



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS**

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BÁSICAS Y APLICADAS
CENTRO DE INVESTIGACIONES QUÍMICAS

“Síntesis quimioenzimática de glicopolímeros”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

PEDRO ÁNGEL CID JIMÉNEZ

DIRECTOR DE TESIS

Dr. Edmundo Castillo Rosales



CUERNAVACA, MORELOS

NOVIEMBRE, 2023

Este trabajo se realizó en el Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis del Instituto de Biotecnología UNAM (IBt-UNAM), bajo la dirección y asesoría del Dr. Edmundo Castillo Rosales, en el Laboratorio 3 Ingeniería y Tecnología de Enzimas del Dr. Agustín López-Munguía Canales. Para el desarrollo de este proyecto se recibió financiamiento por parte de los programas PAPIIT-UNAM proyecto IT200220 y PAPIIT-UNAM proyecto IT200723. Se agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), en particular al Programa de Apoyos al Fortalecimiento y Desarrollo de la Infraestructura Científica y Tecnológica. Fortalecimiento de la infraestructura del grupo de Biocatálisis en el IBt-UNAM proyecto 269435.

Durante la realización del programa de maestría, el CONACyT otorgó una beca con número de apoyo 791776 (No. CVU 1097119) al alumno Pedro Ángel Cid Jiménez.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Edmundo Castillo, por permitirme realizar este proyecto, por sus valiosas observaciones, sus consejos académicos y enseñanzas brindadas. Al Dr. Agustín López-Munguía Canales, por la oportunidad de formar parte de su laboratorio, por su crítica constructiva y enriquecedora. A los técnicos del Laboratorio 3: M.C María Elena Rodríguez y T.L Fernando González, por su apoyo en el manejo de equipos y solicitud de reactivos. A la Sra. Aurelia Ocampo, por su ayuda en la preparación de las soluciones reveladoras. A la Biol. Larisa Campos, por su apoyo en los asuntos administrativos y cotizaciones. A la Dra. Marcela Ayala, por facilitar el acceso al equipo de espectroscopía de infrarrojo.

Al Dr. Jaime Escalante García, por las valiosas observaciones a este proyecto y por el apoyo para solicitar los análisis de Resonancia Magnética Nuclear. A su grupo de investigación por la retroalimentación y los tantos debates. Al Dr. Jonathan Valdez, por el apoyo en la realización de los cálculos computacionales, por sus objetivos y bien recibidos comentarios para mejorar este proyecto de tesis.

Agradezco a los miembros de mi comité tutorial: Dra. Irma Linzaga Elizalde, Dra. Laura Patricia Álvarez Berber y Dr. Jaime Escalante García; cuyos comentarios y sugerencias no solamente mejoraron la calidad de este trabajo, sino también me permitieron incrementar mis conocimientos sobre los temas relacionados con esta tesis. A la Universidad Autónoma del Estado de Morelos, agradezco la extraordinaria formación académica y personal que me permitió desarrollar.

Al CONACyT, por el apoyo brindado en la beca nacional con número de apoyo 791776, para el desarrollo de mi maestría, dentro del Posgrado en Ciencias Área Química.

Al Ing. Hiram Pacheco, por las sugerencias, comentarios y ánimos brindados durante la redacción de este manuscrito de tesis, por tu entrañable compañía y por las tardes de películas, los almuerzos y las risas compartidas. Gracias por animarme y creer que todo es posible. A mis amigos Kari, Silvia, Sol, Poncho, Cris, Israel y Sergio, por hacer más amena mi estancia en Cuernavaca. Y a las personas maravillosas que pude conocer durante esta etapa. Agradezco en especial a mi familia, siempre están en mi corazón, a mis padres, no habría podido llegar tan lejos sin ustedes. Por su apoyo, ánimos y comprensión. Muchas gracias.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE FIGURAS	iv
ÍNDICE DE TABLAS.....	viii
ABREVIATURAS, SIGLAS, ACRÓNIMOS Y SÍMBOLOS.....	ix
RESUMEN.....	xii
INTRODUCCIÓN.....	1
1 ANTECEDENTES.....	2
1.1 GLICOPOLÍMEROS: SÍNTESIS Y APLICACIONES.....	2
1.1.1 Carbohidratos	2
1.1.2 Glicopolímeros: materiales híbridos y polifuncionales.....	4
1.1.3 Principales estrategias para la síntesis de glicopolímeros.....	7
1.2 DISOLVENTES EUTÉCTICOS PROFUNDOS NATURALES (NADES).....	8
1.2.1 Los NADES en síntesis orgánica.....	13
1.3 ENZIMAS ACTIVAS EN CARBOHIDRATOS: SÍNTESIS DE GLICÓSIDOS Y POLISACÁRIDOS.....	17
1.4 POLIMERIZACIÓN POR RADICALES LIBRES (FRP).....	21
1.5 SÍNTESIS DE GLICOPOLÍMEROS UTILIZANDO GLICOMONÓMEROS.....	22
1.5.1 Síntesis química de glicomonómeros.....	23
1.5.2 Síntesis enzimática de glicomonómeros.....	27
2 JUSTIFICACIÓN	30
3 HIPÓTESIS.....	31
4 OBJETIVOS.....	31
4.1 OBJETIVO GENERAL	31
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	31
5 MATERIALES Y MÉTODOS.....	32
5.1 REACTIVOS, MATERIAL BIOLÓGICO Y GENERALIDADES.....	32
5.2 Cromatografía en capa fina y en columna flash.....	33
5.3 Cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas	33
5.4 Determinación de la rotación óptica.....	33
5.5 Espectroscopía de infrarrojo.....	33
5.6 Resonancia magnética nuclear.....	34
5.7 SÍNTESIS DEL DISOLVENTE EUTÉCTICO PROFUNDO NATURAL.....	34

5.8	SÍNTESIS DE AZÚCARES PROTEGIDOS.....	35
5.8.1	Síntesis de azúcares protegidos utilizando H ₂ SO ₄ /acetona.....	35
5.8.1.1	Síntesis de 2,3:4,5-di-O-isopropiliden-β-D-fructopiranososa (2a).....	35
5.8.1.2	Síntesis de 1,2:4,5-di-O-isopropiliden-β-D-fructopiranososa (2b).....	37
5.8.1.3	Síntesis de 1,2:3,4-di-O-isopropiliden-α-D-galactopiranososa (2c).....	39
5.8.2	Síntesis de azúcares protegidos utilizando un sistema NADES ChCl:MA (1:2)/acetona	41
5.9	METODOLOGÍA GENERAL PARA LA VINILACIÓN DE AZÚCARES PROTEGIDOS.....	42
5.9.1	2,3:4,5-di-O-isopropiliden-1-O-vinil-β-D-fructopiranososa (10a).....	43
5.9.2	1,2:4,5-di-O-isopropiliden-3-O-vinil-β-D-fructopiranososa (10b).....	44
5.9.3	1,2:3,4-di-O-isopropiliden-6-O-vinil-α-D-galactopiranososa (10c).....	45
5.10	SÍNTESIS DE GLICOMONÓMEROS EN NADES.....	46
5.10.1	Síntesis de alil-glicósidos.....	46
5.10.2	Síntesis de alil-glucopiranosido 4d en NADES ChCl:MA (1:2).....	46
5.10.3	Síntesis de propargil-glicósidos.....	49
5.11	REACCIONES DE GLICOSILACIÓN ENZIMÁTICA.....	50
5.11.1	α-Glicosilación del alil-glucósido 4d utilizando una CGTasa de <i>Thermoanaerobacter</i> sp.....	50
5.11.2	β-Glicosilación del alil-glucósido 4d utilizando una β-glucosidasa de almendras.....	51
5.11.3	β-Galactosilación del alil-glucósido 4d utilizando una β-galactosidasa de <i>Kluyveromyces lactis</i>	52
5.11.4	β-Fructosilación del alil-glucosido 4d utilizando una levansacarasa de <i>Bacillus subtilis</i>	53
5.12	POLIMERIZACIÓN POR RADICALES LIBRES.....	54
5.12.1	Síntesis de glicopolímero.....	54
5.12.2	Síntesis de copolímero	54
5.13	DETERMINACIÓN DEL PESO MOLECULAR DE LOS POLÍMEROS.....	54
5.14	MÉTODOS DE DINÁMICA MOLECULAR Y MECÁNICA CUÁNTICA PARA LA OPTIMIZACIÓN DE ESTRUCTURAS QUÍMICAS.....	55
6	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	56
6.1	Síntesis de glicomonómeros: éteres vinílicos, alílicos y propargílicos	56
6.1.1	Síntesis de glicomonómeros tipo éter vinílico de azúcares protegidos.....	56
6.1.1.1	Síntesis de azúcares protegidos empleando grupos di-O-isopropilideno	57
6.1.1.2	Monovinilación de di-O-isopropiliden azúcares utilizando CaC ₂	65
6.1.2	Síntesis y análisis de glicomonómeros tipo alil y propargil azúcares en NADES	70
6.1.2.1	Caracterización del NADES y su capacidad como medio catalítico	70
6.1.2.2	Síntesis de glicomonómeros en el medio eutéctico ChCl:MA (1:2): síntesis regioselectiva de O-glicósidos.....	72
6.1.2.2.1	Versatilidad del NADES ChCl:MA (1:2) para sintetizar alil- y propargil-glicomonómeros.....	72
6.1.2.2.2	Síntesis de O-glicósidos a partir de maltooligosacáridos en NADES	

ChCl:MA (1:2).....	85
6.2 <i>Glicosilación enzimática para la construcción dirigida de glicomonómeros</i>	87
6.2.1 Capacidad de los glicomonómeros para actuar como aceptores de CAZymes	87
6.2.1.1 α -Glucosilación del alil-glucósido con CGTasa de <i>Thermoanaerobacter</i> sp.	88
6.2.1.2 β -Glucosilación del alil-glucósido utilizando una β -glucosidasa de almendras	89
6.2.1.3 β -Galactosidación del alil-glucósido utilizando una β -galactosidasa de <i>Kluyveromyces lactis</i>	92
6.2.1.4 β -Fructofuranosilación de alil-glucósido utilizando una levansacarasa de <i>Bacillus subtilis</i>	94
6.3 <i>Síntesis de glicopolímeros</i>	96
6.3.1 Síntesis de glicopolímeros mediante reacciones de copolimerización a partir de monómeros alilo y vinilo.....	96
7 CONCLUSIONES	102
8 PERSPECTIVAS	103
9 BIBLIOGRAFÍA.....	104

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Representación gráfica de la complejidad del glicocálix celular y su rol en el intercambio de información entre la célula y sus alrededores	2
Figura 2 Disacáridos formados por la unión de dos unidades de D-glucosa.....	3
Figura 3 Definición gráfica y ruta de síntesis para la preparación de glicopolímeros.....	5
Figura 4 Estructuras de glicoconjugados sintéticos y/o semisintéticos, capaces de mimetizar la arquitectura y comportamiento de glicanos naturales	6
Figura 5 Aplicaciones más importantes que actualmente poseen los glicopolímeros	7
Figura 6 Estrategias principales para empleadas en la síntesis de glicopolímeros.....	8
Figura 7 <i>Relación ión-tamaño de hueco/agujero en la estructura del NADES cloruro de colina (ChCl) y urea.....</i>	11
Figura 8 Estructura del NADES ChCl:U (1:2).....	12
Figura 9 Transformaciones químicas de azúcares utilizando mezclas eutécticas.....	14
Figura 10 Ejemplos de diferentes reacciones químicas donde se utilizaron NADES como medio reacción y/o catalizador	16
Figura 11 Resolución racémica de rac-mentol a través su esterificación con ácido láurico catalizada por la lipasa de <i>Candida rugosa</i> , donde los sustratos forman parte del NADES	17
Figura 12 Reacciones de glicosilación catalizadas por enzimas activas en carbohidratos (CAZymes) hacia una molécula aceptora (R).....	18
Figura 13 Especificidad de las enzimas activas en carbohidratos (CAZymes) para reconocer a sus sustratos donadores.....	21
Figura 14 Mecanismo general del proceso de polimerización por radicales libres Izquierda: etapas del proceso de polimerización por radicales libre; derecha: tipos de transferencia de cadena.	22
Figura 15 Formación de glicomonómeros via reacción de Könings-Knorr catalizada por triflatos de plata ^[103]	23
Figura 16 Síntesis de vinilglicomonómeros mediante la reacción de Williamson para la formación de enlaces éter	24
Figura 17 Formación de glicomonómeros de acrilato catalizada por BF ₃ Et ₂ O.....	24
Figura 18 Formación de glicomonómeros via adición de aminas a carbonilos de cloruros de ácido.....	25

Figura 19 Reacción de esterificación de Steglich entre un alcohol y un cloruro de ácido	25
Figura 20 Uso del a reacción de Grignard como estrategia para la formación de glicomonómeros de vinilo	26
Figura 21 Reacción de cicloadición azida-alquino [3+2] de Huisgen	26
Figura 22 Síntesis de glicomonómeros via acoplamiento lactona-amina para la formación de glicomonómeros.	27
Figura 23 Esquema general de síntesis del azúcar protegido de D-fructosa 2a	35
Figura 24 Esquema general de síntesis del azúcar protegido de D-fructosa 2b	37
Figura 25 Esquema general de síntesis del azúcar protegido de D-galactosa 2c	39
Figura 26 Síntesis de azúcares protegidos utilizando como disolvente y catalizador al NADES ChCl:MA (1:2) y Me ₂ CO como grupo protector (<i>i</i> Prd)	41
Figura 27 Síntesis de éteres vinílicos utilizando azúcares protegidos y carburo de calcio (CaC ₂)	42
Figura 28 Esquema general de síntesis de alil glicósidos en ChCl:MA, utilizando azúcares sin grupos protectores	46
Figura 29 Síntesis de propárgil glicósidos (4c-g) en ChCl:MA (1:2), utilizando azúcares libres (1c-g) y alcohol propárgilico.....	49
Figura 30 Reacción de transglicosilación catalizada por la enzima CGTasa, para la transferencia específica de residuos α -glucopiranosilo al aceptor 4d , utilizando β -CD como donador α -glucopiranosilo.....	50
Figura 31 Reacción de β -glucosilación catalizada por la β -glucosidasa de almendras	51
Figura 32 β -Galactosidación del alil-glucósido 4d en medio acuoso	52
Figura 33 Reacción de fructosilación del alil-glucósido 4d catalizada por la enzima SacB	53
Figura 34 Esquema general y condiciones de reacción para la síntesis de éteres vinílicos de azúcares protegidos 10	56
Figura 35 Posible mecanismo de reacción para la formación de éteres vinílico	57
Figura 36 Materia prima (1a , 1c) y productos obtenidos (2a-c) en la síntesis de azúcares protegidos	57
Figura 37 Espectro de masas de la D-fructosa protegida 2a	58
Figura 38 Estructura de la D-fructosa protegida 2a y sus espectros ¹ H- ¹³ C HSQC y HMBC (600 MHz, CDCl ₃ , 293 K).....	59

Figura 39 Espectro ^1H - ^1H COSY (600 MHz, CDCl_3 , 293 K) de la D-fructosa protegida 2a	60
Figura 40 Espectro de masas de la D-fructosa protegida 2b	61
Figura 41 Espectro ^1H - ^1H COSY y superposición de espectro ^1H - ^{13}C HSQC y ^1H - ^{13}C HMBC (600 MHz, CDCl_3 , 293 K) del producto isomérico 2b de la D-fructosa protegida	62
Figura 42 Espectro de masas de 2c por ionización por electrospray en modo positivo	63
Figura 43 Estructura, conformación y espectros de RMN bidimensionales (600 MHz, CDCl_3 , 293 K) del azúcar protegido de D-galactosa 2c	64
Figura 44 <i>Mecanismo de reacción y esquema general para la síntesis de vinil azúcares protegidos</i>	66
Figura 45 Espectro ^1H NMR del vinil azúcar 10a y sus correspondientes asignaciones	67
Figura 46 Estructura del vinil azúcar protegido 10b y su espectro de ^1H NMR (200 MHz, CDCl_3 , 296 K)	68
Figura 47 Estructura del di-O- <i>i</i> Prd-6-O-vinil- α -D-Galp 10c y su espectro de ^1H NMR (200 MHz, CDCl_3 , 296 K)	69
Figura 48 Síntesis e identificación de di-O- <i>i</i> Prd azúcares protegidos 2a y 2c	71
Figura 49 Escala de pH de diferentes mezclas eutécticas, utilizando un indicador universal	71
Figura 50 Síntesis y detección de metil-glicosidos	72
Figura 51 Esquema general para la síntesis de alil-glicósidos	73
Figura 52 Espectro de masas del alil-glucósido 4d	73
Figura 53 Espectro ^1H - ^{13}C HSQC del alil-glucósido 4d (600 MHz, D_2O , 294.15 K)	74
Figura 54 Correlaciones del compuesto 4d observadas en el espectro ^1H - ^1H NOESY (600 MHz, D_2O , 294.15 K)	75
Figura 55 Espectro ^1H - ^1H COSY (600 MHz, D_2O , 294.15 K) del alil-glucósido 4d	76
Figura 56 Espectro ^1H - ^{13}C HMBC (600 MHz, D_2O , 294.15 K) del alil-glucósido 4d	77
Figura 57 Propuesta de mecanismo de reacción para la síntesis del alil-glucósido 4d , mediado por un intermediario oxocarbenio	78
Figura 58 Modelos teóricos, calculados para los complejos Glucosa 1d — $\text{ChCl}:\text{MA}$ (1:2) y Glucosa 1d —alcohol alílico— $\text{ChCl}:\text{MA}$ (1:2)	80
Figura 59 Mecanismo de reacción plausible para la síntesis de 4d en el DES $\text{ChCl}:\text{MA}$ (1:2)	81

Figura 60 Síntesis de propargil-glicósidos y su detección por LC-MS.....	82
Figura 61 Síntesis de alil-maltooligosacáridos y su detección por TLC.....	86
Figura 62 Síntesis maltooligosacáridos y su detección por TLC.....	87
Figura 63 Análisis por TLC de la glicosilación enzimática del glicomonómero 4d y detección del producto glicosilado 6d-I por LC-MS.....	88
Figura 64 Esquema general de glicosilación enzimática del aceptor alil-glucósido 4d catalizada por la CGTasa de <i>Thermoanaerobacter</i> sp.....	89
Figura 65 Reacción de β -glucosidación del aceptor alil-glucósido 4d catalizada por una β -glucosidasa de almendras.....	91
Figura 66 Aductos representativos, observados en el espectro de masas	92
Figura 67 Reacción de β -galactosidación del aceptor alil-glucósido 4d catalizada por una β -galactosidasa de <i>Kluyveromyces lactis</i>	92
Figura 68 Análisis por TLC de la glicosilación enzimática del glicomonómero (alil-glucósido 4d) y detección del producto glicosilado 8d-I por LC-MS.....	93
Figura 69 Reacción de β -fructofuranosilación del aceptor alil-glucósido 4d catalizada por una levansacarasa de <i>Bacillus subtilis</i>	94
Figura 70 Análisis por cromatografía en capa fina (TLC) de la β -fructofuranosilación enzimática del glicomonómero 4d	95
Figura 71 Reacción de polimerización, detección de producto y análisis por cromatografía de permeación en gel (GPC).....	97
Figura 72 Estructura del polímero obtenido de la polimerización por radicales libres del glicomonómero alil-glucósido 4d	98
Figura 73 Caracterización estructural del producto de polimerización del alil-glucósido 4d por ATR-FT-IR	100
Figura 74 Copolimerización de alil-glucósido 4d con 1-O-vinil-fructopiranosido 10a y detección del copolímero funcionalizado por cromatografía de permeación en gel (GPC)	101

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Ejemplos reconocimiento de carbohidratos por proteínas, células y patógenos	4
Tabla 2. Punto de fusión (T_f) de diferentes NADES.....	10
Tabla 3. Desplazamiento químico, multiplicidad y valores de constantes de acoplamiento en espectros de ^1H NMR, ^{13}C NMR (600 MHz, 293 K, CDCl_3) del azúcar protegido de D-Fru 2a	36
Tabla 4. Desplazamiento químico, multiplicidad y valores de constantes de acoplamiento en espectros de ^1H NMR, ^{13}C NMR (600 MHz, 293 K, CDCl_3) del producto 2b	38
Tabla 5. Desplazamiento químico, multiplicidad y valores de constantes de acoplamiento en espectros de ^1H NMR, ^{13}C NMR (600 MHz, 293 K, CDCl_3) del producto 2c	40
Tabla 6. Desplazamiento químico, multiplicidad y valores de constantes de acoplamiento en espectro de ^1H NMR (200 MHz, 296.2 K, CDCl_3) del producto 10a .	43
Tabla 7. Desplazamiento químico, multiplicidad y valores de constantes de acoplamiento en espectro de ^1H NMR (200 MHz, 296.2 K, CDCl_3) del producto 10b .	44
Tabla 8. Desplazamiento químico, multiplicidad y valores de constantes de acoplamiento en espectro de ^1H NMR (200 MHz, 296.2 K, CDCl_3) del producto 10c .	45
Tabla 9. Desplazamiento químico, multiplicidad y valores de constantes de acoplamiento en espectro de ^1H NMR (600 MHz, 296 K, D_2O) del producto 4d	47
Tabla 10 (Continuación).....	48
Tabla 11. Comparación de los valores de las constantes de acoplamiento reportadas en la literatura de conformaciones silla y bote torcido, con las obtenidas experimentalmente en el espectro ^1H del producto 2c	65

ABREVIATURAS, SIGLAS, ACRÓNIMOS Y SÍMBOLOS

v. Desplazamiento químico, Desplazamiento químico, Frecuencia de onda

μm . Micrómetro

(BzO)₂. Peróxido de benzoilo

@. Representación de la preposición «a»

°C. Grados Celsius

¹³C, 33, Núcleo de carbono-13

¹H. Núcleo de hidrógeno

AcOEt. Acetato de etilo

AIBN. Azobisisobutironitrilo, 2,2'-Azobis(2-metilpropionitrilo)

ATR. Reflectancia total atenuada

CaC₂. Carburo de calcio

CD₃OD. Metanol deuterado

CDCl₃. Cloroformo deuterado

CGTasa. Ciclodextringlucanotransferasa

CH₂Cl₂. Diclorometano

ChCl. Cloruro de colina

CHCl₃. Cloroformo

cm⁻¹. Unidad inversa de longitud

COSY. Espectroscopía de correlación

D₂O. Agua deuterada

DFT. teoría de funcional de la densidad, por sus siglas en inglés

DMF. Dimetilformamida

DMSO. Dimetilsulfóxido

ESI+. Ionización por electrospray en modo positivo

$E_T(30)$. Parámetro de polaridad de disolvente medido a partir del solvatocromismo del colorante betaína 30

$E_T(30)$. Parámetro de polaridad de disolvente medido a partir del solvatocromismo del colorante betaína 30

EtOH. Etanol

FCC. Cromatografía en columna flash, por sus siglas en inglés

FTF. Fructosiltransferasa

FTIR. Espectroscopía de infrarrojo por transformada de Fourier

g. Gramos

Gal. Galactosa

GalNAc. *N*-acetilgalactosamina

Gb3. *Globotriaosilceramida*

GHs. *Glicosilhidrolasa*

Glc. Glucosa

GlcCer. *Glucocerebrósido*

GlcNAc. *N*-acetilglucosamina

GM1. *Gangliósido GM1*

GTs. *Glicosiltransferasa*

H₂SO₄. *Ácido sulfúrico*

Hal. *Halógeno*

HMBC. *Conectividad heteronuclear a enlaces múltiples*

HSQC. *Coherencia heteronuclear cuántica simple*

Hz. *Hercio*

ⁱPrOH. *2-propanol, iso-Propanol*

IR. *Infrarrojo, Espectroscopía de infrarrojo*

KF. *Fluoruro de potasio*

KOH. *Hidróxido de sodio, Véase*

kV. *Kilovoltio*

LRMS. *Espectrómetro de masas de baja resolución, Espectrometría de masas de baja resolución, por sus siglas en inglés*

m/z. Relación masa (m)-carga (z)

MA. *Ácido malónico*

Man. *Manosa*

Me₂CO. *Acetona*

MeCN. *Acetonitrilo, Acetonitrilo*

MeOH. *Metanol, Metanol*

mg. *Miligramo*

MHz. *Megahercio*

min. *Minutos*

mL. *Mililitro*

mm. *Milímetro*

MΩ·cm. *Resistividad eléctrica del agua*

Na. *Sodio*

Na₂SO₄ anh. *Sulfato de sodio anhidro*

NaNO₃. *Nitrato de sodio*

Neu5Ac. *Ácido N-acetilneuramínico*

nm. *Nanómetro*

NMR. *Resonancia magnética nuclear, por sus siglas en inglés*

NOESY. *Espectroscopia de mejoramiento nuclear de Overhauser*

PBS. *Buffer de fosfatos salino de potasio, por sus siglas en inglés*

pH. *Concentración de iones hidrógeno en solución*

ppm. *Partes por millón*

psig. *Libra-fuerza por pulgada cuadrada, por sus siglas en inglés*

T. *Tesla; unidad de inducción magnética*

TLC. *Cromatografía en capa fina, por siglas en inglés*

TMS. *Tetrametilsilano*

TOCSY. *Espectroscopia de correlación total*

U. *Unidad de actividad enzimática*

UV. *Ultravioleta*

V. *Voltio*

ρ. *Densidad*

RESUMEN

Las interacciones biomoleculares que establecen los azúcares son de gran interés para la ciencia. Actualmente, diversas estrategias han permitido modificar azúcares para construir glicoconjugados, como lo son los glicopolímeros. De manera general, la preparación de glicopolímeros implica diferentes etapas: I) construir glicomonómeros, II) polimerizar dichos monómeros y III) realizar modificaciones posteriores sobre el polímero obtenido. Un número considerable de reportes actuales para sintetizar glicopolímeros utilizan metodologías puramente químicas, tanto para derivatizar y unir al azúcar a un grupo polimerizable, como para llevar a cabo reacciones de polimerización. Estos métodos utilizan reactivos y disolventes tóxicos, de ahí que dichos procesos de síntesis no se consideran amigables con el ambiente.

En este trabajo se desarrolló una estrategia quimioenzimática novedosa para la síntesis dirigida de glicopolímeros, empleando disolventes neotéricos y modulables como son los disolventes eutécticos profundos naturales (NADES). Particularmente, la mezcla eutéctica cloruro de colina y ácido malónico (ChCl:MA 1:2) se utilizó como medio de reacción y como catalizador, permitiendo obtener azúcares con diversos grupos polimerizables (glicomonómeros). De este modo, usando el NADES ChCl:MA (1:2) se incorporaron grupos alilo y propargilo, de manera simple y específica sobre el carbono anomérico de diferentes monosacáridos, así como de distintos oligosacáridos.

Adicionalmente, se evaluaron diversas enzimas para la construcción de secuencias glicosídicas particulares (glicomonómeros funcionalizados), con lo cual se sintetizaron glicomonómeros funcionalizados con grupos α -Glc p , β -Glc p , β -Gal p y β -Fru f . Finalmente, la versatilidad y funcionalidad de esta plataforma de síntesis se validó polimerizando al glicomonómero alil-glucopiranososa **4d**, lo que permitió integrar un proceso versátil, sencillo y metodológicamente compatible con los principios de la química verde.

INTRODUCCIÓN

Los carbohidratos son la materia orgánica más abundante en la Tierra. Estas moléculas son derivados polihidroxilados de aldehídos o cetonas^[1] y se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza^[2]. Los carbohidratos, además de ser la principal fuente de energía, material de construcción y sostén celular en los seres vivos, también intervienen en numerosos eventos de reconocimiento molecular^[3, 4]. Este comportamiento se debe en gran parte a su diversidad estructural, así como a la complejidad con la que pueden unirse y formar entramados moleculares únicos en diferentes sistemas biológicos. Considerando esta versatilidad estructural y funcional, así como el potencial de modificar propiedades de los materiales a los que pueden unirse, en los últimos años se ha impulsado el desarrollo de materiales y compuestos químicos que incorporen carbohidratos a su estructura^[5-8]. Entre estos materiales destacan los glicopolímeros. Este tipo de polímeros son materiales con peldaños de carbohidratos que cumplen diversas funciones importantes dentro y fuera de las células, además de poseer numerosas aplicaciones. En este contexto, existe en la actualidad un interés particular en la búsqueda de metodologías de síntesis que faciliten su obtención de manera eficiente. No obstante, cabe señalar que en los métodos actuales de síntesis de glicopolímeros se enfrenta el reto de construir secuencias definidas de carbohidratos con una alta quimio-, regio- y estereoselectividad. Dichos procesos enfrentan la inherente complejidad de los métodos de glicosilación química. Una alternativa que desde hace algunas décadas resulta viable para enfrentar esta situación es el uso de enzimas, particularmente enzimas activas en carbohidratos (CAZymes). A diferencia de los métodos químicos tradicionales, estas enzimas tienen la capacidad de construir enlaces glicosídicos con una alta quimio-, regio- y estereoselectividad. Las CAZymes naturalmente son responsables de la biosíntesis y biotransformación de los biomateriales en la naturaleza: los azúcares. Ciertamente, estos biocatalizadores presentan una notable habilidad para el reconocimiento y transformación de otros aceptores estructurales ajenos a la de sus sustratos naturales. En este trabajo, se aprovechó la alta selectividad y la gran capacidad que tiene las CAZymes para reconocer y transformar otras moléculas no naturales, de tal manera que se utilizaron como herramienta para la funcionalización de glicomonómeros previamente sintetizados en medios de reacción no convencionales.

1 ANTECEDENTES

1.1 GLICOPOLÍMEROS: SÍNTESIS Y APLICACIONES

1.1.1 Carbohidratos

Los carbohidratos o azúcares pueden definirse químicamente como compuestos órganooxigenados de aldehídos, cetonas o lactoles^[1, 9]. Estas moléculas son la materia orgánica más abundante en la Tierra^[3]. Los azúcares cumplen importantes funciones como fuente y almacenamiento de energía, material de construcción y soporte de estructuras celulares en los seres vivos, además intervienen en numerosos eventos de reconocimiento celular con una alta selectividad (**Figura 1**). Por ejemplo, entre otras funciones, actúan como mediadores de interacciones célula-célula, participan en el reconocimiento y diferenciación celular o en procesos de infecciones por patógenos^[3, 4, 10, 11].

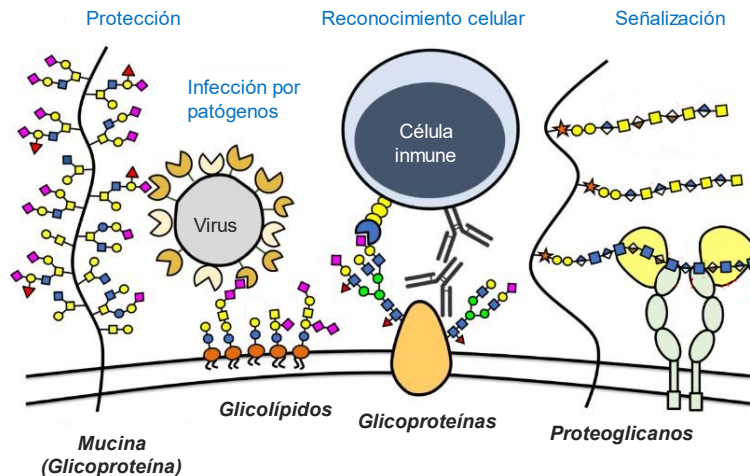


Figura 1. Representación gráfica de la complejidad del glicocáliz celular y su rol en el intercambio de información entre la célula y sus alrededores. Imagen extraída y modificada de Purcell & Godula (2019)^[11]

La eficiencia que tienen estas biomoléculas para cumplir diversas funciones se debe por un lado, a la polifuncionalidad que les confiere el considerable número de hidroxilos que poseen, y por otro lado, a las diversas conformaciones espaciales que pueden adoptar dichas moléculas^[12]. De hecho, los cambios en la orientación espacial de sus sustituyentes contribuyen también a la capacidad de los azúcares para formar una gran cantidad de entramados moleculares al unirse covalentemente con otros azúcares^[13]. Por ejemplo, el caso de la D-glucosa; una aldohexosa de seis carbonos, al combinarse con otra unidad de D-glucosa a través de un enlace glicosídico, resulta en la formación

de cerca de 19 disacáridos con propiedades fisicoquímicas y biológicas muy diferentes (Figura 2)^[14, 15]. Así mismo, esta complejidad puede aumentar considerablemente si se toma en cuenta las configuraciones tipo piranosa y furanosa que pueden adoptar los azúcares.

Es importante señalar que la amplia diversidad estructural y funcional de los carbohidratos, les permite además, establecer comunicación química con otro tipo de moléculas a través de distintas interacciones moleculares no covalente, tales como: enlaces de hidrógeno, coordinación con metales, interacciones hidrofóbicas o hidrofílicas, interacciones CH- π y fuerzas de van der Waals^[16, 17]. La suma de todas estas interacciones tiene como resultado que los carbohidratos sean capaces de establecer una íntima comunicación con receptores biológicos^[5].

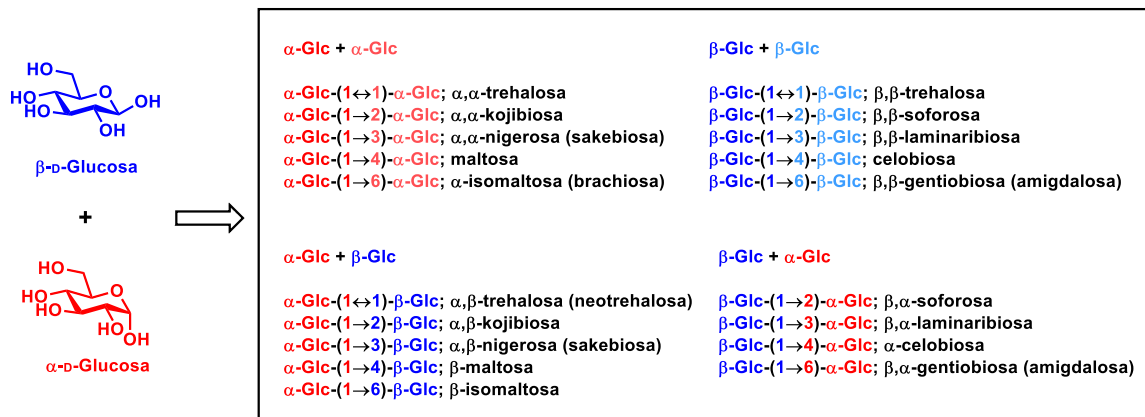


Figura 2. Disacáridos formados por la unión de dos unidades de D-glucosa

Los azúcares no solo se encuentran unidos covalentemente a otros azúcares, en la naturaleza es frecuente encontrarlos conjugados a otras estructuras químicas no glicosídicas (agliconas), tales como: aminoácidos, lípidos, nucleótidos, compuestos fenólicos, alcaloides, terpenos, entre otros^[18, 19]. La glicosilación de moléculas tipo no-azúcar modula su carácter hidrofílico, y además cambia sus propiedades farmacocinéticas, nutraceúticas y de reconocimiento molecular. De hecho, la glicosilación altera propiedades como la solubilidad, estabilidad y volatilidad de las correspondientes agliconas. Se ha reportado que la unión de carbohidratos a diferentes metabolitos secundarios, puede modificar propiedades tales como: su actividad antioxidante, su función intracelular o su estabilidad y transporte^[20]. En resumen, la variabilidad estructural que presentan los azúcares, así como su capacidad para

modificar, conferir y/o potenciar propiedades fisicoquímicas de otras moléculas, ha hecho que en los últimos años se impulse el desarrollo de materiales que incorporen carbohidratos a su estructura.

1.1.2 Glicopolímeros: materiales híbridos y polifuncionales

Existen diversos eventos de reconocimiento celular, tales como las infecciones por patógenos u otros agentes nocivos, mediados por interacción carbohidrato-proteína o carbohidrato-carbohidrato^[5, 10, 11]. Algunos ejemplos de interacciones carbohidrato-ligando de interés biológico son presentados en la **Tabla 1**^[11, 21].

Tabla 1. Ejemplos reconocimiento de carbohidratos por proteínas, células y patógenos

	Ligando	Carbohidrato
Lectina	Concanavalina A (ConA)	α -Man/ α -Glc
	Aglutinina de <i>Ricinus communis</i> (RCA ₁₂₀) y RCA ₆₀	β -Gal/ β -GalNAc
	Aglutinina del maní	β -Gal
	Lectina de <i>Sambucus nigra</i>	α -Neu5Ac(2-6)- β -Gal/GalNAc
	Selectinas (E-, L-, P-)	Sialil-Lewis ^x , Sialil-Lewis ^A
	Galectinas (-1 ~ -15)	β -Gal
Célula	Hepatocito (HepG2)	β -Gal, β -Gal(1→4)GlcNAc
	Macrófago	Man
Patógeno	Toxinas Shiga (<i>E. coli</i> O-157, H-7, etc.)	Gb3: α -Gal(1→4)- β -Gal(1→4)- β -GlcCer
	Toxina de <i>Vibrio cholera</i>	GM1: β -Gal(1→3)- β -GalNAc(1→4)(α -Nau5Ac-3)- β -GlcCer
	Hemaglutinina de influenza A (humana)	α -Neu5Ac(2-6)Gal
	Hemaglutinina de influenza A (aves)	α -Neu5Ac(2-3)Gal
	<i>E. coli</i> tipo 1	α -Man
	<i>E. coli</i> P-adhesión	α -Gal(1→4)- β -Gal
	VIH-gp120-DC-SIGN	Man

Debido a su relevancia biomédica, el estudio de los eventos de reconocimiento molecular mediados por carbohidratos cobra especial interés. Dichos estudios *in vitro* o *in vivo*, se realizan en su mayoría con modelos de estudio que requieren de glicanos naturales. Tradicionalmente, dicha estrategia implica el aislamiento, purificación y caracterización de los glicanos en cuestión, a partir de fuentes naturales, y en algunos casos requiere de modificaciones posteriores por métodos químicos [16].

En años recientes, como alternativa a la recuperación de glicanos de fuentes naturales, se ha recurrido a la obtención de estos compuestos mediante procesos de síntesis de glicopolímeros. Los glicopolímeros pueden definirse como polímeros sintéticos, que integran peldaños de azúcares en su estructura[7], estas moléculas se construyen normalmente a partir de intermediarios conocidos como glicomonómeros (carbohidrato + grupo polimerizable), los cuales se polimerizan para obtener los correspondientes arreglos (Figura 3).

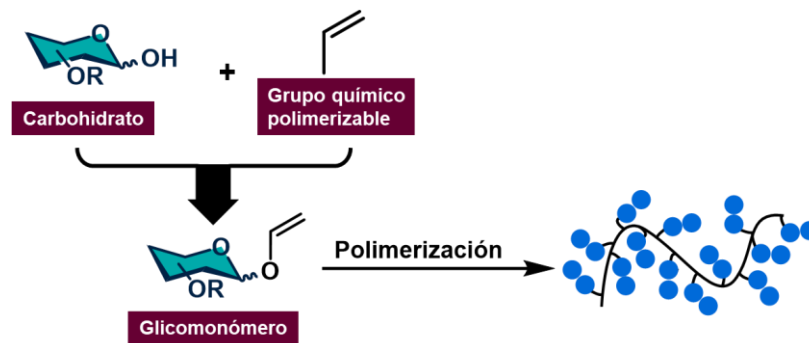


Figura 3. Definición gráfica y ruta de síntesis para la preparación de glicopolímeros

Una vez que se sintetizan los glicopolímeros, al igual que los glicanos naturales, estas macroestructuras híbridas y polifuncionales, son capaces de formar diferentes arreglos, conocidos como «clúster», de arquitecturas variadas. La intención de sintetizar glicopolímeros que sean capaces de formar estos arreglos estructurales, es la de mimetizar a los biopolímeros, polisacáridos y/o glicanos naturales[11]. Algunos de los «clúster» sintéticos o naturales más comunes, son los glicolípidos, glicocalixarenos, glicodextrinas, glicopéptidos y glicopolímeros[6, 7, 11, 17], los cuales se esquematizan en la Figura 4.

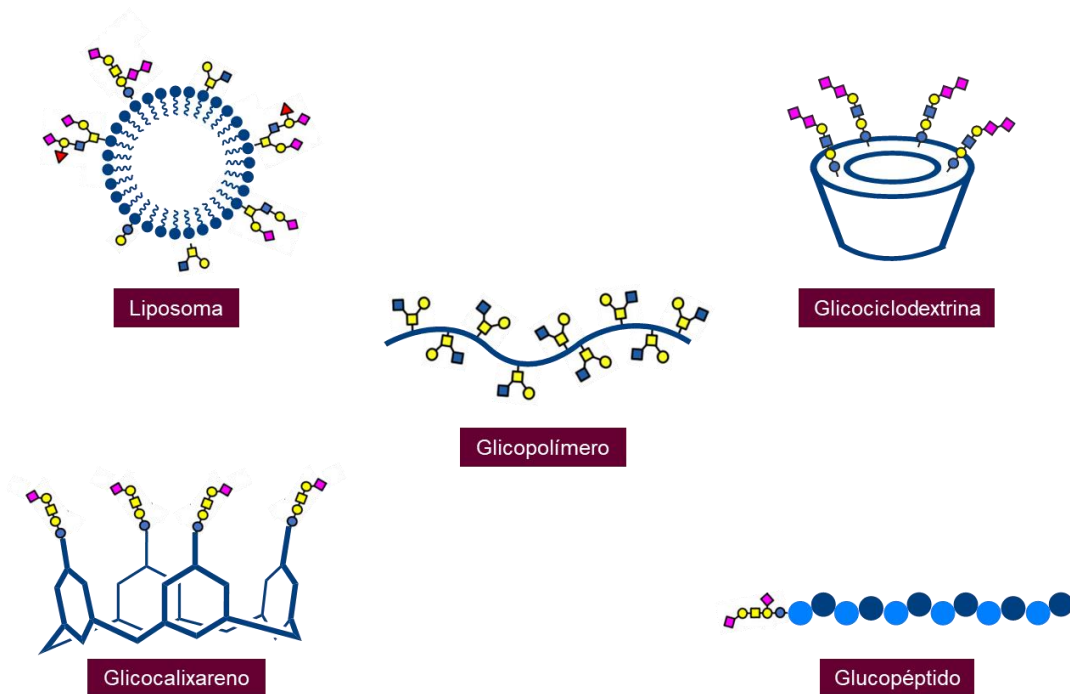


Figura 4. Estructuras de glicoconjugados sintéticos y/o semisintéticos, capaces de mimetizar la arquitectura y comportamiento de glicanos naturales

Estas macroestructuras no solo se emplean en el área de la glicobiología, su espectro de aplicaciones es mucho más amplio (**Figura 5**). De hecho, se han reportado aplicaciones en el área de bionanotecnología para la fabricación de hidrogeles, nanopartículas y acarreadores moleculares de fármacos. Así mismo, en el área del reconocimiento biomolecular, estos materiales se utilizan para estudiar el efecto del reconocimiento biológico de lectinas o la afinidad a ciertas células específicas. Igualmente, los glicopolímeros se utilizan para la eliminación de virus y bacterias, así como para el diseño de bloques de construcción para la síntesis de moléculas más complejas^[8, 17, 22]. De esta manera, la capacidad que tiene los glicopolímeros para mimetizar a biopolímeros y/o glicanos naturales, así como a las atractivas aplicaciones que conlleva el incorporar carbohidratos a otras estructuras químicas, dio lugar a que en los últimos años se profundizó en el desarrollo y mejora de procesos de fabricación de estos materiales^[21]. De hecho, desde los primeros reportes de glicopolímeros por Hořejší *et al.* (1978)^[23], hasta la actualidad, se han desarrollado diferentes métodos y estrategias para su síntesis. De modo que, obtener glicopolímeros de manera sintética a pequeña y gran escala, se vuelve una necesidad académica e industrial.

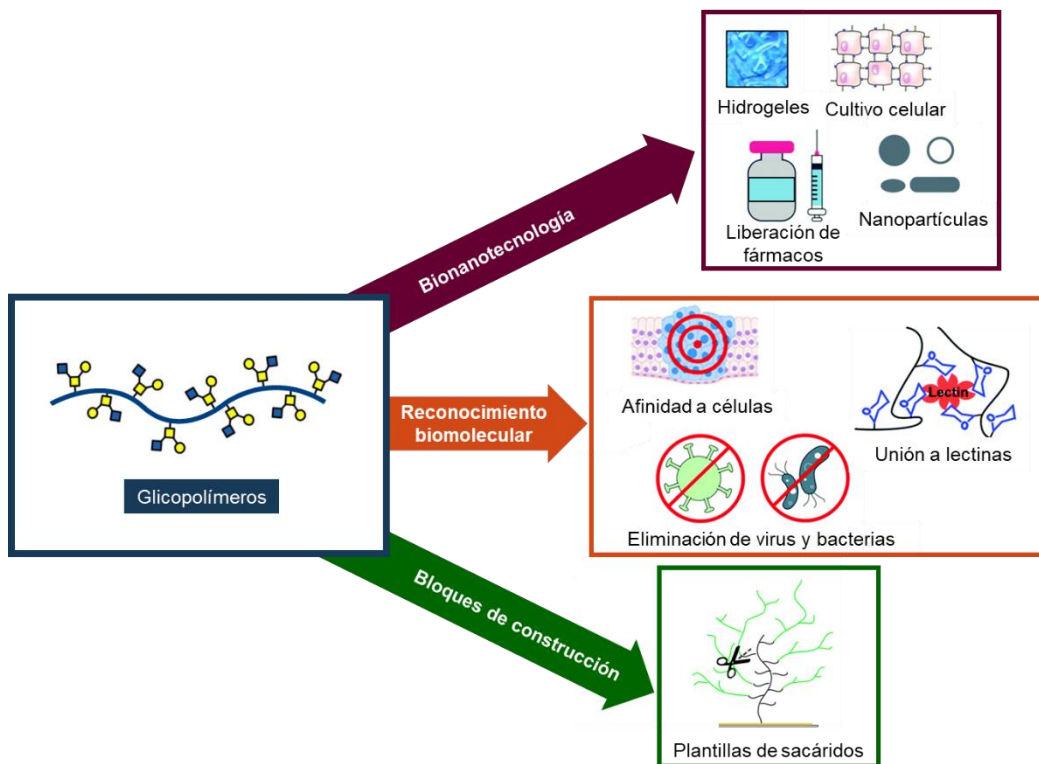


Figura 5. Aplicaciones más importantes que actualmente poseen los glicopolímeros

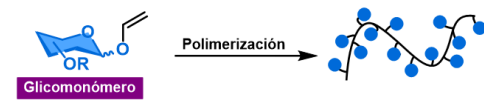
1.1.3 Principales estrategias para la síntesis de glicopolímeros

Las estrategias generales para la síntesis de glicopolímeros se ilustran en la **Figura 6**, donde se observa que es posible obtener estos polímeros como resultado de la polimerización directa del glicomonómero (**Figura 6A**). Por otro lado, la unión de un glicomonómero al esqueleto de un polímero sintetizado, permite también obtener estos arreglos estructurales, siempre y cuando el polímero (previamente construido) posea regiones o grupos en donde anclar al carbohidrato funcionalizado (**Figura 6B**). Una tercera ruta de síntesis es mediante la polimerización secuencial en bloques (**Figura 6C**), donde el ensamblaje progresivo de las cadenas de polímeros hace posible construir glicopolímeros anfipáticos y/o multifuncionales.

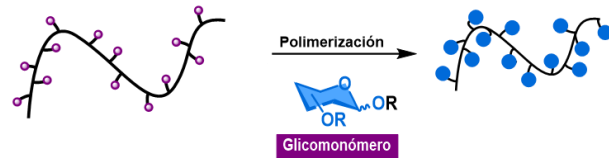
Si bien, cada una de las estrategias anteriores tiene sus ventajas particulares, enfrentan un reto en común, requieren de un monómero que contiene al carbohidrato específico a cada caso (glicomonómero). Actualmente, existe una gran disponibilidad de carbohidratos comerciales, lo que abriría la posibilidad de construir un amplio espectro de glicomonómeros. Sin embargo, la realidad es que la construcción de glicomonómeros o secuencias específicas de glicomonómeros se ve restringida por la complejidad y la

alta inespecificidad de los procesos químicos empleados para la formación de enlaces glicosídicos.

A) Polimerización aleatoria



B) Modificación del copolímero posterior a la polimerización



C) Polimerización secuencial por bloques

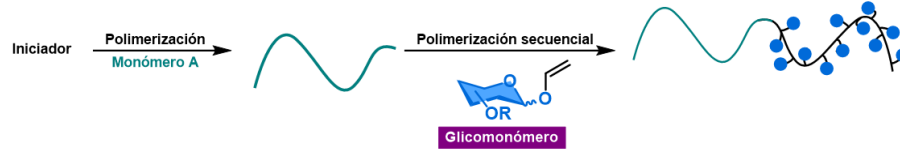


Figura 6. Estrategias principales empleadas en la síntesis de glicopolímeros

1.2 DISOLVENTES EUTÉCTICOS PROFUNDOS NATURALES (NADES)

Las mezclas eutécticas (del griego «eútēktos», «que se funde fácilmente») son mezclas de compuestos orgánicos y/o inorgánicos, en proporciones estrictamente definidas, las cuales presentan un punto de fusión sensiblemente más bajo que el de sus componentes^[24, 25]. La formación de disolventes eutécticos se realiza por diversos métodos^[26] como: el calentamiento directo y agitación^[27, 28], mediante liofilización^[29], aplicando calentamiento y vacío^[30], utilizando microondas^[26, 31], a través de ultrasonido^[26] o mediante procesos de extrusión^[32]. El término de disolvente eutéctico profundo (DES, por sus siglas en inglés) es relativamente nuevo^[33, 34], Abbott et al. (2003)^[33] sugieren que en la formación de mezclas eutécticas, el aumento de la conductividad es dependiente de la temperatura y de la depresión del punto de fusión. Lo cual es consecuencia de la interacción entre las moléculas del donador de enlaces de hidrógeno (HBD) y del anión en el aceptor de enlaces de hidrógeno (HBA; por ejemplo el anión cloruro [Cl⁻], en el caso del cloruro de colina). Lo cual podría sugerir que la reducción entre las interacciones electrostáticas del catión y anión en el HBA, provoca el decremento en el punto de fusión. Los primeros DES se prepararon utilizando sales cuaternarias de amonio mezcladas con glicerol^[35], urea^[36] y/o ácidos carboxílicos^[37], sin embargo hoy en día se utiliza un amplio rango de compuestos, al grado de considerar a

los DES como disolventes de «diseño» o «modulables». Estas «librerías moleculares» permiten ajustar las propiedades físicas y químicas de los DES, acorde a las características deseadas.

En este sentido, los disolventes eutécticos naturales profundos (NADES, por sus siglas en inglés), son aquellos que de manera particular se forman básicamente de productos naturales y/o compuestos biodegradables^[26, 30, 38]. El termino inicialmente se acuñó a aquellas mezclas eutécticas que se encontraban en la naturaleza^[30] y que eran producidos por los organismos vivos bajo ciertas circunstancias (como la miel o el jarabe de maple). No obstante, actualmente el término *natural* en los NADES, se extiende a cualquier mezcla eutéctica formada por componentes naturales de fuentes renovables: urea, azúcares, lípidos, ácidos carboxílicos, polioles, aminoácidos, alcaloides, terpenos, betaína, cloruro de colina (ChCl), etc.

Actualmente, los NADES son capaces de incorporarse en diferentes procesos químicos de extracción y separación, en reacciones de síntesis química e incluso en reacciones enzimáticas^[34, 39-43]. De esta manera, su carácter biocompatible, sus múltiples y potenciales aplicaciones (*vide infra*, **Sección 1.2.1**), así como la posibilidad de diseñar estos medios a medida de las necesidades^[44], los convierte en potentes y versátiles herramientas de síntesis que siguen los principios de química verde^[45]. Como ya se mencionó, las mezclas eutécticas (DES y NADES) se forman mezclando dos o más componentes, que generan una nueva fase con un punto de fusión mucho menor que el de los componentes individuales. En la **Tabla 2** se muestra el punto de fusión (T_f) de varios NADES formados con ChCl como HBA, donde se observa que el T_f es considerablemente más bajo que el punto de fusión del donador de enlaces de hidrógeno (T_m). La dinámica en la formación/ruptura de enlaces de hidrógeno entre las moléculas de los NADES se debe a diversos factores fisicoquímicos^[46]. Un diagrama de la función de distribución espacial del NADES ChCl:Urea (1:2), muestra que la interacción de sus componentes no es del todo dominada por enlaces de hidrógeno.

Tabla 2. Punto de fusión (T_f) de diferentes NADES

Donador de enlaces de hidrógeno (HBD)	Relación molar ChCl:HBD	T_m (°C)	T_f (°C)
Urea	1:2	134	12
Glicerol	1:2	17.8	-40
Ácido adípico	1:1	153	85
Ácido benzoico	1:1	122	95
Ácido cítrico	1:1	149	69
Ácido malónico	1:1	135	10
Ácido oxálico	1:1	190	34
Ácido succínico	1:1	185	71
Ácido levulínico	1:2	32	25
Ácido itacónico	1:1	166	57 ± 3
Xilitol	1:1	96	25
D-sorbitol	1:1	99	25
Ácido L-(+)-tartárico	1:0.5	171	47 ± 3
Ácido cafeico	1:0.5	212	67 ± 3
Ácido <i>p</i> -cumárico	1:0.5	214	67 ± 3
Ácido <i>trans</i> -cinámico	1:1	133	93 ± 3
Ácido gálico	1:0.5	251	77 ± 3

T_m : punto de fusión de donador de enlaces de hidrogeno

T_f : punto de fusión del NADES

Tradicionalmente, se ha sugerido que debido a las propiedades fisicoquímicas de estas mezclas, el comportamiento de los disolventes eutécticos sigue la teoría de hueco o agujero (del inglés «hole theory»)^[47]. Esta teoría sugiere que el radio medio del hueco, de la red cristalina formada, disminuye causando que aumente la viscosidad (ver **Figura 7**). En otras palabras, la viscosidad en los NADES es afectada por la relación ion-tamaño de hueco, ya que estos huecos tienen tamaños y ubicaciones aleatorias bajo flujo constante^[48, 49].

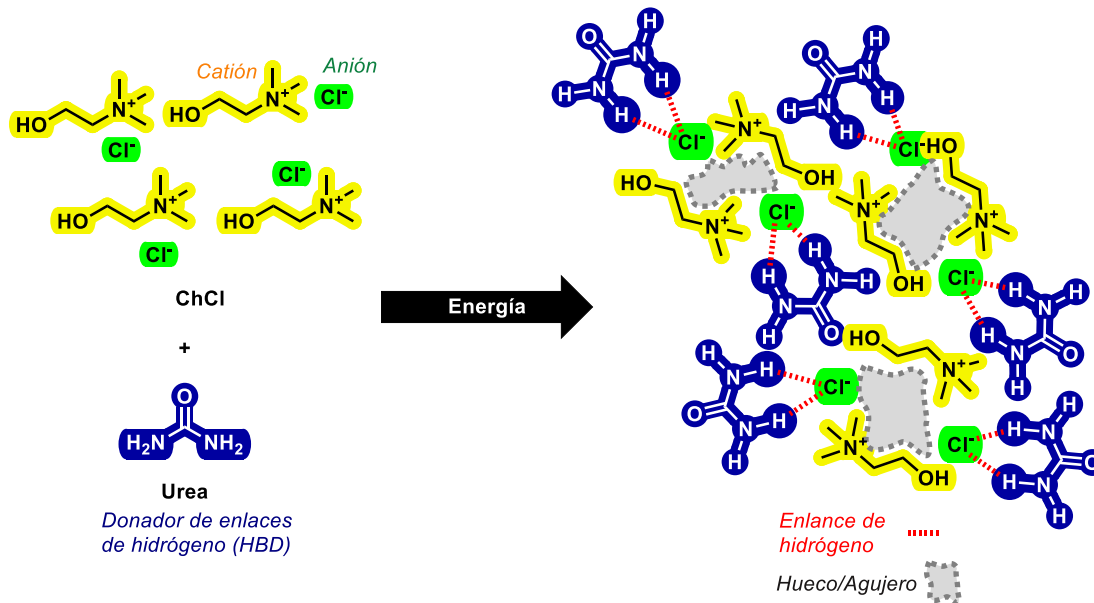


Figura 7. Relación ión-tamaño de hueco/agujero en la estructura del NADES cloruro de colina (ChCl) y urea

En la **Figura 8A**, se aprecia como el ChCl tiende a distribuirse radialmente a lo largo del eje del grupo carbonilo de la urea. Además de enlaces de hidrógeno iónicos y moleculares, se sugiere también la existencia de dobles enlaces de hidrógeno iónicos (**Figura 8B**), con lo cual, entre más fuerte es la interacción de enlaces de hidrógeno entre ChCl y urea, mayor será el fino balance de fuerzas entre todas las especies moleculares. Lo anterior contribuye a la entropía del sistema y previene que la mezcla cristalice a temperatura ambiente^[50].

Debido a que los donadores de enlaces de hidrógeno en los NADES usualmente son polioles, ácidos con múltiples grupos carboxilo, aminas o amidas, se podría asumir que los NADES teóricamente pertenecerían a los disolventes próticos. Sin embargo, la presencia de regiones iónicas permite a los NADES disolver compuestos iónicos. No obstante, el cierto grado de heterogeneidad espacial en los NADES, hace que estos presenten regiones polares y no polares^[51-53]. En consecuencia, debido a la estructura intrínseca de los NADES, estos disolventes neotéricos pueden tener diferentes polaridades. Lo que permite que existan medios con polaridades cercanas a 4; lo que los hace muy similares al cloroformo, hasta aquellos NADES con una polaridad muy similar a la del agua. Con lo cual se presenta la posibilidad de disolver una gran cantidad de reactivos y catalizadores orgánicos y/o inorgánicos^[51].

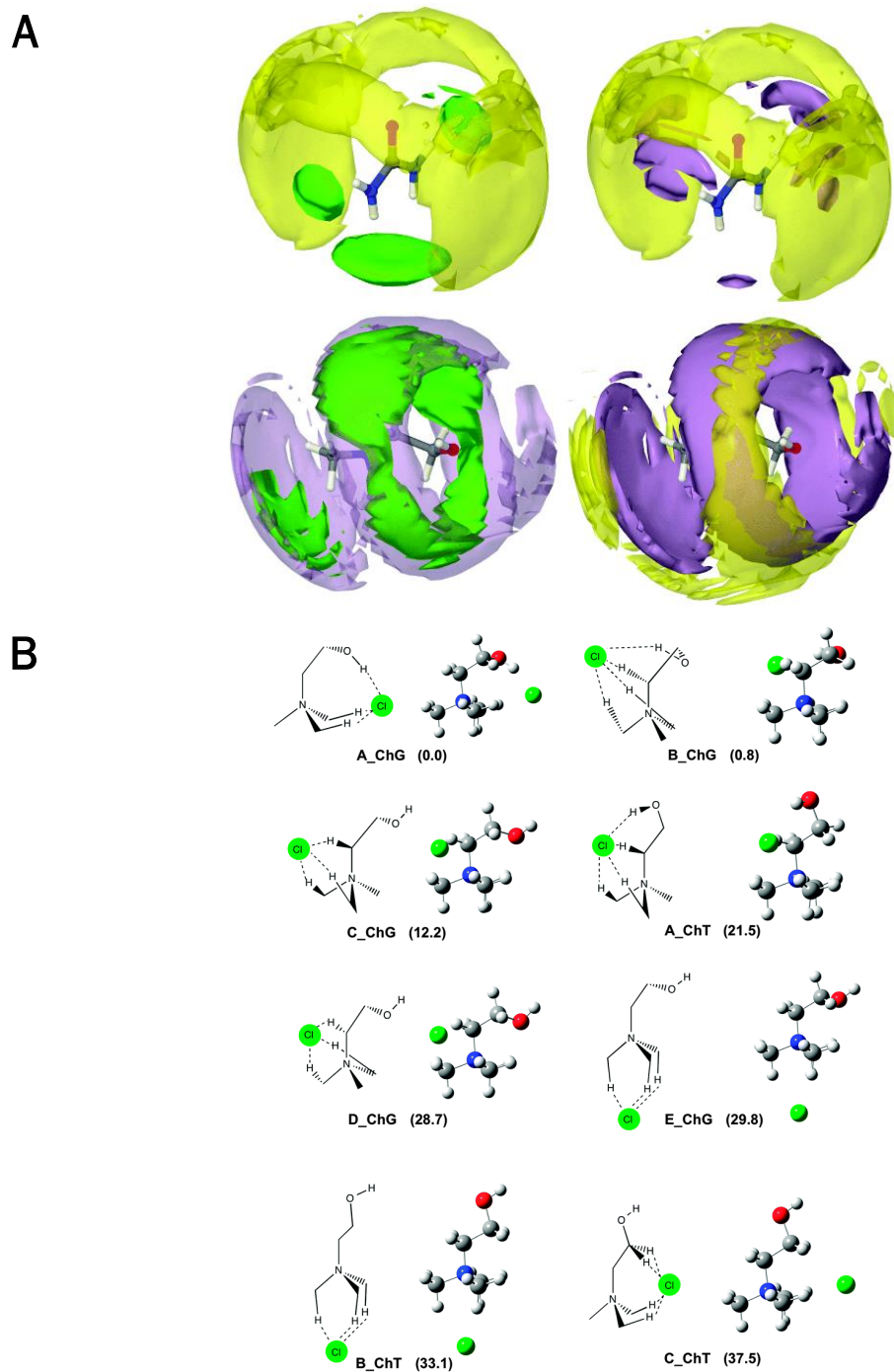


Figura 8. Estructura del NADES ChCl:U (1:2)

A: Función de densidad espacial 3D del NADES ChCl:Urea (1:2). Isosuperficies del 7.5% de las configuraciones más probables de los centros moleculares. En **amarillo** cationes de colina, en **azul** moléculas de urea y en **verde** aniones cloruro. B: estructuras espaciales y energías (kJ/mol) del par iónico en ChCl.

1.2.1 Los NADES en síntesis orgánica

En una reacción química el disolvente orgánico desempeña varios roles. Además de facilitar la transferencia de masa y energía en una reacción, el disolvente estabiliza los estados de transición y modifica parámetros como la reactividad y la selectividad del proceso. El disolvente también puede influir en la acidez y basicidad de los solutos. De este modo, la elección adecuada de un disolvente se vuelve crucial, ya que puede afectar también la velocidad y el éxito de la reacción. Encontrar el disolvente apropiado a menudo implica un proceso de ensayo y error. Adicionalmente, a nivel industrial la elección de un disolvente determina el método de purificación, la posibilidad de recuperarlo y las medidas de eliminación adecuadas, lo que implica considerar aspectos como el costo y la toxicidad que este pueda generar^[54-59].

Los disolventes orgánicos convencionales son productos manufacturados a partir de petróleo y sus derivados^[60]. La mayoría exhibe alta presión de vapor y no son miscibles en agua. Constituyen un grupo heterogéneo de compuestos volátiles, ampliamente utilizados como medios de reacción tanto en laboratorio como a nivel industrial^[61]. Presentan un gran riesgo en su manipulación, almacenamiento y empleo^[62]; no son intrínsecamente seguros debido a que su inflamabilidad es un riesgo de explosión. Además de los daños a la salud que pueden provocar^[63]; desde un punto de vista ambiental, los disolventes orgánicos son volátiles, lo que quiere decir que al ser emitidos a la atmósfera pueden contribuir a la contaminación ambiental y participar activamente en diversos procesos fotoquímicos, acelerando el deterioro de la capa de ozono^[64]. En este contexto, encontrar medios de reacción baratos y seguros para aplicarlos en síntesis orgánica, se vuelve una necesidad y un reto a enfrentar por los químicos modernos^[65, 66].

En los últimos años, los NADES han comenzado a tener un mayor número de aplicaciones. Se ha demostrado que los NADES tienen una gran capacidad para actuar como disolventes y catalizadores reutilizables y ecológicamente compatibles^[30, 38, 39, 67]. Durante el diseño de metodologías verdes y eficientes, se busca prescindir de esquemas de protección/desprotección, derivatización y/o activación. No obstante, tanto las rutas de protección como desprotección son estrategias comunes en procesos sintéticos. En este sentido, recientemente Rokade & Bhate (2017)^[41] desarrollaron un método eficiente y rápido para la derivatización de azúcares libres a los correspondientes di-O-

isopropilidenglicósidos, utilizando un NADES compuesto por cloruro de colina y ácido malónico en una relación molar 1:2 (ChCl:MA 1:2, **Figura 9A**). Esta metodología es atractiva en términos de tiempo de reacción, rendimiento y pureza de los compuestos obtenidos. Un protocolo similar es el presentando en la **Figura 9B**, donde se utilizó una mezcla eutéctica de ChCl y ZnCl₃ para la per-O-acetilación de azúcares, obteniendo rendimientos moderados (80-88%) y con la posibilidad de reciclar y reutilizar al disolvente. Por otra parte, se ha reportado también que una mezcla de ChCl:MA (1:2) permite el ataque nucleofílico de un alcohol sobre glicósidos 2,3-insaturados (**Figura 9C**). Lo cual quiere decir que los procesos de protección y derivatización de carbohidratos podrían ser un método barato, no tóxico y con la posibilidad de reutilizar el medio de reacción.

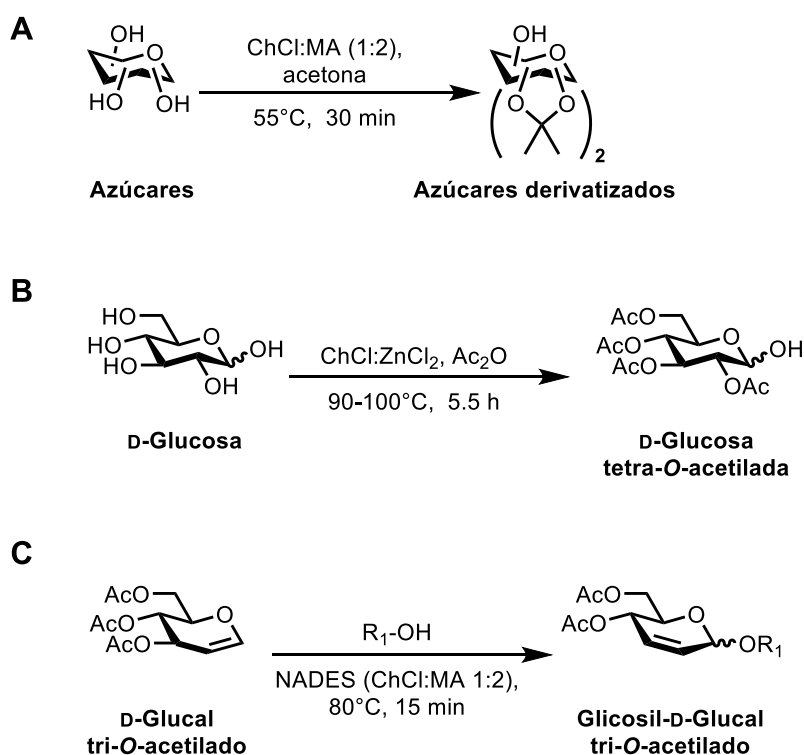


Figura 9. Transformaciones químicas de azúcares utilizando mezclas eutécticas

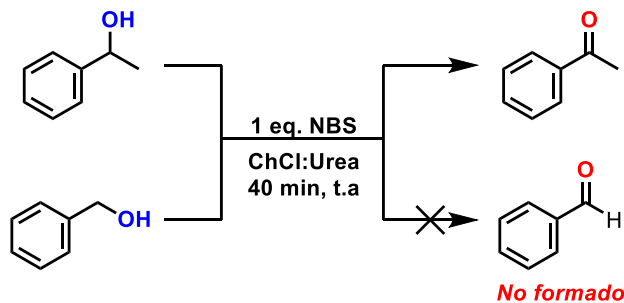
A: Síntesis de di-O-isopropiliden azúcares en NADES^[44]. B: Preparación de per-O-acetil hemiacetal^[68]. C: Síntesis de glicósidos 2,3-insaturados; donde R1= azúcares^[69].

Muchas otras reacciones se han beneficiado de las propiedades y versatilidad de los NADES, empleándolos como medio de reacción y/o como catalizador. Ejemplo de ello se ilustra en la **Figura 10**, que muestra diferentes transformaciones químicas donde los NADES desempeñan un rol como catalizador y/o como medio de reacción. De esta

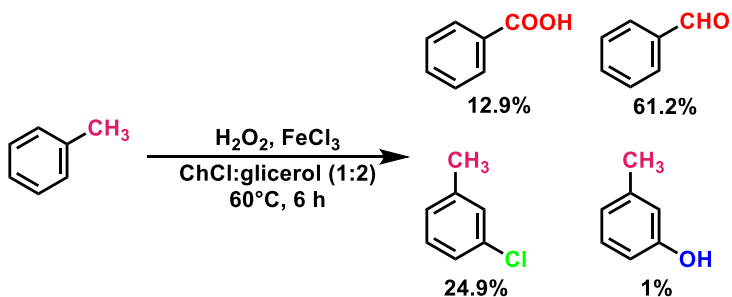
manera, en la **Figura 10A** se ilustra la oxidación quimioselectiva de alcoholes secundarios en NADES ChCl:Urea y NBS en condiciones suaves de reacción^[70]. La reacción anterior permite una oxidación selectiva y sin productos secundarios, como lo es la sobreoxidación a los correspondientes ácidos carboxílicos. En este sentido, las reacciones de oxidación tienen un importante papel a nivel industrial. Recientemente, se reportó el uso de diversos NADES que en conjunto con sales, catalizan la oxidación de tolueno a benzaldehído utilizando H₂O₂ como agente oxidante^[71] (**Figura 10B**). En este caso el NADES, activa de manera efectiva al H₂O₂ mediante la polarización del enlace peróxido, lo que resulta en promover la reacción de oxidación. Adicionalmente, la baja viscosidad del NADES permitió un mejor intercambio de masa en el sistema bifásico NADES/tolueno.

Por otro lado, se han explorado reacciones de reducción en NADES con una diversidad de sustratos y reactivos. Azizi *et al.* (2012)^[72] reportaron un método quimio- y regioselectivo para la reducción de epóxidos y compuestos carbonílicos, empleando NaBH₄ en el medio ChCl:Urea (**Figura 10C**). Condiciones similares a las anteriores, son las ilustradas en la **Figura 10D**, donde la síntesis de aminas secundarias transcurre a través de la aminación reductiva de aldehídos o cetonas en presencia de NaBH₄ como agente reductor y ChCl:Urea (1:2) como catalizador en metanol^[73]. Los diversos sustratos estudiados en este trabajo muestran la versatilidad que tiene los NADES para catalizar reacciones, proporcionando sistemas catalíticos eficientes, libres de metales y/o catalizadores tóxicos.

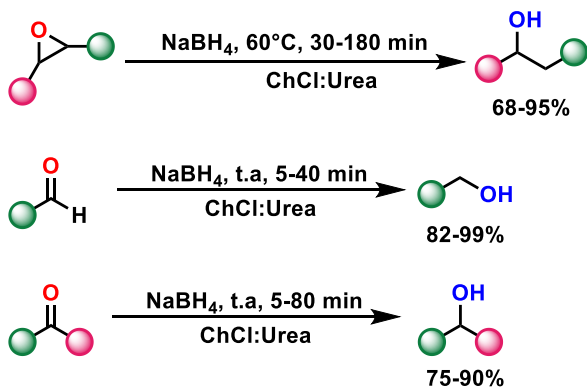
A) Oxidación de alcohol bencílico con NBS en un NADES ChCl:Urea



B) Oxidación de tolueno en presencia de H₂O₂ en NADES



C) Síntesis de alcoholes mediante reducción de epóxidos y compuestos carbonílicos en NADES



D) Aminación reductiva de carbonilos aromáticos y alifáticos, utilizando un NADES ChCl:Urea

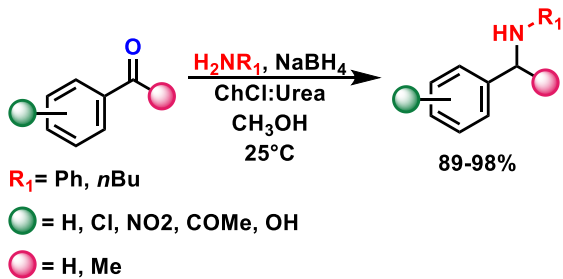


Figura 10 Ejemplos de diferentes reacciones químicas donde se utilizaron NADES como medio reacción y/o catalizador

Debido a las propiedades y aplicaciones de los NADES (*vide supra*), estos medios de reacción han impactado también en la biocatálisis. La estabilización de enzimas^[74] en este tipo de disolventes ha hecho que su aplicación en la biocatálisis aumente. Por ejemplo, Gorke *et al.*, (2008)^[75], fueron de los primeros autores en reportar que ciertas hidrolasas exhiben actividad catalítica en NADES, a pesar de que estos contienen urea (ChCl:U); que normalmente desnaturaliza a las proteínas, o alcoholes (ChCl:Glicerol); los cuales interfieren en las reacciones catalizadas por este tipo de enzimas. Recientemente, Craveiro *et al.* (2019)^[76] utilizaron la especificidad que poseen la lipasa de *Candida rugosa* (CRL), para diseñar la resolución racémica de *rac*-mentol (**Figura 11**). En este caso el NADES compuesto por ácido láurico y *rac*-mentol actuó de manera ambivalente, es decir como disolvente y como sustrato en la esterificación catalizada por CRL. En este sentido, el uso combinado de enzimas y NADES permite obtener procesos eficientes, selectivos y biocompatibles.

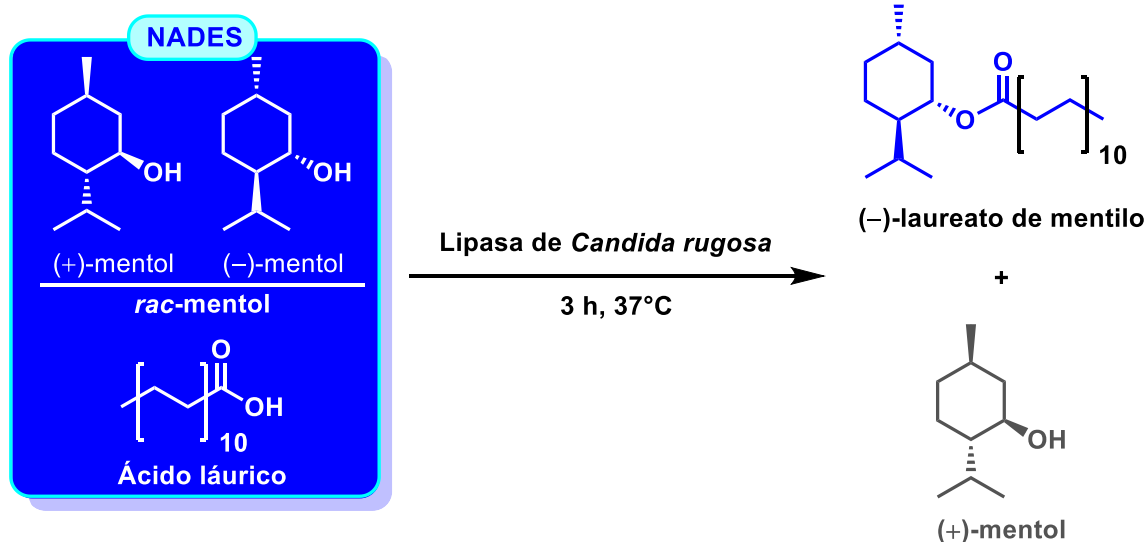


Figura 11 Resolución racémica de *rac*-mentol a través su esterificación con ácido láurico catalizada por la lipasa de *Candida rugosa*, donde los sustratos forman parte del NADES

1.3 ENZIMAS ACTIVAS EN CARBOHIDRATOS: SÍNTESIS DE GLICÓSIDOS Y POLISACÁRIDOS

Las reacciones de glicosilación química podrían considerarse una de las reacciones más importantes en el campo de la glicoquímica. Sin embargo, involucra uno de los mecanismos más complejos y discutidos empíricamente en química orgánica^[77, 78]. En sí misma, la glicosilación química es uno de los mayores retos en síntesis orgánica^[79].

Uno de los aspectos principales, y sobre todo el más difícil de controlar, es la variabilidad estructural de los sustituyentes hidroxilo en el azúcar, particularmente la estereoquímica del carbono anomérico en el subsecuente producto glicosilado [80]. Una alternativa que ha resultado eficaz para enfrentar la complejidad de los procesos de glicosilación química, es el uso y aprovechamiento de las condiciones de reacción y la alta especificidad asociadas al uso de enzimas y/o biocatalizadores. Ciertamente, el constante desarrollo de la biotecnología ha hecho que cada vez se cuente con un mayor número de biocatalizadores eficientes y versátiles.

Actualmente se ha identificado un número considerable de enzimas que hidrolizan y forman enlaces glicósidos entre un donador glicosilo y un aceptor glicosilo adecuado[81]. Estas enzimas activas en carbohidratos (CAZymes) son capaces de realizar reacciones de glicosilación con una alta selectividad por la posición y naturaleza del carbono anomérico. En la **Figura 12** se representan algunas clases de CAZymes así como la reacción que catalizan[82]. Este tipo de reacciones, a diferencia de las glicosilaciones químicas, no requieren de una exhaustiva manipulación del aceptor glicosilo o de la necesidad de esquemas de protección/desprotección[18].

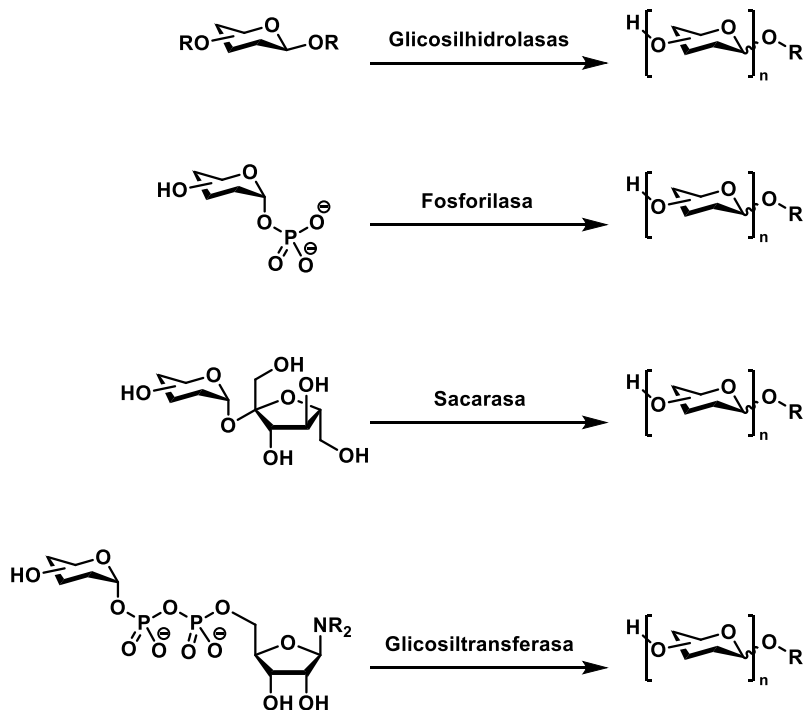


Figura 12 Reacciones de glicosilación catalizadas por enzimas activas en carbohidratos (CAZymes) hacia una molécula aceptora (R)

Actualmente, y gracias al desarrollo de las herramientas biotecnológicas, estas enzimas son cada vez más disponibles y versátiles. Aunque de manera natural las CAZymes catalizan la biosíntesis y biotransformación de carbohidratos, biopolímeros y glicanos en la naturaleza, la biotecnología moderna ha permitido obtener variantes de enzimas mejoradas en su estabilidad y capacidad catalítica. Una ventaja adicional de las CAZymes es que pueden actuar sobre otro tipo de sustratos no naturales, de diferente tamaño, conformación y estereoquímica [82-84].

Las CAZymes pueden clasificarse en: A) glicosilhidrolasas (GHs), las cuales catalizan la hidrólisis del enlace glicosídico entre dos o más carbohidratos, o entre un carbohidrato y otra molécula no glicosídica. Adicionalmente, las GHs son capaces de hacer uso de la reacción inversa de hidrólisis (proceso termodinámico) o la transglicosilación (proceso cinético) para formar enlaces glicosídicos [82]. B) las glicósido fosforilasas, que utilizan azúcares 1-fosfato; compuestos relativamente estables como donadores glicosilo, forman enlaces glicosídicos con una alta estereo- y regioselectividad. A pesar de que no han sido empleadas tanto como otras CAZymes, las glicósido fosforilasas son biocatalizadores versátiles que poseen un gran potencial para la síntesis de diversos carbohidratos y glicósidos [85]. C) las sacarasas, son enzimas que utilizan sacarosa como sustrato. Por una parte, las fructosiltransferasas (FTF) emplean sacarosa como donador glicosilo, transfiriendo residuos fructosilo a otra molécula aceptora, por otra parte las glucosiltransferasas (GTF) emplean sacarosa como donador glicosilo, transfiriendo residuos glucosilo a otra molécula aceptora. Estas enzimas se han aplicado para la síntesis de una gran variedad de fructooligosacáridos, glucopolímeros, fructosidos, glucosidos y biopolímeros [82, 86, 87]. Otro tipo de CAZymes son las D) glicosiltransferasas (GTs) tipo Leloir, estas enzimas utilizan azúcares activados como donadores, usualmente azúcares nucleotídicos como sustrato. En términos de su selectividad hacia el sustrato, las GTs Leloir son enzimas que presentan «promiscuidad» del sustrato que catalizan, es decir son capaces de reconocer y transferir una gran variedad de donadores y aceptores. Estas enzimas pueden ser desde muy específicas y presentar una estricta discriminación de sus sustratos, hasta ser capaces de mostrar una amplia tolerancia en las variaciones estructurales del aceptor y del donador glicosilo, incluso son capaces de transferir más de un residuo glicosilo en diferentes posiciones del aceptor o de elongar una cadena de glicanos en crecimiento [88].

Adicionalmente, las CAZymes pueden clasificarse también de acuerdo con su mecanismo de reacción en enzimas que invierten o conservan la configuración del carbono anomérico en el residuo glicosilo que transfieren. En un sentido amplio, toda esta diversidad y atributos en el contexto de la versatilidad y selectividad que presentan las CAZymes para formar enlaces glicosídicos, da lugar al hecho de que actualmente son una potente maquinaria catalítica para la síntesis e hidrólisis de enlaces glicosídicos.

Las especificidad y versatilidad catalítica de las CAZymes son superiores a las de la glicosilación química. De esta manera, en un primer escenario mecanístico, podemos ubicar la capacidad que tienen las CAZymes para el reconocimiento de la conformación de su aceptor glicosilo. Por ejemplo, una enzima que reconoce residuos en conformación de piranosa 4C_1 de α -D-glucopiranosilo (α -D-Glcp, **Figura 13I**), es capaz de discernir entre las 38 conformaciones canónicas que puede adoptar una piranosa^[89], de tal manera que la enzima únicamente reconocerá a una conformación en específico. Adicionalmente, las CAZymes también discriminan a su sustrato donador por la orientación del hidroxilo en el carbono anomérico (anómeros α -D-Glcp y β -D-Glcp, **Figura 13II**)^[90].

En un segundo nivel de especificidad se encuentra la capacidad de estos biocatalizadores para seleccionar al donador por la orientación de los hidroxilos en el resto de los carbonos continuos en anillo de piranosa (diferenciación de epímeros, **Figura 13III**). Esta especificidad no solo comprende el contexto del reconocimiento y discriminación del aceptor glicosilo sino también implica la estereoespecificidad que poseen estas enzimas en la formación del enlace glicosídico (**Figura 13IV**). Como se mencionó anteriormente, las enzimas tipo CAZymes pueden clasificarse en aquellas que invierten o conservan la configuración del carbono anomérico del donador glicosilo. De manera que, independientemente de la naturaleza de la molécula aceptora, una enzima que transfiere α -D-Glcp hacia el hidroxilo de una aglicona, siempre formará enlaces D-glucopiranosil- α -1 \rightarrow O-aglicona de manera enantioespecífica. En definitiva, todo lo mencionado anteriormente ha permitido la aplicación de CAZymes para la síntesis de diversos glicósidos y sacáridos^[91].

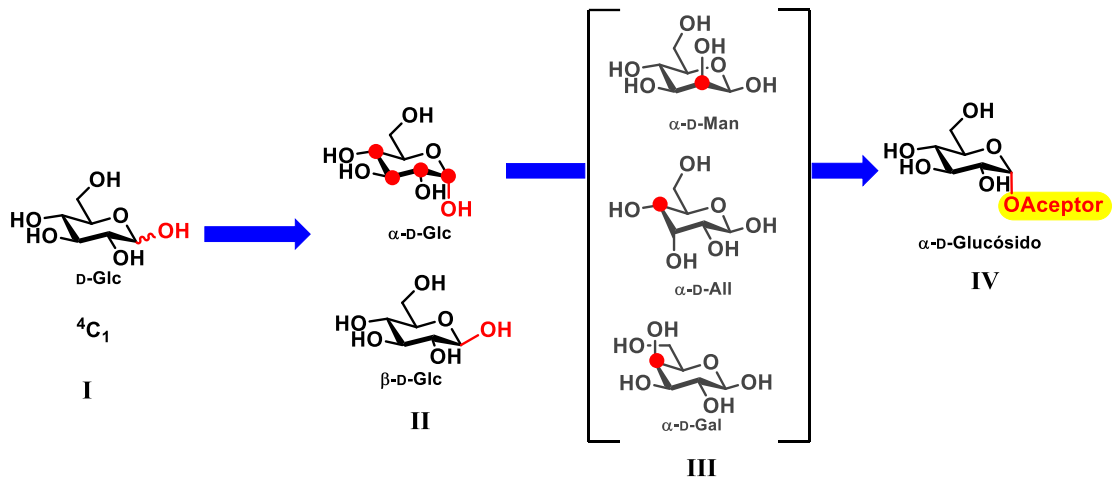


Figura 13. Especificidad de las enzimas activas en carbohidratos (CAZymes) para reconocer a sus sustratos donadores

Reconocimiento de la conformación (I) de un azúcar, diferenciación de sus anómeros (II), discriminación de sus epímeros (III), y transferencia regio- y estereoselectiva (IV)

1.4 POLIMERIZACIÓN POR RADICALES LIBRES (FRP)

La polimerización por radicales libres (FRP, por sus siglas en inglés) es uno de los métodos más utilizados y versátiles para la síntesis de glicopolímeros [92-95]. En esencia, esta metodología consiste en reacciones en cadena, donde la adición de una molécula de monómero al extremo de una cadena activa, regenera el sitio activo en el extremo de la nueva cadena. Como se observa en la **Figura 14**, el proceso consiste en tres etapas principales: 1) iniciación; se genera el radical a partir de una especie neutra que actúa como iniciador, 2) propagación; la adición del radical a un alqueno sustituido y (3) la terminación[96].

La terminación de la polimerización puede ocurrir en dos escenarios diferentes: A) por la combinación de dos cadenas poliméricas en propagación o por B) desproporción; donde un átomo de hidrógeno en una cadena de polímero es transferido a otra, produciendo una cadena saturada y otra con un extremo insaturado. Por otro lado, los polímeros en propagación también pueden terminar el proceso de polimerización por transferencia de cadena a otra especie en el medio (disolvente, monómero, iniciador o polímero), continuando así la propagación, en este evento ocurre la formación de una zona de ramificación.

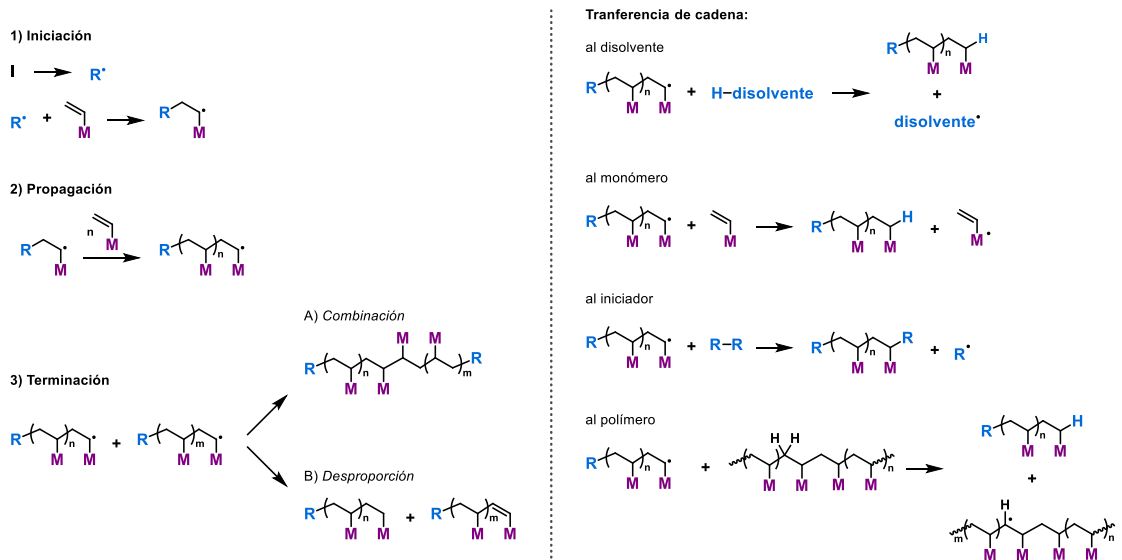


Figura 14 Mecanismo general del proceso de polimerización por radicales libres
 Izquierda: etapas del proceso de polimerización por radicales libre; derecha: tipos de transferencia de cadena

Una de las principales ventajas de este tipo de polimerización es el uso de iniciadores térmicos. Los iniciadores térmicos de FRP son compuestos comerciales flexibles y estables a temperatura ambiente, son principalmente peróxidos como el $(\text{BzO})_2$ y compuestos azoderivados como el AIBN y el ácido 4,4'-azobis(4-cianovalérico), los cuales producen radicales libres a una temperatura de 50-100°C. La FRP se puede considerar como un método versátil para la polimerización adecuada de monómeros con diferentes funcionalidades [93, 97-99]. Esto debido a la tolerancia a impurezas y el amplio rango de condiciones en las que se puede realizar esta reacción, ya que es posible utilizar medios no polares, polares y próticos, así como un considerable espectro de temperaturas [95, 96].

1.5 SÍNTESIS DE GLICOPOLÍMEROS UTILIZANDO GLICOMONÓMEROS

En la actualidad, existen múltiples estrategias para obtener glicopolímeros, entre las cuales destaca la síntesis y posterior polimerización de glicomonómeros. Sin embargo, no se ha desarrollado una ruta sintética universal que permita la producción de glicomonómeros, puesto que la elección de una estrategia particular depende de varios parámetros, tales como los grupos funcionales presentes en el sustrato, las etapas de protección/desprotección requeridas, la solubilidad de las materias primas y las condiciones de reacción, entre otros. A pesar de ello, se han reportado varios métodos

químicos y enzimáticos para sintetizar glicopolímeros, lo que brinda una diversidad de opciones para su preparación.

1.5.1 Síntesis química de glicomonómeros

La reacción de Könings-Knorr se utiliza para lograr la unión de azúcares y grupos polimerizables. Como se muestra en la **Figura 15**, en esta metodología se hace reaccionar azúcares protegidos y halogenados en el carbono anomérico, con metacrilatos de 2-hidroxietilo (grupo polimerizable)^[100, 101]. La reacción procede mediante la sustitución del haluro en el carbono anomérico por el alcohol del grupo polimerizable, dando lugar a la formación de un enlace glicosídico. No obstante, en muchos casos los promotores del grupo saliente suelen ser sales de mercurio, las cuales tienen efectos adversos tanto para la salud como para el medio ambiente^[102].

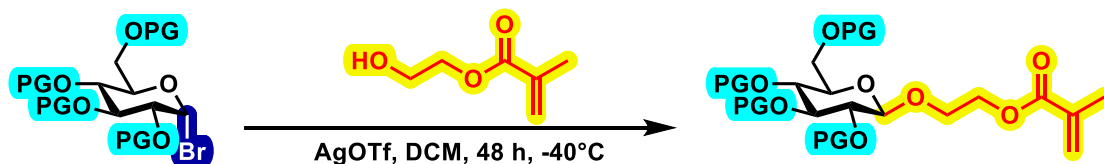


Figura 15 Formación de glicomonómeros via reacción de Könings-Knorr catalizada por triflatos de plata^[103]

Como alternativa a los catalizadores tóxicos utilizados en la reacción de Könings-Knorr, se ha empleado la reacción de Williamson^[104], la cual involucra la formación de éteres como estrategia para la síntesis de glicomonómeros^[105]. En este método, el grupo polimerizable se introduce al azúcar mediante la formación de un enlace tipo C—O—C, donde, por acción de una base el alcohol se transforma en el correspondiente alcóxido, el cual desplaza vía S_N2 al haluro en el grupo polimerizable. Un ejemplo de ello se ilustra en la **Figura 16**, donde la reacción entre el 3-(clorometil)estireno y la di-O-isopropilidengalactosa en presencia de NaH, produce glicomonómeros *para*- y *meta*-sustituidos.

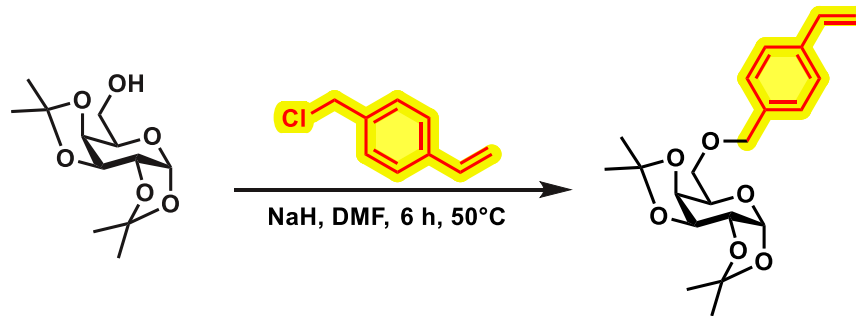


Figura 16. Síntesis de vinilglicomonómeros mediante la reacción de Williamson para la formación de enlaces éter

Por otro lado, los azúcares completamente protegidos con grupos acetilo se han utilizado para formar glicomonómeros^[106]. En este caso, la condensación del azúcar y el grupo polimerizable (acrilato, **Figura 17**) se realiza en presencia de $\text{BF}_3\text{Et}_2\text{O}$ en CH_2Cl_2 ^[107, 108]. Sin embargo, se requiere un grupo saliente adecuado que facilite la formación del enlace éter entre el grupo polimerizable y el azúcar. No obstante, la introducción de buenos grupos funcionales; como los grupos OTf ^[109], tricloroacetamida^[110] o 4-nitrofenol^[111], requiere el uso de reactivos tóxicos y un mayor número de pasos de síntesis^[112].

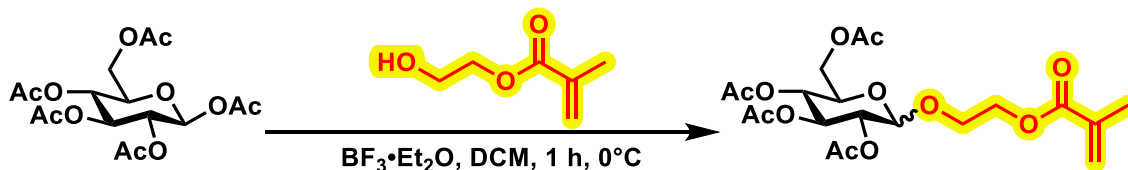


Figura 17 Formación de glicomonómeros de acrilato catalizada por $\text{BF}_3\text{Et}_2\text{O}$

Asimismo, la síntesis de olefinas de glicidilo se puede lograr mediante la adición de aminoazúcares “libres” (sin grupos protectores, como la glucosamina) al cloruro de 5-norboreno-2-carbonilo^[113] (**Figura 18**). En este método, la formación del nuevo enlace amida se realiza aprovechando la reactividad de aminas primarias. Esta estrategia también permite hacer uso de otros sustratos como azúcares protegidos^[114] con al menos un grupo hidroxilo libre, que sea capaz de atacar nucleofílicamente al carbonilo del cloruro de acilo^[115, 116].

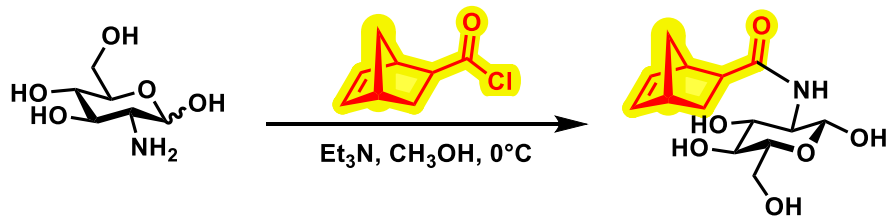


Figura 18. *Formación de glicomonómeros vía adición de aminas a carbonilos de cloruros de ácido*

De manera alterna, la esterificación de Steglich^[117] sintetiza glicomonómeros organosolubles mediante la condensación entre el grupo carbonilo de un ácido vinílico y el grupo hidroxilo de un azúcar^[118-120] (**Figura 19**). Sin embargo, en esta reacción muchas veces se requieren manipulaciones complejas del sustrato; es decir hacer uso de grupos protectores para limitar el número y posición del hidroxilo a reaccionar^[121], así como introducir un grupo saliente con el fin de aumentar la eficiencia de la reacción.

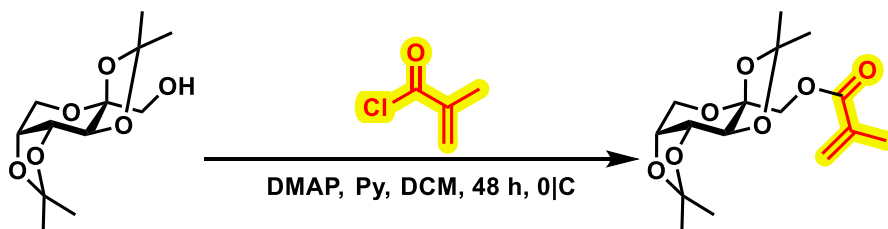


Figura 19. *Reacción de esterificación de Steglich entre un alcohol y un cloruro de ácido*

Por otra parte, los haluros de alquilmagnesio se emplean para sintetizar glicomonómeros mediante la reacción de Grignard^[122, 123]. Por ejemplo, se ha reportado que el cloruro de 4-vinilfenilmagnesio en presencia de un aldehído de azúcar protegido permite la formación de glicomonómeros^[122] (**Figura 20**). No obstante, para este método, el uso de disolventes anhidros y las bajas temperaturas son factores importantes a considerar.

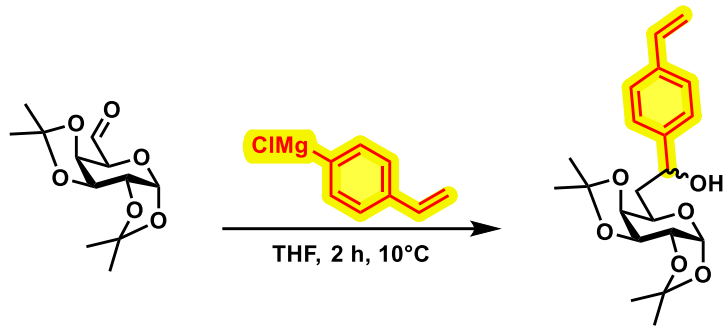


Figura 20. Uso de la reacción de Grignard como estrategia para la formación de glicomonómeros de vinilo

En el contexto de la química “clic”, la cicloadición azida-alquino [3+2] catalizada por cobre de Huisgen para formar triazoles, representa un método rápido y selectivo para unir azúcares y grupos polimerizables o a polímeros ya construidos. Una de las principales ventajas de este método es que se puede realizar en condiciones suaves de reacción, con alta eficiencia y selectividad [124]. En la **Figura 21** se ilustra como la unión entre un residuo de propargilmanosa y el grupo polimerizable 3-azidopropilmetacrilato, transcurre de manera eficiente en una mezcla de metanol/agua a temperatura ambiente en presencia de CuSO_4 y *L*-(+)-ascorbato de sodio[125].

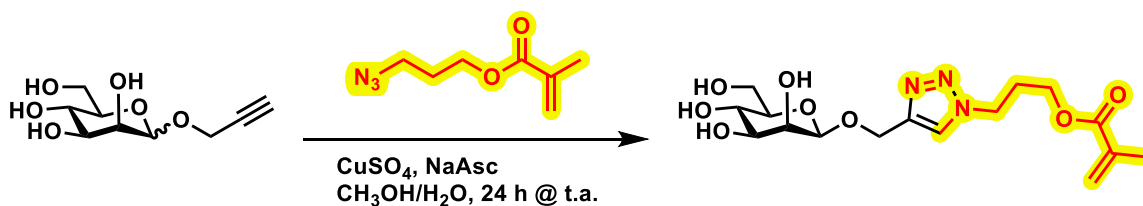


Figura 21. Reacción de cicloadición azida-alquino [3+2] de Huisgen

El acoplamiento de lactonas y aminas como ruta para la síntesis de glicopolímeros, fue inicialmente descrito por Kobayashi et al.(1985)[126]. En dicho estudio, los autores demostraron factibilidad en la síntesis de glicopolímeros de vinil-lactosa, -maltosa y -maltotriosa mediante la reacción entre las correspondientes lactonas con *p*-vinilbencilamina. Un ejemplo de ellos es ilustrado en la **Figura 22**, donde la reacción entre la *D*-gluconolactona y el clorhidrato de 2-aminoetilmetacrilato en presencia de trietilamina en metanol, permite obtener glicopolímeros[127].

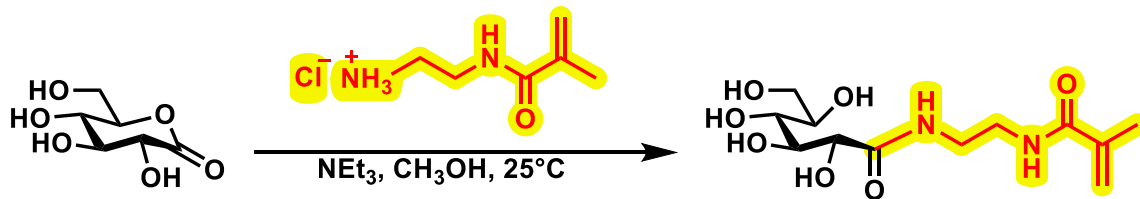


Figura 22. Síntesis de glicomonómeros vía acoplamiento lactona-amina para la formación de glicomonómeros.

En resumen, existen múltiples estrategias que aprovechan la reactividad de ciertos grupos funcionales para obtener glicomonómeros. Cada uno de uno de los métodos anteriores presenta ventajas y desventajas en términos de toxicidad, eficiencia y condiciones de reacción, necesarias para llevar a cabo la catálisis. De modo que, la elección de la estrategia más adecuada dependerá de los requisitos específicos de cada caso, los grupos funcionales en las materias primas, así como el uso final que tendrá el polímero.

1.5.2 Síntesis enzimática de glicomonómeros

Recientemente, se ha buscado obtener glicomonómeros por métodos biocompatibles y menos agresivos con el medio ambiente, por ejemplo, haciendo uso de biocatalizadores como las enzimas. Adharis & Loos (2019)^[128], realizaron una exhaustiva revisión de los principales métodos de síntesis de glicomonómeros que emplean CAZymes para la construcción de glicomonómeros. Como ya se mencionó en la sección anterior (*vide supra*, Página 17), las CAZyme presentan una excelente especificidad comparada con los catalizadores químicos tradicionales. Por lo tanto, en la síntesis enzimática de glicopolímeros, el grupo polimerizable, entre las múltiples posiciones posibles, podría ser introducido de manera selectiva en una posición en particular del azúcar.

En este sentido, si bien las glicósido fosforilasas son enzimas eficientes y altamente selectivas, pocos autores reportan su uso en metodologías de síntesis de polímeros^[85]. Kaneko *et al.* (2007)^[129] sintetizaron polímeros heterogéneos artificiales de quitosano y quitina injertados con cadenas de amilosa, las cuales fueron construidas con α -D-glucosa-1-fosforilasa, a través de la formación de enlaces α -glucosídicos en condiciones suaves de reacción. Estos polímeros presentaron interesantes propiedades, como la posibilidad de obtener películas resistentes a disolventes orgánicos, así como para producir hidrogeles. A pesar de que la metodología anterior es atractiva para la

producción de polímeros heterogéneos y biodegradables, no permite conjugar los polímeros obtenidos a otras moléculas como dendrímeros, calixarenos y lípidos, para poder construir así glicodendrímeros [130], glicocalixarenos [131] y glicoliposomas [132].

Por otro lado, en el caso de las sacarosas, Wang *et al.* (2009)^[133] reportaron la síntesis de glicopolímeros ramificados para el diseño de glicocálix artificiales para estudios de reconocimiento molecular. Los autores emplearon como sustrato aceptor maltosa unida de manera covalente sobre una superficie de oro, para transferir residuos glicosilo, elongando y ramificando las cadenas en crecimiento mediante el uso de una dextranasa de *Leuconostoc mesenteroides* como catalizador^[134], y usando como sustrato donador sacarosa. En este caso los polímeros formados contenían alrededor de 95% enlaces $\alpha(1\rightarrow6)$ y 5% $\alpha(1\rightarrow3)$ glicosilo. Este y otros reportes, han hecho que se comience a ampliar el uso de CAZymes para la síntesis de glicopolímeros^[128, 135]. Por ejemplo Hoffman *et al.* (2020)^[136] reportaron la síntesis a gran escala de 2-(β -galactosil)-etilmetacrilato (glicomonómero) utilizando una β -glicosidasa hipertermoestable de *Pyrococcus woesei* y una relación *p*-nitrofenil- β -D-galactopiranosido/metacrilato de 1:140, alcanzando hasta un 88% de rendimiento. Sin embargo, este tipo de metodologías aun recurren al uso de reactivos y disolventes tóxicos. Como resultado, en los últimos años, el creciente interés por desarrollar metodologías sustentables y eficientes con un menor impacto ambiental en la síntesis de glicopolímeros, incrementó la búsqueda de esquemas de síntesis de glicopolímeros por métodos alternativos como las reacciones tipo «one-pot» y procesos de polimerización en medios acuosos [137, 138].

En este sentido, Kloosterman *et al.* (2014)^[97] sintetizaron glicomonómeros de 2-(β -maltooligooxi)-etil acrilatos con 1-15 residuos glucopiranosil, utilizando una ciclodextringlucanotransferasa de *Bacillus macerans* como catalizador, 2-(β -glucosilo)-etil acrilato como aceptor y α -ciclodextrina como donador glucopiranosilo. Los productos resultantes se polimerizaron en medios acuosos utilizando FRP para producir los correspondientes glicopolímeros. Recientemente Tanaka *et al.* (2020)^[98] reportaron la síntesis one-pot de glicopolímeros con base de *N*-(2-hidroxietil)acrilamida y *N*-(2-hidroxietil)metaacrilamida, los cuales contenían residuos β -galactosil y lactosil, contruidos empleando azúcares libres activados como 4,6-dimetoxi-1,3,5-triazin-2-il- β -galactosido y 4,6-dimetoxi-1,3,5-triazin-2-il-lactosido, y como catalizadores a una β -

galactosidasa de *Aspergillus oryzae* para la transferencia de residuos β -galactopiranosilo, y una endo-1,4- β -glucanasa de *Trichoderma reesei* para transferir β -lactopiranosilo^[139].

Estos dos últimos trabajos tienen la ventaja de que inician a partir de azúcares libres y proceden en medios acuosos sin la necesidad de aislar el glicomonómero sintetizado. Pese a esto, si bien permiten obtener glicopolímeros heterogéneos ramificados sin aislar intermediarios, no son esquemas versátiles aplicables para la obtención de glicopolímeros. Por otra parte, la necesidad de preparar azúcares activados agrega pasos extra al proceso de síntesis. En resumen, las estrategias anteriores no permiten variar tan fácilmente el grupo polimerizable en el glicomonómero, lo que limita la posibilidad de obtener «clústeres» de diversas arquitecturas en función de necesidades específicas.

2 JUSTIFICACIÓN

La gran diversidad estructural y funcionalidad química que presentan los carbohidratos para desarrollar sus funciones biológicas, así como su capacidad para otorgar o modificar ciertas propiedades fisicoquímicas de las moléculas orgánicas a las que se unen, ha hecho que se recurra al uso de estos para producir materiales híbridos y polifuncionales, como los glicopolímeros. Estos materiales poseen diferentes propiedades y desempeñan funciones muy importantes en áreas como la nanotecnología, la biomedicina, el reconocimiento celular y en síntesis orgánica. No obstante, en la actualidad la construcción de estos arreglos generalmente requiere el uso de métodos de glicosilación química. Aunque estos métodos químicos tienen ventajas por sus altos rendimientos de síntesis. Dichos procesos sintéticos son mecanísticamente complicados y poseen una baja especificidad para la formación de enlaces glicosídicos. Actualmente, gracias a los avances de la biotecnología, existe un número considerable de enzimas que naturalmente forman enlaces glicosídicos con una alta regio- quimio- y estereoselectividad. Particularmente, en los últimos años se han tratado de integrar a las enzimas activas en carbohidratos (CAZymes) a la síntesis de glicopolímeros. De este modo, a partir de la alta selectividad característica de las CAZymes, y haciendo uso de metodologías químicas para la funcionalización de carbohidratos, es viable la integración de las ventajas de ambos métodos sintéticos puede dar lugar a una estrategia combinada de alta eficiencia para la síntesis de glicopolímeros.

3 HIPÓTESIS

La integración de glicosilación enzimática a procesos de síntesis y polimerización química (verde), resultará en un proceso simple, eficiente y novedoso para la síntesis de glicopolímeros.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Desarrollar una nueva metodología sintética que integre procesos químicos y enzimáticos, para la obtención de glicomonómeros capaces de ser transformados en glicopolímeros.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Diseñar condiciones de reacción adecuadas para la síntesis de glicomonómeros, utilizando métodos enzimáticos y/o quimioenzimáticos amigables con el medio ambiente:
 - Establecer condiciones de protección/desprotección simples de azúcares como fructosa y galactosa.
 - Establecer condiciones de reacción para la vinilación, alilación o propargilación de azúcares protegidos
 - Introducir variabilidad en los glicomonómeros formados.
 - Explorar diferentes tipos de enzimas activas en carbohidratos, es decir: glicosiltransferasas y glicosidasas, capaces de formar di-, tri-, y/u oligosacáridos de azúcares y glicomonómeros.
- Determinar las condiciones de reacción para la síntesis de glicopolímeros utilizando los glicomonómeros obtenidos

5 MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 REACTIVOS, MATERIAL BIOLÓGICO Y GENERALIDADES

Los reactivos químicos y disolventes fueron adquiridos de fuentes comerciales. Los disolventes: CH_2Cl_2 HPLC (VWR Chemicals BDH®, No. Cat. BDH6012-4), $\text{CHCl}_3 \geq 99.8\%$ (J.T.Baker®, No. Cat. 9180-03), Me_2CO (J.T.Baker®, No. Cat. 9006-03), $\text{MeOH} \geq 99.9\%$ (HiPerSolv CHROMANORM®, VWR Chemicals BDH®, No. cat. BDH6619-4L), AcOEt (JT Baker®, No. Cat. 9280-03), Hexanos (Meyer®, No. Cat. 1480-4000), $i\text{PrOH}$ (Honeywell®, No. Cat. AH323-4), MeCN HPLC (J.T.Baker®, No. Cat. JT9017-3), DMF (J.T.Baker®, No. Cat. 921312) y DMSO (Sigma-Aldrich, No. Cat. D5879-1L) se almacenaron en presencia de un tamiz molecular y se utilizaron sin purificación complementaria. Los azúcares: D-fructosa (Sigma-Aldrich, No. Cat. F0127-5KG), D-galactosa (Sigma-Aldrich, No. Cat. G0625-100G), D-glucosa (Sigma-Aldrich, No. Cat. G5767-500G), D-manosa (Sigma-Aldrich, No. Cat. M8574-100G), D-maltosa (Sigma-Aldrich, No. Cat. M5885-500G), D-celobiosa (Sigma-Aldrich, No. Cat. C7252-100G), D-lactosa (Sigma-Aldrich, No. Cat. L254-25G), D-sacarosa (Sigma-Aldrich, No. Cat. 84100-5KG), L-arabinosa (Sigma-Aldrich, No. Cat. A3256-100G), D-xilosa (Sigma-Aldrich, No. Cat. X1500-500G) y β -ciclodextrina, se utilizaron sin purificación. El H_2SO_4 se adquirió de J.T.Baker® (No. Cat. 9681-05). Las sales Na_2SO_4 (99%, J.T.Baker®, No. Cat. JT3891-1), Na_2CO_3 (99.5%, VWR Chemicals BDH®, No. Cat. BDH9284-500G) y KF (Meyer, No. Cat. 2045), así como los reactivos CaC_2 (Meyer, No. Cat. 2045), KOH (Sigma-Aldrich, No. Cat. 484016-1KG), AIBN (Sigma-Aldrich, No. Cat. 755745), se utilizaron sin purificación adicional, a menos que se indique lo contrario. La enzima comercial Toruzyme® 3.0 L (CGTasa, ciclodextringlucanotransferasa de *Thermoanaerobacter* sp.) fue proporcionada por Novozymes®, México. La β -glucosidasa de almendras (EC 3.2.1.21, liofilizado con $12.4 \text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$) se adquirió de Sigma-Aldrich (No. Cat. G4511). El agua utilizada en las reacciones y para la elaboración de soluciones fue grado ultrapura tipo I; purificada en un equipo Milli-Q con una resistividad de $18.2 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$ @ 25°C . Las reacciones de vinilación se realizaron en atmósfera de nitrógeno utilizando un vial de 18 mL capaz de soportar 150 psig de presión interna @ 120°C (Ace Glass, Incorporated). Las reacciones enzimáticas se realizaron en un equipo Eppendorf ThermoMixer® C. Los rendimientos globales de cada producto se expresan después de realizar los procesos correspondientes de purificación.

5.2 Cromatografía en capa fina y en columna flash

El análisis cualitativo de cromatografía en capa fina (TLC, por sus siglas en inglés) se realizó usando cromatoplasmas Merck sílica gel 60 F254 (MERCK Supelco, No. Cat. 60778), en cámaras TLC presaturadas 15 min con el disolvente de elución. Los compuestos orgánicos se visualizaron con luz UV_{254 nm} y se revelaron mediante la aspersion de una solución de α -naftol al 2.4% disuelto en una mezcla compuesta por EtOH/H₂O/H₂SO₄ (83:7:11 v/v/v). La cromatografía en columna flash (FCC, por sus siglas en inglés) se realizó empleando gel de sílice 60 (Macherey-Nagel™, No. Cat. A2MNA00019), bajo presión de aire.

5.3 Cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas

Los espectros de masas se obtuvieron en un equipo Thermo Scientific™ MSQ Plus™ Single Quadrupole Mass Detector (resolución 17-2000 m/z), la técnica utilizada fue ionización por electrospray en modo positivo (ESI+), las unidades empleadas para expresar los iones en la espectrometría de masas fue m/z .

5.4 Determinación de la rotación óptica

Para la determinación de la rotación óptica de los productos puros, se utilizó un polarímetro Perkin-Elmer 341, con celdas de 100 mm de longitud y de 1 mL de volumen. La longitud de onda empleada fue 589 nm utilizando una lámpara de Na/Hal, las lecturas se realizaron a temperatura ambiente.

5.5 Espectroscopía de infrarrojo

Los espectros obtenidos mediante espectroscopía de infrarrojo (IR, por sus siglas en inglés) se determinaron en un equipo Agilent Cary 630 FTIR con accesorio ATR, los espectros se procesaron en el software SpectraGryph 1.2 (© 2016: Dr. Friedrich Menges Software-Entwicklung) y se expresaron en números de onda ν (cm⁻¹).

5.6 Resonancia magnética nuclear

Los espectros de resonancia magnética nuclear (NMR, por sus siglas en inglés) (^1H , ^{13}C) se adquirieron en espectrómetros Varían Mercury 200 MHz, Bruker AVANCE™ III HD @500 (11.7 T; frecuencia de resonancia de 500 MHz de ^1H) y JEOL JNM-ECZ 600R equipado con un magneto de 14.09 T; que corresponde a la frecuencia de resonancia de ^1H de 600 MHz. Se empleó como referencia interna TMS o la traza remanente del disolvente deuterado. Como disolventes deuterados se utilizó CDCl_3 (99.8%, Cambridge Isotope Lab., Inc., No. Cat. DLM-7-100), CD_3OD (Sigma-Aldrich, No. Cat. 151947-10G-AMP) y D_2O (99%, No. Cat. DLM-7005). Los desplazamientos químicos (δ) se expresaron en ppm.

El procesamiento de los espectros se realizó con el programa MestreNova versión 12.0 y la notación empleada para las señales fue: s=singulete, d=doblete, t=triplete, m=multiplete, dd=doble de dobles, ddd= doble de dobles de dobles, etc. Las constantes de acoplamiento se reportaron en Hertz (Hz) utilizando la notación $^nJ_{x,y}$, donde x,y indican los núcleos involucrados y n el número de enlaces entre ellos. Los experimentos de correlación homonucleares ^1H - ^1H (COSY, TOCSY y NOESY) y experimentos de correlación heteronuclear ^1H - ^{13}C (HSQC y HMBC) se adquirieron utilizando secuencias de pulso estándar.

5.7 SÍNTESIS DEL DISOLVENTE EUTÉCTICO PROFUNDO NATURAL

Se mezclaron 50 g (358.11 mmol) de cloruro de colina (ChCl, Sigma-Aldrich, No. Cat. W450001-1KG); previamente secado 24 h @ 60°C con vacío, con 75 g de ácido malónico (720.73 mmol, MA, Sigma-Aldrich, Cat. No. M1296-100G). Posteriormente se calentó la mezcla a una temperatura de 70-80°C en rotavapor (200 mbar, 6 h) hasta obtener un fluido transparente, con valor de $E_T(30)=62.38 \pm 0.10$ y densidad (ρ)= $2 \pm 0.004 \text{ g mL}^{-1}$.

5.8 SÍNTESIS DE AZÚCARES PROTEGIDOS

5.8.1 Síntesis de azúcares protegidos utilizando H₂SO₄/acetona

5.8.1.1 Síntesis de 2,3:4,5-di-O-isopropiliden-β-D-fructopiranososa (**2a**)

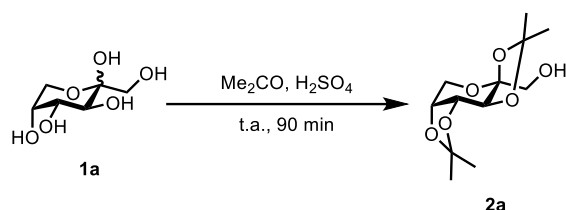


Figura 23. Esquema general de síntesis del azúcar protegido de D-fructosa **2a**

Modificando la metodología reportada por Brady Jr (1970)^[140] (**Figura 23**), a una solución de Me₂CO (97.2 mL, 58.08 mmol) y H₂SO₄ al 98% (4.86 mL, 98.07 mmol) fría y en baño de hielo, se adicionaron 5 g de D-fructosa. La mezcla se agitó vigorosamente hasta completa disolución del azúcar (aproximadamente 8 min). Posteriormente, se dejó agitando por 82 min más, después se llevó a un baño de hielo y se neutralizó lentamente con NaOH_{aq} hasta pH 7. Una vez neutralizada la mezcla, se removió la acetona en rotavapor. El jarabe resultante se extrajo con CH₂Cl₂ (3×69.4 mL). Se reunieron las fases orgánicas de CH₂Cl₂ y se lavaron con 2×34.7 mL de agua Milli-Q. La fase orgánica se secó con Na₂SO_{4anh} y el disolvente se evaporó en rotavapor. El crudo resultante se recrystalizó en Hexanos:CH₂Cl₂ 4:1 v/v a temperatura ambiente con evaporación lenta hasta obtener un sólido cristalino blanco. Los cristales se filtraron y lavaron con hexanos a 2 °C, posteriormente se secaron por 24 h @ 50 °C.

R_f = 0.47 (Hex:AcOEt 1:1)

Sólido cristalino; 4.6 g, 63.65% rendimiento global

[α]_D²⁵ = -23.67° (c 1.1, CHCl₃)

LRMS (ESI+) (m/z): calculado 283.1158 [M+Na]⁺, encontrado 283.25 [M+Na]⁺.

Los datos espectroscópicos de NMR (**Tabla 3**) corresponden con lo reportado en la literatura^[93, 141].

Tabla 3. Desplazamiento químico, multiplicidad y valores de constantes de acoplamiento en espectros de ^1H NMR, ^{13}C NMR (600 MHz, 293 K, CDCl_3) del azúcar protegido de D-Fru **2a**

^1H	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$	M^{b}	J^{c}	^{13}C	$\delta_{\text{C}}^{\text{a}}$
---	---	---	---	C_8^{\ddagger}	109.18
---	---	---	---	C_7^{\ddagger}	108.64
---	---	---	---	C_2^{\ddagger}	103.18
H_4	4.60	dd	$^3J_{\text{H}_4,\text{H}_5}=7.9, ^3J_{\text{H}_4,\text{H}_3}=2.6$	C_4	70.15
H_3	4.33	d	$^3J_{\text{H}_3,\text{H}_4}=2.6$	C_3	71.06
H_5	4.23	ddd	$^3J_{\text{H}_5,\text{H}_4}=7.9, ^3J_{\text{H}_5,\text{H}_{6\text{ax}}}=2.0,$ $^3J_{\text{H}_5,\text{H}_{6\text{eq}}}=0.8$	C_5	70.90
$\text{H}_{6\text{ax}}$	3.90	dd	$^3J_{\text{H}_{6\text{ax}},\text{H}_{6\text{eq}}}=13.0, ^3J_{\text{H}_{6\text{ax}},\text{H}_5}=2.0$	C_6	61.36
$\text{H}_{6\text{eq}}$	3.76	dd	$^3J_{\text{H}_{6\text{eq}},\text{H}_{6\text{ax}}}=13.0, ^3J_{\text{H}_{6\text{eq}},\text{H}_5}=0.8$		
$\text{H}_{1\text{a}}$	3.68	dd	$^3J_{\text{H}_{1\text{a}},\text{H}_{1\text{b}}}=11.7, ^3J_{\text{H}_{1\text{a}},\text{H}_{\text{OH}}}=8.6$	C_1	65.59
$\text{H}_{1\text{b}}$	3.65	dd	$^3J_{\text{H}_{1\text{b}},\text{H}_{1\text{a}}}=11.7, ^3J_{\text{H}_{1\text{b}},\text{H}_{\text{OH}}}=4.8$		
H_{OH}	2.23	dd	$^3J_{\text{H}_{\text{OH}},\text{H}_{1\text{a}}}=8.6, ^3J_{\text{H}_{\text{OH}},\text{H}_{1\text{b}}}=4.8$	---	---
H_9	1.53			C_9	26.56
H_{11}	1.47			C_{11}	25.86
H_{10}	1.39	s	---	C_{10}	25.44
H_{12}	1.34			C_{12}	24.06

^a Desplazamientos químicos reportados en ppm. Referencia interna TMS (δ_{H} y $\delta_{\text{C}}= 0.00$ ppm), ^b Multiplicidad reportada utilizando un análisis de patrones de acoplamiento de primer orden, ^c Constantes de acoplamiento reportadas en Hz, [‡] Carbono cuaternario de cetol

5.8.1.2 Síntesis de 1,2:4,5-di-O-isopropiliden- β -D-fructopiranososa (**2b**)

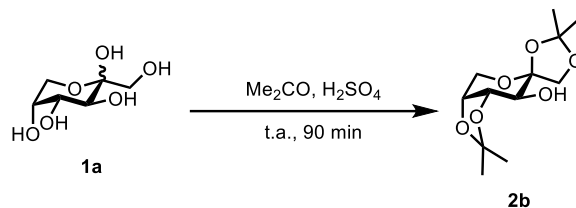


Figura 24. Esquema general de síntesis del azúcar protegido de D-fructosa **2b**

Cambiando el método de cristalización reportado por Brady Jr (1970)^[140] (**Figura 24**), en 70 mL de Me_2CO ; enfriada previamente a 3°C , se añadió en baño de hielo, 350 mL de H_2SO_4 98%. Posteriormente la mezcla se llevó a t.a. y se adicionaron 20.0 mmol de **1a**. La mezcla se mantuvo en agitación constante hasta que se disolvió completamente el azúcar (1.5 h). Una vez disuelto **1a**, la mezcla se enfrió en un baño de hielo y se neutralizó con NaOH_{aq} hasta pH 7. El disolvente orgánico se eliminó en rotavapor y la fase acuosa remanente se extrajo con 3×10 mL de CH_2Cl_2 . Los extractos de CH_2Cl_2 se juntaron y se lavaron con 2×5 mL de agua Milli-Q. La fase orgánica se secó con $\text{Na}_2\text{SO}_4_{\text{anh}}$ y se removió el disolvente hasta obtener un polvo blanco; el cual se recrystalizó en Hexanos: CH_2Cl_2 4:1 v/v a t.a.

$R_f = 0.43$ (Hex:AcOEt 1:1)

Sólido cristalino; 2.2 g, 64.3% rendimiento global

$[\alpha]_D^{25} = -144.54^\circ$ (c 1.4, CHCl_3)

LRMS (ESI+) (m/z): calculado 283.1158 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, encontrado 283.21 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

Los datos espectroscópicos de NMR (**Tabla 4**) corresponde con lo reportado en la literatura.^[93]

Tabla 4. Desplazamiento químico, multiplicidad y valores de constantes de acoplamiento en espectros de ^1H NMR, ^{13}C NMR (600 MHz, 293 K, CDCl_3) del producto **2b**

^1H	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$	M^{b}	J^{c}	^{13}C	$\delta_{\text{C}}^{\text{a}}$
---	---	---	---	C_7^{\ddagger}	111.98
---	---	---	---	C_8^{\ddagger}	109.54
---	---	---	---	C_2^{\ddagger}	104.66
H_5	4.20	ddd	$^3J_{\text{H-5,H-4}}=5.8$, $^3J_{\text{H-5,H-6ax}}=2.6$, $^3J_{\text{H-5,H-5eq}}=0.8$	C_5	73.46
$\text{H}_{1\text{a}}$	4.17	dd	$^3J_{\text{H-1a,H-1b}}=8.8$, $^3J_{\text{H-1a,H-3}}=0.9$	C_1	72.42
H_4	4.13	dd	$^3J_{\text{H-4,H-3}}=6.9$, $^3J_{\text{H-4,H-5}}=5.8$	C_4	77.43
$\text{H}_{6\text{ax}}$	4.10	dd	$^3J_{\text{H-6ax,H-6eq}}=13.4$, $^3J_{\text{H-6ax,H-5}}=2.6$	C_6	68.84
$\text{H}_{6\text{eq}}$	4.00	dd	$^3J_{\text{H-6eq,H-6ax}}=13.4$, $^3J_{\text{H-6eq,H-5}}=0.8$		
$\text{H}_{1\text{b}}$	3.97	dd	$^3J_{\text{H-1b,H-1a}}=8.8$, $^3J_{\text{H-1b,H-3}}=0.9$	C_1	72.42
H_3	3.68	ddd	$^3J_{\text{H-3,H-OH}}=7.9$, $^3J_{\text{H-3,H-4}}=6.9$, $^3J_{\text{H-3,H-1a}}=0.9$, $^3J_{\text{H-3,H-1b}}=0.9$	C_3	70.51
H_{OH}	2.16-2.05	m	---	---	---
H_{10}	1.52			28.07	C_{10}
H_{12}	1.50,			26.54	C_9
H_9	1.43	s	---	26.39	C_{12}
H_{11}	1.36			26.07	C_{11}

^a Desplazamientos químicos reportados en ppm. Referencia interna TMS (δ_{H} y $\delta_{\text{C}}= 0.00$ ppm), ^b Multiplicidad reportada utilizando un análisis de patrones de acoplamiento de primer orden, ^c Constantes de acoplamiento reportadas en Hz, [‡] Carbono cuaternario de cetil

5.8.1.3 Síntesis de 1,2:3,4-di-O-isopropiliden- α -D-galactopiranososa (**2c**)

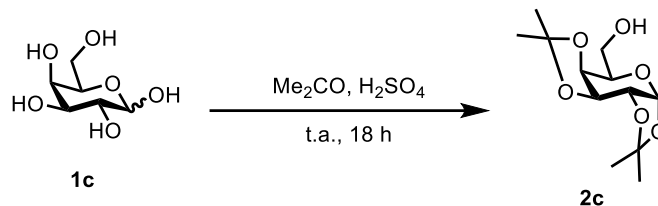


Figura 25. Esquema general de síntesis del azúcar protegido de D-galactosa **2c**

El producto **2c** (**Figura 25**) se sintetizó modificando el procedimiento reportado por Serra *et al.* (2011)^[142]. De esta manera, en 400 mL de Me₂CO enfriada previamente a 3 °C, se adicionó lentamente 4 mL de H₂SO₄ 98%. Después la mezcla se mantuvo en agitación constante a t.a. por 10 min. Entonces, se agregaron 5 g de **1c**. La mezcla de reacción se mantuvo a t.a. por 18 h, posteriormente se neutralizó con Na₂CO₃ y se filtró. A las aguas madre resultantes se les adicionó 1.5 g de carbón activado y 20 g de Na₂CO₃, se calentó hasta alcanzar el reflujo de Me₂CO y se filtró por segunda vez. El filtrado resultante se concentró removiendo el disolvente en rotavapor hasta obtener un jarabe viscoso de color amarillo. El producto crudo se purificó por FCC (Hexanos:AcOEt 100:0→50:50) hasta obtener la pureza deseada.

R_f = 0.40 (Hex:AcOEt 1:1)

Aceite viscoso y transparente, 1.4 g, 60% rendimiento global

[α]_D²⁵ = -56.49° (c 1.5, CHCl₃)

LRMS (ESI+) (*m/z*): calculado 283.1158 [M+Na]⁺, encontrado 283.21 [M+Na]⁺.

Los datos espectroscópicos de NMR (**Tabla 5**) corresponden con lo reportado en la literatura^[93, 141, 142].

Tabla 5. Desplazamiento químico, multiplicidad y valores de constantes de acoplamiento en espectros de ^1H NMR, ^{13}C NMR (600 MHz, 293 K, CDCl_3) del producto **2c**

^1H	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$	M^{b}	J^{c}	^{13}C	$\delta_{\text{C}}^{\text{a}}$
---	---	---	---	C_8^{\ddagger}	109.58
---	---	---	---	C_7^{\ddagger}	108.81
H_1	5.5	d	$^3J_{\text{H-1,H-2}}=5.1$	C_1	96.41
H_3	4.54	dd	$^3J_{\text{H-3,H-4}}=8.0, ^3J_{\text{H-3,H-2}}=2.4$	C_3	70.87
H_2	4.26	dd	$^3J_{\text{H-2,H-1}}=5.1, ^3J_{\text{H-2,H-3}}=2.4$	C_2	70.68
H_4	4.20	dd	$^3J_{\text{H-4,H-3}}=8.0, ^3J_{\text{H-4,H-5}}=1.5$	C_4	71.70
$\text{H}_{5,6\text{a}}$	3.85- 3.75	m	---	C_5, C_6	68.23, 62.42
$\text{H}_{6\text{b}}$	3.67	ddd	$^3J_{\text{H-6b,H-6a}}=11.08, ^3J_{\text{H-6b,H-OH}}=9.8, ^3J_{\text{H-6b,H-5}}=3.51$	C_6	62.42
H_{OH}	2.23	dd	$^3J_{\text{H-OH,H-6b}}=9.8, ^3J_{\text{H-OH,H-6a}}=6.2$	---	---
H_{11}	1.46	s	---	C_{11}	26.14
H_{12}	1.39	s	---	C_{12}	26.04
$\text{H}_{9,10}$	1.27	s	---	$\text{C}_9, \text{C}_{610}$	25.05, 24.42

^a Desplazamientos químicos reportados en ppm. Referencia interna TMS (δ_{H} y $\delta_{\text{C}}= 0.00$ ppm), ^b Multiplicidad reportada utilizando un análisis de patrones de acoplamiento de primer orden, ^c Constantes de acoplamiento reportadas en Hz, [‡] Carbono cuaternario de cetil

5.8.2 Síntesis de azúcares protegidos utilizando un sistema NADES ChCl:MA (1:2)/acetona

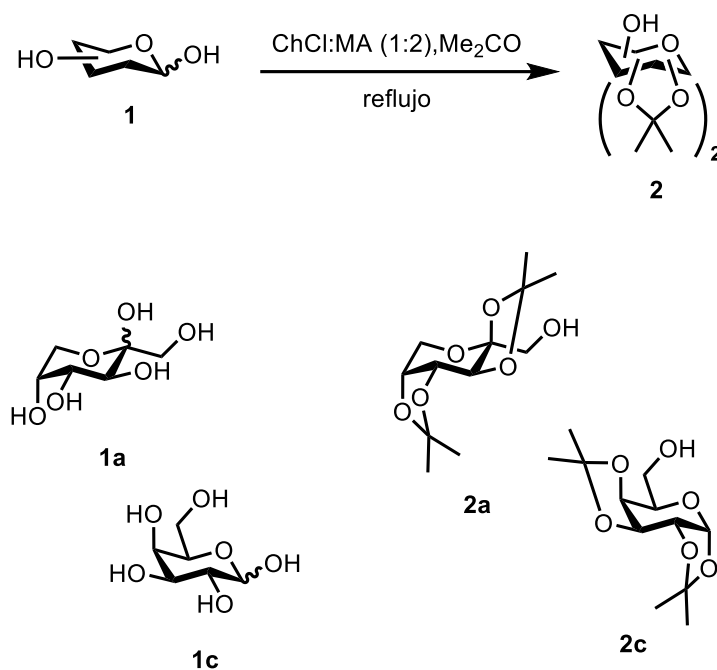


Figura 26. Síntesis de azúcares protegidos utilizando como disolvente y catalizador al NADES ChCl:MA (1:2) y Me₂CO como grupo protector (ⁱPrd)

Para sintetizar los productos **2a** y **2b** (Figura 26), se añadió el azúcar (**1a**, **1c**; 500 mg, 2.8 mmol) y 3.0 mL de acetona a 3 g de NADES ChCl:MA (1:2). La mezcla se llevó a 50 °C hasta que el análisis por TLC (Hex:AcOEt 1:1) indicó el término de la reacción. Una vez completada la reacción, se enfrió la mezcla a t.a. y se realizó una extracción con AcOEt (3×5 mL). La mezcla de reacción se analizó por LC-MS para determinar la síntesis de los productos.

5.9 METODOLOGÍA GENERAL PARA LA VINILACIÓN DE AZÚCARES PROTEGIDOS

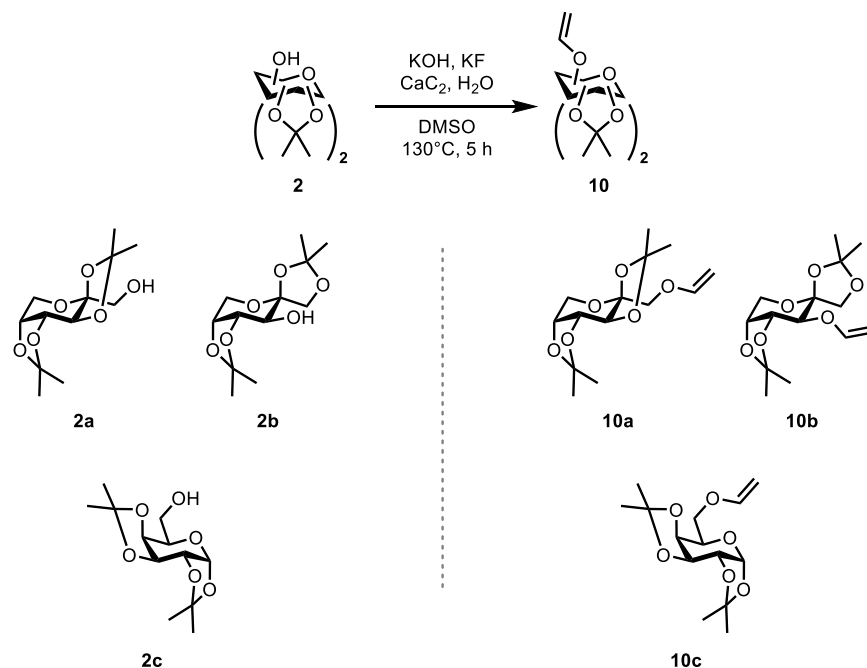


Figura 27. Síntesis de éteres vinílicos utilizando azúcares protegidos y carburo de calcio (CaC₂)

Para la síntesis de los éteres vinílicos **10** (Figura 27), se utilizó el protocolo reportado por Rodygin *et al.* (2018)^[93] con modificaciones, principalmente en el tiempo de reacción. Se pesó 1 mmol del azúcar (**2a-c**), 1.10 mmol de KOH, 4.0 mmol de KF, y 6.0 mmol de CaC₂ recién triturado en mortero. Los cuales se adicionaron a un vial de 15 mL (max 150 psig @ 120°C) y se disolvieron con 5 mL de DMSO. Posteriormente se agregaron 24.0 mmol de agua Milli-Q y se selló el vial. La mezcla de reacción se mantuvo con agitación constante 5 h @ 130°C. Una vez completada la reacción, la mezcla se llevó a t.a. y se extrajo con hexanos (6×5 mL), los extractos de hexanos se filtraron en una cama de celita. Las aguas madre se evaporaron en vacío para remover el disolvente hasta obtener el producto correspondiente. Cuando fue necesaria una purificación adicional, esta se realizó por FCC (silica gel, Hexanos:AcOEt 4:1).

5.9.1 2,3:4,5-di-O-isopropiliden-1-O-vinil-β-D-fructopiranososa (10a)

El producto di-O-Prd-1-O-vinil-β-D-Frup **10a**, se preparó utilizando la metodología general (sección 5.9) para la vinilación de azúcares protegidos.

$R_f = 0.62$ (Hex:AcOEt 1:1)

Aceite viscoso y transparente, 84 % rendimiento global.

Los datos espectroscópicos de NMR de la **Tabla 6** corresponden con lo reportado en la literatura^[93].

Tabla 6. Desplazamiento químico, multiplicidad y valores de constantes de acoplamiento en espectro de ^1H NMR (200 MHz, 296.2 K, CDCl_3) del producto **10a**

^1H	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$	M^{b}	J^{c}
H _{2'}	6.39	dd	$^3J_{\text{H-2}',\text{H-1}'\text{a}}=14.2$, $^3J_{\text{H-2}',\text{H-1}'\text{b}}=6.7$
H ₄	4.55	dd	$^3J_{\text{H-4},\text{H-5}}=7.9$, $^3J_{\text{H-4},\text{H-3}}=2.6$
H ₃	4.32	d	$^3J_{\text{H-3},\text{H-4}}=2.6$
H _{1'a}	4.17	dd	$^3J_{\text{H-1}'\text{a},\text{H-2}'}=14.2$, $^3J_{\text{H-1}'\text{a},\text{H-1}'\text{b}}=2.2$
H ₅	4.17	ddd	$^3J_{\text{H-5},\text{H-5}}=7.9$, $^3J_{\text{H-5},\text{H-6ax}}=1.8$, $^3J_{\text{H-5},\text{H-6eq}}=0.82$
H _{1'b}	3.96	dd	$^3J_{\text{H-1}'\text{b},\text{H-2}'}=6.7$, $^3J_{\text{H-1}'\text{b},\text{H-1}'\text{a}}=2.2$
H _{6ax}	3.87	dd	$^3J_{\text{H-6ax},\text{H-6eq}}=13$, $^3J_{\text{H-6ax},\text{H-5}}=1.8$
H _{1a}	3.79	dd	$^3J_{\text{H-1a},\text{H-1b}}=10.8$
H _{1b}	3.74	d	$^3J_{\text{H-1b},\text{H1a}}=10.8$
H _{6eq}	3.69	dd	$^3J_{\text{H-5eq},\text{H-6ax}}=13$, $^3J_{\text{H-6eq},\text{H-5}}=0.82$
H ₉	1.48		---
H ₁₁	1.41		---
H ₁₀	1.35	s	---
H ₁₂	1.28		---

^a Desplazamientos químicos reportados en ppm. Referencia interna TMS ($\delta_{\text{H}} = 0.00$ ppm), ^b Multiplicidad reportada utilizando un análisis de patrones de acoplamiento de primer orden, ^c Constantes de acoplamiento reportadas en Hz

5.9.2 1,2:4,5-di-O-isopropiliden-3-O-vinil-β-D-fructopiranososa (**10b**)

El producto isomérico **2b** se viniló en el hidroxilo de C₃ siguiendo la metodología general para la vinilación de azúcares protegidos (**sección 5.9**), para sintetizar así al di-O-*i*Prd-3-O-vinil-β-D-Frup **10b**.

R_f = 0.62 (Hex:AcOEt 1:1)

Aceite viscoso y transparente, 77.46% rendimiento global

Los datos espectroscópicos de NMR de la **Tabla 7** corresponden con lo reportado en la literatura^[93].

Tabla 7. Desplazamiento químico, multiplicidad y valores de constantes de acoplamiento en espectro de ¹H NMR (200 MHz, 296.2 K, CDCl₃) del producto **10b**

¹ H	δ _H ^a	M ^b	J ^c
H _{2'}	6.39	dd	³ J _{H-2',H-1'a} =13.9, ³ J _{H-2',H-1'b} =6.4
H _{1'a}	4.39	dd	³ J _{H-1'a,H-2'} =13.9, ³ J _{H-1'a,H-1'b} =1.85
H ₄	4.24	dd	³ J _{H-4,H-3} =7.2, ³ J _{H-4,H-5} =5.5
H ₅	4.16	ddd	³ J _{H-5,H-4} =5.5, ³ J _{H-5,H-6ax} =2.5, ³ J _{H-2',H-6eq} =0.73
H _{6ax}	4.02	dd	³ J _{H-6ax,H-5} =2.5, ³ J _{H-6ax,H-6eq} =13.15,
H _{1'b}	4.01	d	³ J _{H-1'b,H-2'} =6.4, ³ J _{H-1'b,H-1'a} =1.85
H _{1a}	4.01	d	³ J _{H-1a,H-1b} =8.65
H _{6eq}	3.95	dd	³ J _{H-6eq,H-5} =0.73, ³ J _{H-6eq,H-6ax} =13.15
H _{1b}	3.89	d	³ J _{H-1b,H-1a} =8.65
H ₃	3.71	d	³ J _{H-3,H-4} =7.2
H ₉	1.49		---
H ₁₁	1.44		---
H ₁₀	1.35	s	---
H ₁₂	1.30		---

^a Desplazamientos químicos reportados en ppm. Referencia interna TMS (δ_H= 0.00 ppm), ^b Multiplicidad reportada utilizando un análisis de patrones de acoplamiento de primer orden, ^c Constantes de acoplamiento se reportadas en Hz

5.9.3 1,2:3,4-di-O-isopropiliden-6-O-vinil- α -D-galactopiranososa (**10c**)

El di-O-*i*Prd-6-O-vinil- α -D-Galp **10c**; con un grupo vinilo en el hidroxilo del C₆, se obtuvo siguiendo la metodología general para la vinilación de azúcares protegidos (**sección 5.9**).

R_f = 0.76 (Hex:AcOEt 1:1)

Aceite viscoso y transparente, 62 % rendimiento global

Los datos espectroscópicos de NMR (**Tabla 8**) corresponden con lo reportado en la literatura^[37].

Tabla 8. Desplazamiento químico, multiplicidad y valores de constantes de acoplamiento en espectro de ¹H NMR (200 MHz, 296.2 K, CDCl₃) del producto **10c**

¹ H	δ_H^a	M ^b	J ^c
H _{2'a}	6.43	dd	³ J _{H-2',H-1'a} =14.3, ³ J _{H-2',H-1'b} =6.8
H ₁	5.48	d	³ J _{H-1,H-2} =5.0
H ₃	4.56	dd	³ J _{H-3,H-4} =7.9, ³ J _{H-3,H-2} =2.45
H ₂	4.26	dd	³ J _{H-2,H-1} =5.0, ³ J _{H-2,H-3} =2.45
H ₄	4.20	dd	³ J _{H-4,H-3} =7.9, ³ J _{H-4,H-5} =1.9
H _{1'a}	4.16	dd	³ J _{H-1'a,H-2} =14.3, ³ J _{H-1'a,H-1'b} =2.2
H ₅	4.04-3.90	m	---
H _{1'b}	3.96	dd	³ J _{H-1'b,H-2'} =6.8, ³ J _{H-1'b,H-1'a} =2.2
H _{6ax,6eq}	3.90-3.71	m	---
H ₁₁	1.47		---
H ₁₂	1.39	s	---
H _{9,10}	1.28, 1.27		---

^a Desplazamientos químicos se reportan en ppm. Referencia interna TMS ($\delta_H = 0.00$ ppm), ^b Multiplicidad reportada utilizando un análisis de patrones de acoplamiento de primer orden, ^c Constantes de acoplamiento reportadas en Hz

5.10 SÍNTESIS DE GLICOMONÓMEROS EN NADES

5.10.1 Síntesis de alil-glicósidos

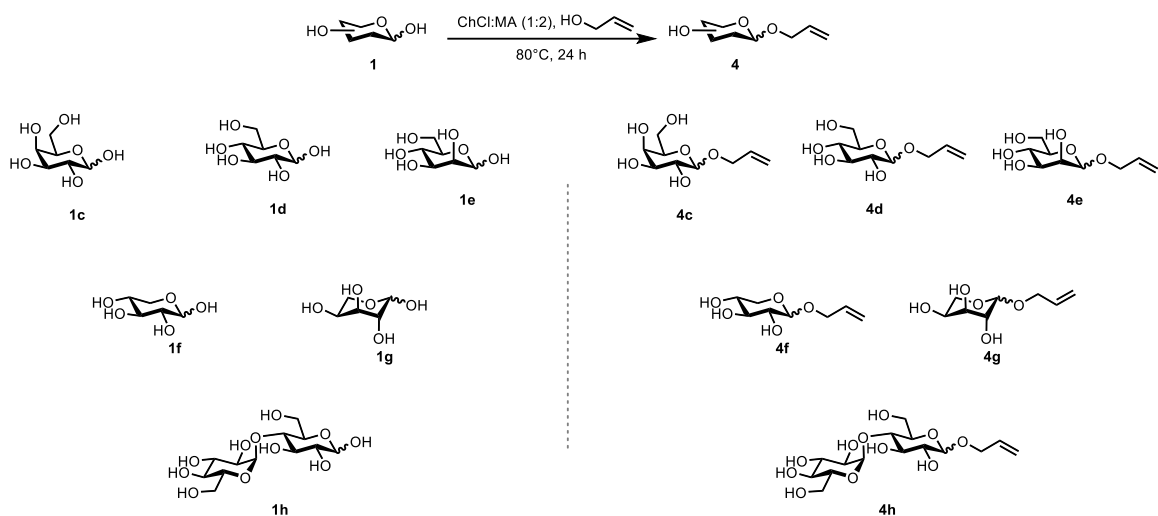


Figura 28. Esquema general de síntesis de alil glicósidos en ChCl:MA, utilizando azúcares sin grupos protectores

Para obtener los alil glicósidos se siguió la metodología de la **Figura 28**, se utilizó 3 g de ChCl:MA (1:2) como medio de reacción, se adicionó 2.8 mmol de azúcar (Gal; **1c**, Glc; **1d**, Man; **1e**, Xyl; **1f**, Ara; **1g**, Mal; **1h**) y 14.23 equiv. de alcohol alílico. Posteriormente, la mezcla se mantuvo en agitación constante por 24 h @ 80 °C, monitoreando el avance de la reacción por TLC (DCM:MeOH 85:15) y LC-MS [MeOH:H₂O Milli-Q 80:20 al 0.1% de ácido fórmico; C-18: 250 × 4.6 mm × 4 μm; 300 mL min⁻¹; 3 kV, 75 V, 350 °C, 100-1000 m/z].

5.10.2 Síntesis de alil-glucopiranosido **4d** en NADES ChCl:MA (1:2)

El compuesto alil-glicósido **4d** se sintetizó utilizando la metodología general para introducir grupos alilo (**sección 5.10.1**), para ello se emplearon 30 g de ChCl:MA (1:2) como medio de reacción, se adicionó 27.8 mmol de glucosa (**1d**) y 14.23 equiv. de alcohol alílico. Posteriormente, la mezcla se mantuvo en agitación constante por 24 h @ 80 °C. En seguida, la reacción se llevó a t.a. y se extrajo con AcOEt (5×3 mL). Los extractos de AcOEt se juntaron y se secaron con Na₂SO₄ anhidro. El disolvente orgánico se eliminó a presión reducida hasta obtener un aceite, el cual se purificó por FCC (silica gel, AcOEt:PrOH:H₂O 20:3:1). R_f = 0.24 (DCM:MeOH 85:15). Relación 64:33 α/β, aceite amarillo, 800 mg, 13.1% rendimiento global.

Tabla 9. Desplazamiento químico, multiplicidad y valores de constantes de acoplamiento en espectro de ^1H NMR (600 MHz, 296 K, D_2O) del producto **4d**

^1H	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$	M^{b}	J^{c}	^{13}C	$\delta_{\text{C}}^{\text{a}}$
anómero α					
H _{2'}	5.95	dddd	$^3J_{\text{H-2}',\text{H-3}'\text{a}}=17.4$, $^3J_{\text{H-2}',\text{H-3}'\text{b}}=10.5$, $^3J_{\text{H-2}',\text{H-1}'\text{b}}=6.5$, $^3J_{\text{H-2}',\text{H-1}'\text{a}}=5.5$	C _{2'}	133.56
H _{3'a}	5.35	dddd	$^3J_{\text{H-3}'\text{a},\text{H-2}'}=17.4$, $^3J_{\text{H-3}'\text{a},\text{H-3}'\text{b}}=1.6$, $^3J_{\text{H-3}'\text{a},\text{H-1}'\text{a}}=1.4$, $^3J_{\text{H-3}'\text{a},\text{H-1}'\text{b}}=1.3$	C _{3'}	118.77
H _{3'b}	5.23	dddd	$^3J_{\text{H-3}'\text{b},\text{H-2}'}=10.5$, $^3J_{\text{H-3}'\text{b},\text{H-3}'\text{a}}=1.6$, $^3J_{\text{H-3}'\text{b},\text{H-1}'\text{a}}=1.3$, $^3J_{\text{H-3}'\text{b},\text{H-1}'\text{b}}=1.2$		
H ₁	4.93	d	$^3J_{\text{H-1},\text{H-2}}=3.8$	C ₁	97.34
H _{1'a}	4.21	dddd	$^3J_{\text{H-1}'\text{a},\text{H-1}'\text{b}}=13.1$, $^3J_{\text{H-1}'\text{a},\text{H-2}'}=5.5$, $^3J_{\text{H-1}'\text{a},\text{H-3}'\text{a}}=1.4$, $^3J_{\text{H-1}'\text{a},\text{H-3}'\text{b}}=1.3$	C _{1'}	68.48
H _{1'b}	4.04	dddd	$^3J_{\text{H-1}'\text{b},\text{H-1}'\text{a}}=13.1$, $^3J_{\text{H-1}'\text{b},\text{H-2}'}=6.5$, $^3J_{\text{H-1}'\text{b},\text{H-3}'\text{a}}=1.3$, $^3J_{\text{H-1}'\text{b},\text{H-3}'\text{b}}=1.2$		
H _{6a}	3.82	dd	$^3J_{\text{H-6a},\text{H-6b}}=12.2$, $^3J_{\text{H-6a},\text{H-5}}=2.3$	C ₆	60.54
H _{6b}	3.72	dd	$^3J_{\text{H-6b},\text{H-6a}}=12.2$, $^3J_{\text{H-6b},\text{H-5}}=5.4$		
H ₃	3.68	dd	$^3J_{\text{H-3},\text{H-2}}=9.7$, $^3J_{\text{H-3},\text{H-4}}=9.1$	C ₃	73.14
H ₅	3.65	ddd	$^3J_{\text{H-5},\text{H-4}}=9.8$, $^3J_{\text{H-5},\text{H-6b}}=5.4$, $^3J_{\text{H-5},\text{H-6a}}=2.3$	C ₅	71.86
H ₂	3.53	dd	$^3J_{\text{H-2},\text{H-3}}=9.7$, $^3J_{\text{H-2},\text{H-1}}=3.8$	C ₂	71.25
H ₄	3.42	dd	$^3J_{\text{H-4},\text{H-5}}=9.8$, $^3J_{\text{H-4},\text{H-3}}=9.1$	C ₄	75.82

^a Desplazamientos químicos reportados en ppm. Referencia: HOD ($\delta_{\text{H}}=4.79$ ppm), ^b Multiplicidad reportada utilizando un análisis de patrones de acoplamiento de primer orden, ^c Constantes de acoplamiento reportadas en Hz

Tabla 10 (Continuación)

^1H	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$	M^{b}	J^{c}	^{13}C	$\delta_{\text{C}}^{\text{a}}$
anómero β					
H _{2'}	5.95	dddd	$^3J_{\text{H-2}',\text{H-3}'\text{a}}=17.1$, $^3J_{\text{H-2}',\text{H-3}'\text{b}}=10.5$, $^3J_{\text{H-2}',\text{H-1}'\text{b}}=6.5$, $^3J_{\text{H-2}',\text{H-1}'\text{a}}=5.7$	C _{2'}	133.33
H _{3'a}	5.34	dddd	$^3J_{\text{H-3}'\text{a},\text{H-2}'}=17.1$, $^3J_{\text{H-3}'\text{a},\text{H-3}'\text{b}}=1.6$, $^3J_{\text{H-3}'\text{a},\text{H-1}'\text{a}}=1.5$, $^3J_{\text{H-3}'\text{a},\text{H-1}'\text{b}}=1.1$	C _{3'}	118.22
H _{3'b}	5.25	dddd	$^3J_{\text{H-3}'\text{b},\text{H-2}'}=10.5$, $^3J_{\text{H-3}'\text{b},\text{H-3}'\text{a}}=1.6$, $^3J_{\text{H-3}'\text{b},\text{H-1}'\text{a}}=1.5$, $^3J_{\text{H-3}'\text{b},\text{H-1}'\text{b}}=1.1$		
H ₁	4.47	dd	$^3J_{\text{H-1},\text{H-2}}=8.0$	C ₁	101.20
H _{1'a}	4.36	d	$^3J_{\text{H-1}'\text{a},\text{H-1}'\text{b}}=12.4$, $^3J_{\text{H-1}'\text{a},\text{H-2}'}=5.7$, $^3J_{\text{H-1}'\text{b},\text{H-3}'\text{a}}=1.5$, $^3J_{\text{H-1}'\text{b},\text{H-3}'\text{b}}=1.5$	C _{1'}	70.64
H _{1'b}	4.19	dddd	$^3J_{\text{H-1}'\text{b},\text{H-1}'\text{a}}=12.4$, $^3J_{\text{H-1}'\text{b},\text{H-2}'}=6.5$, $^3J_{\text{H-1}'\text{b},\text{H-3}'\text{a}}=1.0$, $^3J_{\text{H-1}'\text{b},\text{H-3}'\text{b}}=1.0$		
H _{6a}	3.88	dd	$^3J_{\text{H-6a},\text{H-6b}}=12.4$, $^3J_{\text{H-6a},\text{H-5}}=2.2$	C ₆	60.79
H _{6b}	3.68	dd	$^3J_{\text{H-6b},\text{H-6a}}=12.4$, $^3J_{\text{H-6b},\text{H-5}}=6.1$		
H ₃	3.45	t	$^3J_{\text{H-3},\text{H-4}}=9.3$	C ₃	75.93
H ₅	3.43-3.39	m	---	C ₅	69.61
H ₄	3.37	dd	$^3J_{\text{H-4},\text{H-5}}=9.8$, $^3J_{\text{H-4},\text{H-3}}=9.3$	C ₄	69.68
H ₂	3.24	dd	$^3J_{\text{H-2},\text{H-3}}=9.3$, $^3J_{\text{H-2},\text{H-1}}=8.0$	C ₂	73.07

^a Desplazamientos químicos reportados en ppm. Referencia: HOD ($\delta_{\text{H}}=4.79$ ppm), ^b Multiplicidad reportada utilizando un análisis de patrones de acoplamiento de primer orden, ^c Constantes de acoplamiento reportadas en Hz

5.10.3 Síntesis de propárgil-glicósidos

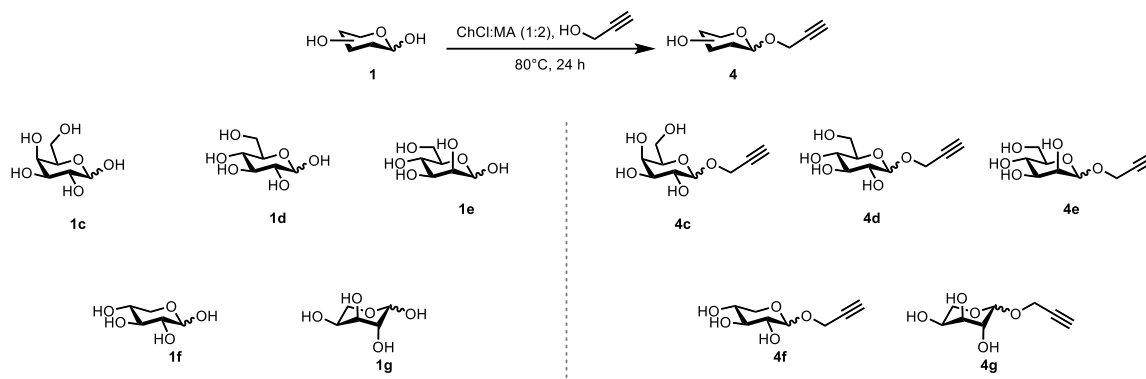


Figura 29. Síntesis de propárgil glicósidos (**4c-g**) en ChCl:MA (1:2), utilizando azúcares libres (**1c-g**) y alcohol propárgilico

Utilizando 3 g de ChCl:MA (1:2) como medio de reacción, se adicionó 2.8 mmol del azúcar (**1c-g**) y 14.23 equiv. de alcohol propárgilico. Posteriormente la mezcla se mantuvo en agitación constante por 24 h a 80 °C, monitoreando el avance de la reacción por TLC (DCM:MeOH 85:15). Al término de la reacción se realizó un análisis por LC-MS [A:MeCN 5% en H₂O Milli-Q, B:10 mM ácido fórmico en MeCN 90%; C-18: 250×4.6mm×4 mm; 5% B por 5 min→40%B en 55 min; 400 mL min⁻¹; 4.5 kV, 120 V, 350 °C, 100-1000 *m/z*].

5.11 REACCIONES DE GLICOSILACIÓN ENZIMÁTICA

5.11.1 α -Glucosilación del alil-glucósido **4d** utilizando una CGTasa de *Thermoanaerobacter* sp.

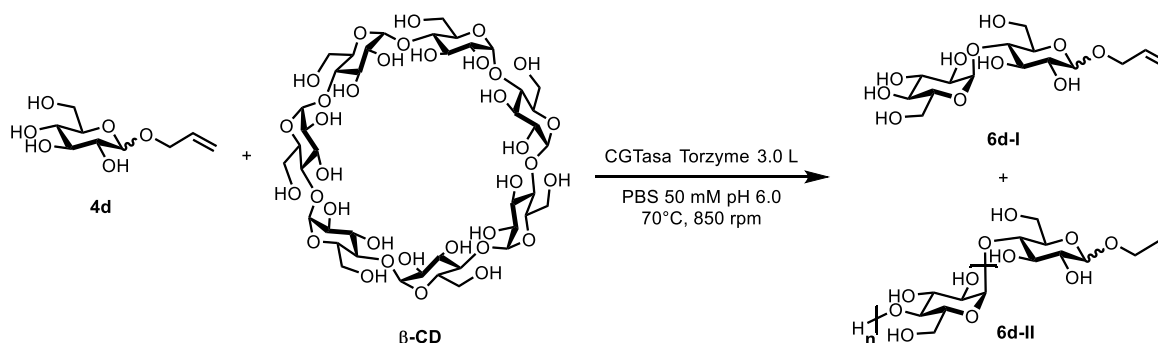


Figura 30. Reacción de transglucosilación catalizada por la enzima CGTasa, para la transferencia específica de residuos α -glucopiranosilo al aceptor **4d**, utilizando β -CD como donador α -glucopiranosilo

En un tubo Eppendorf de 1.5 mL se añadieron 25 mg de **4d** y 28.35 mg de β -CD, los cuales se disolvieron con 900 μ L de buffer de fosfatos salino de potasio (PBS, por sus siglas en inglés) 50 mM pH 6.0. La mezcla se incubó durante 5 min @ 70°C hasta homogeneizar los sustratos. Subsecuentemente, se adicionaron 100 μ L del extracto enzimático comercial de CGTasa de *Thermoanaerobacter* sp. La mezcla se mantuvo en agitación de 850 rpm y después de haber transcurrido 48 h @ 70°C se inactivó la reacción (10 min, 100°C). El avance de la reacción se analizó por TLC [CHCl_3 :MeOH:H₂O (30:20:4)] y LC-MS [A:MeCN 5% en H₂O Milli-Q, B:10 mM ácido fórmico en MeCN 90%; C-18: 250 \times 4.6 mm \times 4 μ m; 5% B por 5 min \rightarrow 40%B en 55 min; 400 mL min⁻¹; 4.5 kV, 120 V, 350°C, 100-1000 m/z].

5.11.2 β -Glucosilación del alil-glucósido **4d** utilizando una β -glucosidasa de almendras

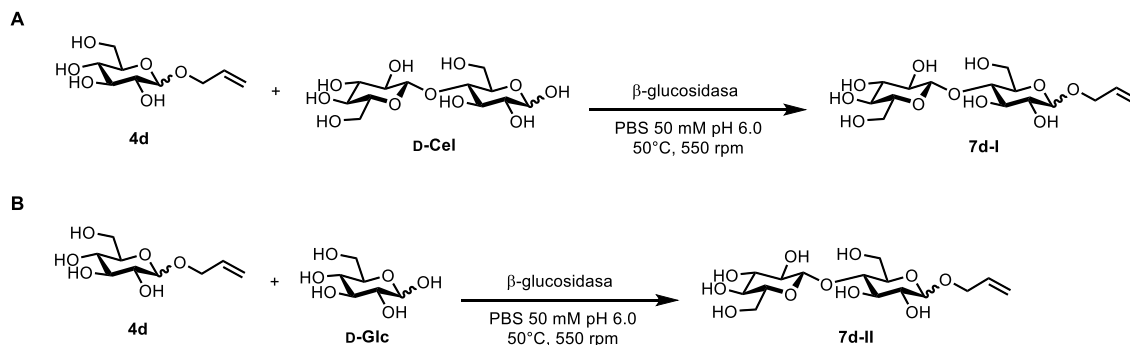


Figura 31. Reacción de β -glucosilación catalizada por la β -glucosidasa de almendras

La síntesis de **7d** (Figura 31) se realizó utilizando 150 mg del aceptor (alil-glucósido **4d**), y como sustratos donadores se utilizaron 510.85 mmol de celobiosa (control cinético, producto **7d-I**) o 27.25 mmol de glucosa (hidrólisis inversa, producto **7d-II**). El aceptor **4d** y el donador se disolvieron en 950 μ L de PBS 50 mM pH 6.0, la mezcla se incubó 5 min a 50 °C. Posteriormente, de una solución stock de β -glucosidasa (5 mg mL⁻¹) se tomaron 50 μ L y se adicionaron a la mezcla de reacción (1 mL de volumen final de reacción). Después de 24 h @ 50 °C y 550 rpm, la reacción se detuvo inactivando la enzima (10 min, 100 °C). El avance de la reacción se analizó por TLC [iPrOH:AcOEt:H₂O (3:1:1)] y LC-MS [A: 100 mM de AcONH₄ pH 5.8, B: MeOH 0.1% de ácido fórmico; C-18: 250 \times 4.6 mm \times 3 μ m; 0 min 11%B \rightarrow 17 min 11%B \rightarrow 30 min 50%B; 400 mL min⁻¹; 4.5 kV, 120 V, 350 °C, 100-1000 *m/z*].

5.11.3 β -Galactosilación del alil-glucósido **4d** utilizando una β -galactosidasa de *Kluyveromyces lactis*

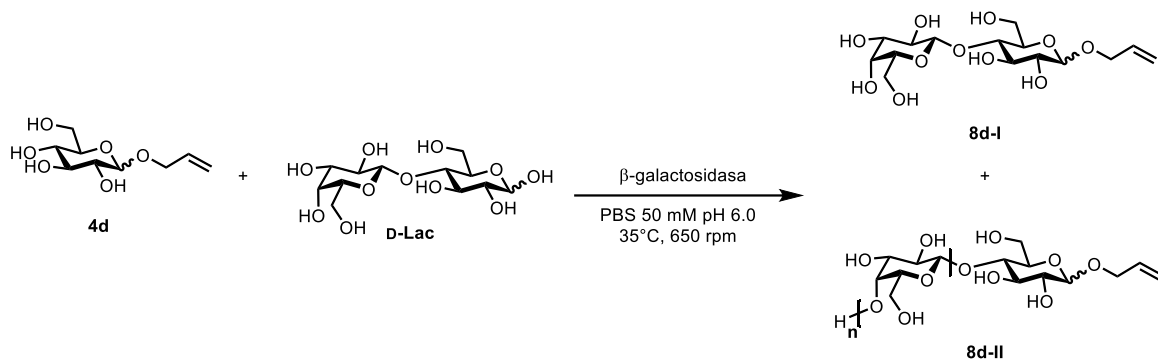


Figura 32. β -Galactosidación del alil-glucósido **4d** en medio acuoso

En un vial de 1.5 mL se adicionó el aceptor **4d** (50 mg, 227.04 μ mol) y 58.29 μ mol de lactosa (donador), los cuales se disolvieron en 950 μ L de PBS 50 mM pH 6.0. Después de incubar la mezcla por 5 min @ 35 °C y 650 rpm, se adicionó el biocatalizador (0.2 U de Kl- β -gal) hasta alcanzar un volumen final de 1 mL. La reacción se monitoreó por TLC [iPrOH:AcOEt:H₂O (3:1:1)] y se analizó por LC-MS [A: 100 mM de AcONH₄ pH 5.8, B: MeOH 0.1% de ácido fórmico; C-18: 250 × 4.6 mm × 3 μ m; 0 min 11%B → 17 min 11%B → 30 min 50%B; 400 mL min⁻¹; 4.5 kV, 120 V, 350 °C, 100-1000 m/z] después de 24 h de reacción.

5.11.4 β -Fructosilación del alil-glucosido **4d** utilizando una levansacarasa de *Bacillus subtilis*

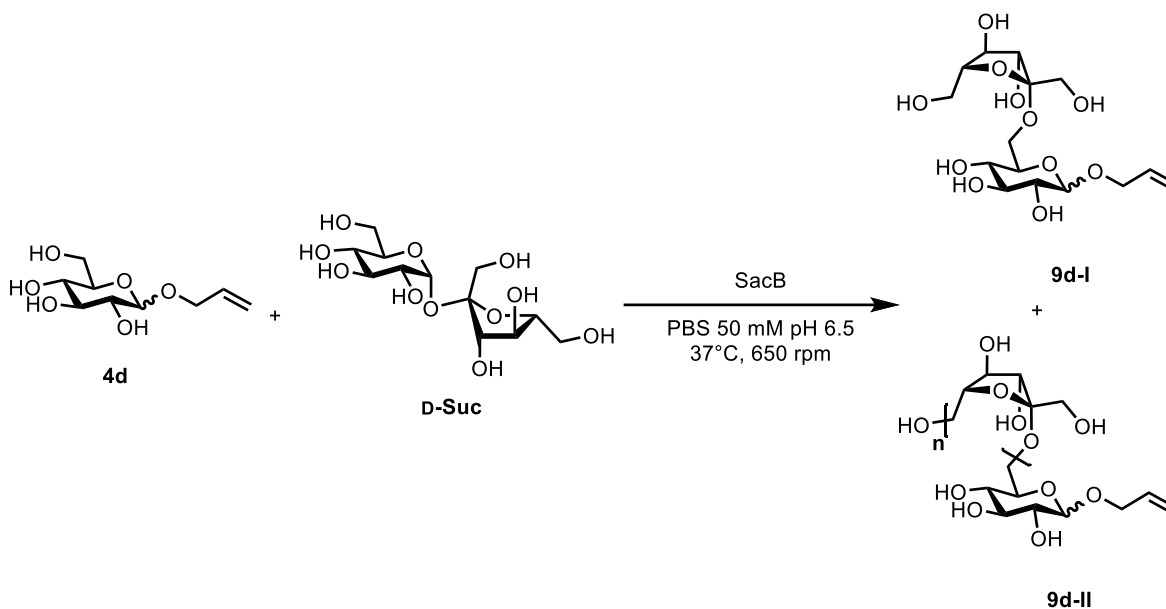


Figura 33. Reacción de fructosilación del alil-glucósido **4d** catalizada por la enzima *SacB*

Para obtener los productos **9d-I** y **9d-II**, se disolvió **4d** (96.80 mg) y *D*-sacarosa (112.84 mg, 329.67 μmol , 0.75 equiv.) utilizando 950 μL de PBS 50 mM pH 6.5. La mezcla se incubó a 37 °C y 650 rpm hasta completa disolución de la *D*-sacarosa. Posteriormente se adicionaron 50 μL de la levansacarasa [*SacB*, 1 U mL^{-1} , obtenida de acuerdo a lo descrito por Castrejón (2021)^[143]]. La reacción se monitoreó por TLC [*i*PrOH:AcOEt:H₂O (3:1:1) y CHCl₃:MeOH:H₂O (30:20:4)] y se analizó por LC-MS [A: 100 mM de AcONH₄ pH 5.8, B: MeOH 0.1% de ácido fórmico; C-18: 250 × 4.6 mm × 3 μm ; 0 min 11%B→17 min 11%B→30 min 50%B; 400 mL min^{-1} ; 4.5 kV, 120 V, 350 °C, 100-1000 m/z] después de 48 h de reacción.

5.12 POLIMERIZACIÓN POR RADICALES LIBRES

5.12.1 Síntesis de glicopolímero

La polimerización del glicomonómero alil-glucósido (50 mg, **4d**), se realizó en DMF o DMSO como disolvente (200 μ L) y AIBN (4 mg, 0.11 equiv.) como iniciador de radicales libres. Después de 72 h @ 65 °C, la reacción se finalizó adicionando 10 volúmenes de MeOH para precipitar el polímero. Posteriormente la mezcla se centrifugó (15,000 G \times 30 min), una muestra del precipitado se analizó por HPLC-SEC (sección 5.13). El polímero puro se obtuvo disolviendo el precipitado de la centrifugación en 200 μ L de agua Milli-Q, posteriormente se dializó en una membrana Membra-Cel™ MC18 (25 mm \times 16 mm \times 27 μ m) la cual se sumergió en 1 L de agua Milli-Q por 72 h a 4 °C, renovando el agua de diálisis cada 24 h. Posteriormente el agua se removió centrifugando al vacío (30 °C, <20 mbar) en un equipo Eppendor® Vacuum concentrator 5310.

5.12.2 Síntesis de copolímero

El copolímero se obtuvo mediante la reacción entre el alil-O-D-Glcp (50 mg, **4d**) y vinil-O-di-O-Prd- β -D-Frup (65 mg, **11b**) en presencia de AIBN (4 mg) por 72 h a 65 °C. Posteriormente la mezcla se centrifugó (15,000 G \times 30 min) y una muestra del precipitado se analizó por HPLC-SEC (sección 5.13). El polímero puro se obtuvo disolviendo el precipitado de la centrifugación en 200 μ L de agua Milli-Q, posteriormente se dializó en una membrana Membra-Cel™ MC18 (25 mm \times 16 mm \times 27 μ m) la cual se sumergió en 1 L de agua Milli-Q por 72 h a 4 °C, renovando el agua de diálisis cada 24 h. Posteriormente el agua se removió centrifugando al vacío (30 °C, <20 mbar) en un equipo Eppendor® Vacuum concentrator 5310.

5.13 DETERMINACIÓN DEL PESO MOLECULAR DE LOS POLÍMEROS

El peso molecular de los glicopolímeros se estimó por cromatografía de permeación en gel (Ultrahydrogel™ Linear, 7.8 \times 300 mm; 35 °C), utilizando como fase móvil NaNO₃ 100 mM con un flujo de 0.8 mL min⁻¹. Las muestras se inyectaron diluidas en agua y se compararon con estándares de D-glucosa, D-fructosa, **4d** y **2a**; así como con los sobrenadantes de la centrifugación. El peso molecular de las muestras se estimó en relación con levana de bajo peso molecular (Lev_{LMW}).

5.14 MÉTODOS DE DINÁMICA MOLECULAR Y MECÁNICA CUÁNTICA PARA LA OPTIMIZACIÓN DE ESTRUCTURAS QUÍMICAS

Las estructuras químicas se optimizaron geoméricamente en un nivel de teoría de mecánica cuántica (QM, por sus siglas en inglés). Las estructuras modelo del NADES ChCl:MA (1:2), glucosa y/o alcohol alílico, se construyeron utilizando Spartan'18. Los cálculos de optimización geométrica se realizaron en Gaussian a través de la teoría de funcional de la densidad (DFT, por sus siglas en inglés) con la base B3LYP 6-31G establecida en Gaussian 16 hasta alcanzar un punto estacionario en la superficie de energía potencial. Las estructuras se visualizaron en Chemcraft.

6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Síntesis de glicomonómeros: éteres vinílicos, alílicos y propargílicos

Una de las estrategias más utilizadas para la obtención de glicopolímeros es la polimerización de glicomonómeros. Esta ruta de síntesis permite aplicar diferentes métodos de polimerización, como lo es la polimerización por ruptura de anillos, la polimerización por radicales libres y la polimerización aniónica o catiónica. En consecuencia, inicialmente fue imprescindible desarrollar un método eficiente para la obtención de glicomonómeros.

6.1.1 Síntesis de glicomonómeros tipo éter vinílico de azúcares protegidos

El primer método explorado para obtener glicomonómeros fue el ilustrado en la **Figura 34**. Se empleó a los azúcares protegidos **2** y CaC_2 como sustratos en condiciones básicas de reacción, para incorporar un grupo vinilo en el OH libre del azúcar correspondiente. Por lo tanto, el primer paso de este proceso de síntesis fue obtener azúcares protegidos con un solo hidroxilo libre, para impedir la formación de productos polivinilados.

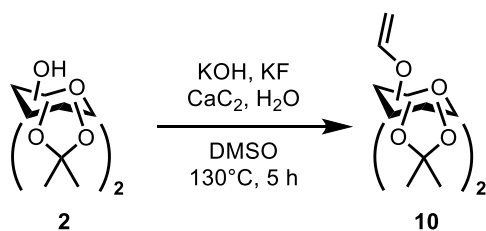


Figura 34. Esquema general y condiciones de reacción para la síntesis de éteres vinílicos de azúcares protegidos **10**

En el sustrato **2**, su hidroxilo libre actuó como nucleófilo, atacando al acetileno generado *in situ*, el cual se originó como resultado de la reacción entre el CaC_2 y el agua del medio. Las sales KOH/KF se utilizaron para aumentar la nucleofilicidad de **2** y además impedir la pasivación en la superficie del CaC_2 (consultar **Figura 35**).

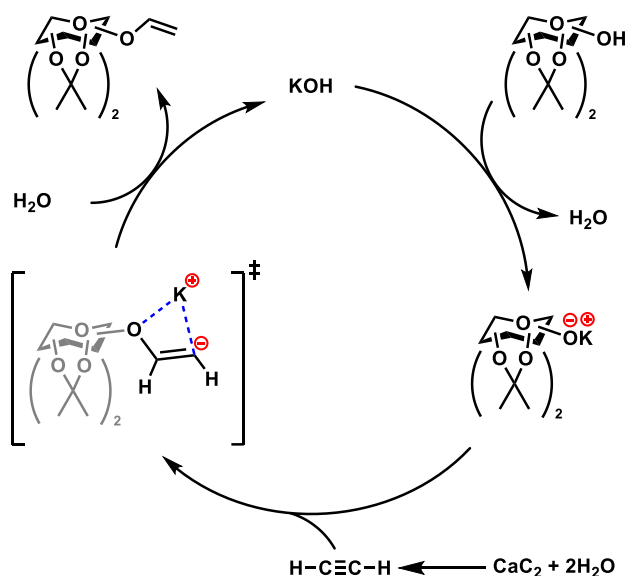


Figura 35. Posible mecanismo de reacción para la formación de éteres vinílico

6.1.1.1 Síntesis de azúcares protegidos empleando grupos di-O-isopropilideno

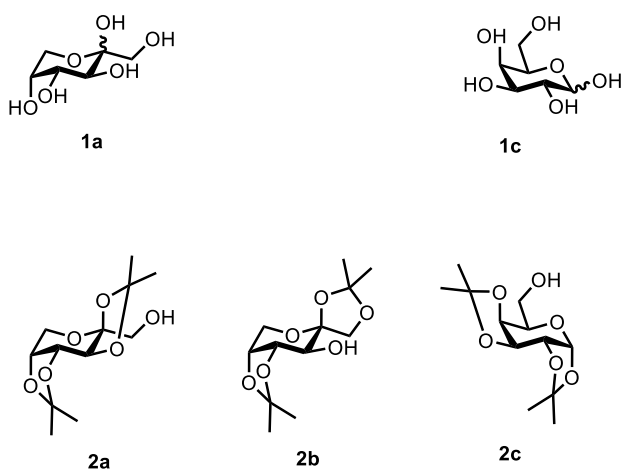


Figura 36. Materia prima (**1a**, **1c**) y productos obtenidos (**2a-c**) en la síntesis de azúcares protegidos

En las reacciones de protección que involucraron a la D-fructosa (**1b**) y D-galactosa (**1c**), ilustradas en la **Figura 36**, se utilizó H₂SO₄ como catalizador, así como Me₂CO para incorporar al grupo protector isopropilideno. Como productos se obtuvieron los azúcares protegidos **2a-c**. Para ello se empleó D-Fru y D-Gal por conveniencia, debido a que son azúcares comunes y de fácil acceso a nivel comercial. Los grupos protectores se introdujeron en los OH cis (mismo plano) del azúcar. Cuando el azúcar **1** entró en

contacto con acetona; previamente activada con H₂SO₄, el ataque nucleofílico del azúcar **1** provocó la formación de un hemiacetal, el cual se deshidrató y produjo la formación del azúcar protegido correspondiente. Debido a la naturaleza de **1a**, se produjeron dos regioisómeros (**2a** y **2b**). Los productos de reacción se purificaron por cristalización o por FCC, y se realizó su elucidación estructural empleando experimentos de NMR y LRMS.

El producto protegido de fructosa (**2a**), se identificó por LR-MS [M+Na]⁺=283.072 *m/z* (Figura 37). La estructura de **2a** se determinó analizando los espectros ¹H, ¹³C, ¹H-¹H COSY, así como el conjunto de experimentos heteronucleares ¹H-¹³C HSQC y HMBC, adquiridos a 292.75 K (la asignación estructural completa se encuentra en la Tabla 3).

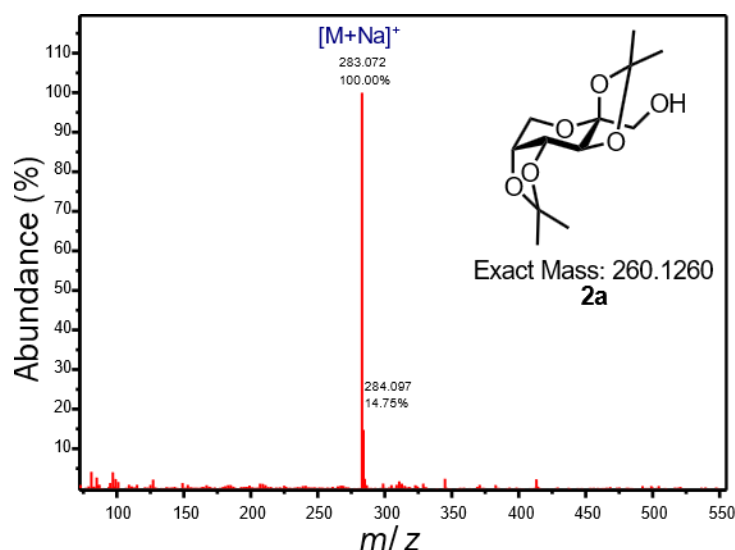


Figura 37. Espectro de masas de la D-fructosa protegida **2a**

La inspección en la región de 3.00–2.00 ppm en el espectro HSQC mostró una señal dd (³J_{H-OH,H-1a}=8.6 Hz, ³J_{H-OH,H-1b}=4.8 Hz) con δ_H=2.23, la cual se asignó al protón del OH en el residuo hidroximetileno exocíclico de **2a** (Figura 38A), ya que dicha señal carece de alguna correlación ¹H-¹³C a un enlace (Figura 38C), y además las correlaciones de esta señal (2.23 ppm, dd) en ¹H-¹³C HMBC corresponden a correlaciones con C₁ y C₂ (Figura 38C). El análisis detallado de la multiplicidad de las señales de protón en el espectro ¹H-¹H COSY (Figura 39) permitió determinar la estructura en **2a**. De hecho, la resolución del multiplete de H_{1a} (³J_{H-1a,H-1b}=11.7 Hz, ³J_{H-1a,H-OH}=8.6 Hz) y H_{1b} (³J_{H-1b,H-1a}=11.7 Hz, ³J_{H-1b,H-OH}=4.8 Hz) se logró a partir de los valores de ⁿJ_{H,H} obtenidos de la señal de OH (³J_{H-OH,H-1a}=8.6 Hz, ³J_{H-OH,H-1b}=4.8 Hz) mediante patrones de acoplamiento de primer orden^[144, 145].

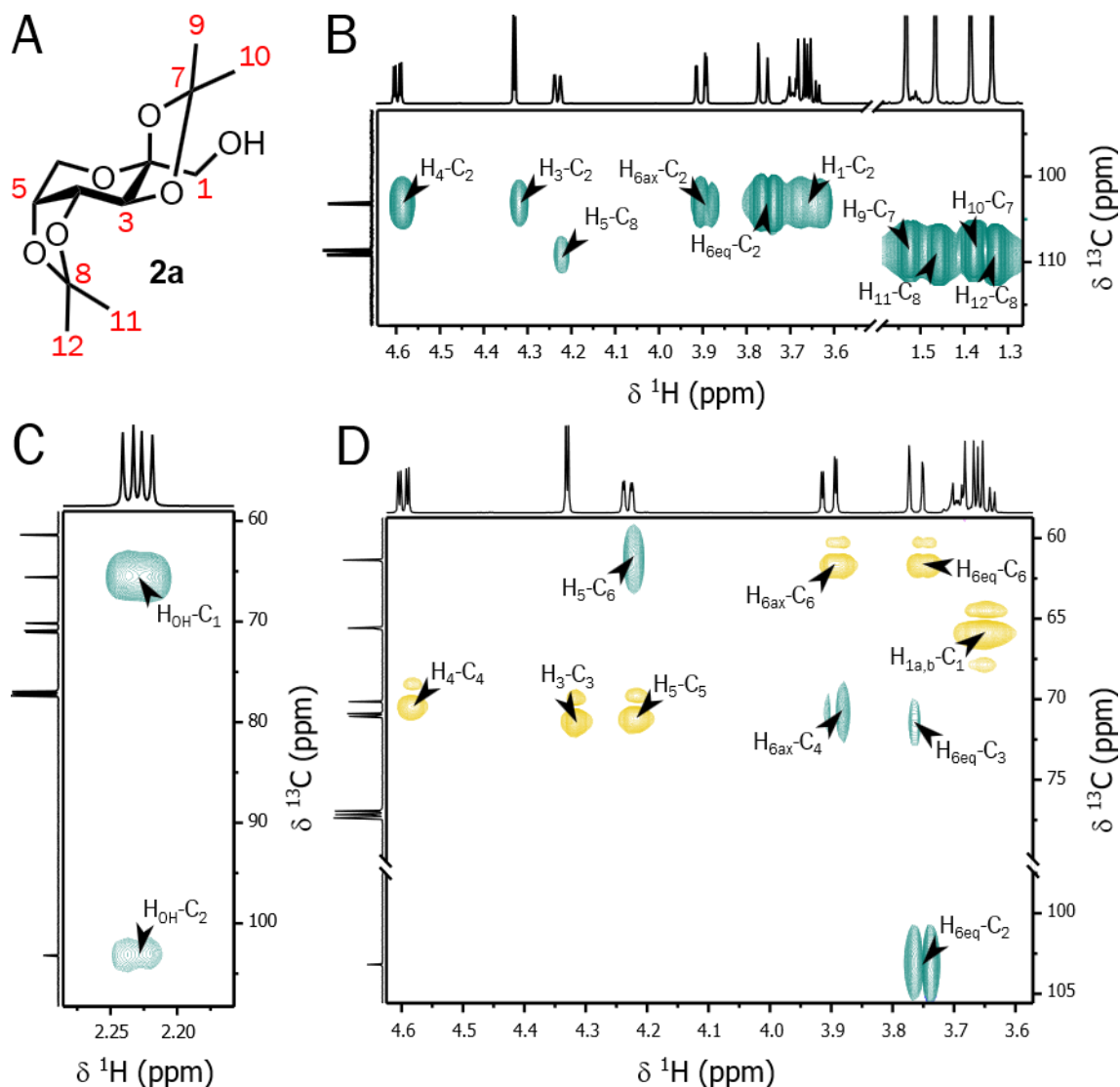


Figura 38. Estructura de la *D*-fructosa protegida **2a** y sus espectros ^1H - ^{13}C HSQC y HMBC (600 MHz, CDCl_3 , 293 K). A: Estructura del producto **2a**. B: ampliación del espectro HMBC. C: Ampliación del espectro ^1H - ^{13}C HMBC (■) en la zona de la señal H_{OH} ($\delta_{\text{H}}=2.23$). D: superposición de espectros ^1H - ^{13}C HSQC (■) y HMBC (■) en la zona de las señales CH del producto **2a**. Con subíndices el número y tipo de núcleo (H o C). Referencia interna TMS (δ_{H} y $\delta_{\text{C}}=0.00$).

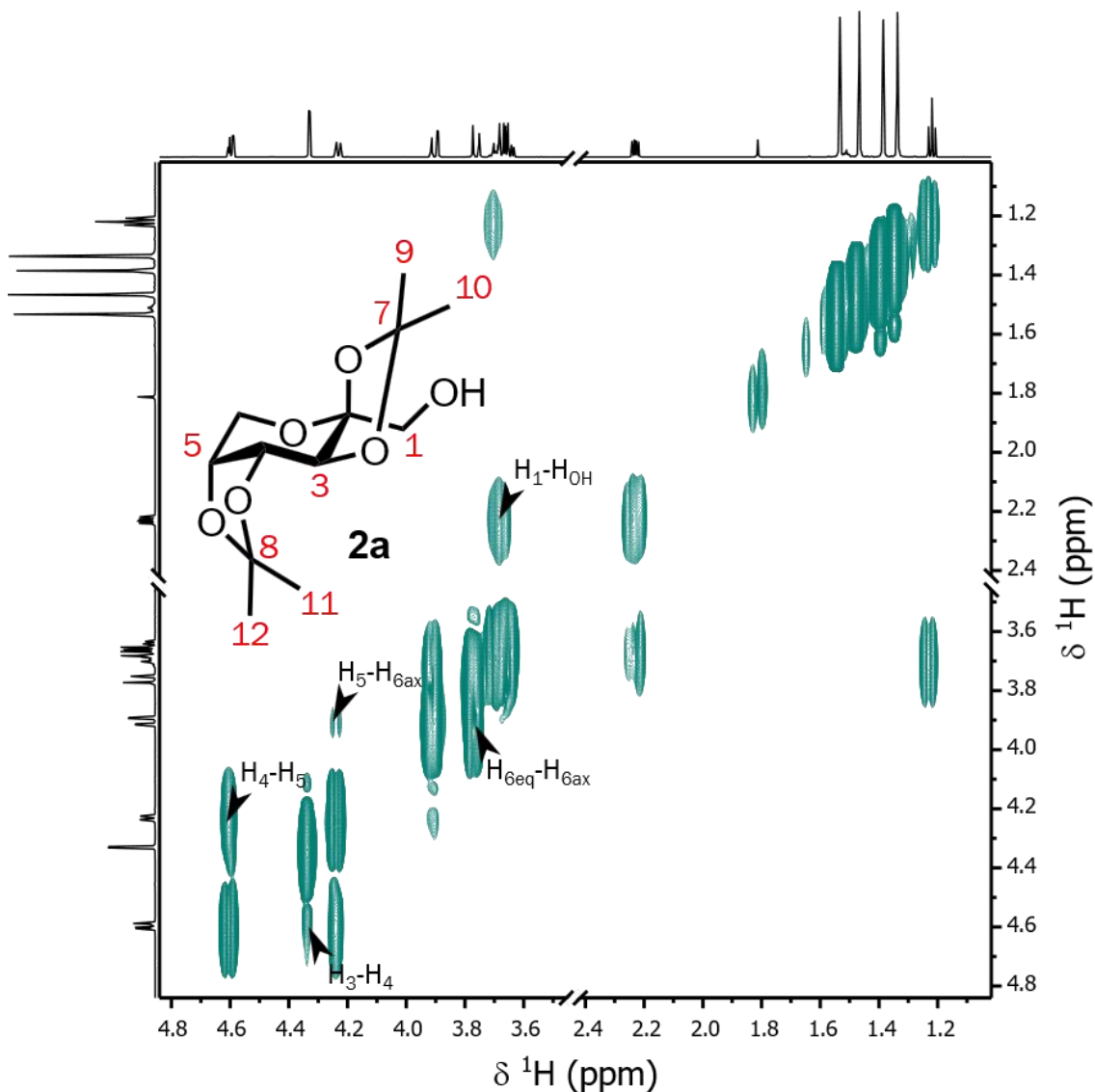


Figura 39. Espectro ^1H - ^1H COSY (600 MHz, CDCl_3 , 293 K) de la D-fructosa protegida **2a**. Carbonos de la estructura de **2a** (■). Correlaciones homonucleares ^1H - ^1H con flechas. Referencia interna TMS (δ_{H} y δ_{C} =0.00).

Los resultados anteriores se validaron con las correlaciones ^1H - ^{13}C en el espectro HMBC, (Figura 38B). Una vez asignadas todas las señales de ^1H , el experimento ^1H - ^{13}C HSQC permitió asignar las señales de ^{13}C . Particularmente para los carbonos cetálicos (C_2 , C_7 , C_8) y carbonos de CH_3 (C_9 , C_{10} , C_{11} , C_{12}), sus señales se asignaron en función de su desplazamiento químico y de sus correlaciones en HMBC (Figura 38B y D). Con lo cual se dispuso que **2a** posee una conformación relativa de piranosa $^2\text{C}_5$ y configuración β sobre el carbono estereogénico C_2 ; coincidiendo con la conformación más estable reportada en la literatura^[146].

En el caso del producto isomérico **2b**, este se obtuvo siguiendo la misma metodología que para obtener **2a**. Sin embargo, su síntesis se logró utilizando un control cinético basado en el uso de una menor concentración de H₂SO₄. El producto final se aisló y se purificó por cristalización (Hexanos:CH₂Cl₂ 4:1 v/v). Al comparar el espectro de ESI-MS de **2b** (Figura 40) con su isómero **2a**, no se observó el pico del aducto [M+Na]⁺, en este caso el pico con mayor abundancia relativa fue la señal que corresponde al aducto deshidratado y protonado [M-H₂O+H]⁺=243.202 m/z.

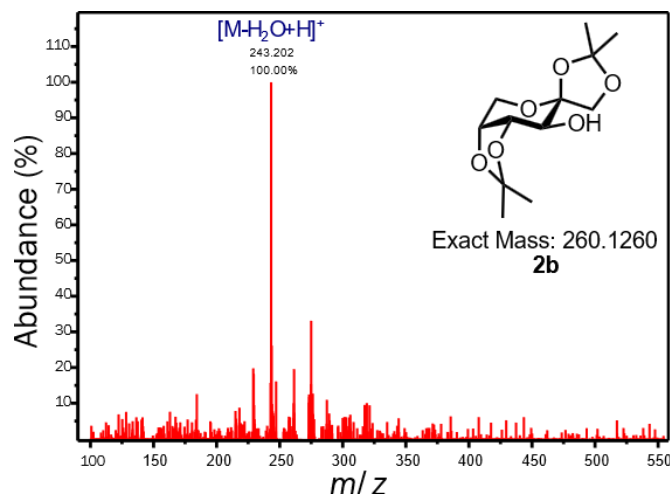


Figura 40. Espectro de masas de la *D*-fructosa protegida **2b**. Aducto [M-H₂O+H]⁺=243.202 m/z (masa exacta de 2b-H₂O+H).

El espectro de NMR del compuesto **2b** (Figura 41A) presentó una señal de H_{OH} (m, 2.16-2.05 ppm) en el espectro ¹H-¹H COSY (Figura 41B), con una correlación homonuclear de protón con el H₃ (ddd, 3.68 ppm). Esto se corroboró con una inspección de los espectros ¹H-¹³C HSQC y HMBC. En la Figura 41C se observa una superposición de los espectros HSQC y HMBC donde las correlaciones del C₃ (70.51 ppm) con el H_{OH} y H₅, así como las correlaciones de H_{OH} con los carbonos C₃ y C₂, confirman lo anteriormente mencionado. Al mismo tiempo, a partir del espectro COSY (Figura 41B) fue posible asignar las señales de H₄, H₅, H_{6ax} e H_{6eq}. Lo anterior se complementó con los valores de acoplamiento ⁿJ_{H,H} del espectro ¹H. La validación de las asignaciones estructurales se realizó mediante las correlaciones ¹H-¹³C del espectro HMBC, obteniendo así la estructura de **2b** (la asignación completa se encuentra en la Tabla 4). La cual también posee una conformación relativa de piranosa ²C₅ y configuración β sobre el carbono estereogénico C₂^[146].

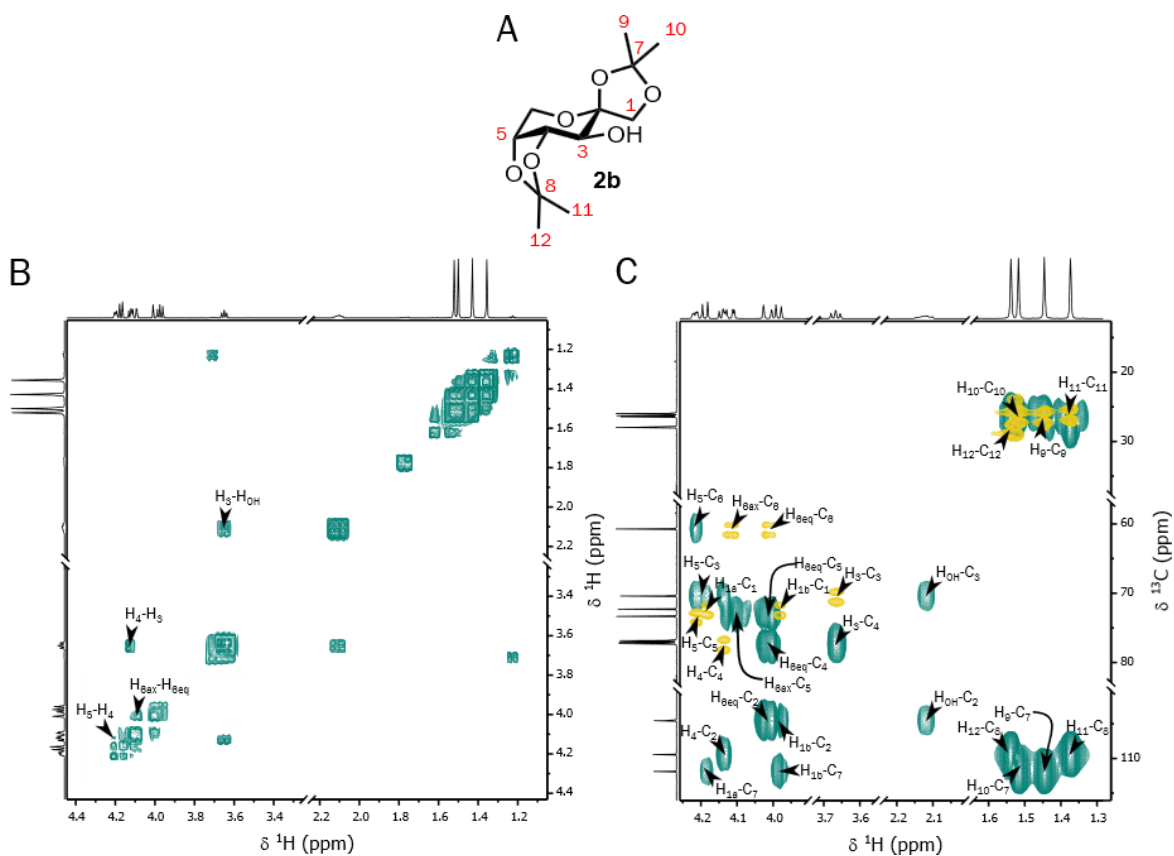


Figura 41. Espectro ^1H - ^1H COSY y superposición de espectro ^1H - ^{13}C HSQC y ^1H - ^{13}C HMBC (600 MHz, CDCl_3 , 293 K) del producto isomérico **2b** de la D-fructosa protegida
 A: Estructura del producto isomérico **2b**. B: Correlaciones (■) en espectro COSY se con flechas. C: Correlaciones en HSQC (un enlace, ■) y correlaciones a dos o más enlaces en HMBC (■). Referencia interna TMS (δ_{H} y δ_{C} =0.00).

El producto di-*O*-*i*Prd-Galp **2c**, se obtuvo en condiciones similares a los productos **2a-b**, se purificó por cromatografía en columna y se identificó inicialmente por LC-ESI-MS. En la **Figura 42** se observó un pico de 283.401 *m/z* que corresponde al aducto [M+Na]⁺.

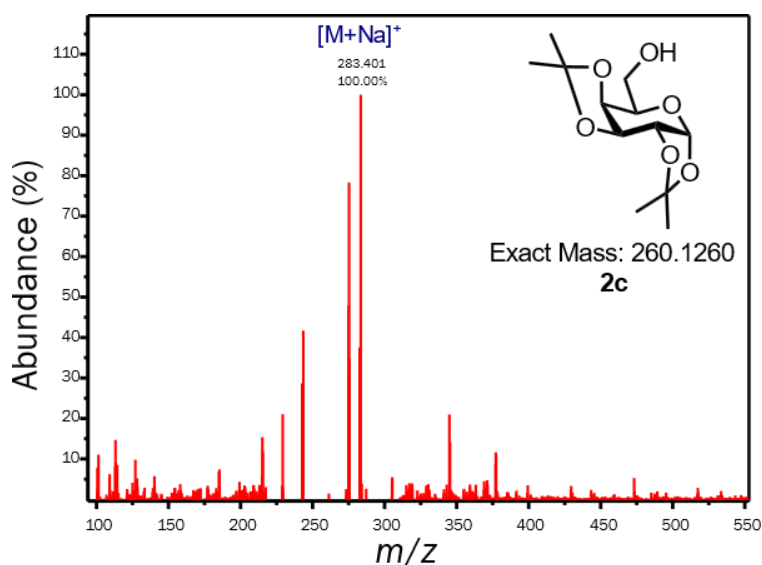


Figura 42. Espectro de masas de **2c** por ionización por electrospray en modo positivo. Aducto [M+Na]⁺; masa exacta de la D-galactosa protegida **2c**+Na =283.401 *m/z*.

Para la elucidación estructural de **2c**, se analizó primero el espectro ¹H-¹H COSY (**Figura 43A**), donde la señal situada en 5.5 ppm corresponde al protón anomérico H₁ (5.5 ppm, d, ³J_{H-1,H-2}=2.4 Hz, α-Galp). Lo cual se confirmó el espectro ¹H-¹³C HSQC (**Figura 43B**), donde se observó una correlación en la zona anomérica δ_H/δ_C 5.5/96.41. El protón H₁ presentó una correlación en ¹H-¹H COSY con H₂ (dd, 4.54 ppm, ³J_{H-2,H-3}=8.0 Hz, ³J_{H-2,H-1}=2.4 Hz). Por lo tanto, a partir de esta señal se asignó el de multiplicidades.

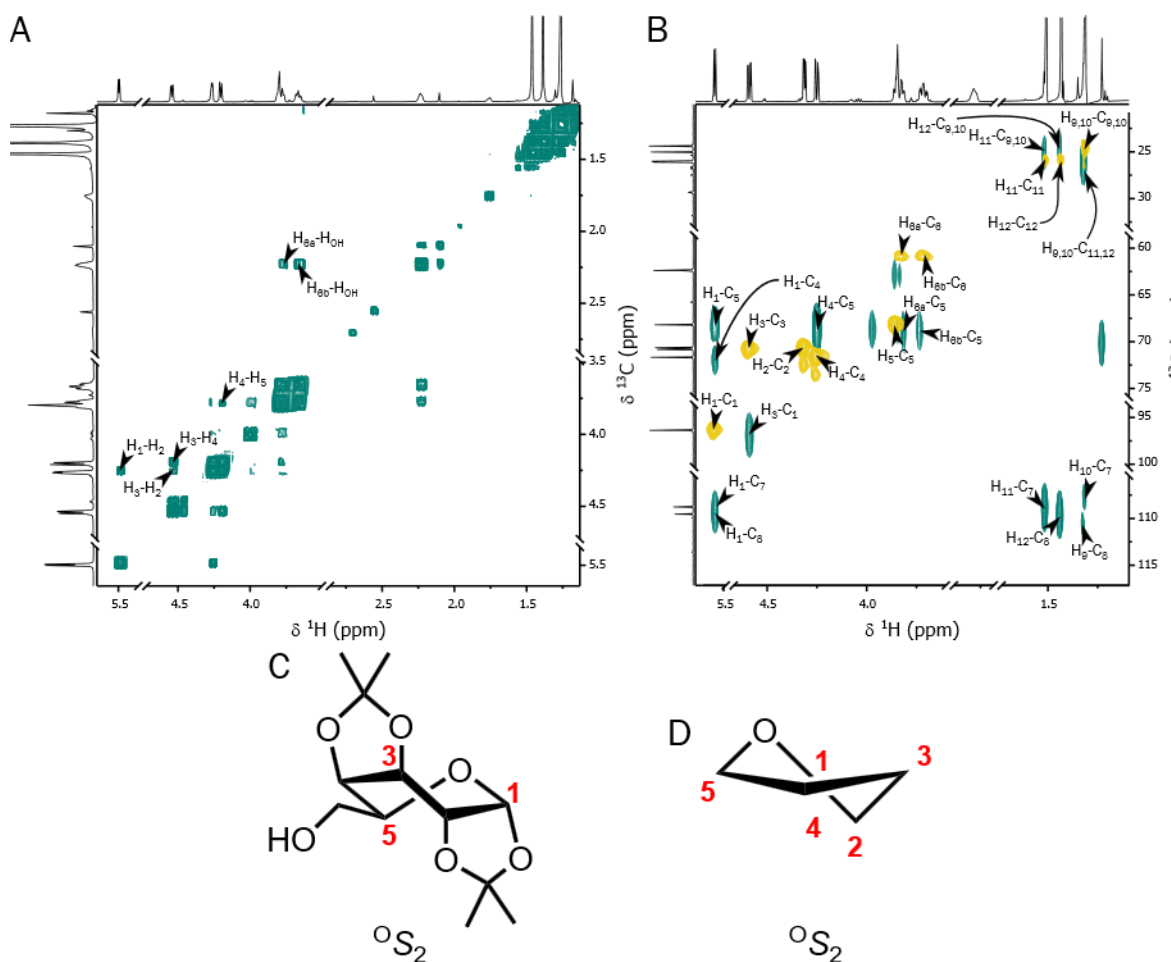


Figura 43. Estructura, conformación y espectros de RMN bidimensionales (600 MHz, $CDCl_3$, 293 K) del azúcar protegido de D-galactosa **2c**. A: Experimentos de NMR 1H - 1H COSY (■). B: Superposición de espectros RMN 1H - ^{13}C HSQC (■) y HMBC (■). Referencia interna TMS (δ_H y $\delta_C=0.00$ ppm). C: Producto de D-galactosa protegida **2c**. D: Conformación 0S_2 de D-galactosa protegida **2c**.

Combinando los datos de HSQC y HMBC (Figura 43B) fue posible asignar todas las señales de protón y carbono (la asignación y datos espectroscópicos completos se encuentran en la Tabla 5, las correlaciones del H_1 α -Galp con los C_4 , C_5 , C_7 y C_8 (Figura 43B), así como las correlaciones del residuo hidroximetileno exocíclico entre los H_{6a} , H_{6b} y C_5 , permitieron establecer que **2c** posee una configuración α en el C_1 . A pesar de que no fue posible asignar completamente los protones H_5 y H_{6a} , para determinar la conformación de **2c**, se compararon los valores de acoplamiento experimentales de este trabajo, con los valores teóricos reportados para conformaciones bote torcido y silla. La comparación hace suponer que a la temperatura de adquisición (293 K) del espectro de

^1H , el isómero conformacional más estable y predominante es la conformación de bote torcido $^0\text{S}_2$ ^[147-149] (Figura 43C y D).

Tabla 11. Comparación de los valores de las constantes de acoplamiento reportadas en la literatura de conformaciones silla y bote torcido, con las obtenidas experimentalmente en el espectro ^1H del producto **2c**

Protón	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$	^1H acoplados	$^nJ_{\text{H,H}}$ silla ^b	$^nJ_{\text{H,H}}$ bote torcido ^b	$^nJ_{\text{H,H}}$ experimental ^c
1	5.5	1,2	4.66	4.66	5.1
2	4.26	2,3	5.96	2.93	2.4
3	4.54	3,4	5.08	7.79	8.0
4	4.20	4,5	1.19	1.98	1.5

^a Desplazamiento químico de protón (600 MHz, CDCl_3 , 293 K). Referencia interna TMS ($\delta_{\text{H}}=0.00$ ppm),

^b Valores teóricos calculados en Hz, ^c Valores de acoplamiento experimentales reportados en Hz obtenidos en este trabajo

6.1.1.2 Monovinilación de di-*O*-isopropiliden azúcares utilizando CaC_2

La metodología general utilizada para construir los éteres vinílicos de carbohidratos (**10a-c**) se describe esquemáticamente en la Figura 44. Los éteres vinílicos se prepararon a partir de los di-*O*-*i*-Prd azúcares **2a-c** previamente sintetizados. Dado que estas moléculas poseen en su estructura un residuo hidroximetileno libre, este fragmento actuó como nucleófilo atacando al acetileno generado *in situ* a lo largo el proceso de síntesis. Durante dicho mecanismo (Figura 44A), el medio básico (KOH/KF) genera CaF_2 , el cual impide la pasivación de la superficie del CaC_2 y también favorece el ataque nucleofílico del azúcar, para genera el correspondiente éter vinílico. Lo cual permitió la obtención de los éteres vinílicos **10a-c**, mediante el uso de azúcares protegidos (**2a-c**, Figura 44B)

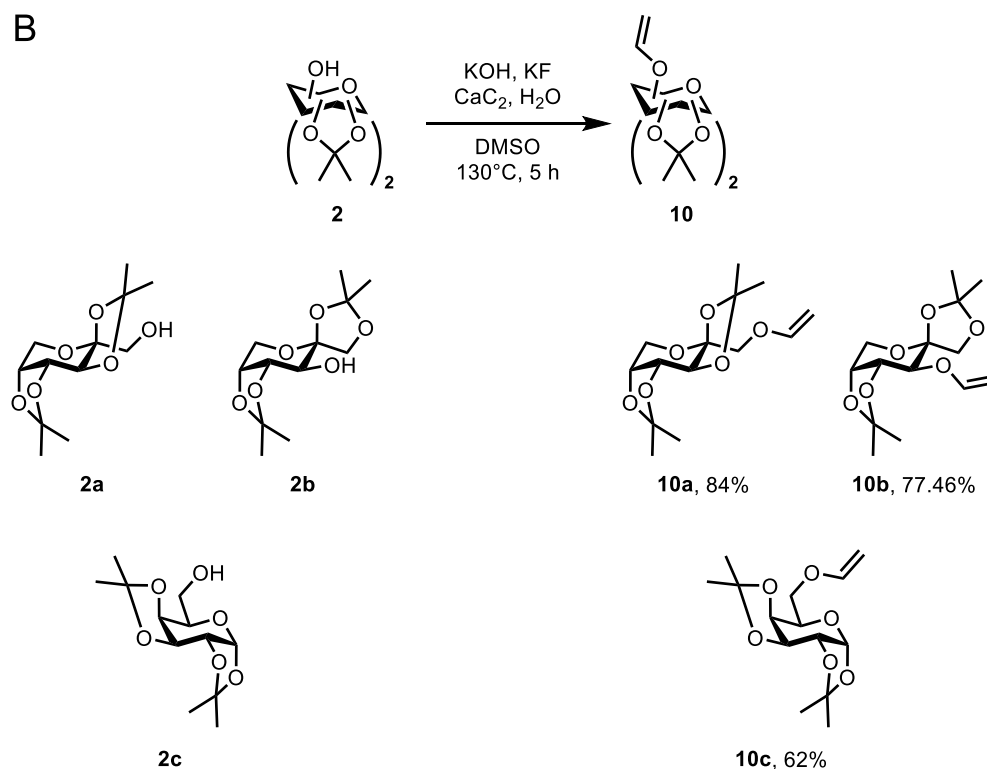
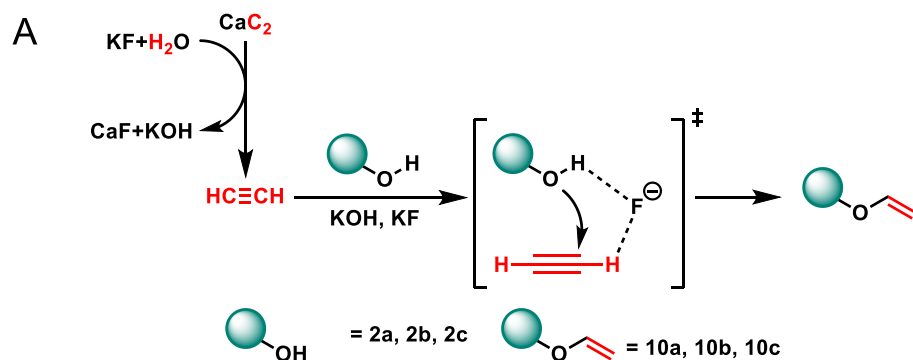


Figura 44. Mecanismo de reacción y esquema general para la síntesis de vinil azúcares protegidos. A: Formación de C_2H_2 en medio básico (KOH/KF) generando CaF_2 . B: Esquema general de reacción para obtener éteres vinílicos **10a-c**, empleando azúcares protegidos (**2a-c**).

Los di-O-Prd-O-vinil azúcares **10a-c** se purificaron por FCC para posteriormente ser caracterizados por resonancia magnética nuclear. Los espectros se compararon con los datos espectroscópicos reportados en la literatura^[93], así como con los espectros del di-O-Prd azúcar utilizado como materia prima.

En el caso del éter vinílico **10a**, su espectro de ^1H NMR (Figura 45) mostró una señal dd (6.39 ppm, $^3J_{\text{H-2}',\text{H-1}'\text{a}}=14.2$ Hz, $^3J_{\text{H-2}',\text{H-1}'\text{b}}=6.7$ Hz), la cual corresponde al $\text{H}_{2'}$ de la aglicona CHCH_2 . Así, a partir de los valores de $^nJ_{\text{H,H}}$ de $\text{H}_{2'}$ se asignaron los protones $\text{H}_{1'\text{a}}$ trans (4.17 ppm, dd, $^3J_{\text{H-1}'\text{a},\text{H-2}'}=14.2$ Hz, $^3J_{\text{H-1}'\text{a},\text{H-1}'\text{b}}=2.2$ Hz) y $\text{H}_{1'\text{b}}$ cis (3.96 ppm, dd, $^3J_{\text{H-1}'\text{b},\text{H-2}'}=6.7$ Hz, $^3J_{\text{H-1}'\text{b},\text{H-1}'\text{a}}=2.2$ Hz). Los protones endocíclicos en **10a** se asignaron tomando como base los valores de $^nJ_{\text{H,H}}$, en la señal centrada en 4.55 (dd, $^3J_{\text{H-4},\text{H-5}}=7.9$ Hz, $^3J_{\text{H-4},\text{H-3}}=2.6$ Hz) la cual se designó como H_4 . Utilizando esta señal, se realizó un análisis de la multiplicidad de todas las señales del espectro ^1H , donde los valores de $^nJ_{\text{H,H}}$ coincidieron con los valores de acoplamiento en la materia prima **2a**.

En consecuencia, al estar la materia prima (**2a-c**) completamente caracterizada por diversos experimentos de NMR, se decidió continuar el proceso de síntesis únicamente con la elucidación estructural basada en una asignación por ^1H NMR. Es importante mencionar que esta acción se consideró para los éteres vinílicos **10a-c**.

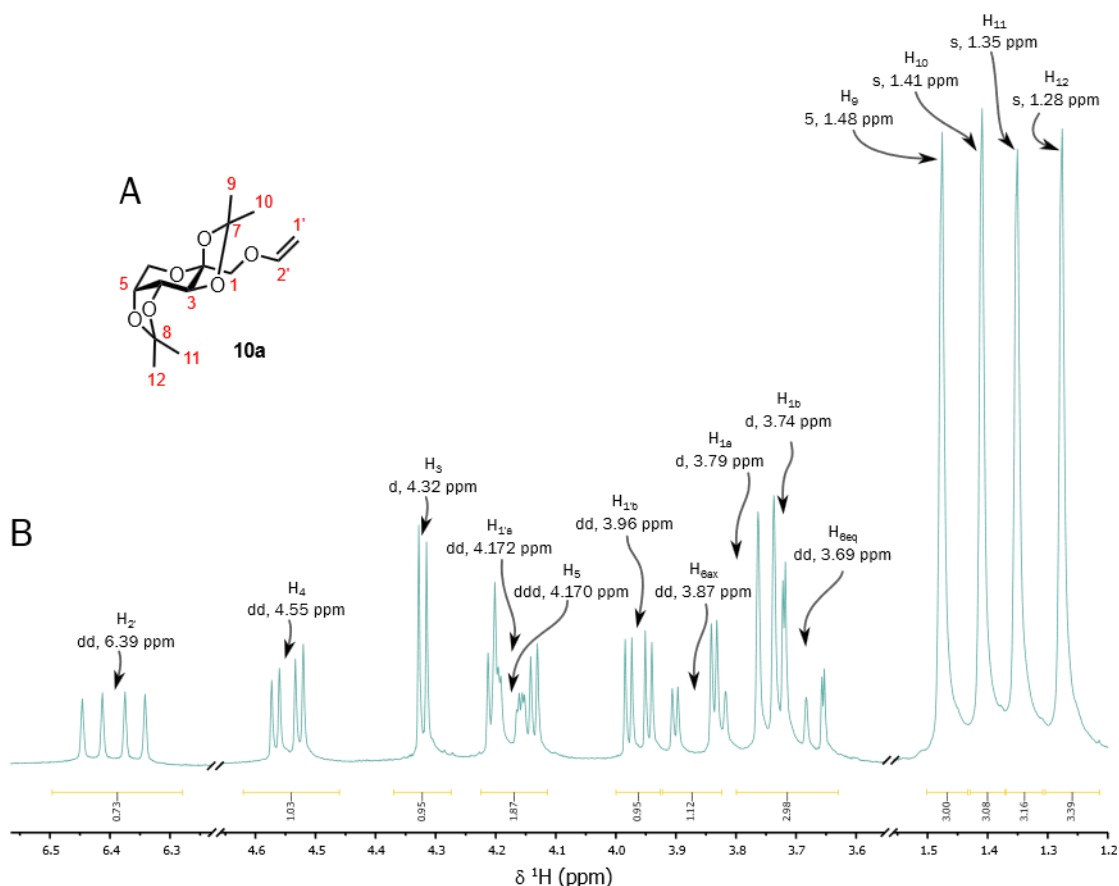


Figura 45. Espectro ^1H NMR del vinil azúcar **10a** y sus correspondientes asignaciones.

El di-*O*-*i*Prd-3-*O*-vinil- β -D-Frup **10b** (Tabla 7, Figura 46A) se obtuvo al someter **2b** a las condiciones de vinilación con CaC_2 (Sección 5.9, Pág. 42). El dd situado en 6.39 ppm corresponde al CHCH_2 del residuo vinílico. El protón $\text{H}_{2'}$ presentó acoplamientos $^3J_{\text{H}-2',\text{H}-1'a}=13.9$ Hz y $^3J_{\text{H}-2',\text{H}-1'b}=6.4$ Hz con los protones metilénicos del carbono sp^2 en el residuo vinílico. La asignación para los protones CH de la β -D-Frup se llevó a cabo tomando los valores $^nJ_{\text{H},\text{H}}$ de **2b** y comparándolos con los extraídos de las señales del espectro ^1H de la Figura 46B. Las señales de $\text{H}_{6\text{ax}}$ ($^3J_{\text{H}-6\text{ax},\text{H}-5}=2.5$ Hz, $^3J_{\text{H}-6\text{ax},\text{H}-6\text{eq}}=13.15$ Hz), $\text{H}_{1'b}$ ($^3J_{\text{H}-1'b,\text{H}-2}=6.4$ Hz, $^3J_{\text{H}-1'b,\text{H}-1'a}=1.85$ Hz), H_{1a} ($^3J_{\text{H}-1a,\text{H}-1b}=8.65$ Hz) e $\text{H}_{6\text{eq}}$ ($^3J_{\text{H}-6\text{eq},\text{H}-5}=0.73$ Hz, $^3J_{\text{H}-6\text{eq},\text{H}-6\text{ax}}=13.15$ Hz) se obtuvieron por un análisis de multipletes de primer orden (Figura 46C).

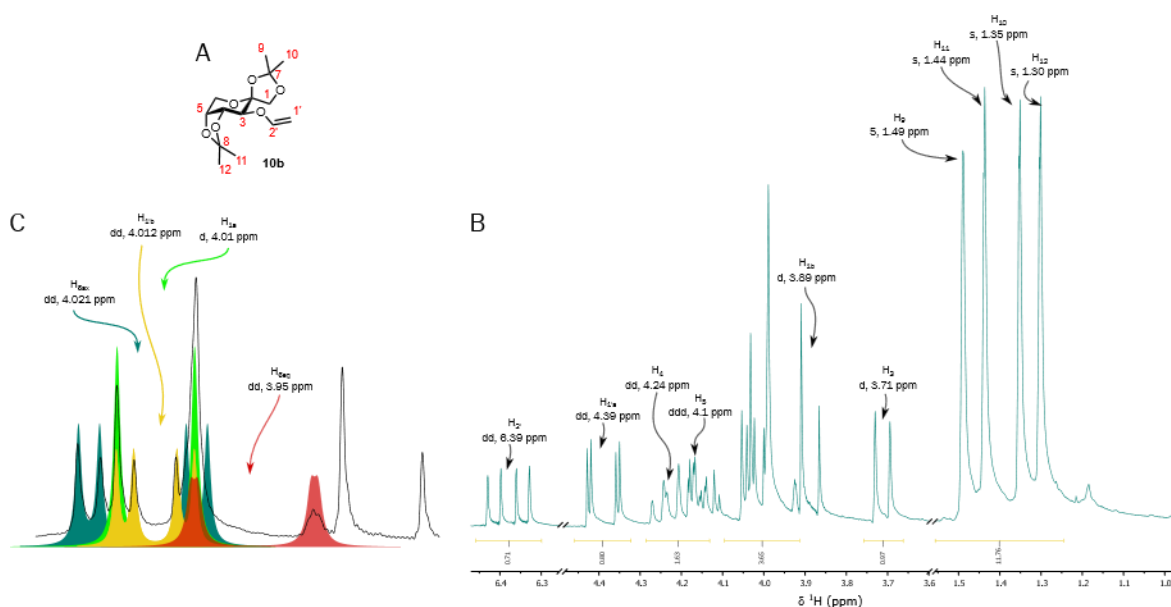


Figura 46. Estructura del vinil azúcar protegido **10b** y su espectro de ^1H NMR (200 MHz, CDCl_3 , 296 K). A: Estructura del di-*O*-*i*Prd-3-*O*-vinil- β -D-Frup **10c**. B: Espectro de ^1H . C: Ampliación de la región 4.07-3.95 ppm y simulación de multipletes de los protones $\text{H}_{6\text{ax}}$ (■), H_{1b} (■), H_{1a} (■) y $\text{H}_{6\text{eq}}$ (■). Referencia interna TMS ($\delta_{\text{H}}=0.00$).

El éter vinílico **10c** se obtuvo con la misma metodología de los éteres **10a-b** (Sección 5.9, Pág. 42). A diferencia de los isómeros **10a-b**, el éter vinílico **10c** presentó una asignación estructural más sencilla (Figura 47A). A partir de la señal centrada en la zona de protones anoméricos, alrededor de 5.48 ppm ($^3J_{\text{H}-1,\text{H}-2}=5.0$ Hz), se aginaron las señales de los CH del anillo α -D-Galp. Por otro lado, el residuo CHCH_2 se asignó a partir de los valores de $^nJ_{\text{H},\text{H}}$ de la señal de $\text{H}_{2'}$ ($^3J_{\text{H}-2',\text{H}-1'a}=14.3$ Hz, $^3J_{\text{H}-2',\text{H}-1'b}=6.8$ Hz). Respecto al multiplete que integra para para 3H (m, 4.34-4.05 ppm, Figura 47B,C), este contiene

a lo protones H₂, H₄ y H_{1'a}.

En resumen, los di-O-*i*Prd-O-vinil éteres **10a-c** se sintetizaron exitosamente sin recurrir a atmósferas inertes o condiciones anhidras^[93]. La purificación de los productos fue sencilla y eficiente. La formación del éter vinílico en el OH libre de **2a-c** no requirió utilizar material tóxico o de intermediarios, lo cual no sucede en reportes donde la ruta de síntesis transcurre a través de formilglucósidos como intermediarios para lograr incorporar el residuo CHCH₂ mediante una olefinación de Tebbe^[150]. Además, los productos **10a-c** poseen en sus estructuras grupos protectores que confieren a estas moléculas una considerable hidrofobicidad. En este sentido, era probable que, si realizaba una reacción de copolimerización con otro monómero más polar, se podría construir glicopolímeros anfifílicos, los cuales; a través de una manipulación del medio, podrían permitir la construcción de diversas arquitecturas moleculares (**Figura 4**) con potenciales aplicaciones (**Figura 5**).

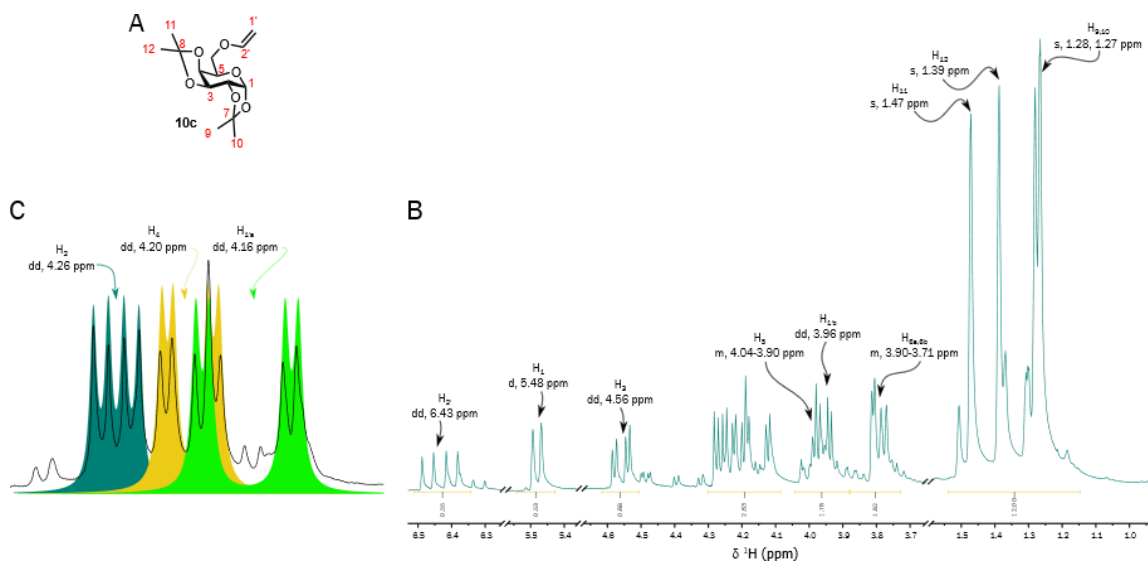


Figura 47. Estructura del di-O-*i*Prd-6-O-vinil- α -D-Galp **10c** y su espectro de ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃, 296 K). A: estructura de **10c**. B: Espectro de ¹H .C: Ampliación de la región 4.34-4.05 ppm y simulación los multipletes de los protones H₂ (■), H₄ (■) y H_{1'a} (■). Referencia interna TMS ($\delta_H=0.00$).

6.1.2 Síntesis y análisis de glicomonómeros tipo alil y propargil azúcares en NADES

6.1.2.1 Caracterización del NADES y su capacidad como medio catalítico

En la actualidad, el uso de disolventes orgánicos tales como DCM, CHCl_3 , MeOH y/o catalizares tóxicos en síntesis orgánica es cada vez menos recomendado [61, 151]. Bajo estas consideraciones, en este proyecto se probó la alternativa de sustituir estos sistemas tradicionales por el uso de disolventes eutécticos profundos naturales (NADES, **sección 1.2.1, Pág. 13**), una clase de disolventes neótericos que se inclinan y siguen la mayor parte de principios de la química verde^[30, 152]. En efecto, además de sus propiedades de disolución, se exploraron sus propiedades catalíticas como catalizador ácido, para así poder eliminar el uso de ácidos fuertes como el H_2SO_4 .

Después de sintetizar el NADES $\text{ChCl}:\text{MA}$ (1:2) (**sección 5.7**), este se caracterizó explorando su capacidad para catalizar la síntesis de di-*O*-Prd azúcares. Siguiendo la metodología de la **Figura 48A** se sintetizaron los productos **2a** y **2c**. La reacción se llevó a cabo a temperatura de reflujo de Me_2CO ($\sim 56^\circ\text{C}$), el curso de la formación de productos se analizó por TLC (Hex:AcOEt 1:1). Una vez que no se detectó aumento aparente en la concentración de producto (4 h para **2a**, 1 h para **2c**), las muestras se analizaron por LRMS (**Figura 48B**). A partir del espectro de LC-MS, los picos más abundantes se asignaron a los aductos $[\text{M}+\text{Na}]^+=283.063$ *m/z* para **2a** y $[\text{M}+\text{Na}]^+=283.064$ *m/z*. Una vez sintetizados los di-*O*-Prd azúcares **2a** y **2c** en NADES, y considerando lo simple de este método, se exploró la factibilidad de extender esta ruta de síntesis a reacciones de alquilación utilizando alcoholes alifáticos en lugar de acetona. Ya que los resultados anteriores sugerían que el medio eutéctico $\text{ChCl}:\text{MA}$ (1:2) podría activar al carbonilo de la Me_2CO para que fuera más electrofílico frente a los OH de un azúcar, se consideró que las condiciones ácidas (**Figura 49**) que brinda el sistema $\text{ChCl}:\text{MA}$ (1:2) serían las suficientes para generar intermediarios reactivos de carbohidratos, susceptibles a ataques nucleofílicos. De este modo, utilizando las condiciones de reacción de la **Figura 50** y sustituyendo a la acetona por metanol, fue posible sintetizar metil-glicósidos. Este experimento sugiere que el NADES $\text{ChCl}:\text{MA}$ (1:2) es capaz de sintetizar intermediarios reactivos que permitieron funcionalizar azúcares de manera eficiente y con una regioselectividad sobresaliente, sin requerir la protección de sus grupos OH reactivos.

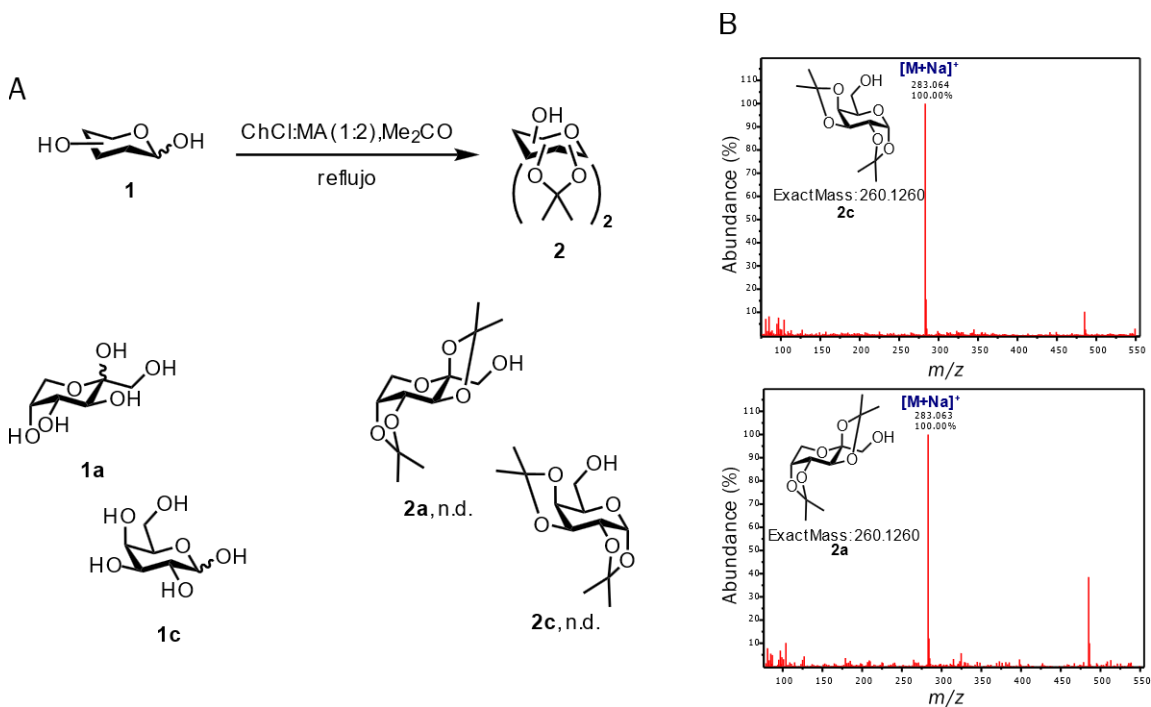


Figura 48 Síntesis e identificación de di-O-iPrd azúcares protegidos **2a** y **2c**. A: Esquema general de reacción, sustratos y productos obtenidos. B: Aductos mayoritarios $[M+Na]^+$. Rendimiento no determinado (n.d.).

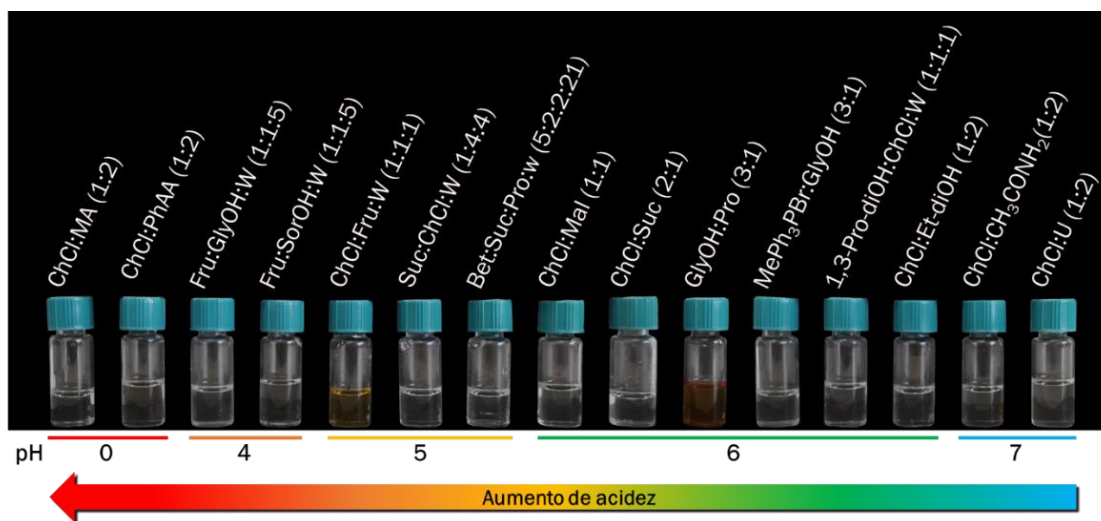


Figura 49. Escala de pH de diferentes mezclas eutécticas, utilizando un indicador universal. La lectura de pH se tomó a los dos min después de impregnar la tira de pH (Fermont #92110 pH-Fix 0-14).

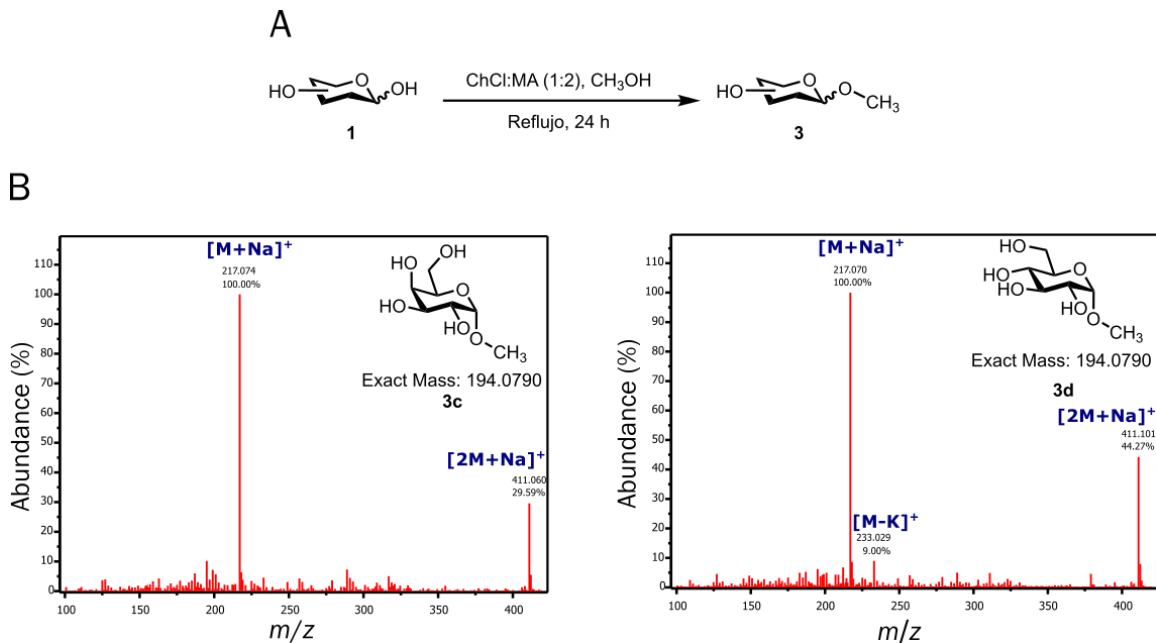


Figura 50 Síntesis y detección de metil-glicosidos

A) Síntesis de metil-glicósidos **3**. B) Detección por LC-MS utilizando electrospray. Picos más abundantes: aductos $[M+Na]^+$, $[2M+Na]^+$ y $[M+K]^+$.

6.1.2.2 Síntesis de glicomonómeros en el medio eutéctico ChCl:MA (1:2): síntesis regioselectiva de O-glicósidos

6.1.2.2.1 Versatilidad del NADES ChCl:MA (1:2) para sintetizar alil- y propargil-glicomonómeros

La síntesis de los glicomonómeros tipo alil-O-glicosidos utilizando diferentes monosacáridos (**Figura 51**), se realizó utilizando alcohol alílico como grupo polimerizable. Para esto, se emplearon diferentes azúcares como sustratos aceptores del grupo polimerizable (**2c-g**), ya que reportes en la literatura, sugieren que el complejo de sal de amonio y ácido carboxílico, ChCl:MA (1:2), puede activar carbonilos mediante enlaces de hidrógeno^[153] para aumentar su electrofílicidad, facilitando así el ataque de una especie nucleofílica.

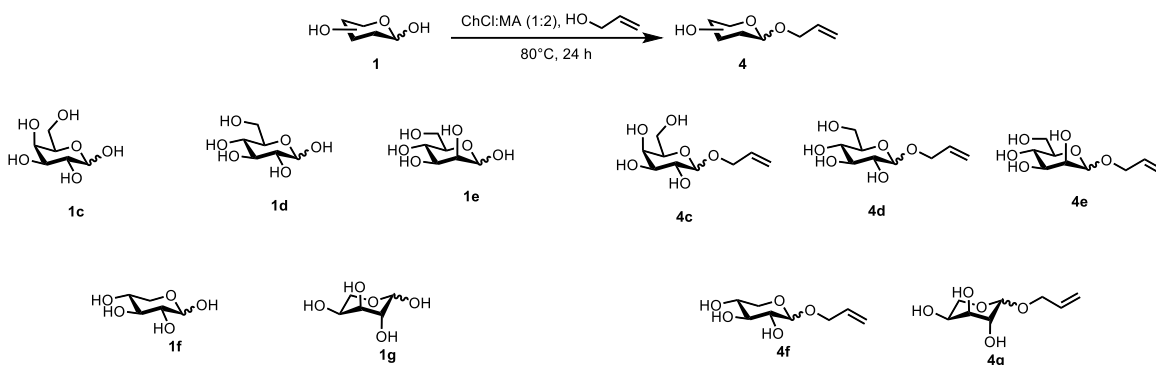


Figura 51 Esquema general para la síntesis de alil-glicósidos

Materia prima (**1c-g**) y productos obtenidos (**4c-g**).

Se tomó como modelo de sustrato a la D-glucosa **1d** y se enfrentó a las condiciones de reacción de la **Figura 51**, generando el correspondiente producto **4d**. El producto obtenido, se aisló y posteriormente se purificó por FCC. En su espectro de masas (**Figura 52**), se identificaron como picos más abundantes a los aductos $[M+\text{Na}]^+=243.069\text{ m/z}$ y $[2M+\text{Na}]^+=463.051\text{ m/z}$, los cuales indicaron la presencia del producto alil-glicósido **4d**.

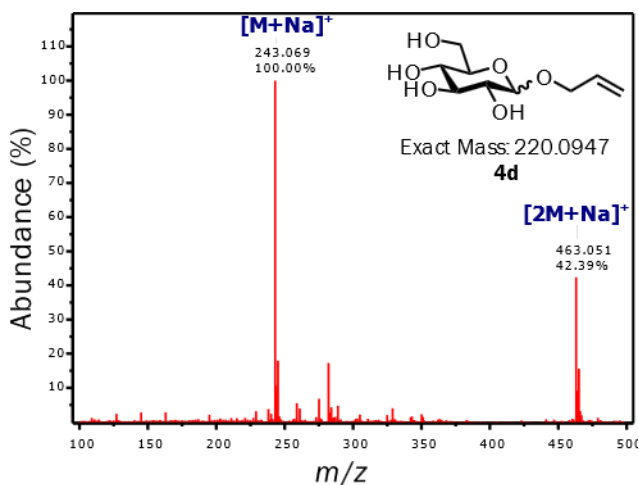


Figura 52 Espectro de masas del alil-glicósido **4d**

Ionización por electroespray. Picos mayoritarios: aductos $[M+\text{Na}]^+$ y $[2M+\text{Na}]^+$.

Una vez corroborada la presencia de **4d**, la estereoselectividad de la reacción durante la incorporación del residuo $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}_2$, se confirmó por NMR. Algunas de las señales mejor resultas se encuentra en la zona de los protones anoméricos (δ_{H} 4.4-5.5)^[12]. El experimento HSQC (**Figura 53**) mostró dos densidades de correlación en la zona anomérica, $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ 4.93/97.34 y 4.47/101.20 ppm, las cuales se clasificaron

como $H_1/C_1 \alpha$ -Glc y $H_1/C_1 \beta$ -Glc, respectivamente. La configuración de los dos protones anoméricos, se confirmó con sus valores $^nJ_{H,H}$ ($\alpha \ ^3J_{H-1,H-2} = 3.8 \text{ Hz}$, $\beta \ ^3J_{H-1,H-2} = 8.0 \text{ Hz}$; **Tabla 9**). Ambos protones anoméricos (δ_H ; 4.93 α , 4.47 β) poseen correlaciones NOESY (**Figura 54**), es decir el $H_1 \alpha$ presentó las correlaciones esperadas con $H_2 \alpha$ y con el protón metilénico $H_{1'b} \alpha$ de la aglicona $-O-CH_2-CH=CH_2$. Por otro lado, el $H_1 \beta$ correlacionó con los $CH_{ax} H_3$ (δ_H 3.45) y H_5 (δ_H 3.43-3.39). Esta información confirmó lo observado en los valores de acoplamiento de los $H_1 \alpha$ y $H_1 \beta$.

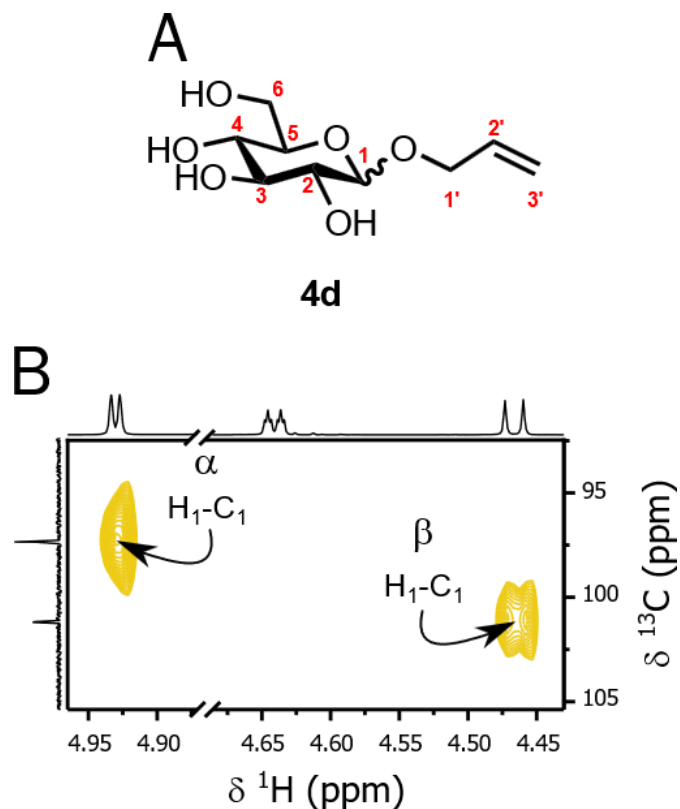


Figura 53 Espectro 1H - ^{13}C HSQC del alil-glucósido **4d** (600 MHz, D_2O , 294.15 K)

A) estructura del alil-glucósido **4d**. B) Correlaciones $^1H/^{13}C$ en HSQC, con flechas se identifican las correlaciones de los protones $H_1 \alpha$ (δ_H 4.93, δ_C 97.34) y $H_1 \beta$ (δ_H 4.47/ δ_C 101.20) con sus correspondientes $C_1 \alpha$ y $C_1 \beta$.

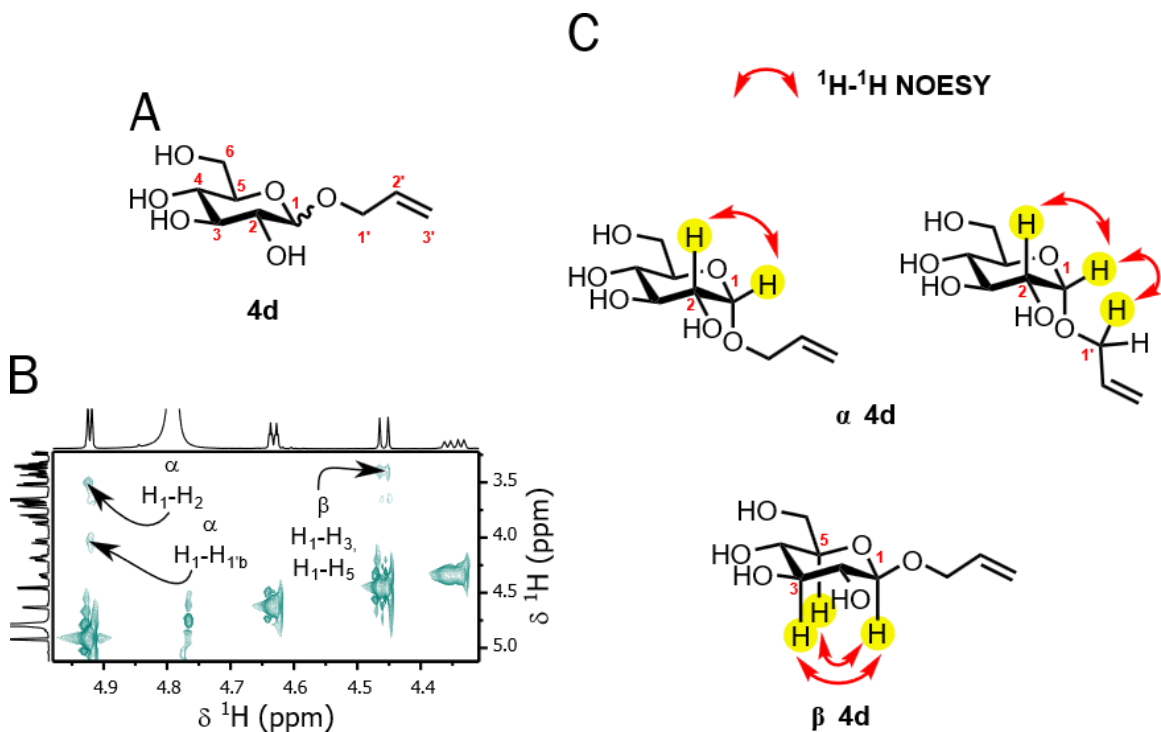


Figura 54 Correlaciones del compuesto **4d** observadas en el espectro ^1H - ^1H NOESY (600 MHz, D_2O , 294.15 K)

A) Estructura del α/β alil-glucósido **4d**. B) Correlaciones ^1H - ^1H NOESY de protones anoméricos. C) Correlaciones de anómeros en flechas rojas con doble punta. Número de carbono (■) y protones implicados en las correlaciones (●)

Las correlaciones en el espectro ^1H - ^1H COSY (**Figura 55**) mostraron que los protones anoméricos correlacionan con sus correspondientes H_2 vecinos. En este sentido, la asignación completa para los CH de los dos sistemas glucopiranosilo se realizó a partir de un análisis de los valores de las constantes de acoplamiento extraídos de cada una de las señales en el espectro ^1H .

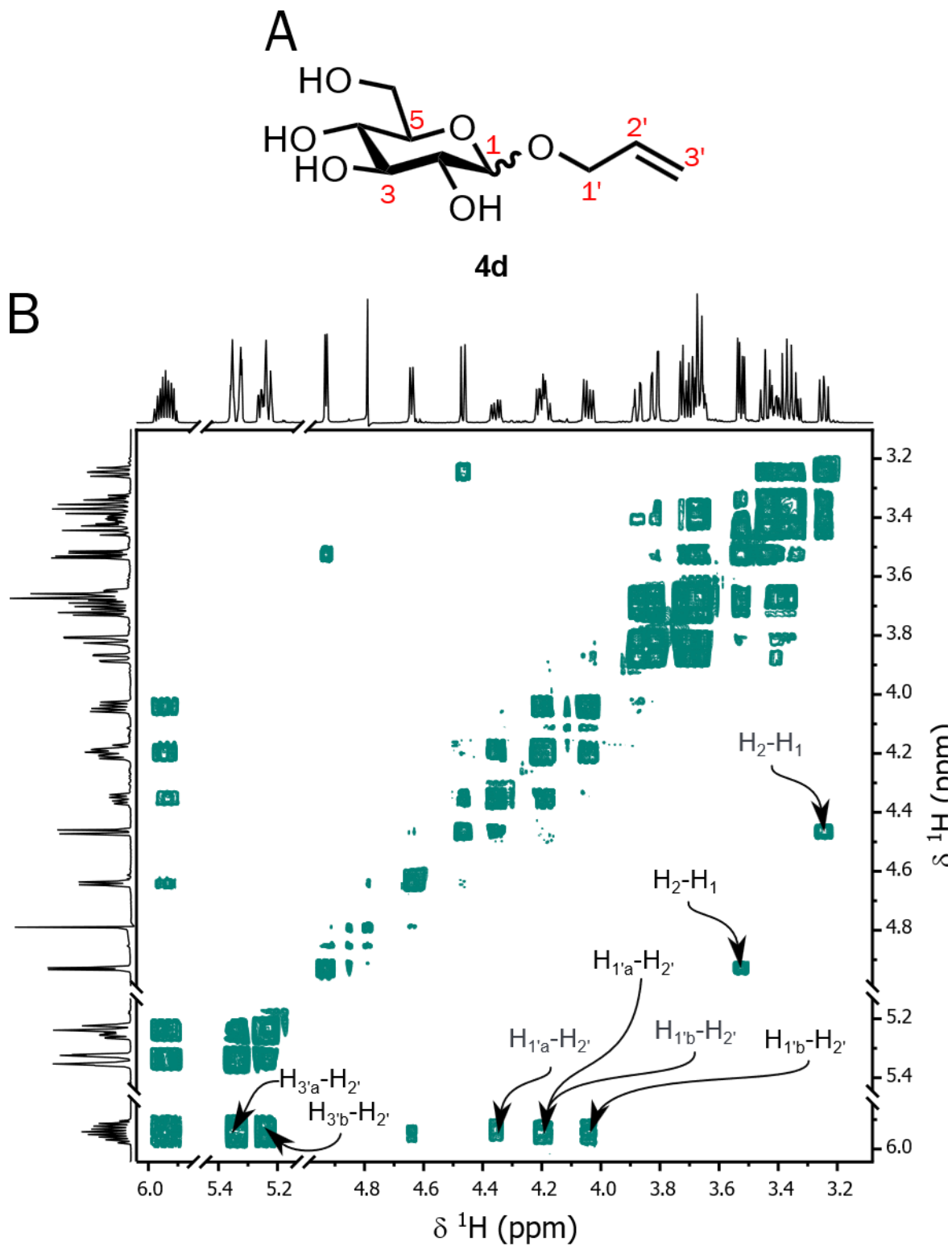


Figura 55 Espectro $^1\text{H}\text{-}^1\text{H}$ COSY (600 MHz, D_2O , 294.15 K) del alil-glucósido **4d**

Las densidades con flechas; en ■ para correlaciones del anomero α y en ■ para el anomero β .

La información anterior se complementó con las correlaciones observadas en el espectro HMBC (Figura 56), donde los acoplamientos del anómero α y β confirmaron la conectividad de la aglicona $-O-CH_2-CH=CH_2$ sobre el carbono C_1 en ambos anómeros. En la Figura 56, se observaron acoplamientos $^1H-^{13}C$ intensos entre los $H_{1'a}$ con los carbonos C_1 y C_3' de ambos anómeros. Así, la información de todos los experimentos de NMR, permitió determinar la estructura de **4d**, y además confirmó la regioselectividad de la reacción durante la formación del enlace glicosídico sobre la posición C_1 anomérico. De modo que, la incorporación del grupo alilo ($-O-CH_2-CH=CH_2$) se realizó sobre el carbono anomérico del azúcar.

En cuanto a la relación de anómeros, dicha proporción se determinó a partir de los valores de la integral de cada núcleo de H_1 en el espectro 1H , la cual tuvo como resultado una relación 2:1 α : β . Los datos espectroscopicos (Tabla 9) obtenidos en este trabajo coinciden con la información de NMR reportada^[154] para la estructura de los anómeros α y β .

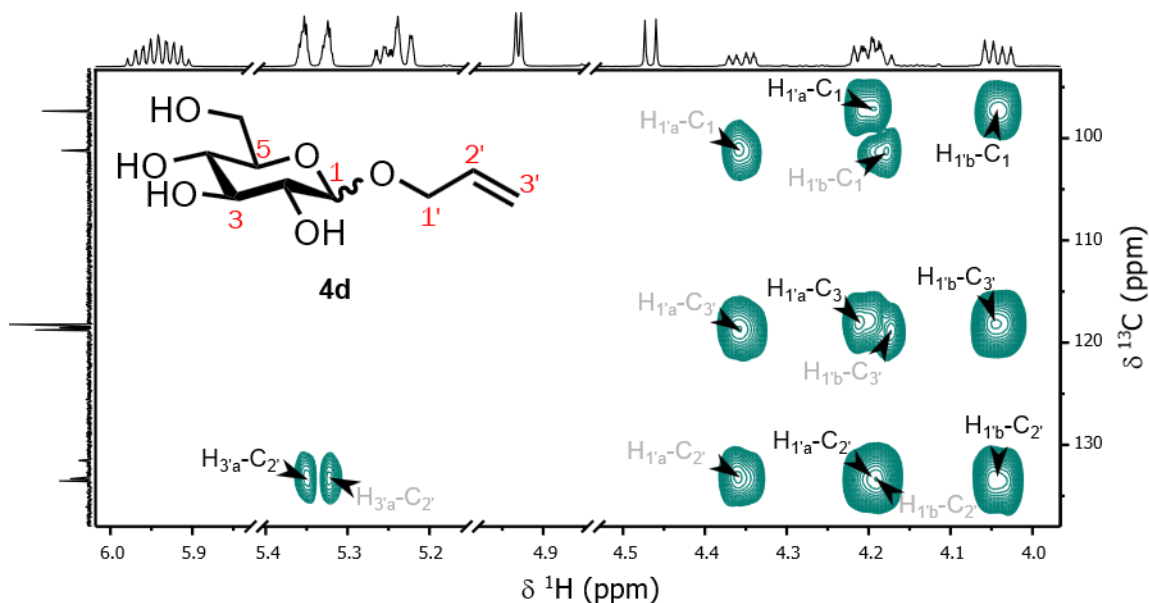


Figura 56 Espectro $^1H-^{13}C$ HMBC (600 MHz, D_2O , 294.15 K) del alil-glucósido **4d**

Densidades (flechas) y en ■ para anómero α y en ■ para anómero β .

Cabe señalar que, gran parte de los métodos actuales para la formación de enlaces glicosídicos involucran el diseño de sustratos, utilizando promotores y activadores adecuados para formar el enlace glicosídico, así como la elección de los correctos grupos protectores que controlen y favorezcan la regioselectividad de la reacción.

En este contexto, la glicosilación de Fischer es una de las reacciones que, hasta los últimos años continúa siendo una de las más utilizadas para sintetizar glicósidos. Este tipo de reacción ^[155] de manera habitual se recurre a carbohidratos no protegidos, se utilizan condiciones de reflujo empleando alcoholes como disolventes y como aceptor del grupo glicosilo, además se recurre a ácidos de Lewis o Brønsted como catalizadores. De modo que, las condiciones de reacción típicas de la glicosilación de Fischer son similares a las desarrolladas en este trabajo durante la síntesis del alil-glucósido **4d**. Debido a esto, nos dimos a la tarea de proponer un mecanismo de reacción asociado a la formación del producto **4d**. Tomando como base las condiciones de reacción típicas en la glicosilación de Fischer^[156], se propuso que el azúcar **1d**, al entrar en el sistema eutéctico ChCl:MA (1:2) (**Figura 57**), sufre una deshidratación por acción del ácido malónico, resultando en la formación de un intermediario glicosil oxocarbenio (**I**, **Figura 57**). Dicho intermediario **I**, subsecuentemente sufre un ataque nucleofílico S_N1 en cualquiera de sus dos caras proquirales por acción del alcohol alílico (**II**, **Figura 57**), lo cual produce los correspondientes anómeros α/β de **4d**. El NADES ChCl:MA (1:2) además de catalizar la reacción, y debido a que posee un número de enlaces de hidrógeno considerable, podría además ejercer fuerzas de atracción que facilitan el acercamiento entre los sustratos para llevar a cabo la reacción.

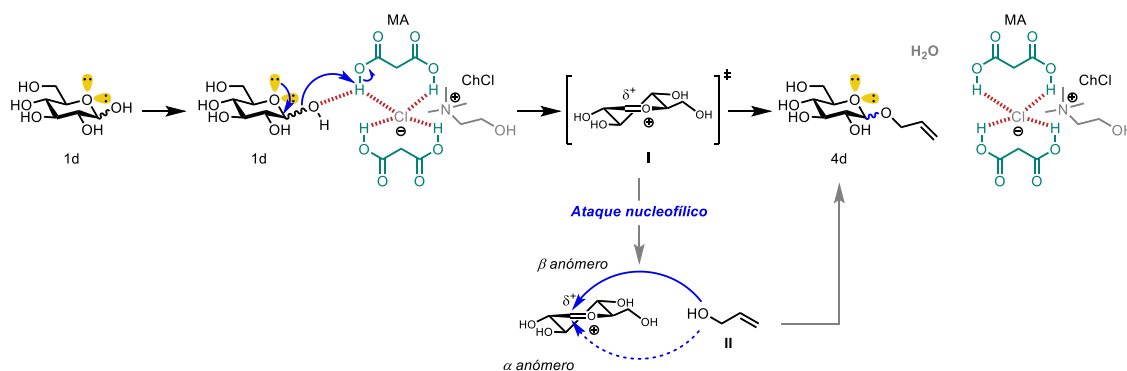


Figura 57 Propuesta de mecanismo de reacción para la síntesis del alil-glucósido **4d**, mediado por un intermediario oxocarbenio

Por lo tanto, con la finalidad de enriquecer y sustentar el mecanismo de reacción previamente propuesto. Se estudiaron las estructuras de los complejos que pudiera formar **1d** con la mezcla eutéctica ChCl:MA (1;2) (nivel de cálculo B3LYP/6-31++G***, **Figura 58**).

En la **Figura 58A** se observó que la α -D-Glcp presentó enlaces de hidrógeno en $C_6-O-H \cdots O=C_{MA}$ con el ácido malónico (MA) y así como en $C_{ChCl}-O-H \cdots O-C_{1\alpha}$ con el cloruro de colina (ChCl). Esta última interacción ($C_{ChCl}-O-H \cdots O-C_{1\alpha}$) sugiere la posibilidad de que el $C_{1\alpha}-OH$ pudiera retirar el protón del hidroximetileno en el ChCl, lo cual provocaría la subsecuente deshidratación en $C_{1\alpha-D-Glcp}$ y posterior formación del intermediario I (**Figura 57**). Si bien es cierto que cuando se lleva a cabo la síntesis de **4d**, solo se adicionó el anómero α -D-Glcp cristalizado (D-(+)-glucosa, contenido aprox. 4% de β -anómero, #G-5000, Lote 75F-0367, Sigma-Aldrich) a la reacción, reportes recientes indican que azúcares como la glucosa, al disolverse en mezclas eutécticas ácidas^[42], experimentan un equilibrio anomérico muy similar al observado en agua^[157, 158]. Particularmente, para D-glucosa se presenta un 43.5% α -piranosa y 56.5% β -piranosa^[159]. Esto quiere decir, que entonces el NADES ChCl:MA (1:2), al ser considerablemente ácido (pH~0.0, **Figura 49, sección 6.1.2.1, Pág. 70**)^[43, 160, 161]. Podría provocar que el azúcar **1d** experimentara un proceso de epimerización sobre el carbono anomérico^[162], y que al alcanzar un equilibrio, estaría presentando de manera mayoritaria la forma β -D-Glcp. En consecuencia, al analizar el complejo optimizado de β -D-Glcp, este presenta un enlace de hidrógeno en $C_{1\beta}-O-H$ (**Figura 58B**), similar al que se observa en el anómero α , lo cual sugiere que el anómero β -D-Glcp, también estaría originando al intermediario oxocarbenio I (**Figura 57**).

Al mismo tiempo, cuando se estudiaron las estructuras de los complejos que contienen también al alcohol alílico (α -**1d**; **Figura 58C**, β -**1d**; **Figura 58D**), se observó que los enlaces de hidrógeno en las estructuras de ambos anómeros (α -**1d** y β -**1d**) con MA y ChCl se conservan. Además, la estructura optimizada del complejo β -**1d**—alcohol alílico—ChCl:MA (1:2) ilustrado en la **Figura 58D**, mostraron un enlace de hidrógeno $C_{AllylOH}-O-H \cdots O-C_{ChCl}$ entre el OH del alcohol alílico y el OH del ChCl. De modo que, muy posiblemente el NADES ChCl:MA (1:2) también estaría participando de manera significativa en una probable desprotonación del alcohol alílico, de este escenario resultaría un aumento en la nucleofilicidad del alcohol alílico. Por lo que dicha especie nucleofílica sería la que ataca al intermediario oxocarbenio I (**Figura 57**).

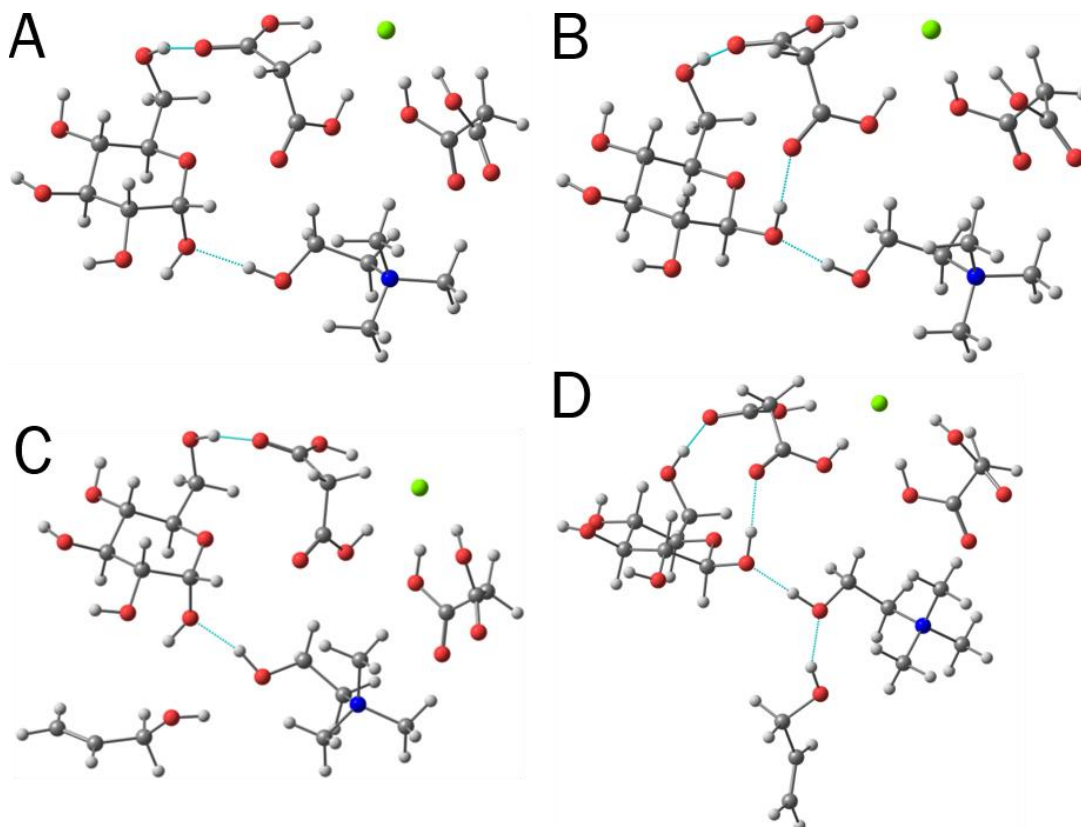


Figura 58 Modelos teóricos, calculados para los complejos Glucosa **1d**—ChCl:MA (1:2) y Glucosa **1d**—alcohol alílico—ChCl:MA (1:2)

Conformaciones optimizadas de cada estructura. A) Complejo α -Glucosa **1d** en el DES ChCl:MA (1:2). B) Complejo β -Glucosa **1d** en el DES ChCl:MA (1:2). C) Complejo α -**1d**—alcohol alílico—ChCl:MA (1:2), D) Complejo β -**1d**—alcohol alílico—ChCl:MA (1:2). ■; carbono, ■; oxígeno, ■; nitrógeno, □; hidrógeno, ■; cloro, - -; enlace de hidrógeno, — ; enlace sencillo y/o doble.

En virtud de la información anterior, se reformuló un mecanismo de reacción descrito con mayor detalle, el cual se ilustra en la **Figura 59**. En primer lugar, apoyados en las interacciones de enlaces de hidrógeno que pueden establecerse entre los componentes de la reacción: α/β -**1d**—alcohol alílico—ChCl:MA (1:2) (**Figura 58C**, **Figura 58D**). Por un lado, se llevaría a cabo el aumento de la nucleofilicidad del alcohol alílico (alcóxido **IIA**, **Figura 59**), y por otro lado la formación del intermediario oxocarbenio **I** (**Figura 59**) vía deshidratación de **1d** sobre **C₁**. Ya que ambos eventos se ven íntimamente influenciados por la mezcla eutéctica ChCl:MA (1:2), se podría sugerir que dicho NADES juega un papel primordial como catalizador y como matriz de reacción para la adecuada solvatación del azúcar y del alcohol.

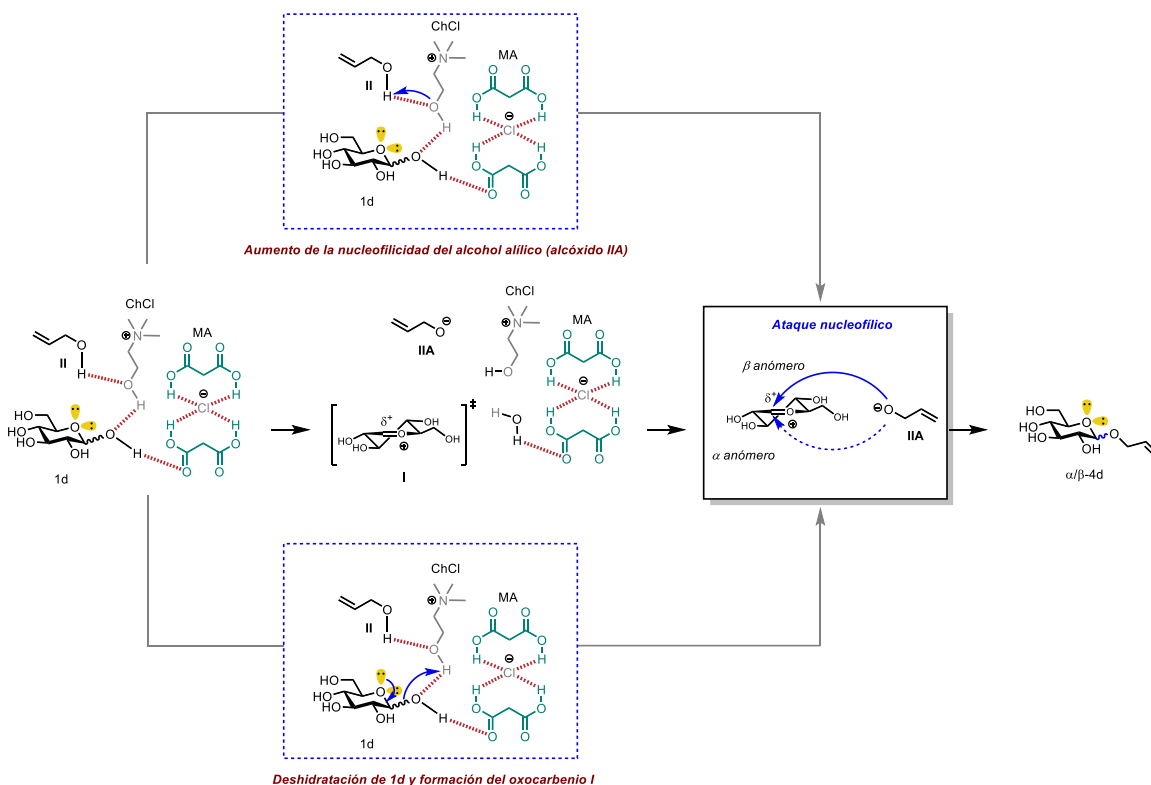


Figura 59 Mecanismo de reacción plausible para la síntesis de 4d en el DES ChCl:MA (1:2)

Recapitulando, lo descrito anteriormente sugiere que los sustratos probados en este trabajo, sufren una alquilación selectiva del grupo alilo sobre el carbono anomérico del azúcar. Los resultados y cálculos computacionales, sugieren que esta reacción podría compartir un mecanismo similar al que se presenta en la reacción de glicosilación de Fischer, con la particularidad de que este trabajo las condiciones de reacción y los materiales utilizados son más suaves y amigables con el medio ambiente.

De manera paralela, para probar la capacidad catalítica del NADES ChCl:MA (1:2), y para extender la diversidad de los monómeros que podrían obtenerse bajo esta metodología desarrollada. Los sustratos **1c-g** se enfrentaron ahora con alcohol propargílico (**Figura 60A**). Después del análisis de estas reacciones por LC-MS se observaron como señales más intensas los aductos de sodio y amonio (**Figura 60B**). De modo que se reafirmó la capacidad del NADES ChCl:MA (1:2) para actuar como un catalizador y medio de reacción en la glicosilación de diferentes azúcares, de manera selectiva sobre el carbono anomérico del azúcar, utilizando dos alcoholes diferentes: alcohol alílico y propargílico, y en condiciones suaves de reacción.

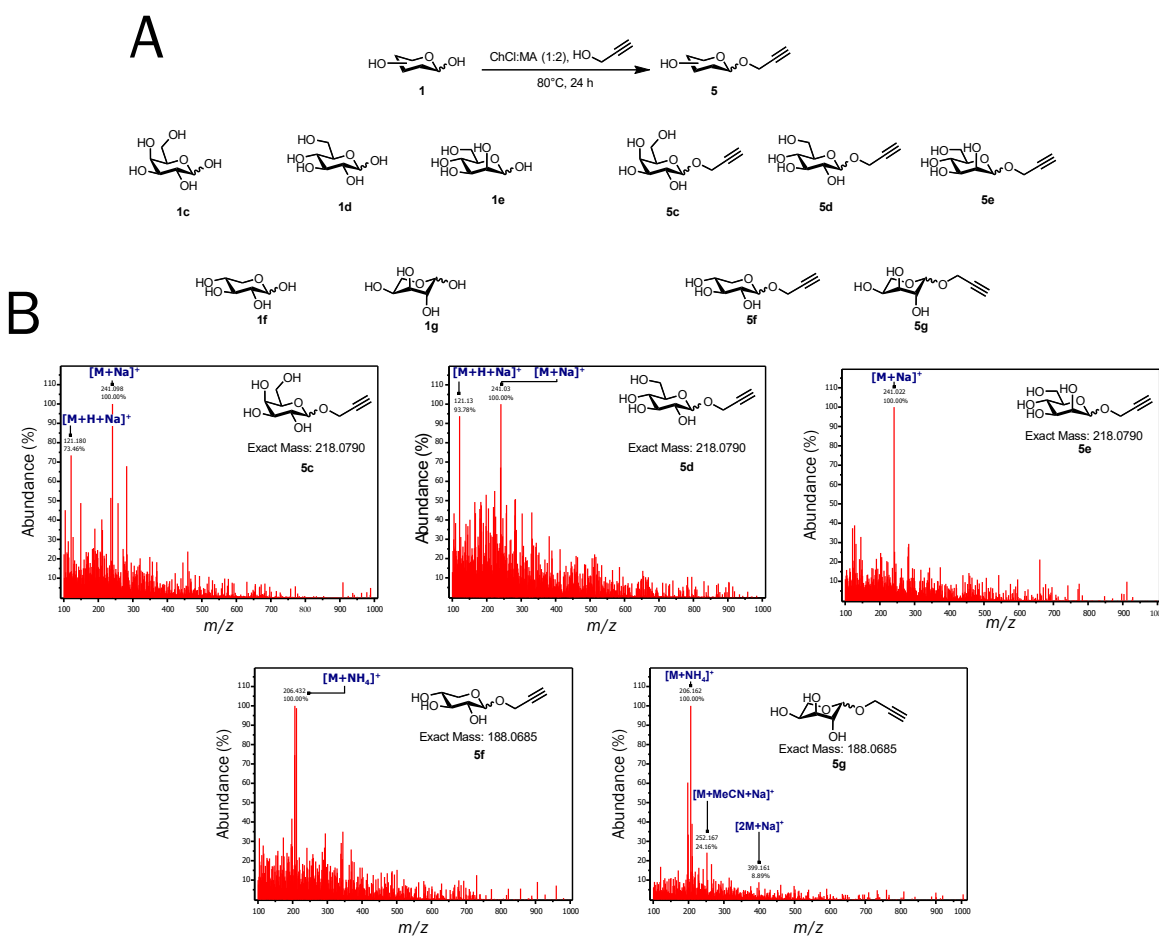


Figura 60 Síntesis de propargil-glicósidos y su detección por LC-MS

A) Síntesis de los propargil-glicósidos **5c-g**. B) Espectros de masas de los productos obtenidos.

Es importante mencionar que si bien se conoce que la glicosilación de Fischer es una de las metodologías más sencillas y utilizadas hasta hoy en día para formar enlaces glicosídicos^[156, 163–166], ya que únicamente implica disolver al azúcar en un alcohol en presencia de un ácido fuerte. La búsqueda para optimizar las condiciones adecuadas se basa principalmente en aumentar la selectividad de la reacción y así como el rendimiento. A causa de ello, la mayoría^[156] de los reportes continúan desarrollando métodos más ecológicos, que limiten el uso de reactivos tóxicos y/o peligrosos, y que además disminuyan el número de subproductos y pasos de síntesis.

En este sentido, se ha buscado utilizar diferentes catalizadores y aditivos para la glicosilación de Fischer. Roy *et al* (2007)^[164] utilizaron ácido sulfúrico inmovilizado en sílica gel (H₂SO₄-sílica) como catalizador para disminuir el tiempo de reacción así como

los equivalentes de alcohol requeridos para sintetizar alquil- y aril-glicósidos a partir de azúcares libres. No obstante, la preparación del catalizador^[167] implica el manejo de reactivos tóxicos, sumamente inestables y corrosivos, los cuales reaccionan de manera peligrosa y violenta en presencia de humedad (ácido clorosulfónico, HCl_g)^[168], mientras que la presente metodología desarrollada en este trabajo de tesis (ChCl:MA, allí/propargil alcohol, azúcar, 80 °C, 24 h) no requiere utilizar prácticamente ningún reactivo tóxico y/o que represente un peligro potencial^[30], a excepción del alcohol con el grupo alquilo^[169, 170] (propargilo, alilo) que se desea incorporar.

De esta manera, en términos de la selectividad de la reacción de glicosilación de Fischer, Rauter *et al.* (2007)^[171] aumentaron la selectividad de la glicosilación de Fischer para las formas furanosa/piranosa, así como la regioselectividad sobre el carbono anomérico utilizando zeolitas ácidas. Sin embargo, la activación del catalizador diseñado por estos autores, requiere altas temperaturas (500 °C). Además la selectividad de la reacción (relación furanosa:piranosa 2:1) es dependiente de un tamaño de poro específico. En cambio, la síntesis del catalizador ChCl:MA (1;2) no requiere más que incorporar al donador (MA) y aceptor de enlaces de hidrógeno (ChCl) en las relaciones molares adecuadas, y aplicar la mínima energía (70-80 °C, **sección 34**) para formar la mezcla eutéctica. Adicionalmente, los resultados de NMR (**sección 6.1.2.2.1, Figura 52-Figura 54**) muestran que se obtiene de manera selectiva la mezcla de anómeros en su forma piranosa.

Si bien gran parte de los métodos reportados, utilizan solo al alcohol como aglicona y al azúcar no derivatizado, estos emplean triflatos de metales^[172], sales de bismuto^[173] y disolventes orgánicos tóxicos^[174] para catalizar sus reacciones. Entonces para prescindir de disolventes y reactivos poco amigables con el ambiente, autores como Jacques & Sizun (2009)^[172] sintetizaron varios O-glicósidos mediante azúcares libres sin grupos protectores, explorando como disolvente alternativo al líquido iónico (LI) trifluorometanolsulfonato de 1-butil-3-metilimidazolio. A pesar de la capacidad del LI para ser reutilizado sin perder actividad^[172], los NADES son muy superiores en materia del impacto ambiental^[39]. No solo por la biocompatibilidad que estas mezclas eutécticas profundas naturales poseen^[49] (intrínseco de sus componentes^[30]), sino también por el número considerable de combinaciones que pueden realizarse al sintetizar mezclas eutécticas^[175]. Este carácter modulable que distingue a los NADES como disolventes de

diseño^[44], así como a la vasta cantidad de aplicaciones que poseen actualmente^[34, 40, 176], son aspectos que pueden aprovecharse para diseñar medios y catalizadores a la medida de las necesidades. Por otro lado, se ha reportado que utilizar ácidos moderadamente fuertes ($pK_a=1.0$), baratos, no corrosivo y que posean una nula volatilidad como el ácido sulfámico (H_3NSO_3), permite catalizar la síntesis de alquilglicósidos ^[177]. El H_3NSO_3 no se compara con la amplia variedad de NADES^[37, 178], con diferente pH que pueden fabricarse (**Figura 49**).

En otras palabras, es posible construir medios de reacción suficientemente ácidos para catalizar la síntesis de glicósidos y azúcares, sin comprometer la integridad del producto de reacción. Además, es bien sabido que la solubilidad de moléculas tan polares como los azúcares^[179], es uno de los problemas más grandes a los que se enfrentan la síntesis química de glicósidos y azúcares. En este sentido, el disolvente juega un papel fundamental en la selectividad de la reacción^[180, 181]. En consecuencia, algunos autores han diseñado sistemas de reacción bifásicos; aprovechando la formación de micromulsiones para enfrentar la pobre solubilidad de los azúcares en disolventes orgánicos^[182]. Por el contrario el problema de la solubilidad no se presenta al utilizar NADES como medio reacción ya que poseen una prominente capacidad para disolver un extraordinario número de moléculas orgánicas^[183]. Dado que el NADES ChCl:MA (1:2) posee una polaridad muy similar al agua^[184] ($E_T(30)=62.38 \pm 0.10$, **sección 5.7**) y es capaz de disolver y catalizar la síntesis de diversos monosacáridos, la metodología desarrollada en este trabajo representa una manera versátil, sencilla y metodológicamente compatible con los principios de la química verde^[45, 137, 138, 185].

6.1.2.2.2 Síntesis de O-glicósidos a partir de maltooligosacáridos en NADES ChCl:MA (1:2)

Contar con un método rápido para sintetizar alquil-maltooligosacáridos (alquil-MOS) es extremadamente valioso. Estas moléculas, poseen importantes actividades como surfactantes no iónicos ^[186] sobre todo cuando se emplean alcoholes de cadena larga.

Como se discutió anteriormente, la síntesis de alquil-glicósidos se realiza tradicionalmente bajo las condiciones de catálisis ácida de Fischer^[155]. Sin embargo, estas moléculas pueden obtenerse por síntesis enzimática, un método sustentable y con una alta especificidad en la formación de enlaces glicosídicos^[137]. Sin embargo, la síntesis de alquil-glicósidos usando CAZymes^[187-190] como biocatalizadores, se ve restringida debido a las reacciones de hidrólisis y desproporción que algunas de estas enzimas poseen^[191, 192]. De este modo, se limita la obtención de alquil-glicósidos con diversas unidades de azúcar (alquil-oligosacáridos) en su estructura.

Por consiguiente, con la finalidad de poder utilizar secuencias glicosídicas naturales para construir glicomonómeros o para obtener moléculas funcionales como los alquil-oligosacáridos, se utilizó como modelo de estudio, maltooligosacáridos (MOS); oligómeros de glucosa unidos por enlaces α -(1→4). De modo que los MOS fueron la materia prima para sintetizar alil-maltooligosacáridos (alil-MOS, **Figura 61A**) en el sistema eutéctico ChCl:MA (1:2), en presencia de alcohol alílico. Después de analizar una muestra a las 72 h de reacción, la placa de TLC (**Figura 61B**) reveló la presencia de diversos productos de reacción, entre ellos el producto **4d**, así como una serie de alil-MOS. El perfil completo de productos observado sugiere que se favorece de manera significativa la formación de **4d**, puesto que las condiciones del medio ChCl:MA (1:2) son considerablemente ácidas ($\text{pH}_{\text{aparente}}=0.0^1$), muy probablemente se presenta la hidrólisis de los alil-MOS formados y como consecuencia dicha hidrólisis sería la causa de la síntesis del producto **4d**.

¹ Valor de pH que se obtuvo al utilizar tiras indicadoras con color Fermont #92110 pH-Fix 0-14

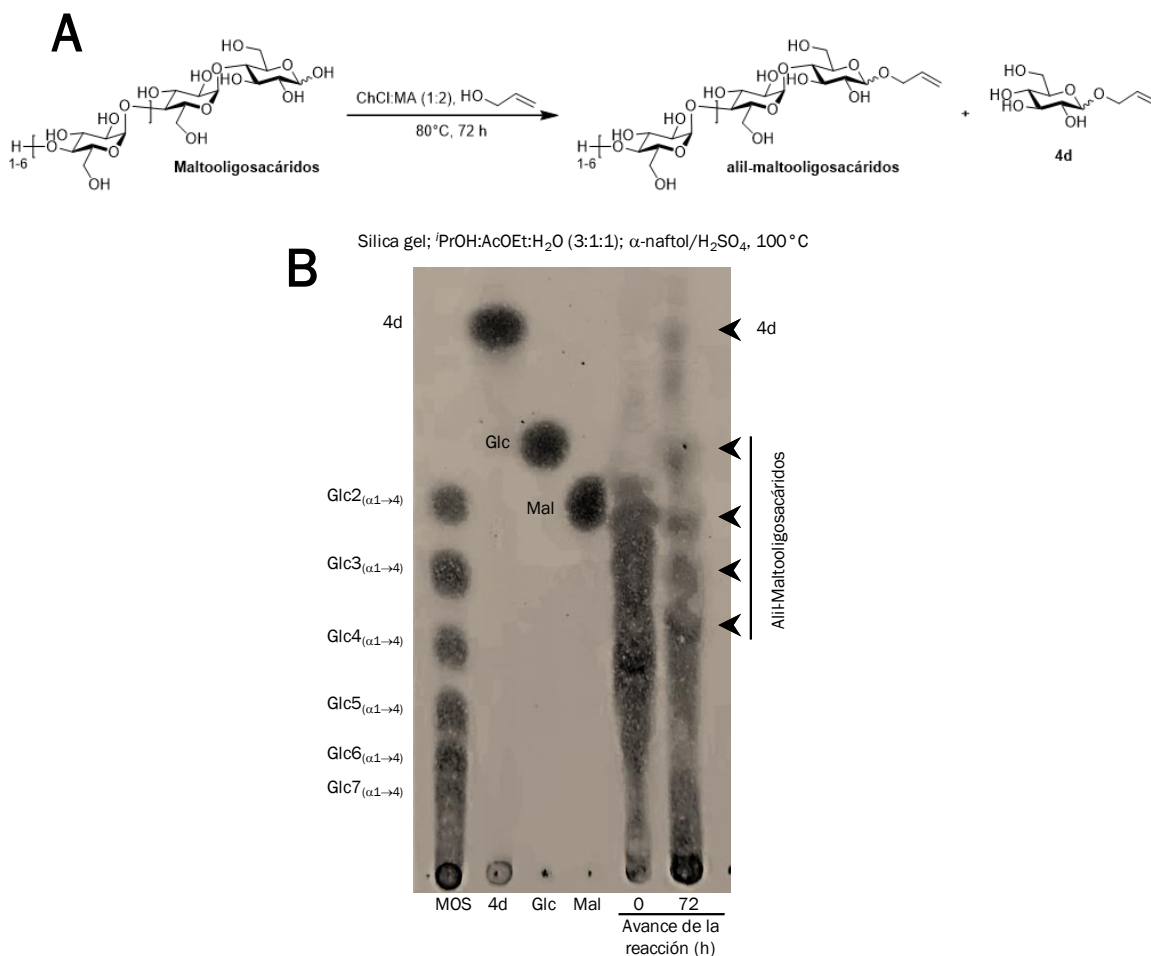


Figura 61 Síntesis de alil-maltooligosacáridos y su detección por TLC

A) Esquema general de reacción. B) Cromatografía en capa fina (TLC). Glc₂($\alpha_1 \rightarrow 4$): Maltosa, Glc₃($\alpha_1 \rightarrow 4$): Maltotriosa, Glc₄($\alpha_1 \rightarrow 4$): Maltotetraosa, Glc₅($\alpha_1 \rightarrow 4$): Maltopentaosa, Glc₆($\alpha_1 \rightarrow 4$): Maltohexaosa, Glc₇($\alpha_1 \rightarrow 4$): Maltoheptaosa, Glc₈($\alpha_1 \rightarrow 4$): Maltooctaosa), Maltosa, **4d** (alil-glucopiranosido). Tiempo inicial (o h) y final (72 h). Revelador α -naftol/ H_2SO_4 , 100°C.

En este sentido, una manera rápida para acceder a secuencias glicosídicas como los MOS es utilizando métodos de hidrólisis enzimática. Para demostrar lo anterior se incubaron (70°C, PBS 50 mM pH 6.0) con CGTasa, esta enzima cuenta con la capacidad de reconocer e hidrolizar ciclodextrinas y almidón [193, 194] (

Figura 62). Esta reacción permitió obtener una serie de MOS a las 48 h de reacción, hidrolizando vía enzimática materia prima renovable y accesible como lo es el almidón y la β -CD. De modo que los MOS obtenidos pueden ser potenciales sustratos para obtener alil-MOS.

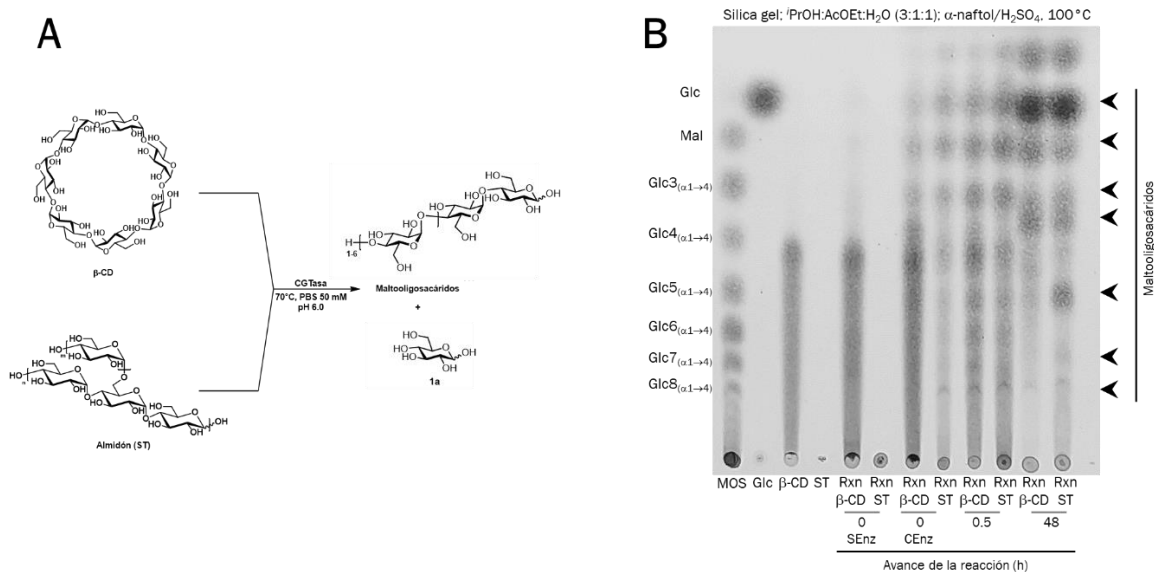


Figura 62 Síntesis maltooligosacáridos y su detección por TLC

A) Esquema general de reacción. B) Cromatografía en capa fina (TLC). Glc₂(α 1 \rightarrow 4): Maltosa, Glc₃(α 1 \rightarrow 4): Maltotriosa, Glc₄(α 1 \rightarrow 4): Maltotetraosa, Glc₅(α 1 \rightarrow 4): Maltopentaosa, Glc₆(α 1 \rightarrow 4): Maltohexaosa, Glc₇(α 1 \rightarrow 4): Maltoheptaosa, Glc₈(α 1 \rightarrow 4): Maltooctaosa), Glc, β -CD, Maltosa, **4d** (alil-glucopiranosido). Tiempo inicial (0 h, sin enzima; SEnz, con enzima; CEnz) y final de reacción (48 h). Revelador α -naftol/H₂SO₄, 100 °C.

6.2 Glicosilación enzimática para la construcción dirigida de glicomonómeros

6.2.1 Capacidad de los glicomonómeros para actuar como aceptores de CAZymes

Contar con un método que permita sintetizar numerosos glicomonómeros y que también sea lo suficientemente versátil para aumentar la diversidad estructural de los glicomonómeros obtenidos, fue uno de los objetivos planteados al inicio del trabajo de tesis. Para estudiar la posibilidad de construir secuencias glicosídicas más complejas, empleando glicomonómeros como plantillas, se continuó utilizando al glicomonómero alil-glucósido **4d** como modelo, empleándolo como aceptor glicosilo y enfrentándolo a diferentes CAZyme.

6.2.1.1 α -Glucosilación del alil-glucósido con CGTasa de *Thermoanaerobacter* sp.

La reacción de glicosilación del aceptor **4d** se realizó con el donador β -CD y el extracto enzimático comercial Toruzyme® 3.0 L CGTasa de *Thermoanaerobacter* sp. como catalizador. En la **Figura 63** se observa la presencia de un producto de reacción a las 0.5 h y después de 24 h de reacción, se observó una mayor concentración de este en el medio. De modo que si se considera la especificidad que tiene la CGTasa para transferir selectivamente residuos α -Glc_p hacia aceptores adecuados^[188, 195, 196], el glicomonómero **4d** posee cuatro sitios probables de glicosilación, sin embargo, se ha reportado que la CGTasa de *Thermoanaerobacter* sp. posee una preferencia sobre los OH-4 de la glucosa^[84]. En consecuencia, el producto observado sería el resultado de la formación de un enlace glicosídico $\alpha 1 \rightarrow 4$ en el OH-4 del aceptor **4d**.

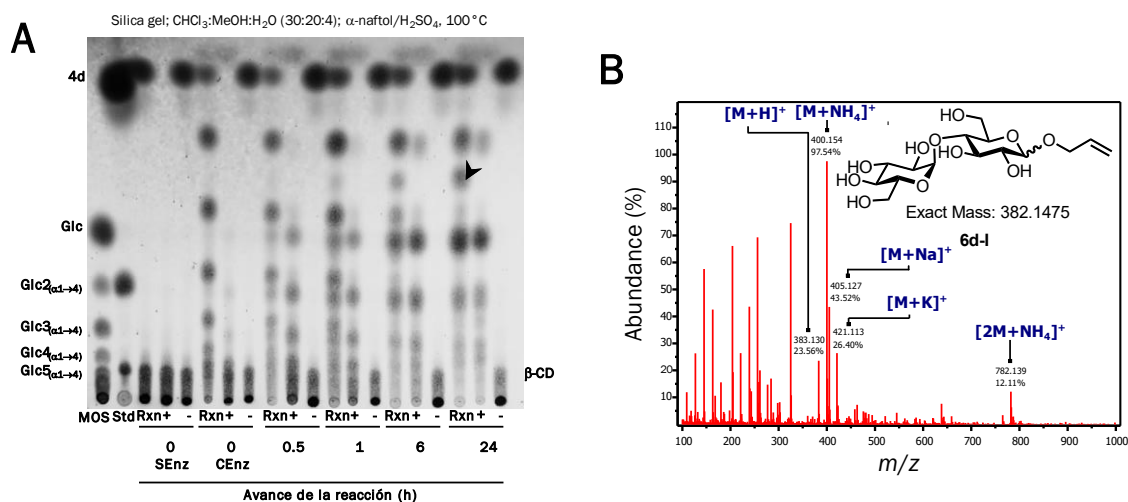


Figura 63 Análisis por TLC de la glicosilación enzimática del glicomonómero **4d** y detección del producto glicosilado **6d-I** por LC-MS

A) Cromatografía en capa fina (TLC). Glc₂($\alpha 1 \rightarrow 4$): Maltosa, Glc₃($\alpha 1 \rightarrow 4$): Maltotriosa, Glc₄($\alpha 1 \rightarrow 4$): Maltotetraosa, Glc₅($\alpha 1 \rightarrow 4$): Maltopentaosa, Glc, β -CD, Maltosa, **4d** (alil-glucopiranosido). Avance de la reacción (h), desde el tiempo inicial (0 h, sin enzima; SEnz, con enzima; CEnz) hasta las 4 h de reacción. Revelado α -naftol/ H_2SO_4 , 100 °C. Control positivo (+) [donador (β -CD) y CGTas]. Control negativo (-) [aceptor (**4d**) y donador sin CGTasa]. B) Aductos representativos.

Es importante mencionar que la CGTasa realizar diferentes reacciones^[197], en consecuencia podría estar también transfiriendo cadenas de oligosacáridos a **4d**, mediante la reacción de desproporción^[198], con lo cual es muy posible que estén presentes en la mezcla de reacción los alil-MOS **6d-II** (**Figura 64**) correspondientes.

Entre los innumerables métodos de síntesis de glicomonómeros que existen^[199], ya se han utilizado CAZymes para obtener glicomonómeros de acrilato^[200]. Sin embargo, este método implica tiempos de incubación largos (55 °C, 4 días) para obtener el disacárido con el grupo polimerizable. Además, estas estrategias parten de un alcohol como aceptor glicosilo. No obstante, se ven limitadas en el aumento de la concentración de aceptor (2-hidroxietil-acrilato, >40%) en el medio para un mayor el rendimiento, ya que esto provoca la pérdida de actividad enzimática. ya que se sabe que las amilasas son menos activas cuando se utilizan aceptores más hidrofóbicos como el 2-hidroxietil-acrilato^[201]. Por esta razón, el aceptor **4d** es un potencial y adecuado glicomonómero que permite construir secuencias de dos azúcares (disacáridos), como lo es la maltosa.

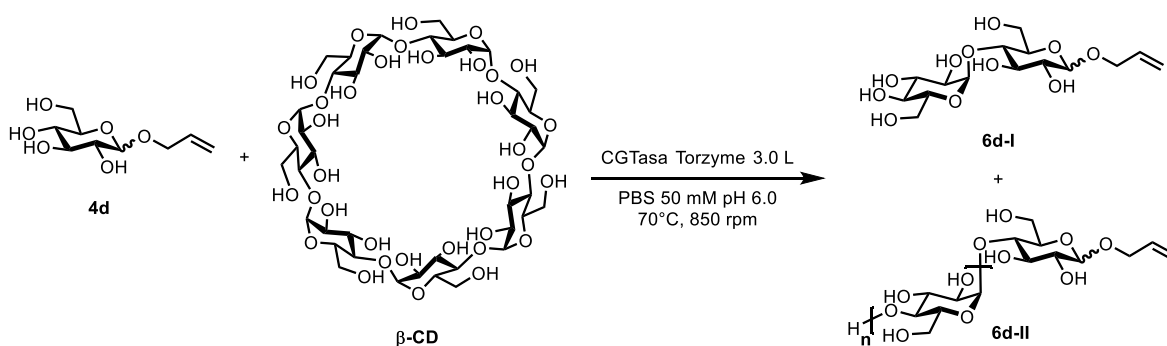


Figura 64 Esquema general de glicosilación enzimática del aceptor alil-glucósido **4d** catalizada por la CGTasa de *Thermoanaerobacter* sp.

6.2.1.2 β -Glucosilación del alil-glucósido utilizando una β -glucosidasa de almendras

Basados en los reportes que existen en la literatura^[97, 202-204], se exploró la β -glucosilación del alil-glucósido **4d**. Dependiendo de las condiciones de reacción, las glucosidasas, tales como la β -glucosidasa de almendras, pueden formar enlaces glicosídicos, ya sea mediante un control cinético de transglicosilación o a través de hidrólisis inversa, gobernada por un control termodinámico. De modo que se exploraron ambas estrategias (**Figura 65**).

Para empezar, se utilizó D-celobiosa (D-Cel, Glc- β -1 \rightarrow 4-Glc) como donador glicosilo y como aceptor a **4d**. La mezcla de reacción se analizó por TLC a las 0.5 h, 1 h, 6 h y 24 h para conocer el progreso de la reacción. Al realizar una TLC de la reacción y su control (donador y enzima), no se observó la aparición del alil-celobiosido **7d-I**. De esta manera se exploraron las condiciones de reacción bajo un control termodinámico (**Figura 65B**), en donde se utilizó Glc como sustrato donador y **4d** como aceptor del grupo β -glucopiranosilo. Después de analizar por TLC y LC-MS los tiempos finales de la reacción (24 h). En el espectro de masas de la **Figura 66** se observó la presencia de señales que corresponden a los aductos provenientes de la ionización del alil-celobiosido **7d-II**.

Ciertamente, la β -glucosilación de **4d** se realizó exitosamente empleando un control termodinámico en la reacción catalizada por la β -glucosidasa de almendras. Ciertamente en trabajos previos, ya se reportó que la hidrólisis inversa es más efectiva para sintetizar β -glucosidos^[203, 204]. Está claro que una ventaja considerable que tiene esta estrategia es que además de realizarse en medio acuoso, se emplearon sustratos baratos como la glucosa. Ahora bien, el control termodinámico requiere de tiempos largo de reacción para lograr la acumulación de producto glucosilado^[205].

Sin embargo, mientras que el control cinético precisa de una optimización en el tiempo de reacción, en tiempos cortos de reacción se produce una baja conversión del aceptor^[97]. No obstante, se conoce que utilizando un control cinético es posible utilizar diversos oligo y polisacáridos como donadores^[97, 99].

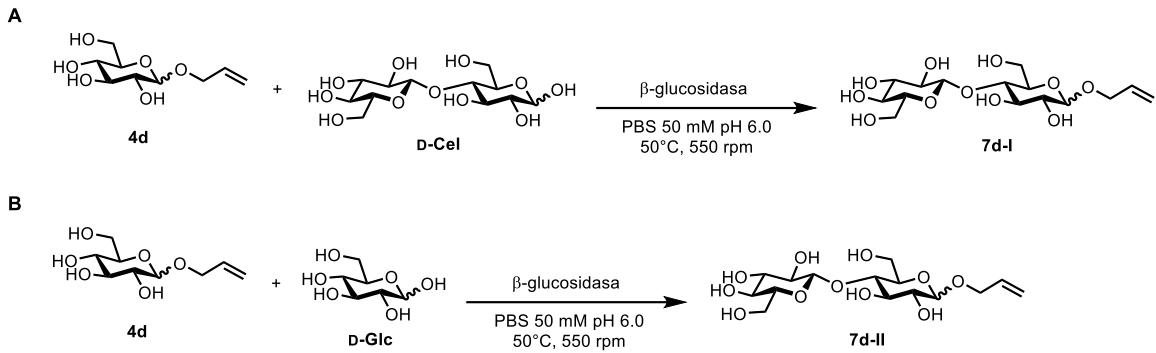


Figura 65 Reacción de β -glucosidación del aceptor alil-glucósido **4d** catalizada por una β -glucosidasa de almendras

A) Control cinético de reacción. B) Reacción de hidrólisis inversa (control termodinámico). Las reacciones se realizaron por 24 h.

Algunos autores han empleado azúcares activados como sustratos de estas enzimas hidrolíticas para construir glicomonómeros^[98, 206], mediante grupos activadores tales como 4,6-dimetoxi-1,3,5-triazin-2-il (DMT)^[139, 206]. No obstante, el uso de estos grupos activantes, es un tanto cuestionable, ya que en dichos reportes no se menciona si se realizó una reacción control (sin biocatalizador). Esto es de relevancia ya que la reactividad intrínseca del DMT^[207] pudiera ser lo suficiente para catalizar la reacción y no requerir un enzima que en la síntesis del glicomonómero.

Por otra parte, la alta selectividad de las enzimas para reconocer a sus sustratos es un aspecto que puede aprovecharse en favor de la metodología desarrollada en el presente trabajo. De esta manera, si consideramos que el aceptor **4d** es una mezcla α : β 1:3. La eventual hidrólisis de **4d** que puede presentarse por parte de este tipo de hidrolasas, se realiza únicamente sobre el anómero β y no en α -**4d**. De hecho, se podría aprovechar esta coyuntura como un método de purificación para la mezcla de α / β -**4d**. Con seguridad, si se utiliza una α o β -glucosidasa se obtendrían los anómeros correspondientes en su forma pura.

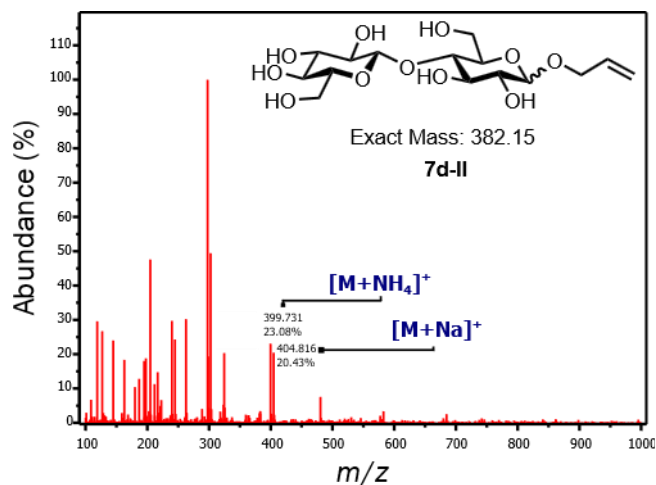


Figura 66 Aductos representativos, observados en el espectro de masas

Los picos se identificaron en función de la masa exacta del alil-celobiosido **7d-II**.

6.2.1.3 β -Galactosidación del alil-glucósido utilizando una β -galactosidasa de *Kluyveromyces lactis*

La síntesis del glicomonómero funcionalizado (**8d-I**, **Figura 67**) se catalizó empleando una β -galactosidasa de *Kluyveromyces lactis* (KI- β -gal) y alil-glucósido **4d**, previamente sintetizado en el NADES ChCl:MA (1:2) (**sección 5.10.2**). Se empleó como sustrato donador a la D-lactosa (D-Lac). La reacción (**Figura 67**) se realizó con 227.04 μ mol de **4d** y 0.75 equiv (170.280 μ mol) de D-Lac en buffer de fosfatos salino (PBS) 50 mM (pH 6.0) a 35 °C por h (**sección 5.11.3**). La reacción inició al adicionar 0.2 U (50 μ L) de KI- β -gal.

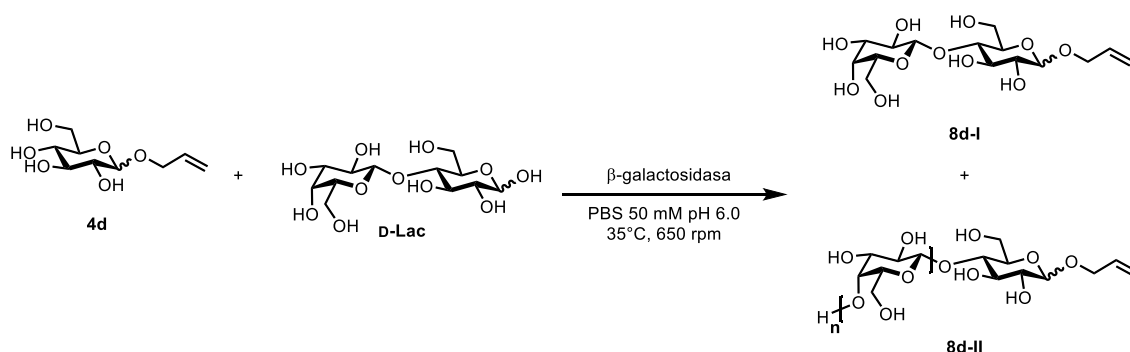


Figura 67 Reacción de β -galactosidación del aceptor alil-glucósido **4d** catalizada por una β -galactosidasa de *Kluyveromyces lactis*

De acuerdo con el monitoreo por TLC (**Figura 68A**) del avance de la reacción, después de agregar la KI- β -gal, se observó un consumo de D-Lac, el cual es originado por una parte, por la liberación de D-Glc y D-Gal en la reacción de hidrólisis^[208], y por otra, debido

a la síntesis de oligosacáridos (reacción de transferencia). En efecto, se observó la formación de oligosacáridos de galactosa desde tiempos iniciales (0 h), y estos inician a ser hidrolizados después de 1 h de reacción. Después del análisis por TLC, no se observó una diferencia considerable entre el perfil de productos entre la reacción y el control (**Figura 68A**). Se decidió realizar un análisis por LC-MS de una muestra a las 24 h, el espectro de masas (**Figura 68B**) mostró algunas señales que se identificaron como aductos de sodio $[M+Na]^+=404.765\ m/z$, amonio $[M+NH_4]^+=399.740\ m/z$ y una señal que corresponde al aducto deshidratado y con pérdida de la aglicona $[M-C_3H_5O-H_2O]^+=144.887\ m/z$. De ello resulta que, bajo las condiciones de reacción anteriores (**Figura 67**), a las 24 h se obtiene el correspondiente producto β -galactosilado **8d-I**. No obstante, el producto observado en LC-MS podría ser un alil-allolactosido^[209] (Gal- $\beta 1\rightarrow 6$ -Glc), un producto de la formación de un enlace glicosídico $\beta 1\rightarrow 6$ en C₆-OH del alil-glucósido **4d**. De la misma forma; aunque no se detectó señal de productos poligalactosilados, muy probablemente por la naturaleza catalítica de la KI- β -gal^[210-212], pudieran haberse sintetizado los productos **8d-II**.

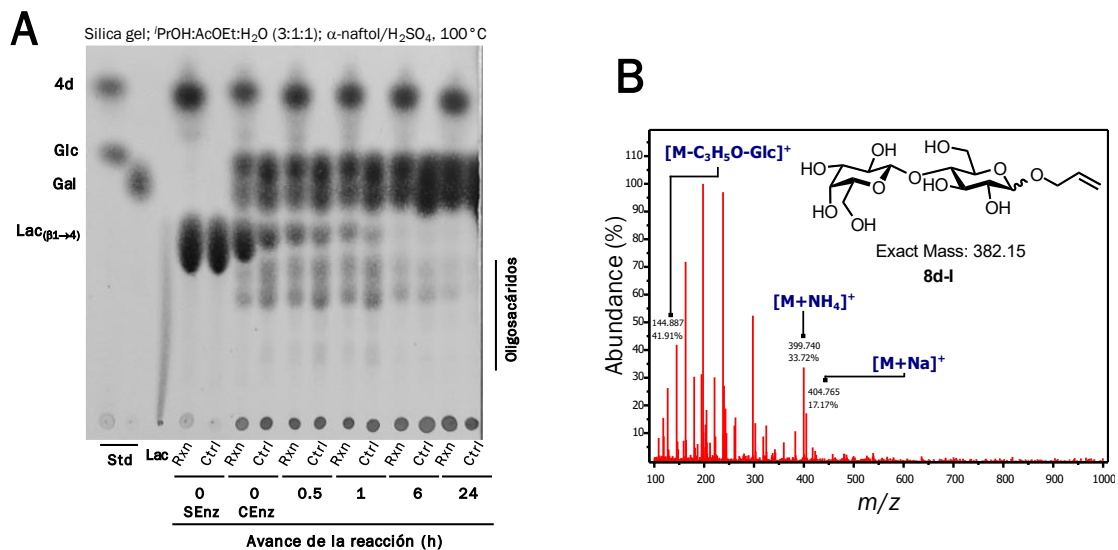


Figura 68 Análisis por TLC de la glicosilación enzimática del glicomonómero (alil-glucósido **4d**) y detección del producto glicosilado **8d-I** por LC-MS.

A) cromatografía en capa fina (TLC). Glucosa (Glc), galactosa (Gal) y lactosa (Lac $\beta 1\rightarrow 4$). Avance de la reacción (h), desde el tiempo inicial (0 h, sin enzima; SEnz, con enzima; CEnz) hasta las 24 h de reacción. Revelador α -naftol/ H_2SO_4 , $100^\circ C$). Control [KI- β -gal y Lac. B]. B) Muestra de 24 h de reacción. Aductos representativos (■).

6.2.1.4 β -Fructofuranosilación de alil-glucósido utilizando una levansacarasa de *Bacillus subtilis*

La levansacarasa de *Bacillus subtilis* (LevSacB) posee una capacidad para sintetizar análogos de sacarosa (D-Suc) y derivados β -D-fructosilados [213-215]. Por consiguiente, se utilizó LevSacB (1 U mL^{-1}) para transferir residuos β -D-fructosilo de la D-Suc (600 mM , $439.56 \mu\text{mol}$) hacia el aceptor no convencional alil-glucósido **4d** (800 mM , $329.67 \mu\text{mol}$). Las condiciones de reacción anteriores (**Figura 69**) se eligieron en función de lo descrito previamente en la literatura [87].

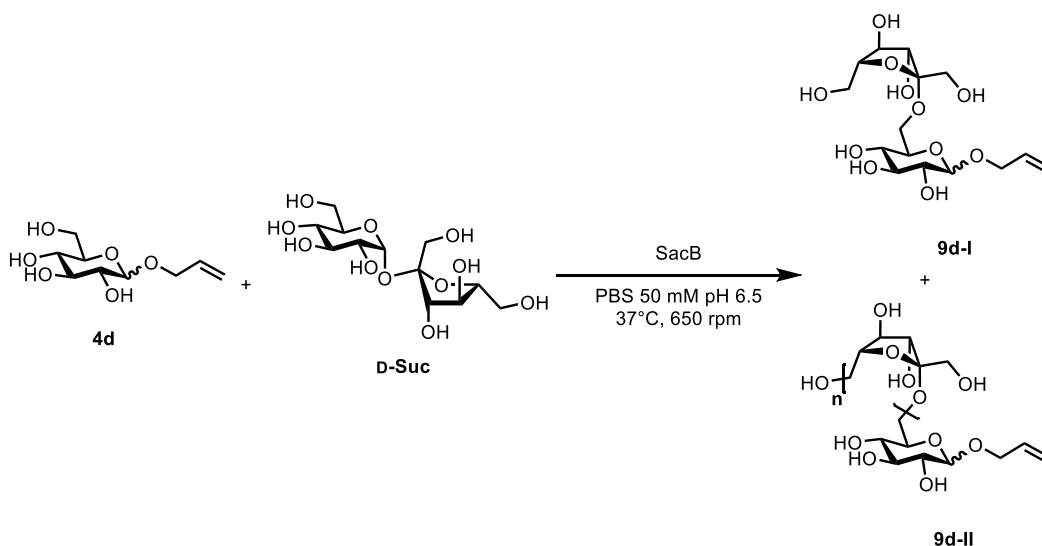


Figura 69 Reacción de β -fructofuranosilación del aceptor alil-glucósido **4d** catalizada por una levansacarasa de *Bacillus subtilis*

Reacción de 48 h donde $n > 2$.

La fructosilación de **4d** se monitoreó por TLC, en la **Figura 70** se observó que la D-Suc se transformó en monosacáridos (Glc, Fru) y fructooligosacáridos (FOS), así como polímero. Después de 1 h de reacción, se observó la formación evidente de producto fructosilado. La enzima LevSacB tiene una alta regioselectividad para fructosilar el C_1 -OH de aceptores α -aldosas[216]; D-monosacáridos, D-disacáridos, deoxi-azúcares, ceto-azúcares y L-azúcares. Por el contrario, el aceptor **4d** es un azúcar no reductor, en otras palabras, su C_1 -OH se encuentra ocupado por la aglicona $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}_2$. Este tipo de aceptores donde el OH del carbono anomérico no está disponible, se han fructosilado previamente[87]. De modo que, los productos fructosilados que se observaron en la TLC deberían ser el resultado de la fructosilación de **4d** en la posición C_6 -OH.

Los productos mono y difructosilado se identificaron como alil-blastosido **9d-I** ($R_f=0.55$, $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$ 30:20:4) y Fruf-(2→6)-O-alil-blastosido **9d-II** ($n=2$) ($R_f=0.47$, $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$ 30:20:4). Los resultados del monitoreo de la reacción por TLC mostraron que la síntesis de los productos mono- y difructosilados, se ve favorecida en tiempos cortos de reacción, dado que al dejar que la reacción avance hasta por 48 h resulta contraproducente para el aumento de los productos fructosilados. Ciertamente, se observó una completa hidrólisis del Fruf-(2→6)-O-alil-blastosido (**9d-II**, $n=2$) a las 24 h de reacción. En cambio, en dicho tiempo de reacción, se percibe la formación de productos polifructosilados así como de polímero de levana^[217]. Desde el punto de vista de que LevSacB tiene capacidad para transferir varios residuos fructofuranosilo y construir series de fructooligosacáridos (FOS). Muy probablemente, en la mezcla de productos polifructosilados estén presentes los alil-blastooligosacáridos (**9d-II**, $n>2$) correspondientes (**Figura 69**).

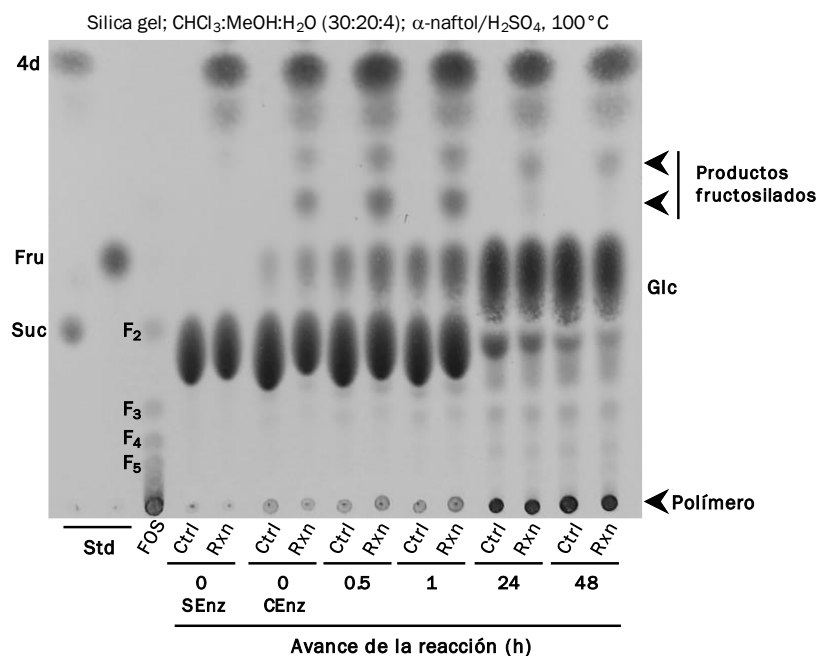


Figura 70 Análisis por cromatografía en capa fina (TLC) de la β -fructofuranosilación enzimática del glicomonómero **4d**

Glucosa (Glc), fructosa (Fru), sacarosa (600 mM, $\text{Suc}_{\text{Glc}-(\alpha,1\leftrightarrow 2\beta)\text{-Fru}}$) y fructooligosacáridos (FOS). Avance de reacción (h), desde el tiempo inicial (0 h, sin enzima; SEnz, con enzima; CEnz) hasta las 24 h de reacción. Revelador α -naftol/ H_2SO_4 , 100 °C. Control [LevSacB y Suc].

6.3 Síntesis de glicopolímeros

6.3.1 Síntesis de glicopolímeros mediante reacciones de copolimerización a partir de monómeros alilo y vinilo

El producto polimerizado, denominado polímero-**4d**, se obtuvo a partir de las condiciones de reacción descritas en la **Figura 71A** y bajo la estrategia de polimerización por radicales libres. A partir del glicomonómero alil-glucósido **4d**, preparado en ChCl:MA (1:2) usando alcohol alílico (**sección 5.10.2**), se efectuaron reacciones exploratorias de polimerización en DMSO y DMF (**Sección 5.12**). Después de 72 h se tomaron muestras de cada reacción y se precipitaron con metanol (**Figura 71B**) y se centrifugaron. El sobrenadante y el precipitado (disuelto en agua) se analizó por cromatografía de permeación en gel (GPC). En el cromatograma de la **Figura 71C** muestra que en las condiciones de polimerización exploradas se obtuvo producto de polimerización. Como estándar de calibración para GPC se utilizó levadura de bajo peso molecular ($Lev_{LMW}=8.5$ kDa). La comparación de este con los picos observados en las muestras de reacción, confirmaron la presencia de producto polimerizado. En efecto, dicho polímero posee un peso similar al de Lev_{LMW} . No obstante, el perfil cromatográfico de los picos de polímero observados muestra una distribución del peso molecular amplia. En este sentido, es de suponerse una amplia polidispersión en el peso molecular de las moléculas sintetizadas. Se conoce que la polimerización por radicales libres es un método versátil y robusto^[92-95], permite polimerizar diversos monómeros. y utilizar diferentes disolventes^[93, 97-99]. Sin embargo, se sabe de su limitada capacidad para controlar el peso molecular en procesos de polimerización^[218]. A pesar de todo, las condiciones de polimerización (**Figura 71A**,), coinciden con lo reportado previamente en polimerizaciones de glicomonómeros que contienen glucosa^[219, 220]. Y fueron lo suficientemente adecuadas para obtener producto de polimerización. Adicionalmente, los resultados de GPC mostraron que el disolvente más adecuado para llevar a cabo la síntesis de polímero-**4d** es DMSO.

Una vez que se determinaron las condiciones adecuadas para polimerizar al glicomonómero **4d**, se ensayó una reacción de polimerización a mayor escala, destinada a producir suficiente muestra para poder realizar diferentes análisis espectroscópicos.

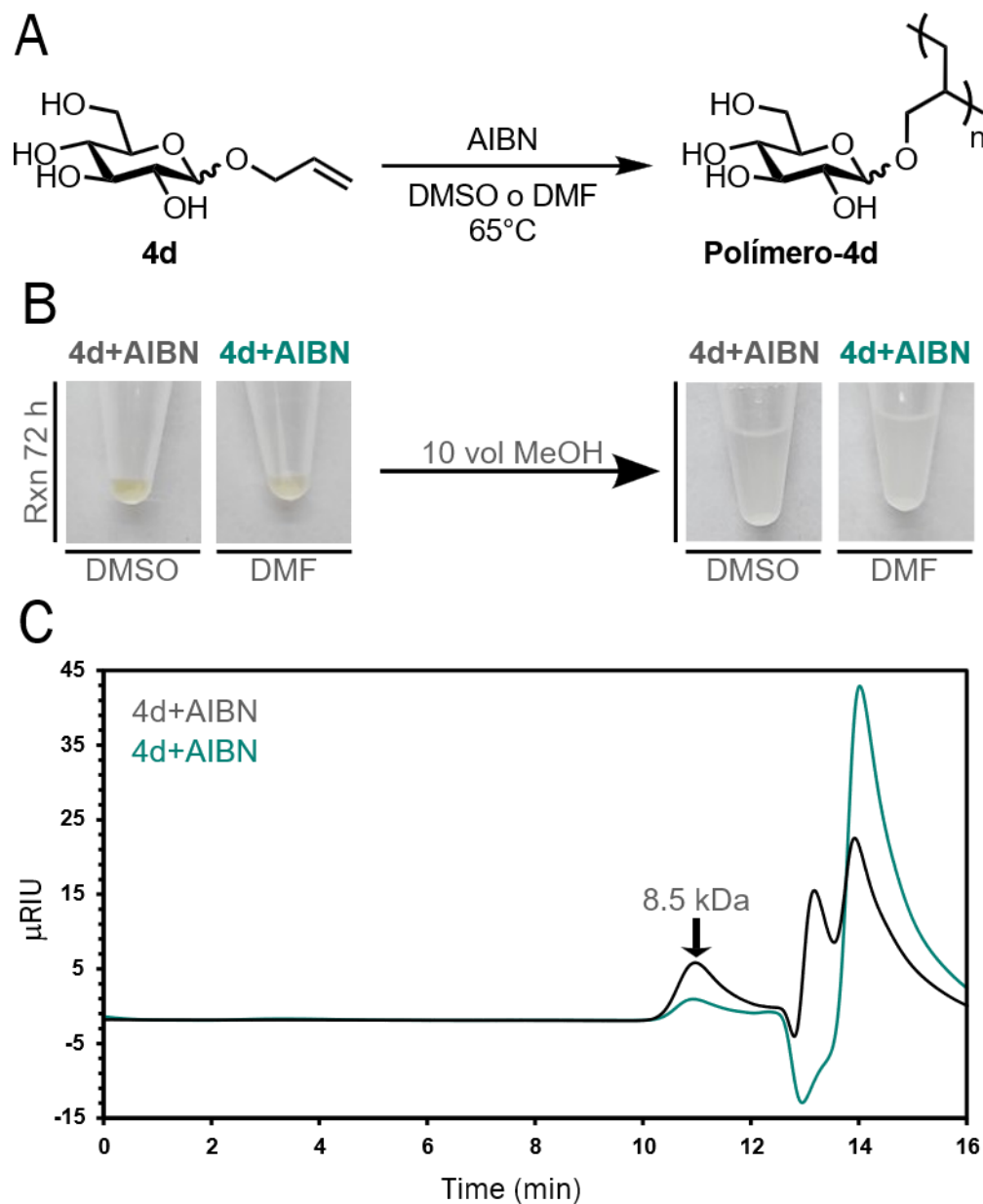
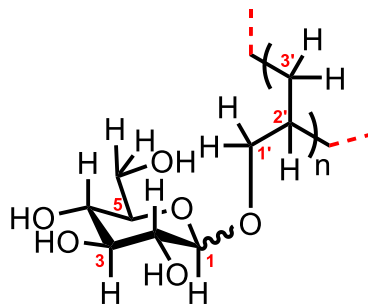


Figura 71 Reacción de polimerización, detección de producto y análisis por cromatografía de permeación en gel (GPC)

El polímero producido, se purificó por diálisis para eliminar restos de monómero **4d** sin reaccionar. El glicopolímero se obtuvo en cantidades mínimas, por lo que la caracterización estructural se limitó a espectroscopía de infrarrojo (IR). La espectroscopía de infrarrojo por transformada de Fourier (FT-IR) es un método versátil para caracterizar e identificar polímeros [221–223]. Ciertamente, se ha utilizado FT-IR para caracterizar, monosacáridos[224], oligosacáridos[225–227], polisacáridos[228–230] y glicopolímeros[230–232]. Debido a la reducida cantidad de glicopolímero con la que se contaba. Para la FT-IR se utilizó un accesorio de reflectancia total atenuada (ATR), esta

técnica que está basada en el análisis de los picos de bandas de absorción a ciertos números de onda, se combina con técnicas de reflectancia total atenuada, para hacer posible recuperar las muestras y emplear cantidades reducidas del analito en cuestión^[233]. Lo anterior permitió analizar la muestra directamente en fase sólida sin ninguna preparación previa^[234-237]. De esta manera, para determinar la estructura del glicopolímero (**Polímero-4d**, **Figura 72**) se analizaron las bandas de frecuencias observadas en espectroscopia de infrarrojo. Las bandas obtenidas resultaron características de la naturaleza de los enlaces presentes en la muestra de polímero analizada. En el espectro de ATR-FT-IR (**Figura 73**), se ilustran las bandas más representativas del espectro, estas se dividieron en tres zonas principales (I, II, III).



Polímero-4d

Figura 72 Estructura del polímero obtenido de la polimerización por radicales libres del glicomonómero alil-glucósido 4d.

En ■ carbonos del residuo α/β -glucopiranosil y propilo ($-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{CH}_2-$). Entre () unidad monomérica del polímero, n= número de veces que se repite dicha unidad.

En la región de $3800-2800\text{ cm}^{-1}$ (**Figura 73**, zona I) se observó una banda intensa y ancha (3336 cm^{-1}) que corresponde a una tensión asimétrica (ν) del estiramiento O–H, la cual es típica de enlaces OH con presencia de interacciones tipo enlace hidrógeno [$\nu(\text{OH})_{\text{HB}}$]^[224, 238-240], confirmando la presencia de residuos de azúcar en la muestra de polímero analizado. En efecto, dicha banda 3336 cm^{-1} $\nu(\text{OH})_{\text{HB}}$ se debe al considerable número de grupos OH que posee el residuo de azúcar en el glicopolímero (**Polímero-4d**, **Figura 72**). Igualmente, se identificó un par de bandas importantes en 2920 cm^{-1} y 2888 cm^{-1} . La banda situada en 2920 cm^{-1} se asignó a una frecuencia de tensión simétrica (ν_s) C–H^[240]. Dicha frecuencia 2920 cm^{-1} $\nu_s(\text{CH}_2)$ se ha reportado que pertenece al metileno exocíclico CH_2 del carbono 6 (C_6) de la glucosa ^[241]. En 2888 cm^{-1} se observó

una banda de metino (C–H), que procede de las contribuciones de estiramientos $\nu(\text{CH})_{\text{C}_3}$ en el carbono 3 y $\nu_{\text{s}}(\text{CH})_{\text{C}_1}$ en el carbono 1^[240, 242].

Con respecto a la zona II de la **Figura 73**; entre 1600-1200 cm^{-1} , también se identificaron frecuencias de flexión C–H. La flexión en tijereo (δ) en el plano 1457 cm^{-1} $\delta(\text{CH}_2)$ ^[224, 240, 243, 244], sugiere la presencia de grupos metileno (CH_2) en el polímero como los **CH₂** en **C_{1'}** y **C_{3'}** del residuo propilo ($\text{Glc}_p\text{-O-CH}_2\text{-CH-CH}_2\text{-}$, **Figura 72**). Aunque también podría originarse del hidroximetileno exocíclico ($\text{-CH}_2\text{-OH}$) del residuo α/β -glucopiranosil^[241]. En esta misma zona II, alrededor de 1470-1200 cm^{-1} , se encontraron bandas de flexión (β) de balanceo en el plano 1419 cm^{-1} $\beta(\text{CH})$ ^[242] y de aleteo (ω) fuera del plano 1374 cm^{-1} $\omega(\text{CH}_2)$, con contribución de los estiramiento OH^[240, 244]. Dichas señales son inherentes de grupos -CH- y $\text{-CH}_2\text{-}$, lo que confirma la presencia de cadenas formadas por grupos -CH- y $\text{-CH}_2\text{-}$, en la estructura del **Polímero-4d (Figura 72)**. Por otra parte, en la zona III (**Figura 73**) se observó una banda 1153 cm^{-1} $\nu(\text{COC})$, $\nu(\text{CC})$ atribuida a la frecuencia de tensión asimétrica en el enlace glucosídico ($\text{-C}_2\text{H-C}_{1\alpha/\beta}\text{HO-C}_1\text{H}_2\text{-}$)^[224, 228, 244, 245]. Así como una banda en 1074 cm^{-1} $\nu(\text{CC})$, particular de D-(+)-Glc_p^[228, 240, 244-246]. Efectivamente, las bandas (1013 cm^{-1} , 928 cm^{-1}) de flexión de balanceo en el plano $\beta(\text{COH})$, $\beta(\text{CH})$ de C_1 y de tensión simétrica en el enlace glucosídico $\nu_{\text{s}}(\text{COC})$ ^[228, 240, 243, 245]. Así como la frecuencia de balanceo en el plano 762 cm^{-1} $\rho(\text{CH}_2)$ ^[240]. Fueron suficientes para confirmar la estructura del producto (**Polímero-4d, Figura 72**) de polimerización del glicomonómero alil glucosa **4d (Polímero-4d, Figura 71A)**.

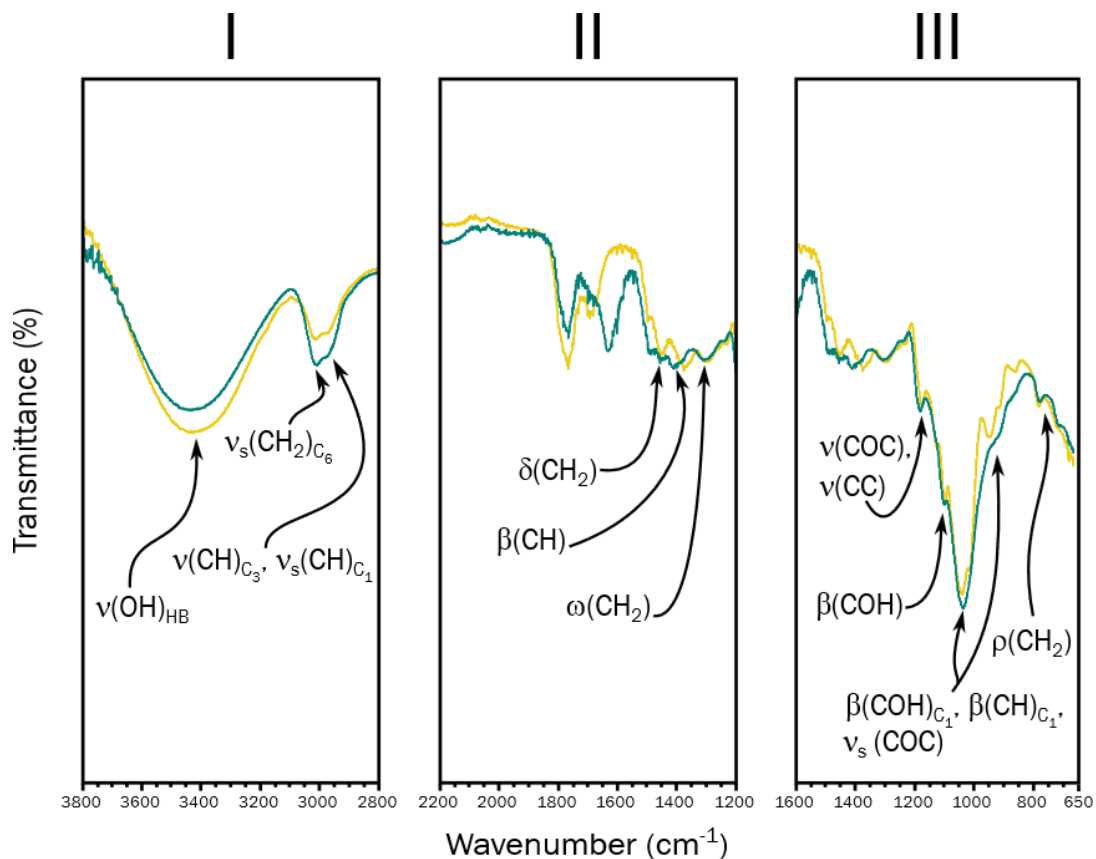


Figura 73 Caracterización estructural del producto de polimerización del alil-glucósido **4d** por ATR-FT-IR

En eje x frecuencia en número de onda (cm^{-1}) barrido de 4,000-600 cm^{-1} . En el eje y porcentaje de transmitancia (%). Frecuencia de tensión; asimétrica (ν) y simétrica (ν_s), frecuencias de flexión; flexión en el plano (β), tijereo en el plano (δ), balanceo en el plano (ρ), aleteo fuera del plano (ω) y torción fuera del plano (τ). C_n =frecuencia carbono en particular, donde C=átomo de carbono y n número en la estructura del polímero. Subíndice $_{\text{HB}}$ para interacción de enlace de hidrógeno.

Por otra parte, con el fin de obtener polímeros que tuvieran una región hidrofílica y al mismo tiempo en su estructura se encontraran zonas hidrofóbicas, también se exploró la posibilidad de sintetizar copolímeros anfifílicos^[7], basados en la presencia de dos bloques diferentes, unidos químicamente de manera lineal. Los cuales permitirían construir una variedad de estructuras a partir de esta clase de polímeros^[247]. La síntesis del copolímero se realizó bajo las condiciones ilustradas en la **Figura 74A** y descritas en la **sección 5.12.2**. A las de 72 h la reacción se precipitó con metanol (**Figura 74B**). Después de analizar el precipitado por GPC, se observó un pico con ($R_t=10.9$ min) en la reacción con iniciador (AIBN) y sin indicador de radicales libres. Lo cual indica que, en

las condiciones previamente establecidas, no es necesario el iniciador para llevar a cabo la síntesis de polímero, dado que la sensibilidad de los grupos $-\text{CH}=\text{CH}_2$ es a adecuada para llevar a cabo una termopolimerización^[248]. Por razones de tiempo e infraestructura no se terminó por ATR-FT-IR la estructura del **Copolímero-4d/10a**. Únicamente se identificó la síntesis de producto por cromatografía (**Figura 74C**). Aunque considerando lo reportado en la literatura [7, 249, 250], es muy probable la obtención de un copolímero funcionalizado con azúcares libres (alil-glucósido **4d**) y azúcares protegidos (1-O-vinil-fructopiranosido **10a**).

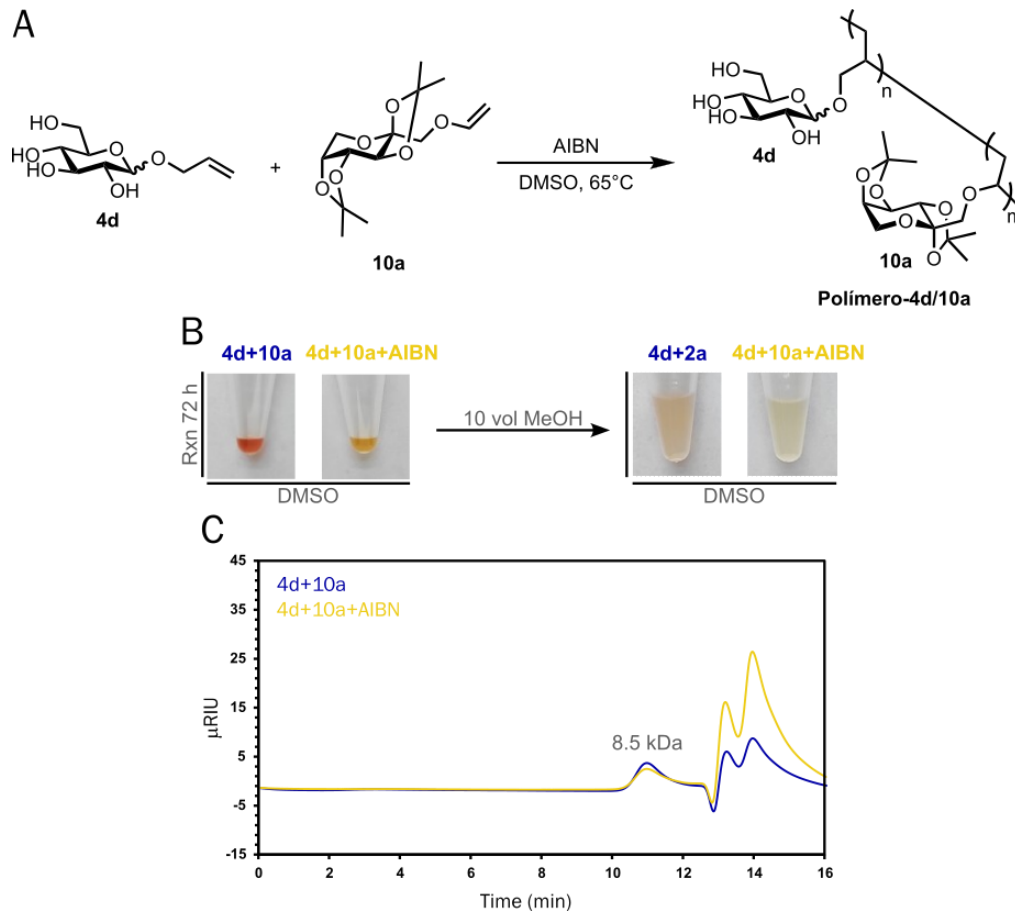


Figura 74 Copolimerización de alil-glucósido **4d** con 1-O-vinil-fructopiranosido **10a** y detección del copolímero funcionalizado por cromatografía de permeación en gel (GPC)

En ■ reacción sin iniciador (AIBN) y en ■ reacción con AIBN. En eje x tiempo de retención (R_t , min) y en y microunidades de índice de refracción (μRIU).

7 CONCLUSIONES

En este trabajo se desarrolló una estrategia quimioenzimática novedosa para la síntesis dirigida de glicopolímeros, empleando, por un lado, disolventes neotéricos y modulables como son los disolventes eutécticos profundos naturales (NADES). Particularmente, la mezcla eutéctica cloruro de colina y ácido malónico (ChCl:MA 1:2) se utilizó como medio de reacción y como catalizador, lo que permitió obtener azúcares con diversos grupos polimerizables (glicomonómeros). El uso de dichos medios neotéricos representa un avance en el desarrollo de procesos de química verde, puesto que, utilizando materia prima renovable fue posible construir un medio capaz de actuar como disolvente y además, ser lo suficientemente ácido para catalizar la formación de enlaces glicosídicos vía glicosilación de Fischer. Este trabajo representa uno de los primeros reportes para formar azúcares protegidos, alil-glicósidos y propargil-glicósidos en NADES. Efectivamente, el sistema ChCl:MA (1:2) fue capaz de incorporar grupos alilo y propargilo, de manera simple y específica sobre el carbono anomérico de diferentes monosacáridos, así como, distintos oligosacáridos.

En la misma forma, se evaluaron diversas enzimas activas en carbohidratos que permitieron la construcción de secuencias glicosídicas particulares (glicomonómeros funcionalizados) y de esta manera se logró sintetizar varios glicomonómeros funcionalizados. Finalmente, la versatilidad y funcionalidad de esta plataforma de síntesis, se validó polimerizando al glicomonómero alil-glucopiranososa, permitiendo la integración de un proceso versátil, sencillo y metodológicamente compatible con los principios de la química verde.

8 PERSPECTIVAS

- Optimizar las condiciones de reacción para obtener alil- y propargil- glicósidos con alto rendimiento y/o conversión ($\geq 50\%$).
- Diseñar diferentes NADES utilizando ácidos débiles como donadores de enlace de hidrógeno (por ejemplo, ácido oxálico, ácido málico, ácido maleico, ácido láctico y ácido malónico) y diferentes aceptores de enlaces de hidrógeno (cloruro de colina, betaína, urea e histidina), y clasificarlos de acuerdo con su acidez.
- Determinar la capacidad de dichos NADES para catalizar la derivatización y alquilación de glucosa, para posteriormente, determinar el mejor NADES y extender la transformación a otros azúcares y/o oligosacáridos. Al mismo tiempo diseñar NADES que sean compatibles con reacciones de glicosilación enzimática.
- Estudiar el mecanismo de reacción que gobierna la glicosilación química en NADES. Determinar los factores que establecen la estereoselectividad de la reacción y como el NADES interviene directa o indirectamente sobre la proporción de anómero (α/β) obtenido, lo cual permitiría desarrollar sistemas para reacciones de organocatálisis.
- Optimizar o explorar otros métodos de polimerización que permitan obtener altos rendimientos en la polimerización o copolimerización de glicomonómeros.

9 BIBLIOGRAFÍA

- [1] Levy, D. E.; Fügedi, P. *The Organic Chemistry of Sugars*; CRC Press, 2005.
- [2] Kiessling, L. L.; Splain, R. A. Chemical Approaches to Glycobiology. *Annu. Rev. Biochem.*, **2010**, *79* (1), 619–653. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.77.070606.100917>.
- [3] Wang, B.; Boons, G.-J. *Carbohydrate Recognition: Biological Problems, Methods, and Applications*; John Wiley & Sons, 2011.
- [4] Finkelstein, J. Glycochemistry & Glycobiology. *Nature*, **2007**, *446* (7139), 999–999. <https://doi.org/10.1038/446999a>.
- [5] González-Cuesta, M.; Ortiz Mellet, C.; García Fernández, J. M. Carbohydrate Supramolecular Chemistry: Beyond the Multivalent Effect. *Chem. Commun.*, **2020**, *56* (39), 5207–5222. <https://doi.org/10.1039/D0CC01135E>.
- [6] Huang, M. L.; Godula, K. Nanoscale Materials for Probing the Biological Functions of the Glycocalyx. *Glycobiology*, **2016**, *26* (8), 797–803. <https://doi.org/10.1093/glycob/cww022>.
- [7] Miura, Y.; Hoshino, Y.; Seto, H. Glycopolymer Nanobiotechnology. *Chem. Rev.*, **2016**, *116* (4), 1673–1692. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.5b00247>.
- [8] Pramudya, I.; Chung, H. Recent Progress of Glycopolymer Synthesis for Biomedical Applications. *Biomater. Sci.*, **2019**, *7* (12), 4848–4872. <https://doi.org/10.1039/C9BM01385G>.
- [9] Carbohydrate (CHEBI:16646) <https://www.ebi.ac.uk/chebi/searchId.do?chebiId=23008> (accessed Jun 10, 2023).
- [10] Penades, S. *Host-Guest Chemistry: Mimetic Approaches to Study Carbohydrate Recognition*; Springer, 2003.
- [11] Purcell, S. C.; Godula, K. Synthetic Glycoscapes: Addressing the Structural and Functional Complexity of the Glycocalyx. *Interface Focus*, **2019**, *9* (2), 20180080. <https://doi.org/10.1098/rsfs.2018.0080>.
- [12] Bubb, W. A. NMR Spectroscopy in the Study of Carbohydrates: Characterizing the Structural Complexity. *Concepts Magn. Reson. Part A*, **2003**, *19A* (1), 1–19. <https://doi.org/10.1002/cmr.a.10080>.
- [13] Sinnott, M. *Carbohydrate Chemistry and Biochemistry: Structure and*

Mechanism; Royal Society of Chemistry, 2007.

- [14] Hodoniczky, J.; Morris, C. A.; Rae, A. L. Oral and Intestinal Digestion of Oligosaccharides as Potential Sweeteners: A Systematic Evaluation. *Food Chem.*, **2012**, *132* (4), 1951–1958. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.12.031>.
- [15] Van Laar, A. D. E.; Grootaert, C.; Van Camp, J. Rare Mono- and Disaccharides as Healthy Alternative for Traditional Sugars and Sweeteners? *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, **2021**, *61* (5), 713–741. <https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1743966>.
- [16] Lindhorst, T. K.; Kubik, S. Supramolecular Approaches to the Study of Glycobiology. In *Supramolecular Chemistry*; Gale, P. A., Steed, J. W., Eds.; John Wiley & Sons, Ltd: Chichester, UK, 2012; p smc170. <https://doi.org/10.1002/9780470661345.smc170>.
- [17] Delbianco, M.; Bharate, P.; Varela-Aramburu, S.; Seeberger, P. H. Carbohydrates in Supramolecular Chemistry. *Chem. Rev.*, **2016**, *116* (4), 1693–1752. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.5b00516>.
- [18] Moulis, C.; Guieysse, D.; Morel, S.; Séverac, E.; Remaud-Siméon, M. Natural and Engineered Transglycosylases: Green Tools for the Enzyme-Based Synthesis of Glycoproducts. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **2021**, *61*, 96–106. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2020.11.004>.
- [19] Desmet, T.; Soetaert, W.; Bojarová, P.; Křen, V.; Dijkhuizen, L.; Eastwick-Field, V.; Schiller, A. Enzymatic Glycosylation of Small Molecules: Challenging Substrates Require Tailored Catalysts. *Chem. - Eur. J.*, **2012**, *18* (35), 10786–10801. <https://doi.org/10.1002/chem.201103069>.
- [20] González-Ríos, J. A.; Pedraza-Chaverri, J.; Medina-Campos, O. N.; Reina, M.; Romero, Y.; Martínez, A.; López-Munguía, A.; Castillo, E. The Influence of the Carbohydrate Anomeric Linkage on the Free Radical Scavenging Activity of Enzymatically-Synthesized Phenolic Glycosides. *RSC Adv.*, **2016**, *6* (51), 45452–45461. <https://doi.org/10.1039/C6RA06572D>.
- [21] Miura, Y.; Hoshino, Y.; Seto, H. Glycopolymer Nanobiotechnology. *Chem. Rev.*, **2016**, *116* (4), 1673–1692. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.5b00247>.
- [22] Ma, Z.; Zhu, X. X. Copolymers Containing Carbohydrates and Other Biomolecules: Design, Synthesis and Applications. *J. Mater. Chem. B*, **2019**, *7* (9), 1361–1378.

<https://doi.org/10.1039/C8TB03162B>.

- [23] Hořejší, V.; Smolek, P.; Kocourek, J. Studies on Lectins XXXV. Water-Soluble O-Glycosyl Polyacrylamide Derivatives for Specific Precipitation of Lectins. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.*, **1978**, *538* (2), 293–298. [https://doi.org/10.1016/0304-4165\(78\)90357-4](https://doi.org/10.1016/0304-4165(78)90357-4).
- [24] Guthrie, F. LII. On Eutexia. *Lond. Edinb. Dublin Philos. Mag. J. Sci.*, **1884**, *17* (108), 462–482. <https://doi.org/10.1080/14786448408627543>.
- [25] Clarke, J. B.; Hastie, J. W.; Kihlberg, L. H. E.; Metselaar, R.; Thackeray, M. M. Definitions of Terms Relating to Phase Transitions of the Solid State (IUPAC Recommendations 1994). *Pure Appl. Chem.*, **1994**, *66* (3), 577–594. <https://doi.org/10.1351/pac199466030577>.
- [26] Santana, A. P. R.; Mora-Vargas, J. A.; Guimarães, T. G. S.; Amaral, C. D. B.; Oliveira, A.; Gonzalez, M. H. Sustainable Synthesis of Natural Deep Eutectic Solvents (NADES) by Different Methods. *J. Mol. Liq.*, **2019**, *293*, 111452. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2019.111452>.
- [27] Dai, Y.; Witkamp, G.-J.; Verpoorte, R.; Choi, Y. H. Tailoring Properties of Natural Deep Eutectic Solvents with Water to Facilitate Their Applications. *Food Chem.*, **2015**, *187*, 14–19. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.03.123>.
- [28] Castro, V. I. B.; Craveiro, R.; Silva, J. M.; Reis, R. L.; Paiva, A.; C. Duarte, A. R. Natural Deep Eutectic Systems as Alternative Nontoxic Cryoprotective Agents. *Cryobiology*, **2018**, *83*, 15–26. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2018.06.010>.
- [29] Gutiérrez, M. C.; Ferrer, M. L.; Mateo, C. R.; del Monte, F. Freeze-Drying of Aqueous Solutions of Deep Eutectic Solvents: A Suitable Approach to Deep Eutectic Suspensions of Self-Assembled Structures. *Langmuir*, **2009**, *25* (10), 5509–5515. <https://doi.org/10.1021/la900552b>.
- [30] Dai, Y.; van Spronsen, J.; Witkamp, G.-J.; Verpoorte, R.; Choi, Y. H. Natural Deep Eutectic Solvents as New Potential Media for Green Technology. *Anal. Chim. Acta*, **2013**, *766*, 61–68. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2012.12.019>.
- [31] Pelosi, C.; Gonzalez-Rivera, J.; Bernazzani, L.; Tiné, M. R.; Duce, C. Optimized Preparation, Thermal Characterization and Microwave Absorption Properties of Deep Eutectic Solvents Made by Choline Chloride and Hydrated Salts of Alkali Earth Metals. *J. Mol. Liq.*, **2023**, *371*, 121104.

<https://doi.org/10.1016/j.molliq.2022.121104>.

- [32] Florindo, C.; Oliveira, F. S.; Rebelo, L. P. N.; Fernandes, A. M.; Marrucho, I. M. Insights into the Synthesis and Properties of Deep Eutectic Solvents Based on Cholinium Chloride and Carboxylic Acids. *ACS Sustain. Chem. Eng.*, **2014**, *2* (10), 2416–2425. <https://doi.org/10.1021/sc500439w>.
- [33] P. Abbott, A.; Capper, G.; L. Davies, D.; K. Rasheed, R.; Tambyrajah, V. Novel Solvent Properties of Choline Chloride/Urea Mixtures. *Chem. Commun.*, **2003**, *0* (1), 70–71. <https://doi.org/10.1039/B210714G>.
- [34] Smith, E. L.; Abbott, A. P.; Ryder, K. S. Deep Eutectic Solvents (DESs) and Their Applications. *Chem. Rev.*, **2014**, *114* (21), 11060–11082. <https://doi.org/10.1021/cr300162p>.
- [35] AlOmar, M. K.; Hayyan, M.; Alsaadi, M. A.; Akib, S.; Hayyan, A.; Hashim, M. A. Glycerol-Based Deep Eutectic Solvents: Physical Properties. *J. Mol. Liq.*, **2016**, *215*, 98–103. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2015.11.032>.
- [36] Parnica, J.; Antalík, M. Urea and Guanidine Salts as Novel Components for Deep Eutectic Solvents. *J. Mol. Liq.*, **2014**, *197*, 23–26. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2014.04.016>.
- [37] Abbott, A. P.; Boothby, D.; Capper, G.; Davies, D. L.; Rasheed, R. K. Deep Eutectic Solvents Formed between Choline Chloride and Carboxylic Acids: Versatile Alternatives to Ionic Liquids. *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, *126* (29), 9142–9147. <https://doi.org/10.1021/ja048266j>.
- [38] Faggian, M.; Sut, S.; Perissutti, B.; Baldan, V.; Grabnar, I.; Dall'Acqua, S. Natural Deep Eutectic Solvents (NADES) as a Tool for Bioavailability Improvement: Pharmacokinetics of Rutin Dissolved in Proline/Glycine after Oral Administration in Rats: Possible Application in Nutraceuticals. *Molecules*, **2016**, *21* (11), 1531. <https://doi.org/10.3390/molecules21111531>.
- [39] Paiva, A.; Craveiro, R.; Aroso, I.; Martins, M.; Reis, R. L.; Duarte, A. R. C. Natural Deep Eutectic Solvents – Solvents for the 21st Century. *ACS Sustain. Chem. Eng.*, **2014**, *2* (5), 1063–1071. <https://doi.org/10.1021/sc500096j>.
- [40] Paiva, A.; Matias, A. A.; Duarte, A. R. C. How Do We Drive Deep Eutectic Systems towards an Industrial Reality? *Curr. Opin. Green Sustain. Chem.*, **2018**, *11*, 81–85. <https://doi.org/10.1016/j.cogsc.2018.05.010>.
- [41] Rokade, S. M.; Bhate, P. M. Practical Preparation of Mono- and Di- O -

- Isopropylidene Derivatives of Monosaccharides and Methyl 4,6- O -Benzylidene Glycosides from Free Sugars in a Deep Eutectic Solvent. *J. Carbohydr. Chem.*, **2017**, 36 (1), 20–30. <https://doi.org/10.1080/07328303.2017.1347262>.
- [42] P. Abbott, A.; M. Alabdullah, S. S.; M. Al-Murshedi, A. Y.; S. Ryder, K. Brønsted Acidity in Deep Eutectic Solvents and Ionic Liquids. *Faraday Discuss.*, **2018**, 206 (0), 365–377. <https://doi.org/10.1039/C7FD00153C>.
- [43] Zhu, P.; Gu, Z.; Hong, S.; Lian, H. One-Pot Production of Chitin with High Purity from Lobster Shells Using Choline Chloride–Malonic Acid Deep Eutectic Solvent. *Carbohydr. Polym.*, **2017**, 177, 217–223. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.09.001>.
- [44] Silva, L. P.; Fernandez, L.; Conceição, J. H. F.; Martins, M. A. R.; Sosa, A.; Ortega, J.; Pinho, S. P.; Coutinho, J. A. P. Design and Characterization of Sugar-Based Deep Eutectic Solvents Using Conductor-like Screening Model for Real Solvents. *ACS Sustain. Chem. Eng.*, **2018**, 6 (8), 10724–10734. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.8b02042>.
- [45] Anastas, P.; Eghbali, N. Green Chemistry: Principles and Practice. *Chem. Soc. Rev.*, **2010**, 39 (1), 301–312. <https://doi.org/10.1039/B918763B>.
- [46] Kovács, A.; Neyts, E. C.; Cornet, I.; Wijnants, M.; Billen, P. Modeling the Physicochemical Properties of Natural Deep Eutectic Solvents. *ChemSusChem*, **2020**, 13 (15), 3789–3804. <https://doi.org/10.1002/cssc.202000286>.
- [47] Abbott, A. P.; Capper, G.; Gray, S. Design of Improved Deep Eutectic Solvents Using Hole Theory. *ChemPhysChem*, **2006**, 7 (4), 803–806. <https://doi.org/10.1002/cphc.200500489>.
- [48] Wang, H.; Jia, Y.; Wang, X.; Ma, J.; Jing, Y. PHYSICO-CHEMICAL PROPERTIES OF MAGNESIUM IONIC LIQUID ANALOGOUS. *J. Chil. Chem. Soc.*, **2012**, 57 (3), 1208–1212. <https://doi.org/10.4067/S0717-97072012000300003>.
- [49] Zhang, Q.; De Oliveira Vigier, K.; Royer, S.; Jérôme, F. Deep Eutectic Solvents: Syntheses, Properties and Applications. *Chem. Soc. Rev.*, **2012**, 41 (21), 7108. <https://doi.org/10.1039/c2cs35178a>.
- [50] Stephens, N. M.; Smith, E. A. Structure of Deep Eutectic Solvents (DESs): What We Know, What We Want to Know, and Why We Need to Know It. *Langmuir*, **2022**, 38 (46), 14017–14024. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.2c02116>.
- [51] Pandey, A.; Rai, R.; Pal, M.; Pandey, S. How Polar Are Choline Chloride-Based Deep

- Eutectic Solvents? *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **2013**, *16* (4), 1559–1568. <https://doi.org/10.1039/C3CP53456A>.
- [52] Craveiro, R.; Aroso, I.; Flammia, V.; Carvalho, T.; Viciosa, M. T.; Dionísio, M.; Barreiros, S.; Reis, R. L.; Duarte, A. R. C.; Paiva, A. Properties and Thermal Behavior of Natural Deep Eutectic Solvents. *J. Mol. Liq.*, **2016**, *215*, 534–540. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2016.01.038>.
- [53] O. Alshammari, O. A.; A. Almulgabsagher, G. A.; S. Ryder, K.; P. Abbott, A. Effect of Solute Polarity on Extraction Efficiency Using Deep Eutectic Solvents. *Green Chem.*, **2021**, *23* (14), 5097–5105. <https://doi.org/10.1039/D1GC01747K>.
- [54] Shanab, K.; Neudorfer, C.; Schirmer, E.; Spreitzer, H. Green Solvents in Organic Synthesis: An Overview. *Curr. Org. Chem.*, **2013**, *17* (11), 1179–1187.
- [55] Sheldon, R. A. Green Solvents for Sustainable Organic Synthesis: State of the Art. *Green Chem.*, **2005**, *7* (5), 267–278. <https://doi.org/10.1039/B418069K>.
- [56] Lipshutz, B. H.; Ghorai, S. Transitioning Organic Synthesis from Organic Solvents to Water. What's Your E Factor? *Green Chem.*, **2014**, *16* (8), 3660–3679. <https://doi.org/10.1039/C4GC00503A>.
- [57] Cseri, L.; Razali, M.; Pogany, P.; Szekely, G. Chapter 3.15 - Organic Solvents in Sustainable Synthesis and Engineering. In *Green Chemistry*; Török, B., Dransfield, T., Eds.; Elsevier, 2018; pp 513–553. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809270-5.00020-0>.
- [58] Xu, Z.-F.; Affleck, R.; Wangikar, P.; Suzawa, V.; Dordick, J. S.; Clark, D. S. Transition State Stabilization of Subtilisins in Organic Media. *Biotechnol. Bioeng.*, **1994**, *43* (6), 515–520. <https://doi.org/10.1002/bit.260430612>.
- [59] Bell, R. P.; Critchlow, J. E.; Page, M. I. Ground State and Transition State Effects in the Acylation of α -Chymotrypsin in Organic Solvent–Water Mixtures. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2*, **1974**, No. 1, 66–70. <https://doi.org/10.1039/P29740000066>.
- [60] Prasad, W.; Wani, A. D.; Khamrui, K.; Hussain, S. A.; Khetra, Y. Green Solvents, Potential Alternatives for Petroleum Based Products in Food Processing Industries. *Clean. Chem. Eng.*, **2022**, *3*, 100052. <https://doi.org/10.1016/j.clce.2022.100052>.
- [61] Henderson, R. K.; Jiménez-González, C.; Constable, D. J. C.; Alston, S. R.; Inglis, G. G. A.; Fisher, G.; Sherwood, J.; Binks, S. P.; Curzons, A. D. Expanding GSK's Solvent

Selection Guide – Embedding Sustainability into Solvent Selection Starting at Medicinal Chemistry. *Green Chem.*, **2011**, 13 (4), 854–862. <https://doi.org/10.1039/C0GC00918K>.

- [62] Joshi, D. R.; Adhikari, N. An Overview on Common Organic Solvents and Their Toxicity. *J. Pharm. Res. Int.*, **2019**, 1–18. <https://doi.org/10.9734/jpri/2019/v28i330203>.
- [63] Brautbar, N.; Williams, J. Industrial Solvents and Liver Toxicity: Risk Assessment, Risk Factors and Mechanisms. *Int. J. Hyg. Environ. Health*, **2002**, 205 (6), 479–491. <https://doi.org/10.1078/1438-4639-00175>.
- [64] Sidebottom, H.; Franklin, J. The Atmospheric Fate and Impact of Hydrochlorofluorocarbons and Chlorinated Solvents. *Pure Appl. Chem.*, **1996**, 68 (9), 1757–1769. <https://doi.org/10.1351/pac199668091757>.
- [65] Gu, Y.; Jérôme, F. Bio-Based Solvents: An Emerging Generation of Fluids for the Design of Eco-Efficient Processes in Catalysis and Organic Chemistry. *Chem. Soc. Rev.*, **2013**, 42 (24), 9550–9570. <https://doi.org/10.1039/C3CS60241A>.
- [66] Chemat, F.; Vian, M. A.; Ravi, H. K. Toward Petroleum-Free with Plant-Based Chemistry. *Curr. Opin. Green Sustain. Chem.*, **2021**, 28, 100450. <https://doi.org/10.1016/j.cogsc.2021.100450>.
- [67] Clarke, C. J.; Tu, W.-C.; Levers, O.; Bröhl, A.; Hallett, J. P. Green and Sustainable Solvents in Chemical Processes. *Chem. Rev.*, **2018**, 118 (2), 747–800. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00571>.
- [68] Rokade, S. M.; Bhate, P. M. One-Pot Synthesis of per-O-Acetylated Hemiacetals from Free Sugars in a Deep Eutectic Solvent. *Carbohydr. Res.*, **2015**, 416, 21–23. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2015.08.007>.
- [69] Rokade, S. M.; Bhate, P. M. Ferrier Reaction in a Deep Eutectic Solvent. *Carbohydr. Res.*, **2015**, 415, 28–30. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2015.07.015>.
- [70] Azizi, N.; Khajeh, M.; Alipour, M. Rapid and Selective Oxidation of Alcohols in Deep Eutectic Solvent. *Ind. Eng. Chem. Res.*, **2014**, 53 (40), 15561–15565. <https://doi.org/10.1021/ie502019z>.
- [71] Guajardo, N.; Carlesi, C.; Aracena, Á. Toluene Oxidation by Hydrogen Peroxide in Deep Eutectic Solvents. *ChemCatChem*, **2015**, 7 (16), 2451–2454. <https://doi.org/10.1002/cctc.201500604>.

- [72] Azizi, N.; Batebi, E.; Bagherpour, S.; Ghafari, H. Natural Deep Eutectic Salt Promoted Regioselective Reduction of Epoxides and Carbonyl Compounds. *RSC Adv.*, **2012**, 2 (6), 2289–2293. <https://doi.org/10.1039/C2RA01280D>.
- [73] Saberi, D.; Akbari, J.; Mahdudi, S.; Heydari, A. Reductive Amination of Aldehydes and Ketones Catalyzed by Deep Eutectic Solvent Using Sodium Borohydride as a Reducing Agent. *J. Mol. Liq.*, **2014**, 196, 208–210. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2014.03.024>.
- [74] Huang, Z.-L.; Wu, B.-P.; Wen, Q.; Yang, T.-X.; Yang, Z. Deep Eutectic Solvents Can Be Viable Enzyme Activators and Stabilizers. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, **2014**, 89 (12), 1975–1981. <https://doi.org/10.1002/jctb.4285>.
- [75] T. Gorke, J.; Srienc, F.; J. Kazlauskas, R. Hydrolase-Catalyzed Biotransformations in Deep Eutectic Solvents. *Chem. Commun.*, **2008**, 0 (10), 1235–1237. <https://doi.org/10.1039/B716317G>.
- [76] Craveiro, R.; Meneses, L.; Durazzo, L.; Rocha, Â.; Silva, J. M.; Reis, R. L.; Barreiros, S.; Duarte, A. R. C.; Paiva, A. Deep Eutectic Solvents for Enzymatic Esterification of Racemic Menthol. *ACS Sustain. Chem. Eng.*, **2019**, 7 (24), 19943–19950. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.9b05434>.
- [77] Crich, D. Mechanism of a Chemical Glycosylation Reaction. *Acc. Chem. Res.*, **2010**, 43 (8), 1144–1153. <https://doi.org/10.1021/ar100035r>.
- [78] Mydock, L. K.; Demchenko, A. V. Mechanism of Chemical O-Glycosylation: From Early Studies to Recent Discoveries. *Org. Biomol. Chem.*, **2010**, 8 (3), 497–510. <https://doi.org/10.1039/B916088D>.
- [79] Ratner, D. M.; Murphy, E. R.; Jhunjhunwala, M.; Snyder, D. A.; Jensen, K. F.; Seeberger, P. H. Microreactor-Based Reaction Optimization in Organic Chemistry—Glycosylation as a Challenge. *Chem Commun*, **2005**, No. 5, 578–580. <https://doi.org/10.1039/B414503H>.
- [80] Fairbanks, A.; Flitsch, S.; Galan, M. C. Introduction to Glycosylation: New Methodologies and Applications. *Org. Biomol. Chem.*, **2020**, 18 (36), 6979–6982. <https://doi.org/10.1039/D00B90110E>.
- [81] Garron, M.-L.; Henrissat, B. The Continuing Expansion of CAZymes and Their Families. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **2019**, 53, 82–87. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2019.08.004>.
- [82] Smith, P. J.; Ortiz-Soto, M. E.; Roth, C.; Barnes, W. J.; Seibel, J.; Urbanowicz, B. R.;

- Pfrenge, F. Enzymatic Synthesis of Artificial Polysaccharides. *ACS Sustain. Chem. Eng.*, **2020**, *8* (32), 11853–11871. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.0c03622>.
- [83] Strompen, S.; Miranda-Molina, A.; López-Munguía, A.; Castillo, E.; Saab-Rincón, G. Acceptor-Induced Modification of Regioselectivity in CGTase-Catalyzed Glycosylations of p-Nitrophenyl-Glucopyranosides. *Carbohydr. Res.*, **2015**, *404*, 46–54. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2014.11.010>.
- [84] Qi, Q.; Zimmermann, W. Cyclodextrin Glucanotransferase: From Gene to Applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **2005**, *66* (5), 475–485. <https://doi.org/10.1007/s00253-004-1781-5>.
- [85] O'Neill, E. C.; Field, R. A. Enzymatic Synthesis Using Glycoside Phosphorylases. *Carbohydr. Res.*, **2015**, *403*, 23–37. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2014.06.010>.
- [86] Castillo, E.; López-Munguía, A. Synthesis of Levan in Water-Miscible Organic Solvents. *J. Biotechnol.*, **2004**, *114* (1), 209–217. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2004.06.003>.
- [87] Miranda-Molina, A.; Castillo, E.; Lopez Munguia, A. A Novel Two-Step Enzymatic Synthesis of Blastose, a β -d-Fructofuranosyl-(2 \leftrightarrow 6)-d-Glucopyranose Sucrose Analogue. *Food Chem.*, **2017**, *227*, 202–210. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.01.094>.
- [88] Nidetzky, B.; Gutmann, A.; Zhong, C. Leloir Glycosyltransferases as Biocatalysts for Chemical Production. *ACS Catal.*, **2018**, *8* (7), 6283–6300. <https://doi.org/10.1021/acscatal.8b00710>.
- [89] Makeneni, S.; Foley, B. L.; Woods, R. J. BFMP: A Method for Discretizing and Visualizing Pyranose Conformations. *J. Chem. Inf. Model.*, **2014**, *54* (10), 2744–2750. <https://doi.org/10.1021/ci500325b>.
- [90] Ardèvol, A.; Rovira, C. Reaction Mechanisms in Carbohydrate-Active Enzymes: Glycoside Hydrolases and Glycosyltransferases. Insights from Ab Initio Quantum Mechanics/Molecular Mechanics Dynamic Simulations. *J. Am. Chem. Soc.*, **2015**, *137* (24), 7528–7547. <https://doi.org/10.1021/jacs.5b01156>.
- [91] Pallister, E.; Gray, C. J.; Flitsch, S. L. Enzyme Promiscuity of Carbohydrate Active Enzymes and Their Applications in Biocatalysis. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **2020**, *65*, 184–192. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2020.07.004>.

- [92] Tengdelius, M.; Lee, C.-J.; Grenegård, M.; Griffith, M.; Pålsson, P.; Konradsson, P. Synthesis and Biological Evaluation of Fucoidan-Mimetic Glycopolymers through Cyanoxyl-Mediated Free-Radical Polymerization. *Biomacromolecules*, **2014**, *15* (7), 2359–2368. <https://doi.org/10.1021/bm5002312>.
- [93] Rodygin, K. S.; Werner, I.; Ananikov, V. P. A Green and Sustainable Route to Carbohydrate Vinyl Ethers for Accessing Bioinspired Materials with a Unique Microspherical Morphology. *ChemSusChem*, **2018**, *11* (1), 292–298. <https://doi.org/10.1002/cssc.201701489>.
- [94] Spain, S. G.; Gibson, M. I.; Cameron, N. R. Recent Advances in the Synthesis of Well-Defined Glycopolymers. *J. Polym. Sci. Part Polym. Chem.*, **2007**, *45* (11), 2059–2072. <https://doi.org/10.1002/pola.22106>.
- [95] Ting, S. R. S.; Chen, G.; Stenzel, M. H. Synthesis of Glycopolymers and Their Multivalent Recognitions with Lectins. *Polym. Chem.*, **2010**, *1* (9), 1392. <https://doi.org/10.1039/c0py00141d>.
- [96] Matyjaszewski, K.; Davis, T. P. *Handbook of Radical Polymerization*; John Wiley & Sons, 2003.
- [97] Kloosterman, W. M. J.; Roest, S.; Priatna, S. R.; Stavila, E.; Loos, K. Chemo-Enzymatic Synthesis Route to Poly(Glucosyl-Acrylates) Using Glucosidase from Almonds. *Green Chem*, **2014**, *16* (4), 1837–1846. <https://doi.org/10.1039/C3GC41115J>.
- [98] Tanaka, T.; Matsuura, A.; Aso, Y.; Ohara, H. One-Pot Chemoenzymatic Synthesis of Glycopolymers from Unprotected Sugars via Glycosidase-Catalysed Glycosylation Using Triazinyl Glycosides. *Chem. Commun.*, **2020**, *56* (71), 10321–10324. <https://doi.org/10.1039/D0CC02838J>.
- [99] Kloosterman, W. M. J.; Spoelstra-van Dijk, G.; Loos, K. Biocatalytic Synthesis of Maltodextrin-Based Acrylates from Starch and α -Cyclodextrin: Biocatalytic Synthesis of Maltodextrin-Based Acrylates ... *Macromol. Biosci.*, **2014**, *14* (9), 1268–1279. <https://doi.org/10.1002/mabi.201400091>.
- [100] Li, Z.-C.; Liang, Y.-Z.; Chen, G.-Q.; Li, F.-M. Synthesis of Amphiphilic Block Copolymers with Well-Defined Glycopolymer Segment by Atom Transfer Radical Polymerization. *Macromol. Rapid Commun.*, **2000**, *21* (7), 375–380. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-3927\(20000401\)21:7<375::AID-MARC375>3.0.CO;2-#](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-3927(20000401)21:7<375::AID-MARC375>3.0.CO;2-#).

- [101] Li, Z.-C.; Liang, Y.-Z.; Li, F.-M. Multiple Morphologies of Aggregates from Block Copolymers Containing Glycopolymer Segments. *Chem. Commun.*, **1999**, No. 16, 1557–1558. <https://doi.org/10.1039/A905114G>.
- [102] Graeme, K. A.; Pollack, C. V. Heavy Metal Toxicity, Part I: Arsenic and Mercury. *J. Emerg. Med.*, **1998**, 16 (1), 45–56. [https://doi.org/10.1016/S0736-4679\(97\)00241-2](https://doi.org/10.1016/S0736-4679(97)00241-2).
- [103] Ambrosi, M.; Batsanov, A. S.; Cameron, N. R.; Davis, B. G.; Howard, J. A. K.; Hunter, R. Influence of Preparation Procedure on Polymer Composition: Synthesis and Characterisation of Polymethacrylates Bearing β -D-Glucopyranoside and β -D-Galactopyranoside Residues. *J. Chem. Soc. Perkin 1*, **2002**, No. 1, 45–52. <https://doi.org/10.1039/B108421F>.
- [104] Labeau, M.-P.; Cramail, H.; Deffieux, A. Amphiphilic Block Copolymers of Controlled Dimensions with Hydrophilic Glycosidic Vinyl Ether Moieties. *Macromol. Chem. Phys.*, **1998**, 199 (3), 335–342. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-3935\(19980301\)199:3<335::AID-MACP335>3.0.CO;2-F](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-3935(19980301)199:3<335::AID-MACP335>3.0.CO;2-F).
- [105] Loykulnant, S.; Hirao, A. Protection and Polymerization of Functional Monomers. 30. Anionic Living Polymerization of 4-Alkylstyrenes Containing Acetal-Protected Monosaccharide Residues. *Macromolecules*, **2000**, 33 (13), 4757–4764. <https://doi.org/10.1021/ma9917848>.
- [106] Pearson, S.; Vitucci, D.; Khine, Y. Y.; Dag, A.; Lu, H.; Save, M.; Billon, L.; Stenzel, M. H. Light-Responsive Azobenzene-Based Glycopolymer Micelles for Targeted Drug Delivery to Melanoma Cells. *Eur. Polym. J.*, **2015**, 69, 616–627. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2015.04.001>.
- [107] Ohno, K.; Tsujii, Y.; Fukuda, T. Synthesis of a Well-Defined Glycopolymer by Atom Transfer Radical Polymerization. *J. Polym. Sci. Part Polym. Chem.*, **1998**, 36 (14), 2473–2481. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-0518\(199810\)36:14<2473::AID-POLA5>3.0.CO;2-U](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-0518(199810)36:14<2473::AID-POLA5>3.0.CO;2-U).
- [108] Ye, W.; Wells, S.; DeSimone, J. M. Well-Defined Glycopolymer Amphiphiles for Liquid and Supercritical Carbon Dioxide Applications. *J. Polym. Sci. Part Polym. Chem.*, **2001**, 39 (21), 3841–3849. <https://doi.org/10.1002/pola.10018>.
- [109] Alder, R. W.; Phillips, J. G. E.; Huang, L.; Huang, X. Methyltrifluoromethanesulfonate. In *Encyclopedia of Reagents for Organic*

Synthesis (EROS); John Wiley & Sons, Ltd, 2005.
<https://doi.org/10.1002/047084289X.rm266m.pub2>.

- [110] Zhang, Y.; Zhao, F.; Deng, Y.; Zhao, Y.; Ren, H. Metagenomic and Metabolomic Analysis of the Toxic Effects of Trichloroacetamide-Induced Gut Microbiome and Urine Metabolome Perturbations in Mice. *J. Proteome Res.*, **2015**, *14* (4), 1752–1761. <https://doi.org/10.1021/pr5011263>.
- [111] Koizumi, M.; Yamamoto, Y.; Ito, Y.; Takano, M.; Enami, T.; Kamata, E.; Hasegawa, R. Comparative Study of Toxicity of 4-Nitrophenol and 2,4-Dinitrophenol in Newborn and Young Rats. *J. Toxicol. Sci.*, **2001**, *26* (5), 299–311. <https://doi.org/10.2131/jts.26.299>.
- [112] Hoffmann, R. Protecting-Group-Free Synthesis. *Synthesis*, **2006**, *2006* (21), 3531–3541. <https://doi.org/10.1055/s-2006-950311>.
- [113] Fraser, C.; Grubbs, R. H. Synthesis of Glycopolymers of Controlled Molecular Weight by Ring-Opening Metathesis Polymerization Using Well-Defined Functional Group Tolerant Ruthenium Carbene Catalysts <https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/ma00125a030> (accessed May 14, 2023). <https://doi.org/10.1021/ma00125a030>.
- [114] Nomura, K.; Schrock, R. R. Preparation of “Sugar-Coated” Homopolymers and Multiblock ROMP Copolymers. *Macromolecules*, **1996**, *29* (2), 540–545. <https://doi.org/10.1021/ma9512519>.
- [115] Ganda, S.; Jiang, Y.; Thomas, D. S.; Eliezar, J.; Stenzel, M. H. Biodegradable Glycopolymetric Micelles Obtained by RAFT-Controlled Radical Ring-Opening Polymerization. *Macromolecules*, **2016**, *49* (11), 4136–4146. <https://doi.org/10.1021/acs.macromol.6b00266>.
- [116] Zhao, J.; Babiuch, K.; Lu, H.; Dag, A.; Gottschaldt, M.; Stenzel, M. H. Fructose-Coated Nanoparticles: A Promising Drug Nanocarrier for Triple-Negative Breast Cancer Therapy. *Chem. Commun.*, **2014**, *50* (100), 15928–15931. <https://doi.org/10.1039/C4CC06651K>.
- [117] List, B.; Mitschke, B. The Steglich Esterification. *Synfacts*, **2019**, *15* (10), 1185. <https://doi.org/10.1055/s-0039-1690907>.
- [118] Menon, S.; Das, S. A Photoresponsive Fluorescent Glycopolymer. *Polym. Chem.*, **2012**, *3* (9), 2619–2624. <https://doi.org/10.1039/C2PY20375H>.
- [119] Kramer, J. R.; Deming, T. J. Glycopolypeptides via Living Polymerization of

- Glycosylated-L-Lysine N-Carboxyanhydrides. *J. Am. Chem. Soc.*, **2010**, *132* (42), 15068–15071. <https://doi.org/10.1021/ja107425f>.
- [120] Akai, S.; Kajihara, Y.; Nagashima, Y.; Kamei, M.; Arai, J.; Bito, M.; Sato, K. SYNTHESIS OF NEW GLYCOPOLYMERS CONTAINING β -D-MANNOPYRANOSE, AND C-2-SUBSTITUTED β -D-MANNOPYRANOSE RESIDUES AS A NEW CLASS OF INHIBITOR. *J. Carbohydr. Chem.*, **2006**. <https://doi.org/10.1081/CAR-100103953>.
- [121] Guo, J.; Ye, X.-S. Protecting Groups in Carbohydrate Chemistry: Influence on Stereoselectivity of Glycosylations. *Molecules*, **2010**, *15* (10), 7235–7265. <https://doi.org/10.3390/molecules15107235>.
- [122] Chen, Y.; Wulff, G. Amphiphilic Block Copolymers with Pendent Sugar as Hydrophilic Segments and Their Surface Properties. *Macromol. Chem. Phys.*, **2001**, *202* (17), 3273–3278. [https://doi.org/10.1002/1521-3935\(20011101\)202:17<3273::AID-MACP3273>3.0.CO;2-8](https://doi.org/10.1002/1521-3935(20011101)202:17<3273::AID-MACP3273>3.0.CO;2-8).
- [123] Chen, Y.; Wulff, G. Synthesis of Poly(Styryl Sugar)s by TEMPO Mediated Free Radical Polymerization. *Macromol. Chem. Phys.*, **2001**, *202* (17), 3426–3431. [https://doi.org/10.1002/1521-3935\(20011101\)202:17<3426::AID-MACP3426>3.0.CO;2-P](https://doi.org/10.1002/1521-3935(20011101)202:17<3426::AID-MACP3426>3.0.CO;2-P).
- [124] Saha, S.; Klein-Hitpaß, M.; Vallet, C.; Knauer, S. K.; Schmuck, C.; Voskuhl, J.; Giese, M. Smart GlycopolymERIC Nanoparticles for Multivalent Lectin Binding and Stimuli-Controlled Guest Release. *Biomacromolecules*, **2020**, *21* (6), 2356–2364. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.0c00292>.
- [125] Yilmaz, G.; Guler, E.; Geyik, C.; Demir, B.; Ozkan, M.; Demirkol, D. O.; Ozelik, S.; Timur, S.; Becer, C. R. PH Responsive Glycopolymer Nanoparticles for Targeted Delivery of Anti-Cancer Drugs. *Mol. Syst. Des. Eng.*, **2018**, *3* (1), 150–158. <https://doi.org/10.1039/C7ME00086C>.
- [126] Kobayashi, K.; Sumitomo, H.; Ina, Y. Synthesis and Functions of Polystyrene Derivatives Having Pendant Oligosaccharides. *Polym. J.*, **1985**, *17* (4), 567–575. <https://doi.org/10.1295/polymj.17.567>.
- [127] Deng, Z.; Ahmed, M.; Narain, R. Novel Well-Defined Glycopolymers Synthesized via the Reversible Addition Fragmentation Chain Transfer Process in Aqueous Media. *J. Polym. Sci. Part Polym. Chem.*, **2009**, *47* (2), 614–627. <https://doi.org/10.1002/pola.23187>.

- [128] Adharis, A.; Loos, K. Synthesis of Glycomonomers via Biocatalytic Methods. In *Methods in Enzymology*; Elsevier, 2019; Vol. 627, pp 215–247. <https://doi.org/10.1016/bs.mie.2019.04.015>.
- [129] Kaneko, Y.; Matsuda, S.; Kadokawa, J. Chemoenzymatic Syntheses of Amylose-Grafted Chitin and Chitosan. *Biomacromolecules*, **2007**, *8* (12), 3959–3964. <https://doi.org/10.1021/bm701000t>.
- [130] Ennist, J. H.; Termuehlen, H. R.; Bernhard, S. P.; Fricke, M. S.; Cloninger, M. J. Chemoenzymatic Synthesis of Galectin Binding Glycopolymers. *Bioconjug. Chem.*, **2018**, *29* (12), 4030–4039. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.8b00599>.
- [131] Boukerb, A. M.; Rousset, A.; Galanos, N.; Méar, J.-B.; Thépaut, M.; Grandjean, T.; Gillon, E.; Cecioni, S.; Abderrahmen, C.; Faure, K.; et al. Antiadhesive Properties of Glycoclusters against *Pseudomonas Aeruginosa* Lung Infection. *J. Med. Chem.*, **2014**, *57* (24), 10275–10289. <https://doi.org/10.1021/jm500038p>.
- [132] Zhu, J.; Xue, J.; Guo, Z.; Zhang, L.; Marchant, R. E. Biomimetic Glycoliposomes as Nanocarriers for Targeting P-Selectin on Activated Platelets. *Bioconjug. Chem.*, **2007**, *18* (5), 1366–1369. <https://doi.org/10.1021/bc700212b>.
- [133] Wang, Y.; Gu, L.; Xu, F.; Xin, F.; Ma, J.; Jiang, M.; Fang, Y. Chemoenzymatic Synthesis of Branched Glycopolymer Brushes as the Artificial Glycocalyx for Lectin Specific Binding. *Langmuir*, **2019**, *35* (13), 4445–4452. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.8b03704>.
- [134] Fang, Y.; Wu, J.; Xu, Z.-K. Dextranucrase-Catalyzed Elongation of Polysaccharide Brushes with Immobilized Mono-/Di-Saccharides as Acceptors. *Chem. Commun.*, **2015**, *51* (1), 129–132. <https://doi.org/10.1039/C4CC06137C>.
- [135] Rosengren, A.; J. Butler, S.; Arcos-Hernandez, M.; Bergquist, K.-E.; Jannasch, P.; Stålbrand, H. Enzymatic Synthesis and Polymerisation of β -Mannosyl Acrylates Produced from Renewable Hemicellulosic Glycans. *Green Chem.*, **2019**, *21* (8), 2104–2118. <https://doi.org/10.1039/C8GC03947J>.
- [136] Hoffmann, M.; Gau, E.; Braun, S.; Pich, A.; Elling, L. Enzymatic Synthesis of 2-(β -Galactosyl)-Ethyl Methacrylate by β -Galactosidase from *Pyrococcus Woesei* and Application for Glycopolymer Synthesis and Lectin Studies. *Biomacromolecules*, **2020**, *21* (2), 974–987. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.9b01647>.

- [137] Li, C.-J.; Trost, B. M. Green Chemistry for Chemical Synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **2008**, *105* (36), 13197–13202. <https://doi.org/10.1073/pnas.0804348105>.
- [138] Zimmerman, J. B.; Anastas, P. T.; Erythropel, H. C.; Leitner, W. Designing for a Green Chemistry Future. *Science*, **2020**, *367* (6476), 397–400. <https://doi.org/10.1126/science.aay3060>.
- [139] Tanaka, T.; Noguchi, M.; Kobayashi, A.; Shoda, S. A Novel Glycosyl Donor for Chemo-Enzymatic Oligosaccharide Synthesis: 4,6-Dimethoxy-1,3,5-Triazin-2-Yl Glycoside. *Chem. Commun.*, **2008**, No. 17, 2016–2018. <https://doi.org/10.1039/B801090K>.
- [140] Brady, R. F. Cyclic Acetals of Ketoses: Part III. Re-Investigation of the Synthesis of the Isomeric DI-O-Isopropylidene- β -D-Fructopyranoses. *Carbohydr. Res.*, **1970**, *15* (1), 35–40. [https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(00\)80291-8](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(00)80291-8).
- [141] Yousefi, S.; Bayat, S.; Rahman, M. B. A.; Ibrahim, Z.; Abdulmalek, E. Synthesis and in Vitro Bioactivity Evaluation of New Galactose and Fructose Ester Derivatives of 5-Aminosalicylic Acid. *Chem. Biodivers.*, **2017**, *14* (4), e1600362. <https://doi.org/10.1002/cbdv.201600362>.
- [142] Serra, F.; Coutrot, P.; Estève-Quellejeu, M.; Herson, P.; Olszewski, T. K.; Grison, C. Diastereoselective Synthesis of Lincosamine Precursors. *Eur. J. Org. Chem.*, **2011**, *2011* (10), 1841–1847. <https://doi.org/10.1002/ejoc.201001740>.
- [143] Castrejón Carrillo, S.; López-Munguía Canales, A.; Universidad, N. A. de M.; Universidad, N. A. de M.; Universidad, N. A. de M. Estudio de Las Interacciones Proteína-Proteína Sobre El Tamaño y La Distribución Del Peso Molecular de La Levana Sintetizada Por SACB de Bacillus Subtilis 168. Maestría en Ciencias Bioquímicas, 2021.
- [144] Hoye, T. R.; Hanson, P. R.; Vyvyan, J. R. A Practical Guide to First-Order Multiplet Analysis in ^1H NMR Spectroscopy. *J. Org. Chem.*, **1994**, *59* (15), 4096–4103. <https://doi.org/10.1021/jo00094a018>.
- [145] Mann, B. E. The Analysis of First-Order Coupling Patterns in NMR Spectra. *J. Chem. Educ.*, **1995**, *72* (7), 614. <https://doi.org/10.1021/ed072p614>.
- [146] Bermúdez, C.; Peña, I.; Cabezas, C.; Daly, A. M.; Alonso, J. L. Unveiling the Sweet Conformations of D-Fructopyranose. *ChemPhysChem*, **2013**, *14* (5), 893–895.

<https://doi.org/10.1002/cphc.201300057>.

- [147] Midland, M. M.; Beck, J. J.; Peters, J. L.; Rennels, R. A.; Asirwatham, G. Synthesis and Conformational Analysis of 1,2:3,4-Di-O-Isopropylidene-Alpha-D-Galactopyranose: A Nuclear Magnetic Resonance and Molecular Modeling Experiment. *J. Chem. Educ.*, **1994**, *71* (10), 897. <https://doi.org/10.1021/ed071p897>.
- [148] O'Donoghue, P.; Luthey-Schulten, Z. A. Barriers to Forced Transitions in Polysaccharides. *J. Phys. Chem. B*, **2000**, *104* (44), 10398–10405. <https://doi.org/10.1021/jp002478v>.
- [149] Roslund, M. U.; Klika, K. D.; Lehtilä, R. L.; Tähtinen, P.; Sillanpää, R.; Leino, R. Conformation of the Galactose Ring Adopted in Solution and in Crystalline Form as Determined by Experimental and DFT ¹H NMR and Single-Crystal X-Ray Analysis. *J. Org. Chem.*, **2004**, *69* (1), 18–25. <https://doi.org/10.1021/jo035400u>.
- [150] 1-O-Vinyl Glycosides via Tebbe Olefination, Their Use as Chiral Auxiliaries and Monomers | The Journal of Organic Chemistry https://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/jo0600510?casa_token=jONL4xY15AEAAAAA%3AtpVqwOFZ76Y_MA7rsaf3l_EhLcY7qBJdOvwrdgVj4poMBxjIAZcOEDtM006NhvN2krvAWbMSMXCgndAs# (accessed Oct 10, 2022).
- [151] M. Alder, C.; D. Hayler, J.; K. Henderson, R.; M. Redman, A.; Shukla, L.; E. Shuster, L.; F. Sneddon, H. Updating and Further Expanding GSK's Solvent Sustainability Guide. *Green Chem.*, **2016**, *18* (13), 3879–3890. <https://doi.org/10.1039/C6GC00611F>.
- [152] Durand, E.; Lecomte, J.; Villeneuve, P. From Green Chemistry to Nature: The Versatile Role of Low Transition Temperature Mixtures. *Biochimie*, **2016**, *120*, 119–123. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2015.09.019>.
- [153] Hu, H.-C.; Liu, Y.-H.; Li, B.-L.; Cui, Z.-S.; Zhang, Z.-H. Deep Eutectic Solvent Based on Choline Chloride and Malonic Acid as an Efficient and Reusable Catalytic System for One-Pot Synthesis of Functionalized Pyrroles. *RSC Adv.*, **2015**, *5* (10), 7720–7728. <https://doi.org/10.1039/C4RA13577F>.
- [154] Fang, T. T.; Bendiak, B. The Stereochemical Dependence of Unimolecular Dissociation of Monosaccharide-Glycolaldehyde Anions in the Gas Phase: A Basis for Assignment of the Stereochemistry and Anomeric Configuration of

- Monosaccharides in Oligosaccharides by Mass Spectrometry via a Key Discriminatory Product Ion of Disaccharide Fragmentation, *m/z* 221. *J. Am. Chem. Soc.*, **2007**, *129* (31), 9721–9736. <https://doi.org/10.1021/ja0717313>.
- [155] Fischer, E.; Helferich, B. Über neue synthetische Glucoside¹. In *Untersuchungen Über Kohlenhydrate und Fermente II (1908 – 1919)*; Fischer, E., Bergmann, M., Eds.; Springer: Berlin, Heidelberg, 1922; pp 23–39. https://doi.org/10.1007/978-3-642-99497-5_3.
- [156] Haese, M.; Winterhalter, K.; Jung, J.; Schmidt, M. S. Like Visiting an Old Friend: Fischer Glycosylation in the Twenty-First Century: Modern Methods and Techniques. *Top. Curr. Chem.*, **2022**, *380* (4), 26. <https://doi.org/10.1007/s41061-022-00383-9>.
- [157] Zhu, Y.; Zajicek, J.; Serianni, A. S. Acyclic Forms of [1-¹³C]Aldohexoses in Aqueous Solution: Quantitation by ¹³C NMR and Deuterium Isotope Effects on Tautomeric Equilibria. *J. Org. Chem.*, **2001**, *66* (19), 6244–6251. <https://doi.org/10.1021/jo010541m>.
- [158] Williams, C.; Allerhand, A. Detection of β-d-Glucofuranose in Aqueous Solutions of d-Glucose. Application of Carbon-13 Fourier-Transform n.m.r. Spectroscopy. *Carbohydr. Res.*, **1977**, *56* (1), 173–179. [https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(00\)84250-0](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(00)84250-0).
- [159] Wu, M.; Zhou, W.; Pedersen, C. M.; Ma, H.; Qiao, Y.; Guo, X.; Hou, X.; Wang, Y. Isomeric Distribution of Monosaccharides in Deep Eutectic Solvents: NMR Study. *J. Mol. Liq.*, **2018**, *255*, 244–249. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2018.01.166>.
- [160] Juneidi, I.; Hayyan, M.; Mohd Ali, O. Toxicity Profile of Choline Chloride-Based Deep Eutectic Solvents for Fungi and Cyprinus Carpio Fish. *Environ. Sci. Pollut. Res.*, **2016**, *23* (8), 7648–7659. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-6003-4>.
- [161] Skulcova, A.; Russ, A.; Jablonsky, M.; Sima, J. The PH Behavior of Seventeen Deep Eutectic Solvents. *BioResources*, **2018**, *13* (3), 5042–5051. <https://doi.org/10.15376/biores.13.3.5042-5051>.
- [162] Moss, G. P. Basic terminology of stereochemistry (IUPAC Recommendations 1996). *Pure Appl. Chem.*, **1996**, *68* (12), 2193–2222. <https://doi.org/10.1351/pac199668122193>.
- [163] Bornaghi, L. F.; Poulsen, S.-A. Microwave-Accelerated Fischer Glycosylation.

- Tetrahedron Lett.*, **2005**, *46* (20), 3485–3488.
<https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2005.03.126>.
- [164] Roy, B.; Mukhopadhyay, B. Sulfuric Acid Immobilized on Silica: An Excellent Catalyst for Fischer Type Glycosylation. *Tetrahedron Lett.*, **2007**, *48* (22), 3783–3787. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2007.03.165>.
- [165] Shaikh, N.; Russo, L.; Cipolla, L.; Nicotra, F. Ultrasonic Assisted Fischer Glycosylation: Generating Diversity for Glycochemistry. *Mol. Divers.*, **2011**, *15* (2), 341–345. <https://doi.org/10.1007/s11030-010-9281-2>.
- [166] Wessel, H. P. Use of Trifluoromethanesulfonic Acid in Fischer Glycosylations. *J. Carbohydr. Chem.*, **1988**, *7* (1), 263–269. <https://doi.org/10.1080/07328308808058919>.
- [167] Zolfigol, M. A. Silica Sulfuric Acid/NaNO₂ as a Novel Heterogeneous System for Production of Thionitrites and Disulfides under Mild Conditions. *Tetrahedron*, **2001**, *57* (46), 9509–9511. [https://doi.org/10.1016/S0040-4020\(01\)00960-7](https://doi.org/10.1016/S0040-4020(01)00960-7).
- [168] Kapias, T.; Griffiths, R. F. Spill Behaviour Using REACTPOOL: Part I. Results for Accidental Releases of Chlorosulphonic Acid (HSO₃Cl). *J. Hazard. Mater.*, **2001**, *81* (1), 19–30. [https://doi.org/10.1016/S0304-3894\(00\)00295-8](https://doi.org/10.1016/S0304-3894(00)00295-8).
- [169] Thakur, S. A.; Flake, G. P.; Travlos, G. S.; Dill, J. A.; Grumbein, S. L.; Harbo, S. J.; Hooth, M. J. Evaluation of Propargyl Alcohol Toxicity and Carcinogenicity in F344/N Rats and B6C3F1/N Mice Following Whole-Body Inhalation Exposure. *Toxicology*, **2013**, *314* (1), 100–111. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2013.09.002>.
- [170] Ohno, Y.; Ormstad, K.; Ross, D.; Orrenius, S. Mechanism of Allyl Alcohol Toxicity and Protective Effects of Low-Molecular-Weight Thiols Studies with Isolated Rat Hepatocytes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **1985**, *78* (2), 169–179. [https://doi.org/10.1016/0041-008X\(85\)90281-9](https://doi.org/10.1016/0041-008X(85)90281-9).
- [171] Rauter, A. P.; Almeida, T.; Xavier, N. M.; Siopa, F.; Vicente, A. I.; Lucas, S. D.; Marques, J. P.; Ramôa Ribeiro, F.; Guisnet, M.; Ferreira, M. J. Acid Zeolites as Efficient Catalysts for O- and S-Glycosylation. *J. Mol. Catal. Chem.*, **2007**, *275* (1), 206–213. <https://doi.org/10.1016/j.molcata.2007.06.002>.
- [172] Augé, J.; Sizun, G. Ionic Liquid Promoted Atom Economic Glycosylation under Lewis Acid Catalysis. *Green Chem.*, **2009**, *11* (8), 1179–1183.

<https://doi.org/10.1039/B904692E>.

- [173] Polanki, I. K.; Kurma, S. H.; Bhattacharya, A. K. Direct Glycosylation of Unprotected and Unactivated Sugars Using Bismuth Nitrate Pentahydrate. *J. Carbohydr. Chem.*, **2015**, *34* (4), 196–205. <https://doi.org/10.1080/07328303.2015.1028585>.
- [174] Manhas, S.; Taylor, M. S. Boronic Acids as Phase-Transfer Reagents for Fischer Glycosidations in Low-Polarity Solvents. *J. Org. Chem.*, **2017**, *82* (21), 11406–11417. <https://doi.org/10.1021/acs.joc.7b01880>.
- [175] Alkhatib, I. I. I.; Bahamon, D.; Llovel, F.; Abu-Zahra, M. R. M.; Vega, L. F. Perspectives and Guidelines on Thermodynamic Modelling of Deep Eutectic Solvents. *J. Mol. Liq.*, **2020**, *298*, 112183. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2019.112183>.
- [176] Guajardo, N.; Müller, C. R.; Schrebler, R.; Carlesi, C.; Domínguez de María, P. Deep Eutectic Solvents for Organocatalysis, Biotransformations, and Multistep Organocatalyst/Enzyme Combinations. *ChemCatChem*, **2016**, *8* (6), 1020–1027. <https://doi.org/10.1002/cctc.201501133>.
- [177] Guchhait, G.; Misra, A. K. Efficient Glycosylation of Unprotected Sugars Using Sulfamic Acid: A Mild Eco-Friendly Catalyst. *Catal. Commun.*, **2011**, *14* (1), 52–57. <https://doi.org/10.1016/j.catcom.2011.07.016>.
- [178] Qin, H.; Hu, X.; Wang, J.; Cheng, H.; Chen, L.; Qi, Z. Overview of Acidic Deep Eutectic Solvents on Synthesis, Properties and Applications. *Green Energy Environ.*, **2020**, *5* (1), 8–21. <https://doi.org/10.1016/j.gee.2019.03.002>.
- [179] Gajula, S.; Inthumathi, K.; Arumugam, S. R.; Srinivasan, K. Strategic Designing on Selection of Solvent Systems for Conversion of Biomass Sugars to Furan Derivatives and Their Separation. *ACS Sustain. Chem. Eng.*, **2017**, *5* (6), 5373–5381. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.7b00681>.
- [180] Andreana, P. R.; Crich, D. Guidelines for O-Glycoside Formation from First Principles. *ACS Cent. Sci.*, **2021**, *7* (9), 1454–1462. <https://doi.org/10.1021/acscentsci.1c00594>.
- [181] Kafle, A.; Liu, J.; Cui, L. Controlling the Stereoselectivity of Glycosylation via Solvent Effects. *Can. J. Chem.*, **2016**, *94* (11), 894–901. <https://doi.org/10.1139/cjc-2016-0417>.
- [182] Nowicki, J.; Woch, J.; Mościpan, M.; Nowakowska-Bogdan, E. Micellar Effect on

- the Direct Fischer Synthesis of Alkyl Glucosides. *Appl. Catal. Gen.*, **2017**, *539*, 13–18. <https://doi.org/10.1016/j.apcata.2017.04.002>.
- [183] Benvenuti, L.; Zielinski, A. A. F.; Ferreira, S. R. S. Which Is the Best Food Emerging Solvent: IL, DES or NADES? *Trends Food Sci. Technol.*, **2019**, *90*, 133–146. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.06.003>.
- [184] Reichardt, C. Solvatochromic Dyes as Solvent Polarity Indicators. *Chem. Rev.*, **1994**, *94* (8), 2319–2358. <https://doi.org/10.1021/cr00032a005>.
- [185] Prat, D.; Hayler, J.; Wells, A. A Survey of Solvent Selection Guides. *Green Chem.*, **2014**, *16* (10), 4546–4551. <https://doi.org/10.1039/C4GC01149J>.
- [186] Ogawa, S.; Kawai, R.; Koga, M.; Asakura, K.; Takahashi, I.; Osanai, S. Oligosaccharide-Based Surfactant/Citric Acid Buffer System Stabilizes Lactate Dehydrogenase during Freeze-Drying and Storage without the Addition of Natural Sugar. *J. Oleo Sci.*, **2016**, *65* (6), 525–532. <https://doi.org/10.5650/jos.ess16007>.
- [187] Lundemo, P.; Adlercreutz, P.; Karlsson, E. N. Improved Transferase/Hydrolase Ratio through Rational Design of a Family 1 β -Glucosidase from *Thermotoga Neapolitana*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **2013**, *79* (11), 3400–3405. <https://doi.org/10.1128/AEM.00359-13>.
- [188] Rather, M. Y.; Ara, K. Z. G.; Nordberg Karlsson, E.; Adlercreutz, P. Characterization of Cyclodextrin Glycosyltransferases (CGTases) and Their Application for Synthesis of Alkyl Glycosides with Oligomeric Head Group. *Process Biochem.*, **2015**, *50* (5), 722–728. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2015.02.016>.
- [189] Hansson, T.; Adlercreutz, P. Enzymatic Synthesis of Hexyl Glycosides from Lactose At Low Water Activity and High Temperature Using Hyperthermostable β -Glucosidases. *Biocatal. Biotransformation*, **2002**, *20* (3), 167–178. <https://doi.org/10.1080/10242420290020697>.
- [190] Ljunger, G.; Adlercreutz, P.; Mattiasson, B. Enzymatic Synthesis of Octyl- β -Glucoside in Octanol at Controlled Water Activity. *Enzyme Microb. Technol.*, **1994**, *16* (9), 751–755. [https://doi.org/10.1016/0141-0229\(94\)90031-0](https://doi.org/10.1016/0141-0229(94)90031-0).
- [191] Svensson, D.; Ulvenlund, S.; Adlercreutz, P. Efficient Synthesis of a Long Carbohydrate Chain Alkyl Glycoside Catalyzed by Cyclodextrin Glycosyltransferase (CGTase). *Biotechnol. Bioeng.*, **2009**, *104* (5), 854–861.

<https://doi.org/10.1002/bit.22472>.

- [192] Svensson, D.; Ulvenlund, S.; Adlercreutz, P. Enzymatic Route to Alkyl Glycosides Having Oligomeric Head Groups. *Green Chem.*, **2009**, *11* (8), 1222–1226. <https://doi.org/10.1039/B904849A>.
- [193] van der Veen, B. A.; Uitdehaag, J. C. M.; Dijkstra, B. W.; Dijkhuizen, L. Engineering of Cyclodextrin Glycosyltransferase Reaction and Product Specificity. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Protein Struct. Mol. Enzymol.*, **2000**, *1543* (2), 336–360. [https://doi.org/10.1016/S0167-4838\(00\)00233-8](https://doi.org/10.1016/S0167-4838(00)00233-8).
- [194] Leemhuis, H.; Dijkhuizen, L. Engineering of Hydrolysis Reaction Specificity in the Transglycosylase Cyclodextrin Glycosyltransferase. *Biocatal. Biotransformation*, **2003**, *21* (4–5), 261–270. <https://doi.org/10.1080/10242420310001614333>.
- [195] E.norman, B.; Tjørgensen, S. Thermoanaerobacter Sp. CGTase : Its Properties and Application. *J. Jpn. Soc. Starch Sci.*, **1992**, *39* (2), 101–108. <https://doi.org/10.5458/jag1972.39.101>.
- [196] Benavent-Gil, Y.; Rosell, C. M.; Gilbert, E. P. Understanding CGTase Action through the Relationship between Starch Structure and Cyclodextrin Formation. *Food Hydrocoll.*, **2021**, *112*, 106316. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.106316>.
- [197] Kelly, R. M.; Leemhuis, H.; Rozeboom, H. J.; van Oosterwijk, N.; Dijkstra, B. W.; Dijkhuizen, L. Elimination of Competing Hydrolysis and Coupling Side Reactions of a Cyclodextrin Glucanotransferase by Directed Evolution. *Biochem. J.*, **2008**, *413* (3), 517–525. <https://doi.org/10.1042/BJ20080353>.
- [198] Pennec, A.; Legentil, L.; Herrera-Estrella, L.; Ferrières, V.; Chauvin, A.-L.; Nugier-Chauvin, C. Environmentally Benign Glycosylation of Aryl Pyranosides and Aryl/Alkyl Furanosides Demonstrating the Versatility of Thermostable CGTase from Thermoanaerobacterium Sp. *Green Chem.*, **2014**, *16* (8), 3803–3809. <https://doi.org/10.1039/C4GC00631C>.
- [199] Pelras, T.; Loos, K. Strategies for the Synthesis of Sequence-Controlled Glycopolymers and Their Potential for Advanced Applications. *Prog. Polym. Sci.*, **2021**, *117*, 101393. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2021.101393>.
- [200] Kloosterman, W. M. J.; Jovanovic, D.; Brouwer, S. G. M.; Loos, K. Amylase Catalyzed Synthesis of Glycosyl Acrylates and Their Polymerization. *Green Chem*,

- 2014, 16 (1), 203–210. <https://doi.org/10.1039/C3GC41471J>.
- [201] Larsson, J.; Svensson, D.; Adlercreutz, P. α -Amylase-Catalysed Synthesis of Alkyl Glycosides. *J. Mol. Catal. B Enzym.*, **2005**, 37 (1), 84–87. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2005.09.009>.
- [202] Kurashima, K.; Fujii, M.; Ida, Y.; Akita, H. Simple Synthesis of β -D-Glycopyranosides Using β -Glycosidase from Almonds. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*, **2004**, 52 (2), 270–275. <https://doi.org/10.1248/cpb.52.270>.
- [203] Meulenbeld, G. H.; de Roode, B. M.; Hartmans, S. Enzymatic Synthesis of Thioglucosides Using Almond β -Glucosidase. *Biocatal. Biotransformation*, **2002**, 20 (4), 251–256. <https://doi.org/10.1080/10242420290029490>.
- [204] Ajisaka, K.; Nishida, H.; Fujimoto, H. The Synthesis of Oligosaccharides by the Reversed Hydrolysis Reaction of β -Glucosidase at High Substrate Concentration and at High Temperature. *Biotechnol. Lett.*, **1987**, 9 (4), 243–248. <https://doi.org/10.1007/BF01027157>.
- [205] Wang, F.; Ma, Y.; Liu, Y.-H.; Zhang, X.; Zhang, F.; Linhardt, R. J. Improved Octyl Glucoside Synthesis Using Immobilized β -Glucosidase on PA-M with Reduced Glucose Surplus Inhibition. *Biocatal. Biotransformation*, **2017**, 35 (5), 349–362. <https://doi.org/10.1080/10242422.2017.1345886>.
- [206] Tanaka, T.; Matsuura, A.; Aso, Y.; Ohara, H. Aqueous One-Pot Synthesis of Glycopolymers by Glycosidase-Catalyzed Glycomonomer Synthesis Using 4,6-Dimethoxy Triazinyl Glycoside Followed by Radical Polymerization. *J. Appl. Glycosci.*, **2020**, 67 (4), 119–127. https://doi.org/10.5458/jag.jag.JAG-2020_0010.
- [207] Falchi, A.; Giacomelli, G.; Porcheddu, A.; Taddei, M. 4-(4,6-Dimethoxy[1,3,5]Triazin-2-Yl)-4-Methyl-Morpholinium Chloride (DMTMM): A Valuable Alternative to PyBOP for Solid Phase Peptide Synthesis. *Synlett*, **2000**, 2000 (2), 275–277. <https://doi.org/10.1055/s-2000-6490>.
- [208] Erich, S.; Kuschel, B.; Schwarz, T.; Ewert, J.; Böhmer, N.; Niehaus, F.; Eck, J.; Lutz-Wahl, S.; Stressler, T.; Fischer, L. Novel High-Performance Metagenome β -Galactosidases for Lactose Hydrolysis in the Dairy Industry. *J. Biotechnol.*, **2015**, 210, 27–37. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2015.06.411>.
- [209] Martínez-Villaluenga, C.; Cardelle-Cobas, A.; Corzo, N.; Olano, A.; Villamiel, M.

- Optimization of Conditions for Galactooligosaccharide Synthesis during Lactose Hydrolysis by β -Galactosidase from *Kluyveromyces Lactis* (Lactozym 3000 L HP G). *Food Chem.*, **2008**, *107* (1), 258–264. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.08.011>.
- [210] Botvynko, A.; Bednářová, A.; Henke, S.; Shakhno, N.; Čurda, L. Production of Galactooligosaccharides Using Various Combinations of the Commercial β -Galactosidases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2019**, *517* (4), 762–766. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2019.08.001>.
- [211] Fischer, C.; Kleinschmidt, T. Synthesis of Galactooligosaccharides in Milk and Whey: A Review. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.*, **2018**, *17* (3), 678–697. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12344>.
- [212] Xavier, J. R.; Ramana, K. V.; Sharma, R. K. β -Galactosidase: Biotechnological Applications in Food Processing. *J. Food Biochem.*, **2018**, *42* (5), e12564. <https://doi.org/10.1111/jfbc.12564>.
- [213] Herrera-González, A.; Núñez-López, G.; Morel, S.; Amaya-Delgado, L.; Sandoval, G.; Gschaedler, A.; Remaud-Simeon, M.; Arrizon, J. Functionalization of Natural Compounds by Enzymatic Fructosylation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **2017**, *101* (13), 5223–5234. <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8359-5>.
- [214] Li, W.; Yu, S.; Zhang, T.; Jiang, B.; Mu, W. Recent Novel Applications of Levansucrases. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **2015**, *99* (17), 6959–6969. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6797-5>.
- [215] Mena-Arizmendi, A.; Alderete, J.; Águila, S.; Marty, A.; Miranda-Molina, A.; López-Munguía, A.; Castillo, E. Enzymatic Fructosylation of Aromatic and Aliphatic Alcohols by *Bacillus Subtilis* Levansucrase: Reactivity of Acceptors. *J. Mol. Catal. B Enzym.*, **2011**, *70* (1), 41–48. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2011.02.002>.
- [216] Seibel, J.; Moraru, R.; Götze, S.; Buchholz, K.; Na'amnieh, S.; Pawlowski, A.; Hecht, H.-J. Synthesis of Sucrose Analogues and the Mechanism of Action of *Bacillus Subtilis* Fructosyltransferase (Levansucrase). *Carbohydr. Res.*, **2006**, *341* (14), 2335–2349. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2006.07.001>.
- [217] Porras-Domínguez, J. R.; Rodríguez-Alegría, M. E.; Ávila-Fernández, Á.; Montiel-Salgado, S.; López-Munguía, A. Levan-Type Fructooligosaccharides Synthesis by a Levansucrase-Endolevanase Fusion Enzyme (LevB1SacB). *Carbohydr. Polym.*,

- 2017, 177, 40–48. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.08.040>.
- [218] Redaelli, F.; Sorbona, M.; Rossi, F. 10 - Synthesis and Processing of Hydrogels for Medical Applications. In *Bioresorbable Polymers for Biomedical Applications*; Perale, G., Hilborn, J., Eds.; Woodhead Publishing, 2017; pp 205–228. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100262-9.00010-0>.
- [219] Kim, J. J.; Park, K. Modulated Insulin Delivery from Glucose-Sensitive Hydrogel Dosage Forms. *J. Controlled Release*, **2001**, *77* (1–2), 39–47. [https://doi.org/10.1016/S0168-3659\(01\)00447-3](https://doi.org/10.1016/S0168-3659(01)00447-3).
- [220] Obaidat, A. A.; Park, K. Characterization of Glucose Dependent Gel-Sol Phase Transition of the Polymeric Glucose-Concanavalin A Hydrogel System. *Pharm. Res.*, **1996**, *13* (7), 989–995. <https://doi.org/10.1023/A:1016090103979>.
- [221] Poljanšek, I.; Krajnc, M. Characterization of Phenol-Formaldehyde Prepolymer Resins by In Line FT-IR Spectroscopy. *Acta Chim Slov*, **2005**, *7*.
- [222] Shea, K. J.; Sasaki, D. Y. An Analysis of Small-Molecule Binding to Functionalized Synthetic Polymers by ¹³C CP/MAS NMR and FT-IR Spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.*, **1991**, *113* (11), 4109–4120. <https://doi.org/10.1021/ja00011a009>.
- [223] Katsara, K.; Kenanakis, G.; Viskadourakis, Z.; Papadakis, V. M. Polyethylene Migration from Food Packaging on Cheese Detected by Raman and Infrared (ATR/FT-IR) Spectroscopy. *Materials*, **2021**, *14* (14), 3872. <https://doi.org/10.3390/ma14143872>.
- [224] Ibrahim, M.; Alaam, M.; El-Haes, H.; Jalbout, A. F.; Leon, A. de. Analysis of the Structure and Vibrational Spectra of Glucose and Fructose. *Eclética Quím.*, **2006**, *31*, 15–21. <https://doi.org/10.1590/S0100-46702006000300002>.
- [225] Mellado-Mojica, E.; Calvo-Gómez, O.; Jofre-Garfias, A. E.; Dávalos-González, P. A.; Desjardins, Y.; López, M. G. Fructooligosaccharides as Molecular Markers of Geographic Origin, Growing Region, Genetic Background and Prebiotic Potential in Strawberries: A TLC, HPAEC-PAD and FTIR Study. *Food Chem. Adv.*, **2022**, *1*, 100064. <https://doi.org/10.1016/j.focha.2022.100064>.
- [226] Mellado-Mojica, E.; Seeram, N. P.; López, M. G. Comparative Analysis of Maple Syrups and Natural Sweeteners: Carbohydrates Composition and Classification (Differentiation) by HPAEC-PAD and FTIR Spectroscopy-Chemometrics. *J. Food Compos. Anal.*, **2016**, *52*, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2016.07.001>.

- [227] Wang, J.; Kliks, M. M.; Jun, S.; Jackson, M.; Li, Q. X. Rapid Analysis of Glucose, Fructose, Sucrose, and Maltose in Honeys from Different Geographic Regions Using Fourier Transform Infrared Spectroscopy and Multivariate Analysis. *J. Food Sci.*, **2010**, *75* (2), C208–C214. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2009.01504.x>.
- [228] Kačuráková, M.; Wilson, R. H. Developments in Mid-Infrared FT-IR Spectroscopy of Selected Carbohydrates. *Carbohydr. Polym.*, **2001**, *44* (4), 291–303. [https://doi.org/10.1016/S0144-8617\(00\)00245-9](https://doi.org/10.1016/S0144-8617(00)00245-9).
- [229] Åkerholm, M.; Salmén, L. Interactions between Wood Polymers Studied by Dynamic FT-IR Spectroscopy. *Polymer*, **2001**, *42* (3), 963–969. [https://doi.org/10.1016/S0032-3861\(00\)00434-1](https://doi.org/10.1016/S0032-3861(00)00434-1).
- [230] Åkerholm, M.; Hinterstoisser, B.; Salmén, L. Characterization of the Crystalline Structure of Cellulose Using Static and Dynamic FT-IR Spectroscopy. *Carbohydr. Res.*, **2004**, *339* (3), 569–578. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2003.11.012>.
- [231] Dong, C.-M.; Sun, X.-L.; Faucher, K. M.; Apkarian, R. P.; Chaikof, E. L. Synthesis and Characterization of Glycopolymer-Polypeptide Triblock Copolymers. *Biomacromolecules*, **2004**, *5* (1), 224–231. <https://doi.org/10.1021/bm0343500>.
- [232] Nasiri Oskooie, M.; Pooresmaeil, M.; Namazi, H. Design and Synthesis of Vinyllic Glycomonomers and Glycopolymer Based on α -D-Glucofuranose Moieties. *J. Polym. Res.*, **2019**, *26* (12), 268. <https://doi.org/10.1007/s10965-019-1969-0>.
- [233] FTIR Analysis & Testing—Applications Guide | Agilent <https://www.agilent.com/en/product/molecular-spectroscopy/ftir-spectroscopy/ftir-analysis-applications> (accessed Jun 3, 2023).
- [234] Vahur, S.; Teearu, A.; Peets, P.; Joosu, L.; Leito, I. ATR-FT-IR Spectral Collection of Conservation Materials in the Extended Region of 4000-80 cm^{-1} . *Anal. Bioanal. Chem.*, **2016**, *408* (13), 3373–3379. <https://doi.org/10.1007/s00216-016-9411-5>.
- [235] Jemison, H. B.; Burr, B. L.; Davison, R. R.; Bullin, J. A.; Glover, C. J. Application and Use of the ATR, FT-IR Method to Asphalt Aging Studies. In *Fuel science & technology international*; 1992; Vol. 10, pp 795–808.
- [236] Mistek, E.; Lednev, I. K. Identification of Species' Blood by Attenuated Total

- Reflection (ATR) Fourier Transform Infrared (FT-IR) Spectroscopy. *Anal. Bioanal. Chem.*, **2015**, 407 (24), 7435–7442. <https://doi.org/10.1007/s00216-015-8909-6>.
- [237] Vahur, S.; Knuutinen, U.; Leito, I. ATR-FT-IR Spectroscopy in the Region of 500–230cm⁻¹ for Identification of Inorganic Red Pigments. *Spectrochim. Acta. A. Mol. Biomol. Spectrosc.*, **2009**, 73 (4), 764–771. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2009.03.027>.
- [238] Gómez-Ordóñez, E.; Rupérez, P. FTIR-ATR Spectroscopy as a Tool for Polysaccharide Identification in Edible Brown and Red Seaweeds. *Food Hydrocoll.*, **2011**, 25 (6), 1514–1520. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2011.02.009>.
- [239] Heperkan, Z. D.; Bolluk, M.; Bülbül, S. Structural Analysis and Properties of Dextran Produced by *Weissella Confusa* and the Effect of Different Cereals on Its Rheological Characteristics. *Int. J. Biol. Macromol.*, **2020**, 143, 305–313. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.12.036>.
- [240] Galat, A. Study of the Raman Scattering and Infrared Absorption Spectra of Branched Polysaccharides. *Acta Biochim. Pol.*, **1980**, 27 (2).
- [241] Synytsya, A.; Novak, M. Structural Analysis of Glucans. *Ann. Transl. Med.*, **2014**, 2 (2), 17. <https://doi.org/10.3978/j.issn.2305-5839.2014.02.07>.
- [242] Wiercigroch, E.; Szafraniec, E.; Czamara, K.; Pacia, M. Z.; Majzner, K.; Kochan, K.; Kaczor, A.; Baranska, M.; Malek, K. Raman and Infrared Spectroscopy of Carbohydrates: A Review. *Spectrochim. Acta. A. Mol. Biomol. Spectrosc.*, **2017**, 185, 317–335. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2017.05.045>.
- [243] Söderholm, S.; Roos, Y. H.; Meinander, N.; Hotokka, M. Raman Spectra of Fructose and Glucose in the Amorphous and Crystalline States. *J. Raman Spectrosc.*, **1999**, 30 (11), 1009–1018. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4555\(199911\)30:11<1009::AID-JRS436>3.0.CO;2-#](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4555(199911)30:11<1009::AID-JRS436>3.0.CO;2-#).
- [244] Vasko, P. D.; Blackwell, J.; Koenig, J. L. Infrared and Raman Spectroscopy of Carbohydrates.: Part II: Normal Coordinate Analysis of α -D-Glucose. *Carbohydr. Res.*, **1972**, 23 (3), 407–416. [https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(00\)82690-7](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(00)82690-7).
- [245] De Gussem, K.; Vandenabeele, P.; Verbeken, A.; Moens, L. Raman Spectroscopic Study of *Lactarius* Spores (Russulales, Fungi). *Spectrochim. Acta.*

- A. *Mol. Biomol. Spectrosc.*, **2005**, *61* (13), 2896–2908.
<https://doi.org/10.1016/j.saa.2004.10.038>.
- [246] Purama, R. K.; Goswami, P.; Khan, A. T.; Goyal, A. Structural Analysis and Properties of Dextran Produced by *Leuconostoc Mesenteroides* NRRL B-640. *Carbohydr. Polym.*, **2009**, *76* (1), 30–35.
<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2008.09.018>.
- [247] Kuperkar, K.; Patel, D.; Atanase, L. I.; Bahadur, P. Amphiphilic Block Copolymers: Their Structures, and Self-Assembly to Polymeric Micelles and Polymersomes as Drug Delivery Vehicles. *Polymers*, **2022**, *14* (21), 4702.
<https://doi.org/10.3390/polym14214702>.
- [248] Matsumoto, A. Polymerization of Multiallyl Monomers. *Prog. Polym. Sci.*, **2001**, *26* (2), 189–257. [https://doi.org/10.1016/S0079-6700\(00\)00039-3](https://doi.org/10.1016/S0079-6700(00)00039-3).
- [249] Suriano, F.; Pratt, R.; Tan, J. P. K.; Wiradharma, N.; Nelson, A.; Yang, Y.-Y.; Dubois, P.; Hedrick, J. L. Synthesis of a Family of Amphiphilic Glycopolymers via Controlled Ring-Opening Polymerization of Functionalized Cyclic Carbonates and Their Application in Drug Delivery. *Biomaterials*, **2010**, *31* (9), 2637–2645.
<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.12.022>.
- [250] Zheng, C.; Guo, Q.; Wu, Z.; Sun, L.; Zhang, Z.; Li, C.; Zhang, X. Amphiphilic Glycopolymer Nanoparticles as Vehicles for Nasal Delivery of Peptides and Proteins. *Eur. J. Pharm. Sci.*, **2013**, *49* (4), 474–482.
<https://doi.org/10.1016/j.ejps.2013.04.027>.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



Cuernavaca, Mor., a 25 de octubre de 2023

DRA. LINA ANDREA RIVILLAS ACEVEDO
COORDINADORA DEL POSGRADO EN CIENCIAS
P R E S E N T E

Atendiendo a la solicitud para emitir DICTAMEN sobre la revisión de la tesis titulada: "**Síntesis quimioenzimática de glicopolímeros**", que presenta el alumno **Pedro Ángel Cid Jiménez** con matrícula (10046077) para obtener el título de **Maestro en Ciencias**.

Director de tesis: Dr. Edmundo Castillo Rosales
Unidad Académica: Instituto de Investigación en Ciencias Básicas y Aplicadas (IICBA)

Nos permitimos informarle que nuestro voto es:

NOMBRE	DICTAMEN	FIRMA
Dra. Laura Patricia Álvarez Berber CIQ-UAEM	APROBADO	
Dr. Jaime Escalante García CIQ-UAEM	APROBADO	
Dra. Marcela Ayala Aceves IBT-UNAM	APROBADO	
Dr. Agustín López-Munguía Canales IBT-UNAM	APROBADO	
Dra. Irma Linzaga Elizalde CIQ-UAEM	APROBADO	

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

LAURA PATRICIA ALVAREZ BERBER | Fecha:2023-10-26 12:10:32 | Firmante

XpfWGTWnC5AMgfNH84G0TmAQ5hPFollJM5plOVfCUD5dSZ61ATtDOXpVU7V4Qzn+70VIW+yywwfRp7ciWWcKADx09t5D9KvHsbThlWfBvBdFQObZGyl41U/PhRoDNZ4ynz of6XUnSF3SIA9FybZATb6xr03Pwx4lw4A12a43GazLufWtAYRAvB54hmY8n/IuLo8AonPVK2o7bf5p5pjE5M26Quu5B7EdjE82bm8n5RTW+7+asWu8sAurJTYTN/CsP333Zrx9m1 Y8IM51QON3SB3cPmCfI9HQDc2za+T1gxxug3bPuVCFprA714UN+AKm4wa89ld4GKu8KPCeFPBRg==

IRMA LINZAGA ELIZALDE | Fecha:2023-10-26 12:25:09 | Firmante

ojm1PomYbS3MT9+0bPKR7FvHD+Dd2Ec5fbHZ8P2E3YjsOH/AsySDaG1PXHY6s7cYyXdtc7AAJqd65uVfqxu6yR2Hi1KOV6w9kdK2DjF6jAm4qxa5M7jOk24aGuwuD4wpqxf ETogjEtfHmT9ZpD+rAISY3+SXgq1NCe4sMBT8ATuT9aQ6e+IjvHVd+wcQ+cvAKCF8IWA BhEtfQHzl+nFBI7f1bH6qYOfZHRUA/EcaCyyHm8aoNsRvjZeZnBUAMqMEbliE07oIER3 BVNM8n8/Vdfj/s0GmhktzLp2YjPo+yVkcukGIs6Zwmz+f4V0Oo1WDKLEolFouVZTNMA3HDDabA==

JAIME ESCALANTE GARCIA | Fecha:2023-10-26 13:05:58 | Firmante

RhLeqOzDikwIT2FhtG7MshnWBTu17iFe8G90x8wtv+kmwBPK5zdSUF7zj2j2oq/udvfhgfnHYKxi1AKVA9Z0z9IJT2tksUj/DHgbPPtkZwIlo9czISNXfBc5m68GaEADF4TuSr0BZOU Mjj8wex6/QyFGJfOPjYdvHL9StAawSdMJCaX+I1cq86W1x6xL/8Kbr2Sqxdqhhjs+0zkaJq2hymNqp8K6KxdArYqvUGMhJKf6Wf22d3TwOold+IU8WRaLlzJ4VDvuScIIOn78hTrdAa eJucAXouA12BN50Ukjm11nXOolNRmTHN+RSN/r1TP6xcsRILfA0WBzYMoVcTGA==

MARCELA AYALA ACEVES | Fecha:2023-10-26 13:23:29 | Firmante

BhAPvTMAC/ra7QyGJi1llw7wtTB3EVt+f+YN2JzrMkn/Iololv6oLTPVd+AHgyNm9/ozLW4L0R5qTD2H5MMbTjQpKsUdixK1DIWoVn1GM/+NicZUSTMvhgm1zJEW8T1O40sh+KUy IUymkn+NhQXEPcvkehNClxMaZNGpWLkLcZeFvpHd+iNyuiPTeEjP4aOqg/4BrX5R+i3S2GsYebblB6PFXObEsn9g1NsbWUz9ceEAAC4iNEtqKSY8J3BP9xHTZyAFHA1BDLF02f b4rkMzWLN5bdwpyWRBzUHCAyJW4FsO+WvGw9Ud661UukOFKmrFEyx69yUA6oT61XfMbBZVA==

AGUSTIN LOPEZ MUNGUIA CANALES | Fecha:2023-10-26 14:09:23 | Firmante

Q/oAUfy1p3z3yfe+FolUEs3tQCUESro28xvtT7poOq9nVktf3ywf9VIDwQwE4D5MbQkajPQzQCQFJ4TQJz5llkDNi2zCZp7FT9hkng9A1F/bVm7KISSbFruUxCw9cCTUUtwiZZW02O tAMi30cbZZuWrK8QdvpBdODTAdE43/VGMW02TWEixGNECCy6T+5zQZSkW6iHJFz6wD5k6Z2C8C7n5SwFfqpHtwrEtKhyar1/fyhyNAvCI50nqlkzoa8Hf8Aww5Ec1f/gx0+gNzH DtZ4nSliuyJliPw7JWq2vBfeXl7UkqOU1ms7mdBZCCkwh5VQISCVmydMoTs30elZ7g==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



XubZFz2vM

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/t0YgYMPCaeyaEjPH0t54dh4YNkWpxwx>



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

EDMUNDO CASTILLO ROSALES | Fecha:2023-11-07 21:18:42 | Firmante

YNScewAh7BNeHAQtRTi2aBMexVCCD8RdJ83m74cj/kbhyK1cdLYHvID257Me2Q59im0qHKfvgEfXEqhw01sLSM6Y1vd+ibEJm2hltkVqCmUn5AR6KK2pVLHV3tV//AdUES9V8Jds9lIV5fDBINf7BsEXbrJ5B/g/WMqRCYWjEYzPC9RMOqJzhfnR4Xy4tQrVGr8h6IHxcVJXo8GaYSONiqQ/dhaVS9SSNPZwywoqAmuN1YHTXiCNCvzEwd+bjvfkAlAF/qjGFBUKIObH4bJa9M+9N48CH8e2yk5MExNmXklqsgU5WboxAtGPbwRgPty9SKS5cOYblQ5vAFAGbt6g==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



37zQRMDpN

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/z2CPSpSSh7zdbe4xfbA3LklaFsUxVHgX>

