



**Universidad de Granada**  
**Departamento de Química Farmacéutica y Orgánica**

**SÍNTESIS DE ALCALOIDES PIRROLIDÍNICOS Y  
PIRROLIZIDÍNICOS POLIHIDROXILADOS  
ENANTIÓMERICAMENTE PUROS Y SU APLICACIÓN  
COMO INHIBIDORES DE GLICOSIDASAS**

**Tesis Doctoral**

**Alicia Martos Redruejo**

Departamento de Química Farmacéutica y Orgánica.

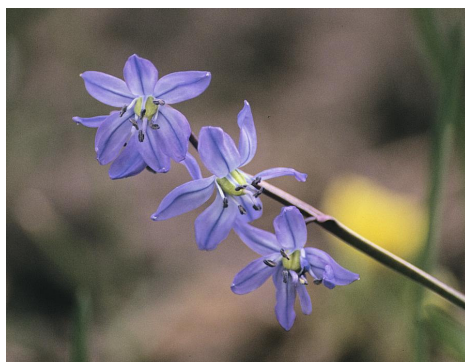
Facultad de Farmacia.







**Universidad de Granada**  
**Departamento de Química Farmacéutica y Orgánica**



**SÍNTESIS DE ALCALOIDES PIRROLIDÍNICOS Y  
PIRROLIZIDÍNICOS POLIHIDROXILADOS  
ENANTIÓMERICAMENTE PUROS Y SU APLICACIÓN  
COMO INHIBIDORES DE GLICOSIDASAS**

**Tesis Doctoral**

**Alicia Martos Redruejo**

Departamento de Química Farmacéutica y Orgánica.

Facultad de Farmacia.

Universidad de Granada.



Memoria de Tesis Doctoral presentada por el Ldo. **Alicia Martos Redruejo** para obtener el grado de Doctor en Farmacia.

Granada, 20 de Marzo de 2007.

**DIRECTORES:**

**D. Isidoro Izquierdo Cubero      Dña. M<sup>a</sup> Teresa Plaza López-Espinosa**

**D. Miguel Rodríguez Alonso**

**DOCTORANDO:**

**Dña. Alicia Martos Redruejo**



## **AGRADECIMIENTOS**

Quedo profundamente agradecida a todas aquellas personas y organismos que han hecho posible la realización de esta Memoria de Tesis Doctoral.

En primer lugar, agradecer a mis padres, por su apoyo y por todo.

Especialmente a mis directores de tesis, Mayte Plaza, Isidoro Izquierdo, y Miguel Rodríguez, por lo que me han aguantado y por la paciencia que han tenido a lo largo de todos estos años, a los cuales admiro por su maravilloso trabajo y respeto a nivel personal, mi más sincero agradecimiento.

A mis compañeros de laboratorio de Química Orgánica, con los que he compartido muchas horas y muy buenos momentos a Juan, Paco, Daniele, Fernando, Nati, Roberto.

Al Departamento de Química Farmacéutica y Orgánica, en general a todas las personas extraordinarias que encierra.

Tienen mi sincero agradecimiento, mis amigos, y especialmente todos aquellos que confían en mí y con los que he pasado todos estos años. Algunas de las personas a las que quiero incluir en este grupo son mis hermanos.

A los Servicios Técnicos de la Universidad de Granada.

Finalmente, mi agradecimiento por la beca concedida por el Ministerio de Ciencia y Tecnología para la realización de este trabajo de Tesis Doctoral sin cuya financiación no hubiese sido posible.





# ÍNDICE



<b>1.- INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1.- IMINOCICLITOLES Y GLICOSIDASAS .....</b>	<b>3</b>
<b>1.2.- LOS IMINOCICLITOLES COMO INHIBIDORES DE LAS           GLICOSIDASAS. MECANISMO DE ACCIÓN.....</b>	<b>5</b>
<b>1.3.- TIPOS DE IMINOCICLITOLES.....</b>	<b>7</b>
<b>1.3.1.- MONOCÍCLICOS.....</b>	<b>7</b>
<b>1.3.2.- BICÍCLICOS.....</b>	<b>8</b>
<b>2.- ANTECEDENTES.....</b>	<b>15</b>
<b>2.1.- SÍNTESIS DE PIRROLIDINAS POLIHIDROXILADAS .....</b>	<b>19</b>
<b>2.1.1.- SÍNTESIS DE 2,5-DIDESOXI-2,5-IMINO-D-ALITOL, DADP           [(2<i>R</i>,3<i>R</i>,4<i>S</i>,5<i>S</i>)-3,4-dihidroxi-2,5-bis(hidroximetil)pirrolidina, 17], Y           SU EPÍMERO EN C-2 DE CONFIGURACIÓN D-ALTRO, DALDP           (24).....</b>	<b>19</b>
<b>2.1.1.1.- Métodos que implican ciclación mediante                   aminación reductora intramolecular.....</b>	<b>19</b>
<b>2.1.1.2.- Métodos que implican desplazamiento nucleofílico                   intramolecular.....</b>	<b>20</b>
<b>2.1.1.3.- Métodos que implican heterocicloaddición de                   Diels-Alder.....</b>	<b>23</b>
<b>2.1.2.- SÍNTESIS DE 2,5-DIDESOXI-2,5-IMINO-D-GALACTITOL, DGADP           [(2<i>R</i>,3<i>S</i>,4<i>R</i>,5<i>S</i>)-3,4-dihidroxi-2,5-bis(hidroximetil)pirro           lidina,           20].....</b>	<b>23</b>

2.1.2.1.- Métodos que implican ciclación mediante aminación reductora intramolecular.....	23
2.1.2.2.- Métodos que implican desplazamiento nucleofílico intramolecular.....	25
<b>2.2.- PIRROLIZIDINAS POLIHIDROXILADAS .....</b>	<b>28</b>
2.2.1.- AISLAMIENTO DE PIRROLIZIDINAS POLIHIDROXILADAS.....	28
2.2.2.- SÍNTESIS DE HIACINTACINAS.....	29
2.2.2.1.- Síntesis de (+)-7a- <i>epi</i> hiacintacina A <sub>2</sub> (71).....	29
2.2.2.2.- Síntesis de (+)-hiacintacina A <sub>2</sub> (10).....	32
2.2.2.3.- Síntesis de (+)-hiacintacina A <sub>3</sub> (11).....	37
..	
2.2.2.4.- Síntesis de (+)-3- <i>epi</i> hiacintacina A <sub>2</sub> y (+)-3- <i>epi</i> hiacintacina A <sub>3</sub> .....	38
2.2.2.5.- Síntesis de (+)-hiacintacina A <sub>1</sub> .....	39
<b>3.- PARTE TEÓRICA.....</b>	<b>41</b>
3.1. INTRODUCCIÓN.....	43
3.2.- SÍNTESIS DE PIRROLIDINAS POLIHIDROXILADAS.....	45
3.2.1.- SÍNTESIS DE 2,5-DIDESOXI-2,5-IMINO-D-ALITOL Y D-ALTRITOL ORTOGONALMENTE PROTEGIDOS 16 y 18.....	45
3.2.2.- SÍNTESIS DE 2,5-DIDESOXI-2,5-IMINO-D-GALACTITOL ORTOGONALMENTE PROTEGIDO 19.....	53
3.3.- SÍNTESIS DE PIRROLIZIDINAS POLIHIDROXILADAS.....	58

3.3.1.- SÍNTESIS DE (-)- (21) Y (+)-3-EPHIACINTACINA A <sub>5</sub> (22).....	58
<b>4.- EXPERIMENTAL.....</b>	<b>67</b>
4.1.- MÉTODOS GENERALES.....	69
4.2.- SÍNTESIS DE PIRROLIDINAS POLIHIDROXILADAS.....	70
4.2.1.- SÍNTESIS DE 2,5-DIDESOXI-2,5-IMINO-D-ALITOL Y D-ALTRITOL ORTOGONALMENTE PROTEGIDOS 16 Y 18.....	70
4.2.1.1.- Síntesis de 3- <i>O</i> -bencil-1,2- <i>O</i> -isopropilidén-β-D- <i>psicopiranos</i> a (92).....	70
4.2.1.2.- Síntesis de 4- <i>O</i> -bencil-3- <i>O</i> -benzoil-5-desoxi-1,2- <i>O</i> -isopropilidén-5-yodo-α- <i>L</i> -sorbopiranos <i>a</i> (95).....	71
4.2.1.3.- Síntesis de 5-azido-4- <i>O</i> -bencil-3- <i>O</i> -benzoil-5-desoxi-1,2- <i>O</i> -isopropilidén-β-D-fructopiranos <i>a</i> (96).....	72
4.2.1.4.- Síntesis de 5-azido-4- <i>O</i> -bencil-5-desoxi-1,2- <i>O</i> -isopropilidén-β-D-fructopiranos <i>a</i> (97).....	73
4.2.1.5.- Síntesis de 5-azido-4- <i>O</i> -bencil-5-desoxi-1,2- <i>O</i> -isopropilidén-β-D- <i>psicopiranos</i> a (99).....	74
4.2.1.6.- Síntesis de 5-azido-3,4-di- <i>O</i> -bencil-5-desoxi-1,2- <i>O</i> -isopropilidén-β-D- <i>psicopiranos</i> a (100).....	75
4.2.1.7.- Síntesis de 5-azido-3,4-di- <i>O</i> -bencil-5-desoxi- <i>D</i> - <i>psicopiranos</i> a (101).....	76
4.2.1.8.- Silanización de 101.....	77
4.2.1.9.- Reacción de Staudinger/aza-Wittig en 102.....	78

4.2.1.10.- Hidrogenación de 102.....	80
4.2.1.11.- Síntesis de (2 <i>R</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>S</i> )-3,4-dihidroxi-2,5-bis(hidroximetil)pirrolidina(2,5-didesoxi-2,5-imino-D-alitol) como hidrocloreuro (DADP, 17).....	81
4.2.1.12.- Reacción de Staudinger/aza-Wittig en 103 ...	82
4.2.1.13.- Hidrogenación de 103.....	84
4.2.2.- SÍNTESIS DE 2,5-DIDESOXI-2,5-IMINO-D-GALACTITOL ORTOGONAL MENTE PROTEGIDO 19.....	84
4.2.2.1.- Síntesis de 5-azido-4- <i>O</i> -bencil-3- <i>O</i> -benzoil-5-desoxi-1,2- <i>O</i> -isopropilidén- $\alpha$ -L-sorbopiranosa (108).....	84
4.2.2.2.- Síntesis de 4- <i>O</i> -bencil-1,2- <i>O</i> -isopropilidén-5- <i>O</i> -metanosulfonil- $\beta$ -D-fructopiranosa (112).....	85
4.2.2.3.- Síntesis de 4- <i>O</i> -bencil-1,2- <i>O</i> -isopropilidén-5- <i>O</i> -metanosulfonil- $\beta$ -D-psicopiranosa (114).....	86
4.2.2.4.- Síntesis de 5-azido-4- <i>O</i> -bencil-5-desoxi-1,2- <i>O</i> -isopropilidén- $\alpha$ -L-tagatopiranosa (115).....	87
4.2.2.5.- Síntesis de 5-azido-3,4-di- <i>O</i> -bencil-5-desoxi-1,2- <i>O</i> -isopropilidén- $\alpha$ -L-tagatopiranosa (116).....	88
4.2.2.6.- Síntesis de 5-azido-3,4-di- <i>O</i> -bencil-5-desoxi- $\alpha$ -L-tagatopiranosa (117).....	89
4.2.2.7.- Síntesis de 5-azido-3,4-di- <i>O</i> -bencil-5-desoxi-1- <i>O</i> -pivaloil- $\alpha$ -L-tagatopiranosa (118).....	89
4.2.2.8.- Hidrogenación de 118.....	90
4.2.2.9.- Síntesis de (2 <i>R</i> ,3 <i>S</i> ,4 <i>R</i> ,5 <i>S</i> )-3,4-dibenciloxi-2,5-bis(hidroximetil)pirrolidina (119).....	91

- 4.2.2.10.- Síntesis de (2*R*,3*S*,4*R*,5*S*)-3,4-dihidroxi-2,5-bis(hidroximetil) pirrolidina (2,5-didesoxi-2,5-imino-D-galactitol) como hirocloruro (DGADP, 20).....92
- 4.2.3.- SÍNTESIS DE (-)- (21) Y (+)-3-*EPIHIACINTACINA* A<sub>5</sub>, (22)...92
- 4.2.3.1.- Síntesis de (2*S*,3*S*,4*R*,5*R*)-3,4-dibenciloxi-*N*-benciloxycarbonil-2'-*O*-*terc*-butildifenilsilil-2,5-bis(hidroximetil)pirrolidina (120).....92
- 4.2.3.2.- Síntesis de 4-[(3*E*,2'*R*,3'*R*,4'*S*,5'*S*)-3',4'-dibenciloxi-*N*-benciloxycarbonil-5'-*terc*-butildifenilsililoximetilpirrolidin-2'-il]but-3-en-2-ona (122).....93
- 4.2.3.3.- Síntesis de (1*R*,2*S*,3*S*,5*R*,7*aR*)-1,2-dibenciloxi-3-*terc*-butildifenilsililoximetil-5-metilpirrolizidina (123)..95
- 4.2.3.4.- Síntesis de (1*R*,2*S*,3*S*,5*R*,7*aR*)-1,2-dihidroxi-3-hidroximetil-5-metilpirrolizidina [(-)-3-*epihiacintacina* A<sub>5</sub>, 21].....95
- 4.2.3.5.- Síntesis de (2*R*,3*R*,4*S*,5*S*)-3,4-dibenciloxi-*N*-benciloxycarbonil-2'-*O*-benzoil-5'-*O*-*terc*-butildifenilsilil-2,5-bis(hidroximetil)pirrolidina (125).....96
- 4.2.3.6.- Síntesis de (2*R*,3*R*,4*S*,5*S*)-3,4-dibenciloxi-*N*-benciloxycarbonil-2'-*O*-benzoil-2,5-bis(hidroximetil)pirrolidina (126).....97
- 4.2.3.7.- Síntesis de 4-[(2'*S*,3'*S*,4'*R*,5'*R*)-3',4'-dibenciloxi-*N*-benciloxycarbonil-5'-benzoiloximetilpirrolidina-2'-il]but-3-en-2-ona (128).....98
- 4.2.3.8.- Síntesis de (1*S*,2*R*,3*R*,5*S*,7*aS*)-1,2-dibenciloxi-3-benzoiloximetil-5-metilpirrolizidina (129).....99



4.2.3.9.- Síntesis de (1 <i>S</i> ,2 <i>R</i> ,3 <i>R</i> ,5 <i>S</i> ,7 <i>aS</i> )-1,2-dihidroxi-3-hidroxi-5-metilpirrolizidina [(+)-3- <i>epi</i> hiacintacina A <sub>5</sub> , 22].....	100
---	-----

## 5.- INHIBICIÓN ENZIMÁTICA.....101

5.1.- INTRODUCCIÓN.....	103
-------------------------	-----

5.2.- GLICOSIDASAS.....	105
-------------------------	-----

5.3.- ENSAYOS ENZIMÁTICOS.....	107
--------------------------------	-----

5.3.1.- EXPERIMENTAL.....	111
---------------------------	-----

5.4.- RESULTADOS DE LOS ENSAYOS DE INHIBICIÓN.....	113
--	-----

5.4.1.- ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD INHIBIDORA DE (2 <i>R</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>S</i> )-3,4-DIHI-DROXI-2,5-BIS(HIDROXIMETIL)PIRROLIDINA (DADP, 17) FRENTE A LA $\beta$ -GLUCOSIDASA DE ALMENDRA.....	113
--	-----

5.4.2.- ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD INHIBIDORA DE (2 <i>R</i> ,3 <i>S</i> ,4 <i>R</i> ,5 <i>S</i> )-3,4-DIHI-DROXI-2,5-BIS(HIDROXIMETIL)PIRROLIDINA (DGADP, 20) FRENTE A LA $\beta$ -GLUCOSIDASA DE ALMENDRA.....	114
---	-----

5.4.3.- ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD INHIBIDORA DE (1 <i>R</i> ,2 <i>S</i> ,3 <i>S</i> ,5 <i>R</i> ,7 <i>aR</i> )-1,2-DIHI-DROXI-3-HIDROXIMETIL-5-METILPIRROLIZIDINA (21) FRENTE A LA $\alpha$ -MANOSIDASA DE <i>CANAVALIA ENSIFORMIS</i> (JACK BEANS).....	115
--	-----

5.4.4.- ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD INHIBIDORA DE (1 <i>S</i> ,2 <i>R</i> ,3 <i>R</i> ,5 <i>S</i> ,7 <i>aS</i> )-1,2-DIHI-DROXI-3-HIDROXIMETIL-5-METILPIRROLIZIDINA (22) FRENTE A LA $\alpha$ -MANOSIDASA DE <i>CANAVALIA ENSIFORMIS</i> (JACK BEANS).....	117
--	-----

5.4.5.- ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD INHIBIDORA DE 6,7-DIEPICASUARINA (23) FRENTE A LA $\alpha$ -GLUCOSIDASA DE ARROZ.....	119
5.4.6.- Resumen de los resultados .....	120
<b>6.- CONCLUSIONES.....</b>	<b>123</b>
<b>7.- ESPECTROS.....</b>	<b>127</b>



# **I.- INTRODUCCIÓN**



## **1.- INTRODUCCIÓN**

### **1.1.- IMINOCICLITOLES Y GLICOSIDASAS**

Los iminociclitoles (iminoazúcares o aza-azúcares, como también se les denomina) son las moléculas que resultan de sustituir en un azúcar, el átomo de oxígeno endocíclico por un átomo de nitrógeno. Los iminociclitoles presentan una obvia analogía estructural con los carbohidratos (glicomiméticos) y pueden, por tanto, ocupar su lugar en ciertas reacciones enzimáticas, especialmente en las de hidrólisis de los enlaces glicosídicos de oligosacáridos y glicoconjugados, catalizadas por las glicosidasas y glicosiltransferasas, inhibiendo la acción de éstas. Esta posibilidad de actuar como inhibidores enzimáticos ha generado un considerable interés y una rápida expansión en el campo de investigación de los aza-azúcares.

Las glicosidasas juegan un papel fundamental en algunos procesos bioquímicos como la digestión de los alimentos, el catabolismo de glicoconjugados en los lisosomas celulares, o en los procesos de post-traducción de glicoproteínas<sup>1</sup>.

Por lo que respecta a su acción en la digestión de alimentos, las glicosidasas están integradas en las membranas celulares de algunas regiones del intestino delgado. Allí rompen los oligosacáridos de la dieta en monosacáridos asimilables. Si se inhibe la acción de estas glicosidasas, se puede regular la absorción de aquellos, y en consecuencia, disminuir sus niveles. Por ello se usan inhibidores de glicosidasas intestinales en el tratamiento de la diabetes<sup>2</sup>.

Las glicosidasas presentes en los lisosomas catalizan la hidrólisis de glicoconjugados contribuyendo así al reciclado de los materiales celulares. Una hidrólisis insuficiente de estos materiales puede producir enfermedades relacionadas con su almacenamiento en los lisosomas<sup>3</sup>. Algunas de estas enfermedades son susceptibles de tratamiento con iminociclitolos<sup>4</sup>.

Por otra parte, las células cancerígenas tienen en sus membranas *N*- y *O*-glicósidos con patrones de glicosilación aberrantes. La síntesis de estas glicoproteínas en los mamíferos está controlada por glicosidasas y glicosiltransferasas, por lo que actuando sobre ellas se pueden llegar a prevenir los procesos de glicosilación aberrantes. El uso de los inhibidores de las glicosidasas constituye así una importante estrategia en la terapia contra el cáncer<sup>5</sup>.

---

<sup>1</sup> a) Asano, N.; Nash, R.J.; Molyneux, R.J.; Fleet, G.W.J. *Tetrahedron:Asymmetry*, **2000**, *11* 1645; b) Compain, P. Martin, O.R. *Bioorg. Med. Chem.*, **2001**, *9*, 3077; c) Watson, A.A.; Fleet, G.W.J.; Asano, N.; Molyneux, R.J.; Nash, R.J. *Phytochemistry*, **2001**, *56*, 265; d) Borges de Melo E.; Silveira A.; Carvalho I.; *Tetrahedron*, **2006**, *62*, 10277.

<sup>2</sup> Rinhehart, B.L.; Robinson, K.M.; Liu, P.S.; Payne, A.J.; Wheatley, M.E.; Wagner, S.R. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **1987**, *241*, 915.

<sup>3</sup> Cenci di Bello, I; Dorling, P.; Winchester, B. *Biochem J.*, **1983**, *215*, 693.

<sup>4</sup> a) Takeuchi, M.; Kamata, K.; Yoshida, M.; Kameda, Y.; Matsui, K. *J. Biochem.*, **1990**, *108*, 42; b) Sawkar, A.R.; Adamski-Werner, S.L.; Cheng, W.-C.; Wong, C.-H.; Beutler, E.; Zimmer, K.-P.; Kelly, J.W. *Chem. Biol.*, **2005**, *12*, 1235.

<sup>5</sup> Dwek, R.A. *Chem Rev.*, **1996**, *96*, 683; Olden, K.; Breton, P.; Grzegorzewski, K.; Yasuda, Y.; Gause, B.L.; Oredipe, O.A.; Newton, S.A.; White, S.L. *Pharmacol. Ther.*, **1991**, *50*, 285.

El acoplamiento de muchos virus a las células animales, así como su infectividad, están relacionados con la presencia en la superficie del virus de glicoproteínas cuya síntesis puede, eventualmente, ser controlada por inhibidores de glicosidasas. De esta manera, los iminociclitoles constituyen también un importante material para el estudio de los mecanismos de infección vírica.

Por último, la manipulación de la síntesis de glicoproteínas mediante el uso de inhibidores de las glicosidasas, puede ser de gran ayuda en el desarrollo de fármacos anti-inflamatorios, antitumorales, antivirales y antibióticos, a través de la investigación y descubrimiento del papel que ejercen los carbohidratos individuales de las glicoproteínas en la acción de éstas. Resulta evidente, por tanto, que la interferencia de los glicomiméticos en los procesos anteriores confiere a los aza-azúcares un enorme potencial terapéutico<sup>1b,c,6</sup> en el tratamiento de muchas enfermedades, como infecciones virales (incluida el VIH), diversos tipos de cáncer o diabetes.

Se puede concluir que la puesta a punto de métodos eficaces para la síntesis de iminociclitoles y otros glicomiméticos tiene una importancia clave en la investigación de los mecanismos de acción de las glicosidasas, y en el desarrollo de nuevos fármacos antiinflamatorios, antitumorales, antivirales, antibióticos, etc.

Esta Tesis tiene como objetivo la síntesis estereocontrolada de ciertos iminoazúcares, y la determinación de su capacidad para inhibir la acción enzimática de varias glicosidasas.

## **1.2.- LOS IMINOCICLITOLES COMO INHIBIDORES DE LAS GLICOSIDASAS. MECANISMO DE ACCIÓN**

Una característica notable de las glicosidasas es su selectividad, ya que

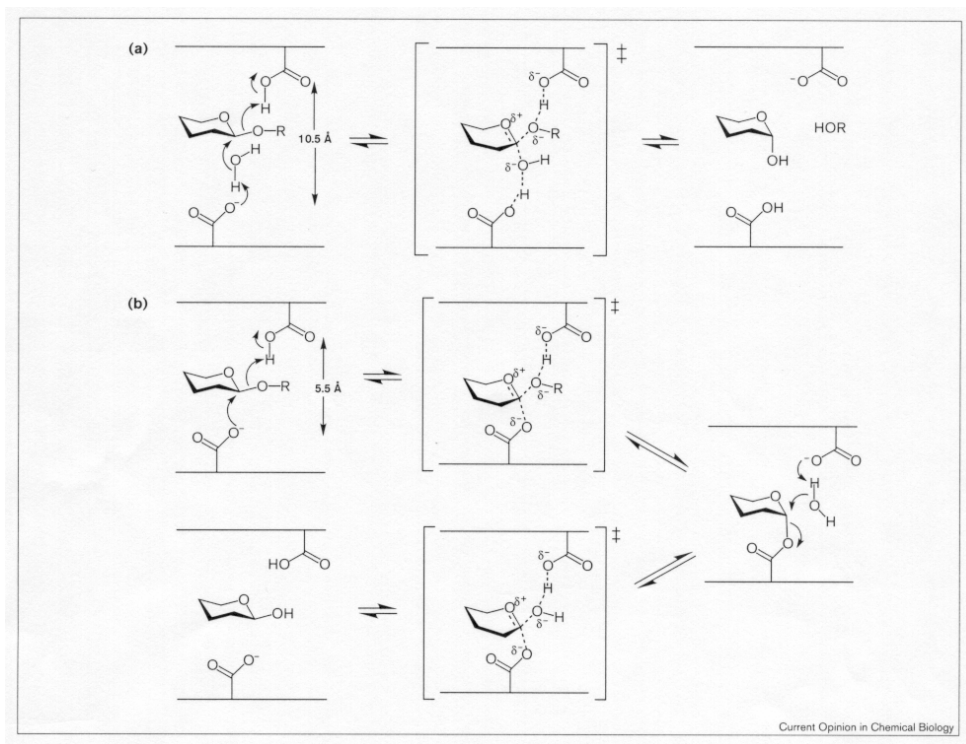
---

<sup>6</sup> Recientemente se ha aprobado, por parte de la FDA, el uso de los correspondientes *N*-(2-hidroxietil)- (Miglitol<sup>®</sup>) y *N*-(*n*-butil)- (Zavesca<sup>®</sup>) derivados de la desoxinójirimicina para el tratamiento de la diabetes no insulino-dependiente y la enfermedad de Gaucher Tipo-1, respectivamente.



son capaces de discriminar no sólo dos azúcares entre sí, sino también los enlaces glicosídicos  $\alpha$  y  $\beta$  de un mismo azúcar.

Otra característica no menos notable es que las hidrólisis de enlaces glicosídicos catalizadas por glicosidasas pueden transcurrir con inversión, o con retención de la configuración del azúcar resultante. Se han propuesto dos posibles mecanismos para explicar la estereoquímica de la reacción. Ambos transcurren a través de un estado de transición que tiene carácter de catión oxacarbenio, con la intervención de dos restos de ácidos carboxílicos en el centro activo de la enzima. A continuación se comentan ambos mecanismos, según la reciente propuesta de C.S. Rye y S.G. Withers<sup>7</sup>:



a) Mecanismo con inversión de la configuración; b) Mecanismo con retención de la configuración.

<sup>7</sup> Rye, C.S.; Withers, S.G. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **2000**, *4*, 573.

a) Las glicosidasas que realizan la hidrólisis invirtiendo la configuración tienen estos dos residuos carboxílicos situados a una distancia de aproximadamente 10 Å, lo que permite la inserción de una molécula de agua entre uno de los restos carboxílicos y el carbono anomérico del azúcar que se está hidrolizando. La reacción tiene entonces lugar por un desplazamiento nucleofílico donde uno de los restos carboxílicos interviene como base y el otro como ácido.

b) En las enzimas que actúan con retención de la configuración los dos restos carboxílicos están situados a una distancia de 5.5 Å, lo que no permite la inserción de la molécula de agua, transcurriendo en este caso el mecanismo a través de un doble desplazamiento, cuyo resultado final es la retención de la configuración del centro anomérico del azúcar. En las reacciones que transcurren con esta estereoquímica se forma un intermedio (glicosilenzima) que ha sido caracterizado en algunos casos.

No obstante esta propuesta, el mecanismo de acción de las glicosidasas, aún en estudio, presenta muchos interrogantes, de manera que, ni para los enzimas mejor estudiados y más conocidos, se ha podido comprender totalmente.

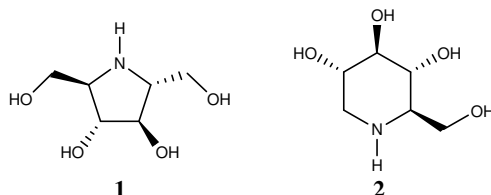
Lo que sí se puede afirmar es que un inhibidor eficaz de glicosidasas debe reproducir lo más fielmente posible el estado de transición de la hidrólisis a pH fisiológico, y ya que los aza-azúcares presentan un átomo de nitrógeno anular, que en condiciones fisiológicas debe estar protonado, en una estructura cíclica polihidroxilada, se puede deducir del mecanismo propuesto que deben ser -y de hecho han resultado ser- un adecuado mimético de los glicósidos.

### **1.3.- TIPOS DE IMINOCICLITOLES**

Hasta el momento se han aislado un gran número de glicomiméticos con estructura de alcaloides polihidroxilados, de plantas y microorganismos. Desde un punto de vista estructural pueden ser:

### 1.3.1.- MONOCÍCLICOS

Dentro de este apartado se encuentran las polihidroxipirrolidinas como el 2,5-didesoxi-2,5-imino-D-manitol<sup>8</sup> (DMDP, **1**), presente en muchas plantas y microorganismos, lo que sugiere que debe tratarse de un metabolito común, y las polihidroxipiperidinas como la 1-desoxinojirimicina<sup>9</sup> (DNJ, **2**), aislada de las raíces de las moreras<sup>10</sup>.



### 1.3.2.- BICÍCLICOS

Dentro de este apartado se encuentran las indolizidinas polihidroxiladas como la castanospermina<sup>11</sup> (**3**), un alcaloide tóxico que inhibe la  $\alpha$ -glucosidasa de los lisosomas y pirrolizidinas como la australina<sup>12</sup> (**4**) y casuarina<sup>13</sup> (**5**). Esta última se ha aislado de plantas que han sido utilizadas en el tratamiento de diabetes, cáncer de pulmón e infecciones bacterianas<sup>14</sup>.

<sup>8</sup> Welter, A.; Jadot, J.; Dardenne, G.; Marlier, M.; Casimir, J. *Phytochemistry*, **1976**, *15*, 747; Nash, R.J.; Watson, A.A.; Asano, N. *Alkaloids: Chemical and Biological Perspectives*; Elsevier: Oxford, 1996; Vol. 11, capítulo 5.

<sup>9</sup> Schmidt, D.D.; Frommer, W.; Müller, L.; Truscheit, E. *Naturwiss.*, **1979**, *66*, 584.

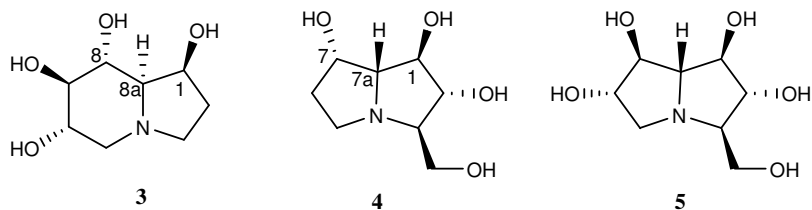
<sup>10</sup> Yagi, M.; Kouno, T.; Aoyagi, Y.; Murai, H. *J. Agric. Chem. Soc. Jpn.*, **1976**, *50*, 571.

<sup>11</sup> Hohenschutz, L.D.; Bell, E.A.; Jewess, P.J.; Leworthy, D.P.; Pryce, R.J.; Arnold, E.; Clardy, J. *Phytochemistry*, **1981**, *20*, 811; Saul, R.; Chambers, J.P.; Molyneux, R.J.; Elbein, A.D. *Arch. Biochem. Biophys.*, **1983**, *221*, 593.

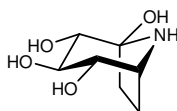
<sup>12</sup> Molyneux, R.J.; Benson, M.; Wong, R.Y.; Tropea, J.E.; Elbein, A.D. *J. Nat. Prod.*, **1988**, *51*, 1198.

<sup>13</sup> Nash, R.J.; Thomas, P.I.; Waig, R.D.; Fleet, G.W.J.; Wormald, M.R.; De Q. Lilley, P.M.; Watkin, D.J. *Tetrahedron Lett.*, **1994**, *35*, 7849.

<sup>14</sup> Maiti, A.P.; Pal, S.C.; Chattopadhyay, D.; De, S.; Nandy, A. *Ancient Sci. Life*, **1985**, *5*, 113; Nair, R.B.; Santhakumari, G. *Ancient Sci. Life*, **1986**, *6*, 80.



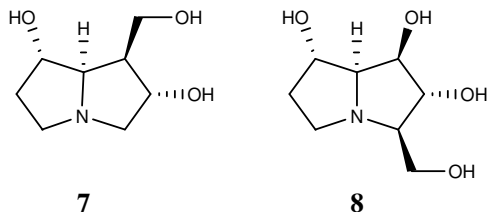
Finalmente, los compuestos con estructura relacionada con el nortropano, como la calistegina B<sub>2</sub><sup>15</sup> (**6**), que también presentan actividad como inhibidores de glicosidasas.



**6**

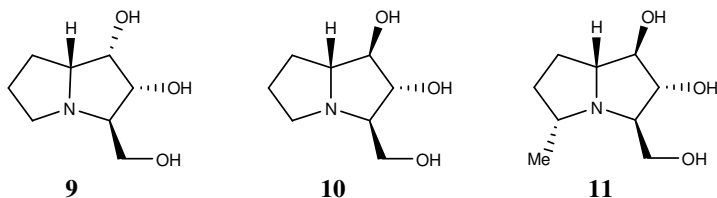
Las pirrolizidinas polihidroxiadas pueden, a su vez, clasificarse en dos grupos:

Las necinas, que presentan una ramificación en la posición 1 (grupo hidroximetilo) como el caso de la rosmarinicina (**7**), y aquellas, donde la ramificación se encuentra en C-3, como la alexina (**8**) y la ya mencionada, australina (**4**), encontradas en *Alexa leiopetala* y *Castanospermum australe*, respectivamente, y que han resultado ser importantes inhibidores selectivos de glicosidasas así como agentes antivirales y antirretrovirales.

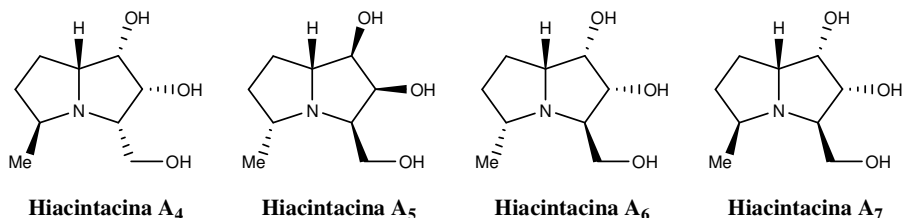


<sup>15</sup> Tepfer, D.A.; Goldmann, A.; Pamboukdjian, N.; Maille, M.; Lepingle, A.; Chevalier, D.; Denarié, J.; Rosemberg, C. *J. Bacteriol.*, **1988**, *170*, 1153; Tepfer, D. *Phytochemistry*, **1990**, *29*, 2125.

Dentro de este mismo grupo se han aislado recientemente las hiacintacinas, que también pueden tener una ramificación en C-5. Hasta el año 2000 sólo se conocían siete de estos compuestos<sup>16</sup> aislados de los bulbos de *Muscari armeniacum* y de los tallos de *Hyacinthoides non-scripta*, de los cuales se representan tres de ellos: las hiacintacinas A<sub>1</sub> (**9**), A<sub>2</sub> (**10**) y A<sub>3</sub> (**11**).



En los años 2002 y 2003, el grupo de N. Asano<sup>17</sup>, en una reinvestigación sobre los extractos de las semillas de la *Castanospermum australe* y de los bulbos de *Scilla sibirica*, identifica siete nuevos compuestos algunos de los cuales se formulan a continuación:



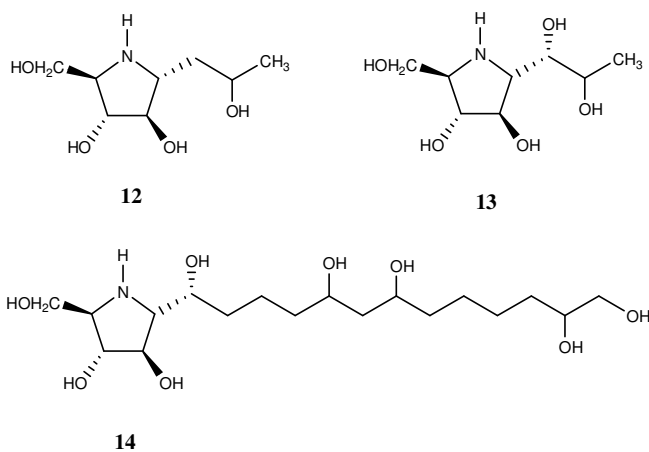
En el año 2004, el mismo grupo<sup>18</sup> aisló e identificó una serie de nuevas pirrolidinas (**12**, **13**, **14**) de los bulbos de la *Scilla peruviana*. Éstas, muestran la misma configuración en el anillo que la DMDP, aunque estructuralmente se

<sup>16</sup> a) Kato, A.; Adachi, I.; Miyauchi, M.; Ikeda, K.; Komae, T.; Kizu, H.; Kameda, Y.; Watson, A.A.; Nash, R.J.; Wormald, M.R.; Fleet, G.W.J.; Asano, N. *Carbohydr. Res.*, **1999**, *316*, 95; b) Asano, N.; Kuroi, H.; Ikeda, K.; Kizu, H.; Kameda, Y.; Kato, A.; Adachi, I.; Watson, A.A.; Nash, R.J.; Fleet, G.W.J. *Tetrahedron: Asymmetry*, **2000**, *11*, 1.

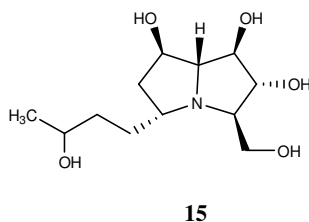
<sup>17</sup> a) Yamashita, T.; Yasuda, K.; Kizu, H.; Kameda, Y.; Watson, A.A.; Nash, R.J.; Fleet, G.W.J.; Asano, N. *J. Nat. Prod.*, **2002**, *65*, 1875; b) Kato, A.; Kano, E.; Adachi, I.; Molyneux, R.J.; Watson, A.A.; Nash, R.J.; Fleet, G.W.J.; Wormald, M.R.; Kizu, H.; Ikeda, K.; Asano, N. *Tetrahedron: Asymmetry*, **2003**, *14*, 325.

<sup>18</sup> Asano, N.; Ikeda, K.; Kasahara, M.; Arai, Y.; Kizu, H. *J. Nat. Prod.*, **2004**, *67*, 846.

diferencian de ella en que el grupo hidroximetilo en C(2) es sustituido por cadenas hidrocarbonadas de mayor complejidad.



Asimismo, dichos autores también describen pirrolizidinas con cadenas hidrocarbonadas más complejas en la posición 5, como se muestra en el compuesto **15**.



El diseño y puesta a punto de estrategias sintéticas para la obtención estereoselectiva de los inhibidores de glicosidasas indicados anteriormente, ha sido el objetivo de diferentes grupos de investigación, entre los que se encuentra el nuestro.

En los últimos años, nuestro equipo de investigación ha desarrollado nuevas metodologías para la síntesis estereoselectiva de polihidroxiindolizidas<sup>19</sup> utilizando, como intermedios clave, derivados de 4-octulosas<sup>20</sup> y

<sup>19</sup> a) Izquierdo, I.; Plaza, M.T.; Robles, R.; Mota, A.J. *Tetrahedron: Asymmetry*, **1998**, 9,

desoxi-4-oculosas<sup>21</sup> obtenidos a su vez a partir de la D-fructosa y L-sorbosa. Asimismo, se han preparado pirrolidinas<sup>22</sup> y pirrolizidinas<sup>23</sup> polihidroxiladas utilizando D-fructosa como material quiral de partida.

En el presente trabajo, hemos centrado la atención en la preparación estereoselectiva de pirrolidinas y pirrolizidinas polihidroxiladas a partir de la D-fructosa que es la hexulosa natural más abundante, ya que con 60.000 Tm/año, ocupa el 4º lugar en la lista de producción mundial de carbohidratos<sup>24</sup>.

En esta Memoria de Tesis Doctoral se describe en primer lugar, la síntesis estereoselectiva de 2,5-didesoxi-2,5-imino-D-alitol (DADP, **17**), y un derivado ortogonalmente protegido (**16**), útil como intermedio en la preparación de pirrolizidinas polihidroxiladas. Asimismo, se han preparado (2*R*,3*S*,4*R*,5*R*)-3,4-dibenciloxi-2'-*O*-*terc*-butildifenilsilil-2,5-bis(hidroximetil) pirrolidina (**18**), derivado de 2,5-didesoxi-2,5-imino-D-altritol (DALDP) y (2*R*,3*S*,4*R*,5*S*)-3,4-dibenciloxi-2,5-bis(hidroximetil)-2'-*O*-pivaloil-pirrolidina (**19**), que se ha desprotegido para dar 2,5-didesoxi-2,5-imino-D-galactitol (DGADP, **20**).

---

1015; b) Izquierdo, I.; Plaza, M.T.; Robles, R.; Rodríguez, C.; Ramírez, A.; Mota, A.J. *Eur. J. Org. Chem.*, **1999**, 1269; c) Izquierdo, I.; Plaza, M.T.; Robles, R.; Mota, A.J. *Eur. J. Org. Chem.*, **2000**, 2071.

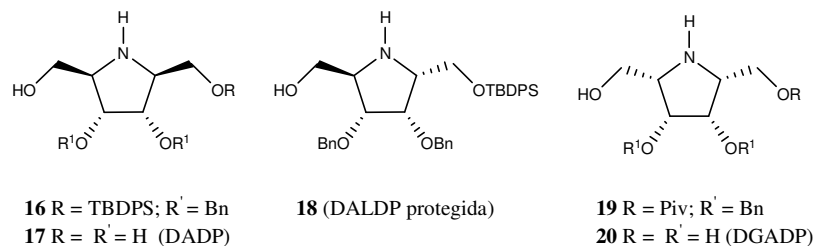
<sup>20</sup> Izquierdo, I.; Plaza, M.T. *J. Carbohydr. Chem.*, **1996**, *15*, 303; Izquierdo, I.; Plaza, M.T.; Rodríguez, M.; Asenjo, R.; Ramírez, A. *Carbohydr. Res.*, **1998**, *308*, 217.

<sup>21</sup> Izquierdo, I.; Plaza, M.T.; Robles, R.; Rodríguez, C. *Tetrahedron: Asymmetry*, **1996**, *7*, 3593; Izquierdo, I.; Plaza, M.T.; Robles, R.; Mota, A.J. *Tetrahedron: Asymmetry*, **1997**, *8*, 2597.

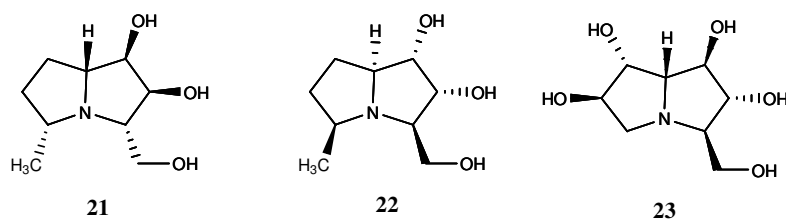
<sup>22</sup> a) Izquierdo, I.; Plaza, M.T.; Robles, R.; Franco, F. *Carbohydr. Res.*, **2001**, *330*, 401; b) Izquierdo, I.; Plaza, M.T.; Franco, F. *Tetrahedron: Asymmetry*, **2002**, *13*, 1503.

<sup>23</sup> a) Izquierdo, I.; Plaza, M.T.; Robles, R.; Franco, F. *Tetrahedron: Asymmetry*, **2001**, *12*, 2481; b) Izquierdo, I.; Plaza, M.T.; Franco, F. *Tetrahedron: Asymmetry*, **2002**, *13*, 1581; c) *ibid*, **2003**, *14*, 3933; d) *ibid*, **2004**, *15*, 1465; e) Izquierdo, I.; Plaza, M.T.; Tamayo, J.A. *Tetrahedron: Asymmetry*, **2004**, *15*, 3635; f) *ibid*, *Tetrahedron*, **2005**, *61*, 6527; g) *ibid*, *J. Carbohydr. Chem.*, **2006**, *25*, 281.

<sup>24</sup> Lichtenthaler, F.W. *Carbohydr. Res.*, **1998**, *313*, 69.



En segundo lugar, se han preparado las pirrolizidinas enantioméricas (-)-3-*epi*hiacintacina A<sub>5</sub> (**21**), y (+)-3-*epi*hiacintacina A<sub>5</sub> (**22**) a partir de **16** como intermedio clave. Ambas, son análogas a la hiacintacina natural A<sub>5</sub> anteriormente mencionada.



Finalmente se ha evaluado la capacidad inhibitoria frente a una serie de glicosidasas, de los compuestos **17**, **20**, **21** y **22** así como de la 6,7-diepicuarina<sup>25</sup> (**23**), sintetizada también por nuestro grupo<sup>24f</sup>.

<sup>25</sup> Bell, A.A.; Pickering, L.; Watson, A.A.; Nash, R.J.; Pan, Y.T.; Elbein, A.D.; Fleet, G.W.J. *Tetrahedron Lett.*, **1997**, *38*, 5869.





## **II.- ANTECEDENTES**



## **2.- ANTECEDENTES**

No son muchos los antecedentes bibliográficos encontrados sobre las pirrolidinas y pirrolizidinas que son objeto de la presente Tesis Doctoral. En el caso de las primeras, por tratarse de isómeros configuracionales no naturales que no han sido objeto de muchas síntesis quirales, y en el de las segundas, debido a su reciente descubrimiento.

Como se ha comentado previamente en la Introducción de la presente Memoria, los aza-azúcares son potentes inhibidores de glicosidasas que catalizan una amplia variedad de procesos biológicos lo que les confiere un evidente potencial terapéutico. A continuación se concretan algunos ejemplos de sus posibles aplicaciones ya esbozados en la Introducción.

### **a) Agentes Anticancerosos**

Las glicosidasas son enzimas que participan tanto en el catabolismo como en el procesado de glicoproteínas. Participan en la transformación de las células normales en células cancerosas y en la migración de las células tumorales, e invasión de otros tejidos (metástasis). También es un hecho bien sabido que los niveles de glicosidasas en la sangre de pacientes con diferentes tipos de tumores, están elevados por encima de lo normal, ya que dichas enzimas, excretadas al flujo sanguíneo, participan en la degradación de la matriz celular de las células tumorales.

Se están usando alcaloides polihidroxiados, como una nueva estrategia para tratar el cáncer ya que pueden prevenir la formación de oligosacáridos unidos a asparagina durante la síntesis de glicoproteínas anómalas.

### **b) Estimulantes del Sistema Inmune**

Algunos alcaloides polihidroxiados presentan actividad sobre la proliferación medular en huesos e incluso pueden proteger contra la citotoxicidad que presentan los agentes anticancerosos convencionales. Otros son capaces de regenerar la respuesta inmune en pacientes inmunodeprimidos.

### **c) Antidiabéticos<sup>2,7</sup>**

Desde la década de los 70 se están utilizando alcaloides polihidroxiados en el tratamiento de la diabetes. Su aplicación se debe a que inhiben las disacaridasas específicas que participan en la digestión de los azúcares en el intestino de los mamíferos, disminuyendo así su absorción en sangre.

### **d) Antivirales**

Estos alcaloides también pueden actuar como agentes antivirales. La presencia de estos compuestos afecta a la pauta de acoplamiento de las glicoproteínas de membrana de los virus con sus receptores celulares, impidiendo así la infección de la célula y la proliferación del virus.

### **e) Fármacos para el Tratamiento de la Enfermedad de Gaucher Tipo-1<sup>7</sup>**

Esta rara enfermedad supone una disminución en la actividad de las enzimas que catalizan la degradación de los glicosfingolípidos (GSL), generalmente por una mutación genética. Esto provoca neurodegeneración por el continuo almacenamiento de GSL en los lisosomas de las células del SNC. Los alcaloides polihidroxiados pueden ser utilizados para regular la biosíntesis de estos GSL, disminuyendo así la cantidad de sustrato que la enzima metaboliza. De esta forma se equilibra la síntesis con la degradación, previniendo el almacenamiento excesivo.

### **f) Tratamiento de Agentes Infecciosos y Patologías Relacionadas**

Una nueva área de investigación en este campo la constituye el uso de derivados sintéticos de alcaloides polihidroxiados como inhibidores de las enzimas que participan en la biosíntesis de las paredes celulares de microorganismos patógenos. Se ha visto que pueden reducir la adhesión de los glóbulos rojos infectados por *Plasmodium falciparum* (parásito causante de la malaria) a los endotelios vasculares, evitando así la aparición de coágulos sanguíneos.

### **g) Otras Aplicaciones**

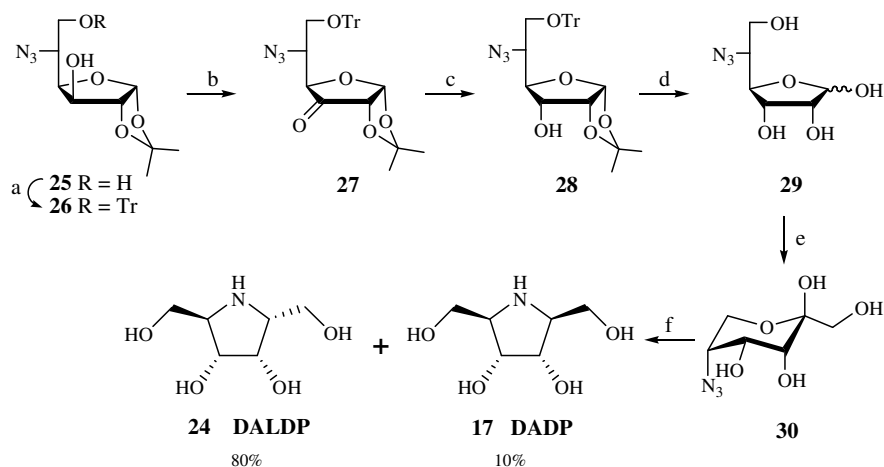
Se han investigado también posibles aplicaciones de estos alcaloides para el tratamiento de la esclerosis múltiple y la artritis, así como para el tratamiento en el trasplante de órganos.

## **2.1.- SÍNTESIS DE PIRROLIDINAS POLIHIDROXILADAS**

### **2.1.1.- SÍNTESIS DE 2,5-DIDESOXI-2,5-IMINO-D-ALITOL, DADP [(2*R*,3*R*,4*S*,5*S*)-3,4-dihidroxi-2,5-bis(hidroximetil)pirrolidina, 17], Y SU EPÍMERO EN C-2 DE CONFIGURACIÓN D-ALTRO, DALDP (24)**

#### **2.1.1.1.- Métodos que implican ciclación mediante aminación reductora intramolecular**

M. H. Fechter y A. E. Stütz<sup>26</sup> sintetizan la DADP y la DALDP, como mezcla de epímeros, mediante un proceso de aminación reductora intramolecular en un derivado de la D-psicosa. Partiendo de la 5-azido-5-desoxi-1,2-*O*-isopropilidén- $\alpha$ -D-glucofuranosa (**25**), se lleva a cabo una inversión de configuración en C-3, mediante oxidación seguido de reducción, para obtener el derivado de configuración D-*alo* **28**. La hidrólisis ácida del grupo isopropilideno en **28** da lugar a la aldosa libre **29**, la cual sufre una isomerización enzimática aldosa  $\rightarrow$  cetosa, para dar 5-azido-5-deoxi-D-psicopiranososa **30**. La hidrogenación catalítica de **30** produce la reducción del grupo azido a amina, que cicla espontáneamente a la correspondiente  $\Delta^1$ -pirrolina, que es finalmente hidrogenada obteniéndose una mezcla de DALDP y DADP **24** y **17**, respectivamente, en una proporción de 8:1.

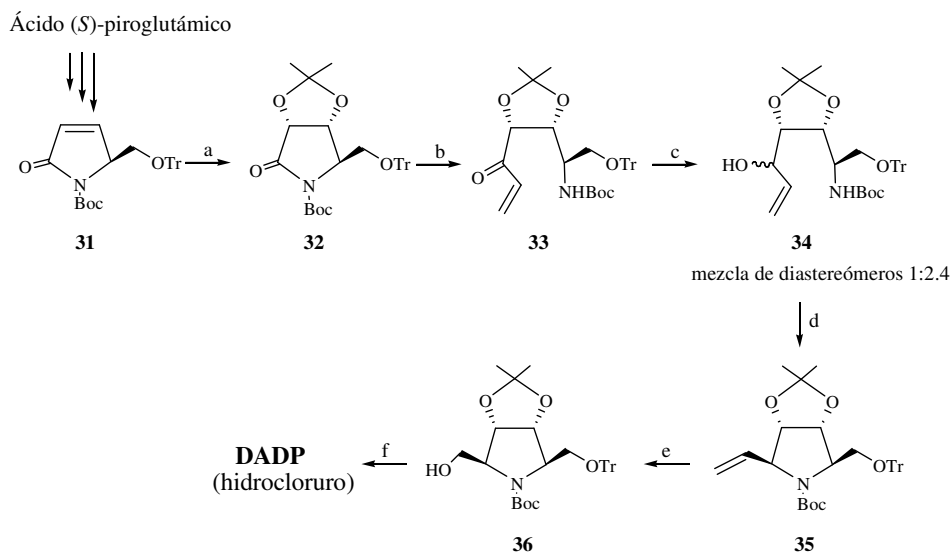


a) TrCl, Et<sub>3</sub>N, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>; b) PCC, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>; c) NaBH<sub>4</sub>, MeOH; d) Amberlita (H<sup>+</sup>); e) Glucosa Isomerasa; f) H<sub>2</sub>, Pd-C, 10%.

### 2.1.1.2.- Métodos que implican desplazamiento nucleofílico intramolecular

<sup>26</sup> Fechter, M.H.; Stütz, A.E. *Carbohydr. Res.*, **1999**, 319, 55.

Nobuo Ikota<sup>27</sup>, utiliza el ácido (*S*)-piroglutámico como material de partida para la obtención de su molécula objetivo, un derivado de la alexina, obteniendo la DADP con el único objetivo de confirmar la configuración de uno de los intermedios clave de su síntesis. Obtiene la DADP mediante una ciclación por desplazamiento nucleofílico interno, utilizando un mesilato como grupo saliente. El ácido (*S*)-piroglutámico se transforma en la lactama insaturada **31**, que mediante una *cis*-dihidroxiación con OsO<sub>4</sub>, seguida de acetona, origina el producto **32**. El tratamiento de **32** con bromuro de vinilmagnesio produce la enona **33**, que seguidamente es reducida con NaBH<sub>4</sub> en presencia de CeCl<sub>3</sub> en metanol dando el alcohol alílico **34**, como mezcla inseparable de diastereómeros. La transformación de **34** en el correspondiente mesilato, seguida de ciclación con *t*-BuOK en THF, da lugar a la pirrolidina **35** como un sólo estereoisómero. La configuración de **35** se confirma mediante su transformación en la DADP (**17**), a través del alcohol **36**.

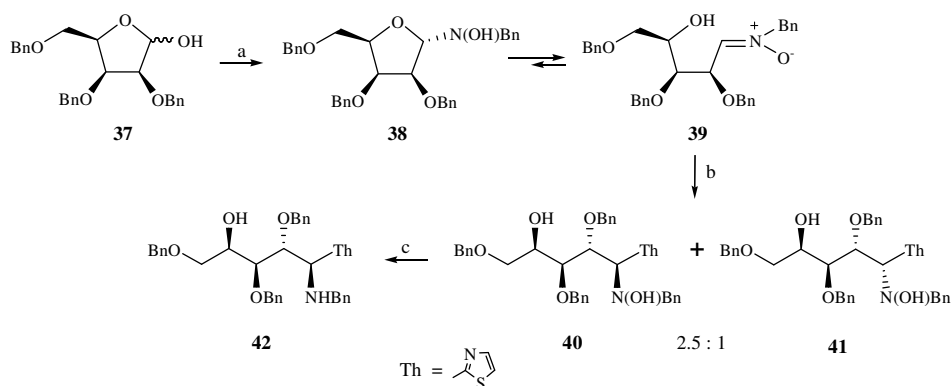


a) OsO<sub>4</sub>, NMO, acetona-H<sub>2</sub>O, después 2,2-dimetoxipropano, *p*-TsOH, acetona; b) Bromuro de vinilmagnesio, THF, -50°C; c) NaBH<sub>4</sub>, CeCl<sub>3</sub>·7H<sub>2</sub>O, MeOH; d) MsCl, TEA, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, después, *t*-BuOK, THF; e) O<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, -78°C, después NaBH<sub>4</sub>, EtOH; f) HCl 10%, MeOH, 60°C.

<sup>27</sup> Ikota, N. *Tetrahedron Lett.*, **1992**, 33, 2553.

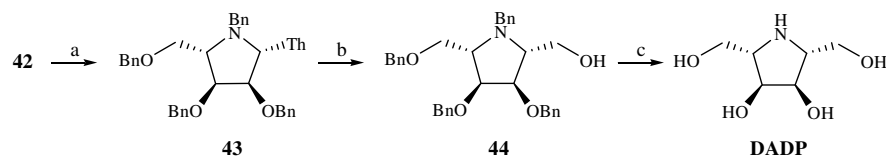


En 2002, Dondoni *et al.*<sup>28</sup> sintetizan la DADP usando como material de partida la 2,3,5-tri-*O*-bencil-D-lixofuranosa (**37**), mediante una estrategia, en la cual se produce la sustitución del oxígeno del anillo por un nitrógeno básico y se incrementa la cadena de la aldosa con un grupo metileno (aminohomologación). El compuesto **37** se transforma, por tratamiento con *N*-bencilhidroxilamina en el *N*-glicósido **38**, que se encuentra en equilibrio con la nitrona de cadena abierta **39**. El tratamiento de **39** con 2-litiotiazol da lugar a la tiazolilhidroxilamina **40**, como producto mayoritario en la mezcla de diastereómeros (**40** y **41**), que se separan por cromatografía. El producto **40** se reduce con Zn-Cu para dar la amina **42**.



a) BnNHOH; b) 2-litiotiazol; c) Cu(AcO)<sub>2</sub>, Zn.

De acuerdo con el siguiente esquema, a partir del compuesto **42** se obtiene la pirrolidina **43**, mediante la introducción de un buen grupo saliente (Tf) en el hidroxilo libre de **42**, seguido de ciclación. Finalmente, el grupo tiazol de **43** se transforma en un aldehído inestable que se reduce hasta el alcohol **44**. La *N*- y *O*-desprotección da lugar a la DADP.

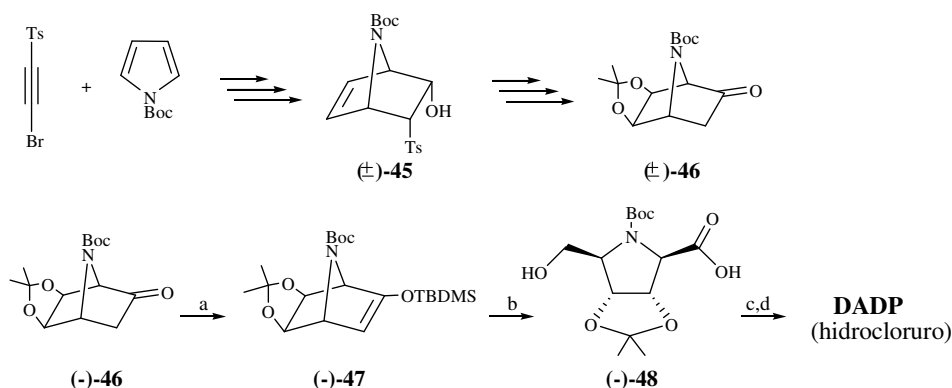


<sup>28</sup> Dondoni, A.; Giovannini, P.P.; Perrone, D. *J. Org. Chem.*, **2002**, *67*, 7203.

a)  $\text{Ti}_2\text{O}$ , Py; b)  $\text{TiOMe}$ , MeCN, después  $\text{NaBH}_4$ , MeOH, después  $\text{AgNO}_3$  en MeCN- $\text{H}_2\text{O}$ , después  $\text{NaBH}_4$ ; c)  $\text{H}_2$ ,  $\text{Pd}(\text{OH})_2/\text{C}$ , Dowex (OH).

### 2.1.1.3.- Métodos que implican heterocicloación de Diels-Alder

Moreno-Vargas *et al.*<sup>29</sup> en el curso de un trabajo cuyo objetivo es la síntesis de derivados de la prolina, obtienen la DADP con el único fin de confirmar la configuración de su molécula objetivo. Comienzan con una reacción de Diels-Alder entre 2-bromo-1-tosilacetileno y *N*-Boc pirrol para dar en varios pasos el producto racémico **45**, que es transformado en la ( $\pm$ )-7-azanorbomanona **46**, la cual se resuelve en sus enantiómeros mediante la metodología de Alexakis<sup>30</sup> a través de aminales cíclicos diastereómeros. La cetona (-)-**46**, enantioméricamente pura, contiene el esqueleto de la futura pirrolidina con la estequiometría adecuada. A partir de ella, mediante una corta serie de transformaciones, indicadas en el esquema, se obtiene la DADP.



a)  $\text{CF}_3\text{CON}(\text{Me})\text{TBDMs}$ ,  $\text{Et}_3\text{N}$ , DMF,  $60^\circ\text{C}$ , 2h; b)  $\text{O}_3$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -MeOH, después  $\text{NaBH}_4$ ; c)  $\text{BH}_3\text{-SMe}_2$ , THF, reflujo; d)  $\text{HCl}$  (1M)-THF.

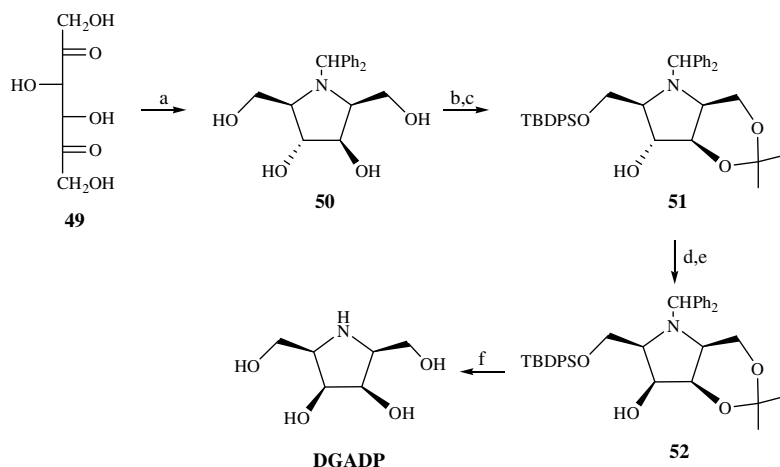
### 2.1.2.- SÍNTESIS DE 2,5-DIDESOXI-2,5-IMINO-D-GALACTITOL, DGADP [(2R, 3S, 4R, 5S)-3,4-dihidroxi-2,5-bis(hidroximetil)pirrolidina, 20]

<sup>29</sup> Moreno-Vargas, A.J.; Robina, I.; Petricci, E.; Vogel, P. *J. Org. Chem.*, **2004**, *69*, 4487.

<sup>30</sup> Alexakis, A.; Frutos, J.C.; Mangeney, P. *Tetrahedron: Asymmetry*, **1993**, *4*, 2431.

### 2.1.2.1.- Métodos que implican ciclación mediante aminación reductora intramolecular

Baxter y Reitz<sup>31</sup>, sintetizan la *N*-arilaquil DGDP (**50**) como producto mayoritario de una mezcla de estereoisómeros mediante una doble aminación reductora de una diulosa como es la 5-ceto-D-fructosa (**49**). Utilizando **50** como producto de partida, Wong *et al.*<sup>32</sup> describen la síntesis de la DGADP. La estereoquímica de ésta, requiere una inversión de configuración en C-3 del compuesto **50**. Para ello, llevan a cabo una protección adecuada en el resto de los grupos hidroxilo, mediante una acetonación y silylación regioselectivas, generando el compuesto **51**. La inversión de configuración se realiza mediante una oxidación seguida de una reducción altamente estereoselectiva, obteniéndose el producto **52**. La desprotección de todos los grupos hidroxilo y amino, produce la DGADP.



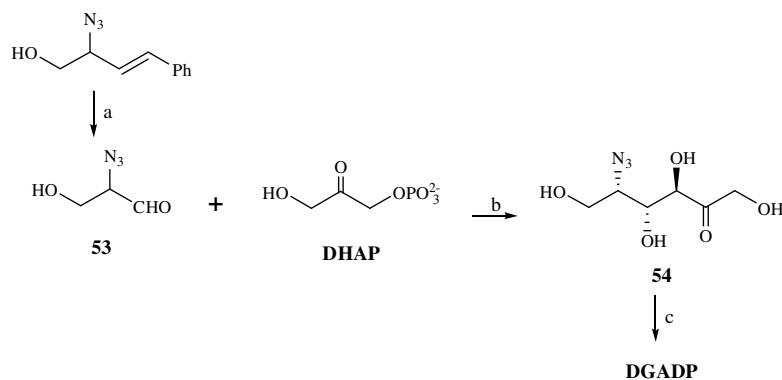
a)  $\text{Ph}_2\text{CHNH}_2$ ,  $\text{NaBH}_3\text{CN}$ , MeOH; b) 2-metoxipropeno, *p*-TsOH; c) CITBDPS, Py; d) peryodinato de Dess-Martin; e) DIBAL, tolueno,  $-78^\circ\text{C}$ ; f) i)  $\text{Bu}_4\text{NF}$ , THF; ii) *p*-TsOH, MeOH, iii)  $\text{H}_2$ ,  $\text{Pd}(\text{OH})_2$ .

En el mismo artículo se describe una ruta más corta para la DGADP mediante una síntesis enzimática, utilizando fuculosa-1-fosfato aldolasa. La dihidroxiacetona fosfato (DHAP) se hace reaccionar, en presencia de dicha

<sup>31</sup> Reitz, A.B.; Baxter, E.W. *Tetrahedron Lett.*, **1990**, 47, 6777; Baxter, E.W.; Reitz, A.B. *J. Org. Chem.*, **1994**, 59, 3175.

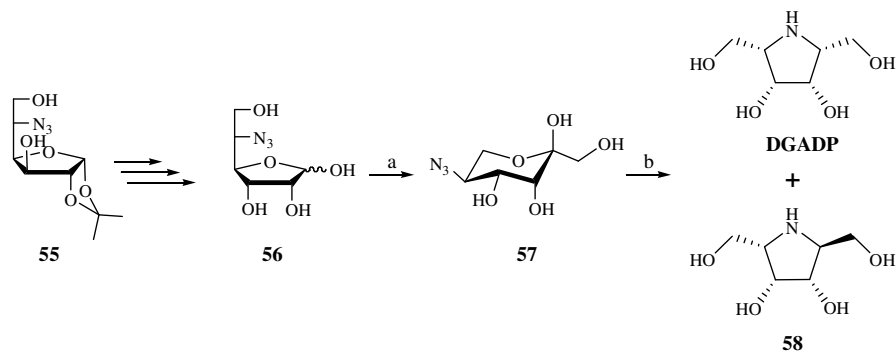
<sup>32</sup> Wang, Y.-F.; Takaoka, Y.; Wong, C.-H. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1994**, 33, 1242.

aldolasa, con 2-azido-3-hidroxiopropanal (**53**), obtenido según se indica en el esquema siguiente. La condensación seguida de la defosforilación da lugar al aldol **54**, cuya posterior aminación reductora genera la DGADP.



a)  $O_3$ ; b) fuculosa-1-fosfato aldolasa; después fosfatasa ácida; c)  $H_2$ , Pd-C.

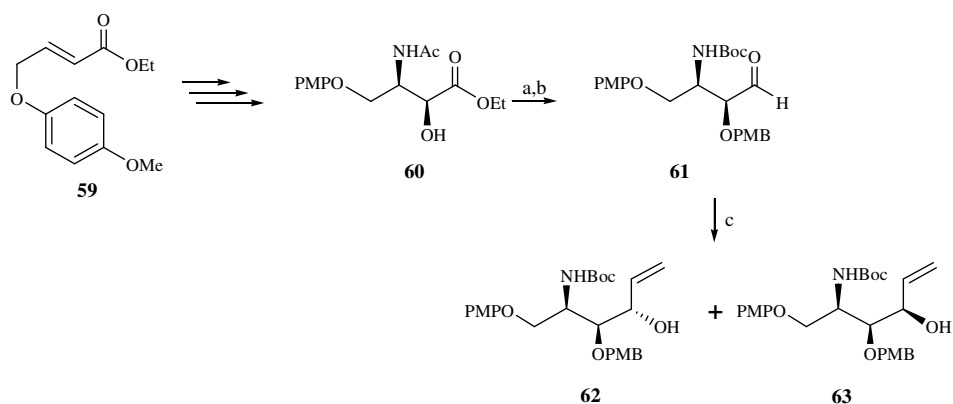
Unos años más tarde Fechter y Stütz<sup>26</sup>, aplicando la metodología descrita en el apartado 2.1.1.1., obtienen la DGADP utilizando como precursor 5-azido-5-desoxi-1,2-*O*-isopropilidén- $\beta$ -L-idofuranosa (**55**), que se transforma en varios pasos en 5-azido-5-desoxi-L-talosa (**56**). La aldosa **56** sufre una isomerización enzimática para dar la cetosa **57**, que posteriormente, se reduce a las correspondientes pirrolidinas DGADP y su epímero en C-2, **58**, en una proporción relativa 1:1.



a) Glucosa Isomerasa; b)  $H_2$ , Pd-C 10%.

### 2.1.2.2.- Métodos que implican desplazamiento nucleofílico intramolecular

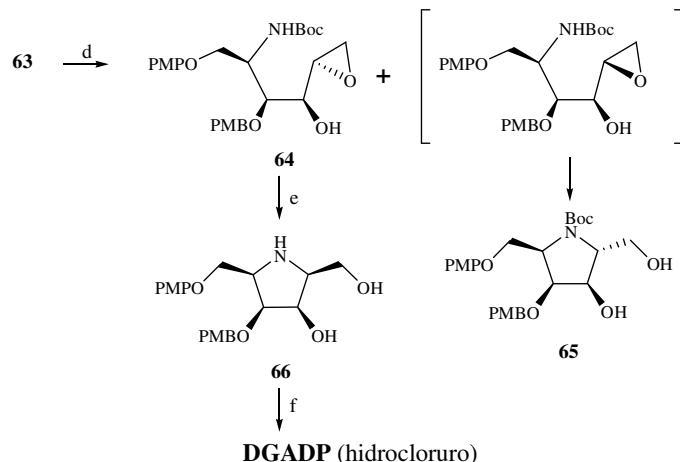
H. Han *et al.*<sup>33</sup> describen la síntesis de la DGADP a través de una aminohidroxilación asimétrica y regioselectiva (RAA) de la olefina aquiral **59** como producto de partida. Así, obtienen el *syn*-aminoalcohol **60** con una excelente regio (>20:1) y enantioselectividad (> 99%). Después de la adecuada protección de los grupos hidroxilo y amino, se reduce el grupo ester para dar el aldehído **61**, el cual se trata con bromuro de vinilmagnesio obteniéndose los alcoholes alílicos **62** y **63** en una relación 7:3, respectivamente.



a) i) NaH, PMBCl, DMF, 0°C; ii) (Boc)<sub>2</sub>O, DMAP, THF, después H<sub>2</sub>NNH<sub>2</sub>, MeOH; b) DIBAL, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, -78°C; c) bromuro de vinilmagnesio, THF, -50°C.

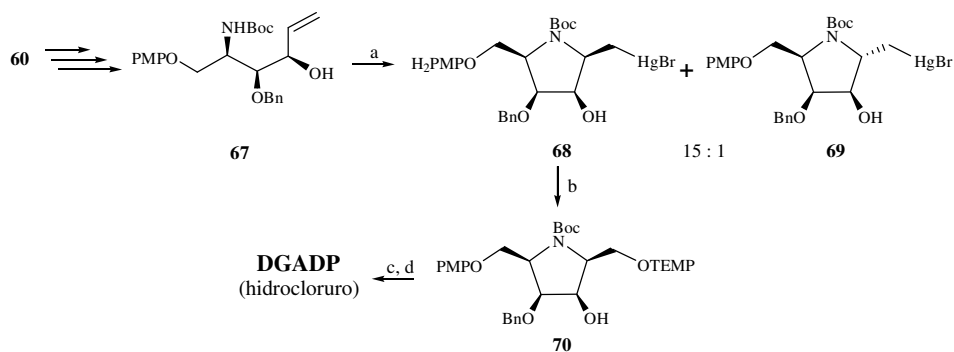
El alcohol **63** se somete a una epoxidación asimétrica de Sharpless para dar el epóxido **64** y el producto cíclico **65**, procedente del epóxido epímero, no aislado. La apertura del anillo de oxirano producida por la concomitante ciclación intramolecular en **64** (proceso *5-exo-tet*), genera la pirrolidina **66**, que, una vez eliminados sus grupos protectores, produce la DGADP.

<sup>33</sup> Han, H.; Singh, S. *Tetrahedron Lett.*, **2004**, *45*, 6349.



d) VO(acac)<sub>2</sub>, TBHP, tolueno, 60°C; e) TFA, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>; f) i) CAN, CH<sub>3</sub>CN-H<sub>2</sub>O; ii) HCl 3N.

Los mismos autores<sup>34</sup>, a partir del aminoalcohol **60**, ya descrito, obtienen, siguiendo la misma estrategia comentada anteriormente, el alcohol alílico **67**, que se somete a un proceso de amidomercuriación para dar principalmente la pirrolidina **68** y su correspondiente epímero en C-2 (**69**). El mercurial **68** se transforma en **70**, a través de una reacción de desmercuriación oxidativa y finalmente, la eliminación de los grupos protectores da lugar a la DGADP como hidrocloruro.



a) Hg(CF<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>)<sub>2</sub>, THF, -78°C, después NaHCO<sub>3</sub>, KBr; b) O<sub>2</sub>, TEMPO, NaH<sub>4</sub>B, DMF; c) Zn, HOAc-THF-H<sub>2</sub>O, 80°C; d) i) CAN, MeCN-H<sub>2</sub>O; ii) HCl 3N, EtOAc; iii) H<sub>2</sub>, Pd-C.

<sup>34</sup> Chikkanna, D.; Han, H. *Synlett.*, **2004**, 2311.

## 2.2.- PIRROLIZIDINAS POLIHIDROXILADAS

### 2.2.1.- AISLAMIENTO DE PIRROLIZIDINAS POLIHIDROXILADAS

Este tipo de alcaloides, como ya se indicó en la Introducción de la presente Memoria, se han aislado hasta el momento de algunas especies de las familias de las Leguminosae, Casuarinaceae y Myrtaceae, no obstante, en trabajos recientes, se han encontrado en abundancia en varias especies de la familia Hyacinthaceae<sup>16,17,18</sup>. Hasta el momento se han caracterizado y aislado las siguientes pirrolizidinas:

**1) Familia Leguminosae:** dentro de esta familia se han aislado pirrolizidinas en las siguientes especies:

- *Castanospermum australe*: Alexina, 3,7a-diepialexina, Australina (7a-epialexina) y 1,7a-diepialexina.
- *Alexa grandiflora*: 7a-epialexaflorina.

**2) Familia Casuarinaceae:** dentro de esta familia se han aislado pirrolizidinas en las siguientes especies:

- *Casuarina equisetifolia*: Casuarina y su 6-O- $\alpha$ -D-glucopiranosido.

**3) Familia Myrthaceae:** dentro de esta familia se han aislado pirrolizidinas en las siguientes especies:

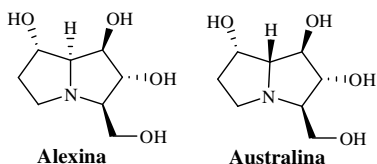
- *Eugenia jambolana*: Casuarina y su 6-O- $\alpha$ -D-glucopiranosido.

**4) Familia Hyacinthaceae:** dentro de esta familia se han aislado pirrolizidinas en las siguientes especies:

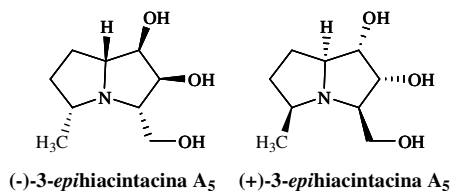
- *Muscari armeniacum*: Hiacintacina A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, A<sub>3</sub>, B<sub>3</sub> y C<sub>1</sub>.
- *Hyacinthoides non-scripta*: Hiacintacina B<sub>1</sub> y C<sub>1</sub>.
- *Scilla campanulata*: Hiacintacina B<sub>1</sub> y B<sub>2</sub>.
- *Scilla sibirica*: Hiacintacina A<sub>4</sub>, A<sub>5</sub>, A<sub>6</sub>, A<sub>7</sub>, B<sub>4</sub>, B<sub>5</sub> y B<sub>6</sub>.
- *Scilla peruviana*: pirrolidinas y pirrolizidinas con estructuras más complejas.

## 2.2.2.- SÍNTESIS DE HIACINTACINAS

Dado el reciente descubrimiento de estos compuestos, no hay muchas referencias sobre la síntesis quiral de los mismos. Si bien, en la década de los 90 se describen diferentes síntesis para la alexina y australina, dos pirrolizidinas naturales tetrahidroxiladas, y algunos de sus epímeros, es a partir del año 2000 cuando aparece en la literatura la primera síntesis estereocontrolada de una 1,2-dihidroxi-3-hidroximetilpirrolizidina.



Aunque no existen antecedentes de ningún procedimiento sintético de la (-)- y (+)-3-epihiacintacina A<sub>5</sub>, objeto de la presente Memoria, se van a describir las estrategias empleadas para la obtención de compuestos relacionados trihidroxilados.

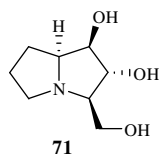


### 2.2.2.1.- Síntesis de (+)-7a-epihiacintacina A<sub>2</sub> (71)

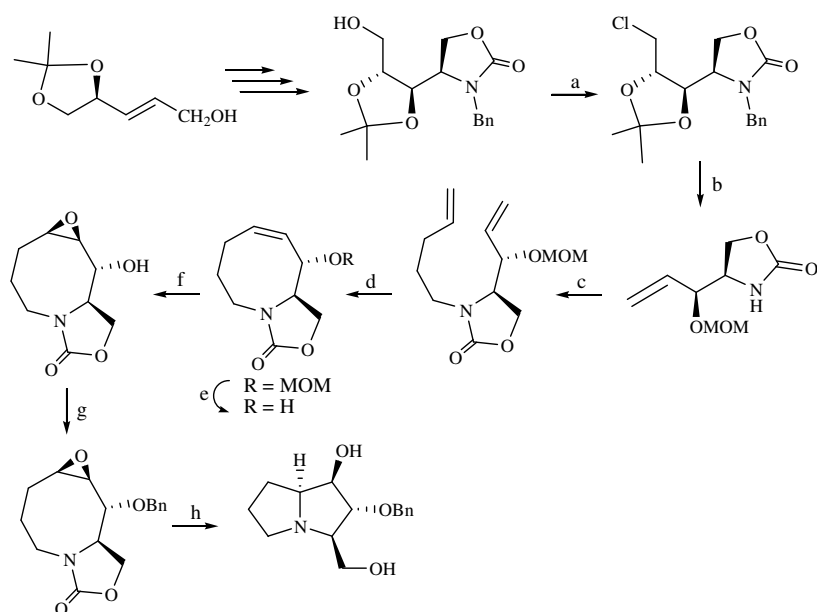
La primera síntesis de una hiacintacina, como ya se ha indicado anteriormente, data del año 2000, cuando el grupo de Yoda<sup>35</sup> describe la preparación de 7a-epihiacintacina A<sub>2</sub> (7-desoxialexina, **71**). Se trata de una ruta larga y compleja que requiere varias separaciones de estereoisómeros y que utiliza como producto de partida 2,3,4-tri-O-bencil-D-arabinofuranosa.

<sup>35</sup> Yoda, Y.; Asai, F.; Takabe, K. *Synlett*, **2000**, 1001.





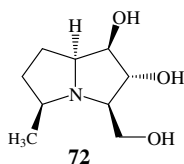
El mismo año, White y Hrniciar publican un artículo<sup>36</sup> donde describen una nueva metodología para la preparación de la australina y el 2-*O*-bencil derivado de **71**. Utilizan como material quiral de partida 2,3-*O*-isopropilidén-D-gliceraldehido y van construyendo el esqueleto y generando los estereocentros a lo largo de una ruta, que implica una reacción de metátesis con cierre de anillo (RCM) y una ciclación transanular, como etapas clave, según se indica en el siguiente esquema.



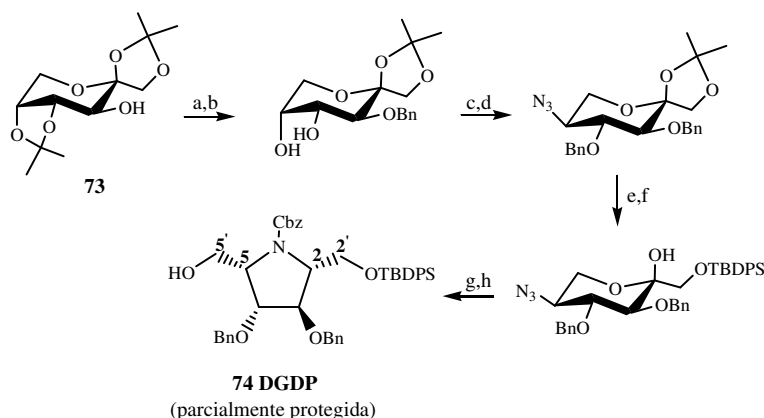
a)  $\text{CCl}_4$ , HMPT,  $-78^\circ\text{C} \rightarrow 60^\circ\text{C}$ ; b) i) Na,  $\text{NH}_3$ ,  $-78^\circ\text{C}$ ; ii)  $\text{CH}_2(\text{OMe})_2$ ,  $\text{P}_2\text{O}_5$ ; c)  $\text{CH}_2=\text{CH}(\text{CH}_2)_3\text{OTs}$ , NaH,  $(n\text{-Bu})_4\text{NI}$ , THF; d)  $\text{Cl}_2(\text{Cy}_3\text{P})_2\text{RuCHPh}$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ; e) HBr, MeCN; f) AMCPB,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ; g) NaH, BnBr; h) LiOH, EtOH- $\text{H}_2\text{O}$ .

<sup>36</sup> White, J.D.; Hrniciar, P. *J. Org. Chem.*, **2000**, *65*, 9129.

El compuesto **71** y su análogo **72** han sido preparados por nuestro grupo<sup>22a,23a</sup>, siguiendo una estrategia que implica utilizar la D-fructosa como material quiral de partida, con el fin de aprovechar su esqueleto carbonado, funcionalización e información quiral, que será transferida a la molécula diana.

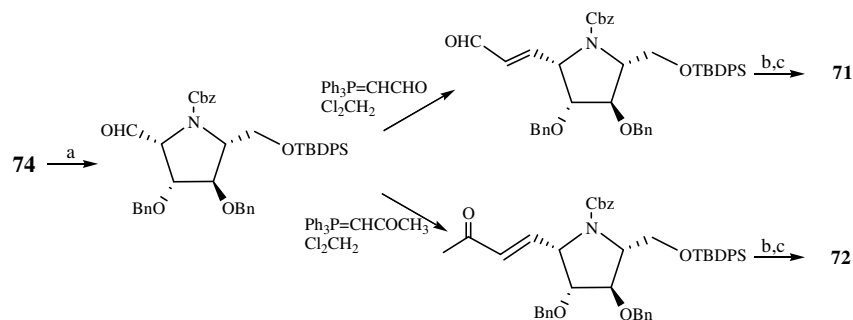


En primer lugar, el derivado diacetinado de la fructosa **73**, se transforma en la pirrolidina DGDP (2,5-didesoxi-2,5-imino-D-glucitol), adecuadamente protegida (**74**), para ser utilizada posteriormente, según se indica en el siguiente esquema.



a) NaH, THF, BrBn; b) AcOH-H<sub>2</sub>O 60%, 45°C; c) Bu<sub>2</sub>SnO, MeOH, después BnBr, DMF; d) i) MsCl, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, Et<sub>3</sub>N; ii) N<sub>3</sub>Na, DMF; e) ATFA-H<sub>2</sub>O 70%; f) TBDPSCl, imidazol, DMF; g) H<sub>2</sub>, Ni-Raney; h) CbzCl, MeOH, Et<sub>3</sub>N.

Esta pirrolidina **74**, es un intermedio clave muy versátil para la preparación de hiacintacinas, ya que el alargamiento de la cadena por la posición 5', empleando la metodología de Wittig, nos va a permitir sintetizar **71** y **72** utilizando el iluro adecuado.

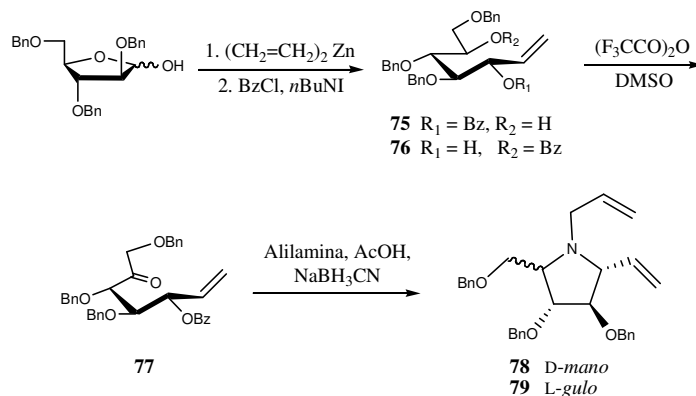


a) TPAP, TM 4Å, NMO, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>; b) H<sub>2</sub>, Pd-C 10%; c) i) Bu<sub>4</sub>NF, THF; ii) H<sub>2</sub>, Pd-C 10%, HCl; iii) Amberlita IRA 400 (ciclo OH), MeOH.

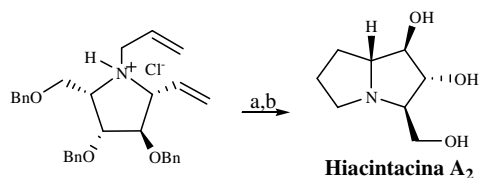
### 2.2.2.2.- Síntesis de (+)-hiacintacina A<sub>2</sub> (10)

O. R. Martin *et al.*<sup>37</sup> en 2001, describen la primera síntesis de la (+)-hiacintacina A<sub>2</sub> natural, utilizando como fuente de quiralidad la 2,3,4-tri-*O*-bencil-*D*-arabinosa. Ésta comienza por una adición altamente estereoselectiva de divinilzinc al azúcar, seguida de una benzoilación regioselectiva del grupo hidroxilo alílico, obteniéndose mayoritariamente el benzoato intermedio **75**. La mezcla no separable de **75** y **76** se somete a oxidación dando la cetona **77** que se purifica por cromatografía. El tratamiento de **77** con alilamina, cianoborohidruro sódico y ácido acético, permite, después de 6 días, obtener los compuestos **78** y **79** en una proporción de 3:1, siendo el mayoritario el de configuración *D*-*mano*. Este proceso implica una aminación reductora, en primer lugar, y un posterior desplazamiento nucleofílico del benzoato alílico.

<sup>37</sup> Rambaud, L.; Compain, P.; Martin, O.R. *Tetrahedron: Asymmetry*, **2001**, *12*, 1807.



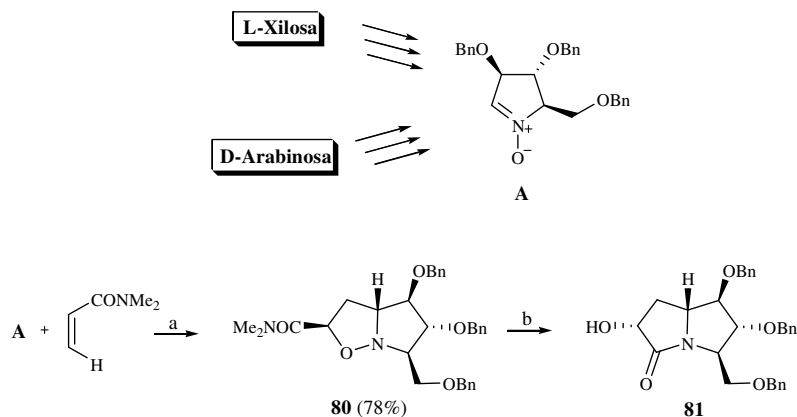
La mezcla de **78** y **79** en forma de clorhidratos se somete a una reacción de metátesis con cierre de anillo, obteniéndose la pirrolizidina deseada con un 30% de rendimiento. Finalmente, la hidrogenación catalítica produce la desprotección de los grupos hidroxilo y la reducción del doble enlace, para dar la hiacintacina **A<sub>2</sub>**.



a) Cat. Grubbs; b) H<sub>2</sub>, Pd-C 10%.

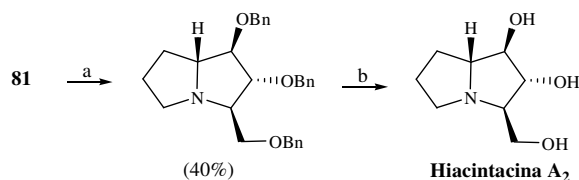
Una segunda síntesis descrita para la hiacintacina **A<sub>2</sub>**, se ha publicado en 2003 por A. Goti *et al.*<sup>38</sup>, los cuales usan L-xilosa y D-arabinosa como materiales quirales de partida. La síntesis transcurre a través de una nitrona quiral trisustituida **A**, que se hace reaccionar con la *N,N*-dimetilacrilamida en un proceso de cicloadición 1,3-dipolar.

<sup>38</sup> Cardona, F.; Faggi, E.; Liguori, F.; Cacciarini, M.; Goti, A. *Tetrahedron Lett.*, **2003**, *44*, 2315.



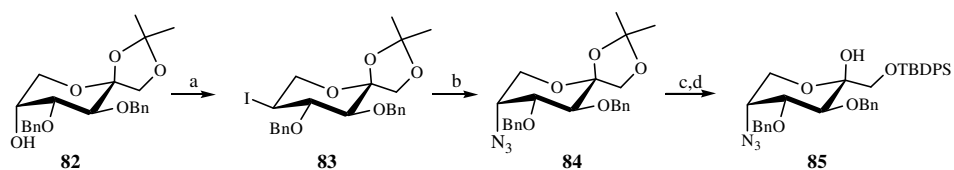
a)  $\text{Cl}_2\text{CH}_2$ , t.a; b) Zn, AcOH.

La pirroloisoxazolidina **80**, se forma con una alta estereoselectividad, y se transforma en la lactama **81** mediante una rotura reductiva del enlace N-O. El grupo hidroxilo en **81** se convierte en mesilato y a continuación, el producto obtenido, se reduce con hidruro de aluminio y litio para dar la pirrolizidina protegida, cuya hidrogenación catalítica da, finalmente, la hiacintacina  $\text{A}_2$ .



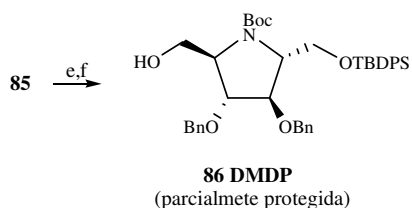
a) i) MsCl; ii)  $\text{LiAlH}_4$ ; b)  $\text{H}_2$ , Pd-C 10%.

En el mismo año 2003, se describe<sup>23c</sup> por parte de nuestro grupo una tercera síntesis para la hiacintacina  $\text{A}_2$ , siguiendo la estrategia anteriormente comentada, que implica utilizar la D-fructosa como material quiral de partida. Como ya se ha indicado en el apartado 2.2.2.1. (pag. 31) se prepara el derivado **82**, a partir de la D-fructosa. Este compuesto se transforma en 5-azido-3,4-di-O-bencil-5-desoxi-1,2-O-isopropilidén-β-D-fructopiranososa (**84**) a través del correspondiente 5-yodo derivado **83** mediante una doble sustitución nucleofílica bimolecular, según se indica en el siguiente esquema.



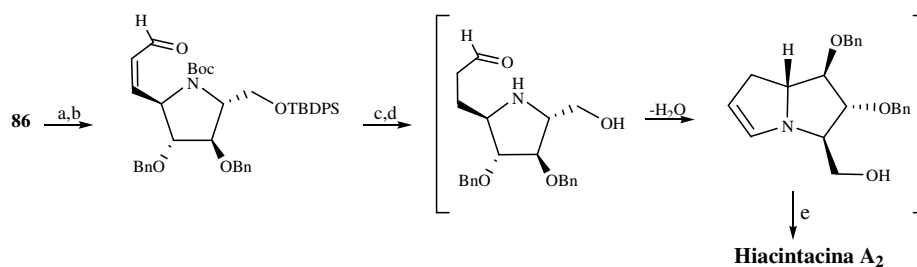
a)  $\text{Ph}_3\text{P}$ ,  $\text{I}_2$ , imidazol, DMF,  $\Delta$ ; b)  $\text{NaN}_3$ , DMF,  $\Delta$ ; c) TFA- $\text{H}_2\text{O}$  70%; d) TBDPSCI, imidazol, DMF.

Siguiendo una ruta sintética similar a la anterior, se obtiene la DMDP (2,5-didesoxi-2,5-imino-D-manitol) adecuadamente protegida **86**, para ser utilizada en la etapa siguiente.



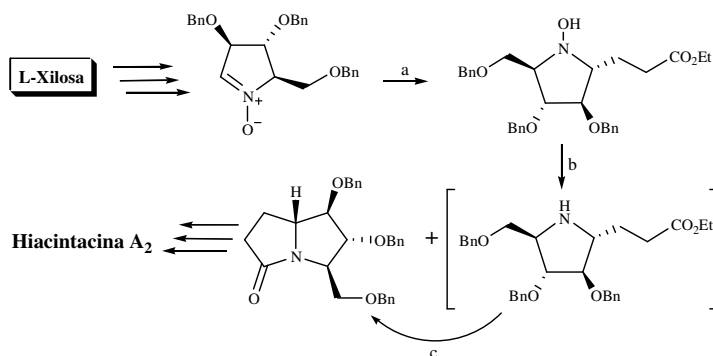
e)  $\text{H}_2$ , Ni-Raney; f)  $(t\text{-BuOCO})_2\text{O}$ , TEA,  $\text{Cl}_2\text{CH}_2$ .

A partir de la pirrolidina **86** se lleva a cabo el alargamiento de la cadena en el C-5', seguido de una aminación reductora intramolecular, para finalmente obtener la hiacintacina  $\text{A}_2$ , una vez eliminados los grupos protectores.



a) TPAP, TM 4Å, NMO,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ; b)  $\text{Ph}_3\text{P}=\text{CHCHO}$ , tolueno,  $\Delta$ ; c)  $\text{H}_2$ , Pd-C 10%; d) HCl, después Amberlita IRA-400 (ciclo OH<sup>-</sup>); e)  $\text{H}_2$ , Pd-C 10%, HCl, después Amberlita IRA 400 (ciclo OH<sup>-</sup>).

Por otra parte, en 2005, el grupo de S. Py<sup>39</sup> describe una estrategia para la síntesis de (+)-hiacintacina A<sub>2</sub>, utilizando una metodología similar a la usada por A. Goti, donde emplea una nitrona cíclica obtenida de la L-xilosa, que se utiliza para un proceso de cicloadición 1,3-dipolar con el acrilato de etilo, en presencia de yoduro de samario, según se indica en el esquema siguiente.

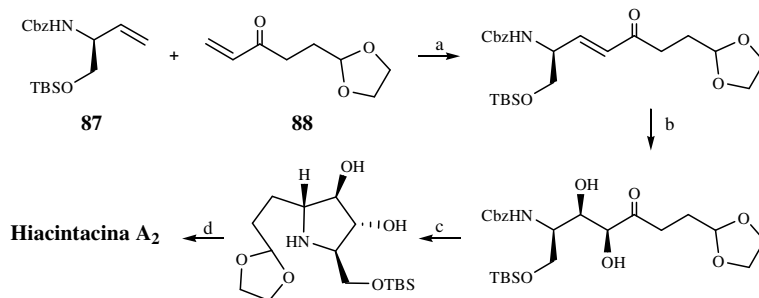


a) Acrilato de etilo, SmI<sub>2</sub> (3 eq.), THF-H<sub>2</sub>O; b) SmI<sub>2</sub> (3 eq.), THF; c) K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, EtOH-H<sub>2</sub>O.

Finalmente, Blechert *et al.*<sup>40</sup> en 2006, describen otra síntesis de la hiacintacina A<sub>2</sub> a través de una reacción de metatesis cruzada (CM), seguida de aminación reductora. La reacción de metatesis cruzada se lleva a cabo entre la (*S*)-alilamina **87** y la enona **88**, para dar la correspondiente olefina de configuración *E* con alta estereoselectividad. En la etapa siguiente se lleva a cabo una dihidroxilación asimétrica de Sharpless generando el diol intermedio que seguidamente cicla a la hiacintacina.

<sup>39</sup> Desvergues, S.; Py, S.; Vallée, Y. *J. Org. Chem.*, **2005**, *70*, 1459.

<sup>40</sup> Dewi-Wülfig, P.; Blechert, S. *Eur. J. Org. Chem.*, **2006**, 1852.

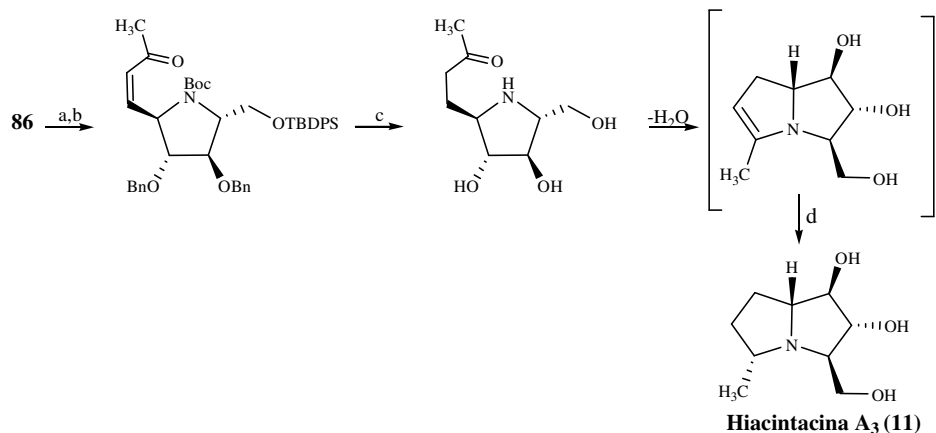


a) cat. [Ru], CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>; b) AD-Mix-β, CH<sub>3</sub>SO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>, K<sub>2</sub>OsO<sub>4</sub>; c) H<sub>2</sub>, Pd-C 10%, MeOH; d) i) cat. HCl; ii) H<sub>2</sub>; después Amberlita (ciclo OH).

### 2.2.2.3.- Síntesis de (+)-hiacintacina A<sub>3</sub> (11)

La primera, y hasta ahora única, síntesis total de la (+)-hiacintacina A<sub>3</sub> natural, ha sido descrita en 2002 por nuestro grupo<sup>23b</sup> siguiendo una ruta ya comentada y altamente estereocontrolada. A partir de la anteriormente mencionada DMDP adecuadamente protegida **86**, se lleva a cabo el alargamiento de la cadena en el C-5' con el correspondiente iluro de la bromo acetona y a continuación se hidrogena en medio ácido con lo que se satura el doble enlace y se eliminan todos los grupos protectores. La neutralización subsiguiente con resina básica permite la ciclación a la enamina intermedia, que en un segundo proceso de hidrogenación produce la (+)-hiacintacina A<sub>3</sub> (**11**). Es de destacar, que este último proceso es altamente estereoselectivo dado que sólo se detecta la presencia de **11**, donde la estereoquímica en C-5 viene determinada por la de C-7a, quedando el grupo metilo en disposición *trans*, respecto al H-7a.

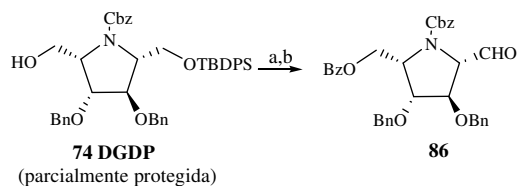




a) TPAP, TM 4Å, NMO, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>; b) Ph<sub>3</sub>P=CHCOCH<sub>3</sub>, tolueno, Δ; c) H<sub>2</sub>, Pd-C 10%, HCl, después Amberlita IRA-400 (ciclo OH<sup>-</sup>); d) H<sub>2</sub>, Pd-C 10%.

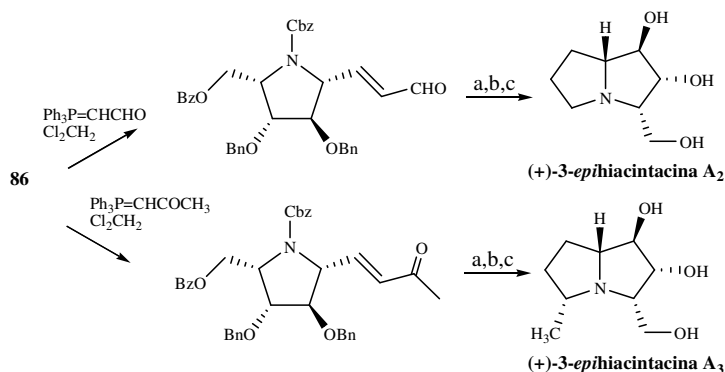
#### 2.2.2.4.- Síntesis de (+)-3-epihiacintacina A<sub>2</sub> y (+)-3-epihiacintacina A<sub>3</sub>

Otros isómeros descritos recientemente por I. Izquierdo *et al.*<sup>23d</sup>, son la (+)-3-epihiacintacina A<sub>2</sub> y (+)-3-epihiacintacina A<sub>3</sub> utilizando la misma estrategia descrita más arriba. En este caso, se emplea la DGDP ortogonalmente protegida **74**, pero el alargamiento de la cadena se lleva a cabo en C-2'. Para ello solo es necesario cambiar de posición los grupos protectores en los hidroximetilos, lo cual requiere dos etapas. La oxidación subsiguiente del grupo hidroximetilo a formilo, permite el posterior alargamiento de la cadena.



a) i) BzCl, TEA, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>; ii) *n*-Bu<sub>4</sub>NF·3H<sub>2</sub>O, THF; b) TPAP, NMO, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, TM 4Å.

El resto de la ruta sintética es análoga a la descrita en el apartado 2.2.2.1. (pag. 29).



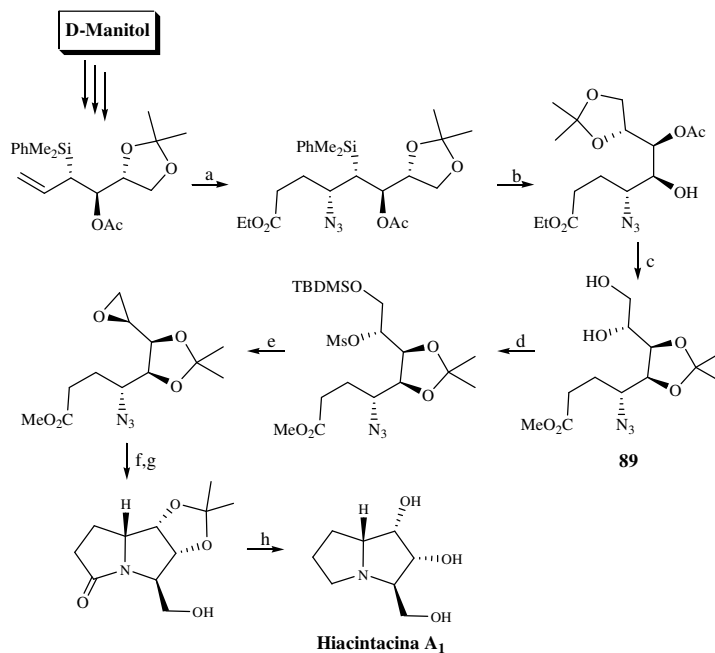
a) H<sub>2</sub>, Pd-C 10%, MeOH; b) MeONa, MeOH; c) H<sub>2</sub>, Pd-C 10%, HCl, después Amberlita IRA-400 (ciclo OH).

### 2.2.2.5.- Síntesis de (+)-hiacintacina A<sub>1</sub>

P. Renaud *et al.*<sup>41</sup> describen en 2005 la primera síntesis total de la hiacintacina A<sub>1</sub>, partiendo de D-manitol como material quiral de partida. El 2,3-*O*-isopropilidén-D-gliceraldehído, obtenido del D-manitol, se transforma en un alilsilano quiral intermedio, que se somete a una reacción de carbooxidación radicalaria como etapa clave. La oxidación del grupo PhMe<sub>2</sub>Si siguiendo el procedimiento de Tamao-Fleming<sup>42</sup>, genera el diol monoacetilado, que se transforma en el intermedio **89**, según se indica en el esquema siguiente. La transformación de **89** en el correspondiente epóxido, permite posteriormente, la doble ciclación al esqueleto de pirrolizidina, a través de un proceso de hidrogenación. Finalmente, la reducción del grupo carbonilo de la lactama intermedia y desprotección de los grupos hidroxilo genera la deseada hiacintacina A<sub>1</sub>.

<sup>41</sup> Chabaud, L.; Landais, Y.; Renaud, P. *Org. Lett.*, **2005**, 7, 2587.

<sup>42</sup> Fleming, I.; Henning, R.; Parker, D.C.; Plaut, H.E.; Sanderson, P.E.J. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*, **1995**, 317.



a)  $\text{EtOCOCH}_2\text{S}(\text{C}=\text{S})\text{OEt}$ ,  $(\text{Bu}_3\text{Sn})_2$ ,  $t\text{-BuON}=\text{NO}t\text{-Bu}$ , benceno,  $\text{PyrSO}_2\text{N}_3$ ; b)  $\text{AcOOH}$ ,  $\text{KBr}$ ,  $\text{AcONa}$ ;  
 c) i) DOWEX (1X10); ii)  $\text{Me}_2\text{C}(\text{OMe})_2$ ,  $p\text{-TsOH}$ ; iii)  $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$ ; d) i)  $\text{TBDMSCl}$ ,  $\text{Pyr}$ ; ii)  $\text{MsCl}$ ,  $\text{Pyr}$ ; e)  
 $\text{TBAF}$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , después  $\text{K}_2\text{CO}_3$ ,  $\text{MeOH}$ ; f)  $\text{H}_2$ ,  $\text{Pd-C}$ ,  $\text{MeOH}$ ; g)  $\text{Et}_3\text{N}$ ,  $\text{MeOH}$ ; h) i)  $\text{LiAlH}_4$ ,  $\text{THF}$ ; ii)  
 $\text{HCl}$ ,  $\text{MeOH}$ , después DOWEX (OH).

## **III. PARTE TEÓRICA**

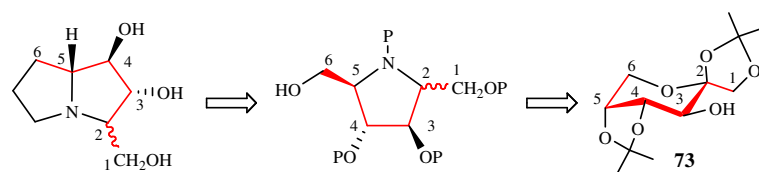


## **3.- PARTE TEÓRICA**

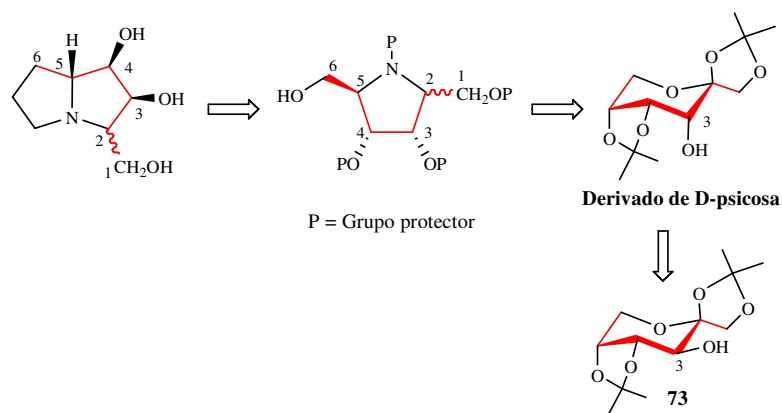
### **3.1.- INTRODUCCIÓN**

El creciente interés mostrado por diferentes grupos, entre ellos el nuestro, por las hiacintacinas está justificado debido a su reciente descubrimiento y a su interesante actividad biológica. De algunas de ellas, aún no se conoce la configuración absoluta del producto natural, dado que no ha sido sintetizado por el momento. Nuestra estrategia sintética se basa, principalmente, en aprovechar el esqueleto, la funcionalización y sobre todo la información quiral de la D-fructosa, una hexulosa natural muy económica, que se transfiere a la molécula diana.

El siguiente esquema retrosintético muestra la interrelación entre las hiacintacinas, las pirrolidinas intermedias, y el derivado diacetinado de la D-fructosa **73**<sup>43</sup>. La numeración que se indica en ambos aza-azúcares es la correspondiente al azúcar, como se puede observar, las configuraciones absolutas de los C-3,4,5 de la misma, quedan determinadas en ambos heterociclos. Sólo queda por determinar la configuración en C-2 de la pirrolidina que, de acuerdo con resultados previos<sup>22</sup>, se genera en un proceso de hidrogenación altamente estereoselectivo.



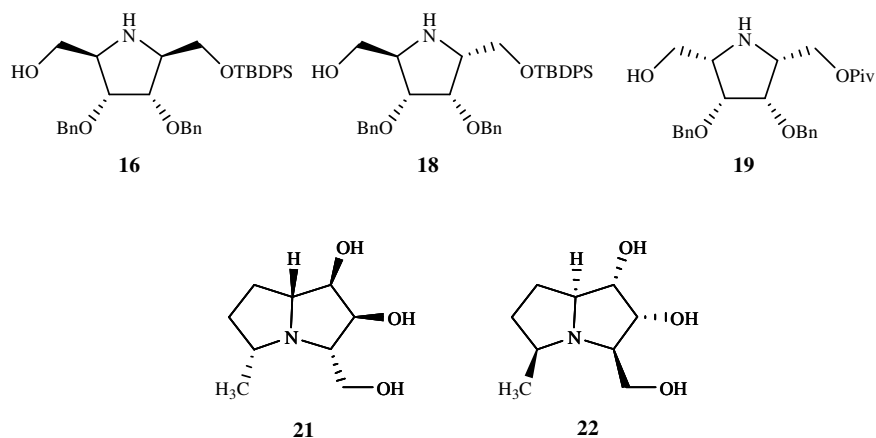
Los buenos resultados, obtenidos hasta ahora, en la aplicación de esta metodología, nos ha animado a hacerla extensiva para la preparación de otras moléculas relacionadas, como son las indicadas en el esquema siguiente y que son el objetivo de la presente Tesis Doctoral.



La diferencia con las anteriores estructuras, estriba en el cambio de configuración del C-3, esto implica el uso de un derivado de la D-psicosa

<sup>43</sup> Brady, R.F. Jr. *Carbohydr. Res.*, **1970**, *15*, 35.

como azúcar de partida, que debe ser obtenido de la asequible D-fructosa. En los apartados siguientes se describirán los pasos seguidos para la preparación de los 2,5-didesoxi-2,5-imino-D-alitol (**16**), -D-altritol (**18**) y -D-galactitol (**19**), ortogonalmente protegidos, y las pirrolizidinas obtenidas a partir de **16**, la (-)-(**21**) y (+)-3-epihiacintacina A<sub>5</sub> (**22**).



### 3.2.- SÍNTESIS DE PIRROLIDINAS POLIHIDROXILADAS

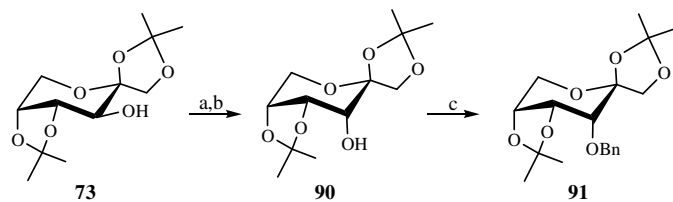
#### 3.2.1.- SÍNTESIS DE 2,5-DIDESOXI-2,5-IMINO-D-ALITOL Y D-ALTRITOL ORTOGONALMENTE PROTEGIDOS **16** y **18**

Para llevar a cabo la preparación de **16** y **18** se requiere, como ya se ha comentado, la inversión en el C-3 de la D-fructosa, para ello se ha comenzado con la ruta más sencilla, que consiste en primer lugar, a partir de **73** invertir la configuración en C-3, mediante un proceso de oxidación seguido de reducción, altamente estereoselectivo, para dar el derivado D-psicosa **90**<sup>44</sup>, que se bencila posteriormente para dar el conocido<sup>45</sup> bencil derivado **91**.

<sup>44</sup> Tipson, R.S.; Brady, R.F. Jr.; West, B.F. *Carbohydr. Res.* **1971**, *16*, 383.

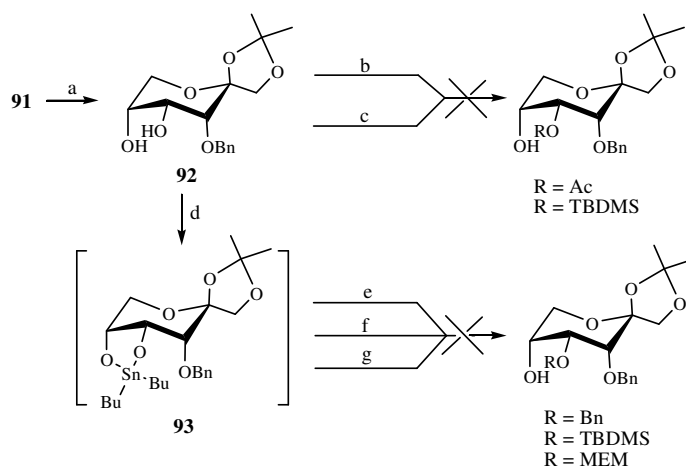
<sup>45</sup> Elliot, R.D.; Niwas, S.; Riordan, J.M.; Montgomery, J.A.; Secrist, J.A. III *Nucleosides & Nucleotides*, **1992**, *11*, 97.





a) PCC,  $\text{Cl}_2\text{CH}_2$ , TM 4Å; b)  $\text{NaBH}_4$ , MeOH; c) NaH, THF, BrBn.

En segundo lugar, la introducción de la función nitrogenada en la posición 5 de **91**, requiere la hidrólisis selectiva del grupo isopropilideno en C-4,5 y la posterior protección regioselectiva del grupo hidroxilo en C-4. Si bien, el primer paso se lleva a cabo sin dificultad para dar **92**, la protección regioselectiva mencionada resulta infructuosa, según se muestra en el siguiente esquema.



a)  $\text{AcOH-H}_2\text{O}$ , 50%; b) acetato de vinilo, Chirazyme®: varias lipasas; c) TBDMSCl, imidazol,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ; d)  $n\text{-Bu}_2\text{SnO}$ , MeOH,  $\Delta$ ; e) ClBn, DMF; f) TBDMSCl, DMF; g) MEMCl, DMF.

Tanto la protección directa en **92**, vía acetilación enzimática o por tratamiento con un agente silanzante, como la protección en dos etapas, a través del 4,5-*O*-di-*n*-butilestannilén derivado **93**, no dan los resultados esperados en cuanto a la regioselectividad requerida (O-4).

Es conocido<sup>46</sup> que la apertura de estos anillos se debe producir por ataque del átomo de oxígeno ecuatorial al reactivo electrofílico. Sin embargo, el tratamiento del intermedio **93** con diferentes electrofilos, da lugar a la mezcla de regioisómeros y en algunos casos, el producto mayoritario es el derivado en O-5 protegido, no deseado.

Estos resultados, no concordantes con los obtenidos en los 4,5-*O*-di-*n*-butilestannilén derivados de la D-fructosa<sup>22a,47</sup>, deben ser consecuencia de un cambio en la conformación de **93**. Este hecho se ha podido poner de manifiesto al realizar el análisis de difracción de Rayos X del compuesto **91**, un análogo estructural de **93**, asumiendo que un cambio del grupo  $\text{Me}_2\text{C}< \rightarrow n\text{-Bu}_2\text{Sn}<$  no debe influir en los resultados de manera significativa. Según se muestra en la Figura 1, la conformación que adopta la molécula es una <sup>3,6</sup>B, donde los enlaces C(4)-O y C(5)-O son paralelos y en consecuencia cualquiera de ellos puede atacar al electrófilo, lo que implica la pérdida de la regioselectividad en la reacción de apertura del anillo de dioxaestannano.

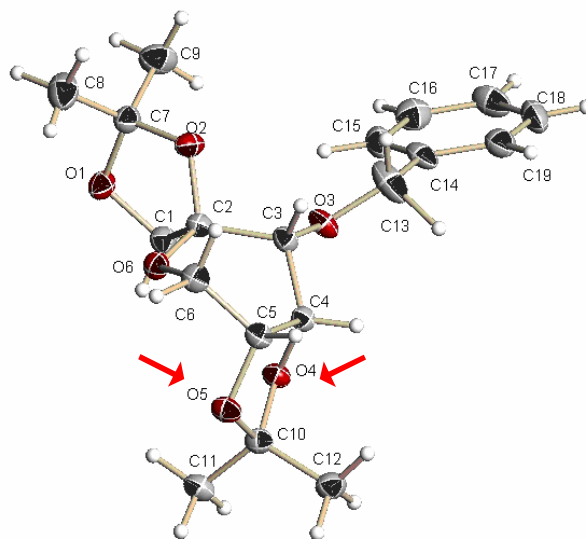


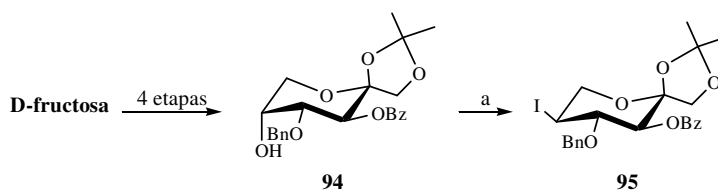
Figura 1. ORTEP del compuesto **91**. Elipsoide termal con 50% de densidad electrónica.

<sup>46</sup> Nashed, M.A.; Anderson, L. *Carbohydr. Res.* **1977**, *56*, 325.

<sup>47</sup> Izquierdo, I.; Plaza, M.T.; Tornel, P.L. *An. Quim.*, **1988**, *84C*, 340.

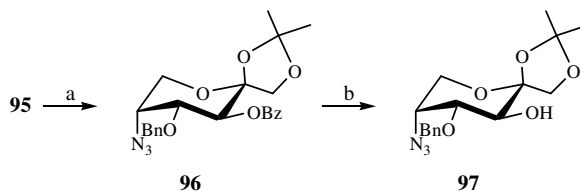
Dada la ineficacia de la ruta anterior, se procede a modificar la estrategia, que consiste en introducir el grupo protector en el hidroxilo de la posición 4 del derivado de la D-fructosa, en primer lugar, y llevar a cabo, posteriormente, la inversión de configuración en C-3.

Así, se utiliza como producto de partida, el conocido 4-*O*-bencil-3-*O*-benzoil-1,2-*O*-isopropilidén- $\beta$ -D-fructopiranososa<sup>47</sup> (**94**), obtenido de la D-fructosa en cuatro etapas. El tratamiento de **94** con los reactivos de Garegg<sup>48</sup> da lugar al 5-desoxi-5-yodo derivado **95**, de configuración  $\alpha$ -L-sorbo, que se hace reaccionar con azida de litio en DMF para producir una S<sub>N</sub>2 en el C-5 y dar lugar al 5-azido-5-desoxi derivado **96**.



a) I<sub>2</sub>, Ph<sub>3</sub>P, imidazol.

Se consigue así, la introducción en la molécula de la necesaria función nitrogenada en C-5 con retención de la configuración. Las etapas siguientes están dirigidas a invertir la configuración en C-3, lo cual requiere la previa desbenzoilación de **96**, por el procedimiento de Zemplen, para dar **97**.

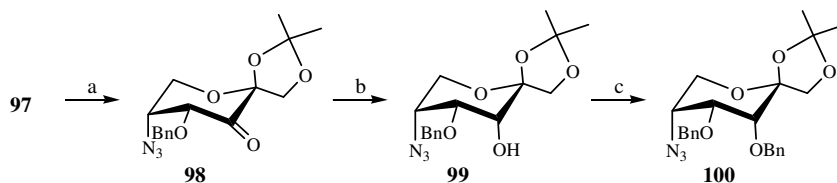


a) LiN<sub>3</sub>, DMF; b) MeONa, MeOH.

La oxidación en **97** a la correspondiente 2,3-diulosa **98**, que no se caracteriza totalmente, permite su posterior reducción, altamente estereo selectiva con borohidruro sódico, al derivado de D-psicosa **99**. La protección

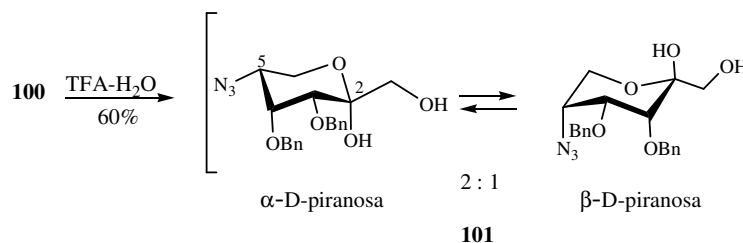
<sup>48</sup> Garegg, P.J.; Samuelsson, B. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, **1980**, 2866.

del grupo hidroxilo en C-3, como bencil éter, da lugar a la molécula **100**, que presenta todos los grupos adecuadamente protegidos para las etapas siguientes.



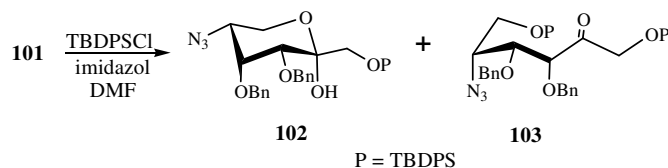
a) Dess-Martin peryodinano,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ; b)  $\text{NaBH}_4$ ,  $\text{MeOH}$ ; c)  $\text{NaH}$ ,  $\text{DMF}$ , después  $\text{BrBn}$ .

La formación de la pirrolidina intermedia requiere la liberación del grupo carbonilo de la ulosa, por lo tanto se procede a una hidrólisis ácida del grupo acetónido generándose la ulosa **101**, como mezcla de anómeros  $\alpha$ - y  $\beta$ -piranosas, en proporción aproximada de 2:1 y en conformación  ${}^5\text{C}_2$  y  ${}^2\text{C}_5$ , respectivamente.



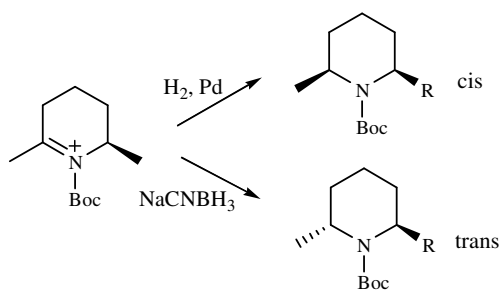
Este resultado se pone de manifiesto en los datos de  ${}^1\text{H}$ - y  ${}^{13}\text{C}$ -RMN, donde se observan las señales de ambos anómeros con diferente intensidad. El  ${}^1\text{H}$ -RMN nos permite identificar el producto mayoritario como el  $\alpha$ -D-piranósico, cuya señal más significativa es el H-6ax que aparece como triplete con una  $J_{6\text{ax},6\text{ec}} = J_{5,6\text{ax}} = 11.4$  Hz, mientras que en el minoritario el H-6ax aparece como doblete con una  $J_{6\text{ax},6\text{ec}} = 12.4$  y  $J_{5,6\text{ax}} = 2.4$  Hz. Este es un resultado predecible, ya que la conformación  ${}^5\text{C}_2$  del anómero  $\alpha$ -D- presenta como factores estabilizantes, tres sustituyentes en disposición ecuatorial y un efecto anomérico, mientras que la conformación  ${}^2\text{C}_5$  del anómero  $\beta$ -D- tiene dos sustituyentes en disposición ecuatorial y un efecto anomérico.

El paso siguiente es la protección regioselectiva del grupo hidroxilo primario con un agente silanizante voluminoso, para lo cual se utiliza *tert*-butildifenilclorosilano.



De esta reacción se obtiene el producto esperado **102** (70%) y una cantidad apreciable del 1,6-di-*O*-silil derivado **103** (26%) que se pueden separar por cromatografía en columna. La transformación de ambos azido derivados, **102** y **103**, en las correspondientes pirrolidinas se puede llevar a cabo por dos procedimientos, bien por hidrogenación catalítica, que implica una reducción del grupo azido a amina, seguida de una aminación reductora intramolecular, todo lo cual transcurre en una sola etapa, o bien, a través de la reacción tandem Staudinger/aza-Wittig, que genera la  $\Delta^1$ -pirrolina correspondiente como un intermedio, que en una posterior etapa se reduce con  $\text{NaCNBH}_3$ .

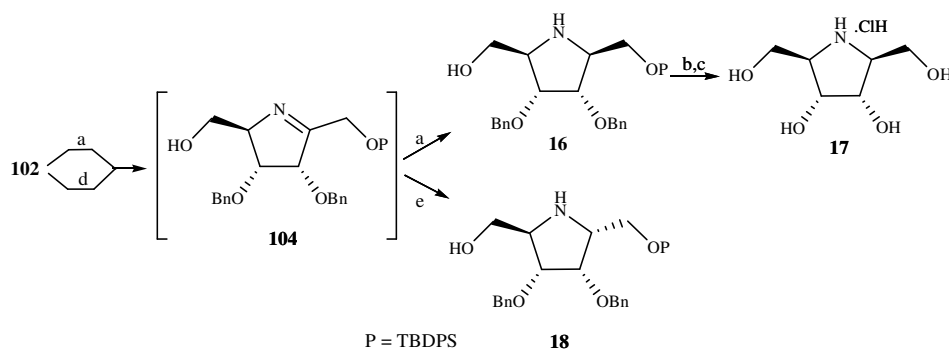
Existen datos previos<sup>49</sup> que indican que, en moléculas similares, los resultados obtenidos con ambos procedimientos son altamente estereoselectivos y que generan isómeros con la estereoquímica contraria, según se indica en el siguiente esquema.



<sup>49</sup> Ciblat, S.; Besse, P.; Canet, J.L.; Troin, Y.; Veschambre, H.; Gelas, J. *Tetrahedron: Asymmetry*, **1999**, *10*, 2225.

Sobre la base de estos resultados, ambos productos, **102** y **103**, se transforman en la correspondientes pirrolidinas por los dos procedimientos indicados, a fin de comparar los resultados, y con el objetivo de obtener las dos pirrolidinas posibles.

Así, el compuesto **102**, cuando de hidrogena en presencia de Ni-Raney da lugar a (2*S*,3*S*,4*R*,5*R*)-3,4-dibenciloxi-2'-*O*-*tert*-butildifenilsilil-2,5-bis(hidroximetil)pirrolidina (**16**), cuya estructura queda confirmada cuando se eliminan todos los grupos protectores para dar la conocida<sup>27</sup> 2,5-didesoxi-2,5-imino-D-alitol (DADP, **17**) como hidrocioruro. El compuesto **17**, dada su simetría, muestra la ausencia de rotación óptica y la mitad de las señales correspondientes en los espectros de RMN.

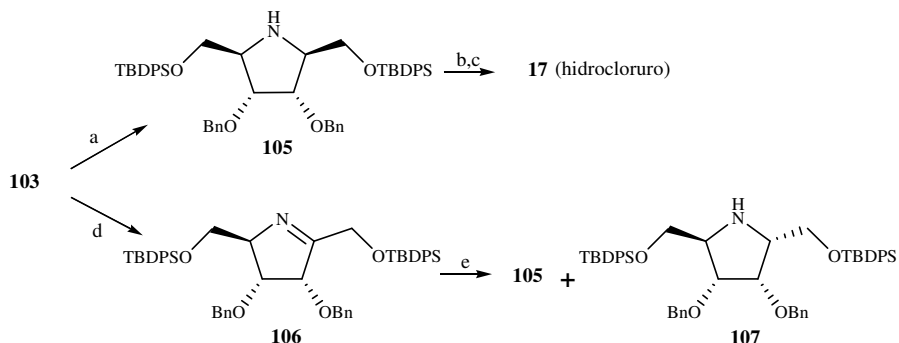


a) H<sub>2</sub>, Ni-Raney, MeOH; b) TBAF.3H<sub>2</sub>O, THF; c) H<sub>2</sub>, Pd-C 10%, MeOH, ClH; d) Ph<sub>3</sub>P, THF, Δ; e) NaCNBH<sub>3</sub>, THF, AcOH, 0°C.

Por el contrario, el tratamiento de **102** con Ph<sub>3</sub>P en THF a reflujo genera la Δ<sup>1</sup>-pirrolina intermedia **104**, que no se aísla dada su inestabilidad, y que es inmediatamente reducida con NaCNBH<sub>3</sub>/AcOH para dar el isómero (2*R*,3*S*,4*R*,5*R*)-3,4-dibenciloxi-2'-*O*-*tert*-butildifenilsilil-2,5-bis(hidroximetil)pirrolidina (**18**), epímero en C-2 de **16**.

Ambos procesos por tanto, son altamente estereoselectivos, y dan como resultado las dos posibles pirrolidinas, derivados de la DADP (**16**) y DALDP (**18**) que, dada su adecuada protección, puede ser utilizadas en la preparación de aza-azúcares más complejos como las hiacintacinas.

Por otra parte, el compuesto **103**, cuando se hidrogena en presencia de Ni-Raney da lugar al isómero (2*R*,3*R*,4*S*,5*S*)-3,4-dibenciloxi-2',5'-di-*O*-*tert*-butildifenilsilil-2,5-bis(hidroximetil)pirrolidina (**105**), que se muestra ópticamente inactivo, y cuyos datos de RMN indican la presencia de un plano de simetría en la molécula. La eliminación de los grupos protectores en **105** genera la ya mencionada, DADP (**17**) como hidrocloreuro.

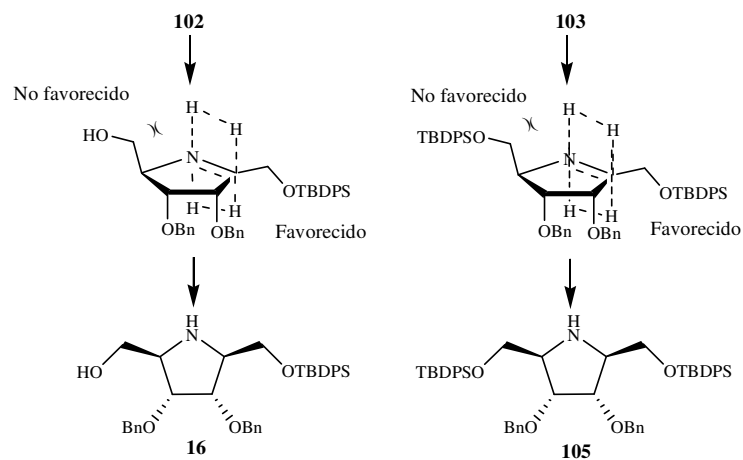


a) H<sub>2</sub>, Ni-Raney, MeOH-THF; b) TBAF.3H<sub>2</sub>O, THF; c) H<sub>2</sub>, Pd-C 10%, MeOH, ClH; d) Ph<sub>3</sub>P, THF, Δ; e) NaCNBH<sub>3</sub>, THF, AcOH, 0°C.

Finalmente, la reacción de Staudinger/aza-Wittig sobre **103** genera la  $\Delta^1$ -pirrolina intermedia **106**, que en este caso se puede purificar e identificar, y cuyo proceso de reducción no resulta tan estereoselectivo, ya que se obtienen las dos posibles pirrolidinas epímeras (2*R*,3*R*,4*S*,5*R*)-3,4-dibenciloxi-2',5'-di-*O*-*tert*-butildifenilsilil-2,5-bis(hidroximetil)pirrolidina (**107**) y **105**, en una proporción de 2:1, que se separan por cromatografía en columna.

La alta estereoselectividad encontrada en la hidrogenación catalítica de ambos compuestos, **102** y **103**, se puede explicar a través de los estados de transición de las correspondientes  $\Delta^1$ -pirrolinas intermedias, que se generan en el proceso de aminación intramolecular, durante el proceso de reducción (ver Figura 2).

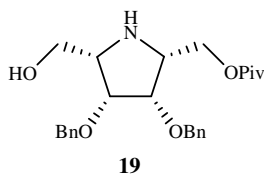
La molécula de H<sub>2</sub> se aproxima en ambos casos por la cara  $\alpha$ , de tal forma que el sustituyente en C-2 queda en disposición *trans* a los sustituyentes en C-3 y C-4. Según este resultado el ataque del hidrógeno se produce por la cara contraria al sustituyente en el C-5.



**Figura 2.** Estados de transición para la hidrogenación catalítica de **102** y **103**.

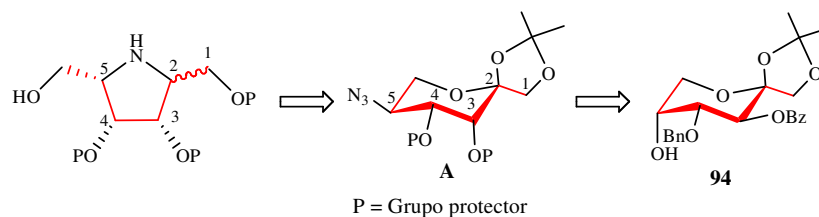
### 3.2.2.- SÍNTESIS DE 2,5-DIDESOXI-2,5-IMINO-D-GALACTITOL ORTOGONALMENTE PROTEGIDO **19**

Otra pirrolidina ortogonalmente protegida que se ha preparado es el derivado de la 2,5-didesoxi-2,5-imino-D-galactitol (**19**).

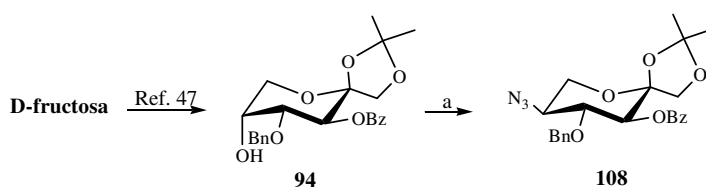


La estereoquímica de esta molécula está relacionada con la 2-ulosa de configuración  $\alpha$ -L-tagato **A**, que se puede preparar del derivado de la D-fructosa **94**, ya utilizado. La configuración en C-2 de la pirrolidina queda indeterminada en el análisis retrosintético, que se muestra más abajo.



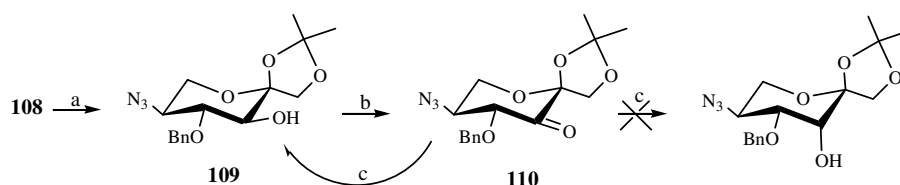


Una primera aproximación llevada a cabo para la preparación del intermedio **A**, consiste en la utilización de **94**, obtenido de la D-fructosa, donde se introduce la función nitrogenada en C-5 con inversión de la configuración, dando lugar al correspondiente 5-azido-5-desoxi- $\alpha$ -L-sorbo derivado **108** para, posteriormente, invertir la configuración en C-3.



a)  $\text{Ph}_3\text{P}$ , DEAD,  $(\text{PhO})_2\text{PON}_3$ , THF.

La preparación del compuesto **108**, se ha llevado a cabo mediante una modificación del procedimiento anteriormente descrito<sup>22a</sup>, que consiste en el tratamiento de **94** con difenilfosforilazida en las condiciones de Mitsunobu<sup>50</sup>, lo que permite acortar la ruta en una etapa. La desbenzoilación de Zemplen genera el correspondiente derivado con el grupo hidroxilo libre en C-3, **109** que se somete a oxidación con el reactivo de Dess-Martin, para dar la 2,3-diulosa **110**.

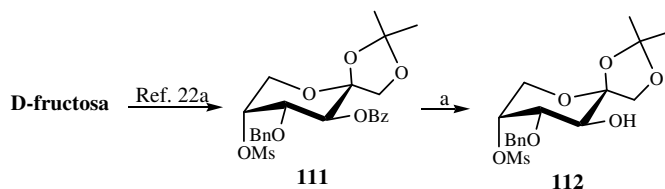


a) NaMeO, MeOH; b) Dess-Martin peryodinano,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ; c)  $\text{NaBH}_4$ , MeOH.

<sup>50</sup> Lal, B.; Pramanick, B.M.; Manhas, M.S.; Bose, A.K. *Tetrahedron Lett.*, **1977**, *18*, 1977.

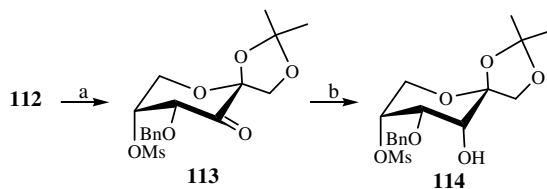
La etapa siguiente, consistente en la reducción de la cetona para obtener el alcohol epímero en C-2 de **109**, resulta infructuosa y se obtiene de manera altamente estereoselectiva el alcohol de partida. Otros intentos de invertir dicha configuración con reactivos de Mitsunobu ( $\text{Bu}_3\text{P}/\text{DEAD}/\text{ácido 3,5-dinitrobenzoico}$ ) dan lugar también al producto de partida exclusivamente. Estos resultados parecen ser consecuencia de la disposición ecuatorial del sustituyente en C-5 del azúcar.

Es necesario, por tanto, modificar la ruta, por lo que se utiliza como material de partida el ya conocido<sup>22a</sup> 4-*O*-bencil-3-*O*-benzoil-5-*O*-metanosulfonil- $\beta$ -D-fructopiranososa (**111**) cuya desbenzoilación genera el correspondiente **112**.



a) NaOMe, MeOH.

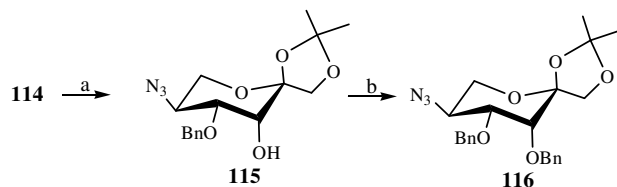
En este caso, el proceso de oxidación a la 2,3-diulosa **113**, seguido de reducción, da exclusivamente el deseado producto de configuración  $\beta$ -D-psicopiranososa **114**, con buen rendimiento y como sólido cristalino.



a) Dess-Martin peryodiano,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ; b)  $\text{NaBH}_4$ , MeOH.

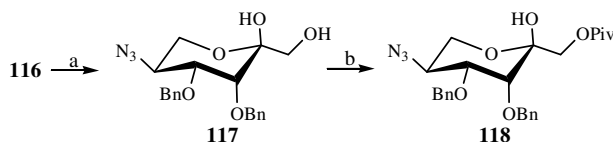
En la etapa siguiente el compuesto **114** se trata con azida de litio para introducir la función azida en C-5, mediante una  $\text{S}_{\text{N}}2$ , dando lugar al derivado **115** que finalmente se bencila para dar **116**. Éste ya tiene la configuración, la funcionalización y protección necesaria, para continuar la ruta.

El cambio de configuración que se produce en el C-3 de **112** para dar **116**, se pone de manifiesto por los valores de las  $J_{3,4}$  en sus correspondientes espectros de  $^1\text{H-RMN}$ , que pasa de 9.8 Hz en **112** a 2.6 Hz en **116**, como consecuencia de la disposición *trans*-diaxial y *cis*-axial ecuatorial que presentan los H-3 y H-4 en ambos compuestos, respectivamente.



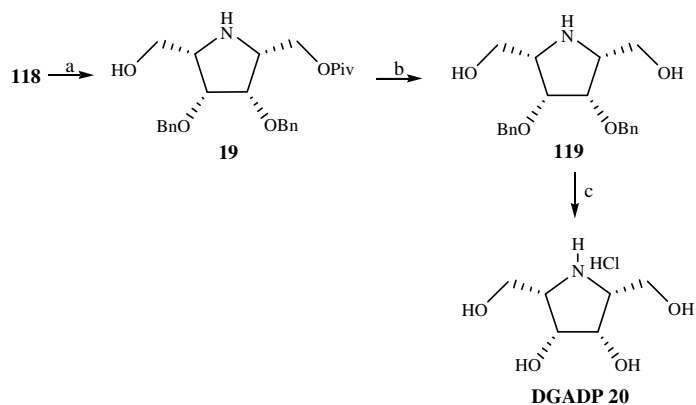
a)  $\text{LiN}_3$ , DMF,  $100^\circ\text{C}$ ; b) NaH, BrBn, DMF.

La desacetoneación en medio ácido de **116**, da lugar a la hexulosa libre **117**, como sólido cristalino y un único anómero,  $\alpha$ -L-tagato en conformación  $^2\text{C}_5$ . Los valores de  $J_{5,6\text{ax}}$  y  $J_{4,5}$  de 11.2 y de 10.0 Hz, respectivamente, indican una disposición *trans*-diaxial para los H-4,5 y 6ax. La protección del grupo hidroxilo primario en **117**, se lleva a cabo con cloruro de pivaloilo, al objeto de ensayar otros grupos protectores voluminosos, dando lugar exclusivamente al derivado deseado **118**.



a) TFA- $\text{H}_2\text{O}$  70%; b) PivCl, TEA,  $\text{Cl}_2\text{CH}_2$ .

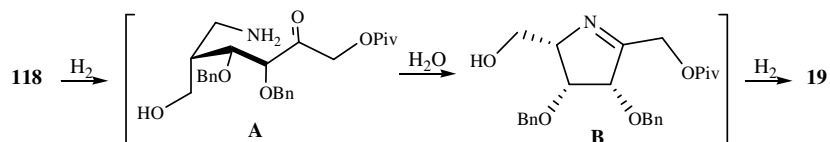
La etapa siguiente es la formación de la correspondiente pirrolidina que se produce mediante una hidrogenación catalítica con Ni-Raney, según se muestra en el siguiente esquema. El proceso tiene lugar con una alta estereo selectividad dando únicamente (2*R*,3*S*,4*R*,5*S*)-3,4-dibenciloxi-2,5-bis(hidroxi metil)-2'-*O*-pivaloilpirrolidina (**19**), cuya estructura queda confirmada al eliminar el grupo pivaloilo de la molécula, ya que se genera una pirrolidina parcialmente protegida **119**, cuyos datos de RMN indican la presencia de un plano de simetría, lo que implica que todos los sustituyentes en ambas pirrolidinas están en disposición *cis* y de aquí una configuración de D-galactitol.



a)  $\text{H}_2$ , Ni-Raney, MeOH; b) NaMeO, MeOH; c)  $\text{H}_2$ , Pd-C 10%, MeOH, HCl.

Finalmente, la total desprotección en **119**, genera el ya conocido<sup>33</sup> 2,5-didesoxi-2,5-imino-D-galactitol (DGADP, **20**) como hidrocloreuro.

La formación de **19** ocurre, al igual que en casos anteriores, a través de una  $\alpha$ -aminourosa intermedia **A**, que condensa a la imina cíclica **B** y, finalmente, la hidrogenación estereocontrolada de ésta.



La entrada de la molécula de hidrógeno se produce, en este caso, por la cara  $\beta$  menos impedida, y por tanto, por la cara contraria al sustituyente en C-5, al igual que ocurre en la formación de la DADP (ver Figura 3).

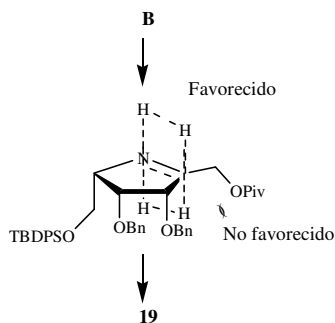
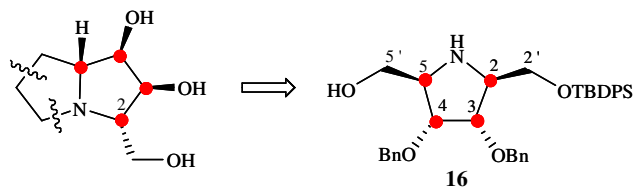


Figura 3. Estado de transición para la hidrogenación catalítica de B.

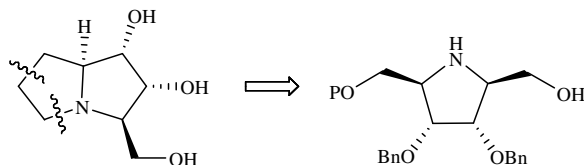
### 3.3.- SÍNTESIS DE PIRROLIZIDINAS POLIHIDROXILADAS

#### 3.3.1.- SÍNTESIS DE (-)- (21) Y (+)-3-EPIHIACINTACINA A<sub>5</sub> (22)

De acuerdo con el esquema retrosintético mostrado en el apartado 3. 1. (Pág. 44), una vez obtenidas las pirrolidinas adecuadamente protegidas, y con las configuraciones determinadas en los cuatro estereocentros, la preparación de las hiacintacinas requiere el alargamiento de la cadena por el grupo hidroximetilo libre (posición 5') con un sintón de dos átomos de carbono y funcionalizado adecuadamente para poder llevar a cabo la segunda ciclación.

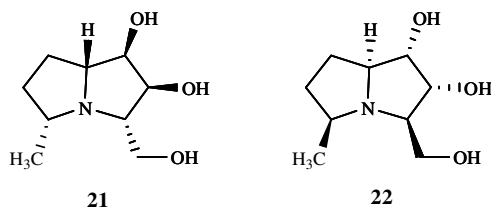


La aplicabilidad de esta metodología puede ser más amplia, ya que la naturaleza de los grupos protectores en la pirrolidina, que pertenecen a diferentes sets ortogonales, permite llevar a cabo una nueva protección en el hidroxilo de la posición 5' y dejar libre el grupo hidroxilo en C-2'. El alargamiento de la cadena por esta posición daría lugar a otras pirrolizidinas isómeras.

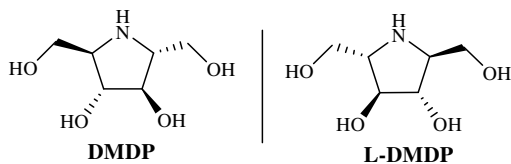


En este caso, dada la simetría de **16** (en ausencia de grupos protectores) ambos procesos dan lugar a pirrolizidinas enantioméricas.

Esta es la estrategia que se ha seguido para la preparación de las (-)- y (+)-3-epihiacintacinas A<sub>5</sub>, **21** y **22**, respectivamente, a partir de **16**.



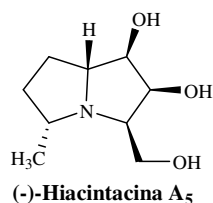
El interés en preparar ambos enantiómeros es debido al hecho de que, en algunos casos, el antípoda óptico sintético presenta una mayor actividad biológica que el producto natural. Este es el caso de la DMDP natural, cuya actividad como inhibidor de la  $\alpha$ -glucosidasa está incrementada, en potencia y especificidad, en su imagen especular sintética, el 2,5-didesoxi-2,5-imino-L-manitol (L-DMDP)<sup>51</sup>. Este hecho se observa también en otros alcaloides pirrolidínicos y piperidínicos polihidroxilados<sup>52</sup>.



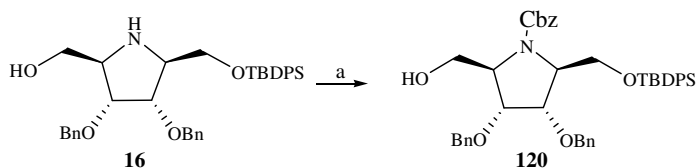
<sup>51</sup> Yu, Ch.Y.; Asano, N.; Ikeda, K.; Wang, M.X.; Butters, T.D.; Wormald, M.R.; Dwek, R.A.; Winters, A.L.; Nash, R.J.; Fleet, G.W.J. *J. Chem. Commun.*, **2004**, 1936.

<sup>52</sup> Blériot, Y.; Gretzke, D.; Krülle, T.M.; Butters, T.D.; Dwek, R.A.; Nash, R.J.; Asano, N.; Fleet, G.W.J. *Carbohydr. Res.*, **2005**, 340, 2713.

En nuestro caso, ninguna de las hiacintacinas **21** y **22** son naturales, **21** es epímero en C-3 de la natural hiacintacina A<sub>5</sub>, aislada de los bulbos de *Scilla sibirica* (*Liliaceae*)<sup>17a</sup> y que es un moderado inhibidor (IC<sub>50</sub> 110 μM) de amiloglucosidasa. Dado que no hay descrita, por el momento, ninguna síntesis para la (-)-hiacintacina A<sub>5</sub>, su configuración absoluta no está actualmente determinada, aunque se ha formulado, por parte de los autores que la han aislado e identificado, como se indica en la Figura.

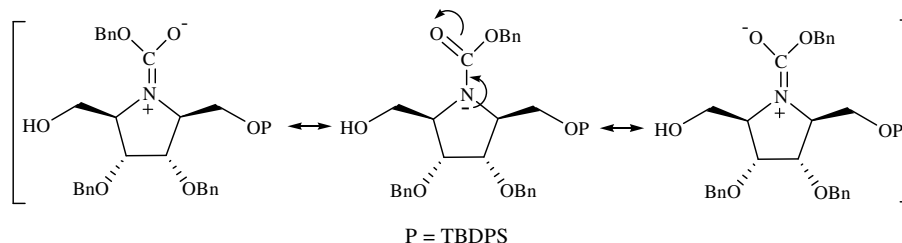


Nuestra ruta sintética para obtener la hiacintacina **21**, utiliza la pirrolidina **16**, anteriormente descrita, como material de partida. La *N*-protección en **16**, se lleva a cabo con clorocarbamato de bencilo en acetona seca, en presencia de carbonato potásico para dar **120**.



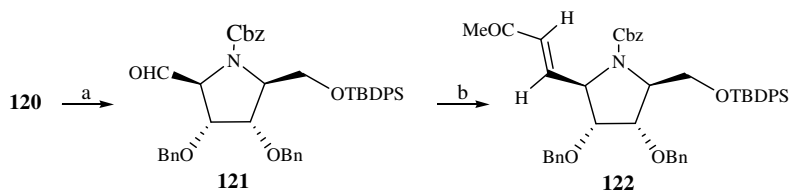
a) CbzCl, Me<sub>2</sub>CO, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>.

La presencia del grupo carbamato, tanto en **120**, como en el resto de los intermedios que se forman a lo largo de la ruta, complica los espectros de RMN, debido a la presencia de rotámeros en dichos compuestos, según se indica en el siguiente esquema.



Este es un hecho generalizado en este tipo de compuestos, observado anteriormente por nosotros<sup>23</sup> y por otros autores<sup>53</sup>.

El compuesto **120** se trata con perrutenato de tetra-*n*-propilamonio y *N*-metilmorfolina *N*-óxido, para oxidar el grupo hidroximetilo a formilo dando **121**, que no se identifica totalmente, si bien su espectro de IR muestra la banda característica del grupo formilo a 1735 cm<sup>-1</sup>.



a) TPAP, NMO, Cl<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>, TM 4Å; b) Ph<sub>3</sub>P=CHCOCH<sub>3</sub>, tolueno, Δ.

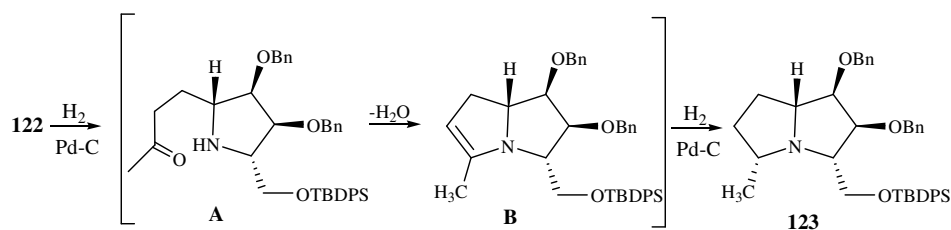
En la etapa siguiente se lleva a cabo el alargamiento de la cadena aplicando la metodología de Wittig. Así, el compuesto **121** se trata con acetilmetiléntrifenilfosforano en tolueno a reflujo, obteniéndose la correspondiente olefina **122** de configuración *E*, también como mezcla de rotámeros según se puede apreciar en sus espectros de <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C-RMN. La configuración *E* se establece sobre la base de las señales que se observan en el <sup>1</sup>H-RMN, entre otras, dos dobletes anchos a 6.26 y 6.12 ppm con una *J*<sub>3,4</sub> de 16.0 y 15.6 Hz, que corresponden al H-3 de ambos rotámeros.

Obtenida la olefina **122**, sólo es necesaria una hidrogenación catalítica para producir el esqueleto de pirrolizidina. Según se muestra en el siguiente esquema, la hidrogenación produce la saturación del doble enlace y la eliminación del grupo carbamato para dar la cetona intermedia **A**, que cicla

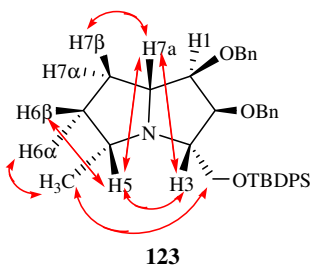
<sup>53</sup> Aamlid, K.H.; Hough, L.; Richardson, A.C. *Carbohydr. Res.*, **1990**, 202, 117.



espontáneamente a través de una condensación intramolecular a la enamina **B**, cuya hidrogenación, finalmente, genera la pirrolizidina **123**.



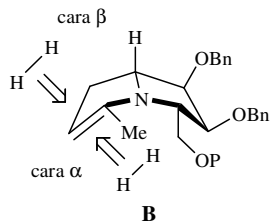
En este último paso se genera un nuevo estereocentro en C-5 de la pirrolizidina, sin embargo, sólo se detecta la presencia de un estereoisómero, el compuesto **123**. La configuración de este nuevo centro estereogénico se establece sobre la base de experiencias NOE. En la Figura 4 se muestra las interacciones que se producen entre los diferentes átomos de hidrógeno en la molécula.



**Figura 4.** Interacciones NOE en el compuesto **123**.

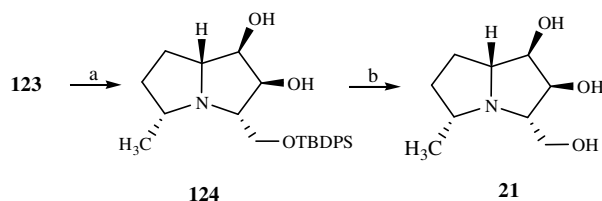
Así, las interacciones que aparecen entre los H-3, H-5, H-7a y, por otra parte, entre el Me en C-5 y los H-8, son determinantes para deducir una configuración *R* para el C-5 en **123**. Por otra parte, las demás interacciones NOE nos permiten distinguir y asignar los H-6 $\alpha$ , 6 $\beta$ , 7 $\alpha$  y 7 $\beta$ .

Este resultado indica que la hidrogenación de la enamina **B** se produce de acuerdo con resultados previos<sup>23b,d</sup>, por la cara  $\beta$ , menos impedida, en la conformación preferente que adoptan estas moléculas<sup>16,17</sup> y que se representa en la Figura 5.



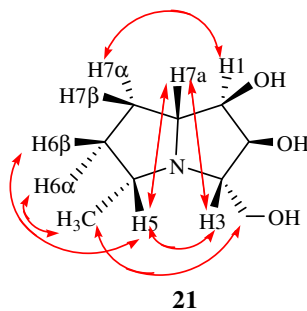
**Figura 5.** Estereoquímica en la hidrogenación de la enamina **B**.

La eliminación de los grupos protectores en **123**, llevada a cabo en dos etapas, da lugar finalmente a la (-)-3-epihiacintacina A<sub>5</sub> (**21**).



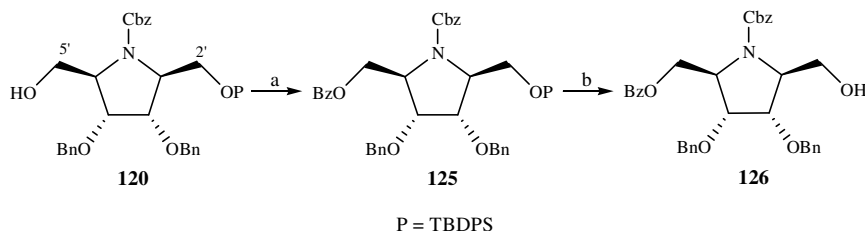
a) H<sub>2</sub>, Pd-C 10%, MeOH, ClH, después Amberlita IRA-400 (OH); b) TBAF·3H<sub>2</sub>O, THF.

La estructura de **21** está de acuerdo con todos sus datos analíticos y espectroscópicos y es determinante, de nuevo, los resultados de los experimentos NOE realizados en este compuesto, que se muestran en la Figura 6 y confirman todas las configuraciones absolutas.



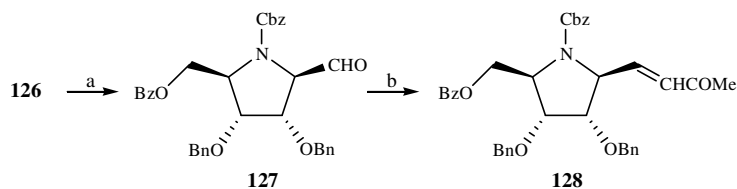
**Figura 6.** Interacciones NOE en el compuesto **21**

Para la preparación de la antípoda óptica de **21** (hiacintacina **22**) partimos de nuevo de la pirrolidina **120**, donde se lleva a cabo la protección del grupo hidroxilo en C-5', mediante una benzoilación convencional, y se libera el que se encuentra C-2', dando lugar a una nueva pirrolidina adecuadamente protegida, **126**, para aplicar la metodología ya comentada.



a) BzCl, Cl<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>, TEA, DMAP; b) TBAF·3H<sub>2</sub>O, THF.

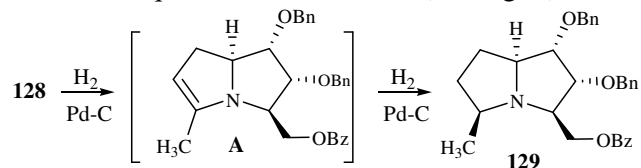
La oxidación de **126** (TPAP/NMO) da el correspondiente aldehído **127**, que se somete a una reacción de Horner-Wadsworth-Emmons (HWE) con (2-oxopropil)fosfonato de dietilo, en presencia de hidruro sódico, para dar la olefina **128**. En este caso, no se ha podido determinar la configuración del doble enlace debido a las señales anchas que presentan los H-3 y H-4 en el espectro de <sup>1</sup>H-RMN. Este hecho es intrascendente, dado que el paso siguiente en la ruta sintética es la hidrogenación catalítica de **128** para saturar dicho doble enlace, entre otros procesos.



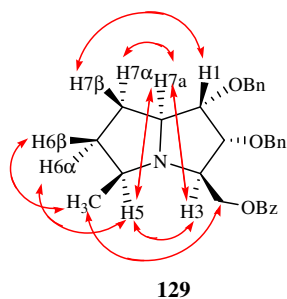
a) TPAP, NMO, Cl<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>, TM 4Å; b) (EtO)<sub>2</sub>POCH<sub>2</sub>COMe, NaH, THF.

La transformación de **128**, tiene lugar, como en el caso anterior, a través de la enamina intermedia **A** que se hidrogena, de manera altamente estereoselectiva, para dar una única pirrolizidina, (1*S*,2*R*,3*R*,5*S*,7*aS*)-1,2-dibenciloxi-3-benziloximetil-5-metilpirrolizidina (**129**), donde la configura

ción absoluta del C-5 se establece, como en los casos anteriores, con la ayuda de los experimentos NOE que se realizan en **129** (ver Fig. 7).

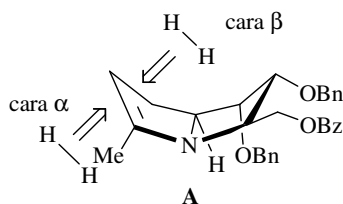


Los efectos NOE entre H-3, H-5 y H-7a, y por otro lado, de Me-5 con los H-8,8', indican claramente una configuración *S* para C-5. El resto de las interacciones nos permiten también asignar los H-6 $\alpha$ , 6 $\beta$ , 7 $\alpha$  y 7 $\beta$ .



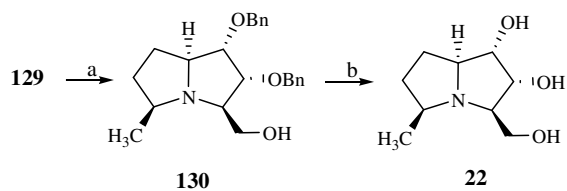
**Figura 7.** Interacciones NOE en el compuesto **129**.

Este resultado sólo es compatible con una hidrogenación estereoselectiva de la enamina **A**, en su conformación más estable, producida por la cara  $\alpha$ , más accesible, según se indica en la Figura 8.



**Figura 8.** Estereoquímica en la hidrogenación de la enamina **A**.

La eliminación de los grupos protectores en **129**, da lugar, finalmente, a la (+)-3-epihiacintacina A<sub>5</sub> (**22**).



a) MeONa, MeOH; b) H<sub>2</sub>, Pd-C 10%, MeOH, ClH, después Amberlita IRA 400 (OH<sup>-</sup>).

Como se puede observar, tanto en la formación de **21** como en la de **22**, se ha producido la hidrogenación de tal manera que el grupo metilo en C-5 queda en disposición *trans* al H-7a, por lo que este dato, apoyado por resultados previos<sup>23</sup>, permite deducir que la configuración en C-7a determina la de C-5, en este tipo de compuestos.

## **IV.- EXPERIMENTAL**



## **4.- EXPERIMENTAL**

### **4.1.- MÉTODOS GENERALES**

Los puntos de fusión se han determinado con un aparato Gallenkamp y están sin corregir. Las soluciones se han secado sobre  $\text{MgSO}_4$  anhidro y se han concentrado bajo presión reducida. Los espectros de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  RMN se han registrado en espectrómetros Bruker AMX-300, AM-300, ARX-400 y AMX-500, en solución de  $\text{CDCl}_3$  (patrón interno  $\text{Me}_4\text{Si}$ ). Los espectros de IR han sido registrados con un espectrofotómetro Perkin-Elmer FTIR Spectrum One, las medidas de UV-vis se realizaron en un Spectronic<sup>®</sup> Genesys, los espectros de masas con espectrómetros Micromass Modelos Platform II y Autospec-Q. Las rotaciones ópticas se han medido para soluciones de  $\text{CHCl}_3$  (tubo 1-dm) con un polarímetro Jasco DIP-370. Las cromatografías en capa fina se han



realizado sobre sílica gel 60 F<sub>254</sub> soportado en láminas de aluminio y se ha empleado como revelador H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> en etanol (5% en vol.) así como un revelador específico para aminas: molibdato amónico (10% p/v) en una solución de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> acuoso al 10% que contiene sulfato de cerio tetrahidrato al 0.8% (p/v). Las cromatografías en columna se han realizado sobre sílica gel (Merck, 7734). Los compuestos no cristalinos para los que no se han realizado sus análisis elementales muestran homogeneidad en cromatografía y se han caracterizado por I.R., R.M.N. y espectrometría de masas.

## 4.2.- SÍNTESIS DE PIRROLIDINAS POLIHIDROXILADAS

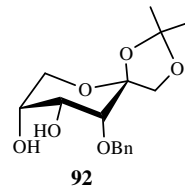
### 4.2.1.- SÍNTESIS DE 2,5-DIDESOXI-2,5-IMINO-D-ALITOL Y D-ALTRITOL ORTOGONALMENTE PROTEGIDOS 16 Y 18

#### 4.2.1.1.- Síntesis de 3-*O*-bencil-1,2-*O*-isopropilidén-β-D-psicopiranos (92)

Una solución de 3-*O*-bencil-1,2:4,5-di-*O*-isopropilidén-β-D-psicopirano sa<sup>45</sup> (**91**, 3.50 g, 10 mmol) en ácido acético acuoso al 75% (50 mL) se calienta a 45°C durante 2 h. La c.c.f. (éter) revela un nuevo compuesto de mayor movilidad. La mezcla se concentra, se codestila con agua varias veces y después se disuelve en etanol (60 mL), se neutraliza con K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> y se concentra. El residuo se cromatografía en columna (éter-hexano, 1:1) para dar **92** (2.50 g, 79%) como sirupo.

[α]<sub>D</sub><sup>27</sup> -90 (*c* 1)

IR: ν<sub>max</sub><sup>film</sup> 3484 y 3451 (OH), 3031 (aromáticos), 1373 y 1245 (CMe<sub>2</sub>), 745 y 700 cm<sup>-1</sup> (aromáticos).



#### Datos de RMN:

<sup>1</sup>H (400 MHz): δ 7.33 (m, 5H, Ph), 4.86 y 4.69 (2d, 2H, *J* 11.3 Hz, CH<sub>2</sub>Ph), 4.06 y 3.80 (2d, 2H, *J*<sub>1,1'</sub> 9.3 Hz, H-1,1'), 3.96 (t, 1H, *J*<sub>3,4</sub> = *J*<sub>4,5</sub> = 3.5 Hz, H-4), 3.96 (dd, 1H, *J*<sub>5,6</sub> 2, *J*<sub>6,6'</sub> 12.3 Hz, H-6), 3.86 (dd, 1H, *J*<sub>5,6'</sub> 2.3 Hz, H-6'), 3.74 (m, 1H, H-5), 3.66 (d ancho, 1H, H-3), 2.60 (s ancho, 2H, HO-4,5), 1.47 y 1.35 (2s, 6H, CMe<sub>2</sub>).

$^{13}\text{C}$ :  $\delta$  137.15, 128.69, 128.38 y 128.16 ( $\text{PhCH}_2$ ), 112.06 ( $\text{CMe}_2$ ), 104.88 (C-2), 80.99 (C-3), 76.02 (C-1), 73.27 ( $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 69.28 y 67.43 (C-4,5), 65.33 (C-6), 26.78 y 26.29 ( $\text{CMe}_2$ ).

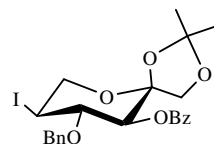
**EM:**  $m/z$  333.1319 [ $\text{M}^+\text{Na}$ ]. Calculado para  $\text{C}_{16}\text{H}_{22}\text{O}_6\text{Na}$  333.1314 (desviación -1.5 ppm).

#### 4.2.1.2.- Síntesis de 4-*O*-bencil-3-*O*-benzoil-5-desoxi-1,2-*O*-isopropilidén-5-yodo- $\alpha$ -L-sorbopiranososa (**95**)

A una solución de trifenilfosfina (8.82 g, 33.62 mmol), imidazol (4.57 g, 67.20 mmol), y yodo (8.52 g, 33.57 mmol) en tolueno seco (120 mL), se le añade una solución de 4-*O*-bencil-3-*O*-benzoil-1,2-*O*-isopropilidén- $\beta$ -D-fructopiranososa<sup>47</sup> (**94**, 6.95 g, 17.79 mmol) en el mismo disolvente (50 mL) y la mezcla se calienta a 110°C durante 2 h. La c.c.f. (éter-hexano, 3:2) revela un producto de mayor  $R_f$ . La mezcla de reacción se enfría, se lava con tiosulfato sódico al 10%, salmuera y después se concentra. El residuo se cromatografía en columna (éter-hexano, 1:3) para dar **95** (6.7 g, 76%) como sólido cristalino.

**P. Fusión:** 166-168°C (de éter)

$[\alpha]_D^{26}$  -64.5 (c 1.1)



**IR:**  $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$  3033 (aromáticos), 1727 (ester), 1382 y 1274 ( $\text{CMe}_2$ ), 713 y 693  $\text{cm}^{-1}$  (aromáticos).

#### Datos de RMN:

$^1\text{H}$  (300 MHz):  $\delta$  8.10-8.07, 7.63-7.58, 7.49-7.44, y 7.17-7.10 (4m, 10H, 2 Ph), 5.30 (d, 1H,  $J_{3,4}$  8.8 Hz, H-3), 4.84 y 4.59 (2d, 2H,  $J$  10.1 Hz,  $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 4.22-3.92 (m, 4H, H-4,5,6<sub>ax</sub>,6<sub>ec</sub>), 3.97 y 3.92 (2d, 2H,  $J_{1,1'}$  9.3 Hz, H-1,1'), 1.52 y 1.43 (2s, 6H,  $\text{CMe}_2$ ).

$^{13}\text{C}$  (*inter alia*):  $\delta$  165.56 ( $\text{COPh}$ ), 112.52 ( $\text{CMe}_2$ ), 104.93 (C-2), 81.88 (C-3), 75.57 (C-1), 72.67 (C-4), 71.88 ( $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 66.20 (C-6), 26.77 y 26.30 ( $\text{CMe}_2$ ) y 25.57 (C-5).

Anal. Elem.: para C<sub>23</sub>H<sub>25</sub>IO<sub>6</sub>

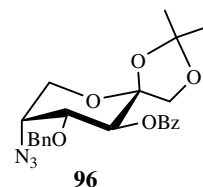
	Calculado	Encontrado
% C	52.68	53.21
% H	4.81	5.04

#### 4.2.1.3.- Síntesis de 5-azido-4-O-bencil-3-O-benzoil-5-desoxi-1,2-O-isopropilidén-β-D-fructopiranososa (**96**)

Una solución de **95** (3 g, 5.72 mmol) y azida de litio (0.84 g, 17.1 mmol) en DMF seca (25 mL) se calienta a 100°C durante 6 h con agitación. La c.c.f. (éter-hexano, 3:2) revela la presencia de un compuesto de menor movilidad. La mezcla se concentra hasta un residuo que se disuelve en éter (40 mL), se lava con salmuera y posteriormente se concentra. La cromatografía en columna (éter-hexano, 1:1) del residuo da **96** (2.5 g, 99%) como un sirupo incoloro.

[α]<sub>D</sub><sup>26</sup> -127 (c 0.7)

IR:  $\nu_{\max}^{\text{film}}$  3033 (aromáticos), 2105 (N<sub>3</sub>), 1724 (COPh), 1372 (CMe<sub>2</sub>), 710 cm<sup>-1</sup> (aromáticos).



#### Datos de RMN:

<sup>1</sup>H (300 MHz): δ 8.08-8.06, 7.63-7.57, 7.49-7.44 y 7.22-7.17 (4m, 10H, 2 Ph), 5.64 (d, 1H, *J*<sub>3,4</sub> 9.9 Hz, H-3), 4.65 y 4.58 (2d, 2H, *J* 12.1 Hz, CH<sub>2</sub>Ph), 4.12 (dd, 1H, *J*<sub>4,5</sub> 3.8 Hz, H-4), 4.02 y 3.94 (2d, 2H, *J*<sub>1,1'</sub> 9.3 Hz, H-1,1'), 4.00-3.94 (m, 2H, H-5,6), 3.76 (dd, 1H, *J*<sub>5,6'</sub> 2, *J*<sub>6,6'</sub> 13 Hz, H-6'), 1.47 y 1.37 (2s, 6H, CMe<sub>2</sub>).

<sup>13</sup>C (*inter alia*): δ 165.80 (COPh), 112.22 (CMe<sub>2</sub>), 104.87 (C-2), 76.83 (C-3), 72.49 y 71.97 (C-1 y CH<sub>2</sub>Ph), 68.93 (C-4), 62.26 (C-6), 59.86 (C-5), 26.66 y 26.27 (CMe<sub>2</sub>).

EM: *m/z* 462.1640 [M<sup>+</sup>+Na]. Calculado para C<sub>23</sub>H<sub>25</sub>N<sub>3</sub>O<sub>6</sub>Na 462.1641

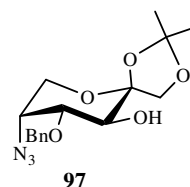
(desviación +0.3 ppm).

#### 4.2.1.4.- Síntesis de 5-azido-4-O-bencil-5-desoxi-1,2-O-isopropilidén-β-D-fructopiranososa (97)

A una solución de **96** (2.47 g, 5.62 mmol) en MeOH anhidro (50 mL) se añade MeONa 0.5 M en MeOH (10 mL) y se deja estar durante 24 h. La c.c.f. (éter-hexano, 3:2) revela un compuesto de menor movilidad. La mezcla se neutraliza con AcOH y se concentra. El residuo obtenido se extrae con  $\text{Cl}_2\text{CH}_2$  y se lava con agua. La fase orgánica se concentra y el residuo obtenido se cromatografía en columna (hexano → éter-hexano, 1:1) para dar **97** (1.83 g, 97%) como sólido cristalino.

**P. Fusión:** 76-78°C (de éter-hexano).

$[\alpha]_D^{27}$  -132 (*c* 0.9)



**IR:**  $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$  3521 (OH), 3039 (aromáticos), 2099 ( $\text{N}_3$ ), 1373 ( $\text{CMe}_2$ ), 741 y 697  $\text{cm}^{-1}$  (aromáticos).

#### Datos de RMN:

$^1\text{H}$  (300 MHz):  $\delta$  7.45-7.25 (m, 5H, Ph), 4.77 y 4.72 (2d, 2H, *J* 11.6 Hz,  $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 4.19 y 3.99 (2d, 2H, *J*<sub>1,1'</sub> 8.8 Hz, H-1,1'), 3.93-3.86 (m, 3H, H-3,5,6), 3.76 (dd, 1H, *J*<sub>4,5</sub> 3.5, *J*<sub>3,4</sub> 9.5 Hz, H-4), 3.70 (dd, 1H, *J*<sub>5,6'</sub> 2.2, *J*<sub>6,6'</sub> 12.8 Hz, H-6'), 1.48 y 1.43 (2s, 6H,  $\text{CMe}_2$ ).

$^{13}\text{C}$ :  $\delta$  137.62, 128.67, 128.16 y 127.98 ( $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 112.27 ( $\text{CMe}_2$ ), 105.76 (C-2), 79.59 (C-3), 72.73 y 72.01 (C-1 y  $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 68.23 (C-4), 62.17 (C-6), 59.41 (C-5), 26.72 y 26.27 ( $\text{CMe}_2$ ).

**Anal. Elem.:** para  $\text{C}_{16}\text{H}_{21}\text{N}_3\text{O}_5$

	Calculado	Encontrado
% C	57.30	57.15
% H	6.31	6.77
% N	12.53	12.05

#### 4.2.1.5.- Síntesis de 5-azido-4-O-bencil-5-desoxi-1,2-O-isopropilidén-β-D- psicopiranos (99)

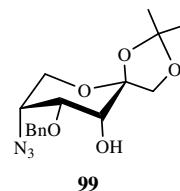
A una suspensión agitada de Dess-Martin peryodiano (3.48 g, 8.18 mmol) en Cl<sub>2</sub>CH<sub>2</sub> seco (20 mL) se añade gota a gota una solución de **97** (1.83 g, 5.46 mmol) en el mismo disolvente (15 mL) en atmósfera inerte y la reacción se mantiene a temperatura ambiente durante 1 h. La c.c.f. (éter-hexano, 3:2) revela la presencia de un producto de mayor movilidad. La mezcla de reacción se filtra y el filtrado se lava con Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> acuoso al 10%, salmuera, y agua, después se concentra. El residuo se columna (éter-hexano, 3:2) para dar la cetona **98** (1.7 g, 93.4%;  $\nu_{\max}^{\text{film}}$  1753 cm<sup>-1</sup>), que se usa directamente en el paso siguiente.

A una solución fría (agua-hielo) y agitada de **98** (1.7 g, 5.1 mmol) en metanol anhidro (20 mL) se le añade NaBH<sub>4</sub> (0.29 g, 7.5 mmol) en porciones. Después de 1 h, la c.c.f. (éter-hexano, 3:2) revela la ausencia de la cetona **98** y la presencia de un nuevo producto de menor movilidad. La mezcla de reacción se neutraliza con AcOH, se concentra y el residuo se disuelve en Cl<sub>2</sub>CH<sub>2</sub> y se lava con agua. La fase orgánica se concentra y el residuo se cromatografía en columna (éter-hexano, 1:1) para dar **99** (1.51 g, 88%) como sólido cristalino.

**P. Fusión:** 60-61°C (de éter-hexano)

$[\alpha]_D^{24}$  -117 (c 1)

**IR:**  $\nu_{\max}^{\text{KBr}}$  3509 (OH), 3033 (aromáticos), 2124 (N<sub>3</sub>), 1368 (CMe<sub>2</sub>), 744 y 693 cm<sup>-1</sup> (aromáticos).



**Datos de RMN:**

$^1\text{H}$  (300 MHz):  $\delta$  7.42-7.26 (m, 5H, Ph), 4.80 y 4.63 (2d, 2H,  $J$  11.8 Hz,  $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 4.17 y 4.08 (2d, 2H,  $J_{1,1'}$  9.5 Hz, H-1,1'), 3.96 (dd, 1H,  $J_{5,6\text{ax}}$  2.2 Hz,  $J_{6\text{ax},6\text{ec}}$  12.8 Hz, H-6ax), 3.89 (t, 1H,  $J_{3,4} = J_{4,5} = 3.5$  Hz, H-4), 3.85-3.80 (m, 3H, H-3,5,6ec), 3.17 (d ancho, 1H,  $J_{\text{OH},3}$  8.8 Hz, OH), 1.45 y 1.36 (2s, 6H,  $\text{CMe}_2$ ).

$^{13}\text{C}$ :  $\delta$  137.48, 128.63, 128.08, y 127.77 ( $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 112.48 ( $\text{CMe}_2$ ), 105.70 (C-2), 73.72 (C-1), 73.26 (C-4), 70.83 (C-3), 70.43 ( $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 62.34 (C-6), 58.86 (C-5), 26.74 y 26.42 ( $\text{CMe}_2$ ).

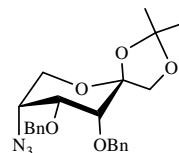
**Anal. Elem.:** para  $\text{C}_{16}\text{H}_{21}\text{N}_3\text{O}_5$

	Calculado	Encontrado
% C	57.30	57.50
% H	6.31	6.29
% N	12.53	12.63

**EM:**  $m/z$  358.1380 [ $\text{M}^+\text{Na}$ ]. Calculado para  $\text{C}_{16}\text{H}_{21}\text{N}_3\text{O}_5\text{Na}$  358.1379 (desviación -0.2 ppm).

#### 4.2.1.6.- Síntesis de 5-azido-3,4-di-*O*-bencil-5-desoxi-1,2-*O*-isopropilidén- $\beta$ -D-psicopiranososa (**100**)

A una suspensión agitada de NaH (dispersión en aceite 60%, 0.27 g, 6.76 mmol) en DMF anhidra (10 mL), se añade a temperatura ambiente el producto **99** (1.51 g, 4.51 mmol) en el mismo disolvente (10 mL). Después de 15 min la mezcla se enfría (agua-hielo), se añade bromuro de bencilo (580  $\mu\text{L}$ , 4.96 mmol), y se deja que alcance la temperatura ambiente. Después de 2 h la c.c.f. (éter-hexano, 3:2) revela la presencia de un producto de mayor movilidad. La mezcla de reacción se vierte en agua-hielo y se extrae con éter (4 x 30 mL). Los extractos reunidos se lavan con salmuera, agua y se concentran. La cromatografía (éter-hexano, 1:3) del residuo obtenido da **100** (1.37 g, 72%) como sólido cristalino blanco.



**100**

**P. Fusión:** 118-120°C (de éter-hexano)

$[\alpha]_D^{25}$  -101 (*c* 1)

**IR:**  $\nu_{\max}^{\text{KBr}}$  3031 (aromáticos), 2103 (N<sub>3</sub>), 1377 (CMe<sub>2</sub>), 735 y 694 cm<sup>-1</sup> (aromáticos).

**Datos de RMN:**

<sup>1</sup>H (300 MHz):  $\delta$  7.43-7.26 (m, 10H, 2 Ph), 4.86 y 4.76 (2d, 2H, *J* 11.7 Hz, CH<sub>2</sub>Ph), 4.82 y 4.77 (2d, 2H, *J* 9.2 Hz, CH<sub>2</sub>Ph), 4.14 y 3.98 (2d, 2H, *J*<sub>1,1'</sub> 9.8 Hz, H-1,1'), 4.04 (t, 1H, *J*<sub>3,4</sub> = *J*<sub>4,5</sub> = 3.0 Hz, H-4), 3.87 (dd, 1H, *J*<sub>5,6ax</sub> 4.1 Hz, *J*<sub>6ax,6ec</sub> 11.9 Hz, H-6ax), 3.80 (dd, 1H, *J*<sub>5,6ec</sub> 6.0 Hz, H-6ec), 3.66 (d, 1H, H-3), 3.61 (m, 1H, H-5), 1.48 y 1.35 (2s, 6H, CMe<sub>2</sub>).

<sup>13</sup>C:  $\delta$  137.99, 137.68, 128.65, 128.54, 128.50, 128.26, 127.97 y 127.85 (CH<sub>2</sub>Ph), 111.39 (CMe<sub>2</sub>), 105.69 (C-2), 77.22 y 77.04 (C-3,4), 74.50 (C-1), 74.49 y 73.21 (CH<sub>2</sub>Ph), 62.01 (C-6), 56.47 (C-5), 27.20 y 26.03 (CMe<sub>2</sub>).

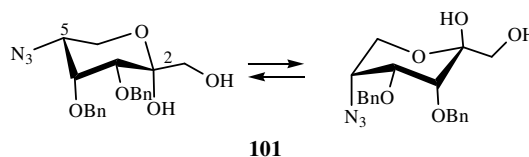
**Anal. Elem.:** para C<sub>23</sub>H<sub>27</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>

	Calculado	Encontrado
% C	64.93	64.49
% H	6.40	6.90
% N	9.88	10.06

**4.2.1.7.- Síntesis de 5-azido-3,4-di-O-bencil-5-desoxi-D-psicopiranososa (101)**

Una solución de **100** (1.37 g, 3.22 mmol) en TFA acuoso al 60% (5 mL), se mantiene a temperatura ambiente durante 2 h. La c.c.f. (éter) revela dos productos de menor movilidad. La mezcla se concentra y se codestila repetidas veces con agua. El residuo se disuelve en diclorometano, se lava con Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> acuoso al 10%, agua, y se concentra. La cromatografía (éter-hexano,

1:1) del residuo obtenido da **101** (1.05 g, 85%) como mezcla ~2:1 de los anómeros  $\alpha$  y  $\beta$ , respectivamente.



#### Datos de RMN para **101 $\alpha$** :

$^1\text{H}$  (400 MHz, *inter alia*):  $\delta$  4.85 y 4.78 (2d, 2H,  $J$  10.6 Hz,  $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 4.63 (s, 2H,  $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 4.22 (s ancho, 1H, H-4), 4.07 (t, 1H,  $J_{5,6\text{ax}} = J_{6\text{ax},6\text{ec}} = 11.4$  Hz, H-6ax), 3.74 (dd, 1H, H-6ec), 3.69 (d, 1H,  $J_{1,1'}$  11.6 Hz, H-1), 3.58 (d, 1H,  $J_{3,4}$  2.5 Hz, H-3), 3.46 (d, 1H, H-1') y 3.31 (ddd, 1H,  $J_{4,5}$  2.5,  $J_{5,6\text{ec}}$  5.3 Hz, H-5).

$^{13}\text{C}$ :  $\delta$ , 97.86 (C-2), 76.86 y 73.12 (C-3,4), 75.98 y 72.27 (2  $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 64.46 (C-1), 57.09 (C-5) y 56.77 (C-6).

#### Datos de RMN para **101 $\beta$** :

$^1\text{H}$  (400 MHz, *inter alia*):  $\delta$  5.00 y 4.69 (2d, 2H,  $J$  11.6 Hz,  $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 4.76 y 4.68 (2d, 2H,  $J$  11.9 Hz,  $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 4.10 (s ancho, 1H, H-4), 3.93 y 3.26 (2d, 2H,  $J_{1,1'}$  11.8 Hz, H-1,1'), 3.92 (dd, 1H,  $J_{5,6\text{ax}}$  2.4,  $J_{6\text{ax},6\text{ec}}$  12.4 Hz, H-6ax), 3.86 (m, 1H, H-5), 3.74 (m, 2H, H-3,6ec) y 2.11 (s ancho, 1H, OH).

$^{13}\text{C}$ :  $\delta$  97.67 (C-2), 76.46 y 75.26 (C-3,4), 74.89 y 71.42 (2  $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 65.91 (C-1), 62.15 (C-6) y 56.28 (C-5).

**EM:**  $m/z$  408.1538 [ $\text{M}^+ + \text{Na}$ ]. Calculado para  $\text{C}_{20}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{O}_5\text{Na}$  408.1535 (desviación -0.6 ppm).

#### 4.2.1.8.- Silanización de **101**

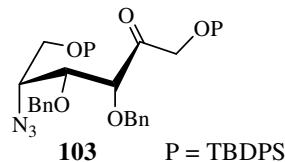
A una solución fría (agua-hielo) de **101** (4.90 g, 12.7 mmol) en DMF anhidra (30 mL), se añade imidazol (1 g, 14.7 mmol) y *terc*-butilclorodifenilsilano (3.7 mL, 14.5 mmol) y la mezcla se mantiene en agitación y a temperatura ambiente durante 20 h. La c.c.f. (éter) revela la existencia de una mezcla compleja. Se añade MeOH (1 mL) y después de 15



min la mezcla de reacción se diluye con agua (100 mL), se extrae con éter (2 x 40 mL) y se concentra. El residuo obtenido se cromatografía (éter-hexano, 1:6 → éter) para obtener en primer lugar 5-azido-3,4-di-*O*-bencil-1,6-di-*O*-*tert*-butildifenilsilil-5-desoxi-D-psicosa **103** (2.31 g, 26%) como un sirupo incoloro.

$[\alpha]_D^{26}$  -1.2;  $[\alpha]_{405}^{26}$  +7 (c 1.2)

**IR:**  $\nu_{\max}^{\text{film}}$  2101 ( $N_3$ ), 1735 (cetona) y 701  $\text{cm}^{-1}$  (aromáticos).



#### Datos de RMN:

$^1\text{H}$  (300 MHz):  $\delta$  7.70-7.00 (4m, 30H, 6 Ph), 4.58 y 4.49 (2d, 2H,  $J_{1,1'}$  18.6 Hz, H-1,1'), 4.45 y 4.39 (2d, 2H,  $J$  11.8 Hz,  $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 4.45 y 4.33 (2d, 2H,  $J$  11.3 Hz,  $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 4.20 (d, 1H,  $J_{3,4}$  3 Hz, H-3), 3.92 (c, 1H, H-5), 3.82 (dd, 1H,  $J_{4,5}$  7.2 Hz, H-4), 3.73 (t, 1H,  $J_{5,6} = J_{6,6'}$  = 6.4 Hz, H-6), 3.71 (t, 1H,  $J_{5,6'}$  6.7 Hz, H-6') y 1.06 (s, 9H,  $\text{CMe}_3$ ).

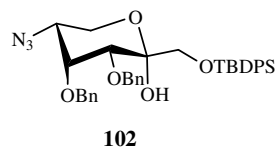
$^{13}\text{C}$  (*inter alia*):  $\delta$  206.67 (C-2), 81.77 (C-3), 79.43 (C-4), 73.27 (2  $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 69.11 (C-6), 64.55 (C-1), 62.94 (C-5), 26.81 ( $\text{CMe}_3$ ) y 19.36 ( $\text{CMe}_3$ ).

**EM:**  $m/z$  884.3896 [ $\text{M}^+$ +Na]. Calculado para  $\text{C}_{52}\text{H}_{59}\text{N}_3\text{O}_5\text{NaSi}_2$  884.3891 (desviación -0.6 ppm).

En segundo lugar se obtiene 5-azido-3,4-di-*O*-bencil-1-*O*-*tert*-butildifenilsilil-5-desoxi- $\alpha$ -D-psicopiranososa **102** (4.55 g, 70%) como un sirupo incoloro.

$[\alpha]_D^{26}$  -37 (c 1.4)

**IR:**  $\nu_{\max}^{\text{film}}$  3468 (OH), 2102 ( $N_3$ ) y 701  $\text{cm}^{-1}$  (aromáticos).



#### Datos de RMN:

$^1\text{H}$  (300 MHz):  $\delta$  7.75-7.25 (2m, 20H, 4 Ph), 5.40 (s, 1H, OH-2), 4.86 y 4.79 (2d, 2H,  $J$  10.7 Hz,  $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 4.69 (s, 2H,  $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 4.28 (t ancho, 1H, H-4),

4.10 (t, 1H,  $J_{5,6ax} = J_{6ax,6ec} = 11.3$  Hz, H-6ax), 3.96 y 3.60 (2d, 2H,  $J_{1,1'} = 10.5$  Hz, H-1,1'), 3.90 (d, 1H,  $J_{3,4} = 2.6$  Hz, H-3), 3.78 (dd, 1H,  $J_{5,6ec} = 5.0$  Hz, H-6ec), 3.36 (ddd, 1H,  $J_{4,5} = 2.5$  Hz, H-5) y 1.08 (s, 9H,  $CMe_3$ ).

$^{13}C$  (*inter alia*):  $\delta$  98.52 (C-2), 77.32 y 73.97 (C-3,4), 75.92 y 72.59 (2  $CH_2Ph$ ), 65.47 (C-1), 57.54 (C-5), 56.92 (C-6), 27.04 ( $CMe_3$ ) y 19.43 ( $CMe_3$ ).

Finalmente se recoge material de partida (0.87 g).

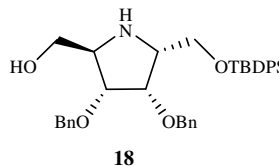
#### 4.2.1.9.- Reacción de Staudinger/aza-Wittig en **102**

A una solución de **102** (1.2 g, 1.93 mmol) en THF anhidro (30 mL) se añade trifenilfosfina (760 mg, 2.9 mmol) y la mezcla se mantiene a reflujo durante 7 h. La c.c.f. (éter-hexano, 1:2) revela la presencia de un producto de menor movilidad. La mezcla de reacción se soporta sobre silicagel previamente tratada con éter-hexano-TEA (1:3:0.1) y se cromatografía en columna (éter-hexano, 2:1  $\rightarrow$  ether) para dar (3*S*,4*R*,5*R*)-3,4-dibenciloxi-2'-*O*-*tert*-butildifenilsilil-2,5-bis(hidroximetil)- $\Delta^1$ -pirrolina (**104**, 850 mg, 77%), como un producto inestable de color amarillo pálido, que no se caracteriza y se usa en el paso siguiente.

A una solución agitada y fría (agua-hielo) de **104** (815 mg, 1.41 mmol) en THF (15 mL) conteniendo ácido acético (180  $\mu$ L), se le añade poco a poco  $NaCNBH_3$  (273 mg, 4.35 mmol). Después de 1 h, la mezcla de reacción se deja alcanzar la temperatura ambiente. La cromatografía en c.c.f. (éter) muestra un producto con  $R_f$  0. La mezcla de reacción se concentra, el residuo se disuelve en EtAcO y se lava con salmuera, después se concentra. La cromatografía en columna (éter-metanol, 10:1) da (2*R*,3*S*,4*R*,5*R*)-3,4-dibenciloxi-2'-*O*-*tert*-butildifenilsilil-2,5-bis(hidroximetil)pirrolidina (**18**, 335 mg, 41%) como un sirupo.

$[\alpha]_D^{27} +32$  (*c* 1.6)

**IR:**  $\nu_{max}^{film}$  3338 (OH), 3069, 3031 y 701  $cm^{-1}$  (aromáticos).



**Datos de RMN:**

$^1\text{H}$  (300 MHz):  $\delta$  7.70-7.20 (2m, 20H, 4 Ph), 4.68 y 4.56 (2d, 2H,  $J$  11.7 Hz,  $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 4.60 y 4.48 (2d, 2H,  $J$  11.9 Hz,  $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 4.03 (t, 1H,  $J_{2,3} = J_{3,4} = 4.3$  Hz, H-3), 3.92 (dd, 1H,  $J_{2,2'a} 6.6$ ,  $J_{2'a,2'b} 10.2$  Hz, H-2'a), 3.86 (dd, 1H,  $J_{2,2'b} 7.3$  Hz, H-2'b), 3.80 (dd, 1H,  $J_{4,5} 6.1$  Hz, H-4), 3.51 (dd, 1H,  $J_{5,5'a} 3.5$ ,  $J_{5'a,5'b} 10.5$  Hz, H-5'a), 3.46 (dd, 1H,  $J_{5,5'b} 3.5$  Hz, H-5'b), 3.38 (m, 1H, H-2), 3.32 (m, 1H, H-5), 2.28 (s ancho, 1H, NH) y 1.08 (s, 9H,  $\text{CMe}_3$ ).

$^{13}\text{C}$  (*inter alia*):  $\delta$  80.89 (C-4), 78.47 (C-3), 73.23 y 72.58 (2  $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 62.96 (C-2',5'), 61.46 (C-2), 61.09 (C-5), 27.05 ( $\text{CMe}_3$ ) y 19.32 ( $\text{CMe}_3$ ).

**Anal. Elem:** para  $\text{C}_{36}\text{H}_{43}\text{NO}_4\text{Si}$

	Calculado	Encontrado
% C	74.32	74.48
% H	7.45	7.43
% N	2.41	2.28

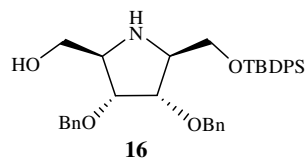
#### 4.2.1.10.- Hidrogenación de 102

El compuesto **102** (3.3 g, 5.3 mmol) en MeOH (40 mL) se hidrogena a 60 psi sobre níquel Raney (3 g) durante 20 h. La c.c.f. (éter-metanol, 15:1) revela la presencia de un producto de menor movilidad. El catalizador se filtra, se lava con MeOH y el filtrado se concentra y se cromatografía en columna (éter  $\rightarrow$  éter-metanol, 15:1) para dar (2*S*,3*S*,4*R*,5*R*)-3,4-dibenciloxi-2'-*O*-terc-butildifenilsilil-2,5-bis(hidroximetil)pirrolidina **16** (1.9 g, 62%).

**P. Fusión:** 92-94°C (de éter)

$[\alpha]_D^{27} +16$  (c 1)

**IR:**  $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$  3270 (OH, NH), 3087, 3030 y 700  $\text{cm}^{-1}$  (aromáticos).



**Datos de RMN:**

<sup>1</sup>H (400 MHz): δ 7.68-7.62 y 7.44-7.25 (2m, 20H, 4 Ph), 4.56 y 4.49 (2d, 2H, *J* 11.8 Hz, CH<sub>2</sub>Ph), 4.52 (s, 2H, CH<sub>2</sub>Ph), 3.86 (t, 1H, *J*<sub>3,4</sub> = *J*<sub>4,5</sub> = 4.5 Hz, H-4), 3.78 (t ancho, 1H, *J*<sub>2,3</sub> 5.2 Hz, H-3), 3.52 (d ancho, 2H, H-2',2'), 3.49-3.39 (m, 4H, H-2,5,5'a,5'b), 2.05 (s ancho, 2H, NH, OH) y 1.05 (s, 9H, CMe<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C (*inter alia*): δ 78.71 (C-3), 78.59 (C-4), 72.28 y 71.83 (2 CH<sub>2</sub>Ph), 65.46 (C-2'), 62.72 y 61.50 (C-2,5), 62.05 (C-5'), 27.00 (CMe<sub>3</sub>), y 19.34 (CMe<sub>3</sub>).

**EM:** *m/z* 582.3038 [M<sup>+</sup>+H]. Calculado para C<sub>36</sub>H<sub>44</sub>NO<sub>4</sub>Si 582.3040 (desviación +0.2 ppm).

**Anal. Elem.:** para C<sub>36</sub>H<sub>43</sub>NO<sub>4</sub>Si

	Calculado	Encontrado
% C	74.32	74.35
% H	7.45	7.29
% N	2.41	2.22

**4.2.1.11.- Síntesis de (2R,3R,4S,5S)-3,4-dihidroxi-2,5-bis(hidroximetil)pirolidina (2,5-didesoxi-2,5-imino-D-alitol) como hidrocloreuro (DADP, 17)**

El compuesto **16** (990 mg, 1.2 mmol) en THF (25 mL), se trata con una solución de TBAF·3H<sub>2</sub>O (915 mg, 2.9 mmol) durante 1 h a temperatura ambiente. La c.c.f. (éter) revela la presencia de un producto de R<sub>f</sub> 0. La mezcla de reacción se concentra, el residuo se disuelve en AcOEt y se lava con salmuera, después se concentra. La cromatografía en columna (éter → éter-metanol-NH<sub>4</sub>OH, 5:1:0.1) del residuo, da lugar al 3,4-dibenciloxi derivado de **17** (se observa por RMN), contaminado con hidróxido de tetra-*n*-butilamonio. La mezcla se hidrogena en MeOH (15 mL) con HCl concentrado (5 gotas) sobre Pd-C al 10% (200 mg) en atmósfera de H<sub>2</sub> durante 24 h. La c.c.f. (éter-

metanol-NH<sub>4</sub>OH, 5:1:0.1) muestra la presencia de un compuesto de menor movilidad.

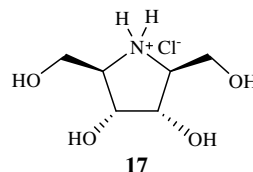
El catalizador se filtra y se lava con MeOH. El filtrado se concentra hasta un residuo que se lava repetidas veces con Cl<sub>2</sub>CH<sub>2</sub> para obtener **17** como hidrocloreto (90 mg, 38%) en forma de espuma sólida incolora.

#### Datos de RMN:

<sup>1</sup>H (300 MHz, MeOH-*d*<sub>4</sub>): δ 4.10 (m, 2H, H-3,4), 3.86 (dd, 2H,  $J_{2,2'a} = J_{5,5'a} = 3.9$ ,  $J_{2'a,2'b} = J_{5'a,5'b} = 12.0$  Hz, H-2'a,5'a), 3.77 (dd, 2H,  $J_{2,2'b} = J_{5,5'b} = 5.7$  Hz, H-2'b,5'b) y 3.59 (m, 2H, H-2,5).

<sup>13</sup>C : δ 72.44 (C-3,4), 66.21 (C-2,5) y 59.46 (C-2',5').

EM:  $m/z$  164.0919 [M<sup>+</sup>+H]. Calculado para C<sub>6</sub>H<sub>14</sub>NO<sub>4</sub> 164.0923 (desviación +2.6 ppm).

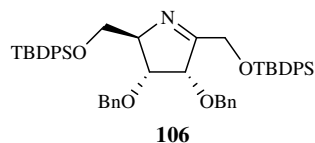


#### 4.2.1.12.- Reacción de Staudinger/aza-Wittig en **103**

Siguiendo el mismo procedimiento indicado en **4.2.1.9.**, el tratamiento de **103** (418 mg, 0.48 mmol) en THF anhidro (10 mL) con trifenilfosfina (250 mg, 0.95 mmol) durante 5 h, da tras la cromatografía en columna (éter-hexano-TEA, 1:3:0.1) el (3*S*,4*R*,5*R*)-3,4-dibenciloxi-2',5'-di-*O*-*tert*-butildifenilsilil-2,5-bis(hidroximetil)-Δ<sup>1</sup>-pirrolina (**106**, 380 mg, 97%).

$[\alpha]_D^{24}$  -39 (*c* 1.3)

IR:  $\nu_{\max}^{\text{film}}$  3070, 3049 y 3031 (aromáticos), 1659 (C=N) y 701 cm<sup>-1</sup> (aromáticos).



#### Datos de RMN:

<sup>1</sup>H (300 MHz): δ 7.72-7.20 (3m, 30H, 6 Ph), 4.83 (d ancho, 1H,  $J_{3,4} 5.8$  Hz, H-3), 4.72 y 4.63 (2d, 2H,  $J 11.2$  Hz, CH<sub>2</sub>Ph), 5.57 y 4.51 (2d, 2H,  $J 11.7$  Hz, CH<sub>2</sub>Ph), 4.61-4.54 (m, 2H, H-2'a,2'b), 4.25 (m, 1H, H-5), 4.17 (dd, 1H,  $J_{4,5}$

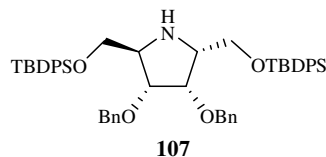
1.9 Hz, H-4), 3.87 (dd, 1H,  $J_{5,5'a}$  3.5,  $J_{5'a,5'b}$  10.5 Hz, H-5'a), 3.81 (dd, 1H,  $J_{5,5'b}$  4.1 Hz, H-5'b), 1.06 y 1.03 (2s, 18H, 2 CMe<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C (*inter alia*): δ 176.40 (C-2), 82.29, 77.63 y 73.23 (C-3,4,5), 73.39 y 71.89 (2 CH<sub>2</sub>Ph), 64.03 y 62.81 (C-2',5'), 27.01 (2 CMe<sub>3</sub>), 19.33 y 19.27 (2 CMe<sub>3</sub>).

A una solución agitada y fría (agua-hielo) de **106** (340 mg, 0.41 mmol) en THF (5 mL) conteniendo ácido acético (50 μL), se añade NaCNBH<sub>3</sub> (70 mg, 1.11 mmol) poco a poco. Después de 15 min se deja que la mezcla de reacción alcance la temperatura ambiente. Luego se añade hidróxido amónico hasta pH ligeramente básico y se concentra hasta un residuo que se extrae con éter y se lava con agua. La fase orgánica se concentra y el residuo se cromatografía (éter-hexano-TEA, 1:3:0.1). En primer lugar se obtiene el producto (2*R*,3*R*,4*S*,5*R*)-3,4-dibenciloxi-2',5'-di-*O*-*tert*-butildifenilsilil-2,5-bis(hidroxi)metilpirrolidina **107** (145 mg, 43%) como un sirupo incoloro.

[α]<sub>D</sub><sup>29</sup> +19 (c 1.5)

IR:  $\nu_{\text{max}}^{\text{film}}$  3070, 3049 y 701 cm<sup>-1</sup>  
(aromáticos).



#### Datos de RMN:

<sup>1</sup>H (300 MHz): δ 7.70-7.20 (3m, 30H, 6 Ph), 4.69 y 4.61 (2d, 2H,  $J$  11.9 Hz, CH<sub>2</sub>Ph), 4.52 y 4.42 (2d, 2H,  $J$  12.0 Hz, CH<sub>2</sub>Ph), 4.11 (t, 1H,  $J_{3,4} = J_{4,5} = 4.4$  Hz, H-4), 3.94 (dd, 1H,  $J_{5,5'a}$  6.9,  $J_{5'a,5'b}$  10.2 Hz, H-5'a), 3.93 (dd, 1H,  $J_{2,3}$  6.4 Hz, H-3), 3.82 (dd, 1H,  $J_{5,5'b}$  7.4 Hz, H-5'b), 3.70 (dd, 1H,  $J_{2,2'a}$  4.6,  $J_{2'a,2'b}$  10.7 Hz, H-2'a), 3.66 (dd, 1H,  $J_{2,2'b}$  4.4 Hz, H-2'b), 3.45 (dt, 1H, H-5), 3.33 (dt, 1H, H-2), 1.90 (s ancho, 1H, NH), 1.09 y 1.06 (2s, 18H, 2 CMe<sub>3</sub>).

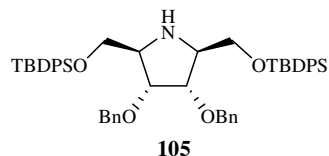
RMN: <sup>13</sup>C (*inter alia*): δ 80.49 (C-3), 78.00 (C-4), 73.23 y 72.18 (2 CH<sub>2</sub>Ph), 64.58 (C-2'), 63.72 (C-5'), 61.70 (C-2), 61.20 (C-5), 27.09 y 27.07 (2 CMe<sub>3</sub>) y 19.39 (2 CMe<sub>3</sub>).

Anal. Elem.: para C<sub>52</sub>H<sub>61</sub>NO<sub>4</sub>Si<sub>2</sub>

	Calculado	Encontrado
% C	76.15	75.87
% H	7.50	7.34
% N	1.71	2.05

El segundo lugar se eluye (2*R*,3*R*,4*S*,5*S*)-3,4-dibenciloxi-2',5'-di-*O*-*tert*-butildifenilsilil-2,5-bis(hidroximetil)pirrolidina (**105**, 77 mg, 23%) como un sirupo incoloro.

**IR:**  $\nu_{\text{max}}^{\text{film}}$  3070, 3048, 3030 y 701  $\text{cm}^{-1}$  (aromáticos).



**Datos de RMN:**

<sup>1</sup>H (300 MHz):  $\delta$  7.70-7.21 (2m, 30H, 6 Ph), 4.51 y 4.47 (2d, 4H,  $J$  12.4 Hz, 2 CH<sub>2</sub>Ph), 3.81 (d ancho, 2H,  $J_{2,3} = J_{4,5} = 4.7$  Hz, H-3,4), 3.76 (dd, 2H,  $J_{2,2'a} = J_{5,5'a} = 4.5$ ,  $J_{2'a,2'b} = J_{5'a,5'b} = 10.5$  Hz, H-2'a,5'a), 3.71 (dd, 2H,  $J_{2,2'b} = J_{5,5'b} = 4.4$  Hz, H-2'b,5'b), 3.41 (c ancho, 2H, H-2,5), 1.95 (s ancho, 1H, NH) y 1.03 (s, 18H, 2 CMe<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C (*inter alia*):  $\delta$  78.43 (C-3,4), 71.87 (2 CH<sub>2</sub>Ph), 64.47 (C-2',5'), 63.07 (C-2,5), 27.05 (2 CMe<sub>3</sub>) y 19.35 (2 CMe<sub>3</sub>).

**Anal. Elem.:** para C<sub>52</sub>H<sub>61</sub>NO<sub>4</sub>Si<sub>2</sub>

	Calculado	Encontrado
% C	76.15	76.43
% H	7.50	7.46
% N	1.71	1.67

**4.2.1.13.- Hidrogenación de 103**

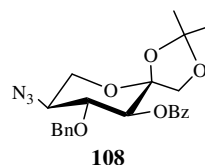
El producto **103** (1.76 g, 2.04 mmol) en MeOH-THF (2:1 v/v, 60 mL) se hidrogena a 60 psi sobre níquel Raney (3 g) durante 5 h. La c.c.f. (éter-hexano, 3:1) revela la presencia de un producto de menor movilidad. El catalizador se filtra y se lava con MeOH, el filtrado se concentra hasta un residuo que se cromatografía en columna (éter-hexano-TEA, 1:3:0.1) para obtener **105** (1.06 g, 73%).

El tratamiento de **105** como se indica en **4.2.1.11**. da el compuesto **17** como hidrocloreuro.

#### 4.2.2.- SÍNTESIS DE 2,5-DIDESOXI-2,5-IMINO-D-GALACTITOL ORTOGONALMENTE PROTEGIDO **19**

##### 4.2.2.1.- Síntesis de 5-azido-4-*O*-bencil-3-*O*-benzoil-5-desoxi-1,2-*O*-isopropilidén- $\alpha$ -L-sorbopiranososa (**108**)

A una solución fría (agua-hielo) de 4-*O*-bencil-3-*O*-benzoil-1,2-*O*-isopropilidén- $\beta$ -D-fructopiranososa<sup>47</sup> (**94**, 1.1 g, 3.6 mmol) en THF seco (30 mL), se añade consecutivamente trifenilfosfina (1 g, 3.8 mmol), una solución de DEAD al 40% en tolueno seco (1.75 mL, 3.8 mmol) y después de 10 min DPPA (1 mL, 4.6 mmol). La mezcla se deja a temperatura ambiente durante toda la noche. La c.c.f. (éter-hexano, 3:2) revela la presencia de un nuevo compuesto de mayor  $R_f$ . La mezcla se concentra, y se cromatografía en columna (éter-hexano, 1:3) para dar **108** (1.23 g, 78%), como un sólido cristalino, cuyos datos analíticos y espectroscópicos coinciden con los previamente descritos.<sup>22a</sup>



##### 4.2.2.2.- Síntesis de 4-*O*-bencil-1,2-*O*-isopropilidén-5-*O*-metanosulfonil- $\beta$ -D-fructopiranososa (**112**)

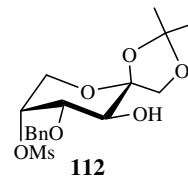
Una solución de 4-*O*-bencil-3-*O*-benzoil-1,2-*O*-isopropilidén-5-*O*-metanosulfonil- $\beta$ -D-fructopiranososa<sup>22a</sup> (**111**, 4.93 g, 10 mmol) en metanol anhidro (20 mL) se trata con NaOMe 0.1 M en metanol anhidro (5 mL) durante toda la noche. La c.c.f. (éter-hexano, 4:1) revela la ausencia de **111** y



la presencia de un producto de menor movilidad. La mezcla de reacción se neutraliza con AcOH y se concentra. El residuo se disuelve en  $\text{Cl}_2\text{CH}_2$  (25 mL), se lava con agua y concentra. El residuo se cromatografía en columna (éter-hexano, 1:1) para dar **112** (3.67 g, 94%) como sirupo.

$[\alpha]_{\text{D}}^{26}$  -150 (*c* 1.1)

**IR:**  $\nu_{\text{max}}^{\text{film}}$  3520  $\text{cm}^{-1}$  (OH)



**Datos de RMN:**

$^1\text{H}$  (300 MHz)  $\delta$  7.40-7.30 (m, 5H, Ph), 5.10 (dt, 1H, H-5), 4.82 y 4.68 (2d, 2H,  $J$  11.0 Hz,  $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 4.21 y 4.02 (2d, 2H,  $J_{1,1'}$  8.8 Hz, H-1,1'), 4.00 (dd, 1H,  $J_{5,6}$  1.6,  $J_{6,6'}$  13 Hz, H-6), 3.94 (dd, 1H,  $J_{5,6'}$  1.6 Hz, H-6'), 3.86 (d, 1H,  $J_{3,4}$  9.8 Hz, H-3), 3.69 (dd, 1H,  $J_{4,5}$  3.2 Hz, H-4), 3.02 (s, 3H, Ms), 1.90 (s ancho, 1H, OH), 1.49 y 1.44 (2s, 6H,  $\text{CMe}_2$ ).

$^{13}\text{C}$ ,  $\delta$  137.27, 128.68, y 128.28 (Ph), 112.37 ( $\text{CMe}_2$ ), 105.71 (C-2), 77.46 (C-4), 76.79 (C-5), 72.94 ( $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 71.99 (C-1), 63.12 (C-6), 39.11 (Ms), 26.57 y 26.31 ( $\text{CMe}_2$ ).

**EM:**  $m/z$  411.1088 [ $\text{M}^+ + \text{Na}$ ]. Calculado para  $\text{C}_{17}\text{H}_{24}\text{O}_8\text{NaS}$  411.1089 (desviación +0.3 ppm).

**4.2.2.3.- Síntesis de 4-O-bencil-1,2-O-isopropilidén-5-O-metanosulfonil- $\beta$ -D-psicopiranososa (114)**

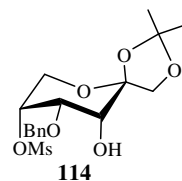
A una suspensión agitada de peryodinano de Dess-Martin (5.93 g, 13.9 mmol) en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  seco (25 mL) se añade gota a gota una solución de **112** (4 g, 10.3 mmol) en el mismo disolvente (25 mL) bajo atmósfera inerte. La mezcla se agita a temperatura ambiente durante toda la noche. La c.c.f. (éter-hexano, 4:1) revela la presencia de un producto de mayor movilidad. La mezcla de reacción se filtra y el filtrado se lava con  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  acuoso al 10%, salmuera, agua y se concentra. El residuo obtenido se cromatografía en columna (éter-hexano, 3:2), para dar la cetona **113** (3.8 g, 96%; **IR:**  $\nu_{\text{max}}^{\text{film}}$  1757  $\text{cm}^{-1}$ ), que se usa directamente en el siguiente paso.

A una solución agitada y fría (agua-hielo) de **113** (3.8 g, 9.8 mmol) en metanol anhidro (25 mL) se añade NaBH<sub>4</sub> (0.44 g, 11.5 mmol) poco a poco. Después de 1 h, la c.c.f. (éter-hexano, 4:1) muestra la ausencia de la cetona **113** y la presencia de un compuesto de menor movilidad. La mezcla de reacción se neutraliza con AcOH y se concentra. El residuo se disuelve en Cl<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>, se lava con agua y se concentra. La cromatografía en columna (éter-hexano, 1:1) del residuo obtenido da **114** (2.9 g, 76%) como un sólido cristalino.

**P. Fusión:** 93-94°C (de éter-hexano)

$[\alpha]_D^{28}$  -97 (*c* 1.2)

**IR:**  $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$  3549 (OH), 3089, 726 y 696 cm<sup>-1</sup> (aromáticos).



**Datos de RMN:**

<sup>1</sup>H (300 MHz):  $\delta$  7.40-7.30 (m, 5H, Ph), 4.97 (dt, 1H, H-5), 4.73 y 4.66 (2d, 2H, *J* 11.3 Hz, CH<sub>2</sub>Ph), 4.20 y 4.14 (2d, 2H, *J*<sub>1,1'</sub> 9.6 Hz, H-1,1'), 4.04 (d, 2H, *J*<sub>5,6</sub> 1.7 Hz, H-6,6), 3.88-3.83 (m, 2H, H-3,4), 3.04 (s, 3H, Ms), 1.46 y 1.37 (2s, 6H, CMe<sub>2</sub>).

<sup>13</sup>C,  $\delta$  136.98, 128.69, 128.32, y 128.12 (Ph), 112.68 (CMe<sub>2</sub>), 105.47 (C-2), 77.06 (C-5), 73.62 (C-1) 71.90 (C-4), 70.66 (CH<sub>2</sub>Ph), 70.40 (C-3), 63.33 (C-6), 39.03 (Ms), 26.61 y 26.42 (CMe<sub>2</sub>).

**Anal. Elem.:** para C<sub>17</sub>H<sub>24</sub>O<sub>8</sub>S

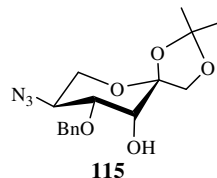
	Calculado	Encontrado
% C	52.57	52.86
% H	6.23	6.53
% S	8.25	8.07

#### 4.2.2.4.- Síntesis de 5-azido-4-O-bencil-5-desoxi-1,2-O-isopropilidén- $\alpha$ -L-tagatopiranososa (**115**)

Una solución agitada de **114** (3.8 g, 9.7 mmol) y azida de litio (1.43 g, 29.2 mmol) en DMF anhidra (20 mL) se calienta a 100°C durante 2 h. La c.c.f. (éter-hexano, 4:1) muestra la presencia de un compuesto de mayor movilidad. La mezcla se concentra hasta un residuo que se disuelve en éter (40 mL), la solución se lava con salmuera y se concentra. El residuo se cromatografía en columna (éter-hexano, 2:1) para dar **115** (2.7 g, 82%) como un sólido cristalino.

**P. Fusión:** 74-76°C (de éter-hexano)

$[\alpha]_D^{26}$  -112.5 (c 0.9)



**IR:**  $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$  3492 (OH), 3064 (aromáticos), 2105 ( $\text{N}_3$ ), 1384 y 1372 ( $\text{CMe}_2$ ), 752 y 699  $\text{cm}^{-1}$  (aromáticos).

#### Datos de RMN:

$^1\text{H}$  (400 MHz):  $\delta$  7.45-7.30 (m, 5H, Ph), 4.73 y 4.67 (2d, 2H,  $J$  11.2 Hz,  $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 4.11 y 4.02 (2d, 2H,  $J_{1,1'}$  9.4 Hz, H-1,1'), 3.87-3.73 (m, 4H, H-3,4,5,6ec), 3.51 (t, 1H,  $J_{5,6\text{ax}} = J_{6\text{ax},6\text{ec}} = 11.1$  Hz, H-6ax), 1.46 y 1.37 (2s, 6H,  $\text{CMe}_2$ ).

$^{13}\text{C}$ ,  $\delta$  137.15, 128.75, 128.40 y 128.22 (Ph), 112.29 ( $\text{CMe}_2$ ), 104.54 (C-2), 78.96 (C-3), 73.26 ( $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 72.31 (C-1), 69.98 (C-4), 61.60 (C-6), 57.10 (C-5), 26.60 y 26.44 ( $\text{CMe}_2$ ).

**EM:**  $m/z$  358.1377 [ $\text{M}^+ + \text{Na}$ ]. Calculado para  $\text{C}_{16}\text{H}_{21}\text{N}_3\text{O}_5\text{Na}$  358.1379 (desviación +0.4 ppm).

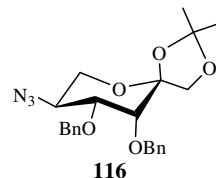
#### 4.2.2.5.- Síntesis de 5-azido-3,4-di-O-bencil-5-desoxi-1,2-O-isopropilidén- $\alpha$ -L-tagatopiranososa (**116**)

A una suspensión agitada de NaH (60% dispersión en aceite, 387 mg, 16.1 mmol) en DMF anhidra (5 mL) se añade **115** (2.7 g, 8.0 mmol) en el mismo disolvente (10 mL) a temperatura ambiente. Después de 15 min, la

mezcla se enfría (agua-hielo) y a continuación se añade bromuro de bencilo (1.2 mL, 10.4 mmol). Se deja que la mezcla alcance la temperatura ambiente y se mantiene así durante 4 h. La c.c.f. (éter-hexano, 1:2) muestra la presencia de un compuesto de mayor movilidad. La mezcla se vierte cuidadosamente en agua-hielo y se extrae con éter (4 x 30 mL). Los extractos se lavan con salmuera, agua y se concentran. La cromatografía en columna (éter-hexano, 1:5) de residuo da **116** (2.9 g, 85%) como un sirupo incoloro.

$[\alpha]_D^{26}$  -65 (c 1).

**IR:**  $\nu_{\text{max}}^{\text{film}}$  3031 (aromáticos) 2110 (N<sub>3</sub>), 1382 y 1372 (CMe<sub>2</sub>), 736 y 697 cm<sup>-1</sup> (aromáticos).



#### Datos de RMN:

<sup>1</sup>H (300 MHz): δ 7.46-7.26 (m, 10H, 2 Ph), 4.93 y 4.57 (2d, 2H, *J* 11.5 Hz, CH<sub>2</sub>Ph), 4.80 y 4.75 (2d, 2H, *J* 11.4 Hz, CH<sub>2</sub>Ph), 4.01 (dt, 1H, H-5), 3.96 y 3.73 (2d, 2H, *J*<sub>1,1'</sub> 9.3 Hz, H-1,1'), 3.83 (dd, 1H, *J*<sub>4,5</sub> 9.7 Hz, H-4), 3.79 (dd, 1H, *J*<sub>5,6ec</sub> 5.5, *J*<sub>6ax,6ec</sub> 11.1 Hz, H-6ec), 3.66 (d, 1H, *J*<sub>3,4</sub> 2.6 Hz, H-3), 3.49 (t, 1H, *J*<sub>5,6ax</sub> 11.1 Hz, H-6ax), 1.43 y 1.31 (2s, 6H, CMe<sub>2</sub>).

<sup>13</sup>C, δ 137.95, 137.73, 128.65, 128.53, 128.25, 128.12, y 128.06 (Ph), 112.21 (CMe<sub>2</sub>), 105.21 (C-2), 80.28 (C-3), 76.92 (C-4), 74.70 y 72.96 (CH<sub>2</sub>Ph), 73.42 (C-1), 62.30 (C-6), 57.98 (C-5), 26.70 y 26.44 (CMe<sub>2</sub>).

**EM:** *m/z* 448.1842 [M<sup>+</sup>+Na]. Calculado para C<sub>23</sub>H<sub>27</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>Na 448.1848 (desviación +1.5 ppm).

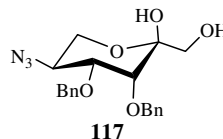
#### 4.2.2.6.- Síntesis de 5-azido-3,4-di-O-bencil-5-desoxi-α-L-tagatopiranososa (117)

Una solución de **116** (3.74 g, 8.8 mmol) en TFA acuoso al 70% (10 mL) se mantiene a temperatura ambiente durante 24 h. La c.c.f. (éter-hexano, 2:1) revela la presencia de un producto de menor movilidad. La mezcla se concentra y se codestila repetidas veces con agua y el residuo se disuelve en diclorometano, se lava con Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> acuoso al 10%, agua y posteriormente se concentra. La cromatografía en columna (éter-hexano, 1:5 → 1:1) del residuo da **117** (2.6 g, 78%) como sólido cristalino.

**P. Fusión:** 83-85°C

$[\alpha]_D^{25}$  -36 (c 0.9)

**IR:**  $\nu_{\max}^{\text{KBr}}$  3386 (OH), 3088 (aromáticos), 2106 (N<sub>3</sub>), 749 y 699 cm<sup>-1</sup> (aromáticos).



**Datos de RMN:**

<sup>1</sup>H (300 MHz):  $\delta$  7.45-7.28 (m, 10H, 2 Ph), 4.90 y 4.54 (2d, 2H, *J* 11.5 Hz, CH<sub>2</sub>Ph), 4.78 y 4.74 (2d, 2H, *J* 11.9 Hz, CH<sub>2</sub>Ph), 4.03 (dt ancho, 1H, H-5), 3.93 (dd, 1H, *J*<sub>3,4</sub> 2.5, *J*<sub>4,5</sub> 10.0 Hz, H-4), 3.78 (d, 1H, H-3), 3.78 y 3.21 (2d, 2H, *J*<sub>1,1'</sub> 11.6 Hz, H-1,1'), 3.76 (dd, 1H, *J*<sub>5,6ec</sub> 5.6, *J*<sub>6ax,6ec</sub> 11.2 Hz, H-6ec), 3.55 (t, 1H, *J*<sub>5,6ax</sub> 11.2 Hz, H-6ax) y 3.42 (s ancho, 1H, OH).

<sup>13</sup>C (*inter alia*):  $\delta$  97.54 (C-2), 79.87 (C-3), 75.17 (C-4), 74.78 y 72.76 (CH<sub>2</sub>Ph), 66.39 (C-1), 61.91 (C-6) y 58.25 (C-5).

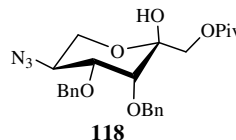
**EM:** *m/z* 408.1540 [M<sup>+</sup>+Na]. Calculado para C<sub>20</sub>H<sub>23</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>Na 408.1535 (desviación -1.0 ppm).

**4.2.2.7.- Síntesis de 5-azido-3,4-di-O-bencil-5-desoxi-1-O-pivaloil- $\alpha$ -L-taga topiranos (118)**

A una solución fría (agua-hielo) y en agitación de **117** (0.5 g, 1.3 mmol) en Cl<sub>2</sub>CH<sub>2</sub> seco (15 mL) se añade TEA (200  $\mu$ L, 1.5 mmol) y cloruro de pivaloilo (175  $\mu$ L, 1.5 mmol) y la mezcla se deja a temperatura ambiente durante 5 h. La c.c.f. (éter-hexano, 2:1) revela un compuesto de mayor movilidad. A la mezcla de reacción se le añade MeOH (0.5 mL) y pasados 15 min, se lava con agua, y después se concentra hasta un residuo que se cromatografía en columna (éter-hexano, 1:2) para dar **118** (535 mg, 88%) como sirupo incoloro.

$[\alpha]_D^{24}$  -30 (c 1)

**IR:**  $\nu_{\max}^{\text{film}}$  3440 (OH), 3065 (aromáticos), 2110 (N<sub>3</sub>),



1734 (C=O), 734 y 698  $\text{cm}^{-1}$  (aromáticos).

**Datos de RMN:**

$^1\text{H}$  (300 MHz):  $\delta$  7.45-7.25 (m, 10H, 2 Ph), 4.92 y 4.56 (2d, 2H,  $J$  11.0 Hz,  $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 4.79 y 4.72 (2d, 2H,  $J$  11.5 Hz,  $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 4.39 y 4.02 (2d, 2H,  $J_{1,1'}$  11.7 Hz, H-1.1'), 4.01 (dt, 1H, H-5), 3.91 (dd, 1H,  $J_{3,4}$  2.6,  $J_{4,5}$  9.9 Hz, H-4), 3.76 (dd, 1H,  $J_{5,6\text{ec}}$  5.5,  $J_{6\text{ax},6\text{ec}}$  11.1 Hz, H-6ec), 3.75 (d, 1H, H-3), 3.58 (t, 1H,  $J_{5,6\text{ax}}$  11.1 Hz, H-6ax), 3.18 (s ancho, 1H, HO) y 1.20 (s, 9H,  $\text{CMe}_3$ ).

$^{13}\text{C}$  (*inter alia*):  $\delta$  179.49 (C=O), 97.97 (C-2), 79.52 (C-4), 75.13 y 72.83 (2  $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 74.93 (C-3), 65.78 (C-6), 61.81 (C-6), 58.00 (C-5), 39.02 ( $\text{CMe}_3$ ) y 27.24 ( $\text{CMe}_3$ ).

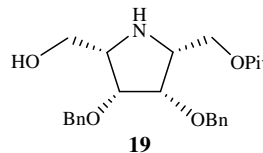
**EM:**  $m/z$  492.2112 [ $\text{M}^+\text{Na}$ ]. Calculado para  $\text{C}_{25}\text{H}_{31}\text{N}_3\text{O}_6\text{Na}$  492.2111 (desviación -0.3 ppm).

**4.2.2.8.- Hidrogenación de 118**

El compuesto **118** (1.4 g, 3 mmol) en MeOH (40 mL) se hidrogena a 60 psi sobre níquel-Raney (Fluka, 500 mg) durante 5 h. La c.c.f. (éter-hexano, 5:1) muestra la presencia de un producto de menor movilidad. El catalizador se filtra y se lava con MeOH y el filtrado se concentra hasta un residuo que se cromatografía en columna (éter  $\rightarrow$  éter-metanol, 10:1) para obtener (2*R*,3*S*,4*R*,5*S*)-3,4-dibenciloxi-2,5-bis(hidroximetil)-2'-*O*-pivaloilpirroli dina (**19**, 680 mg, 53%) como sirupo.

$[\alpha]_{\text{D}}^{26}$  -11 ( $c$  0.5)

**IR:**  $\nu_{\text{max}}^{\text{film}}$  3268 (OH, NH), 3064, (aromáticos), 1726 (C=O), 736 y 698  $\text{cm}^{-1}$  (aromáticos).



**Datos de RMN:**

$^1\text{H}$  (300 MHz):  $\delta$  7.40-7.24 (m, 10H, 2 Ph), 4.76 y 4.63 (2d, 2H,  $J$  11.2 Hz,  $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 4.69 y 4.56 (2d, 2H,  $J$  11.8 Hz,  $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 4.31 (dd, 1H,  $J_{2,2'a}$  6.4,  $J_{2'a,2'b}$  11.1 Hz, H-2'a), 4.22 (dd, 1H,  $J_{2,2'b}$  7.0 Hz, H-2'b), 4.14 (dd, 1H,  $J_{3,4}$  4.0,  $J_{4,5}$

7.6 Hz, H-4) 4.01 (t, 1H,  $J_{2,3}$  4.2 Hz, H-3), 3.82 (dd, 1H,  $J_{5,5'a}$  4.5,  $J_{5'a,5'b}$  11.5 Hz, H-5'a), 3.65 (dd, 1H,  $J_{5,5'b}$  4.8 Hz, H-5'b), 3.47 (dt, 1H, H-5), 3.41 (dt, 1H, H-2), 2.35 (s ancho, 1H, OH) y 1.18 (s, 9H,  $CMe_3$ ).

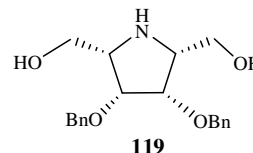
$^{13}C$  (*inter alia*):  $\delta$  178.44 ( $CO_2Me_3$ ), 81.46 (C-4), 78.36 (C-3), 74.05 y 73.24 (2  $CH_2Ph$ ), 64.29 (C-2'), 61.64 (C-5'), 58.82 (C-5), 57.69 (C-2), 38.85 ( $CO_2Me_3$ ) y 27.30 ( $CO_2Me_3$ ).

**EM:**  $m/z$  450.2250 [ $M^+ + Na$ ]. Calculado para  $C_{25}H_{33}NO_5Na$  450.2256 (desviación +1.4 ppm).

#### 4.2.2.9.- Síntesis de (2R,3S,4R,5S)-3,4-dibenciloxi-2,5-bis(hidroximetil)pirolidina (119)

Una solución de **19** (680 mg, 1.59 mmol) en MeOH anhidro (5 mL), se trata con MeONa 0.5M en el mismo disolvente (0.3 mL) durante 6 h a temperatura ambiente. La c.c.f. (éter-metanol, 1.5:1) muestra la presencia de un producto de menor movilidad. La mezcla de reacción se concentra y el residuo se cromatografía en columna (éter-metanol, 5:2) obteniéndose **119** (330 mg, 61%) como un sirupo incoloro.

**IR:**  $\nu_{max}^{film}$  3324 (OH, NH), 3088, 736 y 697  $cm^{-1}$  (aromáticos).



#### Datos de RMN:

$^1H$  (300 MHz):  $\delta$  7.38-7.25 (m, 10H, 2 Ph), 4.70 y 4.57 (2d, 4H,  $J$  11.7 Hz, 2  $CH_2Ph$ ), 4.07 (m, 2H, H-3,4), 3.92 (s ancho, 2H, OH, NH), 3.86 (dd, 2H,  $J_{2,2'a} = J_{5,5'a} = 6.0$ ,  $J_{2'a,2'b} = J_{5'a,5'b} = 11.7$  Hz, H-2'a,5'a), 3.71 (dd, 2H,  $J_{2,2'b} = J_{5,5'b} = 4.7$  Hz, H-2'b,5'b) y 3.38 (c ancho, 2 H, H-2,5).

$^{13}C$  (*inter alia*):  $\delta$  137.68, 128.64, 128.07 y 127.71 (Ph), 79.85 (C-3,4), 73.64 (2  $CH_2Ph$ ), 61.33 (C-2',5') y 59.76 (C-2,5).

**EM:**  $m/z$  366.1687 [ $M^+ + Na$ ]. Calculado para  $C_{20}H_{25}NO_4Na$  366.1681 (desviación -1.4 ppm).

#### 4.2.2.10.- Síntesis de (2*R*,3*S*,4*R*,5*S*)-3,4-dihidroxi-2,5-bis(hidroximetil)pirrolidina (2,5-didesoxi-2,5-imino-D-galactitol) como hirocloruro (DGADP, 20)

El producto **119** (94 mg, 0.27 mmol) se hidrogena en MeOH (5 mL) y HCl concentrado (5 gotas) sobre Pd-C 10% (50 mg) en atmósfera de H<sub>2</sub> durante toda la noche. La c.c.f. (éter-metanol-TEA, 3:3:0.5) muestra la presencia de un compuesto de menor movilidad. El catalizador se filtra y se lava con MeOH. El filtrado se concentra hasta un residuo que se lava repetidas veces con diclorometano obteniéndose **20** como hidrocioruro (30 mg, 56%) en forma de espuma sólida e incolora.

#### Datos de RMN:

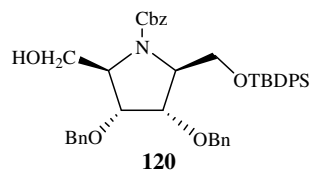
<sup>1</sup>H (400 MHz, MeOH-*d*<sub>4</sub>): δ 4.37 (d ancho, 2H, *J* 5.0 Hz, H-3,4), 3.94 (dd, 2H, *J*<sub>2,2'a</sub> = *J*<sub>5,5'a</sub> = 5.0, *J*<sub>2'a,2'b</sub> = *J*<sub>5'a,5'b</sub> = 11.9 Hz, H-2'a,5'a), 3.89 (dd, 2H, *J*<sub>2,2'b</sub> = *J*<sub>5,5'b</sub> = 8.2 Hz, H-2'b,5'b) y 3.65 (m, 2H, H-2,5).

<sup>13</sup>C, δ 71.57 (C-3,4), 63.22 (C-2,5) y 59.29 (C-2',5').

#### 4.2.3.- SÍNTESIS DE (-)- (21) Y (+)-3-EPHIACINTACINA A<sub>5</sub>, (22)

##### 4.2.3.1.- Síntesis de (2*S*,3*S*,4*R*,5*R*)-3,4-dibenciloxi-*N*-benciloxicarbonil-2'-*O*-*tert*-butildifenilsilil-2,5-bis(hidroximetil)pirrolidina (120)

A una solución agitada de **16** (1.8 g, 3 mmol) en acetona anhidra (20 mL), se añade carbonato potásico anhidro (3 g) y una solución de cloroformiato de bencilo (600 μL, 4.2 mmol) en el mismo disolvente (10 mL) y la mezcla de reacción se mantiene a temperatura ambiente durante 30 min. La c.c.f. (éter) revela la presencia de un producto de mayor movilidad. La mezcla se filtra y el sólido se lava con acetona. El filtrado se concentra hasta un residuo que se cromatografía en columna (éter-hexano, 1:2) para dar **120** (1.7 g, 79%) como un sirupo incoloro.



$[\alpha]_D^{25} +10$  (c 1.8)



**IR:**  $\nu_{\text{max}}^{\text{film}}$  3448 (OH), 3067 y 3031 (aromáticos), 1704 (C=O, Cbz), 740 y 700  $\text{cm}^{-1}$  (aromáticos).

**Datos de RMN:**

**$^1\text{H}$**  (300 MHz, *inter alia*):  $\delta$  7.68-7.12 (m, 25H, 5 Ph), 5.09 y 5.01 (2d, 2H,  $J$  12 Hz,  $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 4.61-4.51 (m ancho, 4H, 2  $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 4.28-3.60 (3m anchos, 8H, H-2,2'a,2'b,3,4,5,5'a,5'b) y 1.05 (s, 9H,  $\text{CMe}_3$ ).

**$^{13}\text{C}$**  (*inter alia*):  $\delta$  155.73 (C=O, Cbz), 77.66 y 76.74 (C-3,4), 71.96 y 71.79 (2  $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 67.57 ( $\text{CH}_2\text{Ph}$ , Cbz), 64.63 y 62.82 (C-2',5'), 64.56 y 63.59 (C-2,5), 26.98 ( $\text{CMe}_3$ ) y 19.23 ( $\text{CMe}_3$ ).

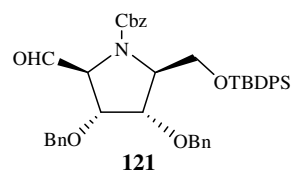
**EM:**  $m/z$  738.3221 [ $\text{M}^+\text{Na}$ ]. Calculado para  $\text{C}_{44}\text{H}_{49}\text{NO}_6\text{NaSi}$  738.3227 (desviación +0.9 ppm).

**4.2.3.2.- Síntesis de 4-[(3*E*,2'*R*,3'*R*,4'*S*,5'*S*)-3',4'-dibenciloxi-*N*-benciloxicarbonil-5'-*terc*-butildifenilsililoximetilpirrolidin-2'-il]but-3-en-2-ona (122)**

A una solución de **120** (835 mg, 1.17 mmol) en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  seco (10 mL) se añade tamiz molecular de 4 Å (0.6 g), *N*-metilmorfolina-*N*-óxido (NMO, 213 mg, 1.82 mmol) y tetra-*n*-propilamonio perrutenato (TPAP, 50 mg) y la mezcla de reacción se mantiene a temperatura ambiente durante 15 min. La c.c.f. (éter-hexano, 1:1) indica la ausencia de **120** y la presencia de un producto de mayor movilidad. La mezcla de reacción se diluye con éter (30 mL), se filtra sobre una capa de sílica gel 60 (Scharlau, 230-400 mesh) que posteriormente se lava con éter. El filtrado se concentra para dar el aldehído **121** (730 mg, 88%), que se usa en el paso siguiente.

$[\alpha]_{\text{D}}^{25}$  -9 ( $c$  0.85)

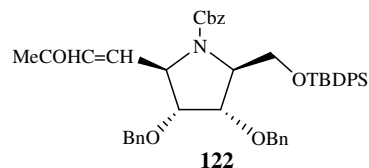
**IR:**  $\nu_{\text{max}}^{\text{film}}$  3068 y 3032 (aromáticos), 1735 (CHO), 1710 (C=O, Cbz), 738 y 700  $\text{cm}^{-1}$  (aromáticos).



A una solución de **121** (730 mg, 1 mmol) en tolueno anhidro (20 mL) se añade 1-trifenilfosforanilidén-2-propanona (1.07 g, 3.36 mmol) y la mezcla se calienta a 80°C durante 3 h. La c.c.f. (éter-hexano, 1:2) revela la presencia de un producto de menor movilidad. La mezcla de reacción se filtra y se soporta sobre silicagel. La cromatografía en columna (éter-hexano, 1:2) da **122** (730 mg, 83%) como sirupo.

$[\alpha]_D^{26} +27$  (c 1)

**IR:**  $\nu_{\max}^{\text{film}}$  3068 y 3032 (aromáticos), 1705, 1679 y 1633 (C=O, cetona conjugada, Cbz y C=C conjugado) y 700  $\text{cm}^{-1}$  (aromáticos).



#### Datos de RMN:

**<sup>1</sup>H** (400 MHz):  $\delta$  7.57-7.14 (m, 25H, 5 Ph), 6.64 y 6.56 (2 dd anchos,  $J_{2',4}$  6.5 y 7.1 Hz, H-4, dos rotámeros), 6.26 y 6.12 (2 d anchos,  $J_{3,4}$  16.0 y 15.6 Hz, H-3, dos rotámeros), 5.20-4.97 y 4.64-3.74 (4 m anchos, 12H, 3 CH<sub>2</sub>Ph y H-2',3',4',5',5''a,5''b), 2.05 y 1.90 (2 s anchos, 3H, H-1,1,1, dos rotámeros) y 1.01 (s, 9H, CMe<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C** (*inter alia*):  $\delta$  198.16 (C-2), 155.62 (Cbz), 81.52 y 80.47 (C-3',4'), 72.27, 71.66 y 67.30 (2 CH<sub>2</sub>Ph y Cbz), 64.21, 63.56, 62.49 y 62.26 (C-2',5', dos rotámeros), 62.72 (C-5'), 27.01 (C-1 y CMe<sub>3</sub>) y 19.33 (CMe<sub>3</sub>).

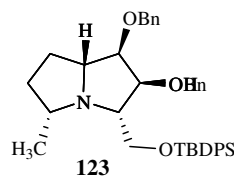
**EM:**  $m/z$  776.3381 [M<sup>+</sup>+Na]. Calculado para C<sub>47</sub>H<sub>51</sub>NO<sub>6</sub>NaSi 776.3383 (desviación +0.3 ppm).

#### 4.2.3.3.- Síntesis de (1*R*,2*S*,3*S*,5*R*,7*aR*)-1,2-dibenciloxi-3-*terc*-butildifenilsililoximetil-5-metilpirrolizidina (**123**)

El compuesto **122** (690 mg, 0.92 mmol) en metanol (30 mL) se hidrogena a 60 psi sobre Pd-C 10% (200 mg) durante 18 h. La c.c.f. (éter-hexano, 1:2) muestra la presencia de un compuesto de mayor movilidad. El catalizador se filtra y se lava con metanol y el filtrado se concentra hasta un residuo que se cromatografía en columna (éter-hexano, 1:2) para obtener **123** (290 mg, 52%) como sirupo.

$[\alpha]_D^{25} +15$  (c 1.3)

IR:  $\nu_{\max}^{\text{film}}$  3068, 3030, 738 y 700  $\text{cm}^{-1}$  (aromáticos).



#### Datos de RMN:

$^1\text{H}$  (400 MHz):  $\delta$  7.70-7.25 (2m, 20H, 4 Ph), 4.70 y 4.63 (2d, 2H,  $J$  11.8 Hz,  $\text{CH}_2\text{Ph}$ ) 4.60 y 4.57 (2d, 2H,  $J$  12.8 Hz,  $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 4.06 (dd, 1H,  $J_{1,2}$  6.2,  $J_{2,3}$  3.4 Hz, H-2), 3.75 (dd, 1H,  $J_{3,8}$  5.0,  $J_{8,8'}$  10.5 Hz, H-8), 3.60 (dd, 1H, H-1), 4.56 (dd, 1H,  $J_{3,8'}$  6.6 Hz, H-8'), 3.11 (dt, 1H,  $J_{7\beta,7\alpha}$  5.4,  $J_{1,7\alpha} = J_{7\alpha,7\alpha} = 10.0$  Hz, H-7 $\alpha$ ), 2.83 (m, 1H, H-3), 2.52 (sex, 1H,  $J_{5,6\beta} = J_{5,6\alpha} = J_{5,\text{Me}} = 6.2$  Hz, H-5), 2.18 (dc, 1H,  $J_{6\beta,7\beta} = J_{6\beta,7\alpha} = 8.3$ ,  $J_{6\alpha,6\beta}$  13 Hz, H-6 $\beta$ ), 1.77 (m, 1H, H-7 $\beta$ ), 1.58 (m, 1H, H-6 $\alpha$ ), 1.39 (dc, 1H,  $J_{6\alpha,7\alpha}$  7.6,  $J_{7\alpha,7\beta}$  10.7 Hz, H-7 $\alpha$ ), 1.08 (s, 9H,  $\text{CMe}_3$ ) y 0.98 (d, 3H, Me).

$^{13}\text{C}$  (*inter alia*):  $\delta$  84.91 (C-2), 79.36 (Cbz), 72.20 y 71.73 ( $2\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 72.09 (C-7 $\alpha$ ), 68.27 (C-3), 65.86 (C-8), 55.03 (C-5), 37.10 (C-6), 26.99 ( $\text{CMe}_3$ ), 25.21 (C-7), 21.33 (Me) y 19.34 ( $\text{CMe}_3$ ).

EM:  $m/z$  628.3227 [ $\text{M}^+ + \text{Na}$ ]. Calculado para  $\text{C}_{39}\text{H}_{47}\text{NO}_3\text{NaSi}$  628.3223 (desviación -0.6 ppm).

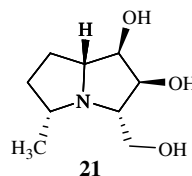
#### 4.2.3.4.- Síntesis de (1R,2S,3S,5R,7aR)-1,2-dihidroxi-3-hidroximetil-5-metilpirrolizidina [(-)-3-epihiacintacina A<sub>5</sub>, 21]

Una solución de **123** (260 mg, 0.43 mmol) en metanol (30 mL) y HCl concentrado (5 gotas) se hidrogena a 60 psi sobre Pd-C al 10% (110 mg) durante 15 h. El catalizador se filtra y se lava con metanol y el filtrado se neutraliza con Amberlita IRA-400 (ciclo  $\text{HO}^-$ ) y luego se concentra. El  $^1\text{H}$ -RMN del residuo indica la ausencia de los grupos bencilo y que el grupo TBDPS permanece en la molécula. El residuo se disuelve en THF (5 mL) y se trata con una solución de TBAF.3H<sub>2</sub>O (350 mg) en el mismo disolvente (5 mL) y se deja a temperatura ambiente durante toda la noche. La c.c.f. (éter-metanol-NH<sub>4</sub>OH 30%, 5:1:0.1) revela la presencia de un nuevo compuesto con un  $R_F$  de 0.46. El disolvente se elimina y el residuo se cromatografía en

columna (éter → éter-metanol-NH<sub>4</sub>OH, 5:1:0.1) para dar **21** (75 mg, 93%) como un sirupo incoloro.

$[\alpha]_D^{29}$  -15;  $[\alpha]_{405}^{29}$  -20 (*c* 0.44, metanol)

**Datos de RMN:**



<sup>1</sup>H (400 MHz, MeOH-*d*<sub>4</sub>): δ 4.10 (dd, 1H, *J*<sub>1,2</sub> 7.0, *J*<sub>2,3</sub> 4.8 Hz, H-2), 3.73 (dd, 1H, *J*<sub>3,8</sub> 4.4, *J*<sub>8,8'</sub> 11.9 Hz, H-8), 3.70 (dd, 1H, *J*<sub>3,8'</sub> 4.6 Hz, H-8'), 3.62 (dd, 1H, *J*<sub>1,7a</sub> 8.5 Hz, H-1), 2.77 (ddd, 1H, *J*<sub>7a,7β</sub> 5.8, *J*<sub>7a,7α</sub> 10.4 Hz, H-7a), 2.53 (sex ancho, 1H, *J*<sub>5,6α</sub> = *J*<sub>5,6β</sub> = *J*<sub>5,Me</sub> = 6.3 Hz, H-5), 2.43 (c, 1H, H-3), 2.23 (ddt, 1H, *J*<sub>6β,7β</sub> 9.0, *J*<sub>6β,7α</sub> 7.9, *J*<sub>6α,6β</sub> 12.8 Hz, H-6β), 1.79 (dddd, 1H, *J*<sub>6α,7β</sub> 2.6, *J*<sub>7α,7β</sub> 11.7 Hz, H-7β), 1.65 (dddd, 1H, *J*<sub>6α,7α</sub> 10.7 Hz, H-6α), 1.45 (dc ancho, 1H, H-7α) y 1.19 (d, 3H, Me).

<sup>13</sup>C, δ 78.26 (C-2), 76.14 (C-7a), 72.45 (C-1), 71.70 (C-3), 63.22 (C-8), 56.95 (C-5), 37.69 (C-6), 24.98 (C-7) y 21.19 (Me).

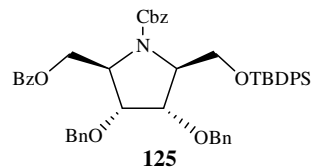
**EM:** *m/z* 156.1025 [M<sup>+</sup>-CH<sub>2</sub>OH]. Calculado para C<sub>8</sub>H<sub>14</sub>NO<sub>2</sub> 156.1025 (desviación -0.1 ppm).

#### 4.2.3.5.- Síntesis de (2*R*,3*R*,4*S*,5*S*)-3,4-dibenciloxi-*N*-benciloxicarbonil-2'-*O*-benzoil-5'-*O*-*terc*-butildifenilsilil-2,5-bis(hidroxi metil)pirrolidina (**125**)

A una solución agitada de **120** (835 mg, 1.17 mmol) en diclorometano anhidro (10 mL) se le añade trietilamina (TEA, 150 μL, 1.4 mmol), DMAP (50 mg) y cloruro de benzoilo (150 μL, 1.4 mmol) y la mezcla se mantiene a temperatura ambiente durante 20 h. La c.c.f. (éter-hexano, 2:1) revela la presencia de un compuesto de mayor movilidad. El crudo de reacción se procesa de manera convencional y la cromatografía en columna (éter-hexano, 1:3) da el compuesto puro **125** (910 mg, 95%) como un sirupo incoloro.

$[\alpha]_D^{25}$  +10;  $[\alpha]_{405}^{26}$  +27 (*c* 1.8)

**IR:**  $\nu_{\max}^{\text{film}}$  3088 y 3067 (aromáticos), 1722 (COPh y CO Cbz), 740 y 700 cm<sup>-1</sup> (aromáticos).



### Datos de RMN:

$^1\text{H}$  (400 MHz):  $\delta$  8.14-7.18 (m, 30H, 6 Ph), 5.21-5.01 y 4.69-3.68 (2m, 14H, 3  $\text{CH}_2\text{Ph}$ , H-2,2'a,2'b,3,4,5,5'a,5'b) y 1.03 (s, 9H,  $\text{CMe}_3$ ).

$^{13}\text{C}$  (*inter alia*):  $\delta$  166.03 (COPh), 155.74 (CO Cbz), 76.97, 76.07, 75.78 y 75.07 (C-3,4, dos rotámeros), 71.85, 71.71 y 71.43 (2  $\text{OCH}_2\text{Ph}$ , dos rotámeros), 67.35 y 67.13 (Cbz, dos rotámeros), 63.58, 62.99, 60.41 y 59.88 (C-2,5, dos rotámeros), 62.57, 62.23, 62.02 y 61.69 (C-2',5', dos rotámeros), 26.98 ( $\text{CMe}_3$ ) y 19.26 ( $\text{CMe}_3$ ).

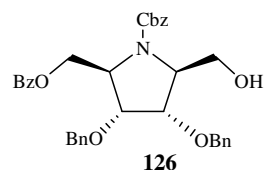
**EM:**  $m/z$  842.3485 [ $\text{M}^+\text{Na}$ ]. Calculado para  $\text{C}_{51}\text{H}_{53}\text{NO}_7\text{NaSi}$  842.3489 (desviación +0.4 ppm).

### 4.2.3.6.- Síntesis de (2R,3R,4S,5S)-3,4-dibenciloxi-N-benciloxycarbonil-2'-O-benzoil-2,5-bis(hidroximetil)pirrolidina (126)

A una solución agitada de **125** (840 mg, 1.03 mmol) en THF (15 mL) se añade TBAF.3H<sub>2</sub>O (490 mg, 1.55 mmol) y la mezcla se mantiene a temperatura ambiente durante la noche. La c.c.f. (éter-hexano, 3:1) muestra un nuevo compuesto de menor movilidad. La mezcla se neutraliza con ácido acético, se concentra y el residuo obtenido se disuelve en éter, se lava con salmuera y se concentra. La cromatografía en columna (éter-hexano, 2:1) del residuo da **126** (500 mg, 84%) como un sirupo incoloro.

$[\alpha]_D^{26}$  -12 (*c* 0.8)

**IR:**  $\nu_{\text{max}}^{\text{film}}$  3470 (OH), 3064 y 3032 (aromáticos), 1719 (COPh y CO Cbz), 712 y 698  $\text{cm}^{-1}$  (aromáticos).



### Datos de RMN:

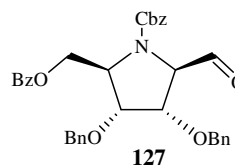
$^1\text{H}$  (300 MHz):  $\delta$  7.93-7.27 (m, 20H, 4 Ph), 5.26 y 5.12 (2d, 2H,  $J$  12.3 Hz,  $\text{OCH}_2\text{Ph}$ ), 4.62-3.85 (m, 11H, 2  $\text{CH}_2\text{Ph}$ , H-2,2'a, 2'b,3,4,5,5'a) y 3.63 (dd, 1H,  $J_{4,5'b}$  4.9,  $J_{5'a,5'b}$  11.6 Hz, H-5'b).

$^{13}\text{C}$  (*inter alia*):  $\delta$  77.10 y 76.68 (C-3,4) 72.15 y 71.90 (2 OCH<sub>2</sub>Ph) 67.80 (>NCO<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Ph), 64.32 y 61.30 (C-2,5), 63.82 y 63.17 (C-2',5').

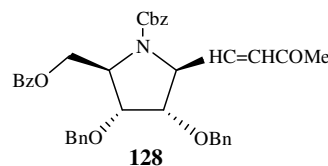
**EM:**  $m/z$  604.2312 [M<sup>+</sup>+Na]. Calculado para C<sub>35</sub>H<sub>35</sub>NO<sub>7</sub>Na 604.2311 (desviación -0.1 ppm).

#### 4.2.3.7.- Síntesis de 4-[(2'S,3'S,4'R,5'R)-3',4'-dibenciloxi-N-benciloxicarboil-5'-benzoiloximetilpirrolidina-2'-il]but-3-en-2-ona (**128**)

A una solución de **126** (1.08 g, 1.9 mmol) en diclorometano anhidro (10 mL) se le añade tamiz molecular 4Å (700 mg), NMO (325 mg, 2.8 mmol) y TPAP (40 mg) y la mezcla de reacción se mantiene a temperatura ambiente durante 1 h. La c.c.f. (éter-hexano, 4:1) revela un compuesto de mayor movilidad. El crudo de reacción se diluye con éter (30 mL), se filtra sobre sílica gel 60 (Scharlau, 230-400 mesh) y posteriormente se lava con éter. El filtrado se concentra para obtener un aldehído **127**, que se usa directamente en el siguiente paso.



A una suspensión agitada de hidruro sódico (60% dispersión en aceite, 150 mg, 3.7 mmol) en THF anhidro (15 mL) se le añade (2-oxopropil)fosfonato de dietilo (660  $\mu\text{L}$ , 3.7 mmol) y la mezcla se mantiene a temperatura ambiente. Pasada 1 h, se añade la solución de **127** en THF (10 mL) y se deja 5 min. La c.c.f. (éter-hexano, 4:1) revela la presencia de un nuevo compuesto de menor movilidad. El disolvente se elimina y el residuo se reparte en éter-agua. La fase orgánica se separa y se concentra hasta un residuo que se cromatografía en columna (éter-hexano, 3:1) para dar **128** (520 mg, 45% de **126**) como un sirupo incoloro.



$[\alpha]_{\text{D}}^{23}$  -15 (c 0.8);  $[\alpha]_{405}^{24}$  -46 (c 2.1)

**IR:**  $\nu_{\text{max}}^{\text{film}}$  3088 y 3063 (aromáticos), 1718 y 1678 (PhCO, CO Cbz, y cetona  $\alpha,\beta$ -insaturada), 713 y 699  $\text{cm}^{-1}$  (aromáticos).

**Datos de RMN:**

$^1\text{H}$  (300 MHz):  $\delta$  7.85-7.25 (m, 20H, 4 Ph), 6.52 (m ancho, 1H, H-4), 6.20-6.07 (m ancho, 1H, H-3), 5.22-4.25 (2m, 10H, 3  $\text{CH}_2\text{Ph}$ , H-3',4',5''a,5''b), 4.01 (t ancho, 1H,  $J$  4 Hz) y 3.91 (t ancho, 1H,  $J$  5.2 Hz) para H-2',5' y 1.90 (s ancho, 3H, H-1,1,1).

$^{13}\text{C}$  (*inter alia*):  $\delta$  197.58 (C-2), 166.09 (COPh), 155.72 ( $>\text{NCO}_2\text{Bn}$ ), 72.11 (2  $\text{OCH}_2\text{Ph}$ ), 67.58 ( $>\text{NCO}_2\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 62.56 (C-5'') y 27.41 (C-1).

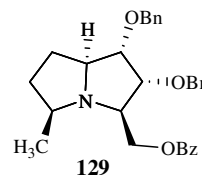
**EM:**  $m/z$  642.2470 [ $\text{M}^+\text{+Na}$ ]. Calculado para  $\text{C}_{38}\text{H}_{37}\text{NO}_7\text{Na}$  642.2468 (desviación -0.3 ppm).

#### 4.2.3.8.- Síntesis de (1*S*,2*R*,3*R*,5*S*,7*aS*)-1,2-dibenciloxi-3-benzoiloximetil-5-metilpirrolizidina (**129**)

El compuesto **128** (500 mg, 0.8 mmol) en metanol anhidro (15 mL) se hidrogena a 60 psi con Pd-C al 10% (100 mg) durante 24 h. La c.c.f. (éter-hexano, 4:1) muestra la presencia de un nuevo compuesto de menor movilidad. El catalizador se filtra y se lava con metanol. El filtrado se concentra hasta un residuo que se cromatografía en columna (éter-hexano, 2:1) para obtener **129** (280 mg, 74%) como un sirupo.

$[\alpha]_{\text{D}}^{25} +8.5$ ;  $[\alpha]_{405}^{25} +19$  ( $c$  1)

**IR:**  $\nu_{\text{max}}^{\text{film}}$  3063 y 3031 (aromáticos), 1720 (COPh), 712 y 697  $\text{cm}^{-1}$  (aromáticos).



#### Datos de RMN:

$^1\text{H}$  (400 MHz):  $\delta$  8.03 (d, 2H,  $J_{\text{o,m}}$  7.5 Hz, H-orto Bz), 7.58 (t, 1H,  $J_{\text{m,p}}$  7.5 Hz, H-para Bz), 7.44 (t, 2H, H-meta Bz), 7.39-7.27 (m, 10H, 2  $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 4.77 y 4.58 (2d, 2H,  $J$  11.7 Hz,  $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 4.65 y 4.59 (2d, 2H,  $J$  12.0 Hz,  $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 4.43 (dd, 1H,  $J_{3,8}$  4.8,  $J_{8,8'}$  11.4 Hz, H-8), 4.30 (dd, 1H,  $J_{3,8'}$  6.3 Hz, H-8'), 4.14 (dd, 1H,  $J_{1,2}$  6.4,  $J_{2,3}$  4.2 Hz, H-2), 3.68 (dd, 1H,  $J_{1,7a}$  8.7 Hz, H-1), 3.10 (dt, 1H,  $J_{7a,7\alpha}$  5.5,  $J_{7a,7\beta}$  9.9 Hz, H-7a), 3.00 (c ancho, 1H, H-3), 2.62 (sex ancho, 1H,  $J_{5,6\alpha} = J_{5,6\beta} = 7.0$  Hz, H-5), 2.22 (dc, 1H,  $J_{6\alpha,7\alpha} = J_{6\alpha,7\beta} = 8.5$ ,  $J_{6\alpha,6\beta}$  13.0 Hz, H-

6 $\alpha$ ), 1.81 (dddd, 1H,  $J_{7\alpha,6\beta}$  2.2 Hz, H-7 $\alpha$ ), 1.65 (dddd, 1H,  $J_{6\beta,7\beta}$  10.0 Hz, H-6 $\beta$ ), 1.47 (dc, 1H,  $J_{7\alpha,7\beta}$  10.9 Hz, H-7 $\beta$ ) y 1.16 (d, 3H,  $J_{Me,5}$  6.0 Hz, Me).

$^{13}\text{C}$  (*inter alia*):  $\delta$  166.46 (COPh), 84.82 (C-2), 79.07 (C-1), 72.73 (C-7a), 72.73 y 71.83 (2 CH<sub>2</sub>Ph), 65.93 (C-8), 65.07 (C-3), 54.81 (C-5), 37.13 (C-6), 25.36 (C-7) y 21.47 (Me).

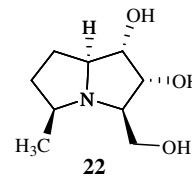
**EM:**  $m/z$  494.2309 [ $\text{M}^+$ +Na]. Calculado para C<sub>30</sub>H<sub>33</sub>NO<sub>4</sub>Na 494.2307 (desviación -0.4 ppm).

#### 4.2.3.9.- Síntesis de (1*S*,2*R*,3*R*,5*S*,7*aS*)-1,2-dihidroxi-3-hidroximetil-5-metil pirrolizidina [(+)-3-epihiacintacina A<sub>5</sub>, 22]

La desbenzoilación convencional de **129** (270 mg, 1 mmol) con metóxido sódico 0.2 M en metanol anhidro (7 mL), da lugar al compuesto **130** (280 mg, 0.8 mmol) que seguidamente se disuelve en metanol anhidro (30 mL) y se hidrogena a 50 psi sobre Pd-C al 10 % (170 mg) en medio ácido (HCl conc. cuatro gotas) durante 48 h. La c.c.f. (éter-metanol, 3:1) revela la presencia de un compuesto de R<sub>f</sub> igual a cero. El catalizador se filtra, se lava con metanol y el filtrado se lava y se neutraliza con Amberlita IRA-400 (forma OH<sup>-</sup>), después se concentra. La cromatografía (éter-metanol-TEA, 5:1:0.1) del residuo genera **22** (110 mg, 80%).

$[\alpha]_{\text{D}}^{26} +14.5$  ( $c$  8, metanol)

Los datos de RMN son idénticos a los de su antípoda óptica **21**.







## **V.- INHIBICIÓN ENZIMÁTICA**



## **5.- INHIBICIÓN ENZIMÁTICA**

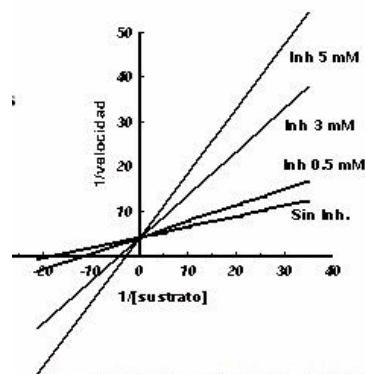
### **5.1.- INTRODUCCIÓN**

De una manera sencilla, podemos definir la inhibición enzimática como la disminución de la actividad catalítica de una enzima como resultado de una modificación de las condiciones de reacción (como por ejemplo, pH, temperatura, concentración del sustrato o el producto , etc). Esta modificación puede afectar al enzima de diferentes formas: puede resultar en cambios conformacionales, bloqueo de los sitios activos o en la propia desnaturalización del mismo. La inhibición también puede, ocasionalmente, estar causada por el sustrato o el producto de la reacción.

Dependiendo de la fortaleza de la unión del enzima con el inhidor la inhibición puede ser reversible o irreversible. Cuando esta unión es muy fuerte, el inhidor que ocupa un sitio libre del enzima, no vuelve a desocuparlo, por lo que no hay un equilibrio establecido entre el enzima libre y el complejo enzima-inhibidor. Es el caso de la inhibición irreversible.

Con respecto a la interacción entre el sustrato y el inhibidor en relación a la ocupación de sitios libres en el enzima, se puede hablar de tres modos generales de inhibición<sup>54</sup>: competitiva, no competitiva y acompetitiva, que pueden ser distinguidas fácilmente de forma experimental mediante una representación de tipo Lineweaver-Burk.

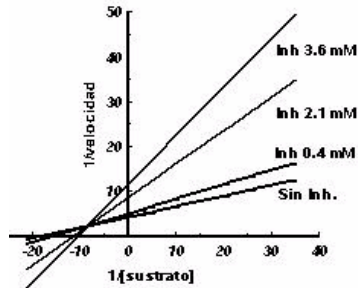
En el caso de una inhibición de tipo competitiva, el inhibidor y el sustrato compiten por un mismo sitio, por lo que la unión del inhibidor a dicho sitio impide la unión del sustrato. Este tipo de inhibición se caracteriza porque, en una representación Lineweaver-Burk, las diferentes rectas se cortan en el eje de ordenadas. En este caso la  $v_{max}$  no varía al modificar la concentración del inhibidor pero  $K_M$  aumenta al aumentar dicha concentración.



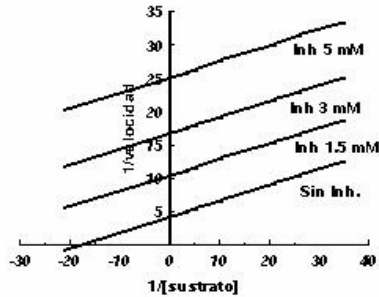
En el caso de una inhibición de tipo no competitiva, el inhibidor y el sustrato no compiten por un mismo sitio. Una interpretación de la inhibición no competitiva es que el inhibidor se une igual de bien al enzima que al complejo enzima-sustrato, por lo que la unión se produce haya o no haya

<sup>54</sup> a) Walsh, C. *Enzymatic Reaction Mechanisms*, Freeman, W.H. and Co. San Francisco, 1977; b) Fersht, A. *Enzyme Structure and Mechanism*, 2ª ed, Freeman, W.H. and Co. New York, 1985.

sustrato unido. Este tipo de inhibición se caracteriza porque, en una representación Lineweaver-Burk, las diferentes rectas se cortan en la zona negativa del eje de abscisas. En este caso  $v_{\max}$  disminuye al aumentar la concentración de inhibidor, pero  $K_M$  permanece constante.



Cuando tiene lugar una inhibición de tipo acompetitiva, el inhibidor solamente se une al complejo enzima-sustrato y no al enzima. Este tipo de inhibición se caracteriza porque, en una representación Lineweaver-Burk, las diferentes rectas son paralelas entre sí, y cortan al eje de abscisas en su zona negativa. En este caso tanto  $v_{\max}$  como  $K_M$  disminuyen al aumentar la concentración de inhibidor.



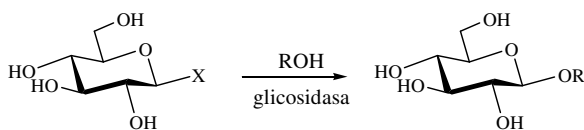
## 5.2.- GLICOSIDASAS

Las glicosidasas juegan un papel muy importante en la catálisis de la hidrólisis de los enlaces glicosídicos. Esta rotura ocurre, habitualmente, de tal

forma que se mantiene la configuración absoluta del carbono anomérico, (retención de la configuración), como en el caso de la  $\beta$ -galactosidasa lisozima, aunque a veces tiene lugar la inversión de dicha configuración (caso de la trehalasa  $\beta$ -amilasa<sup>55</sup>).

La hidrólisis enzimática es, mecanísticamente similar a la hidrólisis de glicósidos catalizada por ácidos. Ambas tienen lugar *via* ión oxonio intermedio o *via* un estado de transición que posee carácter de ión oxonio (explicado previamente en la introducción). En el caso de las glicosidasas siempre aparece un grupo carboxilato próximo a dicho ión como una unidad estructural repetitiva, cuya función es estabilizar el estado de transición (pag 6).

La síntesis glicosídica catalizada por glicosidasas es bastante similar a la síntesis de péptidos catalizada por proteasas. Y, como sucede en la síntesis peptídica, las glicosidasas pueden ser empleadas bajo condiciones de control termodinámico o control cinético<sup>56</sup>.



**Control termodinámico:** X=OH  
**Control cinético:** X=F, *o*-NO<sub>2</sub>Ph, OR'

Una serie de análogos y derivados de carbohidratos han mostrado ser interesantes para el estudio de la biosíntesis y modificación de oligosacáridos: la desoxinojirimicina, la swainsonina y la castanospermina inhiben la rotura de los oligosacáridos de glicoproteínas unidos a través de átomos de nitrógeno<sup>57</sup>; la tunicamicina y la estreptovirudina inhiben también la

<sup>55</sup> Sinott, M.L. *Chem. Rev.*, **1990**, 90, 1171.

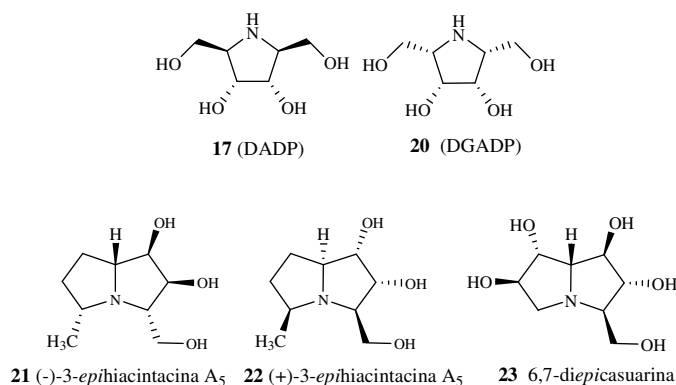
<sup>56</sup> Nilsson, K.G.I. *TIBTECH*, **1988**, 6, 256.; Bouquelot, E. *Ann. Chim.*, **1913**, 29, 145; Bouquelot, E. *J. Pharm. Chem.*, **1914**, 10, 361.

<sup>57</sup> Saul, R.; Chambers, J.P.; Molyneux, R.J.; Elbein, A.D. *Arch. Biochem. Biophys.*, **1983**, 221, 593; Elbein, A.D.; Molyneux, R.J.; *Alkaloids: Chemical and Biological Perspectives*, Pelletier, S.W. Ed.; New York, **1987**, 5, 1; Fellows, L. *Chem. Brit.*, **1987**, 23, 842; Winchester, B.G.; Cenci di Bello, I.; Richardson, A.C.; Nash, R.J.; Fellows, L.E.; Ramsden, N.G.; Fleet, G.W.J. *Biochem. J.*, **1990**, 269, 227; Fleet, W.J.; Winchester, G. B. *Glycobiology*, **1992**, 2, 199; Vogel, P. *Studies in Natural Products Chemistry*, Atta-ur-Rahman, Ed.; Elsevier: Amsterdam, **1993**, 12, 275.

glicosidación de proteínas<sup>58</sup>, la acarbosa inhibe la amilasa<sup>59</sup>, etc. Ambos conjuntos de inhibidores han llamado la atención por dos razones: en primer lugar, proveen de una vía de estudio de la química de los oligosacáridos de la superficie celular; por otro lado, se trata de sustancias que pueden considerarse con relativa facilidad, como análogos del estado de transición de la glicólisis, lo que permite aventurarse en el diseño de nuevos iminoazúcares más potentes y selectivos que inhiban la misma u otras glicosidasas<sup>60</sup>.

### 5.3.- ENSAYOS ENZIMÁTICOS

Como parte de los objetivos de la presente Tesis Doctoral se han realizado ensayos enzimáticos de algunos de los productos obtenidos, con la finalidad de evaluarlos como inhibidores potenciales de ciertas enzimas, ya que algunas estructuras de este tipo, se han revelado como unos potentes inhibidores de glicosidasas. De todos los productos obtenidos se han seleccionado los siguientes para su evaluación.



Cada experiencia se basa en principio en la determinación de la  $K_M$  (constante para cada enzima y medida que determina la afinidad del enzima

<sup>58</sup> Elbein, A.D. *Ann. Rev. Biochem.*, **1987**, 56, 497.

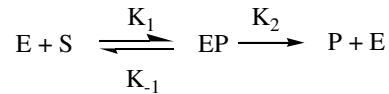
<sup>59</sup> Muller, L. *Biotechnology*, Rehm, H.J.; Reed, G. Ed.; VCH: Verlagsgesellschaft Weinheim, **1985**, 4, 18.

<sup>60</sup> Wong, C.H.; Dumas, D.P.; Ichikawa, Y.; Koseki, K.; Danishefsky, S.J.; Weston, B.W.; Lowe, J.B. *J. Am. Chem. Soc.*, **1992**, 114, 7321.



por el sustrato), y la determinación de la  $v_{\max}$  (velocidad máxima teórica: es la velocidad cuando todos los centros activos están ocupados con sustrato, nunca alcanzada en la realidad). Estos parámetros son calculados mediante el modelo de Michaelis-Menten, en el cual estos valores son representados en función de la concentración del sustrato.

$$v = \frac{V_{\max} \cdot [S]}{K_m + [S]}$$



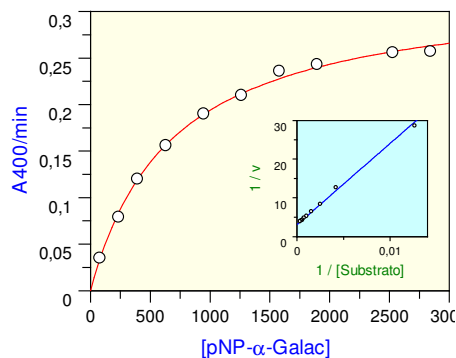
En una gráfica se representa A400/min frente a la [S], siendo A400/min la absorbancia a 400 nm de longitud de onda en función del tiempo y [S] la concentración del sustrato. En el inserto se observa la representación doble recíproca o de Lineweaver-Burk. Mediante el programa Grafit 4.0<sup>61</sup> se calculan directamente los valores de  $K_M$  y  $v_{\max}$  para cada enzima. En presencia del inhibidor, en una inhibición competitiva la  $v_{\max}$  permanece constante, mientras que la  $K_M$  aumenta al aumentar dicha concentración. En esta experiencia por tanto fijamos el valor de la  $v_{\max}$ .

Una vez determinada la  $v_{\max}$  para cada enzima, se realizan diferentes experiencias en presencia del inhibidor, obteniéndose una familia de rectas donde se representa  $1/v$  frente a [I], siendo  $v$  la velocidad de la reacción ( $\text{mM} \times \text{min}^{-1}$ ) e [I] la concentración del inhibidor. Con los enzimas probados este tipo de inhibidores ofrecen una inhibición competitiva, por lo que la  $v_{\max}$  permanece constante, mientras que la  $K_M$  aumenta al aumentar dicha concentración.

---

<sup>61</sup> Leatherbarrow, R.J. *Grafit 4.0*; Erithacus Software: Staines UK, 1998.

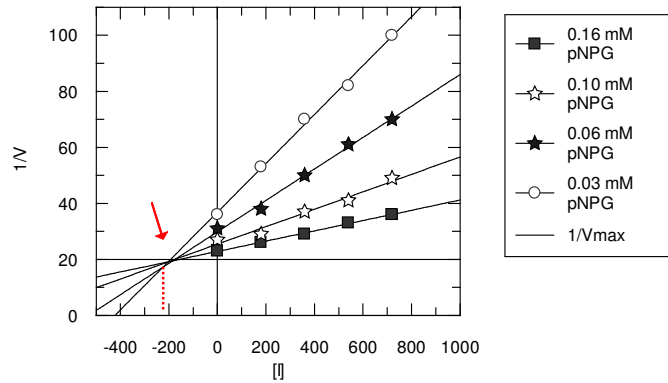
*Datos Cinética  
Enzimática  
pNP- $\alpha$ -Galac,  $\alpha$ -Galac,  
37°C, pH 7.3 mM NaPi*



Parameter	Value	Std. Error
Vmax	0,3266	0,0059
Km	684,9595	36,3975

Cada recta se ha determinado usando concentraciones diferentes de sustrato (mM) para las mismas concentraciones de inhibidor.

Finalmente, la representación de cómo varía la velocidad en función de la concentración del inhibidor, nos permite evaluar la capacidad inhibitoria de nuestro candidato, como una constante que denominaremos  $K_i$  (constante de inhibición), que corresponde a la constante de disociación del complejo enzima-inhibidor.



$$K_i = 200$$

Un buen inhibidor debe caracterizarse por producir una gran variación en la velocidad del proceso de hidrólisis al modificar levemente su concentración. En particular, cuando la concentración del inhibidor aumenta mucho, la velocidad del proceso debe hacerse muy pequeña. Esto implica un valor de  $K_i$  pequeño. Así, cuanto menor sea el valor de  $K_i$ , mayor será la variación en la velocidad de la reacción producida por pequeñas variaciones en la  $[I]$ .

Debido a los requerimientos actuales referentes a la citotoxicidad de los fármacos empleados, lo que se pretende siempre es que muy pequeños incrementos en la concentración del inhibidor originen grandes descensos en la velocidad de reacción. Esto es lo que debe caracterizar, de entrada, a un buen inhibidor enzimático.

Otro parámetro interesante se obtiene cuando se representan los valores de  $v/v_{\max}$  frente a  $[I]$ . De esta representación se recoge el valor de  $IC_{50}$ , (constante de inhibición 50), que corresponde a la concentración de inhibidor necesaria para que la velocidad de la reacción sea el 50% del valor que posee en ausencia de inhibidor (que correspondería a  $v_{\max}$ ). Al igual que el valor de  $K_i$ , un inhibidor será tanto más potente cuanto menor sea su valor de  $IC_{50}$ , ya que significará que se necesitará menos cantidad para originar una inhibición del 50%.

### 5.3.1.- EXPERIMENTAL

La metodología a seguir para la realización de los ensayos enzimáticos se basa en un método colorimétrico, es decir, en la medida de la absorbancia a una cierta longitud de onda dentro del visible, al originarse un producto coloreado en el seno de la reacción. Para ello, a un pH determinado (mediante disoluciones tampones de fosfato sódico), a una temperatura determinada y durante un cierto tiempo (3 min) se deja incubar *in vitro* una concentración constante de enzima con concentraciones variables del sustrato, (siempre como *p*-nitrofenilglucósido) que va a ser hidrolizado<sup>62</sup>. De esta forma, mientras tiene lugar la hidrólisis enzimática, se va liberando *p*-nitrofenol. El pH de la disolución (7.3) hace que se genere el anión *p*-nitrofenolato<sup>63</sup>. Este anión es amarillo, por lo que la intensidad del color (absorbancia a 400 nm) nos indica la cantidad de *p*-nitrofenolato presente, que será equivalente a la cantidad de hidrólisis producida por el enzima (actividad).

La adición de un inhibidor hace que la actividad enzimática sobre el sustrato disminuya ya que el sitio activo es ocupado por aquél. Esto hace que la absorbancia observada sea menor, que en ausencia de inhibidor, ya que hay menos *p*-nitrofenolato libre.

En los dos tipos de ensayos se ha seguido siempre el siguiente protocolo para la determinación del grado de hidrólisis:

a) En ausencia de inhibidor:

- Adición de la disolución tampón.

Tampón fosfato<sup>64</sup>:

A: 0.2 M solución de fosfato sódico monobásico 27.8 g en 1000 mL de agua desionizada.

---

<sup>62</sup> Evans, S.V.; Fellows, L.E.; Bell, E.A. *Phytochemistry*, **1983**, 22, 768; Hashimoto, H.; Fujimori, T.; Yuasa, H. *J Carbohydr. Chem.*, **1990**, 9, 683; Izquierdo, I.; Plaza, M.T.; Richardson, A.C.; Suárez Ortega, M.D. *Carbohydr. Res.*, **1993**, 242, 109; Picasso, S.; Chen, Y.; Vogel, P. *Carbohydr. Lett.*, **1994**, 1, 1.

<sup>63</sup> Coeficiente de extinción molar para el *p*-nitrofenolato a pH 10 = 18300 M<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>

<sup>64</sup> Plumell, M. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **1949**, 30, 129.

B: 0.2 M solución de fosfato sódico dibásico heptahidratado 53.65 g o dodecahidratado 71.7 g en 1000 mL de agua desionizada.

- Adición de albúmina (10 mg/mL).
- Adición del sustrato (*p*-nitrofenilglicósido).
- Se deja alcanzar la temperatura de 37°C, durante un tiempo prefijado en cubetas termostatzadas.
- Se añade el enzima.
- Medida de absorción en cubetas de plástico de 1 cm de luz, durante 3 min, a 400 nm, en un espectofotómetro UV-visible Spectronic®.

En cada ensayo siempre se ha medido un *blanco*, caracterizado por la ausencia del sustrato. De esta forma se observa la posible absorción a 400 nm de los diferentes componentes de la mezcla.

b) En presencia del inhibidor

- Adición de la disolución tampón.
- Adición de albúmina (10 mg/mL).
- Adición del enzima.
- Adición del inhibidor.
- Incubación de la mezcla durante un tiempo prefijado, en cubetas termostatzadas a 37°C.
- Adición del sustrato (*p*-nitrofenilglicósido).
- Medida de absorción en cubetas de plástico de 1 cm de luz, durante 3 min, a 400 nm, en un espectofotómetro UV-visible Spectronic®.

En estos casos, también se han medido *blancos*, en ausencia de enzima, que muestran que la absorción es sólo producida por la hidrólisis y no por la temperatura que alcanza la mezcla.

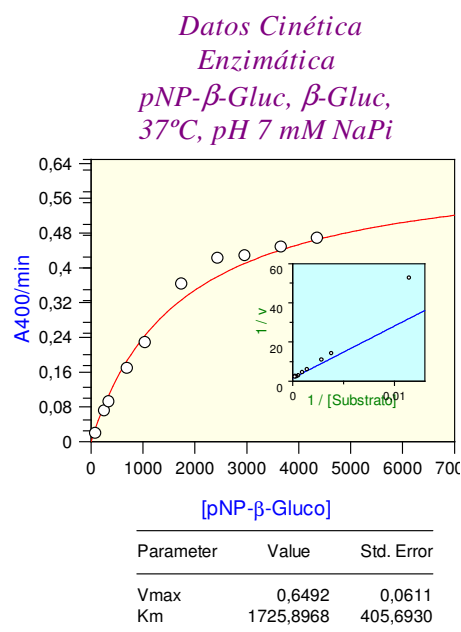
Se ha determinado la actividad de varios inhibidores potenciales (antes expuestos) con varias enzimas.

## 5.4.- RESULTADOS DE LOS ENSAYOS DE INHIBICIÓN

A continuación se describe la determinación experimental de los valores de inhibición más significativos encontrados, que corresponden a los marcados en negrita en la tabla de resultados generales (pag. 121).

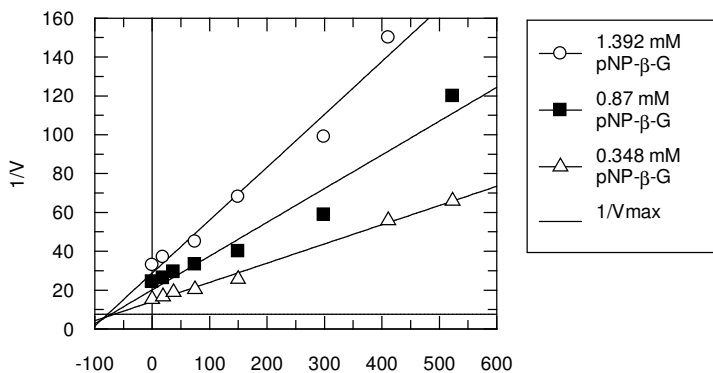
### 5.4.1.- Estudio de la actividad inhibitora de (2R,3R,4S,5S)-3,4-dihidroxi-2,5-bis(hidroximetil)pirrolidina (DADP, 17) frente a la $\beta$ -Glucosidasa de almendra (EC 3.2.1.21)

En primer lugar, la representación de Michaelis-Menten nos ofrece la siguiente gráfica para la  $\beta$ -glucosidasa. Ésta nos permite calcular los valores de  $K_M$  y  $v_{max}$  característica de cada enzima, en ausencia de inhibidor. Para esta determinación se han empleado las siguientes condiciones:

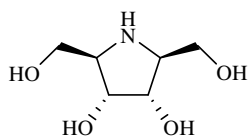


Del valor de la  $K_M$  se determinan las tres concentraciones de sustrato que se utilizan en la determinación de la  $K_i$ , siendo una de ellas igual a la  $K_M$ , otra tres veces superior y la última tres veces inferior. Esto determina el número de rectas que aparecen en la gráfica siguiente.

El valor de  $K_i$ , se puede conocer representando los valores de  $(1/v)$  frente a las diferentes concentraciones de inhibidor. El punto de corte de todas las rectas se caracteriza por una ordenada cuyo valor es  $1/v_{\max}$  y por una abscisa, cuyo valor es precisamente  $-K_i$  (en el caso de inhibición competitiva la  $v_{\max}$  no varía al modificar la concentración del inhibidor).



[17]



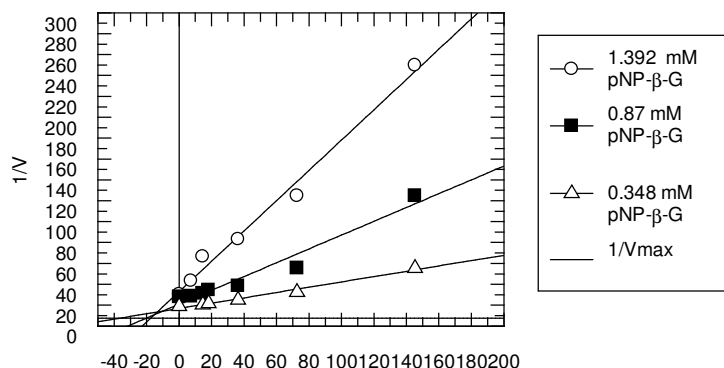
17 (DADP)

De la representación anterior se obtiene el valor de  $K_i = 85 \mu\text{M}$  para la DADP 17.

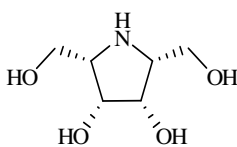
#### 5.4.2.- Estudio de la actividad inhibidora de (2R,3S,4R,5S)-3,4-dihidroxi-2,5-bis(hidroximetil) pirrolidina (DGADP, 20) frente a la $\beta$ -Glucosidasa de almendra (EC 3.2.1.21)

Para el estudio de la DGADP 20, los valores de  $K_M$  y  $v_{\max}$  para la  $\beta$ -glucosidasa de almendra obtenidos en la representación de Michaelis-Menten, son los mismos que utilizamos en el estudio anterior para la misma enzima (pag. 113). Una vez obtenidos estos datos se procede a calcular la  $K_i$ ,

representando los valores obtenidos de  $1/v$  frente a las distintas concentraciones de inhibidor que aparecen en las diferentes rectas.



[20]



**20** (DGADP)

Para la DGADP **20**, el valor de  $K_i = 13 \mu\text{M}$ , se obtiene de la abscisa en el punto de corte de todas las rectas.

Aunque sólo la pirrolidina **20** ofrece una sensible actividad inhibidora, vamos a calcular también el valor de  $K_i$  para el caso de pirrolizidinas **21**, **22**, **23**.

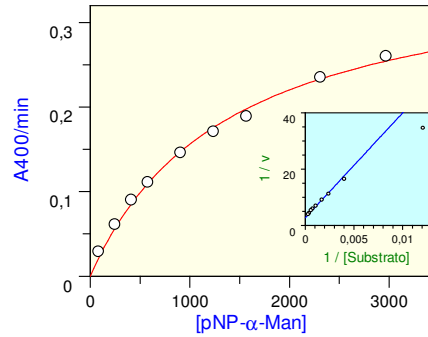
#### 5.4.3.- Estudio de la actividad inhibidora de (1R,2S,3S,5R,7aR)-1,2-dihidroxi-3-hidroximetil-5-metilpirrolizidina (**21**) frente a la $\alpha$ -Manosidasa de *Canavalia ensiformis* (jack beans) (EC 3.2.1.24)

La representación tipo Michaelis-Menten nos ofrece la siguiente gráfica. En el inserto podemos observar la recta que resulta al representar  $1/v$



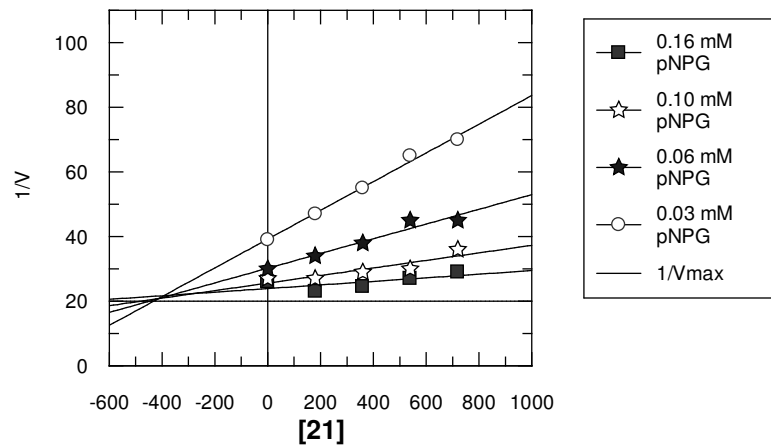
frente a  $1/[S]$  (representación doble recíproca o de Lineweaver-Burk). Una vez determinados los valores de  $K_M$  y  $v_{max}$  se realiza el ensayo de inhibición.

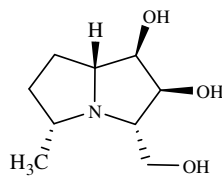
*Datos Cinética  
Enzimática  
pNP- $\alpha$ -Man,  $\alpha$ -Man, 37°C,  
pH 7.0 mM NaPi*



Parameter	Value	Std. Error
Vmax	0,3736	0,0160
Km	1392,5952	125,6733

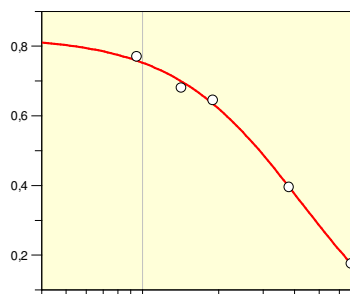
A partir de la siguiente gráfica calculamos el valor de  $K_i$ .





**21** (-)-3-ephiacintacina A<sub>5</sub>

También se ha determinado para **21** el valor de su IC<sub>50</sub> (definido en la pag 110). Se obtiene representando  $v/v_{\max}$  frente a [I].



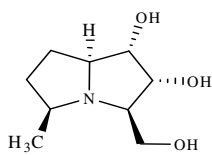
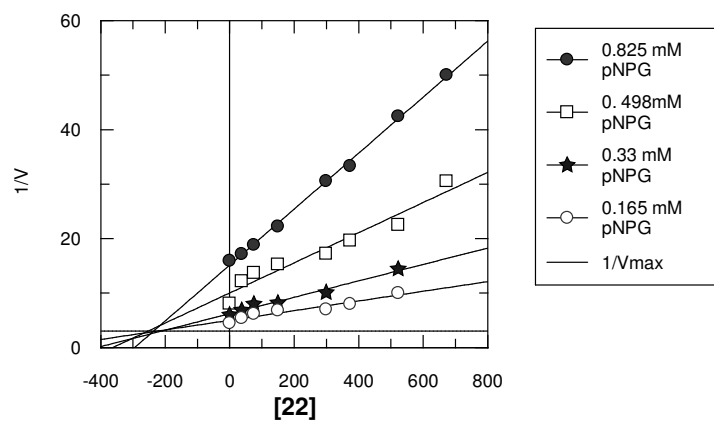
[I]

Parameter	Value	Std. Error
Y Range	0,95	0,16
IC 50	422,06	91,03
Slope factor	1,71	0,26
Background	-0,12	0,16

El valor de IC<sub>50</sub> = **422** para el compuesto **21** no es muy destacable, pero se observa cierta actividad inhibitoria.

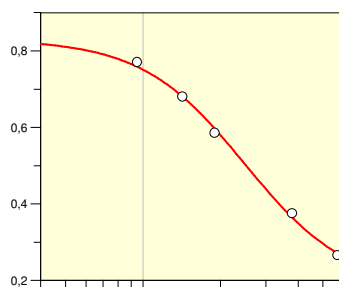
#### 5.4.4.- Estudio de la actividad inhibitoria de (1S,2R,3R,5S,7aS)-1,2-dihidroxi-3-hidroximetil-5-metilpirrolizidina (**22**) frente a la $\alpha$ -Manosidasa de *Canavalia ensiformis* (jack beans) (EC 3.2.1.24)

El compuesto **22**, muestra la siguiente gráfica frente a la  $\alpha$ -manosidasa.



22 (+)-3-epihiacintacina A<sub>5</sub>

La gráfica siguiente nos dará el valor de IC<sub>50</sub> = 250.



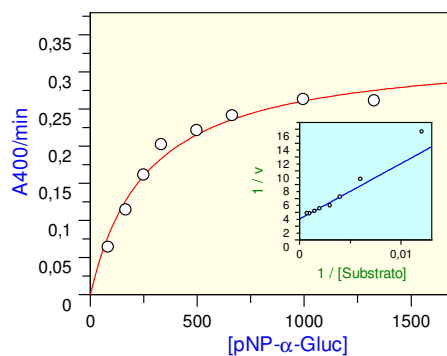
[1]

Parameter	Value	Std. Error
Y Range	0,65	0,06
IC 50	248,11	26,17
Slope factor	2,17	0,31
Background	0,18	0,05

#### 5.4.5.- Estudio de la actividad inhibidora de 6,7-diepicasuarina (**23**) frente a la $\alpha$ -Glucosidasa de arroz (EC 3.2.1.20)

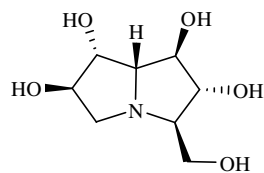
Los datos de cinética enzimática aparecen para la  $\alpha$ -Glucosidasa de arroz en la siguiente gráfica.

*Datos Cinética  
Enzimática  
pNP- $\alpha$ -Gluc,  $\alpha$ -Gluc,  
37°C, pH 6.8 mM NaPi*

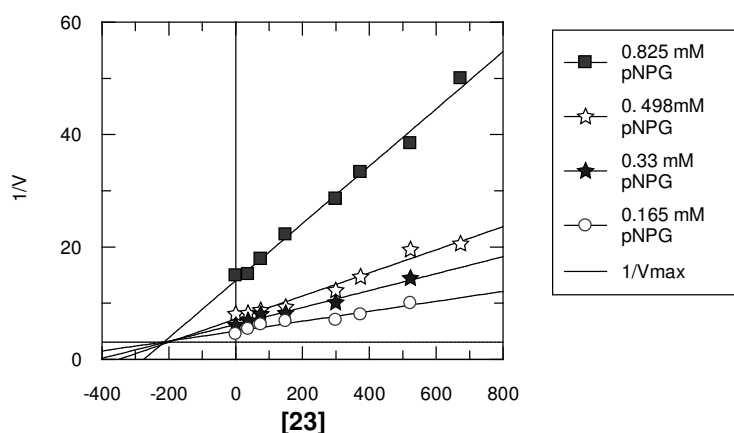


Parameter	Value	Std. Error
Vmax	0,3302	0,0178
Km	265,7749	41,7514

Para el compuesto **23**, la constante de inhibición  $K_i$  se determina por el mismo procedimiento usado para los compuestos anteriores.



**23** 6,7-diepicasuarina



Para el compuesto **23**, finalmente la  $K_i = 200 \mu\text{M}$ .

#### 5.4.6.- RESUMEN DE LOS RESULTADOS

A continuación pueden verse recogidos en la siguiente tabla los resultados de inhibición ( $K_i$ ) para los compuestos **17**, **20**, **21**, **22** y **23** frente a los enzimas que se indican.

Como puede observarse en el esquema siguiente, el producto más activo es la DGADP **20**, que manifiesta una potente actividad inhibitoria ( $K_i = 50 \text{ nM}$ ) frente a la  $\alpha$ -galactosidasa (café verde), como había sido determinado previamente por otros autores<sup>65</sup>. En el presente trabajo hemos determinado que este compuesto manifiesta también una notable actividad frente a  $\beta$ -glucosidasa de almendra y frente a  $\alpha$ -galactosidasa (*Aspergillus oryzae*) ( $K_i = 13 \mu\text{M}$ ,  $K_i = 7 \mu\text{M}$ , respectivamente). Por otra parte la (**DADP**, **17**) presenta una actividad inhibitoria moderada ( $K_i = 85 \mu\text{M}$ ) muy interesante frente a la  $\beta$ -glucosidasa de almendra.

<sup>65</sup> Wang, Y.-F.; Takaoka, Y.; Wong, C.-H. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1994**, *33*, 1242.

	<b>17</b>	<b>20</b>	<b>21</b>	<b>22</b>	<b>23</b>
$\alpha$ -Glucosidasa (arroz) (EC 3.2.1.20)	175 $\mu$ M	NI	NI	NI	<b>200 <math>\mu</math>M</b>
$\alpha$ -Glucosidasa (levadura) (EC 3.2.1.20)	240 $\mu$ M	NI	NI	NI	NI
$\beta$ -Glucosidasa (almendra) (EC 3.2.1.21)	<b>85 <math>\mu</math>M</b>	<b>13 <math>\mu</math>M</b>	NI	NI	NI
$\alpha$ -Galactosidasa (café verde) (EC 3.2.1.22)	100 $\mu$ M	50 nM <sup>65</sup>	NI	NI	NI
$\beta$ -Galactosidasa (hígado de bovino) (EC 3.2.1.23)	NI	NI	NI	300 $\mu$ M	NI
				IC <sub>50</sub> 329	
$\beta$ -Galactosidasa (Aspergillus oryzae) (EC 3.2.1.23)	NI	7 $\mu$ M	NI	NI	NI
$\alpha$ -Manosidasa (almendra) (EC 3.2.1.24)	NI	NI	NI	NI	NI
$\alpha$ -Manosidasa (Jack bean) (EC 3.2.1.24)	NI	NI	<b>420 <math>\mu</math>M</b>	<b>250 <math>\mu</math>M</b>	NI
			<b>IC<sub>50</sub> 417</b>	<b>IC<sub>50</sub> 253</b>	
$\alpha$ -Xilosidasa (E. coli) (EC 3.2.1.37)	NI	NI	NI	NI	NI

**NI:** no inhibe (la velocidad de hidrólisis del sustrato es la misma en ausencia de inhibidor y en presencia del mismo a altas concentraciones).

**En negrita:** valores cuya determinación experimental se ha descrito en este apartado.



## **VI.- CONCLUSIONES**





A la vista de los resultados comentados en la Parte Teórica, podemos llegar a las siguientes conclusiones:

**1<sup>a</sup>.**- La D-fructosa es una materia prima adecuada, por su esqueleto, su funcionalización y estereoquímica para la síntesis de derivados de pirrolidinas y pirrolizidinas polihidroxiladas.

**2<sup>a</sup>.**- La 1,2:4,5-di-*O*-isopropilidén- $\beta$ -D-fructopiranososa, es un material de partida adecuado para obtener derivados de 5-azido-5-desoxi- $\beta$ -D-psicopiranososa y - $\alpha$ -L-tagatopiranososa ya que la etapa clave en ambos procesos, inversión de la configuración en C-3 de la D-fructosa, se produce con alta estereoselectividad.

**3<sup>a</sup>.**- El 5-azido-3,4-di-*O*-bencil-1-*O*-*terc*-butildifenilsilil-5-desoxi- $\alpha$ -D-psicopiranososa (**102**) es un precursor apropiado para la preparación de pirrolidinas parcialmente protegidas como la (2*S*,3*S*,4*R*,5*R*)-3,4-dibenciloxi-2'-*O*-*terc*butildifenilsilil-2,5-bis(hidroximetil)pirrolidina (DADP) o su epímero en C-2 (DALDP), en procesos altamente estereoselectivos.

**4<sup>a</sup>.**- El 5-azido-3,4-di-*O*-bencil-5-desoxi-1-*O*-pivaloil- $\alpha$ -L-tagatopiranososa (**118**) es un precursor adecuado para la preparación de (2*R*,3*S*,4*R*,5*S*)-3,4-dibenciloxi-2,5-bis(hidroximetil)-2'-*O*-pivaloilpirrolidina (DGADP) en un proceso altamente estereoselectivo.

**5<sup>a</sup>.**- La DADP parcialmente protegida es un buen intermedio sintético para la preparación de pirrolizidinas polihidroxiladas.

**6<sup>a</sup>.**- La presencia de un plano de simetría en la DADP, permite la preparación de pirrolizidinas enantioméricas, a partir de sus derivados ortogonalmente protegidos.

**7<sup>a</sup>.**- En la preparación de la (-)- (**21**) y (+)-3-*epi*hiacintacina A<sub>5</sub> (**22**), la configuración del nuevo estero centro generado (C-5) está controlada por la del C-7a, quedando el grupo metilo en disposición *trans* respecto al átomo de hidrógeno en C-7a.

**8<sup>a</sup>.**- Las pruebas de inhibición indican, que en el caso que nos ocupa, las polihidroxipirrolidinas resultan ser más activas que las correspondientes pirrolizidinas, frente a los enzimas ensayados.

## **VII.- ESPECTROS**

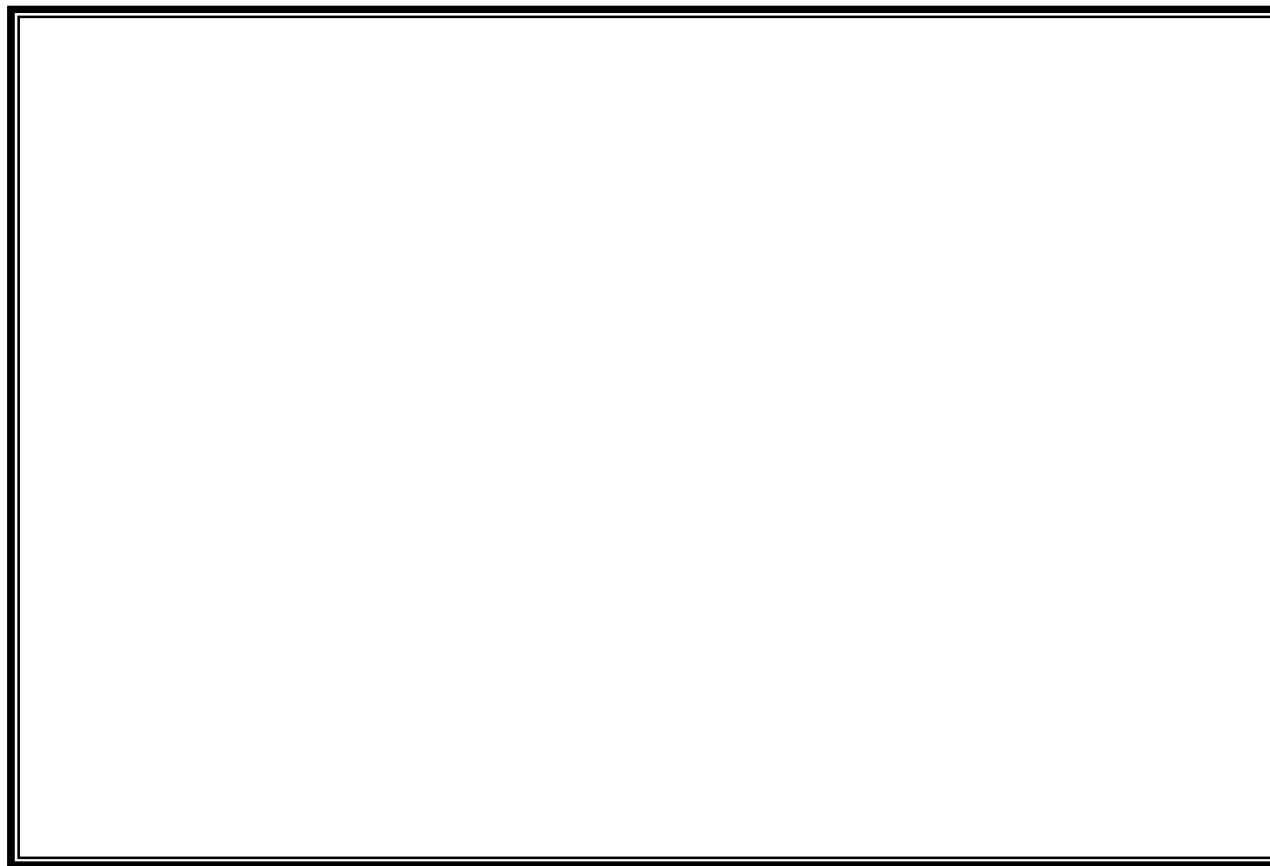


149



<sup>1</sup>H-RMN (92): 3-*O*-bencil-1,2-*O*-isopropilidén-β-D-psicopiranososa

150



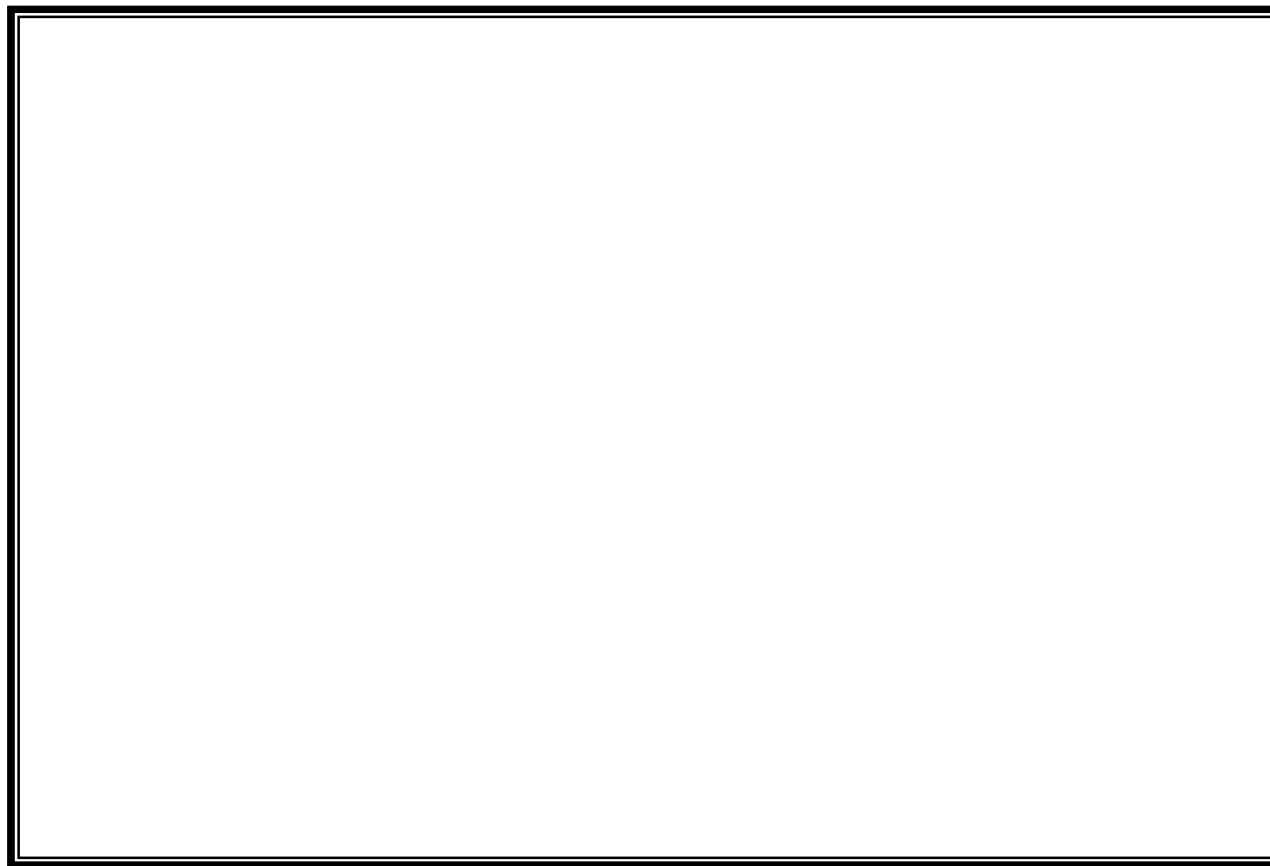
<sup>13</sup>C-RMN (92): 3-*O*-bencil-1,2-*O*-isopropilidén-β-D-psicopiranos

151



<sup>1</sup>H-RMN (95): 4-*O*-bencil-3-*O*-benzoil-5-desoxi-1,2-*O*-isopropilidén-5-yodo- $\alpha$ -L-sorbopiranosá.

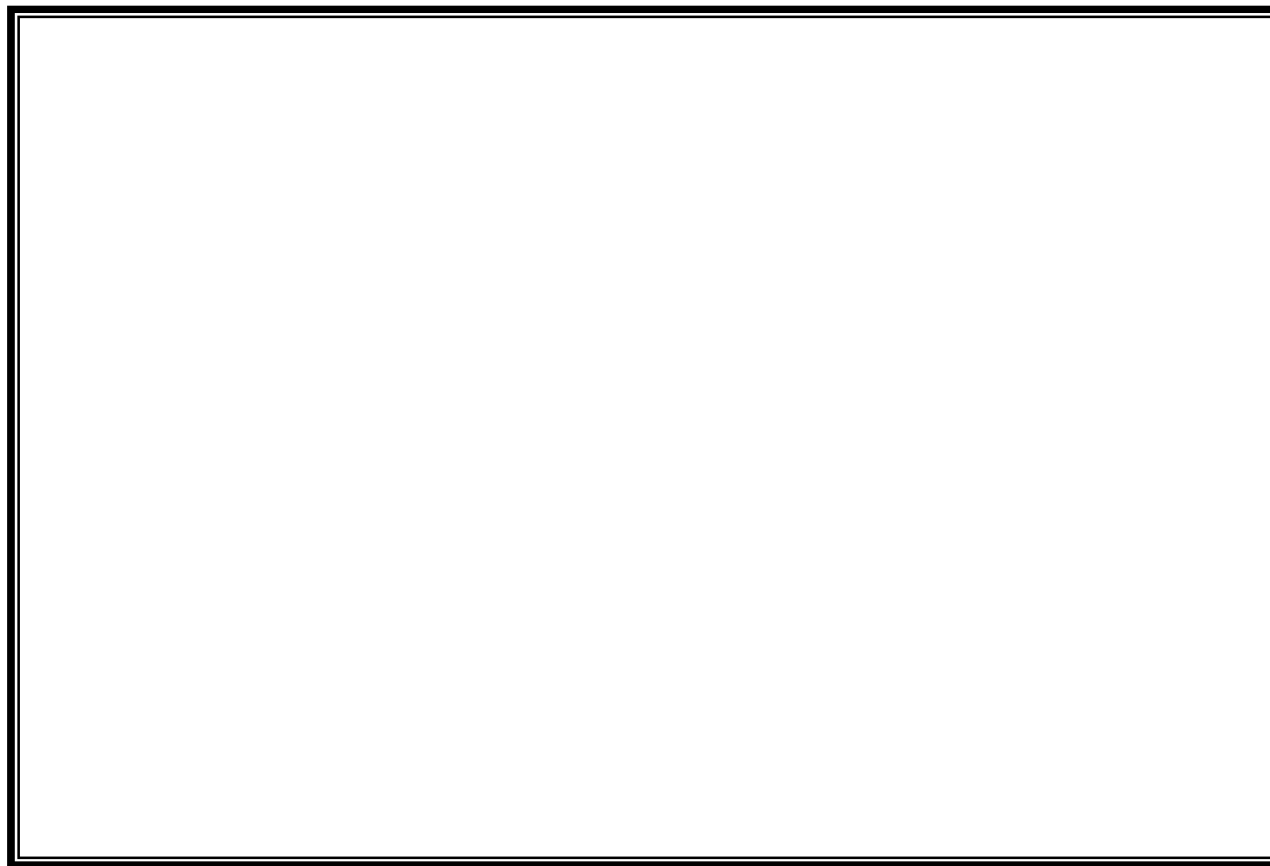




<sup>13</sup>C-RMN (95): 4-*O*-bencil-3-*O*-benzoil-5-desoxi-1,2-*O*-isopropilidén-5-yodo- $\alpha$ -L-sorbopiranosá.



<sup>1</sup>H-RMN (96): 5-azido-4-*O*-bencil-3-*O*-benzoil-5-desoxi-1,2-*O*-isopropilidén-β-D-fructo piranosa.

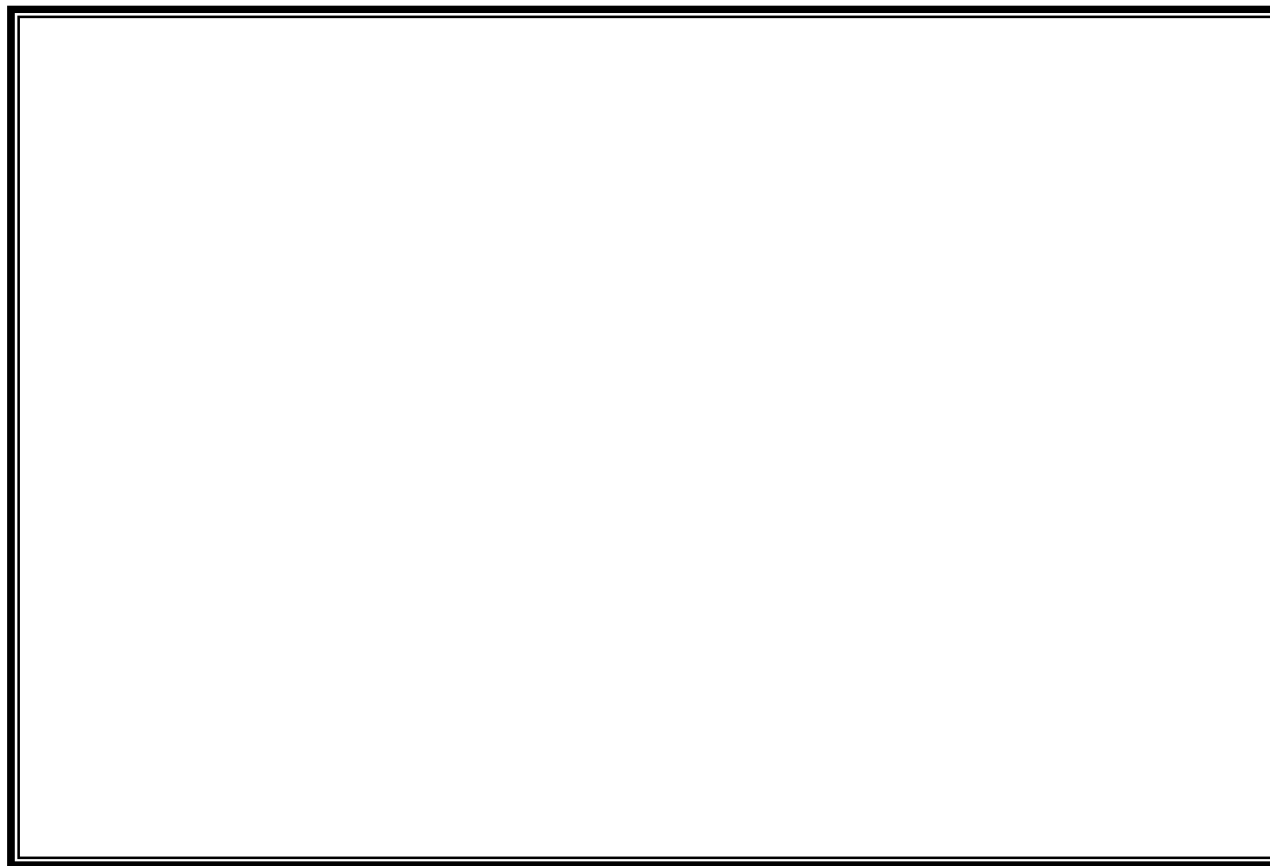


<sup>13</sup>C-RMN (96): 5-azido-4-*O*-bencil-3-*O*-benzoil-5-desoxi-1,2-*O*-isopropilidén-β-D-fructopiranosá.

155



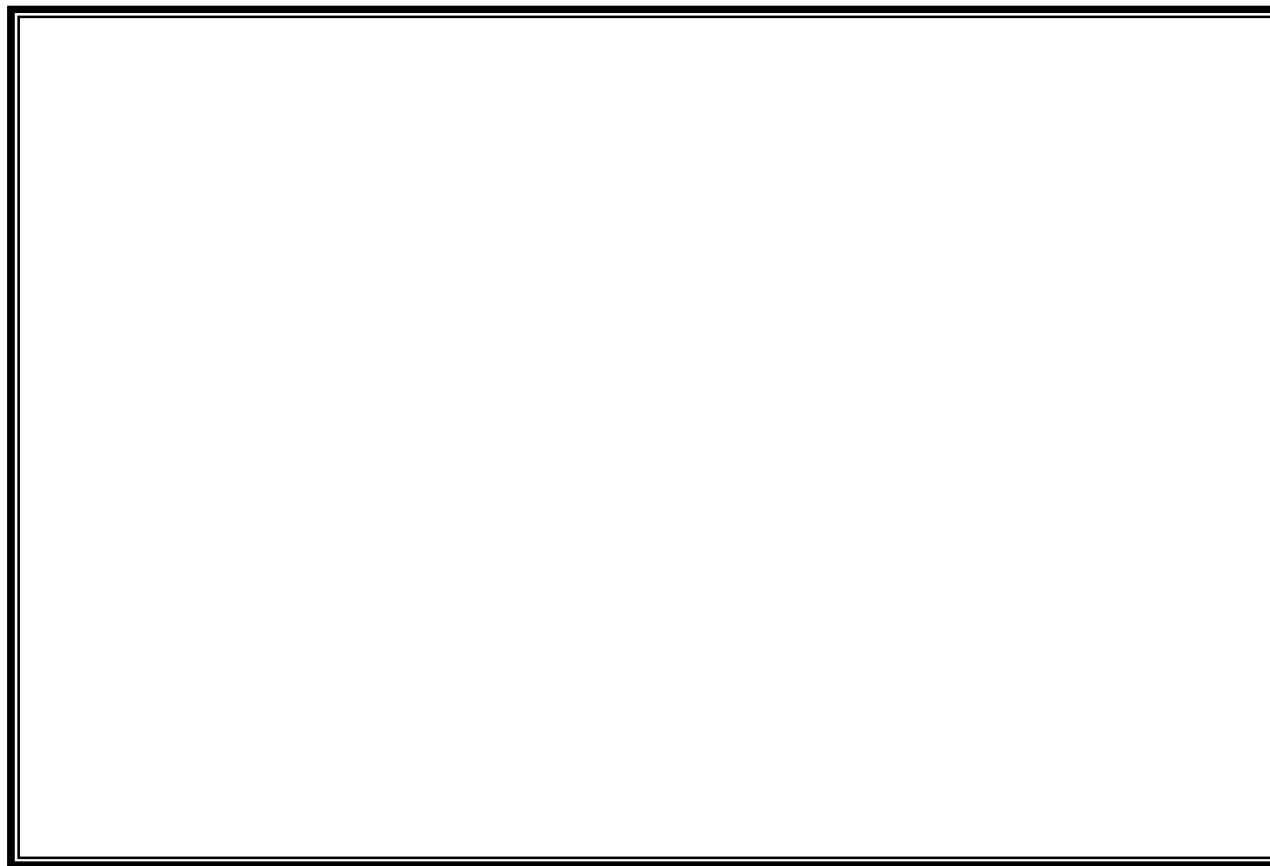
<sup>1</sup>H-RMN (97): 5-azido-4-*O*-bencil-5-desoxi-1,2-*O*-isopropilidén-β-D-fructopiranososa



<sup>13</sup>C-RMN (97): 5-azido-4-*O*-bencil-5-desoxi-1,2-*O*-isopropilidén-β-D-fructopiranososa



<sup>1</sup>H-RMN (99): 5-azido-4-*O*-bencil-5-desoxi-1,2-*O*-isopropilidén-β-D-psicopiranososa.

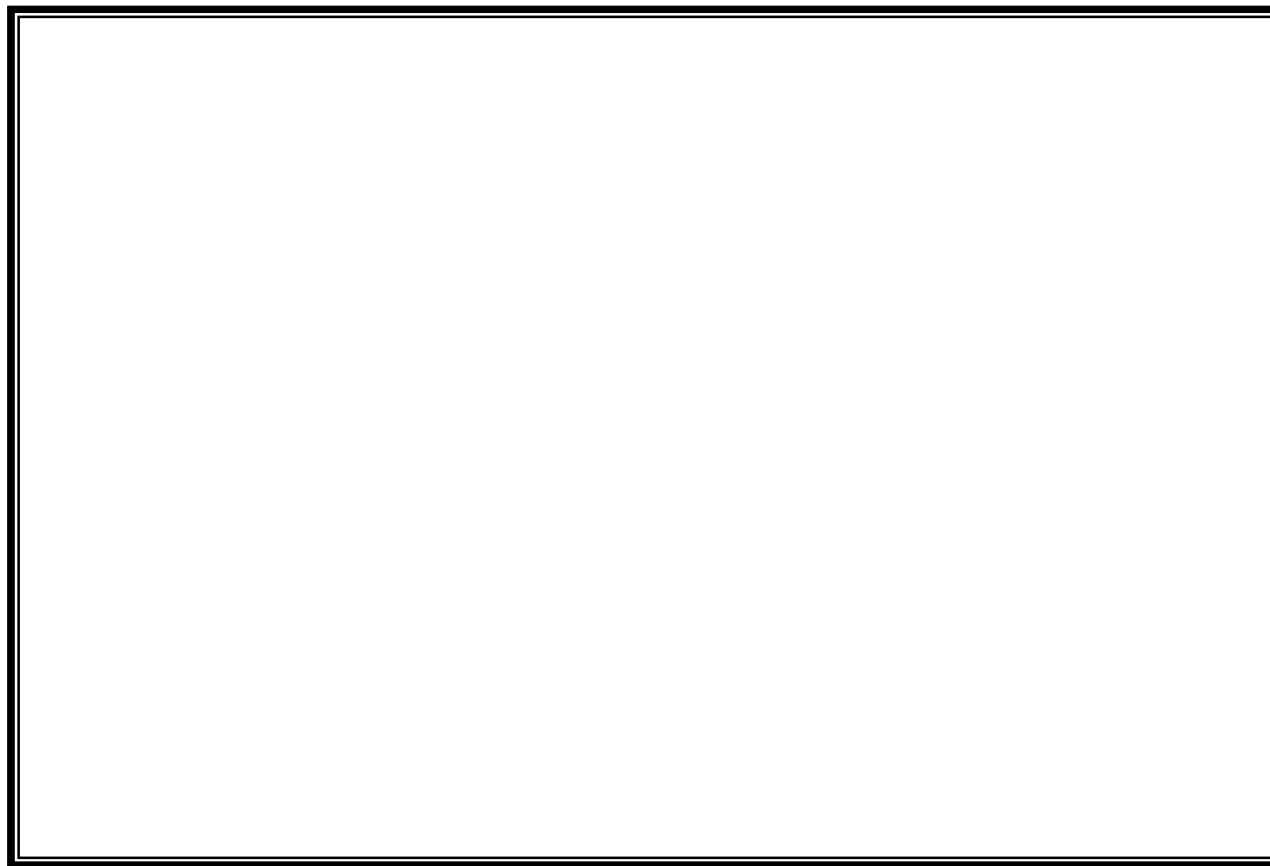


<sup>13</sup>C-RMN (99): 5-azido-4-*O*-bencil-5-desoxi-1,2-*O*-isopropilidén-β-D-psicopiranososa



<sup>1</sup>H/<sup>13</sup>C-HMQC (99): 5-azido-4-*O*-bencil-5-desoxi-1,2-*O*-isopropilidén-β-D-psicopiranososa

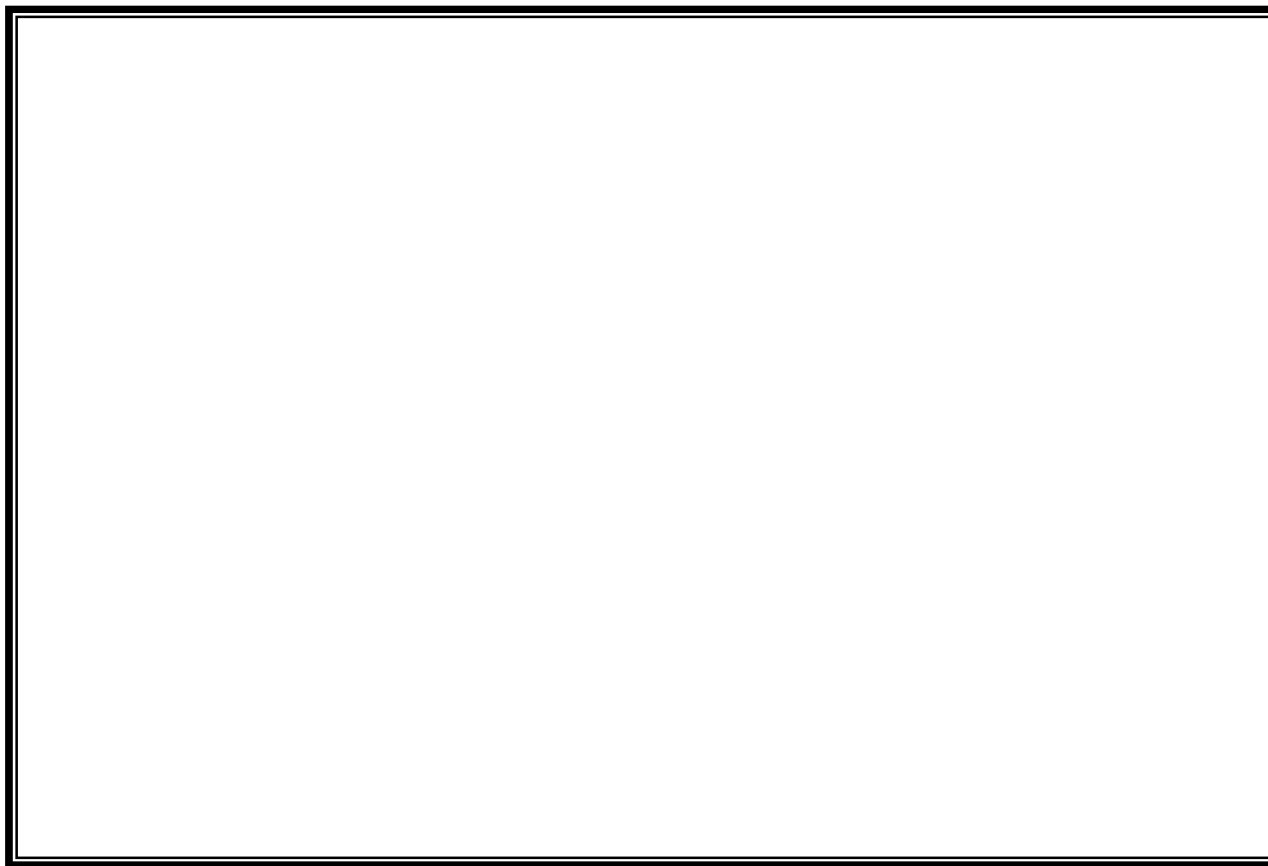




**<sup>1</sup>H-RMN (100): 5-azido-3,4-di-*O*-bencil-5-desoxi-1,2-*O*-isopropilidén-β-D-psicopiranos.**



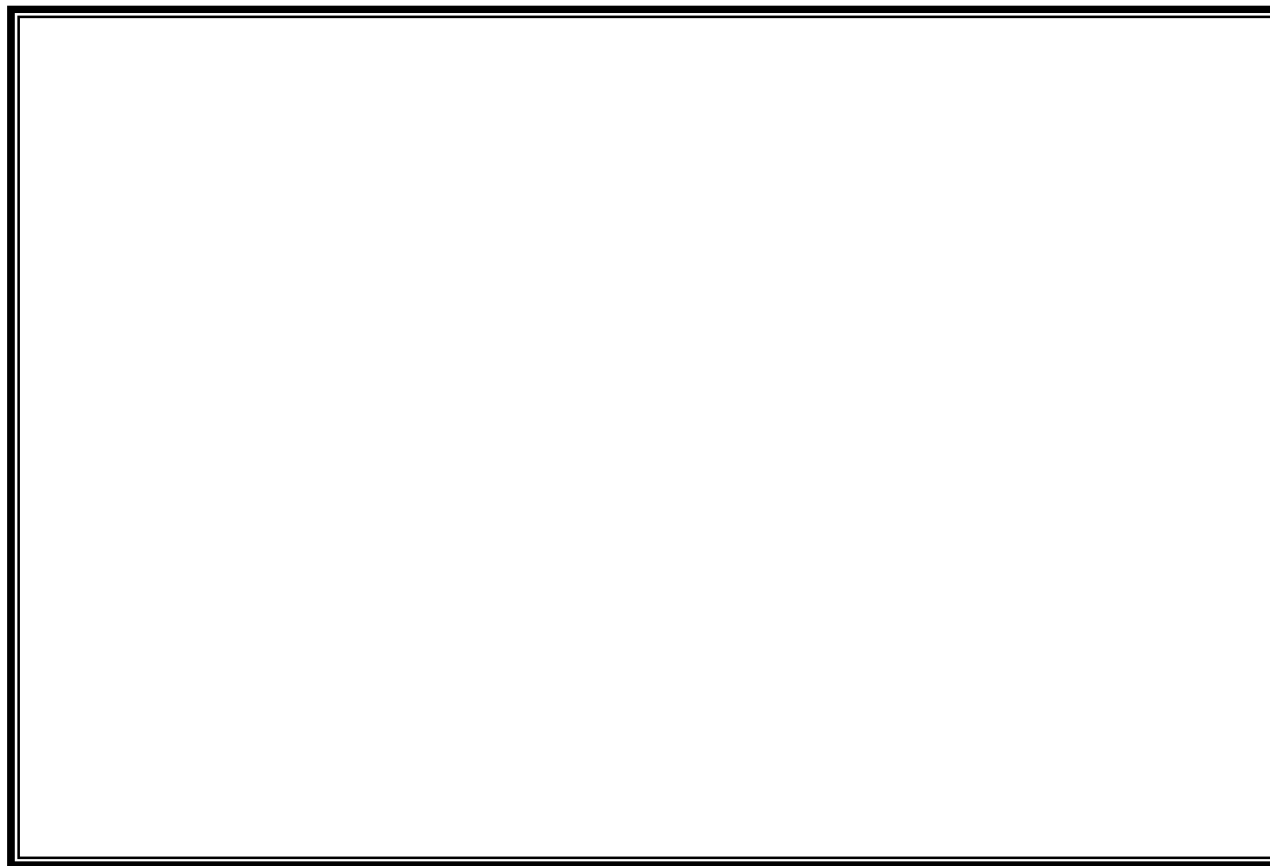
<sup>13</sup>C-RMN (100): 5-azido-3,4-di-*O*-bencil-5-desoxi-1,2-*O*-isopropilidén-β-D-psicopiranososa.



**<sup>1</sup>H-RMN (101): 5-azido-3,4-di-*O*-bencil-5-desoxi- D-psicopiranososa**



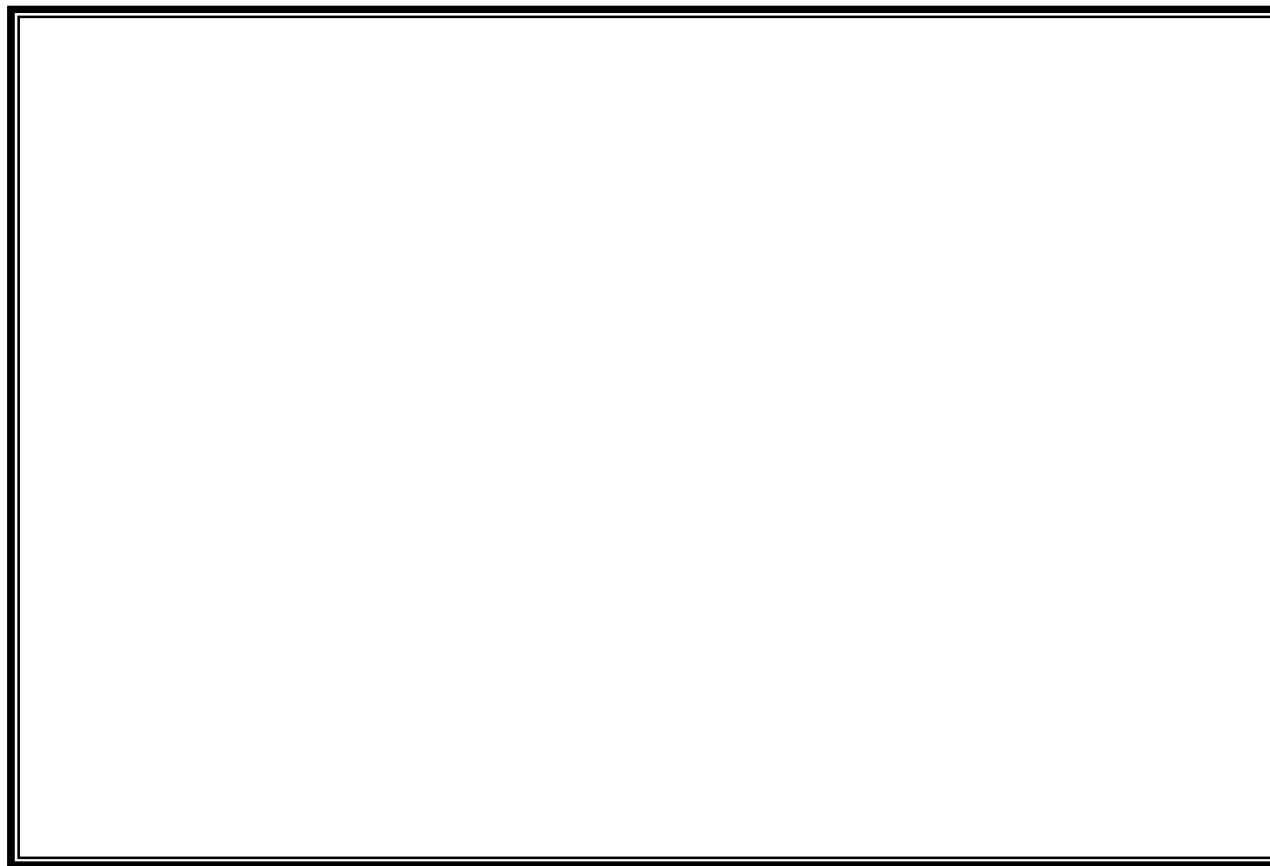
<sup>13</sup>C-RMN (101): 5-azido-3,4-di-*O*-bencil-5-desoxi-D-psicopiranosas.



<sup>1</sup>H-RMN (102): 5-azido-3,4-di-*O*-bencil-1-*O*-*terc*-butildife nilsilil-5-desoxi- $\alpha$ -D-psicopiranososa.



<sup>13</sup>C-RMN (102): 5-azido-3,4-di-*O*-bencil-1-*O*-*terc*-butildife nilsilil-5-desoxi- $\alpha$ -D-psicopiranosu.

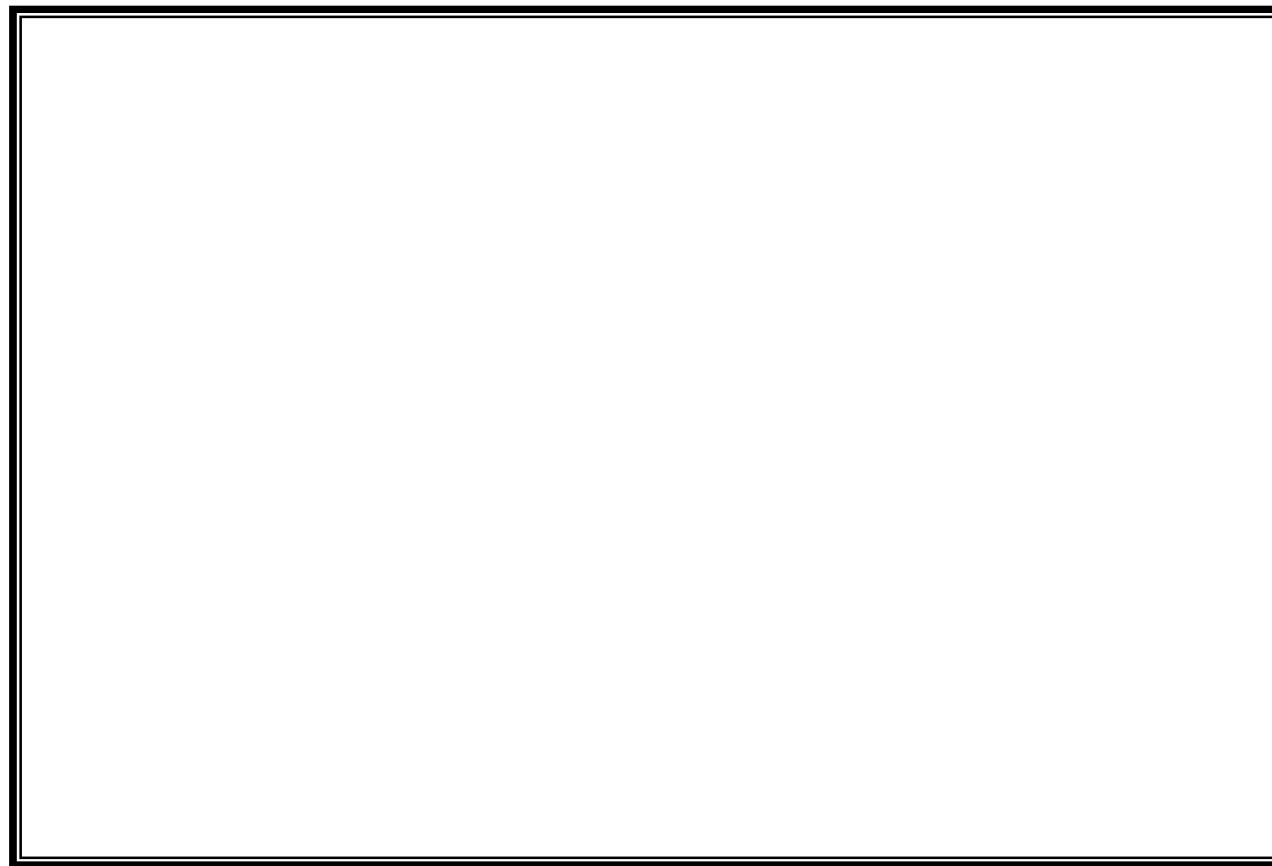


**<sup>1</sup>H-RMN (103): 5-azido-3,4-di-*O*-bencil-1,6-di-*O*-*tert*-butildifenilsilil-5-desoxi-D-psicosa.**



<sup>13</sup>C-RMN (103): 5-azido-3,4-di-*O*-bencil-1,6-di-*O*-*terc*-butildifenilsilil-5-desoxi-D-p



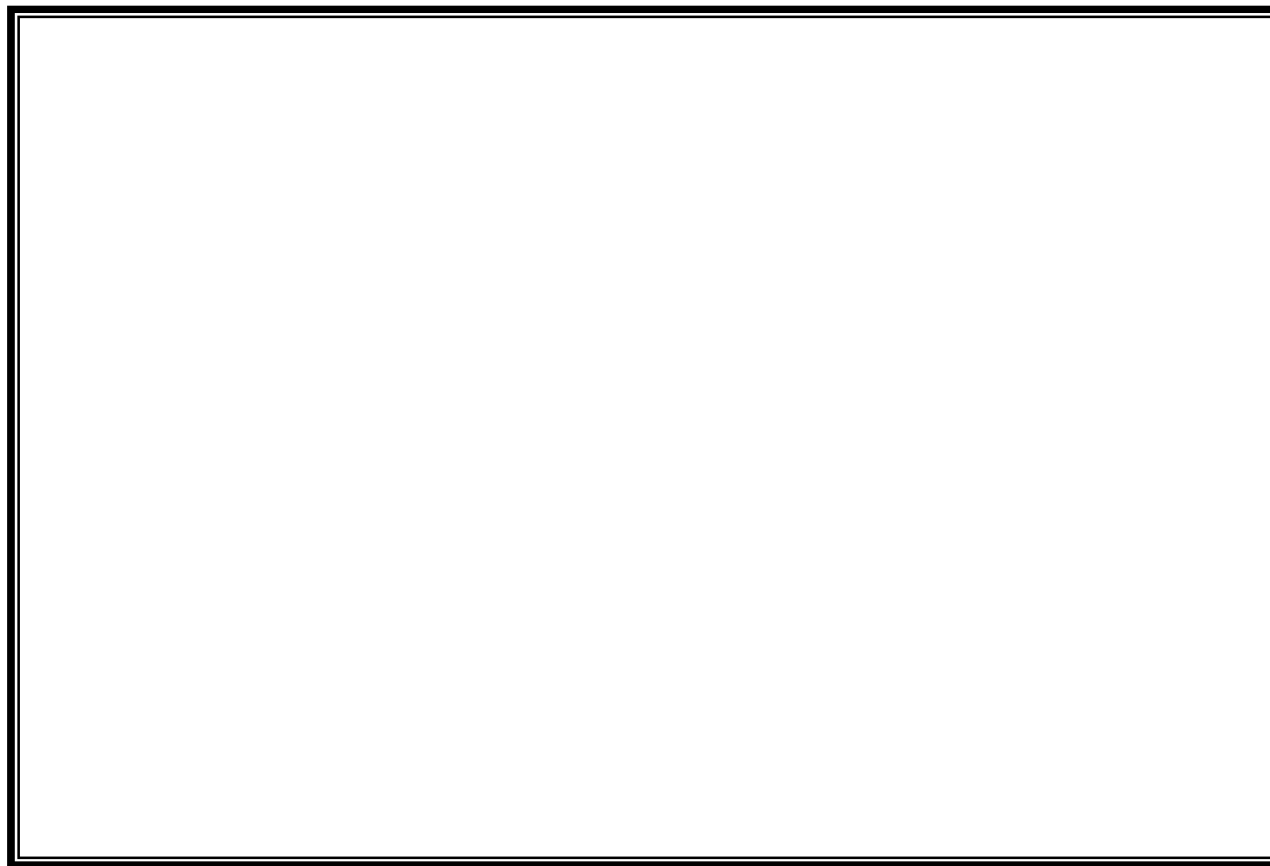


**<sup>1</sup>H-RMN (18): (2*R*,3*S*,4*R*,5*R*)-3,4-dibenciloxi-2'-*O*-*terc*-butildifenilsilil-2,5-bis(hidroxi metil)pirro lidina**



<sup>13</sup>C-RMN (18): (2*R*,3*S*,4*R*,5*R*)-3,4-dibenciloxi-2'-*O*-*terc*-butildifenilsilil-2,5-bis(hidroximetil)pirro lidina

170

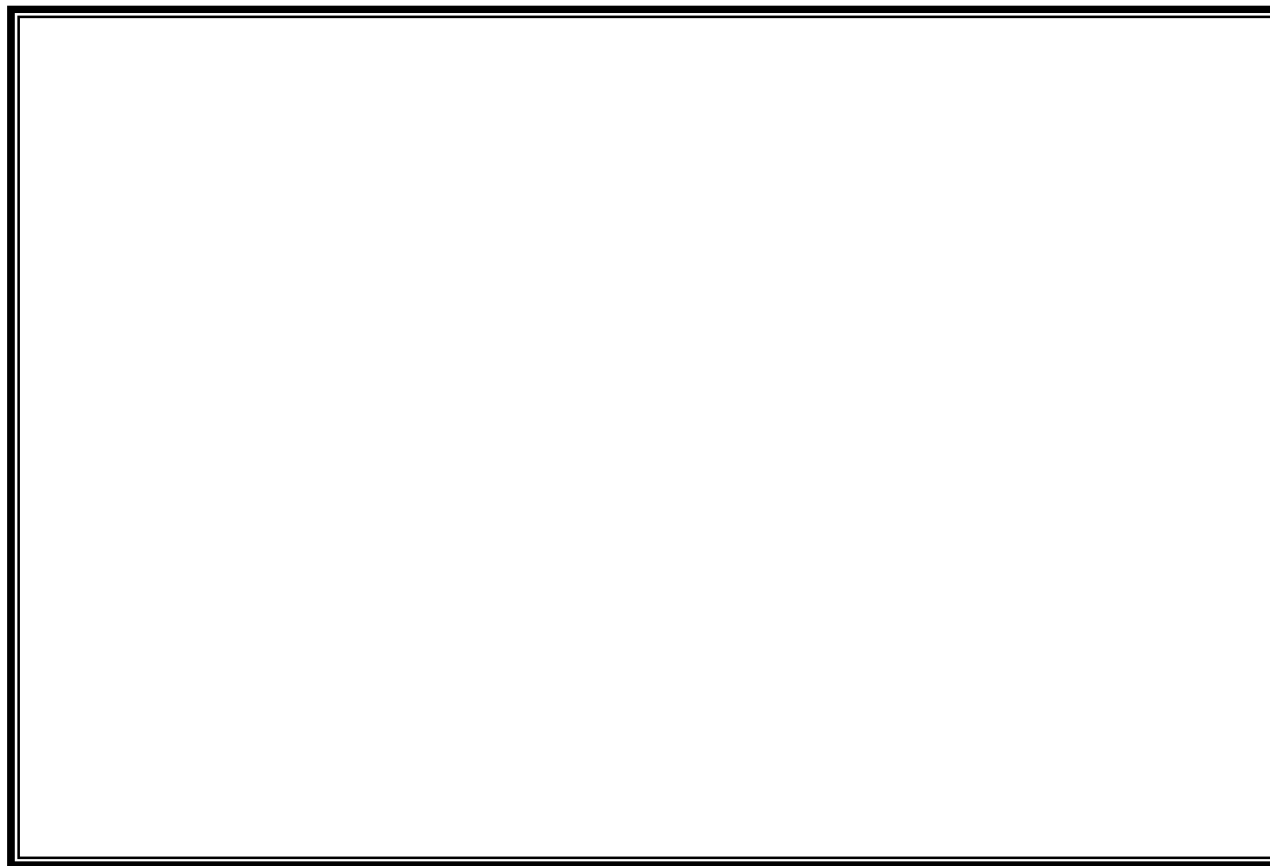


**<sup>1</sup>H/<sup>1</sup>H-COSY (18): 2*R*,3*S*,4*R*,5*R*-3,4-dibenciloxi-2'-*O*-*terc*-butildifenilsilil-2,5-bis(hidroxi metil)pi rrolidina**



$^1\text{H}/^{13}\text{C}$ -HMQC (18): *2R,3S,4R,5R*-3,4-dibenciloxi-2'-*O*-*terc*-butildifenilsilil-2,5-bis(hidroxi metil)pirrolidina

$^1\text{H}$ -RMN (16): (*2S,3S,4R,5R*)-3,4-dibenciloxi-2'-*O*-*terc*-butildifenilsilil-2,5-bis(hidroxi metil)pirrolidina.

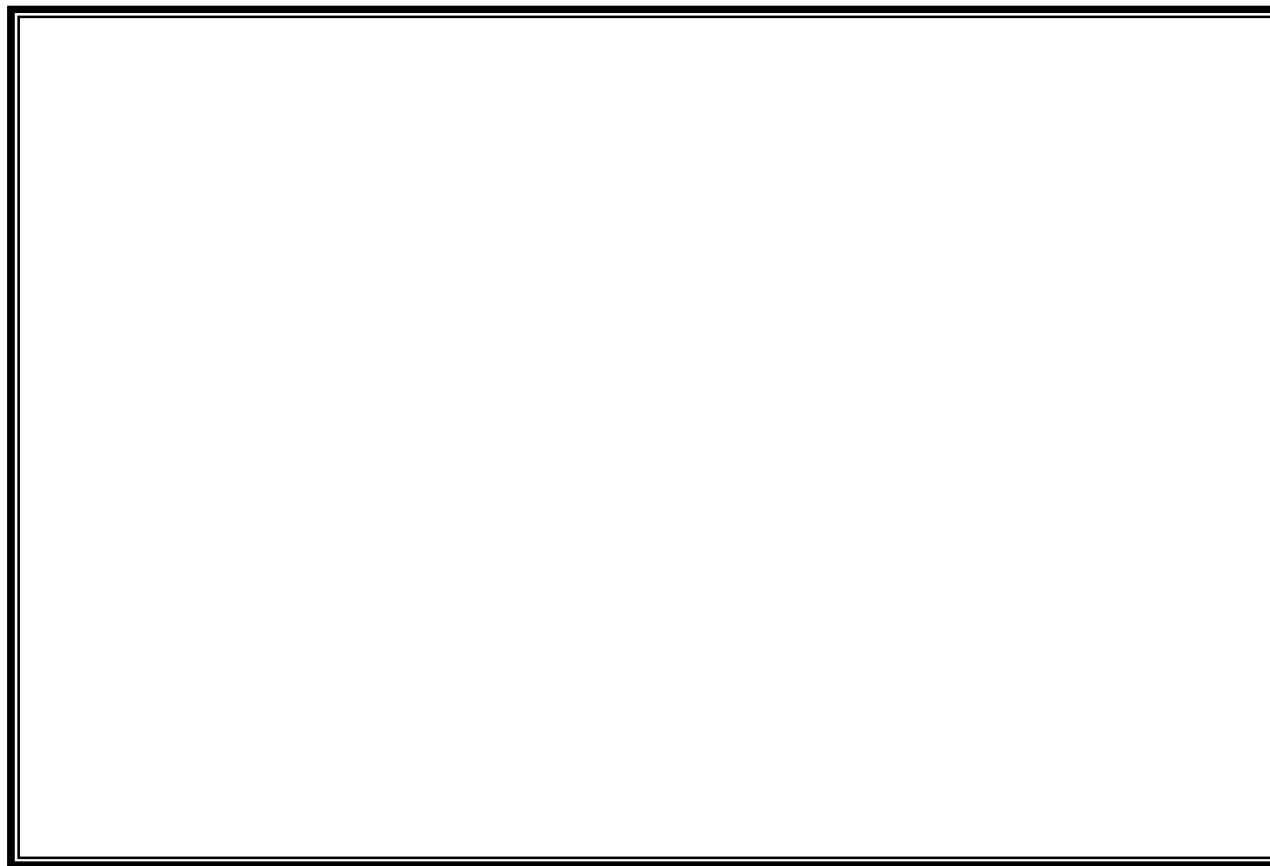


**<sup>1</sup>H-RMN (16): (2*S*,3*S*,4*R*,5*R*)-3,4-dibenciloxi-2'-*O*-*terc*-butildifenilsilil-2,5-bis(hidroximetil)pirrolidina.**

173



<sup>13</sup>C-RMN (16): (2*S*,3*S*,4*R*,5*R*)-3,4-dibenciloxi-2'-*O*-*terc*-butildifenilsilil-2,5-bis(hidroxi metil)pi rrolidina.



**<sup>1</sup>H/<sup>1</sup>H-COSY (16): (2*S*,3*S*,4*R*,5*R*)-3,4-dibenciloxi-2'-*O*-*tert*-butildifenilsilil-2,5-bis(hidroxi metil) pirrolidina.**

175



<sup>1</sup>H-RMN (106): (3*S*,4*R*,5*R*)-3,4-dibenciloxi-2',5'-di-*O*-*terc*-butildife nilsilil-2,5-bis(hidroxi metil)-Δ<sup>1</sup>-pirrolina.



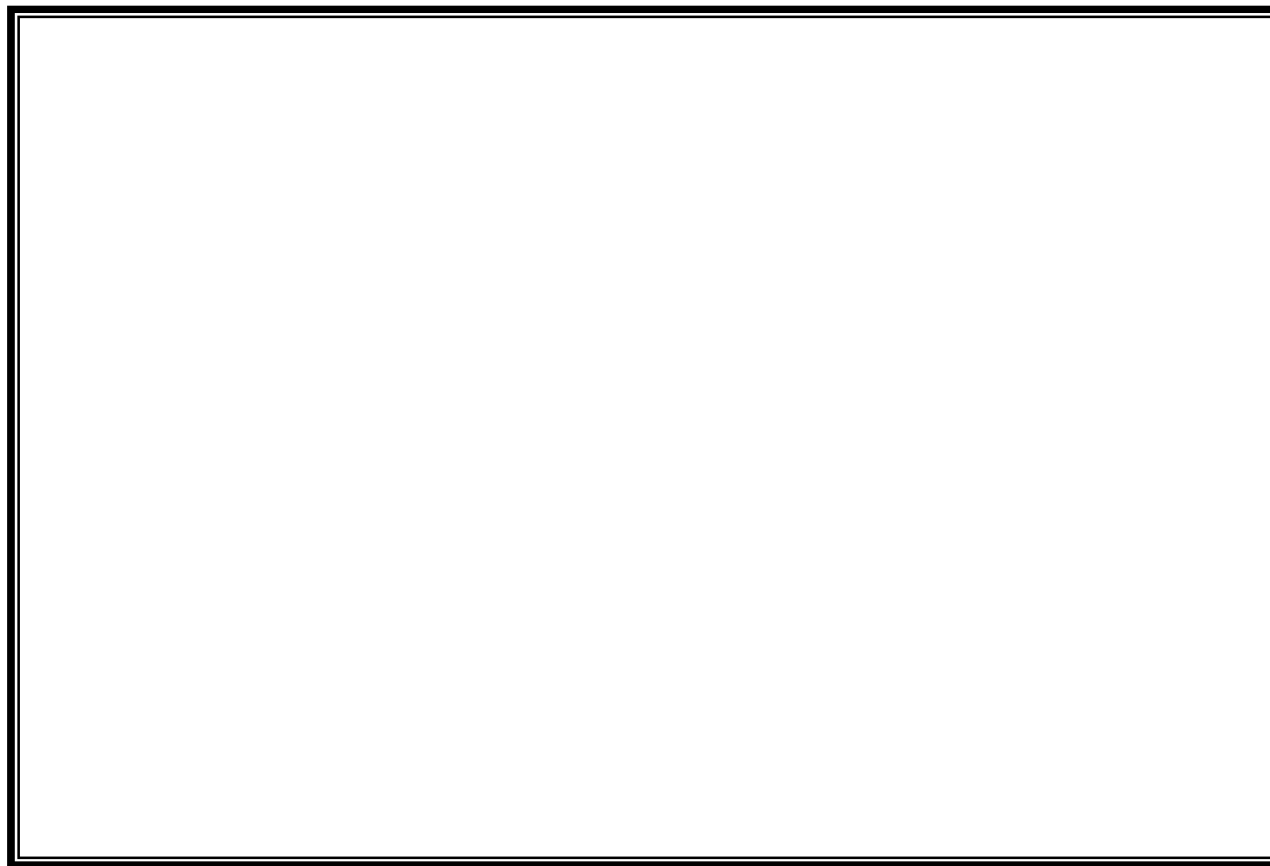


**<sup>1</sup>H-RMN (17): (2*R*,3*R*,4*S*,5*S*)-3,4-dihidroxi-2,5-bis(hidroxiometil)pi rrolidina (2,5-didesoxi-2,5-imi no-D-alitol) hidrocloruro (DADP).**



<sup>13</sup>C-RMN (17): (2*R*,3*R*,4*S*,5*S*)-3,4-dihidroxi-2,5-bis(hidroxi metil)pi rrolidina (2,5-didesoxi-2,5-imi no-D-alitol) hidrocloruro (DADP).

178

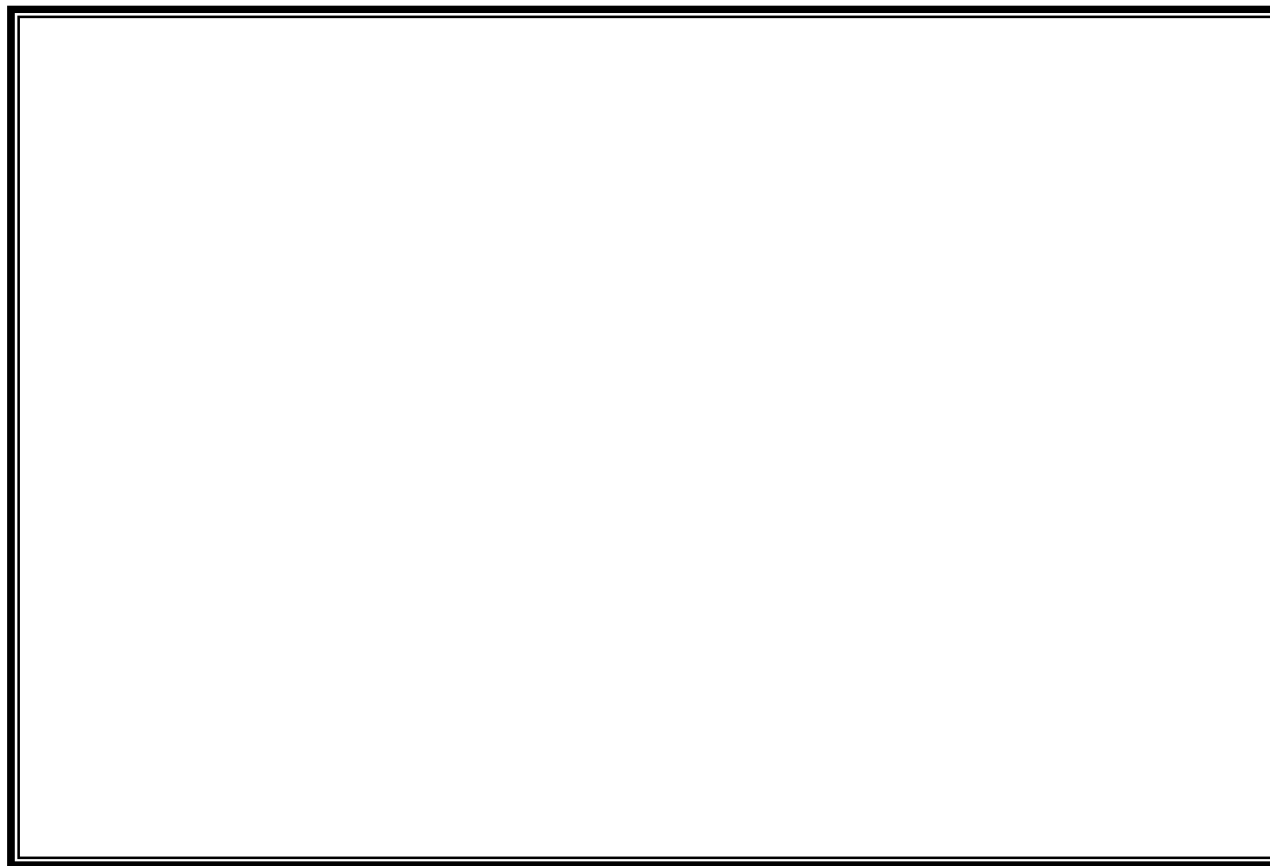


**<sup>1</sup>H-RMN (107): (2*R*,3*R*,4*S*,5*R*)-3,4-dibenciloxi-2',5'-di-*O*-*terc*-butildifenilsilil-2,5-bis(hidroxiime til)pirrolidina.**

179



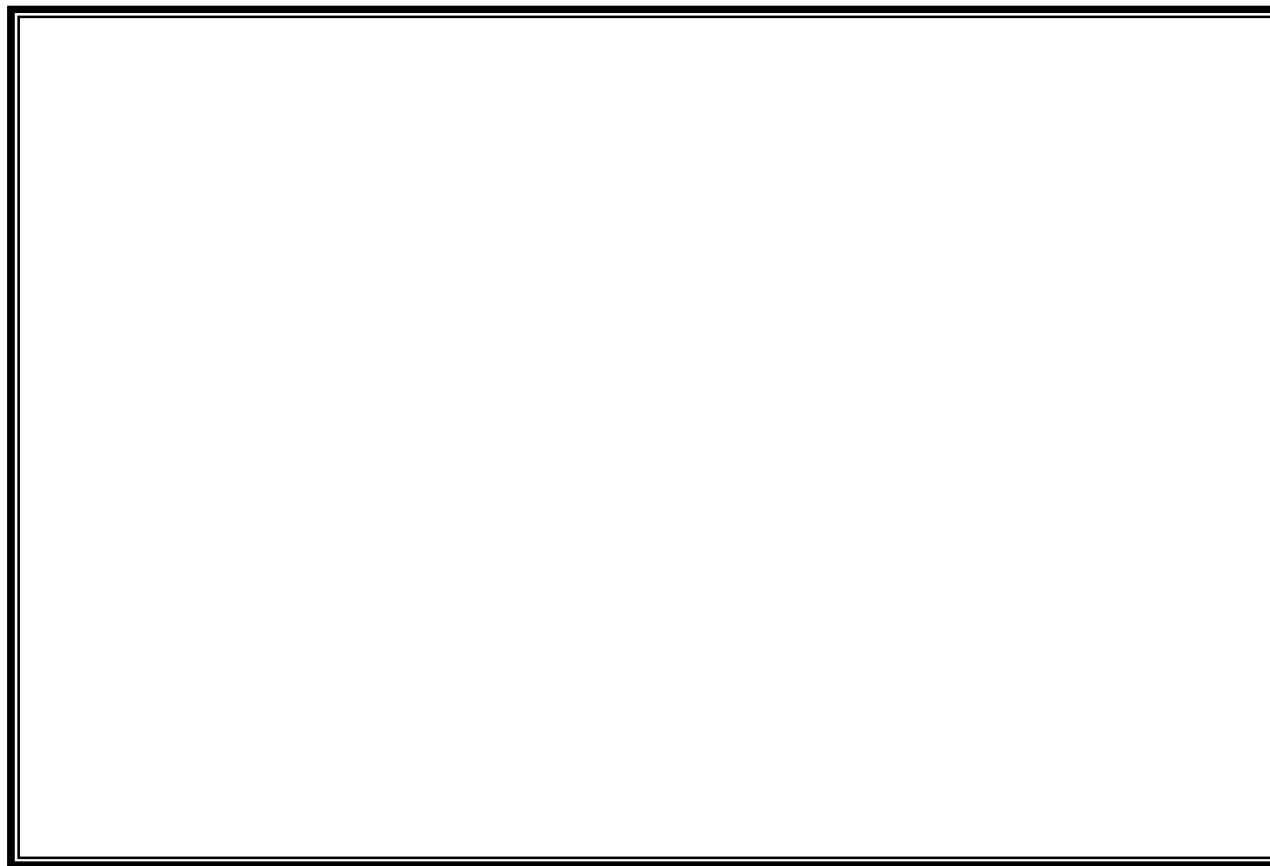
<sup>13</sup>C-RMN (107): (2*R*,3*R*,4*S*,5*R*)-3,4-dibenciloxi-2',5'-di-*O*-*terc*-butildifenilsilil-2,5-bis(hidroxiime til)pirrolidina.



<sup>1</sup>H/<sup>1</sup>H-COSY (107): (2*R*,3*R*,4*S*,5*R*)-3,4-dibenciloxi-2',5'-di-*O*-*terc*-butildifenilsilil-2,5-bis(hidroxi metil)pirrolidina.



<sup>1</sup>H/<sup>13</sup>C-HMQC (107): (2*R*,3*R*,4*S*,5*R*)-3,4-dibenciloxi-2',5'-di-*O*-*terc*-butildifenilsilil-2,5-bis(hidroxi metil)pirrolidina.

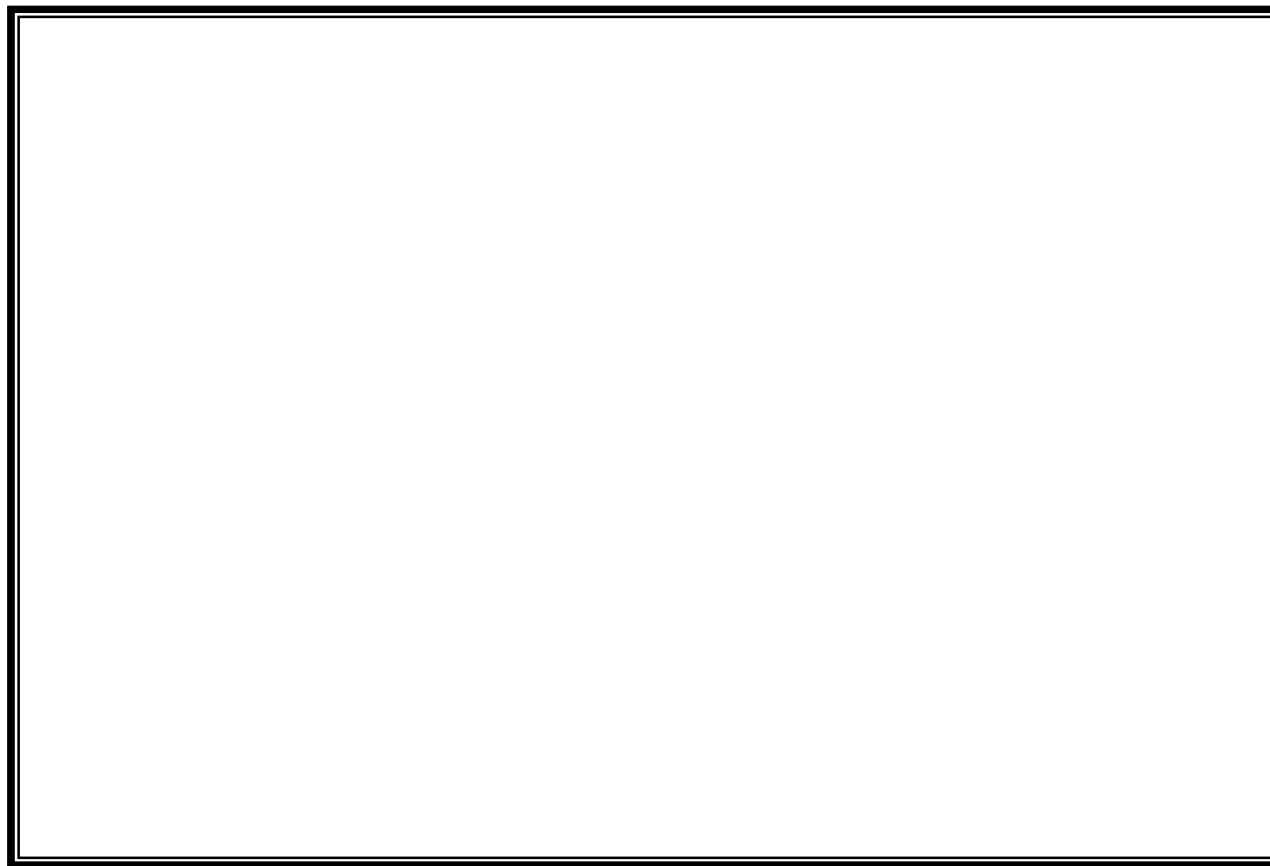


<sup>1</sup>H-RMN (105): (2*R*,3*R*,4*S*,5*S*)-3,4-dibenciloxi-2',5'-di-*O*-*terc*-butildifenilsilil-2,5-bis(hidroxiometil) pirrolidina



<sup>13</sup>C-RMN (105): (2*R*,3*R*,4*S*,5*S*)-3,4-dibenciloxi-2',5'-di-*O*-*terc*-butildifenilsilil-2,5-bis(hidroxime til) pirrolidina



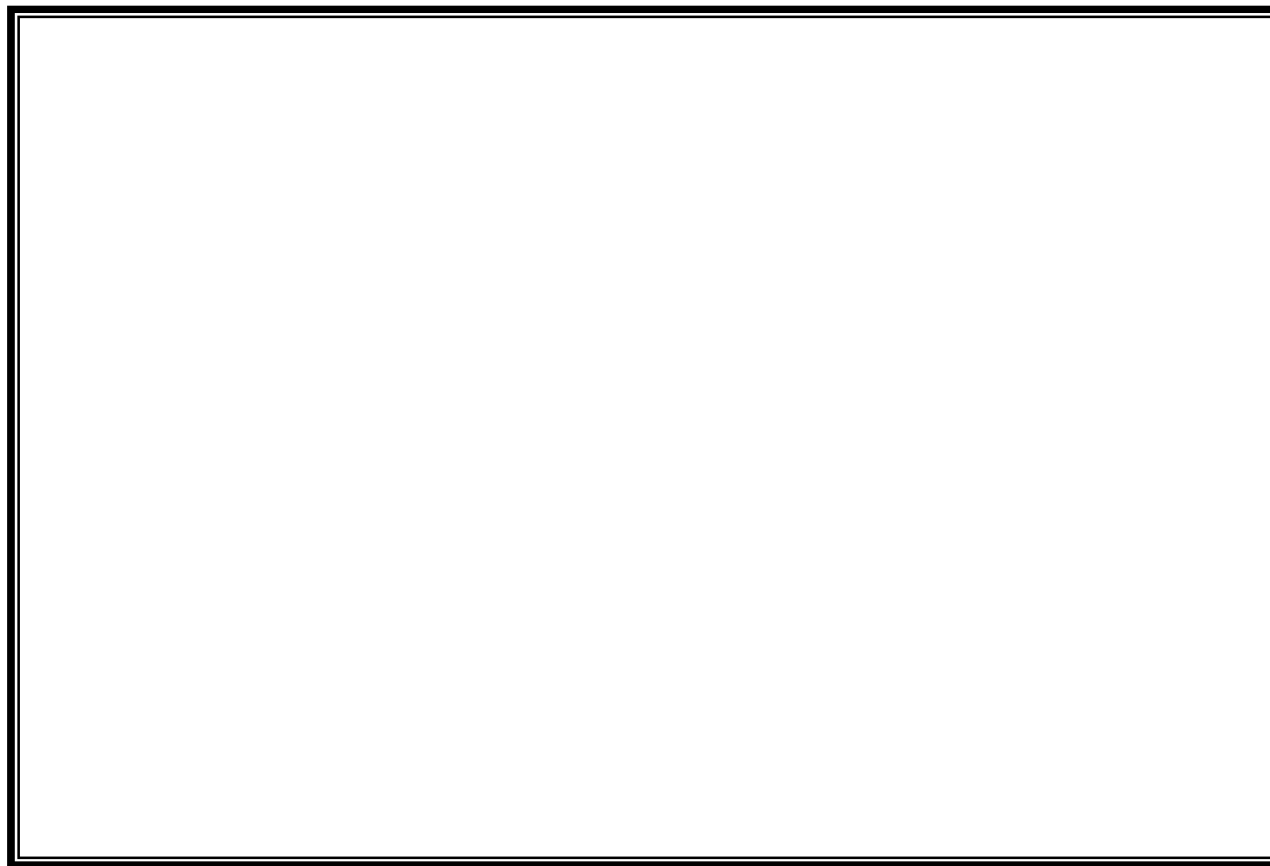


**<sup>1</sup>H-RMN (112): 4-*O*-bencil-1,2-*O*-isopropilidén-5-*O*-metanosulfonil-β-D-fructopiranos**

185



<sup>13</sup>C-RMN (112): 4-*O*-bencil-1,2-*O*-isopropilidén-5-*O*-metanosulfonil-β-D-fructopiranososa

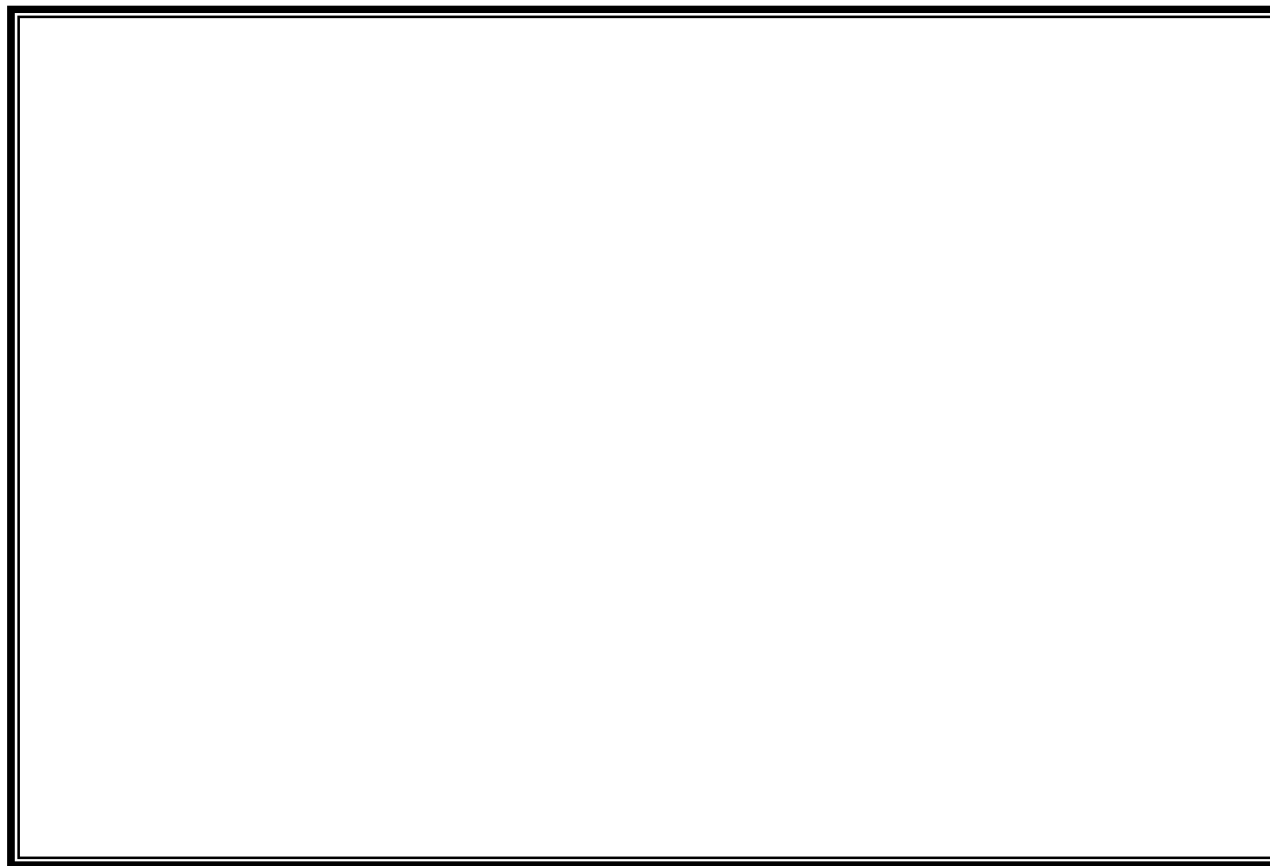


**$^1\text{H}/^{13}\text{C}$ -HMQC (112): 4-*O*-bencil-1,2-*O*-isopropilidén-5-*O*-metanosulfonil- $\beta$ -D-fructopiranososa**

187



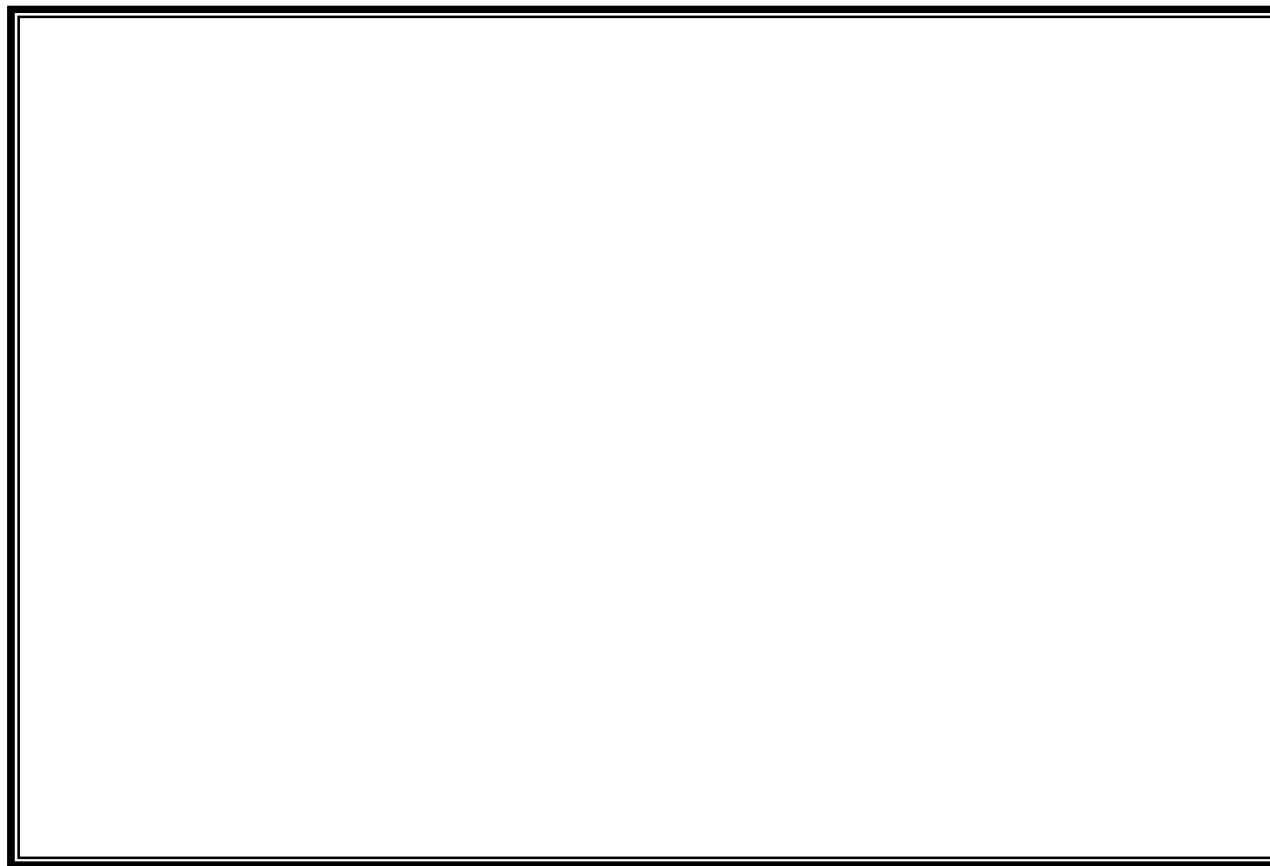
<sup>1</sup>H-RMN (114): 4-*O*-bencil-1,2-*O*-isopropilidén-5-*O*-metanosulfonil-β-D-psicopiranososa



<sup>13</sup>C-RMN (114): 4-*O*-bencil-1,2-*O*-isopropilidén-5-*O*-metanosulfonil-β-D-psicopiranososa



<sup>1</sup>H/<sup>13</sup>C-HMQC (114): 4-*O*-bencil-1,2-*O*-isopropilidén-5-*O*-metanosulfonil-β-D-psicopiranososa

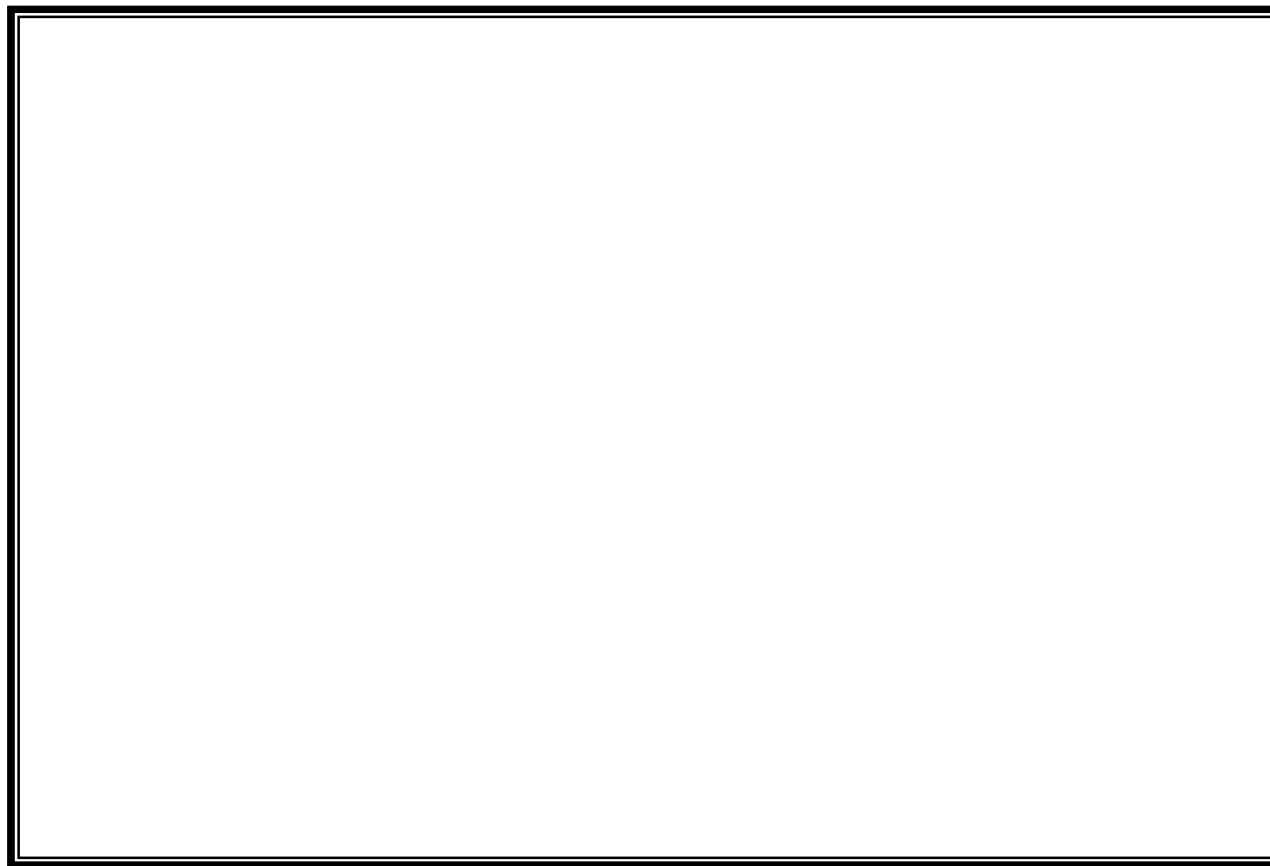


**<sup>1</sup>H-RMN (115): 5-azido-4-*O*-bencil-5-desoxi-1,2-*O*-isopropilidén- $\alpha$ -L-tagatopiranosas.**



<sup>13</sup>C-RMN (115): 5-azido-4-*O*-bencil-5-desoxi-1,2-*O*-isopropilidén- $\alpha$ -L-tagatopiranososa.

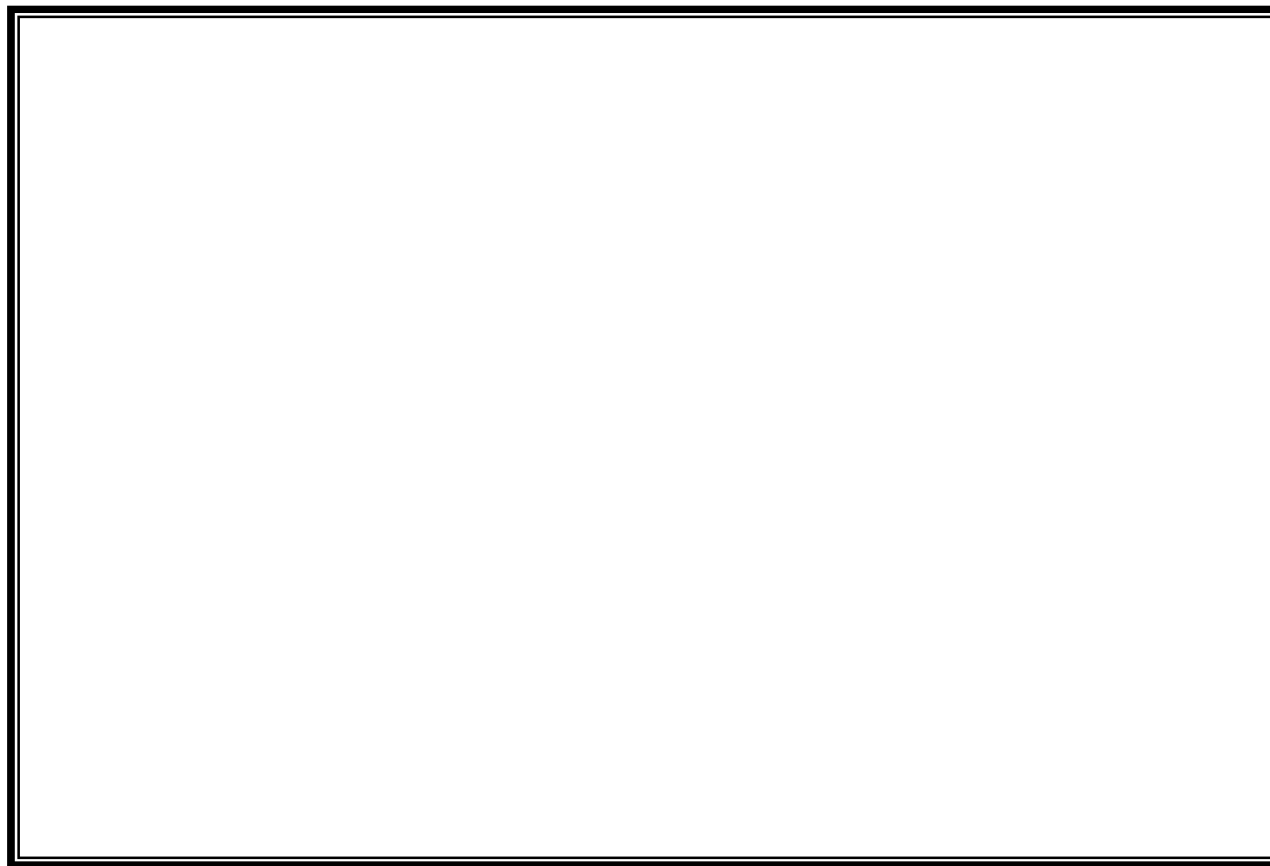




**<sup>1</sup>H/<sup>13</sup>C-HMQC (115): 5-azido-4-*O*-bencil-5-desoxi-1,2-*O*-isopropilidén- $\alpha$ -L-tagatopiranosas.**



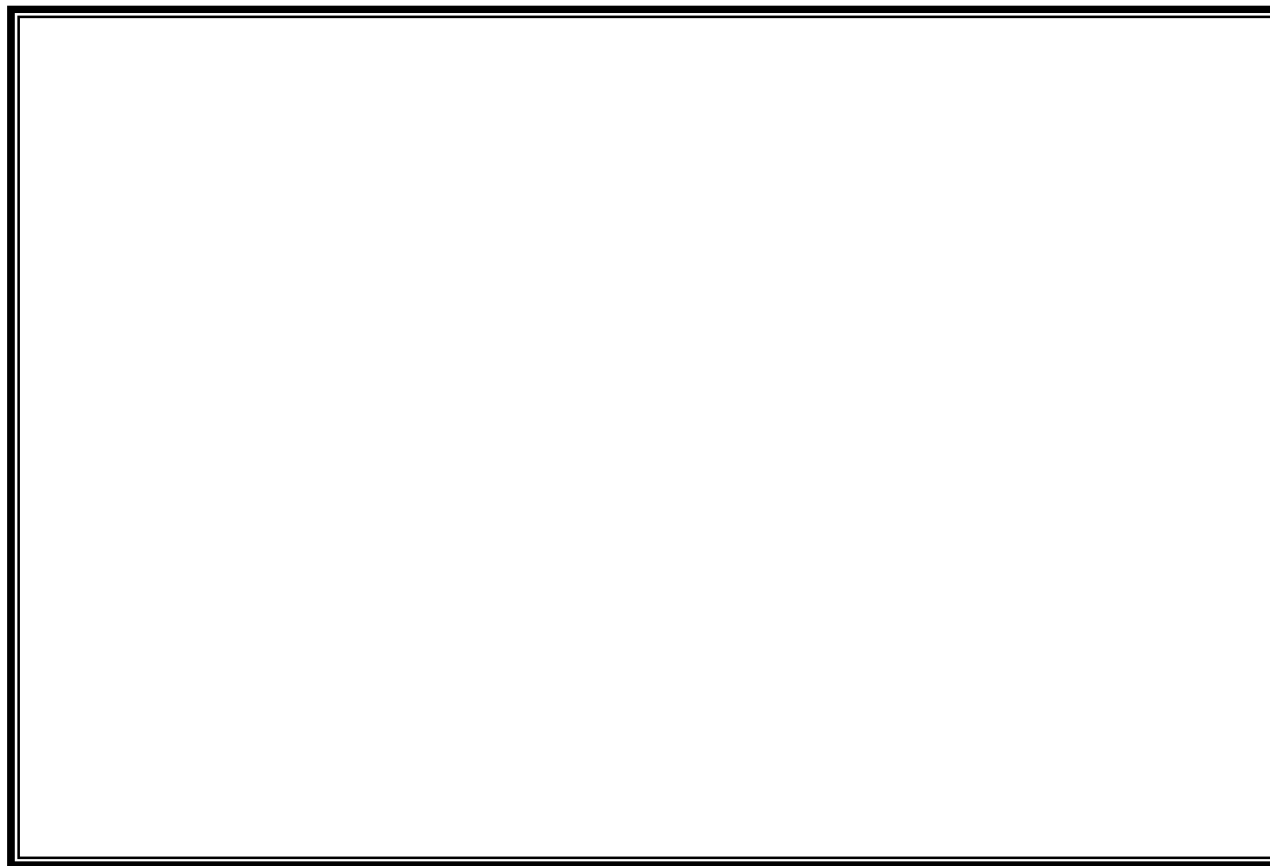
<sup>1</sup>H-RMN (116): 5-azido-3,4-di-*O*-bencil-5-desoxi-1,2-*O*-isopropilidén- $\alpha$ -L-tagatopiranososa.



<sup>13</sup>C-RMN (116): 5-azido-3,4-di-*O*-bencil-5-desoxi-1,2-*O*-isopropilidén- $\alpha$ -L-tagatopiranosas.



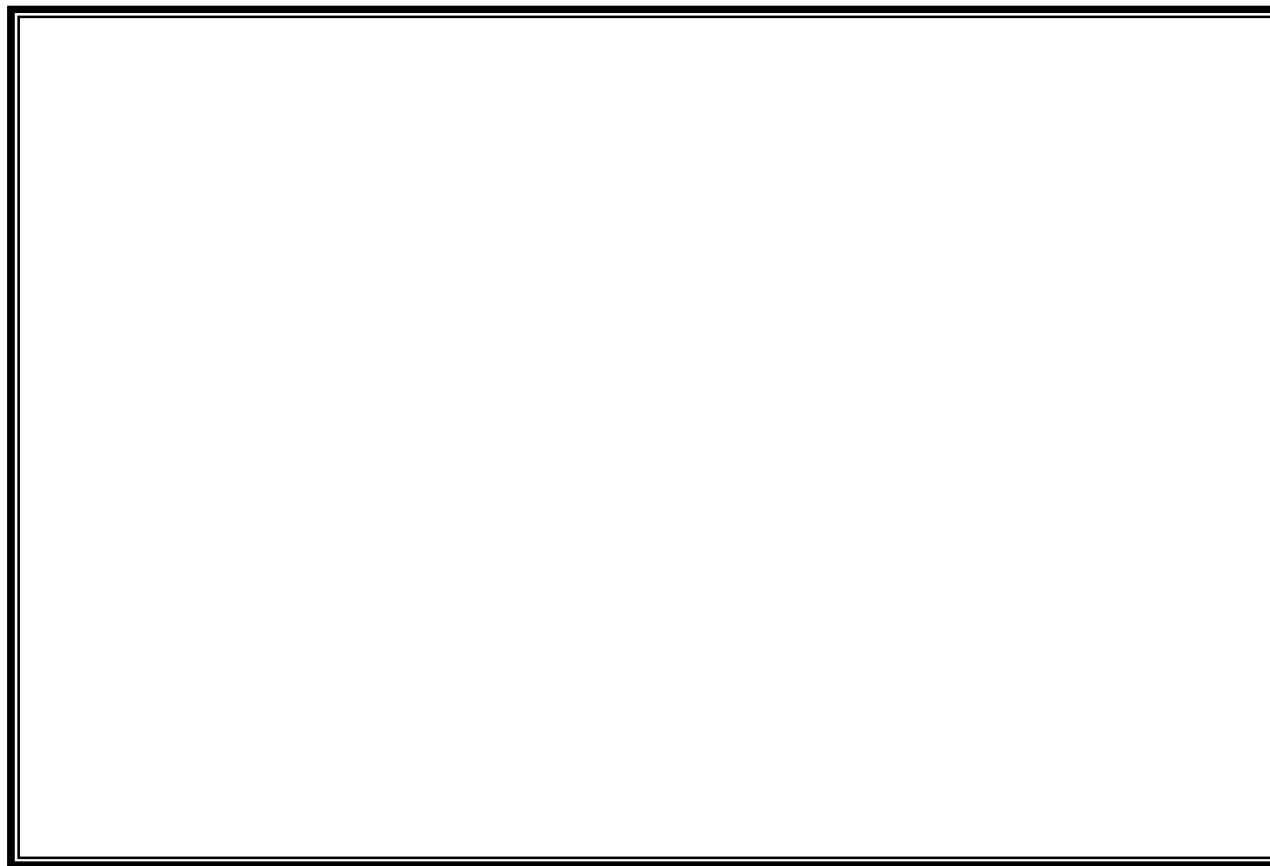
<sup>1</sup>H-RMN (117): 5-azido-3,4-di-*O*-bencil-5-desoxi- $\alpha$ -L-tagatopiranososa



<sup>13</sup>C-RMN (117): 5-azido-3,4-di-*O*-bencil-5-desoxi- $\alpha$ -L-tagatopiranos



<sup>1</sup>H-RMN (118): 5-azido-3,4-di-*O*-bencil-5-desoxi-1-*O*-pivaloil- $\alpha$ -L-tagatopiranososa

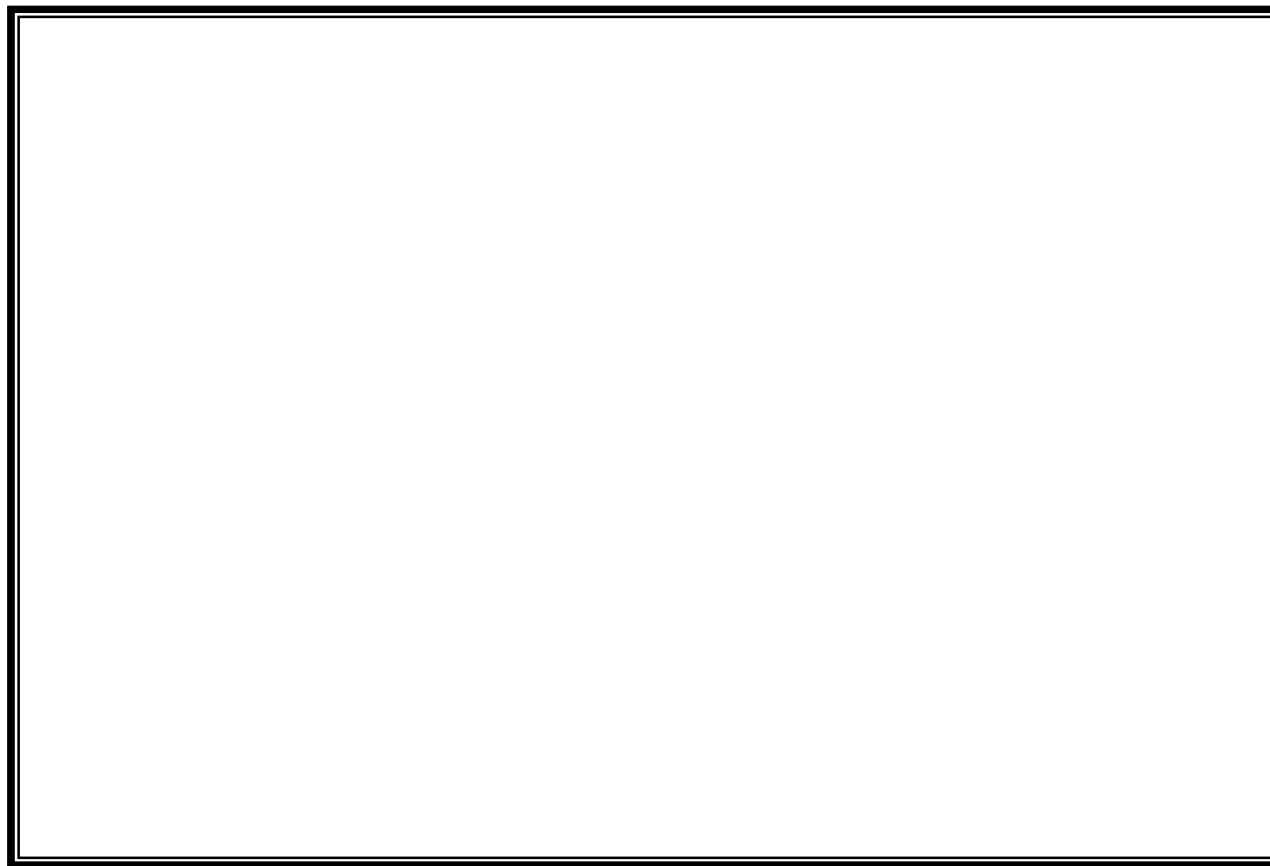


<sup>13</sup>C-RMN(118): 5-azido-3,4-di-*O*-bencil-5-desoxi-1-*O*-pivaloil- $\alpha$ -L-tagatopiranosia



<sup>1</sup>H/<sup>13</sup>C-HMQC (118): 5-azido-3,4-di-*O*-bencil-5-desoxi-1-*O*-pivaloil- $\alpha$ -L-tagatopiranosia

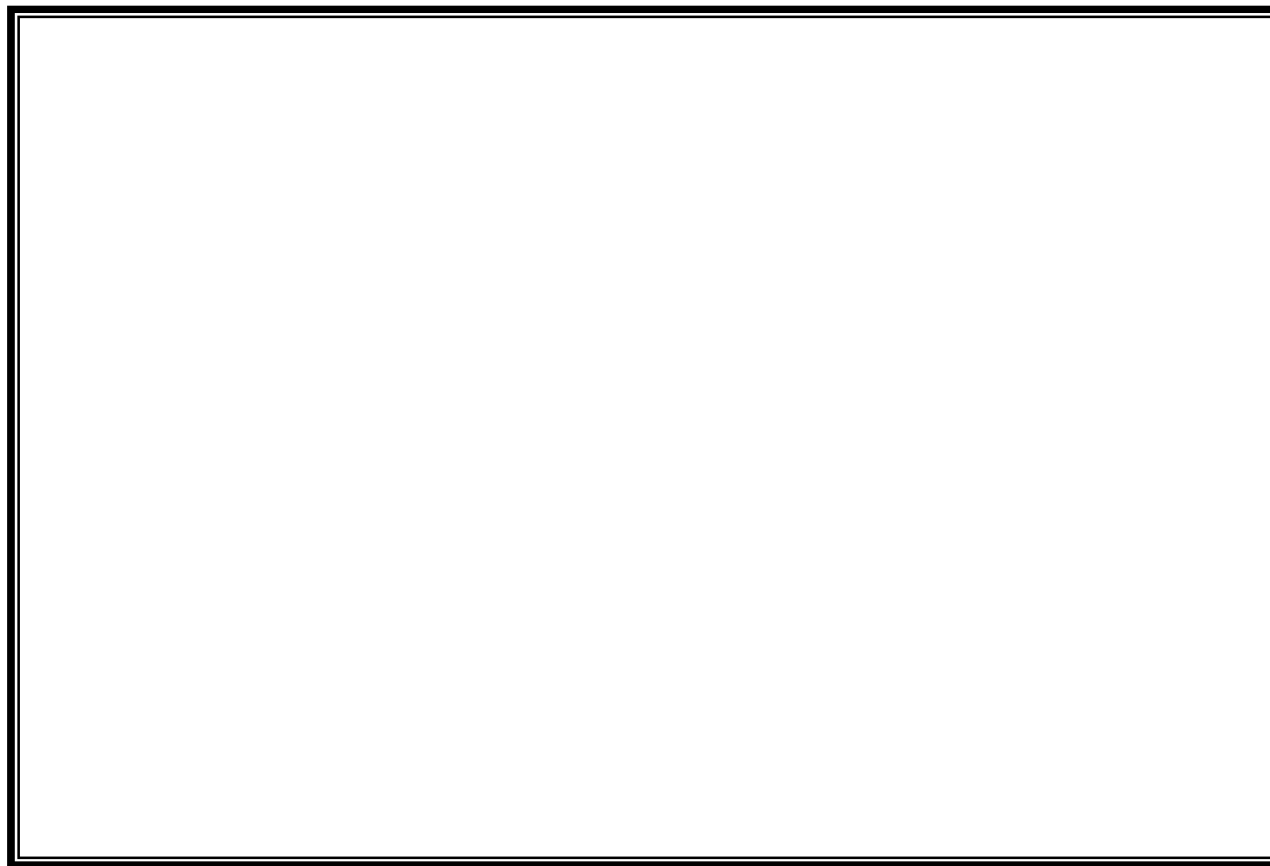




<sup>1</sup>H-RMN (19): 2*R*,3*S*,4*R*,5*S*-3,4-dibenciloxi-2,5-bis(hidroximetil)-2'-*O*-pivaloilpirrolidina



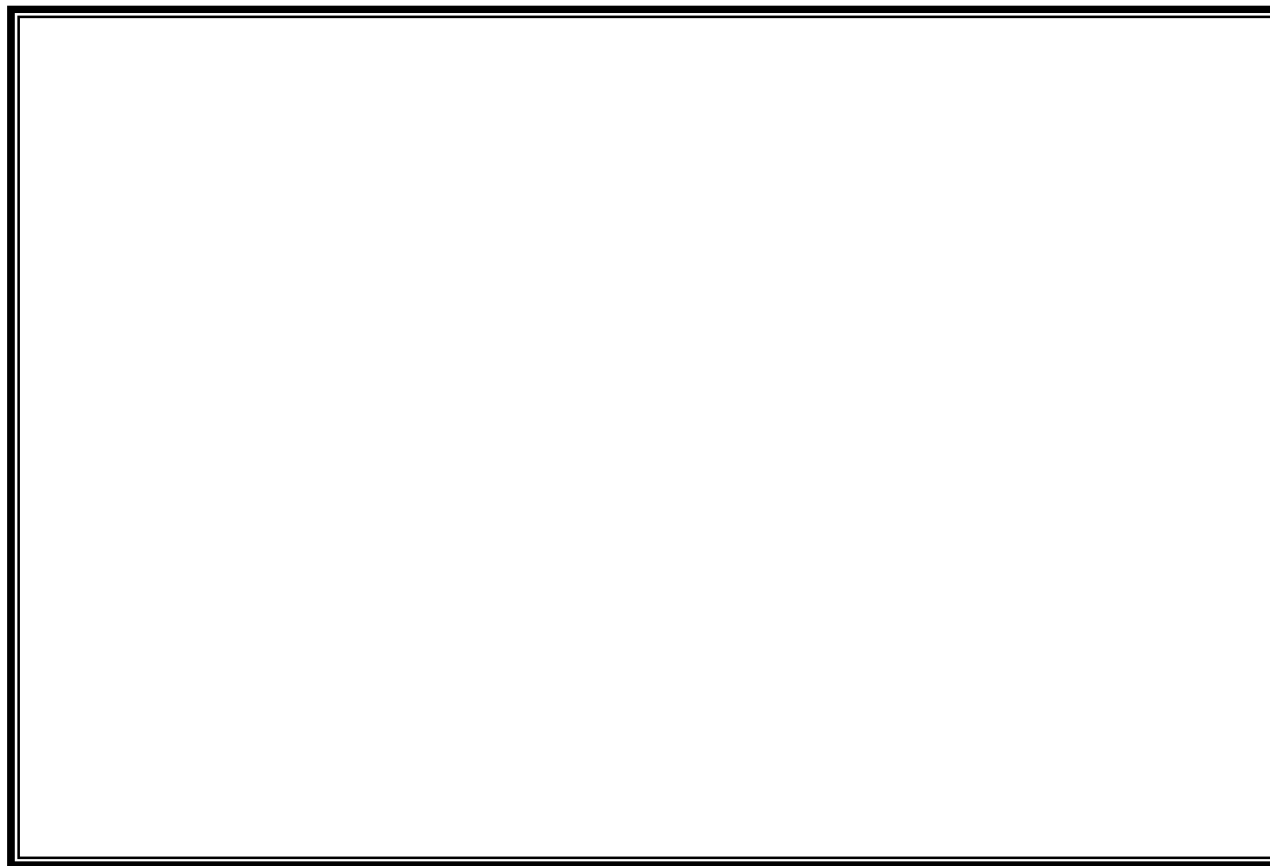
<sup>13</sup>C-RMN (19): 2*R*,3*S*,4*R*,5*S*-3,4-dibenciloxi-2,5-bis(hidroximetil)-2'-*O*-pivaloilpirrolidina



$^1\text{H}/^{13}\text{C}$ -HMQC (19): *2R,3S,4R,5S*-3,4-dibenciloxi-2,5-bis(hidroximetil)-2'-*O*-pivaloilpirrolidina



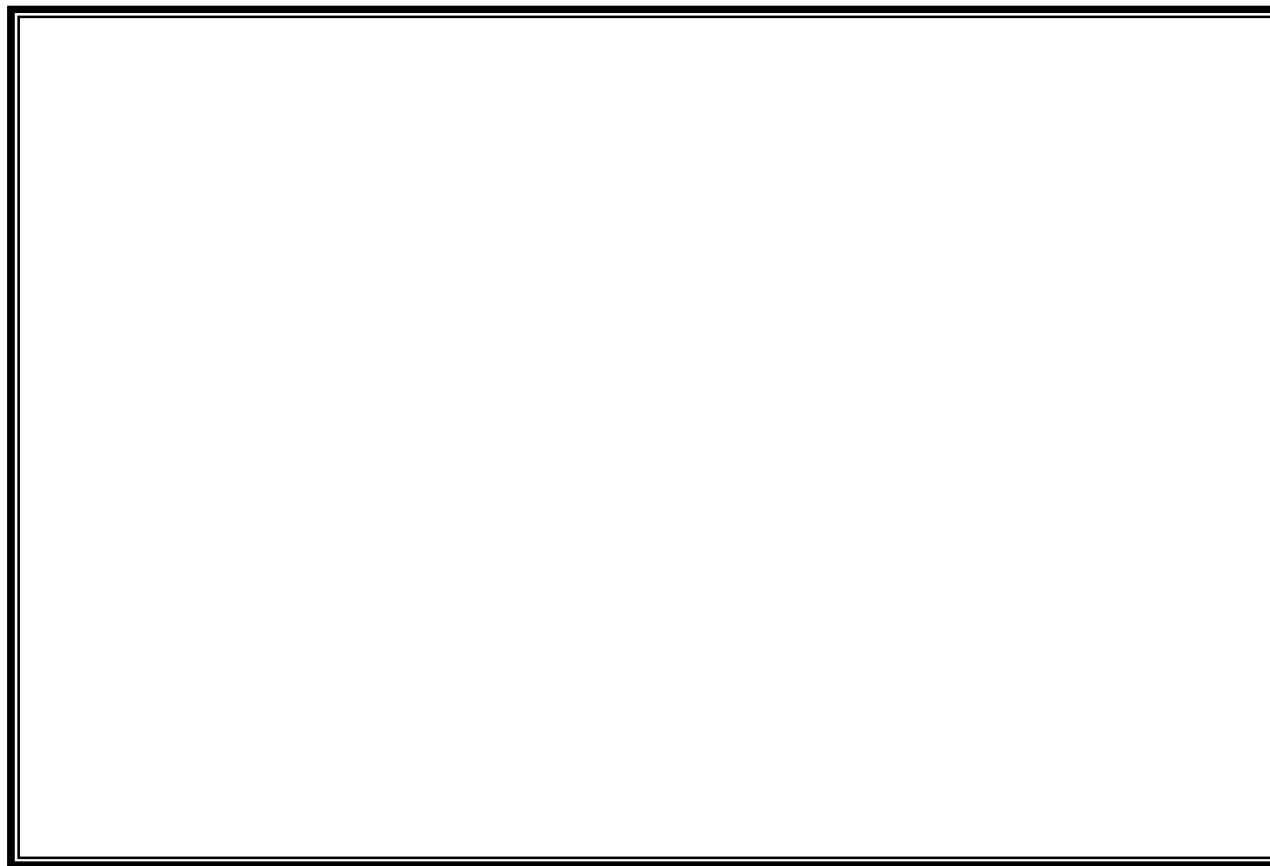
<sup>1</sup>H-RMN (119): (2*R*,3*S*,4*R*,5*S*)-3,4-dibenciloxi-2,5-bis(hidroximetil)pirrolidina



<sup>13</sup>C-RMN (119): (2*R*,3*S*,4*R*,5*S*)-3,4-dibenciloxi-2,5-bis(hidroximetil)pirrolidina



<sup>1</sup>H-RMN (DGADP, 20): (2*R*,3*S*,4*R*,5*S*)-3,4-dihidroxi-2,5-bis(hidroxiometil)pirrolidina como hidrocloruro

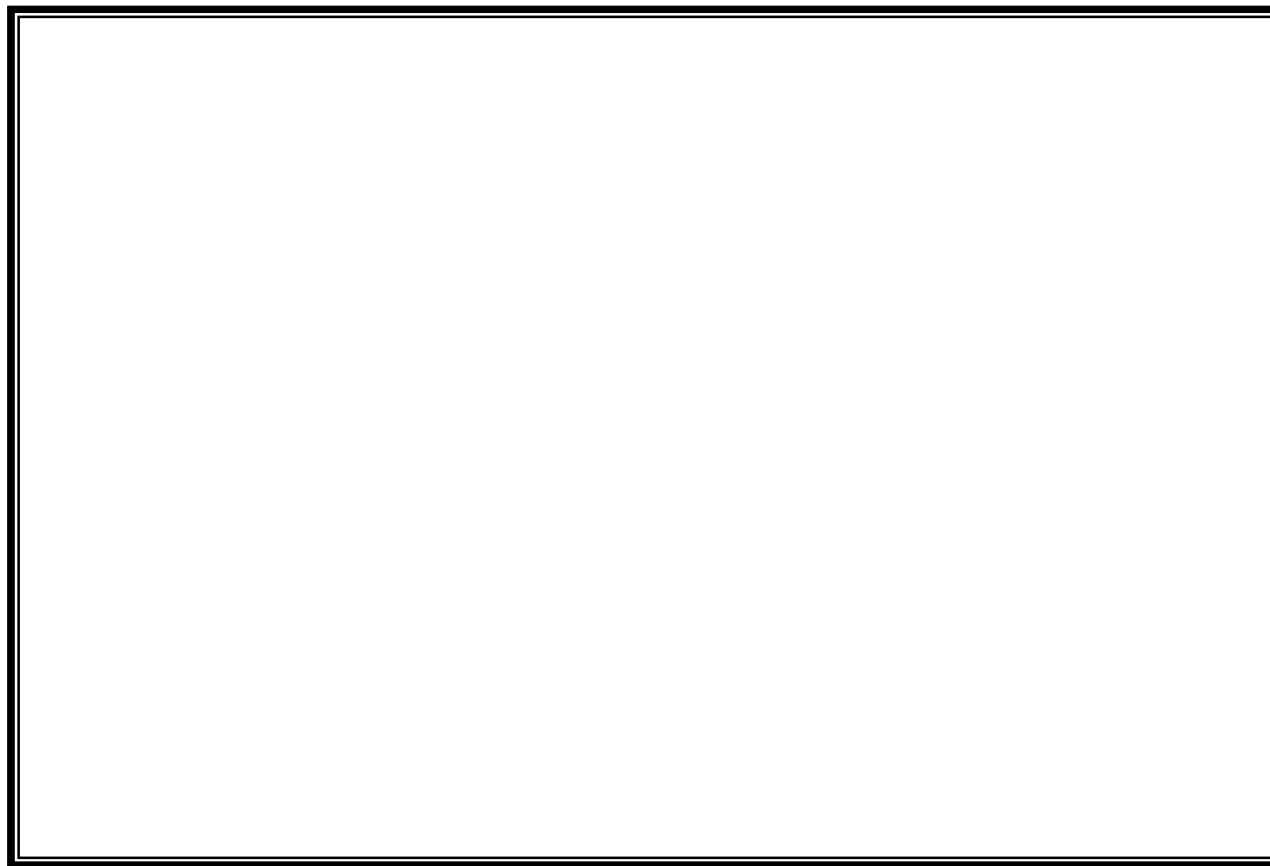


<sup>13</sup>C-RMN (DGADP, 20): (2*R*,3*S*,4*R*,5*S*)-3,4-dihidroxi-2,5-bis(hidroxiometil)pirrolidina como hiroclo ruo



<sup>1</sup>H-RMN (120): (2*S*,3*S*,4*R*,5*R*)-3,4-dibenciloxi-*N*-benciloxycarbonil-2'-*O*-*terc*-butildifenilsilil-2,5-bis(hidroxiometil)pirrolidina

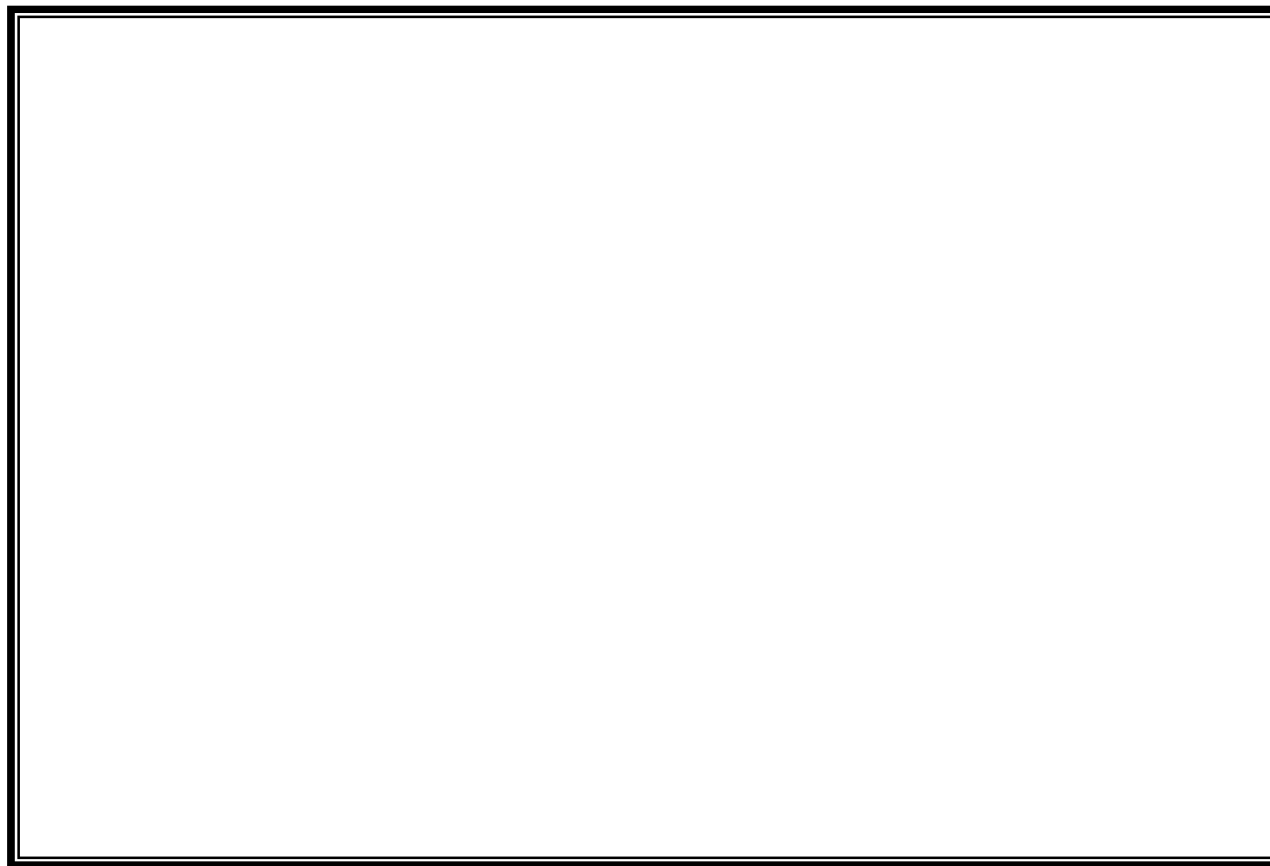




<sup>13</sup>C-RMN (120): (2*S*,3*S*,4*R*,5*R*)-3,4-dibenciloxi-*N*-benciloxycarbonil-2'-*O*-*terc*-butildifenilsilil-2,5-bis(hidroxiometil)pirrolidina



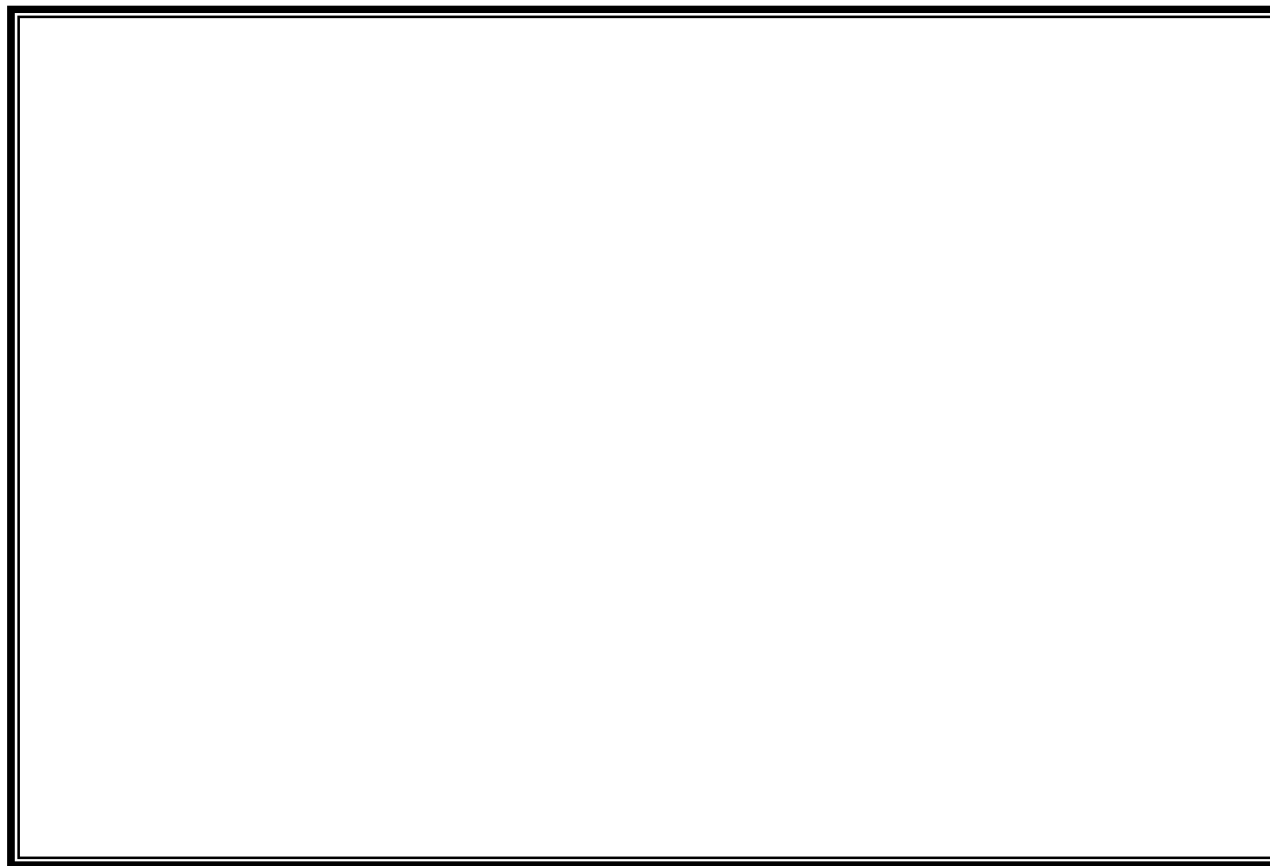
<sup>1</sup>H-RMN (122): 4-[(3*E*,2'*R*,3'*R*,4'*S*,5'*S*)-3',4'-dibenciloxi-*N*-benci loxicarbonil-5'-*terc*-butildifenil sililoximetilpirrolidin-2'-il]but-3-en-2-ona



<sup>13</sup>C-RMN (122): 4-[(3*E*,2'*R*,3'*R*,4'*S*,5'*S*)-3',4'-dibenciloxi-*N*-benci loxicarbonil-5'-*terc*-butildifenil sililoximetilpirrolidin-2'-il]but-3-en-2-ona



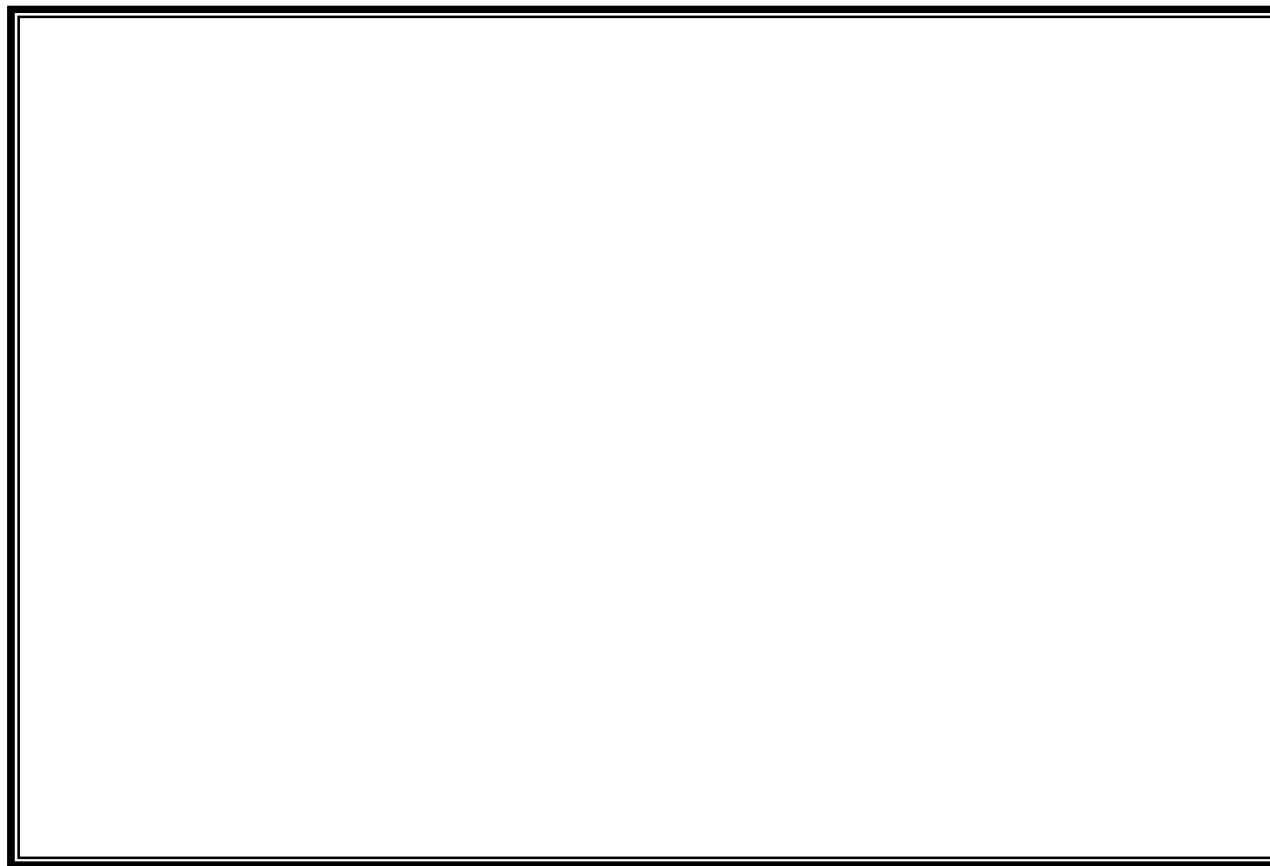
<sup>1</sup>H-RMN (123): (1*R*,2*S*,3*S*,5*R*,7*aR*)-1,2-dibenciloxi-3-*terc*-butildifenilsi lioximetil-5-metilpirrolizi dina



<sup>13</sup>C-RMN (123): (1*R*,2*S*,3*S*,5*R*,7*aR*)-1,2-dibenciloksi-3-*terc*-butildifenilsi lioximetil-5-metilpirrolizi dina



<sup>1</sup>H/<sup>1</sup>H-RMN (123): (1*R*,2*S*,3*S*,5*R*,7*aR*)-1,2-dibenciloxi-3-*terc*-butildifenilsi lioximetil-5-metilpirrolizi dina



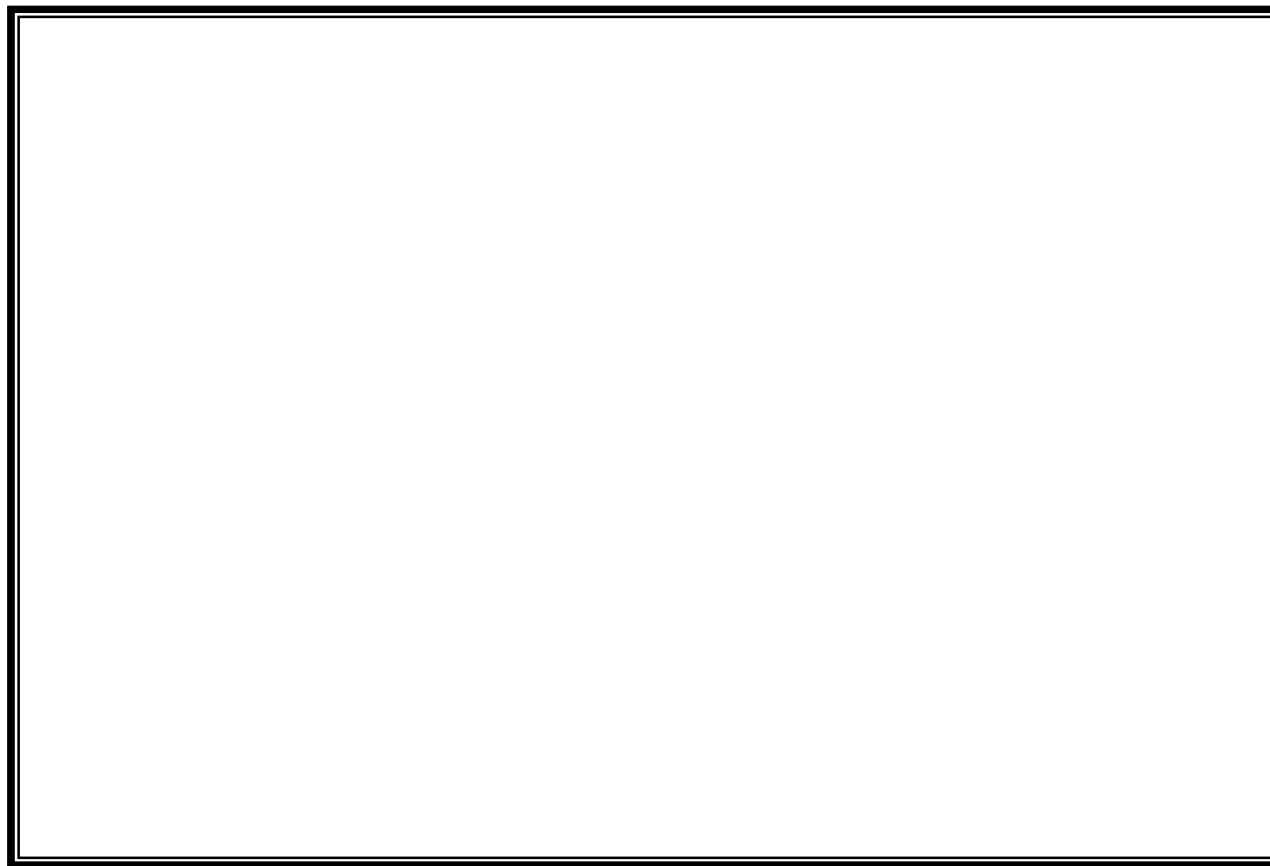
**$^1\text{H}/^{13}\text{C}$ -HMQC (123): (1*R*,2*S*,3*S*,5*R*,7*aR*)-1,2-dibenciloxi-3-*terc*-butildifenilsi lioximetil-5-metilpirrolizi dina**

215



<sup>1</sup>H-RMN (21): (1*R*,2*S*,3*S*,5*R*,7*aR*)-1,2-dihidroxi-3-hidroximetil-5-metilpirrolizidina [(-)-3-*epi*hia cintacina A<sub>5</sub>, 21]

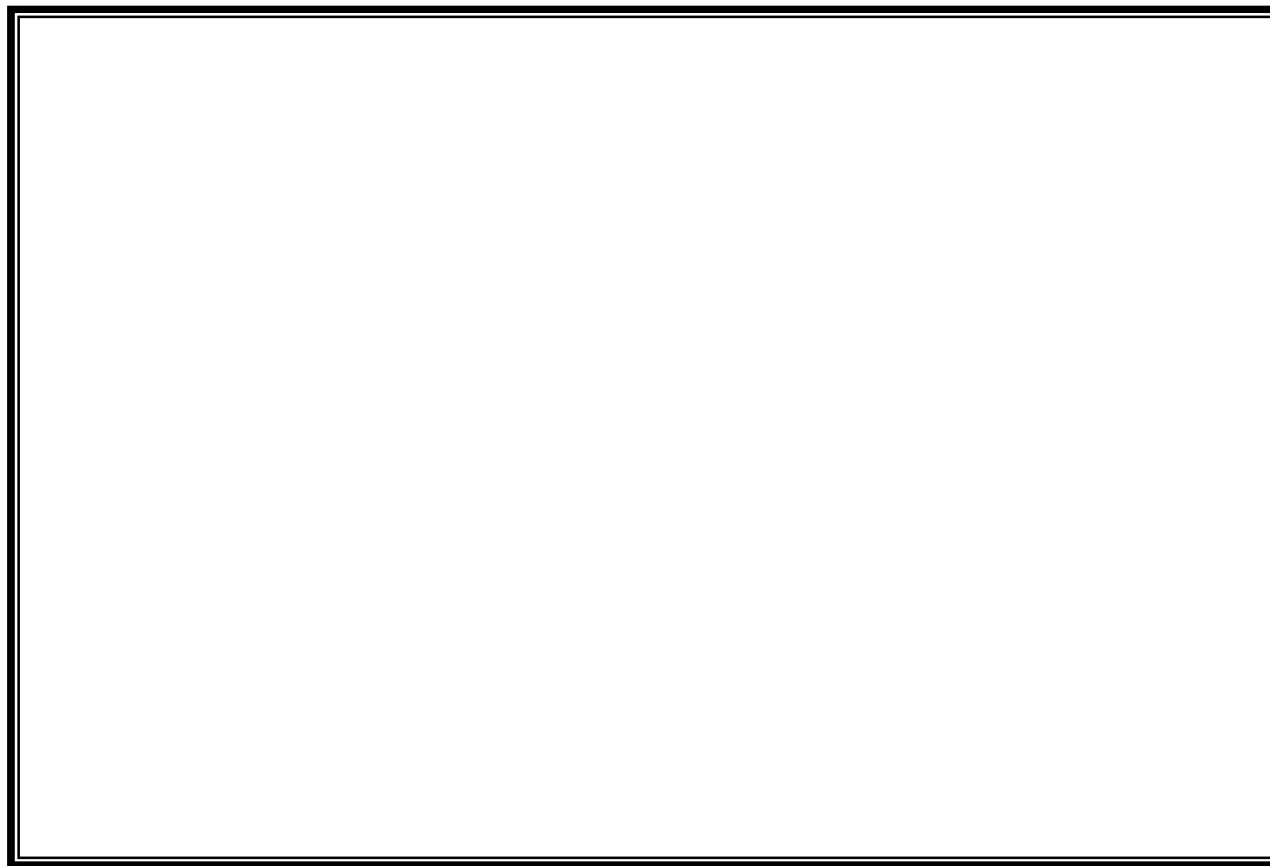




<sup>13</sup>C-RMN (21): (1*R*,2*S*,3*S*,5*R*,7*aR*)-1,2-dihidroxi-3-hidroxi-5-metilpirrolizidina [(-)-3-*epihia* cintacina A<sub>5</sub>, 21]



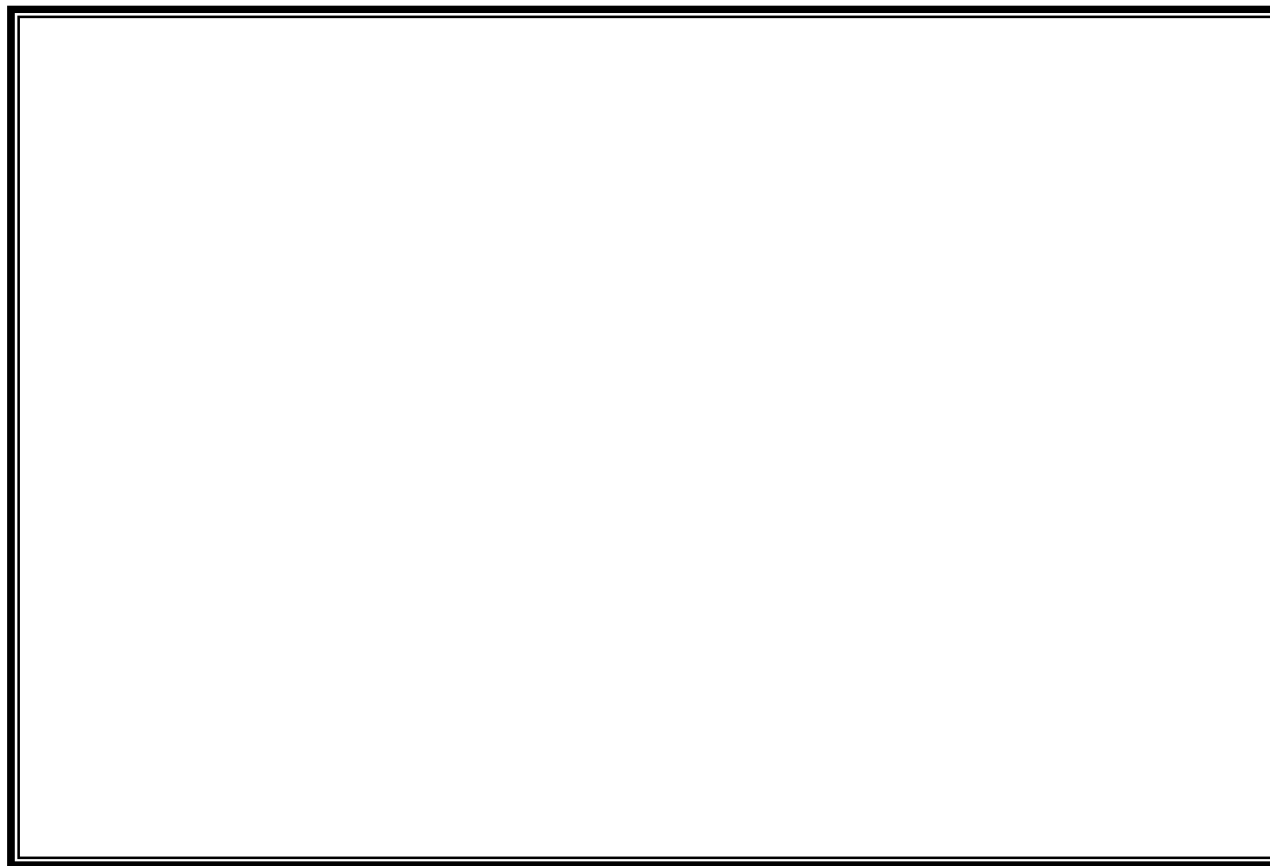
<sup>1</sup>H/<sup>1</sup>H-COSY (21): (1*R*,2*S*,3*S*,5*R*,7*aR*)-1,2-dihidroxi-3-hidroxi-5-metilpirrolizidina [(-)-3-*epi* hiacintacina A<sub>5</sub>, 21]  
]



<sup>1</sup>H/<sup>13</sup>C-HMQC (21): (1*R*,2*S*,3*S*,5*R*,7*aR*)-1,2-dihidroxi-3-hidroxi-5-metilpirrolizidina [(-)-3-*epi* hiacintacina A<sub>5</sub>, 21]



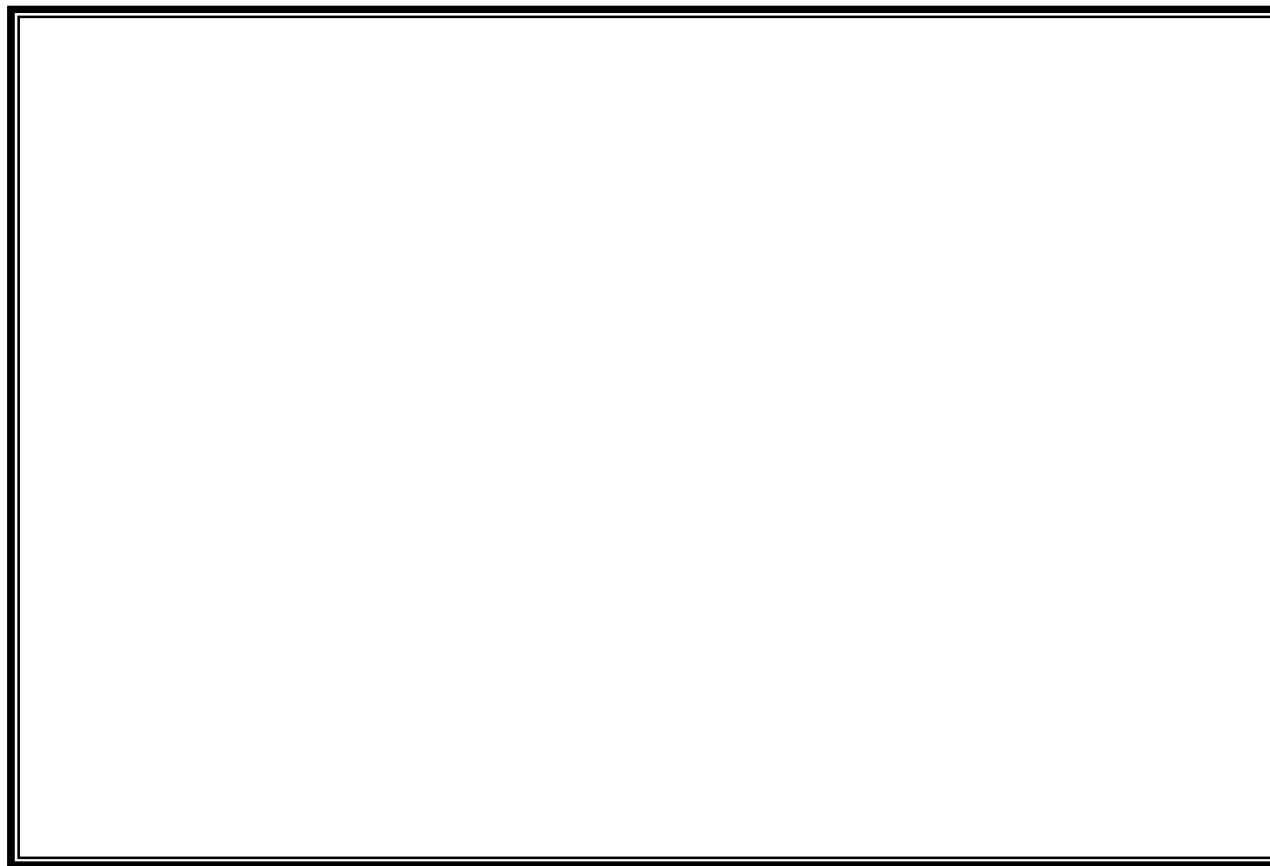
<sup>1</sup>H-RMN (125): (2*R*,3*R*,4*S*,5*S*)-3,4-dibenciloxi-*N*-benciloxycarbonil-2'-*O*-benzoil-5'-*O*-*terc*-butildi fenilsilil-2,5-bis(hidroxi metil)pirrolidi na



<sup>13</sup>C-RMN (125): (2*R*,3*R*,4*S*,5*S*)-3,4-dibenciloxi-*N*-benciloxycarbonil-2'-*O*-benzoil-5'-*O*-*terc*-butildi fenilsilil-2,5-bis(hidroxi metil)pirrolidi na



<sup>1</sup>H-RMN (126): (2*R*,3*R*,4*S*,5*S*)-3,4-dibenciloxi-*N*-benciloxycarbonil-2'-*O*-benzoil-2,5-bis(hidroxi metil)pirrolidina

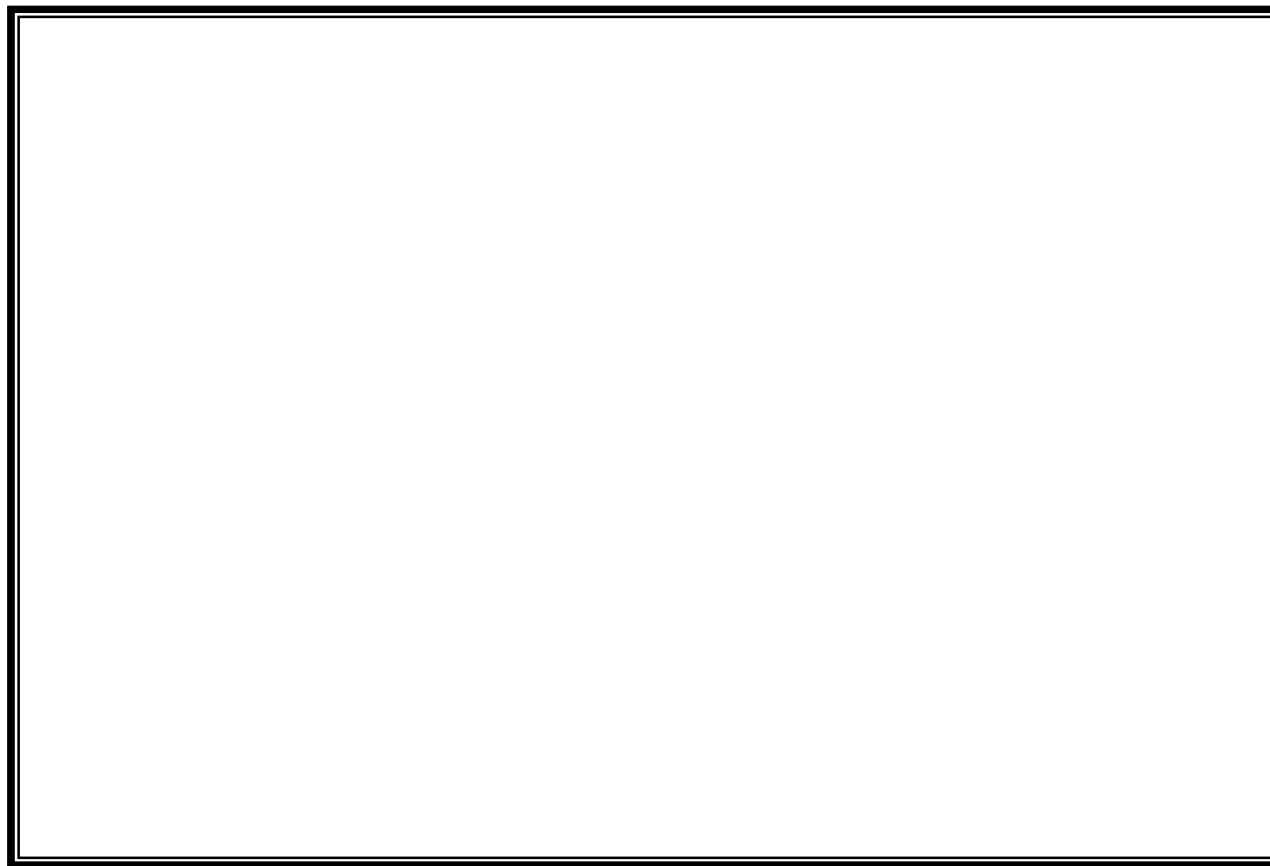


<sup>13</sup>C-RMN (126): (2*R*,3*R*,4*S*,5*S*)-3,4-dibenciloxi-*N*-benciloxycarbonil-2'-*O*-benzoil-2,5-bis(hidroxi metil)pirrolidina

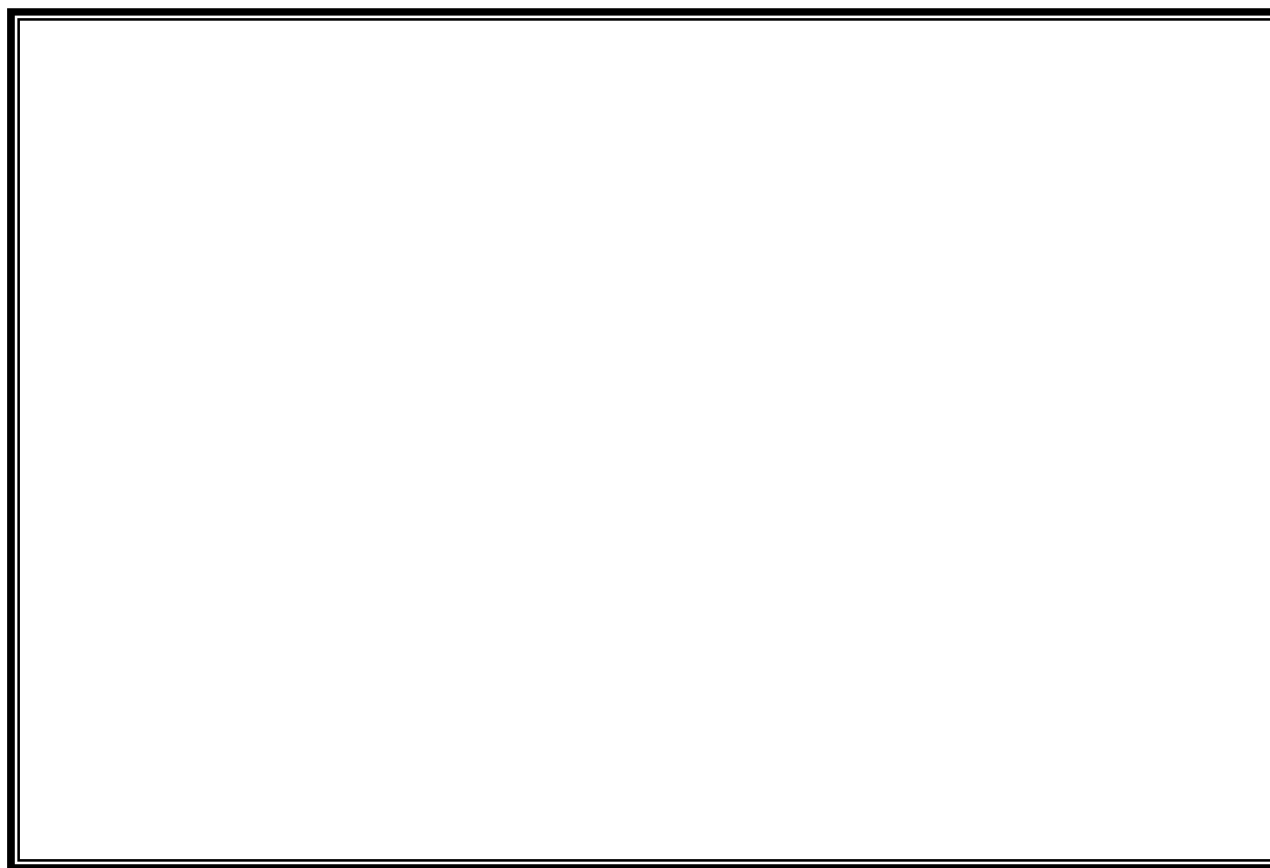


<sup>1</sup>H/<sup>13</sup>C-HMQC (126): (2*R*,3*R*,4*S*,5*S*)-3,4-dibenciloxi-*N*-benciloxicarbonil-2'-*O*-benzoil-2,5-bis(hidroxi metil)pirrolidina

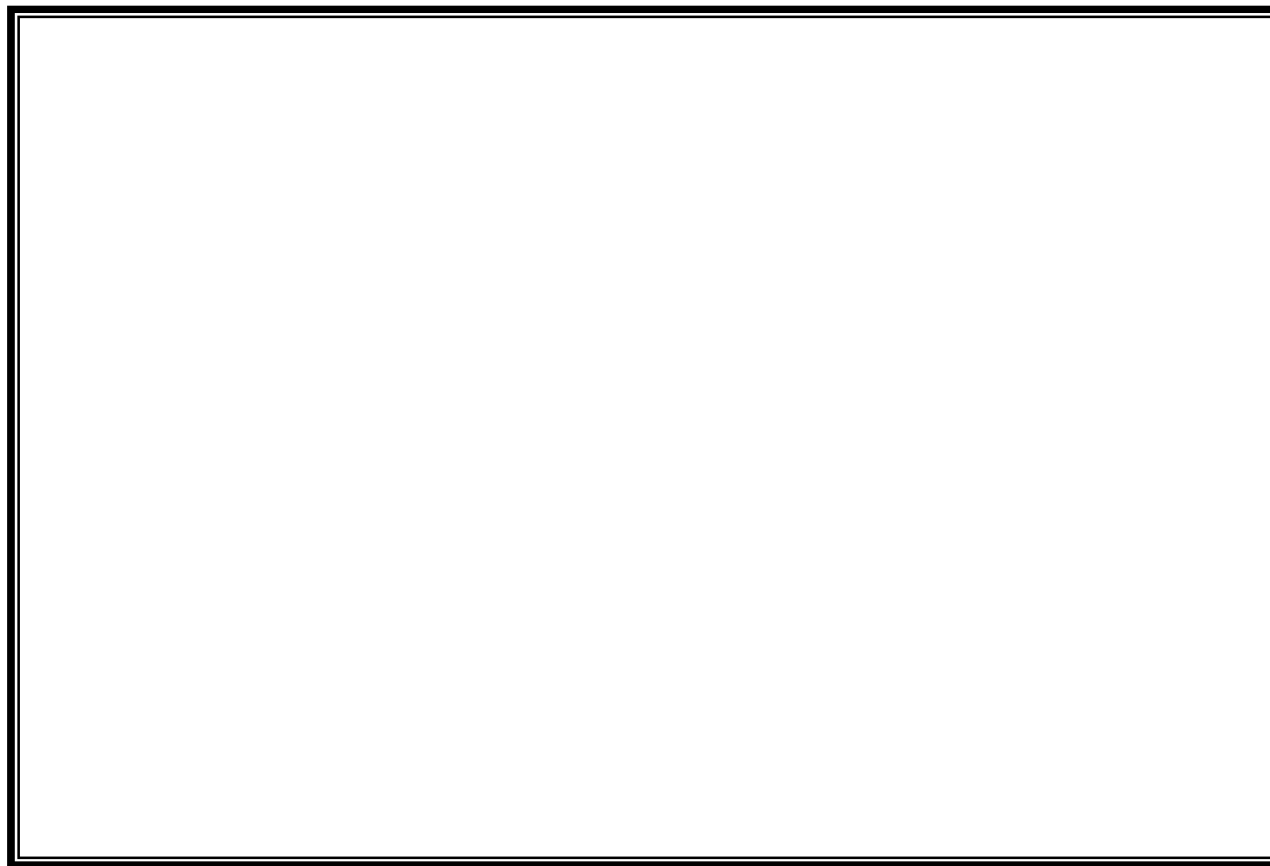




<sup>1</sup>H-RMN (128): 4-[(2'*S*,3'*S*,4'*R*,5'*R*)-3',4'-dibenciloxi-*N*-benciloxicar bonil-5'-benzoiloximetilpi rrolidina-2'-il]but-3-en-2-ona



<sup>13</sup>C-RMN (128): 4-[(2'*S*,3'*S*,4'*R*,5'*R*)-3',4'-dibenciloxi-*N*-benciloxicar bonil-5'-benzoiloximetilpi rrolidina-2'-il]but-3-en-2-ona



**<sup>1</sup>H-RMN (129): (1*S*,2*R*,3*R*,5*S*,7*aS*)-1,2-dibenciloxi-3-benzoiloximetil-5-metilpirrolizidina**



<sup>13</sup>C-RMN (129): (1*S*,2*R*,3*R*,5*S*,7*aS*)-1,2-dibenciloxi-3-benzoiloximetil-5-metilpirrolizidina

