

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

FACULTAD DE FARMACIA

DEPARTAMENTO DE QUIMICA ORGANICA Y FARMACEUTICA

T
578



**ANTICANCEROSOS POTENCIALES.
AGENTES ALQUILANTES DERIVADOS DE AZUCARES.**

Memoria presentada por el Licenciado
José Ignacio Candela Lena para optar
al Grado de Licenciado en Química.

Sevilla, 1995

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

FACULTAD DE FARMACIA

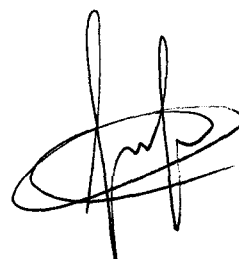
DEPARTAMENTO DE QUIMICA ORGANICA Y FARMACEUTICA

VºBº

Los Directores



José Manuel Vega Pérez
Profesor Titular de Química Orgánica
de la Universidad de Sevilla



Fernando Iglesias Guerra
Profesor Titular de Química Orgánica
de la Universidad de Sevilla

VºBº

El Tutor



Felipe Alcudia González
Catedrático de Química Orgánica
de la Universidad de Sevilla

A mis padres

La presente Memoria ha sido realizada en el Departamento de Química Orgánica y Farmacéutica de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Sevilla, bajo la dirección de D. Fernando Iglesias Guerra y D. José Manuel Vega Pérez, Profesores Titulares de Química Orgánica, a quienes deseo expresar mi agradecimiento por la educación investigadora recibida, por su constante apoyo y consejos y por permitirme participar en sus ansias investigadoras.

Asimismo, expreso mi agradecimiento a:

D. Felipe Alcudia González, Catedrático de Química Orgánica, Director del Departamento y Tutor de esta Memoria, por permitirme integrarme en su grupo de investigación y sus siempre acertados consejos.

D. José Luis Espartero Sánchez, Profesor Asociado de Química Orgánica, por su inestimable ayuda.

Mai, Isi y M^a José, por su imprescindible colaboración, por los entrañables momentos pasados no sólo en el laboratorio y, en definitiva, por su amistad.

Los compañeros del Departamento, que me han ayudado día a día .

La Dirección General de Investigación Científica y Técnica (DGICYT), por la financiación del Proyecto de Investigación PB91-0260, en el que se encuadra esta Memoria .

Todas aquellas personas que, de forma más o menos directa, han contribuido a hacer posible esta Memoria.

Por último, quiero dedicar este parrafo final a agradecer a mis padres el haber estado a mi lado en todo momento, ofreciéndome su ayuda y confianza, sin las cuales no hubiera podido llevar a fin este trabajo.

A todos ellos, gracias.

INDICE

1.- INTRODUCCION	1
2.- ANTECEDENTES	3
3.- SINTESIS Y CARACTERIZACION	13
3.1.- SINTESIS DE LAS NUEVAS SUSTANCIAS	14
3.1.1.- Preparación de productos de partida	14
3.1.2.- Preparación de las nuevas sustancias	16
3.2.- DETERMINACION ESTRUCTURAL DE LAS NUEVAS SUSTANCIAS	22
3.2.1.- Determinación estructural por RMN	23
3.2.2.- Determinación estructural por espectrometría de masas	37
3.2.2.1.- Fracción alquilante unida a la posición 3 del azúcar	37
3.2.2.2.- Fracción alquilante unida a la posición 2 del azúcar	50
4.- PARTE EXPERIMENTAL	52
4.1.- METODOS GENERALES	53
4.2.- NUEVAS SUSTANCIAS	56
4.2.1.- Dodecil 4,6- <i>O</i> -bencilidén-2-clorambucilamido-2-desoxi- β -D-glucopiranosido	56
4.2.2.- Dodecil 2-clorambucilamido-2-desoxi- β -D-glucopiranosido	57
4.2.3.- Bencil 2-acetamido-4,6- <i>O</i> -bencilidén-3- <i>O</i> -carboximetil-2-desoxi- β -D-glucopiranosido	58
4.2.4.- Dodecil 2-acetamido-4,6- <i>O</i> -bencilidén-3- <i>O</i> -carboximetil-2-desoxi- β -D-glucopiranosido	59
4.2.5.- Bencil 2-acetamido-4,6- <i>O</i> -bencilidén-2-desoxi-3- <i>O</i> -metoxycarbonilmetil- β -D-glucopiranosido	60

4.2.6.- Dodecil 2-acetamido-4,6- <i>O</i> -bencilidén-2-desoxi-3- <i>O</i> -metoxicarbonilmetil- β -D-glucopiranosido	61
4.2.7.- Bencil 2-acetamido-4,6- <i>O</i> -bencilidén-2-desoxi-3- <i>O</i> -[<i>N,N</i> -bis(2-hidroxietyl)aminocarbonilmetil]- β -D-glucopiranosido	62
4.2.8.- Dodecil 2-acetamido-4,6- <i>O</i> -bencilidén-2-desoxi-3- <i>O</i> -[<i>N,N</i> -bis(2-hidroxietyl)aminocarbonilmetil]- β -D-glucopiranosido	63
4.2.9.- Bencil 2-acetamido-4,6- <i>O</i> -bencilidén-2-desoxi-3- <i>O</i> -[<i>N,N</i> -bis(2-cloroetyl)aminocarbonilmetil]- β -D-glucopiranosido	64
4.2.10.- Dodecil 2-acetamido-4,6- <i>O</i> -bencilidén-2-desoxi-3- <i>O</i> -[<i>N,N</i> -bis(2-cloroetyl)aminocarbonilmetil]- β -D-glucopiranosido	65
4.2.11.- Bencil 2-acetamido-4,6- <i>O</i> -bencilidén-2-desoxi-3- <i>O</i> -(morfolin-1-ilcarbonilmetil)- β -D-glucopiranosido	66
4.2.12.- Dodecil 2-acetamido-4,6- <i>O</i> -bencilidén-2-desoxi-3- <i>O</i> -(morfolin-1-ilcarbonilmetil)- β -D-glucopiranosido	67
5.- CONCLUSIONES	68
6.- BIBLIOGRAFIA	72
7.- APENDICES	76

1.- INTRODUCCION

La presente Tesis de Licenciatura, está englobada en un Proyecto de Tesis Doctoral, en el que nos proponemos la síntesis de diversos compuestos con potencial actividad antitumoral contra células neoplásicas.

Para ello hemos elegido, como grupo de compuestos anticancerosos, los agentes alquilantes, mostazas nitrogenadas¹ y ciclofosfamidas² entre otros, ya que éstos, junto con los antimetabolitos, son actualmente los fármacos antineoplásicos de mayor aplicación clínica dentro del campo de la Quimioterapia del Cáncer.

Las nuevas sustancias tienen como característica común la presencia de un resto de hidrato de carbono al que está unida la fracción alquilante. Presentamos en esta Memoria la síntesis de nuevas sustancias que son mostazas nitrogenadas y está en curso de realización la preparación de ciclofosfamidas derivadas de hidratos de carbono.

Es de esperar que el resto de azúcar pueda actuar como transportador selectivo³ del agente alquilante hacia las células cancerosas, ya que, al ser los monosacáridos metabolitos primarios, serán más demandados por las células malignas, en proceso de rápido crecimiento, que por las células sanas.

Además del hecho diferenciador de unir la fracción activa al resto de azúcar, otras variaciones que se pueden introducir en la molécula, pueden ir encaminadas a modificar sus propiedades físico-químicas, entre ellas, su balance hidrófilo-lipófilo (HLB). Así, sustancias con un mayor HLB conseguirán pasar más eficazmente las barreras lipofílicas (membranas celulares entre otras), que tienen que atravesar para llegar a su lugar de acción.

La unión entre el transportador (azúcar modificado) y el agente alquilante (mostaza nitrogenada), en una serie de compuestos, se lleva a cabo mediante la formación de un enlace amídico, entre el nitrógeno de la mostaza nitrogenada y el grupo ácido del espaciador unido previamente al azúcar, mientras que, en otro conjunto de compuestos, el resto alquilante está unido al espaciador por dicho nitrógeno en forma de amina terciaria.

2.- ANTECEDENTES

La Quimioterapia del cáncer trata de encontrar sustancias citotóxicas que, inhibiendo el crecimiento tumoral, tengan la mayor selectividad para los tejidos neoplásicos y la menor toxicidad posible para los tejidos normales, sobre todo cuando se requiere un tratamiento prolongado. Este objetivo se puede conseguir, bien mediante el empleo de sustancias que liberan los agentes citotóxicos intracelularmente⁴ por la acción de enzimas, existentes preferentemente en los tejidos tumorales⁵, o buscando compuestos que incorporen grupos funcionales citotóxicos, por ejemplo, con acción alquilante, a sustancias fisiológicas como aminoácidos o hidratos de carbono⁶, o sintetizando antimetabolitos que puedan inhibir selectivamente los enzimas esenciales para el crecimiento de las células enfermas, tratando de explotar las diferencias bioquímicas existentes entre los tejidos normales y neoplásicos⁷.

Los agentes alquilantes fueron el primer grupo de fármacos investigados como inhibidores efectivos contra células neoplásicas. Actualmente ellos junto con los antimetabolitos, son los fármacos antineoplásicos de mayor aplicación clínica dentro del campo de la Quimioterapia del cáncer^{8, 9}.

Ha habido al menos dos tendencias significativas en el reciente desarrollo de agentes alquilantes:

- a) La búsqueda de nuevas funciones alquilantes citotóxicas, las cuales encabezan lo que se podría llamar la 1ª generación de agentes clínicamente usados.
- b) La búsqueda de estructuras con selectividad intensificada hacia células malignas, teniendo en cuenta algunos principios teóricos, como el concepto de actividad latente y el de transportador, para el diseño de nuevos agentes alquilantes.

Hoy en día se están llevando a cabo nuevas aproximaciones tales como, el uso de anticuerpos monoclonales como transportadores selectivos de fracciones alquilantes, el desarrollo de nuevos fragmentos de ADN encerrando, entre los espacios de la doble

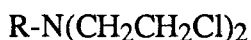
hélice, agentes alquilantes capaces de reconocer y englobar secuencias específicas de estas macromoléculas.

La eficacia antitumoral de los agentes alquilantes está relacionada con su habilidad para inducir mutaciones letales e inhibir la síntesis de ADN, por ello, los compuestos capaces de unirse a moléculas de ADN, son los más efectivos. Así, los agentes alquilantes, son capaces de producir mutaciones que provocan la mala codificación de los ácidos nucleicos.

Los agentes alquilantes son transformados, durante la solvolisis (en medio acuoso), en especies electrófilas capaces de alquilar centros nucleófilos biológicos; su unión a ellos se realiza a través de un átomo de carbono saturado.

La alquilación de las biomoléculas responsables de la proliferación celular y la especificidad de esta reacción depende de la reactividad de los agentes alquilantes, la cual, podemos usar como parámetro controlador de la actividad antitumoral y la toxicidad de estos compuestos.

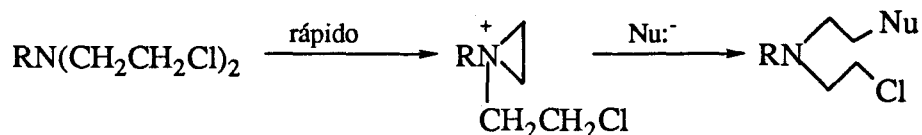
Así la cinética obtenida para la reacción de hidrólisis en las condiciones: Me₂CO/H₂O 1:1, 66° C durante 30 minutos de las mostazas nitrogenadas **1**, sugiere que el mecanismo dependa de la basicidad del heteroátomo.



1

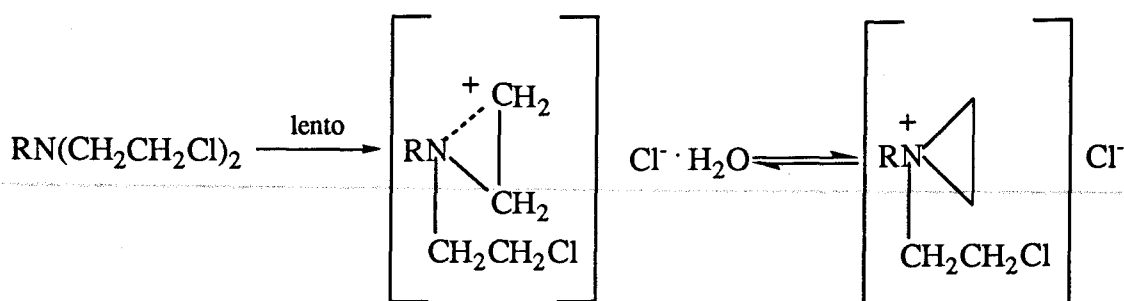
Así si éste es muy básico, como ocurre en las mostazas nitrogenadas alifáticas, la mostaza nitrogenada es capaz de ciclar rápidamente, para formar un ión aziridinio que, reaccionaría con los nucleófilos mediante un mecanismo de reacción S_N2 (Esquema 1), sin embargo, si la reacción de formación de este ión aziridinio es más lenta, como ocurre en las mostazas nitrogenadas aromáticas, el paso determinante será la formación del carbocatión solvatado en equilibrio con el ión aziridinio, siendo el

mecanismo de reacción cada vez más consistente con un mecanismo S_N1 ^{8, 10, 11} (Esquema 2).



R: Alquilo

Esquema 1



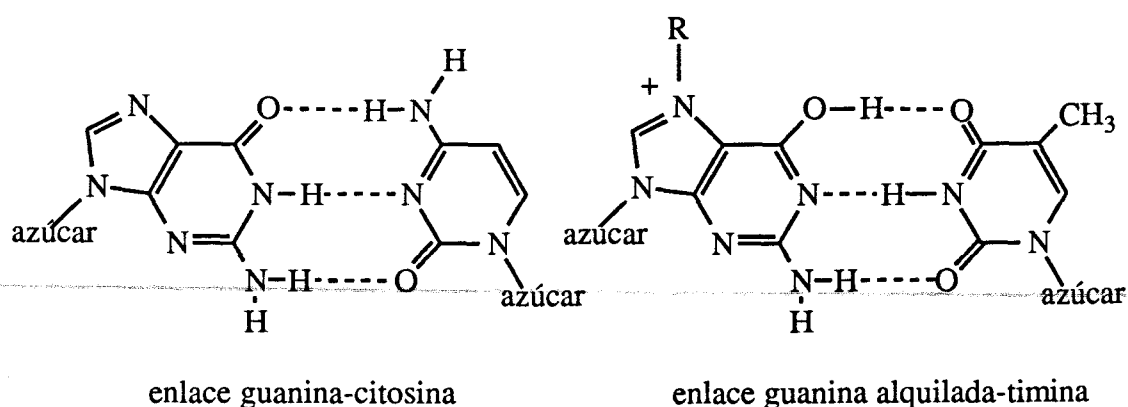
R: Arilo

Esquema 2

La dureza o blandura como base del N de la mostaza nitrogenada, no altera el mecanismo de alquilación, el cual transcurre por ataque del nucleófilo al intermedio cíclico.

Aunque son muchos los componentes celulares que sufren el proceso de alquilación (ADN, ARN, proteínas, membranas), la hipótesis más aceptada responsabiliza a la interacción con el ADN como el mecanismo más importante de la actividad antitumoral. Dentro del ADN, aunque los grupos fosfatos pueden interactuar con los agentes alquilantes, son las bases nitrogenadas las más afectadas. En ellas, la posición más activa es el nitrógeno 7 (N 7) de la Guanina. Su alquilación produce importantes cambios en las propiedades químicas de la Guanina. La carga positiva,

generada en el anillo imidazólico, lo hace más lábil, favoreciendo la forma del tautómero enólico. Como consecuencia, la Guanina puede mostrar preferencia de emparejarse con la Timina, en lugar de hacerlo con su pareja natural que es la Citosina (Esquema 3). Además puede favorecerse la hidrólisis y sufrir el proceso de despurinación, desestabilizando así localmente al ADN y favoreciendo la escisión de la cadena; finalmente, puede abrirse el anillo imidazólico, lo que también induce a la despurinación¹².



Esquema 3

Los agentes alquilantes bifuncionales, como las mostazas nitrogenadas, presentan la capacidad de reaccionar secuencialmente con los grupos N 7 de dos residuos diferentes de Guanina en el ADN, produciendo una alquilación bifuncional que se manifiesta en forma de un puente cruzado, bien dentro de una misma hebra de ADN o entre las dos hebras de la doble hélice.

La actividad antitumoral de los agentes alquilantes se puede mejorar aumentando, bien su citotoxicidad o bien su selectividad hacia células malignas.

La citotoxicidad parece ser más fácil de manejar porque está relacionada con:

a) La reactividad química de la fracción alquilante.

b) El caracter bifuncional del agente alquilante.

El diseño de agentes alquilantes altamente específicos contra las células malignas, es a menudo difícil, porque se requiere, por ejemplo, alguna diferencia bioquímica reproducible entre las células normales y las tumorales, para que éstas puedan ser eliminadas. Esas diferencias podrían estar relacionadas con el sistema enzimático, comportamiento metabólico, material genético etc. Desafortunadamente, aunque varias de éstas existen¹³, sólo presentan carácter cualitativo. Por ejemplo, muchos agentes antitumorales se han diseñado basándose en que la multiplicación de las células del cáncer es más rápida que la de las células normales. Esta aproximación tuvo éxito, se obtuvieron muchas sustancias altamente citotóxicas contra las células de rápida proliferación, pero desafortunadamente, también hay células normales que tienen rápida proliferación, lo cual limita su uso.

La estructura de los agentes alquilantes, para lograr la selectividad deseada, debe cumplir:

- a) Reactividad adecuada, de forma que el fármaco sea capaz de alcanzar el objetivo en una concentración suficiente.
- b) Capacidad de lograr un transporte selectivo de la fracción alquilante hacia las células malignas.
- c) Susceptibilidad de que pudiera ser activada específicamente dentro de las células malignas para realizar una alquilación efectiva allí.

La estructura molecular y a menudo la estereoquímica, son elementos importantes, para la permeabilidad celular a los agentes alquilantes y para su transporte a través del citoplasma. Así, las moléculas a las que se unen las fracciones alquilantes, pueden considerarse como transportadores.

Dos tipos importantes de transportadores son:

a) Estructuras xenobióticas. Estos transportadores son importantes cuando intentamos diseñar compuestos que muestren algunas propiedades físico-químicas preseleccionadas, por ejemplo, diseñar agentes alquilantes latentes capaces de cruzar la barrera hematoencefálica.

b) Estructuras fisiológicas. Tales transportadores son creados para atravesar las membranas celulares mediante procesos de transporte específico, acumulándose así en las células tumorales.

Para evitar la alteración de las propiedades transportadoras de tales moléculas, el agente alquilante debe cumplir:

a) Baja reactividad de la fracción alquilante.

b) El log P de la fracción alquilante debe ser lo más cercano posible a 0.00. Donde log P es la lipofilia expresada en términos del coeficiente de reparto entre n-octanol y agua¹⁴.

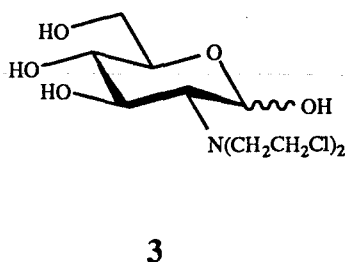
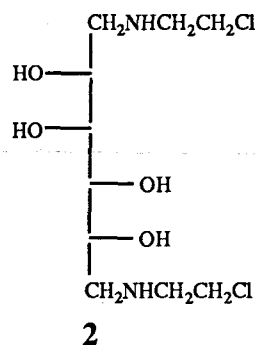
c) La unión entre la fracción alquilante y el transportador no debe afectar u ocultar las características estructurales del transportador, involucradas en su capacidad para transportar.

Muchos tipos de moléculas fisiológicas, como hidratos de carbono, lípidos, aminoácidos, péptidos y proteínas, esteroides, bases púricas y pirimidínicas han sido usadas con este fin.

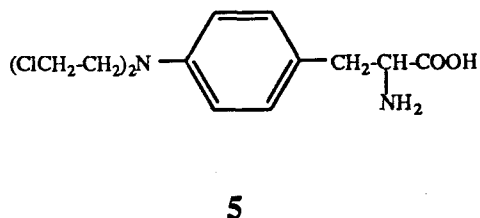
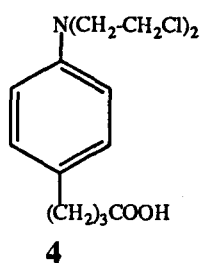
Una vez vistas las características que deben reunir para un comportamiento eficaz, tanto los agentes alquilantes como los transportadores, nos centraremos en algunas mostazas nitrogenadas usadas en clínica.

Entre los primeros compuestos sintéticos utilizados en la quimioterapia del cáncer¹⁵ se encuentra la *N,N*-bis(2-cloroetil)-*N*-metilamina (**1**, R=Me), fármaco conocido como Mecloroetamina y, usado ampliamente en clínica, contra la enfermedad de Hodgkin y la leucemia linfoide con gran efectividad. También existen, aunque en

número muy reducido, algunos 2-cloroetilamino y bis(2-cloroetil)amino derivados de hidratos de carbono con actividad clínica; entre éstos se encuentra el 1,6-bis(2-cloroetilamino)-1,6-didesoxi-D-manitol (Degranol)¹⁶ (2), que es efectivo por su capacidad para suprimir el crecimiento metastático y la 2-[bis(2-cloroetil)amino]-2-desoxi-D-glucosa (3), que tiene una actividad similar a la Mecloroetamina. Sorprendentemente, las mostazas derivadas de la 6-desoxi-D-glucosa con una sola rama $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Cl}$ muestran una sustancial actividad contra la leucemia L1210 en ratones mientras que, las análogas con dos ramas $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Cl}$, fueron apenas activas. Tal distinción no fue vista cuando el transportador fue D-Ribosa¹⁷.

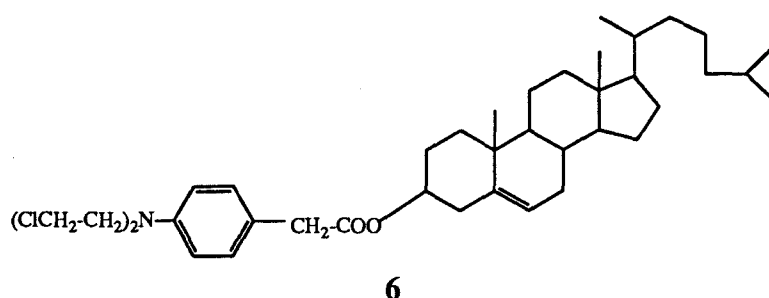


Por otra parte, las mostazas nitrogenadas aromáticas constituyen el grupo más ampliamente representado, debido al gran número de sistemas aromáticos y heteroaromáticos usados para este propósito. Dentro de este grupo caben destacar el Clorambucil (4), que fue sintetizado por Everett y col.¹⁸ y es ampliamente usado en clínica y la L-PAM, 4-[N,N-bis(2-cloroetil)amino]fenil-L-alanina (5), publicada su síntesis en 1953 por Bergel y Stock¹⁹, de gran utilidad en clínica para el carcinoma de ovarios, cáncer testicular, osteosarcoma y mieloma múltiple.



La actividad significativa de estos compuestos estimuló otras investigaciones en esta área. Así, se llevó a cabo la síntesis de cientos de mostazas nitrogenadas derivadas de aminoácidos y péptidos; algunos derivados interesantes surgieron de esta aproximación²⁰⁻²³.

Un ejemplo de mostaza nitrogenada aromática, acoplada a moléculas transportadora, puede ser el Fenesterine²⁴ (6), obtenido por tratamiento del Colesterol con el cloruro del ácido 4-[*N,N*-bis-(2-cloroetil)amino]fenilacético²⁵, propuesto para el tratamiento del cáncer de prostata, pero con resultados clínicos limitados.



Como hemos podido comprobar, existen pocos antecedentes en los cuales, se usen hidratos de carbono como transportadores de la fracción activa y los que existen, son o bien hidratos de carbono en forma abierta, los más abundantes, o algún caso en que el azúcar está ciclado en forma furanósica, con la posición anomérica libre; no hemos encontrado ningún azúcar en forma de glicósido y por tanto, ningún glicósido del alcohol bencílico o dodecílico que, le conferiría un gran carácter lipófilo al hidrato de carbono como agente transportador, favoreciendo su permeabilidad a través de las

membranas celulares y transportando la mostaza nitrogenada, hasta las mismas células tumorales.

No hemos encontrado, tampoco, antecedentes en los que se utilice como transportador hidratos de carbono derivados de la N-acetilglucosamina.

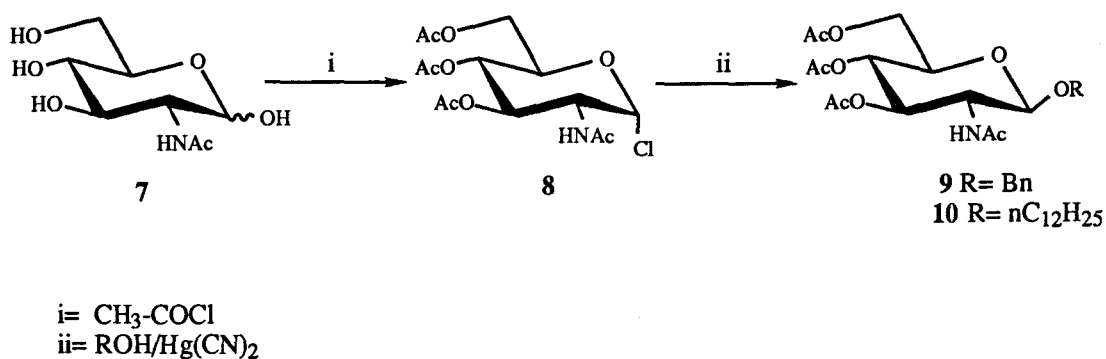
Por todo esto, en la presente Tesis de Licenciatura, se ha llevado a cabo la síntesis de productos con una actividad potencial como agentes alquilantes, que reúnen todas o gran parte de las características expuestas hasta el momento, usando como fracción alquilante la *N,N*-bis(2-cloroetil)amina, acoplada a través de un espaciador a un hidrato de carbono, en el que hemos modificado su lipofilia al formar dodecil y bencil glicósidos, tratando conseguir un mejor paso a través de la membrana citoplasmática de las células malignas para que, pueda ejercer allí su acción alquilante, impidiendo así, la replicación del ADN.

3.- SINTESIS Y CARACTERIZACION

3.1.- SINTESIS DE LAS NUEVAS SUSTANCIAS

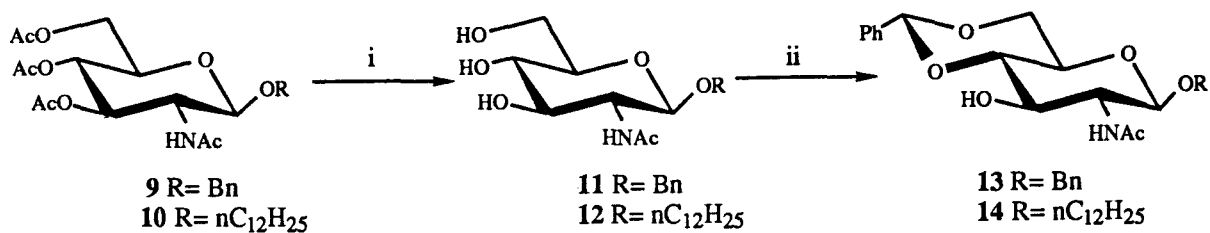
3.1.1.- Preparación de productos de partida

La síntesis de las nuevas sustancias descritas en esta Tesis de Licenciatura se ha realizado utilizando *N*-acetil-D-glucosamina (7) como monosacárido precursor. En el primer paso de la síntesis se obtiene el cloruro de 2-acetamido-3,4,6-tri-*O*-acetil-2-desoxi- α -D-glucopiranosilo (8), por reacción de 7 con cloruro de acetilo²⁶. La posterior reacción de 8 con alcohol bencílico en presencia de cianuro mercuríco²⁷ conduce al bencil 2-acetamido-3,4,6-tri-*O*-acetil-2-desoxi- β -D-glucopiranosido (9). Igualmente, por el método de Koenigs-Knorr, se ha obtenido el dodecil 2-acetamido-3,4,6-tri-*O*-acetil-2-desoxi- β -D-glucopiranosido²⁸ (10), por reacción de 8 con alcohol dodecílico (Esquema 4).



Esquema 4

La reacción de 9 con metóxido de sodio en metanol conduce al derivado desacetilado 11. Análogamente, el mismo tratamiento para 10, conduce al correspondiente derivado desacetilado 12. La posterior acetalación de estos derivados con benzaldehído, en presencia de cloruro de cinc, rinde los correspondientes 4,6-*O*-bencilidén derivados (13 y 14) (Esquema 5).



i= MeONa/MeOH
 ii= PhCHO/ZnCl₂

Esquema 5

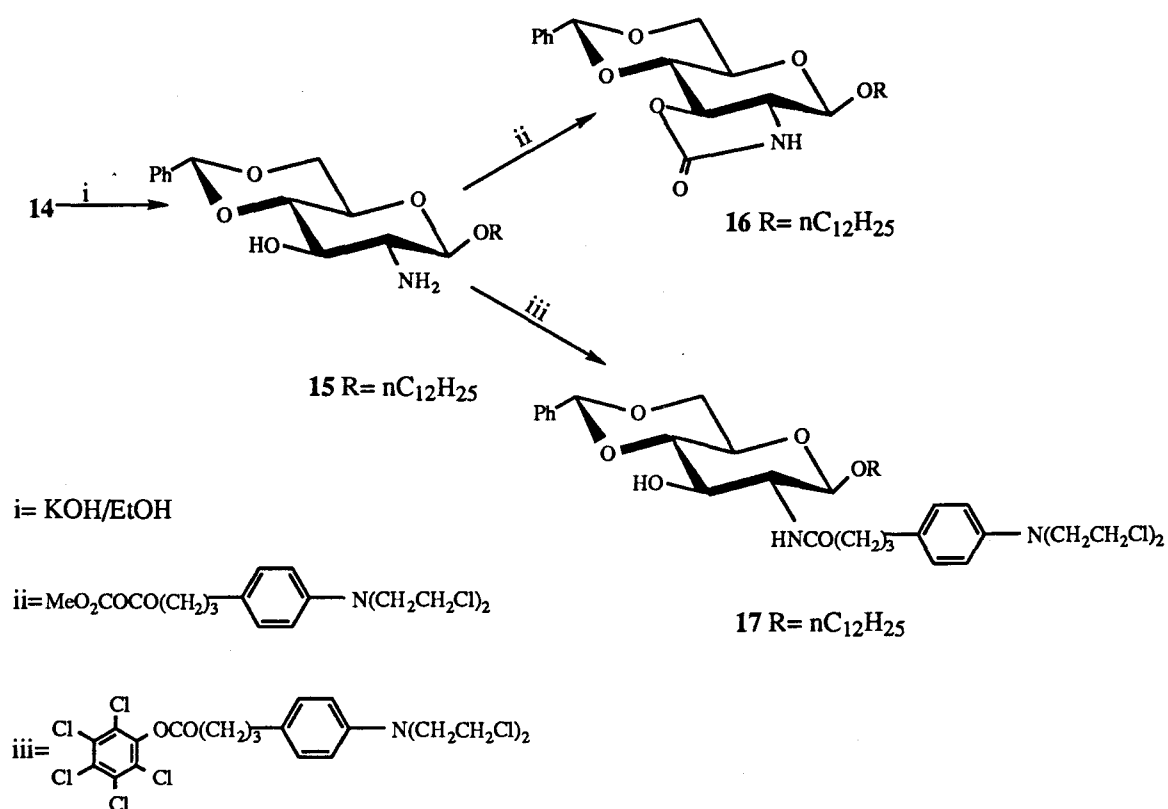
Los compuestos **13** y **14** son las sustancias de partida para la preparación de las mostazas nitrogenadas derivadas de azúcares, que nos proponemos como objetivo en este trabajo.

3.1.2.- Preparación de las nuevas sustancias

Hemos utilizado dos estrategias distintas para llegar a los objetivos marcados. La primera de ellas consiste en acoplar el clorambucil (**4**) al azúcar, mediante la formación de una amida entre el grupo ácido de **4** y el grupo amino de la posición dos, presente en el azúcar convenientemente protegido. La segunda estrategia que hemos utilizado en la preparación de mostazas nitrogenadas con restos de azúcar consiste en la unión del resto activo a la posición tres de la glucosamina convenientemente funcionalizada. Esta forma de acoplar las dos partes de la molécula final, requiere la utilización de un tercer resto que, por una parte actúa de espaciador entre el azúcar y el resto alquilante y por otra, posee la funcionalidad adecuada para unir las dos partes importantes de la molécula completa. El espaciador escogido, es un resto de ácido acético que, se une por el grupo ácido al nitrógeno de la mostaza nitrogenada, mediante la formación de una amida y a través del carbono dos, al oxígeno de la posición tres del azúcar, mediante la formación de un éter.

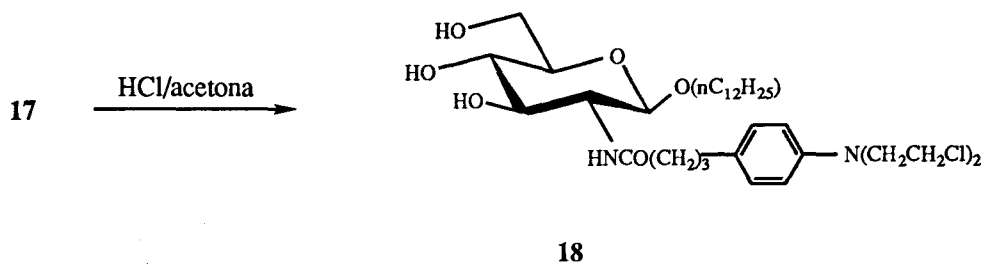
Así, siguiendo la primera de las estrategias descritas anteriormente, hemos sintetizado la sustancia **18**, que es una mostaza nitrogenada aromática.

La hidrólisis del grupo acetamido presente en **14**, con hidróxido potásico en etanol hirviente²⁹, conduce al dodecil 2-amino-4,6-*O*-benciliden-2-desoxi- β -D-glucopiranosido (**15**). El tratamiento de **15** con el anhídrido mixto de clorambucil con cloroformiato de metilo, según la metodología descrita por G. Wess³⁰, conduce a la sustancia deseada como producto minoritario de la reacción. El producto mayoritario se purificó e identificó como el uretano **16**. Para mejorar el rendimiento del producto deseado se activó el clorambucil por el procedimiento del tricloroacetato de pentaclorofenol³¹. El tratamiento del éster activado del clorambucil con la amina **15** condujo al dodecil 4,6-*O*-bencilidén-2-clorambucilamido-2-desoxi- β -D-glucopiranosido (**17**), como producto mayoritario de la reacción (Esquema 6).



Esquema 6

La desbenzalación de **17** se ha llevado a cabo con HCl/acetona, obteniéndose el compuesto desbenzalado **18** (Esquema 7), que constituye una de las sustancias que nos habíamos marcado como objetivo en esta Tesis de Licenciatura.

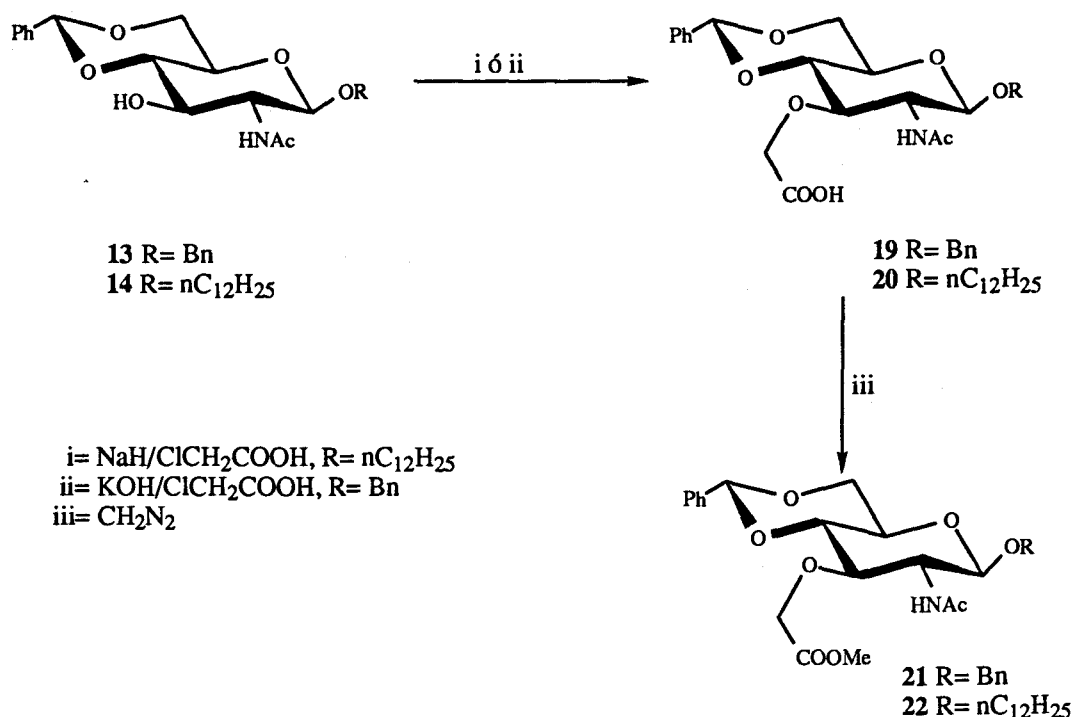


Esquema 7

La molécula de la sustancia **18** contiene una fracción de mostaza nitrogenada, cuya actividad como agente alquilante ha sido ampliamente demostrada¹⁸. Por otra parte, la presencia del resto de azúcar convenientemente modificado en su lipofilia por la cadena dodecífica, puede ser aprovechado para conseguir un transporte fisiológico selectivo del fármaco hacia las células cancerosas, las cuales, requieren metabolitos primarios (azúcares entre ellos) para su rápido crecimiento. La capacidad de la sustancia **18** como agente alquilante será analizada mediante las pruebas biológicas pertinentes.

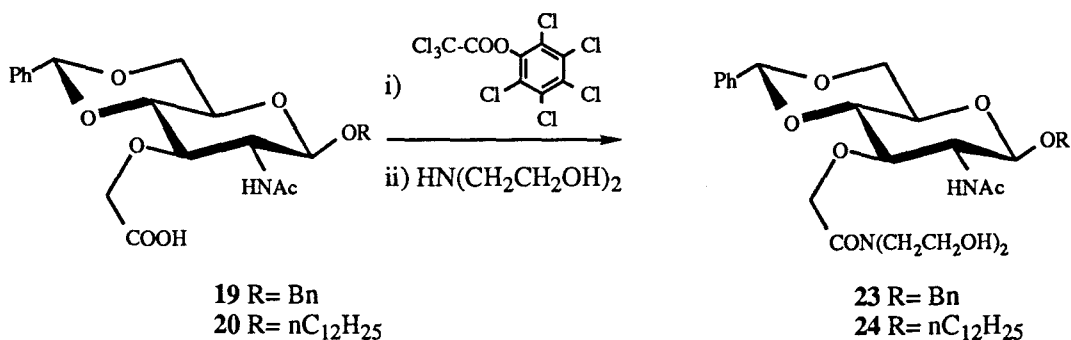
Como ejemplo de la segunda estrategia, hemos introducido la *N,N*-bis(2-cloroetil)amina, mostaza nitrogenada alifática, en un resto de aminoazúcar.

La agitación de una suspensión de **13**, con potasa machacada y ácido cloroacético, en DMSO, conduce al bencil 2-acetamido-4,6-*O*-bencilidén-3-*O*-carboximetil-2-desoxi- β -D-glucopiranosido (**19**); mientras que, el tratamiento de **14** con hidruro de sodio en THF/DMF y posterior adición de ácido cloroacético rinde el dodecil 2-acetamido-4,6-*O*-bencilidén-3-*O*-carboximetil-2-desoxi- β -D-glucopiranosido (**20**). Estos ácidos fueron caracterizados en forma de ésteres metílicos (**21** y **22**), obtenidos por su reacción con diazometano (Esquema 8).



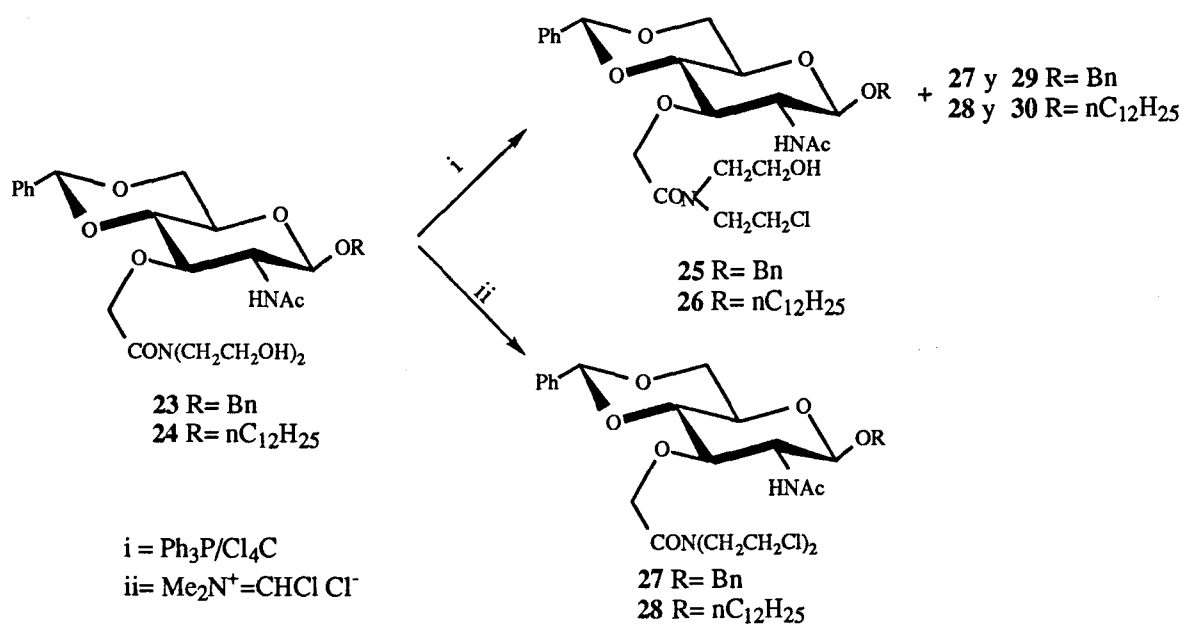
Esquema 8

La activación de **19** con tricloroacetato de pentaclorofenol y su posterior reacción con dietanolamina, lleva a la formación del correspondiente bencil 2-acetamido-4,6-*O*-bencilidén-2-desoxi-3-*O*-[*N,N*-bis(2-hidroxietyl)aminocarbonilmetil]-β-D-glucopiranosido (**23**). Análogamente, el mismo tratamiento para **20**, conduce al correspondiente dodecil 2-acetamido-4,6-*O*-bencilidén-2-desoxi-3-*O*-[*N,N*-bis(2-hidroxietyl)aminocarbonilmetil]-β-D-glucopiranosido (**24**) (Esquema 9).

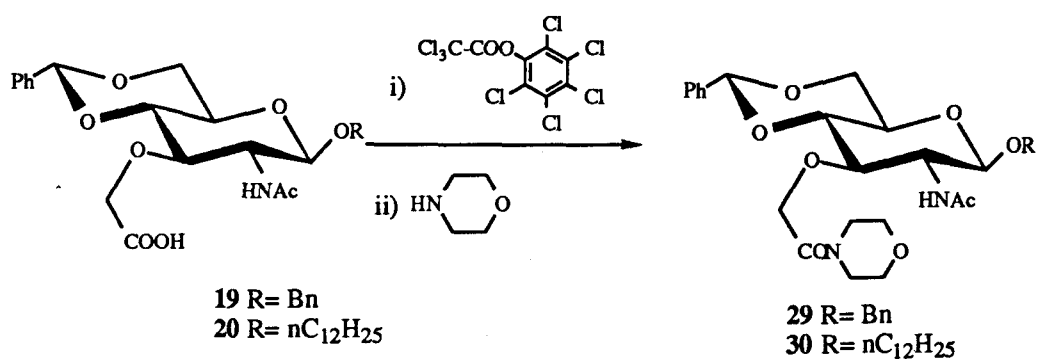


Esquema 9

Para llevar a cabo la interconversión del grupo funcional OH por Cl, se empleó en primer lugar como reactivo la mezcla de $\text{Ph}_3\text{P}/\text{Cl}_4\text{C}$ en caliente³². El análisis mediante espectrometría de masas (FAB) de los productos de la reacción, una vez aislados, nos llevó a la conclusión de que el producto mayoritario de la reacción, era aquel en el que se había sustituido un solo hidroxilo (**25** ó **26**) y que el producto buscado (**27** ó **28**) resultaba ser minoritario (Esquema 10a). Junto a éstos, se obtenía otro producto secundario, cuya fórmula se correspondía con la deshidratación de la sustancia de partida. Por ello, se llevó a cabo la síntesis de los compuestos **29** y **30**, por reacción de los ácidos **19** y **20** con morfolina (Esquema 10b), al objeto de confirmar que eran éstos, los productos minoritarios de la reacción de formación de **27** y **28**. Para mejorar el rendimiento en las sustancias dicloradas se empleó un nuevo reactivo, el cloruro de clorometilendimetilamonio^{33, 34}, obteniéndose los productos deseados como mayoritarios de la reacción y con buen rendimiento (Esquema 10a).



Esquema 10a



Esquema 10b

Una vez llegado a este punto, sólo quedaba la desbenzalación de los compuestos **27** y **28** para cumplir el objetivo de la síntesis. Actualmente estamos estudiando la manera más adecuada de eliminar los grupos protectores de las posiciones 4,6 y de la posición uno en el caso del bencil glicósido. Hemos ensayado la desprotección del bencilideno del producto **28**, mediante hidrólisis con HCl/acetona, aunque los resultados obtenidos no son de momento muy concluyentes.

Dentro de la Tesis Doctoral, en la que se incluye este trabajo, se concluirá la síntesis de los productos desprotegidos, así como otras mostazas nitrogenadas y ciclofosfamidas derivadas de azúcares.

3.2.- DETERMINACION ESTRUCTURAL DE LAS NUEVAS SUSTANCIAS

La determinación estructural de las sustancias descritas en la presente Memoria, se ha realizado en base a los datos obtenidos por la aplicación de técnicas espectroscópicas tales como, la espectroscopía de resonancia magnética nuclear (^1H y ^{13}C -RMN), la espectrometría de masas de baja resolución, realizada con diversas técnicas de ionización como son, la ionización por impacto electrónico (EI), la ionización química (CI) y la ionización mediante bombardeo con átomos rápidos (FAB), la espectrometría de masas de alta resolución (EI-HR) y la espectroscopía de infrarrojo (IR).

3.2.1.- Determinación estructural por RMN.

Se han estudiado los espectros de RMN de las diversas sustancias descritas en esta Tesis de Licenciatura, registrados a 200 MHz para ^1H y a 50 MHz para ^{13}C . Como disolvente, se ha utilizado DMSO- d_6 en todos los casos, salvo en los que se indica el uso de otro.

Por otra parte, con el fin de facilitar la asignación de los protones de algunos compuestos, se han llevado a cabo experimentos de doble resonancia.

Estudio de los espectros de ^1H -RMN

Los datos de ^1H -RMN de las sustancias descritas en esta Tesis de Licenciatura se encuentran recogidos en las Tablas 1 y 2.

En el espectro de ^1H -RMN del dodecil 4,6-*O*-bencilidén-2-clorambucilamido-2-desoxi- β -D-glucopiranosido (17) en Cl_3CD registrado a 200 MHz y a 25 $^\circ$ (Figura 1H), se observa a campo alto las señales correspondientes al grupo dodecilo en posición anomérica. Así a 0,91 ppm, aparece un triplete con integral para tres protones, correspondiente al metilo terminal de la cadena, a 1,26 ppm un singulete ancho correspondiente a los protones de los nueve metilenos siguientes al metilo terminal, mientras que a 1,62 ppm aparece una señal mal resuelta, correspondiente a los protones del metileno en β al oxígeno anomérico.

Centrado a 1,92 ppm, aparece un multiplete con integral para dos protones y con un acoplamiento vecinal de 7,3 Hz que asignamos al metileno intermedio, metileno β , de los tres metilenos de la cadena alifática de la fracción alquilante.

A 2,22 ppm y a 2,55 ppm, aparecen dos tripletes con integral para dos protones cada uno y un acoplamiento vecinal de 7,3 Hz que se asignan, al metileno en α y al metileno en γ a la amida, respectivamente.

Entre 3,33 y 3,90 ppm, aparece una señal compleja para catorce protones, de los cuales algunos se pueden asignar. Así, centrado a 3,38 ppm, aparece un multiplete que, mediante experimentos de doble resonancia, se puede asignar a H-2, con constante de acoplamiento $J_{\text{NH},2} = 5,7$ Hz, $J_{1,2} = 8,4$ Hz y $J_{2,3} = 9,5$ Hz. Centrado a 3,62 ppm, aparece un multiplete correspondiente a los metilenos unidos a cloro y a nitrógeno de la fracción alquilante. A 3,8 ppm se distingue, un triplete con constante de acoplamiento de 10,2 Hz que se asigna a H-6_{ax} y también centrado a 3,8 ppm se puede observar, un doble triplete con acoplamiento vecinal de 6,5 Hz y acoplamiento geminal de 9,5 Hz asignado a uno de los protones diasterotópicos en α al oxígeno anomérico. En esta señal compleja deben encontrarse también H-4, H-5 y el otro protón diasterotópico.

A 4,13 ppm aparece un triplete con integral para un protón, asignado a H-3 y con una $J_{2,3}$ y $J_{3,4}$ de 9,1 Hz.

A 4,32 ppm se observa un doble doblete con integral para un protón y que se asigna a H-6_{eq}, con las dos constantes típicas de este protón $J_{5,6\text{eq}} = 4,5$ Hz y $J_{6\text{ax},6\text{eq}} = 10,4$ Hz.

A 4,70 ppm se observa un doblete con integral para un protón que asignamos a H-1, con un acoplamiento $J_{1,2} = 8,3$ Hz que corresponde a una constante que indica la disposición anti de estos dos protones lo que confirma la anomería β .

A 5,5 ppm aparece un singulete que corresponde al protón de tipo acetálico del grupo bencilideno presente en las posiciones 4,6 del azúcar.

A 5,64 ppm aparece un doblete ancho que se asigna al protón del NH de la acetamida con una $J_{\text{NH},2} = 5,6$ Hz.

A campo bajo, aparecen las dos señales correspondientes a los dos grupos de protones aromáticos presentes en la molécula, una para 6,87 ppm correspondiente al anillo aromático *p*-disustituido y otra a 7,43 ppm, correspondiente al anillo de bencilideno.

En el espectro de ^1H -RMN del dodecil 2-clorambucilamido-2-desoxi- β -D-glucopiranosido (18) registrado en DMSO a 200 MHz y 60° (Figura 2H), se observa a campo alto las señales correspondientes a los protones del grupo dodecilo en posición anomérica. Su asignación es la misma que en el producto anterior.

Centrado a 1,75 ppm aparece un multiplete con integral para dos protones y con una constante de acoplamiento vecinal de 7,2 Hz que asignamos, al metileno intermedio, metileno β , de los tres metilenos de la cadena alifática de la fracción alquilante.

A 2,10 ppm y a 2,45 ppm aparecen dos tripletes con integral para dos protones cada uno y con una constante de acoplamiento vecinal de 7,2 Hz que se asigna, al metileno en α y al metileno en γ a la amida respectivamente.

Centrado a 3,60 ppm aparece un multiplete correspondiente a los metilenos unidos a cloro y a nitrógeno de la molécula.

A 4,30 ppm se observa un doblete con integral para un protón que asignamos a H-1, con un acoplamiento $J_{1,2} = 8,1$ Hz.

Lo que cabe destacar de este espectro, respecto del anterior, es que han desaparecido las señales correspondientes al anillo de bencilideno mientras que, las correspondientes al anillo aromático *p*-disustituido siguen observándose centradas a 6,85 ppm.

En el espectro de ^1H -RMN del bencil 2-acetamido-4,6-*O*-bencilidén-3-*O*-carboximetil-2-desoxi- β -D-glucopiranosido (19) registrado en DMSO a 200 MHz y 100° (Figura 3H), se observa a 1,85 ppm un singulete con integral para tres protones, que se asigna a los protones del metilo del grupo acetamido presente en la molécula.

A 4,15 ppm aparece un singulete con integral para dos protones, que se asignan a los dos protones del metileno en α al oxígeno de la posición tres del azúcar, que colapsan a 100°.

A 4,27 ppm se observa un doble doblete con integral para un protón y unas constantes de acoplamiento de 4,7 y 10,1 Hz, características del protón H-6_{eq}.

A 4,66 ppm aparece un conjunto de cuatro señales con integral para dos protones, que corresponde al sistema AB formado por los protones del metileno del grupo bencilo presente en la posición anomérica, con una constante de acoplamiento geminal de 12,1 Hz.

A 4,73 ppm se observa un doblete con integral para un protón y con una constante de acoplamiento de 7,5 Hz, que asignamos a H-1.

A 5,65 ppm aparece un singulete con integral para un protón, que se asigna al protón de tipo acetálico del grupo bencilideno presente en posiciones 4,6 del azúcar.

En el espectro de ¹H-RMN del dodecil 2-acetamido-4,6-*O*-bencilidén-3-*O*-carboximetil-2-desoxi- β -D-glucopiranosido (20) se ha realizado en DMSO-d₆ a 100° (Figura 4H). Algunos señales son muy difíciles de asignar, ya que en tan sólo 0,4 ppm aparecen las señales correspondientes a 7 protones (H-2, H-3, H-4, H-5, H-6_{ax} y los dos protones del metileno en α al oxígeno anomérico); por ello se llevó a cabo la formación de su éster metílico, con el fin de facilitar la caracterización de dicho producto.

Así, a campo alto, observamos las señales características del grupo dodecilo en posición anomérica, asignadas en los productos anteriores.

A 1,8 ppm observamos un singulete con integral para tres protones que se asigna, al metilo del grupo acetamido en posición dos del azúcar.

A 4,07 ppm aparece otro singulete con integral para dos protones que se asigna, a los protones pertenecientes al metileno de la cadena lateral unido al oxígeno de la posición tres del azúcar.

A 4,21 ppm se encuentra un conjunto de cuatro señales con integral para un protón y que presenta los acoplamientos característicos para H-6_{eq} ($J_{5,6eq} = 5$ Hz y $J_{6ax,6eq} = 10$ Hz).

A 4,52 ppm aparece un doblete con integral para un protón y con un acoplamiento de 8 Hz que se asigna a H-1. Esta constante indica una disposición anti entre los protones H-1 y H-2 lo que confirma la anomería β .

A 5,61 ppm observamos un singulete con integral para un protón que se asigna, al protón de tipo acetal del grupo bencilideno que se encuentra en las posiciones 4,6 del azúcar.

En el espectro de ^1H -RMN del bencil 2-acetamido-4,6-*O*-bencilidén-2-desoxi-3-*O*-metoxicarbonilmetil- β -D-glucopiranosido (**21**) registrado en DMSO a 200 MHz y 100° (Figura 5H), se observa a 1,84 ppm un singulete con integral para tres protones, que se asigna a los protones del metilo del grupo acetamido presente en la molécula.

A 4,24 ppm aparece un singulete con integral para dos protones, que se asignan a los dos protones del metileno en α al oxígeno de la posición tres del azúcar, que colapsan a 100°.

A 4,25 ppm se observa un doblete con integral para un protón y unas constantes de acoplamiento de 5 y 10 Hz, características del protón H-6_{eq}.

A 4,67 ppm aparece un conjunto de cuatro señales con integral para dos protones, que corresponde al sistema AB formado por los protones del metileno del grupo bencilo presente en la posición anomérica, con una constante de acoplamiento geminal de 12,3 Hz.

A 4,72 ppm se observa un doblete con integral para un protón y con una constante de acoplamiento de 8 Hz, que asignamos a H-1.

A 5,62 ppm aparece un singulete con integral para un protón, que se asigna al protón de tipo acetálico del grupo bencilideno presente en posiciones 4,6 del azúcar.

En el espectro de ^1H -RMN del dodecil 2-acetamido-4,6-*O*-bencilidén-2-desoxi-3-*O*-metoxicarbonilmetil- β -D-glucopiranosido (**22**) registrado en Cl_3CD a 200 MHz y a temperatura ambiente (Figura 6H), se observa a campo alto las señales correspondientes a los protones del grupo dodecilo en posición anomérica. Su asignación es la misma que en espectros anteriores.

A 2,05 ppm aparece un singulete con integral para tres protones que corresponde al metilo del grupo acetamido presente en la posición dos del azúcar.

Entre 3,38 y 3,52 ppm aparece una señal compleja que corresponde a H-2 y H-5 del azúcar y a uno de los protones del metileno en posición α al oxígeno anomérico.

A 3,61 ppm aparece un singulete con integral para tres protones que corresponde al grupo metilo del éster.

Entre 3,64 y 3,85 ppm aparece un conjunto de señales con integral para tres protones que se pueden asignar de la siguiente manera; a 3,64 ppm un triplete con una constante de acoplamiento vecinal de 9,1 Hz que se puede asignar a H-4, a 3,75 ppm se aprecia un triplete con un valor de constante de acoplamiento de 10,3 Hz que se asigna a H-6_{ax} debido a que, se trata de un valor alto de constante de acoplamiento por su acoplamiento geminal con H-6_{eq} y su acoplamiento anti con H-5, mientras que a 3,80 ppm se observa un doble triplete que se asigna al otro protón del metileno en α al oxígeno anomérico, ya que, los valores de las constantes de acoplamiento están de acuerdo con los esperados, pues se observa un valor de 9,4 Hz que corresponde al acoplamiento geminal con el otro protón del metileno y otro valor de acoplamiento de 7

Hz que se debe al acoplamiento con los dos protones del metileno en β al oxígeno anomérico.

A 4,08 ppm se observa un doblete de doblete con integral para un protón y con valores de constantes de acoplamiento de 9 Hz y de 10 Hz que se asigna a H-3.

A 4,31 ppm aparece otro doblete de doblete para un protón que se asigna a H-6_{eq} ya que tiene los valores de acoplamientos característicos de éste ($J_{5,6eq} = 4,8$ Hz y $J_{6ax,6eq} = 10,4$ Hz).

Centrado a 4,35 ppm aparece un conjunto de cuatro señales con integral para dos protones, que corresponde al sistema AB formado por los protones en α al oxígeno de la posición tres del azúcar y con una constante de acoplamiento geminal de 13 Hz.

A 4,79 ppm aparece un doblete con integral para un protón y con un valor de acoplamiento vecinal de 8,3 Hz que se asigna a H-1, confirmándose la disposición anti entre H-1 y H-2.

A 5,5 ppm aparece un singulete con integral para un protón que se asigna al protón de tipo acetálico del grupo bencilideno presente en las posiciones 4,6 del azúcar.

A 6,27 ppm aparece un doblete con integral para un protón y con un valor de constante de acoplamiento de 7,3 Hz, que corresponde al protón unido al nitrógeno del grupo acetamido.

En el espectro de ^1H -RMN del bencil 2-acetamido-4,6-*O*-bencilidén-2-desoxi-3-*O*-[*N,N*-bis(2-hidroxietil)aminocarbonilmetil]- β -D-glucopiranosido (**23**) registrado en DMSO a 200 MHz y 100° (Figura 7H), aparece a 1,85 ppm un singulete con integral para tres protones, que se asigna a los tres protones del metilo del grupo acetamido presente en la molécula.

A 3,47 ppm se observa un triplete ancho, que se asigna a los metilenos unidos a nitrógeno mientras que, centrado a 3,80 ppm se observa otro triplete ancho que corresponde a los metilenos unidos a oxígeno.

Centrado a 4,25 ppm aparece un doble doblete con integral para un protón, que asignamos a H-6_{eq}, ya que posee la constante de acoplamiento características de este protón ($J_{5,6eq} = 5$ Hz y $J_{6ax,6eq} = 10,2$ Hz).

A 4,35 ppm aparece un conjunto de cuatro señales con integral para dos protones, que corresponde al sistema AB formado por los protones del metileno en α al oxígeno de la posición tres del azúcar y con una constante de acoplamiento geminal de 13 Hz.

Centrado a 4,68 ppm aparece otro conjunto de cuatro señales con una integral correspondiente a dos protones, que asignamos al sistema AB formado por los protones del metileno del grupo bencilo presente en posición anomérica. Este sistema presenta una constante de acoplamiento geminal de 12,4 Hz.

A 4,70 ppm aparece un doblete con integral para un protón y una constante de acoplamiento de 7,7 Hz, que se asigna a H-1.

A 5,65 ppm aparece un singulete con integral para un protón, que asignamos al protón de tipo acetálico del grupo bencilideno presente en las posiciones 4,6 del azúcar.

A 7,60 ppm aparece un doblete ancho con integral para un protón, que se asigna al protón unido al nitrógeno del grupo acetamido.

En el espectro de ^1H -RMN del dodecil 2-acetamido-4,6-*O*-bencilidén-2-desoxi-3-*O*-[*N,N*-bis(2-hidroxietil)aminocarbonilmetil]- β -D-glucopiranosido (**24**) se ha realizado en DMSO- d_6 a 200 MHz y a 100° de temperatura (Figura 8H). A campo alto se observan las señales correspondientes al grupo dodecilo en posición anomérica y cuya asignación, es idéntica a los espectros anteriores.

A 1,85 ppm aparece un singulete con integral para tres protones que se asigna, al metilo del grupo acetamido en posición dos del azúcar.

Entre 3,3 y 3,5 ppm aparecen dos señales complejas, que corresponden a los metilenos unido a N y a OH, respectivamente, de la parte de dietanolamida y a los dos protones del metileno en posición α al oxígeno anomérico.

Entre 3,53 y 3,83 ppm aparece otro grupo de señales con integral para cinco protones, que se pueden asignar haciendo un estudio cuidadoso del listado de frecuencias, determinándose que estas señales corresponden a los protones H-2, H-3, H-4, H-5 y H-6_{ax} del azúcar; así a 3,58 ppm aparece un triplete ensanchado con acoplamiento de 9 Hz que se asigna a H-2, a 3,66 ppm aparece un doble doblete con valores de constantes de acoplamiento de 10 y 6 Hz que se asigna a H-5, ya que sus acoplamientos concuerdan con los valores de $J_{5,6ax}$ y $J_{5,6eq}$ respectivamente; a 3,68 ppm aparece un triplete con una constante de acoplamiento de 9 Hz, que es asignado a H-4 y a 3,75 ppm, aparece un triplete con valores de acoplamiento de 10,1 Hz que se asigna a H-6_{ax}.

Entre 4,18 y 4,43 ppm se encuentra otro grupo de señales con integral para cinco protones, que corresponde al metileno unido al oxígeno en posición tres del azúcar, a los dos protones hidroxílicos de la molécula y al H-6_{eq}. Así, centrado a 4,22 ppm se observa un conjunto de cuatro señales con los acoplamientos característicos de H-6_{eq} ($J_{5,6eq} = 5$ Hz y $J_{6ax,6eq} = 10,2$ Hz); a 4,35 ppm aparecen las señales correspondientes al sistema AB formado por los protones del metileno en α al oxígeno de la posición tres del azúcar y con un acoplamiento geminal de 13 Hz.

A 4,56 ppm aparece un doblete con integral para un protón y con un valor de acoplamiento de 8 Hz, que se asigna a H-1.

A 5,70 ppm aparece un singulete con integral para un protón que asignamos al protón de tipo acetálico presente en el grupo bencilideno en las posiciones 4,6 del azúcar.

Entre 7,25 y 7,45 ppm aparecen las señales correspondientes al anillo aromático del grupo bencilideno anterior y a 7,55 ppm, aparece un pequeño doblete que asignamos al protón unido al nitrógeno del grupo acetamido en posición dos del azúcar.

En el espectro de ^1H -RMN del bencil 2-acetamido-4,6-*O*-bencilidén-2-desoxi-3-*O*-[*N,N*-bis(2-cloroetil)aminocarbonilmetil]- β -D-glucopiranosido (27) registrado en DMSO- d_6 a 200MHz y 80° (Figura 9H), se observa a 1,84 ppm un singulete con integral para tres protones que se asigna al metilo del grupo acetamido presente en la molécula.

Centrados a 3,20 y 3,30 ppm se observan dos tripletes con un acoplamiento de 6,5 Hz que asignamos a los protones de los metilenos unidos a nitrógeno presente en la molécula.

A 3,60 ppm se observa un multiplete que asignamos a los protones de los metilenos unido a cloro de la molécula.

Centrado a 4,65 ppm se observa un conjunto de cuatro señales que corresponde al sistema AB formado por los protones del metileno del grupo bencilo de la posición anomérica que presenta un acoplamiento geminal de 12,3 Hz.

A 4,71 ppm se observa un doblete con integral para un protón que asignamos al protón anomérico del azúcar (H-1), que presenta un acoplamiento vecinal de 7,6 Hz, lo que está conforme con la anomería β de la molécula.

A 5,65 ppm aparece un singulete con integral para un protón que asignamos al protón de tipo acetálico del grupo bencilideno presente en las posiciones 4, 6 del azúcar.

En el espectro de ^1H -RMN del dodecil 2-acetamido-4,6-*O*-bencilidén-2-desoxi-3-*O*-[*N,N*-bis(2-cloroetil)aminocarbonilmetil]- β -D-glucopiranosido (28) registrado en DMSO- d_6 a 200MHz y 100° (Figura 10H), se observa a campo alto las señales correspondientes a los protones del grupo dodecilo presente en posición anomérica, su asignación es la misma que en espectros anteriores.

A 1,80 ppm aparece un singulete con integral para tres protones, que se asigna a los tres protones del grupo acetamido presente en la molécula.

Centrado a 3,20 y 3,30 ppm se observan dos tripletes con constante de acoplamiento de 6 Hz, que se asignan a los protones de los metilenos unidos a nitrógeno.

A 3,68 ppm aparece un multiplete, que por comparación con otros espectros, se asigna tentativamente a los protones de los metilenos unidos a cloro.

A 4,31 ppm se observa un singulete con integral para dos protones, que corresponde a los dos protones del metileno en α al oxígeno de la posición tres del azúcar.

Centrado a 4,32 ppm, aparece un doble doblete con integral para un protón, que asignamos a H-6_{eq} ya que posee las constantes de acoplamiento características de este protón ($J_{5,6eq} = 5,1$ Hz y $J_{6ax,6eq} = 10,5$ Hz).

Centrado a 4,60 ppm aparece un doblete con integral para un protón y constante de acoplamiento de 8 Hz que se asigna a H-1.

A 5,61 ppm aparece un singulete con integral para un protón, que se asigna al protón de tipo acetálico del grupo bencilideno presente en las posiciones 4,6 del azúcar.

En el espectro de ^1H -RMN del bencil 2-acetamido-4,6-*O*-bencilidén-2-desoxi-3-*O*-(morfolin-1-ilcarbonilmetil)- β -D-glucopiranosido (**29**) registrado en DMSO a 200 MHz y 100° (Figura 11H), aparece a 1,85 ppm un singulete con integral para tres protones que se asigna a los tres protones del metilo del grupo acetamido presente en la molécula.

Centrado a 3,42 ppm se observa dos señales complejas, que se asigna a los metilenos unidos a nitrógeno y a los metilenos unidos a oxígeno, respectivamente, de la fracción correspondiente a la morfolina.

Centrado a 4,23 ppm aparece un doble doblete con integral para un protón, que asignamos a H-6_{eq}, ya que posee la constante de acoplamiento características de este protón ($J_{5,6eq} = 4,8$ Hz y $J_{6ax,6eq} = 10$ Hz).

A 4,30 ppm aparece un conjunto de cuatro señales, con integral para dos protones, que corresponde al sistema AB formado por los protones del metileno en α al oxígeno de la posición tres del azúcar y con una constante de acoplamiento geminal de 12,5 Hz.

Centrado a 4,65 ppm aparece otro conjunto de cuatro señales, con una integral correspondiente a dos protones, que asignamos al sistema AB formado por los protones del metileno del grupo bencilo presente en posición anomérica. Este sistema presenta una constante de acoplamiento geminal de 12,3 Hz.

A 4,70 ppm aparece un doblete con integral para un protón y una constante de acoplamiento de 7,63 Hz, que se asigna a H-1.

A 5,65 ppm aparece un singulete con integral para un protón, que asignamos al protón de tipo acetálico del grupo bencilideno presente en las posiciones 4,6 del azúcar.

A 7,60 ppm aparece un doblete ancho con integral para un protón, que se asigna al protón unido al nitrógeno del grupo acetamido.

En el espectro de ^1H -RMN del dodecil 2-acetamido-4,6-*O*-bencilidén-2-desoxi-3-*O*-(morfolin-1-ilcarbonilmetil)- β -D-glucopiranósido (30) registrado en DMSO- d_6 a 200 MHz y a 100° de temperatura (Figura 12H), se observa a campo alto las señales correspondientes al grupo dodecilo en posición anomérica ya asignadas en espectros anteriores.

A 1,81 ppm se encuentra un singulete con integral para tres protones correspondiente al metilo del grupo acetamido.

Entre 3,33 y 3,47 ppm aparece una señal compleja y poco resuelta, que corresponde a los protones de los metilenos unidos a nitrógeno y a los unidos a oxígeno del fragmento de morfolina y al metileno en α al oxígeno de la posición anomérica.

Entre 3,51 y 3,80 ppm aparece otro conjunto de señales que deben corresponder a los protones H-2, H-3, H-4, H-5 y H-6_{ax}, de los cuales sólo se puede distinguir H-6_{ax}, que aparece a 3,75 ppm y con las constantes de acoplamiento características para este protón ($J_{5,6ax}$ y $J_{6ax,6eq} = 10,1$ Hz) y H-3, cuya señal se encuentra centrada a 3,72 ppm y con un valor de la constante de acoplamiento vecinal de 9,5 Hz.

A 4,22 ppm aparece un doble doblete con integral para un protón que se asigna a H-6_{eq}, ya que tiene las constantes de acoplamiento típicas para este protón ($J_{5,6eq} = 5,1$ Hz y $J_{6ax,6eq} = 10,6$ Hz)

Centrado a 4,29 ppm aparece un conjunto de cuatro señales, con integral para dos protones, que corresponde al sistema AB formado por los protones del metileno en α al oxígeno de la posición tres del azúcar y con una constante de acoplamiento geminal de 12,4 Hz.

A 4,56 ppm aparece un doblete con integral para un protón con un acoplamiento de 7,9 Hz que se asigna a H-1.

A 5,64 ppm aparece un singulete con integral para un protón, que se asigna al protón de tipo acetálico presente en el grupo bencilideno en las posiciones 4,6 del azúcar.

A 7,3 ppm aparece una señal con integral para cinco protones, que corresponde al anillo aromático del grupo bencilideno anterior.

Finalmente a 7,6 ppm aparece un doblete muy ancho que se asigna al protón de tipo amídico del grupo acetamido en posición dos del azúcar.

Tabla 1

Datos de ¹H-RMN de las sustancias 17, 18, 20, 22, 24, 28 y 30 (DMSO-d₆, 200 MHz, 100°).

Sustancia	PhCH	OCH ₂ CO	COOMe	CH ₂ N	CH ₂ X	H-1	H-2	H-3	H-4	H-5	H-6eq	H-6ax
17*	5,50 s			3,58 m	3,66 m	4,70 d	3,38 m	4,13 t			4,32 dd	3,8t
X= Cl						J _{1,2} 8	J _{2,3} 9	J _{3,4} 9			J _{5,6eq} 4	J _{5,6ax} 10
											J _{6ax,6eq} 10	
18				3,55 m	3,65 m	4,30 d						
X= Cl												
20	5,61 s	4,07 s				4,52 d					4,21 dd	
						J _{1,2} 8					J _{5,6eq} 5; J _{6ax,6eq} 10	
22*	5,50 s	4,35	3,61 s			4,79 d		4,08 dd	3,64 t		4,31 dd	3,75 t
		J _{gem} 13				J _{1,2} 8		J _{2,3} 10	J _{3,4} 9		J _{5,6eq} 5	J _{5,6ax} 10
											J _{6ax,6eq} 10	
24	5,70 s	4,35		3,30 m	3,50 m	4,56 d	3,58 t		3,68 t	3,66 dd	4,22 dd	3,75 t
X= OH		J _{gem} 13				J _{1,2} 8	J _{2,3} 9		J _{3,4} 9	J _{4,5} 9	J _{5,6eq} 6	J _{5,6ax} 10
											J _{6ax,6eq} 10	
28	5,61 s	4,31		3,20 t	3,68 m	4,60 d					4,32 dd	
X= Cl				3,30 t		J _{1,2} 8					J _{5,6eq} 5,1	
												J _{6ax,6eq} 10,5
30	5,64 s	4,29		3,33	3,47	4,56 d		3,72 t			4,22 dd	3,75 t
X= O		J _{gem} 12				J _{1,2} 8		J _{2,3} =J _{3,4} 9,5			J _{5,6eq} 5	J _{5,6ax} 10,6
											J _{6ax,6eq} 10,1	

* Registrado en Cl₃CD



Tabla 2

Datos de ^1H -RMN de las sustancias **19**, **21**, **23**, **27** y **29** (DMSO-d₆, 200MHz, 100°).

Sustancia	PhCH	CH ₃ CON	PhCH ₂	OCH ₂ CO	CH ₂ N	CH ₂ X	H-1	H-6eq
19	5,65 s	1,85 s	4,66 J _{gem} 12,1	4,15 s			4,73 d J _{1,2} 7,5	4,27 dd J _{5,6eq} 4,7; J _{6ax,6eq} 10,1
21	5,62 s	1,84 s	4,67 J _{gem} 12,3	4,24 s			4,72 d J _{1,2} 8	4,25 dd J _{5,6eq} 5; J _{6ax,6eq} 10
23 X= OH	5,65 s	1,85 s	4,68 J _{gem} 12,4	4,35 J _{gem} 13	3,47 t	3,80 t	4,70 d J _{1,2} 7,7	4,25 dd J _{5,6eq} 5; J _{6ax,6eq} 10,2
27 X= Cl	5,65 s	1,84 s	4,65 J _{gem} 12,3		3,20 t 3,30 t	3,60 m	4,71 d J _{1,2} 7,6	
29 X= O	5,65 s	1,85 s	4,65 J _{gem} 12,3	4,30 J _{gem} 12,5	3,35	3,44	4,70 d J _{1,2} 7,7	4,23 dd J _{5,6eq} 4,8; J _{6ax,6eq} 10

Se han asignado las distintas señales de los espectros de ^{13}C -RMN de las sustancias descritas en esta Tesis de Licenciatura (Figuras 1C-12C). Los datos se encuentran recogidos en las Tablas 3 y 4 y están de acuerdo con las estructuras de los compuestos.

Tabla 3

Datos de ^{13}C -RMN de las sustancias 17, 18, 20, 22, 24, 28 y 30 (DMSO- d_6 , 50 MHz).

Sustancia	Acetamido		Aglucón				Acido				Azúcar					
	CH ₃	CO	PhCH	CH ₃	OCH ₂	OCH ₂ CO	COR	CH ₂ N	CH ₂ X	OCH ₃	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6
17* R= N(C ₂ H ₄ X) ₂ X= Cl			101,9	14,1	68,6		174,6	40,4	53,2		100,5	59,3	71,2	81,7	66,2	70,1
18 R= N(C ₂ H ₄ X) ₂ X= Cl				14,0	61,0		171,7	40,9	52,3		100,1	55,2	74,2	77,0	70,7	68,3
20 R= OH	22,9	171,8	101,9	13,9	67,8	69,1	169,5				100,0	54,2	77,8	81,3	65,5	68,7
22* R= OCH ₃	23,6	171,7	101,5	14,1	68,6	70,2	171,1			51,6	101,5	56,7	77,5	82,7	65,8	68,8
24 R= N(C ₂ H ₄ X) ₂ X= OH	22,9	169,2	101,6	13,9	67,8	70,3	168,7	48,3 49,7	58,4 59,1		100,0	54,3	78,1	81,0	65,4	68,7
28 R= N(C ₂ H ₄ X) ₂ X= Cl	22,9	169,6	101,3	13,9	65,3	68,8	169,1	48,1 45,4	59,3		100,2	54,2	79,0	80,9	65,3	68,3
30 R= Morfolin-1-il X= O	23,6	171,3	102,1	14,1	68,8	70,2	168,3	41,8	66,2 44,8	66,6	101,3	56,3	77,2	82,5	66,0	69,3

* registrado en Cl₃CD

Tabla 4

Datos de ^{13}C -RMN de las sustancias **19**, **21**, **23**, **27** y **29** (DMSO- d_6 , 50 MHz).

Sustancia	Acetamido			Aglucón		Acido				Azúcar					
	CH ₃	CO	PhCH	OCH ₂	OCH ₂ CO	COR	CH ₂ N	CH ₂ X	OCH ₃	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6
19 R= OH	23,0	171,3	100,1	70,1	68,2	169,3				100,1	54,3	78,4	81,0	65,5	67,8
21 R= OMe	23,0	170,3	101,1	70,1	68,3	169,2			51,2	100,2	54,2	78,9	81,0	65,4	67,8
23 R=N(C ₂ H ₄ X) ₂ X= OH	23,0	170,1	100,1	70,3	70,1	169,4	48,4 49,8	58,5 59,1		100,1	54,3	78,0	81,3	65,6	67,9
27 R=N(C ₂ H ₄ X) ₂ X= Cl	23,0	169,6	101,2	70,2	68,4	169,3	45,4 48,1	59,3		100,2	54,2	79,0	80,9	65,4	67,8
29 R= Morfolina X= O	23,2	172,3	100,0	71,3	70,9	169,7	42,4 44,8	66,5 68,7		100,0	55,9	77,3	82,3	66,1	69,0

3.2.2.- Determinación estructural por espectrometría de masas.

Se han estudiado los espectros de masas de las diversas sustancias descritas en esta Memoria, obtenidos por impacto electrónico (EI), con electrones de una energía nominal de 70 eV. Asimismo, con objeto de caracterización, se han obtenido los espectros de estas sustancias mediante ionización química (CI) y para los compuestos en que los iones moleculares no eran observables, debido a su escasa volatilidad, se han registrado sus espectros mediante una técnica de ionización más suave, como es la técnica de ionización mediante bombardeo con átomos rápidos (FAB).

Por otra parte, con el fin de establecer los mecanismos de fragmentación, se han llevado a cabo experiencias de barridos ligados (búsqueda de iones padres, iones hijos y pérdida de molécula neutra).

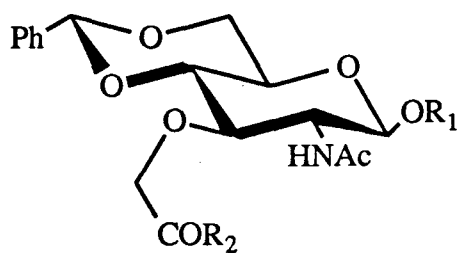
Las sustancias se han dividido en dos grupos, en función del grado de similitud que presentan. Así, en el primer apartado, se estudian los espectros de masas de aquellas sustancias, en las que la fracción alquilante se encuentra unida a la posición 3 del azúcar; en el segundo apartado, estudiamos los compuestos en que el clorambucil se une al azúcar a través de la posición 2 del mismo.



Antes de iniciar el estudio hay que decir que, el uso de una fórmula estructural determinada, no implica que el ión en cuestión haya sido investigado y haya mostrado esa estructura particular; su uso se hace sólo con carácter orientativo y con el objeto de intentar facilitar la comprensión de las rutas de fragmentación que se proponen.

3.2.2.1.- Fracción alquilante unida a la posición 3 del azúcar.

La estructura general, así como las sustancias estudiadas, se recogen en la Tabla 5.

Tabla 5



Compuesto	R ₁	R ₂
19	CH ₂ Ph	OH
20	nC ₁₂ H ₂₅	OH
21	CH ₂ Ph	OMe
22	nC ₁₂ H ₂₅	OMe
23	CH ₂ Ph	N(CH ₂ CH ₂ OH) ₂
24	nC ₁₂ H ₂₅	N(CH ₂ CH ₂ OH) ₂
27	CH ₂ Ph	N(CH ₂ CH ₂ Cl) ₂
28	nC ₁₂ H ₂₅	N(CH ₂ CH ₂ Cl) ₂
29	CH ₂ Ph	
30	nC ₁₂ H ₂₅	

Los espectros de masas de estas sustancias, obtenidos por CI y FAB, están recogidos en las Figuras 3F-12F. Tanto en los espectros registrados en CI, como en los espectros registrados en FAB, se observan los iones $[M + H]^+$ y $[M + Na]^+$, respectivamente, como una de las señales principales del espectro. En la Tabla 6, se recoge la relación masa/carga (m/z) e intensidad (%) de estos iones, para los diversos compuestos integrantes de este grupo.

Tabla 6

Relación masa/carga (m/z) y abundancia relativa (%) para los iones $[M + H]^+$ (CI) y $[M + Na]^+$ (FAB) para las sustancias estudiadas en este apartado.

Compuesto	$[M + H]^+$	$[M + Na]^+$	Intensidad (%)
19	458		90
20*		580	100
21	472		30
22	550		25
23		567	85
24		645	100
27		603	100
28		681	80
29	527		20
30		627	100

* Sal sódica del ácido.

Del estudio de EM realizados en condiciones de EI para estas sustancias, se deduce que existen cuatro fragmentaciones primarias principales cuyos iones tienen una relación m/z que se recoge en la Tablas 8-11. Estas fragmentaciones son:

- 1) La escisión de los enlaces que unen C3-C4 y C1-C2 para dar un fragmento que contiene los carbonos 2 y 3, con sus respectivos sustituyentes, conocida en la bibliografía³⁵ como ruta H. Esta ruta aparece en todos los espectros estudiados y es la única que produce una fragmentación primaria del anillo de azúcar dando lugar al fragmento-ión primario H_1^2 .
- 2) La escisión del enlace O-R₁ puede producirse de manera heterolítica, dando el ión R₁, o de manera homolítica, rindiendo el ión $[M-R_1]^+$. Cuando R₁=Bn ambas fragmentaciones son importantes; ya que en el primer caso el ión R₁ es el ión tropilio (m/z 91) y en el segundo caso se obtiene el radical bencilo junto con el ión $[M-R_1]^+$.

En el caso de R₁=dodecilo, sólo se detecta la rotura homolítica que conduce al ión $[M-R_1]^+$.

El ión $[M-R_1]^+$ evoluciona de dos formas distintas: a) por fragmentación del anillo de 1,3-dioxano, produciendo el ión $[M-R_1-106]^+$; b) por expulsión del fragmento C2-C3 del anillo de azúcar, conduciendo al pico que denominamos $[M-R_1-H]^+$ de relación m/z 207, que evoluciona a su vez al ión $[M-R_1-H-106]^+$ de m/z 101, por pérdida de benzaldehído. Esta ruta la denominaremos $(M-R_1 \rightarrow)^{\#}$.

- 3) La ruptura del grupo protector acetálico en posiciones 4,6 del azúcar, conocida en la bibliografía³⁶ con el nombre de ruptura h , la cual da lugar a los iones h_1 y h_2 . Estos iones toman los valores $m/z=149$ y $[M-149]^+$ respectivamente cuando el grupo protector es el bencilideno.

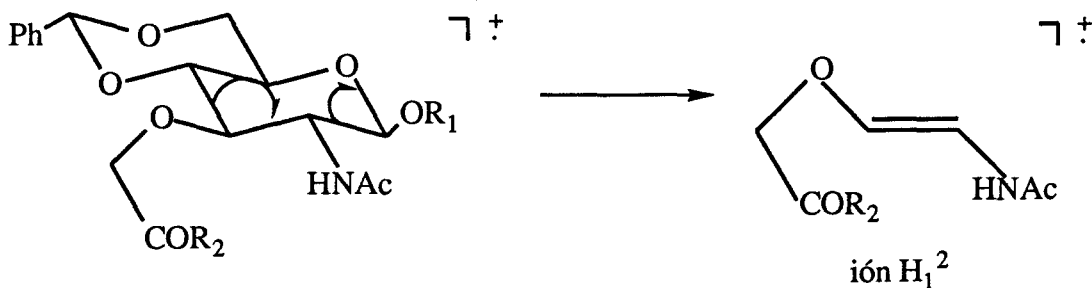
- 4) La escisión homolítica del enlace glicosídico. Esta ruta es muy general en glicósidos derivados de azúcares y es conocida en la literatura³⁵ como ruta A. El fragmento primario A_1 es un ión oxonio proveniente de la rotura homolítica del enlace C1-OR₁ en la que se pierde un radical alcoxilo.

Este ión A_1 , también denominado $[M-OR_1]^+$, sufre la pérdida de benzaldehído dando lugar al fragmento $[M-OR_1-106]^+$. Esta ruta la denominaremos también $(M-OR_1 \rightarrow)^{\#}$.

Esta ruta de fragmentación es menos importante que las anteriores descritas, para las sustancias cuyos espectros de masas de EI estudiamos en esta Memoria. Aparece, sin embargo, en casi todos los espectros registrados aunque resulta ser algo más importante cuando el radical R₁ es poco estable, es decir, cuando se produce poco $[M-R_1]^+$.

Ruta H

Es la única ruta que produce una fragmentación primaria del anillo de azúcar.



En la Tabla 7 se recogen la relación masa carga y la abundancia relativa para los iones de este tipo.

Tabla 7

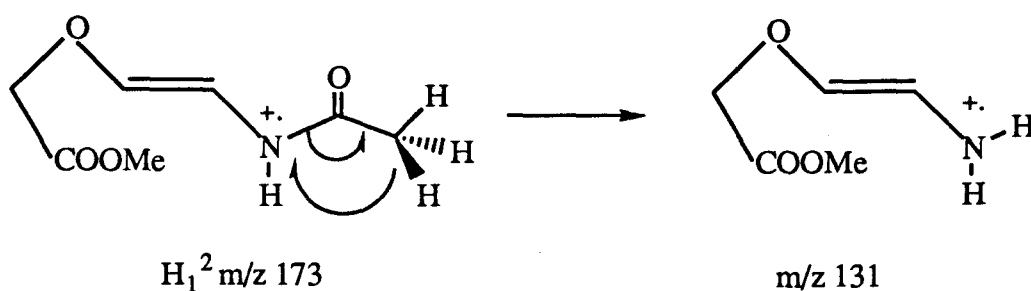
Relación masa/carga (m/z) y abundancia relativa (%) para el ión H_1^2

Compuesto	m/z (ión H_1^2)
21	173 (5%)
22	173 (100%)
23	246 (1%)
24	246 (2,4%)
29	228 (4%)
30	228 (70%)

Como puede observarse, la abundancia relativa del ión H_1^2 es mayor cuando R_1 = dodecilo que cuando R_1 = bencilo; la explicación que proponemos es que cuando R_1 = bencilo esta ruta entra en competencia con la ruta $(M-R_1 \rightarrow)^{\#}$ y con la formación del ión tropilio.

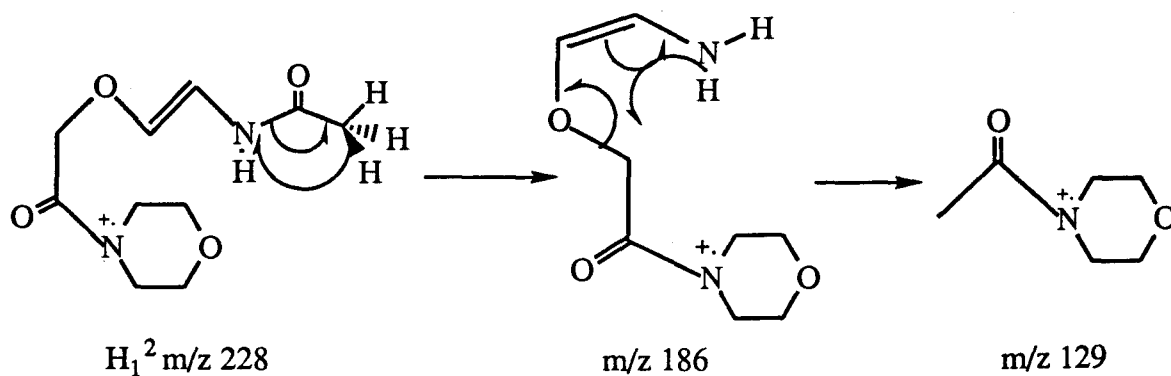
El ión H_1^2 puede generar varios fragmentos-iones que estudiaremos para cada uno de los compuestos investigados en este grupo.

Así, el ión H_1^2 para los compuestos 21 y 22 puede sufrir la pérdida de cetena para dar un ión con m/z 131 que tiene un 58% de abundancia relativa para la sustancia 22 y un 10% para la sustancia 21.

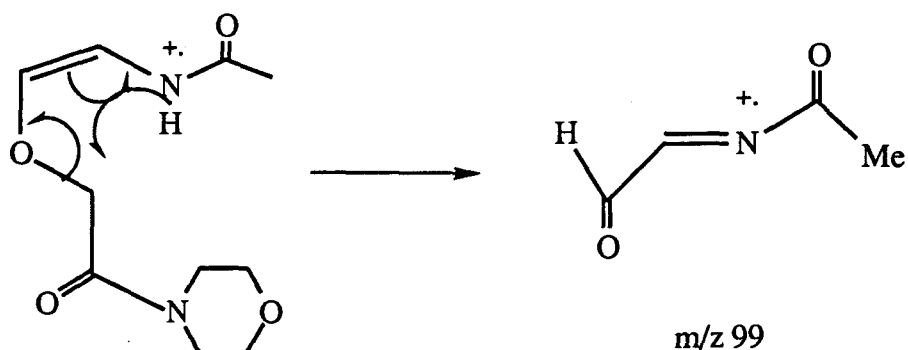


La distinta abundancia relativa de m/z 131 para **21** y **22** es debida a que también la abundancia relativa del ión H_1^2 es distinta para ambos.

El ión H_1^2 para las sustancias **29** y **30** también sufre fragmentaciones secundarias.



Si consideramos la carga en el nitrógeno de tipo acetamídico, se produce el ión m/z 99 mediante pérdida de 129 como molécula neutra.



En la Tabla 8, se recoge la relación masa/carga (m/z) y la abundancia relativa (%), para las fragmentaciones del ión H_1^2 para los compuestos **29** y **30**.

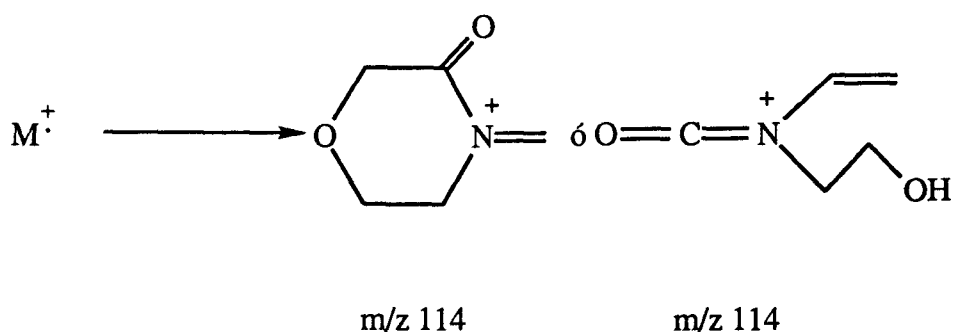
Tabla 8

Relación masa/carga (m/z) y abundancia relativa (%) para las fragmentaciones del ión H_1^2 para los compuestos 29 y 30.

Compuesto	m/z	%
29	99	30
29	186	4
29	129	30
30	99	41
30	186	21
30	129	78

Para los compuestos 23 y 24 la abundancia relativa del ión H_1^2 es tan pequeña porque hay una fragmentación primaria a partir del ión molecular que inhibe la ruta H. Esta fragmentación implica al resto de dietanolamina y consiste en una β -eliminación de uno de los sustituyentes unidos al nitrógeno.

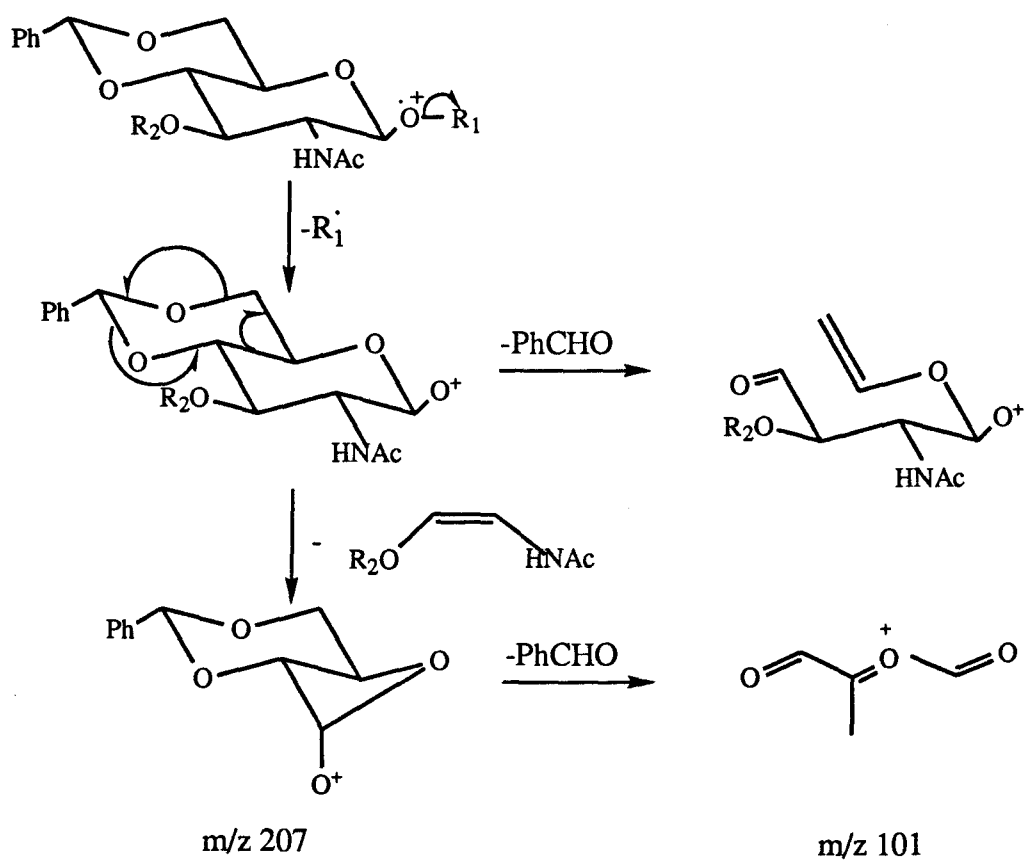
El ión m/z 114 que se produce es el pico base del espectro y lo explicamos en base a las siguientes estructuras:



Ruta de fragmentación ($M-R_1 \rightarrow$)[#]

Cuando la rotura del enlace $O-R_1$ se produce de manera homolítica se obtiene el ión $[M-R_1]^+$ que es el primer fragmento cargado de la ruta con este nombre. El ión $[M-R_1]^+$ evoluciona de formas distintas: a) por fragmentación del anillo de 1,3-dioxano, produciendo el ión $[M-R_1-106]^+$; b) por expulsión del fragmento C2-C3 del anillo de azúcar, conduciendo al ión $[M-R_1-H]^+$ de relación m/z 207 que evoluciona a su vez al ión $[M-R_1-H-106]^+$ de m/z 101 por pérdida de benzaldehído y con una abundancia relativa mayor que el ión m/z 207.

El esquema de fragmentación que hemos propuesto para esta ruta se representa en el Esquema 11.



Esquema 11

En la Tabla 9 se recoge la relación masa/carga (m/z) y la abundancia relativa para los iones correspondientes a esta ruta de fragmentación.

Tabla 9

Relación masa/carga (m/z) y abundancia relativa (%) para los iones procedentes de la ruta de fragmentación ($M-R_1 \rightarrow$)[#] para las sustancias estudiadas en este apartado.

Compuesto	$[M-R_1]^+$	$[M-R_1-106]^+$	$[M-R_1-H]^+$	$[M-R_1-H-106]^+$
21	380 (18%)	274 (35%)	207 (12%)	101 (62%)
22	380 (2%)	274 (4%)	207 (2%)	101 (12%)
23	453 (-)	347 (-)	207 (2%)	101 (11%)
24	453 (-)	347 (-)	207 (1%)	101 (32%)
29	435 (9%)	329 (3%)	207 (3%)	101 (23%)
30	435 (10%)	329 (2%)	207 (1%)	101 (21%)

Esta ruta de fragmentación tiene importancia sólo cuando R_1 es estable como ión o como radical. Así, cuando R_1 es bencilo, la rotura homolítica del enlace $O-R_1$ conduce a la formación del radical estable bencilo, produciéndose el ión $[M-R_1]^+$ que al igual que el ión molecular tiende a romperse separándose el fragmento C_2-C_3 , pero en este caso como molécula neutra (H) quedando la carga sobre el oxígeno anomérico.

La rotura heterolítica del enlace $O-R_1$ conduce al estable ión tropilio (m/z 91) que en la mayoría de los casos es el pico base del espectro.

Ruptura *h*

Para el tercer tipo de fragmentación primaria, la conocida como ruptura *h*, se recoge en la Tabla 10 la abundancia relativa de los iones $[M-149]^+$ y m/z 149 observado para los espectros de ionización por impacto electrónico recogidos en las Figuras 5E-10E.

Tabla 10

Relación masa/carga (m/z) y abundancia relativa (%) para los iones $[M-149]^+$ y m/z 149 de los compuestos estudiados en este apartado.

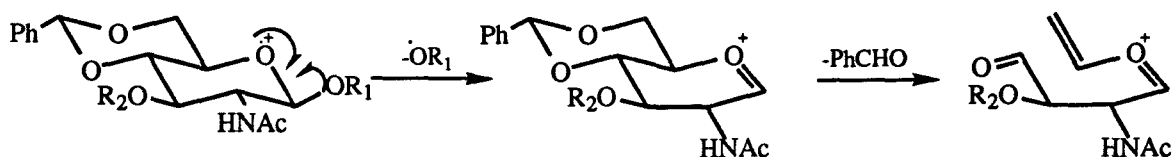
Compuesto	$[M-149]^+$	m/z 149
21	322 (1%)	(10%)
22	400 (2%)	(15%)
23	395 (1%)	(3,5%)
24	473 (2%)	(9%)
29	377 (1%)	(12%)
30	455 (1%)	(35%)

Como puede observarse la abundancia relativa tanto de los iones $[M-149]^+$ como m/z 149 es mayor cuando R_1 = dodecilo debido a que, para R_1 = bencilo la ruta de fragmentación más importante es la $(M-R_1 \rightarrow)^{\#}$ que origina mediante rotura heterolítica

el ión muy estable tropilio y por otra parte mediante escisión homolítica el ión $[M-R_1]^+$ ya que se forma a la vez el estable radical bencilo.

Ruta de fragmentación $(M-OR_1 \rightarrow)^{\#}$

El esquema de fragmentación que se ha propuesto para esta ruta se representa en el Esquema 12.



Esquema 12

En la Tabla 11 se recoge la relación masa/carga (m/z) y la abundancia relativa de los iones correspondientes a esta ruta de fragmentación.

Tabla 11

Relación masa/carga (m/z) y abundancia relativa (%) para los iones procedentes de la ruta de fragmentación ($M-OR_1 \rightarrow$)[#] para las sustancias estudiadas en este apartado.

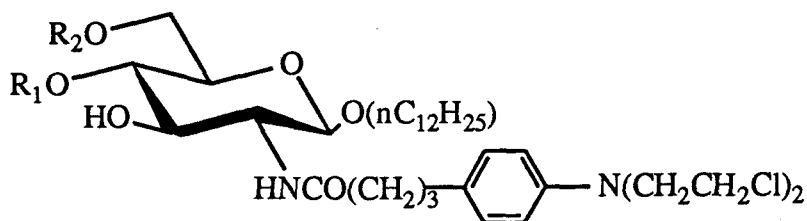
Compuesto	$[M-OR_1]^+$	$[M-OR_1-106]^+$
21	364 (2%)	258 (1%)
22	364 (3%)	258 (4%)
23	437 (1%)	331 (0,3%)
24	437 (1%)	331 (-)
29	419 (1%)	313 (1%)
30	419 (5%)	313 (2%)

Esta ruta de fragmentación es la menos importante para los compuestos cuyos espectros de masas de EI estudiamos en este apartado. Aparece, sin embargo, en casi todos los espectros registrados aunque resulta ser algo más importante cuando el radical R_1 es poco estable, es decir, cuando se produce poco $[M-R_1]^+$.

3.2.2.2.- Fracción alquilante unida a la posición 2 del azúcar.

Este grupo consta sólo de dos sustancias, 17 y 18, de fórmula general:

Tabla 12



Compuesto	R ₁	R ₂
17	PhCH	
18	H	H

Los espectros de masas de estas sustancias, obtenidos por FAB, están recogidos en la Figura 1F, 2F, observándose los iones $[M + Na]^+$, como una de las señales principales del espectro. En la Tabla 13, se recoge la relación masa/carga (m/z) e intensidad (%) de estos iones, para los dos compuestos.

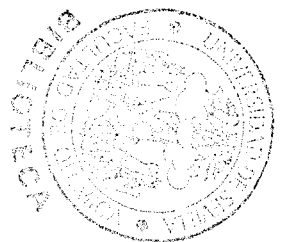
Tabla 13

Relación masa/carga (m/z) y abundancia relativa (%) para el ión $[M + Na]^+$ para las sustancias estudiadas en este apartado.

Compuesto	$[M + Na]^+$	Intensidad (%)
17	743	18
18	655	63

Se han realizado los espectros de masas mediante ionización por impacto electrónico de ambos productos, que se representan en la Figura 1E y 2E para hacer un

estudio de las fragmentaciones, pero en estos espectros aparecen pocos iones de intensidad considerable, debido a la escasa volatilidad de estos compuestos; generalmente aparecen uno o dos iones aislados en el centro del espectro, registrándose a masas bajas un grupo de iones de mediana a alta intensidad, por lo que no hemos podido obtener mucha información de sus rutas de fragmentación.



4.-PARTE EXPERIMENTAL

4.1.- METODOS GENERALES

Las evaporaciones de disolventes se efectuaron a temperaturas inferiores a 60°C a presión reducida (10 a 25 mm de mercurio).

Los puntos de fusión se determinaron en un aparato GALLENKAMP y están sin corregir.

Las rotaciones ópticas se midieron a 25°C, en un polarímetro automático BELLINGHAM + STANLEY Ltd P-20, empleando luz amarilla de sodio ($\lambda=589$ nm). La notación para esta magnitud es $[\alpha]_D$.

Los análisis elementales han sido realizados, en los Servicios de Análisis Elemental del Instituto Químico de Sarrià de Barcelona, en el Centro de Microanálisis Elemental de la Universidad Complutense de Madrid y en el Departamento de Química Analítica de la Universidad de Sevilla.

Cromatografía en capa fina (ccf)

Esta técnica se ha utilizado como método analítico cualitativo, empleando cromatoplasmas comerciales (Merck, 60 F₂₅₄) de un espesor de capa de 0,25 mm y cromatofolios de aluminio (Merck, 60 F₂₅₄) de un espesor de capa de 0,20 mm. Los eluyentes empleados se indican en cada caso.

Los reveladores empleados fueron: luz ultravioleta de 254nm, yodo, ácido sulfúrico al 20% y la mezcla de anisaldehído-ácido sulfúrico-ácido acético-etanol 95% (25:25:1:450). En estos dos últimos casos el revelado se ha realizado por inmersión de la placa en el revelador y posterior calentamiento en placa calefactora durante 1-2 minutos.

Cromatografía en columna

Este procedimiento se ha utilizado con fines preparativos. El soporte empleado ha sido gel de sílice 60 (Merck), usando la técnica conocida como "Flash chromatography". El eluyente empleado se indica en cada caso. Las fracciones colectadas se analizaron por ccf.

Espectros de absorción en el infrarrojo (IR)

Se han registrado en un espectrofotómetro MICHELSON 100 FT-IR. Los espectros de muestras sólidas se registraron en discos de bromuro potásico (KBr).

Espectros de resonancia magnética nuclear (RMN)

Los espectros de RMN (^1H y ^{13}C), se han registrado en un espectrofotómetro BRUKER AC-200, a 200 MHz (^1H) y 50 MHz (^{13}C). Como disolventes se han empleado Cl_3CD y DMSO-d_6 y como referencia interna TMS. Para el desplazamiento químico se usa el parámetro δ .

Las constantes de acoplamiento (J) se dan en Hz y se han leído directamente en los listados del ordenador. La asignación de las señales, en el caso de los espectros de ^{13}C -RMN, se facilitó mediante el empleo de la técnica DEPT.

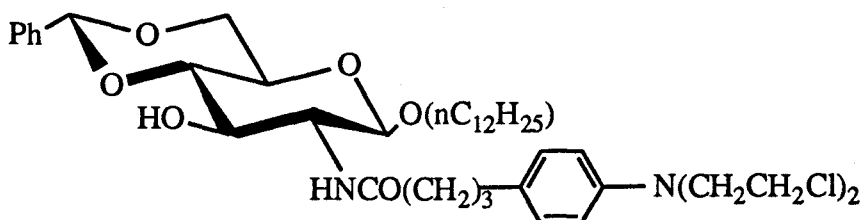
Espectros de masas

Los espectros obtenidos mediante, ionización química (CI), por impacto electrónico (EI) o ionización por bombardeo con átomos rápidos (FAB), se registraron en espectrómetro de masas KRATOS, modelo MS-80-RFA. Las muestras se introdujeron mediante una sonda de sólidos, calentada de 30° a 280°. La temperatura de la fuente de ionización, fué de 150° a 250°, según las experiencias realizadas que fueron las siguientes:

- Ionización por impacto electrónico a 70 eV, corriente de ionización de 100 mA, voltaje acelerador de 4 KV, resolución 1000 (definición del 10% del valle) y velocidad de barrido de 3 s/dec.
- Ionización por impacto electrónico a 70 eV, corriente de ionización de 100 mA, voltaje acelerador de 4 KV, resolución 1000 (definición del 10% del valle) y velocidad de barrido de 10 s/dec.
- Ionización química a 150 eV, usando como gas reactivo isobutano a una presión de 0,8 bar, corriente de ionización de 500 μ A, voltaje acelerador de 4 KV, velocidad de barrido de 3 s/dec.

4.2.- NUEVAS SUSTANCIAS

4.2.1.- Dodecil 4,6-*O*-bencilidén-2-clorambucilamido-2-desoxi-β-D-glucopiranosido



17

A una disolución de clorambucil (0,2 g; 0,66 mmoles), en THF (10 mL) se le añade, trietilamina (0,92 mL; 6,6 mmoles) y se agita durante treinta minutos a temperatura ambiente. Se añade una disolución de tricloroacetato de pentaclorofenol (0,3 g; 0,76 mmoles), en THF (5mL) y se agita a temperatura ambiente durante dos horas, para formar el éster activado del clorambucil. Se adiciona una disolución de dodecil 2-amino-4,6-*O*-bencilidén-2-desoxi-β-D-glucopiranosido (**15**) (0,29 g; 0,66 mmoles) en THF (5 mL) y se agita durante cuatro horas, formándose un nuevo producto, que purificamos por cromatografía en columna, usando como eluyente diclorometano-éter-hexano (1:1:1), resultando ser el producto buscado. Rend: 63 % (después de aislar); P.f.: 150-152°; $[\alpha]_D^{25}$: -0,67° (c 1,13; DMF); IR (cm⁻¹): 1656 (Banda I amida), 1525 (Banda II amida), 1313 (Banda III amida).

Espectro de RMN: ¹H, Figura 1H; ¹³C, Figura 1C.

Espectro de masas: FAB, Figura 1F; EI, Figura 1E.

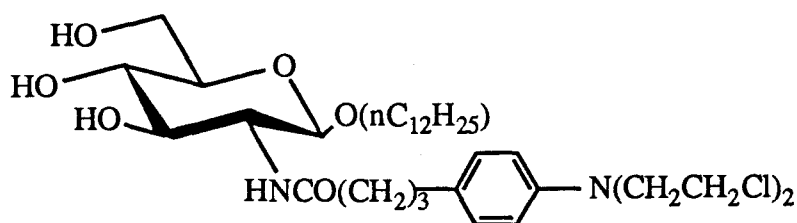
Espectro de IR: Figura 1I.

Análisis elemental: Calculado para C₃₉H₅₈Cl₂N₂O₆: C, 64,90; H, 8,10; N, 3,88.

Encontrado:

C, 65,15; H, 8,01; N, 3,50.

4.2.2.- Dodecil 2-clorambucilamido-2-desoxi- β -D-glucopiranosido



18

A una disolución de dodecil 4,6-*O*-bencilidén-2-clorambucilamido -2-desoxi- β -D-glucopiranosido (**17**) (0,36 g; 0,5 mmoles) en acetona (50 mL), se le añade ácido clorhídrico concentrado (2 gotas) y se agita a temperatura ambiente durante dos horas. Se concentra a sequedad en frío, se lava con éter, éter-hexano (1:1) y diclorometano, rindiendo el producto deseado. Rend; 55%; P.f.: 165° (d); $[\alpha]_{D}^{25}$: -0,18° (c 1,14; DMF).

Espectro de RMN: ^1H , Figura 2H; ^{13}C , Figura 2C.

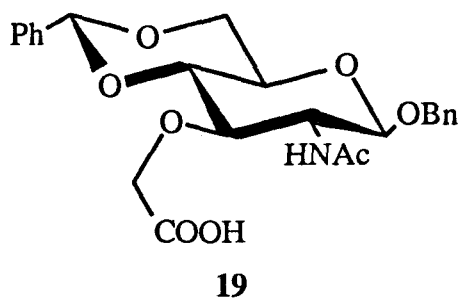
Espectro de masas: FAB, Figura 2F; EI, Figura 2E.

Espectro de IR: Figura 2I.

Análisis elemental: Calculado para $\text{C}_{32}\text{H}_{54}\text{Cl}_2\text{N}_2\text{O}_6$: C, 60,65; H, 8,59; N, 4,42.

Encontrado: C, 60,83; H, 8,48; N, 4,45.

4.2.3.- Bencil 2-acetamido-4,6-*O*-bencilidén-3-*O*-carboximetil-2-desoxi- β -D-glucopiranosido.



A una suspensión conteniendo bencil 2-acetamido-4,6-*O*-bencilidén-2-desoxi- β -D-glucopiranosido (5 g; 12,5 mmoles), potasa machacada (30 g) y DMSO (30 mL) se le añade, ácido cloroacético (7,5 g; 79,3 mmoles) disuelto en DMSO (10 mL) y se agita manualmente durante 45 minutos. Se vierte sobre agua ~2 litros y se acidula con ácido clorhídrico 1N hasta pH ~4, precipitando el producto. Rend: 70%; P.f.: 248-249°; $[\alpha]_D$: -0.36° (c 1,7; DMF); IR (cm⁻¹): 1658 (Banda I amida), 1560 (Banda II amida), 1310 (Banda III amida).

Espectro de RMN: ¹H, Figura 3H; ¹³C, Figura 3C.

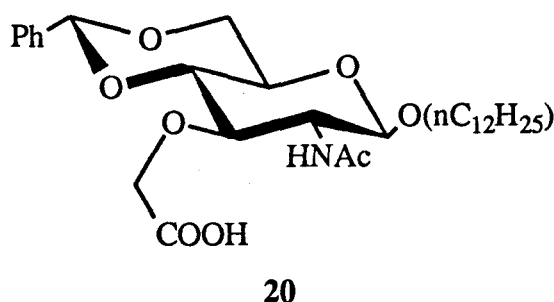
Espectro de masas: FAB, Figura 3F; EI, Figura 3E.

Espectro de IR: Figura 3I.

Análisis elemental: Calculado para C₂₄H₂₇NO₈: C, 63,01; H, 5,95; N, 3,06.

Encontrado: C, 63,17; H, 5,79; N, 2,71.

4.2.4.- Dodecil 2-acetamido-4,6-*O*-bencilidén-3-*O*-carboximetil-2-desoxi-β-D-glucopiranosido.



A una suspensión conteniendo NaH (4 g), THF (150 mL) y DMF (32 mL), se le añade dodecil 2-acetamido-4,6-*O*-bencilidén-2-desoxi-β-D-glucopiranosido (**14**) (2 g; 4,2 mmoles) y se calienta a 60° durante 20 minutos. Una vez transcurrido este tiempo, se añade una disolución de ácido cloroacético (3 g) en THF (25 mL), gota a gota. Cuando ha terminado la adición, cesa el calentamiento y se deja a temperatura ambiente toda la noche. Se destruye el exceso de NaH por adición de agua (gota a gota), se vierte en un vaso de precipitado que contiene agua (~ 2 L) y se acidula hasta pH~ 5,5. El precipitado producido se filtra, se lava con agua y se deja secar. Rend: 90%; P.f.: 224-225°; $[\alpha]_D^{25}$: -0,25° (c 1; DMF); IR (cm⁻¹): 1660 (Banda I amida); 1559 (Banda II amida); 1321 (Banda III amida).

Espectros de RMN: ¹H, Figura 4H; ¹³C, Figura 4C.

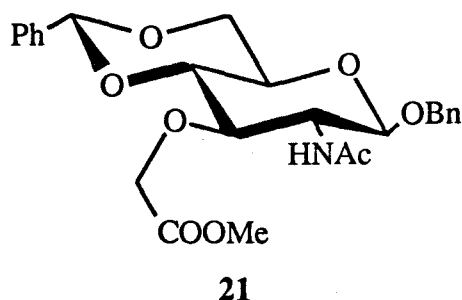
Espectro de masas: FAB, Figura 4F; EI, Figura 4E.

Espectro de IR: Figura 4I.

Análisis elemental: Calculado para C₂₉H₄₅NO₈: C, 65,02; H, 8,47; N, 2,61.

Encontrado: C, 65,42; H, 8,33; N, 2,34.

4.2.5.- Bencil 2-acetamido-4,6-*O*-bencilidén-2-desoxi-3-*O*-metoxicarbonilmetil-β-D-glucopiranosido.



Bencil 2-acetamido-4,6-*O*-bencilidén-3-*O*-carboximetil-2-desoxi-β-D-glucopiranosido (**19**) (1 g) se disuelve en diclorometano (100 mL) y se trata con una disolución etérea, preparada recientemente, de diazometano (50 mmoles). Después de 30 minutos, la disolución se concentra a sequedad y se obtiene el producto buscado. Rend: 95%; P.f.: 247-248°; $[\alpha]_D$: -0,70° (c 2,36; DMF); IR (cm⁻¹): 1652 (Banda I amida), 1556 (Banda II amida), 1307 (Banda III amida).

Espectro de RMN: ¹H, Figura 5H; ¹³C, Figura 5C.

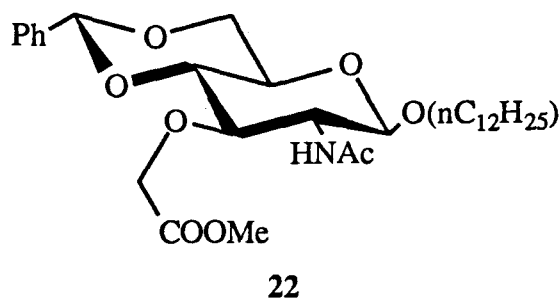
Espectro de masas: CI, Figura 5F; EI, Figura 5E.

Espectro de IR: Figura 5I.

Análisis elemental: Calculado para C₂₅H₂₉NO₈: C, 63,68; H, 6,20; N, 2,97.

Encontrado: C, 63,72; H, 6,21; N, 3,03.

4.2.6.- Dodecil 2-acetamido-4,6-*O*-bencilidén-2-desoxi-3-*O*-metoxycarbonilmetil-β-D-glucopiranosido.



Dodecil 2-acetamido-4,6-*O*-bencilidén-3-*O*-carboximetil-2-desoxi-β-D-glucopiranosido (**20**) (1 g) se disuelve en metanol (100 mL) y se trata con una disolución etérea recién preparada de diazometano. Después de 30 minutos la disolución se concentra a sequedad y se obtiene el producto buscado. Rend: 95%; P.f.: 193-195°; $[\alpha]_D^{25}$: -0,43° (c 0,97; DMF); IR (cm⁻¹): 1622 (Banda I amida); 1571 (Banda II amida); 1305 (Banda III amida).

Espectro de RMN: ¹H, Figura 6H; ¹³C, Figura 6C.

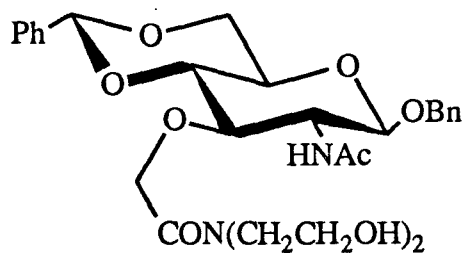
Espectro de masas: CI, Figura 6F; EI, Figura 6E.

Espectro de IR: Figura 6I.

Análisis elemental: Calculado para C₃₀H₄₇NO₈: C, 65,55; H, 8,62; N, 2,55.

Encontrado: C, 65,57; H, 8,33; N, 2,63.

4.2.7.- Bencil 2-acetamido-4,6-*O*-bencilidén-2-desoxi-3-*O*-[*N,N*-bis(2-hidroxietyl)aminocarbonilmetil]- β -D-glucopiranosido.



23

A una disolución de bencil 2-acetamido-4,6-*O*-bencilidén-3-*O*-carboximetil-2-desoxi- β -D-glucopiranosido (**19**) (5,4 g; 10,8 mmoles), en DMF (54 mL) y trietilamina (6,2 mL; 44,2 mmoles), se añade tricloroacetato de pentaclorofenol (7,2 g; 17,7 mmoles) y se agita durante 20 minutos a temperatura ambiente, para formar el éster activado del ácido. Se añade dietanolamina (7,6 g; 70,8 mmoles) disuelta en DMF (10 mL) y se agita durante una hora a temperatura ambiente. Se diluye con diclorometano y se lava con hidróxido de sodio al 5% y agua, se seca sobre sulfato de sodio anhidro y se concentra a sequedad. Se purifica mediante columna de cromatografía, usando como eluyente diclorometano-metanol (20:1). Rend: 70%; P.f.: 216-218°; $[\alpha]_D$: -0,35° (c 2,36; DMF); IR (cm⁻¹): 1652 (Banda I amida), 1557 (Banda II amida), 1314 (Banda III amida).

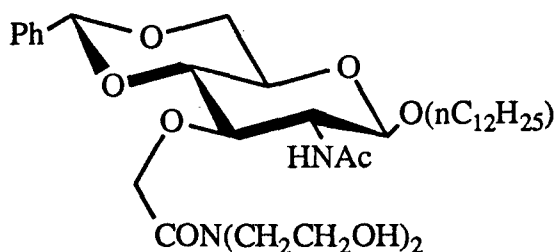
Espectro de RMN: ¹H, Figura 7H; ¹³C, Figura 7C.

Espectro de masas: FAB, Figura 7F; EI, Figura 7E.

Espectro de IR: Figura 7I.

Análisis elemental: Calculado para C₂₈H₃₆N₂O₉: C, 59,78; H, 6,81; N, 4,98.
Encontrado: C, 59,96; H, 6,70; N, 4,99.

4.2.8.- Dodecil 2-acetamido-4,6-*O*-bencilidén-2-desoxi-3-*O*-[*N,N*-bis(2-hidroxietil)aminocarbonilmetil]-β-D-glucopiranosido.



24

A una disolución de dodecil 2-acetamido-4,6-*O*-bencilidén-3-*O*-carboximetil-2-desoxi-β-D-glucopiranosido (20), (5 g; 9,34 mmoles) en DMF (50 mL) y trietilamina (4,9 mL; 35 mmoles), se añade tricloroacetato de pentaclorofenol (5,8 g; 14 mmoles) y se agita durante 20 minutos a temperatura ambiente, para formar el éster activado del ácido. Se añade dietanolamina (6 g; 56 mmoles) disuelta en DMF (10 mL) y se agita durante una hora, a temperatura ambiente. Se diluye con diclorometano y se lava con hidróxido de sodio al 5% y agua. Se purifica por cromatografía en columna, usando como eluyente diclorometano-metanol (25:1). Rend: 80%; P.f.: 184-186°; $[\alpha]_D^{25}$: -0,25° (c 1,04; DMF); IR (cm⁻¹): 1651 (Banda I amida); 1555 (Banda II amida); 1315 (Banda III amida).

Espectro de RMN: ¹H, Figura 8H; ¹³C, Figura 8C.

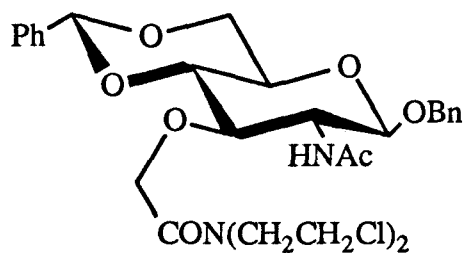
Espectro de masas: FAB, Figura 8F; EI, Figura 8E.

Espectro de IR: Figura 8I.

Análisis elemental: Calculado para C₃₃H₅₄N₂O₉: C, 63,64; H, 8,74; N, 4,50.

Encontrado: C, 63,33; H, 9,01; N, 4,49.

4.2.9.- Bencil 2-acetamido-4,6-*O*-bencilidén-2-desoxi-3-*O*-[*N,N*-bis(2-cloroetil)aminocarbonilmetil]-
β-D-glucopiranosido.



27

A una disolución de bencil 2-acetamido-4,6-*O*-bencilidén-2-desoxi-3-*O*-[*N,N*-bis(2-hidroxi-etil)aminocarbonilmetil]-β-D-glucopiranosido (**23**) (1 g; 1,8 mmoles), en 1,2-dicloroetano (20 mL), se añade cloruro de clorometilendimetilamonio (0,46 g, 7,2 mmoles) y cloruro de litio (0,30 g; 7,2 mmoles) y se agita a temperatura ambiente durante toda la noche. Se diluye con diclorometano y se lava con carbonato ácido de sodio al 5% y posteriormente con agua; se seca sobre sulfato de sodio anhidro y se concentra a sequedad. El producto se purifica por cromatografía en columna, usando diclorometano-éter-hexano (5:5:1) como eluyente. Rend: 40%; P.f.: 191-193°; $[\alpha]_D^{25}$: -0,32° (c 1,26; DMF).

Espectro de RMN: ^1H , Figura 9H; ^{13}C , Figura 9C.

Espectro de masas: FAB, Figura 9F.

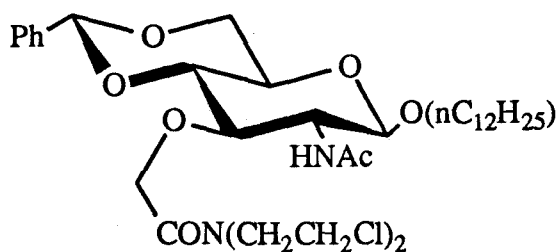
Espectro de IR:

Análisis elemental: Calculado para $\text{C}_{28}\text{H}_{34}\text{Cl}_2\text{N}_2\text{O}_7$: C, 57,84; H, 5,90; N, 4,82.

Encontrado:

C, 58,03; H, 5,81; N, 4,96.

4.2.10.- Dodecil 2-acetamido-4,6-*O*-bencilidén-2-desoxi-3-*O*-[*N,N*-bis(2-cloroetil)aminocarbonilmetil]- β -D-glucopiranosido.



A una disolución de dodecil 2-acetamido-4,6-*O*-bencilidén-2-desoxi-3-*O*-[*N,N*-bis(2-hidroxi-etil)aminocarbonilmetil]- β -D-glucopiranosido (**24**) (2 g; 3,2 mmoles) en 1,2-dicloroetano (40 mL), se añade cloruro de clorometilendimetilamonio (1,25 g; 9,6 mmoles) y cloruro de litio (0,41 g; 9,6 mmoles) y se agita a temperatura ambiente, durante cuatro horas, se cromatografía usando como eluyente para ccf, una mezcla de diclorometano-metanol (10:1). Se diluye con diclorometano y se lava con carbonato ácido de sodio al 5% y posteriormente con agua, se seca sobre sulfato de sodio anhidro y se concentra a sequedad. El producto se purifica por cromatografía en columna, usando diclorometano-éter-hexano (2:2:1) como eluyente. Rend: 60%; P.f.: 156-158°; $[\alpha]_D^{25}$: -0,12° (c 1; DMF); IR (cm⁻¹): 1660 (Banda I amida); 1560 (Banda II amida); 1310 (Banda III amida).

Espectro de RMN: ¹H, Figura 10H; ¹³C, Figura 10C.

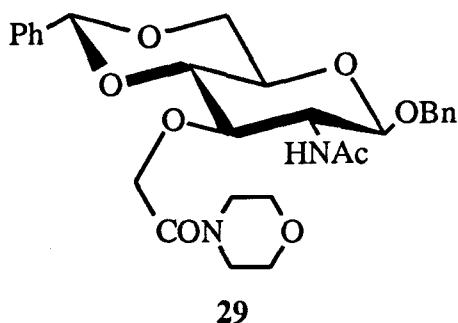
Espectro de masas: FAB, Figura 10F.

Espectro de IR: Figura 9I.

Análisis elemental: Calculado para C₃₃H₅₂Cl₂N₂O₇: C, 60,08; H, 7,95; N, 4,25.

Encontrado: C, 60,13; H, 7,88; N, 4,39.

4.2.11.- Bencil 2-acetamido-4,6-*O*-bencilidén-2-déoxi-3-*O*-(morfolin-1-ilcarbonilmetil)- β -D-glucopiranosido.



A una disolución de bencil 2-acetamido-4,6-*O*-bencilidén-3-*O*-carboximetil-2-desoxi- β -D-glucopiranosido (**19**) (1 g; 2,19 mmoles) en DMF (10 mL) y trietilamina (0,33 mL; 2,39 mmoles) se añade tricloroacetato de pentaclorofenol (1 g; 2,40 mmoles) y se agita durante 20 minutos, para formar el éster activado, Se añade morfolina (0,83 mL; 9,5 mmoles) y se agita durante una hora a temperatura ambiente. Se precipita sobre agua-éter, se filtra y se lava con agua y éter. Rend: 75%; P.f.: 207-209°; $[\alpha]_D$: -40° (c 2,78; DMF); IR (cm⁻¹): 1658 (Banda I amida), 1557 (Banda II amida), 1315 (Banda III amida).

Espectro de RMN: ¹H, Figura 11H; ¹³C, Figura 11C.

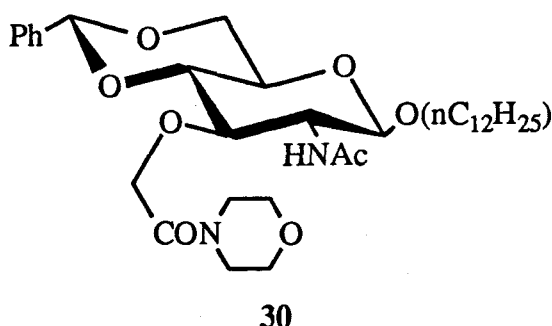
Espectro de masas: CI, Figura 11F; EI, Figura 9E.

Espectro de IR: Figura 10I.

Análisis elemental: Calculado para C₂₈H₃₄N₂O₈: C, 63,86; H, 6,51; N, 5,32

Encontrado: C, 64,05; H, 6,58; N, 5,33.

4.2.12.- Dodecil 2-acetamido-4,6-*O*-bencilidén-2-desoxi-3-*O*-(morfolin-1-ilcarbonilmetil)-β-D-glucopiranosido.



A una disolución de dodecil 2-acetamido-4,6-*O*-bencilidén-3-*O*-carboximetil-2-desoxi-β-D-glucopiranosido (20) (1 g; 1,87 mmoles) en DMF (10 mL) y trietilamina (0,28 mL; 2,04 mmoles), se añade tricloroacetato de pentaclorofenol (0,85 g; 2,04 mmoles) y se agita durante 20 minutos, para formar el éster activado. Se añade morfolina (0,71 mL; 8,11 mmoles) y se agita durante una hora a temperatura ambiente. Se precipita sobre agua-éter. Se purifica pasando por columna de cromatografía, usando acetato de etilo-éter (2:1) como eluyente. Rend: 80%; P.f.: 164-166°; $[\alpha]_D^{25}$: -0,28° (c 1,21; DMF); IR (cm⁻¹): 1658 (Banda I amida); 1552 (Banda II amida); 1306 (Banda III amida).

Espectro de RMN: ¹H, Figura 12H; ¹³C, Figura 12C.

Espectro de masas: FAB, Figura 12F; EI, Figura 10E.

Espectro de IR: Figura 11I.

Análisis elemental: Calculado para C₃₃H₅₂N₂O₈: C, 65,54; H, 8,67; N, 4,63.

Encontrado: C, 65,27; H, 8,43; N, 4,60.

5.- CONCLUSIONES

PRIMERA

Con el fin de ser usados como productos antineoplásicos, mediante las oportunas pruebas biológicas, se han sintetizado los compuestos **18**, **27** y **28**, a saber:

-Dodecil 2-clorambucilamido-2-desoxi- β -D-glucopiranosido (**18**).

-Bencil 2-acetamido-4,6-*O*-bencilidén-2-desoxi-3-*O*-[*N,N*-bis(2-cloroetil)aminocarbonilmetil]- β -D-glucopiranosido (**27**), como precursor del bencil 2-acetamido-2-desoxi-3-*O*-[*N,N*-bis(2-cloroetil)aminocarbonilmetil]- β -D-glucopiranosido.

-Dodecil 2-acetamido-4,6-*O*-bencilidén-2-desoxi-3-*O*-[*N,N*-bis(2-cloroetil)aminocarbonilmetil]- β -D-glucopiranosido (**28**), como precursor del dodecil 2-acetamido-2-desoxi-3-*O*-[*N,N*-bis(2-cloroetil)aminocarbonilmetil]- β -D-glucopiranosido.

SEGUNDA

Los esquemas de síntesis de las sustancias citadas en la conclusión anterior, han requerido la preparación de los siguientes compuestos intermedios:

Dodecil 4,6-*O*-bencilidén-2-clorambucilamido-2-desoxi- β -D-glucopiranosido (**17**).

Bencil 2-acetamido-4,6-*O*-bencilidén-3-*O*-carboximetil-2-desoxi- β -D-glucopiranosido (**19**).

Dodecil 2-acetamido-4,6-*O*-bencilidén-3-*O*-carboximetil-2-desoxi- β -D-glucopiranosido (**20**).

Bencil 2-acetamido-4,6-*O*-bencilidén-2-desoxi-3-*O*-[*N,N*-bis(2-hidroxi-etil)aminocarbonilmetil]- β -D-glucopiranosido (**23**).

Dodecil 2-acetamido-4,6-*O*-bencilidén-2-desoxi-3-*O*-[*N,N*-bis(2-hidroxietyl)aminocarbonilmetil]- β -D-glucopiranosido (24).

TERCERA

Se han obtenidos los ésteres metílicos (21 y 22), bencil 2-acetamido-4,6-*O*-bencilidén-2-desoxi-3-*O*-metoxicarbonilmetil- β -D-glucopiranosido (21) y dodecil 2-acetamido-4,6-*O*-bencilidén-2-desoxi-3-*O*-metoxicarbonilmetil- β -D-glucopiranosido (22), de los ácidos 19 y 20, bencil 2-acetamido-4,6-*O*-bencilidén-3-*O*-carboximetil-2-desoxi- β -D-glucopiranosido (19) y dodecil 2-acetamido-4,6-*O*-bencilidén-3-*O*-carboximetil-2-desoxi- β -D-glucopiranosido (20), para facilitar su análisis estructural, por medio de IR, EM y RMN.

CUARTA

La reacción de interconversión del grupo funcional OH por Cl, se llevó a cabo usando cloruro de clorometilendimetilamonio, aumentándose el rendimiento de los productos diclorados, ya que, usando como reactivo la mezcla $\text{Ph}_3\text{P}/\text{Cl}_4\text{C}$ en caliente, se obtenían éstos como minoritarios, formándose los productos monoclorados como productos principales.

QUINTA

Se han sintetizado los derivados morfolínicos 29 y 30, bencil 2-acetamido-4,6-*O*-bencilidén-2-desoxi-3-*O*-(morfolin-1-ilcarbonilmetil)- β -D-glucopiranosido (29) y dodecil 2-acetamido-4,6-*O*-bencilidén-2-desoxi-3-*O*-(morfolin-1-ilcarbonilmetil)- β -D-glucopiranosido (30), para confirmar que eran éstos unos de los productos secundarios, que se obtenían en la reacción de formación de 27 y 28, usando como reactivo la mezcla $\text{Ph}_3\text{P}/\text{Cl}_4\text{C}$ en caliente.

SEXTA

Se ha llevado a cabo, un estudio de RMN, de las sustancias descritas en la presente Memoria (Apartado 3.2.1.).

SEPTIMA

Se ha realizado un estudio, por espectrometría de masas, de las nuevas sustancias. La realización de barridos ligados, ha permitido confirmar, las rutas de fragmentación propuestas.

Para los compuestos en que el glicósido es bencilo, la ruta de fragmentación $(M-R_1 \rightarrow)^{\#}$ predomina sobre la ruta H, mientras que, cuando el glicósido es dodecilo, la ruta H es la más importante.

6.- BIBLIOGRAFIA

1. R. K. Furner and R. K. Brown, *Cancer Treat. Rep.*, **64**, 559 (1980); R. B. Livingston, L. Heilbrun, D. Lehane, et al, *Cancer Treat. Rep.*, **61**, 1623 (1977); U. S. Department of Health and Human Services, Fourth Annual Report on Carcinogens (NTP-85 002) (1985).
2. D. L. Hill, in *A Review of Cyclophosphamide*, Charles C. Thomas, Springfield, IL (1975); J. Passos Coelho, A. Ross, J.M. Davis, B. Clarke, *Cancer Res.*, **54**, 2366 (1994).
3. H. Fujimoto, T. Takayanagi and K. Ajisaka, *J. Med. Chem.*, **37**, 3668-3670 (1994).
4. O.M. Friedman y E. Boger, *J. Am. Chem. Soc.*, **81**, 3750 (1959); H. Arnold, F. Bourseaux y N. Brock, *Naturwiss.*, **45**, 64 (1958); R. Gross y K. Lambers, *Naturwiss.*, **45**, 66 (1958).
5. J. Meyer y J.P. Weinman, *J. Histochem. and Chytochem.*, **1**, 305 (1953); **5**, 393 (1957).
6. M.H. Benn, L.N. Owen y A.M. Creighton, *J. Chem. Soc.*, 2800 (1958).
7. H.E. Skipper y L.L. Bennet, *Ann. Rev. Biochem.*, 137 (1958).
8. W.C.J. Ross, en "*Biological alkilating agents*" Butterworths, London 1962.
9. *Handbook of experimental pharmacology*. Vol. XXXVIII. "*Antineoplasia and Inmunossupresive Agents*". Tomo I, 1974 cap. 3. Tomo II, 1975 cap. 30-35 Springer-Verlag, Berlin.
10. W.C.J. Ross, *Adv. Cancer Res.*, **1**, 397 (1953).
11. C.C. Price, G.M. Gaucher, P. Koneru, R. Shibakawa, J.R. Sowa y M. Yamaguki, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **163**, 593 (1969).

12. J. Flórez y J.A. Armijo, "*Farmacología Humana*", Ediciones Científicas y Técnicas, Barcelona (1992)
13. G. Weber, *Cancer Res.*, **43**, 3466 (1983).
14. A. Leo, C. Hansch y D. Elkins, *Chem. Rev.*, **71**, 929 (1977).
15. A. Gilman y R.S. Philips, *Science*, **103**, 409 (1946).
16. I. Vargha, L. Toldy, O. Feher y S. Lendvai, *J. Chem. Soc.*, 805 (1957).
17. E.J. Reist, R.R. Spencer, M.E. Wain, I.G. Junga, L. Goodman y B.R. Baker, *J. Org. Chem.*, **26**, 2821 (1961).
18. J.J. Everett, J.J. Roberts y W.J.C. Ross, *J. Chem. Soc.*, 2386 (1953).
19. F. Bergel y J.A. Stock, *Br. Emp. Cancer Comp. Annu. Rep.*, **31**, 6 (1953).
20. F. Fukuoka y Y. Shirasu, *Gann*, **52**, 191 (1961).
21. L.F. Larionov, *Cancer Res.*, **21**, 99 (1961).
22. S.L. Gurina, R.K. Batulina, L.V. Alekseeva y L.V. Pushkareva, *Khim. Geterotsikl. Soedin.*, 431 (1968).
23. L.P. Rateikene, M.I. Dagene y I.L. Knunians, *Usp. Khim.*, **39**, 1537 (1970).
24. E.P. Wollmer, D.J. Taylor, I.J. Masnik, et al., *Cancer Chemother. Rep.*, **4**, 121 (1973).
25. I. Niculescu-Duvaz, *Oncologia (Bucharest)*, **18**, 161 (1979)
26. D. Horton, "*Organic Synthesis*", vol V, H.E. Baumgarter ed., Wiley, 1973, p. 1.
27. D. Charon, R. Chaby, A. Malinvaud, M. Mondange y L. Szabo, *Biochemistry*, **24**, 2736 (1985).

28. J.L. Espartero, Tesis Doctoral, Sevilla (1992).
29. P. Gross y R. Jeanloz, *J. Org. Chem.*, **32**, 2759 (1967).
30. G. Wess, W. Kramer, G. Shubert, A. Enhsen, K.H. Baringhaus, H. Glombik, S. Müllner, K. Bock, H. Kleine, M. John, G. Neckermann y A. Hoffmann, *Tetrahedron Lett.*, **34**, 819 (1993).
31. M. Fujino y C.Hatanaka, *Chem. Pharm. Bull.*, **16** (5), 929 (1968).
32. C.R. Haylock, L.D. Melton, K.N. Slessor y A.S. Tracey, *Carbohydr. Res.*, **16**, 375 (1971).
33. M. Benazza, R. Uzan, D. Beaupère y G. Demailly, *Tetrahedron Lett.*, **33**, 4901 (1992).
34. S. Hanessian y N.R. Plessas, *J. Org. Chem.*, **34**, 2163 (1969).
35. N.K. Kochekov and O.S. Chizhov, *Adv. Carbohydr. Chem.*, **21**, 39-93 (1966).
36. O.S. Chizhov, L.S. Golovkina and N.S. Wulfson, *Carbohydr. Res.*, **6**, 138 (1968).

7.- APENDICES

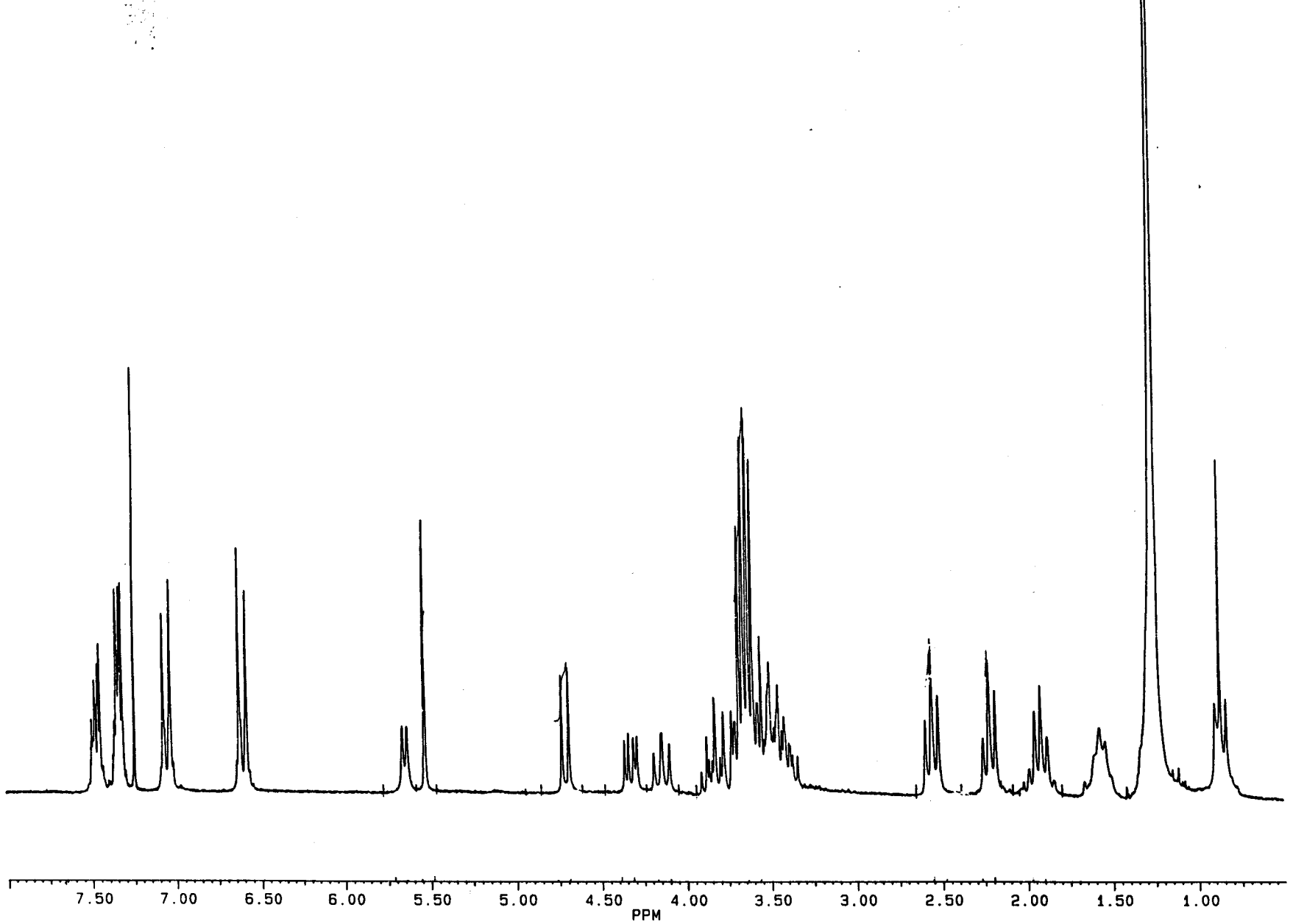


Figura 1H
Espectro de ¹H-RMN del dodecil 4,6-*O*-bencilidén-2-clorambucilamido-2-desoxi-β-D-glucopiranosido (17)
(CDCl₃, 200MHz)

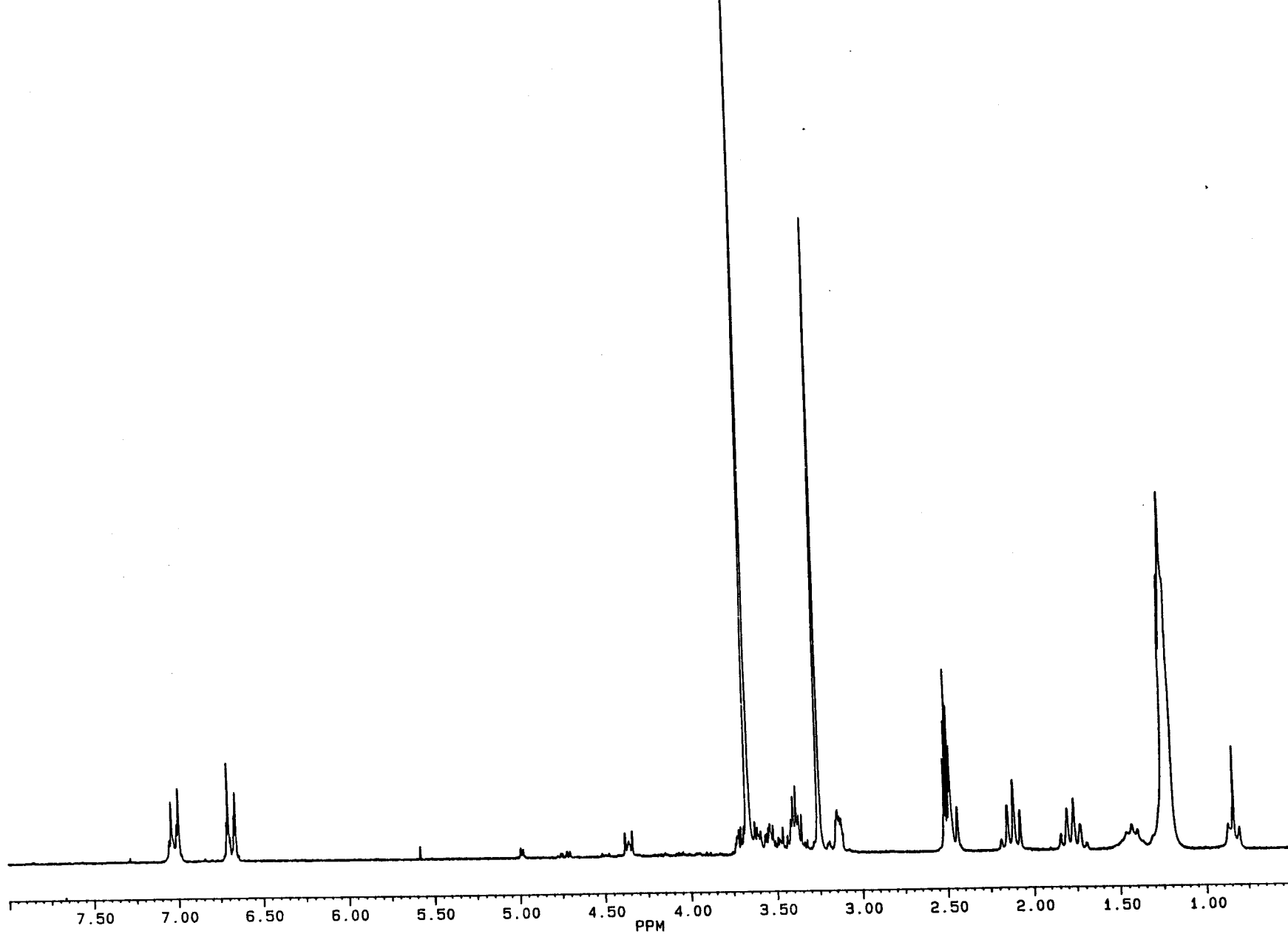


Figura 2H
Espectro de ^1H -RMN del dodecil 2-clorambucilamido-2-desoxi- β -D-glucopiranosido (18)
(DMSO- d_6 , 200MHz, D $_2$ O, 100°)

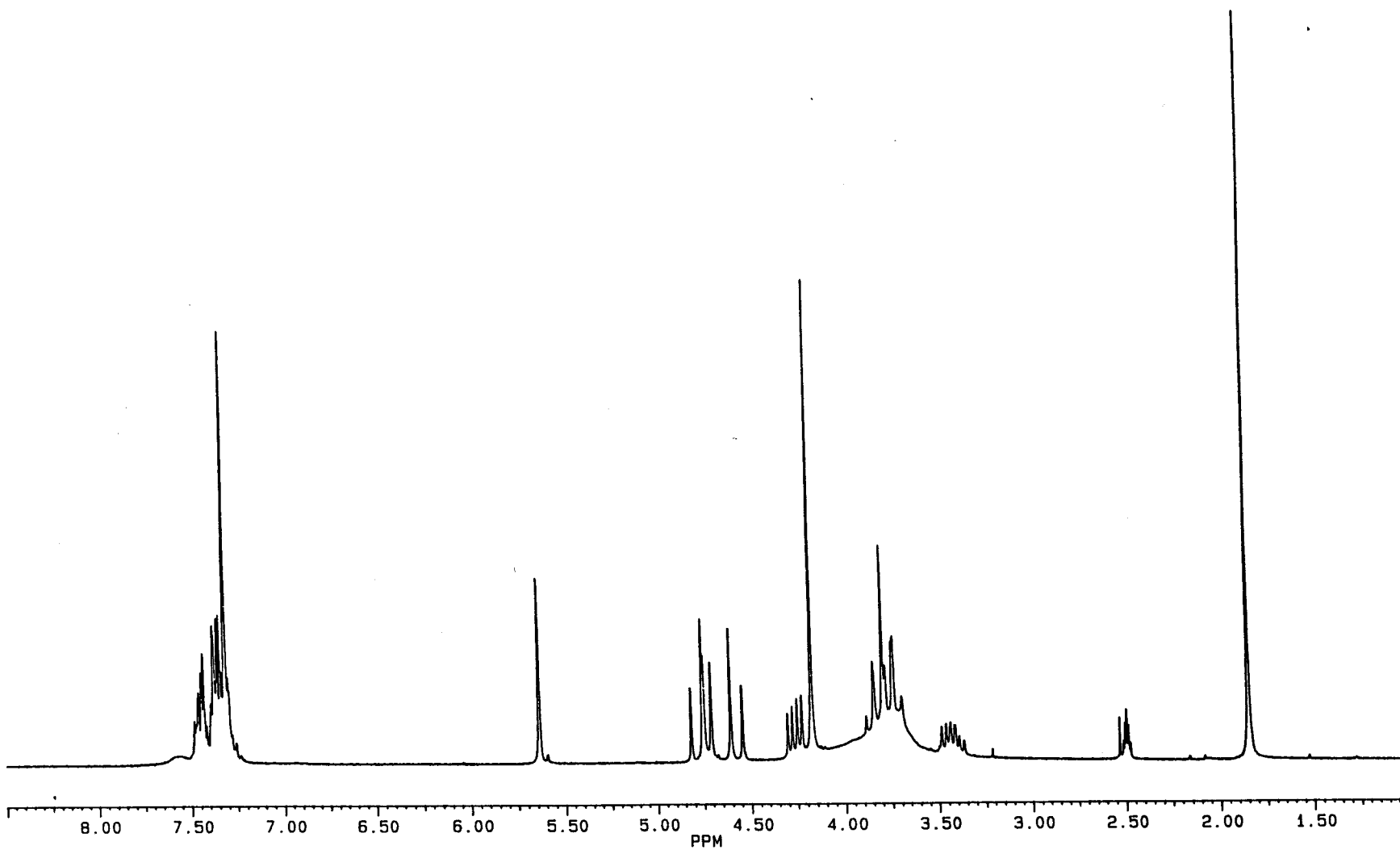


Figura 3H
Espectro de ^1H -RMN del bencil 2-acetamido-4,6-*O*-bencilidén-3-*O*-carboximetil-2-desoxi- β -D-glucopiranosido (19)
(DMSO- d_6 , 200MHz, 100°)

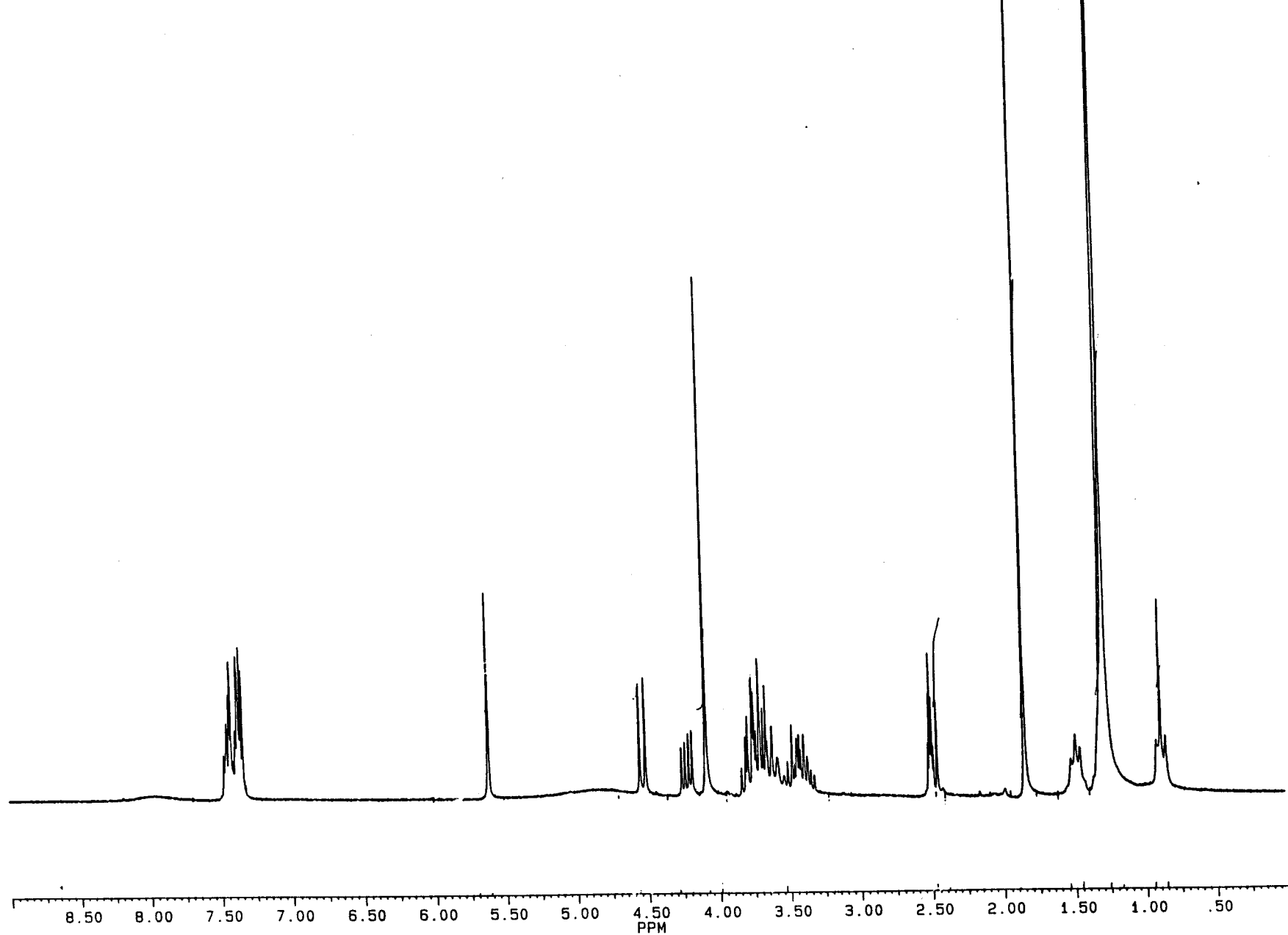


Figura 4H
Espectro de ¹H-RMN del dodecil 2-acetamido-4,6-*O*-bencilidén-3-*O*-carboximetil-2-desoxi-β-D-glucopiranosido (20)
(DMSO-*d*₆, 200MHz, 100°)

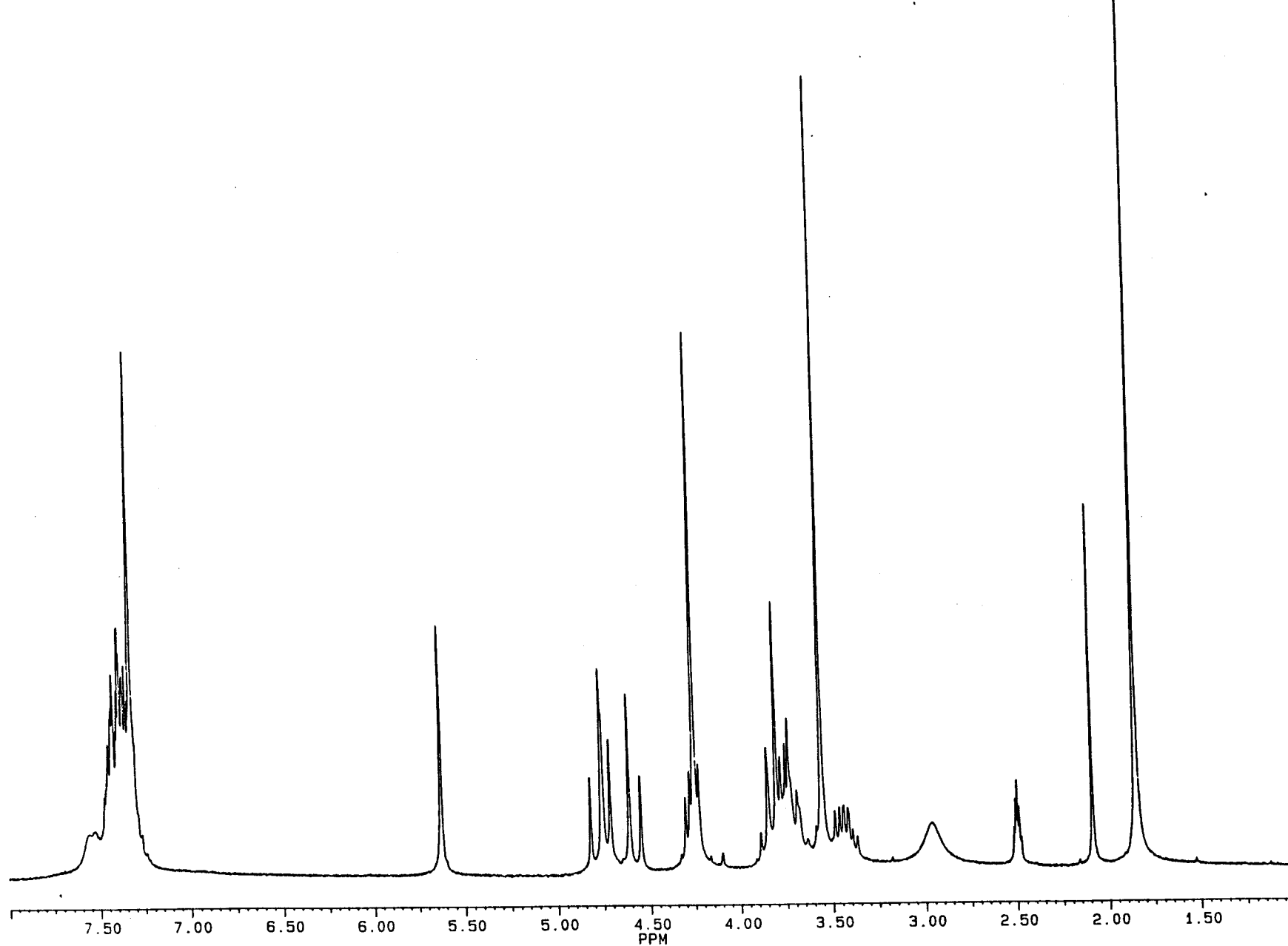


Figura 5H
Espectro de ¹H-RMN del bencil 2-acetamido-4,6-*O*-bencilidén-2-desoxi-3-*O*-metoxicarbonilmetil-β-D-glucopiranosido (21)
(DMSO-d₆, 200MHz, 100°)

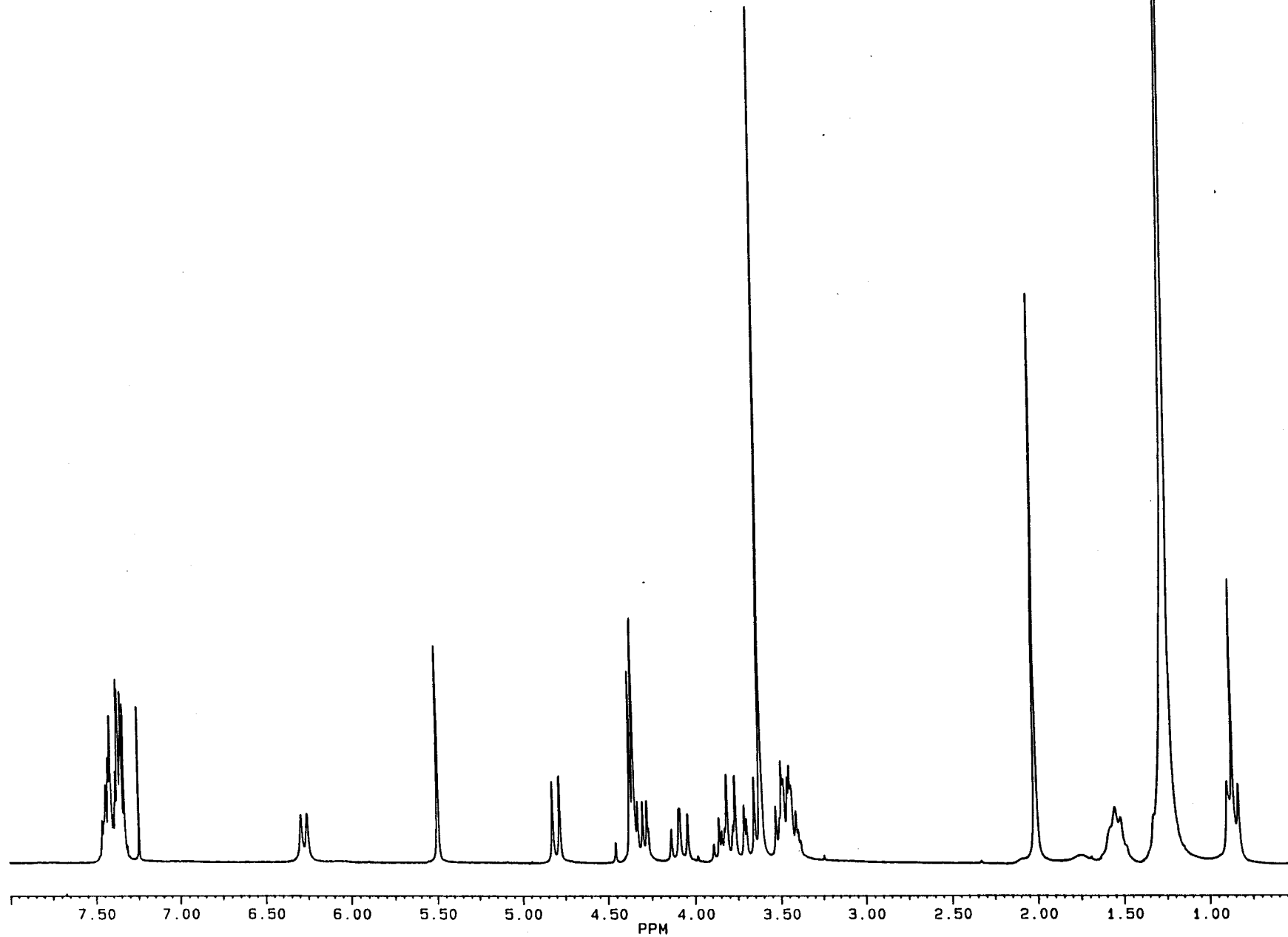


Figura 6H
Espectro de ^1H -RMN del dodecil 2-acetamido-4,6-*O*-benzilidén-2-desoxi-3-*O*-metoxycarbonilmetil- β -D-glucopiranosido (22)
(Cl_3CH , 200MHz, 25°)

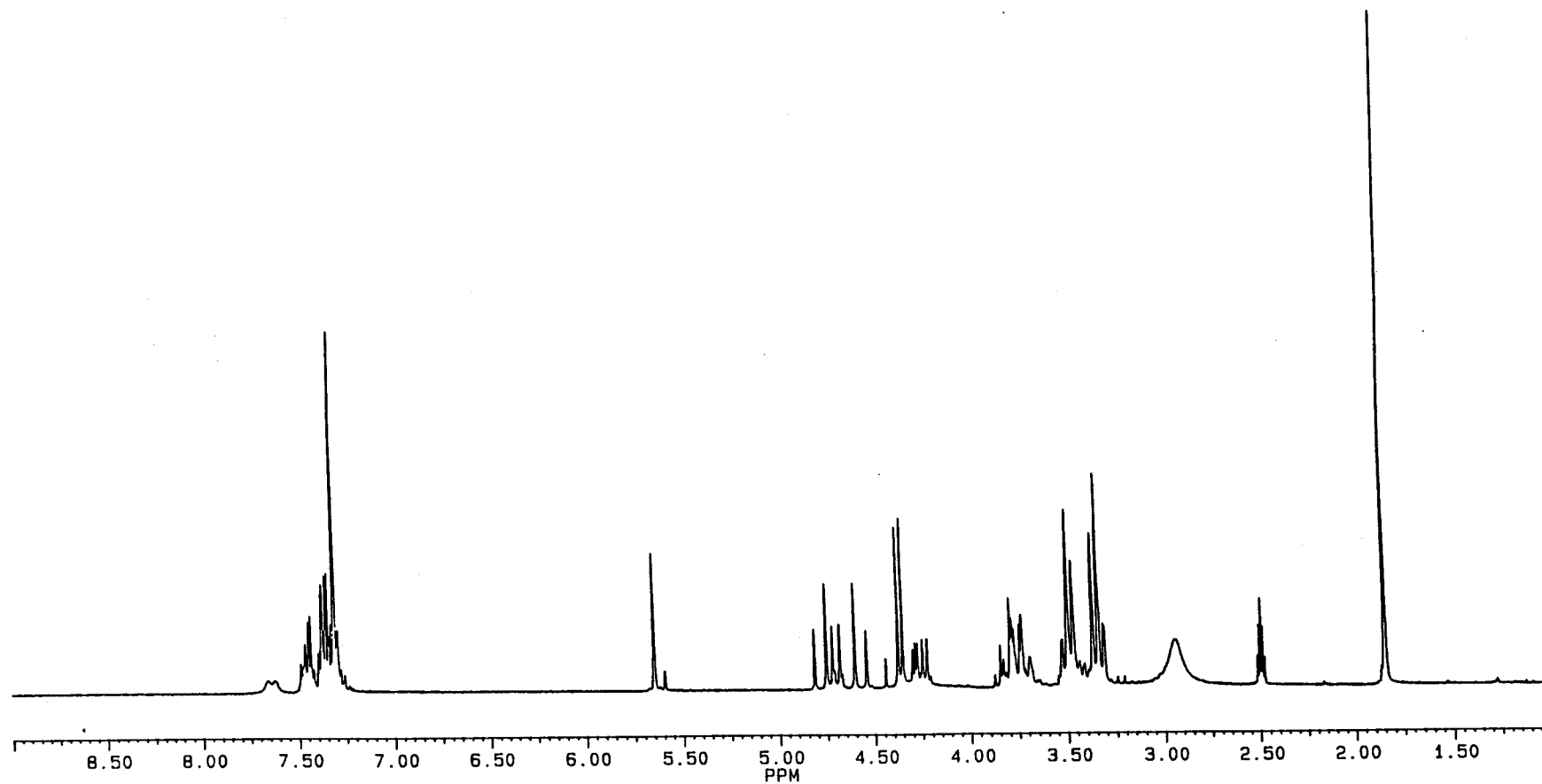


Figura 7H
Espectro de ^1H -RMN del bencil 2-acetamido-4,6-*O*-bencilidén-2-desoxi-3-*O*-[*N,N*-bis(2-hidroxietyl)aminocarbonilmetil]- β -D-glucopiranosido (23)
(DMSO-d_6 , 200MHz, 100°)

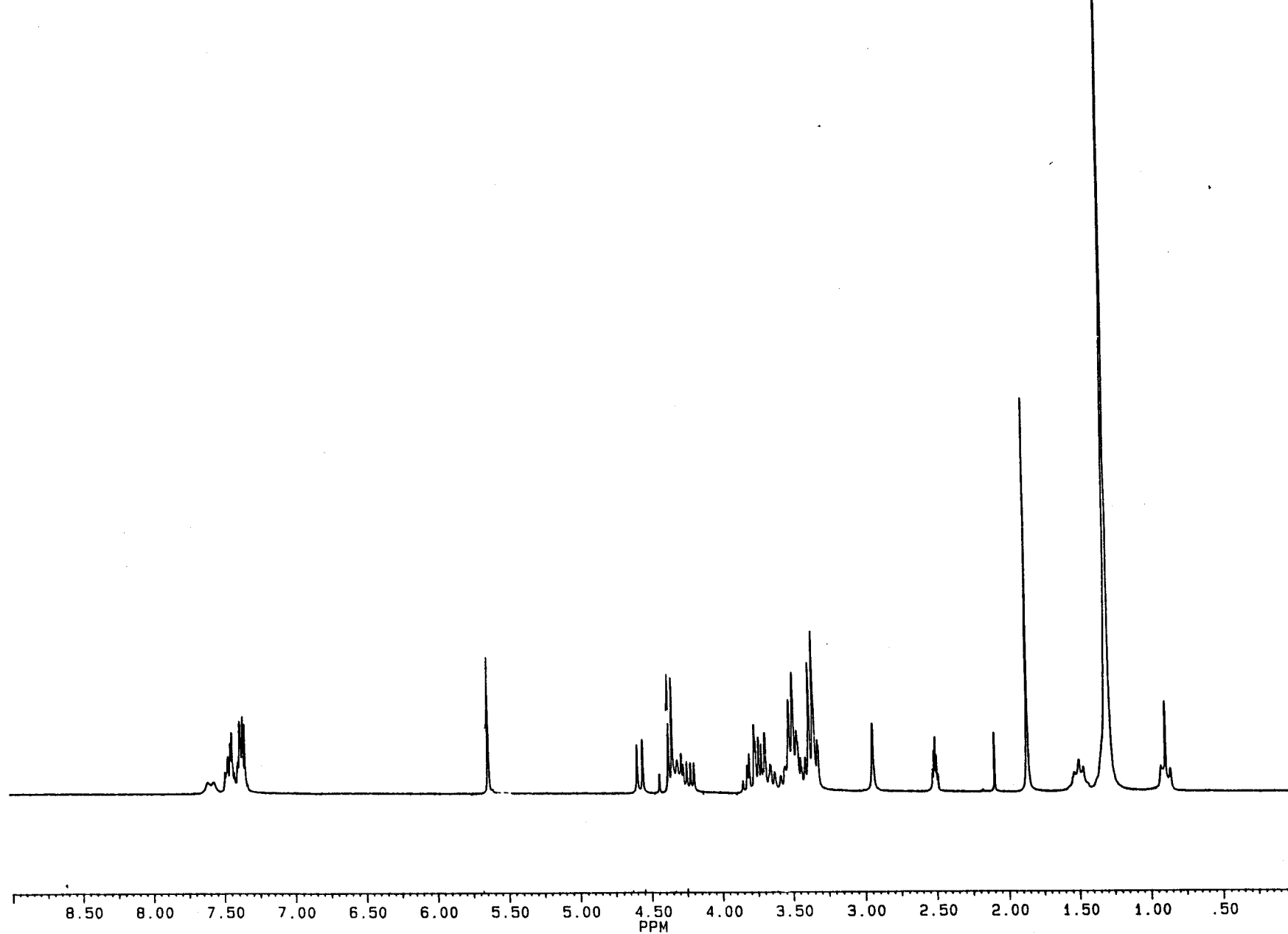


Figura 8H
Espectro de ^1H -RMN del dodecil 2-acetamido-4,6-*O*-bencilidén-2-desoxi-3-*O*-[*N,N*-bis(2-hidroxietyl)aminocarbonilmetil]- β -D-glucopiranosido (24)
(DMSO-d_6 , 200MHz, 100°)

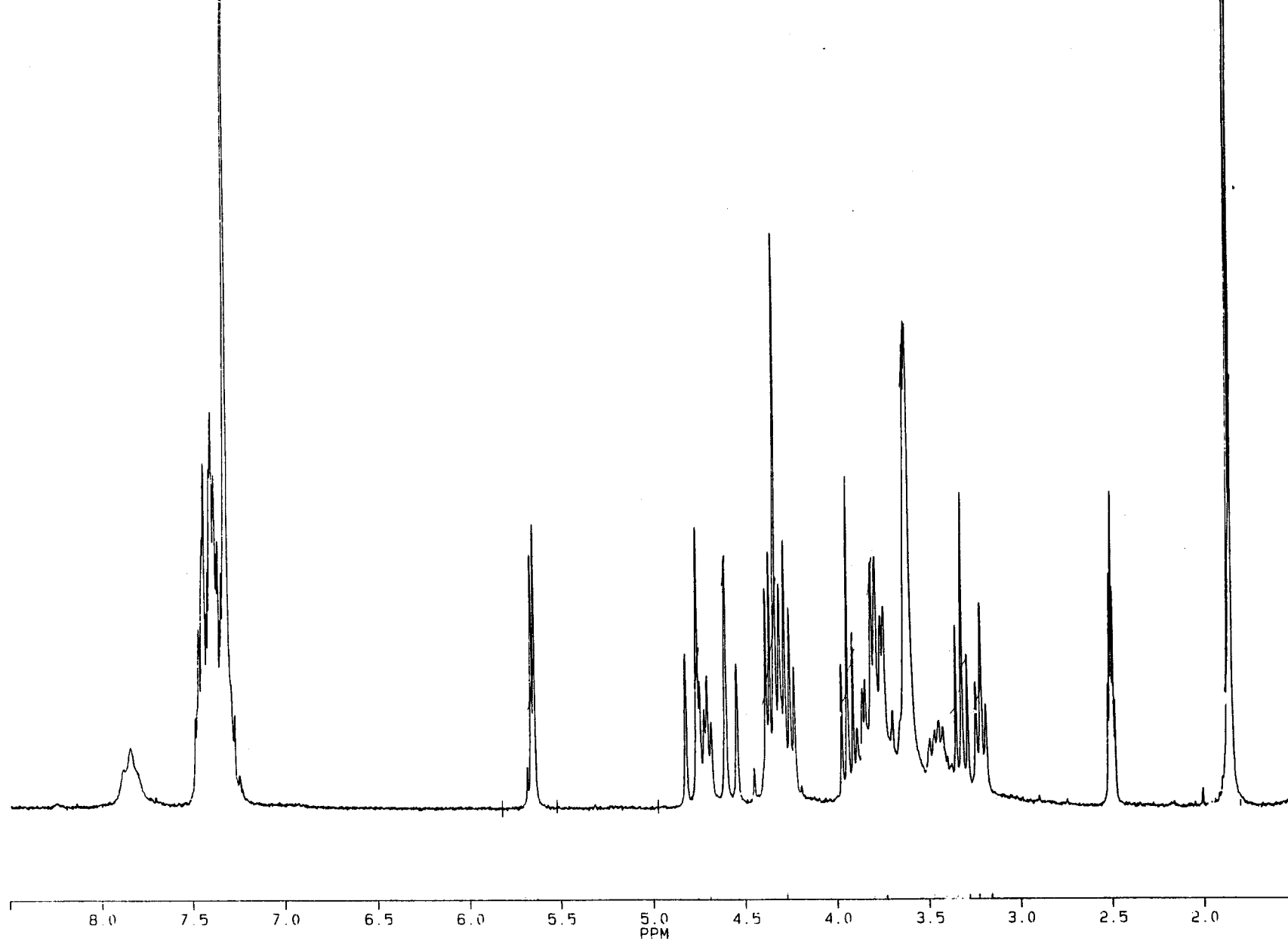


Figura 9H
Espectro de ^1H -RMN del bencil 2-acetamido-4,6-*O*-bencilidén-2-desoxi-3-*O*-[*N,N*-bis(2-cloroetil)aminocarbonilmetil]- β -D-glucopiranosido (27)
(DMSO- d_6 , 200MHz, 80°)

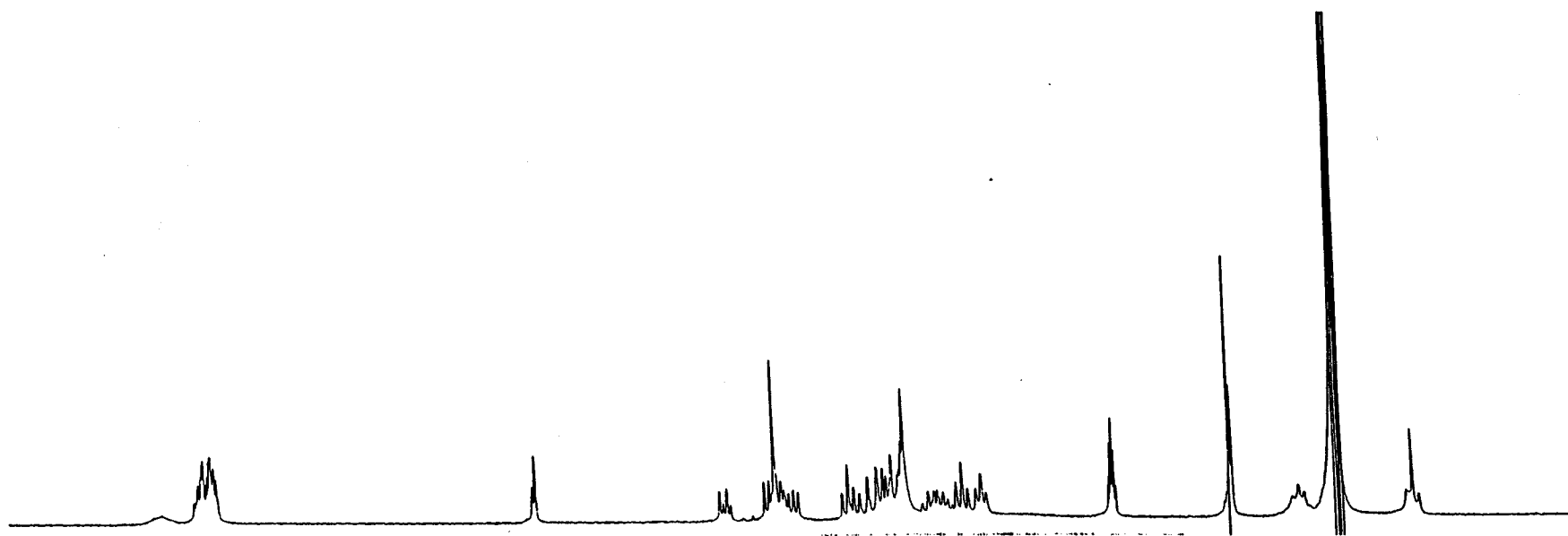


Figura 10H
Espectro de ^1H -RMN del dodecil 2-acetamido-4,6-*O*-bencilidén-2-desoxi-3-*O*-[*N,N*-bis(2-cloroetil)aminocarbonylmetil]-β-D-glucopiranosido (28)
(DMSO- d_6 , 200MHz, 100°)

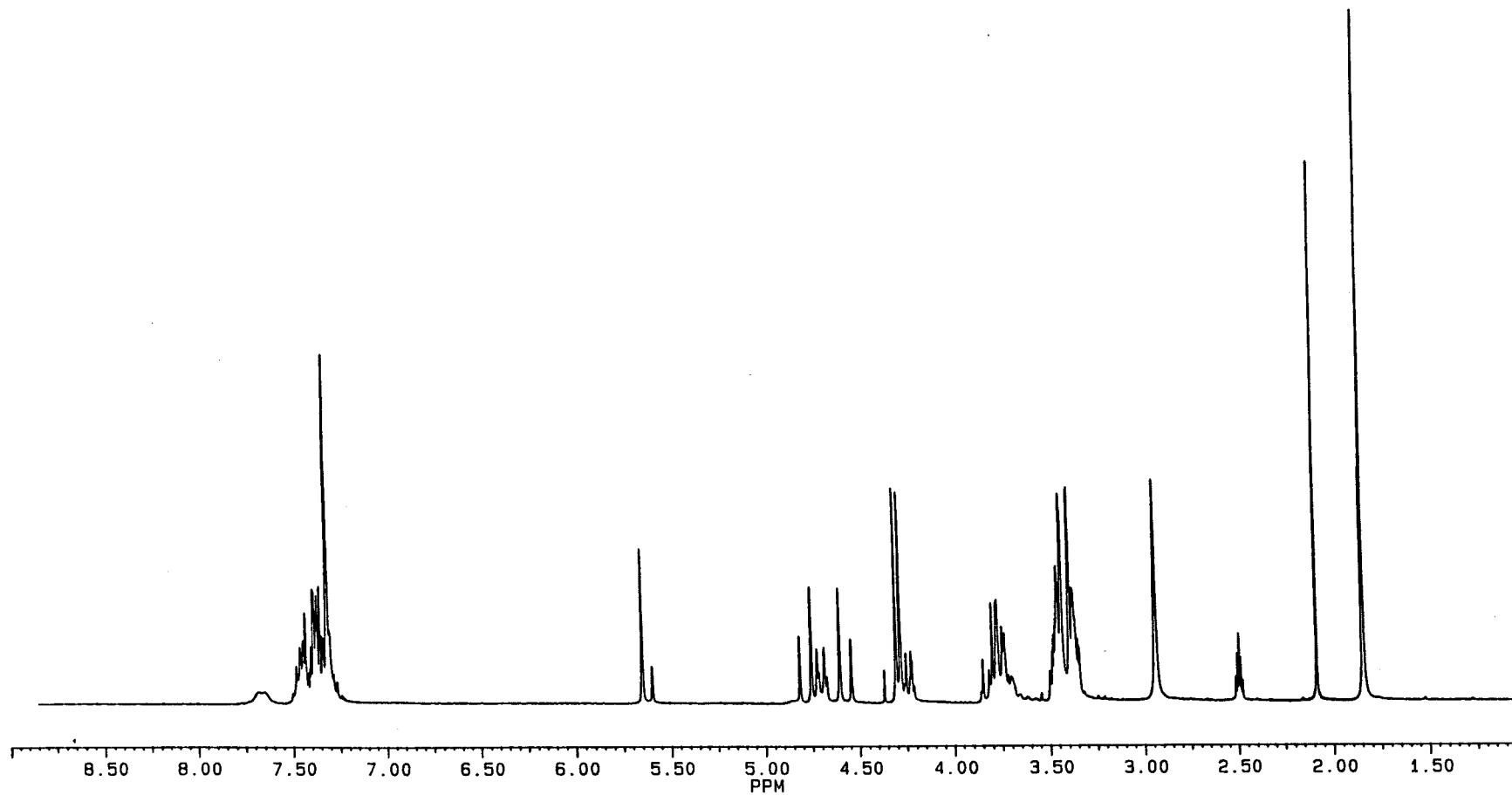


Figura 11H
Espectro de ¹H-RMN del bencil 2-acetamido-4,6-*O*-bencilidén-2-desoxi-3-*O*-(morfolin-1-ilcarbonilmetil)-β-D-glucopiranosido (29)
(DMSO-d₆, 200MHz, 100°)

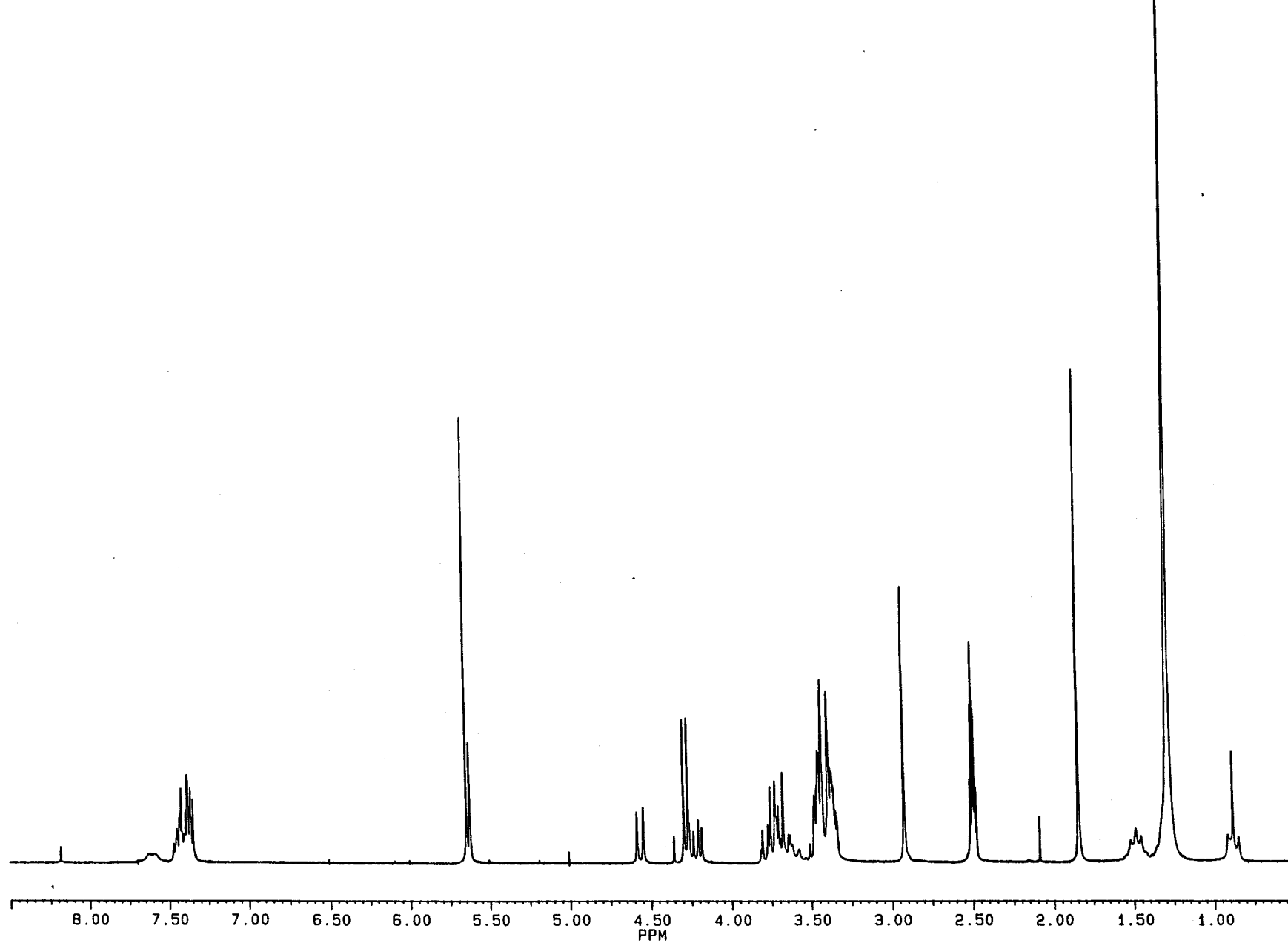


Figura 12H
Espectro de ¹H-RMN del dodecil 2-acetamido-4,6-*O*-bencilidén-2-desoxi-3-*O*-(morfolin-1-ilcarbonilmetil)-β-D-glucopiranosido (30)
(DMSO-d₆, 200MHz, 100°)

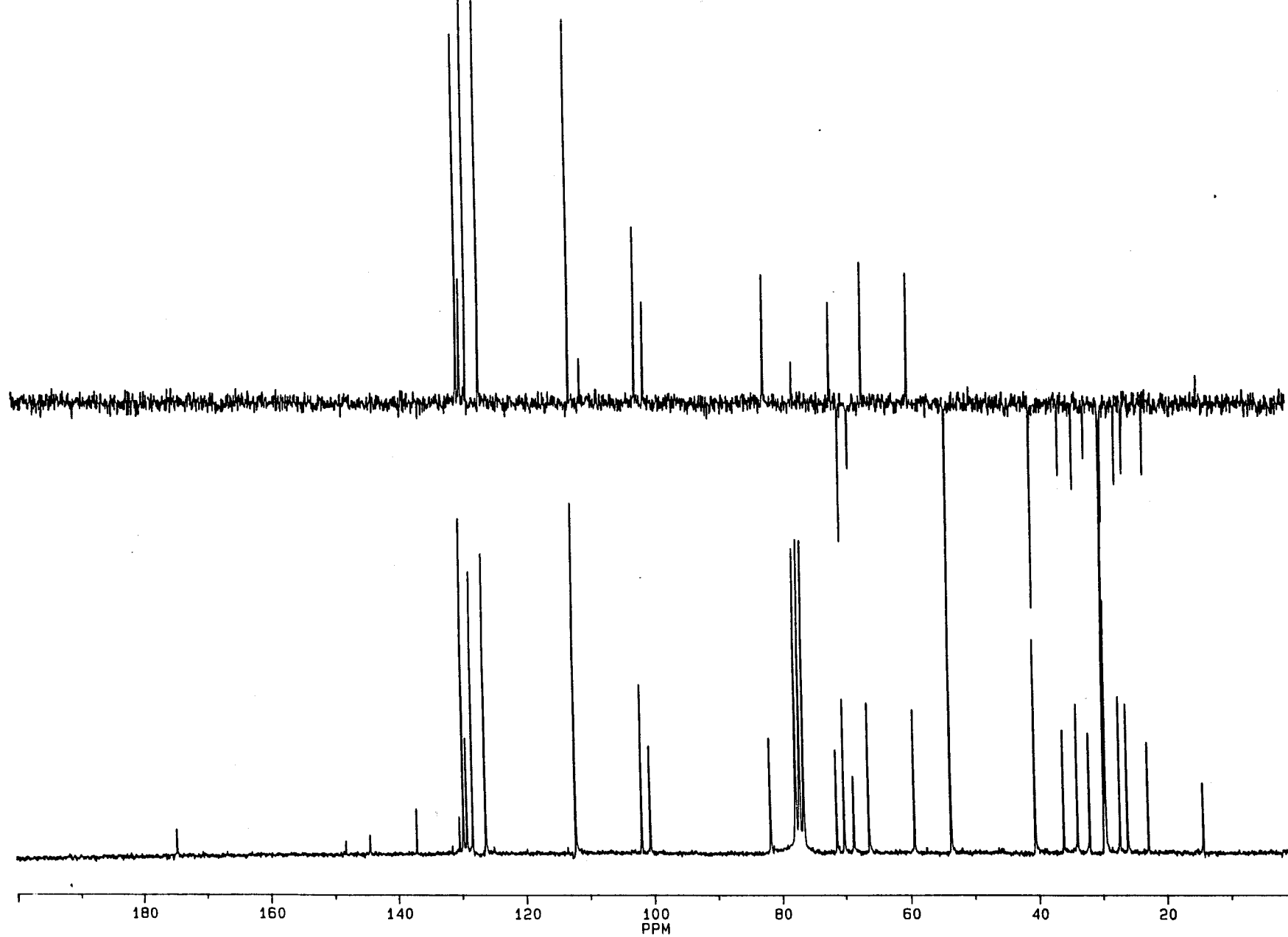


Figura 1C
Espectro de ^{13}C -RMN del dodecil 4,6-*O*-bencilidén-2-clorambucilamido-2-desoxi- β -D-glucopiranosido (17)
(CDCl_3 , 200MHz, 25°). En la parte superior se recoge el registro DEPT realizado

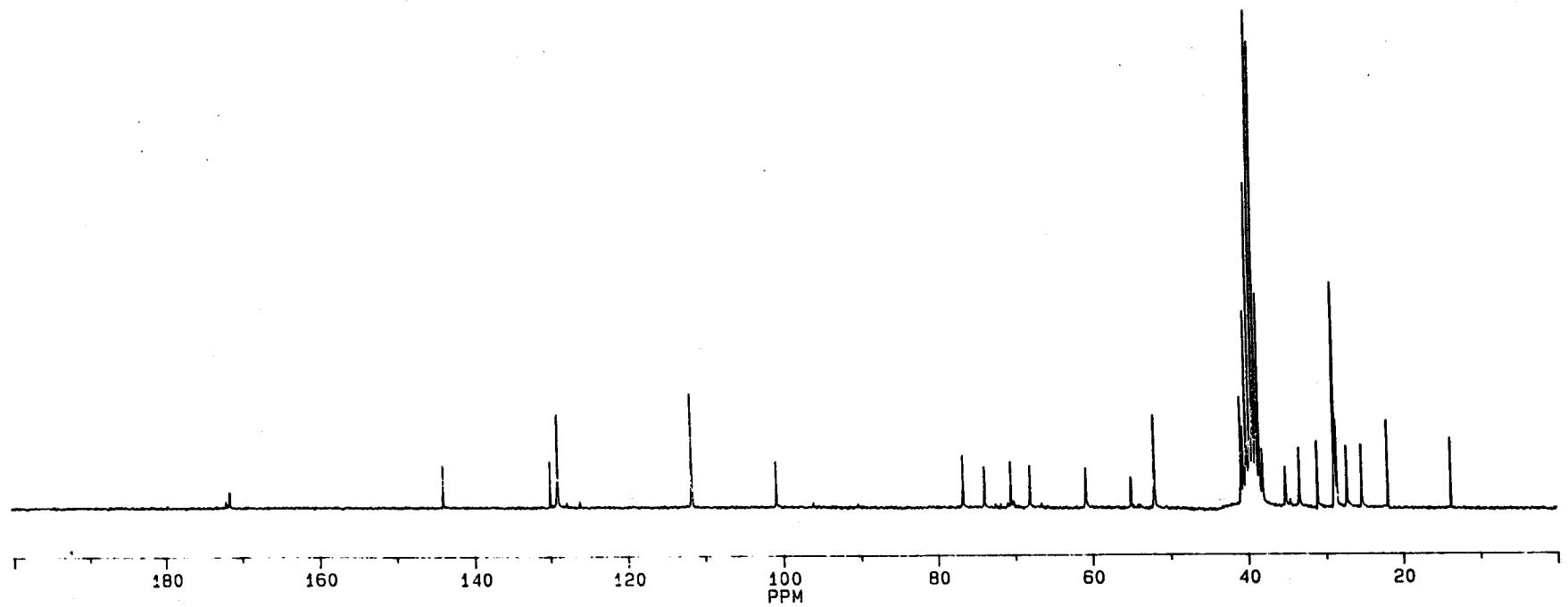


Figura 2C
Espectro de ^{13}C -RMN del dodecil 2-clorambucilamido-2-desoxi- β -D-glucopiranosido (18)
(DMSO-d_6 , 200MHz, 25°)

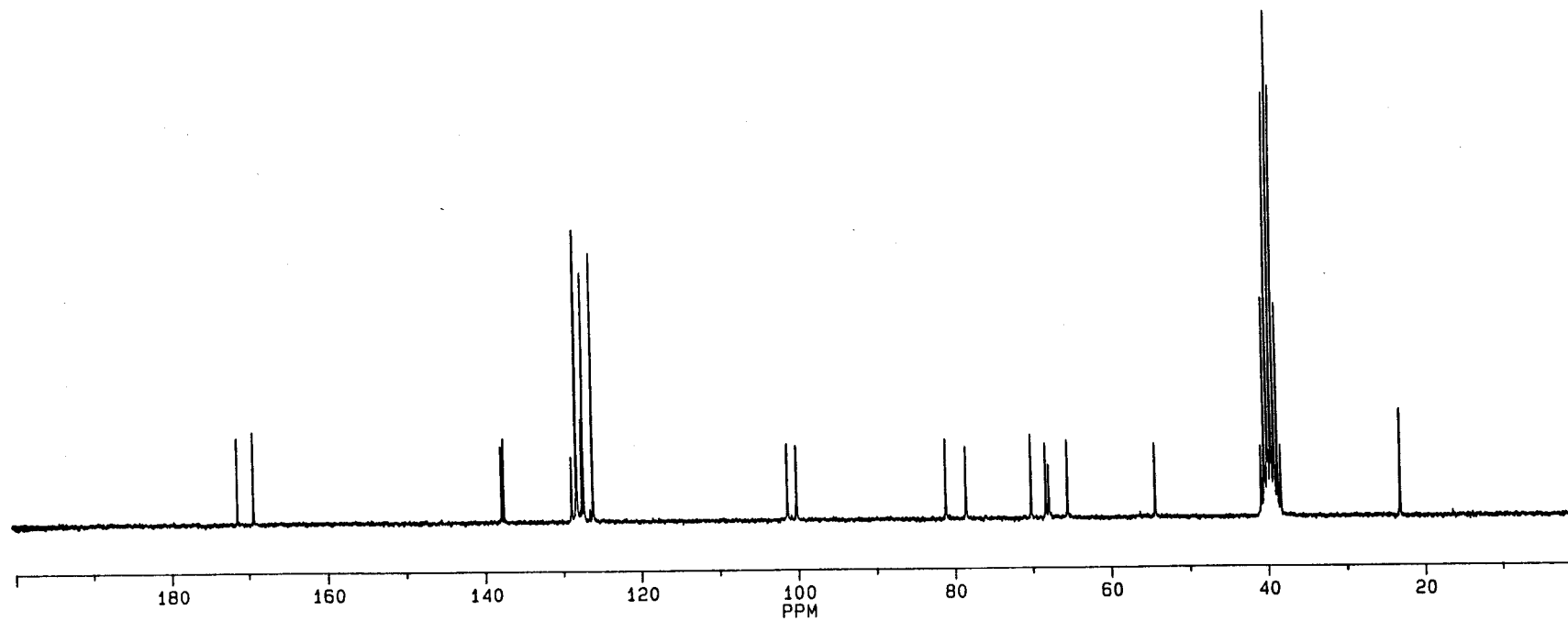


Figura 3C
Espectro de ^{13}C -RMN del bencil 2-acetamido-4,6-*O*-bencilidén-3-*O*-carboximetil-2-desoxi- β -D-glucopiranosido (19)
(DMSO-d_6 , 50MHz, 25°)

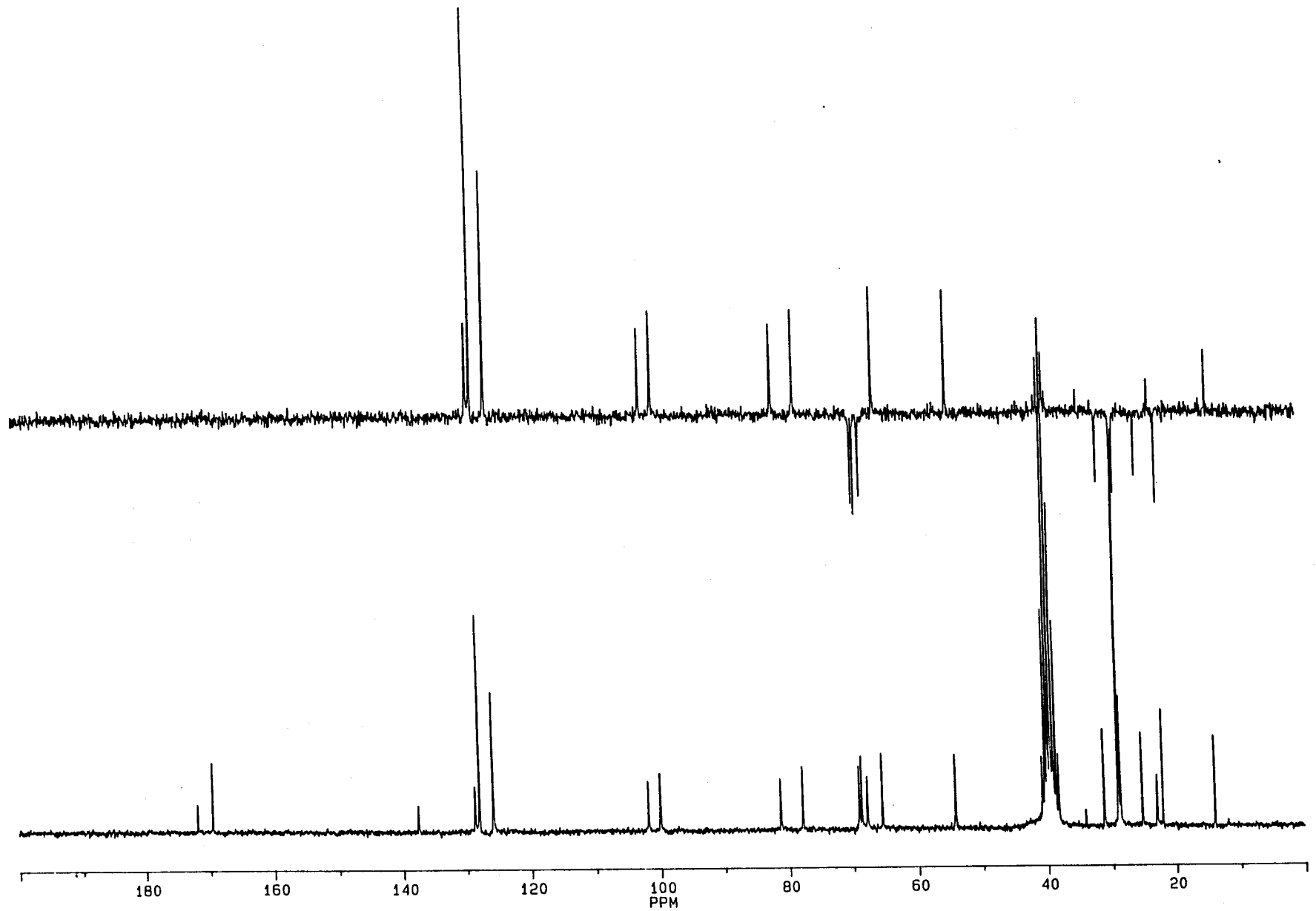


Figura 4C
Espectro de ^{13}C -RMN del dodecil 2-acetamido-4,6-*O*-benzilidén-3-*O*-carboximetil-2-desoxi- β -D-glucopiranosido (20) (DMSO- d_6 , 50MHz, 25°). En la parte superior se recoge el registro DEPT realizado.

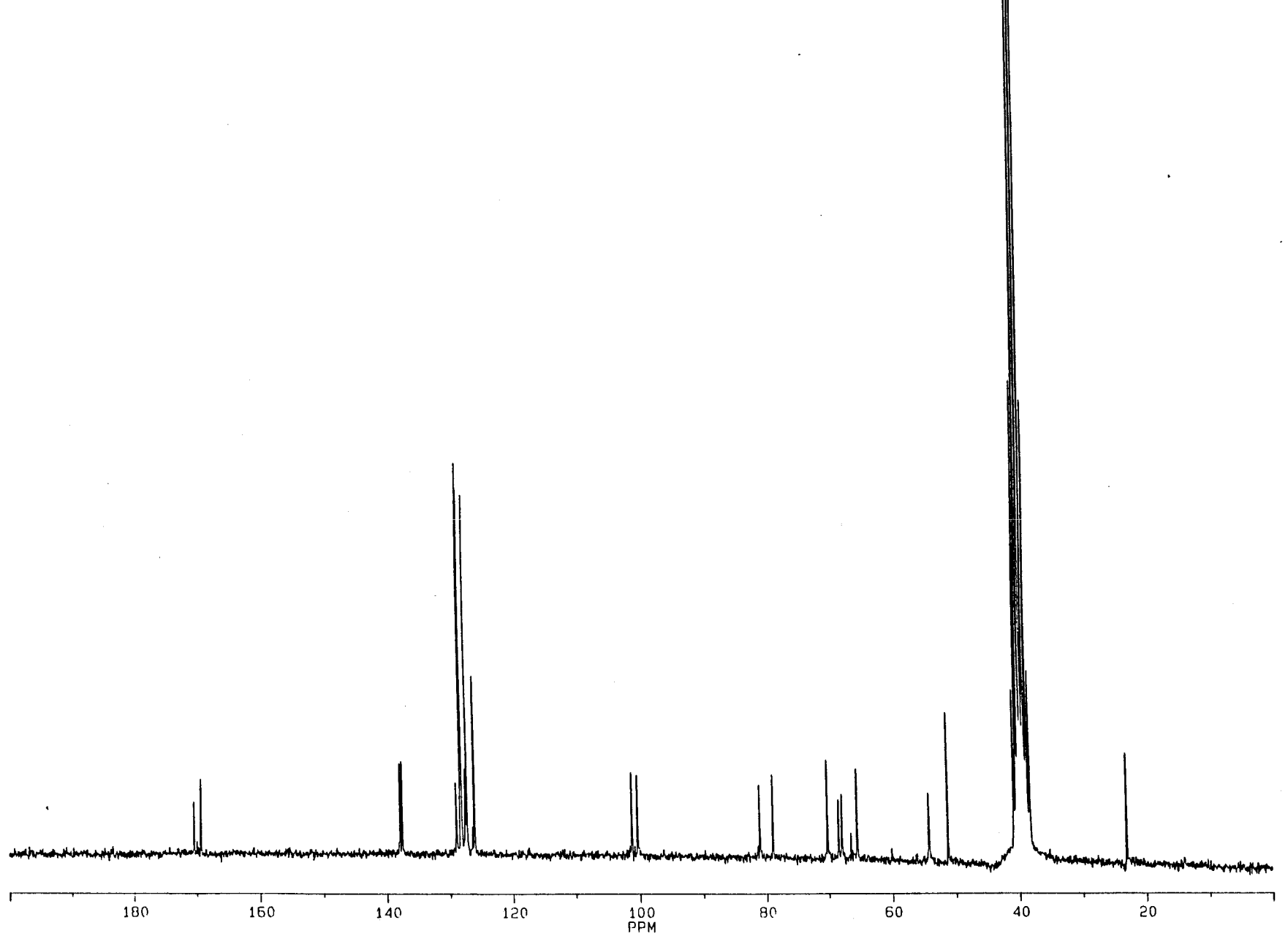


Figura 5C
Espectro de ^{13}C -RMN del bencil 2-acetamido-4,6-*O*-bencilidén-2-desoxi-3-*O*-metoxicarbonilmetil- β -D-glucopiranosido (21)
(DMSO- d_6 , 50MHz, 25°)

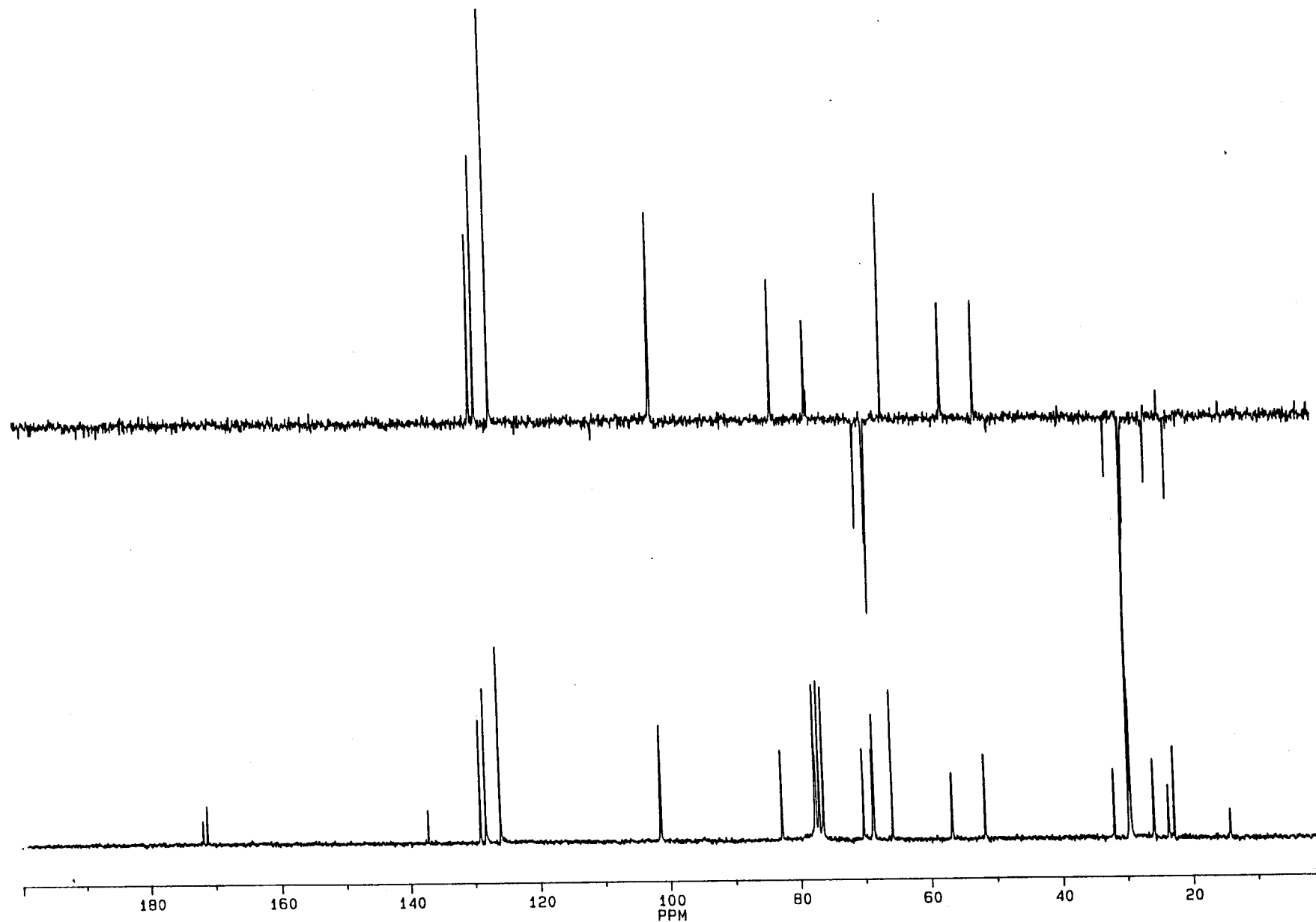


Figura 6C
Espectro de ^{13}C -RMN del dodecil 2-acetamido-4,6-*O*-bencilidén-2-desoxi-3-*O*-metoxicarbonilmetil- β -D-glucopiranosido (22)
(Cl_3CH , 50MHz, 25°). En la parte superior se recoge el registro DEPT realizado

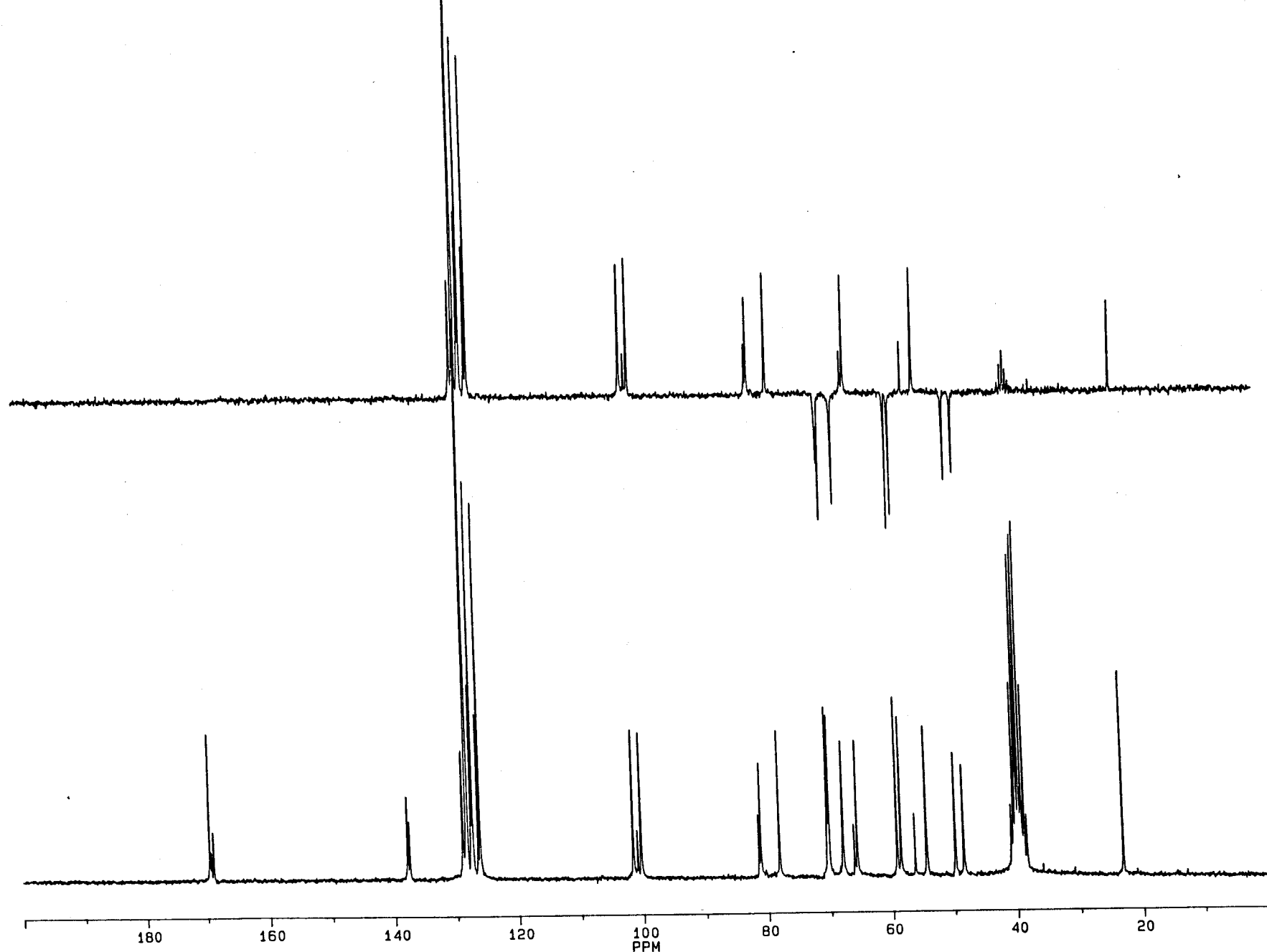


Figura 7C

Espectro de ^{13}C -RMN del bencil 2-acetamido-4,6-*O*-bencilidén-2-desoxi-3-*O*-[*N,N*-bis(2-hidroxi-etil)aminocarbonilmetil]- β -D-glucopiranosido (23) (DMSO- d_6 , 50MHz, 25°). En la parte superior se recoge el registro DEPT realizado

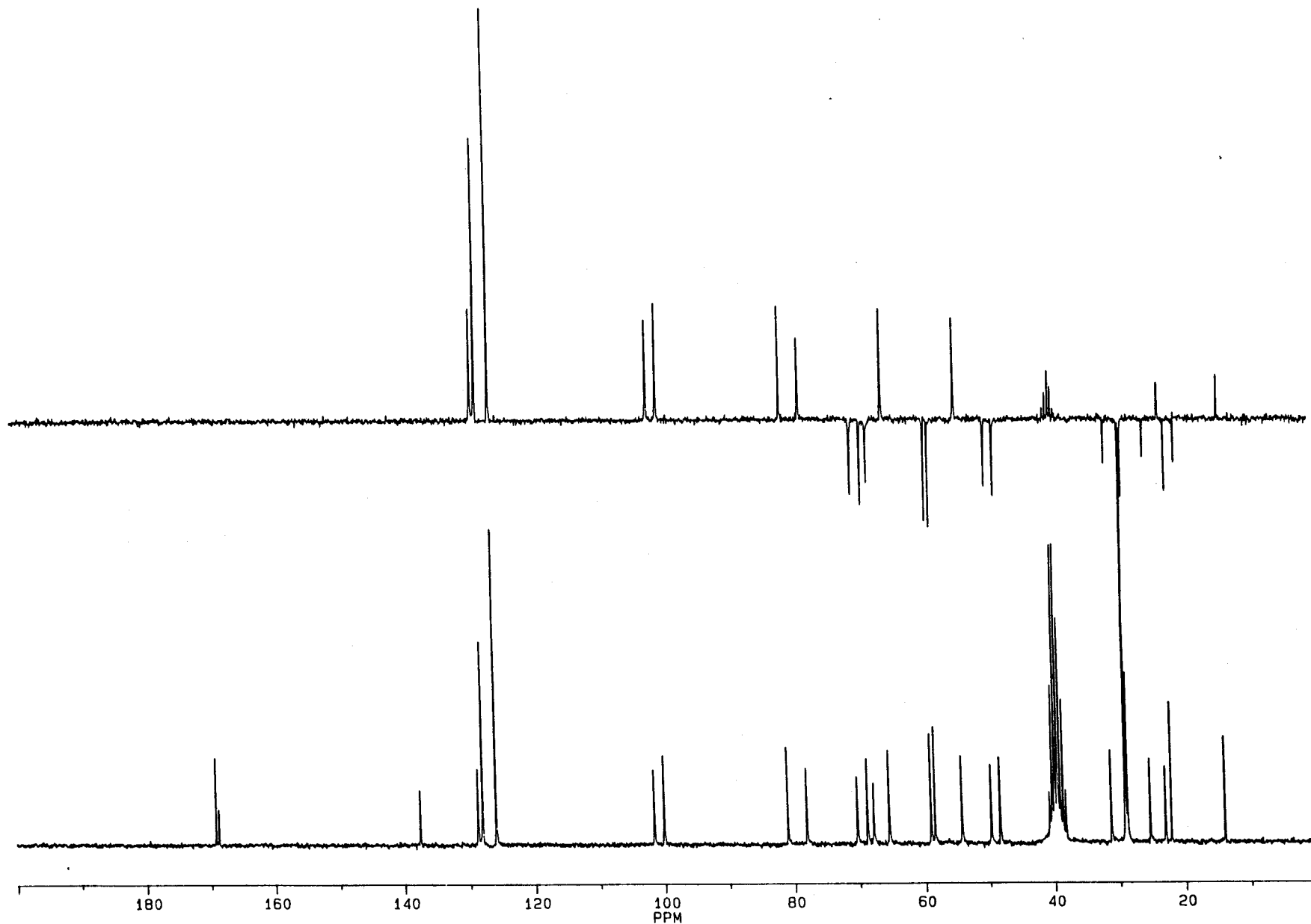


Figura 8C

Espectro de ^{13}C -RMN del dodecil 2-acetamido-4,6-*O*-bencilidén-2-desoxi-3-*O*-[*N,N*-bis(2-hidroxietyl)aminocarbonylmetyl]- β -D-glucopiranosido (24) (DMSO- d_6 , 50MHz, 25°). En la parte superior se recoge el registro DEPT realizado

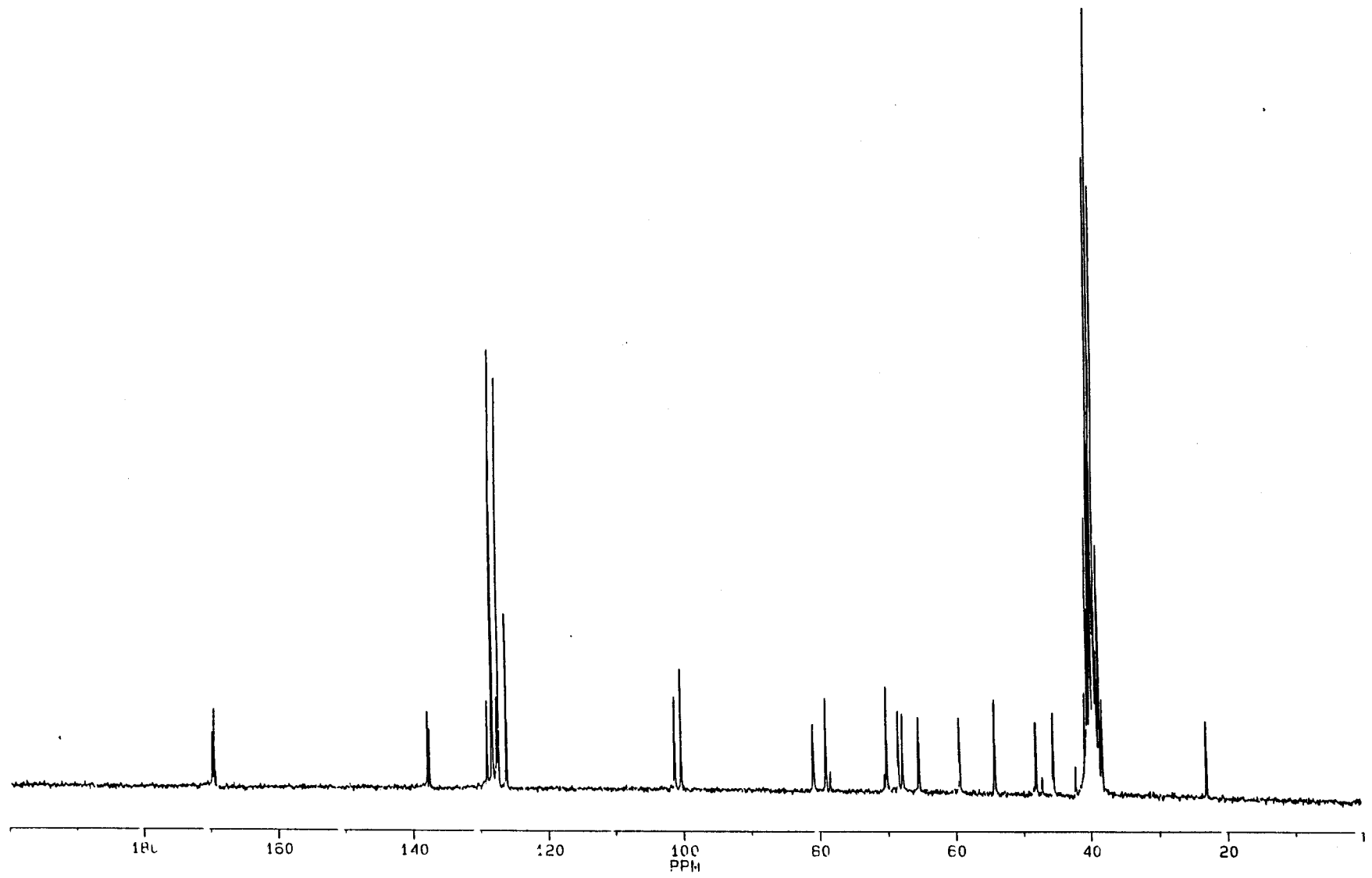


Figura 9C
Espectro de ^{13}C -RMN del bencil 2-acetamido-4,6-*O*-bencilidén-2-desoxi-3-*O*-[*N,N*-bis(2-cloroetil)aminocarbonilmetil]- β -D-glucopiranosido (27)
(DMSO- d_6 , 50MHz, 25°)

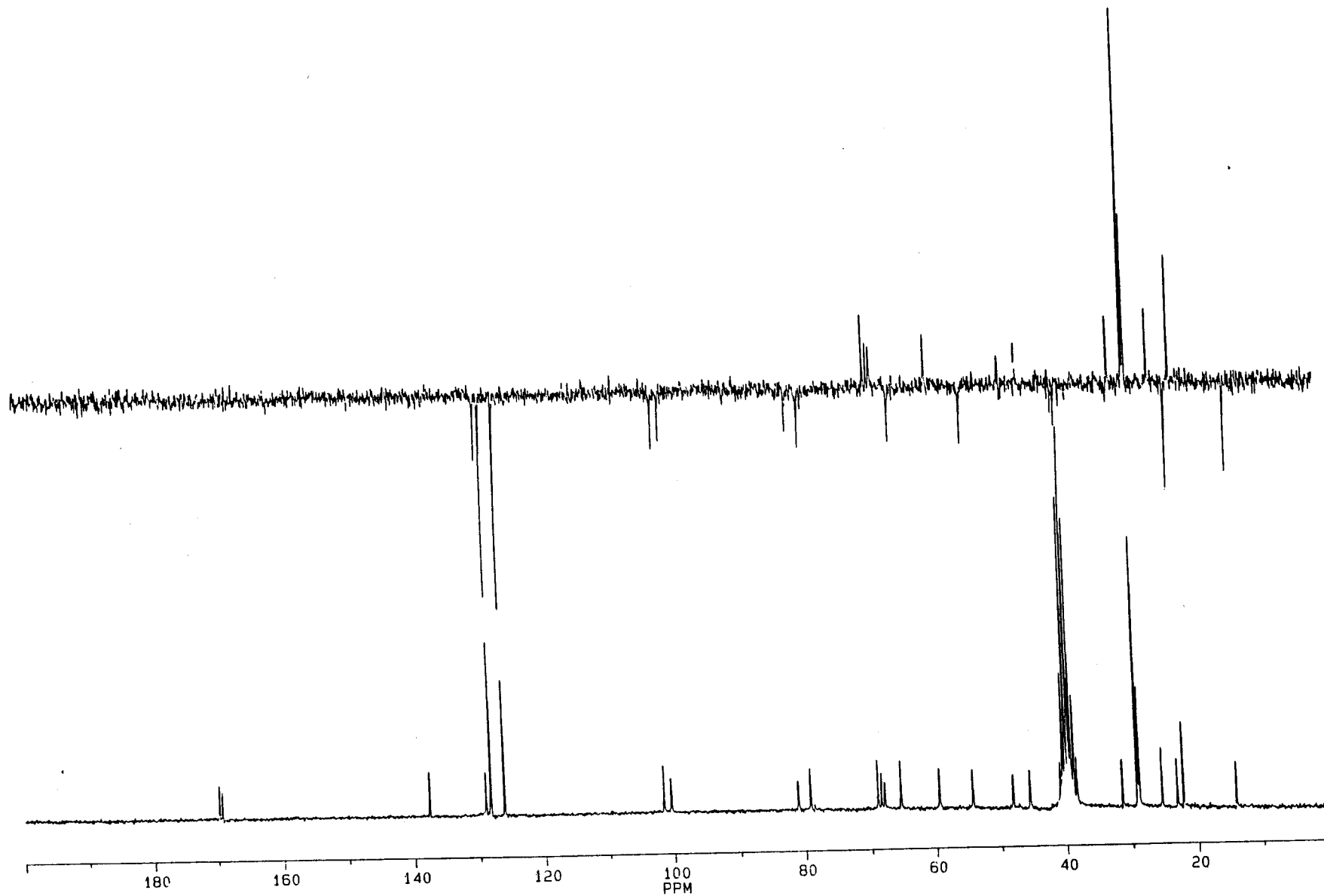


Figura 10C

Espectro de ^{13}C -RMN del dodecil 2-acetamido-4,6-*O*-benzilidén-2-desoxi-3-*O*-[*N,N*-bis(2-cloroetil)aminocarbonilmetil]- β -D-glucopiranosido (28) (DMSO- d_6 , 50MHz, 25°). En la parte superior se recoge el registro DEPT realizado

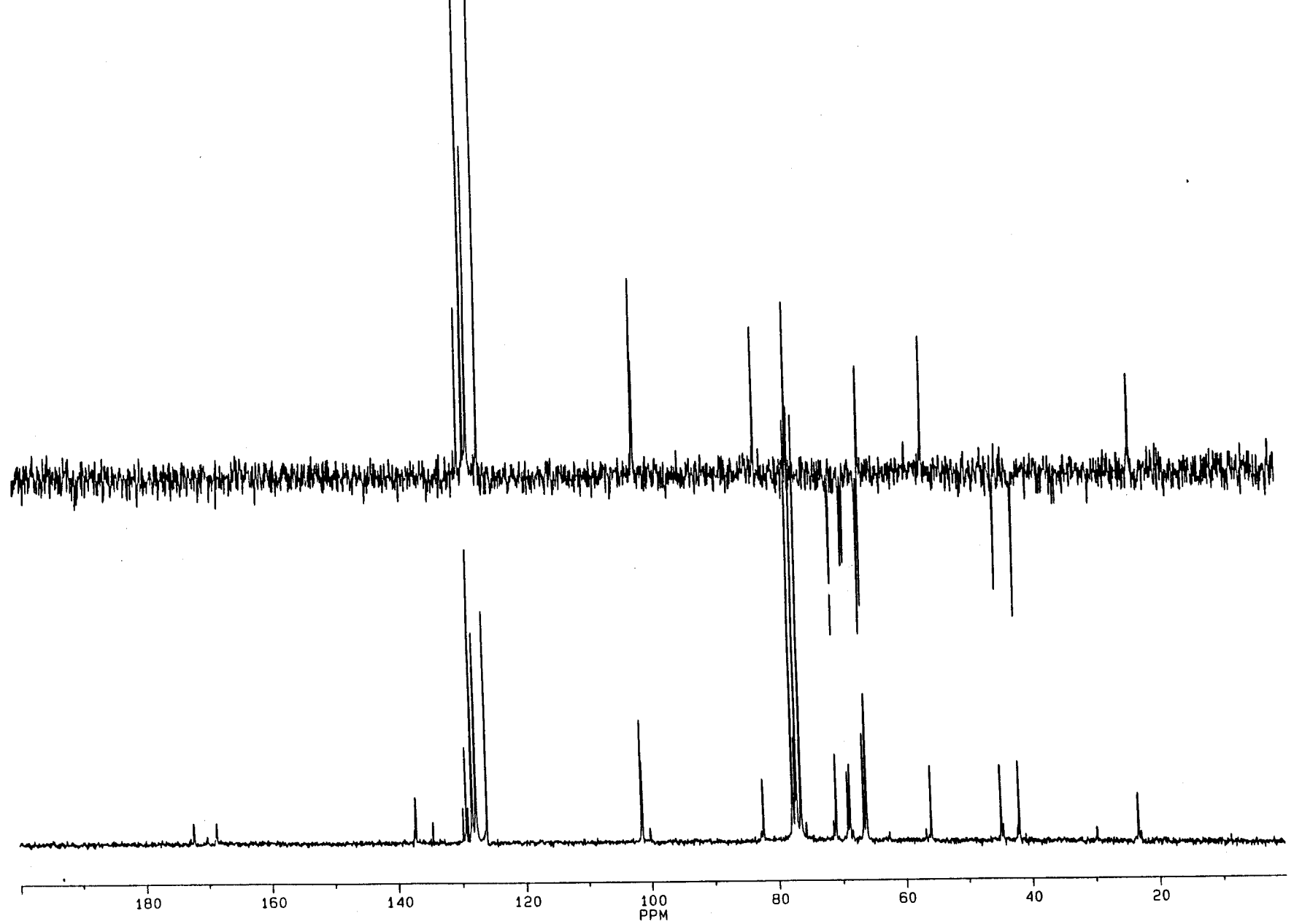


Figura 11C
Espectro de ^{13}C -RMN del bencil 2-acetamido-4,6-*O*-bencilidén-2-desoxi-3-*O*-(morfolin-1-ilcarbonilmetil)- β -D-glucopiranosido (29)
(DMSO- d_6 , 50MHz, 25°). En la parte superior se recoge el registro DEPT realizado

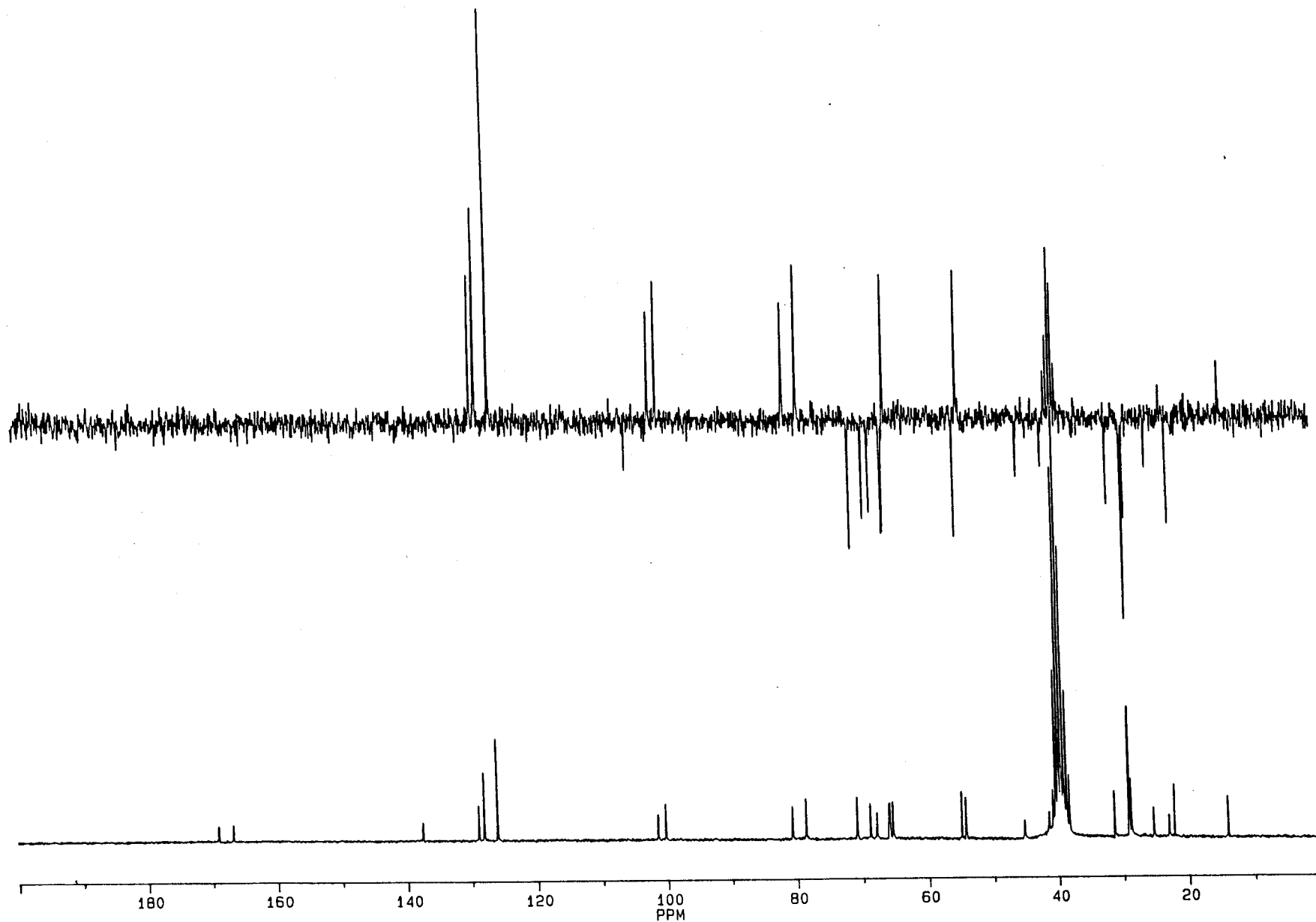


Figura 12C
Espectro de ^{13}C -RMN del dodecil 2-acetamido-4,6-*O*-bencilidén-2-desoxi-3-*O*-(morfolin-1-ilcarbonylmetil)- β -D-glucopiranosido (30) (DMSO- d_6 , 50MHz, 25°). En la parte superior se recoge el registro DEPT realizado

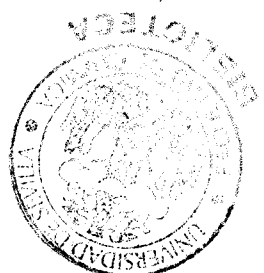
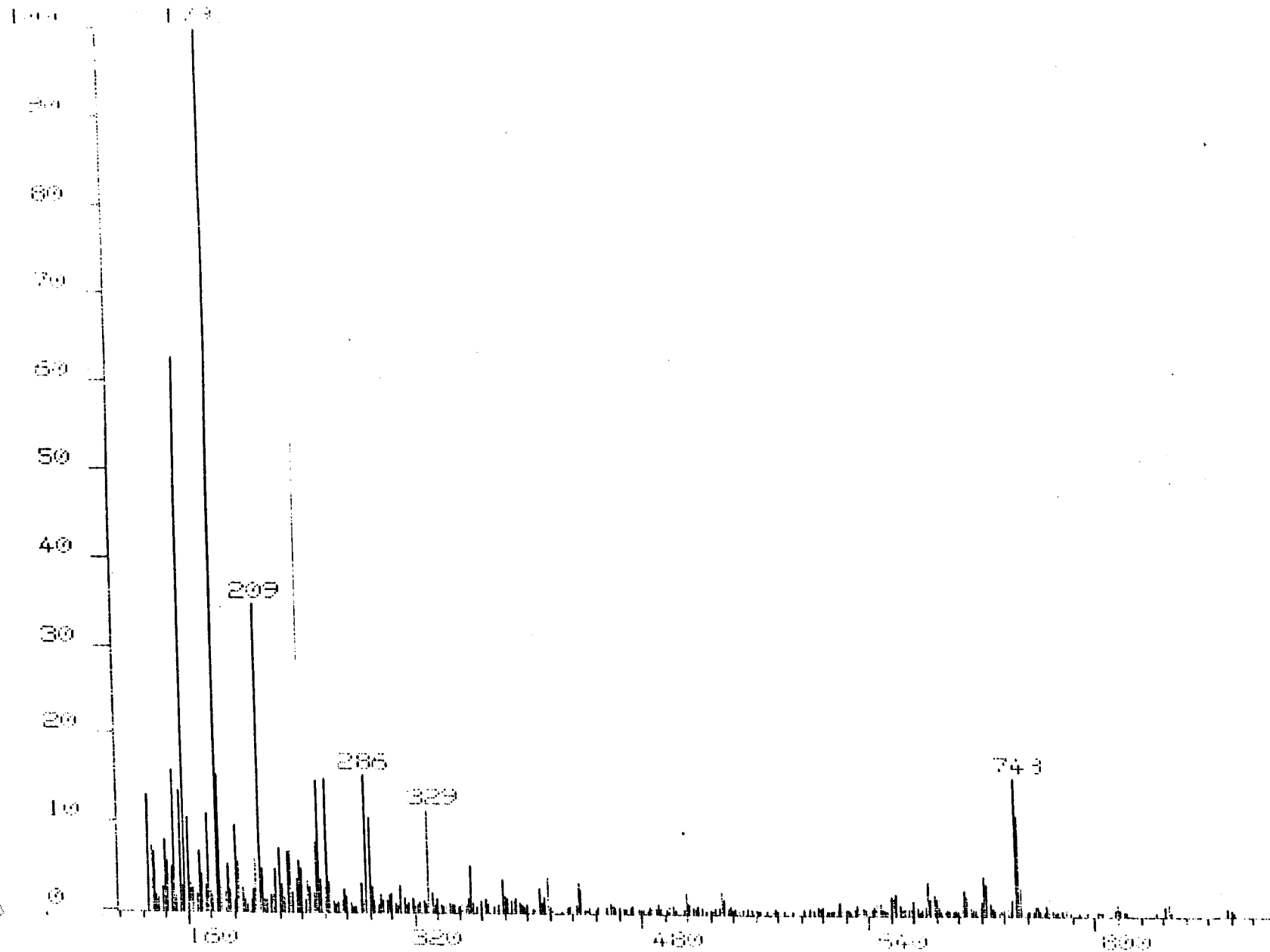


Figura 1F
Espectro de masas (FAB) del dodecil 4,6-*O*-bencilidén-2-clorambucilamido-2-desoxi- β -D-glucopiranosido (17)

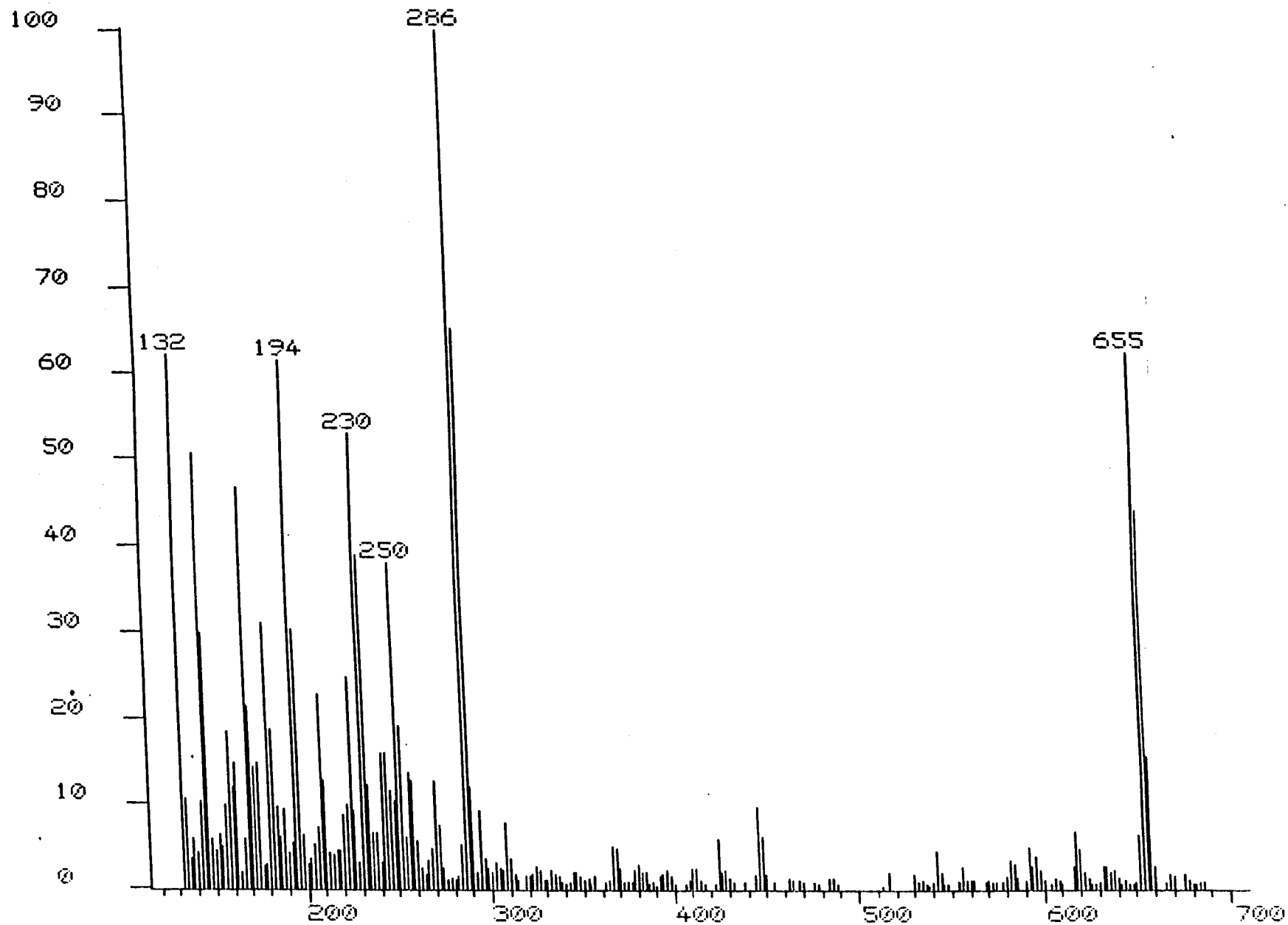


Figura 2F
Espectro de masas (FAB) del dodecil 2-clorambucilamido-2-desoxi- β -D-glucopiranosido (18)

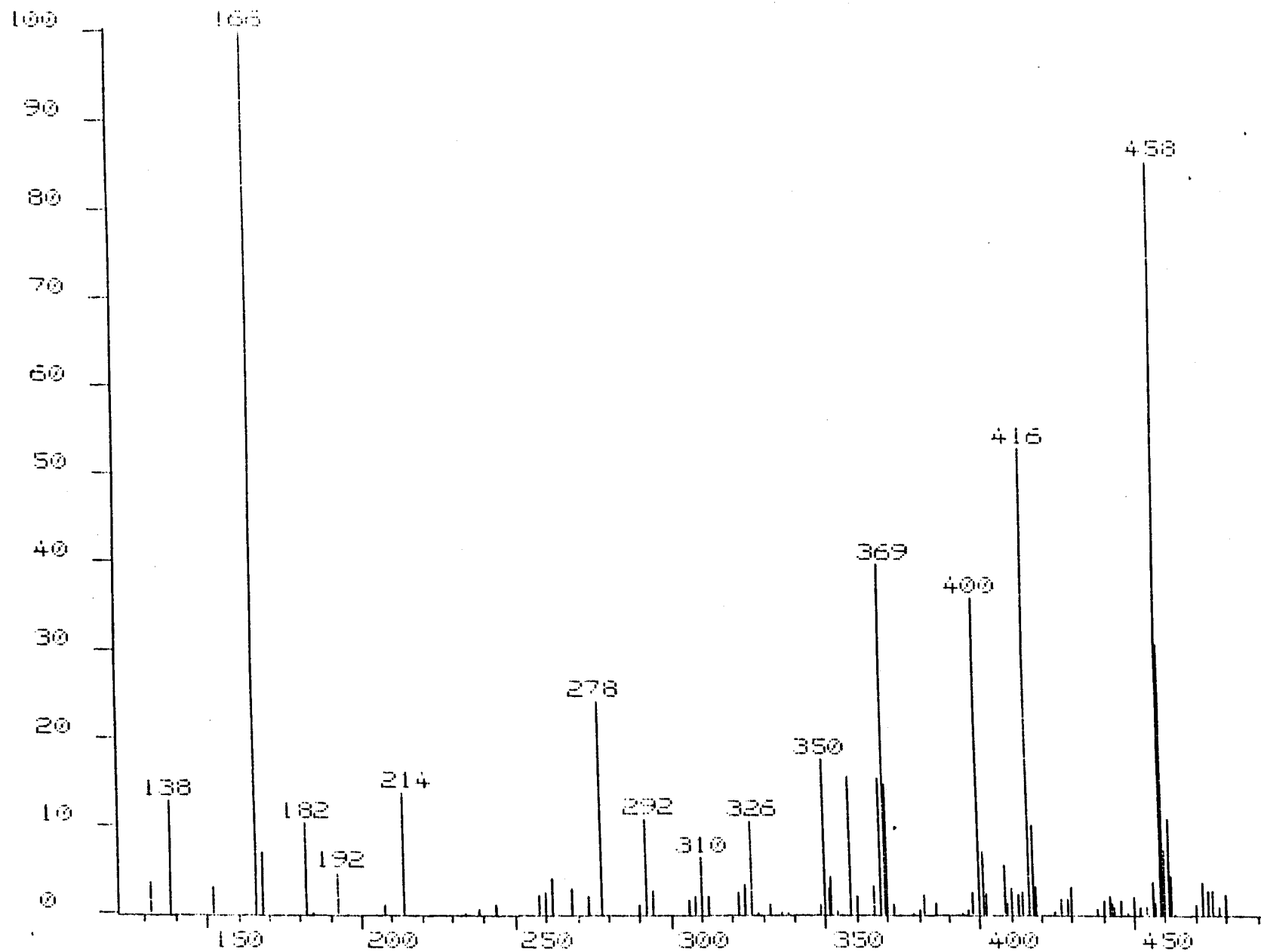


Figura 3F
Espectro de masas (FAB) del bencil 2-acetamido-4,6-*O*-bencilidén-3-*O*-carboximetil-2-desoxi- β -D-glucopiranosido (19)

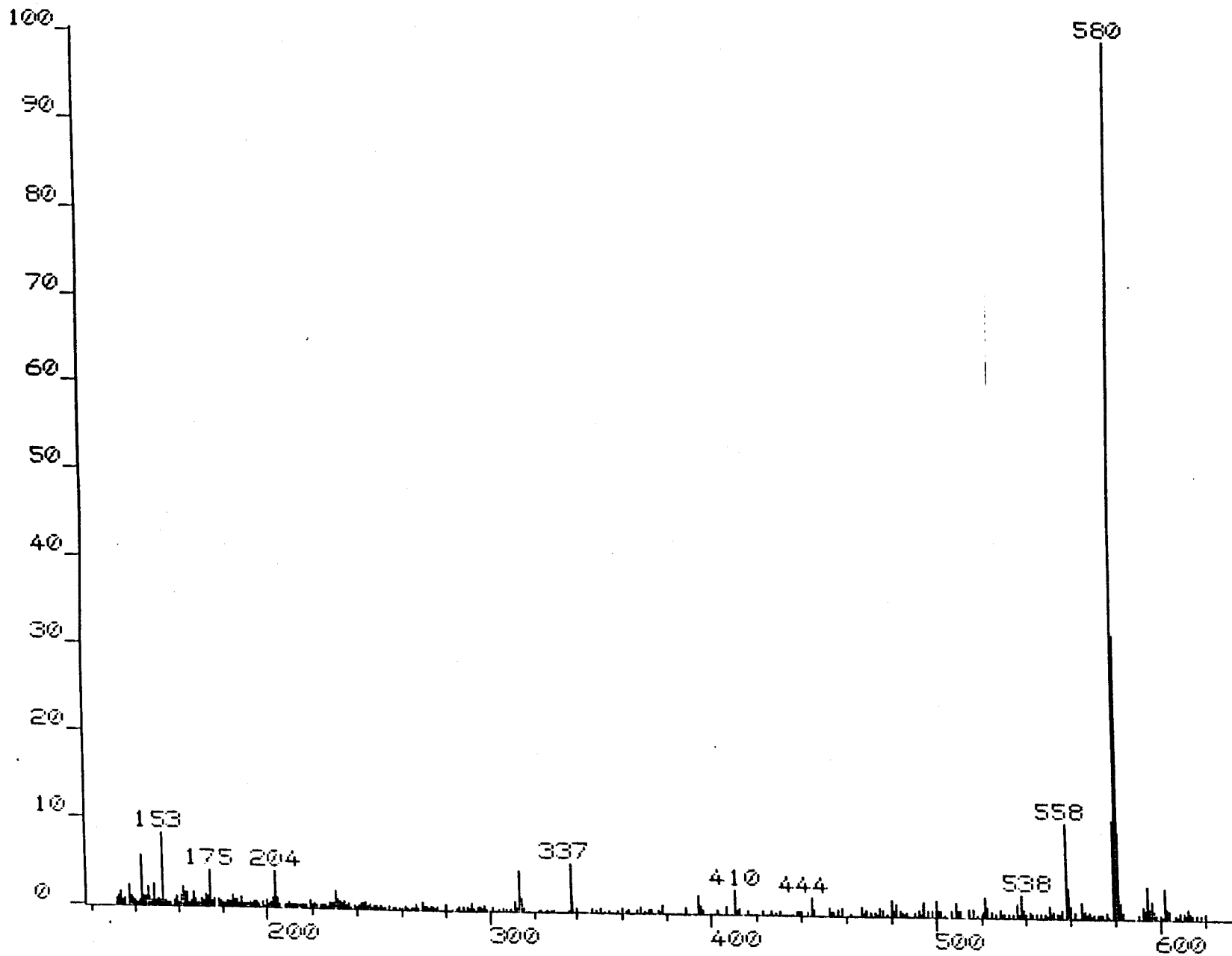


Figura 4F
Espectro de masas (FAB) del dodecil 2-acetamido-4,6-*O*-benzilidén-3-*O*-carboximetil-2-desoxi- β -D-glucopiranosido (20)

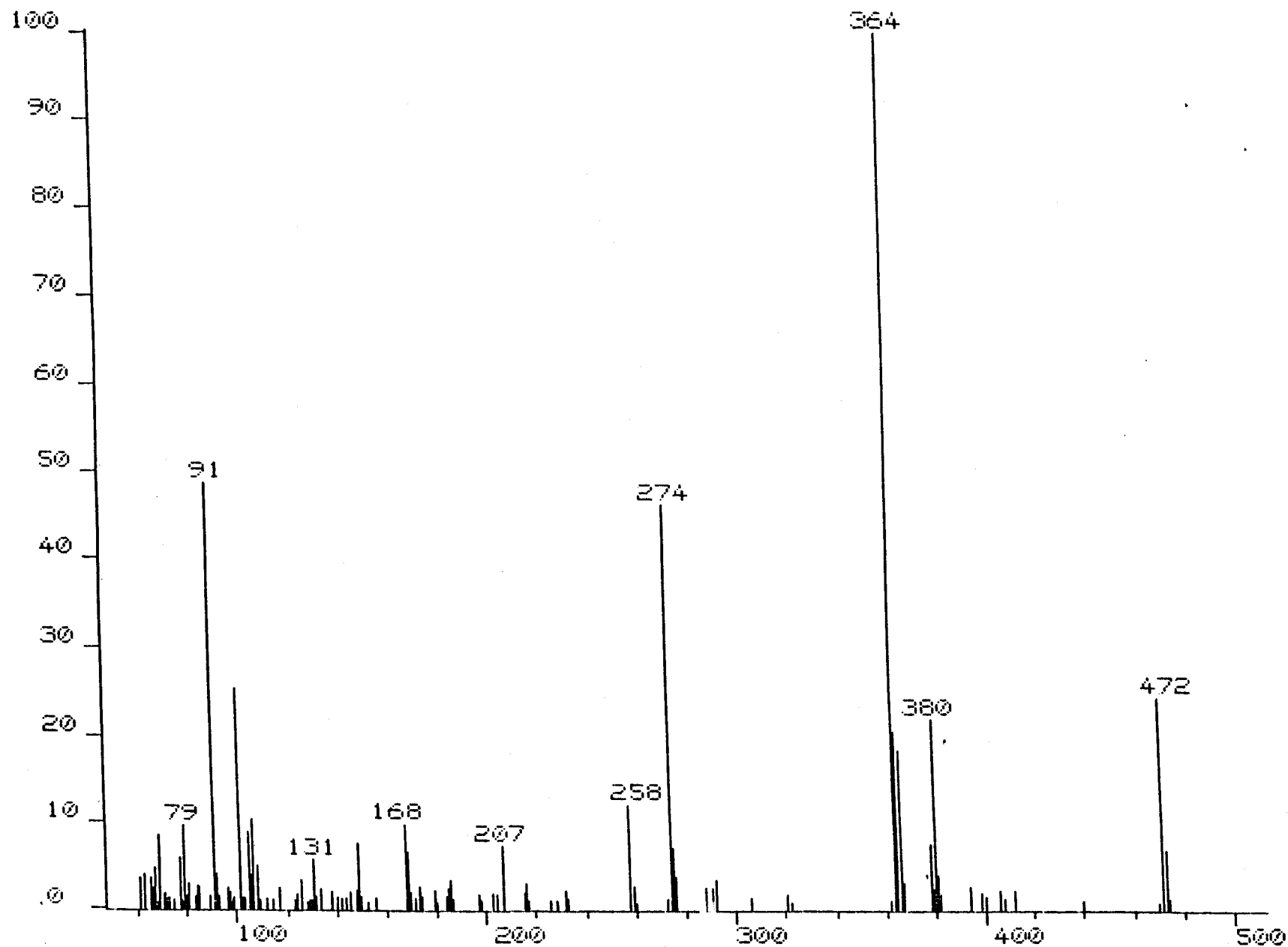


Figura 5F

Espectro de masas (CI) del bencil 2-acetamido-4,6-O-bencilidén-2-desoxi-3-O-metoxicarbonilmetil-β-D-glucopiranosido (21)

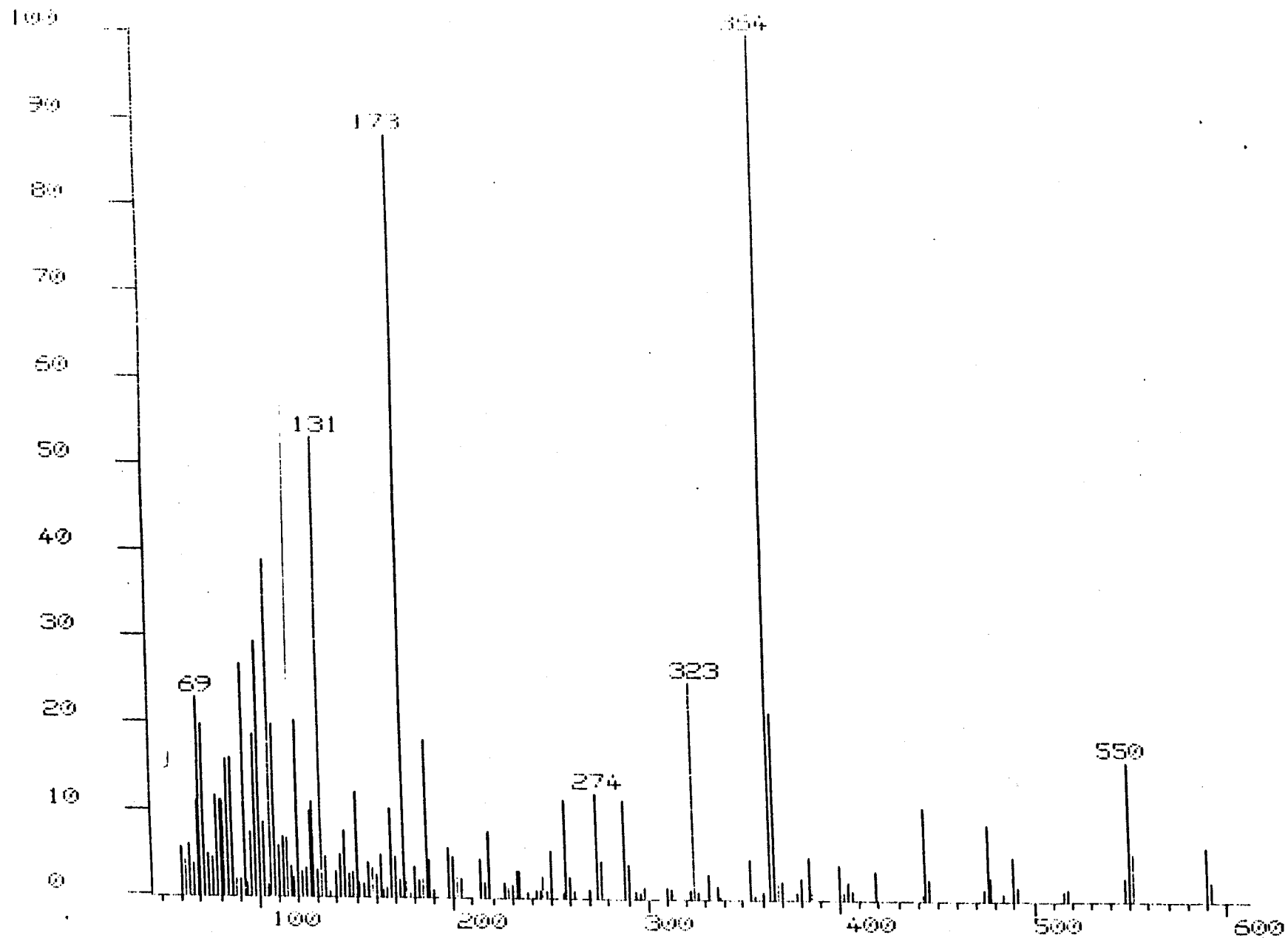


Figura 6F

Espectro de masas (CI) del dodecil 2-acetamido-4,6-*O*-bencilidén-2-desoxi-3-*O*-metoxicarbonilmetil-β-D-glucopiranosido (22)

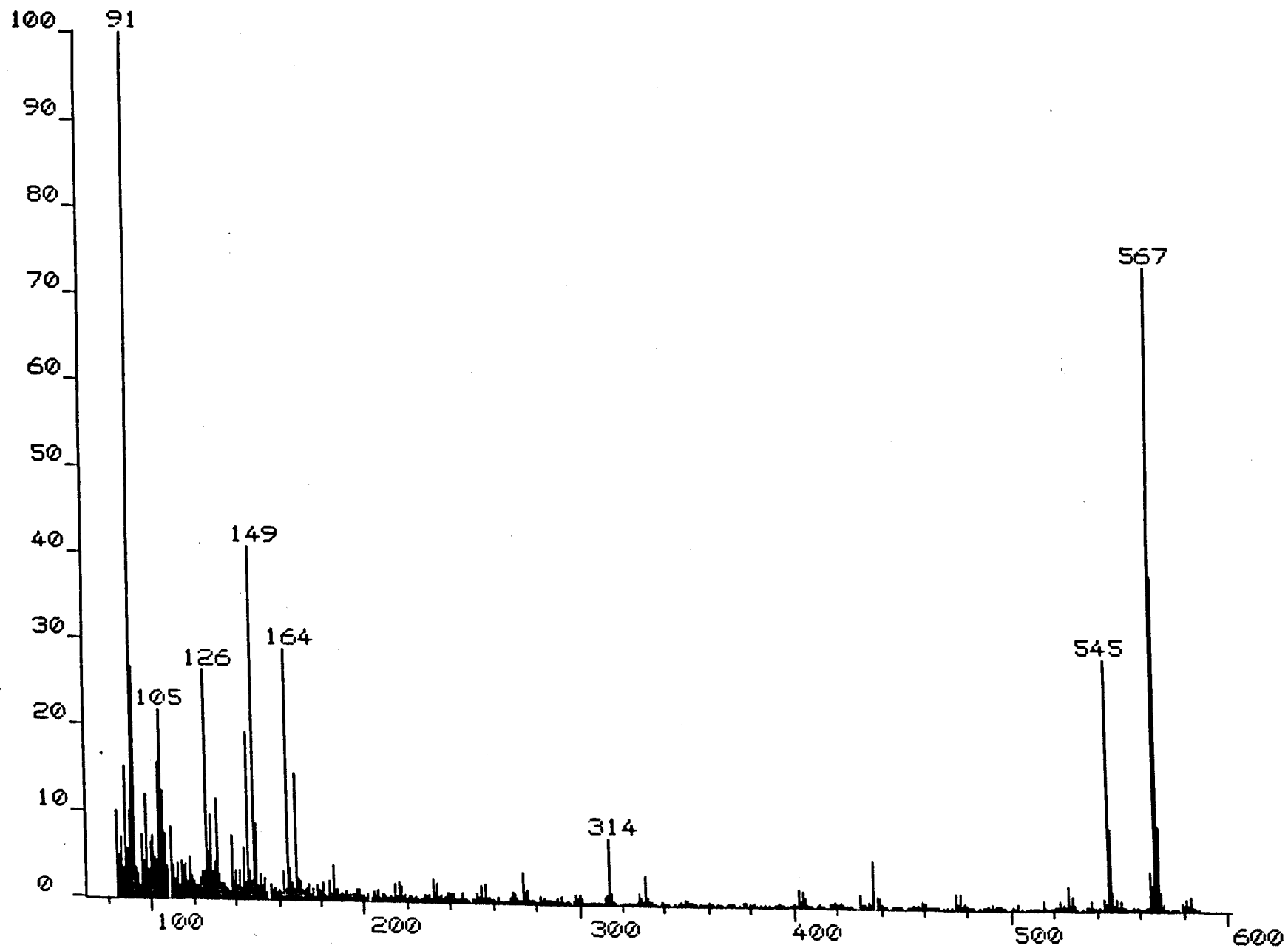


Figura 7F

Espectro de masas (FAB) del bencil 2-acetamido-4,6-O-bencilidén-2-desoxi-3-O-[N,N-bis(2-hidroxietyl)aminocarbonilmetil]-β-D-glucopiranosido (23)

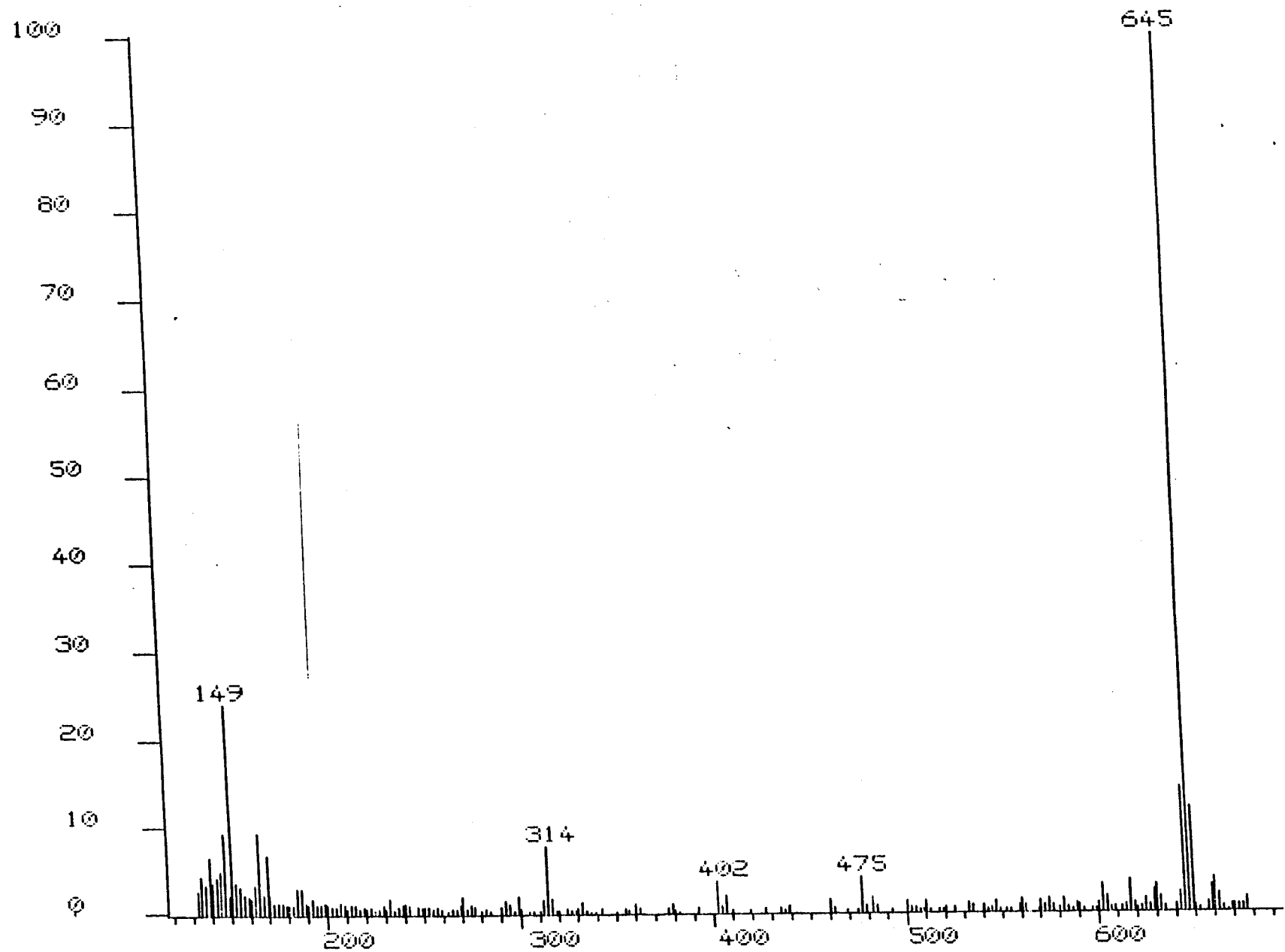


Figura 8F

Espectro de masas (FAB) del dodecil 2-acetamido-4,6-*O*-bencilidén-2-desoxi-3-*O*-[*N,N*-bis(2-hidroxietyl)aminocarbonylmetyl]-β-*D*-glucopiranosido (24)

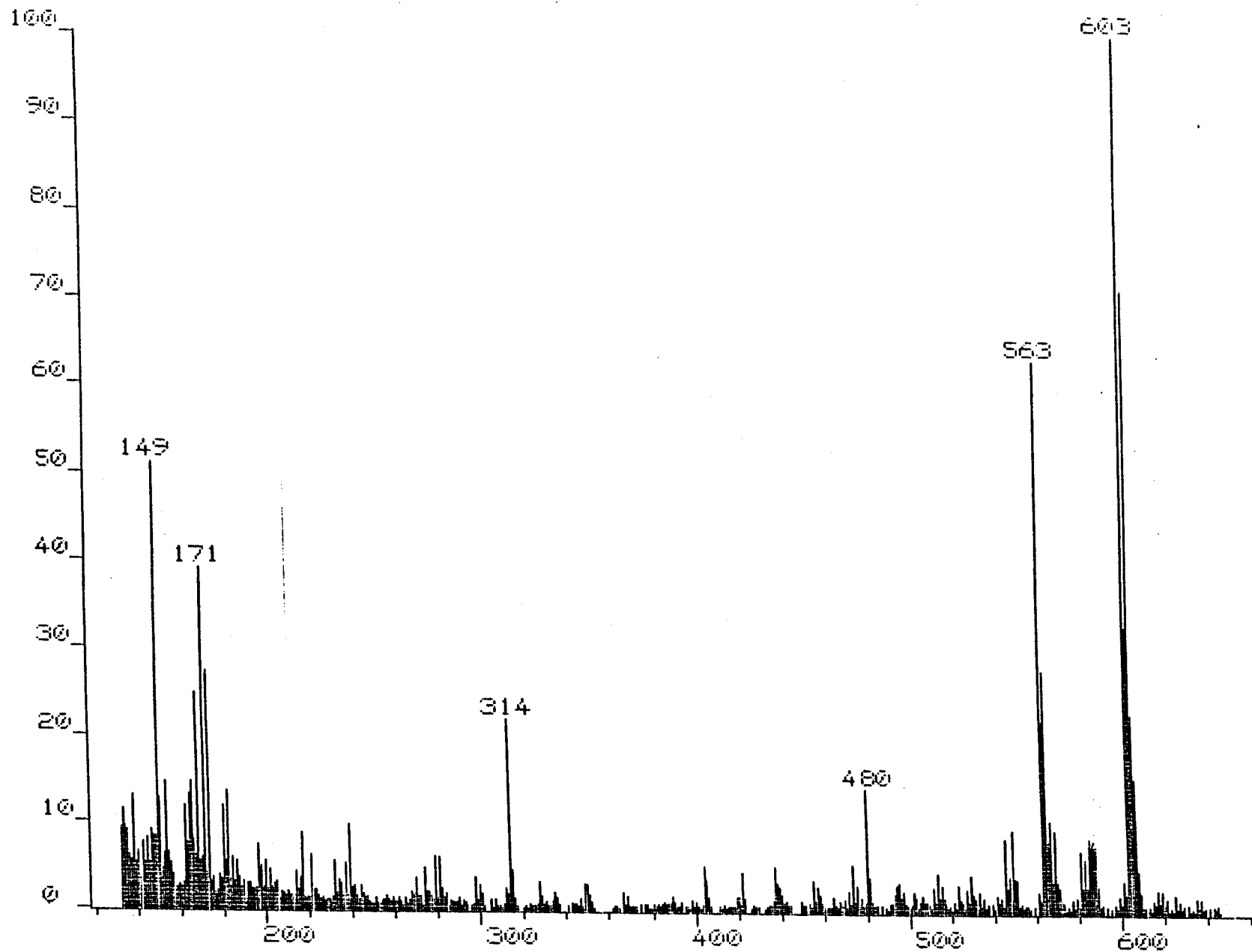


Figura 9F

Espectro de masas (FAB) del bencil 2-acetamido-4,6-O-bencilidén-2-desoxi-3-O-[N,N-bis(2-cloroetil)aminocarbonilmetil]-β-D-glucopiranosido (27)

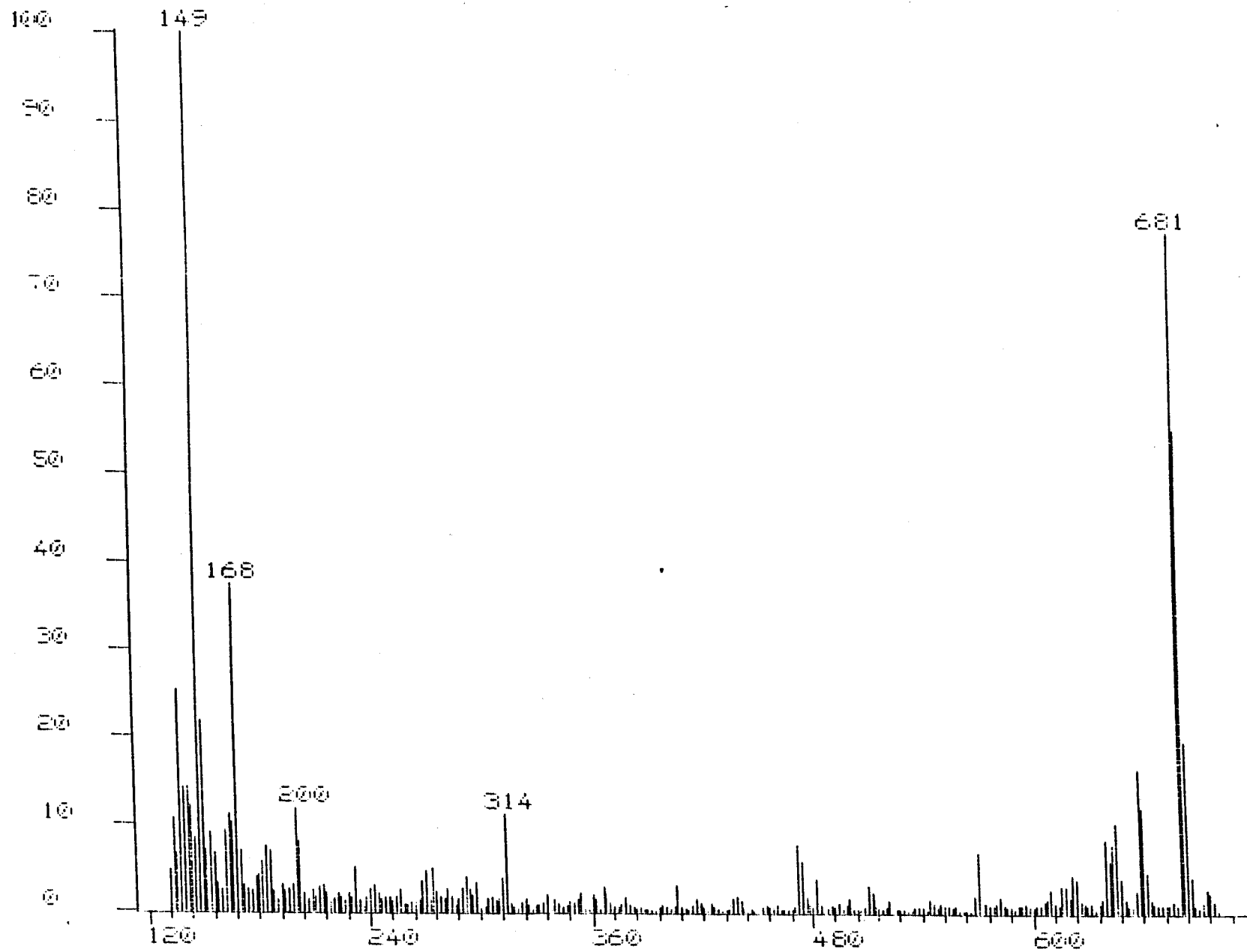


Figura 10F

Espectro de masas (FAB) del dodecil 2-acetamido-4,6-O-bencilidén-2-desoxi-3-O-[N,N-bis(2-cloroetil)aminocarbonilmetil]-β-D-glucopiranosido (28)

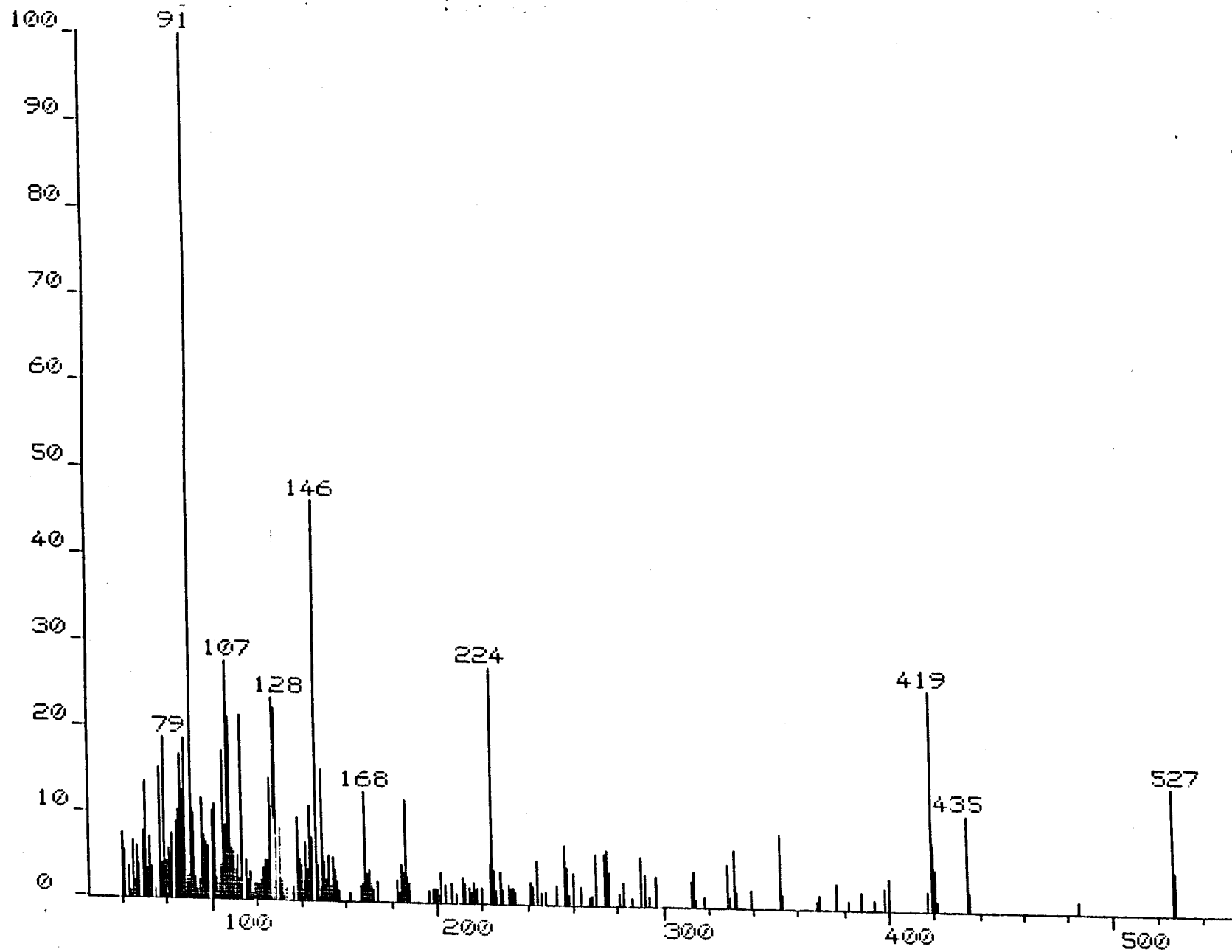


Figura 11F

Espectro de masas (CI) del bencil 2-acetamido-4,6-O-benzilidén-2-desoxi-3-O-(morfolin-1-ilcarbonilmetil)-β-D-glucopiranosido (29)

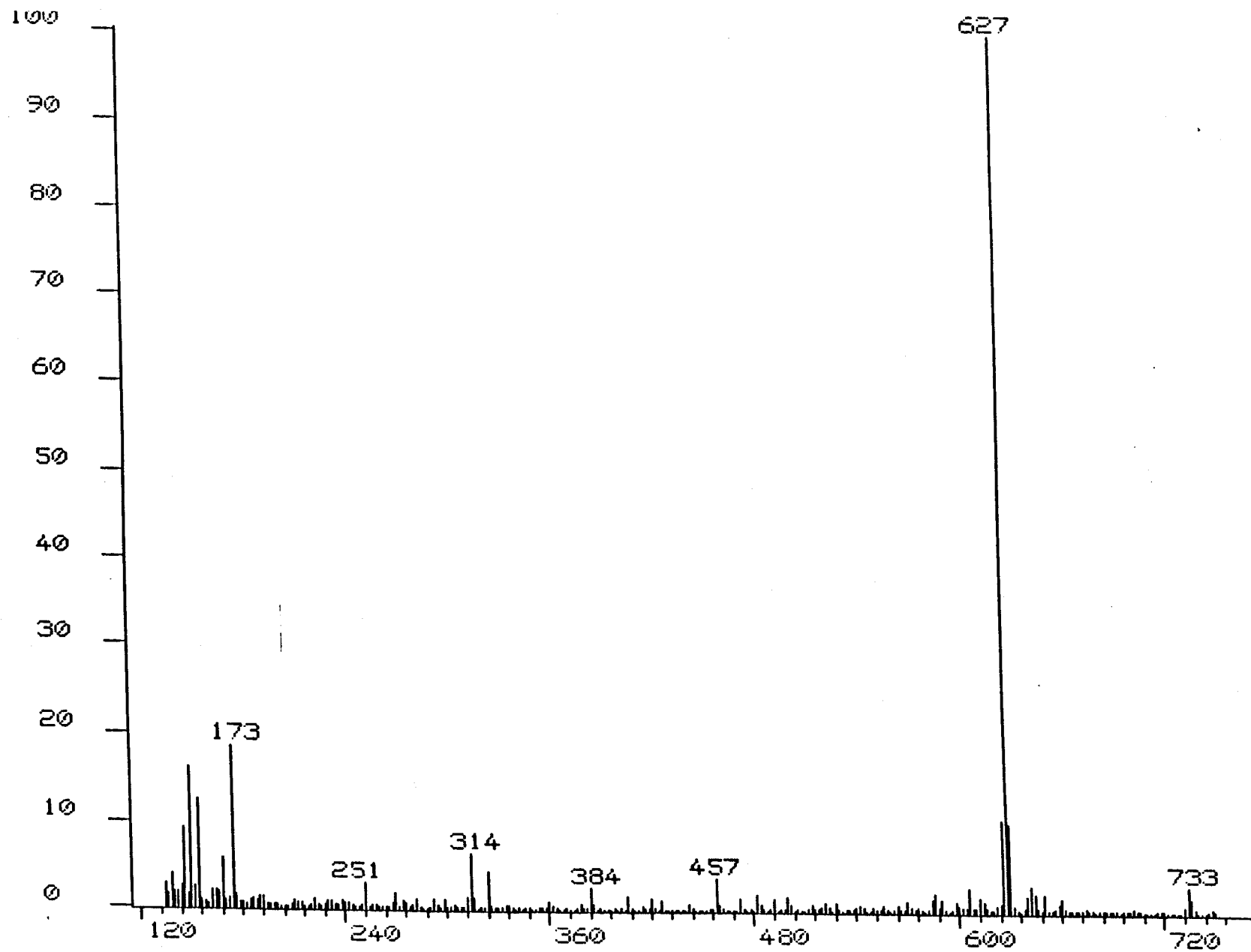


Figura 12F

Espectro de masas (FAB) del dodecil 2-acetamido-4,6-*O*-bencilidén-2-desoxi-3-*O*-(morfolin-1-ilcarbonylmetil)-β-D-glucopiranosido (30)

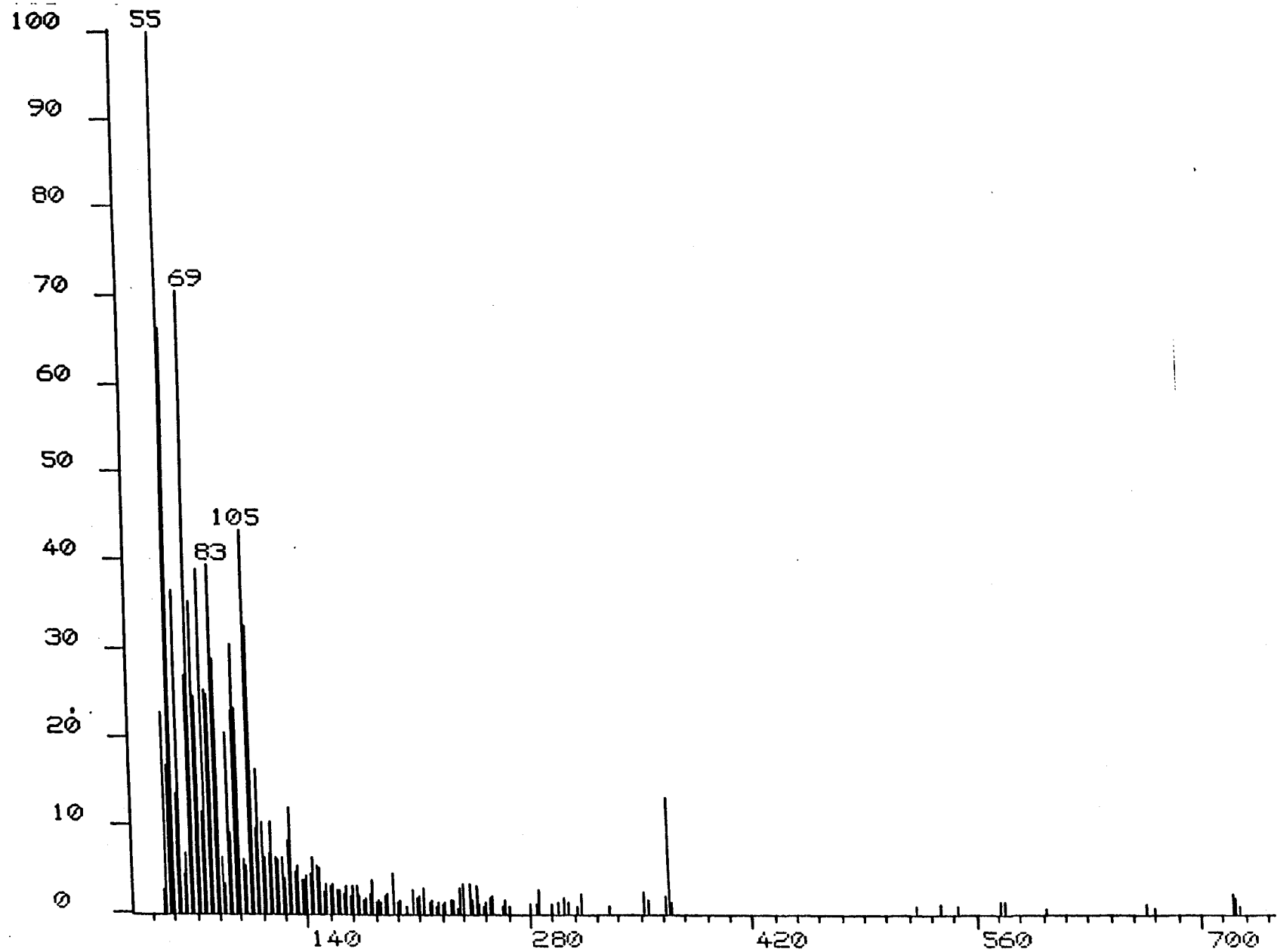


Figura 1E
Espectro de masas (EI) del dodecil 4,6-*O*-bencilidén-2-clorambucilamido-2-desoxi- β -D-glucopiranosido (17)

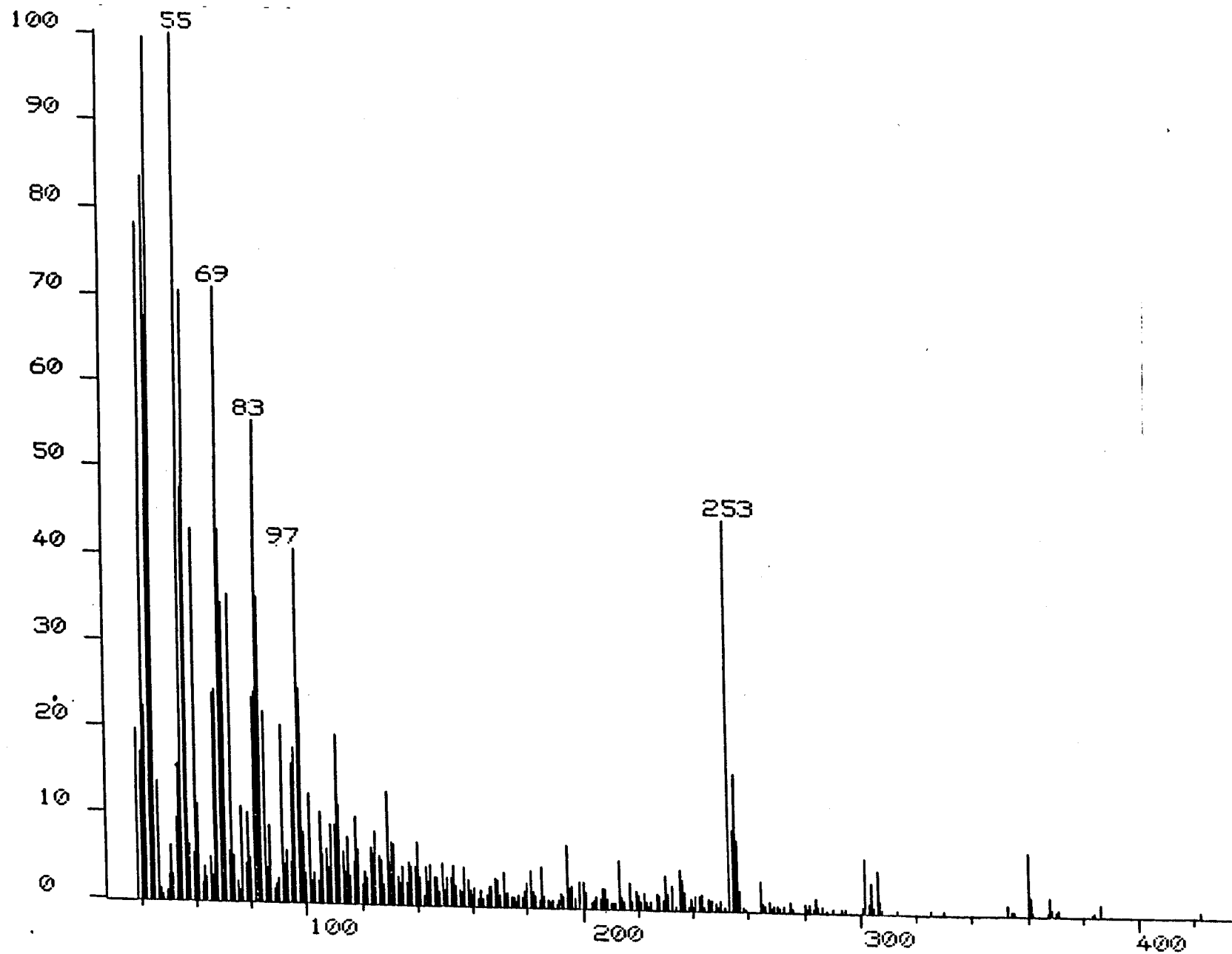


Figura 2E

Espectro de masas (EI) del dodecil 2-clorambucilamido-2-desoxi- β -D-glucopiranosido (18)

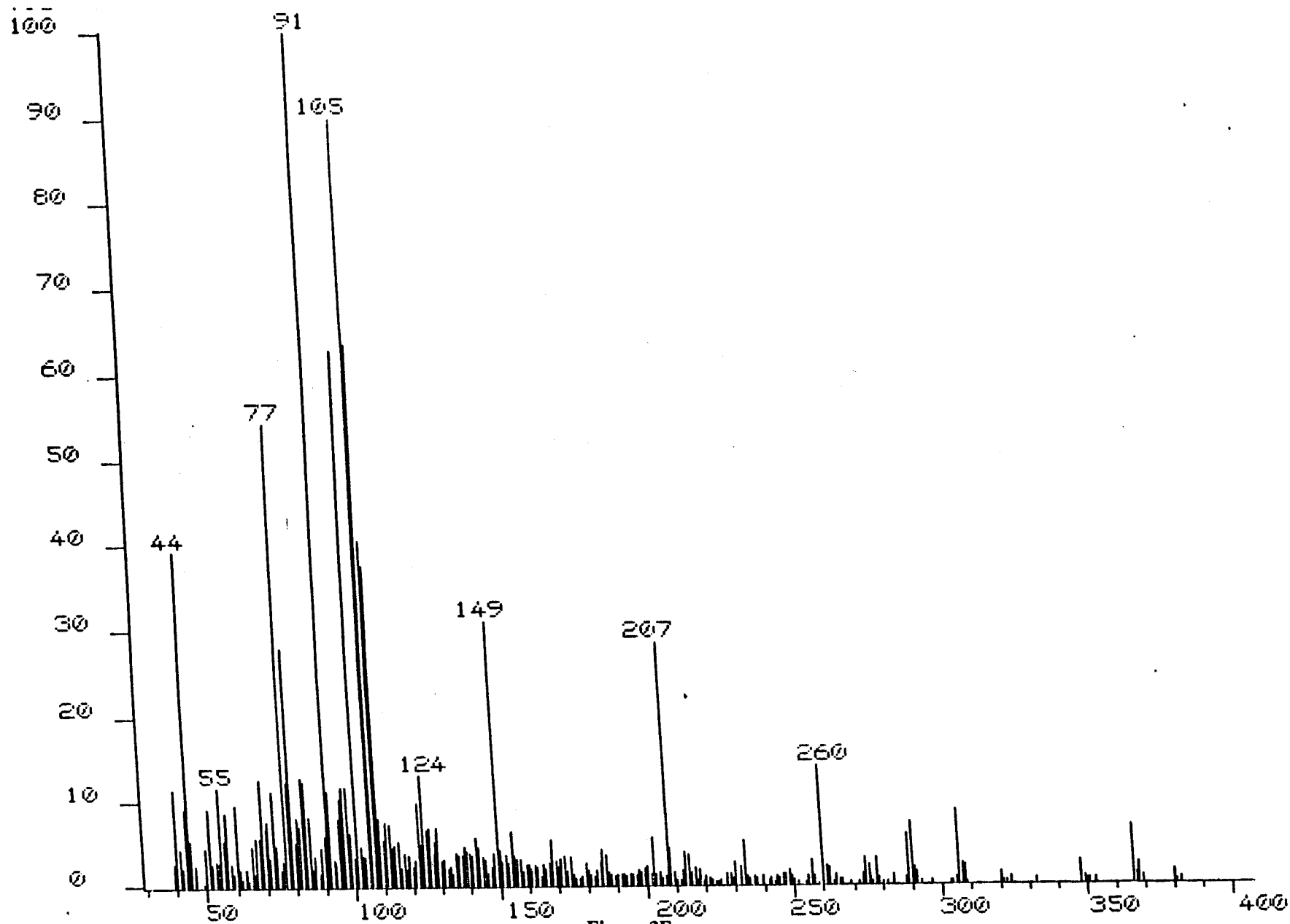


Figura 3E
Espectro de masas (EI) del bencil 2-acetamido-4,6-O-bencilidén-3-O-carboximetil-2-desoxi-β-D-glucopiranosido (19)

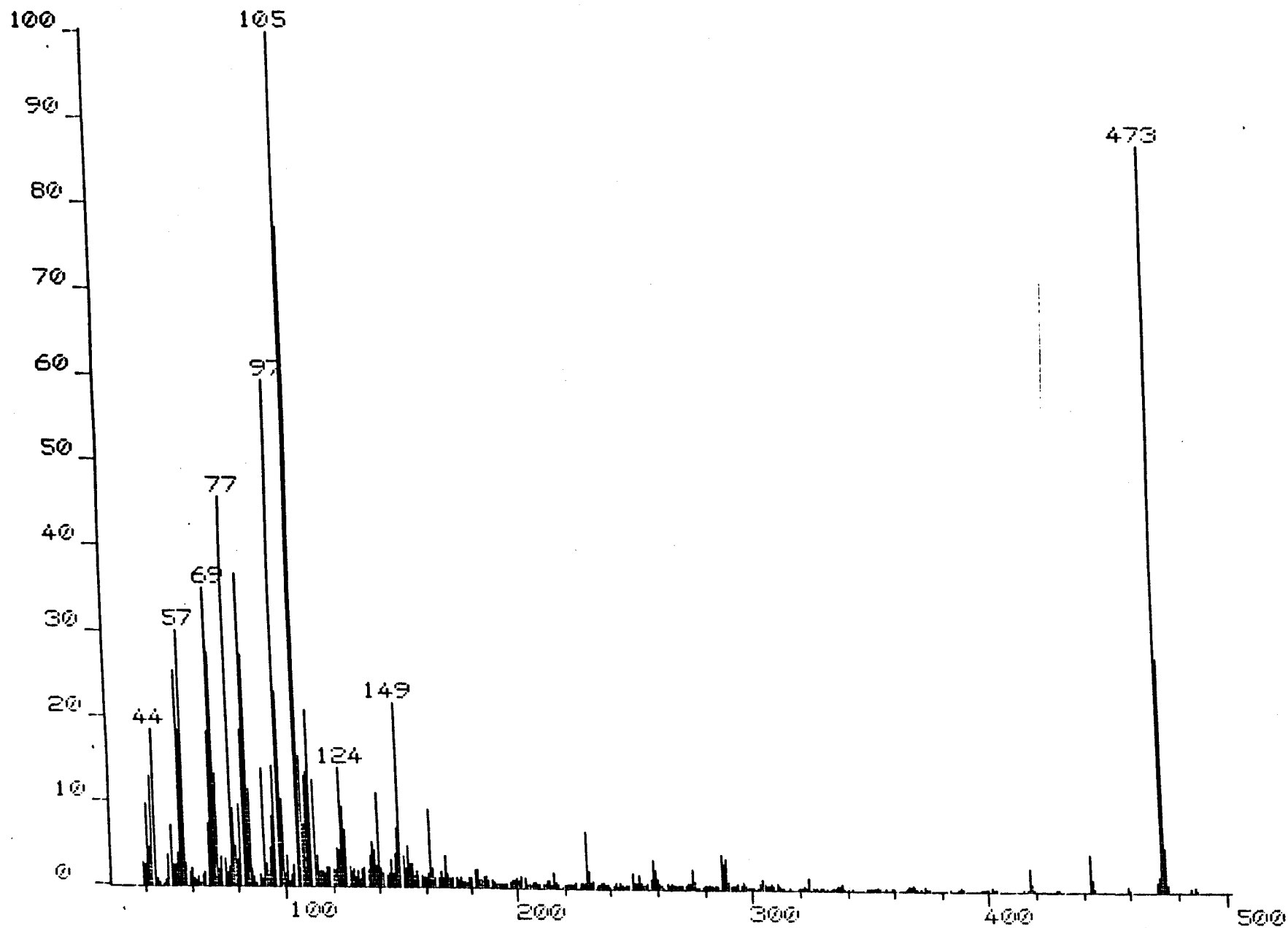


Figura 4E
Espectro de masas (EI) del dodecil 2-acetamido-4,6-O-benzilidén-3-O-carboximetil-2-desoxi-β-D-glucopiranosido (20)

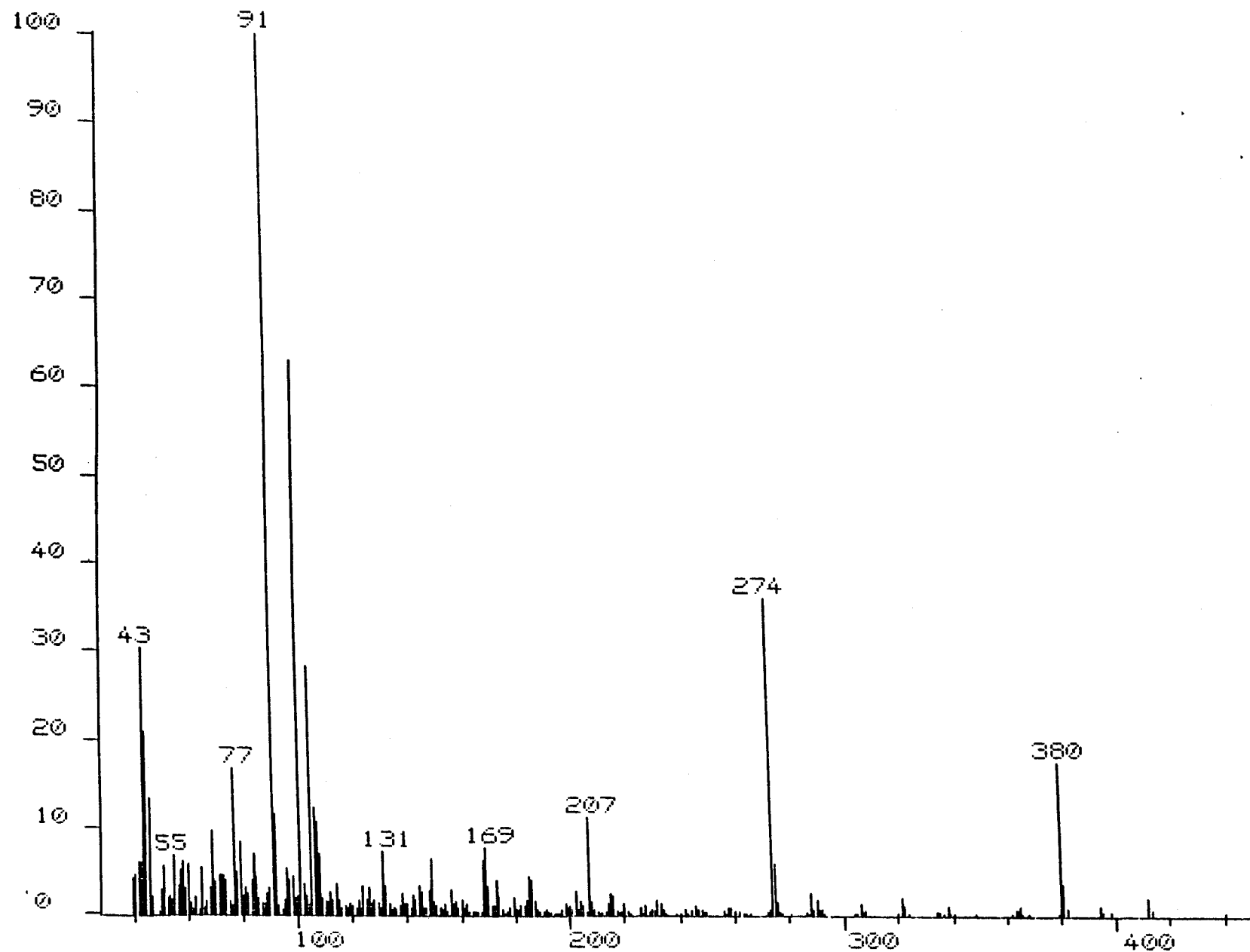


Figura 5E

Espectro de masas (EI) del bencil 2-acetamido-4,6-O-bencilidén-2-desoxi-3-O-metoxicarbonilmetil-β-D-glucopiranosido (21)

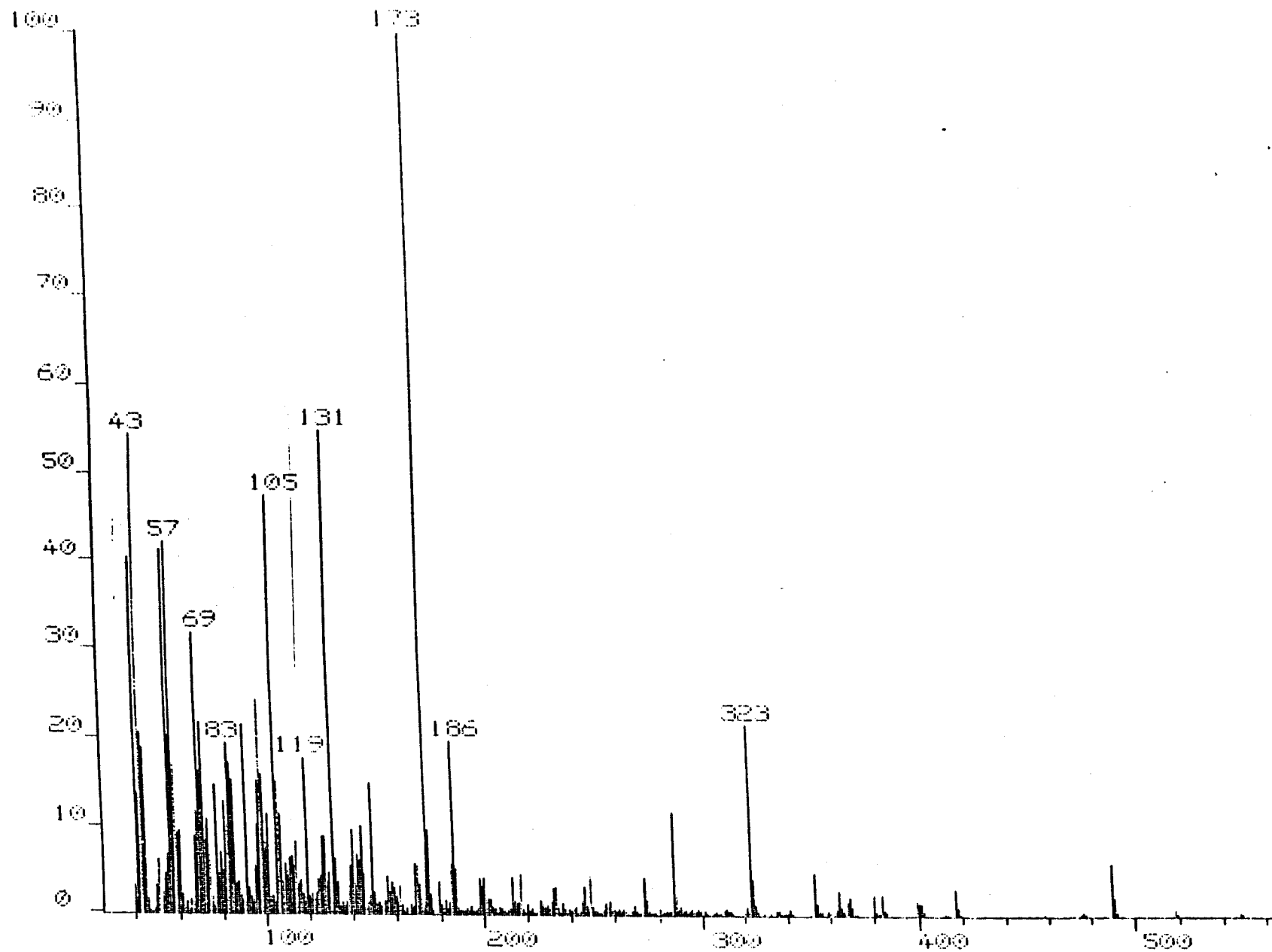


Figura 6E
Espectro de masas (EI) del dodecil 2-acetamido-4,6-*O*-bencilidén-2-desoxi-3-*O*-metoxicarbonilmetil-β-D-glucopiranosido (22)

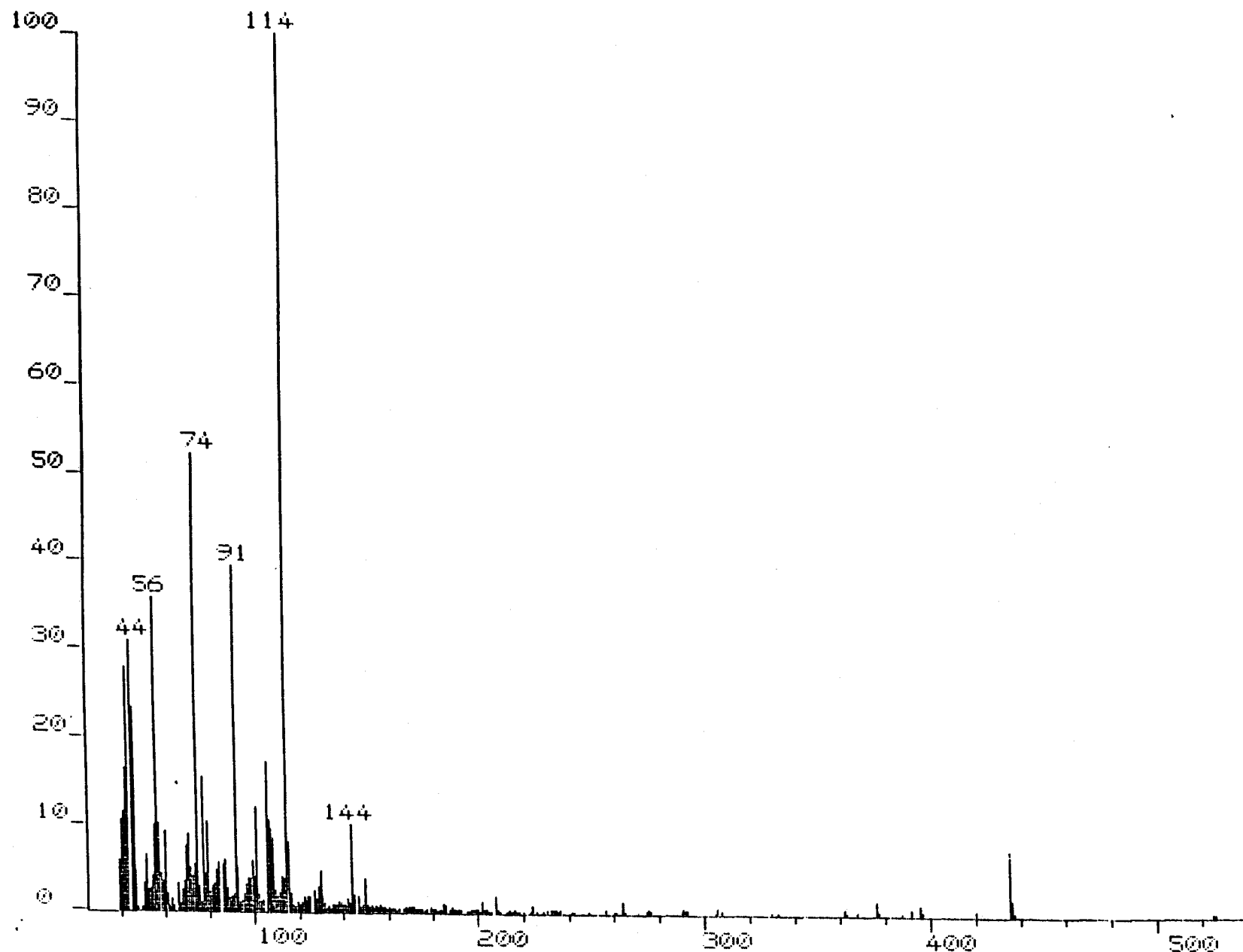


Figura 7E

Espectro de masas (EI) del bencil 2-acetamido-4,6-*O*-bencilidén-2-desoxi-3-*O*-[*N,N*-bis(2-hidroxietyl)aminocarbonilmetil]- β -D-glucopiranosido (23)

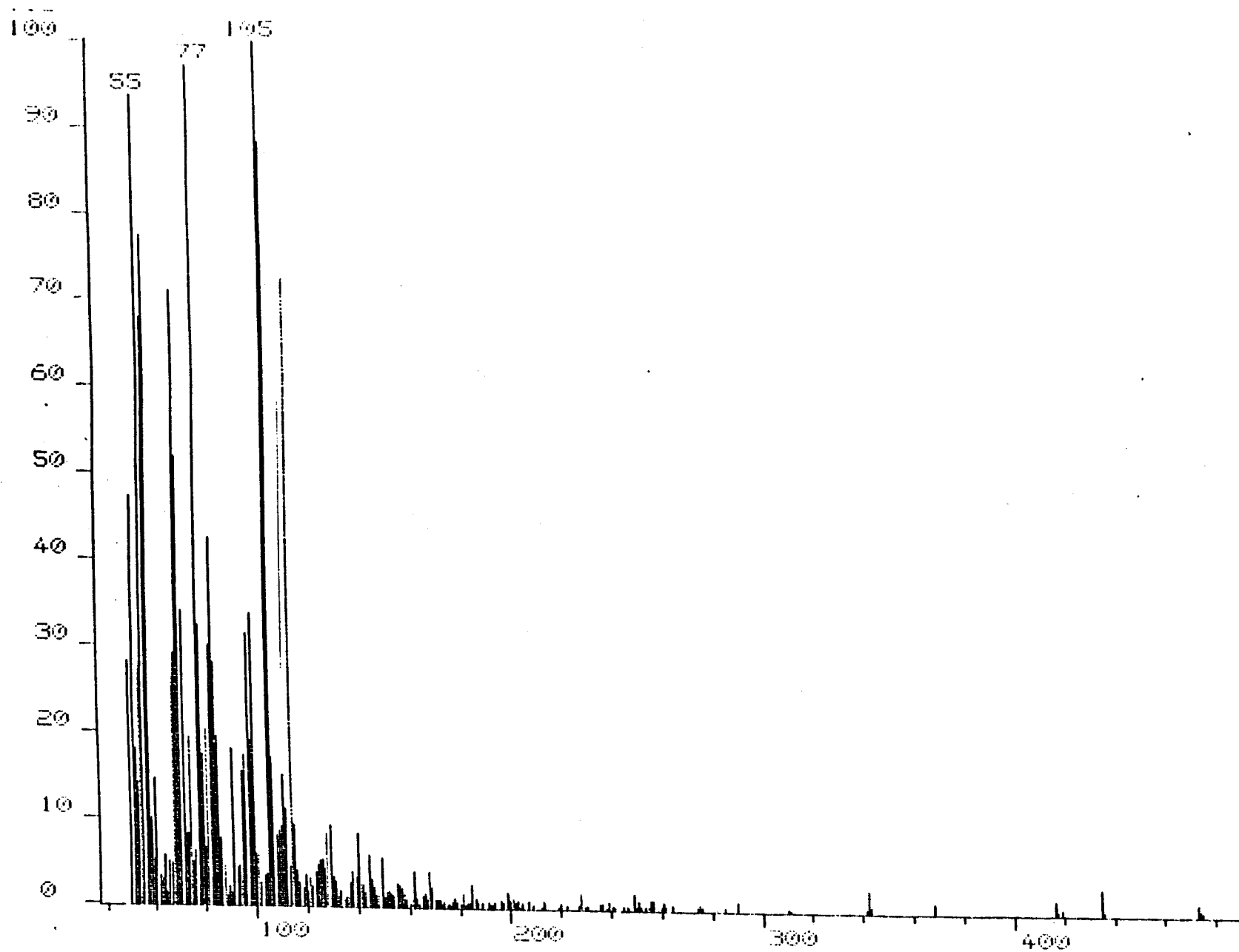


Figura 8E

Espectro de masas (EI) del dodecil 2-acetamido-4,6-*O*-bencilidén-2-desoxi-3-*O*-[*N,N*-bis(2-hidroxietil)aminocarbonilmetil]-β-*D*-glucopiranosido (24)

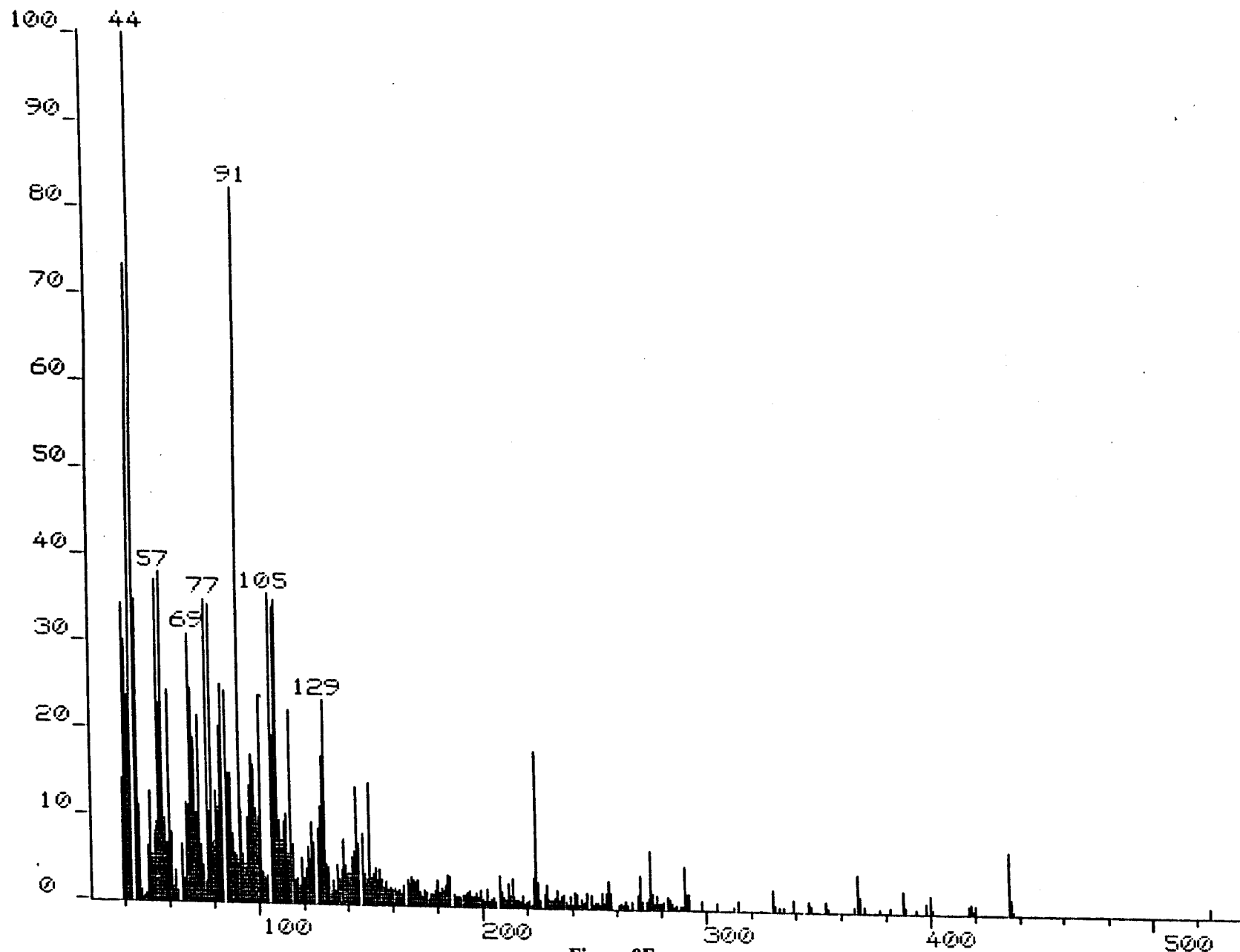


Figura 9E
Espectro de masas (EI) del bencil 2-acetamido-4,6-O-bencilidén-2-desoxi-3-O-(morfolin-1-ilcarbonilmetil)-β-D-glucopiranosido (29)

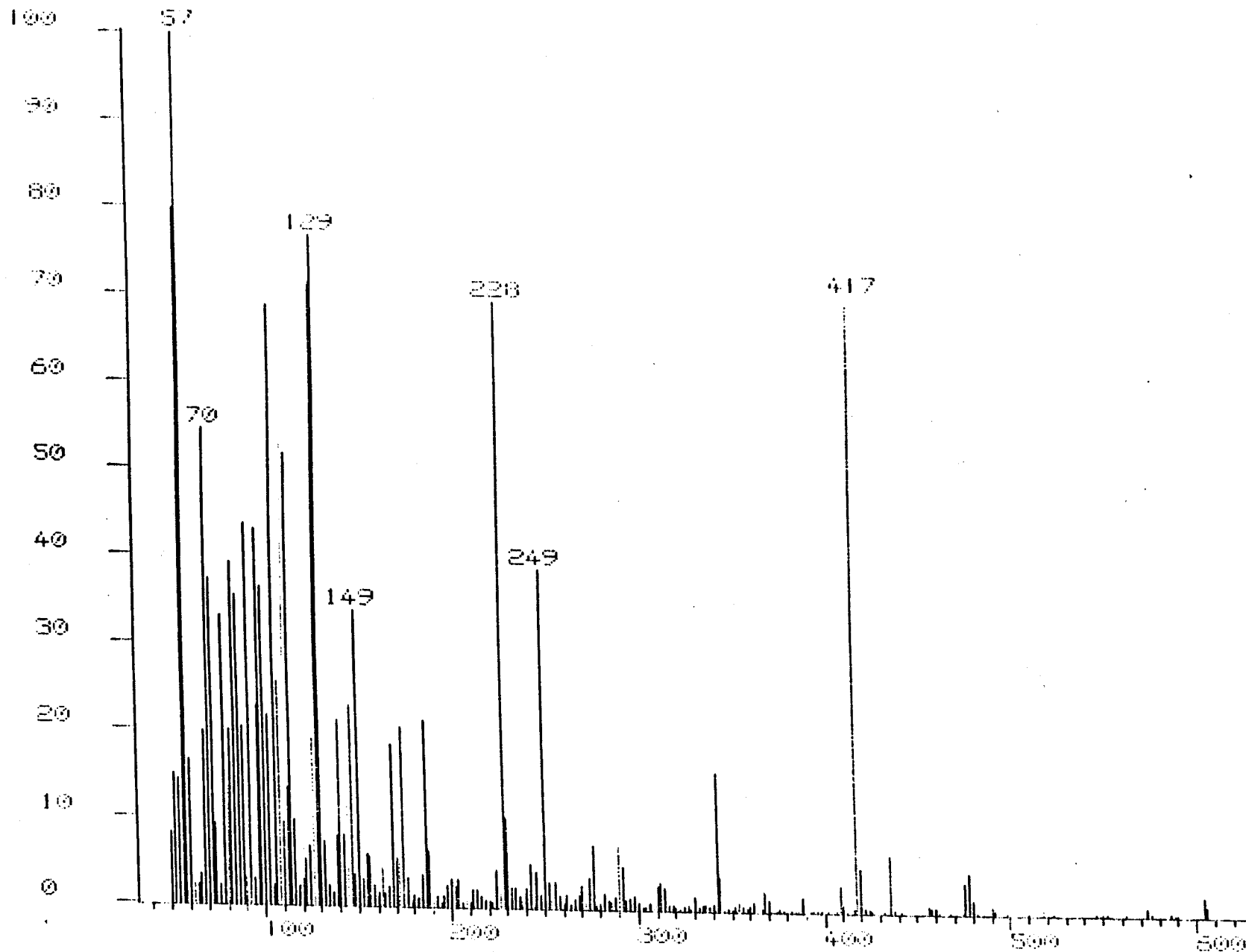


Figura 10E

Espectro de masas (EI) del dodecil 2-acetamido-4,6-*O*-bencilidén-2-desoxi-3-*O*-(morfolin-1-ilcarbonilmetil)-β-D-glucopiranosido (30)

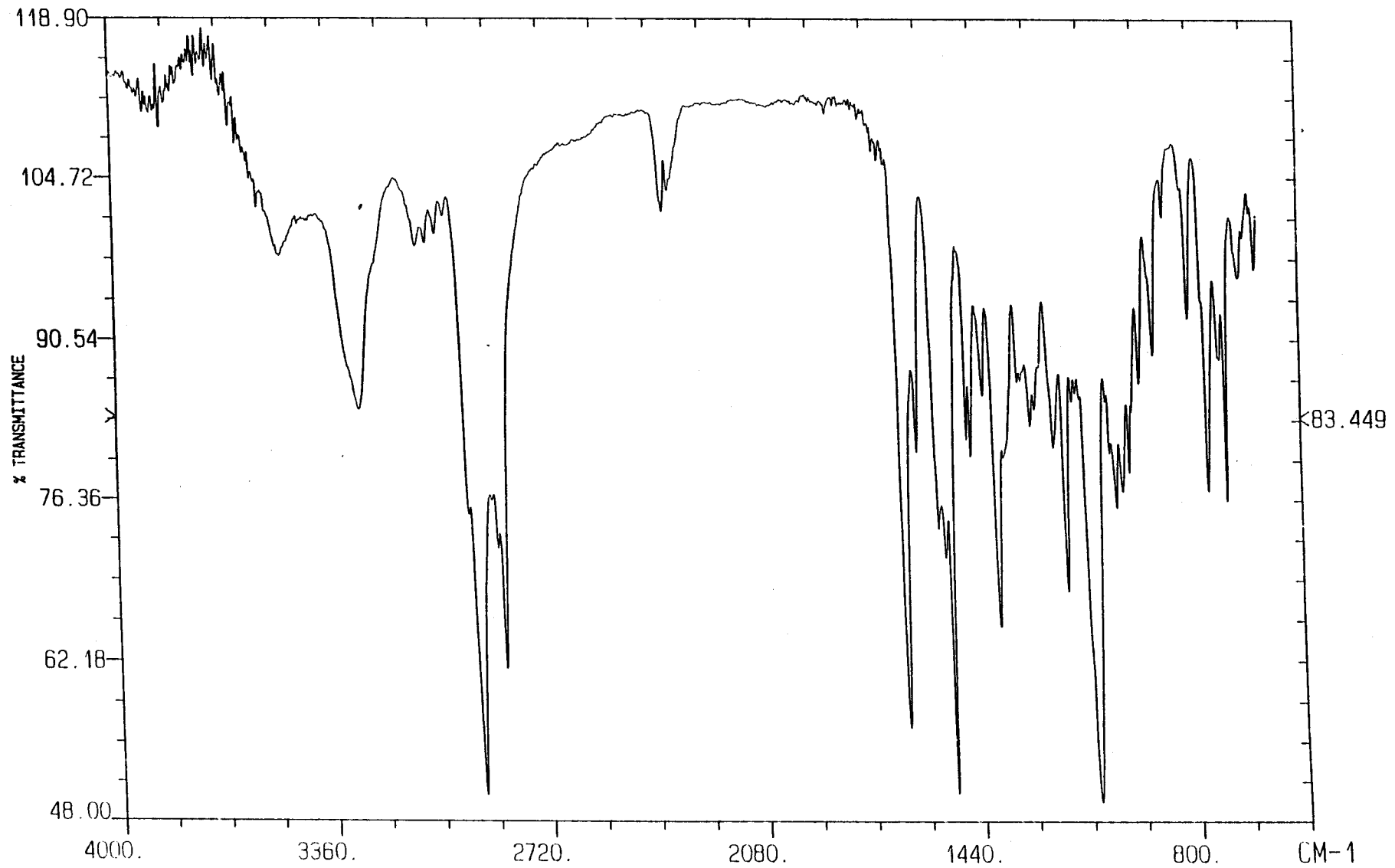


Figura 11
Espectro de IR del dodecil 4,6-*O*-bencilidén-2-clorambucilamido-2-desoxi-β-D-glucopiranosido (17)

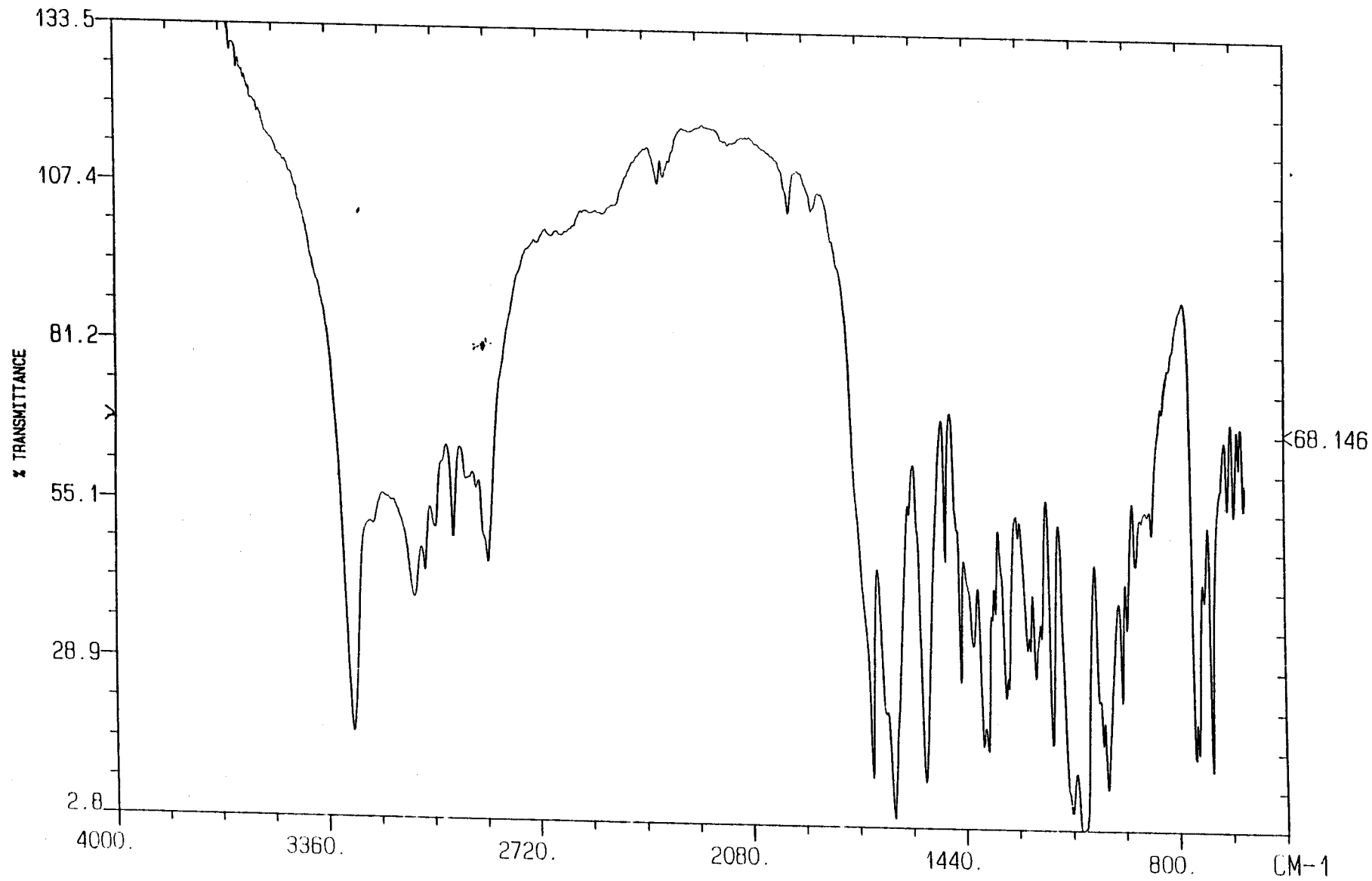


Figura 3I
Espectro de IR del bencil 2-acetamido-4,6-*O*-bencilidén-3-*O*-carboximetil-2-desoxi- β -D-glucopiranosido (19)

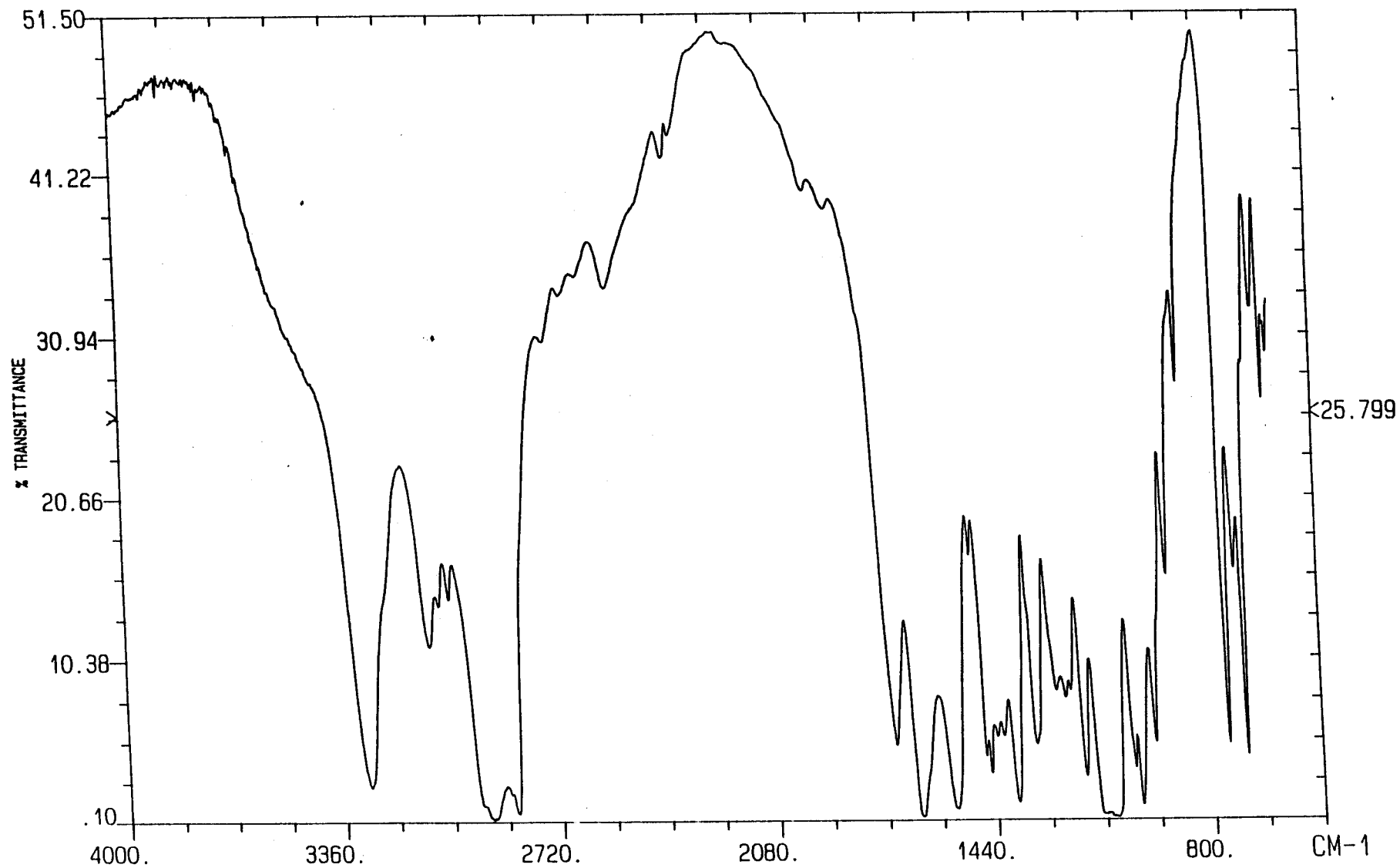


Figura 4I
Espectro de IR del dodecil 2-acetamido-4,6-*O*-bencilidén-3-*O*-carboximetil-2-desoxi-β-D-glucopiranosido (20)

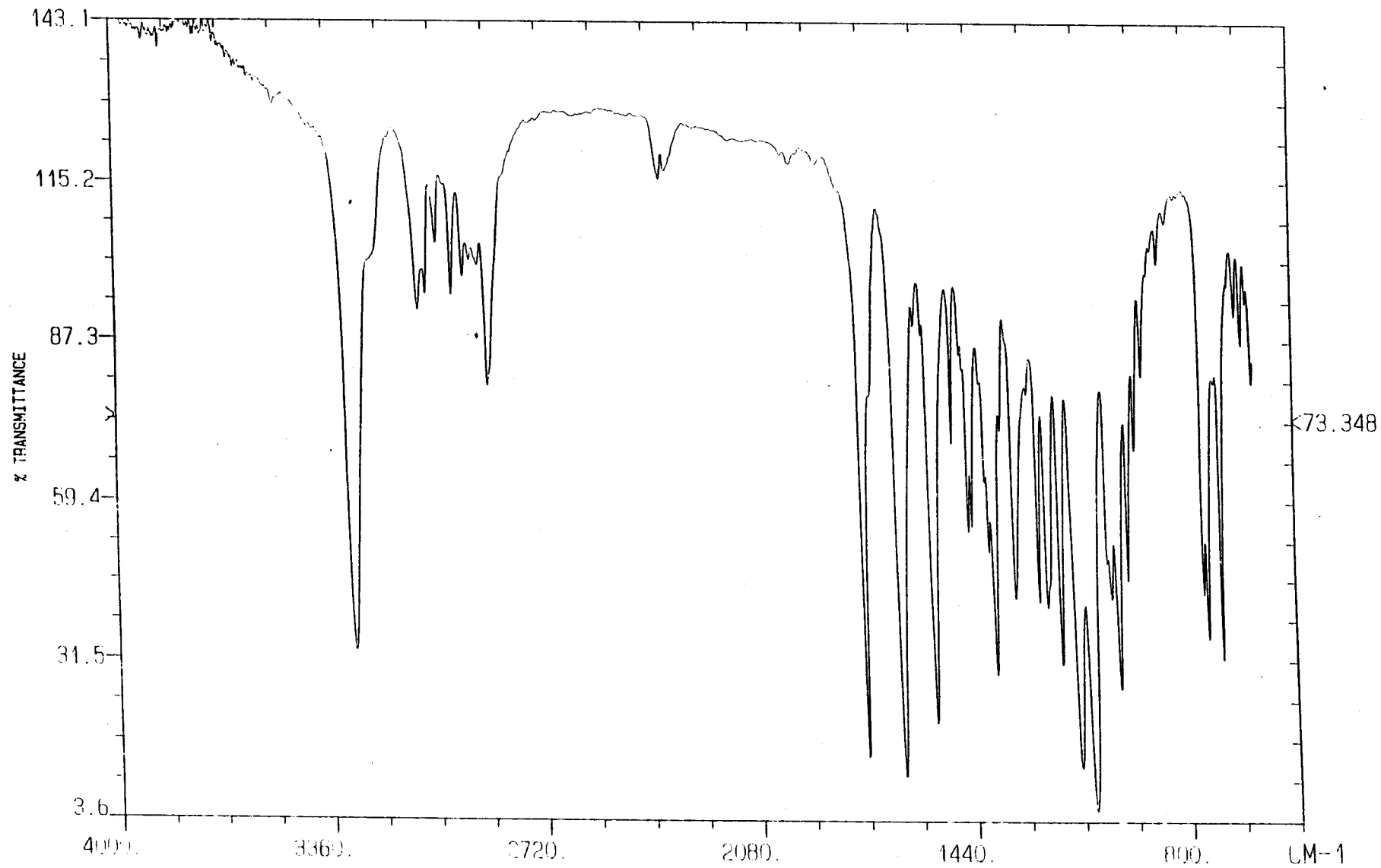


Figura 5I
Espectro de IR del bencil 2-acetamido-4,6-*O*-bencilidén-2-desoxi-3-*O*-metoxicarbonilmetil-β-D-glucopiranosido (21)

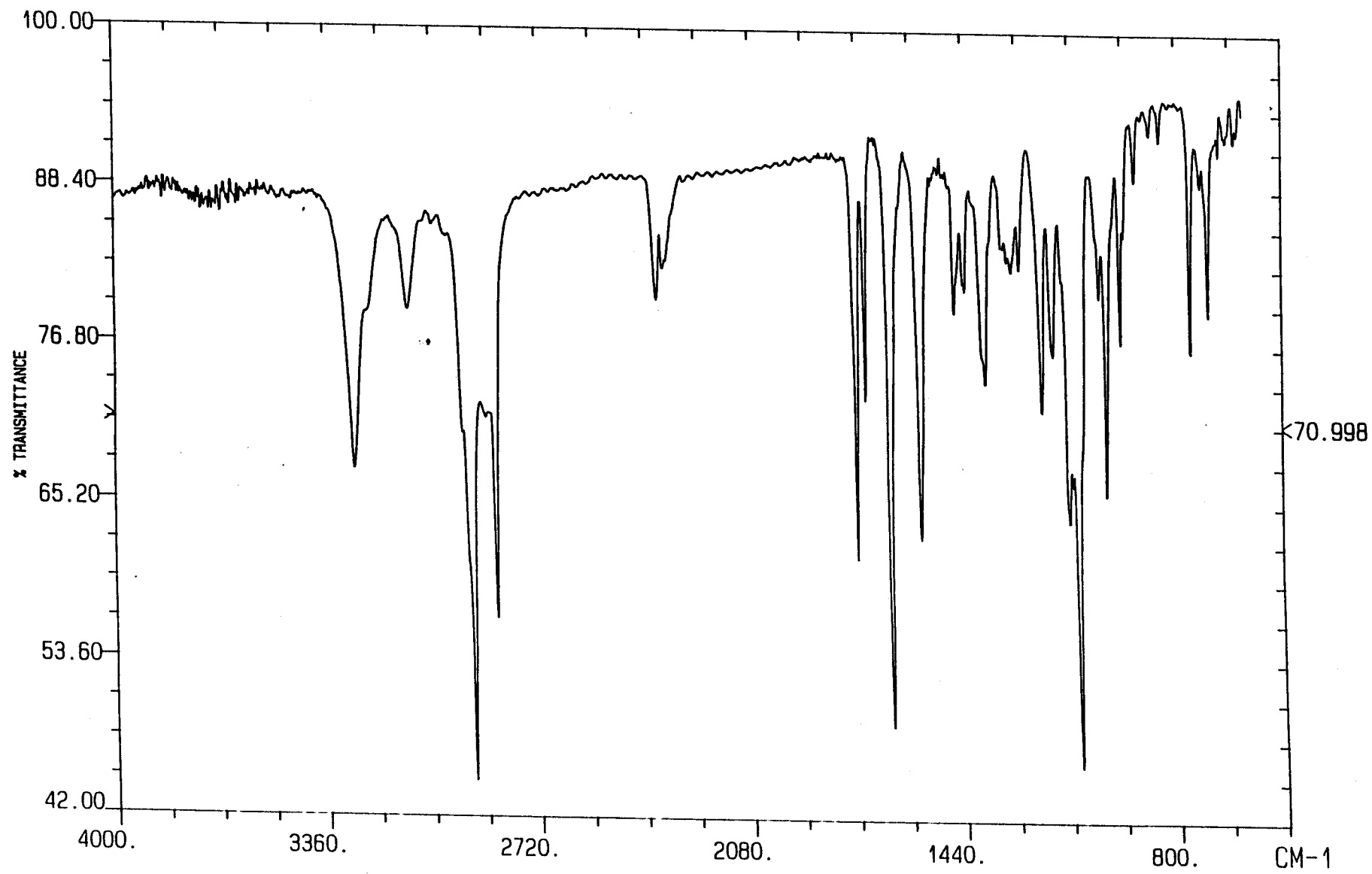


Figura 61
Espectro de IR del dodecil 2-acetamido-4,6-*O*-bencilidén-2-desoxi-3-*O*-metoxicarbonilmetil-β-D-glucopiranosido (22)

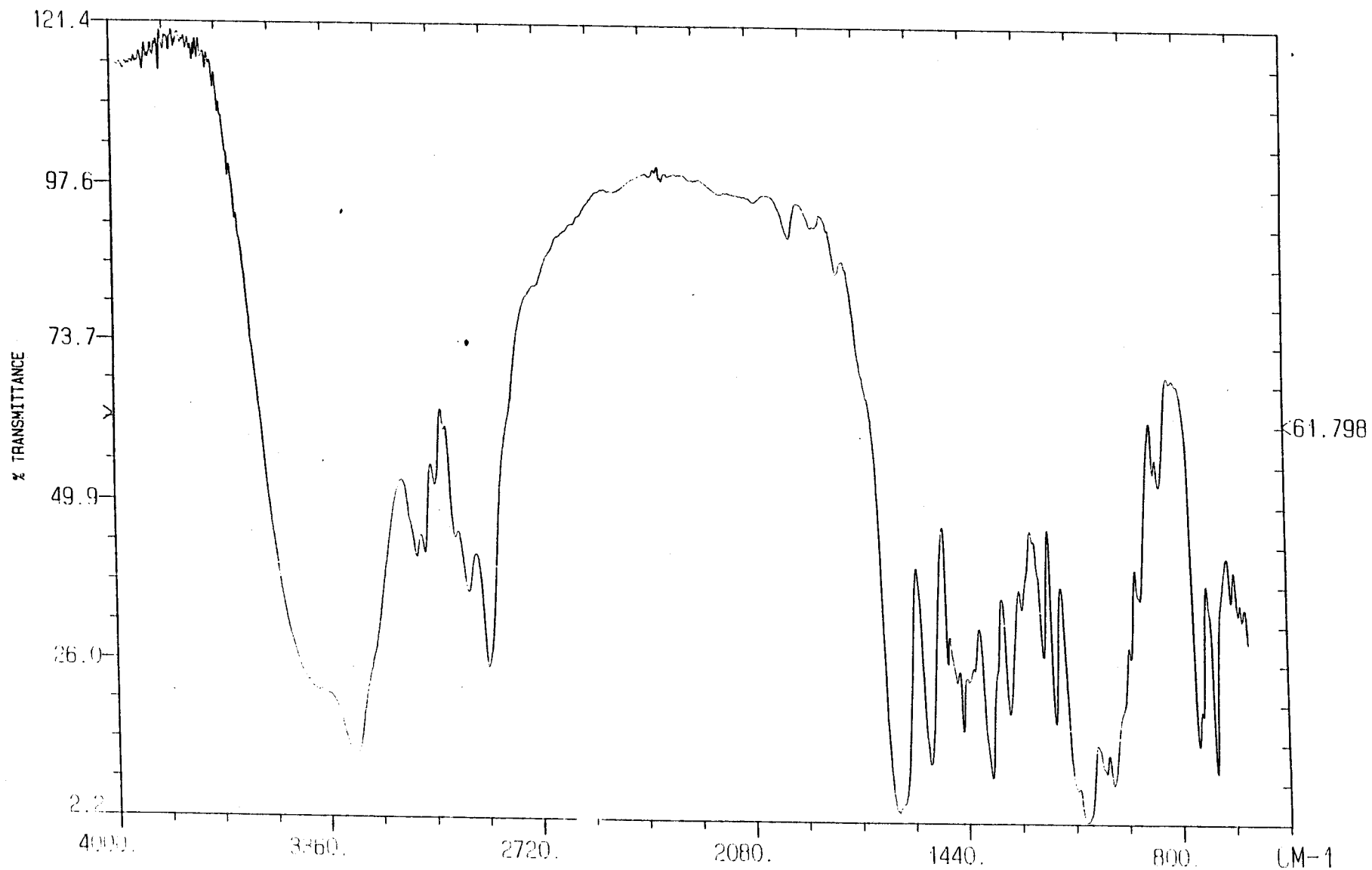


Figura 7I

Espectro de IR del bencil 2-acetamido-4,6-*O*-bencilidén-2-desoxi-3-*O*-[*N,N*-bis(2-hidroxietyl)aminocarbonilmetil]-β-D-glucopiranosido (23)

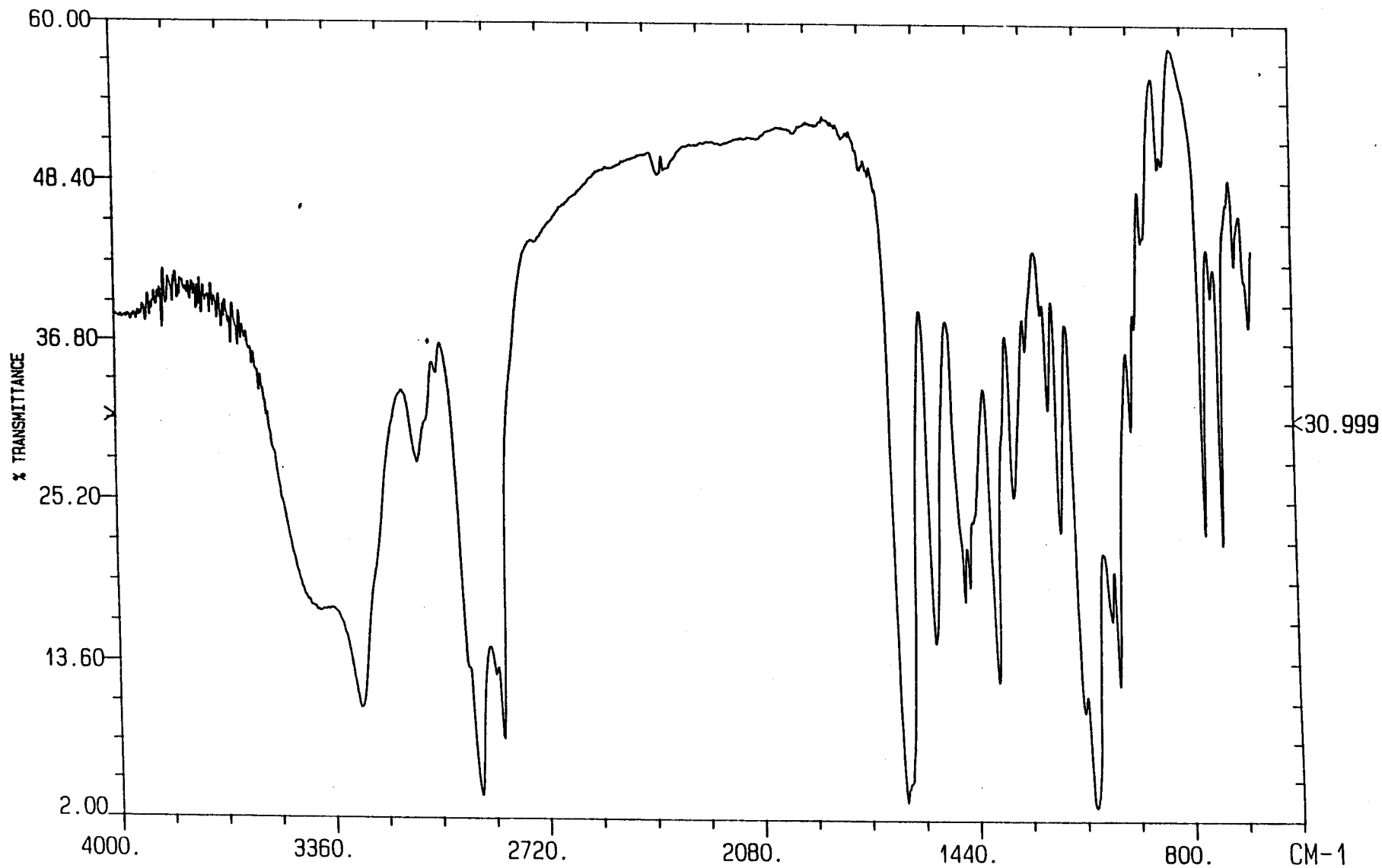


Figura 8I

Espectro de IR del dodecil 2-acetamido-4,6-*O*-bencilidén-2-desoxi-3-*O*-[*N,N*-bis(2-hidroxietyl)aminocarbonilmetil]-β-*D*-glucopiranosido (24)

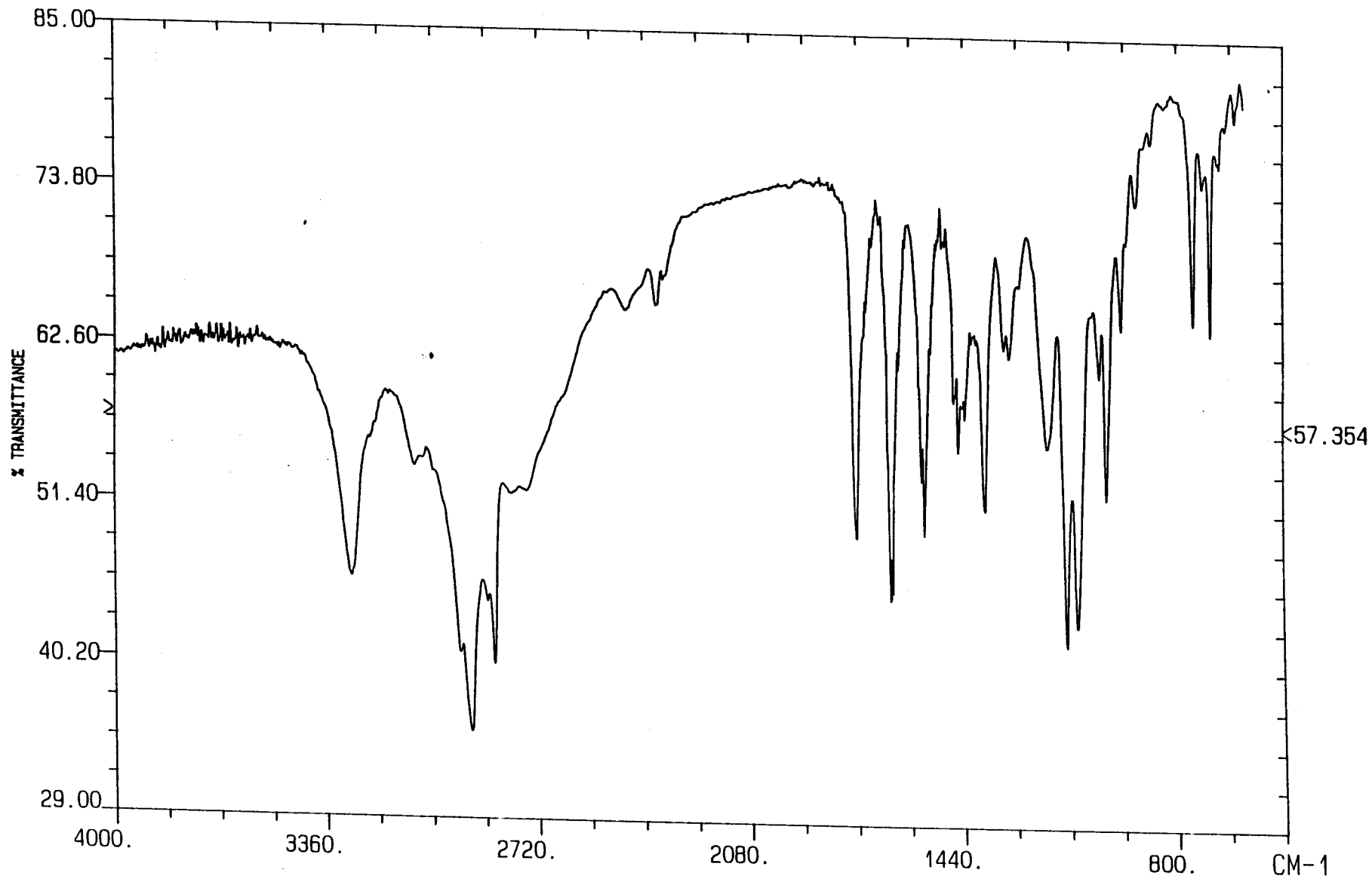


Figura 9I

Espectro de IR del dodecil 2-acetamido-4,6-*O*-bencilidén-2-desoxi-3-*O*-[*N,N*-bis(2-cloroetil)aminocarbonilmetil]-β-*D*-glucopiranosido (28)

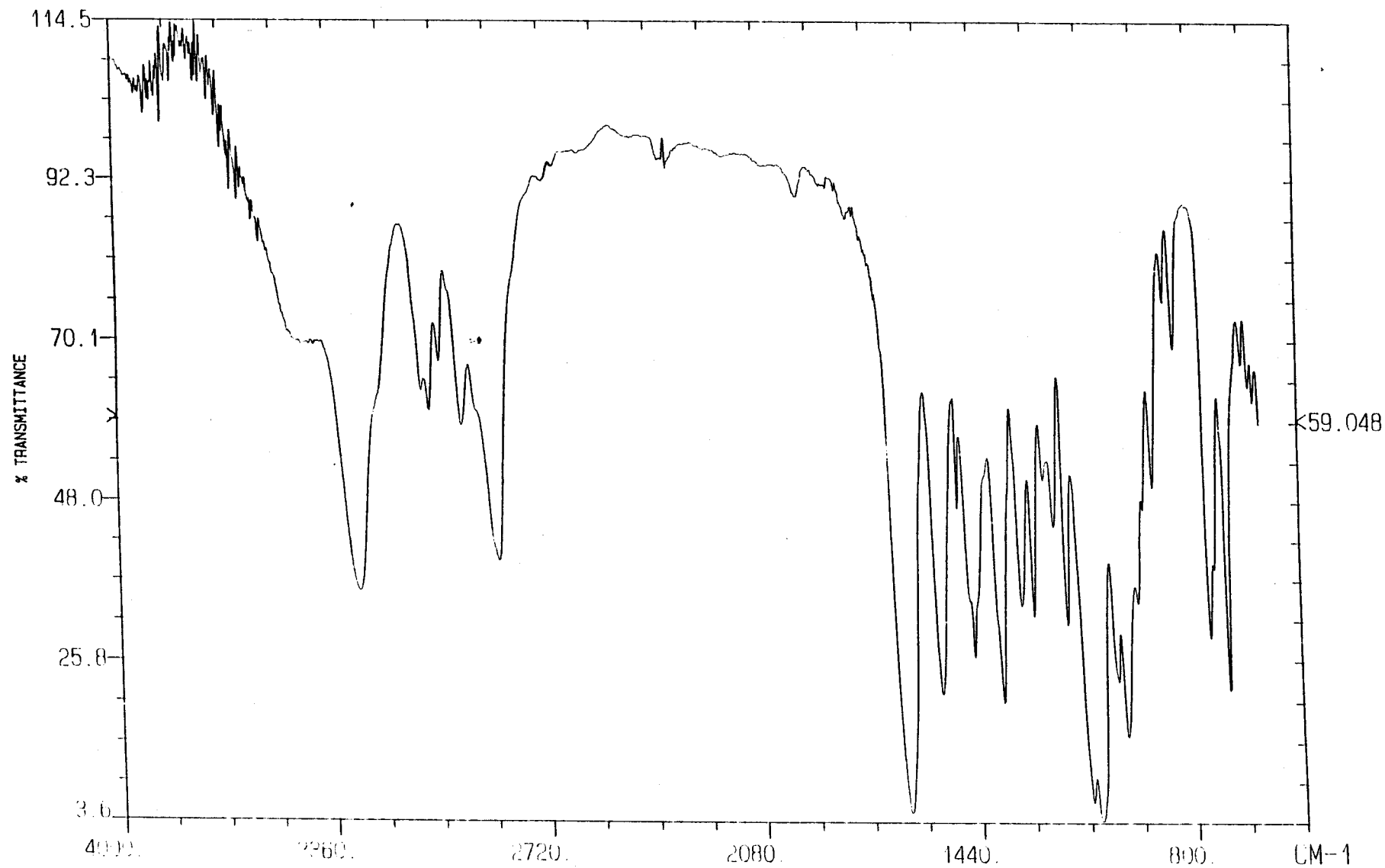


Figura 10I
Espectro de IR del bencil 2-acetamido-4,6-*O*-bencilidén-2-desoxi-3-*O*-(morfolin-1-ilcarbonilmetil)-β-D-glucopiranosido (29)

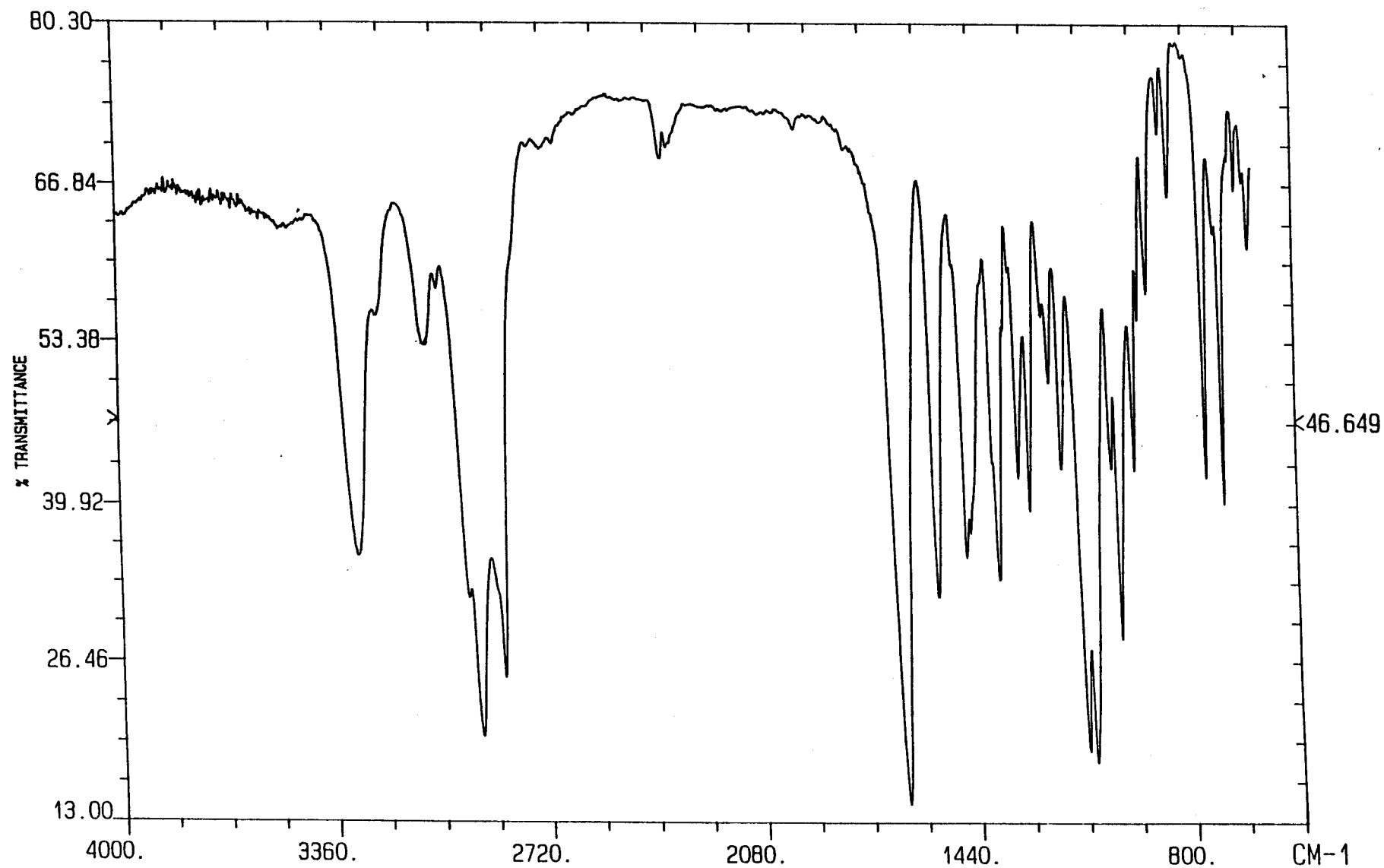


Figura 111
Espectro de IR del dodecil 2-acetamido-4,6-*O*-bencilidén-2-desoxi-3-*O*-(morfolin-1-ilcarbonilmetil)-β-D-glucopiranósido (30)