Biblioteca Digital
F C E N - U B A

BIBLIOTECA CENTRAL LUIS F LELOIR
BIBLIOTECA CENTRAL LELOIR
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES UBA

Tesis de Posgrado

Estudios sobre el sistema de carragenanos del alga roja Iridaea undulosa Bory

Matulewicz, María Cristina

1978

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. 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. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:
Matulewicz, María Cristina. (1978). Estudios sobre el sistema de carragenanos del alga roja Iridaea undulosa Bory. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1562_Matulewicz.pdf

Cita tipo Chicago:
Matulewicz, María Cristina. "Estudios sobre el sistema de carragenanos del alga roja Iridaea undulosa Bory". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1978. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1562_Matulewicz.pdf

EXACTAS UBA
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

UBA
Universidad de Buenos Aires

Dirección: Biblioteca Central Dr. Luis F. Leloir, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Intendente Güiraldes 2160 - C1428EGA - Tel. (++54 +11) 4789-9293

Contacto: digital@bl.fcen.uba.ar

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

ESTUDIOS SOBRE EL SISTEMA DE CARRAGENANOS DEL ALGA ROJA *IRIDAEA UNDULOSA* BORY

MARIA CRISTINA MATULEWICZ

Tesis presentada para optar al Título de

DOCTOR EN QUIMICA

1978

Nº 1562
ej. 2

1562-

A mis padres

Para el Dr. Alberto S. Cerezo — que me propuso el tema de esta Tesis y me guió en su realización brindándome generosamente capacidad científica y constante estímulo — mi profunda gratitud.

Al Dr. Oscar Kühnemann (Centro de Investigaciones de Biología Marina), por el asesoramiento en la clasificación de las algas Iridaea undulosa Bory y Gigartina skottsbergii;

al Dr. Eduardo G. Gros, por las muestras de 2-, 3-, 4- y 6-O-metil-D-galactosa, y 4,6-di-O-metil-D-galactosa;

al Dr. David A. Rees (Inglaterra), por la muestra de κ-carragenano de Chondrus crispus;

a la Dra. Blanca B. de Deferrari y a la Lic. Marta Marcote, por los microanálisis realizados;

a los Sres. Juan J. Ferrer, Carlos G. Arabehety y Ricardo Báez Barreto, por los espectros de masas realizados;

al Lic. César A. Russo y a la Srta. Susana Melo, por los espectros infrarrojos realizados;

a los profesores, compañeros y demás miembros del Departamento de Química Orgánica, por el apoyo brindado;

a todos,

mi sincero agradecimiento.

INTRODUCCION

Los estudios realizados durante los últimos quince años sobre carragenanos provenientes de distintas especies de algas rojas, han mostrado que dichos polisacáridos forman lo que se ha denominado una "familia", es decir, un conjunto de polisacáridos con estructuras variantes, sin solución de continuidad, entre dos estructuras límites. Dentro de la "familia", cada alga sintetiza el "sistema" de carragenanos necesario para sus funciones biológicas y ecológicas. De esta forma el concepto teórico de "familia" está relacionado con el de "sistema", entendiendo como tal al conjunto de polisacáridos asociados en una estructura nativa.

En el presente trabajo se estudia el sistema de carragenanos del alga roja Iridaea undulosa Bory recogida en invierno en las costas patagónicas. Se continúa de esta manera la línea de investigaciones desarrollada por laboratorios especializados en la última década y que en el nuestro se inició con el estudio del sistema de polisacáridos de la semilla de la leguminosa Gleditsia triacanthos. Este tipo de estudios enfatiza, más que el análisis de estructuras según el concepto clásico *, el estudio del conjunto de polisacáridos relacionados (sistema) con respecto a la separación e identificación de sus componentes, sus interrelaciones y las variaciones de sus propiedades con ciertos factores estructurales determinantes

* Dado que todas las muestras de carragenano son altamente polidispersas ("familia" de polisacáridos) y que los límites de polidispersión son moléculas diferentes, el concepto de "estructura" no tiene sentido real sino estadístico.

de las mismas.

Para los carragenanos dicho estudio no sólo presenta el interés académico, como en el caso de los polisacáridos de las semillas de leguminosas, sino también el interés práctico debido a la capacidad de estos polisacáridos de formar geles o soluciones de alta viscosidad a bajas concentraciones. Dado que solamente algunos tipos de carragenano poseen esta propiedad, para determinar el valor comercial de una muestra debe conocerse la contribución de los mismos al sistema total. Por otra parte, variantes moleculares que no gelifican pueden transformarse mediante una reacción sencilla en otras de gran capacidad gelificante. La determinación de dichas variantes moleculares, así como el conocimiento de la relación entre sus estructuras y las de los componentes gelificantes, resultan importantes en la valoración del carragenano.

La forma usual de fraccionar el sistema de carragenanos se basa en la solubilidad de sus componentes en soluciones de cloruro de potasio de distinta concentración. El estudio del sistema hace necesario entonces conocer los factores que gobiernan dicha solubilidad; y así, por ejemplo, la determinación de la composición y de la distribución de 3,6-anhidro galactosa y de los grupos sulfato de cada una de las fracciones, es importante para el análisis de las propiedades de las mismas.

En función de estas consideraciones hemos encarado el estudio del "carragenano" de Iridaea undulosa Bory como un sistema que fue necesario fraccionar e investigar en cada una de sus partes. Los resultados han sido fructíferos respecto de las metas establecidas ya que se puede presentar un panorama claro de la composición de este sistema. Paralelamente, se han obtenido evidencias de tipo estructural que permiten formular hipó-

tesis sobre la presencia de estructuras no clásicas, y plantear problemas no claros hasta el momento como la desaparición de unidades de galactosa 2-sulfato unidas por la posición 4, vía epóxido, en medio alcalino. Estas evidencias deberán ser confirmadas por los estudios de metilación, que en su primera parte son presentados en esta Tesis.

I N D I C E

CAPITULO I

INTRODUCCION BOTANICA 1

Generalidades 2
Rhodophytas o algas rojas 3
Clasificación sistemática 5
Distribución geográfica en la Argentina 5

CAPITULO II

LOS CARRAGENANOS 6

Estudios previos 7
Escuela noruega 20
Escuela inglesa 24
λ-carragenano 24
μ-carragenano 29
κ-carragenano 30
ι-carragenano 34
ν-carragenano 34
ε-carragenano 35
Estudios realizados en la Argentina 36

CAPITULO III

FORMACION DE GELES 41

Generalidades 42
Mecanismo de formación de geles 43
Caracterización de las zonas de unión 46
Influencia de la estructura en la formación del gel 50
Histéresis 52
Geles de carragenanos con galactomananos 55
Geles de carragenanos con κ-caseína 58

CAPITULO IV

ESPECTROMETRIA DE MASAS DE AZUCARES METILADOS 60

Generalidades 61
Espectrometría de masas de los acetatos de alditoles parcialmente metilados 63

CAPITULO V

ESPECTROSCOPIA INFRARROJA 77

CAPITULO VI

APLICACIONES DE LAS ALGAS MARINAS 87

Introducción 88
Algas como alimento 88
Algas como forraje 89
Algas como fertilizantes 89
Polisacáridos de algas marinas 90
Aplicaciones de los carragenanos 90

Aspectos farmacológicos de los carragenanos 92
Actividad antiulcerosa 92
Actividad anticoagulante 92
Actividad antilipémica 93
Toxicidad 93
Producción de carragenanos en la Argentina 94

CAPITULO VII

DESCRIPCION Y DISCUSION DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS 96

Aislamiento y purificación del carragenano 97
Composición y propiedades del carragenano 97
Fraccionamiento en cloruro de potasio 107
Composición y propiedades de las fracciones provenientes del fraccionamiento 0,24%..... 113
Estudio del residuo insoluble 134
Estudios de metilación 136
Tratamiento alcalino del carragenano 146
Tratamiento alcalino del carragenano de Iridaea undulosa Bory... 148
Fraccionamiento con cloruro de potasio..... 152
Composición y propiedades de las fracciones aisladas..... 153
Método turbidimétrico para la determinación de las curvas de precipitación de los carragenanos 160
Conclusión 171

CAPITULO VII

PARTE EXPERIMENTAL 174

Consideraciones generales 175
Ultracentrifugación 177
Métodos cromatográficos 178
Cromatografía en papel y en columna..... 178
Cromatografía gaseosa 179
Electroforesis sobre papel 184
Hidrólisis ácida total del polisacárido 184
Oxidación con periodato 185
Determinación cuantitativa de los azúcares componentes 187
Determinación de 3,6-anhidrogalactosa..... 187
Determinación de galactosa..... 189
Determinación de 6-sulfato 192
Determinación cuantitativa de las proteínas totales 192
Hidrólisis de las proteínas y purificación del hidrolizado..... 194
Dosaje con el analizador automático 195
Determinación de ácido pirúvico..... 196
Preparación de los acetatos de los alditoles parcialmente metilados..... 197
Determinación de las curvas de solubilidad por turbidimetría 198
Formación de geles 199
Viscosimetría 199
Características del material 207
Aislamiento del carragenano 207
Fraccionamiento del carragenano 208
Tratamiento alcalino del carragenano 209

Determinación de L-galactosa 211
Preparación de la N-(p-nitrofenil)-galactopiranosa 212
Reconocimiento de xilosa en el hidrolizado de la fracción 8 212
Estudios de metilación 212
Metilación del polisacárido 212
Hidrólisis del polisacárido metilado 214
Síntesis de la 2,3,4,6-tetra-0-metil-D-galactosa 217
Preparación del metilgalactósido 217
Metilación del metilgalactósido 218
Hidrólisis del metilgalactósido permetilado 219

RESUMEN 221

BIBLIOGRAFIA 227

CAPITULO I

INTRODUCCION BOTANICA

GENERALIDADES

La palabra alga proviene del latín y significa "yuyo de mar", pero aunque la mayor parte de las plantas marinas son algas, hay muchas algas que no son marinas. Algunas habitan aguas dulces y otras se encuentran en la tierra, especialmente en lugares húmedos, pero éstas son siempre organismos pequeños y simples. Las algas se caracterizan por la presencia de clorofila a, y la ausencia de órganos sexuales multicelulares y tejidos especializados conductores de agua, típicos de las plantas superiores.

Uno de los caracteres más evidentes que se ha utilizado en la clasificación de las algas es su color el cual depende de los pigmentos fotosintéticos presentes (clorofilas, carotenoides y ficobilinas) y de la proporción relativa de los mismos.

Las sustancias que se acumulan como reserva en sus células son distintas en cada grupo y proporcionan criterios taxonómicos útiles. Las más corrientes son polisacáridos (almidón, almidón de las florídeas, almidón de las cianofíceas, laminarano, etc.) (Smith y Montgomery, 1959 a). Otros productos de reserva importantes son el floridósido (2-gliceril α-D-galactopiranósido), manitol, etc..

En la mayor parte de las algas existe, además de la membrana plasmática celular, una pared celular inerte cuyos componentes químicos varían de un grupo a otro. Esta consta de polisacáridos relativamente puros (pectina, celulosa, hemicelulosa, ácido algínico, fucoidina, carragenano, quitina, etc.) o mezclados, y pueden presentarse junto a ellos monosacáridos, lípidos y proteínas. En algunos casos la pared celular está reforzada por sustancias inorgánicas (sílice, carbonato de calcio o de magnesio).

Para delimitar las categorías sistemáticas dentro del vasto grupo de las algas, a estos caracteres distintivos de orden bioquímico (naturaleza de los pigmentos fotosintéticos, reservas nutritivas acumuladas y composición de la pared celular) se agregan los datos sobre reproducción, ciclos de vida, morfología del talo (cuerpo vegetativo no diferenciado que carece de raíz, tallo y hojas), etc., y se tienen así los criterios taxonómicos que se emplean en la actualidad para establecer una clasificación adecuada (Cronquist, 1969 a; Grassi, 1971 a).

RHODOPHYTAS O ALGAS ROJAS

La división Rhodophyta reúne a las algas conocidas como rojas, porque su coloración predominante va del rojo al púrpura, aunque las especies de agua dulce y las que viven en el litoral marino a poca profundidad suelen ser verdosas, parduscas o de tonalidades oliváceas. El grupo comprende 500 géneros con alrededor de 4.000 especies. De ellas, unas 200 son de agua dulce, casi siempre límpida, bien aireada y preferentemente fría, como las corrientes rápidas, cascadas y saltos; pero la gran mayoría son especies marinas de mares templados. Algunas son exclusivas de la zona intercotidal, es decir del sector de la costa que queda al descubierto con la marea baja, pero también las hay infralitorales, encontrándose a profundidades de hasta 200 m. Las especies marinas son casi siempre fijas y no libres; generalmente se encuentran fijas a rocas u a otro sustrato inorgánico, pero frecuentemente son epífitas en otras algas o parásitas de otras algas rojas. Se trata de un grupo muy antiguo pues ya aparecen restos que pueden incluirse en el Silúrico Inferior, no obstante su origen debe ser aún anterior, pues esos restos corresponden ya a formas muy evolucionadas.

Los pigmentos fotosintéticos característicos para la división son la r-ficocianina y la r-ficoeritrina (ficobilinas), y la clorofila d. Se encuentran tambien presentes las clorofilas a y b, luteína, y α-y β-caroteno. Cuando la luz del sol atraviesa el agua, son absorbidos primeramente los rayos rojos, luego los anaranjados, amarillos y verdes, y finalmente quedan los rayos azules y violetas. La clorofila no puede utilizar con mucha eficacia estos últimos y por lo tanto las plantas que poseen sólo clorofila no pueden llevar a cabo la fotosíntesis a grandes profundidades. La r-ficoeritrina puede usar esos rayos azules y es por eso que las algas rojas pueden vivir a profundidades mayores que otras plantas.

Las reservas nutritivas se presentan como el almidón de las florídeas y el floridósido. La membrana celular contiene además de celulosa, polisacáridos sulfatados (carragenano, agar) o carbonato de calcio (Cronquist, 1969 b; Grassi, 1971 b ; Villee, 1961).

Stoloff y Silva (1957) trataron de encontrar, dentro de esta división, una correlación entre los polisacáridos de paredes celulares y los diferentes grupos de algas, previamente establecidos en base a criterios morfológicos y reproductivos, pero la evidencia sobre el tipo de polisacárido estaba limitada a las propiedades físicas del sol.

Yaphe (1959) introdujo una clasificación enzimática usando hidrolasas específicas para agar y carragenano obtenidas de las bacterias marinas Pseudomonas atlantica y Pseudomonas carrageenovora, respectivamente. A partir de Pseudomonas carrageenovora aisló una K-carragenasa (específica para el K-carragenano; ver Capítulo II) con la cual incubó extractos de diferentes algas, determinando el poder reductor de los hi-

drolizados. Encontró que en el orden Gigartinales se obtenía un incremento del poder reductor para las familias Furcellariaceae, Hypneaceae y Gigartinaceae, y dentro de esta última familia la enzima hidrolizaba extractos de las especies de los géneros Chondrus, Iridaea, Rhodoglossum y Gigartina.

CLASIFICACION SISTEMATICA

La ubicación sistemática de la especie Iridaea undulosa Bory dentro del reino vegetal es la siguiente (Kylin, 1956):

División: Rhodophyta

Clase: Florideae

Orden: Gigartinales

Familia: Gigartinaceae

Género: Iridaea

Especie: I. undulosa Bory

Recientemente la especie Iridaea undulosa Bory fue reclasificada como Gigartina undulosa (Bory) Kim (1976).

DISTRIBUCION GEOGRAFICA EN LA ARGENTINA

El género Iridaea aparece alrededor del paralelo 44° L.S., presentándose en forma más o menos constante en la resaca. Abunda desde el Golfo San Jorge hasta Bahía Laura y continúa apareciendo en la resaca hasta el sur de San Julián (Halperin y col., 1973).

CAPITULO II

LOS CARRAGENANOS

ESTUDIOS PREVIOS

El desarrollo del estudio químico de los carragenanos puede dividirse en cuatro períodos:

El primer período comienza en 1844, cuando Schmidt informó haber aislado un mucílago del alga Chondrus crispus para el cual Stanford (1862) propuso el nombre de "carragenina". Dicho nombre deriva de la ciudad costera de Irlanda, Carragheen, que era el principal centro comercial del alga llamada también "musgo de Irlanda" o "musgo de Carragheen".

Flückiger y Obermaier (1868) y Bente (1875, 1876) determinaron la presencia de galactosa en el mucílago por oxidación del mismo con ácido nítrico e identificación del ácido múcico producido. Haedicke y col. (1887) estimaron en 28% el contenido de galactosa e indicaron la presencia de fructosa y rafinosa. Sebor (1900) confirmó que la carragenina era un carbohidrato complejo formado por la unión de galactosa y fructosa, conjuntamente con una pequeña cantidad de pentosa o metilpentosa como impureza, y posiblemente glucosa pero negó la existencia de rafinosa. (Smith y Montgomery, 1959 a).

Haas (1921, y referencias allí citadas) estudiaron las propiedades químicas y físicas del extracto acuoso de Chondrus crispus y encontraron que:

a- El material coloidal extraído con agua caliente contenía dos sustancias.

b- Estas dos sustancias podían separarse teniendo en cuenta sus solubilidades diferentes en agua fría.

c- El producto extraído con agua fría contenía más sodio y potasio y menos calcio que el extraído con agua caliente.

Se sabía que el Chondrus crispus daba por calcinación gran cantidad de cenizas cuyo componente principal era el sulfato de calcio; dicho contenido en cenizas se podía reducir, sólo en parte, por diálisis del alga. Haas (1921) y Rusell-Wells (1922) comprobaron que los dos componentes de la carragenina eran ésteres sulfato de galactanos; el calcio precipitaba cuantitativamente con reactivos específicos (como el oxalato de amonio), mientras que ello no ocurría con el sulfato (no precipitaba con el cloruro de bario) hasta después de la hidrólisis. Además la cantidad de sulfato después de la hidrólisis era el doble de la encontrada en cenizas, y esto podía justificarse en base a la siguiente ecuación:

$$2\ ROSO_3M \rightarrow M_2SO_4 + SO_3 + \text{productos gaseosos de combustión.}$$

donde M es el catión (sodio, potasio, etc.).

Pero esta relación 2:1 de sulfato de hidrólisis a sulfato en ceniza no siempre se verificaba y Haas y Rusell-Wells (1923) lo atribuyeron a:

a- Las dificultades experimentales de la hidrólisis o calcinación del producto.

b- Las propiedades inherentes del éster sulfato; así en una combinación del tipo $ROSO_2ONH_4$ todo el sulfato se perdería por calcinación y algo similar ocurriría para $ROSO_2OR'$ donde R y R' son radicales orgánicos. A la inversa en el caso de ceniza fuertemente alcalina la relación sería mayor que 2:1.

Haas y Rusell-Wells (1929) encontraron que las condiciones ácí-

das o básicas que favorecían la desulfatación de la carragenina, producían su degradación total y observaron que, por tratamiento de la misma con hidróxido de sodio 3% a 110°, había un tipo de sulfato más resistente que otro a la hidrólisis.

Butler (1934) describió un método general para la obtención de carragenina y como las propiedades (aspecto de la solución acuosa, cenizas, etc.) del polisacárido extraído resultaron intermedias entre las correspondientes para las dos fracciones de Haas (1921), concluyó que el fraccionamiento efectuado por éste era artificial y que dichas fracciones no eran compuestos puros. Consideró factible de que ambas fueran mezclas de las mismas sustancias en diferentes proporciones y que, además de los componentes comunes, cada fracción podía contener componentes propios (este es el primer argumento sobre la polidispersidad de la carragenina). Además observó el dializar una solución al 1% de carragenina en agua contra cloruro de potasio que ésta gelificaba.

Como las variaciones estacionales podían resultar importantes para interpretar el metabolismo de un alga, Butler (1936) efectuó recolecciones mensuales de Chondrus crispus y en un mismo lugar para eliminar de esta forma factores ecológicos. Comparó entonces el contenido de cenizas, nitrógeno e hidratos de carbono de las distintas recolecciones y los correspondientes extractos acuosos, y encontró que tanto en las algas como en los mucílagos las fluctuaciones con respecto a sus componentes eran las mismas.

El segundo período se caracterizó por las primeras determinaciones estructurales así como por la extracción de mucílagos semejantes

de otras algas rojas.

Hassid (1933, 1935) publicó el primer estudio estructural; este fue realizado sobre el galactano extraído del alga roja Iridaea laminarioides. Para ello metiló el polisacárido tal cual y el polisacárido desulfatado, los hidrolizó y mediante una serie de transformaciones posteriores (en particular en el segundo caso) llegó a la conclusión, partiendo de la hipótesis de que el grupo sulfato estaba unido al C-6, que la unión entre las unidades de galactosa era (1→3)- o (1→4)-; se inclinó, sin embargo, por la unión (1→4)- pues ésta ya había sido encontrada en disacáridos y polisacáridos.

Buchanan y col. (1943) estudiaron los mucílagos extraídos con agua fría y con agua caliente (Haas, 1921) del alga Chondrus crispus. El extracto extraído con agua fría presentaba las siguientes constantes: $[\alpha]^{18}_{D}$ +50° (agua); sulfato (como SO_4), 35,1%; galactosa, 34%; pentosa, 1% y estimaciones colorimétricas indicaban un 20-22% de cetosa. A su vez, el extracto extraído con agua caliente tenía: $[\alpha]^{18}_{D}$ +63° (agua); sulfato (como SO_4), 23,8%; galactosa, 36,9%; pentosa, 1% y cetosa, 17%.

La metilación e hidrólisis de ambas fracciones permitió determinar la presencia de 2,6-di-O-metil-D-galactosa y 2-O-metil-D-galactosa. Como la mayor parte del sulfato era resistente a la hidrólisis alcalina (sólo lo investigaron para el extracto extraído con agua fría), éste debía encontrarse en una posición tal que la formación de un anillo de 3,6-anhidro o de un epóxido resultara imposible, y concluyeron entonces que la unión entre las unidades de galactosa era (1→3)- y que éstas estaban sulfatadas en el C-4. De los poderes rotatorios y de la pre-

ponderancia de D-galactosa consideraron probable que dicha unión fuera α-. Desgraciadamente en el método usado para efectuar la hidrólisis alcalina (usualmente hidróxido de sodio N) no se tomaban las precauciones necesarias para impedir la liberación del sulfato por degradación del polisacárido, y por lo tanto los resultados eran cualitativos. Esta unión, (1→3)-, fue confirmada cuando por metilación y posterior hidrólisis de carragenina parcialmente degradada y desulfatada por tratamiento con solución diluída de ácido oxálico, se aisló la 2,4,6-tri-O-metil-D-galactosa (Johnston y Percival, 1950). Dillon y O'Colla (1951) la ratificación por acetólisis, metilación y oxidación con periodato. Smith y col. (1955) aislaron, a partir de una muestra comercial, aproximadamente un 1% de L-galactosa.

Aunque el término "carragenina" se había reservado para el mucílago extraído del alga Chondrus crispus, Tseng (1945) y Newton (1945) comenzaron a usarlo para el obtenido de Gigartina stellata, a causa de que el parecido morfológico entre las dos algas hacía prever semejanzas entre sus mucílagos. En efecto, al estudiar el polisacárido extraído con agua caliente del alga Gigartina stellata, Dewar y Percival (1947), encontraron que éste presentaba las siguientes constantes: $[\alpha]_D^{15}$ +51° (agua); sulfato (como SO_4), 23,9% y galactosa, 40%; además el hidrolizado dio reacción positiva de cetosas. El catión más abundante era el calcio y había cantidades menores de magnesio, sodio y potasio. La estabilidad de los sulfatos en medio alcalino resultó ser semejante a la de los del mucílago de Chondrus crispus (se necesitaban tres días en hidróxido de sodio N a 100° para hidrolizar el 62% de los sulfatos), y por metilación y posterior hidrólisis también se obtuvo

2,6-di-O-metil-D-galactosa. Posteriormente Johnston y Percival (1950) aislaron a partir de dicho mucílago derivados de la L-galactosa. A su vez se comprobó (Mori, 1953, y referencias allí citadas) la semejanza del mucílago de Chondrus ocellatus con la carragenina en cuanto a que la unión entre galactosas era (1→3)-, pero no en cuanto a la posición del sulfato al cual se le asignó el C-6. Al reexaminar la estructura del polisacárido de Iridaea laminarioides se encontró que éste era análogo al de Chondrus ocellatus (Mori, 1953, y referencias allí citadas).

Cabe destacar que tanto Johnston y Percival (1950) como Dillon y O'Colla (1951) determinaron pequeñas cantidades de 2,4-di-O-metil-D-galactosa por análisis de metilación de derivados desulfatados de bs polisacáridos de Gigartina stellata y de Chondrus crispus, respectivamente, lo cual sugería la presencia de ramificaciones en el C-6 de la estructura original de los mucílagos.

En el mismo período varios hechos dieron lugar a confusión, entre ellos el reconocimiento de glucosa en los extractos extraídos con agua caliente del alga Chondrus crispus (Buchanan y col., 1943); previamente la habían detectado Sebor (1900), Müther y Tollens (1904) y Haas y Rusell-Wells (1929). Dillon y O'Colla (1951) determinaron que ésta provenía de la contaminación de la carragenina con almidón de las florídeas, polisacárido elaborado por el mismo vegetal como sustancia de reserva (ver Capítulo I, pág.4); dicho polisacárido es únicamente soluble en agua caliente. A su vez, Sebor (1900), Haas y Rusell-Wells (1929) y Buchanan y col. (1943) detectaron pequeñas cantidades de pentosas en carrageninas de Chondrus crispus; Johnston y Percival (1950) y Dillon y O'Colla (1951) determinaron, en particular, xilosa

en carrageninas de Gigartina stellata y de Chondrus crispus respectivamente, que se atribuyó a xilanos contaminantes (Johnston y Percival, 1950; Smith y col., 1955). Sin embargo, llama la atención que Johnston y Percival (1950) por metilación e hidrólisis de una carragenina degradada no hayan aislado otros derivados de la D-xilosa que la 2,3,4-tri-O-metil-D-xilosa. Young y Rice (1944, 1946) aislaron el ácido 2-cetoglucónico por hidrólisis de la carragenina de Chondrus crispus con una solución de ácido oxálico-oxalato de potasio 0,05M en atmósfera de nitrógeno. Es de notar que a pesar de los numerosos estudios realizados sobre estos mucílagos no hay mención posterior en la literatura sobre la presencia del cetoácido.

El comienzo del tercer período estuvo dado por la demostración experimental de la presencia de por lo menos dos componentes en los carragenanos*.

Las sucesivas extracciones del alga Chondrus crispus con agua a temperaturas crecientes y la determinación de las viscosidades de los extractos correspondientes indicaron que el mucílago era polidisperso (Rose, 1950).

Cook y col. (1952) estudiaron el carragenano Chondrus crispus aplicando electroforesis, ultracentrifugación y difusión. El análisis electroforético reveló considerable heterogeneidad pero no dió evidencia alguna sobre componentes separables; posteriormente pudo resolverse en dos fracciones (K- y λ-carragenano) utilizando papel de fibra

* El uso del vocablo "carragenano" en lugar de "carragenina" se basa en una recomendación del "Committee on Nomenclature of the Division of Organic Chemistry, A.C.S.".

de vidrio e hidróxido de sodio N como electrolito (Lewis y Smith, 1957). Por ultracentrifugación (velocidad de sedimentación) se separaron dos componentes y se observó que la cantidad del componente menor (aquél que sedimentaba rápidamente y cuyo coeficiente de sedimentación no fue posible determinar) aumentaba (hasta un 12%) con la viscosidad de la muestra. Los pesos moleculares de las muestras, calculados aplicando la ecuación de Svedberg estaban comprendidos entre 110.000 y 530.000.

Smith y Cook (1953) desarrollaron un método para separar los componentes resueltos por ultracentrifugación, aprovechando la propiedad de uno de ellos (que se denominó K-carragenano) de formar geles a una concentración aproximadamente 0,125 M de cloruro de potasio. De esta forma, de una solución de la mezcla era posible obtener un componente quedando disuelto el otro (λ-carragenano) que luego podía precipitarse con etanol. Los iones potasio se podían reemplazar por los de cesio, rubidio y amonio, pero no por los de sodio y litio que no producían efecto alguno (requerimiento catiónico). Smith y col. (1954) consideraron que el radio de los cationes solvatados era, probablemente, un factor importante. Los radios de los cationes efectivos eran similares y menores que los de sodio y de litio. Los contenidos en sulfato de un carragenano y de las fracciones K y λ obtenidas a partir del mismo resultaron ser 29%, 24% y 33% respectivamente, y las rotaciones específicas + 58°, +63° y +44°; es decir el carragenano contenía por lo menos dos polisacáridos que diferían en su sensibilidad frente al ión potasio, en el contenido de sulfato y en la rotación óptica. Este método de fraccionamiento se aplicó a extractos de Chondrus crispus, Gigartina spp., Hypnea musciformis, etc..

Los estudios de velocidad de sedimentación y viscosidad (Smith y col., 1954) demostraron que las fracciones κ y λ estaban relacionadas con los componentes de sedimentación lenta y rápida observados por Cook y col. (1952) para las muestras de alta viscosidad, y que el peso molecular de la primera era menor que el de la segunda (comparando fracciones de un mismo carragenano). Sin embargo, existían grandes discrepancias entre los porcentajes de las fracciones κ y λ calculados a partir de las áreas de los diagramas de sedimentación y los obtenidos de los fraccionamientos. Esto se atribuyó al efecto previamente discutido por Johnston y Ogston (1946) y por Harrington y Schachman (1953) por el cual el área del componente lento aumenta y la del rápido disminuye. La magnitud de este efecto depende de la proximidad de los coeficientes de sedimentación de los componentes y de la relación de estos últimos con la concentración. En particular, resultó más pronunciado para aquellas muestras de carragenano de baja viscosidad.

Smith y col. (1954) comprobaron la polidispersidad del λ-carragenano por adición gradual de etanol a una solución al 0,2% de polisacárido en cloruro de sodio 0,5 M; por un procedimiento análogo, pero utilizando cloruro de sodio 0,25 M, se demostró (Smith y col., 1955) la polidispersidad del κ-carragenano. Si el tamaño hubiera sido el factor determinante del fraccionamiento, tanto la viscosidad, como el coeficiente de sedimentación y el peso molecular hubieran disminuído al aumentar la concentración de etanol. Esto se verificó para el λ-pero no para el κ-carragenano. Por lo tanto las diferentes solubilidades, en este último caso, reflejaban distintas composiciones y/o es-

tructuras pero como los datos analíticos sugerían composiciones similares, dichas solubilidades debían atribuirse a factores estructurales.

Goring y Young (1955) compararon las propiedades de las fracciones aisladas a partir del alga Chondrus crispus por: a) fraccionamiento con cloruro de potasio del extracto obtenido a 100° y b) extracción sucesiva del alga a 30°, 60° y 100-120°. De los resultados, llamó la atención el hecho de que de las fracciones obtenidas en el segundo caso, sólo la extraída a 60°, tenía gran capacidad gelificante.

Los estudios estructurales realizados indicaban que los carragenanos eran galactanos con uniones (1→3)- sulfatados en el C-4 y con ramificaciones en el C-6. Pero la galactosa y el sulfato (expresados como $C_6H_{12}O_6$ y SO_4) constituían aproximadamente un 40% y un 30% del polisacárido respectivamente. A su vez las cetosas habían sido repetidamente detectadas pero nunca aisladas. Percival (1954) obtuvo, por mercaptólisis del carragenano de Chondrus crispus, 3,6-anhidro-D-galactosa dietil ditioacetal, pero no se pudo determinar la cantidad de 3,6-anhidro-D-galactosa por este método pues la degradación resultó incompleta (O'Neill, 1955 a). Sin embargo, por hidrólisis del polisacárido en condiciones controladas era posible transformar cuantitativamente dicho azúcar en el 5-(hidroximetil)-2-furaldehido que posee una fuerte banda de absorción a 285 nm (O'Neill, 1955 a). La presencia del 5-(hidroximetil)-2-furaldehido en los hidrolizados explicaba las reacciones positivas de cetosas antes obtenidas.

A partir de entonces el estudio de los carragenanos se transformó en el análisis de un sistema de dos componentes, κ- y λ-carragenano, los cuales una vez aislados, se purificaban y se sometían a las deter-

minaciones correspondientes.

O'Neill (1955 b) determinó la estructura de un κ-carragenano de Chondrus crispus que contenía 38,1% de D-galactosa, 28,1% de 3,6-anhidro-D-galactosa y 28% de sulfato (expresado como SO_3Na); es decir la relación molar galactosa : 3,6-anhidrogalactosa : sulfato era 1 : 0,83 : 1,17. Por mercaptólisis parcial del mismo se aisló el 4-O-β-D-galactopiranosil-3,6-anhidro-D-galactosa dietil ditioacetal. El alto rendimiento con que se obtenía dicho disacárido, así como los resultados de la oxidación con periodato que no mostraban un consumo detectable del reactivo después de 220 horas (Smith y col., 1955), sugerían una estructura como la siguiente:

$\rightarrow$3)-β-D-Galp 4-sulfato-(1$\rightarrow$4)-3,6-anhidro-D-Galp-(1$\rightarrow$

En las posibles ramificaciones las unidades terminales debían ser 3,6-anhidro-D-galactopiranosa, D-galactopiranosa 3,4-disulfato y/o D-galactopiranosa 3,6-disulfato pues éstas no consumen periodato (O'Neill, 1955 b; Smith y col., 1955).

Smith y col. (1955) determinaron que la fracción λ (obtenida a partir de un carragenano comercial) contenía pequeñas cantidades de 3,6-anhidro-D-galactosa, y por oxidación con periodato durante 220 horas se consumían 0,31 moles del reactivo y se formaban 0,13 moles de ácido fórmico por unidad anhidro promedio. Por lo tanto cada tres unidades había un grupo diol libre y cada ocho un grupo triol libre. Morgan y O'Neill (1959) por degradación parcial por acetólisis de un λ-carragenano (también obtenido por fraccionamiento de una muestra comercial), desacetilación y posterior cromatografía de la mezcla

producida, aislaron un disacárido, un trisacárido y un tetrasacárido que resultaron miembros de la serie homóloga formada por unidades de α-(1→3)-D-galactopiranosa. Esto si bien demostró la presencia de uniones α-(1→3)-, no justificaba el consumo de periodato del mismo (0,15 moles de periodato con formación de 0,05 moles de ácido fórmico por unidad anhidro promedio); sin embargo, las otras uniones presentes (β-(1→4)-) no pudieron ser puestas en evidencia hasta el próximo período.

Bayley (1955) estudió el carragenano de Chondrus crispus y las fracciones κ y λ obtenidas a partir del mismo por difracción de rayos X. Encontró que el diagrama del carragenano no representaba la suma de los correspondientes a las fracciones κ y λ, y que la posterior recombinación de dichas fracciones no parecía destruir irreversiblemente características estructurales del carragenano original. Los diagramas de las fibras estiradas de los tres productos mostraron un período de fibra de 25,2 A. El κ-carragenano podía representarse como una sucesión de pares de unidades sulfatadas de α- y β-D-galactopiranosa unidas (1→3)- y (1→4)- respectivamente, separados por una unidad de 3,6-anhidro-α-D-galactopiranosa unida (1→3)-. Cada 25,2 A había una ramificación constituída por una unidad de 3,6-anhidro-D-galactosa en posición (1→6)-. Para el λ-carragenano se confirmó la presencia de uniones α-(1→3)-. En base a los resultados obtenidos Bayley (1955) propuso además un modelo para explicar la precipitación del κ-carragenano. Pero tanto las estructuras como el modelo propuesto resultaron incorrectos (ver Capítulo III, pág. 41).

En este mismo período se comenzaron a usar los espectros infrarrojos como ayuda para determinar la posición de los grupos sulfato

(ver Capítulo V, pág. 77). Trabajando con compuestos modelo, sulfatos de alquilo (Lloyd y col., 1961 b), monosacáridos (Lloyd y Dodgson, 1961; Turvey y Williams, 1962) y polisacáridos sulfatados (Bayley, 1955; Lloyd y col., 1961 a), se pudo llegar a determinar que un grupo éster sulfato unido a un azúcar da una banda a 1.240 cm^{-1} correspondiente a la tensión S=O y por lo tanto independiente de la posición del sulfato, y otra entre 800-900 cm^{-1} que se atribuye a un modo vibracional del sistema C-O-S y que depende de la posición del hidroxilo esterificado. Así los ésteres sulfato sobre hidróxilos primarios absorben a 820 cm^{-1}, sobre hidroxilos secundarios ecuatoriales a 830 cm^{-1} y sobre hidroxilos secundarios axiales a 850 cm^{-1}. Los espectros de los carragenanos de Chondrus crispus, Chondrus ocellatus, Gigartina radula, Gigartina pistillata, Gigartina stellata e Iridaea laminarioides mostraban además de la absorción a 1.240 cm^{-1} una banda a 850 cm^{-1} que confirmaba la presencia de unidades de galactosa 4-sulfato en los polisacáridos (Lloyd y col., 1961 a). Esto concordaba con los resultados obtenidos previamente para Chondrus crispus y Gigartina stellata, no así para Chondrus ocellatus e Iridaea laminarioides que asignaban al C-6 la posición del sulfato (ver Capítulo II, pág. 10).

Clingman y Nunn (1959) estudiaron el polisacárido extraído del alga Hypnea specifera y demostraron que su estructura era similar a la del κ-carragenano. El análisis estructural del polisacárido extraído del alga Furcellaria fastigiata y precipitado a una concentración 0,4 M de cloruro de potasio indicó que, si bien éste también era similar al κ-carragenano, sólo dos de cada cinco unidades estaban sulfatadas (Painter, 1960).

El cuarto período comprende desde 1963 hasta la actualidad; en

él se demuestra que lo que se denomina carragenano no es un producto puro ni una mezcla de dos o más polisacáridos sino toda una familia de compuestos cuyas estructuras y propiedades pueden variar en forma continua entre dos estructuras y propiedades extremas. Dicho estudio fue abordado por dos escuelas, la noruega (de Haug y col.) y la inglesa (de Rees y col.). La primera analizó las curvas de solubilidad en cloruro de potasio, las cuales son representativas de la distribución molecular; la segunda trabajó en función de polisacáridos relacionados por una estructura básica variante.

ESCUELA NORUEGA

Pernas y col. (1967) determinaron que los carragenanos de *Chondrus crispus*, *Gigartina skottsbergii* y *Gigartina stellata* precipitaban a diferentes concentraciones de cloruro de potasio en un rango considerable, a ambos lados de la concentración 0,125 M originariamente usada. La posibilidad de construir una curva de solubilidad que fuera representativa de la distribución molecular estaba dada por los siguientes hechos experimentales:

a- El fraccionamiento era bastante neto pues la contaminación con otras fracciones de precipitación cercana era de aproximadamente un 10%.

b- La solubilidad de las moléculas de carragenano en la mezcla era esencialmente la misma que en las fracciones más homogéneas.

c- El fraccionamiento en función del peso molecular sólo se producía en pequeña proporción, y por lo tanto era posible comparar curvas de distintas muestras sin hacer correcciones por diferencias en las viscosidades intrínsecas.

En el caso de muestras comerciales o muestras recogidas durante un lapso considerable las precipitaciones eran difusas (Pernas y col., 1967); pero en cambio cuando las algas eran recogidas en condiciones controladas de tiempo de recolección y de habitat, se producían precipitaciones a concentraciones definidas de cloruro de potasio. Siempre se observaba una precipitación difusa, de poca importancia, entre estas concentraciones (Cerezo, 1967 a; Cerezo, 1967 b).

Dado que la correlación entre el contenido de 3,6-anhidro-D-galactosa y la solubilidad en cloruro de potasio era diferente para los tres carragenanos utilizados, Pernas y col. (1967) concluyeron que la solubilidad debía depender, además del contenido de 3,6-anhidro-D-galactosa, del contenido de sulfato y/o de su distribución. En efecto, observaron que a medida que disminuía el contenido de 3,6-anhidro-D-galactosa y aumentaba el de sulfato, las fracciones resultaban solubles a concentraciones mayores de cloruro de potasio. Es de notar que no estudiaron la influencia de la distribución del sulfato sobre la solubilidad.

Los resultados obtenidos justificaban, asimismo, la subdivisión del λ-carragenano en dos fracciones: a) la que precipitaba a concentraciones de cloruro de potasio mayores de 0,125 M o "fracción intermedia", y b) la soluble a todas concentraciones de cloruro de potasio (concentración final utilizada, 1,5 M). Los contenidos de 3,6-anhidro-D-galactosa y los poderes gelificantes (determinados con leche; ver Capítulo III, pág. 58) de los carragenanos de Chondrus crispus, Gigartina skottsbergii y Gigartina stellata y de las fracciones κ, intermedia (0,125-1,5M) y soluble correspondientes, se encuentran en la Tabla 1 (Pernas y col., 1967; Smidsrød y col., 1967). El poder gelificante

Tabla 1. Fraccionamiento del carragenano y tratamiento alcalino del carragenano y de las fracciones obtenidas a partir del mismo.

fracción	antes del tratamiento			después del tratamiento	
	rendimiento %	3,6 a.h.g.[1] %	fuerza del gel	3.6 a.h.g. %	fuerza del gel
Chondrus crispus					
sin fraccionar		23,5	60	31,5	150
insoluble a 0,125 M	50,9	29,2	145	34,0	175
insoluble a 0,125-1,5 M	36,6	25,0	20	33,0	120
soluble a 1,5 M	12,2	4,9	0	22,0	0
Gigartina stellata					
sin fraccionar		23,5	30	30,9	90
insoluble a 0,125 M	28,3	28,4	61	32,4	95
insoluble a 0,125-1,5 M	59,6	25,0	19	32,9	85
soluble a 1,5 M	12,1	10,1	0	26,5	35
Gigartina skottsbergii					
sin fraccionar		20,9	15	30,0	60
insoluble a 0,125 M	11,7	29,4	70	33,3	80
insoluble a 0,125-1,5 M	69,9	20,6	8	33,4	60
soluble a 1,5 M	18,4	10,1	0	30,1	54

[1] 3,6-anhidrogalactosa.

resultó mayor para la fracción κ, mientras que para la fracción intermedia, a pesar de su contenido relativamente alto de 3,6-anhidro-D-galactosa, fue escaso, y para la soluble nulo.

Cuando estos carragenanos se trataron con álcali (hidróxido de potasio M durante 1 hora a 100°), previa adición de borohidruro de potasio (Rees, 1961; ver Capítulo II, pág. 24), las curvas de solubilidad de los polisacáridos modificados mostraron una única precipitación definida por debajo de la concentración 0,125 M de cloruro de potasio (concentración final, 1,5 M). Se constató, además, un incremento significativo en el contenido de 3,6-anhidro-D-galactosa y en el poder gelificante de las muestras (Tabla 1; Smidsrød y col., 1967).

También se sometieron a dicho tratamiento las fracciones κ, intermedia y soluble de dichos carragenanos (Smidsrød y col., 1967). En la Tabla 1 se observa que dicho tratamiento condujo a un aumento apreciable en el contenido de 3,6-anhidro-D-galactosa y en el poder gelificante de la fracción intermedia, cuyas propiedades resultaron análogas a las del κ-carragenano. A su vez por fraccionamiento de las fracciones solubles modificadas, a una concentración de 1,5 M de cloruro de potasio, se obtuvieron fracciones solubles con un alto contenido de 3,6-anhidro-D-galactosa (Tabla 2; Smidsrød y col., 1967).

Tabla 2. Fraccionamiento de la fracción soluble modificada a 1,5 M de ClK.

alga	insoluble		soluble	
	fracción %	3,6 a.h.g. %	fracción %	3,6 a.h.g. %
Chondrus crispus	19	22,8	81	20,2
Gigartina stellata	78	30,5	22	7,6
Gigartina skottsbergii	75	33,0	25	12,3

Painter (1966) había atribuído la escasa solubilidad del κ-carragenano en cloruro de potasio a la presencia de un elevado contenido de 3,6-anhidro-D-galactosa; quedaba demostrado, sin embargo, que hay además otros factores que controlan dicha solubilidad (ver Capítulo III, pág. 41).

ESCUELA INGLESA

El estudio comprende el análisis de estructuras de fracciones definidas.

λ-carragenano

Rees (1963) demostró que las unidades de D-galactosa 2,6-disulfato unidas por la posición 4 constituían aproximadamente el 40% de las unidades estructurales del λ-carragenano (de Chondrus crispus).

La reacción por la cual los grupos 6-sulfato se eliminaban para dar 3,6-anhidrogalactosa (Percival, 1949) en presencia de hidróxido de sodio N a ebullición era sólo cualitativa, pues durante el tratamiento se producía la degradación del polisacárido y no se podía saber si el sulfato era liberado por una S_N2 y formación del anillo de 3,6-anhidro, o por destrucción del producto (ver Capítulo II, pág. 10). Rees (1961) encontró que si el polisacárido era previamente reducido con borohidruro de potasio, la degradación disminuía; esto sugería que la principal causa de este proceso era el "peeling" que se iniciaba en el extremo reductor (Whistler y BeMiller, 1958), y si la ciclación se producía en hidróxido de sodio N y más borohidruro de potasio (para reducir los grupos terminales que ocasionalmente podían formarse por ruptura de la cadena), la reacción S_N2 podía considerarse cuantitativa y así dosar los grupos 6-sulfato de unidades con el hidroxilo del C-3

libre.

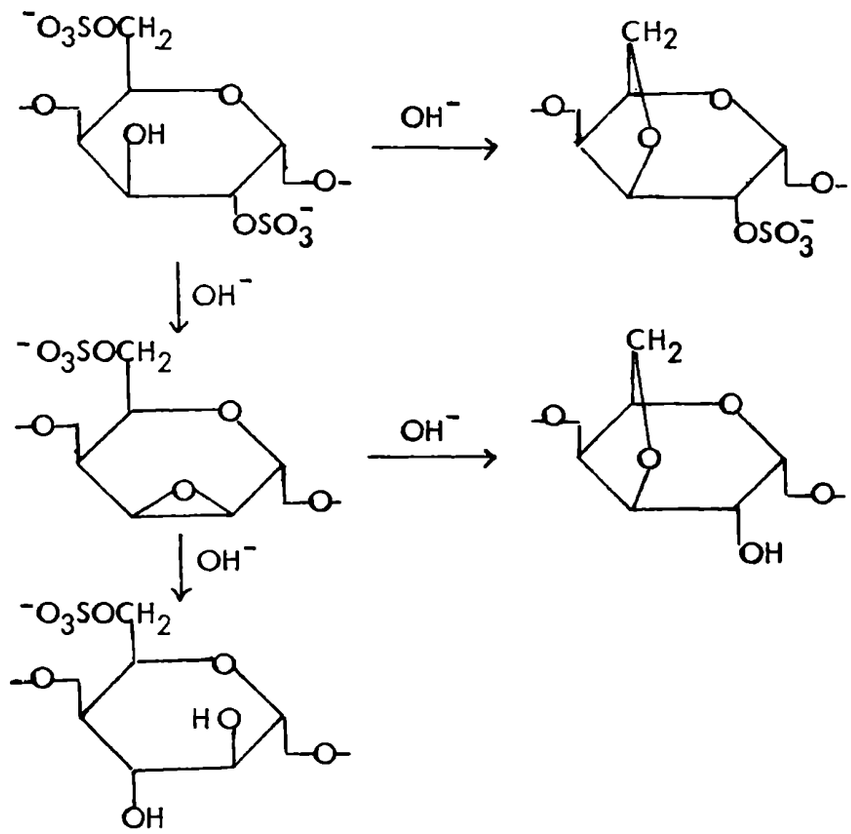
Cuando este método se aplicó al λ-carragenano aproximadamente una tercera parte del sulfato fue liberado con la formación concomitante de unidades de 3,6-anhidrogalactosa, y para probar que éstas se formaban a partir de las unidades de D-galactosa 2,6-disulfato unidas por la posición 4 ("unidades precursoras") se procedió de la siguiente forma:

a- Por mercaptólisis parcial del λ-carragenano tratado con álcali se obtuvo el dietil ditioacetal de la carrabiosa (4-O- β-D-galactopiranosil-3,6-anhidro-D-galactosa dietil ditioacetal), que indicaba la presencia de uniones β-(1→4)-. Cabe destacar que el λ-carragenano original contenía aproximadamente un 1,6% de 3,6-anhidro-D-galactosa.

b- Por hidrólisis parcial del λ-carragenano se aisló D-galactosa 6-sulfato que también estaba presente, aunque en mucho menor cantidad, en el hidrolizado del λ-carragenano tratado con álcali.

c- El λ-carragenano resultó ser resistente a la oxidación con periodato (después de 72 horas el consumo fue de menos de un mol de periodato por cada 10 unidades de galactosa en el polímero). El polisacárido oxidado dio, por tratamiento alcalino, un 93% de la 3,6-anhidro-D-galactosa obtenida a partir del producto no oxidado.

d- Una unidad de D-galactosa 2,6-disulfato podría reaccionar en medio alcalino de varias formas. Se determinó que la estequiometría de la reacción del λ-carragenano era concordante con la conversión directa a unidades de 3,6-anhidro-D-galactosa 2-sulfato, y si bien había un 15% de sulfato liberado en exceso, éste podría atribuirse no sólo a las reacciones laterales que involucran la formación de epóxidos, sino también a la ruptura O-S de los grupos 2- y 4-sulfato.



e-Turvey y Clancy (1961) demostraron que los grupos sulfato estabilizan la unión glicosídica del azúcar al cual están unidos. Las uniones 3,6-anhidrogalactosídicas del λ-carragenano tratado con álcali, aunque lábiles en medio ácido, lo fueron menos que las correspondientes uniones en polisacáridos que no tenían sustituyentes en el C-2 de las unidades de 3,6-anhidrogalactosa.

f-Mediante una serie de reacciones a partir del λ-carragenano tratado con álcali, se obtuvo un producto que, si bien no se pudo comparar con una muestra auténtica, todo parecía indicar que se trataba del 3,6-anhidrogalactitol 2-sulfato.

g-El espectro infrarrojo del λ-carragenano mostró una banda ancha a 810-860 cm^{-1} con un máximo a 827 cm^{-1} que indicaba la presencia

de ésteres sulfato primarios, secundarios axiales y ecuatoriales. A su vez, el λ-carragenano tratado con álcali dio una banda neta a 850 cm^{-1}, característica de sulfatos secundarios axiales (ver Capítulo II, pág. 18). Es de notar que Rees (1963) no hace mención alguna de la presencia de una banda a 805 cm^{-1} atribuída posteriormente (Anderson y col., 1968 b) al 2-sulfato unido a una unidad de 3,6-anhidrogalactosa.

Dolan y Rees (1965) por metilación del λ-carragenano (también de Chondrus crispus, pero de una recolección diferente que el anterior) y del λ-carragenano desulfatado (obtenido por tratamientos sucesivos con cloruro de hidrógeno metanólico), hidrólisis e identificación de los monosacáridos correspondientes, determinaron que había igual proporción de unidades D-galactosa unidas por la posición 4 que por la posición 3. Las unidades unidas por la posición 4 estaban sulfatadas en C-2 y C-6, mientras que las unidas por la posición 3 estaban ocasionalmente no esterificadas, pero frecuentemente sulfatadas en C-2 y más raramente en C-4.

Se propuso entonces la siguiente estructura para el λ-carragenano (Fig. 1):

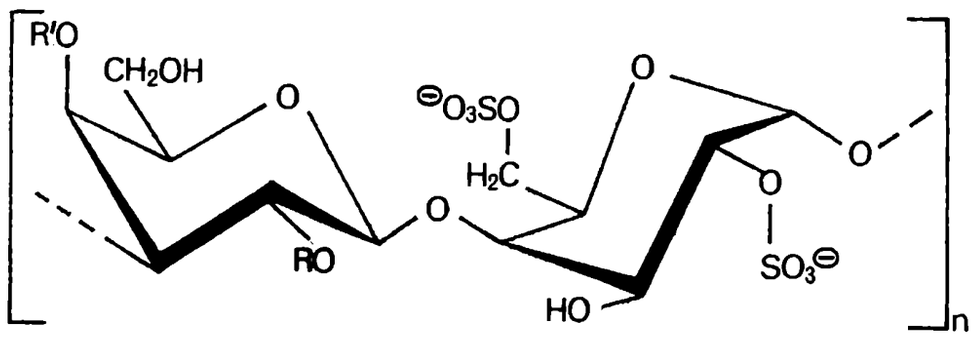


Fig. 1. Cuando R = SO_3^- , R' = H ; cuando R = H , R' = H y más raramente SO_3^-.

Una estructura alternante como la anterior no fue determinada en forma concluyente; sin embargo, la igual proporción de uniones α-(1→3)- y β-(1→4)-, así como la presencia de regiones de estructura alternante (obtención del dietil ditio acetal de la carrabiosa), sugerían una unidad repetitiva de este tipo. La determinación del contenido de "carrabiosa consecutiva" del λ-carragenano tratado con álcali (Anderson y Rees, 1966; ver Capítulo II, pág.31) y los estudios de acetólisis (Lawson y Rees, 1968) la confirmaron. La mayor labilidad de las uniones (1→4)- frente a la acetólisis explicaría porque Morgan y O'Neill (1959) no detectaron 4-0-β-D-galactopiranosil-D-galactosa entre los productos de degradación.

El término λ-carragenano fue originariamente usado para designar el polisacárido que quedaba en solución después de precipitar el κ-carragenano con cloruro de potasio (ver capítulo II, pág. 14). El examen de cierto número de muestras provenientes de diferentes especies y variedades estacionales (Black y col., 1965; Rees, 1963) indicó que, además de las características estructurales antes mencionadas, había cantidades variables de 3,6-anhidro-D-galactosa. Dolan y Rees (1965) determinaron que cuando el contenido de 3,6-anhidro-D-galactosa era bajo también lo era el de D-galactosa 4-sulfato; por lo tanto, la presencia de dichas unidades podía atribuirse a una contaminación o a una modificación de una estructura fundamental.

Se definió entonces como λ-carragenano a una molécula exenta de unidades de D-galactosa 4-sulfato y 3,6-anhidro-D-galactosa (Dolan y Rees, 1965; Fig. 2), en un extremo del espectro de una estructura básica variante.

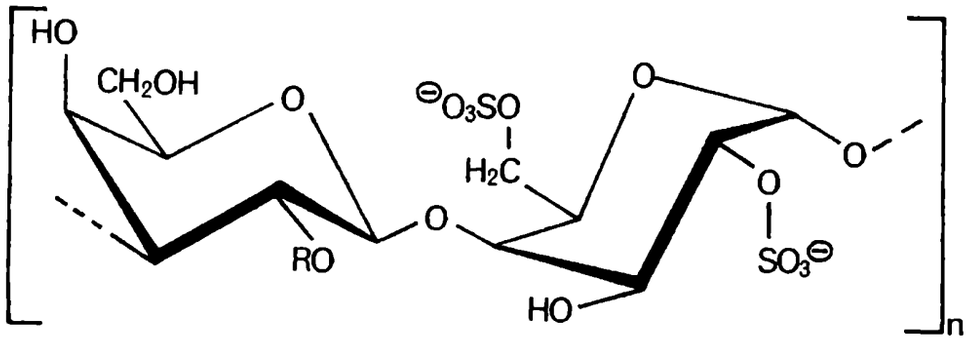


Fig. 2. λ-carragenano ; R = SO_3^- y más raramente R = H.

μ-carragenano

Anderson y Rees (1966) y Anderson y col. (1968 a) obtuvieron por tratamiento alcalino de la fracción soluble de Chondrus crispus (λ-carragenano según Smith y Cook, 1953) y por posterior fraccionamiento del carragenano modificado con cloruro de potasio a una concentración 0,3 M, dos subfracciones de las que determinaron la estructura: una soluble que provenía del λ-carragenano propiamente dicho y otra insoluble que provenía del denominado "tercer componente" o μ-carragenano. La estructura del μ-carragenano está indicada en la Fig. 3.

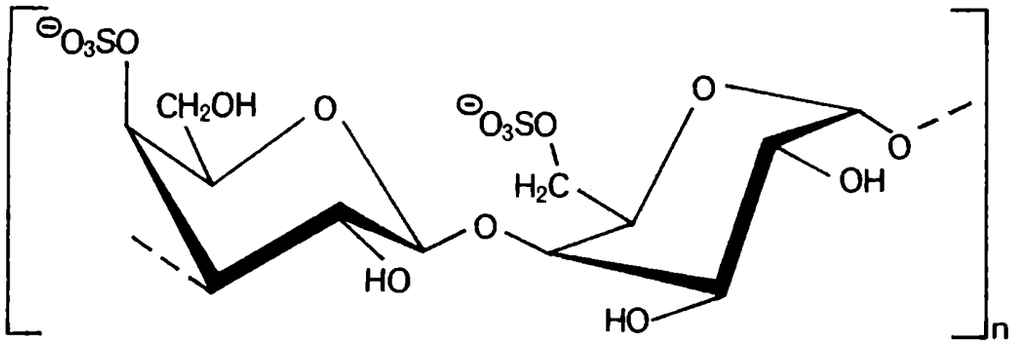


Fig. 3. μ-carragenano.

Además como el análisis por metilación de diversas fracciones solubles indicaba que a un mayor contenido de D-galactosa 4-sulfato correspondía, a su vez, un mayor contenido de 3,6-anhidro-D-galactosa, Anderson y col. (1968 a) consideraron que la estructura alternante fundamental del μ-carragenano estaba enmascarada por la presencia de unidades de 3,6-anhidro-D-galactosa que reemplazaban a las de D-galactosa 6-sulfato.

κ-carragenano

La estructura alternante del κ-carragenano había sido previamente propuesta por O'Neill (1955 b), sin embargo, como la relación molar galactosa :3,6-anhidrogalactosa:SO_3Na 1:0,83:1,17 no respondía a una estructura estrictamente alternante se propusieron algunas modificaciones a la misma (ver Capítulo II, pág. 17).

Anderson y col. (1968 c) demostraron que la explicación correcta residía en la presencia de una estructura repetitiva (Fig. 4) enmascarada por una cierta proporción de unidades de D-galactosa 6-sulfato y D-galactosa 2,6-disulfato que reemplazaban a las de 3,6-anhidro-D-galactosa; asimismo un pequeño porcentaje de estas últimas estaba sulfatado en el C-2.

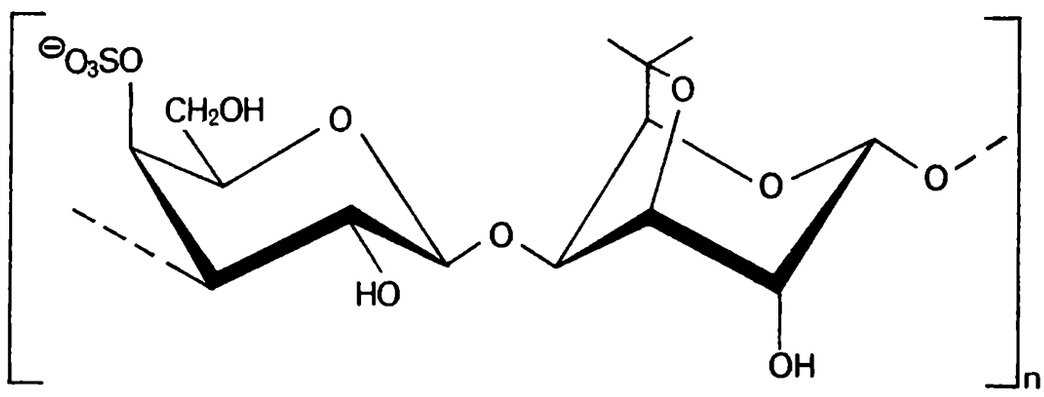


Fig. 4. κ-carragenano.

Para determinar la estructura del κ-carragenano (de Chondrus crispus) se procedió de la siguiente forma (Anderson y Rees, 1966; Anderson y col., 1968 c):

a- Por tratamiento alcalino se modificó su relación molar galactosa :3,6-anhidrogalactosa de 1:0,89 a 1:1. El aumento en el contenido de 3,6-anhidro-D-galactosa estuvo acompañado por una pérdida equimolecular de sulfato.

b- El contenido de "carrabiosa consecutiva" del κ-carragenano y del κ-carragenano tratado con álcali, se determinó por metanólisis suave que rompe las uniones 3,6-anhidrogalactosídicas pero no las uniones galactosídicas. Los porcentajes obtenidos antes y después del tratamiento con borohidruro alcalino resultaron ser 88% y 99% respectivamente, e indicaban que las unidades de galactosa 6-sulfato formaban parte de la cadena del polisacárido original. En efecto, en una estructura como la siguiente:

G-A-G-G'-G-A

(donde G= galactosa, A = 3,6-anhidrogalactosa y G'=galactosa 6-sulfato)

se liberaría por metanólisis, un sólo segmento de carrabiosa (G-A). A su vez, por tratamiento alcalino se obtendría:

G-A-G-A-G-A

con un contenido de "carrabiosa consecutiva" del 100%.

c- Por tratamiento del κ-carragenano con κ-carragenasa, el 80% del mismo se degradó a oligosacáridos de una serie homóloga cuyo miembro inferior resultó ser la neocarrabiosa 4-sulfato (3-0-(3,6-anhidro-

α-D-galactopiranosil)-D-galactosa 4-sulfato). Por otra parte, el fragmento resistente a la acción de la enzima (20%) no lo era si se lo sometía previamente al tratamiento alcalino. Esto era una evidencia más de que las unidades de galactosa 6-sulfato formaban parte del polisacárido original. Además, como entre los productos de la hidrólisis enzimática se aisló neocarrabiosa 4-sulfato, se confirmó la posición del éster sulfato sobre la unidad de D-galactosa y la configuración de la unión (1→3)- (Weigl y col., 1966).

d- El dosaje de los grupos 6-sulfato antes y después de la oxidación con periodato indicó que aproximadamente un 75% de los mismos se encontraba como galactosa 6-sulfato.

e- Por metilación del κ-carragenano y posterior hidrólisis se aisló la 2,6-di-O-metil-D-galactosa como producto principal. Con el objeto de aislar los derivados de la 3,6-anhidrogalactosa que se degradan en las condiciones habituales de hidrólisis ácida, se desarrolló un método que transforma las unidades de 3,6-anhidrogalactosa en los correspondientes ácidos aldónicos. Estos son estables en medio ácido, y se obtienen fácilmente al estado cristalino o como derivados cristalinos. El nuevo procedimiento involucra una hidrólisis oxidativa en presencia de bromo y en condiciones lo suficientemente suaves como para permitir únicamente la ruptura de las uniones 3,6-anhidrogalactosídicas. Después de eliminar el bromo, se aumenta la concentración de ácido sulfúrico y la temperatura para completar la hidrólisis. Los ácidos galactónicos se separan de los azúcares neutros por cromatografía de intercambio iónico y entre sí por cromatografía de partición en columna de celulosa o en papel. Así se determinó que los ácidos 3,6-anhidro-4-O-metil-D-galactónico y 3,6-anhi-

dro-2,4-di-O-metil-D-galactónico estaban ausentes entre los productos de hidrólisis del κ-carragenano, mientras que los ácidos 3,6-anhidro-2-O-metil-D-galactónico y 3,6-anhidro-D-galactónico se encontraban en una relación 6:1.

Cabe destacar que por metilación del κ-carragenano no se determina en forma unívoca la posición de la unión glicosídica y del éster sulfato. Además representa una dificultad adicional la liberación del sulfato durante la etapa de metilación (método de Haworth, 1915). Mayor información se puede obtener por desulfatación del polisacárido y posterior metilación. Sin embargo, el método de desulfatación con cloruro de hidrógeno metanólico (Johnston y Percival, 1950; Kantor y Schubert, 1957), que resultó útil para determinar la estructura de un λ-carragenano (Dolan y Rees, 1965), tiene uso limitado para polisacáridos ricos en 3,6-anhidrogalactosa debido a la ruptura glicosídica que acompaña a la desulfatación. Usov y col (1971) propusieron la desulfatación solvolítica (en dimetilsulfóxido-piridina) de polisacáridos sulfatados para reducir apreciablemente la despolimerización. Asimismo se pueden determinar las posiciones de los grupos sulfato por fragmentación a monosacáridos (Painter, 1966) u oligosacáridos (Penman y Rees, 1973 b) sulfatados: la primera involucra la autohidrólisis de la muestra (Painter, 1969) y la segunda la hidrólisis oxidativa de las uniones 3,6-anhidrogalactosídicas en condiciones de mínima desulfatación.

Penman y Rees (1973 b), aplicando el método de hidrólisis oxidativa confirmaron la estructura del κ-carragenano previamente estudiado por Anderson y col. (1968 c).

Cabe destacar que el carragenano extraído del alga Eucheuma cottonii no se pudo fraccionar con cloruro de potasio, y al determinar su estructura se encontró que se trataba de un κ-carragenano que contenía un 7,2% de D-galactosa 6-sulfato (Anderson y col., 1973).

ι-carragenano

A partir del alga Eucheuma spinosum se extrajo un carragenano que tampoco pudo fraccionarse con cloruro de potasio; se demostró que su estructura consistía de una unidad repetitiva (ι-carragenano; Fig.5) enmascarada por un 9,5% de unidades de D-galactosa 2,6-disulfato que reemplazaban a las unidades de 3,6-anhidro-D-galactosa 2-sulfato (Anderson y col., 1973).

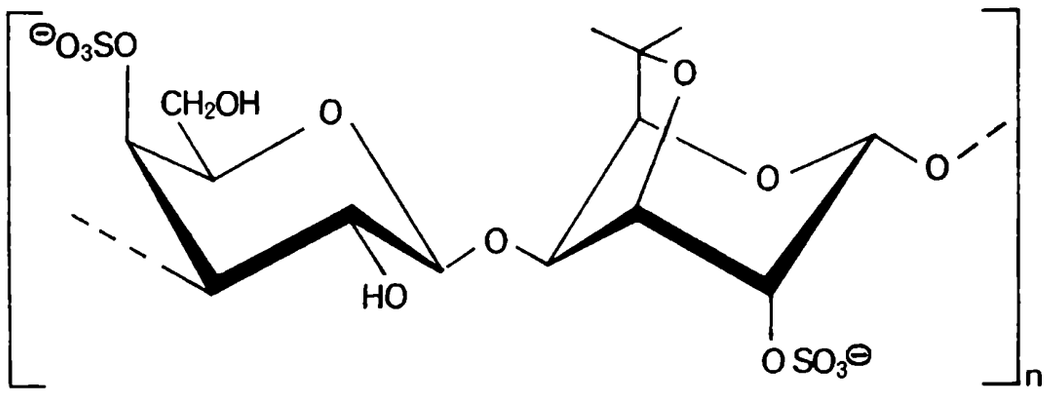


Fig. 5. ι-carragenano

ν-carragenano

Por tratamiento alcalino de la fracción soluble a una concentración 3 M de cloruro de potasio del carragenano de Eucheuma uncinatum, y por posterior fraccionamiento de la fracción modificada con cloruro de potasio a una concentración 0,3 M, se aisló una subfracción insoluble que provenía del que se denominó ν-carragenano (Fig. 6). Así como el μ-carragenano sería precursor biológico del κ-carragenano, el

ν-carragenano lo sería del ι-carragenano. Cabe destacar que la fracción insoluble a una concentración 3 M de cloruro de potasio del carragenano de partida tenía, una estructura de ι-carragenano (Stancioff y Stanley, 1969).

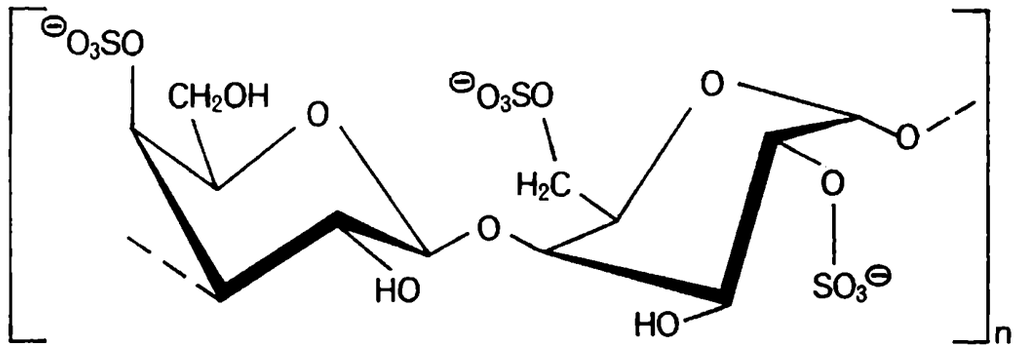


Fig. 6. ν-carragenano.

Stancioff y Stanley (1969) ampliaron las definiciones de κ- y λ-carragenano de Smith y Cook (1953). Denominaron carragenanos del grupo κ a aquellos que forman geles con cloruro de potasio (κ- y ι- carragenano) o pueden llegar a formarlos por tratamiento con borohidruro alcalino (μ- y ν-carragenano). A su vez el grupo λ estaría constituído por aquellos carragenanos que no forman geles aún después del tratamiento alcalino (λ - y ε-carragenano). La estructura del ε-carragenano fue determinada en el carragenano de Gigartina atropurpurea (Penman y Rees, 1973 a; Fig. 7).

A modo de conclusión podemos decir que las estructuras definidas por la escuela inglesa no son más que casos extremos de las innumerables estructuras que, como una función continua, constituyen la "familia de polisacáridos" de los carragenanos.

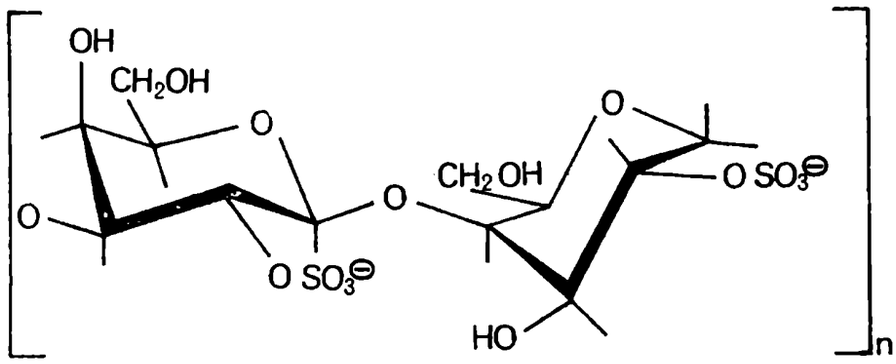


Fig. 7. ε -carragenano.

ESTUDIOS REALIZADOS EN LA ARGENTINA

Este capítulo ha sido realizado con el fin de presentar, en un conjunto, los trabajos químicos efectuados sobre carragenanos en la Argentina.

Luzzati (1953) presentó un trabajo sobre la "Extracción del ficocoloide de la Iridaea cordata"*. Obtuvo el carragenano utilizando una técnica original basada en métodos previamente descriptos en la literatura. En las mismas condiciones extrajo el carragenano de Chondrus crispus. Concluyó que si bien la composición y las propiedades químicas (comportamiento frente al reactivo de Stokes, de Millon, hidróxido de potasio 10%, cloruro férrico 5%, acetato neutro de plomo 20%,

* El nombre de ficocoloide fue asignado por Tseng (1946) a todos los polisacáridos derivados de algas rojas o pardas capaces de formar sistemas coloidales cuando se dispersan en agua. Dicho término fue propuesto para diferenciar gomas y mucílagos (coloides de origen terrestre) de aquellos obtenidos de algas marinas.

acetato básico de plomo, etc.) eran semejantes, no sucedía lo mismo con las propiedades físicas ya que a igualdad de concentración "la iridoficina" (carragenano de Iridaea cordata) tenía una viscosidad notablemente superior a la de "la carragenina" (carragenano de Chondrus crispus) y, si bien una solución de iridoficina al 5% en agua no gelificaba, si lo hacía una solución al 5% de carragenina.

Barón (1954) extrajo el carragenano de Iridaea cordata empleando el método usado por Luzzati y, además de determinar su composición y sus propiedades físicas (poder rotatorio, viscosidad y pH), analizó su comportamiento frente a una serie de reactivos específicos (precipitación con safranina y con clorhidrato de bencidina, reacción con iodo y con carbazol, y preparación del ácido libre) y llevó a cabo los correspondientes estudios de oxidación con ácido periódico y de hidrólisis alcalina. Del ensayo de oxidación con ácido periódico y de la hidrólisis alcalina, y en base a los trabajos de Buchanan y col. (1943) y Dillon y O'Colla (1951) (ver Capítulo II, pág. 10), concluyó que el carragenano estaba formado por unidades de D-galactosa con uniones (1→3)-, y que dichas unidades se encontraban probablemente sulfatadas en el C-4.

Steinitz (1955) efectuó un "Estudio del método de obtención y determinación del ficocoloide de Iridaea cordata". Analizó todas las variables que intervienen en la extracción del carragenano: concentración de sales y proporción del líquido de extracción, temperatura y tiempo, y estudió la influencia de estos factores sobre la calidad, rendimiento y facilidad de extracción. Propuso además dos métodos para la determinación del carragenano: a) Método viscosimétrico que refiere a curvas patrones que se confeccionan con el carragenano obtenido en las

mismas condiciones, y b) Dosaje del ión sulfato con bendicina aplicando un factor de conversión que se establece.

Torcat Rojas (1955) presentó un trabajo de características industriales que reviste interés desde el punto de vista químico, pues analiza el comportamiento de una solución al 1-2% del carragenano de Iridaea cordata frente a cantidades fijas de cloruros de amonio, potasio, bario, calcio y magnesio, observándose formación de geles en todos los casos. Además se determinó que el carragenano tiene buenas características como estabilizante en suspensiones de chocolate amargo con leche (formación de geles de los carragenanos con leche; ver Capítulo III, pág. 58).

Hajdu (1956) en su trabajo "Extracción del ficocoloide de la Iridaea laminarioides" analizó las condiciones óptimas para la extracción del carragenano en función del rendimiento y de las propiedades. Determinó su composición química, hallándola cuantitativamente diferente a la indicada por Hassid (1933, ver Capítulo II, pág. 10), quien empleó un procedimiento distinto de extracción. Efectuó sobre el producto algunas reacciones de caracterización y determinaciones físicas, y aplicó técnicas de dosaje limitándose a utilizar la experiencia existente para la Iridaea cordata.

Lacoste de Díaz (1957) publicó un estudio sobre el "Ficocoloide de Gigartina skottsbergii". En el mismo se discuten los distintos factores que intervienen en la extracción del carragenano y su influencia sobre el rendimiento y la viscosidad (temperatura, agitación, presión, tiempo, filtración, precipitación con alcohol y secado), y se indica su composición. Se exponen además los resultados del comportamiento de las soluciones acuosas del ficocoloide frente a diferentes reactivos (hidróxido de potasio 10%, cloruro férrico 5%, acetato neutro de plomo

20%, acetato básico de plomo, etc.), y se analiza su poder gelificante en función del agregado de distintas sales, destacándose la influencia del cloruro de potasio en la formación de geles de notable firmeza.

Dados los resultados y conclusiones a que había llegado Lacoste de Díaz, Gómez Artero (1961) discutió con la autora la posibilidad de haber trabajado con un material similar a los utilizados en los trabajos de Tesis por Luzzati, Barón, Steinitz, Torcat Rojas y Hajdu, hecho que no pudo confirmarse porque no se guardaron testigos de las muestras usadas en estos últimos casos. Cabe destacar que posteriormente la Iridaea cordata fue reclasificada como Gigartina skottsbergii.

Todos los trabajos mencionados tienen simplemente valor desde el punto de vista histórico, ya que ninguno de ellos (salvo la oxidación con periodato y la hidrólisis alcalina (Barón, 1954)) encaró el análisis estructural o el fraccionamiento del carragenano con cloruro de potasio.

Durante de lo que podríamos denominar el cuarto período dentro del campo de investigación de los carragenanos (ver Capítulo II, pág. 19), Cerezo (1967 b; 1967 a) publicó los estudios realizados sobre dos variedades de Gigartina skottsbergii recogidas en mayo (invierno) y en octubre (primavera) en la estación algológica de Puerto Deseado (Santa Cruz). Se demostró que los carragenanos extraídos mostraban una diferencia fundamental con los similares obtenidos de Chondrus crispus, ya que sus soluciones presentaban sólo una pequeña precipitación a una concentración de cloruro de potasio 0,125 M, pero daban precipitaciones abundantes en el rango de concentraciones 0,3-0,4 M de cloruro de potasio en el caso de la muestra recolectada en mayo y 0,6-0,8 M en la recolectada en octubre. Además de estas precipitaciones que fueron

cuantitativamente las más importantes, se obtuvieron otras a diferentes concentraciones de cloruro de potasio que revelaron la complejidad de estos sistemas. Se determinaron las propiedades generales de las fracciones principales: espectro infrarrojo, poder rotatorio, análisis cuantitativo de los azúcares constituyentes, grupos éster sulfato y 6-sulfato, oxidaciones con periodato de sodio, cinética de hidrólisis de las uniones 3,6-anhidrogalactosídicas y de los grupos éster sulfato, etc.; en el caso de la fracción precipitada a una concentración 0,3-0,4 M de cloruro de potasio dicho estudio se completó por el análisis de metilación de la misma (Cerezo, 1973) y de su derivado parcialmente desulfatado (Cerezo, 1974).

El control industrial de los carragenanos se hace usualmente midiendo el poder gelificante, en condiciones normalizadas, y la viscosidad de sus soluciones. Estas pruebas, si bien son sencillas y dan idea de las posibles aplicaciones del producto, tienen poco significado respecto a la composición del mismo y no se pueden preveer los resultados de las modificaciones químicas que pueden realizarse sobre dicho producto. Las curvas de precipitación en función de la concentración de cloruro de potasio pueden ser usadas para caracterizar no sólo la muestra, sino también la distribución del material en sus fracciones componentes. Se diseñó un método rápido para la determinación de dicha curva (Matulewicz y Cerezo, 1975) que se basa en la precipitación de una solución de carragenano en condiciones normalizadas, a una dada concentración de cloruro de potasio, y la medición de la turbidez producida (ver Capítulo VII, pág. 160).

CAPITULO III

FORMACION DE GELES

GENERALIDADES

En ciertas condiciones es posible coagular un sol obteniéndose una masa semirrígida que incluye todo el líquido del sol; este producto se denomina gel.

El gel es un estado típico para los polisacáridos tanto en sistemas biológicos como artificiales. Los geles de los polisacáridos poseen funciones biológicas en las paredes celulares de vegetales en crecimiento, en fluídos y tejidos conectivos de animales y en cápsulas bacterianas. Su uso está ampliamente difundido en la industria alimentaria, de cosméticos, del papel y textil. En la laboratorio, el agar y el Sephadex se utilizan para cromatografía y electroforesis sobre geles. Derivados del Sephadex se emplean en cromatografía de intercambio iónico, y los geles del agar son medios de cultivo de muchos microorganismos.

En el curso de la formación de un gel las moléculas de polímero se entrelazan de modo que la viscosidad del sistema aumente, llegándose finalmente a un estado semisólido. Estos filamentos entrecruzados forman una red tridimensional que encierra al medio líquido dispersante en los intersticios. Es decir las cadenas de polisacáridos se encuentran libres y solvatadas en algunas regiones, y asociadas en otras para formar los entrecruzamientos. Las regiones asociadas se denominan "zonas de unión" y pueden estar constituídas por dos o más cadenas (Fig.8). Es importante, entonces, determinar los ordenamientos o interacciones moleculares entre los polímeros en las zonas de unión.

Se excluirá de esta discusión a los geles con entrecruzamientos que corresponden a uniones covalentes y se limitará a aquellos sistemas en los cuales la transición sol-gel se produce en ambas direcciones, es

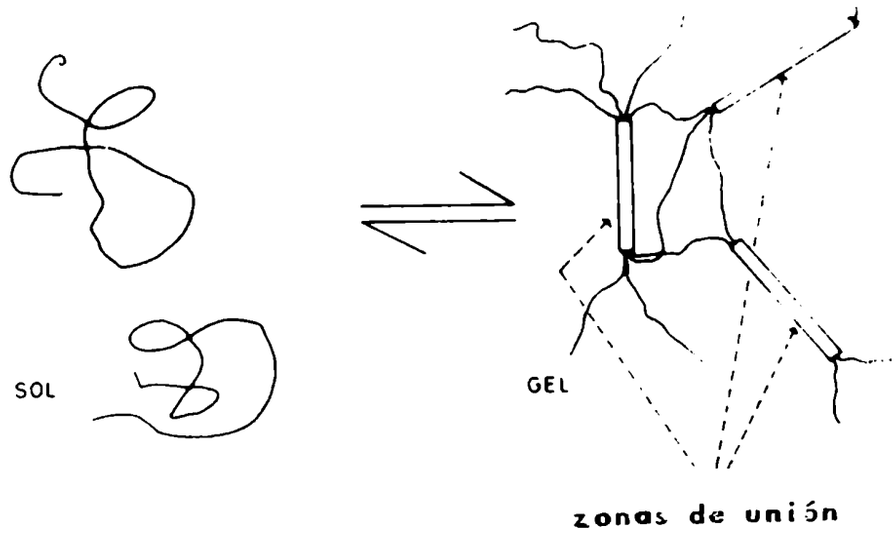


Fig. 8. Transición sol-gel de un polisacárido.

decir sistemas con zonas de unión no covalentes que son las involucradas en los geles de los carragenanos (Rees, 1969).

MECANISMO DE FORMACION DE GELES

Debido a la semejanza estructural y conformacional del κ- y del ι-carragenano (ver Capítulo II, págs. 30 y 34) se va a considerar que el mecanismo de formación de geles es análogo para ambos polisacáridos, dejando de lado las diferentes propiedades de los mismos tales como la fuerza y la elasticidad.

Se denomina "sinéresis" a la contracción espontánea de la red tridimensional con la consiguiente separación de fase líquida. Los carragenanos presentan este comportamiento. Este proceso constituye un desplazamiento a un estado más estable aunque su iniciación puede demorar varios días. Por lo tanto la red no es una "estructura dinámica"

que se está formando y destruyendo constantemente, sino que se produce un reordenamiento de las zonas de unión hasta llegar a un estado final de equilibrio.

Como el punto de fusión es definido y la fusión involucra una energía de activación alta, este proceso no es favorable a bajas temperaturas a menos que la entropía de activación sea muy elevada. A su vez la histéresis (ver Capítulo III, pág.52) indica que la gelificación ocurre más rápidamente a medida que disminuye la temperatura. Estas evidencias son compatibles con la interpretación de que la formación y la destrucción de las zonas de unión involucran un cambio de fase que se asemeja a la fusión de los cristales. A resultados similares, se llega mediante el estudio de la influencia de las variaciones estructurales en las propiedades del gel (ver Capítulo III, pág.50). El tratamiento alcalino de muestras que contienen tan sólo 0,5% de 6-sulfato produce un aumento considerable en la fuerza del gel, a pesar del efecto opuesto de la degradación; esto es una evidencia más que para la formación del gel es necesario el adosamiento de cadenas entre sí.

Dadas las analogías con el proceso de cristalización se postuló un ordenamiento en el gel, que involucra la formación de dobles hélices enrolladas hacia la derecha (Fig. 9), semejante al encontrado por difracción de rayos X para las fibras de κ- y ι-carragenano (Anderson y col., 1969). De hecho, las fibras utilizadas para los estudios de rayos X se prepararon por secado lento en frío de geles diluídos, y es muy probable que la estructura ordenada de las mismas haya provenido de zonas de unión microcristalinas.

Cuando los agregados son muchos, el gel pierde transparencia óp-

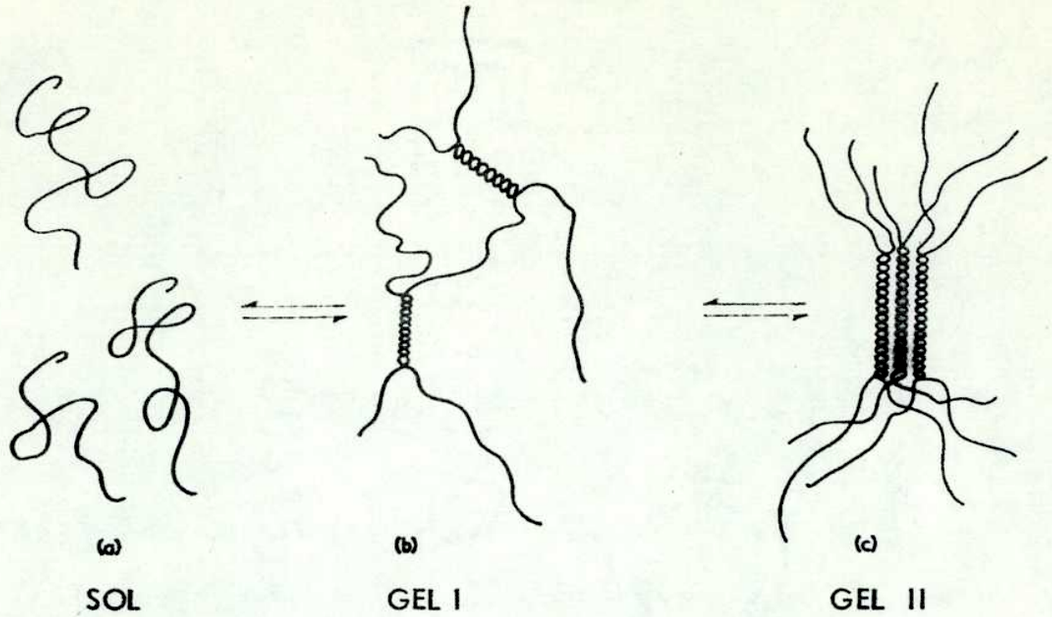


Fig. 9. Cadenas de polisacárido: (a) en solución, y (b) y (c) en el gel; (b) representa la formación de las dobles hélices y (c) su agregación.

tica y se produce la etapa posterior de sinéresis. Por lo tanto el proceso total puede considerarse como un cambio de un sol homogéneo a un gel compacto, quebradizo y opaco, suspendido en el fluído que ha perdido como resultado de su propia contracción. Esto se puede resumir de la siguiente forma (Rees, 1972 a):

sol $\rightleftharpoons$ gel incipiente $\rightleftharpoons$ gel transparente y elástico $\rightleftharpoons$ gel rígido $\rightleftharpoons$ gel turbio y rígido $\rightleftharpoons$ separación de fases (sinéresis)

Cabe destacar que el polisacárido no se encuentra en forma de hélices individuales en solución. Las conformaciones de los polisacáridos son dinámicas, a menos que existan interacciones intermoleculares como en las fibras, en los geles o en las redes cristalinas, pero como en los polisacáridos hay restricciones de tipo estérico, se puede conside-

rar que en solución fluctúan alrededor de conformaciones de mínima energía. Frecuentemente, hay un único mínimo que se encuentra próximo a la conformación en el estado sólido; sólo en ese caso las hélices representan cadenas de carragenano en solución.

CARACTERIZACION DE LAS ZONAS DE UNION

Las variaciones en la rotación óptica que acompañan a la transición sol-gel pudieron ser interpretadas sobre la base del mecanismo antes propuesto, en razón de la relación existente entre la rotación óptica y la conformación del polisacárido (Rees, 1970).

Cuando se enfrió una solución acuosa de K-carragenano, la rotación óptica y otras propiedades variaron muy poco hasta que la temperatura llegó a 40°. La Fig. 10 (Rees y col., 1969) muestra que en A (38,8°) la rotación óptica comenzó a aumentar, pero no se observó un cambio cualitativo en el aspecto de la solución. En B (37°) las medidas mecánicas indicaron que la transformación sol→gel se había producido; por ejemplo cuando se adicionaron unas gotas de mercurio, éstas no se hundieron; esta temperatura se denominó "punto de gelificación". En C (34,8°), punto de inflexión de la curva, hubo un cambio visible en la textura del gel; éste se volvió más rígido y perdió transparencia; esta temperatura se denominó "punto de enturbiamiento". A partir de D (30,6°), la rotación óptica comenzó a disminuir. Las temperaturas correspondientes a los estados A, B, C y D dependen de la concentración y del polisacárido utilizado.

A mayores temperaturas que A, la solución contiene moléculas en conformaciones desordenadas. En A se inicia la formación de las dobles

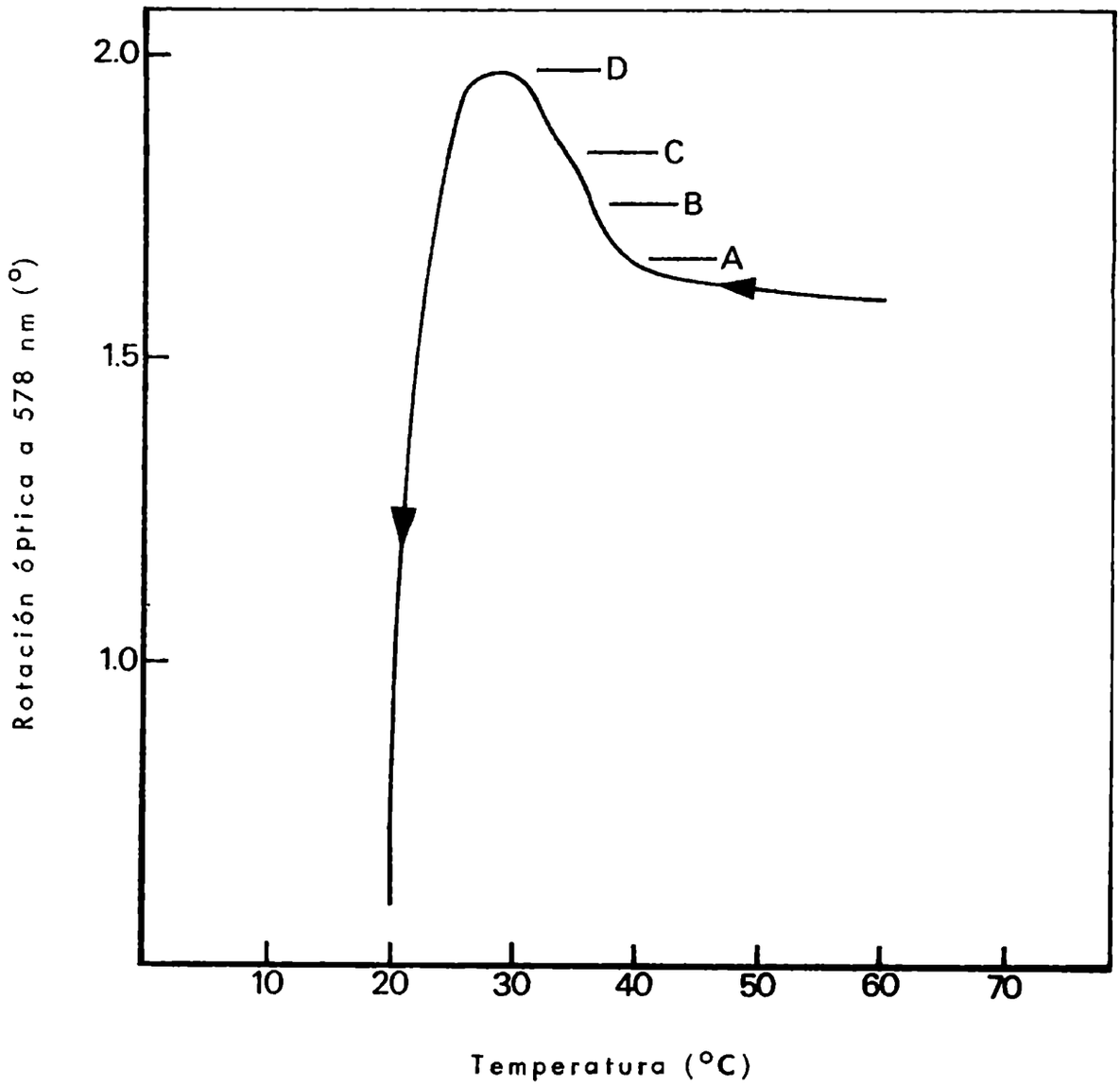


Fig. 10. Variación de la rotación óptica en función de la temperatura para una solución de κ-carragenato de potasio al 3,2% en agua.

hélices que contribuyen positivamente a la rotación óptica, pero hay muy pocas para formar la red hasta que se alcanza el punto de gelificación B. En C, las hélices comienzan a formar los agregados y como éstos contribuyen negativamente a la rotación se produce la inflexión. La variación de la rotación óptica con la temperatura resulta positiva hasta D debido a que la contribución correspondiente a la formación de las dobles hélices contrarresta a la de los agregados; a partir de D di-

cha variación se vuelve negativa. En la Fig. 11 se indica cualitativamente como contribuyen a la rotación óptica las dobles hélices y los agregados en función de la temperatura (Rees y col., 1969).

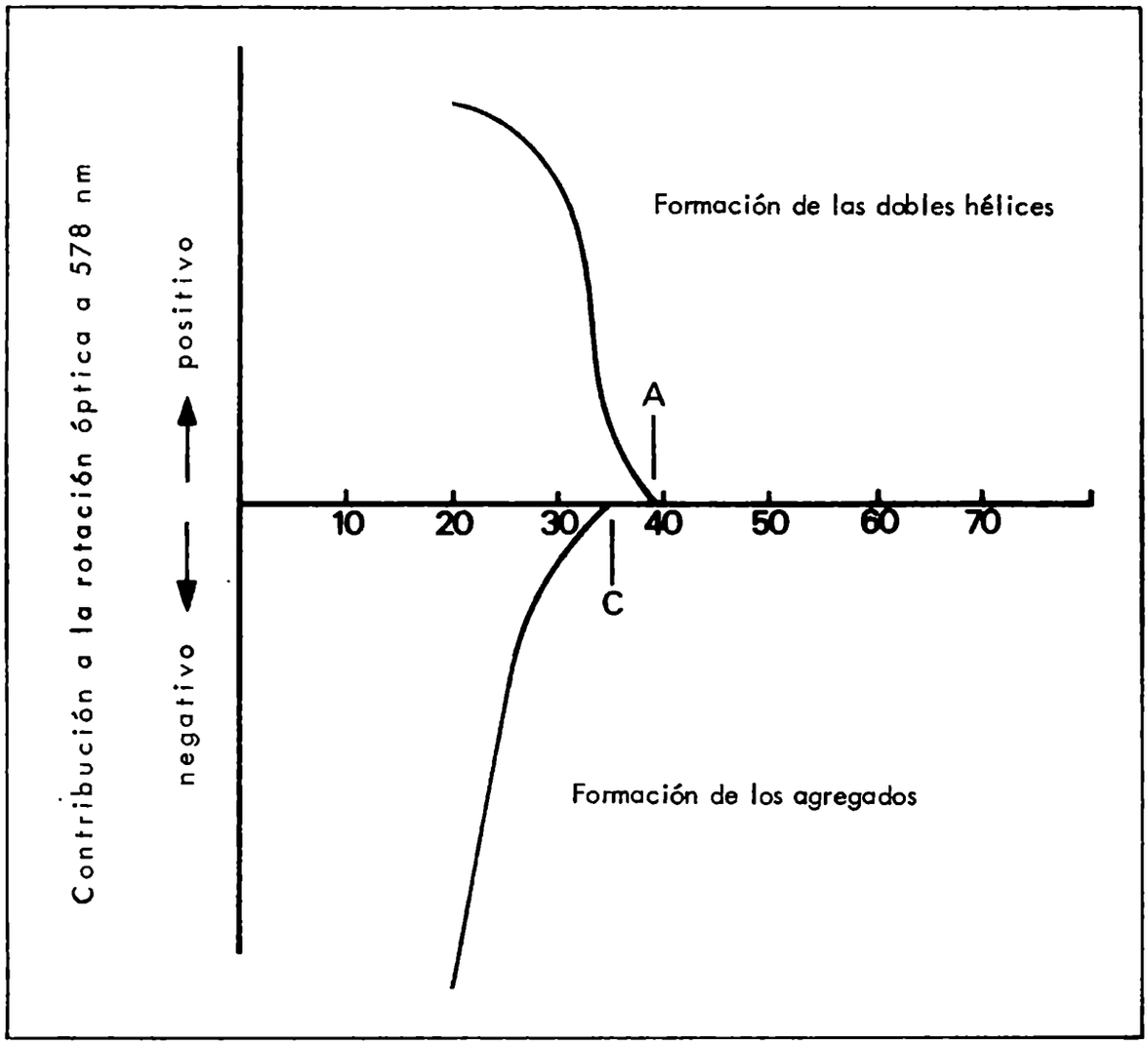


Fig. 11. Contribución a la rotación óptica de las dobles hélices y los agregados, en función de la temperatura.

McKinnon y col. (1969) estudiaron la variación de la rotación óptica en función de la temperatura para soluciones de ι-carragenano degradado por el método de Smith (Smith y Montgomery, 1959 b). Si bien las soluciones no gelificaban debido a que los "segmentos" eran dema-

siado cortos como para formar una red, los poderes rotatorios obtenidos a bajas y altas temperaturas coincidieron con los calculados (Rees y col., 1970) para una conformación de doble hélice y de enrollamiento al azar respectivamente. La duplicación de los pesos moleculares promedio pesado y promedio numérico a bajas temperaturas confirmó, además, la formación de los dímeros (Jones y col., 1973). A partir de los pesos moleculares de los segmentos y del polisacárido sin degradar, se determinó que cada cadena de este último contendría ocho o más regiones capaces de formar dobles hélices. La conversión a hélices de tantos segmentos independientes dentro de una misma cadena, es de esperar que esté bastante impedida a medida que progresa la formación de la red. Sin embargo, estudios de rotación óptica indicaron que se formaban por lo menos 6 dobles hélices independientes dentro de una misma cadena (conversión de un 70-90% de las regiones que poseen una estructura covalente apropiada) (Bryce y col., 1974).

La transición sol-gel también puede estudiarse por r.m.n. de ^{13}C (Bryce y col., 1974). En la Fig. 12 se observan los espectros correspondientes a una solución al 6% de segmentos de ι-carragenano en cloruro de sodio 0,1 M a dos temperaturas diferentes, 80° y 15°. Como puede verse se obtienen picos bien definidos a 80°, cuando las moléculas del polisacárido se encuentran en un estado de enrollamiento al azar, tal como lo indican los resultados de la rotación óptica. Los picos a 104 ppm y 94 ppm se asignan a las resonancias de los núcleos de carbono anoméricos y la señal a 63 ppm a la resonancia del núcleo del carbono del hidroximetilo. Todos estos picos desaparecen a 15° que corresponde al límite de conversión a la doble hélice. Evidentemente la movilidad

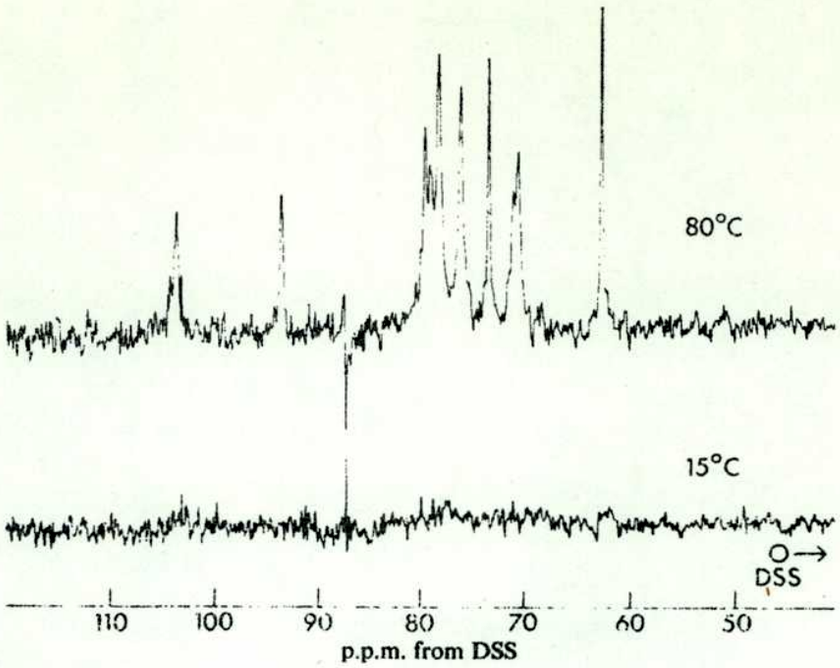


Fig. 12. Espectro r.m.n. de ^{13}C de segmentos de ι-carragenano (sal de potasio) al 6% en cloruro de sodio 0,1 M, a 80° (espectro superior) y 15° (espectro inferior).

de las unidades está tan restringida en la hélice que los tiempos de relajación de los núcleos de carbono disminuyen y provocan el ensanchamiento y la consiguiente desaparición de los picos del espectro.

Finalmente, cabe mencionar que en la precipitación de los carragenanos con cloruro de potasio, el catión potasio induciría la formación de las dobles hélices y la consiguiente gelificación (Penman y Rees, 1973 a).

INFLUENCIA DE LA ESTRUCTURA EN LA FORMACION DEL GEL

Cantidades mayores de unidades de D-galactosa 6-sulfato y D-galactosa 2,6-disulfato unidas por la posición 4 ("unidades enmascarantes"; ver Capítulo II, pág.30) y de D-galactosa 2-sulfato unidas por la

posición 3, pueden inhibir la formación del gel. A diferencia de las unidades de 3,6-anhidro-D-galactosa que están en la conformación piranósica 1C, las unidades enmascarantes se encuentran en la conformación C1. Esto modifica la estructura secundaria y la conformación preferida será la indicada en la Fig. 13a.

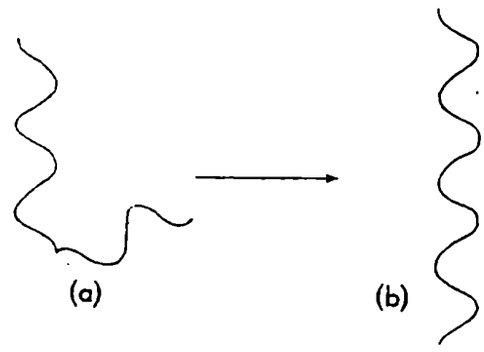


Fig. 13. Influencia de la estructura primaria sobre la conformación de la molécula.

Una pequeña proporción de dichas unidades enmascarantes tendría la función biológica de obligar a las cadenas a formar dobles hélices con más de una molécula, en vez de una única doble hélice asociada a lo largo de toda la cadena, hecho que es indispensable para obtener una red tridimensional. Las algas poseen enzimas como las galactosa 6-sulfato alquiltransferasas que regulan la distribución de las unidades enmascarantes por eliminación del grupo 6-sulfato, para dar el anillo de 3,6-anhidro y la conformación indicada en la Fig. 13b (Lawson y Rees, 1970).

Por otro lado, la sulfatación irregular del C-4 de la unidad de D-galactosa o del C-2 de la unidad de 3,6-anhidro-D-galactosa no interfiere estéricamente en la formación del gel I, pero complicaciones de tipo electrostático pueden inhibir la formación del gel II (Fig. 9).

En efecto, las soluciones de ι-carragenano, a diferencia de las de κ-carragenano, no sufren agregación, de donde se concluye que el grado de sulfatación tiene gran influencia sobre el poder gelificante y las propiedades del gel (Dea y Morrison, 1975).

HISTERESIS

Para moléculas en equilibrio, un cambio del estado A al estado B sigue el mismo camino que del estado B al estado A (principio de reversibilidad microscópica). Sin embargo, puede suceder que el camino de A a B sea diferente del de B a A, aún cuando los cambios se efectúen en forma excesivamente lenta y sean reproducibles en su totalidad. Este fenómeno se denomina "histéresis". La histéresis se reconoce fácilmente si se hace el barrido de un proceso de A a B y se invierte el camino.

Las soluciones de κ-carragenano y de κ-carragenano degradado presentan este comportamiento (Dea y Morrison, 1975, y referencias allí citadas). La Fig. 14 muestra la curva de histéresis para el κ-carragenano (Rees y col., 1969).

Para explicar este fenómeno es necesario analizar las superficies de energía libre (Fig. 15). Se van a considerar pares de cadenas en los tres estados: conformación de enrollamiento al azar (C), doble hélice (D) y el estado de transición (A) que involucra una doble hélice parcialmente formada. Las entropías configuracionales se encuentran en el siguiente orden, $C > A > D$, y la fusión ($D \rightarrow A \rightarrow C$) y la formación ($C \rightarrow A \rightarrow D$) del gel siguen los caminos indicados por las flechas de la izquierda y de la derecha, respectivamente. Para simplificar, las energías libres de

C y D son relativas a la de A y la variación de la energía libre de A con la temperatura aparece como una meseta paralela al eje de tempe-

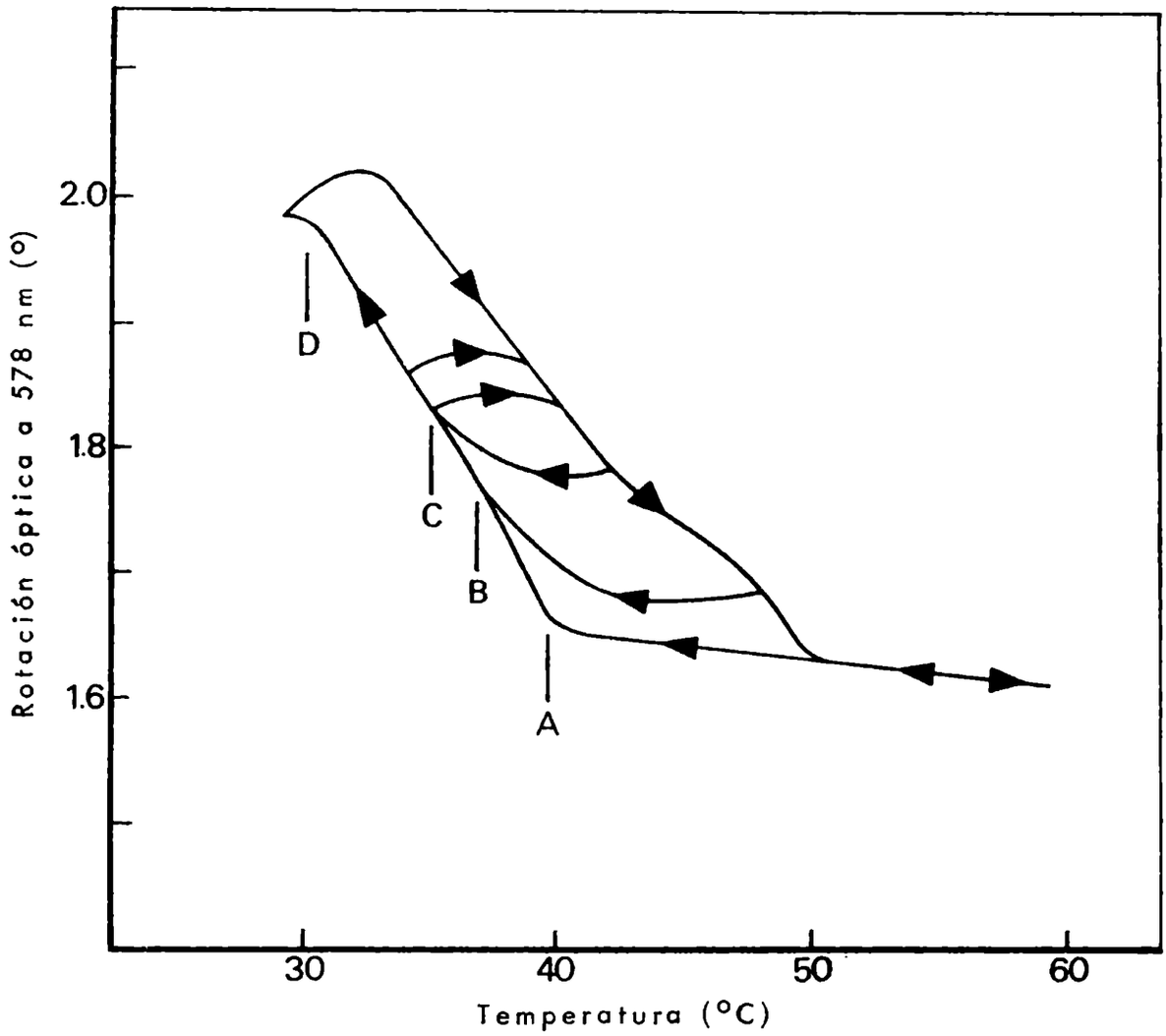


Fig. 14. Curva de histéresis de una solución de κ-carragenato de potasio al 3,2% en agua.

raturas correspondiente. A altas temperaturas, la contribución $T\Delta S$ determina que C tenga la energía libre menor; cuando desciende la temperatura, este término disminuye y D representa el mínimo.

Al enfriar la solución, se alcanza una temperatura a la cual sería posible la distribución de las moléculas entre los estados C y D, pero

ello no sucede debido a la altura de la barrera de activación. La presencia de esta barrera de activación se puede interpretar como que el estado de transición requiere una conformación ordenada que no es posible a esa temperatura. Al proseguir el enfriamiento, con la consiguiente variación del término $T\Delta S$, la energía libre de C se aproxima a la de A y se llega eventualmente a un punto por donde la barrera puede ser atravesada; entonces se produce la transición $C \rightarrow D$.

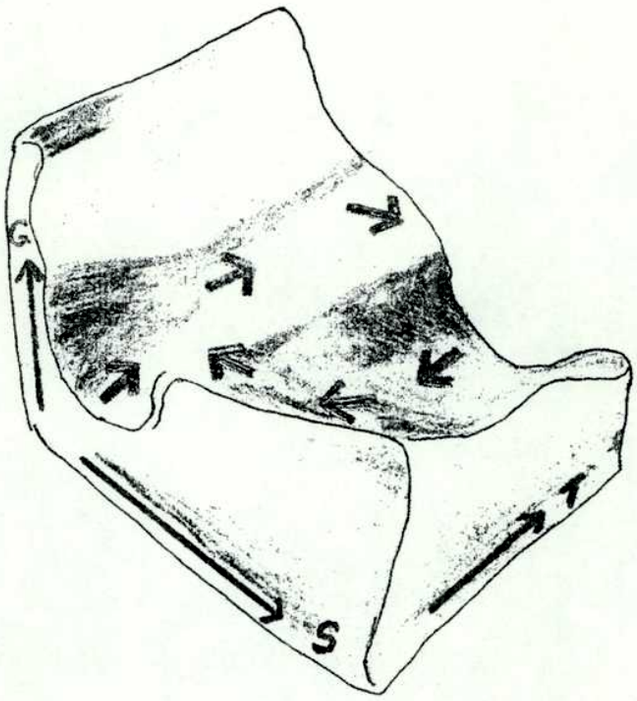


Fig. 15. Superficie de energía libre.

Al calentar el sistema, éste sigue el camino de la izquierda; pero nuevamente la distribución entre D y C no está controlada por las energías libres relativas debido a la barrera de activación.

Si bien se sabe que el fenómeno de histéresis está asociado a la formación y disociación de las dobles hélices, más que a su agregación

(que es un estado aparte de la transición sol-gel), se desconoce aún si la red como un todo contribuye o modifica este fenómeno. Llama la atención, además, la ausencia de histéresis para el ι-carragenano (Dea y Morrison, 1975) y el ι-carragenano degradado (Jones y col., 1973).

GELES DE CARRAGENANOS CON GALACTOMANANOS

Un hecho interesante de mencionar es que cuando se mezcla una solución de κ-carragenano, por debajo de su concentración de gelificación, con un galactomanano no gelificante adecuado (ver más adelante) se obtiene un gel (Rees, 1972 a; Rees, 1972 b). Un comportamiento similar presenta una solución de κ-carragenano degradado por el método de Smith, que al igual que el ι-carragenano degradado (ver Capítulo III, pág. 48), forma dobles hélices pero no gelifica (Dea y col., 1972; Dea y Morrison, 1975).

Las Figs. 16 y 17 muestran las curvas de rotación óptica en función de la temperatura para el κ-carragenano y el κ-carragenano degradado, sin y con galactomanano, respectivamente (Dea y col., 1972; Dea y Morrison, 1975).

La similitud en la forma de las curvas de las Figs. 16 y 17 es una evidencia de la formación de dobles hélices en las mezclas con galactomananos. La magnitud de la rotación óptica observada en presencia de galactomanano indica que tanto la licuefacción como la gelificación se producen a menores contenidos de dobles hélices. Si se comparan las curvas correspondientes para los segmentos de κ-carragenano se observa que en presencia de galactomanano se produce el ensanchamiento de la curva de histéresis y el desplazamiento de la misma hacia

mayores temperaturas.

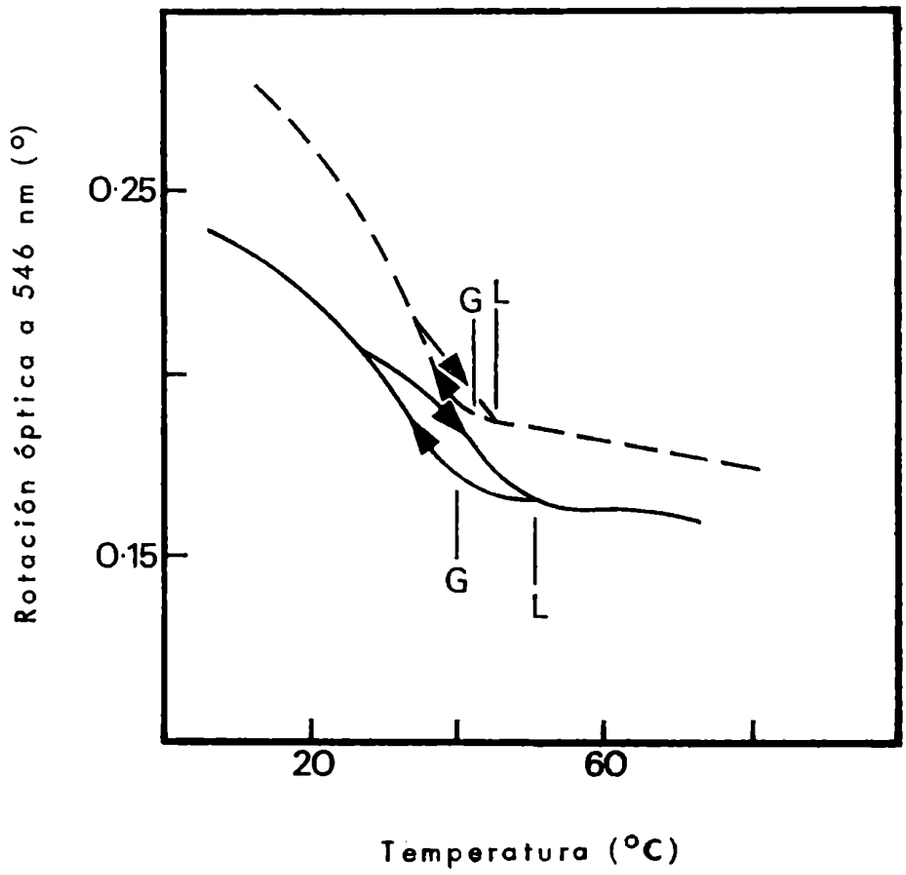


Fig. 16. Variación de la rotación óptica en función de la temperatura para soluciones de κ-carragenato de potasio (——) y de κ-carragenato de potasio degradado (- - -) al 3% en agua. G es el punto de gelificación y L el de licuefacción.

El hecho de que los galactomananos con menor contenido de galactosa interaccionen más favorablemente con el κ-carragenano o el κ-carragenano degradado, es un indicio más de que las regiones pobres en galactosa son las más efectivas en la unión con estos polisacáridos.

Se propone el siguiente modelo para explicar la interacción de los carragenanos con los galactomananos (Fig.18; Dea y col., 1972; Rees, 1972 a; Rees, 1972 b; Dea y Morrison, 1975).

El galactomanano está constituído por una cadena de unidades de D-manosa enlazadas por uniones β-(1→4)- con ramificaciones de D-galactosa en posición α-(1→6). Las partes no ramificadas del mismo pue-

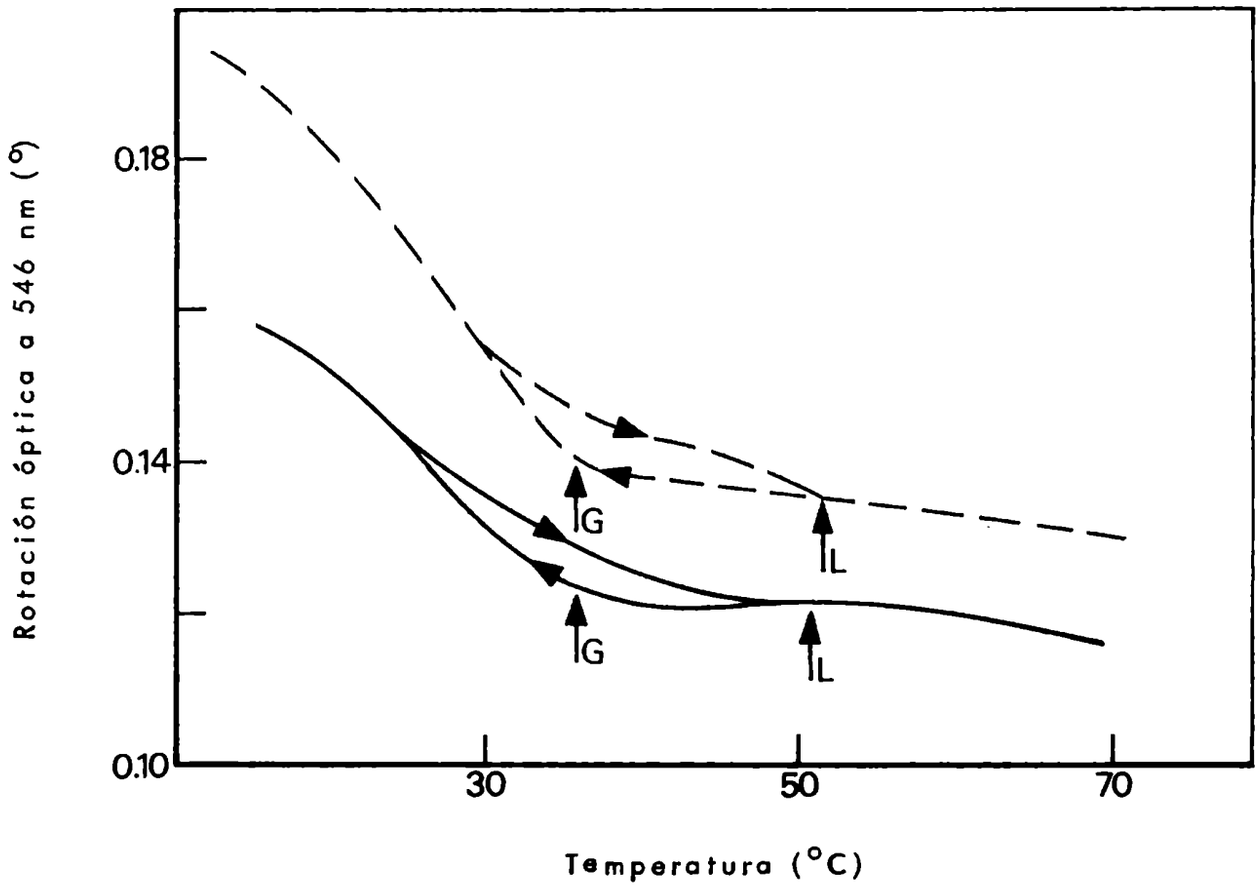


Fig. 17. Variación de la rotación óptica con la temperatura para soluciones de κ-carragenato de potasio (—) y de κ-carragenato de potasio degradado (- - -), en presencia de galactomanano; la concentración en agua es del 2% respecto del carragenano y del 1% respecto del galactomanano. G es el punto de gelificación y L el de licuefacción.

den pasar de una conformación de enrollamiento al azar a una conformación regular extendida que puede estabilizarse por unión a las dobles hélices del carragenano. Esta unión provee un entrecruzamiento extra que permite la formación de geles a menores concentraciones de κ-carragenano y de las soluciones no gelificantes de κ-carragenano

degradadc. Las partes de la cadena de galactomanano que poseen la ramificación de D-galactosa no pueden unirse a las hélices; como se encuentran en una conformación de enrollamiento al azar, confieren elasticidad al gel, y como impiden la asociación, se oponen a la sinéresis.

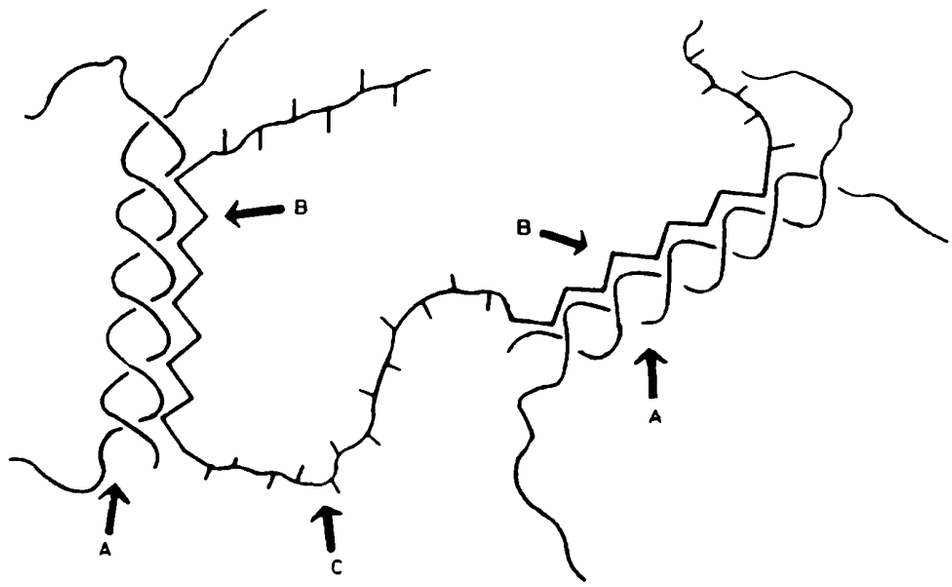


Fig. 18. Geles de carragenanos con galactomananos. A: dobles hélices de carragenano, B: conformación regular extendida del galactomanano y C: porción de enrollamiento al azar del galactomanano.

En base al modelo anterior, se podría explicar la falta de interacción entre el ι-carragenano y el galactomanano, como debida a impedimentos de tipo estérico por la presencia de sulfatos en la parte exterior de la doble hélice (Dea y Morrison, 1975).

GELES DE CARRAGENANOS CON κ-CASEINA

Los más recientes análisis de la constitución de la caseína, lleva-

dos a cabo sobre numerosas muestras de leche, la presentan como una mezcla de gran complejidad. Seitov y Zhumashev (1970) determinaron 15 fracciones que designaron α_1, α_2, α_3, α_4, α_5, α_6, κ_2, κ_0, κ_1, β_1, β_2, β_3, γ_1, γ_2 y γ_3.

Grindrod y Nickerson (1968) demostraron que la κ-caseína es la única proteína de la leche que interacciona con el carragenano.

Snoeren y col. (1975) estudiaron por ultracentrifugación la interacción entre el κ-carragenano y diferentes caseínas y determinaron que sólo la κ-caseína forma complejos con el polisacárido. De la influencia de la fuerza iónica en la formación del complejo concluyeron que dicha interacción es electrostática, aún en la zona alcalina del punto isoeléctrico de la κ-caseína, y atribuyeron la reactividad a una distribución determinada de los grupos aniónicos y catiónicos en la cadena del polipéptido (estructura primaria). Los grupos catiónicos estarían orientados hacia los grupos sulfato del carragenano.

Snoeren (1976) encontró, además, que el λ-carragenano no forma geles con la κ-caseína.

CAPITULO IV

ESPECTROMETRIA DE MASAS DE AZUCARES METILADOS

GENERALIDADES

Desde hace años, la espectrometría de masas se ha convertido en un complemento muy útil de los métodos químicos para la determinación de estructuras de compuestos orgánicos.

La espectrometría de masas se aplicó por primera vez a los hidratos de carbono cuando Finan y col. (1958) informaron haber realizado los espectros de masas de la D-glucosa , D-galactosa, D- galactosa 6-sulfato, metil α- y β-D-glucopiranósidos y una serie de disacáridos. Unos años más tarde se iniciaron estudios sistemáticos, simultáneamente en diferentes partes del mundo, demostrando la utilidad de los espectros de masas en el campo de los hidratos de carbono.

Como es sabido, en el análisis estructural de los polisacáridos por metilación y posterior hidrólisis ácida se obtienen mezclas de monosacáridos parcialmente metilados que es necesario separar e identificar; la espectrometría de masas permite identificar cantidades mínimas de sustancia en forma rápida y precisa.

Para determinar la posición de los sustituyentes por espectrometría de masas en un monosacárido parcialmente metilado se puede proceder de varias maneras:

a- Uno de los métodos más antiguos consiste en convertir el monosacárido parcialmente metilado en el metilglicósido que se metila luego con ioduro de trideuteriometilo. A partir del espectro de masas del permetil derivado así obtenido, y por comparación con espectros tabulados se determina la posición de los grupos trideuteriometoxilo, que es la posición de los hidroxilos libres en el monosacárido de partida. Es importante destacar que por espectrometría de masas no se

pueden diferenciar estereoisómeros con distribución análoga de metoxilos; para los polisacáridos que contienen diferentes azúcares se determinan las constantes de los monosacáridos trideuteriometilados y se comparan con las de muestras auténticas permetiladas, que son fáciles de obtener. Se completa así la identificación del monosacárido parcialmente metilado con la ventaja de que no se requieren muestras auténticas parcialmente metiladas (Kochetkov y Chizhov, 1966, y referencias allí citadas).

b- Se pueden efectuar directamente los espectros de masas de los metilglicósidos de los monosacáridos parcialmente metilados que, si bien se fragmentan de manera análoga a los glicósidos permetilados, presentan efectos de sustituyente debido a las diferentes probabilidades de eliminación de los grupos metoxilo e hidroxilo. Este método tiene el inconveniente de que la descomposición térmica de los compuestos que poseen hidroxilos libres, puede influir en el espectro obtenido (Lönngren y Svensson, 1974, y referencias allí citadas).

c- Se demostró que los espectros de masas de los trimetilsilil derivados de los monosacáridos parcialmente metilados presentan las fragmentaciones características de los pertrimetilsilil y permetil derivados, que a su vez son similares entre sí (Dutton, 1974, y referencias allí citadas).

d- Análogamente, los espectros de masas de los acetatos correspondientes presentan las fragmentaciones de los peracetatos y los permetil derivados (Budzikiewicz y col., 1964).

e- Con el objeto de evitar la formación de mezclas anoméricas y de isómeros de anillo, los monosacáridos parcialmente metilados se redu-

cen a alditoles que luego se pueden analizar como los acetatos correspondientes. Hay que tener presente que por reducción dos aldosas diferentes pueden dar el mismo alditol y una cetosa da dos alditoles. Este inconveniente se puede solucionar utilizando borodeuteriuro de sodio para la reducción.

Dado que la identificación de los monosacáridos parcialmente metilados, obtenidos por hidrólisis del polisacárido metilado de Iridaea undulosa Bory, se llevó a cabo por espectrometría de masas de los acetatos de alditoles correspondientes, a continuación se discutirán en detalle las fragmentaciones de los mismos.

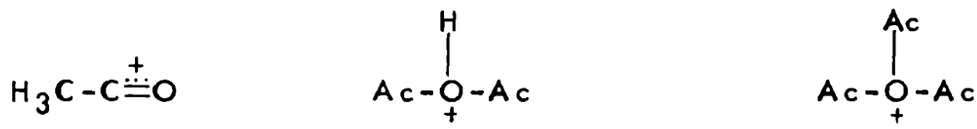
ESPECTROMETRIA DE MASAS DE LOS ACETATOS DE ALDITOLES PARCIALMENTE METILADOS

La espectrometría de masas de los acetatos de alditoles parcialmente metilados ha sido ampliamente estudiada comparando los espectros de compuestos marcados con deuterio con los de los compuestos sin marcar (Björndal y col., 1967; Björndal y col., 1970 a; Björndal y col., 1970 b; Axberg y col., 1972).

La investigación sistemática de los espectros de masas condujo a las siguientes generalizaciones:

a- No se pueden diferenciar estereoisómeros, es decir derivados de diferentes azúcares con distribución análoga de metoxilos.

b- El pico base del espectro es generalmente, pero no siempre, el m/e 43 (ión acetilo). Los picos correspondientes a los iones diacetil (m/e 103) y triacetil (m/e 145) oxonio son poco importantes, a menos que haya varios grupos acetilo adyacentes como en el 1,2,3,4,5-penta-O-acetil-6-O-metil-D-glucitol.

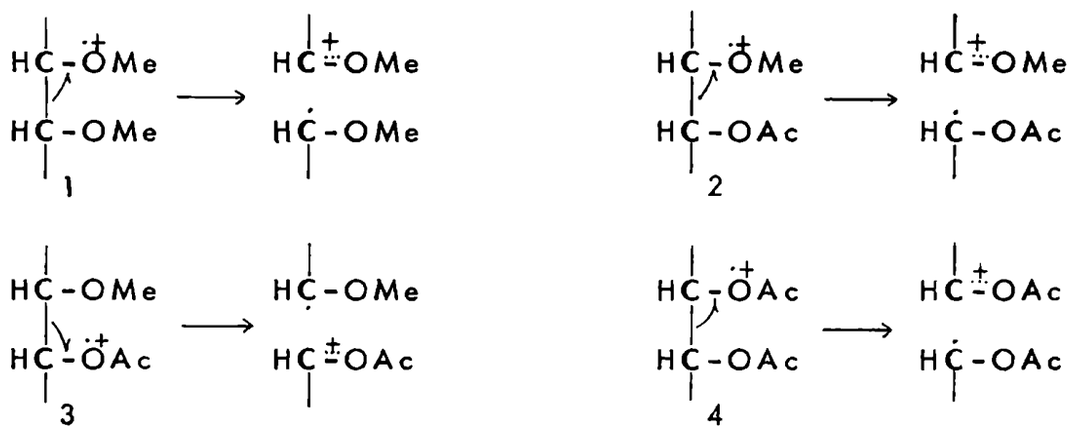


m/e 43 m/e 103 m/e 145

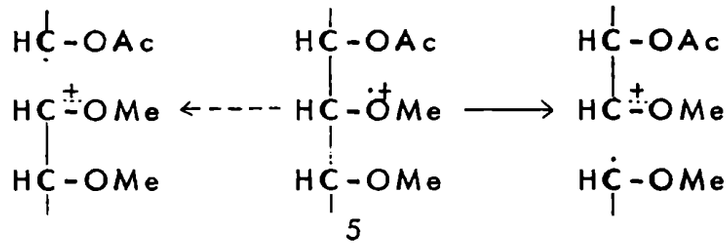
c- No aparece el ión molecular, $M^{+\cdot}$.

c- Los fragmentos primarios se forman a partir del ión molecular por ruptura α entre dos átomos de carbono de la cadena carbonada del alditol. Las intensidades de dichos fragmentos disminuyen con el aumento del peso molecular.

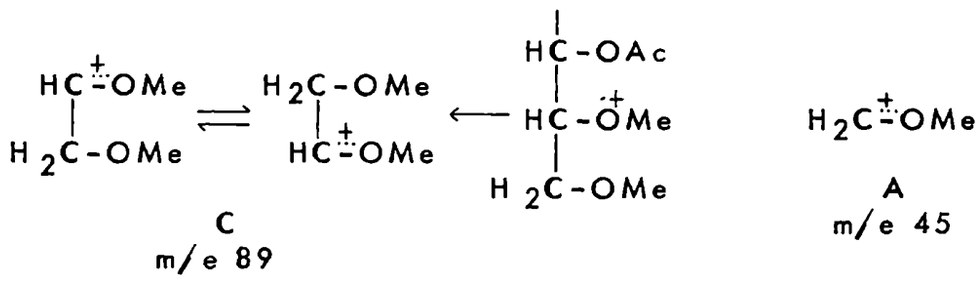
Hay cuatro casos posibles de rupturas α:



Es razonable suponer que la carga del ión molecular, obtenido a partir del acetato del alditol parcialmente metilado, se localiza esencialmente en el átomo de oxígeno del éter (estructuras 1 y 2) y no en el átomo de oxígeno del éster(estructuras 3 y 4). En concordancia, las rupturas indicadas para 1 y 2 son más importantes que las indicadas para 3 y 4. Además, la ruptura de 1 está más favorecida que la de 2 porque el radical metoxilado es más estable que el acetoxilado. Por lo tanto, en la estructura 5 predomina la ruptura entre los carbonos metoxilados:



Una excepción a esta regla es la formación del fragmento primario C, m/e 89, proveniente de los acetatos de 1,2-di-O-metilalditoles. Este fragmento es siempre más abundante que el fragmento primario A, m/e 45. Esto se puede explicar si se tiene en cuenta la estabilización de la carga positiva en cualquiera de los dos metoxilos del fragmento C, y que un ión carbonio secundario (C) es más estable que uno primario (A).



e- Los fragmentos secundarios se forman a partir de los primarios por pérdida de formaldehido (30), metanol (32), cetena (42), ácido acético (60), acetato de metilo (74), acetato de metoximetilo (104) y acetato de acetoximetilo (132).

Se analizarán los fragmentos primarios y secundarios obtenidos a partir de los acetatos de alditoles parcialmente metilados. La Tabla 3 muestra los fragmentos primarios derivados de los acetatos de hexitoles.

El fragmento primario más pequeño A, m/e 45, se obtiene a partir de sustancias que poseen un grupo metoxilo primario (por ejemplo 1-O-

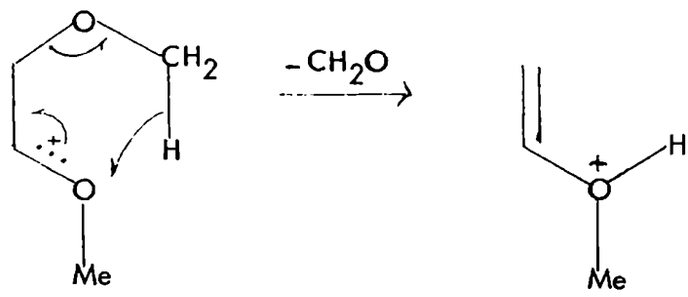
Tabla 3. Fragmentos primarios de los acetatos de hexitoles parcialmente metilados.

	m/e							
Hexitol[1]	45	89	117	161	189	205	233	261
1	+							
2			+					
3					+			+
1,2	+	+						
1,3	+			+				+
1,4	+				+		+	
1,5	+		+					
2,3			+					+
2,4			+		+			
2,5			+					
3,4					+			
1,2,5	+	+	+					
1,3,4	+			+	+			
1,3,5	+		+	+				
1,4,5	+		+				+	
2,3,4			+	+	+			
2,3,5			+				+	
1,2,4,5	+	+	+			+		
1,3,4,5	+		+	+		+		

[1] La numeración de los alditoles se efectúa de tal modo que los carbonos portadores de metoxilos alcanzan los ordinales más bajos.

metilhexitoles) (*).

El fragmento primario C, m/e 89, se forma cuando hay un grupo metoxilo primario y uno secundario adyacentes(por ejemplo 1,2-di-O-metilhexitoles). A partir de C, por pérdida de formaldehido, se obtiene el fragmento secundario c_1, m/e 59.



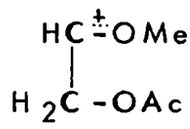
C

m/e 89

c_1

m/e 59

El fragmento primario D, m/e 117, proviene de alditoles que poseen un grupo de acetoxilo en el C-1 y uno metoxilo en el C-2(**).



D

m/e 117

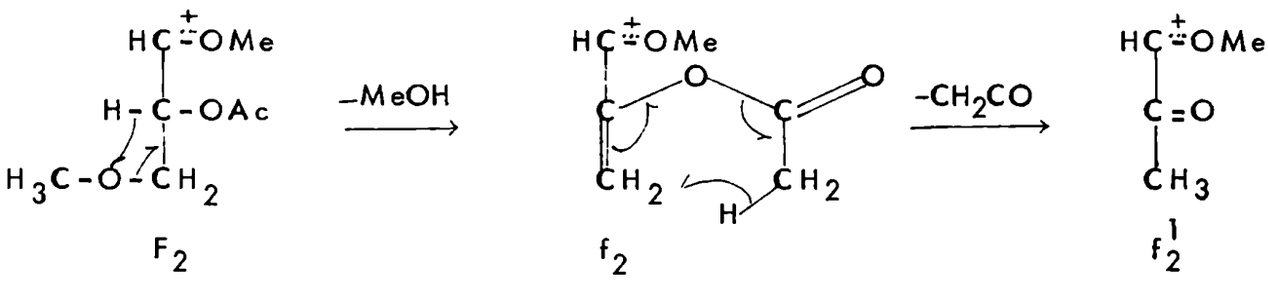
(*) La numeración de los alditoles se efectúa de tal modo que los carbonos portadores de metoxilos alcancen los ordinales más bajos.

(**) Se entiende que las agrupaciones que presentan el mismo tipo de sustitución sufren fragmentaciones similares; así tanto los 2-O-metilhexitoles como los 1,5-di-O-metilhexitoles dan el fragmento m/e 117.

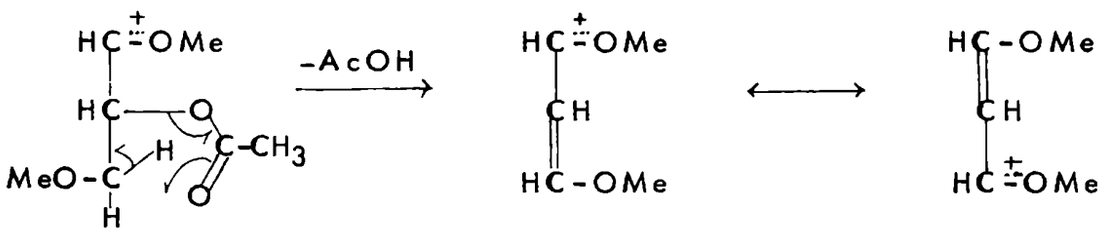
Los alditoles metoxilados en el C-2 y en el C-3 dan el fragmento primario F_1, m/e 161, que es poco abundante a menos que el C-4 esté metoxilado. Los alditoles metoxilados en el C-1 y en el C-3 dan el fragmento primario F_2, m/e 161, que siempre es de alta intensidad.

F_1 m/e 161 F_2 m/e 161

Dos fragmentos secundarios, m/e 129 (f_2) y m/e 101 (f_2^2), se forman a partir de F_2 por pérdida de metanol y de ácido acético, respectivamente. El fragmento f_2 puede perder cetena para dar el f_2^1, m/e 87.



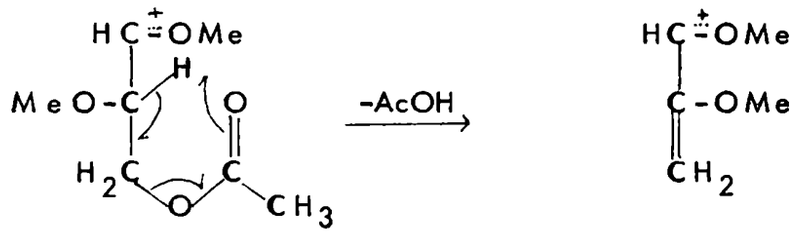
F_2 m/e 161 f_2 m/e 129 f_2^1 m/e 87



F_2 m/e 161 f_2^2 m/e 101

La eliminación de ácido acético a partir de F_2 está favorecida, posiblemente, por la estabilización por resonancia de f_2^2.

También el fragmento F_1 puede perder, ácido acético para dar f_1.



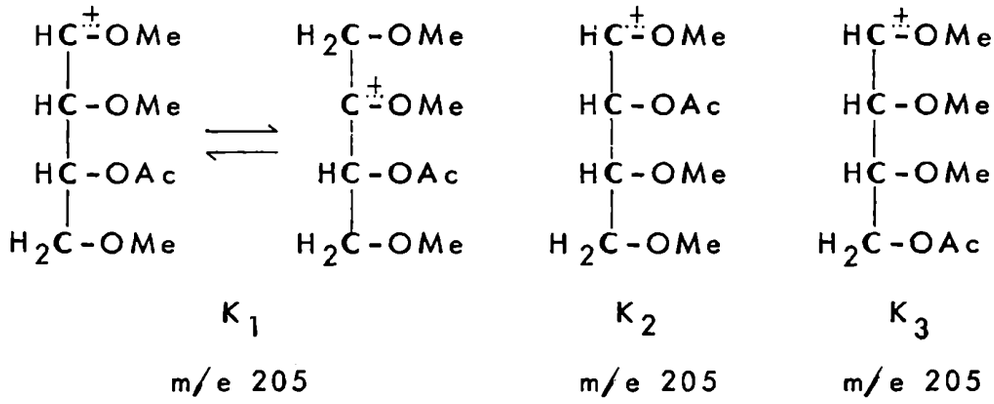
F_1 m/e 161 f_1 m/e 101

Tanto la eliminación de ácido acético de F_1 como la de metanol de F_2 están favorecidas por la acidez del átomo de hidrógeno eliminado. Es de notar, además, que la eliminación de metanol sólo se produce cuando hay un grupo metoxilo en el carbono β al que lleva la carga formal positiva.

Los alditoles metoxilados en el C-3 y acetoxilados en el C-1 y en el C-2 dan el fragmento primario H, m/e 189. A partir de H, por eliminación de ácido acético se obtiene el fragmento secundario h_1, m/e 129; por marcación con deuterio se comprobó que h_1 era idéntico a f_2, y por lo tanto pierde cetena para dar el fragmento m/e 87.

H m/e 189 h_1 m/e 129

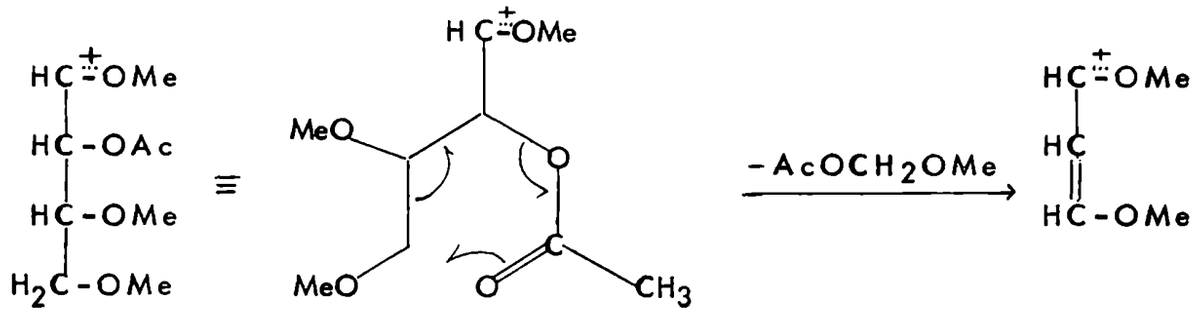
Otros fragmentos primarios que se pueden obtener a partir de alditoles (hexitoles) parcialmente metilados, son los fragmentos K_1, K_2 y K_3, todos de m/e 205.



El fragmento K_1 se forma a partir de alditoles metoxilados en los C-1, C-3 y C-4. El fragmento K_2 se obtiene a partir de alditoles metoxilados en los C-1, C-2 y C-4 y el K_3, a partir de alditoles metoxilados en los C-2, C-3 y C-4. Si en cualquiera de estos casos el C-5 no está metoxilado los picos correspondientes tienen baja intensidad. K_1 existe, probablemente, en dos formas tautómeras y pierde ácido acético para dar el fragmento secundario k_1, m/e 145.

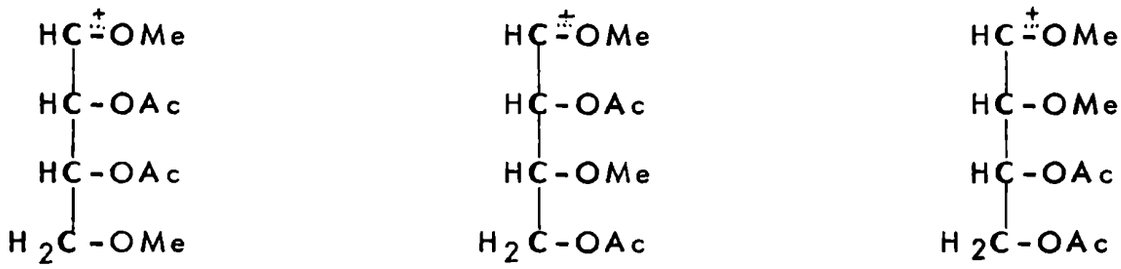
Dos fragmentos secundarios k_2^1, m/e 173 y k_2, m/e 145, se forman a partir de K_2 por eliminación de metanol y ácido acético, respectivamente. Por marcación con deuterio se demostró que se eliminaba el metoxilo del C-2. Por lo tanto los mecanismos de fragmentación de K_1 y K_2 son similares a los de F_1 y F_2. Además, K_2 puede perder acetato de metoximetilo para dar el fragmento secundario k_2^2.

Las fragmentaciones secundarias de K_3 no han sido estudiadas.



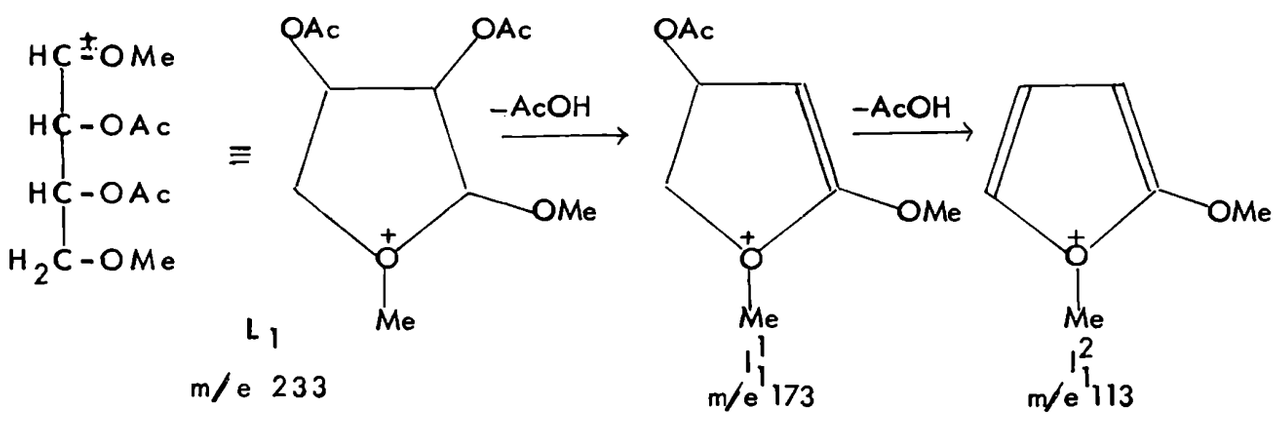
K_2 m/e 205 k_2^2 m/e 101

Otros tres fragmentos primarios isómeros L_1, L_2 y L_3, m/e 233, se obtienen a partir de los acetatos de alditoles parcialmente metilados.



L_1 m/e 233 L_2 m/e 233 L_3 m/e 233

L_1 proviene de alditoles metoxilados en el C-1 y en el C-4. El fragmento secundario I_1^1, m/e 173, se forma a partir de L_1 por pérdida de ácido acético. La presencia del fragmento secundario I_1^2, m/e 113, es explicable asumiendo que L_1 y I_1^1 pueden existir en forma cíclica.

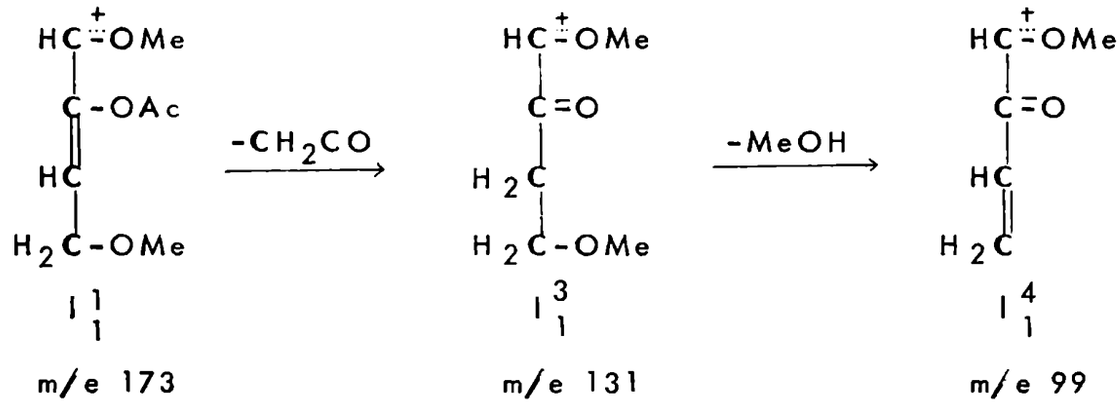


L_1 m/e 233 I_1^1 m/e 173 I_1^2 m/e 113

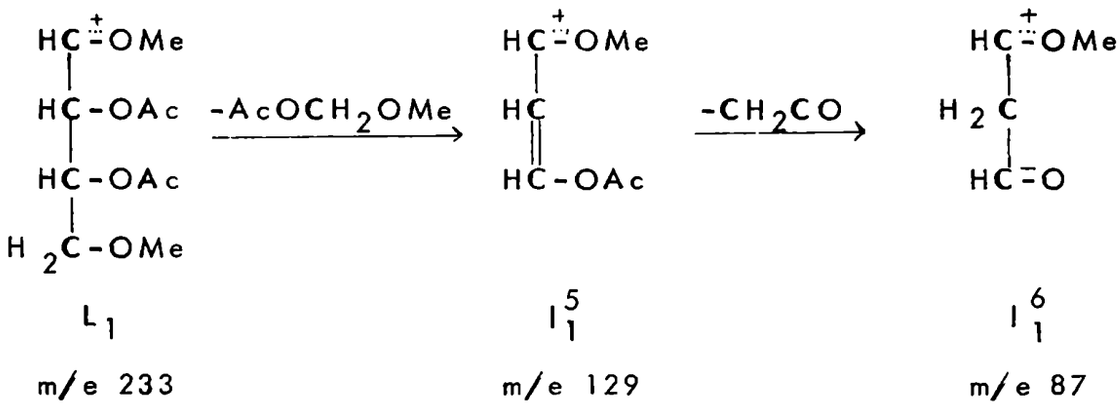
Por otros mecanismos de fragmentación vía iones no cíclicos, se ob-

tienen los fragmentos secundarios I_1^3, m/e 131, I_1^4, m/e 99, I_1^5, m/e 129 y I_1^6, m/e 87.

A partir de la forma no cíclica de I_1^1, se forman los fragmentos secundarios I_1^3, m/e 131 y I_1^4, m/e 99, por eliminación consecutiva de cetena y de metanol.

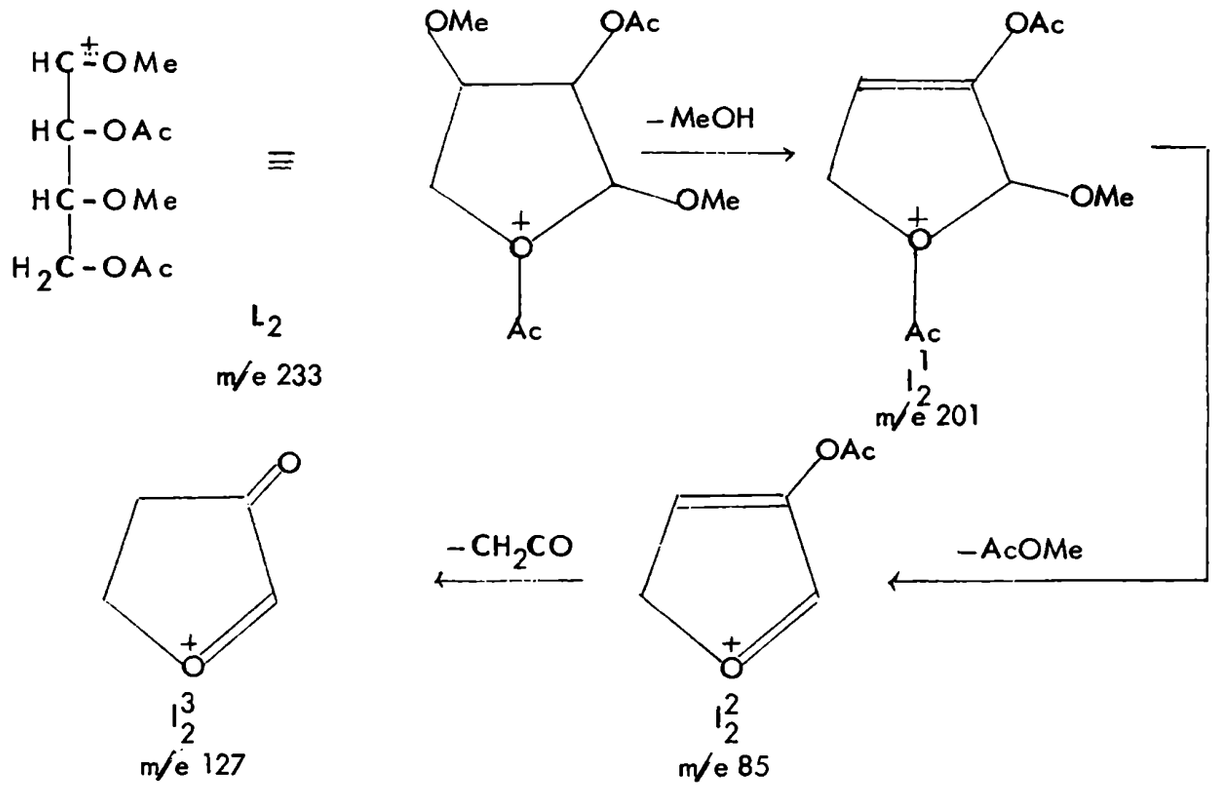


Los fragmentos I_1^5, m/e 129 y I_1^6, m/e 87, se forman a partir de L_1 por eliminación consecutiva de acetato de metoximetilo (por el mecanismo descripto para la formación del fragmento k_2^2) y de cetena.

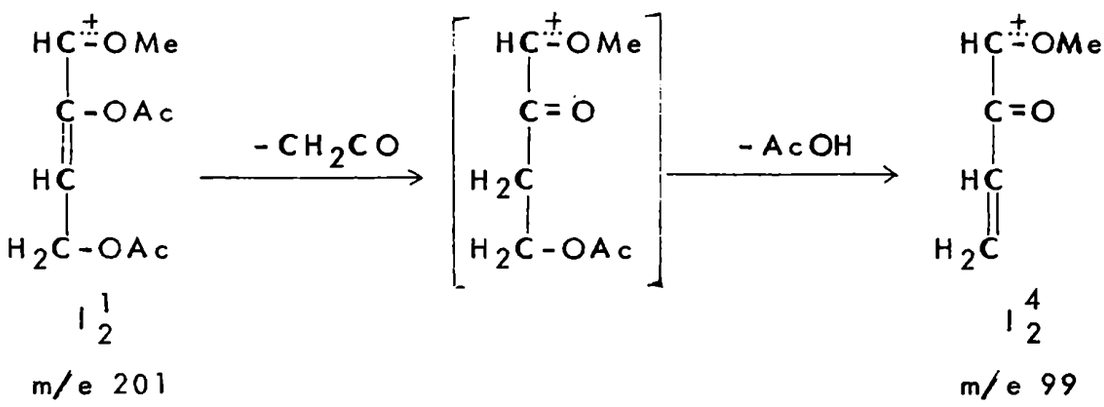


Ambos caminos de fragmentación (vía iones cíclicos y no cíclicos) han sido corroborados por marcación con deuterio.

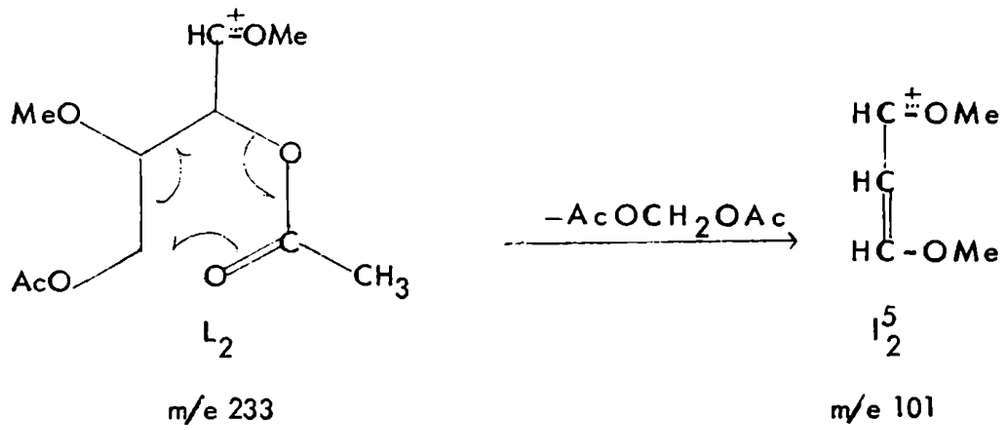
L_2 proviene de alditoles metoxilados en el C-2 y en el C-4. El fragmento secundario I_2^1, m/e 201, se forma a partir de L_2 por pérdida de metanol. La presencia de los fragmentos secundarios I_2^2, m/e 127 y I_2^3, m/e 85, es explicable, nuevamente, asumiendo que L_2 y I_2^1 pueden existir en forma cíclica.



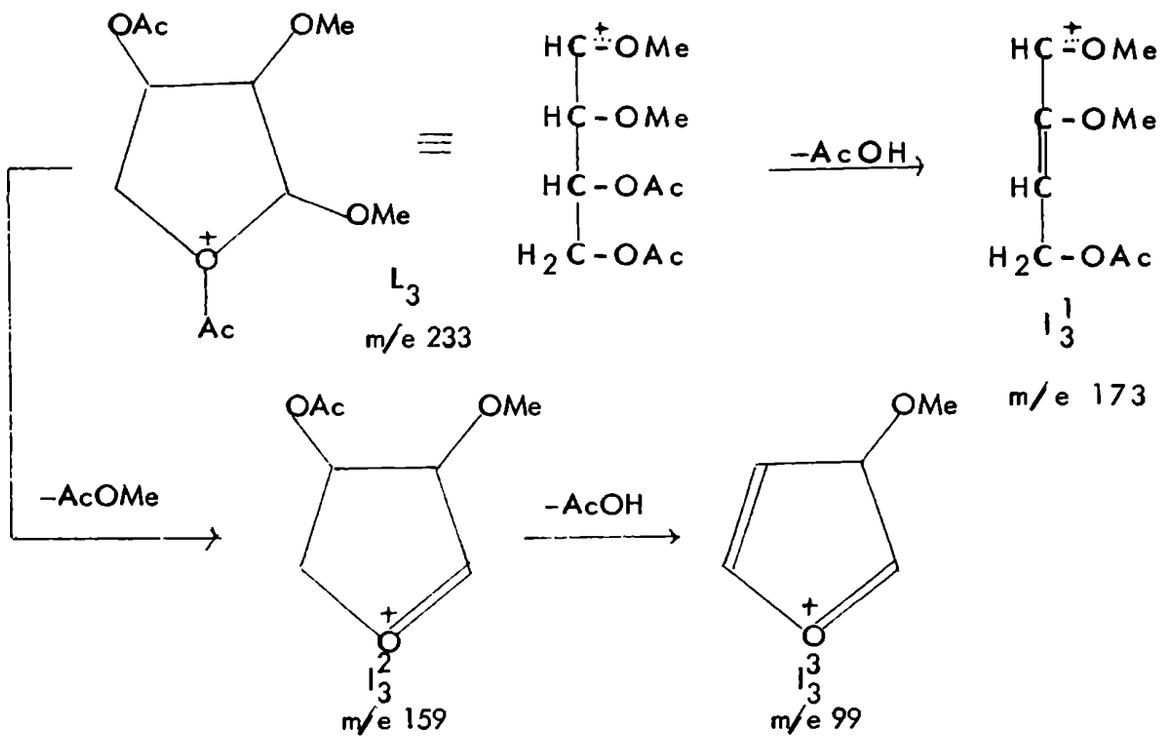
El fragmento secundario I_2^4, m/e 99, se forma por eliminación consecutiva de cetena y de ácido acético por un camino análogo a la secuencia I_1^1-I_1^3-I_1^4.



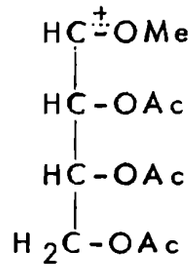
El fragmento secundario I_2^5, m/e 101, se forma a partir de L_2 por eliminación de acetato de acetoximetilo por un mecanismo similar al descripto para la eliminación de acetato de metoximetilo.



L_3 proviene de alditoles (hexitoles) metoxilados en el C-3 y en el C-4 y es poco abundante a menos que el C-2 esté metoxilado. A su vez L_3 puede dar los siguientes fragmentos secundarios:



El fragmento primario M, m/e 261, se obtiene a partir de pentitoles metoxilados en el C-2 y hexitoles metoxilados en el C-3.



M

m/e 261

Resumiendo, los fragmentos secundarios se forman a través de una o varias de las siguientes eliminaciones:

a- La eliminación de formaldehido se produce sólo a partir del fragmento primario C. Los fragmentos F_1 y K_1 tienen estructuras relacionadas con la de C, pero no pierden formaldehido debido, quizás, a que es más favorable la eliminación de ácido acético.

b- Se observa una eliminación significativa de metanol cuando hay un metoxilo en el carbono β al que lleva la carga formal positiva. Esta característica estructural está presente en una de las formas tautómeras de K_1, pero la eliminación de metanol es insignificante, debido a la mayor facilidad de eliminación de ácido acético.

c- El ácido acético se elimina fácilmente cuando hay un grupo acetoxilo en el carbono β al que lleva la carga formal positiva; pero también se puede eliminar cuando hay un acetoxilo en el carbono α debido, probablemente, a que el ión resultante (f_2^2 y k_2^2) se estabiliza por resonancia.

d- Por un mecanismo análogo al de eliminación de ácido acético se elimina el acetato de acetoximetilo y el acetato de metoximetilo.

e- Es posible eliminar metanol y ácido acético cuando hay un grupo metoxilo o acetoxilo, en el carbono β a un carbonilo.

f- Nunca se elimina cetena a partir de un fragmento primario; su eliminación está precedida por la de ácido acético o la de metanol y se produce cuando hay un grupo acetoxilo unido a un átomo de carbono no saturado.

g- Ciertas fragmentaciones se producen vía iones cíclicos; la pérdida del acetato de metilo se explica de esta forma.

En los últimos años ha adquirido gran importancia el empleo de la combinación directa de la cromatografía gaseosa con la espectrometría de masas. Los acetatos de alditoles parcialmente metilados son derivados muy útiles para el análisis estructural de los polisacáridos, debido a que la ausencia de mezclas anoméricas y de isómeros de anillo simplifica notablemente el esquema de una corrida cromatográfica, y a que, además, presentan modos de fragmentación simples. Es, entonces, de fundamental importancia poseer fases cromatográficas adecuadas para separar los diferentes acetatos de alditoles; el conocimientos de los tiempos de retención en un dado sistema así como de los espectros de masas, permite identificar los azúcares sin ningún tipo de ambigüedad.

CAPITULO V

ESPECTROSCOPIA INFRARROJA

Los estudios efectuados por Orr (1954) sobre los espectros infrarrojos del ácido hialurónico, del ácido hialurónico sulfato y de los isómeros A y B del ácido condroitinsulfúrico, mostraron: además de una banda a aproximadamente 1240 cm^{-1}, debida a la vibración de tensión S=O (Klotz y Gruen, 1948; Colthup, 1950), otras bandas a 700-1000 cm^{-1} que podían atribuirse, por analogía con las bandas correspondientes al sistema C-O-C de los acetatos, a los modos vibracionales que involucran la tensión en el sistema C-O-S.

En efecto, ya se había estudiado (Jones y col., 1951) el sistema C-O-C de los 3-acetoxiesteroides y se había determinado que un grupo acetato ecuatorial en un ciclohexano daba una única banda a 1236-1242 cm^{-1}, mientras que un grupo acetato axial daba tres bandas a 1210-1260 cm^{-1}. Como el anillo piranósico es estereoquímicamente muy similar al anillo del ciclohexano, eran de esperar diferencias en las bandas correspondientes al sistema C-O-S de hexosas sulfatadas en posición axial o ecuatorial.

Como el ácido hialurónico es un polímero alternante de unidades de ácido β-D-glucopiranosilurónico y 2-acetamido-2-desoxi-β-D-glucopiranosa unidas (1→3)- y (1→4)-, respectivamente, la banda a 820 cm^{-1} del ácido hialurónico sulfatado (ausente en el espectro del ácido hialurónico) se asignó a grupos sulfato en posición primaria y/o secundaria ecuatorial (conformación C1 para el anillo piranósico). También se asignaron las posiciones de los sulfatos en los isómeros A y B del ácido condroitinsulfúrico (polímero alternante de unidades de ácido β-D-glucopiranosilurónico y 2-acetamido-2-desoxi-β-D-galactopiranosa sulfatada unidas (1→3)- y (1→4)-, respectivamente). El isómero B presentaba una banda a 825 cm^{-1} que, de acuerdo con los resultados obte-

nidos para el ácido hialurónico sulfatado, indicaba que los grupos sulfato se encontraban en posición primaria y/o secundaria ecuatorial. A su vez el isómero A daba tres bandas de intensidad comparable en la región de 700-1000 cm^{-1} (a 725 cm^{-1}, 855 cm^{-1} y 928 cm^{-1}), y si bien se consideró la posibilidad de grupos sulfato en posición axial, no se asignó a cual o cuales de las bandas correspondía la vibración C-O-S. La Fig. 19 muestra los espectros infrarrojos del ácido hialurónico, del ácido hialurónico sulfatado y de los isómeros A y B del ácido condroitinsulfúrico.

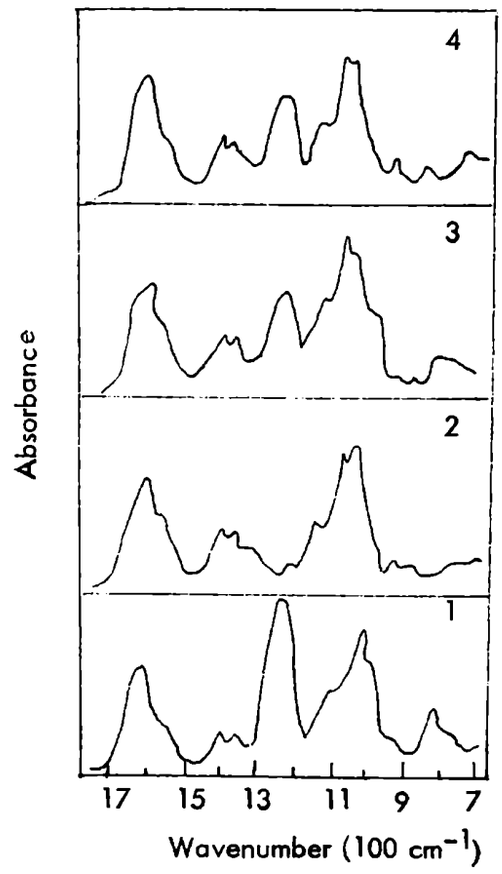


Fig. 19. Espectros infrarrojos de las sales de los ácidos: hialurónico sulfatado (1), hialurónico (2), condroitinsulfúrico B (3) y condroitinsulfúrico A (4).

Con el objeto de fundamentar los estudios efectuados por Orr (1954), Lloyd y col. (1961 b) examinaron los espectros infrarrojos de las sales de potasio de diversos sulfatos ácidos de alquilo ($R-O-SO_3^-K^+$). Se observaron, además de la banda característica a 1210-1260 cm^{-1}, otras dos bandas a 1030-1050 cm^{-1} y 770-810 cm^{-1}.

Los estudios de los ésteres fosfato (Bellamy y Beecher, 1953, y referencias allí citadas) indicaron que la unión alifática C-O-P daba origen a dos frecuencias de absorción características; una de ellas provenía de la vibración de tensión O-P modificada por la unión C-O y la otra de la vibración de tensión C-O modificada por la unión O-P. Una banda a 980 cm^{-1} se asignó al primer modo, mientras que otra a 1030 cm^{-1} se asignó al segundo.

Por analogía con los ésteres fosfato, los ésteres sulfato deberían presentar dos frecuencias características similares. Los espectros correspondientes mostraron una absorción fuerte a 770-810 cm^{-1} y otra a 1030-1050 cm^{-1}. La primera se atribuyó a la vibración de tensión O-S modificada por la unión C-O, y al igual que para la banda a 980 cm^{-1}, su posición dependía de que el hidroxilo esterificado fuera primario, secundario en sistema acíclico o cíclico. A su vez, la segunda se atribuyó a la vibración de tensión C-O modificada por la unión O-S, pero dado que aparecía en una región en la cual absorben muchos compuestos que no contienen grupos éster sulfato, resultó de poca utilidad para fines diagnósticos.

Asimismo Lloyd y Dodgson (1961) extendieron el estudio de la espectroscopía infrarroja a una serie de monosacáridos sulfatados (D-glucosa 3-sulfato, D-glucosa 6-sulfato, D-galactosa 6-sulfato y N-acetil-D-glucosamina 6-sulfato), cuyos espectros compararon con los de los co-

rrespondientes monosacáridos no sulfatados. Así determinaron que, junto con la banda característica de los ésteres sulfato a 1240-1250 cm^{-1}, las hexosas y la hexosamina sulfatadas en el hidroxilo primario daban una banda a 820 cm^{-1}, en cambio, si la sulfatación aparecía en el hidroxilo secundario ecuatorial, como en la D-glucosa 3-sulfato, el pico se desplazaba a 832 cm^{-1}. Esto confirmaba las asignaciones de Orr (1954).

Lloyd y col. (1961 a) efectuaron los espectros infrarrojos de numerosos polisacáridos sulfatados (veintisiete en total) y en particular de carragenanos extraídos de distintas especies de algas rojas (Chondrus crispus, Chondrus ocellatus, Gigartina radula, Gigartina pistillata, Gigartina stellata e Iridaea laminarioides). Para los carragenanos se observó una banda a 850 cm^{-1} que desaparecía en el espectro del polisacárido desulfatado de Chondrus crispus. Este pico se atribuyó a grupos sulfato en posición axial lo cual estaba avalado, además, por evidencias de tipo químico que habían determinado la presencia de unidades de galactosa 4-sulfato en los carragenanos de Chondrus crispus y de Gigartina stellata (ver Capítulo II, pág. 10). Esta asignación se confirmó cuando se obtuvo el espectro infrarrojo de la D-galactosa 4-sulfato (Turvey y Williams, 1962). La Fig. 20 muestra los espectros infrarrojos de los carragenanos de Chondrus crispus, Chondrus ocellatus y Gigartina stellata y del carragenano desulfatado de Chondrus crispus.

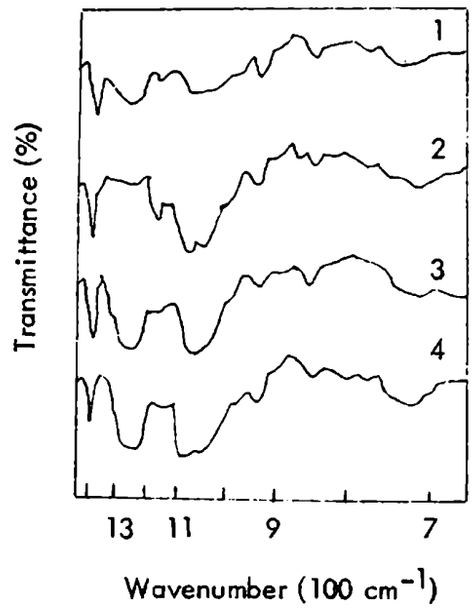


Fig. 20. Espectros infrarrojos de los carragenanos de Chondrus crispus (1), Chondrus ocellatus (3) y Gigartina stellata (4), y del carragenano desulfatado de Chondrus crispus (2).

Además Lloyd y col. (1961 a) compararon los espectros infrarrojos del isómero A del ácido condroitinsulfúrico y del correspondiente polisacárido desulfatado, comprobando la desaparición de las bandas a 1240 cm^{-1} y 850 cm^{-1} en el último caso; esto confirmaba nuevamente las asignaciones de Orr (1954).

Con el objeto de ampliar los fundamentos de estas asignaciones, Turvey y col. (1967), Peat y col. (1968) y Harris y Turvey (1970) determinaron los espectros infrarrojos de diversos monosacáridos sulfatados y encontraron que la exacta correlación de los modelos de Lloyd y Dodgson (1961) no era tan general como se suponía. En efecto, la presencia de diferentes grupos aglicona y sustituyentes en un glicósido o azúcar sulfatado, modificaba apreciablemente la vibración del sistema C-O-S en la región de 700-1000 cm^{-1}. Casos extremos resultaron ser el metil α-D-galactopiranósido 4-sulfato (817 cm^{-1}) frente al bencil β-D-galactopiranósido 4-sulfato (853 cm^{-1}) y la β-D-galactosa 4-sulfato (845 cm^{-1});

a su vez, el metil 4,6-0-benciliden-α-D-glucopiranósido 2,3-disulfato daba dos bandas, a 850 cm^{-1} (fuerte) y a 830 cm^{-1} (media) y el derivado correspondiente de la D-galactosa daba tres bandas, a 856 cm^{-1} (media), a 843 cm^{-1} (media) y a 829 cm^{-1} (fuerte). Por lo tanto, si bien los modelos usados no correspondían exactamente a las unidades existentes en los polisacáridos, indicaban la necesidad de extremar las precauciones en la interpretación de los espectros de los polisacáridos sulfatados.

Anderson y col. (1969 b) determinaron los espectros infrarrojos de diferentes κ-carragenanos y observaron que, además de la banda a 850 cm^{-1}, había un pico a 805 cm^{-1} cuya intensidad parecía estar relacionada con la proporción de 3,6-anhidro-D-galactosa 2-sulfato (conformación 1C) presente en la muestra. Cuando el metil 3,6-anhidro-2-0-metil-α-D-galactopiranósido y el metil 3,6-anhidro-4-0-metil-α-D-galactopiranósido se trataron con trióxido de azufre en piridina se obtuvieron los productos sulfatados en el C-4 y en el C-2, respectivamente; el primero mostró una banda característica a 815 cm^{-1} y el segundo a 798 cm^{-1}.

Harris y Turvey (1970) estudiaron la influencia del catión asociado (Na^+, K^+ y Ba^{2+}) con el anión del monosacárido sulfatado y encontraron que éste parecía alterar poco el espectro. No ocurría así, sin embargo, con la fase utilizada para la preparación de la muestra (Nujol, bromuro de potasio o film) que sí modificaba las característica del mismo (Turvey y col., 1967; Peat y col., 1968; Harris y Turvey, 1970).

Con respecto a la influencia de la fase, la mejor resolución espectral obtenida en Nujol se explicó en función del entorno molecular. Si

la muestra se suspende en Nujol, las moléculas conservan su posición compacta dentro de la red cristalina y por lo tanto se obtienen picos agudos. En bromuro de potasio o en film los entornos de cada molécula son menos ordenados y las absorciones resultan menos agudas y más difusas. El espectro de un azúcar sulfatado presentará multiplicidad en Nujol, mientras que en bromuro de potasio dará una banda ancha con el pico aparente en el valor medio de las absorciones individuales.

A modo de conclusión hay que recalcar que la importancia de la espectroscopía infrarroja en el estudio de los carragenanos reside en considerar al espectro como una entidad total. Es decir, en aquellos casos en los cuales los grupos sulfato están en una única posición los espectros son bien definidos y pueden ser representados por un máximo de absorción en la región de 700-1000 cm^{-1}. Pero esto raramente ocurre en los carragenanos, y por lo tanto, más que la posición del máximo de absorción, interesa la forma del espectro en esa zona de la cual el investigador experimentado puede obtener información sumamente útil para el estudio posterior de los carragenanos. Por otra parte, es notable la influencia de la fase sobre la resolución espectral; se logran resultados satisfactorios con películas de polisacárido obtenidas por concentración de soluciones acuosas a sequedad sobre una superficie de mercurio.

Las Figs. 21 y 22 muestran los espectros infrarrojos de las fracciones κ y λ (según Smith y Cook, 1953; ver Capítulo II, pág. 14) del carragenano de Chondrus crispus (Stancioff y Stanley, 1969).

Se observa en el espectro del κ-carragenano, en la región de 700-1000 cm^{-1}, un pico a 930 cm^{-1} debido al anillo de 3,6-anhidro

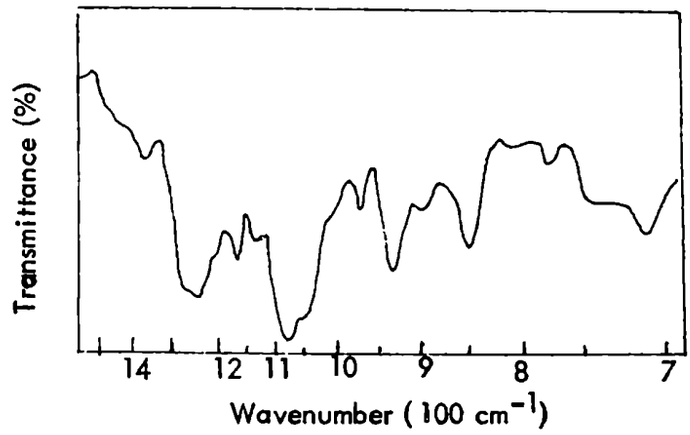


Fig. 21. Espectro infrarrojo del κ-carragenano de Chondrus crispus.

(Black y col., 1965, y referencias allí citadas) y otro a 850 cm^{-1} que indica el predominio de grupos sulfato en posición axial. En cambio, una banda ancha centrada a 830 cm^{-1} para el λ-carragenano es carac-

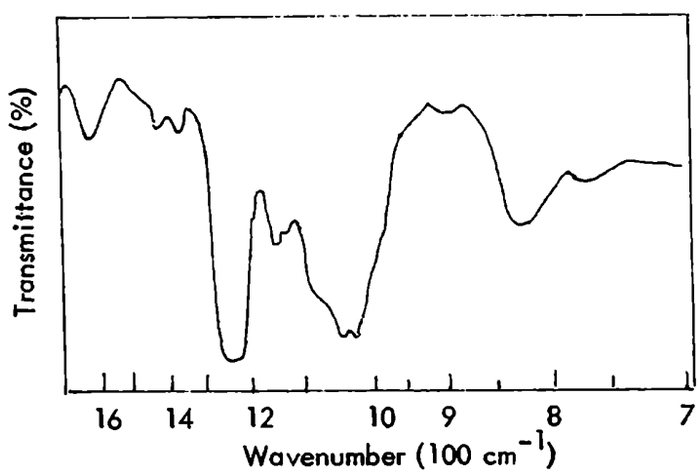


Fig. 22. Espectro infrarrojo del λ-carragenano de Chondrus crispus.

terística de un mayor contenido de grupos sulfato en posición primaria y secundaria ecuatorial.

Generalizando, las bandas a 820 cm^{-1}, 830 cm^{-1} y 850 cm^{-1} son indicativas de la presencia de grupos sulfato en posición primaria, secundaria ecuatorial y secundaria axial, respectivamente; la banda a 805 cm^{-1} proviene de los sulfatos de las unidades de 3,6-anhidro-D-galactosa 2-sulfato.

CAPITULO VI

APLICACIONES DE LAS ALGAS MARINAS

INTRODUCCION

Las algas han sido conocidas y utilizadas por el hombre desde los tiempos más remotos pero recién en las últimas décadas la flora marina fue objeto de numerosos estudios en distintas partes del mundo. Se han llegado a clasificar más de 17.000 especies de algas y actualmente se explotan industrialmente más de 100. Su tamaño varía desde microscópicas hasta gigantes con más de 70 m de longitud, y su distribución geográfica es muy amplia. La composición química depende además de la especie, de los factores climáticos, latitud, estación del año, salinidad, luminosidad, profundidad, mareas, corrientes marinas, etc.. Los sistemas de recolección varían según la especie y el uso al cual están destinadas; se recolectan las arribazones que aparecen en las costas y se extraen de las rocas en la zona entre alta y baja marea. También se practica la extracción por inmersión e inclusive con equipos de buceo autónomos preparados para tal fin, o se efectúa el corte en praderas con embarcaciones simples o con barcos cortadores mecánicos.

ALGAS COMO ALIMENTO

El uso más antiguo de las algas es en la alimentación. En todas las costas del Pacífico hay muchas variedades comestibles y en algunos países de Oriente constituyen hasta el 25% de las dietas alimenticias. En el Japón el consumo es tan intenso que se utilizan más de 70 especies cultivándose en numerosas bahías las más preciadas como la *Porphyra* spp. (algas rojas), *Laminaria* spp. (algas pardas), etc.; con las primeras se prepara el producto comercial denominado "Nori" y con las segundas el denominado "Kombu". En las costas de Chile, Perú y parte

del Ecuador se emplean varias especies que se conocen como el "cachiyuyo" (especies de Ulva y Durvillea, algas verdes y pardas respectivamente) y el "luche" (Porphyra spp.). En Europa y América del Norte se consumen algas aunque en mucho menor cantidad: Rhodymenia palmata (alga roja), Chondrus crispus (alga roja) y distintas especies de Porphyra y Laminaria.

Las algas marinas son de escaso valor energético para el hombre, pues una gran parte de las calorías que podrían suministrar, están en forma no asimilable (polisacáridos complejos). Su valor nutritivo reside en el contenido de minerales y vitaminas, y en algunos casos en el de proteínas (Grassi, 1971 b; Luzzati, 1953; Márquez, 1974).

ALGAS COMO FORRAJE

De todos los usos que tienen las algas marinas, el más generalizado mundialmente es el empleo en forma de harinas en la alimentación animal. La materia prima más común en ellas es el alga parda Macrocystis pyrifera aunque también se elaboran harinas de otras algas, y éstas se incorporan en aproximadamente un 10% a alimentos balanceados que contienen cereales, harinas de pescado y otros. Su introducción en la dieta como complemento del forraje aumenta la fecundidad y el desarrollo normal de todas las especies, inclusive las avícolas, por su elevado contenido de manganeso, vitaminas e iodo (Luzzati, 1953; Márquez, 1974).

ALGAS COMO FERTILIZANTES

Las algas marinas debido a su elevado contenido de potasio y de-

más componentes constituyen un excelente abono y como tal se emplean en todos los países de las regiones costeras que disponen de ellas y donde la agricultura es intensa.

Son fertilizantes más ricos en potasio pero más pobres en nitrógeno y fósforo que el estiércol, pero presentan la ventaja sobre éste de no introducir semillas de malas hierbas, ni hongos productores de enfermedades, ni larvas de insectos nocivos. Las algas por ser muy higroscópicas, absorben y conservan largo tiempo la humedad (propiedad relacionada con su contenido de polisacáridos), hecho que incide económicamente en el riego; además se descomponen con facilidad, condición que las hace de rápida asimilación para la tierra. Se las emplea según los cultivos en que son utilizadas: frescas, fermentadas, mezcladas con estiércol y con tierra (Luzzati, 1953; Márquez, 1974).

POLISACARIDOS DE ALGAS MARINAS

Tres ficocoloides importantes se obtienen a partir de las algas marinas: ácido algínico (de algas pardas), agar y carragenano (de algas rojas). Estos productos son ampliamente utilizados en la industria alimentaria, cosmética, medicinal, del papel, textil, etc.. A continuación se resumen algunas aplicaciones de interés de los carragenanos (Kirk-Othmer, 1968).

APLICACIONES DE LOS CARRAGENANOS

Los carragenanos tienen uso generalizado en la industria alimentaria en la cual se aprovecha su capacidad de formar geles en leche y en agua (ver Capítulo III, pág. 41).

El poder gelificante en leche se atribuye a la interacción del polisacárido con la κ-caseína de la misma y es así que los carragenanos se utilizan en la fabricación de: leche en polvo (pues evitan su sedimentación en la posterior redisolución), quesos, flanes, helados (impiden la cristalización y separación del suero), leches chocolatadas (para suspender chocolate en leche), etc.. En la fabricación de panes y fideos el agregado de carragenano permite incorporar hasta aproximadamente un 6% de materias sólidas de la leche aumentando el valor nutritivo de los productos; el carragenano favorecería el entrecruzamiento entre las proteínas de la harina y de la leche.

El poder gelificante en agua con o sin agregado de sales solubles de potasio o de galactomananos los hace muy útiles en la elaboración de jarabes de fruta, salsas, jaleas, etc.; se usan en reemplazo de la gelatina pues forman geles a temperaturas mayores que la ambiente y éstos no funden cuando se los retira de la heladera. Debido a su escaso valor energético se emplean en la elaboración de alimentos dietéticos. En la industria cervecera son clarificantes pues tienen la propiedad de reaccionar con las proteínas acelerando la coagulación y la precipitación (MacDonough, 1953).

En la industria farmacéutica y cosmética se los incorpora en la elaboración de jaleas medicinales, pastas dentífricas y tabletas (como agentes ligantes), emulsiones de aceites minerales, etc..

Además se incluyen en suspensiones de abrasivos y de grafito, adhesivos (Weiss, 1976), pinturas para castos de barco (Bataafsche Petroleum Maatschappij, 1951) y otros.

Al usar el carragenano hay que tener presente el pH del medio y

el contenido en sales, pues las propiedades del mismo varían notablemente bajo la influencia de estos factores.

ASPECTOS FARMACOLOGICOS DE LOS CARRAGENANOS

Los carragenanos poseen actividad antiulcerosa, anticoagulante y antilipémica. Dichas actividades están relacionada con la estructura y el peso molecular del carragenano utilizado (Anderson, 1969).

ACTIVIDAD ANTIULCEROSA

Los carragenanos pueden prevenir o reducir la formación de úlceras estomacales o duodenales, pero el mecanismo de protección aún no está totalmente dilucidado.

Anderson y Harthill (1967) encontraron que la actividad antipéptica es mayor para los λ-carragenanos que para los κ-carragenanos, hecho que se asoció con el contenido de 3,6-anhidrogalactosa y de sulfato de las fracciones. Baillie y Anderson (1968) comprobaron que dicha actividad está relacionada con la formación de glóbulos constituídos por el sustrato y el carragenano. Los carragenanos degradados (menor peso molecular) no forman glóbulos y la correspondiente actividad antipéptica es menor. Es decir, que la inhibición enzimática es función de la estructura del complejo sustrato-carragenano formado. En el caso particular de una úlcera gástrica, la mucosa estomacal es sustrato de la pepsina y si el carragenano interacciona con los componentes macrocatiónicos de la misma, la protegerá de la consiguiente digestión.

ACTIVIDAD ANTICOAGULANTE

Los carragenanos poseen actividad anticoagulante y como dicha ac-

tividad es mayor para el λ-carragenano que para el K-carragenano, ésta parecería estar asociada al contenido de sulfato de las fracciones.

Si bien la interacción de los polisacáridos sulfatados con el fibrinógeno y la trombina se está estudiando, la acción anticoagulante sería el resultado de una interacción general no específica con las proteínas del plasma.

Los carragenanos degradados difieren apreciablemente de los no degradados en las dosis requeridas y los efectos tóxicos laterales. Los carragenanos degradados son menos tóxicos y menos activos que los no degradados, hecho que se asocia a la estabilidad y a la solubilidad de los complejos polisacárido-proteína formados. En efecto, la mayor toxicidad del carragenano no degradado puede deberse a la formación de un complejo insoluble en el sistema circulatorio,que conduce a una embolia.

ACTIVIDAD ANTILIPEMICA

Los carragenanos degradados así como los no degradados, poseen actividad antilipémica; el contenido de sulfato parecería ser un factor importante.

TOXICIDAD

Se comprobó que los carragenanos no degradados no se obsorben, pero si lo hacen los degradados aunque en muy pequeña proporción (Anderson, 1969 y referencias allí citadas).

El trastorno más grave conocido que se puede producir por administración oral del carragenano es la diarrea. Sin embargo, como estudios recientes demostraron la toxicidad fetal en lauchas y ratas de las sales

de sodio y de calcio del mismo, en los EE.UU. se ha prohibido su uso en la alimentación en el caso de pesos moleculares menores de 100.000 (Food Drug Adm., Washington, 1972).

Por vía intravenosa el factor limitante es la formación de complejos insolubles con las proteínas del plasma. Anderson y Duncan (1965) encontraron que los κ-carragenanos son menos tóxicos que los λ-carragenanos.

PRODUCCION DE CARRAGENANOS EN LA ARGENTINA

La empresa Soriano S.A. inició en 1974 la producción de carragenano en la Argentina. El mucílago se extrae de las algas del género Gigartina que se recolectan en dos establecimientos situados en Cabo Raso y Camarones (Provincia de Chubut). Hasta 1976 la producción no alcanzaba para abastecer el mercado interno, estando limitada por la falta de materia prima. Este problema fue resuelto importando de las Filipinas el alga Eucheuma cottonii de la que se obtiene un carragenano de alto poder gelificante(ver Capítulo II, pág. 34). Para 1977 se esperaba una producción [1] de aproximadamente 100 ton. Las estadísticas de producción se dan en la Tabla 4.

Tabla 4. Estadísticas de producción e importación (en kg).

Año	Producción [1]	Importación [2]
1971	-	94.954
1972	-	112.749
1973	-	97.145
1974	20.232	92.358
1975	27.360	48.899 (hasta junio)
1976	32.603	

[1] La estadística de producción ha sido suministrada por Soriano S.A..
[2] Weiss (1976).

La producción actual se consume en el mercado interno en la elaboración de flanes en polvo y de adhesivos (Weiss, 1976).

CAPITULO VII

DESCRIPCION Y DISCUSION DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS

AISLAMIENTO Y PURIFICACION DEL CARRAGENANO

El alga Iridaea undulosa Bory, previamente molida, se sometió a extracciones consecutivas con agua a temperatura ambiente y el polisacárido se precipitó de la solución acuosa por agregado de la misma sobre isopropanol (concentración final de isopropanol, 75%). El carragenano, que se aisló con rendimiento del 53%, se purificó por disolución en agua y reprecipitación con isopropanol. Se obtuvo un insoluble en agua (8-10% del peso inicial) que se reservó para su posterior estudio.

El rendimiento tan elevado de carragenano, de aproximadamente 45%, es del orden de los encontrados para carragenanos de diferentes especies, aunque en la literatura los datos son muy dispares para muestras de la misma especie pero diferente origen, y aún para el mismo origen pero diferente época de recolección (Black y col., 1965).

Por extracción con agua a temperatura ambiente se evitó la posible contaminación del carragenano con el almidón de las florídeas que es únicamente soluble en agua caliente (ver Capítulo II, pág. 12)

COMPOSICION Y PROPIEDADES DEL CARRAGENANO

El producto resultó homogéneo por ultracentrifugación (Fig. 23) y el coeficiente de sedimentación ($S_{20,w}$) fue de $1,98 \times 10^{-13}$ (c 0,5).

La hidrólisis ácida total y posterior cromatografía en papel (solvente 2, revelador biftalato de anilina) y cromatografía gaseosa (trimetilsilil derivados de los metilglicósidos correspondientes) indicaron la presencia de galactosa como único azúcar estable en medio ácido. Se observaron también por cromatografía en papel trazas de pentosas y productos que corrían con el frente. Dichos productos, que revelaban

con biftalato de anilina, son usuales en hidrolizados de polisacáridos que contienen 3,6-anhidrogalactosa y han sido asignados a productos de descomposición de la misma dado que este monosacárido es inestable en medio ácido.

Cabe destacar además que en reiteradas oportunidades se detectó xilosa en hidrolizados de carragenanos de Chondrus crispus (Dillon y O'Colla, 1951), Gigartina stellata (Johnston y Percival, 1950) y Gigartina skottsbergii (Cerezo, 1967 a) y su presencia en un principio se atribuyó a xilanos contaminantes. Sin embargo, llama la atención que Johnston y Percival (1950) por metilación e hidrólisis de un carragenano degradado no hayan aislado otros derivados de la D-xilosa que la 2,3,4-tri-O-metil-D-xilosa.

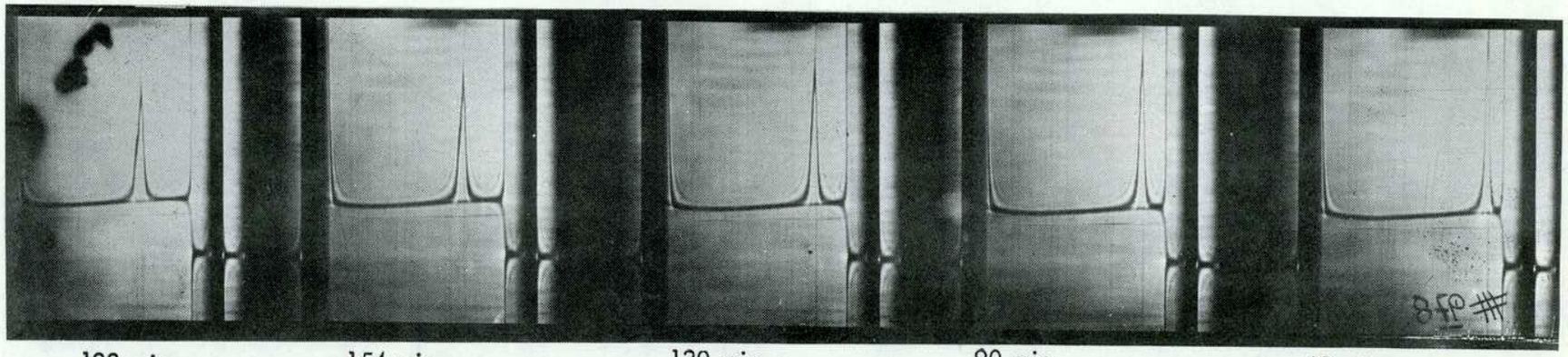
Las propiedades generales del carragenano figuran en la Tabla 5. Contenía galactosa (39,7%; determinado por el método del fenol-ácido sulfúrico a partir de la diferencia entre la absorbancia medida y la absorbancia de la 3,6-anhidrogalactosa presente en la muestra (ver parte experimental, pág. 189)), 3,6-anhidrogalactosa (6,4%) y un porcentaje relativamente elevado de sulfato (40,6%, expresado como SO_3K). La relación molar galactosa:3,6-anhidrogalactosa:sulfato (1,00:0,18:1,39), así como el poder gelificante nulo en cloruro de potasio 1% y en leche, indicaban que podía tratarse de un carragenano constituído en gran parte por lo que la escuela noruega ha denominado fracciones "intermedia" y/o "soluble". En cambio, para la escuela inglesa dicho carragenano estaría formado por una fracción λ y el contenido de 3,6-anhidrogalactosa provendría de una contaminación o una modificación de una estructura fundamental (ver Capítulo II, págs. 20 y 24).

Tabla 5. Composición y propiedades del carragenano.

Galactosa anhidro %	3,6 a.h.g. anhidro %	Sulfato (SO_3K) %	Gal:3,6 a.h.g.:Sulfato relación molar	6-Sulfato (SO_3K) %	6-Sulfato[1] (SO_3K) %	Oxid. con[2] periodato	$[\alpha]_D$ o	$[\eta]$ 100 ml/g	Proteína %
39,7	6,4	40,6	1,00:0,18:1,39	10,1	4,3	4,9	+70,1	5,60	3,0

[1] Después de la oxidación con periodato.

[2] Unidades anhidro promedio por mol de periodato consumido.



188 min 154 min 120 min 90 min 60 min

Fig. 23. Ultracentrifugación del carragenano. Las placas se obtuvieron con una solución 0,5% en cloruro de sodio 0,1 M a 47.660 rpm y a 20°, y las fotos fueron tomadas a 60, 90, 120, 154 y 188 minutos después de llegar a la velocidad indicada ($S_{20,w}$ 1,98 x 10^{-13}).

El poder rotatorio, $[\alpha]_D$ +70,1° (c 0,38, agua), era del orden de los encontrados para otros carragenanos (Black y col., 1965; Lawson y col., 1973). Sin embargo, la gran dispersión en los valores de los poderes rotatorios para carragenanos con relaciones molares análogas (Tabla 6), impidió establecer correlaciones con factores estructurales.

La viscosidad intrínseca de 5,6 100 ml/g resultó menor que las determinadas por Pernas y col. (1967) para muestras de Chondrus crispus (8,7 100 ml/g), Gigartina stellata (9,2 100 ml/g) y Gigartina skottsbergii (8,4 100 ml/g) y por Smidsrød y col. (1967) para diversos carragenanos (Tabla 16, pág. 147). El hecho de que cantidades considerables de polisacárido de las fracciones más solubles en cloruro de potasio pasaran a través de los tubos de diálisis, indicaba que la menor viscosidad se debía, en parte, a un menor peso molecular (ver Capítulo VII, pág. 112).

Los métodos para determinar la posición de los grupos sulfato se basan en la estabilidad de los mismos en medio alcalino. Se estableció que el mecanismo de reacción es análogo al observado para los ésteres p-toluensulfónicos (Peat, 1946; Tipson, 1953) y que, por lo tanto, la liberación del sulfato no es un proceso hidrolítico sino que el resultado de una eliminación catalizada por base con la formación concomitante de un éter cíclico; los únicos éteres cíclicos que se forman en un glicósido son los de óxido de etileno y 3,6-anhidro. La reacción de eliminación está acompañada por la inversión de la configuración del átomo de carbono portador del sulfato (Percival, 1949; Turvey, 1965).

A partir del metil α-D-galactopiranósido 6-sulfato se obtiene el 3,6-anhidrogalactósido correspondiente.

Tabla 6. Poderes rotatorios de los carragenanos totales y de las fracciones[1].

Especie	Fracción	Gal:3,6 a.h.g.:Sulfato relación molar	$[\alpha]_D$ °
Chondrus crispus[2]	Total		+ 50
Eucheuma cottonii[3]	"	1,00:0,85:1,09	+ 50
Eucheuma isiforme[4]	"	1,00:0,56:1,45	+ 54
Eucheuma spinosum[3]	"	1,00:0,85:1,94	+ 38
Eucheuma uncinatum[4]	"	1,00:0,45:1,44	+ 36
Gigartina atropurpurea[4]	"	1,00:0,14:1,37	+ 59
Gigartina skottsbergii[5]	"	1,00:0,72:1,09	+ 55
Gigartina stellata[6]	"		+ 51
Chondrus crispus	κ	1,00:0,74:1,32	+ 50
Chondrus crispus	"	1,00:0,76:1,26	+ 75
Chondrus crispus	"	1,00:0,79:1,42	+ 67
Chondrus crispus	"	1,00:0,80:1,29	+ 61
Chondrus crispus	"	1,00:0,80:1,36	+ 63
Chondrus crispus	"	1,00:0,83:1,29	+ 64
Chondrus crispus	"	1,00:0,84:1,38	+ 80
Chondrus crispus	"	1,00:0,84:1,40	+ 104
Chondrus crispus	"	1,00:0,84:1,40	+ 148
Gigartina stellata	"	1,00:0,73:1,36	+ 76
Chondrus crispus[7]	λ	1,00:0,04:1,16	+ 81
Chondrus crispus	"	1,00:0,12:1,39	+ 16
Chondrus crispus	"	1,00:0,13:1,31	+ 39
Chondrus crispus	"	1,00:0,13:1,38	+ 38
Chondrus crispus	"	1,00:0,27:1,32	+ 20
Chondrus crispus	"	1,00:0,29:1,36	+ 33
Chondrus crispus	"	1,00:0,30:1,39	+ 32
Gigartina stellata	"	1,00:0,43:1,07	+ 28
Gigartina acicularis	"	1,00:0,09:1,35	+ 73
Gigartina skottsbergii[8]	0,3-0,4	1,00:0,62:1,00	+ 55
Gigartina skottsbergii[5]	0,6-0,8	1,00:0,78:1,20	+ 55

[1] Black y col. (1965).

[2] Buchanan y col. (1943); ver Capítulo II, pág. 10.

[3] Anderson y col. (1973); ver Capítulo II, pág. 34.

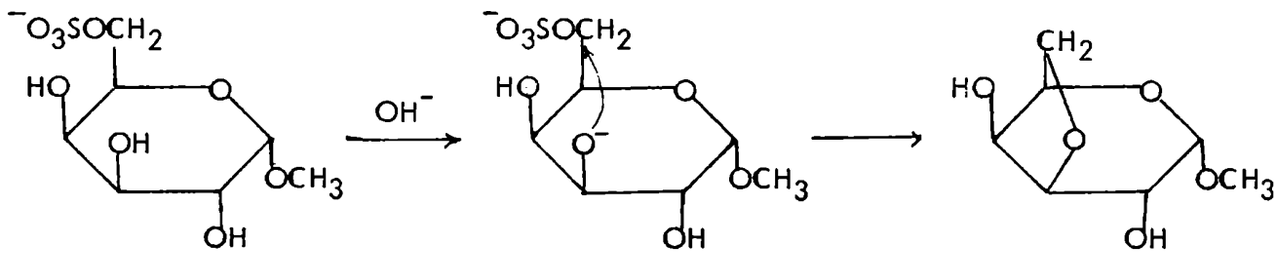
[4] Lawson y col. (1973).

[5] Cerezo (1967 a); ver Capítulo II, pág. 39.

[6] Dewar y Percival (1947); ver Capítulo II, pág. 11.

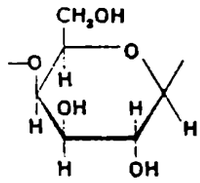
[7] Rees (1963); ver Capítulo II, pág. 24.

[8] Cerezo (1967 b); ver Capítulo II, pág. 39.

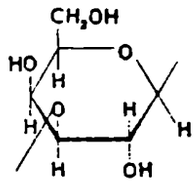


En la formación del metil 3,6-anhidrogalactopiranósido a partir del metilgalactopiranósido 6-sulfato, la libre rotación de la unión C-5--C-6 permite que el nucleófilo (alcóxido en el C-3) ataque al C-6 del lado opuesto al grupo saliente (sulfato). Si bien no existen antecedentes de la literatura para metilhexapiranósidos 3-sulfato, podría suponerse por un razonamiento análogo que el metilgalactopiranósido 3-sulfato no debería dar el 3,6-anhidro derivado, en razón de que el nucleófilo (alcóxido en el C-6) no se puede aproximar del lado opuesto al grupo saliente.

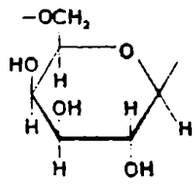
Para la formación de un anillo del tipo óxido de etileno es necesario que el hidroxilo adyacente al hidroxilo sulfatado esté en posición trans. A continuación se indican los posibles efectos del álcali sobre grupos sulfato que se encuentran esterificando hidroxilos de unidades de D-galactosa unidas de diferentes maneras.



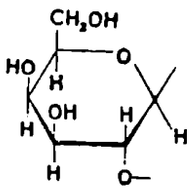
Un grupo sulfato será lábil frente al álcali cualquiera sea la posición.



Un grupo sulfato será estable frente al álcali cualquiera sea la posición.



Un grupo sulfato en posición 4 será estable mientras que en posición 2 ó 3 será lábil frente al álcali.



Un grupo sulfato en posición 3 ó 4 será estable mientras que en posición 6 será lábil frente al álcali.

En general puede afirmarse que a menos que la eliminación del sulfato conduzca a la formación de un éter cíclico, su liberación se llevará a cabo con extrema lentitud.

El tratamiento con álcali diluído (generalmente hidróxido de sodio 1 N) se aplicó en muchas ocasiones a los carragenanos. Sin embargo, los resultados eran sólo cualitativos ya que se producía una fuerte degradación del polisacárido. Rees (1961) determinó que si el polisacárido era previamente reducido con borohidruro de potasio la degradaciór disminuía, y si la ciclación se efectuaba en hidróxido de sodio N y más borohidruro de potasio (para reducir los grupos terminales que ocasionalmente podían formarse), la reacción S_N2 podía considerarse cuantitati-

va y así dosar los grupos 6-sulfato en unidades con el hidroxilo del C-3 libre. En base a los antecedentes de la escuela inglesa, las únicas unidades con sulfato lábil en medio alcalino, presentes en los carragenanos, serían las de galactosa 6-sulfato y galactosa 2,6-disulfato unidas por la posición 4.

Por lo tanto, para determinar el contenido total de galactosa 6-sulfato y el de galactosa 2,6-disulfato, basta con sólo dosar la cantidad de 3,6-anhidrogalactosa antes y después del tratamiento alcalino. Si se desea conocer por separado el contenido de galactosa 6-sulfato y de galactosa 2,6-disulfato, se determina el incremento en el contenido de 3,6-anhidrogalactosa por tratamiento alcalino antes y después de la oxidación con periodato. En esta forma, por tratamiento alcalino previo a la oxidación se obtiene el contenido total de 6-sulfato, el de galactosa 2,6-disulfato (no oxidable con periodato) se obtiene luego de la oxidación, y por diferencia el de galactosa 6-sulfato. Los resultados obtenidos para el carragenano se encuentran en la Tabla 5.

La Fig. 24 muestra el espectro infrarrojo del carragenano.

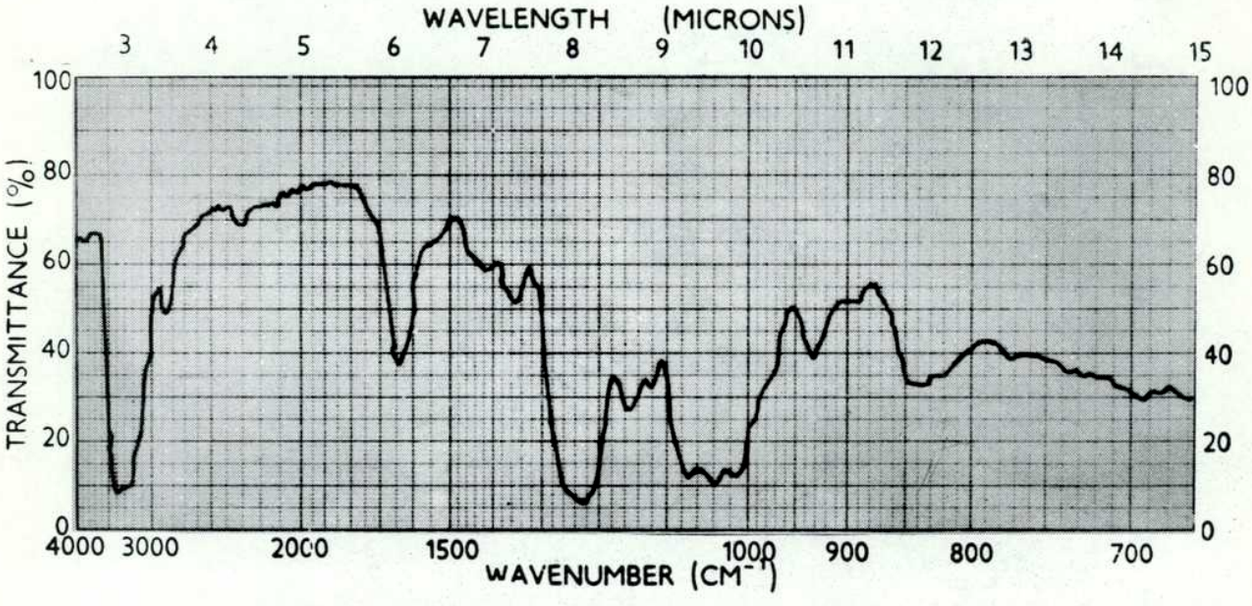


Fig. 24. Espectro infrarrojo del carragenano.

Presenta una banda ancha centrada a 840 cm^{-1}, que indica la presencia de grupos sulfato primarios, secundarios ecuatoriales y secundarios axiales, con predominio de estos últimos. La presencia mayoritaria de este tipo de ésteres estaría de acuerdo con la naturaleza de "fracción intermedia" de este polisacárido. La banda a 930 cm^{-1} se puede atribuir al anillo de 3,6-anhidro (ver Capítulo V, pág. 77).

Los estudios estructurales efectuados por la escuela inglesa indican la presencia de unidades repetitivas constituídas por D-galactosa o por D-galactosa y 3,6-anhidro-D-galactosa y sulfatadas en distintas posiciones, con alternancia de uniones (1⟶3)- y (1⟶4)-. Por lo tanto el consumo de un mol de periodato cada 4,9 unidades anhidro promedio puede atribuirse, en principio, a las unidades de D-galactosa 6-sulfato y/o de D-galactosa sin sulfatar, ambas unidas por la posición 4. La Fig. 25 muestra la curva de consumo de periodato para el carragenano.

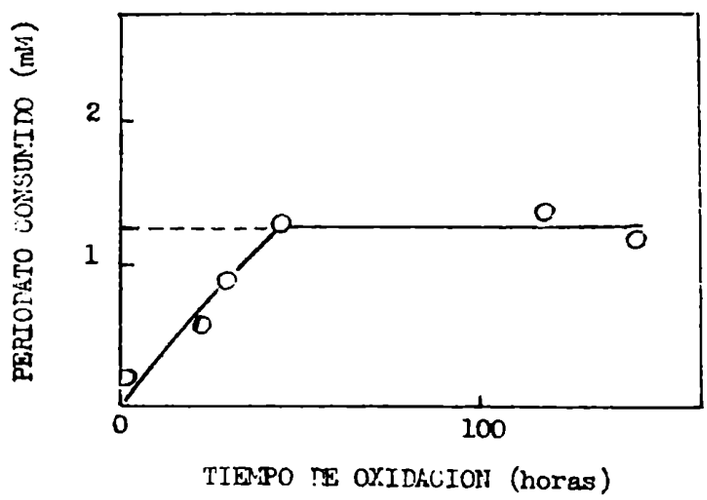


Fig. 25. Determinación del consumo de periodato del carragenano.

El contenido de proteínas fue del 3,0%. Llama la atención que la proteína se haya mantenido "asociada" al polisacárido a través del fraccionamiento con cloruro de potasio (ver Tabla 11, pág.114).

Hirase (1957 a) detectó, por primera vez, la presencia de ácido pirúvico en una muestra comercial de agar. El posterior aislamiento (Hirase, 1957 b) e identificación del dimetilacetal de la 4,6-O-(1'-carboxietiliden)-β-D-galactopiranosil-(1→4)-3,6-anhidro-L-galactosa entre los productos de metanólisis permitió determinar su unión al polisacárido (Hirase, 1957 c; Hirase, 1957 d).

El ácido pirúvico no sólo se detectó en agares de distintas agarofitas (Young y col., 1971) sino que, también, en otros polisacáridos sulfatados extraídos de algas rojas (Hirase y Watanabe, 1972; Nunn y col., 1973, y referencias allí citadas) y en particular en el λ-carragenano de Gigartina tenella (Hirase y Watanabe, 1972). La unión del ácido pirúvico al polisacárido resultó análoga a la encontrada en agares.

En el caso de la Iridaea undulosa Bory, por hidrólisis ácida total del carragenano y por extracción con éter del hidrolizado se obtuvo un residuo que se identificó por metanólisis y posterior cromatografía gaseosa (ver parte experimental, pág.196). Este resultó ser el 5-(hidroximetil)-2-furaldehido que provenía, principalmente, de la descomposición de la 3,6-anhidrogalactosa en el medio de hidrólisis (O'Neill, 1955 a, y referencias allí citadas).

El bajo contenido de metoxilo (dentro del error experimental del método, 0,48%) así como la hidrólisis total y posterior cromatografía gaseosa del carragenano (trimetilsilil derivados de los glicósidos co-

rrespondientes), indicaron la ausencia de azúcares metilados, detectados en los polisacáridos de otras algas rojas; la 6-O-metil-D-galactosa fue encontrada en el polisacárido de Porphyra umbilicalis (Peat y col., 1961) y en agarosa (Rees, 1972 a, y referencias allí citadas) y la 3-O-metilgalactosa en el polisacárido de Anatheca dentata (Nunn y col., 1971).

FRACCIONAMIENTO CON CLORURO DE POTASIO

Estudios previos (Pernas y col., 1967; Smidsrød y col., 1967; ver Capítulo II, pág. 20) demostraron que las curvas de solubilidad en soluciones de cloruro de potasio resultan muy útiles para caracterizar la distribución de moléculas con diferente composición química de un carragenano. Por lo tanto, antes de efectuar los fraccionamientos preparativos del carragenano de Iridaea undulosa Bory, se determinó la curva de precipitación analítica (método turbidimétrico; ver Capítulo VII, pág. 160) correspondiente. Esta indicó la ausencia de una fracción κ pero mostró que un gran porcentaje del carragenano estaba constituído por una "fracción intermedia".

Dado que en soluciones concentradas la interacción entre las moléculas de polisacárido, debida al entrecruzamiento de las cadenas, puede incidir sobre los resultados de los fraccionamientos, se estudiaron las condiciones óptimas de trabajo llevando a cabo los mismos con soluciones de concentración decreciente de carragenano en agua (0,55%, 0,36% y 0,24%). Cabe destacar, sin embargo, que a medida que la concentración de polisacárido disminuía aumentaban las dificultades para separar los geles formados. Este hecho se sumaba al problema habitual de resus-

pensión del gel por calentamiento gradual de la solución durante la centrifugación que obligaba a enfriar la misma, en un baño de agua helada, antes de dicho proceso.

En las Tablas 7, 8 y 9 se indican los intervalos de precipitación y los rendimientos parciales y totales de los fraccionamientos 0,24%, 0,36% y 0,55%, respectivamente.

Antecedentes previos sobre el carragenano de Iridaea undulosa Bory (Cerezo, comunicación personal) habían mostrado que las precipitaciones se producían a concentraciones de cloruro de potasio superiores a 1,00 M. En consecuencia en el primer fraccionamiento (0,55% de carragenano en agua), después de separar la fracción κ (0,9%), la solución se llevó a una concentración 0,90 M y, a diferencia de lo esperado, se observó la formación de un precipitado. Considerando que este resultado podría deberse a una coprecipitación por interacción entre las cadenas de polisacárido en soluciones concentradas, las fracciones 2 y 3 reunidas se sometieron a un nuevo fraccionamiento en condiciones más diluídas (0,4% de carragenano en agua; Tabla 10). La diferencia entre ambos fraccionamientos confirmó la influencia de la coprecipitación.

La forma similar de las curvas de precipitación (método turbidimétrico) en el rango 0,09-0,24% de carragenano en agua mostró que las interacciones soluto-soluto eran mínimas en dicho rango de concentraciones. Por lo tanto, resultaba muy útil comparar los resultados del fraccionamiento 0,36% con los del fraccionamiento 0,24%. Se efectuaron dos fraccionamientos 0,24%, uno de ellos en pequeña escala con el objeto de estudiar las dificultades experimentales en el manejo de soluciones diluídas.

Tabla 7. Fraccionamiento del carragenano (0,24%) con cloruro de potasio.

Fracción	Rango de precipitación ClK, M	Rendimiento[1] %
1	0-0,10	0,5
2	0,70-0,90	5,8
3	0,90-0,95	7,4
4	0,95-1,05	6,8
5	1,20-1,25	15,0
6	1,35-1,40	7,2
7	1,55-1,65	13,2
8	2,00[2]	13,0
Total		68,9

[1] Respecto de 19,2 g de carragenano disueltos en 8 l de agua.

[2] Soluble a una concentración 2,00 M de cloruro de potasio.

Tabla 8. Fraccionamiento del carragenano (0,36%) con cloruro de potasio.

Fracción	Rango de precipitación ClK, M	Rendimiento[1] %
1	0-0,10	0,4
2	0,95-1,05	19,4
3	1,20-1,25	13,8
4	1,80-2,00	10,0
5	2,00[2]	9,7
Total		53,3

[1] Respecto de 10,8 g de carragenano disueltos en 3 l de agua.

[2] Soluble a una concentración 2,00 M de cloruro de potasio.

Tabla 9. Fraccionamiento del carragenano (0,55%) con cloruro de potasio.

Fracción	Rango de precipitación ClK, M	Rendimiento[1] %
1	0-0,10	0,9
2	0,10-0,90	19,2
3	1,10-1,15	32,3
4	1,50-2,00	4,7
5	2,00[2]	18,6
Total		75,7

[1] Respecto de 16,5 g de carragenano disueltos en 3 l de agua.

[2] Soluble a una concentración 2,00 M de cloruro de potasio.

Tabla 10. Refraccionamiento (0,4%) con cloruro de potasio de las fracciones 2 y 3 provenientes del fraccionamiento 0,55%.

Fracción	Rango de precipitación ClK, M	Rendimiento[1] %
1	0,60-0,80	21,1
2	0,90-0,95	34,1
3	1,15-1,25	12,8
4	1,65-2,00	5,6
5	2,00[2]	7,1
Total		80,7

[1] Respecto de 7,8 g de carragenano (2,8 g de fracción 2 más 5,0 g de fracción 3, provenientes del fraccionamiento 0,55%) disueltos en 1,96 l de agua.

[2] Soluble a una concentración 2,00 M de cloruro de potasio.

Las Tablas 7 y 8 muestran que los fraccionamientos 0,24% y 0,36% fueron semejantes pero no idénticas. En efecto, en el caso del fraccionamiento 0,24% se obtuvieron las fracciones 2 (5,8%) y 3 (7,4%) que precipitaron en rangos estrechos de molaridad de cloruro de potasio (0,70-0,90 M y 0,90-0,95 M, respectivamente). Es de notar, además, que el rendimiento total en el rango 0,70-1,05 M para el fraccionamiento 0,24% (20,0%) resultó análogo al determinado en el rango 0,95-1,05 M para el fraccionamiento 0,36% (19,4%). Asimismo, los rendimientos fueron similares en el rango 1,20-1,25 M (15,0% y 13,8% para los fraccionamientos 0,24% y 0,36%, respectivamente) y para las fracciones solubles (13,0% y 9,7%, respectivamente).

Sin embargo, las diferencias entre ambos fraccionamientos se acentuaron en el rango 1,25-2,00 M. Para el fraccionamiento 0,24% fue posible aislar dos fracciones, 6 (7,2%) y 7 (13,2%), que precipitaron en rangos estrechos de molaridad (1,35-1,40 M y 1,55-1,65 M, respectivamente) mientras que para el fraccionamiento 0,36% se aisló sólo una (fracción 4, 10,0%) que precipitó en el rango 1,80-2,00 M. El hecho de que los rendimientos totales fueran diferentes en el rango 1,25-2,00 M (20,4% y 10,0% para los fraccionamientos 0,24% y 0,36%, respectivamente) puede atribuirse al pasaje de moléculas a través de los tubos de diálisis. En efecto, en el caso de la fracción 7 del fraccionamiento 0,24% se recuperaron cantidades considerables del carragenano de las aguas externas de diálisis; cuando esta cantidad se tuvo en cuenta el rendimiento del fraccionamiento ascendió a 80,4% y era del orden de los determinados por Cerezo (1967 a; 1967 b) y por Pernas y col. (1967). También hubo evidencias de pérdidas por diálisis para la fracción 8.

Cabe destacar, además que en algunos casos se observaba una precipitación difusa, de poca importancia, entre las concentraciones en que se producían las precipitaciones definidas.

Dado que para el fraccionamiento 0,24% las interacciones entre las moléculas de polisacárido eran mínimas, se procedió a estudiar la composición y las propiedades de las fracciones aisladas por dicho fraccionamiento.

COMPOSICION Y PROPIEDADES DE LAS FRACCIONES PROVENIENTES DEL FRACCIONAMIENTO 0,24 %

La Tabla 11 indica la composición y las propiedades de las fracciones aisladas.

Las ocho fracciones obtenidas se pueden ordenar, de acuerdo a la escuela noruega, en tres grupos:

I - Fracción insoluble a una concentración 0,10 M de cloruro de potasio.

II- Fracciones que precipitaron a concentraciones de cloruro de potasio superiores a 0,10 M.

III- Fracción soluble a una concentración 2,00 M de cloruro de potasio.

I- Fracción insoluble a una concentración 0,10 M de cloruro de potasio

La fracción 1 debería corresponder a lo que originariamente se ha denominado κ-carragenano, asociado a un alto contenido de 3,6-anhidrogalactosa y a una gran capacidad de formar geles. Pero su contenido de 3,6-anhidrogalactosa resultó ser del 4,1% y no formó geles en cloruro de potasio 1% o en leche.

El espectro infrarrojo (Fig. 26) mostró, a diferencia de los espec-

Tabla 11. Composición y propiedades de las fracciones provenientes del fraccionamiento 0,24% [1].

Fracción	Galactosa anhidro %	3,6 a.h.g. anhidro %	Sulfato (SO_3K) %	Gal:3,6 a.h.g.:Sulfato relación molar	6-Sulfato (SO_3K) %	6-Sulfato[2] (SO_3K) %	Oxid. con periodato[3]	$[\alpha]_D$ °	$[\eta]$ 100 ml/g	Proteína %
1	20,7	4,1	30,0	1,00:0,22:1,97	3,9	-	-	-	-	13,0
2	37,6	18,9	37,0	1,00:0,57:1,34	2,3	0	2,2	+ 56,0	3,02	1,8
3	39,3	17,4	32,9	1,00:0,50:1,14	4,3	0	1,6	+ 49,3	1,26	3,4
4	41,2	17,0	33,7	1,00:0,46:1,11	3,6	0	4,0	+ 54,0	2,42	2,3
5	41,6	3,5	44,6	1,00:0,09:1,46	12,8	7,6	4,4	+ 71,0	4,20	1,5
6	40,9	1,8	44,5	1,00:0,05:1,48	11,9	10,0	5,9	+ 66,5	5,58	1,1
7	40,2	1,6	42,2	1,00:0,04:1,43	10,4	8,3	2,2	+ 62,2	5,30	1,7
8	34,6	5,8	40,1	1,00:0,19:1,57	3,0	1,8	4,7	+ 39,8	4,48	2,0

[1] La desviación respecto del 100% observada en la determinación de la composición total de las fracciones, es usual en el análisis de los carragenanos, y en particular cuando las muestras han sido liofilizadas debido a la dificultad de remover completamente el agua en esas condiciones.

[2] Después de la oxidación con periodato.

[3] Unidades anhidro promedio por mol de periodato consumido.

tros de los κ-carragenanos que presentan un pico neto a 845-850 cm^{-1}, una banda ancha centrada a 830 cm^{-1} que es característica de las fracciones solubles.

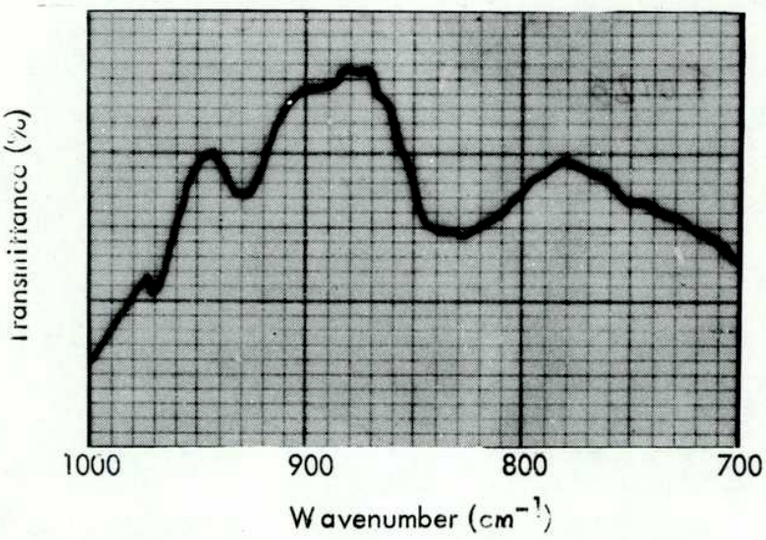


Fig. 26. Espectro infrarrojo de la fracción 1.

Por lo tanto, se concluyó que la precipitación de la fracción 1 pudo estar determinada por otros factores, diferentes a los que producen la precipitación del κ-carragenano, tales como la contaminación con un alto porcentaje de proteína (13,0%).

Dada su pequeña contribución al sistema total (0,5%) esta fracción no fue estudiada posteriormente.

II- Fracciones que precipitaron a concentraciones de cloruro de potasio superiores a 0,10 M

Estas fracciones se denominaron "fracciones intermedias" (escuela noruega) y son las que determinan, en gran parte, las propiedades de este carragenano. De acuerdo con su composición y sus propiedades pueden subdividirse en dos subgrupos:

a- Fracciones insolubles a concentraciones de cloruro de potasio menores de 1,05 M (fracciones 2, 3 y 4).

b- Fracciones insolubles a concentraciones de cloruro de potasio mayores de 1,05 M (fracciones 5, 6 y 7).

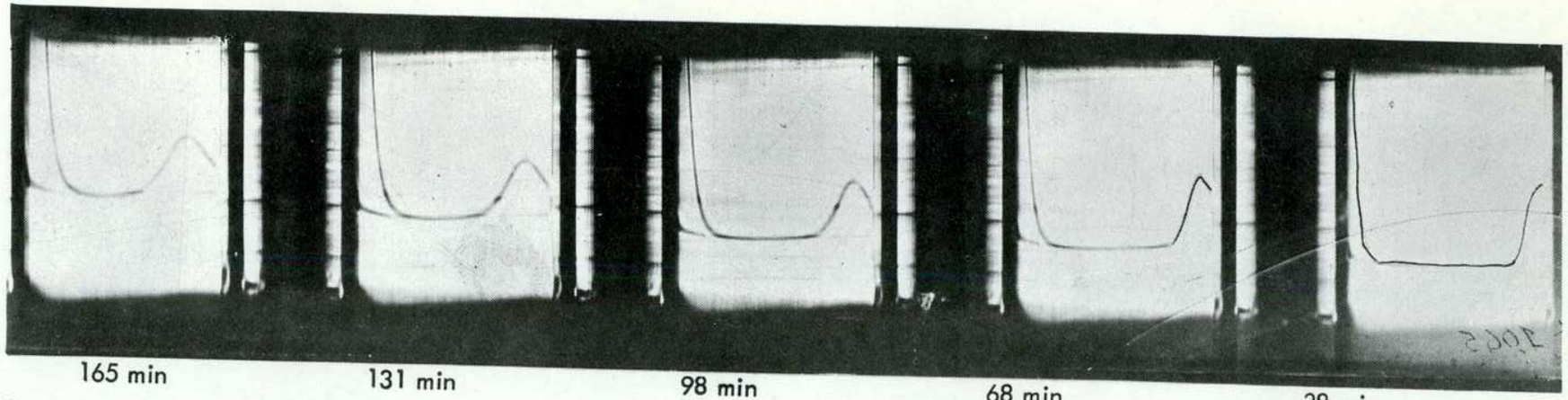
a- Fracciones insolubles a concentraciones de cloruro de potasio menores de 1,05 M.

Las fracciones 2, 3 y 4 se obtuvieron con un rendimiento total del 20,0%. Si bien poseían un contenido relativamente alto de 3,6-anhidrogalactosa (18,9%, 17,4% y 17,0%, respectivamente) no formaban geles en cloruro de potasio 1% y en leche.

Se presentaron como sustancias homogéneas por ultracentrifugación ya que dieron un único pico simétrico (Figs. 27, 28 y 29). Sin embargo, las mismas no deben considerarse monodispersas sino que constituídas por un grupo de moléculas extremadamente similares. Este comportamiento es análogo al del carragenano que dio también un único simétrico por ultracentrifugación pero resultó altamente polidisperso en lo que respecta al fraccionamiento con cloruro de potasio.

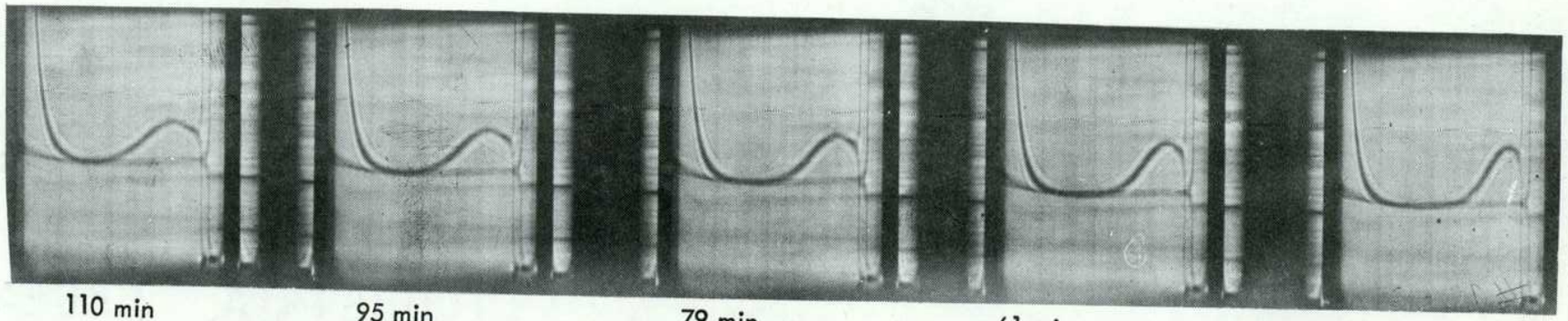
Las viscosidades intrínsecas del mismo orden (3,02 100 ml/g, 1,26 100 ml/g y 2,42 100 ml/g, para las fracciones 2, 3 y 4, respectivamente) indicaron que el fraccionamiento no se debió a diferencias en el peso molecular.

La Fig. 30 muestra los espectros infrarrojos de las fracciones 2, 3 y 4 en la región de 700-1000 cm^{-1}. Dichos espectros resultaron análogos mostrando una absorción principal a 840 cm^{-1} que es característica de las unidades de galactopiranosa 4-sulfato.



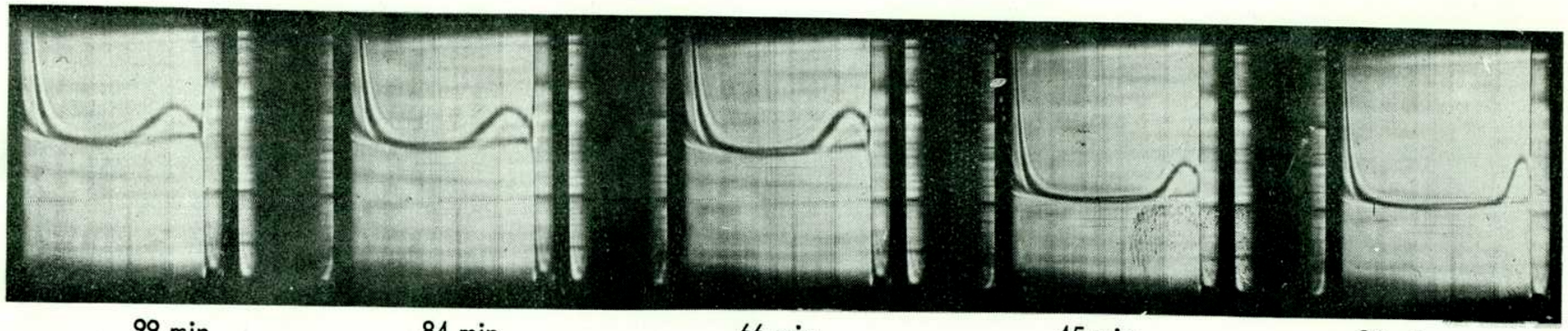
165 min 131 min 98 min 68 min 38 min

Fig. 27. Ultracentrifugación de la fracción 2. Las placas se obtuvieron con una solución 0,91% en cloruro de sodio 0,1 M a 47.660 rpm y a 20°, y las fotos fueron tomadas a 38, 68, 98, 131 y 165 minutos después de llegar a la velocidad indicada ($S_{20,w}$ 1,51 x 10^{-13}). Las placas obtenidas con una solución más diluída (0,33%) resultaron similares.



110 min 95 min 79 min 61 min 41 min

Fig. 28. Ultracentrifugación de la fracción 3. Las placas se obtuvieron con una solución 1,1% en cloruro de sodio 0,1 M a 59.780 rpm y a 20°, y las fotos fueron tomadas a 41, 61, 79, 95 y 110 minutos después de llegar a la velocidad indicada ($S_{20,w}$ 1,11 x 10^{-13}) . Las placas obtenidas con una solución más diluída (0,37%) resultaron similares.



99 min 84 min 66 min 45 min 25 min

Fig. 29. Ultracentrifugación de la fracción 4. Las placas se obtuvieron con una solución 0,5% en cloruro de sodio 0,1 M a 59.780 rpm y a 20°, y las fotos fueron tomadas a 25, 45, 66, 84 y 99 minutos después de llegar a la velocidad indicada ($S_{20,w}$ $1,43 \times 10^{-13}$).

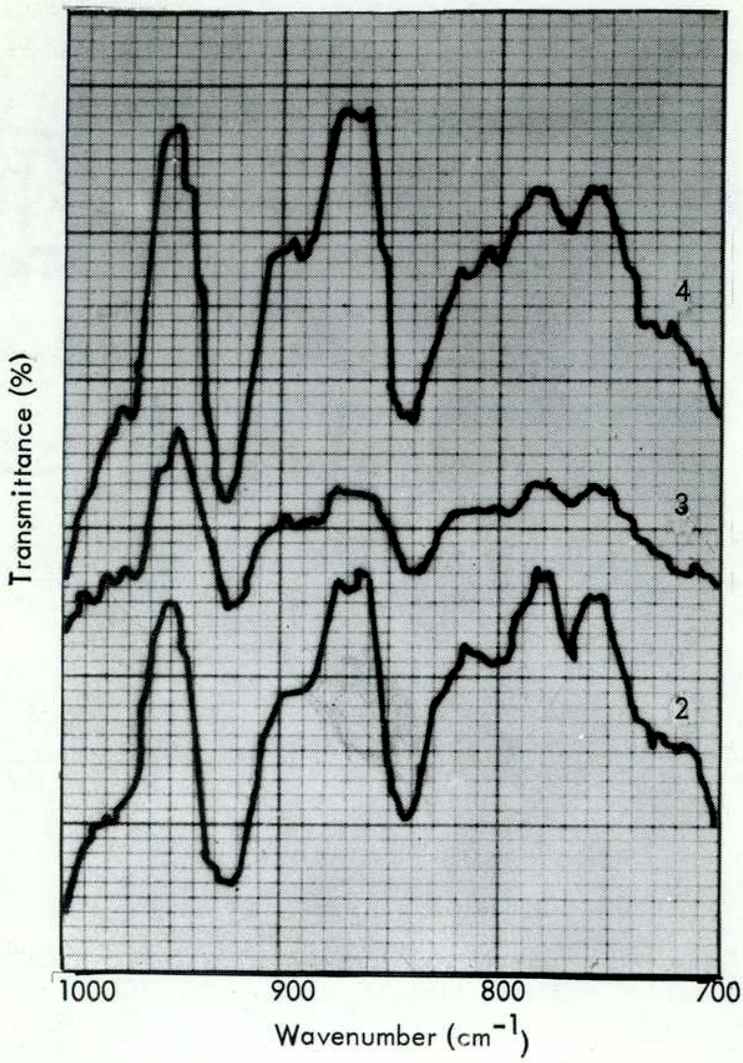


Fig. 30. Espectros infrarrojos de las fracciones 2, 3 y 4 en la región de 700-1000 cm^{-1}.

El pico a 800 cm^{-1} sugería la presencia de unidades de 3,6-anhidrogalactopiranosa 2-sulfato, mientras que la absorción pequeña a 820 cm^{-1} coincidió con la determinación de pequeños porcentajes de 6-sulfato. El pico a 925 cm^{-1} se debe al anillo de 3,6-anhidro.

Dado que las relaciones molares de estas fracciones eran semejantes (ver Tabla 11) y dado que el fraccionamiento no estaba determinado por el peso molecular, las diferencias en la solubilidad en soluciones de cloruro de potasio podrían atribuirse a la distinta distribución de los sulfatos en las moléculas de polisacárido.

Los dosajes de 6-sulfato indicaron contenidos del 2,3%, 4,3% y 3,6% para las fracciones 2, 3 y 4, respectivamente (6,2%, 13,1% y 10,7% del sulfato total). Las unidades que llevaban dichos grupos sulfato no sobrevivieron a la oxidación con periodato mostrando que poseían funciones α-glicol libres. Esto significaba que las unidades enlazadas por la posición 4 y sulfatadas en el C-6 no estaban sustituídas en el C-2. Por lo tanto, en estas fracciones no había unidades de galactosa 2,6-disulfato unidas por la posición 4.

Las Figs. 31, 32 y 33 muestran los consumos de periodato para las fracciones 2, 3 y 4, respectivamente.

En la oxidación con periodato de la fracción 2 se consumió un mol de periodato cada 2,2 unidades anhidro promedio, es decir aproximadamente 45 moles de oxidante cada 100 unidades. Dado que la escuela inglesa ha obtenido evidencias de que las uniones existentes en los carragenanos son (1$\rightarrow$3)- y (1$\rightarrow$4)- se puede calcular sobre esta base, en función de los análisis realizados, el tipo y la proporción de las unidades existentes en el polímero y comparar finalmente los resultados con los determinados por la escuela inglesa.

De los 45 moles de periodato consumidos en la oxidación de 100 unidades, 5 fueron usados en el oxidación de igual número de unidades de galactosa 6-sulfato unidas por la posición 4 (calculado a partir del dosaje de 6-sulfato); el resto (40 moles de periodato) deben haber sido consumidos, mol a mol, por las unidades de galactosa unidas por la posición 4 y sin sulfatar (sustituyentes en otra posición así como las uniones por la posición 3 impedirían la oxidación).

Como cada 100 unidades hay 85 grupos sulfato (calculado a partir

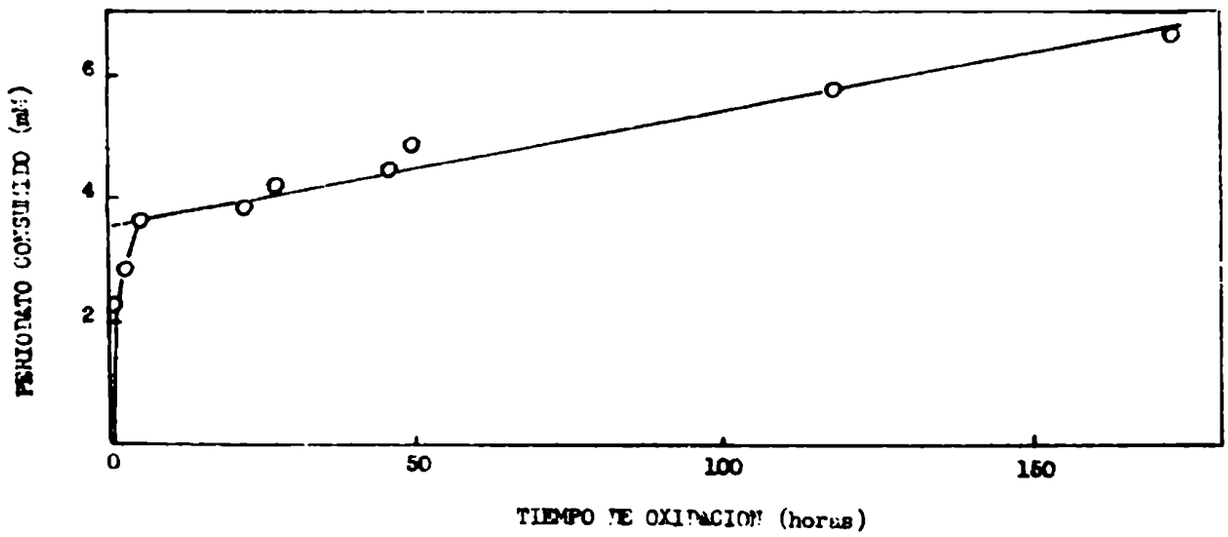


Fig. 31. Determinación del consumo de periodato de la fracción 2.

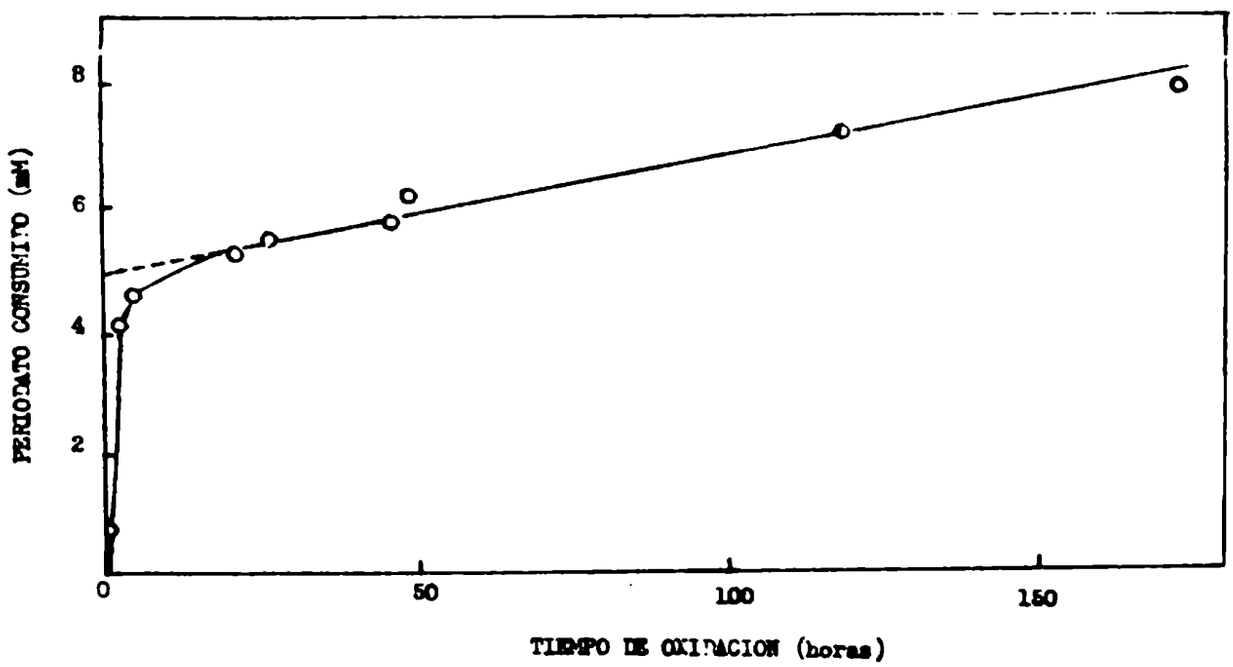


Fig. 32. Determinación del consumo de periodato de la fracción 3.

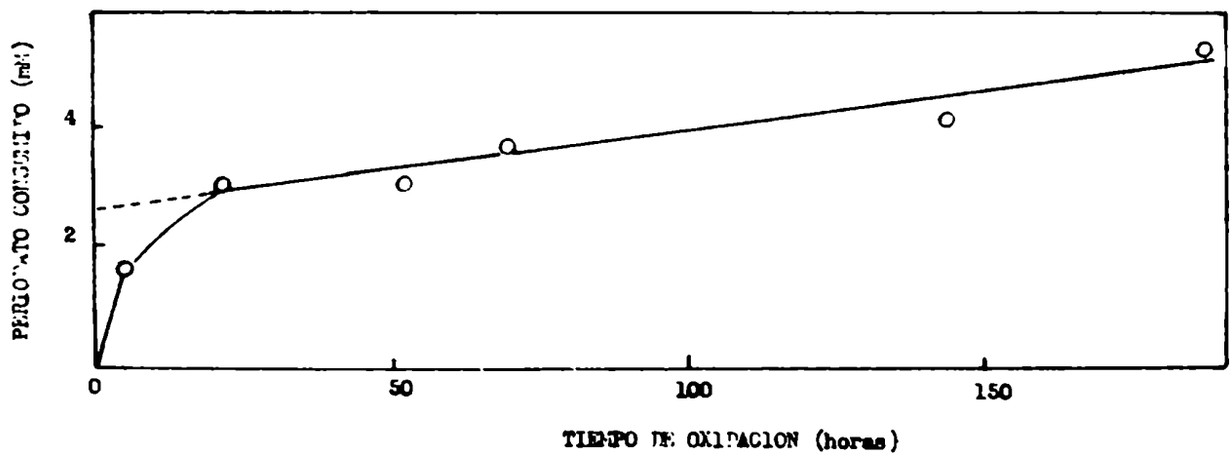


Fig. 33. Determinación del consumo de periodato de la fracción 4.

de la relación molar) y si, de acuerdo con lo encontrado para otros carragenanos insolubles aún a menores concentraciones de cloruro de potasio (Cerezo, 1973; Lawson y col., 1973), se considera que las unidades de 3,6-anhidrogalactosa unidas por la posición 4 (36, calculado a partir de la relación molar) están sulfatadas en el C-2, quedan 44 grupos sulfato a distribuir entre las unidades de galactosa restantes (19, determinado por diferencia). Dichas unidades que deben cumplir, además, con la condición de no consumir periodato, pues el consumo de éste ya fue adjudicado, deben estar unidas por la posición 3.

El análisis realizado para la fracción 2, que obviamente es una simplificación, nos conduce a resultados que difieren de los encontrados previamente para los carragenanos por la escuela inglesa (igual proporción de uniones (1⟶3)- y (1⟶4)- y monosulfatación de las unidades enlazadas por la posición 3). En efecto cada 100 unidades hay 81 unidades enlazadas por la posición 4 (galactosa más galactosa 6-sulfato más 3,6-anhidrogalactosa 2-sulfato) y 19 unidades enlazadas por la posición 3 y estas últimas presentan una sulfatación de 2,3 grupos por unidad. La existencia de otros tipos de enlace, por ejemplo (1⟶6)- no considerados en la discusión por no existir antecedentes en la literatura, podría introducir otra variante en esta estructura.

La Tabla 12 muestra la composición en monosacáridos de todas las fracciones.

Para las fracciones 3 y 4 se pueden efectuar razonamientos análogos. Dicho razonamiento conduce, en el caso de la fracción 3, al absurdo de tener que distribuir 33 grupos sulfato entre 4 unidades de galactosa unidas por la posición 3. Esta conclusión proviene de haber

Tabla 12. Composición en monosacáridos de las fracciones aisladas [1].

Fracción	Gal[2]	Gal 6-sulfato	Gal 2,6-disulfato	3,6 a.h.g.	Gal[3]
2	40	5	0	36	19
3	53	10	0	33	4
4	17	8	0	31	44
5	7	16	23	8	46
6	11	6	32	5	46
7	39	7	27	4	23
8	17	4	6	16	57

[1] La composición se expresó en unidades %.

[2] Unidades de galactosa que consumen periodato.

[3] Unidades de galactosa que no consumen periodato.

aceptado como base del razonamiento la presencia de uniones (1→3)- y (1→4)- como únicas uniones glicosídicas en el carragenano. La existencia de uniones (1→6)- justificaría un mayor consumo de periodato y sería compatible con el grado de sulfatación de esta fracción.

En la oxidación con periodato de la fracción 4 se consumió un mol de periodato cada 4,0 unidades anhidro promedio, es decir 25 moles de oxidante cada 100 unidades. De esos 25 moles, 8 fueron consumidos por las unidades de galactosa 6-sulfato y el consumo de los moles restantes puede atribuirse a las unidades de galactosa unidas por la posición 4 y sin sulfatar. Como cada 100 unidades hay 76 grupos sulfato quedan 68 grupos sulfato a distribuir entre las unidades de 3,6-anhidrogalactosa (31) y las unidades de galactosa unidas por la posición 3 (44). Es decir, habría una proporción de 56 unidades enlazadas por la posición 4 por cada 44 unidades enlazadas por la posición 3.

Los poderes rotatorios de estas fracciones resultaron semejantes ($[\alpha]_D$ +56,0° (c 0,32, agua), $[\alpha]_D$ +49,3° (c 0,45, agua) y $[\alpha]_D$ +54,0° (c 0,57, agua) para las fracciones 2, 3 y 4, respectivamente) pero inferiores al del carragenano original.

Los contenidos de proteínas de las tres fracciones también fueron del mismo orden (1,8%, 3,4% y 2,3% para las fracciones 2, 3 y 4, respectivamente); si bien no hay pruebas para asignar a la proteína un significado estructural, llama la atención que ésta se haya mantenido "asociada" al polisacárido a lo largo del fraccionamiento en un medio de fuerza iónica alta.

b- Fracciones insolubles a concentraciones de cloruro de potasio mayores de 1,05 M.

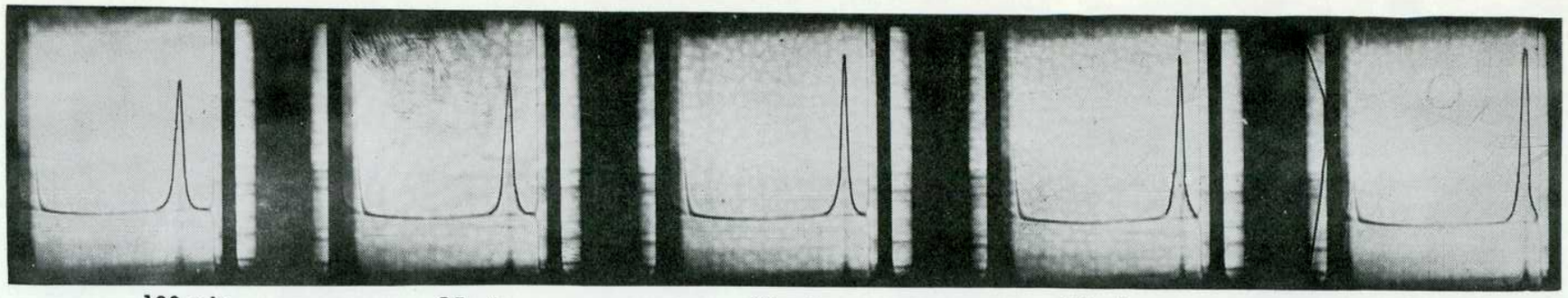
Las fracciones 5, 6 y 7 se obtuvieron con un rendimiento total del 35,4%.

Las fracciones 5 y 7 se presentaron como sustancias homogéneas por ultracentrifugación ya que dieron un único pico simétrico (Figs. 34 y 36); sin embargo como en el caso de las fracciones del grupo a), éstas no deben considerarse monodispersas. En cambio la fracción 6 dio un pico ligeramente deformado que indicó su falta de homogeneidad (Fig. 35).

Los poderes rotatorios resultaron mayores que los del grupo a) ($[\alpha]_D$ +71,0° (c 0,50, agua), $[\alpha]_D$ +66,5° (c 0,45, agua) y $[\alpha]_D$ +62,2° (c 0,40, agua)para las fracciones 5, 6 y 7, respectivamente).

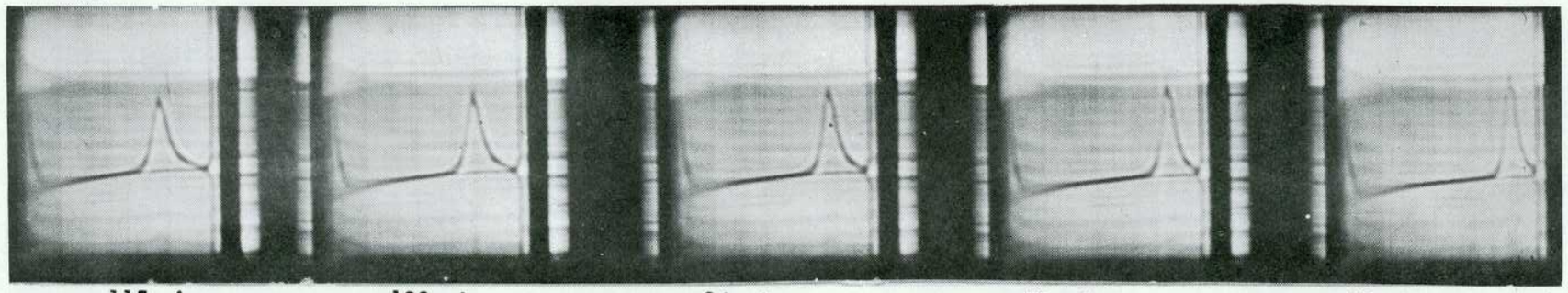
Las viscosidades intrínsecas del mismo orden (4,20 100 ml/g, 5,58 100 ml/g y 5,30 100 ml/g para las fracciones 5, 6 y 7, respectivamente) muestran que el fraccionamiento no se debió a diferencias en el peso molecular. Más aún, si comparamos las viscosidades intrínsecas del grupo a) con las del grupo b), vemos que son superiores las del grupo soluble a mayores concentraciones de cloruro de potasio (grupo b) lo que confirma que el peso molecular no fue el factor determinante del fraccionamiento.

En la Fig. 37 se encuentran los espectros infrarrojos de las fracciones 5, 6 y 7 en la región de 700-1000 cm^{-1}. Dichos espectros resultaron similares y mostraron una banda ancha centrada a 815 cm^{-1} que indicaba el predominio de unidades de galactopiranosa sulfatadas en el C-2 y/o en el C-6.



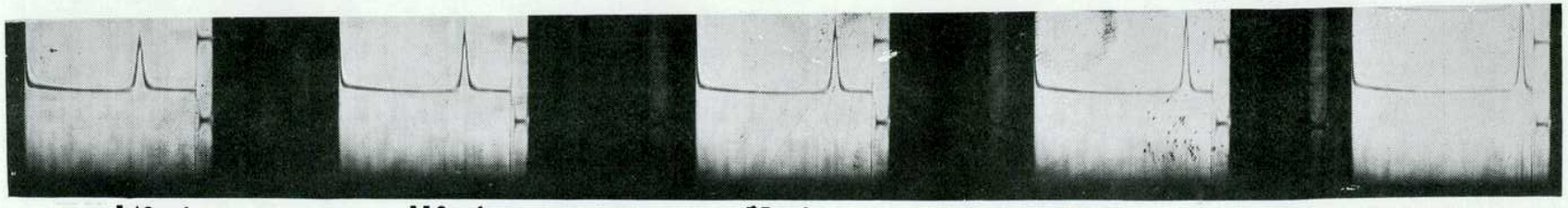
100 min 85 min 70 min 58 min 46 min

Fig. 34. Ultracentrifugación de la fracción 5. Las placas se obtuvieron con una solución 0,92% en cloruro de sodio 0,1 M a 59.780 rpm y a 20°, y las fotos fueron tomadas a 46, 58, 70, 85 y 100 minutos después de llegar a la velocidad indicada ($S_{20,w}$ $1,67 \times 10^{-13}$).



115 min 100 min 86 min 70 min 55 min

Fig. 35. Ultracentrifugación de la fracción 6. Las placas se obtuvieron con una solución 0,63% en cloruro de sodio 0,1 M a 59.780 rpm y a 20°, y las fotos fueron tomadas a 55, 70, 86, 100 y 115 minutos después de llegar a la velocidad indicada ($S_{20,w}$ $1,99 \times 10^{-13}$).



140 min 110 min 80 min 50 min 20 min

Fig. 36. Ultracentrifugación de la fracción 7. Las placas se obtuvieron con una solución 0,36% en cloruro de sodio 0,1 M a 52.640 rpm y a 20°, y las fotos fueron tomadas a los 20, 50, 80, 110 y 140 minutos después de llegar a la velocidad indicada (la determinación del coeficiente de sedimentación no fue posible pues se utilizó una celda doble).

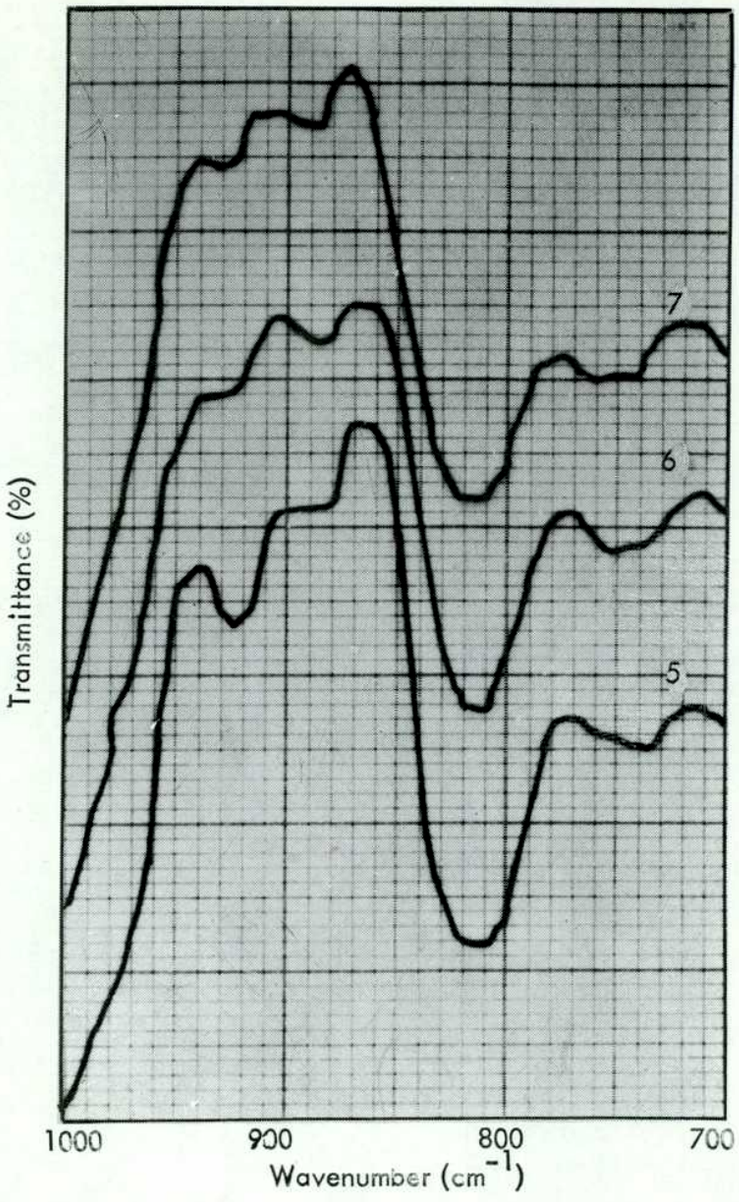


Fig. 37. Espectros infrarrojos de las fracciones 5, 6 y 7 en la región de 700-1000 cm^{-1}.

Dado que las relaciones molares también eran semejantes las diferencias en solubilidad en soluciones de cloruro de potasio podrían atribuirse, análogamente a lo expresado para las fracciones del grupo a), a la distinta distribución de los sulfatos en las moléculas de polisacárido.

El dosaje de 6-sulfato antes de la oxidación con periodato fue

del 12,8%, 11,9% y 10,4% para las fracciones 5, 6 y 7, respectivamente. Dichos contenidos se redujeron al 7,6%, 10,0% y 8,3% después de la oxidación con periodato, indicando que el 59,4%, 84,0% y 79,8% de dicho sulfato primario provenía de las unidades de galactosa 2,6-disulfato.

El contenido de 3,6-anhidrogalactosa (3,5%, 1,8% y 1,6% para las fracciones 5, 6 y 7, respectivamente) podría atribuirse a la modificación de una estructura básica fundamental semejante a la del λ-carragenano (Dolan y Rees, 1965).

Las Figs. 38, 39 y 40 muestran los consumos de periodato para las fracciones 5, 6 y 7, respectivamente.

Un razonamiento semejante al efectuado para las fracciones del grupo a) (ver Capítulo VII, pág.120) indica que la fracción 5 consumió un mol de periodato cada 4,4 unidades anhidro promedio, es decir aproximadamente 23 moles de oxidante cada 100 unidades. De esos 23 moles de oxidante, 16 fueron consumidos por las unidades de galactosa 6-sulfato y el consumo de los moles restantes puede atribuirse a las unidades de galactosa unidas por la posición 4 y sin sulfatar. Como cada 100 unidades hay 134 grupos sulfato, y si tenemos en cuenta la presencia de 23 unidades de galactosa 2,6-disulfato y que las 8 unidades de 3,6-anhidrogalactosa están sulfatadas, quedan 64 grupos sulfato a distribuir entre 46 unidades de galactosa unidas por la posición 3 (sulfatación de 1,4 grupos por unidad). Es decir habría una proporción de 54 unidades enlazadas por la posición 4 por cada 46 unidades enlazadas por la posición 3.

En el caso de la fracción 6 se determina que cada 100 unidades

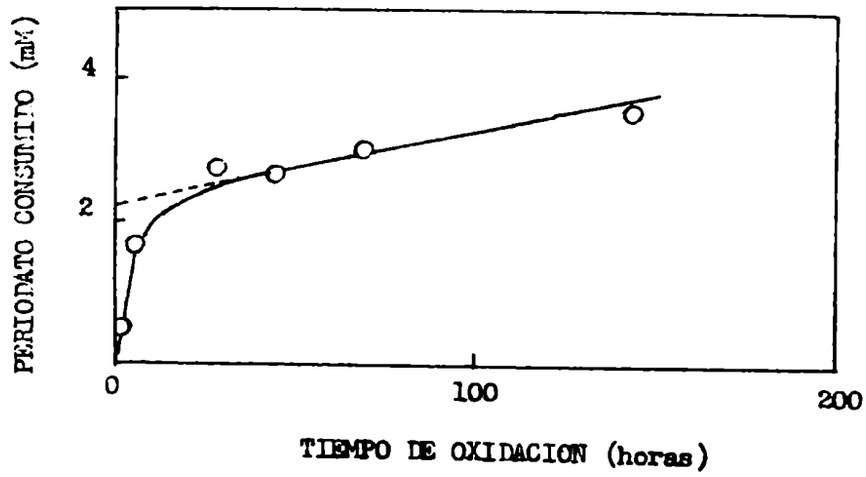


Fig. 38. Determinación del consumo de periodato de la fracción 5.

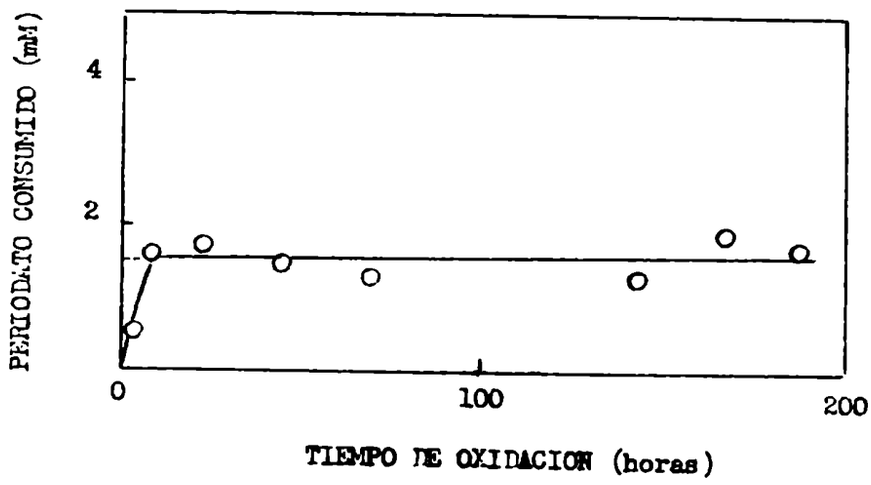


Fig. 39. Determinación del consumo de periodato de la fracción 6.

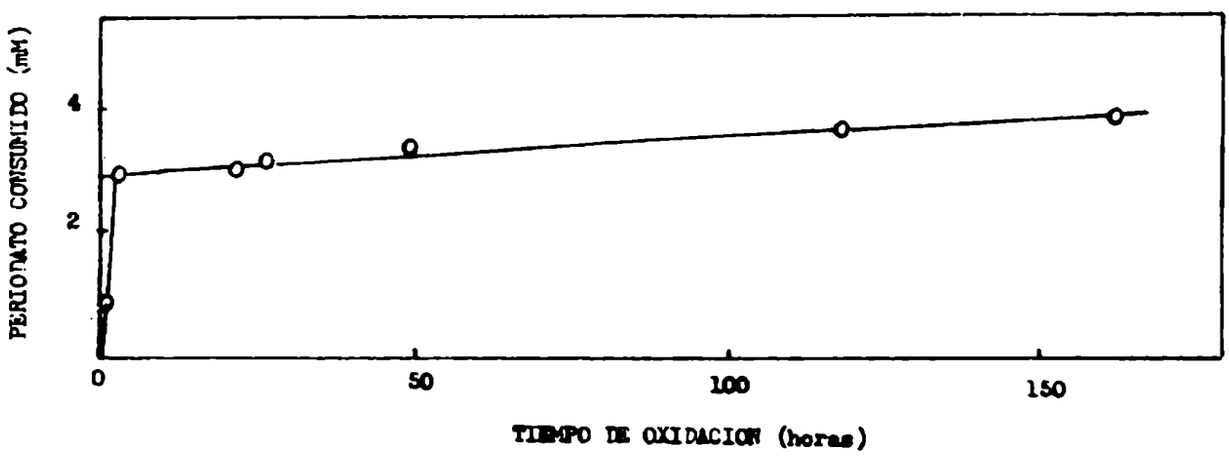


Fig. 40. Determinación del consumo de periodato de la fracción 7.

anhidro promedio habría 54 unidades enlazadas por la posición 4 y 46 unidades enlazadas por la posición 3 con un grado de sulfatación de estas últimas de 1,4 grupos por unidad.

Para la fracción 7 se obtiene un resultado de 77 unidades enlazadas por la posición 4 por cada 33 unidades enlazadas por la posición 3 con un grado de sulfatación de estas últimas de 3,1 grupos por unidad. El hecho de haber obtenido un grado de sulfatación tan alto podría ser la consecuencia de haber aceptado como base del razonamiento la presencia de uniones (1⟶3)- y (1⟶4)- como únicas uniones en el carragenano. La existencia de uniones (1⟶6)- podría introducir otra variante en esta estructura.

El contenido de proteínas de estas fracciones fue semejante (1,5%, 1,1% y 1,7% para las fracciones 5, 6 y 7, respectivamente).

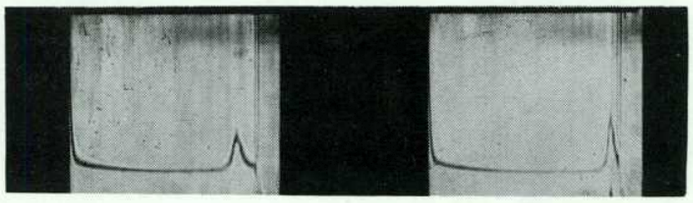
Cabe destacar que estas fracciones no formaron geles en cloruro de potasio 1% y en leche.

III- Fracción soluble a una concentración 2,00 M de cloruro de potasio

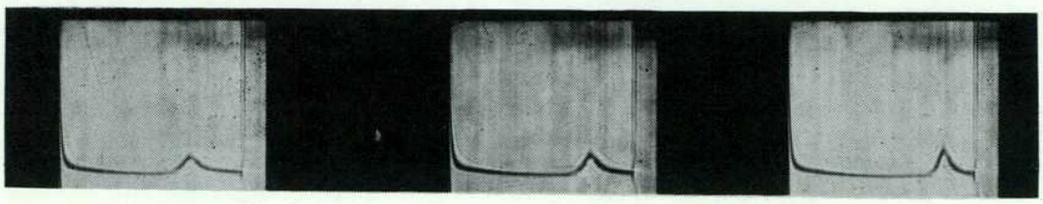
La fracción 8, soluble a una concentración 2,00 M de cloruro de potasio, se presentó como homogénea por ultracentrifugación (Fig. 41).

Contenía más 3,6-anhidrogalactosa (5,8%) y menos 6-sulfato (3,0%) que las fracciones del grupo b).

La Fig. 42 muestra el espectro infrarrojo en la región de 700-1000 cm^{-1}. La banda ancha centrada a 830 cm^{-1} indicaba un predominio de unidades de galactopiranosa 2-sulfato.



50 min 20 min



140 min 110 min 80 min

Fig. 41. Ultracentrifugación de la fracción 8. Las placas se obtuvieron en una solución 0,41% en cloruro de sodio 0,1 M a 52.640 rpm y a 18°, y las fotos fueron tomadas a los 20, 50, 80, 110 y 140 minutos después de llegar a la velocidad indicada (la determinación del coeficiente de sedimentación no fue posible pues se utilizó una celda doble).

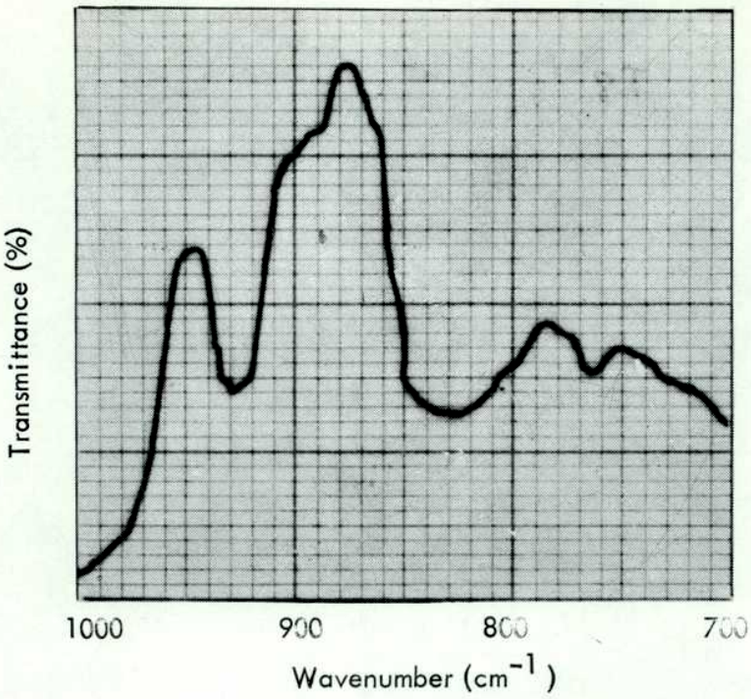


Fig. 42. Espectro infrarrojo de la fracción 8 en la región de 700-1000 cm^{-1}.

Dado que existen antecedentes en la literatura de haber encontrado L-galactosa en el carragenano de Gigartina stellata (Johnston y Percival, 1950) y en el λ-carragenano de Chondrus crispus (Smith y col., 1955), se pensó que el poder rotatorio bajo de esta fracción ($[\alpha]_D$ +39,8° (c 0,27, agua)) así como su mayor solubilidad, podían deberse a la presencia de dicho azúcar. Por hidrólisis ácida total y posterior cromatografía en columna de celulosa (solvente 1) se aisló galactosa; por determinación del punto de fusión (Nunn y von Holdt, 1957) y del poder rotatorio de la galactosa aislada y de su N-(p-nitrofenil)-galactopiranosilamina, se constató la ausencia del isómero L. Además es de notar que se detectaron trazas de xilosa en el hidrolizado de esta fracción.

La Fig. 43 muestra el consumo de periodato para la fracción 8.

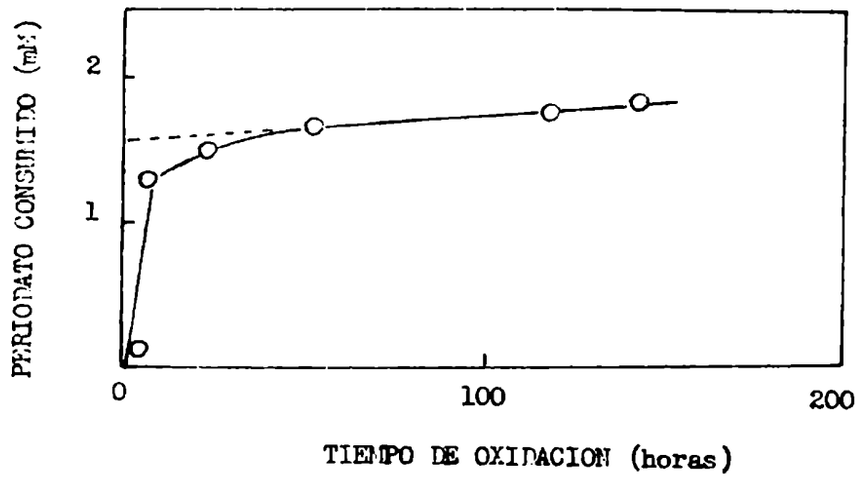


Fig. 43. Determinación del consumo de periodato de la fracción 8.

Por un razonamiento semejante al efectuado para las fracciones del grupo a) y del grupo b) se determina que cada 43 unidades enlazadas por la posición 4 hay 57 unidades enlazadas por la posición 3 con un grado de sulfatación de estas últimas de 1,7 grupos por unidad.

Como era de esperar, esta fracción no formó geles con cloruro de potasio 1% y en leche.

ESTUDIO DEL RESIDUO INSOLUBLE

El carragenano, obtenido por precipitación con isopropanol hasta una concentración del 75%, estaba contaminado con aproximadamente un 8-10% de un residuo insoluble en agua que se separó por disolución del carragenano en agua (ver Capítulo VII, pág.97).

Por hidrólisis ácida total y posterior cromatografía gaseosa (trimetilsilil derivados de los metilglicósidos correspondientes) se determinó

Tabla 13. Composición en aminoácidos del residuo insoluble[1].

Aminoácido	g/16 g N
Acido aspártico	13,7
Treonina	2,9
Serina	6,1
Acido glutámico	13,6
Prolina	7,3
Glicina	4,4
Alanina	8,6
Valina	7,1
Metionina	1,2
Isoleucina	4,5
Leucina	10,0
Tirosina	4,0
Fenilalanina	5,9
Lisina	3,5
Arginina	7,0

[1] En las condiciones de operación del TMS2 no se pueden dosar triptofano, hidroxiprolina e hidroxilisina.

la presencia de glucosa y galactosa en una relación 4:1. Este residuo contenía, además, 6,0% de nitrógeno y 2,5% de azufre, y a los efectos de estudiar la naturaleza proteica del mismo la determinación de aminoácidos se llevó a cabo con el analizador automático. Los resultados se encuentran en la Tabla 13.

Como este material insoluble no fue el objeto de este trabajo, éste se reservó para su posterior estudio.

ESTUDIOS DE METILACION

La fracción del carragenano, proveniente del fraccionamiento 0,24%, que precipitaba en el rango 0,70-1,05 M de cloruro de potasio 20,0% del carragenano total) fue elegida para llevar a cabo los estudios de metilación. Dado que por razones de tiempo y esfuerzo dicho estudio no podía ser aplicado, dentro del período de esta Tesis, a todas las fracciones obtenidas en el fraccionamiento general, se escogió aquel conjunto de moléculas que teniendo iguales características analíticas (% de galactosa, % de 3,6-anhidrogalactosa y % de sulfato) y porcentajes menores de 6-sulfato (el cual se elimina en medio alcalino) precipitara en el rango de concentraciones más amplio. Los resultados, por lo tanto, no deben ser aplicados a la concreción de una estructura, ya que dada la amplitud de la polidispersión (confirmada por los valores obtenidos en la oxidación con periodato) ésta tendría un sentido estadístico matemático sin significado real, sino para determinar el tipo de unidades que existen en los carragenanos precipitables entre esas concentraciones de cloruro de potasio.

El carragenano, previamente reducido con borohidruro de sodio para minimizar la degradación alcalina, se metiló repetidamente con sulfa-

to de dimetilo e hidróxido de sodio según el método de Haworth (1915), primero a temperatura ambiente y luego a 30-50° (5-6 adiciones de reactitivos por metilación y tres metilaciones en total). Este método, quizás por ser el menos agresivo, es el único que permite obtener derivados metilados de los carragenanos sin degradación evidente de la molécula. El uso de métodos más modernos ha dado siempre como resultado la degradación del producto y la obtención de alquitranes no trabajables (Rees, comunicación personal; Cerezo, comunicación personal). El único caso conocido en la literatura de un producto relacionado con los carragenanos metilado por un método distinto al de Haworth, es el de un λ-carragenano despolimerizado y parcialmente desulfatado que se metiló con sulfato de dimetilo en un medio de dimetilsulfóxido-dimetilformamida e hidróxido de bario según un procedimiento modificado del método de Kuhn y Trischmann (1963) (Dolan y Rees, 1965). Sin embargo, cuando se intentó aplicar este método sobre la fracción que precipitaba en el rango 0,3-0,4 M de cloruro de potasio del carragenano de Gigartina skottsbergii y que poseía un contenido relativamente alto 3,6-anhidrogalactosa (24,7%)(Cerezo, 1967 b) se produjo la degradación total del producto (Cerezo, comunicación personal).

La metilación se llevó a cabo hasta valores constantes en el contenido de metoxilo. Los criterios de metilación total para estos productos son más restringidos que en el caso de polisacáridos más sencillos. El criterio de anulación de la banda correspondiente al hidroxilo en el espectro infrarrojo no puede usarse al ser el derivado metilado insoluble en solventes como cloroformo o benceno anhidros; por otra parte en estructuras tan complejas no puede realizarse un cálculo teórico de por-

centajes máximos de metoxilo. El porcentaje final de metoxilo fue del 13,2%. Dolan y Rees (1965) y Anderson y col. (1968 a) informaron para λ-carragenanos (según Smith y Cook, 1953) contenidos de metoxilo que variaban en un rango de 9,8-16,3%. Cerezo (1973) informó para la fracción precipitable en el rango 0,3-0,4 M de cloruro de potasio un contenido de metoxilo del 14,3%. Esta apertura de valores se debe a las diferentes estructuras que, dentro del mismo esquema general, presentan los miembros de una familia.

Llama la atención el hecho de que al cabo de la primera serie de adiciones de los reactivos (primera metilación) se haya obtenido el polisacárido parcialmente metilado con un rendimiento del 58,8%. Este rendimiento resultó inferior al determinado por Cerezo (1973), 97,8%, en la metilación de la fracción precipitable en el rango 0,3-0,4 M de cloruro de potasio, y sugería una despolimerización considerable del producto con pérdida de los fragmentos pequeños en la diálisis posterior. Cabe mencionar que los demás rendimientos que se encuentran en la literatura corresponden a valores finales y son variables. Dolan y Rees (1965) informaron para un λ-carragenano (según Smith y Cook, 1953) del que sólo se eliminaba el 15% del 6-sulfato, un rendimiento final de aproximadamente un 70%; Anderson y col. (1968 a) obtuvieron para diferentes λ-carragenanos (según Smith y Cook, 1953) rendimientos del 70-90%, mientras que Cerezo (1973) indicó para la fracción precipitable en el rango 0,3-0,4 M de cloruro de potasio un rendimiento del 82,3%. En el caso de la fracción en estudio el rendimiento final fue del 40,7%.

La hidrólisis del polisacárido metilado se efectuó por calentamien-

to en ácido fórmico 45% (v/v) a 100° durante 16 horas. Es importante destacar que dicha hidrólisis destruye los derivados de la 3,6-anhidro-galactosa y por lo tanto se obtienen solamente derivados parcialmente metilados de la galactosa.

La mezcla de galactosa parcialmente metiladas fue analizada por cromatografía gaseosa y cromatografía en papel.

Por cromatografía gaseosa de los metilgalactitoles sililados se detectaron galactitoles trimetilados (4% del área total), dimetilados (76%), monometilados (17%) y galactitol (3%); no se detectó la presencia de 2,3,4,6-tetra-O-metilgalactitol. Es decir con las fases disponibles sólo se pudo lograr una separación en función del peso molecular.

La cromatografía en papel del hidrolizado usando como solvente butanol medio saturado (solvente 3) mostró seis manchas:

R_f 0,74 (productos de descomposición ó 2,3,4,6-tetra-O-metilgalactosa, R_f 0,71).

R_f 0,60 (R_f de la 2,4,6-tri-O-metil-D-galactosa, 0,61).

R_f 0,40 (R_f de la 2,6-di-O-metil-D-galactosa, 0,41).

R_f 0,31 (R_f de la 4,6-di-O-metil-D-galactosa, 0,29).

R_f 0,11 (esta mancha puede corresponder a la 3-, 4-, ó 6-O-metilgalactosa, R_f 0,13, pero no a la 2-O-metilgalactosa, R_f 0,18).

R_f 0,02 (la galactosa prácticamente no se desplaza en este solvente, R_f 0,04).

El hidrolizado se fraccionó en una columna de celulosa utilizando el mismo solvente de desarrollo. Las fracciones obtenidas (seis) fueron analizadas por cromatografía gaseosa y cromatografía en papel, y en el caso de la fracción que contenía los derivados monometilados se usó,

además, electroforesis con buffer de borato pH 10,0 (Bouveng y Lindberg, 1956).

El análisis de dichas fracciones indicó que la 2,6-di-O-metil-D-galactosa era el producto principal del hidrolizado. Además había 4,6-di-O-metilgalactosa, 3-O-metilgalactosa y trazas de 2,4,6-tri-O-metilgalactosa, 6-O-metilgalactosa y galactosa. Asimismo se confirmó la ausencia de 2,3,4,6-tetra-O-metilgalactosa.

La 2,6- y la 4,6-di-O-metilgalactosa se encontraban en una relación 2:1 (peso en peso) y representaban el 44% del hidrolizado; la 2,6-di-O-metil-D-galactosa se identificó por cromatografía en papel, poder rotatorio y espectrometría de masas, y la 4,6-di-O-metilgalactosa por cromatografía en papel y espectrometría de masas. Cabe mencionar que en el caso de la 4,6-di-O-metilgalactosa el poder rotatorio resultó notablemente inferior al tabulado para el isómero D aún cuando el producto, controlado por los métodos antes indicados, era puro.

En las Tablas 14 y 15 se encuentran los datos de los espectros de masas de los acetatos de alditoles parcialmente metilados de los monosacáridos aislados y los testigos correspondientes.

La 2,6-di-O-metil-D-galactosa ya fue aislada anteriormente a partir de carragenanos sin fraccionar (Buchanan y col., 1943; Percival, 1945; Dewar y Percival, 1947; Johnston y Percival, 1950) y de carragenanos fraccionados, y en particular de aquellas fracciones insolubles a bajas concentraciones de cloruro de potasio (κ- y ι-carragenanos en la nomenclatura de la escuela inglesa)(Clingman y Nunn, 1959; Anderson y col., 1968 b; Anderson y col., 1968 c; Cerezo, 1973; Penman y Rees, 1973 a). La 4,6-di-O-metil-D-galactosa se encontró en polisacá-

Tabla 14. Espectros de masas de las fracciones 108-131 y 132-142 y del testigo correspondiente [1].

Temperatura de introducción 100°	Fracciones 108-131		Fracciones 132-142		Testigo [2]	
	m/e	%	m/e	%	m/e	%
	43	100	43	100	43	100
	45	23	45	18	45	16
	87	16	55	25	57	14
	99	10	57	33	60	18
	112	10	60	23	87	10
	113	10	69	18	99	10
	117	55	71	16	117	57
	129	23	73	26	129	12
	142	10	83	12		
	155	21	87	20		
	275	19	117	35		
			129	14		

[1] Se indican aquellos picos cuyas intensidades son mayores o iguales al 10%.

[2] 2,6-di-O-metil-1,3,4,5-tetra-O-acetilgalactitol.

Tabla 15. Espectros de masas de la fracción 143-173 y del testigo correspondiente [1].

Temperatura de introducción 25°	Fracciones 143-173		Testigo [2]	
	m/e	%	m/e	%
	43	100	43	100
	45	23	45	26
	55	24	52	15
	57	35	55	30
	60	10	56	10
	69	26	57	48
	71	26	69	26
	73	14	70	10
	81	12	71	26
	83	20	73	10
	85	25	74	22
	87	31	79	22
	95	12	81	11
	97	19	83	21
	99	24	85	21
	101	24	87	33
	111	12	95	10
	117	12	97	21
	127	30	99	22
	129	67	101	19
	161	37	111	12
	261	21	127	22
			129	52
			161	37
			261	22

[1] Se indican aquellos picos cuyas intensidades son mayores o iguales al 10%.

[2] 4,6-di-O-metil-1,2,3,5-tetra-O-acetilgalactitol.

ridos metilados provenientes de las fracciones solubles (ε- y λ-carragenano en la nomenclatura de la escuela inglesa)(Dolan y Rees, 1965; Anderson y col., 1968 a; Penman y Rees, 1973 a).

En función de antecedentes previos (Buchanan y col. 1943; Dewar y Percival, 1947; Johnston y Percival, 1950; Clingman y Nunn, 1959; Weigl y col., 1966; Anderson y col., 1968 b; Anderson y col., 1968 c; Penman y Rees, 1973 a; Penman y Rees, 1973 b) la 2,6-di-0-metil-D-galactosa provendría de unidades de D-galactopiranosa 4-sulfato unidas por la posición 3. A su vez la 4,6-di-0-metil-D-galactosa provendría de unidades de D-galactopiranosa 2-sulfato unidas por la posición 3 (Rees, 1963; Dolan y Rees, 1965; Anderson y col., 1968 a; Penman y Rees, 1973 a).

La fracción de azúcares monometilados, constituída por 3-0-metilgalactosa y trazas de 6-0-metilgalactosa, representaba un 19% del hidrolizado. De acuerdo con los antecedentes (Rees, 1963; Dolan y Rees, 1965; Anderson y col., 1968 a) la 3-0-metilgalactosa provendría de unidades de D-galactopiranosa 2,6-disulfato unidas por la posición 4; sin embargo, el dosaje de estas unidades demostró que no estaban presentes en el polisacárido original (ver Tabla 11, pág.114). Además hay otras dos unidades que darían 3-0-metilgalactosa por metilación y posterior hidrólisis: galactopiranosa 2,4-disulfato unida por la posición 6 y galactopiranosa 4,6-disulfato unida por la posición 2. Asimismo la 3-0-metilgalactosa podría provenir de un punto de ramificación en cuyo caso cada unidad tendría, además de la unión glicosídica, dos uniones y un grupo sulfato. Las tres unidades que se pueden construir en base a estos datos son 1,2,4 (unión) 6-sulfato, 1,2,6 (unión) 4-sulfato y 1,4,6 (unión) 2-sulfato. No hay antecedentes en la literatura sobre la existencia de

estas unidades en los carragenanos.

La 6-O-metilgalactosa fue detectada previamente entre los productos de hidrólisis de un λ-carragenano metilado de Chondrus crispus y se atribuyó a una metilación incompleta (Dolan y Rees, 1965). También podría atribuirse a la presencia de unidades de galactopiranosa 3,4-disulfato unidas por la posición 2, galactopiranosa 2,4-disulfato unidas por la posición 3 y/o galactopiranosa 2,3-disulfato unidas por la posición 4, o provenir de un punto de ramificación. En este último caso las tres unidades que se pueden construir son 1,2,3 (unión) 4-sulfato, 1,2,4 (unión) 3-sulfato y 1,3,4 (unión) 2-sulfato. Tampoco hay antecedentes en la literatura sobre la existencia de estas unidades en los carragenanos.

La pequeña proporción de galactosas trimetiladas (determinado por cromatografía gaseosa, 4% del área total) indica que las unidades no sulfatadas (no terminales) desempeñan un papel poco importante en la estructura de las fracciones solubles en el rango de concentraciones de cloruro de potasio considerado. Solamente un derivado trimetilado fue detectado y por cromatografía en papel (solvente 3) resultó idéntico a la 2,4,6-tri-O-metilgalactosa; ésta provendría de una unidad de D-galactopiranosa unida por la posición 3, en el polisacárido original. La 2,4,6-tri-O-metil-D-galactosa fue detectada anteriormente a partir de diferentes carragenanos (Dolan y Rees, 1965; Anderson y col., 1968 a; Penman y Rees, 1973 a; Cerezo, 1973).

La pequeña cantidad de galactosa (determinado por cromatografía gaseosa, 3% del área total) podría atribuirse a una submetilación, a la presencia de unidades trisulfatadas y/o a puntos de ramificación disul-

fatados. Si bien es poco probable encontrar contenidos elevados tanto de unidades trisulfatadas como de puntos de ramificación disulfatados, su aparición en porcentajes del orden del determinado no puede descartarse.

Debe recordarse que la fracción que se metiló contenía aproximadamente 3,5% de 6-sulfato que correspondía íntegramente a unidades de galactopiranosa 6-sulfato (ver Tabla 11, pág. 114); por lo tanto dichas unidades deberían haber dado origen por metilación y posterior hidrólisis a la 2,3-di-O-metilgalactosa que no fue detectada. Podemos presuponer que la ciclación a 3,6-anhidrogalactosa que sufren en medio alcalino las unidades de galactopiranosa 6-sulfato unidas por la posición 4, es más rápida que la metilación del hidroxilo del C-3 y, por lo tanto, éste quedaría bloqueado. Esta reacción lateral durante la metilación ya fue observada anteriormente (Dolan y Rees, 1965; Penman y Rees, 1973 a).

Finalmente, es de notar que de las tres fracciones (2,3 y 4; ver Tabla 7, pág.109) que integraban el carragenano a metilar, había dos (fracciones 2 y 3) que mostraron consumos de periodato muy elevados (ver Tabla 11, pág.114); en particular, en el caso de la fracción 3 dicho consumo no pudo explicarse si se consideraba que las uniones (1⟶3)- y (1⟶4)- eran las únicas presentes en los carragenanos (ver Capítulo VII, pág.120). La presencia de unidades oxidables con periodato y a su vez capaces de formar epóxidos en medio alcalino, justificaría su no detección en el carragenano metilado así como el bajo porcentaje obtenido para el mismo. La desaparición (vía epóxido) durante la metilación en medio alcalino de las unidades de galactosa 2-sulfato unidas por la posición 4, fue previamente observada por Penman y Rees (1973 a).

TRATAMIENTO ALCALINO DEL CARRAGENANO

Rees (1963) encontró que si el λ-carragenano de Chondrus crispus se trataba con álcali se eliminaba aproximadamente una tercera parte del sulfato (6-sulfato) con la formación concomitante de unidades 3,6-anhidrogalactosídicas (ver capítulo II, pág.24). Stanley (1963) observó que si bien el κ-carragenano no aumentaba su capacidad de formar geles mediante dicho tratamiento, sí lo hacía el λ-carragenano.

Smidsrød y col. (1967) analizaron en forma combinada propiedades físicas y químicas y, buscando las condiciones óptimas para aplicar el método a diferentes carragenanos (concentración de álcali, temperatura y tiempo de calentamiento), determinaron que durante el mismo se producía una disminución constante de la viscosidad intrínseca, que la fuerza del gel alcanzaba un máximo y luego disminuía y que el contenido de 3,6-anhidrogalactosa aumentaba rápidamente hasta un valor límite. En la Tabla 16 se comparan las propiedades y análisis de dichas muestras antes y después del tratamiento alcalino (carragenano al 1% en hidróxido de potasio N, 1 hora a 100°). Se observa un efecto pronunciado sobre la fracción intermedia (Int.) cuyo porcentaje se produjo notablemente después del tratamiento, salvo en los casos de los carragenanos de Gigartina acicularis y Gigartina pistillata. El carragenano de Gigartina acicularis poseía un alto contenido de fracción soluble a una concentración 1,5 M de cloruro de potasio ($S_{1,5}$); cabe destacar que aquellos carragenanos que poseen estructuras de λ-carragenano no forman geles aún después del tratamiento alcalino (ver Capítulo III, pág. 50).

Tabla 16. Composición y propiedades de los carragenanos sin y con tratamiento alcalino.

ALGA	Fuerza del Gel (en leche)	[η]	3,6 a.h.g.	Sulfato (SO_3Na)	3,6 a.h.g.		Fracción		
					$I_{0,125}$[1]	$S_{1,5}$[2]	$I_{0,125}$	Int.[3]	$S_{1,5}$
		100 ml/g	%	%	%	%	%	%	%
C. crispus									
Sin trat.alc.	185	8,3	19,3	29,0	31,5	4,4	62	18	20
Con trat.alc.	830	4,9	28,5	29,0	36,5	18,5	85	0	15
G. stellata									
Sin trat.alc.	60	11,3	24,0	33,0	26,2	7,1	39	46	15
Con trat.alc.	180	5,5	30,2	32,7	33,2	6,7	73	19	8
G. stiriata									
Sin trat.alc.	110	12,8	23,0	37,3	30,8	2,5	46	34	20
Con trat.alc.	850	6,6	33,2	35,3	37,4	19,0	82	1	17
G. acicularis									
Sin trat.alc.	0	11,7	5,9	40,2	18,6	3,2	11	8	81
Con trat.alc.	20	7,0	14,6	36,3	25,2	13,0	16	5	79
G. pistillata									
Sin trat.alc.	25	14,2	9,5	40,4	14,1	2,5	17	61	22
Con trat.alc.	85	4,0	15,6	39,8	24,6	5,1	35	52	13
G. tenella									
Sin trat.alc.	135	6,0	24,2	28,4	32,0	9,8	68	14	18
Con trat.alc.	475	4,2	30,8	27,6	34,0	16,2	83	3	14

1 Insoluble a una concentración 0,125 M de cloruro de potasio.
2 Soluble a una concentración 1,5 M de cloruro de potasio.
3 "Fracción intermedia".

TRATAMIENTO ALCALINO DEL CARRAGENANO DE IRIDAEA UNDULOSA BORY

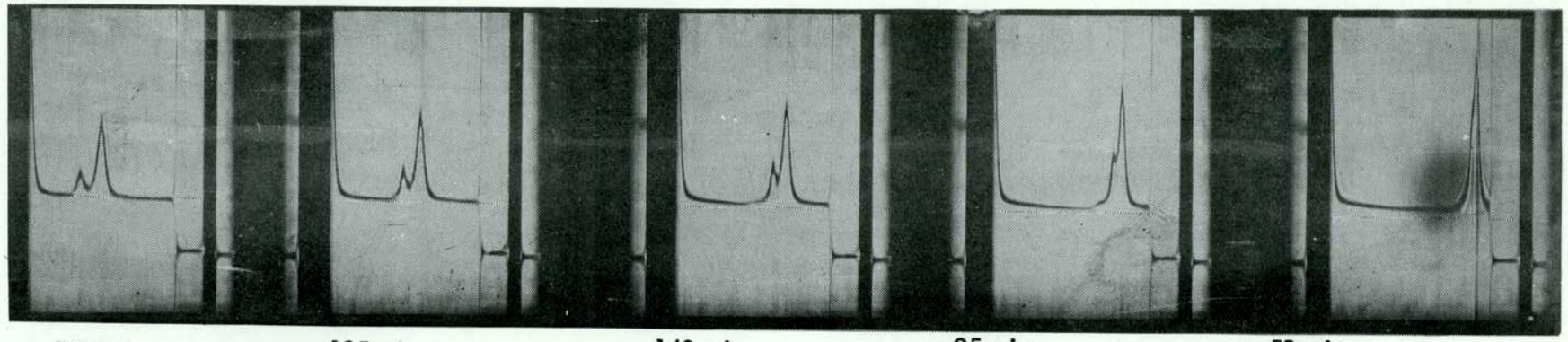
Como el valor comercial de un carragenano está asociado a su capacidad de formar geles a bajas concentraciones de cloruro de potasio, el tratamiento alcalino resulta de gran utilidad para aumentar dicha capacidad en muestras ricas en fracciones intermedias.

El carragenano de Iridaea undulosa Bory se sometió al tratamiento alcalino según el método de Anderson y col. (1968 a) hasta un contenido constante de 3,6-anhidrogalactosa (ver condiciones en parte experimental). El polisacárido modificado se aisló, previa diálisis y liofilización, con un rendimiento del 86%.

El producto no resultó homogéneo por ultracentrifugación ya que se observaron dos picos ($S^1_{20,w}$ 1,53 x 10^{-13}, $S^2_{20,w}$ 2,02 x 10^{-13}; c 0,76) (ver Fig. 44). La composición y las propiedades generales del mismo figuran en la Tabla 17; contenía galactosa (22,2%), 3,6-anhidrogalactosa (22,8%) y sulfato (32,4%, expresado como SO_3Na) en una relación molar galactosa:3,6-anhidrogalactosa:sulfato de 1,00:1,15:2,30.

Tabla 17. Composición y propiedades del carragenano y del carragenano modificado.

Carragenano	Galactosa anhidro %	3,6 a.h.g. anhidro %	Sulfato (SO_3Na) %	Gal:3,6 a.h.g.:Sulfato relación molar	$[\alpha]_D$ o	$[\eta]$ 100 ml/g
Sin trat. alc.	39,7	6,4	35,1	1,00:0,18:1,39	+70,1	5,60
Con trat.alc.	22,2	22,8	32,4	1,00:1,15:2,30	+37,1	2,76



230 min 185 min 140 min 95 min 50 min

Fig. 44. Ultracentrifugación del carragenano modificado. Las placas se obtuvieron con una solución 0,76% en cloruro de sodio 0,1 M a 59.780 rpm y a 21°, y las fotos fueron tomadas a los 50, 95, 140, 185 y 230 minutos después de llegar a la velocidad indicada ($S^1_{20,w}$ 1,53 x 10^{-13}; $S^2_{20,w}$ 2,02 x 10^{-13}). Las placas obtenidas con una solución más diluída (0,38%) resultaron similares.

La Tabla 17 muestra que hay correspondencia molar entre las unidades de 3,6-anhidrogalactosa formadas y las unidades de galactosa que reaccionaron; sin embargo, la eliminación del sulfato resultó inferior a la esperada en función del incremento de 3,6-anhidrogalactosa. A este respecto cabe señalar que Rees (1963) encontró que por tratamiento alcalino del λ-carragenano de Chondrus crispus se liberaban 1,4 moles de sulfato por cada mol de 3,6-anhidrogalactosa formado (ver Capítulo II, pág. 24). En cambio Stanley (1963) no detectó pérdidas de sulfato y Smidsrød y col. (1967) determinaron contenidos de sulfato ligeramente inferiores a los de los carragenanos de partida (ver Tabla 16). Dado que en el caso de la Iridaea undulosa Bory se obtuvo el carragenano modificado con un 86% de rendimiento, la eliminación anómala del sulfato se atribuyó (Rees, comunicación personal) a la pérdida por diálisis de "fragmentos no representativos" (formados por degradación alcalina) del sistema total.

La Fig. 45 muestra el espectro infrarrojo en la región de 700-1000 cm^{-1}. Presenta una banda definida a 840 cm^{-1} que indica un predominio de unidades de galactopiranosa 4-sulfato. Hay también una absorción a 805 cm^{-1}, característica de unidades de 3,6-anhidrogalactopiranosa 2-sulfato. El pico a 930 cm^{-1} se debe al anillo de 3,6-anhidro. Si se comparan los espectros infrarrojos del carragenano (ver Fig. 24, pág.104) y del carragenano modificado se observa en el primer caso una banda ancha a 830 cm^{-1} que no aparece en el segundo. Esto confirma la naturaleza de "fracción intermedia" del carragenano; el tratamiento alcalino transforma las unidades de galactosa 6-sulfato y de galactosa 2,6-disulfato en unidades de 3,6-anhidrogalactosa y de 3,6-anhidrogalactosa 2-

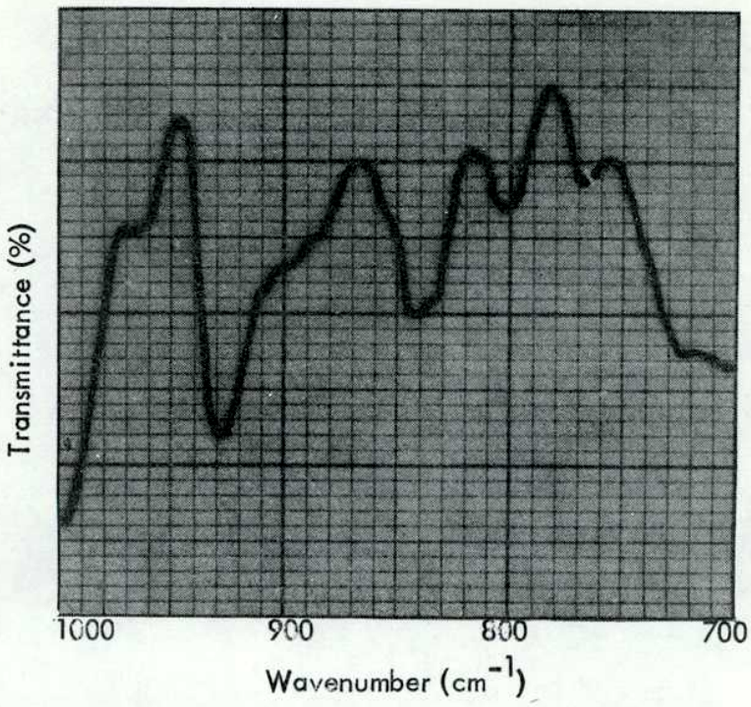


Fig. 45. Espectro infrarrojo del carragenano modificado en la región de 700-1000 cm^{-1}.

sulfato, respectivamente. La banda a 840 cm^{-1} se debe principalmente al 4-sulfato, presente originariamente en la molécula.

La viscosidad intrínseca del carragenano modificado (2,76 100 ml/g) resultó inferior a la del carragenano original (5,60 100 ml/g); esto concuerda con los resultados de Smidsrod y col. (1967) que observaron una disminución constante de la viscosidad intrínseca durante el tratamiento alcalino.

El carragenano modificado formó gel en solución de cloruro de potasio 1% pero no en leche.

Cabe destacar que el poder rotatorio del carragenano modificado ($[\alpha]_D$ + 37,1° (c 0,36, agua)) también resultó inferior al del carragenano de partida ($[\alpha]_D$ + 70,1° (c 0,38, agua)).

FRACCIONAMIENTO CON CLORURO DE POTASIO

La curva de precipitación analítica (método turbidimétrico) del carragenano modificado (ver Capítulo VII, pág.160) indicó: a) una precipitación abundante en el rango 0-0,15 M de cloruro de potasio, b) la presencia de pequeños porcentajes de fracciones intermedias, y c) la ausencia de material precipitable a concentraciones de cloruro de potasio mayores de 0,9 M.

La distribución molecular dada por la curva de precipitación coincidió con los resultados del fraccionamiento preparativo de una solución 0,4% del carragenano modificado (Tabla 18).

Tabla 18. Fraccionamiento del carragenano modificado (0,4%) con cloruro de potasio.

Fracción	Rango de precipitación ClK, M	Rendimiento [1] %
1	0-0,125	53,6
2	0,125-0,50	1,9
3	0,50-1,00	1,0
4	2,00[2]	31,4
Total		87,9

[1] Respecto de 3,0 g de carragenano modificado disueltos en 750 ml de agua.

[2] Soluble a una concentración 2,00 M de cloruro de potasio.

Mediante el tratamiento alcalino se transformó el carragenano de partida, constituído en su mayoría por fracciones intermedias (ver Capítulo VII, pág.107), en un producto formado por un κ-carragenano

(fracción 1, 53,6%) y una fracción soluble (fracción 4, 31,4%), y un muy pequeño porcentaje de fracciones intermedias (fracciones 2 y 3, 2,9%).

A pesar de que sería de esperar una disminución o por lo menos una constancia en la proporción de la fracción soluble en el carrageenano modificado, el porcentaje resultó mayor que en el polisacárido de partida. Ello puede atribuirse a un aumento de solubilidad producido por la degradación alcalina.

COMPOSICION Y PROPIEDADES DE LAS FRACCIONES AISLADAS

La Tabla 19 indica la composición y propiedades de las fracciones aisladas.

Tabla 19. Composición y propiedades de las fracciones provenientes del fraccionamiento 0,4% del carrageenano modificado.

Fracción	Galactosa anhidro %	3,6 a.h.g. anhidro %	Sulfato (SO_3K) %	Gal:3,6 a.h.g.:Sulfato relación molar	$[\alpha]_D$ °	$[\eta]$ 100 ml/g
1	27,7	25,5	32,3	1,00:1,03:1,58	+ 48,2	2,15
2	25,2	23,1	36,4	1,00:1,03:1,97	+ 52,8	-
3	22,5	16,4	44,4	1,00:0,82:2,68	+ 48,5	-
4	29,1	18,7	33,9	1,00:0,72:1,58	+ 21,9	2,14

Las cuatro fracciones obtenidas se pueden ordenar, de acuerdo a la escuela noruega (en forma análoga a las fracciones del fraccionamiento

0,24% del carragenano; ver Capítulo VII, pág.113), en tres grupos:

I - Fracción insoluble a una concentración 0,125 M de cloruro de potasio.

II - Fracciones que precipitaron a concentraciones de cloruro de potasio superiores a 0,125 M.

III- Fracción soluble a una concentración 2,00 M de cloruro de potasio.

I- Fracción insoluble a una concentración 0,125 M de cloruro de potasio

La fracción 1, si bien precipitó en un rango estrecho de concentración de cloruro de potasio, no resultó homogénea por ultracentrifugación ya que se observaron dos picos con coeficientes de sedimentación $S^1_{20,w}$ $1,44 \times 10^{-13}$ y $S^2_{20,w}$ $2,00 \times 10^{-13}$ (c 0,96) (Fig. 46).

La relación molar galactosa:3,6-anhidrogalactosa:sulfato (1,00: 1,03:1,58) indicó que esta fracción contenía cantidades equimoleculares de galactosa y 3,6-anhidrogalactosa, como era de esperar de acuerdo con la estructura propuesta para los carragenanos por la escuela inglesa. Asimismo, por lo menos el 22% de las unidades de hexosa no deberían estar sulfatadas.

En la Fig. 47 se encuentra el espectro infrarrojo en la región de 700-1000 cm^{-1}. Dicho espectro mostró, además de la banda a 930 cm^{-1} debida al anillo de 3,6-anhidro, una banda a 845 cm^{-1} y otra a 805 cm^{-1} características de las unidades de galactopiranosa 4-sulfato y 3,6-anhidrogalactopiranosa 2-sulfato, respectivamente.

La fracción 1 formó geles en cloruro de potasio 1% y en leche.

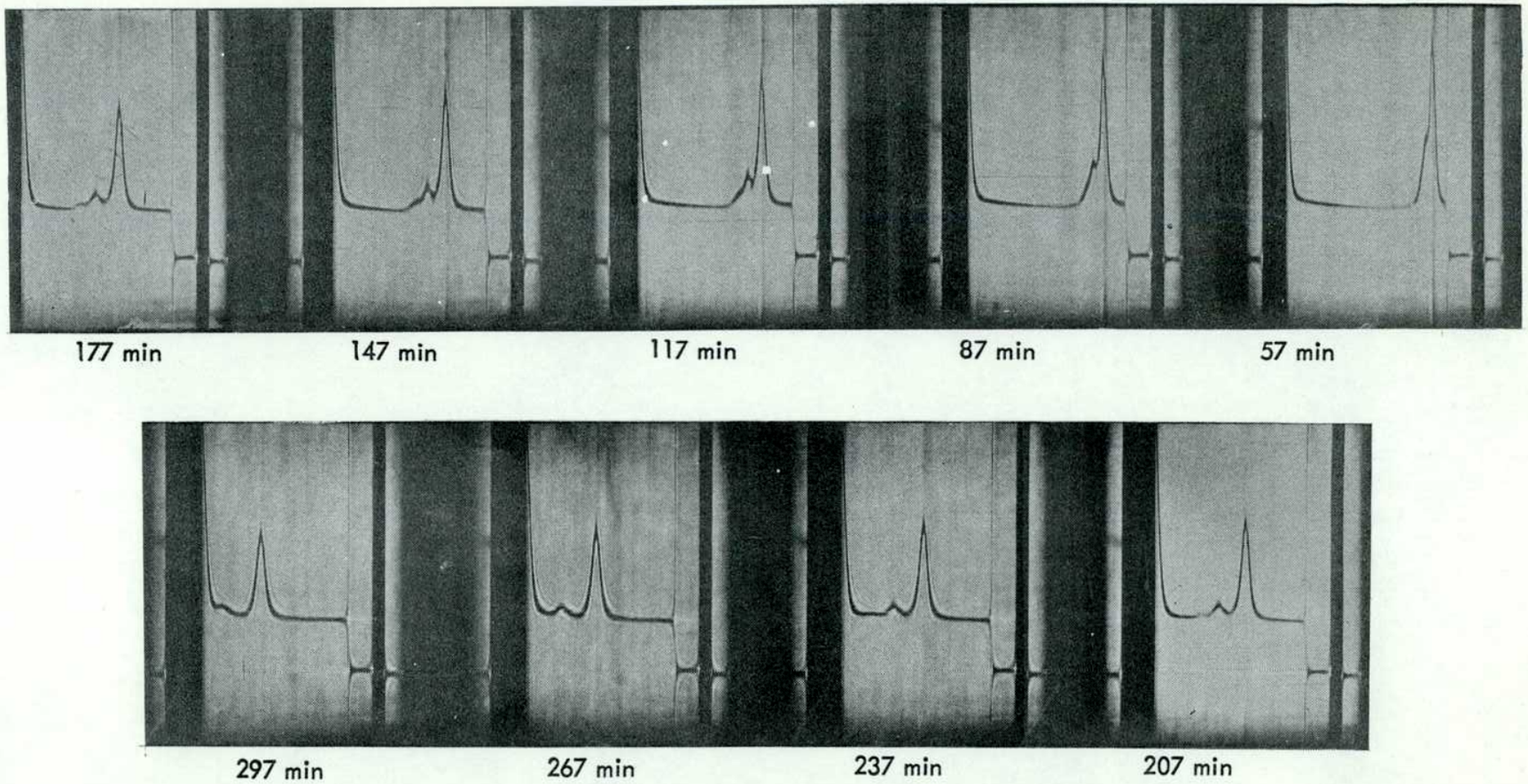


Fig. 46. Ultracentrifugación de la fracción 1. Las placas se obtuvieron con una solución 0,96% en cloruro de sodio 0,1 M a 59.780 rpm y a 22,5°, y las fotos fueron tomadas a los 57, 87, 117, 147, 177, 207, 237, 267 y 297 minutos después de llegar a la velocidad indicada ($S^1_{20,w}$ $1,44 \times 10^{-13}$; $S^2_{20,w}$ $2,00 \times 10^{-13}$). Las placas obtenidas con una solución más diluída (0,48%) resultaron similares.

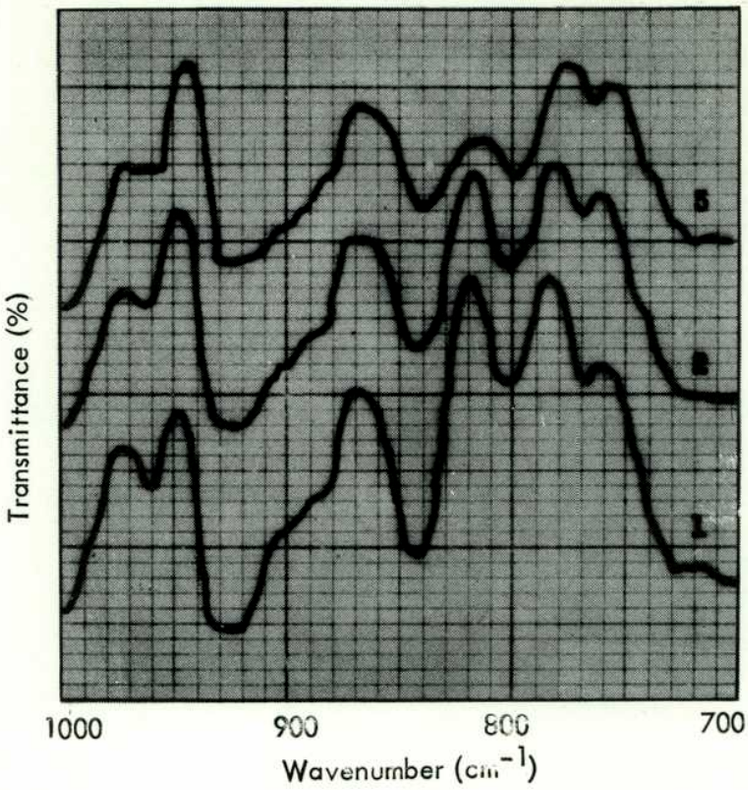


Fig. 47. Espectros infrarrojos en las fracciones 1, 2 y 3 en la región de 700-1000 cm^{-1}.

II- Fracciones que precipitaron a concentraciones de cloruro de potasio superiores a 0,125 M

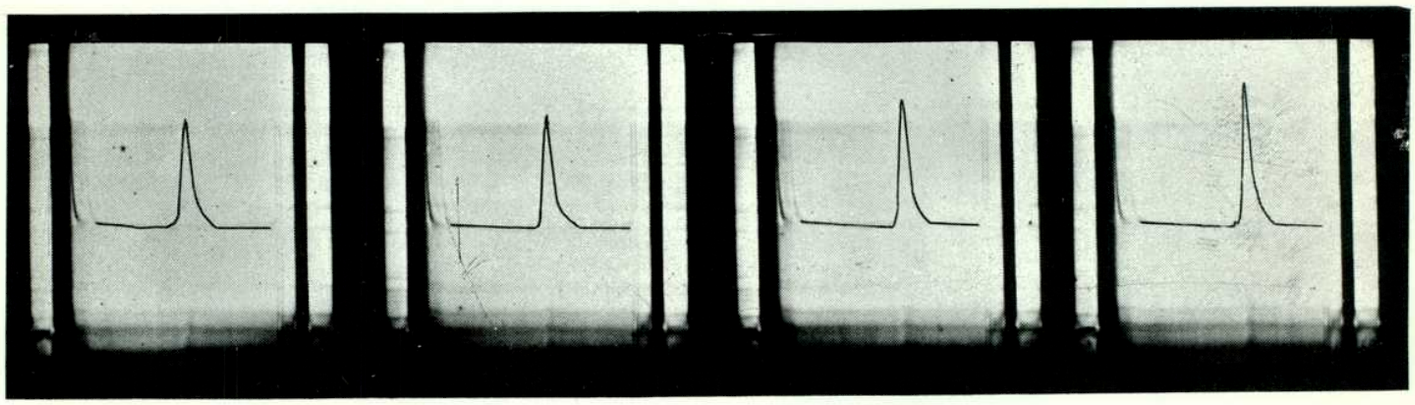
El grado de sulfatación de la fracción 2 resultó más elevado que el de la fracción 1 (comparar las relaciones molares correspondientes), y posiblemente a ello se debió la solubilidad a mayores concentraciones de cloruro de potasio. A su vez el espectro infrarrojo mostró las mismas bandas de absorción, en la región de 700-1000 cm^{-1} que el espectro de la fracción 1 (Fig. 47).

Llama la atención en el caso de la fracción 3 el alto grado de sulfatación de las unidades de galactosa (ver la relación molar correspon-

diente). En efecto si consideramos que las unidades de 3,6-anhidrogalactosa están sulfatadas, el grado de sulfatación de las unidades de galactosa resulta de 1,7 grupos por unidad. El espectro infrarrojo, semejante a los de las fracciones anteriores, mostró una ligera deformación del pico a 845 cm^{-1} sugiriendo la presencia de unidades de galactopiranosa sulfatadas en el C-2.

III- Fracción soluble a una concentración 2,00 M de cloruro de potasio

La fracción 4 dio por ultracentrifugación un único pico, ligeramente deformado, con un coeficiente de sedimentación ($S_{20,w}$) de 2,43 x 10^{-13} (c 0,58)(Fig.48).



181 min 170 min 161 min 152 min

Fig. 48. Ultracentrifugación de la fracción 4. Las placas se obtuvieron con una solución 0,58% en cloruro de sodio 0,1 M a 59.780 rpm y a 20°, y las fotos fueron tomadas a los 152, 161, 170 y 181 minutos después de llegar a la velocidad indicada ($S_{20,w}$ 2,43 x 10^{-13}).

El espectro infrarrojo (Fig. 49) mostró una banda ancha a 830 cm^{-1} que indicaba el predominio de unidades de galactopiranosa 2-sulfato y otra a 805 cm^{-1} característica de las unidades de 3,6-anhidrogalactopiranosa 2-sulfato.

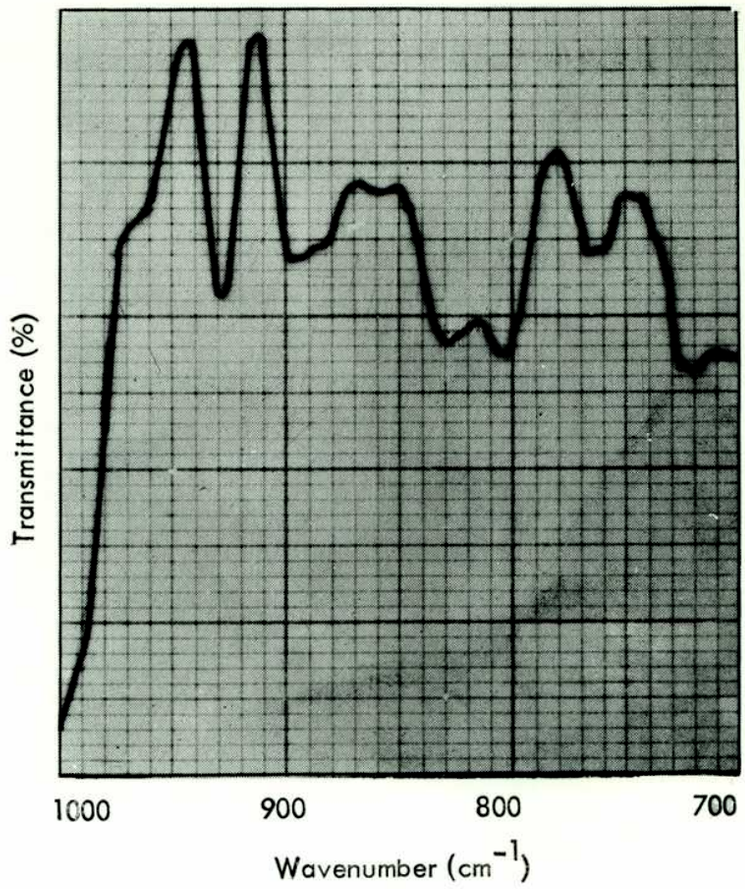


Fig. 49. Espectro infrarrojo de la fracción 4 en la región de 700-1000 cm^{-1}.

El hecho de que esta fracción haya sido soluble a una concentración 2,00 M de cloruro de potasio, a pesar de su contenido relativamente alto de 3,6-anhidrogalactosa (18,7%) puede atribuirse a la presencia de unidades de galactopiranosa 2-sulfato unidas por la posición 3 (ver Capítulo III, pág. 50).

Esta fracción, como era de esperar, no formó geles en cloruro de potasio 1% ni en leche, y su viscosidad intrínseca (2,14 100 ml/g) resultó idéntica a la de la fracción 1 (2,15 100 ml/g).

A su vez el poder rotatorio ($[\alpha]_D$+ 21,9° (c 0,39, agua)) resultó inferior a los de las fracciones anteriores($[\alpha]_D$+ 48,2° (c 0,38, agua),

$[\alpha]_D$ + 52,8° (c 0,36, agua) y $[\alpha]_D$ + 48,5° (c 0,29, agua) para las fracciones 1, 2 y 3, respectivamente), en forma análoga a lo encontrado para la fracción soluble del fraccionamiento 0,24% del carragenano (ver Tabla 11, pág. 114).

METODO TURBIDIMETRICO PARA LA DETERMINACION DE LAS CURVAS DE PRECIPITACION DE LOS CARRAGENANOS

La importancia económica de los carragenanos está relacionada principalmente con su capacidad de formar geles, y dado que dicha propiedad está asociada a una baja solubilidad en soluciones de cloruro de potasio, las curvas de precipitación resultan muy útiles para determinar el valor comercial de las muestras.

Pernas y col. (1967) determinaron las curvas de precipitación de los carragenanos de Chondrus crispus, Gigartina stellata y Gigartina skottsbergii (Fig. 50). El método usado se basaba en la siguiente secuencia de operaciones: centrifugación del precipitado formado a una dada concentración de cloruro de potasio, disolución del mismo en agua y dosaje del contenido de polisacárido por la reacción del fenol-ácido sulfúrico. Encontraron así que la posibilidad de construir una curva de

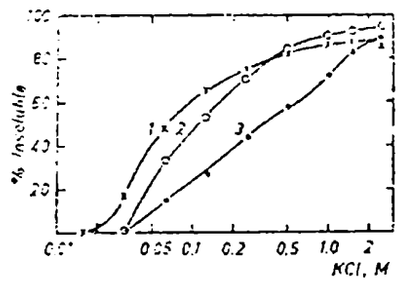


Fig. 50. Curvas de precipitación de los carragenanos de Chondrus crispus (1), Gigartina stellata (2) y Gigartina skottsbergii (3).

precipitación, que fuera representativa de la distribución molecular, estaba dada por los siguientes hechos experimentales:

a-El fraccionamiento era bastante neto ya que la contaminación con otras fracciones de precipitación cercana era sólo de un 10%. Este

resultado se obtuvo del análisis de las curvas de precipitación de las fracciones aisladas del carragenano de Chondrus crispus (fraccionamiento preparativo) que precipitaron en el rango 0-0,0625 M (fracción 1) y 0,0625-0,25 M (fracción 2) y de la fracción soluble a una concentración 0,25 M de cloruro de potasio (fracción 3)(Fig. 51).

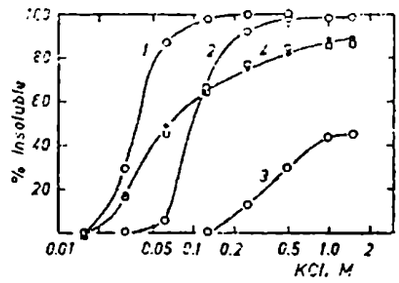


Fig. 51. Curvas de precipitación de las fracciones 1 (1), 2 (2) y 3 (3) y del carragenano de partida (4) ((•) experimental, (□) calculada).

b- La solubilidad de las moléculas de carragenano en la mezcla era esencialmente la misma que en las fracciones más homogéneas. A partir de las curvas de precipitación de las fracciones 1, 2 y 3 y de los porcentajes de las mismas en el carragenano (fraccionamiento preparativo) se elaboró una curva teórica que concordaba con la obtenida para el carragenano original (Fig. 51).

c- El fraccionamiento en función del peso molecular se producía sólo en pequeña proporción. La solubilidad de una molécula de polímero depende no sólo de su estructura sino que también de su peso molecular. Como los polisacáridos son polidispersos con respecto al peso molecular, cualquier tipo de fraccionamiento químico puede estar acompañado a su vez por un fraccionamiento por peso molecular. Sin embargo,

Pernas y col.(1967) determinaron viscosidades intrínsecas similares para las fracciones 1, 2 y 3 (fracción 1, 9,4 100 ml/g; fracción 2, 8,6 100 ml/g; fracción 3, 9,2 100 ml/g), lo cual indicaba que era posible comparar curvas de distintas muestras sin hacer correcciones por diferencias en el peso molecular.

El método de Pernas y col.(1967) para la determinación de curvas de precipitación es muy elaborado y requiere precisión analítica así como condiciones normalizadas. La interpretación cuantitativa se hace difícil porque el factor de calibración de la reacción colorimétrica varía con la composición de la fracción precipitada, siendo mayor (hasta un 40%) para una fracción λ que para una fracción K.

En consecuencia consideramos conveniente desarrollar un método que fuera igualmente útil, pero que proporcionara los resultados en un tiempo mucho menor. Dicho método se basa en la precipitación de fracciones, en condiciones normalizadas (ver parte experimental), a distintas concentraciones de cloruro de potasio, y en la medición de la turbidez producida. Las curvas de precipitación se analizaron en función de la longitud de onda utilizada, de la concentración de carragenano y del tiempo de envejecimiento del precipitado, encontrándose así las condiciones óptimas de trabajo (Matulewicz y Cerezo, 1975).

Se determinó la turbidez entre 400-600 nm para una solución 0,24% de carragenano de Iridaea undulosa Bory en agua y para las correspondientes soluciones de concentración creciente de cloruro de potasio (límite superior 1,3 M). Las curvas obtenidas eran similares y, por lo tanto, se eligieron arbitrariamente dos longitudes de onda (450 nm y 550 nm) para las determinaciones preliminares. La Fig. 52 muestra las

curvas de precipitación a 450 nm y 550 nm; aunque ambas curvas eran idénticas, como la sensibilidad resultó mayor para la de 450 nm, se eligió esta longitud de onda para las determinaciones posteriores.

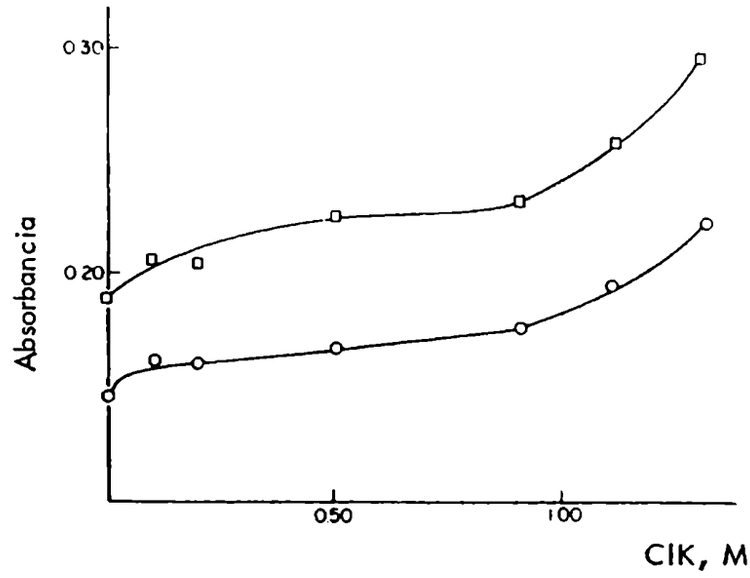


Fig. 52. Curvas de precipitación del carragenano de Iridaea undulosa Bory (concentración original, 0,24%) a 450 nm (□) y 550 nm (o).

En la Fig. 53 se encuentran las curvas de precipitación obtenidas a diferentes concentraciones (0,09-0,24%) del carragenano de Iridaea undulosa Bory. La forma similar de las mismas indicaba que la solubilidad de las moléculas de carragenano en soluciones de cloruro de potasio, era independiente de la concentración de polisacárido en el rango de concentraciones analizado. Por lo tanto, se emplearon soluciones 0,24-0,30% de carragenano en agua en el procedimiento general.

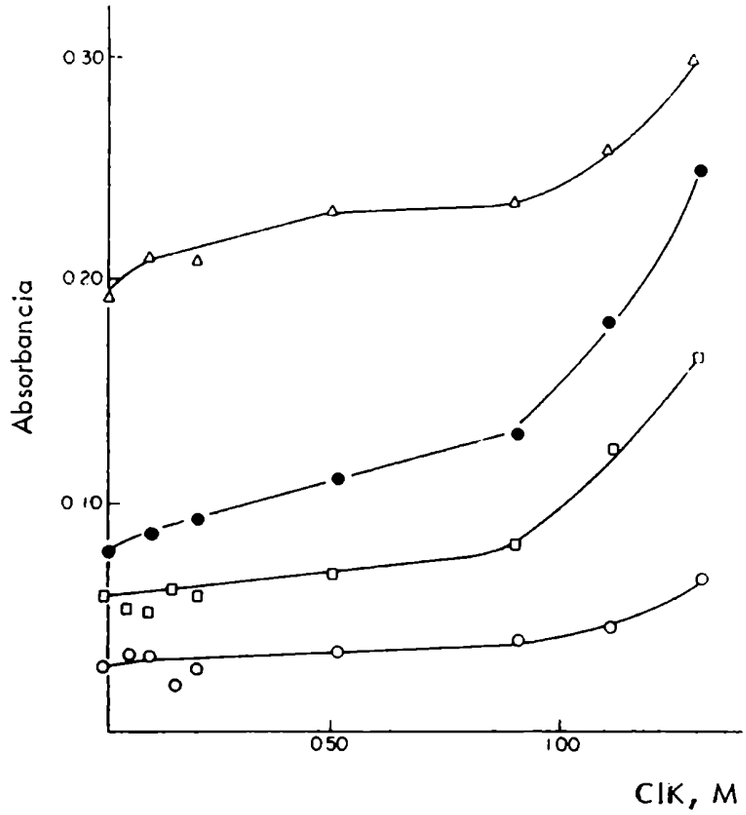


Fig. 53. Curvas de precipitación del carragenano de Iridaea undulosa Bory determinadas a 450 nm. Concentración original 0,09% (o), 0,14% (□), 0,18% (●) y 0,24% (△).

Se estudió la influencia del tiempo de envejecimiento de los precipitados, para lo cual se efectuaron las mediciones a diferentes tiempos después de haber llevado a cabo la precipitación (Fig. 54). Si el sistema se homogeneizaba durante 10 segundos antes de hacer la medición, la turbidez se mantenía constante aún después de 26 horas de haber realizado la precipitación.

La mayor concentración de cloruro de potasio usada fue 2,0 M. En todas las muestras estudiadas, las determinaciones efectuadas en el rango 1,6-2,0 M de cloruro de potasio no resultaron reproducibles, debido a la tendencia a aglomerarse del precipitado. Los resultados obte-

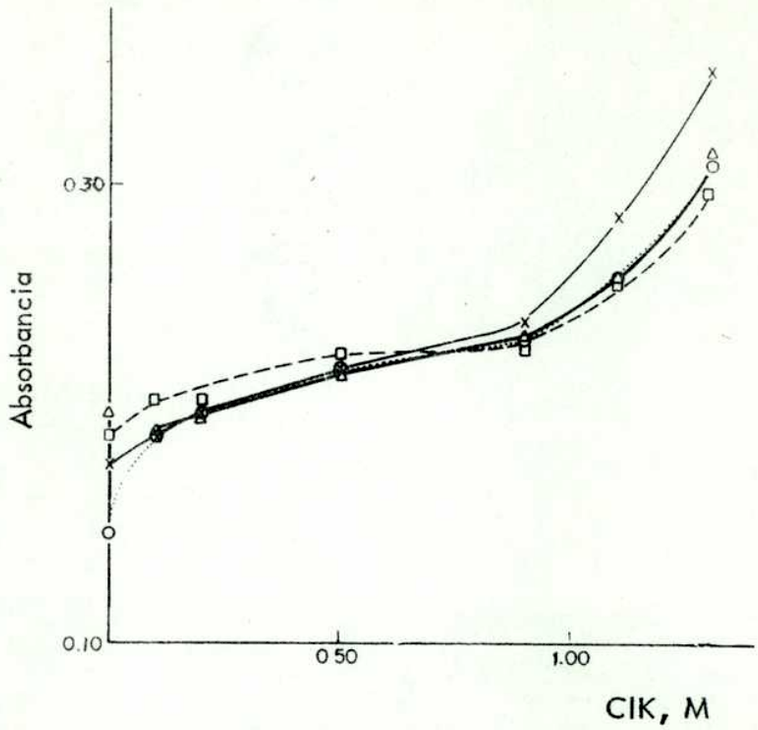


Fig. 54. Curvas de precipitación del carragenano de Iridaea undulosa Bory determinadas a diferentes tiempos después de haber llevado a cabo la precipitación. Concentración original 0,24%, 30 minutos (□), 2 horas (△), 5 horas (o) y 26 horas (x).

nidos en el rango 1,3-1,6 M variaron en función de la muestra analizada: para el κ-carragenano de Chondrus crispus y para el carragenano de Iridaea undulosa Bory modificado por tratamiento alcalino los resultados fueron reproducibles hasta una concentración 1,6 M; pero para el carragenano de Iridaea undulosa Bory y para los carragenanos de Gigartina skottsbergii (dos variedades estacionales) el límite superior fue 1,3 M.

Dado que las soluciones remanentes después de haber efectuado la precipitación, eran diferentes para cada concentración de cloruro de potasio, se estudió la influencia de las mismas sobre la curva de precipitación. Para ello se centrifugó el precipitado formado y se determinó la absorbancia de la solución que se restó al valor de absorbancia ini-

cial en cada caso. En la Fig. 55 se observa que la curva resultante tiene la misma forma que la correspondiente a la determinación directa por lo que este último procedimiento puede usarse sin inconvenientes.

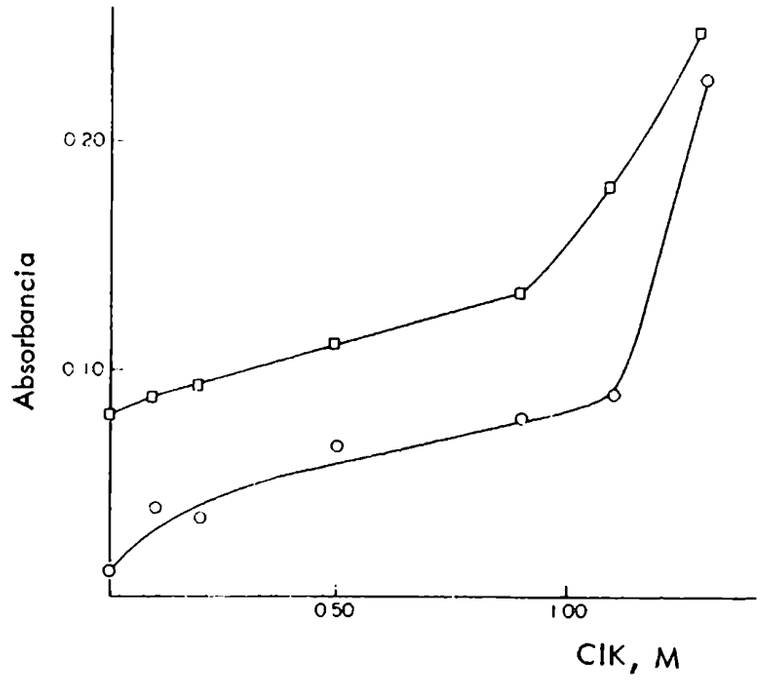


Fig. 55. Curvas de precipitación del carragenano de Iridaea undulosa Bory (concentración original, 0,18%), determinación directa (□) y usando como blanco cada una de las soluciones después de eliminar el material precipitado (o).

Para investigar la posibilidad de utilizar las curvas de precipitación con fines cuantitativos, se examinaron dichas curvas para fracciones de carragenano solubles a distintas concentraciones de cloruro de potasio, y se encontró que a igual concentración de carragenano la turbidez producida era diferente. En consecuencia este método sólo puede ser usado para caracterizar en forma cualitativa la distribución molecular de las muestras.

En la Fig. 56 se encuentran las curvas de precipitación de los carragenanos de Gigartina skottsbergii y en la Fig. 57 las del carragena-

no de Iridaea undulosa Bory y su modificación alcalina, y la del κ-carragenano de Chondrus crispus.

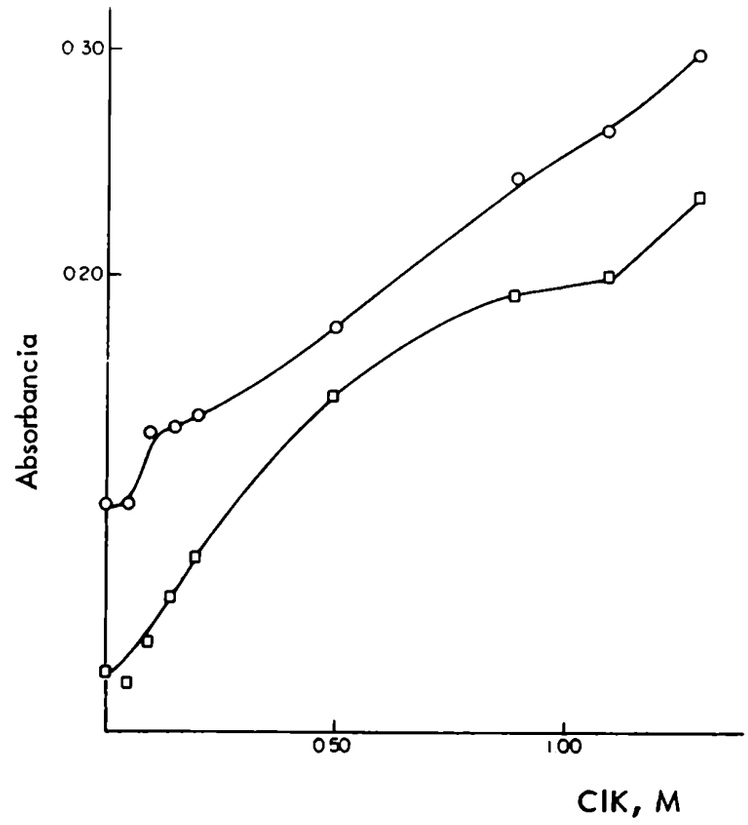


Fig. 56. Curvas de precipitación de los carragenanos de Gigartina skottsbergii (concentración original, 0,3%); muestras recogidas en mayo (o) y octubre (□).

La curva de precipitación de la fracción κ de Chondrus crispus mostró como era de esperar, una precipitación abundante en el rango 0-0,15 M de cloruro de potasio. Cuando esta curva de distribución integral se derivó gráficamente (d absorbancia/dc_{ClK}), se obtuvo una curva de distribución diferencial que indicó, nuevamente, la presencia de una fracción definida (Fig. 58).

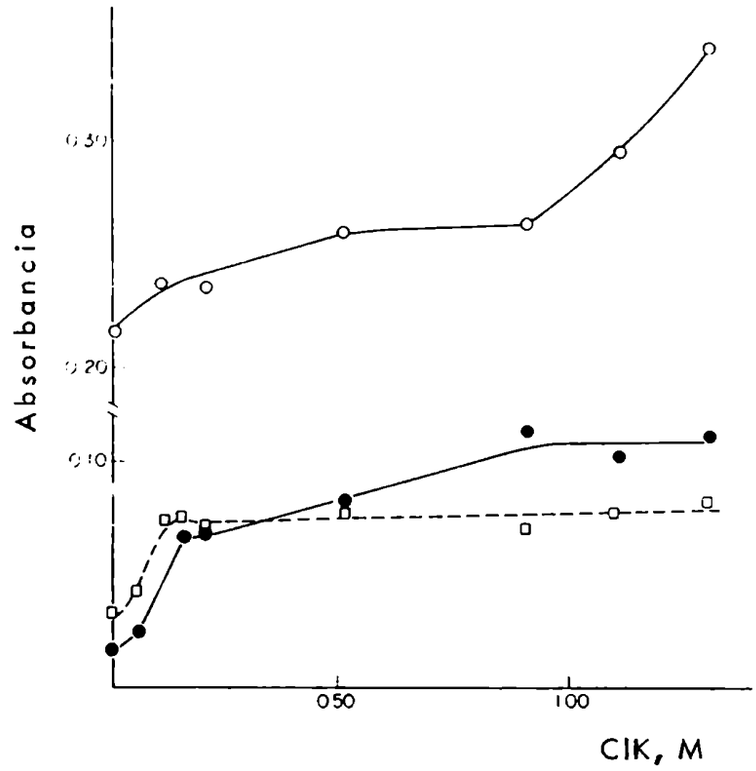


Fig. 57. Curvas de precipitación del K-carragenano de Chondrus crispus (□), del carragenano de Iridaea undulosa Bory (o) y del carragenano de Iridaea undulosa Bory modificado por tratamiento alcalino (●); concentración original 0,3%.

Las curvas de precipitación de los carragenanos de Gigartina skottsbergii dieron en ambos casos una distribución molecular compleja, rica en fracciones intermedias. A su vez la distribución molecular dada por estas curvas coincidía con los resultados obtenidos por Cerezo(1967 a; 1967 b) en los fraccionamientos preparativos de dichos carragenanos.

La curva de precipitación del carragenano de Iridaea undulosa Bory mostró, también, la presencia de fracciones intermedias, pero solubles a mayores concentraciones de cloruro de potasio que las de los carragenanos de Gigartina skottsbergii. Esta distribución molecular asimismo coincidía con los resultados del fraccionamiento preparativo (ver Capítulo VII, pág. 107).

Smidsrød y col. (1967) encontraron que las fracciones intermedias podían ser modificadas por tratamiento con álcali para dar, con buenos rendimientos, productos con características similares a las del κ-carragenano (ver Capítulo II, pág. 23). La curva de distribución diferencial del carragenano de Iridaea undulosa Bory modificado por tratamiento alcalino (Fig. 58) indicó: a) una precipitación abundante en

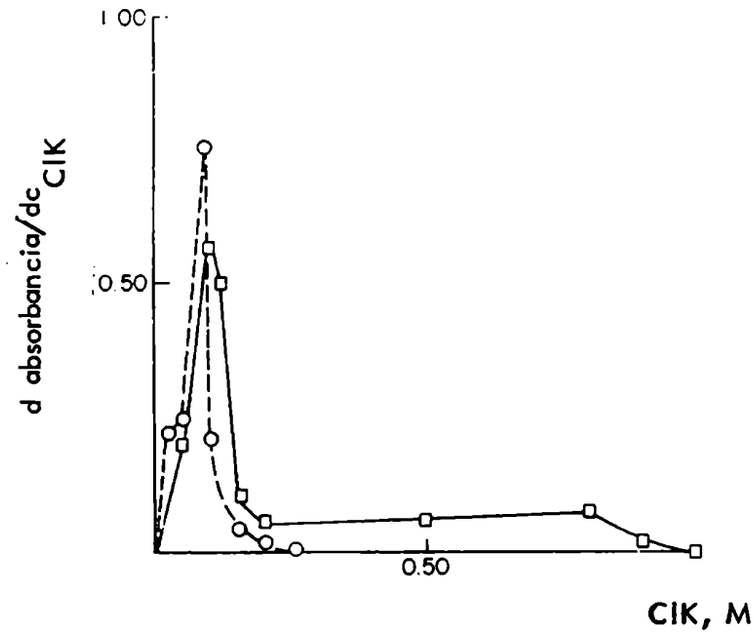


Fig. 58. Curvas de distribución diferencial del κ-carragenano de Chondrus crispus (o) y del carragenano de Iridaea undulosa Bory modificado por tratamiento alcalino (□).

el rango 0-0,15 M de cloruro de potasio; b) la presencia de pequeños porcentajes de fracciones intermedias; y c) la ausencia de material precipitable a concentraciones de cloruro de potasio mayores de 0,9 M. Esta distribución molecular coincidía con los resultados del fraccionamiento preparativo correspondiente (ver Capítulo VII, pág.152).

El control industrial de los carragenanos se hace usualmente midiendo el poder gelificante en condiciones normalizadas. Si bien esta

prueba es sencilla y da una idea de las posibles aplicaciones del producto, no suministra información respecto de la composición. Además dado que se trabaja sobre bases empíricas, no se pueden proveer los resultados de las modificaciones químicas que puedan realizarse sobre el mismo. El método turbidimétrico, sin embargo, puede ser usado no sólo para caracterizar las muestras sino para conocer su distribución molecular, y puede resultar de fundamental importancia para la explotación racional de las algas.

Finalmente, el hecho de haber encontrado dos sistemas de carrageninos diferentes en dos variedades estacionales de Gigartina skottsbergii muestra como cualquier intento de industrialización debe estar necesariamente precedido por un estudio de las variaciones estacionales, de manera de hacer la recolección del alga en el momento adecuado para obtener los productos con las propiedades óptimas para el uso requerido.

CONCLUSION

Los estudios realizados en este trabajo de Tesis han permitido caracterizar en detalle el sistema de carragenanos de una muestra del alga roja Iridaea undulosa Bory, recogida en invierno en las costas patagónicas. Dicho sistema difiere de la mayor parte de los carragenanos conocidos debido a que carece de fracciones gelificables a bajas concentraciones de cloruro de potasio. Este hecho orientó la investigación por dos vías paralelas. Por un lado, dado que la ausencia de fracciones del tipo κ resta valor comercial a un carragenano, resultaba importante establecer un método para la transformación del carragenano extraído en un producto utilizable. Por tratamiento alcalino en condiciones controladas y por posterior fraccionamiento con cloruro de potasio, se obtuvo el κ-carragenano con un 53% de rendimiento; dicho rendimiento es semejante al obtenido a partir de los carragenanos de Chondrus crispus, que es el alga utilizada mundialmente para la producción de κ-carragenano.

La otra vía de estudio fue la determinación de los factores que gobiernan la polidispersión en este tipo de polisacáridos. Las dos escuelas que más han estudiado el tema, noruega e inglesa, han caracterizado a los carragenanos según fracciones definidas en base a conceptos diferentes. Así la escuela noruega definió las fracciones κ, intermedia y soluble, mientras que la escuela inglesa ha preferido señalar estructuras básicas variantes que cubren todo el espectro de posibilidades.

En este trabajo, en función de su utilidad y claridad, se adoptó las primeras reglas de caracterización (escuela noruega), habiendo subdividido a su vez la "fracción intermedia" en seis fracciones que fueron estudiadas por separado.

Dado que debido a la amplitud de la polidispersión toda definición

estructural completa tendría un sentido estadístico sin significado real, se trató de establecer las propiedades y el tipo de unidades que pudieran existir en cada una de las fracciones (ocho en total). Así se determinaron la composición (galactosa, 3,6-anhidrogalactosa y sulfato) y la distribución de los sulfatos en las unidades del polisacárido (espectro infrarrojo, dosaje de 6-sulfato antes y después de la oxidación con periodato). Asimismo se midieron la viscosidad y el poder rotatorio (ver Tabla 11, pág.114).

El análisis de los resultados permitió diferenciar en la "fracción intermedia" dos grupos (de tres fracciones cada uno) que, respondiendo a la definición común, presentaban características diferentes:

a- Fracciones insolubles a concentraciones de cloruro de potasio menores de 1,05 M.

b- Fracciones insolubles a concentraciones de cloruro de potasio mayores de 1,05 M.

Es de notar que es la primera vez que se efectúa un estudio de esta naturaleza sobre una "fracción intermedia"; el mismo acentúa aún más la necesidad de investigar los factores determinantes de la solubilidad en soluciones de cloruro de potasio.

Durante el transcurso del trabajo, los distintos resultados indicaron además la posibilidad de factores estructurales no contemplados anteriormente. Así las oxidaciones con periodato conjuntamente con los análisis de sulfato proporcionaron datos difícilmente compatibles con el sistema de uniones (1→3)- y (1→4)- postulado usualmente, sugiriendo la existencia de uniones (1→6)-.

Por otra parte, el bajo rendimiento obtenido en la metilación de la fracción que precipita en el rango 0,70-1,05 M de cloruro de potasio

fraccionamiento 0,24%) podría atribuirse a una degradación vía epóxido (por eliminación del sulfato) en medio alcalino. Dicha degradación no permitiría detectar unidades de galactopiranosa 2-sulfato que son extremos terminales no reductores y/o están unidas por las posiciones 4 y/ó 6.

De esta manera, los estudios realizados han contribuído a abrir nuevos caminos de investigación que ayudarán a conocer más en detalle la compleja y poco estudiada estructura fina de los carragenanos.

CAPITULO VIII

PARTE EXPERIMENTAL

CONSIDERACIONES GENERALES

El secado en desecador se hizo a presión reducida sobre cloruro de calcio, y en los casos indicados, sobre hidróxido de sodio.

Los puntos de fusión se determinaron en un aparato Thomas Hoover, en capilar y no están corregidos.

Las evaporaciones se realizaron a presión reducida en un evaporador rotatorio y a temperaturas del baño menores de 45°.

Las extracciones y los fraccionamientos se realizaron a temperatura ambiente y con agitación mecánica constante. Los precipitados obtenidos se separaron por centrifugación, y se dializaron, concentraron y liofilizaron; o bien se lavaron por intercambio de solvente con etanol y luego éter, y se secaron a temperatura ambiente en desecador a presión reducida hasta peso constante.

Las diálisis se efectuaron a temperatura ambiente usando tubos de celulosa (Arthur H. Thomas Co., Filadelfia, EE.UU.) anudados en ambos extremos. Los rollos conteniendo los tubos se conservaron, dentro de sus respectivas bolsas de polietileno, a temperatura ambiente y en lugar fresco, a fin de evitar alteraciones con el tiempo. Las diálisis preparativas se llevaron a cabo en tubos 3 5/8 y 1 1/8 pulgadas de diámetro inflado, empleando agua corriente renovada a intervalos regulares de tiempo.

Los poderes rotatorios fueron medidos a temperatura ambiente (entre 20° y 25°) en un polarímetro O.C. Rudolph & Sons modelo 70, en un tubo de 2 dm y en un polarímetro Perkin-Elmer modelo 141, en un tubo de 1 dm. Las rotaciones ópticas indicadas son valores finales. Los residuos insolubles observados en algunos casos se despreciaron en los cálculos de concentración.

Las muestras para análisis y microanálisis fueron secadas sobre pen-

tóxido de fósforo en alto vacío en una difusora de mercurio Leybold y a una temperatura de 50°.

La determinación de nitrógeno se llevó a cabo por el método de Dumas-Pregl (Pregl y Roth, 1958). El contenido de azufre se determinó por el método de Wagner (1957) luego de eliminar el sodio o el potasio, y el de metoxilo por el método de Belcher y col.(1955).

Las cenizas se expresaron como el peso del residuo de calcinación efectuada en corriente de oxígeno en un horno a 800°.

Las soluciones utilizadas en las determinaciones cuantitativas se mezclaron mediante el uso de un Super-Mixer (Lab-Line Instruments Inc.).

Los espectros de absorción en el visible fueron registrados en un espectrofotómetro Beckman DK-2A. Las determinaciones colorimétricas se realizaron con un espectrofotómetro Beckman DU y la concentración se calculó mediante la siguiente expresión:

$$\% = \frac{A \cdot 100}{b \cdot c}$$

donde,

A: absorbancia de la solución conteniendo la muestra.

b: pendiente de la curva patrón (ml/mg).

c: concentración de la muestra (mg/ml).

En todos los casos se utilizaron celdas de cuarzo.

Los espectros de absorción en el infrarrojo fueron determinados en un espectrofotómetro Perkin-Elmer 421 o en un espectrofotómetro Perkin-Elmer 137 B Infracord, usando películas de polisacárido obtenidas por concentración de soluciones acuosas al 0,5% a sequedad sobre una superficie de mercurio, en desecador a presión reducida, a temperatura

ambiente.

Los espectros de masas fueron realizados en un espectrómetro de masas Varian Mat CH7. Se utilizó el sistema de introducción directa. Los espectros se efectuaron a diferentes temperaturas de introducción (25°, 100°, 200° y 250°) a un potencial de ionización de 70 eV. Se indican sólo los espectros de masas obtenidos en condiciones óptimas.

ULTRACENTRIFUGACION

Las placas de sedimentación se obtuvieron con una ultracentrífuga Spinco modelo E. Las velocidades de corrida y las temperaturas están indicadas en las Figuras correspondientes. Las determinaciones se llevaron a cabo con soluciones del 0,36% al 1,1% en cloruro de sodio 0,1M.

Se midió la variación de la distancia del máximo del pico al eje de rotación durante la ultracentrifugación y se graficó el log x en función del tiempo. Se obtuvo así una línea recta y de la pendiente de la misma, calculada por el método de los cuadrados mínimos, y utilizando factores de conversión de unidades, se calculó el coeficiente de sedimentación (S):

$$S = \frac{2,303 \; d \log x/dt}{(2\pi)^2 \; \frac{v^2}{60}}$$

donde,

x: distancia (cm).

t: tiempo (minutos).

v: velocidad (rpm).

No fue posible determinar el coeficiente de sedimentación para aquellas placas obtenidas utilizando una celda doble, debido a que las

placas carecen de la referencia necesaria para medir la distancia del máximo del pico al eje de rotación.

METODOS CROMATOGRAFICOS

CROMATOGRAFIA EN PAPEL Y EN COLUMNA

Las cromatografías sobre papel se realizaron por el método descendente empleando papel Whatman N° 1.

Para las cromatografías en columna se empleó celulosa Whatman CF 11 y el eluído se recogió en fracciones de 10 ml con un colector de fracciones Gilson (Gilson Medical Electronics, Middleton, Wisconsin).

Las fracciones eluídas se analizaron por cromatografía en papel utilizando como solvente el eluyente de la columna y revelando con el reactivo de biftalato de anilina.

Solventes

Las relaciones se expresan en volumen.

1) n-butanol, etanol, agua; 4:1:5. (capa superior).
2) acetato de etilo, piridina, agua; 10:4:3.
3) n-butanol medio saturado.

Reactivos para revelado

Biftalato de anilina

Se disolvieron 0,93 g de anilina (bidestilada al vacío sobre cinc) y 1,6 g de ácido ftálico en 100 ml de butanol saturado con agua. Los cromatogramas se rociaron con el reactivo y se secaron en estufa a 105° durante cinco minutos. Las aldohexosas adquieren color marrón y las aldopentosas un color rosado.

Reactivo para aminoácidos: ninhidrina

Se preparó según la técnica de Consden y Gordon (1948). Se disolvieron 0,3 g de ninhidrina en 100 ml de una mezcla de 95 partes de n-butanol y 5 partes de ácido acético 2 N (en volumen). Los cromatogramas una vez pulverizados se secaron al aire y finalmente en estufa a 105° durante 5 minutos. Los aminoácidos adquieren un color azul violáceo característico.

CROMATOGRAFIA GASEOSA

Se utilizó un aparato Hewlett-Packard Research Gas Chromatograph modelo 5750B equipado con un detector de ionización de llama y un registrador Hewlett-Packard modelo 7127A.

Metanólisis

La solución de cloruro de hidrógeno en metanol 0,5 M se preparó según la técnica de Penman y Rees (1973 a) por adición de cloruro de acetilo a metanol anhidro (3,5:100 en volumen).

Procedimiento:

Para el análisis del polisacárido 20 mg de muestra se hidrolizaron y trataron en la forma indicada en el procedimiento general de hidrólisis total del polisacárido, y el hidrolizado obtenido se llevó a 1 ml y se pasó a un tubo para precintar de 3 ml. Se llevó a seco bajo corriente de nitrógeno y luego en desecador a presión reducida durante una noche. Se precintó entonces el tubo y se agregó 1 ml de cloruro de hidrógeno 0,5 M en metanol anhidro. El calentamiento se efec-

tuó a 65° durante 3 horas. La muestra proveniente de la metanólisis se llevó a seco bajo corriente de nitrógeno y se guardó en desecador a presión reducida sobre hidróxido de sodio durante una noche antes de ser derivatizada.

Reducción a alditoles

Procedimiento:

20 mg del polisacárido metilado se hidrolizaron y trataron en la forma indicada en el procedimiento general de hidrólisis del polisacárido metilado, y el hidrolizado obtenido se llevó a seco y los azúcares se extrajeron con etanol. La solución etanólica se pasó a un tubo para precintar de 3 ml, se evaporó el solvente en corriente de nitrógeno y se agregó 1 ml de agua. Se adicionaron entonces 70 mg de borohidruro de sodio y se dejó a temperatura ambiente durante 3 horas. Se destruyó el exceso de borohidruro de sodio por adición de ácido acético glacial gota a gota, se descationizó por agitación con resina Dowex 50 (H^+) y se llevó a seco bajo corriente de nitrógeno. El ácido bórico se eliminó por adiciones sucesivas de 1 ml de metanol (x 5) y evaporación a 50° bajo corriente de nitrógeno. La muestra se guardó en desecador de vacío sobre hidróxido de sodio durante una noche antes de ser derivatizada (Albersheim y col., 1967).

Preparación de los trimetilsilil derivados

Se utilizaron como derivados de los hidratos de carbono los O-trimetilsilil (TMS) éteres, preparados según la técnica de Sweeley y col. (1963).

Reactivos necesarios

Piridina anhidra, bidestilada sobre hidróxido de sodio y guardada sobre hidruro de calcio en ausencia de luz.

Hexametildisilazano.

Trimetilclorosilano.

Ambos reactivos fueron usados tal como se suministran comercialmente.

Procedimiento:

El hidrato de carbono (metilglicósido o alditol), convenientemente pesado en el tubo de reacción y precintado, se disolvió o suspendió en piridina (1 ml) y luego se trató, primero con hexametildisilazano (0,2 ml), seguido de trimetilclorosilano (0,1 ml). La mezcla se agitó durante 30 segundos hasta disolución total de los hidratos de carbono, después de lo cual se dejó a temperatura ambiente durante 15 minutos. Previo a la inyección en el cromatógrafo gaseoso se centrifugó la mezcla durante 20 ó 30 minutos. En esas condiciones la solución de los TMS derivados puede ser conservada en refrigerador durante varias semanas.

Preparación de los azúcares testigo

Se utilizaron monosacáridos comerciales que se usaron sin purificar (resultaron cromatográficamente puros por cromatografía en papel) y azúcares metilados obtenidos por síntesis (2,3,4,6-tetra-O-metil-D-galactosa, 4,6-di-O-metil-D-galactosa, 3-O-metil-D-galactosa y 6-O-metil-D-galactosa) o a partir de carragenanos metilados (2,4,6-tri-O-metil-D-galactosa y 2,6-di-O-metil-D-galactosa).

Se prepararon los metilglicósidos de la D-xilosa, L-arabinosa, D-galactosa, D-manosa, D-glucosa, D-galacturonato de metilo y de D-glucuronato de metilo, partiendo de 10 mg del correspondiente azúcar y de acuerdo a lo indicado en el procedimiento para el polisacárido.

Se prepararon los alditoles de los azúcares metilados por disolución de éstos (10 mg) en agua (1 ml) y adición de aproximadamente 10 veces el peso de borohidruro de sodio, procediéndose finalmente en forma análoga a la descripta para el polisacárido.

Los TMS derivados se prepararon en la forma indicada en la técnica general.

Columnas utilizadas

Se emplearon columnas de acero inoxidable de 6 pies de largo (1,83 m) por 1,8 mm de diámetro interno.

Las columnas utilizadas fueron de dos tipos: 1) OV-17 3% sobre Chromosorb W AW/DMCS, malla 60/80 para los metilglicósidos y 2) OV-101 3% sobre Chromosorb W AW/DMCS, malla 60/80 para los alditoles parcialmente metilados. Ambas columnas se usaron tal como las suministran comercialmente (Hewlett-Packard Ltd.).

Condiciones de operación

Las condiciones de operación empleadas (sistema dual) están indicadas en la Tabla 20.

La solución piridínica de los TMS derivados de los metilglicósidos o de los alditoles parcialmente metilados se inyectó en la columna apropiada. Para la inyección de las muestras se utilizó una jeringa Hamilton 701-N de 10 μl.

Tabla 20. Condiciones de operación utilizadas en cromatografía gaseosa.

Condiciones	OV-17 3%	OV-101 3%
Gas portador	Nitrógeno	Nitrógeno
Flujo de gases:		
Portador (ml/min)	30	40
Aire (ml/min)	2 00	200
Hidrógeno (ml/min)	30	30
Temperatura:		
Cámara de inyección (°)	170	170
Detector (°)	300	340
Operación de la columna:	Programada	Programada
Temperatura inicial (°)	120	120
Temperatura final (°)	250	210
Velocidad del programa (°/min)	6	4
Velocidad de la carta (pulg/min)	0,25	0,25

La identidad de los azúcares se determinó por referencia a los compuestos auténticos y por co-cromatografía con los mismos.

Se midieron las áreas de los picos y para aquellos azúcares que aparecen en dos o más formas (metilglicósidos), el área total se tomó como la suma del área de los respectivos picos. La integración se llevó a cabo multiplicando la altura del pico por el ancho a la altura media, usando una regla graduada al mm. Las áreas de los picos no resueltos totalmente se calcularon por sucesivas triangulaciones.

ELECTROFORESIS SOBRE PAPEL

Las electroforesis se llevaron a cabo en un aparato de electroforesis con refrigeración en las dos placas de cierre a presión (E-C Apparatus Corporation, modelo EC451).

Se utilizó papel Whatman 3 MM y una solución buffer de borato de sodio (7,45 g de ácido bórico más 4,0 g de hidróxido de sodio por litro de solución) a pH 10,0. Se efectuaron corridas de 5 horas aplicando 800 volts. Los papeles se secaron primero al aire y luego en estufa, y se revelaron con solución de biftalato de anilina.

HIDROLISIS ACIDA TOTAL DEL POLISACARIDO

El polisacárido se hidrolizó por calentamiento con ácido sulfúrico 1 N (10 mg/ml) en un tubo cerrado durante 7-8 horas a 95-98°. La solución ácida se enfrió, se neutralizó con carbonato de bario, se separó por centrifugación el sulfato de bario formado y el material insoluble, y el sobrenadante se evaporó a presión reducida para insolubilizar las sales suspendidas. El hidrolizado se tomó con agua (1 a 2 ml), se separó por centrifugación el material insoluble y se llevó nuevamente

a sequedad. Se repitió el proceso un par de veces a los efectos de eliminar las sales de bario suspendidas y se llevó a volumen (1 ml). El hidrolizado así obtenido se analizó por cromatografía en papel y por cromatografía gaseosa.

OXIDACION CON PERIODATO

Técnica General

En un matraz aforado se disolvió la muestra en la solución de metaperiodato de sodio 0,015 M (dos a cuatro veces el consumo de periodato esperado) con agitación y se llevó a volumen con la misma solución (concentración de la sustancia a oxidar 0,2 a 0,3%). La oxidación se realizó a temperatura ambiente en ausencia de luz. Se midió el consumo de periodato a distintos tiempos hasta que se observó constancia en el consumo de oxidante y/o sobreoxidación. Paralelamente se efectuó un blanco libre de azúcar en las mismas condiciones.

Determinación del consumo de periodato

Se llevó a cabo por el método espectrofotométrico de Guthrie (1962).

Soluciones necesarias

Solución de metaperiodato de sodio 0,015 M: se preparó por disolución de 160,4 mg de metaperiodato de sodio en 50 ml de agua.
Solución de iodato de potasio 0,015 M: se preparó de igual forma a partir de 160,5 mg de iodato de potasio.

Construcción de la curva patrón

Se midieron las absorbancias a 223 nm de las soluciones testigo de metaperiodato de sodio y iodato de potasio, diluídas 250 veces (los valores de absorbancia oscilan alrededor de 0,6 y 0,1 respectivamente) y se graficaron en función de las concentraciones de las soluciones originales (Fig. 59).

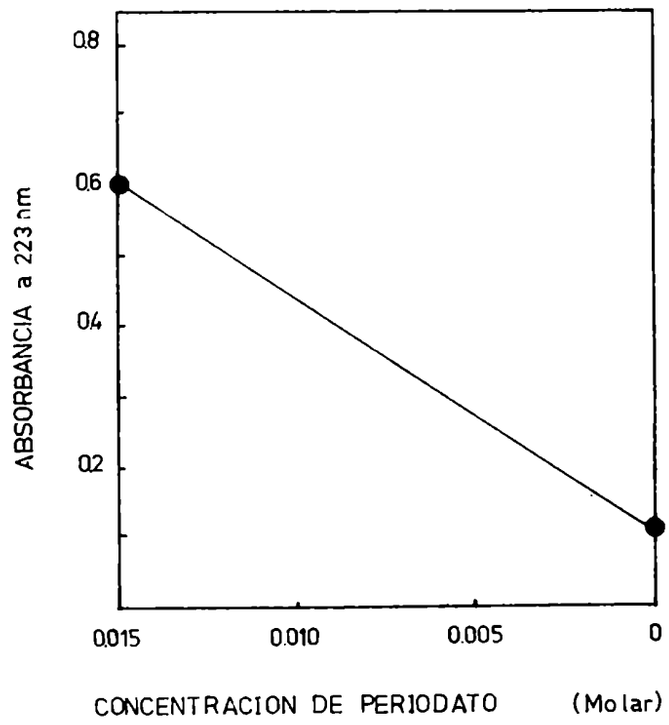


Fig. 59. Determinación de la concentración de periodato por comparación con soluciones testigo de metaperiodato de sodio 0,015 M e iodato de potasio 0,015 M.

Procedimiento

Se extrajeron alícuotas de la mezcla de oxidación y se diluyeron 250 veces. Se midió la absorbancia de la solución a 223 nm y se determinó el periodato consumido a partir de la curva patrón. Se graficaron los valores de periodato consumido en función del tiempo de oxidación hasta valor constante; cuando se observó sobreoxidación se extrapoló

a tiempo cero para obtener el periodato consumido. Con este dato se calcularon los gramos de polisacárido oxidado por mol de periodato consumido:

$$g \text{ polisacárido/mol } IO_4^- = \frac{p \cdot 1000}{V \cdot m}$$

y las unidades de monosacárido oxidadas por mol de periodato consumido:

$$n^o \text{ unidades/mol } IO_4^- = \frac{p \cdot 1000}{V \cdot m \cdot M}$$

donde,

p: peso de la muestra (g)

V: volumen de la solución (ml).

m: periodato consumido (molar).

M: peso molecular de la unidad de monosacárido, calculado conociendo la composición del polisacárido y tomando los pesos moleculares de los monosacáridos en la cadena (galactosa, 162 y 3,6-anhidrogalactosa, 144) y del sulfato (SO_3K, 119).

DETERMINACION CUANTITATIVA DE LOS AZUCARES COMPONENTES

DETERMINACION DE 3,6-ANHIDROGALACTOSA

Se llevó a cabo con el reactivo de resorcinol-ácido clorhídrico siguiendo el método de Yaphe (1960).

Soluciones necesarias

Se disolvieron 130 mg de resorcinol en 100 ml de alcohol absoluto; la solución guardada en un frasco color caramelo puede ser conservada en refrigerador durante un mes. Para preparar el reactivo se agre-

garon 10 ml de esta solución a 100 ml de ácido clorhídrico 12 M (grado analítico); esta mezcla se efectuó inmediatamente antes de usarse.

Procedimiento

1 ml de una solución conteniendo de 5 a 40 µg de 3,6-anhidrogalactosa o de 50 a 180 µg de polisacárido se enfrió en un baño de hielo y se agregaron 5 ml del reactivo de resorcinol-ácido clorhídrico. Se mezcló, se tapó el tubo con una bolita de vidrio y se calentó o mantuvo en baño de hielo pues la reacción desarrolla color a temperatura ambiente. Se calentó 10 minutos a 80°, se enfrió 1,5 minutos en baño de hielo y se midió la absorbancia del color desarrollado a 550 nm dentro de los primeros 30 minutos. Paralelamente se efectuó un blanco en agua destilada. La cantidad de azúcar se determinó, previa sustracción del blanco, por referencia a curvas patrón, y se expresó como el porcentaje del componente anhidro (162 - 18).

Observaciones: Yaphe (1960) estimó que 45 µg de galactosa equivalen a 0,5 µg de 3,6-anhidrogalactosa.

Construcción de la curva patrón

Se disolvieron 33 mg de 3,6-anhidrogalactosa dietilmercaptal en 50 ml de agua; a 5 ml de esta solución se agregaron 33 mg de cloruro mercúrico y 13 mg de carbonato de cadmio y se calentaron a 50° durante 30 minutos. Se llevó entonces a 50 ml obteniéndose una solución de 40 µg/ml de 3,6-anhidrogalactosa. Se efectuaron las diluciones a partir de la misma y se graficó la absorbancia de estas soluciones testigo en función de la concentración (Fig. 60).

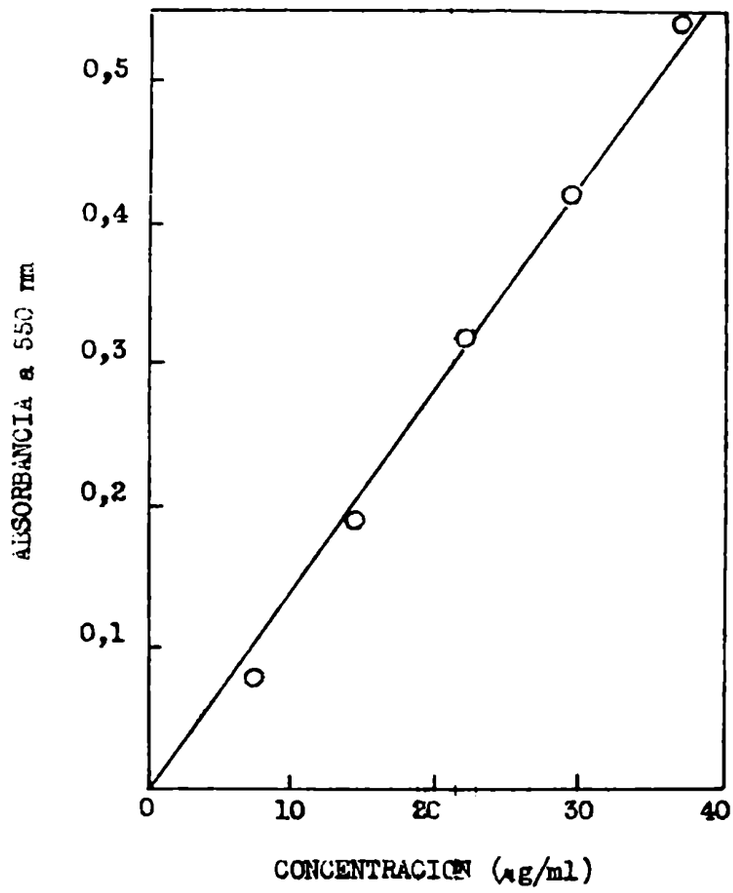


Fig. 60. Curva patrón de 3,6-anhidrogalactosa obtenida por el método de Yaphe (1960) con el reactivo de resorcinol-ácido clorhídrico.

DETERMINACION DE GALACTOSA

Se llevó a cabo con el reactivo de fenol-ácido sulfúrico siguiendo el método de Dubois y col. (1956).

Soluciones necesarias

Acido sulfúrico, grado analítico, 98,08% (British Drug Houses Ltd., Inglaterra). Solución de fenol 5% en agua (p/v); se preparó por

disolución de 5 g de fenol (bidestilado a presión reducida, en corriente de nitrógeno) en 100 ml de agua. La solución incolora obtenida es estable durante varios meses conservada a temperatura ambiente.

Procedimiento

A 1 ml de solución conteniendo entre 10 y 70 µg de azúcar se le agregó 1 ml de solución de fenol 5% y se mezcló. Con una pipeta de punta ancha se dejaron caer 5 ml de ácido sulfúrico directamente sobre la superficie de la solución a fin de asegurar un máximo calentamiento y mezcla. Al cabo de 10 minutos los tubos se agitaron y se colocaron en un baño de agua a 25-30° durante 15 minutos. La absorbancia del color desarrollado se midió a 490 nm. Paralelamente se efectuó un blanco en agua destilada. La cantidad de azúcar se determinó, previa sustracción del blanco, por referencia a las curvas patrón, y se expresó como el porcentaje del componente anhidro (180 - 18).

Construcción de las curvas patrón de galactosa y metil 3,6-anhidrogalactósido

A partir de soluciones madres de galactosa (700 µg/ml) y metil 3,6-anhidrogalactósido (112,4 µg/ml) se efectuaron las diluciones correspondientes entre 10 y 70 µg/ml y se graficó la absorbancia de estas soluciones testigo en función de la concentración (Fig. 61).

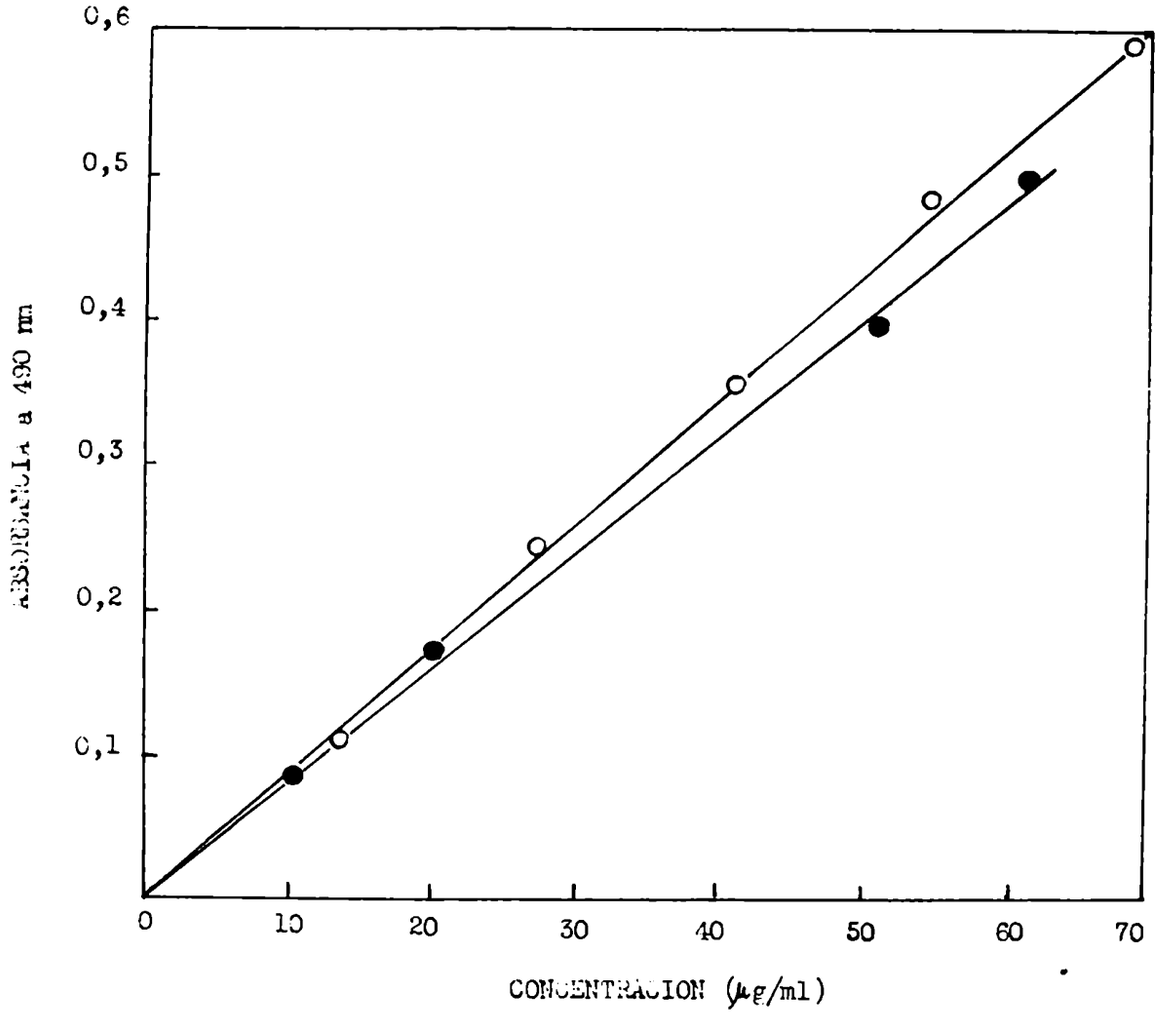


Fig. 61. Curvas patrón de galactosa (o) y metil 3,6-anhidrogalactósido (•)obtenidas por el método de Dubois y col. (1956) con el reactivo de fenol-ácido sulfúrico.

Determinación de galactosa en presencia de 3,6-anhidrogalactosa

La absorbancia medida es suma de las absorbancias de la 3,6-anhidrogalactosa y la galactosa presentes en el polisacárido. La contribución de la 3,6-anhidrogalactosa a dicha absorbancia se estimó, conociendo la concentración de la misma (que se determinó por el método del resorcinol-ácido clorhídrico), a partir de la curva patrón del me-

til 3,6-anhidrogalactósido. La absorbancia debida a la galactosa se determinó por diferencia y su contenido se calculó a partir de la curva patrón correspondiente.

DETERMINACION DE 6 — SULFATO

Se llevó a cabo por el método de Rees (1961).

A 10 ml de una solución al 0,2% de polisacárido en agua se adicionaron 20 mg de borohidruro de sodio y se dejó a temperatura ambiente durante 24 horas. Se agregaron entonces 5 ml de hidróxido de sodio 3 N y 40 mg de borohidruro de sodio. Se extrajeron tres alícuotas, de 2 ml cada una, que se transfirieron a sendos tubos Pyrex que se cerraron y calentaron en baño de agua a 80° durante 2 horas, 3 horas y 4 horas, respectivamente (ensayos previos con el carragenano indicaron constancia en el contenido de 3,6-anhidrogalactosa al cabo de 4 horas de calentamiento). Los tubos se abrieron y los contenidos de 3,6-anhidrogalactosa se compararon con el de la solución que se mantuvo a temperatura ambiente (los ensayos de control (Rees, 1961) no mostraron cambios en el contenido de 3,6-anhidrogalactosa cuando la solución se mantuvo a temperatura ambiente durante 24 horas), mediante el método de resorcinol-ácido clorhídrico, previa dilución a concentraciones adecuadas.

En la determinación de 6-sulfato en el polisacárido oxidado, se destruyó el exceso de periodato por adición de etilenglicol, se agregó borohidruro de sodio y se procedió de acuerdo a lo indicado en el procedimiento general.

DETERMINACION CUANTITATIVA DE LAS PROTEINAS TOTALES

Se llevó a cabo con el reactivo de fenol según Folin-Ciocalteu de acuerdo con el método descripto por Lowry y col. (1951).

Soluciones necesarias

Reactivo A: solución de carbonato de sodio 2% en solución de hidróxido de sodio 0,1 N.

Reactivo B: solución de sulfato de cobre (II) pentahidrato 0,5% en solución de tartrato de sodio y potasio 1%.

Reactivo C: mezclar 50 ml del reactivo A con 1 ml del reactivo B. La solución debe ser descartada al cabo de 24 horas de preparada.

Reactivo D: reactivo de fenol según Folin-Ciocalteu (Merck). Se diluye al medio inmediatamente antes de ser usado; la absorbancia de la solución resultante no debe ser mayor de 0,040 medida contra un blanco de agua destilada.

Procedimiento

A 0,4 ml de solución conteniendo 25 a 500 μg de proteína por ml se agregaron 2 ml del reactivo C; se mezclaron y dejaron a temperatura ambiente durante 10 minutos o más. Se adicionaron rápidamente 0,2 ml del reactivo D y se mezclaron dentro de los 2 segundos. Al cabo de 30 minutos o más se midió la absorbancia a 500 nm. Paralelamente se efectuó un blanco con agua destilada. La cantidad de proteínas se determinó, previa sustracción del blanco, por referencia a curvas patrón.

El procedimiento es aplicable a proteínas en solución o fácilmente solubles en álcali diluído.

Construcción de la curva patrón

A partir de una solución madre de albúmina de suero bovino 0,097% en agua se obtuvieron las soluciones diluídas conteniendo entre 50 y 500 μg/ml, y se graficó la absorbancia de las mismas en función de la concentración (Fig. 62).

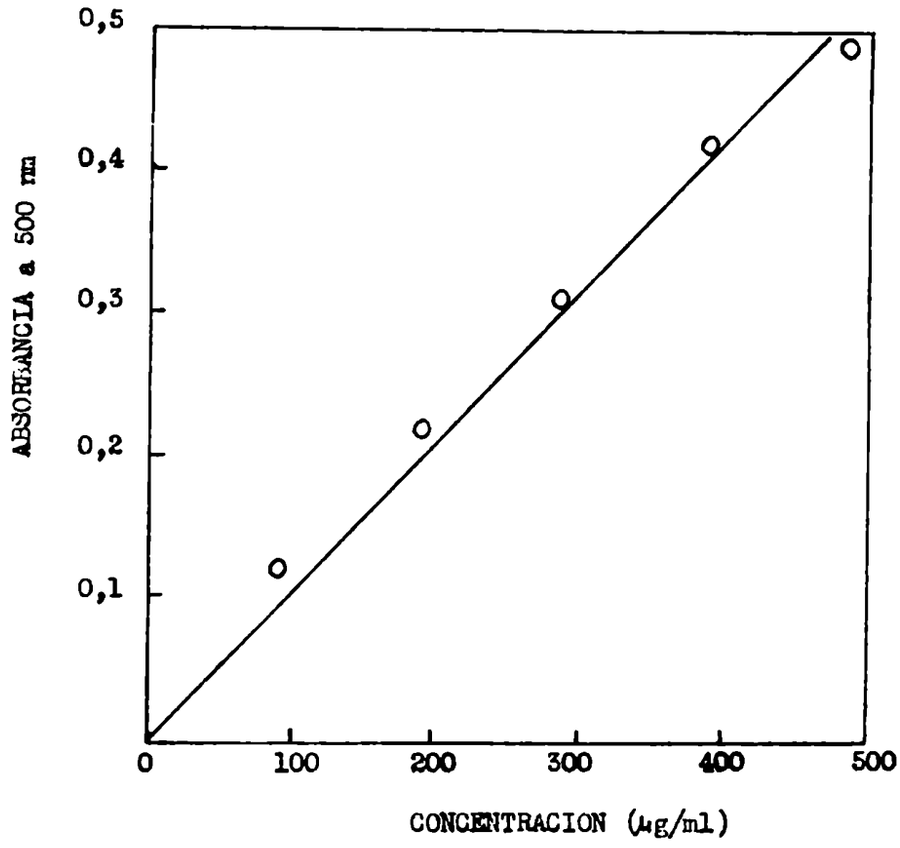


Fig. 62. Curva patrón de albúmina obtenida por el método de Lowry (1951).

HIDROLISIS DE LAS PROTEINAS Y PURIFICACION DEL HIDROLIZADO

El residuo insoluble (10 mg) se hidrolizó con ácido clorhídrico 6 N (20 ml) conteniendo fenol al 1‰, por calentamiento en un tubo cerrado

al vacío durante 24 horas a 105°. El hidrolizado se enfrió, se centrifugó el residuo carbonoso y el ácido se eliminó por evaporación a presión reducida hasta casi sequedad, seguida de tres evaporaciones sucesivas de pequeños volúmenes de agua agregada, después de lo cual se secó en desecador de vacío sobre hidróxido de sodio durante 24 horas. El hidrolizado se tomó con agua caliente, se centrifugó el insoluble y se llevó a sequedad. Este procedimiento se repitió dos veces más, y finalmente el hidrolizado, disuelto en 1 ml de agua, se purificó por adsorción en una columna de Amberlite IR-120 (H^+) (30 x 7 mm).

La columna se lavó con agua (6 ml) para remover los aniones y material no iónico (hidratos de carbono). Los aminoácidos se eluyeron con solución de hidróxido de amonio 4 N (34 ml) usando ninhidrina para determinar el final de la elución (Redfield, 1953). La solución se llevó a seco por evaporación a presión reducida, obteniéndose así la fracción con los aminoácidos que fue utilizada para el análisis que se detalla a continuación.

DOSAJE CON EL ANALIZADOR AUTOMATICO

La determinación de los aminoácidos estables al ácido en el hidrolizado obtenido, se llevó a cabo en base al método de Spackman y col. (1958) en un Technicon Sequential Multi-Sample Aminoacids Analyser, TMS2 (Technicon Corporation, New York).

Los picos de las curvas de elución se integraron multiplicando la altura del pico por el ancho a la altura media, usando una regla graduada al mm. Para los picos no resueltos totalmente, las áreas se calcularon por sucesivas triangulaciones.

En base a los datos obtenidos se calcularon los porcentajes relativos al total de aminoácidos recuperados, y el contenido en aminoácidos se expresó en g de aminoácido anhidro/16 g de nitrógeno (equivale a 100 g de proteína) utilizando la siguiente expresión:

$$\text{g aminoácido anh./16 g nitrógeno} = \frac{h_i \cdot a_i \cdot k_i \cdot M_i}{\sum_i h_i \cdot a_i \cdot k_i \cdot M_i} \cdot 100$$

donde,

h_i: altura del pico (cm).

a_i: ancho del pico a la altura media (cm).

k_i: constante característica para cada aminoácido (nmol/cm^2).

M_i: peso molecular del aminoácido en la cadena (peso molecular - 18).

DETERMINACION DE ACIDO PIRUVICO

Se llevó a cabo de acuerdo con el método descripto por Nunn y col. (1973).

Se calentó 1,00 g del carragenano con 4 ml de ácido sulfúrico 1M en un tubo cerrado durante 9 horas a 95-98°. La solución ácida se enfrió, se neutralizó con carbonato de bario, se separó por centrifugación el sulfato de bario formado y el material insoluble, y el sobrenadante se agitó con resina IR-120 (H^+) y se filtró. La solución ácida se extrajo con 80 ml de éter y la solución etérea se llevó a sequedad a presión reducida; el residuo obtenido (171 mg) se pasó con 2 ml de éter a un tubo para precintar de 3 ml. Se llevó a seco bajo corriente de nitrógeno y luego en desecador de vacío durante una noche. Se precintó el tubo, se agregaron 1,5 ml de cloruro de hidrógeno 3% en metanol anhidro (preparado por adición de 0,3 ml de cloruro de acetilo a 5 ml de meta-

nol) y se calentó a 65° durante 3 horas. La solución ácida se enfrió, se neutralizó con carbonato de plomo y se centrifugó durante 20 minutos.

La determinación de ácido pirúvico se efectuó por cromatografía gaseosa por referencia al testigo correspondiente y por co-cromatografía con el mismo.

Preparación de los testigos

15 mg del testigo (ácido pirúvico ó 5-(hidroximetil)-2-furaldehido) se pesaron en un tubo para precintar de 3 ml, y una vez cerrado se agregó 1 ml de cloruro de hidrógeno 3% en metanol anhidro. El calentamiento se efectuó a 65° durante 3 horas. La solución se neutralizó con carbonato de plomo y se centrifugó.

Cromatografía gaseosa

Se utilizó un aparato Hewlett-Packard Research Gas Chromatograph modelo 5750B equipado con un detector de ionización de llama y un registrador Hewlett-Packard 7127A.

Se empleó una columna de succinato de etilenglicol 10% sobre Chromosorb W AW/DMCS, malla 80/100, de 6 pies (1,83 m) de largo y 1,8 mm de diámetro interno (suministrada por Hewlett-Packard Ltd.). Las condiciones de operación fueron: sistema dual, temperatura programada (140-200°) a una velocidad de 6°/min y un flujo de nitrógeno de 40 ml/min.

PREPARACION DE LOS ACETATOS DE LOS ALDITOLES PARCIALMENTE METILADOS

Los acetatos de los alditoles parcialmente metilados se prepara-

ron de acuerdo con el método de Albersheim y col. (1967).

Se disolvieron 3 mg del monosacárido metilado, contenido en un tubo para precintar de 3 ml, en 1 ml de agua y se adicionaron aproximadamente 10 veces su peso de borohidruro de sodio. Después de 3 horas a temperatura ambiente, el exceso de borohidruro se destruyó por adición gota a gota de ácido acético glacial (hasta que no se observó más efervescencia) y se llevó a seco bajo corriente de nitrógeno. El ácido bórico se eliminó por adiciones sucesivas de 1 ml de metanol (x 5) y evaporación a 50° bajo corriente de nitrógeno. Se guardó en desecador de vacío sobre hidróxido de sodio durante una noche, se precintó el tubo y se agregó 1 ml de anhidrido acético. El calentamiento se efectuó a 121° durante 3 horas. Se enfrió, agregó 1 ml de agua y se hicieron 3 extracciones con cloroformo (10 ml en total). Por evaporación del cloroformo a presión reducida se obtuvo el alditol acetilado correspondiente que se analizó por espectrometría de masas.

DETERMINACION DE LAS CURVAS DE SOLUBILIDAD POR TURBIDIMETRIA

Se llevó a cabo por el método de Matulewicz y Cerezo (1975).

Se centrifugó una solución 0,48-0,60% de polisacárido en agua a 3000 rpm durante 30 minutos para eliminar el material suspendido y se transfirieron alícuotas de 5 ml a tubos de ensayo de 150 x 16 mm. Se prepararon soluciones de cloruro de potasio de concentración comprendida entre 0,1 y 3,2 M. La precipitación se llevó a cabo mezclando volúmenes iguales de ambas soluciones. Paralelamente se efectuó un blanco con la solución de polisacárido diluída al medio con agua destilada.

La suspensión producida se homogeneizó en un mixer durante 10 segundos, se calentó en baño de agua a 25° durante 10 minutos y se homogeneizó nuevamente durante 10 segundos más. Se midió la absorbancia a 450 nm.

En aquellos casos en que las mediciones no se realizaron de inmediato después de la precipitación se homogeneizó el sistema durante 10 segundos antes de efectuar la determinación.

FORMACION DE GELES

a- En leche

Se llevó a cabo por el método de Pernas y col. (1967).

Una parte de carragenano (33 mg) y 15 partes de leche en polvo descremada (500 mg) se mezclaron y suspendieron en 150 partes de agua (5 g). Se calentó en un baño de agua a ebullición agitando ocasionalmente hasta disolución del polisacárido. Al cabo de 24 horas a temperatura ambiente se observó si hubo gelificación, se puso en refrigerador por 24 horas más y se repitió la observación.

b- En cloruro de potasio 1%

Se llevó a cabo por método de Anderson y col. (1968 b).

Se disolvieron 50 mg de carragenano en 5 ml de cloruro de potasio 1%, agitando ocasionalmente en un baño de agua a ebullición. Al cabo de 24 horas a temperatura ambiente se observó si hubo gelificación, se puso en refrigerador por 24 horas más y se repitió la observación.

VISCOSIMETRIA

Las viscosidades se determinaron con un viscosímetro a caída de es-

fera Colora modelo Höppler tipo C, con tubo de caída inclinado.

Para ello se prepararon soluciones madres de polisacárido en cloruro de sodio 0,1 M: la muestra se disolvió en el solvente mediante la ayuda de un "shaker", se llevó a volumen y se centrifugó a 2000 rev/min; se efectuaron entonces las diluciones correspondientes. Los residuos insolubles observados en algunos casos se despreciaron en los cálculos de concentración.

Las densidades de las soluciones se midieron con densímetros Höppler adecuados y se calculó la viscosidad dinámica con la fórmula siguiente:

$$\eta = (\delta_1 - \delta_2)t$$

donde,

K : constante de la esfera (cP cm/g seg).

δ_1 : densidad de la esfera (g/cm^3).

δ_2 : densidad de la solución (g/cm^3).

t : tiempo de caída de la esfera (seg).

En todos los casos la temperatura fue de 20°. A partir de la viscosidad dinámica (η) se calcularon la viscosidad relativa (η_{rel}) y la viscosidad específica (η_{esp}), y la viscosidad intrínseca ($[\eta]$) se determinó graficando η_{esp}/c en función de c (concentración) y extrapolando a dilución infinita (Tablas 21-31).

$$\eta_{rel} = \frac{\eta \text{ solución}}{\eta \text{ solvente}} \qquad \eta_{esp} = \frac{\eta \text{ solución} - \eta \text{ solvente}}{\eta \text{ solvente}} = (\eta_{rel} - 1)$$

$$[\eta] = \lim_{c \to 0} \left(\frac{\eta_{esp}}{c}\right)$$

Tabla 21. Determinación de la viscosidad intrínseca del carragenano.

conc. g/100 ml	t seg.	η cP	η_{rel}	η_{esp}	η_{esp}/c 100 ml/g
	52,9	0,977	1,000	0,000	
0,046	69,6	1,285	1,315	0,315	6,848
0,114	105,1	1,940	1,986	0,986	8,649
0,155	131,6	2,429	2,486	1,486	9,587
0,228	192,4	3,552	3,636	2,636	11,561
0,342	350,7	6,474	6,626	5,626	16,450
0,456[1]	78,2	11,319	11,585	10,585	23,213

[1] δ_1 : 2,391687 g/cm^3; K : 0,104003 cP cm^3/g seg ; δ_2 : 1,000 g/cm^3.

Viscosidad intrínseca ($[\eta]$): 5,60 100 ml/g.

Tabla 22. Determinación de la viscosidad intrínseca de la fracción 2 proveniente del fraccionamiento 0,24% del carragenano.

conc. g/100 ml	t seg.	η cP	η_{rel}	η_{esp}	η_{esp}/c 100 ml/g
	52,2	0,964	1,000	0,000	
0,062	62,7	1,157	1,200	0,200	3,226
0,124	74,4	1,373	1,424	0,424	3,419
0,185	87,0	1,606	1,666	0,666	3,600
0,247	102,2	1,887	1,957	0,957	3,874

Viscosidad intrínseca ($[\eta]$): 3,02 100 ml/g.

Tabla 23. Determinación de la viscosidad intrínseca de la fracción 3 proveniente del fraccionamiento 0,24% del carragenano.

conc. g/100 ml	t seg.	η cP	η_{rel}	η_{esp}	η_{esp}/c 100 ml/g
	52,0	0,960	1,000	0,000	
0,062	56,3	1,039	1,082	0,082	1,323
0,125	60,6	1,119	1,166	0,166	1,328
0,187	65,4	1,207	1,257	0,257	1,374
0,249	70,3	1,298	1,352	0,352	1,414

Viscosidad intrínseca ($[\eta]$): 1,26 100 ml/g.

Tabla 24. Determinación de la viscosidad intrínseca de la fracción 4 proveniente del fraccionamiento 0,24% del carragenano.

conc. g/100 ml	t seg.	η cP	η_{rel}	η_{esp}	η_{esp}/c 100 ml/g
	52,0	0,960	1,000	0,000	
0,061	59,9	1,106	1,152	0,152	2,492
0,122	68,7	1,268	1,321	0,321	2,631
0,183	77,6	1,433	1,493	0,493	2,694
0,244	86,2	1,591	1,657	0,657	2,693

Viscosidad intrínseca ($[\eta]$): 2,42 100 ml/g.

Tabla 25. Determinación de la viscosidad intrínseca de la fracción 5 proveniente del fraccionamiento 0,24% del carragenano.

conc. g/100 ml	t seg.	η cP	η_{rel}	η_{esp}	η_{esp}/c 100 ml/g
	52,9	0,977	1,000	0,000	
0,062	68,4	1,263	1,293	0,293	4,726
0,123	86,3	1,593	1,630	0,630	5,122
0,185	107,4	1,983	2,030	1,030	5,568
0,246	132,9	2,452	2,510	1,510	6,138

Viscosidad intrínseca ($[\eta]$): 4,20 100 ml/g.

Tabla 26. Determinación de la viscosidad intrínseca de la fracción 6 proveniente del fraccionamiento 0,24% del carragenano.

conc. g/100 ml	t seg.	η cP	η_{rel}	η_{esp}	η_{esp}/c 100 ml/g
	51,8	0,956	1,000	0,000	
0,059	71,1	1,313	1,373	0,373	6,322
0,118	94,5	1,745	1,825	0,825	6,991
0,177	123,2	2,274	2,379	1,379	7,791
0,236	155,6	2,872	3,004	2,004	8,491

Viscosidad intrínseca ($[\eta]$): 5,58 100 ml/g.

Tabla 27. Determinación de la viscosidad intrínseca de la fracción 7 proveniente del fraccionamiento 0,24% del carragenano.

conc. g/100 ml	t seg.	η cP	η_{rel}	η_{esp}	η_{esp}/c 100 ml/g
	51,8	0,956	1,000	0,000	
0,063	71,9	1,327	1,388	0,388	6,159
0,126	97,5	1,800	1,883	0,883	7,008
0,189	127,1	2,346	2,454	1,454	7,693
0,252	165,9	3,063	3,204	2,204	8,746

Viscosidad intrínseca ($[\eta]$): 5,30 100 ml/g.

Tabla 28. Determinación de la viscosidad intrínseca de la fracción 8 proveniente del fraccionamiento 0,24% del carragenano.

conc. g/100 ml	t seg.	η cP	η_{rel}	η_{esp}	η_{esp}/c 100 ml/g
	52,4	0,967	1,000	0,000	
0,040	62,0	1,145	1,184	0,184	4,600
0,101	77,4	1,429	1,478	0,478	4,733
0,141	88,1	1,626	1,681	0,681	4,830
0,201	109,1	2,014	2,083	1,083	5,388

Viscosidad intrínseca ($[\eta]$): 4,48 100 ml/g.

Tabla 29. Determinación de la viscosidad intrínseca del carragenano modificado por tratamiento alcalino.

conc. g/100 ml	t seg.	η cP	η_{rel}	η_{esp}	η_{esp}/c 100 ml/g
	52,1	0,962	1,000	0,000	
0,062	61,5	1,135	1,180	0,180	2,903
0,124	71,3	1,316	1,368	0,368	2,968
0,187	81,7	1,508	1,568	0,568	3,037
0,249	93,8	1,732	1,800	0,800	3,213

Viscosidad intrínseca ($[\eta]$): 2,76 100 ml/g.

Tabla 30. Determinación de la viscosidad intrínseca de la fracción 1 proveniente del fraccionamiento 0,40% del carragenano modificado por tratamiento alcalino.

conc. g/100 ml	t seg.	η cP	η_{rel}	η_{esp}	η_{esp}/c 100 ml/g
	52,1	0,962	1,000	0,000	
0,062	59,5	1,098	1,141	0,141	2,274
0,124	68,8	1,270	1,320	0,320	2,581
0,186	78,5	1,449	1,506	0,506	2,720
0,249	90,0	1,661	1,727	0,727	2,920

Viscosidad intrínseca ($[\eta]$): 2,15 100 ml/g.

Tabla 31. Determinación de la viscosidad intrínseca de la fracción 4 proveniente del fraccionamiento 0,40% del carragenano modificado por tratamiento alcalino.

conc. g/100 ml	t seg.	η cP	η_{rel}	η_{esp}	η_{esp}/c 100 ml/g
	52,0	0,960	1,000	0,000	
0,062	59,3	1,095	1,141	0,141	2,274
0,124	66,7	1,231	1,282	0,282	2,274
0,186	74,5	1,375	1,432	0,432	2,323
0,249	82,8	1,529	1,593	0,593	2,381

Viscosidad intrínseca ($[\eta]$): 2,14 100 ml/g.

Salvo en el caso indicado (Tabla 21), K: 0,013327 cP cm^3/g seg; δ_1: 2,385241 g/cm^3 y δ_2: 1,000 g/cm^3.

CARACTERISTICAS DEL MATERIAL

Se utilizó el alga roja Iridaea undulosa Bory obtenida en Puerto Deseado, Santa Cruz. La recolección se llevó a cabo en invierno y se hizo manualmente, después de lo cual las algas fueron secadas al aire libre.

AISLAMIENTO DEL CARRAGENANO

Se efectuaron dos aislamientos similares.

En el primero, 101,3 g del alga, previamente molida en un molinillo Wiley (malla 20), se extrajeron mediante agitación con 5 l de agua, durante 24 horas y a temperatura ambiente. El extracto se centrifugó y el polisacárido se precipitó de la solución acuosa al volcarla con agitación sobre tres volúmenes de isopropanol (14 l).

El residuo insoluble se extrajo dos veces más en condiciones análogas empleándose 3,1 l de agua para la segunda extracción y 1,8 l para la tercera. En ambos casos se concentró la solución hasta aproximadamente la mitad del volumen antes de volcar sobre isopropanol (6,0 l y 2,8 l, respectivamente).

Durante las extracciones se utilizó m-toluidina como germicida.

El carragenano precipitó en esas condiciones en forma de fibras parduzcas. Los precipitados obtenidos se prensaron entre hojas de papel de filtro, luego se lavaron por intercambio de solventes, etanol y luego éter, y se secaron a temperatura ambiente en desecador a presión reducida hasta peso constante. Se obtuvieron así 54,1 g (53,4%) de

carragenano de los dos primeros extractos y 0,33 g (0,3%) del tercero.

El carragenano proveniente de los dos primeros extractos se purificó por redisolución en agua (4 l), centrifugación y reprecipitación con isopropanol (12 l) obteniéndose 45,0 g (44,4%) de carragenano (fibras blancas) y un residuo insoluble en agua que también se lavó por intercambio de solventes y se secó en desecador a temperatura ambiente (5,2 g, 9,6% del carragenano a purificar).

En el segundo aislamiento se partió de 97,1 g del alga y, a diferencia del anterior, los precipitados obtenidos a partir del primer y del segundo extracto se llevaron a peso constante por separado. Dado el bajo rendimiento en carragenano del tercer extracto se suprimió la etapa correspondiente en este aislamiento. Se obtuvieron 45,6 g (46,9%) de carragenano del primer extracto y 6,2 g (6,3%) del segundo. El carragenano proveniente del primer extracto se purificó de forma análoga a la descripta obteniéndose así 40,0 g (41,2%) de carragenano y 3,7 g (8,1% del carragenano a purificar) de residuo insoluble en agua.

FRACCIONAMIENTO DEL CARRAGENANO

El carragenano se disolvió en agua mediante agitación durante 24 horas y a temperatura ambiente; se efectuaron entonces sucesivos agregados de cloruro de potasio molido, en cantidad tal de incrementar la concentración en 0,05 M cada vez. La solución se agitó durante 24 horas después de cada adición de sal, se dejó reposar durante 2 horas y se centrifugaron alícuotas de la misma a fin de observar si hubo formación de gel; éste se separó de la solución de igual forma. En algunos casos hubo que enfriar la solución en baño de hielo antes de centrifu-

gar pues el calor desarrollado durante este proceso hacía difícil la separación del gel. La concentración de sal se controló cada cierto número de adiciones por el método de Mohr para la determinación cuantitativa de cloruros. La concentración final de cloruro de potasio fue 2,00 M. La porción soluble se recuperó por diálisis contra agua, concentración y liofilización, procedimiento similar al que se siguió con los geles obtenidos.

Los liofilizados de los carragenanos tienen una gran capacidad para retener agua; en particular en el caso de la fracción 5, proveniente del fraccionamiento 0,24% del carragenano (Tabla 7; pág.109), fue imposible recuperarla por liofilización y hubo que recurrir a la diálisis, concentración y volcado con agitación sobre tres volúmenes de isopropanol.

Se comprobó además la pérdida de material por pasaje a través de los tubos de diálisis para las fracciones 7 y 8 provenientes del fraccionamiento 0,24% del carragenano (determinación de hidratos de carbono en las aguas de diálisis con el reactivo de fenol-ácido sulfúrico). En el caso de la fracción 7, las aguas de diálisis se concentraron, dializaron durante 1 hora y volcaron con agitación sobre tres volúmenes de isopropanol. Se obtuvieron así 3,35 g de un producto cuyo contenido en cenizas fue del 33,8%, lo que representa un valor aproximado de polisacárido dializado del 11,5%.

TRATAMIENTO ALCALINO DEL CARRAGENANO

El tratamiento alcalino se efectuó de acuerdo con el método descripto por Anderson y col. (1968 a).

El carragenano (6,68 g) se disolvió en agua (380 ml) mediante agitación durante 24 horas y a temperatura ambiente, y se adicionó borohidruro de sodio (380 mg). Al cabo de 20 horas se agregaron más borohidruro de sodio (185 mg) e hidróxido de sodio 3 N (185 ml). Se calentó a reflujo en baño de agua a 80° (15 horas) hasta constancia en el contenido de 3,6-anhidrogalactosa (reactivo de resorcinol-ácido clorhídrico) (Tabla 32; Fig. 63). Finalizado el calentamiento la solución se dializó contra agua, concentró y liofilizó (4,89 g, 86,0%).

Tabla 32. Tratamiento alcalino del carragenano. Formación de 3,6-anhidrogalactosa en función del tiempo[1].

Tiempo min.	Absorbancia
0	0,140
270	0,295
450	0,325
540	0,330
660	0,345
780	0,355
900	0,350

[1] Se extrajo una alícuota, se diluyó 100 veces y se efectuó la determinación correspondiente.

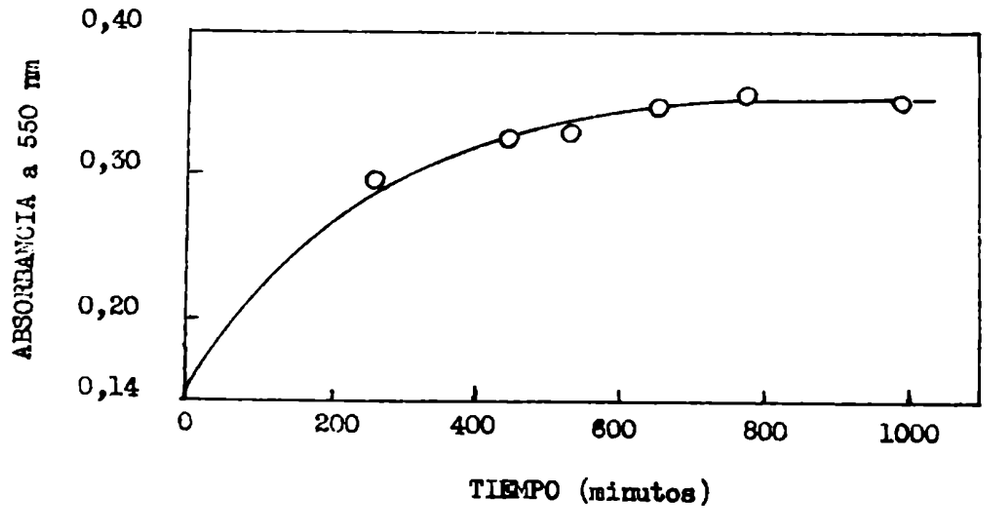


Fig. 63. Tratamiento alcalino del carragenano. Formación de 3,6-anhidrogalactosa en función del tiempo.

DETERMINACION DE L-GALACTOSA

1,6 g de la fracción 8, proveniente del fraccionamiento 0,24% del carragenano (Tabla 7, pág.109), se hidrolizaron a reflujo con 160 ml de ácido sulfúrico 1 N durante 8 horas a 95-98°. La solución ácida se enfrió, centrifugó y trató con resinas de intercambio iónico: resina De-Acidite E (CO_3^{2-}), resina Amberlite IR-120 (H^+) y nuevamente la resina aniónica. La solución se decoloró con carbón y se llevó a sequedad. El residuo se cromatografió en una columna de celulosa (40 x 1,9 cm) usando el solvente 1. Se recogieron fracciones de 10 ml que se analizaron por cromatografía en papel en el mismo solvente y se juntaron aquellas más enriquecidas en galactosa (0,050 g), p.f. 164-166°, $[\alpha]_D$ + 77,2°(c 0,27, agua); D-galactosa, p.f. 167° y $[\alpha]_D$ + 80,2° (agua, en el equilibrio) (Bates y col., 1942).

PREPARACION DE LA N-(p-NITROFENIL) - GALACTOPIRANOSILAMINA

Se preparó de acuerdo con la técnica descripta por Weygand y col. (1951).

A 24,9 mg de galactosa contenidos en un tubo de ensayo se agregaron 21,4 mg de p-nitroanilina y 0,5 ml de cloruro de hidrógeno 0,03% en metanol (a 50 ml de metanol se adicionaron 0,04 ml de ácido clorhídrico concentrado). El tubo se cerró y se calentó en baño de agua aumentando gradualmente la temperatura hasta 98°. Al cabo de dos horas se enfrió y centrifugó, y el residuo se lavó con metanol y se recristalizó una vez de metanol 80%; se obtuvo la N-(p-nitrofenil)-galactopiranosilamina de p.f. 209-211°, $[\alpha]_D$ -185,1° (c 0,15, piridina).

Para el derivado preparado a partir de la D-galactosa se obtuvieron: p.f. 214-215°, $[\alpha]_D$ -188,9°(c 0,23, piridina).

Weygand y col. (1951) informaron para la N-(p-nitrofenil)-D-galactopiranosilamina p.f. 219°, $[\alpha]_D$ -187° $\longrightarrow$ - 248°(piridina).

Reconocimiento de xilosa en el hidrolizado de la fracción 8

El hidrolizado de la fracción 8, utilizado para la determinación de L-galactosa, mostró además la presencia de trazas de una pentosa que por cromatografía gaseosa (trimetilsilil derivados de los metilglicósidos correspondientes) (ver parte experimental, pág. 179) resultó ser xilosa.

ESTUDIOS DE METILACION

METILACION DEL POLISACARIDO

Se metiló por el método descripto por Haworth (1915).

La fracción del carragenano, proveniente del fraccionamiento 0,24%, que precipitaba en el rango 0,70-1,05 M de cloruro de potasio (2,12 g) se disolvió en agua (65 ml) mediante agitación mecánica y a temperatura ambiente, y se adicionaron 200 mg de borohidruro de sodio. Al cabo de 24 horas la solución se alcalinizó con hidróxido de sodio 60% (65 ml) (concentración final de hidróxido de sodio, 30%) y se agregaron, simultáneamente y gota a gota, 16 ml de sulfato de dimetilo y 40 ml de hidróxido de sodio 30% (las soluciones de hidróxido de sodio se burbujearon con nitrógeno antes de ser utilizadas), con agitación constante durante 3 horas. Una vez terminado el agregado, se continuó la agitación durante 21 horas. Se hicieron cuatro agregados más de sulfato de dimetilo e hidróxido de sodio 30%, en las mismas condiciones durante cuatro días consecutivos. El polisacárido parcialmente metilado se recuperó por diálisis contra agua, concentración y liofilización (1,30 g); su contenido de metoxilo fue de 9,4%. Este producto se remetiló dos veces más siguiendo el mismo tratamiento pero efectuando los agregados a diferentes temperaturas. En la segunda metilación se partió de 1,10 g del polisacárido previamente aislado y se obtuvieron 0,92 g de un producto cuyo contenido de metoxilo resultó de 13,0%, y los agregados se realizaron a 30°, 40°, 45°, 48° y 48°. En la tercera metilación las temperaturas fueron de 30°, 45°, 45°, 45°, 50° 50° (seis agregados en total); a partir de 0,77 g del polisacárido obtenido en la etapa anterior se recuperaron 0,65 g de un producto con un contenido de metoxilo de 13,2%.

HIDROLISIS DEL POLISACARIDO METILADO

El polisacárido metilado (0,51 g) se disolvió en 38 ml de ácido fórmico 45% (v/v) y la solución se calentó en tubo cerrado a 100° durante 16 horas. El ácido fórmico se eliminó por evaporación a presión reducida hasta casi sequedad, seguida de evaporaciones sucesivas de pequeños volúmenes de agua agregada, después de lo cual se tomó con agua (10 ml) y se neutralizó el ácido sulfúrico, proveniente de la hidrólisis de los grupos sulfato, con hidróxido de sodio 0,05 N. Se llevó a sequedad y se guardó en desecador de vacío durante una noche. El hidrolizado se tomó con etanol (10 ml), se centrifugó y por evaporación del solvente a presión reducida se obtuvo un residuo (0,220 g).

Por cromatografía gaseosa de los metilgalactitoles sililados (ver parte experimental, pág. 179) se detectaron galactitoles trimetilados (4% del área total), dimetilados (76%), monometilados (17%) y galactitol (3%). Es decir con las fases disponibles sólo se pudo lograr una separación en función del peso molecular. Los resultados obtenidos son promedio de tres corridas realizadas en las mismas condiciones.

La cromatografía en papel del hidrolizado usando como solvente butanol medio saturado (solvente 3) mostró seis manchas alargadas:

R_f 0,74 (R_f de la 2,3,4,6-tetra-O-metil-D-galactosa, 0,71).

R_f 0,60 (R_f de la 2,4,6-tri-O-metil-D-galactosa, 0,61).

R_f 0,40 (R_f de la 2,6-di-O-metil-D-galactosa, 0,41).

R_f 0,31 (R_f de la 4,6-di-O-metil-D-galactosa, 0,29).

R_f 0,11 (R_f de la 3-, 4- y 6-O-metil-D-galactosa, 0,13).

R_f 0,02 (la galactosa prácticamente no se desplaza en este solvente, R_f 0,04).

El hidrolizado (0,220 g) se fraccionó en una columna de celulosa (70 x 4,5 cm) utilizando el solvente 3. Se recogieron fracciones de 10 ml que se analizaron por cromatografía en papel (solvente 3) y se obtuvieron ocho fracciones principales que luego se reagruparon en seis:

Fracciones 1-80: La cromatografía en papel de esta fracción dio una mancha tenue de R_f 0,88 y una mancha principal de R_f 0,75.

Fracciones 81-94: Por cromatografía en papel de esta fracción aparecían dos manchas, una mancha tenue de R_f 0,89 y una mancha principal de R_f 0,79.

Fracciones 95-99: La cromatografía en papel de esta fracción resultó análoga a la de las dos fracciones anteriores, mancha tenue de R_f 0,88 y mancha principal de R_f 0,79.

Estas fracciones estaban enriquecidas en un componente cuyo R_f en el solvente 3 era 0,75-0,79 y por lo tanto se juntaron y analizaron en forma conjunta por cromatografía en papel en el mismo solvente y por cromatografía gaseosa (TMS derivados de los alditoles parcialmente metilados) (ver parte experimental, pág.179) al igual que las cinco fracciones restantes.

Fracciones 1-99: Como la cromatografía gaseosa de esta fracción (56 mg) no mostró la presencia de azúcares la mancha de R_f 0,75-0,79 podría deberse a una mezcla de productos de degradación formados a partir de las unidades de 3,6-anhidrogalactosa durante la hidrólisis.

Fracciones 100-107: la cromatografía en papel de esta fracción (16 mg) dio una mancha principal de R_f 0,76 y dos manchas muy tenues de R_f

0,61 (R_f de la 2,4,6-tri-O-metil-D-galactosa, 0,61) y R_f 0,40 (R_f de la 2,6-di-O-metil-D-galactosa, 0,41). La cromatografía gaseosa sólo indicó la presencia de un dimetilado y de trazas de un trimetilado.

Fracciones 108-131: El único componente de esta fracción (33 mg) era un dimetilado (cromatografía gaseosa), idéntico a la 2,6-di-O-metil-galactosa (cromatografía en papel, R_f 0,41). Se purificó por redisolución del azúcar en acetona y decoloración con carbón. Por evaporación del solvente a presión reducida se obtuvo un jarabe, $[\alpha]_D$ + 76,1° (c 0,30, agua); Andrews y col. (1954) informaron para la 2,6-di-O-metil-D-galactosa $[\alpha]_D$ + 48° $\longrightarrow$ + 84° (agua). Se hizo el espectro de masas de la fracción reducida y acetilada (ver Tabla 14, pág.141).

Fracciones 132-142: El único componente de esta fracción (32 mg) también resultó ser la 2,6-di-O-metil-D-galactosa que se purificó e identificó en forma análoga a la fracción anterior (ver Tabla 14, pág.141); $[\alpha]_D$ + 75,7° (c 0,21, agua).

Fracciones 143-173: Esta fracción (32 mg) contenía 4,6-di-O-metilgalactosa (R_f 0,34). Se purificó por redisolución del azúcar en metanol y decoloración con carbón. Por evaporación del solvente a presión reducida se obtuvo un jarabe, $[\alpha]_D$ + 47,9° (c 0,38, agua); Bacon y col. (1940) informaron para la 4,6-di-O-metil-D-galactosa $[\alpha]_D$ + 133° $\longrightarrow$ + 77° (agua). Se hizo el espectro de masas de la fracción reducida y acetilada (ver Tabla 15, pág.142).

Fracciones 174-424: El principal componente de esta fracción (41 mg) era un monometilado (cromatografía gaseosa). La cromatografía en pa-

pel (para mejorar la resolución de las manchas cromatográficas fue necesario efectuar corridas múltiples) indicó que podía tratarse de la 3-, 4- y/ó 6-O-metilgalactosa:

$R_{2,6}$ (respecto de la 2,6-di-O-metil-D-galactosa) de la 3-O-metil-D-galactosa, 0,46.

$R_{2,6}$ de la 4-O-metil-D-galactosa, 0,45.

$R_{2,6}$ de la 6-O-metil-D-galactosa, 0,47.

$R_{2,6}$ de las fracciones 174-424, 0,44.

La electroforesis (ver parte experimental, pág.184) mostró la presencia de 3-O-metilgalactosa así como de trazas de 6-O-metilgalactosa y galactosa:

M_{Gal} de la 3-O-metil-D-galactosa, 0,72.

M_{Gal} de la 4-O-metil-D-galactosa, 0,21.

M_{Gal} de la 6-O-metil-D-galactosa, 0,96.

M_{Gal} de las fracciones 174-424, 0,69 (mancha principal).

La cromatografía gaseosa indicó asimismo la presencia de trazas de un dimetilado y galactosa.

SINTESIS DE LA 2,3,4,6-TETRA-O-METIL-D-GALACTOSA

PREPARACION DEL METILGALACTOSIDO

La preparación de esta sustancia se llevó a cabo por el método de Robertson y Lamb (1934).

Se disolvieron 50 g de D-galactosa en 400 ml de cloruro de hidrogeno 1% en metanol anhidro (preparado por adición de 7,75 ml de clo-

ruro de acetilo en 400 ml de metanol) y se calentó a reflujo durante 13 horas. Se neutralizó en la penumbra con carbonato de plata, se filtró y se llevó a seco a presión reducida. Se obtuvo un jarabe amarillo que se disolvió en alcohol absoluto a ebullición y se decoloró con carbón. Se enfrió y al cabo de varias horas precipitó el metilgalactósido cristalino (27,7 g) que luego de una segunda recristalización del mismo solvente (20,0 g) dio p.f. 92-150° y $[\alpha]_D$ + 91,5° (c 0,92, agua).

Preparación del carbonato de plata

Se preparó por adición de una solución de carbonato de sodio 8,8% (100 ml) a una solución de nitrato de plata 8,6% (300 ml). La solución de carbonato de sodio se agregó lentamente y con agitación vigorosa. Se filtró, se lavó con acetona y se secó al aire. Todas las operaciones se efectuaron en la penumbra.

METILACION DEL METILGALACTOSIDO

Se llevaron a cabo dos metilaciones:

a- Método de Haworth (1915). En un balón de cuatro bocas equipado con dos ampollas, un refrigerante y un agitador con cierre esmerilado, se disolvieron 20,0 g del metilgalactósido en 10 ml de agua. Se calentó a 70° en baño de agua y se adicionaron, simultáneamente y gota a gota, 160 ml de hidróxido de sodio 30% y 55 ml de sulfato de dimetilo (la solución de hidróxido de sodio se burbujeó con nitrógeno antes de ser utilizada) con agitación mecánica durante 1 hora, cuidando de mantener la solución alcalina durante todo el transcurso del agregado. Finalizado el mismo, se calentó durante 1 hora en baño de agua a ebullición pa-

ra descomponer el exceso de sulfato de dimetilo. Se dejó enfriar a temperatura ambiente y por extracción con cloroformo se obtuvo un jarabe (6,0 g) que por cromatografía gaseosa (trimetilsilil derivados de los metilgalactitoles correspondientes; ver parte experimental, pág.179) resultó ser una mezcla de productos parcialmente metilados.

b- Método de Purdie e Irvine (1903). En un balón de tres bocas equipado con un refrigerante (por el cual circuló agua helada) y un agitador con cierre esmerilado, se disolvieron 6,0 g del producto parcialmente metilado en 30 ml de ioduro de metilo. Se calentó a 45° en baño de agua para mantener a reflujo el ioduro de metilo, y se adicionaron 10 porciones iguales de óxido de plata (5,5 g) a intervalos de 30 minutos. Finalizado el agregado se prosiguió el calentamiento durante 1 hora más. Se dejó enfriar a temperatura ambiente y por extracción con éter se obtuvo un jarabe (5,0 g) que no mostró la banda de tensión O-H en el infrarrojo.

Preparación del óxido de plata

Se preparó por adición de una solución filtrada en caliente de hidróxido de bario (100 g de hidróxido de bario octahidrato en un litro de agua) a una solución caliente de nitrato de plata (100 g de nitrato de plata en 500 ml de agua). Se filtró, se lavó con agua caliente hasta remover el hidróxido de bario, y se secó en estufa.

HIDROLISIS DEL METILGALACTOSIDO PERMETILADO

Se hidrolizaron 1,3 g del metilgalactósido permetilado con 100 ml de ácido sulfúrico 1 N durante 5 horas a 95-98°. La solución ácida se

enfrió, se neutralizó con carbonato de bario y se separó por centrifugación el sulfato de bario formado. El hidrolizado se descationizó con resina Dowex 50 (H^+), se filtró y por evaporación se obtuvo un jarabe. Este jarabe se purificó por extracción con etanol y los intentos para cristalizarlo de éter de petróleo no dieron resultado (0,94 g); $[\alpha]_D$ + 112,0° (c 0,37, agua). White y Rao (1953) informaron para la 2,3,4,6-tetra-O-metil-D-galactosa $[\alpha]_D$ + 118° (agua, en el equilibrio).

El espectro de masas del acetato del alditol correspondiente se encuentra en la Tabla 33.

Tabla 33. Espectro de masas de la 2,3,4,6-tetra-O-metil-D-galactosa obtenida por síntesis[1].

Temperatura de introducción 25°	m/e	%
	43	100
	45	32
	71	11
	87	16
	101	36
	117	39
	129	23
	145	20
	161	16

[1]Se indican aquellos picos cuyas intensidades son mayores o iguales al 10%.

RESUMEN

Este trabajo de Tesis tuvo por objeto el estudio del sistema de carragenanos aislado del alga roja Iridaea undulosa Bory. En él se presentan:

1- Una descripción de las algas rojas o Rhodophytas, la clasificación sistemática del alga Iridaea undulosa Bory y su ubicación geográfica en la Argentina.

2- Un resumen que abarca los trabajos químicos llevados a cabo sobre los carragenanos desde 1844 hasta la actualidad; se detallan, por separado, los trabajos realizados en la Argentina.

3- Una descripción detallada del mecanismo de formación de geles de los carragenanos, y de su relación con factores estructurales. Se discuten, además, la formación de geles de carragenanos con galactomananos y de carragenanos con K-caseína.

4- Dado que los principales métodos empleados en la determinación de estructuras y el tipo de información que éstos proporcionan son ampliamente conocidos, sólo se discuten en detalle:

   a- La utilidad de la espectrometría de masas en la determinación de las estructuras de los monosacáridos parcialmente metilados. Como la identificación de los monosacáridos parcialmente metilados, obtenidos por hidrólisis del polisacárido metilado de Iridaea undulosa Bory, se llevó a cabo por espectrometría de masas de los acetatos de alditoles correspondientes, se analizaron en particular los mecanismos de fragmentación de los mismos.

   b- El uso y las limitaciones de la espectroscopía infrarroja en la determinación de la posición de los grupos sulfato en las unidades

del polisacárido.

5- Un resumen de las aplicaciones de los carragenanos que comprende también los aspectos farmacológicos. Se incluye, además, una breve descripción de las aplicaciones de las algas marinas.

6- La descripción y la discusión de los resultados obtenidos en el estudio del sistema de carragenanos del alga Iridaea undulosa Bory.

El carragenano se aisló de un extracto acuoso del alga por precipitación con isopropanol hasta una concentración del 75% (rendimiento de aproximadamente 45%).

La composición y las propiedades del carragenano (ver Tabla 5, pág. 99) indicaron que éste podía estar constituído, en gran parte, por una "fracción intermedia" y/o "soluble". La curva de precipitación analítica (método turbidimétrico) así como los fraccionamientos preparativos con soluciones de concentración creciente de cloruro de potasio, confirmaron la presencia mayoritaria de una "fracción intermedia".

Por fraccionamiento con cloruro de potasio de una solución 0,24% de carragenano en agua se aislaron ocho fracciones (ver Tabla 7, pág. 109) que se ordenaron, de acuerdo a la escuela noruega, en tres grupos:

I- Fracción insoluble a una concentración 0,10 M de cloruro de potasio (fracción 1, 0,7% del producto recuperado). Su composición y sus propiedades indicaron que no se trataba de un κ-carragenano. Dada su pequeña contribución al sistema total esta fracción no fue estudiada posteriormente.

II- Fracciones que precipitaron a concentraciones de cloruro de potasio superiores a 0,10 M (seis fracciones en total, 80,4% del producto

recuperado). Dichas "fracciones intermedias" se subdividieron, en base a su composición y a sus propiedades, en dos subgrupos:

a- Fracciones insolubles a concentraciones de cloruro de potasio menores de 1,05 M (fracciones 2, 3 y 4; 29,0% en total).

b- Fracciones insolubles a concentraciones de cloruro de potasio mayores de 1,05 M (fracciones 5, 6 y 7; 51,4% en total).

III- Fracción soluble a una concentración 2,00 M de cloruro de potasio (fracción 8, 18,9% del producto recuperado).

La composición y las propiedades de las fracciones provenientes del fraccionamiento 0,24% se encuentran en la Tabla 11 (pág. 114). Los estudios de oxidación con periodato de las fracciones 2, 3 y 7 condujeron a resultados que diferían de los encontrados previamente para los carragenanos por la escuela inglesa (igual proporción de uniones (1→3)-y (1→4)- y monosulfatación de las unidades enlazadas por la posición 3). La presencia de otros tipos de enlace, por ejemplo (1→6)-, justificaría el mayor consumo de periodato y resultaría compatible con el grado de sulfatación de dichas fracciones.

La fracción de carragenano que precipitaba en el rango 0,70-1,05 M de cloruro de potasio (fraccionamiento 0,24%; 29,0% del producto recuperado) que elegida para llevar a cabo los estudios de metilación. Dado que por razones de tiempo y esfuerzo dicho estudio no podía ser aplicado, dentro del período de esta Tesis, a todas las fracciones obtenidas en el fraccionamiento general, se escogió aquel conjunto de moléculas que teniendo iguales características analíticas (% de galactosa, % de 3,6-anhidrogalactosa y % de sulfato) y porcentajes menores de 6-sulfato (el cual se elimina en medio alcalino) preci-

pitara en el rango de concentraciones más amplio. Los resultados, por lo tanto, no deben ser aplicados a la concreción de una estructura sino para determinar el tipo de unidades que existen en los carragenanos precipitables entre esas concentraciones de cloruro de potasio.

Por metilación y posterior hidrólisis del polisacárido metilado se identificaron: 2,6-di-O-metil-D-galactosa, 4,6-di-O-metilgalactosa, 3-O-metilgalactosa y trazas de 2,4,6-tri-O-metilgalactosa, 6-O-metilgalactosa y galactosa. La 2,6- (producto principal del hidrolizado) y la 4,6-di-O-metilgalactosa se encontraban en una relación 2:1 (peso en peso). La 2,6-di-O-metil-D-galactosa provendría de unidades de D-galactopiranosa 4-sulfato y la 4,6-di-O-metilgalactosa de unidades de galactopiranosa 2-sulfato, ambas unidas por la posición 3. Dado que el dosaje de las unidades de galactopiranosa 2,6-disulfato unidas por la posición 4 indicó que éstas no estaban presentes en la fracción de partida, se desconoce cual es la unión de la 3-O-metilgalactosa al polisacárido metilado; tampoco se conoce la unión de la 6-O-metilgalactosa a dicho polisacárido. A su vez la 2,4,6-tri-O-metilgalactosa provendría de unidades de galactopiranosa unidas por la posición 3, y la galactosa podría atribuirse a una submetilación, a la presencia de unidades trisulfatadas y/o puntos de ramificación disulfatados.

El bajo rendimiento obtenido en la metilación (40,7%) podría atribuirse a una degradación vía epóxido (por eliminación de sulfato) en medio alcalino. Dicha degradación no permitiría detectar las unidades de galactopiranosa 2-sulfato que son extremos terminales no reductores o que están unidas por las posiciones 4 y/ó 6.

Dado que la ausencia de fracciones del tipo K resta valor comercial a un carragenano, resultaba importante establecer un método para la transformación del carragenano extraído en un producto utilizable. Por tratamiento alcalino en condiciones controladas y por posterior fraccionamiento con cloruro de potasio se obtuvieron:

I- Fracción insoluble a una concentración 0,125 M de cloruro de potasio (fracción 1, 61,0% del producto recuperado).

II- Fracciones que precipitaron a concentraciones de cloruro de potasio superiores a 0,125 M (fracciones 2 y 3; 3,3% del producto recuperado).

III- Fracción soluble a una concentración 2,00 M de cloruro de potasio (fracción 4, 35,7% del producto recuperado).

Mediante el tratamiento alcalino se transformó el carragenano, constituído en su mayoría por una "fracción intermedia", en un producto formado por un K-carragenano y una fracción soluble, y un muy pequeño porcentaje de una "fracción intermedia". El rendimiento de K-carragenano es semejante a los obtenidos a partir de los carragenanos de Chondrus crispus, que es el alga utilizada mundialmente para la producción de K-carragenano. La composición y las propiedades de las fracciones provenientes del fraccionamiento 0,4% del carragenano modificado se encuentran en la Tabla 19 (pág. 153).

Es de notar que el estudio de la composición del carragenano modificado con álcali (Tabla 17, pág. 148) indicó que la eliminación de sulfato era inferior a la esperada en función del incremento de 3,6-anhidrogalactosa. Esta eliminación anómala del sulfato podría atribuirse a la pérdida por diálisis de "fragmentos no representativos" (formados por degradación alcalina) del sistema total.

Se desarrolló un método rápido y sencillo para determinar las curvas de precipitación de los carragenanos en soluciones de cloruro de potasio. Dicho método se basa en la precipitación de fracciones, en condiciones normalizadas, a distintas concentraciones de cloruro de potasio, y en la medición de la turbidez producida. Las curvas de precipitación se analizaron en función de la longitud de onda utilizada, de la concentración de carragenano y del tiempo de envejecimiento del precipitado, encontrándose así las condiciones óptimas de trabajo.

7- La descripción de las técnicas experimentales utilizadas.

BIBLIOGRAFIA

1. Albersheim P., Nevins D.J., English P.D. y Karr A. (1967). Carbohyd. Res., 5, 340.
2. Anderson N.S., Campbell J.W., Harding M.M., Rees D.A. y Samuel J.W.B. (1969). J. Mol. Biol., 45, 85.
3. Anderson N.S., Dolan T.C.S., Lawson C.J., Penman A. y Rees D. A. (1968 a). Carbohyd. Res., 7, 468.
4. Anderson N.S., Dolan T.C.S., Penman A., Rees D.A., Mueller G. P., Stancioff D.J. y Stanley N.F. (1968 b). J. Chem. Soc. (C), 602.
5. Anderson N.S., Dolan T.C.S. y Rees D.A. (1968 c). J. Chem. Soc. (C), 596.
6. Anderson N.S., Dolan T.C.S. y Rees D.A. (1973). J.C.S. Perkin I, 2173.
7. Anderson N.S. y Rees D.A. (1966). "Proceedings of the 5th International Seaweed Symposium", eds. Young E.G. y McLachlan J.L., Pergamon Press, Halifax, p. 243.
8. Anderson W. (1969). "Proceedings of the 6th International Seaweed Symposium", ed. Margalef R., Subsecretaría de la Marina Mercante-Dirección General de Pesca Marítima, Madrid, p. 627.
9. Anderson W. y Duncan J.G.C. (1965). J. Pharm. Pharmacol., 17, 647.
10. Anderson W. y Harthill E.J. (1967). J. Pharm. Pharmacol., 19, 460; Chem. Abstr. 1967, 67, 62781x.
11. Andrews P., Hough L. y Jones J.K.N. (1954). J. Chem. Soc., 806.
12. Axberg K., Björndal H., Pilotti A. y Svensson S. (1972). Acta Chem. Scand., 26, 1319.

13. Bacon J.S.D., Bell D.J. y Lorber J. (1940). J. Chem Soc., 1147.

14. Baillie A.J. y Anderson W. (1968). Nature, 218, 770.

15. Barón M. (1954). "Estudio de la constitución del ficocoloide de la Iridaea cordata", Tesis Doctoral registrada en la Biblioteca de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, U.N.B.A..

16. Bates F.J. y Asociados (1942). "Polarimetry, Saccharimetry and the Sugars", United States Government Printing Office, Washington, p. 717.

17. Bayley S.T. (1955). Biochim. Biophys. Acta, 17, 194.

18. Belcher R., Fildes J.E. y Nutten A.J. (1955). Anal. Chim. Acta, 13, 16.

19. Bellamy L.J. y Beecher L. (1953). J. Chem. Soc., 728.

20. Bente F. (1875). Ber., 8, 416.

21. Bente F. (1876). Ber., 9, 1157.

22. Björndal H., Hellerqvist C.G., Lindberg B. y Svensson S. (1970 a). Angew. Chem. internat. Edit., 9, 610.

23. Björndal H., Lindberg B., Pilotti A y Svensson S. (1970 b). Carbohyd. Res., 15, 339.

24. Björndal H., Lindberg B. y Svensson S. (1967). Carbohyd. Res., 5, 433.

25. Black W.A.P., Blakemore W.R., Colquhoun J.A. y Dewar E.T. (1965) J. Sci. Fd. Agric., 16, 573.

26. Bouveng H. y Lindberg B. (1956). Acta Chem. Scand., 10, 1283.

27. Buchanan J., Percival E.E. y Percival E.G.V. (1943). J. Chem. Soc., 51.

28. Budzikiewicz H., Djerassi C. y Williams D.H. (1964). "Structure elucidation of natural products by mass spectrometry", Holden Day Inc., San Francisco, California, Vol. II, p. 203.

29. Bryce T.A., McKinnon A.A., Morris E.R., Rees D.A. y Thom D. (1974). Faraday Disc. Chem Soc., 57, 221.

30. Butler M.R. (1934). Biochem. J., 28, 759.

31. Butler M.R. (1936). Biochem.J., 30, 1338.

32. Cerezo A.S. (1967 a). J. Chem. Soc. (C), 992.

33. Cerezo A.S. (1967 b). J. Chem. Soc. (C), 2491.

34. Cerezo A.S. (1973). Carbohyd. Res., 26, 335.

35. Cerezo A.S. (1974). Carbohyd. Res., 36, 201.

36. Clancy M.J. y Turvey J.R. (1961). J. Chem. Soc., 2935.

37. Clingman A.L. y Nunn J.R. (1959). J. Chem. Soc., 493.

38. Colthup N.B. (1950). J. Opt. Soc. Am., 40, 397.

39. Consden R. y Gordon A.H. (1948). Nature, 162, 180.

40. Cook W.H., Rose R.C. y Colvin J.R. (1952). Biochim. Biophys. Acta, 8, 595.

41. Cronquist A. (1969 a). "Introducción a la Botánica", Compañía Editorial Continental S.A., México, p. 125.

42. Cronquist A. (1969 b). "Introducción a la Botánica", Compañía Editorial Continental S.A., México, p. 203.

43. Dea I.C.M., McKinnon A.A. y Rees D.A. (1972). J. Mol. Biol., 68, 153.

44. Dea I.C.M. y Morrison A. (1975). Advan. Carbohyd. Chem. Biochem., 31, 241.

45. Dewar T.E. y Percival E.G.V. (1947). J. Chem. Soc., 1622.

46. Dillon T. y O'Colla P.(1951). Proc. R.I.A., 54 B, 51.

47. Dolan T.C.S. y Rees D.A. (1965). J. Chem. Soc., 3534.

48. Dubois M., Gilles K.A., Hamilton J.K., Rebers P.A. y Smith F. (1956). Anal. Chem., 28, 350.

49. Dumas-Pregl (1958). "Quantitative organische Mikroanalyse". Pregl-Roth, Springer-Verlag, Wien, p. 91.

50. Dutton G.G.S. (1974). Advan. Carbohyd. Chem. Biochem., 30, 9.

51. Finan P.A., Reed R.I. y Snedden W. (1958). Chem. & Ind., 1172.

52. Flückiger F.A. y Obermaier L. (1868). Neues Repertorium Pharm., 380.

53. Food Drug Adm., Washington, D.C.- Fed. Regist. (Ago 2, 1972), 37 (149), 15434; Chem. Abstr. 1972, 77, 99787m.

54. Gómez Artero J.C. (1961). "Estudios sobre algas marinas realizados en la Argentina", Memoria Crítica, INTI, p. 23.

55. Goring D.A.I. y Young E.G. (1955). Can J. Chem., 33, 480.

56. Grassi M.M. (1971 a). "Notas de Clase-Algas", Universidad Nacional de Tucumán, Fundación e Instituto Miguel Lillo, p. 10.

57. Grassi M.M. (1971 b). "Notas de Clase-Algas", Universidad Nacional de Tucumán, Fundación e Instituto Miguel Lillo, p. 263.

58. Grindrod J. y Nickerson T.A. (1968). J. Dairy Sci., 51, 834; Chem. Abstr. 1968, 69, 18102u.

59. Guthrie R.D. (1962). Methods Carbohyd. Chem., 1, 435.

60. Haas P. (1921). Biochem. J., 15, 469.

61. Haas P. y Rusell-Wells B. (1923). Biochem. J., 17, 696.

62. Haas P. y Rusell-Wells B. (1929). Biochem. J., 23, 425.

63. Haedicke J., Bauer R.W. y Tollens B. (1887). Ann., 238, 302.

64. Hajdu J. (1956). "Extracción del ficocoloide de la Iridaea laminarioides", Tesis Doctoral registrada en la Biblioteca de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, U.N.B.A..

65. Halperin D.R., Asensi A.O. y Boraso A.L. (1973). "Informe preliminar sobre la distribución de algunas algas de interés industrial en la costa patagónica", Contr. Téc. (CIBIMA, Buenos Aires) 13, p.12.

66. Harrington W.F. y Schachman H.K.J. (1953). J. Am. Chem. Soc., 75, 3533.

67. Harris M.J. y Turvey J.R. (1970). Carbohyd. Res., 15, 51.

68. Hassid W.Z. (1933). J. Am. Chem. Soc., 55, 4163.

69. Hassid W.Z. (1935). J. Am. Chem. Soc., 57, 2046.

70. Haworth W.N. (1915). J. Chem. Soc., 107, 8.

71. Hirase S. (1957 a). Bull. Chem. Soc. Japan, 30, 68; Chem. Abstr. 1958, 52, 9479i.

72. Hirase S. (1957 b). Bull. Chem. Soc. Japan, 30, 70; Chem. Abstr. 1958, 52, 9479i.

73. Hirase S. (1957 c). Bull. Chem. Soc. Japan, 30, 75; Chem.Abstr. 1958, 52, 9479i.

74. Hirase S. (1957 d). Mem. Fac. Ind. Arts Kyoto Tech. Univ. Sci. Technol., 17; Chem. Abstr. 1958, 52, 16221d.

75. Hirase S. y Watanabe K. (1972). Bull.Inst. Chem. Res. Kyoto Univ., 50(4), 332; Chem. Abstr. 1973, 78, 84675v.

76. Johnston J.P. y Ogston A.G. (1946). Trans. Faraday Soc., 42, 789.

77. Johnston R. y Percival E.G.V. (1950). J. Chem. Soc., 1994.

78. Jones R.N., Humphries P., Herling F. y Dobriner K. (1951). J. Am. Chem. Soc., 73, 3215.

79. Jones R.A., Staples E.J. y Penman A. (1973). J.C.S. Perkin II, 1608.

80. Kantor T.G. y Schubert M. (1957). J. Am. Chem. Soc., 79, 152.

81. Kim D.H. (1976). Nova Hedwigia, 27(5/6), 1.

82. Kirk-Othmer (1968). "Encyclopedia of Chemical Technology", 2nd ed., Interscience Publishers-John Wiley & Sons Inc., Vol.17,p. 774.

83. Klotz I.M. y Gruen D.M. (1948). J. Phys Colloid Chem., 52, 961.

84. Kochetkov N.K. y Chizhov O.S. (1966). Advan. Carbohyd. Chem., 21, 39.

85. Kuhn R. y Trischmann H. (1963). Ber., 96, 284.

86. Kylin H. (1956). "Die Gattungen der Rhodophyceen", CWK Gleerups Förlag, Lund, p. 321.

87. Lacoste de Díaz E.N. (1957). Revista de Investigaciones Agrícolas, 11, 163.

88. Lawson C.J. y Rees D.A. (1968). J. Chem. Soc. (C), 1301.

89. Lawson C.J. y Rees D.A. (1970). Nature, 227, 392.

90. Lawson C.J., Rees D.A., Stancioff D.J. y Stanley N.F. (1973). J.C.S. Perkin I, 2177.

91. Lewis B.A. y Smith F.J. (1957). J. Am. Chem.Soc., 79, 3929.

92. Lönngren J. y Svensson S. (1974). Advan. Carbohyd. Chem. Biochem., 29, 41.

93. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr L.A. y Randall R.J. (1951). J. Biol. Chem., 193, 265.

94. Luzzati M. (1953). "Extracción del ficocoloide de la Iridaea cordata", Tesis Doctoral registrada en la Biblioteca de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, U.N.B.A..

95. Lloyd A.G. y Dodgson K.S. (1961). Biochim. Biophys. Acta, 46, 116.

96. Lloyd A.G., Dodgson K.S., Price R.G. y Rose F.A. (1961 a). Biochim. Biophys. Acta, 46, 108.

97. Lloyd A.G., Tudball N. y Dodgson K.S. (1961 b). Biochim. Biophys. Acta, 52, 413.

98. MacDonough J.V., Pat. EE.UU. 2.658.829 (Nov 10, 1953); Chem. Abstr. 1954, 48, 2982f.

99. Márquez A.R. (1974). "Industrialización de las algas marinas", CONICET, p. 115.

100. Matulewicz M.C. y Cerezo A.S. (1975). J. Sci. Fd. Agric., 26, 243.

101. McKinnon A.A., Rees D.A. y Williamson F.B. (1969). Chem Comm., 701.

102. Morgan K. y O'Neill A.N. (1959). Can. J. Chem., 37, 1201.

103. Mori T. (1953). Advan. Carbohyd. Chem., 8, 316.

104. Müther A. y Tollens B. (1904). Ber., 37, 298.

105. Newton L. (1945). Endeavour, 4, 69.

106. Nunn J.R., Parolis H. y Rusell I. (1971). Carbohyd. Res., 20, 205.

107. Nunn J.R., Parolis H. y Rusell I. (1973). Carbohyd. Res., 29, 281.

108. Nunn J.R. y von Holdt M.M. (1957). J. Chem. Soc., 1094.

109. N.V. de Bataafsche Petroleum Maatschappij, Pat. Holanda 66.089; Chem. Abstr. 1951, 45, 2232b.

110. O'Neill A.N. (1955 a). J. Am. Chem. Soc., 77, 2837.

111. O'Neill A.N. (1955 b). J. Am. Chem. Soc., 77, 6324.

112. Orr S.F.D. (1954). Biochim. Biophys. Acta, 14, 173.

113. Painter T.J. (1959). Chem & Ind., 1488.

114. Painter T.J. (1960). Can. J. Chem., 38, 112.

115. Painter T.J. (1966). "Proceedings of the 5th International Seaweed Symposium", eds. Young E.G. y McLachlan J.L., Pergamon Press, Halifax, p. 305.

116. Peat S. (1946). Advan. Carbohyd. Chem., 2, 37.

117. Peat S., Bowker D.M. y Turvey J.R. (1968). Carbohyd. Res., 7, 225.

118. Peat S., Turvey J.R. y Rees D.A. (1961). J. Chem. Soc., 1590.

119. Penman A. y Rees D.A. (1973 a). J.C.S. Perkin I, 2182.

120. Penman A. y Rees D.A. (1973 b). J.C.S. Perkin I, 2191.

121. Percival E.E. (1954). Chem. & Ind., 1487.

122. Percival E.G.V. (1945). J. Chem. Soc., 119.

123. Percival E.G.V. (1949). Quart. Rev., 3, 369.

124. Pernas J.A., Smidsrød O., Larsen B. y Haug A. (1967). Acta Chem. Scand., 21, 98.

125. Purdie T. e Irvine J.C. (1903). J. Chem. Soc., 83, 1021.

126. Redfield R.R. (1953). Biochim. Biophys. Acta, 10, 344.

127. Rees D.A. (1961). J. Chem. Soc., 5168.

128. Rees D.A. (1963). J. Chem. Soc., 1821.

129. Rees D.A. (1969). Advan. Carbohyd. Chem. Biochem., 24, 267.

130. Rees D.A. (1970). J. Chem. Soc. (B), 877.

131. Rees D.A. (1972 a). Chem. & Ind., 630.

132. Rees D.A. (1972 b). Biochem J., 126, 257.

133. Rees D.A., Scott W.E. y Williamson F.B. (1970). Nature, 227, 390.

134. Rees D.A., Steele I.W. y Williamson F.B. (1969). J. Polym. Sci. (C), 28, 261.

135. Robertson G.J. y Lamb R.A. (1934). J. Chem. Soc., 1321.

136. Rose R.C. (1950). Can. J. Research F, 28, 202.

137. Rusell-Wells B. (1922). Biochem. J., 16, 578.

138. Schmidt C. (1844). Ann., 51, 29.

139. Sebor J. (1900). Oesterr. Chem. Z., 3, 441.

140. Seitov Z.S. y Zhumashev Zh. (1970). Biokhimiya, 35, 430; Chem. Abstr. 1970, 73, 105508g.

141. Smidsrød O., Larsen B., Pernas A.J. y Haug A. (1967). Acta Chem. Scand., 21, 2585.

142. Smith D.B. y Cook W.H. (1953). Arch. Biochem. Biophys., 45, 232.

143. Smith D.B., Cook W.H. y Neal J.L. (1954). Arch. Biochem. Biophys., 53, 192.

144. Smith F. y Montgomery R. (1959 a). "Chemistry of Plant Gums and Mucilages", Reinhold Publishing Corp., New York, p. 402.

145. Smith F. y Montgomery R. (1959 b). "Chemistry of Plant Gums and Mucilages", Reinhold Publishing Corp., New York, p. 377.

146. Smith D.B., O'Neill A.N. y Perlin A.S. (1955). Can J. Chem., 33, 1352.

147. Snoeren T.H.M. (1976). NIZO-Versl., Vol. 174; Chem. Abstr. 1977, 86, 42069k.

148. Snoeren T.H.M., Payens T.A.J., Jeunink J. y Both P. (1975). Milchwissenschaft, 30, 393.

149. Spackman D.H., Stein W.H. y Moore S. (1958). Anal. Chem., 30. 1190.

150. Stancioff D.J. y Stanley N.F. (1969). "Proceedings of the 6th International Seaweed Symposium", ed. Margalef R., Subsecretaría de la Marina Mercante-Dirección General de Pesca Marítima, Madrid, p. 595.

151. Stanford E.C. (1862). J. Soc. Arts, 10, 185.

152. Stanley N.F., Marine Colloids Inc., Pat. EE.UU. 3.094.517 (Jun 18, 1963); Chem. Abstr. 1963, 59, 6603a.

153. Steinitz S. (1955). "Estudio del método de obtención y determinación del ficocoloide de la Iridaea cordata", Tesis Doctoral registrada en la Biblioteca de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, U.N.B.A..

154. Stoloff L. y Silva P. (1957). Econ. Botany, 11, 327.

155. Sweeley C.C., Bentley R., Makita M. y Wells W.W. (1963). J. Am. Chem. Soc., 85, 2497.

156. Tipson R.S. (1953). Advan. Carbohyd. Chem., 8, 107.

157. Torcat Rojas J. (1955). "Estudio y aplicaciones del ficocoloide de Iridaea cordata", Tesis Doctoral registrada en la Biblioteca de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, U.N.B.A..

158. Tseng C.K. (1945). Sci., 101, 597.

159. Tseng C.K. (1946). Coll. Chem., 6, 629; Chem. Abstr. 1946, 40, 2245[6].

160. Turvey J.R. (1965). Advan. Carbohyd. Chem., 20, 183.

161. Turvey J.R., Bowker D.M. y Harris M.J. (1967). Chem & Ind., 2081.

162. Turvey J.R. y Williams T.P. (1962). J. Chem. Soc., 2119.

163. Usov A.I., Adamyants K.S., Miroshnikova L.I., Shaposhnikova A. A. y Kochetkov N.K. (1971). Carbohyd. Res., 18, 336.

164. Villee C.A. (1961). "Biología", Editorial Universitaria de Buenos Aires, Buenos Aires, p. 156.

165. Wagner H. (1957). Mikrochim. Acta, 19.

166. Weigand F., Perkom W. y Kuhner P. (1951). Ber., 84, 594.

167. Weigl J., Turvey J.R. y Yaphe W. (1966). "Proceedings of the 5th International Seaweed Symposium". eds. Young E.G. y McLachlan J.L., Pergamon Press, Halifax, p. 329.

168. Weiss A. (1976). Industria y Química, 237, 15.

169. Whistler R.L. y BeMiller J.N. (1958). Advan. Carbohyd. Chem. 13, 289.

170. White E.V. y Rao P.S. (1953). J. Am. Chem. Soc., 75, 2617.

171. Yaphe W. (1959). Can. J. Bot., 37, 751.

172. Yaphe W. (1960). Anal. Chem., 32, 1327.

173. Young K., Duckworth M. y Yaphe W. (1971). Carbohyd. Res., 16, 446.

174. Young E.G. y Rice F.A.H. (1944). J. Biol. Chem., 156, 781.

175. Young E.G. y Rice F.A.H. (1946). J. Biol. Chem., 164, 35.