo no reductor de la cadena de hidrato de carbono. Las estructuras responsables de la especificidad no están tampoco definitivamente asignadas y aunque el determinante antigénico que los anticuerpos humanos son capaces de reconocer, comprende probablemente tres o cuatro azúcares, la contribución fundamental a la especificidad corresponde al terminal no reductor. A este respecto se ha sugerido<sup>37</sup> que los oligosacáridos determinantes actúan en solución en una conformación definida y que la función de ciertas unidades de hidratos de carbono próximas al terminal, consiste en mantener al oligosacárido en esta conformación, de tal modo, que el terminal de la cadena presente la geometría óptima para reaccionar con los centros activos del anticuerpo<sup>38</sup>.

El estudio de la estructura de estas complejas sustancias y de la función que desempeñan, en las membranas celulares

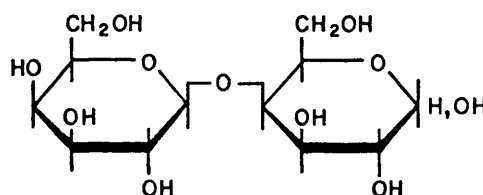
res, ó en las sustancias específicas de los grupos sanguíneos no unidos a membrana, hace deseable disponer de compuestos - puros, preparados por síntesis, y de sustancias modelo que - faciliten la interpretación de los resultados obtenidos a -- partir de material biológico. En efecto, en los últimos años la espectroscopia de RMN, la difracción de rayos X, medidas de superficie, métodos calorimétricos, dispersión óptica rotatoria y dicroísmo circular, resonancia de espín electrón - y otros métodos físicos, han aportado una considerable infor- mación sobre la estructura de importantes macromoléculas. -- Sin embargo, la aplicación de técnicas físicas a macromolécu- las compuestas por hidratos de carbono complejos, componen-- tes de membranas celulares o de sustancias específicas de -- grupo sanguíneo, cuenta con escasos antecedentes debido, pro- bablemente, a su complejidad estructural. Es esta compleji-- dad estructural la que hace deseable la preparación y el es- tudio de sustancias de síntesis y sistemas modelo de las -- que puede obtenerse información que puede ser valiosa en el estudio de la estructura y función de las macromoléculas bio- lógicas.

El trabajo que se presenta en esta Memoria ha estado - dirigido, siguiendo la línea arriba apuntada y dentro de un programa recientemente iniciado<sup>1</sup>, a la síntesis química y el estudio estructural de algunos oligosacáridos de galactosa - presentes en glicosfingolípidos de membranas celulares y en sustancias específicas de los grupos sanguíneos. En esta Te-

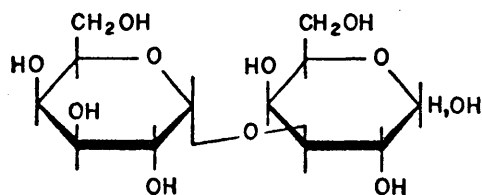
sis se describen las síntesis químicas de los disacáridos -  
 4-O- $\alpha$ -D-galactopiranosil-D-galactosa (1), 4-O- $\beta$ -D-galactopi-  
 ranosil-D-galactosa (2), 3-O- $\alpha$ -D-galactopiranosil-D-galacto-  
 sa (3) y 3-O- $\beta$ -D-galactopiranosil-D-galactosa (4).



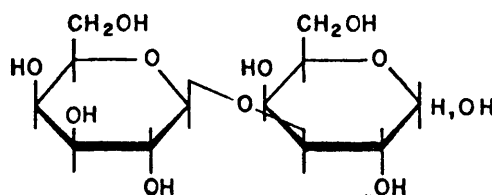
1



2



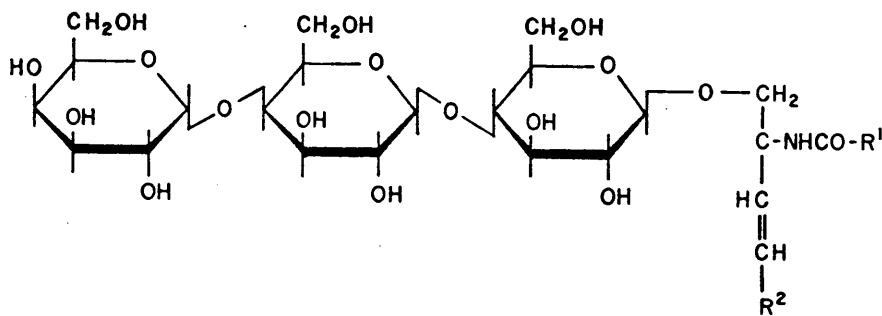
3



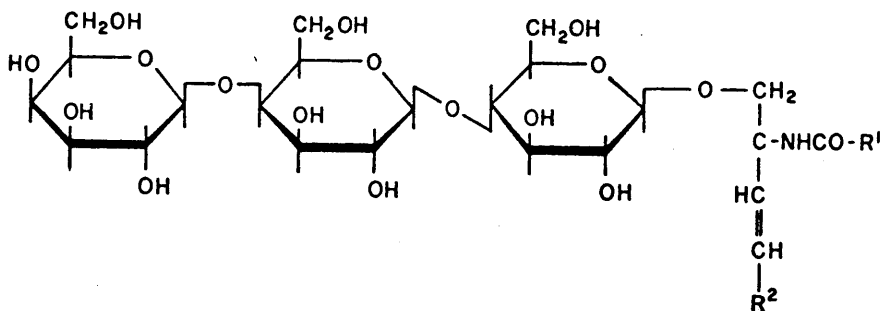
4

La síntesis de los disacáridos 4-O- $\alpha$ -D-galactopiranosil-D-galactosa (1) y 4-O- $\beta$ -D-galactopiranosil-D-galactosa (2) - se ha emprendido en relación con los trabajos ya iniciados<sup>1</sup> de aplicación de técnicas físicas al estudio de glicosfingo lípidos de membranas celulares. Recientemente, se han pro- - puesto, casi simultáneamente, las estructuras de 1-O-{4-O(4-O- $\alpha$ -D-galactopiranosil)- $\beta$ -D-galactopiranosil}- $\beta$ -D-glucopira- nosil ceramida (5) y 1-O-{4-O-(4-O- $\beta$ -D-galactopiranosil)- $\beta$ -D

galactopiranosil}- $\beta$ -D-glucopiranosil ceramida (6)<sup>42,43</sup>, para un glicoesfingolípido que se acumula en el riñón de pacien--



5



6

tes con la enfermedad de Fabry, y que se encuentra también - en el riñón humano normal y en los eritrocitos<sup>39-43</sup>. Aunque la controversia sobre la estructura del glicoesfingolípido - parece zanjada a favor de la estructura 5<sup>43,44</sup>, las síntesis de los disacáridos terminales, 4-O- $\alpha$ -D-galactopiranosil-D-galactosa (1) y 4-O- $\beta$ -D-galactopiranosil-D-galactosa

(2), descritas en esta Tesis, representan un paso indispensable hacia la síntesis total inequívoca del producto natural y el estudio de la conformación de ambos disacáridos por métodos físicos puede, además, ser de utilidad en relación con estudios estructurales en glicoesfingolípidos de la membrana celular.

Por otra parte, las síntesis químicas de los disacáridos 3-O- $\alpha$ -D-galactopiranosil-D-galactosa (3) y 3-O- $\beta$ -D-galactopiranosil-D-galactosa (4), descritas en la presente Memoria, están directamente conectadas con el estudio de la estructura de la sustancia específica de grupo sanguíneo B en humanos. El disacárido 3-O- $\alpha$ -D-galactopiranosil-D-galactosa (3) es el terminal no reductor de la sustancia del grupo sanguíneo B<sup>55-57</sup> y su síntesis química y la de su isómero con enlace glicosílico  $\beta$  (4), descritas en esta Tesis, representan un importante paso en el estudio del mecanismo de reacciones serológicas específicas.

Las dos 1  $\rightarrow$  4  $\alpha$  y  $\beta$  galactosilgalactosas (1 y 2) se han sintetizado químicamente por primera vez en esta Tesis y son conocidas como sustancias aisladas de productos naturales. El disacárido 4-O- $\alpha$ -D-galactopiranosil-D-galactosa (1) ha sido obtenido previamente por hidrólisis parcial del mucílago del okra común<sup>45</sup>, por reversión enzimática de la D-galactosa con  $\alpha$ -galactosidasa<sup>46,47</sup> y por reducción de esteres del ácido 4-O- $\alpha$ -D-galactopiranosilurónico-D-galacturónico<sup>48</sup>.

El disacárido 4-O-β-D-galactopiranosil-D-galactosa (2), ha sido también aislado de hidrolizados parciales de varios polisacáridos de origen vegetal<sup>49-53</sup> y existe en la literatura un previo intento de síntesis<sup>54</sup>; las constantes físicas de la sustancia sintética, no coinciden, sin embargo, con las descritas para el producto natural.

El disacárido 3-O-α-D-galactopiranosil-D-galactosa (3) se ha sintetizado por primera vez en este trabajo, aunque, como en el caso de los disacáridos 1 y 2, la sustancia ha sido previamente aislada de los hidrolizados parciales de λ-carragenina<sup>58</sup> y por polimerización enzimática de la D-galactosa<sup>46,47</sup>. El disacárido 3-O-β-D-galactopiranosil-D-galactosa (4) se ha obtenido también con anterioridad de los hidrolizados parciales de varios polisacáridos<sup>59-74</sup> y se ha sintetizado previamente por un método diferente al descrito en esta Memoria<sup>76</sup>.

Existen, en principio, dos posibles aproximaciones a la síntesis química de oligosacáridos: la conversión de un oligosacárido fácilmente asequible en otro, sin formación de nuevo enlace glicosílico en la transformación y la creación de un enlace glicosílico entre los monosacáridos componentes.

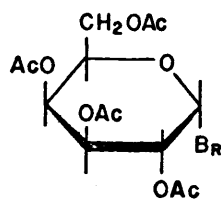
Dentro de la primera aproximación, se han utilizado métodos muy conocidos en la química de monosacáridos, para acortar o alargar la cadena carbonada de oligosacáridos reduc

tores<sup>4,20,76,77</sup>, convertir la unidad reductora de un oligosacárido en otro por transposición<sup>4,19,20,78,79</sup>, transformar la molécula de un oligosacárido neutro en un oligosacárido de ácido urónico<sup>80-82</sup>, invertir la configuración de enlaces glicosílicos<sup>83,84</sup> o desplazar un grupo hidroxilo de un oligosacárido por grupos desoxi, aminodesoxi o ceto<sup>85</sup>.

La segunda aproximación citada, que es el procedimiento más general de obtención de oligosacáridos, implica la creación de enlaces glicosílicos entre monosacáridos por sustitución nucleofílica en un centro anomérico<sup>23,24</sup> y requiere, por una parte, la presencia de un grupo saliente apropiado en el carbono anomérico del monosacárido glicosilante y por otra, la disponibilidad de derivados específicamente protegidos para ser utilizados como componente aglicónico. Con relación al agente glicosilante empleado y las condiciones de la reacción se han utilizado diferentes derivados y distintos métodos de condensación. Los más comunes utilizan haluros de glicosilo protegidos e incluyen la conocida reacción de Koenigs-Knorr<sup>4,10,17,19-22,90-93</sup>, la modificación de Meys tre y Miescher<sup>94</sup>, la modificación de Helferich<sup>95,96</sup> el empleo de haluros de glicosilo con un grupo no participante en C-2<sup>25,97</sup> y el método de Lemieux<sup>98,99</sup>. Otros hacen uso de otros agentes glicosilantes, como ortoesteres<sup>23,100</sup> y menos comunmente anhídridos de azúcares<sup>101-103</sup> acetatos<sup>104-105</sup>, derivados reductores<sup>106,107</sup> y glicales<sup>108</sup>.

En cuanto al componente aglicónico la protección de to dos los grupos hidroxilos, a excepción del de la posición -- que se desea glicosilar, es un problema a resolver en cada caso de acuerdo con el tipo de oligosácarido que se pretende obtener e implica el estudio de la reactividad de cada grupo hidroxilo frente al reactivo protector y al agente glicosilante. Desgraciadamente, el conocimiento de los factores que gobiernan la reactividad de los grupos hidroxilo en hidratos de carbono es actualmente insuficiente<sup>109,110</sup> y aunque se conoce una gran cantidad de derivados parcialmente bloqueados, la elección del derivado adecuado depende de la síntesis específica a realizar.

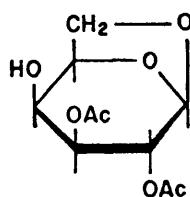
Las síntesis de los disacáridos 1-4 descritas en esta Tesis se ha realizado de acuerdo con la segunda aproximación citada, por condensación de bromuro de 2,3,4,6,-tetra-O-acetil- $\alpha$ -D-galactopiranosilo (7) con 2,3-di-O-acetil-1,6-anhidro- $\beta$ -D-galactopiranososa (8) (disacáridos 1 y 2) y 2,4-di-O-acetil-1,6-anhidro- $\beta$ -D-galactopiranososa (9), (disacáridos 3 y 4)



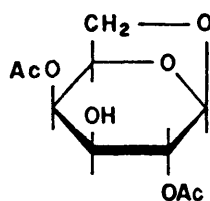
7

Los dos diacetatos, 2,3-di-O-acetil-1,6-anhidro- $\beta$ -D-galactopiranososa (8) y 2,4-di-O-acetil-1,6-anhidro- $\beta$ -D-galacto-

piranosa (9), se han obtenido en el presente trabajo por acetilación parcial de la 1,6-anhidro- $\beta$ -D-galactopiranosa (10)

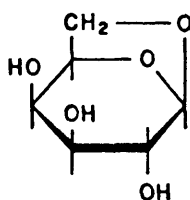


8

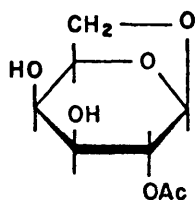


9

y 2-O-acetil-1,6-anhidro- $\beta$ -D-galactopiranosa (11) y su obtención ha implicado el estudio de las reactividades relativas de los grupos hidroxilo de ambos compuestos (10 y 11). Por otra parte, el establecimiento de las estructuras de los dos



10



11

diacetatos (8 y 9) se ha realizado tras un minucioso estudio de sus espectros de RMN y de los espectros de RMN de otros derivados de 1,6-anhidro hexosas y este estudio ha permitido determinar la conformación preferida de las 1,6-anhidro galactosas parcialmente acetiladas 8, 9 y 11, estudiar la interconversión de los dos diacetatos 8 y 9 y diseñar un método para el estudio cinético de la acetilación de la 1,6-anhidro  $\beta$ -D-galactopiranosa (10) y la 2-O-acetil-1,6-anhidro- $\beta$ -D-galactopiranosa (11).

La condensación del bromuro de 2,3,4,6-tetra-O-acetil- $\alpha$ -D-galactopiranosilo (7) con 2,3-di-O-acetil-1,6-anhidro- $\beta$ -D-galactopiranososa (8) y 2,4-di-O-acetil-1,6-anhidro- $\beta$ -D-galactopiranososa (9) se ha llevado a cabo por el procedimiento de Helferich<sup>95,96</sup>. De los métodos citados para la obtención de disacáridos, la reacción de Koenigs-Knorr y el método del ortoester dan lugar, preferentemente, a enlaces glicosílicos 1,2-trans; el método de Lemieux y la reacción de Koenigs-Knorr a partir de haluros de glicosilo con un sustituyente no participante en C-2, forman, a menudo, enlaces glicosílicos 1,2-cis. En disolventes polares y en presencia de catalizadores fuertemente complejantes, de acuerdo con la modificación de Helferich<sup>95,96</sup>, la reacción conduce frecuentemente a una mezcla de disacáridos con enlaces glicosílicos 1,2-cis y 1,2-trans. Como, dentro del planteamiento de este trabajo y a efectos de comparación, ha sido necesario obtener las dos 1  $\rightarrow$  4 galactosilgalactosas con enlaces glicosílicos  $\alpha$  (compuesto 1) y  $\beta$  (compuesto 2) y las dos 1  $\rightarrow$  3  $\alpha$  y  $\beta$  galactosilgalactosas (compuestos 3 y 4), las condensaciones se han llevado a cabo por éste último procedimiento y los cuatro disacáridos 1 - 4 se han obtenido con rendimientos aceptables.

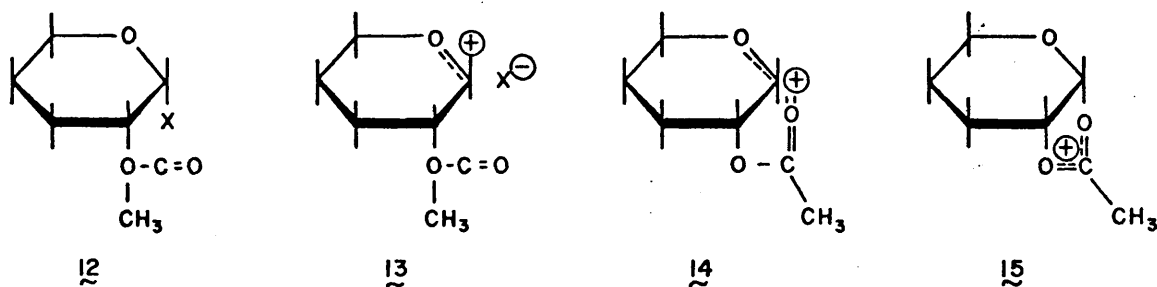
La síntesis de los disacáridos 1-4 se han intentado -- también, en una sola condensación, por reacción del bromuro 7 con la 2-O-acetil-1,6-anhidro- $\beta$ -D-galactopiranososa (11). -- Los resultados obtenidos en esta reacción indican que, en -- las condiciones empleadas, el grupo hidroxilo axial en C-3 -

del compuesto 11 es el más reactivo en la reacción de glicosilación y que la reacción constituye un método fácil y conveniente de síntesis de 3-O-β-D-galactopiranosil-D-galactosa (4).

La determinación de las configuraciones anoméricas de los disacáridos obtenidos 1-4 se ha determinado a partir de los espectros de RMN de sus derivados paracetilados. La complejidad de los espectros ha hecho necesario su estudio en diversos disolventes y su análisis mediante un programa de cálculo. Este estudio espectroscópico ha conducido, por otra parte, a la determinación de la conformación de los derivados paracetilados de los disacáridos 1-4 en solución lo que constituye una información valiosa para el conocimiento de las conformaciones de los disacáridos 1-4 en medio acuoso y para el estudio de sus interacciones con otros compuestos de interés biológico por espectroscopia de RMN.

La síntesis de disacáridos por formación de un enlace glicosílico entre dos monosacáridos, en presencia de un catalizador soluble fuertemente complejante, ( $\text{Hg}(\text{CN})_2$ ,  $\text{Hg Br}_2$  o  $\text{AgClO}_4$ ), implica interesantes problemas mecanísticos de un indudable interés práctico. Actualmente sólo existen datos fragmentarios sobre el mecanismo de las reacciones de glicosilación<sup>25,92,111</sup> y ninguno de los mecanismos propuestos ha sido comprobado en un sentido estricto.

La reacción en presencia de sales mercuricas en benceno, conduce casi exclusivamente a disacáridos con enlace glicosílico 1,2-trans mientras que en un disolvente más polar,, como el nitrometano, lleva, preferentemente, a glicósidos -- 1,2-cis. Un mecanismo propuesto para estas glicosilaciones es el de sustitución nucleofílica de primer orden en base a la fácil formación, a partir del halogenuro de glicosilo peracilado (12), de un catión glicosílico estabilizado por resonancia (13) que, interaccionando con los orbitales p del oxígeno carbonílico del grupo acetoxilo en C-2 (14) o formando un ión aciloxonio (15), sea atacado por un grupo alcoholi-

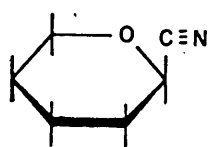


co del componente aglicónico formando el glicósido 1,2-trans cuando la reacción se realiza en disolventes no polares, o - que, sin formación del ión aciloxonio (15), conduzca a una - mezcla de glicósidos 1,2-cis y 1,2-trans cuando la reacción transcurre en disolventes polares.

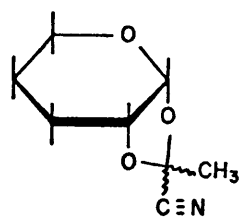
En esta Tesis y con objeto de aportar nuevos datos sobre el mecanismo de la reacción de glicosilación en presen--

cia de catalizadores solubles, se ha reinvestigado la reacción de haluros de glicosilo peracetilados con cianuros metálicos.

Trabajos anteriores<sup>112,113</sup> han demostrado que la reacción de haluros de cis- $\alpha$ -acetoxi-glicopiranosilo (12) con cianuro de plata y cianuro mercurico da lugar, al menos, a dos tipos de compuestos que contienen nitrógeno: cianuros de  $\beta$ -D-glicopiranosilo peracetilados (16) y 1,2-O-(1-cianoetilidén)- $\alpha$ -D-glicopiranosas (17).

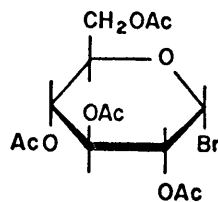


16



17

En el trabajo que constituye esta Memoria se ha estudiado la reacción de los bromuros de 2,3,4,6-tetra-O-acetil- $\alpha$ -D-galactopiranosilo (7) y 2,3,4,6-tetra-O-acetil- $\alpha$ -D-glucopiranosilo (18) con cianuro mercurico y cianuro de plata en nitrometano y xileno, se han aislado la mayor parte de los -



18

productos formados en la reacción, se han determinado sus estructuras y discutido, con base en los resultados obtenidos, su papel en las reacciones de glicosilación en presencia de cianuros metálicos.

Los resultados obtenidos se describen y discuten en la Parte 2 de esta Tesis, RESULTADOS Y DISCUSION, divididos en tres capítulos. En el primero de ellos (capítulo 2.1.) se presentan los resultados obtenidos en la acetilación parcial de la 1,6-anhidro- $\beta$ -D-galactopiranososa (10) y 2-O-acetil-1,6- $\beta$ -D-galactopiranososa (11) (apartados 2.1.2. y 2.1.3.), se estudian las reactividades relativas de los distintos grupos hidroxilos en ambos compuestos (apartado 2.1.4.) y se discuten los espectros de RMN de los derivados parcialmente acetilados (apartado 2.1.5.). En el segundo capítulo (2.2.) se describen las síntesis de los disacáridos 4-O- $\alpha$ -D-galactopiranosil-D-galactosa (1) y 4-O- $\beta$ -D-galactopiranosil-D-galactosa (2) (apartado 2.2.2.) y 3-O- $\alpha$ -D-galactopiranosil-D-galactosa (3) y 3-O- $\beta$ -D-galactopiranosil-D-galactosa (4) (apartado 2.2.3.), se estudia la condensación del bromuro de 2,3,4,6-tetra-O-acetil- $\alpha$ -D-galactopiranosilo (7) con 2-O-acetil-1,6-anhidro- $\beta$ -D-galactopiranososa (11) (apartado 2.2.4.) y se analizan los espectros de RMN de los derivados octaacetilados de los disacáridos 1-4 (apartado 2.2.5.). El tercer capítulo (2.3.) presenta los resultados obtenidos en la reacción

de los bromuros de 2,3,4,6-tetra-O-acetil- $\alpha$ -D-glucopiranosilo (18) y 2,3,4,6 -tetra-O-acetil- $\alpha$ -D-galactopiranosilo (7) con cianuro de plata (apartados 2.3.2. y 2.3.4.) y con cianuro mercurico (apartados 2.3.3. y 2.3.5.) en xileno y nitrometano. Finalmente, en la Parte 3 (PARTE EXPERIMENTAL) se reseñan los procedimientos experimentales seguidos en esta Tesis y en la última parte (CONCLUSIONES) se enumeran las conclusiones obtenidas.

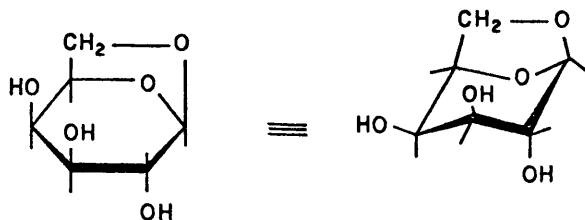
## 2. RESULTADOS Y DISCUSION

2.1. LAS REACTIVIDADES RELATIVAS DE LOS GRUPOS HIDROXILO DE LA 1,6-ANHIDRO- $\beta$ -D-GALACTOPIRANOSA (8) Y LA 2-O-ACETIL-1,6-ANHIDRO- $\beta$ -D-GALACTOPIRANOSA (9) EN LA REACCION DE ACETILACION.

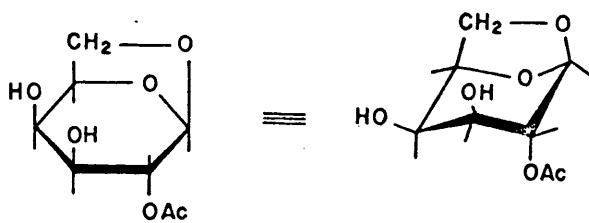
#### 2.1.1. INTRODUCCION

La síntesis de los disacaridos 4-O- $\alpha$ -D-galactopiranosil-D-galactosa (1), 4-O- $\beta$ -D-galactopiranosil-D-galactosa (2), 3-O- $\alpha$ -D-galactopiranosil-D-galactosa (3) y 3-O- $\beta$ -D-galactopiranosil-D-galactosa (4), por creación de un enlace glicosílico con la configuración adecuada entre dos unidades de galactosa, ha requerido la preparación de derivados de galactosa específicamente protegidos. La preparación de derivados de galactosa con todos los grupos hidroxilos bloqueados a excepción del hidroxilo en C-4, para ser utilizados en la síntesis de los disacáridos 1 y 2 ó en C-3, para ser utilizados en la síntesis de los disacáridos 3 y 4, se ha realizado en esta Tesis por acetilación parcial de -

la 1,6-anhidro- $\beta$ -D-galactopiranososa (10) y de la 2-O-acetil--  
1,6-anhidro- $\beta$ -D-galactopiranososa (11).



10



11

Las 1,6-anhidro- $\beta$ -D-hexopiranosas parcialmente esterificadas se han utilizado previamente en la síntesis de disacáridos y otros derivados de hidratos de carbono<sup>54,114,120</sup>. La obtención de estos derivados específicamente esterificados, requiere el estudio de las reactividades relativas de los diferentes grupos hidroxilo en la reacción de esterificación.

Las diferentes reactividades de los grupos hidroxilo de azúcares están plenamente demostradas y existen numerosos es-

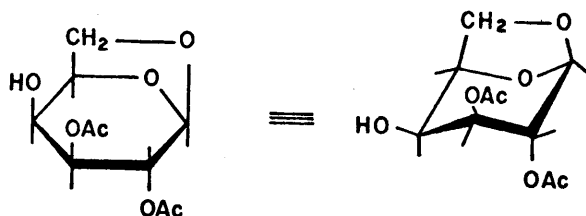
tudios sobre acilaciones y alquilaciones selectivas<sup>121-122</sup>; - la mayor parte de estos estudios han estado dirigidos a la obtención de derivados parcialmente sustituidos para ser utilizados en síntesis. Los factores que influyen la reactividad relativa de los hidroxilos de azúcares, no son, sin embargo, suficientemente conocidos. Algunas de las diferencias de reactividad observadas pueden explicarse desde el punto de vista de la Química Orgánica clásica, como la mayor reactividad de los hidroxilos primarios o la mayor reactividad del hidroxilo en C-2 de entre los secundarios debido, en este último caso, al efecto activante del centro anomérico<sup>121</sup>. Afirmaciones tan generales como éstas tienen, no obstante, sus excepciones, como ha podido comprobarse en estudios de sulfonación<sup>122</sup> y bencilación<sup>123</sup> parcial de derivados de D-manopiranosa.

De los numerosos trabajos publicados en relación con este tema puede concluirse que las reactividades relativas de los grupos hidroxilo dependen de la reacción específica que se estudie, de la naturaleza del reactivo<sup>124</sup>, de las condiciones en que se lleva a cabo la reacción y de otros muchos factores dependientes de la naturaleza del azúcar, factores configuracionales y conformacionales<sup>121-123,125</sup>, participación de grupos vicinales, migraciones de grupos acilos<sup>110,121</sup> y formación de enlaces de hidrógeno intramoleculares<sup>126</sup>.

La consideración de cada uno de estos factores por separado puede no conducir a la determinación del orden de reactividad de los grupos hidroxilo de un azúcar dado, siendo necesario en cada caso, utilizar una aproximación cinética que permita evaluar la influencia cuantitativa de todos estos efectos<sup>127,128</sup>.

Los estudios realizados sobre acilaciones o alquilaciones selectivas de 1,6-anhidro-hexopiranosas y sus derivados<sup>114,126,129-133</sup>, parecen concluir que si bien todos los grupos hidroxilo se acilan o alquilan fácilmente, los ecuatoriales lo hacen preferentemente a los axiales siendo un grupo axial en C-3 el menos reactivo debido al impedimento estérico que supone la presencia del puente etéreo 1,6.

En relación con la esterificación selectiva de la 1,6-anhidro- $\beta$ -D-galactopiranososa (10) y de la 2-O-acetil-1,6-anhidro- $\beta$ -D-galactopiranososa (11), Shapiro y colaboradores<sup>114</sup> han descrito que, en contraste con este orden de reactividad establecido para las 1,6-anhidrohexopiranosas, la acetilación parcial de 10 con 2.5 equivalentes de anhídrido acético en piridina conduce al 2,3 diacetato (8), con un rendimiento del 41% y que el mismo producto (8) se obtiene en la acetilación parcial de 11 con 1.1 equivalentes de anhídrido acético.



8

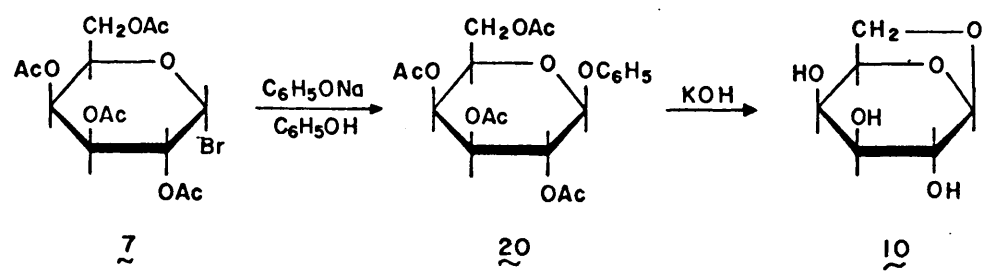
La asignación de la estructura (8) al diacetato obtenido en estas condiciones se hace, en la referida publicación<sup>114</sup> a partir de su espectro de RMN a 60 MHz que muestra las señales correspondientes a los protones metílicos de los acetoxilos a  $\delta$ 2.09 y 2.12 ppm, en contraste con el triacetato (19) - cuyo espectro presenta la señal de los protones metílicos del acetoxilo ecuatorial a 2.02 y las dos señales correspondientes a los protones metílicos de los acetoxilos axiales a 2.14<sup>134</sup>.

El hecho de que el grupo hidroxilo ecuatorial en C-4 - de la 1,6-anhidro- $\beta$ -D-galactopiranososa (10) y 2-O-acetil-1,6-anhidro- $\beta$ -D-galactopiranososa (11) no muestre una reactividad preferente sobre el grupo hidroxilo axial en C-3 indica, de acuerdo con los referidos autores<sup>114</sup>, que otros factores, además de los conformacionales, deben estar implicados en el curso de la acetilación. Este hecho, aparentemente normal, y la necesidad de obtener los derivados diacetilados 8 y 9 para ser utilizados en las síntesis de los disacáridos con enlaces glicosílicos 1-4, (1 y 2) y 1-3 (3 y 4) nos ha llevado a la reinvestigación de la acetilación parcial de 10 y 11.

2.1.2. LA ACETILACION PARCIAL DE LA 1,6-ANHIDRO-β-D-GALACTOPIRANOSA (10)

La 1,6-anhidro-β-D-galactopiranos (10) puede obtenerse por pirólisis del agar<sup>135</sup>, de la D-galactosa<sup>136</sup>, o de la lactosa<sup>137</sup> y por acción de alcalí sobre β-galactósidos<sup>138</sup>. En esta Tesis la sustancia 10, se ha preparado por este último procedimiento, con buen rendimiento, de acuerdo con el esquema 1.

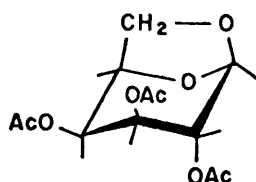
ESQUEMA I



La acetilación parcial de la 1,6-anhidro-β-D-galactopiranos (10) con 2.5 equivalentes de anhídrido acético en piridina en las condiciones previamente descritas<sup>114</sup>, (16 hr a T ambiente y 1 hr a 50°C), dio lugar a una mezcla de productos. Por cromatografía en columna sobre gel de sílice de la mezcla de reacción, se separaron cuatro fracciones.

De la primera fracción se aisló un producto puro (35%), totalmente acetilado que se identificó con la 2,3,4-tri-O-acetil-1,6-anhidro-β-D-galactopiranos<sup>139</sup> (19). En efecto, el es

pectro IR de este producto no mostró absorción  $\nu_{\text{O-H}}$  y presentó bandas a  $1.760 \text{ cm}^{-1}$  y  $1.740 \text{ cm}^{-1}$  asignadas a las vibración  $\nu_{\text{C=O}}$  de los acetoxilos. El espectro de RMN a 100 MHz (fig. 1) presentó singletes a  $\delta$  2.12 ppm (integral total seis protones) y 2.00 (integral total tres protones), asignados a los protones metílicos de los dos acetoxilos axiales en C-2 y C-3 y al grupo metilo del acetoxilo ecuatorial en C-4, respectiva



19

mente. En la región o campo más bajo, el espectro mostró señales a  $\delta$  5.39 ppm, atribuida al protón H-1, ( $J_{1,2}$  1 Hz) y 4.72, asignada al protón H-2 ( $J_{2,3}$  1.5 Hz); un multiplete centrado a -- 5.20 se asignó a los protones H-3 y H-4. Por encima de estas señales, el multiplete a 4.43 se asignó al protón H-5, el doblete a 4.31 al protón H-6endo ( $J_{6\text{endo}, 6\text{exo}}$  7.5 Hz,  $J_{6\text{endo}} \approx 0$  Hz) y el multiplete a 3.70 al protón H-6exo ( $J_{6\text{exo}, 5}$  4.7 Hz). El producto coincidió en todas sus constantes con una muestra auténtica de 2,3,4-tri-O-acetil-1,6-anhidro- $\beta$ -D-galactopiranososa (19) obtenida por acetilación total de 1,6-anhidro- $\beta$ -D-galactopiranososa (10).

La segunda fracción eluida de la columna (52% de la mezcla total), mostró al ser examinada en capa fina, dos manchas

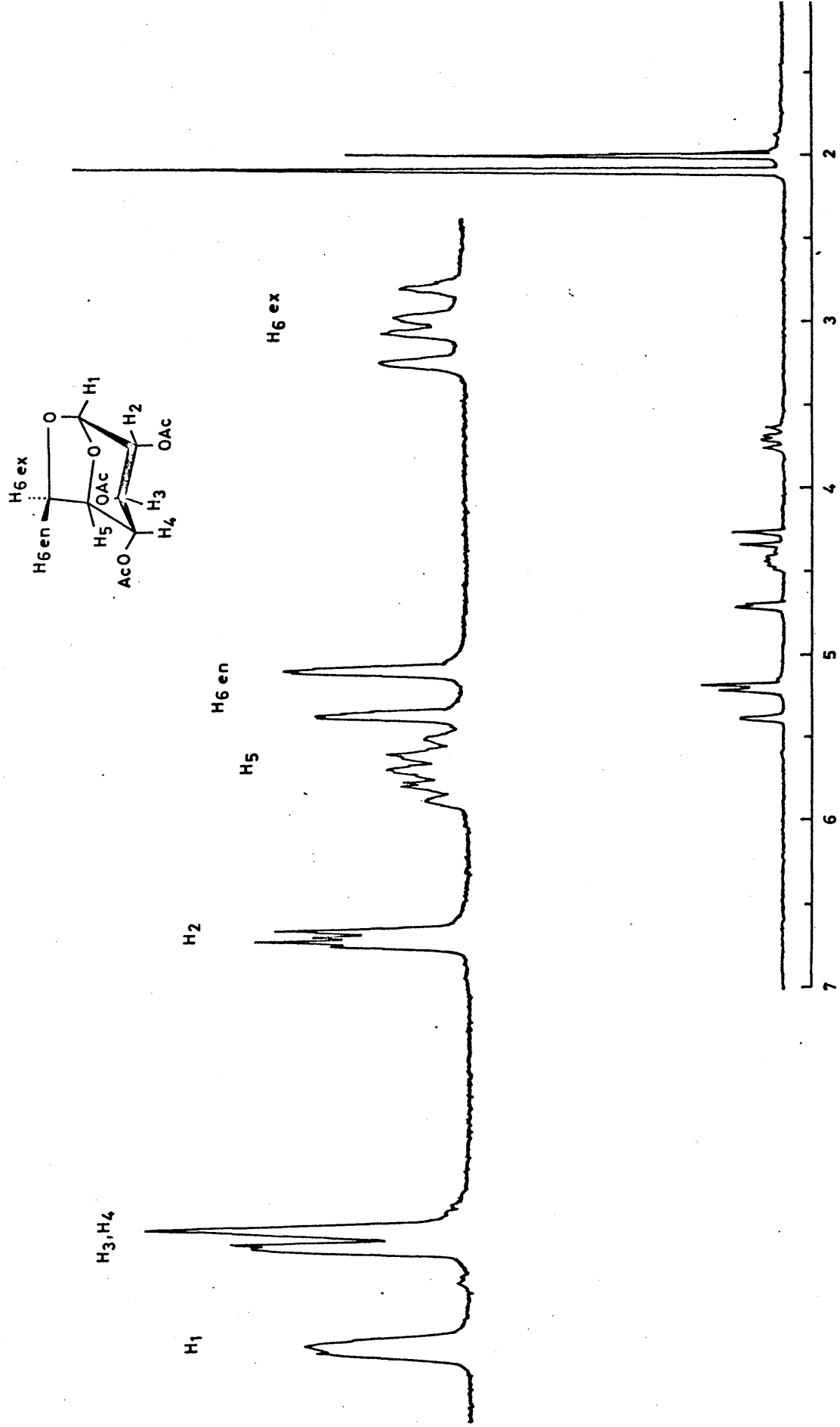
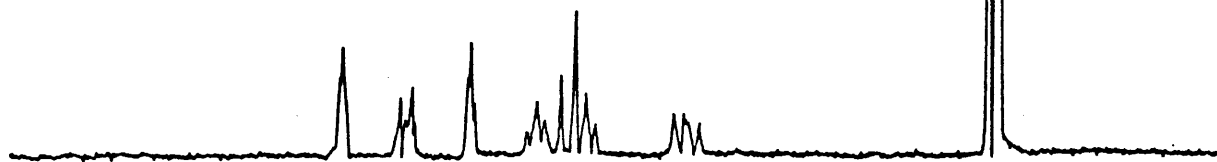
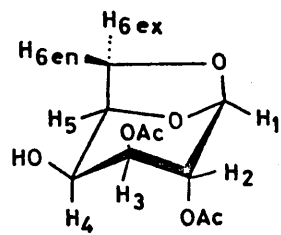


Fig.1 - Espectro de RMN a 100 MHz de 2,3,4 - tri - O - acetil - β - D - galactopiranos (19)

con movilidades cromatográficas muy similares. De hecho, la presencia de dos productos en esta fracción fue sólo detectable en capa fina con algunos eluyentes. Los numerosos intentos realizados para resolver cromatográficamente esta mezcla fueron infructuosos, no obstante, tras repetidas cristalizaciones de éter-hexano, se obtuvo un producto cristalino (50% de la mezcla) cuyas características físicas, p.f. 114-116°C,  $\{\alpha\}_D^{25} - 0,5^\circ$ , coincidieron prácticamente con las descritas por Shapiro<sup>114</sup>, p.f. 113-115°C,  $\{\alpha\}_D^{20} - 0,8^\circ$ , para la 2,4-di-O-acetil-1,6-anhidro- $\beta$ -D-galactopiranososa (8). Por concentración de las aguas madres de cristalización del producto anterior, se obtuvo un compuesto siruposo (50% de la mezcla) prácticamente puro. Los espectros IR de ambos productos presentaron bandas entre  $3.465 \text{ cm}^{-1}$  y  $3.620 \text{ cm}^{-1}$ , que indicaron la presencia de grupos hidroxilos libres y sus espectros de RMN a 100 MHz, en  $\text{Cl}_3\text{CD}$ , mostraron dos singletes (integral total seis protones) en cada caso (fig. 2), demostrando la existencia de dos grupos hidroxilo acetilados en ambos compuestos. La estructura de estos dos derivados diacetilados se estableció por análisis de primer orden de sus espectros de RMN a 100 MHz. Es una regla general<sup>140</sup>, que en RMN los protones metílicos de los acetoxilos ecuatoriales absorben a campo más alto que los correspondientes de acetoxilos axiales. Esta regla se cumple en la 2,3,4,-tri-O-acetil-1,6-anhidro- $\beta$ -D-galactosa (19) (fig. 1) en que el singlete asignado a los protones metílicos del acetoxilo ecuatorial en C-4 aparece a  $\delta$  2.00 ppm y el atribuido a los protones metílicos de los acetoxilos axiales en --



b

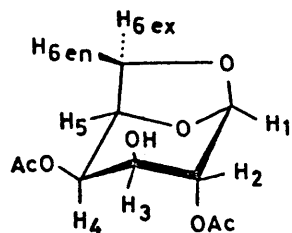


Fig. 2a - Espectro de RMN a 100 MHz de 2,3 - di - O - acetil - 1,6 - anhidro -  $\beta$  - D - galactopiranososa (8)

Fig. 2b - Espectra de RMN a 100 MHz de 2,4 - di - O - acetil - 1,6 - anhidro -  $\beta$  - D - galactopiranososa (9)

C-2 y C-3 a 2.12. En los dos diacetatos aislados en esta segunda fracción las señales correspondientes a los protones metílicos de los acetoxilos aparecieron a 2.10 y 2.14 en el diacetato cristalino (fig. 2a) y a 2.09 y 2.12 en el compuesto siruposo (fig. 2b), sin que pudiera observarse una diferencia clara entre los valores de desplazamientos químicos que permitiera determinar, a partir de ellos, la posición de los grupos acetilo en ambos diacetatos. Sin embargo el análisis de la región  $\delta$ 6-3 ppm permitió establecer las estructuras de los dos compuestos. En el espectro del producto cristalino (fig. 3a), los tripletes a 5.38 y 4.75 se asignaron a los protones H-1 y H-2 ( $J_{1,2} = J_{1,3} = J_{2,3} \approx 1.5$  Hz) respectivamente; el doblete a 4.26 se adscribió al protón H-6endo ( $J_{5,6endo} \approx 0$  Hz,  $J_{6endo,6exo} = 7.5$  Hz), el multiplete a 3.67 al protón H-6exo ( $J_{5,6exo} = 5.0$  Hz,  $J_{5exo,6endo} = 7.5$  Hz) y el triplete a 4.42 al protón H-5 ( $J_{5,6exo} = 5.0$  Hz,  $J_{4,5} = 4.5$  Hz,  $J_{5,6endo} \approx 0$  Hz); los valores de los desplazamientos químicos y la multiplicidad de estas señales fueron similares en los espectros de los dos diacetatos (fig. 3a y b) y en el del triacetato (19) (fig. 1). La diferencia fundamental entre los espectros de los dos diacetatos estribó en las dos señales restantes correspondientes a los protones H-3 y H-4: el multiplete que en el espectro del producto cristalino apareció a 5.08 (fig. 3a) se observó en el espectro del sirupo a 4.10 (fig. 3b) y el triplete a 5.00 en este último espectro (fig. 3b) apareció centrado a 4.17 en el espectro del producto cristalino (fig. 3a), aunque en éste último caso, la señal estuvo parcialmente solapada con uno de los componentes del doblete asignado al protón

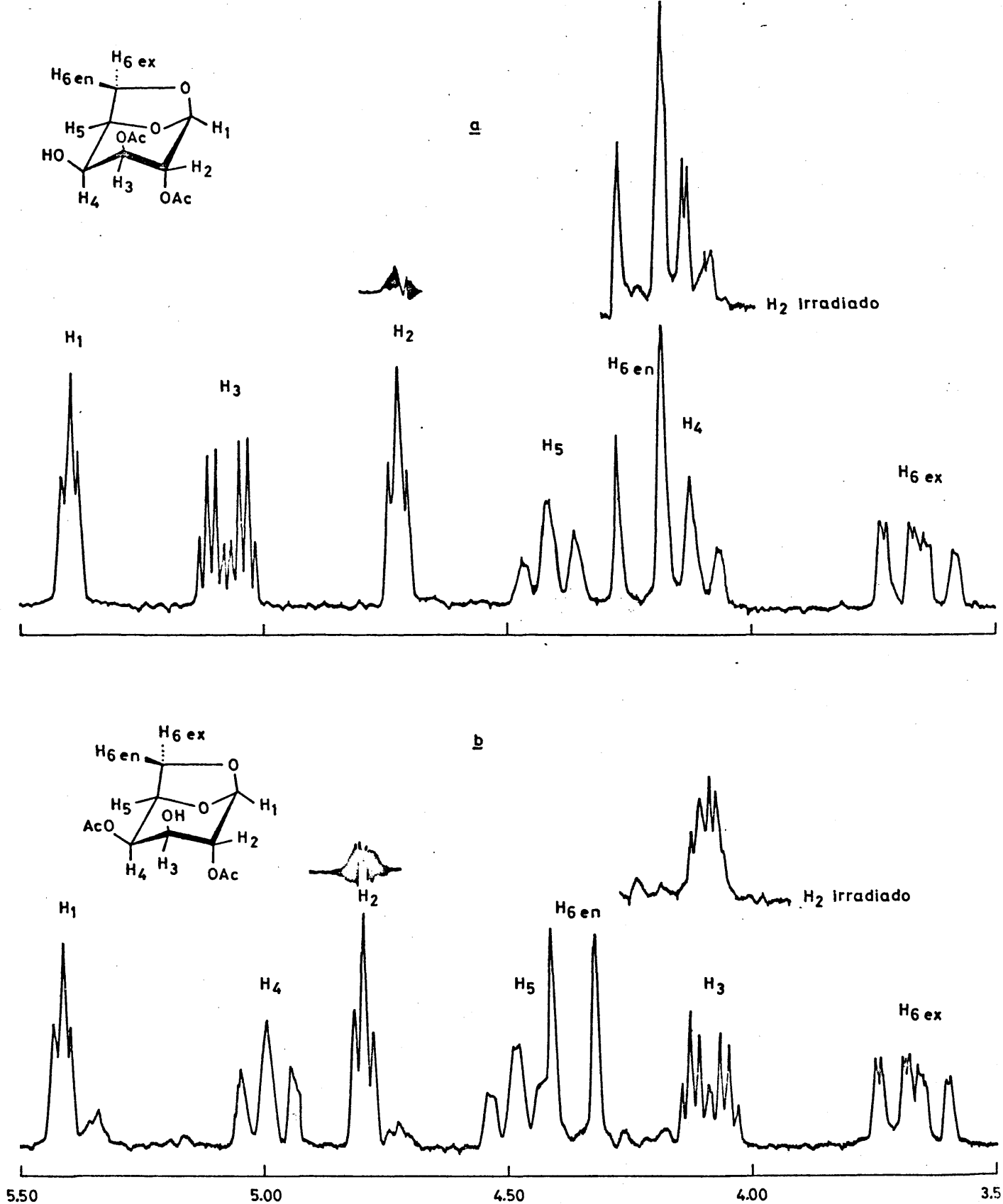


Fig. 3 - La región comprendida entre  $\delta$  3.50 - 5.50 de los espectros de RMN a 100 MHz de  
 a) 2,3 di-O-acetil-1,6 anhidro- $\beta$ -D-galactopiranososa (8)  
 b) 2,4 di-O-acetil-1,6 anhidro- $\beta$ -D-galactopiranososa (9)

H-6endo. La consideración de los desplazamientos químicos y - las constantes de acoplamiento de estas señales y dos experimentos de doble resonancia permitieron su asignación inequívoca. La irradiación de la señal atribuida al protón H-2 en el espectro del producto cristalino no alteró el triplete a 4.17 (fig. 3a); el mismo experimento de doble resonancia en el espectro del sirupo afectó el multiplete a 4.10 (fig. 3b). El multiplete a 5.08 en el espectro del producto cristalino (4.10 en el sirupo) se asignó, por tanto al protón H-3 ( $J_{3,4}$  5.5 Hz,  $J_{2,3} = J_{3,5} = J_{1,3} \approx 1.5$  Hz) y el triplete centrado a 4.17 en el producto cristalino (5.00 en el sirupo) se atribuyó al protón H-4 ( $J_{3,4}$  5.5 Hz,  $J_{4,5}$  4.5 Hz). La estructura del producto cristalino se estableció por tanto como 2,3-di-O-acetil-1,6-anhidro- $\beta$ -D-galactopiranososa (8) y corresponde, muy probablemente al descrito por Shapiro y col<sup>114</sup>, y la del sirupo como 2,4-di-O-acetil-1,6-anhidro- $\beta$ -D-galactopiranososa (9), formada también en la reacción y no detectada por los citados autores.

La tercera fracción eluida de la columna (3% de la mezcla) mostró, al ser examinada en capa fina, la presencia de un producto único. Su espectro IR mostró banda de tensión O-H y su espectro RMN indicó la existencia de un sólo grupo acetilo (fig. 4). Las constantes físicas del producto coincidieron con las de la 2-O-acetil-1,6-anhidro- $\beta$ -D-galactopiranososa (11), preparada por síntesis.

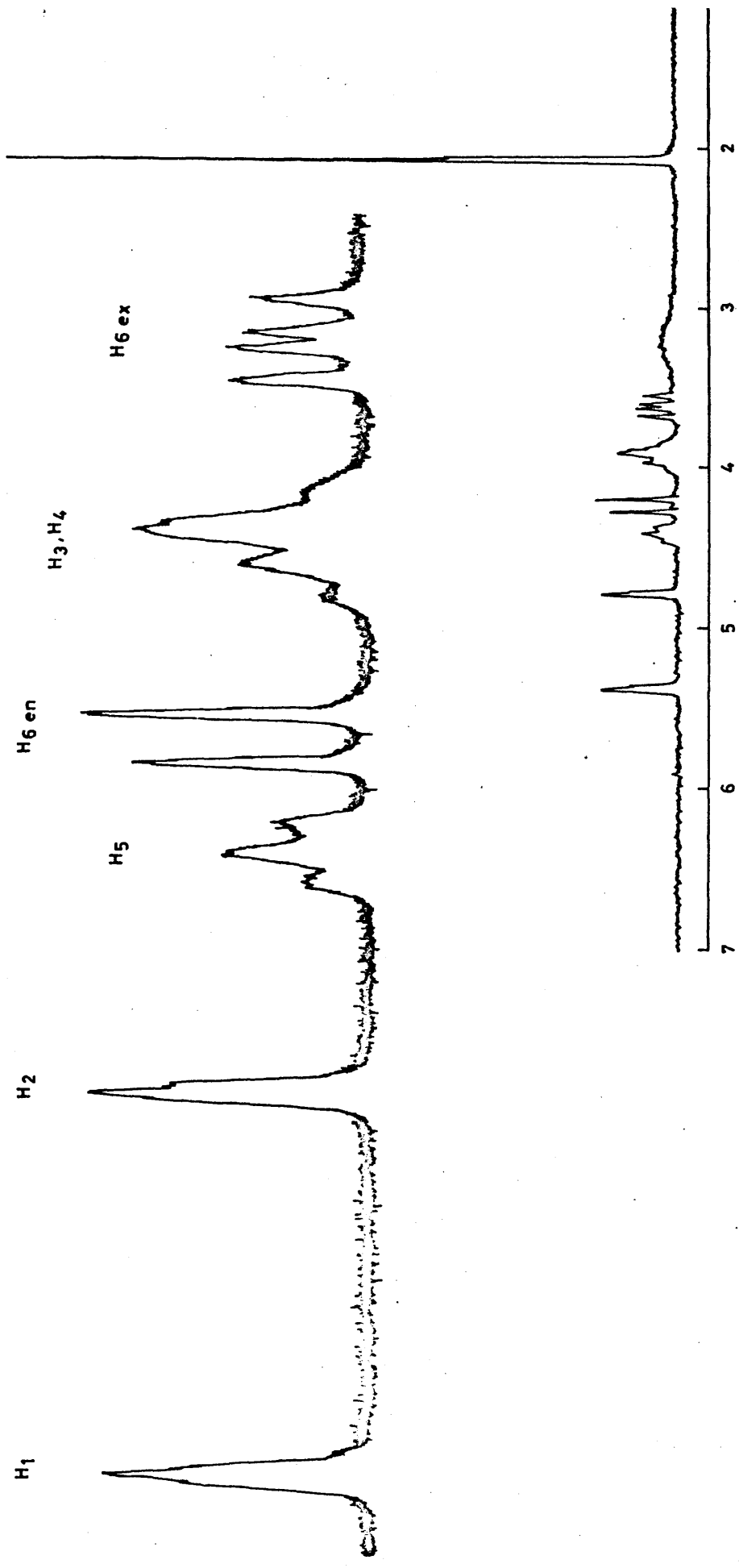
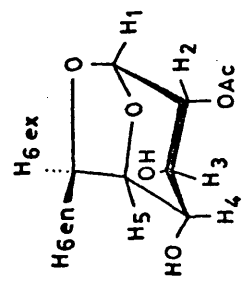
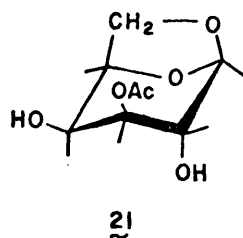


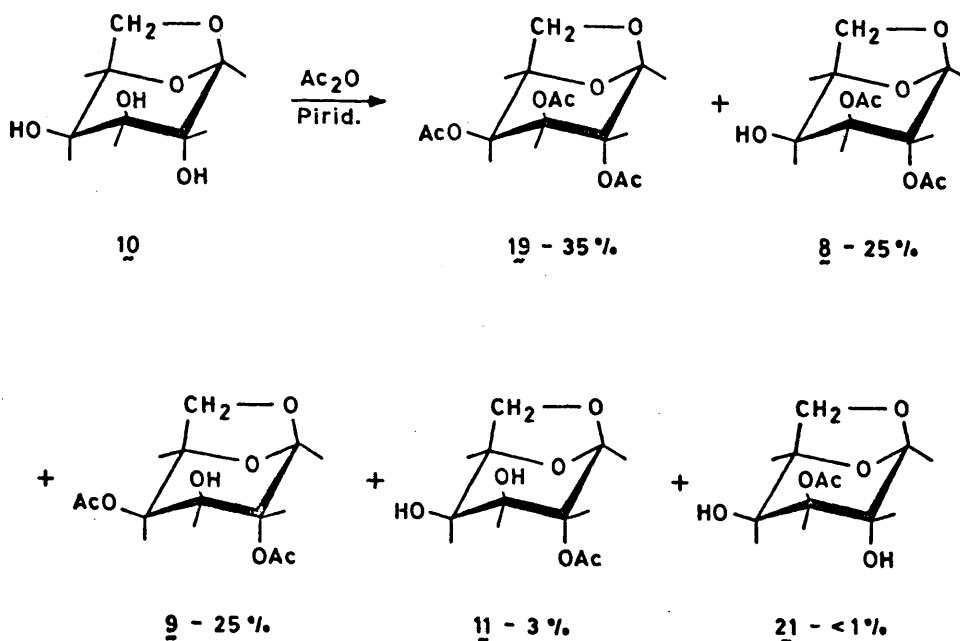
Fig. 4 - Espectro de RMN a 100 MHz de 2-O-acetil -  $\beta$ -D-galactopiranososa (II)

La cuarta y última fracción separada estuvo constituida por un sólo producto, en muy pequeña cantidad, cuya estructura no ha sido totalmente determinada. Su espectro RMN indicó la presencia de un sólo grupo acetoxilo a 2.12 lo que ha permitido asignarle, provisionalmente, la estructura de 3-O-acetil-1,6-anhidro-β-D-galactopiranososa (21).



De estos resultados, que se acaban de describir, puede concluirse que en la acetilación parcial de la 1,6-anhidro-β-D-galactopiranososa (10), en las condiciones previamente descritas por Shapiro y col<sup>114</sup>, se aísla al triacetato (19) en un rendimiento del 35%; los dos derivados diacetilados 2,3-di-O-acetil-1,6-anhidro-β-D-galactopiranososa (8) y 2,4-di-O-acetil-1,6-anhidro-β-D-galactopiranososa (9), se aíslan con rendimientos del 25% cada uno y los dos monoacetatos, 2-O-acetil-1,6-anhidro-β-D-galactopiranososa (11) y 3-O-acetil-1,6-anhidro-β-D-galactopiranososa (21) se aíslan en rendimientos de 3% y <1% respectivamente (esquema 2).

## ESQUEMA 2



Estos resultados no coinciden con los obtenidos previamente por Shapiro y col<sup>114</sup> que no lograron detectar en la fracción de diacetatos la presencia de la 2,4-di-O-acetil-1,6-anhidro-β-D-galactopiranososa (9), probablemente debido a la escasa diferencia entre la movilidad cromatográfica de este diacetato y la de la 2,3-di-O-acetil-1,6-anhidro-β-D-galactopiranososa (9) y a la casi identidad de valores de desplazamientos químicos de los protones metílicos de los acetoxilos en los espectros de RMN de ambos compuestos.

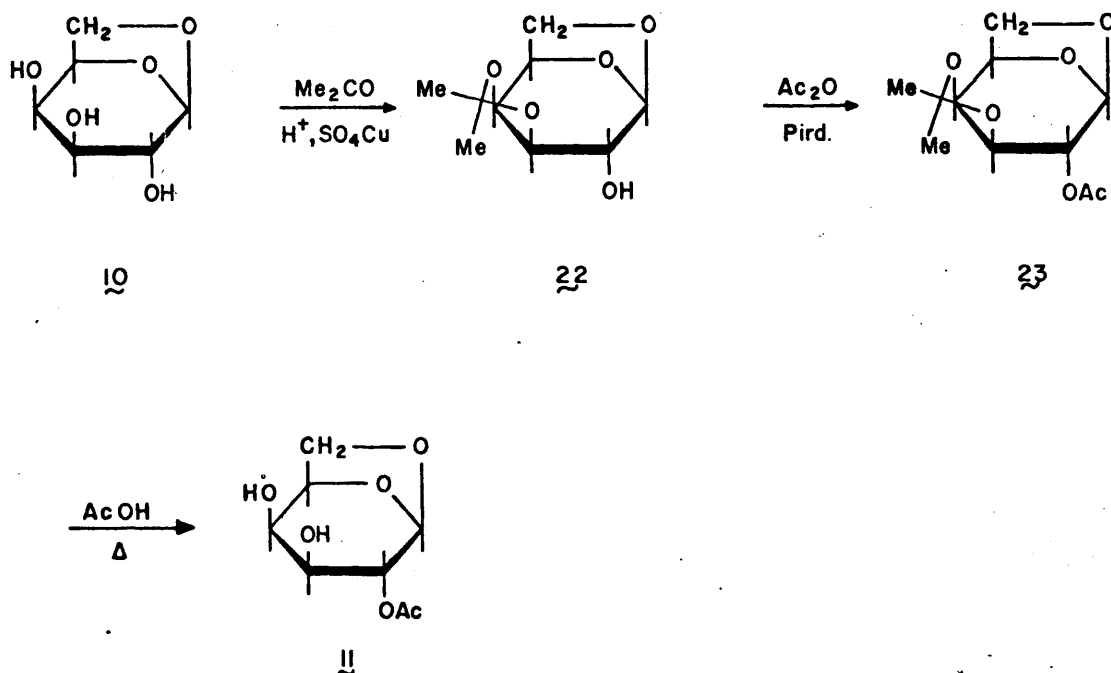
2.1.3. LA ACETILACION PARCIAL DE LA 2-O-ACETIL-1,6-ANHIDRO- $\beta$ -D-GALACTOPIRANOSA (11).

Paralelamente al trabajo de Shapiro y col<sup>114</sup> al que se viene haciendo referencia, y en un intento de determinar la influencia del acetoxilo axial en C-2 de 11 sobre las reactividades relativas de los grupos hidroxilos en C-3 y C-4 se estudió la acetilación parcial de la 2-O-acetil-1,6-anhidro- $\beta$ -D-galactopiranososa (11) en las condiciones previamente descritas.

La 2-O-acetil-1,6-anhidro- $\beta$ -D-galactopiranososa (11) se preparó fácilmente a partir de la 1,6-anhidro- $\beta$ -D-galactopiranososa (10) a través del 3,4-O-isopropilidén derivado (22), acetilación a 2-O-acetil-3,4-O-isopropilidén-1,6-anhidro- $\beta$ -D-galactopiranososa<sup>137</sup> (23) y posterior hidrólisis del grupo isopropilidén, según se indica en el esquema 3. Este producto (11) se ha obtenido por primera vez en esta Tesis en estado cristalino.

La acetilación parcial de la 2-O-acetil-1,6-anhidro- $\beta$ -D-galactopiranososa (11) con 1.1 equivalentes de anhídrido acético en piridina, dió lugar, a una mezcla de productos. Por cromatografía en columna sobre gel de sílice de la mezcla de reacción se aislaron dos fracciones.

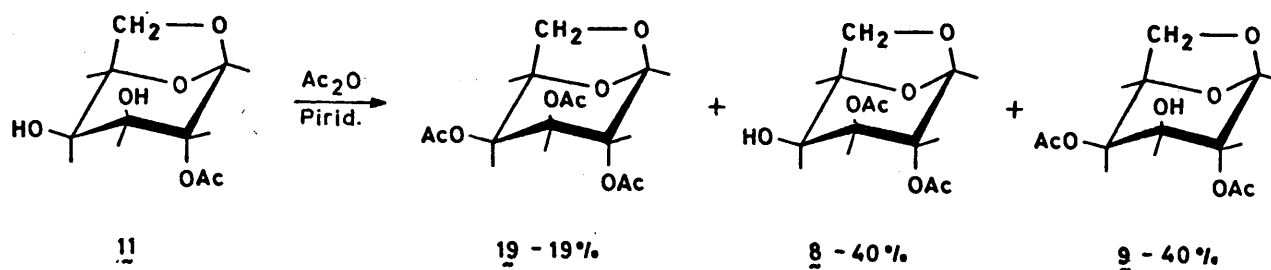
## ESQUEMA - 3



El producto eluido en la primera fracción (19%) se identificó, como en el caso de la acetilación de 10, con la 2,3,4-tri-O-acetil-1,6-anhidro-β-D-galactopiranososa (19).

En la segunda fracción (80%) se eluyó una mezcla de diacetatos. Por cristalización fraccionada de esta mezcla se aisló un producto cristalino (50% de esta segunda fracción), - identificado con la 2,3-di-O-acetil-1,6-anhidro-β-D-galactopiranososa (8) y por concentración de las aguas madres se obtuvo un producto siruposo (50% de esta segunda fracción) identificado con la 2,4-di-O-acetil-1,6-anhidro-β-D-galactopiranososa - (9) (esquema 4).

## ESQUEMA 4



Aparentemente, pues, los dos derivados di-O-acetilados 8 y 9 se forman también en la acetilación parcial del 2-O-ace-  
tato 11. La cantidad total de derivados di-O-acetilados aisla-  
dos en esta reacción (80% de la mezcla total de acetilación)  
es mayor que la obtenida en la correspondiente acetilación -  
parcial de la 1,6-anhidro-β-D-galactopiranososa (10). Sin embar-  
go, la proporción de cada diacetato (8) y (9) en la mezcla de  
diacetatos (8 y 9) permanece constante cualquiera que sea la  
materia prima utilizada. En ambos casos la cantidad de cada -  
diacetato obtenida constituye el 50% de la fracción total de  
diacetatos, sin que pueda apreciarse ninguna variación, en -  
las cantidades de diacetatos aislados, debida a la presencia  
de un grupo acetoxilo (compuesto 11) o un grupo hidroxilo -  
(compuesto 10) sobre C-2 en el sustrato utilizado.

Si las reactividades relativas de los grupos hidroxilo  
pueden deducirse de las proporciones de los productos aisla-  
dos en la acetilación parcial de la 1,6-anhidro-β-D-galactopi-

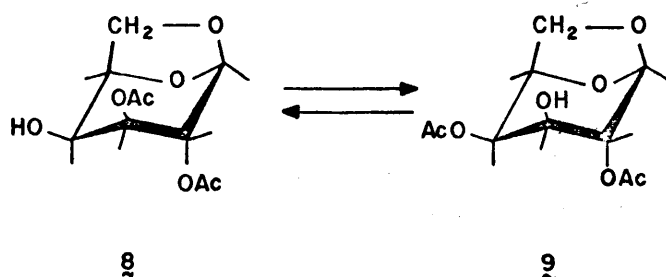
ranosa (10) y 2-O-acetil-1,6-anhidro- $\beta$ -D-galactopiranososa (11) los resultados obtenidos indican que el hidroxilo axial en C-2 es, en las condiciones empleadas, más reactivo que el hidroxilo ecuatorial en C-4 y el axial en C-3, sin que entre estos últimos se haya observado diferencia de reactividad.

Este resultado, en cierto modo sorprendente, ha inducido a pensar que, las cantidades de cada diacetato 8 y 9 aislados cromatográficamente en la acetilación parcial de la 1,6-anhidro- $\beta$ -D-galactopiranososa (10) y la 2-O-acetil-1,6-anhidro- $\beta$ -D-galactopiranososa (11) pueden no responder a las cantidades reales formadas de cada diacetato (8 y 9) y que las manipulaciones realizadas para resolver las mezclas de acetilación pueden variar la composición de la mezcla y conducir a conclusiones erróneas al tratar de determinar las reactividades relativas de los hidroxilos en función de las cantidades de acetatos aislados. En otras palabras, en los derivados parcialmente acetilados obtenidos existe la posibilidad de una emigración de grupos acetilo que pudieran ejercer un control termodinámico sobre los productos de reacción.

Con el fin de comprobar esta hipótesis y profundizar en el estudio de la acetilación parcial de 10 y 11, el estudio de ambas reacciones se ha realizado empleando un método que no implica la manipulación de la mezcla de reacción ni el aislamiento de los productos acetilados. Los resultados obtenidos se describen en el siguiente apartado.

2.1.4. ESTUDIO DE LAS REACTIVIDADES RELATIVAS DE LOS GRUPOS  
 HIDROXILOS DE LA 1,6-ANHIDRO- $\beta$ -D-GALACTOPIRANOSA (10)  
 Y 2-O-ACETIL-1,6-ANHIDRO- $\beta$ -D-GALACTOPIRANOSA (11). MI  
 GRACION DE GRUPOS ACETILO EN DERIVADOS PARCIALMENTE -  
 ACETILADOS.

Según ha quedado anteriormente reseñado, los dos diace-  
 tatos aislados en la acetilación parcial de la 1,6-anhidro- $\beta$ -  
 -D-galactopiranososa (10) y 2-O-acetil-1,6-anhidro- $\beta$ -D-galacto-  
 piranososa (11) son muy difíciles de diferenciar por métodos -  
 cromatográficos e imposibles de distinguir atendiendo a los  
 desplazamientos químicos de los protones de los grupos meti-  
 lo de los acetoxilos (ver fig. 2). Los desplazamientos quími-  
 cos de algunos de los protones en la región del espectro a -  
 campo más bajo son suficientemente diferentes, sin embargo,  
 para permitir la diferenciación entre ambas sustancias (8 y  
 9) y la detección de cada diacetato en mezclas de diacetatos  
 (ver fig. 3a y b). Por este procedimiento, ha podido obser--  
 varse que la 2,3-di-O-acetil-1,6-anhidro- $\beta$ -D-galactopiranososa  
 (8) en solución etanólica en medio alcalino se transforma en  
 una mezcla de 2,3-di-O-acetil-1,6-anhidro- $\beta$ -D-galactopirano-  
 sa(8) y 2,4-di-O-acetil-1,6-anhidro- $\beta$ -D-galactopiranososa (9).



Del mismo modo, se ha comprobado que cualquiera de los diacetatos  $\underline{8}$  ó  $\underline{9}$  se transforma en una mezcla al 50% (fig. 5) de los dos diacetatos  $\underline{8}$  y  $\underline{9}$  al pasar a través de una columna de gel de sílice, cuando se mantienen durante una noche en solución clorofórmica sobre gel de sílice o cuando se adsorben sobre un cromatoplateo de gel de sílice durante varias horas antes de desarrollar la placa. Obviamente durante el proceso de separación cromatográfica de los derivados acetilados descrita en los apartados 2.1.2. y 2.1.3 tiene lugar la migración de los grupos acetilo promovida por la gel de sílice y no es posible obtener conclusiones válidas sobre la reactividad de los grupos hidroxilo en la 1,6-anhidro- $\beta$ - $\underline{D}$ -galactopiranososa ( $\underline{10}$ ) y 2- $\underline{O}$ -acetil-1,6-anhidro- $\beta$ - $\underline{D}$ -galactopiranososa ( $\underline{11}$ ) a partir de las cantidades de 2,3-di- $\underline{O}$ -acetato ( $\underline{8}$ ) y 2,4-di- $\underline{O}$ -acetato ( $\underline{9}$ ) aislados por éste método.

Las migraciones de los grupos acetilo<sup>110,121,141</sup> implican una isomerización por transesterificación intramolecular y proceden a través de un ortoéster cíclico; la facilidad de esta migración parece depender, principalmente, de la posibilidad de formación del intermedio cíclico adecuado y está catalizada por ácidos y bases. La disposición espacial de los grupos hidroxilo en C-3 y C-4 en los dos diacetatos  $\underline{8}$  y  $\underline{9}$  es la idónea para la formación de tales intermedios cíclicos ( $\underline{22}$ ) (esquema 5) y la transformación de un diacetato en otro tiene lugar con gran facilidad.

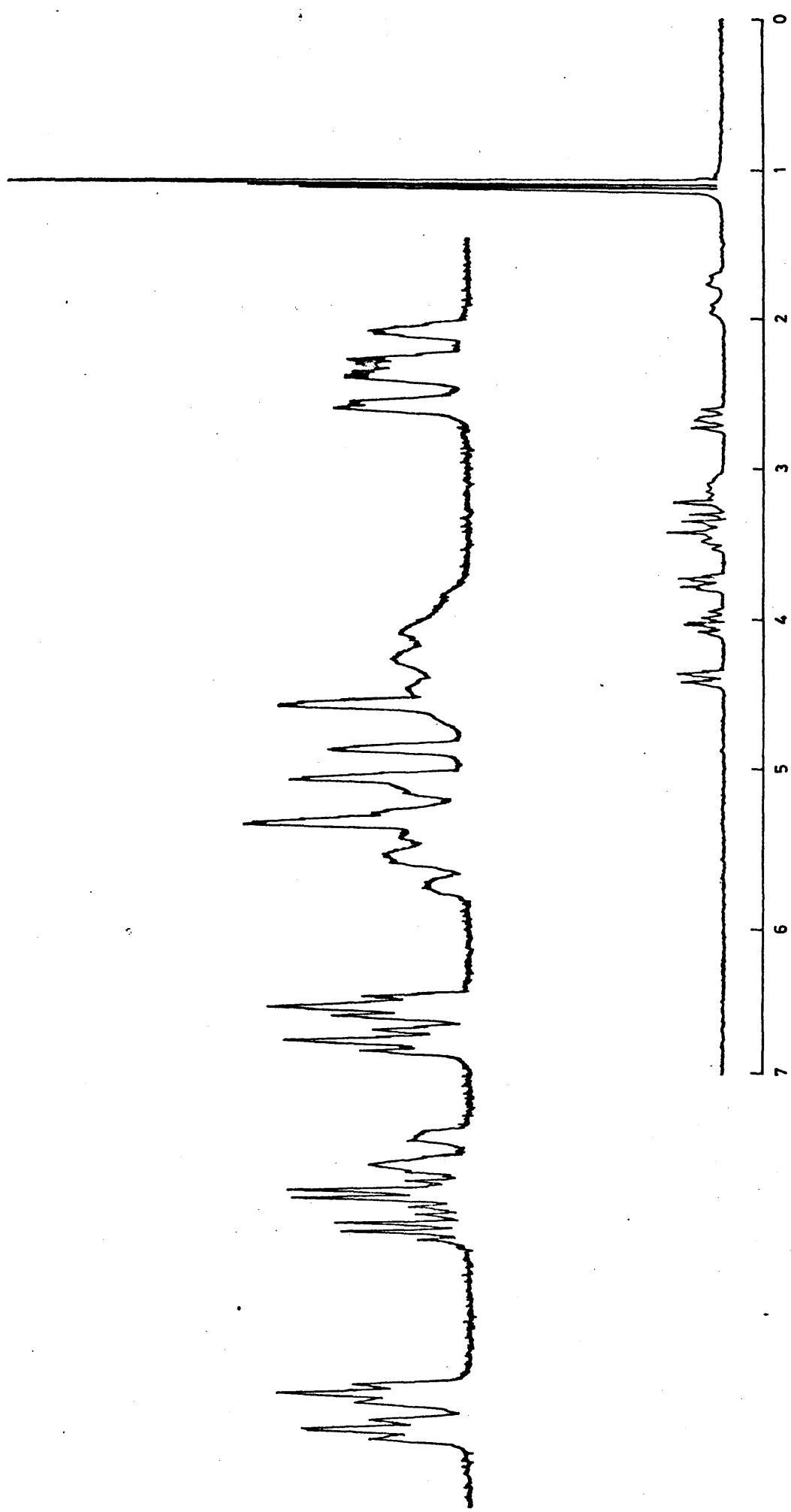
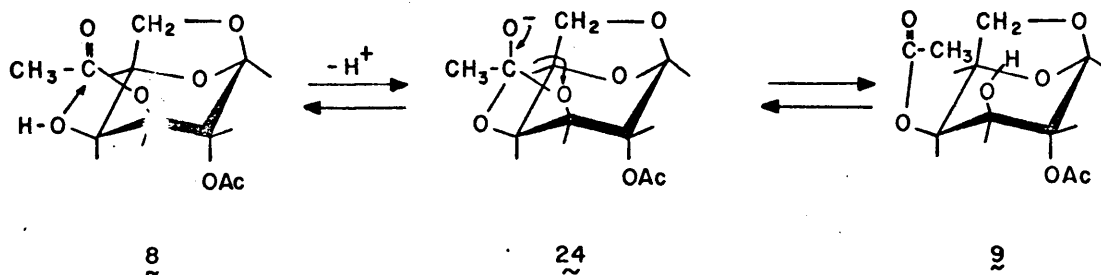


Fig. 5 - Espectro de RMN a 100 Mz de la mezcla de 2,3 di-O-acetil-1,6 anhidro- $\beta$ -D-galactopiranosas (8) y 2,4 di-O-acetil-1,6 anhidro- $\beta$ -D-galactopiranosas (9) obtenida por transposición a partir de (8) ó (9) ( $\text{Cl}_3\text{CD}$ )

## ESQUEMA 5



Las proporciones relativas de cada diacetato 8 ó 9 en mezclas de diacetatos 8 y 9 determinadas en todos los casos a partir de las integrales de las señales asignadas a los protones H-2 y H-4 del 2,4-diacetato (9) y el protón H-3 del 2,3-diacetato (8) en el espectro de RMN de la mezcla, no fueron nunca superiores al 50% lo que parece indicar que ambos derivados son igualmente estables y que la formación preferente de uno u otro en las reacciones de acetilación parcial de la 1,6-anhidro-β-D-galactopiranososa (10) o la 2-O-acetil-1,6-anhidro-β-D-galactopiranososa (11) está cinéticamente controlada.

En vista de estos resultados, se procedió al estudio de las reactividades relativas de los grupos hidroxilo de 10 y 11 por análisis de los espectros de RMN de las mezclas de la reacción.

El exámen del espectro de RMN de la mezcla de reacción de acetilación de la 1,6-anhidro- $\beta$ -D-galactopiranososa (10) en las condiciones descritas por Shapiro y col<sup>114</sup> y empleadas posteriormente por nosotros (apartado 2.1.2) mostró que la 2,4-di-O-acetil-1,6-anhidro- $\beta$ -D-galactopiranososa (9) es el diacetato que se forma en mayor proporción (fig. 6a). La relación 2,4-diacetato (9): 2,3-diacetato (8) fue en este caso de 5:1. Este resultado está de acuerdo con el orden reactividad esperado (4-OH ecuatorial > 3-OH axial) y totalmente en desacuerdo con los sorprendentes resultados encontrados por Shapiro y col<sup>114</sup> y posteriormente por nosotros (apartado 2.1.1.).

El análisis de los espectros de RMN de mezclas de reacción de acetilación de 1,6-anhidro- $\beta$ -D-galactopiranososa (10) en diferentes condiciones demostró que, igualmente, la 2,4-di-O-acetil-1,6-anhidro- $\beta$ -D-galactopiranososa (9) es el diacetato principal formado. En todos los casos el producto triacetilado (19) fue el producto principal de la reacción (fig. 6b).

Del mismo modo, el exámen de los espectros de RMN de las mezclas de reacción de la acetilación parcial de la 2-O-acetil-1,6-anhidro- $\beta$ -D-galactopiranososa (11), mostró también la formación preferente de la 2,4-di-O-acetil-1,6-anhidro- $\beta$ -D-galactopiranososa (9). En las condiciones utilizadas por Shapiro y col<sup>114</sup> y posteriormente por nosotros (aparta-

H<sub>2</sub>(8) + H<sub>2</sub>(19)

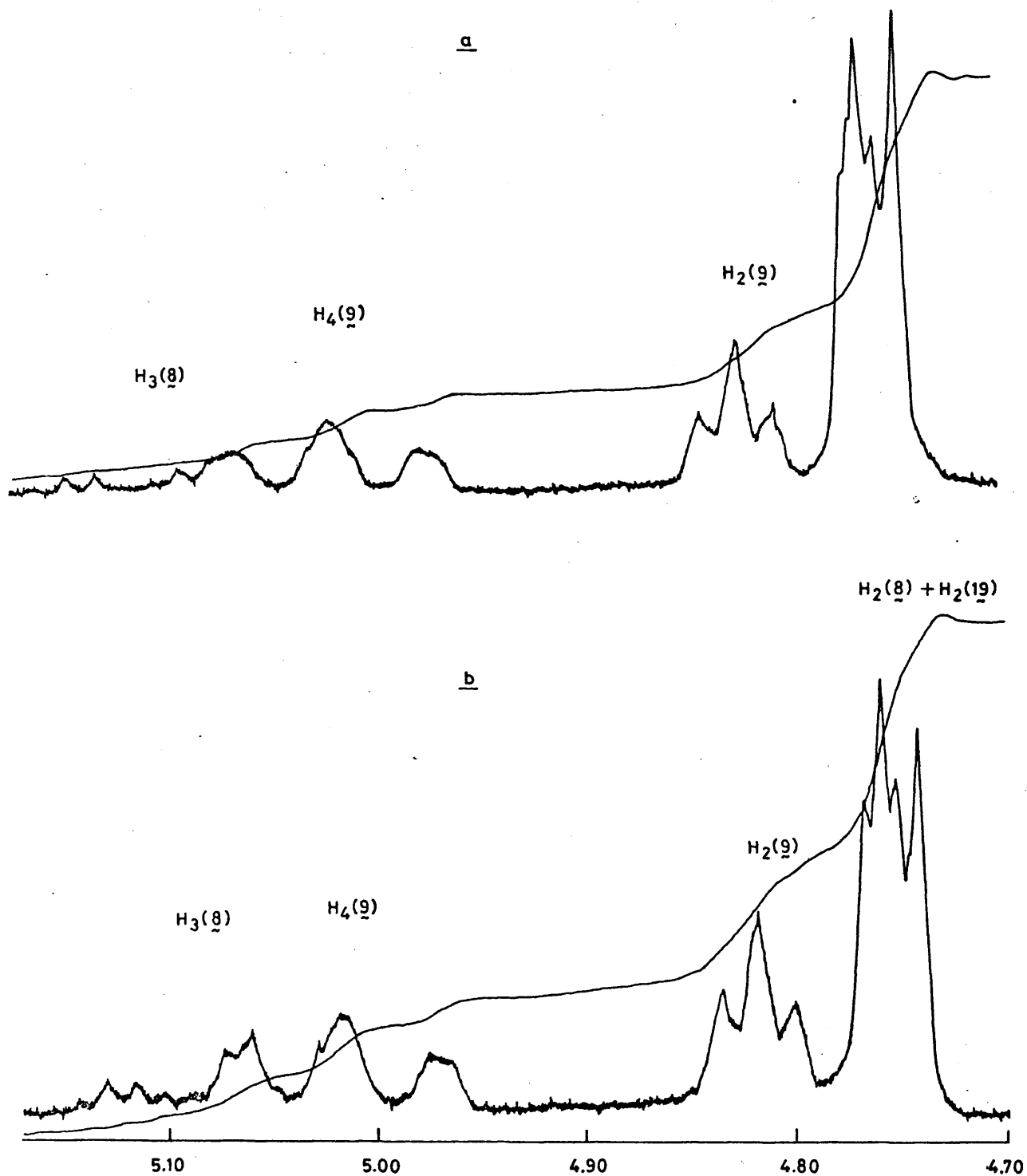


Fig. 6 - La región a campo más bajo de los espectros de RMN a 100 MHz de las mezclas de acetilación 1,6-anhidro- $\beta$ -D-galactopiranososa (10) con 2,5 equivalentes de anhídrido acético.  
a)- 16 hrs. a temperatura ambiente y 1 hr. a 50°C.  
b)- 16 hrs. a temperatura ambiente

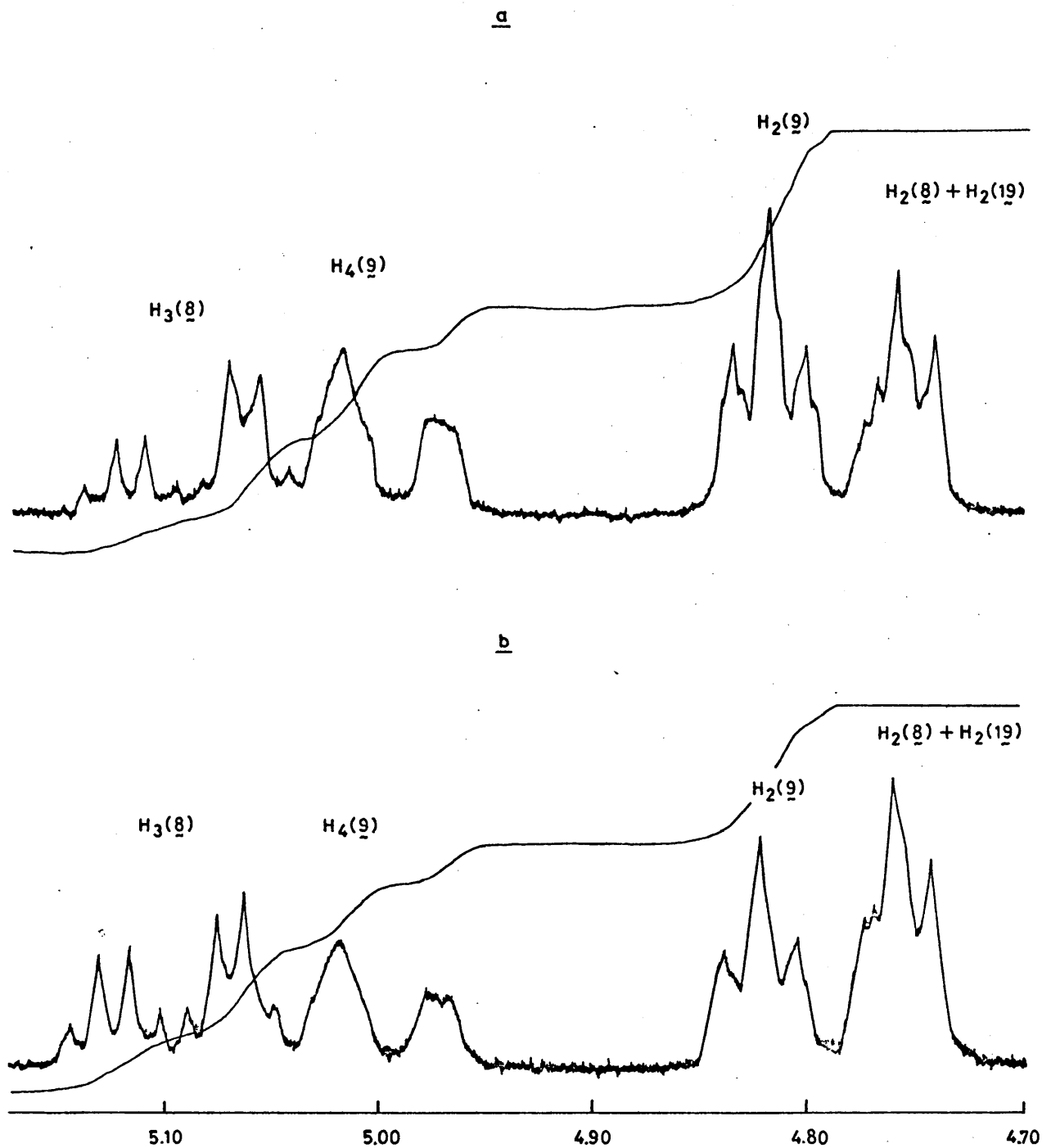


Fig. 7 - La región a campo más bajo de los espectros de RMN a 100 MHz de las mezclas de acetilación d 2-O-acetil-1,6-anhidro-β-D-galactopiranososa (1) con 1,1 equivalentes de anhídrido acético.  
 a) - 16 hrs. a temperatura ambiente y 1hr. a 50°C.  
 b) - 16 hrs. a temperatura ambiente.

do 2.1.3.) la relación 2,4-diacetato (9): 2,3-diacetato (8) fue de 3:1 (fig. 7a). La formación preferente del 2,4-di-O-acetato pudo observarse para distintas condiciones experimentales de la reacción de acetilación (fig. 7b). En todos los casos, la proporción de triacetato (19) formado -- fue mucho menor que en la acetilación parcial de 10.

Con estos resultados puede ya concluirse que en contraste con los resultados previos,<sup>114</sup> el principal diacetato formado en la acetilación parcial de la 1,6-anhidro-β-D-galactopiranososa (10) y 2-O-acetil-1,6-anhidro-β-D-galactopiranososa (11) es la 2,4-di-O-acetil-1,6-anhidro-β-D-galactopiranososa (9) y que el 2,3-diacetato (8) también se forma pero en pequeña cantidad. La evaluación cuantitativa de los factores que influyen la reactividad de los grupos hidroxilo en la 1,6-anhidro-β-D-galactopiranososa (10) y su 2-acetato (11) requiere un estudio cinético completo de la reacción de acetilación que actualmente se lleva a cabo -- por el método espectroscópico descrito en esta Tesis.

#### 2.1.5. CONSIDERACIONES SOBRE LOS ESPECTROS DE RMN DE LOS DERIVADOS ACETILADOS DE LA 1,6-ANHIDRO-β-D-GALACTOPIRANOSA (10)

Los desplazamientos químicos de las señales de los protones metílicos de los acetoxilos en los espectros RMN

a 100 MHz de los derivados acetilados obtenidos, se indican en la tabla I. Los desplazamientos químicos de las señales de los protones metínicos y metilénicos y sus constantes de acoplamiento se recogen en las tablas II y III respectivamente.

Aunque es una regla de tipo general que los grupos acetoxilo ecuatoriales resuenan a campo más alto que los axiales y no existe normalmente solapamiento entre ambos tipos de señales<sup>140</sup> una deformación del anillo piranoide de la forma ideal de silla o la presencia de un grupo voluminoso, unido al anillo, que puede apantallar preferentemente algunos grupos, deben provocar un cambio en estos márgenes de absorción<sup>142</sup>. Este es el caso en el espectro de los derivados acetilados de la 1,6-anhidro- $\beta$ -D-galactopiranososa (10) en que la diferencia de desplazamientos químicos entre los protones metínicos del acetoxilo ecuatorial en C-4 y los protones metínicos de los acetoxilos axiales en C-2 y C-3 es menor que la que cabría esperar atendiendo a su disposición espacial. En los diacetatos obtenidos, el efecto citado y la presencia de hidroxilos libres en carbonos contiguos a los grupos acetoxilo hace imposible asignar la posición de éstos a partir de sus desplazamientos químicos.

La consideración de los desplazamientos químicos y las constantes de acoplamiento de los restantes protones -

(tablas II y III) permite establecer las estructuras de los productos y deducir que, como otros derivados de 1,6-anhidro-hexopiranosas<sup>142-150</sup>, todos los derivados acetilados - obtenidos existen en la conformación  ${}^1C_4$ . En efecto, el doblete asignado al proton H-6endo indica en todos los casos, que sólo existe una constante de acoplamiento geminal y -- que la constante de acoplamiento entre el proton H-5 y H-6endo es muy próxima a cero, que es lo que cabe esperar para un ángulo diédrico, entre dos protones, próximo a los  $90^\circ$ <sup>151,152</sup>. Los protones H-1, H-4 y H-5 por otra parte, deben encontrarse en una disposición 1,3-diecuatorial rígida ("W") como indican las pequeñas constantes de acoplamiento a larga distancia encontradas en todos los espectros. Asimismo, la multiplicidad de la señal asignada al protón H-6exo y el ensachamiento de las señales del proton H-4 indican una constante de acoplamiento a larga distancia entre ambos protones. Estos requisitos se cumplen sólo en la conformación antes citada.

## T A B L A I

Desplazamientos químicos de los protones metílicos  
de los acetoxilos en los espectros de RMN a 100 MHz  
de derivados acetilados de la  
1,6-anhidro- $\beta$ -D-galactopiranososa (10)  
 $\delta$  ppm (integral, protones)

2,3,4-tri- <u>O</u> -acetil-1,6-anhidro- - $\beta$ - <u>D</u> -galactopiranososa (19)	2.00 (3)	2.12 (6)
2,3-di- <u>O</u> -acetil-1,6-anhidro- - $\beta$ - <u>D</u> -galactopiranososa (8)	2.10 (3)	2.14 (3)
2,4-di- <u>O</u> -acetil-1,6-anhidro- - $\beta$ - <u>D</u> -galactopiranososa (9)	2.09 (3)	2.12 (3)
2- <u>O</u> -acetil-1,6-anhidro- $\beta$ - <u>D</u> - -galactopiranososa (11)	2.08 (3)	
3- <u>O</u> -acetil-1,6-anhidro- $\beta$ - <u>D</u> - -galactopiranososa (21)		2.12 (3)

T A B L A II

Desplazamientos químicos ( $\delta$  ppm) de los protones metínicos y metilénicos en los espectros de RMN a 100 MHz de derivados acetilados de la 1,6-anhidro- $\beta$ -D-galactopiranososa (10) en  $Cl_3CD$

(Análisis de primer orden)

	H-1	H-2	H-3	H-4	H-5	H-6 endo	H-6 exo
2,3,4-tri-O-acetil-1,6-anhidro- $\beta$ -D-galactopiranososa (19)	5.39	4.72	5.20	4.43	4.31	4.31	3.70
2,3-di-O-acetil-1,6-anhidro- $\beta$ -D-galactopiranososa (8)	5.38	4.75	5.08	4.17	4.42	4.26	3.67
2,4-di-O-acetil-1,6-anhidro- $\beta$ -D-galactopiranososa (9)	5.43	4.79	4.10	5.00	4.48	4.38	3.67
2-O-acetil-1,6-anhidro- $\beta$ -D-galactopiranososa (11)	5.36	4.77	3.92	4.41	4.24	4.24	3.61

T A B L A III

Constantes de acoplamiento (Hz) de los protones metínicos y metilénicos en los espectros de RMN a 100 MHz de derivados acetilados de la 1,6-anhidro-β-D-galactopiranososa (10) en Cl<sub>3</sub>CD

(Análisis de primer orden)

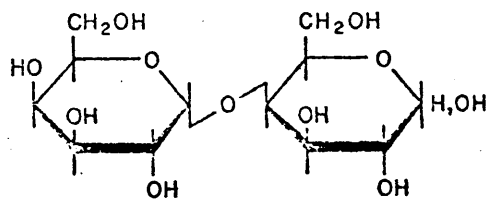
	J <sub>1,2</sub>	J <sub>1,3</sub>	J <sub>2,3</sub>	J <sub>3,4</sub>	J <sub>3,5</sub>	J <sub>4,5</sub>	J <sub>5,6en</sub>	J <sub>5,6exo</sub>	J <sub>6en,6exo</sub>
2,3,4-tri-O-acetil-1,6-anhidro-β-D-galactopiranososa (19)	1	-	1.5	-	-	-	≈ 0	4.7	7.5
2,3-di-O-acetil-1,6-anhidro-β-D-galactopiranososa (8)	1.5	1.5	1.5	5.5	1.5	4.5	≈ 0	5.0	7.5
2,4-di-O-acetil-1,6-anhidro-β-D-galactopiranososa (9)	1.5	1.5	1.5	5.0	1.5	4.5	≈ 0	5.0	7.5
2-O-acetil-1,6-anhidro-β-D-galactopiranososa (11)	1.3	1.3	1.3	-	-	4.5	≈ 0	5.0	7.5

2.2. SINTESIS QUIMICA Y ESTUDIO ESTRUCTURAL DE LOS DISACARIDOS 4-O- $\alpha$  Y - $\beta$ -D-GALACTOPIRANOSIL-D-GALACTOSA (1 y 2) Y 3-O- $\alpha$  Y - $\beta$ -D-GALACTOPIRANOSIL-D-GALACTOSA (3 y 4)

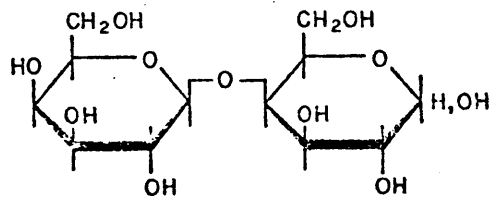
2.2.1. INTRODUCCION

En este capítulo se describen las síntesis químicas de los disacáridos 4-O- $\alpha$ -D-galactopiranosil-D-galactosa -- (1), 4-O- $\beta$ -D-galactopiranosil-D-galactosa (2), 3-O- $\alpha$ -D-galactopiranosil-D-galactosa (3) y 3-O- $\beta$ -D-galactopiranosil-D-galactosa (4). Los dos disacáridos con enlaces glicosílicos 1 $\rightarrow$ 4 (1 y 2) se han sintetizado en relación con la estructura del glicoesfingolípido de la enfermedad de Fabry 42-44. Los disacáridos en enlaces glicosílicos 1 $\rightarrow$ 3 (3 y 4) se han preparado en relación con la sustancia específica del grupo sanguíneo B en humanos<sup>55-57</sup>.

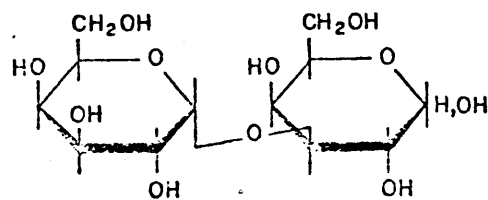
Los dos disacáridos con enlace glicosílico 1 $\rightarrow$ 4 (1 y 2), no han sido sintetizados químicamente hasta ahora. Aunque existe una síntesis descrita del disacárido 4-O- $\beta$ -D-ga



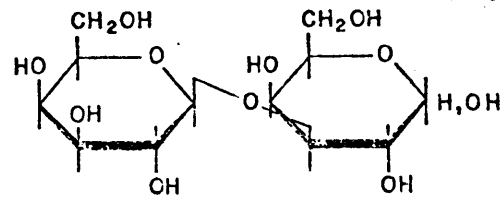
1



2



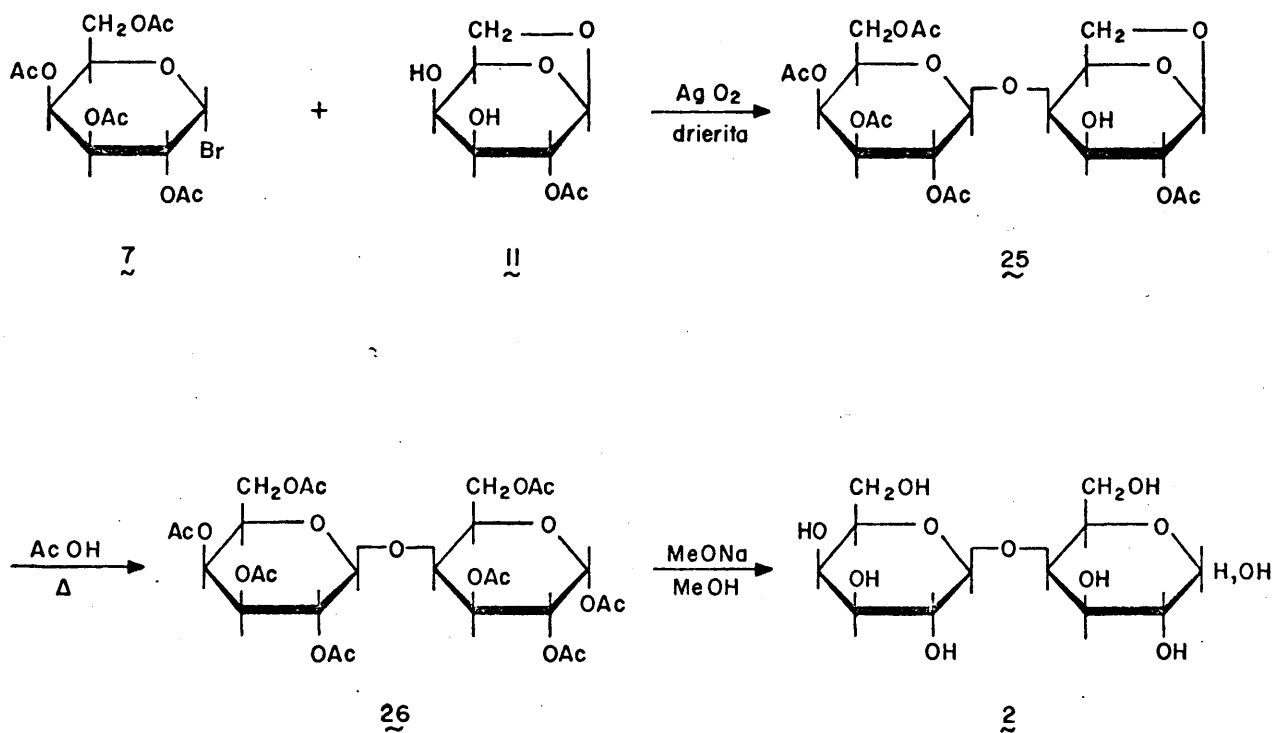
3



4

lactopiranosil-D-galactosa (2)<sup>54</sup>, por reacción del bromuro de 2,3,4,6-tetra-O-acetil- $\alpha$ -D-galactopiranosilo (7) con -- 2-O-acetil-1,6-anhidro- $\beta$ -D-galactopiranososa (11) (esquema 6)

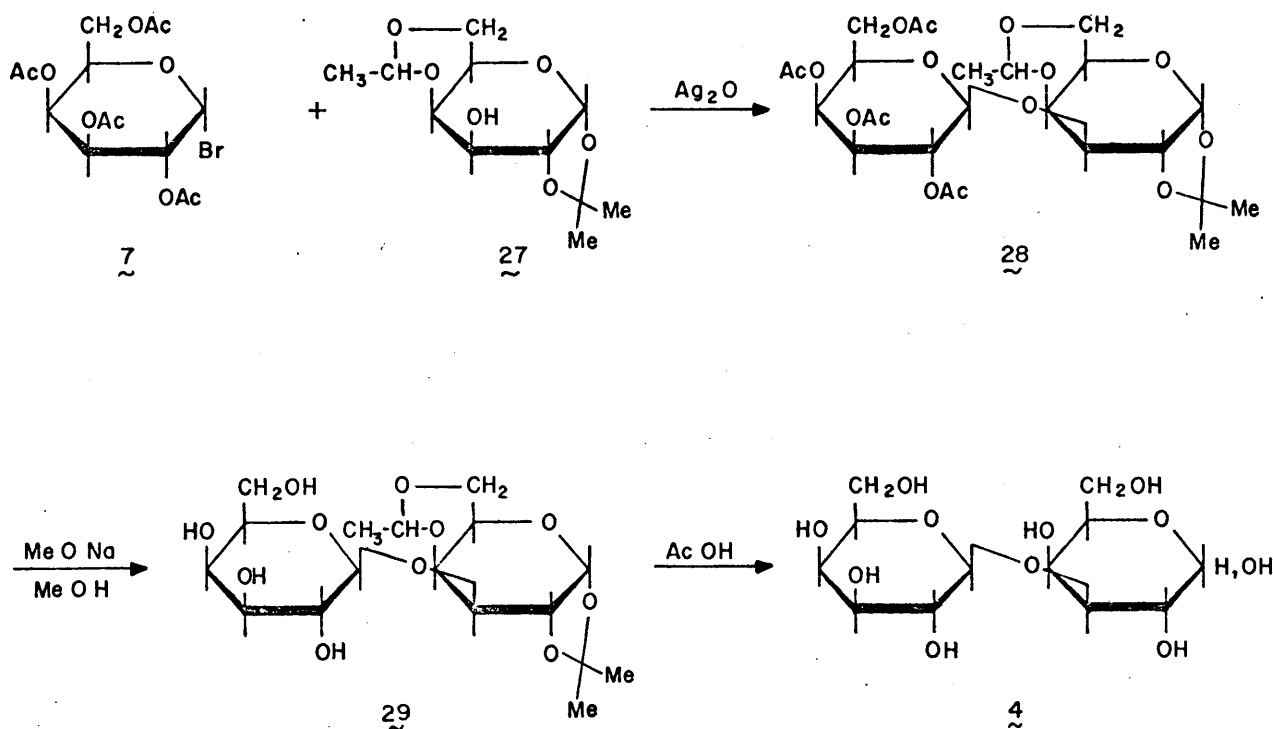
## ESQUEMA 6



las constantes físicas del producto obtenido no coinciden con las descritas para la 4-O-β-D-galactopiranosil-D-galactosa (2) aislada de fuentes naturales.

De los disacáridos con enlace glicosílico 1→3 (3 y 4) la 3-O-α-D-galactopiranosil-D-galactosa (3) se sintetiza -- también, químicamente, por primera vez en esta Tesis; la -- 3-O-β-D-galactopiranosil-D-galactosa (4), ha sido sintetizada químicamente con anterioridad<sup>75</sup>, por un procedimiento distinto al descrito en la presente Memoria, consistente en la reacción del bromuro de 2,3,4,6-tetra-O-acetil-α-D-galactopiranosilo (7) con 4,6-O-etiliden-1,2-O-isopropilidén-D-galactosa (27), desacetilación e hidrólisis posterior del bencilidén acetal (esquema 7).

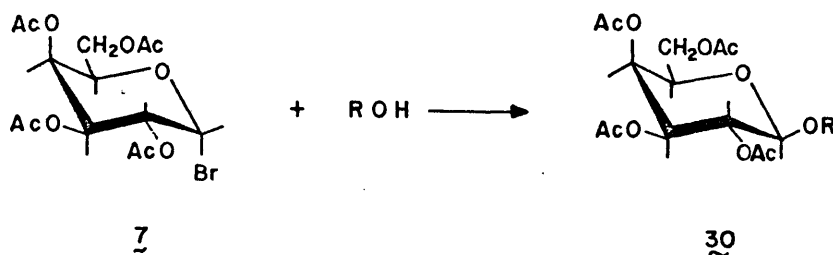
ESQUEMA 7



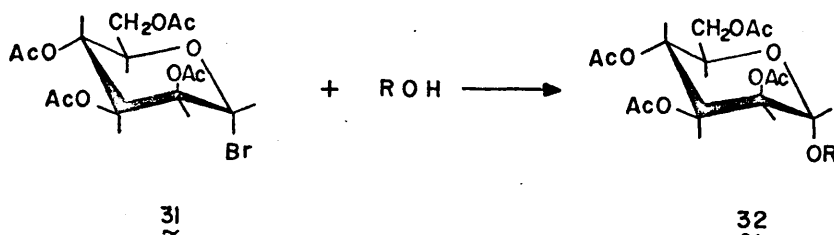
La síntesis de glicósidos y oligosacáridos presenta serias dificultades que derivan de la formación de un enlace glicosílico en una posición y en una configuración determinadas. Mientras el problema de la posición del enlace tiene que resolverse con la preparación de derivados específicamente protegidos para ser utilizados como componente aglicónico, y en el caso concreto de la síntesis de los disacáridos 1-4 ha quedado resuelto con la síntesis de los diacetatos 8 y 9, la formación del enlace glicosílico en una configuración deseada es siempre un importante obstáculo, los rendimientos obtenidos son generalmente modestos y el control estérico de la reacción muy difícil de conseguir. Los métodos que actualmente se emplean para formar un enlace glicosídico, que se han enumerado en la INTRODUCCION de esta Tesis - (ver págs. 9 y 10), conducen a resultados no siempre previsibles debido, principalmente, a los escasos conocimientos de que se dispone sobre los mecanismos que actúan en las --reacciones de glicosilación. En los párrafos que siguen se reseñan las ventajas e inconvenientes de los métodos de glicosilación más comunmente utilizados y las consideraciones que nos han llevado a elegir uno de ellos para la síntesis de los disacáridos 1-4.

El curso estérico de las reacciones de glicosilación - con halogenuros de glicosilo peracetilados no viene determinado por la orientación axial o ecuatorial del átomo de halógeno sino por la interacción del átomo de halógeno con el

sustiyente vecino en C-2. Así, la reacción de un halogenuro de glicosilo 1,2-cis, como el bromuro de 2,3,4,6-tetra-O-acetil- $\alpha$ -D-galactopiranosilo (7) con un alcohol en cloruro de metileno o cloroformo en presencia de carbonato de plata y de un agente desecante (condiciones originales de la reacción de Koenigs-Knorr) conduce, casi invariablemente, a glicósidos 1,2-trans (30) y en las mismas condiciones, la gli-



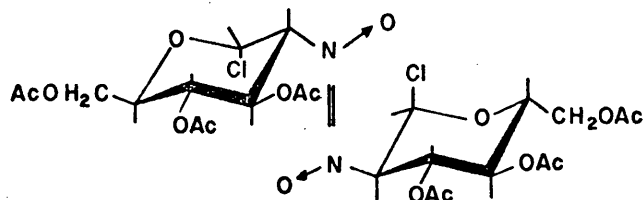
cosilación con un halogenuro de glicosilo 1,2-trans como el bromuro de 2,3,4,6-tetra-O-acetil- $\alpha$ -D-manopiranosilo (31) - da lugar, también a glicósidos 1,2-trans, (32). Resultados



análogos se obtienen empleando la modificación de Meystre y Miescher<sup>94</sup>, con óxido o carbonato de plata, en benceno, separando el agua formada en la reacción por destilación azeotrópica.

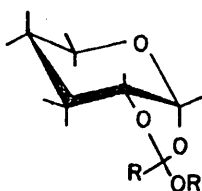
La preparación de glicosídeos 1,2-cis es, por tanto, difícil de conseguir a partir de halogenuros de glicosilo peracetilados. La modificación introducida por Helferich<sup>95,96</sup>, empleando un catalizador soluble, como el cianuro mercurico, en nitrometano, presenta sobre los anteriores procedimientos, la ventaja de un medio de reacción homogéneo, con mejores rendimientos y más alta reproducibilidad. La glicosilación, en estas condiciones conduce, por otra parte, a una mezcla de glicósidos 1,2-cis y 1,2 trans en proporciones -- que dependen de la estructura del azúcar, y las condiciones de la condensación. La obtención de los glicósidos puros según esta modificación conlleva la separación de los dos números y el 1,2-cis glicósido rara vez se consigue en rendimientos superiores al 50%.

Sobre la hipótesis de una participación del grupo acilo en C-2 del haluro de glicosilo peracilado, se han ensayado glicosilaciones con haluros de glicosilo con un grupo no participante en C-2<sup>25,97</sup>. Aunque los rendimientos de 1,2-cis glicósidos obtenidos por éste método son aceptables, la mezcla de reacción presenta invariablemente cierta cantidad de glicósidos 1,2-trans que dependen de las condiciones empleadas. No obstante, la síntesis de glicosídeos 1,2-cis se consigue, con mejores resultados, empleando el método del glicol<sup>98,99</sup>, que utiliza el dimero de un cloruro de tri-0-acetil-2-desoxi-2-nitroso-hexopiranosilo (33) en dimetil formamida como agente glicosilante.



33

De entre los métodos que hacen uso de otros agentes  $\pm$  glicosilantes el más extendido es el conocido como método del ortoéster<sup>23,100</sup>. Los 1,2-ortoésteres (34) reaccionan con alcoholes dando lugar a glicósidos. La reacción de glicosi-



34

lación en disolventes polares se cataliza por cloruro mercurírico o bromuro mercurírico y en disolventes no polares por --percloratos de piridina o lutidina y da lugar, invariablemente a glicósidos 1,2-trans. Menos extendido es el uso de 1,2-anhidro azúcares<sup>101-103</sup> que dan lugar a una mezcla de 1,2-cis y 1,2-trans glicósidos; glicales<sup>108</sup> que conducen a trans-glicósidos y la condensación, catalizada por ácidos, de monosacáridos parcialmente acetilados<sup>104,105</sup> o derivados reductores de azúcares<sup>106,107</sup>.

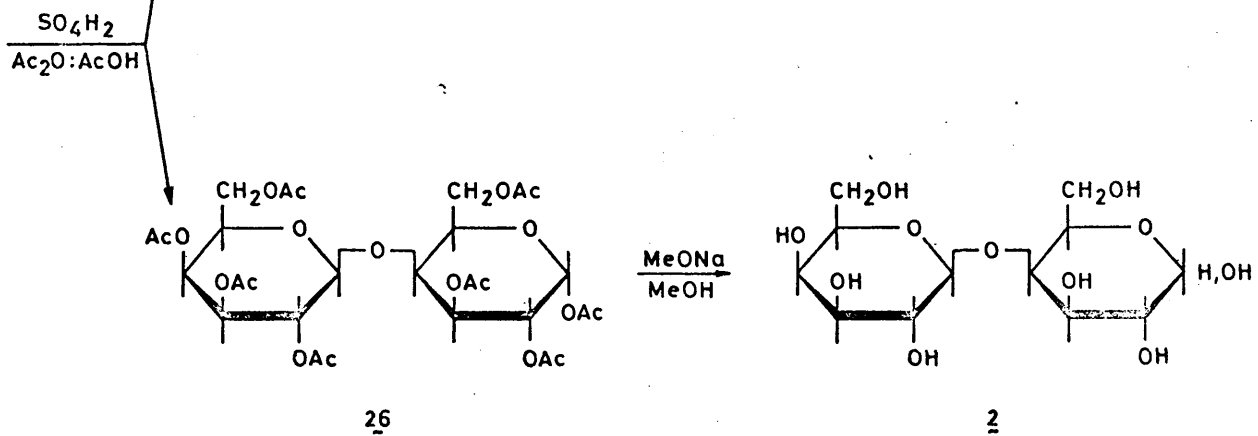
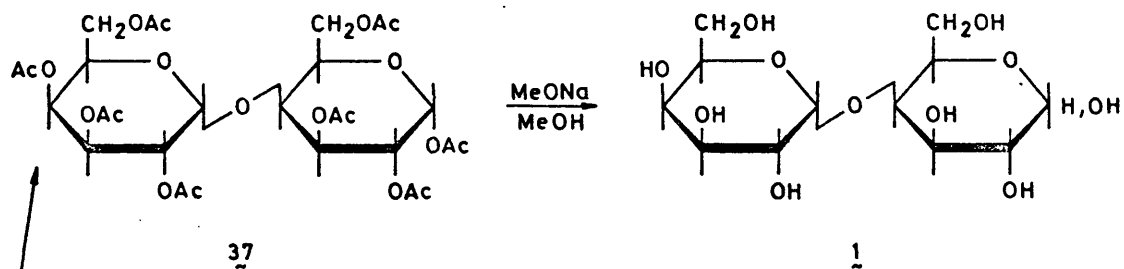
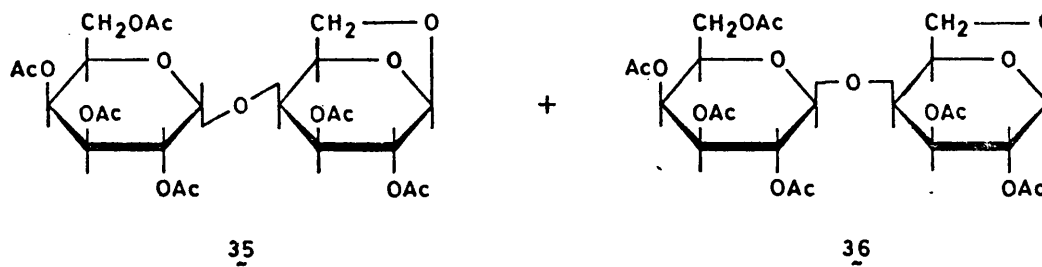
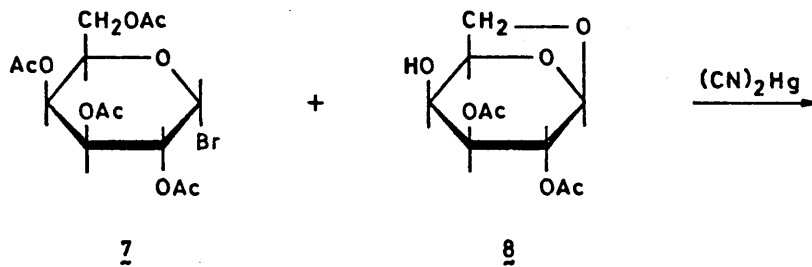
El paso clave en la síntesis de los disacáridos 1-4 ha sido la condensación del bromuro de 2,3,4,6-tetra-O-acetil-

- $\alpha$ -D-galactopiranosilo (7) con 2,3-di-O-acetil-1,6-anhidro-- $\beta$ -D-galactopiranososa (8) (disacáridos 1 y 2) y 2,4-di-O-acetil-1,6-anhidro- $\beta$ -D-galactopiranososa (9) (disacáridos 3 y 4). Como en ambos casos fueron necesarios los anómeros  $\alpha$ (1 y 3) y  $\beta$ (2 y 4), a efectos de comparación, estas reacciones de condensación, se han llevado a cabo en presencia de cianuro mercúrico en mezcla de nitrometano-benceno de acuerdo con el procedimiento introducido por Helferich<sup>95,96</sup>.

2.2.2. CONDENSACION DEL BROMURO DE 2,3,4,6-TETRA-O-ACETIL- $\alpha$ -D-GALACTOPIRANOSILO (7) CON 2,3-DI-O-ACETIL-1,6---ANHIDRO- $\beta$ -D-GALACTOPIRANOSA (8). SINTESIS DE 4-O- $\alpha$ -D-GALACTOPIRANOSIL-D-GALACTOSA Y 4-O- $\beta$ -D-GALACTOPIRANOSIL-D-GALACTOSA (2)

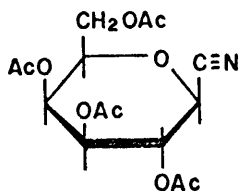
La síntesis de los disacáridos 4-O- $\alpha$ -D-galactopiranosil-D-galactosa (1) y 4-O- $\beta$ -D-galactopiranosil-D-galactosa (2) se ha llevado a cabo por condensación de bromuro de 2,3,4,6,-tetra-O-acetil- $\alpha$ -D-galactopiranosilo (7) con 2,3-di-O-acetil-1,6-anhidro- $\beta$ -D-galactopiranososa (8) en nitrometano benceno catalizada por cianuro mercúrico, acetólisis de los 1,6-anhidro disacáridos peracetilados (39 y 40) así obtenidos, y posterior desacetilación de las correspondientes octaacetil galactosilgalactosas (26 y 37) (Esquema 8).

ESQUEMA 8



La reacción de 2,3-di-O-acetil-1,6-anhidro- $\beta$ -D-galactopiranososa (8) con 1.5 equivalente de acetobromogalactosa (7) en presencia de 1.5 equivalentes de cianuro mercurico en nitrometano-benceno 1:1, a 40°C, se completó en 50 hr. La cromatografía en capa fina de la mezcla de reacción indicó la presencia de varios productos. La mezcla de reacción se - - fraccionó por cromatografía en columna sobre gel de sílice y se aislaron dos fracciones principales.

La primera fracción eluida de la columna estuvo constituida por un sólo producto (16% a partir de acetobromogalactosa) cuyo análisis elemental indicó la presencia de nitrógeno y cuyas características físicas, p.f. 168-169°C,  $[\alpha] + 37.2^\circ$ , coincidieron con las descritas para el cianuro de 2,3,4,6-tetra-O-acetil- $\beta$ -D-galactopiranosilo (38). Sus espectros IR y RMN (ver pág. 113 , apartado 2.3.3.) y su aná

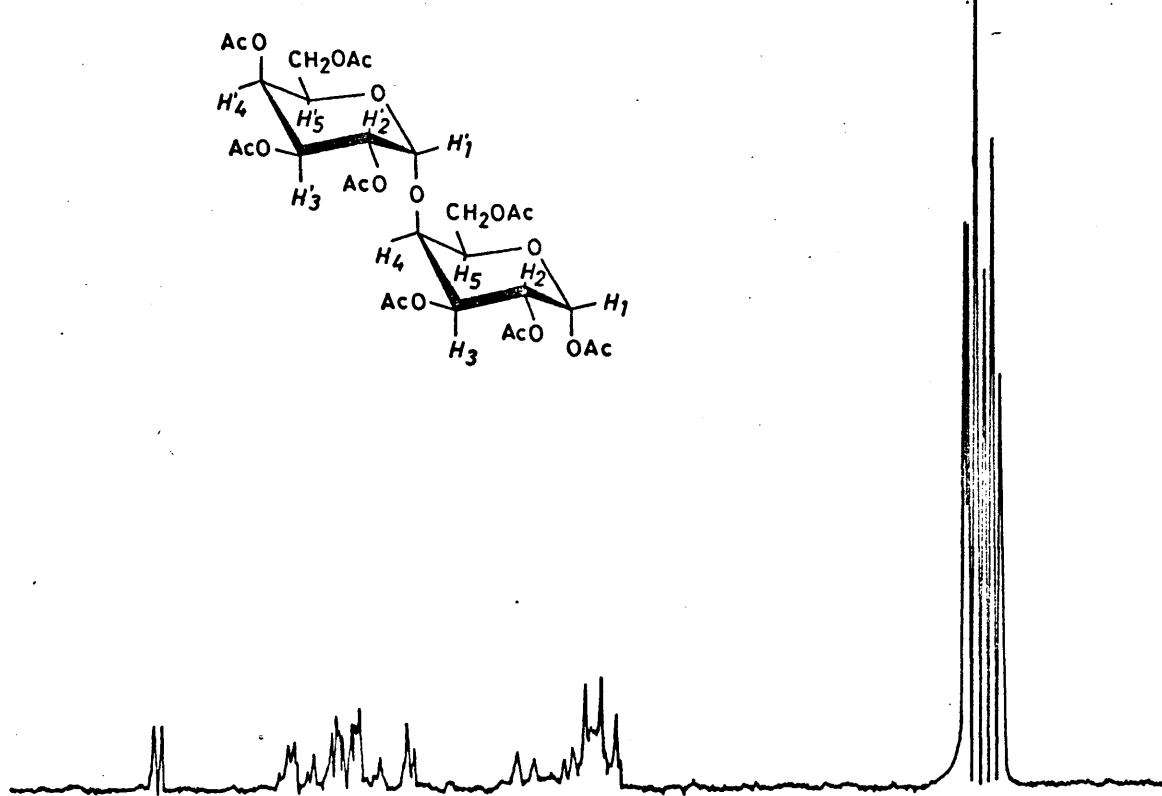


38

lisis elemental concordaron con los descritos para 38 y el compuesto resultó idéntico a la sustancia 38 preparada por reacción del bromuro de 2,3,4,6-tetra-O-acetil- $\alpha$ -D-galactopiranosilo (7) con cianuro mercurico en nitrometano<sup>153</sup>. Compuestos de este tipo han sido previamente aislados en reacciones de glicosilación en presencia de cianuros metálicos<sup>154-156</sup>.

En la segunda fracción se eluyó una mezcla siruposa -- (90,5%) de 1,6-anhidro disacáridos peracetilados (26 y 27) -- con movilidades cromatográficas muy similares. El fraccionamiento de esta mezcla presentó serias dificultades por lo -- que se procedió directamente a su acetólisis. El establecimiento de las condiciones de acetólisis de los puentes 1,6-anhidro sin acetólisis simultánea de los enlaces glicósílicos se realizó tras un cuidadoso estudio cromatográfico de -- los productos de reacción en diferentes tiempos, y a distintas temperaturas y concentraciones de ácido. Este estudio -- permitió concluir que la acetólisis de los puentes 1,6-anhidro se completa en quince minutos a temperatura ambiente con una mezcla de anhídrido acético-ácido acético conteniendo un 2% de sulfúrico, sin que en estas condiciones tenga lugar -- una acetólisis apreciable de los enlaces glicosílicos. La acetólisis de la mezcla de disacáridos dió lugar a dos productos principales que se separaron sin dificultad por cromatografía en columna sobre gel de sílice.

Los espectros IR de ambos productos presentaron una banda a  $1.750\text{ cm}^{-1}$  asignada a la  $\nu\text{ C=O}$  de los grupos acetoxilos y su análisis elementales coincidieron con los esperados para los disacáridos octaacetilados 37 y 26. Los espectros de RMN a 100 MHz en cloroformo deuterado de ambos compuestos, -- mostraron la presencia de ocho grupos acetoxilo en la región comprendida entre  $\delta\ 1.97$  y  $2.17$  ppm (fig. 8 a y b) corroborando su naturaleza de disacáridos octaacetilados.



b

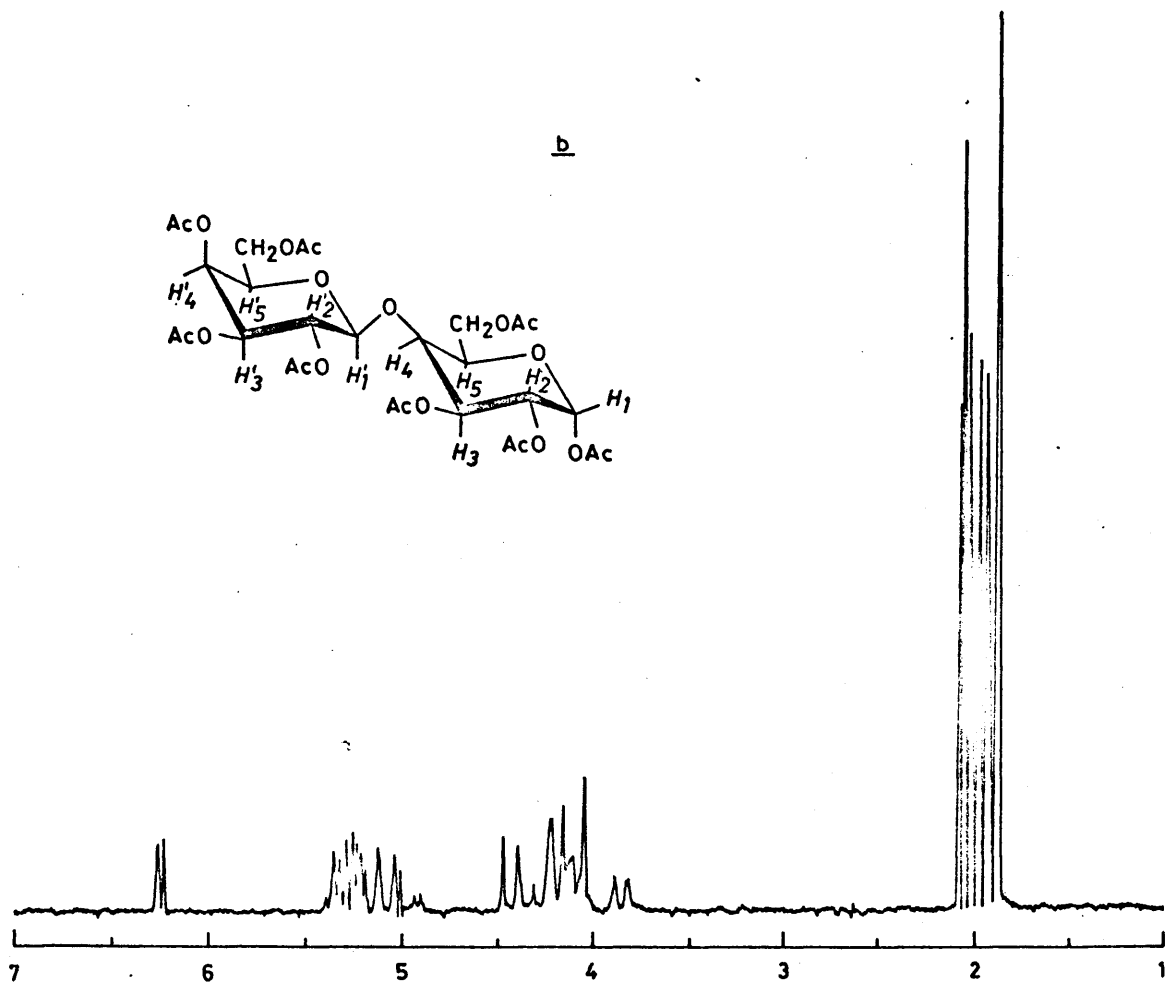


Fig. 8 - Espectros de RMN a 100 MHz en  $\text{Cl}_3\text{CD}$  de  
 a) - 1,2,3,6 - tetra -  $\text{O}$  - acetil - 4 -  $\text{O}$  - (2,3,4,6 - tetra -  $\text{O}$  - acetil -  $\alpha$  -  $\text{D}$  - galactopiranosil) -  $\alpha$  -  $\text{D}$  - galactopiranosil (37)  
 b) - 1,2,3,6 - tetra -  $\text{O}$  - acetil - 4 -  $\text{O}$  - (2,3,4,6 - tetra -  $\text{O}$  - acetil -  $\beta$  -  $\text{D}$  - galactopiranosil) -  $\alpha$  -  $\text{D}$  - galactopiranosil (26)

Las configuraciones anóméricas de ambas octaacetil galactosilgalactosas (26 y 37) se determinaron a partir de los espectros de RMN. El espectro del compuesto eluido en primer lugar mostró (fig. 9a), dos dobletes a  $\delta$  6.35 ( $J_{1,2}$  3.3 Hz) y 4.99 ( $J_{1',2'}$  3.0 Hz) que se asignaron a los protones anóméricos H-1 y H-1' respectivamente; los valores de las constantes de acoplamiento de estas señales indicaron configuración  $\alpha$  de ambos centros anóméricos. Sobre estas bases se asignó a esta sustancia la estructura de 1,2,3,6-tetra-O-acetil-4-O-(2,3,4,6-tetra-O-acetil- $\alpha$ -D-galactopiranosil)- $\alpha$ -D-galactopiranososa (37), obtenida en la condensación con un rendimiento del 40%.

La región comprendida entre  $\delta$  7 y 3 del espectro de RMN del producto eluido en segundo lugar (fig. 9b) mostró dos dobletes asignables a los protones anóméricos H-1 y H'-1 a  $\delta$  6.26 ( $J_{1,2}$  3.0 Hz) y 4.43 ( $J_{1',2'}$  7.5 Hz) respectivamente; las constantes de acoplamiento observadas fueron indicativas de configuración anómérica  $\alpha$  en C-1 y  $\beta$  en C'-1. A la vista de estos resultados se atribuyó a este producto la estructura de 1,2,3,6-tetra-O-acetil-4-O-(2,3,4,6-tetra-O-acetil- $\beta$ -D-galactopiranosil)- $\alpha$ -D-galactopiranososa (26), obtenida con un rendimiento del 30%.

En ambos espectros (figs. 9a y 9b) las señales correspondientes a los protones H-4, H-5, H'-5 y los protones metilénicos H-6, H'-6 aparecieron, entre  $\delta$  3.90 y 4.60 ppm y

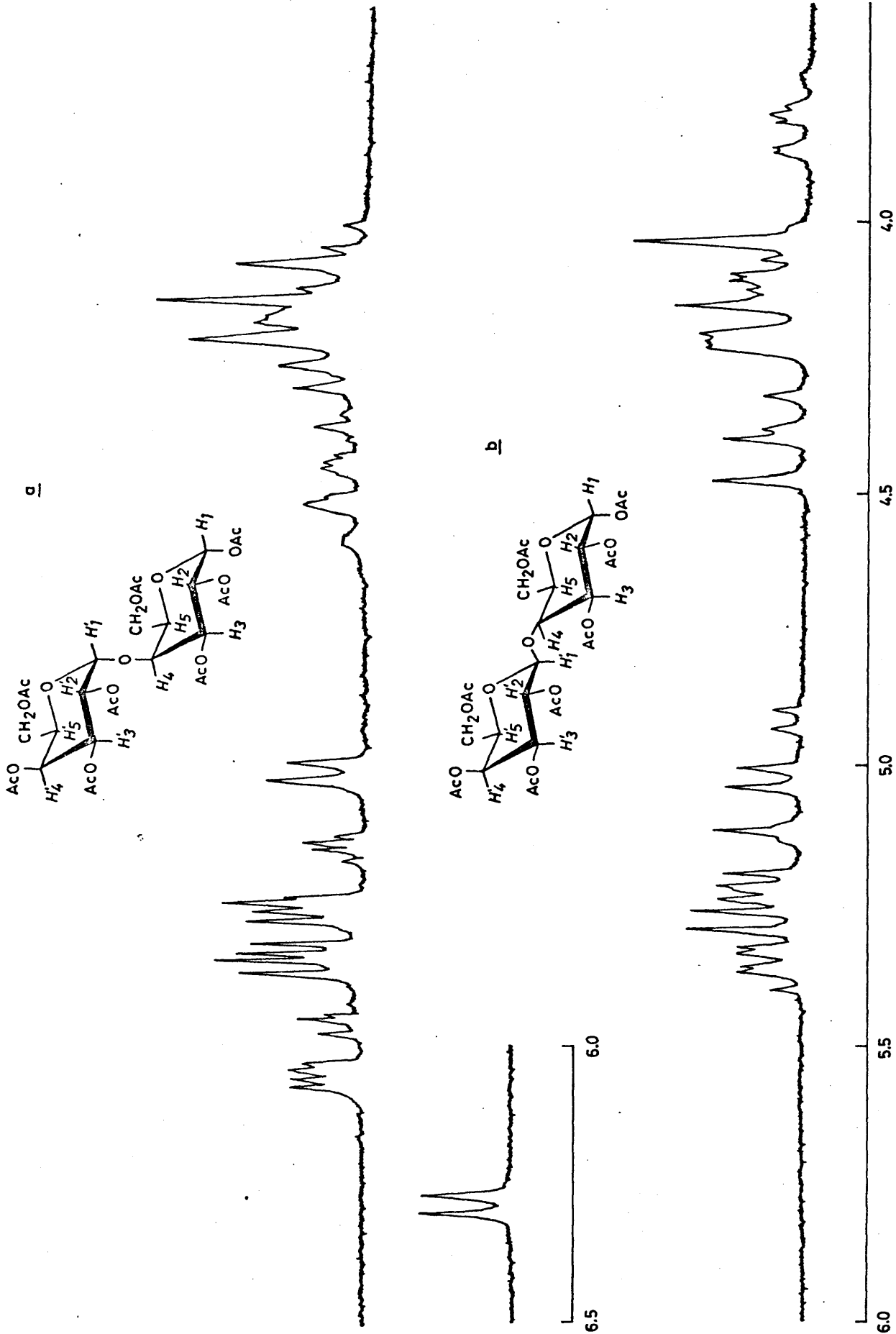


Fig. 9 - La región  $\delta$  6.5 - 3.5 de los espectros de RMN a 100 MHz en  $Cl_3CD$  de  
 a) - 1,2,3,6-tetra-O-acetil-4-O-(2,3,4,6-tetra-O-acetil- $\alpha$ -D-galactopiranosil)- $\alpha$ -D-galactopiranososa (37)  
 b) - 1,2,3,6-tetra-O-acetil-4-O-(2,3,4,6-tetra-O-acetil- $\beta$ -D-galactopiranosil)- $\beta$ -D-galactopiranososa (26)

las de los protones H-2, H'-2, H-3, H'-3 y H'-4 resonaron en la región entre 4.90 y 5.60. Un estudio más detallado de los espectros de RMN de los dos compuestos se describe en el apartado 2.2.5.

Los poderes rotatorios de los dos octaacetatos obtenidos (37 y 26), + 138° para la 1,2,3,6-tetra-O-acetil-4-O-(2,3,4,6-tetra-O-acetil- $\alpha$ -D-galactopiranosil)- $\alpha$ -D-galactopiranososa (37) y + 54° para la 1,2,3,6-tetra-O-acetil-4-O-(2,3,4,6-tetra-O-acetil- $\beta$ -D-galactopiranosil)- $\alpha$ -D-galactopiranososa (26) coincidieron también con los esperados para compuestos con las configuraciones anoméricas  $\alpha$  y  $\beta$  en C'-1 respectivamente.

La desacetilación de 1,2,3,6-tetra-O-acetil-4-O-(2,3,4,6-tetra-O-acetil- $\alpha$ -D-galactopiranosil)- $\alpha$ -D-galactopiranososa (37) en metóxido sódico 0.2 M en metanol condujo con rendimiento prácticamente cuantitativo a un producto cromatográficamente homogéneo ( $R_{Gal}$  0.70), cuyo espectro IR presentó banda de tensión O-H a  $3.400\text{ cm}^{-1}$ . Sus características físicas, p.f. 212 - 213°C y  $\{\alpha\}_D +170^\circ$ , fueron idénticas a las descritas para la 4-O- $\alpha$ -D-galactopiranosil-D-galactosa (1) preparada por otros procedimientos<sup>45-48</sup>.

Analogamente, la desacetilación de 1,2,3,6-tetra-O-acetil-4-O-(2,3,4,6-tetra-O-acetil- $\beta$ -D-galactopiranosil)- $\alpha$ -D-galactopiranososa (26) en las mismas condiciones, dió lugar a

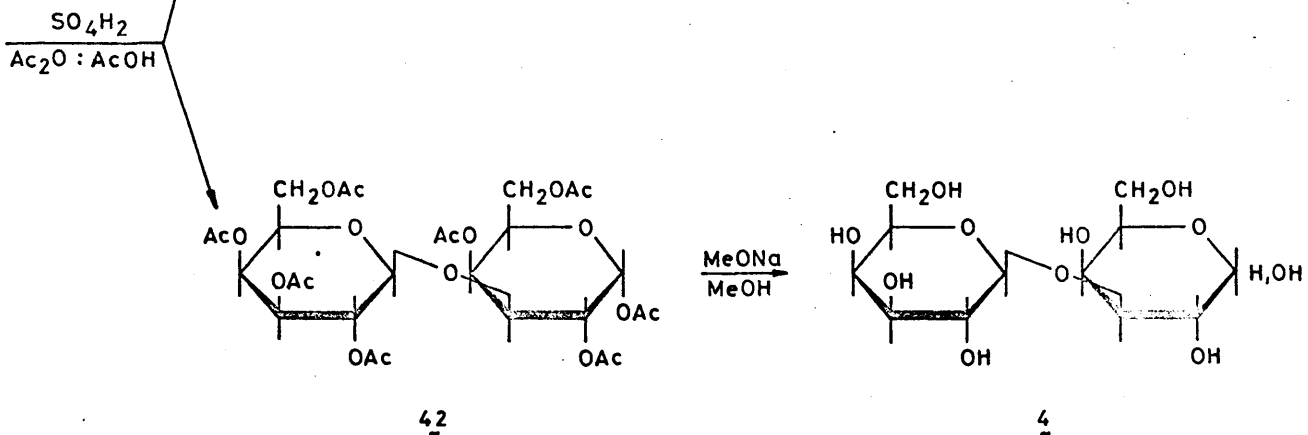
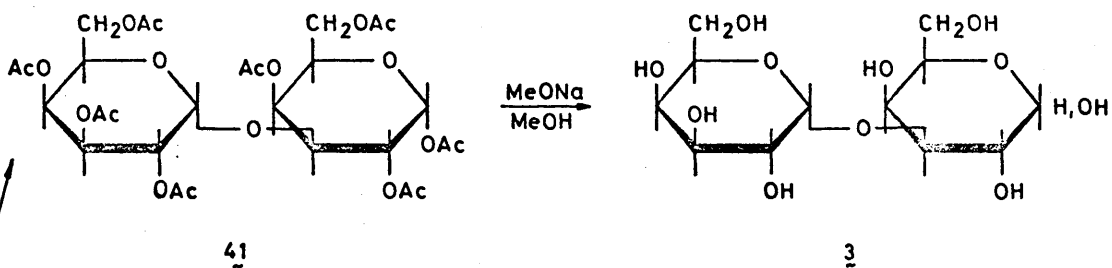
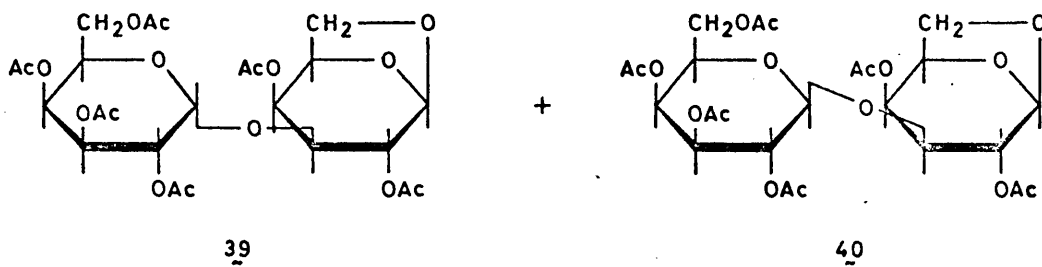
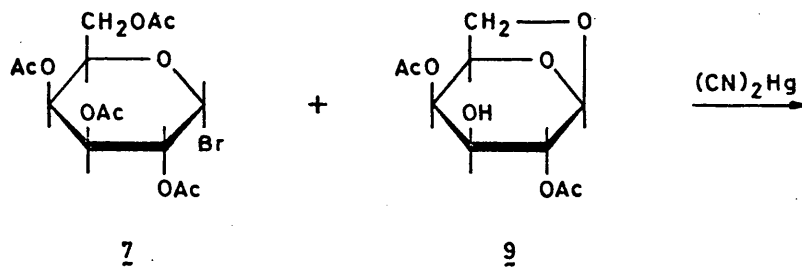
un producto cromatográficamente puro ( $R_{Gal}$  0.78), cuyo espectro IR presentó bandas de tensión O-H a 3.440 y 3.370  $\text{cm}^{-1}$ . Su p.f. 204-206°C, y  $[\alpha]_D + 69^\circ$  coincidieron con los previamente descritos para la 4-O- $\beta$ -D-galactopiranosil-D-galactosa (2) aislada de fuentes naturales<sup>49-53</sup>.

2.2.3. CONDENSACION DEL BROMURO DE 2,3,4,6-TETRA-O-ACETIL- $\alpha$ -D-GALACTOPIRANOSILO (7) CON 2,4-DI-O-ACETIL-1,6-ANHIDRO- $\beta$ -D-GALACTOPIRANOSA (9). SINTESIS DE 3-O- $\alpha$ -D-GALACTOPIRANOSIL-D-GALACTOSA (3) Y 3-O- $\beta$ -D-GALACTOPIRANOSIL-D-GALACTOSA (4)

El procedimiento de síntesis seguido ha sido similar al descrito anteriormente para la síntesis 4-O- $\alpha$  y  $\beta$ -D-galactopiranosil-D-galactosa (1 y 2) y se resume en el esquema 9.

La reacción de 2,4-di-O-acetil-1,6-anhidro- $\beta$ -D-galactopiranosil (9) con 1.5 equivalentes de acetobromogalactosa (7) en presencia de 1.5 equivalentes de cianuro mercúrico en nitrometano-benceno 1:1, a 40°C, se completó en 52 hr dando lugar a una mezcla de productos, de la que por cromatografía en columna sobre gel de sílice se separó cianuro de 2,3,4,6-tetra-O-acetil- $\beta$ -D-galactopiranosilo (38) y una mezcla (76%) de 1,6-anhidro disacáridos peracetilados, (39 y 40), con movilidades cromatográficas muy similares.

ESQUEMA 9



Las condiciones requeridas para la acetólisis del puente 1,6-anhidro de 39 y 40 fueron más enérgicas que las utilizadas en la acetólisis de los 1,6-anhidro disacáridos peracetilados con uniones glicosídicas 1→4 (35 y 36). La mezcla de disacáridos 1,6-anhidro peracetilados se trató con anhídrido acético-ácido acético contenido un 2% de ácido sulfúrico durante 90 min a temperatura ambiente y 30 min a 50°C. La cromatografía en columna sobre gel de sílice de la mezcla de acetólisis condujo a la separación de dos productos principales. Como en la condensación anterior, los análisis elementales de ambas sustancias estuvieron de acuerdo con los esperados para dos galactosilgalactosas peracetiladas (41 y 42) y sus espectros IR, correspondieron con los esperados para estas estructuras. Por otra parte, los espectros RMN a 100 MHz en cloroformo deuterado de ambas sustancias (41 y 42) mostraron las señales correspondientes a los protones mitílicos de ocho grupos acetoxilos entre  $\delta$  1.96 - y 2.16 ppm (fig. 10a y b). El espectro del producto eluido en primer lugar (fig. 11a) que no pudo analizarse, mostró, sin embargo, un doblete a  $\delta$  6.40, adscrito al protón H-1, con una constante de acoplamiento de 3.5 Hz indicando configuración anomérica  $\alpha$  en C-1. El espectro de la sustancia eluida en segundo lugar (fig. 11b) mostró dos dobles a  $\delta$  6.28 ( $J_{1,2}$  3,5 Hz) y 4.62 ( $J_{1,2}$  7.2 Hz) que se asignaron a los protones anoméricos H-1 y H'-1 respectivamente; los valores de las constantes de acoplamiento observadas indicaron configuración anomérica  $\alpha$  en C-1 y  $\beta$  en C'-1. Las señales corres--

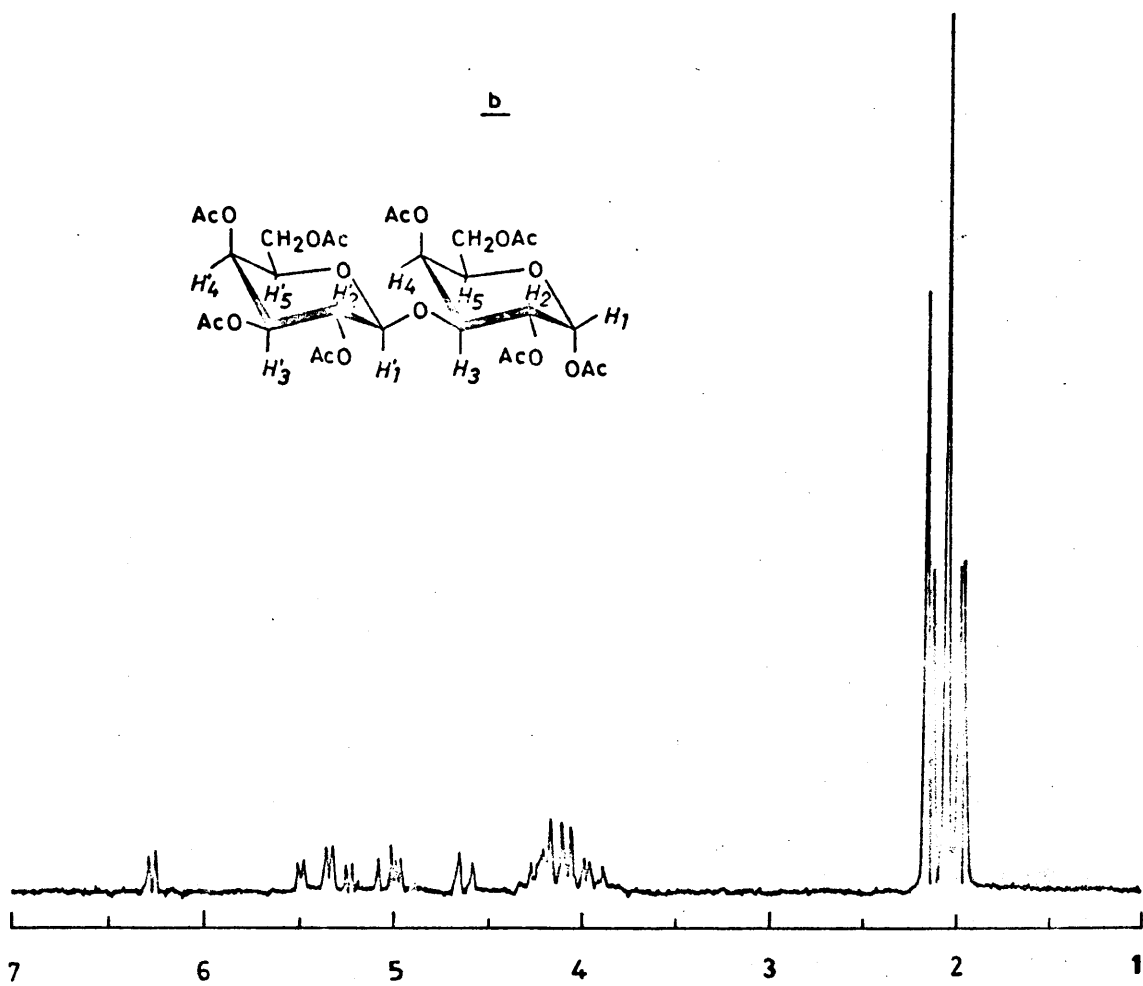
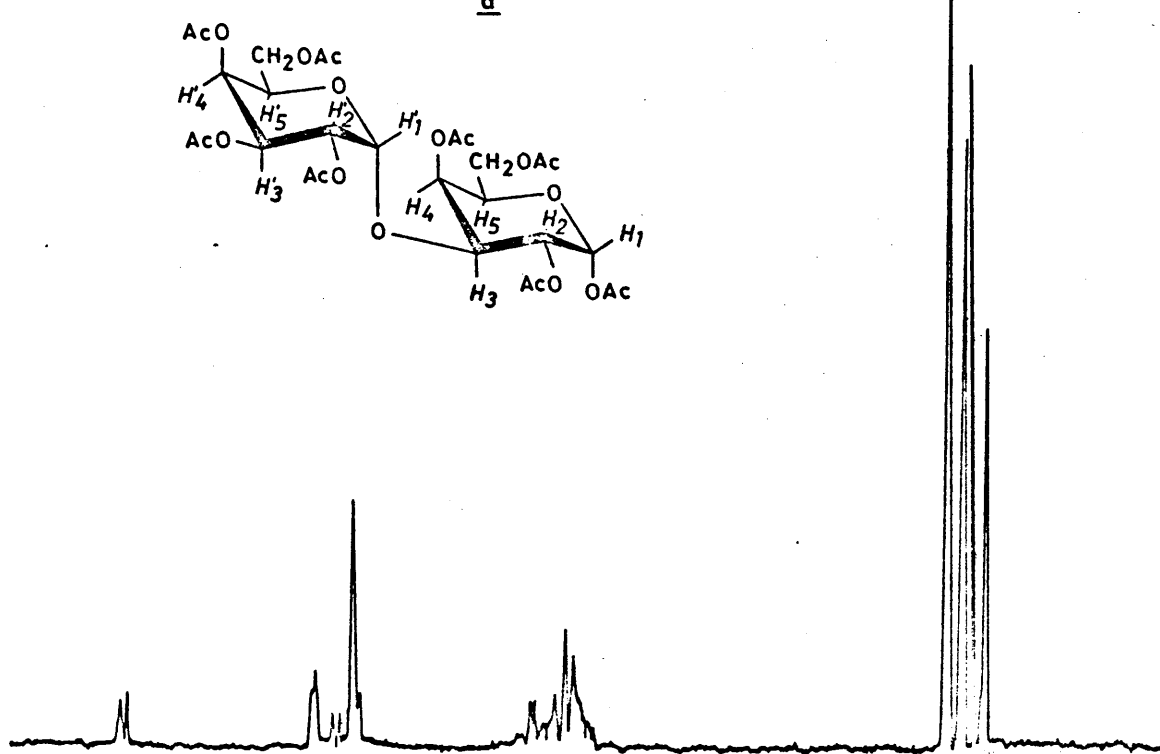
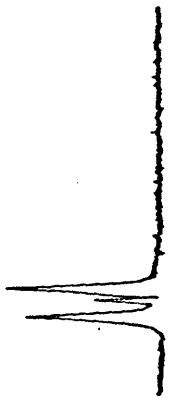


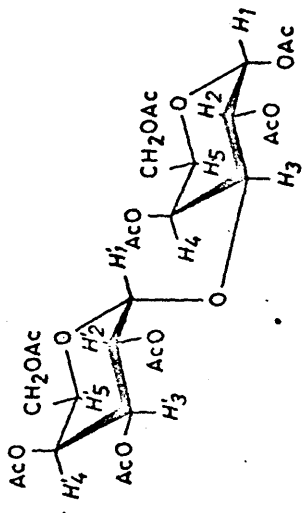
Fig. 10 - Espectros de RMN a 100 MHz en  $\text{Cl}_3\text{CD}$  de

a) - 1,2,4,6 - tetra - O - acetil - 3 - O - ( 2,3,4,6 - tetra - O - acetil -  $\alpha$  - D - galactopiranosil ) -  $\alpha$  - D - galactopiranososa (41)

b) - 1,2,4,6 - tetra - O - acetil - 3 - O - ( 2,3,4,6 - tetra - O - acetil -  $\beta$  - D - galactopiranosil ) -  $\alpha$  - D - galactopiranososa (42)



a



b

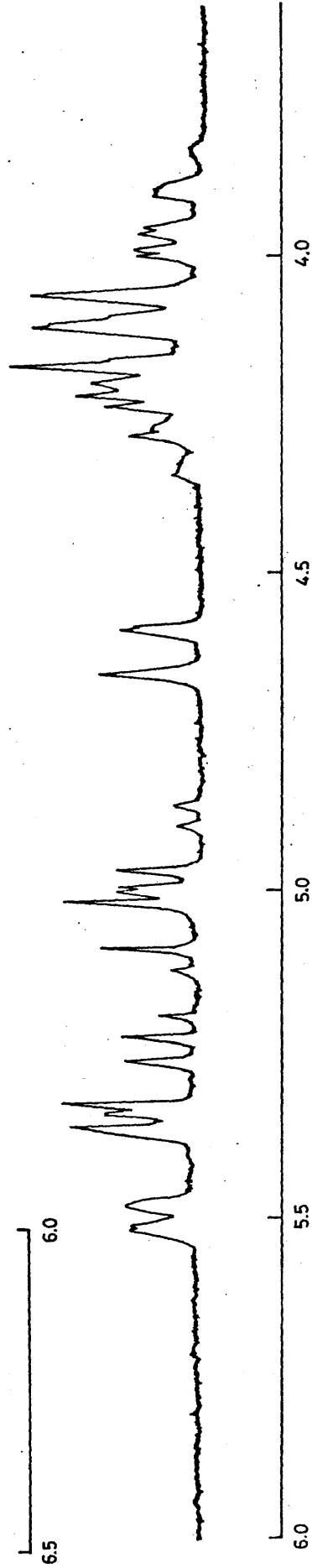
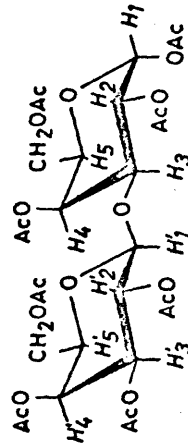


Fig. 11.- La región  $\delta$  6.5 - 3.5 de los espectros de RMN a 100 MHz en  $\text{Cl}_3\text{CD}$  de

a) = 1,2,4,6 - tetra - O - acetil - 3 - O - ( 2,3,4,6 - tetra - O - acetil -  $\alpha$  - D - galactopiranosil ) -  $\alpha$  - D - galactopiranososa (41)

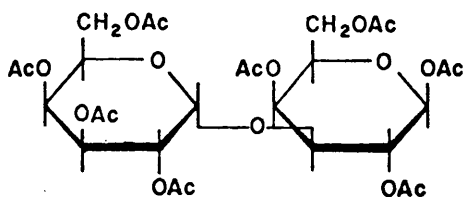
b) = 1,2,4,6 - tetra - O - acetil - 3 - O - ( 2,3,4,6 - tetra - O - acetil -  $\beta$  - D - galactopiranosil ) -  $\beta$  - D - galactopiranososa (42)

pondientes a los protones H-3, H-5, H'-5 y los protones metilénicos H-6, H'-6 aparecieron sin resolver en la región comprendida entre  $\delta$  3.80 y 4.35 y los protones H-2, H'-2, H'-3, H-4 y H'-4 resonaron entre 4.80 y 5.55. Estos resultados permitieron asignar al producto de mayor  $R_f$  la estructura de 1,2,4,6-tetra-O-acetil-3-O-(2,3,4,6-tetra-O-acetil- $\alpha$ -D-galactopiranosil)- $\alpha$ -D-galactopiranosil) (41) y al producto de menor movilidad la estructura de 1,2,4,6-tetra-O-acetil-3-O-(2,3,4,6-tetra-O-acetil- $\beta$ -D-galactopiranosil)- $\alpha$ -D-galactosa (42). El anómero  $\alpha$  (41) se obtuvo con un rendimiento final del 46% y el  $\beta$  (42) con el 14%.

Los poderes rotatorios de  $+137^\circ$  y  $+54^\circ$ , para 41 y 42 respectivamente, estuvieron también de acuerdo con las configuraciones anoméricas asignadas a partir de los espectros RMN.

La desacetilación de la 1,2,4,6-tetra-O-acetil-3-O-(2,3,4,6-tetra-O-acetil- $\alpha$ -D-galactopiranosil)- $\alpha$ -D-galactopiranosil) (41) con metóxido sódico 0,2M en metanol condujo a una masa siruposa, cromatográficamente homogénea ( $R_{Gal}$  0.77), que no se consiguió cristalizar. El poder rotatorio de esta sustancia,  $\{\alpha\}_D +149^\circ$ , concidió prácticamente con el descrito para la 3-O- $\alpha$ -D-galactopiranosil-D-galactosa (3) preparada por otros procedimientos<sup>58, 46, 47</sup>. Por otra parte, la reacetilación de este producto (3) con anhídrido acético piridina dió lugar a un producto cristalino cuyas constantes físicas p.f. 156-157°C y  $\{\alpha\}_D + 113.6^\circ$  fueron idénticas a

las descritas para la 1,2,4,6-tetra-O-acetil-3-O-(2,3,4,6-tetra-O-acetil- $\alpha$ -D-galactopiranosil)- $\beta$ -D-galactopiranososa (43) preparada a partir de la 3-O- $\alpha$ -D-galactopiranosil-D-galactosa (3) aislada de los hidrolizados parciales de  $\lambda$ -carragenina<sup>58</sup>. El espectro RMN a 100 MHz de este octaacetato (43)  $\text{Cl}_3\text{CD}$  no pudo tampoco analizarse, pero mostró un doblete a  $\delta$  5.61 asignado al protón H-1 con una constante de acoplamiento  $J_{1,2}$  8.2 Hz indicativa de configuración anomérica  $\beta$  en C-1.



43

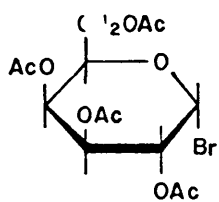
La desacetilación de 1,2,4,6-tetra-O-acetil-3-O-(2,3,4,6-tetra-O-acetil- $\beta$ -D-galactopiranosil)- $\alpha$ -D-galactopiranososa (42) en las mismas condiciones, dió lugar a un producto cromatográficamente puro ( $R_{\text{Gal}}$  0.72), cuyo espectro IR correspondió al de un producto completamente desacetilado. Sus características físicas p.f. 165 -168°C,  $[\alpha]_{\text{D}} +62^\circ$  coincidieron con las descritas para la 3-O- $\beta$ -D-galactopiranosil-D-galactosa (4) obtenida de fuentes naturales<sup>59-74</sup> y preparada por síntesis<sup>76</sup>.

2.2.4. CONDENSACION DEL BROMURO DE 2,3,4,6-TETRA-O-ACETIL- $\alpha$ -D-GALACTOPIRANOSILO (7) CON 2-O-ACETIL-1,6-ANHIDRO- $\beta$ -D-GALACTOPIRANOSA (11). SINTESIS DE 3-O- $\beta$ -D-GALACTOPIRANOSIL-D-GALACTOSA (4).

Como continuación del estudio presentado en esta Tesis sobre las reactividades relativas de los grupos hidroxilo de la 1,6-anhidro- $\beta$ -D-galactopiranososa (10) y 2-O-acetil-1,6-anhidro- $\beta$ -D-galactopiranososa (11) y en relación con la síntesis de disacáridos de galactosa se ha estudiado la reacción de glicosilación de la 2-O-acetil-1,6-anhidro- $\beta$ -D-galactopiranososa (11) con acetobromogalactosa (7) siguiendo el procedimiento anteriormente descrito para la 2,3-di-O-acetil (8) y 2,4-di-O-acetil-1,6-anhidro- $\beta$ -D-galactopiranososa (9). Los resultados obtenidos en esta condensación se indican en el esquema 10.

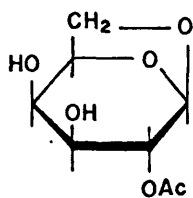
La reacción de 2-O-acetil-1,6-anhidro- $\beta$ -D-galactopiranososa (11) con 1.5 equivalentes de acetobromogalactosa (7) en presencia de 0.75 equivalentes de cianuro mercuríco en 1:1 nitrometano-benceno, a 40°C, se completó en veintiuna horas. La acetilación de la mezcla de reacción con anhídrido acético en piridina dió lugar a una mezcla de productos que se separaron por cromatografía en columna sobre gel de sílice. Se obtuvo así a una pequeña cantidad de cianuro de 2,3,4,6-tetra-O-acetil- $\beta$ -D-galactopiranosilo (38), una fracción principal constituida por 1,6-anhidro disacáridos para

ESQUEMA 10



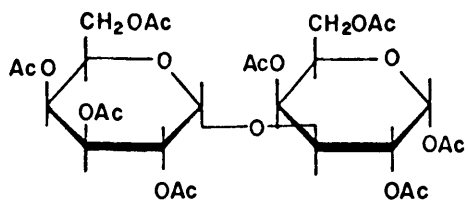
7

+



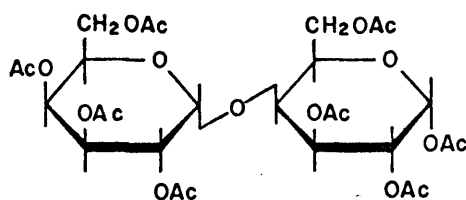
II

- 1.- (CN)<sub>2</sub> Hg
- 2.- Ac<sub>2</sub>O/Pird
- 3.- Ac<sub>2</sub>O/SO<sub>4</sub>H<sub>2</sub>



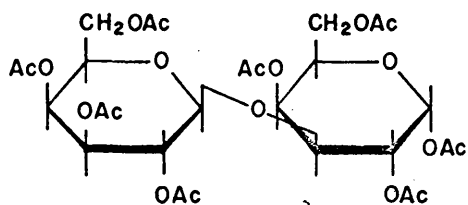
41 - 17%

+



37 - 4%

+



42 - 52%

cetilados (93 %) y una minoritaria probablemente compuesta por una mezcla de trisacáridos, que no ha sido estudiada.

La acetólisis de la mezcla de 1,6-anhidro disacáridos peracetilados con una mezcla de anhídrido acético-ácido acético, conteniendo un 2% de ácido sulfúrico se completó en 1 hr a temperatura ambiente y dió lugar a una mezcla compuesta por un producto principal y tres minoritarios, que se separaron por cromatografía en columna sobre gel de sílice. Se obtuvieron de este modo por orden de elución, una pequeña cantidad de pentaacetyl galactosa, formada en la acetólisis, y los disacáridos peracetilados 1,2,4,6,-tetra-O-acetyl-3-O-(2,3,4,6-tetra-O-acetyl- $\alpha$ -D-galactopiranosil)- $\alpha$ -D-galactopiranososa (41) (17%) 1,2,3,6-tetra-O-acetyl-4-O-(2,3,4,6-tetra-O-acetyl- $\alpha$ -D-galactopiranosil)- $\alpha$ -D-galactopiranososa (37) (4%) y 1,2,4,6-tetra-O-acetyl-2-O-(2,3,4,6-tetra-O-acetyl- $\beta$ -D-galactopiranosil)- $\alpha$ -D-galactopiranososa (42) (52%). Los octaacetatos 37, 41 y 42 se identificaron por comparación de sus movilidades cromatográficas, puntos de fusión, poderes rotatorios y espectros IR con los octaacetatos obtenidos en la condensación de la 2,3-di-O-acetyl-1,6-anhidro- $\beta$ -D-galactopiranososa (8) (octaacetatos 37 y 26) y 2,4-di-O-acetyl-1,6-anhidro- $\beta$ -D-galactopiranososa (9) (octaacetatos 41 y 42), con acetobromogalactosa (7).

Estos resultados indican que, en las condiciones empleadas, el grupo hidroxilo axial en C-3 de la 2-O-acetyl-1,6-

anhidro- $\beta$ -D-galactopiranososa es el más reactivo y que esta - reacción constituye un método directo y sencillo de obtener 3-O- $\beta$ -D-galactopiranosil-D-galactosa (4) por desacetilación de 42.

La mayor reactividad del grupo hidroxilo axial en C-3 de 11 en la reacción de glicosilación es en cierto modo sorprendente. Como se ha indicado previamente los grupos hidroxilo ecuatoriales son, en general, más reactivos que los -- axiales en reacciones de glicosilación<sup>24</sup>. Conforme se ha citado en la introducción (pag. 54) Masamune<sup>54</sup> ha descrito que la reacción de glicosilación de 11 con acetobromogalactosa (7) en cloroformo y en presencia de carbonato de plata tiene lugar, preferentemente, en el grupo hidroxilo ecuatorial en C-4; si bien las características del producto aislado no coinciden con las descritas para la 4-O- $\beta$ -D-galactopiranosil-D-galactosa<sup>49-53</sup> (2). Por otra parte, Shapiro y col.<sup>115</sup> han establecido que la reacción de 11 con el bromuro de 2-- dicloroacetamido-2-desoxi-3,4,6-tri-O-benzoil- $\alpha$ -D-galactopiranosilo, en condiciones similares a las utilizadas en el presente trabajo, tiene lugar sobre ambos hidroxilos, ecuatorial C-4 y axial y en C-3, obteniéndose una mezcla de disacáridos con enlaces glicosílicos 1 $\rightarrow$ 4 y 1 $\rightarrow$ 3 en la relación 3:2. A la vista de estos antecedentes, los resultados que aquí se describen indican, que las reactividades relativas de los grupos hidroxilos de 11 en reacciones de glicosidación dependen en alto grado del agente glicosilante empleado y de las condiciones experimentales.

2.2.5. ESPECTROS DE RMN DE LOS DERIVADOS PERACETILADOS DE -  
 LOS DISACARIDOS 4-O- $\alpha$  Y - $\beta$ -D-GALACTOPIRANOSIL-D-GA--  
 LACTOSA (1 y 2) Y 3-O- $\alpha$  Y - $\beta$ -D-GALACTOPIRANOSIL-D-GA  
 LACTOSA (3 y 4)

Los espectros de RMN de los cuatro disacáridos perace-  
 tilados 1,2,3,6-tetra-O-acetil-4-O-(2,3,4,6-tetra-O-acetil-  
 $\alpha$ -D-galactopiranosil)- $\alpha$ -D-galactopiranososa (37), 1,2,3,6-te-  
 tra-O-acetil-4-O-(2,3,4,6-tetra-O-acetil- $\beta$ -D-galactopirano-  
 sil)- $\alpha$ -D-galactopiranososa (26), 1,2,4,6-tetra-O-acetil-3-O--  
 (2,3,4,6-tetra-O-acetil- $\alpha$ -D-galactopiranosil)- $\alpha$ -D-galactopi-  
 ranosa (41) y 1,2,4,6-tetra-O-acetil-3-O-(2,3,4,6-tetra-O--  
 acetil- $\beta$ -D-galactopiranosil)- $\alpha$ -D-galactopiranososa (42), se -  
 ha determinado en cloroformo-d, acetona-d<sub>6</sub>, y benceno-d<sub>6</sub>. -  
 Este estudio espectroscópico se ha realizado con objeto de  
 obtener la mayor información posible sobre la configuración  
 y la conformación de las moléculas en solución que puede --  
 ser valiosa en un estudio posterior de la conformación de -  
 los disacáridos libres (1-4). La complejidad de los espec--  
 tros en la región  $\delta$  3-7 ppm ha hecho necesario la utiliza--  
 ción de un programa de cálculo que ha permitido comprobar -  
 las asignaciones hechas por análisis parcial de primer or--  
 den.

Los desplazamientos químicos de los protones metálicos de los acetoxilos en los espectros de RMN a 100 MHz en distintos disolventes de los  $\alpha$ -octaacetatos de 4-O- $\alpha$  y - $\beta$ -D-galactopiranosil-D-galactosa (37 y 26) y 3-O- $\alpha$  y - $\beta$ -D-galactopiranosil-D-galactosa (41 y 42), se indican en la Tabla IV; los desplazamientos químicos y las constantes de acoplamiento de los protones anoméricos se recogen en la Tabla V. Los resultados obtenidos de la asignación de las señales a campo más bajo comprobada por comparación de los espectros experimentales con los teóricos (figs. 12, 13 y 14) obtenidos por medio del programa de cálculo LAOCN 3, se indican en la Tabla VI.

Como en otros derivados de oligosacáridos los espectros de RMN de los disacáridos octaacetilados 1,2,3,6-tetra-O-acetil-4-O-(2,3,4,6-tetra-O-acetil- $\alpha$  y  $\beta$ -D-galactopiranosil)- $\alpha$ -D-galactopiranososa (37 y 26) y 1,2,4,6-tetra-O-acetil-3-O-(2,3,4,6-tetra-O-acetil- $\alpha$  y  $\beta$ -D-galactopiranosil)- $\alpha$ -D-galactopiranososa (41 y 42), presentaron bastante complejidad. Sin embargo, el análisis parcial de primer orden en distintos disolventes ha sido posible en la mayor parte de las sustancias y este análisis ha permitido establecer sus configuraciones anoméricas y determinar las conformaciones de los anillos de galactopiranososa.

Las señales correspondientes a los protones metílicos de los acetoxilos de 37, 26, 41 y 42 (Tabla VI), aparecieron a valores de  $\delta$  entre 1.96 y 2.16 ppm en cloroformo deuterado, de 1.87 a 2.12 en acetona deuterada y de 1.58 a 2.08 en benceno deuterado; en ningún caso ha sido posible establecer una diferencia clara entre los desplazamientos químicos de los protones metílicos de los acetoxilos axiales y ecuatoriales.

Las regiones de los espectros a campo más bajo, ha permitido, sin embargo, obtener interesantes conclusiones.

En el espectro de RMN de 1,2,3,6-tetra-O-acetil-4-O-(2,3,4,6-tetra-O-acetil- $\alpha$ -D-galactopiranosil)- $\alpha$ -D-galactosa (37) a 100 MHz, en cloroformo deuterado, la región comprendida entre  $\delta$  3.9 y 6.4 ppm (figs. 9a y 12) pudo dividirse en dos subregiones. La subregión a campo más alto ( $\delta$  3.9-4.6, integral total 7 protones) presentó señales asignables a los protones H-4, H-5, H<sup>3</sup>-5 y los protones metilénicos H-6 y H'-6, que aparecieron sin resolver. La subregión a campo más bajo ( $\delta$  4.9-6.4, integral total 7 protones), pudo analizarse completamente: el doblete a 4.99 se asignó al protón H'-1 ( $J_{1,2}$  3.0 Hz); los cuartetos entrecruzados centrados a 5.17 y 5.19 se asignaron a los protones H'-3 y H-3 respectivamente ( $J_{2,3}$  11.0 Hz,  $J_{3,4}$  2.7 Hz,  $J_{2,3}$  10.7 Hz,  $J_{3,4}$  3.0 Hz); los cuartetos solapados a 5.36 y 5.38 se adscribieron a los protones H-2 y H'-2 respectivamente ( $J_{1,2}$  3.3 Hz,  $J_{2,3}$  10.7 Hz,

$J_{1',2'}$  3.0 Hz,  $J_{2',3'}$  11.0 Hz); el doblete de dobletes a 5.54 se asignó al proton H'-4 ( $J_{3',4'}$  2.7 Hz,  $J_{4',5'}$  1.2 Hz) y finalmente el doblete a 6.35 se asignó al proton H-1 ( $J_{1,2}$  3.3 Hz). En el espectro de 37 en acetona deuterada el doblete a  $\delta$  5.11 se asignó al protón H'-1 ( $J_{1',2'}$  3.5 Hz); el cuadruplete a 5.50 se adscribió al protón H-4 ( $J_{3',4'}$  3Hz,  $J_{4',5'}$  1.5 Hz) y el doblete a 6.32 se asignó al protón H-1 ( $J_{1,2}$  3.0 Hz). El espectro en benceno deuterado presentó un doblete a  $\delta$  5.07 que se asignó a H'-1 ( $J_{1',2'}$  3.2 Hz); un cuadruplete a 5.40 que se asignó a H'-3 ( $J_{2',3'}$  11.2 Hz,  $J_{3',4'}$  2.5 Hz) y un doblete a 6.55, asignado al protón H-1 ( $J_{1,2}$  3.5 Hz). Las constantes de acoplamiento medidas en las señales asignadas a los protones H-1 y H'-1 indicaron claramente configuración anomérica  $\alpha$  en ambos centros y las restantes constantes estuvieron de acuerdo con dichas configuraciones con los dos anillos de galactopiranososa en la conformación  ${}^4C_1$ .

El espectro de 1,2,3,6-tetra-O-acetil-4-O-(2,3,4,6-tetra-O-acetil- $\beta$ -D-galactopiranosil)- $\alpha$ -galactopiranososa (26) en cloroformo deuterado (figs. 9b y 13), presentó en la región entre  $\delta$  3.7 y 4.5 ppm (integral total 8 protones), un doblete aislado a 4.43 que se asignó al protón H'-1 ( $J_{1',2'}$  7.5 Hz); el resto de las señales de esta región, correspondientes a los protones H-4, H-5, H'-5 y los protones metilénicos H-6, H'-6, no pudo analizarse. La región comprendida entre  $\delta$  4.9 y 5.5 (integral total 5 protones) mostró un cuar

tete centrado a 4.97 que se asignó al protón H'-3 ( $J_{2',3'} - 10.2$  Hz,  $J_{3',4'} 3.2$  Hz) y cuatro cuartetos solapados a 5.17, asignado al protón H-3 ( $J_{2,3} 10.5$  Hz,  $J_{3,4} 2.5$  Hz), 5.20, asignado al protón H'-2 ( $J_{1',2'} 7.5$  Hz,  $J_{2',3'} 10.2$  Hz), -- 5.32, asignado al protón H-2 ( $J_{1,2} 3.0$  Hz,  $J_{2,3} 10.5$  Hz), y 5.34, asignado al protón H'-4 ( $J_{3',4'} 3.2$  Hz,  $J_{4',5'} 1.0$  Hz) A campo más bajo, el espectro presentó un doblete a 6.26 -- (integral 1 protón) asignado al protón H-1 ( $J_{1,2} 3.0$  Hz). - El espectro de 26 en acetona deuterada no pudo analizarse; presentó sin embargo, un doblete a  $\delta$  6.21, asignado al protón H-1 ( $J_{1,2} 2.7$  Hz). Asimismo en benceno deuterado únicamente se pudieron asignar el doblete a 4.47 al protón H'-1 ( $J_{1',2'} 8$  Hz), el cuartete a 5.15 al protón H'-3 ( $J_{2',3'} - 10.5$  Hz,  $J_{3',4'} 3.2$  Hz) y el doblete a 6.37 al protón H-1 ( $J_{1,2} 3.5$  Hz). También en este caso los valores de las constantes de acoplamiento de las señales asignadas a los protones anoméricos indicaron claramente las configuraciones anoméricas  $\alpha$  en C-1 y  $\beta$  C'-1, las constantes medidas en el resto de las señales estuvieron de acuerdo con estas configuraciones anoméricas con los anillos de galactopiranososa en la conformación  ${}^4C_1$ .

El espectro de 1,2,4,6-tetra-O-acetil-3-O-(2,3,4,6-tetra-O-acetil- $\alpha$ -D-galactopiranosil)- $\alpha$ -D-galactopiranososa (41) no pudo analizarse en ninguno de los disolventes empleados, observándose sin embargo un doblete aislado a  $\delta$  6.40 en cloroformo deuterado, (fig. 11a) 6.32 en acetona deuterada y -

6.66 en benceno deuterado, con una constante de acoplamiento de 3.5 Hz que se asignó al protón H-1 y permitió establecer la configuración  $\alpha$  en C-1. El espectro en acetona- $d_6$  presentó además, dos dobletes desdoblados a 5.43 y 5.61 - asignables a los protones  $H_4$  y  $H'_4$ .

El espectro de 1,2,4,6-tetra-O-acetil-3-O-(2,3,4,6-tetra-O-acetil- $\beta$ -D-galactopiranosil)- $\alpha$ -D-galactopiranososa (42) en cloroformo deuterado (figs. 11b y 14), presentó un conjunto de señales sin resolver entre  $\delta$ 3.8-4.35 (integral total 7 protones), asignadas a los protones H-3, H-5, H'-5 y los protones metilénicos H-6, H'-6; un doblete a 4.62 que se asignó al protón H'-1 ( $J_{1',2'}$  7.2 Hz); un cuartete a 4.94 asignado a H'-3 ( $J_{2',3'}$  10.2 Hz,  $J_{3',4'}$  3.0 Hz); un cuartete a 5.10 asignado a H'-2 ( $J_{1',2'}$  7.2 Hz,  $J_{2',3'}$  10.2 Hz); un cuartete centrado a 5.28 asignado a H-2 ( $J_{1,2}$  3.5 Hz,  $J_{2,3}$  10.5 Hz) que solapó con el cuartete centrado a 5.35, adscrito al protón H-4 ( $J_{3,4}$  3.0 Hz); un doblete de dobletes sin resolver a 5.49 asignado a H'-4 ( $J_{3',4'}$  3.0 Hz,  $J_{4',5'}$  1.5 Hz) y un doblete a 6.28 asignado al protón H-1 ( $J_{1,2}$  3.5 Hz). El espectro de 42 en acetona deuterada mostró un cuartete a 4.39, asignado al protón H-3 ( $J_{2,3}$  10.5 Hz,  $J_{3,4}$  3.5 Hz); un cuartete a 5.21 asignado a H-2 ( $J_{1,2}$  3.7 Hz,  $J_{2,3}$  10.5 Hz); un multiplete a 5.34 asignado a H-4 ( $J_{3,4}$  3.5 Hz); un doblete de dobletes a 5.57 asignado a H'-4 ( $J_{3',4'}$  3.5 Hz,  $J_{4',5'}$  1 Hz) y un doblete a 6.21 asignado a H-1 ( $J_{1,2}$  3.7 Hz). En el espectro de 42 en benceno

deuterado el doblete a  $\delta$  4.43 se asignó al protón H'-1 ( $J_{1,2}$ , 7.7 Hz), el cuartete a 4.99 se asignó al protón H'-3 ( $J_{2,3}$ , 3.2 Hz,  $J_{2',3'}$ , 10.7 Hz), el doblete de dobletes sin resolver centrado a 5.37 se asignó al protón H'-4 ( $J_{3,4}$ , 3.2 Hz,  $J_{4,5}$ , 1 Hz) y solapó con el cuartete a 5.39 adscrito al protón H'-2 ( $J_{1,2}$ , 7.7 Hz,  $J_{2',3'}$ , 10.7 Hz), el cuartete a 5.59 se asignó al protón H-2 ( $J_{2,3}$ , 10.2 Hz,  $J_{1,2}$ , 3.7 Hz) y solapó con el doblete de dobletes a 5.60 asignado al protón H'-4 ( $J_{3,4}$ , 3.2 Hz,  $J_{4,5}$ , 1 Hz) y un doblete a 6.58 asignado a H-1 ( $J_{1,2}$ , 3.5 Hz). Las constantes de acoplamiento observadas en los protones anoméricos H-1 ( $J_{1,2}$ , 3.5 Hz) y H'-1 ( $J_{1',2'}$ , 7.2 Hz), indicaron claramente las configuraciones anoméricas  $\alpha$  en C-1 y en C'-1 y las restantes constantes de acoplamiento estuvieron de acuerdo con dichas configuraciones considerando los anillos de galactopiranososa en la conformación  ${}^4C_1$ .

a)

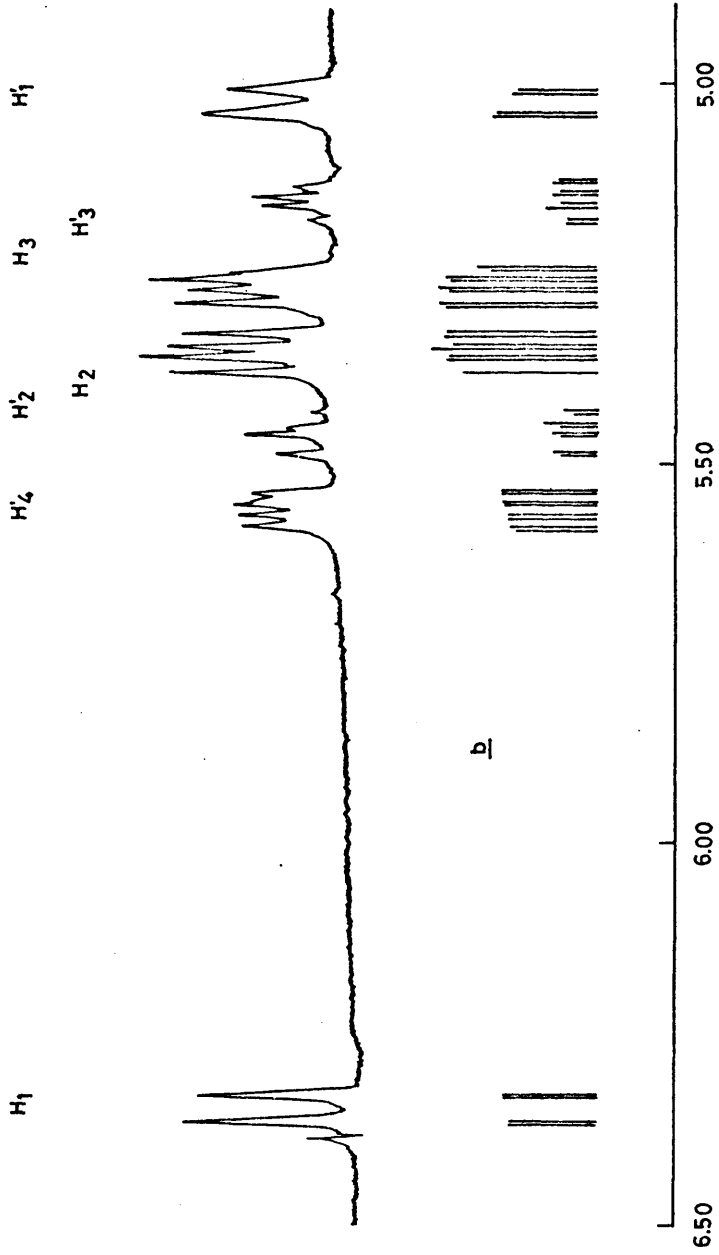
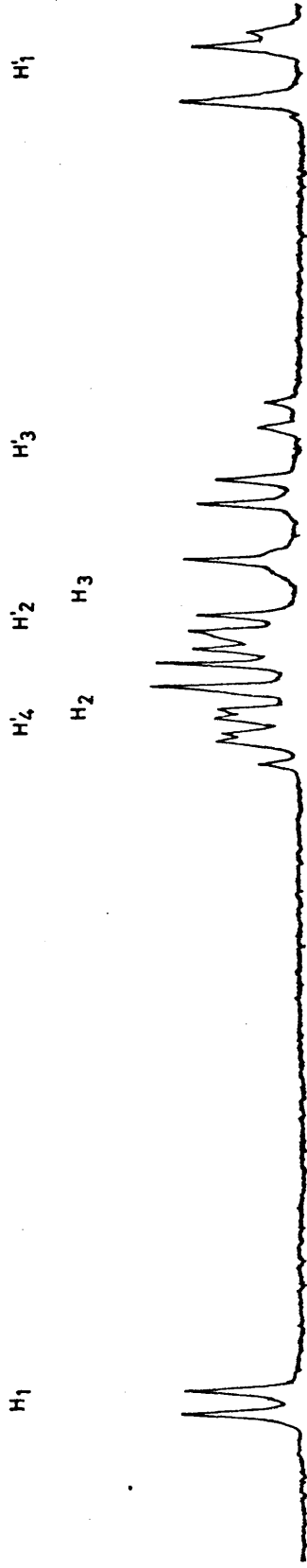


Fig. 12 - La región comprendida entre  $\delta$  5.00 - 6.50 del espectro de RMN a 100 MHz en  $\text{CD}_3\text{CO}$  de 1,2,3,6 - tetra -  $\bar{O}$  - acetil - 4 -  $\bar{O}$  - ( 2,3,4,6 - tetra -  $\bar{O}$  - acetil -  $\alpha$  -  $\bar{D}$  - galactopiranosil ) -  $\alpha$  -  $\bar{D}$  - galactopiranososa ( 37 )  
a) - Experimental  
b) - Calculado

a)



b)

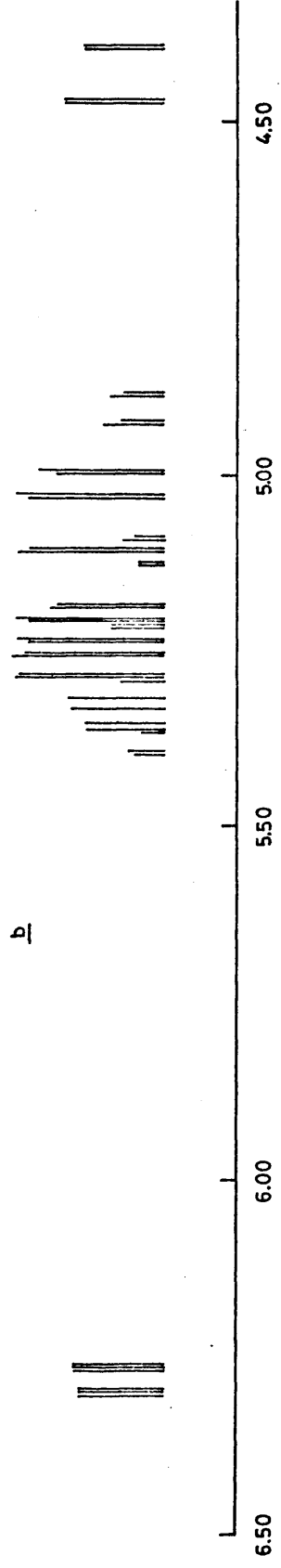


Fig. 13 :- La región comprendida entre  $\delta$  4.20 - 6.50 del espectro de RMN a 100 MHz en Cl<sub>3</sub>CD de 1,2,3,6 - tetra - O - acetil - 4 - O - ( 2,3,4,6 - tetra - O - acetil -  $\beta$  - D - galactopiranosil ) -  $\alpha$  - D - galactopiranososa ( 26 )  
a) :- Experimental  
b) :- Calculado

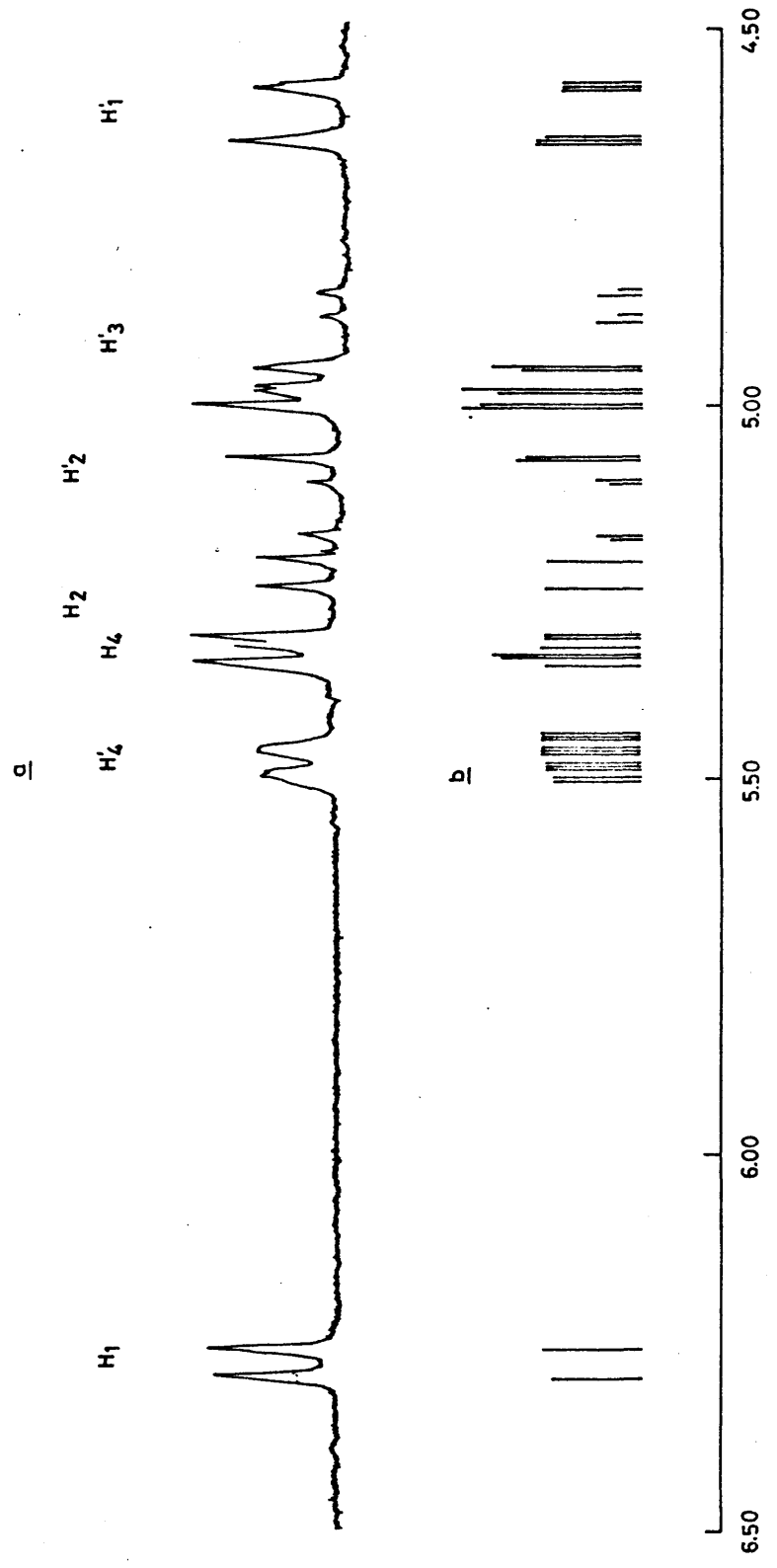


Fig. 14 - La región comprendida  $\delta$  4.50 - 6.50 del espectro de RMN a 100 MHz en Cl<sub>3</sub>CD de 1,2,4,6 - tetra - O - acetil -  $\alpha$  - D - galactopiranosil) -  $\alpha$  - D - galactopiranosil) (42)

a) - Experimental  
b) - Calculado

TABLA IV

Desplazamientos químicos de los protones metílicos de los acetoxilos en los espectros - de RMN a 100 MHz de los  $\alpha$ -octaacetatos de 3-O- $\alpha$  y  $\beta$ -D-galactopiranosil-D-galactosa (compuestos 37 y 26) y 3-O- $\alpha$  y  $\beta$ -D-galactopiranosil-D-galactosa (compuestos 41 y 42). ( $\delta$ ppm). (integral -- protones)

Comp.	Disolvente								
37	$Cl_3CD$	1.97(3)	2.01(6)	2.04(3)	2.09(6)	2.11(3)	2.13(3)		
37	$(CD_3)_2CO$	1.90(3)	1.94(3)	1.95(3)	1.97(3)	2.06(3)	2.08(6)	2.09(3)	
37	$C_6D_6$	1.62(3)	1.64(3)	1.68(3)	1.74(6)	1.76(3)	1.90(3)	1.98(3)	
26	$Cl_3CD$	1.97(6)	2.02(3)	2.04(3)	2.08(3)	2.10(6)	2.14(3)		
26	$(CD_3)_2CO$	1.90(3)	1.94(6)	1.98(3)	2.03(3)	2.09(9)			
26	$C_6D_6$	1.58(3)	1.62(3)	1.64(3)	1.66(3)	1.72(3)	1.76(3)	1.86(3)	2.08(3)
41	$Cl_3CD$	1.96(3)	2.02(6)	2.05(6)	2.14(9)				
41	$(CD_3)_2CO$	1.87(3)	1.93(3)	2.00(6)	2.04(3)	2.08(3)	2.10(3)	2.12(3)	
41	$C_6D_6$	1.60(3)	1.66(6)	1.70(6)	1.74(3)	1.84(3)	1.85(3)		
42	$Cl_3CD$	1.96(3)	1.98(3)	2.04(9)	2.12(3)	2.16(6)			
42	$(CD_3)_2CO$	1.88(3)	1.96(3)	1.97(6)	2.04(3)	2.06(3)	2.08(6)		
42	$C_6D_6$	1.59(3)	1.65(3)	1.68(6)	1.69(3)	1.73(3)	1.78(3)	1.80(3)	

TABLA V

Desplazamientos químicos ( $\delta$  ppm) y constantes de acoplamiento (Hz) de los protones anoméricos de los  $\alpha$ -octaacetatos de 4-O- $\alpha$  y - $\beta$ -D-galactopiranosil-D-galactopiranosas (compuestos 37 y 26) y 3-O- $\alpha$  y - $\beta$ -D-galactopiranosil-D-galactopiranosas (compuestos 41 y 42).

Compuesto	Disolvente	H-1	$J_{1,2}$	H'-1	$J_{1',2'}$
37	$Cl_3CD$	6.35	3.3	4.99	3.0
37	$(CD_3)_2CO$	6.32	3.0	5.11	3.5
37	$C_6D_6$	6.55	3.5	5.07	3.2
26	$Cl_3CD$	6.26	3.0	4.43	7.5
26	$(CD_3)_2CO$	6.21	2.7	-	-
26	$C_6D_6$	6.37	3.5	4.47	8.0
41	$Cl_3CD$	6.40	3.5	-	-
41	$(CD_3)_2CO$	6.32	3.5	-	-
41	$C_6D_6$	6.66	3.5	-	-
42	$Cl_3CD$	6.28	3.5	4.62	7.2
42	$(CD_3)_2CO$	6.21	3.7	-	-
42	$C_6D_6$	6.58	3.7	4.43	7.7

TABLA VI

Desplazamientos químicos (δppm) y constantes de acoplamiento (Hz) calculados para los aspectos de RMN a 100 Hz en Cl<sub>3</sub>CD de los α-octaacetatos de 4-O-α y β-D-galactopiranosil-D-galactosa (compuestos 37 y 26) y 3-O-β-D-galactopiranosil-D-galactosa (compuesto 42).

Compuesto	H-1	H-2	H-3	H-4	H'-1	H'-2	H'-3	H'-4
37	6.35	5.36	5.19	-	4.99	5.38	5.17	5.54
26	6.26	5.32	5.17	-	4.43	5.20	4.97	5.34
42	6.28	5.28	-	5.35	4.62	5.10	4.94	5.49

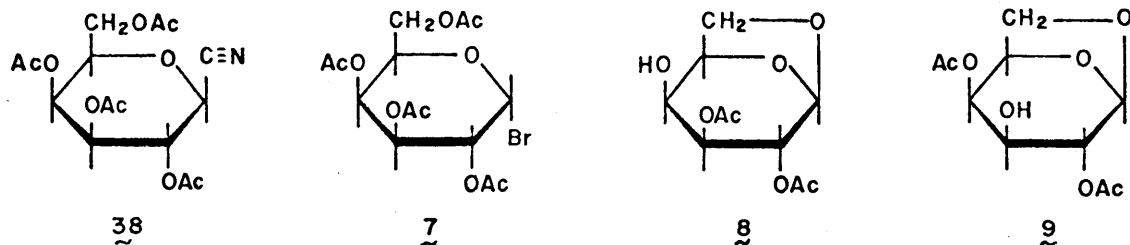
Compuesto	J <sub>1,2</sub>	J <sub>2,3</sub>	J <sub>3,4</sub>	J <sub>4,5</sub>	J <sub>1',2'</sub>	J <sub>2',3'</sub>	J <sub>3',4'</sub>	J <sub>4',5'</sub>
37	3.3	10.7	3.0	1.2	3.0	11.0	2.7	1.2
26	3.0	10.5	2.5	1.0	7.5	10.2	3.2	1.0
42	3.5	10.5	3.0	1.5	7.2	10.2	3.0	1.5

2.3. EL MECANISMO DE LAS REACCIONES DE GLICOSILACION EN PRESENCIA DE CATALIZADORES SOLUBLES. ESTRUCTURA Y FUNCION DE LOS CIANO DERIVADOS FORMADOS EN GLICOSILACIONES CATALIZADAS POR CIANUROS METALICOS.

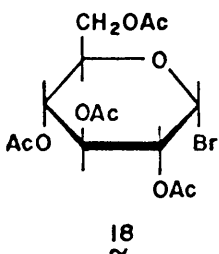
2.3.1. INTRODUCCION

En las reacciones de condensación del bromuro de 2,3,4,6-tetra-O-acetil- $\alpha$ -D-galactopiranosilo (7) con 2,3-di-O-acetil-1,6-anhidro- $\beta$ -D-galactopiranososa (8) y 2,4-di-O-acetil-1,6-anhidro- $\beta$ -D-galactopiranososa (9), en presencia de cianuro mercúrico, dirigidas a la síntesis de los disacáridos de galactosa 1-4, se ha aislado una sustancia identificada como cianuro de 2,3,4,6-tetra-O-acetil- $\beta$ -D-galactopiranosilo (38) (ver apartados 2.2.2. y 2.2.3.). Cianuros de glicosilo de este tipo se han obtenido previamente en reacciones haluros de glicosilo con cianuros metálicos<sup>112,113,154-158</sup>. De acuerdo en la literatura, la reacción de halu--

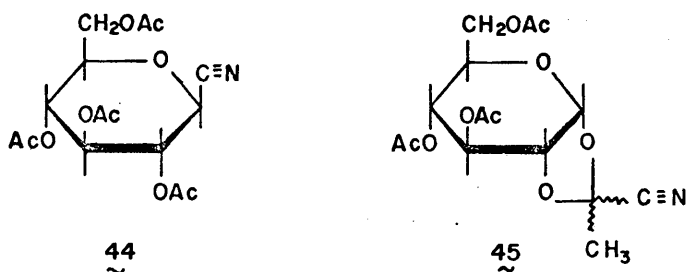
ros de cis- $\alpha$ -acetoxiglicopiranosilo con cianuro de plata y cianuro mercúrico da lugar, al menos, a dos tipos de ciano derivados. La reacción del bromuro de 2,3,4,6-tetra-O-ace-



til- $\alpha$ -D-glucopiranosilo (18) con cianuro mercúrico en nitrometano conduce a cianuro de 2,3,4,6-tetra-O-acetil- $\beta$ -D-glucopiranosilo (44) y 3,4,6-tri-O-acetil-1,2-O-(1-cianoetilidén)- $\alpha$ -D-glucopiranososa (45) con muy bajo rendimiento<sup>112</sup>.



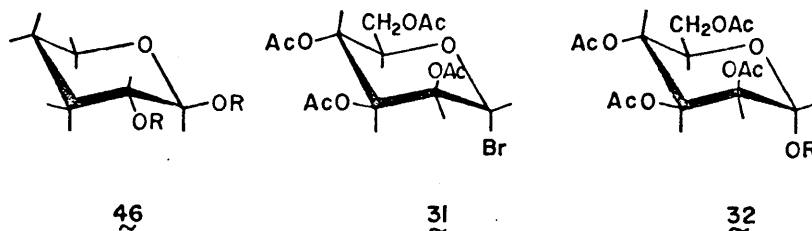
La reacción del bromuro 18 con cianuro de plata en xileno,



da lugar, por otra parte, al 1,2-O-(1-cianoetilidén) derivado (45) con un rendimiento apreciablemente mayor<sup>112,159</sup>. La configuración absoluta del carbono portador del grupo ciano en el compuesto 45 no se conoce y los valores de -- constantes de acoplamiento en su espectro de RMN parecen -- indicar la existencia del anillo de piranosa en una confor- mación de bote torcido<sup>160</sup>. Contrariamente, la reacción del bromuro de 2,3,4,6-tetra-O-acetil- $\alpha$ -D-galactopiranosilo -- (7) con cianuro mercúrico en nitrometano da lugar al cianu- ro de 2,3,4,6-tetra-O-acetil- $\beta$ -D-galactopiranosilo (38) -- con buen rendimiento<sup>113,153,154,157,158</sup>, y del mismo modo se comportan los bromuros de 2,3,4-tri-O-acetil- $\alpha$ -D-xilopi- ranosilo<sup>155</sup> y 2,3,4-tri-O-benzoil- $\beta$ -D-ribopiranosilo<sup>161</sup>.

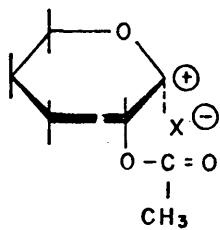
Como se ha indicado en la Introducción de esta Tesis, los datos de que se dispone actualmente acerca de los meca- nismos de reacciones de glicosilación, son muy reducidos y la clasificación de los distintos tipos de reacción y los diferentes esquemas propuestos se basan, solamente, en una combinación de datos bibliográficos<sup>92,111</sup>. Los 1-halógeno azúcares utilizados en reacciones de glicosilación se obtie- nen normalmente en la forma termodinámicamente más estable, con el átomo de halógeno en posición axial. Para azúcares de la serie D en conformación  ${}^4C_1$  y de la serie L en con- formación  ${}^1C_4$ , estos derivados son los denominados  $\alpha$ -halu- ros. La glicosilación con halogenuros de glicosilo-1,2-cis, como los bromuros de 2,3,4,6-tetra-O-acetil- $\alpha$ -D-gluco (18)

y galactopiranosilo (7), procede generalmente con inversión de la configuración en C-1 dando glicósidos 1,2-trans (46), mientras que halógenuros de glicosilo-1,2-trans, como el -- bromuro de 2,3,4,6-tetra-O-acetil- $\alpha$ -D-manopiranosilo (31), transcurre con retención de la configuración en C-1, dando también glicósidos 1,2-trans (32).

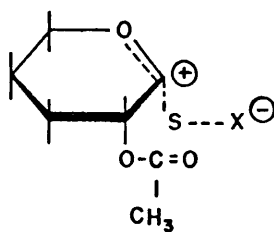


La formación preferente de glicósidos 1,2-trans (46) puede explicarse admitiendo un mecanismo  $S_N2$ , aunque el mecanismo de glicosilación parece ser mucho más complejo. Está generalmente admitido que cuando las glicosilaciones se llevan a cabo en presencia de sales de plata insolubles -- ( $CO_3Ag_2$  y  $Ag_2O$ ) y en disolventes que contribuyen a la estabilización del estado de transición, como el éter o el cloroformo en presencia de iodo, el halogenuro, adsorbido sobre el compuesto de plata, sufre una reacción concretada con el alcohol<sup>25</sup>, que da lugar al glicósido 1,2-trans. -- Cuando las glicosilaciones se realizan en presencia de catalizadores solubles o aceptores de ácido<sup>162-164</sup> se admite un mecanismo  $S_N1$  en base a la fácil formación de un catión glicosílico estabilizado por resonancia. Por analogía con los esquemas de solvolisis propuestos por Winstein<sup>165</sup> el halogenuro puede reaccionar vía un par iónico íntimamente

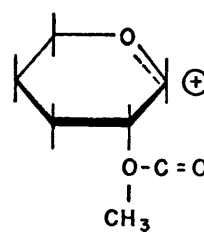
ligado (47), un par iónico separado por el disolvente (48) ó un ión libre (49), según las condiciones. El hecho de --



47

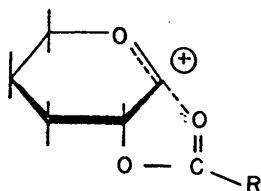


48

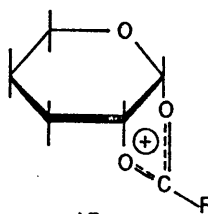


49

que se obtengan preferentemente glicósidos 1,2-trans a pesar del mecanismo  $S_N1$  propuesto, se explica si se admite - que la reacción transcurre a través del par iónico íntimamente ligado 47 que reaccionaría con nucleófilos con inversión de la configuración<sup>165-168</sup>. Sin embargo, y de acuerdo con los resultados obtenidos a partir de haluros de glicosilo con un grupo no participante en C-2<sup>97,169</sup>, parece más lógico admitir un efecto de grupo vicinal que implique al grupo 2-aciloxi como responsable del curso estérico de la glicosilación. Este efecto puede consistir en la interacción de los orbitales p del oxígeno carbonílico con el carbocación en C-1 (14) ó en la formación de un ión aciloxo--



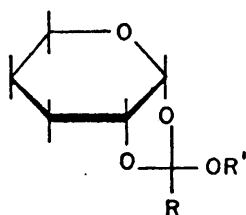
14



15

nio (15). Estudios realizados con iones aciloxonio<sup>170</sup> y con ortoesteres de azúcares<sup>23</sup> indican que estos cationes ambientales (15) pueden reaccionar de dos modos con un alcohol. En medio alcalino o neutro y en reacción cinéticamente controlada se obtiene predominantemente el ortoester<sup>100,171--174</sup>

(34). En presencia de aniones, perclorato o cianuro -- que puedan bloquear el ión aciloxonio (15), el alcohol puede atacar en C-1, en una reacción cinéticamente controlada, para dar el glicósido 1,2-trans (46). Si la reacción se -- lleva a cabo en disolventes muy polares, la glicosilación puede proceder, sin embargo, vía el catión glicosílico 49 dando una mezcla de glicósidos cis y trans sin que tenga lugar la formación de ión aciloxonio (15)<sup>175</sup>.



34

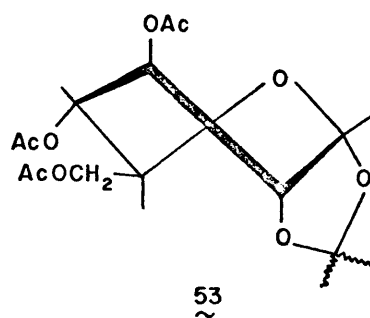
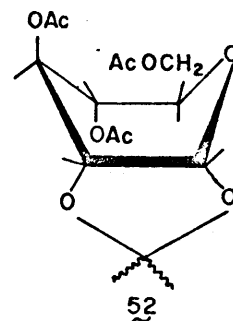
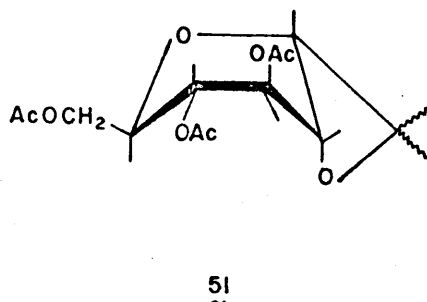
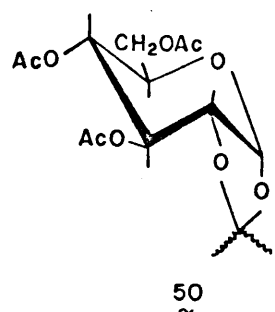
Estos son, en líneas generales, los mecanismos propuestos para las reacciones de glicosilación con haluros de glicosilo. No existe, sin embargo, una prueba definitiva sobre la existencia de iones aciloxonio en estas reacciones aunque la química de tales iones<sup>23,170</sup> es consistente con el curso de glicosilación y el aislamiento de ciertos productos de tipo ortoester, como el 1,2-O-(1-cianoetilidén) derivado (45), constituye una evidencia adicional de la formación de iones aciloxonio (15).

Con objeto de aportar nuevos datos sobre el mecanismo de la reacción de glicosilación en presencia de cianuros metálicos y a la vista de los interesantes problemas que presentan, tanto el mecanismo de formación como la estructura de los productos de reacción de cianuros metálicos con haluros de glicosilo, se han estudiado en esta Tesis las reacciones del bromuro de 2,3,4,6-tetra-O-acetil- $\alpha$ -D-galactopiranosilo (7) y de 2,3,4,6-tetra-O-acetil- $\alpha$ -D-glucopiranosilo (18) con cianuro mercurico en nitrometano y cianuro de plata en xileno. La mayor parte de los productos formados en estas reacciones se han separado en este trabajo por métodos cromatográficos, se han establecido sus estructuras por métodos espectroscópicos y se han estudiado sus reacciones en relación con el papel que pueden desempeñar en la síntesis de glicósidos.

### 2.3.2. LA REACCION DEL BROMURO DE 2,3,4,6-TETRA-O-ACETIL- $\alpha$ -D-GLUCOPIRANOSILO (18) CON CIANURO DE PLATA EN XILENO

La reacción del bromuro de 2,3,4,6-tetra-O-acetil- $\alpha$ -D-glucopiranosilo (18) con cianuro de plata en xileno ha sido previamente estudiada por L.R. Buerger<sup>159</sup> en 1934. De acuerdo con este autor la reacción da lugar a un producto, p.f. 76°C, con un rendimiento del 45%, al que se asignó, en principio, la estructura de cianuro de 2,3,4,6-tetra-O-acetil- $\beta$ -D-glucopiranosilo (44). Posteriormente, Coxon y Fletcher<sup>112</sup>

asignaron a esta sustancia la estructura de 3,4,6-tri-O-acetil-1,2-O-(1-ciano-etilidén)- $\alpha$ -D-glucopiranososa (45). La estructura 45 quedó químicamente demostrada de forma inequívoca<sup>112</sup> y el espectro de RMN del producto indicó un cambio fundamental en la conformación normal  ${}^4C_1$  del anillo de glucopiranososa producido por la formación del anillo acetálico 1,2-cis<sup>160</sup>. En efecto, la consideración de las constantes de acoplamiento conduce, de acuerdo con Coxon y Fletcher, a una conformación diferente a la  ${}^4C_1$  normal (50) e intermedia entre las conformaciones bote (51) y (52) y bote torcido (53), pero más próxima a esta última<sup>160</sup>.



El rendimiento con que se obtiene 45 en la reacción de acetobromogalactosa con cianuro de plata en xileno es bajo y en la reacción se forma una cantidad considerable de productos no identificados<sup>112,159</sup>. Con objeto de obte--

ner mayor información sobre la formación del cianoetilidén derivado 45, y su posible papel en las reacciones de glicosilación, en esta Memoria se han estudiado la mayor parte de los productos formados en la reacción.

La condensación del bromuro de 2,3,4,6-tetra-O-acetil- $\alpha$ -D-glucopiranosilo (18) con cianuro de plata en xileno - en las condiciones previamente descritas<sup>112</sup> dió lugar a -- una mezcla compleja de sustancias. La cromatografía en capa fina de la mezcla de reacción mostró la presencia de -- tres productos principales con movilidades cromatográficas muy similares en todos los eluyentes ensayados. Tras una laboriosísima separación cromatográfica se obtuvieron pu-- rros los tres productos principales que se denominaron, por orden de elución F-1 Glc CNAg, F-2 Glc GNAg y F-3 Glc CNAg.

El producto eluido en primer lugar, F-1 Glc CNAg, -- coincidió en todas sus constantes, con la 3,4,6-tri-O-acetil-1,2-O-(1-cianoetilidén)- $\alpha$ -D-glucopiranososa (45), previamente obtenida por cristalización de la mezcla de reacción bruta por el procedimiento descrito<sup>112,159</sup>. Las interesantes propiedades espectroscópicas de esta sustancia y la interpretación de éstas en términos conformacionales, nos indujo a estudiar e reinterpretar detenidamente su espectro de RMN en distintos disolventes.

De acuerdo con la literatura<sup>112</sup> del espectro IR de 45 no presentó banda asignable a la vibración de tensión C≡N (fig. 15). El espectro de RMN de 45 a 100 MHz en Cl<sub>3</sub>CD -- (fig. 16) fue también concordante con el descrito previamente<sup>160</sup> y, con objeto de obtener más información sobre la inesperada conformación 53 asignada a 45<sup>160</sup>, se registraron sus espectros en acetona-d<sub>6</sub> (fig. 17) y benceno-d<sub>6</sub> -- (fig. 18). Los desplazamientos químicos de los protones metílicos y metilénicos y metínicos, en los tres disolventes, se dan en las Tablas VII y VIII respectivamente, y las constantes de acoplamiento medidas se reseñan en la Tabla IX. En todos los casos, el protón anomérico apareció a campo -- más bajo que los restantes protones seguido de los protones H-3, H-4 y H-2 y de los protones H-6 H'-6 y H-5 (Tabla VIII). Las constantes de acoplamiento observadas en los espectros registrados en acetona-d<sub>6</sub> y en benceno-d<sub>6</sub> coincidieron prácticamente con las medidas en el espectro en cloroformo-d. Una simple inspección de estas constantes pone de manifiesto, que la molécula no se encuentra en la esperada conformación 50 con los protones H-2, H-3, H-4 y H-5 en -- orientación axial. La constante J<sub>4,5</sub> (9.5 Hz) está de acuerdo con la esperada para 50 pero las constantes J<sub>2,3</sub> (2.7 Hz) y J<sub>3,4</sub> (2.7 Hz) están más próximas a las esperadas para orientaciones "gauche" de los protones H-2, H-3 y H-4, H-5. El valor de la constante J<sub>1,2</sub> (5.0 Hz), indica, por -- otra parte, que la parte del anillo en que se encuentran -- los protones H-1 y H-2 se hace más plana que en 50 debido a la existencia del anillo de cinco miembros<sup>176, 177</sup>.

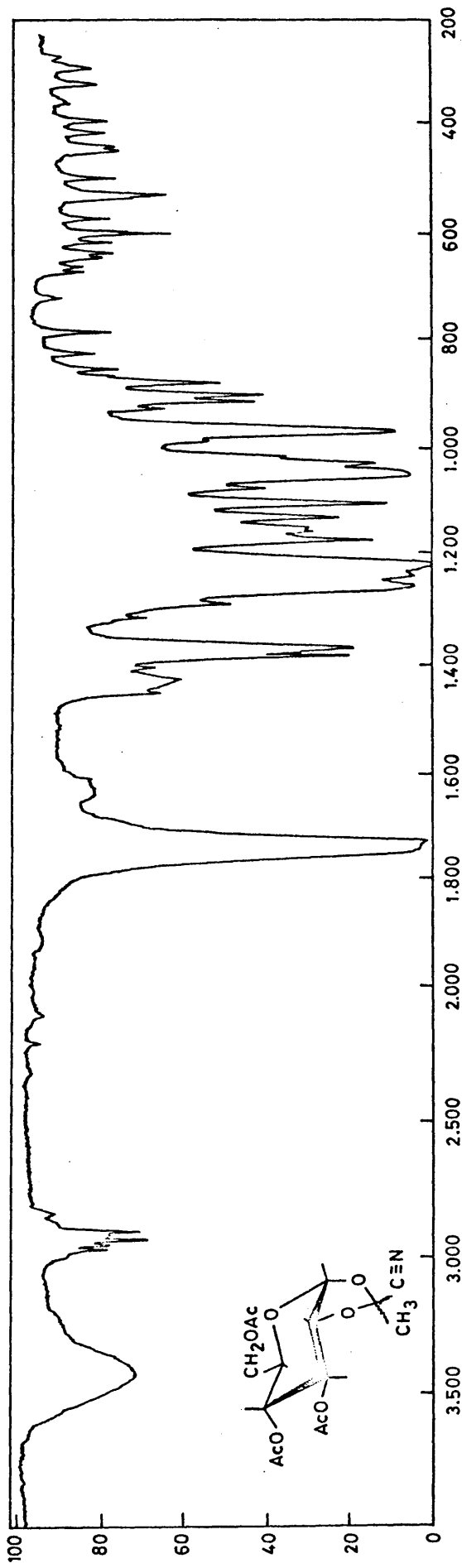


Fig. 15 - Espectro IR (ErK) de la 3,4,6-tri-O-acetil-1,2-O-(1-cianoetilidén) -  $\alpha$ -D-glucopiranososa (45)

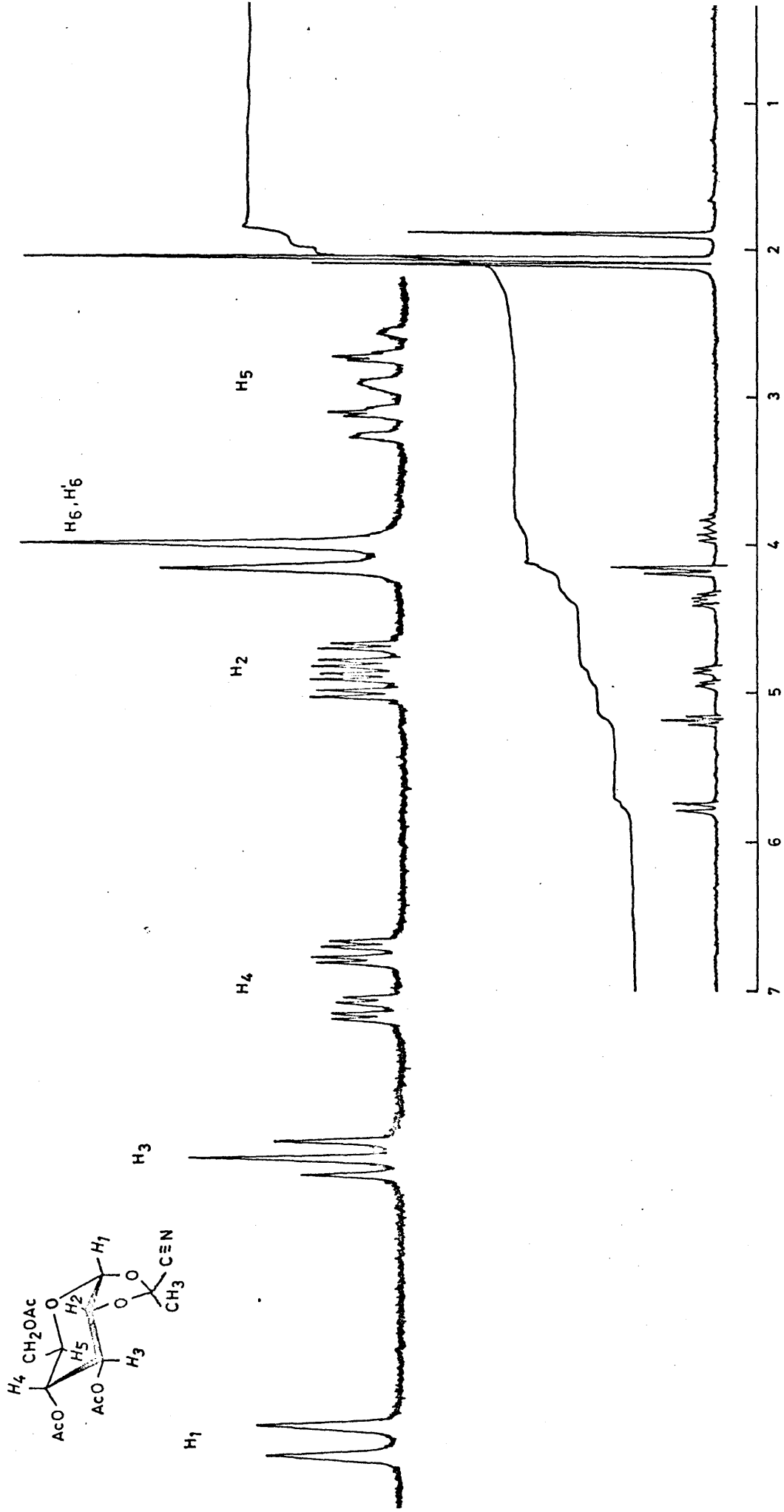
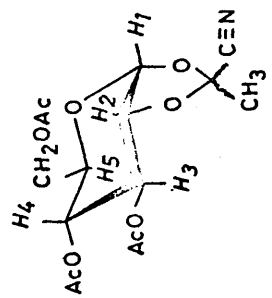


Fig. 16 - Espectro RMN a 100 MHz de la 3,4,6-tri-O-acetil-1,2-O-(1-cianoetilidén) -  $\alpha$  - D - glucopiranos (45) ( $CDCl_3$ )

H<sub>6</sub>, H'<sub>6</sub>



H<sub>3</sub>

H<sub>1</sub>

H<sub>5</sub>

H<sub>2</sub>

H<sub>4</sub>

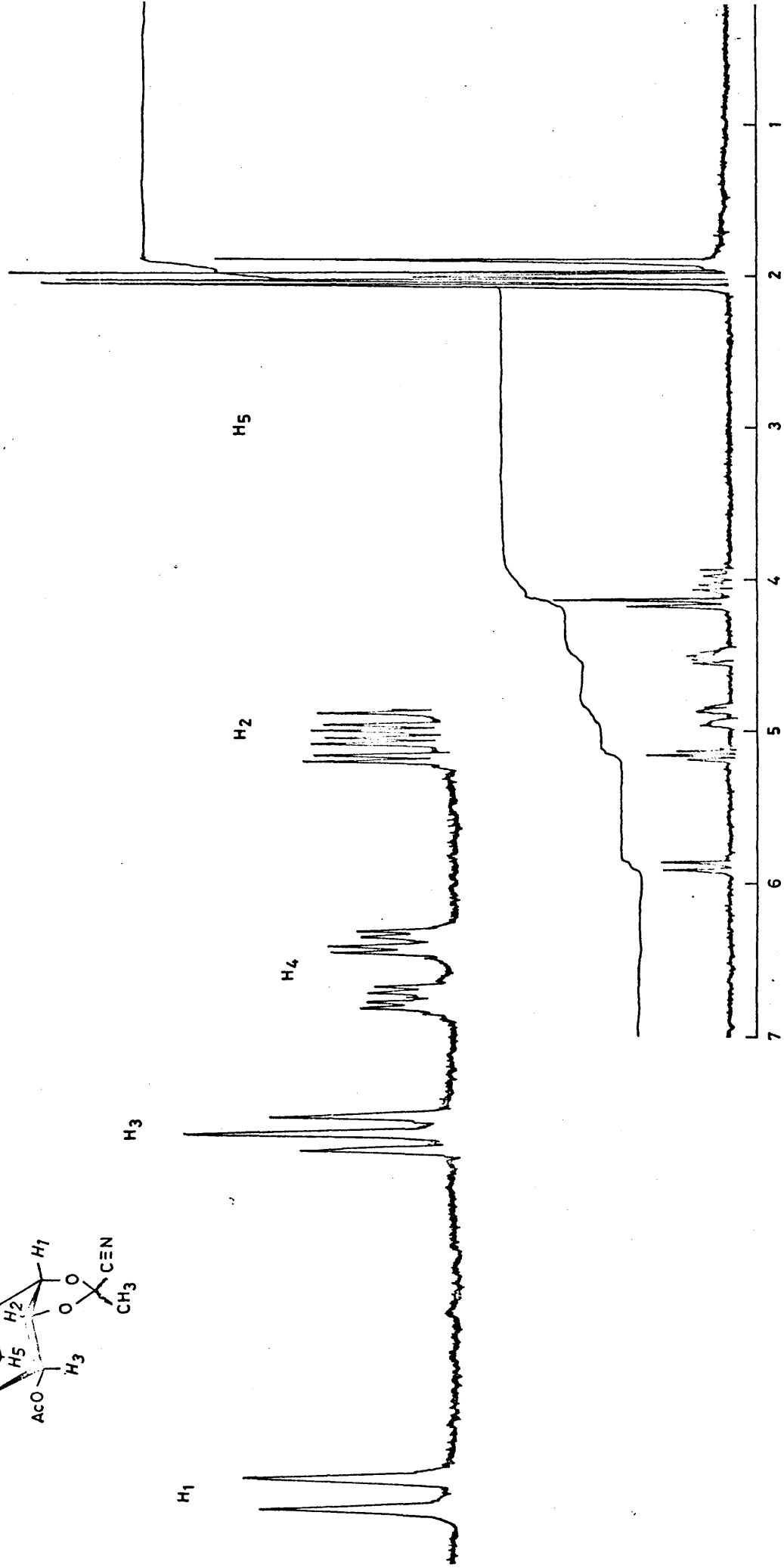
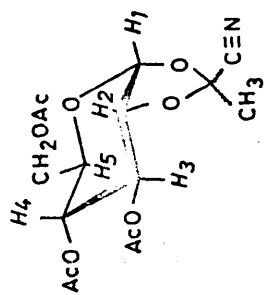


Fig. 17 - Espectro de RMN a 100 MHz de la 3,4,6-tri-O-acetil-1,2-O-(1-cianoetilidén) -  $\alpha$ -D-glucopiranos (45) ((CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO)

H<sub>6</sub>, H<sub>6'</sub>



H<sub>3</sub>

H<sub>1</sub>

H<sub>4</sub>

H<sub>2</sub>

H<sub>5</sub>

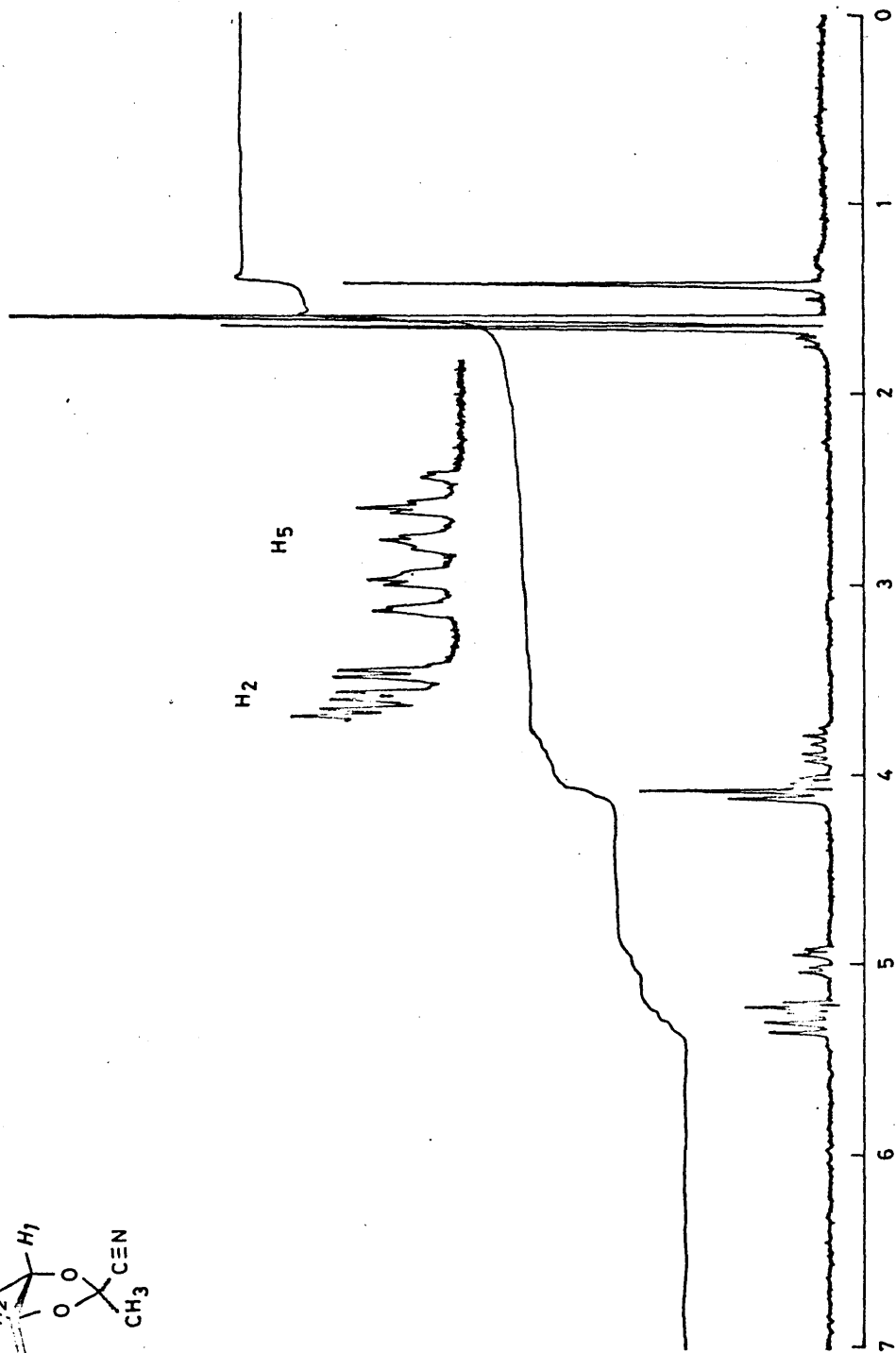
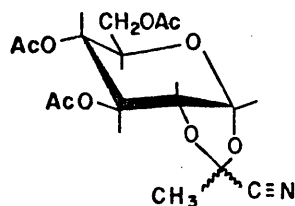


Fig. 18 - Espectro de RMN a 100 MHz de la 3,4,6-tri-O-acetil-1,2-O-(1-cianoetilidén) -  $\alpha$ -D-glucopiranos (45) (C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>)

La comparación de los ángulos diédricos deducidos a partir de las constantes de acoplamiento por aplicación de la ecuación de Karplus, con los ángulos diédricos teóricos en las formas silla (50), bote (51 y 52) y bote torcido -- (53) para el compuesto 45, condujo, a Coxón y Hall<sup>160</sup> a establecer para esta sustancia (45) una conformación intermedia entre 51 y 53 pero más próxima a 53 y a concluir que la fusión cis de un acetal cíclico 1,2, fuerza al anillo de D-glucopiranososa a desviarse de la conformación silla -- normal (50).

Existe una considerable controversia sobre la influencia que ejerce un anillo acetálico de cinco miembros fusionado en cis a un anillo piranoide, sobre la conformación del anillo piranoide<sup>160,174,178-182</sup>. A la vista de los resultados obtenidos en el estudio de la estructura cristalina de algunos de estos derivados<sup>179</sup> hay que admitir que la asignación de conformaciones torcidas, como 53, basadas en medidas de constantes de acoplamiento, necesitan revisión. Las constantes de acoplamiento medidas en los espectros de 45 (Tabla IX) son explicables admitiendo que la molécula tiene una conformación silla muy distorsionada por la presencia del anillo acetálico de cinco miembros fusionado en cis, como 54. Con el fin de elucidar la conformación de 53 definitivamente y determinar, inequívocamente la configuración absoluta del carbono portador del grupo ciano se es

tá estudiando, actualmente, la estructura cristalina de esta sustancia en el Instituto de Química Física del C.S.I.C.



54

La segunda fracción eluida F-2 Glc CNAg, se comportó cromatográficamente como una sustancia pura. Contrariamente a lo ocurrido en el producto F-1 Glc CNAg su espectro IR - (fig. 19) mostró una banda a  $2.130 \text{ cm}^{-1}$  asignable a la vibración de tensión de un enlace múltiple carbono-nitrógeno. Su espectro de masas indicó una masa molecular de 357 u.m. y mostró un pico M-26 (pérdida de CN) y las fragmentaciones típicas de un glicósido tetracetilado. El espectro RMN en cloroformo-d (fig. 20) presentó cuatro singletes a 2.01, 2.03, 2.07 y 2.11 ppm (integral total doce protones) asignables a los protones metílicos de cuatro acetoxilos y, a campo más bajo, un conjunto de señales atribuibles a los protones del anillo de glucopiranososa que se asignaron del modo siguiente: el doblete a  $\delta 5.53$  se asignó al protón anómérico H-1 ( $J_{1,2}$  5.0 Hz); dos dobletes centrados a 5.44 se adscribieron al protón H-3 ( $J_{2,3}$  9.0 Hz,  $J_{3,4}$  9.5 Hz); el triplete a 5.07 se asignó el protón H-4 ( $J_{4,5}$  9.5 Hz); el cuadruplete, parcialmente solapado a 4.89 se asignó al protón H-2; el conjunto de señales entre 4.40 y 4.00 se asig-

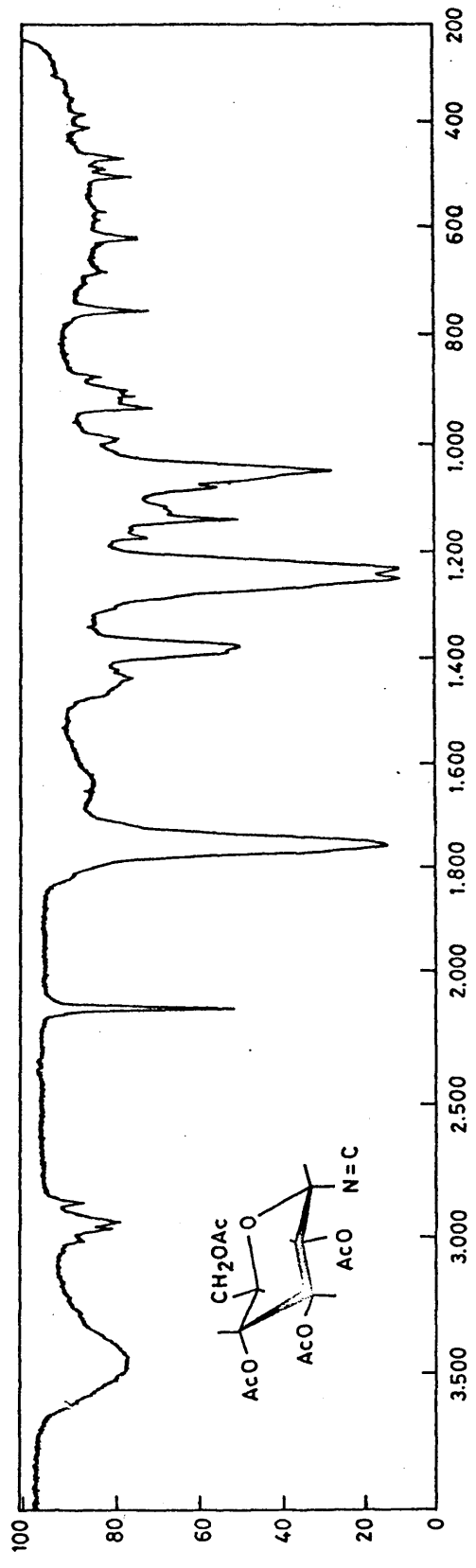


Fig.19 - Espectro IR (BrK) del producto F-2 GLcCNAG

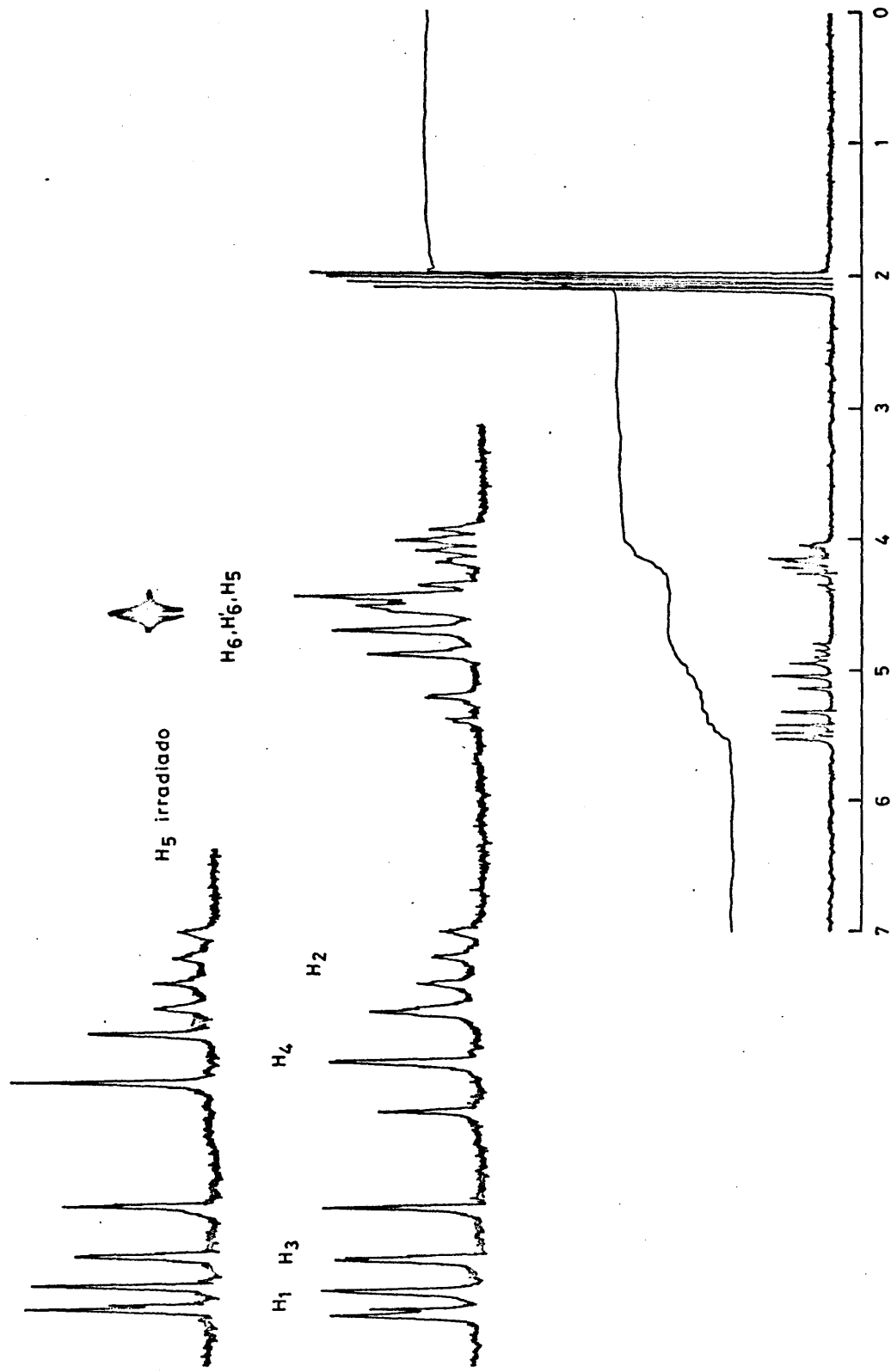
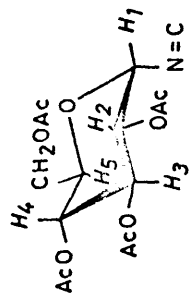
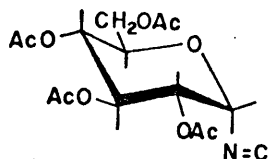


Fig. 20 - Espectro de RMN a 100 MHz del producto F-1 Glc CNAg. (Cl<sub>3</sub>CD)

nó a los protones H-6, H'-6 y H-5. La irradiación de la se-  
ñal asignada al protón H-5 convirtió en un doblete la se-  
ñal atribuida al protón H-4 confirmando la asignación.

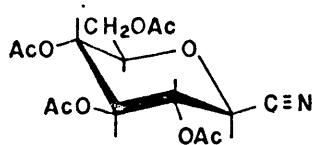
La consideración de las constantes de acoplamiento me-  
didas en este espectro conduce a atribuir a la sustancia -  
F-2 Glc CNAg una estructura de  $\alpha$ -D-glucopiranósido perace-  
tilado en conformación  ${}^4C_1$  y sus espectros de masas e in-  
frarrojo llevan a asignar a este producto la estructura de



55

isocianuro de 2,3,4,6-tetra-O-acetil- $\alpha$ -D-glucopiranósilo -  
(55). La caracterización de la sustancia como un isonitri-  
lo se basa esencialmente, en el pico molecular m/e357 en -  
el espectro de masas, las fragmentaciones, similares a las  
de un nitrilo (ver más adelante en el caso del cianuro de  
2,3,4,6-tetra-O-acetil- $\beta$ -D-galactopiranósilo (38), aparta-  
do 2.3.3. pág. 113), pero con los iones correspondientes a  
fragmentaciones en que se conserva el grupo ciano ausente  
o de muy pequeña intensidad y en la aparición de una banda  
aguda, de intensidad media, a  $2.130\text{ cm}^{-1}$ , ausente en los ni-  
trilos correspondientes.

La sustancia F-3 Glc CNAg, presentó también en su espectro IR una banda aguda de intensidad media a  $2.150\text{ cm}^{-1}$  (fig. 21). Su movilidad cromatográfica en capa fina fué, en un gran número de eluyentes, prácticamente la misma que la del cianuro de 2,3,4,6-tetra-O-acetil- $\beta$ -D-glucopiranosilo (44) obtenido previamente en la reacción de acetobromo-



44

glucosa con cianuro mercurico en nitrometano. Su espectro RMN (fig. 22) fué también muy similar al del compuesto 44. El espectro presentó señales correspondientes a los protones de los grupos metilo de cuatro acetoxilos a  $\delta 2.00$  (tres protones),  $2.02$  (tres protones) y  $2.10$  (seis protones). A campo más bajo el espectro mostró un conjunto de señales no analizadas y centrado a  $5.14$  (integral total 3H) un doblete a  $4.78$  ( $J_{1,2} 9.0$  Hz), un octuplete AB típico del sistema ABX, H-6, H'-6, H-5, centrado a  $4.17$  ( $J_{6,6'} 12.7$  Hz,  $J_{5,6} 4.5$  Hz,  $J_{5,6'} 2.7$  Hz); y un multiplete ancho  $3.72$ , asignado a un protón H-5. La aparición de la banda a  $2.150\text{ cm}^{-1}$  en el espectro IR y la gran analogía del espectro de RMN con el del ciano derivado 44 conduce a asignar a ésta sustancia, provisionalmente, la estructura de isocianuro de 2,3,4,6-tetra-O-acetil- $\beta$ -D-glucopiranosilo (56)

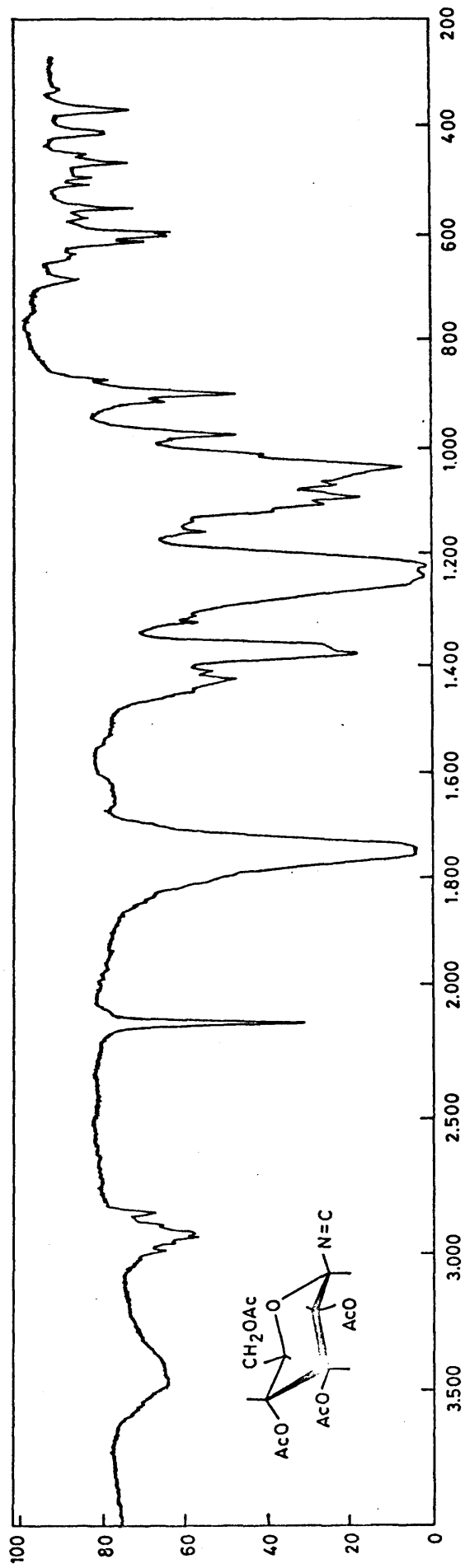


Fig. 21 - Espectro IR (BrK) del producto F-3 Glc CNAg

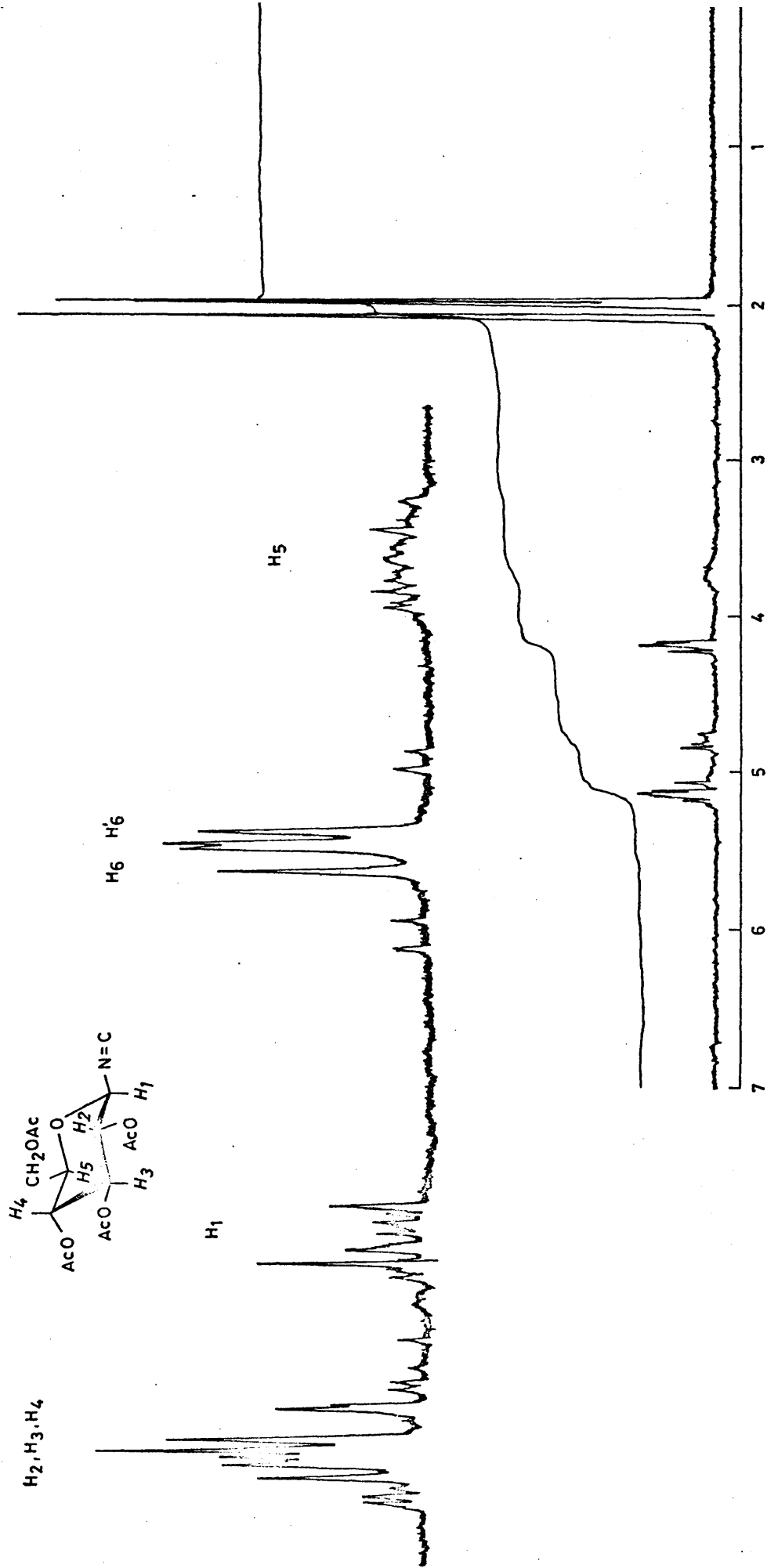
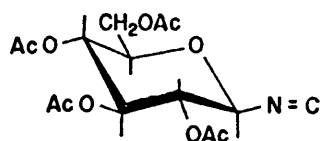


Fig. 22 - Espectro de RMN a 100 MHz del producto F-3  $Cl_3CD$ .



56

Los resultados obtenidos en la reacción de condensación de acetobromoglucosa con cianuro de plata en xileno -- pueden resumirse diciendo que aparte de la 3,4,6-tri-O-acetil-1,2-(1-cianoetiliden)- $\alpha$ -D-glucopiranososa (45) descrita -- previamente, se forman dos isonitrilos que se describen por primera vez a los que se asignan las estructuras de isocianuro de 2,3,4,6-tetra-O-acetil- $\alpha$ -D-glucopiranosilo (55) e isocianuro de 2,3,4,6-tetra-O-acetil- $\beta$ -D-glucopiranosilo (56).

### 2.3.3. LA REACCION DEL BROMURO DE 2,3,4,6-TETRA-O-ACETIL- $\alpha$ -D-GALACTOPIRANOSILO (7) CON CIANURO MERCURICO EN NITROMETANO

La reacción del bromuro de 2,3,4,6-tetra-O-acetil- $\alpha$ -D-galactopiranosilo (7) con cianuro mercurico en nitrometano ha sido estudiada previamente por Helferich<sup>153</sup>. De acuerdo con este autor, la reacción conduce al cianuro de 2,3,4,6-tetra-O-acetil- $\beta$ -D-galactopiranosilo (38) con un rendimiento del 40%. La estructura del compuesto 38 ha sido demostrada química y espectroscópicamente por Coxon<sup>158</sup>.

En esta Memoria se ha estudiado la reacción en las -- mismas condiciones en un intento de aislar y caracterizar el resto de los productos formados.

El exámen cromatográfico de la mezcla de reacción indicó que ésta se completa en 1 hr y que no hay alteración apreciable en los protones formados si la reacción se realiza en este tiempo o en las 24 hr empleadas en el procedimiento original de Helferich<sup>153</sup>. Por cristalización directa de la mezcla de reacción se obtuvo el nitrilo 38. De -- acuerdo con la literatura, el espectro IR de 38 no mostró banda asignable a la vibración C≡N (fig. 23) y sus espectros de RMN en cloroformo-d (fig. 24), acetona-d<sub>6</sub> y benceno-d<sub>6</sub>, estuvieron de acuerdo con la estructura asignada. -- Los valores de los desplazamientos químicos de los protones de los grupos metilo de los acetoxilos se dan en la Tabla VII. Los desplazamientos químicos de los protones metínicos y metilénicos se indican en la Tabla VIII y las constantes de acoplamiento en la Tabla IX. Su espectro de masas presentó el ión molecular m/e 357 y las fragmentaciones -- normales de un glicósido peracetilado estando presentes -- los picos correspondientes a iones que conservan la agrupación CN.

La mezcla de reacción, una vez separado por cristalización el producto 38, se fraccionó cromatográficamente en columna. Tras una muy laboriosa manipulación se separaron tres fracciones que se denominaron F-1 Gal (CN)<sub>2</sub>Hg, F-2 Gal (CN)<sub>2</sub>Hg y F-3 Gal (CN)<sub>2</sub>Hg.

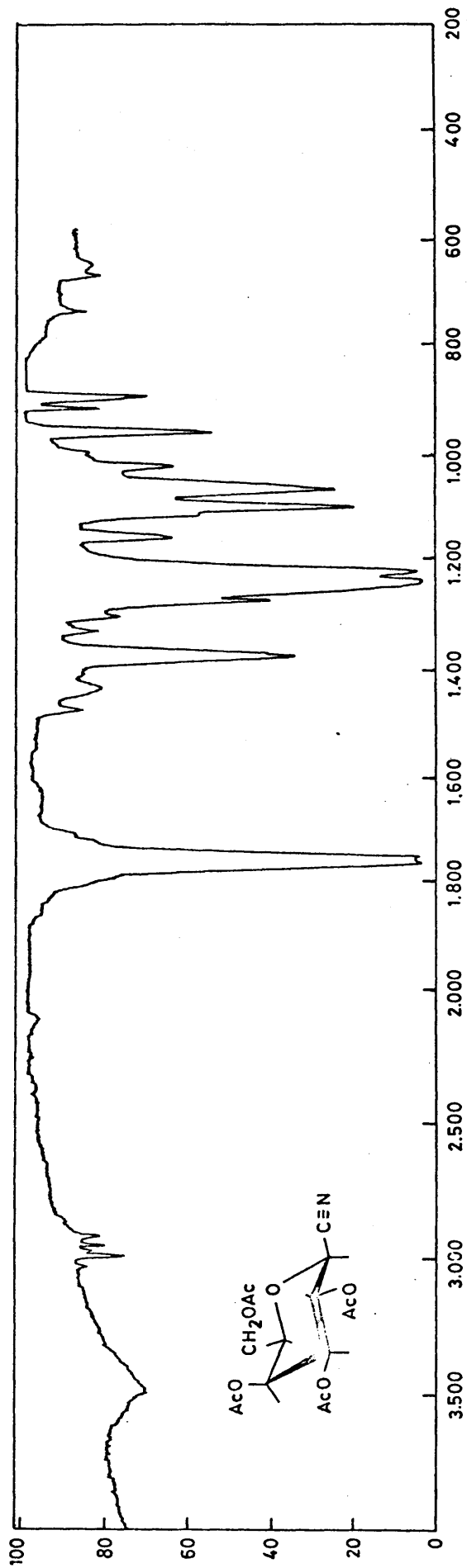


Fig. 23 - Espectro IR (BrK) del cianuro de 2,3,4,6 - tetra - O - acetil -  $\beta$  - D - galactopiranosilo (38)

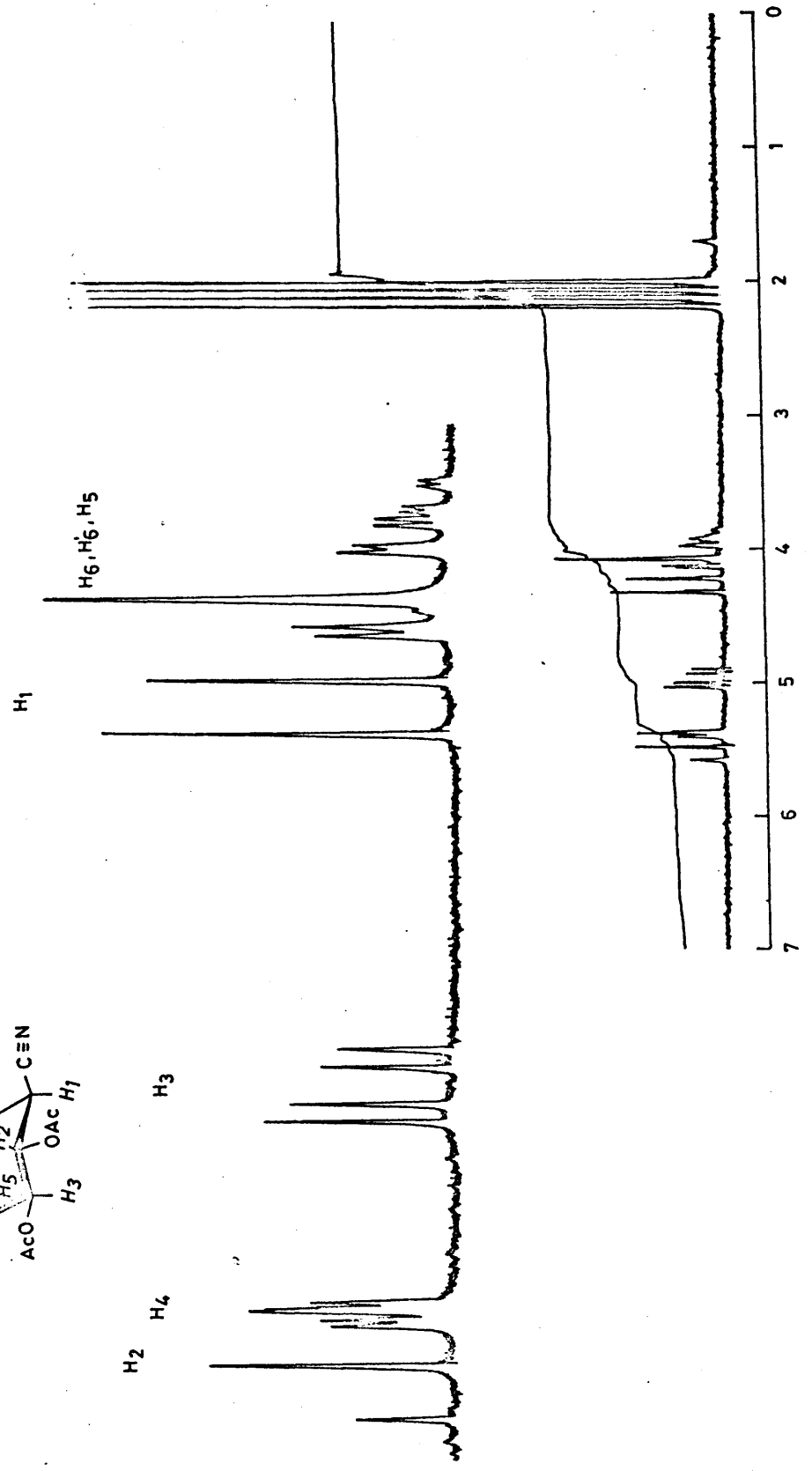
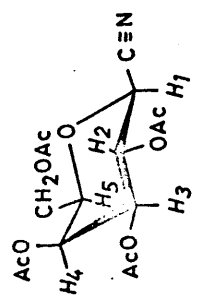


Fig. 24 - Espectro de RMN a 100 MHz del cianuro de 2,3,4,6 - tetra - O - acetil -  $\beta$  - D - galactopiranosilo (38) (Cl<sub>3</sub>CD).

La fracción F-1 Gal (CN)<sub>2</sub>Hg estuvo constituida por un producto puro. El espectro IR de este producto no mostró banda alrededor de 2.150 cm<sup>-1</sup>. Su espectro de RMN a 100 MHz en cloroformo-d (fig. 25) presentó, a campo alto, un singlete a δ1.84 ppm (integral total tres protones) y singletes a 2.10, 2.05 y 2.03 (integral total nueve protones). La comparación de esta región del espectro con la del espectro de la 3,4,6-tri-O-acetil-1,2-O-(1-cianoetilidén)-α-D-glucopiranososa (45) (fig. 16) indicó la existencia de una agrupación similar en ambos compuestos. A campo más bajo el espectro presentó un doblete a δ5.85, atribuido al protón anomérico (J<sub>1,2</sub> 5.0 Hz), un doblete de dobletes a 5.37 asignado al protón H-4 (J<sub>3,4</sub> 3.5 Hz, J<sub>4,5</sub> 1.7 Hz), un doblete de dobletes a 4.96 adscrito al protón H-3 (J<sub>3,4</sub> 3.5 Hz, J<sub>2,3</sub> 7.0 Hz) y una señal compleja (integral total cuatro protones) que se analizó del modo siguiente: un doblete de dobletes a 4.31 se asignó al protón H-2 (J<sub>1,2</sub> 5.0 Hz, J<sub>2,3</sub> 7.0 Hz) y las restantes señales constituyeron un sistema A<sub>2</sub>B formado por los protones H-6, H'-6 y H-5. La naturaleza de la reacción, la ausencia de banda alrededor de 2.100 cm<sup>-1</sup> en el espectro IR y el análisis del espectro de RMN conducen a asignar al producto aislado en la fracción F-1 Gal (CN)<sub>2</sub>Hg la estructura de 3,4,6-tri-O-acetil-1,2-O-(1-cianoetilidén)-α-D-galactopiranososa (57). Esta sustancia (57) se describe por primera vez en esta Tesis.

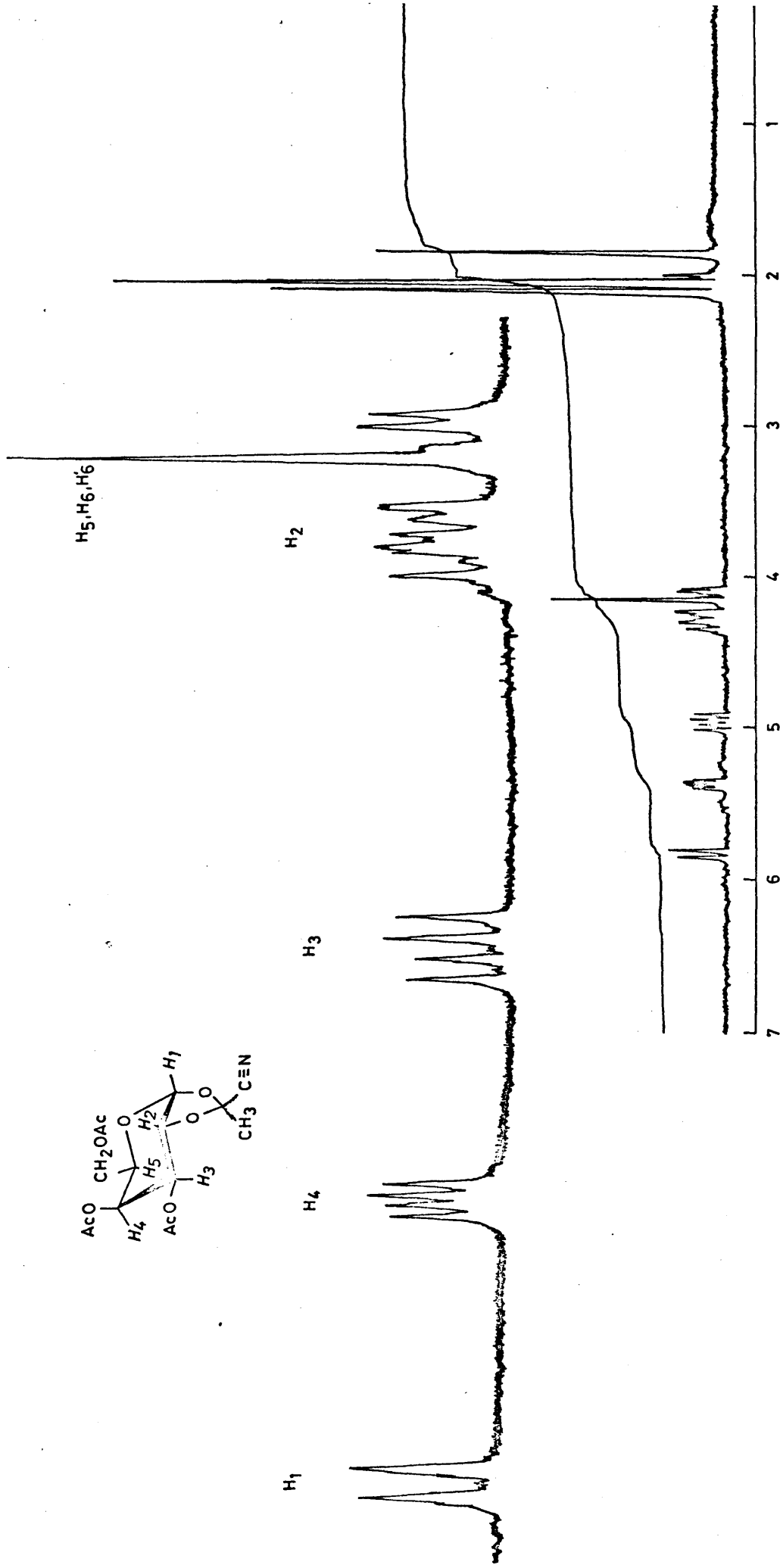
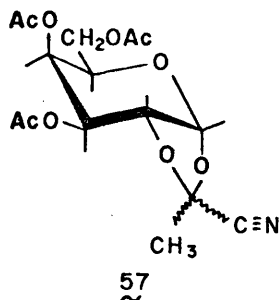


Fig. 25 - Espectro de RMN a 100 MHz del producto F-1 Gal (CN)<sub>2</sub>Hg, (Cl<sub>3</sub>CD).



Las constantes de acoplamiento medidas en el espectro RMN de 57, indican que la fusión 1,2 cis del anillo acetálico de cinco miembros al ciclo de D-galactopiranososa produce también en este caso una distorsión del ciclo de seis miembros haciendolo más plano en los enlaces C-1, C-2, C-3. El espectros puede interpretarse sin necesidad de admitir una distorsión mayor hacia una conformación bote torcido o bote.

La fracción F-2 Gal (CN)<sub>2</sub>Hg no fue pura cromatográficamente. El espectro RMN de la fracción bruta mostró la presencia de una mezcla del producto 57 y otro derivado de galactosa con configuración anomérica  $\alpha$ . La estructura de esta sustancia no ha sido aún establecida.

La fracción F-3 Gal (CN)<sub>2</sub>Hg, estuvo prácticamente constituida por cianuro de 2,3,4,6-tetra-O-acetil- $\beta$ -D-galactopiranosilo (38).

En resumen, en la reacción de condensación de aceto--bromogalactosa (7) con cianuro mercurico en nitrometano se forman, además del cianuro de 2,3,4,6-tetra-O-acetil-β-D--galactopiranosilo (38) descrito<sup>153</sup>, producto mayoritario de la reacción, otras sustancias. La más importante de estas se caracteriza como 3,4,6-tri-O-acetil-1,2-O-(1-cianoetilidén)-α-D-galactopiranososa (57).

#### 2.3.4. LA REACCION DEL BROMURO DE 2,3,4,6-TETRA-O-ACETIL-α-D-GALACTOPIRANOSILO (7) CON CIANURO DE PLATA EN XILENO

La reacción del bromuro de 2,3,4,6-tetra-O-acetil-α-D-galactopiranosilo (7) con cianuro de plata en xileno no cuenta con antecedentes. La cristalización directa de la mezcla de reacción dió lugar a un producto, con un rendimiento del 19%. El p.f. y el poder rotatorio de esta sustancia fueron muy próximos a los encontrados previamente para el cianuro de 2,3,4,6-tetra-O-acetil-β-D-galactopiranosilo (38). Su espectro IR, sin embargo, presentó una banda aguda de intensidad media a  $2.155 \text{ cm}^{-1}$  (fig. 26) y su espectro RMN en cloroformo-d (fig. 27) presentó una distribución de señales prácticamente idéntica a la del producto 38 (comparese las figs. 24 y 27). El espectro presentó dos dobletes centrados a  $\delta 5.43$  ppm asignados al protón H-2 ( $J_{1,2} 9.0 \text{ Hz}$ ,  $J_{2,3} 10.0 \text{ Hz}$ ) y, solapados, con ellos un cuadruplete a 5.42 asignado a un protón H-4 -

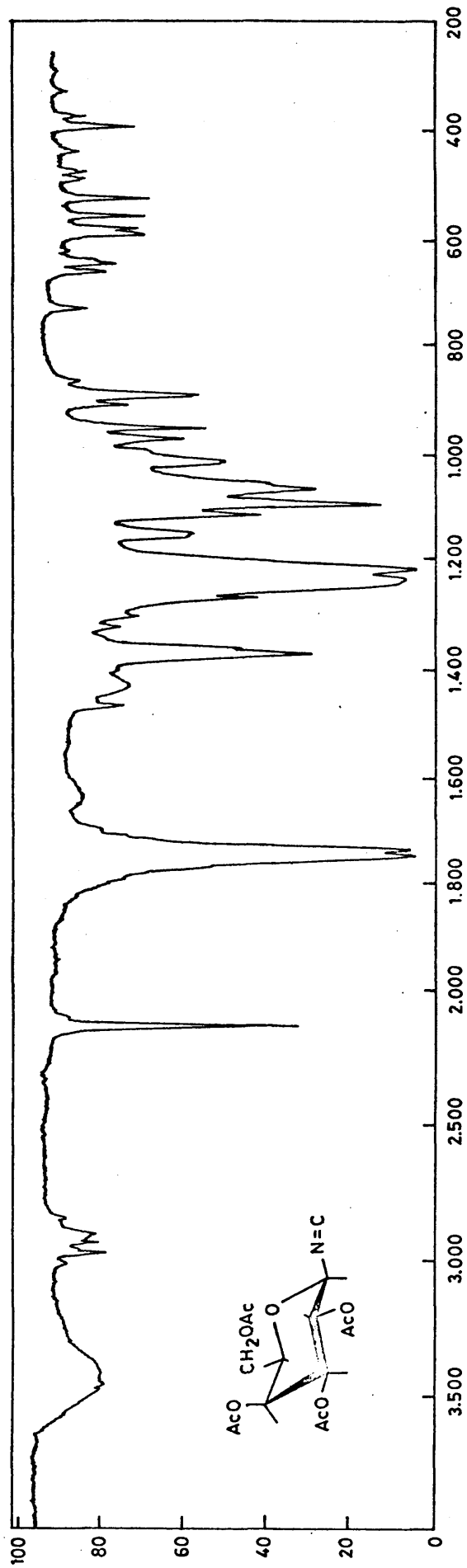


Fig. 26 - Espectro IR (BrK) del Isocianuro de 2,3,4,6 - tetra - O - acetil - β - D - galactopiranosilo (58)

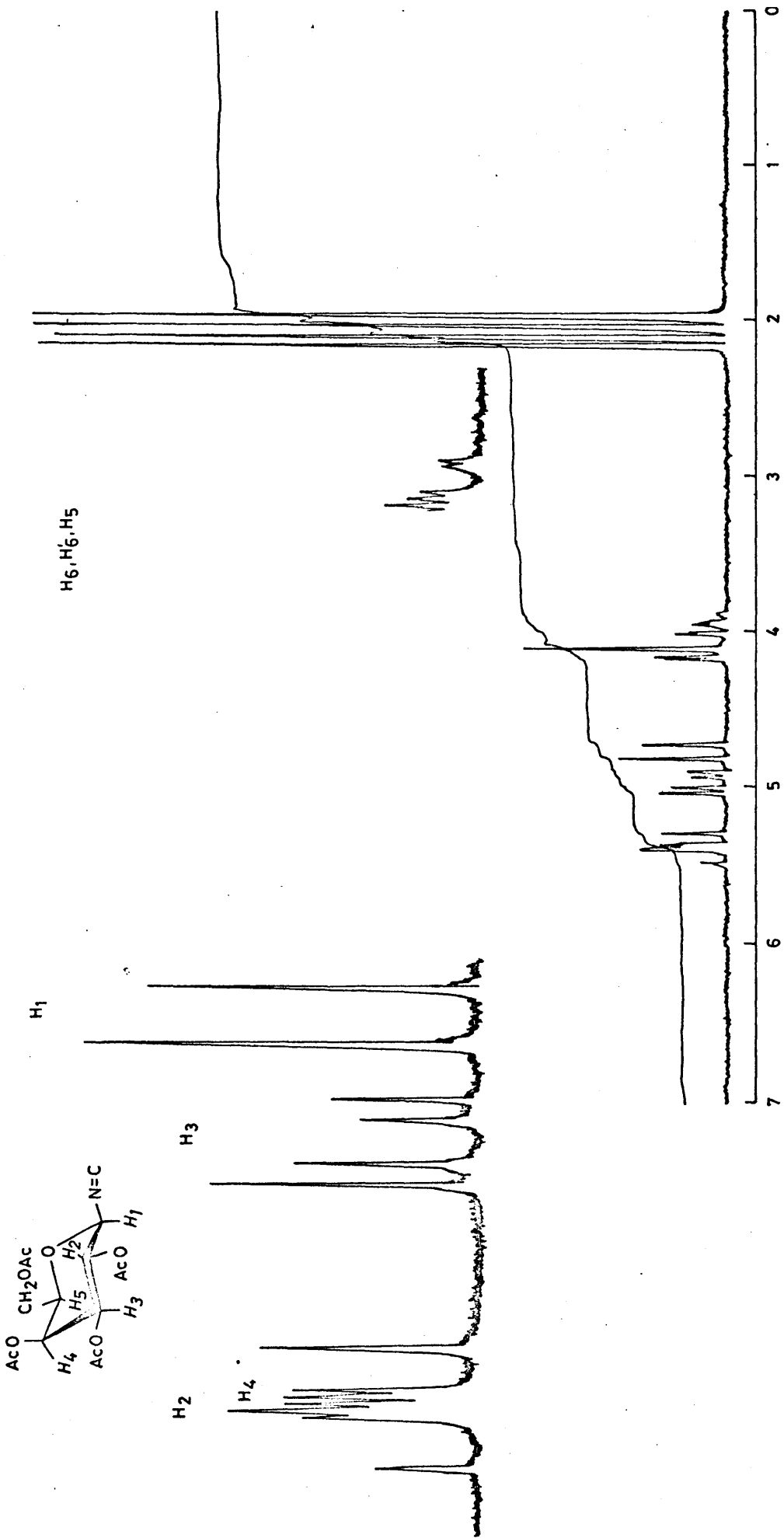
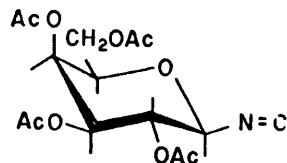


Fig. 27 - Espectro de RMN a 100 MHz del isocianuro de 2,3,4,6 - tetra - O - acetil - β - D - galactopiranosilo (58)

( $J_{3,4}$  3.2 Hz,  $J_{4,5}$  1.0 Hz); el doblete de dobletes a 5.01 se asignó al protón H-3 ( $J_{2,3}$  10.0 Hz,  $J_{3,4}$  3.2 Hz) y el doblete a 4.80 se adscribió al protón anomérico H-1 ( $J_{1,2}$  9.0 Hz); las señales a campo más alto constituyeron un sistema  $A_2B$ , como en el caso del nitrilo 38 y se asignaron a los protones H-6, H'-6 y H-5. En la región en que absorben los protones de los grupos metilo de los acetoxilos el espectro presentó cuatro singletes a  $\delta$ 1.97, 2.03, 2.10 y 2.15. La única diferencia importante entre los espectros del nitrilo 38 y el producto aislado en esta reacción es--tribó en el desplazamiento químico de la señal asignada al protón H-1 (0.5 ppm a campo más bajo en el espectro del --nuevo producto).

El espectro de masas de esta sustancia presentó el ión molecular, m/e 357, y las fragmentaciones típicas de un galactopiranosido peracetilado estando ausentes o en --muy pequeña proporción los iones correspondientes a fragmen--taciones en que se conserva la agrupación CN, siendo esta la diferencia fundamental entre éste espectro y el del nitrilo 38. Estos resultados llevan a asignar a esta sustancia una estructura de isocianuro de 2,3,4,6-tetra-O-acetil-- $\beta$ -D-galactopiranosilo (58).



58

La separación cromatográfica del resto de la mezcla de reacción fué muy difícil, laboriosa y no condujo a productos puros. Sí fue posible obtener, sin embargo, una primera fracción constituida por una mezcla de dos sustancias, de, prácticamente, el mismo  $R_f$ . El espectro de RMN de esta mezcla (fig. 28) fué una superposición del espectro de la 3,4,6-tri-O-acetil-1,2-O-(1-cianoetilidén)- $\alpha$ -D-galactopiranosina (57), aislada en la reacción de la acetobromogalactosa con cianuro mercuríco en nitrometano, (apartado 2.3.3. -- pág. 113) y otra sustancia. En efecto, las señales a  $\delta$ 4,31 4.97, 5.37 y 5.85 fueron idénticas a las observadas en el espectro de 57, y del mismo modo, la señal a 1.84 coincidió con la asignada a los protones metílicos en el anillo de cinco miembros de 57. Respecto a la estructura de la sustancia que impurifica a 57 en la mezcla reacción no puede hablarse en el estado actual de la investigación. La mezcla de reacción, contiene además otros productos que no han podido aislarse.

Como resumen puede concluirse que en la reacción del bromuro de 2,3,4,6-tetra-O-acetil- $\alpha$ -D-galactopiranosilo --

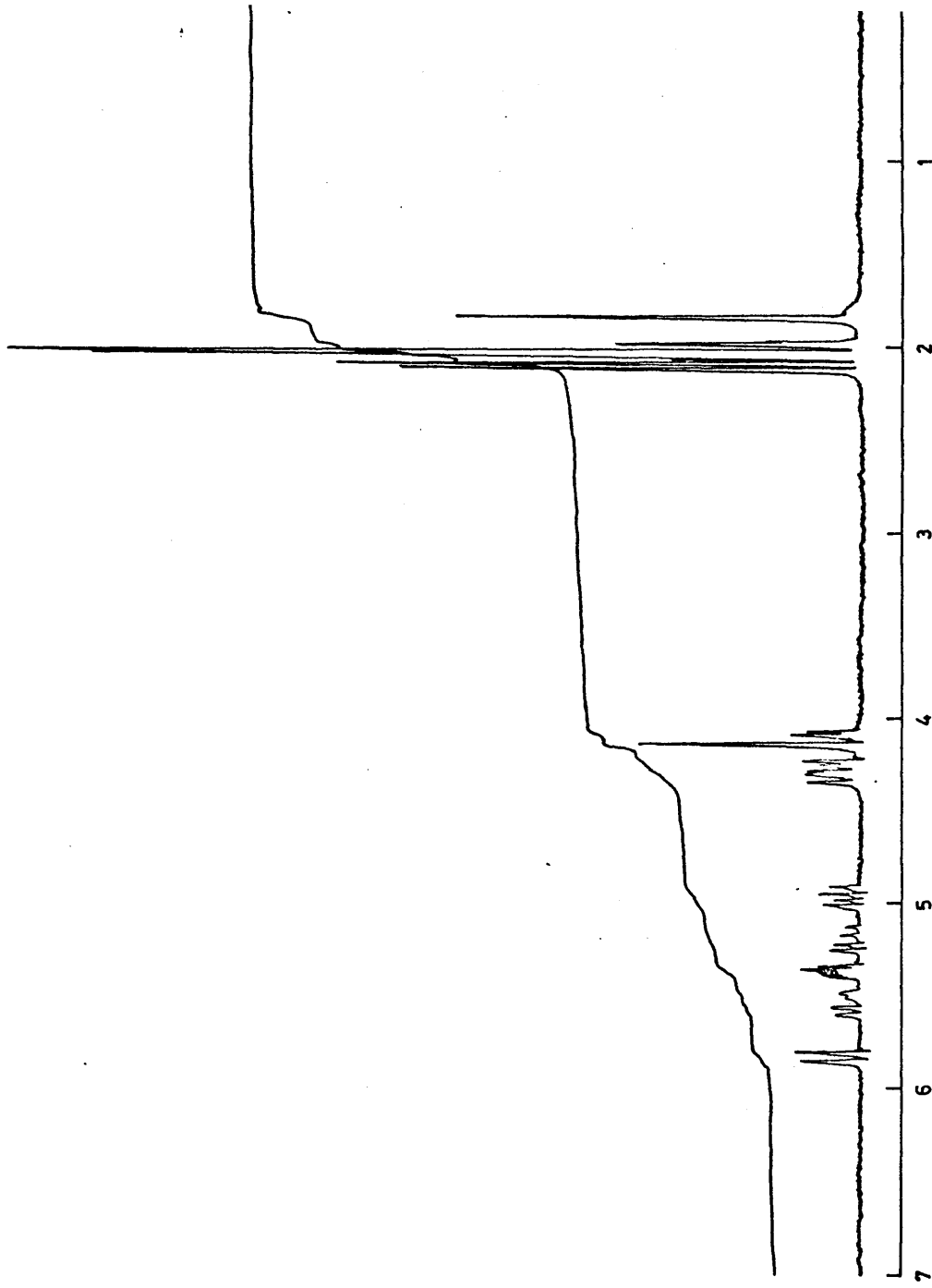
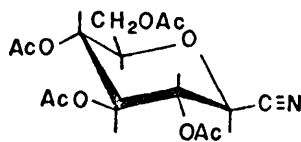


Fig. 28.- Espectro de RMN a 100 MHz de la primera fracción separada de la mezcla de reacción del bromuro de 2,3,4,6-tetra-O-acetil- $\alpha$ -D-galactopiranosilo ( $\gamma$ ) con CNAg en xileno. ( $\text{Cl}_3\text{CD}$ )

(7) con cianuro de plata en xileno se forma isocianuro de 2,3,4,6-tetra-O-acetil- $\beta$ -D-galactopiranosilo (58), 3,4,6-tri-O-acetil-1,2-O-(1-cianoetilidén)- $\alpha$ -D-galactopiranosido (57) y otros productos cuya estructura no ha podido aún establecerse.

2.3.5. LA REACCION DEL BROMURO DE 2,3,4,6-TETRA-O-ACETIL- $\alpha$ -D-GLUCOPIRANSILO (18) CON CIANURO MERCURICO EN NITROMETANO.

La reacción de acetobromoglucosa con cianuro mercúrico en nitrometano ha sido estudiada previamente por Coxón y Fletcher<sup>112</sup>. De acuerdo con estos autores, en la reacción se forman la 3,4,6-tri-O-acetil-1,2-O-(1-cianoetilidén)- $\alpha$ -D-glucopiranosa (45) y cianuro de 2,3,4,6-tetra-O-acetil- $\beta$ -D-glucopiranosilo (44).



44

En esta Memoria, la referida reacción no ha sido estudiada y la repetición de la misma ha estado dirigida exclusivamente a la obtención del producto 44 y su estudio por métodos espectroscópicos con el fin de obtener datos que apoyen la asignación de la estructura de isocianuro de 2,3,

4,6-tetra-O-acetil- $\beta$ -D-glucopiranosilo (56) al producto F-3 Glc CNAg aislado en la reacción de acetobromoglucosa con cianuro de plata en xileno (ver pág. 110) .

El espectro IR del nitrilo 44 no presentó banda a  $2.150 \text{ cm}^{-1}$  (fig. 29). Su espectro de RMN en cloroformo-d (fig. 30) presentó singletes a  $\delta$  1.98 (tres protones), 2.00 (tres protones y 2.08 (seis protones). A campo más bajo el espectro presentó un conjunto de señales centradas a  $\delta$  5.16 (integral total 3 protones), atribuido a los protones H-2, H-3 y H-4, que no pudo analizarse; un doblete a 4.30, asignado al protón H-1 ( $J_{1,2}$  9.0 Hz) parcialmente solapado con el octuplete AB del sistema ABX formado por los protones H-6, H'-6 y H-5; el octuplete AB se asignó a los protones H-6 a 4.24 y H'-6 a 4.09 ( $J_{5,6}$  5.1 Hz,  $J_{5,6'}$  2.7 Hz,  $J_{6,6'}$  13 Hz); el multiplete a 3.68, se asignó al protón H-5.

La comparación entre este espectro (fig. 30) y el de la substancia F-3 Glc CNAg (fig. 22) obtenida previamente, mostró las mismas diferencias encontradas entre el espectro del cianuro de 2,3,4,6-tetra-O-acetil- $\beta$ -D-galactopiranosilo (38) (fig. 23) y el isocianuro de 2,3,4,6-tetra-O-acetil- $\beta$ -D-galactopiranosilo (58) (fig. 26). En ambas series, el protón anomérico en el ciano derivado aparece unas 0.5 ppm a campo más alto que en el isociano derivado.

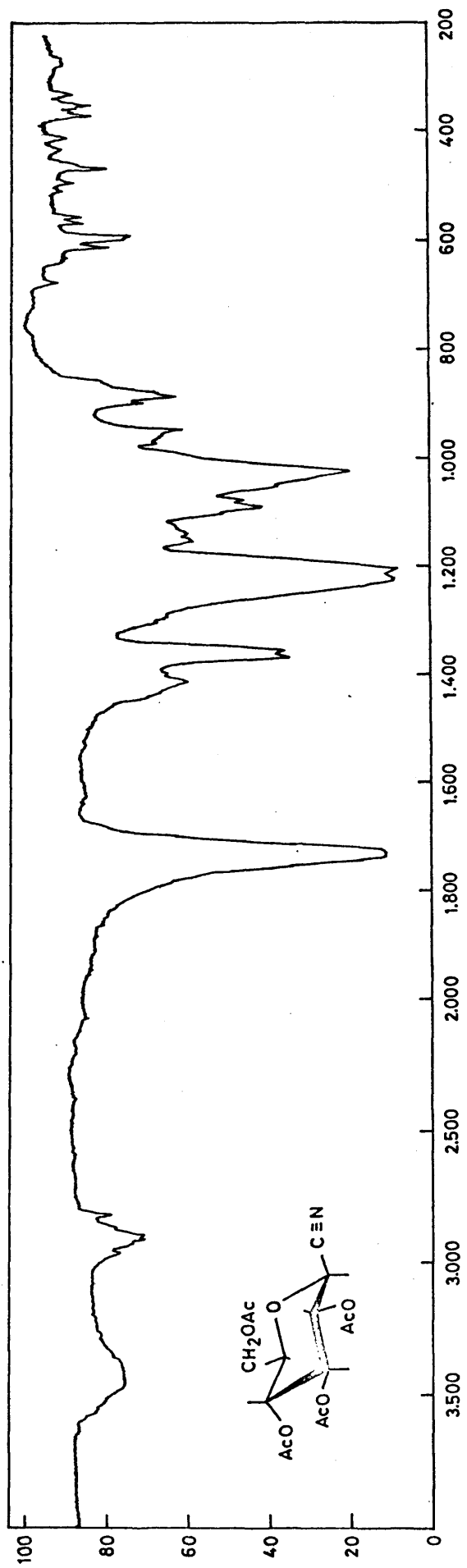


Fig. 29 - Espectro IR (BrK) del clonuro de 2,3,4,6 - tetra - O - acetil -  $\beta$  - D - glucopiranosilo (44)

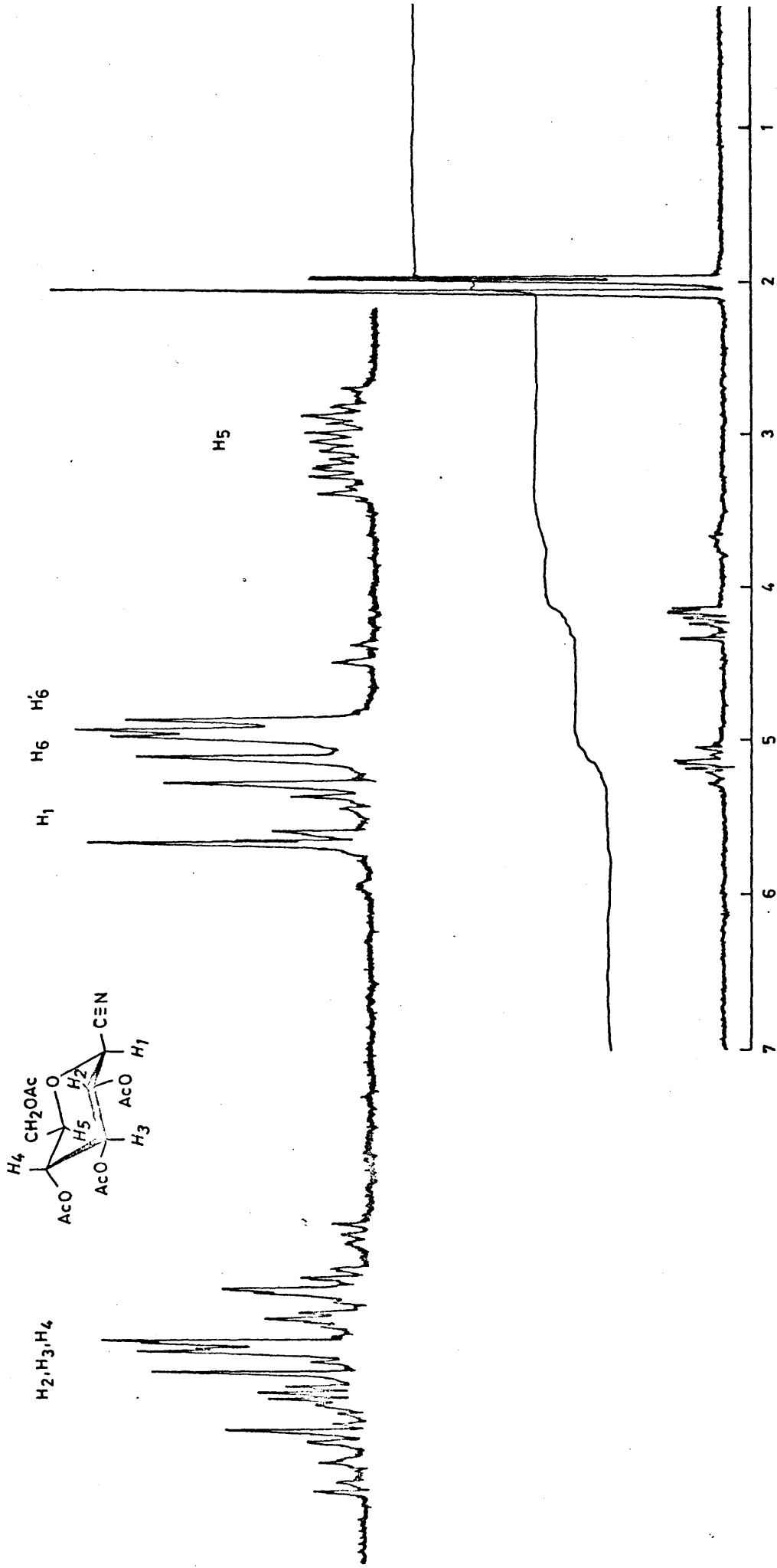
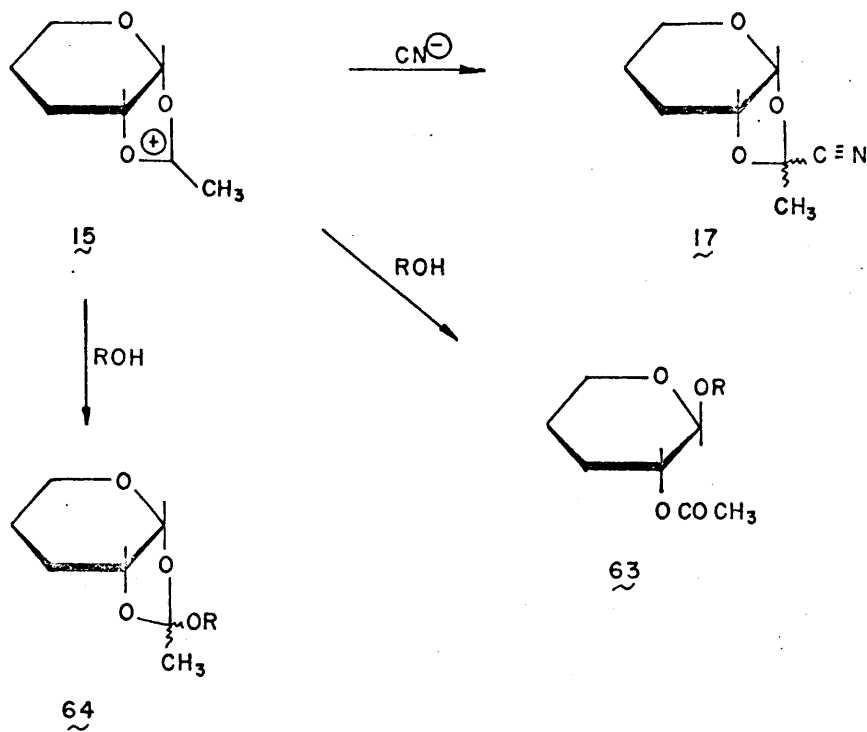
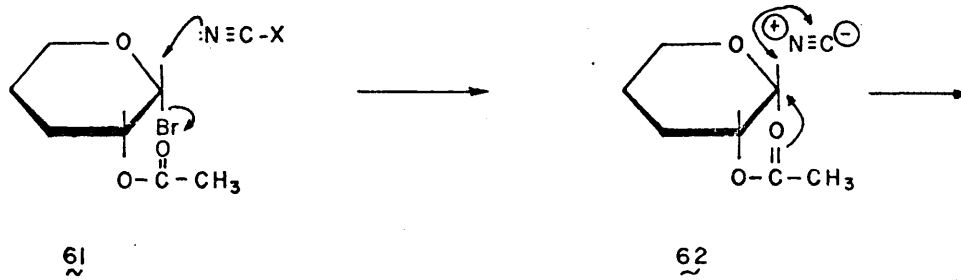


Fig. 30 - Espectro de RMN a 100 MHz del cianuro de 2,3,4,6 - tetra - O - acetil - β - D - glucopiranosilo (44) (Cl<sub>3</sub>CD)

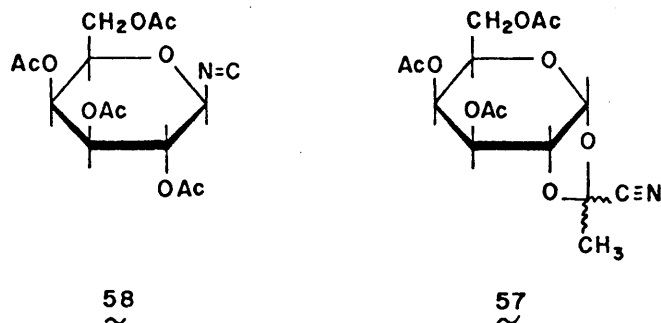
## 2.3.6. DISCUSION

De los resultados obtenidos en las reacciones de acetohalógeno azúcares con cianuros metálicos, descritas en los párrafos anteriores, parece deducirse que, independientemente de la naturaleza de la hexosa estudiada, la reacción en un medio poco polar da lugar a la correspondiente 1,2-O-(1-cianoetilidén)- $\alpha$ -hexopiranososa peracetilada (17). El aislamiento, sin embargo, de los  $\beta$ -isonitrilos (60), obtenidos por primera vez en el presente trabajo, parece indicar que la formación del ión aciloxonio  $15$  viene iniciada por ataque del par de electrones no compartido del nitrógeno del cianuro metálico sobre el carbono anomérico y posterior ataque del oxígeno carbonílico del grupo acetoxilo en C-2 sobre el mismo carbono según se indica en el esquema 11. El ión acetoxonio  $15$  puede reaccionar con ión cianuro dando la correspondiente 1,2-O-(1-cianoetilidén)- $\alpha$ -hexopiranososa peracetilada (17) o con un alcohol presente en el medio para dar el correspondiente  $\beta$ -glicósido (63) o el ortoéster (64). Como evidencia de que la reacción transcurre a partir del  $\beta$ -isonitrilo se puede aducir que en la reacción de acetobromogá lactosa con cianuro de plata en xileno, con tiempos de reacción relativamente cortos, el producto obtenido en mayor cantidad es el  $\beta$ -isonitrilo correspondiente (58), que lo mismo ocurre en la reacción de acetobromoglucosa en las mismas condiciones y que por tratamiento del  $\beta$ -isonitrilo (58) con cianuro de plata en

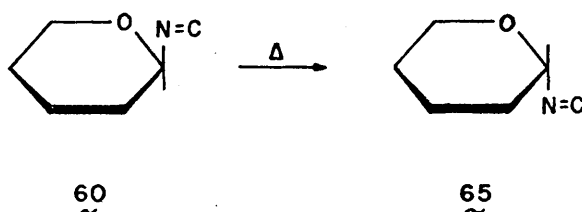
ESQUEMA II



xileno se forman, entre otros productos, uno cuya movilidad cromatográfica coincide con la de la 3,4,6-tri-O-acetil-1,2-O-(1-cianoetilidén)- $\alpha$ -D-galactopiranososa (57).

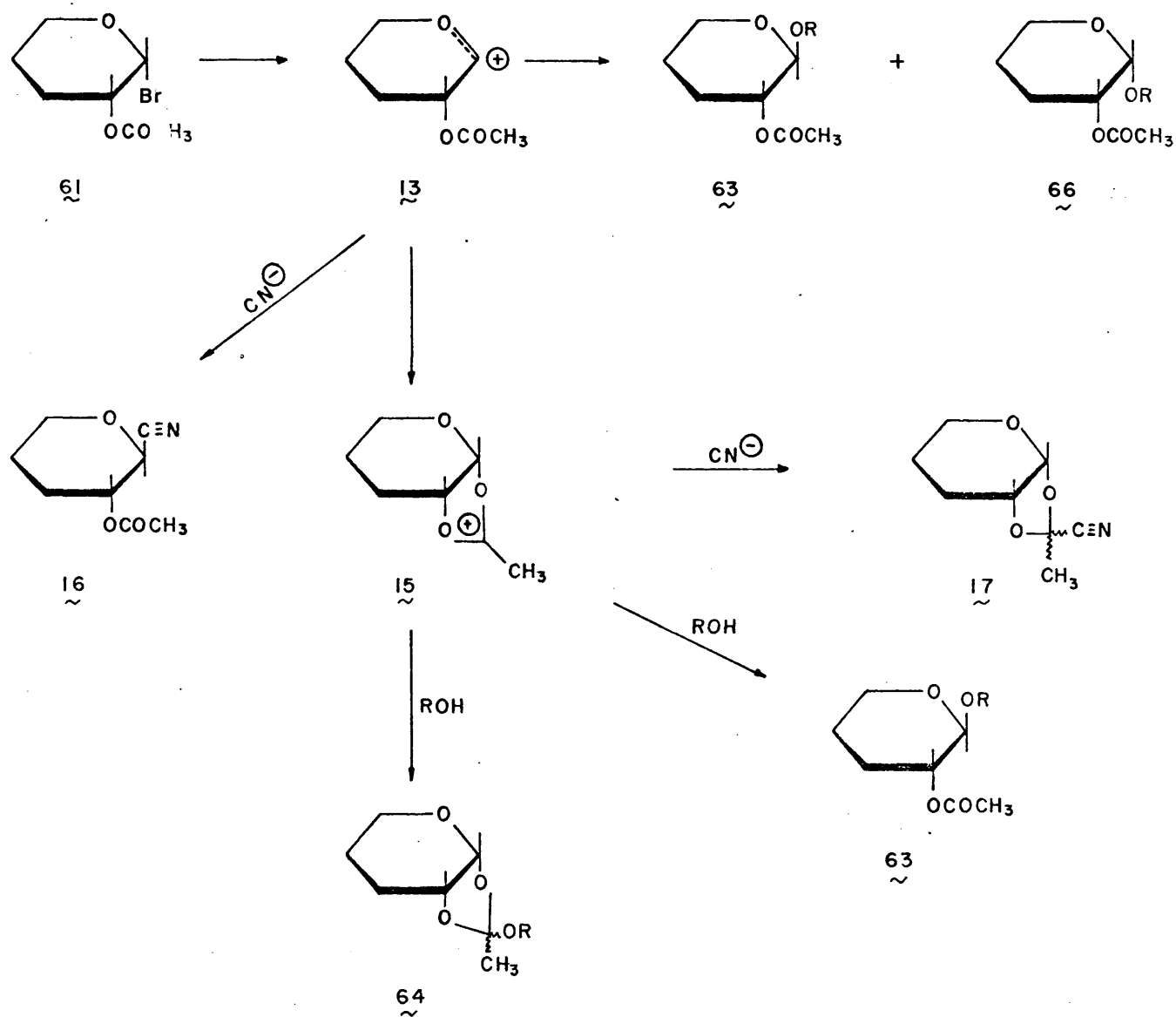


La formación del  $\alpha$ -isonitrilo (65) en estas condiciones, aislado en la reacción de acetobromoglucosa con cianuro de plata puede explicarse dentro del mismo esquema por anomerización del  $\beta$ -isonitrilo (60) a la temperatura de ebullición del xileno.



La reacción en disolventes polares da lugar, preferentemente a los  $\beta$ -nitrilos (16), formados probablemente a partir del ión carbonio 13 formado en la solvolisis del correspondiente bromuro (esquema 12). Este ión carbonio, puede en presencia de un alcohol dar la mezcla de  $\alpha$  y  $\beta$  glicósidos (63) y (66). El hecho de que tanto en el caso de la acetobromoglucosa como en el de la acetobromogalactosa no

ESQUEMA 12



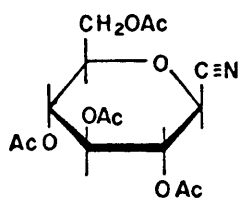
se hayan aislado más que los  $\beta$ -nitrilos, y que en ambos ca sos se formen también cantidades menores de las correspondientes 1,2-O-(1-cianoetilidén)- $\alpha$ -hexopiranosas acetiladas (17), puede interpretarse aduciendo que también en el ión carbonio 13 es posible un ataque del oxígeno carbonílico - del acetoxilo en C-2 sobre el carbono anomérico para dar - el ión aciloxonio 15 que en presencia de cianuro daría lugar al 1,2-O-(1-cianoetilidén) derivado (17) y en presen-- cia del alcohol daría lugar al  $\beta$ -glicósido (63) y/o al or toéster (64). El  $\beta$ -glicósido (64) puede, pues, formarse - en principio por cualquiera de las dos rutas reseñadas -- mientras el  $\alpha$ -glicósido puede hacerlo sólo por la primera indicada.

Lo que se acaba de exponer está de acuerdo con los re sultados experimentales. Es necesario no obstante un estu- dio más detallado de los productos formados en las distin- tas reacciones estudiadas que permita establecer sin ambi- guedades la ruta que siguen las reacciones de glicosilación catalizadas por cianuros metálicos y encontrar las condi-- ciones adecuadas para dirigir la reacción en la dirección deseada.

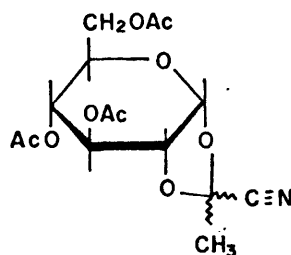
### 2.3.7. DESACETILACION DE LOS CIANO DERIVADOS

En una comunicación reciente<sup>183</sup>, se ha descrito que - la desacetilación con metóxido sódico en metanol, de los -

nitrilos obtenidos en la reacción de acetobromoglucosa (18) y acetobromogalactosa (7) con cianuros metálicos no conduce a los esperados ciano derivados desacetilados. Es particularmente sorprendente que en esta publicación se sigue asignando la estructura de cianuro de 2,3,4,6-tetra-O-acetil- $\beta$ -D-glucopiranosilo (44) al producto descrito con tal estructura primeramente por Buerger<sup>159</sup> y posteriormente caracterizado por Coxon<sup>112</sup> como 3,4,6-tri-O-acetil-1,2-O-(1-cianoetilidén)- $\alpha$ -D-galactopiranososa (45). La desacetilación del producto 45 conduce, de acuerdo con la publicación<sup>183</sup>,

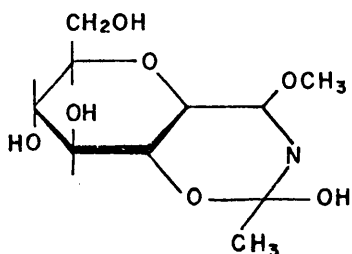


44

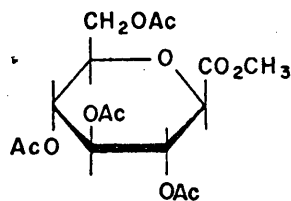


45

a una sustancia cristalina a la que asigna la estructura 67, y que por reacetilación conduce al ester 68.

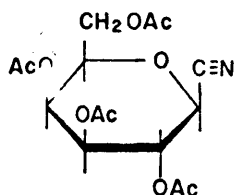


67

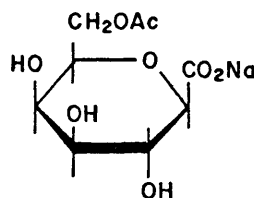


68

Por otra parte, la desacetilación del cianuro de 2,3,4,6-tetra-O-acetil- $\beta$ -D-galactopiranosilo (38) da lugar a una sustancia que por hidrólisis alcalina conduce a un producto caracterizado como la sal sódica 69.



38



69

En nuestras manos la desacetilación del cianuro de 2,3,4,6-tetra-O-acetil- $\beta$ -D-galactopiranosilo (38) con metóxido sódico en metanol, tanto en las condiciones de concentración y temperatura descritas por Helferich<sup>183</sup> como en las más suaves empleadas rutinariamente para desacetilaciones en esta Memoria, condujo a un producto que no se consiguió cristalizar. El espectro IR de esta sustancia (fig. 31) --mostró la presencia de grupos hidroxilo libres y la existencia de un grupo ester en la molécula y el espectro de RMN (fig. 32) presentó un singlete a  $\delta$ 3.79 (integral total tres protones) asignable a los protones de un grupo ester metílico y la ausencia de protones metílicos asignables a los grupos acetoxilo. La reacetilación de esta sustancia en las condiciones usuales dió lugar a un producto cristalino cuyo espectro de RMN en cloroformo-d (fig. 33) mostró las señales correspondientes a los protones metílicos de cuatro grupos acetoxilo a  $\delta$  1.96, (tres protones), 2.01 -- (seis protones) y 2.14 (tres protones), y un singlete --

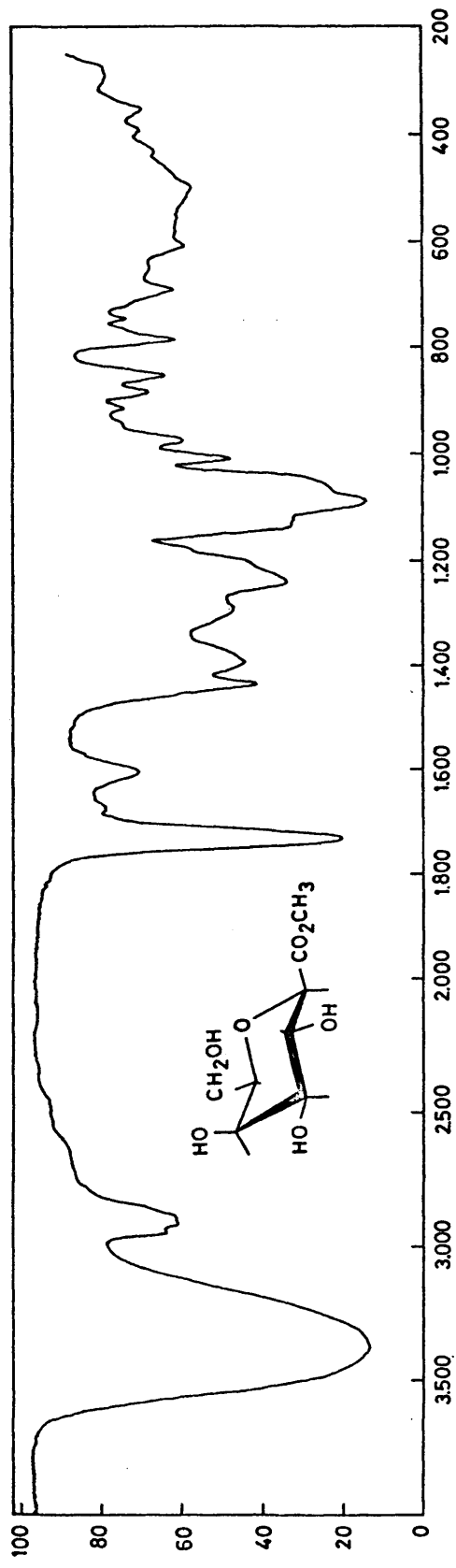


Fig. 31 - Espectro IR (BrK) del producto de desacetilación del cianuro de 2,3,4,6-tetra-O-acetil- $\beta$ -D-galactopiranosilo (38)

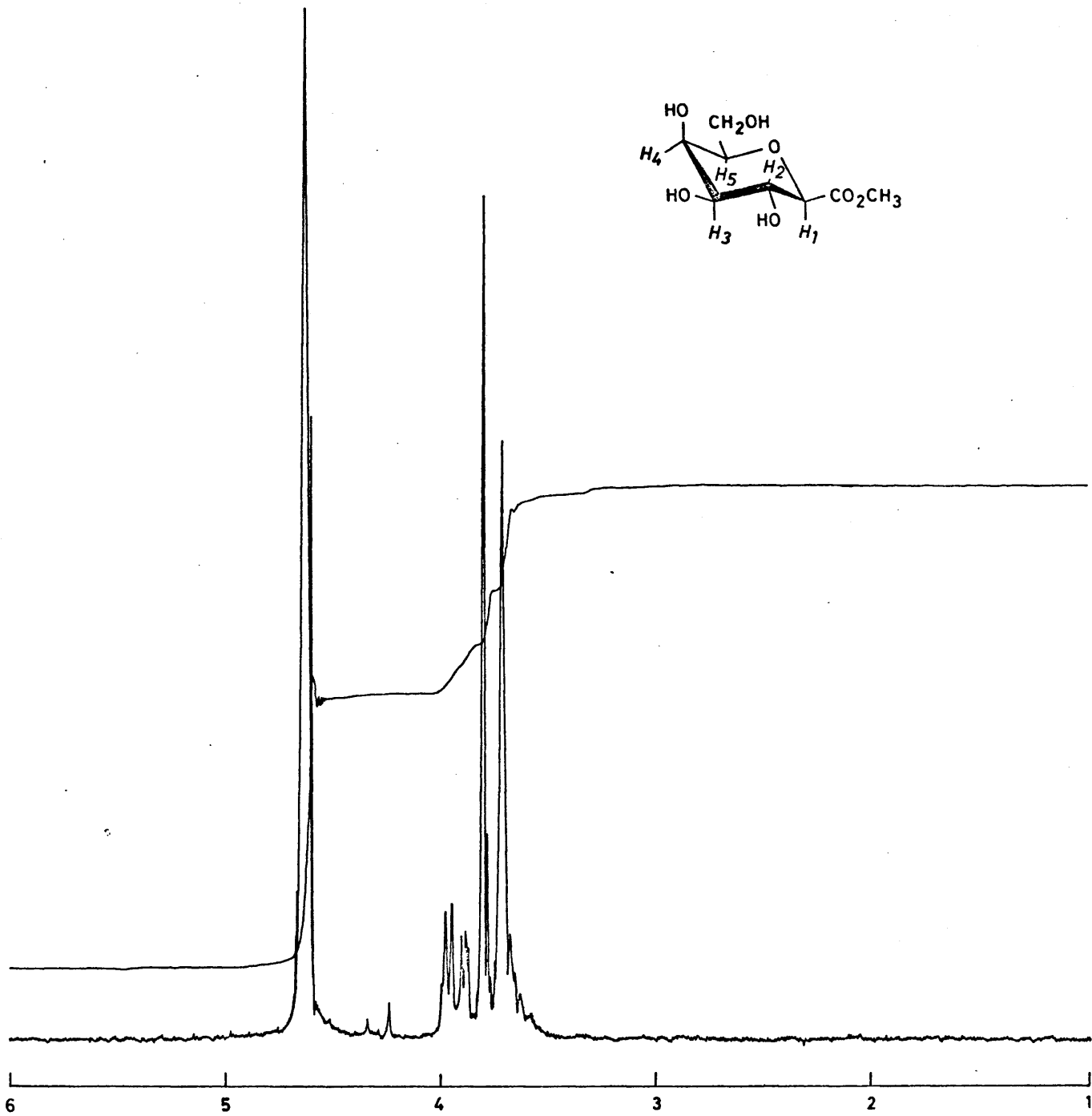


Fig. 32 - Espectro de RMN a 100 MHz del producto de desacetilación del cianuro de 2,3,4,6-tetra-O-acetil- $\beta$ -D-galactopiranosilo (38). ( $D_2O$ )

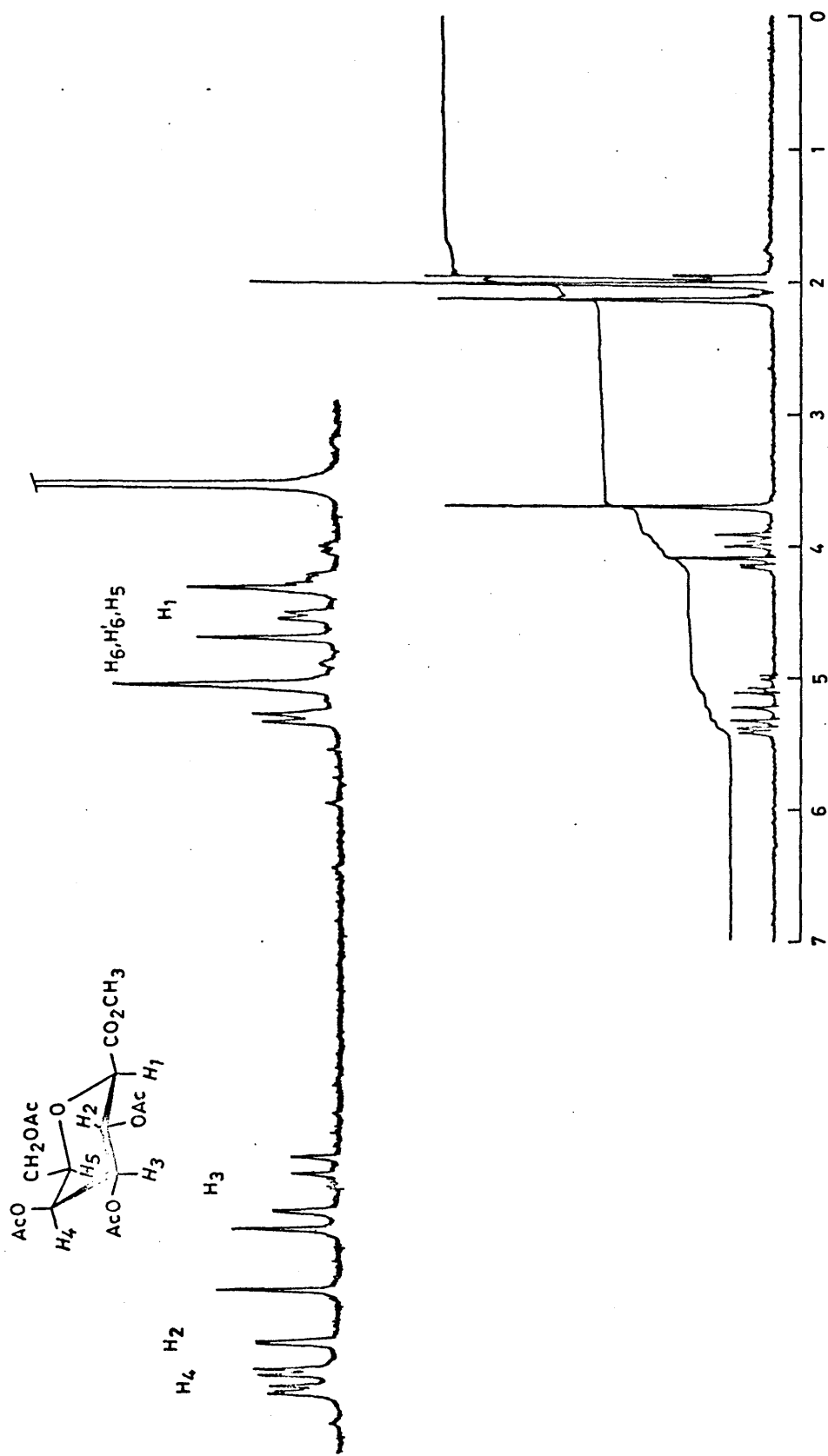
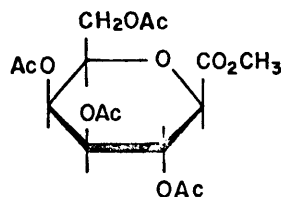


Fig. 33 - Espectro de RMN a 100 MHz de 2,3,4,6 - tetra - O - acetil - 1 - carboximetil - 1 - desoxi -  $\beta$  - D - galactopiranososa (70) (Cl<sub>3</sub>CD)

a 3.73 (tres protones) asignado a los protones metílicos - de un grupo carboximetilo. A campo más bajo el espectro -- presentó un cuadruplete a 5.45, asignado al protón ecuato rial H-4 ( $J_{3,4}$  3.2 Hz,  $J_{4,5}$  1.0 Hz); otro cuadruplete, par cialmente solapado con el anterior a 5.38, asignado al pro tón H-2 ( $J_{2,3}$  10.0 Hz,  $J_{1,2}$  9.7 Hz); y un tercer cuadruple te a 5.10, adscrito al protón H-3 ( $J_{2,3}$  10.0 Hz,  $J_{3,4}$  3.2 Hz). Entre 3.60 y 4.30 resonaron los protones H-6, H'-6, - H-5 y el protón anomérico H-1. Los tres protones H-5, H-6 y H'-6 aparecieron como un sistema  $A_2B$  que analizado dió los siguientes resultados: los protones H-6 y H'-6, apare cieron a  $\delta$ 4.12 y el protón H-5 a 3.95, ( $J_{5,6}$  6.7 Hz). Entre estas señales apareció el protón H-1 como un doblete a -- 4.00 ( $J_{1,2}$  9.7 Hz).

Estos resultados están de acuerdo con una estructura de 2,3,4,6-tetra-O-acetil-1-carboximetil-1-desoxi- $\beta$ -D-ga-- lactopiranosido (70).



70  
~

Análogamente, la desacetilación de 3,4,6-tri-O-acetil -1,2-O-(1-cianoetilidén)- $\alpha$ -D-glucopiranososa (45, en las mis mas condiciones, dió lugar a un producto, que no pudo cris

talizarse, cuyo espectro IR (fig. 34) indicó la presencia de grupos hidroxilo libres y de un grupo ester. Su espectro de RMN en agua deuterada (fig. 35) mostró un singlete a  $\delta 1.72$  (tres protones) asignado a los protones metílicos -- del grupo cianoetilidén, otro singlete a 3.70 asignado a -- los protones de un grupo carboximetilo, y un doblete a -- 5.76, asignado al protón anomérico ( $J_{1,2}$  5.0 Hz). La reacetilación del producto condujo, con rendimiento prácticamente cuantitativo, a una sustancia cristalina cuyo espectro IR indicó la ausencia de grupos hidroxilo libres. Su espectro de RMN en cloroformo-d (fig. 36) fué muy similar al de la 3,4,6-tri-O-acetil-1,2-O- (1-cianoetilidén)- $\alpha$ -D-galactopiranosa (45) (compárense con la fig. 16 pág. 102). El espectro presentó el singlete correspondiente a los protones metílicos del grupo cinoetilidén a  $\delta 1.74$  y los singletes -- de los grupos metilo de los acetoxilos a 2.06 (seis protones) y 2.08 (tres protones). A campo más bajo el espectro presentó un singlete a 3.76 (tres protones), asignado a -- los protones del grupo carboximetilo y las señales correspondientes al anillo de glucopiranosa. El protón anomérico H-1 apareció a  $\delta 5.80$  ( $J_{1,2}$  5.0 Hz); el protón H-3 resonó -- a 5.18 ( $J_{2,3} \approx J_{3,4} \approx 2.5$  Hz); el protón H-4 apareció a -- 4.89 ( $J_{3,4}$  2.5 Hz,  $J_{4,5}$  9.0 Hz,  $J_{2,4}$  1.0 Hz); el protón -- H-2 apareció a 4.35 y los protones H-6, H'-6 y H-5 aparecieron a 4.20 y 4.02, como un sistema  $A_2B$  ( $J_{5,6}$  6.6 Hz). -- Estos hechos están de acuerdo con una estructura de 3,4,6-tri-O-acetil-1,2-O-(1-metoxicarboniletidén)- $\alpha$ -D-glucopiranosa (71).

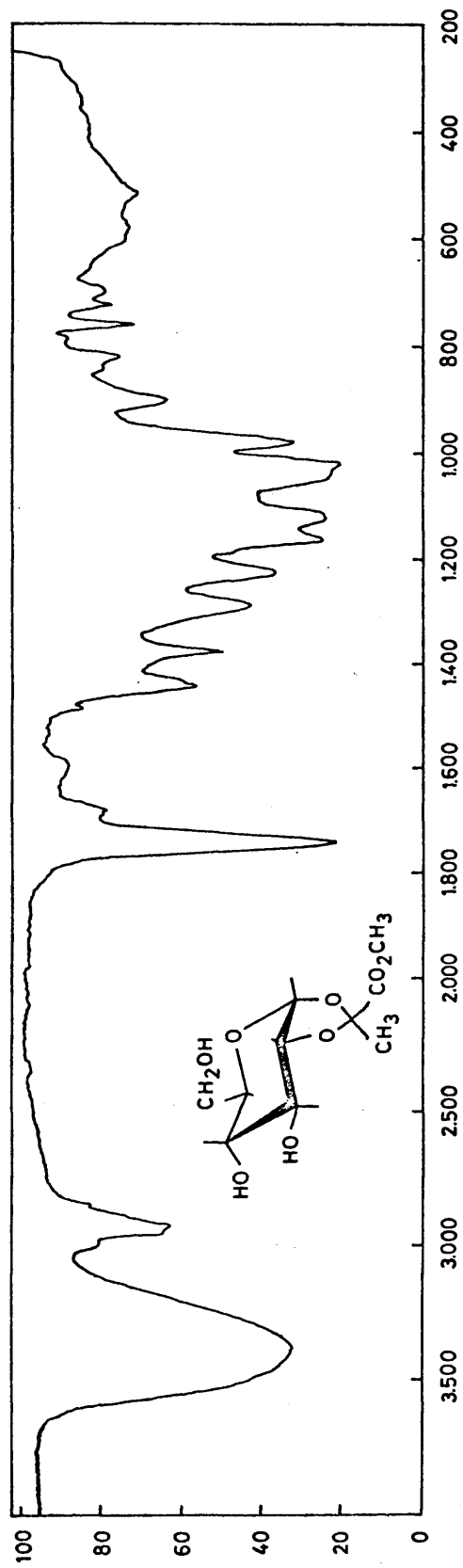


Fig. 34 - Espectro IR (BrK) del producto de desacetilación de la 3,4,6-tri-O-acetil-1,2-O-(1-cianoetilidén) -  $\alpha$ -D-glucopiranososa (45)

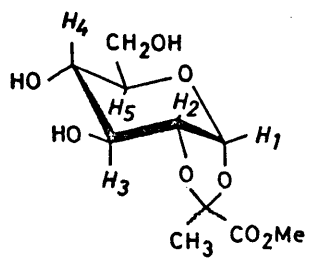
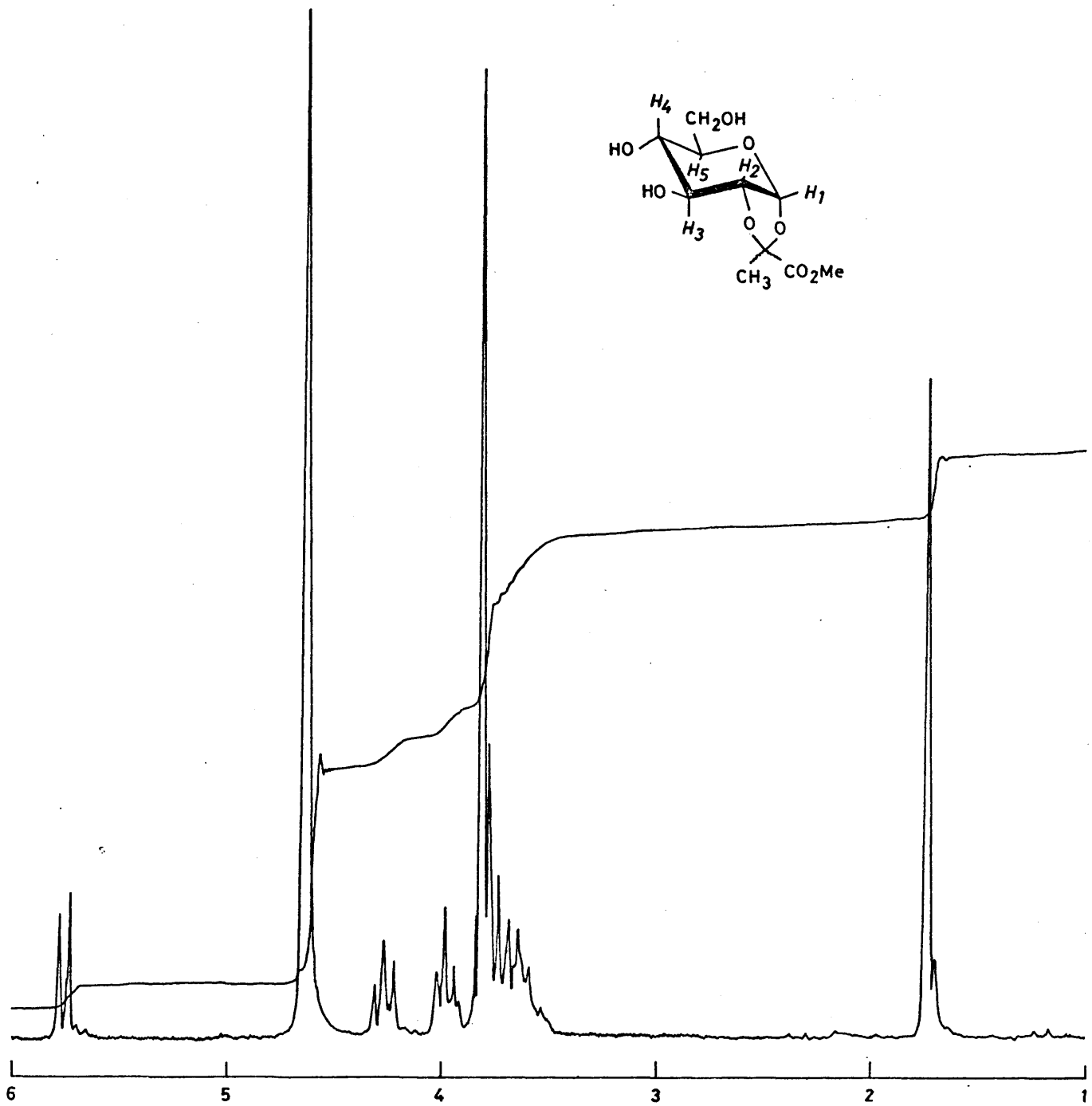


Fig. 35 - Espectro de RMN a 100 MHz del producto de desacetilación del 3,4,6-tri-O-acetil-1,2-O (1-cianoetilidén) -  $\alpha$ -D-glucopiranososa (45) (D<sub>2</sub>O)

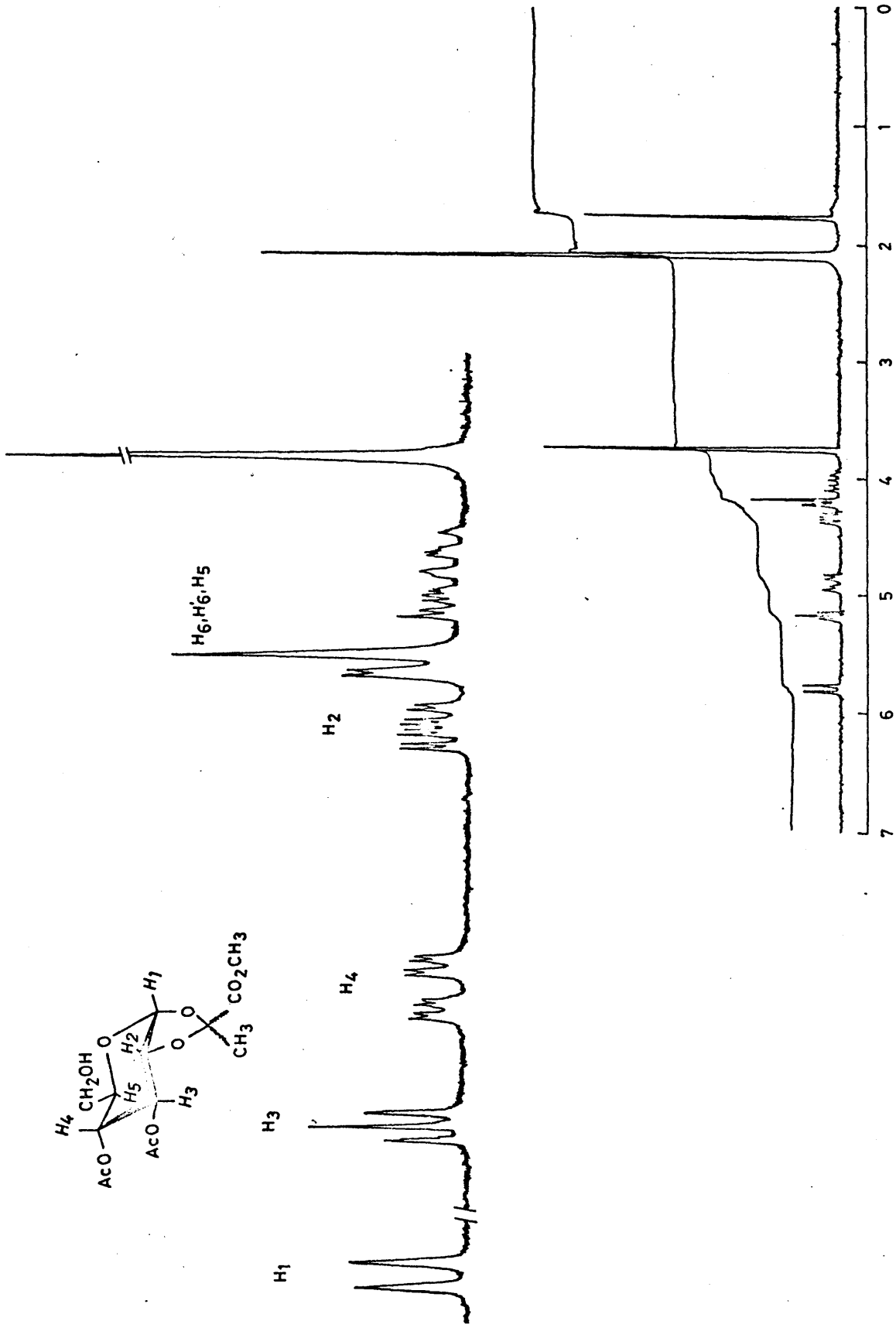
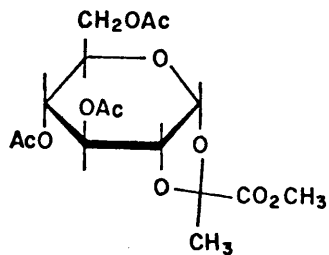


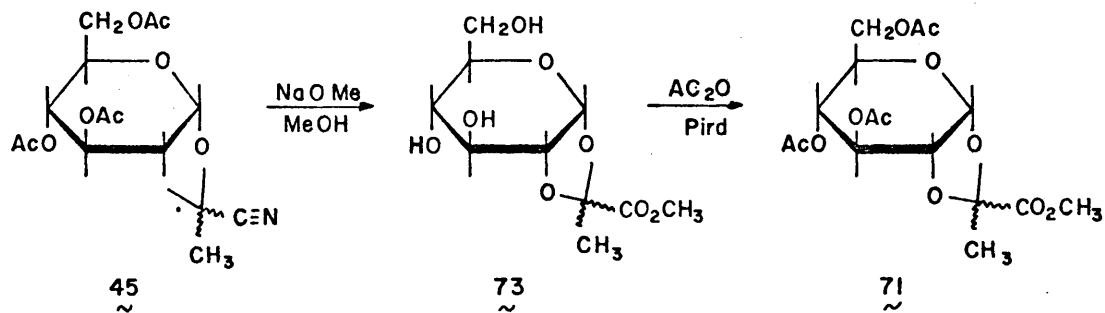
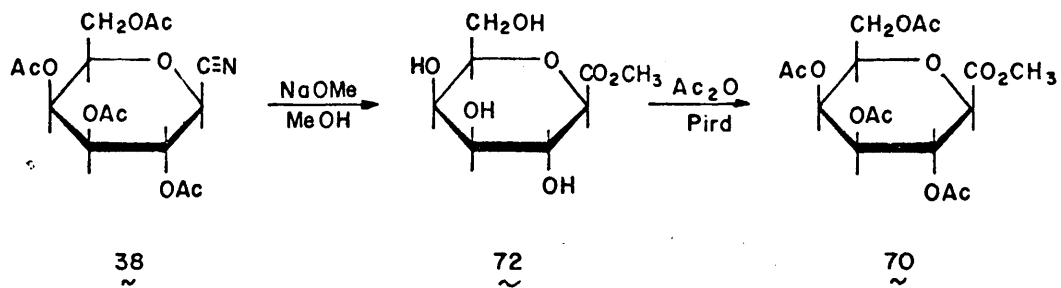
Fig.36 - Espectro de RMN a 100 MHz de 3,4,6-tri-O-acetil-1,2-O-(1-carboximetililidén) -  $\alpha$ -D-glucopiranos (71) ( $\text{Cl}_3\text{CD}$ )



71

A la vista de estos resultados parece evidente que durante la desacetilación de 38 y 45, catalizada por metóxido sódico tiene lugar una adición de metanol al triple enlace  $C\equiv N$  y formación inmediata de los correspondientes ésteres metílicos tal como se indica en el esquema 13.

## ESQUEMA 13



T A B L A VII

Desplazamientos químicos de los protones metílicos en los espectros de RMN a 100 MHz de los ciano derivados formados en glicosilaciones catalizadas por cianuros metálicos  
 $\delta$  ppm (integral protones)

compuesto	disolvente	$\delta$ ppm	integral
45 ~	Cl <sub>3</sub> CD	1.90 (3)	2.06 (6)
45 ~	(CD <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CO	1.88 (3)	1.98 (3)
45 ~	C <sub>6</sub> D <sub>6</sub>	1.42 (3)	1.60 (6)
44 ~	Cl <sub>3</sub> CD	1.98 (3)	2.00 (3)
56 ~	Cl <sub>3</sub> CD	2.00 (3)	2.02 (3)
55 ~	Cl <sub>3</sub> CD	2.01 (3)	2.03 (3)
57 ~	Cl <sub>3</sub> CD	1.84 (3)	2.03 (3)
38 ~	Cl <sub>3</sub> CD	1.97 (3)	2.03 (3)
38 ~	(CD <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CO	1.92 (3)	1.97 (3)
38 ~	C <sub>6</sub> D <sub>6</sub>	1.95 (3)	2.00 (3)
58 ~	Cl <sub>3</sub> CD	1.97 (3)	2.03 (3)
		2.11 (3)	2.11 (3)
		2.03 (3)	2.03 (3)
		1.64 (3)	1.64 (3)
		2.08 (6)	2.08 (6)
		2.10 (6)	2.10 (6)
		2.07 (3)	2.07 (3)
		2.11 (3)	2.11 (3)
		2.10 (3)	2.10 (3)
		2.15 (3)	2.15 (3)
		2.14 (3)	2.14 (3)
		2.04 (3)	2.04 (3)
		2.15 (3)	2.15 (3)

T A B L A VIII

Desplazamientos químicos ( $\delta$  ppm) de los protones metínicos y metilénicos en los espectros de RMN de los ciano derivados formados en glicosilaciones catalizadas por cianuros metálicos

compuesto	disolvente	H-1	H-2	H-3	H-4	H-5	H-6	H'-6
45	Cl <sub>3</sub> CD	5.78	4.37	5.19	4.90	3.89	4.18	
45	(CD <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CO	5.89	4.51	5.17	4.90	3.98	4.16	
45	C <sub>6</sub> D <sub>6</sub>	5.34	4.06	5.23	4.99	3.85	4.11	
44	Cl <sub>3</sub> CD	4.30	-	-	-	3.68	4.24	4.09
56	Cl <sub>3</sub> CD	4.78	-	-	-	3.72	4.24	4.10
55	Cl <sub>3</sub> CD	5.53	4.89	5.44	5.07	-	-	
57	Cl <sub>3</sub> CD	5.85	4.31	4.96	5.37	-	-	
38	Cl <sub>3</sub> CD	4.32	5.53	5.02	5.44	3.97	4.12	
38	(CD <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CO	4.83	5.44	5.18	5.44	4.29	4.12	
38	C <sub>6</sub> D <sub>6</sub>	4.48	5.66	4.81	5.31	3.17	3.93	
58	Cl <sub>3</sub> CD	4.80	5.43	5.01	5.42	3.97	4.15	

T A B L A IX

Constantes de acoplamiento (Hz) de los protones metínicos y metilénicos en los espectros de RMN a 100 MHz de los ciano derivados formados en glicosilaciones catalizadas por cianuros metálicos

compuesto	disolvente	J <sub>1,2</sub>	J <sub>2,3</sub>	J <sub>2,4</sub>	J <sub>3,4</sub>	J <sub>4,5</sub>	J <sub>5,6</sub>	J <sub>5,6'</sub>	J <sub>6,6'</sub>
45~	Cl <sub>3</sub> CD	5.0	2.7	1.0	2.7	9.0	4.2		0.0
45~	(CD <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CO	5.0	2.7	1.0	2.7	9.0	4.2		0.0
45~	C <sub>6</sub> D <sub>6</sub>	5.0	3.0	1.0	3.0	9.5	4.2		0.0
44~	Cl <sub>3</sub> CD	9.0	-	-	-	-	5.1	2.7	13.0
56~	Cl <sub>3</sub> CD	9.0	-	-	-	-	4.5	2.7	12.7
55~	Cl <sub>3</sub> CD	5.0	9.0	0.0	9.5	9.5	-	-	-
57~	Cl <sub>3</sub> CD	5.0	7.0	0.0	3.5	1.7	-	-	-
38~	Cl <sub>3</sub> CD	10.0	10.0	0.0	3.3	1.2	6.3		0.0
38~	(CD <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CO	10.0	10.0	0.0	3.3	1.2	7.0		0.0
38~	C <sub>6</sub> D <sub>6</sub>	10.0	10.0	0.0	3.2	1.3	6.6		0.0
58~	Cl <sub>3</sub> CD	9.0	10.0	0.0	3.2	1.0	6.3		0.0

### 3. PARTE EXPERIMENTAL

### 3.1. PROCEDIMIENTOS GENERALES

Las evaporaciones se realizaron a presión reducida y temperaturas inferiores a 50° C.

La separación y purificación de las sustancias obtenidas se llevó a cabo por cromatografía en columna sobre gel de sílice Merck (70-230 mallas), y/o por cromatografía en capa fina preparativa sobre placas de gel de sílice G Merck de 1mm de espesor; en el último caso, las manchas se hicieron visibles con vapores de I<sub>2</sub> que se eliminaron fácilmente por calentamiento y/o por exposición a la luz U.V. Los eluyentes empleados se indican en cada caso.

La pureza de los productos se comprobó por cromatografía en capa fina sobre placas de gel de sílice G Merck de 0.25 mm de espesor detectando las manchas por pulverización con una disolución al 10% de SO<sub>4</sub>H<sub>2</sub> en metanol y posterior carbonización, o por cromatografía en papel, utilizando la

técnica descendente; se empleó papel Whatman n° 1 y las manchas se hicieron visibles con  $\text{NO}_3\text{Ag}$  alcalino<sup>184</sup>. Se utilizaron los eluyentes que se indican en el lugar correspondiente.

Los puntos de fusión se determinaron en tubos capilares en un aparato Buchi y/o en un Kofler. En ambos casos, - están sin corregir.

Los poderes rotatorios se midieron en un polarímetro Perkin-Elmer 141, usando luz amarilla de sodio.

Los espectros IR se registraron como pastillas de BrK ó en disolución de  $\text{Cl}_4\text{C}$  en un espectrógrafo Perkin-Elmer, - modelo 457, operando entre  $4.000$  y  $600 \text{ cm}^{-1}$ .

Los espectros de RMN se registraron en los disolventes indicados en cada caso usando TMS como standar interno en un espectrómetro Varian XL-100, operando a 100 MHz.

Los espectros de masas se registraron sobre muestras sólidas en un espectrómetro Perkin-Elmer RMU-6MG.

3.2. ACETILACIONES PARCIALES DE LA 1,6-ANHIDRO- $\beta$ -D-GALACTOPIRANOSA (10) y 2-O-ACETIL-1,6-ANHIDRO- $\beta$ -D-GALACTOPIRANOSA (11). ESTUDIO DE LAS REACTIVIDADES RELATIVAS - DE LOS GRUPOS HIDROXILO.

La 1,6-anhidro- $\beta$ -D-galactopiranososa (10) y la 2-O-acetil-1,6-anhidro- $\beta$ -D-galactopiranososa (11), se prepararon de acuerdo con los esquemas 1 y 2 (págs. 25 y 35), su preparación y las reacciones de acetilación parcial de ambos compuestos se describen a continuación.

3.2.1. BROMURO DE 2,3,4,6-TETRA-O-ACETIL- $\alpha$ -D-GALACTOPIRANOSILO (7)

A 100 ml (1.05 moles) de anhídrido acético a 0°C se, añadieron gota a gota 0.6 ml de ácido perclórico del 60-70%. La solución se dejó hasta alcanzar la temperatura ambiente y se adicionaron con agitación 25 g (0.13 moles) de D-galac

tosa a una velocidad tal que la temperatura se mantuviese entre 30 y 40°C. Terminada la adición se enfrió a 20°C, - se añadieron 7.5 g de fósforo rojo, 14.5 ml de Br<sub>2</sub> y 9 ml de H<sub>2</sub>O agitando y sin que la temperatura se elevara, en - ninguna de las adiciones, por encima de 20°C. La mezcla - de reacción se dejó estar durante dos horas a temperatura ambiente, pasadas las cuales se adicionaron 60 ml de clo- roformo y se filtró a vacío. La solución clorofórmica se lavó sucesivamente con dos porciones, de 200 ml y 75 ml - respectivamente, de agua a 0°C, se añadió sobre 125 ml de una solución saturada de bicarbonato sódico y se secó so- bre ácido silícico. La solución seca se concentró hasta - dar un sirupo amarillo que se trató con 125 ml de una mez- cla de éter de petróleo - éter 2:1 con lo que se convirtió en un sólido blanco que se recristalizó de éter y se secó a vacío sobre NaOH. Rend. 37 g (80%), p.f. 83-86°C (Lit.<sup>185</sup> p.f. 88-89°C).

### 3.2.2. 1,6-ANHIDRO-β-D- GALACTOPIRANOSA (10)

A una solución de 42.8 g de fenolato potásico seco\* en 428 g de fenol fundido, se añadieron con fuerte agita-

---

\* El fenolato potásico se preparó por neutralización de fe- nol con una cantidad estequiométrica de hidróxido potásico en solución acuosa. Se obtuvo seco eliminando el agua por destilación azeotrópica con benceno.

ción, 65 g (0.20 moles) de bromuro de 2,3,4,6-tetra-O-acetil- $\alpha$ -D-galactopiranosilo (7) y la mezcla se mantuvo en estado líquido a temperatura ambiente durante dieciséis horas. Al cabo de este tiempo, la mezcla de reacción se trató con una solución fría de 254 g de hidróxido potásico en 2.540 ml de agua y se extrajo inmediatamente con tres porciones de 1.200 ml de benceno. El extracto se secó sobre sulfato magnésico y se concentró en vacío hasta la formación de una masa siruposa constituida por 2,3,4,6-tetra-O-acetil-1-fenil- $\beta$ -D-galactopiranosido (20) y restos de fenol. A esta masa se añadió una solución de 270 g de hidróxido potásico en 3.500 ml de agua y la mezcla se calentó a reflujo durante nueve horas. La solución así obtenida se pasó a través de una columna de Amberlita IR 120 ( $H^+$ ) para eliminar los iones potasio y el eluido se introdujo en una columna de Deacidite FFIP donde se retuvieron los restos de fenol y ácido acético. La solución neutra se concentró a presión reducida. Se obtuvieron 15.5 g (50%) de 1,6-anhidro- $\beta$ -D-galactopiranososa (10), que se recristalizó de etanol. P.f. 213-215°C (Lit.<sup>138</sup> p.f. 220-221°C).

### 3.2.3. 3,4-O-ISOPROPILIDEN-1,6-ANHIDRO- $\beta$ -D-GALACTOPIRANOSA (22)

A una solución de 4 g (0.02 moles) de 1,6-anhidro- $\beta$ -D-galactopiranososa (10) en 400 ml de acetona anhidra se

añadieron 40 g de sulfato de cobre, y la mezcla de reacción se mantuvo a temperatura ambiente con agitación durante 40 hr. Transcurrido este tiempo se filtró el sulfato de cobre y la solución se concentró a presión reducida. El residuo sólido se cristalizó de etanol. Rend. 4.5 g - (92%), p.f. 151-152°C (Lit.<sup>137</sup> p.f. 151-152°C).

3.2.4. 2-O-ACETIL-3,4-O-ISOPROPILIDEN-1,6-ANHIDRO- $\beta$ -D-GALACTOPIRANOSA (23)

Se disolvieron 4.5 g (0.02 moles) de 3,4-O-isopropiliden- $\beta$ -D-galactopiranososa (22) en 22.5 ml de piridina anhidra y se añadieron 22.5 ml de anhídrido acético. La mezcla de reacción se dejó estar una noche a temperatura ambiente, se recogió, con agitación, sobre 500 ml de agua-hielo y el precipitado se filtró y se lavó con agua fría. El acetil derivado se cristalizó de agua. Rend. 4 g (74%), - p.f. 133-135°C (Lit.<sup>137</sup> p.f. 136-137°C).

3.2.5. 2-O-ACETIL-1,6-ANHIDRO- $\beta$ -D-GALACTOPIRANOSA (11)

Una solución de 4.0 g (0.02 moles) de 2-O-acetil-3,4-O-isopropiliden-1,6-anhidro- $\beta$ -D-galactopiranososa (23) en 40 ml de ácido acético al 20% se calentó dos horas y media a 90-100°C. A continuación la mezcla de reacción se -

evaporó a sequedad y se eliminaron los restos de ácido acético por adiciones y eliminaciones sucesivas de tolueno. - El residuo sólido se recristalizó de etanol. Rend. 3.0 g (90%), p.f. 110-112°C,  $[\alpha]_D^{24} = 4.02$  (C, 1.12 Cl<sub>3</sub>CH).

IR (BrK): 3.490 cm<sup>-1</sup> (ν O-H), 1.740 cm<sup>-1</sup> (ν C=O), otras absorciones a 1.375, 1.235, 1.130, 1.085, 1.055, 1.035, - 990, 930, 900, 880, 810 y 760 cm<sup>-1</sup>.

RMN (Cl<sub>3</sub>CD) (fig. 4): δ 3.20 (2H, protones hidroxílicos).  
 RMN (Cl<sub>3</sub>CD + D<sub>2</sub>O): δ 2.08 (3H, singlete, metilo acetoxilo); 3.61 (1H, cuadruplete, H-6exo, J<sub>6exo,6endo</sub> 7.5 Hz, J<sub>5,6exo</sub> 5.0 Hz); 3.92 (2H, multiplete, H-3 y H-4); 4.24 (1H, doblete, H-6endo, J<sub>6exo,6endo</sub> 7.5 Hz); 4.41 (1H, triplete, H-5, J<sub>4,5</sub> 4.5 Hz, J<sub>5,6exo</sub> 5.0 Hz); 4.77 (1H, triplete, H-2, J<sub>1,2</sub> ≈ J<sub>2,3</sub> ≈ 1.3 Hz); 5.36 (1H, triplete, H-1, J<sub>1,2</sub> ≈ J<sub>1,3</sub> ≈ 1.3 Hz)

Análisis: Calculado para C<sub>8</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>: C, 47.05, H, 5.92.

Encontrado: C, 47.23. H, 5.92.

### 3.2.6. LA ACETILACION PARCIAL DE LA 1,6-ANHIDRO-β-D-GALACTOPIRANOSA (10)

A una solución de 10.47 g (65 mmoles) de 1,6-anhidro-β-D-galactopiranososa (10) en 100 ml de piridina se añadieron

15.1 ml (164 mmoles) de anhídrido acético y la solución se dejó estar a temperatura ambiente durante dieciseis horas. Al cabo de este tiempo, la mezcla de reacción se calentó a 50°C durante una hora y se evaporó a sequedad eliminando los restos de la mezcla acetilante por adiciones y eliminaciones sucesivas de tolueno. La cromatografía en capa fina (benceno-éter 1:1) del residuo obtenido (18 g), mostró cuatro manchas una de las cuales apareció ligeramente desdoblada. La mezcla se introdujo en una columna de gel de sílice, que se eluyó con mezclas de benceno-éter. Por elución de la columna con benceno-éter 5:3 se separó el producto de mayor  $R_f$  que se identificó con la 2,3,4-tri-O-acetil-1,6-anhidro- $\beta$ -D-galactopiranososa (19). Rend. 6.42 g (35%), p.f. 73-74°C,  $\{\alpha\}_D^{22} - 7.4^\circ$  (C, 1.5  $\text{Cl}_3\text{CH}$ ). (Lit.<sup>115</sup> p.f. 73-74°C,  $\{\alpha\}_D^{20} - 6.5^\circ$ ).

IR (BrK): 1.760 y 1.740  $\text{cm}^{-1}$  ( $\nu$  C=O), otras absorciones a 1.370, 1.250, 1.220, 1.140, 1.040, 945 y 890  $\text{cm}^{-1}$ .

RMN ( $\text{Cl}_3\text{CD}$ ) (fig. 1):  $\delta$  2.00 (3H, singlete, grupo acetoxilo ecuatorial en C-4); 2.12 (6H, singlete, grupos acetoxilos axiales en C-2 y C-3); 3.70 (1H, cuadruplete, H-6exo,  $J_{6\text{exo},6\text{endo}}$  7.5 Hz,  $J_{5,6\text{exo}}$  4.7 Hz); 4.31 (1H, doblete desdoblado, H-6endo,  $J_{6\text{exo},6\text{endo}}$  7.5 Hz); 4.43 (1H, multiplete, H-5,  $J_{5,6\text{exo}}$  4.7 Hz); 4.72 (1H, cuadruplete, H-2,  $J_{2,3}$  1.5 Hz,  $J_{1,2}$  1.0 Hz); 5.20 (2H, dobletes entrecruzados, H-3 y H-4); 5.39 (1H, doblete desdoblado, H-1,  $J_{1,2}$  1.0 Hz).

Análisis: Calculado para  $C_{12}H_{16}O_8$ : C, 50.00, H, 5.59.

Encontrado: C, 50.11, H, 5.60.

Con benceno éter 1:1 se eluyeron dos productos (8.45 g) con valores de  $R_f$  muy similares. Esta mezcla de productos se recristalizó repetidamente de éter etílico con unas gotas de hexano. Se consiguió así un producto cristalino que se caracterizó como 2,3-di-O-acetil-1,6-anhidro- $\beta$ -D-galactopiranososa (8). Rend. 4 g (25%), p.f. 114-116°C,  $[\alpha]_D^{25} - 0.5^\circ$  (C, 2.02  $Cl_3CH$ ). (Lit.<sup>114</sup> p.f. 113-115°C,  $[\alpha]_D^{20} - 0.8^\circ$ ).

IR (BrK): 3.460  $cm^{-1}$  ( $\nu$ O-H), 1.750 y 1.740  $cm^{-1}$  ( $\nu$ C=O), otras absorciones a 1.375, 1.235, 1.145, 1.060, 1.040, 1.020, 930 y 880  $cm^{-1}$ .

RMN ( $Cl_3CD + D_2O$ ) (figs. 2a y 3a):  $\delta$  2.10 y 2.14 (6H, singletes, metilos acetoxilos); 3.67 (1H, cuadruplete desdoblado, H-6exo,  $J_{6exo, 6endo} 7.5$  Hz,  $J_{5,6exo} 5.0$  Hz); -- 4.17 (1H, triplete parcialmente solapado, H-4,  $J_{3,4} 5.5$  Hz,  $J_{4,5} 4.5$  Hz); 4.26 (1H doblete, H-6endo,  $J_{6exo, 6endo} 7.5$  Hz); 4.42 (1H, triplete, H-5,  $J_{4,5} 4.5$  Hz,  $J_{5,6exo} 5.0$  Hz); 4.75 (1H, triplete, H-2,  $J_{1,2} \approx J_{2,3} \approx 1.5$  Hz); 5.08 (1H, multiplete, H-3,  $J_{3,4} 5.5$  Hz,  $J_{1,3} \approx J_{2,3} \approx J_{3,5} \approx 1.5$  Hz); 5.38 (1H, triplete, H-1,  $J_{1,2} \approx J_{1,3} \approx 1.5$  Hz).

Análisis: Calculado para  $C_{10}H_{14}O_7$ : C, 48.78, H, 5.73.

Encontrado C, 48.97, H, 5.51.

Por evaporación de las aguas madres de cristalización se obtuvo un producto siruposo que se caracterizó como - 2,4-di-O-acetil-1,6-anhidro- $\beta$ -D-galactopiranososa (9). Rend. 4 g (25%),  $[\alpha]_D^{26} - 8.7^\circ$  (C, 2.15  $Cl_3CH$ ).

IR (solución de  $Cl_4C$ ): 3.615 y 3.570  $cm^{-1}$  ( $\nu$  O-H), - 1.740 y 1.760  $cm^{-1}$  ( $\nu$  C=O), otras absorciones a 1.370, -- 1.220, 1.135, 1.040 y 900  $cm^{-1}$ .

RMN ( $Cl_3CD + D_2O$ ) (figs. 2b y 3b):  $\delta$  2.09 y 2.12 (6H, singletes, metilos acetoxilos); 3.67 (1H, cuadruplete desdoblado, H-6exo,  $J_{6exo, 6endo}$  7.5 Hz,  $J_{5,6exo}$  5.0 Hz); - 4.10 (1H, multiplete, H-3,  $J_{3,4}$  5.0 Hz,  $J_{1,3} \approx J_{2,3} \approx J_{3,5} \approx 1.5$  Hz); 4.38 (1H, doblete, H-6endo,  $J_{6exo, 6endo}$  7.5 - Hz); 4.48 (1H, triplete parcialmente solapado, H-5,  $J_{4,5}$  4.5 Hz,  $J_{5,6exo}$  5.0 Hz); 4.79 (1H, triplete H-2,  $J_{1,2} \approx J_{2,3} \approx 1.5$  Hz); 5.00 (1H, triplete, H-4,  $J_{3,4}$  5.0 Hz, -  $J_{4,5}$  5.0 Hz); 5.43 (1H, triplete, H-1,  $J_{1,2} \approx J_{1,3} \approx 1.5$  Hz).

Análisis: Calculado para  $C_{10}H_{14}O_7$ : C, 48.78, H, 5.73.

Encontrado C, 48.88, H, 5.93.

Por elución de la columna con éter se obtuvieron 0.3 g (3%) de 2-O-acetil-1,6-anhidro- $\beta$ -D-galactopiranososa (11), que se identificó por comparación con el producto obtenido por síntesis (ver apartado 3.2.5.).

Finalmente se eluyó, en muy pequeña cantidad otro -- producto, cuyo espectro de RMN está de acuerdo con la estructura de 3-O-acetil-1,6-anhidro- $\beta$ -D-galactopiranososa -- (21).

RMN ( $\text{Cl}_3\text{CD} + \text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  2.12 (3H, singlete, metilo acetoxilo); 3.68 (2H, multiplete, H-2, H-6exo); 4.32 (3H, multiplete, H-4, H-5, H-6endo); 5.02 (1H, multiplete, H-3); 5.34 (1H, triplete, H-1).

### 3.2.7. LA ACETILACION PARCIAL DE LA 2-O-ACETIL-1,6-ANHIDRO- $\beta$ -D-GALACTOPIRANOSA (11).

A una solución de 0.30 g (1.47 moles) de 2-O-acetil-1,6-anhidro- $\beta$ -D-galactopiranososa (11) en 2.8 ml de piridina se agregaron 0.16 ml (1.62 mmoles) de anhídrido acético. La mezcla de reacción se trató como en el caso de la acetilación parcial de la 1,6-anhidro- $\beta$ -D-galactopiranososa -- (10). La cromatografía en capa fina (benceno-éter 1:1) -- del residuo obtenido (0.38 g) mostró, junto a una pequeña cantidad del producto de partida, dos manchas una de las

cuales apareció ligeramente desdoblada. Por cromatografía en columna sobre gel de sílice de la mezcla, eluyendo con benceno-éter 5:3, se obtuvieron 0.07 g (19%) de 2,3,4-tri-O-acetil-1,6-anhidro- $\beta$ -D-galactopiranosas (19). Con la mezcla benceno-éter 1:1, se eluyeron 0.29 g (80%) de un producto cuyo espectro de RMN correspondió al esperado para una mezcla equimolecular de 2,3 y 2,4 di-O-acetil-1,6-anhidro- $\beta$ -D-galactopiranosas (8 y 9). Por cristalización fraccionada de esta fracción en etanol o éter etílico con una gota de hexano se obtuvo el 2,3-di-O-acetato (8) cristalino.

### 3.2.8. MIGRACION DE GRUPOS ACETILO EN LA 2,3 y 2,4 DI-O-ACETIL-1,6-ANHIDRO- $\beta$ -D-GALACTOPIRANOSAS. (8 y 9)

#### 3.2.8.1. POR ADSORCION EN UNA PLACA DE GEL DE SILICE

Se adsorbió sobre una placa de cromatografía en capa fina de gel de sílice una muestra de 2,3-di-O-acetato (8) puro y se dejó estar durante una noche, inmediatamente antes de desarrollar la placa con acetato de etilo se adsorbió otra referencia de la misma muestra. La placa se desarrolló en acetato etilo; y se reveló. La muestra que había permanecido varias horas sobre la sílice dió lugar a dos manchas de  $R_f$  muy similar, mientras la otra referencia mostró una mancha única.

## 3.2.8.2. POR ADSORCION EN COLUMNA DE GEL DE SILICE

En una columna de gel de sílice se introdujo una pequeña cantidad de 2,3-di-O-acetato (8) puro. Por elución de la columna con benceno éter 1:1 se obtuvo una mezcla de 2,3 y 2,4-di-O-acetatos (8 y 9).

## 3.2.8.3. POR GEL DE SILICE EN SOLUCION DE CLOROFORMO

Una solución de 2,3-di-O-acetato (8) en cloroformo se agitó con sílice durante varias horas, se filtró y se concentró a sequedad. El residuo así obtenido mostró por cromatografía en capa fina (acetato de etilo) dos manchas con  $R_f$  iguales a los de la 2,3 (8) y 2,4-di-O-acetil- $\beta$ -D-galactopiranososa (9).

## 3.2.8.4. EN MEDIO ALCALINO

Una solución de 10 mg del 2,3-di-O-acetato (8) puro, en 0.2 ml de una disolución de NaOH en etanol 0.1M se dejó estar a temperatura ambiente. Por cromatografía en capa fina se observó la paulatina formación del 2,4-di-O-acetato (9), hasta que ambos diacetatos se encontraron en proporciones prácticamente iguales.

## 3.2.8.5. ESPONTANEAMENTE

Se dejaron estar a temperatura ambiente 1.5 g de 2,4-di-O-acetato (9), prácticamente puro por RMN (figs. 2b y 3b), en forma de sirupo. Transcurridos unos meses se observó la aparición de cristales en el seno del sirupo y se cristalizó de etanol obteniéndose 0.8 g de un producto -- cristalino p.f. 114°C, que se identificó por RMN como el 2,3-di-O-acetato (8).

## 3.2.8.6. EN SOLUCION DE CLOROFORMO

Se registró el espectro de RMN en  $Cl_3CD$  del 2,4-di-O-acetato (9) (figs. 2b y 3b), la misma muestra se volvió a registrar a los nueve meses mostrando una mezcla equimolecular de 2,3 y 2,4-di-O-acetatos (8 y 9).

3.2.9. ESTUDIO DE LAS REACTIVIDADES RELATIVAS DE LOS GRUPOS HIDROXILO EN LA 1,6-ANHIDRO- $\beta$ -D-GALACTOPIRANOSA (10).

Se prepararon tres soluciones de 0.10 g (0.61 mmoles) de 1,6-anhidro- $\beta$ -D-galactopiranososa (10) en 1 ml de piridina y se les añadió 0.22 ml (1.52 mmoles de anhídrido acético. La primera mezcla de reacción se mantuvo durante 16 hr

a 0°C; La segunda, 16 hr a temperatura ambiente y la tercera 16 hr a temperatura ambiente y una hr a 50°C. Las mezclas de reacción se recogieron, posteriormente sobre agua-hielo, se extrajeron separadamente con cloroformo, se lavaron con  $\text{SO}_4\text{H}_2$  1N,  $\text{CO}_3\text{HNa}$  y agua y se concentraron a temperatura inferior a 30°C y a presión reducida\*.

Las proporciones relativas de 2,3 (8) y 2,4-di-O-acetil-1,6-anhidro- $\beta$ -D-galactopiranososa (9) obtenidas en las diferentes condiciones se dedujeron a partir de las integrales de las señales asignadas a los protones H-2 y H-4 del 2,4-di-O-acetato (9) y H-3 del 2,3-di-O-acetato (8) - en los espectros de RMN en  $\text{Cl}_3\text{CD}$  de las mezclas de acetilación (fig. 6).

	2,3-di-O-acetato	2,4-di-O-acetato
16 hr a 0°C	1	6.2
16 hr a T amb.	1	6.5
16 hr a T amb. + 1 hr a 50°C	1	4.0

---

\* Previamente se comprobó que este tratamiento de las mezclas de acetilación no modificaba las proporciones de los productos obtenidos en la reacción. Se registró un espectro de RMN de una mezcla de 2,3 di-O-acetato, 2,4 di-O-acetato y 2,3,4 triacetato (8, 9 y 19), la mezcla se diluyó en cloroformo, se sometió al tratamiento antes mencionado y se volvió a registrar el espectro de RMN. Las proporciones de los compuestos deducidas de las integrales de las distintas señales en ambos espectros eran las mismas.

3.2.10. ESTUDIO DE LAS REACTIVIDADES RELATIVAS DE LOS GRUPOS HIDROXILO EN LA 2-O-ACETIL-1,6-ANHIDRO- $\beta$ -D-GALACTOPIRANOSA (11)

Se prepararon tres soluciones de 0.10 g (0.44 mmoles) de 2-O-acetil-1,6-anhidro- $\beta$ -D-galactopiranososa (11) en 1 ml de piridina y se añadieron, a cada una, 0.04 ml (0.48 --- mmoles) de anhídrido acético. Las mezclas de reacción se trataron de forma análoga a la descrita en el apartado anterior. De los espectros de RMN en  $\text{Cl}_3\text{CD}$  (fog, 7) se dedujeron las siguientes proporciones de diacetatos en las mezclas de reacción:

	2,3-di-O-acetato	2,4-di-O-acetato
16 hr a 0°C	1	2
16 hr a T amb.	1	2
16 hr a T amb. + 1 hr a 50°C	1	3

3.3. SINTESIS QUIMICA DE LOS DISACARIDOS 4-O- $\alpha$ - Y - $\beta$ -D-GALACTOPIRANOSIL-D-GALACTOSA (1 Y 2) Y 3-O- $\alpha$ - Y - $\beta$ -D-GALACTOPIRANOSIL-D-GALACTOSA (3 Y 4)

Con objeto de obtener disacáridos de galactosa con enlaces glicosílicos  $\alpha$  y  $\beta$  1 $\rightarrow$ 3 y 1 $\rightarrow$ 4 se estudiaron las reacciones de condensación de Koenigs-Knorr de la 2,3-di-O-acetil-1,6-anhidro- $\beta$ -D-galactopiranosil (8), 2,4-di-O-acetil-1,6-anhidro- $\beta$ -D-galactopiranosil (9) y 2-O-acetil-1,6-anhidro- $\beta$ -D-galactopiranosil (7).

3.3.1. CONDENSACION DEL BROMURO DE 2,3,4,6-TETRA-O-ACETIL- $\alpha$ -D-GALACTOPIRANOSILO (7) CON 2,3-DI-O-ACETIL-1,6-ANHIDRO- $\beta$ -D-GALACTOPIRANOSA (8).

Una solución de 0.90 g (3.7 mmoles) de 2,3-di-O-acetil-1,6-anhidro- $\beta$ -D-galactopiranosil (8) en 95 ml de nitro

metano-benceno 1:1 se concentró hasta que destilaron 25 ml del disolvente. La solución se enfrió a 40°C y se agregaron 0.93 g (3.7 mmoles) de cianuro mercúrico y 1.48 g (3.7 mmoles) de acetobromogalactosa. La mezcla se agitó a 40°C y se siguió la reacción por cromatografía en capa fina -- (acetato de etilo-benceno 5:3). Se adicionaron 0.47 g (1.8 mmoles) de cianuro mercúrico y 0.74 g (1.8 mmoles) de acetobromogalactosa a las 20, 28 y 40 hr de iniciada la reacción. Después de 50 hr la mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente, se diluyó con benceno, se lavó con bicarbonato sódico al 5% y agua, se secó sobre  $\text{SO}_4\text{Mg}$  y se concentró a presión reducida. La cromatografía en capa fina (acetato de etilo-benceno 5:3) del residuo obtenido (4.3 g) mostró, junto a restos de acetobromogalactosa, la presencia de un producto minoritario y dos productos principales de movilidad muy similar. Esta mezcla se introdujo en una columna de gel de sílice que se eluyó con acetato de etilo-benceno (5:3). Se obtuvieron de este modo 0.54 g (16% a partir de acetobromogalactosa) del producto minoritario y 1.90 g (90.5%) de una mezcla siruposa de los productos principales.

El producto minoritario se recristalizó de etanol y se identificó como cianuro de 2,3,4,6-tetra-O-acetil- $\beta$ -D-galactopiranosilo (38). P.f. 168-169°C,  $\{\alpha\}_D^{25} + 35,6^\circ\text{C}$  (C, 2.0  $\text{Cl}_3\text{CH}$ ) (Lit.<sup>153</sup> p.f. 168-169°C,  $\{\alpha\}_D^{22} + 37.2^\circ\text{C}$  (C, 2.5  $\text{Cl}_3\text{CH}$ )).

La mezcla de los dos productos principales (1.90 g) se disolvió en 78 ml de una mezcla de anhídrido acético--ácido acético (7:3) conteniendo 1.6 ml de ácido sulfúrico concentrado, la solución se mantuvo durante 15 min. a temperatura ambiente, y a continuación se neutralizó cuidadosamente con solución acuosa de bicarbonato sódico al 5% a 0° y se extrajo con cloroformo. El extracto se lavó con agua, se secó sobre  $\text{SO}_4\text{Mg}$  y se concentró a vacío. La cromatografía en capa fina (éter-benceno 3:1) del residuo -- (2.10 g) mostró dos productos principales. La mezcla se introdujo en una columna de gel de sílice. Por elución -- con éter-benceno 3:1 se obtuvo en primer lugar 1,2,3,6-tetra-O-acetil-4-O-(2,3,4,6-tetra-O-acetil- $\alpha$ -D-galactopiranosil)- $\alpha$ -D-galactopiranososa (37) que se recristalizó de -- etanól. Red: 0.875 g (40%), p.f. 153 -154°C,  $[\alpha]_D^{24} + 138^\circ$  (C, 2.0  $\text{Cl}_3\text{CH}$ ).

IR (BrK): 1750  $\text{cm}^{-1}$  ( $\nu$  C=O), otras absorciones a -- 1.370, 1.230, 1.070, 935, 850 y 785  $\text{cm}^{-1}$ .

RMN ( $\text{Cl}_3\text{CD}$ ) (figs.8a y 9a):  $\delta$  1.97, 2.01, 2.04, 2.09, 2.11 y 2.13 (24H, singletes metilos acetoxilos); 3.90-4.60 (7H, multiplete, H-5, H'-5, H-6, H'-6, H-6', H'-6' y H-4); 4.99 (1H, doblete, H'-1,  $J_{1',2'}$  3 Hz); 4.90-5.60 (5H, multiplete, H-2, H'-2, H-3, H'-3, H'-4); 6.35 (1H, doblete, H-1,  $J_{1,2}$  3.3 Hz).

Análisis: Cálculado para  $C_{28}H_{38}O_{19}$ : C, 49.55, H, 5.64.

Encontrado: C, 49.63, H, 5.75.

A continuación se eluyó 1,2,3,6-tetra-O-acetil-4-O(2,3,4,6-tetra-O-acetil- $\beta$ -D-galactopiranosil)- $\alpha$ -D-galactopiranososa (2f), que se recristalizó de etanol. Rend. 0.655 g (30%); p.f. 189-190°C,  $[\alpha]_D^{25} + 54^\circ$  (C, 1.8  $Cl_3CH$ ) (Lit.<sup>54</sup> p.f. 172-173°C,  $[\alpha]_D^{26} + 57.3$  ( $Cl_3CH$ )).

IR (BrK): 1.750  $cm^{-1}$  ( $\nu$  C=O), otras absorciones a 1.370, 1.220, 1.065, 930 y 790  $cm^{-1}$ .

RMN ( $Cl_3CD$ ) (figs. 8b y 9b):  $\delta$ 1.97, 2.02, 2.04, 2.08, 2.10 y 2.14 (24H, singletes, metilos acetoxilos); 3.80-4.40 (7H, multiplete, H-5, H'-5, H-6, H'-6, H-6', H'-6', H-4); - 4.43 (1H, doblete, H'-1,  $J_{1',2'}$  7.5 Hz); 4.90-5.40 (5H, multiplete, H-2, H'-2, H-3, H'-3, H'-4); 6.26 (1H, doblete, H-1,  $J_{1,2}$  3.0 Hz).

Análisis: Cálculado para  $C_{28}H_{38}O_{19}$ : C, 49.55, H, 5.64,

Encontrado: C, 49.49, H, 5.76.

### 3.3.2. 4-O- $\alpha$ -D-GALACTOPIRANOSIL-D-GALACTOSA (1)

A una suspensión de 0.22 g (0.32 mmoles) de 1,2,3,6-tetra-O-acetil-4-O(2,3,4,6-tetra-O-acetil- $\alpha$ -D-galactopirano-

sil)- $\alpha$ -D-galactopiranososa (37), en 2.2 ml de metanol se agregaron 0.65 ml de una solución de metóxido sódico 0.2 M. La solución se mantuvo 30 min. a temperatura ambiente, pasados los cuales, se neutralizó con Amberlita IR-120 ( $H^+$ ) y se evaporó a vacío. La cromatografía en papel del residuo obtenido mostró una mancha única,  $R_{Gal}$  0.70 (acetato de etilopiridina-agua 10:4:3). Se recristalizó de metanol-butanol-agua. Rend. 0.08 g (85%), p.f. 212-213°C,  $\{\alpha\}_D^{26} + 167 \rightarrow 170^\circ$  (C, 1.0  $H_2O$ ). (Lit.<sup>45</sup> p.f. 210-211°C,  $\{\alpha\}_D^{25} + 177^\circ$ )

IR (BrK):  $3.400\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu$  O-H), otras absorciones a 1.420, 1.330, 1.220, 1.150, 1.070, 1.020, 980 y  $805\text{ cm}^{-1}$ .

### 3.3.3. 4-O- $\beta$ -D-GALACTOPIRANOSIL-D-GALACTOSA (2)

A una suspensión de 0.175 g (0.27 mmoles) de 1,2,3,6-tetra-O-acetil-4-O-(2,3,4,6-tetra-O-acetil- $\beta$ -D-galactopiranosil)- $\alpha$ -D-galactopiranososa (26) en 1.75 ml de metanol se añadieron 0.51 ml de una solución de metóxido sódico 0.2 M. La solución se agitó durante 30 min. a temperatura ambiente, se neutralizó con Amberlita IR-120 ( $H^+$ ) y se concentró a vacío. Se obtuvo un producto homogéneo por cromatografía en papel  $R_{Gal}$  0.78 (acetato de etilopiridina-agua 10:4:3), que cristalizó de agua-acetona (0.5:10). Rend. 0.09 g (100%) p.f. 204-206°C,  $\{\alpha\}_D^{26} + 76 \rightarrow 69^\circ$  (C, 1.1  $H_2O$ ). (Lit.<sup>49</sup> p.f. 204°C,  $\{\alpha\}_D + 68^\circ$  (C, 1.0  $H_2O$ )).

IR (BrK): 3.440 y 3.370  $\text{cm}^{-1}$  ( $\nu$  O-H); otras absorciones a 1.405, 1.370, 1.350, 1.070, 1.060, 1.035, 900, 870 y 760  $\text{cm}^{-1}$ .

3.3.4. CONDENSACION DEL BROMURO DE 2,3,4,6-TETRA-O-ACETIL-D-GALACTOPIRANOSILO (7) CON 2,4-di-O-ACETIL-1,6-ANHIDRO- $\beta$ -D-GALACTOPIRANOSA (9).

Una solución de 1.80 g (7.3 mmoles) de 2,4-di-O-acetil-1,6-anhidro- $\beta$ -D-galactopiranososa (9), en 185 ml de nitrometano benceno 1:1 se concentró hasta que destilaron 50 ml del disolvente. La solución se enfrió a 40°C y se agregaron 1.86 g (7.3 mmoles) de cianuro mercúrico y 2.97 g (7.3 mmoles) de acetobromogalactosa. La mezcla se agitó a 40°C y se siguió la reacción por cromatografía en capa fina (acetato de etilo-benceno 5:3). Se adicionaron 0.90 g (3.6 mmoles) de cianuro mercúrico y 1.45 g (3.6 mmoles) de acetobromogalactosa a las 23, 30 y 46 hr de iniciada la reacción. Después de 52 hr la mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente, se diluyó con benceno, se lavó con bicarbonato sódico al 5% y agua, se secó sobre  $\text{SO}_4\text{Mg}$  y se concentró a presión reducida. La cromatografía en capa fina (acetato de etilo-benceno 5:3) del residuo (7.50 g) así obtenido, mostró junto a restos de acetobromogalactosa, la presencia de un producto minoritario y dos productos principales de movilidad muy similar. Esta mezcla (7.50 g) se introdujo en una

columna de gel de sílice que se eluyó con acetato de etilobenceno 5:3. Se obtuvieron de este modo 2.08g(38% a partir de acetobromogalactosa) del producto minoritario que se - - identificó como cianuro de 2,3,4,6- tetra-O-acetil-β-D-galactopiranosilo (38) y 3.2 g (76%) de una mezcla siruposa - de los disacáridos 1-6 anhidro peracetilados (39 y 40).

Se disolvieron 2.9 g de esta mezcla en 110 ml de una - mezcla de anhídrido acético-ácido acético (7:3) conteniendo 2.2 ml de ácido sulfúrico concentrado, la solución se mantuvo 90 min. a temperatura ambiente y 30 min. a 50°C, y a continuación se enfrió, se neutralizó cuidadosamente con solución acuosa de bicarbonato sódico al 5% a 0°C y se extrajo con cloroformo. El extracto se lavó con agua, se secó sobre SO<sub>4</sub>Mg y se concentró a vacío. La cromatografía en capa fina (éter-benceno 5:1) del residuo (3.4 g) mostró dos productos principales. La mezcla se introdujo en una columna de gel - de sílice, por elución con éter-benceno 3:1 se obtuvo en - primer lugar 1,2,4,6-tetra-O-acetil-3-O-(2,3,4,6-tetra-O--- acetil-α-D-galactopiranosil)-α-D-galactopiranososa (41) que - se recristalizó de etanol absoluto. Rend. 1.55 g (46%), p.f. 97-100°C,  $[\alpha]_D^{23} + 137^\circ$  (C, 2.0 Cl<sub>3</sub>CH).

IR (BrK): 1.750 cm<sup>-1</sup> (ν C=O), otras absorciones a 1.370 1.225, 1.070, 1.050, 1.010, 935, 910, 850 y 785 cm<sup>-1</sup>.

RMN ( $\text{Cl}_3\text{CD}$ ) (figs. 10a y 11a):  $\delta$  1.96, 2.02, 2.05 y -- 2.14 (24H, singletes, metilos acetoxilos); 4.00-4.30 (7H, - multiplete, H-5, H'-5, H-6, H'-6, H-6', H'-6', H-3); 5.17- - 5.50 (6H, multiplete, H'-1, H-2, H'-2, H-3, H'-3, H'-4); -- 6.39 (1H, doblete, H-1,  $J_{1,2}$  3.5 Hz).

Análisis: Calculado para  $\text{C}_{28}\text{H}_{38}\text{O}_{19}$ : C, 49.55, H, 5.64  
Encontrado: C, 49.28, H, 5.89.

A continuación se eluyó, 1,2,4,6-tetra-O-acetil-3-O- - (2,3,4,6-tetra-O-acetil- $\beta$ -D-galactopiranosil)- $\alpha$ -D-galactopi ranosa (42), que se recristalizó de etanol absoluto. Rend. 0.65 g (14%), p.f. 189-190°C,  $[\alpha]_D^{25} + 54^\circ$  (C, 1.8  $\text{Cl}_3\text{CH}$ ).

IR (BrK): 1750  $\text{cm}^{-1}$ , otras absorciones a 1370, 1220, - 1070, 1045, 1010, 930, 820 y 760  $\text{cm}^{-1}$ .

RMN ( $\text{Cl}_3\text{CD}$ ) (figs. 10b y 11b):  $\delta$  1.96, 1.98, 2.04, -- 2.12 y 2.16 (24H, singletes, metilos acetoxilos); 3.80-4.35 (7H, multiplete H-5, H'-5, H-6, H'-6, H-6', H'-6', H-3); -- 4.62 (1H, doblete, H'-1,  $J_{1,2}$  7.2 Hz); 4.80-5.55 (5H, mul tiplete, H-2, H'-2, H'-3, H-4, H'-4); 6.28 (1H, doblete, -- H-1,  $J_{1,2}$  3.5 Hz).

Análisis: Calculado para  $\text{C}_{28}\text{H}_{38}\text{O}_{19}$ : C, 49.55, H, 5.64.  
Encontrado: C, 49.58, H, 5.36.

## 3.3.5. 3-O-β-GALACTOPIRANOSIL-D-GALACTOSA (4)

Se obtuvo por desacetilación de 0.12 g (0.16 mmoles) de 1,2,4,6-tetra-O-acetil-3-O-(2,3,4,6-tetra-O-acetil-β-D-galactopiranosil)-α-D-galactopiranososa (42) en 1.2 ml de metanol con 0.36 ml de metóxido sódico 0.2M. La solución se mantuvo 30 min. con agitación a temperatura ambiente, se neutralizó con Amberlita IR-120 (H<sup>+</sup>), se concentró a vacío y se obtuvo un producto puro por cromatografía en papel, - R<sub>Gal</sub> 0.72 (acetato de etilo-piridina-agua 10:4:3). Se cristalizó de agua-acetona (0.5:10). Rend. 0.07 g (100%), p.f. 165-168°C,  $\{\alpha\}_D^{26}$  71° + 62° (C, 1.0 H<sub>2</sub>O). (Lit.<sup>62</sup> P.f. - - 165°C,  $\{\alpha\}_D^{24}$  + 64°).

IR (BrK): 3.400 cm<sup>-1</sup> (ν O-H), otras absorciones a - - 1.330, 1.150, 1.060, 1.040, 890, 870, 800, 775 y 700 cm<sup>-1</sup>.

## 3.3.6. 3-O-α-GALACTOPIRANOSIL-D-GALACTOSA (3)

A una suspensión de 0.07 g (0.10 mmoles) de 1,2,4,6-tetra-O-acetil-3-O-(2,3,4,6-tetra-O-acetil-α-D-galactopiranosil)-α-D-galactopiranososa (41) en 0.7 ml de metanol se agregaron 0.21 ml de una solución de metóxido sódico 0.1M. La solución se mantuvo 20 min. a temperatura ambiente con agitación, se neutralizó con Amberlita IR-120 (H<sup>+</sup>) y se concentró a vacío. El residuo que rehusó a cristalizar te-

nía en cromatografía en papel un  $R_{Gal}$  0.77 (acetato de etilo-piridina-agua 10:4:3). Rend. 0.026 (74%),  $\{\alpha\}_D^{26} + 149^\circ$  (C, 1.6 H<sub>2</sub>O). (Lit.<sup>58</sup>  $\{\alpha\}_D^{25} + 155^\circ$  (C, 0.3 H<sub>2</sub>O)).

3.3.7. 1,2,4,6-TETRA-O-ACETIL-3-O-(2,3,4,6-TETRA-O-ACETIL- $\alpha$ -D-GALACTOPIRANOSIL)- $\beta$ -D-GALACTOPIRANOSA (43)

A una solución de 0.13 g (0.37 mmoles) del sirupo de 3-O- $\alpha$ -D-galactopiranosil-D-galactosa (3) en 2 ml de piridina se agregaron 1.2 ml de anhídrido acético y la solución se mantuvo toda la noche a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se evaporó a sequedad eliminando los restos de la mezcla acetilante por adiciones y eliminaciones sucesivas de tolueno. El residuo se purificó por cromatografía - en capa fina preparativa (benceno-éter 1:3) y se recristalizó de etanol. Rend. 0.118 g (47%), p.f. 156-157°C,  $\{\alpha\}_D^{26} + 113.6^\circ$  (C, 0.95 Cl<sub>3</sub>CH). (Lit.<sup>58</sup> p.f. 157.5-158.5°C,  $\{\alpha\}_D^{25} + 110,7^\circ$  (C, 0.5 Cl<sub>3</sub>CH)).

RMN (Cl<sub>3</sub>CD):  $\delta$  1.92, 2.00, 2.03, 2.08, 2.09 y 2.12 -- (24H, singletes, grupos acetoxilos); 3.80-4.34 (7H, multiplete, H-5, H'-5, H-6, H'-6, H-6', H'-6', H-3); 5.10-5.46 (6H, multiplete, H-2, H'-2, H'-3, H-4, H'-4); 5.61 (1H, do<sub>1,2</sub>blete, H-1, J<sub>1,2</sub> 8.2 Hz).

3.3.8. CONDENSACION DEL BROMURO DE 2,3,4,6-TETRA-O-ACETIL- $\alpha$ -D-GALACTOPIRANOSILO (7) CON 2-O-ACETIL-1,6-ANHIDRO- $\beta$ -D-GALACTOPIRANOSA (11)

Una solución de 1.14 g (5.6 mmoles) de 2-O-acetil-1,6-anhidro- $\beta$ -D-galactopiranososa (11) en 120 ml de nitrometano-benceno 1:1 se concentró hasta que destilaron 25 ml del disolvente. La solución se enfrió a 40°C y se añadieron 2.30 g (5.6 mmoles) de acetobromogalactosa (7) y 0.71 g (2.8 mmoles) de cianuro mercúrico. La mezcla se agitó a 40°C y el curso de la reacción se siguió por cromatografía en capa fina (acetato de etilo-benceno 5:3). A las 10 hr de iniciada la reacción se adicionaron 1.2 g (1.8 mmoles) de acetobromogalactosa (7) y 0.35 g (1.4 mmoles) de cianuro mercúrico. La reacción fué total en 21 hr al cabo de las cuales la mezcla se enfrió a temperatura ambiente, se diluyó con benceno, se lavó con solución de bicarbonato sódico al 5% y con agua, se secó sobre SO<sub>4</sub>Mg y se evaporó. El residuo (4.0 g) se disolvió en 20 ml de piridina, se añadieron 20 ml de anhídrido acético y la solución se dejó estar a temperatura ambiente una noche. La mezcla de reacción se evaporó a sequedad. El residuo se introdujó en una columna de gel de sílice que se eluyó con acetato de etilo-benceno 5:3. Se obtuvieron de este modo 3.00 (93%) de una mezcla siruposa de 1,6-anhidro-disacáridos peracetilados y 0.35 g (7%) de un componente de menor movilidad cromatográfica. Se disolvieron 2.00 g de la fracción principal en 80 ml de

una mezcla de anhídrido acético-ácido acético (7:3) contenido 1.6 ml de ácido sulfúrico concentrado y la solución se mantuvo durante 1 hr a temperatura ambiente, se neutralizó cuidadosamente a 0°C con solución de bicarbonato sódico al 5% y se extrajo con cloroformo. El extracto se lavó con agua, se secó sobre  $\text{SO}_4\text{Mg}$  y se evaporó a sequedad. La cromatografía en capa fina (éter-benceno 5:1) del residuo (2.4 g) mostró la presencia de un producto principal y tres minoritarios. La mezcla se introdujo en una columna de gel de sílice. Por elución con éter-benceno 5:1 se obtuvieron, en primer lugar, 0.18 g de 1,2,3,4,6-penta-O-acetil- $\alpha$ -D-galactopiranososa y seguidamente los siguientes disacáridos peracetilados:

1,2,4,6-tetra-O-acetil-3-O-(2,3,4,6-tetra-O-acetil- $\alpha$ -D-galactopiranosil)- $\alpha$ -D-galactopiranososa (41). Rend. 0.38 g -- (17%), p.f. 100°C (EtOH).

1,2,3,6-tetra-O-acetil-4-O-(2,3,4,6-tetra-O-acetil- $\alpha$ -D-galactopiranosil)- $\alpha$ -D-galactopiranososa (37). Rend. 0.10 g -- (4%), p.f. 153-155°C (EtOH).

1,2,4,6-tetra-O-acetil-3-O-(2,3,4,6-tetra-O-acetil- $\beta$ -D-galactopiranosil)-D-galactopiranososa (42). Rend. 1.2 g (52%), p.f. 185-190°C.

3.4. LAS REACCIONES DE LOS BROMUROS DE 2,3,4,6-TETRA-O-ACETIL- $\alpha$ -D-GLUCOPIRANOSILO (18) y 2,3,4,6-TETRA-O-ACETIL- $\alpha$ -D-GALACTOPIRANOSILO (17) CON CIANUROS METALICOS.

3.4.1. PREPARACION DE CIANURO DE 2,3,4,6-TETRA-O-ACETIL- $\beta$ -D-GALACTOPIRANOSILO (38).

A una solución de 4.1 g (0.01 mol) de acetobromogalactosa (7) en 20 ml de nitrometano seco se agregaron 2.4 g (0.01 mol) de cianuro mercúrico y la mezcla se agitó durante 24 hr a temperatura ambiente. A continuación se filtraron las sales mercúricas, se lavaron con nitrometano y se evaporó el filtrado a sequedad. El residuo obtenido se disolvió en 90 ml de metanol, y la solución de BrK 1N y 50 ml de hielo. El precipitado formado se filtró y se recristalizó de metanol. Rend. 1.7 g (50%), p.f. 167-169°C (Lit.<sup>154</sup> p.f. 168-169°C).

IR (BrK) (fig. 23): 1.755 y 1.745  $\text{cm}^{-1}$  ( $\nu$  C=O), otras absorpciones a 1.375, 1.235, 1.220, 1.065 y 910  $\text{cm}^{-1}$ .

RMN ( $\text{Cl}_3\text{CD}$ ) (fig. 24):  $\delta$  1.97, 2.03, 2.09 y 2.15 (12H, singletes, grupos acetoxilos); 3.84-4.16 (3H, H-5, H-6, - H'-6, sistema  $A_2B$ ,  $\delta_B$  3.97 H-5,  $\delta_A$  4.12 H-6 y H'-6,  $J_{4,5}$  - 1.2 Hz,  $J_{5,6} \approx J_{5,6}$ , 6.2 Hz); 4.32 (1H, doblete, H-1, -  $J_{1,2}$  10.0 Hz); 5.02 (1H, cuadruplete, H-3,  $J_{3,4}$  3.5 Hz, -  $J_{3,2}$  10.0 Hz); 5.44 y 5.53 (2H, cuadruplete y triplete - parcialmente solapados, H-4 y H-2,  $J_{3,4}$  3.5 Hz,  $J_{4,5}$  1.2 Hz,  $J_{1,2}$  10.0 Hz,  $J_{2,3}$  10.0 Hz).

Análisis: Calculado para  $\text{C}_{15}\text{H}_{19}\text{O}_9\text{N}$ : C, 50.42. H, - 5.49. N, 3.97. Encontrado: C, 50.42, H, 5.36. N, 3.92.

3.4.2. CONDENSACION DEL BROMURO DE 2,3,4,6-TETRA-O-ACETIL - $\alpha$ -D-GALACTOPIRANOSILO (7) CON CIANURO MERCURICO - EN NITROMETANO. AISLAMIENTO DE PRODUCTOS SECUNDA--RIOS.

A una solución de 2.05 g (5 mmoles) de acetobromogalactosa (7) en 11 ml de nitrometano seco se añadieron - 1.10 g (5 mmoles) de cianuro mercurico y la suspensión se agitó a temperatura ambiente en ausencia de humedad, durante 24 hr. Al cabo de este tiempo la mezcla de reacción se filtró y el filtrado se concentró a sequedad. El resi-

duo obtenido se disolvió parcialmente en 45 ml de metanol y la suspensión resultante se añadió sobre 25 ml de una solución de BrK 1N y 50 ml de hielo. Esta suspensión se extrajo cuatro veces con 60 ml de cloroformo cada vez y el extracto se secó sobre  $\text{SO}_4\text{Mg}$  y se concentró a sequedad.

La cromatografía en capa fina (benceno-acetato de etilo 4:1) del residuo (2.51 g), mostró la presencia de, al menos, cuatro compuestos el más importante de los cuales presentó un valor  $R_f$  idéntico al cianuro de 2,3,4,6-tetra-O-acetil- $\beta$ -D-galactopiranosilo (38). Por cristalización del residuo (2.51 g) en metanol, se obtuvieron 0.67 g del producto 38.

Las aguas madres de cristalización de 38 se concentraron a sequedad. El sirupo obtenido (1.42 g) se introdujo en una columna seca de gel de sílice que se eluyó con una mezcla de benceno-acetato de etilo 4:1. El producto eluido en cabeza, denominado F-1 Gal  $(\text{CN})_2\text{Hg}$  (0.0137 g) se caracterizó tentativamente como 3,4,6-tri-O-acetil-1,2-O-(1-cianoetilidén)- $\alpha$ -D-galactopiranososa (57).

IR (BrK):  $1.750 \text{ cm}^{-1}$  ( $\nu \text{ C=O}$ ), otras absorciones a 1.440, 1.370, 1.240, 1.175, 1.115, 1.100, 965, 945, 925, 905, 875, 800, 720, 655, 625,  $600 \text{ cm}^{-1}$ .

RMN ( $\text{Cl}_3\text{CD}$ ) (fig. 25):  $\delta$  1.84 (3H, singlete, metilo cianoetilidén); 2.03, 2.05 y 2.00 (12H, singletes, metilos acetoxilos); 4.00-4.40 (3H, multiplete H-5, H-6, H'-6, sistema  $A_2B$ ); 4.31 (1H, cuadruplete, H-2,  $J_{1,2}$  5.0 Hz,  $J_{2,3}$  7.0 Hz); 4.96 (1H, cuadruplete, H-3,  $J_{2,3}$  7.0 Hz,  $J_{3,4}$  3.5 Hz); 5.37 (1H, cuadruplete, H-4,  $J_{3,4}$  3.5 Hz,  $J_{4,5}$  1.7 Hz); 5.85 (1H, doblete, H-1,  $J_{1,2}$  5.0 Hz).

La fracción eluida en segundo lugar, denominado F-2 Gal  $(\text{CN})_2\text{Hg}$  (0.18 g) estuvo compuesta por dos sustancias una de las cuales coincidió con el producto F-1 Gal  $(\text{CN})_2\text{Hg}$ . El espectro de RMN de esta fracción indicó que la mezcla estaba compuesta por 3,4,6-tri-O-acetil-1,2-O-(1-cianoetilidén)- $\alpha$ -D-galactopiranososa (57) y una segunda sustancia en la proporción relativa de 4:1. La nueva sustancia presentó señales a  $\delta$  1.99, 2.12, 5.50 y 5.75.

La tercera fracción denominada F-3 Gal  $(\text{CN})_2\text{Hg}$  (0.20 g) presentó en capa fina (benceno-acetato de etilo 4:1) tres manchas, dos correspondientes a los productos anteriores y una tercera con el mismo  $R_f$  que el cianuro de 2,3,4,6-tetra-O-acetil- $\beta$ -D-galactopiranosilo (38). Por cristalización en metanol se obtuvieron 0.15 g de este último producto.

3.4.3. CONDENSACION DEL BROMURO DE 2,3,4,6-TETRA-O-ACETIL  
- $\beta$ -D-GALACTOPIRANOSILO (7) CON CIANURO DE PLATA EN  
XILENO.

A una solución de 4.14 g (0.01 mol) del bromuro de 2,3,4,6-tetra-O-acetil- $\beta$ -D-galactopiranosilo (7) en 40 ml de xileno seco se agregaron 6 g (0.04 moles) de cianuro de plata y la mezcla se calentó a reflujo con agitación durante 1 hr. Transcurrido este tiempo, se enfrió la solución, se filtraron y lavaron con xileno las sales de plata, y el filtrado se evaporó a sequedad. El residuo siruposo (4.50 g) se cristalizó de metanol. Se obtuvo así un producto cristalino al que se asignó la estructura de isocianuro de 2,3,4,6-tetra-O-acetil- $\beta$ -D-galactopiranosilo (58). Rend. 0.65 g (18%), p.f. 164-165°C,  $\{\alpha\}_D^{25} + 32^\circ$  (C, 1.5 Cl<sub>3</sub>CH).

IR (BrK) (fig. 26): 2.155 cm<sup>-1</sup> ( $\nu$  N=C), 1.750 y 1.760 cm<sup>-1</sup> ( $\nu$  C=O), otras absorciones a 1.380, 1.240, 1.225, - 1.100, 1.065, 1.020, 980, 960, 905, 900 y 740 cm<sup>-1</sup>.

RMN (Cl<sub>3</sub>CD) (fig. 27):  $\delta$  1.97, 2.03, 2.10, 2.15 (12H, singletes, metilos acetoxilos); 3.86-4.20 (3H, H-5, H-6 y H'-6 sistema A<sub>2</sub>B,  $\delta_B$  3.97 H-5,  $\delta_A$  4.15 H-6 y H'-6, J<sub>4,5</sub> - 1.0 Hz, J<sub>5,6</sub>  $\approx$  J<sub>5,6'</sub>  $\approx$  6.3 Hz); 4.80 (1H, doblete, H-1, - J<sub>1,2</sub> 9 Hz); 5.01 (1H, cuadruplete, H-3, J<sub>2,3</sub> 10.0 Hz, J<sub>3,4</sub> 3.2 Hz); 5.42 y 5.43 (2H, cuadrupletes solapados, H-3 y -

H-4,  $J_{3,4}$  3.2 Hz,  $J_{4,5}$  1.0 Hz,  $J_{1,2}$  9.0 Hz,  $J_{2,3}$  10.0 Hz).

Análisis: Calculado para  $C_{15}H_{19}O_9N$ : C, 50.41. H, 5.36 N, 3.92. Encontrado: C, 49.74. H, 5.04. N, 3.64.

Las aguas madres de cristalización de 58 se concentraron a sequedad. El sirupo obtenido (2.7 g) se introdujo en una columna seca de gel de sílice que se eluyó con una mezcla de benceno-acetato de etilo 4:1. La fracción eluida en primer lugar (0.057 g) estuvo compuesta por dos sustancias. El espectro de RMN (fig. 28) de esta fracción indicó que la mezcla estaba compuesta por 3,4,6-tri-O-acetil-1,2-O-(1-cianoetilidén)- $\alpha$ -D-galactopiranososa (57) y una segunda sustancia no identificada en proporción relativa 2:1. La nueva sustancia presentó señales a  $\delta$  1.99, 2.12, 5.12, 5.28, 5.51 y 5.59.

#### 3.4.4. PREPARACION DE 3,4,6-TRI-O-ACETIL-1,2-O-(1-CIANOETILIDEN)- $\alpha$ -D-GLUCOPIRANOSA (45).

A una solución de 2.07 g (5 mmoles) de acetobromoglucosa\* (18) en 20 ml de xileno seco se añadió 3.0 g (11 mmoles) de cianuro de plata y la mezcla se calentó a reflujo

---

\* La acetobromoglucosa (18) se obtuvo por el mismo procedimiento descrito para la acetobromogalactosa (7) en el apartado 3.2.1.

con agitación durante 1 hr. Al cabo de éste tiempo la mezcla de reacción se filtró y concentró a sequedad. El residuo (2.14 g) se disolvió en 5 ml de benceno caliente y la solución se diluyó con 25 ml de éter. La solución se pasó a través de una columna de alumina (40 g, grado III) que se eluyó con una mezcla de benceno-éter (1:5) y con éter. La mezcla eluida se disolvió en etanol caliente y de esta solución cristalizaron 0.6 g (37%) de 3,4,6-tri-O-acetil-1,2-O-(1-cianoetilidén)- $\alpha$ -D-galactopiranososa (45). P.f. 76°C,  $\{\alpha\}_D^{20} + 13.5$  (C, 1.21 Cl<sub>3</sub>CH). (Lit.<sup>112</sup> p.f. 77-78°C,  $\{\alpha\}_D^{20} + 13.8$ ).

IR (BrK) (fig. 15): 1.740 cm<sup>-1</sup> ( $\nu$  C=O), otras absorciones a 1.450, 1.425, 1.402, 1.380, 1.365, 1.310, 1.285, 1.250, 1.230, 1.210, 1.165, 1.150, 1.140, 1.120, 1.095, - 1.070. 1.050. 1.030. 1.010, 980, 962, 922, 910, 895, 875, 850, 820, 780, 720, 670, 640, 630, 615 y 600 cm<sup>-1</sup>.

RMN (Cl<sub>3</sub>CD) (fig. 16):  $\delta$  1.90 (3H, singlete, metilo cianoetilidén); 2.06 y 2.11 (9H, singletes, metilos acetoxilos); 3.89 (1H, multiplete, H-5, J<sub>4,5</sub> 9.0 Hz, J<sub>5,6</sub> 4.2 Hz); 4.18 (2H, doblete, H-6 y H'-6, J<sub>5,6</sub> 4.2 Hz); 4.37 - (1H, octuplete, H-2, J<sub>1,2</sub> 5.0 Hz, J<sub>2,3</sub> 2.7 Hz, J<sub>2,4</sub> 1.0 - Hz); 4.90 (1H, octuplete, H-4, J<sub>4,5</sub> 9.0 Hz, J<sub>3,4</sub> 2.7 Hz, J<sub>2,4</sub> 1.0 Hz); 5.19 (1H, triplete, H-3, J<sub>3,4</sub>  $\approx$  J<sub>2,3</sub>  $\approx$  2.7 Hz); 5.78 (1H, doblete, H-1, J<sub>1,2</sub> 5.0 Hz).

3.4.5. CONDENSACION DEL BROMURO DE 2,3,4,6-TETRA-O-ACETIL  
 - $\alpha$ -D-GLUCOPIRANOSILO (18) CON CIANURO DE PLATA EN  
 XILENO. AISLAMIENTO DE PRODUCTOS SECUNDARIOS.

Las aguas madres de cristalización de la 3,4,6-tri-O-acetil-1,2-O-(1-cianoetilidén)- $\alpha$ -D-glucopiranososa (45) se concentraron a sequedad, 0.22 g del residuo obtenido se introdujeron en una columna seca de 200 g de gel de sílice y la columna se eluyó con una mezcla de benceno-acetato de etilo 95:5 y se recogieron fracciones de 10-15 ml. Se obtuvieron así tres productos puros que por orden de elución se denominaron F-1 Glc CNAg, F-2 Glc CNAg y F-3 Glc CNAg.

El producto F-1 Glc CNAg (0.1108 g) cristalizó de etanol y se identificó con la 3,4,6-tri-O-acetil-1,2-O-(1-cianoetilidén)- $\alpha$ -D-glucopiranososa (45).

El producto F-2 Glc CNAg (0.1689 g) se caracterizó como isocianuro de 2,3,4,6-tetra-O-acetil- $\alpha$ -D-glucopiranosilo (55) p.f. 107-110°C.

IR (BrK) (fig. 19): 2.130  $\text{cm}^{-1}$  ( $\nu$  N=C), 1.750  $\text{cm}^{-1}$  ( $\nu$  C=O), otras absorciones a 1.430, 1.370, 1.240, 1.220, 1.165, 1.130, 1.040, 985, 920, 900, 890, 870, 740, 670 y 600  $\text{cm}^{-1}$ .

RMN ( $\text{Cl}_3\text{CD}$ ) (fig. 20):  $\delta$  2.01, 2.03, 2.07 y 2.11 - (12H, singletes, metilos acetoxilos); 4.40-4.00 (3H, multiplete, H-6, H'-6 y H-5); 4.89 (1H, cuadruplete, H-2,  $J_{1,2}$  5.0 Hz,  $J_{2,3}$  9.7 Hz); 5.07 (1H, triplete, H-4,  $J_{3,4} \approx J_{4,5} \approx 9.5$  Hz); 5.44 (1H, cuadruplete, H-3,  $J_{2,3}$  9.0 Hz,  $J_{3,4}$  9.5 Hz); 5.53 (1H, doblete, H-1,  $J_{1,2}$  5.0 Hz).

Espectros de masas: m/e 357, 331 y fragmentaciones típicas de un glucopiranosido peracetilado.

El producto F-3 Glc CNAg (0.073 g) cristalizó de etanol p.f. 100-102°C y se caracterizó como isocianuro de 2,3,4,6-tetra-O-acetil- $\beta$ -D-glucopiranososa (56).

IR (BrK) (fig. 21): 2.150  $\text{cm}^{-1}$  ( $\nu$  N=C), 1.750  $\text{cm}^{-1}$  ( $\nu$  C=O), otras absorciones a 1.430, 1.385, 1.240, 1.220, 1.110, 1.105, 1.090, 1.070, 1.040, 1.010, 928, 915, 900, 870, 690, 645, 620 y 600  $\text{cm}^{-1}$ .

RMN ( $\text{Cl}_3\text{CD}$ ) (fig. 22):  $\delta$  2.00, 2.02 y 2.10 (12H, singletes, metilos acetoxilos); 3.72 (1H, multiplete, H-5,  $J_{5,6}$  4.5 Hz,  $J_{5,6'}$  2.7 Hz); 4.10 (1H, cuartete, H'-6,  $J_{5,6'}$  2.7 Hz,  $J_{6,6'}$  12.7 Hz); 4.24 (1H, cuartete, H-6,  $J_{5,6}$  4.5 Hz,  $J_{6,6'}$  12.7 Hz); 4.78 (1H, doblete, H-1,  $J_{1,2}$  9.0 Hz); 5.00-5.25 (3H, multiplete, H-2, H-3 y H-4).

3.4.6. PREPARACION DEL CIANURO DE 2,3,4,6-TETRA-O-ACETIL-  
 $\beta$ -D-GLUCOPIRANOSILO (44)

A una disolución de 10.20 g (0.024 moles) de bromuro de 2,3,4,6-tetra-O-acetil- $\alpha$ -D-glucopiranosilo (18) en 50 ml de nitrometano seco se añadieron 6.30 g (0.025 moles) de cianuro mercúrico y la mezcla se agitó durante 24 hr a temperatura ambiente en ausencia de humedad. Pasado este tiempo la mezcla de reacción se filtró y el filtrado se concentró a sequedad. El residuo se disolvió en 100 ml de metanol y la solución metanólica se añadió sobre una mezcla de 200 ml de BrK 1N y 200 ml de hielo. El sólido blanco formado se extrajo cuatro veces con 100 ml de cloroformo cada vez y los extractos reunidos se lavaron con agua se secaron sobre sulfato magnésico y se concentraron a sequedad. El sirupo obtenido (8.46 g) se introdujo en una columna de gel de sílice que se eluyó con una mezcla de benceno-acetato de etilo 7:3. El producto principal obtenido fue el cianuro de 2,3,4,6-tetra-O-acetil- $\beta$ -D-glucopiranosilo (44). El producto cristalizó en etanol. Rend. - 2.80 g (32%), p.f. 114.5-115.5°C,  $\{\alpha\}_D^{20} + 9.8^\circ$  (Lit.<sup>112</sup> - p.f. 116°C,  $\{\alpha\}_D^{20} + 10.1^\circ$ ).

IR (BrK) (fig. 29): 1.750  $\text{cm}^{-1}$  ( $\nu$  C=O), otras absorciones a 1.430, 1.385, 1.375, 1.240, 1.220, 1.105, 1.040, 965, 900, 690, 620 y 600  $\text{cm}^{-1}$ .

RMN ( $\text{Cl}_3\text{CD}$ ) (fig. 30):  $\delta$  1.98, 2.00 y 2.08 (12H, sin gletes, metilos acetoxilos); 3.72 (1H, multiplete, H-5 -  $J_{5,6}$  5.1 Hz,  $J_{5,6'}$  2.7 Hz); 4.09 (1H, cuartete, H'-6, -  $J_{5,6'}$  2.7 Hz,  $J_{6,6'}$  13.0 Hz); 4.24 (1H, cuartete, H-6, -  $J_{5,6}$  5.1 Hz,  $J_{6,6'}$  13.0 Hz); 4.30 (1H, doblete, H-1,  $J_{1,2}$  9.0 Hz); 5.00-5.35 (3H, multiplete, H-2, H-3, H-4).

### 3.4.7. DESACETILACION DE LOS CIANO DERIVADOS

#### 3.4.7.1. DESACETILACION DEL CIANURO DE 2,3,4,6-TETRA-O-ACETIL- $\beta$ -D-GALACTOPIRANOSA (38).

1°).- A una suspensión de 1.2 g (3.3 mmoles) de 2,3,4,6-tetra-O-acetil-1-ciano- $\beta$ -D-galactopiranosilo (38) en 12 ml de metanol absoluto se agregaron 3.6 ml de una solución de métoxido sódico 0.2 M. La solución se agitó 16 hr a 3°C, se neutralizó con Amberlita IR-120 ( $\text{H}^+$ ) y se concentró a vacío. La masa siruposa obtenida 0.65 g (87%) - presentaba una ligera impureza en cromatografía en capa fina sobre gel de sílice (alcohol isopropílico-acetato de etilo-agua 7:1:2) y rehusó a cristalizar.

IR (BrK) (fig. 31):  $3.350 \text{ cm}^{-1}$  ( $\nu$  O-H),  $1.733 \text{ cm}^{-1}$  - ( $\nu$  C=O), otras absorciones a 1.435, 1.390, 1.290, 1.240, 1.130, 1.085, 1.010, 970, 910, 880, 850, 785 y  $690 \text{ cm}^{-1}$ .

RMN ( $D_2O$ ) (fig. 32):  $\delta$  3.66 (4H multiplete); 3.79 - (3H, singlete, metilo grupo carboximetil); 3.93 (3H, multiplete).

Se disolvieron 0.2 g de la masa siruposa en 2 ml de piridina se agregaron 1.2 ml de anhídrido acético y la solución se mantuvo una noche a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se concentró a sequedad, eliminando los restos de la mezcla acetilante por adiciones y eliminaciones sucesivas de tolueno, el residuo obtenido se cristalizó de etanol y se caracterizó como 2,3,4,6-tetra-O-acetil-1-carboximetil-1-desoxi- $\beta$ -D-gá lactopiranososa (70). Rend. 0.25 g (71.4%), p.f. 147-149°C,  $[\alpha]_D^{25} + 17.5^\circ$  (C, 1.25  $Cl_3CH$ ).

IR (BrK): 1.765, 1.750 y 1.738  $cm^{-1}$  ( $\nu$  C=O), otras absorciones a 1.460, 1.390, 1.375, 1.275, 1.235, 1.220, 1.170, 1.155, 1.128, 1.110, 1.070, 1.060, 1.028, 963, 925, 920 y 870  $cm^{-1}$ .

RMN ( $Cl_3CD$ ) (fig. 33):  $\delta$  1.96, 2.01, 2.14 (12H, singletes, metilos acetoxilos); 3.73 (3H, singlete, metilo grupo carboximetil); 3.8-4.2 (4H, doblete,  $\delta$  4.00 H-1,  $J_{1,2}$  9.7 Hz, sistema A B,  $\delta_B$  3.95 H-5,  $\delta_A$  4.15 H-6 y H'-6  $J_{4,5}$  1.0 Hz,  $J_{5,6} \approx J_{5,6'} \approx 6.7$  Hz); 5.10 (1H, cuadruplete, H-3,  $J_{2,3}$  10.0 Hz,  $J_{3,4}$  3.2 Hz); 5.38 (1H, triplete parcialmente solapado, H-2,  $J_{1,2}$  9.7 Hz,  $J_{2,3}$  10.0 Hz); 5.45 (1H, cuadruplete, H-4,  $J_{3,4}$  3.2 Hz,  $J_{4,5}$  1.0 Hz).

Análisis: Calculado para  $C_{16}H_{22}O_{11}$ : C, 49.22, H, 5.68.  
Encontrado C, 49.62, H, 5.36.

2°).- A una solución de 1.2 g (3.3 mmoles) de 2,3,4,6-tetra-O-acetil-1-ciano-β-D-galactopiranosilo (7) se agregaron 5 ml de metóxido sódico 0.8M y se trató la mezcla de reacción de forma análoga a la descrita en el apartado 1. La masa siruposa así obtenida era idéntica por cromatografía en capa fina sobre gel de sílice (alcohol isopropílico-acetato de etilo-agua 7:1:2, n-butanol-acético-agua-éter 9:6:1:3), al producto obtenido con metóxido sódico 0.2M. Por reacetilación de 0.2 g de esta masa siruposa con 2 ml de anhídrido acético en 2 ml de piridina se obtuvieron 0.23 g (71%) de 2,3,4,6-tetra-O-acetil-1-carboximetil-1-deoxi-β-D-galactopiranososa (70), anteriormente descrita

#### 3.4.7.2. DESACETILACION DE LA 3,4,6-TRI-O-ACETIL-1,2-O-(1-CIANOETILIDEN)-α-D-GLUCOPIRANOSA (45)

A una disolución de 0.1 g (0.3 mmoles de 3,4,6-tri-O-acetil-1,2-O-(1-cianoetiliden)-α-D-glucopiranososa (45) en 1.5 ml de metanol absoluto se añadieron 0.5 ml de una solución de metóxido sódico 0.2M en metanol. La solución se dejó estar durante 16 hr a temperatura ambiente, se neutralizó con Amberlita IR-120 (H<sup>+</sup>) y se evaporó a sequedad. Se obtuvo un sirupo practicamente puro, que no se consiguió cristalizar.

IR (BrK) (fig. 34):  $3.390\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu$  O-H),  $1.740\text{ cm}^{-1}$  -- ( $\nu$  C=O), otras absorciones a 1.450, 1.375, 1.290, 1.225, - 1.165, 1.120, 1.020, 980, 900, 820, 760, 725 y  $700\text{ cm}^{-1}$ .

RMN ( $\text{D}_2\text{O}$ ) (fig. 35):  $\delta$  1.72 (3H, singlete, metilo del anillo cinco miembros); 3.80 (3H, singlete, metilo grupo -carboximetil); 5.76 (1H, doblete, H-1,  $J_{1,2}$  5.0 Hz).

Este sirupo, se disolvió en 2 ml de piridina anhidra y a la solución se añadieron 2 ml de anhídrido acético y - se dejó estar durante 16 hr a temperatura ambiente. Al cabo de este tiempo la mezcla de reacción se evaporó a sequedad. El producto siruposo obtenido cristalizó espontáneamente y se recristalizó de etanol. El producto se caracterizó como 3,4,6-tri-O-acetil-1,2-O-(1 -carboximetiletileden)- $\alpha$ -D-galactopiranososa (71). Rend. 0.10 g (100%), p.f. -  $107^\circ\text{C}$ .

RMN ( $\text{Cl}_3\text{CD}$ ) (fig. 36):  $\delta$  1.75 (3H, singlete, metilo del anillo cinco miembros); 2.06 y 2.07 (9H, singletes, metilos acetoxilos); 3.76 (3H, singlete, metilo grupo carboximetil); 3.80-4.40 (3H, sistema  $A_2B$ , H-6, H'-6 y H-5,  $\delta_A$  -- 4.00 H-5,  $\delta_B$  4.20 H-6 y H'-6,  $J_{5,6}$  6.0 Hz); 4.45 (1H, octuplete, H-2,  $J_{1,2}$  5.0 Hz,  $J_{2,3}$  2.7 Hz,  $J_{2,4}$  0.7 Hz); 4.89 - (1H, octuplete, H-4,  $J_{4,5}$  9.0 Hz,  $J_{3,4}$  2.7 Hz,  $J_{2,4}$  0.7 - Hz); 5.18 (1H, triplete, H-3,  $J_{2,3} \approx J_{3,4} \approx 2.7$  Hz); 5.80 (1H, doblete, H-1,  $J_{1,2}$  5.0 Hz).

#### 4. CONCLUSIONES

1°) Por acetilación parcial de la 1,6-anhidro-β-D-galactopiranososa (10) con 1.5 equivalentes de anhídrido acético y posterior separación de los productos de reacción cromatográficamente sobre gel de sílice se obtienen, contrariamente a lo descrito en la literatura<sup>114</sup> 2,3,4-tri-O-acetil-1,6-anhidro-β-D-galactopiranososa (19) - (35%), 2,3-di-O-acetil-1,6-anhidro-β-D-galactopiranososa (8) (25%), 2,4-di-O-acetil-1,6-anhidro-β-D-galactopiranososa (9) (25%), 2-O-acetil-1,6-anhidro-β-D-galactopiranososa (11) (3%) y otro monoacetato al que provisionalmente, se asigna la estructura de 3-O-acetil-1,6-anhidro-β-D-galactopiranososa (21) (<1%). De estos productos, se describe por primera vez, la 2,4-di-O-acetil-1,6-anhidro-β-D-galactopiranososa (9).

2°) Por acetilación parcial de la 2-O-acetil-1,6-anhidro-β-D-galactopiranososa (11) con 1.1 equivalentes de anhídrido acético en piridina y posterior separación de los productos de acetilación cromatográficamente sobre

gel de sílice, se obtienen, contrariamente a lo descrito previamente en la literatura<sup>114</sup>, 2,3,4-tri-O-acetil-1,6-anhidro-β-D-galactopiranosas (19) (19%), 2,3-di-O-acetil-1,6-anhidro-β-D-galactopiranosas (8) (40%), y 2,4-di-O-acetil-1,6-anhidro-β-D-galactopiranosas (9) (40%).

3°) Cualquiera de los dos diacetatos, 2,3-di-O-acetil-1,6-anhidro-β-D-galactopiranosas (8) ó 2,4-di-O-acetil-1,6-anhidro-β-D-galactopiranosas (9), obtenidos en la acetilación parcial de la 1,6-anhidro-β-D-galactopiranosas (10) y 2-O-acetil-1,6-anhidro-β-D-galactopiranosas (11), se transforma en una mezcla al 50% de los dos diacetatos, 2,3-di-O-acetil-1,6-anhidro-β-D-galactopiranosas (8) y 2,4-di-O-acetil-1,6-anhidro-β-D-galactopiranosas (9), cuando en disolución se ponen en contacto con gel de sílice. En las condiciones de separación cromatográfica de los productos de acetilación parcial de la 1,6-anhidro-β-D-galactopiranosas (10) y 2-O-acetil-1,6-anhidro-β-D-galactopiranosas (11) tiene lugar una emigración de grupos acetilo y las reactividades relativas de los grupos hidroxilos de la 1,6-anhidro-β-D-galactopiranosas (10) y 2-O-acetil-1,6-anhidro-β-D-galactopiranosas (11) no puede deducirse de las cantidades de productos parcialmente acetilados obtenidas tras fraccionamiento cromatográfico de las mezclas de acetilación.

4°) El estudio directo de las mezclas de acetilación parcial de la 1,6-anhidro- $\beta$ -D-galactopiranososa (10) y 2-O-acetil-1,6-anhidro- $\beta$ -D-galactopiranososa (11) por espectroscopia de resonancia magnética nuclear pone claramente de manifiesto que en las condiciones empleadas - y en contradicción con publicaciones anteriores, el -- grupo hidroxilo ecuatorial en C-4 es más reactivo que el grupo hidroxilo axial en C-3 siendo la 2,4-di-O-acetil-1,6-anhidro- $\beta$ -D-galactopiranososa (9) el diacetato principal formado en ambos casos. Este método espectroscópico constituye un procedimiento adecuado para el estudio cinético de las reacciones de acetilación parcial de la 1,6-anhidro- $\beta$ -D-galactopiranososa (10) y 2-O-acetil-1,6-anhidro- $\beta$ -D-galactopiranososa (11).

5°) El análisis de los espectros de resonancia magnética nuclear de los derivados parcialmente acetilados de la 1,6-anhidro- $\beta$ -D-galactopiranososa (10) pone de manifiesto que no existe una diferencia clara entre los valores de desplazamientos químicos de los protones metílicos de grupos acetoxilos axiales y ecuatoriales probablemente debido a la presencia del puente etéreo entre los carbonos 1 y 6 de la molécula, que apantalla a unos grupos preferentemente, y a la presencia de grupos hidroxilos libres. Por otra parte los espectros indican que todos los derivados parcialmente acetilados estudiados adoptan, preferentemente, la conformación  ${}^1C_4$ .

6°) Por reacción de la 2,3-di-O-acetil-1,6-anhidro-β-D-galactopiranososa (8) con bromuro de 2,3,4,6-tetra-O-acetil-α-D-galactopiranosilo (7) en presencia de cianuro mercúrico y posterior acetólisis se obtienen los disacáridos peracetilados 1,2,3,6-tetra-O-acetil-4-O-(2,3,4,6-tetra-O-acetil-α-D-galactopiranosil)-α-D-galactopiranososa (37) y 1,2,3,6-tetra-O-acetil-4-O-(2,3,4,6-tetra-O-acetil-β-D-galactopiranosil)-α-D-galactopiranososa (26) con rendimientos del 40% y 30% respectivamente. - Ambos octaacetatos se preparan químicamente por primera vez en esta Tesis.

7°) Por desacetilación de la 1,2,3,6-tetra-O-acetil-4-O-(2,3,4,6-tetra-O-acetil-α-D-galactopiranosil)-α-D-galactopiranososa (37) se obtiene por primera vez por síntesis química el disacárido 4-O-α-D-galactopiranosil-D-galactosa (1), unidad terminal del glicoesfingolípidos que se acumula en el riñón de pacientes con la enfermedad de Fabry.

Análogamente y por desacetilación de la 1,2,3,6-tetra-O-acetil-4-O-(2,3,4,6-tetra-O-acetil-β-D-galactopiranosil)-α-D-galactopiranososa (26), se obtiene por primera vez por síntesis química, el disacárido 4-O-β-D-galactopiranosil-D-galactosa (2).

8°) Por reacción de la 2,4-di-O-acetil-1,6-anhidro-β-D-galactopiranososa (9) con bromuro de 2,3,4,6-tetra-O-acetil

- $\alpha$ -D-galactopiranosilo (7) y posterior acetólisis se obtienen los disacáridos peracetilados 1,2,4,6-tetra-O-acetil-3-O-(2,3,4,6-tetra-O-acetil- $\alpha$ -D-galactopiranosil)- $\alpha$ -D-galactopiranososa (41) y 1,2,4,6-tetra-O-acetil-3-O-(2,3,4,6-tetra-O-acetil- $\beta$ -D-galactopiranosil)- $\alpha$ -D-galactopiranososa (42) con rendimientos del 46% y 14% respectivamente. Ambos octaacetatos se preparan por primera vez en esta Tesis.

9°) Por desacetilación de la 1,2,4,6-tetra-O-acetil-3-O-(2,3,4,6-tetra-O-acetil- $\alpha$ -D-galactopiranosil)- $\alpha$ -D-galactopiranososa (41) se prepara por primera vez por síntesis química, el disacárido 3-O- $\alpha$ -D-galactopiranosil-D-galactosa (3) unidad terminal y determinante antigénico de la sustancia específica de grupo sanguíneo B.

Análogamente, por desacetilación de la 1,2,4,6-tetra-O-acetil-3-O-(2,3,4,6-tetra-O-acetil- $\beta$ -D-galactopiranosil)- $\alpha$ -D-galactopiranososa (42) se obtiene el disacárido 3-O- $\beta$ -D-galactopiranosil-D-galactosa (4).

10°) Por reacción de la 2-O-acetil-1,6-anhidro- $\beta$ -D-galactopiranososa (11) con el bromuro de 2,3,4,6-tetra-O-acetil- $\alpha$ -D-galactopiranosilo (7) en presencia de cianuro mercurico se obtienen los disacáridos peracetilados 1,2,4,6-tetra-O-acetil-3-O-(2,3,4,6-tetra-O-acetil- $\beta$ -D-galactopiranosil)- $\alpha$ -D-galactopiranososa (42) 52%, 1,2,4,6-tetra-O-acetil-3-O-(2,3,4,6-tetra-O-acetil- $\alpha$ -D-galacto

piranosil)- $\alpha$ -D-galactopiranososa (41) 17%, 1,2,3,6-tetra-O-acetil-4-O-(2,3,4,6-tetra-O-acetil- $\alpha$ -D-galactopiranosil)- $\alpha$ -D-galactopiranososa (37) 4%. El grupo hidroxilo axial en C-3 de la 2-O-acetil-1,6-anhidro- $\beta$ -D-galactopiranososa (11) muestra así, una mayor reactividad que el ecuatorial en C-4 en la reacción de glicosilación en las condiciones estudiadas, y la reacción constituye un procedimiento rápido y conveniente de síntesis del disacárido 3-O- $\beta$ -D-galactopiranosil-D-galactosa -- (4).

11°) El análisis de primer orden de los espectros de resonancia magnética nuclear de los disacáridos octaacetilados 1,2,3,6-tetra-O-acetil-4-O-(2,3,4,6-tetra-O-acetil- $\alpha$ -D-galactopiranosil)- $\alpha$ -D-galactopiranososa (37), 1,2,3,6-tetra-O-acetil-4-O-(2,3,4,6-tetra-O-acetil- $\beta$ -D-galactopiranosil)- $\alpha$ -D-galactopiranososa (26) y 1,2,4,6-tetra-O-acetil-3-O-(2,3,4,6-tetra-O-acetil- $\beta$ -D-galactopiranosil)- $\alpha$ -D-galactopiranososa (42) y la comparación de los espectros experimentales con los calculados por medio de un programa de cálculo indican que los anillos de galactopiranososa en los tres disacáridos octaacetilados existen en solución, preferentemente, en la conformación  ${}^4C_1$ .

12°) La reacción del bromuro de 2,3,4,6-tetra-O-acetil- $\alpha$ -D-galactopiranosilo (7) con cianuro mercúrico en nitrome

tano da lugar al ya descrito cianuro de 2,3,4,6-tetra-O-acetil- $\beta$ -D-galactopiranosilo (38) y a la 3,4,6-tri-O-acetil-1,2-O-(1-cianoetiliden)- $\alpha$ -D-galactopiranososa (57). Este último compuesto se describe por primera vez en esta Tesis y su aparición en la mezcla de reacción indicada sugiere que en el mecanismo, a través de ión carbonio, propuesto para las reacciones de glicosilación en estas condiciones, concurre la formación de un ión aciloxonio formado por ataque del oxígeno carbonílico del grupo acetoxilo en C-2 sobre el carbono anomérico. La existencia de este ión aciloxonio, que al reaccionar con un alcohol daría lugar a un glicósido 1,2-trans, explicaría la mayor facilidad de obtención de  $\beta$ -galactósidos en estas condiciones.

- 13°) En la reacción del bromuro de 2,3,4,6-tetra-O-acetil- $\alpha$ -D-glucopiranosilo (18) con cianuro de plata en xileno se forman, además de la 3,4,6-tri-O-acetil-1,2-O-(1-cianoetiliden)- $\alpha$ -D-glucopiranososa (45) previamente descrita por otros autores, isocianuros de 2,3,4,6-tetra-O-acetil- $\alpha$ -D-glucopiranosilo (55) y 2,3,4,6-tetra-O-acetil- $\beta$ -D-glucopiranosilo (56). Estos dos isocianuros se describen por primera vez en esta Tesis y la presencia del  $\beta$ -isocianuro en la mezcla de reacción puede constituir evidencia de que los iones aciloxonio postulados como intermedios en el mecanismo propuestos para las reacciones de glicosilación en estas condicioo

nes, pueden formarse a partir de los  $\beta$ -isocianuros formados en el primer estadio de la reacción.

- 14°) En la reacción del bromuro de 2,3,4,6-tetra-O-acetil-- $\alpha$ -D-galactopiranosilo (7) con cianuro de plata en xileno se obtiene una sustancia caracterizada como isocianuro de 2,3,4,6-tetra-O-acetil- $\beta$ -D-galactopiranosilo (58). Este isocianuro se describe por primera vez en esta Tesis y su presencia en la mezcla de reacción apoya la hipótesis de la formación del ión aciloxonio, postulado en las reacciones de glicosilación en estas condiciones, a partir de dicho isonitrilo.
- 15°) El estudio del espectro de resonancia magnética nuclear de la 3,4,6-tri-O-acetil-1,2-O-(1-cianoetiliden)- $\alpha$ -D--glucopiranososa (45), previamente interpretado como indicativo en la existencia del anillo de hexopiranososa de esta molécula en una conformación de bote torcido, indica que la molécula puede también encontrarse con el anillo de hexopiranososa en una conformación silla  ${}^4C_1$  - distorsionada por la existencia del anillo de cinco --miembros fusionados en cis. En el mismo sentido, puede interpretarse el espectro de la 3,4,6-tri-O-acetil-1,2-O-(1-cianoetiliden)- $\alpha$ -D-galactopiranososa (57).
- 16°) La desacetilación del cianuro de 2,3,4,6-tetra-O-ace--til- $\beta$ -D-galactopiranosilo (38) y de la 3,4,6-tri-O-ace

til-1,2-O-(1-cianoetiliden)- $\alpha$ -D-glucopiranososa (45) no conduce a los correspondientes cianoderivados desacetilados sino a unos compuestos desacetilados en los que los grupos ciano se han transformado en esteres metílicos. Por reacetilación de estas sustancias se obtienen 2,3,4,6-tetra-O-acetil-1-carboximetil-1-desoxi- $\beta$ -D-galactopiranososa (70) y 3,4,6-tri-O-acetil-1,2-O-(1-carboximetiletaliden)- $\alpha$ -D-glucopiranososa (71). Ambos compuestos se describen por primera vez en esta Tesis.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- M. MARTIN-LOMAS y D. CHAPMAN, Chem. Phys. Lipids, 10, 153 (1973).
- 2.- C.S. HUDSON, Advan. Carbohyd. Chem., 2, 1 (1946).
- 3.- W.Z. HASSID y M. DOUDOROFF, Advan. Carbohyd. Chem., 5, 29 (1950).
- 4.- W.L. EVANS, D.D. REYNOLDS y E.A. TALLEY, Advan. Carbohyd. Chem., 6, 27 (1951).
- 5.- E.J. EHRE, Advan. Carbohyd. Chem., 8, 277 (1953).
- 6.- D. FRENCH, Advan. Carbohyd. Chem., 9, 149 (1954).
- 7.- D.J. MANNERS, Quart. Rev. Chem. Soc., 9, 73 (1955).
- 8.- J. MONTREUILL, Bull. Soc. Chím. Biol., 39, 395 (1957).
- 9.- R. KUHN, Bull. Soc. Chím. Biol., 40, 297 (1958).
- 10.- M.G. BLAIR y W. PIGMAN, Angew. Chem., 69, 422 (1959).
- 11.- J. MONTREUILL, Bull. Soc. Chím. Biol., 42, 1399 (1960).
- 12.- J.S.D. BACON, Bull. Soc. Chím. Biol., 42, 1441 (1960).

- 13.- J.E. CURTOIS, Bull. Soc. Chím. Biol., 42, 1451 (1960).
- 14.- A. ROUDIER, Bull. Soc. Chím. Biol., 42, 1493 (1960).
- 15.- J.B. CLAMP, L. HOUGH, J.L. HICKSON y R.L. WHISTLER, Ad  
van. Carbohyd. Chem., 16, 159 (1961).
- 16.- T. REICHSTEIN y E. WEISS, Advan. Carbohyd. Chem., 17,  
65 (1962).
- 17.- R.W. BAILEY y J.B. PRIDHAM, Advan. Carbohyd. Chem., 17,  
121 (1962).
- 18.- M. STACEY y S.A. BAKER, "Carbohydrates of Living Tis--  
sues", D. Van Nostrand Co. Ltd. Londres 1962.
- 19.- R.W. BAILEY, "Oligosaccharides", Pergamon Press. Oxford  
1965.
- 20.- J. STANĚK, M. ČERNÝ y J. PACÁK, "The Oligosaccharides",  
Publishing House of Czechoslovak Academy of Sciences. -  
Praga 1965.
- 21.- N.K. KOCHETKOV, A.F. BOCHKOV, B.A. DMITRIEV, A.I. USOV,  
O.S. CHIZHOV y V.N. SHIBAEV, Khimia Uglevodov. Moscú -  
1967.
- 22.- R.J. FERRIER, Topics in Current Chemistry, 14, 390 (1970).
- 23.- N.K. KOCHETKOV y A.F. BOCHKOV, "Recent Development in -  
the Chemistry of Natural Carbon Compounds", 4, 77 (1971).  
Akademiai Kiadó. Budapest.

- 24.- N.K. KOCHETKOV y O.S. CHIZHOV y A.F. BOCHKOV, MTP International Review of Science. Organic Chemistry Series One. Vol 7. "Carbohydrates". G.O. Aspinall (Ed.) Butterworths Co. Ltd. Londres 1973.
- 25.- G. WULFF y G. RÖHLE, Angew. Chem. Int. Ed., 13, 157 - (1974).
- 26.- A. GOTTSCHALK. "Glycoproteins, their composition, -- structure and function", 2<sup>a</sup> Edición. Elsevier Publishing Co. Amsterdam 1972.
- 27.- D. SHAPIRO, "Chemistry of Sphingolipids", Hermann. - Paris 1969.
- 28.- M.J. OSBORN, Ann. Rev. Biochem., 38, 501 (1969).
- 29.- W.J. LENNARZ, Ann. Rev. Biochem., 39, 359 (1970).
- 30.- P.H. MÄKELÄ y B.A.D. STOCKER, Ann. Rev. Genet., 3, - 291 (1969).
- 31.- O. LÜDERITZ, Jahrb. Max-Planck-Ges, Förderung Wiss. - e. V. 93 (1969).
- 32.- H. NIKAIDO, Advan. Enzymol., 31, 77 (1969).
- 33.- S. ROSEMAN. Chemistry and Metabolism of Sphingolipids. CC. Sweeley ed. Chem. Phys. Lipids. Supl. Amsterdam, North Holland, 1970.

- 34.- A. DORFMAN, Thule Int. Symp. Aging. Connective Skeletal Tissue. Nordiska. Bokhandelns Förlag, 1970.
- 35.- R.J. WINZLER en "Glycoproteins, their Composition, -- Structure and function", Parte B. A. Gottschalk (Ed.) 2<sup>a</sup> Ed. Elsevier Publishing Co. Amsterdam 1972. p. -- 1268.
- 36.- W.M. WATKINS en "Glycoproteins, their composition, - structure and function", A. Gottschalk (Ed.) 2<sup>a</sup> Ed. - Elsevier Publishing Co. Amsterdam 1972. p. 830.
- 37.- S. BEYCHOK y E.A. KABAT, Biochemistry, 4, 2565 (1965).
- 38.- K.O. LLOYD, E.A. KABAT y R.E. ROSENFELD, Biochemis-- try, 5, 1502 (1966).
- 39.- C.C. SWEELEY, y B. KLIONSKI, J. Biol. Chem., 238, PC 3148 (1963).
- 40.- T. MIYATAKE, Jap. J. Exp. Med., 39, 35 (1969).
- 41.- D.E. VANCE, W. KRIVIT y C.C. SWEELEY, J. Lipid. Res., 10, 188 (1969).
- 42.- C.C. SWEELEY, P.D. SYNDER Jr. y C.E. GRIFFIN, Chem. - Phys. Lipids, 4, 393 (1970).
- 43.- J.T.R. CLARKE, L.S. WOLFE y A.S. PERLIN, J. Biol. -- Chem., 246, 5563 (1971).

- 44.- Y. LI y S. LI, J. Biol. Chem., 246, 3769 (1971).
- 45.- R.L. WHISTLER y H.E. CONRAD, J. Amer. Chem. Soc., 76, 1673 (1954).
- 46.- M.J. CLANCY y W.J. WHELAN, Biochem. J., 76, 22P (1960)
- 47.- M.J. CLANCY y W.J. WHELAN, Arch. Biochím. Biophys., - 118, 724 (1967).
- 48.- G.O. ASPINALL y R.S. FANSHAWE, J. Chem. Soc., 4215, - (1961).
- 49.- J.K. GILLMAN, A.S. PERLIN y T.E. TIMMELL, Can. J. Chem., 36, 1741 (1958).
- 50.- H.O. BOUVENG y H. MEIER, Acta.Chem. Scand., 13, 1884 (1959).
- 51.- M. MEIER, Acta. Chem. Scand., 16, 2275 (1962).
- 52.- G.O. ASPINALL y V.P. BHAVANANDAN, J. Chem. Soc., 2685 (1965).
- 53.- J.B. HAY y G.M. GRAY, Biochem. J., 100, 33 c (1966).
- 54.- M. MASAMUNE y S. KAMIYAWA, Tohoku J. Exp. Med., 66 - (1957) 43.
- 55.- T.J. PAINTER, W.M. WATKINS y W.T.J. MORGAN, Nature -- (Londres), 193, 1042 (1962).
- 56.- T.J. PAINTER, V.P. REGE y W.T.J. MORGAN, Nature (Londres), 199, 569 (1963).

- 57.- A. LUNDBLAD, S. HAMMARSTRÖM, E. LICERIO y E.A. KABAT, Arch. Biochem. Biophys., 148, 291 (1972).
- 58.- K. MORGAN y A.N. O'NEILL, Can. J. Chem., 37, 1201 --- (1959).
- 59.- E.L. HIRST y A.S. PERLIN, J. Chem. Soc., 2622 (1954).
- 60.- J.H. PAZUR, M. SHADAKSHARASWAMY y A. CEPURE, Arch. Biochem. Biophys., 94, 142 (1961).
- 61.- P.A.J. GORIN, J.F.T. SPENCER y H.J. PHAFF, Can. J. Chem., 42, 2307 (1962).
- 62.- A.M. STEPHEN, S. KIRKWOOD y F. SMITH, Can. J. Chem., 40, 151 (1962).
- 63.- A.J. CHARLSON, P.A.J. GORIN y A.S. PERLIN, Can. J. Chem., 35, 365 (1967).
- 64.- J.K.N. JONES y G.H.S. THOMAS, Can. J. Chem., 39, 122 (1961).
- 65.- D.W. DRUMMOND y E. PERCIVAL, J. Chem. Soc., 3908 (1961).
- 66.- F. SMITH y A.M. STEPHEN, J. Chem. Soc., 4892 (1961).
- 67.- G.O. ASPINALL y T.B. CHRISTENSEN, J. Chem. Soc., 3461 (1961).
- 68.- S. HAQ y G.A. ADAMS, Can. J. Chem., 39, 1563 (1961).
- 69.- P.A.J. GORIN, J.F.T. SPENCER, Can. J. Chem., 39, 2282 (1961).

- 70.- G.O. ASPINALL y R. YOUNG, J. Chem. Soc., 3003 (1965).
- 71.- E.L. HIRST, W. MACKIE y E. PERCIVAL, J. Chem. Soc., -  
2958 (1965).
- 72.- V.M. PARISH y J.K.N. JONES, Can. J. Chem., 44, 1531 -  
(1966).
- 73.- L. RODEN y R. SMITH, J. Biol. Chem., 241, 5949 (1966).
- 74.- B. LINDBERG, L. RODEN y B.G. SILVANDER, Carbohyd. Res.,  
2, 413 (1966).
- 75.- D.H. BALL y J.K.N. JONES, J. Chem. Soc., 905 (1958).
- 76.- H.S. ISBELL, H.L. FRUSH, y J.D. MOYER, J. Res. Nat. -  
Bur. Stand. Sect. A, 72, 769 (1968).
- 77.- I. FURDA y M.B. PERRY, Can. J. Chem., 47, 2891 (1969).
- 78.- D. RUTHERFORD y N.K. RICHTMYER, Carbohyd. Res., 11, -  
341 (1969).
- 79.- H.S. ISBELL, H.L. FRUSH, C.W.R. WADZ y C.E. HUNTER, -  
Carbohyd. Res., 9, 163 (1969).
- 80.- N. ROY y C.P.J. GLAUDEMANS, J. Org. Chem., 33, 1559 -  
(1968).
- 81.- M.L. WOLFROM y K.A. KOIZUMI, J. Org. Chem., 32, 656 -  
(1967).

- 82.- J. JOHANSSON, B. LINDBERG y O. THEANDER, Acta Chem. Scand., 17, 2019 (1963).
- 83.- E. PACSU, J. JANSON y B. LINDBERG, Methods in Carbohydrate Chem., 2, 376 (1963); R.L. WHISTLER y M.L. WOLFROM, Eds. Academic Press, New York.
- 84.- I.J. GOLDSTEIN y W.J. WHELAND, J. Chem. Soc., 4264 (1963).
- 85.- K. MIYAI y R.W. JEANLOZ, Carbohydr. Res., 21, 57 (1972).
- 86.- L. HOUGH, A.C. RICHARDSON y E. TARELLI, J. Chem. Soc. (c), 1732 (1971).
- 87.- S. UMEZAWA y K. TATSUTA, Bull. Chem. Soc. (Japón), 41 464 (1968).
- 88.- T. SUAMI, K. KATO, M. KAWAMURA y T. NISHIMURA, Carbohydr. Res., 19, 407 (1971).
- 89.- C.H. BOLTON, L. HOUGH y R. KHAN, Carbohydr. Res., 21 - 133 (1972).
- 90.- W. KOENIGS y E. KNORR, Ber., 34, 957 (1901).
- 91.- L.J. HAYNES y F.H. NEWTH, Advan. Carbohydr. Chem., 10, 207 (1955).
- 92.- R.U. LEMIEUX, Advan. Carbohydr. Chem., 9, 1 (1954).

- 93.- J. STANĚK, M. ČERNÝ, J. KOKOUREK y J. PACÁK. "The Monosaccharides". Publishing House of the Czechoslovak Academy of Sciences. Praga 1963.
- 94.- G. MEYSTRE y K. MIESCHER, *Helv. Chim. Acta*, 27, 231 - (1944).
- 95.- B. HELFERICH y K.F. WEDEMEYER, *Liebigs Ann. Chem.*, - 563, 139 (1949).
- 96.- H.M. FLOWERS, *Methods Carbohyd. Chem.* 6, 474 (1972).
- 97.- P.W. AUSTIN, F.E. HARDY, J.G. BUCHANAN y J. BADDILEY, *J. Chem. Soc.* 2128 (1964); 1419 (1965).
- 98.- R.U. LEMIEUX, R. SUEMITSU y S.W. GUNNER, *Can. J. Chem.* 46, 1040 (1968).
- 99.- R.U. LEMIEUX y T.L. NAGABUSHAN, *Methods in Carbohydrate Chem.*, 6, 487 (1972); R.L. WHISTLER y J.N. BEMLLET, Eds. Academic Press, New York.
- 100.- N.K. KOCHETKOV, A.J. KHORLIN y A.F. BOCHKOV, *Tetrahedron*, 23, 693 (1967).
- 101.- R.U. LEMIEUX y G. HUBER, *J. Amer. Chem. Soc.* 75, 4118 (1953).
- 102.- R.U. LEMIEUX y H.F. BAUER, *Can. J. Chem.*, 32, 340 (1954).
- 103.- G. MAGHUIN-ROGISTER, *Bull. Soc. Chim. Belg.*, 77, 575 (1969).

- 104.- D.Mc.GRATH, E.E. LEE y P.S. O'COLLA, Carbohyd. Res.,  
11, 453 (1969).
- 105.- D. Mc GRATH, E.E. LEE y P.S. O'COLLA, Carbohyd. Res.,  
11, 461 (1969).
- 106.- A. KLEMER y R. KUTZ, Tetrahedron Lett., 1963 (1969).
- 107.- F. MICHEEL y E.D. PICK, Tetrahedron Lett., 1965 -  
(1969).
- 108.- R.U. LEMIEUX y A.R. MORGAN, Can. J. Chem., 43, 2190  
(1965).
- 109.- H.M. FLOWERS, "The Chemistry of the Hydroxyl Group".  
Parte 2. S. PETAI (Ed.) Wiley. Londres 1971 pp. --  
1035.
- 110.- L. HOUGH y A.C. RICHARDSON in S. COFFEY (Ed.) "Rodd's  
Chemistry of Carbon Compounds". Vol. 1F. 2<sup>a</sup> Ed. Else  
vier, Amsterdam 1967, p. 387.
- 111.- B. CAPON, Chem. Rev., 69, 407 (1969).
- 112.- B. COXON y H.G. FLETCHER Jr., J. Am. Chem. Soc., 85,  
2637 (1963).
- 113.- B. COXON y H.G. FLETCHER Jr., J. Am. Chem. Soc., 86,  
922 (1964).
- 114.- D. SHAPIRO, A.J. ACHER y E.S. RACHAMAN, J. Org. Chem.,  
32, 3767 (1967).

- 115.- D. SHAPIRO, Y. RABINSOHN y A. DIVER-HABER, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 37, 28 (1969).
- 116.- C. MERCER, F. SCHMITT y P. SINAY, *Abstr. Papers 6 th Intern. Symp. Carbohyd. Chem. Madison, Wisconsin, - 1972* pp. 44.
- 117.- A.D. BARFORD, A.B. FOSTER, J.H. WESTWOOD, L.D. HALL y A.N. JOHNSON, *Carbohyd. Res.*, 19, 49 (1971).
- 118.- J. PACÁK, Z. TOCIK y M. ČERNÝ, *Chem. Commun.*, 77 -- (1969).
- 119.- R.M. HANN y C.S. HUDSON, *J. Amer. Chem. Soc.*, 64, -- 925 (1942).
- 120.- P. SEIB, *J. Chem. Soc. (c)*, 2552 (1969).
- 121.- J.M. SUGIHARA, *Advan. Carbohyd. Chem.*, 8, 1 (1953).
- 122.- D.H. BALL y F.W. PARRISH, *Advan. Carbohyd. Chem.* 23, 233 (1968).
- 123.- J.M. WILLIAMS y A.C. RICHARDSON, *Tetrahedron*, 23, - 1369 (1967).
- 124.- R.W. JEANLOZ y D.A. JEANLOZ, *J. Am. Chem. Soc.*, 79, 2579 (1957).
- 125.- M.L. WOLFROM y W.A. SZAREK, "The Carbohydrates Chemistry and Biochemistry". W. Pigman y D. Horton (Ed.), vol. 1A, 2nd ed. Academic Press, New York 1972, pag. 218.

- 126.- J.M. Mc LEOD, L.R. SCHOEDER y P.A. SEIB, Carbohyd. Res., 30, 337 (1973).
- 127.- J. STANĚK, Jr, P. CHUCHVALEK, K. ČAPEK, K. KEFURT y J. JARÝ, Carbohyd. Res., 36, 273 (1974).
- 128.- J. LEHRFELD, Carbohyd. Res., 39, 364 (1975).
- 129.- M. ČERNÝ y J. STANĚK, Fortschr. Chem. Forsch., 14, 526 (1969).
- 130.- G.O. ASPINALL y G. ZWEIFEL, J. Chem. Soc., 1957, -- 2271.
- 131.- J. PACÁK, J. PODĚSUA, Z. TOČIK y M. ČERNÝ, Collection. Czeh. Chem. Commun., 37, 2589 (1972).
- 132.- R.W. JEANLOZ, A. Mc RAPIN y S. HAKOMORI, J. Org. Chem., 26, 3939 (1961).
- 133.- D. SHAPIRO, Y. RABINSON, A.J. ACHER y A. DIVER-HABER, J. Org. Chem., 35, 1464 (1970).
- 134.- L.D. HALL y L. HOUGH, Proc. Chem. Soc., 382 (1962).
- 135.- R.M. HANN y C.S. HUDSON, J. Amer. Chem. Soc., 63, - 1484 (1941).
- 136.- B.H. ALEXANDER, R.J. DIMLER y C.L. MEHLTRETTER, J. Am. Chem. Soc., 73, 4658 (1951).
- 137.- R.M. HANN y C.S. HUDSON, J. Am. Chem. Soc., 64, 2435 (1942).

- 138.- A. FERNEZ y P.J. STOFFYN, *Tetrahedron*, 6, 139 (1959).
- 139.- J. TRUCHLY y S. BAUER, *Chem. Zvesti.*, 19, 650 (1965).
- 140.- H.S. GUTOWSKI y C.J. HOFFMAN, *J. Chem. Phys.*, 19, -  
1259 (1951).
- 141.- R.U. LEMIEUX. P. Mayo (Ed.). "Molecular Rearrange- -  
ments", vol. 2. Interscience publishers. New York -  
1964, pag. 763.
- 142.- L.D. HALL, *Advan. Carbohydr. Chem.*, 19, 51 (1964).
- 143.- D. HORTON y J.S. JEWELL, *Carbohydr. Res.*, 3, 255 -  
(1966).
- 144.- D. HORTON y E.K. JUST, *Carbohydr. Res.*, 9, 129 (1969).
- 145.- D. HORTON y J.S. JEWELL, *Carbohydr. Res.*, 5, 149 (1967).
- 146.- D. HORTON y J.D. WANDER, *J. Org. Chem.*, 32, 3780 -  
(1967).
- 147.- D. HORTON y J.D. WANDER, *Carbohydr. Res.*, 14, 83 (1970).
- 148.- E.R. RUCKEL y C. SCHNERCH, *J. Org. Chem.*, 31, 2233  
(1966).
- 149.- F. SWEET y R.K. BROWN, *Can. J. Chem.*, 45, 2289 (1968).
- 150.- K. HEYNS y J. WEYER, *Ann.*, 718, 224 (1968).
- 151.- M. KARPLUS, *J. Chem. Phys.*, 30, 11 (1959).

- 152.- M. KARPLUS, J. Am. Chem. Soc., 85, 2870 (1963).
- 153.- B. HELFERICH y K.L. BETTIN, Chem. Ber., 94, 1159 --  
(1961).
- 154.- M. CONSTANTZAS y J. KOCOUREK. Chem. Listy, 52, 1629  
(1958). Coll. Czech. Chem. Comun., 24, 1099 (1959).
- 155.- B. HELFERICH y W. OST. Chem. Ber., 95, 2613 (1962).
- 156.- K. HEYNUS, R. HARRISON y H. PAULSEN, Chem. Ber., 100,  
267 (1967).
- 157.- J. KOCOUREK, Chem. Ber., 94, 3346 (1961).
- 158.- B. COXON y H.G. FLETCHER Jr., Chem. Ind. (Londres),  
622, (1964).
- 159.- L.R. BUERGER, J. Amer. Chem. Soc., 56, 2494 (1934).
- 160.- B. COXON y L.D. HALL, Tetrahedron, 20, 1685 (1964).
- 161.- B. COXON, Tetrahedron, 27, 2281 (1966).
- 162.- B. LINDBERG, Acta Chem. Scand., 1, 710 (1947).
- 163.- G.L. MATOK y G.O. PHILLIPS, J. Chem. Soc., 130 (1958).
- 164.- H. BREDERECK, A. WAGNER. D. GEISSEL, P. GROSS, U. HUT  
TEN y H. OTT, Chem. Ber., 95, 3056 (1962) y literatu-  
ra citada.
- 165.- A.F. DIAZ, I. LAZDINS y S. WINSTEIN, J. Amer. Chem.  
Soc., 90, 1904 (1968).

- 166.- C.K. INGOLD, "Structure and Mechanism in Organic Chemistry". Cornell Univ. Press. Ithaca N.Y. 1969.
- 167.- D.J. RABER, J.M. HARRIS, R.E. HALL y P.V.R. SCHLEYER, J.Amer. Chem. Soc. , 93, 4821 (1971).
- 168.- A. STRETTWIESER, T.D. WALSH y J.R. WOLFE, J. Amer. - Chem. Soc., 87, 3682 (1965).
- 169.- A.J. RHIND-TUTT y C.A. VERNON, J. Chem. Soc., 4637 - (1960).
- 170.- S. HÜNIG, Angew. Chem. Int. Ed., 3, 548 (1964).
- 171.- G. WULFF, G. RÖHLE y W. KRÜGER, Chem. Ber., 105, - - 1097 (1972).
- 172.- G. WULFF y W. KRÜGER, Carbohyd. Res., 19, 119 (1971).
- 173.- B. HELFERICH y K. WEIS, Chem. Ber., 89, 314, (1956).
- 174.- R.U. LEMIEUX y A.R. MORGAN, Can. J. Chem., 43, 2199 (1965).
- 175.- B. HELFERICH y J. ZIRNER, Chem. Ber., 95, 2604 (1962).
- 176.- L.D. HALL, L. HOUGH, K.A. Mc LAUHLAN y K.J. PACH-- LER, Chem. Ind., 1465 (1962).
- 177.- A.S. PERLIN, Can. J. Chem., 41, 399 (1963).
- 178.- C. CONE y L. HOUGH, Carbohyd. Res., 1, 1 (1965).

- 179.- J. TROTTER y J.K. FAWCET, Acta Crystallogr., 21, 236  
(1966).
- 180.- R.G. REES, A.R. TATCHELL y R.D. WELLS, J. Chem. Soc.  
(c), 1768 (1967).
- 181.- R.U. LEMIEUX y D.H. DETERT, Can J. Chem., 46, 1039 -  
(1968).
- 182.- T. MAEDA, K. TORI, S. SATOH y K. TOKUYAMA, Bull. --  
Chem. Soc. Jap., 42, 2635 (1969).
- 183.- B. HELFERICH y K.L. BETTIN, Chem. Ber., 104, 1701 --  
(1971).
- 184.- W.E. TREVELYAN, D.P. PROCTER y J.S. MARRISON, Nature  
(Londres), 166, 444 (1950).
- 185.- R.U. LEMIEUX, Methods in Corbohydrate Chem. 2, 221 -  
(1963); R.L. WHISTLER y M.L. WOLFROM, Eds. Academic  
Press, New York.