



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Química Orgánica

**Síntesis de galactofuranósidos de superficie
de *Leishmania* para el desarrollo de un
test de diagnóstico serológico**

Tesis presentada para optar por el título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área de Química Orgánica

Carolina Sofía Touloumdjian

Director de tesis: Dra. Lucía Gandolfi Donadío

Consejero de estudios: Dra. Adriana Kolender

Lugar de trabajo: Instituto Nacional de Tecnología Industrial

Buenos Aires, diciembre de 2025

Síntesis de galactofuranósidos de superficie de *Leishmania* para el desarrollo de un test de diagnóstico serológico

Esta tesis doctoral se centró en el diseño y síntesis de galactofuranósidos constitutivos de glicanos de superficie de *Leishmania braziliensis* con el objeto de identificar biomarcadores de infección para el desarrollo de un método de diagnóstico serológico de leishmaniasis tegumentaria americana (LTA), enfermedad endémica en Argentina.

Se llevó a cabo la síntesis total de cinco galactofuranósidos estructuralmente definidos presentes en glicolípidos de superficie altamente antigenicos de *Leishmania*: los glicoinositofosfolípidos (GIPLs) y el lipofosfoglicano (LPG). Los oligosacáridos fueron diseñados con un grupo 5-aminopentilo en su extremo reductor a modo de conector para su posterior anclado a superficies.

La afinidad de los glicósidos sintetizados por anticuerpos presentes en sueros humanos infectados con LTA se estudió por medio de microarreglos de glicanos. De esta manera, se identificaron dos compuestos con marcada inmunorreactividad IgM que, además, mostraron baja reactividad cruzada al ser expuestos a sueros de pacientes con enfermedad de Chagas.

Complementariamente, se abordó el desarrollo de un glicobiosensor para diagnóstico serológico basado en espectroscopía de impedancia electroquímica. Los galactofuranósidos se anclaron sobre electrodos de oro por medio de monocapas autoensambladas de tioles (SAMs) y la incorporación de los glicósidos se confirmó por técnicas fisicoquímicas y electroquímicas. Posteriormente, superficies funcionalizadas con uno de los glicósidos sintetizados se utilizaron para evaluar la respuesta del sistema a sueros positivos y negativos para LTA, sentando las bases para futuras aplicaciones diagnósticas.

Palabras claves: galactofuranósidos, síntesis química, *Leishmania*, microarreglos de glicanos, glicobiosensores, biosensores electroquímicos, espectroscopía de impedancia, inmunoreactividad.

Synthesis of surface galactofuranosides of *Leishmania* for serological test development

This doctoral thesis focused on the design and chemical synthesis of galactofuranoside constituents from the surface glycans of *Leishmania braziliensis*, aiming to identify infection biomarkers for the development of a serological diagnostic platform against american tegumentary leishmaniasis (ATL), an endemic disease in Argentina.

We carried out the total synthesis of five structurally defined galactofuranosides found in highly antigenic surface glycolipids of *Leishmania*: the glycoinositolphospholipids (GIPLs) and the lipophosphoglycan (LPG). The synthetic oligosaccharides were designed with a terminal 5-aminopentyl linker for their subsequent anchoring to surfaces.

The affinity of the synthetic glycosides for antibodies present in human sera from patients with ATL was investigated using glycan microarrays. Two compounds displaying high IgM immunoreactivity and also low cross-reactivity against sera from Chagas disease patients were identified using this technology.

As a complementary approach, we undertook the development of a glycobiosensor for serological diagnosis based on electrochemical impedance spectroscopy. Galactofuranosides were immobilized on gold electrodes via thiol self-assembled monolayers (SAMs), and their incorporation was confirmed using physicochemical and electrochemical techniques. Subsequently, surfaces functionalized with one of the synthetic glycosides were used to assess the system's response to ATL-positive and ATL-negative sera, providing a foundation for future diagnostic applications.

Key words: galactofuranosides, chemical synthesis, *Leishmania*, glycan microarrays, glycobiosensors, electrochemical biosensors, electrochemical impedance spectroscopy, immunoreactivity.

A Fede, mi hogar es donde vos estás.

*A mis padres, ejemplo de persistencia,
compromiso, superación y, sobre todo, amor.*

A Marisa, Edgardo y Facu, que desde el día en que me conocieron me hicieron parte de su familia.

*«Con tesón, has de ser,
cada día mejor»*

Agradecimientos

Primero y principal, le agradezco infinitamente al mejor compañero. *Fede* no sólo me contuvo, me apoyó y creyó en mí, sino que incontables veces me ayudó a idear, a pensar y planificar... Qué suerte la mía de tenerte a mi lado. Por seguir creciendo juntos y seguir cumpliendo sueños.

En la concreción de esta tesis *Juan* fue una figura indispensable. Si bien es mi terapeuta, y como tal le pago para que me escuche, así y todo merece un lugar en esta sección. Juan me escuchó y me entendió en momentos difíciles, me ayudó a aplacar y, de a poco, controlar mis miedos y me guió para encontrar mi fuerza interior y alcanzar una vida que hoy me hace sentir feliz y orgullosa.

Me considero muy afortunada de haber recorrido parte de este camino con *Dani* y con *Bren*, mis compañeras de oficina. Ambas me hicieron sentir contenida y acompañada y estuvieron siempre dispuestas a escucharme en las mil idas y vueltas que dio este proyecto. Gracias por su amistad y su apoyo.

De todos los compañeros con los que compartí el laboratorio a lo largo de los años me llevo algo: de *Lau R.*, *Marisa*, *Mati*, *Anto*, *Mariana*, *Diego*, *Lu T.*, *Ailén*, *Tomi*, *Estani*, *Lucho*, *Nacho*, *Mauro* y *Sil*. El apoyo en el día a día y los momentos compartidos los llevo conmigo, gracias. Mención aparte para *Lu T.*, quien realizó algunos de los ensayos de síntesis y optimización de las reacciones que se describen en esta tesis.

A *Ele* y *Ana*, les agradezco por acompañarme y contenerme en todas las etapas de este camino, y atesoro los miles de momentos vividos. También les agradezco por brindarme su invaluable ayuda y consejo durante la etapa de síntesis de esta tesis.

Les quiero agradecer a *Sergio* y *Leandro*, quienes incontables veces me asistieron con los ensayos de RMN, estuvieron al pie del cañón para ayudarme en lo que necesitara, y que transmiten la dedicación que vuelcan en su trabajo. Y a *Pau* y *Marie* les agradezco por la buena onda de todos los días. Son excelentes incorporaciones a la oficina!

No me olvido de *Ceci*, *Ili*, *Juli* y *Loren*, mis compañeros de control de procesos. Gracias por la buena onda de todos los días, y por sus contribuciones a la parte sintética de esta tesis.

Un gracias ENORME para *Santi Herrera*, quién me abrió las puertas de su laboratorio, me dio cursos acelerados de AFM, STM y electroquímica, se sentó a pensar y planificar conmigo y me permitió adentrarme en un campo desconocido para mí, que nutrió tanto esta tesis como mi formación profesional. Por sobre todo, agradezco que me haya compartido conmigo (y un poco contagiado) su amor por la ciencia.

Hay muchas personas del INQUIMAE que contribuyeron en este trabajo y es necesario mencionar. Primero, a *Dani, Lili y Pablo*, integrantes 2023/2024 del laboratorio de Electroquímica Molecular, que me recibieron con los brazos abiertos y, desde el primer día, me hicieron sentir como en casa. A la *Dra. Lucy Coria*, por permitirme hacer los ensayos de QCM y por su invaluable ayuda y excelente predisposición. Al *Dr. Federico Williams*, quién ejecutó las mediciones de XPS que enriquecieron los estudios de esta tesis. Al *Dr. Ernesto Calvo*, por brindarme el espacio y los recursos de su laboratorio para realizar los ensayos electroquímicos. Por último, a la *Dra. Lorena I. Ibañez*, por permitirme utilizar su cabina de bioseguridad para la manipulación de los sueros.

Le quiero agradecer a quienes hicieron posible la ejecución de los ensayos con sueros humanos, *Germán Astudillo* y el *Dr. Diego Marco*, quienes brindaron las muestras que necesitábamos para concretar esta etapa.

Al *Prof. Dr. Peter Seeberger* y al *Max Planck Institute of Colloids and Interfaces*, por el apoyo económico para el envío de los materiales y para llevar a cabo la estadía científica en su laboratorio. A *Emelie Reuber* y *Fabienne Weber*, quienes muy gentilmente me recibieron en su laboratorio, me guiaron en los ensayos por microarreglos de glicanos, y realizaron el procesamiento de los datos experimentales.

A la *Universidad de Buenos Aires* y al *Dept. de Química Orgánica de la FCEN*, que me permitieron acceder a una excelente formación académica de manera gratuita.

A la ANPCyT por los recursos económicos adjudicados a este proyecto.

Le agradezco al *INTI*, por brindarme el espacio, el apoyo económico y los recursos necesarios para concretar este proyecto. A quienes forman y formaron parte de la dirección del centro de Química y luego de la SOlyS, por impulsarlo y brindar las herramientas necesarias para su ejecución. A todos mis compañeros de INTI-Química, y mención especial para *Lau M., Diego G., Fabi y Cin*, que a diario realizan las gestiones indispensables para el buen funcionamiento del laboratorio.

Muchas gracias a *Juli Comin*, por abrirme las puertas de su laboratorio, acompañar e impulsar este proyecto y facilitar los recursos necesarios para su concreción.

Y el gracias más grande para mi directora. *Lu*, gracias por recibirme con los brazos abiertos, confiar en mis capacidades, brindarme todo tu conocimiento, guiar este trabajo, realizar una revisión detallada de esta tesis y, en el tramo final de la parte experimental, brindarme el apoyo que necesitaba para poner a prueba algunas de mis ideas.

En estos años, entre otras muchas cosas, aprendí que el buen desarrollo profesional se nutre y necesita de un buen sistema de contención. Les agradezco muy sinceramente a quienes estos años estuvieron a mi lado:

A *Romi Ronchi*, que fue un ejemplo de persistencia y que me acompañó en momentos de inseguridades e incertezas.

A *Reni, Caro, Sofi, Dinais y Aldi*, las personas que me conocen en lo más profundo y que me conectan con mis raíces.

A *Titu*, que me hace reír como nadie, me quiere con mis mañas y que peleó todas las batallas a mi lado. Que nunca nos falte chisme y mucho drama.

A *Bren, Emi, Facu, Nacho, Nico F., Nico A., Rodri y Santi*. ¡Qué honor tenerlos en mi vida! Agradezco que, a pesar de que me conocen mucho, me quieren como soy y me permiten ser su amiga. Honestamente, conocerlos me cambió la vida. Son un grupo humano hermoso y disfruto mucho de su compañía.

A mis tíos *Eli y Cris*, mis primas *Ali, Diana, Marce, Nati y Sil*, mis primos *Mati, Loren, Mateo y Diego*, y a mi bella ahijada *Shawntu*. Aunque somos una familia un poquito caótica, nos apoyamos en las buenas y en las malas y nos queremos mucho. Gracias por estar siempre presentes.

A mis *padres* y a mis *suegros* por su incondicionalidad y su ayuda permanente. Soy muy feliz de compartir mi vida y mis logros con ustedes.

Este trabajo fue arduo, sinuoso y difícil.

También gratificante, nutritivo y esclarecedor.

Fue hecho con mucho empeño y amor.

Espero haber podido plasmarlo en estas páginas.

Indice

INTRODUCCIÓN	1
Capítulo 1. Síntesis química de glicanos aplicados al diagnóstico de leishmaniasis	3
1.1. <i>Síntesis química de carbohidratos.....</i>	6
1.1.1. Glicosidación: mecanismos y control estereoquímico	6
1.1.2. Donores de glicosilo y estrategias sintéticas	11
1.1.3. Consideraciones para la síntesis de furanósidos	14
1.1.4. Estrategias para mejorar la eficiencia sintética	15
1.2. <i>Leishmania y sus glicanos como herramientas de diagnóstico.....</i>	17
1.2.1. Patogénesis	18
1.2.2. Glicanos de superficie. Estructura y función del lipofosfoglicano (LPG) y los glicoinositolfosfolípidos (GIPLs)	18
1.2.3. Desafíos del diagnóstico: limitaciones y oportunidades	21
Capítulo 2. Azúcares como herramientas de diagnóstico.....	25
2.1. <i>Biosensores. Generalidades</i>	27
2.2. <i>Biosensores basados en carbohidratos.....</i>	30
2.2.1. El elemento de reconocimiento	31
2.2.2. Elección del sustrato y estrategias de anclaje de glicanos.....	33
2.2.3. Elección del modo de detección y del transductor.....	38
Objetivos.....	42
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	45
Capítulo 3. Síntesis de galactofuranósidos de <i>Leishmania</i>	47
3.1. <i>Introducción</i>	49
Primera parte. Fragmentos del GIPL-1	53
3.2. <i>Diseño de las rutas sintéticas para la obtención de 1, 2 y 3</i>	55
3.3. <i>Síntesis del precursor de D-Galf, tricloroacetimidato de O-(2,3,5,6-tetra-O-benzoíl-β-D-galactofuranosilo) (6)</i>	57
3.4. <i>Síntesis del precursor del amino linker, N-(bencil)benciloxicarbonil-5-aminopentanol (8)</i>	58
3.5. <i>Síntesis del 5-aminopentil β-glicósido de D-Galf (1)</i>	60
3.5.1. Glicosidación. Obtención de <i>N</i> -(bencil)benciloxicarbonil-5-aminopentil 2,3,5,6-tetra-O-benzoíl-β-D-galactofuranósido (11)	60
3.5.2. Desprotección. Obtención de 5-aminopentil β-D-galactofuranósido (1)	63

3.6. Síntesis del precursor de <i>D-Manp</i> , alil 4,6-O-bencilidén- α -D-manopiranósido (7)	66
3.7. Síntesis del 5-aminopentil α -glicósido de <i>D-Galf</i> - β -(1 \rightarrow 3)- <i>D-Manp</i> (2)	69
3.7.1. Glicosidación. Obtención de alil 2,3,5,6-tetra-O-benzoíl- β -D-galactofuranosil-(1 \rightarrow 3)-4,6-O-bencilidén- α -D-manopiranósido (15).....	69
3.7.2. Activación del centro anomérico de 2,3,5,6-tetra-O-benzoíl- β -D-galactofuranosil-(1 \rightarrow 3)-4,6-O-bencilidén- α -D-manopiranosa	71
3.7.3. Glicosidación. Obtención de <i>N</i> -(bencil)benciloxicarbonil-5-aminopentil 2,3,5,6-tetra-O-benzoíl- β -D-galactofuranosil-(1 \rightarrow 3)-4,6-O-bencilidén-2-O-benzoíl- α -D-manopiranósido (19)	73
3.7.4. Desprotección. Obtención de 5-aminopentil β -D-galactofuranosil-(1 \rightarrow 3)- α -D-manopiranósido (2)	79
3.8. Síntesis del 5-aminopentil α -glicósido de <i>D-Galf</i> - β -(1 \rightarrow 3)- <i>D-Manp</i> - α -(1 \rightarrow 3)- <i>D-Manp</i> (3)	81
3.8.1. Glicosidación. Obtención de alil 2,3,5,6-tetra-O-benzoíl- β -D-galactofuranosil-(1 \rightarrow 3)-4,6-O-bencilidén-2-O-benzoíl- α -D-manopiranosil-(1 \rightarrow 3)-4,6-O-bencilidén-2-O-benzoíl- α -D-manopiranósido (23)	81
3.8.2. Activación del centro anomérico de 2,3,5,6-tetra-O-benzoíl- β -D-galactofuranosil-(1 \rightarrow 3)-4,6-O-bencilidén-2-O-benzoíl- α -D-manopiranosil-(1 \rightarrow 3)-4,6-O-bencilidén-2-O-benzoíl- α -D-manopiranosa.....	83
3.8.3. Glicosidación. Obtención de <i>N</i> -(bencil)benciloxicarbonil-5-aminopentil 2,3,5,6-tetra-O-benzoíl- β -D-galactofuranosil-(1 \rightarrow 3)-4,6-O-bencilidén-2-O-benzoíl- α -D-manopiranosil-(1 \rightarrow 3)-4,6-O-bencilidén-2-O-benzoíl- α -D-manopiranósido (26)	84
3.8.4. Desprotección. Obtención de 5-aminopentil β -D-galactofuranosil-(1 \rightarrow 3)- α -D-manopiranósido (3)	88
3.9. Conclusiones	91
Segunda parte. Fragmentos del GIPL-2	93
3.10. Diseño de las rutas sintéticas para la obtención de 4 y 5.....	95
3.11. Síntesis del precursor de <i>D-Galp</i> , tricloroacetimidato de O-(2,3,4,6-tetra-O-bencil- β -D-galactopiranosilo) (30).....	96
3.12. Síntesis del precursor de <i>D-Galf</i> , 2-O-benzoíl-5,6-O-isopropilidén-D-galactono-1,4-lactona (31)	98
3.13. Síntesis del 5-aminopentil β -glicósido de <i>D-Galp</i> - α -(1 \rightarrow 3)- <i>D-Galf</i> (4)	99
3.13.1. Glicosidación. Obtención de 2,3,4,6-tetra-O-bencil- α -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 3)-2-O-benzoíl-5,6-O-isopropilidén-D-galactono-1,4-lactona (35)	99
3.13.2. Activación del centro anomérico de 2,3,4,6-tetra-O-bencil- α -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 3)-2-O-benzoíl-5,6-O-isopropilidén-D-galactofuranosa	102
3.13.3. Glicosidación. Obtención de <i>N</i> -(bencil)benciloxicarbonil-5-aminopentil 2,3,4,6-tetra-O-bencil- α -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 3)-2-O-benzoíl-5,6-O-isopropilidén- β -D-galactofuranósido (38)	102

3.13.4. Desprotección. Obtención del del 5-aminopentil α -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 3)- β -D-galactofuranósido (4)	104
3.14. Síntesis del 5-aminopentil α-glícido de D-Galp-α-(1\rightarrow3)-D-Galf-β-(1\rightarrow3)-D-Manp (5)	107
3.14.1. Glicosidación. Obtención de alil 2,3,4,6-tetra-O-bencil- α -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 3)-2-O-benzoíl-5,6-O-isopropilidén- β -D-galactofuranosil-(1 \rightarrow 3)-4,6-O-bencilidén-2-O-benzoíl- α -D-manopiranósido (42)	107
3.14.2. Activación del centro anomérico de 2,3,4,6-tetra-O-bencil- α -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 3)-2-O-benzoíl-5,6-O-isopropilidén- β -D-galactofuranosil-(1 \rightarrow 3)-4,6-O-bencilidén-2-O-benzoíl-D-manopiranosa	109
3.14.3. Glicosidación. Obtención del <i>N</i> -(bencil)benciloxicarbonil-5-aminopentil 2,3,4,6-tetra-O-bencil- α -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 3)-2-O-benzoíl-5,6-O-isopropilidén- β -D-galactofuranosil-(1 \rightarrow 3)-4,6-O-bencilidén-2-O-benzoíl- α -D-manopiranósido (45)	111
3.14.4. Desprotección. Obtención de 5-aminopentil α -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 3)- β -D-galactofuranosil-(1 \rightarrow 3)- α -D-manopiranósido (5)	114
3.15. Conclusiones	116
Capítulo 4. Evaluación de la antigenicidad de los galactofuranósidos	117
4.1. <i>Introducción</i>	119
4.2. <i>Análisis de la inmunorreactividad mediante microarreglos de glicanos</i>	119
4.3. <i>Conclusiones y perspectivas futuras</i>	127
Capítulo 5. Desarrollo de un glicobiosensor para diagnóstico serológico	129
5.1. <i>Introducción</i>	131
5.2. <i>Diseño de la superficie</i>	132
5.3. <i>Caracterización de superficies funcionalizadas con glícidos</i>	135
5.3.1. Análisis morfológico por AFM y STM	135
5.3.2. Análisis de la composición química superficial: Estudios por XPS	138
5.3.3. Análisis de las propiedades electroquímicas	140
5.4. <i>Respuesta a interacciones inespecíficas</i>	145
5.5. <i>Evaluación del glícido 2 como biomarcador de infección</i>	146
5.6. <i>Conclusiones</i>	150
6. PARTE EXPERIMENTAL	153
6.1. <i>Materiales y métodos empleados en la síntesis de glicanos (Capítulo 3)</i>	155
6.1.1. Generalidades	155
6.1.2. Metodologías de síntesis	160
6.2. <i>Materiales y métodos empleados en la evaluación de antigenicidad y desarrollo del glicobiosensor basado en los glícidos 1-5 (Capítulos 4 y 5)</i>	201

6.2.1. Sueros humanos utilizados.....	201
6.2.2. Ensayos de reconocimiento por microarreglo de glicanos de anticuerpos séricos de pacientes con LTA y enfermedad de Chagas	202
6.2.3. Desarrollo del glicobiosensor impedimétrico para la detección de anticuerpos en sueros de pacientes con LTA	207
6.2.4. Ensayos de respuesta del glicobiosensor a muestras biológicas.....	215
RESUMEN EXTENDIDO	219
APÉNDICE	227
Figuras y datos supplementarios	229
A1. Capítulo 4	231
A1.1. Análisis de la inmunorreactividad mediante microarreglos de glicanos	231
A2. Capítulo 5	233
A2.1. Caracterización de superficies funcionalizadas con glicósidos. Análisis de las propiedades electroquímicas.....	233
A2.2. Respuesta a interacciones inespecíficas	234
A2.3. Evaluación del glicósido 2 como biomarcador de infección.....	235
Fundamentos de las técnicas fisicoquímicas utilizadas.....	241
A3. Técnicas de caracterización fisicoquímica	243
A3.1. Espectroscopía fotoelectrónica de rayos X.....	243
A3.2. Microscopía de efecto túnel.....	247
A3.3. Microscopía de fuerza atómica	249
A4. Técnicas electroquímicas.....	251
A4.1. Introducción.....	251
A4.2. Voltametría cíclica	253
A4.3. Espectroscopía de impedancia electroquímica	256
A5. Microbalanza de cristal de cuarzo con disipación (QCM-D)	263
BIBLIOGRAFÍA	267

Abreviaturas

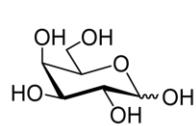
$[\alpha]_D$	rotación específica
(c)	concentrado
(s)	sólido
δ	desplazamiento químico
λ	longitud de onda
ACN	acetonitrilo
Ac	acetato
AcOEt	acetato de etilo
AcOH	ácido acético
AFM	<i>atomic force microscopy</i> (microscopía de fuerza atómica)
All	alilo
AlOH	alcohol alílico
alt.	altura
anh.	anhidro
Bn	bencilo
Bz	benzoílo
c	concentración
cat.	catalítico
Cbz	carboxibencilo
ccd	cromatografía en capa delgada
C_{dc}	capacidad de doble capa
CMIA	<i>chemoluminescent microparticle immunoassay</i> (inmunoensayo quimioluminiscente de micropartículas)
COSY	espectroscopía de correlación homonuclear
CPE	<i>constant phase element</i> (elemento de fase constante)
CSA	ácido (1S)-(+)-10-camforsulfónico
CV	<i>cyclic voltammetry</i> (voltametría cíclica)
d.	diámetro
DBU	1,8-diazabiciclo[5.4.0]undec-7-eno
dil.	dilución
DMF	dimetilformamida
DMP	2,2-dimetoxipropano
DSB	disiamilborano [bis(2-butil-3-metil)borano]
EA	etanolamina
EDC	1-etyl-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida
EFS	extracción en fase sólida
EIS	<i>electrochemical impedance spectroscopy</i> (espectroscopía de impedancia electroquímica)
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbant assay</i> (ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas)
EM	espectrometría de masa
EMAR	espectrometría de masa de alta resolución
equiv.	equivalente(s)
ESI	<i>electrospray ionization</i> (ionización por electrospray)
Et	etilo

Et ₂ O	dietil éter
EtOH	etanol
<i>f</i>	furanosa
GIPL	glicoinositolfosfolípido
GPI	glicosilfosfatidilinositol
<i>h</i>	hora(s)
HMBC	espectroscopía de correlación heteronuclear a enlaces múltiples
HSQC	espectroscopía de coherencia cuántica simple heteronuclear
<i>i</i> -PrOH	isopropanol
<i>J</i>	constante de acoplamiento
KF	Karl Fisher
lit.	literatura
LPG	lipofosfoglicano
<i>m/z</i>	relación masa-carga
Me	metilo
MeOH	metanol
MH	mercaptophexanol
min	minutos
MLEE	<i>multilocus enzyme electrophoresis</i> (electroforesis enzimática multilocus)
MS	<i>molecular sieves</i> (tamices moleculares)
MUA	ácido mercaptoundecanoico
NHS	<i>N</i> -hidroxisuccinimida
P.Eb	punto de ebullición
<i>p</i>	piranosa
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (reacción en cadena de la polimerasa)
pf	punto de fusión
Ph	fenilo
PS-PCR	<i>polymorphism-specific PCR</i> (PCR específica para polimorfismos)
Py	piridina
QCM-D	<i>quartz cristal microbalance with dissipation</i> (microbalanza de cristal de cuarzo con disipación)
R _f	relación de frente
Rha	ramnosa
RMN	resonancia magnética nuclear
R _s	resistencia de la solución
R _{tc}	resistencia a la transferencia de carga
SAM	<i>self-assembled monolayer</i> (monocapa autoensamblada)
STM	<i>scanning tunnelling microscopy</i> (microscopía de efecto túnel)
ss	solución saturada
t.a.	temperatura ambiente
TEA	trietilamina
temp.	temperatura
TFA	ácido trifluoroacético
THF	tetrahidrofurano
TMSOTf	trimetilsililtriflato
TOCSY	espectroscopía de correlación total
UV	ultravioleta

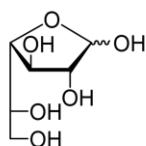
XPS

X-ray photoelectronic spectroscopy (espectroscopía
fotoelectrónica de rayos X)

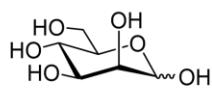
Nomenclatura de carbohidratos



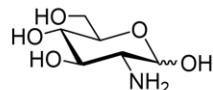
D-Galactosa (D-Gal) o
D-Galactopiranosa (D-Galp)



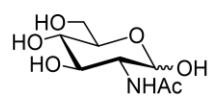
D-Galactofuranosa
(D-Galf)



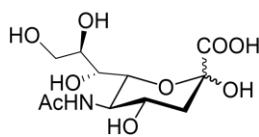
D-Manosa (D-Man) o
D-Manopyranosa (D-Manp)



D-Glucosamina
(D-GlcN)



N-Acetyl-D-glucosamina
(D-GlcNAc)



Ácido N-acetylneuramínico
(Neu5Ac)



INTRODUCCIÓN

Capítulo 1

**Síntesis química de
glicanos aplicados al
diagnóstico de
leishmaniasis**

Los carbohidratos, junto con los ácidos nucleicos, lípidos y proteínas, conforman el grupo de biomoléculas esenciales para la vida. Mientras que algunos polímeros sacarídicos son componentes estructurales de las paredes celulares de diversos organismos, otros actúan como mediadores en numerosos procesos biológicos y metabólicos.^[1,2]

Las células (eucariotas y procariotas) y los virus están recubiertos por una capa densa de carbohidratos complejos. Esta capa participa en procesos de reconocimiento, diferenciación, y adhesión celular, al interactuar con proteínas (como lectinas), otros carbohidratos y lípidos. Además, debido a su exposición en la superficie, los carbohidratos participan en la interacción con patógenos y con distintos elementos del sistema inmune, jugando un papel central en procesos como la patogénesis, la inflamación y el reconocimiento antigénico.

Una propiedad característica de los glicanos es su gran diversidad estructural, que está estrechamente ligada con la amplia variedad de funciones biológicas que desempeñan. A diferencia de los oligopéptidos o los oligonucleótidos, cuyos monómeros se enlazan en forma lineal a través de un único punto de anclaje, los oligosacáridos presentan múltiples posibilidades de enlace. Cada monosacárido puede establecer un enlace glicosídico entre su carbono anomérico y algún hidroxilo libre de otro azúcar, dando lugar tanto a polímeros lineales como ramificados. Además, el carbono anomérico es un centro estereogénico, por lo que cada enlace puede adoptar una configuración α o β , multiplicando el número de posibles isómeros estructurales. A esto se suma que las cadenas sacarídicas pueden presentar modificaciones en sus grupos hidroxilo, por fosforilación, metilación, acetilación y lactonización, entre otras.^[3]

Una de las mayores limitaciones en el estudio del rol biológico de los carbohidratos y sus aplicaciones es la dificultad de obtener oligosacáridos y glicoconjungados puros y de estructuras bien definidas. A diferencia de las proteínas y los ácidos nucleicos, que pueden obtenerse en forma homogénea mediante expresión recombinante y reacción en cadena de la polimerasa (PCR), respectivamente, no existe una forma semejante de producción de oligosacáridos. Sumado a esto, el aislamiento de estas estructuras a partir de fuentes naturales involucra protocolos de separación y purificación extensos que sólo permiten obtener los carbohidratos en bajas cantidades y, a menudo, como mezclas heterogéneas.^[4,5]

En este contexto, la síntesis química de oligosacáridos es una alternativa interesante para obtener cantidades apreciables de oligo- o polisacáridos puros, incluso aquellos que, en la naturaleza, se encuentran en bajas concentraciones.^[6] Sin embargo, como ya se

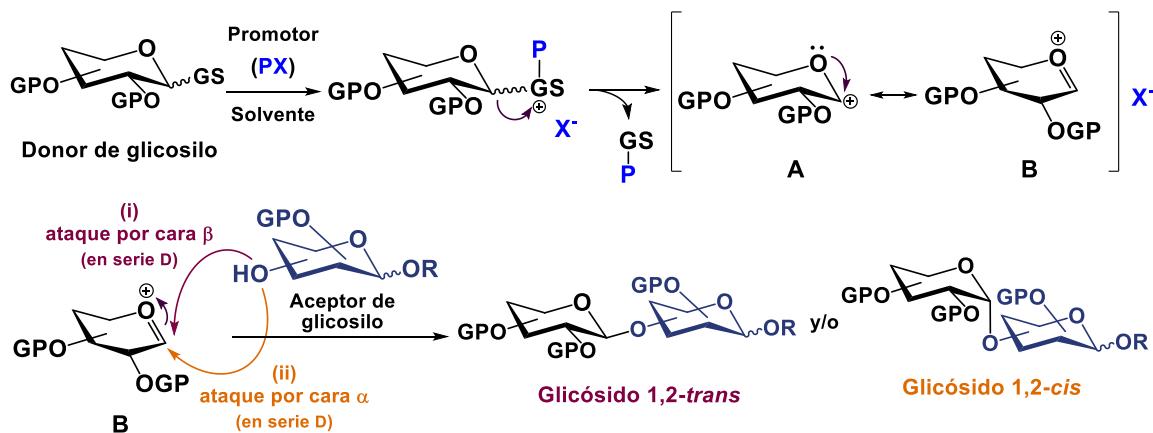
mencionó antes, la unión de dos monómeros puede dar lugar a gran variedad de posibles productos, lo que convierte a la síntesis de oligosacáridos en el laboratorio en un desafío. Si bien al día de hoy no existe una metodología de síntesis estandarizada que permita construir la variedad de estructuras presentes en la naturaleza, se han desarrollado numerosas estrategias para obtener de manera eficiente las biomoléculas deseadas. Algunas de ellas serán desarrolladas a continuación.

1.1. Síntesis química de carbohidratos

Para acceder a cadenas sacáridicas complejas por medio de la síntesis química, es importante conocer y controlar el paso clave de la síntesis: la formación de la unión glicosídica o reacción de glicosidación. En este proceso intervienen, por lo general, tres especies: un donor de glicosilo, un aceptor de glicosilo y un promotor (Esquema 1.1).

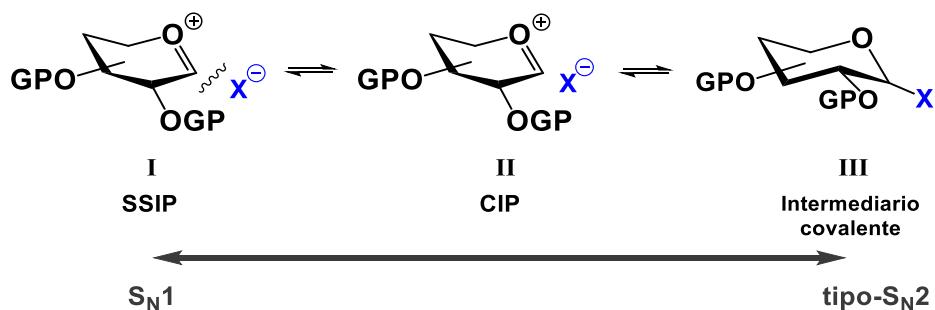
1.1.1. Glicosidación: mecanismos y control estereoquímico

La glicosidación consiste en una sustitución nucleofílica donde el aceptor de glicosilo ataca a un donor de glicosilo activado (especie electrofílica). Dado que los aceptores suelen ser nucleófilos relativamente débiles, el mecanismo inicialmente propuesto para esta transformación fue una sustitución de tipo unimolecular (S_N1 , Esquema 1.1).^[6] Según este mecanismo, en primera instancia, el agente promotor (PX) cataliza la salida del sustituyente anomérico sobre el donor de glicosilo, dando lugar al carbocatión **A** que se estabiliza por resonancia para dar el ion oxacarbenio **B** (Esquema 1.1). Dado que el carbono anomérico resultante presenta hibridación sp^2 , el nucleófilo (aceptor de glicosilo) puede atacar indistintamente por la cara superior (cara β en la serie D, camino *i*) o por la cara inferior (cara α en la serie D, camino *ii*), dando lugar a un par de diastereoisómeros (o anómeros). La configuración del enlace glicosídico resultante se describe como 1,2-*cis* cuando el grupo entrante se orienta en la misma cara que el sustituyente en C-2, y como 1,2-*trans* cuando se encuentra en la cara opuesta, (Esquema 1.1).^[7]



Esquema 1.1. Mecanismo de glicosidación S_N1 . GP=grupo protector; GS=grupo saliente.

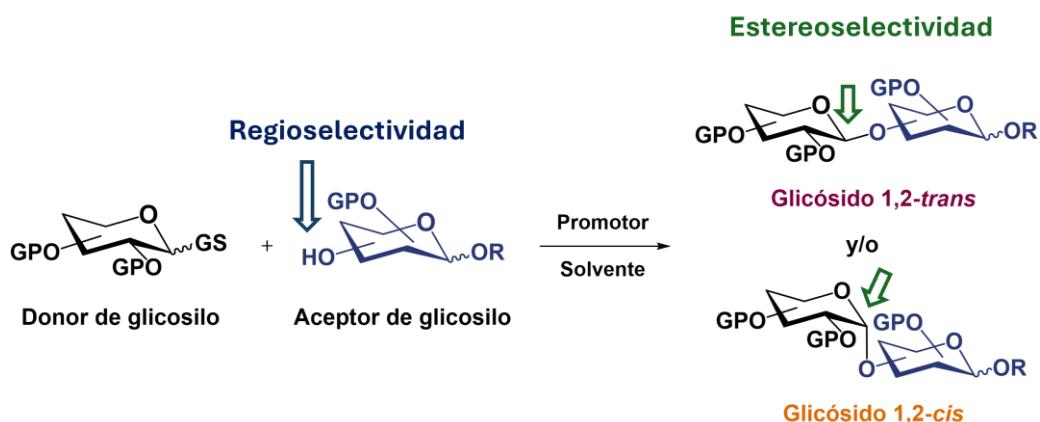
Sin embargo, en los últimos años diversos estudios mecanísticos sostienen que la glicosilación no estaría limitada a un mecanismo puramente S_N1 (sin cara preferencial de ataque). En su lugar, se propone que existen diferentes mecanismos que conforman un espectro entre sustituciones S_N1 y sustituciones tipo- S_N2 .^[8] Según este modelo, luego de la activación del donor y previo al ataque del acceptor pueden formarse distintos intermediarios electrofílicos interconvertibles entre sí: el par iónico separado por solvente I (*solvent-separated ion pair* o SSIP), el par iónico de contacto II (*contact ion pair* o CIP) e intermediarios covalentes activados III (por ejemplo, glicosiltriflatos, glicosilsulfonios, etc.) (Esquema 1.2).^[8-10] Cuando la reacción ocurre vía las especies II o III el ataque nucleofílico se verá restringido en alguna de las caras, por lo que, en estos casos, el intermediario modula la estereoquímica de la reacción. La especie iónica dominante en una dada reacción de glicosidación y, por consiguiente, la estereoquímica del producto, dependen de la combinación de donor-aceptor-promotor elegida y las condiciones de reacción empleadas (temperatura, concentración, solvente).^[8]



Esquema 1.2. Intermediarios de glicosidación según el modelo continuo entre S_N1 y tipo- S_N2 . X^- = contraión proveniente del promotor (PX). GP=grupo protector; SSIP= *solvent-separated ion pair* (par iónico separado por solvente); CIP= *contact ion pair* (par iónico de contacto).

Adicionalmente, el curso estereoquímico de las glicosidaciones también puede ser modulado por algunos grupos protectores específicos o por el solvente elegido, como se verá más adelante.

En conclusión, en el diseño de las rutas de síntesis de oligosacáridos es muy importante la elección cuidadosa de los bloques constructores, esto es, el donor y acceptor de glicosilo, de forma de controlar la *estereoquímica* (la configuración α o β de los enlaces) y la *regioquímica* (la posición de sustitución) de la unión glicosídica (Esquema 1.3) deseada.



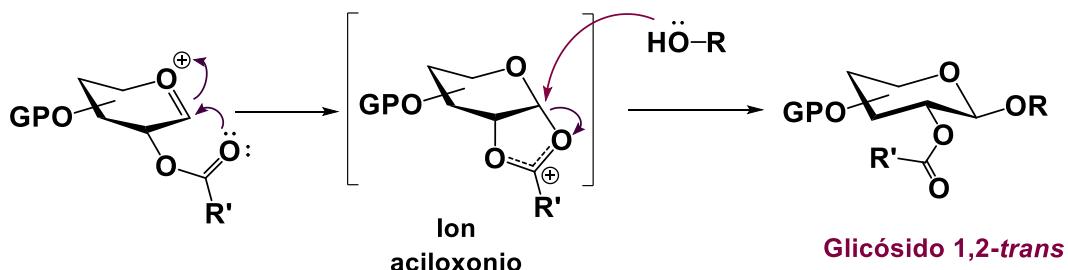
Esquema 1.3. Reacción de glicosidación. GP=grupo protector; GS=grupo saliente.

La *regioselectividad* de la glicosidación puede ser controlada a través de grupos protectores (“GP”). Es por esto que, usualmente, los grupos hidroxilo del acceptor se protegen de forma tal que el único hidroxilo libre sea aquel que se desea sustituir. Algunos grupos protectores, como los éteres aromáticos, son estables a gran variedad de condiciones de reacción y suelen ser removidos en el tramo final de la ruta de síntesis. Otros grupos, como los ésteres, acetales y silil ésteres, pueden proteger una posición determinada de forma temporal para luego ser removidos selectivamente, ya sea para extender la cadena oligosacáridica o para modificar grupos funcionales, según los requerimientos de la molécula objetivo.^[11] Asimismo, los grupos protectores pueden mejorar la solubilidad en solventes orgánicos y facilitar la purificación de los compuestos.

La *estereoselectividad* es el aspecto más desafiante de la síntesis de oligosacáridos. Para su control, se dispone de distintas herramientas, entre las cuales se encuentra la elección de grupos protectores. Estas funcionalidades pueden modular la reactividad de donores y aceptores de glicosilo, e incluso dirigir la estereoquímica de las reacciones de glicosilación.^[9,12]

La estrategia más utilizada para la construcción estereoselectiva de enlaces 1,2-*trans* consiste en el uso de grupos acilo protectores del C-2 (típicamente O-acetilo y O-

benzoílo). El grupo 2-O-acilo “participante” ataca al intermediario oxacarbenio durante la glicosidación para dar un ion aciloxonio estabilizado por resonancia (Esquema 1.4). El anillo de 5 miembros resultante conduce el ataque del aceptor exclusivamente por la cara opuesta al sustituyente en C-2 para dar el producto 1,2-*trans*. A este fenómeno se lo conoce también como asistencia anquimérica.



Esquema 1.4. Mecanismo asociado con la obtención de glicósidos 1,2-*trans* por participación anquimérica de un grupo acilo en C-2.

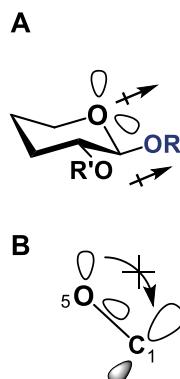
Asimismo, existen grupos participantes en C-2 que favorecen la formación de glicósidos 1,2-*cis*.^[9] Un ejemplo de este tipo de funcionalidades es el auxiliar quiral (S)-1-fenil-2-tiofeniletilo, que ha sido utilizado para obtener α -glicósidos de forma estereoselectiva a partir de donores de glucopiranósilo. En este caso, el tiol en C-2 ataca al C anomérico electrofílico del intermediario oxacarbenio para dar el ión sulfonio *trans*-decalina correspondiente, que presenta un grupo fenilo bloqueando la cara β . Es por esto que el ataque del aceptor ocurre por la cara α para dar el glicósido 1,2-*cis* correspondiente.^[13]

Cuando el grupo en C-2 es no participante, como es el caso de los éteres o las azidas, el producto de glicosidación en piranasas suele ser una mezcla de anómeros, donde típicamente el glicósido α (serie D) se obtiene como producto mayoritario. Este comportamiento se atribuye al denominado efecto anomérico, un fenómeno estereoelectrónico gobernado por interacciones electrostáticas y efectos de hiperconjugación (Esquema 1.5).^[9]

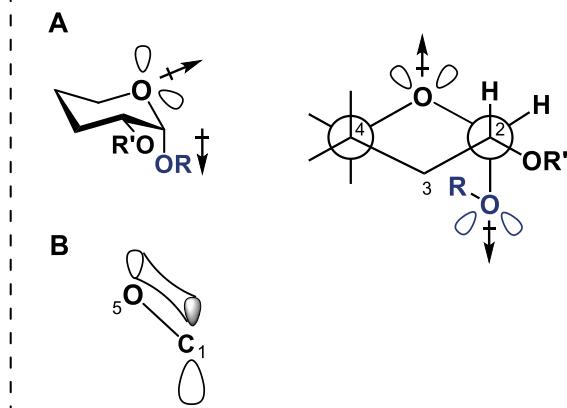
Desde el punto de vista electrostático, el efecto anomérico se explica en términos de interacciones dipolo-dipolo. Cuando el sustituyente anomérico “OR” se ubica en posición ecuatorial (anómero β en la serie D), los pares de electrones no enlazados del oxígeno exocíclico interaccionan de forma repulsiva con los pares de electrones no enlazados del oxígeno endocíclico (O-5), generando una interacción electrostática desestabilizante. En el anómero α , en el que el sustituyente anomérico se orienta en forma axial, esta interacción es mínima, por lo que este anómero presenta una estabilización relativa respecto del anómero β (Esquema 1.5.A).

Adicionalmente, cuando el sustituyente anomérico es un grupo electronegativo orientado en forma axial, se produce el solapamiento entre el orbital no enlazante del O-5 y el orbital antienlazante del enlace C-OR, que se disponen en forma *anti*-periplanar. Esto resulta en una estabilización del anómero α por hiperconjugación. Esta interacción no tiene lugar en el anómero β ya que cuando el sustituyente anomérico está en posición ecuatorial los orbitales se ubican en planos distintos y no pueden interactuar eficazmente (Esquema 1.5.B).

Anómero β (serie D)
desestabilizado



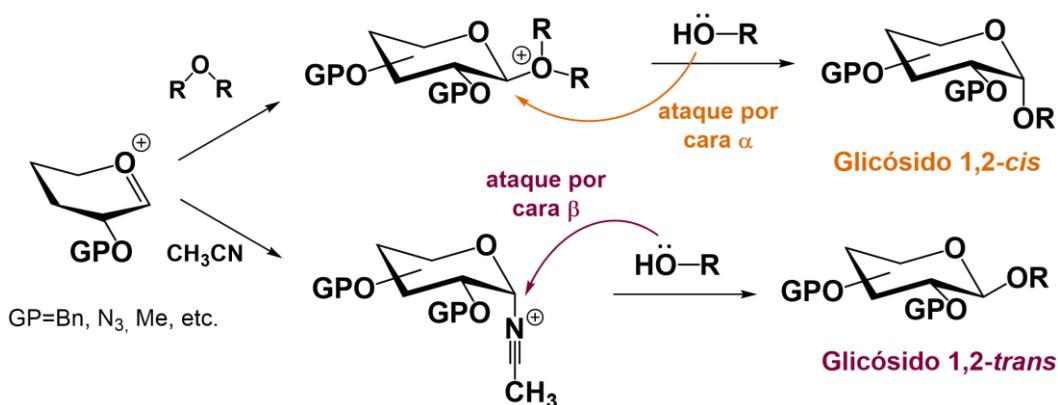
Anómero α (serie D)
estabilizado



Esquema 1.5. Efectos electrostáticos y de hiperconjugación involucrados en el efecto anomérico.

Otras estrategias disponibles para la obtención estereoselectiva de enlaces 1,2-*cis* incluyen el uso de grupos protectores remotos^[14] o voluminosos,^[15] y de donores conformacionalmente restringidos, por la presencia de funcionalidades como el 4,6-O-bencilidén acetal^[16] o los silil éteres voluminosos.^[17,18]

La elección del solvente de reacción también puede afectar la estereoquímica del producto de glicosidación. La mayoría de las glicosidaciones se llevan a cabo en disolventes de baja polaridad que no participan en la reacción, como diclorometano, tolueno o dicloroetano. Sin embargo, en ausencia de grupos participantes, algunos disolventes pueden modificar el curso estereoquímico de la reacción por formación de complejos con el intermediario oxacarbenio. Entre los solventes “participantes” se destacan el acetonitrilo, cuya coordinación en posición axial favorece el ataque nucleofílico por la cara β , y algunos éteres, que se coordinan de forma ecuatorial y median el ataque por la cara α (Esquema 1.6).^[19]



Esquema 1.6. Mecanismos involucrados en las glicosidaciones con solventes participantes, en ausencia de grupos protectores participantes.

Otros parámetros, como la temperatura, la presión, la concentración e incluso el orden en que se añaden los reactivos, pueden afectar significativamente la selectividad de la glicosilación. Por lo tanto, frecuentemente es necesario encontrar las condiciones de reacción adecuadas para lograr una alta estereoselectividad.

1.1.2. Donores de glicosilo y estrategias sintéticas

Existe una amplia variedad de métodos de glicosidación, que se clasifican según la naturaleza del sustituyente anomérico del donor de glicosilo. La reactividad química de este sustituyente determina la especie promotora a utilizar. La Tabla 1.1 muestra algunos de los donores más comunes y los agentes promotores típicos utilizados para su activación.^[6,20]

El método de Koenigs-Knorr, que utiliza *bromuros o cloruros de glicosilo*, es uno de los métodos de glicosidación más antiguos. En general, los bromuros son más reactivos que los cloruros correspondientes, por lo que son los preferidos en la mayoría de las reacciones. En estas glicosidaciones, el agente promotor es un compuesto halofílico, como las sales de Ag (AgOTf, Ag₂CO₃, AgClO₄) o de Hg (Hg(CN)₂, HgBr₂, HgCl₂). Una desventaja de este método de glicosidación es que utiliza cantidades equimolares o superiores de sales metálicas costosas y tóxicas. Asimismo, los halogenuros de glicosilo son especies térmicamente inestables y susceptibles a la hidrólisis durante la manipulación de grupos protectores o la purificación por columna de sílica gel, por lo que su uso es limitado.^[21,22]

Los *alquil o aril tioglicósidos* son ampliamente utilizados como donores en síntesis de oligosacáridos dado que son estables frente a una amplia gama de condiciones de reacción. En estos compuestos, el grupo tiol anomérico actúa como grupo protector de C-1, a la vez que admite la activación selectiva para la glicosidación en presencia de

Introducción

agentes tiofílicos, como el triflato de metilo (MeOTf), triflato de dimetil(metiltio)sulfonio (DMTST) o la mezcla *N*-iodosuccinimida/ácido tríflico (NIS/TfOH).^[23]

Tabla 1.1. Donores de glicosilo comunes y algunos de sus agentes promotores.^[6,20]
GP=grupo protector; GS=grupo saliente.



Denominación	Grupo saliente	Promotor
Método de Koenigs-Knorr	 X=Cl, Br	AgCO ₃ , AgOTf HgCl ₂ , Hg(CN) ₂
Método del tioglicósido	 R=Alquil, Aril	NIS/TfOH MeOTf DMTST
Método del selenoglicósido	 R=Alquil, Aril	NIS/TfOH, I ₂ AgOTf/K ₂ CO ₃
Método del acilo anomérico	 R=CH ₃ , Ph	TMSOTf BF ₃ .OEt ₂ ZnCl ₂ , SnCl ₄
Método del <i>n</i> -pentenil glicósido		NIS, NBS IDCP, NIS/TfOH
Método del tricloroacetimidato		BF ₃ .OEt ₂ TMSOTf AgOTf, Tf ₂ O

Los *selenoglicósidos*, por su parte, tienen propiedades similares a los *tioglicósidos*, aunque son compuestos más reactivos. Esta característica facilita su activación, aunque compromete su estabilidad, lo que limita su uso. Sin embargo, son donores atractivos debido a la amplia gama de promotores disponibles para su activación, como la mezcla *N*-iodosuccinimida/ácido tríflico (NIS/TfOH), el iodo (I₂) y la mezcla triflato de plata/carbonato de potasio (AgOTf/K₂CO₃).^[24]

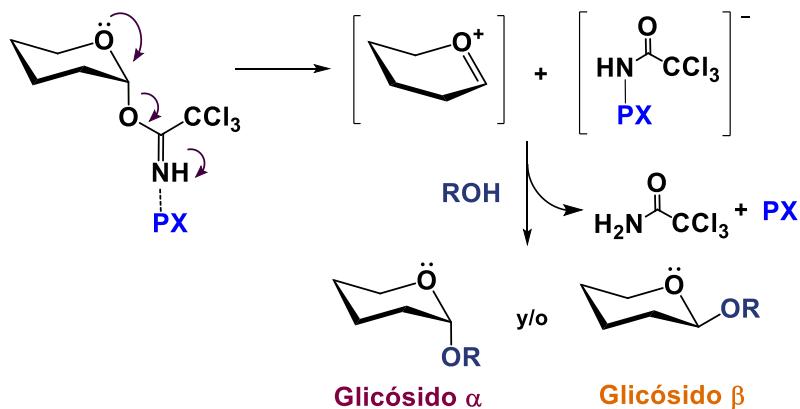
Los donores con grupo *éster anomérico* son compuestos que, a menudo, son estables y sencillos de preparar, lo que permite su síntesis en grandes cantidades y almacenamiento hasta su uso. Los donores 1-O-aciados más utilizados son los 1-O-acetil

y 1-O-benzoíl glicósidos, cuya glicosidación puede ser promovida por una variedad de ácidos de Lewis como el triflato de trimetilsililo (TMSOTf), el cloruro de estaño (IV) (SnCl_4) o el trifluoruro de boro eterato ($\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$), entre otros.^[25]

Los *n-pentenil glicósidos*, por su parte, son donores estables y fáciles de sintetizar. En estos compuestos la cadena alquílica en C-1 actúa como grupo protector del centro anomérico y puede activarse selectivamente para la glicosidación en presencia de iones iodonio o bromonio. Para esta transformación, los compuestos más utilizados son la *N*-bromosuccinimida (NBS) y la *N*-iodosuccinimida (NIS) que, a su vez, pueden combinarse con cantidades catalíticas de un ácido de Lewis, como el ácido trifílico (TfOH), para acelerar la generación de los iones bromonio o iodonio. Un promotor alternativo para la glicosidación es el perclorato de iodonio dicollidina (IDCP).^[20,26]

Por último, los *tricloroacetimidatos de glicosilo* son agentes glicosilantes muy populares en síntesis de oligosacáridos. Una de sus principales ventajas frente a otros métodos de glicosidación es que requieren cantidades catalíticas de un ácido de Lewis como promotor. Entre los ácidos de Lewis más empleados se encuentran el trifluoruro de boro eterato ($\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$) y el triflato de trimetilsililo (TMSOTf).^[27]

En las glicosidaciones por este método, el ácido de Lewis promueve la formación del intermediario de glicosidación electrofílico, susceptible de ser atacado por un nucleófilo (aceptor de glicosilo) (Esquema 1.7). Esta reacción se caracteriza por la formación de un subproducto neutro y estable (la tricloroacetamida), fuerza impulsora de la reacción, y por la regeneración del promotor, lo que permite su uso en cantidades catalíticas.



Esquema 1.7. Mecanismo general de glicosidación por el método del tricloroacetimidato. El intermediario de glicosidación puede ser alguno de los detallados en el Esquema 1.2. PX=agente promotor (ácido de Lewis).

Los tricloroacetimidatos son donores muy reactivos y, generalmente, las glicosidaciones se llevan a cabo a bajas temperaturas, en tiempos cortos y con altos

rendimientos. Estas características convierten a este método en una estrategia suave, especialmente adecuada para la síntesis de oligosacáridos que contienen uniones galactofuranosídicas químicamente lábiles. Por este motivo, el método del tricloroacetimidato fue la estrategia seleccionada para llevar a cabo las glicosidaciones involucradas en la síntesis de los galactofuranósidos objetivo de este trabajo de tesis.

Los métodos de glicosidación mencionados en esta sección son aplicables a la construcción de estructuras que contienen residuos tanto piranósicos como furanósicos. Sin embargo, la síntesis de furanósidos presenta desafíos particulares, que se describen brevemente a continuación.

1.1.3. Consideraciones para la síntesis de furanósidos

En la naturaleza, los azúcares piranósicos son significativamente más abundantes que los furanósicos. Por este motivo, los desarrollos en síntesis de oligosacáridos se han centrado principalmente en los isómeros de seis miembros. Sin embargo, aunque los anillos hexafuranósicos no forman parte del glicoma de mamíferos, sí se encuentran en una amplia variedad de bacterias, hongos, y protozoos, algunos de ellos patogénicos.^[28,29] Esto los convierte en blancos atractivos para el desarrollo de drogas, métodos de diagnóstico y vacunas.

Muchos de los conceptos fundamentales aplicados a la síntesis de piranósidos pueden extenderse a los furanósidos. Sin embargo, hay aspectos importantes a considerar.

En primer lugar, para todas las hexosas, hexulosas y pentosas más comunes, la forma cíclica de seis miembros (piranósica) es termodinámicamente más estable que la de cinco miembros (furanósica). Como resultado, los azúcares reductores se encuentran mayoritariamente en su forma piranósica en solución.^[30] Es por eso que, para obtener precursores furanósicos de síntesis (donores o aceptores) con buenos rendimientos se requiere de estrategias específicas. Algunas metodologías reportadas incluyen la alquilación directa, la ciclación de ditioacetales, la acilación a alta temperatura y la reducción de lactonas.^[31,32] La elección del método más adecuado dependerá de la naturaleza del glicano a sintetizar y de la estrategia sintética global.

Desde el punto de vista conformacional, mientras que la mayoría de las D-aldochexopiranosas y D-aldopentopiranosas adoptan preferentemente la conformación de tipo silla (usualmente 4C_1), donde las interacciones entre sustituyentes están minimizadas,^[29] las furanosas, con mayor tensión de anillo, exhiben una mayor flexibilidad conformacional. Esto se debe a que adoptan múltiples conformaciones de energía comparable, que se interconvieren fácilmente a lo largo de un ciclo pseudorrotacional.

Como consecuencia, el efecto anomérico en las furanosas es mucho más débil que en sus análogos piranósicos.^[28,33]

En cuanto a su reactividad, los donores de furanosilo suelen ser más reactivos que los de piranosilo.^[34] Esta diferencia se debe a la estabilidad de los intermediarios electrofílicos, generalmente iones oxacarbenio asociados a contraiones, generados durante la glicosidación. Como se puede ver en el Esquema 1.1, el ion oxacarbenio presenta carácter de doble enlace, lo que aplana el anillo e incrementa su tensión torsional. Dado que los anillos de cinco miembros son intrínsecamente más planos que sus contrapartes de seis miembros, los intermediarios carbocatiónicos se forman más rápidamente, lo que acelera la glicosidación.^[35] Sin embargo, la tensión torsional dificulta el control estereoquímico, ya que el intermediario puede adoptar varias conformaciones con energías similares.^[36]

En las furanosas se ha observado que, al igual que en las piranosas, la asistencia anquimérica permite obtener glicósidos 1,2-*trans* con buenos rendimientos.^[37] En cambio, la síntesis estereoselectiva de furanósidos 1,2-*cis* resulta más desafiante. Dado que este tema excede el contenido de esta tesis, estas estrategias no serán descriptas por lo que se sugiere consultar bibliografía especializada para un análisis detallado.^[31]

En cuanto a las condiciones de reacción, la formación de enlaces glicosídicos con donores de furanosilo puede llevarse a cabo bajo condiciones similares a las utilizadas en piranósidos. De hecho, se han empleado prácticamente todas las principales familias de donores de glicosilo, incluyendo haluros de furanosilo, acilos anoméricos, *n*-pentenil furanósidos, tiofuranósidos y sulfóxidos, entre otros.^[31,35,37] Entre los métodos de glicosidación reportados, uno de los más utilizados es el método del tricloroacetimidato, que se destaca por ser un método de glicosidación suave, compatible con aceptores sensibles al medio ácido y con uniones furanosídicas lábiles.^[38]

1.1.4. Estrategias para mejorar la eficiencia sintética

Como se detalló en la sección anterior, la síntesis de oligosacáridos es un proceso complejo que involucra múltiples etapas: obtención de precursores, glicosidaciones sucesivas, y reacciones de protección y desprotección. Todas estas etapas son necesarias para controlar la regio- y estereoquímica del producto final.

En el contexto del desarrollo de fármacos, vacunas o herramientas de diagnóstico basadas en carbohidratos, resulta deseable contar con rutas de síntesis robustas, reproducibles y escalables, capaces de generar cantidades suficientes de carbohidratos complejos con alta pureza.

Dado que durante la síntesis pueden generarse productos secundarios indeseados, que disminuyen el rendimiento global y requieren de etapas de purificación adicionales, uno de los principales desafíos para los químicos sintéticos es aplicar estrategias de optimización que maximicen la conversión al producto deseado y minimicen las impurezas. Ante la ausencia de protocolos estandarizados, cada caso requiere un análisis particular. En esta tesis se ha priorizado el diseño de rutas sintéticas operativamente simples y reproducibles, basadas en dos pilares: la elección racional de precursores y la optimización de cada etapa de la síntesis.

En primer lugar, la selección de precursores adecuados resulta esencial para favorecer la formación de los enlaces glicosídicos deseados. En este sentido, la elección de los grupos protectores apropiados es clave para alcanzar la regio- y estereoselectividad requeridas. Además, siempre que sea posible, es conveniente optar por precursores asequibles y sencillos de obtener.

En segundo lugar, es importante monitorear los rendimientos y la aparición de impurezas en cada uno de los pasos, a fin de ajustar los parámetros de reacción: temperatura, concentración, tiempo de reacción, solvente y tipo de promotor, entre otros. Estas optimizaciones requieren un conocimiento fundamental de las transformaciones químicas involucradas y son necesarias para alcanzar procesos con alta eficiencia, robustez y reproducibilidad.

Además de las estrategias convencionales, se han desarrollado métodos alternativos para agilizar la obtención de oligosacáridos puros. Uno de los más destacados es la síntesis automatizada en fase sólida, impulsada por el grupo del Dr. Peter Seeberger, la cual permite reducir significativamente los tiempos de síntesis y el consumo de recursos. En esta técnica, un monosacárido adecuadamente protegido es anclado a un soporte sólido inerte, y luego es sometido a ciclos secuenciales de desprotección y glicosidación, hasta alcanzar la cadena sacáridica deseada, sin necesidad de realizar purificaciones intermedias. Las únicas operaciones adicionales involucradas son la filtración y el lavado del soporte para eliminar las impurezas y reactivos en exceso luego de cada reacción.^[39]

Si bien la síntesis automatizada presenta grandes ventajas frente a la síntesis en solución, está lejos de resolver las complejidades asociadas a la obtención de glicanos dado que muchos de los aceptores de glicosilo necesarios no están disponibles comercialmente o son muy costosos, y las etapas de clivaje del soporte sólido y desprotección final del oligosacárido resultante involucran múltiples pasos complejos.^[40]

Otra estrategia que ha cobrado relevancia es la síntesis *one-pot*, en la que varios donores de glicosilo cuidadosamente seleccionados se hacen reaccionar

secuencialmente dentro de un mismo recipiente, minimizando los pasos de manipulación. Desde su implementación inicial en 1993, se han desarrollado múltiples variantes basadas, fundamentalmente, en el control de la reactividad relativa de los donores de glicosilo. Las principales estrategias se agrupan en tres categorías: las quimioselectivas, las ortogonales y las de pre-activación. A grandes rasgos, en la primera se utilizan donores con el mismo grupo saliente donde la reactividad es modulada a través de los grupos protectores; en la segunda, se emplean donores con distintos grupos salientes y se aplican estrategias de activación (o promotores) ortogonales; y la última combina conceptos de las estrategias anteriores para obtener los oligosacáridos deseados.^[41]

Estas metodologías han demostrado ser herramientas eficaces para construir estructuras complejas con menor esfuerzo experimental, aunque su implementación exitosa requiere de la planificación cuidadosa de la secuencia de reacciones y de la comprensión detallada de la reactividad de cada donor involucrado.

1.2. *Leishmania* y sus glicanos como herramientas de diagnóstico

Las leishmaniasis constituyen un grupo de enfermedades tropicales y subtropicales desatendidas, que afectan principalmente a las poblaciones más vulnerables en más de 90 países de Asia, África, Oriente Medio y América Latina. Estas infecciones parasitarias pueden presentarse en tres formas clínicas principales: visceral (LV), cutánea (LC) y mucocutánea (LM). Entre los factores de riesgo de estas enfermedades se encuentran la pobreza, el trabajo rural, la migración poblacional, la desnutrición, las condiciones de vivienda precarias y el acceso limitado a los servicios de salud.^[42,43]

A nivel mundial, más de 1.000 millones de personas viven en zonas endémicas y corren riesgo de infección. Se estima que cada año se producen entre 50.000 y 90.000 nuevos casos de LV, y alrededor de 1 millón de nuevos casos de LC.^[44]

A la fecha, se han identificado 22 especies del género *Leishmania* patogénicas en humanos, cada una de ellas asociada a una región geográfica específica y a una forma clínica principal.^[43] En Argentina, el área endémica abarca aproximadamente 500.000 km² e incluye provincias del norte y nordeste como Salta, Jujuy, Tucumán, Santiago del Estero, Chaco, Catamarca, Corrientes, Misiones, Formosa, y Santa Fe.^[45] En esta región predomina la infección por *L. braziliensis*, responsable de las formas cutánea y mucocutánea.^[46] Esta patología, distribuida en gran parte de América Latina, es conocida como leishmaniasis tegumentaria americana (LTA).

1.2.1. Patogénesis

El parásito *Leishmania* se transmite a mamíferos susceptibles, entre ellos los seres humanos, mediante la picadura de flebótomos (insectos de la subfamilia *Phlebotominae*). La forma clínica de la infección, que puede manifestarse en forma cutánea, mucocutánea o visceral, depende principalmente de la especie parasitaria involucrada, aunque el estado inmunológico del huésped también influye en la evolución de la enfermedad.^[47]

La leishmaniasis cutánea es la manifestación más frecuente y menos peligrosa, y suele limitarse a una úlcera en el sitio de la picadura, la cual puede resolverse espontáneamente en el plazo de 3 a 18 meses. Sin embargo, las lesiones abiertas son susceptibles a infecciones secundarias por otros patógenos,^[48] pueden dejar cicatrices visibles y, de no resolverse, pueden evolucionar hacia la forma mucocutánea. En este caso, los parásitos migran hacia las membranas mucosas de la nariz, boca y faringe, provocando destrucción de tejidos, daños faciales y, en casos extremos, dificultades respiratorias crónicas.^[48,49] Por otro lado, en la forma visceral los parásitos migran desde el sitio de inoculación hacia órganos internos como el hígado, bazo y médula ósea, generando daños severos que, sin tratamiento, pueden resultar mortales.^[50]

Los protozoos de la especie *Leishmania* son parásitos intracelulares obligados cuya transmisión es únicamente de insecto a mamífero (el contagio entre mamíferos no ha sido demostrado). En el intestino del insecto vector, el parásito se encuentra como promastigote flagelado y se diferencia progresivamente desde un estadio procíclico no infectivo hacia la forma metacíclica infectiva. Tras la picadura, los promastigotes metacíclicos son fagocitados por macrófagos y, una vez dentro del fagolisosoma, se transforman en amastigotes aflagelados. Estos se multiplican activamente y provocan la lisis de la célula huésped, liberando parásitos que proceden a infectar macrófagos circundantes.^[48]

Desde su ingreso, el parásito se expone a los mecanismos de eliminación desplegados por el sistema inmune innato y adaptativo del huésped. Para sobrevivir y establecer la infección, *Leishmania* activa diversas estrategias de defensa y evasión. En estos procesos intervienen múltiples componentes celulares, entre los cuales se encuentran los glicanos, estructuras muy abundantes en la membrana del parásito.^[48]

1.2.2. Glicanos de superficie. Estructura y función del lipofosfoglicano (LPG) y los glicoinositofosfolípidos (GIPs)

La membrana de *Leishmania* está recubierta por un glicocálix, que es fundamental en la interacción con el huésped y funciona como una barrera de protección a las condiciones del entorno.^[51,52] Esta capa está formada por distintas moléculas ancladas a

la membrana plasmática mediante un ancla de glicosilfosfatidilinositol (GPI). Allí se distribuyen: los glicoinositolfosfolípidos (GIPLs), oligosacáridos de hasta ocho unidades; el lipofosfoglicano (LPG), un polisacárido fosforilado de cadena larga; y glicoproteínas, como gp63 y los proteofosfoglicanos (PPG), cuyas cadenas sacáridicas se asemejan a las del LPG.^[53]

La composición del glicocálix varía según el estadio del parásito (promastigote y amastigote). En los promastigotes, el lipofosfoglicano es el glicano superficial más abundante. Esta molécula presenta cuatro dominios principales: (i) un ancla de glicosilfosfatidilinositol (GPI); (ii) un núcleo (o *core*) fosfohexasacárido; (iii) una región con unidades repetitivas del motivo $[\rightarrow 6]-\beta\text{-D-Galp}-(1\rightarrow 4)-\alpha\text{-D-Manp}-(1\text{-O-PO}_3)]$, que puede presentar ramificaciones; y (iv) un oligosacárido terminal (cubierta o *cap*) (Figura 1.1). Mientras que los tres primeros dominios son conservados entre especies y estadios de *Leishmania*, las ramificaciones y el oligosacárido terminal presentan variaciones en su composición sacáridica y secuencia.^[54,55] Esta variabilidad contribuye a la diversidad antigenica del parásito y a su capacidad de evasión inmune.^[53,56]

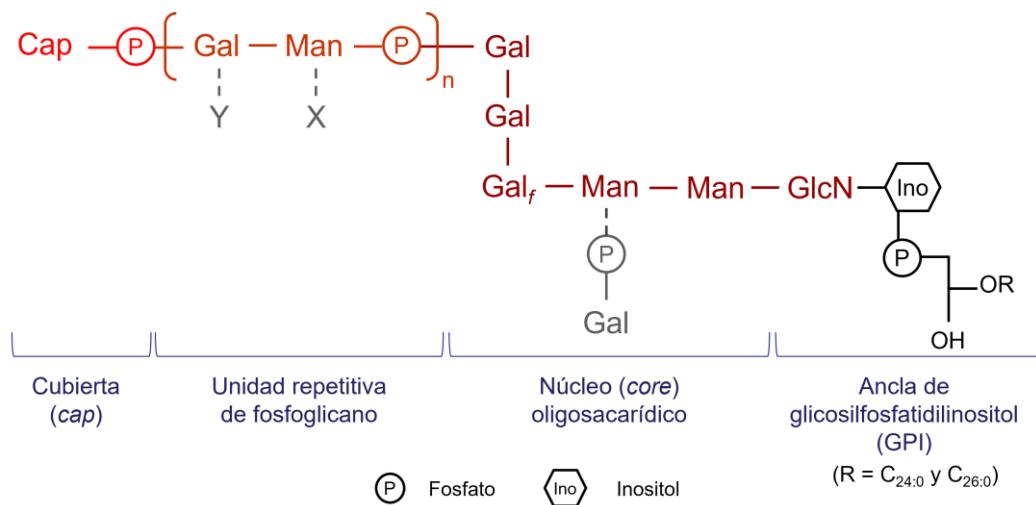


Figura 1.1. Estructura general del lipofosfoglicano (LPG) de *Leishmania*; n=15-30.^[56,57] La cubierta (color rojo) y las ramificaciones (X, Y, color gris) varían según la especie.

El LPG en los promastigotes actúa como un importante factor de virulencia, ya que participa tanto en el inicio de la infección como en la protección del parásito frente a los mecanismos de defensa del huésped.^[48,58] Por un lado, al ingresar al mamífero el LPG bloquea la acción lítica del sistema de complemento sobre el parásito,^[57,59,60] y luego facilita su adhesión a la pared celular e ingreso a la célula huésped.^[61,62] Allí, el glicano superficial puede contribuir a la supervivencia del parásito por diversos mecanismos: retrasando la formación del fagolisosoma;^[63,64] bloqueando la acción de agentes

antimicrobianos como las especies reactivas de oxígeno (ROS);^[65,66] y/o inhibiendo a PKCa, enzima implicada en la generación de ROS.^[67]

Otros componentes sacáridicos muy abundantes en la membrana del parásito son los glicoinositolfosfolípidos (GIPLs), presentes en ambos estadios del ciclo de vida de *Leishmania*,^[68] pero particularmente abundantes en la etapa amastigote, en la que se inhibe la expresión del LPG.^[67,69] Se estima que estas estructuras recubren alrededor del 45-60% de la membrana plasmática de los amastigotes.^[70]

Los GIPLs se componen de un núcleo oligosacárido de 3 a 6 unidades unido, a través de D-GlcN, al ancla de GPI. Tanto la cadena sacáridica como los ácidos grasos de los GIPLs varían según la especie y el estadio del parásito,^[71] y se han distinguido tres linajes de GIPLs: tipo-I, tipo-II e híbridos (Figura 1.2).^[68]

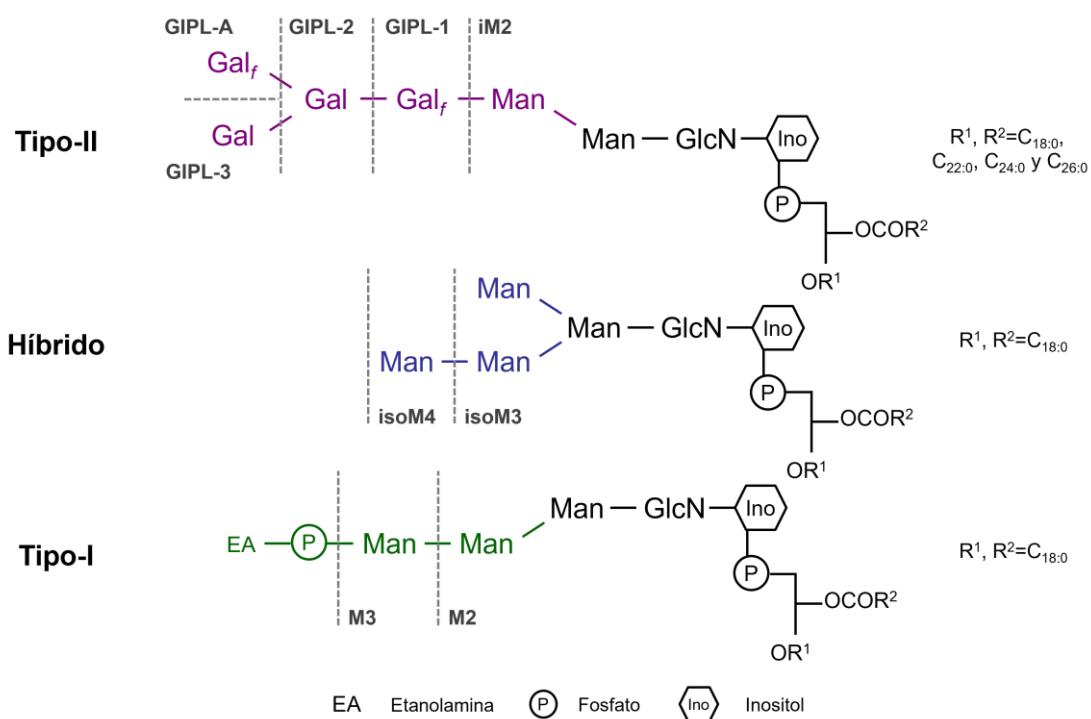


Figura 1.2. Estructura de los glicoinositolfosfolípidos (GIPLs) de *Leishmania*.^[71]

Al igual que el LPG, los GIPLs están involucrados en los procesos de infección y virulencia del parásito. Aunque su función principal no ha sido completamente dilucidada,^[72] existen evidencias de que estas estructuras están involucradas en la protección del parásito de las amenazas del entorno, por interferencia en la producción de agentes antimicrobianos,^[73-75] a la vez que participan en las interacciones parásito-célula huésped.^[76]

Como se mencionó antes, el principal agente causante de la LTA es *Leishmania braziliensis*. Si bien la estructura detallada de sus GIPLs de membrana no ha sido

caracterizada por completo, estudios comparativos sugieren su similitud con los GIPLs tipo-II de *L. major* (Figura 1.2).^[71,77] Una característica estructural distintiva de estas moléculas es la presencia de residuos de D-galactofuranosa (D-Galf), un azúcar que no es biosintetizado por mamíferos. En el LPG, la unidad de D-Galf forma parte del núcleo oligosacárido (Figura 1.1), y en los GIPLs se presenta ya sea como una unidad interna (en GIPL-2 y GIPL-3, Figura 1.2) o como unidad terminal (en GIPL-1 y GIPL-A, Figura 1.2).

En estudios *in vitro* e *in vivo* se ha demostrado que los galactofuranósidos de membrana de *L. major* participan en los procesos de adhesión e invasión de las células de mamíferos. Por un lado, Suzuki E. y colaboradores observaron que, al bloquear los residuos de D-Galf en la superficie de *L. major* mediante un anticuerpo monoclonal específico, se redujo significativamente la colonización de macrófagos.^[76] Por otro lado, en un estudio con ratones, Kleczka B. *et al.* registraron una atenuación de la infectividad de parásitos deficientes en LPG y con GIPLs truncados, respecto de parásitos *wild-type*.^[70]

Asimismo, diversos autores han reportado la presencia de anticuerpos específicos contra galactofuranósidos de membrana en sueros de pacientes infectados por distintas especies de *Leishmania*.^[77-83] Estas inmunoglobulinas pueden emplearse como biomarcadores de la enfermedad en curso, y su detección puede ser la base de un método serológico de diagnóstico.

1.2.3. Desafíos del diagnóstico: limitaciones y oportunidades

El control de la LTA depende tanto de la disponibilidad de tratamientos farmacológicos y vacunas eficaces como del diagnóstico rápido de la infección.

En América Latina, el tratamiento de primera línea es el antimonioato de meglumina, un fármaco del grupo de los antimoniales pentavalentes (SbV). Si bien estos tratamientos son los más utilizados, presentan una eficacia limitada en un número considerable de pacientes con leishmaniasis cutánea y mucocutánea,^[84,85] alta toxicidad y efectos adversos significativos.^[86,87] A falta de alternativas terapéuticas más seguras y efectivas, es deseable contar con una vacuna que prevenga el contagio. No obstante, en la actualidad no existe ninguna vacuna aprobada para uso humano, aunque tres candidatos se encuentran en fase clínica.^[49]

Frente a estas limitaciones, el diagnóstico rápido y preciso de la enfermedad es esencial para brindar la respuesta terapéutica adecuada y evitar la exposición innecesaria a fármacos.

Actualmente, el diagnóstico de la LTA se basa en la combinación de datos clínicos y epidemiológicos, así como en técnicas de laboratorio para la detección directa o indirecta del parásito.^[88,89] La prueba diagnóstica más directa es la examinación de las lesiones por un médico dermatólogo. Sin embargo, las lesiones pueden confundirse con otras afecciones de la piel (dermatitis atópica, cáncer o la enfermedad de Hansen) por lo que se requiere la confirmación por técnicas complementarias.^[90] El método más utilizado es la visualización de amastigotes mediante microscopía en material colectado de las lesiones. Esta técnica es de bajo costo y, cuando resulta positiva, brinda un diagnóstico confiable. Sin embargo, su sensibilidad disminuye notablemente en lesiones de evolución prolongada (más de tres meses).^[89,91] Alternativamente, se puede recurrir al cultivo del material en medios especializados, aunque este procedimiento requiere equipamiento e infraestructura más complejos y su sensibilidad depende de la carga parasitaria en la zona infectada.^[50]

En contraste, la PCR ofrece una alta sensibilidad y especificidad, a la vez que permite identificar la especie causante de la infección.^[88,92] No obstante, su implementación es limitada en las áreas de transmisión de *L. braziliensis*, debido al alto costo por ensayo y a la falta de infraestructura adecuada. Por esta razón, la prueba de Montenegro o *leishmanin skin test* (LST) es de uso habitual en zonas endémicas.^[93] Sin embargo, la técnica tiene sus limitaciones, ya que ha mostrado baja sensibilidad tanto en casos de leishmaniasis cutánea con lesiones típicas como en pacientes con formas diseminadas o difusas, más avanzadas.^[85,94]

Finalmente, para el diagnóstico puede recurrirse a métodos inmunológicos basados en la detección de anticuerpos específicos en suero. Entre ellos, el método más utilizado es el ELISA, cuya sensibilidad y especificidad dependen en gran medida del antígeno seleccionado como sonda de detección. Diversos estudios han identificado proteínas y glicoproteínas constitutivas de *Leishmania* con potencial diagnóstico en diferentes formas clínicas de leishmaniasis.^[95-98]

Asimismo, se ha demostrado que oligosacáridos de membrana de distintos patógenos pueden emplearse como antígenos para detectar anticuerpos específicos en sueros humanos infectados.^[99-102] Estos hallazgos respaldan el potencial de los glicanos antigénicos de superficie de *Leishmania* como elementos de reconocimiento para desarrollar ensayos serológicos de diagnóstico.

En resumen, en la actualidad no se dispone de un único método de diagnóstico de LTA que combine alta sensibilidad, especificidad y portabilidad, factores clave para el manejo adecuado de la enfermedad en zonas endémicas. La elección del procedimiento

de diagnóstico suele depender de la infraestructura y los recursos disponibles.^[92] En particular, en las formas cutánea y mucocutánea es prioritario el desarrollo de técnicas de diagnóstico de bajo costo, accesibles y sensibles, que además permitan discriminar la especie causante de la infección, a fin de orientar la elección del tratamiento más adecuado.^[49]

En este contexto, los glicanos de superficie de *Leishmania* y, en especial, aquellos que contienen motivos estructurales con galactofuranosa, se perfilan como candidatos promisorios para el diseño de nuevas herramientas diagnósticas. La síntesis química constituye una estrategia esencial para acceder a estos compuestos en forma pura y estructuralmente bien definida, lo que posibilita su evaluación sistemática como antígenos en el desarrollo de métodos de diagnóstico serológico.

Capítulo 2

Azúcares como herramientas de diagnóstico

El control de las enfermedades infecciosas constituye un desafío persistente para los sistemas de salud. Estas patologías son causadas por organismos patógenos, entre los que se incluyen hongos, protozoos, bacterias, virus y priones. Resulta fundamental desarrollar técnicas que permitan diagnosticarlas de manera rápida y precisa a partir de muestras complejas, como fluidos corporales y aerosoles, con el fin de brindar tratamiento temprano a los pacientes y controlar su propagación.^[103]

Habitualmente, el diagnóstico se basa en la detección de biomarcadores de enfermedad en muestras biológicas de pacientes infectados. Como biomarcadores pueden utilizarse los propios agentes infecciosos completos (por ejemplo, bacterias y virus), componentes de dichos agentes (como ácidos nucleicos y proteínas), o bien anticuerpos generados por el huésped en respuesta a la infección.

En la actualidad, las técnicas de referencia (o *gold standard*) para el diagnóstico son: la microscopía, el ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).^[104] Sin embargo, a menudo estos ensayos resultan laboriosos y requieren instrumentación compleja y personal calificado, lo cual se traduce en altos costos por ensayo y demoras significativas entre la recolección de las muestras y el diagnóstico médico.^[105] Estas limitaciones son especialmente críticas en entornos con recursos limitados, donde el acceso a servicios de salud es reducido y muchas infecciones permanecen sin diagnosticar.^[106,107] En este contexto, los biosensores emergen como una alternativa promisoria para el desarrollo de plataformas diagnósticas sensibles, rápidas y asequibles, que puedan utilizarse en, o cerca de, los puntos de atención primaria.

2.1. Biosensores. Generalidades

Un biosensor es un dispositivo analítico que emplea un elemento de reconocimiento biológico, como enzimas, anticuerpos, ácidos nucleicos o células, para detectar y/o cuantificar de manera específica un analito de interés. Su principio de funcionamiento se basa en la transformación, mediante un transductor, de esta interacción bioquímica en una señal medible. Estos dispositivos son una alternativa interesante a los ensayos de diagnóstico clínico convencionales, ya que son más sencillos y económicos, con potencial de miniaturización y portabilidad para el diagnóstico en campo.

Los biosensores se componen de tres elementos principales: un elemento de reconocimiento o biorreceptor, un transductor, y un sistema de procesamiento de señales (Figura 2.1).^[108]

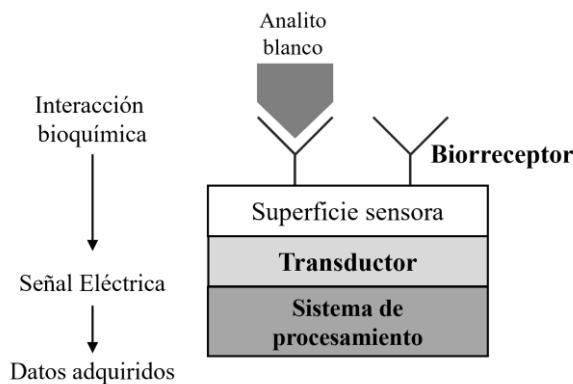


Figura 2.1. Esquema general de la composición de un biosensor y del flujo de señales.
Imagen adaptada de Daniels J.S. y Pourmand N.^[108]

El *elemento de reconocimiento* (o *biorreceptor*) es el componente del biosensor que interacciona de forma específica con el analito de interés (o analito blanco) (Figura 2.1). Según la naturaleza de esta interacción, los biosensores se clasifican en dos grandes categorías: catalíticos y basados en afinidad. Los *biosensores catalíticos* son aquellos que emplean un catalizador biológico, típicamente una enzima, como elemento de reconocimiento. Así, en presencia del analito blanco, el biorreceptor cataliza una reacción bioquímica que genera una señal medible. Un ejemplo clásico y muy difundido de este tipo de biosensores es el sensor de glucosa que utiliza la enzima glucosa oxidasa, encargada de catalizar la oxidación del analito.^[109] Por otro lado, los *biosensores de afinidad* se basan en la unión específica de una biomolécula con el analito blanco. Ejemplos comunes de este tipo de sensores son los inmunoensayos de flujo lateral,^[110] como, por ejemplo, las pruebas de embarazo comerciales que se basan en la interacción de anticuerpos monoclonales específicos con la hormona GCh excretada en la orina.

En esta tesis se propone el uso de carbohidratos como biorreceptores para el desarrollo de un biosensor de afinidad, por lo que en adelante se hará hincapié en este tipo de dispositivos.

En los biosensores de afinidad, la interacción específica analito-biorreceptor produce una perturbación en alguna propiedad fisicoquímica del sistema como la carga, la masa, la temperatura o la absorción de luz. Esta perturbación es detectada por el *transductor*, que convierte la señal fisicoquímica generada durante el evento de reconocimiento en una señal, generalmente eléctrica, proporcional a la concentración del analito. Por último, un *sistema de procesamiento* capta la señal de salida del transductor, y la amplifica, filtra y digitaliza, permitiendo su visualización e interpretación (Figura 2.1).

Entre las múltiples formas de clasificar biosensores, las más comunes refieren al mecanismo que confiere la especificidad biológica (el elemento de reconocimiento) o al

transductor empleado. De acuerdo con el biorreceptor utilizado, se distinguen varias categorías: inmunosensores (emplean anticuerpos), genosensores (emplean ácidos nucleicos), aptasensores (emplean aptámeros), citosensores (emplean células enteras), y glicobiosensores (emplean lectinas o glicanos). Según el transductor pueden ser electroquímicos, piezoelectricos o gravimétricos, ópticos, calorimétricos, entre otros.^[111,112]

Como resultado del evento de reconocimiento biorreceptor-analito, la señal fisicoquímica puede generarse de forma directa, es decir, sin intervención de otros agentes, como se ilustra en la Figura 2.2.a. Sin embargo, también existen estrategias de detección indirecta, en las que la señal es generada por sondas secundarias o terciarias, tal como se muestra en la Figura 2.2 (b y c).^[113] Estas sondas, también conocidas como marcadores, pueden ser enzimas, radionúclidos, nanopartículas, y moléculas fluorescentes o electroquimioluminiscentes. Cada una de ellas genera un tipo de señal específica, que debe ser detectada mediante un transductor adecuado.^[114] Las ventajas y desventajas de la detección directa e indirecta y las características de los transductores más utilizados serán detalladas más adelante (Sección 2.2.3).

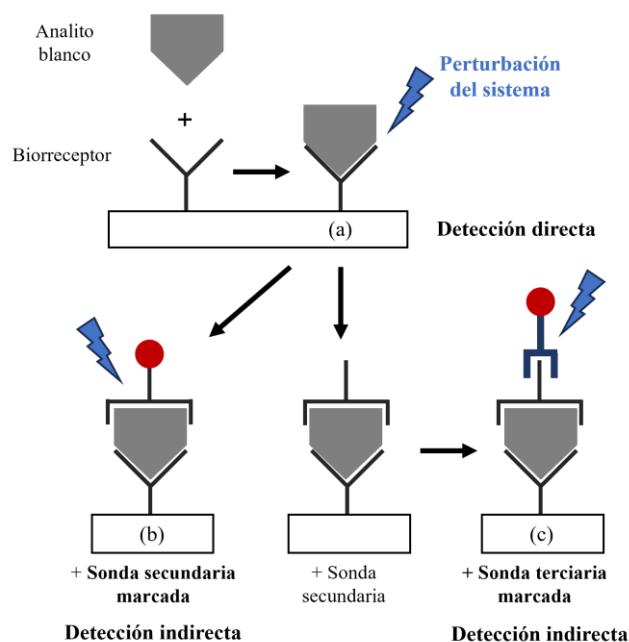


Figura 2.2. Modos de detección utilizados en biosensores. (a) Detección directa, (b) detección con sonda secundaria marcada, y (c) con sonda terciaria marcada. Imagen adaptada de Daniels J.S. y Pourmand N.^[108]

En el caso de los glicobiosensores, la clasificación engloba tanto los dispositivos en los que los carbohidratos actúan como biorreceptores, como aquellos en los que constituyen el analito a determinar. Este trabajo de tesis se centró en la primera categoría

de glicobiosensores, también conocidos como biosensores basados en carbohidratos, y en particular en su aplicación al diagnóstico de patologías.

2.2. Biosensores basados en carbohidratos

Como se describió en el capítulo anterior, los carbohidratos desempeñan un rol importante en gran variedad de procesos celulares, muchos de los cuales están mediados por interacciones específicas con proteínas de unión a glicanos (GBPs, por las siglas en inglés de *glycan binding proteins*), tales como toxinas, anticuerpos, lectinas o receptores de superficie.^[115,116]

Este principio de reconocimiento molecular glicano-proteína es aprovechado por los biosensores basados en carbohidratos para detectar analitos en forma específica. Dado que los glicanos participan en procesos de reconocimiento entre células, así como en la interacción con agentes patógenos y el sistema inmunológico, este tipo de biosensores presenta gran potencial para el diagnóstico clínico. En este marco, diversos autores, como Tkac J., Heineman W. R., Mrksich M. y Orozco J., han desarrollado sensores capaces de detectar partículas virales, bacterias, lectinas y anticuerpos séricos. En la Tabla 2.1 se incluyen algunos ejemplos de desarrollos de sensores basados en carbohidratos orientados al diagnóstico.

A la hora de diseñar y construir un biosensor basado en carbohidratos resulta fundamental definir, en función de la aplicación deseada, la combinación óptima de tres variables esenciales: (a) el biorreceptor o elemento de reconocimiento adecuado; (b) el sustrato y la metodología de anclaje del biorreceptor; y (c) el modo de detección, ya sea directo o indirecto, junto con el transductor correspondiente. A continuación, se introducirán algunos conceptos clave para orientar la selección de cada una de estas variables.

Tabla 2.1. Ejemplos de biosensores de afinidad basados en carbohidratos orientados al diagnóstico clínico de patologías diversas.

Biorreceptor sacárido	Analito blanco	Patología asociada	Transductor
D-Man	Bacteria (<i>E. coli</i> ORN178)	Infección urinaria*	Piezoeléctrico ^[117] Electroquímico ^[118]
Oligosacárido (sialillactosa)	Partícula viral (H3N2)	Gripe	Electroquímico ^[119]
Oligosacárido (sialillactosa)	Hemaglutininas virales (H1N1, H5N1)	Gripe	Electroquímico ^[120] Óptico ^[121]
D-GlcNAc	Partícula viral (H5N1)	Gripe	Piezoeléctrico ^[122]
Neu5Ac	Proteína β -amiloide	Enfermedad de Alzheimer	Electroquímico ^[123]
Gangliósidos (GD3 y GM2)	Anticuerpos (monoclonales)	Cáncer**	Óptico ^[124]
Oligosacárido (GPI de <i>T. gondii</i>)	Anticuerpos (suero humano)	Toxoplasmosis	Electroquímico ^[125]
Oligosacáridos (LPG de <i>Leishmania</i>)	Anticuerpos (suero humano y canino)	Leishmaniasis visceral	Óptico ^[81]

* *E. coli* ORN178 no es patogénica en humanos, pero se utiliza como modelo ya que expresa la lectina FimH. La interacción Man-FimH está involucrada en la invasión de *E. coli* a células de la vejiga.^[126] ** GD3 y GM2 están expresados en melanomas malignos y otros tipos de cáncer.^[127] GPI= glicosilfosfatidilinositol.

2.2.1. El elemento de reconocimiento

En los biosensores de afinidad, el biorreceptor es el elemento que confiere especificidad y selectividad a la técnica, ya que debe ser capaz de reconocer el analito blanco incluso en presencia de interferentes o moléculas estructuralmente similares. La elección del biorreceptor requiere evaluar la afinidad del analito con diferentes biomoléculas a fin de identificar el elemento de reconocimiento más adecuado.

Para el estudio de las interacciones entre carbohidratos y biomoléculas, pueden utilizarse diversas metodologías, tales como la calorimetría de titulación isotérmica (ITC),^[128,129] la resonancia plasmónica de superficie (SPR),^[130] la resonancia magnética nuclear (RMN),^[131] la microbalanza de cuarzo (QCM),^[132] y métodos ópticos como la microscopía de fuerza atómica (AFM).^[133]

Una forma muy difundida y eficiente de evaluar interacciones entre glicanos y otras biomoléculas es por medio de microarreglos de glicanos. El atractivo de esta técnica y su principal ventaja es que permite realizar múltiples ensayos en paralelo y en

microescala.^[134] Esta técnica fue empleada en esta tesis para estudiar la interacción entre glicósidos sintéticos y anticuerpos presentes en sueros humanos, por lo que se abordará con mayor detalle a continuación.

2.2.1.1. Microarreglos de glicanos/carbohidratos

Los microarreglos de glicanos se han consolidado como una herramienta fundamental en el estudio de interacciones biomoleculares dentro del campo de la glicobiología.^[135] Esta tecnología consiste en la inmovilización de carbohidratos sobre una superficie sólida en una disposición espacial definida (Figura 2.3), con el fin de detectar interacciones específicas con biomoléculas afines (lectinas, anticuerpos, enzimas, etc.), ya sea en muestras purificadas o en matrices biológicas complejas (suero, membranas celulares, lisados, etc.).

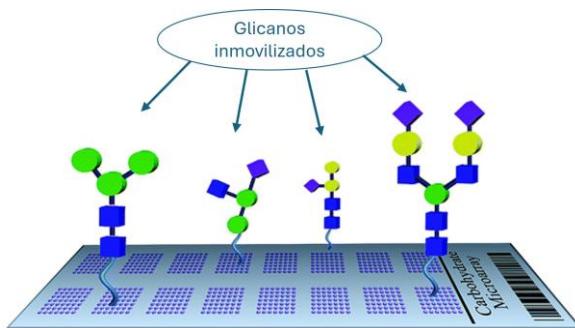


Figura 2.3. Representación de un microarreglo de glicanos. Cada uno de los puntos sobre la superficie corresponde a un glicano inmovilizado. Adaptado de Park S. *et al.*^[136]

Existen diversas superficies y metodologías para la inmovilización de glicanos;^[137,138] sin embargo, el método más comúnmente utilizado es la inmovilización covalente sobre portaobjetos de vidrio. Para su fabricación se utiliza una plataforma robótica de alta precisión, capaz de depositar pequeñas gotas de ~ 1 nL (diámetro ~ 200 μm) de las soluciones sacáridicas en posiciones predefinidas.^[137] La automatización y miniaturización son las características distintivas de la técnica. De esta manera, es posible evaluar numerosos compuestos en paralelo en un mismo ensayo, empleando cantidades muy pequeñas de azúcares (<1 mL de soluciones acuosas 0,1 mM), lo que convierte a los microarreglos en una herramienta muy eficiente para el análisis sistemático de interacciones carbohidrato-biomolécula.

En la inmovilización sobre la superficie pueden emplearse carbohidratos aislados de una fuente natural o sintetizados químicamente y, en ambos casos, es usual la incorporación, en el extremo reductor del azúcar, de un fragmento conector (*spacer*) que separa al azúcar de la superficie y facilita el acceso del ligando durante el ensayo de reconocimiento.

Tras la fabricación del microarreglo, la superficie se incuba con la muestra a analizar y luego se detectan los posibles eventos de unión. Si bien varias técnicas de detección han sido descriptas,^[135,138] el método más utilizado es la fluorescencia, ya sea por acoplamiento directo de un fluoróforo al analito blanco, o por agregado de una sonda secundaria fluorescente con afinidad por el analito blanco.^[139]

La tecnología de microarreglos ha tenido un impacto significativo en el campo de la glicobiología, al permitir el estudio de la afinidad de múltiples glicanos con cientos de lectinas, anticuerpos, células y partículas virales.^[135,140] Dichos estudios han facilitado la identificación de antígenos relevantes,^[101,141] la evaluación *in vivo* de candidatos a vacunas,^[100,142,143] y el descubrimiento de biomarcadores para el diagnóstico temprano de enfermedades.^[144,145]

2.2.2. Elección del sustrato y estrategias de anclaje de glicanos

Una vez elegido el elemento de reconocimiento sacárido, el paso siguiente consiste en diseñar la superficie sensora, lo que implica elegir tanto el sustrato como la estrategia de anclaje del carbohidrato. En este proceso es importante considerar que el protocolo de anclaje debe preservar la integridad tanto del sustrato como del elemento de reconocimiento, y al mismo tiempo generar un sistema estable y reproducible.

La mayoría de los biosensores basados en carbohidratos requieren de la inmovilización del elemento de reconocimiento sobre una superficie sólida. Los materiales más empleados como sustratos son el oro, el silicio y el carbón.

El *oro* es un material muy utilizado dado que es químicamente inerte, altamente biocompatible y resistente a la corrosión. Es de particular interés su alta afinidad por tioles y disulfuros, que dan lugar a monocapas autoensamblas (o SAM, *self-assembled monolayers*) densas y ordenadas^[146] que, funcionalizadas de forma adecuada, permiten la unión de una amplia variedad de moléculas. El oro puede utilizarse en forma de láminas planas o como nanopartículas (AuNP), que presentan mayor área superficial por lo que admiten una mayor densidad de glicanos anclados.^[147]

Por su parte, las superficies de *silicio* pueden funcionalizarse mediante silanización para generar SAMs de organosilanos.^[148] Sin embargo, es importante tener en cuenta que estas monocapas son menos uniformes y estables que las formadas sobre oro.^[149]

Por último, una alternativa muy popular dado su bajo costo, buenas propiedades mecánicas y electroquímicas, y alta biocompatibilidad, es el uso del *carbón* en distintas formas, como el carbón vítreo, el grafito, los nanotubos de carbono y el grafeno.^[150] A pesar de sus ventajas, la rugosidad y porosidad variables de cada alótropo pueden afectar

la reproducibilidad de las mediciones, por lo que, su utilización requiere de un control riguroso del pretratamiento superficial y de una selección cuidadosa del alótropo a utilizar.

Habiendo elegido el sustrato y el biorreceptor, el siguiente paso para obtener la superficie sensora deseada es elegir la estrategia de anclaje más adecuada. En el caso de los carbohidratos, el anclaje puede abordarse mediante *métodos de unión no covalentes*, que incluyen la inmovilización por fisisorción y la basada en bioafinidad, o bien por *métodos covalentes*.^[115,151]

2.2.2.1. Métodos de unión no covalente

Las estrategias de inmovilización no covalentes más comunes se esquematizan en la Figura 2.4. La *fisisorción* es una forma de anclaje basada en las interacciones hidrofílicas e hidrofóbicas de glicanos naturales, generalmente de alto peso molecular, con polímeros como la nitrocelulosa y el poliestireno (Figura 2.4.a).^[152,153] En algunos casos, se ha reportado la incorporación al glicano de una cola lipídica para aumentar su afinidad por la superficie (Figura 2.4.c).^[153–156]

En el caso de los polisacáridos cargados (natural o sintéticamente), como los glucosaminoglicanos, puede aplicarse un acoplamiento electrostático a materiales con carga opuesta (Figura 2.4.b).^[157] Alternativamente, Pohl N. L. y colaboradores desarrollaron un método de anclaje por afinidad que explota la interacción F-F entre carbohidratos y superficies de vidrio, ambos modificados con cadenas fluoradas (C_8F_{17}) (Figura 2.4.d).^[158]

Entre las estrategias no covalentes se destaca la unión por *bioafinidad*. El par molecular más utilizado es el complejo estreptavidina-biotina, con numerosos ejemplos de ensamblado por interacción entre glicósidos biotinilados y superficies modificadas con estreptavidina (Figura 2.4.f).^[159,160] Una técnica alternativa consiste en conjugar los glicanos a una secuencia de ADN simple cadena y fijarlos mediante hibridización con una secuencia complementaria previamente inmovilizada sobre la superficie (Figura 2.4.g).^[161,162]

Métodos de inmovilización no covalentes

Tipo de glicano	Polisacárido, proteoglicano, neoglicoproteína	Polisacárido cargado	Glicolípido, neoglicolípido	Cadena fluorada	Glicolípido, Neoglicolípido	Biotinilado	Marcado con ssADN
Tipo de superficie	Nitrocelulosa Poliestireno	Poli-lisina Con carga	Nitrocelulosa	Cadena fluorada	Lipídica	Modificada con estreptavidina	Arreglo de ADN
Tipo de interacción	Hidrofóbica e hidrofílica mixta	Electrostática	Hidrofóbica	Fluorofílica	Hidrofóbica	Bioafinidad	Hibridización complementaria

Figura 2.4. Métodos de inmovilización de carbohidratos y glicoconjungados a través de uniones no covalentes. Adaptado de Rillahan C. et al.^[163]

2.2.2.2. Métodos de unión covalente

En general, las estrategias de inmovilización por *unión covalente* suelen ser las metodologías preferidas ya que son robustas y reproducibles, y proporcionan superficies estables a cambios en el entorno.^[164] A grandes rasgos, pueden diferenciarse tres estrategias: (a) la inmovilización de glicanos naturales (con extremo reductor libre) sobre superficies pre-funcionalizadas con grupos reactivos; (b) la inmovilización de glicanos derivatizados sobre superficies modificadas con grupos reactivos y; (c) la inmovilización de glicanos por media de una monocapa autoensamblada.^[136]

En el primer caso, la aminación reductiva es la opción preferida para la inmovilización de carbohidratos naturales, donde el grupo aldehído en el extremo reductor reacciona con grupos hidrazida previamente incorporados sobre la superficie.^[165,166] Otros grupos nitrogenados alternativos, como el aminooxiacetilo y la cisteína, también han sido empleados como puntos de anclaje a superficies para inmovilizar azúcares libres.^[167,168]

En el segundo caso, en lugar de estructuras naturales se utilizan glicanos modificados en su extremo reductor con grupos funcionales capaces de reaccionar covalentemente con grupos complementarios anclados a la superficie. Las reacciones de acoplamiento más utilizadas son (Figura 2.5):

- La formación de amidas por reacción entre glicanos modificados con grupos amino y superficies carboxiladas. Generalmente, el grupo carboxilo expuesto en la superficie

se trata con *N*-hidroxisuccinimida (NHS) para formar el éster de NHS, activado para la reacción con el grupo amino.^[169]

- La apertura de epóxidos, mediante la reacción de un grupo amino del glicano con un epóxido sobre la superficie, formando un β -aminoalcohol.^[165]
- La adición de Michael, entre grupos tiol sobre la superficie y grupos maleimida del glicano, para dar un tioéter de succinimida.^[170,171]
- La reacción de Diels-Alder, entre glicanos y superficies funcionalizadas con un dieno y un dienófilo, para formar el producto de cicloadición [4+2] correspondiente.^[172,173]
- La cicloadición 1,3-dipolar catalizada por Cu(I) (química click o *click chemistry*), entre un alquino y una azida, para dar un anillo 1,2,3-triazol.^[174,175]

Métodos de inmovilización covalentes

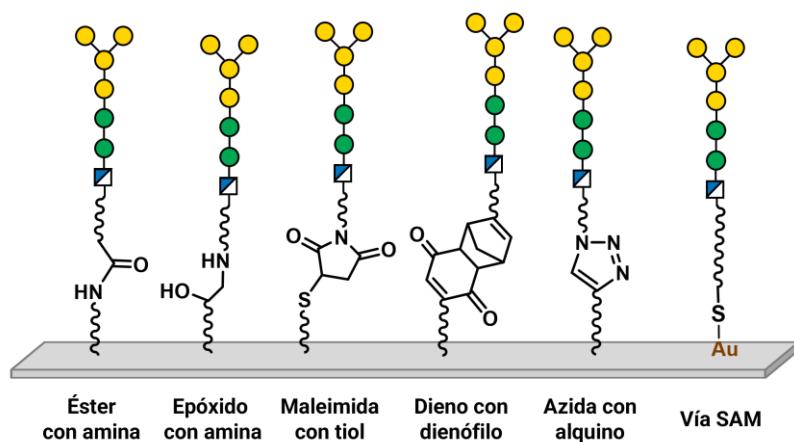


Figura 2.5. Métodos covalentes de anclaje de carbohidratos funcionalizados a superficies modificadas. Adaptado de Park S. et al.^[136]

Cuando se requiere un mayor control sobre la orientación y el espaciado de los glicanos, se puede recurrir a la funcionalización de superficies metálicas mediante monocapas autoensambladas (SAM) (Figura 2.5). Estas monocapas se componen de moléculas unidas covalentemente a la superficie que, por acción de interacciones intermoleculares, se disponen de forma ordenada y densamente empaquetada. En las moléculas que forman una SAM pueden distinguirse tres elementos: el grupo de anclaje a la superficie, la cadena principal (o *backbone*) y el grupo funcional terminal (Figura 2.6).^[176,177]

El grupo de anclaje es aquel que posee alta afinidad por la superficie y que, por lo tanto, guía el proceso de autoensamblado. El más utilizado es el tiol ya que presenta interacciones covalentes fuertes con el oro. Por su parte, la cadena principal se compone, típicamente, de unidades repetitivas de grupos metileno, etilenglicol o una combinación

de ambos. La longitud de este fragmento determina el grosor de la SAM, la eficiencia del empaquetamiento y la estabilidad de la monocapa: las cadenas de mayor longitud generan películas más estables.^[178] Por último, el grupo funcional terminal define las propiedades de la superficie (hidrofobicidad, hidrofilicidad, etc.) y aporta sitios reactivos para la funcionalización química.^[176] Entre los más utilizados se encuentran los grupos -NR₂, -OH, -CN, -COOH y -NH₂.^[150] Las propiedades fisicoquímicas de la monocapa también pueden modularse por medio de SAMs “mixtas”, conformadas por una mezcla de moléculas: una que contiene el grupo terminal adecuado para funcionalizar químicamente la superficie, y otra que contiene un grupo terminal neutro o no reactivo. Esta estrategia permite, además, controlar la densidad de biomoléculas sobre la superficie, parámetro importante en el desarrollo de biosensores.^[150]

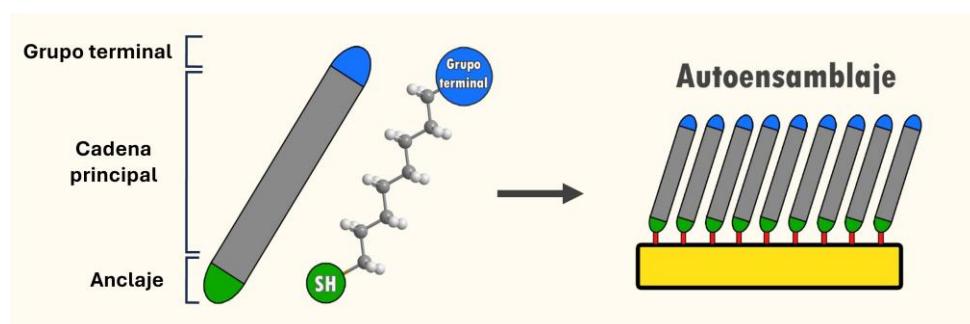


Figura 2.6. Representación de la composición, orientación y empaquetado de una monocapa de tioles autoensamblados sobre oro.

Para la inmovilización de carbohidratos mediante SAMs pueden aplicarse dos técnicas:^[179,180] funcionalizar los azúcares con un *linker* con grupos tioles o disulfuros terminales para la formación directa de la SAM sobre la superficie metálica;^[181,182] o acoplarlos químicamente a una SAM pre-formada funcionalizada con grupos terminales reactivos.^[183]

La estructura compacta y altamente organizada de las monocapas autoensambladas permite un control preciso sobre el patrón, densidad y orientación de las biomoléculas en la superficie. La caracterización de estas superficies funcionalizadas puede realizarse mediante una variedad de técnicas analíticas. Para el estudio morfológico, se emplean métodos como la elipsometría, la microscopía de fuerza atómica (AFM), la microscopía de efecto túnel (STM) y técnicas electroquímicas como la voltametría cíclica (CV) y/o la espectroscopía de impedancia electroquímica (EIS). Luego, la composición química superficial puede elucidarse mediante espectroscopía fotoelectrónica de rayos X (XPS), y/o espectroscopía infrarroja (IR), entre otras.^[180]

En el desarrollo de biosensores, el estudio exhaustivo de las características de la superficie permite establecer correlaciones directas entre la composición superficial y la eficacia del sensor. Esta información es esencial para optimizar de forma racional el sistema de sensado, acortando el tiempo y los recursos requeridos para el desarrollo.

2.2.3. Elección del modo de detección y del transductor

En función de factores como el tipo de muestra a analizar, la naturaleza del analito blanco, la aplicación prevista y los recursos disponibles, se debe elegir el modo de detección más adecuado, ya sea directo o indirecto (Figura 2.2).

La principal ventaja de los métodos de *detección indirecta* es su alta sensibilidad, que permite la detección de analitos en concentraciones muy bajas. Sin embargo, el uso de marcadores suele incrementar el costo y el tiempo requerido por ensayo.

En comparación, los métodos de *detección directa* (sin marcación o “*label-free*”) suelen ser más rápidos, sencillos y, a menudo, más económicos. En estos sensores, el elemento de reconocimiento se inmoviliza directamente sobre el transductor (Figura 2.2) y la interacción con el analito blanco se detecta como un cambio en alguna propiedad cuantificable del sistema, como su conductividad, impedancia, absorbancia, masa o potencial eléctrico.^[184]

Los biosensores de detección directa más extendidos emplean transductores ópticos, mecánicos o piezoeléctricos, o electroquímicos.^[185] Los sistemas ópticos procesan variaciones de propiedades ópticas del sistema, como el índice de refracción, la absorbancia (o densidad óptica) o la dispersión de la luz;^[184,186] los dispositivos mecánicos o piezoeléctricos detectan cambios de masa, fuerza mecánica o rigidez y;^[187,188] los electroquímicos miden alteraciones en la corriente, voltaje o impedancia del sistema, generadas como consecuencia del evento de reconocimiento.^[189,190]

Entre estos dispositivos, los biosensores electroquímicos destacan por su alta sensibilidad y especificidad, y son herramientas ideales para el diagnóstico temprano de enfermedades.^[191–194] Asimismo, son una alternativa interesante para uso en campo ya que requieren de equipamiento simple y asequible, y son compatibles con la miniaturización.^[108]

Los principales tipos de biosensores electroquímicos incluyen los voltamétricos, amperométricos, potenciométricos e impedimétricos.^[191] Además de su uso consolidado en el monitoreo de glucosa^[109] y en la medición de pH,^[195] se han desarrollado biosensores electroquímicos para la detección de patógenos y biomarcadores de enfermedad.^[191–194]

Dentro de esta categoría, la espectroscopía de impedancia electroquímica (EIS) destaca por mostrar sensibilidades muy altas (hasta atomolares).^[119,196] Esta técnica se ha aplicado a la detección de una amplia gama de analitos, incluyendo anticuerpos,^[197–199] ADN,^[108] bacterias,^[118,200] proteínas,^[201,202] glicoproteínas,^[203,204] partículas virales,^[119,205] y oligosacáridos.^[206,207] Por esta razón, la EIS fue la metodología seleccionada para la construcción del modelo de biosensor basado en carbohidratos desarrollado en esta tesis.

2.2.3.1. Biosensores impedimétricos

La EIS se basa en la perturbación de un sistema electroquímico en estado estacionario, por medio de un estímulo de potencial sinusoidal de baja amplitud a una frecuencia dada y en el registro de la corriente sinusoidal de respuesta. La forma de trabajo más habitual es realizar mediciones de impedancia sucesivas a distintas frecuencias para obtener un espectro de impedancia que contiene información sobre las propiedades de la interfaz electrodo-electrolito y permite caracterizar el sistema en estudio.^[108,208]

En los biosensores impedimétricos, la EIS se emplea para detectar eventos de reconocimiento en una celda electroquímica donde el transductor es el electrodo de trabajo funcionalizado con el biorreceptor (Figura 2.7). El sensado del evento de unión puede realizarse en forma directa (*label-free*) o empleando marcadores. En esta tesis los esfuerzos se enfocaron en desarrollar una plataforma de detección directa por lo que no se abordarán otras estrategias. Para ampliar la información sobre métodos de detección indirecta se sugiere consultar el trabajo de Katz E. y Willner I.^[209]

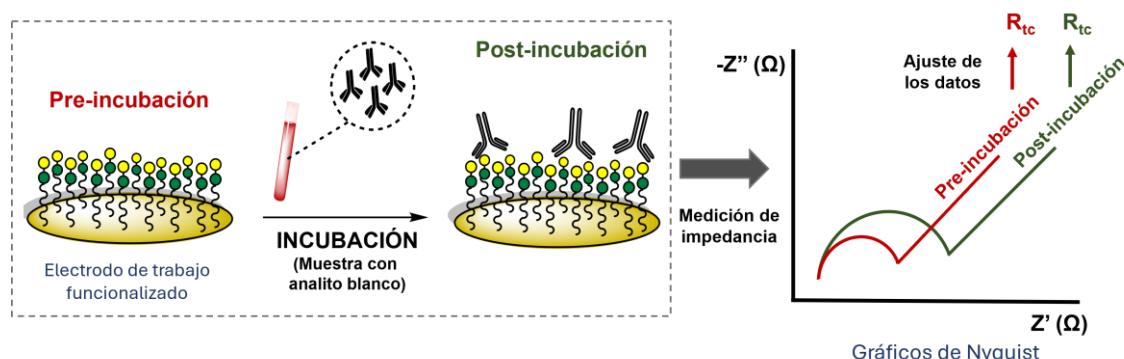


Figura 2.7. Flujo de trabajo aplicado en la detección de un evento de biorreconocimiento por espectroscopía de impedancia electroquímica (EIS). Z'' =componente imaginaria de la impedancia (Z), Z' =componente real de la impedancia (Z). R_{tc} =resistencia a la transferencia de carga del sistema en estudio.

Una forma muy habitual de realizar estos experimentos es incorporar a la celda una especie electroactiva capaz de experimentar una reacción redox reversible. Bajo la perturbación aplicada, tendrán lugar reacciones de oxidación y reducción que generarán un pasaje de electrones desde y hacia el electrodo de trabajo, que se verá reflejado en la señal de respuesta. Este modo de EIS se conoce como faradaico y es el empleado en esta tesis. La especie electroactiva más utilizada es la pareja $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$,^[210] aunque también puede emplearse el ferrocenometanol,^[211] y el hexaaminrutenio (III/II) $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{2+}/[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$.^[212]

En EIS faradaica, el espectro de impedancia contiene información sobre la cinética de la reacción redox, entre otros procesos que ocurren en la celda. Esta respuesta depende, entre otros factores, de la composición de la superficie del electrodo de trabajo. Por ejemplo, la unión de un analito voluminoso, como una proteína o anticuerpo, puede dificultar el acceso de la especie redox al electrodo, limitando la reacción de óxido-reducción y causando un aumento de la impedancia del sistema a altas frecuencias. La impedancia también puede verse afectada cuando existen interacciones electrostáticas entre las especies redox y la superficie del transductor.

Como se mencionó antes, los espectros de impedancia se obtienen registrando la respuesta del sistema en un rango de frecuencias. Usualmente, estos datos se grafican como una función de los valores de las componentes complejas de la impedancia: Z'' (componente imaginaria) y Z' (componente real). El gráfico $-Z''$ vs. Z' se conoce como gráfico (o curva) de Nyquist. Para el sistema $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ en solución, lo que se observa es un semicírculo seguido por una línea recta de pendiente positiva (Figura 2.7). Los valores hacia la izquierda son los datos obtenidos a altas frecuencias y los de la derecha a bajas frecuencias.

Para su interpretación, los gráficos de Nyquist se ajustan a un circuito eléctrico modelo. El circuito más utilizado en EIS faradaica es el circuito de Randles, compuesto por cuatro elementos: la resistencia de la solución R_s , la resistencia a la transferencia de carga R_{tc} , la capacidad de doble capa eléctrica C_{dc} , y el elemento de Warburg Z_w (Figura 2.8). Para ampliar la información sobre los fundamentos de la EIS y la correlación entre los elementos circuitales y las propiedades fisicoquímicas de una celda electroquímica, se sugiere consultar el Apéndice.

En los biosensores basados en EIS faradaica, el parámetro más utilizado para la detección del evento de reconocimiento es la resistencia a la transferencia de carga (R_{tc}). En el gráfico de Nyquist, su valor se relaciona directamente con el diámetro del semicírculo (Figura 2.7). En términos generales, la unión del analito blanco al biorreceptor

genera un bloqueo parcial de la superficie del electrodo que, a menudo, conlleva un aumento en el valor de R_{tc} . Para analizar este cambio en las propiedades electroquímicas del sistema, comúnmente se utilizan: (a) la diferencia del parámetro obtenido en presencia (R_{tc}) y ausencia ($R_{tc,0}$) del analito ($\Delta R_{tc} = R_{tc} - R_{tc,0}$),^[198,202,213] o (b) un cociente entre las resistencias, ya sea $R_{tc}/R_{tc,0}$ o $\Delta R_{tc}/R_{tc,0}$.^[214,215] Este último enfoque es el más apropiado cuando se comparan mediciones realizadas con electrodos independientes, dado que R_{tc} depende del área electroactiva, que puede variar entre electrodos. Al normalizar los valores, se minimiza el error asociado a las diferencias entre superficies, permitiendo una evaluación más confiable de la respuesta del sensor.

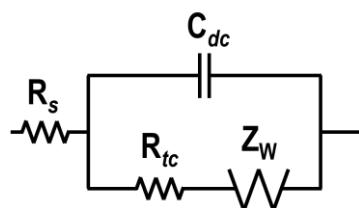


Figura 2.8. Circuito de Randles. Circuito equivalente modelo de una celda electroquímica faradaica. R_s =resistencia de la solución; R_{tc} =resistencia a la transferencia de carga; C_{dc} = capacidad de doble capa; Z_w = elemento de Warburg.

Los biosensores impedimétricos pueden utilizarse tanto para la detección cualitativa (presencia o ausencia) de un analito en solución como para realizar determinaciones cuantitativas, mediante curvas de calibración a partir de soluciones puras del analito blanco.^[108]

Como se mencionó anteriormente, los carbohidratos son moléculas atractivas como biorreceptores. Sus interacciones con distintas biomoléculas han sido aprovechadas en el desarrollo de biosensores impedimétricos *label-free* capaces de detectar agentes patógenos o componentes extraídos de los mismos. Por ejemplo, Hushegyi A. *et al.* desarrollaron un glicobiosensor impedimétrico para detectar lectinas y hemaglutininas de influenza hasta concentraciones atomolares (aM).^[196] En el caso de la detección bacteriana, Cui F. *et al.* utilizaron esta técnica para detectar interacciones entre bacterias patógenas y D-manosa, mientras que Hargol Zadeh S. *et al.* emplearon esta misma estrategia para el monitoreo de *E. coli* como contaminante ambiental.^[215,216] Por su parte, Jeong D. *et al.* demostraron que un sensor impedimétrico basado en D-galactosa podía detectar la toxina colérica en soluciones de concentración en el rango picomolar.^[217]

La alta sensibilidad, el bajo costo, la simplicidad, y los tiempos de ensayo breves alcanzados en estos trabajos convierten a los glicobiosensores impedimétricos en una alternativa prometedora para el desarrollo de nuevas plataformas de diagnóstico de enfermedades infecciosas.

Objetivos

La leishmaniasis tegumentaria americana (LTA) es una enfermedad endémica del norte de nuestro país causada principalmente por el parásito *Leishmania braziliensis*. Se trata de una de las llamadas enfermedades desatendidas, dado que afecta mayormente a poblaciones aisladas y de bajo recursos.

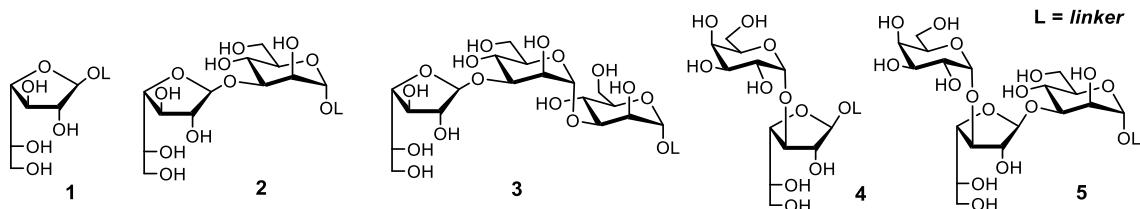
Actualmente, no se dispone de un método de diagnóstico específico, sencillo y económico que permita detectar la enfermedad en zonas aisladas y de difícil acceso. En este contexto, los glicanos antigenicos de superficie de *L. braziliensis*, reconocidos por anticuerpos presentes en sueros infectados, representan blancos prometedores para el desarrollo de biosensores serológicos. En particular, los sensores electroquímicos se destacan como una plataforma adecuada para el diagnóstico en campo, debido a su alta sensibilidad, bajo costo y facilidad de uso.

Entre los glicanos superficiales del parásito, el lipofosfoglicano (LPG) y los glicoinositofosfolípidos (GIPLs) tipo-II son biomoléculas abundantes e inmunogénicas que, además, comparten una característica estructural distintiva: contienen residuos de D-galactofuranosa, un azúcar no biosintetizado por mamíferos, cuya antigenicidad ha sido reportada, pero cuya aplicación en diagnóstico serológico de LTA no había sido explorada al inicio de este trabajo.

Para estudiar el reconocimiento de estos galactofuranósidos por anticuerpos específicos, es necesario contar con fragmentos sacáridicos bien definidos. Dado que su aislamiento a partir del parásito resulta muy complejo e ineficiente, la síntesis química se presenta como una alternativa eficaz para acceder a estos compuestos.

En este marco, para esta tesis se plantearon los siguientes objetivos:

1- Diseñar y desarrollar rutas sintéticas para obtener lotes puros de los galactofuranósidos **1-5** presentes en el LPG y los GIPLs tipo-II de *Leishmania*, incorporando un *linker* adecuado para su anclaje a superficies.



2- Evaluar la afinidad de los galactofuranósidos por anticuerpos presentes en sueros humanos de pacientes con LTA, de forma de identificar candidatos potenciales para el desarrollo de un método de diagnóstico serológico de la infección.

3- Abordar el desarrollo de un biosensor basado en carbohidratos, utilizando espectroscopía de impedancia electroquímica. Esto incluyó diseñar, construir y caracterizar una superficie sensora decorada con los galactofuranósidos sintéticos y evaluar su respuesta frente a sueros humanos infectados.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Capítulo 3

Síntesis de

galactofuranósidos

de *Leishmania*

3.1. Introducción

El tripanosomárido *Leishmania*, agente causante de las leishmaniasis, está recubierto de una capa densa de oligo- y polisacáridos, que exponen sus residuos hacia el medio extracelular. Estos glicanos de superficie son determinantes para la virulencia y supervivencia del parásito y, al ingresar al organismo huésped, entran en contacto directo con los componentes del sistema inmune.^[58,70] En consecuencia, en sueros de individuos infectados se detectan anticuerpos con afinidad por componentes de la membrana,^[93,95] incluyendo específicamente el lipofosfoglicano (LPG) y los glicoinositofosfolípidos (GIPLs).^[77,79,80,82,218–220]

La mayoría de los estudios de interacción de anticuerpos con glicanos superficiales de *Leishmania* se han realizado utilizando extractos del parásito. Sin embargo, el uso de extractos naturales no permite identificar con precisión los epitopes responsables del reconocimiento ni determinar las unidades estructurales mínimas necesarias para la antigenicidad. La síntesis química, en cambio, posibilita la obtención de glicanos puros y bien definidos, y permite funcionalizarlos con fragmentos conectores como los *linkers*, que posibilitan anclarlos o conjugarlos a plataformas adecuadas para efectuar estudios inmunológicos.

En trabajos previos, Anish C. y colaboradores sintetizaron oligosacáridos de la cubierta del LPG de *L. infantum*, funcionalizados con un amino *linker* en el extremo reductor, y demostraron su inmunorreactividad frente a sueros humanos utilizando la tecnología de microarreglo de glicanos, lo que evidenció su potencial aplicación en el diagnóstico serológico.^[81] Por su parte, el grupo de Igor Almeida sintetizó oligosacáridos con α-Gal, residuo xenobiótico en humanos,^[221] presentes en los GIPLs tipo-II de *L. major* y *L. braziliensis*. En este caso, los autores incorporaron, en el extremo reductor de los oligosacáridos, un *linker* con grupo tiol terminal para formar glicoconjungados, que fueron empleados en ensayos ELISA para evaluar su capacidad de reconocer anticuerpos en sueros humanos. En estos estudios, se identificaron fragmentos di- y trisacáridicos candidatos para el diagnóstico serológico de estas infecciones parasitarias.^[83,222,223]

Como se mencionó anteriormente, en Argentina, la principal especie causante de leishmaniasis cutánea y mucocutánea, conocida como leishmaniasis tegumentaria americana (LTA), es *Leishmania braziliensis*. En el estadio amastigote, el parásito se encuentra recubierto por glicanos ricos en D-galactofuranosa (D-Galf), un azúcar no biosintetizado por mamíferos,^[224] que ha demostrado ser antigénico en diversos

Resultados y discusión

microorganismos patógenos como *Aspergillus fumigatus* y *Trypanosoma cruzi*, entre otros.^[99,225-231]

En las especies causantes de leishmaniasis cutánea y mucocutánea, diversos estudios han demostrado la presencia de anticuerpos dirigidos contra glicanos con D-Galf en sueros de pacientes infectados. En *L. major*, predominante en África y Asia, los grupos de Nilsson B. y Bacic A. demostraron la antigenicidad de los GIPLs tipo-II aislados del parásito,^[78,80] mientras que Montoya A. L. *et al.* observaron el reconocimiento de fragmentos terminales con D-Galf derivados del GIPL-2.^[83] En América Latina, donde predominan *L. braziliensis* y *L. mexicana*, Avila J. L. y colaboradores reportaron inmunorreactividad frente a GIPLs nativos,^[77] a la vez que Viana S. M. *et al.* observaron la misma respuesta frente a fragmentos sintéticos terminales de los GIPLs 1 y 3 que contenían D-Galf.^[223]

Estos hallazgos sugieren que las estructuras galactofuranosídicas presentes en la superficie de *L. braziliensis* pueden desencadenar una respuesta inmune humoral durante la infección. Sin embargo, al inicio de esta tesis (2018), no se encontraron estudios sistemáticos específicamente dirigidos a evaluar el rol de la D-Galf en la antigenicidad de los glicolípidos superficiales de *Leishmania*.

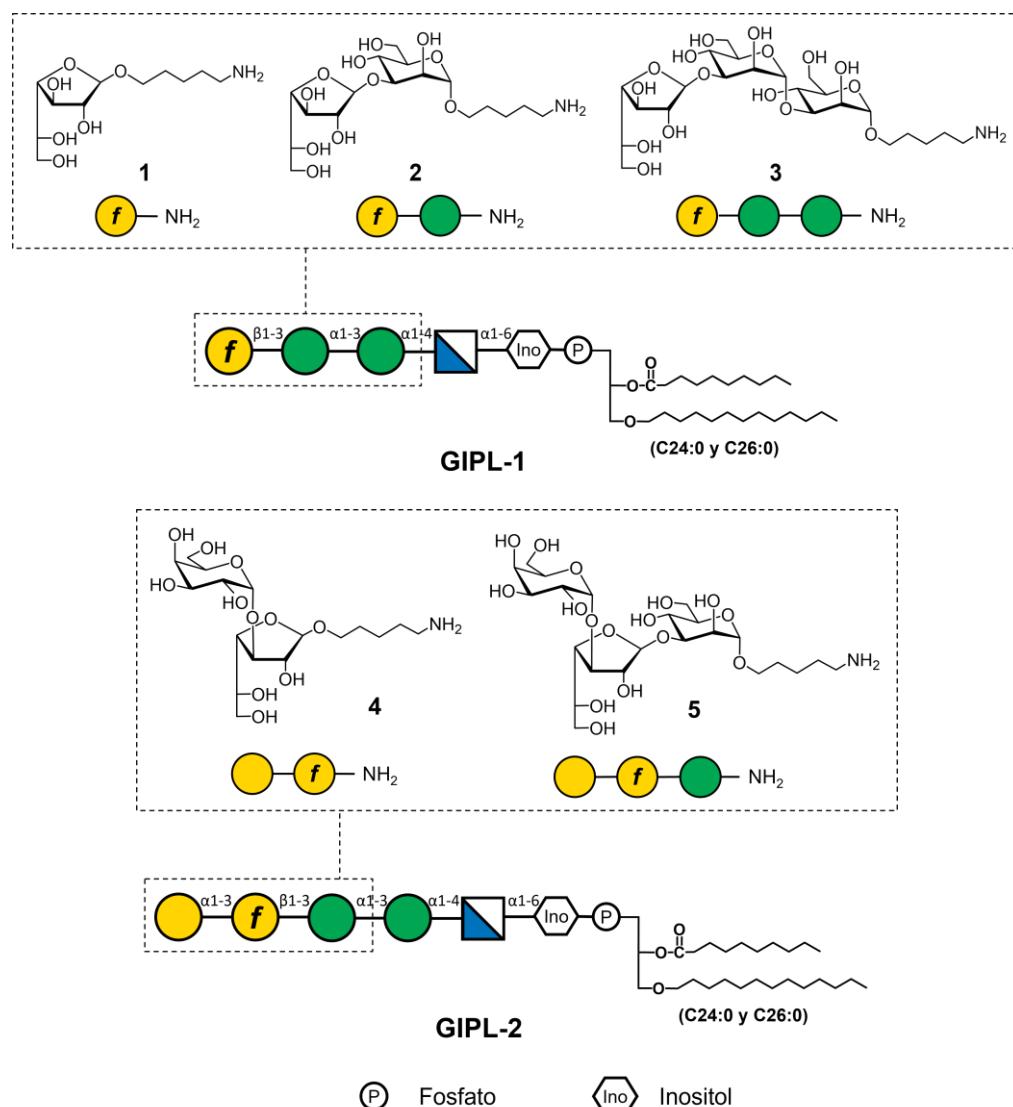
En este contexto, se propuso la síntesis de cinco galactofuranósidos (**1** a **5**) constitutivos del core del LPG y de los GIPLs tipo-II de *L. braziliensis*, como estrategia para identificar determinantes estructurales de antigenicidad del parásito y, eventualmente, potenciales biorreceptores para el diagnóstico serológico de la LTA (Esquema 3.1). Si bien existían antecedentes de síntesis del core oligosacárido del LPG y de fragmentos con D-Galf derivados del LPG y de los GIPLs tipo-II,^[83,223,232,233] al inicio del presente trabajo no se habían reportado trabajos sintéticos enfocados en la preparación sistemática de oligosacáridos con galactofuranosa para el análisis de la antigenicidad de los glicolípidos de membrana del parásito.

Los glicósidos **1** a **5** seleccionados están compuestos por unidades de β -D-Galf, α -D-Galp y α -D-Manp, y están funcionalizados con un *linker* 5-aminopentilo (o amino *linker*) en el extremo reductor. Este conjunto de estructuras fue diseñado para evaluar la influencia de distintas variables estructurales en la antigenicidad: (a) la posición de la unidad de β -D-Galf (interna o terminal); (b) la presencia de residuos de α -D-Manp y α -D-Galp y, (c) la conectividad entre unidades, es decir, la secuencia sacáridica del galactofuranósido.

La incorporación del grupo 5-aminopentilo responde a la necesidad de inmovilizar los glicanos sobre superficies o de conjugarlos a proteínas, un requisito habitual para llevar a

cabo estudios inmunológicos. Esta estrategia, previamente empleada por distintos autores,^[234-237] permite el acoplamiento de los azúcares a biomoléculas o matrices carboxiladas mediante enlaces amida estables.^[139,238,239] En los ensayos que emplean superficies sólidas, la cadena alquílica del amino *linker* actúa como un espaciador, separando los azúcares de la superficie para minimizar las interacciones no específicas.^[240]

En la *primera parte* de este capítulo se describirá la síntesis de los 5-aminopentil derivados de los glicanos terminales del GIPL-1, (compuestos **1**, **2** y **3**, Esquema 3.1) que contienen β -D-Galf en el extremo no reductor. Luego, en la *segunda parte*, se abordará la síntesis de fragmentos terminales del GIPL-2 (compuestos **4** y **5**, Esquema 3.1) con la unidad de D-galactofuranosa interna.



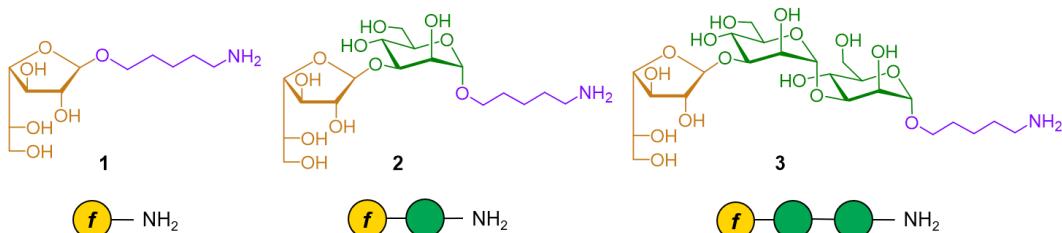
Esquema 3.1. Galactofuranósidos **1** a **5**, objetos de esta tesis y representación esquemática de su ubicación en el GIPL-1 y el GIPL-2.^[71]

En esta tesis se procuró desarrollar procesos de síntesis robustos, con la premisa de que, en caso de identificarse candidatos prometedores para el sensado de anticuerpos, ya contáramos con una ruta sintética optimizada y escalable. En este sentido, se priorizó el uso de precursores comunes, que pudieran ser obtenidos a partir de moléculas sencillas y asequibles.

Primera parte.

Fragments del GIPL-1

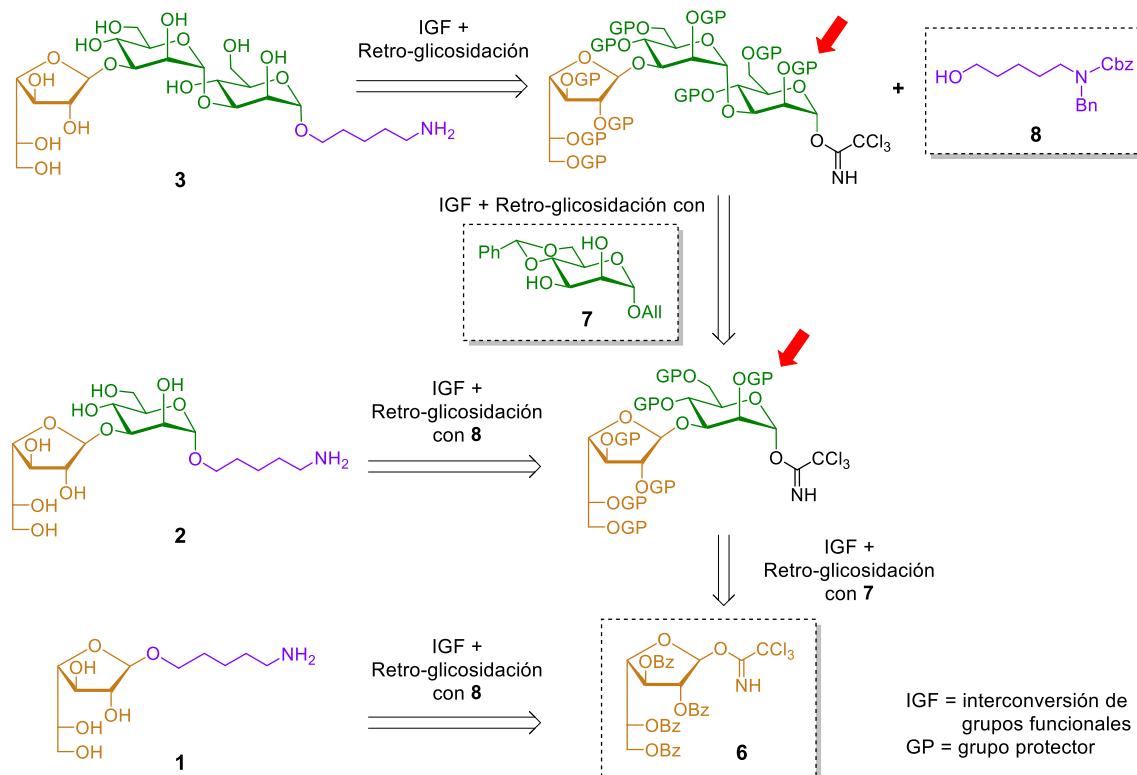
En esta sección se describe el diseño del camino sintético y los resultados de la síntesis de los compuestos **1** a **3** (Esquema 3.2), presentes en el extremo no reductor del GIPL-1 de *Leishmania* y en el core oligosacárido del LPG.



Esquema 3.2

3.2. Diseño de las rutas sintéticas para la obtención de 1, 2 y 3

Las rutas de síntesis de los galactofuranósidos constitutivos del GIPL-1 se definieron en base al análisis retrosintético de los compuestos **1** a **3** presentado en el Esquema 3.3. Se estableció una ruta sintética convergente, basada en un conjunto reducido de bloques constructores comunes (compuestos **6-8**). De este modo, cada glicano objetivo sería ensamblado por acoplamiento controlado de las unidades sacáridicas constitutivas desde el extremo no reductor al reductor, con la introducción final del eslabón 5-aminopentílico.



Esquema 3.3

Como se puede ver en el Esquema 3.2, los tres compuestos a sintetizar contienen un residuo β -D-Galf en el extremo no reductor. Entre los numerosos precursores reportados para la síntesis de β -galactofuranósidos,^[241-244] se eligió el tricloroacetimidato de O-(2,3,5,6-tetra-O-benzoíl- β -D-galactofuranosilo) (**6**, Esquema 3.3), utilizado por primera vez por Gallo-Rodríguez C. y colaboradores en la síntesis estereoselectiva del disacárido β -D-Galf-(1 \rightarrow 3)-D-GlcNAc.^[38] La elección de este precursor tenía como ventajas: (i) la presencia de un grupo acilo participante en C-2, adecuado para la formación de la unión galactofuranosídica 1,2-*trans* presente en los glicósidos **1-3**; (ii) la posibilidad de obtener el donor con buen rendimiento a partir del 1,2,3,5,6-penta-O-benzoíl- α , β -D-galactofuranósido; y (iii) la aplicación de un método de glicosidación suave, compatible con las funcionalidades y enlaces glicosídicos lábiles al medio ácido presentes en la síntesis.

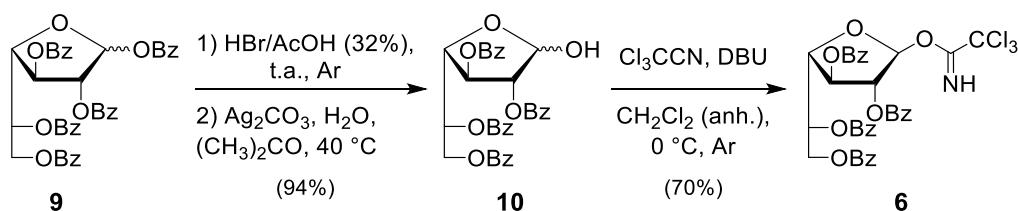
Para introducir la unidad de D-manopiranosa, se eligió el alil 4,6-O-bencilidén- α -D-manopiranósido (**7**, Esquema 3.3), utilizado por Ma Z. *et al.* en la síntesis del motivo β -D-Galf-(1 \rightarrow 3)-D-Manp, estructura interna presente en la superficie de *Trichophyton*.^[245] El uso de **7** para la síntesis de **2** y **3** tenía como ventajas que, por un lado, podía obtenerse en dos pasos a partir de D-mannosa y, por otro lado, que contaba con un grupo alilo protector de la posición anomérica, el cual podía ser removido selectivamente para extender el oligosacárido hacia el extremo reductor.^[246]

Para la incorporación del *linker* 5-aminopentilo era necesario partir de un precursor con el grupo amino protegido. Entre las alternativas reportadas, se encontraron numerosos ejemplos del empleo de *N*-(bencil)benciloxicarbonil 5-aminopentanol^[235,247,248] (**8**, Esquema 3.3), o de su análogo monoprotegido, el *N*-benciloxicarbonil 5-aminopentanol.^[234,249,250] Para este trabajo, se eligió el precursor **8** como el más adecuado en base a un reporte de Seeberger P. H. y colaboradores. Allí, se describieron reacciones de glicosidación entre tricloroacetimidil oligosacáridos de variado peso molecular con ambos aceptores de glicosilo, y se observaron mejores rendimientos cuando se utilizaba el derivado protegido **8**.^[251] Los autores atribuyeron este fenómeno al efecto desactivante del grupo -NH, previamente observado por Dudkin V. y Crich D.^[252]

En las rutas sintéticas elegidas para la obtención de los compuestos **1** a **3** a partir de los precursores **6**, **7** y **8**, se empleó el método del tricloroacetimidato, estrategia de glicosidación suave y compatible con las uniones furanosídicas presentes en los intermediarios de reacción. Asimismo, se introdujeron grupos ésteres en C-2 para favorecer la formación de glicósidos 1,2-*trans* (flechas rojas, Esquema 3.3).

3.3. Síntesis del precursor de D-Galf, tricloroacetimidato de O-(2,3,5,6-tetra-O-benzoíl- β -D-galactofuranosilo) (6)

Como primer paso en la síntesis de **1**, se procedió con la formación del precursor **6**. En primer lugar, se hizo reaccionar D-galactosa con cloruro de benzoílo en piridina a 60 °C y, por recristalización selectiva en etanol del producto crudo, se aisló 1,2,3,5,6-penta-O-benzoíl- α , β -D-galactofuranosa (**9**)^[253] con 29% de rendimiento. Luego, el sólido se trató con una solución de HBr en AcOH (32%) para dar el bromuro de 2,3,5,6-tetra-O-benzoíl- α , β -D-galactofuranosa, que fue hidrolizado en presencia de Ag₂CO₃ para dar 2,3,5,6-tetra-O-benzoíl- α , β -D-galactofuranosa (**10**)^[254] con excelente rendimiento (94%, Esquema 3.4).



Esquema 3.4

En el espectro de RMN ¹H del producto de reacción se observaron un singulete a δ 5,71 ppm y, a δ 5,84 ppm, un doblete con constante de acoplamiento 4,5 Hz, correspondientes a los H-1 de los anómeros β y α del compuesto **10**, respectivamente. La integración de estas señales indicó que se trataba de una mezcla anomérica con una relación $\beta/\alpha \sim 7:3$. Adicionalmente, los multipletes de la zona aromática integraban para 20 H, lo que resultó consistente con la presencia de los 4 grupos benzoílo protectores.

El paso siguiente consistía en activar el centro anomérico libre de **10** mediante la formación del tricloroacetimidato. Para ello, el compuesto se hizo reaccionar con tricloroacetonitrilo en presencia de DBU para dar, luego de la purificación por cromatografía *flash* en columna de sílica gel, el tricloroacetimidato **6**^[38] como un sólido amorfó espumoso con 70% de rendimiento (Esquema 3.4). Dado que el producto de reacción era susceptible a la hidrólisis en presencia de agua, se mantuvo a -20 °C bajo exclusión de humedad hasta su uso.

La caracterización de **6** se realizó por RMN ¹H (Figura 3.1) y ¹³C, y los datos obtenidos fueron coincidentes con los reportados en bibliografía.^[38] El espectro protónico mostró como señal diagnóstica un singulete a δ 8,73 ppm que integraba para 1 H, correspondiente al H del grupo tricloroacetimidato. A campos más altos, se observó la resonancia del protón anomérico a δ 6,70 ppm como un singulete ($^3J_{1,2} < 1$ Hz), indicando que el componente mayoritario era el imidato de configuración β , en el que H-1 y H-2 se

Resultados y discusión

encuentran en disposición *trans*.^[255] Al comparar el desplazamiento del H-1 de **6** con el registrado para **10**, se evidenció un corrimiento de ~1 ppm hacia campos más bajos, consistente con la incorporación del grupo tricloroacetimida en esta posición.

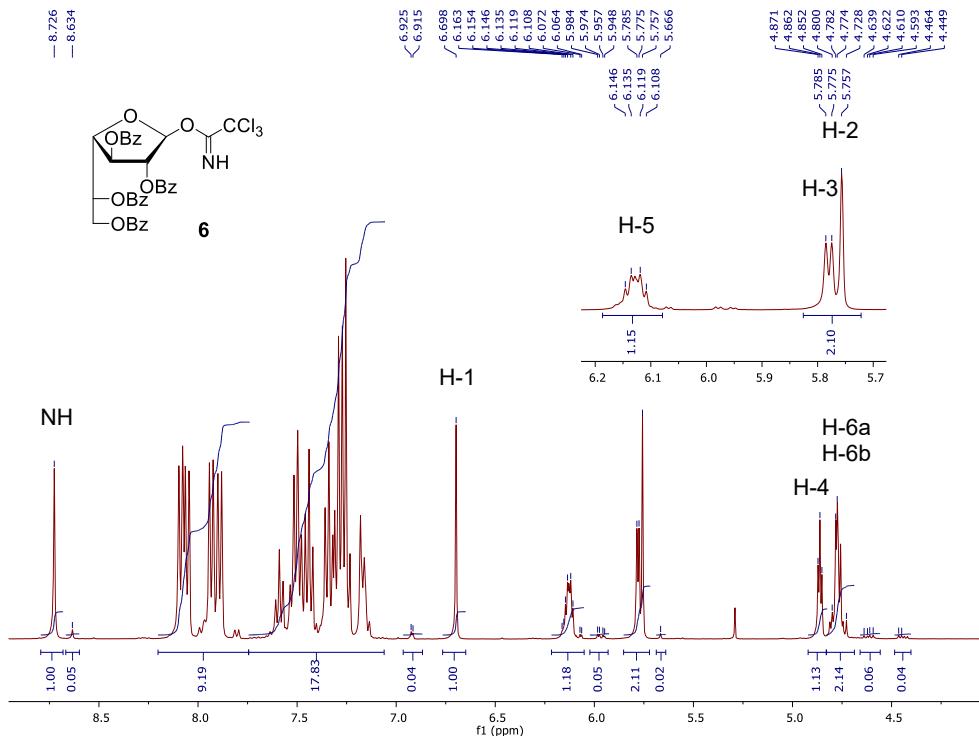


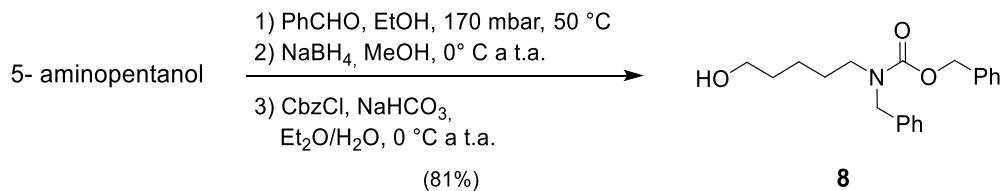
Figura 3.1. Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) de **6**.

Acompañando a las señales del tricloroacetimidato β se observaron picos adicionales de muy baja intensidad, entre ellos un singulete a δ 8,63 ppm y un doblete a δ 6,9 ppm ($J \sim 4$ Hz), que se asociaron a la obtención de $\sim 5\%$ del anómero α .

De esta forma, se obtuvo el precursor de la unidad de β -D-Galf, que sería utilizado en las rutas sintéticas de obtención de los glicósidos **1**, **2** y **3**, con galactofuranosa en el extremo no reductor.

3.4. Síntesis del precursor del amino *linker*, N-(bencil)benciloxicarbonil-5-aminopentanol (8)

El *N*-(bencil)benciloxicarbonil-5-aminopentanol (**8**) se obtuvo según la estrategia descripta por Castelli R. *et al.*^[256] En primer lugar, se incorporó el grupo bencilo a través de una aminación reductiva, por reacción de 5-aminopentanol con benzaldehído seguido de la reducción con borohidruro de sodio. El paso siguiente fue en la incorporación del grupo carboxibencilo por tratamiento con cloroformiato de bencilo en medio básico, para aislar **8** con 81% de rendimiento (Esquema 3.5).



Esquema 3.5

La obtención de **8** se corroboró por RMN mono y bidimensionales, y los datos espectroscópicos resultaron coincidentes con los reportados.^[256] En el espectro de RMN ¹H (Figura 3.2) se identificaron las resonancias de los metilenos bencílicos a δ ~5,2 ppm (CH₂-g) y ~4,5 ppm (CH₂-h), respectivamente, confirmando la incorporación de los grupos protectores del N, junto con las señales de los metilenos alifáticos de **8**. En el espectro de ¹³C (Figura 3.3), además de estos metilenos se observó un *pseudo*-doblete a δ ~156,7 ppm que se asignó al carbonilo del grupo carboxibencílico (C-f).

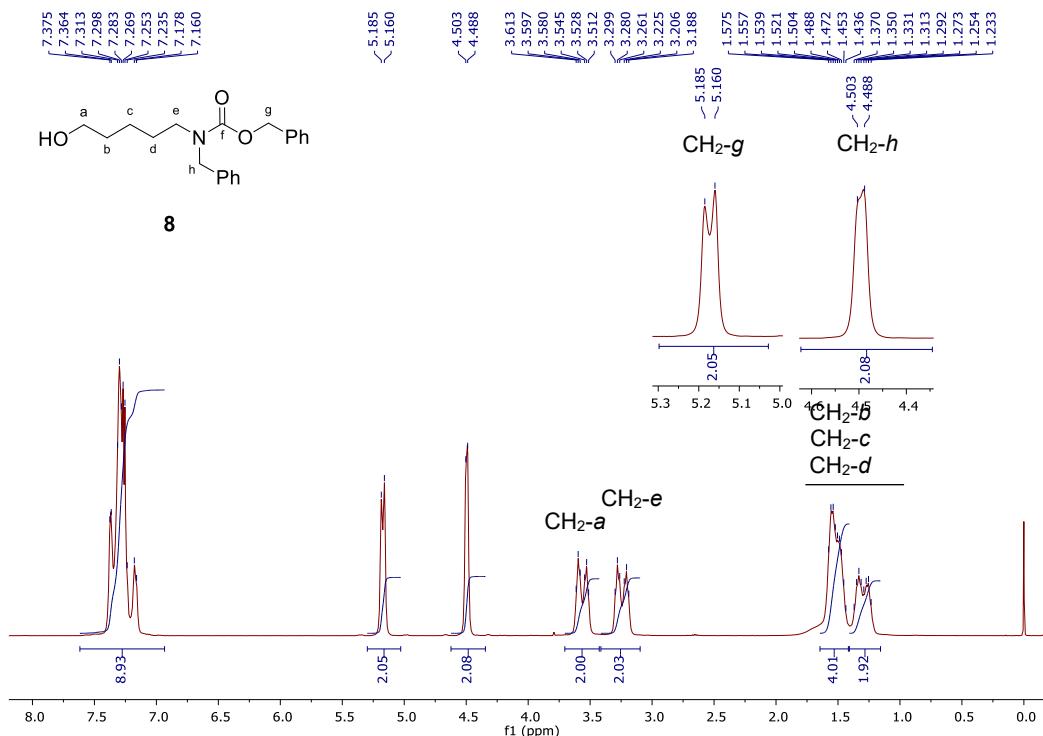


Figura 3.2. Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) de **8**.

Tanto en el espectro RMN de ^1H como de ^{13}C , las señales de todos los núcleos aparecieron desdobladas y/o ensanchadas. Este fenómeno se asocia a la presencia del grupo carboxibencílico, que contiene una unión N-C(O) con cierto carácter de doble enlace. Esta característica incrementa la barrera energética asociada a la rotación en torno al enlace N-C. Cuando dicha rotación es más lenta que la ventana de tiempo del experimento de RMN, como ocurre en el caso del compuesto **8**, se registra una superposición de señales, correspondientes a distintos isómeros conformatacionales

Resultados y discusión

(rotámeros).^[257] Esta distorsión de las señales se observará, a lo largo de esta tesis, en aquellas moléculas que cuenten con el amino *linker* protegido.

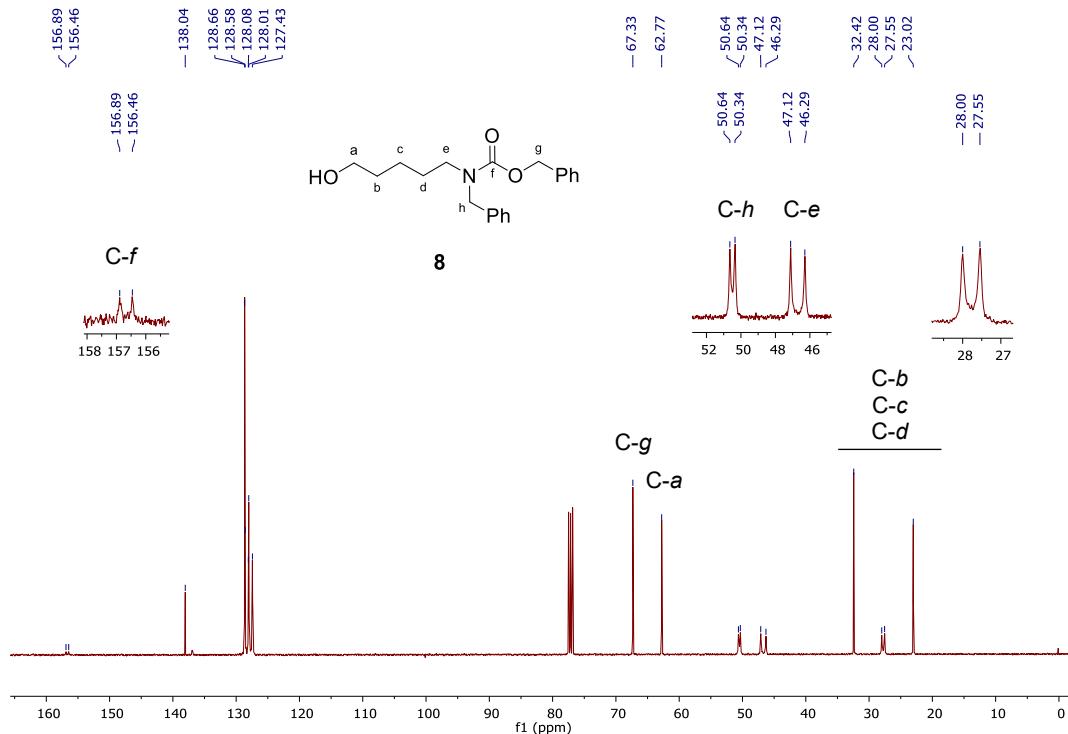


Figura 3.3. Espectro de RMN ^{13}C (101 MHz, CDCl_3) de **8**.

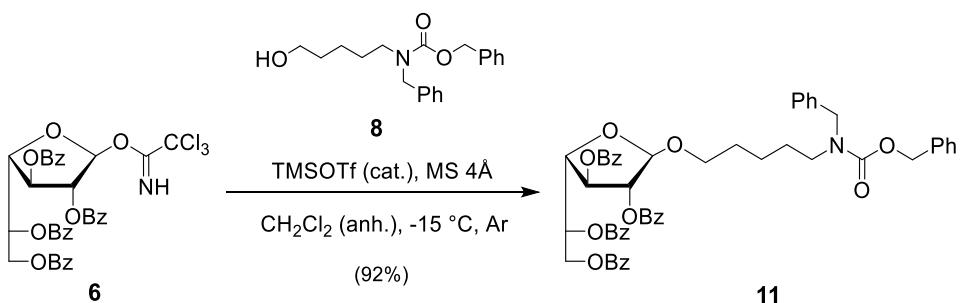
El compuesto **8** se reservó para su uso como precursor del amino *linker* en las rutas sintéticas de los cinco glicósidos objeto de esta tesis (**1-5**).

3.5. Síntesis del 5-aminopentil β -glicósido de D-Galf (**1**)

3.5.1. Glicosidación. Obtención de *N*-(bencil)benciloxicarbonil-5-aminopentil 2,3,5,6-tetra-O-benzoíl- β -D-galactofuranósido (**11**)

Una vez activado el centro anomérico furanosídico de **10** por formación del tricloroacetimidato **6**, y habiendo obtenido el aceptor **8**, se procedió a realizar la reacción de glicosidación (Esquema 3.6). Debido a la alta reactividad del grupo tricloroacetimidato en medio ácido, se aplicaron exhaustivos cuidados para mantener la reacción anhidra durante todo el proceso, esto es, atmósfera inerte, uso de tamices moleculares en polvo y de solvente anhídrido recién destilado. Estas condiciones se replicaron en todas las glicosidaciones realizadas a lo largo de esta Tesis.

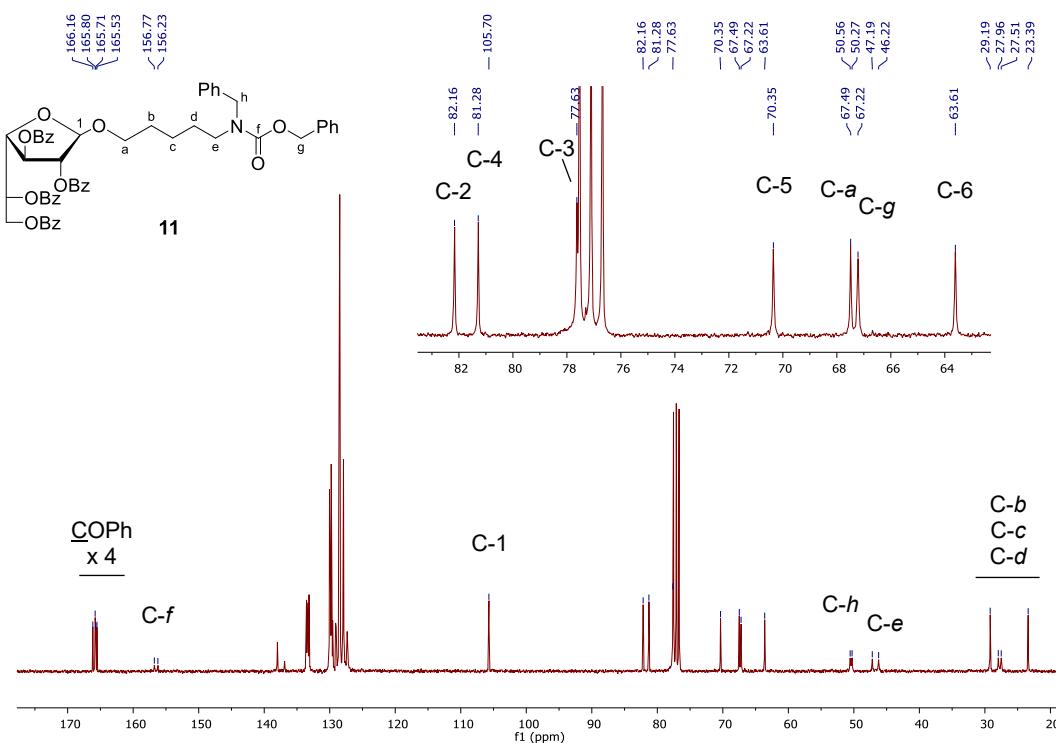
La reacción del donor **6** con el aceptor **8** se completó en 30 minutos y rindió como único producto el glicósido **11**, el cual se aisló por cromatografía en columna de sílica gel con excelente rendimiento (92%, Esquema 3.6).



Esquema 3.6

El nuevo compuesto se analizó por RMN y, al igual que en el caso de **8**, algunas señales aparecieron desdobladas y/o ensanchadas. En el espectro de ^{13}C (Figura 3.4) se registró una señal en la zona anomérica a δ 105,7 ppm que evidenció la obtención de un único glicósido de configuración β . Allí se identificaron, además, las resonancias de todos los grupos protectores, que fueron estables a las condiciones de glicosidación elegidas.

En el espectro de RMN ^1H (Figura 3.5) se identificó al protón anomérico a δ 5,27 ppm como un multiplete y al H-2 como un singulete a δ 5,44 ppm. El valor de $^3J_{1,2}$ resultó ser $<1,5$ Hz, confirmando la disposición 1,2-*trans* entre H-1 y H-2, correspondiente al anómero β en D-Galf. Por último, en el espectro RMN ^1H - ^{13}C HMBC el protón anomérico mostró un acoplamiento a largo alcance con el C-a del amino *linker* a δ 67,5 ppm, lo que confirmó que la unión entre los fragmentos fue exitosa.

Figura 3.4. Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) de **11**.

Resultados y discusión

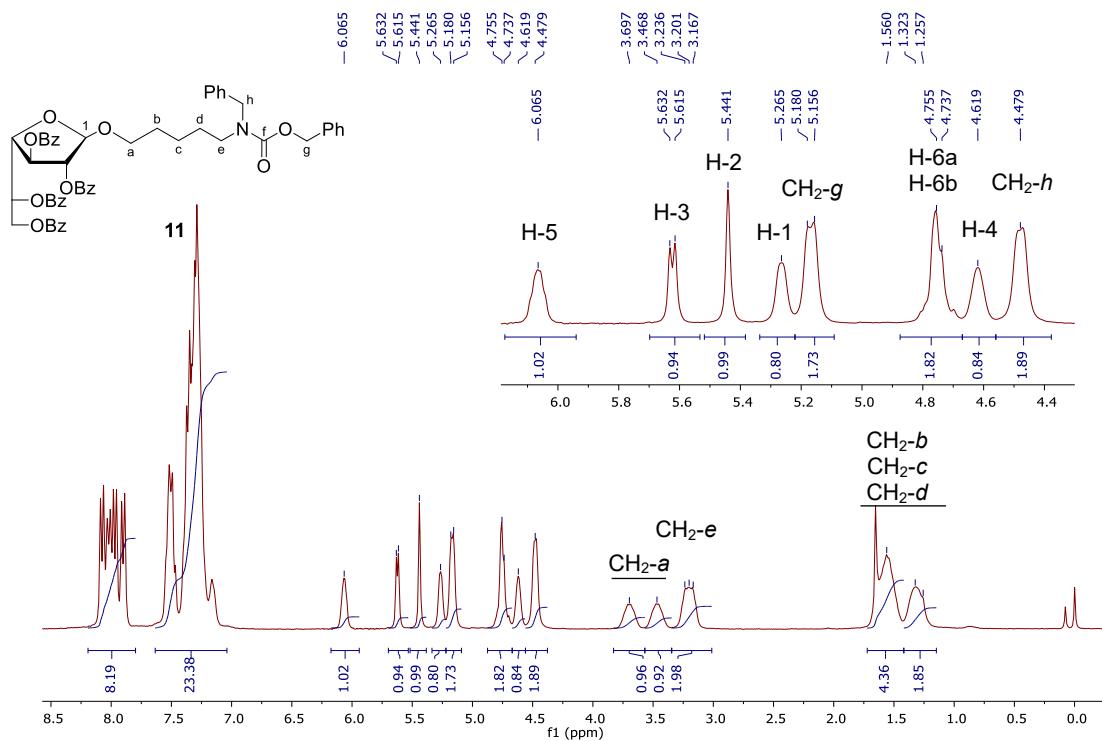


Figura 3.5. Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) de **11**.

Para confirmar que la distorsión observada en la señal del H-1 en el espectro protónico se debía a la presencia de rotámeros, se realizaron experimentos de RMN a distintas temperaturas: 25, 40 y 55 °C (Figura 3.6). Al aumentar la temperatura, se registró un cambio en la multiplicidad de dicha señal, que pasó de un multiplete a un singulete, en concordancia con lo esperado para el β -galactofuranósido. Este mismo comportamiento se observó en las resonancias de los metilenos bencílicos $\text{CH}_2\text{-g}$ y $\text{CH}_2\text{-h}$. Este fenómeno se debe a que, al aumentar la velocidad de interconversión entre rotámeros, los entornos electromagnéticos de los núcleos tienden a homogeneizarse, lo que provoca la coalescencia de las señales en una única resonancia.

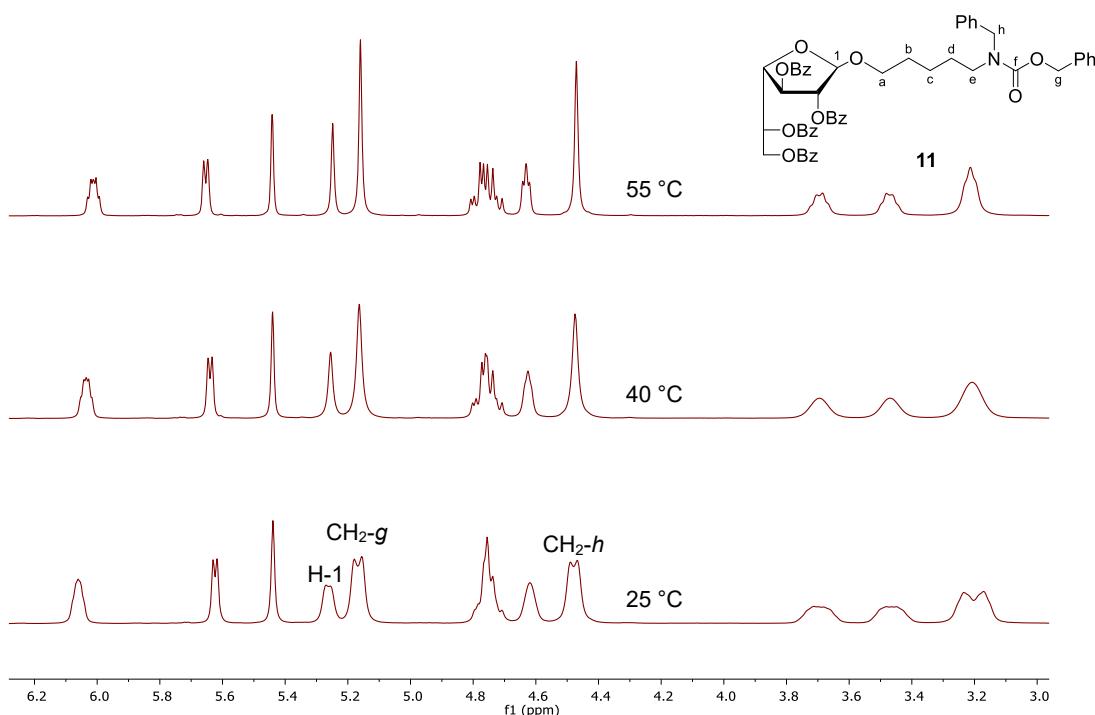
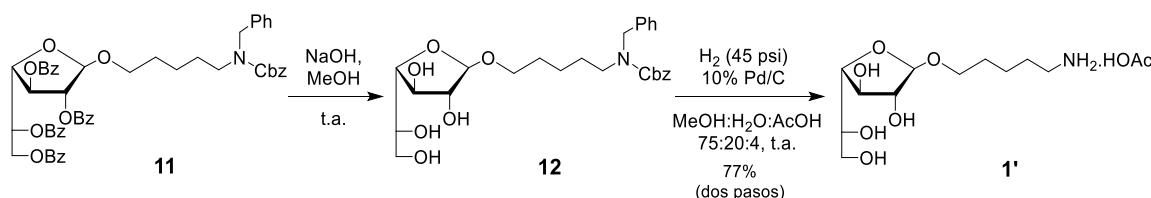


Figura 3.6. Espectros de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) de **11** a 25, 40 y 55 °C. Ampliación de la región δ 3,0-6,3 ppm.

3.5.2. Desprotección. Obtención de 5-aminopentil β -D-galactofuranósido (1)

A efectos de obtener el glicósido deseado, era necesario eliminar los grupos protectores de **11** a través de condiciones suaves que conservaran intacta la unión β -D-galactofuranosídica.



Esquema 3.7

En primera instancia, los grupos ésteres de **11** se hidrolizaron por tratamiento con hidróxido de sodio en metanol (Esquema 3.7). En el espectro de RMN ^{13}C del producto de reacción se observó la desaparición de las señales de los carbonilos presentes en el espectro de **11**. Asimismo, en el espectro protónico se evidenció un corrimiento hacia campos más altos de las resonancias asociadas a las posiciones previamente protegidas de **11** (H-2 , H-3 , H-5 y H-6). En conjunto, estas evidencias confirmaron que la desbenzoilación de la galactofuranosa fue completa, obteniéndose el compuesto **12** deseado.

Resultados y discusión

Para liberar el grupo amino de **12**, el jarabe obtenido, sin purificar, se disolvió en una mezcla de MeOH/H₂O/AcOH y se sometió a una hidrogenólisis a alta presión. Tras la purificación cromatográfica del crudo, se obtuvo el producto deseado **1** como un jarabe, con un rendimiento del 77% a partir de **11** (Esquema 3.7). Con la asistencia de los espectros bidimensionales, se efectuó la asignación completa de las resonancias de ¹H y ¹³C del producto (Figura 3.7 y Figura 3.8). Allí se registró la desaparición de las señales asociadas al carboxibencilo y al bencilo de **12**, confirmando que la desprotección había sido completa.

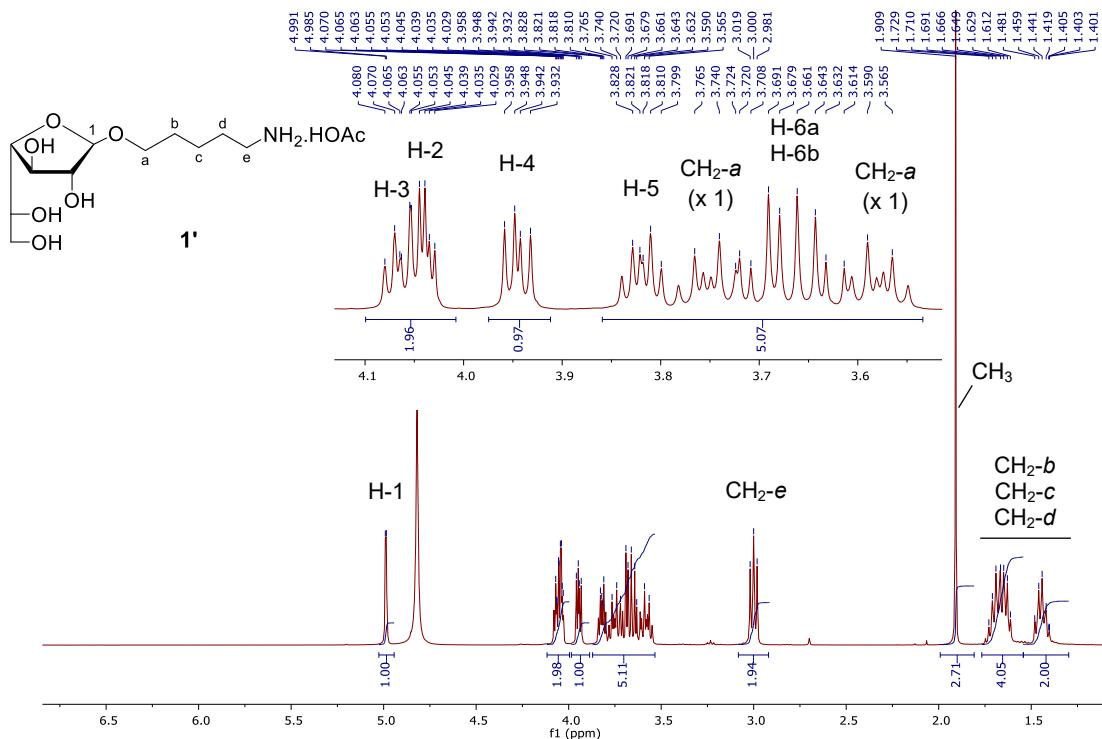


Figura 3.7. Espectro de RMN ^1H (400 MHz, D_2O) de **1'**.

Una vez asignadas las señales de 1, en el espectro de RMN ^1H se observó una resonancia adicional a δ 1,91 ppm, que integraba para aproximadamente 3 H. En los espectros ^1H - ^{13}C HSQC y ^1H - ^{13}C HMBC, esta señal mostró correlaciones a un enlace con un C en la zona alifática a δ 23,9 ppm y, a largo alcance, con un núcleo en la región de carbonilo a δ 182,2 ppm (esta señal no aparece en el espectro de RMN ^{13}C). Estos datos fueron consistentes con la presencia de un grupo acetato asociado al amino terminal, proveniente del solvente empleado en la reacción. Este fenómeno ya había sido reportado por Gerbst A. G. y colaboradores en 3-aminopropil glicósidos tratados con ácido acético.^[258]

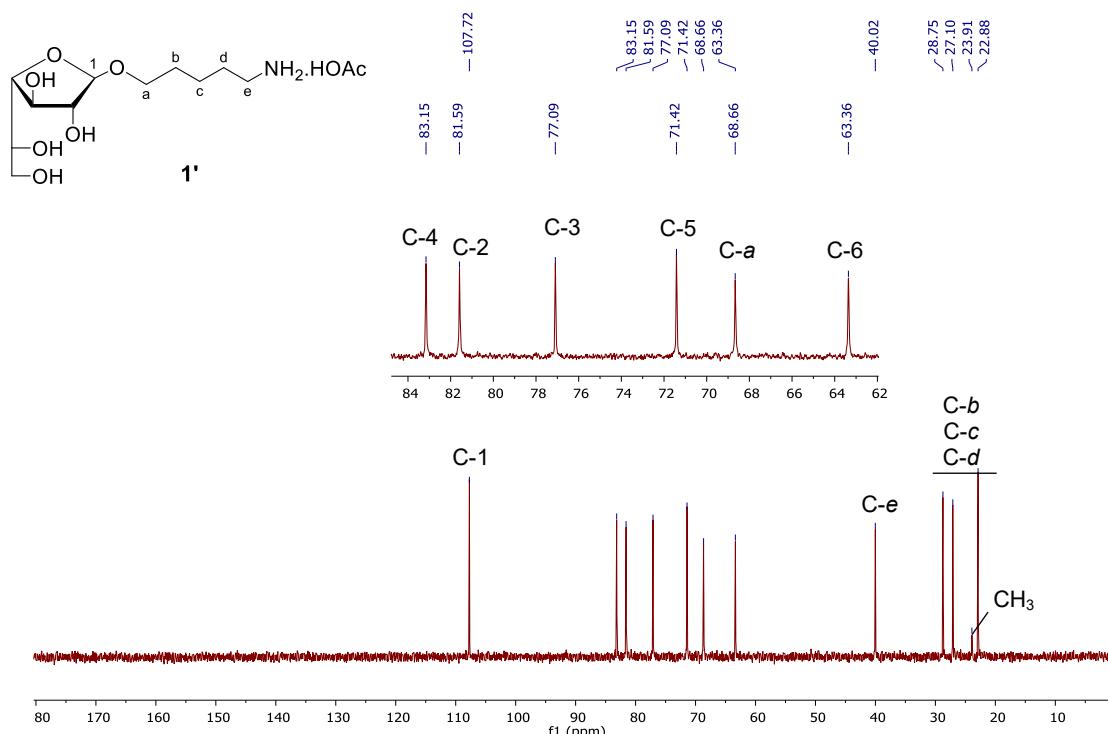


Figura 3.8. Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, D_2O) de **1'**.

Para confirmar esta hipótesis, una fracción del jarabe obtenido se trató con resina de intercambio catiónico, se pasó a una columna cromatográfica y se eluyó con hidróxido de amonio para liberar al glicósido retenido en la resina. En el espectro de la fracción eluída (Figura 3.9) se observaron, por un lado, las señales asignadas a **1** y, por otro lado, la desaparición de la señal a δ 1,91 ppm correspondiente al metilo del grupo acetato. Se concluyó, entonces, que el producto de la hidrogenólisis catalítica de **12** fue el acetato del 5-aminopentil β -D-galactofuranósido (**1'**).

De esta manera se aisló, por primera vez, el acetato del 5-aminopentil β -D-galactofuranósido. La estrategia de glicosidación empleada resultó adecuada para la formación estereoselectiva del enlace β , y se aplicará también en la síntesis de los galactofuranósidos **2** y **3**.

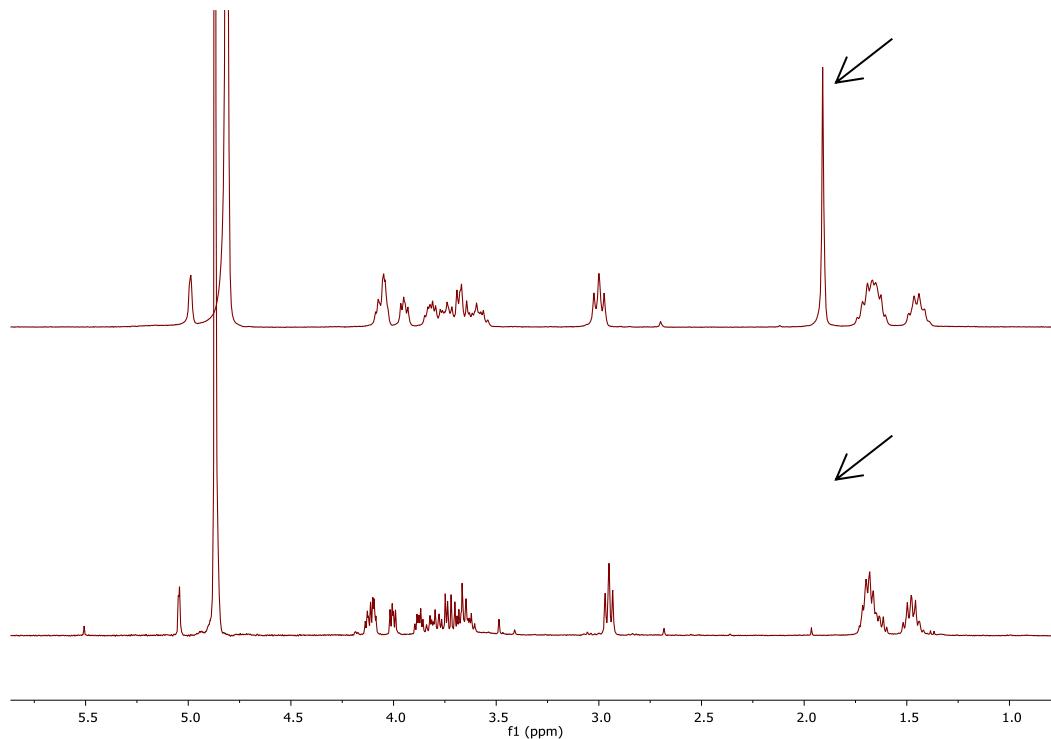
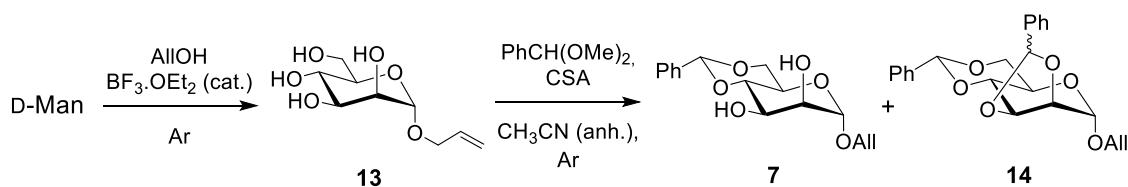


Figura 3.9. Espectros de RMN ^1H de **1** antes (arriba, 300 MHz, D_2O) y después (abajo, 400 MHz, D_2O) del intercambio iónico.

A continuación, se describe la obtención del precursor de la unidad de D-manopiranosa **7** necesario para la síntesis de ambos glicósidos.

3.6. Síntesis del precursor de D-Manp, alil 4,6-O-bencilidén- α -D-manopiranósido (7)

Para la síntesis del alil 4,6-di-O-bencilidén- α -D-manopiranósido (**7**) se aplicó el procedimiento en dos pasos reportado por Ali A. *et al.* (Esquema 3.8).^[259]



Esquema 3.8

En nuestras manos, una vez completada la glicosidación de Fischer de la D-manosa con alcohol alílico, el RMN del producto crudo mostró una relación 60:40 entre las formas piranósica y furanósica, respectivamente. Mediante la purificación por columna se aisló el compuesto **13** con 36% de rendimiento (Fila A, Tabla 3.1). Luego, el producto puro se trató con α,α -dimetoxitolueno en presencia de ácido camforsulfónico y, por purificación en columna del crudo de reacción, se aisló **7** con 50% de rendimiento (Fila A, Tabla 3.2).

Durante la purificación se obtuvo, además, un 15% de un subproducto de menor polaridad identificado como el 2,3:4,6-di-O-bencilidén- α -D-manopiranósido (**14**, Esquema 3.8).

El rendimiento global de la síntesis fue inferior al reportado por Ali A. *et al.* (18% vs. 60%). Como era necesario escalar la síntesis del precursor **7** para contar con suficiente masa y así abastecer las múltiples rutas en las que intervenía, se encaró un estudio de optimización de las reacciones involucradas. Por un lado, se intentó mejorar el rendimiento global, maximizando las conversiones de ambas reacciones y, por el otro, se intentó minimizar el uso de reactivos costosos (por ej. alcohol alílico) y operaciones de purificación que demandaban mucho tiempo y recursos (por ej. la columna cromatográfica). En la Tabla 3.1 y la Tabla 3.2 se muestran los resultados de las condiciones ensayadas para la síntesis de **13** y **7**, respectivamente, en comparación con lo reportado en bibliografía (“Ref”).

Tabla 3.1. Condiciones de síntesis de **13** ensayadas (A-F)^a vs. Ref.^[259]

	Escala (mmol) ^b	Alc. alílico (mL/mmol) ^c	Tiempo (h)	Rel. p/f ^d
Ref.	110	2	3	n.d. ^e
A	5,4	2	4	60:40
B	5,0	2	24	100:0
C	8,4	1,7	24	92:8
D	10,3	1,5	29	92:8
E	30,6	1,5	28	92:8
F	43,3	1,5	72	97:3

^a En todos los casos la temperatura de reacción fue de 70-80 °C, se utilizaron 0,07 equiv. de BF_3OEt_2 , y la reacción se cortó cuando se observó desaparición de la D-Man por ccd. ^b mmol de D-manosa.

^c Volumen de alcohol alílico/(mmol de D-Man). ^d Relación entre las formas piranósica (p) vs. furanósica (f) de **13**, determinada por integración de los H-1 de las piranósicas (δ 4,92 y 4,71 ppm) y de las furanósicas (δ 5,11 y 5,07 ppm) en el RMN ¹H del producto crudo. ^e Sin datos; el rendimiento reportado es de 80%. n.d.=no determinado.

En primer lugar, para favorecer la conversión al glicósido piranósico **13**, termodinámicamente más estable, en la glicosidación de Fischer se realizó un segundo experimento prolongando el tiempo de reacción a 24 h. En estas condiciones, se observó convergencia total al producto piranósico (Fila B, Tabla 3.1), por lo que se estableció este plazo como tiempo mínimo de reacción.

Luego, a fines de minimizar el uso de alcohol alílico, se evaluó el efecto de reducir su concentración en la mezcla (Filas C y D, Tabla 3.1). Aunque se observó una leve disminución de la proporción piranosa/furanosa (p/f), se decidió continuar con estas

Resultados y discusión

condiciones para el escalado del proceso (Filas E y F, Tabla 3.1), logrando una excelente reproducibilidad y manteniendo una buena conversión hacia la forma piranósica.

Cabe destacar que fue necesario sintetizar alcohol alílico, ya que el reactivo había sido discontinuado debido a restricciones para su importación. Por este motivo, se desarrolló un método de síntesis a partir de glicerol y ácido fórmico, adaptando procedimientos reportados previamente por distintos autores.^[260-262] La reacción rindió el producto deseado con 14 % v/v de agua (determinado por Karl Fischer). Dado que la presencia de agua interfiere en la glicosidación de Fischer, se efectuó un *screening* de agentes desecantes para reducir el contenido de agua del reactivo. Se ensayaron diversos agentes: alúmina, tamices moleculares de 3 Å y sales anhidras de CaSO_4 , Na_2SO_4 y MgSO_4 . Finalmente, se estableció un protocolo de tres pasos: (1) secado sobre MgSO_4 (anh.), (2) filtración del sólido, y (3) almacenamiento sobre tamices moleculares. Este tratamiento permitió reducir el contenido de agua a 1% v/v. El alcohol alílico obtenido mediante este protocolo dio un resultado comparable al del reactivo comercial al ser utilizado en la glicosidación para dar **13**, por lo que permitió cubrir nuestra demanda para los siguientes ensayos.

Una vez definidas las mejores condiciones de obtención del alil manósido **13**, se encaró la optimización del paso de formación del bencilidén acetal (Esquema 3.8). Partiendo de fracciones puras de **13**, se ensayaron cambios en el protocolo de reacción (temperatura, tiempo y equivalentes del acetal) en busca de disminuir la formación del subproducto **14** (Filas A-D, Tabla 3.2). A continuación, se realizaron pruebas para evaluar si era factible eliminar la purificación por columna del intermediario **13**.

En el primer ensayo realizado (Fila A, Tabla 3.2), en la primera hora de reacción ya se evidenciaba la presencia de la mezcla de productos. Como estrategias para desfavorecer la formación de **14**, en los ensayos subsiguientes se disminuyó la temperatura de reacción a 0 °C y se realizó un agregado lento del acetal. En estas condiciones, se evaluó el efecto de la cantidad de equivalentes iniciales de α,α -dimetoxitolueno (Filas B-D, Tabla 3.2) y se encontró que la mejor conversión hacia **7** se daba cuando se utilizaban 1,3 equivalentes (Fila C, Tabla 3.2). Luego, estas condiciones se aplicaron sobre una fracción cruda del paso anterior (Fila E, Tabla 3.2). En este caso, el jarabe de partida no se solubilizó de forma completa en la mezcla de reacción a 0 °C, por lo que fue necesario continuar la reacción a temperatura ambiente. En estas condiciones, **7** se aisló con 38% de rendimiento a partir de D-Man, lo que resultó en una mejora significativa respecto al ensayo inicial (18%). Al aplicar las mismas

condiciones sobre lotes más grandes (Filas F y G, Tabla 3.2) se obtuvieron resultados similares.

Tabla 3.2. Condiciones ensayadas en la optimización de la síntesis de **7^a** vs. Ref.^[259]

Purificación previa de 13	Escala (mmol) ^b	Equiv. acetal	Tiempo (h)	Temp. (°C)	Rel. molar 7:14 ^c	Rend. Paso 2 (%)	Rend. Pasos 1+2 (%)	
Ref.	Si	68,1	1,3	15	t.a.	n.d.	74	60
A	Si	1,9	1,6	26	t.a.	n.d.	50	18
B	Si	0,1	2,7	2,5	0 °C	50:50	n.d. ^d	n.d.
C	Si	1,5	1,3	2	0 °C	n.d.	46	22
D	Si	1,3	1,1	20	0 °C	90:10	38	16
E	No	1,7	1,3	5,5	0 °C a t.a.	65:35	--	38
F	No	30,7	1,3	4	0 °C a t.a.	74:26	--	34
G	No	45,1	1,3	4	0 °C a t.a.	72:28	--	30

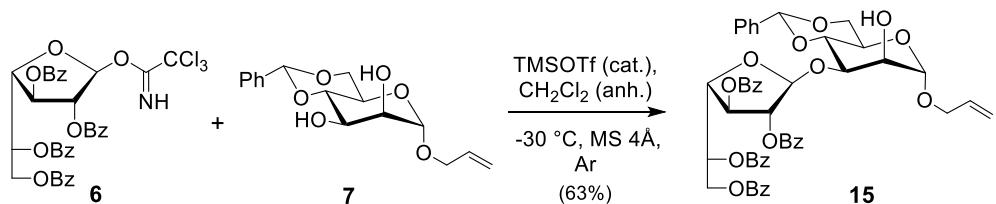
^a En todos los ensayos se utilizaron 0,15 equiv. de ácido (1S)-(+)-10-camforsulfónico y 4,4 mL/(mmol **13**) de acetonitrilo. ^b mmol de **13**. ^c Relación determinada por integración del H-1 de **7** (δ 4,87 ppm) y de los CHPh de los diasterómeros de **14** (δ 5,64 y 5,52 ppm) en el RMN ¹H del producto crudo. ^d El crudo no se pasó por columna. n.d.= no determinado; -- = no corresponde.

Las modificaciones del protocolo de síntesis de **7** a partir de D-manosa rindieron un proceso en el que se disminuyó aproximadamente un 25% el volumen de alcohol alílico utilizado, se eliminó una purificación cromatográfica y se duplicó el rendimiento global de síntesis. El procedimiento optimizado permitió obtener, a partir de D-Man, alil 4,6-O-bencilidén- α -D-manopiranósido (**7**) en una escala de 4,15 g, para ser utilizado en la síntesis de los compuestos **2** y **3**.

3.7. Síntesis del 5-aminopentil α -glicósido de D-Galf- β -(1 \rightarrow 3)-D-Manp (2)

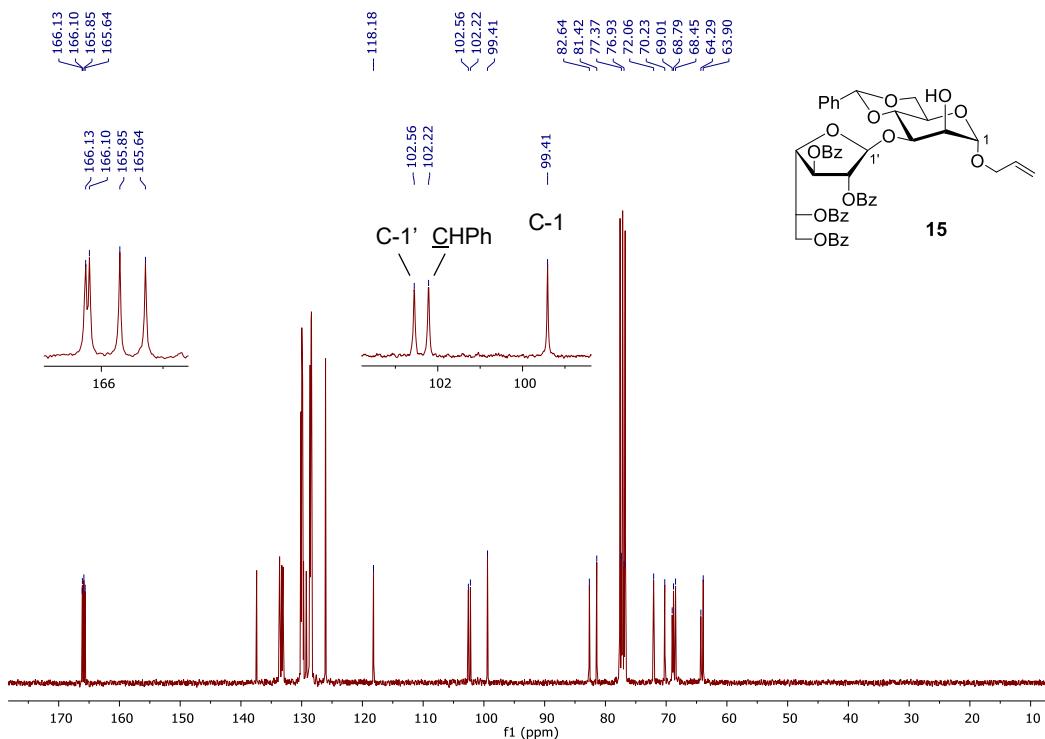
3.7.1. Glicosidación. Obtención de alil 2,3,5,6-tetra-O-benzoíl- β -D-galactofuranosil-(1 \rightarrow 3)-4,6-O-bencilidén- α -D-manopiranósido (15)

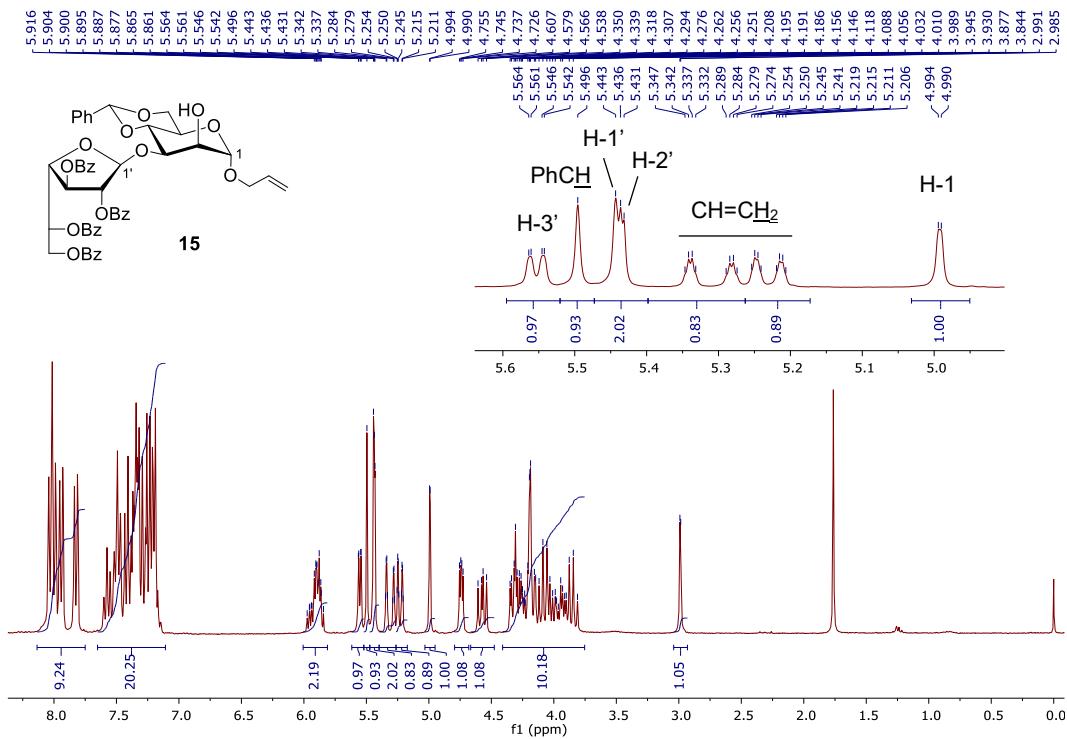
Habiendo obtenido el aceptor de manosilo **7**, se procedió a realizar el acoplamiento con el donador de galactofuranosilo **6** según el procedimiento reportado por Ma Z. et al.^[245] con algunas modificaciones (Esquema 3.9). Si bien el aceptor presenta dos posiciones libres, la glicosidación ocurre preferentemente sobre el OH-3 ecuatorial según reportes previos.^[233,244,263]



Esquema 3.9

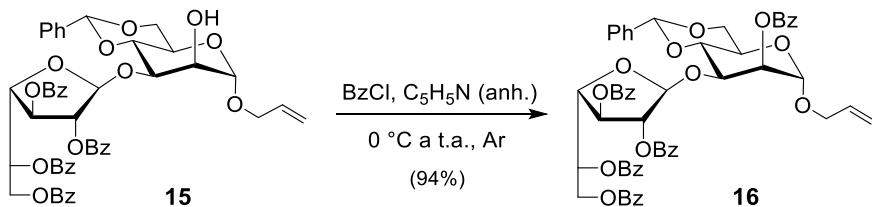
La reacción se completó rápidamente y rindió como único producto un compuesto cuyos datos espectroscópicos fueron coincidentes con los reportados para **15**.^[245] En la zona anomérica del espectro de RMN ^{13}C (Figura 3.10) se observaron señales a δ 102,6 ppm y 99,4 ppm, correspondientes a los centros anoméricos de β -D-Galf y α -D-Manp, respectivamente, y una señal a 102,2 ppm correspondiente al grupo bencilidén. En el espectro de RMN ^1H (Figura 3.11) de **15** la señal del H-1' se identificó como un singulete ancho ($^3J_{1,2} < 1$ Hz) a 5,44 ppm, confirmando la formación del enlace glicosídico β entre las unidades. Por último, la unión regioselectiva de los fragmentos a favor del enlace (1→3) se confirmó por aparición en el espectro ^1H - ^{13}C HMBC de una correlación entre el C-1 de D-Galf y la señal correspondiente al H-3 de D-Manp a δ 4,32 ppm.

Figura 3.10. Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) de **15**.

Figura 3.11. Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) de **15**.

3.7.2. Activación del centro anomérico de 2,3,5,6-tetra-O-benzoíl- β -D-galactofuranosil-(1→3)-4,6-O-bencilidén- α -D-manopiranosa

En vistas de obtener el donor de glicosilo adecuado para la reacción con el amino *linker*, se procedió con la benzoilación del OH-2 de la manosa de **15** para dar el derivado **16** con excelente rendimiento (94%, Esquema 3.10).



Esquema 3.10

Durante la caracterización por RMN, en el espectro protónico de **16** (Figura 3.12) se observó el corrimiento de la resonancia del H-2 en \sim 1,5 ppm hacia campos más bajos (δ 5,65 ppm) respecto de **15**, por efecto desprotectivo del nuevo grupo éster incorporado en esa posición. Asimismo, en el espectro de ^{13}C se registró la aparición de una nueva señal en la zona de carbonilos (entre δ 164 y 166 ppm) asignada al nuevo grupo benzoato.

Resultados y discusión

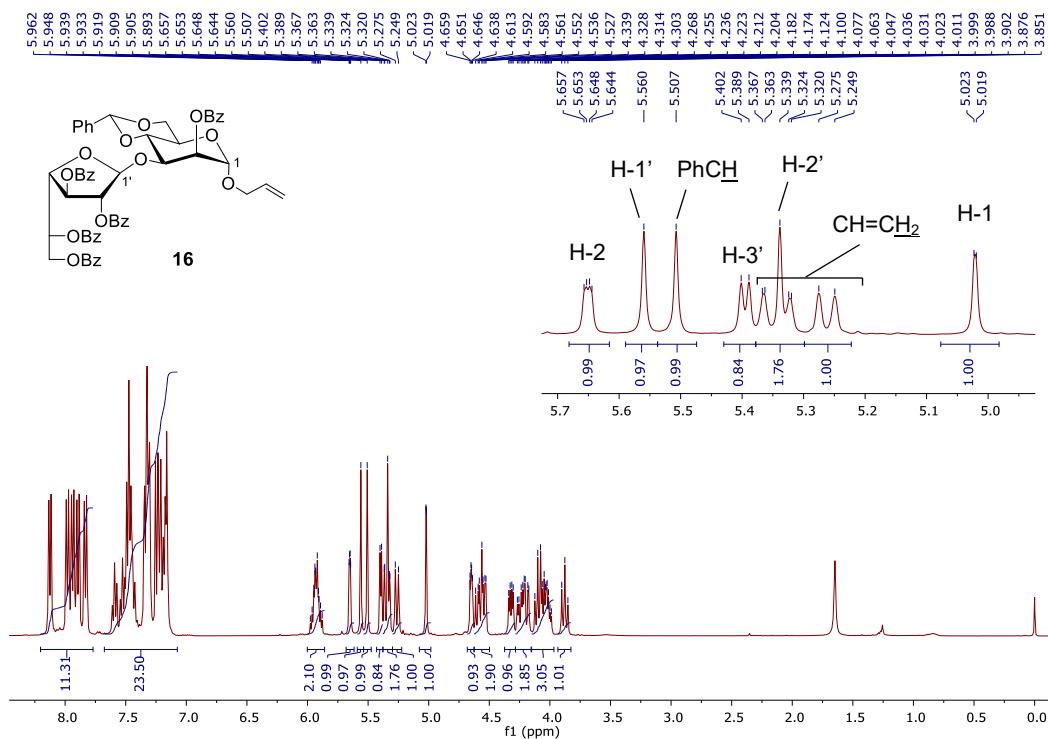
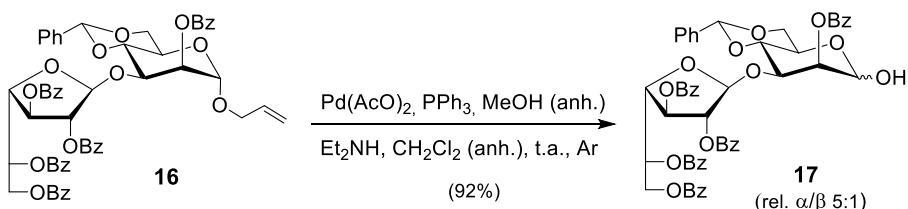


Figura 3.12. Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) de **16**.

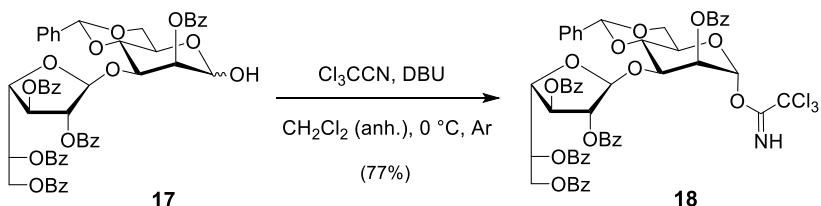
El paso siguiente era la desprotección del centro anomérico por remoción del grupo alilo. El método más extensamente reportado para efectuar esta transformación es la reacción con PdCl_2 en ácido acético acuoso y en presencia de acetato de sodio.^[259,264–266] Sin embargo, en trabajos previos realizados en nuestro laboratorio, cuando estas condiciones se aplicaron sobre alil glicósidos de estructura similar a **16**, la reacción rindió cantidades apreciables (hasta un 50%) de un subproducto identificado como el acetonil glicósido. Esta reacción secundaria, conocida como oxidación de Wacker, ya había sido observada por otros autores,^[264,267] y está asociada a la presencia de O_2 en el medio de reacción. Los intentos de extremar los cuidados para mantener inerte la atmósfera de reacción dieron resultados similares, por lo que, para desproteger a **16**, se decidió aplicar un método alternativo empleando tetrakis(trifenilfosfina)paladio(0) como catalizador (Esquema 3.11).^[267–269] Esta reacción rindió el hemiacetal **17** con 92% de rendimiento, sin indicios de formación del acetonil glicósido como subproducto.



Esquema 3.11

El espectro RMN ^1H del producto evidenció la obtención de una mezcla de anómeros. El H-1 del compuesto mayoritario resonaba a campos más bajos (δ 5,38 ppm) que el H-1 del minoritario (5,04 ppm), lo que era consistente con la obtención de una mezcla de hemiacetales en relación $\alpha/\beta \sim 5:1$.^[270] Asimismo, se observó la desaparición de las señales asociadas al grupo alilo y la aparición de una señal a δ 3,5 ppm correspondiente al protón del OH anomérico, confirmando la desprotección del C-1 de **16**.

Habiendo aislado el disacárido **17**, la posición anomérica se activó por tratamiento con tricloroacetonitrilo en presencia de DBU para dar **18** con 77% de rendimiento (Esquema 3.12).

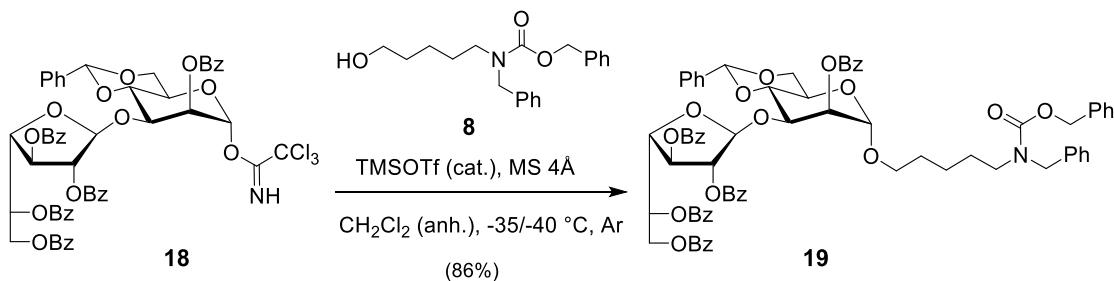


Esquema 3.12

El análisis por RMN ^1H confirmó la obtención del producto deseado **18** por presencia de un singulete a δ 8,77 ppm, señal diagnóstica correspondiente al NH del tricloroacetimidato. Asimismo, a δ 6,42 ppm se identificó la resonancia del H-1 como un doblete de $^3J_{1,2} = 1,4$ Hz, corrido ~ 1 ppm hacia campos más bajos respecto del H-1 del hemiacetal **17**, por efecto desprotectivo del nuevo sustituyente anomérico.

3.7.3. Glicosidación. Obtención de *N*-(bencil)benciloxicarbonil-5-aminopentil 2,3,5,6-tetra-O-benzoíl- β -D-galactofuranosil-(1 \rightarrow 3)-4,6-O-bencildidén-2-O-benzoíl- α -D-manopiranósido (19)

Una vez sintetizado el donador de manosilo **18**, se procedió con su acoplamiento al amino *linker* **8**. Para ello se eligieron las condiciones utilizadas previamente en la síntesis del 5-aminopentil glicosídeo **11**. Dado que se trataba de una reacción rápida se decidió disminuir la temperatura a -40 °C para evitar reacciones secundarias indeseadas.



Esquema 3.13

Una vez iniciada la reacción, a los 5 minutos se observó por ccd la conversión del compuesto de partida a una mancha principal, que se aisló por cromatografía en columna (tolueno/AcOEt) y se caracterizó como el glicósido **19** deseado (Esquema 3.13). En los espectros de RMN ^1H (Figura 3.13) y ^{13}C (Figura 3.14) del producto, la unión de los fragmentos se evidenció por la presencia de las señales del amino *linker*, distorsionadas por la presencia de rotámeros, y en el corrimiento $>1,5$ ppm de la resonancia del H-1 hacia campos más altos ($\delta \sim 4,92$ ppm) respecto del imidato **18**.

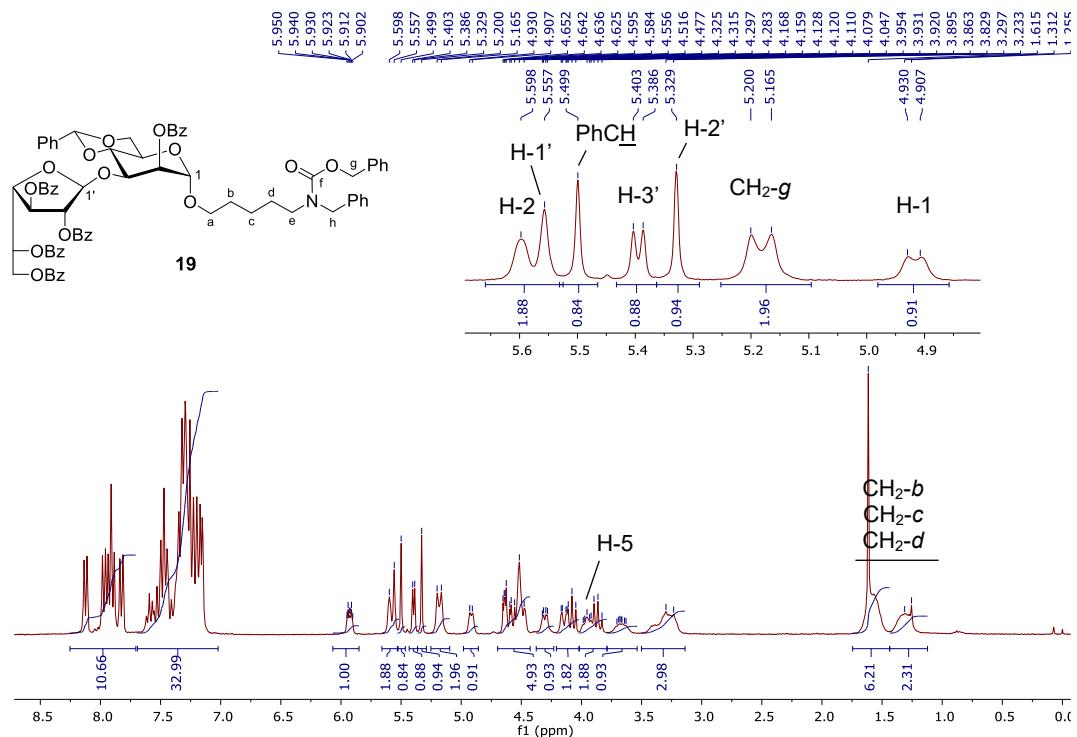


Figura 3.13. Espectro RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) de **19**.

Para verificar la estereoquímica del nuevo enlace glicosídico se realizó un experimento de RMN ^{13}C acoplado a ^1H . El C-1 se identificó como un doblete de constante de acoplamiento $^1\text{J}_{\text{C},\text{H}}$ de 171 Hz, característica de un enlace α -1,2-*trans*.^[271,272] Este resultado confirmó el curso estereoselectivo de la reacción, favorecida por la participación del grupo éster en C-2 de **18**.

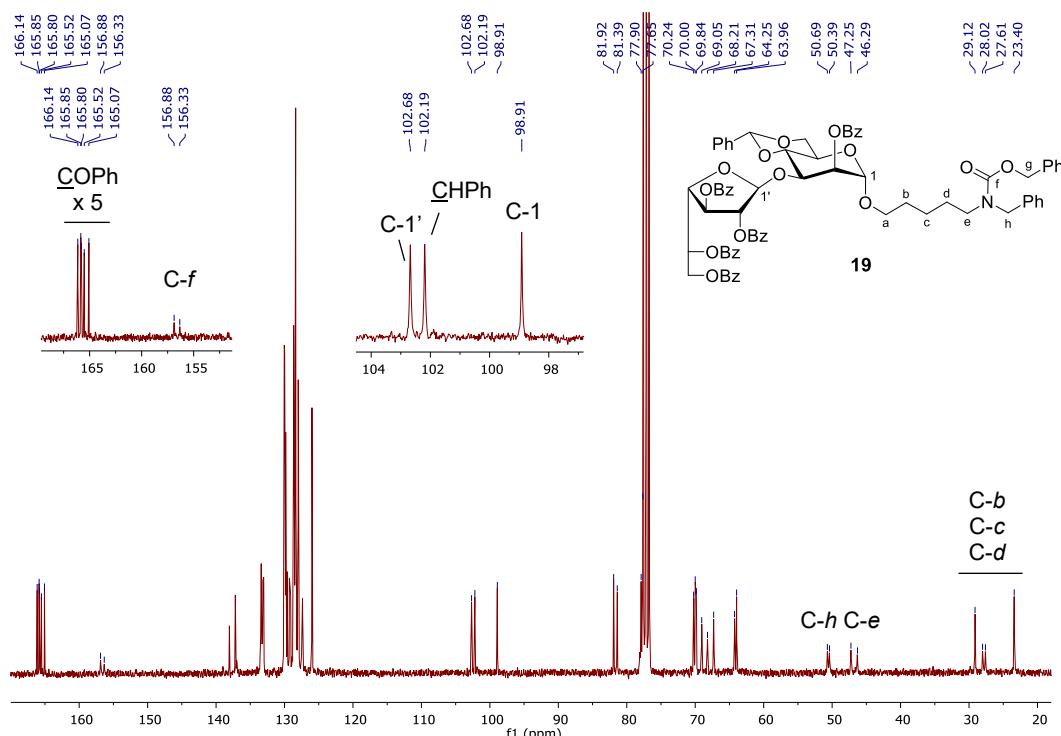


Figura 3.14. Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) de **19**.

Habiendo confirmado la obtención de **19**, la reacción se escaló 26 veces para obtener más masa del glicósido y continuar con la síntesis de **2**. El análisis por RMN ^1H del producto aislado por cromatografía en columna (tolueno/AcOEt) reveló que, a diferencia del ensayo anterior, la reacción había rendido una mezcla compuesta por el producto deseado y un subproducto en proporción $\sim 7:3$. La purificación cromatográfica utilizando un sistema de solventes de elución alternativo (hexano/AcOEt) permitió aislar algunos miligramos del subproducto y posibilitó su caracterización por RMN. Cabe destacar que, dado que los compuestos tenían polaridades similares, resultó complicado aislar fracciones puras de cada componente de la mezcla.

El espectro de RMN ^{13}C del subproducto, en adelante **20**, (Figura 3.15) mostró similitudes con el espectro de **19**, esto es, desplazamientos químicos comparables en la zona anomérica y presencia de las señales del amino *linker*, lo que sugería que se trataba de una molécula de estructura similar. Sin embargo, en la zona de carbonilos se observaron cuatro señales en lugar de las cinco correspondientes a los benzoílos de **19**, lo cual indicaba la pérdida de uno de estos grupos protectores.

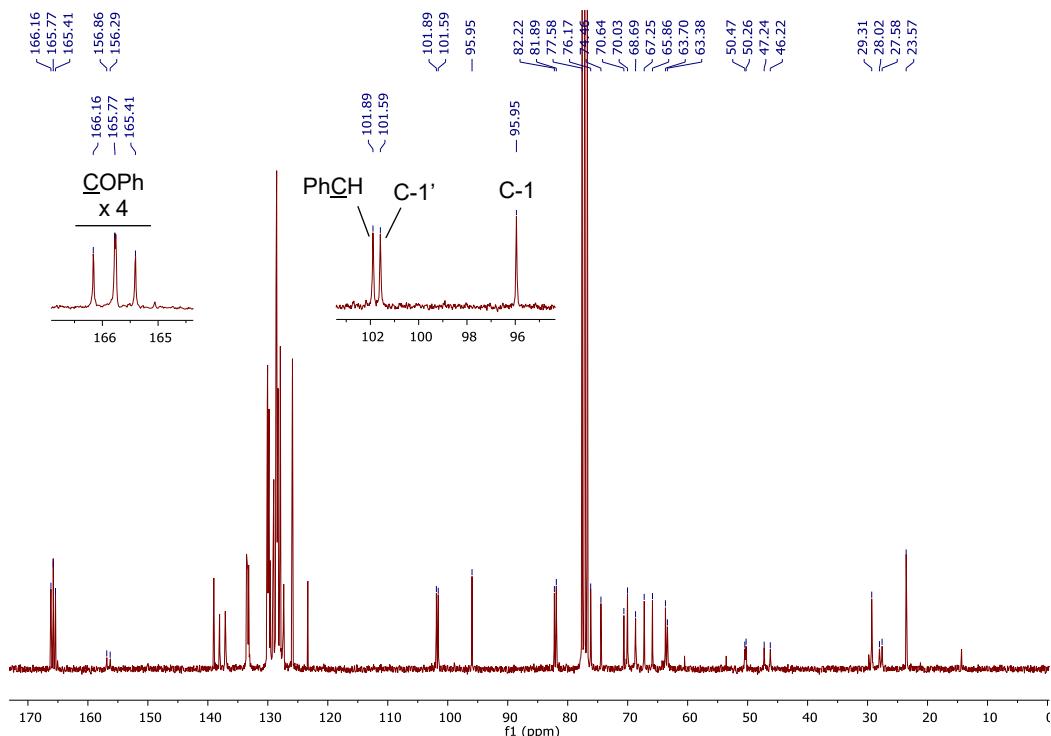
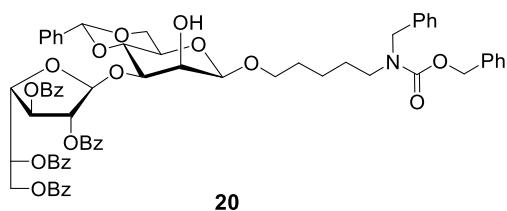


Figura 3.15. Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) del subproducto **20**.

Al comparar los espectros protónicos de **19** y **20** (Figura 3.13 y Figura 3.16, respectivamente), se registraron dos diferencias importantes. En primer lugar, la resonancia del H-2 de **20** se desplazó ~ 1 ppm hacia campos más altos, lo cual apuntaba a la ausencia del grupo protector en esta posición. En segundo lugar, el desplazamiento químico del H-5 de **20** se registró a δ 3,44 ppm, valor característico de β -manósidos según las observaciones de D. Crich y S. Sun.^[271] En este trabajo, los autores reportaron que, así como en el RMN ^1H de **20**, la resonancia del H-5 de los 4,6-O-bencilidén β -manósidos aparece típicamente como un multiplete aislado del resto de las señales sacáridicas, entre δ 3,3-3,4 ppm, mientras que en los anómeros α el H-5 aparece a campos más bajos (δ 3,6-3,9 ppm), tal como se observa en el RMN ^1H de **19**.

A partir de la información espectroscópica, se dedujo que el subproducto de glicosidación era el *N*-(bencil)benciloxicarbonil-5-aminopentil 2,3,5,6-tetra-O-benzoíl- β -D-galactofuranosil-(1 \rightarrow 3)-4,6-O-bencilidén- β -D-manopiranósido (**20**), esto es, el análogo de **19** de configuración β (1,2-*cis*) con OH-2 libre.



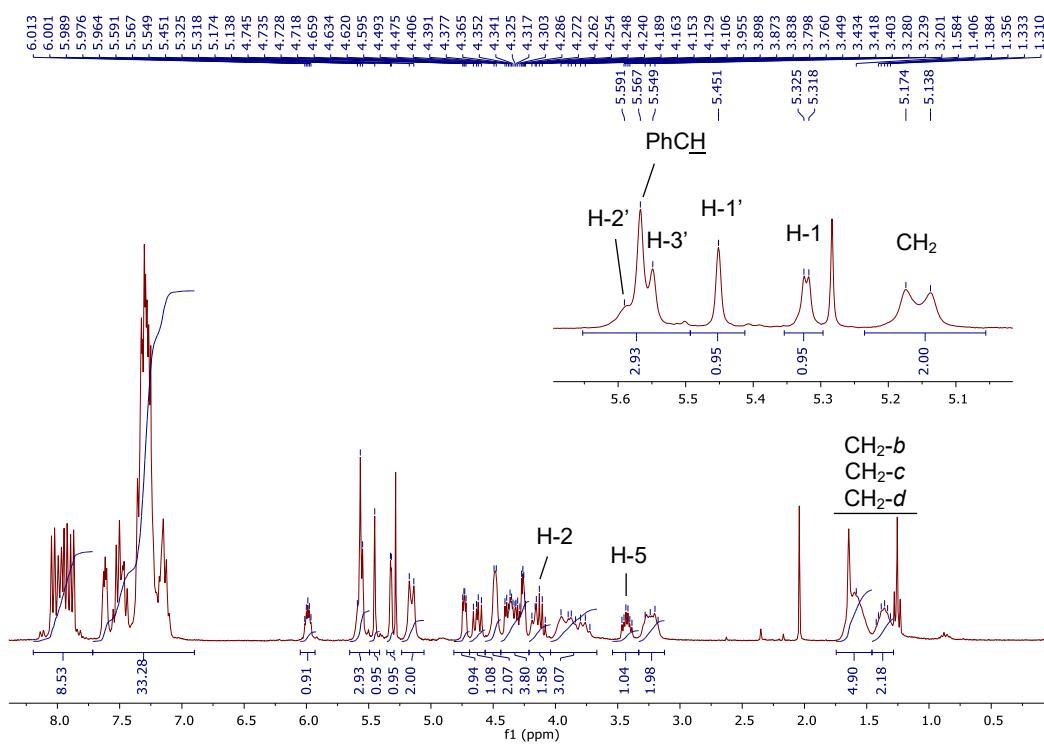


Figura 3.16. Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) del subproducto **20**.

Si bien la síntesis de manósidos 1,2-*cis* es un desafío, diversos autores demostraron que los β -manósidos pueden obtenerse utilizando donores con grupo 4,6-O-bencilidén,^[271,273-275] incluso cuando se emplean glicosil tricloroacetimidatos y TMSOTf como promotor.^[276] Sin embargo, en estas condiciones la presencia de un grupo éster en C-2 resulta dominante, y favorece la formación de los análogos 1,2-*trans*.^[81] Teniendo en cuenta estos antecedentes, se concluyó que la obtención inesperada del β -manósido **20** fue consecuencia de la hidrólisis del grupo participante del imidato **18** en el medio de reacción, previo a su acoplamiento al aceptor de glicosilo.

Dado que, en ausencia del grupo participante, la presencia del bencilidén en el donor **18** estaba favoreciendo el curso de la glicosidación hacia el glicósido 1,2-*cis* no deseado, se ensayaron estrategias alternativas de protección de la unidad de manosa. Entonces, se sintetizaron imidatos análogos a **18** donde las posiciones 2, 4 y 6 estaban sustituidas por grupos acetato o benzoato. Sin embargo, al efectuar el acoplamiento de estos donores con el amino *linker* **8**, el producto de glicosidación no pudo ser aislado con buen rendimiento, observándose descomposición, ya sea en el medio de reacción (cuando se utilizó el análogo benzoilado) o durante la purificación cromatográfica (cuando se empleó el derivado acetilado). Ante estos resultados, se optó por dirigir los esfuerzos a buscar condiciones de glicosidación que evitaran la hidrólisis del benzoato en C-2 de **18**.

Resultados y discusión

Tomando como punto de partida el protocolo aplicado inicialmente (Esquema 3.13), se estudió la influencia de distintos parámetros de reacción (ácido de Lewis, equivalentes, temperatura, uso de tamices moleculares) sobre la composición del crudo de la glicosidación (determinado por RMN ^1H). Las condiciones ensayadas se detallan en la Tabla 3.3. Las filas A y B corresponden a los ensayos descriptos al inicio de esta sección.

Tabla 3.3. Ensayos de glicosidación de **18** con el amino *linker* **8**.^a

Ref.	Escala (μmol) ^b	Promotor	Equiv. Promotor	Temp. ($^{\circ}\text{C}$)	Rel. molar 19:20 ^c
A	46	TMSOTf	0,20	-35/-40	100:0
B	1195	TMSOTf	0,15	-35/-40	70:30
C ^d	47	TMSOTf	0,15	-35/-40	100:0 ^e
D	320	TMSOTf	0,10	-35/-40	87:13
E	164	TMSOTf	0,25	-35/-40	100:0 ^f
F	51	BF_3OEt_2	0,12+0,06+0,06	-35/-40	85:15
G	133	TMSOTf	0,05 + 0,05	-65/-70	n.d. ^g
H	48	TMSOTf	0,20	-35/-40	100:0

^a En todos los casos el volumen de solvente fue de 65 mL/(mmol de **18**) y el tiempo de reacción de 20 min luego de cada agregado de ácido de Lewis. ^b μmol de **18**. ^c Relación determinada por integración del H-1 de **19** (δ 4,92 ppm) y de una señal diagnóstica de **20** (δ 4,73 ppm) en el RMN ^1H del producto crudo. ^d Realizado en ausencia de tamices moleculares. ^e Se observó producto de hidrólisis del imidato (**17**) en rel. ~1:1 (ccd). ^f Se obtuvo un subproducto sacárido no identificado en rel. ~8:2 (RMN ^1H). ^g Mezcla compleja. n.d.=no determinado.

Dado que está reportada la hidrólisis de ésteres catalizada por tamices moleculares,^[277,278] en primer lugar, se evaluó la influencia de este agente desecante repitiendo la reacción en ausencia de tamices. En estas condiciones, no se observó formación del subproducto **20**, pero se obtuvo una cantidad significativa del producto de hidrólisis del imidato **18** (hemiacetal **17**), en una relación aproximada **17/19** de 1:1. Se concluyó, entonces, que los tamices eran necesarios para evitar la degradación del donor (Fila C, Tabla 3.3).

A continuación, se estudió la influencia de los equivalentes y el tipo de ácido catalizador. En primer lugar, se realizaron ensayos a -35/-40 $^{\circ}\text{C}$ empleando TMSOTf en proporciones distintas a las utilizadas previamente (Filas D y E, Tabla 3.3). Los resultados indicaron que alrededor de 0,2 equivalentes de TMSOTf favorecían la formación del producto **19** (Fila A, Tabla 3.3). No obstante, la reacción mostró una marcada sensibilidad a pequeñas variaciones de este parámetro, evidenciando que la estrategia de reacción era poco robusta. Por este motivo, se evaluó el uso de BF_3OEt_2 como ácido de Lewis alternativo (Fila F, Tabla 3.3). En este caso, la reacción fue muy lenta y requirió agregados sucesivos de promotor hasta observar avance por ccd. Asimismo, el ensayo rindió un

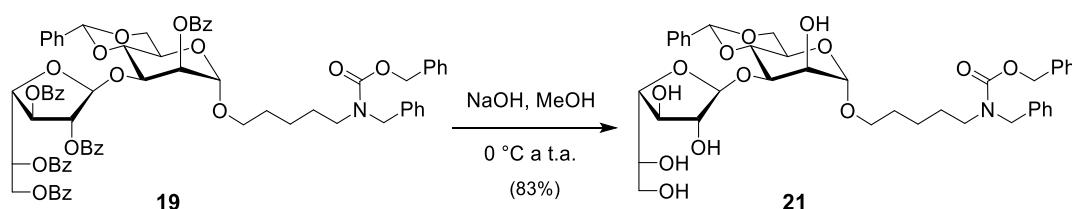
crudo con una elevada proporción de subproducto (**19/20**, 85:15), por lo que se descartó el reemplazo del ácido de Lewis.

Alternativamente, se realizó una prueba con TMSOTf a menor temperatura (entre -65 y -70 °C) para estudiar si una disminución de la velocidad de la reacción permitía controlar la formación de **20**. Sin embargo, esta condición no mejoró la selectividad y dio lugar a una mezcla compleja de productos (Fila G, Tabla 3.3), por lo que también se descartó.

En base a los resultados obtenidos, se establecieron como condiciones óptimas de glicosidación el uso de 0,2 equivalentes de TMSOTf, la presencia de tamices moleculares, y una temperatura entre -35 y -40°C. Un nuevo experimento bajo estas condiciones (Fila H, Tabla 3.3) nuestras observaciones y permitió obtener como único producto el α -manósido **19**, precursor protegido del glicósido **2** deseado.

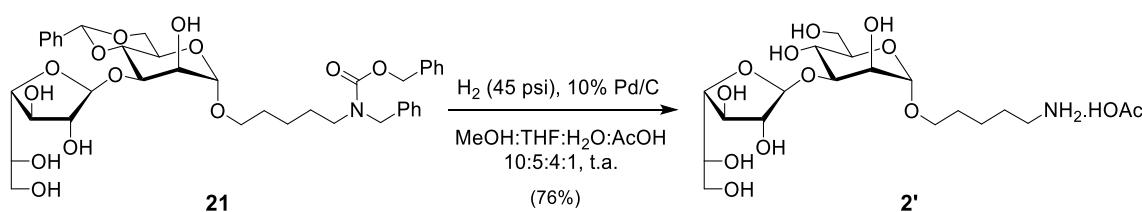
3.7.4. Desprotección. Obtención de 5-aminopentil β -D-galactofuranosil-(1→3)- α -D-manopiranósido (2)

Habiendo obtenido el glicósido **19**, el paso siguiente era la liberación de las posiciones protegidas de la molécula.



Esquema 3.14

En primer lugar, el compuesto se trató con hidróxido de sodio en metanol para remover los grupos ésteres (Esquema 3.14). El análisis por RMN del producto aislado resultó consistente con la obtención de **21**. En particular, en el espectro de RMN de ^{13}C se observó la desaparición de las señales de carbonilo asociadas a los benzoílos, confirmando la hidrólisis total de estos grupos protectores.



Esquema 3.15

Por último, el compuesto **21** se disolvió en una mezcla de MeOH/THF/H₂O/AcOH y se sometió a una hidrogenólisis a alta presión, para dar el acetato del compuesto **2** (**2'**) con 76% de rendimiento (Esquema 3.15). En los espectros de RMN del producto (Figura

Resultados y discusión

3.17 y Figura 3.18), se registró la desaparición de las señales correspondientes al grupo bencilidén protector de la unidad de D-Manp, así como de los grupos bencilo y carboxibencilo protectores del amino, demostrando que la reacción había sido completa. Asimismo, en la zona alifática de los espectros se identificaron señales a δ 1,91 ppm (RMN ^1H) y δ 24,0 ppm (RMN ^{13}C), características del metilo del grupo acetato, lo que confirmó que el compuesto aislado correspondía al acetato del producto deseado **2**, tal como se había observado durante la síntesis de **1**.

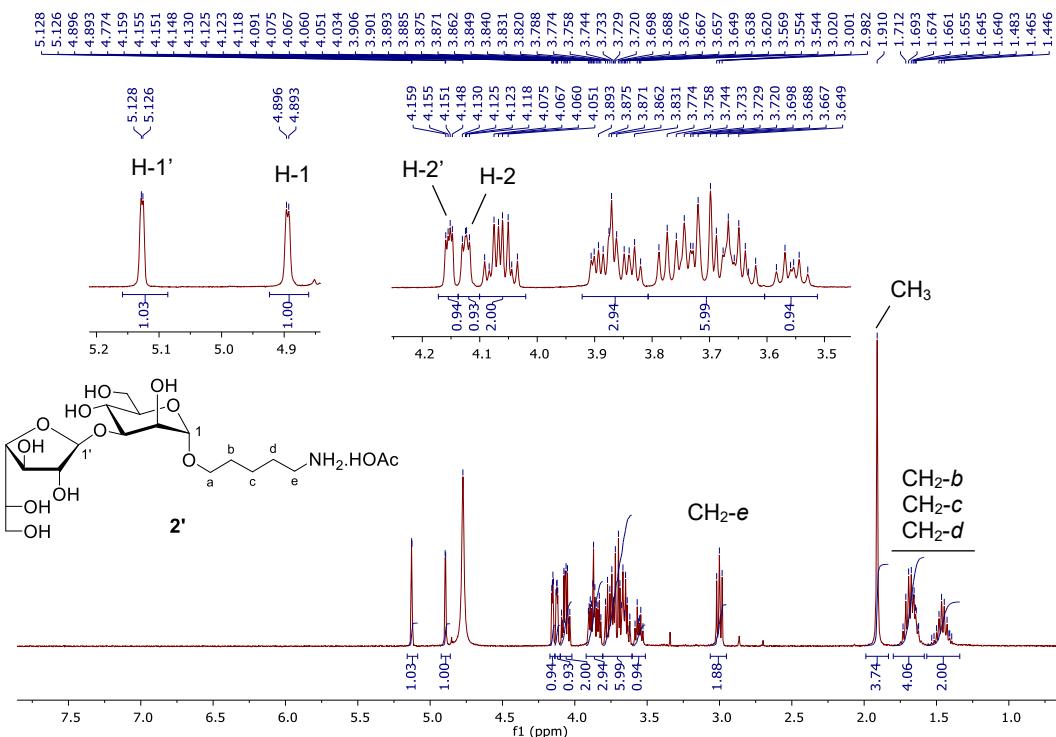


Figura 3.17. Espectro de RMN ^1H (400 MHz, D_2O) de **2'**.

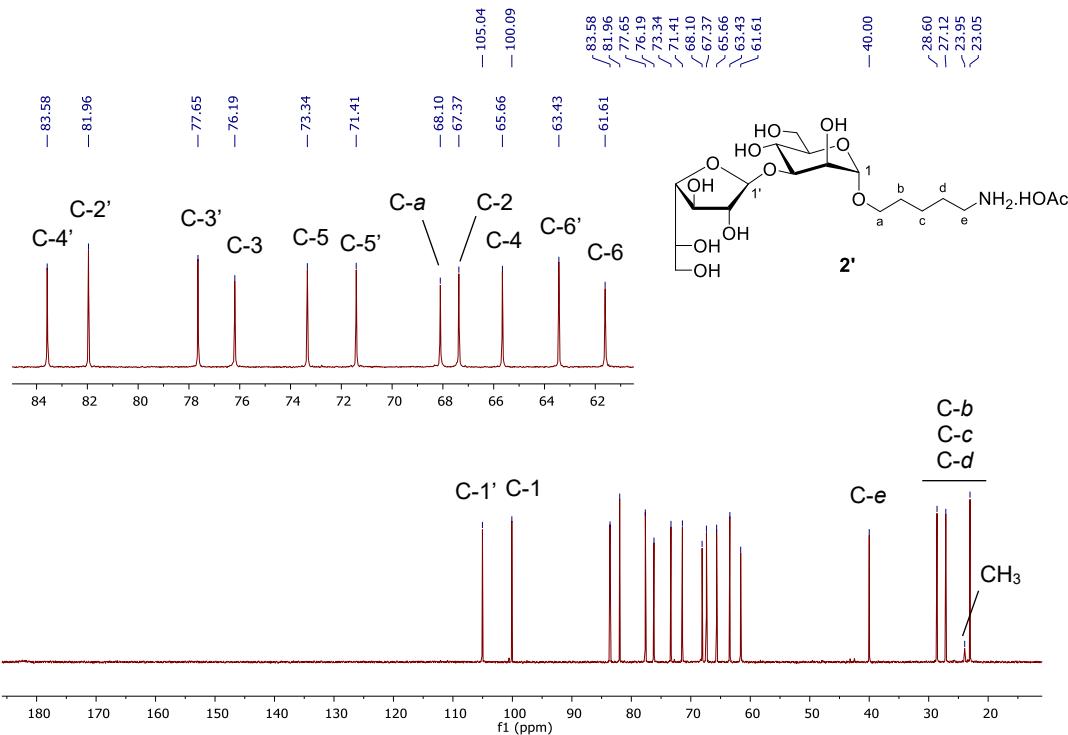


Figura 3.18. Espectro de RMN ^{13}C (101 MHz, D_2O) de **2'**.

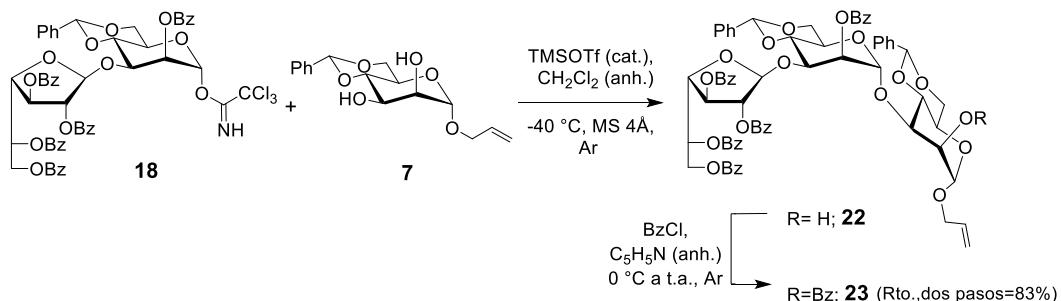
De esta forma, se concluyó la síntesis y caracterización del disacárido **2**. El paso clave y más desafiante de esta ruta sintética fue la glicosidación entre el imidato de D-Galf- β -(1 \rightarrow 3)-D-Manp (**18**) y el amino *linker* **8**, en el cual se registró la formación de un subproducto como consecuencia de la hidrólisis del benzoílo en C-2 de **18**. Mediante la aplicación de distintas modificaciones al protocolo de glicosidación, se identificaron aquellas condiciones que permitieron obtener el disacárido α deseado como único producto.

3.8. Síntesis del 5-aminopentil α -glicósido de D-Galf- β -(1 \rightarrow 3)-D-Manp- α -(1 \rightarrow 3)-D-Manp (**3**)

3.8.1. Glicosidación. Obtención de alil 2,3,5,6-tetra-*O*-benzoíl- β -D-galactofuranosil-(1 \rightarrow 3)-4,6-*O*-bencilidén-2-*O*-benzoíl- α -D-manopiranósido-(1 \rightarrow 3)-4,6-*O*-bencilidén-2-*O*-benzoíl- α -D-manopiranósido (**23**)

Para obtener el esqueleto sacárido del compuesto **3**, era necesario acoplar el imidato de β -D-Galf-(1 \rightarrow 3)-D-Manp **18** con el alil manósido **7**. La síntesis de ambos fragmentos fue descripta anteriormente para la obtención del disacárido **2**.

La glicosidación de **7** con **18** se llevó a cabo utilizando TMSOTf como promotor y diclorometano como solvente (Esquema 3.16). El análisis por RMN del producto crudo de la reacción reveló que el compuesto mayoritario ($> 75\%$) era el trisacárido deseado **22**.



Esquema 3.16

En la zona anomérica del espectro de ^{13}C (Figura 3.19) se registró la señal característica del C-1 de β -galactofuranosa a δ 102,8 ppm, junto con las resonancias anoméricas de los dos residuos de α -D-Man a 99,8 (C-1') y 99,7 (C-1) ppm, confirmando la incorporación del nuevo residuo de α -D-Man a la molécula. En esa misma región se identificaron las señales correspondientes a los C acetálicos de los grupos bencilidén protectores, a δ 101,9 y 101,3 ppm. En el espectro ^1H - ^{13}C HMBC de **22** se observó una correlación entre el C-3 del residuo de manosa terminal (δ 73,8 ppm) y el H-1 de la manosa interna (δ 5,52 ppm), consistente con la formación de la unión glicosídica (1 \rightarrow 3) entre residuos. Asimismo, en el espectro de ^{13}C se observaron cinco señales correspondientes a los grupos benzoilo de **22**, lo que indicó que estos grupos fueron estables a las condiciones de reacción utilizadas.

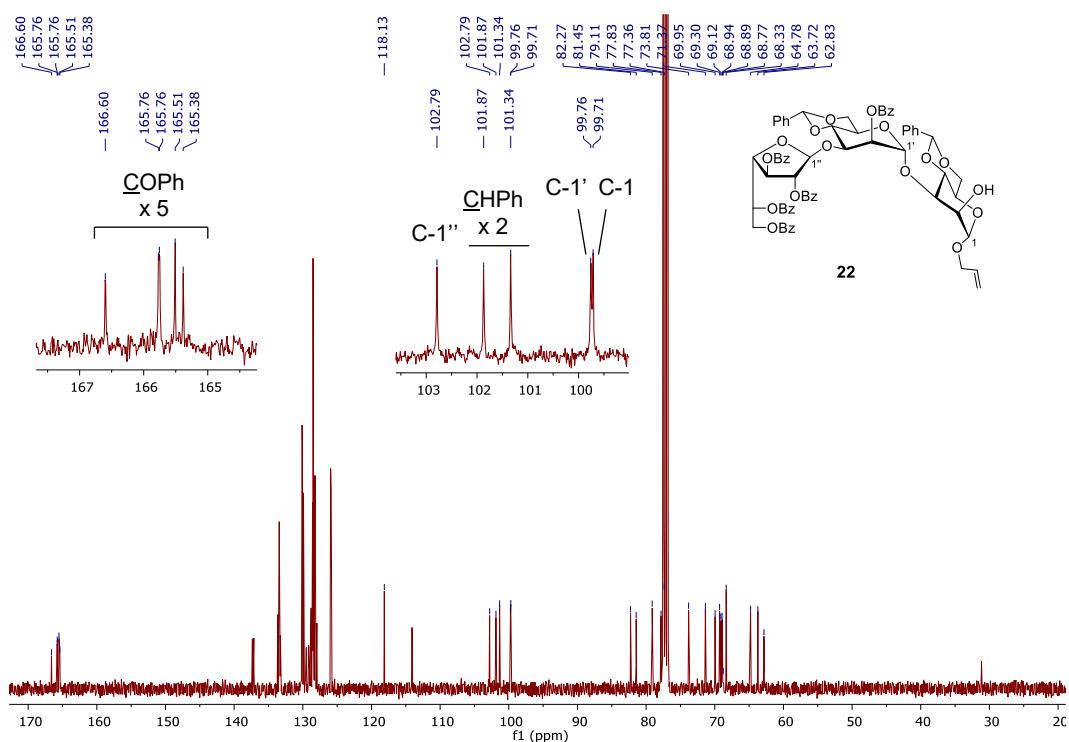


Figura 3.19. Espectro de RMN ^{13}C (101 MHz, CDCl_3) de **22**.

Asimismo, la formación de **22** se evidenció en el espectro protónico (Figura 3.20), donde aparecieron las resonancias características del sustituyente alilo del extremo reductor, una nueva señal correspondiente al H acetálico del grupo bencilidén, y una resonancia a δ 3,47 ppm correspondiente al OH en C-2 presente en el residuo de D-Man incorporado en la reacción.

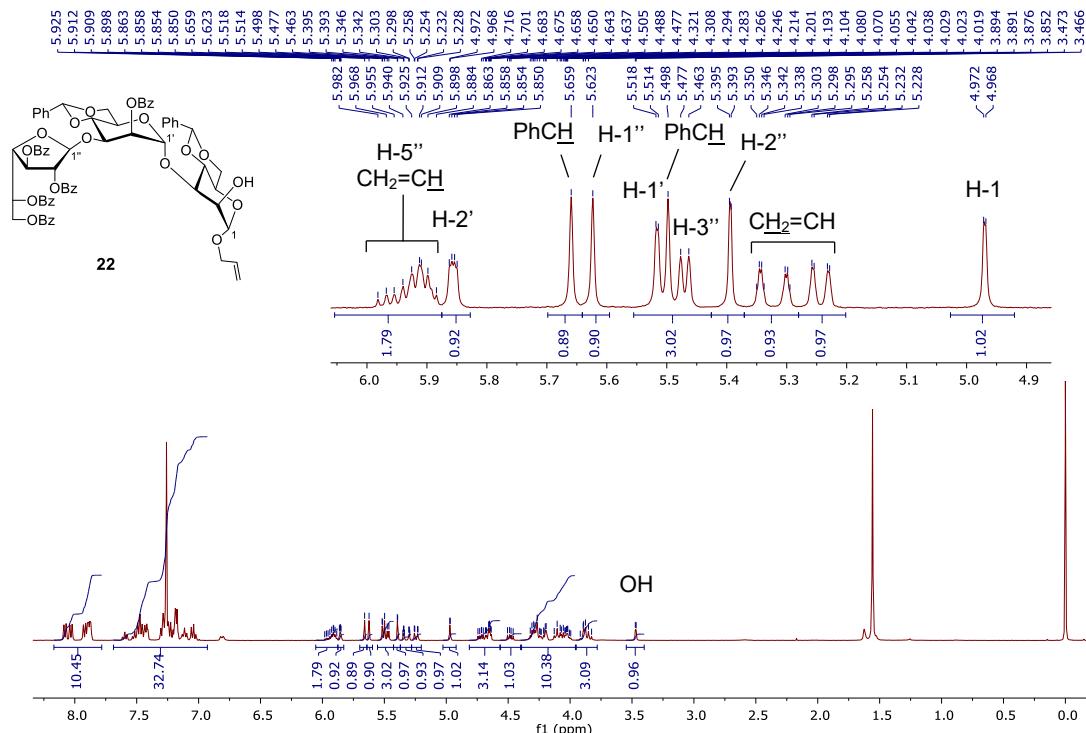


Figura 3.20. Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) de **22**.

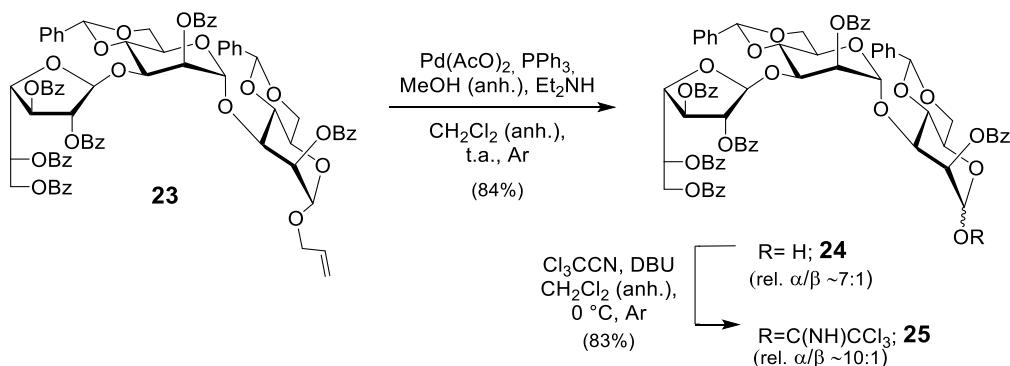
Previo a la activación del centro anomérico del trisacárido obtenido para introducir el amino *linker* **8**, era necesario proteger el OH libre de la molécula. Es por esto que el producto crudo de la glicosidación se trató con cloruro de benzoilo para dar **23** con excelente rendimiento (83% a partir de **18**, Esquema 3.16).

En el espectro de RMN ^1H del producto se registró la desaparición de la señal a δ 3,47 ppm correspondiente al OH en C-2 de **22**, y un corrimiento >1 ppm de la señal del H-2 hacia campos más bajos. Esta información, junto con la aparición de una nueva señal de carbonilo en el espectro de RMN ^{13}C , confirmó la incorporación del grupo benzoilo en la posición 2 de la unidad de α -D-Man terminal.

3.8.2. Activación del centro anomérico de 2,3,5,6-tetra-O-benzoíl- β -D-galactofuranosil-(1 \rightarrow 3)-4,6-O-bencilidén-2-O-benzoíl- α -D-manopiranósil-(1 \rightarrow 3)-4,6-O-bencilidén-2-O-benzoíl- α -D-manopiranosa

Para la activación del centro anomérico del nuevo trisacárido **23** se procedió con la remoción del grupo alilo. Por tratamiento con tetrakis(trifenilfosfina)paladio(0) y dietilamina

y posterior purificación del crudo obtenido por columna cromatográfica, se obtuvo la mezcla de hemiacetales **24** con muy buen rendimiento (84%, Esquema 3.17).



Esquema 3.17

El espectro RMN ¹H del producto evidenció la formación de la mezcla de anómeros. El H-1 del compuesto mayoritario resonaba a campos más bajos (δ 5,4 ppm) que el H-1 del minoritario (~5 ppm), lo que era consistente con la obtención de una mezcla de hemiacetales $\alpha/\beta \sim 7:1$.^[270] Ese resultado coincide con lo esperado, ya que el compuesto de configuración 1,2-*trans* es el favorecido por efecto anomérico.

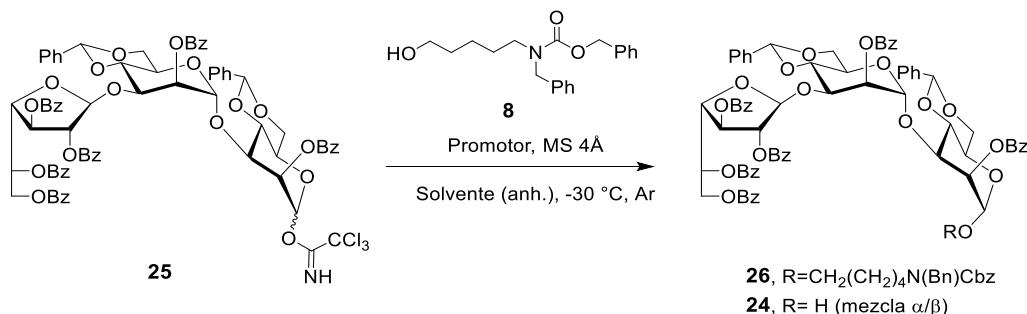
Luego, el trisacárido **24** con el extremo reductor libre, se activó con tricloroacetonitrilo y DBU (Esquema 3.17). El espectro de RMN ¹H del producto aislado mostró la señal característica del grupo NH del tricloroacetimidato a δ 8,82 ppm, junto con la señal del H-1 que aparecía a δ 6,46 ppm, por efecto desprotector del grupo imidato unido en esa posición. Estas observaciones confirmaron la obtención del tricloroacetimidato **25**, que se aisló con 83% de rendimiento.

3.8.3. Glicosidación. Obtención de *N*-(bencil)benciloxicarbonil-5-aminopentil 2,3,5,6-tetra-O-benzoíl- β -D-galactofuranosil-(1 \rightarrow 3)-4,6-O-bencilidén-2-O-benzoíl- α -D-manopiranosil-(1 \rightarrow 3)-4,6-O-bencilidén-2-O-benzoíl- α -D-manopiranósido (26)

Habiendo aislado el donor de manosilo **25**, se encaró la glicosidación con el amino linker **8** utilizando las mejores condiciones encontradas para la síntesis del 5-aminopentil glicósido **19** (Fila H, Tabla 3.3, Página 78). Entonces, se realizó un ensayo en diclorometano anhídrico con 0,2 equivalentes de TMSOTf que permitió obtener el trisacárido deseado **26** con un rendimiento del 69% (Fila A, Tabla 3.4). Ante este resultado, la reacción se escaló a 0,4 mmol de imidato **25** (2,5 veces), pero el análisis por RMN ¹H del producto crudo evidenció la hidrólisis de gran parte del imidato de partida, dando un 70% del hemiacetal **24** (Fila B, Tabla 3.4).

Con el fin de encontrar condiciones de glicosidación que permitieran obtener el producto deseado con buen rendimiento, se estudió esta reacción variando el solvente junto con el tipo y equivalentes del agente promotor (Tabla 3.4).

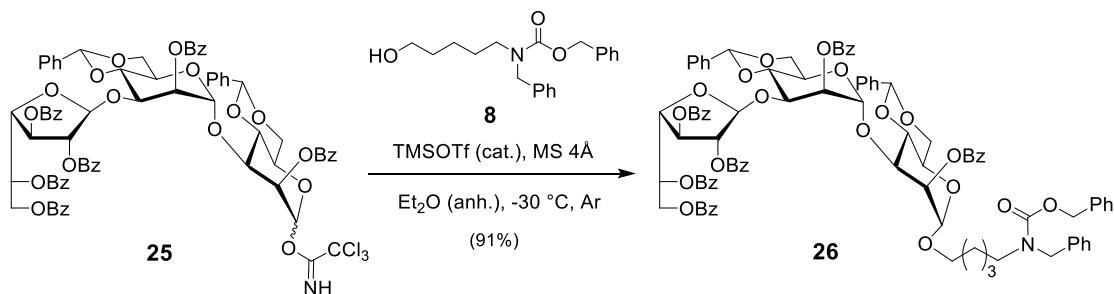
Tabla 3.4. Ensayos de glicosidación de **25** con el amino *linker* **8**.^a



Ref.	Escala (μmol) ^b	Solvente	Promotor	Equiv. Promotor	Rel. molar 26:24 ^c	Rend. (%)
A	138	CH ₂ Cl ₂	TMSOTf	0,20	100:0	69
B	400	CH ₂ Cl ₂	TMSOTf	0,20	29:71	18
C	53	CH ₂ Cl ₂	TMSOTf	0,20	24 may.	--
D	53	CH ₂ Cl ₂	BF ₃ ·OEt ₂	0,16+0,08+0,08	100:0 ^d	--
E	37	Et ₂ O	TMSOTf	0,25	100:0	59
F	448	Et ₂ O	TMSOTf	0,20	100:0	91

^a En todos los casos el volumen de solvente fue de 60 mL/(mmol de **25**), y el tiempo de reacción fue de 15 min luego de cada agregado de ácido de Lewis. ^b μmol de **25**. ^c Relación determinada por integración de las señales de H-1 de **26** (δ 4,93 ppm) y de H-2α y H-1β de **24** (δ 5,61 y 5,02 ppm) en el RMN ¹H del producto crudo. ^d Se observa un subproducto sacarídico no identificado en relación 0,6:1 (RMN ¹H) respecto de **26**.

Para evitar la hidrólisis del imidato de partida, se realizó un nuevo experimento extremando las medidas para disminuir el contenido de agua de los reactivos, pero aún así se obtuvo **24** como producto mayoritario (Fila C, Tabla 3.4). El uso de BF₃·OEt₂ como promotor tampoco resultó adecuado, ya que se detectó por RMN la presencia de un subproducto sacarídico desconocido (Fila D, Tabla 3.4). Finalmente, al emplear éter etílico anhidro como solvente se obtuvo el glicósido **26** con 59% de rendimiento, sin evidencias de hidrólisis del imidato de partida (Fila E, Tabla 3.4). La repetición de este ensayo a mayor escala (12x) confirmó la eficacia de las condiciones, permitiendo aislar **26** con un 91% de rendimiento (Fila F, Tabla 3.4). De esta manera, el estudio realizado condujo a un protocolo de síntesis de **26** más eficiente y reproducible (Esquema 3.18).



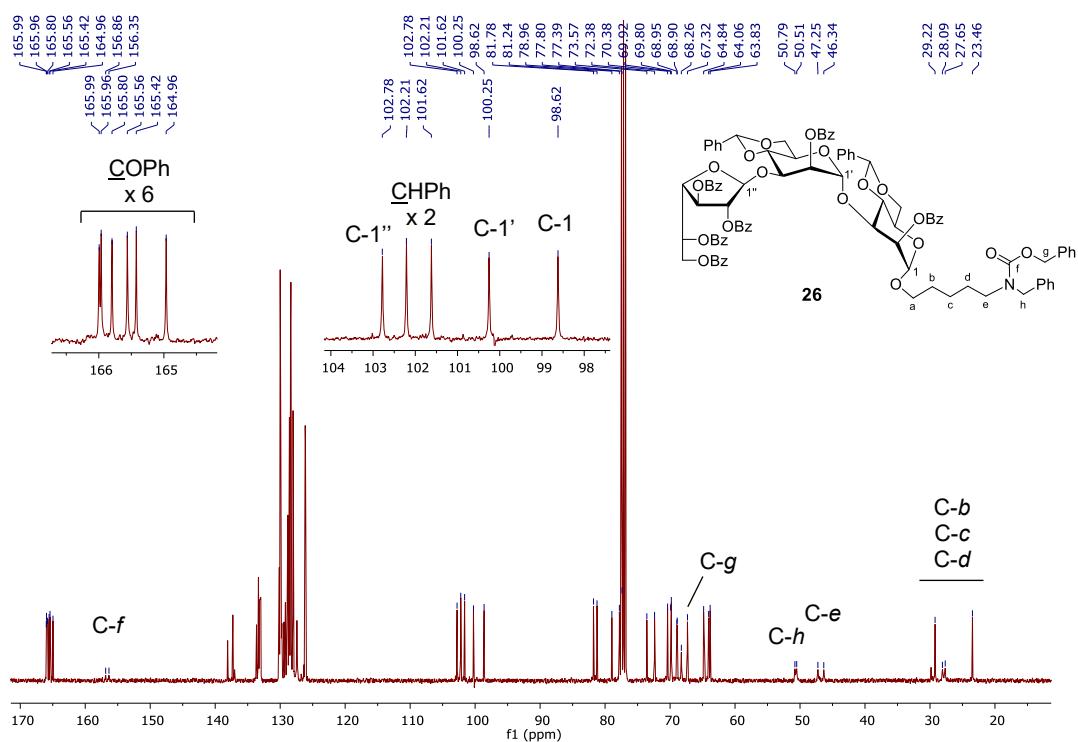
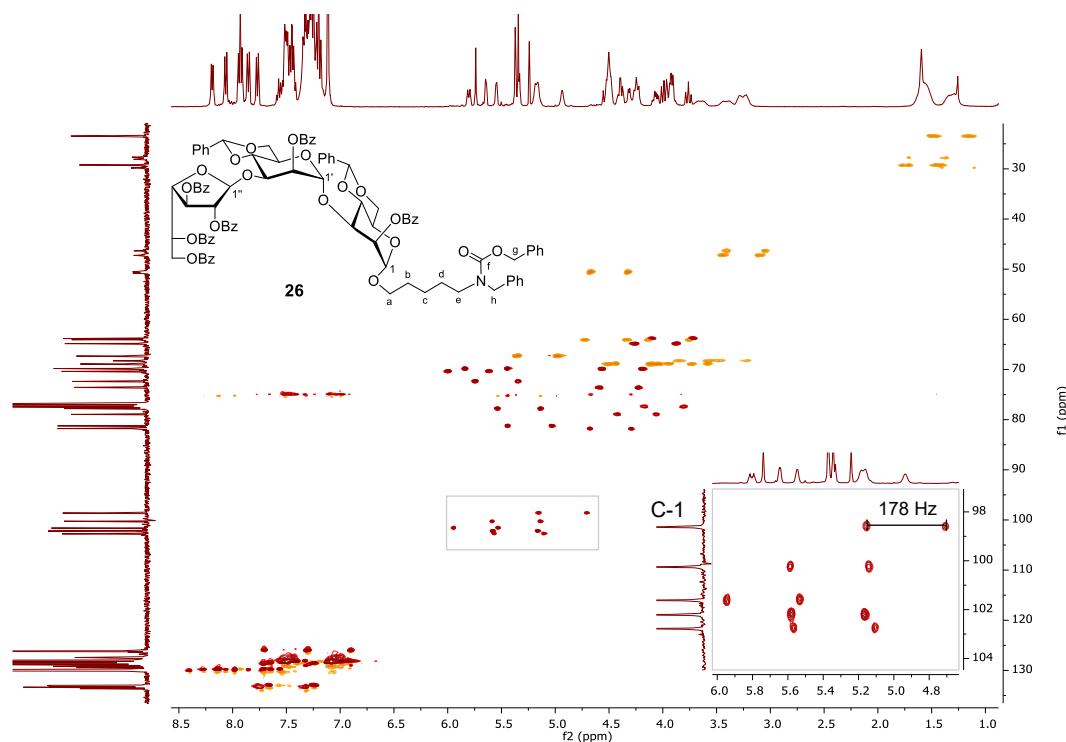
Esquema 3.18

La ausencia de producto de hidrólisis ante el cambio de solvente podría estar relacionada con la formación de un complejo entre el ion oxacarbenio y el éter etílico (solvente participante) como intermediario de glicosidación,^[19] que resultó más reactivo frente al ataque nucleofílico de **8** respecto al del agua.

Alternativamente, este resultado podría atribuirse a diferencias en el contenido de agua de los solventes empleados, asociadas a la eficacia del protocolo de secado aplicado en cada caso. En el caso del éter, se utiliza un indicador visual (benzofenona) que adquiere un color azul brillante en ausencia de agua y marca el punto de inicio de la destilación. En contraste, el secado del diclorometano con P_2O_5 no incluye un indicador que permita detectar la humedad remanente, lo que podría resultar en un solvente con mayor contenido de agua. Esta diferencia podría explicar la aparición del producto de hidrólisis al utilizar diclorometano como solvente de glicosidación.

Una vez optimizada la síntesis, el nuevo 5-aminopentil glicósido **26** se caracterizó por RMN. En el espectro de RMN ^{13}C (Figura 3.21), se observaron las señales del amino *linker*, tanto de la cadena alquílica (20-30 ppm) como de los metilenos bencílicos de sus grupos protectores a δ 50,8/50,5 y 67,3 ppm, lo que confirmó la incorporación de este fragmento a la molécula. Asimismo, en la zona anomérica del espectro se identificaron las resonancias de los centros anoméricos de la unidad de β -D-Galf a δ 102,8 ppm (C-1''), y de las unidades de α -D-Manp a 100,3 ppm (C-1') y 98,6 ppm (C-1). La estereoquímica α del nuevo enlace glicosídico se confirmó por medio de un experimento de RMN 1H - ^{13}C HSQC acoplado (Figura 3.22), en el que la señal de C-1 de **26** mostró un $^1J_{H,C}$ de 178 Hz, valor característico de manósidos 1,2-*trans*.^[271]

En línea con lo observado en el espectro de RMN ^{13}C , el espectro de RMN 1H (Figura 3.23) mostró, en la zona anomérica, dos singuletes a 5,37 y 5,34 ppm correspondientes al H-1 de la unidad de α -D-Manp (H-1') y de β -D-Galf (H-1''), respectivamente. A campos más altos, aparecía el H-1 de **26**, como una señal ancha debido a la presencia de rotámeros. Asimismo, en la zona alifática (δ 1,0-1,8 ppm) se identificaron las señales asociadas al amino *linker*, lo que sumó evidencia a la obtención del precursor **26**.

Figura 3.21. Espectro de RMN ^{13}C (101 MHz, CDCl_3) de **26**.Figura 3.22. Espectro de RMN ^1H - ^{13}C HSQC acoplado (400 MHz, CDCl_3) de **26**.

Resultados y discusión

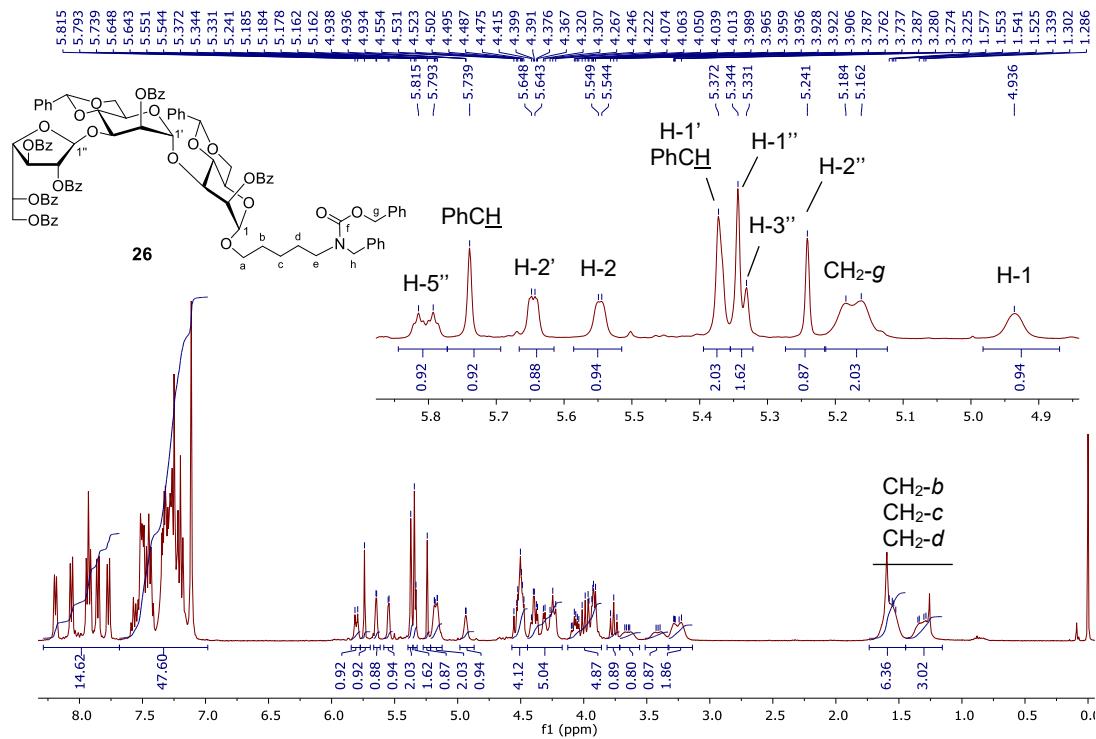
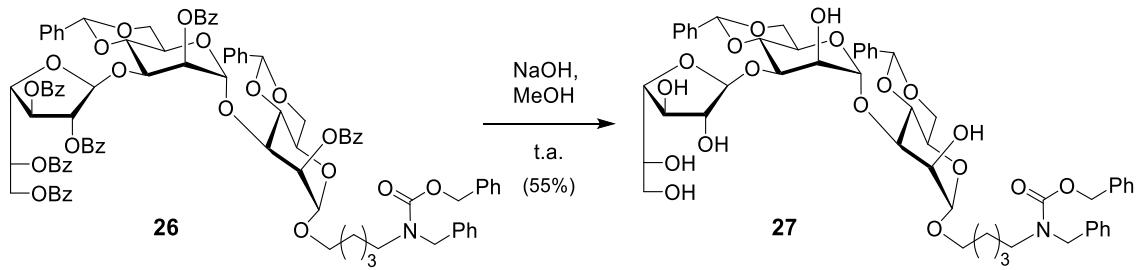


Figura 3.23. Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) de **26**.

3.8.4. Desprotección. Obtención de 5-aminopentil β -D-galactofuranosil-(1→3)- α -D-manopiranósil-(1→3)- α -D-manopiranósido (3)

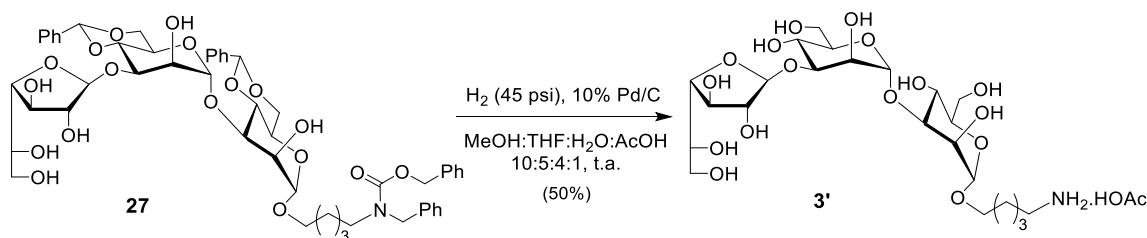
Habiendo sintetizado exitosamente el glicósido protegido **26**, restaba liberar las posiciones protegidas a fin de obtener el galactofuranósido deseado **3**. En primer lugar, se efectuó la hidrólisis de los grupos benzoílo de **26** en medio básico (Esquema 3.19).



Esquema 3.19

Por purificación por columna del crudo de reacción, se obtuvo una fracción pura del producto. En el espectro de RMN ^1H se observó un corrimiento hacia campos más altos de los protones en las posiciones previamente benzoiladas de **26** (H-2, H-2', H-2'', H-3'', H-5'' y H-6''), a la vez que en el espectro de ^{13}C se registró la desaparición de las señales de carbonilo entre δ 164 y 167 ppm. Estas observaciones confirmaron que la hidrólisis de los grupos ésteres fue completa, obteniéndose como producto el compuesto **27**.

Finalmente, el compuesto aislado en el paso anterior se sometió a una hidrogenólisis a alta presión en MeOH/THF/H₂O/AcOH para eliminar los grupos protectores remanentes (Esquema 3.20). La purificación cromatográfica del producto crudo de la reacción permitió obtener el compuesto **3'** con 50% de rendimiento.



Esquema 3.20

El producto obtenido se caracterizó por RMN. En los espectros de ^1H (Figura 3.24) y ^{13}C (Figura 3.25) se registró la desaparición de las resonancias asociadas a los grupos bencilidén protectores de las unidades de D-Manp y a los grupos bencilo y carboxibencilo protectores del grupo amino de **27**, evidenciando que la reacción había sido efectiva. Asimismo, en ambos espectros se identificó una señal en la zona alifática (δ 1,91 ppm en el ^1H y 23,9 ppm en el ^{13}C) consistente con la incorporación de un grupo acetato, lo que indicó que se había aislado el acetato del compuesto **3** (**3'**), de forma análoga a lo observado previamente en la síntesis de los 5-aminopentil glicósidos **1** y **2**. De esta manera se concluyó con éxito la síntesis del fragmento con galactofuranosa terminal restante.

Resultados y discusión

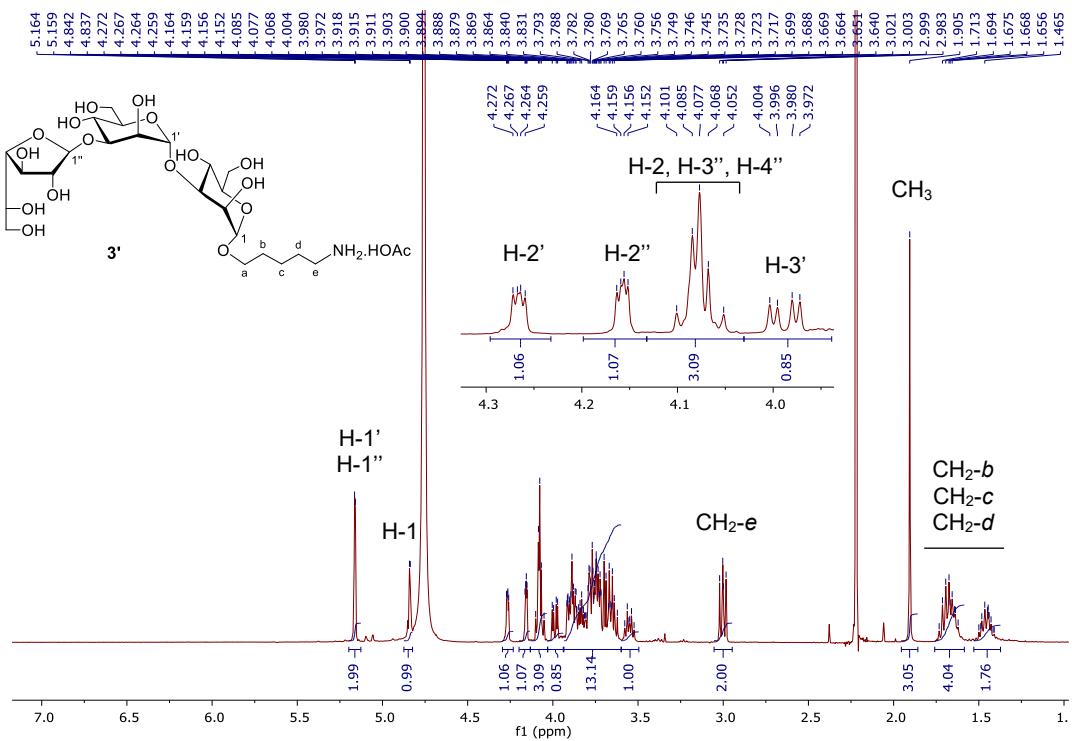


Figura 3.24. Espectro de RMN ^1H (400 MHz, D_2O) de $3'$.

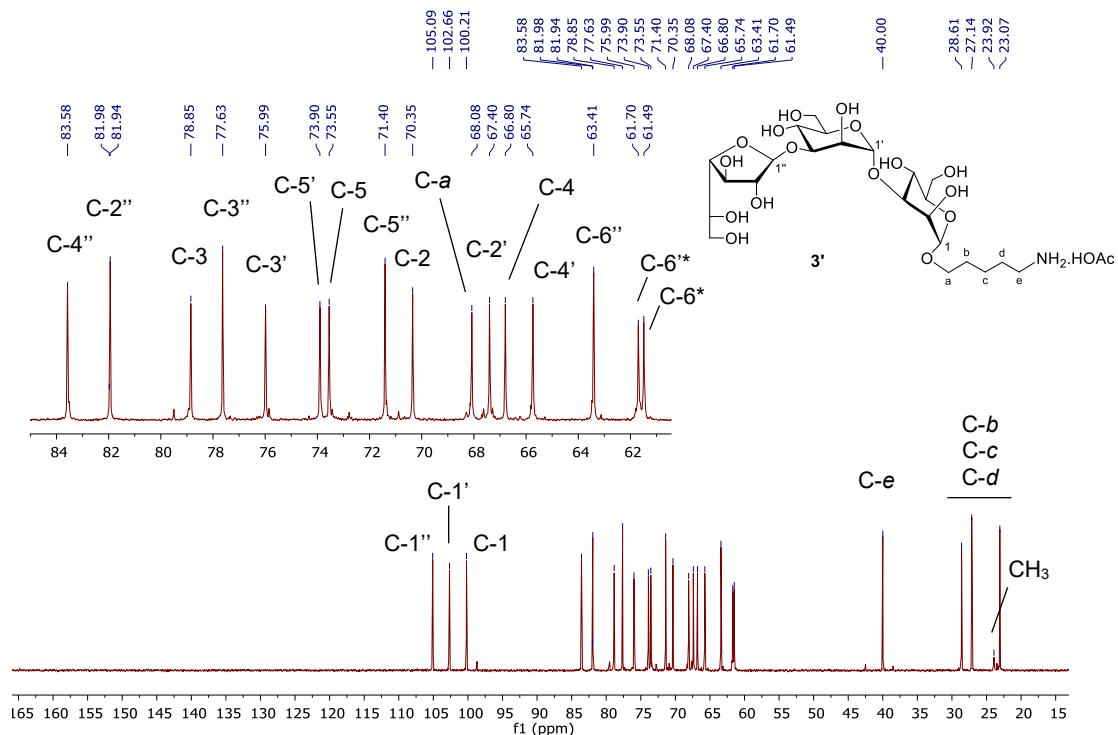


Figura 3.25. Espectro de RMN ^{13}C (101 MHz, D_2O) de $3'$.

* Las asignaciones pueden estar intercambiadas.

3.9. Conclusiones

En resumen, en esta primera parte del capítulo se describió en detalle el trabajo realizado para obtener por primera vez los 5-aminopentil glicósidos **1**, **2** y **3**, a partir de los precursores **6**, **7** y **8**, comunes a todas las rutas sintéticas. Estos precursores se obtuvieron en escala multigramo a partir de D-galactosa, D-manosa y 5-aminopentanol. Para lograr un procedimiento costo-eficiente de síntesis de **7**, precursor de la unidad de D-Manp, se realizó un estudio detallado de las condiciones de reacción que permitió duplicar el rendimiento de la ruta sintética respecto del obtenido en el primer ensayo.

Asimismo, las reacciones de glicosidación de los donores de manosilo **18** y **25** con el amino *linker* protegido **8** resultaron desafiantes. Sin embargo, las modificaciones introducidas en los protocolos de reacción permitieron superar estas dificultades y obtener los precursores del disacárido **2** y del trisacárido **3** con buenos rendimientos.

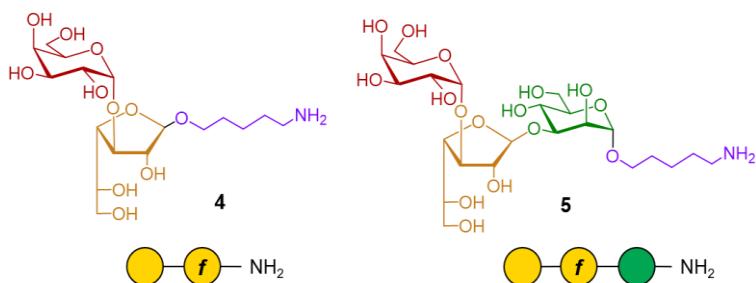
La estrategia de síntesis elegida resultó altamente selectiva, reproduciendo con fidelidad la regio- y estereoselectividad de las cadenas sacáridicas presentes en el *core* del LPG y en el GIPL-1 de *L. braziliensis*, e incorporando de manera eficiente el amino *linker* en su extremo reductor. Además, el trabajo realizado condujo al aislamiento y caracterización de 16 nuevas moléculas, que no habían sido reportadas anteriormente.

Finalmente, los glicósidos **1'**, **2'** y **3'** se reservaron para su uso en la fabricación de microarreglos de glicanos, con el fin de evaluar su inmunorreactividad frente a sueros de pacientes con leishmaniasis tegumentaria americana.

Segunda parte.

Fragmentos del GIPL-2

En esta segunda parte del capítulo se describe el diseño del camino sintético y los resultados de la síntesis de los compuestos **4** y **5** (Esquema 3.21), presentes en el *core* oligosacárido del LPG y en el extremo no reductor del GIPL-2 de *Leishmania*.



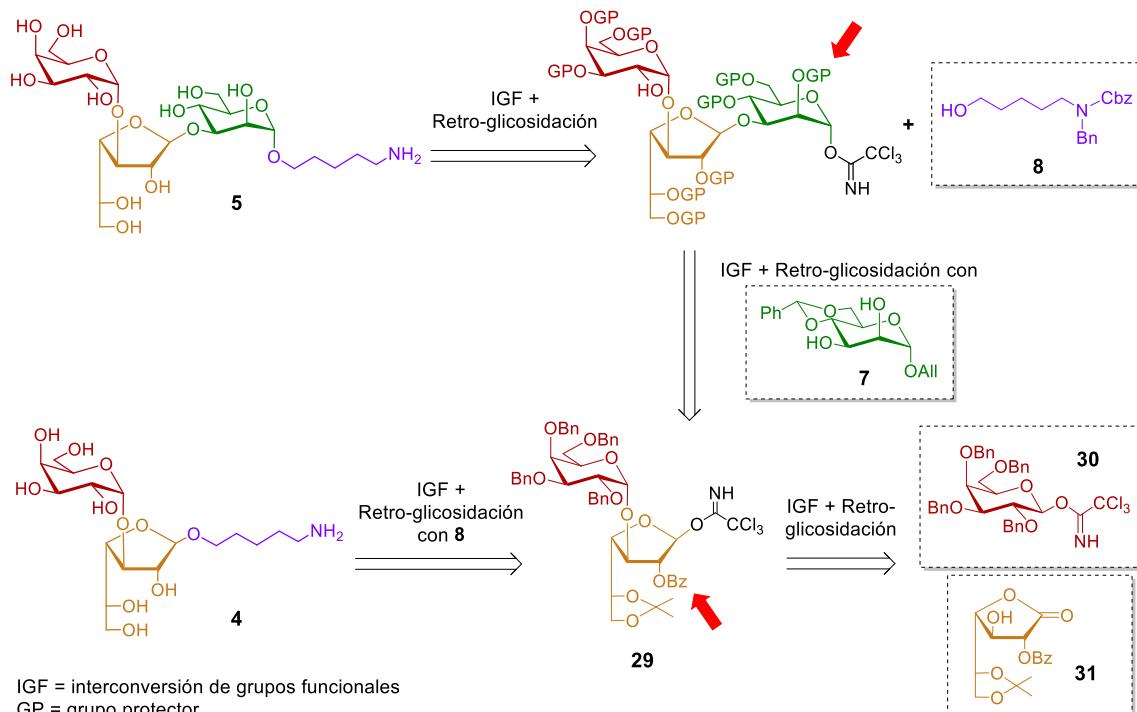
Esquema 3.21

3.10. Diseño de las rutas sintéticas para la obtención de 4 y 5

Las rutas de síntesis de los galactofuranósidos constitutivos del GIPL-2 se diseñaron a partir del análisis retrosintético de los compuestos **4** a **5**, presentado en el Esquema 3.22. Así como para la obtención de los glicósidos **1-3**, se estableció una estrategia sintética convergente basada en un conjunto de bloques constructores comunes, entre ellos los compuestos **7** y **8**, empleados previamente como precursores de la unidad de D-Manp y del amino *linker*, respectivamente. La secuencia de acoplamiento consistió en la incorporación de las unidades sacáridicas desde el extremo no reductor al reductor, seguido de la introducción final del grupo 5-aminopentilo. En las rutas sintéticas elegidas, se empleó nuevamente el método del tricloroacetimidato y se emplearon grupos ésteres participantes en C-2 para favorecer la formación estereoselectiva de glicósidos 1,2-*trans* (flechas rojas, Esquema 3.22).

Para la incorporación del fragmento α -D-Galp(1 \rightarrow 3)-D-Galf se eligió el precursor **29** (Esquema 3.22), previamente reportado por Gandolfi-Donadio L. *et al.*^[233] En dicho trabajo, el disacárido se obtuvo a partir de dos bloques constructores: el tricloroacetimidato de O-(2,3,4,6-tetra-O-bencil- β -D-galactopiranósilo) (**30**) y la 2-O-benzoíl-5,6-O-isopropilidén-D-galactono-1,4-lactona (**31**) (Esquema 3.22). En esta estrategia, la formación del enlace α -glicosídico entre las unidades se ve favorecida por el efecto anomérico, ya que el donor presenta un grupo no participante en C-2, y por el empleo de éter etílico como solvente participante. En cuanto al acceptor de galactofuranosilo, resulta interesante el uso de un derivado de la D-galactono-1,4-lactona como precursor de la galactofuranosa interna. La ventaja de esta estrategia radica en que, durante la glicosidación que da lugar al disacárido, el OH anomérico de la D-Galf se encuentra virtualmente protegido por la función lactona. Posteriormente, la reducción de

este grupo permite obtener el furanósido libre, que puede ser activado para dar un nuevo donador, en este caso el compuesto **29**. El precursor de D-Galf **31** contiene, además, un grupo benzoílo participante en C-2 adecuado para generar las uniones galactofuranosídicas 1,2-*trans* presentes en los objetivos sintéticos **4** y **5**.



Esquema 3.22

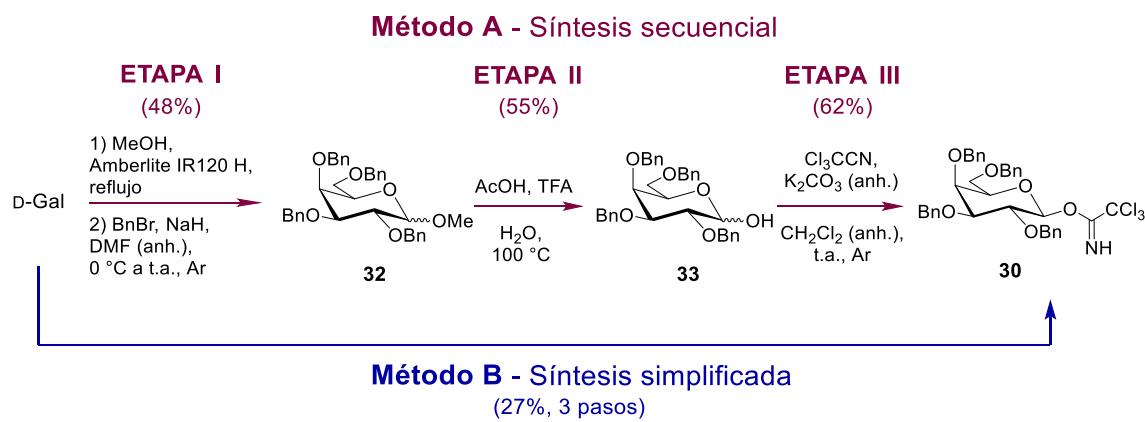
A continuación, se describirá la síntesis de los precursores **30** y **31**, su acoplamiento para dar **29** y, luego, la obtención de los glicósidos **4** y **5**.

3.11. Síntesis del precursor de D-Galp, tricloroacetimidato de O-(2,3,4,6-tetra-O-bencil-β-D-galactopiranósilo) (30)

Para la síntesis del precursor de la unidad de D-Galp **30**, se utilizó el procedimiento descripto por Gandolfi Donadío L. que partía de metil β-D-galactopiranósido y constaba de tres etapas: (a) la protección de los hidroxilos libres por bencilación, (b) la hidrólisis del metilo anomérico en medio ácido y, (c) la activación con tricloroacetonitrilo (Esquema 3.23).^[279]

Como no contábamos con metil β-D-galactopiranósido comercial, el primer paso de la síntesis fue obtenerlo a partir de D-galactosa. Para ello, se llevó a cabo una glicosidación de Fischer con metanol utilizando resina de intercambio catiónico como agente promotor, según lo descripto por Moradei O. et al. (Etapa I, Esquema 3.23).^[280] Si bien el procedimiento de referencia empleaba metanol anhidro, observamos que se

obtenían resultados similares al utilizar metanol sin tratamiento previo. El proceso simplificado rindió un producto crudo que, según el análisis por RMN ^{13}C , correspondía a una mezcla de α,β -methyl-D-galactopiranósidos y α,β -methyl-D-galactofuranósidos.^[281] En concordancia con la estabilidad termodinámica relativa, se observó un predominio de las formas piranósicas, con una relación piranosa/furanosa cercana a 6:1 (determinación cualitativa por RMN ^{13}C).^[282,283]



Esquema 3.23

Con el fin de aislar las formas piranósicas del metil galactósido, se intentaron purificaciones del crudo de reacción por cristalización en distintos solventes, sin éxito. Dada la alta polaridad de los componentes de la mezcla y la dificultad de separarlos por columna cromatográfica, se decidió continuar directamente con el paso de bencilación sobre el producto crudo, con la expectativa de aislar luego el compuesto **32** (Esquema 3.23).

Una vez efectuada la bencilación, se ensayó la recristalización del producto crudo en las condiciones reportadas por Gandolfi Donadío L.^[279] pero, como no fue posible aislar los metil galactopiranósidos deseados, se procedió con la purificación por columna. De esta forma se aisló metil 2,3,4,6-tetra-O-bencil- α,β -D-galactopiranósido (**32**)^[284] en una relación ~7:3 (RMN ^1H) con 48% de rendimiento.

Para la liberación del centro anomérico y la formación del tricloroacetimidato, se siguieron las condiciones reportadas (Etapas II y III, Esquema 3.23) para dar el donor **30**^[233] como un sólido cristalino cuyas propiedades fisicoquímicas y datos espectroscópicos fueron coincidentes con los descriptos. El método desarrollado para obtener **30** en tres etapas a partir de D-Gal se denominó “Método A”.

Dado que se requería gran cantidad del precursor **30** para la síntesis de **4** y **5**, el proceso debió escalarse (4x), partiendo de 24 g de D-galactosa. A escala multigramo, las purificaciones cromatográficas resultarían tediosas y requerirían de gran cantidad de

insumos, por lo que se puso el foco en eliminarlas. Entonces, se ensayó una secuencia alternativa de síntesis (“Método B”) en la cual las etapas II y III se realizaron directamente sobre los crudos de los pasos previos sin purificar (Esquema 3.23). Asimismo, se realizaron modificaciones adicionales, detalladas en la Tabla 3.5, que permitieron optimizar la síntesis y simplificar las operaciones.

Tabla 3.5. Cambios aplicados sobre el método secuencial de obtención de **30** (Método A), que dieron lugar al método simplificado (Método B, Esquema 3.23).

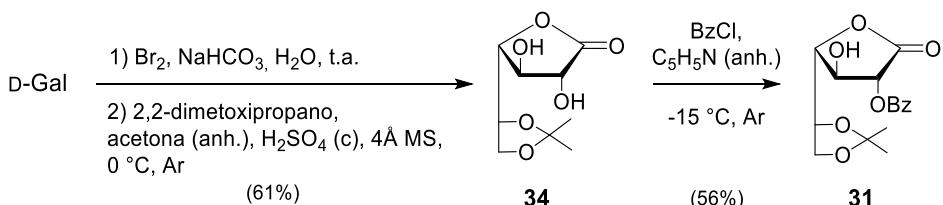
Etapa	Cambios introducidos
I	<ul style="list-style-type: none">• Escalado 4x.• Eliminación de la purificación cromatográfica.
II	<ul style="list-style-type: none">• Escalado 4x.• Uso de reactor encamisado para efectuar la reacción y el <i>workup</i>.• Incorporación de un lavado básico al crudo del paso I.• Eliminación de la purificación cromatográfica.
III	<ul style="list-style-type: none">• Escalado 4x.• Reducción del volumen de CH_2Cl_2 en un 43%.• Reducción de los equivalentes de Cl_3CCN y de K_2CO_3 en un 28%.

El nuevo esquema resultó exitoso y permitió aislar el compuesto deseado con un rendimiento del 27% a partir de D-galactosa, mayor al registrado a través del Método A (16%). De esta forma, **30** se obtuvo en escala multigramo bajo un proceso más eficiente, con menor número de pasos y menor gasto de insumos.

3.12. Síntesis del precursor de D-Galf, 2-O-benzoíl-5,6-O-isopropilidén-D-galactono-1,4-lactona (31)

Una vez aislado el donor de D-galactopiranosilo, el paso siguiente consistía en sintetizar el precursor **31**. Para ello, se eligió la estrategia reportada Gandolfi-Donadio L.,^[279] que partía de D-galactono-1,4-lactona y consistía en formar el 5,6-O-isopropilidén derivado y luego benzoilar de forma regioselectiva el OH-2 del anillo, para dar una unidad de D-Galf con OH-3 libre.

Como no disponíamos de D-galactono-1,4-lactona comercial, este compuesto se sintetizó a partir de D-galactosa por oxidación con Br_2 .^[285] Una vez confirmada la obtención del compuesto deseado por RMN ^1H y ^{13}C , se continuó con la ruta sintética elegida, por reacción del producto crudo con 2,2-dimetoxipropano y acetona en medio ácido (Esquema 3.24). La síntesis permitió obtener **34**^[279] con 61% de rendimiento a partir de D-galactosa, y sus datos espectroscópicos fueron coincidentes con los reportados.



Esquema 3.24

Para llevar a cabo la benzoilación, el compuesto **34** se trató con 1,1 equivalentes de cloruro de benzoílo. En estas condiciones, la reacción rindió como producto mayoritario (56%) el 2-O-benzoíl derivado **31**^[233] junto con el producto de disustitución (18%). Este resultado, sumado a la ausencia del producto monosustituido en la posición 3, confirmaron la mayor nucleofilicidad del hidroxilo α respecto del β por efectos estereoelectrónicos, como había sido descripto por de Lederkremer R. M. y colaboradores.^[233]

De esta forma, se obtuvo el derivado de D-galactono-1,4-lactona con OH-3 libre, necesario para la glicosilación con **30**. Cabe destacar que, al igual que en la sección anterior, se intentaron simplificar las operaciones de síntesis para obtener el precursor de manera más costo-eficiente. En este caso, se ensayó la síntesis de **31** a partir de D-Gal suprimiendo la purificación cromatográfica del intermediario **34** (Esquema 3.24). Sin embargo, el producto final se obtuvo acompañado de impurezas desconocidas e inseparables, lo que demostró que era necesario purificar **34** por columna previo al paso de benzoilación.

3.13. Síntesis del 5-aminopentil β -glicósido de D-Galp- α -(1 \rightarrow 3)-D-Galp

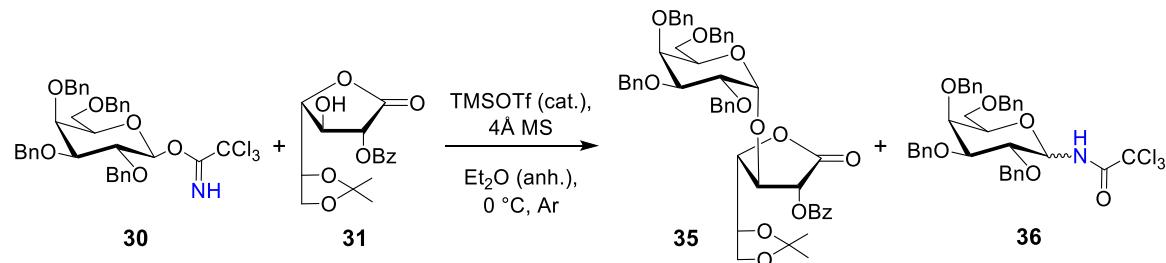
(4)

3.13.1. Glicosidación. Obtención de 2,3,4,6-tetra-O-bencil- α -D-galactopiranósil-(1 \rightarrow 3)-2-O-benzoíl-5,6-O-isopropilidén-D-galactono-1,4-lactona (35)

Una vez obtenidos los fragmentos **30** y **31**, se procedió con el acoplamiento de las unidades. Para ello, se siguió el método descripto por Gandolfi-Donadío L. *et al.*^[233] (Esquema 3.25).

Desafortunadamente, al efectuar la reacción en el laboratorio no se pudo reproducir el resultado reportado. Si bien el compuesto **35**^[233] se obtuvo como producto mayoritario, el rendimiento registrado (45%) fue menor al reportado (60%) y, durante la purificación por columna, se aisló un 38 % de un subproducto de menor polaridad. Este compuesto se identificó por RMN como 2,3,4,6-tetra-O-bencil-N-tricloroacetil- α , β -D-

galactopiranosilamida (**36**, Esquema 3.25).^[286] Cabe destacar que en el trabajo utilizado como referencia, Gandolfi Donadío *et al.* no reportaron la formación de estas acetamidas durante la glicosidación.



Esquema 3.25

En las glicosidaciones mediadas por tricloroacetimidatos, las acetamidas son productos secundarios frecuentes,^[265,287–289] y su formación está favorecida cuando intervienen donores muy activados (armados) y/o aceptores voluminosos o poco nucleofílicos.

El concepto de donores “armados”/“desarmados”, introducido por Fraser-Reid B.^[290,291] y ampliado posteriormente por Demchenko A. V.,^[292,293] clasifica a los donores según su reactividad en función de los grupos protectores de la molécula. Según los estudios de Fraser-Reid, los donores sustituidos con grupos dadores de electrones, como los éteres, son más reactivos que aquellos sustituidos por grupos acilos, que actúan como atractores de electrones. El aumento de reactividad en los donores armados estaría asociado a dos factores: la mayor nucleofilicidad del grupo saliente hacia el promotor, y una estabilización adicional del ion oxacarbenio intermediario de la reacción.^[9] En el presente caso, el donor **30** se encontraba totalmente protegido por grupos bencílicos, por lo que se trataba de un donor armado, susceptible de dar el producto de transposición del imidato.

Si bien, clásicamente, el mecanismo de conversión del imidato a la acetamida se atribuyó a un reordenamiento intramolecular tipo-Chapman,^[294] recientemente Codée J. D. C. y colaboradores cuestionaron esta teoría, demostrando que las acetamidas podían formarse vía transferencia de aglicona.^[295] Según este mecanismo, una vez iniciada la reacción de glicosidación, el N del grupo tricloroacetimida de una molécula de donor sin reaccionar actúa como nucleófilo, atacando a un ion oxacarbenio y generando una glicosil acetamida junto con un nuevo ion oxacarbenio.

Según los estudios de Schmidt R. R. y Toepfer A., una estrategia para evitar la formación del producto de transposición cuando se emplea un tricloroacetimidato armado

es aplicar un “procedimiento inverso” de glicosidación, en el que el donor se adiciona a una mezcla de acceptor y promotor.^[296]

En vistas de la dificultad encontrada al efectuar el acoplamiento del imidato **30** con el acceptor **31**, y teniendo en cuenta los conceptos anteriores, se ensayaron modificaciones al procedimiento aplicado inicialmente (Fila A, Tabla 3.6) en busca de aquellas condiciones que minimizaran la formación de **36**. En primer lugar, para evaluar si era posible modular la reactividad de **30**, se intentó controlar la velocidad de activación del imidato mediante la disminución de: (a) los equivalentes de promotor, y (b) la temperatura de reacción. Sin embargo, estas estrategias no fueron adecuadas ya que, en ambos casos, se obtuvieron productos crudos con cantidades apreciables de subproducto (Filas B y C, Tabla 3.6). Cabe destacar que la temperatura mínima ensayada fue de -10 °C dado que por debajo de ese valor **30** se tornaba insoluble en la mezcla de reacción.

Tabla 3.6. Condiciones de glicosidación ensayadas en la optimización del acoplamiento entre **30** y **31**.^a

Ref.	Escala (mmol) ^b	Equiv. TMSOTf	Temp. (°C)	Orden de agregado	Rel. molar 35:36 ^c	Rend. (%)
A	0,3	0,4	0	Proc. Normal	2:1	45
B	0,3	0,05	0	Proc. Normal	1:1	n.d. ^d
C	0,3	0,05	-10	Proc. Normal	1:1	n.d. ^d
D	0,3	0,05	-10	Proc. Inverso ^e	1:0	61
E	3,7	0,05	-10	Proc. Inverso ^f	4:1	84
F	6,0	0,05	-10	Proc. Inverso ^f	4:1	79

^a En todos los casos el solvente fue éter etílico ($[\mathbf{30}] = 50 \text{ mM}$) y la reacción se finalizó cuando se observó desaparición de **30** por ccd; ^b mmol de **30**; ^c Relación determinada por integración de las señales del H-2 de **35** (δ 5,88 ppm) y de H-1 α y H-1 β de **36** (δ 5,61 y 5,08 ppm, respectivamente) en el RMN ^1H del producto crudo; ^d el crudo no se purificó; ^e el donor se agregó a lo largo de 6 minutos; ^f el donor se agregó a lo largo de 20 minutos. n.d.=no determinado.

Proc. Normal: Se adiciona el promotor a una mezcla de **30** y **31**; Proc. Inverso: Se adiciona el donor **30** a la mezcla de **31** con el promotor.

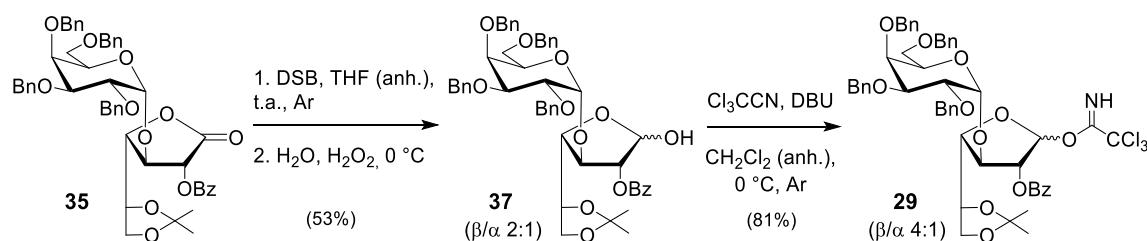
Entonces, se realizó un ensayo de glicosidación utilizando el “procedimiento inverso”, que resultó exitoso ya que no se detectó acetamida **36** en el crudo de reacción (Fila D, Tabla 3.6). Luego, en experimentos a mayor escala, se ensayó la disminución de la velocidad de agregado del donor, con el objetivo de mantener al acceptor de glicosilo como la especie mayoritaria en la mezcla al inicio de la reacción y, de este modo, favorecer el acoplamiento entre los azúcares. En estas condiciones, si bien se registró formación del subproducto, el rendimiento del α glicósido deseado **35** fue muy bueno (84 y 79%, Filas E y F, Tabla 3.6) e incluso superó al reportado en el procedimiento de referencia.

En conclusión, la aplicación de condiciones de glicosidación inversas permitió controlar la formación de la acetamida y aumentar significativamente el rendimiento del producto deseado, que pasó de un 45%, obtenido inicialmente, a un 84%. Estas mejoras se tradujeron en una mayor eficiencia en la síntesis del disacárido, lo que permitió obtener 3,2 g de precursor **35** con menor consumo de reactivos y otros insumos.

3.13.2. Activación del centro anomérico de 2,3,4,6-tetra-O-bencil- α -D-galactopiranósil-(1 \rightarrow 3)-2-O-benzoíl-5,6-O-isopropilidén-D-galactofuranosa

Habiendo aislado el disacárido **35**, se encaró la activación del centro anomérico de la galactofuranosa según el protocolo descripto por Gandolfi-Donadío L. *et al.*^[233] (Esquema 3.26).

En primer lugar, se efectuó la reducción selectiva de la lactona por tratamiento con disiamilborano para dar **37** con rendimiento moderado (53%). El producto de la reacción se caracterizó por RMN, donde se identificó la presencia de una mezcla de anómeros en relación β/α 2:1.



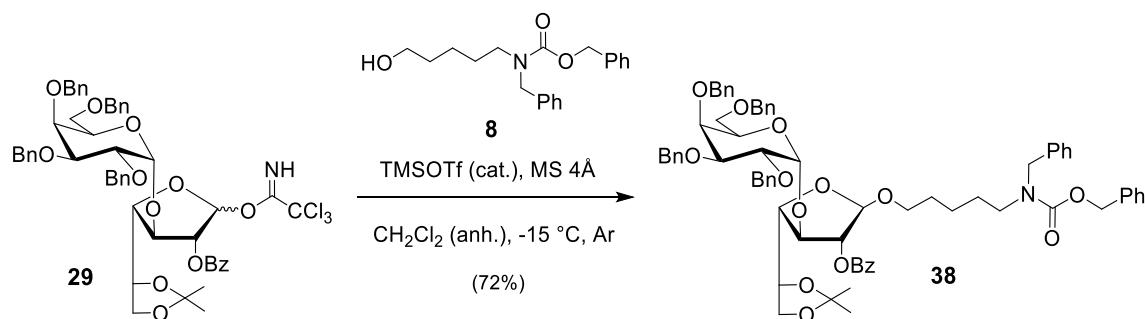
Esquema 3.26

Una vez confirmada la obtención del hemiacetal, el centro anomérico se activó por tratamiento con tricloroacetonitrilo y DBU. En los espectros de RMN ^1H y ^{13}C del producto se observó el patrón de señales reportado para el β tricloroacetimidato derivado,^[233] junto con señales adicionales que eran consistentes con la presencia del anómero α en relación β/α 4:1. El corrimiento hacia campos más bajos (~ 1 ppm) de los H-1 respecto de las mismas señales en el espectro de **37** se atribuyó a la formación del acetimidato anomérico, confirmando que se había aislado el compuesto deseado **29**. Además, el espectro protónico mostró las señales características del NH del tricloroacetimidato de ambos anómeros, a δ 8,61 y 8,41 ppm.

3.13.3. Glicosidación. Obtención de *N*-(bencil)benciloxicarbonil-5-aminopentil 2,3,4,6-tetra-O-bencil- α -D-galactopiranósil-(1 \rightarrow 3)-2-O-benzoíl-5,6-O-isopropilidén- β -D-galactofuranósido (38)

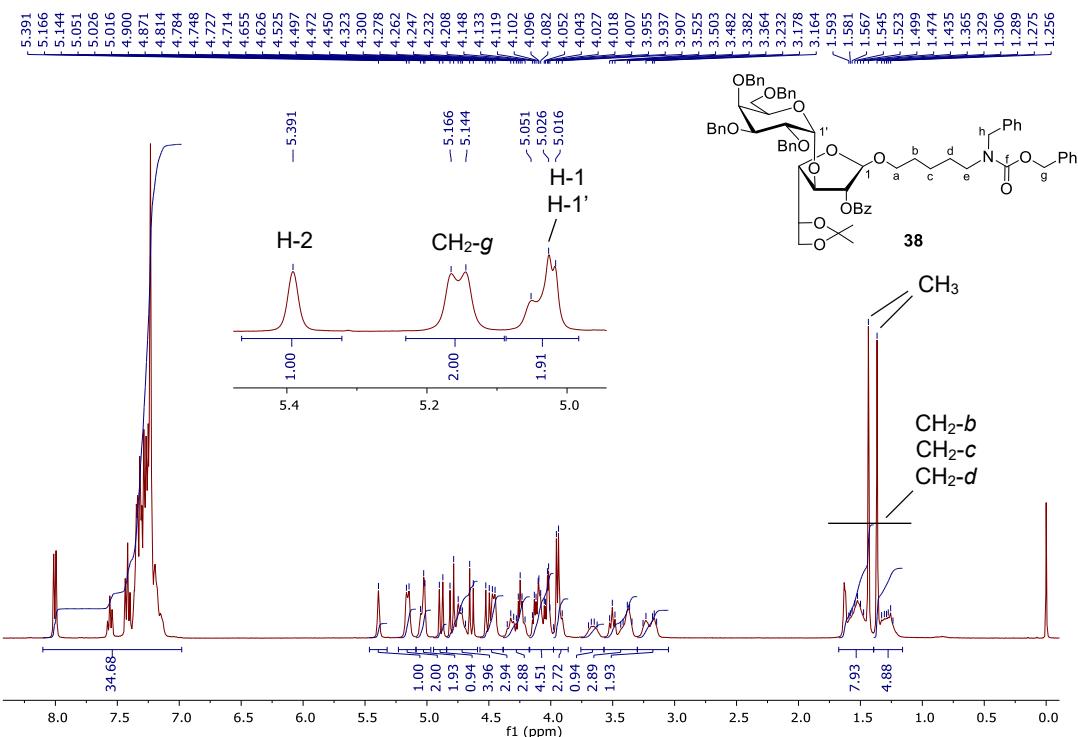
Habiendo activado el centro anomérico del disacárido D-Galp- α -(1 \rightarrow 3)-D-Galf, se procedió con el acoplamiento del azúcar al precursor del amino *linker* **8**. Para efectuar

esta reacción, se emplearon condiciones de glicosidación ya descriptas y desarrolladas en esta Tesis.



Esquema 3.27

La purificación por columna del crudo de la reacción permitió aislar el producto deseado **38** con buen rendimiento (Esquema 3.27). En el espectro de RMN ¹H (Figura 3.26) se identificó la resonancia del H-1 a δ 5,04 ppm, desplazado más de 1,5 ppm hacia campos más altos respecto de la misma señal en el imidato, lo que indicó la formación de la unión glicosídica. El H-2 se detectó a δ 5,39 ppm como un singulete ancho ($J_{1,2} < 1$ Hz), confirmando la formación estereoselectiva del glicósido 1,2-*trans* por asistencia del éster en C-2. Tanto el espectro protónico como el de ¹³C (Figura 3.27) mostraron las señales correspondientes al amino *linker* protegido, confirmando la incorporación de este fragmento a la molécula. Asimismo, se identificaron las señales de los grupos protectores, que fueron estables bajo las condiciones de glicosidación.

Figura 3.26. Espectro de RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) de **38**.

Resultados y discusión

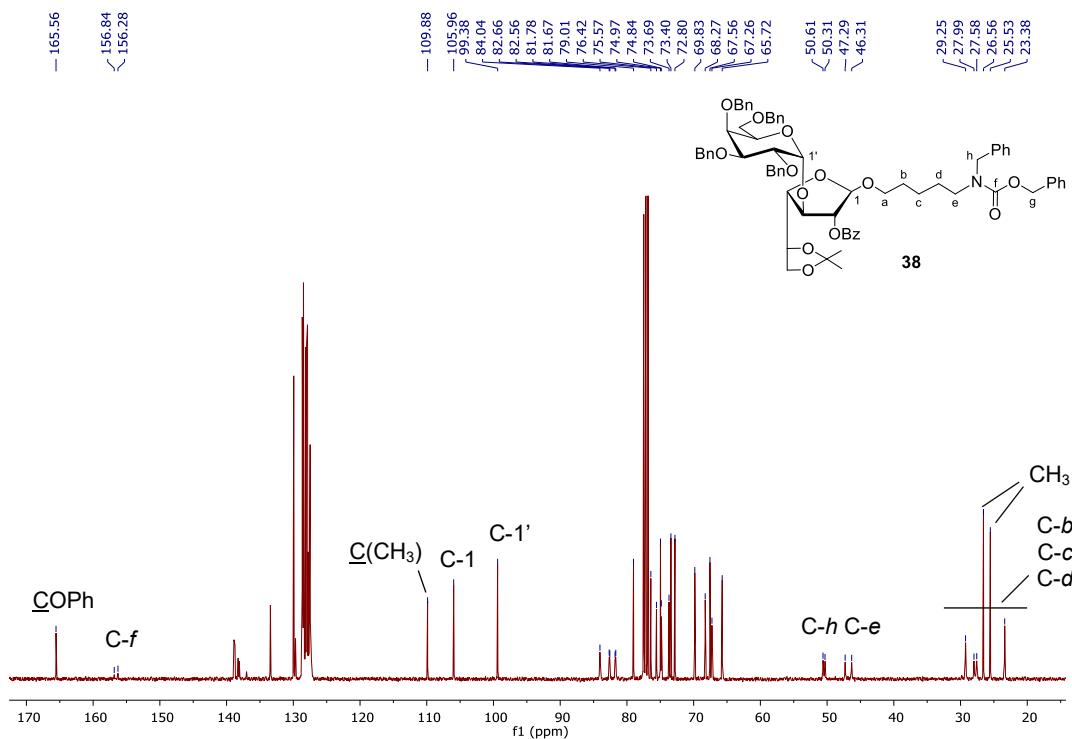
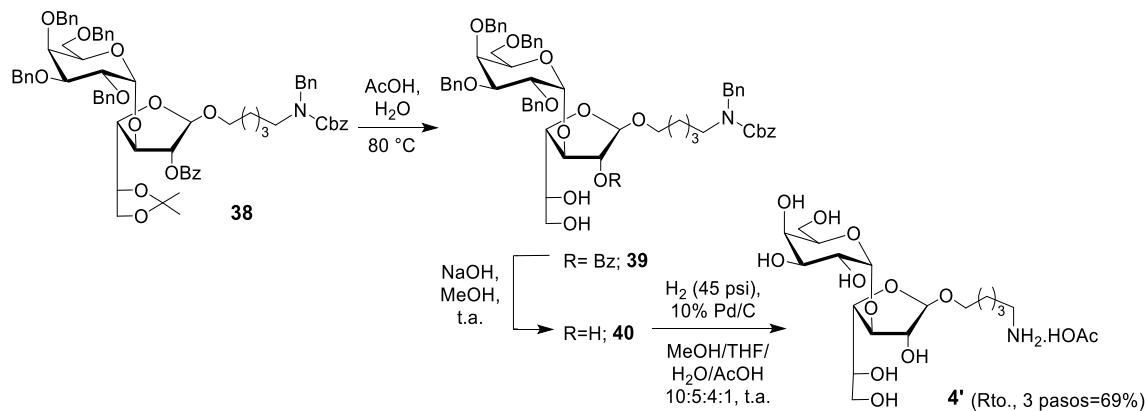


Figura 3.27. Espectro de RMN ^{13}C (101 MHz, CDCl_3) de **38**.

3.13.4. Desprotección. Obtención del 5-aminopentil α -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 3)- β -D-galactofuranósido (4)

Una vez aislado con éxito el 5-aminopentil glicósido **38**, restaba eliminar los grupos protectores en pos de obtener el compuesto **4** deseado. Para ello, se aplicó un protocolo de tres pasos (Esquema 3.28).



Esquema 3.28

En primer lugar, el disacárido **38** se trató con ácido acético acuoso a 80 °C con el fin de hidrolizar el grupo isopropilidén sobre la unidad de D-Galf (Esquema 3.28). Los espectros de RMN ^1H y ^{13}C del crudo de reacción evidenciaron la formación de un único compuesto, carente de las señales asociadas al acetal. En el espectro protónico se

observó, además, el corrimiento de las resonancias del H-5 y los H-6 hacia campos más altos respecto de las mismas señales de **38**, confirmando que estas posiciones se habían desprotegido para dar **39**.

El jarabe obtenido, sin purificar, se trató con hidróxido de sodio en metanol y el producto crudo de reacción se analizó por RMN. En el espectro protónico se evidenció un corrimiento >1 ppm de la señal de H-2 de D-Galf hacia campos más altos, indicativo de la desprotección del hidroxilo en esa posición. Por otro lado, en el RMN ^{13}C se observó la desaparición de la señal del carbonilo del grupo benzoílo presente en el espectro de **39**. Estos datos confirmaron que la hidrólisis había sido exitosa, dando como producto el compuesto **40** (Esquema 3.28).

Por último, el crudo de la reacción anterior se disolvió en una mezcla de MeOH/THF/H₂O/AcOH y se sometió a una hidrogenólisis a alta presión para desproteger el grupo amino terminal y remover los bencilos de la unidad de D-Galp. La purificación cromatográfica del producto permitió aislar el compuesto deseado **4** como el acetato **4'** con 69% de rendimiento a partir de **38** (tres pasos de reacción). En los RMN ^1H (Figura 3.28) y ^{13}C (Figura 3.29) de **4'** se evidenció la desaparición de las señales de los bencilos de la unidad de D-Galp y de los grupos protectores del amino. Se identificaron resonancias en la zona alifática a δ 1,92 ppm (^1H) y δ 23,9 ppm (^{13}C), típicas del grupo acetato, de forma análoga a lo registrado previamente en la síntesis de los compuestos **1-3**.

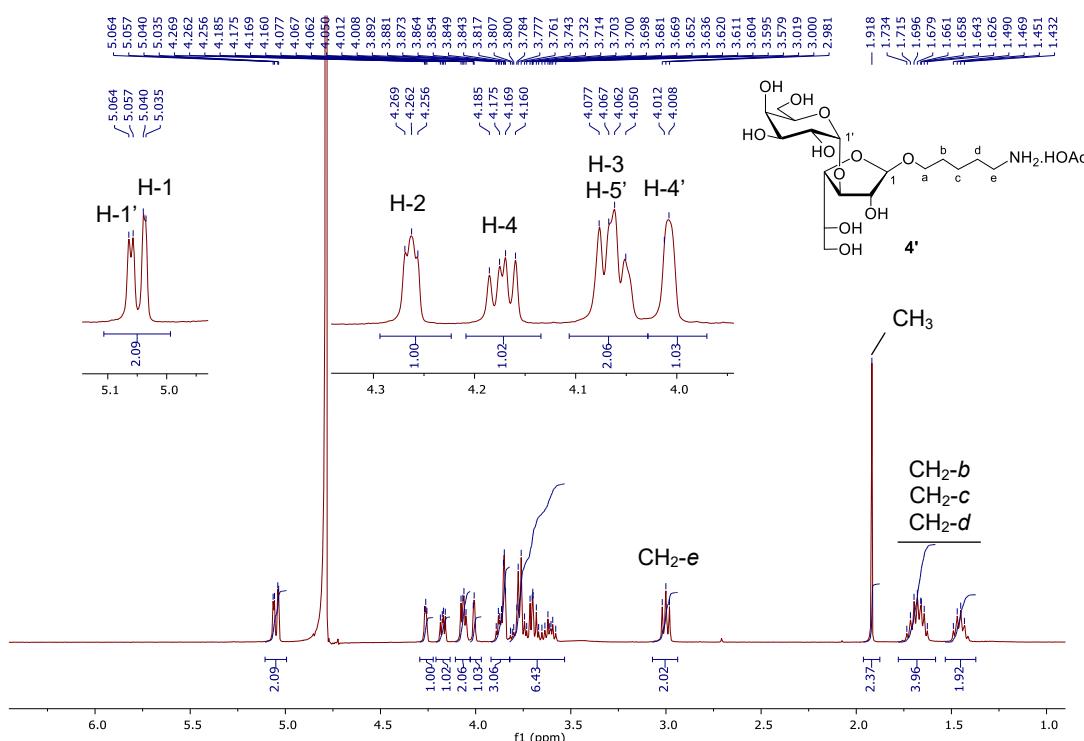


Figura 3.28. Espectro de RMN ^1H (400 MHz, D₂O) de **4'**.

Resultados y discusión

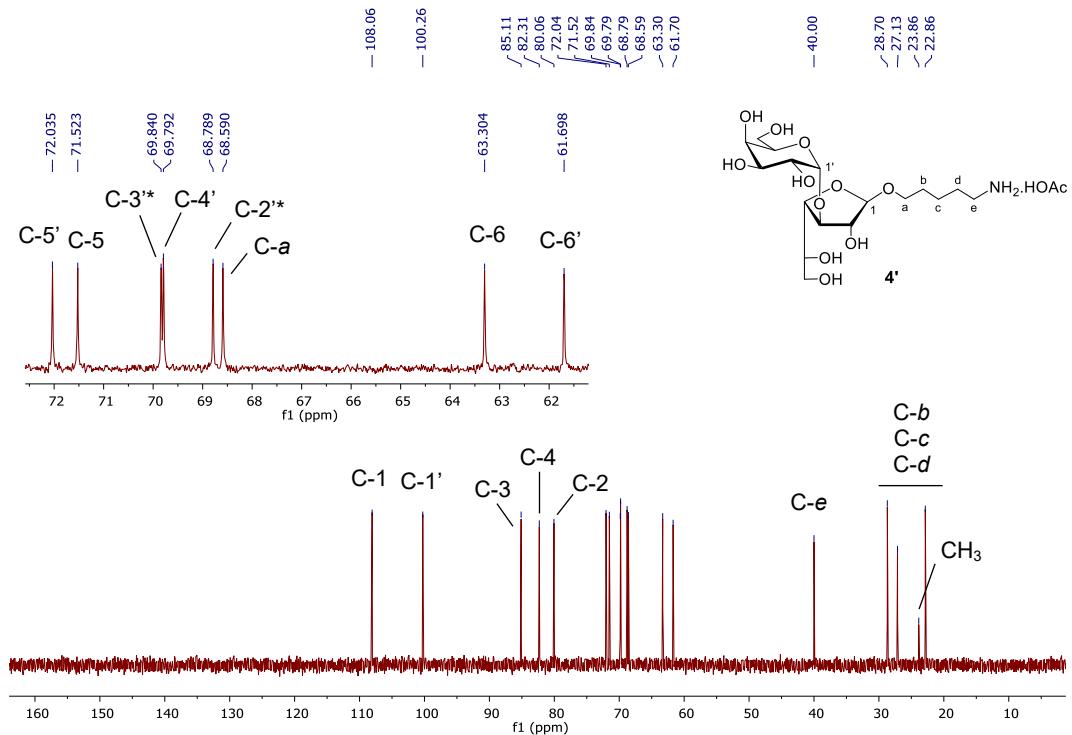


Figura 3.29. Espectro de RMN ^{13}C (101 MHz, D_2O) de **4'**.

* Las asignaciones pueden estar intercambiadas.

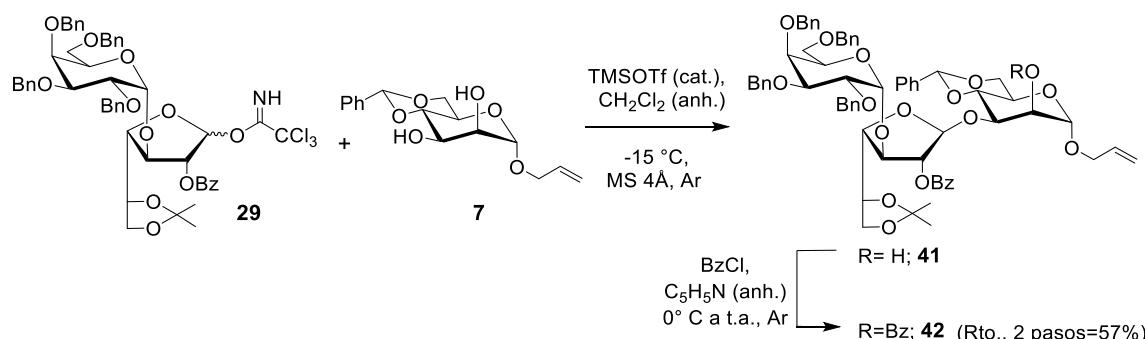
De esta forma, se concluyó con la síntesis del disacárido **4**, aislado como el correspondiente acetato **4'**. La ruta sintética elegida permitió obtener el 5-aminopentil glicósido con la regio- y estereoquímica deseadas. La utilización del método del tricloroacetimidato como estrategia de glicosidación fue compatible con los grupos funcionales elegidos, y la asistencia anquimérica del grupo éster en C-2 de la unidad de D-Galf permitió formar la unión glicosídica 1,2-*trans* con el amino *linker*.

Como precursores de las unidades de D-Galp y D-Galf se utilizaron los compuestos **30** y **31**, obtenidos a partir de D-galactosa. Se implementaron mejoras en los métodos de síntesis de estas moléculas para escalar el proceso, lo que permitió aislar los precursores en escala multigramo. Asimismo, a través del estudio de la reacción de acoplamiento entre estas unidades, se optimizó la conversión al intermediario clave **35**, que se obtuvo con excelente rendimiento (84%).

3.14. Síntesis del 5-aminopentil α -glicósido de D-Galp-(1 \rightarrow 3)-D-Galf- β -(1 \rightarrow 3)-D-Manp (5)

3.14.1. Glicosidación. Obtención de alil 2,3,4,6-tetra-O-bencil- α -D-galactopiranósil-(1 \rightarrow 3)-2-O-benzoíl-5,6-O-isopropilidén- β -D-galactofuranósil-(1 \rightarrow 3)-4,6-O-bencilidén-2-O-benzoíl- α -D-manopiranósido (42)

Habiendo obtenido con éxito el galactofuranósido **4**, se encaró la ruta sintética del trisacárido **5**. La estrategia elegida utilizaba como precursores el imidato de D-Galp- α -(1 \rightarrow 3)-D-Galf **29** y el alil manopiranósido **7**, sintetizados previamente. Para el acoplamiento de las unidades se aplicaron las mismas condiciones de síntesis del glicósido **38** (Esquema 3.29), que habían resultado efectivas para acoplar el mismo donor con el acceptor **8**.



Esquema 3.29

En el producto crudo de esta reacción se observó por ccd una mancha mayoritaria. Para su caracterización, una fracción del sólido obtenido se purificó chromatográficamente y se analizó por RMN, lo que permitió confirmar la formación del trisacárido deseado **41**.

Por un lado, en la zona anomérica del espectro de RMN ^{13}C se identificaron las resonancias de C-1 de los residuos de D-Galf a δ 102,7 ppm y de D-Galp a 99,0 ppm junto con dos señales asociadas al residuo de D-manosa (el C-1 a δ 99,7 ppm y el C acetálico del bencilidén a δ 101,7 ppm) que confirmaron la incorporación de esta unidad a la molécula (Figura 3.30). Por otro lado, en el espectro de RMN ^1H (Figura 3.31), se identificó la resonancia de H-1' a δ 5,11 ppm como un singulete ancho, característico de β -galactofuranósidos. Esta señal confirmó la formación del enlace glicosídico 1,2-*trans* por participación del grupo benzoílo en C-2 de la unidad de D-Galf. Por último, en el espectro $^1\text{H-}^{13}\text{C}$ HMBC del compuesto se observó una correlación entre el H-1 de D-Galf y el C-3 de D-Manp (Figura 3.32), confirmando la formación regioselectiva del enlace glicosídico (1 \rightarrow 3) entre las unidades.

Resultados y discusión

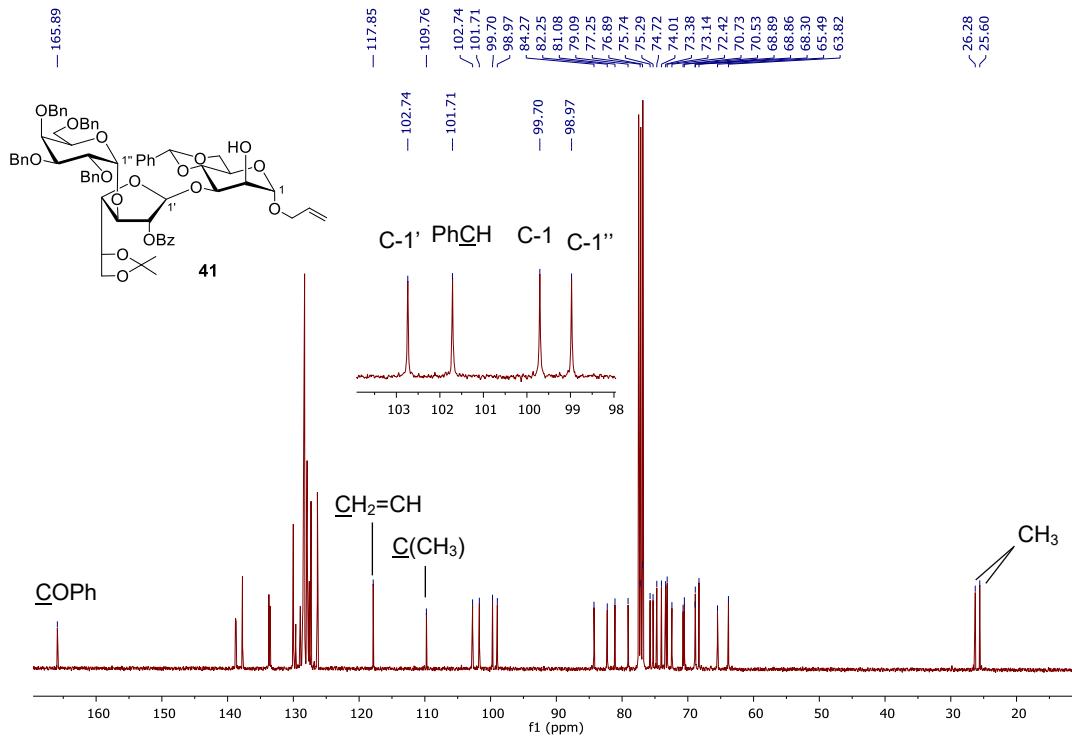


Figura 3.30. Espectro de RMN ^{13}C (101 MHz, CDCl_3) de **41**.

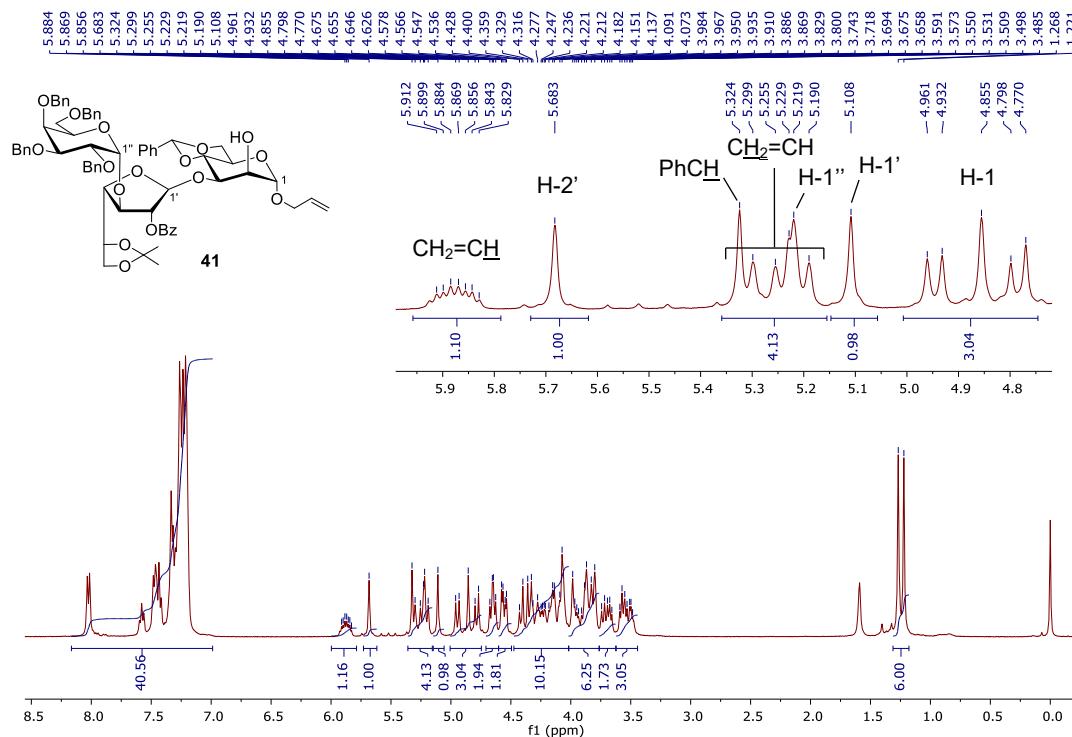


Figura 3.31. Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) de **41**.

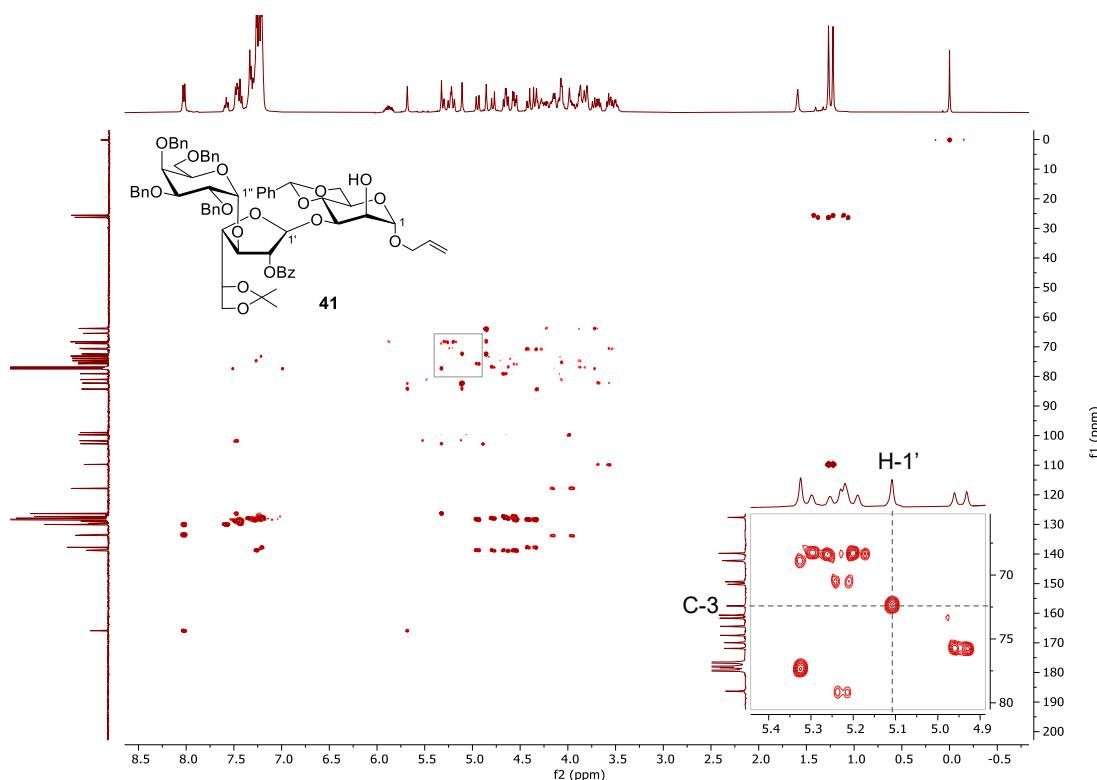
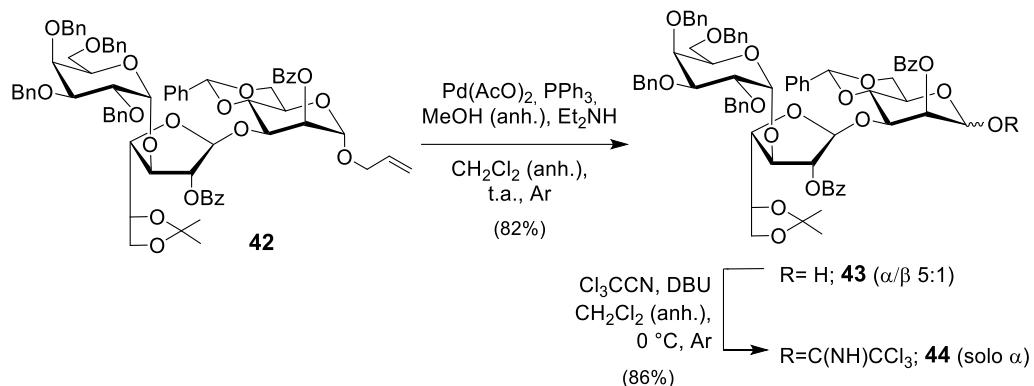


Figura 3.32. Espectro ^1H - ^{13}C HMBC (400 MHz, CDCl_3) de **41**.

Habiendo identificado a **41** como producto mayoritario de la glicosidación, se continuó trabajando con el resto del crudo sin purificar. La mezcla se trató con cloruro de benzoílo (Esquema 3.29), obteniéndose **42** como un sólido con 57% de rendimiento a partir de **29**. En el espectro protónico de **42**, la resonancia del H-2 de la D-Manp apareció desplazada >1.5 ppm hacia campos más bajos respecto de la misma señal en **41**, lo cual resultó consistente con la incorporación de un grupo atractor de electrones sobre esa posición. Sumado a esto, en el espectro de RMN ^{13}C se observó una nueva resonancia en la zona de carbonilos, confirmando la incorporación del grupo benzoílo a la molécula.

3.14.2. Activación del centro anomérico de 2,3,4,6-tetra-*O*-bencil- α -D-galactopiranósil-(1 \rightarrow 3)-2-*O*-benzoíl-5,6-*O*-isopropilidén- β -D-galactofuranósil-(1 \rightarrow 3)-4,6-*O*-bencilidén-2-*O*-benzoíl-D-manopiranosa

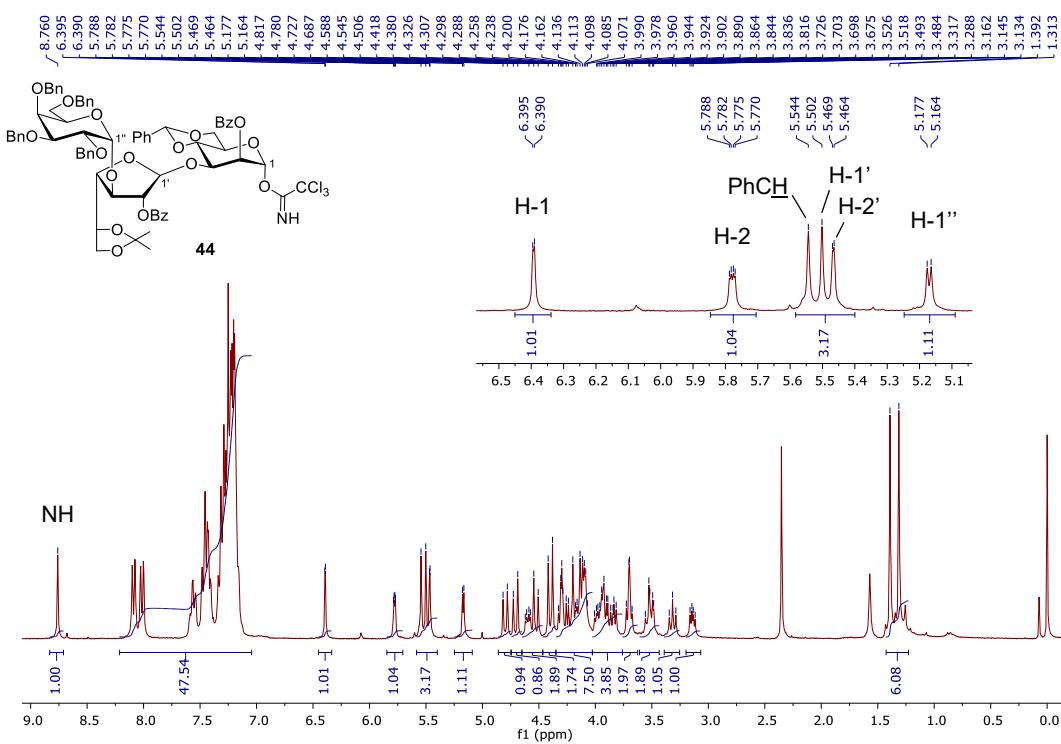
Para poder a introducir el amino *linker* al trisacárido sintetizado era necesario activar su extremo reductor. La estrategia empleada (Esquema 3.30) fue análoga a la utilizada anteriormente en la activación de **16** y **23**.



Esquema 3.30

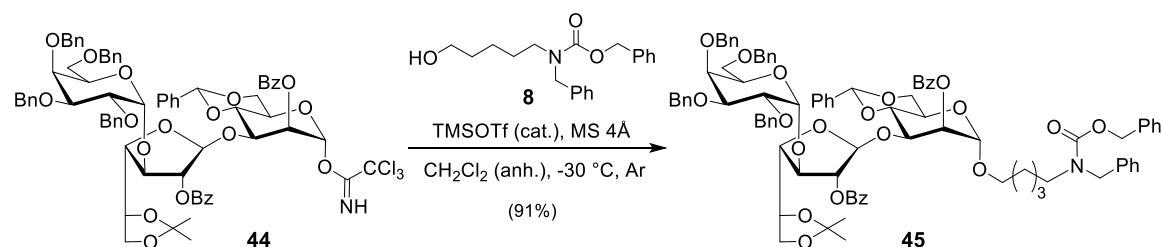
La reacción de **42** con tetrakis(trifenilfosfina)paladio(0) y dietilamina rindió el hemiacetal **43** con muy buen rendimiento (82%). El análisis por RMN mostró la desaparición de las señales asociadas al grupo alilo que estaban presentes en los espectros de **42** y confirmó la formación de una mezcla de hemiacetales α/β en relación 5:1. El anómero α resultó el mayoritario en concordancia con su mayor estabilidad termodinámica debida al efecto anomérico.

Seguidamente, el trisacárido **43** se trató con tricloroacetonitrilo y DBU para dar el imidato **44**, el cual se aisló con 86% de rendimiento (Esquema 3.30). La formación del tricloroacetimido se evidenció en el espectro RMN ^1H por la aparición de la resonancia del NH del imidato a δ 8,76 ppm (Figura 3.33). A su vez, el H-1 se identificó como un doblete a δ 6,39 ppm ($^3J_{1,2} = 1,5$ Hz), muy desprotegido por acción del nuevo grupo unido en esa posición, con una constante de acoplamiento consistente con la formación del manopiranosil imidato de configuración 1,2-*trans*.

Figura 3.33. Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) de 44.

3.14.3. Glicosidación. Obtención del *N*-(bencil)benciloxicarbonil-5-aminopentil 2,3,4,6-tetra-O-bencil- α -D-galactopiranósil-(1 \rightarrow 3)-2-O-benzoíl-5,6-O-isopropilidén- β -D-galactofuranósil-(1 \rightarrow 3)-4,6-O-bencilidén-2-O-benzoíl- α -D-manopiranósido (45)

Una vez aislado y caracterizado el imidato donor **44**, se procedió con la glicosidación con el amino *linker*. Para efectuar esta reacción, se emplearon las condiciones optimizadas previamente durante el estudio de la manosilación de **18** con el aceptor **8**, descripto en la primera parte de este capítulo.



Esquema 3.31

La glicosidación de **44** con **8** permitió obtener el trisacárido **45** con excelente rendimiento (91%, Esquema 3.31). Es importante destacar que, en este caso, la glicosidación rindió como único producto el α -glicósido 1,2-*trans*, favorecido por la participación anquimérica del benzoílo en C-2 de la unidad de D-Man.

Resultados y discusión

La incorporación del amino *linker* a la molécula se evidenció por la presencia de las señales alifáticas características de su cadena alquílica y de los metilenos asociados a sus grupos protectores, tanto en el espectro RMN ^1H (Figura 3.34) como ^{13}C (Figura 3.35). El H-1 de la unidad D-Manp apareció en el espectro protónico a $\delta \sim 4,87$ ppm como un multiplete por efecto de la formación de rotámeros asociados a la presencia del grupo carbamato en el *linker*. La estereoquímica α del nuevo enlace se confirmó a través de un experimento ^1H - ^{13}C HSQC acoplado, en el que se observó que la constante de acoplamiento $^1J_{\text{C},\text{H}}$ del C-1 era de 177 Hz, valor característico de manósidos 1,2-*trans* (Figura 3.36).

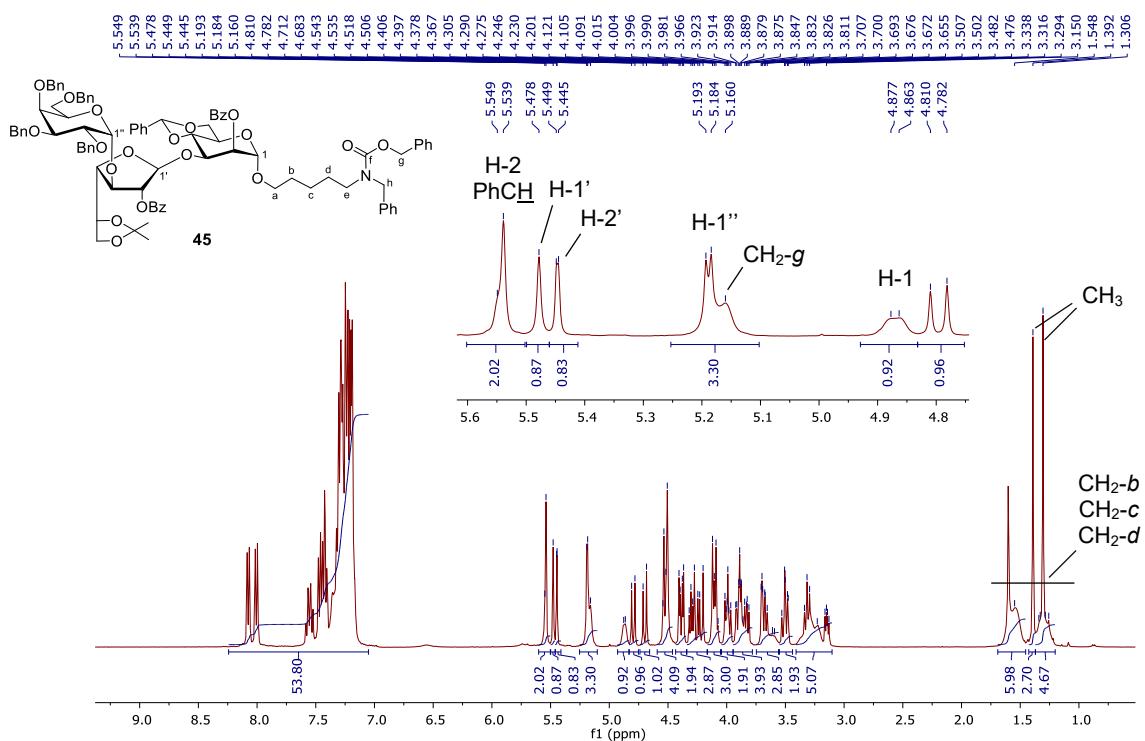
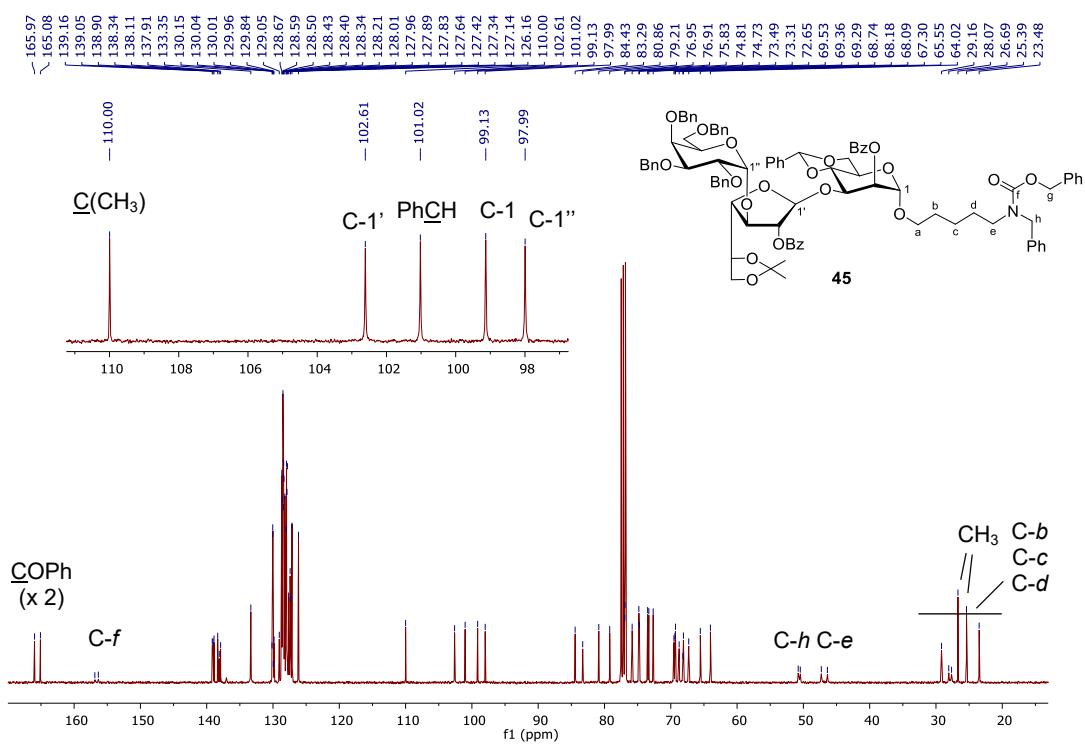
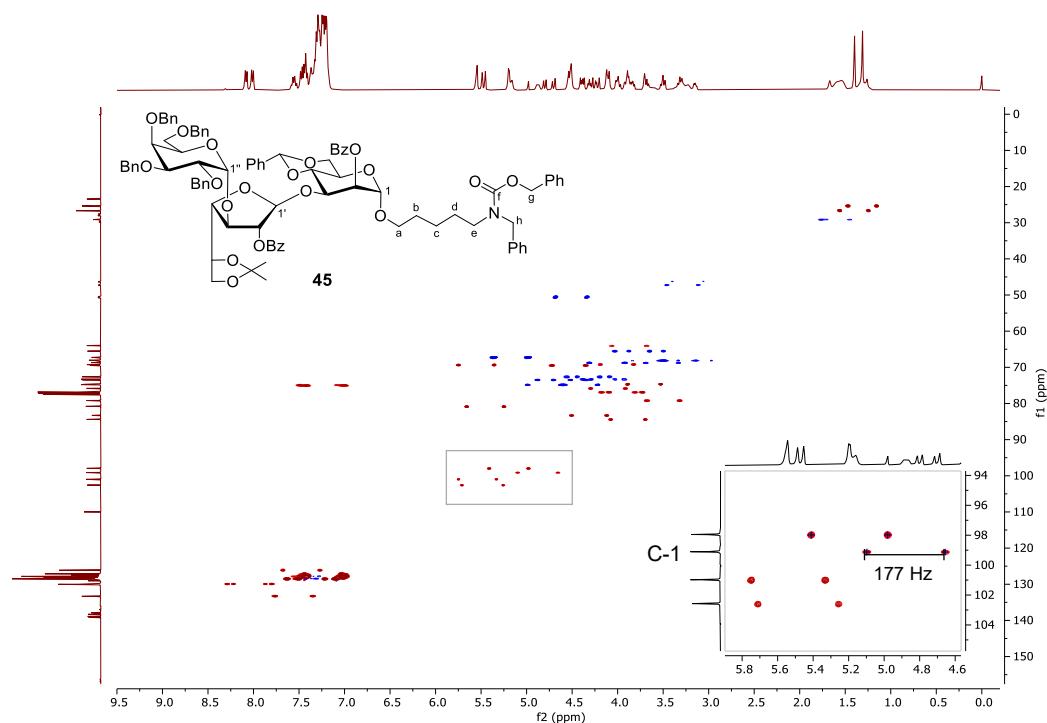
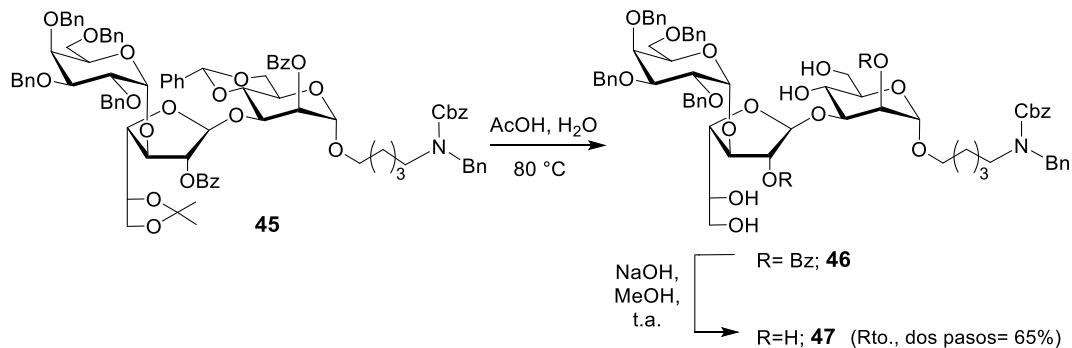


Figura 3.34. Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) de **45**.

Figura 3.35. Espectro de RMN ^{13}C (101 MHz, CDCl_3) de **45**.Figura 3.36. Espectro ^1H - ^{13}C HSQC acoplado (400 MHz, CDCl_3) de **45**.

3.14.4. Desprotección. Obtención de 5-aminopentil α -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 3)- β -D-galactofuranosil-(1 \rightarrow 3)- α -D-manopiranósido (5)

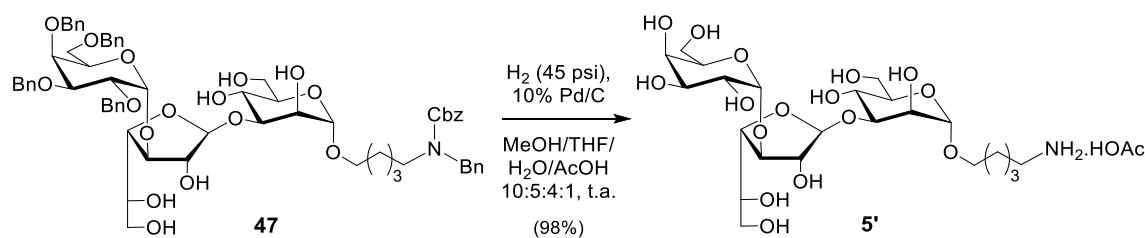
Una vez aislado el glicósido **45**, era necesario liberar el trisacárido de sus grupos protectores para obtener el 5-aminopentil glicósido **5**, objeto de síntesis. Para ello, se utilizó una secuencia de reacciones de desprotección análoga a la aplicada sobre **38**.



Esquema 3.32

En primer lugar, se efectuó la hidrólisis de los acetales protectores de las unidades de D-Galf y D-Manp de **45** por tratamiento en medio ácido a 80 °C (Esquema 3.32). El análisis por RMN del crudo de reacción evidenció la formación del compuesto **46** como producto mayoritario, ya que no se observaron las resonancias de los núcleos asociados a los grupos bencildén e isopropilidén presentes en los espectros de **45**.

Luego, sobre el crudo del paso anterior se efectuó la hidrólisis en medio básico de los grupos ésteres, que permitió obtener **47** con 65% de rendimiento en dos pasos a partir de **45** (Esquema 3.32). La obtención del producto **47** se confirmó en el espectro de RMN ^{13}C con la desaparición de las resonancias de los carbonilos, y en el espectro de ^1H por el corrimiento >1 ppm hacia campos más altos de las resonancias de los protones ubicados en las posiciones desbenzoiadas (H-2' y H-2), que aparecieron a δ 4,35 y 3,83 ppm, respectivamente.

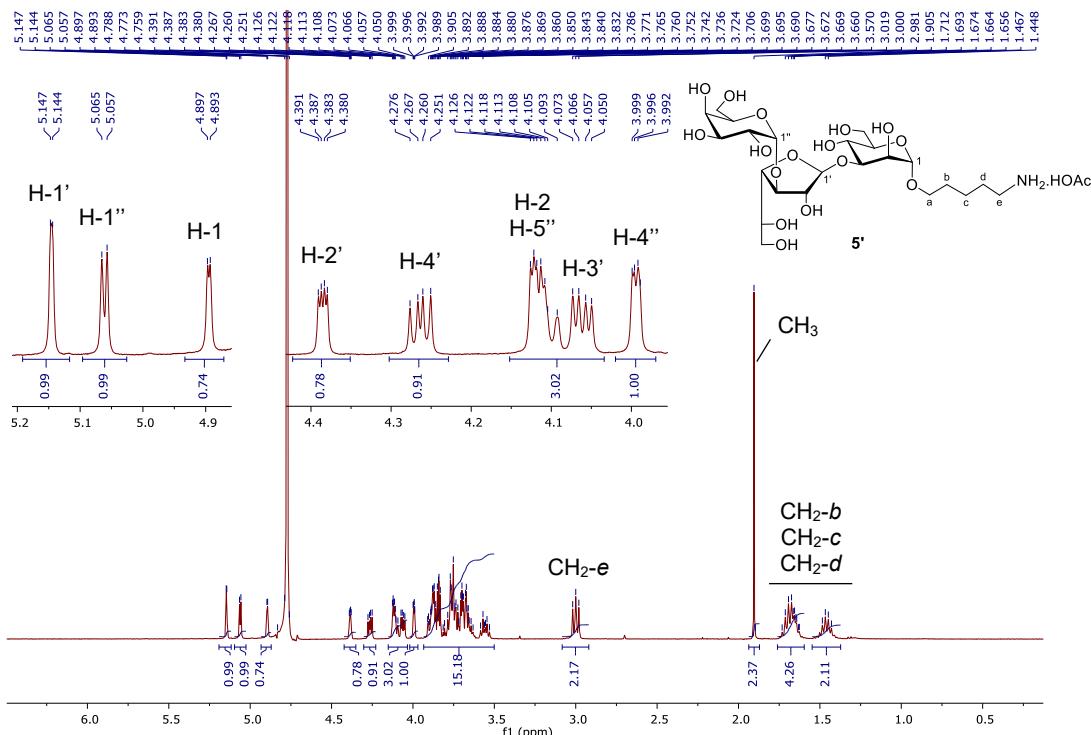


Esquema 3.33

La última etapa del trabajo consistió en la desprotección de la molécula por remoción de los grupos protectores del amino terminal y de los éteres bencílicos presentes en la unidad de D-Galp. Para ello, se realizó la hidrogenólisis a alta presión de **47** en una mezcla

de solventes MeOH/THF/H₂O/AcOH (Esquema 3.33), que permitió aislar el compuesto objetivo **5** con excelente rendimiento (98%).

En los espectros de RMN ¹H y ¹³C (Figura 3.37 y Figura 3.38) se identificaron señales consistentes con la obtención del glicósido **5**, junto con resonancias a δ 1,91 ppm (RMN ¹H) y 23,9 ppm (RMN ¹³C), características de un grupo metilo. Estas señales son consistentes con la formación del acetato de **5** (**5'**), en analogía con los productos de hidrogenólisis obtenidos en la síntesis de **1-4**.



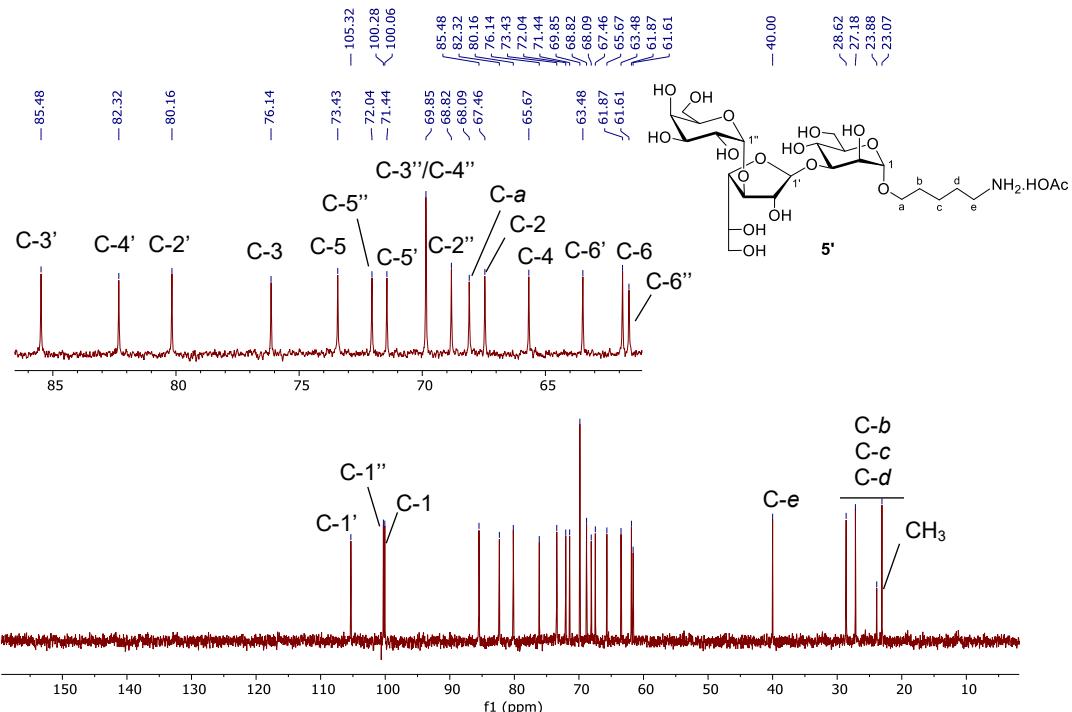


Figura 3.38. Espectro de RMN ^{13}C (101 MHz, D₂O) de **5'**.

3.15. Conclusiones

En esta segunda parte del capítulo se presentó la primera síntesis de los 5-aminopentil glicósidos **4** y **5**, a partir de los precursores **29**, **7** y **8**. Para optimizar la obtención de **29** se introdujeron mejoras en los protocolos utilizados como referencia, lo que permitió incrementar los rendimientos y simplificar las operaciones involucradas en los distintos pasos de reacción.

Las reacciones desarrolladas en esta sección condujeron a los compuestos objetivo, presentes en el *core* del LPG y en el extremo no reductor del GIPL-2, y al aislamiento y caracterización de 10 nuevas moléculas no reportadas previamente.

Finalmente, los compuestos **4'** y **5'** se reservaron para los ensayos de reconocimiento de anticuerpos por microarreglos de glicanos, que se describen a continuación.

Capítulo 4

Evaluación de la antigenicidad de los galactofuranósidos

4.1. Introducción

Como ya se ha mencionado, en las infecciones por microorganismos patógenos, los carbohidratos de superficie son reconocidos por componentes del sistema inmune humano, lo que a menudo desencadena la producción de anticuerpos anti-glicano.^[297,298] En el caso de la infección por *Leishmania*, los glicolípidos de superficie más abundantes, el lipofosfoglicano (LPG) y los glicoinositolfosfolípidos (GIPLs), inducen la generación de anticuerpos específicos,^[77,299,300] lo que los convierte en blancos prometedores para el desarrollo de plataformas diagnósticas.

Habiendo sintetizado los 5-aminopentil galactofuranósidos 1-5, fragmentos terminales del GIPL-1 y GIPL-2 de *Leishmania braziliensis*, se procedió a evaluar su antigenicidad con el objetivo de utilizarlos como elementos de reconocimiento de anticuerpos en sueros de pacientes con leishmaniasis tegumentaria americana (LTA). En esta etapa se investigaron los motivos estructurales involucrados en el reconocimiento inmunológico y se analizó la posible presencia de interacciones cruzadas con sueros de pacientes con enfermedad de Chagas.

Dado que la complejidad sintética de los oligosacáridos dificulta la obtención de grandes cantidades de material, los microarreglos de glicanos son plataformas ideales para evaluar su inmunorreactividad. Esta técnica permite realizar gran cantidad de ensayos con cantidades mínimas de compuesto (en el orden de los miligramos), y su formato posibilita la detección simultánea de distintos tipos de interacción mediante el uso de diversas sondas de detección secundaria específicas.^[140]

4.2. Análisis de la inmunorreactividad mediante microarreglos de glicanos

Para los estudios de inmunoreactividad, se utilizaron 16 sueros archivados de pacientes con diagnóstico positivo ($n = 8$) o negativo ($n = 8$) de leishmaniasis tegumentaria americana (LTA). Las muestras fueron provistas por el Dr. J. Diego Marco del Instituto de Patología Experimental (Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Nacional de Salta) y correspondían a sueros de individuos residentes en la provincia de Salta, quienes se presentaron a la consulta médica con lesiones sospechosas de infección por *Leishmania*. Para el diagnóstico de los pacientes, los sueros se analizaron por dos técnicas: PCR y ELISA. Para ampliar la información sobre la procedencia de las muestras, se sugiere consultar el Capítulo 6, Sección 6.2.1.1.

El procedimiento experimental para realizar el ensayo de inmunorreactividad mediante microarreglos de glicanos constó de cuatro etapas principales: (1) el anclaje de los glicósidos a una superficie, (2) la incubación de la superficie con los sueros de pacientes, (3) la incubación con anticuerpos secundarios marcados con fluoróforos, y (4) la detección de la fluorescencia (Figura 4.1.A). Todas estas operaciones se realizaron en el *Laboratorio de Glicobiología y Desarrollo de Vacunas del Max Planck Institute of Colloids and Interfaces* situado en Potsdam, Alemania.

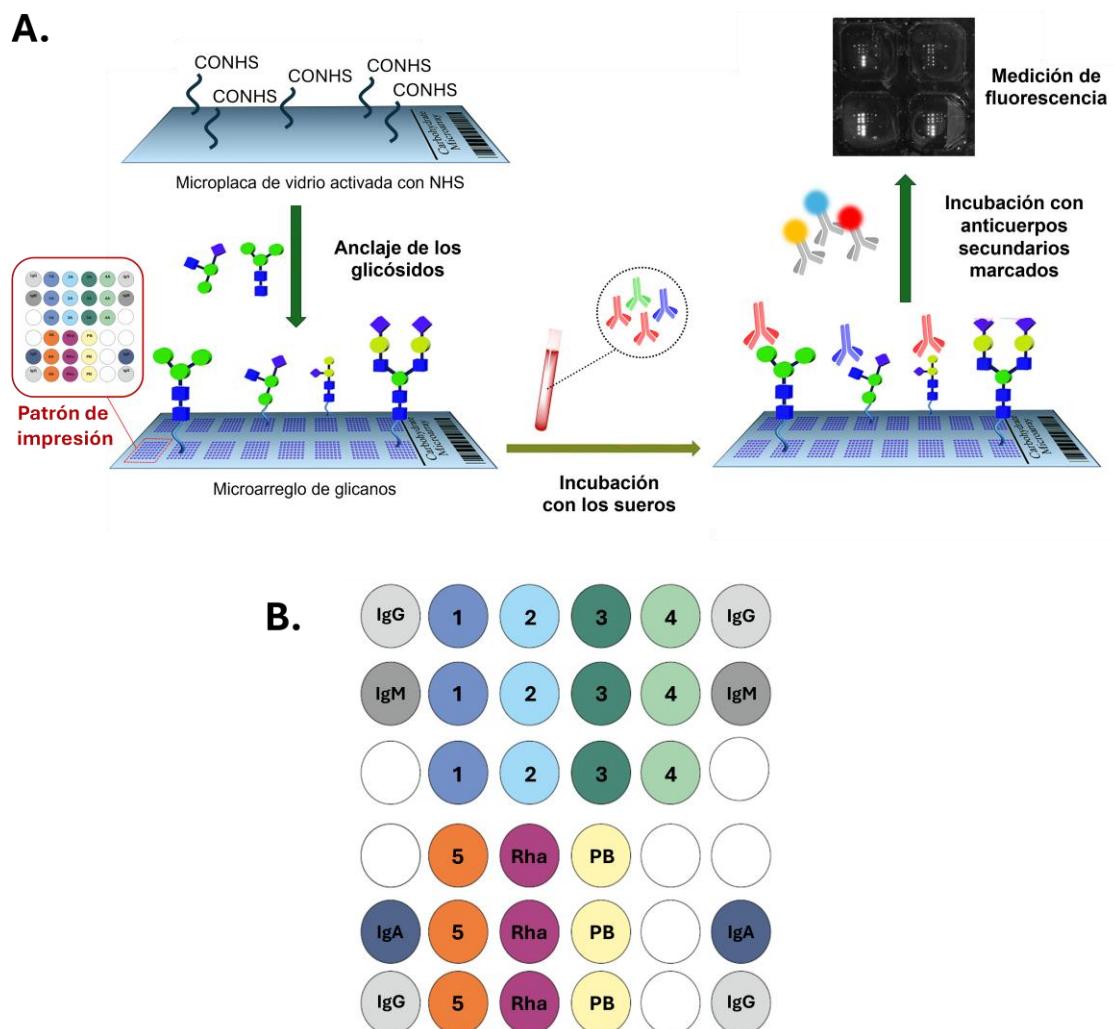


Figura 4.1. (A) Flujo de trabajo empleado en el ensayo de reconocimiento de anticuerpos mediante microarreglos de glicanos. Imagen adaptada de Pai J. et al.^[301] (B) Detalle del patrón impreso sobre las placas en 64 campos idénticos conformando una grilla de 4 x 16. Los números corresponden a los 5-aminopentil glicósidos sintéticos 1-5. “IgG”, “IgM” e “IgA”= inmunoglobulinas comerciales, utilizadas como controles de isotipo; “Rha” = Rha(α1-2)Rha(α1-2)Rha(α1-1) aminopentanol, utilizado como control positivo; “PB”=buffer de impresión (*printing buffer*), utilizado como control negativo.

En primer lugar, los glicanos se anclaron a placas de vidrio (portaobjetos) funcionalizadas con ésteres de NHS, por reacción del grupo amino terminal de los compuestos **1-5** para dar uniones amida. Para ello, se utilizó una plataforma robótica que permitió sembrar los glicósidos sintéticos según el patrón de impresión esquematizado en la Figura 4.1.B. Este patrón se replicó 64 veces sobre la superficie del portaobjetos, formando una grilla de 4x16 campos idénticos. En cada campo se incluyeron, además de los glicanos **1-5**, diferentes controles: posiciones sin glicano como control negativo (“PB”); posiciones modificadas con un trímero de L-ramnosa (“Rha”), de alta afinidad por anticuerpos humanos, como control positivo; y posiciones modificadas con inmunoglobulinas comerciales como controles positivos de isotipo.

Una vez preparados los microarreglos, las placas se incubaron con sueros individuales de pacientes positivos y negativos para LTA (“LTA +” y “LTA -”, respectivamente), colocando un suero por cada campo de la placa tal como se esquematiza en la Figura 4.2. Luego de la incubación y de los lavados correspondientes, se emplearon anticuerpos secundarios marcados con fluoróforos específicos para detectar los anticuerpos capturados sobre la superficie. Se utilizaron anticuerpos anti-IgG, anti-IgM y anti-IgA, conjugados con “AlexaFluor488”, “AF637” y FITC, respectivamente, los cuales fueron detectados mediante un lector de fluorescencia. Las señales de “AlexaFluor488” y FITC se registraron a 488 nm, mientras que la de “AF637” se midió a 637 nm. A modo de ejemplo, la Figura 4.2.A muestra un fragmento de la imagen obtenida tras el escaneo a 637 nm de una de las placas. Dentro de cada campo (I-IV), se observa la fluorescencia correspondiente a cada glicósido o control, dispuestos según el patrón de impresión (Figura 4.2.B), en respuesta a la incubación con una determinada muestra de suero (Figura 4.2.C).

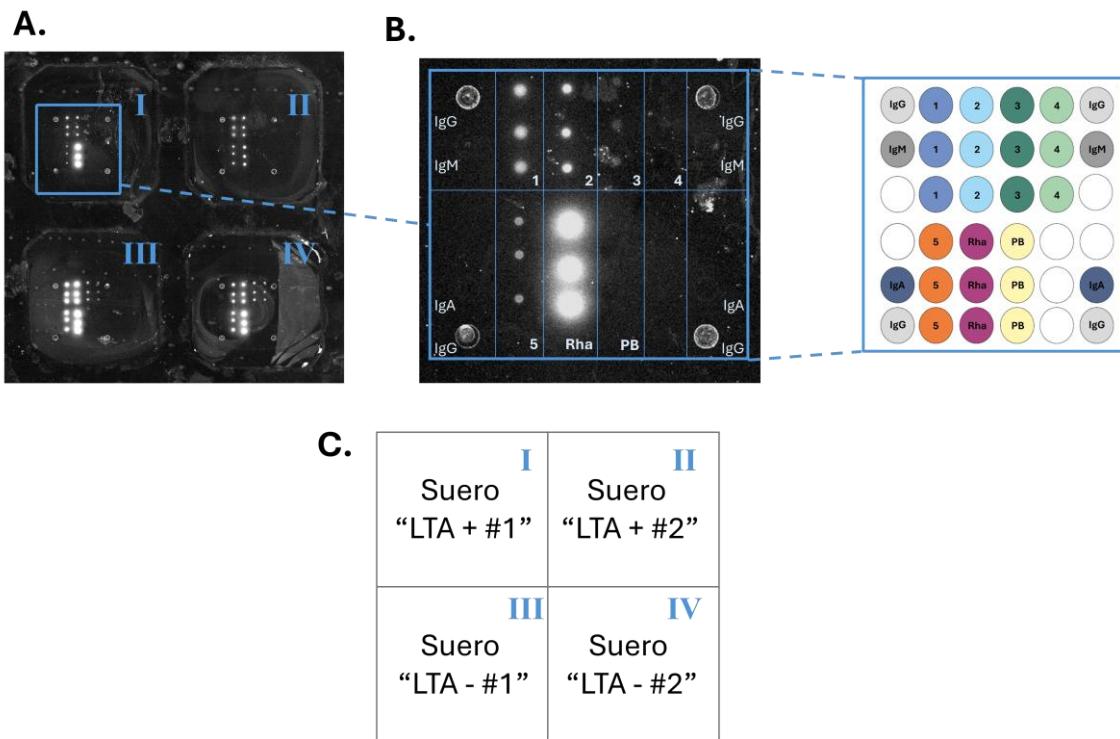


Figura 4.2. (A) Fragmento de la imagen obtenida tras la detección de fluorescencia a 637 nm de un microarreglo. Cada cuadrante (I-IV) fue incubado con una muestra distinta de suero “LTA +” o “LTA -”. Los puntos brillantes indican la presencia de anticuerpos IgG en esa posición. (B) Ampliación del cuadrante I, donde se observa la fluorescencia registrada en cada punto del patrón de impresión. (C) Detalle de la identidad de las muestras de suero ensayadas en cada campo del panel A. “LTA +”= suero de paciente positivo para LTA; “LTA -” = suero de paciente negativo para LTA.

Una vez obtenidos los valores de fluorescencia, los datos fueron clasificados y procesados por separado según el isotipo de inmunoglobulina evaluado (IgG, IgM o IgA). Se construyeron gráficos representando valores promedio de fluorescencia de los grupos de sueros positivos (“LTA +”) y negativos (“LTA -”), en función del glicósido ensayado. Luego, con el objetivo de determinar si existían diferencias estadísticamente significativas en los niveles de anticuerpos anti-glicanos entre ambos grupos, se utilizó el Test de Mann-Whitney.

En el caso de IgA, se observaron intensidades de fluorescencia bajas en todas las muestras analizadas, sin diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de sueros positivos y negativos (Figura 4.3). Dado el escaso reconocimiento de los glicósidos por anticuerpos IgA séricos, este ensayo se descartó como estrategia para el desarrollo de una herramienta de diagnóstico.

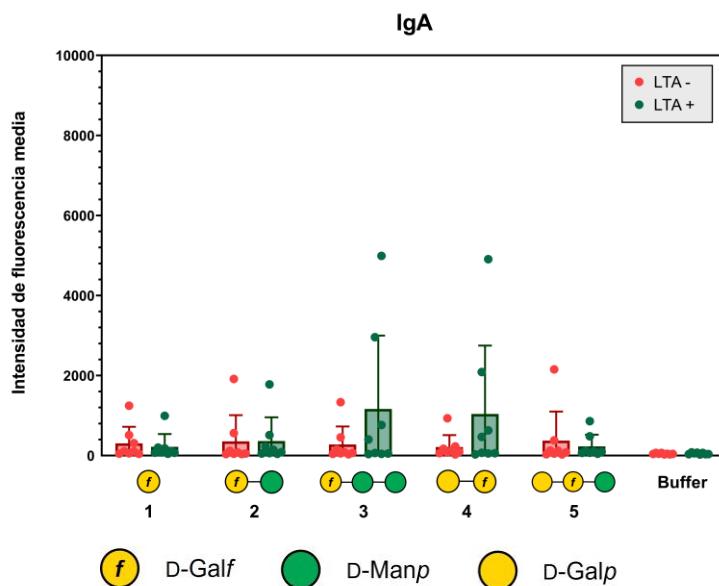


Figura 4.3. Análisis de la concentración de anticuerpos IgA afines a los glicósidos sintéticos **1-5** en sueros individuales de pacientes diagnosticados como positivos (verde, “LTA +”) o negativos (rojo, “LTA -“) de LTA. Los sueros se diluyeron 1:100 en 1% BSA-PBS. Se presentan los valores medios con desvíos estándar. El grupo positivo se comparó con el negativo utilizando el test múltiple de Mann-Whitney, con (****) $p<0,0002$, (**) $p<0,0021$ y (*) $p<0,0332$.

En IgG, los valores medios de fluorescencia fueron más elevados que en IgA para todos los glicósidos ensayados (Figura 4.4), aunque no se detectaron diferencias estadísticamente significativas en los niveles de anticuerpos específicos anti-glicanos entre los grupos “LTA +” y “LTA -“. No obstante, para el compuesto **3** se registró un p valor de 0,065, cercano al criterio de aceptación ($p<0,0332$). Dado que la muestra de sueros analizada fue pequeña, sería pertinente reevaluar este glicósido en un estudio con una cohorte de mayor tamaño para confirmar su potencial diagnóstico.

En el caso de IgM, se registraron valores de fluorescencia mayores y diferencias más marcadas entre sueros positivos y negativos, en comparación con lo observado para IgG (Figura 4.5). El análisis estadístico reveló diferencias significativas en los niveles de IgM específicas frente a los glicósidos **3** ($p=0,0006$) y **4** ($p=0,0104$). El análisis estadístico reflejó una antigenicidad más marcada del trisacárido D-Galf- β -(1→3)-D-Manp- α -(1→3)-D-Manp- α (**3**), fragmento terminal del GIPL-1, con respecto al compuesto D-Galp- α -(1→3)-D-Galf- β (**4**), motivo terminal del GIPL-2.

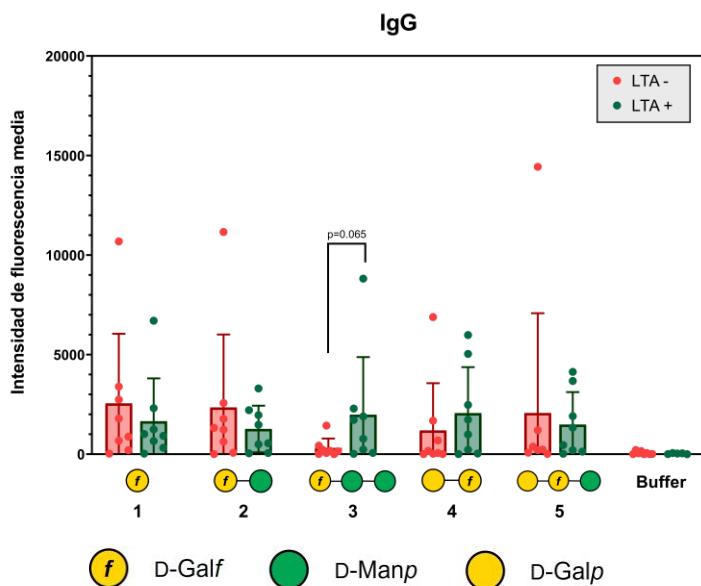


Figura 4.4. Análisis de la concentración de anticuerpos IgG afines a los glicósidos sintéticos **1-5** en sueros individuales de pacientes diagnosticados como positivos (verde, “LTA +”) o negativos (rojo, “LTA -”) de LTA. Los sueros se diluyeron 1:100 en 1% BSA-PBS. Se presentan los valores medios con desvíos estándar. El grupo positivo se comparó con el negativo utilizando el test múltiple de Mann-Whitney, con (****) $p<0,0002$, (**) $p<0,0021$ y (*) $p<0,0332$.

Estos resultados sugieren, en primer lugar, que el residuo de α -D-Galp, presente en **4** pero ausente en **3**, no es imprescindible para inducir una respuesta humoral IgM frente al parásito. Considerando que este residuo es altamente inmunogénico en primates,^[221] es posible que la capacidad diagnóstica de **4** esté atenuada por la presencia de anticuerpos anti α -Gal preexistentes en sueros de pacientes no infectados.

Asimismo, la mayor inmunorreactividad del compuesto **3** podría deberse, por un lado, a la ubicación del residuo de β -D-Galf en el extremo no reductor del oligosacárido, o bien a que **3** representa un fragmento más extenso de la estructura de los GIPLs tipo-II.

Por último, la composición de anticuerpos observada podría indicar que el GIPL-1 es una estructura más inmunogénica, o bien más abundante en la superficie de *Leishmania braziliensis*, en comparación con el GIPL-2.

En general, los ensayos mostraron la presencia de inmunoglobulinas IgM e IgG con afinidad por el glicósido **1** (la unidad de β -D-Galf) tanto en sueros positivos como negativos. La detección de estos anticuerpos en individuos no infectados sugiere que los pacientes presentaban un nivel basal de inmunoglobulinas específicas frente a este residuo, posiblemente debido a exposiciones previas a microorganismos que contienen galactofuranosa en su pared celular, tales como hongos (*Aspergillus*,

Paracoccidioides),^[302] bacterias patógenas (*M. tuberculosis*, *K. pneumoniae*, *Salmonella enterica*),^[303-305] y miembros de la microbiota humana (*Bacteroides eggerthii*).^[306] En consecuencia, el uso del residuo de β -D-Galf aislado resulta inadecuado para el desarrollo de herramientas diagnósticas para *L. braziliensis*.

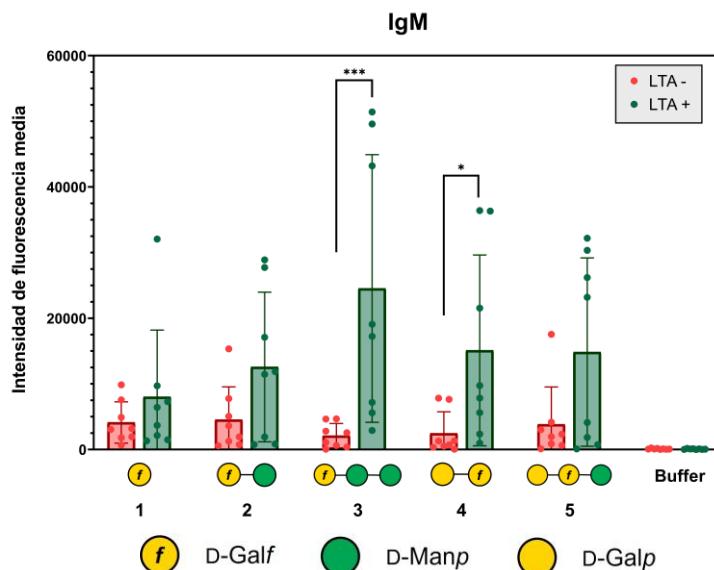


Figura 4.5. Análisis de la concentración de anticuerpos IgM afines a los glicósidos sintéticos 1-5 en sueros individuales de pacientes diagnosticados como positivos (verde, “LTA +”) o negativos (rojo, “LTA -”) de LTA. Los sueros se diluyeron 1:100 en 1% BSA-PBS. Se presentan los valores medios con desvíos estándar. El grupo positivo se comparó con el negativo utilizando el test múltiple de Mann-Whitney, con (***): $p < 0,0002$, (**) $p < 0,0021$ y (*) $p < 0,0332$.

Por otro lado, se observó que los sueros infectados presentaron predominancia de anticuerpos anti-glicanos IgM respecto de los IgG. La predominancia de los anticuerpos IgM podría estar relacionada con el tipo de respuesta inmune que los seres humanos desencadenan frente a los carbohidratos. Estas estructuras actúan como antígenos T-independientes tipo 2 (TI-2), y se caracterizan por inducir preferentemente la secreción de anticuerpos IgM y restringir el cambio de isotipo a IgG.^[298,307] Si bien no hay antecedentes de respuestas IgM sostenidas en leishmaniasis cutánea y mucocutánea, este fenómeno ha sido observado en pacientes con leishmaniasis visceral^[308] y en otras infecciones por patógenos intracelulares, como *Coxiella burnetii* y *Ehrlichia muris*.^[309,310]

Una consideración importante en la búsqueda de métodos de diagnóstico de LTA basados en carbohidratos de *L. braziliensis*, es la posibilidad de reacción cruzada con anticuerpos generados frente a *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico de la enfermedad de Chagas. Esta inquietud se debe a que ambas infecciones son endémicas en el

Resultados y discusión

noroeste argentino,^[311] y a que existen motivos glicosídicos superficiales compartidos entre ambos parásitos.^[312]

Es por esto que en los ensayos por microarreglos descriptos anteriormente se incluyeron pootes de sueros de pacientes con diagnóstico positivo y negativo de enfermedad de Chagas ($n = 10$). Luego, la respuesta se comparó con la registrada frente a pootes de los sueros positivos y negativos para LTA ($n = 8$) estudiados previamente (Figura 4.6).

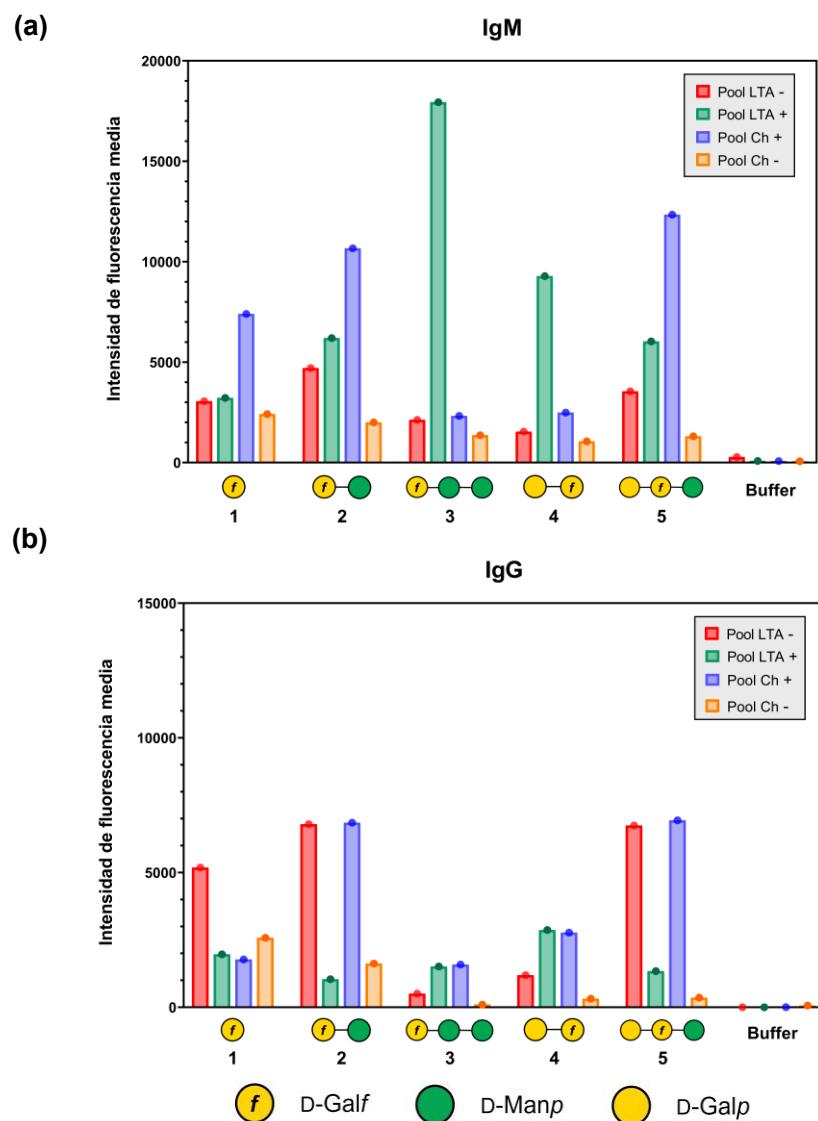


Figura 4.6. Análisis de la concentración de anticuerpos (a) IgM y (b) IgG afines a los glicosídos sintéticos 1-5 en pootes de sueros ($n = 8$) de pacientes diagnosticados como negativos (rojo, “Pool LTA -“) o positivos (verde, “Pool LTA +“) para LTA y en pootes de sueros ($n = 10$) de pacientes positivos (azul, “Pool Ch +“) o negativos (naranja, “Pool Ch -“) para la enfermedad de Chagas. Las muestras se diluyeron 1:100 en 1% BSA-PBS.

Los sueros de pacientes con enfermedad de Chagas presentaron anticuerpos IgM e IgG específicos para el compuesto **2**, correspondiente al disacárido β -D-Galf-(1 \rightarrow 3)- α -D-Manp (Figura 4.6). Esta observación fue consistente con la presencia de este motivo en las mucinas y GIPLs de *T. cruzi*, y evidenció que este fragmento no era un candidato adecuado para el desarrollo de un test de diagnóstico específico para LTA. Cabe destacar que esta respuesta frente a sueros de pacientes chagásicos ya había sido observada por Viana S. M. *et al.* en un ensayo por ELISA.^[223] En contraste, los sueros de individuos infectados con *T. cruzi* presentaron bajos niveles de anticuerpos IgM e IgG frente a los galactofuranósidos **3** y **4** (Figura 4.6), que había sido identificados previamente como candidatos promisorios.

En resumen, los microarreglos de los glicanos **1-5** demostraron que los glicósidos **3** y **4** pueden ser utilizados para discriminar muestras de suero de pacientes con infecciones activas por *Leishmania braziliensis* de aquellos infectados por *T. cruzi*, mediante la detección de anticuerpos IgM específicos.

4.3. Conclusiones y perspectivas futuras

La tecnología de microarreglos de glicanos permitió evaluar exitosamente la antigenicidad de los glicósidos **1-5** sintetizados en esta tesis. La funcionalidad amino incorporada en el extremo reductor de los compuestos permitió el anclaje directo de las estructuras a las microplacas. De esta forma, se registraron los niveles de anticuerpos IgM, IgG e IgA presentes en sueros de pacientes diagnosticados con leishmaniasis tegumentaria americana y se observó, como tendencia general, la predominancia de los anticuerpos anti-glicanos IgM frente a los IgG, y una concentración muy baja de anticuerpos IgA.

La variedad de estructuras ensayadas permitió analizar la influencia de distintos motivos estructurales en la antigenicidad. Por un lado, se confirmó el rol de la β -D-galactofuranosa como motivo antigénico, aunque, el residuo en forma aislada no fue suficiente para discriminar sueros infectados de no infectados. Entre los glicósidos evaluados, los compuestos **3** y **4** se destacaron como los más promisorios para el diagnóstico serológico de leishmaniasis, siendo el trisacárido **3** el más inmunorreactivo. Este hallazgo sugiere que el residuo de α -Gal no es un determinante indispensable de la antigenicidad de los GIPLs tipo-II de *L. braziliensis*.

Por último, se evaluó la reactividad cruzada de los galactofuranósidos **1-5** frente a sueros de pacientes con enfermedad de Chagas. Se observaron bajos niveles de anticuerpos afines a los candidatos **3** y **4**, lo que refuerza su potencial como herramientas

Resultados y discusión

diagnósticas selectivas para LTA en el noroeste de Argentina, donde coexisten las infecciones por *L. braziliensis* y por *T. cruzi*.

A futuro, será fundamental validar su desempeño en cohortes mayores de pacientes con LTA y enfermedad de Chagas. Avanzar en esta investigación permitirá consolidar el uso de estos antígenos puros, obtenidos por síntesis química, como componentes principales de herramientas diagnósticas de interés para la salud pública.

Capítulo 5

Desarrollo de un glicobiosensor para diagnóstico serológico

5.1. Introducción

En Argentina, cientos de casos de LTA son reportados cada año.^[313] Al ser una enfermedad que afecta principalmente a individuos que residen en zonas aisladas y de bajos recursos, su diagnóstico suele basarse únicamente en la evaluación clínica de las lesiones, en el examen parasitológico de raspados o aspirados, y en datos epidemiológicos.^[89,314] Estas metodologías presentan baja sensibilidad y especificidad y con frecuencia retrasan el inicio del tratamiento adecuado. Si bien existen métodos más sensibles, como la PCR o los ensayos ELISA, estos requieren equipamiento y personal especializados que a menudo no están disponibles en centros médicos de baja complejidad.^[315] Es por esto que es necesario el desarrollo de métodos de diagnóstico de LTA que sean confiables, económicos y portables, para facilitar el acceso al tratamiento de toda la población.

Para cubrir esta necesidad, los biosensores electroquímicos se destacan por su alta especificidad y sensibilidad, bajo costo y su potencial de miniaturización para uso en puntos de atención primaria (*point-of-care*). En particular, la detección mediante espectroscopía de impedancia electroquímica (EIS) se ha convertido en una alternativa popular, ya que puede llevarse a cabo sin marcación (formato *label-free*), lo cual minimiza el costo del ensayo y los requerimientos de personal e insumos específicos.^[238]

Ante una infección parasitaria, el organismo huésped desencadena una respuesta humoral, por lo que los anticuerpos circulantes pueden actuar como biomarcadores de infección. Diversos grupos han demostrado que estos anticuerpos pueden detectarse por medio de biosensores electroquímicos. Chain C. Y. *et al.* emplearon la proteína *cruzipain*, aislada de la superficie del parásito *T. cruzi*, como biorreceptor para discriminar sueros infectados de no infectados mediante EIS.^[316] Por su parte, Martins B. R. y colaboradores utilizaron antígenos crudos de *L. infantum* para identificar pacientes con leishmaniasis visceral por voltametría cíclica, con alta selectividad y especificidad.^[317] A su vez, Cordeiro T. A. R. *et al.* aplicaron EIS para la detección de anticuerpos séricos en muestras humanas y caninas mediante el bioreconocimiento de proteínas recombinantes de los parásitos *L. infantum* y *T. cruzi*.^[213]

Usualmente, en los biosensores basados en EIS, la superficie del electrodo de trabajo se modifica con un biorreceptor capaz de interactuar de manera específica con el analito blanco. Existen múltiples ejemplos de biosensores electroquímicos con elementos de reconocimiento sacarídicos orientados al diagnóstico de patologías, ya sea para la detección de microorganismos patógenos o biomarcadores de enfermedad (por ejemplo,

biomoléculas de la superficie celular, anticuerpos o toxinas).^[318] En particular, para la detección de infecciones parasitarias, se ha reportado recientemente el desarrollo de un glicobiosensor impedimétrico basado en el fosfoglicano del glicosilfosfatidilinositol (GPI) de *Toxoplasma gondii*, obtenido por síntesis química, para la detección y cuantificación de anticuerpos IgM e IgG anti-GPI en individuos infectados.^[125]

Teniendo en cuenta los desarrollos de biosensores impedimétricos descriptos y las bondades de la EIS, nuestro trabajo se enfocó en el diseño y fabricación de un glicobiosensor orientado a la detección de anticuerpos específicos contra *L. braziliensis*. La estrategia consistió en inmovilizar los galactofuranósidos antigénicos sintetizados en esta tesis sobre la superficie de electrodos de oro, los cuales fueron luego tratados con sueros de pacientes negativos o positivos para LTA. La medición del espectro de impedancia del sistema en presencia de la pareja redox $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$, permitió evaluar si la interacción específica entre los anticuerpos séricos y los glicósidos inmovilizados genera una variación significativa en la respuesta electroquímica que permitiera diferenciar ambos grupos de muestras.

Entonces, en este capítulo se detallan: la construcción de la superficie sensora y su caracterización fisicoquímica y electroquímica; la evaluación del desempeño de la plataforma para la detección selectiva de anticuerpos séricos en muestras de pacientes con LTA por EIS; y la verificación de nuestras observaciones mediante una técnica *label-free* alternativa, la microbalanza de cristal de cuarzo con disipación.^[319]

5.2. Diseño de la superficie

Para la construcción del modelo de biosensor impedimétrico planteado, se eligió como sustrato un electrodo de oro, material caracterizado por sus propiedades conductoras, baja reactividad y alta biocompatibilidad.^[180] En particular, se decidió emplear electrodos de vidrio recubiertos de Au policristalino ya que son de bajo costo y pueden ensamblarse en el laboratorio.

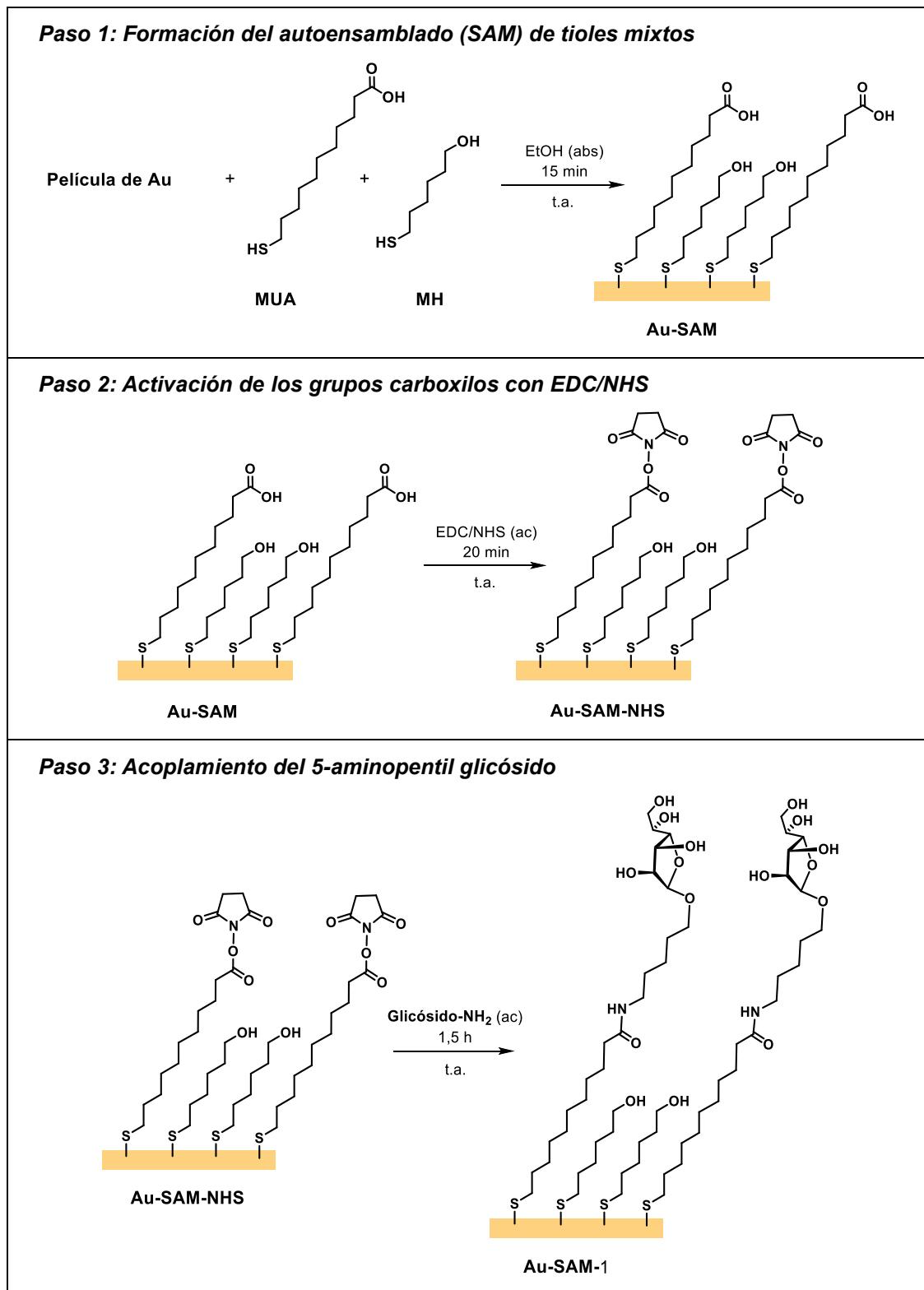
Una ventaja adicional del oro es su alta afinidad por los grupos tioles, que reaccionan de manera covalente con los átomos de oro formando uniones muy estables. Entonces, al sumergir una superficie de oro en una solución de alcanotioles, estos se depositan sobre la superficie formando monocapas autoensambladas (SAM). Lo más notable, es que las propiedades fisicoquímicas de la superficie (reactividad, hidrofilicidad, hidrofobicidad, espesor) pueden modularse variando la naturaleza de los grupos terminales (-CH₃, -COOH, -NH₂, -OH) y el largo de la cadena alquílica. De esta manera, es posible diseñar superficies que sirvan de punto de anclaje para los glicósidos

preparados. Las monocapas autoensambladas son muy utilizadas en la funcionalización de superficies ya que se preparan de forma sencilla y reproducible y permiten el estudio exhaustivo, por medio de diversas técnicas fisicoquímicas y electroquímicas, del patrón, densidad y orientación adoptados por las moléculas que las conforman.^[320,321]

En la elección del tiol adecuado para anclar los 5-aminopentil glicósidos sintetizados, se puso especial atención en la densidad y distribución de los azúcares sobre la superficie, ya que estos parámetros pueden afectar la afinidad de la interacción con proteínas o anticuerpos.^[116,322] Dado que, en general, las interacciones simples azúcar-anticuerpo son de baja afinidad, se requiere del contacto multivalente para aumentar la avidez.^[115,323] Entonces, un número reducido de azúcares en la superficie puede resultar insuficiente para la captura del analito blanco. Sin embargo, una alta densidad de ligandos puede limitar el acceso del analito a la superficie sensora por impedimento estérico^[324,325] o provocar cambios en las propiedades de la superficie.^[326,327] En consecuencia, la densidad de carbohidratos inmovilizados debe ajustarse cuidadosamente para maximizar la captura del analito sin comprometer la funcionalidad de la superficie.

Para ajustar este parámetro se recurrió al uso de una SAM mixta de dos componentes: un tiol con grupo carboxilo terminal reactivo frente al amino terminal de los compuestos **1–5**, y un tiol con un grupo funcional inerte. Los elegidos fueron el ácido 11-mercaptoundecanóico (MUA) y el mercaptohexanol (MH), una combinación ampliamente reportada para la inmovilización de diversas biomoléculas, incluyendo carbohidratos.^[196,328–330]

El protocolo de acoplamiento consistió de tres pasos: *(i)* formación del autoensamblado de tioles, *(ii)* activación de los grupos carboxilo con NHS y, *(iii)* acoplamiento del 5-aminopentil glicósido elegido (Esquema 5.1).



Esquema 5.1. Esquema de tres pasos empleado para la funcionalización de una superficie de oro con un 5-aminopentil glicósido (se ejemplifica con **1**) a través de una monocapa de tioles mixtos autoensamblados (SAM mixta).

Habiendo definido el protocolo de funcionalización de superficies de oro con los 5-aminopentil glicósidos sintéticos, se construyeron modelos de la superficie sensora con

el fin de estudiar sus propiedades. Se utilizaron técnicas fisicoquímicas y electroquímicas para determinar características como la morfología, composición atómica superficial y propiedades electroquímicas, y para monitorear la eficiencia del protocolo de funcionalización elegido. Las técnicas empleadas fueron: microscopía de fuerza atómica (AFM), microscopía de efecto túnel (STM), espectroscopía fotoelectrónica de rayos X (XPS), voltametría cíclica (CV) y espectroscopía de impedancia electroquímica (EIS). Los fundamentos de cada una de estas técnicas y sus aplicaciones se detallan en el Apéndice.

5.3. Caracterización de superficies funcionalizadas con glicósidos

5.3.1. Análisis morfológico por AFM y STM

Dado que los biosensores estarían compuestos por electrodos de Au policristalino, se utilizó este mismo sustrato para estudiar la topografía y caracterizar la SAM mediante AFM. En este ensayo se utilizó el 5-aminopentil β -D-galactofuranósido (**1**) ya que era el glicósido más sencillo disponible y su residuo sacárido estaba presente en el resto de los compuestos sintetizados. Para facilitar la identificación de las cadenas glicosiladas inmovilizadas sobre la superficie, se empleó una mezcla de MUA/MH 1:2, con el objetivo de generar una capa glicosilada densa y, en principio, más fácilmente detectable.

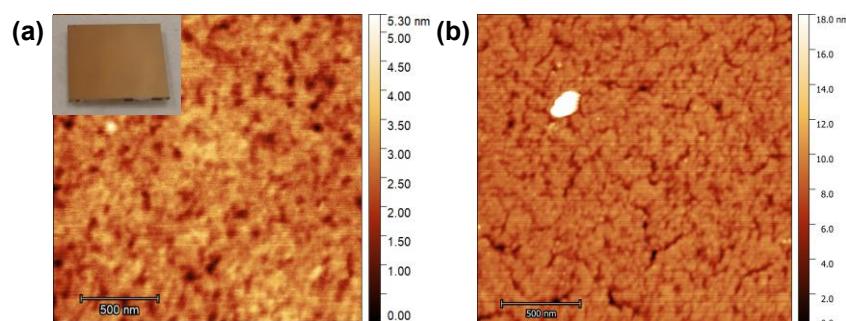


Figura 5.1. Imágenes tomadas por AFM en modo contacto intermitente (*tapping*) de (a) un electrodo de Au policristalino limpio, y (b) un electrodo de Au policristalino modificado con **1** (“Au-SAM-1”). En la esquina superior izquierda de la figura (a) se incluye una fotografía de un electrodo policristalino limpio.

En la imagen del electrodo tomada antes del protocolo de acoplamiento de los azúcares (Au limpio) (Figura 5.1.a) se observó una superficie que, a pesar de ser macroscópicamente plana (ver imagen en la esquina superior izquierda), a nivel microscópico presentaba rugosidades. El análisis del perfil de alturas evidenció una rugosidad media de 0,4 nm, típica de electrodos preparados por desmolde en plantilla de Si/SiO₂. Este espesor, equivalente a aproximadamente dos monocapas de átomos de Au, daba una superficie considerablemente plana, pero sin regiones atómicamente planas o “terrazas”, como las que se observan en los monocróstales de oro. Por su parte, la imagen

de la superficie “Au-SAM-1” (Figura 5.1.b), tomada luego del acoplamiento de **1**, resultó muy similar a la del oro limpio, por lo que no había evidencia del anclado exitoso del azúcar. Esto podría deberse a que las diferencias de morfología se vieron enmascaradas por la rugosidad intrínseca del sustrato.

Entonces, para estudiar la morfología de la monocapa depositada y confirmar la incorporación del glicósido, fue necesario partir de un sustrato con regiones atómicamente planas, para lo cual se empleó un monocrystal de Au(111). El uso de este sustrato tiene la ventaja adicional de permitir el uso de STM, una técnica muy sensible a variaciones en la topología superficial y capaz de visualizar patrones de autoensamblado de tioles altamente ordenados, inaccesibles por otras técnicas (véase Figura 5.3).

Por medio de STM se estudiaron los cambios en la superficie: (a) previo a la modificación (Au limpio), (b) al finalizar el tratamiento con MUA/MH 1:2 (“Au-SAM”) y (c) al finalizar la reacción con el 5-aminopentil glicósido (“Au-SAM-1”).

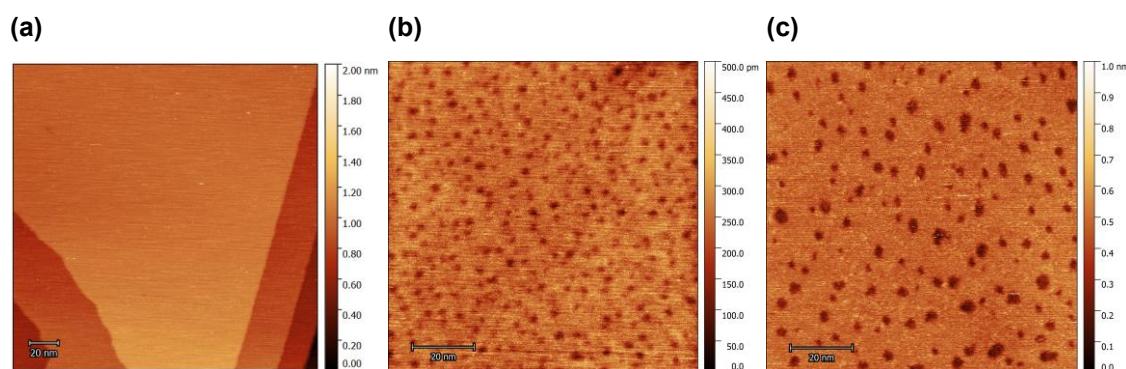


Figura 5.2. Imágenes de STM tomadas en aire correspondientes a la superficie: (a) Au(111) limpio; (b) con el autoensamblado de MUA/MH 1:2 (“Au-SAM”); y (c) con el glicósido **1** acoplado a la monocapa (“Au-SAM-1”).

Inicialmente, en la Figura 5.2.a, correspondiente a la superficie sin tratar, se observan las típicas terrazas o zonas planas del sustrato. La diferencia de altura de un escalón se determinó en $\sim 2,3 \text{ \AA}$, magnitud que se asemeja al valor de literatura de una monocapa de átomos de oro ($2,4 \text{ \AA}$).^[331]

La imagen de la Figura 5.2.b muestra la morfología de la superficie una vez completado el autoensamblado de la monocapa MUA/MH 1:2 (“Au-SAM”). Allí se observan defectos sobre la superficie, que corresponden a depresiones (o *pinholes*) de unos $1,6\text{--}2,6 \text{ nm}$ de diámetro aproximadamente y $2,5 \text{ \AA}$ de profundidad (consistente con una monocapa de oro). Este fenómeno de erosión o “*etching*” confirmó la formación de la SAM ya que, durante el proceso de ensamblado de una monocapa de tioles alifáticos, los

tioles provocan una erosión en la superficie que da como resultado islas de vacancia de átomos de oro.^[332]

Asimismo, la imagen del autoensamblado “Au-SAM” se escaneó exhaustivamente en busca de arreglos simétricos que evidenciaran la presencia de islas, compuestas por moléculas de la misma especie de tiol altamente ordenadas, como las que se observan en la imagen de la Figura 5.3. Dado que no se encontraron estos patrones, se concluyó que los tioles MUA y MH se distribuyeron de forma homogénea sobre la superficie.

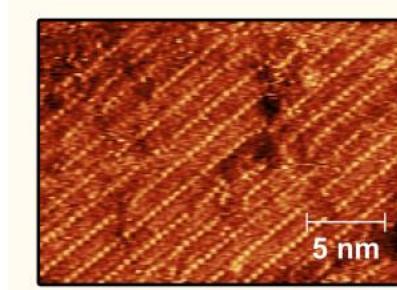


Figura 5.3. Imagen de STM tomada en aire de una monocapa de mercaptohexanol autoensamblado sobre Au(111). Imagen tomada de Herrera, S.E.^[333]

Por último, se tomó una imagen de la superficie al finalizar la incubación con el glicósido **1** (“Au-SAM-1”) (Figura 5.2.c). Allí se identificaron las depresiones (*pinholes*) previamente observadas, aunque se observó un cambio en su diámetro (2,1-3,2 nm aproximadamente), lo que sugiere un posible reordenamiento del autoensamblado para dar zonas de mayor densidad de carbohidratos. Esto está en concordancia con lo observado por Tantakitti F. y colaboradores en una superficie de Au(111) cubierta de un autoensamblado mixto de oligo(etilenglicol) tioles y sus análogos glicosilados.^[181]

Si bien se esperaba observar puntos brillantes correspondientes a los glicósidos expuestos, las imágenes no mostraron protuberancias o puntos de mayor densidad de corriente. Esto podría deberse a: (1) que los glicósidos se mueven constantemente a temperatura ambiente, por lo que no pueden ser detectados en un único lugar, y (2) como el STM mide densidad de transferencia electrónica y no topografía, de no haber un buen solapamiento entre la densidad de estados electrónicos de la punta (detector del STM) y de la superficie glicosilada, no es posible detectar los azúcares sobre la superficie.

Analizando en conjunto los resultados de AFM y STM, no se observaron diferencias topográficas o morfológicas significativas entre la superficie antes y después de incorporar el azúcar, por lo que no se pudo confirmar el anclado exitoso del compuesto **1**. Ante este resultado, se recurrió al uso de XPS como técnica complementaria para verificar la presencia de los glicósidos anclados al oro.

5.3.2. Análisis de la composición química superficial: Estudios por XPS

Para llevar a cabo este estudio, se prepararon tres superficies independientes: una monocapa sin azúcar (“Au-SAM”), una funcionalizada con el monosacárido **1** (“Au-SAM-**1**”) y otra con el trisacárido **5** (“Au-SAM-**5**”). El uso de un monosacárido y un trisacárido tuvo como objetivo evaluar el efecto del número de unidades sacáridicas presentes en el glicósido anclado sobre la señal obtenida por XPS. Para facilitar la comparación de las muestras, todas las superficies se funcionalizaron con una monocapa homogénea compuesta exclusivamente por ácido 11-mercaptoundecanoico (MUA).

Al funcionalizar las superficies, se puso especial atención en asegurar que la única fuente de átomos de N fuera el grupo amida formado entre el glicósido y la monocapa. Es por esto que, luego de la incubación con el azúcar correspondiente, las superficies se trataron con una solución de bicarbonato de potasio a pH 9,5, capaz de hidrolizar rápidamente los ésteres de NHS que no hubieran reaccionado.

En la Figura 5.4 se presentan, para cada una de las superficies, las señales registradas en los espectros XPS en las regiones características de los orbitales electrónicos C 1s (Figura 5.4.a), N 1s (Figura 5.4.b), O 1s (Figura 5.4.c), y Au 4f (Figura 5.4.d).

En primer lugar, la región del espectro donde se observa la señal asociada al Au 4f (Figura 5.4.d) muestra las señales esperadas: el doblete Au 4f_{7/2} (84 eV) - Au 4f_{5/2} (87,7 eV) con una relación de intensidades de 4:3. La aparición de estos picos indica que la monocapa autoensamblada funcionalizada no es lo suficientemente espesa como para atenuar la señal del Au lo cual, en este caso, es consistente con una SAM bien formada y con la correcta ejecución de las mediciones.

La señal registrada en la zona del espectro correspondiente a las energías de unión de C 1s (Figura 5.4.a), se deconvolucionó como tres señales centradas en: 285 eV (rojo), 286,5 eV (azul) y 289 eV (verde). La primera corresponde a los átomos de carbono de la cadena alquílica unidos a C e H, la segunda a los carbonos unidos a grupos hidroxilo o carboxilo, y la tercera a los carbonos unidos a dos átomos de O. La integración de los picos para cada una de las superficies se presenta en la Tabla 5.1.

En la zona de C 1s, la superficie “Au-SAM” (Figura 5.4.a, curva inferior) mostró señales a 285 y 289 eV correspondientes a los metilenos de la cadena principal del tiol y los carbonos carboxílicos, respectivamente, en una relación cercana a 1:10. Esta distribución de señales confirmó la unión del MUA (conformado por 11 carbonos) al Au. Adicionalmente, en la región de O 1s (Figura 5.4.c, curva inferior) se registró un pico

ancho, típico del grupo ácido y, de acuerdo con lo esperado, no se observó señal en la zona de N 1s (Figura 5.4.b, curva inferior).

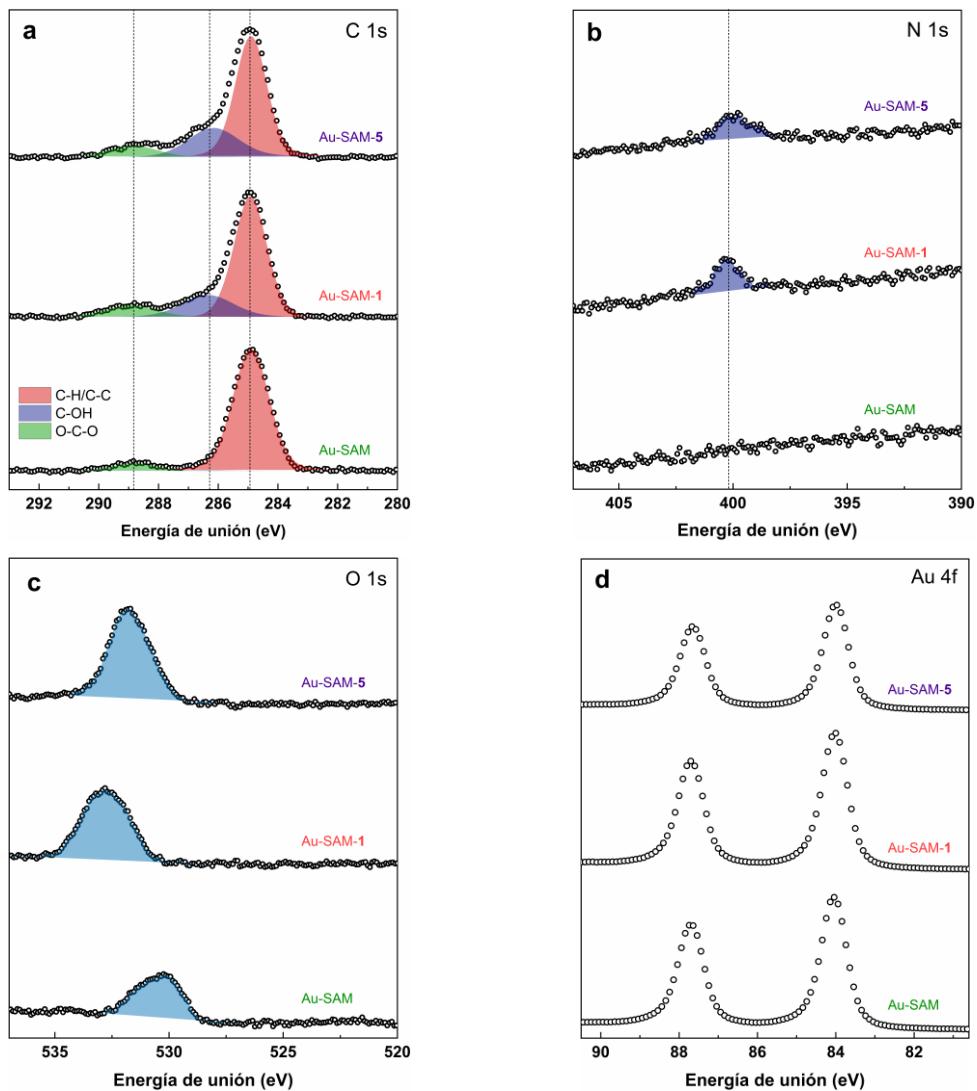


Figura 5.4. Espectros de XPS de (a) C 1s, (b) N 1s, (c) O 1s y (d) Au 4f de: “Au-SAM” (curva inferior), “Au-SAM-1” (curva central) y “Au-SAM-5” (curva superior). En todos los casos la SAM está formada únicamente por ácido 11-mercaptoundecanoico (MUA).

En la región de C 1s de la superficie “Au-SAM-1”, tratada con el monosacárido **1** (Figura 5.4.a, curva central), se observaron señales a 285 y 289 eV junto con una nueva señal a 286,5 eV, característica de átomos de C unidos a grupos hidroxilo como los presentes en el azúcar. Además, se registró la aparición de un pico a aproximadamente 400 eV, en la región de N 1s (Figura 5.4.b, curva central), consistente con la incorporación del 5-aminopentil glicósido a la superficie por medio de una unión amida.

Por último, el espectro de XPS de la superficie “Au-SAM-5”, tratada con el trisacárido **5**, mostró los mismos picos en la región N 1s (Figura 5.4.b, curva superior) y C 1s (Figura 5.4.a, curva superior) que “Au-SAM-1”. En particular, en la región de C 1s se observó un

incremento relativo en la señal de los carbonos característicos del azúcar (286,5 eV) frente a la correspondiente a los metilenos de los alcanotioles (285 eV), lo que evidenció la incorporación exitosa del trisacárido **5** a la superficie de oro por medio de la monocapa de MUA.

Tabla 5.1. Valores de integración de las señales que componen la región de C 1s. Entre paréntesis se presenta la contribución de cada estado de oxidación del C a la señal total para cada superficie.

Espectro	O-C*-O	C*-OH	C*-H/C*-C
	289 eV	286,5 eV	285 eV
“Au-SAM-5”	2450 (9,9%)	6220 (25,2%)	15980 (64,8%)
“Au-SAM-1”	2203 (9,9%)	4398 (19,7%)	15680 (70,4%)
“Au-SAM”	1090 (6,4%)	54 (0,3%)	15860 (93,3%)

A partir de la evidencia obtenida por XPS, se concluyó que el protocolo de funcionalización desarrollado permitía incorporar los 5-aminopentil glicósidos sintetizados a superficies de oro recubiertas por una SAM con grupos ácidos expuestos.

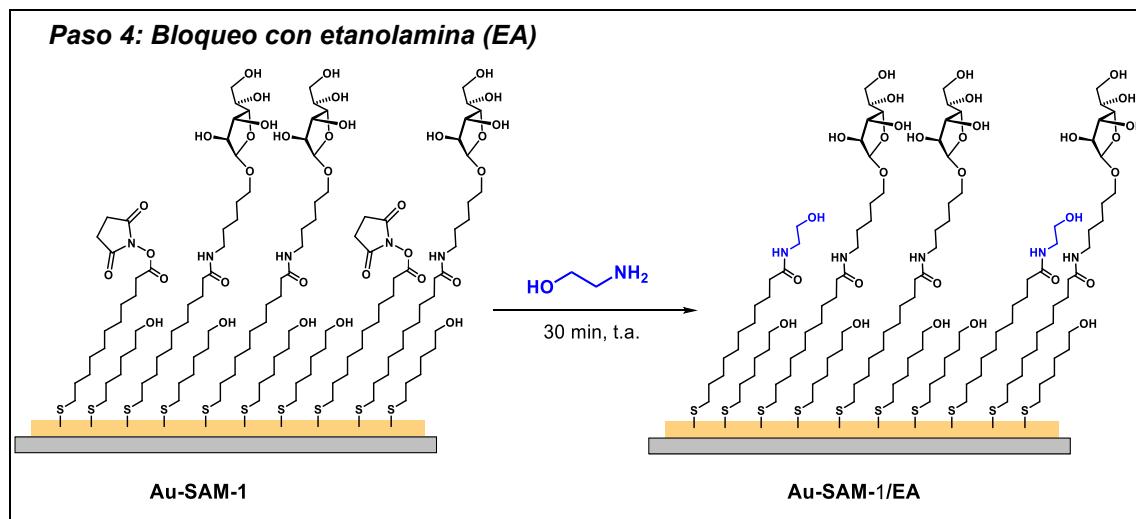
5.3.3. Análisis de las propiedades electroquímicas

Previo al análisis de las propiedades electroquímicas de la superficie se definió el protocolo de funcionalización que se emplearía para el ensayo con las muestras de sueros humanos.

Por un lado, era necesario definir la relación molar entre los tioles MUA y MH en la SAM mixta, con el fin de determinar la densidad de azúcares sobre la superficie, parámetro determinante para maximizar la interacción con los anticuerpos. En la bibliografía, los trabajos que utilizan MUA/MH como estrategia de anclaje de azúcares, reportan relaciones molares óptimas en el rango entre 1:20 y 1:3 MUA:MH para la detección de diversos analitos (proteínas, partículas virales o bacterias).^[119,182,196,215,334] Por otro lado, los estudios enfocados en la detección de anticuerpos en sueros policlonales por medio de diversas sondas (no sólo azúcares) reportan relaciones molares óptimas entre 1:20 y 1:6.^[197,330,335,336] Ante estos antecedentes, se adoptó un valor intermedio de 1:10 MUA/MH como primera combinación a evaluar.

Asimismo, en muchos de los reportes relevados se empleaba el protocolo de funcionalización elegido en esta tesis (acoplamiento por unión amida vía una SAM ácido-terminal) y se realizaba un tratamiento final de la superficie con etanolamina (EA), con el fin de bloquear las posiciones que no hubieran reaccionado con el azúcar (Esquema 5.2).^[214,316,335,337] Este bloqueo neutraliza los grupos carboxílicos remanentes sobre la

superficie y coloca un grupo hidroxilo terminal, de forma de mantener la hidrofilicidad del autoensamblado para evitar interacciones electrostáticas o hidrofóbicas indeseadas con la muestra a analizar. Como estas características eran deseables en nuestro glicobiosensor, se decidió incluir este paso dentro del protocolo de anclado de los glicósidos sobre electrodos de Au policristalino.



Esquema 5.2. Bloqueo de la superficie con etanolamina (EA).

Una vez definidas las condiciones de funcionalización, para confirmar la eficacia del protocolo de anclado se evaluaron los cambios en las propiedades electroquímicas de la superficie a lo largo del proceso de funcionalización usando como modelo al monosacárido **1**. Para ello, se registraron los voltágramas y los espectros de impedancia de la superficie en distintas etapas del protocolo: (1) antes de iniciar la funcionalización (Au), (2) luego del tratamiento con los tioles (“Au-SAM”), y (3) al finalizar el bloqueo con etanolamina (“Au-SAM-**1**/EA”). Las mediciones se realizaron en presencia de la cupra redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ y se realizaron entre 3 y 4 replicados de cada experimento para evaluar la reproducibilidad de las mediciones.

Los replicados de los voltágrafos registrados para cada superficie resultaron prácticamente idénticos, pero en los espectros de impedancia se observaron ligeras variaciones en el diámetro del semicírculo (asociado al parámetro R_{tc}), como se ejemplifica en la Figura 5.5 para la superficie “Au-SAM-1/EA”.

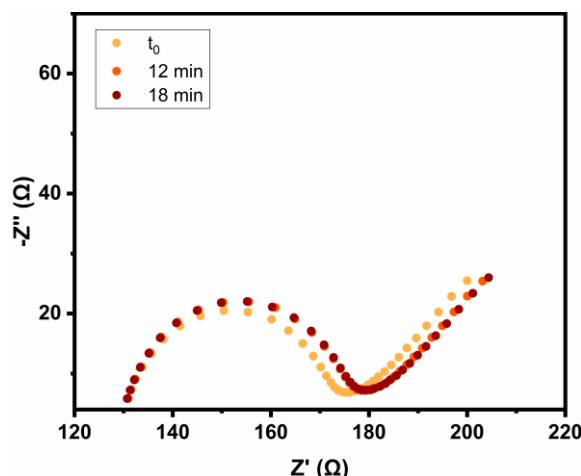


Figura 5.5. Espectros de impedancia de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6/\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ 5 mM en KNO_3 0,1 M de un electrodo “Au-SAM-1/EA”. El espectro de impedancia se registró por triplicado: espectro inicial (curva roja), a los 12 minutos (curva naranja) y a los 18 minutos (curva amarilla).

Considerando que estas variaciones podían estar asociadas a la inestabilidad de la pareja redox elegida,^[338] se ensayó el uso de ferrocenometanol y de $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}/[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{4+}$ como especies redox alternativas. Sin embargo, los gráficos de Nyquist de estos sistemas presentaron semicírculos muy pequeños que demostraban que la impedancia estaba controlada por difusión.^[208] Este fenómeno impedía determinar el valor de la resistencia a la transferencia de carga (R_{tc}) de las superficies, parámetro necesario para la detección del evento de reconocimiento antígeno-anticuerpo sobre el glicobiosensor, por lo que el uso de estas especies se descartó.

Como no se encontró especie redox alternativa, se siguió adelante con la pareja $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6/\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ aplicando dos cambios en el protocolo de medición. En primer lugar, inmediatamente después de preparada, la solución de la pareja redox se burbujeó con N_2 para desplazar el O_2 disuelto y se mantuvo bajo atmósfera de N_2 hasta su utilización, de forma de prevenir la oxidación del ferrocianuro entre mediciones. En segundo lugar, se estableció como protocolo de trabajo la medición de tres espectros de impedancia de cada superficie y el uso del promedio de los parámetros de ajuste obtenidos post-procesamiento como los valores de referencia para la comparación entre experimentos.

Los voltágrafos y los espectros de impedancia registrados a lo largo de la funcionalización del electrodo de oro con el monosacárido **1** se muestran en la Figura 5.6. Para simplificar la figura, se incluyó únicamente la primera medición de EIS de cada superficie.

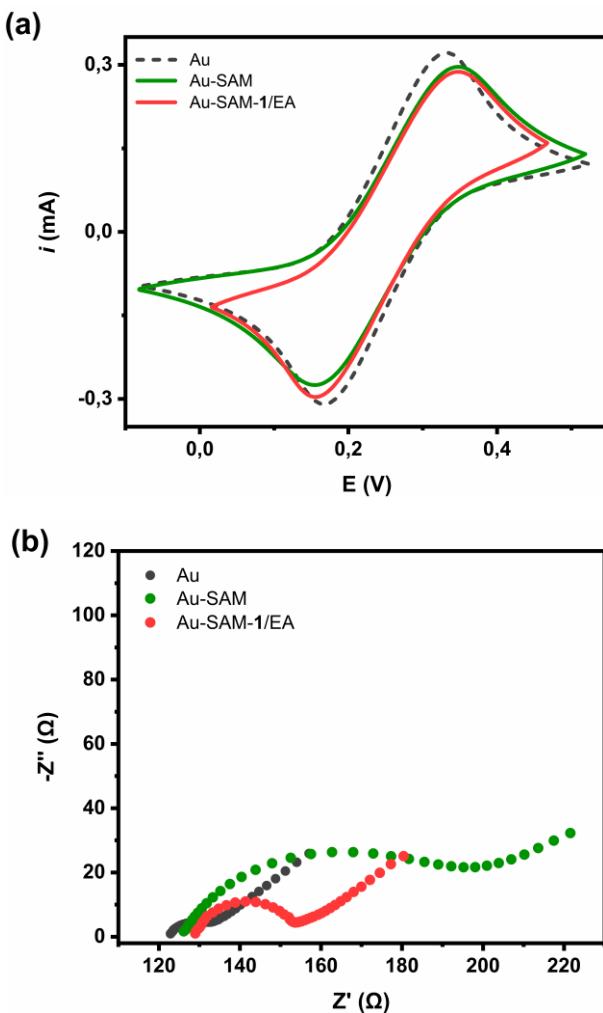


Figura 5.6. (a) Voltametrías cíclicas y (b) espectros de impedancia de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6/\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ 5 mM en KNO_3 0,1 M tomados lo largo de la funcionalización de un electrodo de oro policristalino con **1**. Se muestran las curvas superpuestas del electrodo sin tratar (Au, curva gris), modificado con MUA/MH 1:10 (“Au-SAM”, curva verde) y luego de la reacción con el glicósido y del bloqueo con etanolamina (“Au-SAM-1/EA”, curva roja).

El voltágrafo del electrodo de Au sin modificar presentó los picos de oxidación y reducción a 0,332 y 0,168 V característicos de la pareja $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ frente al electrodo de $\text{Ag}/\text{AgCl}(\text{s})$. Las curvas registradas tras la formación de la SAM (“Au-SAM”) y luego del acoplamiento de **1** (“Au-SAM-1/EA”) resultaron similares entre sí, aunque ambas aparecieron ligeramente desplazadas respecto a la del oro. Esta diferencia cualitativa indicó que el proceso redox de la pareja $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ era menos reversible, fenómeno esperable en un electrodo recubierto por una monocapa. Sin embargo, la técnica no resultó adecuada para el monitoreo de la funcionalización, ya que las diferencias entre las curvas fueron poco evidentes. En este sentido, EIS es un método más apropiado para caracterizar modificaciones en el recubrimiento superficial.

Para el ajuste de los espectros de impedancia (curvas de Nyquist) obtenidos en la tesis se utilizó un circuito de Randles considerando un capacitor no ideal (CPE).^[208] Los valores medios de R_{tc} y CPE de cada una de las superficies se presentan en la Tabla 5.2.

Tabla 5.2. Valores de R_{tc} y CPE obtenidos del ajuste de las curvas de Nyquist obtenidas por EIS a lo largo de la funcionalización con **1**. Se informan los valores de medios de tres espectros de EIS sucesivos con sus desvíos estándar.

Espectro	R_{tc} (Ω)	CPE (μF)
Au	$9,0 \pm 0,1$	$82,3 \pm 3,0$
“Au-SAM”	$68,5 \pm 0,1$	$125,9 \pm 0,5$
“Au-SAM-1/EA”	$44,1 \pm 1,9$	$4,1 \pm 0,1$

Para analizar los resultados obtenidos por espectroscopía de impedancia es importante recordar que los cambios en el recubrimiento del electrodo de trabajo (en este caso, el Au policristalino) se traducen en un impedimento (estérico y/o electrostático) a la llegada de las especies redox al electrodo, lo que, a menudo, se refleja en el aumento de la resistencia a la transferencia de carga (R_{tc}). Es por esto que, al efectuarse el recubrimiento de la superficie de oro por la SAM se observó un aumento del valor de R_{tc} de la muestra “Au-SAM” respecto de Au (Tabla 5.2).

Con la incorporación del monosacárido **1** y posterior tratamiento con etanolamina, se registró en la muestra “Au-SAM-1/EA” una disminución en el valor de R_{tc} (Tabla 5.2), contrario a lo esperado ante el aumento del espesor del recubrimiento. Esta tendencia se explica considerando que la superficie “Au-SAM” contiene grupos carboxilatos que exponen sus cargas negativas al seno de la solución. En esta superficie, al impedimento estérico generado por la monocapa se suma un impedimento electrostático producto de la repulsión entre los grupos COO^- y los aniones de la pareja redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ (Figura 5.7). Este proceso afecta el acercamiento de la especie redox a la superficie del electrodo, lo que se traduce en un aumento de la resistencia a la transferencia de carga R_{tc} del sistema. Al efectuar las reacciones de acoplamiento con el glicósido y el bloqueo de los grupos COO^- con etanolamina, para dar “Au-SAM-1/EA”, la superficie pierde la carga y, por ende, desaparece la contribución electrostática a la R_{tc} . Es por esto que la disminución del valor de R_{tc} es consistente con la funcionalización efectiva de la superficie. Cabe señalar que, si bien en la funcionalización de este electrodo no se registró el espectro de impedancia de la superficie previo al tratamiento con etanolamina (“Au-SAM-1”), en ensayos previos se había observado una diferencia mínima en el R_{tc} de las superficies antes y después del bloqueo.

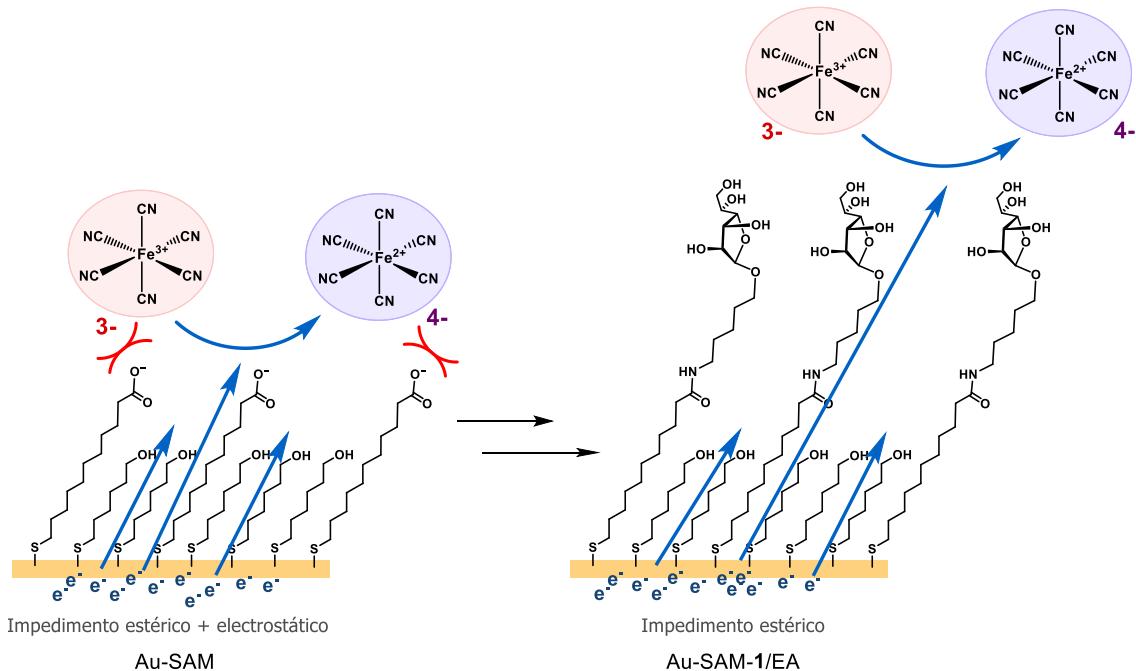


Figura 5.7. Transferencia electrónica desde el electrodo de trabajo hacia una solución con la pareja redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$. Modelos de los efectos estéricos y electrostáticos de los recubrimientos de las superficies “Au-SAM” y “Au-SAM-1/EA”.

En conclusión, la respuesta electroquímica observada por EIS a lo largo del protocolo de funcionalización permitió seguir la formación del autoensamblado e incorporación del monosacárido **1** a la superficie, confirmando la eficacia del protocolo de anclado de los 5-aminopentil glicósidos.

5.4. Respuesta a interacciones inespecíficas

El biosensor impedimétrico propuesto debía ser capaz de detectar de forma selectiva anticuerpos generados durante la infección con *L. braziliensis* en sueros humanos. Estas muestras representan matrices complejas compuestas por proteínas, lípidos y sales, entre otras moléculas que pueden interferir en la medición. Por este motivo, se planteó como primer ensayo de evaluación del sistema en desarrollo, el estudio de la respuesta EIS del electrodo frente a una muestra semejante al suero humano. Para este fin, se utilizó un electrodo funcionalizado con **1** que se incubó con diferentes diluciones de plasma de conejo comercial. En esta etapa, se seleccionó el monosacárido **1** como modelo de estudio por ser la estructura más simple que contiene D-Galf, motivo estructural presente en todos los glicósidos sintetizados.

Entonces, un electrodo funcionalizado con **1** se incubó con diluciones decrecientes del plasma, registrando los espectros de impedancia luego de cada incubación. Una vez ajustadas las curvas obtenidas durante el ensayo, se calculó para cada dilución el

cociente $R_{tc}/R_{tc,0}$, esto es, la relación entre la resistencia a la transferencia de carga del electrodo al finalizar la funcionalización ($R_{tc,0}$) y luego de la exposición al plasma (R_{tc}) a una dada dilución. Este parámetro se empleó como indicador de la unión de componentes plasmáticos sobre la superficie, ya que se correlaciona con el grado de bloqueo superficial inducido por la muestra.

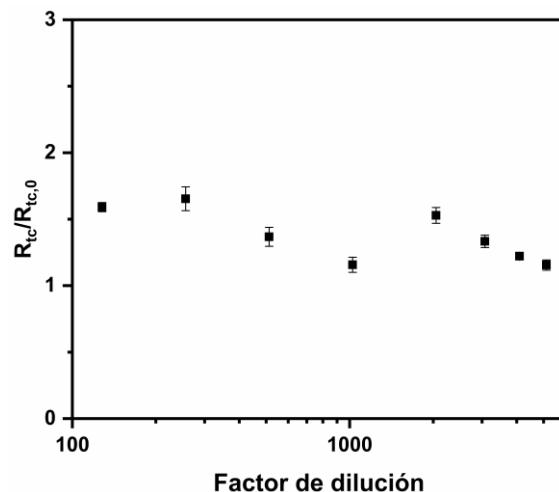


Figura 5.8. Respuesta electroquímica de un electrodo “Au-SAM-1/EA” a una matriz biológica compleja (plasma de conejo). Relación entre las señales registradas por EIS pre ($R_{tc,0}$) y post (R_{tc}) incubación con el plasma en función del factor de dilución empleado. Se informan los valores medios de tres mediciones con sus desvíos estándar.

En el ensayo se registraron valores de $R_{tc}/R_{tc,0}$ en el rango entre 1,15 y 1,65 (Figura 5.8). Si bien los valores de $R_{tc}/R_{tc,0} > 1$ indicaron la aparición de interacciones indeseadas con componentes del plasma animal, estos valores fueron bajos y muy similares entre diluciones. Esto sugiere que dichas especies no se acumularon sobre la superficie, y que su adsorción/desorción resultó reversible. Si bien este comportamiento podría no reproducirse en ensayos con sueros humanos, la baja respuesta registrada frente a especies interferentes justificó avanzar con la evaluación de la respuesta del sistema frente a muestras de pacientes con LTA.

En este sentido, se determinó que el sistema de sensado podría ser selectivo si los anticuerpos anti-glicanos presentes en los sueros infectados generaran valores de $R_{tc}/R_{tc,0}$ significativamente mayores a 1,65, atribuibles a interacciones de alta afinidad con los azúcares anclados.

5.5. Evaluación del glicósido 2 como biomarcador de infección

Con el fin de seleccionar el biorreceptor adecuado para los primeros ensayos con sueros humanos, se tomó como referencia un trabajo del grupo del Dr. Igor C. Almeida,

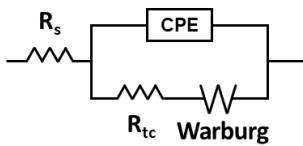
en el que se evaluó el potencial diagnóstico de distintos glicósidos para la detección serológica de la infección por *L. braziliensis* mediante ELISA. En dicho estudio, los autores analizaron el desempeño de distintos glicoconjungados derivados de oligosacáridos terminales de los GIPLs 1, 2 y 3 como elementos de reconocimiento de anticuerpos.^[223] Entre los compuestos ensayados se encontraba el glicoconjungado D-Galf- β -(1 \rightarrow 3)-D-Manp- α -BSA, cuyo fragmento sacarídico correspondía al disacárido **2**, y que reportó alta inmunorreactividad frente a sueros de pacientes con diversas formas clínicas de LTA, y buena selectividad frente a sueros de pacientes con diagnóstico negativo.

Con este antecedente, y dado que al momento no contábamos aún con los resultados de los microarreglos de glicanos, se decidió evaluar el desempeño del biosensor impedimétrico planteado, utilizando el compuesto **2** como biorreceptor. Esto nos permitiría, luego, comparar los resultados con lo observado por Almeida I. C. y colaboradores.

De forma análoga al ensayo con plasma de conejo, dos electrodos de oro policristalino se funcionalizaron con el glicósido **2** para dar la superficie “Au-SAM-**2**/EA” y se incubaron con diluciones de un pool de sueros positivos ($n = 8$; “Pool LTA +”) o negativos ($n = 8$; “Pool LTA -”) para LTA.

Para la evaluación de los resultados del ensayo se optó por procesar los espectros de impedancia mediante dos circuitos equivalentes. Por un lado, se utilizó el circuito de Randles aplicado previamente en los ensayos de caracterización de la superficie y determinación de la respuesta inespecífica (“Modelo A”, Figura 5.9.a) y, por otro lado, el circuito de Randles sin elemento de Warburg (“Modelo B”, Figura 5.9.b), que fue utilizado por Echeverri D. y colaboradores en la detección de anticuerpos anti-*T. gondii* en sueros humanos.^[125] Cabe destacar que el elemento de Warburg es aquel que considera el efecto de la difusión de las especies redox hacia el electrodo de trabajo sobre la impedancia del sistema.^[208] Mientras que el Modelo A permitió ajustar todos los puntos del espectro, el Modelo B solo permitió ajustar los puntos correspondientes al semicírculo, registrados a altas frecuencias. En este caso, el uso del Modelo B no se consideró apropiado, ya que los parámetros obtenidos del ajuste mostraron una marcada dependencia del intervalo de frecuencias seleccionado, variando de forma significativa al modificar este rango. Por este motivo, el modelo se utilizó únicamente con fines comparativos.

(a) Circuito modelo A:



(b) Circuito modelo B:

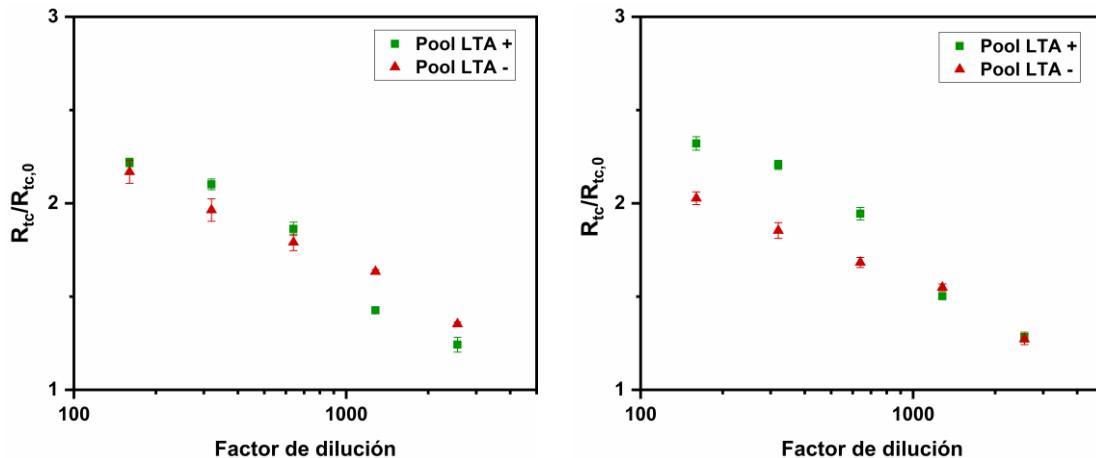
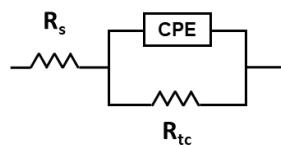


Figura 5.9. Respuesta electroquímica por EIS de un electrodo “Au-SAM-2/EA” a la incubación con diluciones de un pool de sueros positivos (“Pool LTA +”, ■) o negativos para LTA (“Pool LTA -”, ▲). Cociente de R_{tc} pre ($R_{tc,0}$) y post (R_{tc}) incubación según el factor de dilución. Se muestran los resultados del ajuste por (a) el Modelo A (con elemento de Warburg) y (b) el Modelo B (sin Warburg). Se graficaron los valores medios con los desvíos estándar de tres medidas de EIS sucesivas.

Una vez obtenidos los parámetros de ajuste de las curvas, se construyeron los gráficos de $R_{tc}/R_{tc,0}$ en función del factor de dilución de los pools (Figura 5.9). Los gráficos obtenidos mostraron resultados contrapuestos. Mientras que con el Modelo B (Figura 5.9.b) se observó diferenciación de los sueros positivos y negativos a bajas diluciones, con el Modelo A (Figura 5.9.a) la respuesta del sensor fue similar para ambas muestras en todo el rango de diluciones. Esto subraya la importancia de la elección cuidadosa del modelo de ajuste de los espectros. En función de los resultados obtenidos mediante el Modelo A, se concluyó que el sistema no resultó adecuado para diferenciar sueros positivos de negativos.

Para validar este análisis, se evaluó la respuesta de la superficie funcionalizada con **2** a los sueros por un método de detección alternativo. Se eligió la técnica de microbalanza de cuarzo con disipación (QCM-D), que emplea un transductor piezoelectrónico (distinto al electroquímico), puede realizarse sin marcación (*label-free*) y que presenta muy alta sensibilidad.^[319,339]

Para el ensayo se utilizaron obleas de cuarzo recubiertas de oro y se empleó el protocolo de funcionalización con **2** aplicado anteriormente sobre el oro policristalino. En

en este caso, el parámetro asociado a la unión de especies sobre la superficie es la frecuencia de resonancia del cristal de cuarzo, que disminuye a medida que aumenta el espesor de la película depositada. Tomando como punto de referencia la frecuencia de resonancia del cristal al finalizar la funcionalización ($\Delta f = 0$), se midió la respuesta del sistema luego de la incubación con diluciones decrecientes del pool de sueros positivos (“Pool LTA +”) o negativos (“Pool LTA -”) para LTA. Los resultados (Figura 5.10) mostraron cambios de frecuencia prácticamente idénticos en respuesta al tratamiento con los sueros positivos y negativos, en concordancia con lo observado por EIS.

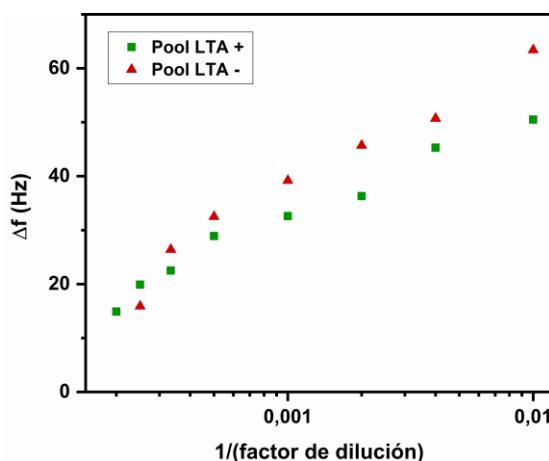


Figura 5.10. Estudio de la respuesta frente a sueros positivos (“Pool LTA +”, ■) y negativos (“Pool LTA -”, ▲) para LTA por QCM-D de una superficie “Au-SAM-2/EA”. Cambio en la frecuencia de oscilación (tercer sobretono) en función de la dilución empleada.

Teniendo en cuenta que los métodos de detección *label-free*, como EIS y QCM-D, sólo permiten detectar eventos de unión sin discriminar qué tipo de molécula causa el bloqueo, es posible que la señal detectada en el ensayo con el pool positivo provenga de la interacción del glicósido **2** con anticuerpos séricos. Sin embargo, la magnitud de esta señal no difiere significativamente de la observada en el pool negativo. Esta ausencia de respuesta diferencial coincide con los resultados obtenidos mediante microarreglos de glicanos (Capítulo 4), donde se detectaron niveles comparables de anticuerpos anti-**2** en ambos grupos de sueros. En conjunto, estos hallazgos desalientan el uso de **2** para el desarrollo de un kit de diagnóstico.

La discrepancia con lo reportado por Almeida podría atribuirse a diferencias en el tamaño y la composición de las cohortes analizadas. En nuestro estudio se utilizaron ocho sueros positivos y ocho sueros negativos de pacientes argentinos, residentes en una zona donde la LTA es endémica; en cambio, el trabajo de referencia empleó muestras de individuos de Brasil, entre las cuales se encontraban 80 sueros con LTA, 33 sueros de individuos no infectados, 15 de residentes en una zona endémica y 18 en una zona no

endémica. Teniendo esto en cuenta, hay dos factores que podrían explicar la discordancia entre ensayos: (1) la concentración de anticuerpos puede variar considerablemente entre individuos^[47,50] y, (2) el lugar de residencia del paciente puede afectar la composición del suero cuando los individuos están expuestos a agentes externos diferentes.^[340] En este sentido, sería necesario ampliar nuestro estudio utilizando una muestra de sueros más grande y heterogénea.

Por otro lado, la baja respuesta específica de nuestro glicobiosensor a los sueros positivos de LTA podría estar asociada a una densidad insuficiente de sitios de unión que permitan interacciones multivalentes con los anticuerpos, lo que podría optimizarse aumentando la proporción de MUA en la SAM. También debe considerarse que en el trabajo de Almeida la presentación de los antígenos se realizó por medio de glicoconjungados depositados sobre la placa de ELISA, una estrategia distinta a la utilizada en nuestro sensor.

Finalmente, considerando que el ensayo por microarreglo de glicanos mostró el potencial de **3** como biomarcador de infección, y que no se habían observado diferencias significativas en los niveles de anticuerpos anti-**2**, sería pertinente repetir los ensayos electroquímicos empleando electrodos funcionalizados con el trisacárido **3**. Esto permitiría evaluar la influencia del glicósido en los resultados y validar la utilidad del sistema de biosensado propuesto.

5.6. Conclusiones

En este capítulo se describió el desarrollo de un protocolo robusto de anclaje de 5-aminopentil glicósidos sobre electrodos de oro mediante una SAM mixta. La caracterización superficial por XPS, CV y EIS permitió confirmar la eficacia del método de funcionalización elegido. Al evaluar el desempeño del biosensor impedimétrico funcionalizado con el disacárido **2** frente a sueros de pacientes con LTA, se observó que el sistema no permitió discriminar muestras positivas de negativas, lo cual se confirmó luego por QCM-D. Estos hallazgos indican que, si bien la superficie sensora es robusta, su selectividad y sensibilidad deben optimizarse. Posibles mejoras incluyen ajustar la densidad de azúcares en la superficie, explorar glicósidos alternativos y validar el sistema con cohortes de mayor tamaño y heterogeneidad.

La estrategia de funcionalización presentada, sencilla y versátil, resulta adaptable a otros glicanos y superficies de oro y ofrece un marco general para estudiar interacciones glicano-biomolécula y desarrollar nuevas estrategias de diagnóstico clínico basadas en carbohidratos.

PARTE EXPERIMENTAL

6.1. Materiales y métodos empleados en la síntesis de glicanos (Capítulo 3)

6.1.1. Generalidades

Los reactivos comerciales se utilizaron sin purificación previa excepto lo indicado en casos particulares. En la manipulación de compuestos finales y en los casos en que se especifica, se utilizó agua de 18MΩ ultrapura obtenida con un equipo ELGA PURELAB Classic UV MK2 por tratamiento con lámpara UV y pasaje a través de un cartucho depurador LC186.

Uso de solventes anhidros y reactivos sensibles a la humedad

Los solventes utilizados eran de calidad “para análisis” o superior. El diclorometano (CH_2Cl_2) y el acetonitrilo (CH_3CN) se secaron por refluxo sobre P_2O_5 y luego se destilaron y se guardaron sobre tamices moleculares 4Å y 3Å, respectivamente. La piridina ($\text{C}_5\text{H}_5\text{N}$) se refluxó sobre lentejas de NaOH , se destiló y se conservó sobre NaOH . Por último, el metanol (CH_3OH) se refluxó sobre torneaduras de magnesio, se destiló y se guardó sobre tamices moleculares 3Å. Estos solventes se fraccionaron y almacenaron bajo atmósfera inerte. El éter etílico (Et_2O) y el THF se destilaron previo a su uso sobre Na-benzofenona. La DMF anhidra se utilizó sin tratamiento previo directamente desde su envase comercial. En todos los casos las reacciones con solventes o reactivos sensibles a la humedad se llevaron a cabo con material de vidrio previamente secado en estufa a 120 °C y bajo atmósfera de N_2 o Ar.^[341]

Secado de reactivos

En las reacciones sensibles a la humedad los reactivos se secaron utilizando estufa de vacío Memmert VO500 o bomba de vacío Vacuubrand RZ6 por un mínimo de 3 horas. Excepto los casos en que se especifica, el secado se realizó a temperatura ambiente.

En los casos en que fue necesaria la eliminación de trazas de agua de los compuestos de partida, se realizó una destilación azeotrópica con tolueno en evaporador rotatorio previo al secado por vacío.

Los tamices moleculares (MS) de 4Å y 3Å se activaron por calentamiento a 300 °C por un mínimo de 3 horas y se enfriaron bajo exclusión de humedad (desecador) previo a su uso.

Determinación de agua por Karl Fischer

Se utilizó un potenciómetro Metrohm modelo 852, con accesorio para titulación por el método de Karl Fischer Ti Stand 803 con software asociado Tiamo versión 2.2.

Determinación de punto de fusión

Se utilizó un equipo Electrothermal IA9000 series.

Determinación de punto de ebullición

Se utilizó el método de Siwoloboff.

Cromatografía en capa delgada (ccd)

Las ccd se corrieron en placas de aluminio recubiertas por sílica gel 60 F₂₅₄ (Merck) de 0,2 mm de espesor. Los sistemas de solvente de elución utilizados se indican en cada caso. El revelado se efectuó por alguna de las siguientes técnicas: (a) exposición a la luz UV ($\lambda=254$ nm); (b) inmersión en una solución de H₂SO₄ 5% (v/v) en etanol y posterior calentamiento; (c) inmersión en una solución 0,04 M de Mo₇O₂₄(NH₄)₆, 3 mM de Ce(SO₄)₂ en H₂SO₄-H₂O (9:1) y posterior calentamiento y/o; (d) inmersión en solución 0,1% (p/v) de ninhidrina (2,2-dihidroxiindan-1,3-diona) en etanol y posterior calentamiento.

Cromatografía en columna flash

Se utilizó un equipo CombiFlash Rf (Teledyne ISCO) y columnas RediSep de sílica gel desechables (Teledyne ISCO). Los solventes de elución utilizados se indican en cada caso.

Cromatografía en columna

Para la purificación por cromatografía en columna se utilizó sílica gel 60 de malla 200-400 (Merck). Los solventes de elución empleados se indican en cada caso.

Extracción en fase sólida (EFS)

Se utilizaron cartuchos de fase reversa C8 Maxi-Clean (Alltech). La muestra se suspendió en un solvente adecuado y se hizo pasar a través del cartucho utilizando una jeringa. Los solventes de elución utilizados se indican en cada caso.

Liofilización de muestras

Se empleó un equipo VIRTIS Advantage Plus EL-85. Se partió de muestras acuosas que se expusieron a 50 mTorr a temperatura ambiente hasta sequedad.

Determinación de poder rotatorio

El poder rotatorio se midió a 20 °C con un polarímetro Perkin-Elmer modelo 341, empleando lámpara de sodio (línea D, $\lambda=589$ nm) en celda de 1 dm de longitud. Los solventes y concentraciones utilizados se indican en cada caso.

Reacciones de hidrogenación bajo presión

Se llevaron a cabo en un equipo Parr 3910. La mezcla de reacción se colocó en una botella adecuada cerrada, se inyectó H₂ y se agitó mecánicamente. Las presiones de hidrógeno y tiempos de agitación aplicados se indican en cada caso.

Resonancia magnética nuclear

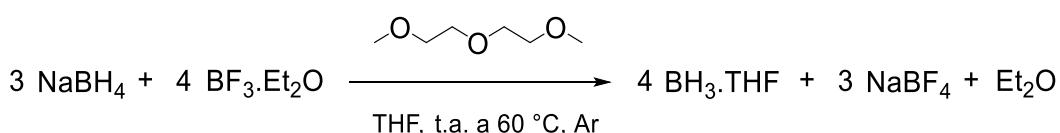
Los espectros de RMN ¹H fueron adquiridos a 300 MHz con un equipo Bruker Fourier 300 o a 400 MHz con un equipo Avance DPX 400 a 303 K, utilizando como solventes CDCl₃, D₂O o CD₃OD, según se indica en cada caso. Los desplazamientos químicos (δ) se expresan en partes por millón (ppm) respecto de tetrametilsilano ($\delta_H = 0,00$ ppm; CDCl₃ y CD₃OD) o de acetona ($\delta_H = 2,22$ ppm; D₂O). Los espectros de resonancia magnética nuclear de ¹³C fueron adquiridos a 75 MHz con un equipo Bruker Fourier 300 o a 101 MHz con un equipo Avance DPX 400 a 303 K. Los desplazamientos químicos (δ) se expresan en partes por millón (ppm) respecto de la señal de CDCl₃ ($\delta_C = 77,1$ ppm, CDCl₃), de CD₃OD ($\delta_C = 49,0$ ppm; CD₃OD) o de acetona ($\delta_C = 30,9$ ppm; D₂O). Las constantes de acoplamiento (J) se expresan en Hz. Las señales se describen como s (singulete), d (doblete), t (triplete), q (cuarteto), dd (doble doblete), ddd (doble doble doblete), ddt (doble doble triplete), dt (doble triplete), dq (doble cuarteto), sa (singulete ancho), m (multiplete) o ABq (cuarteto AB). La asignación de las señales correspondientes a los espectros de resonancia magnética de ¹H o ¹³C se realizó utilizando una combinación de técnicas mono y bidimensionales, tales como experimentos de correlación heteronuclear ¹H-¹³C (HSQC y HMBC) y/o homonuclear (COSY-45 y TOCSY).

Espectrometría de masa de alta resolución

Los espectros fueron adquiridos por el Laboratorio de Espectrometría de Masas del Centro de Investigaciones en Bionanociencias (CIBION-CONICET) con un espectrómetro Xevo G2S Q-ToF (Waters Corp.) calibrado en el intervalo de *m/z* 50-2300 utilizando una solución de formiato de sodio 0,5 mM preparada en 9:1 2-propanol:H₂O (v/v). Los datos se corrigieron durante la adquisición utilizando un compuesto de referencia (LockSpray).

Preparación de reactivos generales

Borano (BH₃.THF)



Se preparó según la técnica descripta por Brown.^[342]

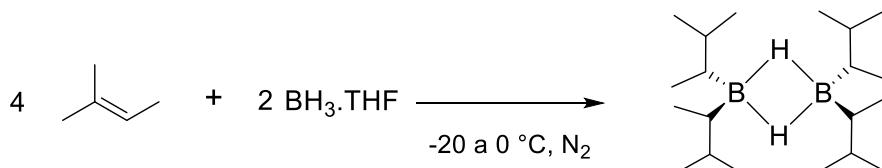
A una mezcla de borohidruro de sodio (7,5 g; 0,2 mol) y bis(2-metoxietil)éter (90 mL) contenida en un balón de tres bocas, se agregó lentamente desde una ampolla

compensadora trifluoruro de boro-etyl eterato (48 mL; 0,4 mol) a temperatura ambiente y con agitación. El agregado se hizo a lo largo de 2 h y bajo una corriente de argón.

El diborano generado, arrastrado por el Ar, se burbujeó a través de una solución diluida de borohidruro de sodio (0,4 g) en bis(2-metoxietil)éter (7 mL) para eliminar el trifluoruro de boro contaminante y se recogió sobre 90 mL de THF anhídrico enfriado a -15 °C. Una vez finalizado el agregado de trifluoruro de boro, el balón se calentó a 60 °C durante 1 h para arrastrar el diborano residual.

Para determinar la concentración de la solución, se tomaron 1,0 mL de la solución en 10 mL de acetona, se agregaron 10 mL de agua y 0,7 g de manitol. La solución se tituló con hidróxido de sodio 0,1 M valorado y utilizando fenolftaleína como indicador. La concentración de la solución de borano obtenida fue de alrededor de 2,5 M. El producto se almacenó bajo exclusión de humedad a -20 °C hasta su utilización.

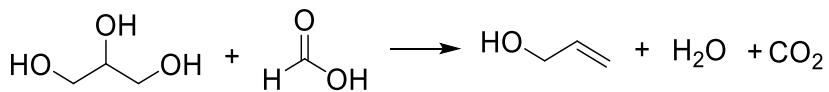
Bis(2-butil-3-metil)borano



Se preparó según la técnica descripta por Kohn *et al.*^[343]

En un balón seco se colocó 2-metil-2-buteno (2 equiv.) bajo atmósfera de N₂ y se enfrió en baño de hielo-sal entre -10 y -20 °C. Luego, se agregó lentamente y con agitación una solución valorada de BH₃·THF (1 equiv.). Una vez finalizado el agregado, la mezcla se agitó por 6 h a 0 °C y se empleó para reducir el compuesto indicado.

Alcohol alílico



Se adaptaron los procedimientos descriptos por Chattaway F. D.,^[260] Arceo E. *et al.*^[261] y Kamm *et al.*^[262]

En un balón de dos bocas se agregaron glicerol (401,7 g; 4,36 mol), ácido fórmico (105 mL; 2,78 mol) y piedra porosa. En la boca lateral se introdujeron, a través de un *septum*, un termómetro y una aguja conectada a una línea de N₂; en la boca central se colocó la columna de destilación seguida de un refrigerante/condensador y un recipiente colector. La salida de gases del condensador se conectó secuencialmente a un tubo burbujeador vacío sumergido en hielo, y un tubo burbujeador con NaOH 20%. Se burbujeó N₂ a través de la mezcla por 30 min para desplazar el O₂ disuelto y así evitar la formación

de subproductos de reacción indeseados. La mezcla se calentó con manta calefactora manteniendo un burbujeo constante de N₂ sobre la solución. La fracción destilada por debajo de 210 °C (47,2 g) con temperatura de ebullición entre 82 y 97 °C se identificó por RMN ¹H mayoritariamente como ácido fórmico. Cuando la temperatura interna alcanzó los 210 °C se inició la recolección del destilado hasta que la misma alcanzó los 245 °C. En este tiempo se recolectó un destilado (26,7 g) de punto de ebullición entre 53-75 °C (fracción A). El residuo se dejó enfriar y se realizó un nuevo agregado de ácido fórmico (71 mL; 1,88 mol). Nuevamente, se burbujeó N₂ a la solución por 30 min y se inició el calentamiento. Se colectó la fracción destilada entre 222 y 245 °C (49,3 g) de temperatura de ebullición entre 55-74 °C (fracción B). El procedimiento anterior se repitió para dar una fracción destilada entre 220 y 242 °C (60,7 g) de temperatura de ebullición 55-76 °C (fracción C).

Las fracciones A-C se juntaron y se agregó K₂CO₃ en porciones hasta que cesó la liberación de gas. Esta operación favorece el proceso de *salting out* del alcohol alílico y, a su vez, permite neutralizar el ácido fórmico arrastrado por el vapor durante la destilación. La mezcla se dejó en reposo toda la noche y luego se separaron las fases. La fase superior (158,3 g) se aisló y se identificó por RMN ¹H como una mezcla de alcohol alílico y alil formiato. Para hidrolizar el alil formiato, se agregó NaOH (38 g), la mezcla se mantuvo con agitación en hielo por 20 min, se reflujo por 6 h y luego se destiló recogiendo la fracción de punto de ebullición entre 88-90 °C (104,23 g), que posteriormente fue identificada por RMN ¹H y ¹³C como alcohol alílico puro.^[261]

Al líquido obtenido se agregó MgSO₄ anhídrido (20 g), la mezcla se dejó reposar por 10 días y se midió el contenido de agua por Karl Fischer, que resultó de 2,9 %v/v. Para conseguir un producto con menor porcentaje de agua, se filtró el MgSO₄ hidratado y el alcohol alílico se almacenó sobre MS 3Å recién activadas hasta su uso.

P.Eb. 96-97 °C, [lit.^[344] 96,9 °C].

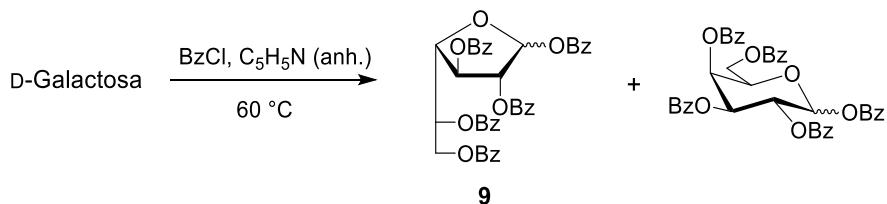
RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ: 6,00 (ddt, *J* = 17,2; 10,3; 5,2 Hz, 1H, CH=CH₂), 5,28 (dq, *J* = 17,2; 1,7 Hz, 1H, CH=CH_aH), 5,15 (dq, *J* = 10,4; 1,6 Hz, 1H, CH=CHH_b), 4,20 – 4,09 (m, 2H, CH₂OH).

RMN ¹³C (101 MHz, CDCl₃) δ: 137,4 (CH=CH₂), 115,3 (CH=CH₂), 63,9 (CH₂OH).

% H₂O (KF) = 1 %v/v (luego de 4 días de reposo sobre MS).

6.1.2. Metodologías de síntesis

1,2,3,5,6-Penta-O-benzoíl- α , β -D-galactofuranosa (9)



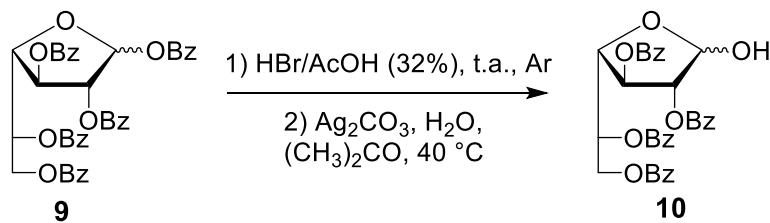
Se siguió el procedimiento descripto por Gallo-Rodríguez C. et al.^[253]

Una suspensión de D-galactosa (5,05 g; 0,03 mol) seca (temp. de secado = 90 °C), en piridina anhidra (70 mL) se calentó en un baño de agua hirviendo por 2 h bajo exclusión de humedad. Luego, el baño externo se enfrió rápidamente a 60 °C, se agregó cloruro de benzoílo (19,5 mL; 0,17 mol) y se continuó la agitación a 60 °C por 1,5 h. Luego, se agregó agua (10 mL) y la mezcla se agitó por 30 min a temperatura ambiente. La solución se vertió lentamente y con agitación sobre un baño de agua-hielo (500 g) para obtener un sólido amorfo. Luego de decantar el líquido, el sólido remanente se lavó con agua fría (5 x 500 mL). El sólido amorfo obtenido se disolvió en etanol hirviendo (800 mL) y se dejó cristalizar lentamente a temperatura ambiente. Después de dos días, por filtración de la solución se obtuvieron cristales de 1,2,3,5,6-penta-O-benzoíl- α , β -D-galactofuranosa (9; 5,63 g; 29%). Los datos de RMN ¹H fueron coincidentes con los descriptos en bibliografía.^[345]

$[\alpha]_D^{20} +10,1$ (c 1, CHCl₃), [lit.^[345] $[\alpha]_D +18,1$ (c 1, CHCl₃)]; R_f 0,64 y 0,6 (tolueno/AcOEt 9:1).

Las aguas madres se mantuvieron en reposo, a temperatura ambiente, por 6 días y luego se filtraron los cristales formados. Esta segunda cosecha de cristales se identificó como 1,2,3,4,6-penta-O-benzoíl- α , β -D-galactopiranosa (6 g; 30%; R_f 0,62 tolueno/AcOEt 9:1).^[346]

2,3,5,6-Tetra-O-benzoíl- α , β -D-galactofuranosa (10)



Se siguió el procedimiento descripto por Allen^[254] con ligeras modificaciones.

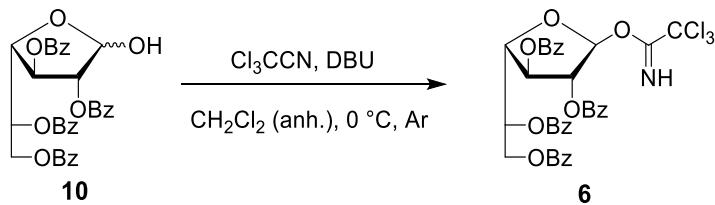
Se suspendió 1,2,3,5,6-penta-O-benzoíl- α , β -D-galactofuranosa (9; 2,20 g; 3,13 mmol) seca (temp. de secado = 90 °C), en HBr en AcOH 32% (4,2 mL). La mezcla se

agitó por 16 h a temperatura ambiente en oscuridad bajo atmósfera de Ar. Por evaporación a seco y co-evaporación con tolueno (5 x 3 mL) se obtuvo bromuro de 2,3,5,6-tetra-O-benzoíl-β-D-galactofuranosa como un sólido amorfó espumoso anaranjado. El producto crudo se disolvió en acetona (5 mL), se agregó agua (0,32 mL; 17,78 mmol) y Ag_2CO_3 (1,56 g; 5,66 mmol) y se llevó a 40 °C. La suspensión resultante se agitó por 2 h, se filtró sobre lecho de celite y el filtrado se evaporó a sequedad. Por cromatografía en columna de sílica gel (tolueno/AcOEt 20:1) se aisló **10** (1,76 g; 94%) como un sólido amorfó blanco. La caracterización del producto por RMN ^1H evidenció la obtención de una mezcla de anómeros en relación $\alpha/\beta \sim 0,3:0,7$.^[38]

$[\alpha]_D^{20} +28,5$ (c 1, CHCl_3), [lit.^[38] $[\alpha]_D +24,2$ (c 1, CHCl_3)]; R_f 0,45, única mancha (tolueno/AcOEt 9:1).

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ de la mezcla de anómeros: 8,19 – 7,18 (m, 20H, 4 x PhCO), 6,14 – 6,01 (m, 1H, H-3 α , H-5 β), 5,98 (ddd, $J = 6,3; 6,3; 3,5$ Hz, 0,3H, H-5 α), 5,84 (d, $J = 4,5$ Hz, 0,3H, H-1 α), 5,71 (s, 0,7H, H-1 β), 5,65 (d, $J = 4,9$ Hz, 0,7H, H-3 β), 5,55 (t, $J = 5,0$ Hz, 0,3H, H-2 α), 5,51 (d, $J = 1,4$ Hz, 0,7H, H-2 β), 4,93 – 4,63 (m, 2,7H, H-4 α , H-4 β , H-6a α , H-6a β , H-6b β), 4,56 (dd, $J = 6,6; 4,7$ Hz, 0,3H, H-6b α).

Tricloroacetimidato de O-(2,3,5,6-tetra-O-benzoíl-β-D-galactofuranosilo) (6)



Se siguió el procedimiento descripto por Gallo-Rodríguez C. et al.^[38]

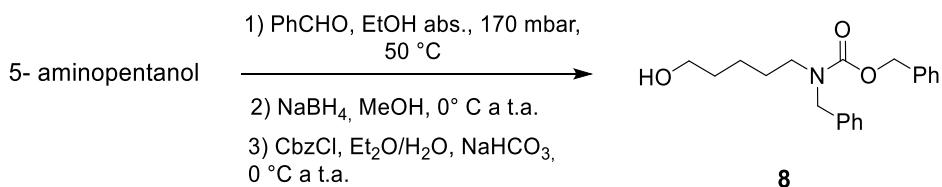
A una solución de 2,3,5,6-tetra-O-benzoíl- α,β -D-galactofuranosa (**10**; 4,41 g; 7,39 mmol) seca en diclorometano anhídrico (80 mL) se agregó tricloroacetonitrilo (3,7 mL; 36,9 mmol). La mezcla se llevó a 0 °C y se agregó DBU (0,33 mL; 2,21 mmol) lentamente y con agitación. Luego de 1 h de agitación a 0 °C bajo atmósfera de Ar, la solución se concentró a presión reducida obteniéndose un jarabe oscuro que se purificó por cromatografía *flash* en columna de sílica gel (tolueno/AcOEt/TEA 100:1:1) para dar **6** (3,84 g; 70%) como un sólido amorfó espumoso. La caracterización del producto por RMN ^1H evidenció la obtención de una mezcla de anómeros en relación $\alpha/\beta 0,5:10$.^[38] Para evitar la descomposición, el producto aislado se guardó en freezer bajo exclusión de humedad hasta su utilización.

$[\alpha]_D^{20} -2,2$ (c 1, CHCl_3), [lit.^[38] $[\alpha]_D -6,6$ (c 2, CHCl_3)]; R_f 0,7, única mancha (tolueno/AcOEt/TEA 9:1:0,1).

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ del anómero β : 8,73 (s, 1H, NH), 8,15 – 7,06 (m, 20H, 4 x PhCO), 6,70 (s, 1H, H-1), 6,23 – 6,07 (m, 1H, H-5), 5,78 (d, J = 4,3 Hz, 1H, H-3), 5,76 (s, 1H, H-2), 4,86 (t, J = 3,9 Hz, 1H, H-4), 4,82 – 4,72 (m, 2H, H-6a, H-6b).

RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ del anómero β : 166,1 (COPh); 165,9 (COPh); 165,6 (COPh); 165,3 (COPh); 160,4 (C=NH); 133,8 - 125,4 (4 x PhCO); 103,0 (C-1); 84,7 (C-4); 80,9 (C-2); 77,1 (C-3); 70,1 (C-5); 63,5 (C-6).

N-bencil-N-benciloxicarbonil-5-aminopentanol (8)



Se siguió el procedimiento descripto por Castelli R. *et al.*^[256]

A una solución de 5-aminopentanol (0,82 g; 7,95 mmol) en EtOH absoluto (11 mL), se agregó benzaldehído (0,82 mL; 8,07 mmol) y la solución resultante se calentó a 50 °C a presión reducida (170 mbar), rotovaporando lentamente hasta sequedad en el transcurso de 20 min. Luego, el producto crudo se co-evaporó con tolueno (3 x 2 mL).

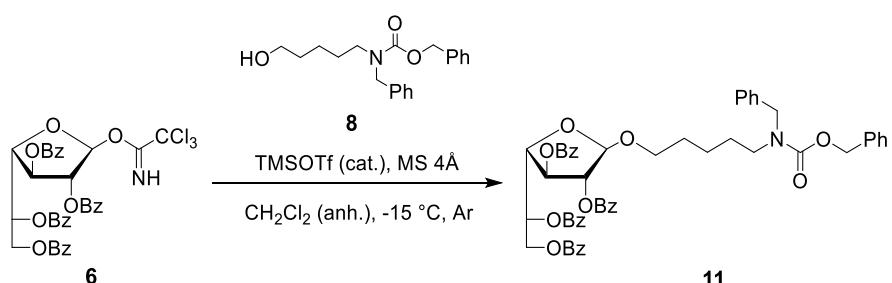
El jarabe obtenido se disolvió en metanol (15 mL) y se enfrió a 0 °C. Se añadió borohidruro de sodio (0,36 g; 9,52 mmol) en pequeñas porciones permitiendo que cese la liberación de gases antes de continuar el agregado. La mezcla se dejó llegar a temperatura ambiente con agitación. Después de 2 h, se adicionó ácido acético (0,4 mL; 6,46 mmol) para destruir el exceso de borohidruro y se agregó una solución de carbonato de potasio (1,84 g; 13,31 mmol) en agua (11 mL). La mezcla se agitó a temperatura ambiente toda la noche y luego se extrajo con dietil éter (40 mL). La fase acuosa resultante se extrajo nuevamente con dietil éter (15 mL) y las fases orgánicas combinadas se evaporaron hasta reducir su volumen aproximadamente a la mitad. Seguidamente, se agregó NaHCO_3 (ss) (22 mL) y a la mezcla bifásica resultante, enfriada a 0 °C, se añadió lentamente y con agitación cloroformiato de bencilo (1,2 mL; 8,51 mmol). Luego de 24 h de agitación a temperatura ambiente, se agregó dietil éter (25 mL) y se separó la fase acuosa. La fase orgánica se lavó con HCl 5% (10 mL) y NaCl (ss) (2 x 10 mL), se secó con MgSO_4 (anh.), se filtró y se llevó a sequedad. El producto crudo se purificó por columna corta de sílica gel (hexano/AcOEt 1:1) para dar **8** (2,1 g; 81%; R_f 0,39 hexano/AcOEt 1:1) como un jarabe incoloro. Los datos de RMN ^1H y ^{13}C fueron coincidentes con los reportados.^[251]

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ de la mezcla de rotámeros: 7,61 – 6,96 (m, 10H, 2 x PhCH_2), 5,30 – 5,04 (m, 2H, NCOOCH_2Ph), 4,61 – 4,35 (m, 2H, NCH_2Ph), 3,70 – 3,44 (m, 2H, CH_2OH), 3,35 – 3,12 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 1,68 – 1,41 (m, 4H, 2 x CH_2), 1,43 – 1,17 (m, 2H, CH_2).

RMN ^{13}C (101 MHz, CDCl_3) δ de la mezcla de rotámeros: 156,9/156,5 (NCOO); 138,0 – 127,4 (2 x PhCH_2); 67,3 (NCOOCH₂Ph); 62,8 (CH_2OH); 50,6/50,3 (NCH_2Ph); 47,1/46,3 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$); 32,4 (CH_2); 28,0/27,5 (CH_2); 23,0 (CH_2).

***N*-(Bencil)benciloxicarbonil-5-aminopentil**
galactofuranósido (11)

2,3,5,6-tetra-O-benzoíl- β -D-



Una suspensión de tricloroacetimidato de $\text{O}-(2,3,5,6\text{-tetra-O-benzoíl-}\beta\text{-D-galactofuranosilo})$ (**6**; 0,84 g; 1,13 mmol), *N*-bencil-*N*-benciloxicarbonil-5-aminopentanol (**8**; 0,47 g; 1,44 mmol), ambos previamente secados, y tamices moleculares de 4 Å pulverizados (500 mg) en diclorometano anhídrico (39 mL) se enfrió a -10 °C bajo atmósfera de Ar y se agregó lentamente triflato de trimetilsililo (41 µL; 0,23 mmol). Luego de 30 min de agitación a -15 °C, la suspensión se neutralizó con TEA (41 µL), se filtraron los tamices moleculares y la solución se lavó con agua (2 x 50 mL). La fase orgánica se secó sobre Na_2SO_4 (anh.), se filtró y se concentró a presión reducida. El producto crudo se purificó por cromatografía *flash* en columna de sílica gel (tolueno a tolueno/AcOEt 100:1) para dar **11** (0,94 g; 92%) como un jarabe incoloro.

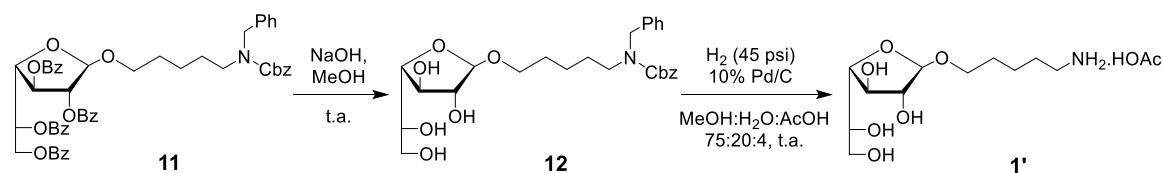
$[\alpha]_D^{20}$ -6,8 (c 1, CHCl_3); R_f 0,6 (tolueno/AcOEt 9:1).

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ de la mezcla de rotámeros: 8,19 – 7,04 (m, 30H, 4 x PhCO , 2 x PhCH_2), 6,17 – 5,94 (m, 1H, H-5), 5,62 (d, J = 5,2 Hz, 1H, H-3), 5,44 (s, 1H, H-2), 5,33 – 5,22 (m, 1H, H-1), 5,22 – 5,09 (m, 2H, NCOOCH_2Ph), 4,87 – 4,67 (m, 2H, H-6a, H-6b), 4,62 (m, 1H, H-4), 4,56 – 4,39 (m, 2H, NCH_2Ph), 3,83 – 3,57 (m, 1H, OCH_aHCH_2), 3,57 – 3,35 (m, 1H, OCHH_bCH_2), 3,35 – 3,01 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 1,72 – 1,42 (m, 4H, 2 x CH_2), 1,42 – 1,15 (m, 2H, CH_2).

RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ de la mezcla de rotámeros: 166,2 (COPh); 165,8 (COPh); 165,7 (COPh); 165,5 (COPh); 156,8/156,2 (NCOO); 138,0 - 127,3 (4 x PhCO , 2 x PhCH_2); 105,7 (C-1); 82,2 (C-2); 81,3 (C-4); 77,6 (C-3); 70,3 (C-5); 67,5 (OCH_2CH_2); 67,2 (NCOO CH_2Ph); 63,6 (C-6); 50,6/50,3 (N CH_2Ph); 47,2/46,2 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$); 29,2 (CH_2); 28,0/27,5 (CH_2); 23,4 (CH_2).

EMAR (ESI) m/z calculado para $\text{C}_{54}\text{H}_{51}\text{NO}_{12} [\text{M}+\text{Na}]^+$: 928,3309. Encontrado: 928,3310.

Acetato de 5-aminopentil β -D-galactofuranósido (1')



A una suspensión de *N*-(bencil)benciloxicarbonil-5-aminopentil 2,3,5,6-tetra-O-benzoil- β -D-galactofuranósido (**11**; 0,84 g; 0,93 mmol) en metanol (2,6 mL) se agregó una solución de NaOH 1 M en metanol (0,55 mL). Luego de 2 h de agitación a temperatura ambiente, la solución se purificó a través de una columna corta (1,5 cm x 0,5 cm, d. x alt.) de Amberlite IR120 H. El eluido se concentró y el jarabe obtenido se co-evaporó con agua ultrapura (6 x 5 mL) para eliminar el benzoato de metilo. Se obtuvo un jarabe (0,47 g) cuyo componente mayoritario (>95%) se identificó por RMN mono y bidimensionales como *N*-(bencil)benciloxicarbonil-5-aminopentil β -D-galactofuranósido (**12**).

R_f 0,74 (AcOEt/EtOH/H₂O/NH₃ 7:2:1:0,5).

RMN ^1H (400 MHz, MeOD) δ de la mezcla de rotámeros: 7,48 – 7,03 (m, 10H, 2 x PhCH_2), 5,26 – 5,02 (m, 2H, NCOO CH_2Ph), 4,83 (sa, 1H, H-1), 4,50 (s, 2H, N CH_2Ph), 4,01 (dd, J = 6,6; 3,9 Hz, 1H, H-3), 3,97 – 3,87 (m, 2H, H-2, H-4), 3,79 – 3,52 (m, 4H, H-5, OCH_aHCH₂, H-6a, H-6b), 3,44 – 3,13 (m, 3H, OCHH_bCH₂, CH₂CH₂N), 1,81 – 1,39 (m, 4H, 2 x CH_2), 1,39 – 1,14 (m, 2H, CH₂).

RMN ^{13}C (75 MHz, MeOD) δ de la mezcla de rotámeros: 158,5/158,0 (NCOO); 139,3 - 128,4 (2 x PhCH_2); 109,4 (C-1); 84,1 (C-4); 83,4 (C-2); 78,7 (C-3); 72,4 (C-5); 68,6 (OCH₂CH₂); 68,4 (NCOO CH_2Ph); 64,6 (C-6); 51,5/51,3 (N CH_2Ph); 47,6 (CH₂CH₂N); 30,3 (CH₂); 28,9/28,5 (CH₂); 24,4 (CH₂).

El producto crudo de la reacción anterior se disolvió en una mezcla MeOH/H₂O/AcOH 75:20:4 (145 mL). Luego, se agregó Pd/C 10% (0,43 g) y la mezcla se agitó en hidrogenador a 45 psi y temperatura ambiente por 94 h hasta que por ccd se observó conversión mayoritaria a un producto de R_f 0,65 (EtOH/H₂O/AcOH 7:1:1). La suspensión

se filtró por lecho de celite, el filtrado se llevó a sequedad y se co-evaporó con tolueno (6 x 8 mL). El jarabe obtenido se filtró a través de un cartucho de EFS de fase reversa C8 (H_2O/ACN 95:5) para eliminar impurezas no polares y luego se purificó por columna cromatográfica de sílica gel (ACN/ $H_2O/AcOH$ 9:1:0,1) y el producto se co-evaporó con tolueno (6 x 1 mL). El jarabe obtenido se disolvió en agua ultrapura y se liofilizó para dar **1'** (231 mg; 77%) como un jarabe incoloro.

Para identificar la presencia del grupo acetato en el producto final, una fracción del producto de reacción se trató con resina de intercambio catiónico. El jarabe se disolvió en una mezcla $MeOH/H_2O$ 9:1 y se agregó ácido acético (1,3 equiv.). La solución resultante se agitó con resina Amberlite IR 120H por 1 hora, se pasó a una columna cromatográfica y se eluyó con hidróxido de amonio 1 M. Las fracciones colectadas se analizaron por ccd, y aquellas en las que se identificó el producto de reacción se juntaron, concentraron y se analizaron por RMN 1H .

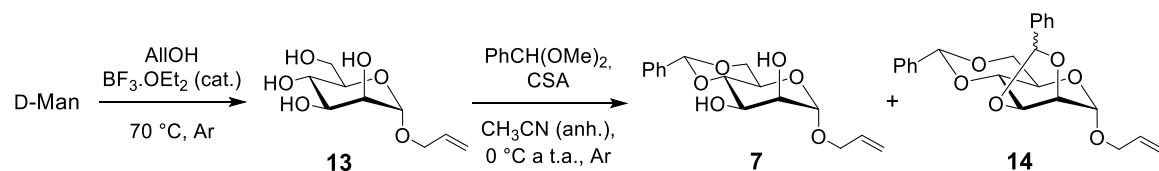
$[\alpha]_D^{20} -49,3$ (c 1, H_2O); R_f 0,65 ($EtOH/H_2O/AcOH$ 7:1:1).

RMN 1H (400 MHz, D_2O) δ : 4,99 (d, J = 2,3 Hz, 1H, H-1), 4,14 – 3,98 (m, 2H, H-3, H-2), 3,95 (dd, J = 6,4; 4,1 Hz, 1H, H-4), 3,88 – 3,50 (m, 5H, H-5, H-6a, H-6b, OCH_2CH_2), 3,06 – 2,92 (m, 2H, CH_2NH_2), 1,91 (s, 3H, CH_3COOH), 1,80 – 1,56 (m, 4H, 2 x CH_2), 1,54 – 1,34 (m, 2H, CH_2).

RMN ^{13}C (75 MHz, D_2O) δ : 107,7 (C-1); 83,2 (C-4); 81,6 (C-2); 77,1 (C-3); 71,4 (C-5); 68,7 (OCH_2CH_2); 63,4 (C-6); 40,0 (CH_2NH_2); 28,7 (CH_2); 27,1 (CH_2); 23,9 (CH_3COOH); 22,9 (CH_2).

EMAR (ESI) m/z calculado para $C_{11}H_{23}NO_6$ $[M+Na]^+$: 288,1423. Encontrado: 288,1424.

Alil 4,6-O-bencilidén- α -D-manopiranósido (7) y alil 2,3:4,6-di-O-bencilidén- α -D-manopiranósido (14)



Se siguió el procedimiento descripto por Ali A. *et al.*^[259] con modificaciones.

A una suspensión de D-manosa (8,1 g; 45 mmol) seca (temp. de secado = 90 °C) en alcohol alílico (68 mL) se agregó, lentamente y con agitación, trifluoruro de boro-etyl eterato (0,4 mL; 3,2 mmol). Seguidamente, la mezcla se calentó a 70 °C y se mantuvo con agitación bajo atmósfera de Ar por 72 h. La solución se neutralizó con TEA (0,56 mL) y se concentró para dar un jarabe incoloro (12,0 g; R_f 0,66, única mancha,

AcOEt/i-PrOH/H₂O 9:4:2). La caracterización del crudo de reacción por RMN ¹H indicó la obtención como producto mayoritario (~97%) del alil α,β-D-manopiranósido (**13**) como una mezcla de anómeros en relación α/β 15:1.^[347]

RMN ¹H (300 MHz, D₂O) δ de la mezcla de anómeros: 6,08 – 5,88 (m, 1H, CH=CH₂), 5,37 (dq, *J* = 17,3; 1,7 Hz, 1H, CH=CH_aH), 5,29 (dd, *J* = 10,4; 1,1 Hz, 1H, CH=CHH_b), 4,92 (d, *J* = 1,6 Hz, 0,9 H, H-1 α), 4,71 (d, *J* = 0,8 Hz, 0,1 H, H-1 β), 4,43 – 3,50 (m, 10H), 3,43 – 3,32 (m, 0,2 H).

RMN ¹³C (75 MHz, D₂O) δ del anómero α: 133,2 (CH=CH₂); 118,4 (CH=CH₂); 99,0 (C-1); 72,8; 70,6; 70,0; 68,1; 66,8; 60,9.

El producto crudo del paso anterior (12,0 g), previamente secado, se suspendió en acetonitrilo anhídrico (200 mL) y se agregó ácido (1S)-(+)-10-camforsulfónico (1,8 g; 7,75 mmol) seco (temp. de secado = 70 °C). La suspensión resultante se enfrió a 0 °C y se agregó α,α-dimetoxitolueno (8,7 mL; 58 mmol) con agitación a lo largo de 20 min. Luego de 2 h de agitación a 0 °C bajo atmósfera de Ar, la suspensión se llevó a temperatura ambiente y se continuó la agitación por 2 h. La mezcla se neutralizó con TEA (1,3 mL) y se llevó a sequedad. El producto crudo se disolvió en diclorometano (300 mL) y se extrajo con NaHCO₃ (ss) (250 mL). La fase orgánica se lavó con agua (250 mL) y con NaCl (ss) (250 mL), se secó con Na₂SO₄ (anh.), se filtró y se llevó a sequedad. El análisis por ccd del crudo de reacción evidenció la presencia de dos manchas principales de *R*_f 0,97 y 0,63 (CH₂Cl₂/MeOH 9:1). La purificación por cromatografía *flash* en columna de sílica gel (tolueno/AcOEt 7:3) permitió separar dos fracciones. El componente de mayor movilidad eluído de la columna (*R*_f 0,97 CH₂Cl₂/MeOH 9:1) fue un sólido amorfó blanco que se identificó por RMN ¹H y ¹³C como alil 2,3:4,6-di-O-bencilidén-α-D-manopiranósido (**14**; 2,9 g; 16%) en una mezcla de diasterómeros *endo/exo* 0,45:0,55.

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ: 7,60 – 7,29 (m, 10H, 2 x PhCH), 6,29 (s, 0,55H, PhCH *exo*), 5,99 – 5,80 (m, 1,45H, PhCH *endo*, CH=CH₂ *endo*, CH=CH₂ *exo*), 5,64 (s, 0,55H, PhCH *exo*), 5,52 (s, 0,45H, PhCH *endo*), 5,38 – 5,20 (m, 2,45H, CH=CH₂ *endo*, CH=CH₂ *exo*, H-1 *endo*), 5,17 (s, 0,55H, H-1 *exo*), 4,66 (dd, *J* = 7,7; 5,4 Hz, 0,55H, H-3 *exo*), 4,50 (dd, *J* = 7,8; 6,3 Hz, 0,45H, H-3 *endo*), 4,38 – 4,25 (m, 1,45H, H-6a *endo*, H-2 *endo*, H-6a *exo*), 4,25 – 4,16 (m, 1,55H, OCH_aHCHCH₂ *endo*, OCH_aHCHCH₂ *exo*, H-2 *exo*), 4,09 – 3,98 (m, 1H, OCHH_bCHCH₂ *endo*, OCHH_bCHCH₂ *exo*), 3,93 – 3,77 (m, 2H, H-4 *exo*, H-6b *endo**; H-5 *endo*, H-5 *exo*), 3,79 – 3,68 (m, 1H, H-4 *endo*, H-6b *exo**).

* Las asignaciones pueden estar intercambiadas.

RMN ¹³C (101 MHz, CDCl₃) δ: 138,8 - 126,2 (2 x PhCH *endo*, 2 x PhCH *exo*, CH=CH₂ *endo*, CH=CH₂ *exo*); 118,2 (2 x CH=CH₂); 104,2 (PhCH *endo*); 103,1 (PhCH *exo*); 102,1

(PhCH *exo*); 101,9 (PhCH *endo*); 97,1 (C-1 *exo*); 96,9 (C-1 *endo*); 80,7 (C-4 *endo*); 78,5 (C-2 *endo*); 77,7 (C-4 *exo*); 75,7 (C-2 *exo*); 75,5 (C-3 *exo*); 74,2 (C-3 *endo*); 69,0 (C-6); 68,9 (C-6); 68,6 (OCH₂CHCH₂); 68,5 (OCH₂CHCH₂); 60,63 (C-5); 60,61 (C-5).

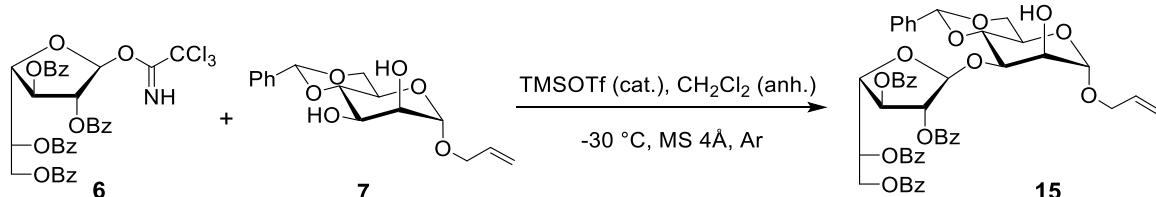
De la fracción de menor movilidad se obtuvo **7** (4,15 g; 30%) como un sólido blanco. Los datos de RMN ¹H y ¹³C fueron coincidentes con los reportados.^[348]

$[\alpha]_D^{20} +69,9$ (*c* 1, CHCl₃), [lit.^[349] $[\alpha]_D^{23} +71,4$ (*c* 1, CHCl₃)]; R_f 0,61 (CH₂Cl₂/MeOH 9:1); pf 144,6-146 °C, [lit.^[350] 148-149 °C (Et₂O)].

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ : 7,53 – 7,33 (m, 5H, PhCH), 6,00 – 5,81 (m, 1H, CH=CH₂), 5,55 (s, 1H, PhCH), 5,39 – 5,26 (m, 1H, CH=CH_aH), 5,26 – 5,18 (m, 1H, CH=CHH_b), 4,87 (d, *J* = 0,9 Hz, 1H, H-1), 4,32 – 4,13 (m, 2H, H-6a, OCH_aHCH=CH₂), 4,12 – 3,76 (m, 6H, H-3, H-2, OCHH_bCH=CH₂, H-4, H-5, H-6b), 2,88 (sa, 2H, OH).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ : 137,3 – 126,4 (CH=CH₂, PhCH); 117,9 (CH=CH₂); 102,4 (PhCH); 99,5 (C-1); 79,0 (C-4); 71,1 (C-2); 68,9 (C-6); 68,7 (C-3); 68,4 (OCH₂CH=CH₂); 63,2 (C-5).

Alil 2,3,5,6-tetra-O-benzoíl-β-D-galactofuranosil-(1→3)-4,6-O-bencilidén-α-D-manopiranósido (15)



Se procedió según lo descripto por Ma Z. et al.^[245] con ligeras modificaciones.

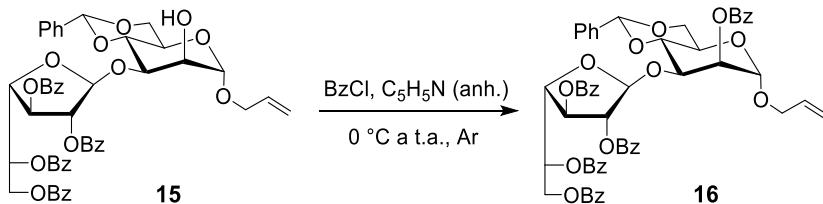
A una suspensión de tricloroacetimidato de O-(2,3,5,6-tetra-O-benzoíl-β-D-galactofuranosilo) (**6**; 3,69 g; 5 mmol), alil 4,6-O-bencilidén-α-D-manopiranósido (**7**; 1,95 g; 6,3 mmol), ambos previamente secados, y tamices moleculares de 4 Å pulverizados (1 g), en diclorometano anhídrico (140 mL) enfriada a -30 °C bajo atmósfera de Ar, se agregó triflato de trimetilsililo (50 μL; 0,28 mmol). Luego de 15 min de agitación a -30 °C, la ccd mostró la desaparición del imidato de partida. La suspensión se neutralizó con TEA (50 μL), se filtraron los tamices moleculares y la solución resultante se concentró a sequedad. El residuo obtenido se purificó por cromatografía flash en columna de sílica gel (tolueno/AcOEt 15:1 a 6:1) para dar **15** (2,77 g; 63%) como un sólido amorfó blanco. Los datos de RMN ¹H y ¹³C fueron coincidentes con los reportados.^[245]

$[\alpha]_D^{20} +10,9$ (*c* 1, CHCl₃) [lit.^[245] $[\alpha]_D^{25} +10,2$ (*c* 1, CHCl₃)]; R_f 0,54 (tolueno/AcOEt 8:2); pf 77,6-79 °C.

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ : 8,17 – 7,07 (m, 25H, 4 x PhCO , PhCH), 6,02 – 5,80 (m, 2H, $\text{CH}=\text{CH}_2$, H-5'), 5,55 (dd, J = 5,6; 1,0 Hz, 1H, H-3'), 5,50 (s, 1H, PhCH), 5,44 (sa, 1H, H-1'), 5,43 (d, J = 1,5 Hz, 1H, H-2'), 5,31 (dq, J = 17,3; 1,5 Hz, 1H, $\text{CH}=\text{CH}_a\text{H}$), 5,23 (dq, J = 10,4; 1,5 Hz, 1H, $\text{CH}=\text{CHH}_b$), 4,99 (d, J = 1,3 Hz, 1H, H-1), 4,74 (dd, J = 5,5; 3,1 Hz, 1H, H-4'), 4,57 (dd, J = 12,1; 8,4 Hz, 1H, H-6'a), 4,42 – 3,77 (m, 9H, H-3, H-6a, H-2, H-6'b, H-4, $\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$, H-5, H-6b), 2,99 (d, J = 1,9 Hz, 1H, OH).

RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ : 166,1 (COPh); 166,1 (COPh); 165,9 (COPh); 165,6 (COPh); 137,4 – 126,1 ($\text{CH}=\text{CH}_2$, 4 x PhCO , PhCH); 118,2 ($\text{CH}=\text{CH}_2$); 102,6 (C-1'); 102,2 (PhCH); 99,4 (C-1); 82,6 (C-2'); 81,4 (C-4'); 77,4 (C-3'); 76,9 (C-4); 72,1 (C-3); 70,2 (C-5'); 69,0 (C-6); 68,8 (C-2); 68,5 ($\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$); 64,3 (C-6'); 63,9 (C-5).

Alil 2,3,5,6-tetra-O-benzoíl- β -D-galactofuranosil-(1 \rightarrow 3)-4,6-O-bencilidén-2-O-benzoíl- α -D-manopiranósido (16)



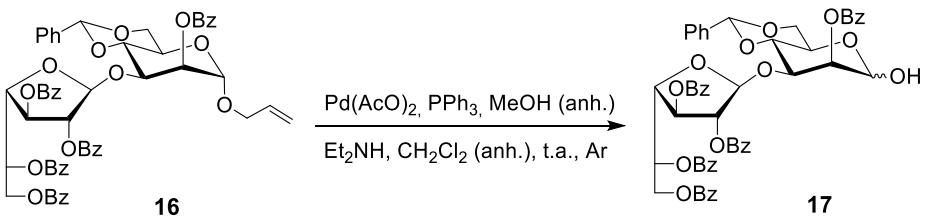
A una solución de alil 2,3,5,6-tetra-O-benzoíl- β -D-galactofuranosil-(1 \rightarrow 3)-4,6-O-bencilidén- α -D-manopiranósido (**15**; 1,96 g; 2,2 mmol), previamente secado, en piridina anhidra (22 mL) enfriada a 0 °C se agregó, lentamente y con agitación, cloruro de benzoílo (0,82 mL; 7 mmol). Luego de 1 h de agitación a temperatura ambiente bajo atmósfera de Ar, la ccd mostró la desaparición del compuesto de partida. Se agregó diclorometano (140 mL) y la solución se extrajo con HCl 5% (2 x 110 mL). La fase orgánica resultante se lavó con agua (110 mL), NaHCO_3 (ss) (110 mL) y nuevamente con agua (110 mL), se secó con Na_2SO_4 (anh.), se filtró y se llevó a sequedad. Por cromatografía *flash* en columna de sílica gel (tolueno/AcOEt 9:1) se obtuvo **16** (2,05 g; 94%) como un sólido amorfó blanco. $[\alpha]_D^{20}$ -41,2 (c 1, CHCl_3); R_f 0,6 (tolueno/AcOEt 9:1); pf 79,4-81,7 °C.

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ : 8,20 – 7,07 (m, 30H, 5 x PhCO , PhCH), 6,00 – 5,86 (m, 2H, $\text{CH}=\text{CH}_2$, H-5'), 5,65 (dd, J = 3,6; 1,6 Hz, 1H, H-2), 5,56 (s, 1H, H-1'), 5,51 (s, 1H, PhCH), 5,40 (d, J = 5,1 Hz, 1H, H-3'), 5,34 (dq, J = 17,2; 1,6 Hz, 1H, $\text{CH}=\text{CH}_a\text{H}$), 5,34 (d, J = 1,0 Hz, 1H, H-2'), 5,26 (dq, J = 10,3; 1,3 Hz, 1H, $\text{CH}=\text{CHH}_b$), 5,02 (d, J = 1,6 Hz, 1H, H-1), 4,65 (dd, J = 5,1; 3,0 Hz, 1H, H-4'), 4,64 – 4,50 (m, 2H, H-6'a, H-3), 4,32 (dd, J = 10,1; 4,5 Hz, 1H, H-6a), 4,25 (ddt, J = 12,7; 5,2; 1,4 Hz, 1H, $\text{OCH}_a\text{HCH}=\text{CH}_2$), 4,19 (dd, J = 12,0; 3,3 Hz, 1H, H-6'b), 4,15 – 3,97 (m, 3H, H-4, $\text{OCHH}_b\text{CH}=\text{CH}_2$, H-5), 3,88 (t, J = 10,1 Hz, 1H, H-6b).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ: 166,2 (COPh); 165,8 (2 x COPh); 165,5 (COPh); 165,1 (COPh); 137,2 - 126,0 (CH=CH₂, 5 x PhCO, PhCH); 118,5 (CH=CH₂); 102,7 (C-1'); 102,2 (PhCH); 98,0 (C-1); 81,9 (C-4'); 81,4 (C-2'); 77,9 (C-3'); 77,6 (C-4); 70,2 (C-5'); 69,9 (C-3); 69,8 (C-2); 69,0 (C-6); 68,7 (OCH₂CH=CH₂); 64,2 (C-6'); 64,1 (C-5).

EMAR (ESI) *m/z* calculado para C₅₇H₅₀O₁₆ [M+Na]⁺: 1013,2997. Encontrado: 1013,3016.

2,3,5,6-tetra-O-benzoíl-β-D-galactofuranosil-(1→3)-4,6-O-bencildén-2-O-benzoíl- α , β -D-manopiranosa (17)



Una suspensión de acetato de paladio (II) (0,45 g; 2 mmol) y trifenilfosfina (2,6 g; 9,9 mmol), previamente secados (temp. de secado= 55 °C), en metanol anhidro (22 mL) se agitó a temperatura ambiente, en oscuridad y bajo atmósfera de Ar por 3 h hasta observar la disolución completa del acetato de paladio. Luego, se agregó dietilamina (210 μL), se mantuvo la agitación por 15 min y se agregó una solución de alil 2,3,5,6-tetra-O-benzoíl-β-D-galactofuranosil-(1→3)-4,6-O-bencildén-2-O-benzoíl- α -D-manopiranósido (**16**; 2,6 g; 2,6 mmol) seco (temp. de secado= 55 °C) en diclorometano anhidro (31 mL). La solución resultante se agitó por 48 h, hasta observar desaparición del compuesto de partida por ccd, y se llevó a sequedad. El residuo obtenido se purificó por cromatografía *flash* en columna de sílica gel (tolueno/AcOEt 20:1 a 6:1) para dar **17** (2,3 g; 92%) como un sólido amorfo blanco. La caracterización del producto obtenido por RMN ¹H y ¹³C evidenció la obtención de una mezcla de anómeros α / β en relación 5:1.

[α]_D²⁰ -71,7 (c 1, CHCl₃); R_f 0,44 (tolueno/AcOEt 8:2).

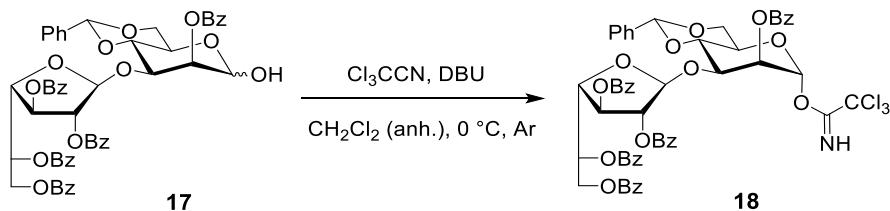
RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ: 8,22 – 7,06 (m, 30H, 6 x PhCO, PhCH), 5,99 – 5,87 (m, 1H, H-5'), 5,67 (dd, *J* = 3,4; 1,4 Hz, 1H, H-2), 5,60 (s, 0,2H, H-1' anómero β), 5,57 (s, 1H, H-1'), 5,50 (s, 1H, PhCH), 5,43 – 5,36 (m, 2H, H-3', H-1), 5,34 (sa, 1H, H-2'), 5,08 – 5,03 (m, 0,2H, H-1 anómero β), 4,66 (dd, *J* = 5,2; 3,0 Hz, 1H, H-4'), 4,64 – 4,53 (m, 2H, H-3, H-6'a), 4,33 – 4,17 (m, 3H, H-6a, H-5, H-6'b), 4,10 (t, *J* = 9,6 Hz, 1H, H-4), 3,84 (t, *J* = 10,1 Hz, 1H, H-6b), 3,53 (d, *J* = 4,1 Hz, 1H, OH).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ: 166,3 (COPh); 165,9 (2 x COPh); 165,6 (COPh); 165,2 (COPh); 137,2 - 126,0 (6 x PhCO, PhCH); 102,7 (C-1'); 102,5 (C-1' anómero β); 102,2

(Ph₂CH); 94,0 (C-1 anómero β); 93,7 (C-1); 81,9 (C-4'); 81,5 (C-2'); 77,9 (C-3'); 77,6 (C-4); 70,2 (C-5'); 70,0 (C-2); 69,5 (C-3); 69,0 (C-6); 64,2 (C-5); 64,0 (C-6').

EMAR (ESI) *m/z* calculado para C₅₄H₄₆O₁₆ [M+Na]⁺: 973,2684. Encontrado: 976,2710.

Tricloroacetimidato de O-(2,3,5,6-tetra-O-benzoíl- β -D-galactofuranosil-(1 \rightarrow 3)-4,6-O-bencilidén-2-O-benzoíl- α -D-manopiranosilo) (18)



A una solución de 2,3,5,6-tetra-O-benzoíl- β -D-galactofuranosil-(1 \rightarrow 3)-4,6-O-bencilidén-2-O-benzoíl- α , β -D-manopiranosa (**17**; 2,86 g; 3,0 mmol) previamente secado, en diclorometano anhidro (30 mL) se agregó tricloroacetonitrilo (1,5 mL; 15,0 mmol), la mezcla se enfrió a 0 °C y se adicionó, lentamente y con agitación, DBU (140 μ L; 0,94 mmol). Luego de 3 h de agitación a 0 °C bajo atmósfera de Ar, la mezcla se concentró a presión reducida. El sólido obtenido se purificó por cromatografía *flash* en columna de sílica gel (tolueno/AcOEt/TEA 9:1:0,1) para dar **18** (2,53 g; 77%) como un sólido amorfó. Para evitar la descomposición, el producto aislado se guardó en freezer bajo exclusión de humedad hasta su utilización.

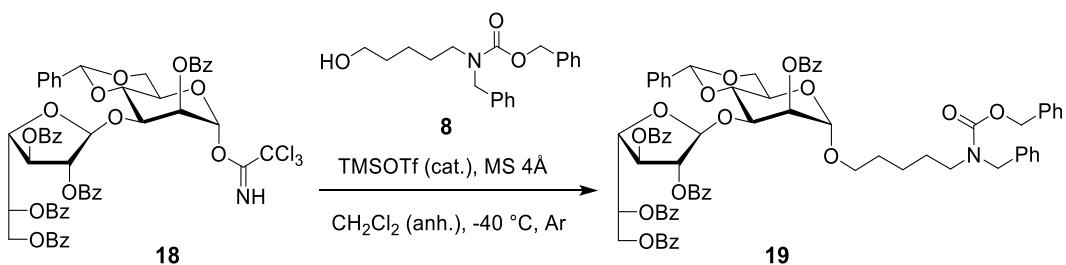
R_f 0,76 (tolueno/AcOEt/TEA 8:2:0,1).

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ : 8,77 (s, 1H, NH), 8,26 – 7,03 (m, 30H, 5 x PhCO, PhCH), 6,42 (d, *J* = 1,4 Hz, 1H, H-1), 6,03 – 5,89 (m, 1H, H-5'), 5,84 (dd, *J* = 3,5; 1,6 Hz, 1H, H-2), 5,61 (s, 1H, H-1'), 5,56 (s, 1H, PhCH), 5,44 (d, *J* = 5,2 Hz, 1H, H-3'), 5,37 (s, 1H, H-2'), 4,69 (dd, *J* = 4,9; 3,3 Hz, 1H, H-4'), 4,66 – 4,56 (m, 2H, H-6'a, H-3), 4,39 (dd, *J* = 10,3; 4,3 Hz, 1H, H-6a), 4,28 – 4,09 (m, 3H, H-4, H-6'b, H-5), 3,91 (t, *J* = 9,8 Hz, 1H, H-6b).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ : 166,1 (COPh); 165,8 (COPh); 165,6 (COPh); 165,5 (COPh); 165,1 (COPh); 160,3 (C=NH); 136,9 - 125,4 (5 x PhCO, PhCH); 102,9 (C-1'); 102,2 (PhCH); 95,9 (C-1); 90,7 (CCl₃); 82,1 (C-4'); 81,6 (C-2'); 77,8 (C-3'); 77,0 (C-4); 70,2 (C-5'); 69,8 (C-3); 68,7 (C-6); 68,1 (C-2); 66,6 (C-5); 63,8 (C-6').

N-(Bencil)benciloxicarbonil-5-aminopentil
galactofuranosil-(1 \rightarrow 3)-4,6-O-bencilidén-2-O-benzoíl- α -D-manopiranósido (19)

2,3,5,6-tetra-O-benzoíl- β -D-



A una suspensión de tricloroacetimidato de O-(2,3,5,6-tetra-O-benzoíl-β-D-galactofuranosil-(1→3)-4,6-O-bencildén-2-O-benzoíl-D-manopiranósido) (**18**; 50 mg; 0,046 mmol), *N*-bencil-*N*-benciloxicarbonil-5-aminopentanol (**8**; 18 mg; 0,055 mmol), ambos previamente secados, y tamices moleculares de 4 Å pulverizados (200 mg), en diclorometano anhídrico (3 mL) enfriada a -40 °C bajo atmósfera de Ar, se agregó triflato de trimetilsililo (1,64 µL; 0,009 mmol). Luego de 5 min de agitación a -40 °C, la ccd mostró consumo total del imidato de partida. La suspensión se neutralizó con TEA (2 µL), se filtraron los tamices moleculares y la solución obtenida se concentró a sequedad. El producto crudo se purificó por columna cromatográfica de sílica gel (hexano/AcOEt 8:2) para dar **19** (50 mg; 86%) como un sólido amorfo blanco.

$[\alpha]_D^{20} -33,9$ (c 1, CHCl₃); R_f 0,5 (tolueno/AcOEt 6:1); pf 59-63,3 °C.

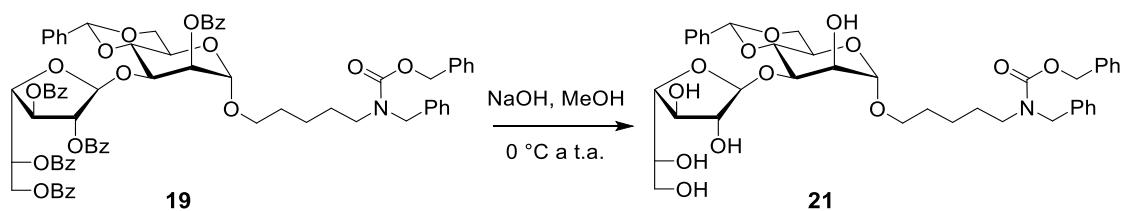
RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ de la mezcla de rotámeros: 8,29 – 7,01 (m, 40H, 5 x PhCO, PhCH, 2 x PhCH₂), 5,98 – 5,87 (m, 1H, H-5'), 5,53 – 5,47 (m, 2H, H-2, H-1'), 5,50 (s, 1H, PhCH), 5,39 (d, J = 5,1 Hz, 1H, H-3'), 5,33 (s, 1H, H-2'), 5,24 – 5,11 (m, 2H, NCOOCH₂Ph), 4,97 – 4,86 (m, 1H, H-1), 4,70 – 4,42 (m, 5H, H-4', H-6'a, NCH₂Ph, H-3), 4,30 (dd, J = 9,1, 3,6 Hz, 1H, H-6a), 4,21 – 4,03 (m, 2H, H-6'b, H-4), 4,02 – 3,81 (m, 2H, H-5, H-6b), 3,78 – 3,52 (m, 1H, OCH_aHCH₂), 3,49 – 3,12 (m, 3H, OCHH_bCH₂, CH₂CH₂N), 1,75 – 1,44 (m, 4H, 2 x CH₂), 1,44 – 1,14 (m, 2H, CH₂).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ de la mezcla de rotámeros: 166,1 (COPh); 165,8 (COPh); 165,8 (COPh); 165,5 (COPh); 165,1 (COPh); 156,9/156,3 (NCOOCH₂Ph); 138,1 - 126,0 (5 x PhCO, PhCH, 2 x PhCH₂); 102,7 (C-1'); 102,2 (PhCH); 98,9 (C-1); 81,9 (C-4'); 81,4 (C-2'); 77,9 (C-3'); 77,6 (C-4); 70,2 (C-5'); 70,0 (C-3); 69,8 (C-2); 69,1 (C-6); 68,2 (OCH₂CH₂); 67,3 (NCOOCH₂Ph); 64,3 (C-6'); 64,0 (C-5); 50,7/50,4 (NCH₂Ph); 47,3/46,3 (CH₂CH₂N); 29,1 (CH₂); 28,0/27,6 (CH₂); 23,4 (CH₂).

EMAR (ESI) m/z calculado para C₇₄H₆₉NO₁₈ [M+Na]⁺: 1282,4413. Encontrado: 1282,4474.

N-(Bencil)benciloxicarbonil-5-aminopentil bencildén-α-D-manopiranósido (21)

β-D-galactofuranosil-(1→3)-4,6-O-



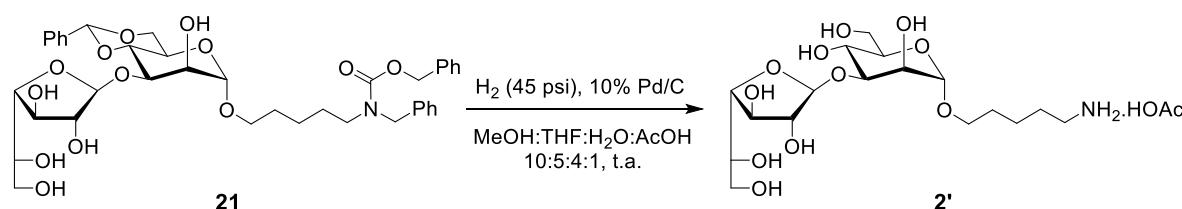
A una solución *N*-(bencil)benciloxicarbonil-5-aminopentil 2,3,5,6-tetra-*O*-benzoíl- β -D-galactofuranosil-(1→3)-4,6-*O*-bencildién-2-*O*-benzoíl- α -D-manopiranósido (**19**; 296 mg; 0,24 mmol) en metanol (3 mL) enfriada a 0 °C se agregó una solución de NaOH 1M en metanol (0,36 mL). La mezcla se agitó a temperatura ambiente por 3 h y se purificó a través de una columna corta (1,5 cm x 0,5 cm, d. x alt.) de Amberlite IR120 H. El eluido se concentró y el jarabe obtenido se co-evaporó con agua ultrapura (5 x 1,5 mL). El crudo obtenido se purificó por cromatografía en columna de sílica gel (CH₂Cl₂/MeOH 30:1 a 9:1) para dar **21** (144 mg; 83%) como un jarabe incoloro.

R_f 0,57 (CH₂Cl₂/MeOH 9:1).

RMN ¹H (300 MHz, MeOD) δ de la mezcla de rotámeros: 7,66 – 6,97 (m, 15H, PhCH, 2 x PhCH₂), 5,60 (s, 1H, PhCH), 5,22 – 5,12 (m, 2H, NCOOCH₂Ph), 5,09 (s, 1H, H-1'), 4,82 – 4,71 (m, 1H, H-1), 4,51 (s, 2H, NCH₂Ph), 4,23 – 4,14 (m, 1H, H-6a), 4,14 – 3,95 (m, 6H, H-2, H-3, H-4, H-4', H-2', H-3'), 3,87 – 3,72 (m, 2H, H-6b, H-5), 3,72 – 3,56 (m, 2H, H-5', OCH_aHCH₂), 3,50 (dd, *J* = 11,3; 7,2 Hz, 1H, H-6'a), 3,44 – 3,21 (m, 4H, H-6'b, OCHH_bCH₂, CH₂CH₂N), 1,70 – 1,44 (m, 4H, 2 x CH₂), 1,43 – 1,22 (m, 2H, CH₂).

RMN ¹³C (75 MHz, MeOD) δ de la mezcla de rotámeros: 139,2 – 127,5 (PhCH, 2 x PhCH₂); 106,2 (C-1'); 103,1 (PhCH); 102,4 (C-1); 85,8 (C-4'); 82,4 (C-2'); 79,2 (C-3'); 78,3 (C-4); 73,0 (C-3); 72,5 (C-5'); 69,9 (C-6); 69,3 (C-2); 68,7 (OCH₂CH₂); 68,5/68,4 (NCOOCH₂Ph); 65,5 (C-5); 64,8 (C-6'); 51,6/51,4 (NCH₂Ph); 47,5 (CH₂CH₂N); 30,1 (CH₂); 28,9/28,5 (CH₂); 24,4 (CH₂).

Acetato de 5-aminopentil β -D-galactofuranosil-(1→3)- α -D-manopiranósido (2')



A una solución de *N*-(bencil)benciloxicarbonil-5-aminopentil β -D-galactofuranosil-(1→3)-4,6-*O*-bencildién- α -D-manopiranósido (**21**; 144 mg; 0,20 mmol) en una mezcla MeOH/THF/H₂O/AcOH 10:5:4:1 (34 mL), se agregó Pd/C 10% (138 mg) y la mezcla se agitó en hidrogenador a 45 psi y temperatura ambiente por 2 días hasta que se observó

conversión total a un único producto de R_f 0,62 (EtOH/H₂O/AcOH 7:1:1). Luego, la suspensión se filtró por lecho de celite, y el filtrado se llevó a sequedad y se co-evaporó con tolueno (7 x 1 mL). El jarabe obtenido se pasó a través de un cartucho de EFS de fase reversa C8 (H₂O/MeOH 95:5) para quitar impurezas no polares y luego se purificó por cromatografía en columna de sílica gel (ACN/H₂O/AcOH 6:1:0,07 a 4:1:0,05). El producto obtenido se co-evaporó con tolueno (5 x 1 mL), se disolvió en agua ultrapura y se liofilizó para **2'** (72 mg; 76%) como un jarabe incoloro.

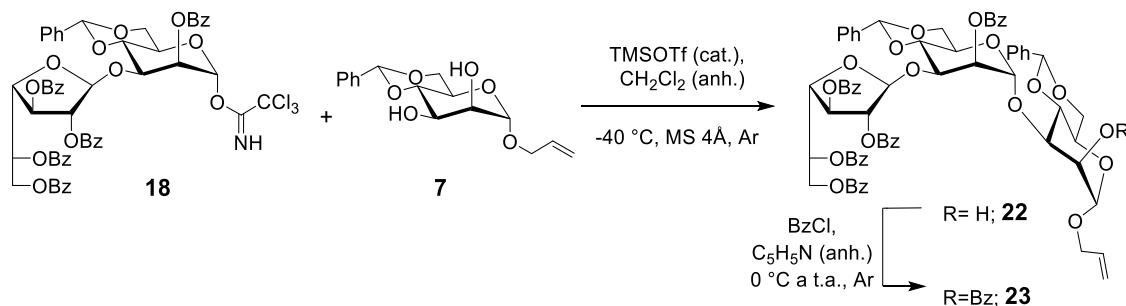
$[\alpha]_D^{20}$ -26,8 (c 1, H₂O); R_f 0,62 (EtOH/H₂O/AcOH 7:1:1).

RMN ¹H (400 MHz, D₂O) δ: 5,13 (d, J = 1,2 Hz, 1H, H-1'), 4,89 (d, J = 1,4 Hz, 1H, H-1), 4,15 (dd, J = 3,0; 1,6 Hz, 1H, H-2'), 4,12 (dd, J = 2,8; 2,0 Hz, 1H, H-2), 4,10 – 4,02 (m, 2H, H-3', H-4'), 3,92 – 3,81 (m, 3H, H-6a, H-3, H-5'), 3,80 – 3,61 (m, 6H, H-6b, OCH_aHCH₂, H-4, H-6'a, H-5, H-6'b), 3,60 – 3,51 (m, 1H, OCHH_bCH₂), 3,03 – 2,95 (m, 2H, CH₂NH₂), 1,91 (s, 3H, CH₃COOH), 1,76 – 1,60 (m, 4H, 2 x CH₂), 1,56 – 1,38 (m, 2H, CH₂).

RMN ¹³C (101 MHz, D₂O) δ: 105,0 (C-1'); 100,1 (C-1); 83,6 (C-4'); 82,0 (C-2'); 77,6 (C-3'); 76,2 (C-3); 73,3 (C-5); 71,4 (C-5'); 68,1 (OCH₂CH₂); 67,4 (C-2); 65,7 (C-4); 63,4 (C-6'); 61,6 (C-6); 40,0 (CH₂NH₂); 28,6 (CH₂); 27,1 (CH₂); 24,0 (CH₃COOH); 23,1 (CH₂).

EMAR (ESI) *m/z* calculado para C₁₇H₃₃NO₁₁ [M+Na]⁺: 450,1958. Encontrado: 450,1951.

Alil 2,3,5,6-tetra-O-benzoíl-β-D-galactofuranosil-(1→3)-4,6-O-bencilidén-2-O-benzoíl-α-D-manopiranósido-(1→3)-4,6-O-bencilidén-2-O-benzoíl-α-D-manopiranósido (23)



A una suspensión de tricloroacetimidato de O-(2,3,5,6-tetra-O-benzoíl-β-D-galactofuranosil-(1→3)-4,6-O-bencilidén-2-O-benzoíl-α-D-manopiranósilo) (**18**; 2,40 g; 2,2 mmol), alil 4,6-O-bencilidén-α-D-manopiranósido (**7**; 0,84 g; 2,7 mmol), ambos secados previamente, y tamices moleculares de 4 Å pulverizados (1 g), en diclorometano anhidro (77 mL) enfriada a -40 °C bajo atmósfera de Ar, se agregó triflato de trimetilsililo (20 μL; 0,11 mmol). Luego de 10 min de agitación a -40 °C, se observó la desaparición del imidato de partida por ccd. La suspensión se neutralizó con TEA (30 μL), se filtraron los tamices moleculares y la solución resultante se concentró a sequedad para dar un

Parte Experimental

sólido amorfo ligeramente amarillo (3,35 g). Por RMN mono y bidimensionales se identificó como producto mayoritario (>75%) alil 2,3,5,6-tetra-O-benzoíl- β -D-galactofuranosil-(1 \rightarrow 3)-4,6-O-bencilidén-2-O-benzoíl- α -D-manopiranósido (**22**). Una pequeña fracción (50 mg) de la muestra se purificó por cromatografía en columna de sílica gel (tolueno/AcOEt 11:1) para efectuar la caracterización del producto por RMN y EMAR.

R_f 0,44 (tolueno/AcOEt 6:1).

RMN 1H (400 MHz, $CDCl_3$) δ : 8,11 – 6,96 (m, 35H, 5 x PhCO, 2 x PhCH), 6,02 – 5,87 (m, 2H, CH=CH₂, H-5''), 5,86 (dd, J = 3,5; 1,7 Hz, 1H, H-2'), 5,66 (s, 1H, PhCH), 5,62 (s, 1H, H-1''), 5,52 (d, J = 1,6 Hz, 1H, H-1'), 5,50 (s, 1H, PhCH), 5,47 (d, J = 5,4 Hz, 1H, H-3''), 5,39 (d, J = 1,2 Hz, 1H, H-2''), 5,32 (dq, J = 17,2; 1,7 Hz, 1H, CH=CH_aH), 5,24 (dq, J = 10,4; 1,1 Hz, 1H, CH=CHH_b), 4,97 (d, J = 1,5 Hz, 1H, H-1), 4,72 (dd, J = 11,4; 5,7 Hz, 1H, H-6'a), 4,69 – 4,62 (m, 2H, H-3', H-4''), 4,48 (dd, J = 11,4; 6,8 Hz, 1H, H-6'b), 4,39 – 4,16 (m, 6H, H-6a, H-6'a, H-3, H-4, OCH_aHCH=CH₂, H-2), 4,14 – 3,96 (m, 3H, H-4', OCHH_bCH=CH₂, H-5''), 3,94 – 3,80 (m, 3H, H-6b, H-6'b, H-5), 3,47 (d, J = 2,7 Hz, 1H, OH).

RMN ^{13}C (101 MHz, $CDCl_3$) δ : 166,6 (COPh); 165,8 (COPh); 165,8 (COPh); 165,5 (COPh); 165,4 (COPh); 137,3 - 125,9 (CH=CH₂, 5 x PhCO, 2 x PhCH); 118,1 (CH=CH₂); 102,8 (C-1''); 101,9 (PhCH); 101,3 (PhCH); 99,8 (C-1'); 99,7 (C-1); 82,3 (C-2''); 81,4 (C-4''); 79,1 (C-4); 77,8 (C-3''); 77,4 (C-4'); 73,8 (C-3); 71,4 (C-2); 70,0 (C-5''); 69,3 (C-2'); 69,1 (C-3'); 68,94 (C-6*); 68,89 (C-6''); 68,3 (OCH₂CH=CH₂); 64,8 (C-5'); 63,7 (C-5); 62,8 (C-6'').

* Las asignaciones pueden estar intercambiadas.

EMAR (ESI) m/z calculado para $C_{70}H_{64}O_{21} [M+Na]^+$: 1263,3838. Encontrado: 1263,3934.

El sólido obtenido en el paso anterior (3,3 g), previamente secado, se disolvió en piridina anhidra (40 mL) y se enfrió a 0 °C. Luego, se agregó lentamente y con agitación cloruro de benzoílo (1,5 mL; 12,9 mmol). La solución se agitó a temperatura ambiente bajo atmósfera de Ar por 1 h, cuando por ccd se observó la desaparición del compuesto de partida. Se agregó diclorometano (240 mL) y la mezcla se extrajo con agua (200 mL). La fase orgánica resultante se lavó con HCl 5% (2 x 200 mL), agua (200 mL), $NaHCO_3$ (ss) (200 mL) y nuevamente con agua (200 mL), se secó con Na_2SO_4 (anh.), se filtró y se concentró a sequedad. El residuo obtenido se purificó por cromatografía *flash* en columna de sílica gel (tolueno/AcOEt 20:1) para dar **23** (2,46 g; 83%) como un sólido amorfo blanco.

$[\alpha]_D^{20}$ -62,2 (c 1, $CHCl_3$); R_f 0,44 (tolueno/AcOEt 20:1); pf 100,3-102,0 °C.

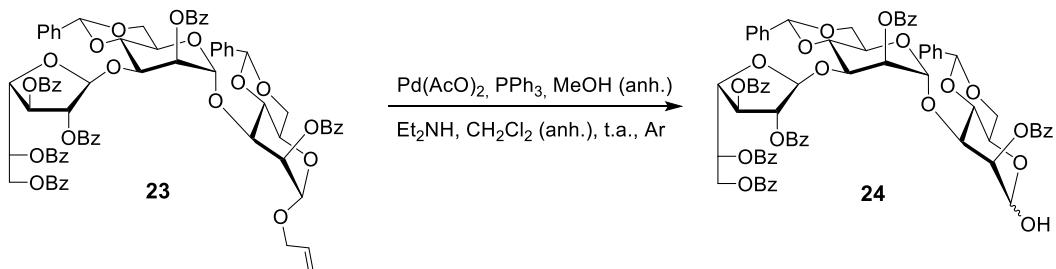
RMN 1H (400 MHz, $CDCl_3$) δ : 8,25 – 7,06 (m, 40H, 6 x PhCO, 2 x PhCH), 6,01 – 5,86 (m, 1H, CH=CH₂), 5,83 – 5,77 (m, 1H, H-5''), 5,74 (s, 1H, PhCH), 5,65 (dd, J = 3,5; 1,5 Hz,

1H, H-2'), 5,60 (dd, J = 3,6; 1,5 Hz, 1H, H-2), 5,40 – 5,37 (m, 2H, PhCH₂, H-1'), 5,37 – 5,29 (m, 3H, CH=CH_aH, H-3'', H-1''), 5,30 – 5,22 (m, 2H, CH=CH_bH, H-2''), 5,04 (d, J = 1,5 Hz, 1H, H-1), 4,57 – 4,43 (m, 3H, H-6'a, H-4'', H-3), 4,39 (dd, J = 9,8; 3,5 Hz, 1H, H-3'), 4,34 (dd, J = 9,6; 4,1 Hz, 1H, H-6a), 4,30 – 4,20 (m, 3H, H-6'a, H-4, OCH_aHCH=CH₂), 4,13 – 4,03 (m, 2H, H-5', OCH_bHCH=CH₂), 4,03 – 3,88 (m, 4H, H-5, H-4', H-6''b, H-6b), 3,78 (t, J = 10,2 Hz, 1H, H-6'b).

RMN ¹³C (101 MHz, CDCl₃) δ: 166,0 (COPh), 165,9 (COPh), 165,8 (COPh), 165,6 (COPh), 165,4 (COPh), 165,0 (COPh), 137,3 – 126,0 (CH=CH₂, 6 x PhCO, 2 x PhCH), 118,4 (CH=CH₂), 102,8 (C-1''), 102,2 (PhCH), 101,6 (PhCH), 100,2 (C-1'), 97,8 (C-1), 81,8 (C-4''), 81,2 (C-2''), 79,0 (C-4), 77,8 (C-3''), 77,4 (C-4'), 73,3 (C-3), 72,3 (C-2), 70,4 (C-5''), 69,9 (C-3'), 69,8 (C-2'), 68,9 (C-6, C-6'), 68,7 (OCH₂CH=CH₂), 64,8 (C-5'), 64,0 (C-6''), 63,9 (C-5).

EMAR (ESI) *m/z* calculado para C₇₇H₆₈O₂₂ [M+H]⁺: 1345,4281. Encontrado: 1345,4343.

2,3,5,6-tetra-O-benzoíl-β-D-galactofuranosil-(1→3)-4,6-O-bencilidén-2-O-benzoíl-α-D-manopiranósido-(1→3)-4,6-O-bencilidén-2-O-benzoíl-α,β-D-manopiranosa (24)



Una suspensión de acetato de paladio (II) (79 mg; 0,35 mmol) y trifenilfosfina (0,44 g; 1,7 mmol), secados previamente (temp. de secado=60 °C), en metanol anhídrico (3,9 mL) se agitó a temperatura ambiente bajo atmósfera de Ar por 3 h hasta observar la disolución completa del acetato de paladio para obtener *in situ* tetrakis(trifenilfosfina)paladio (0). Se agregó dietilamina (35 μL), la mezcla se agitó por 15 min y se agregó alíl 2,3,5,6-tetra-O-benzoíl-β-D-galactofuranosil-(1→3)-4,6-O-bencilidén-2-O-benzoíl-α-D-manopiranósido-(1→3)-4,6-O-bencilidén-2-O-benzoíl-α-D-manopiranosa (23; 1,15 g; 0,86 mmol), previamente secado, disuelto en diclorometano anhídrico (11 mL). Luego de 24 h de agitación a temperatura ambiente bajo atmósfera de Ar, se agregó nuevamente tetrakis(trifenilfosfina)paladio (0) (0,33 mmol) en metanol anhídrico (3,9 mL) y se continuó la agitación por 24 h. La mezcla se llevó a sequedad y se purificó por cromatografía *flash* en columna de sílica gel (tolueno/AcOEt 5:1) para dar 24 (0,9 g; 84%) como un sólido amorfó. La caracterización del producto por RMN ¹H y ¹³C evidenció la obtención de una mezcla de anómeros en relación α/β 1:0,15.

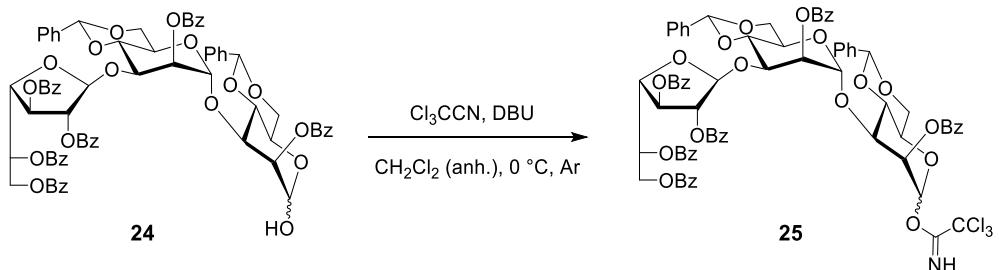
$[\alpha]_D^{20} -86,1$ (c 1, CHCl_3); R_f 0,48, única mancha (tolueno/ AcOEt 8:2).

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ del anómero α : 8,27 – 6,98 (m, 40H, 6 x PhCO , 2 x PhCH), 5,86 – 5,78 (m, 1H, H-5''), 5,71 (s, 1H, PhCH), 5,64 (dd, J = 3,5; 1,7 Hz, 1H, H-2'), 5,61 (dd, J = 3,6; 1,6 Hz, 1H, H-2), 5,42 – 5,37 (m, 3H, PhCH , H-1, H-1'), 5,37 – 5,32 (m, 2H, H-3'', H-1''), 5,24 (d, J = 1,0 Hz, 1H, H-2''), 4,57 – 4,46 (m, 3H, H-6'a, H-4'', H-3), 4,39 (dd, J = 9,9; 3,6 Hz, 1H, H-3'), 4,33 – 4,07 (m, 5H, H-6'a, H-6a, H-4, H-5, H-5'), 4,05 – 3,96 (m, 2H, H-4', H-6''b), 3,86 (t, J = 10,1 Hz, 1H, H-6b), 3,80 (t, J = 10,3 Hz, 1H, H-6'b), 3,43 (d, J = 4,0 Hz, 1H, OH).

RMN ^{13}C (101 MHz, CDCl_3) δ del anómero α : 166,0 (COPh); 165,9 (COPh); 165,8 (COPh); 165,6 (COPh); 165,4 (COPh); 165,0 (COPh); 137,3 – 126,1 (6 x PhCO , 2 x PhCH); 102,8 (C-1''); 102,2 (PhCH); 101,6 (PhCH); 100,1 (C-1'); 93,4 (C-1); 81,7 (C-4''); 81,2 (C-2''); 79,1 (C-4); 77,8 (C-3''); 77,4 (C-4'); 72,6 (C-3); 72,5 (C-2); 70,4 (C-5''); 69,9 (C-3'); 69,8 (C-2'); 68,9 (C-6, C-6'); 64,8 (C-5'); 64,1 (C-6''); 63,8 (C-5).

EMAR (ESI) m/z calculado para $\text{C}_{74}\text{H}_{64}\text{O}_{22} [\text{M}+\text{Na}]^+$: 1327,3787. Encontrado: 1327,3845.

Tricloroacetimidato de O -(2,3,5,6-tetra- O -benzoíl- β -D-galactofuranosil-(1 \rightarrow 3)-4,6- O -bencilidén-2- O -benzoíl- α -D-manopiranosil-(1 \rightarrow 3)-4,6- O -bencilidén-2- O -benzoíl- α , β -D-manopiranosilo) (25)



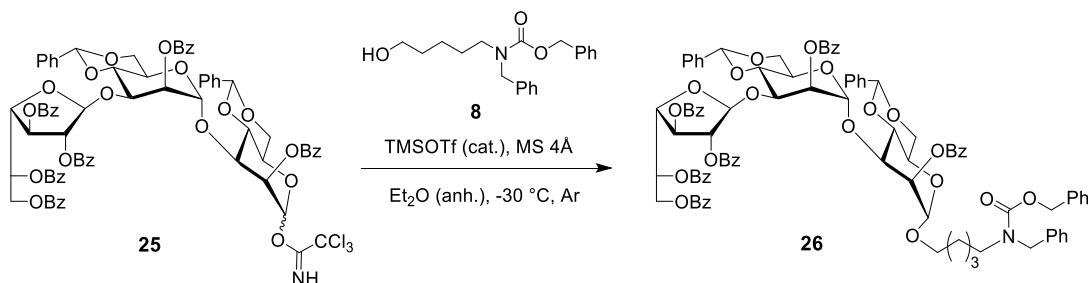
A una solución de 2,3,5,6-tetra- O -benzoíl- β -D-galactofuranosil-(1 \rightarrow 3)-4,6- O -bencilidén-2- O -benzoíl- α -D-manopiranosa (**24**; 0,91 g; 0,69 mmol) previamente secado, en diclorometano anhídrico (8,9 mL) se agregó tricloroacetonitrilo (0,42 mL; 4,2 mmol), la mezcla se enfrió a 0 °C y se agregó lentamente y con agitación DBU (40 μL ; 0,27 mmol). Luego de 2 h de agitación a 0 °C bajo atmósfera de Ar, la solución se concentró a presión reducida. El producto crudo se purificó a través de una columna corta de sílica gel (tolueno/TEA 10:0,1) para dar **25** (0,83 g; 83%) como un sólido amorfó. La caracterización por RMN ^1H y ^{13}C evidenció la obtención de una mezcla de anómeros en relación α/β 1:0,1. Para evitar la descomposición, el producto aislado se guardó en freezer bajo exclusión de humedad hasta su utilización.

R_f 0,72, única mancha (tolueno/AcOEt/TEA 8:2:0,1).

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ del anómero α : 8,82 (s, 1H, NH), 8,29 – 7,06 (m, 40H, 6 x PhCO, 2 x PhCH), 6,46 (d, J = 1,7 Hz, 1H, H-1), 5,87 – 5,80 (m, 1H, H-5’), 5,79 – 5,74 (m, 2H, H-2, PhCH), 5,67 (dd, J = 3,6; 1,6 Hz, 1H, H-2’), 5,47 – 5,39 (m, 2H, H-1’, PhCH), 5,38 – 5,33 (m, 2H, H-3’, H-1’), 5,26 (d, J = 1,0 Hz, 1H, H-2’), 4,61 – 4,50 (m, 3H, H-3, H-6’a, H-4’), 4,44 – 4,33 (m, 3H, H-3’, H-6a, H-4), 4,22 (dd, J = 10,1; 4,7 Hz, 1H, H-6’a), 4,19 – 4,09 (m, 2H, H-5, H-5’), 4,09 – 3,90 (m, 3H, H-4’, H-6’b, H-6b), 3,81 (t, J = 10,1 Hz, 1H, H-6’b).

RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ del anómero α : 166,0 (COPh); 165,8 (COPh); 165,5 (2 x COPh); 165,4 (COPh); 165,0 (COPh); 160,0 (C=NH); 137,2 – 126,0 (6 x PhCO, 2 x PhCH); 102,8 (C-1’); 102,2 (PhCH); 101,6 (PhCH); 100,2 (C-1’); 95,5 (C-1); 90,8 (CCl_3); 81,8 (C-4’); 81,2 (C-2’); 78,4 (C-4); 77,8 (C-3’); 77,3 (C-4’); 72,4 (C-3); 70,6 (C-2); 70,4 (C-5’); 69,8 (C-3’); 69,6 (C-2’); 68,8 (C-6’); 68,5 (C-6); 66,4 (C-5); 64,9 (C-5’); 64,1 (C-6’).

***N*-(Bencil)benciloxicarbonil-5-aminopentil 2,3,5,6-tetra-O-benzoíl- β -D-galactofuranosil-(1→3)-4,6-O-bencilidén-2-O-benzoíl- α -D-manopiranósido (26)**



Una suspensión de tricloroacetimidato de O-(2,3,5,6-tetra-O-benzoíl- β -D-galactofuranosil-(1→3)-4,6-O-bencilidén-2-O-benzoíl- α -D-manopiranósido) (**25**; 0,65 g; 0,45 mmol), *N*-bencil-*N*-benciloxicarbonil-5-aminopentanol (**8**; 180 mg; 0,55 mmol), ambos secados previamente (destilación azeotrópica y vacío a t.a.), y tamices moleculares pulverizados de 4 Å (600 mg), en éter etílico anhidro recién destilado (27 mL), se enfrió a -30 °C bajo atmósfera de Ar y se agregó triflato de trimetilsililo (14,1 μL ; 0,078 mmol). Luego de 20 min de agitación a -30 °C, el control por ccd mostró la desaparición del imidato de partida. La suspensión se neutralizó con TEA (12,5 μL), se filtraron los tamices moleculares y la solución resultante se concentró a sequedad. El crudo obtenido se purificó por cromatografía *flash* en columna de sílica gel (tolueno/AcOEt 12:1) para dar **26** (0,66 g; 91%) como un sólido amorfó blanco.

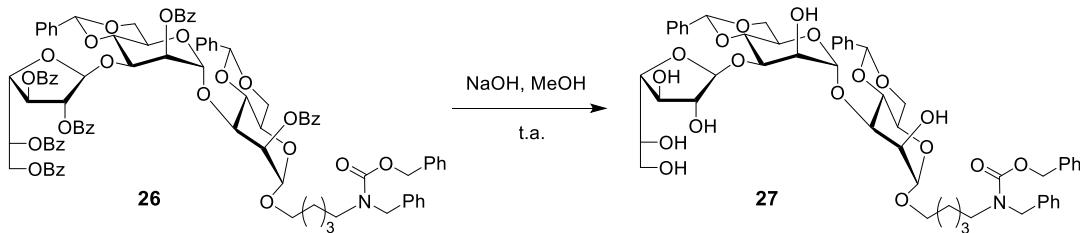
$[\alpha]_D^{20} -51,8$ (c 1, CHCl_3); R_f 0,62 (tolueno/AcOEt 6:1); pf 74,7-76,3 °C.

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ de la mezcla de rotámeros: 8,25 – 7,01 (m, 50H, 6 x PhCO, 2 x PhCH, 2 x PhCH₂), 5,84 – 5,77 (m, 1H, H-5’’), 5,74 (s, 1H, PhCH), 5,65 (dd, J = 3,5; 1,5 Hz, 1H, H-2’), 5,55 (d, J = 2,8 Hz, 1H, H-2), 5,39 – 5,35 (m, 2H, H-1’, PhCH), 5,36 – 5,31 (m, 2H, H-1’’, H-3’’), 5,24 (s, 1H, H-2’’), 5,20 – 5,11 (m, 2H, NCOOCH₂Ph), 4,97 – 4,90 (m, 1H, H-1), 4,58 – 4,45 (m, 4H, H-6’’a, NCH₂Ph, H-4’’), 4,45 – 4,34 (m, 2H, H-3, H-3’), 4,34 – 4,18 (m, 3H, H-6a, H-6’a, H-4), 4,13 – 4,02 (m, 1H, H-5’), 4,03 – 3,86 (m, 4H, H-4’, H-6b, H-5, H-6’b), 3,76 (t, J = 10,1 Hz, 1H, H-6’b), 3,71 – 3,57 (m, 1H, OCH_aHCH₂), 3,51 – 3,33 (m, 1H, OCHH_bCH₂), 3,32 – 3,15 (m, 2H, CH₂CH₂N), 1,73 – 1,44 (m, 4H, 2 x CH_2), 1,42 – 1,20 (m, 2H, CH_2).

RMN ^{13}C (101 MHz, CDCl_3) δ de la mezcla de rotámeros: 166,0 (COPh); 166,0 (COPh); 165,8 (COPh); 165,6 (COPh); 165,4 (COPh); 165,0 (COPh); 156,9/156,3 (NCOO); 138,1 – 126,1 (6 x PhCO, 2 x PhCH, 2 x PhCH₂); 102,8 (C-1’’); 102,2 (PhCH); 101,6 (PhCH); 100,3 (C-1’); 98,6 (C-1); 81,8 (C-4’’); 81,2 (C-2’’); 79,0 (C-4); 77,8 (C-3’’); 77,4 (C-4’); 73,6 (C-3); 72,4 (C-2); 70,4 (C-5’’); 69,9 (C-3’); 69,8 (C-2’); 69,0 (C-6); 68,9 (C-6’); 68,3 (OCH₂CH₂); 67,3 (NCOOCH₂Ph); 64,8 (C-5’); 64,1 (C-6’’); 63,8 (C-5); 50,8/50,5 (NCH₂Ph); 47,3/46,3 (CH₂CH₂N); 29,2 (CH_2); 28,1/27,7 (CH_2); 23,5 (CH_2).

EMAR (ESI) m/z calculado para $\text{C}_{94}\text{H}_{87}\text{NO}_{24} [\text{M}+\text{Na}]^+$: 1636,5515. Encontrado: 1636,5621.

N-(Bencil)benciloxicarbonil-5-aminopentil β-D-galactofuranosil-(1→3)-4,6-O-bencilidén-α-D-manopiranosil-(1→3)-4,6-O-bencilidén-α-D-manopiranósido (27)



A una mezcla de *N*-(bencil)benciloxicarbonil-5-aminopentil 2,3,5,6-tetra-O-benzoíl- β -D-galactofuranosil-(1→3)-4,6-O-bencilidén-2-O-benzoíl- α -D-manopiranosil-(1→3)-4,6-O-bencilidén-2-O-benzoíl- α -D-manopiranósido (**26**; 75 mg; 0,046 mmol) y metanol (0,48 mL) se agregó una solución de NaOH 1M en metanol (0,11 mL). Luego de 7 h de agitación a temperatura ambiente, se observó la desaparición del compuesto de partida por ccd. La mezcla se purificó a través de una columna corta (1,5 cm x 1 cm, d. x alt.) de Amberlite IR120 H y el eluido se concentró a presión reducida. El producto crudo se co-evaporó con agua ultrapura (4 x 1 mL) y se purificó por cromatografía *flash* en columna de sílica gel ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 20:1 a 12:1) para dar **27** (25 mg; 55%) como un jarabe.

$[\alpha]_D^{20} +6,6$ (c 1, CHCl_3); R_f 0,58 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 9:1).

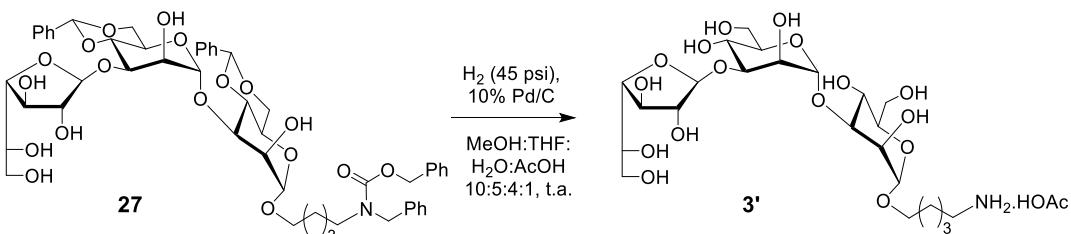
RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ de la mezcla de rotámeros: 7,54 – 7,02 (m, 20H, 2 x PhCH , 2 x PhCH_2), 5,51 (s, 1H, PhCH), 5,48 (s, 1H, PhCH), 5,33 (s, 1H, H-1'), 5,28 – 5,04 (m, 3H, H-1'', NCOOCH₂Ph), 4,78 – 4,68 (m, 1H, H-1), 4,53 – 4,33 (m, 2H, NCH₂Ph), 4,32 – 3,88 (m, 11H), 3,88 – 3,69 (m, 4H, H-5', H-5, H6-b, H-6'b), 3,64 – 3,45 (m, 2H, H-5'', OCH_aHCH₂), 3,37 – 3,07 (m, 5H, OCHH_bCH₂, H-6''a, H-6''b, NCH₂CH₂), 1,71 – 1,37 (m, 4H, 2 x CH₂), 1,37 – 1,10 (m, 2H, CH₂).

RMN ^{13}C (101 MHz, CDCl_3) δ de la mezcla de rotámeros: 156,9/156,4 (NCOO); 138,0 – 126,2 (2 x PhCH , 2 x PhCH_2); 104,8 (C-1''); 102,0 (PhCH); 101,6 (PhCH); 101,4 (C-1'); 100,5 (C-1); 86,1 (C-4''); 79,8 (C-2''); 78,9 (C-4); 78,4 (C-3''); 76,7 (C-4'); 72,8 (C-3*); 71,6 (C-3''); 71,4 (C-2); 70,8 (C-5''); 68,8 (C-6, C-6'); 68,3 (C-2'); 67,9 (OCH₂CH₂); 67,4 (NCOOCH₂Ph); 64,6 (C-5'); 63,9 (C-6''); 63,7 (C-5); 50,7/50,4 (NCH₂Ph); 47,2/46,3 (NCH₂CH₂); 29,2 (CH₂); 28,0/27,6 (CH₂); 23,4 (CH₂).

* Las asignaciones pueden estar intercambiadas.

EMAR (ESI) m/z calculado para $\text{C}_{52}\text{H}_{63}\text{NO}_{18}$ [M+Na]⁺: 1012,3943. Encontrado: 1012,3962.

Acetato de 5-aminopentil β -D-galactofuranosil-(1→3)- α -D-manopiranósido-(1→3)- α -D-manopiranósido (3')



A una solución de *N*-(bencil)benciloxicarbonil-5-aminopentil β -D-galactofuranosil-(1→3)-4,6-O-bencilidén- α -D-manopiranósido-(1→3)-4,6-O-bencilidén- α -D-manopiranósido (**27**; 25 mg; 0,025 mmol) en una mezcla MeOH/THF/H₂O/AcOH 10:5:4:1 (4 mL), se agregó Pd/C 10% (40 mg) y la mezcla se agitó en hidrogenador a 45 psi y temperatura ambiente hasta que por ccd se observó conversión mayoritaria a un producto de R_f 0,55 (EtOH/H₂O/AcOH 7:1:1). Luego de 7 días, la suspensión se filtró por lecho de celite y el filtrado se concentró y se co-evaporó con tolueno (6 x 0,4 mL). El crudo obtenido se purificó por cromatografía en columna de sílica gel (ACN/H₂O/AcOH 9:1:0, 1). El producto se co-evaporó con tolueno (5 x 1 mL), se disolvió en agua ultrapura y se liofilizó para dar **3'** (8,2 mg; 50%) como un jarabe.

$[\alpha]_D^{20} +6,2$ (c 1, H_2O); R_f 0,55 (EtOH/H₂O/AcOH 7:1:1).

RMN ^1H (400 MHz, D_2O) δ : 5,19 – 5,14 (m, 2H, H-1', H-1''), 4,84 (d, J = 1,9 Hz, 1H, H-1), 4,27 (dd, J = 3,1; 1,9 Hz, 1H, H-2'), 4,16 (dd, J = 3,1; 1,7 Hz, 1H, H-2''), 4,11 – 4,05 (m, 3H, H-2, H-3'', H-4''), 3,99 (dd, J = 9,4; 3,2 Hz, 1H, H-3'), 3,93 – 3,61 (m, 14H), 3,60 – 3,51 (m, 1H, $\text{OCHH}_\text{b}\text{CH}_2$), 3,05 – 2,97 (m, 2H, CH_2NH_2), 1,91 (s, 3H, CH_3COOH), 1,78 – 1,58 (m, 4H, 2 x CH_2), 1,53 – 1,38 (m, 2H, CH_2).

RMN ^{13}C (101 MHz, D_2O) δ : 105,1 (C-1''); 102,7 (C-1'); 100,2 (C-1); 83,6 (C-4''); 82,0 (C-2''); 78,9 (C-3); 77,7 (C-3''); 76,0 (C-3'); 73,9 (C-5'); 73,6 (C-5); 71,4 (C-5''); 70,4 (C-2); 68,1 (OCH_2CH_2); 67,4 (C-2'); 66,8 (C-4); 65,8 (C-4'); 63,4 (C-6''); 61,7 (C-6''); 61,5 (C-6*); 40,0 (CH_2NH_2); 28,6 (CH_2); 27,2 (CH_2); 24,0 (CH_3COOH); 23,1 (CH_2).

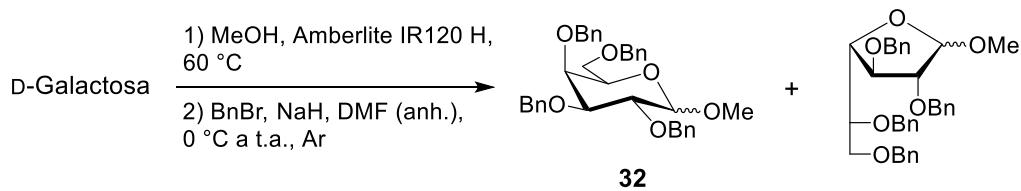
* Las asignaciones pueden estar intercambiadas.

EMAR (ESI) m/z calculado para $\text{C}_{23}\text{H}_{43}\text{NO}_{16}$ [$\text{M}+\text{H}]^+$: 590,2660. Encontrado: 590,2663.

Tricloroacetimidato de *O*-(2,3,4,6-tetra-*O*-bencil- β -D-galactopiranosilo) (30)

Método A (Síntesis por pasos)

I. Metil 2,3,4,6-tetra-*O*-bencil- α , β -D-galactopiranósido (32)



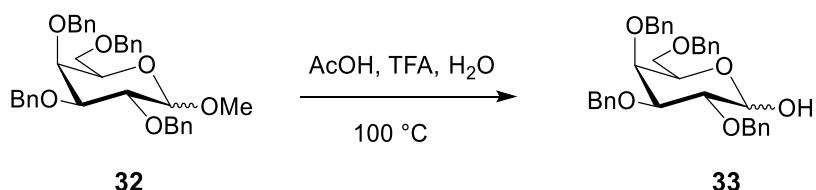
La glicosidación de Fischer (primer paso) se llevó a cabo según el procedimiento descripto por Moradei O. *et al.*^[280] con algunas modificaciones. En el segundo paso, se procedió según la técnica descripta en Gandolfi Donadío L. con modificaciones.^[279]

A una suspensión de D-galactosa (6,1 g; 33,9 mmol) en metanol (74 mL) se agregó Amberlite IR120 H (0,6 mL). La mezcla se calentó a reflujo por 22 h, la resina se filtró y la solución se llevó a sequedad. En el residuo obtenido (6,5 g) se identificó por RMN ^1H y ^{13}C la presencia de metil α , β -D-galactopiranósido como productos mayoritarios (~85%) y metil α , β -D-galactofuranósido como productos minoritarios (~15%, determinación aproximada por RMN ^{13}C).^[281] No se observaron las señales características del compuesto de partida.^[351]

El producto crudo obtenido (6,3 g), previamente secado, se disolvió en DMF anhidra (60 mL) y se enfrió a 0 °C. Se agregó hidruro de sodio 60% en aceite (8 g; 0,2 mol) en pequeñas porciones, lavando el sólido con hexano antes de incorporarlo a la solución. La suspensión resultante se agitó en baño de agua-hielo hasta que cesó la evolución de gas. Posteriormente, se agregó bromuro de bencilo (19,2 mL; 0,16 mol) en el transcurso de

una hora manteniendo la suspensión entre 0 y 15 °C. Luego de 20 h de agitación a temperatura ambiente bajo atmósfera de Ar, se agregó lentamente metanol helado (26 mL), se mantuvo la agitación por 10 min y se agregó diclorometano (300 mL). La mezcla resultante se extrajo con agua (150 mL), se separaron las fases y la fase orgánica se lavó con agua (3 x 150 mL), se secó con Na₂SO₄ (anh.), se filtró y se concentró a sequedad. El residuo resultante se purificó por cromatografía *flash* en columna de sílica gel (8:2 hexano/AcOEt) para dar **32** (8,7 g; 48%; R_f 0,29 y 0,33 hexano/AcOEt 4:1) como un jarabe incoloro. La caracterización del producto por RMN ¹H y comparación con los datos reportados en bibliografía evidenciaron la obtención de una mezcla de anómeros piranósicos en relación α/β ~7:3.^[352]

II. 2,3,4,6-tetra-O-bencil-α,β-D-galactopiranosa (33)

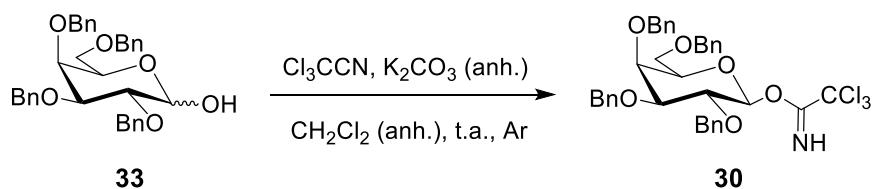


Se procedió según la técnica descripta en Gandolfi Donadío L.^[279]

Una solución de metil 2,3,4,6-tetra-O-bencil-α,β-D-galactopiranósido (**32**; 8,7 g; 15,8 mmol), ácido acético (56 mL) y ácido trifluoroacético (13,4 mL) se calentó a 100 °C con agitación y se agregó agua (9,2 mL) lentamente. Luego de 3 h de agitación a 100 °C, la mezcla se llevó a temperatura ambiente, se concentró a presión reducida y se co-evaporó con tolueno (4 x 14 mL). El producto crudo de reacción se purificó por cromatografía *flash* en columna de sílica gel (7:3 hexano/AcOEt) para dar **33** (4,7 g; 55%) como un jarabe incoloro. La caracterización del producto por RMN ¹H y comparación con los datos reportados en bibliografía evidenciaron la obtención de una mezcla de anómeros en relación α/β 3:1.^[353]

[α]_D²⁰ +11,5 (c 1, CHCl₃), [lit.^[354] [α]_D²² +19,8 (c 1,2, CHCl₃)]; R_f 0,5, única mancha (hexano/AcOEt 7:3).

III. Tricloroacetimidato de O-(2,3,4,6-tetra-O-bencil-β-D-galactopiranosilo) (30)



Se siguió el procedimiento descripto por Wegmann y Schmidt^[355] con algunas modificaciones.

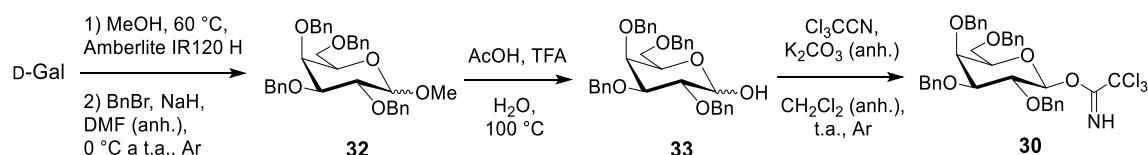
A una solución de 2,3,4,6-tetra-O-bencil- α , β -D-galactopiranosa (**33**; 4,4 g; 8,2 mmol) previamente secado, en diclorometano anhídrico (44 mL) se agregaron con agitación carbonato de potasio anhídrico (4,5 g) y tricloroacetonitrilo (3,3 mL; 33 mmol). Luego de 5 h de agitación a temperatura ambiente bajo atmósfera de Ar, la suspensión se filtró sobre lecho de celite y el filtrado se concentró a presión reducida. El jarabe obtenido se cristalizó de una mezcla de hexano/éter etílico 1:1 para dar **30** (3,45 g; 62%) como un sólido blanco fino. Los datos de RMN ¹H y ¹³C fueron coincidentes con los reportados.^[356]

$[\alpha]_D^{20}$ +19,1 (c 1, CHCl₃), [lit.^[355] $[\alpha]_D^{20}$ +20,9 (c 1, CHCl₃)]; R_f 0,7 (hexano/AcOEt/TEA 7:3:0,1); pf 87,9-89,0 °C, [lit.^[355] 87 °C].

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ: 8,62 (s, 1H, NH), 7,42 – 7,15 (m, 20H, 4 x PhCH₂), 5,75 (d, J = 8,0 Hz, 1H, H-1), 4,94 (d, J = 11,4 Hz, 1H, OCH_aHPh), 4,90 (d, J = 10,8 Hz, 1H, OCH_aHPh), 4,81 (d, J = 10,7 Hz, 1H, OCH_bHPh), 4,73 (ABq, 2H, Δδ_{AB} = 0,04; J_{AB} = 11,8 Hz, OCH₂Ph), 4,63 (d, J = 11,5 Hz, 1H, OCH_bHPh), 4,47, 4,42 (ABq, 2H, J_{AB} = 11,7 Hz, OCH₂Ph), 4,09 (dd, J = 9,7; 8,0 Hz, 1H, H-2), 3,98 (d, J = 2,2 Hz, 1H, H-4), 3,78 – 3,71 (m, 1H, H-5), 3,69 – 3,59 (m, 3H, H-3, H-6a, H-6b).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ: 161,7 (C=NH); 138,4 – 127,7 (4 x PhCH₂); 98,8 (C-1); 91,1 (CCl₃); 82,3 (C-3); 78,2 (C-2); 75,4 (OCH₂Ph); 74,9 (OCH₂Ph); 74,5 (C-5); 73,6 (OCH₂Ph); 73,5 (C-4); 73,2 (OCH₂Ph); 68,2 (C-6).

Método B (Síntesis simplificada)



A una suspensión de D-galactosa (24,2 g; 0,13 mol) en metanol (300 mL) se agregó Amberlite IR 120 H (36 mL). La mezcla se calentó a reflujo por 3 días, la resina se filtró y la solución se llevó a sequedad. En el jarabe obtenido (27,4 g) se identificó por RMN la presencia de metil α , β -D-galactopiranósido como productos mayoritarios (~73%) y metil α , β -D-galactofuranósido como productos minoritarios (~27%, determinación aproximada por RMN ¹³C).^[281]

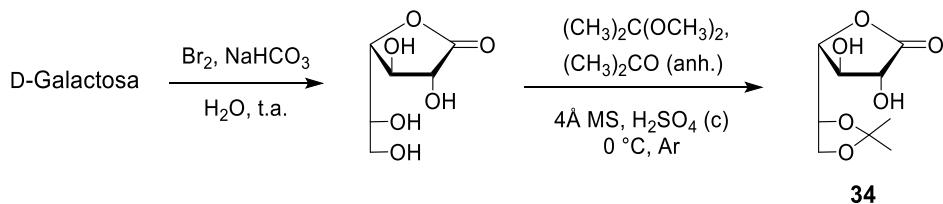
El sólido amorfó obtenido (27,4 g) previamente secado, se disolvió en DMF anhidra (240 mL) y se enfrió a 0 °C. Se agregó hidruro de sodio 60% en aceite (32,5 g; 0,81 mol) en pequeñas porciones cada vez, lavando el sólido con hexano antes de incorporarlo a la solución. La suspensión se agitó en baño de agua-hielo hasta que cesó la evolución de

gas y se mantuvo fría (entre 0 y 15 °C) mientras se agregaba bromuro de bencilo (80 mL; 673 mmol) a lo largo de una hora. Luego de 19 h de agitación a temperatura ambiente bajo atmósfera de Ar, se agregó lentamente metanol helado (130 mL), se mantuvo la agitación por 10 min y se agregó diclorometano (200 mL). La mezcla se extrajo con agua (200 mL), se separaron las fases y la fase orgánica se lavó con agua (2 x 200 mL) y con NaCl (ss) (1 x 200 mL), se secó con Na₂SO₄ (anh.) y se filtró. El filtrado se concentró para dar un jarabe espeso (72,7 g). Por RMN se identificó la presencia de metil 2,3,4,6-tetra-O-bencil- α , β -D-galactopiranósido (**32**) como productos mayoritarios (~85%) y metil 2,3,4,6-tetra-O-bencil- α , β -D-galactofuranósido como productos minoritarios (~15%, determinación aproximada por RMN ¹³C).^[352]

El producto crudo del paso anterior (72,7 g) se disolvió en ácido acético (493 mL) y se trasvasó a un reactor de 2 L encamisado y termostatizado por fluido refrigerante. Luego se agregó ácido trifluoroacético (116 mL) con agitación, la mezcla se calentó a 100 °C, se agregó agua (109 mL) lentamente y se agitó a 100 °C por 5,5 h. Seguidamente, se agregó diclorometano (500 mL) y la mezcla se extrajo con agua (500 mL). Se separaron las fases y la fase orgánica se lavó con agua (1 x 500 mL), NaHCO₃ (ss) (1 x 500 mL) y nuevamente con agua (1 x 500 mL), se secó con Na₂SO₄ (anh.) y se filtró. El filtrado se concentró a presión reducida para dar un jarabe (68,9 g) que se utilizó en el paso siguiente sin purificación previa. La caracterización del producto crudo por RMN ¹H y ¹³C y comparación con los datos reportados en bibliografía evidenciaron la obtención de 2,3,4,6-tetra-O-bencil- α , β -D-galactopiranosa (**33**) como productos mayoritarios (~85%, determinación aproximada por RMN ¹³C).^[353]

El jarabe obtenido seco (68,9 g) se disolvió en diclorometano anhídrico (420 mL) y se agregaron carbonato de potasio anhídrico (53 g) y tricloroacetonitrilo (38 mL; 380 mmol). Luego de 42 h de agitación a temperatura ambiente bajo atmósfera de Ar, la suspensión se filtró sobre lecho de celite y el filtrado se concentró a presión reducida. El jarabe obtenido se cristalizó de una mezcla de hexano/éter etílico 1:1 para dar **30** (24,3 g; 27%; R_f 0,7 hexano/AcOEt/TEA 7:3:0,1) como un sólido blanco fino. Los datos de RMN ¹H y ¹³C fueron coincidentes con los reportados.^[356]

5,6-O-Isopropilidén-D-galactono-1,4-lactona (**34**)

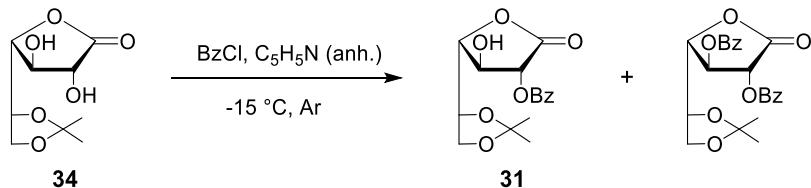


En el primer paso (oxidación del aldehído) se siguió el procedimiento reportado por de Talancé V. L. *et al.*^[285] Seguidamente, para la incorporación del isopropilidén se procedió según la técnica descripta en Gandolfi Donadío L. con modificaciones.^[279]

A una solución de D-galactosa (6,1 g; 33,9 mmol) y bicarbonato de sodio (5,7 g; 67,8 mmol) en agua (30 mL) enfriada a 0 °C se agregó, lentamente y con agitación, Br₂ (1,7 mL; 33,2 mmol). La mezcla resultante se agitó por 3 días a temperatura ambiente. Para destruir el Br₂ en exceso se realizaron agregados secuenciales de NaHSO₃ hasta decoloración de la solución (0,35 g totales), se mantuvo la agitación por 10 min y la mezcla se llevó a sequedad. Al jarabe obtenido se agregó EtOH absoluto (60 mL) y la mezcla se sonicó por 20 min y se filtró por lecho de celite. Esta operación se realizó por triplicado. Las fases etanólicas resultantes se concentraron, el jarabe obtenido se agitó con HCl 0,4% (30 mL) por 30 min y se concentró. Este procedimiento se repitió tres veces para dar un sólido amarillo anaranjado (34,6 g), cuyo componente mayoritario (>80%) se identificó por RMN ¹H y ¹³C como D-galactono-1,4-lactona.^[285]

El producto crudo (34,6 g) previamente secado, se disolvió en una mezcla de acetona anhidra (60 mL) y 2,2-dimetoxipropano (20,8 mL) y se agregaron tamices moleculares pulverizados de 4 Å (2 g). La suspensión resultante se enfrió a 0 °C y se agregó, lentamente y con agitación, H₂SO₄ (c) (60 µL). Luego de 4 h de agitación a temperatura ambiente bajo atmósfera de Ar, la mezcla se neutralizó con NH₄OH (0,14 mL) y se filtró por lecho de celite. El filtrado se concentró a presión reducida y se purificó por cromatografía *flash* en columna de sílica gel (AcOEt) para dar **34** (4,5 g; 61%; R_f 0,64 AcOEt) como un jarabe. Los datos de RMN ¹H y ¹³C fueron coincidentes con los reportados.^[285]

2-O-Benzoíl-5,6-O-isopropilidén-D-galactono-1,4-lactona y 2,3-di-O-benzoíl-5,6-O-isopropilidén-D-galactono-1,4-lactona (31)



Se procedió según la técnica descripta por Gandolfi-Donadío L. *et al.*^[233] con ligeras modificaciones.

A una solución de 5,6-O-isopropilidén-D-galactono-1,4-lactona (**34**; 3,8 g; 17,4 mmol) previamente secada, en piridina anhidra (15,6 mL) enfriada a -15 °C se agregó cloruro de benzoílo (2,25 mL; 19,4 mmol) lentamente a lo largo de 30 min. Luego de 1 h de agitación

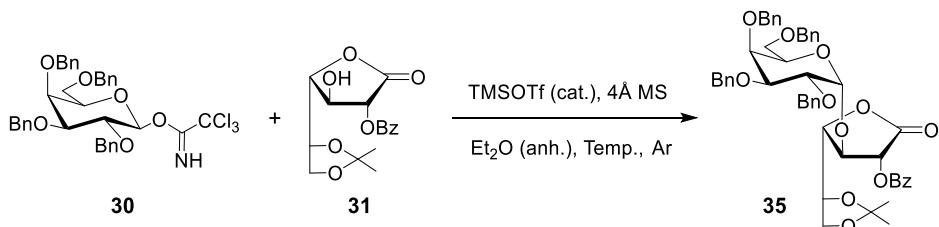
a -15 °C bajo atmósfera de Ar, la ccd mostró desaparición del compuesto de partida y dos manchas principales de R_f 0,79 y 0,55 (tolueno/AcOEt 3:2). La suspensión se volcó sobre agua-hielo (100 mL), se extrajo con diclorometano (100 mL) y la fase acuosa se re-extrajo con diclorometano (100 mL). Las fases orgánicas se juntaron y se lavaron con HCl 5% (2 x 100 mL), NaCl (ss) (1 x 100 mL), NaHCO₃ (ss) (1 x 100 mL) y agua (1 x 100 mL), se secaron con Na₂SO₄ (anh.), se filtraron y se concentraron a sequedad. El sólido obtenido se purificó por cromatografía *flash* en columna de sílica gel (9:1 a 8:2 tolueno/AcOEt). El componente de mayor movilidad eluído de la columna (R_f 0,79 tolueno/AcOEt 3:2) se identificó como 2,3-di-O-benzoíl-5,6-O-isopropilidén-D-galactono-1,4-lactona (1,37 g; 18%). Los datos de RMN ¹H y ¹³C fueron coincidentes con los reportados.^[357]

Del eluído posterior (de R_f 0,55 tolueno/AcOEt) se obtuvo un sólido que se identificó por RMN como **31** (3,2 g; 56%). Los datos de RMN ¹H y ¹³C fueron coincidentes con los reportados.^[233]

$[\alpha]_D^{20}$ -75,9 (c 1, CHCl₃), [lit.^[233] $[\alpha]_D$ -95,9 (c 1, CHCl₃)]; pf 98-99,5 °C, [lit.^[233] 94-95 °C].
 RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ: 8,18 – 7,98 (m, 2H, PhCO), 7,69 – 7,58 (m, 1H, PhCO), 7,56 – 7,41 (m, 2H, PhCO), 5,50 (d, J = 7,7 Hz, 1H, H-2), 4,61 (dd, J = 7,7 Hz, 1H, H-3), 4,45 – 4,37 (m, 1H, H-5), 4,31 (dd, J = 7,4; 3,3 Hz, 1H, H-4), 4,15 (dd, J = 8,6; 6,8 Hz, 1H, H-6a), 4,05 (dd, J = 8,6; 6,6 Hz, 1H, H-6b), 3,91 (sa, 1H, OH), 1,45 (s, 3H, CH₃), 1,39 (s, 3H, CH₃).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ: 168,8 (C-1); 167,3 (COPh); 134,4; 130,4; 128,8; 128,1; 110,5 (C(CH₃)₂); 79,9; 77,6; 74,1; 73,6; 65,1 (C-6); 26,2 (CH₃); 25,6 (CH₃).

2,3,4,6-tetra-O-bencil- α -D-galactopiranósil-(1→3)-2-O-benzoíl-5,6-O-isopropilidén-D-galactono-1,4-lactona (35)



Procedimiento normal

Se siguió el procedimiento descripto por Gandolfi-Donadío L. *et al.*^[233] con modificaciones.

Una suspensión de tricloroacetimidato de O-(2,3,4,6-tetra-O-bencil- β -D-galactopiranósilo) (**30**; 0,2 g; 0,29 mmol), 2-O-benzoíl-5,6-O-isopropilidén-D-galactono-

Parte Experimental

1,4-lactona (**31**; 0,12 g; 0,37 mmol), ambos previamente secados, y tamices moleculares de 4 Å pulverizados (400 mg), en éter etílico anhídrico recién destilado (5,2 mL), se enfrió a 0 °C bajo atmósfera de Ar, y se agregó triflato de trimetilsililo (22 µL; 0,12 mmol). La mezcla se agitó a 0 °C por 2 h bajo atmósfera de Ar, cuando la ccd mostró la desaparición del imidato de partida. Se agregó diclorometano (25 mL), se filtraron los tamices moleculares y la solución se lavó con agua (2 x 10 mL) hasta neutralidad. La fase orgánica se secó con Na₂SO₄ (anh.), se filtró y se concentró a sequedad. La purificación del jarabe obtenido por cromatografía *flash* en columna de sílica gel (tolueno/AcOEt 12:1) condujo a una primera fracción (R_f 0,7 tolueno/AcOEt 6:1) que se identificó como 2,3,4,6-tetra-O-bencil-N-tricloroacetil- α , β -D-galactopiranosilamida (rel. α/β 1:0,7; 78 mg; 38%), de acuerdo con lo reportado en bibliografía.^[286]

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ de la mezcla de anómeros: 7,41 – 7,21 (m, 54H, 4 x PhCH₂ α, 4 x PhCH₂ β, NH α, NH β), 5,61 (dd, J = 6,3; 4,7 Hz, 1H, H-1 α), 5,08 (t, J = 8,9 Hz, 0,7H, H-1 β), 4,96 – 4,39 (m, 13,6H, 4 x OCH₂Ph α, 4 x OCH₂Ph β), 4,12 – 4,01 (m, 2,7H, H-2 α, H-4 α, H-4 β), 3,98 – 3,91 (m, 1H), 3,85 (t, J = 9,0 Hz, 0,7H, H-2 β), 3,74 – 3,63 (m, 4,4H, H-3 β, H-3 α), 3,60 – 3,54 (m, 1,4H).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ de la mezcla de anómeros: 162,1 (NHCOCl₃); 161,8 (NHCOCl₃); 138,3 - 125,4 (4 x PhCH₂ α, 4 x PhCH₂ β); 92,6 (CCl₃); 92,3 (CCl₃); 83,5 (C-3 β); 81,3 (C-1 β); 77,6 (C-3 α); 77,4 (C-2 β); 76,4 (C-1 α); 75,4; 75,2; 75,13; 75,05 (C-2 α); 74,3; 73,7; 73,6 (C-4 α*); 73,5 (C-4 β*); 73,4; 73,0; 72,9; 72,3; 68,0; 67,6.

* Las asignaciones pueden estar intercambiadas.

La segunda fracción rindió **35** (0,12 g; 45%) como un jarabe incoloro. Los datos de RMN fueron coincidentes con los reportados.^[233]

$[\alpha]_D^{20}$ +48,9 (c 1, CHCl₃), [lit.^[233] $[\alpha]_D$ +53,3 (c 1, CHCl₃)]; R_f 0,55 (tolueno/AcOEt 6:1); pf 118,3-120,9 °C, [lit.^[233] 133-134 °C].

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ: 8,16 – 7,11 (m, 25H, PhCO, 4 x PhCH₂), 5,88 (d, J = 8,1 Hz, 1H, H-2), 4,91 – 4,83 (m, 3H, H-1', 2 x OCH_aHPh), 4,77, 4,74 (ABq, 2H, J_{AB} = 11,6 Hz, OCH₂Ph), 4,67 (dd, J = 8,0; 7,7 Hz, 1H, H-3), 4,60 (d, J = 11,7 Hz, 1H, OCHH_bPh), 4,48 (d, J = 11,2 Hz, 1H, OCHH_bPh), 4,33 – 4,25 (m, 2H, H-4, H-5), 4,16; 4,09 (ABq, 2H, J_{AB} = 11,7 Hz, OCH₂Ph), 4,07 – 3,91 (m, 5H, H-2', H-4', H-6a, H-6b, H-5'), 3,89 (dd, J = 10,1; 2,7 Hz, 1H, H-3'), 3,42 (t, J = 8,7 Hz, 1H, H-6'a), 3,18 (dd, J = 8,8; 5,1 Hz, 1H, H-6'b), 1,44 (s, 3H, CH₃), 1,37 (s, 3H, CH₃).

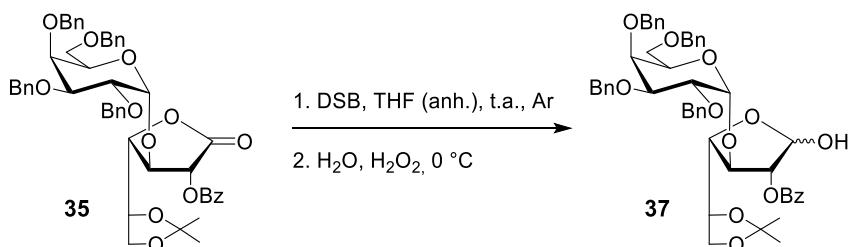
RMN ¹³C (101 MHz, CDCl₃) δ: 168,9 (C-1); 165,2 (COPh); 138,7 - 127,5 (PhCO, 4 x PhCH₂); 110,5 (C(CH₃)₂); 99,8 (C-1'); 78,91 (C-3); 78,87 (C-3'); 78,6 (C-4); 76,3 (C-2');

75,1 (OCH_2Ph); 74,5 (C-4'); 74,3 (OCH_2Ph); 73,7 (C-2); 73,6 (C-5); 73,4 (OCH_2Ph); 72,8 (OCH_2Ph); 70,3 (C-5'); 67,8 (C-6'); 65,2 (C-6); 26,2 (CH_3); 25,8 (CH_3).

Procedimiento inverso

A una suspensión de 2-O-benzoíl-5,6-O-isopropilidén-D-galactono-1,4-lactona (**31**; 1,52 g; 4,7 mmol) previamente secada, y tamices moleculares pulverizados de 4 Å (1 g) en Et₂O anhídrico recién destilado (23 mL) enfriada a -10 °C bajo atmósfera de Ar, se agregó trifluorato de trimetilsililo (34 µL; 0,19 mmol). Luego, se agregó con agitación y a lo largo de 20 min, una solución de tricloroacetimidato de O-(2,3,4,6-tetra-O-bencil-α-D-galactopiranosilo) (**30**; 2,55 g; 3,7 mmol), previamente secado, disuelto en Et₂O anhídrico (48 mL). La mezcla se agitó a -15 °C por 40 min bajo atmósfera de Ar, cuando la ccd mostró la desaparición del imidato de partida. Se agregó diclorometano (200 mL), se filtraron los tamices moleculares y la solución se lavó con agua (2 x 100 mL). La fase orgánica se secó con Na₂SO₄ (anh.), se filtró y se concentró a sequedad. El sólido obtenido se purificó por cromatografía *flash* en columna de sílica gel (tolueno/AcOEt 25:1) para dar **35** (2,63 g; 84%) como un jarabe incoloro. Los datos de RMN fueron coincidentes con los reportados.^[233]

2,3,4,6-tetra-O-bencil- α -D-galactopyranosil-(1 \rightarrow 3)-2-O-benzoil-5,6-O-isopropilidén- α . β -D-galactofuranosa (37)



Se siguió el procedimiento descripto por Gandolfi-Donadío L. *et al.*^[233]

A un balón que contenía 2,3,4,6-tetra-O-bencil- α -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 3)-2-O-benzoíl-5,6-O-isopropilidén-D-galactono-1,4-lactona (**35**; 2,03 g; 2,4 mmol) previamente secada, se agregó una solución de bis(2-butil-3-metil)borano (23,1 mmol) en THF anhídrico (10,5 mL) enfriada a 0 °C. La mezcla se dejó llegar a temperatura ambiente y se agitó por 24 h bajo atmósfera de Ar. La solución resultante se enfrió a 0 °C, se agregó muy lentamente agua (6 mL) y se continuó la agitación a 0 °C por 20 min. Seguidamente, se agregó H₂O₂ (4,2 mL) mientras se ajustaba el pH de la fase acuosa a 8 con KOH 2,5 M y se mantuvo la agitación por 30 min a 0 °C. Se adicionó agua (110 mL) y la mezcla se extrajo con diclorometano (2 x 60 mL). Los extractos orgánicos se juntaron y lavaron con agua (1 x 100 mL), se secaron con Na₂SO₄ (anh.), se filtraron y se concentraron a

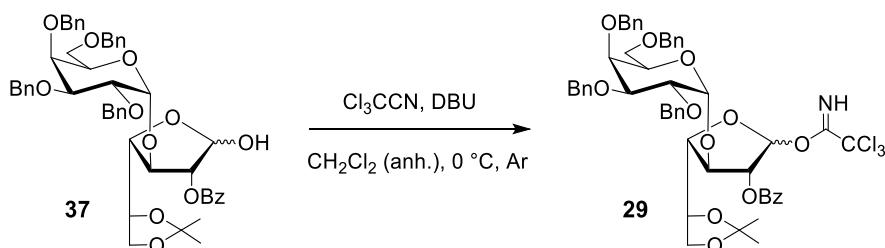
sequedad. El jarabe resultante se co-evaporó con metanol (6 x 12 mL) para eliminar el ácido bórico y se purificó por cromatografía *flash* en columna de sílica gel (9:1 tolueno/AcOEt) para dar **37** (1,07 g; 53%) como un sólido amorfó. Los datos de RMN ¹H y ¹³C fueron coincidentes con los descriptos en bibliografía y evidenciaron la obtención de una mezcla de anómeros en relación β/α 2:1.^[233]

$[\alpha]_D^{20} +60,7$ (c 1, CHCl₃), [lit.^[233] $[\alpha]_D +65,5$ (c 1, CHCl₃)]; R_f 0,32, única mancha (4:1 tolueno/AcOEt).

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ de la región anomérica de la mezcla de anómeros: 5,59 (dd, $J = 8,8$; 4,5 Hz, 1H, H-1 α), 5,45 (d, $J = 1,6$ Hz, 2H, H-1 β), 5,37 (sa, 2H, H-2 β), 5,21 (dd, $J = 7,0$; 4,5 Hz, 1H, H-2 α), 5,07 (d, $J = 3,8$ Hz, 2H, H-1' β).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ de la mezcla de anómeros: 165,9 (COPh); 165,6 (COPh); 138,6 – 127,5 (4 x PhCH₂, PhCO); 110,1 (C(CH₃)₂); 110,0 (C(CH₃)₂); 101,0 (C-1 β); 98,8 (C-1' α); 97,6 (C-1' β); 95,3 (C-1 α); 83,3; 82,2; 81,9; 80,5; 79,3; 79,2; 79,0; 78,9; 77,3; 76,6; 76,4; 75,6; 75,0; 74,8; 74,7; 74,2; 73,9; 73,6; 73,5; 73,0; 70,2; 70,1; 69,3; 68,4; 65,7; 26,5 (CH₃); 26,2 (CH₃); 25,7 (CH₃); 25,4 (CH₃).

Tricloroacetimidato de O-(2,3,4,6-tetra-O-bencil- α -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 3)-2-O-benzoíl-5,6-O-isopropilidén- α , β -D-galactofuranosilo) (29)

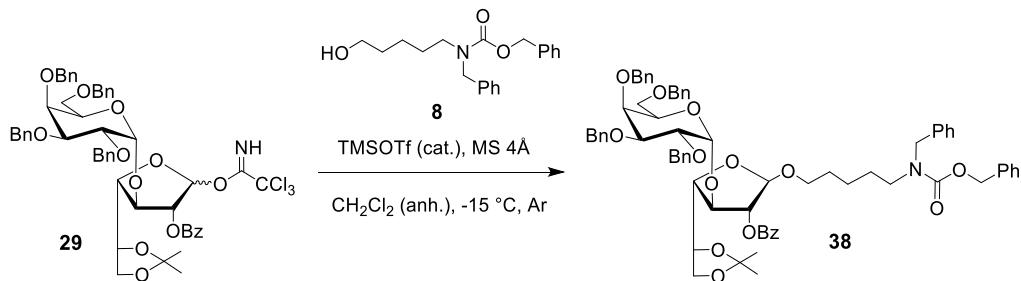


Se siguió el procedimiento descripto por Gandolfi-Donadío L. et al.^[233]

A una solución de 2,3,4,6-tetra-O-bencil- α -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 3)-2-O-benzoíl-5,6-O-isopropilidén- α , β -D-galactofuranosa (**37**; 0,74 g; 0,87 mmol) previamente secada, y tricloroacetonitrilo (0,5 mL; 5 mmol) en diclorometano anhídrico (26,5 mL) enfriada a 0 °C, se agregó, lentamente y con agitación, DBU (50 μ L; 0,33 mmol). La agitación se mantuvo por 1,5 h a 0 °C, y luego la mezcla se concentró a presión reducida. El jarabe obtenido se purificó por cromatografía en columna de sílica gel (tolueno/TEA 9,7:0,3) para dar **29** (0,70 g; 81%; R_f 0,66 y 0,47 tolueno/AcOEt/TEA 6:1:0,07) como un jarabe. La caracterización del producto por RMN ¹H y ¹³C evidenció la obtención de una mezcla de anómeros en relación β/α 4:1.^[233] Para evitar la descomposición, el producto aislado se guardó en freezer bajo exclusión de humedad hasta su utilización.

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ de la mezcla de anómeros: 8,61 (s, 0,8H, NH β), 8,41 (s, 0,2H, NH α), 8,14 – 7,02 (m, 25H, PhCO , 4 x PhCH_2), 6,66 (d, J = 4,7 Hz, 0,2H, H-1 α), 6,47 (s, 0,8H, H-1 β), 5,67 (d, J = 1,1 Hz, 0,8H, H-2 β), 5,51 (dd, J = 7,6; 4,7 Hz, 0,2H, H-2 α), 5,10 (d, J = 3,5 Hz, 0,8H, H-1' β), 5,03 – 3,37 (m, 19H), 3,30 – 3,19 (m, 0,2H), 1,45 – 1,39 (m, 3H, CH_3 α , CH_3 β), 1,37 – 1,33 (m, 3H, CH_3 α , CH_3 β).

***N*-(Bencil)benciloxicarbonil-5-aminopentil 2,3,4,6-tetra-O-bencil- α -D-galactopiranosil-(1→3)-2-O-benzoíl-5,6-O-isopropilidén- β -D-galactofuranósido (38)**



Una suspensión de tricloroacetimidato de O-(2,3,4,6-tetra-O-bencil- α -D-galactopiranosil-(1→3)-2-O-benzoíl-5,6-O-isopropilidén- α , β -D-galactofuranosilo) (29; 0,78 g; 0,79 mmol), *N*-bencil-*N*-benciloxicarbonil-5-aminopentanol (8; 350 mg; 1,07 mmol), ambos previamente secados, y tamices moleculares de 4 Å pulverizados (500 mg) en diclorometano anhídrico (19,5 mL) se enfrió a -15°C bajo atmósfera de Ar y se agregó triflato de trimetilsililo (13,5 μL ; 0,075 mmol). Luego de 30 min de agitación a -15°C , la suspensión se neutralizó con TEA (15 μL), se filtraron los tamices moleculares y la solución se concentró a sequedad. El jarabe obtenido se purificó por cromatografía *flash* en columna de sílica gel (hexano/AcOEt 8:2) para dar 38 (0,66 g; 72%) como un jarabe incoloro.

$[\alpha]_D^{20} +17,4$ (c 1, CHCl_3); R_f 0,67 (tolueno/AcOEt 8:2).

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ de la mezcla de rotámeros: 8,09 – 6,96 (m, 35H, PhCO , 6 x PhCH_2), 5,39 (sa, 1H, H-2), 5,21 – 5,11 (m, 2H, NCOOCH_2Ph), 5,08 – 4,99 (m, 2H, H-1, H-1'), 4,89 (d, J = 11,3 Hz, 1H, OCH_aHPh), 4,83 – 4,68 (m, 3H, OCH_aHPh , OCH_2Ph), 4,64 (d, J = 11,7 Hz, 1H, OCHH_bPh), 4,55 – 4,41 (m, 3H, OCHH_bPh , NCH_2Ph), 4,38 – 4,19 (m, 3H, H-5, OCH_2Ph), 4,18 – 3,99 (m, 5H, H-4, H-3, H-5', H-2', H-4'), 3,99 – 3,86 (m, 3H, H-6a, H-6b, H-3'), 3,78 – 3,57 (m, 1H, OCH_aHCH_2), 3,50 (t, J = 8,6 Hz, 1H, H-6'a), 3,46 – 3,32 (m, 2H, OCHH_bCH_2 , H-6'b), 3,31 – 3,10 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 1,61 – 1,41 (m, 7H, 2 x CH_2 , CH_3), 1,39 – 1,18 (m, 5H, CH_3 , CH_2).

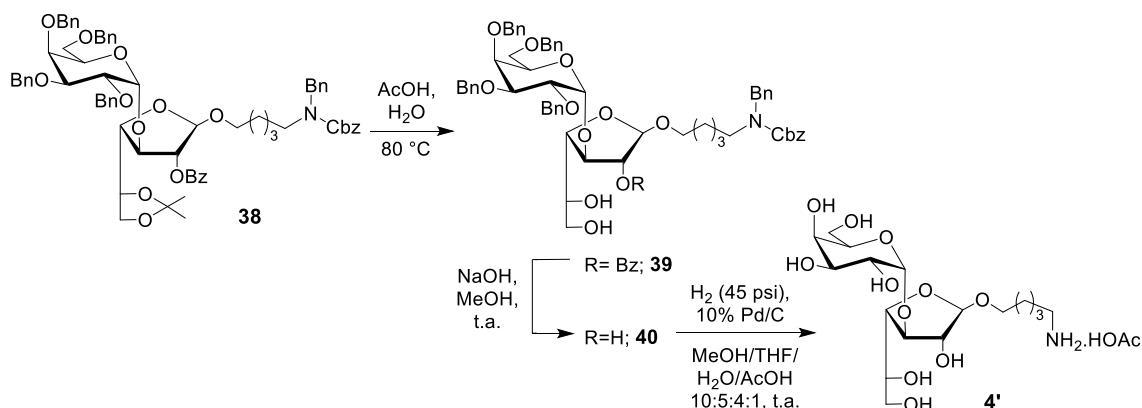
RMN ^{13}C (101 MHz, CDCl_3) δ de la mezcla de rotámeros: 165,6 (COPh); 156,8/156,3 (NCOO); 138,9 – 127,4 (PhCO , 6 x PhCH_2); 109,9 ($\text{C}(\text{CH}_3)_2$); 106,0 (C-1); 99,4 (C-1'); 84,0

(C-3); 82,7/82,6 (C-2); 81,8/81,7 (C-4); 79,0 (C-3'); 76,4 (C-2''); 75,6 (C-5); 75,0 (OCH₂Ph); 74,8 (C-4''); 73,7 (OCH₂Ph); 73,4 (OCH₂Ph); 72,8 (OCH₂Ph); 69,8 (C-5'); 68,3 (C-6'); 67,6 (OCH₂CH₂); 67,3 (NCOOCH₂Ph); 65,7 (C-6); 50,6/50,3 (NCH₂Ph); 47,3/46,3 (CH₂CH₂N); 29,2 (CH₂); 28,0/27,6 (CH₂); 26,6 (CH₃); 25,5 (CH₃); 23,4 (CH₂).

* Las asignaciones pueden estar intercambiadas.

EMAR (ESI) *m/z* calculado para C₇₀H₇₇NO₁₄ [M+Na]⁺: 1178,5242. Encontrado: 1178,5228.

Acetato de 5-aminopentil α -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 3)- β -D-galactofuranósido (4')



A una solución de *N*-(bencil)benciloxicarbonil-5-aminopentil 2,3,4,6-tetra-O-bencil- α -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 3)-2-O-benzoíl-5,6-O-isopropilidén- β -D-galactofuranósido (38; 0,60 g; 0,52 mmol) en ácido acético (7,3 mL) a 80 °C se agregó agua (2,6 mL) hasta observar turbidez. Luego de 1,5 h de agitación a 80 °C se observó desaparición del compuesto de partida por ccd. La mezcla se concentró a presión reducida y se co-evaporó con tolueno (8 x 1 mL) para dar un jarabe incoloro (0,57 g; R_f 0,65 tolueno/AcOEt 1:1). El producto mayoritario en el crudo de reacción (>95%) se identificó por RMN mono y bidimensional como *N*-(bencil)benciloxicarbonil-5-aminopentil 2,3,4,6-tetra-O-bencil- α -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 3)-2-O-benzoíl- β -D-galactofuranósido (39).

RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz) δ de la mezcla de rotámeros: 8,08 – 6,97 (m, 35H, PhCO, 6 x PhCH₂), 5,35 (sa, 1H, H-2), 5,24 – 5,09 (m, 2H, NCOOCH₂Ph), 5,05 – 4,97 (m, 1H, H-1), 4,95 (d, J = 3,7 Hz, 1H, H-1'), 4,90 – 4,79 (m, 2H, 2 x OCH_aHPh), 4,73 – 4,60 (m, 3H, OCH₂Ph, OCHH_bPh), 4,55 – 4,40 (m, 3H, OCHH_bPh, NCH₂Ph), 4,40 – 4,30 (m, 1H, OCH_aHPh), 4,29 – 4,12 (m, 3H, OCHH_bPh, H-3, H-4), 4,11 – 3,97 (m, 3H, H-5', H-2', H-4'), 3,97 – 3,86 (m, 1H, H-3'), 3,84 – 3,74 (m, 1H, H-5), 3,73 – 3,54 (m, 3H, H-6a, H-6b, OCH_aHCH₂), 3,53 – 3,10 (m, 5H, H-6'a, OCHH_bCH₂, H-6'b, CH₂CH₂N), 1,72 – 1,39 (m, 4H, 2 x CH₂), 1,39 – 1,14 (m, 2H, CH₂).

RMN ¹³C (CDCl₃, 75 MHz) δ de la mezcla de rotámeros: 165,7 (COPh); 156,9/156,3 (NCOO); 138,7 - 125,4 (PhCO, 6 x PhCH₂); 106,0 (C-1); 99,9 (C-1'); 84,3 (C-3); 83,0 (C-

2); 82,4/82,2 (C-4); 79,2 (C-3'); 75,8 (C-2'); 74,9 (OCH₂Ph); 74,6 (C-4'); 74,1 (OCH₂Ph); 73,4 (OCH₂Ph); 72,6 (OCH₂Ph); 71,8 (C-5); 70,0 (C-5'); 68,1 (C-6'); 67,7/67,6 (OCH₂CH₂); 67,3 (NCOOCH₂Ph); 64,0 (C-6); 50,6/50,3 (NCH₂Ph); 47,3/46,3 (CH₂CH₂N); 29,2 (CH₂); 28,0/27,4 (CH₂); 23,2 (CH₂).

El jarabe obtenido en el paso anterior se disolvió en metanol (4,2 mL) y se agregó con agitación una solución de NaOH 1M en metanol (0,4 mL). Luego de 3 h de agitación a temperatura ambiente, se observó desaparición del compuesto de partida por ccd. La mezcla se pasó a través de una columna corta (1,5 cm x 3 cm, d. x alt.) de Amberlite IR120 H y el eluido se concentró a presión reducida. El producto crudo obtenido se co-evaporó con agua ultrapura (6 x 5 mL) para dar un jarabe incoloro (0,47 g; R_f 0,48 tolueno/AcOEt 1:1) cuyo producto mayoritario (>95%) se identificó por RMN mono y bidimensional como *N*-(bencil)benciloxicarbonil-5-aminopentil 2,3,4,6-tetra-O-bencil- α -D-galactopiranosil-(1→3)- β -D-galactofuranósido (**40**).

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ de la mezcla de rotámeros: 7,48 – 7,08 (m, 30H, 6 x PhCH₂), 5,23 – 5,09 (m, 2H, NCOOCH₂Ph), 4,93 – 4,84 (m, 3H, OCH_aHPh, H-1', H-1), 4,85 – 4,75 (m, 2H, 2 x OCH_aHPh), 4,71 (d, J = 11,9 Hz, 1H, OCHH_bPh), 4,67 (d, J = 11,7 Hz, 1H, OCHH_bPh), 4,53 – 4,45 (m, 4H, OCHH_bPh, OCH_aHPh, NCH₂Ph), 4,39 (d, J = 12,3 Hz, 1H, OCHH_bPh), 4,13 – 4,02 (m, 3H, H-2, H-4, H-2'), 4,00 – 3,92 (m, 1H, H-5'), 3,91 – 3,83 (m, 1H, H-3'), 3,82 – 3,74 (m, 2H, H-3, H-4'), 3,72 – 3,58 (m, 4H, H-5, H-6a, H-6b, OCH_aHCH₂), 3,55 (t, J = 9,3 Hz, 1H, H-6'a), 3,45 – 3,14 (m, 3H, OCHH_bCH₂, CH₂CH₂N), 3,14 – 3,05 (m, 1H, H-6'b), 1,66 – 1,42 (m, 4H, 2 x CH₂), 1,39 – 1,19 (m, 2H, CH₂).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ de la mezcla de rotámeros: 156,9/156,4 (NCOO); 138,4 - 127,3 (6 x PhCH₂); 107,8 (C-1); 99,9 (C-1'); 87,7 (C-3); 81,4 (C-4*); 80,9 (C-2*); 79,1 (C-3'); 75,5 (C-2'); 74,8 (C-4'); 74,6 (OCH₂Ph); 74,1 (OCH₂Ph); 73,6 (OCH₂Ph); 73,2 (OCH₂Ph); 72,2 (C-5); 70,9 (C-5'); 69,9 (C-6'); 68,3/68,2 (OCH₂CH₂); 67,3 (NCOOCH₂Ph); 63,8 (C-6); 50,5/50,3 (NCH₂Ph); 47,2/46,2 (CH₂CH₂N); 29,4 (CH₂); 28,0/27,5 (CH₂); 23,4 (CH₂).

* Las asignaciones pueden estar intercambiadas.

El crudo del paso anterior (0,47 g) se disolvió en una mezcla MeOH/THF/H₂O/AcOH 10:5:4:1 (90,5 mL), se agregó Pd/C 10% (0,54 g) y la suspensión se agitó en hidrogenador a 45 psi y temperatura ambiente por 7 días hasta que por ccd se observó conversión mayoritaria a un producto de R_f 0,52 (EtOH/H₂O/AcOH 7:1:1). La mezcla se filtró por lecho de celite y el filtrado se concentró a presión reducida. El jarabe obtenido se co-evaporó con tolueno (8 x 6 mL) y se purificó por cromatografía en columna de sílica gel (ACN/H₂O/AcOH 8:2:0,1). El producto se co-evaporó con tolueno (6 x 1 mL), se disolvió

en agua ultrapura y finalmente se liofilizó para dar **4'** (174 mg; 69%) como un jarabe incoloro.

$[\alpha]_D^{20} +29,1$ (*c* 1, H_2O); R_f 0,52 (EtOH/ H_2O /AcOH 7:1:1).

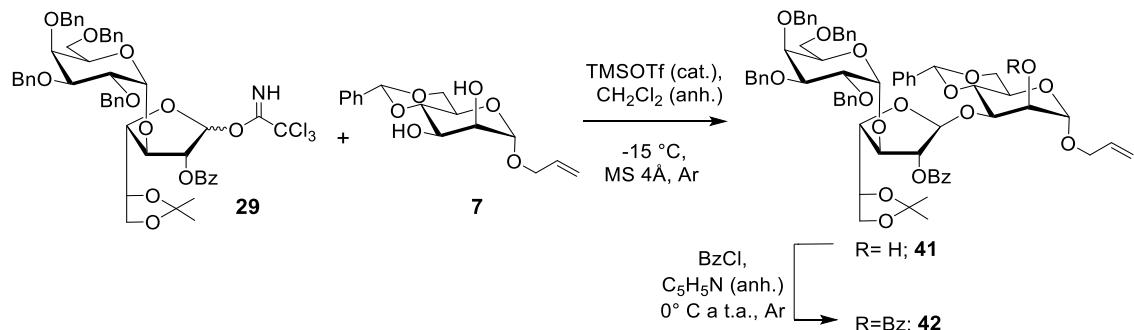
RMN 1H (400 MHz, D_2O) δ : 5,06 (d, J = 2,9 Hz, 1H, H-1'), 5,04 (d, J = 1,8 Hz, 1H, H-1), 4,26 (dd, J = 3,2; 2,0 Hz, 1H, H-2), 4,17 (dd, J = 6,3; 4,0 Hz, 1H, H-4), 4,10 – 4,03 (m, 2H, H-5', H-3), 4,02 – 3,99 (m, 1H, H-4'), 3,92 – 3,82 (m, 3H, H-5, H-2', H-3'), 3,83 – 3,56 (m, 6H), 3,03 – 2,97 (m, 2H, CH_2NH_2), 1,92 (s, 3H, CH_3COOH), 1,77 – 1,60 (m, 4H, 2 x CH_2), 1,52 – 1,40 (m, 2H, CH_2).

RMN ^{13}C (101 MHz, D_2O) δ : 108,1 (C-1); 100,3 (C-1'); 85,1 (C-3); 82,3 (C-4); 80,1 (C-2); 72,0 (C-5'); 71,5 (C-5); 69,84 (C-3''); 69,79 (C-4'); 68,8 (C-2''); 68,6 (OCH_2CH_2); 63,3 (C-6); 61,7 (C-6'); 40,0 (CH_2NH_2); 28,7 (CH_2); 27,1 (CH_2); 23,9 (CH_3COOH); 22,9 (CH_2).

* Las asignaciones pueden estar intercambiadas.

EMAR (ESI) *m/z* calculado para $C_{17}H_{33}NO_{11}$ [M+Na] $^+$: 450,1951. Encontrado: 450,1956.

Alil 2,3,4,6-tetra-O-bencil- α -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 3)-2-O-benzoíl-5,6-O-isopropilidén- β -D-galactofuranosil-(1 \rightarrow 3)-4,6-O-bencilidén-2-O-benzoíl- α -D-manopiranósido (42)



Una suspensión de tricloroacetimidato de O -(2,3,4,6-tetra-O-bencil- α -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 3)-2-O-benzoíl-5,6-O-isopropilidén- α , β -D-galactofuranosilo) (**29**; 1,13 g; 1,1 mmol), alil 4,6-O-bencilidén- α -D-manopiranósido (**7**; 432 mg; 1,4 mmol), ambos previamente secados, y tamices moleculares de 4Å pulverizados (1 g), en diclorometano anhídrico (28 mL) se enfrió a $-15\text{ }^\circ C$ bajo atmósfera de Ar y se agregó con agitación triflato de trimetilsililo (22 μL ; 0,12 mmol). Luego de 25 min de agitación a $-15\text{ }^\circ C$, se observó la desaparición del imidato de partida por ccd. La suspensión se filtró para remover los tamices moleculares y al filtrado se agregó diclorometano (150 mL). La solución resultante se extrajo con $NaHCO_3$ (ss) (120 mL) y con agua (2 x 120 mL), se secó con Na_2SO_4 (anh.), se filtró y se concentró a sequedad para dar un sólido amorfó ligeramente amarillo (1,4 g). El producto mayoritario (>80%) se identificó por RMN mono y bidimensional como alil

2,3,4,6-tetra-O-bencil- α -D-galactopiranósil-(1 \rightarrow 3)-2-O-benzoíl-5,6-O-isopropilidén- β -D-galactofuranosil-(1 \rightarrow 3)-4,6-O-bencilidén- α -D-manopiranósido (**41**). Una pequeña fracción (300 mg) de la muestra se purificó por cromatografía en columna de sílica gel (tolueno/AcOEt 12:1) para efectuar la caracterización del producto por RMN y EMAR.

$[\alpha]_D^{20}$ +39,6 (c 1, CHCl₃); R_f 0,4 (tolueno/AcOEt 6:1); pf 59,0-61,7 °C.

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ: 8,19 – 7,11 (m, 30H, PhCO, 4 x PhCH₂, PhCH), 5,97 – 5,79 (m, 1H, CH=CH₂), 5,68 (s, 1H, H-2'), 5,37 – 5,17 (m, 4H, PhCH, H-1", CH=CH₂), 5,11 (s, 1H, H-1'), 4,95 (d, J = 11,6 Hz, 1H, OCH_aHPh), 4,86 (s, 1H, H-1), 4,78 (d, J = 11,6 Hz, 1H, OCH_aHPh), 4,69 – 4,61 (m, 2H, OCH_aHPh, OCHH_bPh), 4,60 – 4,51 (m, 2H, 2 x OCHH_bPh), 4,45 – 4,30 (m, 3H, OCH₂Ph, H-4'), 4,30 – 4,20 (m, 2H, H-5", H-6a), 4,20 – 4,01 (m, 5H, OCH_aHCH=CH₂, H-3, H-5', H-2", H-3'), 4,00 – 3,77 (m, 6H, OCHH_bCH=CH₂, H-4", H-4, H-3", H-5, H-2), 3,77 – 3,64 (m, 2H, H-6b, H-6'a), 3,63 – 3,45 (m, 3H, H-6'b, H-6'a, H-6"b), 1,27 (s, 3H, CH₃), 1,22 (s, 3H, CH₃).

RMN ¹³C (101 MHz, CDCl₃) δ: 165,9 (COPh); 138,8 - 126,3 (CH=CH₂, PhCO, 4 x PhCH₂, PhCH); 117,9 (CH=CH₂); 109,8 (C(CH₃)₂); 102,7 (C-1'); 101,7 (PhCH); 99,7 (C-1); 99,0 (C-1"); 84,3 (C-3'); 82,3 (C-4'); 81,1 (C-2'); 79,1 (C-3"); 77,3 (C-4); 76,9 (C-2"); 75,7 (C-4"); 75,3 (C-5'); 74,7 (OCH₂Ph); 74,0 (OCH₂Ph); 73,4 (OCH₂Ph); 73,1 (OCH₂Ph); 72,4 (C-3); 70,7 (C-6"); 70,5 (C-5"); 68,89 (C-6); 68,86 (C-2); 68,3 (CH₂CH=CH₂); 65,5 (C-6'); 63,8 (C-5); 26,3 (CH₃); 25,6 (CH₃).

EMAR (ESI) m/z calculado para C₆₆H₇₂O₁₇ [M+Na]⁺: 1159,4667. Encontrado: 1159,4691.

Una fracción del sólido obtenido en el paso anterior (1,1 g) previamente secado, se disolvió en piridina anhidra (18 mL) y se enfrió a 0 °C. Luego, se agregó lentamente y con agitación, cloruro de benzoílo (0,6 mL; 5,2 mmol). La solución se agitó por 5,5 h a temperatura ambiente bajo atmósfera de Ar, cuando por ccd se observó la desaparición del compuesto de partida. Se agregó diclorometano (130 mL) y la mezcla se extrajo con agua (100 mL). La fase orgánica resultante se lavó con HCl 5% (2 x 100 mL), agua (100 mL), NaHCO₃ (ss) (100 mL) y nuevamente con agua (100 mL), se secó con Na₂SO₄ (anh.), se filtró y se concentró a sequedad. El residuo obtenido se purificó por cromatografía *flash* en columna de sílica gel (tolueno/AcOEt 15:1) para dar **42** (0,62 g; 57%) como un sólido amorfó blanco.

$[\alpha]_D^{20}$ -10,4 (c 1, CHCl₃); R_f 0,5 (tolueno/AcOEt 9:1); pf 63,4-65,0 °C.

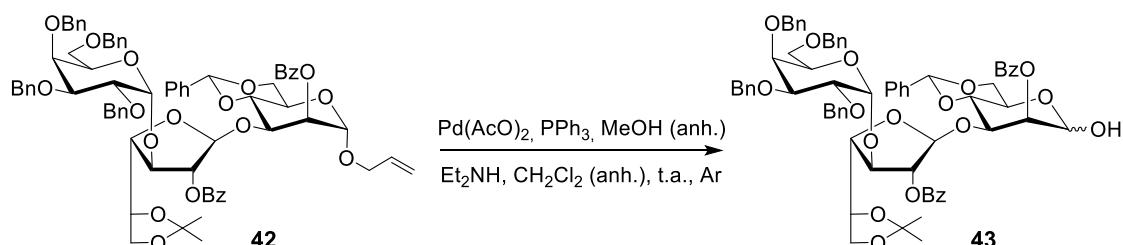
RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ: 8,16 – 7,02 (m, 35H, 2 x PhCO, 4 x PhCH₂, PhCH), 6,02 – 5,80 (m, 1H, CH=CH₂), 5,59 (dd, J = 3,6; 1,6 Hz, 1H, H-2), 5,55 (s, 1H, PhCH), 5,49 – 5,42 (m, 2H, H-1', H-2'), 5,31 (dq, J = 17,3; 1,5 Hz, 1H, CH=CH_aH), 5,23 (dq, J = 10,4; 1,3 Hz, 1H, CH=CHH_b), 5,18 (d, J = 3,7 Hz, 1H, H-1"), 4,97 (d, J = 1,5 Hz, 1H, H-1), 4,80 (d, J =

11,4 Hz, 1H, OCH_aHPh), 4,70 (d, J = 11,7 Hz, 1H, OCH_aHPh), 4,62 – 4,47 (m, 2H, H-3, OCHH_bPh), 4,45 – 4,35 (m, 2H, OCH_aHPh , OCHH_bPh), 4,34 – 4,06 (m, 7H, OCHH_bPh , H-4', OCH_2Ph , $\text{OCH}_a\text{HCH}=\text{CH}_2$, H-6a, H-5'), 4,06 – 3,87 (m, 6H, $\text{OCHH}_b\text{CH}=\text{CH}_2$, H-4, H-5'', H-5, H-3', H-2''), 3,83 (dd, J = 8,5; 6,2 Hz, 1H, H-6'a), 3,73 – 3,64 (m, 2H, H-4'', H-6'b), 3,60 – 3,45 (m, 2H, H-6b, H-3''), 3,33 (t, J = 8,7 Hz, 1H, H-6''a), 3,16 (dd, J = 8,5; 5,1 Hz, 1H, H-6''b), 1,40 (s, 3H, CH_3), 1,31 (s, 3H, CH_3).

RMN ^{13}C (101 MHz, CDCl_3) δ : 165,9 (COPh); 165,1 (COPh); 139,2 - 126,2 ($\text{CH}=\text{CH}_2$, 2 x PhCO , 4 x PhCH_2 , PhCH); 118,4 ($\text{CH}=\text{CH}_2$); 110,0 ($\text{C}(\text{CH}_3)_2$); 102,7 (C-1'); 101,1 (PhCH); 98,2 (C-1); 98,1 (C-1''); 84,4 (C-3'); 83,1 (C-4'); 80,9 (C-2'); 79,2 (C-3''); 77,0 (C-4); 76,9 (C-2''); 75,7 (C-5'); 74,82 (OCH_2Ph); 74,77 (C-4''); 73,5 (OCH_2Ph); 73,3 (OCH_2Ph); 72,7 (OCH_2Ph); 69,5 (C-3); 69,4 (C-2); 69,3 (C-5''); 68,7 (C-6, $\text{OCH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$); 68,1 (C-6''); 65,6 (C-6'); 64,2 (C-5); 26,7 (CH_3); 25,5 (CH_3).

EMAR (ESI) m/z calculado para $\text{C}_{73}\text{H}_{76}\text{O}_{18}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 1263,4929. Encontrado: 1263,4962.

2,3,4,6-tetra-O-bencil- α -D-galactopiranosil-(1→3)-2-O-benzoíl-5,6-O-isopropilidén- β -D-galactofuranosil-(1→3)-4,6-O-bencilidén-2-O-benzoíl- α , β -D-manopiranosa (43)



Una suspensión de acetato de paladio (II) (74 mg; 0,33 mmol) y trifenilfosfina (0,44 g; 1,7 mmol) previamente secados (temp. de secado=60 °C), en metanol anhidro (3,9 mL) se agitó a temperatura ambiente bajo atmósfera de Ar por 3h hasta observar disolución total del acetato de paladio, para obtener *in situ* tetrakis(trifenilfosfina)paladio (0). Luego se agregó dietilamina (34 μL), la mezcla se agitó por 15 min y se agregó alil 2,3,4,6-tetra-O-bencil- α -D-galactopiranosil-(1→3)-2-O-benzoíl-5,6-O-isopropilidén- β -D-galactofuranosil-(1→3)-4,6-O-bencilidén- α -D-manopiranósido (**42**; 0,50 g; 0,4 mmol), previamente secado, disuelto en diclorometano anhidro (7,8 mL). Luego de 24 h de agitación a temperatura ambiente bajo atmósfera de Ar se agregó nuevamente tetrakis(trifenilfosfina)paladio(0) (0,08 mmol) en metanol anhidro (1 mL) y se continuó la agitación por 24 h. La mezcla se llevó a sequedad y se purificó por cromatografía *flash* en columna de sílica gel (tolueno/AcOEt 9:1) para dar **43** (395 mg; 82%) como un sólido amorfo. La caracterización del producto por RMN ^1H y ^{13}C evidenció la obtención de una mezcla de anómeros en relación α/β 5:1.

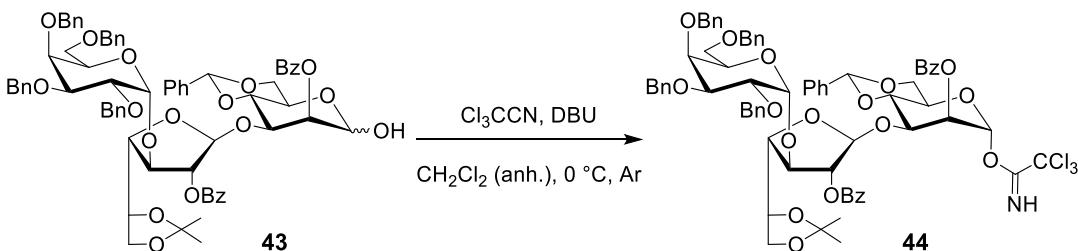
$[\alpha]_D^{20} -32,0$ (c 1, CHCl_3); R_f 0,53, única mancha (tolueno/ AcOEt 3:1).

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ del anómero α : 8,18 – 7,07 (m, 35H, 2 x PhCO , 4 x PhCH_2 , PhCH), 5,70 (dd, $J = 3,4$; 0,8 Hz, 0,2H, H-2 β), 5,61 (dd, $J = 3,5$; 1,5 Hz, 1H, H-2), 5,56 (s, 0,2H, H-1' β), 5,55 (s, 1H, PhCH), 5,54 (s, 0,2H, PhCH β), 5,46 – 5,44 (m, 2H, H-1', H-2'), 5,30 (dd, $J = 4,1$; 1,4 Hz, 1H, H-1), 5,19 (d, $J = 3,8$ Hz, 0,2H, H-1" β), 5,15 (d, $J = 3,7$ Hz, 1H, H-1"), 5,05 – 4,97 (m, 0,2H, H-1 β), 4,81 (d, $J = 11,3$ Hz, 1H, OCH_aHPh), 4,71 (d, $J = 11,7$ Hz, 1H, OCH_aHPh), 4,64 (dd, $J = 10,0$; 3,5 Hz, 1H, H-3), 4,54 (d, $J = 11,6$ Hz, 1H, OCHH_bPh), 4,46 (d, $J = 11,8$ Hz, 1H, OCH_aHPh), 4,41 (d, $J = 11,4$ Hz, 1H, OCHH_bPh), 4,35 (d, $J = 11,8$ Hz, 1H, OCHH_bPh), 4,28 (t, $J = 6,0$ Hz, 1H, H-4'), 4,24 – 3,98 (m, 7H, OCH_2Ph , H-6a, H-5, H-5' H-5", H-4), 3,96 – 3,90 (m, 2H, H-2", H-3'), 3,79 (dd, $J = 8,6$, 5,9 Hz, 1H, H-6'a), 3,76 – 3,73 (m, 1H, H-4"), 3,64 (dd, $J = 8,5$; 6,9 Hz, 1H, H-6'b), 3,62 – 3,52 (m, 2H, H-6b, H-3"), 3,32 (t, $J = 8,5$ Hz, 1H, H-6'a), 3,18 (dd, $J = 8,7$; 5,3 Hz, 1H, H-6'b), 1,37 (s, 3H, CH_3), 1,29 (s, 3H, CH_3).

RMN ^{13}C (101 MHz, CDCl_3) δ del anómero α : 165,9 (COPh); 165,1 (COPh); 139,2 – 126,2 (2 x PhCO , 4 x PhCH_2 , PhCH); 110,0 ($\text{C}(\text{CH}_3)_2$); 102,9 (C-1'); 102,7 (C-1' β); 101,2 (PhCH); 101,0 (PhCH β); 98,3 (C-1"); 98,1 (C-1" β); 94,0 (C-1 β); 93,8 (C-1); 84,3 (C-3'); 82,9 (C-4'); 81,1 (C-2'); 79,2 (C-3"); 77,3 (C-4); 76,8 (C-2"); 75,6 (C-5'); 74,8 (C-4", OCH_2Ph); 73,5 (OCH_2Ph); 73,3 (OCH_2Ph); 72,7 (OCH_2Ph); 69,9 (C-2); 69,4 (C-5"); 69,3 (C-3); 68,8 (C-6); 68,2 (C-6"); 65,5 (C-6'); 64,1 (C-5); 26,5 (CH_3); 25,5 (CH_3).

EMAR (ESI) m/z calculado para $\text{C}_{70}\text{H}_{72}\text{O}_{18} [\text{M}+\text{Na}]^+$: 1223,4617. Encontrado: 1223,4673.

Tricloroacetimidato de O-(2,3,4,6-tetra-O-bencil- α -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 3)-2-O-benzoíl-5,6-O-isopropilidén- β -D-galactofuranosil-(1 \rightarrow 3)-4,6-O-bencilidén-2-O-benzoíl- α -D-manopiranosilo) (44)



A una solución de 2,3,4,6-tetra-O-bencil- α -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 3)-2-O-benzoíl-5,6-O-isopropilidén- β -D-galactofuranosil-(1 \rightarrow 3)-4,6-O-bencilidén-2-O-benzoíl- α , β -D-manopiranosa (**43**; 374 mg; 0,3 mmol) secada previamente, en diclorometano anhídrico (3,8 mL), se agregó tricloroacetonitrilo (0,18 mL; 1,8 mmol), la mezcla se enfrió a 0 °C y se agregó, lentamente y con agitación, DBU (19 μL ; 0,13 mmol). Luego de 2,5 h de agitación a 0 °C bajo atmósfera de Ar, la solución se concentró a presión reducida para dar un

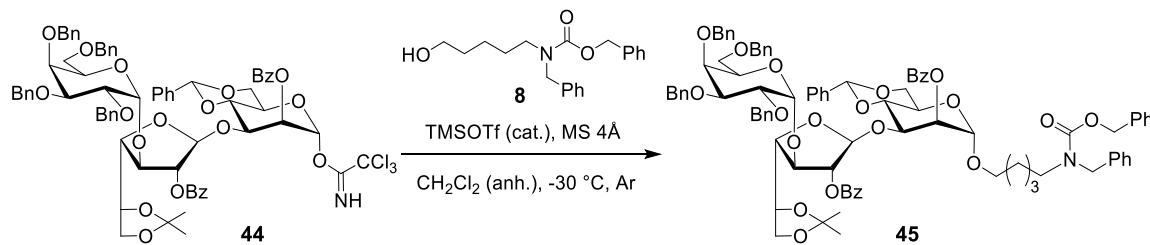
sólido amorfó. El producto crudo se purificó a través de una columna corta de sílica gel (tolueno/TEA 10:0,1) para dar **44** (362 mg; 86%) como un sólido amorfó. Para evitar la descomposición, el producto aislado se guardó en freezer bajo exclusión de humedad hasta su utilización.

R_f 0,74 (tolueno/AcOEt/TEA 8:2:0,1).

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ : 8,76 (s, 1H, NH), 8,20 – 7,05 (m, 35H, 2 x PhCO, 4 x PhCH₂, PhCH), 6,39 (d, J = 1,5 Hz, 1H, H-1), 5,78 (dd, J = 3,7; 1,7 Hz, 1H, H-2), 5,54 (s, 1H, PhCH), 5,50 (s, 1H, H-1'), 5,47 (d, J = 1,6 Hz, 1H, H-2'), 5,17 (d, J = 3,7 Hz, 1H, H-1''), 4,80 (d, J = 11,4 Hz, 1H, OCH_aHPh), 4,71 (d, J = 11,7 Hz, 1H, OCH_aHPh), 4,60 (dd, J = 9,7; 3,7 Hz, 1H, H-3), 4,53 (d, J = 11,7 Hz, 1H, OCHH_bPh), 4,43 – 4,36 (m, 2H, OCH_aHPh, OCHH_bPh), 4,34 – 4,03 (m, 8H, H-4', OCHH_bPh, OCH₂Ph, H-6a, H-5', H-4, H-5), 4,03 – 3,88 (m, 3H, H-5'', H-3', H-2''), 3,84 (dd, J = 8,5; 6,0 Hz, 1H, H-6'a), 3,76 – 3,64 (m, 2H, H-6'b, H-4''), 3,58 – 3,45 (m, 2H, H-6b, H-3''), 3,32 (t, J = 8,7 Hz, 1H, H-6''a), 3,14 (dd, J = 8,5; 5,0 Hz, 1H, H-6''b), 1,39 (s, 3H, CH_3), 1,31 (s, 3H, CH_3).

RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ : 165,7 (COPh); 165,1 (COPh); 160,5 (C=NH); 139,2 - 125,5 (2 x PhCO, 4 x PhCH₂, PhCH); 110,0 ($\text{C}(\text{CH}_3)_2$); 102,9 (C-1'); 101,2 (PhCH); 98,1 (C-1''); 96,2 (C-1); 90,8 (CCl_3); 84,2 (C-3'); 83,0 (C-4'); 81,0 (C-2'); 79,2 (C-3''); 76,9 (C-2''); 76,4 (C-4); 75,6 (C-5'); 74,9 (OCH₂Ph); 74,7 (C-4''); 73,5 (OCH₂Ph); 73,4 (OCH₂Ph); 72,7 (OCH₂Ph); 69,43 (C-3); 69,38 (C-5''); 68,4 (C-6); 68,1 (C-6''); 67,9 (C-2); 66,6 (C-5); 65,6 (C-6''); 26,7 (CH_3); 25,5 (CH_3).

N-(Bencil)benciloxicarbonil-5-aminopentil 2,3,4,6-tetra-O-bencil- α -D-galactopiranosil-(1→3)-2-O-benzoíl-5,6-O-isopropilidén- β -D-galactofuranosil-(1→3)-4,6-O-bencilidén-2-O-benzoíl- α -D-manopiranósido (45)



A una suspensión de tricloroacetimidato de O-(2,3,4,6-tetra-O-bencil- α -D-galactopiranosil-(1→3)-2-O-benzoíl-5,6-O-isopropilidén- β -D-galactofuranosil-(1→3)-4,6-O-bencilidén- α -D-manopiranosilo) (**44**; 255 mg; 0,19 mmol), *N*-bencil-*N*-benciloxicarbonil-5-aminopentanol (**8**; 77 mg; 0,24 mmol), ambos secados previamente (destilación azeotrópica y secado en vacío a t.a.), y tamices moleculares de 4Å pulverizados (450 mg), en diclorometano anhídrico recién destilado (12,3 mL) enfriada a -40 °C bajo atmósfera de

Ar, se agregó triflato de trimetilsililo (4,1 μ L; 0,023 mmol). Luego de 15 min de agitación a -30 °C, el control por ccd mostró la desaparición del imidato de partida. La suspensión se neutralizó con TEA (3,8 μ L), se filtraron los tamices moleculares y la solución resultante se concentró a sequedad. El sólido obtenido se purificó por cromatografía *flash* en columna de sílica gel (tolueno/AcOEt 5:1) para dar **45** (262 mg; 91%) como un sólido amorfó blanco.

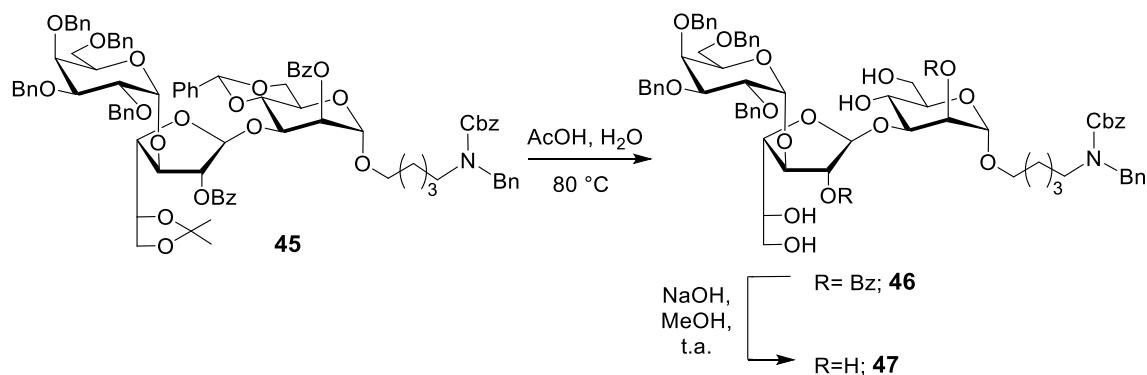
$[\alpha]_D^{20}$ -7,2 (c 1, CHCl₃); R_f 0,64 (tolueno/AcOEt 6:1); pf 50,7-52,2 °C.

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ de la mezcla de rotámeros: 8,18 – 7,11 (m, 45H, 2 x PhCO, 6 x PhCH₂, PhCH), 5,57 – 5,52 (m, 2H, H-2, PhCH), 5,48 (s, 1H, H-1'), 5,45 (d, J = 1,5 Hz, 1H, H-2'), 5,22 – 5,12 (m, 3H, H-1'', NCOOCH₂Ph), 4,92 – 4,84 (m, 1H, H-1), 4,80 (d, J = 11,3 Hz, 1H, OCH_aHPh), 4,70 (d, J = 11,7 Hz, 1H, OCH_aHPh), 4,57 – 4,47 (m, 4H, H-3, OCHH_bPh, NCH₂Ph), 4,42 – 4,35 (m, 2H, OCHH_bPh, OCH_aHPh), 4,30 (dd, J = 6,3; 5,6 Hz, 1H, H-4'), 4,26 (d, J = 11,8 Hz, 1H, OCHH_bPh), 4,22 (d, J = 11,5 Hz, 1H, OCH_aHPh), 4,15 – 4,06 (m, 3H, OCHH_bPh, H-6a, H-5'), 4,04 – 3,94 (m, 2H, H-5'', H-4), 3,93 – 3,79 (m, 4H, H-2'', H-3', H-5, H-6'a), 3,74 – 3,56 (m, 3H, H-4'', H-6'b, OCH_aHCH₂), 3,55 – 3,45 (m, 2H, H-6b, H-3''), 3,41 – 3,18 (m, 4H, OCHH_bCH₂, H-6''a, CH₂CH₂N), 3,15 (dd, J = 8,5; 5,0 Hz, 1H, H-6''b), 1,66 – 1,46 (m, 4H, CH₂ x 2), 1,39 (s, 3H, CH₃), 1,38 – 1,21 (m, 5H, CH₃, CH₂).

RMN ¹³C (101 MHz, CDCl₃): δ de la mezcla de rotámeros: 166,0 (COPh); 165,1 (COPh); 156,9/156,3 (NCOO); 139,2 - 126,2 (2 x PhCO, 6 x PhCH₂, PhCH); 110,0 (C(CH₃)₂); 102,6 (C-1'); 101,0 (PhCH); 99,1 (C-1); 98,0 (C-1''); 84,4 (C-3'); 83,3 (C-4'); 80,9 (C-2'); 79,2 (C-3''); 76,95 (C-4); 76,91 (C-2''); 75,8 (C-5'); 74,8 (OCH₂Ph); 74,7 (C-4''); 73,5 (OCH₂Ph); 73,3 (OCH₂Ph); 72,7 (OCH₂Ph); 69,5 (C-3); 69,4 (C-2); 69,3 (C-5''); 68,7 (C-6); 68,2 (OCH₂CH₂); 68,1 (C-6''); 67,3 (NCOOCH₂Ph); 65,5 (C-6'); 64,0 (C-5); 50,8/50,5 (NCH₂Ph); 47,3/46,4 (CH₂CH₂N); 29,2 (CH₂); 28,1/27,6 (CH₂); 26,7 (CH₃); 25,4 (CH₃); 23,5 (CH₂).

EMAR (ESI) m/z calculado para C₉₀H₉₅NO₂₀ [M+H]⁺: 1532,6345. Encontrado: 1532,6471.

N-(Bencil)benciloxicarbonil-5-aminopentil 2,3,4,6-tetra-O-bencil- α -D-galactopiranosil-(1→3)- β -D-galactofuranosil-(1→3)- α -D-manopiranósido (47)



A una solución de *N*-(bencil)benciloxicarbonil-5-aminopentil 2,3,4,6-tetra-O-bencil- α -D-galactopiranósil-(1 \rightarrow 3)-2-O-benzoíl-5,6-O-isopropilidén- β -D-galactofuranósil-(1 \rightarrow 3)-4,6-O-bencilidén-2-O-benzoíl- α -D-manopiranósido (**45**; 237 mg; 0,16 mmol) en ácido acético (2,8 mL) a 80 °C se agregó agua (0,9 mL) hasta turbidez. La agitación se mantuvo a 80 °C hasta que por ccd se observó conversión mayoritaria a un producto de R_f 0,49 (tolueno/AcOEt 1:2). La mezcla se concentró a presión reducida y se co-evaporó con tolueno (5 x 2,5 mL) para dar un sólido amorfó (200 mg). El producto mayoritario (>85%) en el crudo de reacción se identificó por RMN mono y bidimensional como *N*-(bencil)benciloxicarbonil-5-aminopentil 2,3,4,6-tetra-O-bencil- α -D-galactopiranósil-(1 \rightarrow 3)-2-O-benzoíl- β -D-galactofuranósil-(1 \rightarrow 3)-2-O-benzoíl- α -D-manopiranósido (**46**).

R_f 0,49 (tolueno/AcOEt 1:2).

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ de la mezcla de rotámeros: 8,36 – 6,98 (m, 40H, 2 x PhCO, 6 x PhCH₂), 5,47 (dd, J = 3,1; 1,8 Hz, 1H, H-2), 5,43 (sa, 1H, H-1'), 5,29 (sa, 1H, H-2'), 5,23 – 5,13 (m, 2H, NCOOCH₂Ph), 4,92 – 4,80 (m, 3H, H-1, H-1'', OCH_aHPh), 4,77 (d, J = 12,0 Hz, 1H, OCH_aHPh), 4,71 – 4,60 (m, 3H, OCH_aHPh, 2 x OCHH_bPh), 4,57 – 4,44 (m, 3H, NCH₂Ph, OCHH_bPh), 4,41 – 4,14 (m, 5H, H-4', OCH₂Ph, H-3', H-3), 4,03 – 3,77 (m, 7H, H-5'', H-4, H-2'', H-4'', H-3'', H-6a, H-6b), 3,76 – 3,53 (m, 5H, H-5, H-5', OCH_aHCH₂, H-6'a, H-6'b), 3,47 – 3,17 (m, 5H, H-6''a, H-6''b, OCHH_bCH₂, CH₂CH₂N), 1,70 – 1,45 (m, 4H, 2 x CH_2), 1,42 – 1,19 (m, 2H, CH_2).

RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ de la mezcla de rotámeros: 165,8 (COPh); 165,1 (COPh); 157,0/156,5 (NCOO); 138,7 - 127,5 (2 x PhCO, 6 x PhCH₂); 102,7 (C-1'); 97,9 (C-1); 97,7 (C-1''); 84,2/84,1 (C-4'); 81,9 (C-2'); 80,9/80,7 (C-3'); 79,2 (C-3''); 75,3 (C-2''); 74,8 (OCH₂Ph); 74,6 (C-4''); 74,0 (OCH₂Ph, C-3); 73,4 (OCH₂Ph); 72,7 (OCH₂Ph); 72,3/72,2 (C-5); 71,9 (C-5'); 70,0 (C-5''); 69,3 (C-2); 68,6 (C-6''); 67,9/67,7 (OCH₂CH₂); 67,4 (NCOOCH₂Ph); 67,0 (C-4); 63,6 (C-6'); 63,1 (C-6); 50,6/50,4 (NCH₂Ph); 47,3/46,1 (CH₂CH₂N); 29,1 (CH_2); 28,0/27,5 (CH_2); 23,5 (CH_2).

Una fracción del jarabe obtenido en el paso anterior (191 mg) se disolvió en metanol (1,3 mL) y se agregó una solución de NaOH 1M en metanol (0,26 mL). Luego de 2 h de agitación a temperatura ambiente, se observó la desaparición del compuesto de partida por ccd. La mezcla se pasó a través de una columna corta (1,5 cm x 3 cm, d. x alt.) de Amberlite IR120 H y el eluido se concentró a presión reducida. El producto crudo se co-evaporó con agua ultrapura (6 x 3 mL) y se purificó por cromatografía *flash* en columna de sílica gel ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 12:1) para dar **47** (114 mg; 65%) como un sólido amorfó blanco.

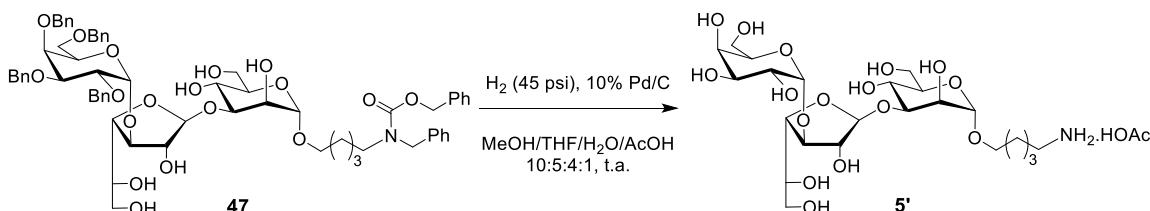
$[\alpha]_D^{20}$ +7,7 (c 1, CHCl_3); R_f 0,59 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 12:1).

RMN ^1H (400 MHz, MeOD) δ de la mezcla de rotámeros: 7,56 – 7,01 (m, 30H, 6 x PhCH_2), 5,22 – 5,10 (m, 2H, NCOOCH_2Ph), 5,06 (s, 1H, H-1'), 5,00 (d, $J = 3,5$ Hz, 1H, H-1''), 4,83 (d, $J = 11,3$ Hz, 1H, OCH_aHPh), 4,77 – 4,66 (m, 5H, 2 x OCH_2Ph , H-1), 4,56 – 4,47 (m, 4H, OCH_aHPh , OCHH_bPh , NCH_2Ph), 4,44 (d, $J = 11,9$ Hz, 1H, OCHH_bPh), 4,38 – 4,30 (m, 2H, H-2', H-4'), 4,22 – 4,15 (m, 1H, H-5''), 4,05 (dd, $J = 5,4, 2,8$ Hz, 1H, H-3'), 4,02 – 3,89 (m, 3H, H-4'', H-2'', H-3''), 3,88 – 3,43 (m, 12H), 3,42 – 3,19 (m, 3H, OCHH_bCH_2 , $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 1,67 – 1,40 (m, 4H, 2 x CH_2), 1,40 – 1,18 (m, 2H, CH_2).

RMN ^{13}C (101 MHz, MeOD) δ de la mezcla de rotámeros: 158,5/158,0 (NCOO); 140,1 – 128,4 (6 x PhCH_2); 106,9 (C-1'); 101,3 (C-1); 100,0 (C-1''); 86,8 (C-3'); 83,8 (C-4'); 80,5 (C-2'); 80,0 (C-3''); 77,9 (C-3); 77,2 (C-2''); 76,6 (C-4''); 75,9 (OCH_2Ph); 74,6 (C-5); 74,5 (OCH_2Ph); 74,3 (OCH_2Ph); 74,0 (OCH_2Ph); 72,6 (C-5'); 71,3 (C-5''); 70,6 (C-6''); 69,0 (C-2); 68,5 (NCOOCH₂Ph); 68,4 (OCH_2CH_2); 66,9 (C-4); 64,4 (C-6'); 63,1 (C-6); 51,6/51,4 (NCH_2Ph); 48,5/47,5 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$); 30,1 (CH_2); 29,0/28,5 (CH_2); 24,5 (CH_2).

EMAR (ESI) m/z calculado para $\text{C}_{66}\text{H}_{79}\text{NO}_{18}$ [M+Na]⁺: 1196,5195. Encontrado: 1196,5226.

Acetato de 5-aminopentil α -D-galactopiranosil-(1→3)- β -D-galactofuranosil-(1→3)- α -D-manopiranósido (5')



A una solución de *N*-(bencil)benciloxicarbonil-5-aminopentil 2,3,4,6-tetra-O-bencil- α -D-galactopiranosil-(1→3)- β -D-galactofuranosil-(1→3)- α -D-manopiranósido (**47**; 96 mg; 0,08 mmol) en una mezcla MeOH/THF/H₂O/AcOH 10:5:4:1 (16,7 mL), se agregó Pd/C 10% (135 mg). La mezcla se agitó en hidrogenador a 45 psi y temperatura ambiente por 3 días hasta que por ccd se observó conversión mayoritaria a un producto de R_f 0,5 (EtOH/H₂O/AcOH 7:1:1). La suspensión se filtró por lecho de celite y el filtrado se concentró, se co-evaporó con tolueno (6 x 5 mL) y se purificó por pasaje a través de un cartucho de EFS de fase reversa C8 (H₂O) para eliminar impurezas no polares. El producto obtenido se disolvió en agua ultrapura y se liofilizó para dar **5'** (51 mg; 98%) como un jarabe.

$[\alpha]_D^{20} +30,7$ (c 1, H₂O); R_f 0,5 (EtOH/H₂O/AcOH 7:1:1).

RMN ^1H (400 MHz, D₂O) δ : 5,15 (d, $J = 1,0$ Hz, 1H, H-1'), 5,06 (d, $J = 3,4$ Hz, 1H, H-1''), 4,89 (d, $J = 1,8$ Hz, 1H, H-1), 4,38 (dd, $J = 3,1; 1,5$ Hz, 1H, H-2'), 4,26 (dd, $J = 6,4; 3,9$ Hz, 1H, H-4'), 4,13 – 4,08 (m, 2H, H-2, H-5''), 4,06 (dd, $J = 6,4; 3,0$ Hz, 1H, H-3'), 4,00 – 3,98

Parte Experimental

(m, 1H, H-4''), 3,92 – 3,82 (m, 5H, H-5', H-6a, H-3, H-3'', H-2''), 3,82 – 3,61 (m, 8H, H-6b, H-6''a, H-6''b, OCH_aHCH_2 , H-6'a, H-6'b, H-4, H-5), 3,60 – 3,51 (m, 1H, OCHH_bCH_2), 3,04 – 2,97 (m, 2H, CH_2NH_2), 1,90 (s, 3H, CH_3COOH), 1,76 – 1,60 (m, 4H, 2 x CH_2), 1,55 – 1,38 (m, 2H, CH_2).

RMN ^{13}C (101 MHz, D_2O) δ : 105,3 (C-1'); 100,3 (C-1''); 100,1 (C-1); 85,5 (C-3'); 82,3 (C-4'); 80,2 (C-2'); 76,1 (C-3); 73,4 (C-5); 72,0 (C-5''); 71,4 (C-5'); 69,9 (C-4'', C-3''); 68,8 (C-2''); 68,1 (OCH_2CH_2); 67,5 (C-2); 65,7 (C-4); 63,5 (C-6'); 61,9 (C-6''); 61,6 (C-6); 40,0 (CH_2NH_2); 28,6 (CH_2); 27,2 (CH_2); 23,9 (CH_3COOH); 23,1 (CH_2).

EMAR (ESI) m/z calculado para $\text{C}_{70}\text{H}_{64}\text{O}_{21} [\text{M}+\text{Na}]^+$: 612,2479. Encontrado: 612,2482.

6.2. Materiales y métodos empleados en la evaluación de antigenicidad y desarrollo del glicobiosensor basado en los glicósidos 1-5 (Capítulos 4 y 5)

6.2.1. Sueros humanos utilizados

6.2.1.1. Leishmaniasis tegumentaria americana

Las muestras fueron provistas por el Dr. J. Diego Marco del Instituto de Patología Experimental (IPE), Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Nacional de Salta (Salta, Argentina). Se utilizaron 16 muestras de suero humano archivadas, provenientes de individuos residentes en el noroeste de Argentina, diagnosticados como positivos (8 muestras, “LTA +”) o negativos (8 muestras, “LTA -”) para leishmaniasis tegumentaria americana (LTA) por dos técnicas: ELISA con extractos solubles de amastigotes de *L. braziliensis*,^[95] y PCR (Tabla 6.1). Si bien las muestras empleadas en nuestros ensayos no fueron tipificadas para identificar la especie causante de la enfermedad, los sueros proceden de pacientes de una región donde aproximadamente el 90% de los casos de LC y LM corresponden a infecciones por *L. braziliensis*, según lo demostrado por el Dr. Marco.^[358,359] Las muestras “LTA +” fueron testeadas para enfermedad de Chagas por ELISA y resultaron negativas.

Para los ensayos de inmunorreactividad de los glicósidos sintéticos por microarreglo de glicanos se utilizaron, por un lado, los sueros individuales y, por otro lado, pools de los sueros positivos ($n = 8$, “Pool LTA +”) y de los sueros negativos ($n = 8$, “Pool LTA -”). Asimismo, estos pools se emplearon en los ensayos de detección de anticuerpos por EIS y QCM-D.

6.2.1.2. Enfermedad de Chagas

Las muestras fueron provistas por el Lic. Germán Astudillo del Depto. de Parasitología Hospital de Enfermedades Infecciosas Francisco Javier Muñiz (Buenos Aires, Argentina). Se utilizaron 20 muestras de suero humano archivadas, provenientes de individuos residentes en Argentina diagnosticados como positivos (10 muestras) o negativos (10 muestras) para la enfermedad de Chagas (“Ch”) por las siguientes técnicas: inmunoensayo quimioluminiscente de micropartículas (CMIA), Architect, Abbott (Alemania); enzimo-inmunoanálisis de adsorción (ELISA), ELISA recombinante v.3.0, Wiener (Argentina); y hemoaglutinación indirecta (HAI), HIDATEST, Laboratorio Lemos S.R.L. (Argentina).

A partir de los sueros individuales se prepararon poolés de sueros positivos ($n = 10$, “Pool Ch +”) y negativos ($n = 10$, “Pool Ch -”) para la enfermedad de Chagas, que se utilizaron en los ensayos de inmunorreactividad por microarreglo de glicanos.

Tabla 6.1. Descripción del estado de salud de los pacientes humanos infectados y no infectados con *Leishmania* y resultados de los ensayos de diagnóstico por ELISA y PCR realizados a los sueros.

Código de muestra	Fecha	Cod. Interno	Sexo	Edad	K-PCR	ELISA		
						DO	DO/CO	Resultado
“LTA - #1”	9/6/2023	9994	F	28	negativo	0,020	0,118	negativo
“LTA - #2”	2/15/2024	10075	M	54	negativo	0,027	0,176	negativo
“LTA - #3”	4/7/2022	10076	F	25	negativo	0,028	0,165	negativo
“LTA - #4”	10/30/2024	10122	M	65	negativo	0,044	0,208	negativo
“LTA - #5”	11/9/2023	10131	M	46	negativo	0,020	0,126	negativo
“LTA - #6”	11/16/2023	10177	M	51	negativo	0,062	0,208	negativo
“LTA - #7”	11/25/2023	10195	M	38	negativo	0,027	0,147	negativo
“LTA - #8”	12/19/2023	10210	F	30	negativo	0,047	0,272	negativo
“LTA + #1”	11/3/2000	1257	M	24	positivo	3,121	3,430	positivo
“LTA + #2”	10/10/2001	1406	M	53	positivo	0,680	3,887	positivo
“LTA + #3”	10/16/2001	1409	F	49	positivo	0,982	2,230	positivo
“LTA + #4”	11/26/2001	1439	M	28	positivo	1,507	1,650	positivo
“LTA + #5”	7/5/2002	1857	M	18	positivo	2,954	2,390	positivo
“LTA + #6”	8/14/2002	1861	M	39	positivo	3,645	4,000	positivo
“LTA + #7”	9/9/2002	2019	F	21	positivo	2,168	2,380	positivo
“LTA + #8”	5/9/2001	3288	M	29	positivo	2,362	2,340	positivo

“LTA -”: pacientes diagnosticados como negativos para LTA, “LTA +”: pacientes diagnosticados como positivos para LTA; K-PCR: *kinetoplast DNA-PCR*^[360]; DO: densidad óptica promedio; CO: valor de corte (*cut-off*).

6.2.2. Ensayos de reconocimiento por microarreglo de glicanos de anticuerpos séricos de pacientes con LTA y enfermedad de Chagas

Los experimentos detallados en esta sección fueron realizados durante una pasantía en el Laboratorio de Glicobiología y Desarrollo de Vacunas del *Max Planck Institute of Colloids and Interfaces*, liderado por el Prof. Dr. Peter Seeberger. Todos los protocolos fueron realizados en conjunto con Emelie Reuber (M.Sc.) y Fabienne Weber (M.Sc.), estudiantes de doctorado del grupo.

6.2.2.1. Preparación de los microarreglos. Anclaje de los glicósidos

El primer paso para la preparación de los microarreglos consistió en el acoplamiento de los oligosacáridos sobre tres placas de vidrio de hidrogel activadas con NHS (NEXTERION® 3-D Hydrogel, Schott). Previo a la impresión de las microplacas se

efectuaron diluciones en buffer fosfato 50 mM (pH 8,5) (buffer de impresión o *printing buffer*, “PB”) de:

- Oligosacáridos **1** a **5** en concentración 0,1 mM
- El trímero Rha- α -(1 \rightarrow 2)-Rha- α -(1 \rightarrow 2)-Rha- α -(1 \rightarrow 1)aminopentanol^[361] (“Rha”) en concentración 0,1 mM
- Inmunoglobulinas G, M y A (Human IgG-UNLB #0150-01, Human IgM Lambda-UNLB, #0158L-01, Human IgA Lambda-UNLB #0155L-01, *Southern Biotech*) en concentración 100 μ g/mL.

Utilizando una plataforma robótica de impresión piezoeléctrica sin contacto sciFLEXARRAYER S12 (Scienion, Berlín, Figura 6.1), las muestras se sembraron de forma automatizada sobre las placas. El proceso de siembra de las muestras está estandarizado y requiere de alta precisión, ya que las gotas (*spots*) se ubican muy cerca y, de no haber un control estricto de su dispensado, estas pueden superponerse o dar patrones irregulares. Entonces, previo al sembrado el equipo realiza las siguientes operaciones: lavado del dispensador (véase Figura 6.1), toma de la muestra, lavado del exterior del dispensador y calibración del tamaño y forma de la gota eyectada. La descripción detallada de este proceso es compleja y escapa al alcance de esta tesis, por lo que a modo ilustrativo se sugiere consultar el material audiovisual de la empresa GeSiM sobre su producto Nanoplotter Microarray Printer (ver minutos 1:40 a 2:20).^[362] En este caso, si bien el formato y tamaño del equipo es distinto, el proceso de siembra es idéntico.



Figura 6.1. (Izq) Imagen del sciFLEXARRAYER S12 (Scienion, Berlín) utilizado para la fabricación de los microarreglos. (Der) Imagen de los dispensadores de muestra ubicados en el interior del equipo.

Para la fabricación de los microarreglos, las muestras se sembraron siguiendo el patrón de la Figura 6.2.B. Este patrón se imprimió 64 veces sobre la placa formando una grilla de 4x16 campos idénticos. La disposición resultante se esquematiza en la Figura 6.2.A. En cada campo se incluyeron, además de los glicanos **1-5**, un trímero de ramnosa

("Rha") utilizado como control positivo, posiciones sin azúcar tratadas solo con buffer de impresión "PB" como control negativo, y las inmunoglobulinas comerciales IgG, IgM e IgA, utilizadas como controles de isotipo. A excepción de las inmunoglobulinas, todas las muestras se sembraron por triplicado.

Una vez sembradas, las placas se incubaron en cámara húmeda a temperatura ambiente por 20 h para completar la reacción de acoplamiento. Luego, las placas se sumergieron en una solución de etanolamina 100 mM en buffer fosfato 0,1 M (pH 9) para bloquear los grupos NHS sin reaccionar. Luego de 1 h en reposo a t.a., se lavaron 3 veces por inmersión en una cuba con ddH₂O y se secaron por centrifugación (5 min, 300 xg).

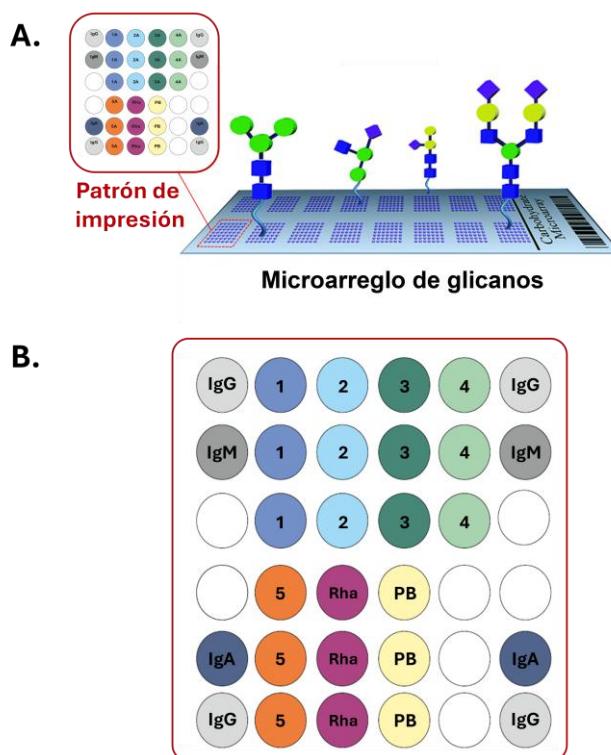


Figura 6.2. (A) Imagen esquemática del diseño del microarreglo. Allí se observa la posición de los compuestos anclados, sembrados según el patrón de impresión elegido, en 64 campos idénticos conformando una grilla de 4 x 16 posiciones. (B) Detalle del patrón de impresión utilizado para la siembra de los glicósidos 1 a 5 y de los controles: de isotipo ("IgG", "IgM" e "IgA"), negativo sin azúcar (buffer de impresión, "PB"), y positivo ("Rha").

6.2.2.2. Incubación con los sueros

Una vez sembrados los glicósidos 1-5, las microplacas se incubaron a temperatura ambiente por 1 h dentro de una cuba rellena con buffer de bloqueo (solución de BSA 1% (m/v) en PBS 1x). Luego, dentro de la cuba, se lavaron 2 veces con PBS 1x y 1 vez con ddH₂O, se retiraron y se secaron por centrifugación (5 min, 300 xg).

Se prepararon diluciones 1:100 en buffer de bloqueo de: ocho sueros individuales positivos para LTA (“LTA +”), ocho sueros individuales negativos para LTA (“LTA -”), pools ($n = 8$) “Pool LTA +” y “Pool LTA -”, y pools ($n = 10$) “Pool Ch +” y “Pool Ch -”.

Previo a la incubación con las muestras, se colocaron grillas de incubación de silicona (FlexWell Grid, *Grace Bio Labs*) sobre las placas. Estas grillas se utilizan para delimitar los campos sembrados previamente, conformando “pocillos” tal como se observa en la Figura 6.3. Luego, se colocaron 25 μ L de solución de suero dentro de cada “pocillo”, de acuerdo a la Figura 6.4 y el sistema se incubó por 1 h a 37 °C en cámara húmeda. Todas las muestras, tanto de pacientes individuales (“LTA +” y “LTA -”) como los pools (“Pool LTA +”, “Pool LTA -”, “Pool Ch +” y “Pool Ch -”), se testearon por duplicado. Dado que la totalidad de los ensayos no podía realizarse en una única placa por escasez de “pocillos”, para generar los duplicados se adoptó el siguiente protocolo: dos placas se trataron según la Figura 6.4.A y una placa según la Figura 6.4.B.

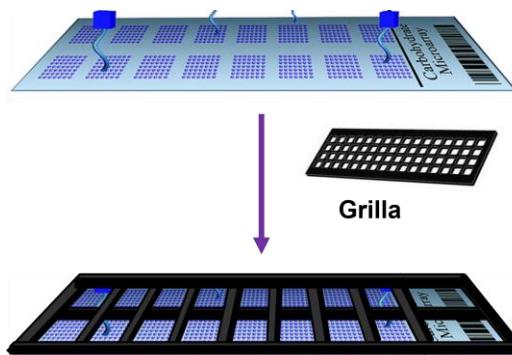


Figura 6.3. Representación esquemática de la forma de colocación de la grilla de silicona sobre la microplaca, previo a la incubación con los sueros. La grilla permite delimitar los campos conformando “pocillos”.

6.2.2.3. Incubación con anticuerpos secundarios y detección de fluorescencia

Habiendo concluido la incubación con los sueros, los “pocillos” se lavaron 3 veces con 25 μ L de PBS-T (PBS 1x + Tween-20 0.1% (v/v)). Luego, se colocaron 25 μ L de una dilución 1:400 en buffer de bloqueo de anticuerpos secundarios fluorescentes específicos para IgG, IgM o IgA (Goat anti-Human IgM, Alexa Fluor 488, *Invitrogen*; Goat Anti-Human IgG Fc-AF647, *Southern Biotech*; Goat Anti-Human IgA-FITC, *Southern Biotech*) de acuerdo a la Figura 6.4, y las placas se incubaron por 1 hora a 37 °C en cámara húmeda. Luego, se realizaron lavados con PBS-T (2 x 25 μ L), se retiraron las grillas, y se realizaron 2 lavados por inmersión en PBS 1x y un lavado por inmersión en ddH₂O. Por último, las placas se secaron por centrifugación (5 min, 300 xg) y se realizó la lectura de fluorescencia a 488 (para visualizar las señales de anticuerpos anti-IgM y anti-IgA) y 635

nm (para visualizar anti-IgG), utilizando un escáner de microarreglos InnoScan 1100 AL (*Innopsys*). El voltaje del fotomultiplicador se ajustó para evitar la sobresaturación de las señales.

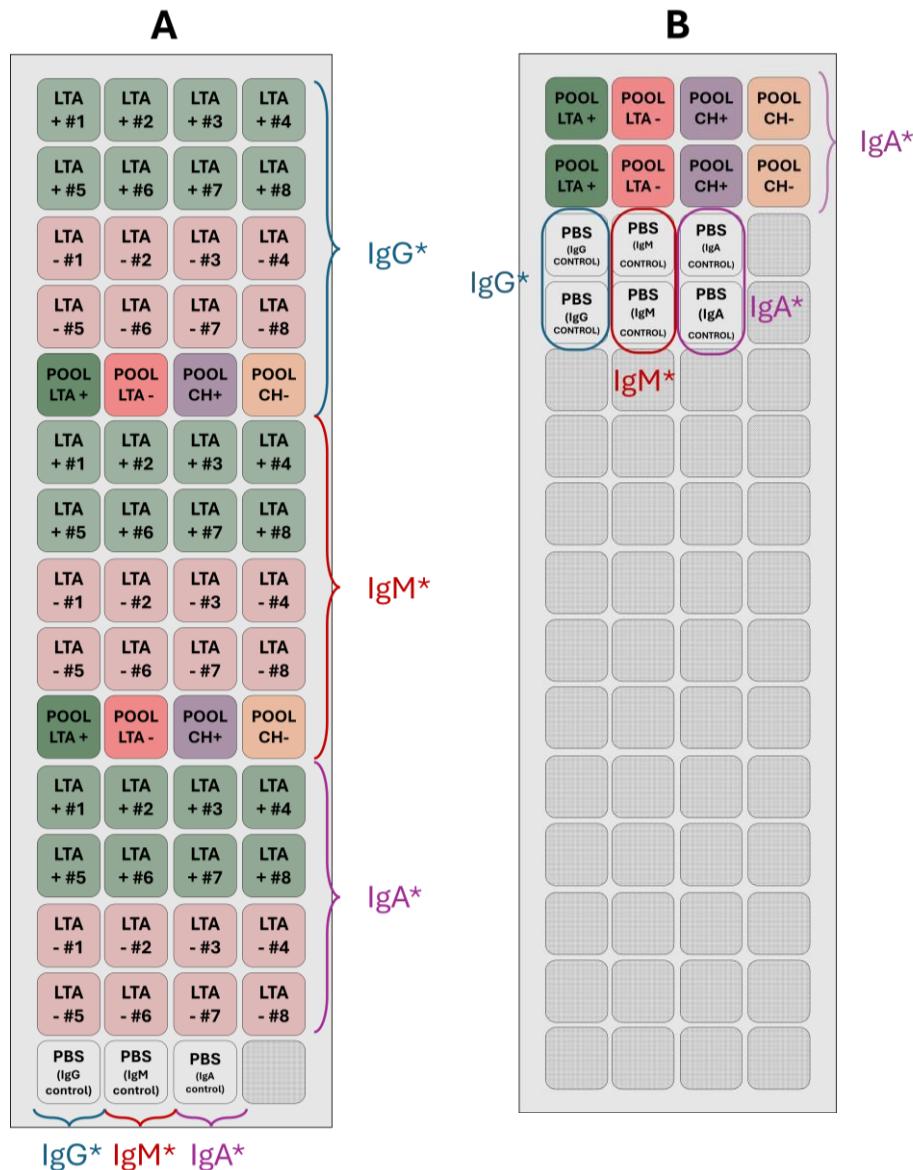


Figura 6.4. Esquema de incubación de las placas A (izq.) y B (der.) con las muestras de suero (dil. 1:100 en 1% BSA-PBS) y anticuerpos secundarios (Ig*, dil. 1:400 en 1% BSA-PBS). La placa A se realizó por duplicado. Cada recuadro corresponde a un “pocillo” de la grilla colocada sobre la placa. Cada “pocillo” contiene los compuestos sembrados según el patrón de impresión (ver Figura 6.2.B). Las posiciones punteadas no fueron utilizadas.

“LTA + / -” = Suero individual positivo o negativo para LTA; “Pool LTA + / -” = Pool de sueros positivos o negativos para LTA ($n = 8$); “Pool Ch + / -” = Pool de sueros positivos o negativos para enfermedad de Chagas ($n = 10$). “IgG*”= IgG anti-humano-AF647; “IgM*”= IgM anti-humano-Alexa Fluor 488; “IgA*”= IgA anti-humano-FITC.

6.2.2.4. Análisis de datos

Una vez obtenidos los datos de fluorescencia, para el análisis de las imágenes y cuantificación de la intensidad de fluorescencia media de cada punto se utilizó el software Mapix (*Innopsys*). Dado que todos los valores se obtuvieron por duplicado, para el análisis de los resultados se utilizó aquel *set* de datos que presentó valores mayores de fluorescencia.

Los datos de intensidad de fluorescencia media en función de la muestra sembrada (glicano o control) se graficaron utilizando el software GraphPad Prism 10.4.0 (*GraphPad Software, Inc.*). El mismo software se utilizó para determinar si existían diferencias significativas en los niveles de anticuerpos anti-glicanos entre los grupos de sueros infectados (“LTA +”) y no infectados (“LTA -”). Para ello se utilizó el test múltiple de Mann-Whitney.

En la Sección A1 del Apéndice se presentan, de forma complementaria a las figuras del Capítulo 4, los gráficos de intensidad de fluorescencia media de todos los ensayos, incorporando también los datos obtenidos para los controles.

6.2.3. Desarrollo del glicobiosensor impedimétrico para la detección de anticuerpos en sueros de pacientes con LTA

Los experimentos detallados en esta sección se realizaron en el Instituto de Química Física de los Materiales, Medio Ambiente y Energía (INQUIMAE-CONICET).

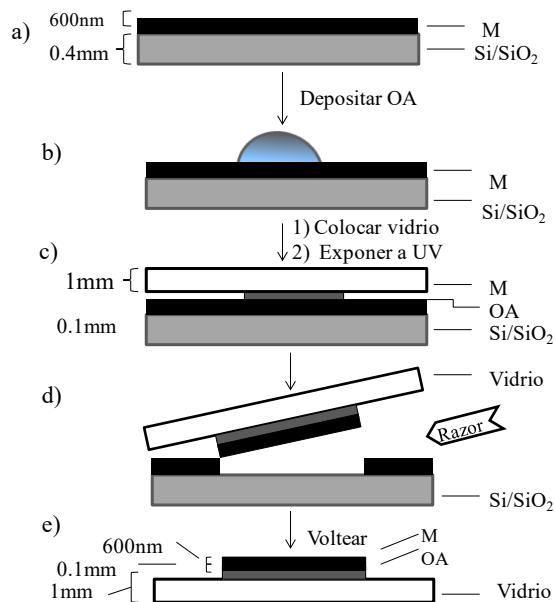
6.2.3.1. Preparación de electrodos de Au policristalino

Los electrodos de Au policristalino utilizados en esta tesis estaban compuestos de una película de oro ultraplana (rugosidad media determinada por AFM de 0,5 nm) adherida sobre un soporte de vidrio. Los sustratos se prepararon en el laboratorio según el procedimiento descrito por Weiss E. A. *et al.* (Esquema 6.1),^[363] utilizando una superficie de Si/SiO₂ como molde para obtener una película de oro extremadamente plana.

Se partió de una oblea de Si/SiO₂ la cual se limpió por inmersión en etanol y luego en acetona, y se secó bajo corriente de N₂. Utilizando una evaporadora de metales (Edwards - Auto 306), se depositó sobre la misma una película de oro de 600 nm de espesor, para prevenir la formación de grietas o microporos. Luego, sobre la película de oro se esparció una fina capa de un adhesivo óptico (“OA”, Norland Optical Adhesive 61) y, por encima, una lámina de vidrio, que había sido previamente enjuagada con etanol y acetona y secada con una corriente de N₂. Posteriormente, el sistema se expuso a luz UV (254 nm, lámpara UVP-UVLS-28, 8 W) durante 8 h procurando que la luz incidiera de manera directa del lado del vidrio. Por último, con ayuda de una trincheta se erosionó la

interfaz entre la película de oro y la plantilla de Si/SiO₂ para, finalmente, movilizar el vidrio y exponer la superficie metálica (Figura 6.5).

Los electrodos de oro policristalino obtenidos en el laboratorio fueron utilizados en la caracterización superficial por AFM, CV y EIS y en los ensayos electroquímicos para evaluación de la respuesta del sensor a interacciones inespecíficas con plasma de conejo, y específicas con anticuerpos en sueros infectados.



Esquema 6.1. Esquema de preparación de electrodos de oro evaporado sobre soporte de vidrio: (a) deposición del oro (M) sobre el sustrato de Si/SiO₂ mediante evaporación con haz de electrones; (b) colocación del adhesivo óptico (OA) sobre la superficie metálica; (c) colocación de la lámina de vidrio y fijación por exposición a luz UV; (d y e) desmolde manual para separar el sistema vidrio/OA/oro del sustrato de Si/SiO₂. Imagen adaptada de Weiss E. A. et al.^[363] *Razor*=trincheta.

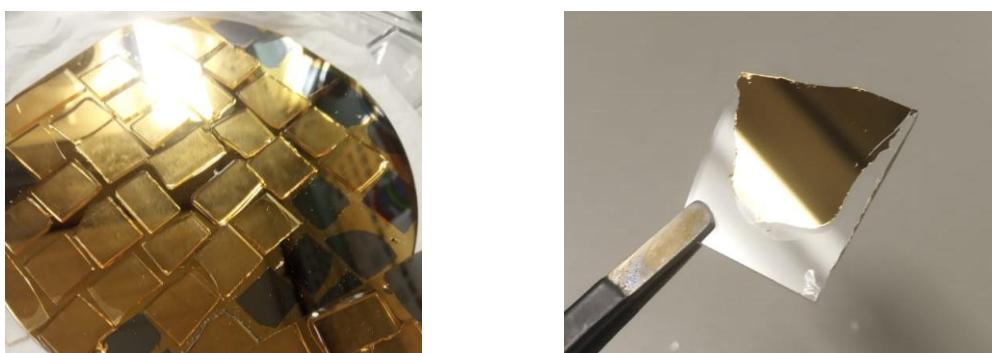


Figura 6.5. (Izq.) Imagen del sistema vidrio/OA/oro/Si/SiO₂ tomada previo al desmolde. (Der.) Imagen de la película de oro policristalino obtenida luego del desmolde.

6.2.3.2. Procedimiento general de acoplamiento de los glicósidos sintéticos

Para la funcionalización de superficies de oro con los azúcares sintéticos se aplicó una secuencia de reacciones, que se presentan en el Esquema 5.1 (Capítulo 5, Página 134). En todos los casos, los lavados de la superficie y la preparación de las diluciones acuosas se realizaron con agua ultrapura (18MΩ).

Paso 1: La superficie de Au se puso en contacto con una mezcla de soluciones 1 mM de ácido 11-mercaptoundecanoico (11-MUA) y 1 mM de 6-mercaptophexanol (MH) en etanol absoluto. La composición de la mezcla se detalla en cada experimento. El sistema se mantuvo en reposo por 15 min a t.a., se lavó con abundante etanol absoluto y se secó bajo corriente de N₂ (Paso 1, Esquema 5.1). En esta tesis, la superficie resultante se denominó “Au-SAM”.

Paso 2: Los ácidos carboxílicos expuestos sobre la superficie se activaron utilizando una mezcla 1:1 de soluciones acuosas 200 mM de EDC y 50 mM de NHS. La mezcla se puso en contacto con la superficie, se dejó en reposo por 20 min a t.a. y se lavó con abundante agua (Paso 2, Esquema 5.1). En esta tesis, la superficie resultante se denominó “Au-SAM-NHS”.

Paso 3: La superficie se puso en contacto con una solución acuosa 0,5 mM del 5-aminopentil glicósido elegido (**1-5**). Luego de 1,5 h en reposo a t.a., la superficie se lavó con abundante agua (Paso 3, Esquema 5.1). En esta tesis, la superficie resultante se denominó “Au-SAM-1” (cuando se funcionalizó con el glicósido **1**).

En aquellos casos en los que se especifica, se aplicó un último paso consistente del bloqueo de los grupos carboxilo sin reaccionar.

Paso 4: La superficie se incubó con una solución acuosa 1 M de etanolamina (EA) por 30 min a t.a., se lavó con abundante agua y se secó con corriente de N₂ (Esquema 5.2, Página 141). En esta tesis, la superficie resultante se denominó “Au-SAM-1/EA” (cuando se funcionalizó con el glicósido **1**).

6.2.3.3. Caracterización de superficies funcionalizadas

Espectroscopía fotoelectrónica de rayos X (XPS)

Los espectros XPS fueron tomados en el Laboratorio de Química de Superficies del INQUIMAE-CONICET con la asistencia del Dr. Federico J. Williams.

Equipamiento y condiciones de medición empleadas:

La Figura 6.6 muestra la cámara de ultra alto vacío utilizada. Las muestras se ingresaron a través de la precámara y se transfirieron hacia la cámara de análisis cuando

la presión en la precámara estaba por debajo de 5×10^{-7} mbar. El equipo utilizado contaba con: un analizador hemisférico de 150 mm de radio, un detector de 9 canales, y una fuente de rayos X monocromática de Al $\text{K}\alpha$ operada a 15 kV y 20 mA. Los fotoelectrones fueron detectados con un ángulo de 20° respecto a la normal de la superficie. Los espectros obtenidos se procesaron e integraron utilizando el software CasaXPS (Casa Software Ltd.). Las energías de unión se referenciaron a la señal de Au 4f_{7/2} a 84 eV y se analizaron las regiones características de S 2p, N 1s, C 1s, O 1s y Au 4f.

Cuando en los espectros XPS se observaron desviaciones por acumulación de carga superficial, se utilizó una *flood gun* (cañón de compensación de carga) para neutralizar la carga durante la adquisición y evitar distorsiones en la medición.

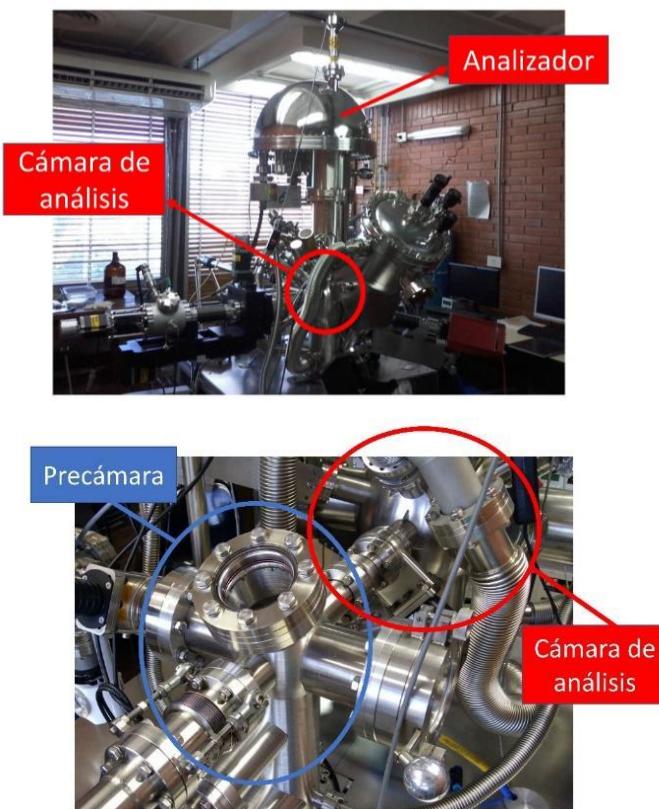


Figura 6.6. Espectrofotómetro de rayos X empleado (Laboratorio de Química de Superficies-INQUIMAE).

Preparación de las superficies:

En este caso se emplearon sustratos comerciales de Au policristalino sobre vidrio porque, dada la alta sensibilidad del XPS a contaminantes y variaciones topográficas, ofrecen pureza certificada y reproducibilidad interlote superiores a las películas obtenidas por desmolde desde Si/SiO₂. Previo a su funcionalización, las mismas se trataron con ozono y luz UV (PSD Pro Series – Digital UV Ozone System) por 15 min para eliminar la

materia orgánica adherida. En este caso, para la funcionalización con los 5-aminopentil glicósidos, no se empleó una SAM mixta sino una SAM “simple” compuesta por MUA.

Las tres superficies (A, B y C) se trataron de la siguiente manera:

A- “Au-SAM”: La superficie se trató únicamente con MUA de acuerdo con el Paso 1 del *procedimiento general de acoplamiento*.

B- “Au-SAM-1”: La superficie se funcionalizó con el glicósido **1** a través de una SAM de MUA, siguiendo los Pasos 1 a 3 del *procedimiento general de acoplamiento*. Por último, para asegurar que la superficie no contuviera ésteres de NHS sin reaccionar, la superficie se puso en contacto con una solución acuosa 10 mM de bicarbonato de potasio que se llevó a pH 9,5 con unas gotas de KOH 0,1 M. El sistema se mantuvo en reposo por 15 min, se lavó con abundante agua y se secó con corriente de N₂.

C- “Au-SAM-5”: Se aplicó el procedimiento descripto en el ítem B con la diferencia de que la superficie se funcionalizó con el glicósido **5** en lugar de **1**.

Microscopías AFM y STM

Las mediciones se realizaron en el INQUIMAE-CONICET con la asistencia del Dr. Santiago E. Herrera.

Equipamiento y condiciones de medición empleadas:

El equipo utilizado fue un Agilent SPM 5500. Para la microscopía de efecto túnel (STM) se empleó un *scanner* N9501-A con 1 μm de ventana (Figura 6.7).



Figura 6.7. Scanner N9501-A de STM.

Para la microscopía de fuerza atómica (AFM) se utilizaron: un *scanner* multipropósito N9521-A con láser incluido, un cono de nariz estándar donde se colocan las puntas de modo contacto, un cono de nariz de 12° de inclinación para los modos acústicos y un módulo MAC para el control de la oscilación del cantiléver (Figura 6.8).

Para la calibración en el eje z se utilizó un promedio de alturas de escalones de una superficie de Au(111), mientras que para la calibración en xy se utilizaron grillas microscópicas rectangulares de tipo comercial. Cada grilla posee una especificación de

las distancias exactas entre los laterales de la cuadrícula. En esta tesis las imágenes AFM se tomaron empleando únicamente el modo de contacto intermitente (*tapping*).

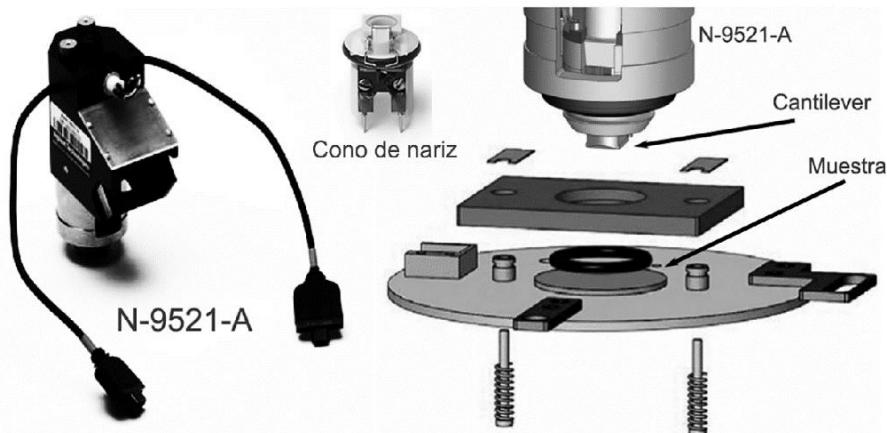


Figura 6.8. (Izq.) Scanner N9521-A de AFM. (Der.) Componentes del AFM Agilent 5500.

Preparación de las superficies y protocolo de medición:

Para los experimentos de AFM se empleó como sustrato una superficie de Au policristalino sobre vidrio obtenida en el laboratorio mediante la técnica de desmolde en plantilla de Si/SiO₂. La superficie se funcionalizó con el glicósido 1 por medio de una SAM mixta de tioles MUA/MH en relación 1:2 siguiendo los pasos 1 a 3 del *procedimiento general de acoplamiento*.

Se tomaron imágenes de la superficie: (a) sin tratar (Au) y, (b) al finalizar el Paso 3 del *procedimiento general de acoplamiento* (“Au-SAM-1”). Luego, las imágenes se procesaron utilizando el software *Gwyddion*. La rugosidad media se calculó a partir del área total de las imágenes, aplicando la herramienta *Statistical Quantities* (descriptor *Mean roughness*).

Para los experimentos de STM se empleó como sustrato un monocrystal de Au(111) comercial MaTeK en forma de medalla circular de 1 cm de diámetro. La superficie se acondicionó por flameado con una llama de H₂ durante 2-5 min para eliminar la materia orgánica adherida. Luego, se funcionalizó con el glicósido 1 por medio de una SAM mixta de tioles MUA/MH en relación 1:2, de acuerdo con los pasos 1 a 3 del *procedimiento general de acoplamiento*.

Se tomaron imágenes en aire de la superficie: (a) sin tratar (Au), (b) al finalizar el Paso 1 (“Au-SAM”), y (c) al finalizar el Paso 3 (“Au-SAM-1”) del *procedimiento general de acoplamiento*. Luego, las imágenes se procesaron utilizando el software *Gwyddion*.

Técnicas electroquímicas: Voltametría cíclica (CV) y espectroscopía de impedancia electroquímica (EIS)

Los ensayos se realizaron en el Laboratorio de Electroquímica Molecular del INQUIMAE-CONICET bajo la supervisión del Dr. Santiago E. Herrera.

Equipamiento y condiciones de medición empleadas:

Se empleó un potenciómetro/galvanómetro Autolab V 30 (*Eco Chemie*, Utrecht, Holanda) controlado a través del software NOVA 2.0 (*Metrohm*). Para su medición, los electrodos se colocaron en una celda de teflón de 5 mL con orificio de 8 mm como la que se muestra en la Figura 6.9. Las mediciones se efectuaron a temperatura ambiente con un sistema de tres electrodos. Como contraelectrodo se utilizó una malla de Pt, flameada con un mechero de gas butano previo a su uso para eliminar cualquier residuo orgánico adherido. Se utilizó como referencia un electrodo de Ag/AgCl (0,196 V vs ENH, saturado en KCl) fabricado en el laboratorio.

Tanto en EIS como en las voltametrías se utilizó como electrolito soporte una solución acuosa que contenía 5 mM $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ (mezcla 1:1) y KNO_3 0,1 M. Inmediatamente después de su preparación, esta solución se burbujeó con N_2 para desplazar el O_2 disuelto y la mezcla se mantuvo bajo atmósfera de N_2 hasta su utilización.

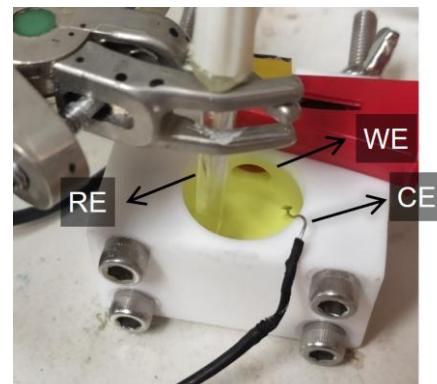
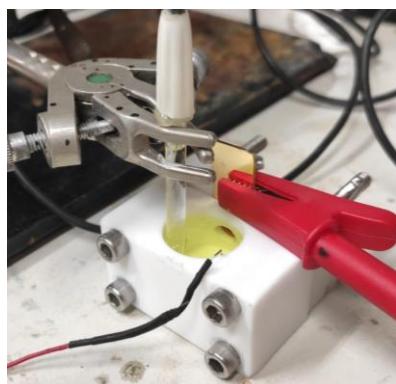


Figura 6.9. Celda de teflón y sistema de tres electrodos empleados para el estudio electroquímico de un electrodo plano de oro funcionalizado con 5-aminopentil glicósidos. En las imágenes se indican los electrodos involucrados: trabajo (“WE”), referencia (“RE”) y contra (“CE”).

Los voltámetros se tomaron aplicando un potencial de barrido entre 0 y 0,6 V por 2 o 3 ciclos a una velocidad de 20 mV/seg. Los experimentos de EIS se midieron al potencial de circuito abierto respecto del electrodo de Ag/AgCl. Se aplicó un potencial alterno con una amplitud de 10 mV en el rango de frecuencias entre 0,75 Hz y 50 kHz. Para cada superficie se tomaron tres espectros de impedancia sucesivos.

Procesamiento de los espectros de impedancia:

Las curvas de Nyquist obtenidas se ajustaron a través del circuito de Randles donde el capacitor de doble capa fue reemplazado por un elemento de fase constante (CPE, Figura 6.10). Los parámetros del ajuste (R_s , R_{tc} , CPE y n) se obtuvieron utilizando el software ZView 4 (Scribner Associates Inc.). Dado que se registraron tres espectros de impedancia de cada superficie, para comparar los resultados se utilizaron los valores medios de los parámetros ajustados. En el Apéndice (Sección A2) se incluyen los datos crudos junto con los valores medios y desvíos estándar de R_s , R_{tc} y CPE.

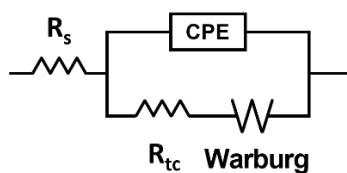


Figura 6.10. Circuito equivalente utilizado para ajustar las curvas de Nyquist.

Preparación de las superficies:

Se utilizaron electrodos de Au policristalino obtenidos en el laboratorio mediante la técnica de desmolde en plantilla de Si/SiO₂.

I. Acondicionamiento previo:

En primer lugar, se realizó una limpieza electroquímica de la superficie para remover la materia orgánica adherida. Para ello, el electrodo se colocó en una celda de teflón (ver Figura 6.9) y se cicló utilizando ácido sulfúrico 2 M como electrolito soporte por 50 o 100 ciclos entre -0,4 y 1,8 V a una velocidad de barrido de 500 mV/seg hasta obtener la voltamperometría cíclica típica del oro limpio (Figura 6.11). Luego, para la funcionalización de los electrodos con el glicósido deseado, tanto las incubaciones como los lavados intermedios se realizaron dentro de la celda de teflón.

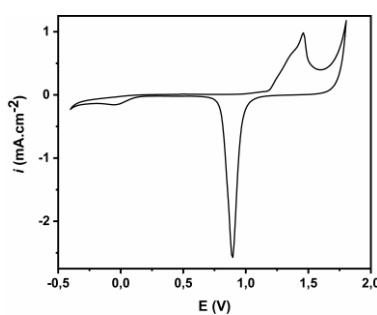


Figura 6.11. Voltametría cíclica típica de Au policristalino en H₂SO₄ 2 M a 0,5 V/seg.

II. Funcionalización con el 5-aminopentil glicósido:

En los ensayos de caracterización electroquímica de electrodos modificados, el sustrato de Au policristalino se funcionalizó con el glicósido **1** por medio de una SAM mixta de tioles MUA/MH en relación 1:10, siguiendo los pasos 1 a 4 del *procedimiento general de acoplamiento*.

6.2.4. Ensayos de respuesta del glicobiosensor a muestras biológicas

6.2.4.1. Respuesta del sensor a una matriz biológica compleja por EIS – Estudio de interacciones inespecíficas

Los ensayos se realizaron en el Laboratorio de Electroquímica Molecular del INQUIMAE-CONICET bajo la supervisión del Dr. Santiago E. Herrera.

Un electrodo de oro policristalino se funcionalizó con el glicósido **1** por medio de una SAM mixta de tioles MUA/MH en relación 1:10. La superficie se acondicionó según el protocolo descripto en la Sección 6.2.3.3 (apartado “Técnicas electroquímicas”), y la funcionalización se realizó siguiendo los pasos 1 a 4 del *procedimiento general de acoplamiento*. Una vez finalizada la modificación superficial, se midió el espectro de impedancia del sistema, a partir del cual se determinó el valor de la resistencia a la transferencia de carga del electrodo antes de la exposición a la muestra ($R_{tc,0}$).

Se prepararon ocho diluciones acuosas de plasma de conejo con EDTA comercial (*Biokar Diagnostics*): 1:128, 1:256, 1:512, 1:1024, 1:2048, 1:3072, 1:4096 y 1:5120.

La celda con el electrodo funcionalizado con **1** se lavó con abundante agua y el electrodo se incubó a t.a. por 20 min con la dilución 1:5120 del plasma de conejo. Pasado ese tiempo, el electrodo se lavó con agua y se midió el espectro de impedancia del sistema. El procedimiento se repitió con las diluciones restantes, desde 1:4096 hasta 1:128, de menor a mayor concentración de plasma, registrando el espectro de impedancia luego de cada incubación.

Los espectros de impedancia obtenidos se ajustaron utilizando el circuito de Randles (Figura 6.10) para obtener los valores de R_{tc} de la superficie luego de la exposición a la dilución de plasma correspondiente. Dado que se registraron tres espectros de impedancia de cada condición, para comparar los resultados se utilizaron los valores medios de los parámetros ajustados (\bar{R}_{tc}), a partir de los cuales se calcularon los cocientes $R_{tc}/R_{tc,0}$, que se graficaron en función de la dilución ensayada. El desvío estándar del cociente $R_{tc}/R_{tc,0}$ se calculó según:

$$\sigma_{R/R_0} \approx \frac{\sigma_{R_{tc}}}{\bar{R}_{tc,0}}$$

Donde $\bar{R}_{tc,0}$ es el valor promedio de $R_{tc,0}$ y $\sigma_{R_{tc}}$ el desvío estándar de R_{tc} para cada dilución ensayada.

El equipamiento y las condiciones de medición de los espectros de impedancia se corresponden con los descriptos en el apartado “Técnicas electroquímicas” de la Sección 6.2.3.3.

6.2.4.2. Respuesta del sensor a sueros humanos por EIS

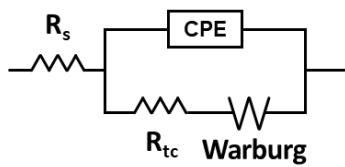
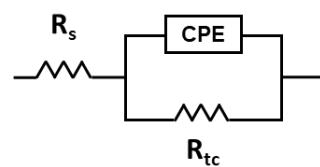
Los ensayos se realizaron en el Laboratorio de Electroquímica Molecular del INQUIMAE-CONICET bajo la supervisión del Dr. Santiago E. Herrera.

Los electrodos de oro policristalino se funcionalizaron con el glicósido **2** por medio de una SAM mixta de tioles MUA/MH en relación 1:10. La superficie se acondicionó según el protocolo descripto en el apartado “Técnicas electroquímicas” de la Sección 6.2.3.3, y la funcionalización se realizó siguiendo los pasos 1 a 4 del *procedimiento general de acoplamiento*. Una vez finalizada la modificación superficial, se midió el espectro de impedancia del sistema a partir del cual se determinó el valor de la resistencia a la transferencia de carga del electrodo antes de la exposición a la muestra ($R_{tc,0}$).

En este ensayo, se utilizaron pools de los sueros de pacientes diagnosticados como positivos o negativos para LTA ($n = 8$, “Pool LTA +” o “Pool LTA -”) descriptos en la Sección 6.2.1.1 y empleados previamente en los microarreglos. Se prepararon cinco diluciones de cada uno de los pools en PBS 1x: 1:160, 1:320, 1:640, 1:1280 y 1:2560.

Luego, la celda con el electrodo funcionalizado con **2** se lavó con abundante agua y el electrodo se incubó a t.a. por 20 min con la dilución 1:2560 del pool. Luego, la celda se lavó con agua y se midió el espectro de impedancia del sistema. El procedimiento se repitió con las diluciones restantes, desde 1:1280 hasta 1:160, de menor a mayor concentración de suero, registrando el espectro de impedancia luego de cada incubación. Todo este protocolo se realizó de manera independiente para cada pool de sueros (“Pool LTA +” y “Pool LTA -”).

El equipamiento y las condiciones de medición de los espectros de impedancia se corresponden con los descriptos en el apartado “Técnicas electroquímicas” de la Sección 6.2.3.3. En este ensayo, se obtuvieron dos valores de R_{tc} por cada experimento, mediante el ajuste de las curvas con los siguientes circuitos equivalentes:

Modelo A (con elemento de Warburg)Modelo B (sin elemento de Warburg)

El ajuste con el “Modelo A” se realizó sobre la totalidad del espectro, utilizando todos los puntos del rango de frecuencias medido. Para el ajuste mediante el “Modelo B”, se empleó, en cada espectro, únicamente la sección inicial del semicírculo (región de alta frecuencia), desde 50 kHz hasta aproximadamente la frecuencia asociada al máximo del semicírculo.

Así como en el ensayo con plasma de conejo, se utilizó el cociente $R_{tc}/R_{tc,0}$ como medida de la respuesta electroquímica del sensor, parámetro que relaciona la resistencia a la transferencia de carga del sistema antes ($R_{tc,0}$) y después de la incubación con la dilución de pool (positivo o negativo) correspondiente (R_{tc}). Los valores del cociente y sus desvíos estándar se obtuvieron según lo descripto en la sección 6.2.4.1.

6.2.4.3. Respuesta del sensor a sueros humanos por QCM-D

Los ensayos se realizaron en el Laboratorio de Interfases y Materiales Blandos del INQUIMAE-CONICET bajo la supervisión de la Dra. Lucy L. Coria-Oriundo.

Equipamiento y condiciones de medición empleadas:

Se utilizó un equipo Q-Sense Instrument (QCM-D, QSense E1, Suecia, Figura 6.12). La celda de medición se ubicó sobre una mesada antivibratoria. Para la adquisición y el análisis de datos se utilizó el software QSoft provisto con el instrumento. La respuesta del sensor se midió en el tercer sobretono debido a la mayor sensibilidad del equipo. Los experimentos se realizaron a 28 °C en una celda abierta sin flujo.



Figura 6.12. Microbalanza de cristal de cuarzo Q-Sense E1 empleada en esta tesis.

Preparación de las superficies:

Como sustratos se utilizaron sensores comerciales (QSX 301), esto es, cristales de cuarzo (5 MHz, AT-cut) de geometría circular (14 mm de diámetro) recubiertos de una película de oro de 0,3 mm pulida hasta obtener una rugosidad inferior a 3 nm.

Los sensores se funcionalizaron con el glicósido **2** por medio de una SAM mixta de tioles MUA/MH en relación 1:10. Previo a su modificación, la superficie de oro se acondicionó por tratamiento con ozono y luz UV (PSD Pro Series – Digital UV Ozone System) por 15 min para eliminar la materia orgánica adherida. La funcionalización se realizó siguiendo los pasos 1 a 4 del *procedimiento general de acoplamiento*.

Al finalizar las mediciones, los sensores se limpian para su reutilización según el siguiente protocolo: el sensor se sumergió en una solución $\text{H}_2\text{O-NH}_3$ 25%- H_2O_2 100 vol. (5:1:1) a 75°C y se mantuvo en reposo por 10 min. Luego, se enjuagó con abundante agua, y se secó con corriente de N_2 .

Protocolo de medición de los sueros:

En este ensayo, se utilizaron pools de los sueros de pacientes diagnosticados como positivos o negativos para LTA ($n = 8$, “Pool LTA +” o “Pool LTA -”) descriptos en la Sección 6.2.1.1 y empleados previamente en los microarreglos. Se prepararon ocho diluciones en PBS 1x del “Pool LTA +” (1:100, 1:250, 1:500, 1:1000, 1:2000, 1:3000, 1:4000 y 1:5000) y siete diluciones en PBS 1x del “Pool LTA -” (1:100, 1:250, 1:500, 1:1000, 1:2000, 1:3000 y 1:4000).

El sensor funcionalizado con **2** se colocó en la celda de medición, que se llenó con agua (400 μL). El sistema se mantuvo en reposo hasta observar estabilización de la señal (aproximadamente 15 min). La frecuencia de resonancia resultante se tomó como $\Delta f = 0$ y el agua se removió de la celda cuidadosamente. Se colocaron 400 μL de muestra de suero (“Pool LTA +” o “Pool LTA -”, según el experimento) más diluida, y el sistema se mantuvo en reposo hasta observar estabilización de la señal. La muestra se removió de la celda y el sensor se lavó con agua (5 x 400 μL). La celda se llenó con agua nuevamente, se incubó hasta observar estabilización y se registró la frecuencia del sensor. El procedimiento se repitió con las diluciones restantes, yendo de menor a mayor concentración de suero. Todo este protocolo se realizó de manera independiente para cada pool de sueros (“Pool LTA +” y “Pool LTA -”).

Para estudiar la respuesta del sensor se graficó la frecuencia de oscilación del cristal de cuarzo registrada en agua luego de cada incubación en función de la dilución del pool de suero utilizada. Los datos crudos de las mediciones se incluyen en el Apéndice (Sección A2).

RESUMEN

EXTENDIDO

Las leishmaniasis son un conjunto de enfermedades tropicales desatendidas causadas por protozoos del género *Leishmania*, y transmitidos al ser humano a través de la picadura de flebótomos infectados. Se manifiestan en tres formas clínicas principales: cutánea, mucocutánea y visceral. En gran parte de América Latina, incluyendo la Argentina, *Leishmania braziliensis* es la principal especie responsable de las infecciones humanas, provocando un cuadro clínico heterogéneo que va desde el desarrollo de lesiones cutáneas localizadas hasta afecciones mucocutáneas severas. Esta forma clínica se conoce como leishmaniasis tegumentaria americana (LTA).

A pesar de su impacto sanitario y amplia distribución, el diagnóstico de LTA requiere habitualmente de una combinación de técnicas y no está garantizado en poblaciones aisladas y de bajos recursos. Frente a esta limitación, surge la necesidad de desarrollar métodos de bajo costo, portables y altamente sensibles y específicos, que permitan el diagnóstico rápido para brindar un tratamiento oportuno y controlar su propagación.

Entre los componentes clave en la interacción parásito-hospedador se encuentran los glicoconjungados de superficie de *Leishmania*, como el lipofosfoglicano (LPG) y los glicoinositolfosfolípidos (GIPLs). Estos compuestos son antigenicos, y dentro de sus estructuras destaca la β -D-galactofuranosa (β -D-Galf), un azúcar xenobiótico, ausente en mamíferos, cuya inmunogenicidad ha sido documentada en diversos patógenos.

Los glicanos antigenicos superficiales de *L. braziliensis*, y especialmente aquellos que contienen Galf, son candidatos prometedores para el desarrollo de biosensores orientados a la detección serológica de la infección. Para evaluar el rol de la D-Galf en la antigenicidad de estos glicolípidos, resulta indispensable contar con fragmentos oligosacáridicos puros y bien definidos. Para acceder a ellos, la síntesis química es una herramienta fundamental, ya que permite obtener dichas estructuras con alta pureza y funcionalizarlas con fragmentos conectores apropiados para su inmovilización o conjugación.

El objetivo de este trabajo fue diseñar, sintetizar y evaluar la inmunorreactividad de galactofuranósidos inspirados en glicoconjungados de superficie de *Leishmania braziliensis*, con vistas al desarrollo de una plataforma diagnóstica basada en estos carbohidratos.

El trabajo experimental se organizó en tres ejes principales:

En el Capítulo 3, se describe la estrategia sintética convergente y eficiente desarrollada para obtener cinco galactofuranósidos (compuestos **1–5**), presentes en los GIPLs tipo-II de *L. braziliensis*. Estos compuestos fueron diseñados para explorar la influencia de distintas variaciones estructurales sobre la antigenicidad. En las estructuras

se incorporó como *linker* un grupo 5-aminopentilo en el extremo reductor, adecuado para su inmovilización sobre superficies o conjugación a proteínas.

Durante la síntesis de los compuestos **1–5** se introdujeron modificaciones en numerosos pasos de reacción, con el fin de alcanzar metodologías de síntesis robustas y costo-eficientes para, en caso de identificarse candidatos prometedores, poder contar con rutas sintéticas optimizadas y escalables. Asimismo, se priorizó el uso de precursores comunes, accesible a partir de compuestos sencillos, y protegidos de manera adecuada para controlar la estereo- y regioselectividad de las glicosilaciones. Los productos fueron purificados y caracterizados exhaustivamente por RMN mono- y bidimensionales (^1H y ^{13}C), espectroscopía de masa de alta resolución (EMAR) y otras técnicas complementarias. Además de los 5-aminopentil glicósidos objetivo, se aislaron y caracterizaron 21 nuevas moléculas, no reportadas previamente.

En el Capítulo 4, se describe la fabricación de microarreglos de glicanos para la evaluación de la afinidad de los oligosacáridos sintetizados por anticuerpos en sueros de pacientes con LTA. Estos experimentos se realizaron en colaboración con el grupo del Prof. Dr. Peter Seeberger en *Max Planck Institute of Colloids and Interfaces*, Alemania.

Los compuestos **1–5** se anclaron covalentemente sobre superficies funcionalizadas con ésteres de NHS y se incubaron con sueros humanos de pacientes diagnosticados con LTA, controles sanos y sueros de pacientes con enfermedad de Chagas. Las respuestas inmunológicas se analizaron por tipo de inmunoglobulina y estructura del glicano.

La mayor respuesta observada fue debida a la presencia de anticuerpos IgM específicos, especialmente frente a los compuestos **3** (β -D-Galf-(1→3)- α -D-Manp-(1→3)- α -D-Manp) y **4** (α -D-Galp-(1→3)- β -D-Galf), que mostraron una inmunorreactividad significativamente superior en sueros de pacientes con LTA respecto a los controles. En cambio, se registraron niveles de IgG más bajos y variables, mientras que los niveles de IgA resultaron muy bajos y no permitieron discriminar individuos infectados de no infectados.

El 5-aminopentil β -D-galactofuranósido (**1**), esto es, la unidad de β -D-Galf, mostró niveles de reconocimiento de anticuerpos IgM e IgG comparables entre sueros positivos y negativos, lo que se atribuye a la presencia de anticuerpos naturales anti-Galf derivados de exposiciones previas a microorganismos ambientales. De esta manera, se concluyó que la galactofuranosa en forma aislada no es una alternativa adecuada como biorreceptor.

Por su parte, el disacárido **2** (β -D-Galf-(1→3)- α -D-Manp), motivo glicosídico compartido con el parásito *Trypanosoma cruzi*, mostró reactividad cruzada con sueros de pacientes con enfermedad de Chagas, subrayando la necesidad de limitar el uso de glicotopes compartidos con otros microorganismos para evitar los falsos positivos.

En contraste, los compuestos **3** y **4** presentaron baja reactividad cruzada con *T. cruzi*, lo que confirmó su mayor selectividad diagnóstica y los posiciona como candidatos promisorios para el desarrollo de pruebas serológicas. En particular, el trisacárido **3** mostró mejores resultados respecto de **4**, lo que sugirió que la presencia de una unidad de D-Man en la estructura mejoraba el reconocimiento específico, y que la unidad de α -Gal, residuo altamente inmunogénico en humanos, no es un determinante imprescindible en la antigenicidad de los glicolípidos de *Leishmania braziliensis*.

Como extensión de los estudios inmunológicos, en el Capítulo 5 se abordó el diseño y evaluación de un glicobiosensor basado en espectroscopía de impedancia electroquímica (EIS), con el objetivo de explorar su aplicación como herramienta de diagnóstico serológico rápida y portátil. Se seleccionó el disacárido **2** como modelo, que había mostrado alta inmunorreactividad frente a sueros de pacientes con LTA en ensayos ELISA reportados por otros autores.

El compuesto **2** se inmovilizó, por medio del grupo amino en su extremo reductor, sobre electrodos de oro recubiertos de monocapas autoensambladas (SAM) mixtas de tioles funcionalizados. Esta superficie se utilizó como electrodo de trabajo en experimentos de EIS. Previo a la evaluación de la respuesta del sensor frente a los sueros, se construyeron modelos de la superficie sensora para estudiar sus propiedades por microscopía de fuerza atómica (AFM), espectroscopía fotoelectrónica de rayos X (XPS), microscopía de efecto túnel (STM), voltametría cíclica (CV) y EIS. Los ensayos permitieron estudiar la morfología, la composición atómica y las propiedades electroquímicas de la superficie y confirmaron el anclado exitoso de los 5-aminopentil glicósidos sintetizados.

Luego, electrodos funcionalizados con **2** se incubaron con pool de los sueros positivos y negativos para LTA y se registró la respuesta electroquímica por EIS. En particular, se observó el cambio en el valor de la resistencia a la transferencia de carga (R_{tc}) del sistema. Si bien el ensayo electroquímico no permitió discriminar sueros positivos de negativos, los resultados demostraron la viabilidad del uso de glicanos sintéticos en plataformas de biosensado y sentaron las bases para desarrollos futuros con estructuras más selectivas, como los compuestos **3** y **4**.

En conjunto, este trabajo constituye un aporte original al campo de la química de carbohidratos aplicada al diagnóstico de enfermedades infecciosas, al integrar la síntesis orgánica de estructuras sacáridicas definidas, la evaluación antigénica mediante microarreglos, y la exploración y evaluación preliminar de un modelo de biosensor electroquímico. Los resultados obtenidos sientan las bases para el desarrollo racional de pruebas serológicas específicas de bajo costo y con potencial de miniaturización, tanto para LTA como para otras patologías, a fin de facilitar el diagnóstico en contextos de escasos recursos.

Este trabajo dio lugar a presentaciones en congresos nacionales (5) e internacionales (3) y a un artículo publicado en la revista *Organic & Biomolecular Chemistry*:

“Synthesis of *Leishmania*’s LPG and GIPLs constituents for vaccine and diagnostic test development”. **Carolina S. Touloumdjian**, Eleonora Elhalem, M. Julieta Comin, Lucía Gandolfi Donadío. *Drug Discovery for Neglected Diseases International Congress*, Buenos Aires, 2018.

“New advances in the synthesis of *Leishmania*’s LPG and GIPLs constituents for vaccine and diagnostic test development”. **Carolina S. Touloumdjian**, Eleonora Elhalem, M. Julieta Comin, Lucía Gandolfi Donadío. *3rd Argentinian Symposium of Glycobiology*, Buenos Aires, 2019.

“Advances in the synthesis of galactofuranosidic constituents of *Leishmania* for vaccine and diagnostic development”. **Carolina S. Touloumdjian**, Eleonora Elhalem, M. Julieta Comin, Lucía Gandolfi Donadío. XXII Simposio Nacional de Química Orgánica (SINAQO), Mendoza, 2019.

“Avances en la síntesis de galactofuranósidos constitutivos de *Leishmania* de interés terapéutico”. **Carolina S. Touloumdjian**, Eleonora Elhalem, M. Julieta Comin, Lucía Gandolfi Donadío. XXIII Simposio Nacional de Química Orgánica (SINAQO), modalidad virtual, 2021.

“Synthesis of galactofuranosidic constituents of *Leishmania* for vaccine and diagnostic test development”. **Carolina S. Touloumdjian**, Lucía Tallone, Eleonora Elhalem, M. Julieta Comin, Lucía Gandolfi Donadío. 30th *International Carbohydrate Symposium* (ICS2022), modalidad virtual, 2022. Este trabajo recibió el premio a mejor póster en la categoría “Glicoconjungados y vacunas”.

“Síntesis de galactofuranósidos de *Leishmania* para el desarrollo de test de diagnóstico”. **Carolina S. Touloumdjian**, Eleonora Elhalem, M. Julieta Comin, Santiago

E. Herrera y Lucía Gandolfi Donadío. XXIV Simposio Nacional de Química Orgánica (SINAQO), Rosario, 2023.

“Hacia un sensor electroquímico basado en carbohidratos de *Leishmania*”. **Carolina S. Touloumdjian**, Eleonora Elhalem, M. Julieta Comin, Santiago E. Herrera y Lucía Gandolfi Donadío. 13er Congreso Iberoamericano de Sensores – Ibersensor, Buenos Aires, 2024.

“Enabling the serodiagnosis of american tegumentary leishmaniasis using synthetic aminopentyl-galactofuranoside-containing oligosaccharide epitopes”. **Touloumdjian, C. S. et al.** *Organic & Biomolecular Chemistry*, 2026, en prensa. DOI: 10.1039/D5OB01900A.



Dra. Lucía Gandolfi Donadío



Lic. Carolina S. Touloumdjian

APÉNDICE

Figuras y datos suplementarios

A1. Capítulo 4

A1.1. Análisis de la inmunorreactividad mediante microarreglos de glicanos

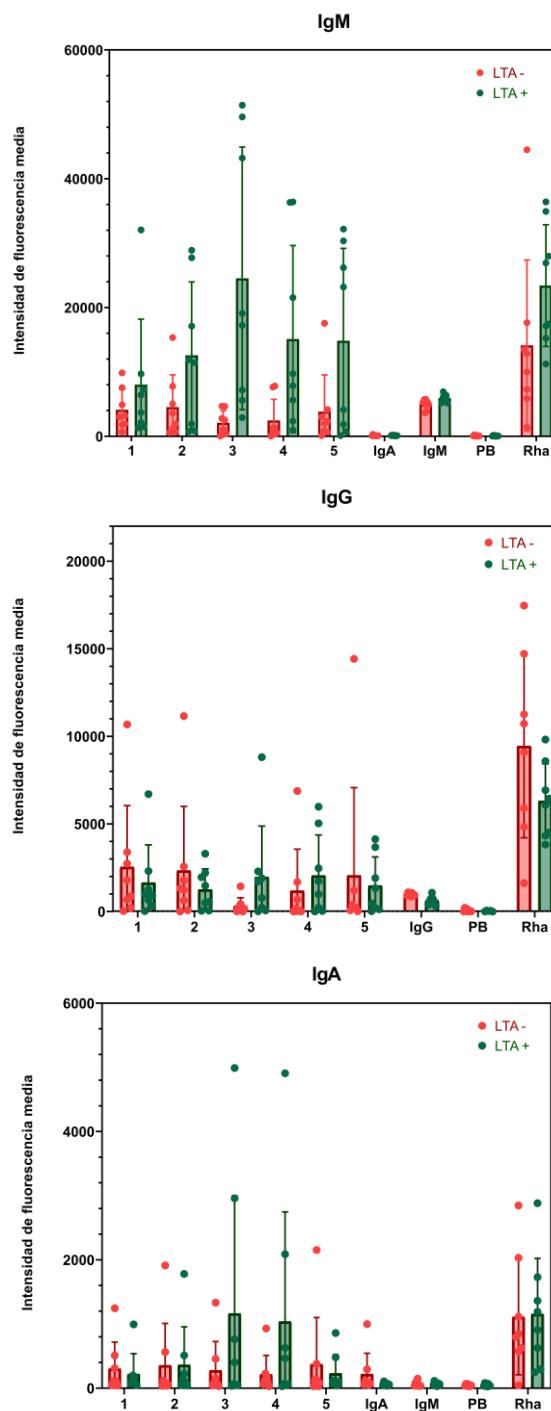


Figura A.1. Análisis de la concentración de anticuerpos IgM (arriba), IgG (medio) e IgA (abajo) afines a los glicósidos sintéticos 1-5 en sueros individuales de pacientes diagnosticados como positivos (verde, "LTA +") o negativos (rojo, "LTA -") para LTA. Los sueros se diluyeron 1:100 en 1% BSA-PBS. Se presentan los valores medios con desvíos estándar. Se incluyen los resultados de los controles positivo ("Rha"), negativo ("PB") y de isotipo ("IgG", "IgM" e "IgA").

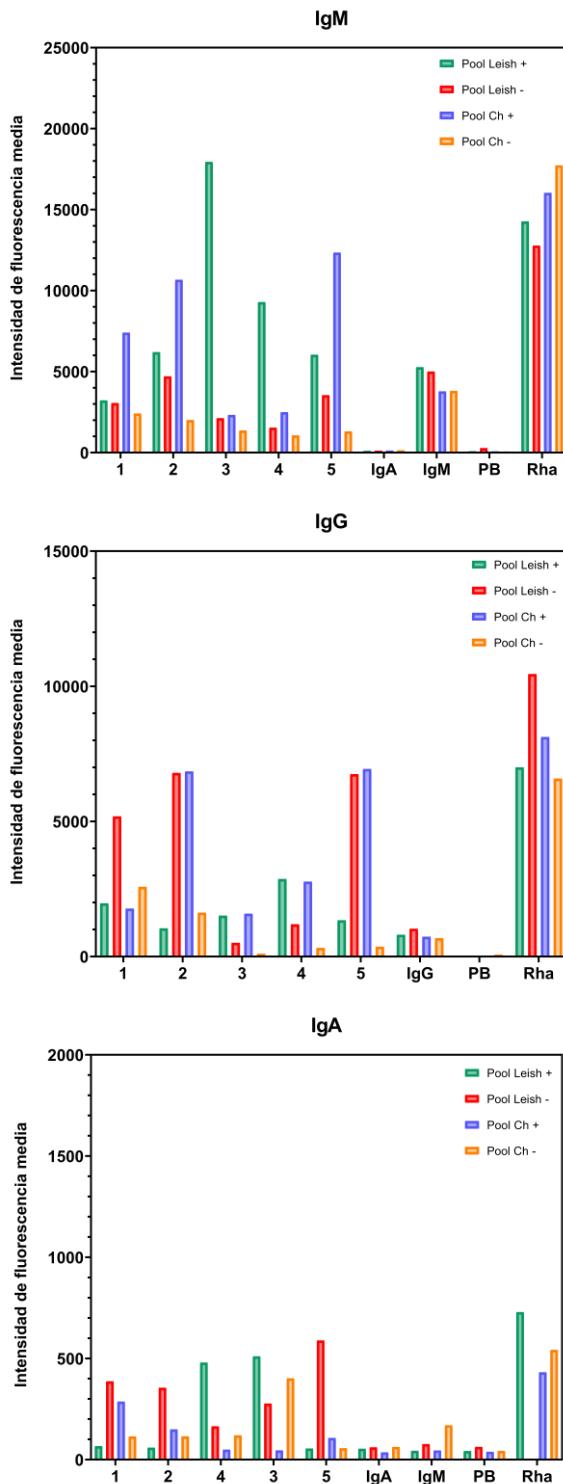


Figura A.2. Análisis de la concentración de anticuerpos IgM (arriba), IgG (medio) e IgA (abajo) afines a los glicósidos sintéticos 1-5 en pools de sueros ($n = 8$) de pacientes diagnosticados como negativos (rojo, “Pool LTA –“) o positivos (verde, “Pool LTA +“) para LTA y en pools de sueros ($n = 10$) de pacientes positivos (azul, “Pool Ch +“) o negativos (naranja, “Pool Ch –“) para enfermedad de Chagas.

A2. Capítulo 5

A2.1. Caracterización de superficies funcionalizadas con glicósidos. Análisis de las propiedades electroquímicas

Tabla A.1. Valores de ajuste obtenidos a lo largo de la funcionalización de la superficie con **1**. “Expto”=Experimento.

Superficie	Hora	Expto	R_s (Ω)	R_{tc} (Ω)	CPE (μF)	n
Au		Limpieza EQ x 50 ciclos				
	12:50	CV	--	--	--	--
	12:54	EIS	122,70	8,99	80,15	0,881
	12:57	EIS	122,70	9,08	84,44	0,873
“Au-SAM”	14:14	CV	--	--	--	--
	14:16	CV+EIS	125,80	68,51	125,90	0,779
“Au-SAM-1/EA”	17:11	CV+EIS	129,70	45,26	4,19	0,961
	17:23	EIS	129,70	45,14	4,09	0,963
	17:29	EIS	129,80	41,85	4,05	0,963

Tabla A.2. Valores medios con desvíos estándar de los parámetros R_s , R_{tc} y CPE obtenidos a lo largo de la funcionalización de la superficie con **1** (Tabla A.1). En el caso de n se presenta el rango de valores obtenidos.

Superficie	R_s (Ω)	R_{tc} (Ω)	CPE (μF)	n
Au	$122,7 \pm 0,0$	$9,0 \pm 0,1$	$82,3 \pm 3,0$	0,873-0,881
“Au/SAM”	125,8	$68,5 \pm 0,1$	$125,9 \pm 0,5$	0,78
“Au-SAM-1/EA”	$129,7 \pm 0,1$	$44,1 \pm 1,9$	$4,1 \pm 0,1$	0,961-0,963

A2.2. Respuesta a interacciones inespecíficas

Tabla A.3. Valores de ajuste obtenidos en el ensayo de respuesta electroquímica de una superficie funcionalizada con galactofuranosa (glicósido **1**) a la exposición a plasma de conejo. “Expto”=Experimento.

	Hora	Expto	R_s (Ω)	R_{tc} (Ω)	CPE (μF)	n
<i>Pre-incubación</i>	10:50	CV+EIS	122,40	15,23	4,52	0,941
	10:59	EIS	122,30	15,43	4,73	0,937
	11:04	EIS	122,50	15,28	4,47	0,946
<i>Plasma 1:5120</i>	11:41	CV+EIS	128,00	16,78	4,28	0,951
	11:49	EIS	127,60	17,61	4,82	0,933
	11:56	EIS	128,10	17,83	4,75	0,936
	12:01	EIS	128,30	18,16	4,80	0,934
<i>Plasma 1:4096</i>	12:32	CV+EIS	122,10	18,30	4,71	0,937
	12:41	EIS	122,10	19,08	4,89	0,932
	12:44	EIS	121,80	18,61	4,24	0,950
	12:48	EIS	121,80	18,43	4,22	0,950
<i>Plasma 1:3072</i>	13:29	CV+EIS	122,30	19,48	4,49	0,941
	13:40	EIS	122,40	20,03	4,46	0,942
	13:45	EIS	122,70	20,62	4,32	0,947
	13:50	EIS	122,70	21,12	4,38	0,945
<i>Plasma 1:2048</i>	14:20	CV+EIS	127,70	22,37	4,46	0,939
	14:30	EIS	128,10	22,75	4,42	0,941
	14:35	EIS	128,40	23,60	4,42	0,941
	14:41	EIS	128,60	24,40	4,51	0,939
<i>Plasma 1:1024</i>	15:11	CV+EIS	120,70	16,54	4,65	0,938
	15:19	EIS	120,60	17,43	5,21	0,925
	15:22	EIS	120,60	17,91	4,98	0,929
	15:27	EIS	120,50	18,60	5,17	0,926
<i>Plasma 1:512</i>	15:58	CV+EIS	128,40	19,58	4,69	0,931
	16:08	EIS	129,00	20,27	4,19	0,947
	16:12	EIS	129,10	21,56	4,48	0,939
	16:17	EIS	129,30	21,89	4,31	0,944
<i>Plasma 1:256</i>	16:47	CV+EIS	118,90	23,45	4,40	0,941
	16:57	EIS	118,90	24,86	4,80	0,931
	17:02	EIS	119,10	25,86	4,86	0,929
	17:07	EIS	119,40	26,59	4,76	0,932
<i>Plasma 1:128</i>	17:35	CV+EIS	132,00	23,73	3,88	0,953
	17:45	EIS	132,60	23,90	3,71	0,960
	17:50	EIS	132,90	24,43	3,77	0,959
	17:55	EIS	133,40	24,88	3,81	0,959

Tabla A.4. Valores medios con desvíos estándar de los parámetros R_s , R_{tc} y CPE obtenidos en el ensayo de respuesta electroquímica de una superficie funcionalizada con galactofuranosa (glicósido 1) a la exposición a plasma de conejo (Tabla A.3). En el caso de n se presenta el rango de valores obtenidos.

Factor de dilución	R_s (Ω)	R_{tc} (Ω)	CPE (μF)	n	R/R_0
Pre-incubación	$122,40 \pm 0,10$	$15,31 \pm 0,10$	$4,57 \pm 0,14$	0,937-0,946	1,00
5120	$128,00 \pm 0,29$	$17,60 \pm 0,59$	$4,66 \pm 0,26$	0,933-0,951	$1,15 \pm 0,04$
4096	$121,95 \pm 0,17$	$18,61 \pm 0,34$	$4,52 \pm 0,33$	0,932-0,95	$1,21 \pm 0,02$
3072	$122,53 \pm 0,21$	$20,31 \pm 0,71$	$4,41 \pm 0,08$	0,941-0,947	$1,33 \pm 0,05$
2048	$128,20 \pm 0,39$	$23,28 \pm 0,91$	$4,45 \pm 0,04$	0,939-0,941	$1,52 \pm 0,06$
1024	$120,60 \pm 0,08$	$17,62 \pm 0,87$	$5,00 \pm 0,26$	0,925-0,938	$1,15 \pm 0,06$
512	$128,95 \pm 0,39$	$20,83 \pm 1,09$	$4,42 \pm 0,22$	0,947-0,931	$1,36 \pm 0,07$
256	$119,08 \pm 0,24$	$25,19 \pm 1,36$	$4,70 \pm 0,21$	0,929-0,941	$1,64 \pm 0,09$
128	$132,73 \pm 0,59$	$24,24 \pm 0,52$	$3,79 \pm 0,07$	0,953-0,960	$1,58 \pm 0,03$

A2.3. Evaluación del glicósido 2 como biomarcador de infección

A2.3.1. Ensayos por espectroscopía de impedancia electroquímica (EIS)

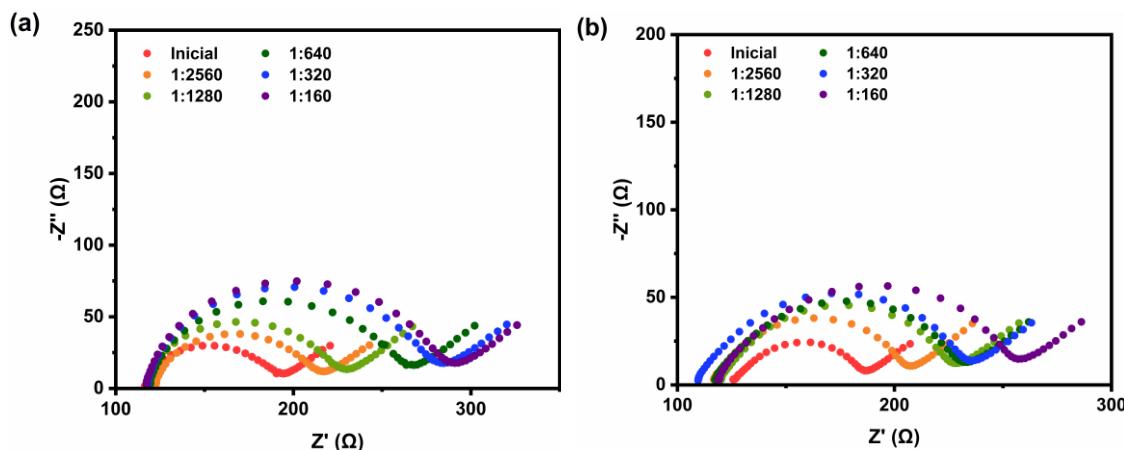


Figura A.3. Espectros de impedancia de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6/\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ 5 mM en KNO_3 0,1 M del electrodo “Au-SAM-2/EA” registrados en el ensayo con: (a) pool de sueros positivos para LTA (“Pool LTA +”) y (b) pool de sueros negativos para LTA (“Pool LTA -”). Para cada una de las diluciones se presenta el primer espectro tomado post-incubación.

Tabla A.5. Valores de ajuste obtenidos mediante el “Modelo A” en el ensayo de respuesta electroquímica de una superficie funcionalizada con **2** a la exposición a un pool de sueros positivos para LTA. “Expto”=Experimento.

	Hora	Expto	R_s (Ω)	R_{tc} (Ω)	CPE (μF)	n
<i>Pre-incubación</i>	10:59	CV+EIS	116,60	70,72	7,86	0,881
	11:05	EIS	116,60	72,18	7,90	0,879
	11:09	EIS	116,50	74,94	8,15	0,876
<i>Pool LTA + 1:2560</i>	12:38	CV+EIS	121,90	86,92	6,68	0,903
	12:45	EIS	121,40	91,30	7,10	0,893
	12:48	EIS	121,40	92,43	7,00	0,894
<i>Pool LTA + 1:1280</i>	13:48	CV+EIS	117,10	103,80	5,69	0,916
	13:51	EIS	116,80	103,30	5,73	0,914
	13:55	EIS	116,60	103,60	5,67	0,914
<i>Pool LTA + 1:640</i>	14:38	EIS	118,50	138,30	6,10	0,907
	14:40	EIS	118,40	134,10	5,90	0,911
	14:44	EIS	118,20	133,50	5,91	0,910
<i>Pool LTA + 1:320</i>	15:42	CV+EIS	117,60	154,90	5,00	0,928
	15:45	EIS	117,30	150,80	5,05	0,926
	15:49	EIS	117,30	152,20	5,02	0,926
<i>Pool LTA + 1:160</i>	16:28	CV+EIS	117,20	163,00	4,82	0,931
	16:32	EIS	116,70	159,80	4,88	0,929
	16:36	EIS	116,20	160,70	4,98	0,925

Tabla A.6. Valores medios con desvíos estándar de los parámetros R_s , R_{tc} y CPE obtenidos mediante el “Modelo A” en el ensayo de respuesta electroquímica de una superficie funcionalizada con **2** a la exposición a un pool de sueros positivos para LTA (Tabla A.5). En el caso de n se presenta el rango de valores obtenidos.

Factor de dilución	R_s (Ω)	R_{tc} (Ω)	CPE (μF)	n	R/R_0
<i>Pre-incubación</i>	$116,57 \pm 0,06$	$72,61 \pm 2,14$	$7,97 \pm 0,15$	0,876-0,881	1,00
2560	$121,57 \pm 0,29$	$90,22 \pm 2,91$	$6,93 \pm 0,22$	0,893-0,903	$1,24 \pm 0,04$
1280	$116,83 \pm 0,25$	$103,57 \pm 0,25$	$5,70 \pm 0,03$	0,914-0,916	$1,43 \pm 0,00$
640	$118,37 \pm 0,15$	$135,30 \pm 2,62$	$5,97 \pm 0,12$	0,907-0,911	$1,86 \pm 0,04$
320	$117,40 \pm 0,17$	$152,63 \pm 2,08$	$5,03 \pm 0,03$	0,926-0,928	$2,10 \pm 0,03$
160	$116,70 \pm 0,50$	$161,17 \pm 1,65$	$4,89 \pm 0,08$	0,925-0,931	$2,22 \pm 0,02$

Tabla A.7. Valores de ajuste obtenidos mediante el “Modelo A” en el ensayo de respuesta electroquímica de una superficie funcionalizada con **2** a la exposición a un pool de sueros negativos para LTA. “Expto”=Experimento.

	Hora	Expto	R_s (Ω)	R_{tc} (Ω)	CPE (μF)	n
<i>Pre-incubación</i>	11:57	CV+EIS	126,20	59,59	18,48	0,840
	11:59	EIS	128,00	61,11	17,53	0,853
	12:03	EIS	117,10	67,27	15,22	0,865
<i>Pool LTA - 1:2560</i>	12:45	CV+EIS	116,90	88,91	14,01	0,869
	12:49	EIS	116,20	87,78	15,10	0,857
	12:53	EIS	118,80	87,64	14,51	0,863
<i>Pool LTA - 1:1280</i>	13:38	CV+EIS	120,00	106,70	13,71	0,867
	13:41	EIS	120,10	106,90	13,83	0,866
	13:45	EIS	119,90	105,60	14,10	0,863
<i>Pool LTA - 1:640</i>	14:24	EIS	117,50	114,10	14,84	0,854
	14:28	EIS	117,30	116,00	14,88	0,854
	14:32	EIS	116,80	119,80	15,14	0,850
<i>Pool LTA - 1:320</i>	15:12	EIS	109,60	125,30	15,16	0,851
	15:16	EIS	108,40	126,00	15,61	0,846
	15:22	EIS	117,70	132,40	14,75	0,852
<i>Pool LTA - 1:160</i>	16:08	EIS	118,90	138,00	15,14	0,844
	16:12	EIS	118,20	140,00	15,78	0,838
	16:17	EIS	118,40	145,70	15,27	0,842

Tabla A.8. Valores medios con desvíos estándar de los parámetros R_s , R_{tc} y CPE obtenidos mediante el “Modelo A” en el ensayo de respuesta electroquímica de una superficie funcionalizada con **2** a la exposición a un pool de sueros negativos para LTA (Tabla A.7). En el caso de n se presenta el rango de valores obtenidos.

Factor de dilución	R_s (Ω)	R_{tc} (Ω)	CPE (μF)	n	R/R_0
<i>Pre-incubación</i>	$123,77 \pm 5,84$	$62,66 \pm 4,07$	$17,08 \pm 1,67$	0,840-0,865	1,00
2560	$117,30 \pm 1,35$	$88,11 \pm 0,70$	$14,54 \pm 0,55$	0,857-0,869	$1,41 \pm 0,01$
1280	$120,00 \pm 0,10$	$106,40 \pm 0,70$	$13,88 \pm 0,20$	0,863-0,867	$1,70 \pm 0,01$
640	$117,20 \pm 0,36$	$116,63 \pm 2,90$	$14,95 \pm 0,16$	0,850-0,854	$1,86 \pm 0,05$
320	$111,90 \pm 5,06$	$127,90 \pm 3,91$	$15,17 \pm 0,43$	0,846-0,852	$2,04 \pm 0,06$
160	$118,50 \pm 0,36$	$141,23 \pm 4,00$	$15,40 \pm 0,34$	0,838-0,844	$2,25 \pm 0,06$

Tabla A.9. Valores de ajuste obtenidos mediante el “Modelo B” en el ensayo de respuesta electroquímica de una superficie funcionalizada con **2** a la exposición a un pool de sueros positivos para LTA. “Expto”=Experimento.

	Hora	Expto	R_s (Ω)	R_{tc} (Ω)	CPE (μF)	n
<i>Pre-incubación</i>	10:59	CV+EIS	116,90	69,10	2,84	0,906
	11:05	EIS	116,80	70,95	2,84	0,903
	11:09	EIS	116,80	72,33	2,84	0,907
<i>Pool LTA + 1:2560</i>	12:38	CV+EIS	121,70	88,65	3,01	0,902
	12:45	EIS	121,73	91,45	3,00	0,903
	12:48	EIS	121,75	92,27	2,99	0,905
<i>Pool LTA + 1:1280</i>	13:48	CV+EIS	116,79	106,86	2,89	0,912
	13:51	EIS	116,69	106,35	2,88	0,913
	13:55	EIS	116,76	105,90	2,87	0,917
<i>Pool LTA + 1:640</i>	14:38	EIS	118,73	140,40	2,98	0,913
	14:40	EIS	118,53	136,20	2,96	0,917
	14:44	EIS	118,22	136,40	2,95	0,912
<i>Pool LTA + 1:320</i>	15:42	CV+EIS	117,94	157,68	2,90	0,931
	15:45	EIS	117,52	154,30	2,88	0,927
	15:49	EIS	117,50	156,60	2,88	0,925
<i>Pool LTA + 1:160</i>	16:28	CV+EIS	117,37	167,20	2,88	0,930
	16:32	EIS	117,30	162,20	2,87	0,935
	16:36	EIS	116,90	163,60	2,86	0,930

Tabla A.10. Valores medios con desvíos estándar de los parámetros R_s , R_{tc} y CPE obtenidos mediante el “Modelo B” en el ensayo de respuesta electroquímica de una superficie funcionalizada con **2** a la exposición a un pool de sueros positivos para LTA (Tabla A.9). En el caso de *n* se presenta el rango de valores obtenidos.

Factor de dilución	R_s (Ω)	R_{tc} (Ω)	CPE (μF)	n	R/R_0
<i>Pre-incubación</i>	$116,83 \pm 0,06$	$70,79 \pm 1,62$	$2,84 \pm 0,00$	0,903-0,907	1,00
2560	$121,73 \pm 0,03$	$90,79 \pm 1,90$	$3,00 \pm 0,01$	0,902-0,905	$1,28 \pm 0,03$
1280	$116,75 \pm 0,05$	$106,37 \pm 0,48$	$2,88 \pm 0,01$	0,912-0,917	$1,50 \pm 0,01$
640	$118,49 \pm 0,26$	$137,67 \pm 2,37$	$2,96 \pm 0,02$	0,912-0,917	$1,94 \pm 0,03$
320	$117,65 \pm 0,25$	$156,19 \pm 1,73$	$2,89 \pm 0,01$	0,925-0,931	$2,21 \pm 0,02$
160	$117,19 \pm 0,25$	$164,33 \pm 2,58$	$2,87 \pm 0,01$	0,930-0,935	$2,32 \pm 0,04$

Tabla A.11. Valores de ajuste obtenidos mediante el “Modelo B” en el ensayo de respuesta electroquímica de una superficie funcionalizada con **2** a la exposición a un pool de sueros negativos para LTA. “Expto”=Experimento.

	Hora	Expto	R_s (Ω)	R_{tc} (Ω)	CPE (μF)	n
<i>Pre-incubación</i>	11:57	CV+EIS	120,07	65,70	5,98	0,912
	11:59	EIS	120,30	66,08	5,98	0,918
	12:03	EIS	121,01	65,07	6,09	0,935
<i>Pool LTA - 1:2560</i>	12:45	CV+EIS	121,40	84,32	5,90	0,935
	12:49	EIS	121,10	81,27	5,87	0,940
	12:53	EIS	122,10	84,80	5,70	0,914
<i>Pool LTA - 1:1280</i>	13:38	CV+EIS	124,40	102,90	5,68	0,923
	13:41	EIS	125,20	100,50	5,78	0,936
	13:45	EIS	124,10	101,60	5,67	0,919
<i>Pool LTA - 1:640</i>	14:24	EIS	122,40	108,70	5,66	0,918
	14:28	EIS	122,60	110,40	5,71	0,916
	14:32	EIS	122,70	112,20	5,70	0,921
<i>Pool LTA - 1:320</i>	15:12	EIS	114,20	120,90	5,63	0,904
	15:16	EIS	113,80	118,10	5,64	0,919
	15:22	EIS	123,80	123,70	5,63	0,925
<i>Pool LTA - 1:160</i>	16:08	EIS	124,60	133,80	5,48	0,891
	16:12	EIS	126,10	130,50	5,60	0,911
	16:17	EIS	127,20	134,80	5,70	0,919

Tabla A.12. Valores medios con desvíos estándar de los parámetros R_s , R_{tc} y CPE obtenidos mediante el “Modelo B” en el ensayo de respuesta electroquímica de una superficie funcionalizada con **2** a la exposición a un pool de sueros negativos para LTA (Tabla A.11). En el caso de n se presenta el rango de valores obtenidos.

Factor de dilución	R_s (Ω)	R_{tc} (Ω)	CPE (μF)	n	R/R_0
<i>Pre-incubación</i>	$120,46 \pm 0,49$	$65,62 \pm 0,51$	$6,02 \pm 0,06$	0,912-0,935	1,00
2560	$121,53 \pm 0,51$	$83,46 \pm 1,91$	$5,83 \pm 0,11$	0,914-0,940	$1,27 \pm 0,03$
1280	$124,57 \pm 0,57$	$101,67 \pm 1,20$	$5,71 \pm 0,06$	0,919-0,936	$1,55 \pm 0,02$
640	$122,57 \pm 0,15$	$110,43 \pm 1,75$	$5,69 \pm 0,03$	0,916-0,921	$1,68 \pm 0,03$
320	$117,27 \pm 5,66$	$120,90 \pm 2,80$	$5,63 \pm 0,01$	0,904-0,925	$1,85 \pm 0,04$
160	$125,97 \pm 1,31$	$133,03 \pm 2,25$	$5,59 \pm 0,11$	0,891-0,919	$2,03 \pm 0,03$

A2.3.2. Ensayos por microbalanza de cuarzo con disipación (QCM-D)

Tabla A.13. Frecuencias de resonancia del cristal de cuarzo registradas luego de la exposición de una superficie funcionalizada con 2 a distintas diluciones de los pooles “Pool LTA +” y “Pool LTA -”. La columna de tiempo (t) corresponde al tiempo transcurrido entre la colocación de la muestra y la estabilización de la señal. Se informan los valores registrados cuando la superficie se encontraba en contacto con un pool en la dilución correspondiente o con agua, al momento de la estabilización de la señal. n.d.= no determinado.

Incubación	Pool LTA -		Pool LTA +	
	t aprox. (min)	Δf (Hz)	t aprox. (min)	Δf (Hz)
Agua	n.d.	n.d.	15	0
1:5000	n.d.	n.d.	12,5	24
Agua	20	0	13	15
1:4000	12,5	25,3	6	27,2
Agua	14	16,7	10	20
1:3000	13	37,4	7	31,8
Agua	12	27,2	9	22,6
1:2000	5	42,7	10	34,9
Agua	12	33,3	12	29
1:1000	15	47,8	10	41,3
Agua	12	40	20	32,7
1:500	5	53,4	7	43,3
Agua	6	46,5	12	36,4
1:250	10	60	7	54,3
Agua	6	51,5	17	45,4
1:100	8	69,8	17	61,7
Agua	14,5	64,2	15,5	50,6

Fundamentos de las técnicas fisicoquímicas utilizadas

A3. Técnicas de caracterización fisicoquímica

Los glicobiosensores electroquímicos suelen caracterizarse en términos de composición superficial, morfología y rendimiento electroquímico. Las técnicas de caracterización más comunes se presentan en la Tabla A.14.^[318]

Tabla A.14. Técnicas de caracterización de glicobiosensores electroquímicos.

Técnica de caracterización	Propiedad	Referencias
AFM STM	Morfología	Sarkar, A. ^[364] , Wang, J. ^[365]
SEM/EDX	Morfología Composición	Prasek, J. <i>et al</i> ^[366] , Aktar, K. <i>et al</i> ^[367]
FT-IR XPS	Composición química superficial	Abdulbari, H. A. <i>et al</i> ^[320]
TGA DSC	Composición de adsorción/absorción	Loganathan, S. <i>et al</i> ^[368]
UV-Vis PL	Óptica	Nair, A. K. <i>et al</i> ^[369]
CV, DPV, EIS	Cinética de transferencia electrónica	Wang, J. ^[365]

Abreviaciones: AFM: *atomic force microscopy*; CV: *cyclic voltammetry*; DPV: *differential pulse voltammetry*; DSC: *differential scanning calorimetry*; EDX: *energy-dispersive X-ray spectroscopy*; EIS: *electrochemical impedance spectroscopy*; FT-IR: *Fourier transform infrared spectroscopy*; PL: *photoluminescence*; SEM: *scanning electron microscopy*; STM: *scanning tunneling microscopy*; TGA: *thermogravimetric analysis*; UV-Vis: *ultraviolet-visible spectroscopy*; XPS: *X-ray photoelectron spectroscopy*.

En esta tesis las superficies funcionalizadas con los glicósidos sintéticos se caracterizaron por medio de espectroscopía fotoelectrónica de rayos X (XPS), microscopía de efecto túnel (STM), microscopía de fuerza atómica (AFM), voltametría cíclica (CV) y espectroscopía de impedancia electroquímica (EIS). A continuación, se detallan brevemente los fundamentos de XPS, STM y AFM.

A3.1. Espectroscopía fotoelectrónica de rayos X

Los conceptos desarrollados en esta sección se encuentran detallados en Stevie F. A. y Donley C. L.^[370] y en Moulder J. F. *et al*.^[371]

A3.1.1. Efecto fotoeléctrico

Se denomina efecto fotoeléctrico a la emisión de electrones desde un material cuando éste se irradia con un haz de fotones. La energía cinética de los electrones

fotoemitidos contiene información acerca de la composición elemental del material, esto es, la identidad de los átomos, su estado químico y su entorno químico.

Cuando un fotón incide sobre un material puede colisionar con un electrón de la muestra. Si la energía $h.\nu$ del fotón es suficiente, el electrón será eyectado con una energía cinética E_k dada por:

$$E_k = h.\nu - E_b^F - \phi \quad (\text{A.1})$$

Donde ϕ es la función trabajo del material y E_b^F es la energía de unión del electrón, que se define como la diferencia de energía entre el estado final (N-1 electrones) y el estado inicial (N electrones), referida al nivel de Fermi del material.

Luego de la aplicación del haz de fotones, los electrones emitidos son colectados por un analizador, cuya función es medir su energía cinética, y son contados por un detector. Si la muestra y el espectrofotómetro están en contacto eléctrico, se puede demostrar que la energía cinética con que los electrones entran al analizador E'_k se relaciona con la energía de unión E_b^F según:

$$E_b^F = h.\nu - E'_k - \phi_{sp} \quad (\text{A.2})$$

Donde ϕ_{sp} es la función trabajo del espectrofotómetro. Entonces, E_b^F se obtendrá a partir de: la energía de los fotones incidentes $h.\nu$, que depende de la fuente utilizada; la función trabajo del espectrofotómetro (ϕ_{sp}), que es una variable independiente de la muestra y se obtiene mediante calibración; y E'_k , que es la magnitud medida por el analizador de energías. Luego, se construirá el espectro correspondiente, que relaciona la intensidad de electrones emitidos con su energía de unión. En los experimentos realizados en esta tesis, se utilizó una fuente monocromática de aluminio ($h.\nu_{Al\ k\alpha} = 1486,6\text{ eV}$), y ϕ_{sp} se determinó por calibración, utilizando una muestra de Au para la cual se conoce con exactitud la posición del pico $4f_{7/2}$ (83,93 eV).

A3.1.2. Espectro XPS

La espectroscopía fotoelectrónica de rayos X (o XPS por las siglas en inglés de *X-ray photoelectron spectroscopy*) es una técnica cuantitativa de análisis de superficies, en la que una muestra se somete a un haz de rayos X para obtener un espectro de electrones fotoemitidos. Las señales registradas corresponderán -con mayor probabilidad- a electrones de capas internas de aquellos átomos que estén ubicados sobre la superficie. En el trayecto desde el punto de origen hacia el detector, los fotoelectrones emitidos sufrirán pérdidas de energía por choques inelásticos, lo que se traduce en una atenuación

de la señal detectada. Es por esto que se considera que el 95% de la señal proviene de electrones originados en una capa de aproximadamente 3 nm de espesor.

A modo de ejemplo, en la Figura A.4 se muestra el espectro XPS de un electrodo de Au limpio, en el que se observan picos bien definidos que se distinguen de la línea de base. Un espectro típico de XPS está conformado por picos principales, picos Auger y picos secundarios, que se caracterizan por su posición en el espectro, su multiplicidad y su intensidad.

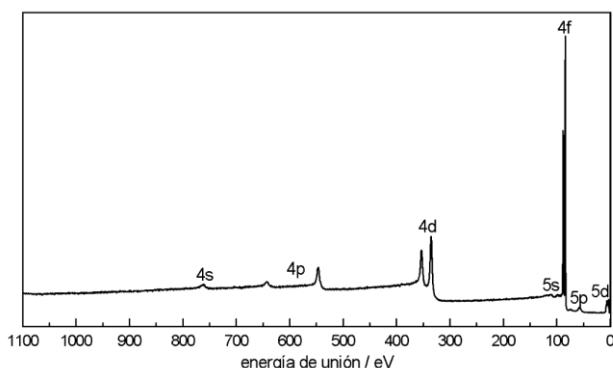


Figura A.4. Espectro XPS de un electrodo de Au limpio. Se distinguen los picos correspondientes a electrones de distintos orbitales atómicos.

Por un lado, los picos principales corresponden a los electrones fotoemitidos que llegan al detector sin sufrir pérdidas energéticas. Para nombrar estos picos se utiliza la notación atómica: nl_j , donde n es el número cuántico principal, l es el momento angular del orbital y j es el momento angular total del orbital del cual fue eyectado el electrón ($j = l + s$, donde s es el momento del espín del electrón). Cuando un electrón es eyectado de un orbital tipo s ($l = 0$), se observa un único pico en el espectro que se nota ns . Cuando el fotoelectrón, en cambio, proviene de un orbital p , d o f puede observarse tanto un único pico como un doblete. En el caso del doblete, la relación de áreas está asociada al acoplamiento spin-órbita y es característico del orbital del que proviene (Tabla A.15). La separación de energía entre picos (*splitting*) depende fuertemente del número atómico (Z), siendo mayor para elementos con mayor Z , y del número cuántico principal n , siendo menor cuanto mayor sea el valor de n . Por este motivo, el doblete sólo podrá observarse en casos en que haya buen compromiso entre el *splitting* y la resolución del equipo.

Tabla A.15. Picos observados según el momento angular (I) del orbital del cual proviene el electrón fotoemitido, identificados por su momento angular total (j), y su relación de áreas.

Orbital atómico	Momento angular total (j)	Relación de áreas
s	1/2	-
p	1/2 , 3/2	1:2
d	3/2 , 5/2	2:3
f	5/2 , 7/2	3:4

Por otro lado, los electrones Auger se originan como un mecanismo de relajación del sistema luego de haber ocurrido la fotoemisión de un electrón, más específicamente cuando ocurre la transición de un electrón hacia el hueco generado. Esta transición puede estar acompañada de la emisión de un fotón (fluorescencia de rayos X) o de la eyección de un segundo electrón ubicado en un estado de mayor energía (Figura A.5). En la práctica, en elementos de alto número atómico suele estar favorecida la primera, y en los de bajo número atómico, la segunda.

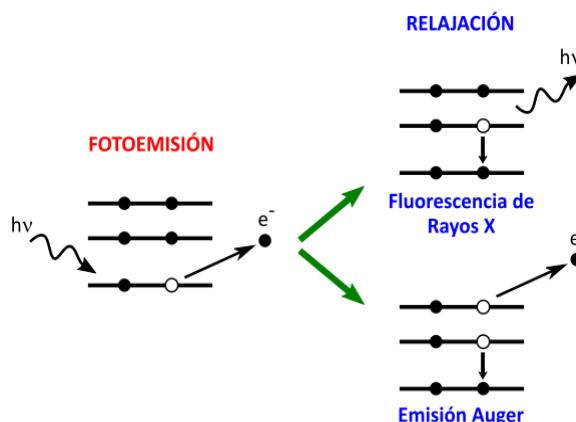


Figura A.5. Representación esquemática de los posibles procesos de relajación que acompañan a la fotoemisión de un electrón.

La apariencia del espectro XPS estará dada por la energía cinética de aquellos electrones que lleguen al detector. En el trayecto, los electrones pueden sufrir diversos choques inelásticos, motivo por el cual la técnica requiere condiciones de ultra alto vacío. Considerando que los electrones provenientes de las primeras capas atómicas de la superficie tienen menor probabilidad de sufrir choques en su trayecto hacia el detector, la técnica brinda mayormente información sobre la composición química superficial de los materiales. Los electrones fotoemitidos que sufren pérdidas energéticas por choques inelásticos generarán picos secundarios que constituyen la línea de base observada en el espectro. Asimismo, existen otros procesos físicos que contribuyen a la aparición de

picos secundarios que no serán discutidos por no ser relevantes en el desarrollo de esta tesis.

La posición de las señales en el espectro XPS se ve afectada principalmente por los números cuánticos n , l y j , pero también por el entorno químico en el cual se encuentra el elemento, debido a su carga y/o su potencial electrostático. Al corrimiento en la posición del pico debido a diferencias en su entorno químico se lo conoce como corrimiento químico. Por ejemplo, la posición de los picos de fotoemisión suele moverse a mayores energías de unión a medida que aumenta el estado de oxidación del átomo.

Si el flujo de rayos X se mantiene constante durante la medición, el cociente de intensidades corregidas por sus respectivos factores de sensibilidad puede utilizarse como indicador de la relación estequiométrica en la que se encuentran dos elementos A y B (o el mismo elemento en dos entornos químicos distintos).

$$\frac{I_A}{I_B} = \frac{s_A \cdot N_A}{s_B \cdot N_B} \quad (\text{A.3})$$

Donde I_i , s_i y N_i son la intensidad, el factor de sensibilidad relativa y la densidad de átomos de la especie i . La intensidad refiere a la integral de cada señal corregida restando la línea de base y la sensibilidad relativa es una propiedad que depende del elemento y el orbital del cual proviene el electrón fotoemitido y de la energía de los fotones utilizada.

El XPS es una técnica que puede aplicarse para el análisis de gran variedad de materiales, incluyendo compuestos inorgánicos, aleaciones metálicas, polímeros y otras superficies como vidrios, cerámicos y maderas. En esta tesis, fue utilizada para estudiar la composición atómica de un electrodo de oro a lo largo de la funcionalización con distintos compuestos orgánicos.

A3.2. Microscopía de efecto túnel

Los conceptos desarrollados en esta sección se encuentran detallados en Hofer W. A. et al.^[372]

La microscopía de efecto túnel (o STM por las siglas en inglés de *scanning tunneling microscopy*) es una técnica de caracterización que permite obtener imágenes de una superficie con resolución atómica.

El principio de funcionamiento de esta técnica reside en la aparición de una corriente cuando se aplica una tensión entre una punta muy fina y una muestra conductora que no están en contacto entre sí (Figura A.6). Este flujo de electrones viene dado por el “efecto túnel” y tiene lugar cuando los materiales se encuentran a una distancia del orden de los

À. Si la tensión aplicada es de algunos mV se observará una corriente de tunelaje en el orden de los pA, que se puede utilizar para testear propiedades físicas locales en la superficie, así como también para controlar la separación entre la punta y la muestra.

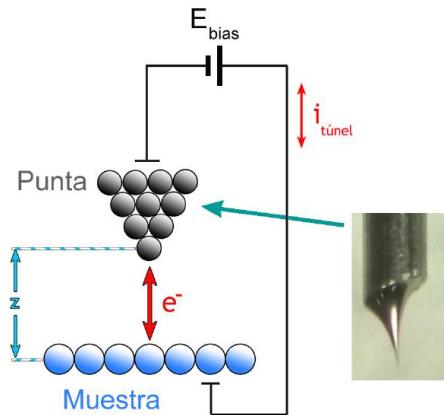


Figura A.6. Esquema básico de funcionamiento del microscopio de efecto túnel.

La corriente túnel es muy sensible a los cambios de distancia entre la punta y la muestra, por lo que un cambio en esta última conlleva una variación muy grande de corriente. Esta propiedad puede aprovecharse en el estudio superficial y, para ello, los equipos de STM están equipados con un sistema electrónico de retroalimentación que varía la distancia entre la muestra y la punta de forma tal de mantener la corriente en un valor constante. Luego, la punta se mueve en el plano xy barriendo un área específica y da como resultado un mapa topográfico tridimensional de la superficie (el eje z se representa con una escala de colores). El movimiento de la punta respecto a la superficie, tanto lateral como verticalmente, es resultado del accionar de piezoelectrónicos controlados por la electrónica del equipo, por lo que tiene precisión subatómica. En la medición por STM es importante la supresión de las vibraciones mecánicas que puedan añadir ruido a la señal de salida, por lo que la unidad soporte de la muestra se encuentra suspendida mediante resortes y suspensores con aire.

En STM, la energía de los electrones que circulan entre la punta y la muestra es incluso más pequeña que las energías típicas de los enlaces químicos, lo que permite obtener imágenes de resolución atómica no destructivas. A diferencia de otras técnicas analíticas de superficie que usan electrones, el STM puede operarse en aire, en líquidos y en vacío ya que no hay electrones libres involucrados en el experimento.

En experimentos de STM es muy importante la naturaleza y morfología de la punta. Los materiales más comunes son el tungsteno, el oro y aleaciones de Pt-Ir. La preparación

de la punta es un proceso de precisión ya que tiene influencia importante en la resolución de las imágenes obtenidas.

A3.3. Microscopía de fuerza atómica

Los conceptos que se presentan en esta sección fueron desarrollados por Giessibl, F. J.^[373]

La microscopía de fuerza atómica (o AFM por las siglas en inglés de *atomic force microscopy*) es una técnica de caracterización superficial en la que una punta montada sobre un muelle tipo voladizo (*cantilever*) actúa como sonda de barrido. Cuando la punta se encuentra a una distancia de la superficie de una a varias decenas de nanómetros, los materiales experimentan una interacción en la que predominan las fuerzas de Van der Waals. La fuerza de esta interacción provoca una desviación del *cantilever* regida por la ley de Hooke. Para detectar estas deflexiones, los equipos de fuerza atómica actuales utilizan un método óptico en el que un láser impacta sobre la cabecera del *cantilever* y se refleja hacia una placa CCD (dispositivo de carga acoplada). Cuando el *cantilever* se flecta, la dirección de la luz reflejada cambia ligeramente y es detectada por distintos píxeles en la CCD. El principio de funcionamiento del microscopio se esquematiza en la Figura A.7.

Para obtener una imagen de AFM, la punta se aproxima a la muestra hasta alcanzar un cierto grado de flexión (denominado *setpoint*). Al realizar un barrido en *xy* de la superficie, manteniendo constante la fuerza entre la punta y la muestra, se obtendrá un mapa topográfico tridimensional de la superficie.

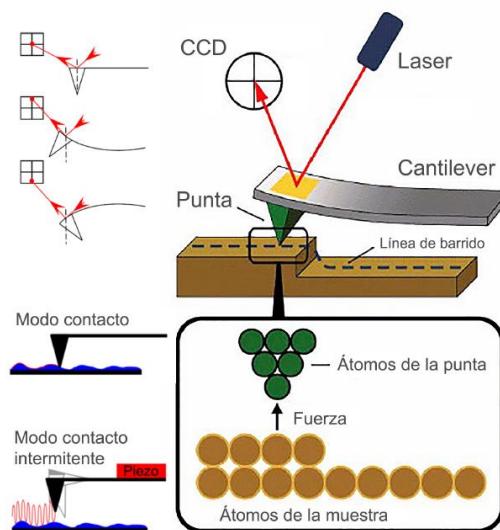


Figura A.7. Esquema de funcionamiento de un microscopio de fuerza atómica y modos de operación.

El AFM se puede operar en distintos modos, siendo los más frecuentemente utilizados el modo contacto, el modo no-contacto y el modo contacto intermitente o *tapping*. Si se coloca un *cantilever* a una distancia lejana de la superficie, tal que no existan interacciones apreciables, y luego se acerca la punta lentamente registrando las fuerzas con un sensor de fuerza, se obtendrá la curva de la Figura A.8. Allí se puede observar que a distancias grandes las fuerzas entre la punta y la muestra son de tipo atractivas (fuerza negativa) y que a distancias cortas las fuerzas son de tipo repulsivas (fuerza positiva). En la figura se indica qué tipo de fuerzas intervienen en los distintos modos de operación del AFM.

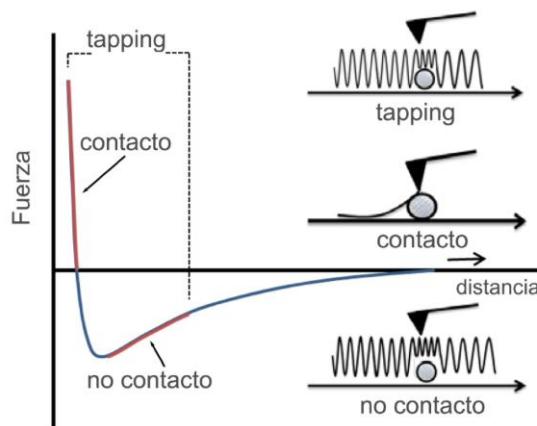


Figura A.8. Curva de fuerza de interacción en función de la distancia de la punta del *cantilever* a la muestra. Fuerzas negativas indican que la muestra y la punta se atraen, mientras que valores positivos indican repulsión.

El modo contacto trabaja en condiciones donde la punta es repelida por la superficie. Suele ser utilizado en superficies duras, como metales o carbones, donde no existe riesgo de daños superficiales. En los modos no-contacto y *tapping*, también llamados modos de operación acústicos, la punta está acoplada a un oscilador que hace que el *cantilever* oscile a una frecuencia cercana a su frecuencia natural de resonancia. Por un lado, en el modo no contacto la punta se aproxima a la superficie lo suficiente como para flexionarse, pero sin tocar la muestra. Esto es particularmente útil en superficies sensibles a deformaciones como, por ejemplo, aquellas en las que se depositó una película capa por capa. Por otro lado, en el método de *tapping* la punta entra en contacto con la superficie de forma intermitente, por lo que se utiliza en el estudio de superficies tanto duras como suaves. Este último es el modo más utilizado en AFM porque suele tener mejor resolución lateral y brinda información respecto a la dureza de la superficie (cambios en la fase de vibración). También es frecuente el uso combinado de distintos modos de operación para

obtener información adicional. En los ensayos realizados en esta tesis se aplicó el modo *tapping* para obtener las imágenes de las superficies en estudio.

Así como en el caso del STM, la punta utilizada para la medición del AFM es determinante en la resolución de las imágenes registradas. En la Figura A.9 se muestran imágenes tomadas por microscopía de barrido electrónico de un *cantilever* de silicio similar a los empleados en esta tesis. Para obtener imágenes con buena resolución, el diámetro del extremo de la punta debe ser menor a 10 nm.

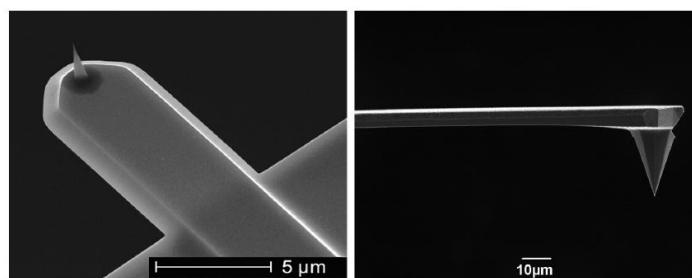


Figura A.9. Imágenes SEM (microscopía de barrido electrónico) de un *cantilever* de silicio. Chip visto desde abajo (izquierda) y de lado (derecha).

La constante de fuerza de una punta de modo contacto es del orden de 0,2 N/m, mientras que las puntas de modo no-contacto o *tapping* tienen constantes de fuerza del orden de 50-60 N/m. Típicamente la frecuencia natural de oscilación de los *cantilever* usados estaba entre 160 y 350 kHz.

La microscopía de fuerza atómica (AFM) es una herramienta muy utilizada para la obtención de imágenes con alta resolución de superficies a escalas nanométricas y es aplicable a muchos campos diferentes de la ciencia, incluyendo el campo de los biosensores. En esta tesis tanto el AFM como el STM se utilizaron para evaluar las diferencias morfológicas experimentadas por un electrodo de oro sometido a una sucesión de reacciones de superficie.

A4. Técnicas electroquímicas

Los conceptos generales de electroquímica y los específicos de cada técnica descripta a continuación se encuentran detallados en Bard A. J. y Faulkner L. R.^[374]

A4.1. Introducción

Las técnicas electroquímicas utilizan las propiedades de óxido reducción de especies químicas junto con propiedades de electrodos para describir procesos de transferencia de carga. La respuesta de un electrodo dependerá, en gran medida, de la termodinámica

y cinética de los procesos involucrados, así como de fenómenos de transporte de masa. Una de las grandes ventajas de estas técnicas es que emplean equipamiento relativamente económico en comparación con otras metodologías, como la microscopía electrónica o diversas técnicas espectroscópicas.

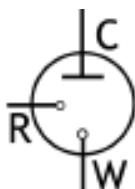


Figura A.10. Esquema de una celda de tres electrodos. “CE”=contraelectrodo, “RE”=electrodo de referencia y “WE”=electrodo de trabajo.

Los experimentos electroquímicos más comunes se llevan a cabo en celdas de tres electrodos (Figura A.10). Se trata de un sistema que incluye: un electrodo de trabajo (*WE*) donde ocurrirá la transferencia de carga con las especies electroactivas a estudiar; un electrodo de referencia (*RE*) que permite determinar el potencial del electrodo de trabajo; y un contraelectrodo (*CE*) a través del cual circula la corriente, cerrando el circuito. Los tres electrodos deben estar en contacto con un “electrolito soporte” conformado por iones transportadores de carga.

El sistema de tres electrodos permite que el potencial del electrodo de referencia permanezca constante e independiente frente a los cambios de potencial/corriente registrados en el electrodo de trabajo y el contraelectrodo. A través del electrodo de referencia no habrá circulación de corriente significativa. Estos electrodos están constituidos por especies idealmente no polarizables, esto es, especies que se reducen u oxidan rápidamente (proceso electroquímico “reversible”), garantizando que el potencial permanezca estable en su valor termodinámico. El electrodo de referencia más utilizado (y el elegido para efectuar los experimentos de esta tesis) es el electrodo de Ag/AgCl. Se trata de un alambre de Ag recubierto de una capa de AgCl(s) y embebido en una solución acuosa de cloruro de potasio 3 M. Otros electrodos de referencia comúnmente utilizados son el electrodo de calomel y el electrodo normal de hidrógeno.

Las técnicas electroquímicas analíticas pueden ser divididas en dos grandes grupos: las amperométricas y las potenciométricas. Las técnicas en las que se aplica una perturbación en el potencial son las denominadas amperométricas, ya que la respuesta que se registra es la corriente. Cuando, en cambio, se modifica la corriente para registrar la variación en el potencial del electrodo, las técnicas se conocen como potenciométricas.

Las técnicas electroquímicas utilizadas en esta tesis son amperométricas. Los potencióstatos disponibles en la actualidad permiten aplicar distintas funciones de potencial, generando así, distintos tipos de respuestas de corriente. Esto da lugar a una variedad de técnicas electroquímicas que permiten estudiar la cinética y termodinámica de distintos procesos que ocurren en el electrodo de trabajo. La técnica a utilizar dependerá del sistema químico en estudio y de la información que se quiera obtener.

Las técnicas amperométricas aplicadas en esta tesis son la voltametría cíclica (o CV, por las siglas en inglés de *cyclic voltammetry*) y la espectroscopía de impedancia electroquímica (o EIS, por las siglas en inglés de *electrochemical impedance spectroscopy*). Ambos ensayos se emplearon para la caracterización electroquímica de las superficies funcionalizadas con azúcares sintéticos, mientras que la EIS fue la técnica de detección elegida para el sensado de anticuerpos. A continuación, se presenta una breve descripción de los fundamentos de estas técnicas.

A4.2. Voltametría cíclica

Los conceptos desarrollados en esta sección se encuentran descriptos en Elgrishi, N. *et al.*^[375] y en Kissinger P. T. y Heineman W. R.^[376]

La voltametría cíclica es una técnica amperométrica en la que un sistema electroquímico se somete a una perturbación del potencial en forma de diente de sierra, también conocida como barrido lineal periódico (Figura A.11). El número de períodos aplicado será el número de ciclos y la pendiente de la función de entrada, o velocidad de barrido v , será constante en módulo. Si se grafica la respuesta de la corriente en función del potencial aplicado se obtiene la curva de corriente (i) vs. potencial (E), curva voltamétrica o voltagrama. La forma exacta de esta curva dependerá del tipo de proceso que tiene lugar en el electrodo de trabajo.

En un experimento con una celda de tres electrodos en el que las especies disueltas no poseen actividad redox en el rango de potenciales aplicados, la corriente que circula por la celda será únicamente corriente no-faradaica originada por la carga y descarga de la doble capa eléctrica. La variación del potencial del electrodo de trabajo se traduce en una variación de la densidad de carga eléctrica sobre la superficie del conductor, fenómeno que da lugar a una redistribución de los iones disueltos en forma de una doble capa eléctrica en la interfase electrodo-electrolito; en otras palabras, los iones en solución se disponen en la interfase de forma tal de apantallar la densidad de carga acumulada sobre la superficie del conductor. El circuito que mejor describe este proceso es el de un

capacitor asociado a una variable C , la capacitancia, cuyo valor depende mayormente del área electroactiva del electrodo y de la concentración de iones en solución.

En sistemas no faradaicos, el fenómeno descripto anteriormente dará lugar a un voltágrafo de aspecto similar al de la Figura A.11.b. Nótese que, en estas curvas, el signo de la corriente corresponde al signo de la velocidad de barrido. En un barrido anódico ($v > 0$, barrido $E_0 \rightarrow E_1$) la corriente es positiva mientras que un barrido catódico ($v < 0$, barrido $E_1 \rightarrow E_0$) toma valores negativos.

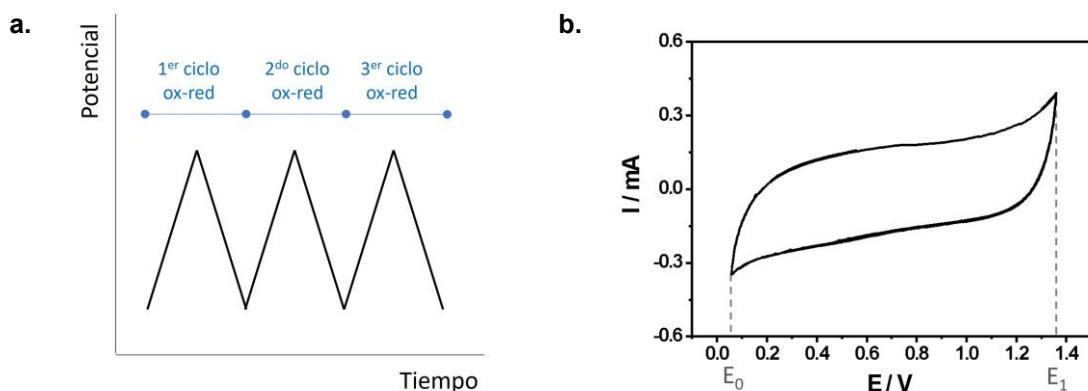


Figura A.11. (a) Función diente de sierra de potencial aplicado sobre el electrodo de trabajo en una voltametría cíclica. (b) Voltágrafo de un electrodo en el que solamente ocurre la carga y descarga de la doble capa eléctrica. La imagen corresponde a un electrodo poroso de película carbón vulcan utilizando como electrolito soporte KOH 0,1 M saturado con argón.

Si ahora al electrolito soporte se agrega una especie electroactiva, es decir, que pueda reducirse u oxidarse (reacción A.4), se registrará una corriente correspondiente al pasaje de electrones entre el metal y las especies en solución (corriente faradaica, i_f) que se adicionará a la corriente no faradaica (i_{nf}) debida a la carga y descarga de la doble capa eléctrica. En la reacción representada en la ecuación A.4, Ox corresponde a la especie oxidada y Red a la especie reducida.



Si suponemos que el potencial redox de la pareja Ox/Red es E^0 , que se parte de una solución de la especie reducida y que el barrido inicial es anódico, el gráfico de i vs E presentará un máximo a corrientes positivas y un mínimo a corrientes negativas conocidos como pico anódico ($i_{p,an}; E_{p,an}$) y pico catódico ($i_{p,cat}; E_{p,cat}$), respectivamente. La Figura A.12 representa un voltágrafo modelo típico de una pareja redox reversible.

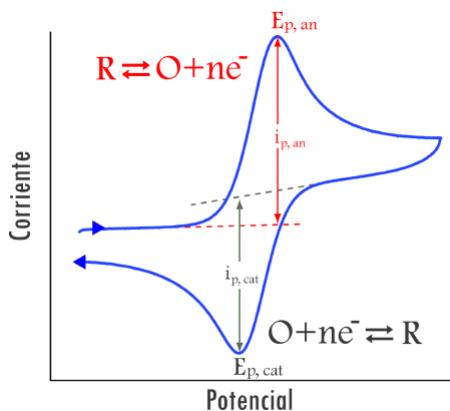


Figura A.12. Voltograma representativo de un sistema electroquímico faradaico de una pareja redox reversible $Ox + n.e^- \rightleftharpoons Red$. En el gráfico se señala la posición de los picos anódico y catódico como $(i_{p,an}; E_{p,an})$ y $(i_{p,cat}; E_{p,cat})$.

El potencial formal de la pareja redox reversible se puede calcular a partir del voltograma registrado y corresponderá al valor promedio entre $E_{p,an}$ y $E_{p,cat}$ según:

$$E^{0'} = \frac{E_{p,an} + E_{p,cat}}{2} \quad (A.5)$$

La forma de la curva correspondiente a un proceso faradaico de tipo $Ox + n.e^- \rightleftharpoons Red$ se puede describir empíricamente de la siguiente manera: inicialmente, cuando el potencial aplicado está por debajo de $E^{0'}$, la corriente es cercana a cero ya que no existen especies que se reduzcan a ese potencial. A medida que el potencial crece siguiendo la función de la Figura A.11.a y acercándose a $E^{0'}$ (corriente anódica o de oxidación), se ve favorecida (se hace termodinámicamente espontánea) la oxidación de las moléculas de *Red* ubicadas en las cercanías de la superficie y, por lo tanto, la densidad de corriente aumenta. Pasando el valor de potencial de $E^{0'}$, la corriente alcanza un máximo cuando el consumo de *Red* en la superficie no es compensado por el flujo por difusión de *Red* hacia el electrodo, lo que provoca una acumulación de moléculas de *Ox* sobre el electrodo. El menor flujo de reactivo, entonces, se ve reflejado como una caída en la corriente total. Cuando la pendiente de la señal de entrada cambia de signo, se observa el mismo comportamiento, pero a la inversa. Primero, el electrodo se encuentra saturado en moléculas de *Ox* y la corriente es pequeña. A medida que el potencial aplicado se acerca a $E^{0'}$, la reducción de *Ox* genera una corriente catódica o de reducción que, por un fenómeno análogo al descripto anteriormente, pasará a través de un pico y volverá a decaer hasta corrientes cercanas a cero.

En sistemas faradaicos, no es posible dar una solución analítica que describa la forma de la curva i vs E , pero, si se considera que el proceso electroquímico es reversible

y que existe difusión lineal semi-infinita de las especies hacia el electrodo, la corriente máxima circulante a través de un electrodo plano (i_p) viene dada por la expresión de Randles-Sevcik:

$$i_p = (2,69 \cdot 10^5) \cdot n^{3/2} \cdot D^{1/2} \cdot C^* \cdot v^{1/2} \quad (\text{A.6})$$

Donde C^* es la concentración de la especie en el seno de la solución y D el coeficiente de difusión de dicha especie. Por otro lado, se puede demostrar que la separación entre los picos es independiente de la velocidad de barrido e igual a:

$$E_{p,an} - E_{p,cat} = \frac{59 \text{ mV}}{n} \quad (\text{A.7})$$

Estas ecuaciones suponen una cinética de intercambio de electrones infinitamente rápida, es decir, que en todo momento las concentraciones se ajustan a las concentraciones nernstianas y no se consideran limitaciones por cinética. En el caso de que la cupla redox posea una cinética muy lenta, la posición y corriente de los picos se verán afectadas.

A modo de resumen, los ensayos de voltametría cíclica permiten estudiar características de un sistema electroquímico tales como la reversibilidad de una reacción redox, el mecanismo de transferencia de carga (por ejemplo, si existen reacciones acopladas), el potencial electroquímico redox de la cupla, la concentración de especies en solución y parámetros asociados al transporte de masa como la constante difusional de dicha especie.

A4.3. Espectroscopía de impedancia electroquímica

Los conceptos desarrollados a continuación se encuentran detallados en Chang B-Y. y Park S-M.^[377] y en Lanzanas A. y Prodromidis M.^[208]

La espectroscopía de impedancia amperométrica consiste en aplicar una perturbación sinusoidal de potencial en torno a un potencial medio a una determinada frecuencia o rango de frecuencias, y registrar la corriente de respuesta. La perturbación aplicada sobre el sistema debe ser pequeña para garantizar linealidad en la respuesta, por lo que típicamente se emplean amplitudes de potencial cercanas a 10 mV. Luego, a partir de la amplitud y fase de la corriente sinusoidal de salida se puede calcular la impedancia del sistema electroquímico en estudio.

La espectroscopía de impedancia permite estudiar la resistencia eléctrica compleja de un sistema electroquímico y es sensible a los fenómenos de superficie y a los cambios en las propiedades de la interfase electrodo/electrolito. En el campo de los biosensores,

se utiliza como método de detección de eventos de unión sobre la superficie del transductor, a la vez que puede aplicarse en la caracterización de la modificación de dicha superficie durante la inmovilización del elemento de biorreconocimiento.

A4.3.1. Aspectos generales

En los circuitos de corriente continua (CC), el flujo de corriente se ve reducido cuando se introduce un resistor. Esta oposición se denomina resistencia (R) y viene dada por la ley de Ohm:

$$R = \frac{E}{i} \quad (\text{A.8})$$

Donde E es el voltaje aplicado e i es la corriente resultante. En un resistor ideal el valor de la resistencia es independiente de la corriente y del potencial.

En circuitos de corriente alterna (CA), esto se puede generalizar por medio de la impedancia (Z). En particular, una diferencia con la CC es que esta propiedad varía con la frecuencia de la corriente alterna:

$$Z = \frac{E(t)}{i(t)} \quad (\text{A.9})$$

En los circuitos de CA, la impedancia, la corriente y el voltaje varían de manera sinusoidal con el tiempo, por lo que es conveniente representarlos por medio de fasores para manejar convenientemente sus magnitudes y fases. De esta manera, la impedancia queda representada como un número complejo, que se puede escribir como:

$$Z = |Z| \cdot [\cos(\varphi) + j \cdot \sin(\varphi)] = |Z| \cdot e^{j\varphi} \quad (\text{A.10})$$

El empleo de números complejos facilita la resolución matemática de las ecuaciones diferenciales que describen el comportamiento del circuito. En especial, se facilita la suma y multiplicación de fasores, que corresponden a la combinación de voltajes y corrientes en circuitos en serie y paralelo; esto, como veremos más adelante, es muy útil cuando se emplean circuitos equivalentes para modelar los procesos que tienen lugar en una celda electroquímica.

Como se definió antes, la impedancia puede pensarse como la oposición al flujo de corriente en circuitos de CA e incluye tanto resistencias (R) como reactancias (X), por lo que se puede expresar como:

$$Z = R + j \cdot X = Z' + j \cdot Z'' \quad (\text{A.11})$$

Donde Z' y Z'' son la parte real y la parte imaginaria de Z , respectivamente.

Al aplicar una perturbación sinusoidal de potencial sobre una celda electroquímica, el flujo de corriente se ve afectado por distintos procesos. Algunos pueden ser representados mediante un resistor, lo que introduce una impedancia resistiva al circuito (Z_R), mientras que otros pueden ser modelados -o entendidos- como un capacitor, causante de una impedancia capacitiva (Z_C). En particular, un capacitor generará un cambio en la fase de la señal aplicada, relativo a la propiedad C (capacitancia) del capacitor. Las ecuaciones que describen estos procesos son:

$$Z_R(\omega) = R \quad (\text{A.12})$$

$$Z_C(\omega) = -\frac{j}{\omega \cdot C} \quad (\text{A.13})$$

A4.3.2. Elementos circuitales. Ajuste de curvas de Nyquist

En espectroscopía de impedancia el equipo utilizado es un potenciómetro acoplado a un analizador de frecuencias (*frequency response analyzer*). En esta disposición, el potenciómetro controla el voltaje aplicado al sistema y el FRA analiza la respuesta en frecuencia, para así determinar impedancia del sistema electroquímico. La información obtenida se representa a través de una serie de gráficos, entre los que destacan los gráficos de Bode y de Nyquist. Los gráficos de Bode relacionan la impedancia total en función de la frecuencia ($\log (|Z|) = f(\log (\frac{\omega}{2\pi}))$ o la fase en función de la frecuencia ($-\varphi = f(\log (\frac{\omega}{2\pi}))$)). Por su parte, en los gráficos de Nyquist se representa la componente imaginaria de la impedancia vs. la componente real ($-Z'' = f(Z')$).

Si bien la impedancia puede ser analizada utilizando las ecuaciones fundamentales que describen los procesos que tienen lugar dentro de celdas electroquímicas, el método de análisis más común es el modelado mediante circuitos equivalentes. En estos modelos, los distintos procesos se representan mediante elementos circuitales ideales. Esta metodología simplifica el análisis de datos, pero requiere criterio por parte del operador para elegir y conectar adecuadamente estos elementos: aquellos procesos por los que circula la misma corriente total deberán conectarse en serie, mientras que cuando la corriente pueda ir a través de distintos procesos los componentes se deberán disponer en paralelo, dado que la corriente tiende a seguir el camino de menor impedancia. Matemáticamente, cuando dos impedancias se encuentran en serie la impedancia total se calcula como $Z = Z_1 + Z_2$, mientras que si se encuentran en paralelo se utiliza $Z_{\parallel} = (Z_1^{-1} + Z_2^{-1})^{-1}$.

La respuesta de impedancia de un sistema electroquímico de tres electrodos no-faradaico (donde no ocurren reacciones redox) está afectada mayormente por los siguientes procesos:

1- La resistencia óhmica del electrolito entre los electrodos de trabajo y de referencia, que se conoce como resistencia del electrolito o R_{sol} . Esta componente se origina en la conductancia finita de los iones, por lo que depende de la conductividad del electrolito, y está directamente asociada a la distancia entre RE y WE.

2- La carga y descarga de la doble capa eléctrica. Cuando se aplica CA, la doble capa eléctrica en la interfase electrodo/electrolito se comporta como un capacitor y se simboliza como C_{dc} .

En este caso, el resistor y el capacitor estarán conectados en serie, por lo que la impedancia quedará descripta como:

$$Z = Z_R + Z_C = R_{sol} - \frac{j}{\omega \cdot C_{dc}} \quad (\text{A.14})$$

Donde ω es la frecuencia angular de la corriente alterna. El ajuste de los datos experimentales a la ecuación (A.14) brindará la solución analítica de la impedancia del sistema en estudio.

Es usual la adición de una especie electroactiva al electrolito soporte para aumentar la sensibilidad de la técnica. En estos experimentos, la impedancia total se verá afectada, adicionalmente, por el intercambio de electrones (transferencia de carga) entre el electrodo de trabajo y la especie en solución en respuesta a la perturbación de potencial aplicada. Las especies electroactivas más utilizadas en ensayos de EIS relacionados a biosensores son los derivados del ferroceno, la mezcla $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ y las sales de rutenio.^[378]

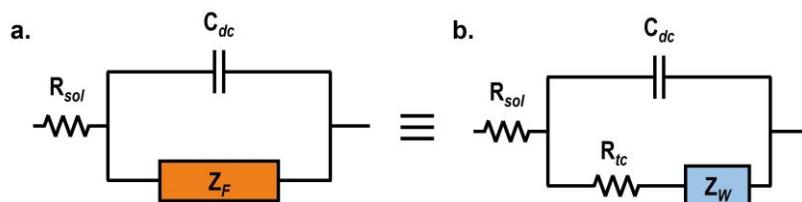


Figura A.13. Circuitos equivalentes de una celda electroquímica faradaica. Adaptado de Lazanas A.C. y Prodromidis M.I.^[208]

Cuando la celda contiene una pareja redox del tipo (A.4), la EIS suele medirse aplicando un potencial sinusoidal en torno al potencial estándar E^0 de la pareja a fin de conseguir la menor resistencia a la transferencia de carga posible. Dicho de otro modo, la

conductancia causada por el proceso redox sobre el electrodo es máxima en dicho potencial. En estos sistemas, la corriente total que pasa a través de R_{sol} se dividirá entre la corriente implicada en la carga/descarga de la doble capa eléctrica y la corriente relacionada al proceso faradaico. En consecuencia, el circuito equivalente que describe el comportamiento de la celda supone un arreglo en paralelo de las impedancias asociadas a dichos procesos, tal y como se esquematiza en la Figura A.13.a. Allí, el proceso faradaico se representa con una impedancia general Z_F , que se ve afectada tanto por la cinética de la reacción redox como por la difusión de las especies hacia la superficie del electrodo de trabajo, de forma tal que:

$$Z_F = R_{tc} + Z_W \quad (\text{A.15})$$

Donde R_{tc} es la resistencia a la transferencia de carga y Z_W es la impedancia de Warburg. El circuito equivalente que contiene a estos elementos se denomina comúnmente circuito de Randles (Figura A.13.b).

Por un lado, la resistencia a la transferencia de carga está relacionada con la cinética del proceso redox sobre el electrodo de trabajo y con la barrera energética que impide la llegada de las especies redox al electrodo, ya sea por repulsión electrostática o por impedimento estérico. Esta variable se puede expresar como:

$$R_{tc} = \frac{R \cdot T}{k^0 \cdot n^2 \cdot F^2 \cdot A \cdot C} \quad (\text{A.16})$$

Donde k^0 es la velocidad de transferencia electrónica heterogénea, n es el número de electrones transferidos en la reacción redox, A es el área electroactiva del electrodo de trabajo y C es la concentración de las especies redox asumiendo que ésta es la misma que la del bulk y que $C_{Ox} = C_{Red} = C$.

La impedancia Z_W expresa la dificultad del transporte de masa de las especies electroactivas hacia la superficie del electrodo. Si se considera difusión lineal semi-infinita, esta variable se puede escribir como:

$$Z_W = \frac{\sigma \cdot (1 - j)}{\sqrt{\omega}} \quad (\text{A.17})$$

$$\sigma = \frac{R \cdot T}{n^2 \cdot F^2 \cdot A \cdot \sqrt{2} \cdot \sqrt{D} \cdot C} \quad (\text{A.18})$$

Donde D es el coeficiente de difusión de las especies electroactivas asumiendo que $D_{Ox} = D_{Red} = D$. Es importante destacar la dependencia directa de la impedancia de

Warburg con la frecuencia ω . En la ecuación (A.17) se puede observar que a altas frecuencias este término tenderá a cero.

Matemáticamente, el circuito modelo del proceso faradaico representado en la Figura A.13.b corresponde a un proceso de impedancia:

$$Z = R_{sol} + \left[(R_{tc} + Z_W)^{-1} + \left(-\frac{j}{\omega \cdot C_{dc}} \right)^{-1} \right]^{-1} \quad (\text{A.19})$$

Si a la ecuación (A.19) se incorpora el término de Z_W dado por la ecuación (A.17) y se reescribe la impedancia como un número complejo se obtendrán las componentes Z' y Z'' , que darán lugar a los gráficos de Nyquist del proceso en estudio.

La relación de Z_W con la frecuencia da origen a la existencia de dos regiones en los gráficos de Nyquist, tal y como puede verse en la Figura A.14. La curva esperada para un proceso faradaico en un amplio rango de frecuencias contiene: un semicírculo a frecuencias altas, donde la impedancia del proceso redox Z_F está principalmente asociada a la cinética de transferencia de carga R_{tc} (zona de control cinético); una región intermedia en la que se observa un cambio en la forma de la curva, que indica que al disminuir la frecuencia la difusión de las especies hacia el electrodo de trabajo comienza a limitar la conductancia; y una línea recta de pendiente 1 a frecuencias bajas, donde la impedancia está mayormente determinada por los procesos de transferencia de masa Z_W (zona de control por transferencia de masa).

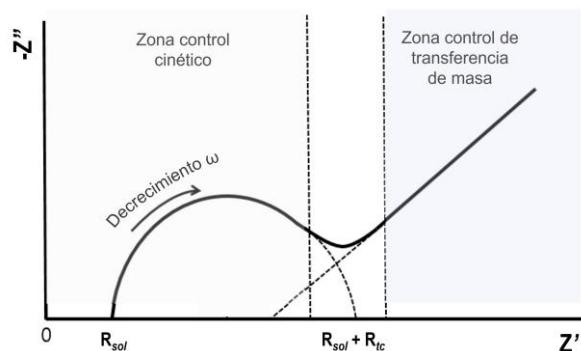


Figura A.14. Curva de Nyquist típica de una celda electroquímica faradaica de comportamiento acorde al circuito de Randles de la Figura A.13.b. Se distinguen las zonas de control cinético (altas frecuencias) y de control de la transferencia de masa (bajas frecuencias).

La curva de Nyquist de un sistema electroquímico permite obtener de forma directa ciertos parámetros que describen su comportamiento. Por un lado, el valor en el que el semicírculo toca el eje x en la zona a altas frecuencias es la resistencia de la solución (R_{sol}), mientras que el diámetro del semicírculo se corresponde con la resistencia a la

transferencia de carga (R_{tc}) (véase Figura A.14). De todas formas, el valor numérico de todos los componentes circuitales puede obtenerse a través de softwares específicos (*Zview*, *Zplot*, entre otros) que permiten ajustar los datos de los espectros de impedancia a distintos circuitos equivalentes.

En la práctica, al trabajar con electrodos conformados por metales macroscópicamente planos (monocristalinos o policristalinos) la curva de Nyquist presenta un semicírculo no simétrico (el valor del diámetro no coincide con el doble del radio) como el que se puede ver en la Figura A.15. En estos casos, el modelo se puede corregir considerando que el circuito presenta un elemento de fase constante (o CPE según sus siglas en inglés) en lugar de un capacitor ideal (C_{dc}). La impedancia asociada a este elemento circuital es:

$$Z_{CPE} = \frac{1}{Y_0 \cdot (j \cdot \omega)^n} \quad (A.20)$$

Donde Y_0 es el parámetro que contiene información sobre la capacitancia, y n es una constante entre 0 y 1. El exponente n define la desviación de la idealidad y se relaciona al ángulo θ como

$$\theta = 90^\circ \cdot (1 - n) \quad (A.21)$$

Notar que cuando $n = 1$ la expresión (A.20) se iguala con (A.13).

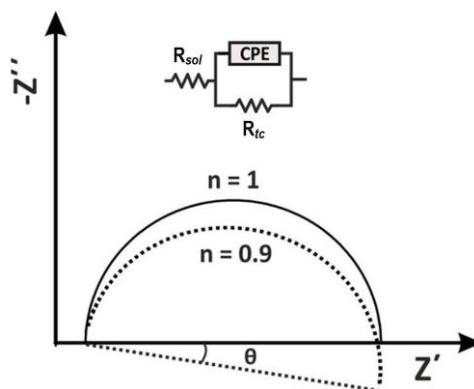


Figura A.15. Gráfico de Nyquist para un circuito $R_{sol}(R_{ct} \cdot CPE)$. Imagen adaptada de Lazanas A.C. y Prodromidis M.I.^[208]

Entonces, en el análisis de la impedancia de electrodos de metales macroscópicamente planos es usual el empleo de un circuito de Randles modificado, donde la capacidad de doble capa se describe como un CPE. Luego, el ajuste de las curvas de Nyquist obtenidas a través de un software de procesamiento de datos permite obtener los valores de Y_0 y de la constante n del proceso en estudio.

En conclusión, la espectroscopía de impedancia electroquímica permite obtener diversos parámetros asociados a un sistema electroquímico dado. El uso de circuitos equivalentes facilita la interpretación de la señal obtenida, lo que permite identificar y caracterizar los procesos fisicoquímicos y electroquímicos que ocurren en la celda. La dependencia de la impedancia del proceso redox con la frecuencia AC permite trabajar en condiciones en las que se obtiene información de la cinética de transferencia de carga sin efectos de los procesos de transporte de masa. En el área de biosensores, la EIS brinda información sobre la naturaleza de la superficie sensora (electrodo de trabajo), la presencia de films depositados sobre la misma y sobre la cinética y la termodinámica de su interacción con especies electroactivas y electrolitos en solución.

A5. Microbalanza de cristal de cuarzo con disipación (QCM-D)

Los conceptos desarrollados en esta sección se encuentran detallados en Rodahl, M. *et al.*^[379] y Easley A. D. *et al.*^[380]

La microbalanza de cuarzo (o QCM por las siglas en inglés de *quartz crystal microbalance*) es un dispositivo que aprovecha las propiedades piezoelectricas del cuarzo para medir masas muy pequeñas adsorbidas sobre una superficie. En particular, la técnica se basa en la propiedad de este material de deformarse al aplicar una tensión eléctrica (efecto piezoelectrico inverso).

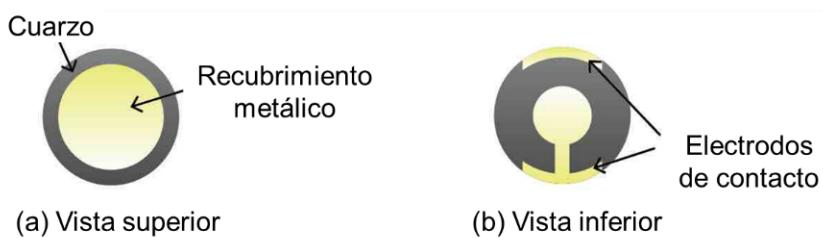


Figura A.16. Representación esquemática de las obleas de cristal de cuarzo utilizadas para experimentos de QCM y QCM-D. Imagen adaptada de <https://www.nanoscience.com>.

Cuando se aplica una tensión eléctrica oscilante, un cristal de cuarzo experimenta una deformación periódica en su estructura cristalina, lo que hace que el material oscile a una frecuencia característica (frecuencia de resonancia). En QCM, la superficie de trabajo consiste en una delgada oblea de cristal de cuarzo cubierta en ambas caras por electrodos metálicos, dispuestos como se observa en la Figura A.16. Si sobre la cara superior de la oblea se deposita una película de un material rígido, la oblea experimentará un cambio en su frecuencia de resonancia. Este cambio con respecto a la frecuencia original (Δf) se

puede relacionar con el cambio en la masa de la oblea (Δm) a través de la ecuación de Sauerbrey:^[319]

$$\Delta f = -\frac{2 \cdot f_0^2 \cdot \Delta m}{\sqrt{\mu_q \cdot \rho_q} \cdot A} \quad (\text{A.22})$$

Donde Δf es el cambio de frecuencia medido, f_0 es la frecuencia resonante fundamental del cristal de cuarzo, Δm es la masa de la película, A es el área activa piezoeléctrica, ρ_q la densidad del cuarzo y μ_q es el módulo de corte del cuarzo (para un cristal de cuarzo de corte AT corresponde a $2,947 \cdot 10^{11} \text{ g.cm}^{-1}\text{s}^{-2}$). El modelo de Sauerbrey es aplicable en aquellos casos en que la capa adsorbida es de un material rígido y uniforme (metal o polímero seco) ya que, en estas condiciones, la onda acústica se propaga a igual velocidad tanto en el electrodo metálico como en el material depositado, es decir, los materiales están acoplados.

El modelo mencionado anteriormente es válido sólo cuando los cambios de frecuencia se miden en aire o en vacío. En los casos en que la medición se realiza en un medio líquido o en los que la película adsorbida posee propiedades viscoelásticas (por ejemplo, polímeros o biomoléculas) aparece una fuerza adicional sobre el sistema: la disipación de la energía de oscilación por pérdidas mecánicas. Este fenómeno se debe a que los materiales no se encuentran totalmente acoplados. Para relacionar el cambio en la frecuencia de oscilación con la masa adicional cuando existe disipación, se emplea otro modo de operación del equipo: la técnica de microbalanza de cuarzo con disipación (o QCM-D por las siglas en inglés de *quartz cristal microbalance with dissipation*). El principio de funcionamiento de esta técnica se esquematiza en la Figura A.17.

En QCM-D, en lugar de aplicar un potencial oscilante constante, el cristal de cuarzo se excita a una frecuencia cercana a la de resonancia por un período corto, la fuente se apaga y luego se registra la caída de voltaje en función del tiempo. Cuando la superficie está recubierta por materia viscosa la oscilación se ve amortiguada provocando un decaimiento exponencial rápido del voltaje según:

$$A(t) = A_0 \cdot e^{-t/\tau} \cdot \sin(\omega \cdot t + \varphi) \quad (\text{A.23})$$

Donde A_0 es la amplitud del potencial de salida, τ es el tiempo de decaimiento, ω es la frecuencia angular de oscilación del potencial de salida y φ es la fase de salida. Luego, con el valor de τ obtenido de la ecuación (A.23) se puede obtener el factor de disipación D según:^[379]

$$D = \frac{1}{\omega \cdot \tau} \quad (\text{A.24})$$

El parámetro D cuantifica la amortiguación que ejercen sobre el sistema las propiedades viscoelásticas de la muestra.

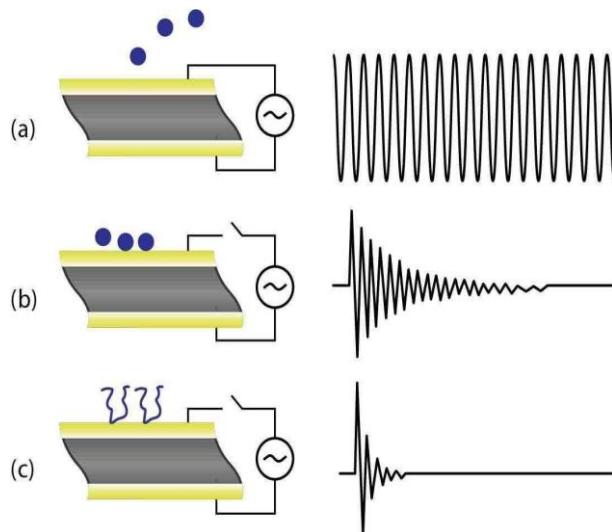


Figura A.17. Representación esquemática del principio de funcionamiento de QCM-D. (a) El cristal de cuarzo limpio oscila a una frecuencia cercana a la resonancia al aplicar de un potencial oscilante constante. (b) Si sobre la superficie se depositó una capa de material rígido al abrir el circuito se produce una caída de potencial lenta. (c) Si sobre la superficie se depositó una capa de material viscoelástico al abrir el circuito se produce una caída de potencial más rápida. Imagen tomada de <https://www.nanoscience.com>.

Los procesos de excitación del cristal de cuarzo, registro y ajuste de la curva de decaimiento ocurren en la escala de los milisegundos por lo que es posible la adquisición de datos por QCM-D a tiempo real. Luego, las variaciones en la frecuencia de resonancia (Δf) y en la disipación (ΔD) de las oscilaciones pueden ser relacionadas con la masa depositada sobre el electrodo y con las propiedades viscoelásticas del film, a través de diversos modelos teóricos. Estas aproximaciones no serán aplicadas en esta tesis, por lo que los modelos no serán detallados.

El uso de QCM-D como método gravimétrico es sólo una de las aplicaciones de esta técnica. Este método permite el estudio de las interacciones moleculares entre especies y entre especies y superficies, la caracterización de films viscoelásticos, el estudio de cambios conformacionales de macromoléculas depositadas, el seguimiento de procesos de ensamblado de polielectrolitos en multicapas, y el estudio de degradación y corrosión de films y recubrimientos, entre otros.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] National Research Council, *Transforming Glycoscience: A Roadmap for the Future*, The National Academies Press, Washington, D.C., 2012.
- [2] A. Varki, "Biological roles of glycans" *Glycobiology* 2017, 27, 3–49.
- [3] P. H. Seeberger in *Essentials of Glycobiology* (Eds.: A. Varki, R.D. Cummings, J.D. Esko, P. Stanley, G.W. Hart, M. Aebi, D. Mohnen, T. Kinoshita, N.H. Packer, J.H. Prestegard, R.L. Schnaar, P.H. Seeberger), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 2022.
- [4] P. M. Rudd, R. A. Dwek, "Glycosylation: Heterogeneity and the 3D Structure of Proteins" *Crit Rev Biochem Mol Biol* 1997, 32, 1–100.
- [5] R. J. Linhardt, H. G. Bazin in *Glycoscience: Chemistry and Chemical Biology I–III*, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 2001, pp. 63–74.
- [6] S. C. Ranade, A. V. Demchenko, "Mechanism of Chemical Glycosylation: Focus on the Mode of Activation and Departure of Anomeric Leaving Groups" *J Carbohydr Chem* 2013, 32, 1–43.
- [7] A. Demchenko, "1,2-cis O-Glycosylation: Methods, Strategies, Principles" *Curr Org Chem* 2003, 7, 35–79.
- [8] P. O. Adero, H. Amarasekara, P. Wen, L. Bohé, D. Crich, "The Experimental Evidence in Support of Glycosylation Mechanisms at the SN1–SN2 Interface" *Chem Rev* 2018, 118, 8242–8284.
- [9] L. K. Mydock, A. V. Demchenko, "Mechanism of chemical O-glycosylation: from early studies to recent discoveries" *Org. Biomol. Chem.* 2010, 8, 497–510.
- [10] A. Franconetti, A. Ardá, J. L. Asensio, Y. Blériot, S. Thibaudeau, J. Jiménez-Barbero, "Glycosyl Oxocarbenium Ions: Structure, Conformation, Reactivity, and Interactions" *Acc Chem Res* 2021, 54, 2552–2564.
- [11] S. Hung, C. Wang in *Glycochemical Synthesis*, Wiley, 2016, pp. 35–68.
- [12] J. Guo, X. S. Ye, "Protecting groups in carbohydrate chemistry: Influence on stereoselectivity of glycosylations" *Molecules* 2010, 15, 7235–7265.
- [13] J.-H. Kim, H. Yang, J. Park, G.-J. Boons, "A General Strategy for Stereoselective Glycosylations" *J Am Chem Soc* 2005, 127, 12090–12097.
- [14] B. S. Komarova, Y. E. Tsvetkov, N. E. Nifantiev, "Design of α -Selective Glycopyranosyl Donors Relying on Remote Anchimeric Assistance" *The Chemical Record* 2016, 16, 488–506.

- [15] H. Tokimoto, Y. Fujimoto, K. Fukase, S. Kusumoto, "Stereoselective glycosylation using the long-range effect of a [2-(4-phenylbenzyl)oxycarbonyl]benzoyl group" *Tetrahedron Asymmetry* 2005, 16, 441–447.
- [16] H. H. Jensen, L. U. Nordstrøm, M. Bols, "The Disarming Effect of the 4,6-Acetal Group on Glycoside Reactivity: Torsional or Electronic?" *J Am Chem Soc* 2004, 126, 9205–9213.
- [17] Y. Okada, T. Mukae, K. Okajima, M. Taira, M. Fujita, H. Yamada, "Highly β -Selective O-Glucosidation Due to the Restricted Twist-Boat Conformation" *Org Lett* 2007, 9, 1573–1576.
- [18] Y. Okada, O. Nagata, M. Taira, H. Yamada, "Highly β -Selective and Direct Formation of 2-O-Glycosylated Glucosides by Ring Restriction into Twist-Boat" *Org Lett* 2007, 9, 2755–2758.
- [19] S. K. Mulani, W.-C. Hung, A. B. Ingle, K.-S. Shiau, K.-K. T. Mong, "Modulating glycosylation with exogenous nucleophiles: an overview" *Org Biomol Chem* 2014, 12, 1184–1197.
- [20] X. Ye, W. Lu in *Glycochemical Synthesis*, Wiley, 2016, pp. 69–95.
- [21] K. Toshima in *Glycoscience*, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 2008, pp. 429–449.
- [22] S. S. Kulkarni, J. Gervay-Hague in *Handbook of Chemical Glycosylation* (Ed.: A. V. Demchenko), Wiley, 2008, pp. 59–93.
- [23] W. Zhong, G.-J. Boons in *Handbook of Chemical Glycosylation* (Ed.: A. V. Demchenko), Wiley, 2008, pp. 261–303.
- [24] R. A. Field in *Handbook of Chemical Glycosylation* (Ed.: A. V. Demchenko), Wiley, 2008, pp. 361–379.
- [25] K. S. Kim, H. B. Jeon in *Glycoscience*, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 2008, pp. 525–564.
- [26] J. C. López in *Glycoscience*, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 2008, pp. 565–615.
- [27] R. R. Schmidt, X. Zhu in *Glycoscience*, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 2008, pp. 451–524.
- [28] T. Lowary, "Synthesis and conformational analysis of arabinofuranosides, galactofuranosides and fructofuranosides" *Curr Opin Chem Biol* 2003, 7, 749–756.

- [29] P. Peltier, R. Euzen, R. Daniellou, C. Nugier-Chauvin, V. Ferrières, "Recent knowledge and innovations related to hexofuranosides: structure, synthesis and applications" *Carbohydr Res* 2008, **343**, 1897–1923.
- [30] S. J. Angyal in *Adv Carbohydr Chem Biochem* (Eds.: R.S. Tipson, D. Horton), Academic Press, Inc., 1984, pp. 15–68.
- [31] C. Gallo-Rodriguez, G. A. Kashiwagi in *Selective Glycosylations: Synthetic Methods and Catalysts*, Wiley, 2017, pp. 297–326.
- [32] C. Marino, L. Baldoni, "Synthesis of D-Galactofuranose-Containing Molecules: Design of Galactofuranosyl Acceptors" *ChemBioChem* 2014, **15**, 188–204.
- [33] X. Zhu, S. Kawatkar, Y. Rao, G.-J. Boons, "Practical Approach for the Stereoselective Introduction of β -Arabinofuranosides" *J Am Chem Soc* 2006, **128**, 11948–11957.
- [34] R. Wolfenden, X. Lu, G. Young, "Spontaneous Hydrolysis of Glycosides" *J Am Chem Soc* 1998, **120**, 6814–6815.
- [35] R. P. Sweeney, T. L. Lowary in *Comprehensive Glycoscience*, Elsevier, 2021, pp. 267–285.
- [36] E. R. van Rijssel, P. van Delft, G. Lodder, H. S. Overkleeft, G. A. van der Marel, D. V. Filippov, J. D. C. Codée, "Furanosyl Oxocarbenium Ion Stability and Stereoselectivity" *Angewandte Chemie International Edition* 2014, **53**, 10381–10385.
- [37] M. R. Richards, T. L. Lowary, "Chemistry and Biology of Galactofuranose-Containing Polysaccharides" *ChemBioChem* 2009, **10**, 1920–1938.
- [38] C. Gallo-Rodriguez, L. Gandolfi, R. M. De Leiderkremer, "Synthesis of β -D-Galf-(1-3)-D-GlcNAc by the trichloroacetamide method and of β -D-Galf-(1-6)-D-GlcNAc by SnCl₄-promoted glycosylation" *Org Lett* 1999, **1**, 245–247.
- [39] P. H. Seeberger, "The Logic of Automated Glycan Assembly" *Acc Chem Res* 2015, **48**, 1450–1463.
- [40] I. Pashkuleva, R. L. Reis, "Sugars: burden or biomaterials of the future?" *J Mater Chem* 2010, **20**, 8803–8818.
- [41] A. V. Demchenko in *Handbook of Chemical Glycosylation* (Ed.: A. V. Demchenko), Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany, 2008, pp. 1–27.
- [42] J. Alvar, S. Yactayo, C. Bern, "Leishmaniasis and poverty" *Trends Parasitol* 2006, **22**, 552–557.

- [43] S. Mann, K. Frasca, S. Scherrer, A. F. Henao-Martínez, S. Newman, P. Ramanan, J. A. Suarez, “A Review of Leishmaniasis: Current Knowledge and Future Directions” *Curr Trop Med Rep* 2021, *8*, 121–132.
- [44] World Health Organization (WHO), “Leishmaniasis,” can be found under <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis> (accessed 17 August 2025), 2023.
- [45] Dirección de Epidemiología, Ministerio de Salud de la República Argentina, *Boletín Epidemiológico Nacional N°767, SE 30*, 2025.
- [46] C. L. Hoyos, S. P. Cajal, M. Juarez, J. D. Marco, A. M. Alberti D’Amato, M. Cayo, I. Torrejón, R. O. Cimino, P. Diosque, A. J. Krolewiecki, J. R. Nasser, J. F. Gil, “Epidemiology of American Tegumentary Leishmaniasis and Trypanosoma cruzi Infection in the Northwestern Argentina” *Biomed Res Int* 2016, *2016*, 1–8.
- [47] P. M. Kaye, I. Cruz, A. Picado, K. Van Bocxlaer, S. L. Croft, “Leishmaniasis immunopathology—impact on design and use of vaccines, diagnostics and drugs” *Semin Immunopathol* 2020, *42*, 247–264.
- [48] G. Matlashewski, “Leishmania infection and virulence” *Med Microbiol Immunol* 2001, *190*, 37–42.
- [49] S. Burza, S. L. Croft, M. Boelaert, “Leishmaniasis” *The Lancet* 2018, *392*, 951–970.
- [50] L. M. B. de Souza, V. Thomaz Soccol, R. R. Petterle, M. D. Bates, P. A. Bates, “Analysis of Leishmania mimetic neoglycoproteins for the cutaneous leishmaniasis diagnosis” *Parasitology* 2018, *145*, 1938–1948.
- [51] P. Kaye, P. Scott, “Leishmaniasis: complexity at the host–pathogen interface” *Nat Rev Microbiol* 2011, *9*, 604–615.
- [52] T. Naderer, J. Vince, M. McConville, “Surface Determinants of Leishmania Parasites and their Role in Infectivity in the Mammalian Host” *Curr Mol Med* 2004, *4*, 649–665.
- [53] Y. Cabezas, L. Legentil, F. Robert-Gangneux, F. Daligault, S. Belaz, C. Nugier-Chauvin, S. Tranchimand, C. Tellier, J.-P. Gangneux, V. Ferrières, “Leishmania cell wall as a potent target for antiparasitic drugs. A focus on the glycoconjugates” *Org Biomol Chem* 2015, *13*, 8393–8404.
- [54] S. J. Turco, D. L. Sacks, “Expression of a stage-specific lipophosphoglycan in Leishmania major amastigotes” *Mol Biochem Parasitol* 1991, *45*, 91–99.
- [55] S. J. Turco, A. Descoteaux, “The Lipophosphoglycan of Leishmania Parasites” *Annu Rev Microbiol* 1992, *46*, 65–92.

- [56] C.-L. Forestier, Q. Gao, G.-J. Boons, "Leishmania lipophosphoglycan: how to establish structure-activity relationships for this highly complex and multifunctional glycoconjugate?" *Front Cell Infect Microbiol* 2015, *4*, 193.
- [57] G. F. Späth, L. A. Garraway, S. J. Turco, S. M. Beverley, "The role(s) of lipophosphoglycan (LPG) in the establishment of Leishmania major infections in mammalian hosts" *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2003, *100*, 9536–9541.
- [58] G. F. Späth, L. Epstein, B. Leader, S. M. Singer, H. A. Avila, S. J. Turco, S. M. Beverley, "Lipophosphoglycan is a virulence factor distinct from related glycoconjugates in the protozoan parasite Leishmania major" *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2000, *97*, 9258–9263.
- [59] S. M. Puentes, R. P. Da Silva, D. L. Sacks, C. H. Hammer, K. A. Joiner, "Serum resistance of metacyclic stage Leishmania major promastigotes is due to release of C5b-9" *The Journal of Immunology* 1990, *145*, 4311–4316.
- [60] E. Panahi, D. I. Stanisic, C. S. Peacock, L. J. Herrero in *Leishmaniasis - General Aspects of a Stigmatized Disease* (Ed.: L. de Azevedo Calderon), IntechOpen, 2022.
- [61] P. Talamás-Rohana, S. D. Wright, M. R. Lennartz, D. G. Russell, "Lipophosphoglycan from Leishmania mexicana promastigotes binds to members of the CR3, p150,95 and LFA-1 family of leukocyte integrins." *The Journal of Immunology* 1990, *144*, 4817–4824.
- [62] F. J. Culley, R. A. Harris, P. M. Kaye, K. P. McAdam, J. G. Raynes, "C-reactive protein binds to a novel ligand on Leishmania donovani and increases uptake into human macrophages" *The Journal of Immunology* 1996, *156*, 4691–4696.
- [63] A. Holm, K. Tejle, K.-E. Magnusson, A. Descoteaux, B. Rasmusson, "Leishmania donovani lipophosphoglycan causes periphagosomal actin accumulation: correlation with impaired translocation of PKC α and defective phagosome maturation" *Cell Microbiol* 2001, *3*, 439–447.
- [64] M. Desjardins, A. Descoteaux, "Inhibition of Phagolysosomal Biogenesis by the Leishmania Lipophosphoglycan" *J Exp Med* 1997, *185*, 2061–2068.
- [65] T. B. McNeely, S. J. Turco, "Requirement of lipophosphoglycan for intracellular survival of Leishmania donovani within human monocytes." *The Journal of Immunology* 1990, *144*, 2745–2750.

- [66] J. Chan, T. Fujiwara, P. Brennan, M. McNeil, S. J. Turco, J. C. Sible, M. Snapper, P. Aisen, B. R. Bloom, "Microbial glycolipids: possible virulence factors that scavenge oxygen radicals." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1989, **86**, 2453–2457.
- [67] A. Descoteaux, S. J. Turco, "Glycoconjugates in Leishmania infectivity" *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 1999, **1455**, 341–352.
- [68] R. R. Assis, I. C. Ibraim, F. S. Noronha, S. J. Turco, R. P. Soares, "Glycoinositolphospholipids from Leishmania braziliensis and L. infantum: Modulation of Innate Immune System and Variations in Carbohydrate Structure" *PLoS Negl Trop Dis* 2012, **6**, e1543.
- [69] P. F. P. Pimenta, E. M. B. Saraiva, D. L. Sacks, "The comparative fine structure and surface glycoconjugate expression of three life stages of Leishmania major" *Exp Parasitol* 1991, **72**, 191–204.
- [70] B. Kleczka, A.-C. Lamerz, G. van Zandbergen, A. Wenzel, R. Gerardy-Schahn, M. Wiese, F. H. Routier, "Targeted Gene Deletion of Leishmania major UDP-galactopyranose Mutase Leads to Attenuated Virulence" *Journal of Biological Chemistry* 2007, **282**, 10498–10505.
- [71] R. R. de Assis, I. C. Ibraim, P. M. Nogueira, R. P. Soares, S. J. Turco, "Glycoconjugates in New World species of Leishmania: Polymorphisms in lipophosphoglycan and glycoinositolphospholipids and interaction with hosts" *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 2012, **1820**, 1354–1365.
- [72] H. S. Al-Khalaifah, "Major Molecular Factors Related to Leishmania Pathogenicity" *Front Immunol* 2022, **13**, 847797.
- [73] S. C. Ilgoutz, J. L. Zawadzki, J. E. Ralton, M. J. McConville, "Evidence that free GPI glycolipids are essential for growth of Leishmania mexicana" *EMBO J* 1999, **18**, 2746–2755.
- [74] L. Proudfoot, C. A. O'Donnell, F. Y. Liew, "Glycoinositolphospholipids of Leishmania major inhibit nitric oxide synthesis and reduce leishmanicidal activity in murine macrophages" *Eur J Immunol* 1995, **25**, 745–750.
- [75] T. B. McNeely, G. Rosen, M. V Londner, S. J. Turco, "Inhibitory effects on protein kinase C activity by lipophosphoglycan fragments and glycosylphosphatidylinositol antigens of the protozoan parasite Leishmania" *Biochemical Journal* 1989, **259**, 601–604.

- [76] E. Suzuki, A. K. Tanaka, M. S. Toledo, H. K. Takahashi, A. H. Straus, "Role of β -D-galactofuranose in *Leishmania* major macrophage invasion" *Infect Immun* 2002, 70, 6592–6596.
- [77] J. L. Avila, M. Rojas, A. Acosta, "Glycoinositol phospholipids from American *Leishmania* and *Trypanosoma* spp: partial characterization of the glycan cores and the human humoral immune response to them" *J Clin Microbiol* 1991, 29, 2305–2312.
- [78] G. Rosen, P. Pahlsson, M. V. Londner, M. E. Westerman, B. Nilsson, "Structural Analysis of Glycosyl-phosphatidylinositol Antigens of *Leishmania major*" *Journal of Biological Chemistry* 1989, 264, 10457–10463.
- [79] G. M. Slutzky, M. V. Londner, C. L. Greenblatt, "Lipid and Lipopolysaccharide-Like Antigens of *Leishmania* Promastigotes" *J Protozool* 1985, 32, 347–352.
- [80] M. J. McConville, S. W. Homans, J. E. Thomas-Oates, A. Dell, A. Bacic, "Structures of the glycoinositolphospholipids from *Leishmania* major. A family of novel galactofuranose-containing glycolipids." *Journal of Biological Chemistry* 1990, 265, 7385–7394.
- [81] C. Anish, C. E. Martin, A. Wahlbrink, C. Bogdan, P. Ntais, M. Antoniou, P. H. Seeberger, "Immunogenicity and diagnostic potential of synthetic antigenic cell surface glycans of leishmania" *ACS Chem Biol* 2013, 8, 2412–2422.
- [82] J. R. Sampaio, R. P. Soares, T. D. Barral, G. P. Passos, M. S. Fonseca, R. Meyer, S. M. Barrouin-Melo, R. W. Portela, "Leishmania infantum-Derived Glycoinositolphospholipids in the Immunodiagnosis of Subclinically Infected Dogs" *Front Vet Sci* 2021, 8, 581148.
- [83] A. L. Montoya, V. M. Austin, S. Portillo, I. Vinales, R. A. Ashmus, I. Estevao, S. R. Jankuru, Y. Alraey, W. S. Al-Salem, Á. Acosta-Serrano, I. C. Almeida, K. Michael, "Reversed Immunoglycomics Identifies α -Galactosyl-Bearing Glycotypes Specific for *Leishmania* major Infection" *JACS Au* 2021, 1, 1275–1287.
- [84] F. V. de O. Prates, M. E. F. Dourado, S. C. Silva, A. Schriefer, L. H. Guimarães, M. das G. O. Brito, J. Almeida, E. M. Carvalho, P. R. L. Machado, "Fluconazole in the Treatment of Cutaneous Leishmaniasis Caused by *Leishmania braziliensis* : A Randomized Controlled Trial" *Clinical Infectious Diseases* 2017, 64, 67–71.
- [85] E. M. Carvalho, A. Barral, J. M. L. Costa, A. Bittencourt, P. Marsden, "Clinical and immunopathological aspects of disseminated cutaneous leishmaniasis" *Acta Trop* 1994, 56, 315–325.

- [86] L. O. Neves, A. C. Talhari, E. P. N. Gadelha, R. M. da Silva Júnior, J. A. de O. Guerra, L. C. de L. Ferreira, S. Talhari, “Estudo clínico randomizado comparando antimoniato de meglumina, pentamidina e anfotericina B para o tratamento da leishmaniose cutânea ocasionada por *Leishmania guyanensis*” *An Bras Dermatol* 2011, 86, 1092–1101.
- [87] B. Zulfiqar, T. B. Shelper, V. M. Avery, “Leishmaniasis drug discovery: recent progress and challenges in assay development” *Drug Discov Today* 2017, 22, 1516–1531.
- [88] H. Goto, J. A. L. Lindoso, “Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis” *Expert Rev Anti Infect Ther* 2010, 8, 419–433.
- [89] C. M. Gomes, N. A. de Paula, O. O. de Moraes, K. A. Soares, A. M. Roselino, R. N. R. Sampaio, “Complementary exams in the diagnosis of american tegumentary leishmaniasis” *An Bras Dermatol* 2014, 89, 701–709.
- [90] J. Saab, F. Fedda, R. Khattab, L. Yahya, A. Loya, M. Satti, A. Kibbi, M. A. Houreih, W. Raslan, M. El-Sabban, I. Khalifeh, “Cutaneous leishmaniasis mimicking inflammatory and neoplastic processes: a clinical, histopathological and molecular study of 57 cases” *J Cutan Pathol* 2012, 39, 251–262.
- [91] V. A. Palma, M. M. Crespín, P. A. Hidalgo, Á. D. González, D. A. Lozada, G. A. Nacimba, J. E. Sion, C. D. Poveda, D. V. Luna, G. P. Borja-Cabrera, “Diagnostic advances in tegumentary leishmaniasis: a narrative review from 2018 to 2023” *J Public Health Emerg* 2024, 8, 36–36.
- [92] H. P. Pena, V. S. Belo, J. C. C. Xavier-Junior, R. G. Teixeira-Neto, S. N. Melo, D. A. Pereira, I. de C. Fontes, I. M. Santos, V. V. Lopes, W. L. Tafuri, G. A. S. Romero, E. S. da Silva, “Accuracy of diagnostic tests for American tegumentary leishmaniasis: a systematic literature review with meta-analyses” *Tropical Medicine & International Health* 2020, 25, 1168–1181.
- [93] A. Magalhães, L. P. Carvalho, R. Costa, M. S. Pita, T. M. Cardoso, P. R. L. Machado, E. M. Carvalho, S. Arruda, A. M. Carvalho, “Anti-*Leishmania* IgG is a marker of disseminated leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis*” *International Journal of Infectious Diseases* 2021, 106, 83–90.
- [94] A. M. Carvalho, L. H. Guimarães, R. Costa, M. G. Saldanha, I. Prates, L. P. Carvalho, S. Arruda, E. M. Carvalho, “Impaired Th1 Response Is Associated With Therapeutic Failure in Patients With Cutaneous Leishmaniasis Caused by *Leishmania braziliensis*” *J Infect Dis* 2021, 223, 527–535.

- [95] M. E. Bracamonte, A. M. Álvarez, A. M. Sosa, C. L. Hoyos, J. J. Lauthier, S. P. Cajal, M. Juarez, R. E. Uncos, F. J. Sánchez-Valdés, L. Acuña, P. Diosque, M. A. Basombrio, J. R. Nasser, Y. Hashiguchi, M. Korenaga, P. A. Barroso, J. D. Marco, "High performance of an enzyme linked immunosorbent assay for American tegumentary leishmaniasis diagnosis with *Leishmania* (Viannia) *braziliensis* amastigotes membrane crude antigens" *PLoS One* 2020, 15, 1–12.
- [96] Z. Maia, M. Lírio, S. Mistro, C. M. C. Mendes, S. R. Mehta, R. Badaro, "Comparative Study of rK39 Leishmania Antigen for Serodiagnosis of Visceral Leishmaniasis: Systematic Review with Meta-Analysis" *PLoS Negl Trop Dis* 2012, 6, e1484.
- [97] D. Menezes-Souza, T. A. de O. Mendes, R. A. P. Nagem, T. T. de O. Santos, A. L. T. Silva, M. M. Santoro, S. F. G. de Carvalho, E. A. F. Coelho, D. C. Bartholomeu, R. T. Fujiwara, "Mapping B-Cell Epitopes for the Peroxidoxin of *Leishmania* (Viannia) *braziliensis* and Its Potential for the Clinical Diagnosis of Tegumentary and Visceral Leishmaniasis" *PLoS One* 2014, 9, e99216.
- [98] B. S. S. Lima, S. F. Pires, L. C. Fialho, E. J. Oliveira, R. A. Machado-de-Avila, C. Chávez-Olórtegui, A. D. Chapeaurouge, J. Perales, H. M. Andrade, "A proteomic road to acquire an accurate serological diagnosis for human tegumentary leishmaniasis" *J Proteomics* 2017, 151, 174–181.
- [99] A. L. Montoya, E. R. Gil, E. L. Heydemann, I. L. Estevao, B. E. Luna, C. C. Ellis, S. R. Jankuru, B. Alarcón de Noya, O. Noya, M. P. Zago, I. C. Almeida, K. Michael, "Specific recognition of β -galactofuranose-containing glycans of synthetic neoglycoproteins by sera of chronic chagas disease patients" *Molecules* 2022, 27, 411.
- [100] C. E. Martin, F. Broecker, M. A. Oberli, J. Komor, J. Mattner, C. Anish, P. H. Seeberger, "Immunological evaluation of a synthetic *Clostridium difficile* oligosaccharide conjugate vaccine candidate and identification of a minimal epitope" *J Am Chem Soc* 2013, 135, 9713–9722.
- [101] O. Blixt, J. Hoffmann, S. Svenson, T. Norberg, "Pathogen specific carbohydrate antigen microarrays: a chip for detection of *Salmonella* O-antigen specific antibodies" *Glycoconj J* 2008, 25, 27–36.
- [102] S. Götze, N. Azzouz, Y.-H. Tsai, U. Groß, A. Reinhardt, C. Anish, P. H. Seeberger, D. Varón Silva, "Diagnosis of Toxoplasmosis Using a Synthetic Glycosylphosphatidylinositol Glycan" *Angewandte Chemie International Edition* 2014, 53, 13701–13705.

- [103] E. Cesewski, B. N. Johnson, "Electrochemical biosensors for pathogen detection" *Biosens Bioelectron* 2020, **159**, 112214.
- [104] M. L. Sin, K. E. Mach, P. K. Wong, J. C. Liao, "Advances and challenges in biosensor-based diagnosis of infectious diseases" *Expert Rev Mol Diagn* 2014, **14**, 225–244.
- [105] K. V. Ragavan, S. Kumar, S. Swaraj, S. Neethirajan, "Advances in biosensors and optical assays for diagnosis and detection of malaria" *Biosens Bioelectron* 2018, **105**, 188–210.
- [106] E. M. Euliano, A. A. Sklavounos, A. R. Wheeler, K. J. McHugh, "Translating diagnostics and drug delivery technologies to low-resource settings" *Sci Transl Med* 2022, **14**, eabm1732.
- [107] S. Sharma, J. Zapatero-Rodríguez, P. Estrela, R. O'Kennedy, "Point-of-Care Diagnostics in Low Resource Settings: Present Status and Future Role of Microfluidics" *Biosensors (Basel)* 2015, **5**, 577–601.
- [108] J. S. Daniels, N. Pourmand, "Label-Free Impedance Biosensors: Opportunities and Challenges" *Electroanalysis* 2007, **19**, 1239–1257.
- [109] J. Wang, "Electrochemical Glucose Biosensors" *Chem Rev* 2008, **108**, 814–825.
- [110] K. M. Koczula, A. Gallotta, "Lateral flow assays" *Essays Biochem* 2016, **60**, 111–120.
- [111] A. P. F. Turner, I. Karube, G. S. Wilson, *Biosensors: Fundamentals and Applications*, Oxford University Press, Suffolk, Great Britain, 1989.
- [112] V. Naresh, N. Lee, "A Review on Biosensors and Recent Development of Nanostructured Materials-Enabled Biosensors" *Sensors* 2021, **21**, 1109.
- [113] U. Bilitewski, "Protein-sensing assay formats and devices" *Anal Chim Acta* 2006, **568**, 232–247.
- [114] B. E. Rapp, F. J. Gruhl, K. Länge, "Biosensors with label-free detection designed for diagnostic applications" *Anal Bioanal Chem* 2010, **398**, 2403–2412.
- [115] X. Zeng, C. A. S. Andrade, M. D. L. Oliveira, X.-L. Sun, "Carbohydrate–protein interactions and their biosensing applications" *Anal Bioanal Chem* 2012, **402**, 3161–3176.
- [116] O. Oyelaran, Q. Li, D. Farnsworth, J. C. Gildersleeve, "Microarrays with Varying Carbohydrate Density Reveal Distinct Subpopulations of Serum Antibodies" *J Proteome Res* 2009, **8**, 3529–3538.

- [117] T.-R. J. Tzeng, Y. R. Cheng, R. Saeidpourazar, S. S. Aphale, N. Jalili, "Adhesin-Specific Nanomechanical Cantilever Biosensors for Detection of Microorganisms" *J Heat Transfer* 2011, 133, 011012.
- [118] X. Guo, A. Kulkarni, A. Doepke, H. B. Halsall, S. Iyer, W. R. Heineman, "Carbohydrate-based label-free detection of escherichia coli ORN 178 using electrochemical impedance spectroscopy" *Anal Chem* 2012, 84, 241–246.
- [119] A. Hushegyi, D. Pihíková, T. Bertok, V. Adam, R. Kizek, J. Tkac, "Ultrasensitive detection of influenza viruses with a glycan-based impedimetric biosensor" *Biosens Bioelectron* 2016, 79, 644–649.
- [120] S. Hidemitsu, H. Hinou, D. Ebihara, R. Sato, S. Kuroiwa, T. Nakanishi, S.-I. Nishimura, T. Osaka, "Attomolar Detection of Influenza A Virus Hemagglutinin Human H1 and Avian H5 Using Glycan-Blotted Field Effect Transistor Biosensor" *Anal Chem* 2013, 85, 5641–5644.
- [121] E. Suenaga, H. Mizuno, K. K. R. Penmetcha, "Monitoring influenza hemagglutinin and glycan interactions using surface plasmon resonance" *Biosens Bioelectron* 2012, 32, 195–201.
- [122] T. Wangchareansak, C. Sangma, P. Ngernmeesri, A. Thitithanyanont, P. A. Lieberzeit, "Self-assembled glucosamine monolayers as biomimetic receptors for detecting WGA lectin and influenza virus with a quartz crystal microbalance" *Anal Bioanal Chem* 2013, 405, 6471–6478.
- [123] M. Chikae, T. Fukuda, K. Kerman, K. Idegami, Y. Miura, E. Tamiya, "Amyloid- β detection with saccharide immobilized gold nanoparticle on carbon electrode" *Bioelectrochemistry* 2008, 74, 118–123.
- [124] B. Catimel, A. M. Scott, F. T. Lee, N. Hanai, G. Ritter, S. Welt, L. J. Old, A. W. Burgess, E. C. Nice, "Direct immobilization of gangliosides onto gold-carboxymethyldextran sensor surfaces by hydrophobic interaction: applications to antibody characterization" *Glycobiology* 1998, 8, 927–938.
- [125] D. Echeverri, M. Garg, D. Varón Silva, J. Orozco, "Phosphoglycan-sensitized platform for specific detection of anti-glycan IgG and IgM antibodies in serum" *Talanta* 2020, 217, 121117.
- [126] K. Stærk, S. Khandige, H. J. Kolmos, J. Møller-Jensen, T. E. Andersen, "Uropathogenic Escherichia coli Express Type 1 Fimbriae Only in Surface Adherent Populations Under Physiological Growth Conditions" *Journal of Infectious Diseases* 2016, 213, 386–394.

- [127] G. Ritter, P. Livingston, "Ganglioside antigens expressed by human cancer cells" *Semin Cancer Biol* 1991, 2, 401–409.
- [128] J. Flint, D. Nurizzo, S. E. Harding, E. Longman, G. J. Davies, H. J. Gilbert, D. N. Bolam, "Ligand-mediated Dimerization of a Carbohydrate-binding Module Reveals a Novel Mechanism for Protein–Carbohydrate Recognition" *J Mol Biol* 2004, 337, 417–426.
- [129] T. K. Dam, C. F. Brewer in *Energetics of Biological Macromolecules, Part D* (Eds.: J.M. Holt, M.L. Johnson, G.K. Ackers), 2004, pp. 107–128.
- [130] P. Critchley, M. N. Willand, A. K. Rullay, D. H. G. Crout, "Carbohydrate–protein interactions at interfaces: synthesis of thiolactosyl glycolipids and design of a working model for surface plasmon resonance" *Org Biomol Chem* 2003, 1, 928–938.
- [131] J. Jiménez-Barbero, T. Peters, *NMR Spectroscopy of Glycoconjugates*, Wiley-VCH, Weinheim, 2003.
- [132] M. M. Pedroso, A. M. Watanabe, M. C. Roque-Barreira, P. R. Bueno, R. C. Faria, "Quartz Crystal Microbalance monitoring the real-time binding of lectin with carbohydrate with high and low molecular mass" *Microchemical Journal* 2008, 89, 153–158.
- [133] I. Bucior, M. M. Burger, "Carbohydrate–carbohydrate interactions in cell recognition" *Curr Opin Struct Biol* 2004, 14, 631–637.
- [134] N. Laurent, J. Voglmeir, S. L. Flitsch, "Glycoarrays—tools for determining protein–carbohydrate interactions and glycoenzyme specificity" *Chemical Communications* 2008, 4400–4412.
- [135] A. Geissner, P. H. Seeberger, "Glycan Arrays: From Basic Biochemical Research to Bioanalytical and Biomedical Applications" *Annual Review of Analytical Chemistry* 2016, 9, 223–247.
- [136] S. Park, H.-W. Hsieh, J. Gervay-Hague, "Anomeric O-Functionalization of Carbohydrates for Chemical Conjugation to Vaccine Constructs" *Molecules* 2018, 23, 1742.
- [137] T. Feizi, "Carbohydrate microarrays — a new set of technologies at the frontiers of glycomics" *Curr Opin Struct Biol* 2003, 13, 637–645.
- [138] E.-H. Song, N. L. Pohl, "Carbohydrate arrays: recent developments in fabrication and detection methods with applications" *Curr Opin Chem Biol* 2009, 13, 626–632.

- [139] T. Horlacher, P. H. Seeberger, "Carbohydrate arrays as tools for research and diagnostics" *Chem Soc Rev* 2008, **37**, 1414–1422.
- [140] A. Geissner, C. Anish, P. H. Seeberger, "Glycan arrays as tools for infectious disease research" *Curr Opin Chem Biol* 2014, **18**, 38–45.
- [141] C. E. Martin, F. Broecker, S. Eller, M. A. Oberli, C. Anish, C. L. Pereira, P. H. Seeberger, "Glycan arrays containing synthetic *Clostridium difficile* lipoteichoic acid oligomers as tools toward a carbohydrate vaccine" *Chemical Communications* 2013, **49**, 7159.
- [142] R. K. Singh, E. E. Reuber, M. Bruno, M. G. Netea, P. H. Seeberger, "Synthesis of oligosaccharides to identify an immunologically active epitope against *Candida auris* infection" *Chem Sci* 2023, **14**, 7559–7563.
- [143] D. Shen, B. M. S. Seco, L. G. Teixeira Alves, L. Yao, M. Bräutigam, B. Opitz, M. Witzenrath, B. C. Fries, P. H. Seeberger, "Semisynthetic Glycoconjugate Vaccine Lead against *Klebsiella pneumoniae* Serotype O2afg Induces Functional Antibodies and Reduces the Burden of Acute Pneumonia" *J Am Chem Soc* 2024, **146**, 35356–35366.
- [144] C.-C. Wang, Y.-L. Huang, C.-T. Ren, C.-W. Lin, J.-T. Hung, J.-C. Yu, A. L. Yu, C.-Y. Wu, C.-H. Wong, "Glycan microarray of Globo H and related structures for quantitative analysis of breast cancer" *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2008, **105**, 11661–11666.
- [145] P.-H. Liang, C.-Y. Wu, W. A. Greenberg, C.-H. Wong, "Glycan arrays: biological and medical applications" *Curr Opin Chem Biol* 2008, **12**, 86–92.
- [146] J. C. Love, L. A. Estroff, J. K. Kriebel, R. G. Nuzzo, G. M. Whitesides, "Self-Assembled Monolayers of Thiolates on Metals as a Form of Nanotechnology" *Chem Rev* 2005, **105**, 1103–1170.
- [147] N. C. Reichardt, M. Martín-Lomas, S. Penadés, "Glyconanotechnology" *Chem Soc Rev* 2013, **42**, 4358.
- [148] J. Sagiv, "Organized Monolayers by Adsorption. 1. Formation and Structure of Oleophobic Mixed Monolayers on Solid Surfaces" *J Am Chem Soc* 1980, **102**, 92–98.
- [149] D. Duleba, S. Denuga, R. P. Johnson, "Reproducibility and stability of silane layers in nanoconfined electrochemical systems" *Physical Chemistry Chemical Physics* 2024, **26**, 15452–15460.

- [150] A. Hushegyi, L. Klukova, T. Bertok, J. Tkac in *Carbohydrate Nanotechnology* (Ed.: K.J. Stine), Wiley, Hoboken, New Jersey, 2015, pp. 387–421.
- [151] S. Park, J. C. Gildersleeve, O. Blixt, I. Shin, “Carbohydrate microarrays” *Chem. Soc. Rev.* 2013, 42, 4310–4326.
- [152] D. Wang, S. Liu, B. J. Trummer, C. Deng, A. Wang, “Carbohydrate microarrays for the recognition of cross-reactive molecular markers of microbes and host cells” *Nature Biotechnology* 2002 20:3 2002, 20, 275–281.
- [153] W. G. T. Willats, S. E. Rasmussen, T. Kristensen, J. D. Mikkelsen, J. P. Knox, “Sugar-coated microarrays: A novel slide surface for the high-throughput analysis of glycans” *Proteomics* 2002, 2, 1666–1671.
- [154] F. Fazio, M. C. Bryan, O. Blixt, J. C. Paulson, C. H. Wong, “Synthesis of sugar arrays in microtiter plate” *J Am Chem Soc* 2002, 124, 14397–14402.
- [155] T. Feizi, W. Chai, “Oligosaccharide microarrays to decipher the glyco code” *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2004 5:7 2004, 5, 582–588.
- [156] G. L. Huang, H. C. Zhang, P. G. Wang, “Fabrication and application of neoglycolipid arrays in a microtiter plate” *Bioorg Med Chem Lett* 2006, 16, 2031–2033.
- [157] E. L. Shipp, L. C. Hsieh-Wilson, “Profiling the Sulfation Specificities of Glycosaminoglycan Interactions with Growth Factors and Chemotactic Proteins Using Microarrays” *Chem Biol* 2007, 14, 195–208.
- [158] K.-S. Ko, F. A. Jaipuri, N. L. Pohl, “Fluorous-Based Carbohydrate Microarrays” *J Am Chem Soc* 2005, 127, 13162–13163.
- [159] B. S. Bochner, R. A. Alvarez, P. Mehta, N. V. Bovin, O. Blixt, J. R. White, R. L. Schnaar, “Glycan array screening reveals a candidate ligand for Siglec-8” *Journal of Biological Chemistry* 2005, 280, 4307–4312.
- [160] T. Mori, M. Toyoda, T. Ohtsuka, Y. Okahata, “Kinetic analyses for bindings of concanavalin A to dispersed and condensed mannose surfaces on a quartz crystal microbalance” *Anal Biochem* 2009, 395, 211–216.
- [161] Y. Chevrolot, C. Bouillon, S. Vidal, F. Morvan, A. Meyer, J. P. Cloarec, A. Jochum, J. P. Praly, J. J. Vasseur, E. Souteyrand, “DNA-Based Carbohydrate Biochips: A Platform for Surface Glyco-Engineering” *Angewandte Chemie International Edition* 2007, 46, 2398–2402.
- [162] Y. Chevrolot, E. Laurenceau, M. Phaner-Goutorbe, V. Monnier, E. Souteyrand, A. Meyer, T. Géhin, J. J. Vasseur, F. Morvan, “DNA directed immobilization

- glycocluster array: applications and perspectives" *Curr Opin Chem Biol* 2014, **18**, 46–54.
- [163] C. D. Rillahan, J. C. Paulson, "Glycan microarrays for decoding the glycome" *Annu Rev Biochem* 2011, **80**, 797–823.
- [164] X. Luo, J. J. Davis, "Electrical biosensors and the label free detection of protein disease biomarkers" *Chem Soc Rev* 2013, **42**, 5944–5962.
- [165] M. Lee, I. Shin, "Fabrication of Chemical Microarrays by Efficient Immobilization of Hydrazide-Linked Substances on Epoxide-Coated Glass Surfaces" *Angewandte Chemie International Edition* 2005, **44**, 2881–2884.
- [166] Z. Zhi, N. Laurent, A. K. Powell, R. Karamanska, M. Fais, J. Voglmeir, A. Wright, J. M. Blackburn, P. R. Crocker, D. A. Russell, S. Flitsch, R. A. Field, J. E. Turnbull, "A Versatile Gold Surface Approach for Fabrication and Interrogation of Glycoarrays" *ChemBioChem* 2008, **9**, 1568–1575.
- [167] K. Larsen, M. B. Thygesen, F. Guillaumie, W. G. T. Willats, K. J. Jensen, "Solid-phase chemical tools for glycobiology" *Carbohydr Res* 2006, **341**, 1209–1234.
- [168] S. Park, M.-R. Lee, I. Shin, "Construction of Carbohydrate Microarrays by Using One-Step, Direct Immobilizations of Diverse Unmodified Glycans on Solid Surfaces" *Bioconjug Chem* 2009, **20**, 155–162.
- [169] L. Liu, D. Deng, Y. Xing, S. Li, B. Yuan, J. Chen, N. Xia, "Activity analysis of the carbodiimide-mediated amine coupling reaction on self-assembled monolayers by cyclic voltammetry" *Electrochim Acta* 2013, **89**, 616–622.
- [170] M. A. Brun, M. D. Disney, P. H. Seeberger, "Miniaturization of Microwave-Assisted Carbohydrate Functionalization to Create Oligosaccharide Microarrays" *ChemBioChem* 2006, **7**, 421–424.
- [171] S. Park, I. Shin, "Fabrication of Carbohydrate Chips for Studying Protein-Carbohydrate Interactions" *Angewandte Chemie International Edition* 2002, **41**, 3180–3182.
- [172] A. Niederwieser, A. Späte, L. D. Nguyen, C. Jüngst, W. Reutter, V. Wittmann, "Two-Color Glycan Labeling of Live Cells by a Combination of Diels–Alder and Click Chemistry" *Angewandte Chemie International Edition* 2013, **52**, 4265–4268.
- [173] B. T. Houseman, M. Mrksich, "Carbohydrate Arrays for the Evaluation of Protein Binding and Enzymatic Modification" *Chem Biol* 2002, **9**, 443–454.
- [174] C.-Y. Huang, D. A. Thayer, A. Y. Chang, M. D. Best, J. Hoffmann, S. Head, C.-H. Wong, "Carbohydrate microarray for profiling the antibodies interacting with Globo

- H tumor antigen" *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2006, **103**, 15–20.
- [175] J. Yang, J.-N. Chazalviel, A. Siriwardena, R. Boukherroub, F. Ozanam, S. Szunerits, A. C. Gouget-Laemmel, "Quantitative Assessment of the Multivalent Protein–Carbohydrate Interactions on Silicon" *Anal Chem* 2014, **86**, 10340–10349.
- [176] C. Vericat, M. E. Vela, G. Benitez, P. Carro, R. C. Salvarezza, "Self-assembled monolayers of thiols and dithiols on gold: new challenges for a well-known system" *Chem Soc Rev* 2010, **39**, 1805.
- [177] A. Turchanin, A. Gölzhäuser, "Carbon nanomembranes from self-assembled monolayers: Functional surfaces without bulk" *Prog Surf Sci* 2012, **87**, 108–162.
- [178] L. Srisombat, A. C. Jamison, T. R. Lee, "Stability: A key issue for self-assembled monolayers on gold as thin-film coatings and nanoparticle protectants" *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp* 2011, **390**, 1–19.
- [179] F. Cheng, D. M. Ratner, "Glycosylated self-assembled monolayers for arrays and surface analysis" *Methods in Molecular Biology* 2012, **808**, 87–101.
- [180] J. K. Bhattarai, D. Neupane, V. Mikhaylov, A. V. Demchenko, K. J. Stine in *Carbohydrate* (Eds.: M. Caliskan, I.H. Kavakli, G.C. Oz), InTech, 2017, pp. 63–97.
- [181] F. Tantakitti, J. Burk-Rafel, F. Cheng, R. Egnatchik, T. Owen, M. Hoffman, D. N. Weiss, D. M. Ratner, "Nanoscale clustering of carbohydrate thiols in mixed self-assembled monolayers on gold" *Langmuir* 2012, **28**, 6950–6959.
- [182] C. F. Grant, V. Kanda, H. Yu, D. R. Bundle, M. T. McDermott, "Optimization of immobilized bacterial disaccharides for surface plasmon resonance imaging measurements of antibody binding" *Langmuir* 2008, **24**, 14125–14132.
- [183] T. P. Sullivan, W. T. S. Huck, "Reactions on Monolayers: Organic Synthesis in Two Dimensions" *European J Org Chem* 2003, **2003**, 17–29.
- [184] H. K. Hunt, A. M. Armani, "Label-free biological and chemical sensors" *Nanoscale* 2010, **2**, 1544–1559.
- [185] M. Feyziazar, M. Amini, A. Jahanban-Esfahlan, B. Baradaran, F. Oroojalian, A. Kamrani, A. Mokhtarzadeh, J. Soleymani, M. de la Guardia, "Recent advances on the piezoelectric, electrochemical, and optical biosensors for the detection of protozoan pathogens" *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 2022, **157**, 116803.
- [186] X. Fan, I. M. White, S. I. Shopova, H. Zhu, J. D. Suter, Y. Sun, "Sensitive optical biosensors for unlabeled targets: A review" *Anal Chim Acta* 2008, **620**, 8–26.

- [187] J. Tamayo, P. M. Kosaka, J. J. Ruz, Á. San Paulo, M. Calleja, "Biosensors based on nanomechanical systems" *Chem. Soc. Rev.* 2013, 42, 1287–1311.
- [188] J. L. Arlett, E. B. Myers, M. L. Roukes, "Comparative advantages of mechanical biosensors" *Nat Nanotechnol* 2011, 6, 203–215.
- [189] E. Bakker, "Electrochemical Sensors" *Anal Chem* 2004, 76, 3285–3298.
- [190] T. G. Drummond, M. G. Hill, J. K. Barton, "Electrochemical DNA sensors" *Nat Biotechnol* 2003, 21, 1192–1199.
- [191] X. Luo, J. J. Davis, "Electrical biosensors and the label free detection of protein disease biomarkers" *Chem Soc Rev* 2013, 42, 5944.
- [192] M. E. Strong, J. R. Richards, M. Torres, C. M. Beck, J. T. La Belle, "Faradaic electrochemical impedance spectroscopy for enhanced analyte detection in diagnostics" *Biosens Bioelectron* 2021, 177, 112949.
- [193] L. C. Brazaca, P. L. dos Santos, P. R. de Oliveira, D. P. Rocha, J. S. Stefano, C. Kalinke, R. A. Abarza Muñoz, J. A. Bonacin, B. C. Janegitz, E. Carrilho, "Biosensing strategies for the electrochemical detection of viruses and viral diseases – A review" *Anal Chim Acta* 2021, 1159, 338384.
- [194] M. Z. H. Khan, M. R. Hasan, S. I. Hossain, M. S. Ahommed, M. Daizy, "Ultrasensitive detection of pathogenic viruses with electrochemical biosensor: State of the art" *Biosens Bioelectron* 2020, 166, 112431.
- [195] M. Yuqing, C. Jianrong, F. Keming, "New technology for the detection of pH" *J Biochem Biophys Methods* 2005, 63, 1–9.
- [196] A. Hushegyi, T. Bertok, P. Damborsky, J. Katrlik, J. Tkac, "An ultrasensitive impedimetric glycan biosensor with controlled glycan density for detection of lectins and influenza hemagglutinins" *Chemical Communications* 2015, 51, 7474–7477.
- [197] F. Kveton, A. Blšáková, A. Hushegyi, P. Damborsky, O. Blixt, B. Jansson, J. Tkac, "Optimization of the Small Glycan Presentation for Binding a Tumor-Associated Antibody: Application to the Construction of an Ultrasensitive Glycan Biosensor" *Langmuir* 2017, 33, 2709–2716.
- [198] T. Bertok, A. Šedivá, J. Filip, M. Ilcikova, P. Kasak, D. Velic, E. Jane, M. Mravcová, J. Rovenský, P. Kunzo, P. Lobotka, V. Šmatko, A. Vikartovská, J. Tkac, "Carboxybetaine Modified Interface for Electrochemical Glycoprofiling of Antibodies Isolated from Human Serum" *Langmuir* 2015, 31, 7148–7157.

- [199] T. Bryan, X. Luo, L. Forsgren, L. A. Morozova-Roche, J. J. Davis, "The robust electrochemical detection of a Parkinson's disease marker in whole blood sera" *Chem Sci* 2012, 3, 3468–3473.
- [200] F. Xi, J. Gao, J. Wang, Z. Wang, "Discrimination and detection of bacteria with a label-free impedimetric biosensor based on self-assembled lectin monolayer" *Journal of Electroanalytical Chemistry* 2011, 656, 252–257.
- [201] D. Pihíková, Š. Belicky, P. Kasák, T. Bertok, J. Tkac, "Sensitive detection and glycoprofiling of a prostate specific antigen using impedimetric assays" *Analyst* 2016, 141, 1044–1051.
- [202] B. Pandey, Y. H. Tan, A. R. Parameswar, P. Pornsuriyasak, A. V. Demchenko, K. J. Stine, "Electrochemical characterization of globotriose-containing self-assembled monolayers on nanoporous gold and their binding of soybean agglutinin" *Carbohydr Res* 2013, 373, 9–17.
- [203] T. Bertok, A. Sediva, J. Katrlik, P. Gemeiner, M. Mikula, M. Nosko, J. Tkac, "Label-free detection of glycoproteins by the lectin biosensor down to attomolar level using gold nanoparticles" *Talanta* 2013, 108, 11–18.
- [204] M. L. S. Silva, M. G. H. Rangel, "A *Vicia villosa* agglutinin biosensor for cancer-associated Tn antigen" *Sens Actuators B Chem* 2017, 252, 777–784.
- [205] A. A. Dunajová, M. Gál, K. Tomčíková, R. Sokolová, V. Kolivoška, E. Vaněčková, F. Kielar, F. Kostolanský, E. Varečková, M. Naumowicz, "Ultrasensitive impedimetric imunosensor for influenza A detection" *Journal of Electroanalytical Chemistry* 2020, 858, 113813.
- [206] A. A. Khorshed, O. Savchenko, J. Liu, L. Shoute, J. Zeng, S. Ren, J. Gu, N. Jha, Z. Yang, J. Wang, L. Jin, J. Chen, "Development of an impedance-based biosensor for determination of IgG galactosylation levels" *Biosens Bioelectron* 2024, 245, 115793.
- [207] S. Chung, L. Bode, D. A. Hall, "Point-of-care human milk testing for maternal secretor status" *Anal Bioanal Chem* 2022, 414, 3187–3196.
- [208] A. Ch. Lazanas, M. I. Prodromidis, "Electrochemical Impedance Spectroscopy—A Tutorial" *ACS Measurement Science Au* 2023, 3, 162–193.
- [209] E. Katz, I. Willner, "Probing Biomolecular Interactions at Conductive and Semiconductive Surfaces by Impedance Spectroscopy: Routes to Impedimetric Immunosensors, DNA-Sensors, and Enzyme Biosensors" *Electroanalysis* 2003, 15, 913–947.

- [210] M. Tolba, M. U. Ahmed, C. Tlili, F. Eichenseher, M. J. Loessner, M. Zourob, "A bacteriophage endolysin-based electrochemical impedance biosensor for the rapid detection of *Listeria* cells" *Analyst* 2012, **137**, 5749–5756.
- [211] A.-E. Radi, J. L. Acero Sánchez, E. Baldrich, C. K. O'Sullivan, "Reagentless, Reusable, Ultrasensitive Electrochemical Molecular Beacon Aptasensor" *J Am Chem Soc* 2006, **128**, 117–124.
- [212] V. Ganesh, S. K. Pal, S. Kumar, V. Lakshminarayanan, "Self-assembled monolayers (SAMs) of alkoxycyanobiphenyl thiols on gold—A study of electron transfer reaction using cyclic voltammetry and electrochemical impedance spectroscopy" *J Colloid Interface Sci* 2006, **296**, 195–203.
- [213] T. A. R. Cordeiro, H. R. Martins, D. L. Franco, F. L. N. Santos, P. A. F. Celedon, V. L. Cantuária, M. de Lana, A. B. Reis, L. F. Ferreira, "Impedimetric immunosensor for rapid and simultaneous detection of chagas and visceral leishmaniasis for point of care diagnosis" *Biosens Bioelectron* 2020, **169**, 112573.
- [214] T. Bryan, X. Luo, L. Forsgren, L. A. Morozova-Roche, J. J. Davis, "The robust electrochemical detection of a Parkinson's disease marker in whole blood sera" *Chem Sci* 2012, **3**, 3468–3473.
- [215] F. Cui, Y. Xu, R. Wang, H. Liu, L. Chen, Q. Zhang, X. Mu, "Label-free impedimetric glycan biosensor for quantitative evaluation interactions between pathogenic bacteria and mannose" *Biosens Bioelectron* 2018, **103**, 94–98.
- [216] S. Hargol Zadeh, S. Kashanian, M. Nazari, "A Label-Free Carbohydrate-Based Electrochemical Sensor to Detect *Escherichia coli* Pathogenic Bacteria Using D-mannose on a Glassy Carbon Electrode" *Biosensors (Basel)* 2023, **13**, 619.
- [217] D. Jeong, K.-S. Ahn, W.-Y. Lee, "Label-free impedimetric glycosensor based on β -galactose-functionalized gold electrode for the determination of cholera toxin" *Journal of Electroanalytical Chemistry* 2017, **806**, 123–129.
- [218] L. U. Buxbaum, "Leishmania mexicana Infection Induces IgG to Parasite Surface Glycoinositol Phospholipids that Can Induce IL-10 in Mice and Humans" *PLoS Negl Trop Dis* 2013, **7**, e2224.
- [219] G. Rosen, M. V. Londner, D. Sevlever, C. L. Greenblatt, "Leishmania major: glycolipid antigens recognized by immune human sera" *Mol Biochem Parasitol* 1988, **27**, 93–99.
- [220] R. D. Portela, R. P. Soares, G. P. Passos, D. F. Larangeira, T. D. Barral, J. R. Sampaio, M. F. Bernardo, E. V. Alves-Sobrinho, M. T. Bahia, F. A. Pinho, S. M.

- Barrouin-Melo, "Leishmania infantum-derived lipophosphoglycan as an antigen in the accurate serodiagnosis of canine leishmaniasis" *PLoS Negl Trop Dis* 2019, 13, e0007720.
- [221] U. Galili, S. B. Shohet, E. Kobrin, C. L. Stults, B. A. Macher, "Man, apes, and Old World monkeys differ from other mammals in the expression of alpha-galactosyl epitopes on nucleated cells." *Journal of Biological Chemistry* 1988, 263, 17755–17762.
- [222] K. Michael, I. C. Almeida, R. A. Maldonado, A. Acosta-Serrano, A. A. Montoya, S. Portillo, *Synthetic Biomarkers for Differential Serological Diagnosis of Cutaneous Leishmaniasis (CL) Caused by Various Leishmania Species*, 2023, US2023009415A1.
- [223] S. M. Viana, A. L. Montoya, A. M. Carvalho, B. S. de Mendonça, S. Portillo, J. J. Olivas, N. H. Karimi, I. L. Estevao, U. Ortega-Rodriguez, E. M. Carvalho, W. O. Dutra, R. A. Maldonado, K. Michael, C. I. de Oliveira, I. C. Almeida, "Serodiagnosis and therapeutic monitoring of New-World tegumentary leishmaniasis using synthetic type-2 glycoinositolphospholipid-based neoglycoproteins" *Emerg Microbes Infect* 2022, 11, 2147–2159.
- [224] E. Suzuki, A. K. Tanaka, M. S. Toledo, H. K. Takahashi, A. H. Straus, "Role of β -D-Galactofuranose in Leishmania major Macrophage Invasion" *Infect Immun* 2002, 70, 6592–6596.
- [225] J. E. Bennett, A. K. Bhattacharjee, C. P. J. Glaudemans, "Galactofuranosyl groups are immunodominant in *Aspergillus fumigatus* galactomannan" *Mol Immunol* 1985, 22, 251–254.
- [226] L. R. Travassos, I. C. Almeida, "Carbohydrate immunity in American trypanosomiasis" *Springer Semin Immunopathol* 1993, 15, 183–204.
- [227] X. Wang, H. Chen, F. Chiodo, B. Tefsen, "Detection of human IgM and IgG antibodies by means of galactofuranose-coated and rhamnose-coated gold nanoparticles" *Matters (Zur)* 2019.
- [228] L. Mendonca-Previato, P. A. J. Gorin, A. F. Braga, J. Scharfstein, J. O. Previato, "Chemical structure and antigenic aspects of complexes obtained from epimastigotes of *Trypanosoma cruzi*" *Biochemistry* 1983, 22, 4980–4987.
- [229] E. A. Leitao, " β -Galactofuranose-containing O-linked oligosaccharides present in the cell wall peptidogalactomannan of *Aspergillus fumigatus* contain immunodominant epitopes" *Glycobiology* 2003, 13, 681–692.

- [230] M. V. Arruda, W. Colli, B. Zingales, "Terminal β -D-galactofuranosyl epitopes recognized by antibodies that inhibit *Trypanosoma cruzi* internalization into mammalian cells" *Eur J Biochem* 1989, **182**, 413–421.
- [231] S. Bertini, A. L. Colombo, H. K. Takahashi, A. H. Straus, "Expression of Antibodies Directed to *Paracoccidioides brasiliensis* Glycosphingolipids during the Course of *Paracoccidioidomycosis* Treatment" *Clinical and Vaccine Immunology* 2007, **14**, 150–156.
- [232] K. Ruda, J. Lindberg, P. J. Garegg, S. Oscarson, P. Konradsson, "Synthesis of the *Leishmania* LPG Core Heptasaccharyl myo-Inositol" *J Am Chem Soc* 2000, **122**, 11067–11072.
- [233] L. Gandolfi-Donadio, C. Gallo-Rodriguez, R. M. de Lederkremer, "Synthesis of α -D-Galp-(1→3)- β -D-Galf-(1→3)-D-Man, a Terminal Trisaccharide of *Leishmania* Type-2 Glycoinositolphospholipids" *J Org Chem* 2002, **67**, 4430–4435.
- [234] N. Nishi, K. Seki, D. Takahashi, K. Toshima, "Synthesis of a Pentasaccharide Repeating Unit of Lipopolysaccharide Derived from Virulent *E. coli* O1 and Identification of a Glycotope Candidate of Avian Pathogenic *E. coli* O1" *Angewandte Chemie International Edition* 2021, **60**, 1789–1796.
- [235] J. Cai, J. Hu, C. Qin, L. Li, D. Shen, G. Tian, X. Zou, P. H. Seeberger, J. Yin, "Chemical Synthesis Elucidates the Key Antigenic Epitope of the Autism-Related Bacterium *Clostridium bolteae* Capsular Octadecasaccharide" *Angewandte Chemie International Edition* 2020, **59**, 20529–20537.
- [236] A. Reinhardt, Y. Yang, H. Claus, C. L. Pereira, A. D. Cox, U. Vogel, C. Anish, P. H. Seeberger, "Antigenic Potential of a Highly Conserved *Neisseria meningitidis* Lipopolysaccharide Inner Core Structure Defined by Chemical Synthesis" *Chem Biol* 2015, **22**, 38–49.
- [237] J. Pham, A. Hernandez, A. Cioce, S. Achilli, G. Goti, C. Vivès, M. Thepaut, A. Bernardi, F. Fieschi, N. Reichardt, "Chemo-Enzymatic Synthesis of *S. mansoni* O-Glycans and Their Evaluation as Ligands for C-Type Lectin Receptors MGL, DC-SIGN, and DC-SIGNR" *Chemistry – A European Journal* 2020, **26**, 12818–12830.
- [238] A. Hushegyi, J. Tkac, "Are glycan biosensors an alternative to glycan microarrays?" *Anal. Methods* 2014, **6**, 6610–6620.
- [239] O. Blixt, S. Head, T. Mondala, C. Scanlan, M. E. Huflejt, R. Alvarez, M. C. Bryan, F. Fazio, D. Calarese, J. Stevens, N. Razi, D. J. Stevens, J. J. Skehel, I. van Die, D. R. Burton, I. A. Wilson, R. Cummings, N. Bovin, C.-H. Wong, J. C. Paulson, "Printed

- covalent glycan array for ligand profiling of diverse glycan binding proteins” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2004, **101**, 17033–17038.
- [240] O. C. Grant, H. M. Smith, D. Firsova, E. Fadda, R. J. Woods, “Presentation, presentation, presentation! Molecular-level insight into linker effects on glycan array screening data” *Glycobiology* 2014, **24**, 17–25.
- [241] M. Hederos, P. Konradsson, “Synthesis of the *Trypanosoma cruzi* LPPG Heptasaccharyl myo-Inositol” *J Am Chem Soc* 2006, **128**, 3414–3419.
- [242] B. D. Johnston, B. M. Pinto, “Use of a phenyl 1-selenogalactofuranoside as a glycosyl donor for the synthesis of galactofuranosyl-containing disaccharides” *Carbohydr Res* 1997, **305**, 289–292.
- [243] V. Ferrières, M. Roussel, M. Gelin, D. Plusquellec, “A New Approach to a Disaccharidic Hapten Containing a Galactofuranosyl Entity” *J Carbohydr Chem* 2001, **20**, 855–865.
- [244] P. A. J. Gorin, E. M. Barreto-Bergter, F. S. Da Cruz, “The chemical structure of the D-galacto-D-mannan component of *Trypanosoma cruzi*: ¹³C-N.M.R. shift dependence on structure of D-galactose to D-mannose linkage” *Carbohydr Res* 1981, **88**, 177–188.
- [245] Z. Ma, J. Zhang, F. Kong, “Convergent synthesis of a galactofuranosylated mannan, the repeating unit of *Trichophyton mentagrophytes* IFO 5466 and *Trichophyton rubrum* IFO 5467” *Tetrahedron Asymmetry* 2004, **15**, 1517–1525.
- [246] P. G. M. Wuts, T. W. Greene in *Greene's Protective Groups in Organic Synthesis*, Wiley, 2006, pp. 16–366.
- [247] S. Arungundram, K. Al-Mafraji, J. Asong, F. E. Leach, I. J. Amster, A. Venot, J. E. Turnbull, G.-J. Boons, “Modular Synthesis of Heparan Sulfate Oligosaccharides for Structure–Activity Relationship Studies” *J Am Chem Soc* 2009, **131**, 17394–17405.
- [248] Y. Zhang, G. Xiang, S. He, Y. Hu, Y. Liu, L. Xu, G. Xiao, “Orthogonal One-Pot Synthesis of Oligosaccharides Based on Glycosyl *ortho* -Alkynylbenzoates” *Org Lett* 2019, **21**, 2335–2339.
- [249] M. K. Patel, B. Vijayakrishnan, J. R. Koeppe, J. M. Chalker, K. J. Doores, B. G. Davis, “Analysis of the dispersity in carbohydrate loading of synthetic glycoproteins using MALDI-TOF mass spectrometry” *Chemical Communications* 2010, **46**, 9119–9121.
- [250] Y. Jiao, Z. Ma, D. Hodgins, B. Pequegnat, L. Bertolo, L. Arroyo, M. A. Monteiro, “*Clostridium difficile* PSI polysaccharide: synthesis of pentasaccharide repeating

- block, conjugation to exotoxin B subunit, and detection of natural anti-PSI IgG antibodies in horse serum" *Carbohydr Res* 2013, 378, 15–25.
- [251] C. Noti, J. L. de Paz, L. Polito, P. H. Seeberger, "Preparation and Use of Microarrays Containing Synthetic Heparin Oligosaccharides for the Rapid Analysis of Heparin–Protein Interactions" *Chemistry - A European Journal* 2006, 12, 8664–8686.
- [252] D. Crich, V. Dudkin, "Why Are the Hydroxy Groups of Partially Protected N-Acetylglucosamine Derivatives Such Poor Glycosyl Acceptors, and What Can Be Done about It? A Comparative Study of the Reactivity of N-Acetyl-, N-Phthalimido-, and 2-Azido-2-deoxy-glucosamine Derivatives" *J Am Chem Soc* 2001, 123, 6819–6825.
- [253] C. Gallo-Rodriguez, O. Varela, R. M. de Lederkremer, "One-pot synthesis of β -D-Galf(1→4)[β -D-Galp(1→6)]-D-GlcNAc, a 'core' trisaccharide linked O-glycosidically in glycoproteins of *Trypanosoma cruzi*" *Carbohydr Res* 1998, 305, 163–170.
- [254] P. Z. Allen, *Methods in carbohydrate chemistry*, Academic Press, New York, 1962.
- [255] M. R. Richards, Y. Bai, T. L. Lowary, "Comparison between DFT- and NMR-based conformational analysis of methyl galactofuranosides" *Carbohydr Res* 2013, 374, 103–114.
- [256] R. Castelli, H. S. Overkleft, G. A. van der Marel, J. D. C. Codée, "2,2-Dimethyl-4-(4-methoxy-phenoxy) butanoate and 2,2-Dimethyl-4-azido Butanoate: Two New Pivaloate-ester-like Protecting Groups" *Org Lett* 2013, 15, 2270–2273.
- [257] D. Marcovici-Mizrahi, H. E. Gottlieb, V. Marks, A. Nudelman, "On the Stabilization of the Syn -Rotamer of Amino Acid Carbamate Derivatives by Hydrogen Bonding" *J Org Chem* 1996, 61, 8402–8406.
- [258] A. G. Gerbst, V. B. Krylov, D. Z. Vinnitskiy, A. S. Dmitrenok, A. S. Shashkov, N. E. Nifantiev, "13C-NMR glycosylation effects in (1→3)-linked furanosyl-pyranosides" *Carbohydr Res* 2015, 417, 1–10.
- [259] A. Ali, D. C. Gowda, R. A. Vishwakarma, "A new approach to construct full-length glycosylphosphatidylinositols of parasitic protozoa and [4-deoxy-Man-III]-GPI analogues" *Chemical Communications* 2005, 1, 519–521.
- [260] F. D. Chattaway, "XLVII.—The preparation of allyl alcohol" *J. Chem. Soc., Trans.* 1915, 107, 407–410.
- [261] E. Arceo, P. Marsden, R. G. Bergman, J. A. Ellman, "An efficient didehydroxylation method for the biomass-derived polyols glycerol and erythritol. Mechanistic studies of a formic acid-mediated deoxygenation" *Chemical Communications* 2009, 3357.

- [262] O. Kamm, C. S. Marvel, “Allyl Alcohol” *Organic Syntheses* 1921, 1, 15.
- [263] C. Unverzagt, “Synthesis of a Biantennary Heptasaccharide by Regioselective Glycosylations” *Angewandte Chemie International Edition in English* 1994, 33, 1102–1104.
- [264] G. Yang, F. Kong, “Synthesis of heptasaccharide and nonasaccharide analogues of the lentinan repeating unit” *Carbohydr Res* 2005, 340, 39–48.
- [265] G. J. S. Lohman, P. H. Seeberger, “A Stereochemical Surprise at the Late Stage of the Synthesis of Fully N-Differentiated Heparin Oligosaccharides Containing Amino, Acetamido, and N-Sulfonate Groups” *J Org Chem* 2004, 69, 4081–4093.
- [266] L. Ban, M. Mrksich, “On-Chip Synthesis and Label-Free Assays of Oligosaccharide Arrays” *Angewandte Chemie International Edition* 2008, 47, 3396–3399.
- [267] A. Hölemann, B. L. Stocker, P. H. Seeberger, “Synthesis of a Core Arabinomannan Oligosaccharide of *Mycobacterium tuberculosis*” *J Org Chem* 2006, 71, 8071–8088.
- [268] K. Nakayama, K. Uoto, K. Higashi, T. Soga, T. Kusama, “A Useful Method for Deprotection of the Protective Allyl Group at the Anomeric Oxygen of Carbohydrate Moieties Using Tetrakis(triphenylphosphine)palladium.” *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 1992, 40, 1718–1720.
- [269] S. Boonyarattanakalin, X. Liu, M. Michieletti, B. Lepenies, P. H. Seeberger, “Chemical synthesis of all phosphatidylinositol mannoside (PIM) glycans from *Mycobacterium tuberculosis*” *J Am Chem Soc* 2008, 130, 16791–16799.
- [270] S. Angyal, V. Pickles, “Equilibria between pyranoses and furanoses. II. Aldoses” *Aust J Chem* 1972, 25, 1695–1710.
- [271] D. Crich, S. Sun, “Direct chemical synthesis of β -mannopyranosides and other glycosides via glycosyl triflates” *Tetrahedron* 1998, 54, 8321–8348.
- [272] W. A. Bubb, “NMR spectroscopy in the study of carbohydrates: Characterizing the structural complexity” *Concepts in Magnetic Resonance Part A* 2003, 19A, 1–19.
- [273] D. Crich, S. Sun, “Are Glycosyl Triflates Intermediates in the Sulfoxide Glycosylation Method? A Chemical and ^1H , ^{13}C , and ^{19}F NMR Spectroscopic Investigation” *J Am Chem Soc* 1997, 119, 11217–11223.
- [274] R. A. Jeanneret, S. E. Johnson, M. C. Galan, “Conformationally Constrained Glycosyl Donors as Tools to Control Glycosylation Outcomes” *J Org Chem* 2020, 85, 15801–15826.

- [275] M. Heuckendorff, P. S. Bols, C. B. Barry, T. G. Frihed, C. M. Pedersen, M. Bols, “ β -Mannosylation with 4,6-benzylidene protected mannosyl donors without preactivation” *Chemical Communications* 2015, 51, 13283–13285.
- [276] R. Weingart, R. R. Schmidt, “Can preferential β -mannopyranoside formation with 4,6-O-benzylidene protected mannopyranosyl sulfoxides be reached with trichloroacetimidates?” *Tetrahedron Lett* 2000, 41, 8753–8758.
- [277] K. P. R. Kartha, B. Mukhopadhyay, R. A. Field, “Practical de-O-acylation reactions promoted by molecular sieves” *Carbohydr Res* 2004, 339, 729–732.
- [278] M. Mizuno, K. Kobayashi, H. Nakajima, M. Koya, T. Inazu, “Unexpected reaction using methanol dried over molecular sieves” *Synth Commun* 2002, 32, 1665–1670.
- [279] L. Gandolfi Donadío, Síntesis de Oligosacáridos Con Galactofuranosa Interna Constituyentes de Microorganismos, Graduate Thesis, Universidad de Buenos Aires, 2007.
- [280] O. Moradei, C. du Mortier, A. F. Cirelli, J. Thiem, “Simple Stereocontrolled Synthesis of Methyl 2-Deoxy-D-erythro-hexopyranosid-4-uloses, Thromboxane B2 (TXB2) Precursors, from D-Galactose” *J Carbohydr Chem* 1995, 14, 525–532.
- [281] S. Santra, E. Jonas, J.-P. Bourgault, T. El-Baba, P. R. Andreana, “Kinetic Products Under Thermal Conditions: Rapid Entry into α/β -D-Galactofuranosides Using Microwave Irradiation and Selective Lewis Acids” *J Carbohydr Chem* 2011, 30, 27–40.
- [282] Thisbe K. Lindhorst, *Essentials of Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, Wiley-WCH Verlag GMbH & Co., Kiel, Germany, 2007.
- [283] D. F. Mowery, R. A. Coelho, “A modification of the mechanism of formation of methyl galactosides by the Fischer reaction including a computer simulation” *Carbohydr Res* 1986, 155, 33–44.
- [284] T. Nokami, A. Shibuya, H. Tsuyama, S. Suga, A. A. Bowers, D. Crich, J. Yoshida, “Electrochemical Generation of Glycosyl Triflate Pools” *J Am Chem Soc* 2007, 129, 10922–10928.
- [285] V. L. De Talancé, E. Thiery, G. Eppe, S. El Bkassiny, J. Mortier, S. P. Vincent, “A simple synthesis of D-galactono-1,4-lactone and key building blocks for the preparation of galactofuranosides” *J Carbohydr Chem* 2011, 30, 605–617.
- [286] J. Lv, C. Liu, Y. Guo, G. Feng, H. Dong, “SnCl₂-Catalyzed Acetalation/Selective Benzoylation Sequence for the Synthesis of Orthogonally Protected Glycosyl Acceptors” *European J Org Chem* 2022, 2022, 27–31.

- [287] H. M. Christensen, S. Oscarson, H. H. Jensen, "Common side reactions of the glycosyl donor in chemical glycosylation" *Carbohydr Res* 2015, **408**, 51–95.
- [288] G. Gola, C. Gallo-Rodriguez, "Synthesis of α -D-Glcp-(1→3)- α -D-Galf-(1→2)- α -L-Rhap constituent of the CPS of *Streptococcus pneumoniae* 22F. Effect of 3-O-substitution in 1,2-cis α -D-galactofuranosylation" *RSC Adv.* 2014, **4**, 3368–3382.
- [289] K. Plé, "Synthesis of the trisaccharide portion of soyasaponin β g: evaluation of a new glucuronic acid acceptor" *Carbohydr Res* 2003, **338**, 1441–1454.
- [290] D. R. Mootoo, P. Konradsson, U. Udodong, B. Fraser-Reid, "Armed and disarmed n-pentenyl glycosides in saccharide couplings leading to oligosaccharides" *J Am Chem Soc* 1988, **110**, 5583–5584.
- [291] B. Fraser-Reid, Z. Wu, U. E. Udodong, H. Ottosson, "Armed/disarmed effects in glycosyl donors: rationalization and sidetracking" *J Org Chem* 1990, **55**, 6068–6070.
- [292] M. N. Kamat, A. V. Demchenko, "Revisiting the Armed–Disarmed Concept Rationale: S-Benzoxazolyl Glycosides in Chemoselective Oligosaccharide Synthesis" *Org Lett* 2005, **7**, 3215–3218.
- [293] L. K. Mydock, A. V. Demchenko, "Superarming the S-Benzoxazolyl Glycosyl Donors by Simple 2-O-Benzoyl-3,4,6-tri-O-benzyl Protection" *Org Lett* 2008, **10**, 2103–2106.
- [294] F. Cramer, N. Hennrich, "Imidoester, V. Die Umlagerung von Trichloracetimidaten zu N-substituierten Säureamiden" *Chem Ber* 1961, **94**, 976–989.
- [295] K. N. A. van de Vrande, D. V. Filippov, J. D. C. Codée, "Formation of Glycosyl Trichloroacetamides from Trichloroacetimidate Donors Occurs through an Intermolecular Aglycon Transfer Reaction" *Org Lett* 2023, **25**, 6128–6132.
- [296] R. R. Schmidt, A. Toepfer, "Glycosylation with highly reactive glycosyl donors: efficiency of the inverse procedure" *Tetrahedron Lett* 1991, **32**, 3353–3356.
- [297] S. Zimmermann, B. Lepenies in *Carbohydrate-Based Vaccines. Carbohydrate-Based Vaccines. Methods in Molecular Biology* (Ed.: B. Lepenies), Humana Press, New York, NY, 2015, pp. 11–26.
- [298] K. Kappler, T. Hennet, "Emergence and significance of carbohydrate-specific antibodies" *Genes Immun* 2020, **21**, 224–239.
- [299] W. K. Tonui, P. A. Mbati, C. O. Anjili, A. S. Orago, S. J. Turco, J. I. Githure, D. K. Keoch, "Transmission blocking vaccine studies in leishmaniasis: I Lipophosphoglycan is a promising transmission blocking vaccine molecule against cutaneous leishmaniasis" *East Afr Med J* 2001, **78**, 84–89.

- [300] M. McConville, "Glycosylated-phosphatidylinositols as virulence factors in *Leishmania*" *Cell Biol Int Rep* 1991, 15, 779–798.
- [301] J. Pai, J. Y. Hyun, J. Jeong, S. Loh, E.-H. Cho, Y.-S. Kang, I. Shin, "Carbohydrate microarrays for screening functional glycans" *Chem Sci* 2016, 7, 2084–2093.
- [302] C. Marino, A. Rinflerch, R. M. de Lederkremer, "Galactofuranose Antigens, a Target for Diagnosis of Fungal Infections in Humans" *Future Sci OA* 2017, 3, FSO199.
- [303] M. Daffe, M. McNeil, P. J. Brennan, "Major structural features of the cell wall arabinogalactans of *Mycobacterium*, *Rhodococcus*, and *Nocardia* spp." *Carbohydr Res* 1993, 249, 383–398.
- [304] S. D. Kelly, B. R. Clarke, O. G. Ovchinnikova, R. P. Sweeney, M. L. Williamson, T. L. Lowary, C. Whitfield, "Klebsiella pneumoniae O1 and O2ac antigens provide prototypes for an unusual strategy for polysaccharide antigen diversification" *Journal of Biological Chemistry* 2019, 294, 10863–10876.
- [305] B. Liu, Y. A. Knirel, L. Feng, A. V. Perepelov, S. N. Senchenkova, P. R. Reeves, L. Wang, "Structural diversity in *Salmonella* O antigens and its genetic basis" *FEMS Microbiol Rev* 2014, 38, 56–89.
- [306] M. Tiemblo Martín, M. Coccimiglio, E. Andretta, L. De Simone Carone, A. Bell, T. Gerpe-Amor, C. Di Carluccio, A. Molinaro, Y. van Kooyk, N. Juge, F. Chiodo, F. Di Lorenzo, A. Silipo, "The human gut *Bacteroides eggerthii* expresses a new galactofuranose-containing lipooligosaccharide with weak immunostimulatory properties" *Carbohydr Polym* 2025, 348, 122833.
- [307] J. J. Mond, A. Lees, C. M. Snapper, "T Cell-Independent Antigens Type 2" *Annu Rev Immunol* 1995, 13, 655–692.
- [308] K. Anam, F. Afrin, D. Banerjee, N. Pramanik, S. K. Guha, R. P. Goswami, S. K. Saha, N. Ali, "Differential Decline in *Leishmania* Membrane Antigen-Specific Immunoglobulin G (IgG), IgM, IgE, and IgG Subclass Antibodies in Indian Kala-Azaz Patients after Chemotherapy" *Infect Immun* 1999, 67, 6663–6669.
- [309] M. Maurin, D. Raoult, "Q Fever" *Clin Microbiol Rev* 1999, 12, 518–553.
- [310] R. Racine, M. McLaughlin, D. D. Jones, S. T. Wittmer, K. C. MacNamara, D. L. Woodland, G. M. Winslow, "IgM Production by Bone Marrow Plasmablasts Contributes to Long-Term Protection against Intracellular Bacterial Infection" *The Journal of Immunology* 2011, 186, 1011–1021.
- [311] F. M. Frank, M. M. Fernández, N. J. Taranto, S. P. Cajal, R. A. Margni, E. Castro, V. Thomaz-soccol, E. L. Malchiodi, "Characterization of human infection by

- Leishmania spp. in the Northwest of Argentina: immune response, double infection with Trypanosoma cruzi and species of Leishmania involved" *Parasitology* 2003, 126, 31–39.
- [312] R. M. de Lederkremer, C. Lima, M. I. Ramirez, M. A. Ferguson, S. W. Homans, J. Thomas-Oates, "Complete structure of the glycan of lipopeptidophosphoglycan from Trypanosoma cruzi Epimastigotes." *Journal of Biological Chemistry* 1991, 266, 23670–23675.
- [313] Organización Panamericana de la Salud, "Leishmaniasis: informe epidemiológico de las Américas," 2024.
- [314] M. V. Hermida, A. M. Lavenia, J. López Piñeiro, M. F. Troglia, "Leishmaniasis 2025," 2024.
- [315] S. Mondal, P. Bhattacharya, N. Ali, "Current diagnosis and treatment of visceral leishmaniasis" *Expert Rev Anti Infect Ther* 2010, 8, 919–944.
- [316] C. Y. Chain, D. E. Pires Souto, M. L. Sbaraglini, C. A. Labriola, M. A. Daza Millone, E. A. Ramirez, J. S. Cisneros, C. Lopez-Albizu, K. Scollo, L. T. Kubota, A. M. Ruiz, M. E. Vela, "Trypanosoma cruzi virulence factors for the diagnosis of chagas' disease" *ACS Infect Dis* 2019, 5, 1813–1819.
- [317] B. R. Martins, Y. O. Barbosa, C. M. R. Andrade, L. Q. Pereira, G. F. Simão, C. J. de Oliveira, D. Correia, R. T. S. Oliveira, M. V. da Silva, A. C. A. Silva, N. O. Dantas, V. Rodrigues, R. A. A. Muñoz, R. P. Alves-Balvedi, "Development of an Electrochemical Immunosensor for Specific Detection of Visceral Leishmaniasis Using Gold-Modified Screen-Printed Carbon Electrodes" *Biosensors (Basel)* 2020, 10, 81.
- [318] D. Echeverri, J. Orozco, "Glycan-Based Electrochemical Biosensors: Promising Tools for the Detection of Infectious Diseases and Cancer Biomarkers" *Molecules* 2022, 27, 8533.
- [319] H. J. Lim, T. Saha, B. T. Tey, W. S. Tan, C. W. Ooi, "Quartz crystal microbalance-based biosensors as rapid diagnostic devices for infectious diseases" *Biosens Bioelectron* 2020, 168, 112513.
- [320] H. A. Abdulbari, E. A. M. Basheer, "Electrochemical Biosensors: Electrode Development, Materials, Design, and Fabrication" *ChemBioEng Reviews* 2017, 4, 92–105.

- [321] M. Mrksich, G. M. Whitesides, "Using Self-Assembled Monolayers to Understand the Interactions of Man-made Surfaces with Proteins and Cells" *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 1996, 25, 55–78.
- [322] K. Yu, A. L. Creagh, C. A. Haynes, J. N. Kizhakkedathu, "Lectin Interactions on Surface-Grafted Glycostructures: Influence of the Spatial Distribution of Carbohydrates on the Binding Kinetics and Rupture Forces" *Anal Chem* 2013, 85, 7786–7793.
- [323] O. Haji-Ghassemi, R. J. Blackler, N. Martin Young, S. V. Evans, "Antibody recognition of carbohydrate epitopes" *Glycobiology* 2015, 25, 920–952.
- [324] B. T. Houseman, M. Mrksich, "The Role of Ligand Density in the Enzymatic Glycosylation of Carbohydrates Presented on Self-Assembled Monolayers of Alkanethiolates on Gold" *Angewandte Chemie International Edition* 1999, 38, 782–785.
- [325] J. Yang, J.-N. Chazalviel, A. Siriwardena, R. Boukherroub, F. Ozanam, S. Szunerits, A. C. Gouget-Laemmel, "Quantitative Assessment of the Multivalent Protein–Carbohydrate Interactions on Silicon" *Anal Chem* 2014, 86, 10340–10349.
- [326] Y. Suda, A. Arano, Y. Fukui, S. Koshida, M. Wakao, T. Nishimura, S. Kusumoto, M. Sobel, "Immobilization and Clustering of Structurally Defined Oligosaccharides for Sugar Chips: An Improved Method for Surface Plasmon Resonance Analysis of Protein–Carbohydrate Interactions" *Bioconjug Chem* 2006, 17, 1125–1135.
- [327] N. Horan, L. Yan, H. Isobe, G. M. Whitesides, D. Kahne, "Nonstatistical binding of a protein to clustered carbohydrates" *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1999, 96, 11782–11786.
- [328] F. Cui, Y. Xu, R. Wang, H. Liu, L. Chen, Q. Zhang, X. Mu, "Label-free impedimetric glycan biosensor for quantitative evaluation interactions between pathogenic bacteria and mannose" *Biosens Bioelectron* 2018, 103, 94–98.
- [329] T. Bertók, J. Katrlík, P. Gemeiner, J. Tkac, "Electrochemical lectin based biosensors as a label-free tool in glycomics" *Microchimica Acta* 2013, 180, 1–13.
- [330] J. S. Cisneros, C. Y. Chain, M. A. Daza Millone, C. A. Labriola, K. Scollo, A. M. Ruiz, P. Estrela, M. E. Vela, "Electrochemical impedance biosensor for Chagas Disease diagnosis in clinical samples" *Biosens Bioelectron X* 2022, 12, 100261.
- [331] G. Yang, G. Liu, "New Insights for Self-Assembled Monolayers of Organothiols on Au(111) Revealed by Scanning Tunneling Microscopy" *J Phys Chem B* 2003, 107, 8746–8759.

- [332] J. A. M. Sondag-Huetborst, C. Schönenberger, L. G. J. Fokkink, “Formation of holes in alkanethiol monolayers on gold” *Journal of Physical Chemistry* 1994, 98, 6826–6834.
- [333] S. E. Herrera, Transferencia de Carga y Electrocatalisis En Superficies Nanoestructuradas, Graduate thesis, Universidad de Buenos Aires, 2018.
- [334] V. Kanda, P. Kitov, D. R. Bundle, M. T. McDermott, “Surface Plasmon Resonance Imaging Measurements of the Inhibition of Shiga-like Toxin by Synthetic Multivalent Inhibitors” *Anal Chem* 2005, 77, 7497–7504.
- [335] L. Wang, J. E. Filer, M. M. Lorenz, C. S. Henry, D. S. Dandy, B. J. Geiss, “An ultra-sensitive capacitive microwire sensor for pathogen-specific serum antibody responses” *Biosens Bioelectron* 2019, 131, 46–52.
- [336] J. G. G. Luz, D. E. P. Souto, G. F. Machado-Assis, M. De Lana, L. T. Kubota, R. C. S. Luz, F. S. Damos, H. R. Martins, “Development and evaluation of a SPR-based immunosensor for detection of anti-Trypanosoma cruzi antibodies in human serum” *Sens Actuators B Chem* 2015, 212, 287–296.
- [337] E. Briand, M. Salmain, J. M. Herry, H. Perrot, C. Compère, C. M. Pradier, “Building of an immunosensor: How can the composition and structure of the thiol attachment layer affect the immunosensor efficiency?” *Biosens Bioelectron* 2006, 22, 440–448.
- [338] A. Bogomolova, E. Komarova, K. Reber, T. Gerasimov, O. Yavuz, S. Bhatt, M. Aldissi, “Challenges of electrochemical impedance spectroscopy in protein biosensing” *Anal Chem* 2009, 81, 3944–3949.
- [339] N. Alanazi, M. Almutairi, A. N. Alodhayb, “A Review of Quartz Crystal Microbalance for Chemical and Biological Sensing Applications” *Sens Imaging* 2023, 24, 10.
- [340] J. Štambuk, N. Nakić, F. Vučković, M. Pučić-Baković, G. Razdorov, I. Trbojević-Akmačić, M. Novokmet, T. Keser, M. Vilaj, T. Štambuk, I. Gudelj, M. Šimurina, M. Song, H. Wang, M. P. Salihović, H. Campbell, I. Rudan, I. Kolčić, L. A. Eller, P. McKeigue, M. L. Robb, J. Halfvarson, M. Kurtoglu, V. Annese, T. Škarić-Jurić, M. Molokhia, O. Polašek, C. Hayward, H. Kibuuka, K. Thaqi, D. Primorac, C. Gieger, S. Nitayaphan, T. Spector, Y. Wang, T. Tillin, N. Chaturvedi, J. F. Wilson, M. Schanfield, M. Filipenko, W. Wang, G. Lauc, “Global variability of the human IgG glycome” *Aging* 2020, 12, 15222–15259.
- [341] W. L. F. Armarego, C. Chai, *Purification of Laboratory Chemicals*, Elsevier, 2013.
- [342] H. C. Brown, *Organic Synthesis via Boranes*, Wiley Interscience, New York, NY, 1974.

- [343] P. Kohn, R. H. Samaritano, L. M. Lerner, "A New Method for the Synthesis of Furanose Derivatives of Aldohexoses 1" *J Am Chem Soc* 1965, 87, 5475–5480.
- [344] L. Krähling, J. Krey, G. Jakobson, J. Grolig, L. Miksche in *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, Wiley, 2000.
- [345] N. B. D'Accorso, I. M. E. Thiel, M. Schüller, "Proton and C-13 nuclear magnetic resonance spectra of some benzoylated aldohexoses" *Carbohydr Res* 1983, 124, 177–184.
- [346] C. Marino, L. Gandolfi-Donadío, C. G. Rodriguez, Y. Bai, R. M. de Lederkremer, "One-Step Syntheses of 1,2,3,5,6-Penta-O-Benzoyl- α , β -D-Galactofuranose and 1,2,3,5-Tetra-O-Benzoyl- α , β -D-Arabinofuranose" *Carbohydrate Chemistry: Proven Synthetic Methods: Volume 1* 2016, 1, 231–238.
- [347] B. J. J. Timmer, O. Ramström, "Acid-Assisted Direct Olefin Metathesis of Unprotected Carbohydrates in Water" *Chemistry – A European Journal* 2019, 25, 14408–14413.
- [348] M. C. Hsu, J. Lee, Y. Kishi, "Synthetic 3-O-methylmannose-containing polysaccharides (sMMPs): Design and synthesis" *Journal of Organic Chemistry* 2007, 72, 1931–1940.
- [349] M. Poláková, M. U. Roslund, F. S. Ekholm, T. Saloranta, R. Leino, "Synthesis of β -(1→2)-Linked Oligomannosides" *European J Org Chem* 2009, 2009, 870–888.
- [350] F. M. Winnik, J. P. Carver, J. J. Krepinsky, "Syntheses of model oligosaccharides of biological significance. 2. Synthesis of a tetramannoside and of two lyxose-containing trisaccharides" *J Org Chem* 1982, 47, 2701–2707.
- [351] K. Bock, C. Pedersen, "Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy of Monosaccharides" *Adv Carbohydr Chem Biochem* 1983, 41, 27–66.
- [352] T. Nokami, A. Shibuya, H. Tsuyama, S. Suga, A. A. Bowers, D. Crich, J. Yoshida, "Electrochemical Generation of Glycosyl Triflate Pools" *J Am Chem Soc* 2007, 129, 10922–10928.
- [353] M. S. Motawia, C. E. Olsen, K. Denyer, A. M. Smith, B. L. Møller, "Synthesis of 4'-O-acetyl-maltose and α -D-galactopyranosyl-(1→4)-D-glucopyranose for biochemical studies of amylose biosynthesis" *Carbohydr Res* 2001, 330, 309–318.
- [354] P. C. Bulman Page, Y. Chan, J. Liddle, M. R. J. Elsegood, "Carbohydrate-derived iminium salt organocatalysts for the asymmetric epoxidation of alkenes" *Tetrahedron* 2014, 70, 7283–7305.

Bibliografía

- [355] B. Wegmann, R. R. Schmidt, "The Application of the Trichloroacetimidate Method to the Synthesis of α -D-Gluco- and α -D-Galactopyranosides" *J Carbohydr Chem* 1987, 6, 357–375.
- [356] M. Shaw, A. Kumar, "Visible-Light-Mediated β -C(sp³)-H Amination of Glycosylimidates: En Route to Oxazoline-Fused/Spiro Nonclassical Bicyclic Sugars" *Org Lett* 2019, 21, 3108–3113.
- [357] G. Limberg, J. Thiem, " β -elimination of protected aldono-1,4-lactones as a general approach to the synthesis of 2-keto-3-deoxyaldonic acids containing four to six carbon atoms" *Carbohydr Res* 1995, 275, 107–115.
- [358] J. D. Marco, P. A. Barroso, M. Calvopiña, H. Kumazawa, M. Furuya, M. Korenaga, S. P. Cajal, M. C. Mora, M. M. J. Rea, C. E. Borda, M. A. Basombrío, N. J. Taranto, Y. Hashiguchi, "Species assignation of *Leishmania* from human and canine American Tegumentary Leishmaniasis cases by Multilocus Enzyme Electrophoresis in north Argentina" *Am J Trop Med Hyg* 2005, 72, 606–611.
- [359] J. D. Marco, P. A. Barroso, T. Mimori, F. M. Locatelli, A. Tomatani, M. C. Mora, S. P. Cajal, J. R. Nasser, L. A. Parada, T. Taniguchi, M. Korenaga, M. A. Basombrío, Y. Hashiguchi, "Polymorphism-specific PCR enhances the diagnostic performance of American tegumentary leishmaniasis and allows the rapid identification of *Leishmania* species from Argentina" *BMC Infect Dis* 2012, 12, 191.
- [360] M. C. Almazán, G. N. Copa, J. F. Gil, I. López Quiroga, M. E. Díaz Fernández, A. Uncos, C. L. Hoyos, J. R. Nasser, P. A. Barroso, J. D. Marco, "Parasitological and molecular search for *Leishmania* natural infection in phlebotomine sand flies in peri-urban and rural sites of an Argentinean area endemic for tegumentary leishmaniasis" *Acta Trop* 2021, 222, 106064.
- [361] P. H. Seeberger, C. L. Pereira, N. Khan, G. Xiao, E. Diago-Navarro, K. Reppe, B. Opitz, B. C. Fries, M. Witzenrath, "A Semi-Synthetic Glycoconjugate Vaccine Candidate for Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae*" *Angewandte Chemie International Edition* 2017, 56, 13973–13978.
- [362] ScieCon LLC, "GeSiM Nanoplotter Microarray Printer for Nanoliter Pipetting," can be found under https://www.youtube.com/watch?v=4IB0NOZ4I_l (accessed 16 September 2025), 2020.
- [363] E. A. Weiss, G. K. Kaufman, J. K. Kriebel, Z. Li, R. Schalek, G. M. Whitesides, "Si/SiO₂-templated formation of ultraflat metal surfaces on glass, polymer, and solder supports: Their use as substrates for self-assembled monolayers" *Langmuir* 2007, 23, 9686–9694.

- [364] A. Sarkar, "Biosensing, Characterization of Biosensors, and Improved Drug Delivery Approaches Using Atomic Force Microscopy: A Review" *Frontiers in Nanotechnology* 2022, 3, 798928.
- [365] J. Wang in *Analytical Electrochemistry*, Wiley, 2006, pp. 29–66.
- [366] J. Prasek, L. Trnkova, I. Gablech, P. Businova, J. Drbohlavova, J. Chomoucka, V. Adam, R. Kizek, J. Hubalek, "Optimization of Planar Three-Electrode Systems for Redox System Detection" *Int J Electrochem Sci* 2012, 7, 1785–1801.
- [367] K. Akhtar, S. A. Khan, S. B. Khan, A. M. Asiri in *Handbook of Materials Characterization*, Springer International Publishing, Cham, 2018, pp. 113–145.
- [368] S. Loganathan, R. B. Valapa, R. K. Mishra, G. Pugazhenthi, S. Thomas in *Thermal and Rheological Measurement Techniques for Nanomaterials Characterization* (Eds.: S. Thomas, R. Thomas, A.K. Zachariah, R.K. Mishra), Elsevier, 2017, pp. 67–108.
- [369] A. K. Nair, A. Mayeen, L. K. Shaji, M. S. Kala, S. Thomas, N. Kalarikkal in *Characterization of Nanomaterials*, Elsevier, 2018, pp. 269–299.
- [370] F. A. Stevie, C. L. Donley, "Introduction to X-ray photoelectron spectroscopy" *Journal of Vacuum Science & Technology A: Vacuum, Surfaces, and Films* 2020, 38, 063204.
- [371] J. F. Moulder, W. F. Stickle, P. E. Sobol, K. D. Bomben, *Handbook of X-ray Photoelectron Spectroscopy*, Physical Electronics, Inc., Eden Prairie, Minnesota, 1995.
- [372] W. A. Hofer, A. S. Foster, A. L. Shluger, "Theories of scanning probe microscopes at the atomic scale" *Rev Mod Phys* 2003, 75, 1287–1331.
- [373] F. J. Giessibl, "Advances in atomic force microscopy" *Rev Mod Phys* 2003, 75, 949–983.
- [374] A. J. Bard, L. R. Faulkner, *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications*, Wiley, 2011.
- [375] N. Elgrishi, K. J. Rountree, B. D. McCarthy, E. S. Rountree, T. T. Eisenhart, J. L. Dempsey, "A Practical Beginner's Guide to Cyclic Voltammetry" *J Chem Educ* 2018, 95, 197–206.
- [376] P. T. Kissinger, W. R. Heineman, "Cyclic voltammetry" *J Chem Educ* 1983, 60, 702.
- [377] B.-Y. Chang, S.-M. Park, "Electrochemical Impedance Spectroscopy" *Annual Review of Analytical Chemistry* 2010, 3, 207–229.

- [378] S. M. Naghib, S. M. Katebi, S. Ghorbanzade in *Electrochemical Biosensors in Practice: Materials and Methods*, Bentham Science Publishers, 2023, pp. 105–138.
- [379] M. Rodahl, F. Höök, A. Krozer, P. Brzezinski, B. Kasemo, “Quartz crystal microbalance setup for frequency and Q-factor measurements in gaseous and liquid environments” *Review of Scientific Instruments* 1995, **66**, 3924–3930.
- [380] A. D. Easley, T. Ma, C. I. Eneh, J. Yun, R. M. Thakur, J. L. Lutkenhaus, “A practical guide to quartz crystal microbalance with dissipation monitoring of thin polymer films” *Journal of Polymer Science* 2022, **60**, 1090–1107.