



INSTITUTO DE
TECNOLOGÍA
QUÍMICA



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



Universidad Politécnica de Valencia
Instituto de Tecnología Química (CSIC-UPV)

SÍNTESIS SOSTENIBLE DE GLICOESTRUCTURAS CON APLICACIÓN EN PROCESOS INFECCIOSOS

Trabajo de Fin de Máster
Máster en Química Sostenible
Curso 2018/2019

Esther Alemán Sierra

Dirigido por:

María José Hernáiz Gómez-Dégano

Pilar Hoyos Vidal

Almudena Perona Requena

RESUMEN Y PALABRAS CLAVE

La síntesis de glicoestructuras es un proceso complejo, que engloba numerosos pasos de protección, activación y desprotección por lo que es un campo donde podemos incorporar metodologías más sostenibles en sus procesos de producción. En este trabajo hemos puesto a punto una estrategia más sostenible para la síntesis de un glicodendrímico derivado del ácido glucurónico, mediante una reacción de *click chemistry*. Para ello hemos utilizado un derivado de ácido glucurónico funcionalizado con un grupo azida y un núcleo o *core* divalente funcionalizado con grupos alquino. Para llevar a cabo esta reacción hemos utilizado la mecanoquímica y los dispositivos microondas, en disolventes orgánicos convencionales y en disolventes sostenibles. De esta forma, hemos podido producir un glicodendrímico derivado del ácido glucurónico, con buenos rendimientos y selectividad, empleando procedimientos sintéticos más sostenibles como son la ausencia de disolvente, utilizar disolventes verdes, disminuir los tiempos de reacción y los requerimientos energéticos.

Palabras clave: química sostenible, glicoestructuras, ácido glucurónico, microondas, molino de bolas, *green solvents*, *click chemistry*.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Química sostenible: Principios con incidencia en microondas y mecanoquímica.....	4
1.2. Microondas aplicado a la síntesis de glicoestructuras mediante <i>click chemistry</i>	7
1.3. Mecanoquímica en la síntesis de glicoestructuras.....	13
2. OBJETIVOS	17
3. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL	18
3.1. Síntesis de sustratos de partida.....	20
A) Síntesis azida del ácido glucurónico (compuesto 1).....	20
B) Síntesis <i>core</i> funcionalizado con grupos alquino (compuesto 2).....	21
3.2. Reacciones de <i>click chemistry</i>	21
A) Reacción <i>click</i> en microondas.....	21
B) Reacción <i>click</i> en molino de bolas.....	21
C) Reacción <i>click</i> en disolventes sostenibles.....	23
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	24
4.1. Síntesis de sustratos de partida.....	25
A) Síntesis azida del ácido glucurónico (compuesto 1).....	25
B) Síntesis <i>core</i> funcionalizado con grupos alquino (compuesto 2).....	26
4.2. Reacciones de <i>click chemistry</i>	28
A) Reacción <i>click</i> en microondas.....	28
B) Reacción <i>click</i> en molino de bolas.....	30
C) Reacción <i>click</i> en disolventes sostenibles.....	33
5. CONCLUSIONES	36
6. BIBLIOGRAFÍA	38

1. INTRODUCCIÓN

Los carbohidratos están implicados en multitud de procesos biológicos y patológicos (1), entre los que cabe destacar el reconocimiento molecular para el tráfico intracelular y las interacciones entre organismos patógenos, como son los virus y las bacterias, y la superficie celular de los mamíferos. Por ello una de las aplicaciones más importantes de los glicoconjugados es el campo de la Biomedicina, ya que son una diana muy importante en el reconocimiento celular de virus, bacterias, toxinas y anticuerpos. Es por ello que suponen la primera línea de contacto para la adhesión y colonización tisular de numerosos patógenos que expresan proteínas de unión a carbohidratos (lectinas) en su superficie.

Normalmente los carbohidratos se encuentran en las membranas celulares (Figura 1) unidos covalentemente a otras moléculas como proteínas o lípidos, en forma de glicoproteínas, proteoglicanos o glicolípidos, formando lo que conocemos como glicoconjugados. En estos glicoconjugados se presentan unidades repetidas de un determinado patrón de glicosidación, que suele ser el responsable de gran parte de sus funciones biológicas (2). A esta presentación multivalente del patrón de glicosidación, se le conoce como multivalencia.

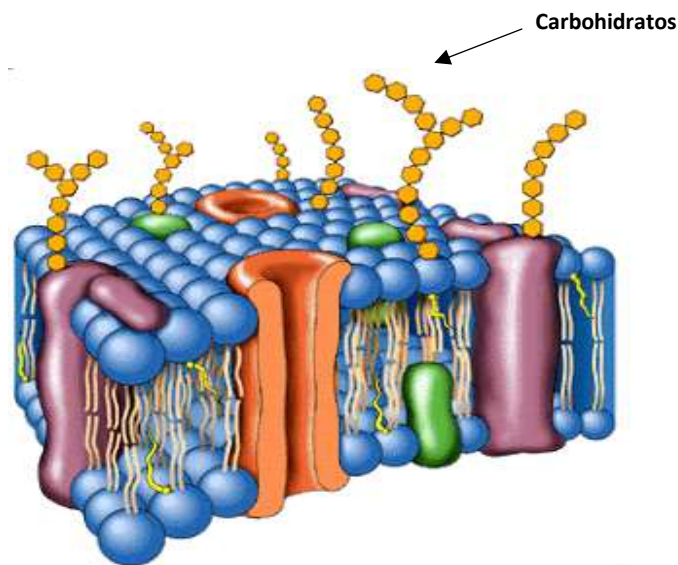


Figura 1. Carbohidratos en la membrana celular.

Generalmente, la valencia de un compuesto, como por ejemplo un oligosacárido o una proteína, puede ser definida como el número de unidades estructurales separadas de un mismo tipo, que pueden interactuar con otras partículas mediante uniones ligando-receptor. Las interacciones multivalentes pueden definirse como asociaciones simultáneas específicas de varios ligandos (carbohidratos), presentes en una construcción molecular o una superficie

biológica, y que se unen de forma cooperativa a múltiples receptores (proteínas) expresados en una unidad complementaria. La presencia de estas interacciones multivalentes en numerosos mecanismos biológicos, determinan su papel esencial (3,4). Estos compuestos presentan numerosas aplicaciones en diferentes sectores de la industria alimentaria, farmacéutica y química, así como en biomedicina, donde podemos encontrar derivados de carbohidratos como base de vacunas, fármacos o adyuvantes, así como formando complejos para administración dirigida de fármacos (5–7).

Los glicodendrimeros son glicoconjugados multivalentes de los correspondientes glicoconjugados naturales y pretenden mimetizar las estructuras complejas involucradas en los procesos de reconocimiento celular, así como el resto de procesos biológicos mediados por carbohidratos (8). Se trata de elementos mucho más fáciles de sintetizar en comparación con los glicoconjugados naturales y, además, permiten modificar con facilidad la simetría del armazón molecular, la longitud y propiedades del espaciador y el tamaño y número de epítopos sacarídicos. Por otro lado, permiten añadir grupos funcionales diferentes a los presentes en medios biológicos o fragmentos que ayuden a dirigir el compuesto hasta el tejido diana. Un ejemplo de estos neoglicoconjugados son los glicodendrimeros (8,9). Estos sistemas artificiales consisten fundamentalmente en soportes (*core*) sobre los que se unen varias copias del carbohidrato, originando así una presentación multivalente del mismo. La unión del carbohidrato al soporte se lleva a cabo a través del espaciador que proporciona el medio de anclaje, así como una separación suficiente entre el soporte y el ligando, para que el primero no interfiera en la interacción (8).

Los dendrimeros son macromoléculas altamente ramificadas con estructura casi globular, versátiles, derivatizables y bien definidos estructuralmente (monodispersos) con tamaños y propiedades fisicoquímicas que pueden parecerse mucho a biomoléculas como las glicoproteínas, proteoglicanos o glicolípidos (10–12). Desde su descubrimiento a finales de los años 70 por Buhleier, estas moléculas han demostrado ser compuestos con múltiples aplicaciones tanto en ciencia de materiales como en biología y biomedicina (13). La ventaja de los glicodendrimeros, frente a otros sistemas multivalentes con carbohidratos, es que se pueden preparar desde compuestos que presentan un número pequeño de unidades de carbohidrato, hasta sistemas que presentan un gran número de estos en la superficie. Es decir, el diseño puede ser ajustado a las características del receptor que se pretende estudiar.

Los glicodendrimeros pueden ser potencialmente empleados como agentes antimicrobianos en forma de vacunas frente a bacterias o virus. Para que este fenómeno pueda

tener lugar, es crucial que dichas estructuras puedan participar de forma adecuada en el proceso de reconocimiento molecular por el patógeno. En este sentido, la flexibilidad en la estructura de los glicodendrimeros y en la cadena espaciadora, que conecta el *core* y el carbohidrato, son fundamentales para el correcto reconocimiento del receptor en la célula y de esta forma poder diseñar posibles alternativas terapéuticas frente a infecciones bacterianas o víricas (14).

El virus del Dengue es un arbovirus del género *Flavivirus*, de la familia *Flaviviridae* (virus del tipo RNA), causante de la enfermedad del Dengue. Para ello se ha descrito que su receptor en las membranas celulares es un oligosacárido presente en el heparán sulfato, proteoglicano que se encuentra en las membranas celulares (15). Este heparán sulfato, está formado por unidades de disacárido ácido glucurónico- β (1,4)-N-acetilglucosamina- α (1,4) (GlcA β 1,4 GlcNAc α 1,4), y además, presenta un patrón de sulfatación específico lo que facilita la interacción entre proteínas que promueve la penetración del virus (16,17).

La enfermedad del Dengue es la principal patología transmitida por artrópodos en el mundo y su sintomatología va desde fiebre hasta un proceso generalizado de activación de la respuesta inmunitaria innata y adquirida (18).

La importancia de este trabajo radica en que un componente importante del heparán sulfato es el ácido glucurónico y, por tanto, sus derivados, por ello los compuestos propuestos aquí para su síntesis sostenible, pueden ser incorporados a una estructura dendrítica, obteniéndose así un compuesto análogo al heparán sulfato, capaz de inhibir el proceso de entrada del virus a la célula a infectar.

1.1. Química sostenible: Principios con incidencia en microondas y mecanoquímica

La síntesis química de oligosacáridos se caracteriza por múltiples pasos de protección y desprotección, siendo fundamental la correcta activación o protección de la posición anomérica (19). Un aspecto importante y limitante en la síntesis de este tipo de compuestos es el control de la regio y estereoselectividad, necesaria para obtener las moléculas de interés específicas para cada finalidad. Otra desventaja que presenta la aproximación química, es la elevada cantidad de residuos que se generan, así como el uso de compuestos contaminantes como parte del medio de reacción: precursores, disolventes contaminantes (disolventes halogenados), agentes oxidantes fuertes o sales de metales pesados como Hg^{2+} o Ag^+ . Por ello en muchas ocasiones el desarrollo de procesos clásicos para sintetizar glicoestructuras, resulta incompatible con la aplicación de los principios de la Química Sostenible: prevención, economía atómica, síntesis menos contaminantes y tóxicas, uso de disolventes y auxiliares más seguros, empleo de catalizadores y reducción de derivados. Por este motivo existe cada vez un mayor interés en el desarrollo de alternativas que permitan la obtención de este tipo de compuestos a través de estrategias menos contaminantes.

La Química Sostenible se define como el diseño de productos y procesos químicos que reducen o eliminan la generación de residuos y sustancias tóxicas (20). Es por ello que podemos considerar diversas alternativas a la síntesis de glicoestructuras, haciendo que se cumplan los principios de la química verde y evitando las metodologías más perjudiciales para el medioambiente, comentadas anteriormente. Algunas variantes sintéticas permiten el empleo de técnicas tales como la mecanoquímica (molino de bolas) o el microondas, que suponen importantes mejoras en el campo de la sostenibilidad, como son: la disminución del uso de disolventes, menores requerimientos energéticos para llevar a cabo la síntesis y la reducción en la producción de derivados y/o etapas intermedias de protección, desprotección o aislamiento. Además de las mejoras comentadas, este tipo de dispositivos, permiten el empleo de materias primas renovables a partir de las cuales podemos obtener los productos deseados de una forma viable tanto técnica como económicamente.

Además de la utilización de las técnicas anteriores, otro factor que permite aumentar la sostenibilidad de un proceso es el uso de disolventes menos contaminantes. Este tipo de medios, también denominados "*green solvents*", se caracterizan por presentar un punto de ebullición elevado, presión de vapor baja, escasa toxicidad, ser económicos, reciclables y con capacidad para disolver una gran variedad de compuestos orgánicos así, su utilización permite reducir el

impacto ambiental de los procesos químicos, manteniendo su eficacia (21,22). Es importante destacar que han sido muchas las reacciones llevadas a cabo empleando disolventes sostenibles en el campo de las glicoestructuras, sobre todo a la hora de trabajar con enzimas del tipo de las glicosidasas (22–28).

Se ha postulado que el disolvente más sostenible en sí mismo es evitar su propio uso (29), sin embargo, las reacciones en fase líquida presentan numerosas ventajas con respecto a los procedimientos en ausencia de medio de reacción; algunas de estas ventajas son:

- Las reacciones se dan a mayor velocidad y más fácilmente cuando los reactivos están disueltos, ya que se disminuyen las restricciones de transferencia de masa.
- El medio puede afectar al rendimiento y selectividad debido a los cambios en la solvatación de reactivos, intermedios y estados de transición.
- El disolvente es capaz de transferir calor evitando los cambios bruscos de temperatura.
- En muchas ocasiones, trabajar en medio líquido favorece la separación y purificación de los compuestos.

En la Unión Europea, es necesario que los disolventes cumplan una serie de características, que les hagan más seguros tanto ambientalmente como en lo referente a su uso. Tras esta consideración, y teniendo presentes algunos principios de la Química Sostenible (menor peligrosidad de las síntesis químicas, mayor seguridad de los productos generados y uso de disolventes más seguros) (20,30), se catalogan como *green solvents* los siguientes disolventes: el agua, los disolventes orgánicos obtenidos de fuentes renovables (conocidos como biodisolventes) y de bajo impacto ambiental, los medios fluorados, los líquidos iónicos y los fluidos supercríticos.

A diferencia de los disolventes convencionales obtenidos a partir de petroquímica en su mayoría, los disolventes verdes pueden ser obtenidos de fuentes renovables. De esta manera, constituyen en sí mismos una forma de reducir residuos, debido a que convierten un potencial agente contaminante en un nuevo disolvente. Existen varios disolventes procedentes de fuentes renovables de uso muy extendido como son biometanol y bioetanol, ya que se producen en grandes cantidades en la fermentación de azúcares (biomasa) y son sustancias fácilmente biodegradables (31,32). También cabe mencionar otros biodisolventes como el bioglicerol, principal subproducto del biodiesel (33–35), metil-THF, isosorbida o valerolactona (22) (Figura 2).

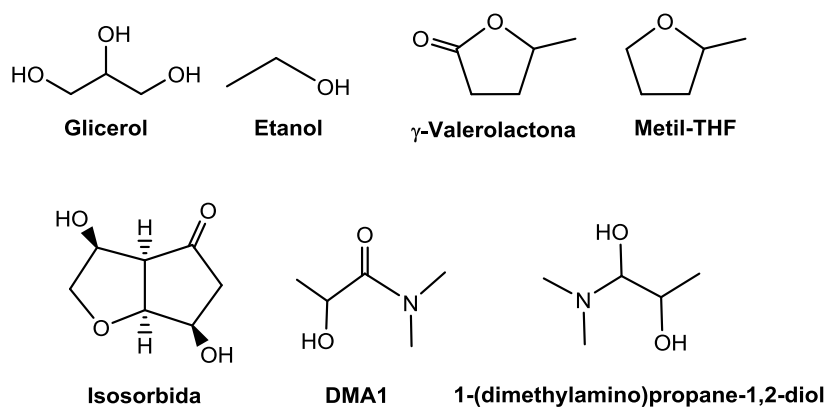


Figura 2. Biodisolventes.

En este TFM, se empleará como biodisolvente un derivado de dimetil lactamida, en concreto se utilizará el DMA1 (2-hidroxi-*N, N*-dimetilpropanamida) (Figura 2), obtenido a partir del procesamiento de la biomasa. Las características más destacables de este compuesto son su temperatura de ebullición, la cual se encuentra alrededor de los 200°C, y su miscibilidad en agua, además se trata de un sistema monofásico que presenta unos valores de densidad y log P de 1,06 g/ml y -0,69, respectivamente. Estas propiedades hacen que su recuperación y reutilización sean posibles tras llevar a cabo el proceso de síntesis.

Otra alternativa sostenible sería la no utilización de disolvente, situación que no es fácilmente asumible dentro de muchas de las reacciones de química orgánica. Este tipo de metodología está encaminado a modernizar los procedimientos clásicos haciendo que sean más limpios, seguros y fáciles de procesar, además de suponer menores tiempos de reacción y condiciones mucho más suaves. Trabajar sin disolvente aumenta la reactividad debido a las altas concentraciones de la preparación, con la consecuente selectividad o posiblemente generación de productos, comparado con los procesos en disolución. Algunas de estas reacciones tienen lugar en fase sólida, pero implican claramente la formación de una fase líquida. Esta fase líquida supone la existencia de una mezcla eutéctica con una temperatura de fusión por debajo de la temperatura ambiental, aunque ambos reactivos tengan puntos de fusión mayores individualmente (36).

1.2. Microondas aplicado a la síntesis de glicoestructuras mediante *click chemistry*

Una de las reacciones más utilizadas para la síntesis de glicodendrimeros es la reacción de *click chemistry* (12,37,38) y en la mayor parte de los casos la reacción es asistida por microondas (39–41), reduciéndose los tiempos de reacción. La reacción *click* o cicloadición 1,3-dipolar es un proceso pseudomulticomponente o AB₂, en el cual tres o más reactivos, uno de ellos empleado en exceso, dan lugar a un compuesto final a través de una única etapa de reacción. El esqueleto del producto obtenido debe estar constituido por la mayoría de los átomos de los reactivos implicados. Se trata de procesos convergentes y, en consecuencia, muy convenientes en términos de rendimientos globales y de carácter práctico (42). Normalmente, la reacción de cicloadición tiene lugar entre un grupo azida y un alquino, dando lugar a un derivado de triazol disustituido. Cuando la reacción es catalizada por compuestos derivados del Cu (I) y utilizando disolventes, se favorece la formación de un solo isómero, en concreto el derivado 1,4-disustituido. Para ello, se requiere la formación de especies de Cu⁺ (Figura 3), generado *in situ* por la reducción del Cu²⁺ gracias al ascorbato sódico (43). Sin embargo, en ausencia de catalizador, al aumentar la temperatura de dicho proceso, pueden obtenerse dos isómeros distintos del mismo producto (Figura 4) (44–47). Estos compuestos presentan importancia farmacológica, ya que son estables a la degradación metabólica y son capaces de formar enlaces de hidrógeno con las dianas biomoleculares.

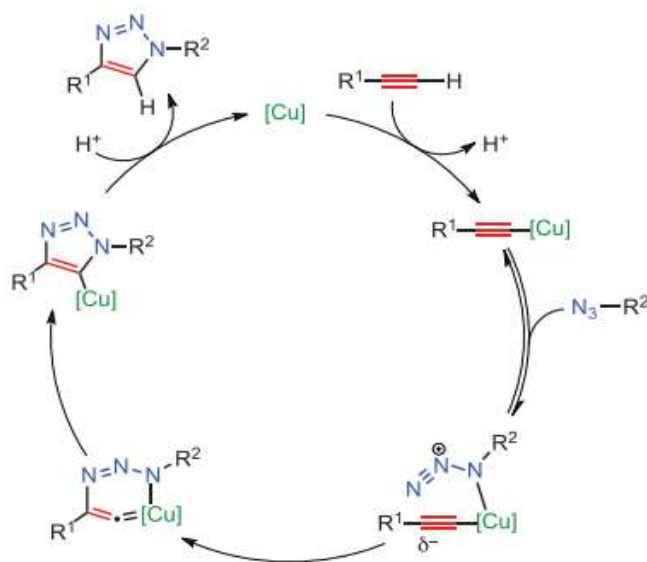


Figura 3. Mecanismo del catalizador de cobre (CuAAC).

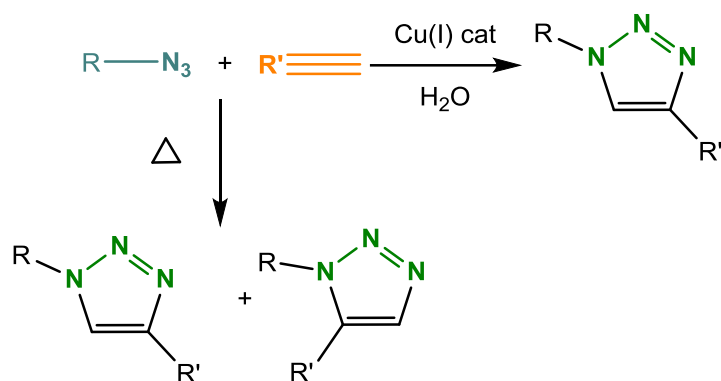


Figura 4. Procedimiento general de la reacción de cicloadición 1,3-dipolar.

Dada su importancia en aplicaciones biológicas, existen numerosos estudios que centran su atención en la producción de dendrímeros, tratando de optimizar el proceso y empleando metodologías sintéticas sostenibles. Entre estas nuevas técnicas destaca la utilización de microondas (48).

El microondas es un dispositivo en el cual se introduce una sustancia que es capaz de absorber las ondas microondas que este genera. Las ondas, al interactuar con la sustancia, provocan el fenómeno de rotación dipolar, que da lugar a la conducción iónica. La radiación microondas hace que los dipolos se orienten en función del campo electromagnético. Este campo varía a alta velocidad y con ello los dipolos, siendo este fenómeno el que permite la generación de calor. Un aspecto a destacar es la imposibilidad de este tipo de radiación para provocar la ruptura de enlaces químicos ni transiciones electrónicas, simplemente produce un aumento de temperatura (49,50).

Las características más destacables de la calefacción microondas son su acoplamiento energético a nivel molecular, su rapidez, selectividad y capacidad de calentamiento volumétrico, en lugar del superficial aportado por la calefacción clásica. Los materiales serán más o menos sensibles a esta irradiación en función de sus características. Las principales son la constante dieléctrica y la polaridad, siendo los medios polares los más adecuados para llevar a cabo este tipo de reacciones (49,51).

Algunas ventajas del uso de estos dispositivos en la síntesis química son la mayor velocidad de reacción, lo que supone menores requerimientos energéticos, ya que, al acelerar el proceso, se precisan altas temperaturas durante menos tiempo; y la mejora tanto en la selectividad como en el rendimiento al producto deseado, disminuyendo así la cantidad de residuos producidos. Además de permitir condiciones de reacción más suaves (52) y disminuir

el uso de disolventes, así como el número de etapas de reacción y los procedimientos de aislamiento y purificación (53,54).

En cuanto a la metodología que puede emplearse para llevar a cabo reacciones en microondas, cabe destacar que podemos realizar: reacciones a presión, en agua (hidrólisis), en disolventes orgánicos, en líquidos iónicos (aumentan la temperatura de disolventes poco polares que no conducen adecuadamente la radiación microondas), en ausencia de disolvente (la radiación es absorbida por los reactivos directamente) y con catalizadores heterogéneos (estos recogen la radiación y la transforman en calor, que dirigen hacia el reactivo) (55–59).

En lo referido a los trabajos para la síntesis de glicodendrimeros asistidos por microondas, comentar que existen artículos muy diversos en los que se muestra el empleo de una gran variedad de *cores* (3, 31–33) pero los más empleados están basados en polialcoholes, poliaminas o poliamidas y en restos aromáticos (8,40,63–68).

Señalar también que existen multitud de criterios para su clasificación, pero pueden dividirse en núcleos alifáticos y núcleos aromáticos. Dentro de estos dos grandes grupos, podemos encontrar diferentes subgrupos (69–72):

- Núcleos alifáticos: de tri(hidroximetil)aminometano (TRIS), con grupos amino, de pentaeritritol, de derivados de lisina y de carbosilano.
- Núcleos aromáticos: con bencenos disustituidos, trisustituidos, tetra y hexavalentes. (Figura 5)

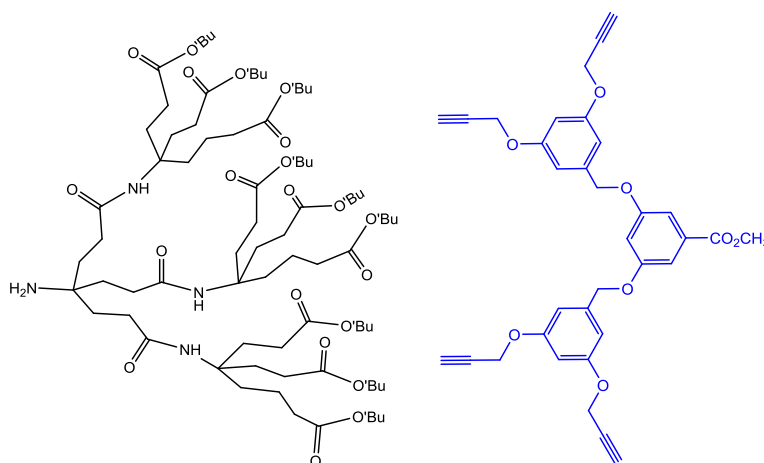


Figura 5. Core poliamida (izq.); Core aromático tetravalente (dcha.) (8).

Yoon y cols. (66) han descrito el empleo de *cores* basados en poliamidas, los cuales presentan ciertas ventajas a la hora de ser empleados como parte estructural de fármacos, debido a su baja toxicidad y su no inmunogenicidad. El interés de estas estructuras radica en la

posibilidad de monofuncionalizar dichos *cores* selectivamente y con elevados rendimientos, para que, de este modo, se pueda llevar a cabo el acoplamiento del compuesto obtenido (dendrúmero) con su diana biológica. La reacción es asistida por microondas y se consigue reducir el tiempo de reacción a 10 minutos, además de obtenerse una buena regioselectividad.

En nuestro equipo de investigación (8) hemos puesto a punto una estrategia para la síntesis de glicodendrúmeros utilizando la reacción de *click chemistry* asistida por ordenador utilizando el mismo tipo de *core* empleado en esta memoria, *core* aromático funcionalizado con grupos alquino, y una lactasa funcionalizada con un grupo azida (Figura 6). Las reacciones se llevaron a cabo en presencia de CuSO_4 y ascorbato sódico en una mezcla DMF: H_2O (90:10), en microondas a 80°C y durante 20 min. Tras una posterior purificación en columna de sílica, empleando como eluyente AcOEt: EtOH (98:2), se obtienen valores de rendimiento a los glicodendrúmeros esperados de entre 75 y 97%.

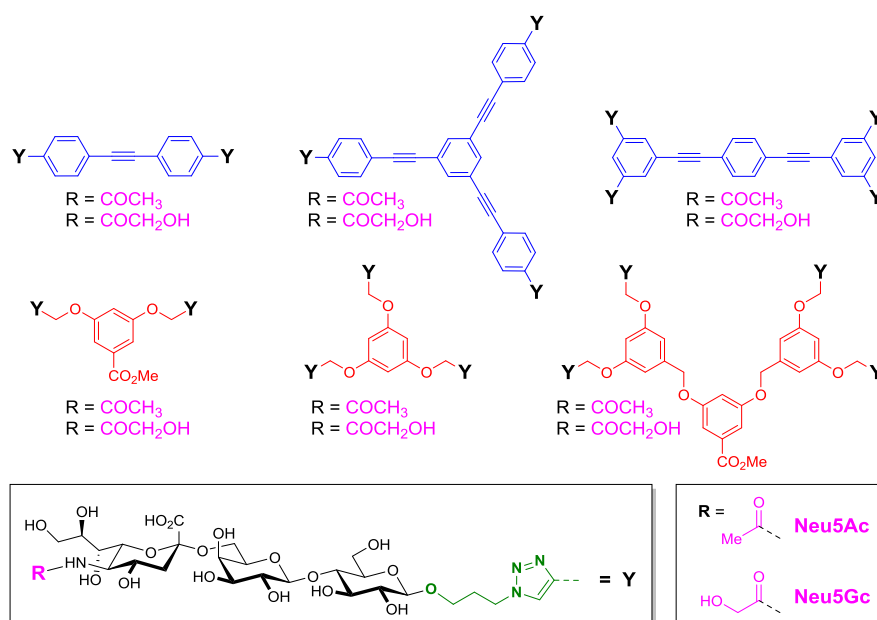


Figura 6. Glicodendrúmeros de sialil-lactósidos.

Otro ejemplo de aplicación de microondas a la síntesis de glicodendrúmeros ha sido descrito por A. Richel y *cols.* (52,73) (Figura 7). Estos autores utilizando las mismas condiciones de trabajo anteriormente mencionadas, consiguen rendimientos al glicodendrúmero mayores del 95%.

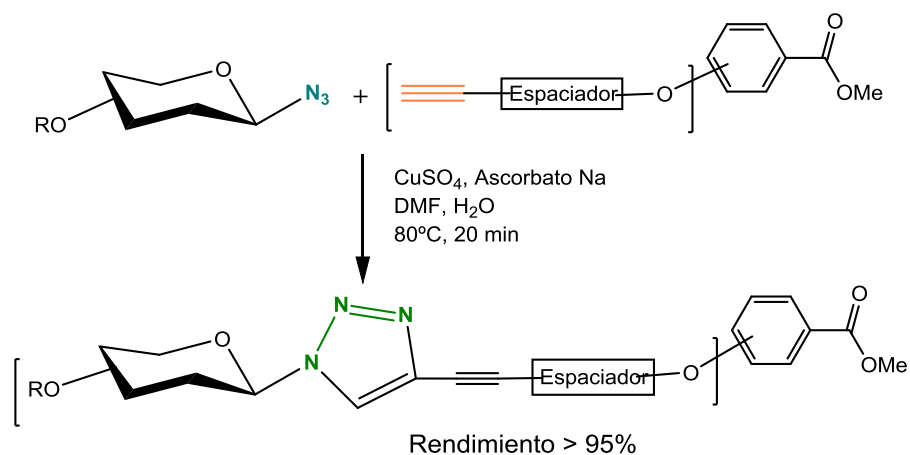


Figura 7. Síntesis de glicodendrimeros mediante *click chemistry* activada por microondas (52).

Otro ejemplo lo tenemos en el trabajo de R. Roy y cols. (74) en el cual se lleva a cabo la síntesis de *cores* dendríticos basados en poliéteres que permitirán una presentación multivalente del resto de azúcar, mediante reacción de tipo *click* y empleando el catalizador orgánico $\text{CuI} \cdot \text{P}(\text{OEt})_3$ con unos rendimientos del 80% (Figura 8).

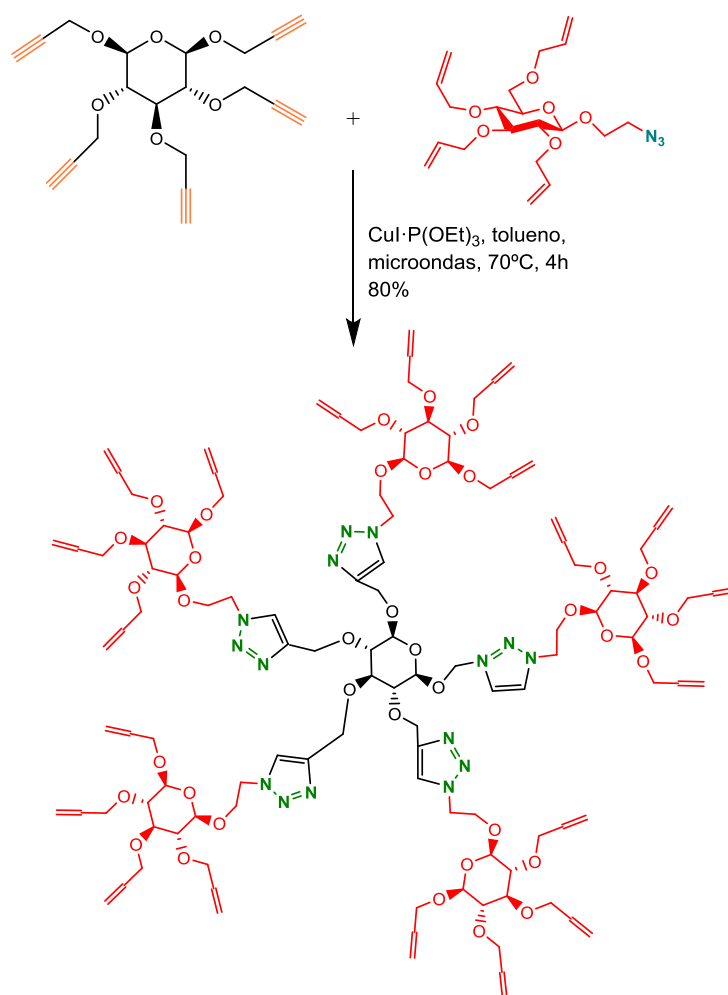


Figura 8. Esquema sintético de obtención de *cores* basados en poliéteres (74).

También se han descrito estudios que demuestran la posibilidad de realizar síntesis de glicodendrimeros con *click chemistry* sobre derivados azucarados desacetilados, obteniéndose moderados rendimientos al producto deseado (65). En estos casos también se lleva a cabo la adición de un catalizador de cobre, en microondas y al igual que con los azúcares protegidos, se favorece la formación de un solo isómero, en concreto el derivado 1,4-disustituido, empleando indistintamente cualquiera de los dos compuestos de partida posibles, además de permitir la reacción *click* sobre los compuestos desprotegidos (73).

1.3. Mecanoquímica en la síntesis de glicoestructuras

La mecanoquímica es una alternativa eficiente frente a la química tradicional que evita el uso de grandes cantidades de disolventes y usa un proceso de molienda de alta frecuencia, mediante diminutas bolas metálicas, para generar las reacciones. La molienda se consigue gracias a los impactos intensos de bolitas de acero que son agitadas junto con los reactivos y los catalizadores en un recipiente que gira con gran rapidez (75–79).

Utilizar fuerza mecánica para sintetizar nuevos materiales y compuesto químicos no es una idea nueva, pero en la actualidad es una estrategia muy de moda dentro de la química sostenible (79). Algunas de las ventajas que presentan este tipo de reacciones, en cuanto a la posibilidad de llevar a cabo procesos limpios y seguros, son:

- Su capacidad para promover reacciones entre sólidos
- Método rápido y cuantitativo: mayor velocidad de reacción, mayor rendimiento y selectividad
- Posibilidad de escalado a nivel industrial
- Útil en una amplia variedad de procesos sintéticos
- Evita el empleo de disolventes y con ello, evita la contaminación medioambiental y la peligrosidad en el manejo de la reacción, reduce la demanda energética del proceso, las etapas de purificación y el reciclado posterior
- La energía mecánica empleada, genera el aumento de temperatura necesario para que la reacción tenga lugar, disminuyendo así los requerimientos energéticos, ya que no es necesaria una fuente externa de calor
- Posibilidad de interacción entre reactivos de muy baja o distinta solubilidad (80,81)

En la actualidad, el dispositivo de molienda más empleado es el molino de bolas, pero también es posible llevar a cabo una molienda manual en un mortero de Ágata. La principal limitación de este último es su escasa reproducibilidad. Existen diversos tipos de molinos, pero en el presente proyecto se empleará un molino de bolas planetario, el cual se caracteriza porque las bolas que contiene no solo giran sobre las paredes del reactor, si no que caen sobre la muestra, provocando de esta manera una molienda más eficiente. Los parámetros a evaluar en un proceso de molienda son: el tipo de molienda, la frecuencia de rotación, el tiempo de reacción, el material a moler, el tamaño de las bolas que se incorporan al molino, el número de estas y el modo de operación.

Un aspecto a señalar, en cuanto a la aplicación de los métodos de molienda, es su capacidad para formar cocrisales o cristales moleculares multicomponentes. La formación de este tipo de compuestos es de vital importancia cuando se consideran aspectos farmacéuticos, ya que la cocrystalización puede mejorar la velocidad de disolución del compuesto formado, su estabilidad térmica o su compresibilidad, debido a que se forman estructuras combinadas entre un principio activo y uno o varios excipientes, unidos por enlaces de tipo dipolo.

Actualmente contamos con escasos ejemplos de aplicación del molino de bolas a la síntesis de glicoestructuras, pero en este trabajo confirmaremos la posibilidad de llevar a cabo este tipo de procedimientos, como las reacciones tipo *click*, consiguiendo buenos rendimientos y selectividades al producto deseado.

Los arilglicósidos han sido preparados mediante procedimientos mecanoquímicos sin disolvente, empleando un molino de bolas planetario y dando lugar a excelentes rendimientos (Figura 9) (78). El proceso que tiene lugar es la glicosidación de derivados acetilados en forma de haluros y las condiciones de reacción son: velocidad de 400 rpm y 45 min de reacción. De esta forma se consiguen rendimientos entre 66-96%.

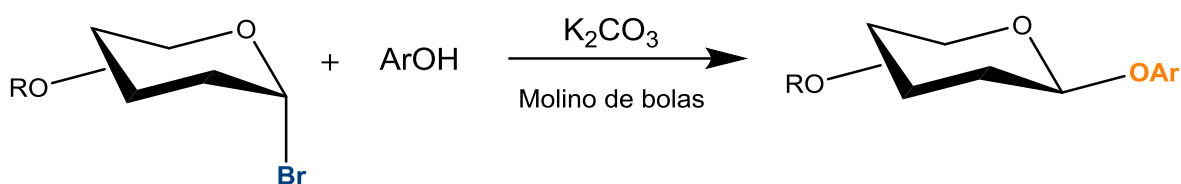


Figura 9. Síntesis mecanoquímica de arilglicósidos (78).

En el trabajo realizado por V. Kumar *y cols.* (82), se presenta la posibilidad de emplear procedimientos mecanoquímicos para activar la posición anomérica de derivados glicosídicos (Figura 10 (A)), trabajando en ausencia de disolvente, y dando lugar a rendimientos alrededor del 90% en ambos casos. La reacción de glicosidación precisa de 45 min y una velocidad de 400 rpm.

Otro ejemplo de activación de la posición anomérica de un azúcar es el descrito por Ramrao Patil *y cols.* (77), en el cual se lleva a cabo la síntesis de tioglicósidos empleando el molino de bolas y en ausencia de disolvente (Figura 10 (B)). En este caso, partiendo de estructuras glicosídicas en forma de haluro, se obtienen los correspondientes tioglicósidos con excelentes rendimientos. Empleando esta metodología, resulta innecesario llevar a cabo procesos de purificación post-síntesis, por lo que se reduce notablemente el gasto de disolventes orgánicos. Además de disminuir el número de pasos sintéticos, siendo posible llevar

a cabo un proceso en *one pot*, evitamos utilizar disolventes tóxicos, como los tioles, y carcinogénicos, como el benceno.

La mecanoquímica también puede ser empleada para sintetizar glicosilaminas de manera eficiente y utilizando la mínima cantidad de disolvente (79). Esta aproximación sostenible desde el punto de vista medioambiental, utiliza como derivado azucarado L-ramnosa y estudia la reacción de aminación utilizando una gran variedad de aminas y derivados de carbohidrato. Se lleva a cabo a temperatura ambiente, durante 1,5 horas, empleando SiO₂ para homogeneizar la mezcla y dando lugar a rendimientos entorno al 94%. En este ejemplo, a parte de emplear como sustrato derivados de biomasa, como son los carbohidratos, lo que supone una alternativa al empleo de los recursos fósiles limitados y no renovables, podemos destacar otro aspecto que favorece la sostenibilidad del proceso, como es la reducción en el consumo de disolventes orgánicos. Cabe destacar que los productos obtenidos derivados de L-ramnosa presentan potente actividad farmacológica como antiinflamatorios y agentes antienvjecimiento (Figura 10 (C)).

Algunos estudios han dirigido su interés hacia la síntesis de carbohidratos derivados de triazol mediante *click chemistry* en condiciones mecanoquímicas *one-pot*, sin disolvente y empleando CuAAC (83,84) (Figura 10 (D)).

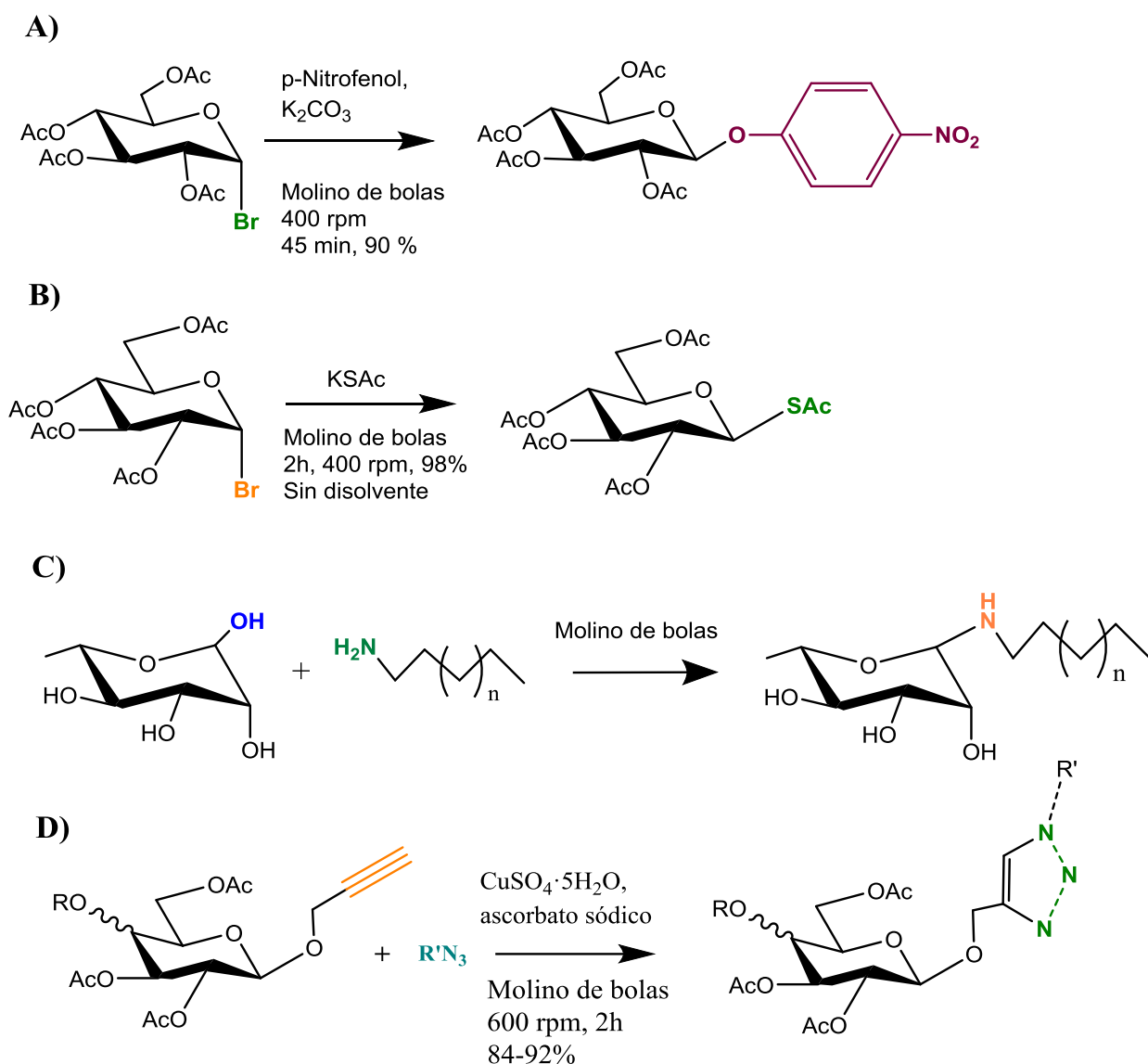


Figura 10. A) Glicosidación llevada a cabo en molino de bolas (82). B) Síntesis de tioglicósidos empleando molino de bolas (77). C) Síntesis mecanoquímica de glicosilaminas (79). D) Síntesis de carbohidratos derivados de triazol (83).

La mecanoquímica también ha sido empleada en la degradación de grandes polímeros como la celulosa, para obtener así derivados de interés de menor tamaño, como el hidroximetilfurfural (HMF). Un ejemplo de esta aplicación es la transformación directa de celulosa en HMF, llevada a cabo por L. Atanda y *cols.* (85), asistida por catálisis mecanoquímica. Este proceso se realiza partiendo de celulosa pretratada en ácido y se lleva a cabo la despolimerización mecanoquímica, obteniéndose un rendimiento del 86%. El molino de bolas facilita la disminución de la cristalinidad de la celulosa, así como su tamaño de partícula y facilita la escisión de los enlaces glicosídicos β -(1-4). La reacción se lleva a cabo en ausencia de disolvente, a una velocidad de 300 rpm y con tiempos de pausa de 20 min cada 15 min de molienda, para permitir la disipación del calor y evitar el sobrecalentamiento de los reactantes.

2. OBJETIVOS

El presente TFM tiene como objetivo general la puesta a punto de un proceso sostenible para la síntesis de glicodendrimeros derivados del ácido glucurónico con potencial aplicación en la infección del virus del Dengue. Para ello hemos seleccionado como azúcar, el ácido glucurónico funcionalizado con un grupo azida **1** y como *core*, el compuesto **2**, sintetizados reproduciendo las metodologías descritas por nuestro grupo de investigación (8). La reacción seleccionada ha sido la reacción de *click chemistry* y las estrategias sintéticas llevadas a cabo: las reacciones asistidas por microondas y la mecanoquímica. Los objetivos concretos se han centrado en analizar los tiempos de reacción, reactivos necesarios para el proceso y el empleo de disolventes convencionales o biodisolventes.

3. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

Los reactivos y disolventes accesibles comercialmente fueron suministrados por diferentes casas comerciales (*Fischer, Sigma-Aldrich*) y fueron utilizados sin necesidad de purificación previa.

Los sustratos de la reacción de *click chemistry* fueron preparados y caracterizados previamente, reproduciendo las condiciones y metodología sintética descritas por el grupo de investigación en sus correspondientes publicaciones. El sustrato *core* divalente, funcionalizado con dos grupos alquino, fue preparado siguiendo el protocolo descrito por miembros del grupo (8) y el derivado del ácido glucurónico funcionalizado con un grupo azida fue sintetizado acorde al protocolo descrito por Chen y cols. (86).

El disolvente procedente de biomasa derivado de dimetilamida, 2-hidroxi-*N, N*-dimetilpropanamida (DMA1) fue proporcionado por *COGNIS IP Management GMBH* (Alemania).

En algunas ocasiones se utilizó H₂O ultra pura proveniente del equipo Millipore MiliQ.

El dispositivo de microondas empleado es el modelo *Discover CEM* (Figura 11), equipo focalizado y con una emisión de hasta 300W. Permite un rango de temperaturas de -80 a 300°C, un volumen de trabajo de hasta 3,5 mL en vial cerrado y una presión de 250 psi. Además, contiene un sensor de temperatura mediante infrarrojo integrado. El vial utilizado es de vidrio Pyrex, el cual no absorbe radiación microondas.



Figura 11. Microondas CEM Discover.

Las reacciones de mecanoquímica, se llevan a cabo en un molino de bolas planetario *Retsch PM-100* (Figura 12). El tamaño aproximado de la alimentación que soporta es de 10 mm

y el tamaño final obtenido es de unos 100 nm. La potencia empleada es de 1250 W. El recipiente de molienda permite contener como máximo 12 mL, considerando que en ese volumen deben contabilizarse las bolas, la muestra y quedar un tercio del mismo libre. Se adicionan a este recipiente 30 bolas de acero inoxidable de 5 mm en todas las reacciones llevadas a cabo en este proyecto.



Figura 12. Molino de bolas Retsch PM-100.

Los espectros de Resonancia Magnética Nuclear de protón y carbono se registraron en un espectrómetro de *Bruker Avance* y *Bruker Avance II* (frecuencia de 300 MHz para ^1H -RMN y 75 MHz para experimentos de ^{13}C -RMN) y *Bruker AC-250* (frecuencia de 250 MHz para ^1H -RMN y 63 MHz para experimentos de ^{13}C -RMN). El disolvente empleado en todos los casos fue cloroformo deuterado.

Para las cromatografías en capa fina (TLC) se utilizaron cromatofolios de gel de sílice. Por su parte, las cromatografías en columna se realizaron empleando gel de sílice y diversos eluyentes indicados particularmente en cada caso. Como reveladores se utilizaron la lámpara de ultravioleta/visible (UV/vis) de $\lambda = 254$ nm y una disolución reveladora de azúcares elaborada a partir de ácido sulfúrico (10%) en metanol y calor.

3.1. Síntesis de sustratos de partida

A) Síntesis azida del ácido glucurónico (compuesto 1)

La ruta sintética que dio lugar al ácido glucurónico funcionalizado con un grupo azida, constó de cinco etapas de reacción:

– Etapa 1: Se suspendieron 8 g (45,42 mmol) de glucuronolactona y 80 mg de metóxido de sodio, en 48 mL de metanol anhidro, manteniendo la agitación a temperatura ambiente durante 2 h. Tras eliminar el disolvente a vacío, se enfrió el sirope resultante hasta 0°C, para adicionar posteriormente 32 mL de anhídrido acético y 40 mL de piridina, y se mantuvo en agitación con atmósfera inerte y a temperatura ambiente, durante la noche. Finalmente se llevaron a cabo varias extracciones con HCl 0,1 M, secando la fase orgánica con NaSO₄ anhidro, filtrando y concentrando, para después purificar el producto mediante cromatografía en columna, empleando como fase móvil hexano: AcOEt (1:1).

– Etapa 2: 11,28 g (30 mmol) del compuesto azucarado peracetilado, resultante de la primera etapa, fueron disueltos en 90 mL de tetrahidrofurano anhidro a temperatura ambiente y bajo atmósfera inerte de Argón. Posteriormente, se añadieron 4 mL (36 mmol, 1,2 equiv) de bencilamina y se dejó en agitación 12 h. Tras ello, se purificó el producto al igual que en la primera etapa, pero empleando en este caso una mezcla de hexano: AcOEt (1:2), como eluyente.

– Etapa 3: Se disolvieron 7 g (21 mmol) del compuesto resultante en la etapa 2, en 70 mL de diclorometano anhidro, sobre un baño de hielo. Bajo atmósfera inerte, se añadieron 5 equiv de tricloroacetnitrilo y 0,2 equiv de DBU, dejando en agitación durante 2 h a temperatura ambiente. Finalmente, se purifica el compuesto obtenido empleando cromatografía en columna con hexano: AcOEt (3:2) como fase móvil.

– Etapa 4: El producto de la etapa 3 fue sometido a varios ciclos de vacío en atmósfera inerte, antes de disolverlo en diclorometano anhidro. Se enfrió la disolución hasta -10°C y se añadieron 1,2 equiv de cloropropanol y 1,1 equiv de trifluoruro de boro. Para finalizar la reacción, se adicionó 1,1 equiv de trietilamina y se evaporó el disolvente a vacío. En este caso, para la purificación en columna se utilizó la misma fase móvil que en la etapa anterior.

– Etapa 5: Se disolvió 1 g (2,4 mmol) del derivado clorado en DMF anhidro y tras ello se añadieron 780 mg (5 equiv) de azida sódica. Se mantuvo en agitación a 65°C durante 12 h. Una vez evaporado el disolvente a vacío, se purificó el derivado azídico del ácido glucurónico obtenido, empleando cromatografía en columna y el mismo eluyente que en la etapa anterior. El compuesto obtenido se caracterizó mediante RMN.

B) Síntesis *core* funcionalizado con grupos alquino (compuesto 2)

Se adicionaron 10,5 g (76 mmol) de carbonato de potasio anhidro sobre una solución de 5 g (30,45 mmol) de 3,5-dihidroximetilbenzoato en 50 mL de DMF anhidro y se mantuvo en agitación durante 30 min. Tras ello, se añadieron 10,9 g (91,5 mmol) de bromuro de propargilo y se continuó con la agitación a temperatura ambiente durante la noche. Al finalizar la reacción, se añadió acetato de etilo y se separó la fase orgánica. Una vez llevado a cabo el lavado, secado y filtrado de dicha fase, se purificó el producto a través de cromatografía en columna de sílice, empleando como fase móvil la mezcla de hexano: AcOEt (5:1). El compuesto obtenido se caracterizó mediante RMN.

3.2. Reacciones de *click chemistry*

A) Reacción *click* en microondas

– Reacción en DMF: H₂O

Tras el análisis de diversas publicaciones en las que se lleva a cabo la síntesis de glicodendrimeros asistida por microondas (8,52,64,66), se decidió llevar a cabo la reacción basándonos en las condiciones descritas por estos autores, en sus ensayos se obtienen elevados rendimientos al glicodendrímico deseado.

En un matraz Erlenmeyer se disolvieron en 2,5 mL de mezcla DMF: H₂O (98:2) 25 mg de **2** (0,1 mmol), 92 mg **1** (1,1 equiv/alquino), 7,5 mg de CuSO₄ (0,2 equiv/alquino) y 15 mg de ascorbato sódico (0,35 equiv/alquino). La mezcla de reacción se trasvasó al vial de microondas y se ajustaron las condiciones de reacción a una temperatura de 80°C., manteniendo el tiempo de radiación microondas durante 90 minutos.

El seguimiento de la reacción se llevó a cabo por TLC empleando como eluyente CH₂Cl₂: MeOH (97:3) y AcOEt. Una vez finalizada la reacción, se eliminó el H₂O que contiene el crudo con Na₂SO₄ anhidro tras su disolución en CH₂Cl₂. La purificación del producto se realizó mediante cromatografía en columna, empleando como fase móvil AcOEt. La caracterización de los compuestos se realizó por RMN.

B) Reacción *click* en molino de bolas

– Reacción en ausencia de disolvente

En el vaso de molienda se añadieron 45 mg de compuesto **2** (0,184 mmol), 153 mg de **1** (1 equiv/alquino), 29 mg de ascorbato sódico (0,4 equiv/alquino), 12 mg CuSO₄ (0,2 equiv/alquino), 475 mg de sílice como auxiliar de molienda inerte, y 30 bolas de acero inoxidable (Figura 13). Las condiciones de reacción establecidas en el molino de bolas fueron las siguientes:

velocidad de giro de 450 rpm, tiempo de reacción de 5 h e inversión del sentido de giro cada 4 min con un tiempo de pausa entre ciclos de 10 s.



Figura 13. Vaso de molienda con bolas y mezcla de reacción.

El seguimiento de la reacción se llevó a cabo mediante TLC, empleando como eluyentes CH_2Cl_2 : MeOH (97:3) y CH_2Cl_2 : AcOEt (86:14), disolviendo previamente la muestra en CH_2Cl_2 . Transcurridas 7 h se paró la reacción y se purificaron los productos mediante cromatografía en columna, empleando en primer lugar la mezcla CH_2Cl_2 : AcOEt (86:14) como fase móvil y en una segunda fase, CH_2Cl_2 : MeOH (97: 3). Llevamos a cabo una nueva cromatografía en la columna, empleando como eluyente CH_2Cl_2 : MeOH (97:3), para purificar definitivamente el producto obtenido. La caracterización de los compuestos extraídos de la columna se realizó mediante RMN.

– Reacción en DMF: H_2O

En 2 mL de mezcla DMF: H_2O (98:2) se disolvieron 16,5 mg de **2** (0,067 mmol), 62 mg de **1** (1,1 equiv/alquino), 10 mg de ascorbato sódico (0,35 equiv/alquino) y 5 mg CuSO_4 (0,2 equiv/alquino). La disolución fue trasvasada al vaso de molienda y se añadieron 30 bolas de acero inoxidable (Figura 14). Las condiciones de reacción en el molino de bolas fueron las mismas que en el apartado anterior.

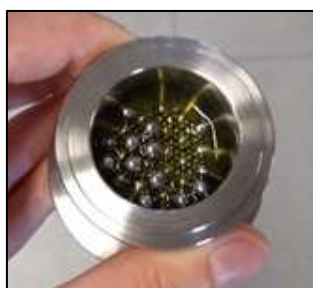


Figura 14. Vaso de molienda con bolas y mezcla de reacción.

El seguimiento de la reacción se llevó a cabo por TLC empleando como eluyente AcOEt. Una vez finalizada la reacción, el crudo se disolvió en acetato de etilo y se eliminó el H_2O que

contenía con Na_2SO_4 anhidro. Tras ello, se evaporaron los disolventes mediante filtración a vacío. Los productos de la reacción fueron purificados mediante cromatografía en columna, empleando AcOEt como fase móvil. La caracterización de los compuestos se realizó mediante RMN.

C) Reacción *click* en disolventes sostenibles

– Reacción en microondas empleando DMA1

Se llevó a cabo la reacción siguiendo el protocolo descrito en el apartado 3.2. A), sustituyendo DMF por DMA1 (Figura 15).



Figura 15. Vial de microondas con mezcla de reacción.

El seguimiento de la reacción se llevó a cabo mediante TLC empleando como eluyentes AcOEt y CH_2Cl_2 : AcOEt (86:14). Una vez finalizada la reacción se purificó el producto mediante, cromatografía en columna de sílica, empleando AcOEt como fase móvil. Las trazas de DMA1 remanentes en el producto se eliminaron mediante su disolución en 50 ml de H_2O ultra pura y enfriamiento a 4 °C. De esta forma se provocó la precipitación del producto, que fue recogido mediante filtración a vacío. La caracterización de los compuestos se realizó por RMN.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este trabajo hemos llevado a cabo el estudio de la reacción de cicloadición 1,3 dipolar entre un derivado de ácido glucurónico funcionalizado con un grupo azida y un *core* que contiene dos grupos alquino (*click chemistry*), empleando metodologías sostenibles (Figura 16). Según los datos descritos en la bibliografía, el protocolo de síntesis tradicional permite llevar a cabo esta reacción sometiendo la mezcla de reactivos a temperaturas medias y elevadas, disolviendo tanto el derivado del monosacárido **1** como el *core* **2**, en DMF: H₂O a 50°C durante 12 h. De esta forma los rendimientos alcanzados se encuentran entre el 70-75%.

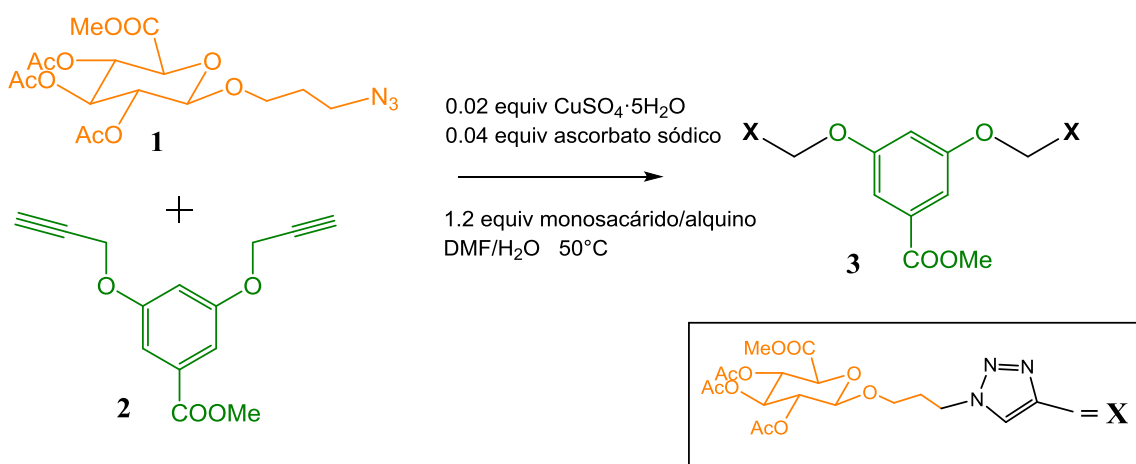


Figura 16. Esquema sintético reacción click tradicional.

El principal objetivo de este trabajo consiste en optimizar este proceso empleando procedimientos más verdes, disminuyendo el empleo de disolventes orgánicos contaminantes o intercambiando estos por disolventes renovables procedentes de biomasa. Diseñando así procesos más eficientes desde el punto de vista energético y más seguros a la hora de llevarlos a cabo.

4.1. Síntesis de sustratos de partida

Para llevar a cabo la reacción indicada en la Figura 16 es necesario sintetizar previamente los compuestos de partida. La elaboración del derivado de ácido glucurónico funcionalizado con un grupo azida **1**, se realizó siguiendo el protocolo descrito por Chen y *cols.* (86). Por su parte, el sustrato *core* **2**, funcionalizado con dos grupos alquino, fue sintetizado acorde al protocolo descrito previamente por el grupo de investigación (8). A continuación, se comentan los correspondientes resultados obtenidos.

A) Síntesis azida del ácido glucurónico (compuesto **1**)

Mediante las diversas etapas sintéticas descritas en el apartado 3.1. A): acetilación de la lactona del ácido glucurónico (etapa A), desacetilación de la posición anomérica (etapa B), activación posterior de esta posición (etapa C), incorporación de la cadena halogenada (etapa D) y sustitución del grupo halógeno por un grupo azida (etapa E), conseguimos obtener buen rendimiento al derivado azídico del ácido glucurónico **1** (Figura 17).

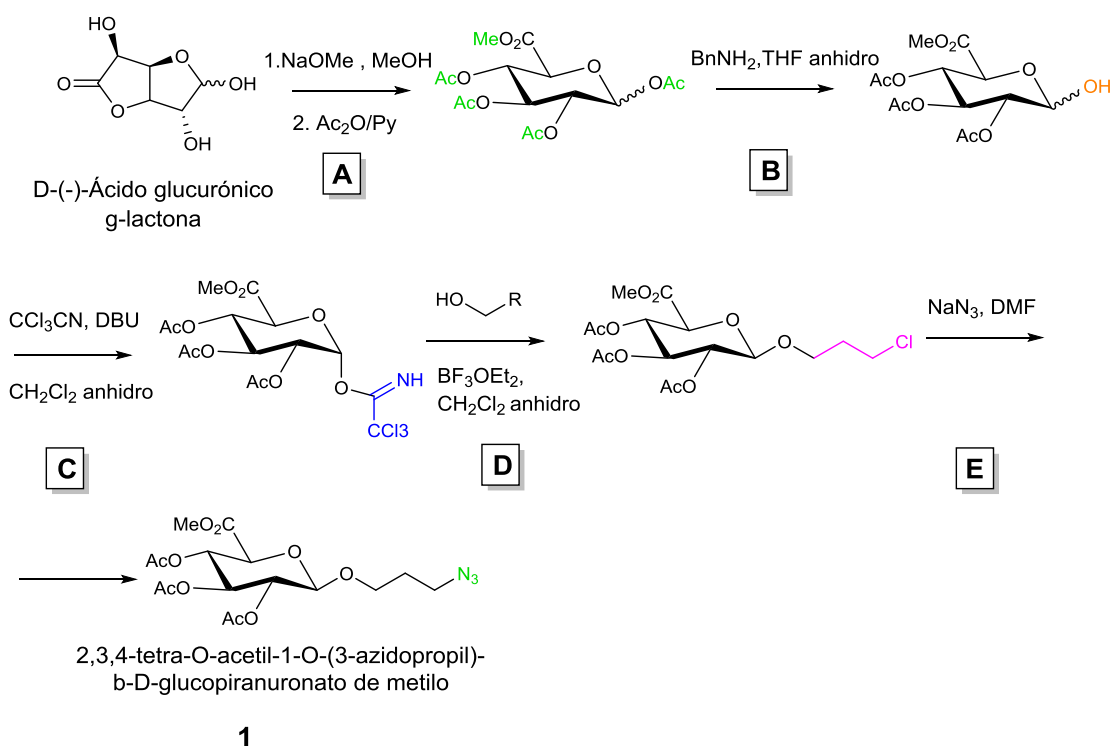


Figura 17. Esquema sintético de la azida del monosacárido (86).

Los rendimientos obtenidos en cada una de las etapas de reacción son:

- Etapa 1: 66% de rendimiento
- Etapa 2: 70% de rendimiento
- Etapa 3: 59% de rendimiento

- Etapa 4: 88% de rendimiento
- Etapa 5: 55% de rendimiento

Tras este proceso, conseguimos aislar el derivado azídico del ácido glucurónico **1**, cuyo espectro ^1H -RMN aparece representado en la Figura 18. Este compuesto será posteriormente empleado para llevar a cabo la reacción *click*, que dará lugar al glicodendrímtero deseado.

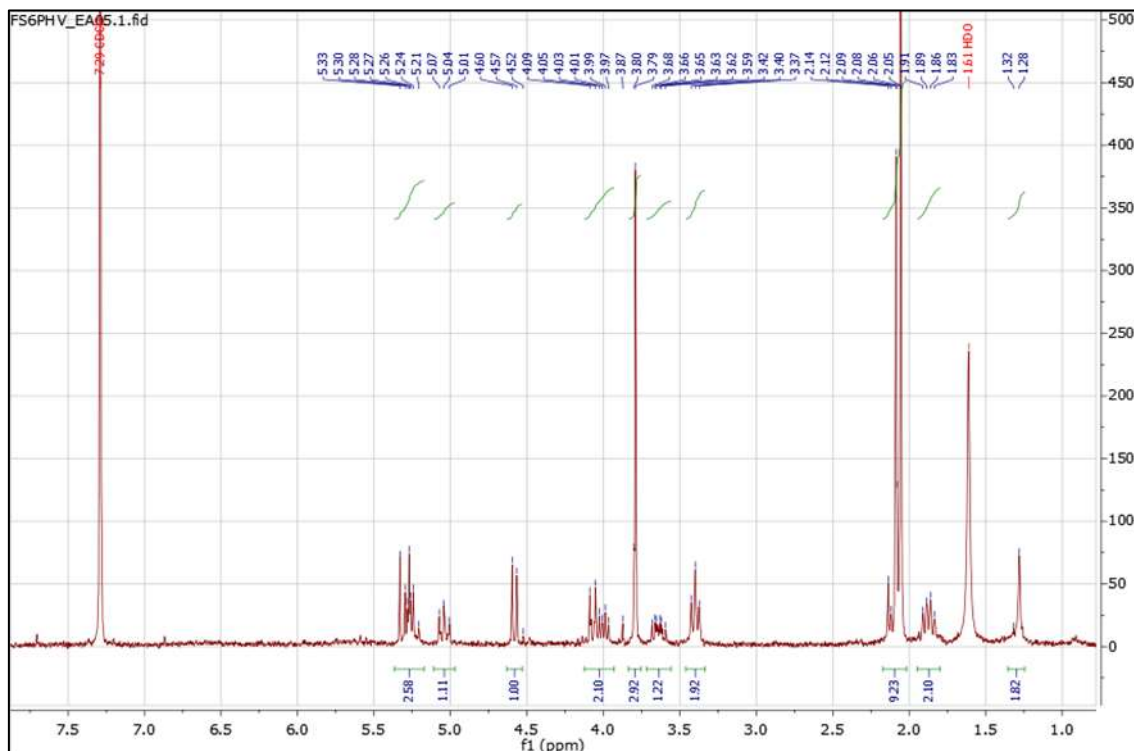


Figura 18. Espectro RMN- ^1H azida del glucurónico **1** en CDCl_3 .

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): 5.26 (t, $J = 9.6$ Hz, 1H, H-3), 5.24 (t, $J = 9.6$ Hz, 1H, H-4), 4.99 (dd, $J = 9.3, 7.7$ Hz, 1H, H-2), 4.54 (d, $J = 7.7$ Hz, 1H, H-1), 4.03 (d, $J = 9.3$ Hz, 1H, H-5), 4.00 - 3.91 (m, 1H, H-8 a), 3.74 (s, 3H, OCH_3 - H-7), 3.65 - 3.55 (m, 1H, H-8 b), 3.35 (dd, $J = 6.4, 1.3$ Hz, 2H, H-10), 2.04 (s, 3H, OAc), 2.01 (s, 6H, OAc), 1.94 - 1.72 (m, 2H, H-9).

^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3): δ 170.27, 169.53, 169.40, 167.34, 101.01, 72.82, 72.23, 71.39, 69.60, 66.92, 53.09, 48.10, 29.11, 20.81, 20.79, 20.68.

B) Síntesis *core* funcionalizado con grupos alquino (compuesto **2**)

Una vez llevado a cabo el proceso sintético descrito en el apartado 3.1. B) del Procedimiento Experimental, en el cual a partir de una estructura fenólica, a la que se conectan por enlaces de tipo éter estructuras alquílicas flexibles, se obtiene el sustrato *core* **2**, funcionalizado con dos grupos alquino, con un rendimiento del 80% (Figura 19).

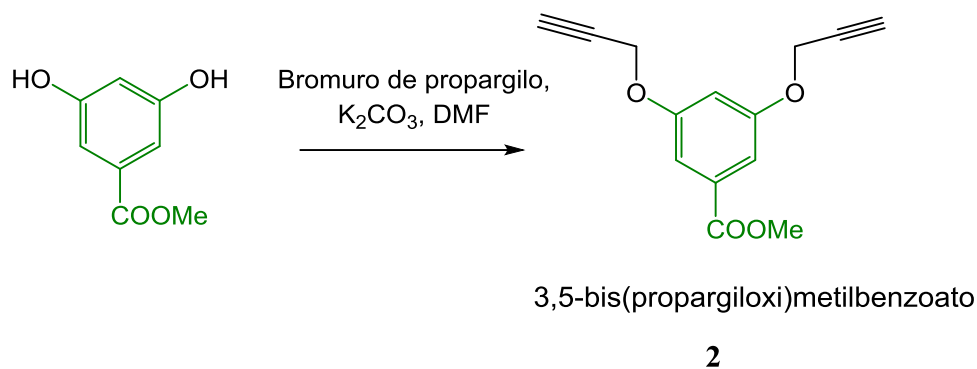


Figura 19. Esquema sintético del core (8).

Su espectro de ^1H -RMN se encuentra representado en la Figura 20. Este compuesto será posteriormente empleado para llevar a cabo la reacción *click*, que dará lugar al glicodendrímero deseado.

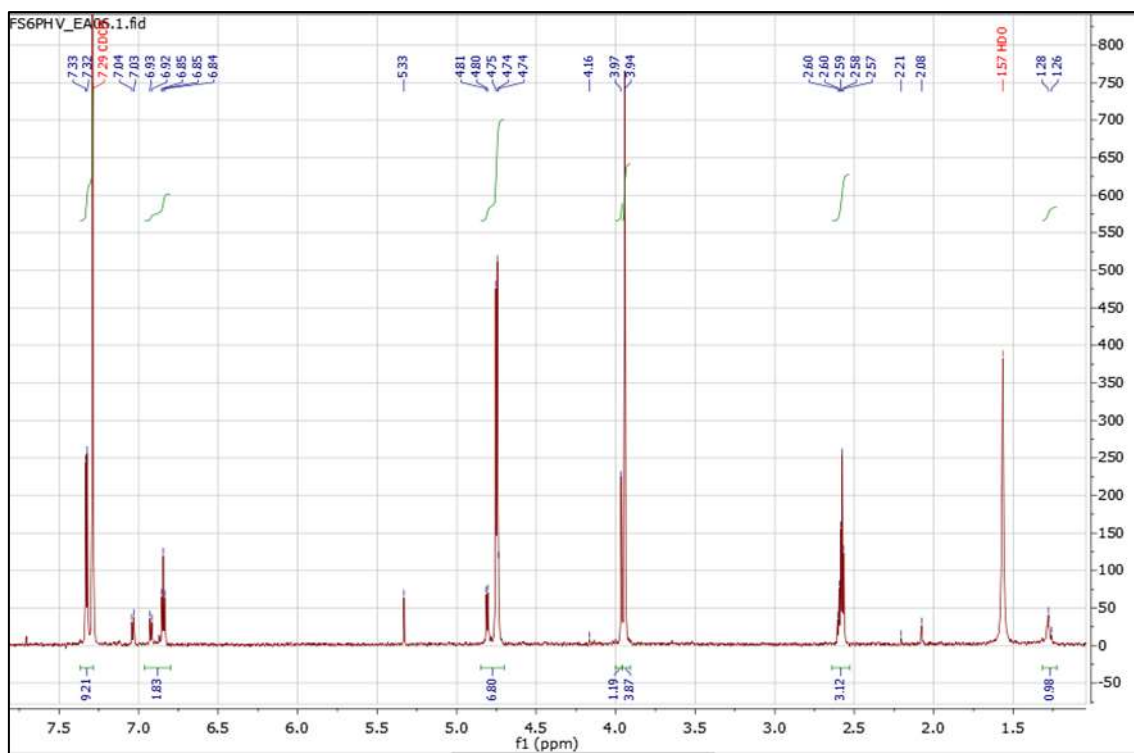


Figura 20. Espectro RMN- ^1H core divalente **2** en CDCl_3 .

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): 7.29 (d, $J=2.4$ Hz, 2H), 6.82 (t, $J=2.4$ Hz, 1H), 4.73 (d, $J=2.4$ Hz, 4H), 3.91 (s, 3H), 2.55 (t, $J=2.4$ Hz, 2H).

^{13}C NMR (75.5 MHz, CDCl_3): δ 165.9, 161.5, 131.9, 106.3, 104.7, 78.7, 76.4, 56.9, 51.5.

4.2. Reacciones de *click chemistry*

A) Reacción *click* en microondas

Existen numerosos ejemplos del uso de los dispositivos microondas en reacciones *click* para la preparación de glicodendrimeros con diferentes tipos de monosacáridos (8,52,73) pero hasta el momento no han sido descritos funcionalizados con ácido glucurónico. En la mayoría de los casos, se emplean disolventes orgánicos contaminantes para llevar a cabo este tipo de reacciones. Uno de los disolventes más empleados con esta tecnología es la dimetilformamida (DMF), ya que, por características como su elevada polaridad, su punto de ebullición de 153°C o su constante dieléctrica, con valor de 38 C²/ (N·m²), es capaz de mantener la temperatura homogénea en el vial, controlar la presión dentro de este y conducir las ondas microondas adecuadamente (73,87). Además, es común emplear una mezcla de dos disolventes en este tipo de procedimientos, ya que en la interfase entre ambos pueden formarse puntos calientes, que favorecen que la reacción tenga lugar. En este trabajo se busca hacer estos procesos más sostenibles, a la vez que mejoramos los rendimientos y selectividades del producto deseado.

En nuestro grupo de investigación se puso a punto el empleo de microondas para llevar a cabo la reacción de *click chemistry* entre el compuesto **2**, utilizado en esta memoria, y una lactosa funcionalizada con un grupo azida (8), lo que nos permitió obtener rendimientos elevados (70-80%). Este TFM está basado en estos trabajos previos, pero en este caso el carbohidrato utilizado ha sido un ácido glucurónico funcionalizado con un grupo azida.

– Reacción en DMF: H₂O

El proceso se llevó a cabo tal y como se describió en el apartado 3.2. A) del Procedimiento Experimental. Tras mantener la radiación microondas durante 90 minutos (Figura 21), se tomó una muestra del crudo y, gracias a la cromatografía en capa fina, se pudo detectar la formación del compuesto **3** (cuyo espectro se muestra en la Figura 22) y un subproducto. La reacción finalizó adecuadamente, sin detectarse cantidades de los reactivos **1** y **2**.



Figura 21. Vial de microondas con mezcla de reacción tras 90 min.

Observado el buen resultado tras finalizar el procedimiento sintético, se incorporó la mezcla a una columna de sílice para purificar el producto, a partir de la cual obtuvimos un 40% de rendimiento al compuesto **3**, compuesto de interés.

A la hora de identificar el producto, fue de utilidad el análisis de su espectro de ^1H -RMN, en el que podemos señalar las siguientes señales características: un singlete a 7,3 ppm, correspondiente a los hidrógenos del anillo aromático, un singlete a 8,1 ppm asociado a los hidrógenos de triazol, a 4,5 ppm los picos de absorción de los hidrógenos presentes en los restos azucarados y a 2,0 ppm los asociados a los grupos acetilo protectores de los hidroxilos pertenecientes a los azúcares.

El subproducto observado, podría corresponderse con el glicodendrímtero sustituido en uno solo de los grupos alquino del *core*.

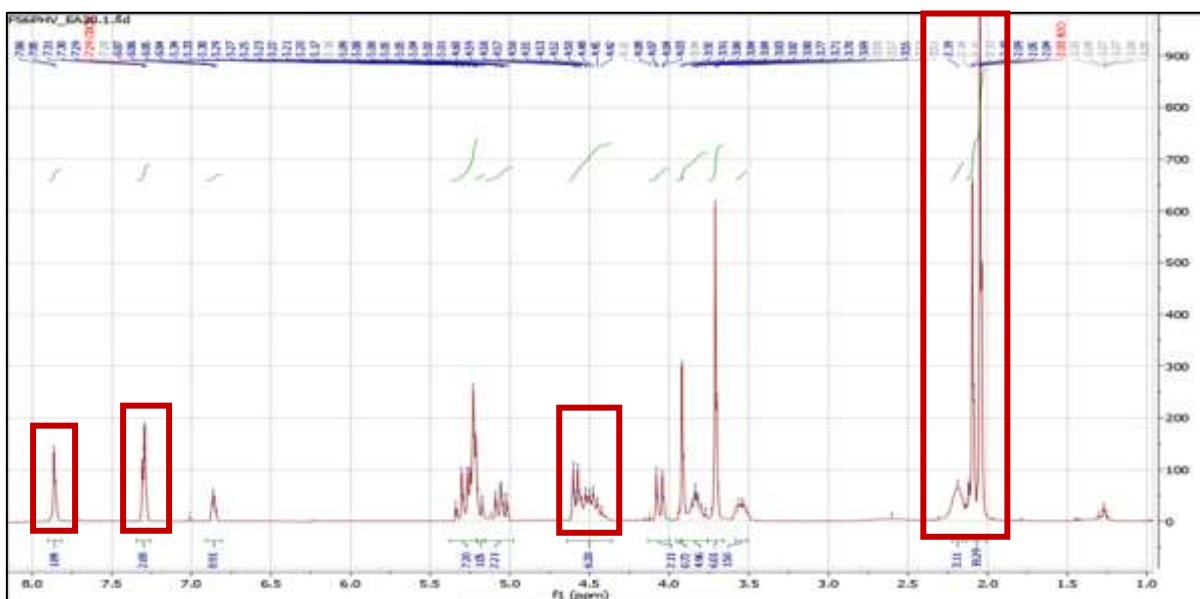


Figura 22. Espectro RMN- ^1H producto disustituido **3** en CDCl_3 .

¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃): 7.77 (s br, 2H, H-11), 7.25 (t, J = 2.2 Hz, 2H, H-2 y H-6), 6.81 (t, J = 2.2 Hz, 1H, H-4), 5.26 (t, J = 9.6 Hz, 2H, H-3'), 5.24 (t, J = 9.6 Hz, 2H, H-4'), 5.18 (s br, 4H, H-9), 4.99 (dd, J = 9.6, 7.7 Hz, 2H, H-2'), 4.54 (d, J = 7.7 Hz, 2H, H-1'), 4.51-4.46 (m, 2H, H-12 a), 4.43-4.37 (m, 2H, H-12 b), 4.01 (d, J = 9.6 Hz, 2H, H-5'), 3.87 (s, 3H, OCH₃ - H-8), 3.82-3.78 (m, 2H, H-14 a), 3.67 (s, 6H, OCH₃ - H-7'), 3.52-3.48 (m, 2H, H-14 b), 2.18-2.11 (m, 4H, H-13), 2.04 (s, 6H, OAc), 1.99 (s, 12H, OAc).

¹³C-RMN (125 MHz, CDCl₃): 170.1 (CO), 169.5 (CO), 169.5 (CO), 167.4 (C-6'), 166.7 (C-7), 159.5 (C-3 and C-5), 143.4 (C-10), 132.2 (C-1), 124.1 (C-11), 108.7 (C-2 and C-6), 107.3 (C-4), 100.6 (C-1'), 72.4 (C-5'), 72.0 (C-3'), 71.3 (C-2'), 69.5 (C-4'), 65.8 (C-14), 62.2 (C-9), 53.0 (C-7'), 52.4 (C-8), 46.6 (C-12), 30.2 (C-13), 20.8 (AcO), 20.7 (AcO), 20.6 (AcO).

Los rendimientos obtenidos en la reacción de *click chemistry* entre el *core 2* y el derivado de ácido glucurónico **1**, son inferiores a los obtenidos anteriormente en nuestro grupo de investigación con derivados de lactosa (**8**); así como el resultado de otros autores con derivados acetilados o desacetilados de sacarosa, xilosa o glucosa (**52**). Esto puede ser debido al tipo de azúcar utilizado en este trabajo o a la necesidad de utilizar un mayor exceso de azúcar para evitar la aparición de compuesto monosustituido. Aun así, se consiguieron rendimientos moderados (40%) a tiempos de reacción cortos (90 min), por lo que estos resultados pueden ser optimizados con el objetivo de aumentar los rendimientos de reacción y mejorando la sostenibilidad del proceso (reducción de los requerimientos energéticos, tiempos de reacción, uso de disolventes...).

B) Reacción *click* en molino de bolas

Una vez estudiada la reacción *click* entre la azida del glucurónico **1** y el *core* divalente **2** para la obtención del glicodendrímico **3**, empleando microondas, y vistos tanto los beneficios como los posibles aspectos a optimizar, se decide probar dicha reacción en el molino de bolas con el fin de reducir y/o eliminar el disolvente para que el proceso sea más sostenible.

Señalar que hasta la fecha no se ha descrito ninguna reacción de *click chemistry* en un molino de bolas.

– Reacción en ausencia de disolvente

Se hicieron reaccionar los compuestos **1** y **2**, tal y como se describió en el apartado 3.2. B), del Procedimiento Experimental. Debido a la necesidad de llenar 2/3 del volumen total del reactor, para que el molino funcione con normalidad y sin que las bolas produzcan ningún daño al mismo, y dado que, la presente reacción se llevó a cabo en ausencia de disolvente, fue necesario adicionar unos miligramos de sílica como auxiliar inerte de la molienda.

La reacción se siguió mediante la toma de muestras y análisis mediante TLC de las mismas. Una vez puesta en marcha, se realizó una toma de muestra a las 5 h (Figura 23).

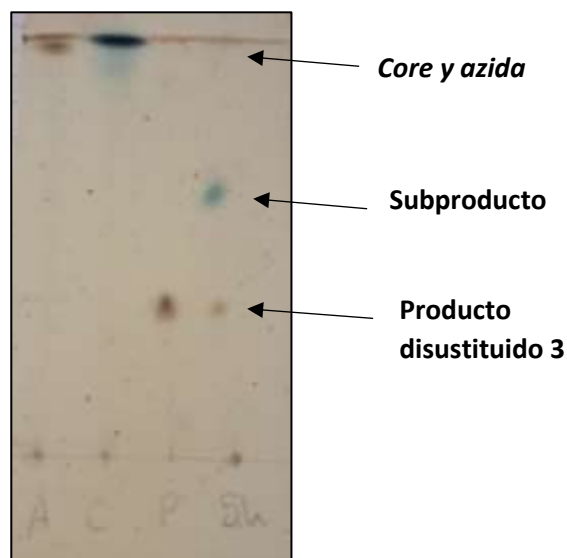


Figura 23. TLC a las 5 h de reacción, empleando como fase móvil CH_2Cl_2 : MeOH (97:3).

Se observó claramente la formación tanto del compuesto disustituido **3**, como del subproducto, que apareció más desplazado y con coloración azul. Se detectó poca cantidad tanto de azida **1** como de *core* **2**, por lo que se pensó que la reacción debía estar próxima a su fin. A las 6 y 7 h se volvió a tomar muestra del vaso de molienda y las TLCs no mostraron diferencia con la comentada anteriormente, por lo que se consideró que a partir de las 5 h la reacción no evolucionaba y, tras 7 h, se dio la misma por finalizada.

Una vez finalizada la reacción, se llevó a cabo una cromatografía en columna para separar las distintas fracciones. En una primera fase se empleó como eluyente la mezcla CH_2Cl_2 : AcOEt (86:14), que permitió obtener por separado la parte sin reaccionar de la azida **1** y del *core* **2**. Y en una segunda fase, se utilizó CH_2Cl_2 : MeOH (97:3), separando parcialmente en este caso, el producto **3** y el subproducto, correspondientes posiblemente, uno a la cicloadición sobre únicamente uno de los grupos alquino del *core* (subproducto) y el producto correspondiente a la doble cicloadición sobre el *core* (**3**) (espectro coincidente con Figura 22). Obteniéndose el glicodendrímico **3** con un 60% de rendimiento.

En su espectro, pudimos determinar claramente las señales características del producto **3**, como un singlete a 8,1 ppm asociado a los hidrógenos de cada uno de los anillos de triazol, además de las comentadas con anterioridad, que son fundamentales a la hora de identificarlo. Concretamente, en el espectro de RMN se observaron dos singletes, uno a 8,1 ppm y otro a 7,9 ppm, que podrían corresponder a anillos de triazol, como hemos comentado, lo que hizo pensar

en la posibilidad de que existieran dos isómeros de este producto disustituido: el isómero 1,5-disustituido (Figura 24) y el isómero 1,4-disustituido (Figura 25).

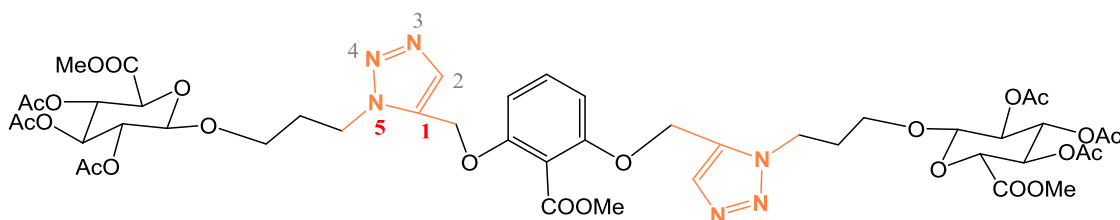


Figura 24. Isómero 1,5 del producto 3.

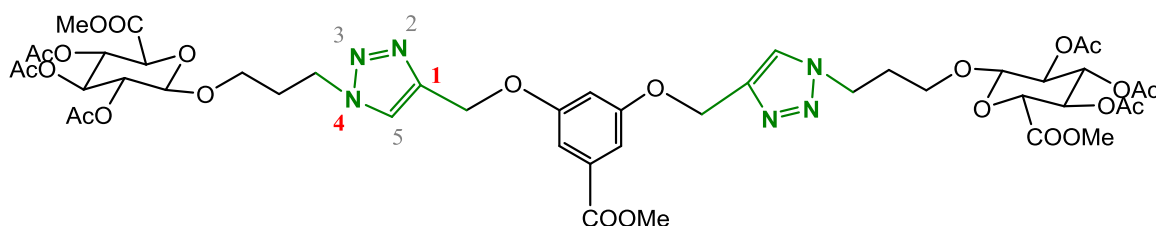


Figura 25. Isómero 1,4 del producto 3.

Estudiando la química de azidas con grupos alquino (Cicloaddición 1,3-dipolar o cicloaddición de Huisgen), se puede observar que existe la posibilidad de que el sustrato *core* reaccione con la azida por el nitrógeno en posición 1 para dar el triazol, o por el contrario que lo haga por el nitrógeno de la posición 3 de la azida. De esta forma en ambos casos obtenemos los derivados triazólicos, pero no totalmente semejantes, son isómeros. La ausencia de catalizador y de disolvente supone la aparición de los dos compuestos, es por ello que se generan en esta reacción. Sin embargo, el empleo de catalizadores de cobre y agua, dirige la reacción hacia la formación de uno solo de los isómeros (isómero 1,4), como ocurría en la reacción llevada a cabo en microondas, comentada con anterioridad en el apartado 4.2. A). (88,89).

Empleando métodos mecanoquímicos, conseguimos obtener el producto deseado, aun llevando a cabo la reacción en ausencia de disolvente. Es cierto, que sería posible optimizar las condiciones de síntesis para obtener así mejores rendimientos y selectividad al producto disustituido, incluso llegando a disminuir el tiempo de reacción. Pero considerando que este tipo de procesos no había sido empleado con derivados del ácido glucurónico, este trabajo aporta resultados prometedores en este campo a desarrollar.

Tras los resultados obtenidos, se decide probar la misma reacción en presencia de disolvente y catalizador, para estudiar si mejora la selectividad hacia uno de los dos isómeros.

– Reacción en DMF: H₂O

Se llevó a cabo la reacción, utilizando como disolvente una mezcla DMF: H₂O, CuSO₄ como catalizador y ascorbato sódico. Se decidió utilizar DMF porque se trata de un disolvente ampliamente utilizado en las reacciones de tipo *click* tradicionales (45).

Se tomó una muestra del vaso de molienda a los 40 min a partir del inicio de reacción (Figura 26), donde pudieron detectarse tanto el producto disustituido, como el subproducto, y azida y *core* aún sin reaccionar. Tras continuar viendo la evolución en las placas, se planteó el final de la reacción a las 6 horas (Figura 27).

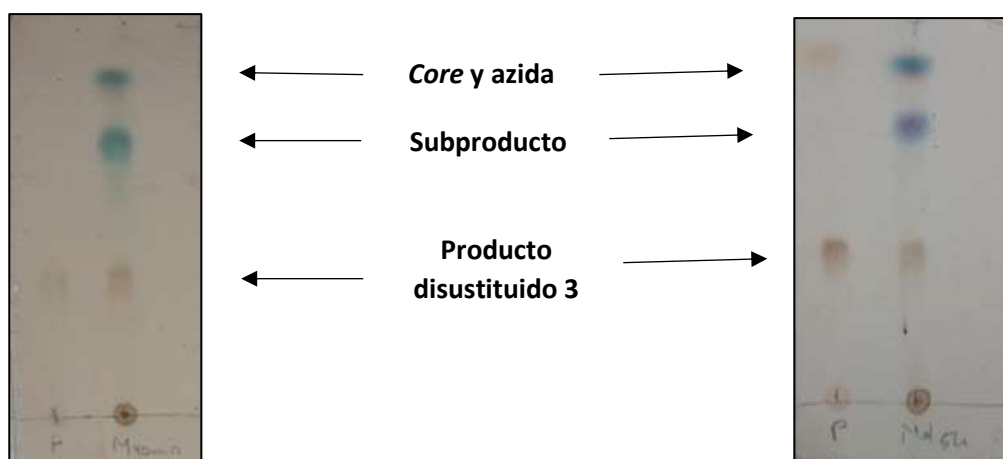


Figura 26. TLC a los 40 min de reacción, en AcOEt.

Figura 27. TLC a los 6 h de reacción, en AcOEt.

Una vez finalizada la reacción, se procedió a la columna de purificación empleando como fase móvil AcOEt, a partir de la cual se consiguió purificar el compuesto disustituido, glicodendrímico **3** (su espectro aparece representado en Figura 22).

Se logró obtener un 37 % de rendimiento al producto disustituido **3**, presentándose este únicamente como un único isómero.

Por tanto, se mejoró la selectividad del proceso. Posteriormente, se llevó a cabo un nuevo estudio en el cual se intercambiaron los disolventes orgánicos por disolventes sostenibles procedentes de biomasa.

C) Reacción *click* en disolventes sostenibles

Dada la importancia de emplear metodologías sintéticas sostenibles, como se ha ido comentado, uno de los puntos sobre los que podemos actuar es la disminución del empleo de disolventes orgánicos. En los ensayos comentados en los puntos 4.2. A) y 4.2. B), se utilizaban dispositivos como el molino de bolas y el microondas, que suponen una mejora significativa en cuanto a la sostenibilidad, con respecto a los métodos de síntesis convencional. Pero existe la

posibilidad de optimizar estas metodologías, intercambiando los disolventes orgánicos empleados, por disolventes procedentes de biomasa, haciendo que de esta forma sean procesos aún más favorables para el medio ambiente.

En este caso, el disolvente empleado será DMA1 (Figura 2), el cual presenta propiedades físicas y químicas muy semejantes a las de la DMF.

En el caso del microondas, la elección del disolvente es un aspecto fundamental a la hora de asegurar el éxito de la reacción, ya que éste influye en el paso de las ondas microondas hasta los reactivos, permitiendo así el aumento de temperatura de estos y, en consecuencia, que tenga lugar la reacción (85). En el caso del molino de bolas, debido a que el calor se genera gracias a la energía mecánica, las características específicas del disolvente, son menos importantes.

– Reacción en microondas empleando DMA1

Manteniendo la concentración de sustratos de la reacción en DMF: H₂O, asistida por microondas (apartado 3.2. A)), se disolvieron los reactivos en 2 ml de DMA1: H₂O (98:2). Tras 90 min de reacción (Figura 28), se observó, por TLC, la ausencia de reactivos de partida **1** y **2**, y se detectó compuesto **3**, así como subproducto.

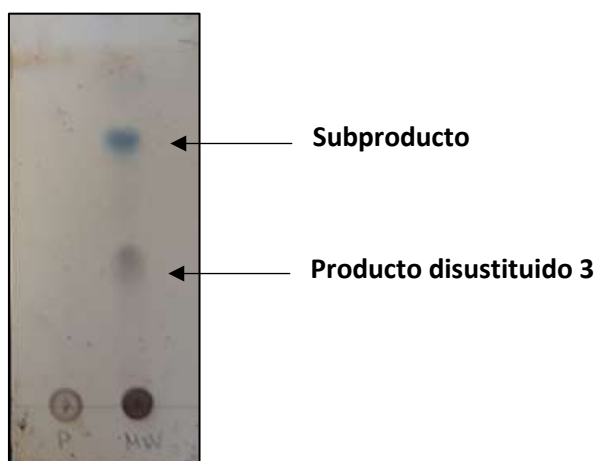


Figura 28. TLC de la mezcla de reacción a los 90 min en AcOEt.

Se purificó el producto **3** mediante cromatografía en columna. Tras ello, el compuesto fue recogido en las mismas fracciones que el disolvente de la reacción, DMA1. Esto nos llevó a desarrollar otro segundo proceso de purificación basado en la diferente solubilidad del producto y del disolvente en agua. La mezcla se sometió al tratamiento comentado en el apartado 3.2. C), por el cual el producto obtenido se somete a filtración tras provocar su precipitación en H₂O ultra pura y puesto en condiciones de baja temperatura, podemos recuperar el DMA1 empleado, después de evaporar el H₂O a presión reducida. Esto es posible gracias a que el DMA1

es arrastrado por H₂O y separado así del producto. El glicodendrímico precipita debido a que el H₂O provoca el aumento de la polaridad del medio, favoreciendo que el compuesto tenga menos tendencia a quedarse en la mezcla DMA1: H₂O, y precipite.

Por tanto, el rendimiento al glicodendrímico disustituido **3** fue del 40 %. El espectro de RMN-¹H del compuesto disustituido, se corresponde con la Figura 22. El glicodendrímico se recuperó en su forma isoméricamente pura.

Comparando los resultados cuando se utiliza el disolvente orgánico DMF frente al sostenible, observamos que la DMF aporta iguales rendimientos, pero es posible que, optimizando los procesos, sobre todo la separación del producto y el disolvente verde, consigamos mejorar estos datos.

5. CONCLUSIONES

1) Se ha llevado a cabo la síntesis de los compuestos de partida, compuesto **1** y compuesto **2**, necesarios para llevar a cabo la reacción de *click chemistry*. Para la síntesis del compuesto **1** se ha utilizado el protocolo descrito por Chen y cols. (86) obteniéndose rendimientos similares a los descritos por estos autores. El compuesto **2** ha sido sintetizado acorde al protocolo descrito previamente por el grupo de investigación (8), obteniéndose también valores de rendimientos similares.

Ambos compuestos han sido caracterizados por ^1H -RMN y ^{13}C -RMN, corroborando sus estructuras.

2) La reacción de *click chemistry* entre el compuesto **1** y **2**, llevada a cabo en microondas, dio lugar a un rendimiento del 40% empleando 90 min de reacción, lo que permitió reducir los tiempos de reacción, en comparación con las estrategias tradicionales, consiguiendo utilizar un menor consumo energético y con ello, mayor sostenibilidad del proceso.

3) La mecanoquímica en ausencia de disolvente, nunca antes evaluada en este tipo de reacciones sintéticas, aporta resultados prometedores, dando lugar al producto deseado **3** con elevados rendimientos (60%), sin necesidad de emplear disolventes orgánicos contaminantes, con la consiguiente mejora en las condiciones de seguridad y toxicidad de los procesos. Este ensayo, puede considerarse el punto de partida para continuar realizando estudios en este campo, de forma que se consiga optimizar el protocolo de reacción, haciendo que disminuya el tiempo empleado y con ello aumenten aún más las características de sostenibilidad.

4) En cuanto al empleo del molino de bolas con disolventes orgánicos y con las mismas condiciones que la reacción asistida por microondas, se puede señalar que permite obtener el glicodendrímico **3** con rendimientos semejantes (37%) a los obtenidos en la reacción con microondas. Sin embargo, la selectividad en este caso es mayor, ya que, además de la temperatura inferior generada en mecanoquímica, se utilizó un catalizador de cobre que permitió la formación del glicodendrímico en su forma isoméricamente pura.

5) La reacción asistida por microondas empleando DMA1 como disolvente verde, da lugar a un rendimiento adecuado (40%) al glicodendrímico **3**. Lo que demuestra, la posibilidad de sintetizar el compuesto deseado en ausencia de disolventes contaminantes, con buen rendimiento, tiempos de reacción cortos y gasto energético reducido. Este ensayo supone el primer paso de sucesivos estudios que permitirán optimizar las condiciones y rendimientos, de forma que logremos aumentar la sostenibilidad del proceso.

Por todo ello, podemos destacar que tanto el microondas como el molino de bolas, permiten llevar a cabo procesos sintéticos que se rigen por los principios de la Química Sostenible. El número de etapas de reacción puede verse disminuido, incluso llegando a ser posible los procedimientos en *one pot*. Empleando estas metodologías, resulta innecesario llevar a cabo procesos de aislamiento del producto, por lo que se reduce notablemente el gasto de disolventes orgánicos, el tiempo de reacción y el consumo energético. Todo ellos dando lugar a buenos rendimientos y selectividad, con posibilidad de escalado industrial.

6. BIBLIOGRAFÍA

1. Lis H, Sharon N. Lectins: Carbohydrate-Specific Proteins That Mediate Cellular Recognition †. **1998**;2665(94).
2. Lundquist JJ, Toone EJ. The Cluster Glycoside Effect. *Chem Rev.* **2002**;102(2):555–78.
3. Delbianco M, Bharate P, Varela-Aramburu S, Seeberger PH. Carbohydrates in supramolecular chemistry. *Chem Rev.* **2016**;116(4):1693–752.
4. Müller C, Despras G, Lindhorst TK. Organizing multivalency in carbohydrate recognition. *Chem Soc Rev.* **2016**;45(11):3275–302.
5. Appelhans D, Klajnert-Maculewicz B, Janaszewska A, Lazniewska J, Voit B. Dendritic glycopolymers based on dendritic polyamine scaffolds: view on their synthetic approaches, characteristics and potential for biomedical applications. *Chem Soc Rev.* **2015**;44(12):3968–96.
6. Roy R, Shiao TC, Rittenhouse-Olson K. Glycodendrimers: Versatile tools for nanotechnology. *Brazilian J Pharm Sci.* **2013**;49(SPL.ISS.):85–108.
7. Lepenies B, Yin J, Seeberger PH. Applications of synthetic carbohydrates to chemical biology. *Curr Opin Chem Biol.* **2010**;14(3):404–11.
8. Bayón C, He N, Deir-Kaspar M, Blasco P, André S, Gabius HJ, et al. Direct Enzymatic Branch-End Extension of Glycocluster-Presented Glycans: An Effective Strategy for Programming Glycan Bioactivity. *Chem - A Eur J.* **2017**;23(7):1623–33.
9. Deir-Kaspar M. Síntesis de nanoestructuras basadas en carbohidratos y estudio de la interacción con viscumina. Universidad Complutense de Madrid; **2015**.
10. Vohra S. Amphiphilic dendrons dendrimers based on polyester. **2018**;(July):1–138.
11. Caminade A-M, Yan D, Smith DK. Dendrimers and hyperbranched polymers. *Chem Soc Rev.* **2015**;44(12):3870–3.
12. Abbassi L, Chabre YM, Kottari N, Arnold AA, André S, Josserand J, et al. Multifaceted glycodendrimers with programmable bioactivity through convergent, divergent, and accelerated approaches using polyfunctional cyclotriphosphazenes. *Polym Chem.* **2015**;6(44):7666–83.
13. Lee CC, MacKay JA, Fréchet JMJ, Szoka FC. Designing dendrimers for biological

- applications. *Nat Biotechnol.* **2005**;23(12):1517–26.
14. Pifferi C, Daskhan GC, Fiore M, Shiao TC, Roy R, Renaudet O. Aminoxyated Carbohydrates: Synthesis and Applications. *Chem Rev.* **2017**;117(15):9839–73.
 15. Li JP, Kusche-Gullberg M. Heparan Sulfate: Biosynthesis, Structure, and Function. *Int Rev Cell Mol Biol.* **2016**;325:215–73.
 16. Velandia ML, Castellanos JE. Virus del dengue : estructura y ciclo viral Dengue virus : structure and viral cycle. **2011**;15(571):33–43.
 17. Marks RM, Lu H, Sundaresan R, Toida T, Suzuki A, Imanari T, et al. Probing the interaction of dengue virus envelope protein with heparin: Assessment of glycosaminoglycan-derived inhibitors. *J Med Chem.* **2001**;44(13):2178–87.
 18. Halstead SB, Cohen SN. Dengue Hemorrhagic Fever at 60 Years: Early Evolution of Concepts of Causation and Treatment. *Microbiol Mol Biol Rev.* **2015**;79(3):281–91.
 19. Dasgupta S, Nitz M. Use of N,O-dimethylhydroxylamine as an anomeric protecting group in carbohydrate synthesis. *J Org Chem.* **2011**;76(6):1918–21.
 20. Anastas PT, Warner JC. *Green chemistry: theory and practice.* New York: Oxford University Press; **1998**.
 21. Bertrand O, Wilson P, Burns JA, Bell GA, Haddleton DM. Cu(0)-mediated living radical polymerisation in dimethyl lactamide (DML); An unusual green solvent with limited environmental impact. *Polym Chem.* **2015**;6(48):8319–24.
 22. Farrán A, Cai C, Sandoval M, Xu Y, Liu J, Hernáiz MJ, et al. Green Solvents in Carbohydrate Chemistry: From Raw Materials to Fine Chemicals. *Chem Rev.* **2015**;115(14):6811–53.
 23. Pérez-Sánchez M, Cortés Cabrera Á, García-Martín H, Sinisterra JV, García JI, Hernáiz MJ. Improved synthesis of disaccharides with *Escherichia coli* β -galactosidase using bio-solvents derived from glycerol. *Tetrahedron.* **2011**;67(40):7708–12.
 24. Pérez-Sánchez M, Sandoval M, Hernáiz MJ. Bio-solvents change regioselectivity in the synthesis of disaccharides using *Biolacta* β -galactosidase. *Tetrahedron.* **2012**;68(9):2141–5.
 25. Bayón C, Moracci M, Hernáiz MJ. A novel, efficient and sustainable strategy for the synthesis of α -glycoconjugates by combination of a α -galactosynthase and a green solvent. *RSC Adv.* **2015**;5(68):55313–20.

26. Hernáiz MJ, Alcántara AR, García JI, Sinisterra J V. Applied biotransformations in green solvents. *Chem - A Eur J.* **2010**;16(31):9422–37.
27. Pérez-Sánchez M, Sandoval M, Cortés-Cabrera A, García-Marín H, Sinisterra J V., García JI, et al. Solvents derived from glycerol modify classical regioselectivity in the enzymatic synthesis of disaccharides with *Biolacta* β -galactosidase. *Green Chem.* **2011**;13(10):2810–7.
28. Bayón C, Cortés Á, Aires-Trapote A, Civera C, Hernáiz MJ. Highly efficient and regioselective enzymatic synthesis of β -(1 \rightarrow 3) galactosides in biosolvents. *RSC Adv.* **2013**;3(30):12155–63.
29. Kaupp G. Solvent-free Organic Synthesis. By Koichi Tanaka. *Angew Chemie Int Ed.* **2003**;42(40):4851–2.
30. Jessop PG, Trakhtenberg S, Warner J. The twelve principles of green chemistry. *ACS Symp Ser.* **2009**;1000:401–36.
31. Calvo-Flores FG, Monteagudo-Arrebola MJ, Dobado JA, Isac-García J. Green and Bio-Based Solvents. *Top Curr Chem.* **2018**;376(3):1–40.
32. Cheah WY, Ling TC, Juan JC, Lee DJ, Chang JS, Show PL. Biorefineries of carbon dioxide: From carbon capture and storage (CCS) to bioenergies production. *Bioresour Technol.* **2016**;215:346–56.
33. Jamil F, Saxena SK, Al-Muhtaseb AH, Baawain M, Al-Abri M, Viswanadham N, et al. Valorization of waste “date seeds” bio-glycerol for synthesizing oxidative green fuel additive. *J Clean Prod.* **2017**;165:1090–6.
34. Lee CS, Aroua MK, Daud WMAW, Cognet P, Pérès-Lucchese Y, Fabre PL, et al. A review: Conversion of bioglycerol into 1,3-propanediol via biological and chemical method. *Renew Sustain Energy Rev.* **2015**;42:235–44.
35. Cardona C, Posada J, Montoya M. Proceedings of European Congress of Chemical Engineering (ECCE-6). *Eur Congr Chem.* **2007**;(September):1–17.
36. Stoyadinova H, Zlatanova Z, Spassova M, Spassov T, Baklanov M. Influence of milling conditions on the hydriding properties of Mg-C nanocomposites. *J Nanomater.* **2015**;2015.
37. Tiwari VK, Mishra BB, Mishra KB, Mishra N, Singh AS, Chen X. Cu-Catalyzed Click Reaction

- in Carbohydrate Chemistry. *Chem Rev.* **2016**;116(5):3086–240.
38. Roy R, Murphy P V., Gabius HJ. Multivalent carbohydrate-lectin interactions: How synthetic chemistry enables insights into nanometric recognition. *Molecules.* **2016**;21(5).
 39. Ramos-soriano J, Illescas BM, Rojo J, Delgado R. Synthesis of Highly Efficient Multivalent Disaccharide/[60]Fullerene Nanoballs for Emergent Viruses. **2019**;
 40. Domínguez-Rodríguez P, Reina JJ, Gil-Caballero S, Nieto PM, de Paz JL, Rojo J. Glycodendrimers as Chondroitin Sulfate Mimetics: Synthesis and Binding to Growth Factor Midkine. *Chem - A Eur J.* **2017**;23(47):11338–45.
 41. Cendret V, François-Heude M, Méndez-Ardoy A, Moreau V, García Fernández JM, Djedaini-Pilard F. Design and synthesis of a “click” high-mannose oligosaccharide mimic emulating binding affinity towards Con A. *Chem Commun.* **2012**;48(31):3733–5.
 42. Kielland N. Desarrollo de Nuevas Reacciones Multicomponente basadas en la activación de isonitrilos . Aplicaciones en biomedicina. Universidad de Barcelona. **2009**. 43,44.
 43. Rinaldi L, Martina K, Baricco F, Rotolo L, Cravotto G. Solvent-Free Copper-Catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition under Mechanochemical Activation. **2015**;2837–49.
 44. Chatkewitz LE, Halonski JF, Padilla MS, Young DD. Investigation of copper-free alkyne/azide 1,3-dipolar cycloadditions using microwave irradiation. *Bioorganic Med Chem Lett.* **2018**;28(2):81–4.
 45. Gomes RS, Jardim GAM, de Carvalho RL, Araujo MH, da Silva Júnior EN. Beyond copper-catalyzed azide-alkyne 1,3-dipolar cycloaddition: Synthesis and mechanism insights. *Tetrahedron.* **2019**;75(27):3697–712.
 46. Miners SA, Fay MW, Baldoni M, Besley E, Khlobystov AN, Rance GA. Steric and Electronic Control of 1,3-Dipolar Cycloaddition Reactions in Carbon Nanotube Nanoreactors. *J Phys Chem C.* **2019**;123(10):6294–302.
 47. Presolski S. Modification of Protein Scaffolds via Copper-Catalyzed. **2007**:187–93.
 48. Sadowski LP, Edem PE, Valliant JF, Adronov A. Synthesis of Polyester Dendritic Scaffolds for Biomedical Applications. *Macromol Biosci.* **2016**;1475–84.
 49. Nayak J, Devi C, Vidyapeeth L. Microwave assisted synthesis : a green chemistry approach. *Int Res J Pharm Appl Sci.* **2016**;3(5):278–85.

50. Anwar J, Shafique U, Waheed-uz-Zaman, Rehman R, Salman M, Dar A, et al. Microwave chemistry: Effect of ions on dielectric heating in microwave ovens. *Arab J Chem.* **2015**;8(1):100–4.
51. Mishra RR, Sharma AK. Microwave-material interaction phenomena: Heating mechanisms, challenges and opportunities in material processing. *Compos Part A Appl Sci Manuf.* **2016**;81:78–97.
52. Richel A, Laurent P, Wathélet B, Wathélet J, Paquot M. *Comptes Rendus Chimie* Microwave-assisted conversion of carbohydrates . State of the art and outlook. **2011**;14:224–34.
53. Silva A de S e., de Magalhães WT, Moreira LM, Rocha MVP, Bastos AKP. Microwave-assisted extraction of polysaccharides from *Arthrospira (Spirulina) platensis* using the concept of green chemistry. *Algal Res.* **2018**;35(August):178–84.
54. Jiménez GI, Bravo JA, Vila JL. Synthesis of Benzylidene Acetophenone Under Microwave Irradiation ; *Green Chemistry. Rev Boliv Química.* **2016**;33(5):179–82.
55. Savaram K, Li M, Tajima K, Takai K, Hayashi T, Hall G, et al. Dry microwave heating enables scalable fabrication of pristine holey graphene nanoplatelets and their catalysis in reductive hydrogen atom transfer reactions. *Carbon N Y.* **2018**;139:861–71.
56. Ding H, Ye W, Wang Y, Wang X, Li L, Liu D, et al. Process intensification of transesterification for biodiesel production from palm oil: Microwave irradiation on transesterification reaction catalyzed by acidic imidazolium ionic liquids. *Energy.* **2018**;144:957–67.
57. Li S, Zhang G, Wang P, Zheng H, Zheng Y. Microwave-enhanced Mn-Fenton process for the removal of BPA in water. *Chem Eng J.* **2016**;294:371–9.
58. Kokel A, Schäfer C, Török B. Application of microwave-assisted heterogeneous catalysis in sustainable synthesis design. *Green Chem.* **2017**;19(16):3729–51.
59. Gaudino EC, Rinaldi L, Rotolo L, Carnaroglio D, Pirola C, Cravotto G, et al. Heterogeneous phase microwave-assisted reactions under CO₂ or CO pressure. *Molecules.* **2016**;21(3).
60. Sajid M. Dendrimers based sorbents: Promising materials for analytical extractions. *TrAC - Trends Anal Chem.* **2018**;98:114–27.
61. Behren S, Westerlind U. Glycopeptides and -mimetics to detect, monitor and inhibit

- bacterial and viral infections: Recent advances and perspectives. *Molecules*. **2019**;24(6).
62. Singh MS, Chowdhury S, Koley S. Advances of azide-alkyne cycloaddition-click chemistry over the recent decade. *Tetrahedron*. **2016**;72(35):5257–83.
63. Fidalgo DM, Kolender AA, Varela O. Poly(amide-triazole)s obtained by regioselective, microwave-assisted click polymerization of bio-based monomers. *Mater Today Commun*. **2015**;2:e70–83.
64. Joosten JAF, Tholen NTH, Ait El Maate F, Brouwer AJ, Wilma Van Esse G, Rijkers DTS, et al. High-yielding microwave-assisted synthesis of triazole-linked glycodendrimers by copper-catalyzed [3+2] cycloaddition. *European J Org Chem*. **2005**;(15):3182–5.
65. Parera Pera N, Branderhorst HM, Kooij R, Maierhofer C, Van Der Kaaden M, Liskamp RMJ, et al. Rapid screening of lectins for multivalency effects with a glycodendrimer microarray. *ChemBioChem*. **2010**;11(13):1896–904.
66. Yoon K, Goyal P, Weck M. Monofunctionalization of Dendrimers with Use of Microwave – Assisted. **2007**;(c):7217–20.
67. Kikkeri R, Grünstein D, Seeberger PH. Lectin biosensing using digital analysis of Ru(II)-glycodendrimers. *J Am Chem Soc*. **2010**;132(30):10230–2.
68. Sun M, Müllen K, Yin M. Water-soluble perylenediimides: Design concepts and biological applications. *Chem Soc Rev*. **2016**;45(6):1513–28.
69. Rajakumar P, Anandhan R. Synthesis and In-vitro anti-inflammatory activity of novel glycodendrimers with benzene 1,3,5 carboxamide core and triazole as branching unit. *Eur J Med Chem*. **2011**;46(9):4687–95.
70. TIWARI VKK, Agrihari AK, Singh AS, Singh AK, Mishra N, Singh M, et al. Click inspired Synthesis of Hexa and Octadecavalent Peripheral Galactosylated Glycodendrimer and their Possible Therapeutic Applications. *New J Chem*. **2019**.
71. Hatano K, Matsuoka K, Terunuma D. Carbosilane glycodendrimers. *Chem Soc Rev*. **2013**;42(11):4574–98.
72. Han S, Kanamoto T, Nakashima H, Yoshida T. Synthesis of a new amphiphilic glycodendrimer with antiviral functionality. *Carbohydr Polym*. **2012**;90(2):1061–8.
73. Joosten JAF, Tholen NTH, El A, Brouwer AJ, Esse GW Van, Rijkers DTS, et al. High-Yielding Microwave-Assisted Synthesis of Triazole-Linked Glycodendrimers by Copper-Catalyzed

- [3 + 2] Cycloaddition. **2005**;(Scheme 3):3182–5.
74. Shiao TC, Rej R, Rose M, Pavan GM, Roy R. Synthesis of Dense and Chiral Dendritic Polyols Using Glyconanosynthon Scaffolds. *Molecules*. **2016**;21(4):1–16.
75. Cousin K, Manuel S, Monflier E, Hapiot F. Hydroformylation of Alkenes in a Planetary Ball Mill: From Additive-Controlled Reactivity to Supramolecular Control of Regioselectivity. *Angew Chemie - Int Ed*. **2017**;56(35):10564–8.
76. Fischer F, Joester M, Rademann K, Emmerling F. Survival of the Fittest: Competitive Co-crystal Reactions in the Ball Mill. *Chem - A Eur J*. **2015**;21(42):14969–74.
77. Ramrao Patil P, Ravindranathan Kartha KP. Solvent-free synthesis of thioglycosides by ball milling. *Green Chem*. **2009**;11(7):953–6.
78. Patil PR, Ravindranathan Kartha KP. Solvent-free mechanochemical synthesis of aryl glycosides. *J Carbohydr Chem*. **2008**;27(7):411–9.
79. Lingome CE, Pourceau G, Gobert-Deveaux V, Wadouachi A. Efficient synthesis of glycosylamines in solventless conditions promoted by mechanical milling. *RSC Adv*. **2014**;4(68):36350–6.
80. Bolm C, Hernández JG. From Synthesis of Amino Acids and Peptides to Enzymatic Catalysis: A Bottom-Up Approach in Mechanochemistry. *ChemSusChem*. **2018**;11(9):1410–20.
81. M'Hamed MO. Ball Milling for Heterocyclic Compounds Synthesis in Green Chemistry: A Review. *Synth Commun*. **2015**;45(22):2511–28.
82. Kumar V, Giri SK, Venugopalan P, Kartha KPR. Synthesis of cross-linked glycopeptides and ureas by a mechanochemical, solvent-free reaction and determination of their structural properties by TEM and X-ray crystallography. *Chempluschem*. **2014**;79(11):1605–13.
83. Tyagi M, Kartha KPR. Synthesis of glycotriazololipids and observations on their self-assembly properties. *Carbohydr Res*. **2015**;413:85–92.
84. Tyagi M, Khurana D, Kartha KPR. Solvent-free mechanochemical glycosylation in ball mill. *Carbohydr Res*. **2013**;379:55–9.
85. Atanda L, Shrotri A, Mukundan S, Ma Q, Konarova M, Beltramini J. Direct Production of 5-Hydroxymethylfurfural via Catalytic Conversion of Simple and Complex Sugars over Phosphated TiO. *ChemSusChem*. **2015**;8(17):2907–16.

86. Chen Y, Li Y, Yu H, Sugiarto G, Thon V, Hwang J, et al. Tailored design and synthesis of heparan sulfate oligosaccharide analogues using sequential one-pot multienzyme systems. *Angew Chemie - Int Ed.* **2013**;52(45):11852–6.
87. Roshandel S, Suri SC, Marcischak JC, Rasul G, Surya Prakash GK. Catalyst and solvent free microwave-assisted synthesis of substituted 1,2,3-triazoles. *Green Chem.* **2018**;20(16):3700–4.
88. Worrell BT, Malik JA, Fokin V V. Direct Evidence of a Dinuclear Copper Intermediate in Cu(I)-Catalyzed Azide-Alkyne Cycloadditions. **2010**;340(1):457–61.
89. Tireli M, Maračić S, Lukin S, Kulcsár MJ, Žilić D, Cetina M, et al. Solvent-free copper-catalyzed click chemistry for the synthesis of N-heterocyclic hybrids based on quinoline and 1, 2, 3-triazole. *Beilstein J Org Chem.* **2017**;13:2352–63.