

## Tesis de Posgrado

# Hidratos de carbono en *Cyttaria harioti* Fischer : Estudio de la estructura de un polisacárido

Fernández Cirelli, Alicia

1972

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Químicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

**Cita tipo APA:**

Fernández Cirelli, Alicia. (1972). Hidratos de carbono en *Cyttaria harioti* Fischer : Estudio de la estructura de un polisacárido. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. [http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_1398\\_FernandezCirelli.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1398_FernandezCirelli.pdf)

**Cita tipo Chicago:**

Fernández Cirelli, Alicia. "Hidratos de carbono en *Cyttaria harioti* Fischer : Estudio de la estructura de un polisacárido". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1972. [http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_1398\\_FernandezCirelli.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1398_FernandezCirelli.pdf)

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

HIDRATOS DE CARBONO EN CYTTARIA HARIOTI FISCHER.

ESTUDIO DE LA ESTRUCTURA DE UN POLISACARIDO.

ALICIA FERNANDEZ CIRELLI

Tesis presentada para optar al título de

Doctor en Química

(Orientación Química Orgánica)

1972

1398  
ej. 2

A mi madre

A Ricardo

Mi más sincero agradecimiento a la  
Dra. Rosa Muchnik de Lederkremer, quien  
sugiriera el tema del presente trabajo y di-  
rigiera su desarrollo, por su interés y dedi-  
cación en mi formación científica.

Agradezco también:

- . Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, por haberme otorgado una beca de iniciación que permitió llevar a cabo parte de esta tesis.
- . A la Dra. I. J. Gamundí por su interés y ayuda en la clasificación de especies de Cyttaria.
- . A la Dra. H. Pezzano, por la ultracentrifugación.
- . Al Dr. R. J. Sturgeon (Edimburgo), por muestras de 2,3,4- y 2,4,6-tri-O-metil-glucosa.
- . Al Dr. K. Matsuda (Sendai, Japón), por una muestra de acetato de isomaltosa.
- . Al Dr. V. C. Barry (Dublin, Irlanda), por una muestra de laminaribiosa.
- . A la Dra. B. B. de Deferrari, por los microanálisis realizados.
- . Al Sr. J. J. Ferrer, por los espectros realizados.
- . A mis compañeros, profesores y personal del Departamento de Química Orgánica, por su apoyo y cordialidad.

## INTRODUCCION

El objeto del presente trabajo es iniciar estudios estructurales sobre los polisacáridos de hongos que abundan en nuestro país. Cyttaria hariatii Fischer es una de las especies más abundantes perteneciente a la familia Cyttariaceae, que se encuentra en los bosques patagónicos, donde constituye una plaga, por los tumores que produce en varias especies de Nothofagus.

Se ha estudiado en particular un polisacárido extraíble con agua. Dos particularidades estructurales caracterizan a este polisacárido. La presencia de ácido D-arabino-hexulosónico, no encontrado antes en hongos y sólo descrito como componente de un polisacárido, aislado de un alga, del cual los autores no dan mayores detalles de estructura.

Por otra parte, la presencia de glucosa con uniones  $\alpha$ - y  $\beta$ -glucosídicas es también un hecho poco común en polisacáridos.

Los estudios químicos sobre los hongos de esta familia podrían ser de utilidad taxonómica para establecer relaciones entre las especies, que permitan diferenciar subgéneros.

CAPITULO I

HONGOS DEL GENERO CYTTARIA

## INTRODUCCION

Los hongos del género Cyttaria no están muy distribuidos en la naturaleza. Son parásitos de varias especies de Nothofagus, en los cuales producen tumores muy característicos, llamados vulgarmente nudos, que invaden el árbol y finalmente producen su muerte, lo que constituye una grave amenaza para la supervivencia de nuestros bosques patagónicos. Pertenecen a la clase Ascomycetes, que incluye algunos de los hongos más destructores. Por ejemplo, un Ascomycete, el Endothia parasítica ha destruído bosques de castaño en Norte América y otro, el Ceratocystis ulmi amenaza extinguir el roble americano.

Algunas de las especies son comestibles y constitufan un alimento muy apreciado por los habitantes de las zonas australes de nuestro país y Chile, especialmente los indígenas, quienes llegaban a derribar los árboles para poder cosechar estos hongos, preparándolos o condimentándolos luego de diversas maneras. Los araucanos solían utilizarlos para hacer una bebida alcohólica, lo que se explica debido a su alto contenido en hidratos de carbono.

Existen todavía controversias respecto de la clasificación sistemática de estos hongos, por lo que los estudios químicos pueden ser de gran utilidad taxonómica.

## CLASIFICACION SISTEMATICA

La posición de la especie Cyttaria harioti dentro del reino vegetal es la siguiente:



REINO: Plantae

DIVISION: Eumycophyta

CLASE: Ascomycetes

SERIE: Discomycetes

ORDEN: Cyttariales

FAMILIA: Cyttariaceae

GENERO: Cyttaria

ESPECIE: Cyttaria harioti

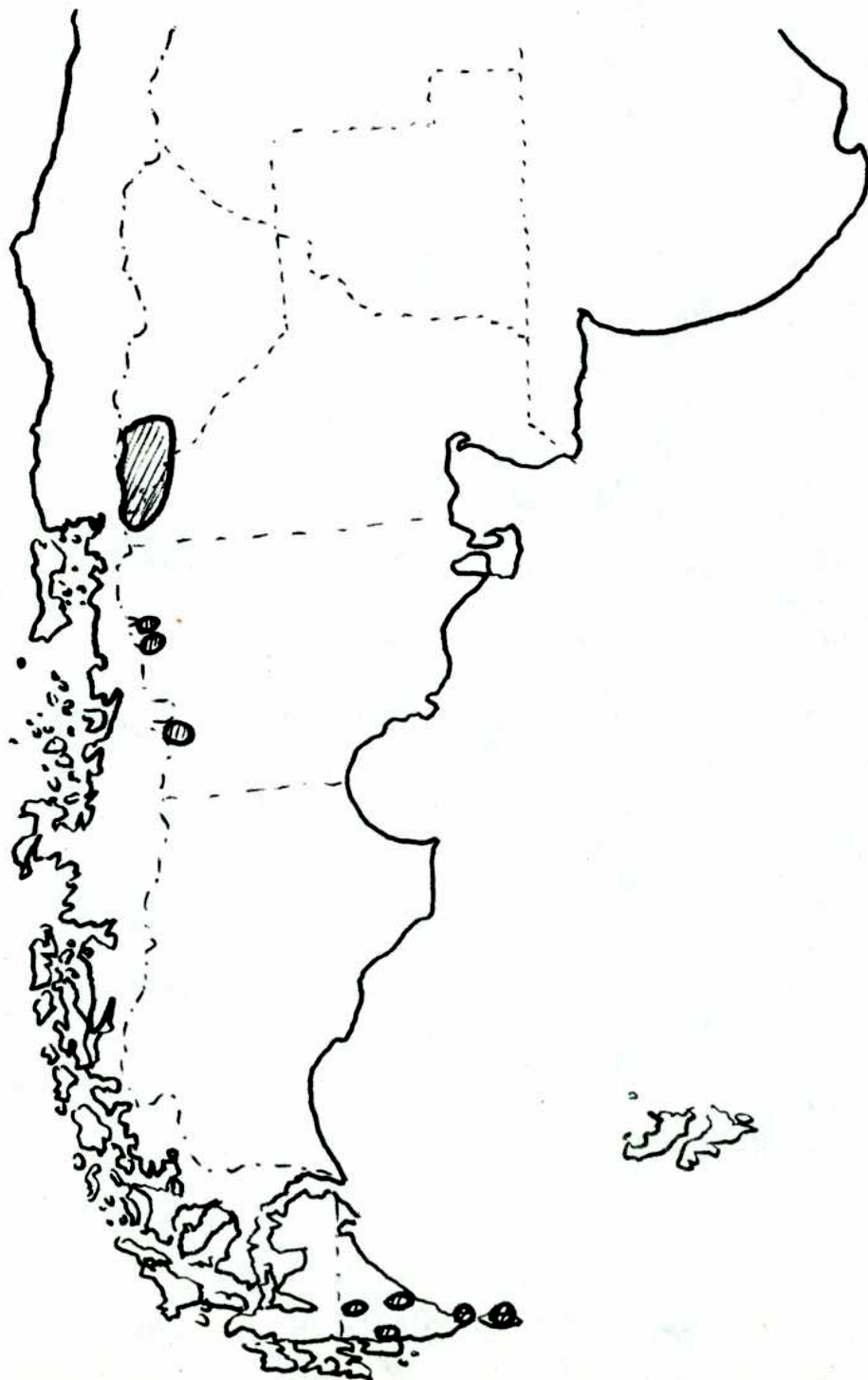
Gamundí (1971) en su revisión de las especies sudamericanas considera a la familia Cyttariaceae en un orden especial dentro de los Discomycetes, el orden de los Cyttariales. Este nuevo orden empalmaría los Discomycetes con las Sphaeriales. Los Cyttariales presentan características comunes con ambos.

#### DISTRIBUCION GEOGRAFICA

Los Cyttariales se encuentran en el hemisferio sur: Sudamérica, Nueva Zelandia, Tasmania y Australia.

En Nueva Zelandia se encuentran en las islas del norte y del sur. En Tasmania, en la región oeste de la isla. En Australia, crece en ciertas zonas de Victoria (sur y este), New South Wales (noreste) y Queensland (sudeste) (Santesson, 1945).

En América del Sur, se encuentran en los bosques extendidos en ambas laderas de los Andes desde aproximadamente 30° L.S. hasta el cabo de Hornos, en Argentina y Chile (Figura 1).

FIGURA 1DISTRIBUCION DE CYTTARIA HARIOTI F.EN LA REPUBLICA ARGENTINA

## LAS CYTTARIALES SUDAMERICANAS

Las especies sudamericanas descritas son: C. hookeri, C. johowii, C. darwinii, C. exigua, C. espinosae y C. berteroi. Algunas especies son afines entre sí. Por ejemplo, C. hookeri y C. johowii constituyen un grupo homogéneo que podría formar un subgénero, mientras que el resto de las especies, con sus estromas carnosos-gelatinosos, podría incluirse en otro (Gamundí, 1971). A este respecto, los estudios químicos podrían aportar datos útiles.

### CYTTARIA HARIOTI FISCHER

Es una de las especies más abundantes. Se la conoce vulgarmente como "dihueño del cohiue". Los araucanos la llamaban "llau-llau". Predomina en primavera y verano. Su período de maduración es corto y ocurre entre los meses de noviembre y diciembre. Los nuevos estromas comienzan a aparecer en enero y febrero, pero permanecen pequeños y son poco perceptibles durante el otoño e invierno (63).

Esta especie la describió Fischer (1888) sobre un material de N. betuloides y N. antarctica coleccionado por P. Harriot en la expedición científica de Romanche al Cabo de Hornos (julio de 1882 a noviembre de 1883).

El hongo al salir del portador forma colonias sobre el tumor que rodea a la rama; los estromas jóvenes son irregularmente esféricos (diám. 2-5 mm) agrupados en gran número, de color rojo anaranjado y con la superficie cubierta con numerosas granulaciones negruzcas, que se desprenden fácilmente. El estroma cuando es joven puede ser sólido, pero en la madurez es hueco. Los tumores que provoca, semejantes a los producidos por C. darwinii, son globosos y muy grandes (hasta 30 cm de diámetro) y rodean

totalmente las ramas. Los estromas adultos, que tienen de 2 a 4,5 cm de diámetro, al desprenderse dejan una cicatriz circular (diam. 3-5 mm) lisa y con los bordes levantados; los pocos que permanecen adheridos al nudo toman color ámbar.

El aislamiento y cultivo "in vitro" de especies de Cyttaria es dificultoso (63).

CAPITULO II

ESTUDIOS QUIMICOS REALIZADOS

SOBRE CYTTARIA HARIOTI FISCHER

## ESTUDIOS QUIMICOS REALIZADOS SOBRE CYTTARIA HARIOTI

### FISCHER

La única especie de la familia sobre la cual se han realizado algunos estudios químicos es Cyttaria hariatoti Fischer.

En general, los hongos pertenecientes a la serie Discomycetes han sido mucho menos estudiados, con respecto a su composición en hidratos de carbono, que otros Ascomycetes.

Wiernik (1962) realizó el primer estudio sobre la composición química de Cyttaria hariatoti Fischer. Estableció que el extracto que mayor rendimiento producía era el acuoso.

Extracto acuoso.....	33,4%
Extracto alcohólico (96%).....	9,4%
Extracto etéreo.....	1,33%

Realizó además una serie de determinaciones sobre los estromas molidos, obteniendo los siguientes resultados:

Humedad (Dean Stark).....	16,2%
Grasas (extracto etéreo).....	1,33%
Materias nitrogenadas (Nx5,7).....	4,48%
Cenizas (550 <sup>o</sup> ).....	1,53%
Fibra cruda.....	14,7%
Azúcares reductores.....	7,0%
Azúcares invertibles.....	4,9%
Hidratos de carbono sacarificables..	41,5%

El extracto etéreo que contenía una mezcla de ácidos grasos fue analizado por cromatografía gaseosa.

El estudio de los azúcares simples presentes en el extracto acuoso de estromas de Cyttaria harioti Fischer fue realizado por Lederkremer y Ranalli (1967). Se determinaron en orden decreciente de abundancia: sacarosa, glicerol, fructosa, glucosa, D-arabitol y D-manitol (Tabla 1).

TABLA 1  
HIDRATOS DE CARBONO EN CYTTARIA HARIOTI FISCHER

Componente	Porcentaje*
Glucosa	2,7
Fructosa	3,0
Sacarosa	4,5
Glicerol	3,7
D-Arabitol	1,3
D-Manitol	0,3

\* Valores determinados sobre material seco.

Wiernik (1962) informó un porcentaje del 7% de azúcares reductores. La diferencia al valor encontrado por Lederkremer y Ranalli (1967) para glucosa y fructosa (6%) se debería a la presencia de otros azúcares reductores, presentes en el extracto acuoso y que presentan, por cromatografía en papel, movilidad menor que la sacarosa.

CAPITULO III

METODOS EMPLEADOS EN LA DETERMINACION

DE ESTRUCTURAS DE POLISACARIDOS



## INTRODUCCION

Los polisacáridos, junto con los ácidos nucleicos, las proteínas y los lípidos, son las macromoléculas de mayor importancia vital. Son polímeros de condensación que pueden considerarse formados por eliminación de moléculas de agua entre una serie de monosacáridos; estando el C-1 invariablemente involucrado en la eliminación cuando los monosacáridos son aldosas. El C-1 de una unidad monosacárido puede unirse a los C-2, 3, 4 ó 6 de la unidad de hexopiranososa siguiente. Las uniones glicosídicas pueden ser además de configuración  $\alpha$ - ó  $\beta$ -, con lo que pueden lograrse estructuras muy variadas y complejas, aunque de cierta regularidad.

A medida que fue aumentando la significación biológica de los polisacáridos, se desarrollaron nuevos métodos para su extracción, purificación y sobre todo, para la determinación de su estructura. En las dos últimas décadas el avance ha sido notable, fundamentalmente debido al empleo de métodos cromatográficos. En el caso de un compuesto de bajo peso molecular, su estudio estructural conduce generalmente a la determinación completa de su estructura. Esto no sucede en el caso de los polisacáridos. Grupos diferentes de investigadores pueden obtener resultados divergentes con el mismo tipo de polisacárido. Este hecho puede explicarse por variaciones en el material biológico, pero no deben descartarse las imprecisiones de los métodos de estudio.

La determinación de la posición de sustitución de las unidades que forman las cadenas de polisacáridos se puede dividir, fundamentalmente debido a las limitaciones de la metodología, en dos problemas: tipo de unión y secuencia de las uniones. El primer problema no presenta inconvenientes para su resolución, pero la determinación de la secuencia de las uniones y de la secuencia de unidades de monosacáridos en la cadena, resulta más compleja, debido a que no se han desarrollado hasta el momento métodos generales para su estudio. En general, los resultados experimentales llevan

a la conclusión de que ciertos elementos estructurales están presentes en el polímero y sólo rara vez puede definirse exactamente la secuencia de todas las unidades presentes.

El primer paso en el estudio de polisacáridos es el de aislamiento, en que debe cuidarse fundamentalmente que el método empleado no produzca degradación del polímero. El material debe luego purificarse exhaustivamente, ya que los polisacáridos naturales se encuentran generalmente presentes en mezclas complejas. Aquí se presenta el problema del criterio a seguir para determinar su homogeneidad, debido a que en general los polisacáridos son polidispersos.

El análisis de los azúcares componentes no presenta mayor dificultad, si bien en el caso de polisacáridos que contienen ácidos urónicos la liberación de las unidades individuales en la hidrólisis puede no ser cuantitativa.

Los estudios de oxidación con periodato, metilación, hidrólisis parcial y acetólisis aportan datos sobre el tipo y configuración de las unidades presentes y de la secuencia de las mismas.

A continuación, se describen los métodos más comunes empleados en el estudio de polisacáridos neutros y ácidos.

## AISLAMIENTO Y PURIFICACION

Los métodos de extracción y de purificación de un polisacárido revisten particular importancia debido a que se deben evitar degradaciones en el polímero, como ya se mencionó, y, por otra parte, debe siempre buscarse el máximo rendimiento en la separación ya que el problema con que se enfrenta el químico generalmente es el de obtener una gran cantidad de información con muy poco material. Por otra parte, una purificación exhaustiva y una cuidadosa investigación de la homogeneidad se hacen cada vez más imprescindibles a medida que avanzan los estudios sobre la relación entre la estructura química y la actividad biológica.

Hay pocos ejemplos en que la extracción directa conduce al aislamiento de un único polisacárido, tal es el caso de los xilanos, constituyentes de todas las plantas terrestres y algunas algas marinas, que se extraen directamente con álcali acuoso.

Pueden usarse solventes orgánicos para la extracción. Hägglund y col. (1956) extrajeron polisacáridos O-acetilados con dimetilsulfóxido.

Muchas veces, además del problema del fraccionamiento de una mezcla de polisacáridos, está el problema de eliminar las proteínas que acompañan en el extracto a los hidratos de carbono. Uno de los métodos empleados es el descrito por Sevag (1934) por el cual las proteínas se desnaturalizan por agitación en una emulsión clorofórmica, formando un gel que queda en la interfase agua-cloroformo. Este método remueve sólo pequeñas cantidades de proteínas. Se han empleado también métodos de desnaturalización de proteínas con trifluorotricloroetano (Markowitz y Henderson, 1958) y desproteínización por enzimas proteolíticas (Jeanloz, 1965).

El método más común para resolver una mezcla de polisacáridos es por precipitación fraccionada con solventes orgánicos, principalmente etanol, de su solución

acuosa.

Pueden usarse también sales de cobre para el fraccionamiento de mezclas de polisacáridos. Se han empleado soluciones de: Fehling, cuprietiléndiamina, cloruro, sulfato y acetato cúprico. El complejo insoluble formado por el polisacárido y cobre se descompone por adición de la solución alcohólica de un ácido o un agente quelante. Así se empleó solución de Fehling para la precipitación de polisacáridos que contienen manosa o xilosa con resultados satisfactorios (Jones y Stoodley, 1965). Erskine y Jones (1956) separaron mezclas de polisacáridos ácidos y neutros, por agregado de acetato cúprico y etanol hasta precipitación incipiente. Los polisacáridos neutros eran los primeros en precipitar.

Los detergentes catiónicos, tales como el cetiltrimetilamonio (CTA) y cetilpiridinio (CP) forman sales muy insolubles en agua con polianiones (Scott, 1955). Los polisacáridos neutros reaccionan solo como complejos de borato o a pH elevados, en que se favorece la ionización de algunos grupos -OH. Este método permite entonces la separación de polisacáridos ácidos y polisacáridos neutros. El reactivo generalmente usado es bromuro de cetiltrimetilamonio en solución ácida, neutra o débilmente alcalina.

Meier (1958) observó que los iones bario forman rápidamente complejos insolubles con mananos y glucomananos, probablemente por reacción con los grupos -OH de los C-2 y C-3 de manosa. Estos complejos precipitan de la solución acuosa por adición de pequeñas cantidades de hidróxido de bario.

Gardell (1957) separó mucopolisacáridos en columna de celulosa por elución con distintas mezclas de agua-etanol. Este método puede usarse para cantidades muy pequeñas de polisacárido. Antonopoulos y col. (1961) describieron una técnica para

la separación en columna de celulosa de polisacáridos ácidos basada en la diferencia de solubilidad en soluciones salinas de los complejos polisacárido-cetilpiridinio.

Las columnas de dietilaminoetilcelulosa se han utilizado satisfactoriamente para la separación tanto de polisacáridos ácidos como de polisacáridos neutros (Neukom y col., 1960). Los polisacáridos ácidos se absorben en solución neutra, mientras que los neutros lo hacen a pH alcalinos o, cuando es posible, por formación de complejos con borato cargados negativamente, mostrando un comportamiento análogo al de la formación de sales de amonio cuaternarias.

Bowness (1960) separó ácido hialurónico y condroitínsulfato en una columna de celite y fosfato de calcio, por elución con buffer fosfato pH 6,5 de molaridad creciente.

Un método de fraccionamiento útil para mezclas de polisacáridos de diferente peso molecular es la ultrafiltración, que Wilkie y col. (1957) aplicaron a la separación de dextranos, obteniendo 5 fracciones cuyos pesos moleculares oscilaban entre 11.000 y 190.000.

La electroforesis en buffer borato, método utilizado en el microanálisis tanto cuali como cuantitativo de mezclas de polisacárido (Northcote, 1954), puede emplearse en forma preparativa, usando columnas de polvo de vidrio, del tipo descrito por Porath (1956), en las que Hocevar y Northcote (1957) separaron satisfactoriamente mezclas de galactano, manano, glicógeno e inulina.

Mezclas de hidratos de carbono simples y complejos pueden separarse por diálisis, eligiendo una membrana apropiada.

La introducción relativamente reciente de una amplia variedad de geles entrecruzados, compuestos por polisacáridos (Sephadex, Agarosa) o poliacrilamida (Bio-gel) y sus derivados iónicos (Dietilaminoetil-, carboximetil-) ha mejorado y simplificado

los procedimientos de purificación.

Porath y Flodin (1959) usaron por primera vez la filtración por gel para la separación de dextranos. Los geles son insolubles en agua, pero se hinchan, y por lo tanto permiten que sólo moléculas de un cierto tamaño penetren en su red, no así las más grandes. El fraccionamiento se debe entonces fundamentalmente a las diferencias en el tamaño de las moléculas. Nordin (1962) separó satisfactoriamente maltodextrinas en columnas de Sephadex.

Barker y col. (1967) separaron los galactomanano-péptidos de Trichophyton mentagrophytes (hongo del pie de atleta), que tienen acción sensibilizadora de la piel, usando DEAE-Sephadex.

Además de su empleo en purificación, la cromatografía en geles resulta útil para el estudio de la distribución de pesos moleculares de polisacáridos. Barker y Young (1966) separaron el complejo de ácido hialurónico-proteína por cromatografía en Agarosa obteniendo simultáneamente una idea de la distribución de pesos moleculares del ácido hialurónico.

Los polisacáridos generalmente son amorfos y deben secarse cuidadosamente para prevenir que se alteren. Los métodos más comúnmente usados son por sucesivos lavados con concentraciones crecientes de etanol y finalmente éter, y por liofilización, que remueve el agua de la solución previamente congelada, por sublimación en alto vacío.

En la química de polisacáridos no hay un método general para seguir el proceso de purificación, lo que implica que tampoco existe un criterio único para determinar la pureza de un polisacárido. Generalmente los métodos empleados para determinar la homogeneidad de la muestra son: a) constancia de poder rotatorio en puri-

ficaciones sucesivas, b) electroforesis sobre papel, c) precipitación fraccionada con etanol, d) análisis de sedimentación por ultracentrifugación.

Whistler y BeMiller (1956) hacen precipitación fraccionada con etanol y grafican el porcentaje de producto precipitado en función de la concentración alcohólica y consideran que el producto es homogéneo cuando más del 90% de polisacárido precipita en un rango estrecho de concentración (del orden del 5%).

Otro criterio para considerar homogéneo un polisacárido es si da un solo pico cuando se lo somete a sedimentación por ultracentrifugación. En este método, la solución o suspensión del soluto en estudio se coloca dentro de una celda que rota a una velocidad suficiente como para producir una fuerza centrífuga 400.000 a 500.000 veces mayor que la de la gravedad y se determinan los cambios de concentración que tienen lugar mientras la centrífuga está en marcha.

Por métodos de ultracentrifugación se conocen el de equilibrio de sedimentación, que es uno de los pocos métodos absolutos para la determinación de peso molecular y el de velocidad de sedimentación, que da información sobre la distribución de pesos moleculares de las partículas en solución y permite la determinación de constantes de sedimentación.

En este último método se somete la solución del polímero a un fuerte campo centrífugo (hasta 500.000 g), produciéndose la sedimentación de la macromolécula. La superficie de sedimentación se moverá a través de la celda con una velocidad igual a la velocidad de sedimentación de una molécula individual. En la práctica, el campo centrífugo varía a lo largo de la celda y la sedimentación de una dada superficie está caracterizada por una constante de sedimentación  $S$ , que se obtiene por medio de la ecuación:

$$S = (1/w^2x) (dx/dt)$$

donde:  $dx/dt$  = velocidad de sedimentación

$w$  = velocidad angular

$x$  = distancia al centro de rotación



## DETERMINACION DE PESOS MOLECULARES

Los polisacáridos son polidispersos, por lo tanto, la determinación de pesos moleculares dará un valor promedio. Los métodos físicos basados en las propiedades coligativas y los métodos químicos que determinan grupos terminales, dan como resultado el peso molecular promedio numérico, definido por:

$$M_n = \frac{\sum n_i M_i}{\sum n_i}$$

donde:  $n_i$  = número de moléculas de peso molecular  $M_i$ .

El peso molecular promedio pesado, definido por:

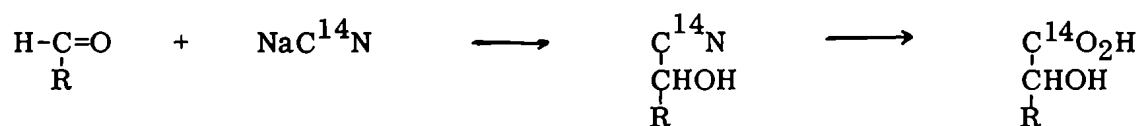
$$M_w = \frac{\sum n_i M_i^2}{\sum n_i M_i}$$

puede obtenerse por ultracentrifugación, por el método de equilibrio de sedimentación.

El cociente entre ambos valores  $M_n/M_w$  es una medida de la homogeneidad del polisacárido.

Considerando que un polisacárido reductor posee una sola unidad reductora por molécula, la determinación del porcentaje de la misma en el polisacárido permite calcular el grado de polimerización.

La determinación de grupos terminales reductores puede hacerse por reacción con cianuro de sodio- $C^{14}$  (Isbell, 1951).



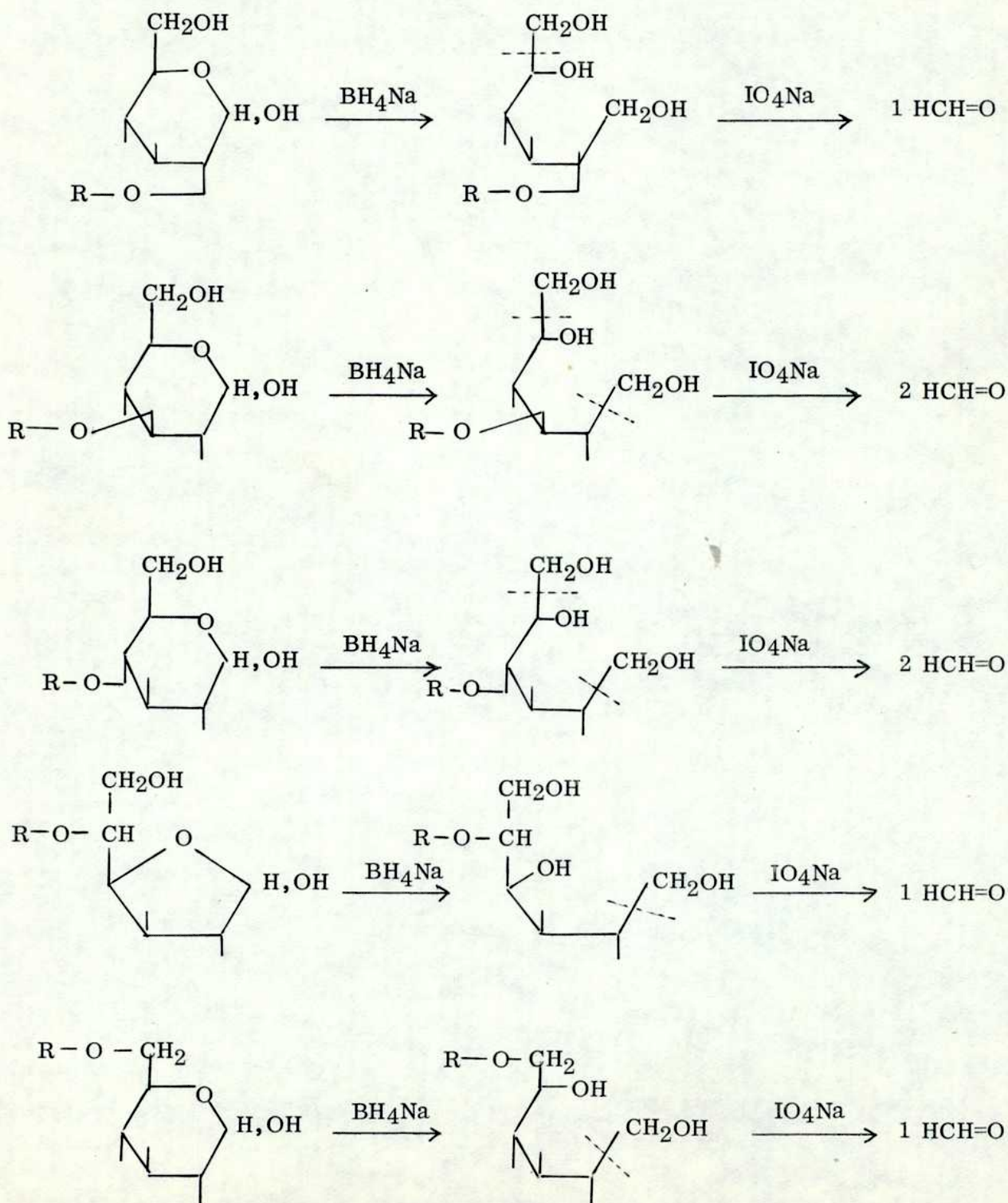
Se hace reaccionar el polisacárido con cianuro de sodio- $C^{14}$ , el exceso de cianuro se volatiliza como cianuro de hidrógeno y se determina el C-14 en el polisacárido.

En las condiciones empleadas, los polisacáridos reductores estables en solución alcalina se combinan con una cantidad de cianuro equivalente al número de grupos terminales presente.

Unrau y Smith (1957) desarrollaron un procedimiento para la determinación de grupos reductores que involucra reducción del polisacárido, oxidación con periodato y determinación del formaldehído formado. Este método ha sido aplicado desde entonces a numerosos oligo- y polisacáridos. La reducción del polisacárido con boro hidruro de sodio convierte la unidad de aldosa terminal reductora en un alditol. En el caso de que la unión sea al C-2, C-5 ó C-6 del alditol, la oxidación con periodato dará lugar a un mol de formaldehído por mol de polisacárido, mientras que si la unión es al C-3 ó al C-4 se obtendrán dos moles de formaldehído por mol de polisacárido (Figura 2). Una alta concentración de polialdehído puede interferir en la determinación de formaldehído con ácido cromotrópico, entonces es necesario dializar para obtener el formaldehído libre del polisacárido oxidado, antes de su determinación.

FIGURA 2

## DETERMINACION DE EXTREMOS REDUCTORES



## IDENTIFICACION DE LOS AZUCARES COMPONENTES

La determinación de los azúcares presentes en un polisacárido se hace generalmente por hidrólisis seguida de separación cromatográfica de los fragmentos obtenidos. Es necesario obtener los componentes del hidrolizado ya sea en forma cristalina o como derivados cristalinos, ya que algunos azúcares, por ejemplo galactosa, se ha encontrado tanto en la forma D- como L-, y por otra parte, un azúcar poco común puede confundirse con algún componente más frecuente en polisacáridos, si el análisis se realiza sólo por comparación cromatográfica.

La aplicación de la cromatografía gaseosa al análisis de azúcares, introducida por McInnes y col. (1958) para el estudio de los metilglicósidos de los metil éteres, permite trabajar con cantidades menores de polisacárido. La preparación de derivados volátiles de hidratos de carbono es relativamente sencilla. Pueden prepararse tri-O-metilsilil éteres de aldonolactonas (Perry y Hulyalkar, 1965) o de metilglicósidos de azúcares (Hedgley y Overend, 1960).

Alberheim y col. (1967) analizan por cromatografía gaseosa mezclas de alditos acetilados. También se han analizado oligosacáridos de estructura simple por cromatografía gaseosa de sus tri-O-metilsilil éteres (Percival, 1967). Estos últimos derivados se han usado para el análisis por espectrometría de masa (Chizau y col., 1967). Kärkkäinen (1970, 1971) aplicó los métodos combinados de cromatografía gaseosa y espectrometría de masa al estudio de mezclas de disacáridos y trisacáridos. Estos fueron reducidos a los correspondientes alditos, metilados y separados por cromatografía gaseosa. Los espectros de masa permitieron determinar el peso molecular de las unidades de monosacárido y la posición de la unión.

El análisis de los azúcares componentes por cromatografía gaseosa y espec-

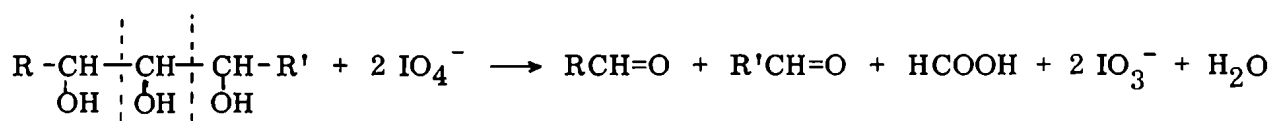
**trometría de masa encuentra cada vez mayor aplicación en estudios estructurales por las ventajas que representa trabajar con cantidades mínimas de material.**

## OXIDACION CON PERIODATO

Cuando un glicol se trata con ácido periódico o sus sales, se rompe la cadena carbonada formándose dos grupos aldehído y consumiéndose un mol de oxidante en el proceso.



En el caso de  $\alpha, \beta, \delta$ -trioles se consumen dos moles de periodato, con la formación de dos grupos aldehído y la liberación de una molécula de ácido fórmico.



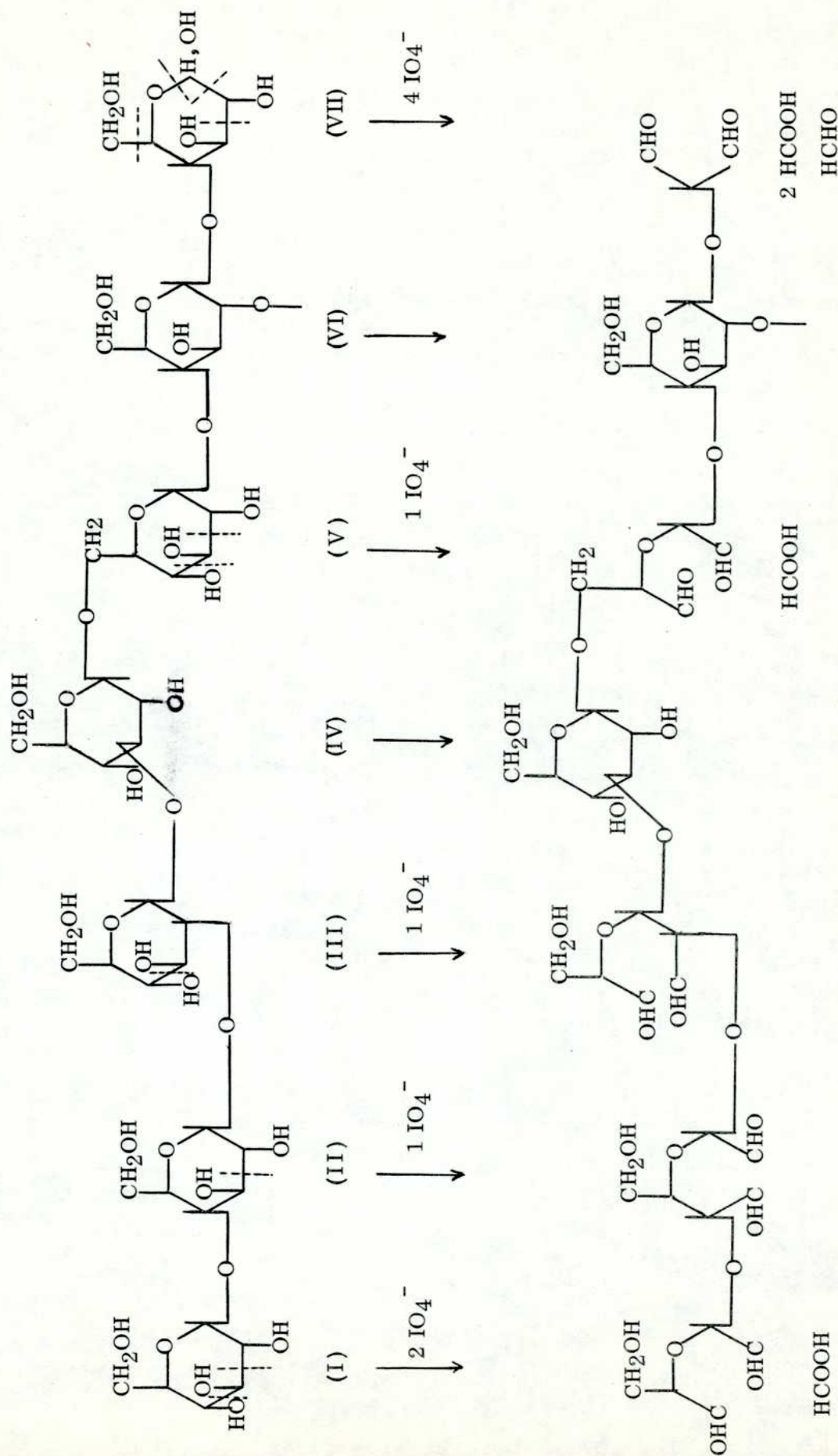
En el caso de una cadena lineal de polisacárido (Figura 3), tendremos que los residuos piranósicos unidos a través de C-1 y C-4 (II) ó C-1 y C-2 (III) reducen un mol de periodato por unidad, rompiéndose la unión entre C-2 y C-3 ó C-3 y C-4, respectivamente. Por el contrario, los azúcares piranósicos unidos (1→3)- (IV) y las unidades ramificadas en C-2 y C-4 (VI) resisten la oxidación. Los grupos terminales no reductores (I) y las hexopiranosas unidas (1→6)- (V) contienen tres grupos hidroxilo vecinos y, por lo tanto, consumen dos moles de periodato, con liberación de un mol de ácido fórmico por residuo.

El grupo terminal reductor (VII) es atacado por periodato liberando en primera instancia un mol de ácido fórmico, con formación de un éster de formilo sobre el C-1, que se hidroliza liberando 1 mol de fórmico y 1 mol de formaldehído.

De esta manera, la oxidación con periodato del polisacárido y la determinación cuantitativa del periodato consumido, del ácido fórmico liberado y de la propor-

FIGURA 3

ACCION DEL PERIODATO SOBRE UNIDADES PIRANOSICAS CON DISTINTO TIPO DE UNION



ción de azúcares no atacados, proporciona información sobre la naturaleza y la proporción de las uniones glicosídicas (Bobbit, 1956).

Jackson (1944), describe los métodos analíticos más comúnmente usados en la oxidación de polisacáridos. Generalmente, las oxidaciones se llevan a cabo con soluciones diluídas de periodato de sodio, a baja temperatura y en la oscuridad, determinando a intervalos el consumo de periodato y la producción de fórmico hasta que se llega a un valor constante. Las condiciones de la reacción (pH, temperatura) deben controlarse cuidadosamente para evitar la sobreoxidación.

La concentración de periodato se determina por titulación o por métodos espectrofotométricos. El método más empleado es el de Fleury y Lange (1933), que consiste en la destrucción del periodato con arsenito de sodio y titulación del arsenito de sodio en exceso con solución de iodo. Rankin y Jeanes (1954) aplican el método de Malaprade (1928) que consiste en titular con solución de tiosulfato el iodo liberado de la solución en oxidación por agregado de ácido sulfúrico.

El consumo de periodato puede seguirse espectrofotométricamente midiendo la disminución en la absorbancia del ion periodato a  $222,5 \text{ m}\mu$ , haciendo la corrección correspondiente por la absorbancia del ion iodato a esa longitud de onda (Aspinnall y Ferrier, 1957). Este método ha dado resultados satisfactorios con polisacáridos fácilmente solubles en agua.

La determinación del ácido fórmico liberado puede hacerse por titulación (potenciométrica o con indicadores) después de destruir el exceso de periodato con etilén glicol libre de acidez; o por iodometría, agregando ioduro de potasio y titulando el iodo que se libera debido a la acidez del medio (Abdel-Akher y Smith, 1951, b).

Las determinaciones de formaldehído se hacen generalmente por reacción



con ácido cromotrópico (MacFadyen, 1945).

En el caso de polisacáridos ramificados que no presentan uniones (1→6)-, la determinación de ácido fórmico da una medida de la relación de unidades terminales a no terminales.

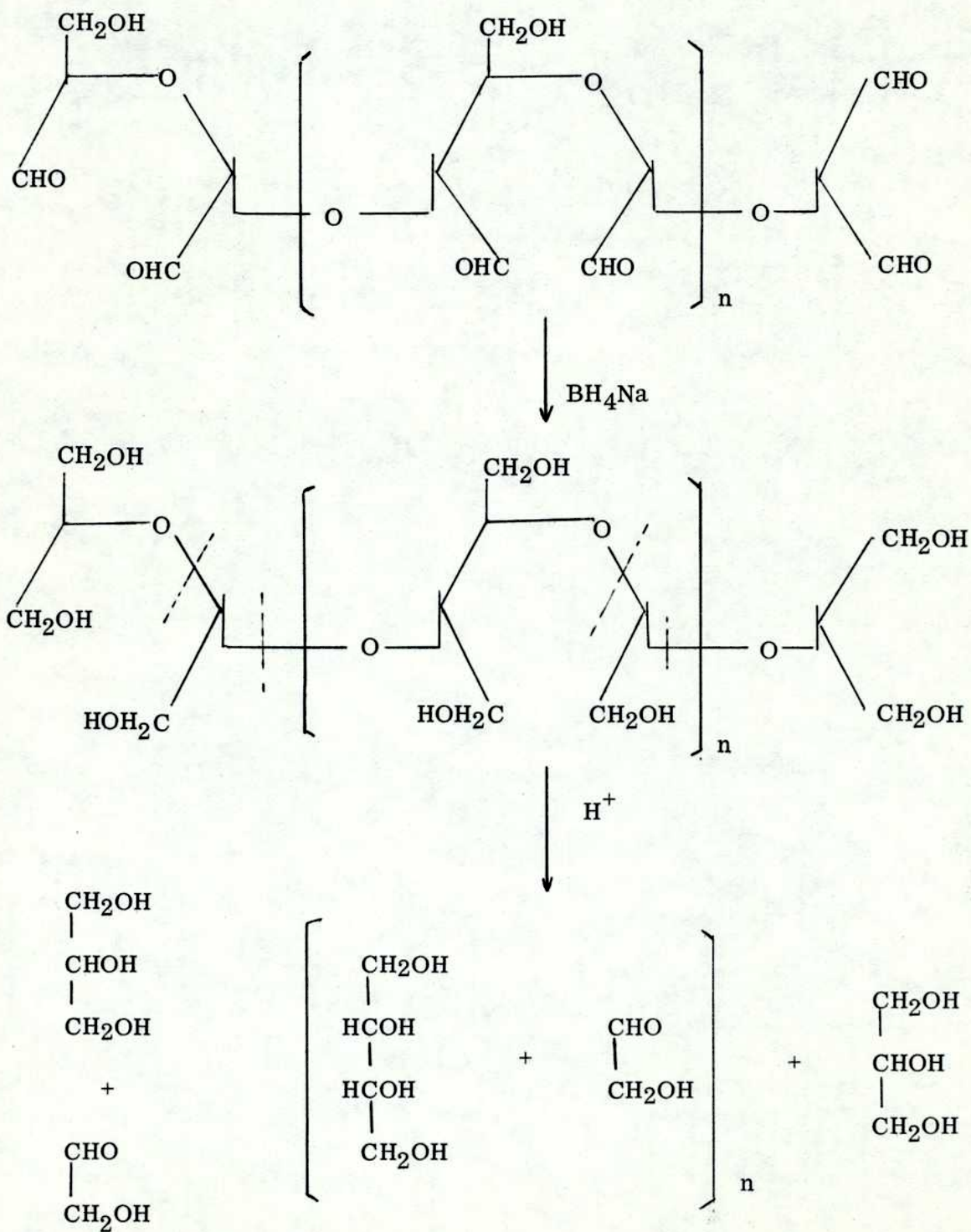
Los oxo-polisacáridos obtenidos en la oxidación con periodato se descomponen por hidrólisis ácida. Si se reducen los grupo aldehído a alcohol primario, por ejemplo con borohidruro de sodio, el polialcohol resultante se puede hidrolizar cuantitativamente. Por ejemplo, en el caso de un oxo-polisacárido que proviene de un glucano lineal unido  $\alpha$ -(1→4)- por reducción e hidrólisis se obtendrán: glicerol y aldehído glicólico del extremo no reductor; glicerol del extremo reductor y aldehído glicólico y eritritol de las unidades intermedias (Figura 4).

En el caso de un glucano unido (1→6)-, se obtendrá aldehído glicólico y glicerol de las unidades intermedias, mientras que si las uniones son (1→3)- se obtiene glucosa, ya que no hay oxidación.

El análisis cuantitativo de los productos obtenidos proporciona datos sobre el tipo y proporción de uniones glicosídicas. Dutton y col. (1968) describen un método para la determinación simultánea de polioles y azúcares como tri-O-metilsilil éteres, por cromatografía gaseosa.

En las unidades de polisacárido que son atacadas por periodato, el derivado alcohólico que se obtiene por reducción es un acetal y, por lo tanto, la unión es muy sensible a la acción de los ácidos; en cambio, cuando una unidad que no se ataca está unida a una molécula que se oxidó, la unión entre ambos es una unión glicosídica relativamente estable en medio ácido. Debido a esta diferencia de estabilidad es posible obtener información sobre la estructura del polisacárido original. Este es el

FIGURA 4



método conocido como método de degradación de polisacáridos oxidados, de Smith (Smith y Montgomery, 1959). Así, por ejemplo, una cadena lineal de glucosa con uniones alternadas (1→6)- y (1→3)- dará por degradación controlada 3-O- $\alpha$ -D-glucopiranosil-D-glicerol (Figura 5).

De la misma manera, un polisacárido como el nigerano, que presenta uniones alternadas  $\alpha$ -(1→3)- y  $\alpha$ -(1→4)- dará origen a 2-O- $\alpha$ -D-glucopiranosil-D-eritritol (Figura 6).

De esta manera, la oxidación cuantitativa de un polisacárido con periodato, seguida de reducción e hidrólisis controlada y total, no sólo da información del tipo de uniones involucradas sino también de su secuencia parcial.

FIGURA 5

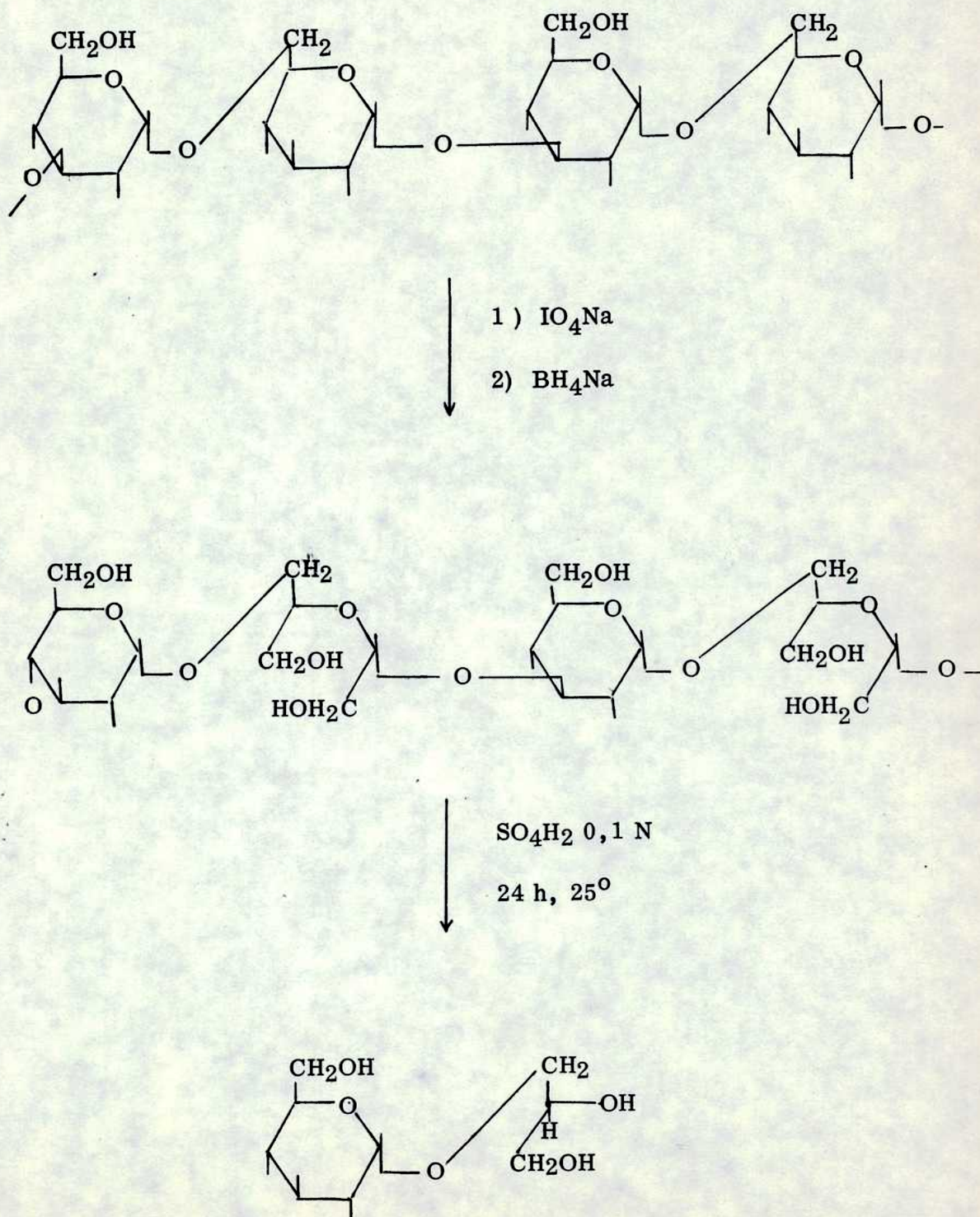
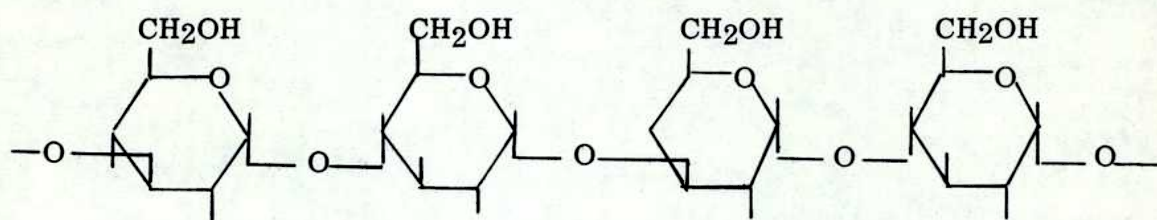
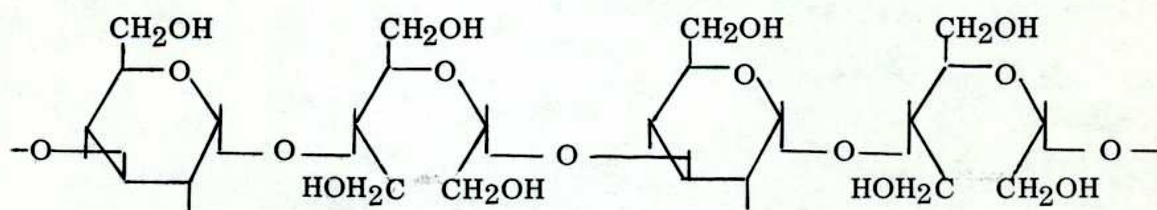


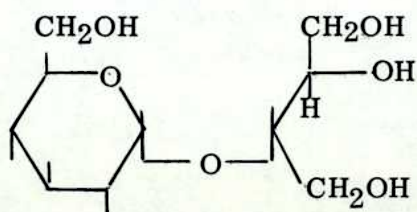
FIGURA 6



1)  $\text{IO}_4\text{Na}$   
2)  $\text{BH}_4\text{Na}$



$\text{SO}_4\text{H}_2$  0,1 N  
24 h,  $25^\circ$



## ESTUDIOS DE METILACION

Los estudios de metilación tienen una importancia muy grande en la química estructural de polisacáridos. Se metila el polisacárido exhaustivamente, se hidroliza y los metil éteres formados se separan, identifican y estiman cuantitativamente. Los átomos de carbono involucrados en la unión en el polisacárido original serán los que posean un hidroxilo no sustituido en los metil éteres monoméricos obtenidos en la hidrólisis del polisacárido metilado. Si bien es un método trabajoso aporta información valiosa sobre los tipos y proporción de las uniones presentes, la proporción de unidades terminales y los puntos de ramificación.

### Metilación

El método clásico y todavía más usado de metilación es el descrito por Haworth (1915), que utiliza hidróxido de sodio acuoso y sulfato de dimetilo. Algunos investigadores introdujeron modificaciones a dicho método. Falconer y Adams (1956) utilizan hidróxido de sodio pulverizado y sulfato de dimetilo en tetrahidrofurano. Hamilton y Kircher (1958) aplicaron este método a la metilación de un glucomanano acetilado, obteniendo en un solo paso un rendimiento cuantitativo.

Srivastava y col. (1964) metilan almidón de maíz disolviéndolo en dimetilsulfóxido y agregando hidróxido de sodio en lentejas y sulfato de dimetilo.

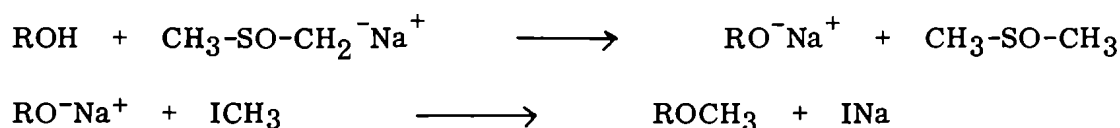
La reacción de los complejos talio-polisacárido con ioduro de metilo, introducida por Fear-Menzies (1926) ha sido utilizada ventajosamente para polisacáridos ácidos tales como ácido algínico y pectinas.

En general, los métodos descritos no dan metilación completa y el producto debe metilarse nuevamente por otro método. El producto parcialmente metilado se

trata comúnmente con yoduro de metilo y óxido de plata según el método descrito por Purdie e Irvine (1903). La reacción debe realizarse en condiciones anhidras y generalmente debe repetirse para obtener buenos resultados. Kuhn y col. (1955) mejoraron la técnica, llevando a cabo la reacción en N,N-dimetilformamida. El método se usa para polisacáridos parcialmente metilados debido a que el óxido de plata produce degradación sobre el polisacárido sin sustituir. Se ha empleado también óxido de bario, que no es oxidante, para la metilación con yoduro de metilo de oligo- y polisacáridos en dimetilsulfóxido (Kuhn y col. , 1958).

Para lograr la metilación total de un arabinogalactano, Adams y Bishop (1960) realizaron cinco metilaciones por el método de Haworth (1915) y dos por el método de Falconer y Adams (1956).

Sandford y Conrad (1966) introdujeron una técnica de metilación que utiliza hidruro de sodio-yoduro de metilo y dimetilsulfóxido, con la que obtienen el polisacárido totalmente metilado en un solo paso. Se genera el anión metilsulfinilo ( $\text{CH}_3\text{-SO-CH}_2^-$ ) por reacción entre el hidruro de sodio y el dimetilsulfóxido, de acuerdo a la técnica descrita por Corey y Chaykovsky (1965). Este anión producirá el alcóxido del polisacárido, que reacciona con yoduro de metilo.



Este es un método relativamente reciente y existen controversias respecto de sus ventajas y desventajas. Axelsson y col. (1968) lo aplicaron exitosamente a un  $\beta$ -glucano. Los estudios realizados sobre gomas de Acacia mostraron que los polisacáridos que tenían bajo contenido en ramnosa y la mayoría de las unidades de ácido glucurónico como residuos terminales no reductores, se metilaban satisfactoriamente

por dicho método (Anderson y Cree, 1966), mientras que los polisacáridos con un contenido relativamente alto de residuos de L-ramnosa terminales unidos a la posición 4 de las unidades de ácido glucurónico son más sensibles al medio altamente alcalino, que daría lugar a  $\beta$ -eliminaciones (Anderson y col. , 1967).

Cheetham y McIlroy (1969) estudiaron comparativamente los métodos de metilación de Haworth (1915), Sandford y Conrad (1966) y Srivastava (1964), aplicándolos a la metilación de hemicelulosas y encontraron que el método del metilsulfinil carbanión presentaba ventajas sobre los métodos clásicos y que el método de Srivastava (1964) producía degradación.

En general, todos los métodos utilizados pueden producir despolimerización debido al medio alcalino en que se lleva a cabo la metilación, y el mejor método a emplear depende en gran medida de las propiedades del polisacárido en estudio.

Para el aislamiento del polisacárido parcialmente metilado generalmente se recurre a la diálisis, ya que no se extraen bien con cloroformo. Los polisacáridos ácidos precipitan en la mayoría de los casos por acidificación de la mezcla de reacción. El producto totalmente metilado se purifica comúnmente por disolución en mezclas de solventes tales como cloroformo-éter de petróleo, para eliminar sales y productos de metilación parcial.

### Hidrólisis del polisacárido metilado

Como el polisacárido metilado es generalmente insoluble aún en agua caliente, se hace necesario un medio no acuoso o sólo parcialmente acuoso para iniciar la hidrólisis.

Los métodos más empleados son: a) el tratamiento con ácido clorhídrico en



metanol (metanólisis), seguido de hidrólisis de los metil glicósidos formados; b) el calentamiento con ácido fórmico concentrado o acuoso (formólisis), seguido de hidrólisis de los formiatos y c) la disolución en ácido sulfúrico concentrado (alrededor de 70%) a baja temperatura, completando la hidrólisis por dilución y calentamiento.

Croon y col. (1960) realizaron un estudio sistemático de la demetilación y degradación de azúcares en la hidrólisis ácida. Las condiciones por ellos empleadas pueden observarse en la Tabla 2.

Se estudió la demetilación y degradación de varios azúcares en esas condiciones y se observó que, de los métodos investigados, el tratamiento con ácido sulfúrico 72% a temperatura ambiente seguido de hidrólisis con ácido sulfúrico 12% a 100° es el más conveniente.

TABLA 2

CONDICIONES	ACIDO	TEMPERATURA	TIEMPO
1	ClH 2% (aq.)	100°	13 h
2	a) ClH 2% (metanol)	100°	13 h
	b) ClH 0,5 N (aq.)	100°	8 h
3	a) SO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> 72%	25°	0,5 h
	b) SO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> 12,4%	100°	4 h
4	a) HCOOH 98%	100°	6 h
	b) SO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> 0,5N	100°	14 h

## Separación e identificación de los azúcares metilados

Los métodos más utilizados para el fraccionamiento de azúcares metilados son por cromatografía de partición en papel o columna de celulosa. Muchos azúcares metilados son difíciles de cristalizar y algunos existen sólo en estado amorfo. La movilidad por cromatografía en papel o electroforesis en varios sistemas de solventes permite una identificación tentativa del éter metílico en estudio. Para conocer cuál es el azúcar original se puede demetilar con tricloruro de boro según el método descrito por Bonner y col. (1960), en que las aldosas no sufren descomposición, pero las cetonas se transforman en 5-(hidroximetil)-2-furaldehído.

Mezclas de azúcares difíciles de separar por cromatografía de partición pueden separarse por cromatografía de adsorción. Para la separación de azúcares metilados, Whelan y Morgan (1954) proponen el uso de columnas de carbón, usando etanol como eluyente, donde separan di-, tri- y tetrametilglucosas. Lindberg y Wickberg (1954) separan 2,3,6- y 2,3,4-tri-O-metil-glucosa, por cromatografía de adsorción en carbón, usando butanona como solvente. Stephen y De Bruyn (1967) cromatografan azúcares metilados en sílica gel.

Mc Innes y col. (1958) introducen la cromatografía gaseosa para metilglicósidos de azúcares totalmente metilados. Desde entonces, el método se desarrolló ampliamente, ya que permite trabajar con cantidades pequeñas de material. Björndal y col. (1967) analizan mezclas de azúcares parcialmente metilados, para lo cual los reducen, acetilan y después de separarlos en el cromatógrafo de gases, los identifican por espectrometría de masas.

## ESTUDIOS DE HIDROLISIS

Los estudios de hidrólisis parcial ácida o enzimática de polisacáridos, seguida de la separación y caracterización de los fragmentos obtenidos (di-, tri- y oligosacáridos) permite obtener detalles estructurales interesantes sobre la configuración y la secuencia de uniones glicosídicas.

La hidrólisis ácida es una reacción reversible y en soluciones muy concentradas de azúcares pueden formarse oligosacáridos que no son característicos del polisacárido que se hidroliza, lo que se conoce como reversión. Sin embargo, en soluciones diluidas (menor que 1%) esta reacción carece de importancia.

Las condiciones empleadas para la hidrólisis dependen del polisacárido en estudio. Se usan generalmente ácido clorhídrico o sulfúrico en un rango de concentraciones entre 0,01 y 2 N y calentamiento a temperaturas cercanas a los 100<sup>o</sup>, durante distintos tiempos. Muchos polisacáridos ácidos sufren autohidrólisis por calentamiento en solución acuosa.

Las uniones furanósicas son mucho más lábiles en medio ácido que las piranósicas (Haworth y Hirst, 1930). Por otra parte, la unión glicosídica en los ácidos aldobiurónicos es resistente a la hidrólisis ácida y si se utilizan condiciones muy drásticas la mayor parte del ácido se degrada a 2-furaldehído. Si se usan períodos prolongados de calentamiento, los azúcares también pueden degradarse.

Se puede metanolizar el polímero (Sweely y Barker, 1964), con lo que se obtienen metilglicósidos que se liberan por hidrólisis ácida suave.

Kuhn (1930) hizo un tratamiento teórico de los resultados de la hidrólisis de polisacáridos lineales que poseían un único tipo de unión; los resultados coinciden con los datos experimentales obtenidos por Freudenberg y col. (1930) para la hidró-

lisis de celulosa. Suponen que todas las uniones tienen la misma probabilidad de romperse; si  $\alpha$  es la fracción de enlaces glicosídicos hidrolizados, la cantidad de oligosacáridos de  $n$  unidades formados estará dada por:

$$n \alpha^2 (1 - \alpha)^{n-1}$$

y la cantidad máxima será:

$$n \left( \frac{2}{n+1} \right)^2 \left( \frac{n-1}{n+1} \right)^{n-1}$$

que se alcanza para  $\alpha = 2 / n + 1$ . Cálculos estadísticos análogos para polisacáridos con más de un tipo de unión son más difíciles y menos exactos, pero de gran utilidad práctica. Wolfrom y col. (1951, a) realizaron un estudio estadístico de la obtención de oligosacáridos con uniones  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 6)- en función del grado de hidrólisis y lo aplicaron al aislamiento de isomaltosa a partir de la hidrólisis parcial de amilopectina. Determinaron además por estudios cinéticos que la maltosa se hidroliza cuatro veces más rápido que la isomaltosa en ácido sulfúrico 0,05 N (2%) a 99,5 $^{\circ}$ .

Los efectos conformacionales y estéricos tienen importancia en la velocidad de hidrólisis. Es de esperar entonces una considerable variación en las velocidades de hidrólisis de los distintos enlaces glicosídicos. En la Tabla 3 pueden compararse las constantes de velocidad para los disacáridos de D-glucosa (Wolfrom y col. , 1963).

Existen diferencias apreciables entre los diferentes tipos de unión, lo que permite hidrolizar selectivamente una de ellas eligiendo cuidadosamente las condiciones. Puede observarse que salvo en el caso de la unión (1 $\rightarrow$ 6)- , los disacáridos con uniones de configuración  $\alpha$  son los que presentan una velocidad mayor de hidrólisis.

TABLA 3

VELOCIDADES DE HIDROLISIS DE DISACARIDOS DE GLUCOSA  
EN ACIDO CLORHIDRICO 0,1 N

SUSTANCIA	UNION	k x 10 <sup>4</sup> min <sup>-1</sup>	
		80°	99,5°
celobiosa	$\beta$ -D-(1→4)-	0,66	6,6
maltosa	$\alpha$ -D-(1→4)-	1,55	16,3
genciobiosa	$\beta$ -D-(1→6)-	0,58	7,2
isomaltosa	$\alpha$ -D-(1→6)-	0,40	5,0
soforosa	$\beta$ -D-(1→2)-	1,17	10,1
kojibiosa	$\alpha$ -D-(1→2)-	1,46	17,3
laminaribiosa	$\beta$ -D-(1→3)-	0,99	9,3
nigerosa	$\alpha$ -D-(1→3)-	1,78	14,1

En el caso de series homólogas de oligosacáridos, a medida que aumenta el número de unidades de la cadena disminuye la velocidad de hidrólisis. Jones y col. (1955) realizaron el estudio para la seire de las isomaltodextrinas y observaron, trabajando con isomaltotriosa e isomaltotriitol, que las uniones glicosídicas no se hidrolizan a igual velocidad.

Kochetkov y col. (1967) describen experimentos sobre la ruptura selectiva de uniones hexourónicas por conversión de los residuos de ácido urónico a amidas, seguida de degradación de Hoffmann para dar 5-aminopentopiranosas, estructuralmente análogas a las glicosilaminas, que se hidrolizan con ácido en condiciones suaves.

La unidad reductora de un oligosacárido puede hidrolizarse selectivamente si

el oligosacárido se convierte primero en el fenilosotriazol y la hidrólisis se realiza con ácido poliestirénsulfónico (BeMiller y Smith, 1968).

Las propiedades de los oligosacáridos en una serie homóloga están relacionados con su grado de polimerización. Freudenberg y Blomqvist (1935) demostraron que para oligosacáridos de  $n$  unidades con rotación molecular  $M_n$ , el cociente  $M_n/n$  es una función lineal de  $(n-1)/n$  (Figura 7). Esta relación puede usarse para ver si un oligosacárido pertenece a una dada serie y también por extrapolación puede sacarse el valor del poder rotatorio del polisacárido original, si se trata de un polímero lineal con un único tipo de unión.

Otra relación muy usada es la encontrada por French y Wild (1953) entre la movilidad ( $R_f$ ) por cromatografía en papel y el número de unidades de la cadena. El valor de  $\alpha' = \log (R_f/(1-R_f))$  es una función lineal de  $n$  para oligosacáridos homólogos. Puede así obtenerse rápidamente por cromatografía información sobre si los oligosacáridos obtenidos en una hidrólisis parcial pertenece o no a la misma serie. En la Figura 8 se observan los datos obtenidos para varias series de oligosacáridos homólogos. Yamauchi y Matsuda (1969) aplican esta relación para los oligosacáridos obtenidos por acetólisis de un polisacárido con uniones  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 6)- y  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 3)-. (Figura 9)

Grimmet y col. (1965) determinan el tipo de unión en disacáridos de hexosas por formación de imidazoles, que presentan por cromatografía en papel una movilidad diferente según la naturaleza del enlace glicosídico, lo que permite trabajar en microescala (0,1-1 mg).

Cuando se dispone de enzimas puras, la hidrólisis enzimática es complementaria y muchas veces preferible a la hidrólisis ácida. Hay muchos ejemplos en la

FIGURA 7

RELACION ENTRE LA ROTACION MOLECULAR (M)  
Y EL GRADO DE POLIMERIZACION (n)

$\alpha$  -Peracetatos de celodextrinas

(Dickey y Wolfrom, 1949)

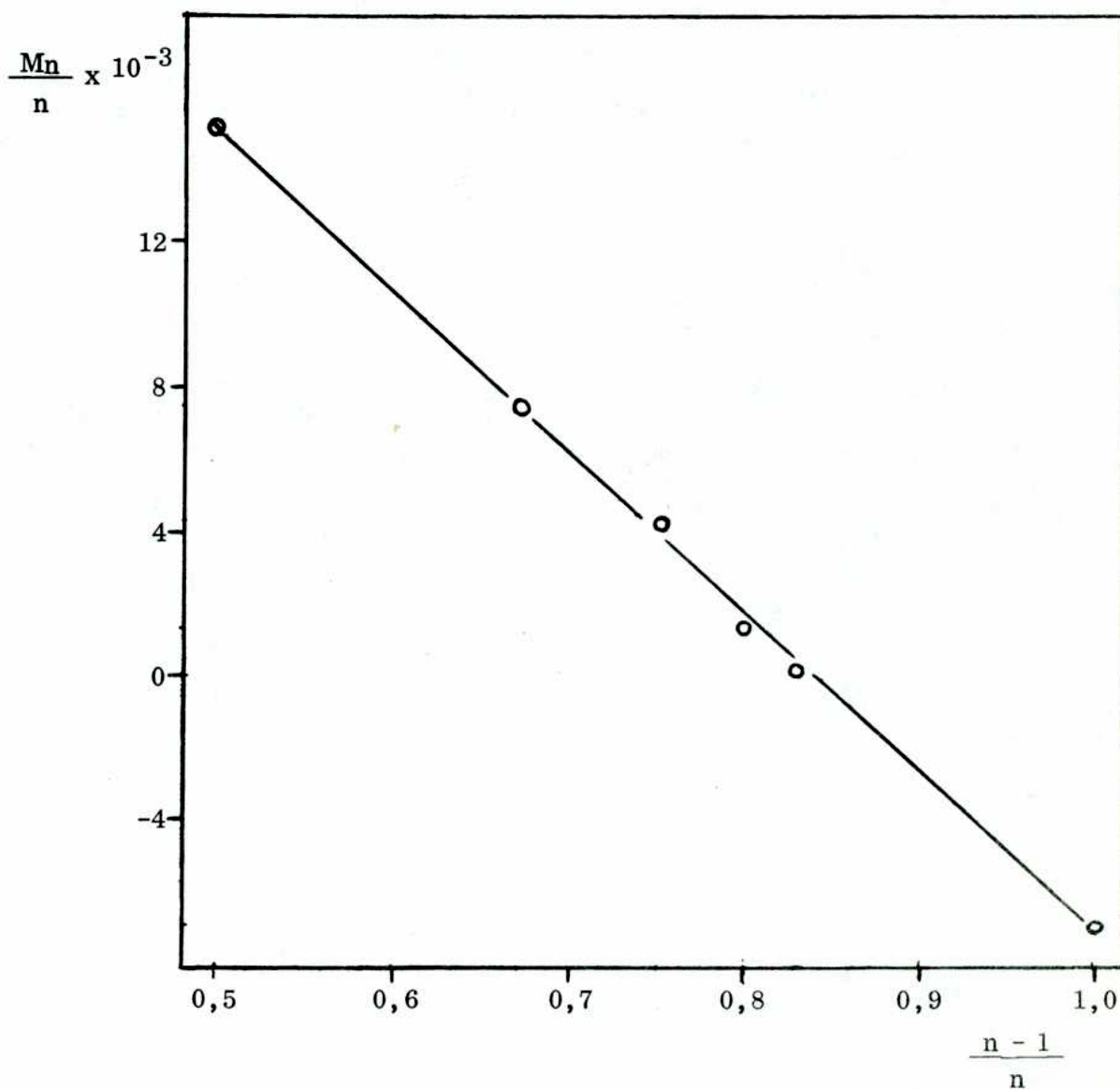
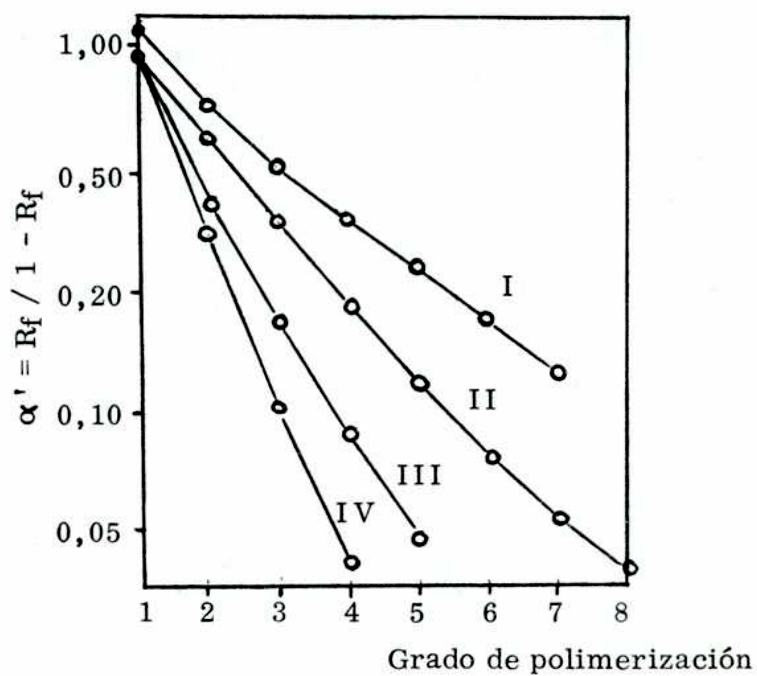


FIGURA 8

RELACION ENTRE LA MOVILIDAD Y EL GRADO DE  
POLIMERIZACION



I Oligosacáridos de inulina

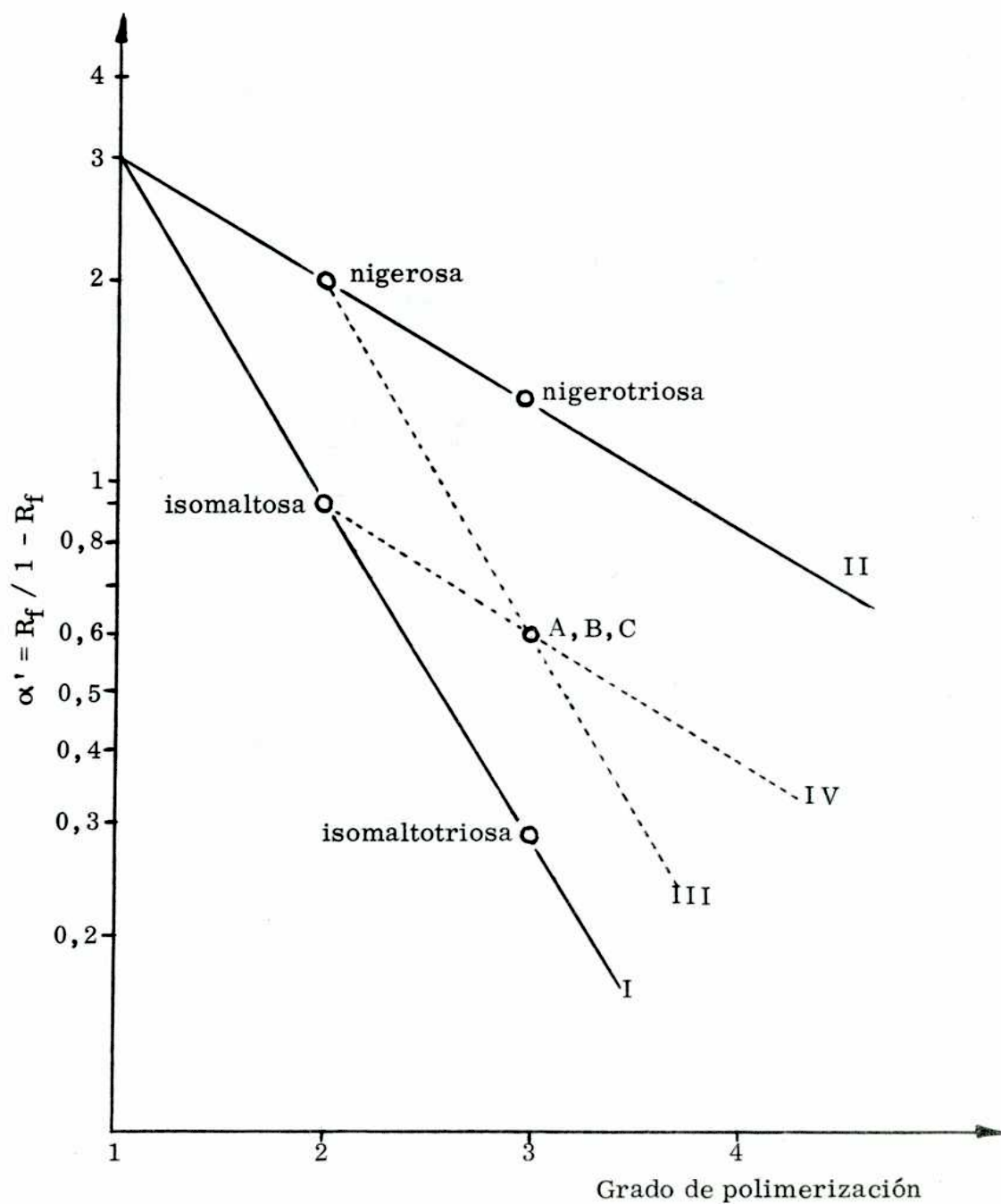
II Oligosacáridos de amilosa

III Oligosacáridos de dextrano

IV Oligosacáridos de galactano



FIGURA 9  
RELACION ENTRE LA MOVILIDAD Y EL GRADO DE  
POLIMERIZACION



I: Oligosacáridos con unión (1→6)-  
 II: Oligosacáridos con unión (1→3)-  
 A, B, C: Oligosacáridos con unión (1→3)- y (1→6)-

literatura del uso de enzimas, fundamentalmente aplicadas al almidón y polisacáridos análogos.

Whistler y Stein (1951), por acción de un preparado enzimático sobre el guarano, obtuvieron 4-O- $\beta$ -D-manopiranosil-D-manosa comprobando que la unión entre las unidades de manosa en el polisacárido era  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-. Bishop y Whitaker (1955) aislaron oligosacáridos de arabinosa y xilosa mediante un preparado enzimático de Mirothecium verrucaria, que rompe cadenas lineales de uniones  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-xilopiranosícas. No se pudieron aislar oligosacáridos de este tipo por hidrólisis ácida, debido a la ruptura preferencial de las uniones arabinofuranósicas respecto de las xilopiranosícas. Painter (1959) desarrolló un método para aumentar el rendimiento en oligosacáridos que se basa en el uso de una membrana semipermeable que contiene una solución acuosa del polisacárido y una enzima apropiada en un gran volumen de agua. Esto hace posible que los oligosacáridos formados difundan a través de la membrana y no sufran degradación posterior. Timell (1959) aplicó este método a un 4-O-metilglucuronoxilano, obteniendo oligosacáridos ácidos y neutros con buen rendimiento.

El empleo de exo-enzimas (enzimas que hidrolizan las unidades terminales no reductoras) permite conocer la posición de los extremos no reductores y, en particular, la configuración de su enlace glicosídico, datos difíciles de obtener por métodos no enzimáticos. Por ejemplo, la acción de  $\alpha$ - y  $\beta$ -L-ramnosidasas sobre el polisacárido de Diplococcus pneumoniae permitió conocer la posición de las unidades de L-ramnosa (Barker y col., 1965). Barker y col. (1966) estudiaron la posibilidad de emplear exo-glicosidasas, preparadas por inducción en microorganismos adecuados, para distinguir no sólo el azúcar y su configuración anomérica, sino también el tipo de unión, pero no obtuvieron resultados satisfactorios en la serie de la

D-glucosa.

La secuencia de azúcares en mucopolisacáridos pudo determinarse en micro-escala mediante el empleo de endo-glicosidasas (Barker y col., 1968).

## ESTUDIOS DE ACETOLISIS

Los polisacáridos son degradados por acetólisis en condiciones suaves a oligosacáridos que se obtienen como peracetatos. Si las condiciones empleadas son más drásticas se obtienen los acetatos de los monosacáridos.

La técnica consiste en agregar el polisacárido a una mezcla previamente enfriada de anhídrido acético, ácido acético glacial y ácido sulfúrico concentrado, generalmente en la proporción 24:16:3, en volumen (Wolfrom y col., 1951, b). El rendimiento en oligosacáridos buscados dependerá del tiempo y temperatura de la reacción. Wolfrom y Thompson (1963) emplearon un período de 72-100 h para obtener di- y trisacáridos con máximo rendimiento. Kaustinen y col. (1969) estudiaron la acetólisis de celulosa en varias condiciones y obtuvieron así oligosacáridos mayores de distinto grado de polimerización.

En la acetólisis se obtienen mezclas de  $\alpha$ - y  $\beta$ -acetatos, lo que dificulta su separación cromatográfica. Generalmente, la mezcla de productos se desacetila separándose sus componentes como azúcares libres, o bien, la mezcla de éstos puede acetilarse con anhídrido acético-acetato de sodio para dar  $\beta$ -acetatos que pueden separarse por cromatografía de adsorción. La cromatografía en placa de sílica gel usando mezclas de benceno-metanol 2 a 10% (v/v) es un método rápido para la determinación analítica o la separación de pequeñas cantidades de acetatos de oligosacáridos de bajo peso molecular (Tate y Bishop, 1962).

La utilidad de la acetólisis reside en que es un método complementario de la hidrólisis ácida. Ya hemos visto que en medio ácido, la unión (1 $\rightarrow$ 6)- es la más estable. Por el contrario, por acetólisis dicha unión es la que sufre más fácil ruptura. Por lo tanto, en el caso de un polisacárido complejo, los oligosacáridos obtenidos por

ambos métodos serán diferentes. Wolfrom y col. (1951, a) aislaron 1% de isomaltosa de la hidrólisis parcial de amilopectina, pero no pudieron aislar este disacárido por acetólisis (Wolfrom y col., 1951, b). Ante la posibilidad de que la isomaltosa hallada fuera un producto de reversión en medio ácido, hicieron experimentos de control en las mismas condiciones, los que resultaron negativos. Jones y Nicholson (1958) en un estudio sobre la reversión en medio ácido de L-arabinosa y D-manosa, mencionan por primera vez la mayor labilidad de la unión (1→6)- en las condiciones de acetólisis. Matsuda y col. (1961) aislaron nigerosa (unión  $\alpha$ -(1→3)-) y kojibiosa (unión  $\alpha$ -(1→2)-) por acetólisis de dextranos, a pesar de que la unión  $\alpha$ -(1→6)- es la predominante en dichos polisacáridos. Además comprobaron que, cuando acetolizan isomaltosa (unión  $\alpha$ -(1→6)-) y nigerosa (unión  $\alpha$ -(1→3)-) en las mismas condiciones, la primera se convierte totalmente en glucosa en 6 h a 25<sup>o</sup>, mientras que la nigerosa permanece inalterada. En las condiciones en que trabajaban no se producía reversión.

Probablemente, la mayor labilidad de la unión (1→6)- en este medio se deba a la mejor accesibilidad que presenta frente al reactivo atacante con respecto a una unión a un hidroxilo secundario.

Smith y Srivastava (1956) en sus estudios de acetólisis del glucomanano de Iles mannan, encontraron que la unión entre dos unidades de manosa se rompe más fácilmente que la unión entre una molécula de glucosa y una de manosa. Pudieron aislar de la mezcla de reacción 4-O- $\beta$ -D-glucopiranosil- $\alpha$ -D-manopiranososa, 4-O- $\beta$ -D-glucopiranosil- $\beta$ -D-glucosa (celobiosa) y 4-O- $\beta$ -D-manopiranosil- $\alpha$ -D-glucopiranososa, no así manobiosa o manotriosa, pese a que en el polisacárido la relación molar de manosa a glucosa es 2:1.

La diferencia de labilidad de las uniones permite obtener información en polisacáridos complejos. Así por ejemplo, polisacáridos con uniones (1→3)- y (1→6)- sufrirán un ataque selectivo, obteniéndose preferentemente por acetólisis fragmentos con uniones (1→3)-, mientras que por hidrólisis parcial sucederá lo contrario y se obtendrán con mayor rendimiento oligosacáridos con uniones (1→6)-.

CAPITULO IV

POLISACARIDOS DE HONGOS

## INTRODUCCION

Los polisacáridos de hongos han sido menos estudiados que los polisacáridos de plantas superiores a pesar de que en la actualidad se conocen más de 75.000 especies de hongos. Un hecho que llama la atención es que sólo un escaso número de polisacáridos de hongos sea estructuralmente análogo a los provenientes de otras fuentes naturales.

En los últimos años, la escuela sueca de Lindberg y, por otra parte, investigadores japoneses han realizado estudios estructurales. Los polisacáridos pueden ser elaborados en el medio de cultivo (extracelulares), formar parte de la pared celular o estar presentes en cápsulas rodeando la célula. El conocimiento de la estructura de los mismos puede ser útil a la taxonomía, inmunoquímica, biosíntesis y enzimólisis de polisacáridos. Vamos a considerar ahora y a grandes rasgos la estructura de algunos polisacáridos obtenidos de hongos. Para ello, vamos a hacer una división en polisacáridos neutros y polisacáridos ácidos y de los primeros consideraremos en especial los glucanos.

## POLISACARIDOS NEUTROS

### $\alpha$ -GLUCANOS

Las primeras investigaciones realizadas dan cuenta de la presencia de polisacáridos estructuralmente semejantes al almidón, fáciles de detectar por el color azul que dan con iodo. Se han aislado almidones de medios de cultivo de, por lo menos, 20 especies de Penicillium (Chrzaszcs y Tinkow, 1927). El Cryptococcus neoformans produce una amilosa cristalina similar a la del maíz (Hehre y col., 1949). Gorin y col.



(1966) aislaron una amilosa de cultivos del género Rhodotorula que tiene un peso molecular medio semejante al de amilosa de papa.

El glucógeno, polisacárido de reserva en animales, fue encontrado en varios Basidiomycetes y levaduras. Podemos ver que las propiedades del glucógeno aislado del Basidiomycete Polyporus giganteus y de levaduras son muy similares a las de glucógeno de hígado de conejo (Figura 10).

Otro  $\alpha$ -glucano extracelular aislado de cultivos de especies de Pullularia es el llamado pullulano. Se comprobó que este glucano estaba formado por uniones  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4)- y  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 6)-, pues por hidrólisis parcial daba maltosa e isomaltosa. Además, por hidrólisis parcial con pullulanasa, que es una  $\alpha$ -D-(1 $\rightarrow$ 6)-glucanasa, se pudo obtener maltotriosa, lo que indicaba que, por lo menos, había 3 unidades de glucosa unidas  $\alpha$ -D-(1 $\rightarrow$ 4)- juntas, o sea que se trataría de un polímero lineal formado por residuos de maltotriosa ligados por uniones  $\alpha$ -D-(1 $\rightarrow$ 6)- (Figura 11).

Dox y Neidig (1914) aislaron con 2% de rendimiento, del micelio de Penicillium expansum un glucano, que resultó igual al obtenido por Dox en 1915 a partir de Aspergillus niger, con 8% de rendimiento. Se lo conoce como nigerano y es producido por una gran variedad de hongos. Barker y col. (1953, 1957) determinaron su estructura (Figura 12).

Su alto poder rotatorio,  $[\alpha]_D^{20} +283^\circ$  (NaOH 1 N), excluye la presencia de uniones  $\beta$ -glucosídicas. Los estudios de metilación e hidrólisis parcial indican una estructura lineal con uniones alternadas  $\alpha$ -D-(1 $\rightarrow$ 3)- y  $\alpha$ -D-(1 $\rightarrow$ 4)-.

En los últimos años, Johnston (1965) aisló del micelio de Aspergillus niger otro polisacárido, denominado pseudonigerano, presente en una proporción de 26 a 42% de la pared celular, que no se extrae con agua, pero sí con hidróxido de sodio acuoso, y que contiene predominantemente uniones  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 3)- (87%) y algunas uniones  $\alpha$ -D-(1 $\rightarrow$ 4)-.

FIGURA 10PROPIEDADES DE GLUCOGENOS DE DISTINTO ORIGEN

PROPIEDAD	ORIGEN				
	Levadura de panadería <sup>1,2</sup>		Levadura de cerveza <sup>3</sup>	Hígado de conejo <sup>4</sup>	Polyporus Giganteus <sup>5</sup>
$[\alpha]_D$ (en agua)	+187	+184	+198	+196	+191
LONGITUD DE CADENA UNITARIA	—	11-12	13	12-13	8-9
PORCENTAJE DE DEGRADACION por $\beta$ -amilasa	46-48	50	44	43	42
LONGITUD DE CADENA EXTERIOR <sup>a</sup>	—	8	8	8	5-6
LONGITUD DE CADENA INTERIOR	—	2-3	4	3-4	2-3

<sup>a</sup> Número de residuos de D-glucosa eliminados por tratamiento con beta-amilasa

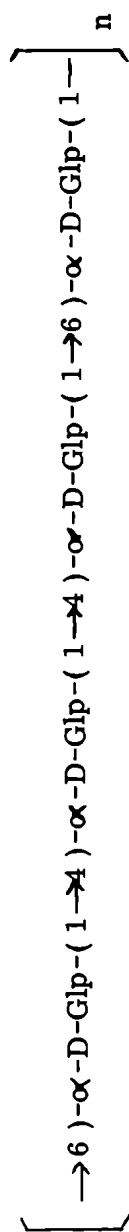
<sup>1</sup> Jeanloz (1944)

<sup>2</sup> Northcote (1953)

<sup>3</sup> Manners y Khin Maung (1955)

<sup>4</sup> Wickerham y Burton (1962)

<sup>5</sup> Bhavanandan y col. (1964)

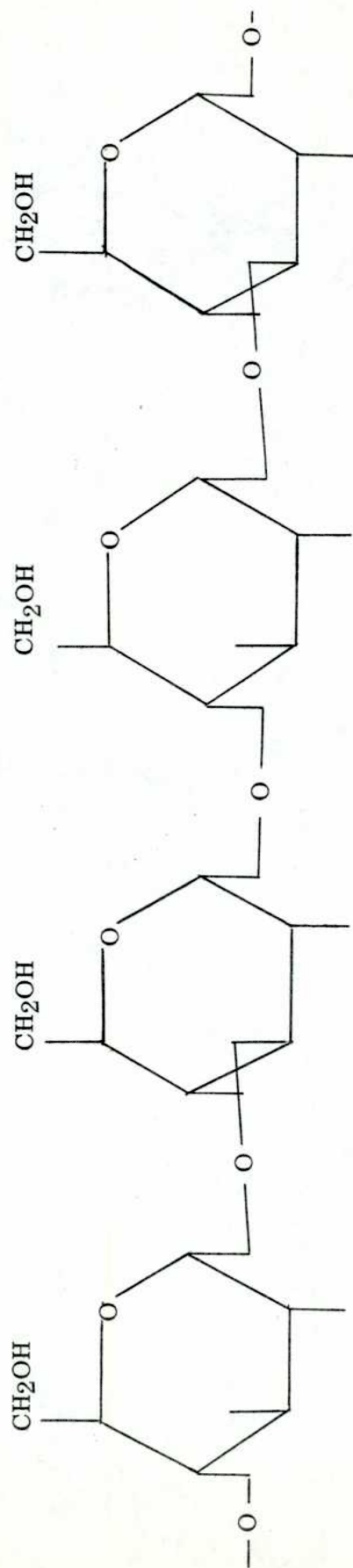
FIGURA 11ESTRUCTURA DEL PULLULANO

Bender y col. (1959)

Wallenfels y col. (1961)

Bouveng y col. (1962, 1963)

FIGURA 12  
ESTRUCTURA DEL NIGERANO



Barker y col. (1953, 1957)

Dox y Neidig (1914)

Dox (1915)

## $\beta$ -GLUCANOS

Entre los  $\beta$ -glucanos, el más abundante en la naturaleza es la celulosa. Se ha encontrado en baja proporción y mezclada con otros polisacáridos en paredes celulares de algunos hongos.

Ciertos Ascomycetes y Basidiomycetes producen glucanos de bajo poder rotatorio con predominio de uniones  $\beta$ -(1→3)-. Del Poria cocos, Basidiomycete que ocasiona la putrefacción de la madera, se ha aislado un glucano (pachyman) de poder rotatorio  $[\alpha]_D^{20} +21,5^\circ$  (NaOH 10%), de estructura lineal con uniones  $\beta$ -D-(1→3)- y algunas unidades internas con unión  $\beta$ -D-(1→6)- (Hoffmann y col., 1971).

Los  $\beta$ -(1→3)-glucanos con ramificaciones en O-6 son más abundantes en hongos. Un polisacárido de este tipo se aisló de cultivos de Claviceps purpurea, Ascomycete que causa el cornezuelo de centeno y que posee alcaloides que causan ergotismo, enfermedad responsable de envenenamiento de animales y hombres. De cultivos ricos en glucosa y fosfato se aisló un polisacárido formado por cadenas de glucosa unidas  $\beta$ -(1→3)- con ramificaciones en 6 distribuidas más o menos regularmente, cada 4 unidades de la cadena principal. Estas ramificaciones tendrían sólo una unidad de glucosa (Figura 13). Es interesante destacar que en condiciones que favorecen la formación del polisacárido se obtienen sólo trazas del alcaloide, que por otra parte se forma en un medio al que le faltan ciertos requerimientos para un crecimiento óptimo de las células.

Un glucano similar fue aislado por Johnson y col. (1963) de medios de cultivo de un Fungi imperfecti. Este polisacárido, sometido a una degradación de Smith daba glicerol y un glucano resistente a la acción del periodato. Los datos de metilación, enzimólisis y oxidación con periodato indicaban que hay una ramificación formada por una

sola unidad de glucosa cada 3 unidades de la cadena principal (Figura 13).

Muchos glucanos de estructura similar aislados de hongos del género Sclerotium han sido patentados por su posible uso como adhesivos para papel o como agentes espesantes en la industria alimenticia.

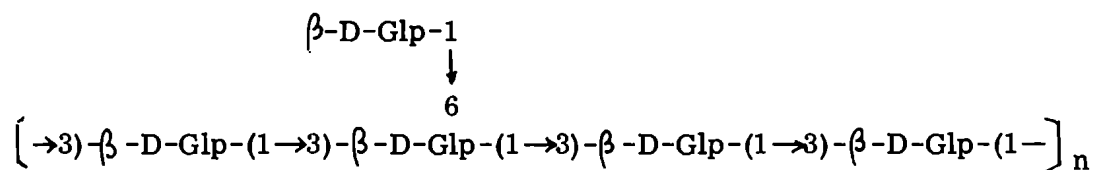
Un mismo organismo puede elaborar varios polisacáridos distintos. Pullularia pullulans produce el pullulano, que como ya vimos es un  $\alpha$ -glucano extracelular y también un  $\beta$ -glucano que se adhiere al micelio, menos soluble en agua, pero soluble en álcali diluído. Los estudios de hidrólisis, enzimólisis, oxidación con periodato y metilación indicaban una estructura muy ramificada, con un esqueleto de D-glucopiranosas unidas  $\beta$ -D-(1 $\rightarrow$ 3)- y dos de cada tres residuos sustituidos en O-6 (Figura 13). De las paredes celulares se aisló por extracción con álcali otro  $\beta$ -glucano, con una cadena principal de  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)-D-glucopiranososa, con ramificaciones en O-6 sustituidas por una sola unidad de glucosa. Habría una ramificación cada 9 unidades. La pared celular que quedaba luego de la extracción con álcali se metiló y mostró estar formado por un glucano con uniones (1 $\rightarrow$ 3)- y (1 $\rightarrow$ 6)- lineales. De las paredes celulares se aisló también un heteropolisacárido que contiene: D-manosa, D-galactosa, D-glucosa y ácido D-glucurónico (Bouveng y col., 1963).

También se aislaron de levaduras  $\beta$ -glucanos con uniones (1 $\rightarrow$ 6)- y (1 $\rightarrow$ 3)-.

Las paredes celulares de Saccharomyces cerevisiae (Ascomycete) están formadas por 29% de un glucano, 31% de un manano, 13% de proteína y 8,5% de lípidos. El glucano fue objeto de numerosos estudios. Misaki y col. (1968) como resultado de sus estudios sobre el polisacárido tal cual y sobre el polisacárido degradado por el método de Smith (160), postulan una estructura, que consiste en una cadena principal de glucosa con uniones preponderantes  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)- que alternan con  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6)-. Algu-

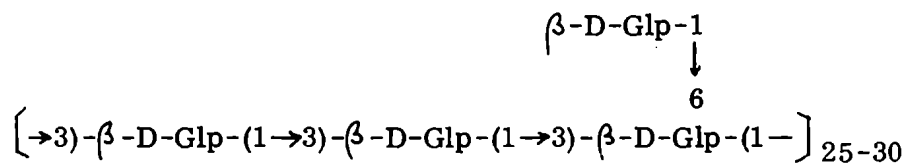
FIGURA 13GLUCANOS CON UNIONES  $\beta$ -D-(1 $\rightarrow$ 3)- Y  $\beta$ -D-(1 $\rightarrow$ 6)-

## POLISACARIDO DE CLAVICEPS PURPUREA



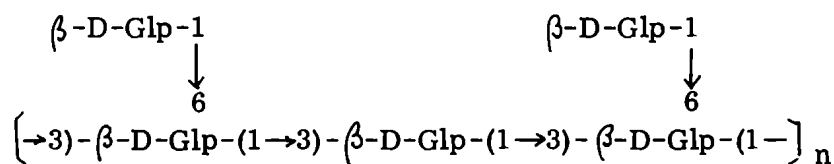
Perlin y Taber (1963)

## POLISACARIDO DE UN FUNGI IMPERFECTI



Johnson y col. (1963)

## POLISACARIDO DE PULLULARIA PULLULANS



Bouveng y col. (1963)

nas de las unidades con unión  $\beta$ -(1-6)- estarían sustituidas en O-3 por cadenas laterales de  $\beta$ -D-(1 $\rightarrow$ 3)-glucosa (Figura 14).

De cinco especies de Dermatofitos, Deuteromycetes que causan enfermedades de la piel, se aislaron 2 galactomananos y un glucano. Este último es ramificado, con uniones  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)- y  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6)-.

Los sistemas enzimáticos capaces de sintetizar  $\beta$ -glucanos con uniones (1 $\rightarrow$ 3)- y (1 $\rightarrow$ 6)- parecen ser característicos de hongos. Las uniones glicosídicas más raras en glucanos de hongos son las (1 $\rightarrow$ 2)- (Gorin y Spencer, 1968).

## MANANOS

Las estructuras más comunes encontradas en los mananos de hongos son ramificadas, con uniones  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 6)- y  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 2)-, pudiendo estar ambos tipos de uniones en la cadena principal o en las cadenas laterales.

El manano de Saccharomyces cerevisiae, que es un Ascomycete, estaría formado por una cadena principal de manopiranosas unidas  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 6)- y cadenas laterales con uniones  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 2)- y  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 3)-. Su estructura se determinó en base a estudios de metilación e hidrólisis parcial. El estudio de las cadenas laterales se realizó por acetólisis, que rompe con preferencia las uniones (1 $\rightarrow$ 6)- (Lee y Ballou, 1965) (Figura 15).

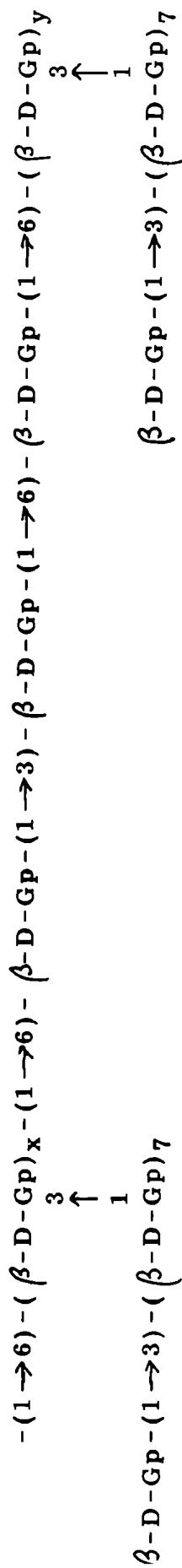
Se encontraron mananos ramificados con uniones  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 6)- y  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 2)- en Saccharomyces rouxii y Trichosporon aculeatum (Gorin y Spencer, 1968).

De cultivos de Penicillium charlesii, Clutterbuck y col. (1935) aislaron dos polisacáridos exocelulares: un manano y un galactano (manocarolosa y galactocarolosa), que fueron los primeros polisacáridos extracelulares de hongos sobre los cuales se hicieron estudios estructurales.



FIGURA 14

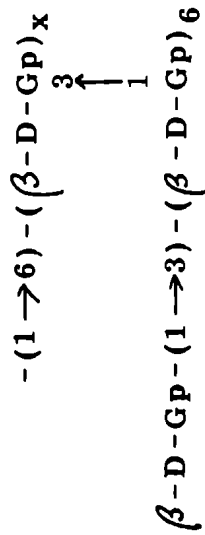
ESTRUCTURA DEL GLUCANO DE SACCHAROMYCES CEREVISIAE



DP 410

$[\alpha]_D^{20} - 10$  (dimetilsulfóxido)

$x + y = 40 - 50$



DP = 150

Misaki y col. (1968)



La estructura del manano fue aclarada por Hough y Perry (1962). La cadena principal está formada por uniones (1→2)-y tiene una sola ramificación en O-6 (Figura 16).

Gorin y col. (1969) describen mananos de levaduras que continen uniones con configuración  $\alpha$ - y  $\beta$ - en la misma molécula. El estudio de los espectros de resonancia magnética nuclear de los polisacáridos muestra señales a campos mayores que  $\tau$  4,55 para el H-1, en contraste a lo que se observa en la mayoría de los espectros de mananos y galactomananos de levaduras, en los que la señal para H-1 aparece a  $\tau$  4,0-4,55. Estas señales a campos mayores sugieren la presencia de unidades  $\beta$ -D-piranósicas si se comparan con las señales correspondientes al H-1 de los anómeros  $\alpha$ - y  $\beta$ - de los metil-manósidos. Los polisacáridos se analizaron polarimétricamente y presentan un poder rotatorio intermedio a los valores encontrados para  $\alpha$ - y  $\beta$ -mananos. Se realizaron estudios químicos sobre algunos de ellos. Por ejemplo, el manano de Pichia pastoris consiste en una cadena principal de  $\alpha$ -(1→6)-D-manopiranososa, sustituida en 2 por cadenas laterales de O- $\alpha$ -D-manopiranosil-(1→2)-O- $\beta$ -D-manopiranosil-(1→2)-O- $\beta$ -D-manopiranosil-(1→2)-O- $\beta$ -D-manopiranosil-(1→2)-D-manosa (Figura 17).

### GALACTANOS

Estos homopolisacáridos no son tan comunes en hongos como los glucanos.

El galactano aislado de Penicillium charlesii, galactocarolosa (Haworth y col., 1937), merece especial mención pues se trata de un polisacárido formado por galactofuranosas unidas  $\beta$ -(1→5)- en una estructura lineal de 9-10 unidades (Figura 18).

FIGURA 16

ESTRUCTURA DE LA MANOCAROLOSA

D-Manp-(1 → 2) - D-Manp-(1 → 2) - D-Manp-(1 → 2) - D-Manp-

1 ↓ 6

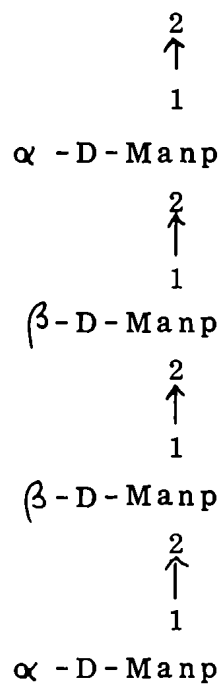
D-Manp-(1 → 2) - D-Manp-(1 → 2) - D-Manp-(1 → 2) - D-Manp-

Hough y Perry (1962)

Clutterbuck y col. (1935)

FIGURA 17MANANO DE PICHIA PASTORIS

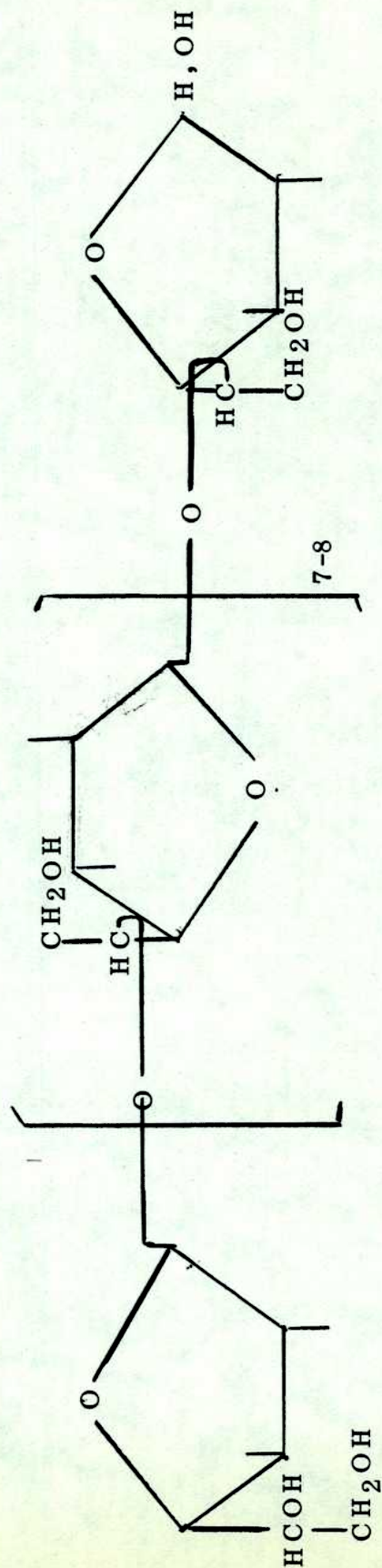
$\rightarrow 6) - \alpha - D - Manp - (1 \rightarrow 6) - \alpha - D - Manp - (1 \rightarrow 6) - \alpha - D - Manp - (1 -$



Gorin y col. (1969)

FIGURA 18

ESTRUCTURA DE GALACTOCAROLOSA



$[\alpha]_D - 84^\circ$

Haworth y col. (1937)

## HETEROPOLISACARIDOS

Se han aislado de hongos polisacáridos con L-fucosa, azúcar bastante común en polisacáridos de otro origen, por ejemplo de algas.

Del extracto acuoso de Polyporus giganteus, Bhavanandan y col. (1964) aislaron un galactofucomanano formado por una cadena principal de  $\beta$ -(1→6)-D-galactopiranosas, sustituida en O-2, cada dos o tres unidades, por un resto de 3-O- $\alpha$ -D-manopiranosil-L-fucopiranosas. La presencia de uniones  $\alpha$  y  $\beta$  en el polisacárido explica su poder rotatorio,  $[\alpha]_D^{20} +65^\circ$  (Figura 19).

Se han aislado también galactofucomananos de este tipo de otros dos Polyporus (P. fomentarius y P. igniarius), por lo cual Björndal y Lindberg (1969) sugieren que polisacáridos con esta estructura son característicos de Basidiomycetes.

De las fructificaciones de Armillaria mellea, Basidiomycete que produce la putrefacción de la raíz del manzano, Fraser y Lindberg (1967) aislaron un galactofucomanano con una relación de azúcares de 6,5:2:1. Los estudios de metilación e hidrólisis parcial indicaban la estructura de la figura 19.

De cinco especies de Dermatofitos, como se mencionó anteriormente, se aislaron dos galactomananos y un glucano, los tres solubles en agua. Los galactomananos se llamaron I y II y responden a las estructuras de la figura 20.

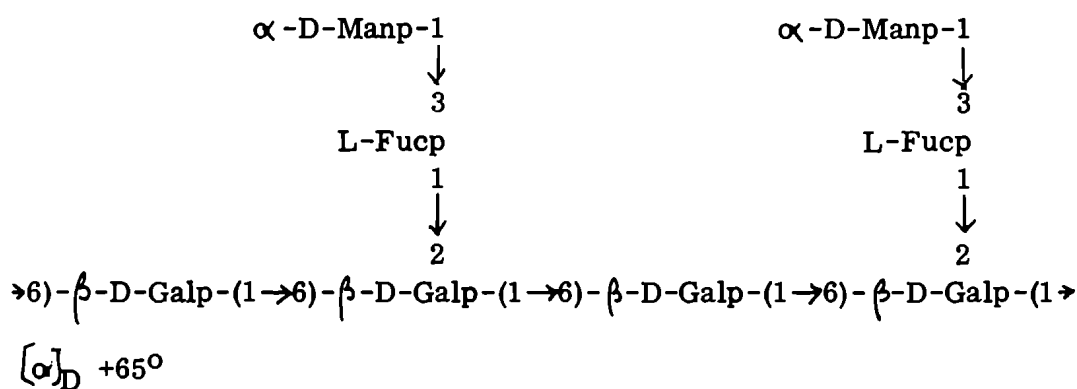
## POLISACARIDOS ACIDOS

Los ácidos urónicos son constituyentes comunes de gran variedad de polisacáridos. No se han aislado de hongos polisacáridos constituidos exclusivamente por ácidos urónicos, como es el caso del ácido algínico, aislado de algas.

Hough y Perry (1955) aislaron de Mucor racemosus un polisacárido formado por

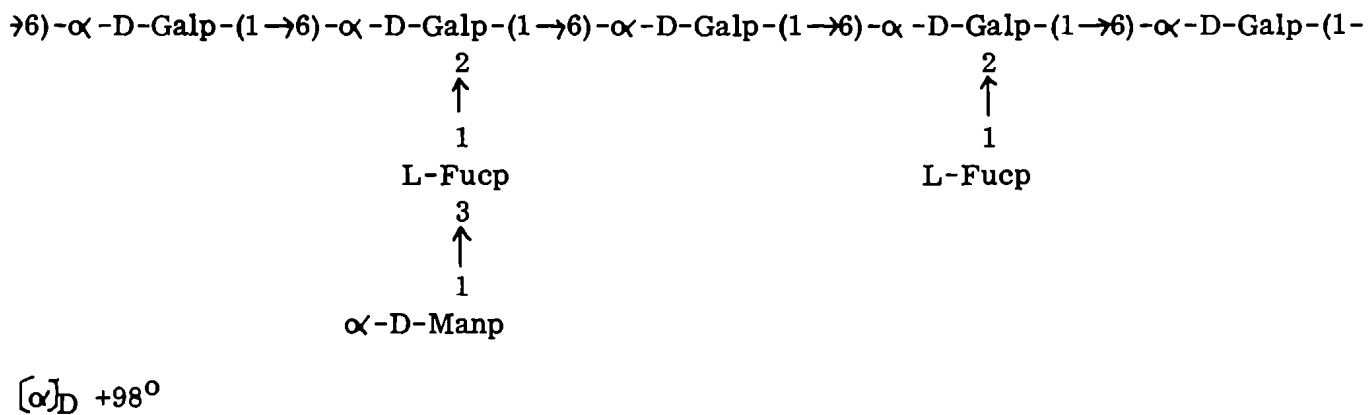
FIGURA 19GALACTOFUCOMANANOS DE HONGOS

## POLISACARIDO DE POLYPORUS GIGANTEUS



Bhavanandan y col. , 1964.

## POLISACARIDO DE ARMILLARIA MELLEA



Fraser y Lindberg, 1967.





ácido D-glucurónico, L-fucosa, D-manosa y D-galactosa en la relación 24:6:3:2.

Esta fue la primera identificación del ácido glucurónico como componente de un polisacárido extraído de un hongo.

Gancedo y col. (1966) determinaron el contenido de ácidos urónicos en paredes celulares de hongos pertenecientes a distintas clases. Los porcentajes dados son bajos ya que se trataría de una mezcla de polisacáridos (Figura 21).

Björndal y Lindberg (1970) aislaron de Basidiomycetes polisacáridos formados por glucosa y glucurónico, en los que el contenido en este último componente es significativo (Figura 21).

Se ha encontrado ácido malónico como componente de polisacáridos de hongos. El ácido luteico, mucflago exocelular de Penicillium luteum Zukal contiene glucosa y ácido malónico en la proporción 2:1.

De Penicillium islandicus se aisló un polisacárido más esterificado, al que se denominó ácido islándico y que contiene glucosa y ácido malónico en iguales proporciones. Polisacáridos de este tipo han sido aislados de varias especies de Penicillium. (Gorin y Spencer, 1968).

FIGURA 21ACIDOS URONICOS EN PAREDES CELULARES DE HONGOS

ESPECIE	CLASE	%
Dactylium dendroides		2 <sup>a</sup>
Alternaria sp	Deuteromycete	0,7 <sup>a</sup>
Fusarium sp	Deuteromycete	0,5 <sup>a</sup>
Penicillium album	Ascomycete	0,2 <sup>a</sup>
Aspergillus niger	Ascomycete	0,1 <sup>a</sup>
Polyporus fomentarius	Basidiomycete	27 <sup>b</sup>
Polyporus igniarius	Basidiomycete	40 <sup>b</sup>

<sup>a</sup> Determinación realizada sobre la pared celular total. Gancedo y col., 1966.

<sup>b</sup> Determinación de ácido glucurónico realizada sobre polisacárido homogéneo.

Björndal y Lindberg, 1970.

## POLISACARIDOS EN TAXONOMIA DE HONGOS

Los polisacáridos exocelulares e intracelulares de levaduras han sido utilizados por los taxonomistas como ayuda en la clasificación de ciertas especies. Así, por ejemplo, Lipomyces lipoferus se puede diferenciar de Lipomyces starkeyi por los azúcares obtenidos por hidrólisis parcial y total de sus polisacáridos exocelulares, diferenciación que es difícil de lograr por sus características morfológicas. La división del género Lipomyces (Ascomycete) en dos especies se había hecho en base a ensayos de asimilación de lactosa, pero las diferencias no eran claras. Los polisacáridos de L. lipoferus contienen manosa y glucurónico, los de L. starkeyi contienen además galactosa. La diferencia en composición y estructura de los polisacáridos extracelulares de Lipomyces es la base más significativa para la división en dos especies (Serdki y Wickerham, 1966).

Las especies del género Trichosporon (Deuteromycete) pueden subclasificarse en tres grupos según los polisacáridos que las componen (Gorin y Spencer, 1968). Mientras que T. fermentans, T. hellenicum y T. penicillatum poseen D-galactomananos con uniones  $\alpha$ - como componentes celulares, T. cutaneum, T. inkin, T. pullulans, T. undulatum y T. sericeum producen pentosilmananos. T. aculeatum contiene un  $\alpha$ -D-manano celular y debería ubicarse en otro grupo.

Se estudiaron varias especies de los géneros Candida y Trichophyton (Deuteromycetes) y se observó que forman polisacáridos que son típicos de cada grupo. Las especies del género Candida contienen mananos ramificados con uniones (1 $\rightarrow$ 2)- y (1 $\rightarrow$ 6)-, en los que las unidades ramificadas pueden ser manopiranosas o manofuranosas. Las especies de Trichophyton contienen en sus paredes celulares galactomananos formados por cadenas principales de D-manopiranosas unidas  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 6)- y cadenas

Laterales de D-galactofuranosa (Gorin y Spencer, 1968).

Galactofucomananos formados por una cadena principal de D-galactosa y cadenas laterales de D-manosa y L-fucosa forman parte de varias especies de Polyporus y de Armillaria mellea. Este tipo de polisacárido sería característico de los Basidiomycetes (Björndal y Lindberg, 1969).

## POLISACARIDOS CON ACTIVIDAD ANTITUMOR

Se encontró que algunos polisacáridos de plantas superiores, algas y hongos superiores inhiben el crecimiento de tumores trasplantados. En general, estos polisacáridos no están bien caracterizados. Shibata y col. (1968) aislaron de los líquenes Gyrophora esculenta Miyoshi y Lasallia populosa Llano  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6)-glucanos del tipo del pustu-lano, que presentan grupos ésteres en baja proporción y que tenían actividad inhibitoria muy marcada frente al sarcoma 180. Los glucanos que se obtienen después de liberar los grupos ésteres en medio básico presentan menor actividad.

Ikekawa y col. (1969) probaron la actividad de los extractos acuosos de siete especies de hongos comestibles contra el Sarcoma 180 trasplantado en ratas. Dichos extractos acuosos inhibían en forma significativa el crecimiento de los tumores. En el caso de Lentinus edodes (Berk.) sing. aislaron la sustancia activa que resultó ser un polisacárido constituido fundamentalmente por glucosa y cantidades menores de galactosa y fructosa, del que no realizaron estudios estructurales.

Villa y Agostoni (1969) probaron la actividad antitumor de un extracto acuoso de Amanita phalloides, que interfiere en el metabolismo de ácidos nucleicos. Se encontró que dicho extracto en ciertas dosis, inhibía la formación de tumores, pero no presentaba efecto si el tumor se había implantado con anterioridad a la aplicación del extracto. Los autores consideran que la sustancia activa podría ser un polisacárido.

Hamuro y col. (1971) trataron el pachimano, que es un  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)-glucano lineal del hongo Poria cocos, con ácido monocloroacético en solución isopropanólica, para obtener carboximetilpachimano. Este polisacárido modificado, que es soluble en agua, tiene un pronunciado efecto contra tumores trasplantados en ratas. Un pretratamiento previo a la implantación del tumor carecía de efecto.

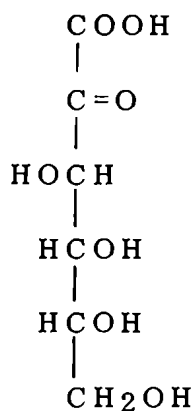
CAPITULO V

ACIDO D-ARABINO-HEXULOSONICO

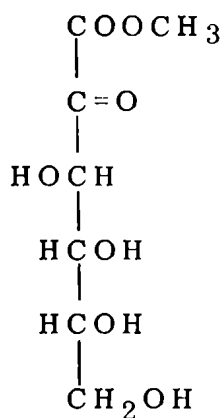
## INTRODUCCION

No se han encontrado previamente ácidos hexulosónicos en polisacáridos de hongos. Son llamados también ácidos cetoaldónicos y fueron estudiados principalmente como intermediarios en la síntesis de ácidos ascórbicos, ya que estos últimos pueden considerarse como sus lactonas enólicas.

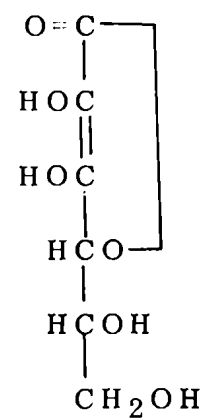
Así, por ejemplo, el ácido D-araboascórbico (III) puede obtenerse por lactonización y enolización simultánea del ácido D-arabino-hexulosónico (I). Esta doble transformación fue realizada por Maurer y Schiedt (1933) y por Ohle y col. (1934), quienes trataron el D-arabino-hexulonato de metilo (II) con metóxido de sodio y obtuvieron un producto no esterificado. El producto obtenido era el ácido D-araboascórbico (III) pero no fue reconocido como tal por Maurer y Schiedt (1933). Baird y col. (1934) señalaron que el producto aislado de la reacción era el enantiomorfo del L-araboascórbico. Los cetoácidos de la serie de las hexosas pueden transformarse parcialmente en los correspondientes ácidos ascórbicos por calentamiento de su solución acuosa, que establece un equilibrio entre el ácido hexulosónico y el ácido ascórbico correspondiente.



(I)



(II)



(III)

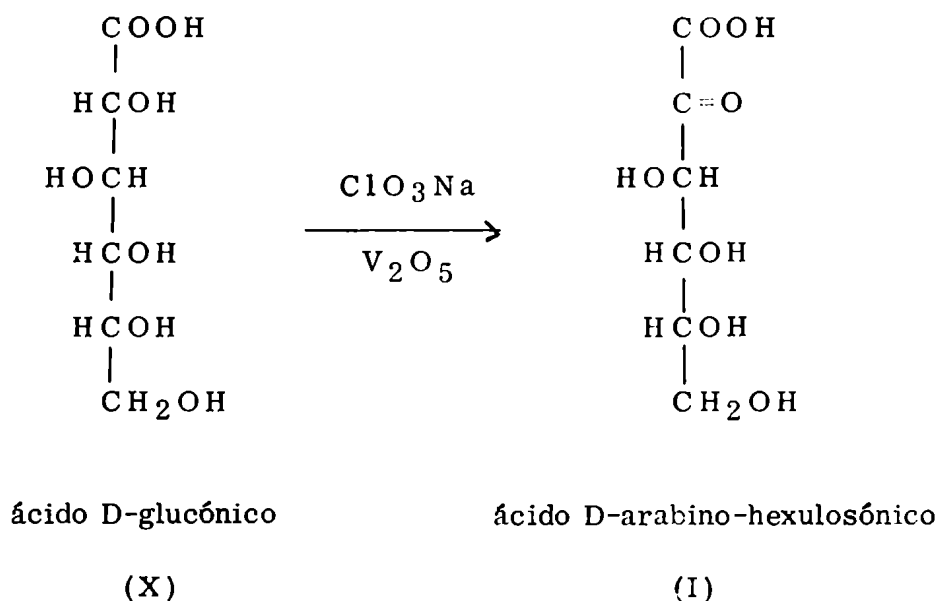


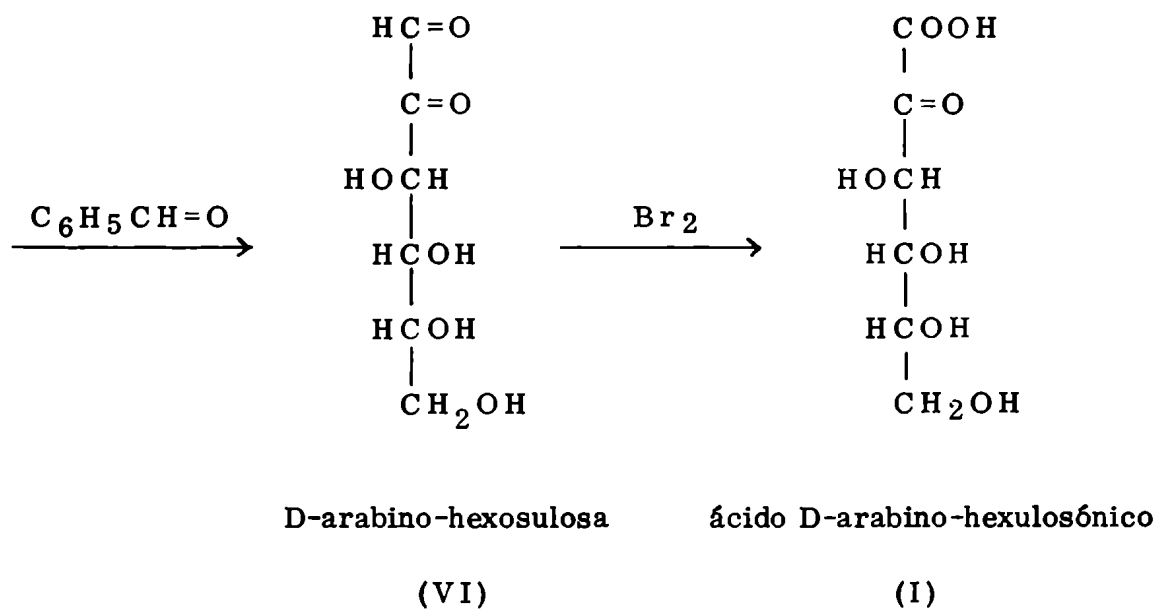
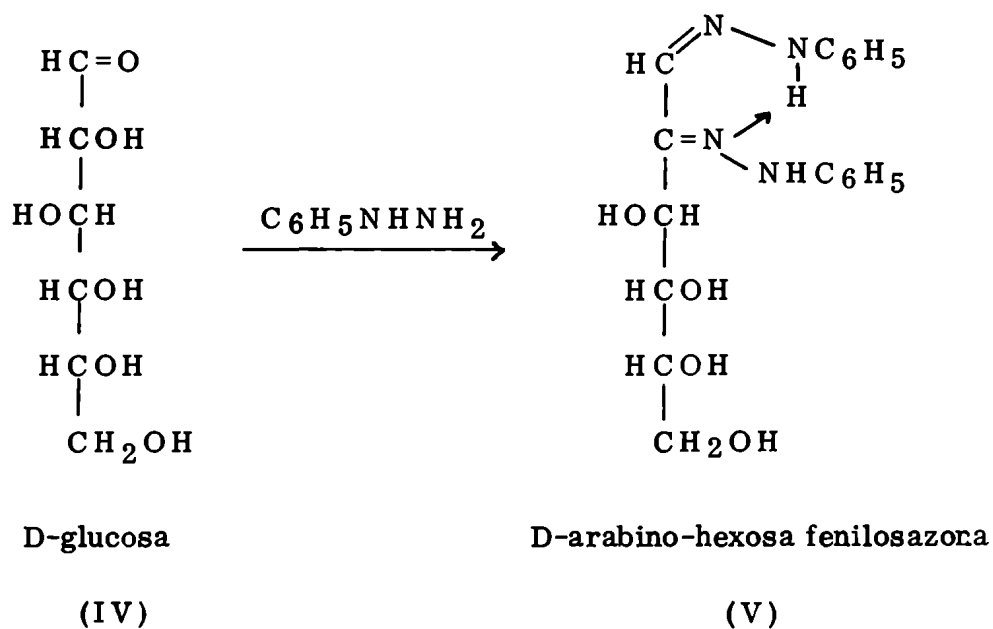
## MÉTODOS DE SÍNTESIS

Los ácidos hexulosónicos pueden obtenerse por oxidación con bromo de la osona correspondiente (Neuberg y Kitasato, 1927). La osona se obtiene por descomposición de la osazona con benzaldehído. El ácido se aísla como sal (Esquema 1).

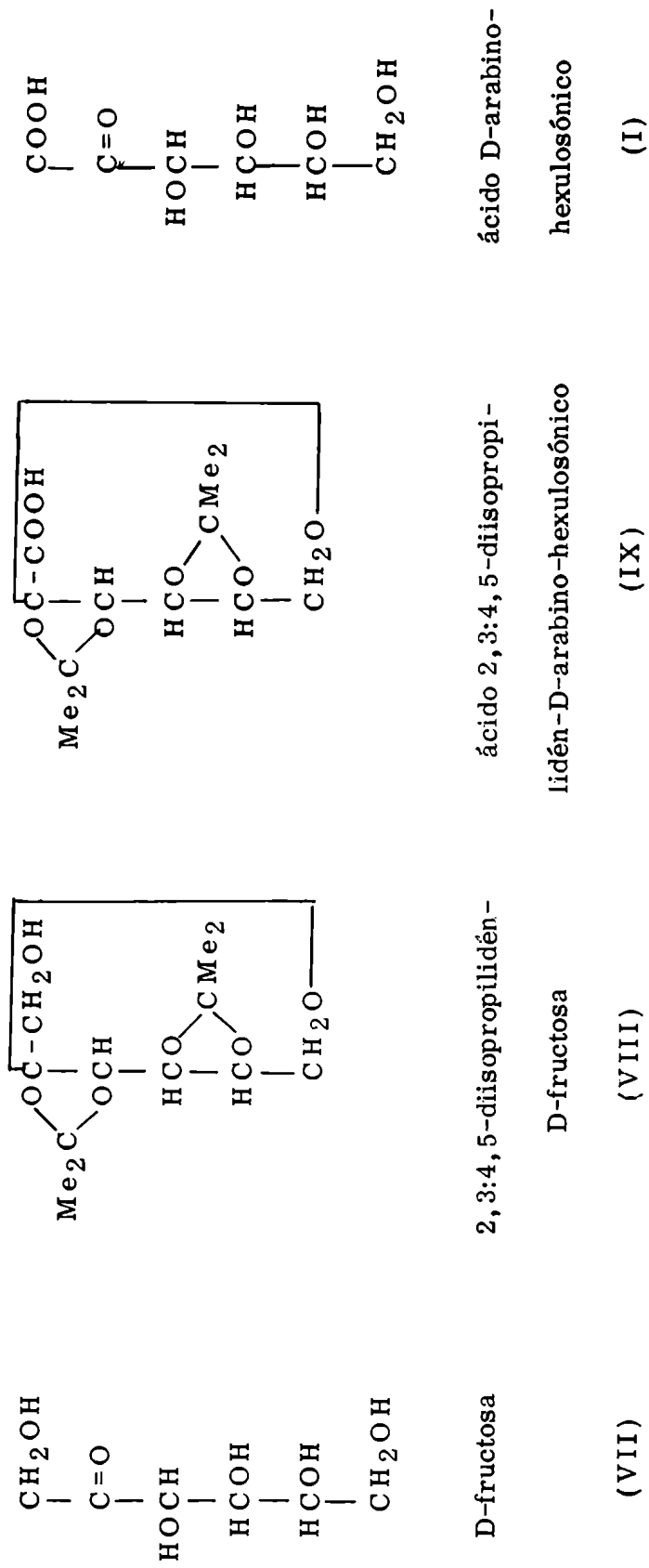
Ohle y Wolter (1930) describieron un método para la obtención de ácido D-arabino-hexulosónico basado en la oxidación de los derivados isopropilidénicos de cetosas (Esquema 2). La condensación de D-fructosa (VII) con acetona en presencia de ácido sulfúrico da lugar a 2,3:4,5-diisopropilidén-D-fructosa (VIII) que por tratamiento con permanganato de potasio en solución alcalina se oxida para dar el ácido 2,3:4,5-diisopropilidén-D-arabino-hexulosónico (IX). Este compuesto se hidroliza por calentamiento en solución acuosa o ácido sulfúrico diluído para dar el ácido D-arabino-hexulosónico.

Otro método de síntesis, se basa en la oxidación preferencial del grupo alcoholico secundario adyacente al carboxilo de un ácido aldónico (X) con ácido crómico o con cloratos en presencia de pentóxido de vanadio como catalizador (Regna y Caldwell, 1944).



ESQUEMA 1

ESQUEMA 2



El método más conveniente de preparación es el biológico que utiliza bacterias del género Pseudomonas y D-glucosa o D-gluconato de calcio como sustrato. P. aeruginosa, P. fluorescens, P. fragii, P. graveolens, P. mildenbergii, P. putida y P. schuykilliensis dan rendimientos satisfactorios (Lockwood y col., 1951).

Phillips y Moody (1960) obtuvieron ácido D-arabino-hexulosónico como uno de los productos principales del tratamiento con radiación  $\gamma$ , de soluciones acuosas de fructosa.

#### PROPIEDADES DEL ACIDO D-ARABINO-HEXULOSONICO

No se han descrito ni el ácido libre ni su lactona en forma cristalina. Generalmente se lo aísla como sal o éster. La única referencia que existe en la literatura sobre la lactona es la de Blouin y Arthur (1960), quienes asignan dicha estructura a uno de los productos que obtienen por irradiación de algodón en presencia de oxígeno. Le asignan la estructura de D-arabino-hexulosonolactona en base a sus características cromatográficas.

Según Ohle y Wolter (1930) el ácido se descompone fácilmente en agua a ebullición o en medio ácido a temperatura ambiente.

El poder reductor del ácido D-arabino-hexulosónico es mucho menor que el de la glucosa. El D-arabino-hexulosonato de sodio cristaliza de su solución acuosa concentrada en cristales prismáticos. Las sales de calcio y bario pueden precipitarse de su solución acuosa con etanol.

El ácido puede caracterizarse por formación de su sal de brucina, que cristaliza fácilmente (127). Puede identificarse también por formación de su derivado quinoxalínico, que se obtiene por tratamiento de las sales en medio ácido con o-feniléndiamina (Ohle, 1934).

Con respecto a los métodos de determinación cuantitativa, Lanning y Cohen (1951) dosan ácidos hexulosónicos con o-feniléndiamina, determinando la absorción del compuesto formado. Este reactivo es también útil para el revelado de cromatogramas.

Juni y Heym (1962) determinan el ácido glioxílico formado por reducción y posterior oxidación con periodato del ácido D-arabino-hexulosónico.

En cuanto a su actividad biológica, Kieckebusch y Lang (1962) observaron que el ácido D-arabino-hexulosónico puede usarse en el tratamiento del escorbuto provocado por una dieta deficiente en vitamina C.

#### ACIDO D-ARABINO-HEXULOSONICO EN PRODUCTOS NATURALES

El ácido D-arabino-hexulosónico ha sido determinado como uno de los productos de hidrólisis de un polisacárido extraído del alga Chondrus Cripsus, siendo ésta la única referencia sobre el mismo como constituyente de polisacáridos. Tampoco ha sido aislado de otros productos naturales el ácido libre o combinado.

Young y Rice (1946) hidrolizaron el polisacárido de Chondrus crispus por ebullición a reflujo con ácido clorhídrico 2% durante 14 horas e identificaron arabinosa y arabonolactona, observando además que el hidrolizado se oscurecía mucho. Realizaron entonces una hidrólisis en condiciones más suaves, calentando a ebullición con una solución de ácido oxálico-oxalato de potasio 0,05 M en atmósfera de nitrógeno, durante 30 horas. Del hidrolizado aislaron el ácido D-arabino-hexulosónico como derivado diisopropilidénico, por tratamiento con acetona absoluta, en presencia de sulfato de cobre. Aislaron además galactosa, que ya había sido identificada como componente del polisacárido.

Realizaron la determinación cuantitativa del ácido D-arabino-hexulosónico por dosaje con 1,3,5-trihidroxibenceno, del furfural producido por calentamiento con ácido clorhídrico y encontraron 3,26% de ácido.

La detección de arabinosa en el hidrolizado realizado con ácido clorhídrico se explica por descarboxilación del ácido en dicho medio y la posterior oxidación de la pentosa explicaría el aislamiento de arabonolactona.

Young y Rice (1946) usaron el método de extracción común a carragenanos, pero no aseguran la pureza del material que estudian. Llama la atención que a pesar de los numerosos estudios realizados sobre este tipo de polisacáridos, no hay mención posterior en la literatura sobre la presencia del cetoácido.

CAPITULO VI

DESCRIPCION Y DISCUSION

DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS

## AISLAMIENTO Y PURIFICACION DEL POLISACARIDO ESTUDIADO

El polisacárido se aisló, con un rendimiento del 10%, de un extracto acuoso de estromas secos de Cyttaria hariatii Fischer por precipitación con etanol hasta una concentración del 50%. No fue necesario desproteinizar, debido a que la determinación del porcentaje de nitrógeno en el polisacárido estaba dentro del error experimental del método. Su poder rotatorio era  $[\alpha]_D^{20} +87,8^\circ$  (KOH 1 N). Se purificó por disolución en agua y reprecipitación con etanol hasta que su poder rotatorio permaneció constante,  $[\alpha]_D^{20} +95,8^\circ$  (KOH 1 N).

Aproximadamente el 90% del polisacárido precipitaba de su solución acuosa con una concentración de etanol de 32-38% (Figura 22). El hecho de que la precipitación se produjera en un rango tan estrecho indicaba homogeneidad del polisacárido, de acuerdo a los estudios de Whistler y BeMiller (1956). El producto daba un solo pico por ultracentrifugación (Figura 23), lo que también demostraba su homogeneidad. Por lo tanto, se procedió a realizar estudios estructurales sobre dicho polisacárido.

## PROPIEDADES DEL POLISACARIDO

El polisacárido no daba coloración con iodo, lo que descarta estructuras del tipo almidón.

El espectro infrarrojo (Figura 24) mostraba absorción a  $1620\text{ cm}^{-1}$ , banda característica de carboxilato, que sugería la presencia de un ácido carboxílico. El hecho de que la banda apareciera a dicha frecuencia indicaría que el ácido está presente como sal, lo que es consistente con el porcentaje de cenizas hallado (1,2%). Por otra parte, la zona característica de la unión glicosídica, que, según Barker y col. (1954), estaría entre  $700$  y  $960\text{ cm}^{-1}$  no está definida, lo cual se debería a la presencia en el polisacá-



FIGURA 22  
DETERMINACION DE HOMOGENEIDAD POR  
PRECIPITACION FRACCIONADA CON ETANOL

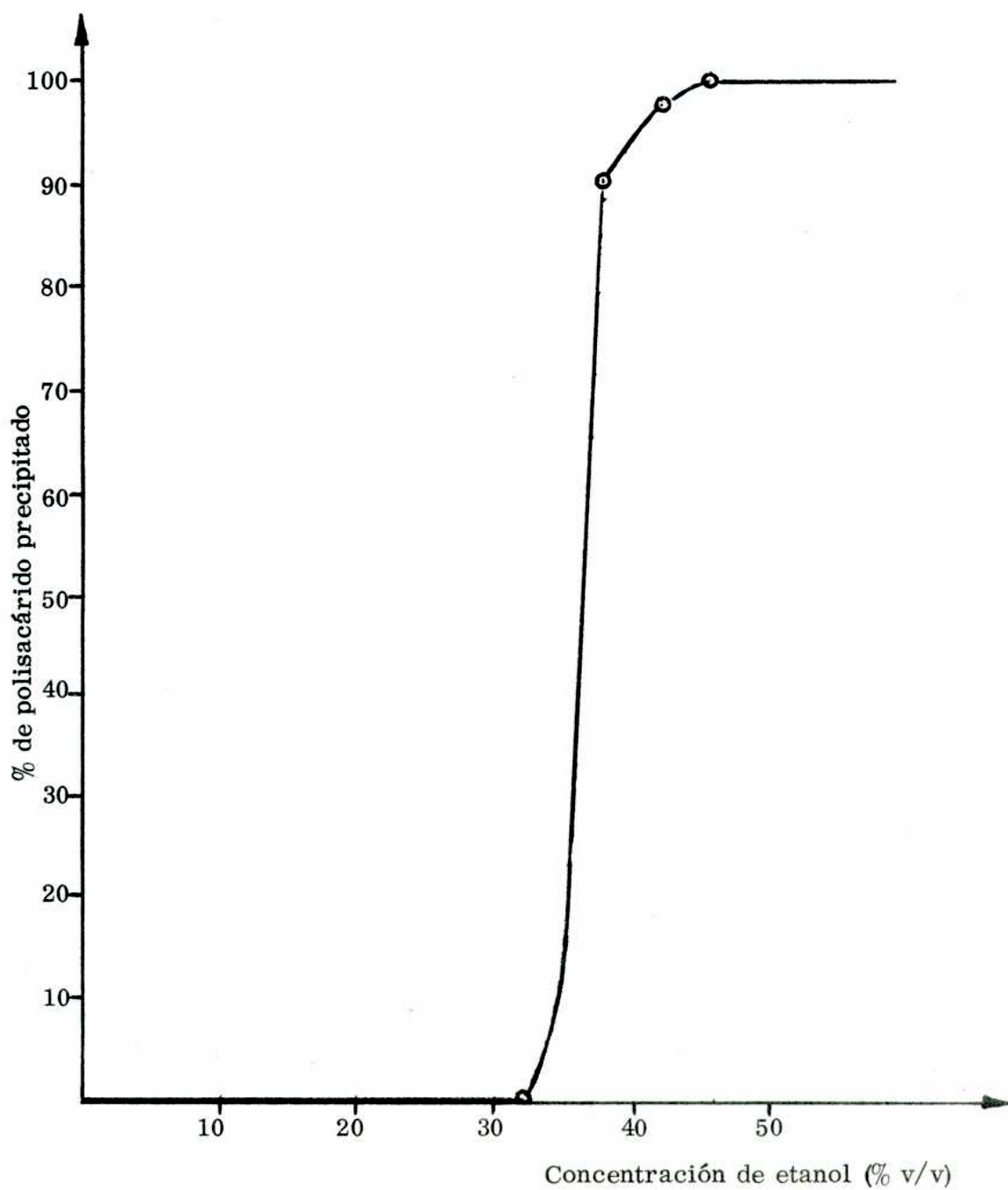
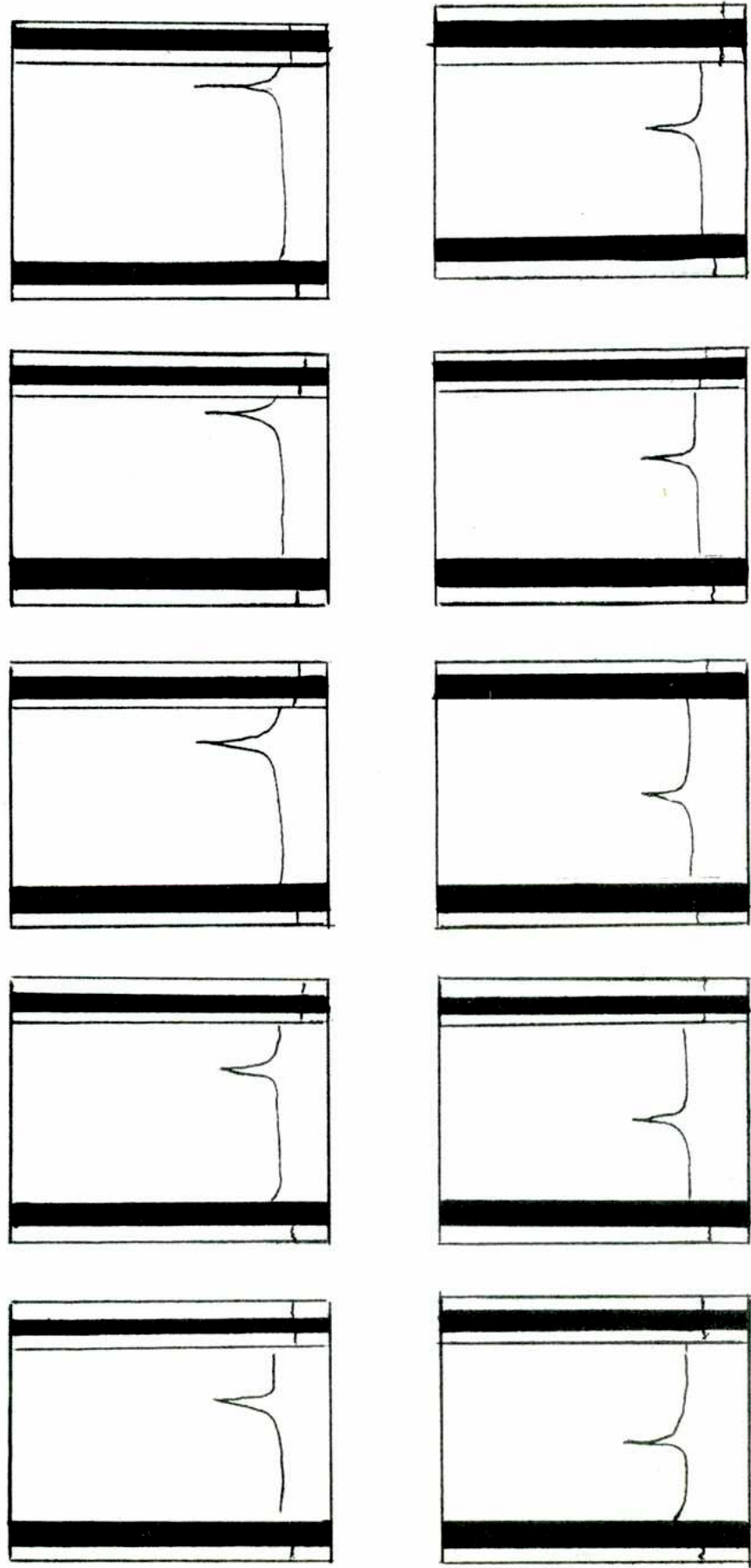


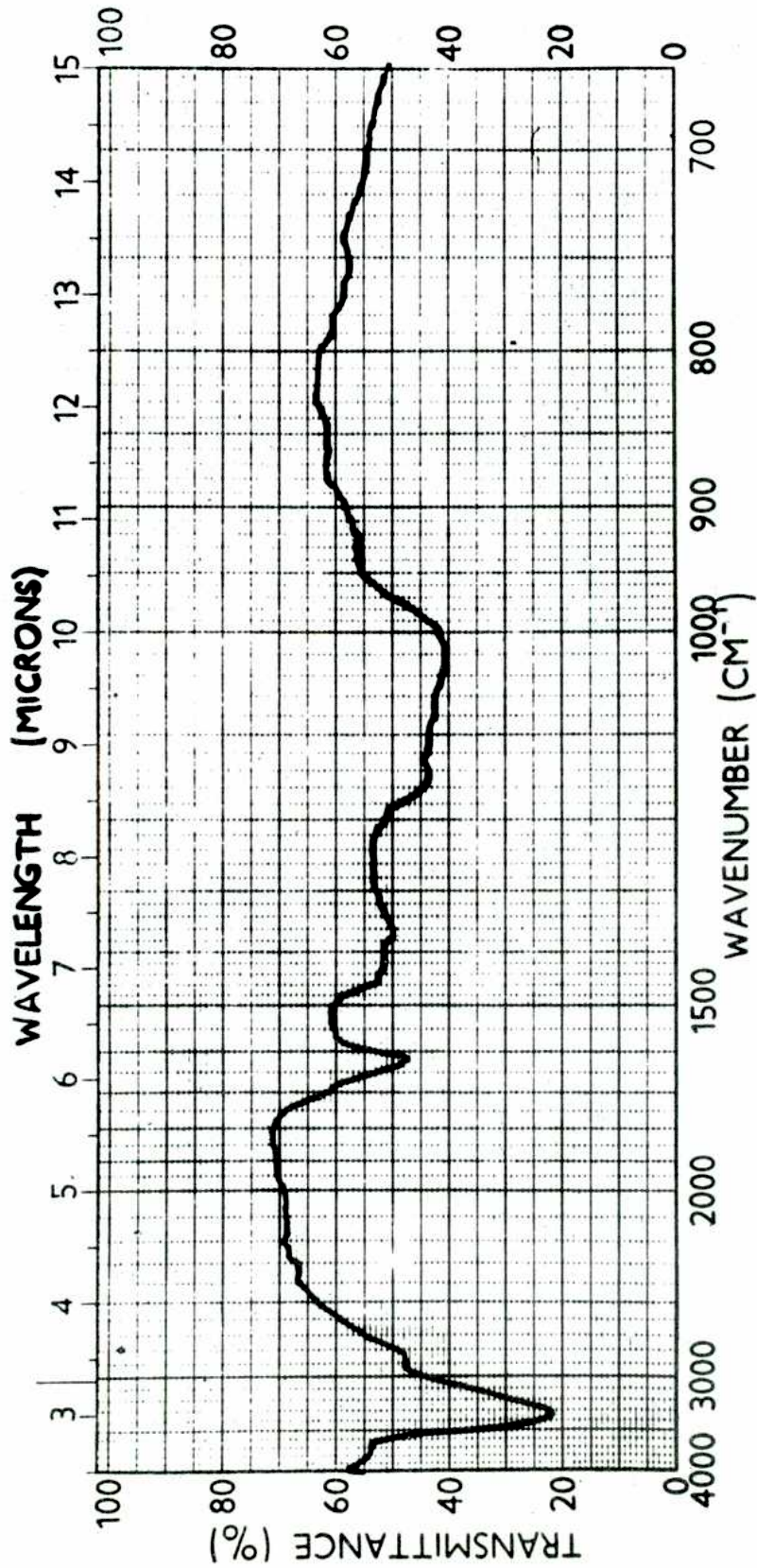
FIGURA 23

ANALISIS DE SEDIMENTACION POR ULTRACENTRIFUGACION



Las fotos fueron tomadas a los 6, 22, 38, 54, 70, 86, 102, 118, 122 y 123 min., después de llegar a 42.040 r.p.m.

FIGURA 24  
ESPECTRO INFRARROJO DEL POLISACARIDO ESTUDIADO



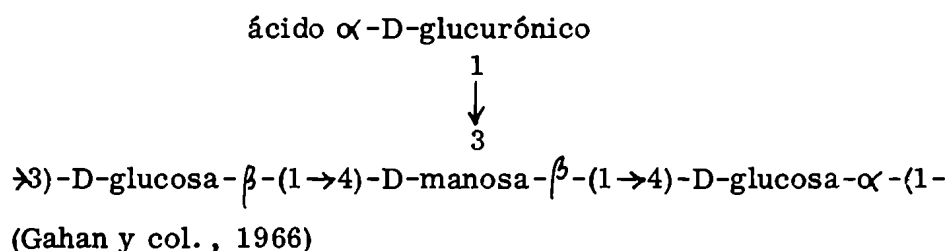
rdo de uniones  $\alpha$  y  $\beta$ -glicosídicas. El poder rotatorio del polisacárido,  $[\alpha]_D^{20} +95,8^\circ$ , es un valor intermedio entre los encontrados para polisacáridos con uniones  $\alpha$ - y los que presentan uniones  $\beta$ -glicosídicas. Por ejemplo, Perlin y Taber (1963) informaron para el glucano de Claviceps purpurea (Figura 13), que posee uniones  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)- y  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6)-, un poder rotatorio  $[\alpha]_D^{20} -4^\circ$  (NaOH 1 N). El glucano presente en la pared celular de Saccharomyces cerevisiae (Figura 14), que es un  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)-D-glucano con ramificaciones en C-6, tiene un poder rotatorio  $[\alpha]_D^{20} -10^\circ$  (dimetilsulfóxido) (Misaki y col., 1968).

Por otra parte, los  $\alpha$ -glucanos presentan poderes rotatorios muy positivos. Así, por ejemplo, el nigerano (Figura 12), que tiene uniones  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 3)- y  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4)- tiene un poder rotatorio  $[\alpha]_D^{20} +283^\circ$  (NaOH 1 N) (Barker y col., 1953).

Un ejemplo de polisacárido con ambos tipos de uniones es el aislado de estromas de Poliporus giganteus,  $[\alpha]_D^{20} +65^\circ$ , constituido por unidades de D-galactosa, D-manosa y L-fucosa (26) (Figura 19).

Gorin y col. (1969) estudiaron mananos de levaduras en los que la manosa presenta uniones  $\alpha$ - y  $\beta$ - en el mismo polisacárido (Figura 17). Dichos mananos presentan poderes rotatorios intermedios entre los que contienen uniones  $\alpha$ - y los que contienen uniones  $\beta$ -.

Uno de los pocos ejemplos en que la glucosa presenta ambos tipos de unión glicosídica es el polisacárido aislado de Aerobacter aerogenes,  $[\alpha]_D^{20} +79^\circ$  (agua), que consistiría en una unidad repetitiva de:



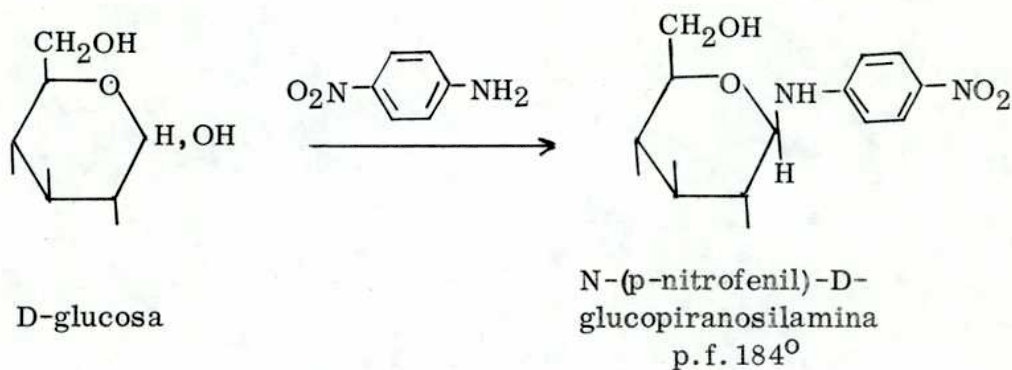
La única referencia que se ha encontrado en la literatura sobre glucanos de hongos con uniones de tipo  $\alpha$  - y  $\beta$  - en la misma molécula es la dada por Buok y Obaidah (1971), que aislan de la pared celular de Fusicoccum amigdali un glucano de  $[\alpha]_D^{+40}$  (NaOH 1 M), que poseería ambos tipos de uniones, pero los autores no realizan mayores estudios estructurales sobre el polisacárido.

Los disacáridos aislados de un hidrolizado parcial del polisacárido de Cytaria hariatii, como se describirá posteriormente en este capítulo, confirman la existencia de ambos tipos de uniones.

El grado de polimerización se determinó por el método descrito por Unrau y Smith (1957), que consiste en la reducción del extremo reductor del polisacárido con borohidruro de sodio, seguida de oxidación con periodato de sodio y determinación del formaldehído producido. Se obtuvo un valor de 230 si se considera que el grupo terminal es una molécula de hexosa unida a través del O-3 y, por lo tanto, un mol de polisacárido produciría 2 moles de formaldehído; o de 115 si se considera que el grupo terminal está unido a través del O-6 y se produciría un mol de formaldehído por mol de polisacárido (Figura 2).

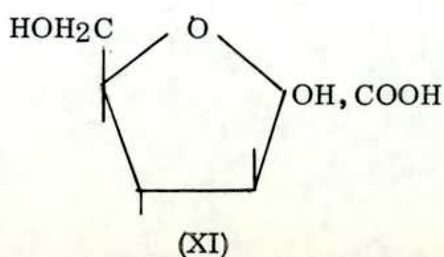
#### AZUCARES COMPONENTES DEL POLISACARIDO

El polisacárido requería condiciones drásticas para su hidrólisis total. El hidrolizado contenía como producto principal D-glucosa, la que fue identificada por preparación de la N-(p-nitrofenil)-D-glucopiranosilamina (174).



Se determinó por cromatografía cuantitativa en papel de un hidrolizado total, por el método descrito por Wilson (1959), que utiliza ftalato ácido de anilina. Se encontró 89,5% en peso de glucosa.

Se observaba también por cromatografía en papel, la presencia de un ácido y de una cetosa en cantidades muy pequeñas. El componente ácido pudo aislarse como sal de bario por cromatografía en columna de celulosa de un hidrolizado obtenido en medio ácido muy diluido ( $\text{SO}_4\text{H}_2$  0,05 N), con un corto período de calentamiento (2 h) y neutralizado inmediatamente con carbonato de bario. En estas condiciones se hidrolizan principalmente las uniones glicosídicas furanósicas que son más lábiles en medio ácido que las piranósicas y, por lo tanto, su velocidad de hidrólisis es mucho mayor (77). El hecho de que el ácido se haya liberado en estas condiciones indicaría que su unión glicosídica es furanósica (XI)



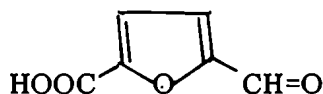
Ohle y Wolter (1930) informan que el ácido D-arabino-hexulosónico libre se descompone por calentamiento en solución acuosa o con ácido diluido a temperatura ambiente. Hasta el momento no ha sido descrito ni el ácido libre ni su lactona en forma cristalina.

El hidrolizado del que se aisló el ácido no fue descationizado previo a su separación cromatográfica y pudo entonces obtenerse como sal de bario, sin mayor descomposición. En la hidrólisis realizada en condiciones más drásticas, con ácido sulfúrico 1 N seguida de neutralización y descationización, se observó cromatográficamente arabinosa, que provendría de la descarboxilación del ácido D-arabino-hexulosónico. Young y Rice (1946) encontraron también arabinosa entre los productos de hidrólisis del polisacárido que aislaron de Chondrus crispus, que contenía también ácido D-arabino-hexulosónico, y atribuyeron su presencia a la misma causa. Una muestra auténtica de sal de calcio del ácido D-arabino-hexulosónico se descationizó y la solución se concentró a presión reducida en las mismas condiciones que los hidrolizados. Por cromatografía en papel se observó la formación de trazas de arabinosa. Esta facilidad de descarboxilación explicaría también el color rosado característico de las pentosas, que se observa al revelar el ácido con clorhidrato de p-anisidina o ftalato ácido de anilina. Al calentar con el reactivo el ácido pasaría a arabinosa, siendo éste el azúcar que en realidad se revela.

El ácido D-arabino-hexulosónico presenta una mayor movilidad en los sistemas de solventes empleados, que los ácidos glucurónico y galacturónico, de la misma manera que las cetosas presentan en general una movilidad mayor que las aldosas correspondientes.

El ácido D-arabino-hexulosónico da negativa la reacción de carbazol-sulfúrico (Dische, 1947), característica de sus isómeros, los ácidos urónicos. Esta reacción

se basa en la formación de 5-carboxi-2-formilfurano (XII) por calentamiento con ácido sulfúrico concentrado, el que reaccionaría con carbazol para dar un compuesto coloreado.



(XII)

El ácido D-arabino-hexulosónico, por su estructura, no puede dar este compuesto. Además, considerando su labilidad en medio ácido es probable que se descarboxile a arabinosa. Esto está de acuerdo con el resultado experimental obtenido, ya que al hacer la reacción con carbazol-sulfúrico y agregado de agua al cabo de 2 horas, aparecía una coloración púrpura indicativa de la presencia de hexosas o pentosas (46).

Por tratamiento con borohidruro de sodio del ácido D-arabino-hexulosónico se obtuvieron las sales de bario de los dos ácidos aldónicos isómeros resultantes de la reducción del grupo ceto. Por descationización y calentamiento a presión reducida se transformaron en las correspondientes aldonolactonas: D-glucono-1,4-lactona y D-mano-1,4-lactona (Esquema 3).

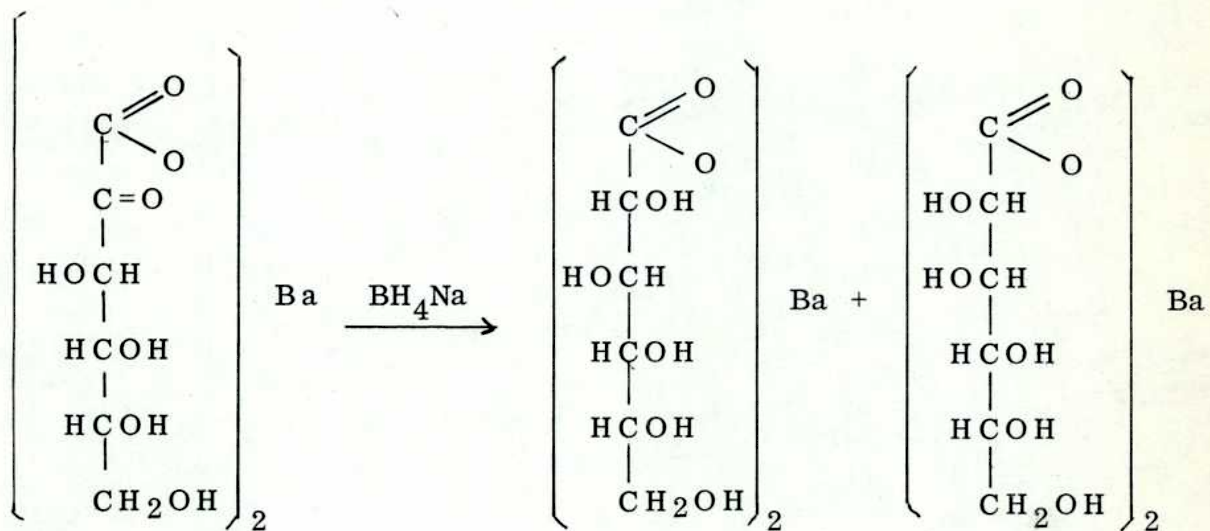
El ácido se caracterizó por preparación de su sal de brucina, idéntica a la preparada con una muestra auténtica de ácido D-arabino-hexulosónico.

Se obtuvo también de una fracción de columna una sustancia que podría corresponder a la lactona del ácido D-arabino-hexulosónico. Dicha sustancia se reveló con el reactivo de hidroxilamina-cloruro férrico, específico para lactonas y ésteres. Presentaba una movilidad semejante a la glucuronolactona en varios sistemas de solventes y la misma movilidad que una sustancia que se obtuvo por tratamiento del D-arabino-hexulosonato de calcio con tricloruro de boro, que también se revelaba con reactivo

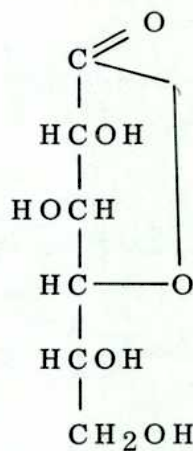


## ESQUEMA 3

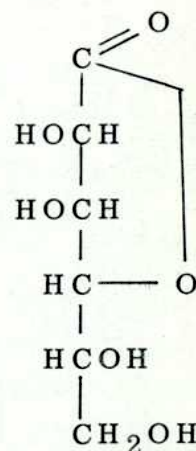
## CARACTERIZACION DEL ACIDO D-ARABOHEXULOSONICO

1) Dowex 50 (H<sup>+</sup>)

2) calentamiento



D-glucono-1,4-lactona



D-manono-1,4-lactona

de lactonas. La única mención que se encuentra en la literatura sobre la D-arabino-hexulosonolactona es la de Blouin y Arthur (1960), que no la aislaron, sino que atribuyeron esta estructura a una de las sustancias que se observaba por cromatografía en papel en la mezcla de productos obtenida por irradiación con rayos  $\gamma$  de celulosa, en la que estaba presente el ácido D-arabino-hexulosónico.

El porcentaje de ácido presente en el polisacárido se determinó, previa esterificación, por la reacción de los ácidos hidroxámicos (Kaye y Kent, 1953) y por descarboxilación (Barker y col., 1958). El resultado obtenido por ambos métodos fue del 6%. El primero de los métodos, aplicado directamente al polisacárido dio resultado negativo, lo que indicaba la ausencia de ácido lactonizado.

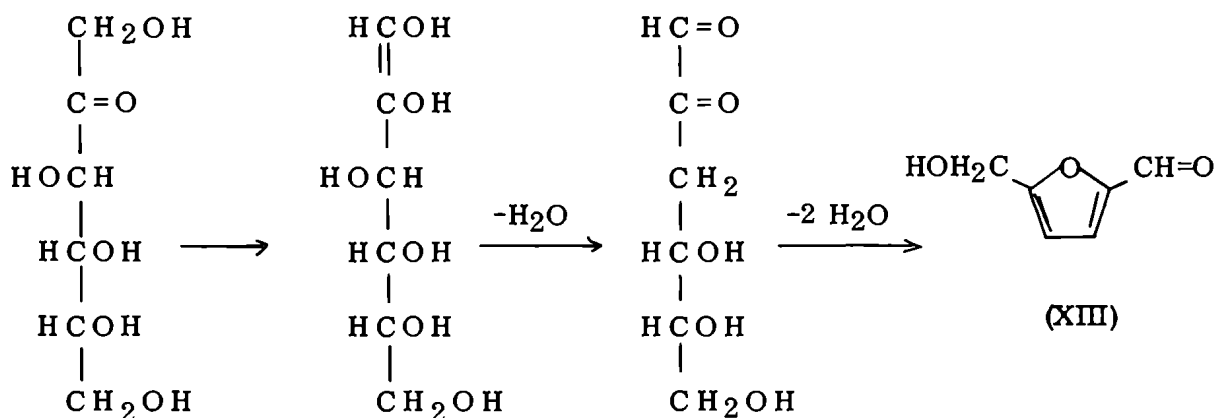
El hecho de haber encontrado un ácido hexulosónico es interesante debido a su relación con los ácidos ascórbicos. Los ácidos urónicos, isómeros de los hexulosónicos, se han encontrado como componentes de muchos polisacáridos de hongos, como puede verse en los trabajos de Gorin y Spencer (1968) y Björndal y Lindberg (1970). Pero ésta es la primera vez que se encuentra un ácido hexulosónico en hongos. Young y Rice (1946) encontraron ácido D-arabino-hexulosónico entre los productos de hidrólisis de un polisacárido, cuya homogeneidad no fue determinada, aislado del alga Chondrus crispus. Las investigaciones posteriores sobre carragenanos no confirman los resultados obtenidos por Young y Rice.

Es probable que el ácido D-arabino-hexulosónico sea un constituyente más común de polisacáridos, como lo son sus isómeros los ácidos urónicos y que no haya sido detectado debido a su facilidad de descarboxilación a arabinosa en las condiciones de hidrólisis.

Se encontró D-fructosa en muy pequeña cantidad (ca. 1%). La cetosa se aisló de una fracción de hidrolizado de polisacárido separada en columna de celulosa,

y que contenía también glucosa. Para separar la fructosa se oxidó la aldosa con agua de bromo a ácido glucónico, que se retuvo en una columna de resina aniónica. La fructosa se caracterizó por preparación de la D-arabino-hexosa fenilosazona, idéntica a una muestra auténtica. El contenido en fructosa se determinó por cromatografía cuantitativa en papel de la fracción de hidrolizado separada en columna, utilizando el mismo método que para glucosa.

En las condiciones de hidrólisis ácida una gran parte de la fructosa se descompone a 5-hidroximetil-2-furaldehído (XIII), que fue aislado entre los productos de hidrólisis. Shaw y col. (1967) estudiaron la degradación térmica de fructosa en medio ácido y sugirieron el siguiente mecanismo para su descomposición:



Las determinaciones cuantitativas de los componentes simples indicaban una relación molar de D-glucosa-ácido D-arabino-hexulosónico-D-fructosa (98:6:1).

#### OXIDACION CON PERIODATO

Los resultados obtenidos por oxidación con periodato (Tabla 4) corresponden a un consumo de 0,68 moles de periodato por mol de glucosa anhidra con formación de 0,33 moles de ácido fórmico. Las determinaciones del consumo de oxidante se realizaron

TABLA 4

OXIDACION CON PERIODATO

TIEMPO	3 h	1 d	2 d	3 d	7 d	8 d	9 d
Periodato (mol/mol glucosa anhidra)	0,44	0,62	0,68	0,68	0,69	0,71	0,73
Acido fórmico (mol/mol glucosa anhidra)	0,14	0,32	0,34	0,33	--	0,34	0,33

por titulación según el método clásico de Fleury y Lange (1933), ya que el método espectrofotométrico dio resultados inconsistentes, posiblemente debido a la presencia del ácido D-arabino-hexulosónico.

El ácido fórmico provenía de moléculas de glucosa unidas (1→6)- y de las unidades terminales, que representan un porcentaje total del 33%. El hecho de que haya un consumo de periodato ligeramente superior al que correspondería a la producción de fórmico está de acuerdo con la presencia de uniones (1→4)-, que consumen 1 mol de periodato sin producción de ácido fórmico (Esquema 4).

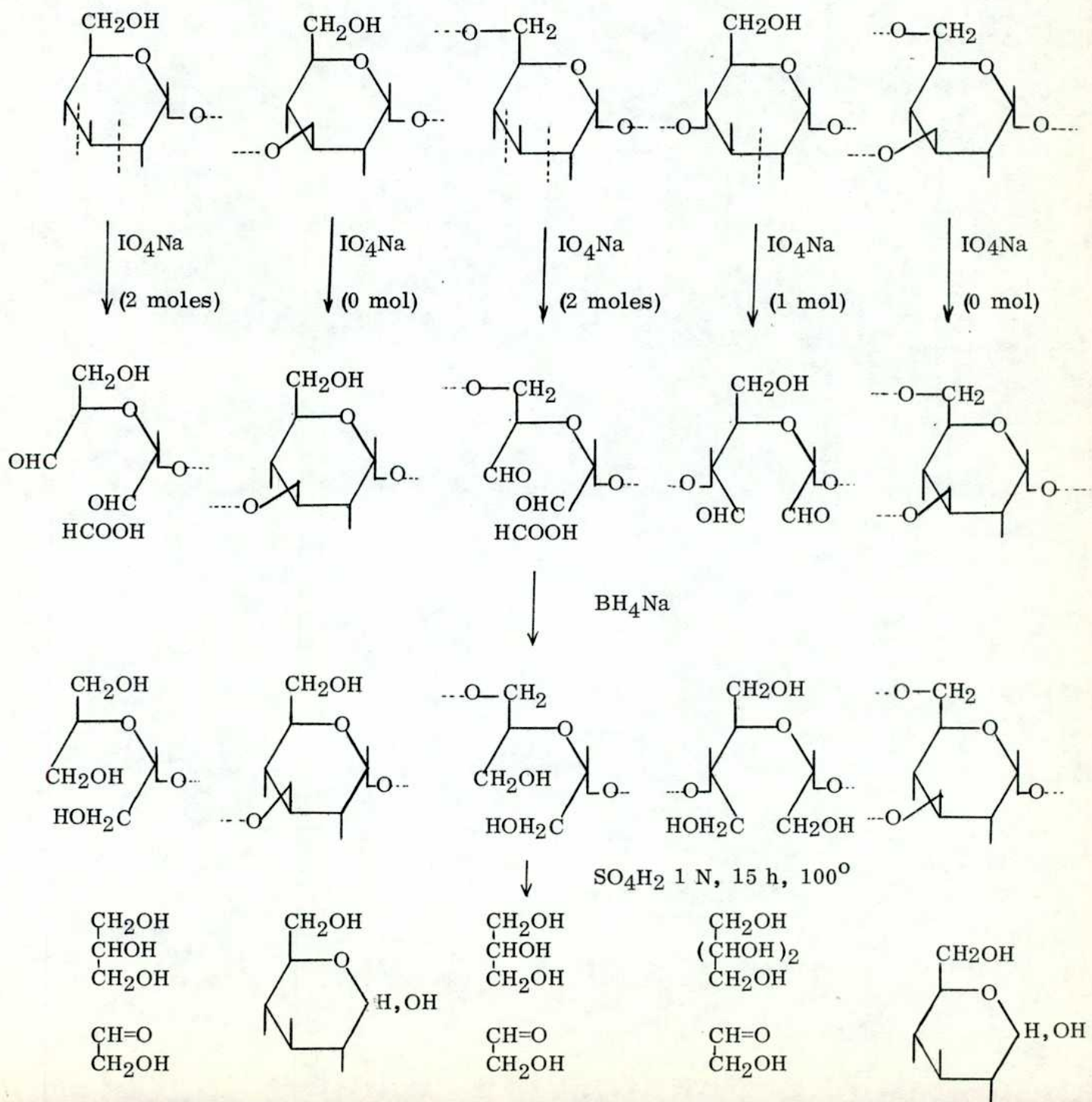
La reducción e hidrólisis total del polialdehído formado dio glucosa, glicerol y eritritol en la relación molar 12:6:1, resultados que están de acuerdo con los obtenidos por titulación (Esquema 4).

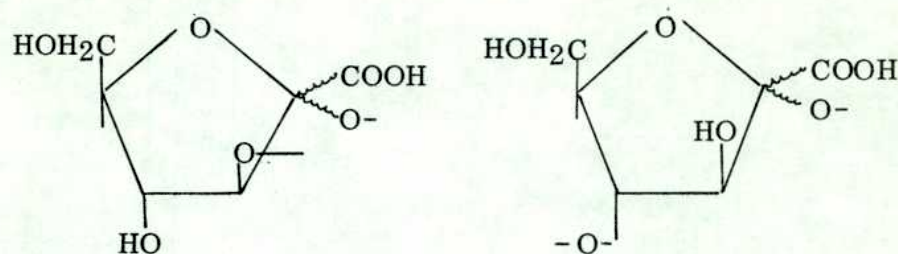
El polialdehído se sometió a una degradación por el método de Smith (160), en las condiciones descritas por Misaki y Kanamaru (1968), que consiste en una hidrólisis suave (ácido sulfúrico 0,1 N, 25°, 24 h) del polialdehído reducido, en forma tal que se rompen las uniones acetálicas pero no las glicosídicas de los residuos no oxidados. En estas condiciones se recuperó un 61% de polisacárido degradado insoluble. En el hidrolizado, se observó por cromatografía en papel glicerol y eritritol. No se pudo detectar glucosilglicerol lo que indica la ausencia de uniones (1→6)- y (1→3)- alternadas (Figura 5). El polisacárido degradado insoluble dio por hidrólisis ácida parcial (ácido sulfúrico 0,05 N, 100°, 3,5 h) ácido D-arabino-hexulosónico.

El hecho de que el ácido no se haya atacado en la oxidación con periodato nos indica que no se encuentra como unidad terminal y que estaría unido a través del O-3 u O-4.

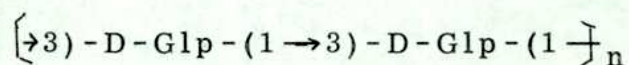
## ESQUEMA 4

## ESTUDIOS DE OXIDACION CON PERIODATO





La hidrólisis total del polisacárido degradado que quedó después de liberar el ácido daba sólo glucosa, lo que es consistente con la presencia de una cadena lineal de glucosa unida (1→3)-



Un resumen del estudio de oxidación con periodato puede verse en el Esquema 5.

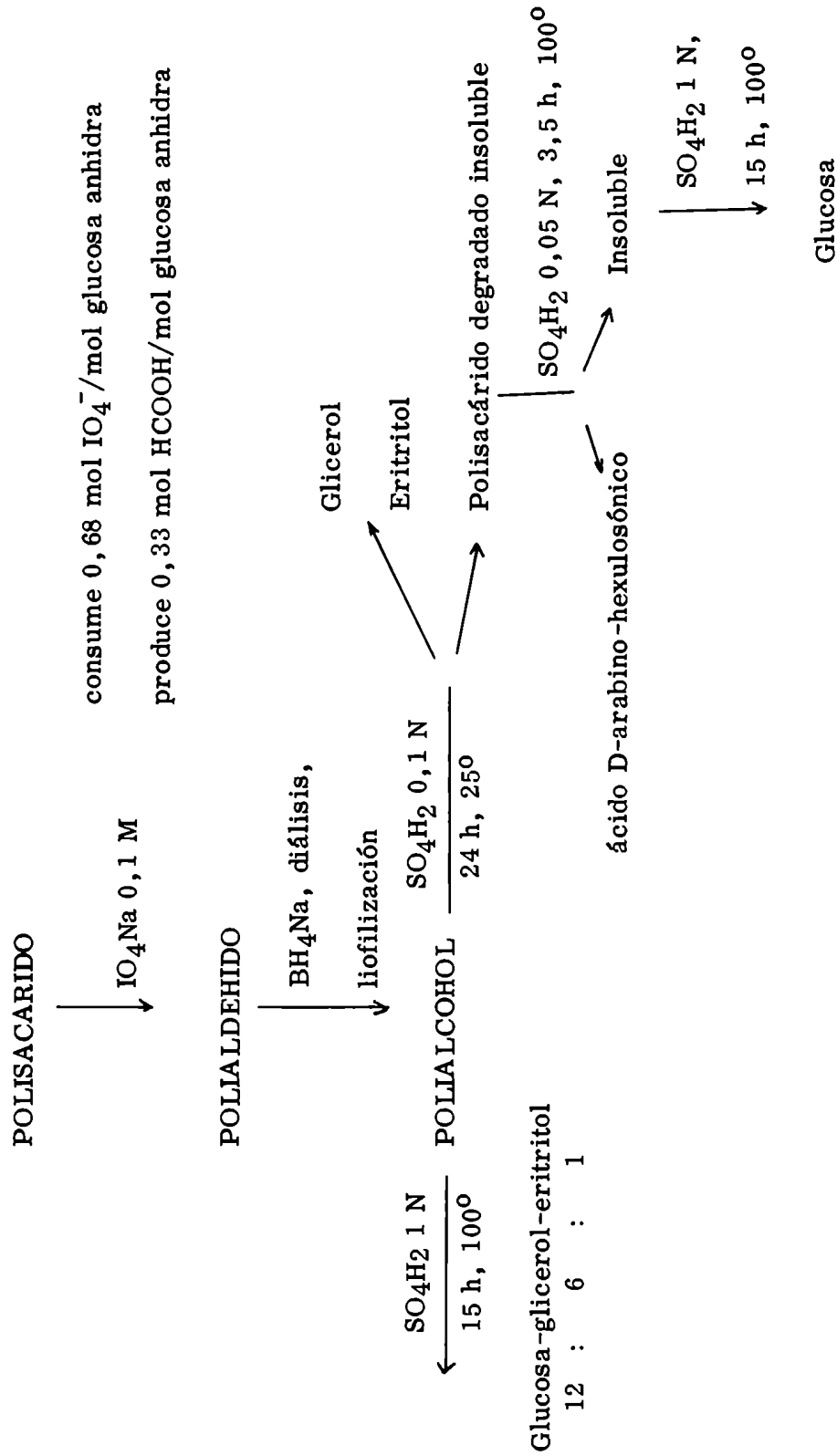
### METILACION DEL POLISACARIDO

El polisacárido se metiló con sulfato de metilo e hidróxido de sodio según el método descrito por Haworth (1915) y a continuación se aplicó el método modificado según Falconer y Adams (1956). El polisacárido parcialmente metilado se metiló repetidamente con yoduro de metilo y óxido de plata, siguiendo el método de Purdie (1903), hasta que no se observó absorción correspondiente a hidroxilo en el espectro infrarrojo. La hidrólisis del polisacárido totalmente metilado se realizó por disolución del mismo en ácido sulfúrico 72% a temperatura ambiente seguida de dilución hasta una concentración de ácido de 12% y calentamiento durante 4 h. Estas son las condiciones recomendadas por Croon y col. (1960) para que la demetilación sea mínima.

Sobre una muestra de polisacárido se ensayó el método de metilación de Sandford y Conrad (1966), que utiliza hidruro de sodio, yoduro de metilo y dimetilsulfóxido,

ESQUEMA 5

ESTUDIOS DE OXIDACION CON PERIODATO





con resultados no satisfactorios debido al bajo rendimiento en producto obtenido y al bajo porcentaje de metilación. Los autores recomiendan este método debido a que se puede lograr metilación total de un polisacárido en un único paso. Sin embargo, existen ejemplos en la literatura (7) de que puede haber degradación de la molécula en estas condiciones, como aparentemente ha sucedido en nuestro caso.

Los azúcares metilados se fraccionaron en columna de celulosa. La 2,3,4,6-tetra-O-metil- y la 2,4,6-tri-O-metil-D-glucosa se cristalizaron e identificaron por comparación con muestras auténticas. La 2,3,4-tri-O-metil- y la 2,4-di-O-metil-D-glucosa se identificaron por preparación de las N-(p-nitrofenil)-O-metil-D-glucopiranosilaminas correspondientes. La 2,3,6-tri-O-metil-D-glucosa que se obtiene en baja proporción, se detectó cromatográficamente. El aislamiento de dichos azúcares metilados indica que las uniones de los residuos de glucosa presentes en el polisacárido son (1→3)-, (1→6)- y (1→4)-, y que en las ramificaciones las uniones son a O-6 y O-3 (Tabla 5).

Por otra parte, la primer fracción eluída de la columna dio positivo el test de los ácidos hidroxámicos, descrito por Abdel-Akher y Smith (1951, a) para lactonas. Esta fracción corrida en placa de sílica gel daba, además de 2,3,4,6-tetra-O-metil-glucosa, una mancha de mayor movilidad, en baja proporción, que se reveló como lactona y que podría corresponder a una lactona metilada derivada del ácido D-arabino-hexulosónico. Por demetilación de esta misma fracción pudo observarse cromatográficamente glucosa como producto principal y arabinosa, que provendría de la descomposición de dicha lactona en el medio de reacción. El hecho de que pueda formarse una lactona del producto de metilación del ácido indicaría que el -OH sobre el C-4 está libre y, por lo tanto, la unión al ácido en el polisacárido sería a través de su O-4. En el caso de los ácidos urónicos, la unión más común es al O-4. La fracción de menor movilidad obtenida de la columna correspondería al producto de metilación del áci-

TABLA 5

ESTUDIOS DE METILACION

PRODUCTO DE HIDROLISIS (O-metil-D-glucosa)	HECHO ESTRUCTURAL INDICADO	PROPORCION MOLAR
2, 3, 4, 6-tetra -	Glp-(1-	1
2, 4, 6-tri-	→3)-Glp-(1-	3
2, 3, 4-tri-	→6)-Glp-(1-	1
2, 3, 6-tri-	→4)-Glp-(1-	trazas
2, 4-di-	→6)- Glp-(1- →3)-	1

do D-arabinohexulosónico, dado que por demetilación se obtuvo dicho ácido y arabinosa. Esta fracción, después de reducir con borohidruro de sodio y oxidar con periodato de sodio, dio negativa la reacción para ácido glioxílico descrita por Ee-grive (1935). Dicha reacción debería ser positiva si la unión con el ácido fuera (1→3)-y el ácido metilado obtenido en la hidrólisis tuviera la fórmula XIV (Esquema 6).

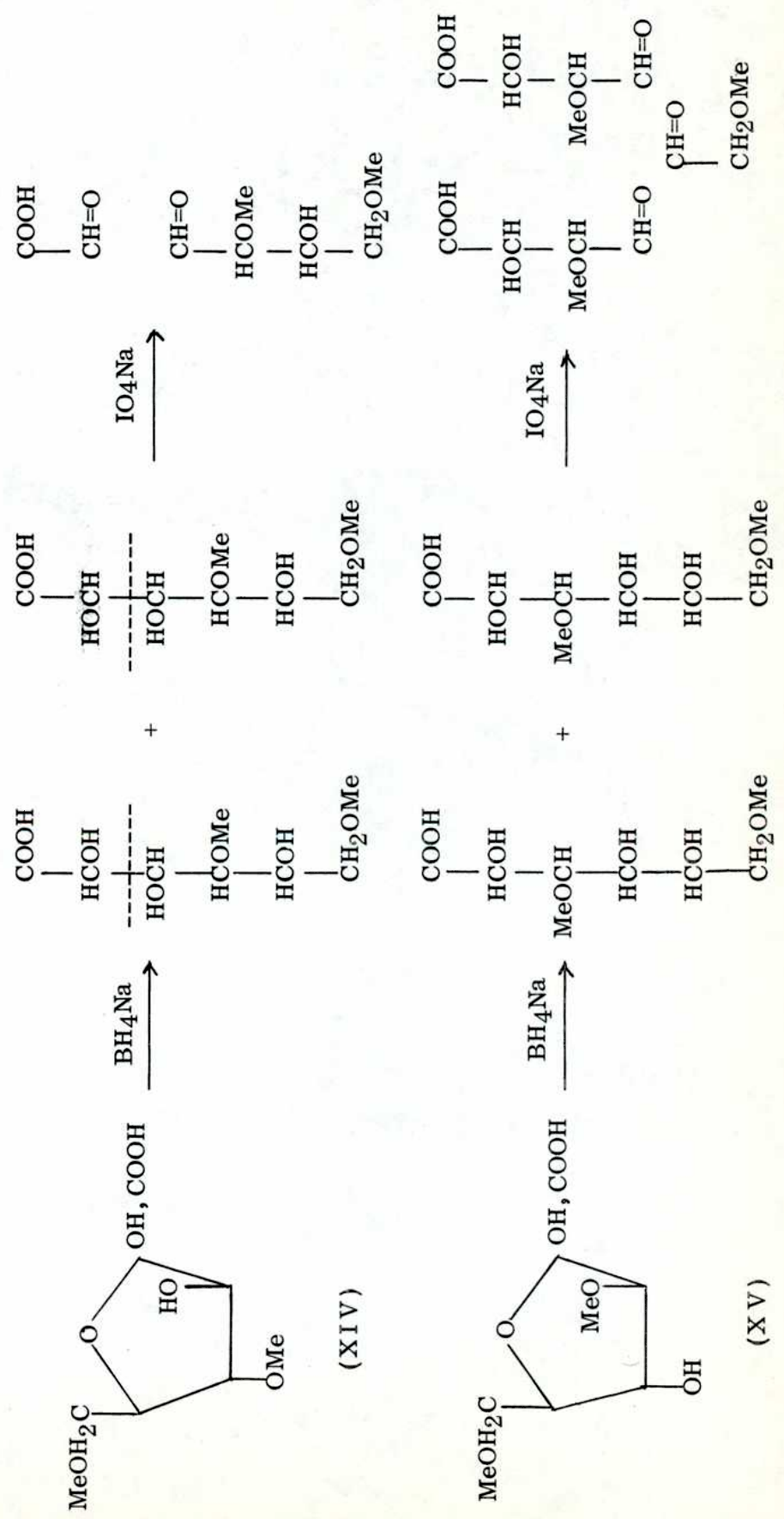
No se observó entre los productos metilados ningún derivado de fructosa. Probablemente la cetosa se descomponga en el medio de reacción y no se haya podido detectar por su baja proporción.

La determinación cuantitativa de los productos metilados se realizó por oxidación con hipiodito de sodio según el método descrito por Hirst y col. (1949, a), después de separarlos cromatográficamente. Se obtuvo una relación molar de tetra-O-metil-, tri-O-metil-, di-O-metil-glucosa de 1:4:1 (Tabla 5). Este resultado indica una estructura altamente ramificada.

Para determinar la proporción relativa de las tri-O-metil-glucosas entre sí se procedió de la siguiente manera. La fracción de productos trimetilados se redujo con borohidruro de sodio y se oxidó cuantitativamente con periodato de sodio. El consumo de oxidante nos da la cantidad de 2,3,4- y 2,3,6-tri-O-metil-glucosa, dado que la 2,4,6-tri-O-metil-glucosa no es atacada. El formaldehído formado nos da directamente la cantidad de 2,3,4-tri-O-metil-D-glucosa presente (Esquema 7). Los resultados obtenidos indican una proporción de uniones (1→3)-, (1→6)-, (1→4)- de 36:12:1.

Un resumen de los resultados obtenidos en la metilación del polisacárido puede verse en el Esquema 8.

ESQUEMA 6

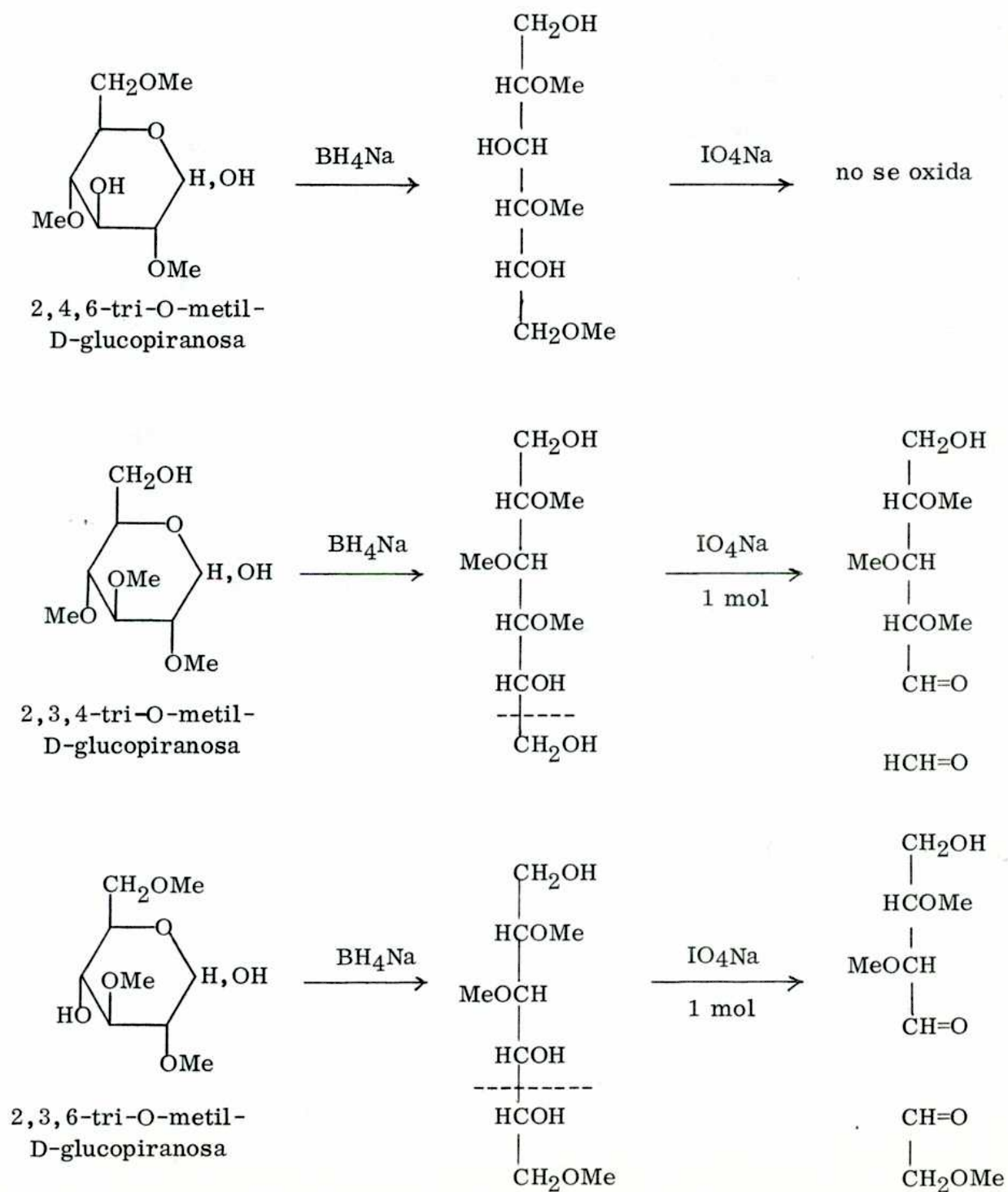


(XIV)

(XV)

## ESQUEMA 7

## OXIDACION CON PERIODATO DE TRI-O-METIL ALDITOLES



## ESQUEMA 8

METILACION DEL POLISACARIDO

POLISACARIDO

 $[\alpha]_D^{20} +95,8^\circ$ 

Metilación

- 1 ) Haworth
- 2 ) Falconer y Adams
- 3 ) Purdie

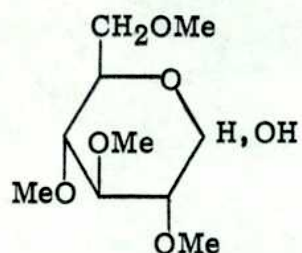
Polisacárido metilado

OCH<sub>3</sub> : 39,1% $[\alpha]_D +60,9^\circ$ 

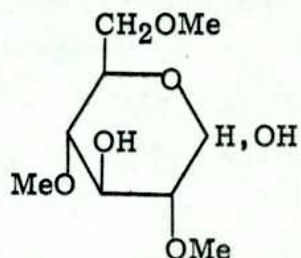
Hidrólisis

- 1 ) SO<sub>4</sub>H<sub>2</sub> 72%  
2 h, 25°

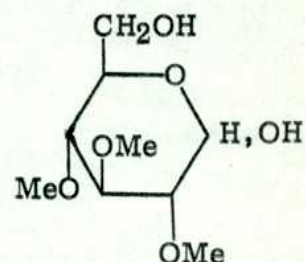
- 2 ) SO<sub>4</sub>H<sub>2</sub> 12%  
4 h, 110°



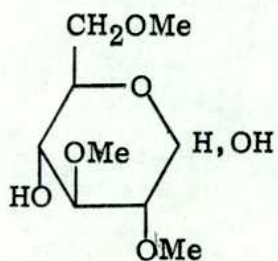
2, 3, 4, 6-tetra-O-metil-D-glucopiranososa



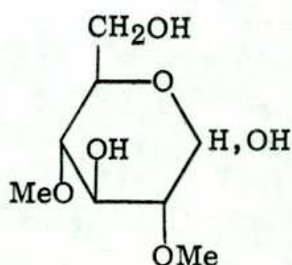
2, 4, 6-tri-O-metil-D-glucopiranososa



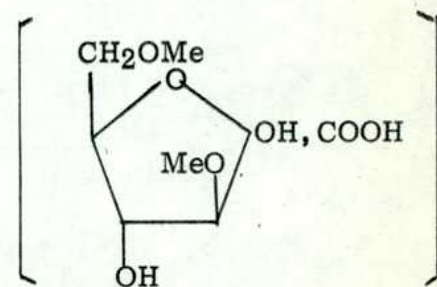
2, 3, 4-tri-O-metil-D-glucopiranososa



2, 3, 6-tri-O-metil-D-glucopiranososa



2, 4-di-O-metil-D-glucopiranososa



ácido 3,6-di-O-metil-D-arabino-hexulosónico

Comparación de los resultados obtenidos por oxidación con periodato y por metilación

Los datos obtenidos en los estudios de metilación concuerdan con los que resultan de la oxidación con periodato. Podemos compararlos considerando un total de 100 moles de glucosa y convirtiendo entonces las relaciones molares en porcentajes molares. Obtendremos entonces:

Grupo	Metilación	Oxidación con $\text{IO}_4^-$	
		Titulación	Polialcohol
Glucosa terminal	17	--	--
Glucosa $-(1 \rightarrow 3)-$	49	--	--
Glucosa $-(1 \rightarrow 6)-$	16	--	--
Glucosa $-(1 \rightarrow 4)-$	1,5	2	5
Glucosa $-(1 \rightarrow 3)-$ 6	17	--	--
Gluc. terminal + gluc. $(1 \rightarrow 6)-$	33	33	30
Gluc. $(1 \rightarrow 3)-$ + gluc. $(1 \rightarrow 3)-$ 6	66	59	60

La mayor diferencia se encuentra en la cantidad de uniones  $(1 \rightarrow 4)-$ , lo que se explica dado que al ser la que se encuentra en menor proporción, las determinaciones están afectadas de un error mayor.

## ESTUDIOS DE HIDROLISIS PARCIAL DEL POLISACARIDO

Para determinar la configuración de las uniones glicosídicas se realizó una hidrólisis parcial del polisacárido con ácido sulfúrico 1 N a 100°, durante 3,5 h. Del hidrolizado se aislaron y caracterizaron 6-O- $\alpha$ -D-glucopiranosil-D-glucopiranososa (isomaltosa), 3-O- $\beta$ -D-glucopiranosil-D-glucopiranososa (laminaribiosa), 4-O- $\beta$ -D-glucopiranosil-D-glucopiranososa (celobiosa) y un trisacárido que posiblemente sea O- $\alpha$ -D-glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 6)-O- $\beta$ -D-glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 3)-D-glucopiranososa (3-O- $\beta$ -isomaltosil-glucosa) (Esquema 9). Estos hechos demuestran que la unión (1 $\rightarrow$ 6)- posee la configuración  $\alpha$  y las uniones (1 $\rightarrow$ 3)- y (1 $\rightarrow$ 4)- son  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)- y  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-.

Los disacáridos se caracterizaron como azúcares libres y por preparación de sus  $\beta$ -octaacetatos.

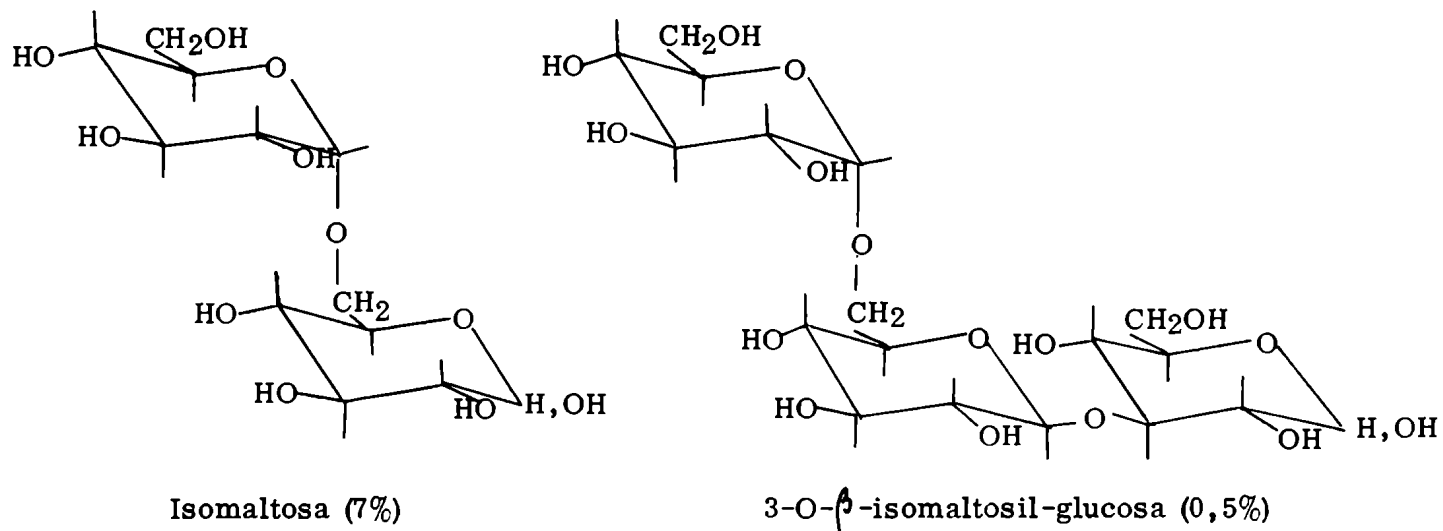
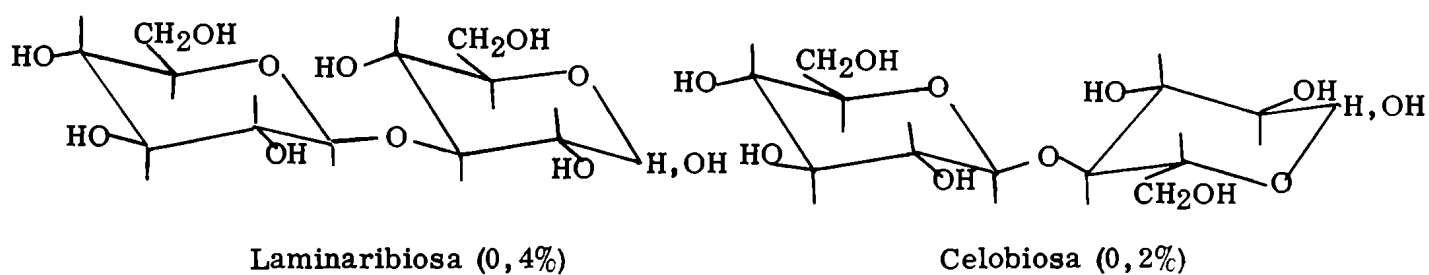
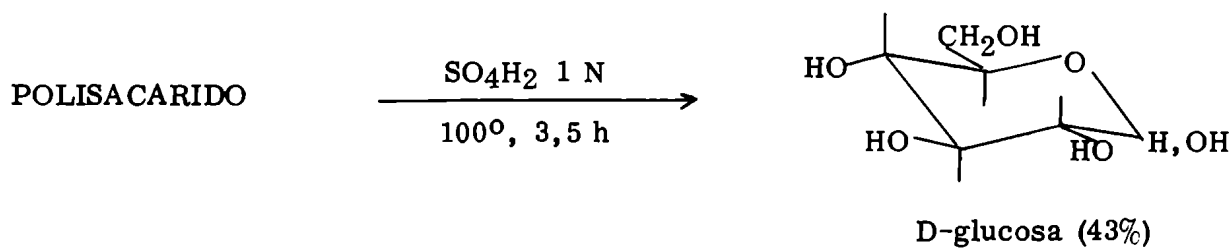
Los estudios de hidrólisis parcial y reducción seguida de hidrólisis parcial realizados sobre el trisacárido aislado indican que se trataría de 3-O- $\beta$ -isomaltosil-glucosa (Esquema 10).

El poder rotatorio de este trisacárido es  $[\alpha]_D^{20} +81^\circ$  (agua), valor intermedio entre los poderes rotatorios de laminaritriosa (O- $\beta$ -D-Glp-(1 $\rightarrow$ 3)-O- $\beta$ -D-Glp-(1 $\rightarrow$ 3)-D-Glp),  $[\alpha]_D^{20} +2,4^\circ$  (agua) e isomaltotriosa (O- $\alpha$ -D-Glp-(1 $\rightarrow$ 6)-O- $\alpha$ -D-Glp-(1 $\rightarrow$ 6)-D-Glp),  $[\alpha]_D^{20} +142^\circ$  (agua).

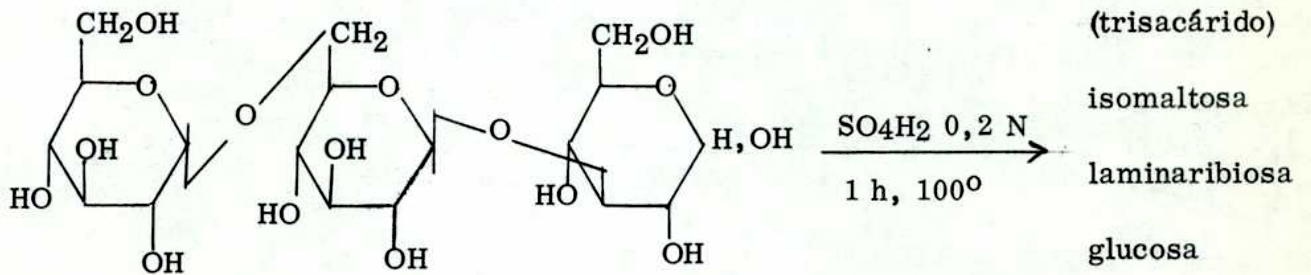
Peat y col. (1958) encontraron entre los productos de hidrólisis de laminarina un trisacárido al que asignan la estructura de 3-O- $\beta$ -isomaltosil-glucosa en base a sus estudios de hidrólisis parcial e hidrólisis enzimática, e informan un poder rotatorio  $[\alpha]_D^{20} +67^\circ$  (agua).

Puede observarse (Esquema 9) que por hidrólisis parcial se obtiene una proporción mucho mayor de isomaltosa que de laminaribiosa, aunque la unión (1 $\rightarrow$ 3)- es más

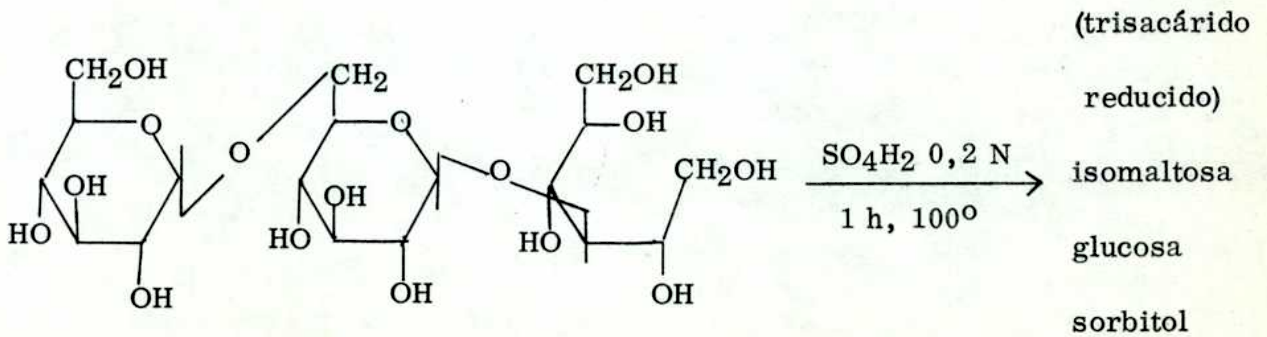
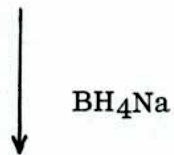


ESQUEMA 9DI- Y TRISACARIDOS DE GLUCOSA OBTENIDOSPOR HIDROLISIS PARCIAL

## ESQUEMA 10

3-O- $\beta$ -ISOMALTOSIL-GLUCOSA

$[\alpha]_D^{20} + 81^\circ$  (agua)



abundante en el polisacárido. Este hecho está de acuerdo con los estudios de Wolfrom y col. (1963) sobre las velocidades de hidrólisis de los distintos disacáridos de D-glucosa. En las condiciones de hidrólisis utilizadas por ellos (ácido clorhídrico 0,1 N, 99,5°), la constante de velocidad de hidrólisis correspondiente a la laminaribiosa es el doble de la correspondiente a la isomaltosa (Tabla 3). Por otra parte en la hidrólisis parcial del trisacárido 3-O- $\beta$ -isomaltosil-glucosa, se observa una mayor proporción de isomaltosa que de laminaribiosa, estando ambas en igual proporción en el producto original.

A pesar de que la unión  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)- se encuentra en muy baja proporción se aísla celobiosa, debido a que la velocidad de hidrólisis de este disacárido es menor que la de laminaribiosa (Tabla 3).

Un resumen de los estudios de hidrólisis del polisacárido puede verse en el Esquema 11.

### ACETOLISIS

En la hidrólisis ácida la unión (1 $\rightarrow$ 6)- es la más difícil de romper, a diferencia de lo que sucede en la acetólisis, en la que dicha unión es la más susceptible al ataque, complementándose así ambos métodos de estudio. Wolfrom y col. (1951, b) aislaron 1% de isomaltosa en la hidrólisis ácida de amilopectina, pero no aislaron este disacárido en sus estudios de acetólisis. Matsuda y col. (1961) estudiaron la acetólisis de isomaltosa (O- $\alpha$ -D-Glp-(1 $\rightarrow$ 6)-D-Glp) y nigerosa (O- $\alpha$ -D-Glp-(1 $\rightarrow$ 3)-D-Glp) y encontraron que la primera se convirtió totalmente en glucosa en 6 horas, mientras que la nigerosa permaneció inalterada. Hicieron experiencias para ver si se producía alguna reacción reversible en el medio de reacción con resultados negativos.

ESQUEMA 11ESTUDIOS DE HIDROLISISSO<sub>4</sub>H<sub>2</sub> 1 N

110°, 16 h

Glucosa: N-(p-nitrofenil)-D-glucosilamina, p.f. 184°

Fructosa (trazas)

Acido (trazas)

SO<sub>4</sub>H<sub>2</sub> 0,05 N

100°, 2 h

Polisacárido parcialmente degradado: 70%

Fructosa (trazas)

Glucosa (trazas)

Hidrolizado

Acido D-arabino-hexulosónico (sal de bario):

sal de brucina, p.f. 179-182°,  $[\alpha]_D^{20}$  -59,4° (agua)

5-hidroximetil-2-furaldehido

D-arabino-hexuloseonolactona,  $[\alpha]_D^{20}$  -19° (agua)

D-fructosa: D-arabino-hexosa fenilosazona, p.f. 206-208°

 $[\alpha]_D^{20}$  -41° (piridina-etanol (2:3))D-glucosa, p.f. 150°,  $[\alpha]_D^{20}$  +53,6° (agua)Laminaribiosa, p.f. 192-3°,  $[\alpha]_D^{20}$  +17,8° (agua);  $\beta$ -octa-O-acetil-laminaribiosa, p.f. 157-159°,  $[\alpha]_D^{20}$  -24,8° (Cl<sub>3</sub>CH)Celobiosa, p.f. 235°;  $\beta$ -octa-O-acetil-celobiosa, p.f. 208-210°Isomaltosa;  $\beta$ -octa-O-acetil-isomaltosa, p.f. 144°,  $[\alpha]_D^{20}$  +98,6° (Cl<sub>3</sub>CH)3-O- $\beta$ -isomaltosil-glucosa,  $[\alpha]_D^{20}$  +81° (agua)SO<sub>4</sub>H<sub>2</sub> 1 N

100°, 3,5 h



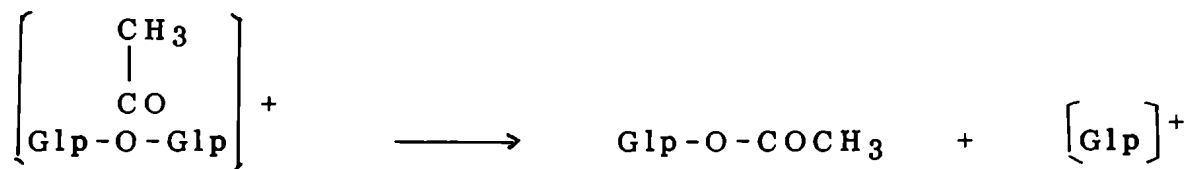
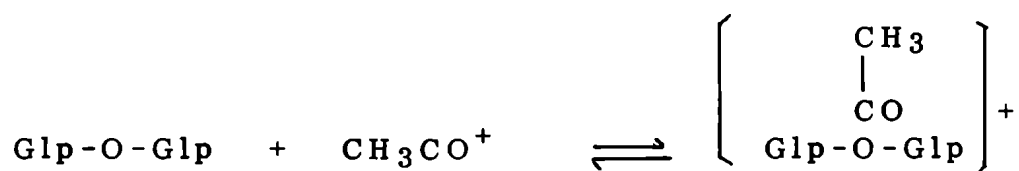
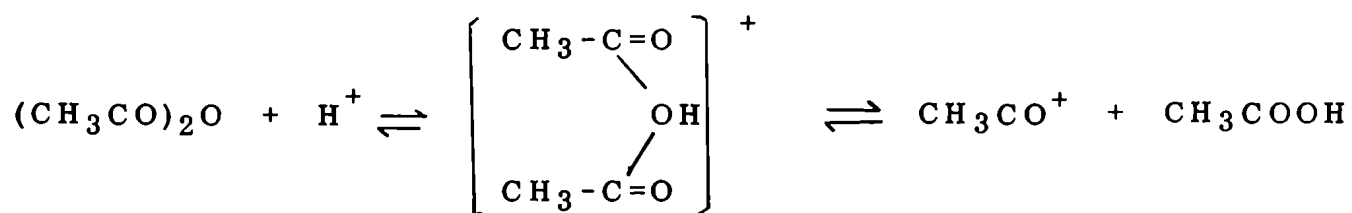
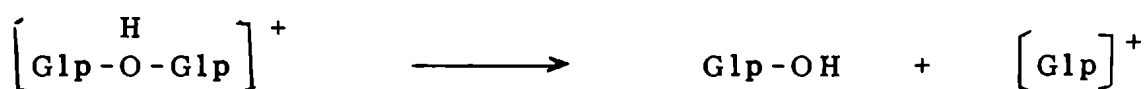
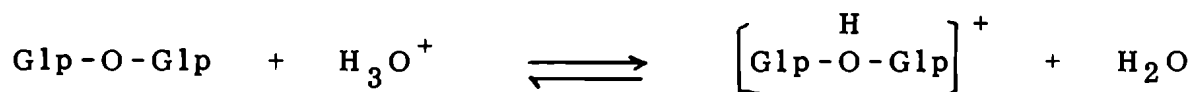
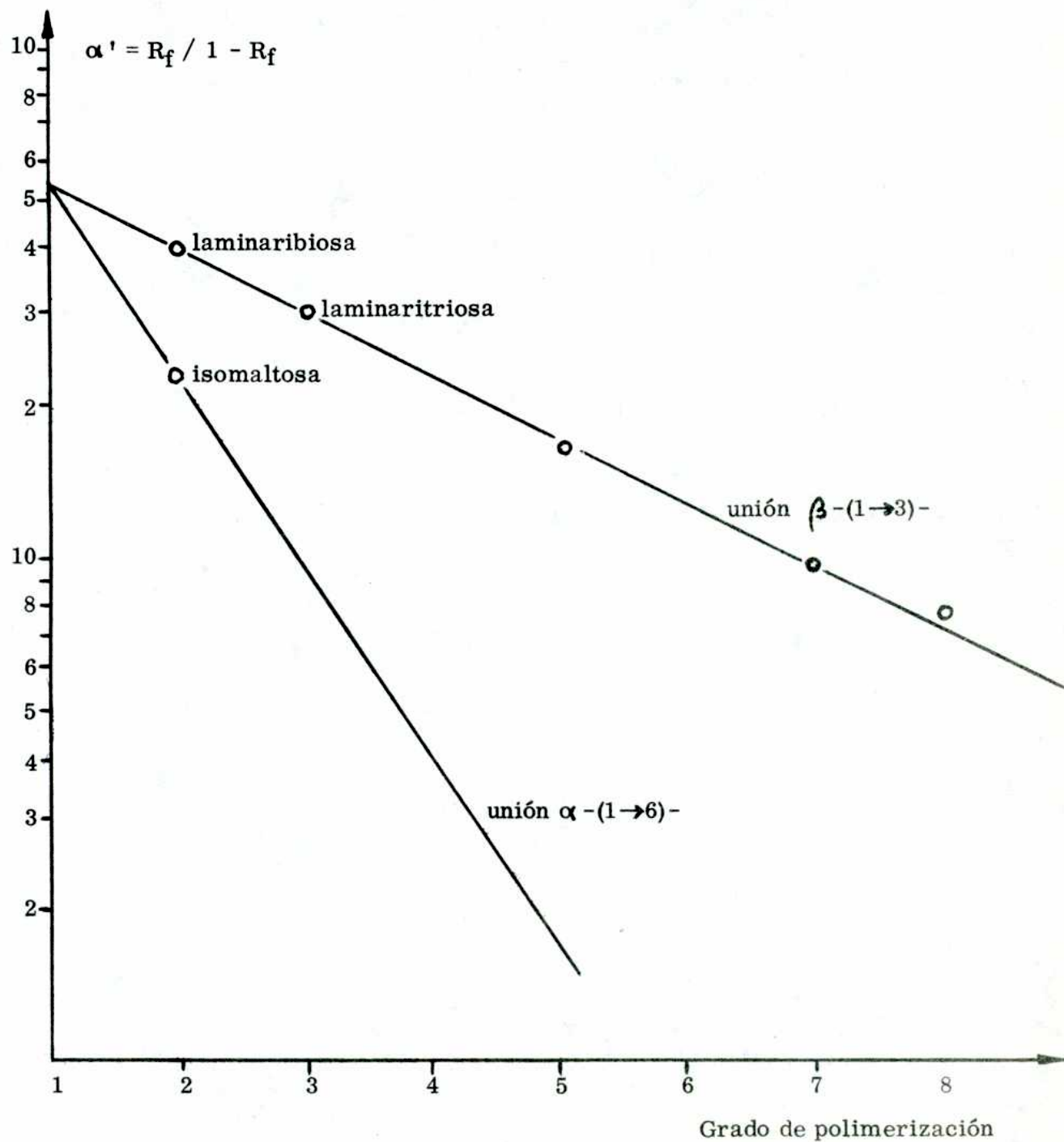
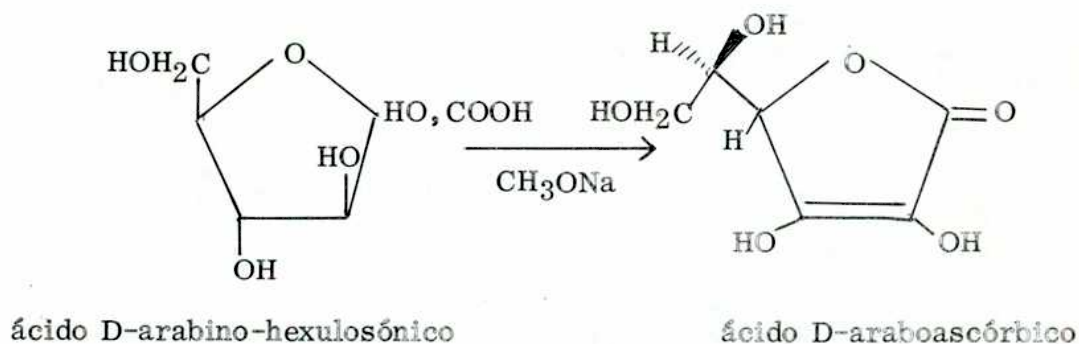
ESQUEMA 12

FIGURA 26  
RELACION ENTRE LA MOVILIDAD Y EL GRADO DE  
POLIMERIZACION



te y ocho unidades de glucosa, que corresponderían a laminaripentaosa, laminariheptaosa y laminarioctaosa. El tetra- y el hexasacárido no se observaron en la acetólisis del polisacárido original debido a que las manchas correspondientes quedaban enmascaradas por el ácido araboascórbico.

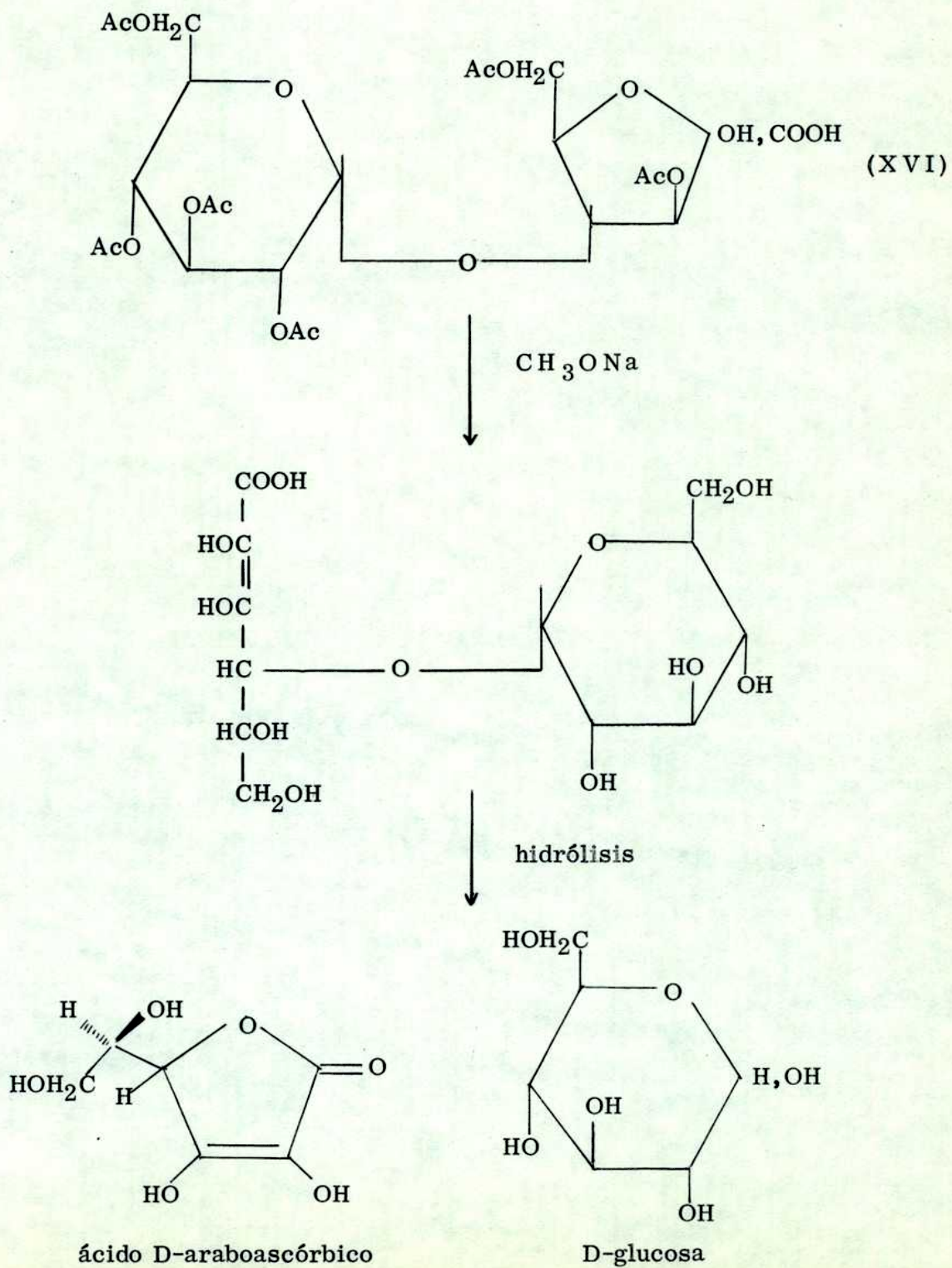
En los estudios de acetólisis del polisacárido se aisló también un disacárido del ácido araboascórbico. Esto se explica fácilmente ya que la enolización y lactonización simultáneas del ácido D-arabinohexulosónico para obtener ácido D-araboascórbico se realiza con metóxido de sodio (Maurier y Schiedt, 1933), o sea en condiciones similares a las usadas en la desacetilación.



El disacárido obtenido (XVII) daba las reacciones de reducción del ácido fosfomolibdico y del dióxido de manganeso, características de los ácidos ascórbicos (55). Por hidrólisis daba glucosa y ácido D-araboascórbico, detectados por cromatografía en papel. Este disacárido se formaría por enolización de un disacárido del ácido D-arabino-hexulosónico y glucosa, en el cual el azúcar reductor libre sería el ácido con lo cual podría isomerizarse al ácido ascórbico correspondiente. Para que ésta tenga lugar el C-3 del ácido tampoco debe estar comprometido en la unión. Podemos postular entonces una estructura en la que la unión de la glucosa es al C-4 del ácido, lo



## ESQUEMA 13



que está de acuerdo con los resultados obtenidos por oxidación con periodato y metilación (Esquema 13). El hecho de que se libere un disacárido de este tipo implica la ruptura de la unión glicosídica del ácido, lo cual es lógico dado que es furanósica. En la acetólisis, este disacárido se liberaría como acetato y al tratar con metóxido de sodio se produciría su deacetilación y enolización (Esquema 13). Es improbable que el ácido se halle lactonizado en el disacárido, ya que tendría que formar una  $\delta$ -lactona, que generalmente son más inestables que las  $\gamma$ -lactonas isómeras.

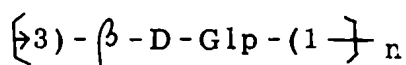
El poder rotatorio del disacárido,  $[\alpha]_D^{20} +92,3^\circ$ , indicaría que la unión al ácido D-arabino-hexulosónico tendría la configuración  $\alpha$ .

#### POLISACARIDO DEGRADADO

Los estudios realizados sobre el polisacárido degradado, obtenido en la hidrólisis con ácido sulfúrico 0,05 N, en la que se liberó el ácido D-arabino-hexulosónico, aportan datos estructurales interesantes.

Su menor poder rotatorio,  $[\alpha]_D^{20} +13,5^\circ$  (KOH 1 N), y menor solubilidad respecto del polisacárido original, indicaría una estructura menos ramificada y constituida fundamentalmente por  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)-D-glucopiranososa. El pachimano, glucano lineal de Poria cocos con uniones  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)- y algunas uniones  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6)- tiene  $[\alpha]_D^{20} +21,5^\circ$  (HONa 10%) (Hoffmann y col., 1971). Por otra parte, el curdlano,  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)-glucano lineal tiene  $[\alpha]_D^{20} +18^\circ$  (HONa 0,1 N) y es insoluble en agua (Harada y col., 1968).

La oxidación con periodato seguida de reducción con borohidruro de sodio e hidrólisis ácida dio como producto fundamental glucosa, lo que estaría de acuerdo con una cadena de  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)-D-glucopiranososa, resultado consistente con los obtenidos en los estudios de oxidación con periodato del polisacárido original.



Se observaron también por cromatografía trazas de glicerol, lo que indicaría la presencia de ramificaciones en O-6 o unidades con unión (1→6)-.

Los estudios de acetólisis realizados sobre el polisacárido degradado confirmaban la presencia de uniones  $\beta$ -(1→3)-, ya que se aislaron laminaribiosa y laminaritriosa y se detectaron cromatográficamente oligosacáridos mayores con igual tipo de unión. Según la Figura 27, pueden observarse tetra, penta y hexasacáridos de glucosa, correspondientes a laminaritetraosa, laminaripentaosa y laminarihexaosa.

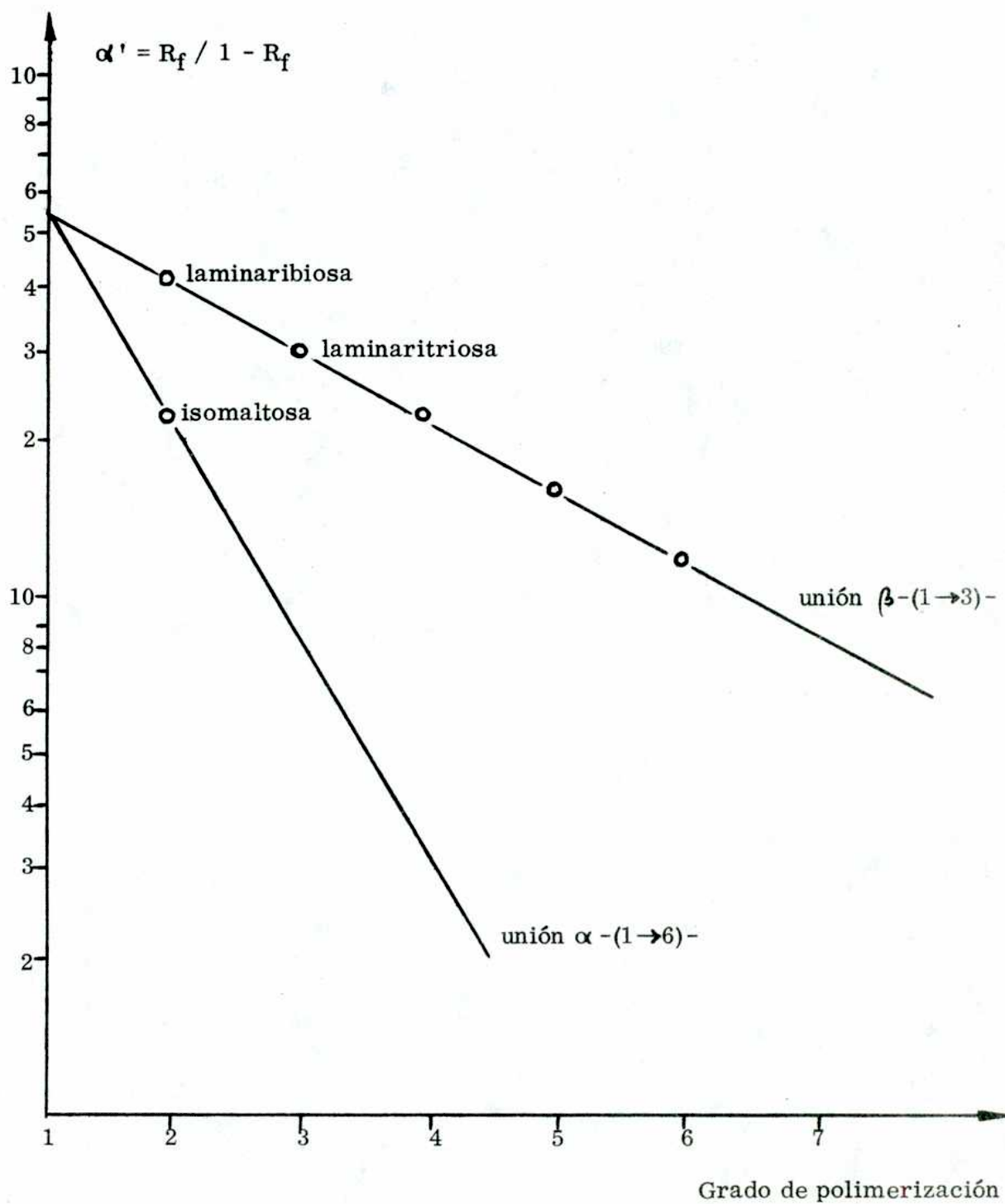
De la mezcla de acetólisis se aisló además fructosa, lo que implica que este azúcar prácticamente no se libera en la hidrólisis con ácido sulfúrico 0,05 N. Dado que la fructosa normalmente se encuentra furanósica y, por lo tanto, debería hidrolizarse en dichas condiciones, y, considerando la baja proporción presente (ca. 1%) se podría suponer que la fructosa fuera la unidad terminal reductora. Abbot y Weigel (1966) encontraron fructosa en pequeñas cantidades en hidrolizados de dextranos y consideran que la cetosa es la unidad terminal reductora de dichos polisacáridos.

El grado de polimerización del polisacárido degradado, determinado por el método de Unrau y Smith (1957), es de 124, considerando que la unidad terminal estuviera unida a través de su O-3, lo cual es válido aún si ésta fuera fructosa.

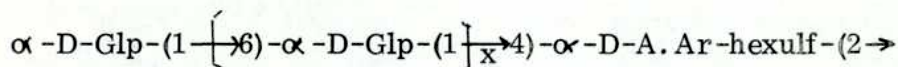
La disminución experimentada por el grado de polimerización (GP 230 para el polisacárido original) nos confirma que el ácido D-arabino-hexulosónico no es una unidad terminal, ya que en ese caso la variación hubiera sido muy pequeña.

Las unidades de glucosa y los oligosacáridos que se liberaron en la hidrólisis con ácido sulfúrico 0,05 N deberían estar unidas al ácido, debido a que una unión piranósica resiste la hidrólisis en estas condiciones. Por otra parte, dichas unidades deberían presentar entre sí uniones  $\alpha$ -(1→6)-, debido a la disminución en el poder rota-

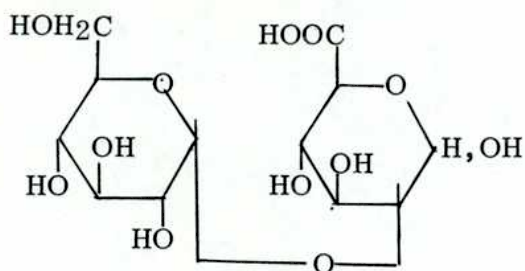
FIGURA 27  
RELACION ENTRE LA MOVILIDAD Y EL GRADO DE  
POLIMERIZACION



torio del polisacárido al liberarse estas cadenas y a los estudios de oxidación con periodato realizados sobre el polisacárido degradado. Podemos entonces postular una cadena del tipo:

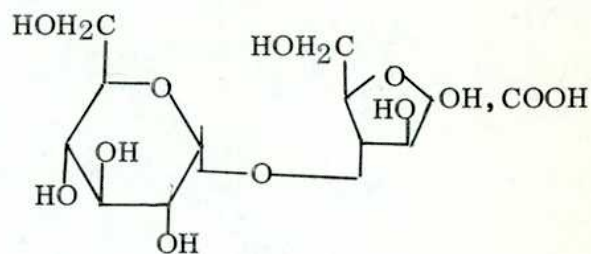


El hecho de que en la hidrólisis se libere el ácido implicaría además de la ruptura de la unión furanósica, la de la unión glicosídica de una glucosa al ácido. Esto sería explicable si su comportamiento fuera similar al de los ácidos urónicos isómeros. Los ácidos pseudoaldobiurónicos, en que el extremo reductor es el del ácido (XVIII) son más fácilmente hidrolizables en medio ácido que los ácidos aldobiurónicos (Barker y col., 1959).



ácido 2-O- $\alpha$ -D-glucopiranosil-D-glucurónico

(XVIII)



ácido 4-O- $\alpha$ -D-glucopiranosil-D-arabino-hexulosónico

(XIX)

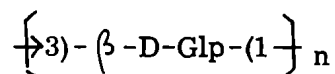
## CONCLUSION

Los datos experimentales indican para el polisacárido una estructura ramificada, ya que la relación de unidades terminales-lineales-ramificadas es de 1:4:1. Por otra parte, los estudios de metilación indican una proporción de uniones (1→3)- tres veces mayor que de (1→6)-, encontrándose también uniones (1→4)- en cantidad mucho menor. El aislamiento de laminaribiosa, isomaltosa y celobiosa por hidrólisis parcial muestran la presencia de uniones de configuración  $\alpha$  y  $\beta$  en la misma molécula. La posibilidad de que se tratase de una mezcla de polisacáridos queda descartada por los criterios de homogeneidad considerados, y el aislamiento de 3-O- $\beta$ -isomaltosil-D-glucosa de un hidrolizado parcial.

El ácido D-arabino-hexulosónico estaría en forma furanósica ya que fue liberado en condiciones hidrolíticas muy suaves; no sería una unidad terminal como queda evidenciado por los estudios de oxidación con periodato y por la disminución del grado de polimerización experimentado al liberarse dicho ácido. La unión glicosídica al ácido sería de configuración  $\alpha$ - y a su O-4, como se deduce de los resultados de metilación y acetólisis.

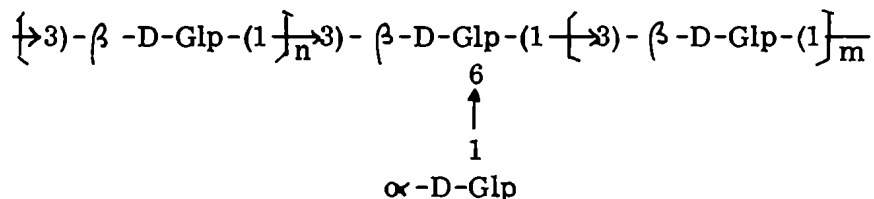
La fructosa podría ser la unidad terminal del polisacárido como muestran los estudios de acetólisis realizados sobre el polisacárido degradado.

Para poder postular una unidad repetitiva debemos tener en cuenta la presencia de una cadena central de unidades  $\beta$ -(1→3)-D-glucopiranososa, como indican los estudios de oxidación con periodato realizados sobre el polisacárido.

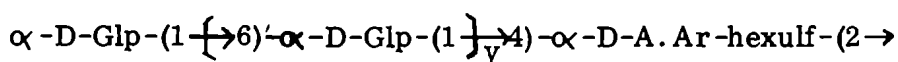


Los estudios de oxidación con periodato realizados sobre el polisacárido degra-

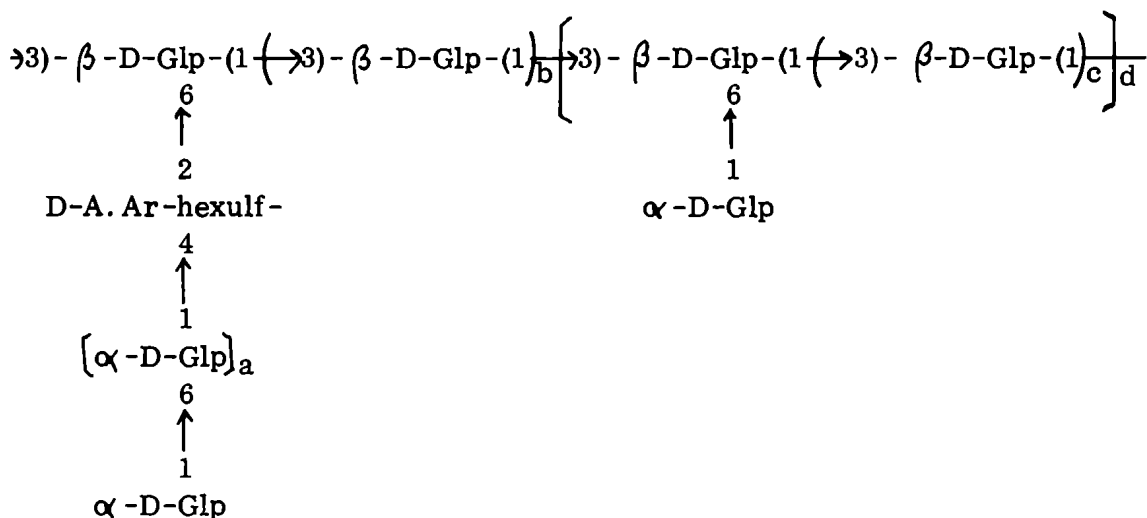
dado indicarían que dicha cadena presenta algunas unidades ramificadas en O-6. La baja proporción de glicerol detectada por hidrólisis del polialcohol y el valor del poder rotatorio del polisacárido indicarían que las ramificaciones consistirían en una sola unidad.



Los resultados obtenidos en la hidrólisis con ácido sulfúrico 0,05 N indican la presencia de cadenas:



Una estructura consistente con los datos experimentales sería:



El porcentaje de unidades de ácido presente limita la proporción de cadenas laterales que pueden iniciarse con el mismo. Considerando que el grado de polimerización es 230 y que el ácido está presente en un 6%, podemos postular una unidad repetitiva de 16 unidades. Si consideramos que  $b=c$  para dar mayor regularidad a la cade-

na, podemos respetar la proporción de unidades terminales:lineales:ramificadas (1:4:1) y la proporción de uniones (1→3)- a (1→6)- (3:1), para los siguientes pares de valores: a=2, b=3, d=1 ó bien a=3, b=3, d=2. En el primer caso tendríamos una unidad repetitiva de 13 unidades y en el segundo caso de 19 unidades.

En esta unidad repetitiva no se considera la presencia de unidades (1→4)- dada su baja proporción. El hecho de que se obtenga celobiosa en la acetólisis del polisacárido degradado indica que no hay uniones (1→4)- en las cadenas iniciadas por el ácido D-arabino-hexulosónico. Dado el bajo porcentaje presente podría considerarse que alguna cadena lateral que debería iniciarse con el ácido D-arabino-hexulosónico (que presenta unión al O-4), esté iniciada por alguna molécula de glucosa unida (1→4)-.

Resumiendo, la unidad repetitiva más simple que podemos postular es la representada en la fórmula XX, para a=2, b=3 y d=1.

Esta estructura responde a: 1) la relación de unidades terminales:lineales:ramificadas (1:4:1), 2) la proporción de uniones (1→3):(1→6) es de (3:1), 3) está de acuerdo con el porcentaje de ácido presente en el polisacárido, 4) no hay alternancia de uniones (1→3)- y (1→6)-, lo que está de acuerdo con el hecho de no haber detectado glucosilglicerol en la degradación de Smith del polisacárido, 5) es consistente con los estudios realizados sobre el polisacárido degradado obtenido en la hidrólisis con ácido sulfúrico 0,05 N, 6) es consistente con el aislamiento de 3-O-β-isomaltosil-D-glucosa.

El fragmento representa una de las varias estructuras alternativas que satisfacen todos los datos experimentales.



CAPITULO VII

PARTE EXPERIMENTAL

## CONSIDERACIONES GENERALES

Los puntos de fusión se determinaron en un aparato Kofler y no están corregidos.

Los poderes rotatorios fueron medidos en un polarímetro O.C. Rudolph & Sons modelo 70.

Las evaporaciones se realizaron a presión reducida y a temperaturas menores de 45°.

Las determinaciones colorimétricas se realizaron con un espectrofotómetro Beckmann DU. Los espectros de absorción en el infrarrojo fueron determinados en un espectrofotómetro Perkin-Elmer 137-B. Los espectros de resonancia magnética nuclear se determinaron con un espectrofotómetro Varian A-60, usando tetrametilsilano como referencia interna.

Los microanálisis fueron efectuados por la doctora Blanca Berinzaghi de Deferrari en el laboratorio de Microanálisis de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales.

## MÉTODOS CROMATOGRAFICOS

Las cromatografías sobre papel se realizaron por el método descendente empleando papel Whatmann N° 1 para las cromatografías analíticas y papel Whatmann 3 MM para las preparativas.  $R_g$  = movilidad respecto de D-glucosa.

Para las cromatografías en capa delgada se utilizó Sílica gel G (Merck), como fase fija.

En las cromatografías en columna se empleó celulosa Whatmann CF 11 y el eluendo se recogió en fracciones de 15 ml con un colector automático de fracciones.



Solventes:

- 1) n-butanol, piridina, agua; 6:4:3, en vol.
- 2) n-butanol, etanol, agua; 10:4:4, en vol.
- 3) acetato de etilo, ácido acético, ácido fórmico, agua; 18:3:1:4, en vol.
- 4) piridina, acetato de etilo, ácido acético, agua; 5:5:1:3, en vol.
- 5) acetato de etilo, piridina, agua; 2:1:2, en vol. (capa superior)
- 6) acetato de etilo, piridina, agua; 10:4:3, en vol.
- 7) n-butanol, ácido acético, agua; 4:1:5, en vol (capa superior)
- 8) n-butanol, etanol, agua; 5:1:4, en vol. (capa superior)
- 9) n-butanol, etanol, agua; 4:1:5, en vol. (capa superior)
- 10) butanona saturada con agua
- 11) butanona, agua; 95:5, v/v.
- 12) n-butanol saturado con agua
- 13) b-butanol, etanol, agua; 10:1:2, en vol.
- 14) acetato de etilo, ácido acético, agua; 9:4:4, en vol.
- 15) benceno, metanol; 96:4, v/v.
- 16) benceno, acetato de etilo; 7:3, v/v.
- 17) benceno, etanol, agua, amoníaco; 200:47:15:1, en vol.

Reactivos para revelado:a) Nitrato de plata-hidróxido de sodio:

Preparado según la técnica descrita por Trevelyan y col. (1950). Se agregaron 0,1 ml de una solución acuosa saturada de nitrato de plata a 20 ml de acetona.

El precipitado de nitrato de plata obtenido se redisolvió por agregado de la mñi-

ma cantidad de agua. Los cromatogramas se sumergieron en la solución anterior y se secaron a temperatura ambiente. Después de 3-4 minutos se pulverizaron con solución de hidróxido de sodio 0,5 N en etanol 50%.

Los azúcares reductores y polialcoholes aparecen como manchas marrón oscuras. Las manchas obtenidas se fijaron por inmersión en una solución acuosa de tiosulfato de sodio 5%. La cantidad mínima detectable de azúcares reductores es de 2-20  $\mu\text{g}$ .

b) Biftalato de anilina:

Se preparó según la técnica descrita por Wilson (1959). Se disolvieron 1,66 g de ácido ftálico y 0,91 g de anilina (destilada sobre Zn) en una mezcla formada por 48 ml de n-butanol, 48 ml de éter etílico y 4 ml de agua. El reactivo es estable por dos semanas, guardado en heladera.

Los cromatogramas se sumergieron en el reactivo, se secaron a temperatura ambiente y se revelaron calentando en estufa a  $105^{\circ}$  por 10-15 minutos. Los disacáridos y aldohexosas adquieren color marrón, mientras que las aldopentosas presentan color rosado.

c) Clorhidrato de p-anisidina:

Preparado según la técnica de Hough y col. (1950). Se pulverizaron los cromatogramas con una solución de clorhidrato de p-anisidina 3-4% (peso/volumen) en n-butanol-etanol-agua (4:1:1, en vol.), que contenía trazas de cloruro estannoso. Se secaron a temperatura ambiente y se revelaron calentando en estufa a  $100-120^{\circ}$  durante 10 minutos. Las aldopentosas dan color rosado; los ácidos urónicos, marrón rojizo; las aldohexosas, marrón y las hexulosas, amarillo. Se detectan 1-5  $\mu\text{g}$

del azúcar reductor.

d) Reactivo para cetosas.

Resorcinol-ácido clorhídrico:

Se preparó según la técnica descrita por Hough y col. (1950). Se pulverizaron los cromatogramas con la solución que resultó de mezclar volúmenes iguales de una solución 1% de resorcinol en n-butanol y ácido clorhídrico 0,25 N. La mezcla se preparó inmediatamente antes de su uso. Los cromatogramas se secaron a temperatura ambiente y se revelaron por calentamiento en estufa durante 10 minutos a 80°. Las hexulosas dan un color rojo característico. En estas condiciones las aldosas no se revelan.

e) Reactivo para ácidos.

Sulfanilamida- $\beta$ -naftol-nitrito de sodio:

Preparado según la técnica de Schmidt y col. (1963). Se pulverizaron los cromatogramas con una solución de 2 g de sulfanilamida y 0,5 g de  $\beta$ -naftol en 100 ml de etanol 95%. Se secaron a temperatura ambiente y se pulverizaron con una solución de nitrito de sodio 1% en agua. Los ácidos aparecen como manchas anaranjadas sobre fondo blanco.

f) Reactivo para lactonas.

Hidroxilamina-cloruro férrico:

Preparado según la técnica descrita por Abdel-Akher y Smith (1951, a). Se pulverizaron los cromatogramas con una solución recién preparada de volúmenes iguales de clorhidrato de hidroxilamina 1 N y KOH 1 N, ambas en metanol. Se secaron a temperatura ambiente y se pulverizaron con una solución de cloruro férrico 1-2%

en ácido clorhídrico 1%. Las lactonas dan color violeta.

g) Reactivo para ácidos hexulosónicos.

Clorhidrato de o-feniléndiamina:

Se preparó según la técnica descrita por Lanning y Cohen (1951). Se pulverizaron los cromatogramas con una solución de 2 g de clorhidrato de o-feniléndiamina en 100 ml de etanol 80%. Se secaron a temperatura ambiente y se revelaron por calentamiento en estufa por 10 minutos a 100°. Los cetoácidos dan manchas fluorescentes de color gris verdoso. Se detectan cantidades del orden de 10-20 µg.

OXIDACIONES CON PERIODATO DE SODIO

Técnica general

En un matraz aforado se colocó una solución de metaperiodato de sodio 0,1 M (cuatro veces el consumo esperado), una cantidad de la sustancia a oxidar tal que su concentración fuera de 0,1% y se llevó a volumen con agua destilada. La oxidación se llevó a cabo a 5° o a temperatura ambiente en ausencia de luz. Se midió el consumo de periodato, la formación de ácido fórmico y de formaldehído a distintos tiempos hasta que se observó constancia en el consumo de oxidante y/o sobreoxidación. Paralelamente se realizó un blanco libre de azúcar en las mismas condiciones.

Determinación del consumo de periodato

Se empleó un método volumétrico basado en la técnica de Fleury y Lange (1933).

Soluciones necesarias:

Solución de trióxido de arsénico 0,01 N

Solución de iodo 0,01 N

Solución de yoduro de potasio 20%

Solución saturada de bicarbonato de sodio

Preparación de las soluciones:

Solución de trióxido de arsénico 0,1 N (0,025 M): Se pesaron 2,474 g de trióxido de arsénico, se transfirieron a un vaso de precipitados de 400 ml y se disolvieron en una solución concentrada de hidróxido de sodio (2 g de hidróxido de sodio en 20 ml de agua). Se diluyó a 200 ml y se neutralizó con ácido clorhídrico 1 N hasta reacción débilmente ácida (pH 5-6). Se agregaron 2 g de bicarbonato de sodio y la solución se transfirió cuantitativamente a un matraz aforado de 500 ml y se llevó a volumen.

A partir de esta solución se preparó solución de trióxido de arsénico 0,01·N, por dilución.

Solución de iodo 0,1 N: A una solución de 10 g de yoduro de potasio en 10 ml de agua se agregaron 3,125 g de iodo bisublimado. Se agitó hasta lograr disolución y se llevó a volumen en un matraz aforado de 250 ml.

A partir de esta solución se preparó la solución de iodo 0,01 N, por dilución.

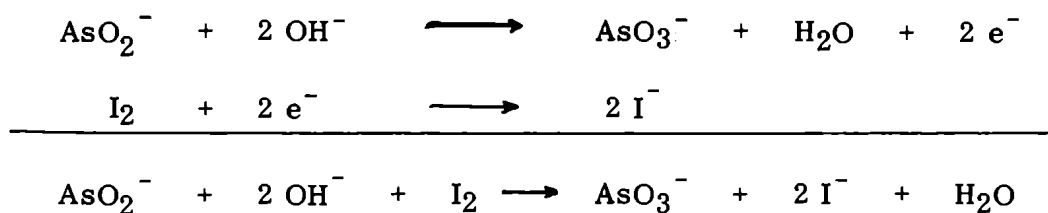
Valoración de las soluciones:

Solución de trióxido de arsénico 0,1 N: Se considera patrón

Solución de iodo 0,1 N: Se colocó en un erlenmeyer 1 ml de solución de trióxido de ar-



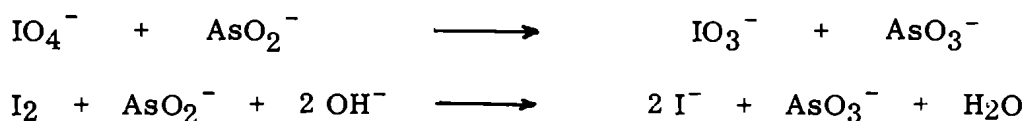
sénico 0,1 N y 0,5 ml de solución saturada de bicarbonato de sodio. Se tituló con solución de iodo, usando almidón como indicador.



$$f_{\text{I}_2} = \frac{V_a}{V_b} = \frac{\text{volumen de la solución de trióxido de arsénico (1 ml)}}{\text{volumen de la solución de iodo utilizada en la titulación}}$$

#### Procedimiento:

Se extrajeron alícuotas de la mezcla en oxidación que se agregaron a una solución de 5 ml de trióxido de arsénico 0,01 N, 1 ml de solución saturada de bicarbonato de sodio y 0,2 ml de ioduro de potasio 20%. Se dejó una hora en la oscuridad y se tituló el exceso de arsenito de sodio con solución de iodo 0,01 N, empleando como indicador 0,2 ml de solución de almidón 0,2%. Se procedió de igual manera con el blanco.



Si el blanco consume a ml de solución de iodo 0,01 N,  $f = f_{\text{I}_2}$ , y la muestra consume b ml de solución de iodo de igual normalidad, entonces, considerando la solución de trióxido de arsénico 0,01 N, como solución patrón, y utilizando 5 ml de la misma en la destrucción del periodato, tendremos:

$$5 \times 0,01 - a \times 0,01 \times f_{\text{I}_2} = c = \text{meq. de IO}_4^- \text{ presentes en el blanco}$$

$$5 \times 0,01 - b \times 0,01 \times f_{\text{I}_2} = d = \text{meq. de IO}_4^- \text{ presentes en la muestra}$$

$c - d = e = \text{meq. de IO}_4^- \text{ consumidos}$

$e / 2 = \text{milimoles de IO}_4^- \text{ consumidos}$

Si V es el volumen de la mezcla de oxidación y A es la alícuota tomada, el número de moles de periodato consumidos en total estará dado por:

$$\frac{e}{2} \times \frac{V}{A} \times 10^{-6}$$

### Determinación de ácido fórmico

#### Soluciones necesarias:

Solución de hidróxido de sodio 0,01 N

etilén glicol

fenolftaleína 0,1% en etanol

#### Procedimiento:

Se recogieron las alícuotas sobre 0,4 ml de etilén glicol libre de acidez y se mantuvieron una hora en la oscuridad, para que se consumiera el exceso de periodato. Se tituló con solución de hidróxido de sodio 0,01 N, utilizando fenolftaleína como indicador. Se procedió de igual manera con el blanco.



Si la muestra consume m ml de hidróxido de sodio 0,01 N y el blanco consume b ml de hidróxido de sodio de igual normalidad:

$m - b = a = \text{meq. (mmoles) de ácido fórmico presentes en la alícuota A}$

$$a \times \frac{V}{A} \times 10^{-6} = \text{moles de ácido fórmico producido}$$

#### Determinación de formaldehído:

Se aplicó el método espectrofotométrico descrito por Eegrive (1937) y adaptado por Lambert y Neish (1950).

#### Reactivo de ácido cromotrópico:

Se preparó según la técnica descrita por MacFadyen (1945). Un gramo de ácido cromotrópico se disolvió en 100 ml de agua y se llevó a 500 ml en un matraz aforado por agregado de ácido sulfúrico 12,5 M. La solución se conserva inalterada durante 2 ó 3 semanas en la oscuridad.

#### Curva de calibración:

Se oxidaron 0,1 milimoles de manitol con 6 ml de periodato de sodio 0,1 M. A la mezcla de oxidación se le agregaron 2 ml de bicarbonato de sodio 1 M y se dejó a 25<sup>o</sup> durante 1 hora para completar la oxidación. Se acidificó con 15 ml de ácido sulfúrico 1 N y se agregaron 5 ml de metaarsenito de sodio 1 M agitando suavemente hasta la desaparición del yodo. La solución resultante se diluyó de modo tal que la concentración de formaldehído en los tubos no excediera de 0,62  $\mu$ moles por ml.

#### Tubos testigos:

Se tomó 1 ml de la solución anterior y de soluciones diluidas al 1/2, 1/4, 1/5 y 1/10 y se le agregaron a cada una de ellas 10 ml del reactivo de ácido cromotrópico.

### Blanco:

Se tomó 1 ml de agua y se le agregaron 10 ml de reactivo de ácido cromotrópico.

El blanco y los tubos testigos se calentaron en un baño de agua hirviente durante 30 minutos, al cabo de los cuales las soluciones tomaron coloración púrpura. Se dejaron enfriar a temperatura ambiente y se midió la absorbancia en un espectrofotómetro Beckmann DU en la longitud de onda de 570 m $\mu$ . Con los datos obtenidos se construyó una curva patrón, que se utilizó para calcular en las muestras la concentración de formaldehído en  $\mu$ mol/ml en base al resultado de la medida espectrofotométrica.

## DEMETILACION CON TRICLORURO DE BORO

### Técnica general

Se siguió la técnica descrita por Bonner y col. (1960). El azúcar metilado (1-10 mg) se disolvió (o suspendió) en diclorometano (1-2 ml), se enfrió en un baño de hielo seco-acetona y se agregó tricloruro de boro (1-2 g) previamente enfriado. La mezcla se mantuvo a esta temperatura durante 30 minutos y se dejó luego que alcanzara lentamente la temperatura ambiente. Se eliminó el solvente y el tricloruro de boro por destilación al vacío a 25<sup>o</sup> y el residuo se trató con metanol (3 x 3 ml), llevándose a seco cada vez. El residuo se disolvió en una pequeña cantidad de agua y se cromatógrafió en papel.

## SINTESIS DEL ACIDO D-ARABINO-HEXULOSONICO

Se preparó la D-arabino-hexosafenilosazona según la técnica descrita por Whistler y Wolfrom (1963, a). A una solución de 20 g de D-glucosa en 1 l de agua, se agregaron 43 ml de fenilhidracina y 29 ml de ácido acético glacial. Se calentó en baño

de agua hirviente durante 2 horas. La fenilosazona precipitó en caliente; se enfrió y filtró, obteniéndose 19,4 g de producto de p.f. 205-208<sup>o</sup> (lit. 178, p.f. 208-209<sup>o</sup>).

Se preparó la D-glucosona según la técnica descrita por Whistler y Wolfrom (1963, b). A una suspensión de 15 g de D-arabino-hexosafenilosazona en 450 ml de etanol 96% se agregaron 750 ml de agua, 9 ml de ácido acético glacial y 24 ml de benzaldehído. La mezcla se calentó a reflujo con agitación. Después de 2,5 h de calentamiento se logró disolución total y luego comenzó a precipitar la fenilhidrazona del benzaldehído. Después de calentar durante otras 2 h, la mezcla se enfrió, filtró y el filtrado se concentró hasta 300 ml con lo que precipitó más fenilhidrazona del benzaldehído, que fue separada por filtración. La solución se extrajo con éter (3 x 70 ml) y la capa acuosa se decoloró con carbón, filtró por lecho de celite y se llevó a seco a presión reducida. Se obtuvieron 3,4 g de producto de R<sub>f</sub> 0,17, solvente 7.

La osona se disolvió en 200 ml de agua y se oxidó por el método descrito por Neuberg y Kitasato (1927). A la solución de osona se agregaron 2 ml de bromo con agitación y se dejó en ausencia de luz a temperatura ambiente durante 4 días. Se eliminó el exceso de bromo mediante una corriente de aire. Se trató la solución con carbonato de plata y después de filtrar se agitó con Dowex 50 (H<sup>+</sup>). Se agregó carbonato de calcio y se agitó durante 10 horas. Se filtró y la solución resultante se concentró hasta un volumen de 20 ml, volcándose luego sobre 100 ml de etanol absoluto, con lo que precipitó la sal de calcio del ácido D-arabino-hexulosónico. Rendimiento: 2 g. El producto obtenido era cromatográficamente homogéneo; R<sub>g</sub> 0,23 (solvente 1), R<sub>g</sub> 0,41 (solvente 2), R<sub>g</sub> 0,96 (solvente 3); marrón (reactivo a), rosa intenso (reactivos b y c), anaranjado (reactivo e), fluorescente (reactivo g).

Se caracterizó como su sal de brucina, que se preparó según la técnica descrip-

ta por Neuberg y Kitasato (1927). Una solución de 0,100 g de D-arabino-hexuloso de calcio en 10 ml de agua se agitó con Dowex 50 ( $H^+$ ). Se filtró y el líquido se hizo reaccionar con 0,250 g de brucina, calentando durante 15 min. Se enfrió y el exceso de alcaloide se extrajo con cloroformo. La capa acuosa se llevó a seco y se cristalizó de etanol, p.f. 180-183°,  $[\alpha]_D^{20}$  -51,0° (c 0,5, agua). Ohle (1925) informó para este compuesto p.f. 166°,  $[\alpha]_D^{20}$  -59,6° (agua). Neuberg y Kitasato (1927) obtuvieron p.f. 171°,  $[\alpha]_D^{20}$  -50,8° (agua).

### CARACTERISTICAS DEL MATERIAL

Se utilizaron estromas maduros de Cyttaria harioti Fischer que parasitaban Nothofagus Antarctica, y fueron recogidos en San Martín de los Andes, Neuquén.

### AISLAMIENTO Y PURIFICACION

Estromas molidos (400 g) secados en estufa de vacío hasta constancia de peso se extrajeron con éter de petróleo liviano (p. eb. 60-80°) por un total de 30 h y luego con metanol durante 50 h en un aparato Soxhlet modificado. El extracto metanólico contenía los azúcares simples y polioles, ya estudiados. El residuo, (276 g, 75% sobre estromas secos), se extrajo con agua a temperatura ambiente en cinco partidas, utilizando un total de 15 litros de agua. La extracción se realizó en un Waring blender\_ que se hizo funcionar intermitentemente tres veces durante 1 minuto, con intervalos de 5 minutos. Se separó el extracto acuoso por centrifugación, filtrándose el sobrenadante al vacío a través de un lienzo cubierto con una capa de celite. El filtrado se concentró hasta la mitad de su volumen a temperatura menor de 40° y se agregó un volumen igual de etanol 95% que precipitó un polisacárido gelatinoso, que

se separó por centrifugación y se lavó sucesivamente con etanol 60%, 80%, 96% y finalmente etanol absoluto. Por secado se obtuvieron 34,4 g de producto crudo (8,6% sobre estromas secos).

El polisacárido (2 g) se purificó por disolución en 2 l de agua en un "Waring blender" a temperatura ambiente. Se filtró al vacío a través de un lienzo cubierto con celite y el filtrado se concentró a presión reducida hasta un volumen de 500 ml. Se reprecipitó el polisacárido por agregado de un volumen igual de etanol 95%, se separó por centrifugación, lavándose con etanol 50%, etanol 95% y etanol absoluto. Por secado se obtuvieron 1,14 g de polisacárido (57% sobre producto crudo).

Se purificó dos veces más siguiendo el mismo procedimiento, con lo que se obtuvo constancia de poder rotatorio.

Producto obtenido en la primera purificación:  $[\alpha]_D^{20} +87,8^\circ$  (c 0,8, KOH 1 N)

Producto obtenido en la segunda purificación:  $[\alpha]_D^{20} +93,2^\circ$  (c 0,8, KOH 1 N)

Producto obtenido en la tercera purificación:  $[\alpha]_D^{20} +95,8^\circ$  (c 0,8, KOH 1 N)

### PROPIEDADES DEL POLISACARIDO

El polisacárido se secó a  $65^\circ/1$  mm durante 10 h sobre pentóxido de fósforo y se determinó su poder rotatorio;  $[\alpha]_D^{20} +95,8^\circ$  (c 0,8, KOH 1 N).

Se determinó el contenido en nitrógeno que resultó menor del 0,3% y se encontró 1,2% de cenizas. El polisacárido dio negativo el análisis de metoxilo y acetilo.

El espectro infrarrojo en bromuro de potasio mostró absorción a  $\nu_{\text{máx}}$  3400, 2900, 1620 y una banda ancha a 1020-1100  $\text{cm}^{-1}$  (Figura 24).

El polisacárido no dio coloración por agregado de una solución de iodo.

## DETERMINACIONES FISICAS

### Ultracentrifugación:

Se usó una solución 0,5% de polisacárido en cloruro de sodio 0,1 M. Las placas de sedimentación se obtuvieron con una ultracentrífuga Spinco Modelo E, a 22° y a una velocidad de corrida de 42.040 r.p.m.. El polisacárido dio un pico único (Figura 23). Su coeficiente de sedimentación ( $S_{20}$ ) fue de  $7,2 \times 10^{-13}$ .

### Determinación de homogeneidad por precipitación fraccionada con etanol:

Se realizó siguiendo la técnica descrita por Whistler y BeMiller (1956). El polisacárido purificado (0,516 g) se disolvió con agitación en 300 ml de agua (concentración ca. 0,2%). Se agregó etanol gota a gota, con agitación, hasta turbidez incipiente. La suspensión se centrifugó y el material precipitado se lavó varias veces con etanol, se secó en desecador y se pesó. Al sobrenadante se agregó etanol gota a gota con agitación hasta precipitación. Se aisló la fracción insoluble de la manera descrita y se repitió el procedimiento hasta una concentración de etanol del 50%. Los resultados obtenidos fueron los siguientes: (Figura 22)

Concentración de etanol (% v/v)	% de polisacárido precipitado
0 - 32 %	---
32 - 38 %	90 %
38 - 42 %	8 %
42 - 46 %	2 %
46 - 50 %	---



## HIDROLISIS DEL POLISACARIDO

### HIDROLISIS ACIDA TOTAL DEL POLISACARIDO

#### Identificación de D-glucosa

El polisacárido (0,200 g) se hidrolizó por calentamiento con ácido sulfúrico 1 N (20 ml) en un tubo cerrado durante 16 h a 110°. El hidrolizado se enfrió, se neutralizó con carbonato de bario y se filtró. El filtrado se descationizó por agitación con Dowex 50 (H<sup>+</sup>) y se concentró al vacío, con lo que se obtuvo un jarabe (0,203 g). Por cromatografía en papel en varios solventes de desarrollo se observó glucosa y trazas de una cetosa y de un ácido. La glucosa se identificó por preparación de la N-(p-nitrofenil)-D-glucopiranosilamina, según la técnica descrita por Weigand y col. (1951). El hidrolizado llevado a seco se tomó con 4 ml de metanol, se agregaron 200 mg de p-nitroanilina y se calentó a reflujo en baño de agua. A los 15 min. se obtuvo disolución total, se prosiguió el calentamiento hasta cristalización del producto en forma de agujas amarillo claras. Se enfrió y filtró, lavando con éter. Se recristalizó de metanol y se obtuvo N-(p-nitrofenil)-D-glucopiranosilamina de p. f. y p. f. mezcla 184-185° (lit. 174, p. f. 184°).

### HIDROLISIS ACIDA PARCIAL (ácido sulfúrico 0,05 N)

El polisacárido (7,0 g) se calentó con 700 ml de ácido sulfúrico 0,05 N en un baño de agua durante 2 horas. El polisacárido degradado insoluble (4,9 g) se separó por centrifugación y se determinó su poder rotatorio,  $[\alpha]_D^{20} +13,5^\circ$  (c 1,0, KOH 1 N). Se realizaron sobre el mismo estudios estructurales que se detallan más adelante.

El hidrolizado se neutralizó con carbonato de bario, se filtró y evaporó a presión reducida. Por cromatografía en papel en varios solventes de desarrollo se observó el componente ácido, trazas de glucosa y oligosacáridos.

El hidrolizado (1,48 g) se cromatografió en columna de celulosa (40 x 3 cm) usando como solvente de desarrollo butanol-etanol-agua (10:4:4). Se recogieron las siguientes fracciones:

Fracciones 1-40: Esta fracción (ca. 25 mg) contenía glucosa y una cetosa cromatográficamente idéntica a fructosa,  $R_g$  1,09 (solvente 1),  $R_g$  1,18 (solvente 2),  $R_g$  1,34 (solvente 3) y  $R_g$  1,14 (solvente 6), que dio color rojo por revelado con reactivo d, específico para cetosas.

Fracciones 41-68: Por cromatografía en papel se observó sólo glucosa (60 mg).

Fracciones 69-95:

#### Identificación del ácido D-arabino-hexulosónico

Esta fracción (360 mg) mostró por cromatografía en papel (solvente 1) dos productos principales de  $R_g$  0,23 y  $R_g$  0,42, respectivamente. Ambos se revelaban con reactivo e, específico para ácidos y daban fluorescentes con reactivo g, específico para  $\alpha$ -cetoácidos. El componente principal de esta fracción mostraba las mismas características cromatográficas que una muestra auténtica de ácido D-arabino-hexulosónico. Los valores de  $R_g$  y la reacción con distintos reveladores pueden observarse en la Tabla 6, en la que se los compara con ácido glucurónico y ácido galacturónico.

El ácido se purificó por cromatografía en papel Whatmann 3 MM, solvente 1.

Se probó sobre el ácido la reacción descrita por Dische (1947), característica

TABLA 6

CARACTERISTICAS CROMATOGRAFICAS DEL ACIDO D-ARABINO-HEXULOSONICO

Sustancia	R <sub>g</sub>						Color observado				
	1	2	3	4	6		a	b	c	e	g
	Solventes						Reactivos				
ácido D-arabino-hexulosónico	0,23	0,41	0,96	0,60	0,51		marrón	rosa	rosa	anaranjado	fluorescente
ácido D-glucurónico	0,19	0,20	0,83	0,45	--		marrón	marrón rojizo	marrón rojizo	anaranjado	---
ácido D-galacturónico	0,19	0,23	0,82	0,50	0,39		marrón	marrón rojizo	marrón rojizo	anaranjado	---

de los ácidos urónicos. A 1 ml de solución de ácido (que contenía 100  $\mu$ g de producto) se le agregaron 6 ml de ácido sulfúrico concentrado enfriando en baño de agua. La mezcla de reacción se calentó durante 20 min. en un baño de agua hirviente. Después de enfriar en baño de agua se agregaron 0,2 ml de una solución etanólica de carbazol 0,1%. Se dejó 2 h a temperatura ambiente. La reacción se hizo con ácido galacturónico, ácido D-arabino-hexulosónico (sal de calcio) y el ácido (sal de bario) aislado del hidrolizado. Se realizó paralelamente un blanco libre de azúcar. La muestra de ácido urónico dio el color violeta característico, mientras que tanto la muestra auténtica de ácido D-arabino-hexulosónico como el ácido aislado del polisacárido no dieron coloración. Se agregó agua y apareció en estos casos coloración púrpura, que es indicativa de la presencia de pentosas o hexosas.

La sal de bario aislada (10 mg) se redujo por agregado de 25 mg de borohidruro de sodio y se dejó durante 4 h a temperatura ambiente. El exceso de borohidruro de sodio se destruyó por agregado de ácido acético gota a gota. La solución se descarbonizó por agitación con resina Dowex 50 ( $H^+$ ). Se filtró y evaporó a presión reducida, tomando varias veces con metanol para eliminar el ácido bórico. Se calentó durante 1 h a 70° para facilitar la lactonización. Por cromatografía en papel usando los solventes 1 y 4 y los reactivos a y f, este último específico para lactonas, se observaron dos manchas cromatográficamente idénticas a D-glucono-1,4-lactona y D-manono-1,4-lactona.

El ácido se caracterizó por preparación de su sal de brucina, que se realizó siguiendo la misma técnica descrita para el ácido de síntesis. Se obtuvo un producto de p.f. y p.f. mezcla 179-182°,  $[\alpha]_D^{20}$  -59,4° (c 0,4, agua). A partir de la sal de brucina se regeneró la sal de bario. Una solución acuosa de la sal de brucina se trató con

solución de hidróxido de bario y el exceso de base se eliminó por neutralización con hielo seco. Se obtuvo un producto de características cromatográficas similares al ácido D-arabino-hexulosónico.

Fracciones 96-180: Esta fracción (880 mg) se eluyó con ácido acético 20% y contenía una mezcla de oligosacáridos reductores.

#### HIDROLISIS ACIDA PARCIAL (ácido sulfúrico 1 N)

El polisacárido (4,60 g) se hidrolizó por calentamiento con 500 ml de ácido sulfúrico 1 N en baño de agua durante 3,5 h y luego se dejó durante la noche a temperatura ambiente. El producto insoluble (1,66 g) se separó por centrifugación, lavado con agua hasta neutralidad y finalmente con etanol. El hidrolizado se neutralizó con hidróxido de bario-carbonato de bario, se filtró por lecho de celite y el filtrado se descationizó por agitación con resina Dowex 50 ( $H^+$ ). Se llevó a seco por evaporación a presión reducida y el jarabe obtenido (2,70 g) se cromatografió en columna de celulosa (50 x 2,5 cm) usando solvente 13. Se obtuvieron las siguientes fracciones:

Fracción 1-20: Por cromatografía en papel de esta fracción (25 mg) se observó un compuesto de las mismas características que 5-(hidroximetil)-2-furaldehído:  $R_g$  3,77 (solvente 2),  $R_g$  2,84 (solvente 1),  $R_g$  6,55 (solvente 3),  $R_g$  2,24 (solvente 4), que se reveló marrón (reactivo a), amarillo (reactivo c), rojo (reactivo d). Su espectro infrarrojo realizado en nujol, idéntico al de una muestra auténtica, presentó bandas a  $\nu$  máx 3300 (ancha); 1720 (m); 1660 (f); 1520 (m); 1380 (d); 1340 (d); 1200 (m); 1075 (d) y 1025  $cm^{-1}$  (m). El espectro de resonancia magnética nuclear, realizado en metanol-d presentó señales a:  $\delta$  4,58 (s, 1 H, OH);  $\delta$  4,68 (s, 2 H,  $-CH_2-$ );  $\delta$  6,55 (d,  $J=4$  Hz,

1 H, H-4);  $\delta$  7,35 (d, J=4 Hz, 1 H, H-3) y  $\delta$  9,51 p.p.m. (s, 1 H, -CH=O).

Fracciones 21-38: Por cromatografía en papel de esta fracción (30 mg), se observó un componente principal de  $R_g$  1,70 (solvente 1),  $R_g$  2,0 (solvente 2),  $R_g$  2,83 (solvente 3),  $R_g$  1,61 (solvente 4),  $R_g$  2,46 (solvente 7), que se reveló marrón con reactivo a y violeta con reactivo f, específico para lactonas.

Este producto se purificó por cromatografía en papel Whatmann 3 MM (solvente 1) y se obtuvo un jarabe cromatográficamente homogéneo,  $[\alpha]_D^{20} -19^\circ$  (c 0,8, agua).

Fracciones 39-45: Por cromatografía en papel de esta fracción (30 mg), en varios sistemas de desarrollo, se observaron manchas correspondientes a arabinosa, fructosa y glucosa.

Fracciones 45-50:

#### Identificación de D-fructosa

Esta fracción (60 mg) contenía fructosa ( $R_g$  1,18 (solvente 2),  $R_g$  1,34 (solvente 3)) y glucosa.

La cetosa fue aislada de la mezcla por oxidación de la glucosa a ácido glucónico, siguiendo el método utilizado por Hirst y col. (1949, b) para separar tagatosa de aldosa. El jarabe, en 10 ml de agua, se trató con 0,5 ml de bromo. Se agitó durante media hora para homogeneizar la mezcla y se dejó en la oscuridad durante 4 días a temperatura ambiente. El exceso de bromo se eliminó por pasaje de una corriente de aire. Se agitó la solución con carbonato de plata hasta reacción negativa de bromuro, se filtró y se descationizó por agitación con resina Dowex 50 ( $H^+$ ). Por cromatografía en papel se observó fructosa y ácido glucónico. La mezcla se agitó con resina De Acidite E ( $OH^-$ )

durante 24 h y se cargó en una columna (2,5 x 15 cm). Se eluyó con 1 l de agua y el eluido se llevó a seco. Por cromatografía en papel se observó fructosa y trazas de ácido glucónico. La fructosa se purificó por cromatografía en papel Whatmann 3 MM (solvente 2). Para su caracterización se preparó la fenilosazona según la técnica descrita por Whistler y Wolfrom (1963, a). La cetosa (20 mg) se disolvió en 1 ml de agua y se agregó 0,08 ml de ácido acético, 0,08 ml de fenilhidracina recién destilada y trazas de bisulfito de sodio. Se calentó a reflujo en un baño de agua. A los 10 min. de calentamiento apareció un precipitado amarillo; se continuó el calentamiento durante 5 min. más, al cabo de los cuales se enfrió y filtró. El producto obtenido (15 mg) se recristalizó de etanol-agua; p.f. y p.f. mezcla 206-208°,  $[\alpha]_D^{20} -41^\circ$  (c 0,6, piridina-etanol (2:3)), coincidentes con los de una muestra auténtica de D-glucocofenilosazona. El espectro infrarrojo, realizado en bromuro de potasio coincide con el publicado para esta sustancia por Otting (1961).

Fracciones 51-90: Esta fracción (1,86 g) contenía D-glucosa, que, recristalizada de metanol-etanol dio p.f. 151-152°,  $[\alpha]_D^{20} +53,6^\circ$  (c 1,0, agua). Nelson y Beegle (1919) informaron para la  $\beta$ -D-glucosa p.f. 148-155°,  $[\alpha]_D^{20} +52,7^\circ$  (agua).

Fracciones 91-120:

Identificación de 3-O- $\beta$ -D-glucopiranosil-D-glucopiranosina (laminaribiosa)

Esta fracción (20 mg) contenía laminaribiosa, R<sub>g</sub> 0,63 (solvente 2) y R<sub>g</sub> 0,80 (solvente 6). Se recristalizó de metanol-isopropanol y se obtuvo laminaribiosa cristalina de p.f. y p.f. mezcla 192-193°,  $[\alpha]_D^{20} +28,5^\circ$  (15 min.)  $\longrightarrow +17,8^\circ$  (en el equilibrio, c 0,7, agua). Bächli y Percival (1952) informaron para este compuesto

p.f. 196-199°,  $[\alpha]_D^{20} +24,9^\circ \longrightarrow +18,6^\circ$  (en el equilibrio, c 2,5, agua).

Fracciones 121-146:

Identificación de 4-O- $\beta$ -D-glucopiranosil-D-glucopiranososa (celobiosa)

Esta fracción (30 mg) contenía como producto principal celobiosa,  $R_g$  0,47 (solvente 2) y glucosa. El disacárido se purificó por cromatografía en papel Whatmann 3 MM (solvente 2). Por recristalización de metanol-etanol se obtuvo un producto de p.f. y p.f. mezcla 235°,  $[\alpha]_D^{20} +35^\circ$  (c 0,6, agua). Hamilton y Kircher (1958) informaron para este compuesto p.f. 233-234°,  $[\alpha]_D^{20} +35,1^\circ$  (agua). Se preparó el  $\beta$ -octaacetato por tratamiento de 5 mg del disacárido con 0,5 ml de una mezcla de volúmenes iguales de anhídrido acético y piridina. Se calentó a ebullición y se dejó a temperatura ambiente durante 5 h. El anhídrido acético y la piridina se evaporaron en desecador al vacío sobre hidróxido de sodio y ácido sulfúrico. La octa-O-acetil celobiosa cristalizó de etanol-agua, p.f. y p.f. mezcla 208-210°. Whistler y Wolfrom (1963, c) informaron para este compuesto p.f. 202-202,5°. Por cromatografía en placa de sílica gel y revelado con iodo se obtuvo  $R_f$  0,52 (solvente 15, doble desarrollo) y  $R_f$  0,24 (solvente 16).

Fracciones 147-255:

Identificación de 6-O- $\alpha$ -D-glucopiranosil-D-glucopiranososa (isomaltosa)

Esta fracción (320 mg) contenía isomaltosa,  $R_g$  0,50 (solvente 1),  $R_g$  0,42 (solvente 2) y  $R_g$  0,59 (solvente 4). Este disacárido se caracterizó por preparación de su  $\beta$ -octaacetato por reacción con anhídrido acético y piridina según el mismo método des-



cripto para la  $\beta$ -octa-O-acetil-celobiosa. La  $\beta$ -octa-O-acetil-isomaltosa se recristalizó de isopropanol y se obtuvo un producto de p.f. y p.f. mezcla  $144^{\circ}$ ,  $[\alpha]_D^{20} +96,8^{\circ}$  (c 0,8, cloroformo). Wolfrom y col. (1949) informaron para este compuesto p.f.  $144-146^{\circ}$ ,  $[\alpha]_D^{20} +97^{\circ}$  (c 4,0, cloroformo). Por cromatografía en placa y revelado con iodo se obtuvo  $R_f$  0,60 (solvente 15, doble desarrollo) y  $R_f$  0,41 (solvente 16).

Fracciones 256-287: Esta fracción (30 mg),  $[\alpha]_D^{20} +81^{\circ}$  (c 0,9, agua), contenía un trisacárido de glucosa de  $R_g$  0,30 (solvente 1),  $R_g$  0,38 (solvente 7) y  $R_g$  0,50 (solvente 5). Se hidrolizó por calentamiento a reflujo con ácido sulfúrico 0,2 N durante 2 h. Se neutralizó el hidrolizado con carbonato de bario y descationizó con Dowex 50 ( $H^+$ ). La cromatografía en papel, usando solventes 1 y 2 mostró glucosa, isomaltosa y laminari-biosa, que se revelaron con reactivos a y c. Por otra parte, 2 mg del trisacárido en 2 ml de agua se redujeron con 20 mg de borohidruro de sodio. La solución se dejó 5 h a temperatura ambiente. Se destruyó el exceso de borohidruro con ácido acético y se descationizó la solución por agitación con resina Dowex 50 ( $H^+$ ). Se llevó a seco y se eliminó el ácido bórico por sucesivos agregados de metanol. Por cromatografía en papel se comprobó que la reducción había sido completa ya que el producto obtenido se revelaba con reactivo a, pero no con reactivos b y c, para azúcares reductores. Se hidrolizó el producto reducido en las mismas condiciones que se utilizaron para el trisacárido. Por cromatografía en papel en solventes 1 y 2 y reactivos b y c se observó isomaltosa y glucosa. Los datos experimentales obtenidos indican que podría tratarse de 3-O- $\beta$ -isomaltosilglucosa. Peat y col. (1958) informaron para este trisacárido  $[\alpha]_D^{20} +67^{\circ}$  (agua).

Fracciones 288-320: Esta fracción (50 mg) se eluyó con solvente 14, y contenía una mezcla de oligosacáridos reductores.

En el esquema 14 pueden observarse los valores de  $R_g$  en varios sistemas de solventes de los productos obtenidos por hidrólisis parcial del polisacárido.

ESQUEMA 14

VALORES DE  $R_g$  DE LOS PRODUCTOS OBTENIDOS POR HIDROLISIS ACIDA PARCIAL DEL POLISACARIDO

SUSTANCIA	SOLVENTES						
	1	2	3	4	5	6	7
5-(hidroximetil)- 2-furaldehido	2,84	3,77	6,55	2,24	--	--	4,21
D-arabino-hexuloso- lactona (?)	1,70	2,0	2,83	1,61	--	--	2,11
D-fructosa	1,09	1,18	1,34	--	--	1,14	--
D-glucosa	1	1	1	1	1	1	1
Laminaribiosa	0,82	0,63	--	--	--	0,80	--
Celobiosa	0,67	0,47	--	--	--	0,63	--
Isomaltosa	0,50	0,42	--	0,59	0,70	0,50	--
3-O- $\beta$ -isomaltosil- glucosa (?)	--	0,30	--	--	0,50	--	0,38

DETERMINACION CUANTITATIVA DE LOS AZUCARES COMPO-  
NENTES DEL POLISACARIDO

D-GLUCOSA

El polisacárido (0,022 g) se hidrolizó con ácido sulfúrico 1 N (2 ml) en un tubo cerrado durante 16 h a 110°. El hidrolizado se enfrió, se neutralizó con carbonato de bario y filtró por lecho de celite, lavando con agua destilada caliente. El filtrado se descationizó por agitación con resina Dowex 50 (H<sup>+</sup>) y se evaporó a presión reducida.

La determinación cuantitativa de glucosa se llevó a cabo por el método descrito por Wilson (1959). El hidrolizado se llevó a volumen en un matraz aforado de 3,29 ml. Se utilizó una solución patrón de glucosa de concentración 5,6 mg/ml. Se corrieron cromatogramas con solución de glucosa patrón, sembrando cantidades tales que la concentración de azúcar fuera de 10 a 125  $\mu$ g. Simultáneamente se corrió el hidrolizado total del polisacárido. Los cromatogramas se desarrollaron con el solvente 2 durante 48 h y se revelaron con el reactivo b. Se cortaron las manchas en áreas rectangulares del mismo tamaño, cada una de las cuales se cortó en pequeñas tiras y se introdujo en un tubo de ensayos. Se utilizó como blanco un rectángulo de igual área de papel tratado en las mismas condiciones. Se agregaron a cada tubo 4 ml de eluyente, preparado por agregado de 29 ml de ClH 36% a 420 ml de etanol 95% y llevando el volumen a 500 ml con agua, con lo cual se tiene una solución de ClH 0,7 N en etanol 80%. Al cabo de 1 h a temperatura ambiente, con agitación esporádica, la elución fue completa. Se determinó la absorbancia en un espectrofotómetro Beckmann DU a 390 m $\mu$ .

Se graficó el logaritmo de la trasmítancia de los tubos testigos en función de su concentración y en base a la trasmítancia de la muestra se calculó la concentración de azúcar presente en el hidrolizado y a partir de ese dato la proporción de glucosa en el polisacárido.

Todas las determinaciones se realizaron por duplicado. Los resultados pueden verse en la Tabla 7.

TABLA 7  
DETERMINACION DE GLUCOSA

Muestra	Cantidad sembrada	Trasmítancia ( $\lambda = 390 \text{ m}\mu$ )	Contenido en glucosa
Glucosa	6 $\mu\text{l}$	56%	33,6 $\mu\text{g}$
Glucosa	8 $\mu\text{l}$	50%	44,8 $\mu\text{g}$
Glucosa	10 $\mu\text{l}$	46%	56,0 $\mu\text{g}$
Glucosa	12 $\mu\text{l}$	42%	67,2 $\mu\text{g}$
Glucosa	15 $\mu\text{l}$	37%	84,0 $\mu\text{g}$
hidrolizado	6 $\mu\text{l}$	55%	35,0 $\mu\text{g}$
hidrolizado	10 $\mu\text{l}$	45%	60,0 $\mu\text{g}$

Los resultados indican que 22 mg de polisacárido dan 19,7 mg de glucosa (89,5% en peso).

## DETERMINACION DEL ACIDO D-ARABINO-HEXULOSONICO

### a) Método de los ácidos hidroxámicos

Se realizó la determinación del contenido de ácido D-arabino-hexulosónico siguiendo la técnica descrita por Kaye y Kent (1953) para la determinación de ácidos urónicos. Se usó como patrón una solución de glucuronolactona de concentración 9,7 mg/ml. Se hizo la determinación sobre el polisacárido tal cual para ver si había restos de ácidos lactonizados y sobre el polisacárido previamente esterificado. La esterificación se realizó calentando el polisacárido con 2 ml de ClH 2,5% en metanol durante 16 h en tubo cerrado. Las soluciones testigo y el polisacárido tal cual se llevaron a 2 ml en agua-metanol (95:5).

Se realizó paralelamente un blanco libre de azúcar.

Procedimiento: Se agregó a todos los tubos 1 ml de agua y 2 ml de una solución de hidroxilamina recientemente preparada, mezclando volúmenes iguales de una solución de clorhidrato de hidroxilamina 2 M e hidróxido de sodio 3,5 M. Después de 4 min. a temperatura ambiente se agregó 1 ml de ClH 3,34 M y 1 ml de solución de cloruro férrico 0,37 M en ácido clorhídrico 0,1 M. Las soluciones se agitaron durante 1 minuto a presión reducida para eliminar gases disueltos y se determinó la absorbancia a 505 m $\mu$ . Todas las determinaciones se hicieron por duplicado.

Se graficó el logaritmo de la transmitancia de las soluciones testigos en función de la cantidad en moles de glucuronolactona presentes. Por interpolación en la recta se determinó la cantidad (en moles) de grupos esterificados presentes en el polisacárido. Multiplicando ese número de moles por el peso de una unidad de ácido arabino-hexulosónico en una cadena y refiriéndolo al peso de polisacárido de partida se obtuvo

el porcentaje de ácido D-arabino-hexulosónico presente en el polisacárido.

Los resultados de las mediciones realizadas pueden observarse en la Tabla 8.

TABLA 8

DETERMINACION DE ACIDO D-ARABINO-HEXULOSONICO

a) Método de los ácidos hidroxámicos

Muestra	Cantidad empleada	Trasmitancia ( $\lambda = 505 \text{ m}\mu$ )	Contenido (en $\mu\text{moles}$ )
Glucuronolactona	180 $\mu\text{l}$	24%	9,3
Glucuronolactona	140 $\mu\text{l}$	32%	7,7
Glucuronolactona	80 $\mu\text{l}$	49%	4,4
Glucuronolactona	30 $\mu\text{l}$	74%	1,6
Polisacárido	4,424 mg	95%	0,1
Polisacárido	2,100 mg	99%	0,02
Polisacárido esterificado	7,585 mg	67%	2,5
Polisacárido esterificado	5,507 mg	72%	1,9

En el caso del polisacárido no esterificado, la absorbancia es muy baja y cae prácticamente dentro del error experimental. El porcentaje de ácido calculado a partir del polisacárido esterificado resultó de 5,8-6,0%.

b) Dosaje por descarboxilación

Se adaptó el método descripto para ácidos urónicos por Barker y col. (1958), que es una modificación del de McCready y col. (1946).

Aparato: El aparato (Figura 28) consiste en un balón con forma de pera que lleva soldado un refrigerante. Arriba del refrigerante se coloca un tubo que contiene Zn granulado y que está conectado al tubo conteniendo hidróxido de sodio 0,1 N, donde se recoge el dióxido de carbono. Se preserva el aparato del anhídrido carbónico atmosférico mediante tubos de ascarita. Todas las uniones se lubrican con silicona y se sostienen mediante resortes.

Método: La muestra se pesó en un tubo angosto de 1 cm de longitud, se colocó en el balón de reacción y se agregaron 5 ml de ácido clorhídrico 19%. Se hizo pasar una corriente de nitrógeno para purgar el aparato antes de conectar el tren de absorción, que consistía en 2 tubos con 5 ml de hidróxido de sodio 0,1 N cada uno. Una vez conectados, se reguló la corriente de nitrógeno en aproximadamente una burbuja cada 2-3 segundos. El baño de aceite, previamente calentado a  $145^{\circ}$ , se colocó de tal manera que el nivel de aceite quedara 0,25 cm por debajo del nivel del líquido en el balón de reacción. Se calentó a  $145^{\circ}$  por 2 h, se retiró el baño de aceite y se aumentó la corriente de nitrógeno a 2-3 burbujas por segundo durante 10 minutos. Se desconectó el tren de absorción y el hidróxido de sodio se transfirió cuidadosamente a un erlenmeyer, lavando con agua (5 x 5 ml). Se agregaron 2 ml de una solución de cloruro de bario dihidrato 10% y dos gotas de fenolftaleína. El exceso de álcali se tituló con ClH 0,1 N  $f = 1,004$ . Se realizó un blanco sin muestra. Se controló el método con muestras de D-arabino-hexulosoato de calcio. Los resultados pueden observarse en la Tabla 9.

FIGURA 28

DOSAJE DE ACIDO D-ARABINO-HEXULOSONICO POR DESCARBOXILACION

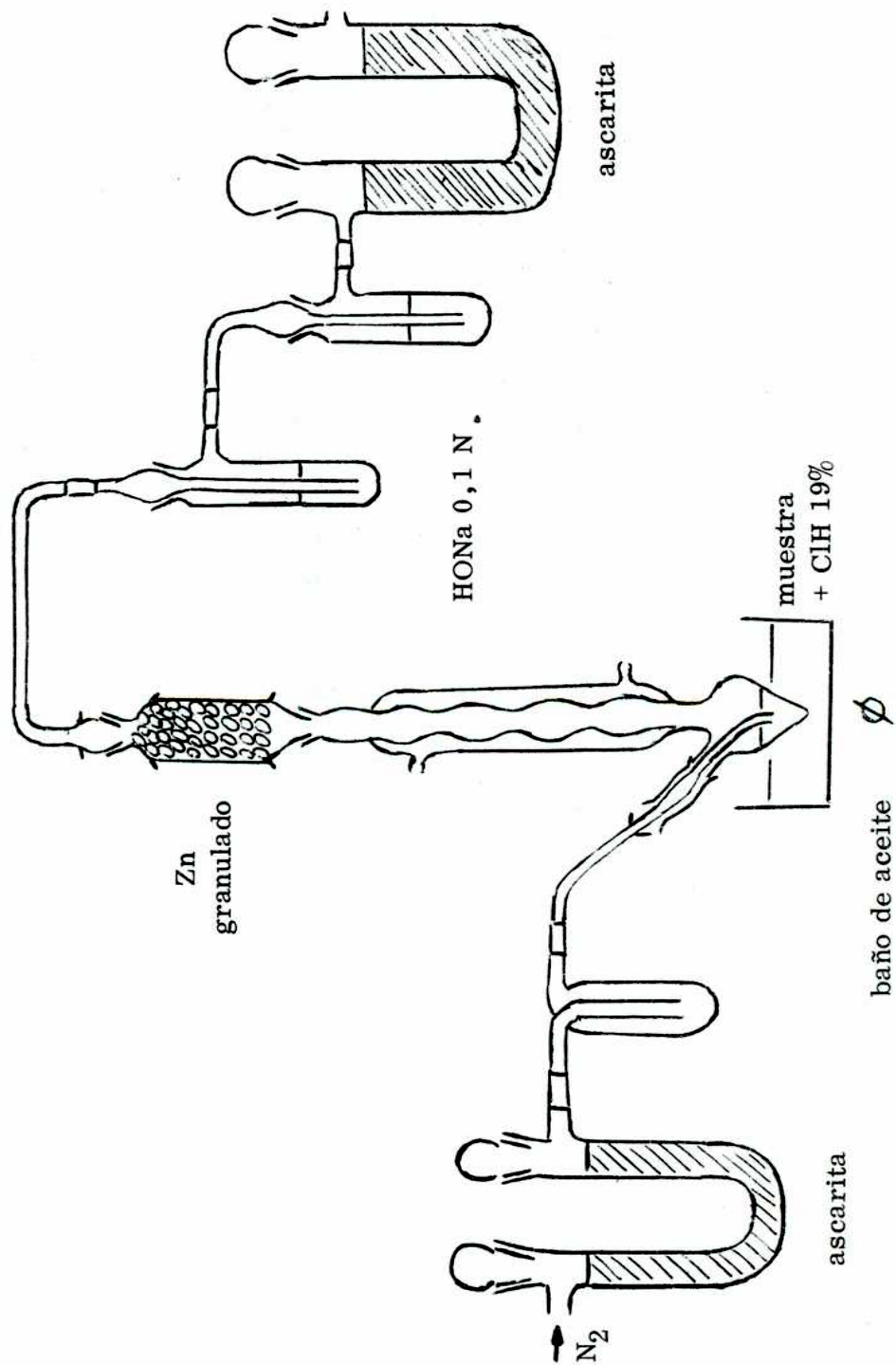




TABLA 9

DETERMINACION DE ACIDO D-ARABINO-HEXULOSONICO

b) Dosaje por descarboxilación

Muestra	Peso (mg)	Volumen de ClH 0,1004 N (ml)	Diferencia de titulación (ml)	% de ácido
Blanco	--	9,25	0,0	--
D-arabino-hexulosoato de calcio	16,5	7,72	1,53	98,9
D-arabino-hexulosoato de calcio	17,1	7,69	1,56	97,7
D-arabino-hexulosoato de calcio	22,2	7,20	2,05	98,7
Polisacárido	47,7	8,93	0,32	5,9
Polisacárido	53,2	8,88	0,37	6,1

$$\% = \frac{a \times P \times 0,1 \times 1,004 \times 100}{2 \times b}$$

donde:

a = diferencia de titulación con el blanco

b = peso de muestra

P = peso equivalente. Para el D-arabino-hexulosoato de calcio será 214. En el caso del polisacárido se considera el peso de una unidad de ácido en la cadena (176).

### DETERMINACION DE D-FRUCTOSA

Se realizó por el método descrito por Wilson (1959), aplicado a las fracciones de columna de un hidrolizado (ácido sulfúrico 1 N, 100°, 3,5 h), que contenían fructosa, dado que por su baja proporción y la cantidad de glucosa presente no pudo realizarse directamente sobre la totalidad del hidrolizado. Los cromatogramas se desarrollaron con solvente 3. Se usó como patrón una solución de D-fructosa de concentración 1,2 mg/ml. Se procedió de la misma manera que en la determinación de glucosa. Se graficó el logaritmo de la transmitancia de las soluciones testigos en función de su concentración y por interpolación en la recta pudo calcularse la cantidad de fructosa presente en las fracciones del hidrolizado. Se refirió dicho valor al total obteniéndose así el porcentaje de fructosa, que es aproximadamente del 1%.

Las fracciones de columna que contenían fructosa en dicho hidrolizado sumaban 65 mg sobre un total de 4,60 g de polisacárido de partida. Los datos obtenidos en la determinación pueden observarse en la Tabla 10.

TABLA 10

#### DETERMINACION DE FRUCTOSA

Muestra	Cantidad sembrada	Trasmitancia ( $\lambda = 390 \text{ m}\mu$ )	Cantidad de fructosa
Fructosa	20 $\mu\text{g}$	90%	20 $\mu\text{g}$
Fructosa	50 $\mu\text{g}$	67%	50 $\mu\text{g}$
Fructosa	80 $\mu\text{g}$	52%	80 $\mu\text{g}$
Fructosa	100 $\mu\text{g}$	43%	100 $\mu\text{g}$
hidrolizado	128 $\mu\text{g}$	47%	91 $\mu\text{g}$
hidrolizado	64 $\mu\text{g}$	72%	45 $\mu\text{g}$

### DETERMINACION DEL GRADO DE POLIMERIZACION

La determinación se realizó según el método descrito por Unrau y Smith (1957).

El polisacárido (32 mg) se suspendió en 10 ml de agua, se agregaron 25 mg de borohidruro de sodio y se mantuvo con agitación constante durante 20 h. El exceso de borohidruro de sodio se destruyó por agregado de ácido acético gota a gota y se ajustó el pH a 7,5 con solución saturada de bicarbonato de sodio. Se agregaron 25 mg de metaperiodato de sodio y la mezcla se dejó en la oscuridad a temperatura ambiente durante 4 días. El exceso de oxidante se destruyó por agregado de 7,5 ml de ácido sulfúrico 1 N y 2,5 ml de arsenito de sodio 1 M. La mezcla (28 ml) se dializó contra igual volumen de agua destilada en un sistema cerrado durante 24 h. Se tomaron alícuotas (1 ml) del dializado y se realizó sobre ellas la determinación de formaldehído según la técnica general descrita. Las determinaciones se realizaron por duplicado y los resultados pueden observarse en la Tabla 11.

TABLA 11

### DETERMINACION DEL GRADO DE POLIMERIZACION

Muestra	Trasmitancia ( $\lambda = 570 \text{ m}\mu$ )	Formaldehído ( $\mu\text{mol/ml}$ )
Testigo 1	15%	0,5
Testigo 2	38%	0,25
Testigo 3	62%	0,125
Testigo 4	85%	0,05
Testigo 5	93%	0,025
Polisacárido	90%	0,03
Polisacárido	88%	0,032

Se encontró que 32 mg de polisacárido dan origen a 1,7  $\mu$  mol de formaldehído, lo que implica un peso molecular de 18.880 (si se considera que la molécula terminal está unida a través del O-6 y que por lo tanto da una molécula de formaldehído por mol de polisacárido) ó 37.760 (si se considera que la molécula terminal está unida a través del O-3 y da 2 moléculas de formaldehído por mol de polisacárido).

Para el grado de polimerización se consideró el porcentaje de ácido presente y se calculó el peso promedio de una unidad del polisacárido según:

$$\frac{94 \times 162 + 6 \times 196}{100} = 164$$

Se encontró que el grado de polimerización es de 115 si se considera que la unidad terminal está unida por O-6 ó 230 en caso de que estuviera unida por O-3.

## OXIDACION CON PERIODATO

Se realizó de acuerdo a la técnica descrita en la parte general. El polisacárido (106,9 mg) se suspendió en 50 ml de solución de periodato de sodio 0,1 M y se completó el volumen a 100 ml con agua destilada. La oxidación se llevó a cabo a 50 en la oscuridad, con agitación. Se tomaron alícuotas a diferentes tiempos para determinar el consumo de oxidante y la producción de ácido fórmico. Se realizó paralelamente un blanco libre de azúcar.

### Dosaje de periodato de sodio

Se tomaron alícuotas de 0,5 ml, las que se agregaron a una solución de 5 ml de arsenito de sodio 0,01 N, 0,5 ml de solución saturada de bicarbonato de sodio y 0,2 ml de yoduro de potasio 20%. Se procedió de acuerdo al método descrito. Las titulaciones se llevaron a cabo con solución de iodo 0,01 N,  $f=0,892$ . Todas las determinaciones se efectuaron por duplicado. El consumo de periodato se expresó como moles de periodato /mol de glucosa anhidra. Los resultados pueden observarse en la Tabla 12.

### Dosaje de ácido fórmico

Se tomaron alícuotas de 1 ml que se agregaron a 0,2 ml de etilén glicol. La determinación se efectuó de acuerdo a la técnica general descrita. Las titulaciones se realizaron con hidróxido de sodio 0,01 N,  $f=0,75$ . Todas las determinaciones se efectuaron por duplicado. Los resultados obtenidos se expresaron como moles de ácido fórmico /mol de glucosa anhidra (Tabla 13).

TABLA 12

DETERMINACION DEL CONSUMO DE PERIODATO

Tiempo	Muestra	I <sub>2</sub> consumido (ml)	IO <sub>4</sub> <sup>-</sup> consumido (moles x 10 <sup>-5</sup> )	moles IO <sub>4</sub> <sup>-</sup> / mol glucosa anhidra
3 h	Blanco	3,36	--	--
	Polisacárido	3,68	29,0	0,44
1 d	Blanco	3,36	--	--
	Polisacárido	3,82	41,0	0,62
2 d	Blanco	3,37	--	--
	Polisacárido	3,86	45,0	0,68
3 d	Blanco	3,30	--	--
	Polisacárido	3,80	45,5	0,69
7 d	Blanco	3,06	--	--
	Polisacárido	3,56	45,5	0,69
8 d	Blanco	3,05	--	--
	Polisacárido	3,59	47,8	0,71
9 d	Blanco	3,02	--	--
	Polisacárido	3,57	48,1	0,73

TABLA 13DETERMINACION DE ACIDO FORMICO PRODUCIDO

Tiempo	Muestra	HONa consumido (ml)	HCOOH (moles x 10 <sup>-5</sup> )	moles HCOOH/ mol glucosa anhidra
3 h	Blanco	0,44	--	--
	Polisacárido	0,56	9,0	0,14
1 d	Blanco	0,46	--	--
	Polisacárido	0,65	14,5	0,22
2 d	Blanco	0,44	--	--
	Polisacárido	0,74	22,5	0,34
3 d	Blanco	0,43	--	--
	Polisacárido	0,72	21,7	0,33
8 d	Blanco	0,45	--	--
	Polisacárido	0,75	22,5	0,34
9 d	Blanco	0,44	--	--
	Polisacárido	0,73	21,7	0,33

### Reducción del polialdehido

Al cabo de 10 días se destruyó el exceso de periodato de sodio de la mezcla de oxidación por agregado de etilén glicol (2 ml) y se dializó contra agua corriente durante 4 días a 20° y finalmente contra agua destilada.

Se agregaron 150 mg de borohidruro de sodio, y a las 10 h y a las 20 h se hicieron nuevos agregados de 50 mg de borohidruro de sodio, agitando durante un total de 28 h. No se logró disolución total del producto. Se destruyó el borohidruro en exceso por agregado de ácido acético gota a gota hasta pH 5. La suspensión se desionizó por diálisis contra agua corriente y agua destilada y se liofilizó.

### Hidrólisis ácida completa del polialcohol

El polialcohol liofilizado (26,8 mg) se hidrolizó con ácido sulfúrico 1 N calentando a reflujo durante 15 h. Se neutralizó el hidrolizado con hidróxido de bario-carbonato de bario y se descationizó por agitación con resina Dowex 50 ( $H^+$ ). El filtrado se llevó a seco, se tomó con agua y se llevó a volumen en un matraz aforado de 3,29 ml.

Por cromatografía en papel se observaron manchas de movilidad igual a glucosa (intensa, revelada con reactivos a y c): eritritol, trazas,  $R_g$  1,30 (solvente 1),  $R_g$  1,54 (solvente 2),  $R_g$  1,55 (solvente 9), revelado con reactivo a y glicerol,  $R_g$  1,52 (solvente 1),  $R_g$  1,92 (solvente 2),  $R_g$  1,97 (solvente 9), revelado con reactivo a.

### Determinación de la relación de glucosa-glicerol-eritritol en el hidrolizado total del polialcohol



### Determinación de glucosa

Se realizó por la técnica descrita por Wilson (1959). Los cromatogramas se desarrollaron con solvente 1. Se usó una solución patrón de glucosa de concentración 5,22 mg/ml. La determinación se llevó a cabo siguiendo el mismo método descrito para la determinación de glucosa en un hidrolizado total del polisacárido. Los resultados pueden verse en la Tabla 14. Todas las determinaciones se efectuaron por duplicado.

TABLA 14

### DETERMINACION DE GLUCOSA EN POLIALCOHOL

Muestra	Cantidad sembrada	Trasmitancia ( $\lambda=390 \text{ m}\mu$ )	Contenido en glucosa
Glucosa	5 $\mu\text{l}$	80%	0,145 $\mu\text{moles}$
Glucosa	10 $\mu\text{l}$	55%	0,290 $\mu\text{moles}$
Glucosa	15 $\mu\text{l}$	40%	0,435 $\mu\text{moles}$
Glucosa	20 $\mu\text{l}$	27%	0,580 $\mu\text{moles}$
Polialcohol	5 $\mu\text{l}$	73%	0,175 $\mu\text{moles}$
Polialcohol	10 $\mu\text{l}$	49%	0,348 $\mu\text{moles}$

### Determinación de glicerol y eritritol

Se realizó por separación cromatográfica de los alditoles en papel Whatmann N<sup>o</sup> 1 (solvente 2), seguida de oxidación con periodato y determinación del formaldehído formado. Se usó como testigo una solución de eritritol de concentración 11,8 mg/ml, que también fue corrida en el mismo solvente para que las condiciones fueran las mismas

que las empleadas para el hidrolizado. Las sustancias se eluyeron con metanol (2 x 5 ml), el eluido se llevó a seco, se tomó con agua y se le agregó 1,3 ml de solución de periodato de sodio 0,1 M. Se dejó durante 0,5 h en la oscuridad y se le agregó 1 ml de ácido sulfúrico 5 N y 1,25 ml de arsenito de sodio 1 M. La solución se llevó a un volumen de 10 ml con agua. Se tomaron muestras de 1 ml a las que se agregaron 10 ml de reactivo de ácido cromotrópico, determinándose el formaldehído producido por la técnica general descripta. Todas las determinaciones se efectuaron por duplicado. Los datos obtenidos pueden observarse en la Tabla 15.

TABLA 15

DETERMINACION DE GLICEROL Y ERITRITOL EN POLIALCOHOL

Muestra	Cantidad sembrada	Trasmitancia ( $\lambda=570 \text{ m}\mu$ )	Formaldehído ( $\mu$ moles)	Alditol ( $\mu$ moles)
Eritritol (testigo)	6 $\mu$ l	86,5%	0,12	0,06
Eritritol (testigo)	10 $\mu$ l	65,5%	0,20	0,10
Eritritol (testigo)	15 $\mu$ l	44 %	0,30	0,15
Eritritol (testigo)	20 $\mu$ l	32 %	0,40	0,20
Glicerol (polialcohol)	5 $\mu$ l	75 %	0,16	0,08
Glicerol (polialcohol)	10 $\mu$ l	38 %	0,34	0,17
Eritritol (polialcohol)	15 $\mu$ l	96 %	0,09	0,045
Eritritol (polialcohol)	20 $\mu$ l	89 %	0,11	0,055

Se determinó una relación molar de glucosa-glicerol-eritritol de 12:6:1, lo que está de acuerdo con los valores obtenidos por titulación.

### Hidrólisis ácida suave del polialcohol

El polialcohol se degradó por el método de Smith (160) siguiendo la técnica descrita por Misaki y Kanamaru (1968). El polialcohol (30 mg) se trató con 10 ml de ácido sulfúrico 0,1 N a temperatura ambiente durante 24 h. El material insoluble (22 mg) se separó por centrifugación. El hidrolizado se neutralizó con carbonato de bario, se descationizó por agitación con Dowex 50 (H<sup>+</sup>) y se llevó a seco. Por cromatografía en papel (solventes 1 y 9) se observó glicerol como producto principal y eritritol. No pudo detectarse ni glucosilglicerol ni glucosileritritol.

El producto insoluble se hidrolizó con ácido sulfúrico 0,05 N calentando en baño de agua hirviente a reflujo durante 3,5 h, condiciones empleadas para el aislamiento del ácido D-arabino-hexulosónico. La mayor parte no se atacó y fue separada por centrifugación. El hidrolizado se neutralizó con carbonato de bario y se concentró sin descationizar. Por cromatografía en papel (solventes 1 y 6) se observó ácido D-arabino-hexulosónico como producto principal.

El polisacárido degradado se hidrolizó totalmente, por calentamiento con ácido sulfúrico 1 N durante 16 h en tubo cerrado a 110<sup>o</sup>, observándose por cromatografía en papel (solventes 1 y 6) glucosa como único producto.

## ESTUDIOS DE METILACION

### Metilación del polisacárido

Se metiló primeramente por el método descrito por Haworth (1915).

El polisacárido (1,5 g) se suspendió en 75 ml de una solución de hidróxido de sodio 30%, con agitación y bajo corriente de nitrógeno. Al cabo de 1 h se logró disolución total. Se agregaron, gota a gota, 75 ml de sulfato de metilo y 75 ml de solución de hidróxido de sodio 30%, con agitación permanente, en atmósfera de nitrógeno y manteniendo la mezcla de reacción en baño de agua, debido a que el desprendimiento de calor resultó apreciable. Se continuó la agitación durante 9 h. Se hicieron 3 agregados más de sulfato de metilo e hidróxido de sodio en las mismas condiciones, en 3 días consecutivos. Al cabo de los mismos, se eliminó el sulfato de metilo que no había reaccionado por calentamiento en baño de agua hirviente, con agitación, durante 1 h. El precipitado de polisacárido parcialmente metilado se separó por centrifugación, lavando con agua (0,38 g). El sobrenadante se neutralizó con ácido sulfúrico 1 N y se extrajo con cloroformo (5 x 50 ml), con lo que se recuperaron 80 mg de producto. La capa acuosa se dializó contra agua corriente durante 5 días y finalmente contra agua destilada y se llevó a seco por liofilización (1,1 g).

Todo el producto parcialmente metilado obtenido (1,56 g) se sometió a una nueva metilación que se llevó a cabo por una modificación del método de Haworth descrita por Falconer y Adams (1956). El producto se suspendió en 45 ml de tetrahidrofurano con agitación. Se agregó 7,5 g de hidróxido de sodio pulverizado en pequeñas porciones y 9 ml de sulfato de metilo gota a gota. Se agitó durante 7 h a temperatura ambiente en baño de agua para evitar que se elevara la temperatura de la mezcla de

reacción. Se agregó agua para disolver el hidróxido de sodio y se calentó durante 1 h a 80° para eliminar el tetrahidrofurano y el sulfato de metilo en exceso. Se neutralizó con ácido sulfúrico 5 N y el polisacárido parcialmente metilado, insoluble, se separó por centrifugación y se lavó con agua (0,9 g). El sobrenadante se extrajo con cloroformo (5 x 50 ml), se secó el extracto con sulfato de sodio y la capa clorofórmica se llevó a seco (0,25 g). La capa acuosa se dializó contra agua corriente (5 días) y después agua destilada y el polisacárido parcialmente metilado se recuperó por liofilización (0,15 g).

Todo el producto aislado (1,30 g) de la mezcla de reacción se remetiló tres veces por el método descrito por Purdie e Irvine (1903) con 30 ml de ioduro de metilo y 2 g de óxido de plata recién preparado, agregado en pequeñas porciones, durante 2,5 h. La mezcla de reacción se calentó a reflujo con agitación en baño de agua a 60° durante 10 h cada vez. Se separó el óxido de plata por filtración a través de un lecho de celite, lavándose cuidadosamente con cloroformo caliente (10 x 10 ml). El filtrado se secó con sulfato de sodio anhidro y se llevó a seco a presión reducida. Se obtuvieron 1,13 g de polisacárido metilado.

#### Purificación del polisacárido metilado

El polisacárido metilado (1,13 g) se calentó a reflujo con benceno (100 ml). Se agregaron 5 ml de cloroformo para facilitar la disolución del producto. Se separaron las impurezas insolubles por filtración a través de un lecho de celite. El filtrado se concentró a presión reducida para eliminar el cloroformo y la solución bencénica se liofilizó. Se obtuvieron 0,84 g.

### Propiedades del polisacárido metilado

El espectro infrarrojo se realizó sobre una película de polisacárido preparada de la siguiente manera: el polisacárido metilado (11 mg) se disolvió en 1,2 ml de cloroformo y la solución se colocó sobre mercurio. Se evaporó el solvente en desecador y se hizo el espectro infrarrojo de la película del producto así obtenida. No se observó absorción correspondiente a hidroxilo a  $3.500\text{ cm}^{-1}$ .

El producto se secó a  $60^{\circ}/5\text{ mm}$  sobre pentóxido de fósforo durante 10 h y se determinó el poder rotatorio,  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} +60,9^{\circ}$  (c 0,6, cloroformo).

Se determinó el contenido de metoxilos, OMe: 39,1%.

### Hidrólisis del polisacárido metilado

El polisacárido metilado (0,770 g) se disolvió en 16 ml de ácido sulfúrico 72% enfriando externamente con un baño de agua helada. Se dejó a temperatura ambiente durante 2 h y luego se diluyó el ácido sulfúrico hasta una concentración del 12% por agregado de 80 ml de agua, cuidando que la temperatura no se elevara. La solución se calentó en tubo cerrado a  $110^{\circ}$  durante 4 h. Se filtró el residuo insoluble (0,046 g), la solución se neutralizó con hidróxido de bario-carbonato de bario y los sólidos se separaron por filtración a través de un lecho de celite, lavándose cuidadosamente con agua y metanol caliente. El filtrado se descationizó por agitación con resina Dowex 50 ( $\text{H}^{+}$ ) y se llevó a seco (0,620 g).

La cromatografía en papel del hidrolizado (solvente 10), usando como revelador el reactivo c, mostró cuatro manchas principales cuyos valores de  $R_f$  y colores coincidían con los de 2,3,4,6-tetra-O-metil- ( $R_f$  0,78, rosada); 2,3,4-tri-O-metil- ( $R_f$  0,59, amarilla); 2,4,6-tri-O-metil- ( $R_f$  0,48, rosada) y 2,4-di-O-metilglucosa ( $R_f$  0,20, ma-

rrón rojizo). Se observó además una mancha tenue ( $R_f$  0,02, solvente 11), que se reveló rosada con reactivo c, correspondiente a un producto de metilación del ácido D-arabino-hexulosónico.

Una alícuota del hidrolizado (0,230 g) se fraccionó en una columna de celulosa (40 x 2,5 cm) usando solvente 11. Se recogieron fracciones de 25 ml.

Fracciones 1-6: El principal componente de esta fracción (30 mg) fue la 2,3,4,6-tetra-O-metil-D-glucosa ( $R_f$  0,78, solvente 10).

Esta fracción dio positivo el ensayo para lactonas basado en la reacción de los ácidos hidroxámicos (Abdel-Akher y Smith, 1951). La cromatografía en placa delgada, solvente 17, dio una mancha principal de  $R_f$  0,18, correspondiente a 2,3,4,6-tetra-O-metilglucosa y otra de  $R_f$  0,33, que se reveló con reactivo f, específico para lactonas.

La fracción se demetiló con tricloruro de boro siguiendo el método general descrito. Por cromatografía en papel (solventes 1 y 6) se observó la presencia de glucosa y trazas de arabinosa.

#### Identificación de 2,3,4,6-tetra-O-metil-D-glucosa

La 2,3,4,6-tetra-O-metil-D-glucosa se cristalizó de éter-éter de petróleo, p.f. y p.f. mezcla 92-93°,  $[\alpha]_D^{20} +90^\circ$  (c 1,0, agua). Irvine y Oldham (1921) informaron para este compuesto p.f. 96°,  $[\alpha]_D^{20} +92^\circ \longrightarrow +84^\circ$  (agua).

Fracciones 7-8: Consistía en una mezcla (15 mg) de tetra- y tri-O-metilglucosa.

Fracciones 9-11: El principal componente de esta fracción (35 mg) era cromatográficamente idéntico a la 2,3,4-tri-O-metilglucosa,  $R_f$  0,59 (solvente 10) y  $R_f$  0,48 (solvente 11), se reveló amarillo con reactivo c. Se observó en menor proporción una mancha de

$R_f$  0,52 (solvente 10), que se reveló rosada con reactivo c y que correspondería a la 2,3,6-tri-O-metil-glucosa. Christensen y Smith (1957) informaron para este compuesto  $R_f$  0,51 en el mismo solvente.

#### Identificación de 2,3,4-tri-O-metil-D-glucopiranososa

La 2,3,4-tri-O-metil-D-glucopiranososa se identificó por preparación de la N-(p-nitrofenil)-2,3,4-tri-O-metil-D-glucopiranosilamina. A la solución del azúcar metilado en 1,5 ml de etanol absoluto se agregaron 40 mg de p-nitroanilina y 0,03 ml de ácido acético glacial. Se calentó a reflujo durante 2 h en baño de agua. La solución se llevó a seco y se cristalizó de isopropanol la N-(p-nitrofenil)-2,3,4-tri-O-metil-D-glucopiranosilamina, p.f. 219-221°,  $[\alpha]_D^{20}$  -255° (c 0,5, piridina). Van Cleve y col. (1956) informaron para este compuesto p.f. 224-225°,  $[\alpha]_D^{20}$  -251° (piridina).

Fracción 12-13: La cromatografía en papel de esta fracción (30 mg) en solvente 11, doble desarrollo, realizada a 5°, mostró la presencia de tres tri-O-metilglucosas, cada una de las cuales daba dos manchas, posiblemente correspondientes a los dos anómeros, pues testigos puros de 2,3,4- y 2,4,6-tri-O-metilglucosa daban también dos manchas en estas condiciones. Las sustancias observadas fueron: 2,3,4-tri-O-metilglucosa, que daba dos manchas de  $R_f$  0,59 y 0,47, coincidentes con los de una muestra auténtica, que se revelaron amarillas con reactivo c; 2,3,6-tri-O-metilglucosa,  $R_f$  0,52 y 0,45, rosada con reactivo c y 2,4,6-tri-O-metilglucosa,  $R_f$  0,43 y 0,32, coincidentes con los de una muestra auténtica, que se revelaron rosadas con reactivo c.

#### Fracciones 14-17:

#### Identificación de 2,4,6-tri-O-metil-D-glucopiranososa

Esta fracción (45 mg) se destiló a 0,001 mm y el destilado cristalizó por agrega-



do de éter isopropílico dando 2,4,6-tri-O-metil-D-glucosa de p.f. 121-123°. Richtmyer (1939) informó para este compuesto p.f. 122-123°.

Fracciones 18-22: Esta fracción (25 mg) contenía una mezcla de tri- y di-O-metilglucosa.

Fracciones 23-31:

Identificación de 2,4-di-O-metil-D-glucopiranososa

El principal producto de esta fracción (25 mg) era 2,4-di-O-metil-D-glucopiranososa, identificada por preparación de la N-(p-nitrofenil)-D-glucopiranosilamina siguiendo la técnica descrita para la identificación de la 2,3,4-tri-O-metil-D-glucopiranososa. La N-(p-nitrofenil)-2,4-di-O-metil-D-glucopiranosilamina cristalizó de etanol absoluto, p.f. 251-254°,  $[\alpha]_D^{20}$  -267,5° (c 0,5, piridina). Van Cleve y Schaeffer (1955) informaron para este compuesto p.f. 250-251°,  $[\alpha]_D^{20}$  -268° (piridina).

Fracciones 32-38: La cromatografía en papel de esta fracción (ca. 5 mg) mostró un componente principal de  $R_f$  0,02 (solvente 11), que se reveló rosado con reactivo c.

El producto (ca. 2 mg) se demetiló por el método general descrito. Se observó por cromatografía en papel (solventes 1 y 6), ácido arabino-hexulosónico, glucosa y arabinosa, revelados con reactivos a y c.

El ácido metilado (ca. 1 mg) se redujo con 10 mg de borohidruro de sodio durante 3 h. El borohidruro de sodio en exceso se destruyó por agregado de ácido acético y la solución se descationizó por agitación con resina Dowex 50 ( $H^+$ ). Se llevó a seco a presión reducida y se eliminó el ácido bórico por sucesivos agregados de metanol. Se disolvió el residuo en 2,5 ml de agua y se agregó 0,5 ml de periodato de sodio 0,1 M. La oxidación se llevó a cabo a temperatura ambiente en ausencia de luz durante 3 h. Se precipitó el periodato de sodio en exceso con acetato de plomo y se eliminó el precipitado

por centrifugación. El sobrenadante se descationizó por agitación con resina Dowex 50 ( $H^+$ ), se concentró y sobre él se realizó la reacción para detectar ácido glioxílico descrita por Eegriwe (1935).

Una gota de la solución de la sustancia se mezcló con una punta de espátula de ácido pirogalol carboxílico y se agregaron dos gotas de ácido sulfúrico concentrado. La mezcla se enfrió en baño de hielo y se agregaron 0,7 ml de ácido sulfúrico concentrado. Se calentó luego a  $40^{\circ}$  durante media hora. Simultáneamente se realizó un blanco de reactivos y un testigo con ácido glioxílico. La reacción fue negativa.

En la Tabla 16 puede observarse un resumen de las fracciones aisladas por separación en columna de los productos de hidrólisis del polisacárido metilado, con las características cromatográficas de sus componentes.

#### Determinación cuantitativa de los azúcares metilados

El polisacárido metilado (0,1861 g) se hidrolizó con ácido sulfúrico por el mismo método descrito anteriormente. El hidrolizado se separó por cromatografía preparativa en papel Whatmann 3 MM (solvente 10). Los testigos de azúcares metilados se sembraron en los bordes, las tiras de papel respectivas se cortaron y se revelaron con reactivo c. Las bandas correspondientes a las tres fracciones: tetrametilglucosa, las tres trimetilglucosas, que se eluyeron juntas, y la dimetilglucosa, se eluyeron con agua (3 x 30 ml) con agitación, a temperatura ambiente, durante 1 h cada vez. El eluido se filtró por embudo de placa de vidrio y se concentró a presión reducida. Las tres fracciones se llevaron a volumen en matraces de 10 ml. El dosaje de azúcar reductor se realizó por el método descrito por Hirst y col. (1949).

TABLA 16

AZUCARES OBTENIDOS POR HIDROLISIS DEL POLISACARIDOMETILADO

Fracción	Peso (mg)	R <sub>f</sub> (a=solvente 10) (b=solvente 11, 5°C) (c=solvente 11)	Color con reactivo c	Contiene
1-6	30	0,78 ( a )	rosa	2,3,4,6-tetrametilglucosa
7-8	15	0,78 ( a )	rosa	tetra- y trimetilglucosa
		0,59 ( a )	amarilla	
9-11	35	0,59 ( a )	amarilla	2,3,4-tri-O-metilglucosa y
		0,52 ( a )	rosa	2,3,6-tri-O-metilglucosa
12-13	30	0,59-0,47 ( b )	amarilla	2,3,4-tri-O-metilglucosa,
		0,52-0,45 ( b )	rosa	2,3,6-tri-O-metilglucosa y
		0,43-0,32 ( b )	rosa	2,4,6-tri-O-metilglucosa
14-17	45	0,48 ( a )	rosa	2,4,6-tri-O-metilglucosa
18-22	25	0,50 ( a )	rosa	tri- y dimetilglucosa
		0,20 ( a )	marrón rojizo	
23-31	25	0,20 ( a )	marrón rojizo	2,4-di-O-metilglucosa
32-38	5	0,02 ( c )	rosa	ácido metilado

Soluciones necesarias

Iodo 0,1 N

Bicarbonato de sodio 0,2 M-carbonato de sodio 0,2 M (pH 10,6)

Ioduro de potasio 10%

Acido sulfúrico 2 N

Tiosulfato de sodio 0,01 N

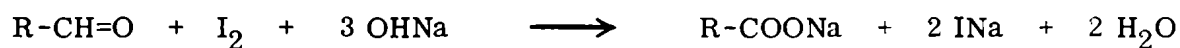
La solución de tiosulfato de sodio se valoró usando iodato ácido de potasio como droga patrón.

La solución de iodo se tituló con la solución de tiosulfato ya valorada.

Descripción del método

Se agregó 1 ml de la solución de iodo 0,1 N mediante una pipeta aforada a la solución del azúcar (menos de 2,5 mg) en 5 ml de agua. Se agregaron 2 ml de buffer carbonato de sodio-bicarbonato de sodio y se tapó el recipiente con un tapón de vidrio humedecido en ioduro de potasio al 10%. Se dejó 2-2,5 h en la oscuridad, se lavó cuidadosamente el tapón con agua destilada y se diluyó la solución a 25 ml. Se acidificó con ácido sulfúrico 2 N, tratando de evitar el desprendimiento fuerte de anhídrido carbónico y se tituló el iodo presente con la solución de tiosulfato de sodio.

La oxidación del azúcar se produce según:



De ahí resulta:

$$\text{mmoles de azúcar presente} = \frac{(a - b) \times N \times f}{2} \times \frac{10}{c}$$

donde:

a = ml de solución  $S_2O_3Na_2$  consumidos por la muestra

b = ml de solución de  $S_2O_3Na_2$  consumidos por el blanco

N = normalidad de la solución de  $S_2O_3Na_2$

f = factor de la solución de  $S_2O_3Na_2$

c = alícuota tomada

Los resultados obtenidos se encuentran en la Tabla 17.

TABLA 17

DETERMINACION CUANTITATIVA DE LOS AZUCARES OBTENIDOS  
POR HIDROLISIS DEL POLISACARIDO METILADO \*

Muestra	Alícuota tomada (ml)	$S_2O_3Na_2$ consumido (ml)	Diferencia con el blanco (ml)	Azúcar presente (moles $\times 10^{-5}$ ) (mg)	
Blanco	--	9,38	--	--	--
Tetrametilglucosa	1 ml	8,11	1,27	6,52	15
Trimetilglucosa	0,25 ml	8,11	1,27	26,0	52
Dimetilglucosa	1 ml	8,13	1,25	6,45	11

\* Los datos son promedio de cuatro determinaciones.

Los resultados obtenidos corresponden a una relación molar de tetrametil-tri-metil-dimetilglucosa de 1:4:1.

Determinación de la proporción de 2,4,6-tri-O-metil-D-glucosa, 2,3,4-tri-O-metil-D-glucosa y 2,3,6-tri-O-metil-D-glucosa

Una alícuota (9 ml) de la solución de productos trimetilados se redujo con 100 mg de borohidruro de sodio durante 4 h. Se destruyó el exceso de borohidruro de sodio por agregado de ácido acético glacial gota a gota hasta que no hubo más efervescencia. Se ajustó el pH a 7,5 con solución saturada de bicarbonato de sodio y se evaporó a presión reducida. El residuo se tomó con agua, se agregaron 4 ml de solución de periodato de sodio 0,1 M y se llevó a 10 ml en matraz aforado. La oxidación se realizó en ausencia de luz y a temperatura ambiente. Simultáneamente se realizó un blanco con un eluïdo de papel en las mismas condiciones que la muestra. Al cabo de 2, 5 y 6 h se tomaron alícuotas y se realizó la determinación del periodato consumido y del formaldehido producido según la técnica general descripta.

Determinación del consumo de periodato de sodio

Alícuotas de 1 ml se agregaron a una solución que contenía 10 ml de trióxido de arsénico 0,01 N, 2 ml de solución saturada de bicarbonato de sodio y 0,4 ml de solución de ioduro de potasio 20%. Se dejó 1 h en la oscuridad a temperatura ambiente y se tituló con solución de iodo 0,01 N,  $f=0,893$ .

Se consumieron  $0,62 \times 10^{-5}$  moles de periodato que corresponden a  $6,8 \times 10^{-5}$  moles de 2,3,4-tri-O-metil- y 2,3,6-tri-O-metilsorbitol en la fracción total de azúcares trimetilados (Tabla 18).

Determinación del formaldehido producido

Cuando el consumo de periodato llegó a un valor constante (4 h) se tomaron alícuo-

tas de 0,1 y 0,2 ml, a las que se agregaron 3 ml de arsenito de sodio 1 M y 4 ml de ácido sulfúrico 1 N. El volumen se llevó a 10 ml con agua en matraz aforado. Sobre 1 ml de la solución resultante se llevó a cabo la reacción con ácido cromotrópico.

Se realizó simultáneamente un blanco con un eluido de papel en las mismas condiciones, cuya absorbancia se restó a la de las muestras.

La determinación se llevó a cabo según la técnica general descrita.

La cantidad de formaldehído encontrada corresponde a  $6,4 \times 10^{-5}$  moles de 2,3,4-tri-O-metilsorbitol (Tabla 18).

Los resultados obtenidos (Tablas 17 y 18) indican que, sobre un total de  $26 \times 10^{-5}$  moles de trimetilglucosa,  $19,2 \times 10^{-5}$  moles corresponden a 2,4,6-tri-O-metilglucosa,  $6,4 \times 10^{-5}$  moles corresponden a 2,3,4-tri-O-metilglucosa y  $0,4 \times 10^{-5}$  moles a 2,3,6-tri-O-metilglucosa.

TABLA 18

OXIDACION CON PERIODATO DE LOS TRI-O-METILALDITOLESDeterminación del consumo de periodato

Tiempo ( h )	Solución de iodo necesaria (ml)*		Periodato consumido (mol x 10 <sup>-5</sup> )	2,3,4-tri-O-metil- y 2,3,6-tri-O-metilsorbitol (mol x 10 <sup>-5</sup> )
	Blanco	Muestra		
2	2,57	3,95	0,62	6,8
4	2,71	4,07	0,62	6,8
6	2,75	4,42	0,75	8,3

\* Promedio de dos determinaciones

Determinación del formaldehído producido

Muestra	Absorbancia	Formaldehído (mol/ml)	2,3,4-tri-O-metilsorbitol (mol x 10 <sup>-5</sup> )
Blanco	0,050	--	--
Testigo 1	0,100	0,050	--
Testigo 2	0,215	0,125	--
Testigo 3	0,405	0,250	--
Testigo 4	0,880	0,500	--
Alfc. 1 (0,1)	0,170	0,056	6,2
Alfc. 2 (0,1)	0,175	0,058	6,4
Alfc. 3 (0,2)	0,256	0,116	6,4
Alfc. 4 (0,2)	0,260	0,120	6,6



## ESTUDIOS DE ACETOLISIS

Se aplicó la técnica descrita por Matsuda y col. (1961) para la acetólisis de un dextrano, que está basada en la empleada por Hess y Dziengel (1935) para celulosa.

Se agregaron 2,3 g del polisacárido a una mezcla previamente enfriada de 11 ml de anhídrido acético, 8 ml de ácido acético glacial y 1,5 ml de ácido sulfúrico concentrado. Se dejó durante 7 días a temperatura ambiente, al cabo de los cuales se calentó a 80° durante 30 min. Se filtró y el filtrado se volcó sobre 500 ml de agua-hielo. El acetolizado se extrajo con cloroformo (5 x 100 ml), se lavó con solución saturada de bicarbonato de sodio y después con agua hasta neutralidad. Se secó con sulfato de sodio anhidro y se eliminó el solvente a presión reducida. Se obtuvieron 3,3 g de un jarabe de poder rotatorio  $[\alpha]_D^{20} +62,1^\circ$  (c 1,0, cloroformo). El acetolizado se disolvió en 20 ml de metanol y se agregaron 10 ml de metóxido de sodio 0,1 N. Se dejó a temperatura ambiente durante toda la noche. Se agregó agua para disolver el precipitado formado y se descationizó por agitación con resina Dowex 50 (H<sup>+</sup>). La solución se evaporó a presión reducida, obteniéndose 1,5 g de producto desacetilado, que se fraccionó en una columna de celulosa (60 x 5 cm) con solvente 13. Se obtuvieron las siguientes fracciones:

Fracciones 1-10: Esta fracción (15 mg) contenía una sustancia cromatográficamente idéntica a 5-(hidroximetil)-2-furaldehído, R<sub>g</sub> 3,77 (solvente 2) y R<sub>g</sub> 2,84 (solvente 1) y se reveló marrón con reactivo a, amarillo con reactivo c y rojo con reactivo d.

Fracciones 11-27: Esta fracción (65 mg) contenía como producto principal una sustancia de R<sub>g</sub> 1,70 (solvente 1), que se reveló marrón con reactivo a, amarillo con reactivo c y violeta con reactivo f.

Fracciones 28-34: (10 mg). Se detectó fructosa por cromatografía en papel.

Fracciones 35-45: Esta fracción (120 mg) contenía principalmente glucosa y en mucha menor proporción fructosa.

Fracciones 46-66: (780 mg) Glucosa

Fracciones 67-72: Esta fracción (20 mg) contenía glucosa y laminaribiosa,  $R_g$  0,63 (solvente 2) en cantidades iguales.

Fracciones 72-95: Esta fracción (90 mg) contenía laminaribiosa, que recristalizada de metanol-isopropanol dio p.f. y p.f. mezcla 192-193°,  $[\alpha]_D^{20}$  +17,8° (c 0,7, agua, en el equilibrio), lit. 11, p.f. 196-199°,  $[\alpha]_D^{20}$  +18,6° (agua, en el equilibrio). Se preparó la  $\beta$ -octa-O-acetil-laminaribiosa. El disacárido (20 mg) se disolvió en 0,5 ml de anhídrido acético por calentamiento. Se agregaron 30 mg de acetato de sodio anhidro y se calentó la mezcla en baño de agua durante 1,5 h. Se volcó sobre agua-hielo (10 ml), se extrajo el acetato con cloroformo, se lavó con solución de bicarbonato de sodio y luego agua hasta neutralidad. Se secó con sulfato de sodio anhidro y se evaporó a presión reducida. La  $\beta$ -octa-O-acetil-laminaribiosa se cristalizó de éter isopropílico, p.f. y p.f. mezcla 157-159°,  $[\alpha]_D^{20}$  -24,8° (c 0,5, cloroformo), lit. 11, p.f. 156-158°,  $[\alpha]_D^{20}$  -25,3° (cloroformo).

Fracciones 96-110: Esta fracción (35 mg) contenía una sustancia de  $R_g$  0,70 (solvente 1) y  $R_g$  0,75 (solvente 6), que se reveló marrón con reactivos a y c;  $[\alpha]_D^{20}$  +83,8° (30 min.)  $\longrightarrow$  +92,3° (c 0,5, agua, en el equilibrio).

Una muestra (3 mg) se reflujó con 5 ml de ácido sulfúrico 0,2 N durante 1 h. El hidrolizado se neutralizó con carbonato de bario y descationizó por agitación con resina

Dowex 50 ( $H^+$ ). Por cromatografía en papel, solventes 1 y 6, se observó glucosa y una mancha que presentaba las mismas características cromatográficas que el ácido D-araboascórbico. Para confirmar la presencia de este ácido en el hidrolizado se realizaron los siguientes ensayos cualitativos característicos del ácido ascórbico, que se llevaron a cabo simultáneamente con el disacárido original (resultado positivo), el hidrolizado (resultado positivo), glucosa (resultado negativo) y ácido D-araboascórbico (resultado positivo).

- a ) Reducción de ácido fosfomolibdico (Feigl, 1960): Una gota de la solución a ensayar se mezcló con una gota de una solución acuosa de ácido fosfomolibdico 5%. Al agregar 1 gota de amoníaco concentrado se observó coloración azul.
- b ) Reacción con nitroprusiato de sodio (Feigl, 1960): Una gota de la solución acuosa de la sustancia a ensayar se mezcló con una gota de solución de nitroprusiato de sodio 5% y una gota de solución de hidróxido de sodio 30%. Se observó coloración anaranjada, que por agregado de una gota de ácido acético glacial, cambió a verde.
- c ) Reducción de dióxido de manganeso (Feigl, 1960):

Reactivos:

- 1 ) Papel con dióxido de manganeso: 1 ml de solución de permanganato de potasio 0,2 N se diluyó a 1000 ml, se sumergió el papel de filtro durante 15 min. en esta solución y después se lo secó con una corriente de aire caliente.
- 2 ) Solución saturada de clorhidrato de bencidina, que se diluyó a la mitad en el momento de su uso.

Una gota de la solución a ensayar se colocó sobre el papel de filtro preparado según 1 ). Después de 2 min. se lo sumergió en la solución de clorhidrato de bencidina. En el caso del ácido D-araboascórbico, el disacárido y el hidrolizado del

mismo, se observó una mancha blanca sobre el papel azul.

Fracciones 111-117: El producto principal en esta fracción (ca. 10 mg) presentaba la misma movilidad que celobiosa;  $R_g$  0,64 (solvente 6) y  $R_g$  0,47 (solvente 2).

Fracciones 118-123: (10 mg). El producto principal presentaba  $R_g$  0,63 (solvente 1). Relacionando su movilidad con el número de unidades de glucosa presentes en la molécula, de acuerdo a los trabajos realizados por French y Wild (1953), se trataría de laminaritriosa. Se desarrollaron cromatogramas hasta el frente en solvente 1, obteniéndose los valores que figuran en la Tabla 19.

TABLA 19

RELACION ENTRE LA MOVILIDAD Y EL GRADO DE POLIMERIZACION

Sustancia	$R_f$	$\alpha' = R_f / 1 - R_f$
glucosa	0,38	0,61
laminaribiosa	0,31	0,44
isomaltosa	0,21	0,26
fracción 118-123	0,24	0,32

Se graficó  $\log \alpha'$  en función del número de unidades de hexosa presentes. El valor del  $\log \alpha'$  correspondiente a la fracción 118-123 caía en la recta que pasaba por los valores de glucosa y laminaribiosa, para 3 unidades.

Fracciones 124-150: Esta fracción (180 mg) contenía oligosacáridos mayores y daba positivas las reacciones ya descritas de reducción de ácido fosfomolibdico y de dióxido de manganeso, características de los ácidos ascórbicos. Por cromatografía en papel, las manchas

correspondientes al ácido se revelaban con mayor intensidad, por ser más reductoras, enmascarando las correspondientes a oligosacáridos. Pudieron separarse por cromatografía preparativa en papel Whatmann 3 MM (solvente 2), tres fracciones (A, B y C), que por su movilidad corresponderían a penta, hepta y octasacáridos de glucosa con uniones  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)-.

Se desarrollaron cromatogramas hasta el frente con el solvente 1, obteniéndose los valores que figuran en la Tabla 20 (Figura 26).

TABLA 20

RELACION ENTRE LA MOVILIDAD Y EL GRADO DE POLIMERIZACION

Sustancia	$R_f$	$\alpha' = R_f / 1 - R_f$
glucosa	0,35	0,54
laminaribiosa	0,28	0,40
isomaltosa	0,18	0,22
fracción A	0,14	0,16
fracción B	0,09	0,09
fracción C	0,07	0,07

Las fracciones se hidrolizaron con ácido sulfúrico 0,2 N a reflujo durante media hora. El hidrolizado se neutralizó con carbonato de bario y se descationizó por agitación con resina Dowex 50 ( $H^+$ ). Por cromatografía en papel se observó como producto principal glucosa (solventes 1 y 6). No se observó isomaltosa y en el hidrolizado de la fracción B se observaron trazas de laminaribiosa.

ESTUDIOS SOBRE EL POLISACARIDO DEGRADADO OBTENIDO  
EN LA HIDROLISIS CON ACIDO SULFURICO 0,05 N

En la hidrólisis realizada con ácido sulfúrico 0,05 N, se separó por centrifugación el polisacárido degradado insoluble,  $[\alpha]_D^{20} +13,5^\circ$  (c 1,0, KOH 1 N).

Determinación del grado de polimerización

La determinación se realizó según el método descripto por Unrau y Smith (1957).

El polisacárido degradado (29,4 mg) se suspendió en 10 ml de agua y se redujo con borohidruro de sodio durante 20 h. Después de destruir el borohidruro, se oxidó con 25 mg de metaperiodato de sodio durante 4 días a temperatura ambiente. Se destruyó el oxidante por agregado de 7,5 ml de ácido sulfúrico 1 N y 2,5 ml de arsenito de sodio 1 M. La mezcla (28 ml) se dializó contra igual volumen de agua destilada en un sistema cerrado durante 24 h. Se tomaron alícuotas del dializado (1 ml) y se determinó el formaldehído producido con ácido cromotrópico por el método general descripto. Los datos obtenidos pueden observarse en la Tabla 21. Todas las determinaciones se efectuaron por duplicado.

Se determinaron 2,9  $\mu$ mol de formaldehído, lo que significa que el peso molecular sería de 20.200 si la unidad terminal estuviera unida a través de O-3 y, por lo tanto 1 mol de polisacárido originaría 2 moles de formaldehído, ó 10.100 si la unidad terminal estuviera unida a través del O-6 y que por lo tanto, 1 mol de polisacárido originaría 1 mol de formaldehído.

El grado de polimerización resulta entonces 124 ó 62, según la unidad terminal esté unida al O-3 ó al O-6.

TABLA 21

DETERMINACION DEL GRADO DE POLIMERIZACION DEL  
POLISACARIDO DEGRADADO

Muestra	Trasmitancia ( $\lambda = 570 \text{ m}\mu$ )	Formaldehido ( $\mu\text{mol/ml}$ )
Testigo 1	15%	0,500
Testigo 2	38%	0,250
Testigo 3	62%	0,125
Testigo 4	85%	0,050
Testigo 5	93%	0,025
Polisacárido degradado	81%	0,055
Polisacárido degradado	83%	0,050

Hidrólisis ácida total

El polisacárido degradado (50 mg) se hidrolizó con 5 ml de ácido sulfúrico 1 N en un tubo cerrado a  $110^{\circ}$  durante 16 h. El hidrolizado se neutralizó con hidróxido de bario-carbonato de bario y se descationizó por agitación con Dowex 50 ( $\text{H}^{+}$ ). Por cromatografía en papel (solventes 1, 2 y 4) se observó glucosa como componente principal. Pudieron detectarse trazas de 5-(hidroximetil)-2-furaldehído y de fructosa, que fueron reveladas con reactivos a, b y d.

Oxidación con periodato

El polisacárido degradado (25 mg) se suspendió en 10 ml de agua y se agregaron

10 ml de solución de periodato de sodio 0,1 M. La mezcla de oxidación se dejó en la oscuridad a 5° durante 10 días con agitación esporádica. El exceso de oxidante se destruyó con 1 ml de etilén glicol y se dializó durante 2 días. El polialdehído se redujo con 50 mg de borohidruro de sodio y el polialcohol obtenido se reflujo con ácido sulfúrico 1 N durante 5 h. La cromatografía en papel (solventes 1, 2 y 6) mostró glucosa como producto principal y trazas de glicerol.

### Acetólisis

El polisacárido degradado (1 g) se agregó en pequeñas porciones a una mezcla de 6 ml de anhídrido acético, 6 ml de ácido acético glacial y 0,6 ml de ácido sulfúrico concentrado, enfriando exteriormente con un baño de hielo, según el procedimiento descrito por Wolfrom y col. (1951, b). La mezcla se agitó durante 3 días a temperatura ambiente y después se calentó en baño de agua a 80° durante 15 min. Se volcó sobre una mezcla de agua-hielo (100 ml) y se extrajo con cloroformo (3 x 70 ml). El extracto clorofórmico se lavó sucesivamente con solución saturada de bicarbonato de sodio y agua hasta neutralidad; se secó sobre sulfato de sodio anhidro y se llevó a seco obteniéndose 1,4 g de un producto de  $[\alpha]_D^{20} +33,7^\circ$  (c 1,0, cloroformo).

Se disolvió en 19 ml de metanol, se agregó 1 ml de solución de metóxido de sodio 1 N y se dejó a temperatura ambiente durante toda la noche. Se agregó agua para disolver el precipitado formado, se descationizó por agitación con resina Dowex 50 (H<sup>+</sup>) y se evaporó a presión reducida. Por cromatografía en papel (solventes 1 y 6) se observaron: fructosa, glucosa, laminaribiosa, celobiosa y oligosacáridos mayores.

Se llevó a cabo una cromatografía preparativa de 0,5 g de la mezcla de azúcares en papel Whatmann 3 MM (solvente 6). Se obtuvieron las siguientes fracciones:



- ( a ) Fructosa (15 mg)
- ( b ) Glucosa (150 mg)
- ( c ) Laminaribiosa (60 mg),  $R_g$  0,63 (solvente 2) y  $R_g$  0,80 (solvente 6),  $[\alpha]_D^{20} +14^\circ$   
(c 0,8, agua)
- ( d ) Celobiosa (10 mg),  $R_g$  0,47 (solvente 2),  $[\alpha]_D^{20} +33,8^\circ$  (c 0,8, agua)
- ( e ) Laminaritriosa (40 mg),  $R_f$  0,20 (solvente 1),  $[\alpha]_D^{20} +1,1^\circ$  (c 0,4, agua). Peat y col. (1958) informaron para laminaritriosa  $R_f$  0,20 (solvente 1),  $[\alpha]_D^{20} +2,4^\circ$  (agua). Se preparó la  $\beta$ -hendeca-O-acetil-laminaritriosa a partir de 20 mg del azúcar por la técnica descrita para la acetilación de laminaribiosa. El producto obtenido se corrió en placa (solvente 15) y se reveló con iodo,  $R_f$  0,16. Por re-cristalización de etanol se obtuvo un producto de p.f. 108-110°, lit.140,  $\beta$ -hendeca-O-acetil-laminaritriosa, p.f. 120-121°.
- ( f ) Se trataría de un trisacárido de fructosa (25 mg),  $[\alpha]_D^{20} +35,4^\circ$  (c 0,5, agua). Se hidrolizó por calentamiento con ácido sulfúrico 0,2 N durante media hora a reflujo. El hidrolizado se trató como siempre y por cromatografía en papel (solventes 1 y 6) se observaron manchas correspondientes a fructosa, glucosa y laminaribiosa (trazas). No se observó ninguna mancha de movilidad igual a isomaltosa.
- ( g ) Oligosacáridos mayores (140 mg). Esta fracción se recromatografió en papel Whatmann 3 MM (solvente 2), durante 70 h, con lo que se pudieron separar las tres fracciones de mayor movilidad (1, 2 y 3), que corresponderían según la regla de French a tetra-, penta- y hexasacáridos de glucosa con unión  $\beta$ -(1→3)-.
- Se desarrollaron cromatogramas hasta el frente en solvente 1, obteniéndose los valores de la Tabla 22 (Figura 27).

TABLA 22  
RELACION ENTRE LA MOVILIDAD Y EL GRADO  
DE POLIMERIZACION

Sustancia	$R_f$	$\alpha' = R_f / 1 - R_f$
Glucosa	0,36	0,56
Laminaribiosa	0,29	0,41
Isomaltosa	0,18	0,22
Fracción 1	0,19	0,23
Fracción 2	0,14	0,16
Fracción 3	0,11	0,12

## RESUMEN

El presente trabajo tuvo por objeto el estudio de la estructura de un polisacárido aislado de estromas de Cyttaria harioti Fischer. En él se presentan:

- 1 ) Una descripción de los hongos del género Cyttaria: su ubicación geográfica, clasificación sistemática y caracteres morfológicos. Se detallan los trabajos químicos realizados sobre Cyttaria harioti Fischer, que es la única especie que ha sido estudiada.
- 2 ) Un resumen de los principales métodos empleados en la determinación de estructuras de polisacáridos y del tipo de información que ellos aportan. En particular, se discuten: a) aislamiento y purificación; b) determinación de pesos moleculares; c) identificación de los azúcares componentes; d) estudios de hidrólisis; e) estudios de acetólisis; f) oxidación con periodato; g) estudios de metilación.
- 3 ) Las características estructurales de los polisacáridos aislados de hongos, en particular de los glucanos; su aplicación en taxonomía química y su actividad biológica.
- 4 ) La relación del ácido D-arabino-hexulosónico con los ácidos ascórbicos; los métodos de síntesis del primero, propiedades y distribución.
- 5 ) Una descripción detallada de los métodos estructurales empleados en la elucidación de la estructura del polisacárido aislado de Cyttaria harioti Fischer y la interpretación y discusión de los resultados obtenidos, que permiten postular una unidad repetitiva.

El polisacárido se aisló de un extracto acuoso de estromas de Cyttaria hariato F., por precipitación con etanol hasta una concentración del 50%. Se purificó por redisolución en agua y reprecipitación con etanol hasta que su poder rotatorio permaneció constante,  $[\alpha]_D +95,8^\circ$  (KOH 1 N). El polisacárido así obtenido daba un solo pico por ultracentrifugación y, dado que precipitaba en un rango estrecho de concentración etanólica, se consideró homogéneo para su estudio.

Se encontraron como componentes del polisacárido D-glucosa, ácido D-arabino-hexulosónico y D-fructosa en la relación molar 98:6:1. La presencia del cetoácido es rara en productos naturales. Esta es la primera vez que se aisló como componente de un polisacárido de hongo.

El grado de polimerización, dio un valor de 230, considerando que la unidad terminal está unida a través de su O-3.

Los estudios de oxidación con periodato, reducción e hidrólisis indican una relación molar de glucosa, glicerol, eritritol (12:6:1), lo que sugiere la presencia de uniones (1→3)-, (1→6)- y (1→4)-. La ausencia de glucosil-glicerol en la degradación del polialcohol por el método de Smith, indica que no hay uniones (1→3)- y (1→6)- alternadas. El ácido D-arabino-hexulosónico no se ataca en la oxidación y, por lo tanto, no es una unidad terminal y su unión debería ser a través de su O-3 ú O-4.

Por metilación, hidrólisis del polisacárido metilado y separación de los éteres metílicos monoméricos, se identificaron: 2,3,4,6-tetra-O-metil-D-glucosa (unidades terminales); 2,4,6-tri-O-metil-D-glucosa (unión (1→3)-); 2,3,4-tri-O-metil-D-glucosa (unión (1→6)-) y 2,4-di-O-metil-D-glucosa (ramificaciones en O-3 y O-6). Se detectó cromatográficamente 2,3,6-tri-O-metil-D-glucosa (unión (1→4)-) y se aisló un derivado metilado del ácido D-arabino-hexulosónico. Las determinaciones cuantitativas indican

una estructura ramificada, ya que la proporción molar de tetra-O-metil-, tri-O-metil-, di-O-metil-glucosa es 1:4:1. La unión (1→3)- es la que predomina en el polisacárido pues la proporción molar de 2,4,6-tri-O-metil- (unión (1→3)-); 2,3,4-tri-O-metil- (unión (1→6)-); 2,3,6-tri-O-metil-glucosa (unión (1→4)-) es de 36:12:1. Los resultados obtenidos por metilación concuerdan con los de oxidación con periodato.

Por hidrólisis ácida parcial se aislaron y caracterizaron laminaribiosa (3-O-β -D-Glp-D-Glp), celobiosa (4-O-β -D-Glp-D-Glp), isomaltosa (6-O-α -D-Glp-D-Glp) y un trisacárido que sería 3-O-β -isomaltosil-glucosa (O-α -D-Glp-(1→6)-O-β -D-Glp-(1→3)-D-Glp), probando que la configuración de las uniones es α-(1→6)-, β-(1→3)- y β(1→4)-.

Por acetólisis del polisacárido y posterior desacetilación de la mezcla de acetatos se aislaron y caracterizaron laminaribiosa, laminaritriosa y se detectaron, por cromatografía en papel, oligosacáridos mayores de glucosa con unión β-(1→3)-, que cumplan la relación de French, hasta un grado de polimerización de 8. Se aisló un disacárido de ácido D-araboascórbico y glucosa, que se originaría por isomerización en el medio alcalino de desacetilación de un disacárido del ácido D-arabino-hexulosónico, que confirma que la unión glicosídica al ácido es (1→4)- y cuyo poder rotatorio,  $[\alpha]_D +92,3^\circ$  indica que dicha unión tendría la configuración α.

Los estudios estructurales realizados sobre el polisacárido degradado ( $[\alpha]_D +13,5^\circ$  (KOH)), obtenido por hidrólisis con ácido sulfúrico 0,05 N, indican una cadena de glucosa unida β-(1→3)-, con algunas ramificaciones en O-6, cuya unidad terminal reductora sería una molécula de D-fructosa. Algunas de las ramificaciones comenzarían con una unidad de ácido D-arabino-hexulosónico.

Se postula una posible unidad repetitiva para el polisacárido (XX) consistente con los resultados experimentales obtenidos.

BIBLIOGRAFIA

1. - Abbot D. y Weigel H. , J. Chem. Soc. , C, 816 (1966)
2. - Abdel-Akher M. y Smith F. , J. Am. Chem. Soc. , 73, 5859 (1951, a)
3. - Abdel-Akher M. y Smith F. , J. Am. Chem. Soc. , 73, 994 (1951, b)
4. - Adams G. A. y Bishop C. T. , Can. J. Chem. , 38, 2380 (1960)
5. - Alberheim P. , Nevins D. J. , English P. D. y Karr A. , Carbohyd. Res. , 5,  
340 (1967)
6. - Anderson D. M. W. y Cree G. M. , Carbohyd. Res. , 2, 162 (1966)
7. - Anderson D. M. W. , Dea I. C. M. , Maggs P. A. y Munro A. C. , Carbohyd.  
Res. , 5, 489 (1967)
8. - Antonopoulus E. , Borelius E. , Gardell S. , Hannström B. y Scott J. E. , Biochim.  
Biophys. Acta, 54, 213 (1961)
9. - Aspinall G. O. y Ferrier R. J. , Chem. & Ind. (London), 1216 (1957)
10. - Axelsson K. , Björndal H. y Eriksson E. , Acta Chem. Scand. , 22, 1363 (1968)
11. - Bächli P. y Percival E. G. V. , J. Chem. Soc. , 1243 (1952)
12. - Baird D. K. , Haworth W. N. , Herbert R. W. , Hirst E. L. , Smith F. y Stacey M. ,  
J. Chem. Soc. , 63 (1934)
13. - Ballio A. , Di Vittorio V. y Russi S. , Arch. Biochem. Biophys. , 107, 177 (1964)
14. - Barker S. A. , Bourne E. J. y Stacey M. , J. Chem. Soc. , 3084 (1953)
15. - Barker S. A. , Bourne E. J. , Stacey M. y Whiffen D. H. , J. Chem. Soc. , 171 (1954)
16. - Barker S. A. , Bourne E. J. , O'Mant D. M. y Stacey M. , J. Chem. Soc. , 2448 (1957)
17. - Barker S. A. , Foster A. B. , Siddiqui I. R. y Stacey M. , Talanta, 1, 216 (1958)
18. - Barker S. A. , Gómez-Sánchez A. y Stacey M. , J. Chem. Soc. , 3264 (1959)
19. - Barker S. A. , Somers P. J. , Stacey M. y Horton J. W. , Carbohyd. Res. , 1,  
106 (1965)

20. - Barker S. A. y Young N. M., *Carbohyd. Res.*, 3, 49, 323 (1966)
21. - Barker S. A., Hopton J. W., Somers P. J. y Repas A., *Carbohyd. Res.*, 3, 230 (1966)
22. - Barker S. A., Basarab O. y Cruickshank C. N. D., *Carbohyd. Res.*, 3, 325 (1967)
23. - Barker S. A., Kennedy J. F. y Somers P. J., *Carbohyd. Res.*, 8, 482 (1968)
24. - BeMiller J. N. y Smith D. R., *Carbohyd. Res.*, 6, 118 (1968)
25. - Bender H., Lehman J. y Wallenfels K., *Biochim. Biophys. Acta*, 36, 309 (1959)
26. - Bhanavandan V. P., Bouveng H. O. y Lindberg B., *Acta Chem. Scand.*, 18, 504 (1964)
27. - Bishop C. T. y Whitaker D. R., *Chem. & Ind. (London)*, 119 (1955)
28. - Bishop C. T., Perry M. B., Blank F. y Cooper F. P., *Can. J. Chem.*, 43, 30 (1965); Bishop C. T., Perry M. B., Hulyalkar R. K. y Blank F., *Can. J. Chem.*, 44, 2291, 2299 (1966)
29. - Björndal H., Lindberg B. y Svensson S., *Acta Chem. Scand.*, 21, 1801 (1967); *Carbohyd. Res.*, 5, 433 (1967)
30. - Björndal H. y Lindberg B., *Carbohyd. Res.*, 10, 79 (1969)
31. - Björndal H. y Lindberg B., *Carbohyd. Res.*, 12, 29 (1970)
32. - Blouin F. A. y Arthur J. C., Jr., *J. Chem. Eng. Data*, 5, 470 (1960)
33. - Bobbit J. M., *Advan. Carbohyd. Chem.*, 11, 1 (1956)
34. - Bonner T. G., Bourne E. J. y McNally S., *J. Chem. Soc.*, 2929 (1960)
35. - Bouveng H. O., Kiessling H., Lindberg B. y McKay J., *Acta Chem. Scand.*, 16, 615 (1962); 17, 1351 (1963)
36. - Bowness J. M., *Arch. Biochem. Biophys.*, 91, 86 (1960)
37. - Buck K. W. y Obaidah M. A., *Biochem. J.*, 125, 461, 473 (1971)

38. - Cheetham N. W. H. , y McIlroy R. J. , Carbohyd. Res. , 11, 187 (1969)
39. - Chizau O. Z. , Molodtzou N. V. y Kochetkov N. K. , Carbohyd. Res. , 4,  
273 (1967)
40. - Christersen G. M. y Smith F. , J. Am. Chem. Soc. , 79, 4492 (1957)
41. - Chrzaszcs T. y Tinkow D. , Biochem. Z. , 207, 39 (1927)
42. - Clutterbuck P. W. , Haworth W. N. , Raistrick H. , Smith G. y Stacey M. ,  
29, 612 (1935)
43. - Corey E. J. y Chaykovsky M. , J. Am. Chem. Soc. , 87, 1345 (1965)
44. - Croon J. , Herrström G. , Kull G. y Lindberg B. , Acta Chem. Scand. , 14,  
1338 (1960)
45. - Dickey E. E. y Wolfrom M. L. , J. Am. Chem. Soc. , 71, 825 (1949)
46. - Dische Z. , J. Biol. Chem. , 167, 189 (1947)
47. - Dox A. W. y Neidig R. E. , J. Biol. Chem. , 18, 167 (1914)
48. - Dox A. W. , J. Biol. Chem. , 20, 83 (1915)
49. - Dutton G. G. S. , Gibney K. B. , Jensen G. B. y Reid P. E. , J. Chromat. ,  
36, 152 (1968)
50. - Eeegrive E. , Z. Anal. Chem. , 100, 34 (1935)
51. - Eeegrive E. , Z. Anal. Chem. , 110, 22 (1937)
52. - Erskine A. J. y Jones J. K. N. , Can. J. Chem. , 34, 821 (1956)
53. - Falconer E. J. y Adams G. A. , Can. J. Chem. , 34, 338 (1956)
54. - Fear C. M. y Menzies R. C. , J. Chem. Soc. , 937 (1926)
55. - Feigl F. , "Spot Tests in Organic Analisis", p. 128, 236, 405, Elsevier Publishing  
Company, (1960)
56. - Fischer E. , Bot. Zeit. , 46, 813 (1888)



57. - Fleury P. y Lange J., *J. Pharm. Chim.*, 17, 107, 196 (1933)
58. - Fraser R. N. y Lindberg B., *Carbohyd. Res.*, 4, 12 (1967)
59. - French D. y Wild G. M., *J. Am. Chem. Soc.*, 75, 2612 (1953)
60. - Freudenberg K., Kuhn W., Dürr W., Boltz F. y Steinbrunn G., *Ber.*, 63, 1510 (1930)
61. - Freudenberg K. y Blomqvist G., *Ber.*, 68, 2070 (1935)
62. - Gahan L., Sandford P. A. y Conrad H. E., *Biochem.*, 6, 2755 (1966)
63. - Gamundí I. J., *Darwiniana*, 16, 461 (1971)
64. - Gancedo J. M., Gancedo C. y Asensio C., *Biochem. Z.*, 346, 328 (1966)
65. - Gardell S., *Acta Chem. Scand.*, 11, 668 (1957)
66. - Goldstein I. J. y Whelan W. J., *J. Chem. Soc.*, 170 (1962)
67. - Gorin P. A. J., Spencer J. F. T. y Mackenzie S. L., *Can.J. Chem.*, 44, 2087 (1966)
68. - Gorin P. A. J. y Spencer J. F. T., *Advan. Carbohyd. Chem.*, 23, 367 (1968)
69. - Gorin P. A. J., Spencer J. F. T. y Bhattacharjee S. S., *Can. J. Chem.*, 47, 1499 (1969)
70. - Grimmet M. R., Bailey R. W. y Richards E. L., *Chem. & Ind. (London)*, 651 (1965)
71. - Hägglund E., Lindberg B. y McPherson J., *Acta Chem. Scand.*, 10, 1160 (1956)
72. - Hamilton J. K. y Kircher H. W., *J. Am. Chem. Soc.*, 80, 4703 (1958)
73. - Hamuro J., Yamashita Y., Ohsada J. y Maeda Y. Y., *Nature*, 233, 486 (1971)
74. - Harada T., Misaki A. y Saito H., *Arch. Biochem. Biophys.*, 124, 292 (1968)
75. - Haworth W. N., *J. Chem. Soc.*, 107, 8 (1915)
76. - Haworth W. N. y Hirst E. L., *J. Chem. Soc.*, 2615 (1930)

77. - Haworth W. N., Raistrick H. y Stacey M., *Biochem. J.*, 31, 640 (1937)
78. - Hedgley E. J., y Overend W. G., *Chem. & Ind. (London)*, 378 (1960)
79. - Hehre E. J., Carlsson A. S. y Hamilton D. M., *J. Biol. Chem.*, 177, 289 (1949)
80. - Hess K. y Dziengel K., *Ber.*, 68, 1594 (1935)
81. - Hirst E. L., Hough L. y Jones J. K. N., *J. Chem. Soc.*, 928 (1949, a)
82. - Hirst E. L., Hough L. y Jones J. K. N., *Nature*, 163, 177 (1949, b)
83. - Hocevar B. J., y Northcote D. H., *Nature*, 179, 488 (1957)
84. - Hoffmann G. C., Simson B. W. y Timell T. E., *Carbohydr. Res.*, 20, 185 (1971)
85. - Hough L., Jones J. K. N. y Wadman W. H., *J. Chem. Soc.*, 1702 (1950)
86. - Hough L. y Perry M. B., *Biochem. J.*, 51, viii-ix (1955)
87. - Hough L. y Perry M. B., *J. Chem. Soc.*, 2801 (1962)
88. - Ikekawa Y., Vehara N., Maeda Y., Nakanishi N. y Fukuoka F., *Cancer Res.*,  
29, 734 (1969)
89. - Irvine J. C. y Oldham J. W. H., *J. Chem. Soc.*, 119, 1744 (1921)
90. - Isbell H. S., *Science*, 113, 532 (1951)
91. - Jackson E. L., "Organic Reactions", 2, p. 341, John Wiley & Sons, New York (1944)
92. - Jeanloz R. W., *Helv. Chim. Acta*, 27, 1501 (1944)
93. - Jeanloz R. W., *Methods Carbohydr. Chem.*, 5, 114 (1965)
94. - Johnson J., Jr., Kirkwood S., Misaki A., Nelson T. E., Scaletti J. V. y Smith F.,  
*Chem. & Ind. (London)*, 820 (1963)
95. - Johnston I. R., *Biochem. J.*, 96, 651, 659 (1965)
96. - Jones J. K. N. y Nicholson W. H., *J. Chem. Soc.*, 27 (1958)
97. - Jones J. K. N. y Stoodley R. J., *Methods Carbohydr. Chem.*, 5, 36 (1965)
98. - Jones R. W., Dimler R. J. y Rist C. E., *J. Am. Chem. Soc.*, 77, 1659 (1955)

99. - Juni E. y Heym G. , Anal. Biochem. , 4, 143 (1962)
100. - Kärkkäinen J. , Carbohyd. Res. , 14, 27 (1970)
101. - Kärkkäinen J. , Carbohyd. Res. , 17, 1 (1971)
102. - Kaustinen H. M. , Kaustinen O. A. y Swenson H. A. , Carbohyd. Res. , 11,  
267 (1969)
103. - Kaye M. A. G. y Kent P. W. , J. Chem. Soc. , 79 (1953)
104. - Kieckebusch W. y Lang K. , Z. Ernaehrungswiss. , 3, 57 (1962); Chem. Abstr. ,  
58: 3718g (1962)
105. - Kochetkov N. K. , Chizhov O. S. , y Sviridov A. F. , Carbohyd. Res. , 4, 362 (1967)
106. - Kuhn R. , Trischmann H. y Löw I. , Angew. Chem. , 67, 32 (1955)
107. - Kuhn R. , Baer H. H. y Seeliger A. , Ann. , 611, 236 (1958)
108. - Kuhn W. , Ber. , 63, 1503 (1930)
109. - Lanning M. C. y Cohen S. S. , J. Biol. Chem. , 189, 109 (1951)
110. - Lederkremer R. M. de y Ranalli M. E. , Anales Asoc. Quím. Argentina, 55,  
199 (1967)
111. - Lee Y. Ch. y Ballou C. E. , Biochem. , 4, 257 (1967)
112. - Lindberg B. y Wickberg B., Acta Chem. Scand. , 8, 569 (1954)
113. - Lockwood L. B. , Tabenkin B. y Ward G. E. , J. Bacteriol. , 42, 51 (1951)
114. - Loewenberg J. R. y Reese E. T. , Can. J. Microbiol. , 3, 643 (1957)
115. - MacFadyen D. A. , J. Biol. Chem. , 158, 107 (1945)
116. - Malaprade L. , Compt. Rend. , 186, 382 (1928)
117. - Manners D. J. y Khin Maung, J. Chem. Soc. , 867 (1955)
118. - Markowitz A. S. y Henderson J. R. , Nature, 181, 771 (1958)
119. - Matsuda K. , Watanabe H. , Fujimoto K. y Aso K. , Nature, 191, 278 (1961):  
Matsuda K. , Watanabe H. y Aso K. , Tohoku J. Agricult. Res. , 12, 351 (1961)

120. - Maurer K. y Schiedt B. , Ber. , 66 B, 1054 (1933)
121. - McCready R. M. , Swensen H. A. , y Maclay W. D. , Ind. Eng. Chem. Anal. ,  
18, 290 (1946)
122. - Mc Innes A. G. , Ball D. H. , Copper F. P. y Bishop C. T. , J. Chromatog. ,  
1, 556 (1958)
123. - Meier H. , Acta Chem. Scand. , 12, 144 (1958)
124. - Misaki A. y Kanamaru S. , Agr. Biol. Chem. , 32, 432 (1968)
125. - Misaki A. , Johnson J. , Jr. , Kirkwood S. , Scaletti J. V. y Smith F. , Carbohyd.  
Res. , 6, 150 (1968)
126. - Nelson J. y Beegle F. , J. Am. Chem. Soc. , 41, 559 (1919)
127. - Neuberg C. y Kitasato T. , Biochem. Z. , 183, 485 (1927)
128. - Neukom H. , Deuel H. , Heri W. J. y Kündig W. , Helv. Chim. Acta , 43, 64 (1960)
129. - Niederpruem D. J. y Hunt S. , Amer. J. Bot. , 54, 241 (1967)
130. - Nordin P. , Arch. Biochem. Biophys. , 99, 101 (1962)
131. - Northcote D. H. , Biochem. J. , 53, 348 (1953)
132. - Northcote D. H. , Biochem. J. , 58, 353 (1954)
133. - Ohle H. , Ber. , 58, 2577 (1925)
134. - Ohle H. y Wolter R. , Ber. , 63 B, 843 (1930)
135. - Ohle H. , Ber. , 67 B, 155 (1934)
136. - Ohle H. , Erlbach H. y Carls H. , Ber. , 67 B, 324 (1934)
137. - Otting W. , Ann. , 640, 44 (1961)
138. - Painter T. J. , Can. J. Chem. , 37, 497 (1959)
139. - Peat S. , Whelan W. J. y Lawley H. G. , J. Chem. Soc. , 724, 729 (1958)
140. - Percival E. , Carbohyd. Res. , 4, 441 (1967)

141. - Perlin A. S. y Taber W. A., *Can. J. Chem.*, 41, 2278 (1963)
142. - Perry M. B. y Hulyalkar R. K., *Can. J. Biochem.*, 43, 573 (1965)
143. - Phillips G. O. y Moody G. J., *J. Chem. Soc.*, 754 (1960)
144. - Porath J., *Biochem. Biophys. Acta*, 22 151 (1956)
145. - Porath J. y Flodin P., *Nature*, 183, 1657 (1959)
146. - Prentice N., Cuendet L. S., Geddes W. F. y Smith F., *J. Am. Chem. Soc.*, 81, 684 (1959)
147. - Purdie T. e Irvine J. C., *J. Chem. Soc.*, 83, 102 (1903)
148. - Rankin J. C. y Jeanes A., *J. Am. Chem. Soc.*, 76, 4435 (1954)
149. - Rena P. P. y Caldwell B. P., *J. Am. Chem. Soc.*, 66, 243 (1944)
150. - Richtmyer N. K., *J. Am. Chem. Soc.*, 61, 1831 (1939)
151. - Rosenthal A. J., *J. Polymer Sci.*, 51, 111 (1961)
152. - Sandford P. A. y Conrad H. E., *Biochem.*, 5, 1508 (1966)
153. - Santesson R., *Sv. Bot. Tidskrift*, 39, 319 (1945)
154. - Schaw P. E., Tatum J. H. y Berry R. E., *Carbohydr. Res.*, 5, 266 (1967)
155. - Schmidt G. C., Fischer C. y McOwen J. M., *J. Pharm. Sci.*, 52, 468 (1963)
156. - Scott J. E., *Chem. & Ind. (London)*, 168 (1955)
157. - Serdki M. E. y Wickerham L. J., *J. Gen. Microbiol.*, 42, 381 (1966)
158. - Sevag M. G., *Biochem. Z.*, 273, 419 (1934)
159. - Shibata S., Nishikawa Y., Takeda T. y Tamaka M., *Chem. Pharm. Bull.* (Japón), 16, 2362 (1968)
160. - Smith F. y Montgomery R., "Chemistry of Plant Gums and Mucilages", Reinhold Publishing Corp., New York, N. Y., p. 372 (1959)
161. - Smith F. y Srivastava H. C., *J. Am. Chem. Soc.*, 78, 1404 (1956)

162. - Srivastava H. S. , Singh P. P. , Harshe S. N. y Virk K. , Tetrahedron Letters, 493 (1964)
163. - Stephen A. M. y de Bruyn D. C. , Carbohydr. Res. , 5, 526 (1967)
164. - Sweeley C. C. y Walker B. , Anal. Chem. , 36, 1461 (1964)
165. - Tate M. E. y Bishop C. T. , Canad. J. Chem. , 40, 1043 (1962)
166. - Timell T. E. , Chem. & Ind. (London), 999 (1959)
167. - Trevelyan M. E. , Procter D. P. y Harrison J. S. , Nature, 166, 444 (1950)
168. - Unrau A. M. y Smith F. , Chem. & Ind. (London), 330 (1957)
169. - Van Cleve J. W . y Schaeffer W. C. , J. Am. Chem. Soc. , 77, 5341 (1955)
170. - Van Cleve J. W. , Schaeffer W. C. y Rist C. E. , J. Am. Chem. Soc. , 78, 4435 (1956)
171. - Villa L. y Agostoni A. , Experientia, 25, 1300 (1969)
172. - Wallenfels K. , Bender H. , Keilich G. y Bechtler G. , Angew. Chem. , 73, 245 (1961)
173. - Wallenfels K. , Bechtler G. , Kuhn R. , Trischmann H. y Edge H. , Angew. Chem., 21, 1014 (1963)
174. - Weigand F. , Perkom W. y Kuhner P. , Ber. , 84, 594 (1951)
175. - Whelan W. J. y Morgan K. , Chem. & Ind. (London), 78 (1954)
176. - Whistler R. L. y Stein J. Z. , J. Am. Chem. Soc. , 73, 4187 (1951)
177. - Whistler R. L. y BeMiller J. N. , J. Am. Chem. Soc. , 78, 163 (1956)
178. - Whistler R. L. y Wolfrom M. L. , Methods Carbohydr. Chem. , 2, 127 (1963, a)
179. - Whistler R. L. y Wolfrom M. L. , Methods Carbohydr. Chem. , 2, 421 (1963, b)
180. - Whistler R. L. y Wolfrom M. L. , Methods Carbohydr. Chem. , 2, 214 (1963, c)
181. - Wickerham L. J. y Burton K. A. , Bacteriol. Rev. , 26, 382 (1962)

182. - Wiernik M. , Anales Asoc. Quím. Argentina, 50, 347 (1962)
183. - Wilkie K. C. B. , Jones J. K. N. , Excell B. J. y Semple R. E. , Can. J. Chem. , 35, 795 (1957)
184. - Wilson C. M. , Anal. Chem. , 31, 1199 (1959)
185. - Wolfrom M. L. , Georges L. W. y Miller I. L. , J. Am. Chem. Soc. , 71, 125 (1949)
186. - Wolfrom M. L. , Lassetre E. N. y O'Neill A. N. , J. Am. Chem. Soc. , 73, 595 (1951, a)
187. - Wolfrom M. L. , Tyree J. T. , Galkowski T. T. y O'Neill A. N. , J. Am. Chem. Soc. , 73, 4527 (1951, b)
188. - Wolfrom M. L. y Thompson A. , Methods Carbohyd. Chem. , 3, 143 (1963)
189. - Wolfrom M. L. , Thompson A. y Timberlake C. E. , Cereal Chem. , 40, 82 (1963)
190. - Young E. G. y Rice F. A. H. , J. Biol. Chem. , 164, 35 (1946)
191. - Yamauchi F. y Matsuda K. , Agr. Biol. Chem. , 33, 103 (1969)

## INDICE

	<u>pág.</u>
Introducción.....	1
 <u>Capítulo I</u>	
<u>Hongos del género Cyttaria</u>	
Introducción.....	2
Clasificación sistemática.....	2
Distribución geográfica.....	3
Las Cyttariales sudamericanas.....	5
Cyttaria harioti Fischer.....	5
 <u>Capítulo II</u>	
<u>Estudios químicos realizados sobre Cyttaria harioti Fischer.....</u>	7
 <u>Capítulo III</u>	
<u>Métodos empleados en la determinación de estructura de polisacáridos</u>	
Introducción.....	9
Aislamiento y purificación.....	11
Determinación de pesos moleculares.....	17
Identificación de azúcares componentes.....	20
Oxidación con periodato.....	22
Estudios de metilación.....	30
Estudios de hidrólisis.....	35
Estudios de acetólisis.....	44



Capítulo IVPolisacáridos de hongos

Introducción.....	47
Polisacáridos neutros.....	47
Polisacáridos ácidos.....	62
Polisacáridos en taxonomía de hongos.....	67
Polisacáridos con actividad antitumor.....	69

Capítulo VAcido D-arabino-hexulosónico

Introducción.....	70
Métodos de síntesis.....	71
Propiedades.....	74
Acido D-arabino-hexulosónico en productos naturales.....	75

Capítulo VI

<u>Descripción y discusión de los resultados obtenidos.....</u>	77
---	----

Capítulo VII

<u>Parte experimental.....</u>	118
--------------------------------	-----

Resumen.....	182
--------------	-----

Bibliografía.....	185
-------------------	-----