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

Hidratos de carbono en Cyttaria Johowii : Estructura de un polisacárido

Couto, Alicia Susana

1982

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:
Couto, Alicia Susana. (1982). Hidratos de carbono en Cyttaria Johowii : Estructura de un polisacárido. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1713_Couto.pdf

Cita tipo Chicago:
Couto, Alicia Susana. "Hidratos de carbono en Cyttaria Johowii : Estructura de un polisacárido". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1982.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1713_Couto.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

Tesis 1713
ej. 2

HIDRATOS DE CARBONO
EN
Cyttaria johowii

ESTRUCTURA DE UN POLISACARIDO

ALICIA S. COUTO

-1982-

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

HIDRATOS DE CARBONO EN *CYTTARIA JOHOWII* ESTRUCTURA DE UN POLISACARIDO.

ALICIA SUSANA COUTO

Tesis presentada para optar al título de

DOCTOR EN QUIMICA

- 1982 -

1713
Ej. 2

Mi más sincero agradecimiento a la Dra. Rosa Muchnik de Lederkremer, quien sugiriera el tema del presente trabajo y dirigiera su desarrollo, por su capacidad y dedicación, que sirvieron de ejemplo a mi formación científica.

Agradezco también:

Al Consejo de Investigaciones Científicas y Técnicas poe haberme concedido Becas de Iniciación y Perfeccionamiento que hicieron posible la realización del presente trabajo.

Al Dr. E. Gros por haber permitido la realización de este trabajo en el departamento a su cargo.

A la Dra. L.S. Rumi y a la Lic. A. Chasseing (Instituto de Biología y Medicina Experimental; CONICET) por los estudios de acción antitumor.

A UMYMFOR (CONICET-FCEN) por el equipo técnico suministrado.

A la Dra. I.J. Gamundi por su ayuda en la clasificación de especies de Cyttaria.

A los Lic. M.Rivero, M.M. de Moglia y H. Garraffo por la realización de las cromatografías gas-líquido.

Al Sr. J.A.Aznarez por la realización de los espectros de masas y cromatografías gas-líquido acopladas a espectrometría de masas.

Al Sr. G.Arabehety y a los Doctores G.Burton y E.Michelotti por los espectros de RMN-^{1}H y de RMN-^{13}C realizados.

A la Dra. B.B.Deferrari y a la Lic. Z.M.Marcote por los microanálisis realizados.

A los Sres. C.Frydrich, L. Taurozzi y J.Raschcovsky por la realización de los dibujos.

A los Doctores N.Waksman, R. Erra Balsells y O. Varela por la experiencia trasmitida, a los Licenciados L.Casal, A. Confalonieri, C. du Mortier, E. Oliva, J. Groisman, C.Lima C. Wolfenson y a los amigos y compañeros por haber conformado una familia, compartiendo momentos de alegría y tristeza que ayudaron a la concreción de este trabajo.

Al personal del Departamento de Química Orgánica, por su apoyo y cordialidad.

INTRODUCCION

El objeto del presente trabajo es el de avanzar en el conocimiento de los hongos del género *Cyttaria*, abundantes en nuestros bosques patagónicos, donde constituyen una plaga por los tumores que producen en varias especies de *Nothofagus*.

Cyttaria johowii que es la segunda especie estudiada, fue elegida para continuar los estudios sobre las Cyttariales pues presenta estromas de consistencia distinta y los resultados químicos podrían diferenciar subgéneros.

En este trabajo se han caracterizado los alditoles y azúcares simples presentes y se ha aislado un polisacárido. El estudio estructural del mismo demostró que se trata de un $\beta(1\rightarrow3)$glucano con ramificaciones en C-6. Un hecho estructural interesante es la presencia de un 10% de fructosa en el mismo. Aunque la cetosa había sido detectada en un polisacárido de *Cyttaria harioti* y mencionada su presencia en otros glucanos, la baja proporción en que se encontraba impedía la determinación de la unión. En este trabajo se pudo determinar que también se presenta ligada a glucosa por su C-3. El disacárido 3-O-β-D-glucopiranosil-D-fructosa (laminaribiulosa) que constituye la unidad estructural no se encontró descripto en la literatura por lo cual se encaró su síntesis y se analizaron los espectros de RMN-^{13}C de los intermediarios.

Por otra parte, dado que estaba descripta la actividad antitumor de glucanos de hongos con uniones $(1\rightarrow3)$ y $(1\rightarrow6)$ resultó de interés investigar si el polisacárido de *Cyttaria johowii* inhibía el crecimiento del Sarcoma 180 en ratones obteniendose resultados promisorios. Estos estudios se realizaron en colaboración con la Dra. Lía S. Rumi y la Lic. Norma A. Chasseing del Instituto de Biología y Medicina Experimental.

CAPITULO I

HONGOS DEL GENERO CYTTARIA. ESTUDIOS QUIMICOS REALIZADOS.

Los hongos del género *Cyttaria* son parásitos de varias especies de *Nothofagus*, en los cuales producen tumores característicos, que invaden el árbol pudiendo causar su muerte(Gamundi 1971). Esto hace que constituyan una grave amenaza para la supervivencia de nuestros bosques patagónicos. Es conocido que dentro de la clase a la cual pertenecen, Ascomycetes, se incluyen algunos de los hongos más destructores.

Las especies más abundantes de Cyttaria constituían un alimento preciado por los indígenas de nuestro país y Chile, quienes también los utilizaban para preparar una bebida alcohólica.

DISTRIBUCION GEOGRAFICA:

Se encuentran en los bosques extendidos en ambas laderas de los Andes desde aproximadamente 30°L.S. hasta el Cabo de Hornos, en la Argentina y Chile.(Fig. 1)

A pesar de no estar muy distribuidos en la naturaleza se los ha encontrado también en Australia, Nueva Zelandia y Tasmania.

Las especies sudamericanas descriptas son: *C. hookeri, C. harioti, C. darwini, C. exigua, C. espinosae, C. berteroi y C. johowii.*

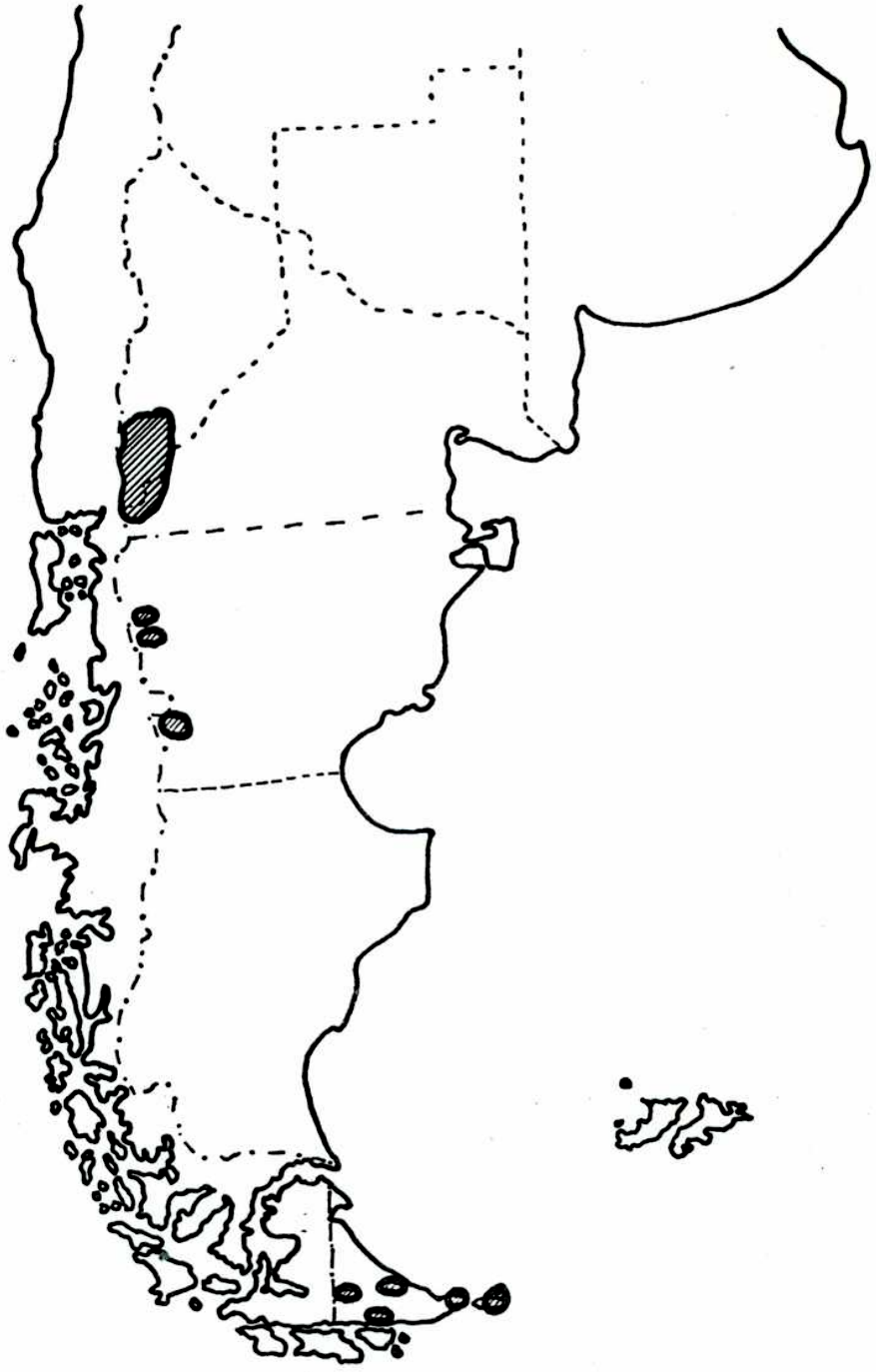
CYTTARIA JOHOWII

Su posición dentro de la clasificación sistemática es la siguiente:

CLASE : Ascomycetes.
SERIE : Discomycetes.
ORDEN : Cyttariales.
FAMILIA : Cyttariaceae.
GENERO : Cyttaria.
ESPECIE : *Cyttaria johowii.*

FIGURA 1

DISTRIBUCION GEOGRAFICA DE *Cyttaria johowii* EN LA REPUBLICA ARGENTINA.



Gamundi (1971) sugirió que *C. johowii y C. hookeri* podrían incluirse en un subgrupo dentro de las especies sudamericanas por la consistencia gomosa de sus estromas, diferente de la de *C. harioti, C. darwini, C. exigua, C.espinosae y C. berteroi.* Ambas especies podrían distinguirse entre sí por sus ciclos de vida. A este respecto los estudios químicos podrían aportar datos útiles para la taxonomía.

CARACTERISTICAS: presenta estromas moriformes y a veces napiformes, de color amarillo-anaranjado a ocre en fresco, y ocre ferruginoso a tostado muy oscuro en seco. Los estromas aparecen sobre las ramitas delgadas en 1-2 hileras longitudinales y en este estado son ovoides y lisos y miden 0,5-0,8 x 0,4-0,5 cm. A medida que crece, el estroma se va arrugando y adquiriendo la forma de una mora, con valéculas. Al poco tiempo de madurar caen al suelo dejando en las ramitas donde nacieron cicatrices en forma de cáliz. No se han observado tumores notables, pero sí una ligera hinchazón en la rama, en la zona donde estaban los estromas.

HOSPEDANTES: *Nothofagus dombeyi* (coihue) .
Nothofagus betuloides (guindo).

ESTUDIOS QUIMICOS REALIZADOS SOBRE HONGOS DEL GENERO CYTTARIA:

Hasta el momento, *Cyttaria harioti* Fischer era la única especie de la familia sobre la que existían estudios químicos. Wiernik (1962) estudió por primera vez la composición química y obtuvo los resultados que se muestran en la Tabla 1.

Lederkremer y Ranalli (1967) estudiaron los azúcares simples y polioles presentes en el extracto acuoso de estromas de *Cyttaria harioti* Fischer. Los resultados expresados sobre material seco, se observan en la Tabla 2.

TABLA 1

COMPOSICION QUIMICA DE *Cyttaria harioti* Fischer

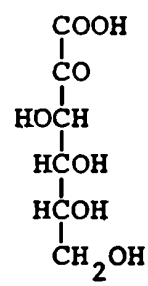
Extracto acuoso	33,40 %
Extracto alcohólico	9,40 %
Extracto etéreo	1,33 %
Humedad (Dean Stark)	16,20 %
Grasas (extracto etéreo)	1,33 %
Materias nitrogenadas (N x 5,7)	4,48 %
Cenizas (550 °)	1,53 %
Fibra cruda	14,70 %
Azúcares reductores	7,00 %
Azúcares invertibles	4,90 %
Hidratos de Carbono sacarificables	41,50 %

TABLA 2

COMPONENTE	PORCENTAJE
Glucosa	2,7
Fructosa	3,0
Sacarosa	4,5
Glicerol	3,7
D-arabinitol	1,3
D-manitol	0,3

La diferencia entre el valor de azúcares reductores encontrado por Wiernik (7 %) y el valor informado por Lederkremer y Ranalli (5,7 %) se debería a la presencia de otros azúcares reductores en el extracto acuoso, los cuales presentan por cromatografía en papel, movilidad menor que la sacarosa.

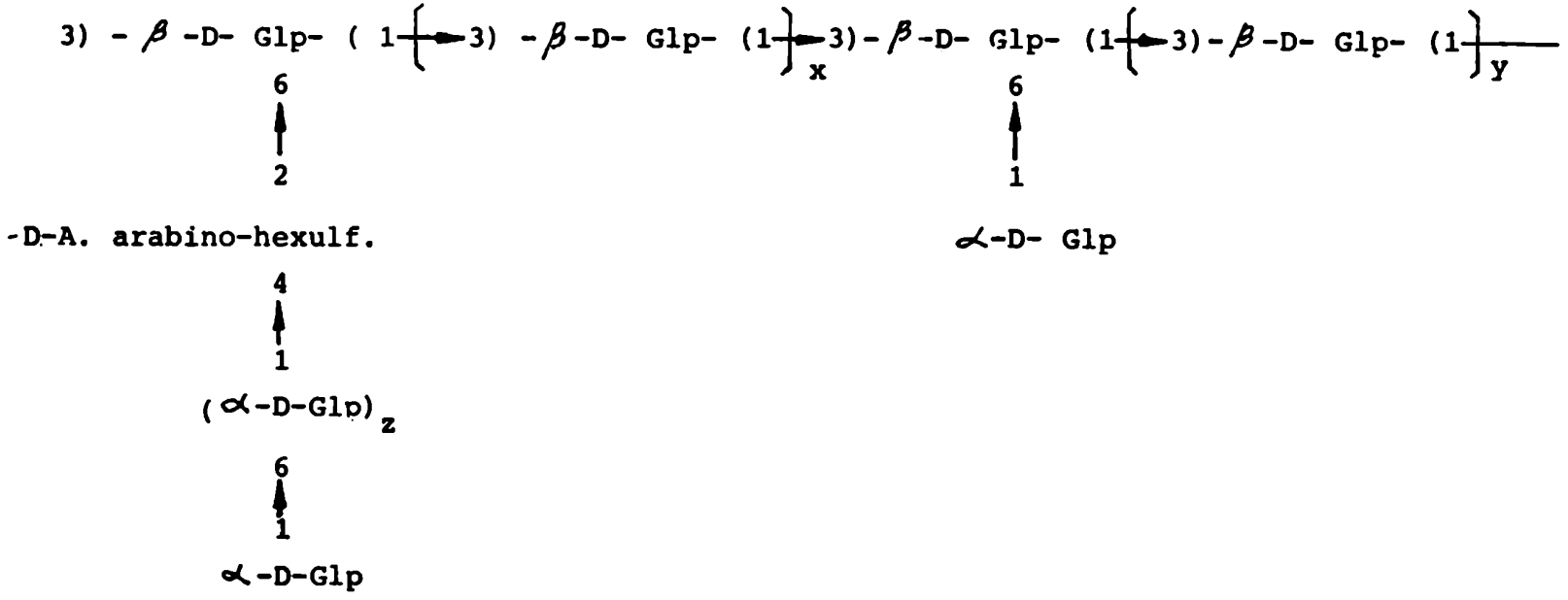
Del extracto acuoso se aisló un polisacárido por precipitación con etanol hasta una concentración del 50 % (Fernández Cirelli y Lederkremer 1971, 1972, 1974). Su poder rotatorio era + 95,8 (KOH 1 N). Los componentes encontrados eran D-glucosa, ácido D-arabino hexulosónico (I) y D-fructosa en una relación molar 98:6:1. El ácido D-arabino hexulosónico no había sido encontrado anteriormente en hongos.



Acido D-arabino hexulosónico (1)

FIGURA 2

UNIDAD REPETITIVA DE UN HETEROPOLISACARIDO DE *Cyttaria harioti* Fischer



De acuerdo con los estudios de oxidación con periodato, reducción e hidrólisis, confirmados por los estudios de metilación, se postuló una posible unidad repetitiva para el polisacárido (Fig. 2).

Posteriormente, Fernandez Cirelli y Lederkremer (1976) publicaron los estudios estructurales sobre un glucano obtenido por extracción alcalina de la misma especie. Su poder rotatorio es $[\alpha]_D^{20°}$ + 11 (KOH 1 N) y posee un esqueleto de β-D-glucosa con uniones (1→3) y ramificaciones en la posición 6.

Waksman (1977) describió también la identificación y determinación cuantitativa de α,α-D-trehalosa(2) y ácido D-arabino hexulosónico (1) en un extracto acuoso del hongo. La trehalosa fue caracterizada por sus propiedades químicas y por hidrólisis enzimática se calculó que su porcentaje en el hongo está entre 0,22 y 0,30 %.

Por otra parte, se determinó la estructura de un polisacárido soluble aislado por precipitación con etanol de un extracto acuoso de *Cyttaria harioti*, luego de separar el heteropolisacárido estudiado anteriormente (Waksman, Lederkremer y Cerezo 1977). El producto de $[\alpha]_D^{20}$ + 171 (H_2O) estaba formado por glucosa con uniones α-D-(1→4) y α-D-(1→6). Por hidrólisis enzimática se determinó que dicho polisacárido tenía una estructura similar al"pululano" aislado de *Pullularia pullulans* y de *Tremella mesentérica*, o sea que contenía una cadena principal constituída por residuos de maltotriosas unidas por el O- de C-6. (Fig. 3).

FIGURA 3

UNIDAD REPETITIVA DE UN POLISACARIDO DE *Cyttaria harioti* Fischer DE TIPO "PULLULANO".

$$\left\{6)\text{-}\alpha\text{-D-Glp-}(1\rightarrow4)\text{-}\alpha\text{-D-Glp-}(1\rightarrow4)\text{-}\alpha\text{-D-Glp-}(1-\right\}_n$$

INTRODUCCION:

Los polioles y la trehalosa han sido encontrados tan frecuentemente en hongos que deben ser considerados entre los hidratos de carbono solubles principales en basidiomicetes, ascomycetes y hongos imperfectos(Smith, Muscatine y Lewis 1969).

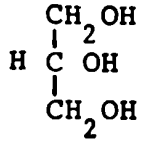
Su presencia en hongos ya fue establecida por Bourquelot y otros a principios de siglo (Cochrane 1958) . En un estudio posterior Bonnet (1959) examinó noventa y un especies de basidiomicetes y encontró que el manitol estaba presente en ochenta y seis y la trehalosa en ochenta y dos de ellas mientras que en ningún caso estuvieron ambos ausentes.

El D-manitol (10) aparece como el poliol más común en hongos aunque hay también gran número de referencias a la presencia de arabinitol (6,7). Por otra parte se han encontrado eritritol (4), D-treitol(5),xilitol(8),dulcitol (11) y sorbitol(9). Además se hallaron los heptitoles: D-glicero-D-mano-heptitol (12), meso-glicero-ido-heptitol (13) y D-glicero-D-ido-heptitol (14) (Onishi y Perri 1965).

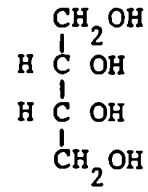
La cantidad de polioles que el hongo produce puede ser afectada por diversos factores. Aparte de las variaciones producidas por el cambio de nutrientes en el medio,las cantidades varían por ejemplo con el tiempo de crecimiento o durante la germinación en las esporas, (Strobel y Kosuge 1963, Quillet y Legrand 1952).

Se conoce poco todavía sobre los niveles de polioles en condiciones naturales, pero en algunos cultivos han sido confirmados valores superiores al 20%, sin considerar el manitol que a veces se encuentra en proporciones mayores. (Vinning y Taber 1964)

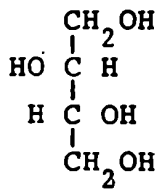
Los polioles pueden aparecer también en forma combinada de hongos, por ejemplo la Riboflavina (XIV) ,que es un derivado del ribitol es sintetizada por numerosos hongos; el glicerol, arabinitol y ribitol son componentes de fracciones lipídicas obtenidas de la levadura *Rhodotorula graminis*,y un ma-



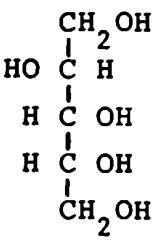
Glicerol
(3)



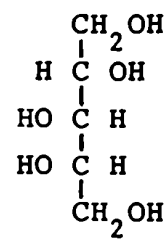
Eritritol
(4)



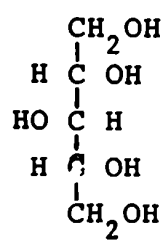
D-treitol
(5)



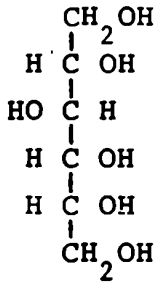
D-arabinitol
(6)



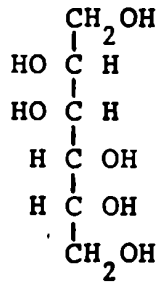
L-arabinitol
(7)



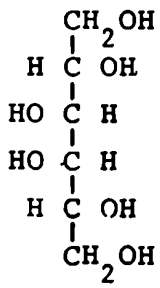
xilitol
(8)



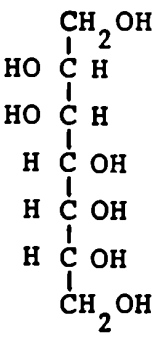
D-sorbitol
(9)



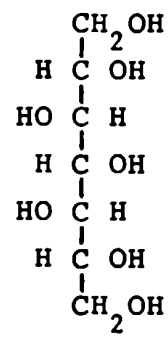
D-manitol
(10)



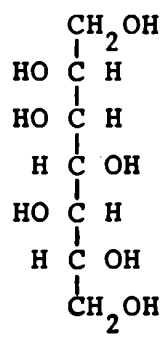
Galactitol
(11)



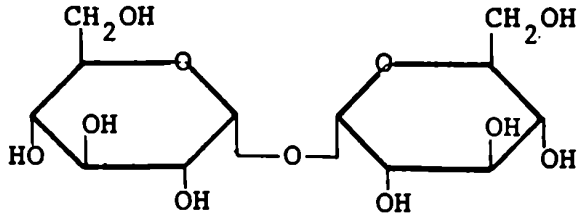
D-glicero-D-mano-heptitol (volemitol)
(12)



meso-glicero-ido-heptitol
(13)



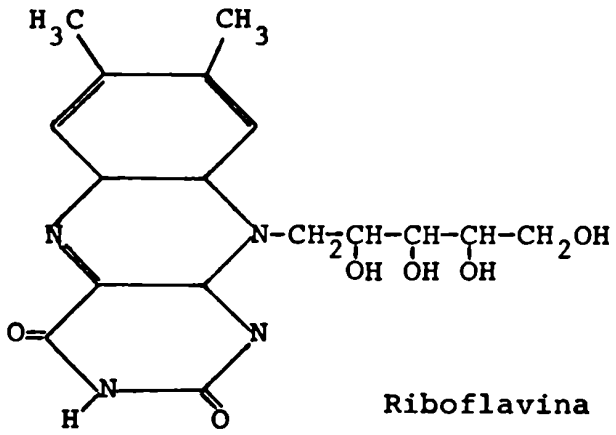
D-glicero-ido-heptitol
(14)



Trehalosa (2)

nósido de eritritol esterificado con ácidos grasos aparece en especies de *Ustilago* (Touster y Shaw 1962).

A pesar de que los polioles son componentes de los ácidos teicoicos de paredes celulares en bacterias Gram +, han sido raramente encontrados como componentes de polisacáridos estructurales o de reserva en hongos. Sin embargo Mahadevan y Tatum (1965) encontraron manitol en un polisacárido tipo laminarina de paredes celulares de Neurospora.



Riboflavina (15)

ROL FISIOLOGICO:

Es de importancia considerar el papel fisiológico de dichos compuestos, que los hongos son capaces de desarrollar en concentraciones tan altas.

Ha sido probado que los polioles tienen acción sobre el crecimiento de hongos de cultivo. El poliol más frecuentemente utilizado por los hongos es el manitol, aunque también muchos utilizan sorbitol y dulcitol. Algunos de los hongos que pueden usar dulcitol también pueden crecer en galactosa.

En especies de *Aspergillus*, en un medio de cultivo con glucosa y urea, se determinó que el 35 % del carbono de la glucosa se transformaba en manitol, junto con cantidades menores de glicerol (10%), eritritol (2,5%) y glucógeno (1%)(Lee 1967). Los polioles tendrían como funciones fisiológicas prioritarias

las de reserva, osmoregulación y protección de la actividad enzimática.

Existen muchas evidencias de que los polioles actúan como productos de reserva. En estudios realizados con *Claviceps purpurea* se encontró que solo la trehalosa y el D-manitol están invariablemente presentes entre los hidratos de carbono solubles del micelio, que varía de composición con cambios de los nutrientes en el medio de crecimiento y con la cepa usada. En algunos casos se encontró también glicerol, arabinitol, treitol, eritritol y xilitol. Estas investigaciones sugirieron que los polioles podrían servir como forma de acumulación del poder reductor. Wiming y Taber 1964).

Corina y Munday (1971) trataron de distinguir entre las funciones del manitol y del ribitol en *Aspergillus clavatus*. Encontraron que el manitol se acumula mientras que el hongo utiliza glucosa, y cuando ésta se ha metabolizado, utiliza manitol. De estudios con $^{3}H/^{14}C$ se concluyó que la función primaria del manitol sería la de ser un material de reserva en la preparación del hongo para la conidiación. En ausencia de conidiación en cultivos sumergidos, el manitol es utilizado como fuente de carbono, actuando como sustituto de la trehalosa. Por el contrario, el ribitol sería producido únicamente para intervenir en mecanismos aceptores de hidrógeno que ocurren durante la utilización de materiales de reserva como los ácidos grasos.

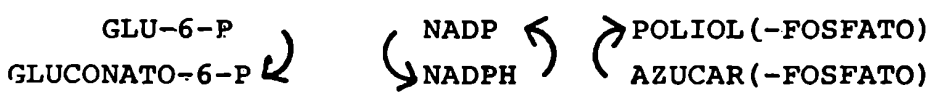
La trehalosa y el glucógeno también son considerados comunmente como hidratos de carbono de reserva en hongos y el manitol coexiste frecuentemente con dichos compuestos.

Hay evidencias de que en algunos hongos existen interrelaciones entre los niveles de polioles, trehalosa y glucógeno en el micelio; una caída en el nivel de unos de ellos puede ser acompañada por un crecimiento en otro. Cuando el *Claviceps purpurea* crece en un medio con glucosa y sales de amonio sin fuente de nitrógeno orgánico, hay mayor síntesis de trehalosa (14,7%) pero se produce un escaso porcentaje de polioles (1,5%). En cambio cuando la cepa crece en un medio con glucosa y nitrógeno

orgánico, la formación de trehalosa decrece a un 1% con una formación concomitante de cinco polioles totalizando un 10,8%. Una explicación posible sería que el poder reductor sería utilizado para la asimilación del amonio por el organismo vía glutámico-deshidrogenasa. Con nitrógeno orgánico, este paso no ocurriría y las coenzimas reducidas serían oxidadas por los azúcares con la producción consecuente de polioles. (Vinning y Taber 1964).

En esporas de *Schizophyllum commune* el 1-^{14}C-arabinitol se convirtió primariamente en trehalosa, mientras que esto no sucedió en el caso de utilizarse 1-^{14}C-manitol (Aitken y Niederpruem 1973). Holligan y Jennings (1972), encontraron que hongos que contienen manitol y arabinitol, acumulan arabinitol mientras que hongos que producen manitol y trehalosa, muestran niveles aumentados de trehalosa con el tiempo.

El papel de los polioles como reserva del poder reductor se postula debido a que son moléculas más reducidas que los azúcares y además su síntesis está acoplada a procesos de óxido-reducción de coenzimas. Para plantas no verdes es obviamente ventajoso tener poder reductor de reserva mientras que en plantas verdes, éste no es un requisito indispensables debido a la provisión regular por fotosíntesis de coenzimas reducidas. Así es posible que en hongos, la frecuente existencia de la vía pentosa-fosfato puede representar un mecanismo sustituto para la provisión del poder reductor con los polioles actuando como compuestos para su reserva, mediante cuplas como:



Estos sistemas también efectúan la regeneración de coenzimas oxidadas, permitiendo que continúe la oxidación de azúcares con la consecuente provisión de energía y crecimiento de las cadenas carbonadas. (Lewis y Smith 1967)

Otra forma en la cual los polioles tienen una función reguladora es a través de la actividad transhidrogenasa (Touster y Shaw 1962). La conversión de una aldosa a un poliol depende frecuentemente de una coenzima diferente de la conversión del mismo poliol a una cetosa. Un par de poliol deshidrogenasas pueden servir no sólo como control del mecanismo de niveles aldosa-cetosa sino también como un sistema "transhidrogenasa", un ejemplo de mecanismo "push-pull" (Davies 1961). Como el NADPH se usa generalmente para reacciones sintéticas y el NAD para las degradativas, el sistema puede servir como mecanismo de regulación entre ambos.

La regulación osmótica es un concepto más utilizado en fisiología de plantas y animales. Si una célula es sometida a una deficiencia de agua por exposición a una solución concentrada, ella podrá sufrir una pérdida de agua o usar energía para acumular un soluto o solutos hasta una concentración termodinámicamente comparable con la extracelular. El soluto puede ser un metabolito que se retiene o una sustancia extracelular que se acumula. La acumulación se realiza hasta que el agua penetra nuevamente en la célula. De esta forma los polioles pueden actuar como osmoreguladores (Brown 1978). El desarrollo de altas concentraciones de manitol, por ejemplo, puede servir para mantener presiones osmóticas altas en el micelio durante períodos de escasez de agua durante el desarrollo. En asociaciones simbióticas y parasitarias la rápida síntesis de manitol por un hongo a partir de los hidratos de carbono del hospedante puede ser importante para promover el flujo de hidratos de carbono dentro del micelio (Lewis y Smith 1967).

Jenning y Austin (1973) describieron también una relación entre los polioles y los polisacáridos en el hongo marino *Dendryphiella salina*. Encontraron un efecto estimulante por 3-O-metil-glucosa en la conversión de manitol y arabinitol en polisacáridos. El efecto de este azúcar no metabolizable sería el de reemplazar a los polioles en la función de regular la presión osmótica y prevenir la ruptura de las hifas o un cambio

en la estructura de éstas.

Brown y Simpson (1974) encontraron que la acumulación de polioles en levaduras está directamente relacionada con la concentración salina del medio de cultivo. La cantidad de arabinitol que se acumuló en una cepa luego de crecerla en un medio diluído fue del 10-14 % de la masa seca. Pero cuando la levadura se suspendió en buffer fosfato 0,05 M, eliminaba arabinitol a una velocidad de 2,8 umol/min por gramo de peso seco.

INTERMEDIARIOS METABOLICOS Y ENZIMOLOGIA

En la mayoría de los organismos vivos se asume generalmente que la primera etapa metabólica de los polioles es la oxidación directa a azúcares, aunque puede ocurrir previamente la fosforilación del poliol para pasar a un azúcar fosfato. Por otra parte se postula que los polioles se producen por reducción directa de azúcares o de azúcares-fosfato.

Han sido aisladas de distintos hongos las enzimas que catalizan interconversiones de polioles y azúcares. En el caso de los hexitoles ambos sistemas óxido-reducción poliol-azúcar y poliol-fosfato - azúcar-fosfato son conocidos, mientras que para los pentitoles sólo se conocen sistemas de interconversión poliol-azúcar. Por ejemplo:

$$\text{FRUCTOSA} + \text{NADH} \xleftarrow{\text{Manitol dehidrogenasa}} \text{MANITOL} + \text{NAD} \qquad (1\text{-a})$$

$$\text{FRUCTOSA} + \text{NADPH} \xleftarrow{\text{manitol dehidrogenasa}} \text{MANITOL} + \text{NADP} \qquad (1\text{-b})$$

$$\text{FRUCTOSA-6-P} + \text{NADPH} \xleftarrow{\text{manitol-1-P dehidrogenasa}} \text{MANITOL-1-P} + \text{NADP} \qquad (2\text{-a})$$

$$\text{FRUCTOSA-6-P} + \text{NADH} \xleftarrow{\text{manitol-1-P dehidrogenasa}} \text{MANITOL-1-P} + \text{NAD} \qquad (2\text{-b})$$

$$\text{MANITOL-1-P} + H_2O \xrightarrow{\text{manitol-1 fosfatasa}} \text{MANITOL} + H_3PO_4 \qquad (3)$$

$$\text{MANITOL} + \text{fosfoenolpiruvato} \xrightarrow{\text{manitol(PEP) fosfotransferasa}} \text{MANITOL-1-P} + \text{PIRUVATO} \qquad (4)$$

$$\text{MANITOL} + \text{acetilfosfato} \xrightarrow{\text{manitol-acetil-P fosfotransferasa}} \text{MANITOL-1-P} + \text{ACETATO} \qquad (5)$$

$$\text{MANITOL} + \text{ATP} \xrightarrow{\text{manitol kinasa}} \text{MANITOL-1-P} + \text{ADP} \qquad (6)$$

Las reacciones enzimáticas indicadas en las ecuaciones 1-a,b y 2-a,b son reversibles in vitro, y estarían involucradas en el catabolismo del manitol. Sin embargo para que las reacciones 2-a,b ocurran, el manitol libre deberá fosforilarse primero por PEP (eq. 4) (Leighton, Stock y Kelln 1970), acetilfosfato (eq. 5) (Lee 1967)O ATP (eq. 6) (Leighton, Stock y Kelln 1970) Además también pueden existir las enzimas manitol deshidrogenasa (1) y manitol-1-P-deshidrogenasa (eq.2) como enzimas unidas a NAD y a NADP al mismo tiempo en la célula.

La trehalosa (XIII),α ,α-diglucósido, es el disacárido de mayor distribución en hongos, y se ha encontrado junto con los polioles desde los primeros estudios de Bourquelot en el siglo pasado. Cabib y Leloir (1958) demostraron que el mecanismo de la biosíntesis de trehalosa en levadura de cerveza ocurre vía un nucleótido-azúcar en un proceso:

$$\text{UDP-GLUCOSA} + \text{D-GLUCOSA-6-P} \xrightarrow[\text{sintetasa}]{\text{Trehalosa-P}} \text{UDP} + \text{TREHALOSA-6-P}$$

$$\text{TREHALOSA-6-P} + H_2O \longrightarrow \text{TREHALOSA} + H_3PO_4$$

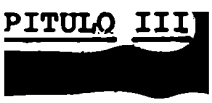
Panek (1962) informó el mismo mecanismo en levadura de panadería. El catabolismo de la trehalosa se efectúa por acción de una sóla enzima, la trehalasa (α,α-trehalosa-1-Dglucohidrolasa). Esta enzima fue encontrada en una variedad de organismos diferentes, incluyendo algunos que no utilizan ni almacenan trehalosa.

$$\text{TREHALOSA} \xrightarrow{\text{Trehalasa}} 2\text{-D-GLUCOSA}$$

Sussman (1966) estudió el papel de la trehalosa en Neurospora y encontró que los conidios contienen 5-10 % de trehalosa que es consumida rápidamente durante la germinación. Luego hay una resíntesis del disacárido por el micelio, llegando a niveles de 2-4 % cuando comienza la formación de conidios. En

mutantes sin conidios, la trehalosa se acumula hasta que el crecimiento cesa, Sussman por lo tanto sugirió que la trehalosa sería usada tanto para la formación de conidios como para la germinación.

CAPITULO III



GLUCANOS EN

INTRODUCCION:

Es muy conocida la presencia de β-glucanos en hongos y por lo tanto existen numerosos estudios de sus estructuras. En este capítulo mencionaremos las publicaciones de los últimos años sobre el tema y los trabajos anteriores se encuentran mencionados en una recopilación de Gorin y Spencer (1968).

β-(1→4) GLUCANOS.

Existen pocas referencias de la presencia de celulosa en paredes celulares de hongos. Matsuda y col.(1976) hallaron en un homogenato de *Phaseolus aureus* una pequeña cantidad de un β-(1→4) glucano citoplasmático que podría preceder la síntesis de celulosa en la pared celular.

Más recientemente, en hifas de *Leptomitus lacteus* se encontró de tipo Celulosa I,de relativamente baja cristalinidad, constituyendo aproximadamente el 6,2-7,5% del peso(Aronson y Lin 1978).

β-(1→3) GLUCANOS.

El"pachimano", glucano extraído de *Poria cocos* ha sido objeto de estudio por varios autores, quienes le atribuyeron la estructura de un glucano lineal con uniones β-D-(1→3) (Earl, Mc Gregor 1934;Warsi y Whelan 1957). Hoffman y col. en 1971 revisaron la estructura y demostraron que en realidad tiene 300 uniones β-(1→3) con tres o seis puntos de ramificación(posiblemente en C-2) y algunas uniones internas (1→6).

Análisis de la composición de paredes de hifas de *Ceratocistis ulmi*, mostraron una alta concentración de hidratos de carbono. Por hidrólisis enzimáticas con celulasa y laminarasa se detectó la presencia de glucanos con uniones β-(1→3) y α-(1→4). (Harris y Taber 1973).

Glucanos con uniones β-(1→3) fueron identificados en

Cladosporium herbarum (Miyasaki y Naoi 1974), *Armillaria mellea* (Jelsma 1975), *Penicillium Charlesii* NRRL-1887, (Bulman 1976), *Sacharomyces cerevisiae* (Kreger 1976) y *Polyporus tumulosus* (Angyal 1974), utilizando técnicas como oxidación con periodato metilación, microscopía electrónica y difracción de rayos X.

Microfibrillas de un β-D-(1→3)-glucano lineal fueron sintetizadas *in vitro* en extractos libres de células de *P. cinnamoni* que contenían un alto nivel de β-(1→3)-D-glucan-sintasa y un bajo nivel de proteasa. Sin embargo las microfibrillas no resultaron del mismo tipo que las encontradas en las paredes de las células originales en las cuales el glucano microfibrilar principal contiene uniones β-(1→3) y β-(1→6) (Wang y col. 1976)

El análisis por metilación y espectroscopía de ^{13}C-NMR indicaron que un β-D-glucano de *Pleurotus ostreatus* está formado por una cadena con uniones β(1→3) con algunos residuos α(1→4). (Saito 1976) La conformación más probable de este β-D-glucano sería la de una hélice de muchas cadenas.

De células de *New Dawn Rosa* cultivadas *in vitro* en un medio de agar fue aislado un glucano unido a hemicelulosa y caracterizado por electroforesis, hidrólisis, permetilación y espectroscopía RMN. El polisacárido es neutro, lineal y está formado por unidades de D-glucosa unidas en 1→3 con un grado de polimerización de aproximadamente 120. Las condiciones de extracción de este polisacárido sugirieron que estaría fuertemente unido a celulosa microfibrilar y lignina en las paredes celulares de aquellas células en las cuales el grado de maduración es muy avanzado (Mollard y col. 1976)

Kreger y Kopecka (1978) encontraron que durante la primera etapa de la regeneración de la pared en *Schizosaccharomyces pombe* la red de microfibrillas formada contenía un glucano con uniones β-(1→3) al igual que la red formada en *Saccharomyces cerevisiae* en las mismas condiciones. Durante la regeneración de la pared, la síntesis de este β-glucano precedería la formación de un α(1→3) glucano.

GLUCANOS CON UNIONES β-D-(1→3) y β-D-(1→6)

El "glucano de levaduras" constituye una estructura continua en las paredes celulares de *Saccharomyces cerevisiae* (levadura de panadería). Durante años existieron controversias sobre la estructura de este glucano, pero recién en 1969, Bacon y col. observaron que en realidad el "glucano de levaduras" era una mezcla heterogénea de por lo menos dos polisacáridos y caracterizó uno de ellos como un glucano con uniones β-D-(1→6) que podía solubilizarse con ácido acético. Manners y col. en 1973 estudiaron la estructura de estos dos polisacáridos. Concluyeron que el principal componente presente era un glucano de PM $2,4 \times 10^5$ con uniones β-D-(1→3) y 3% de ramificaciones β-D-(1→6). El segundo polisacárido que presentaba un -32 y grado de polimerización de 130-140, era un glucano β(1→6) altamente ramificado.

Maret en 1972 estudió la composición química de las paredes celulares de hifas de ascomycete *Chaetonium globosum* y encontró que están compuestas de quitina, un glucano con uniones β-(1→3) y β-(1→6), proteínas y lípidos.

Por oxidación con periodato y degradaciones enzimática se demostró que los glucanos insolubles en agua obtenidos de *Kloeckera apiculata*, (Manners 1974), *Schizosacharomyces pombe*, *Saccharomyces fragilis y Saccharomyces fermentati*, contienen estructuras ramificadas con uniones β(1→3) y β-(1→6) (Manners y Meyer 1977)

Estudios químicos revelaron que un polisacárido soluble en álcali extraído de *Coprinus Lagopus*, es un β-D-glucano conteniendo uniones (1→3) y alrededor de 14% de uniones (1→6). La degradación de Smith dió como productos laminaribiosa y genciobiosa, sugiriendo que las ramificaciones serían en general más largas que un solo residuo D-glucopiranósico. (Schaefer 1977).

El polisacárido soluble en agua de *Lamteromyces japonicus* ha sido identificado como un β-D-glucano con una cadena central de uniones (1→3) y ramificaciones en O-6 formadas por grupos

genciobiósidos (Fufuda 1978).Aronson y Lin (1978) comprobaron la presencia de un glucano de características similares en la pared de hifas de *Leptomitus lacteus* constituyendo un 74% de la pared. Celulosa y quitina también estaban presentes en proporciones menores (7 y 14,5%) respectivamente.

De *Botrytis cinerea* se extrajo un polisacárido cuya función es la de un material de reserva cuando el hongo es cultivado en un medio deficiente en hexosas (Montant y col.1977).Estudios químicos realizados sobre el polisacárido indicaron que estaría formado por una cadena central de residuos glucosídicos con uniones β (1→3) y un gran número de ramificaciones C-6(Dubourdeau 1978). La hidrólisis del polisacárido con una exo-(1→3)-D-glucanasa dió glucosa y genciobiosa.

Hay también algunas referencias a β-(1→3) glucanos con ramificaciones en C-6 extracelulares.

La oxidación con periodato, la degradación de Smith e hidrólisis enzimáticas han indicado que un polisacárido extracelular de *Monilinea fructigena* tiene un PM de 7×10^4 y está formado por una cadena central de residuos β-D-glucosídicos con uniones (1→3) y cadenas laterales de un sólo grupo D-glucosídicon unión (1→6), cada dos glucosas de la cadena central. Por otra parte, del mismo hongo, pero cultivado en otro medio, ha sido aislado también un glucano extracelular polidisperso (PM 5×10^3-8×10^4). En este glucano predominan las uniones (1→4) ya que ha resultado susceptible a la acción de una α-D-(1→4)-glucanasa. (Santamaría y col. 1978)

De la fracción insoluble en álcali de las paredes celulares de *Coprinus macrorhizus* microsporus se aisló un glucano altamente ramificado con uniones α(1→4), β (1→6) y β (1→3). Los segmentos unidos α(1→4) se encontrarían entre uniones β(1→3) como lo sugirió la identificación de 2-O-β-glucopiranosil eritritol en el glucano oxidado con IO_4^-, reducido e hidrolizado. Hidrólisis del glucano permetilado dió cantidades equimoleculares de 2,4 di y 2,3, di-O-metilglucosas. El análisis por metilación

de la cadena central, obtenida de una hidrólisis enzimática, indicó la presencia de residuos de glucosas unidas (1→3) con ramificaciones en O-4 y O-6 (Bottom y col. 1980).

Las conformaciones más probables de los β(1→3) glucanos han sido determinadas por cálculos de diagramas de energía (Rees y Scott 1969) y consideraciones de uniones hidrógeno intramoleculares entre los residuos contíguos (Sathyanarayama y Rao 1971; Sundaralingam 1968). Los resultados indican que la conformación más probable para los ∝(1→3) glucanos sería la se hélices extendidas (Bluhm y Sarko 1977). Fig.4

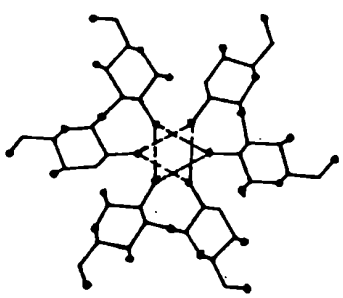
GLUCANOS CON UNIONES β-D-(1→6).

Hay pocos datos de este tipo de glucanos en la literatura. Hemos visto que en el "glucano de levadura", el componente que está en menor proporción es un glucano β-D-(1→6) (Manners

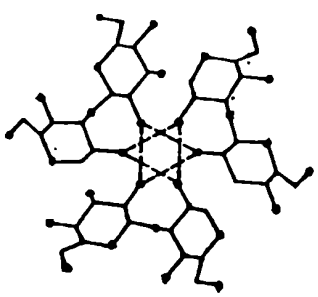
Otro glucano de este tipo descripto en la literatura es el "pustulano" aislado de *Umbilicaria pustulata* (Hellerquist 1968) en el que se determinó que sí existe otro tipo de unión glucosídica correspondería a menos del 1 %. Un glucano similar se aisló de paredes de la forma levadura de *Verticillium alboaum* (Wang 1970).

FIGURA 4

PROYECCION EN EL PLANO X-Y DE LOS PRIMEROS DOS RESIDUOS DE CADA CADENA DE UNA TRIPLE HELICE IZQUIERDA Y DERECHA.



β-(1→3) glucano
hélice izquierda.



β-(1→3) glucano
hélice derecha.

El interés por la acción antitumor de ciertos polisacáridos en hongos (Kanasuka y col. 1968; Ikekawa y col. 1969; Chihara y col. 1969,1970; Singh y col. 1974; Miyasaki y col. 1981; Ueno y col. 1982) se explica por el hecho de ser sustancias no citotóxicas que producirían, por efecto indirecto mediado por el huésped, la inhibición del crecimiento de tumores.

En contraposición los agentes quimioterapéuticos actúan por su acción citocida que se extiende también a las células del huésped. Los primeros ensayos se realizaron con extractos crudos de varias especies de Basidiomycetes (Kamasuka y col. 1968; Chihara y col 1969, 1970) y se encontró un efecto inhibitorio del crecimiento de Sarcoma 180 en ratones.

Investigadores japoneses encuentran actividad antitumor en extractos acuosos de hongos comestibles y la atribuyen a polisacáridos. Más tarde se encontró que uno de los más efectivos es el "lentinano", un $\beta(1\rightarrow3)$-D-glucano aislado de *Lentinus edodes* (Ikekawa y col 1969, Chihara y col 1969,1970; Sasaki y col. 1976)

Un glucano aislado de *Crepidotus*(Nakayoshi y col 1968) producía inhibición en tumores sólidos en ratones con una dosis de 1 mg/kg, indistintamente si se administraba 7 días antes o 7 días después de la implantación del tumor. Este resultado apoyaría la teoría de un efecto mediado por el huésped. En relación con esto puede señalarse que Schmid y col.(1963) encontraron que el pretratamiento de los animales con la mayoría de los agentes carcinostáticos citotóxicos aumentan el crecimiento de los tumores implantados subsecuentemente.

Los polisacáridos extraídos de *Pullularia*, también mostraron actividad contra el tumor sólido de Erlich (Bulanov 1965, 1966).

La acción inhibitoria se encontró principalmente en $\beta(1\rightarrow3)$ glucanos con ramificaciones $\beta(1\rightarrow6)$. Así el "schizophilano", obtenido de *Schizophyllum commune* (Komatsu y col. 1969) presentó una actividad antitumor excepcionalmente alta contra Sarcoma 180. Dicho polisacárido tiene una estructura de $\beta(1\rightarrow3)$ glucano con grupos β-D-glucopiranósidos unidos $(1\rightarrow6)$ cada 3 ó 4

unidades de la cadena principal. Este tipo de estructuras ramificadas las presentan también el "zimosano" de *Saccharomyces cerevisiae* (Bradner, Clarke y Stock 1958), el "scleroglucano" de*Sclerotium glucanicum* (Singh, Whistler y col. 1974; Smith y col. 1963), el "sclerotinano"de *Sclerotinia sclerotiorum* (Sakay y col. 1968)y los polisacáridos extraídos de *Auricula judae, Auricula politrichia* (Misaki y col. 1981), *Coriolus versicolor* (Sukagoshi y col.1974, Susumu y col. 1976)*y Grifora umbellata)*(Miyasaki y col. 1978, 1979; Ueno y col. 1982).En la tabla 3 se puede observar la actividad antitumor de algunos glucanos contra Sarcoma 180.

El "schizophilano" mostró alta actividad cuando se administraba por vía intraperitoneal o endovenoso, pero resultó muy poco activo por vía subcutánea. Este polisacárido mostró efectos interesantes en la sobrevida de los ratones implantados con Sarcoma 180, por vía intraperitoneal. Mientras un tratamiento previo de los ratones con el polisacárido no tuvo efecto, cuando se inyectaba antes y después de la implantación del tumor o sólo por tratamiento posterior se obtenía una sobrevida de 57 y 43% respectivamente.

ESTRUCTURA Y ACTIVIDAD ANTITUMOR

Se ha tratado de relacionar la actividad antitumor de los polisacáridos con su composición, el tipo de unión entre las unidades y la estructura secundaria que puede adoptar. En general, los D-glucanos solubles son agentes activos, particularmente si presentan ramificaciones cortas y no son rápidamente hidrolizados por D-glucanasa. Por ejemplo, el glucógeno, el almidón y la dextrinas son inactivos. El "nigerano" de *Aspergillus japónica* es también inactivo, posiblemente por que es un β-glucano lineal cuyas uniones son (1→3) y (1→4) alternadas, con algunas regiones de uniones (1→4) adyacentes que permitirían la ruptura por amilasas.

En general, los β-D-(1→3) glucanos, y β-D-glucanos

TABLA III.

GLUCANO	ORIGEN	UNIONES	DOSIS	FORMA DE INYECCION	REGRESION COMPLETA	% INHIBICION
" Lentinano"	Lentinus edodes	β-D-(1→3) y β-D-(1→6).	25 x 10	i.p.	2/9	73.0
			5 x 10	i.p.	7/10	97.0
			1 x 10	i.p.	6/10	95.0
			0,2 x 10	i.p.	6/10	78.0
"Schizophyllano"	Schizophyllum commune	β-D-(1→3) y β-D-(1→6).	5 x 10	i.p.	4/10	89.0
			1 x 10	i.p.	7/10	81.0
			0,5 x 10	i.p.	7/10	82.0
			5 x 4	i.v.	5/10	100
			1 x 4	i.v.	4/10	96.0
			10 x 10	s.c.	4/10	82.0
			1 x 10	s.c.	0/10	82.0
"Pachimarano"	Pachimano de Poria cocos	β-D-(1→3)	5 x 10	i.p.	4/9	96.0
"Scleroglucano"	Sclerotium glucanicum	β-D-(1→3)	50 x 10	i.p.	2/10	41.2
			5 x 10	i.p.	5/10	88.2
			0,5 x 10	i.p.	7/10	91.6
Fracción LC-1	Lentinus edodes	β-D-(1→4) y β-D-(1→6)	30 x 10	i.p.	8/9	96.5
			15 x 10	i.p.	10/10	100
			5 x 10	i.p.	8/10	99.0
G-U-2	Grifora Umbellata	β-D-(1→3) y β-D-(1→6).	1 x 10	i.p.	7/10	70.0
G-U-3	Grifora Umbellata	β-D-(1→3) y β-D-(1→6).	1 x 10		9/10	90.0
	Auricula judae	β-D-(1→3) y β-D-(1→6).			3/4	96.6

que tienen preponderancia de uniones (1→3) en la cadena principal, son activos. Se encontró que los β-D-glucanos que contienen principalmente uniones (1→6) son menos activos.

El "pachimano" extraído de *Poria cocos*, resultó inactivo, mientras que el "pachimarano", obtenido por oxidación con IO_4^- seguida de hidrólisis suave del "pachimano", presentó una actividad muy alta (Chihara y col. 1970). La O-carboximetilación del "pachimarano" dió también un derivado muy activo. El efecto antitumor del "carboximetilpachimarano" administrado por cualquiera de las vías excepto por vía oral, fue notable ya que los tumores sufrieron regresión completa en la mayoría de los ratones. La mayor actividad de estos polisacáridos modificados podría atribuirse a la mayor solubilidad de los mismos con respecto al "pachimano" de partida, sin embargo hay datos contradictorios respecto de la relación entre solubilidad y acción antitumor.

Como el "pachimarano" es un β-D-glucano lineal con uniones (1→3), también se podría pensar que habría una relación entre la actividad antitumor y la linealidad de glucanos de este tipo. Si fuera este el caso, la eliminación de las ramificaciones del "scleroglucano" tendría que dar un glucano β-D-(1→3) más activo. Sin embargo la eliminación de las ramificaciones del "scleroglucano" por oxidación con IO_4^- y posterior degradación por el método de Smith dió un glucano inactivo. Esto indica que la linealidad tampoco sería el único factor responsable de la actividad.

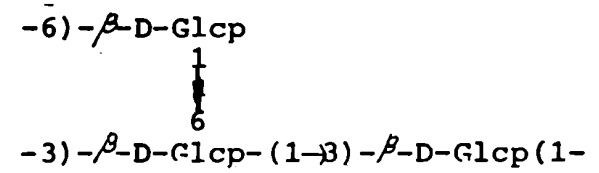
Otros autores encontraron que la actividad antitumor estaría asociada a la longitud de las ramificaciones β(1→6) unidas a la cadena principal y también a la presencia de uniones α(1→4). Esto fue observado en el caso de GU-2 de *Grifora umbellata*el cual por tratamiento con (1→6)-β-D-glucanasa dió un producto más activo que el original, mientras que el tratamiento con α-amilasa , resultó menos activo.

Por otra parte, debe observarse que en el efecto antitumor de los β-D-(1→3)glucanos influye la configuración de

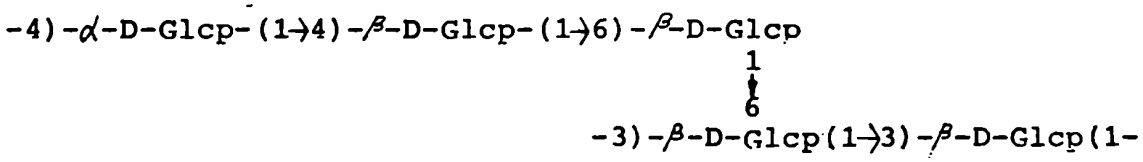
los residuos D-glucosídicos, que darían una conformación helicoidal a la cadena, aparentemente esencial, en la inhibición del Sarcoma 180(Misaki y col 1981). El análisis por Rayos X y estudios de viscosidad en el "lentinano", "schizophilano" y "curdlano", indican que éstos estarían formados por hélices de tres cadenas con uniones puente hidrógeno entre los residuos D-glucosídicos de las cadenas (1→3) (Bluhm y col 1977, Norisuye y col. 1980), mientras que los glucanos con uniones α(1→3) adoptarían una conformación de cadena única tipo "cinta" extendida(Sathyanarama y col. 1972; Ogawa y col. 1980).

De los resultados obtenidos se podría concluir que la presencia del trisacárido A (Fig. 5) es de gran importancia para la actividad antitumor. Aunque la unidad B también podría asociarse a la actividad.

FIGURA 5



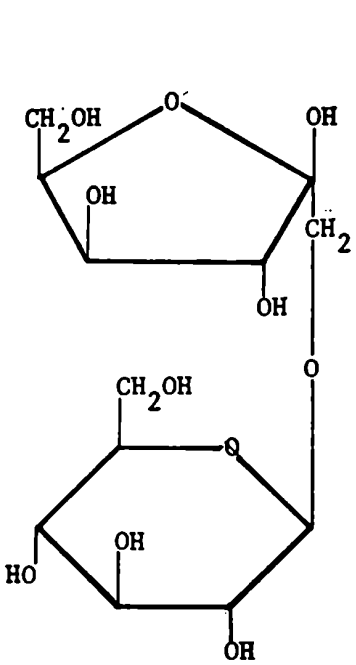
A



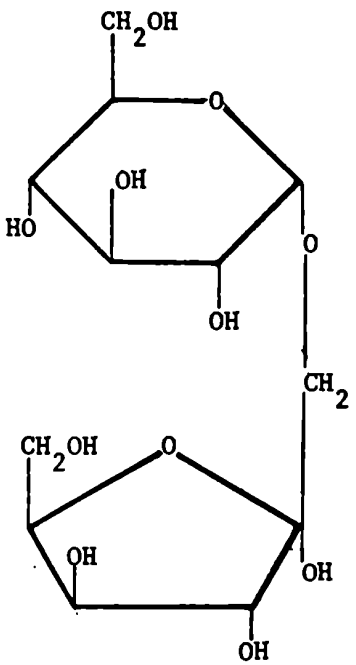
B

Además, el grado de actividad antitumor depende de varios factores como el tipo de unión, longitud de cadena, frecuencia de las ramificaciones, tamaño molecular y conformación. Por otra parte, la especie de animales, la dosis y la vía de administración puede afectar en gran medida los resultados.

1-O-β-D-GLUCOPIRANOSIL-D-FRUCTOSA y 1-O-α-D-GLUCOPIRANOSIL-D-FRUCTOSA. (16; 17)



16



17

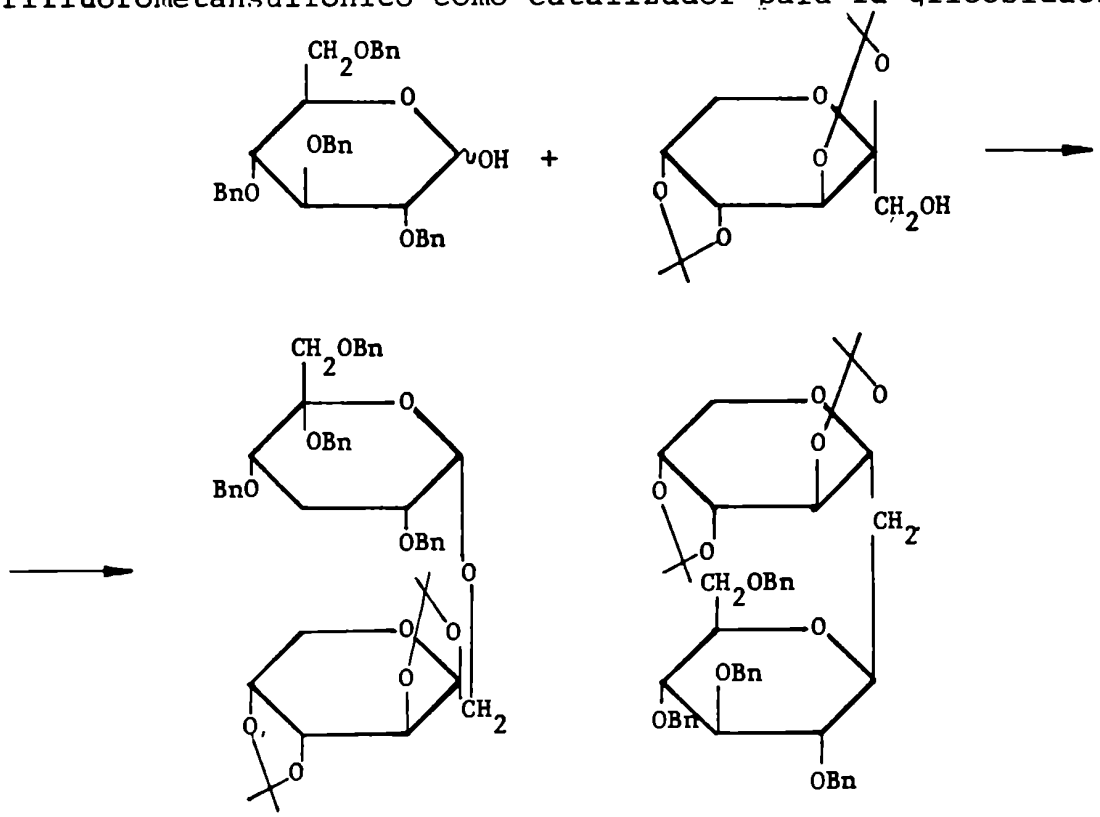
El disacárido 16 fue sintetizado por primera vez por Pacsu y col. en 1939 con el fin de determinar exactamente la unión en la turanosa (18) que estaba en discusión.

La síntesis fue realizada a partir de 2,3:4,5-di-O-isopropiliden-β-D-fructopiranosa y acetobromoglucosa (33) en presencia de óxido de plata como catalizador, utilizando Drierite como desecante y cloroformo como solvente. La desacetilación llevada a cabo con metóxido de sodio en metanol llevó al 1-O-β-D-glucopiranosil-2,3:4,5-di-O-isopropiliden-β-D-fructopiranosa que por hidrólisis con ácido acético 5 % dió el disacárido libre en forma de dihidrato de p.f.132-135° y $[\alpha]_D^{20}$ -59,2°(H_2O).

Avigad (1959) detectó por primera vez la 1-O-α-D-glucopiranosil-D-fructosa, junto con maltulosa (19) en la mezcla de

reacción de un ∝-glucósido (sacarosa, metil-∝-glucósido o maltosa) con ∝-glucosidasa, separándola luego por columna de celulosa como un jarabe que no pudo cristalizar.

Más recientemente, Pavía y Rochenville (1980) obtuvieron la 2,3:4,5-di-O-isopropiliden-1-O-(2,3,4,6-tetra -O-bencil-D-glucopiranosil)β-D-fructopiranosa a partir de 2,3,4,6-tetra--O-bencil-D-glucosa y 2,3:4,5-di-O-isopropiliden-β-D-fructopinosa, como una mezcla de anómeros ∝ y β, con un rendimiento global del 79 %. Estos fueron separados por cromatografía en columna de sílice con rendimientos respectivos de 50 y 10 % (Fig.6) En la reacción se utilizó diclometano como solvente y anhídrido trifluorometansulfónico como catalizador para la glicosidación.



Bn = bencil

FIGURA 6.

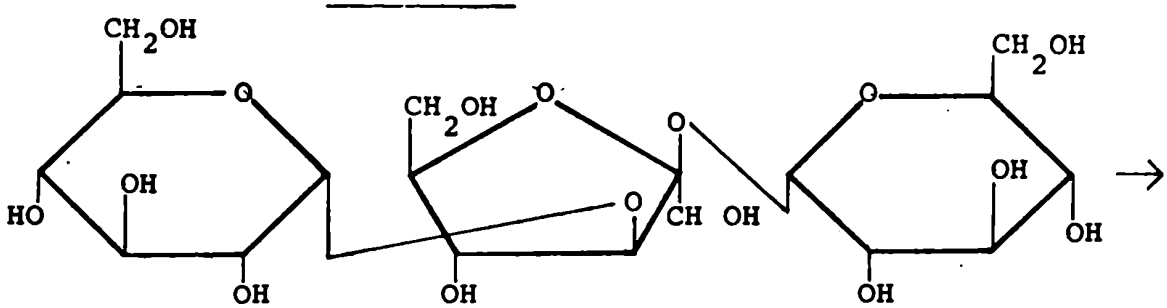
El disacárido 17 fue aislado además de un medio de cultivo de *Erwinia carotovora atroséptica* conteniendo 2-4 % de sacarosa (Lund y Wyatt 1973).

3-O-α-D-DLUCOPIRANOSIL-D-FRUCTOSA. (Turanosa) (18)

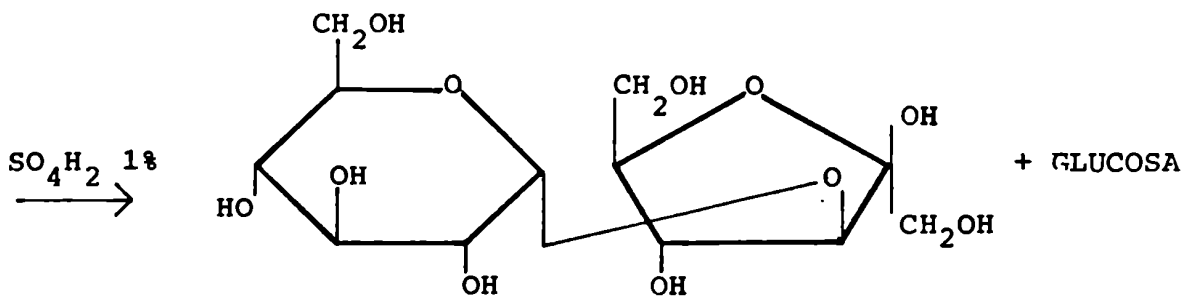
La turanosa fue aislada por primera vez por hidrólisis de melezitosa (Alekhine 1886,1889) (Fig. 7). Fisher en 1894 obtuvo la fenilosazona cristalina del disacárido. La cristalización de la turanosa fue publicada por primera vez por Pacsu en 1918 y fueron Kulin y Von Grundherr (1926) quienes confirmaron la presencia de una cetosa en la molécula. Fueron necesarios estudios de metilación para concluir su estructura (Pacsu 1932, 1937 y Hudson 1946).

Más recientemente se ha encontrado turanosa (18) en nectar de insectos (Basden 1972), en nectar de *Cinara laricis* (Marletto y col. 1979), *Tberolachtus salignus* (Marletto y col. 1979). No se ha obtenido el disacárido por síntesis.

FIGURA 7



MELEZITOSA



TURANOSA (18)

4-O-α-D-GLUCOPIRANOSIL-D-FRUCTOSA (Maltulosa) (19)

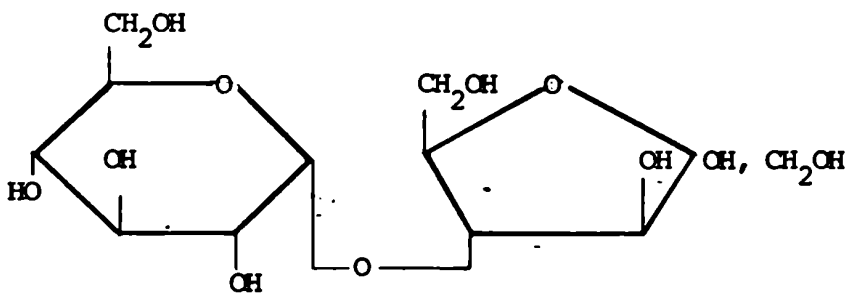
La maltulosa no está aparentemente muy distribuida en la naturaleza. Se ha descripto su presencia en miel (White y Hobau 1959) la cual puede atribuirse a epimerización de maltosa (29) (Mac William y Phillips 1959; Hough y Jones 1953; Corbett y Kenner 1954) o a una transglucosidación durante la hidrólisis de sacarosa por D-glucosidasas provenientes por ejemplo de levaduras (Avigad 1959).

La maltulosa (19) también ha sido detectada en hidrolizados de almidón de maíz y en hidrolizados α-amilolíticos de glucógenos de hígado de conejo (Radomsti y Smith 1962, Peats Roberts y Whelan 1952).

Taeufel y col (1967) detectaron este azúcar en incubaciones de mucosa de intestinos de ratas y conejos con sacarosa. Posteriormente, maltulosa (19), turanosa (18) y 1-β-D-glucopiranosil-D-fructosa (16) fueron aislados de incubaciones de α-fenil-glucósido y D-fructosa con α-glucosidasa de levadura de cerveza (Chiba y Shimomura 1971).

Más recientemente, este azúcar fue obtenido con un rendimiento del 70 % por isomerización de maltosa en soluciones de aluminato de sodio (Rendleman y Hodge 1979).

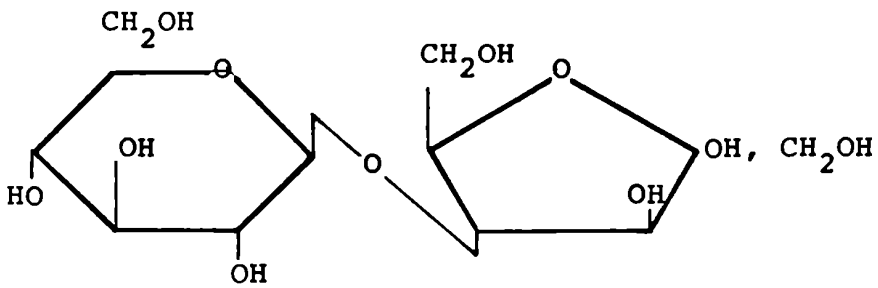
Un estudio sobre maltulosa permitió determinar que un jarabe conteniendo 60 % de maltulosa y 20-40 % de glucosa y fructosa puede ser utilizado como endulzante en comidas ya que posee un poder endulzante comparable el de la sacarosa (Raoult 1979).



MALTULOSA (19)

4-O-β-D-GLUCOPIRANOSIL-D-FRUCTOSA (Celobiulosa) 20

Corbett y Kenner en 1955 estudiaron la degradación de celobiosa en agua de cal libre de oxígeno, técnica descripta por Montgomery y Hudson (1930) para la obtención de lactulosa (4-O-β-D-galactopiranosil-D-fructosa). Obtuvieron una cetosa amorfa de $[\alpha]$ -60,1° (c 2,4; agua) descripta como celobiulosa.

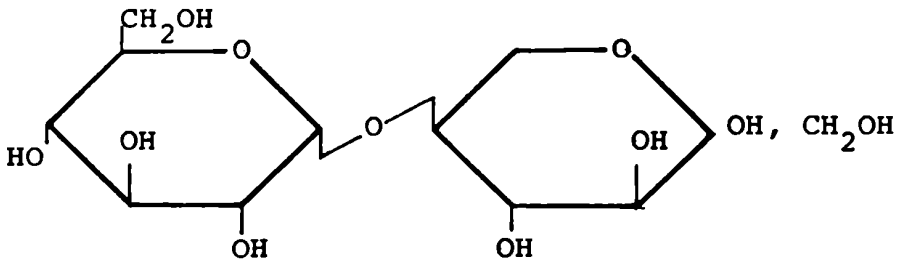


CELOBIULOSA (20)

5-O-α-D-GLUCOPIRANOSIL-D-FRUCTOSA (Leucrosa) 21

Este disacárido fue aislado por primera vez como un producto secundario en la síntesis de dextranos a partir de sacarosa por medio de la bacteria *Leuconostoc mesenteroides* (NRRL B-512 F) (Koepsell y col. 1953, Stodola y col. 1956). Posteriormente, se encontró que el *Streptococcus bovis* también producía leucrosa cuando crecía en un medio conteniendo sacarosa (Bailey y Bourne 1959, Bourne y Hudson 1961).

Más recientemente, Vliegenthart y col. (1978), obtuvieron leucrosa a partir de 5-O-α-D-glucopiranosil-D-glucofuranosa por isomerización en una solución saturada de hidróxido de calcio libre de oxígeno.

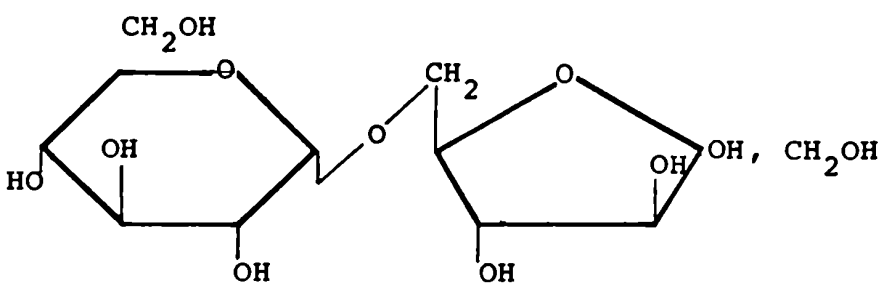


LEUCROSA (21)

6-O-α D-GLUCOPIRANOSIL-D-FRUCTOSA (Palatinosa o Isomaltulosa) 22

La palatinosa (22) fue aislada por primera vez como producto secundario ,junto con leucrosa, en la formación de un dextrano a partir de sacarosa utilizando preparaciones de enzimas extraídas de la bacteria *Leuconostoc mesenteroides* (NRRL B -512) (Sharpe y col. 1960). Por otra parte también fue obtenida con 90 % de rendimiento utilizando sacarosa como sustrato por acción de bacterias de la familia Enterobacteriaceae (Weidenhagen y Lorenz 1957). La estructura de este disacárido fue completamente dilucidada en 1969 por Loss mediante la formación del derivado totalmente metilado y estudio de los productos de hidrólisis de éste.

También fue detectada la palatinosa en orina (Bhatti y Clamp 1968, Laker 1979); en cultivos de *Erwinia carotovora* var. atroséptica, con sacarosa como fuente de carbono (Lund y Wyatt 1973) y de *Serratia phynthica* (Crueger, Draht y Munir 1978).

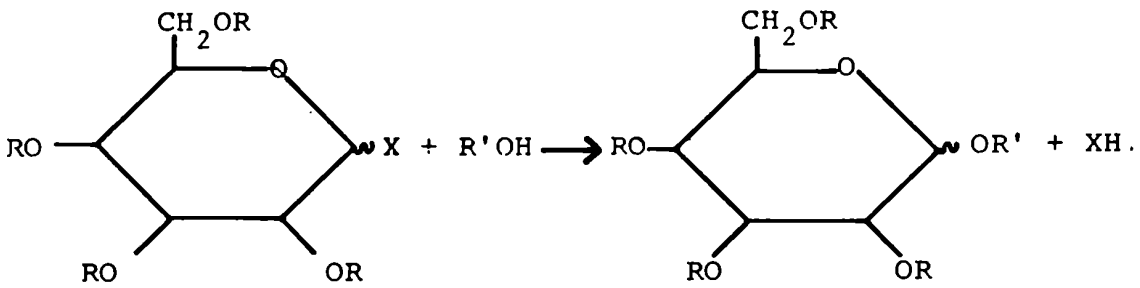


PALATINOSA (22)

CAPITULO VI

SINTESIS DE DISACARIDOS POR REACCIONES DE TIPO KOENIGS-KNORR.

Los primeros trabajos de síntesis de disacáridos se basaron en la reacción de un azúcar sustituído (por ejemplo, derivados poliacetilados) con un buen grupo saliente en C-1 y otro azúcar con hidroxilo libre y adecuadamente protegido en los demás, en presencia de un agente activante (aceptor ácido) (Koenigs Knorr 1901).



El grupo saliente más usado es el haluro, especialmente bromuro, pero se ha utilizado acetato y más recientemente ha sido posible formar el muy inestable glucopiranosil p-toluen sulfonato *in situ* y convertirlo en un disacárido (Eby 1976). Los grupos OR más utilizados son acetatos, benzoatos, o también o también otros ésteres, grupos éter y acetales.

Como el grupo XH que se forma en la reacción es ácido, se adicionan reactivos para neutralizar la acidez. En los primeros estudios se empleaban sales de plata como nitrato, óxido o carbonato de plata y un agente desecante a fin de eliminar el efecto del agua formada en la reacción. La introducción de sales de mercurio especialmente bromuro mercúrico y cianuro mercúrico llevó a un incremento notable de los rendimientos (Helferich 1949, 1956 y 1962). Wulff y Rohle (1974) utilizaron sales de plata de numerosos ácidos orgánicos.

Los glicósidos pueden ser preparados a partir de alcoholes líquidos, utilizandolos en gran exceso a fin de que sirvan como solvente además de reactivo nucleofílico. Cuando se emplean

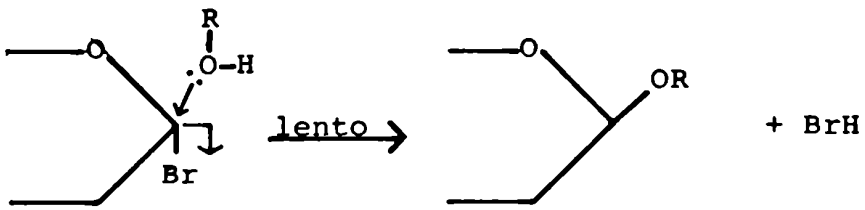
alcoholes sólidos o azúcares protegidos como reactivos, se deben emplear solventes adecuados. Se ha encontrado que los solventes más útiles son aquellos de polaridad baja o intermedia, por ejemplo, éter, solventes clorados, benceno, dioxano, nitrometano, acetonitrilo o mezclas de nitrometano y benceno. La polaridad es frecuentemente crítica: alguna polaridad es necesaria para lograr solubilidad, pero un solvente muy polar, como el dimetilsulfóxido, lleva a una descomposición improductiva del haluro del azúcar. También el curso de la estereoquímica de la reacción está influído en alto grado por la polaridad del solvente. Tanto las sales de plata como el cianuro mercúrico en nitrometano (en el que se disuelven) producen preferentemente β-D-gluco, y galactósidos y α-D-manósidos a partir de haluros de α-D-acilglucopiranósidos. Sin embargo, pequeños cambios en las condiciones llevan frecuentemente a resultados inesperados; así el uso de cantidades equimoleculares de cianuro mercúrico y bromuro mercúrico en acetonitrilo lleva a mezclas de los dos isómeros.

MECANISMO:

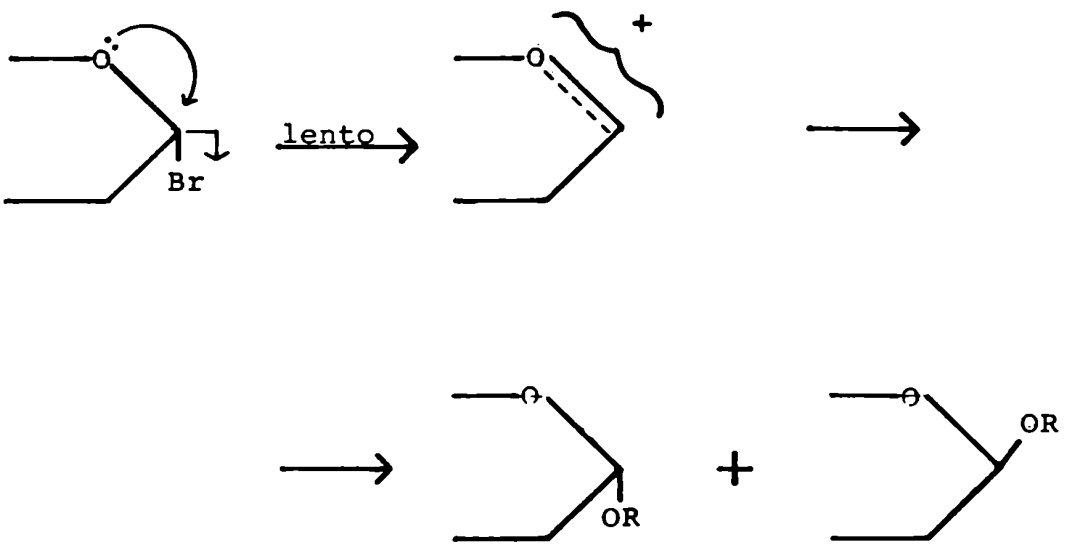
Se debe tener en cuenta que la mayoría de las investigaciones se basaron en reacciones de haluros de glicopiranósidos sustituídos,con nucleófilos utilizados en gran exceso, que sirven también como solventes, de manera que las analogías con las condiciones usuales en la síntesis de disacáridos, donde se emplean cantidades equimoleculares del haluro y del nucleófilo, pueden no justificarse plenamente. Sin embargo, algunas conclusiones generales pueden hacerse (Fig. 6)

FIGURA 6

1) SN-2:



2) SN-1:



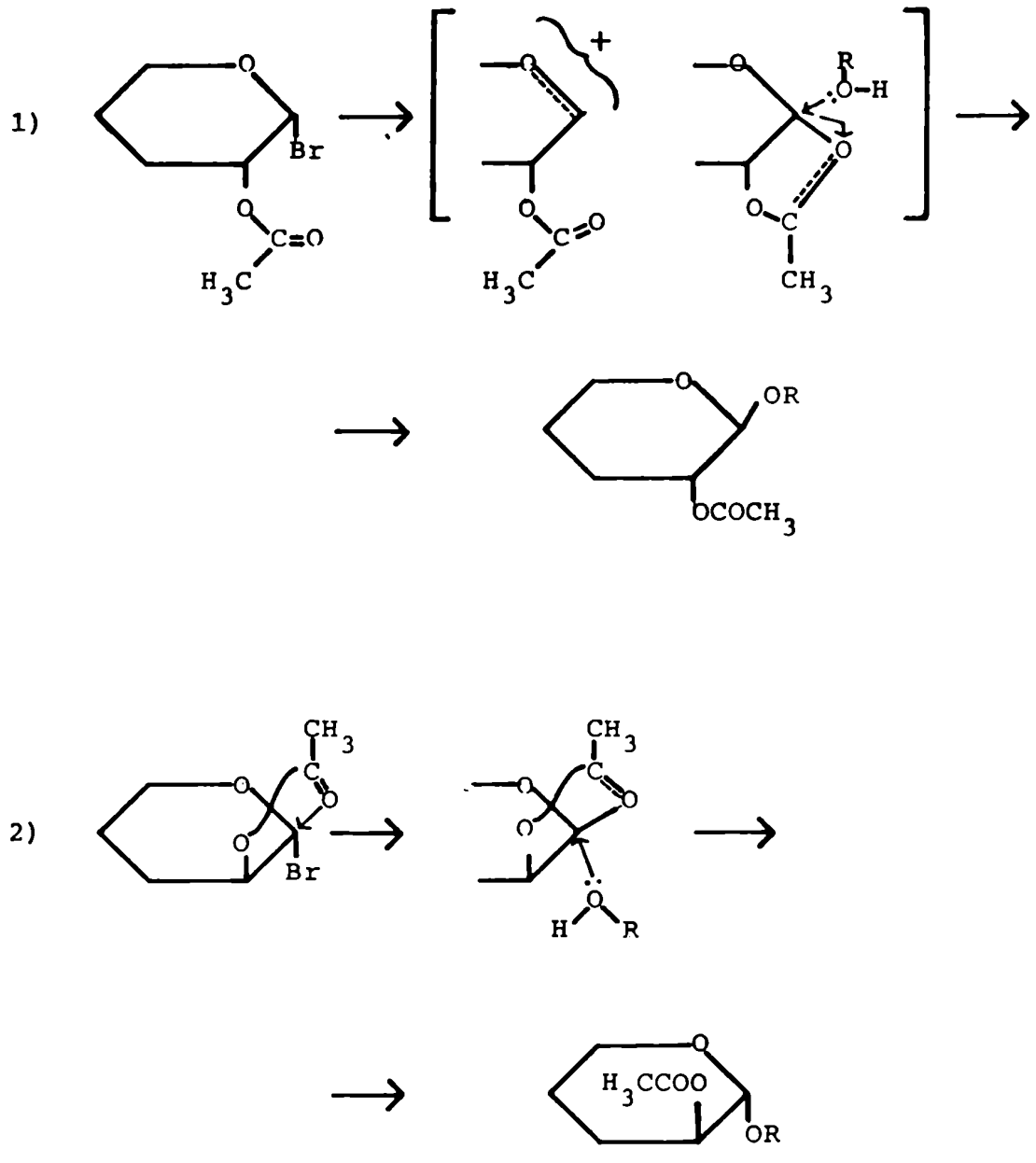
En algunos casos, especialmente en presencia de sales de plata insolubles en solventes de baja polaridad predominan los procesos de tipo SN-2 (1) llevando directamente a la inversión de la configuración del haluro del azúcar de forma que de un haluro α-glicopiranósido resulta un disacárido con unión β. Sin embargo, usualmente se ve involucrado un proceso de tipo Sn-1 (2). En el proceso SN-2 (1), el paso determinante de la velocidad de reacción es aquel en el que interactúan el haluro y el nucleófilo, y la velocidad de reacción será función de las concentraciones de las dos especies.

En el proceso SN-1 (2) la etapa determinante es aquella que involucra la ionización del haluro de manera que la velocidad de reacción es independiente de la concentración del nucleófilo.

ESTEREOQUIMICA: la reacción SN-2 involucra una inversión de Walden y lleva a la conversión de haluro en un glicósido o disacárido de configuración anomérica opuesta. Los procesos de tipo SN-1, por el contrario, dan racemización, o sea llevan a la producción de cantidades similares de los anómeros alfa y beta en el producto, independientemente de la configuración del haluro de partida.

En general, los haluros de α-D-glicopiranósido de D-glucosa y D-galactosa dan glicósidos con unión beta con alta estereoespecificidad, mientras que el correspondiente haluro de D-manosa puede dar ambos productos aunque generalmente predominan los alfa-D-glicósidos. A fin de explicar estos resultados y otros provenientes de reacciones de solvólisis, se postularon los siguientes mecanismos.(Fig. 7)

FIGURA 7



En el primer caso(1),por ejemplo D-gluco, el ión carbonio intermedio estabilizado por resonancia es aún más estabilizado por participación del grupo aciloxi del C-2,para formar un intermediario cíclico que es atacado por nucleófilo desde el lado opuesto del anillo, dando como resultado un beta-D-(por ejemplo trans-2-aciloxi)-glicósido. En el segundo caso (2)por ejemplo D-mano, la estereoquímica del haluro de partida es tal que la participación del grupo aciloxi en C-2 además de hacerlo por el oxígeno del anillo. El intermediario cíclico reactivo resultante puede ser atacado (por el lado alfa) por el nucleófilo. Tambien se obtendría así un trans-2-aciloxi-glicósido. Los solventes de baja polaridad, que minimizan la ionización del bromuro, tienden a la estereoquímica resultante de una reacción de tipo SN-2,la proximidad del bromuro interferirá con el acercamiento del nucleófilo del mismo lado de la molécula, de forma que los haluros D-gluco y D-galacto darían los beta-D-glicósidos, con una posibilidad similar a partir de haluros D-mano si la participación no ocurre.

Los grupos acetamido participan aún mejor que los grupos aciloxi por lo tanto, los haluros de azúcares con grupos acetamido mostrarían un control estérico y tendencia a producir trans-2-acetamido-glicósidos aún mayor quelos azúcares aciloxi correspondientes.

AISLAMIENTO, IDENTIFICACION Y CUANTIFICACION DE LOS AZUCARES LIBRES Y ALDITOLES.

En un extracto acuoso de estromas de *Cyttaria johowii* se analizaron los azúcares libres y alditoles por cromatografía en papel y por cromatografía gas-líquido.

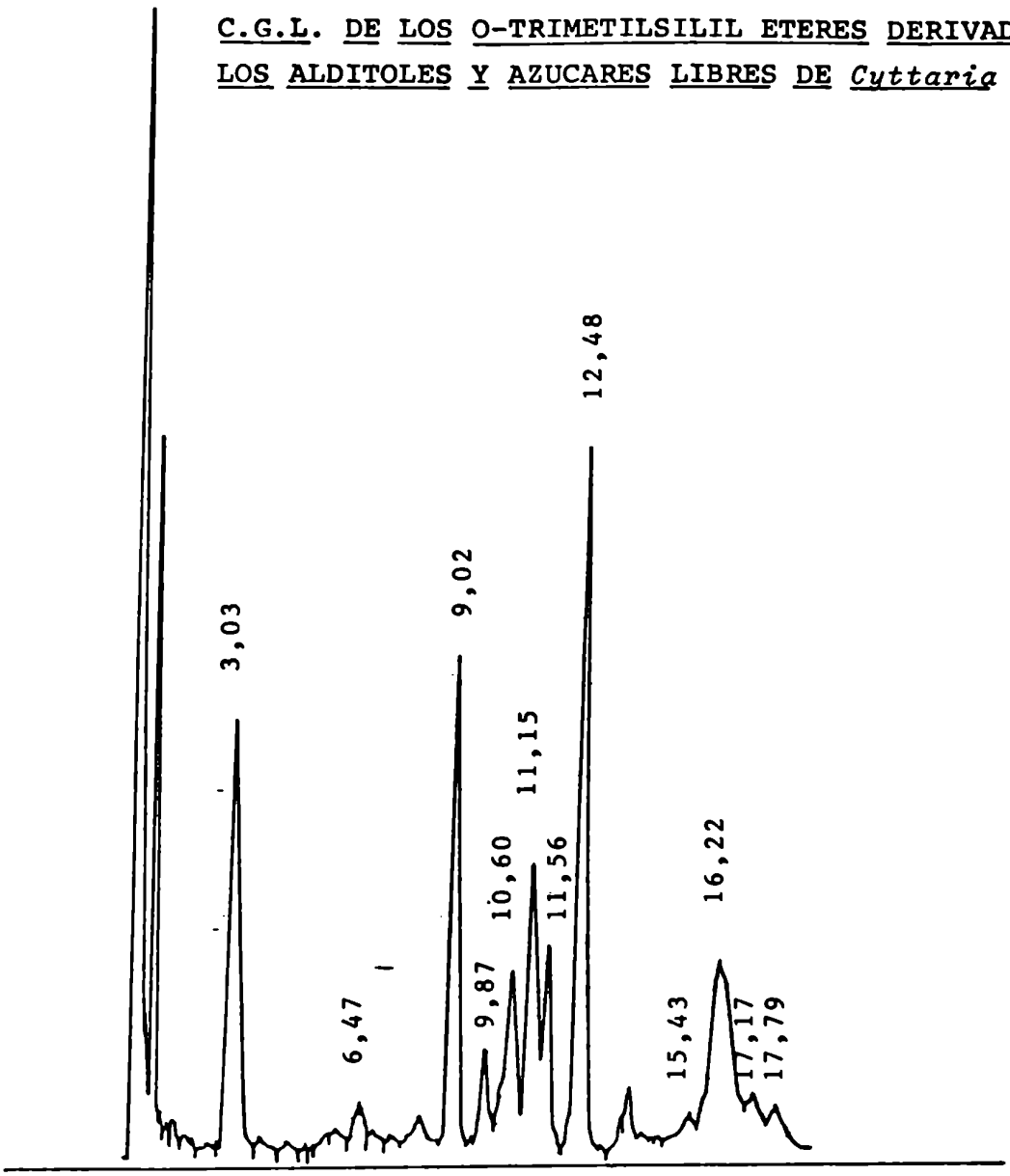
Por el primer método, utilizando como solventes 1 y 2 y como reactivos de revelado a,b y c, comparando con muestras auténticas se detectaron glicerol (3), arabinitol (6), D-manitol (10), glucosa, sacarosa, trehalosa (2) y ácido D-arabinohexulosónico (1), el cual ya había sido descripto anteriormente como componente del hongo (Lederkremer y col. 1975). La cromatografía gas-líquido de los O-trimetilsilil derivados mostró además la presencia de eritritol como componente menor (Fig.8) Tabla IV .

C.G.L.de los O-trimetilsilil derivados y azúcares libres obtenidos de un extracto acuoso de *C. johowii*.

COMPUESTO	Tr.(min)
glicerol	3.03
eritritol	6.47
arabinitol	9.02
α y β glucosa	10.60
	11.56
manitol	12.48
sacarosa	15.43
trehalosa	16.22

FIGURA 8

C.G.L. DE LOS O-TRIMETILSILIL ETERES DERIVADOS DE LOS ALDITOLES Y AZUCARES LIBRES DE *Cyttaria johowii*.

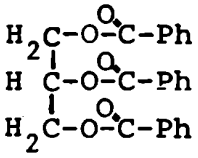


Tiempos de retención (min) de TMSi derivados: 3,03, glicerol 6,47 eritritol, 9,02 arabinitol, 9,87 no identificado, 10,60 y 11,56 α,β glucosa, 11,15 manitol, 12,48 inositol(patrón interno), 15,43 sacarosa, 16,22 trehalosa, 17,17 y 17,79,no identificado.

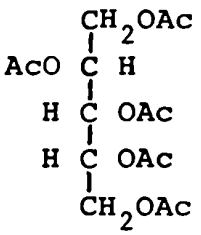
Por cromatografía en papel se observó también una sustancia reductora que no se separaba bien de la trehalosa en ninguno de los solventes utilizados y que presentaba un tiempo de retención ligeramente mayor que la trehalosa por c.g.l.; los dos picos que se observan (17.17 y 17.79 min.)corresponderían a los dos anómeros.

La identidad de la D-glucosa y su determinación cuantitativa se confirmó por el método enzimático de glucosa-oxidasa.

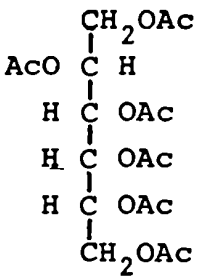
Por cromatografía en columna de celulosa del extracto fue posible aislar fracciones enriquecidas en glicerol, luego caracterizado como tri-O-benzoil-glicerol p.f. 74-75; arabinitol caracterizado por su derivado totalmente acetilado p.f. 75-76° y manitol caracterizado como el hexa-O-acetil-D-manitol p.f.123-124° (23 24 25)



Tri-O-benzoil-glicerol(23)



Penta-O-acetil-D-arabinitol(24)



Hexa-O-acetil-D-arabinitol(25)

La determinación cuantitativa de los azúcares se llevó a cabo por cromatografía gas-líquido de los O-trimetilsilil derivados, comparando con la respuesta obtenida con muestras auténticas procesadas de la misma forma y utilizando inositol como patrón interno.

El contenido de azúcares reductores fue determinado por el método de Somogyi-Nelson. Los resultados pueden verse en

TABLA IV

AZUCARES SIMPLES Y POLIOLES EN ESPECIES DE CYTTARIA

COMPONENTE	PORCENTAJE	
	C. johowii	*C. harioti*
Glicerol	0,30	3.7[a]
D-arabinitol	0,29	1,3[a]
D-manitol	0,17	0,3[a]
Eritritol	trazas	-
D-glucosa	0,12	2,7[a]
Fructosa	-	3,0[a]
Sacarosa	0,02	4,5[a]
Trehalosa	0,40	0,26[b]
Azúcares reductores	0,2	7[c]

a Lederkremer y Ranalli 1967.

b Waksman y Lederkremer 1976.

c Wiernik 1962.

en la tabla IV . Comparando con los resultados obtenidos en *Cyttaria harioti* Fischer, se observa que en *C. johowii* la cantidad de azúcares reductores es significativamente inferior; no se encontró fructosa y sólo una pequeña cantidad de sacarosa está presente, mientras que ambos azúcares son componentes importantes en *C. harioti*. Los alditoles de las dos especies de Cyttaria estudiadas hasta el momento son los mismos, aunque en *C. johowii* se encuentran en menor proporción. En esta última se determinaron trazas de eritritol que podría estar presente en *C. harioti* y no haberse detectado por la menor sensibilidad de la cromatografía en papel respecto a la cromatografía gas-líquido.

Los polioles se han encontrado frecuentemente en hongos lo cual indicaría su importancia en el metabolismo (Smith, Muscatine y Lewis 1969). Su proporción es alta en hongos que crecen naturalmente. Se considera que junto con la trehalosa constituirían productos de reserva en el hongo. Es interesante notar que la trehalosa es el azúcar simple más abundante en *C. johowii*. Su relación con la presencia de polioles se discute en el Capítulo II. La proporción de los hidratos de carbono solubles que el hongo produce puede ser afectada por una cantidad de condiciones, por ejemplo el tiempo de crecimiento, por lo tanto ésta podría ser mayor en otras etapas del ciclo de vida.

AISLAMIENTO Y PURIFICACION DEL POLISACARIDO.

De un extracto acuoso de estromas secos de *Cyttaria johowii* , previamente extraídos con cloroformo y con metanol respectivamente, se obtuvieron por precipitación fraccionada con etanol, tres fracciones (Esquema 1). La primera, precipitó con una concentración de etanol de 16 % (0,44 % de rendimiento sobre producto crudo), $[\alpha]_D^{20}$ + 5,1 (DMSO). La segunda, precipitó con una concentración de etanol de 25 % (0,68 % de rendimiento sobre producto crudo) y presentó un $[\alpha]_D^{20}$ + 45,5 (DMSO) y la tercera precipitó con una concentración de etanol de 28 % (2,8 % de rendimiento sobre producto crudo).

Se procedió a purificar la tercera fracción (precipitado C) por ser la más abundante y se reservaron las otras fracciones (A y B) para las futuras investigaciones.

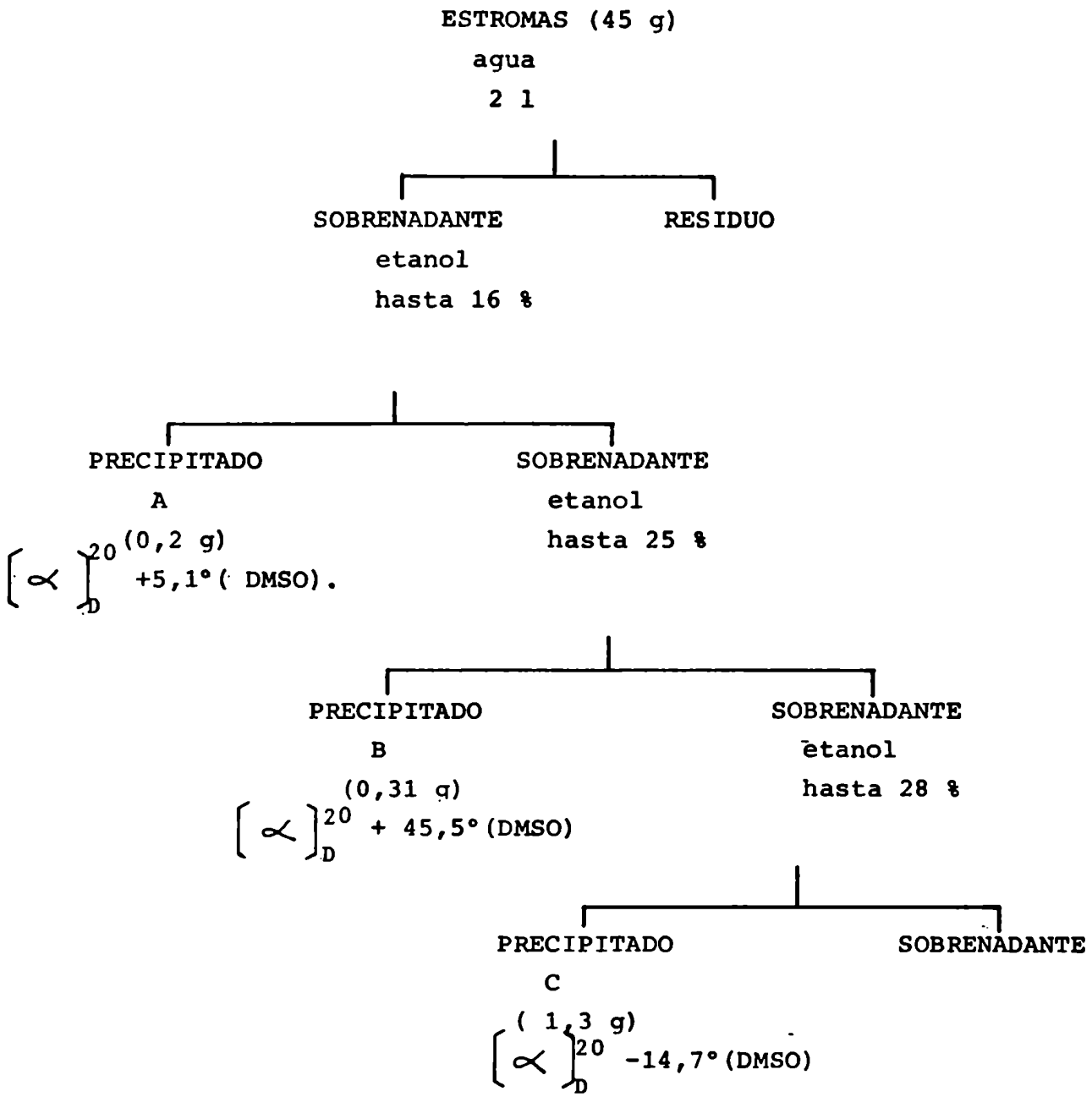
El polisacárido C, $[\alpha]_D^{20}$ -14,7° (DMSO) se purificó por reprecipitación de su solución acuosa con etanol, alcanzando el poder rotatorio un valor de $[\alpha]_D^{20}$ - 34°. La repetición del mismo procedimiento dió un valor constante de la rotación específica.

La determinación de la curva de solubilidad en sistema alcohol-agua, mostró que la misma no presentaba superficies de discontinuidad y que el 92 % del polisacárido precipitaba de su solución acuosa en un margen estrecho de concentración etanólica (30-32 %).

Las soluciones acuosas de este polisacárido son de alta viscosidad, llegando las soluciones concentradas a formar geles. Este comportamiento ha sido ya descripto para glucanos de este tipo como el "lentinano" (Saito, Ohki, Takasuka y Sasaki 1977); un $\beta(1\rightarrow3)$ glucano ramificado de *Alcaligenes faecalis* (Saito, Ohki y Sasaki 1977) y un $\beta(1\rightarrow3)$ glucano ramificado de *Pleurotus ostreatus* (Saito, Ohki, Yoshika y Fukuoka 1976).

Un modelo para la gelificación de polisacáridos fue

ESQUEMA DE EXTRACCION I



propuesto por Rees (1968, 1972) y sería aquel en el que el solvente está atrapado en los intersticios de una red tridimensional formada por la asociación cooperativa de largas regiones, llamadas zonas de conjunción, de cadenas de polímeros en conformación ordenada.

Bluhm, Deslandes y Marchessault (1982) encontraron que mientras el "curdlano" ($\beta(1\rightarrow3)$ glucano lineal) forma geles a temperaturas mayores de 55°; las soluciones acuosas de "scleroglucano" ($\beta(1\rightarrow3)$ glucano ramificado en C-6) aumentan la viscosidad a temperaturas menores de 10°. Ogawa (1973), trabajando con un $\beta(1\rightarrow3)$ glucano lineal de *Alcaligenes faecalis* y glucanos obtenidos por formólisis de éste, encontró que no todas las fracciones formaban geles a temperaturas mayores de 55°; dependiendo este comportamiento del grado de polimerización. Sin embargo el polisacárido en estudio que es altamente ramificado, forma geles a temperatura ambiente en solución acuosa.

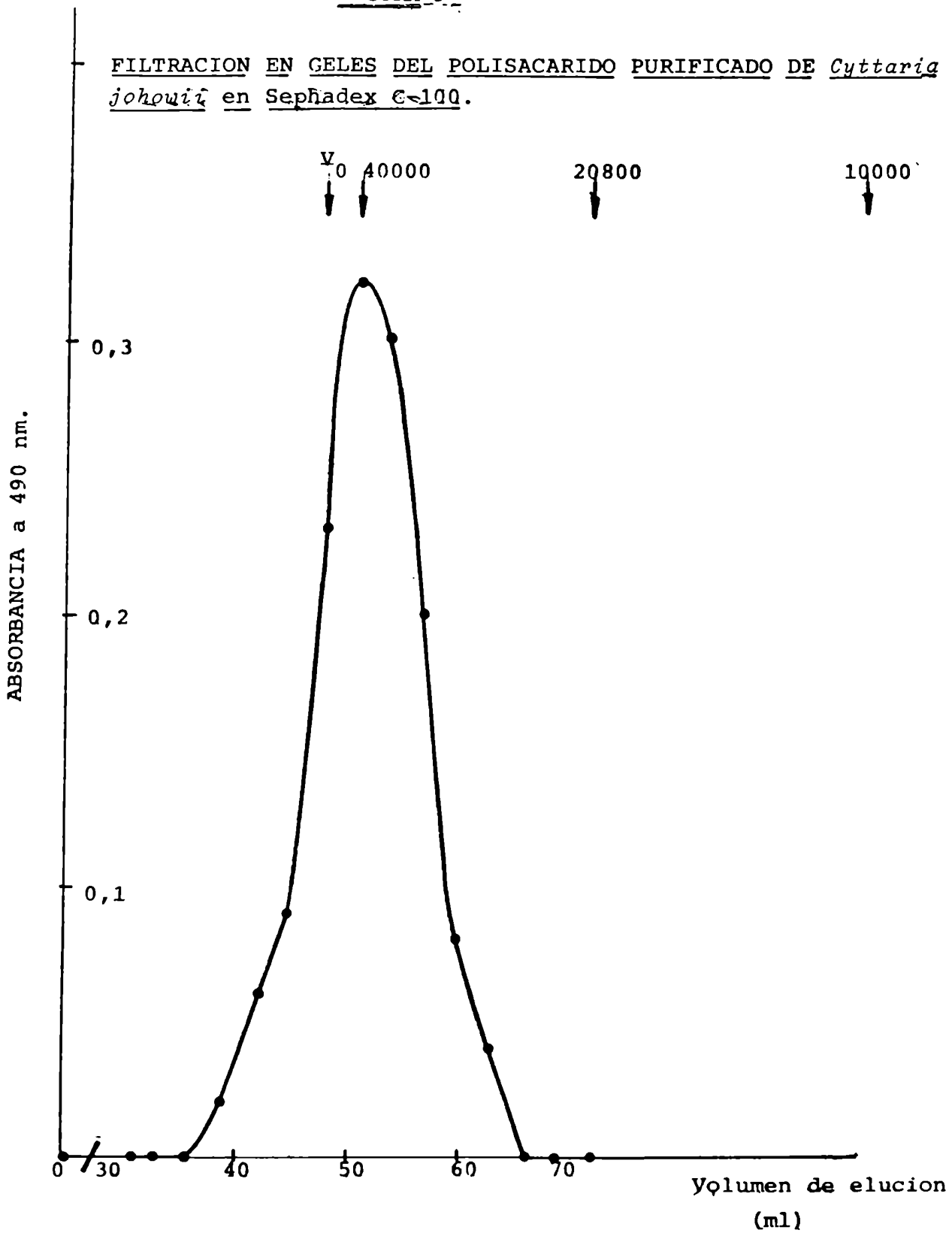
Se puede atribuir la formación de soluciones de menor viscosidad de glucanos de este tipo en dimetilsulfóxido a la transformación de las hélices en una estructura desordenada o al menos en una hélice de cadenas más cortas (Saito 1977). De ahí que el dimetilsulfóxido sea uno de los mejores solventes para muchos polisacáridos (Smith y col. 1968), pues al tener constante dieléctrica alta tiene la habilidad de romper uniones hidrógeno.

La homogeneidad del polisacárido fue confirmada por filtración en geles que se realizó con dimetilsulfóxido como solvente. En la Fig. 9 se observa el perfil de elución del polisacárido en una columna de Sephadex G-100. El pico incluído coincide con el de un patrón de PM 40 000 eluído en las mismas condiciones.

La elución como un pico único por filtración en geles, la curva de solubilidad y la constancia de poder rotatorio a través de las distintas purificaciones, son evidencias de la homogeneidad del producto en estudio, por lo cual se continuó con el exámen de sus propiedades y se procedió a estudiar su estructura.

FIGURA 9

FILTRACION EN GELES DEL POLISACARIDO PURIFICADO DE *Cyttaria johowii* en Sephadex G-100.



PROPIEDADES GENERALES.

En el espectro infrarrojo del polisacárido se observaba una banda a 890 cm^{-1}, característica de la unión β . Fig. 10 . La frecuencia de la absorción en el i.r. junto con el valor del poder rotatorio permitieron concluir que el polisacárido estaba constituido principalmente por uniones β-D-glucosídicas (Barber y col. 1954). En la tabla V se pueden observar valores de $[\alpha]_D^{20}$ de distintos β-(1→3) glucanos de hongos. Es de señalar que en general los poderes rotatorios de los polisacáridos son menores en dimetilsulfóxido que en soluciones acuosas, como en el caso del "pachimano" (Tabla V) No se pudo determinar el poder rotatorio del polisacárido de *C. johowii* en solución acuosa pues el producto purificado era poco soluble. La unión β -glucosídica fue confirmada por los estudios de hidrólisis ácida parcial y oxidación con trióxido de cromo que se detallan más adelante.

El grado de polimerización (y por lo tanto el $\overline{Pmn}$) se determinó según el método de Unrau y Smith (1957), que consiste en la reducción del extremo reductor del polisacárido con borohidruro de sodio, seguida de oxidación con periodato de sodio y medición, según el método espectrofotométrico descripto por Eegrive (1937) del formaldehido producido. En base a los datos obtenidos, se calculó un grado de polimerización de 235 ($\overline{Pmn}$ 38 000) si se considera que el grupo terminal está unido a través del oxígeno de C-3 ó de C-4 y por lo tanto se producen dos moles de formaldehido por mol de polisacárido; o de 117 ($\overline{Pmn}$ 20 000) si se considera que el extremo terminal está unido a través del oxígeno de C-6 produciéndose en este caso un mol de formaldehido por mol de polisacárido. (Fig.11)

Se observa que en el primer caso los resultados coinciden con los obtenidos por filtración en geles y comparación con patrones.

FIGURA 10

ESPECTRO INFRARROJO DEL POLISACARIDO ESTUDIADO.

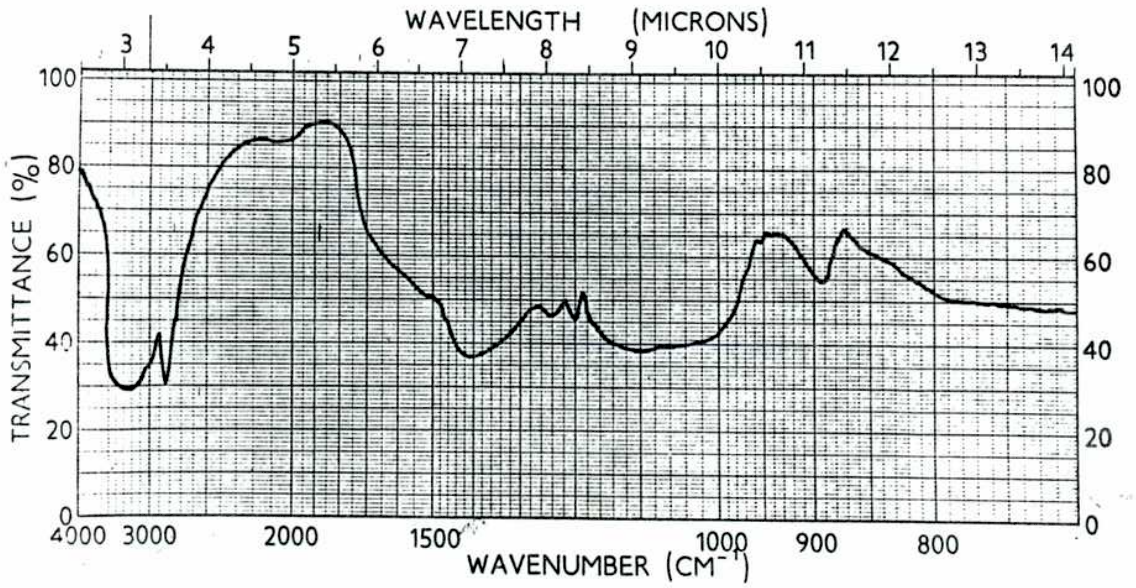


FIGURA 11

DETERMINACION DE EXTREMOS REDUCTORES.

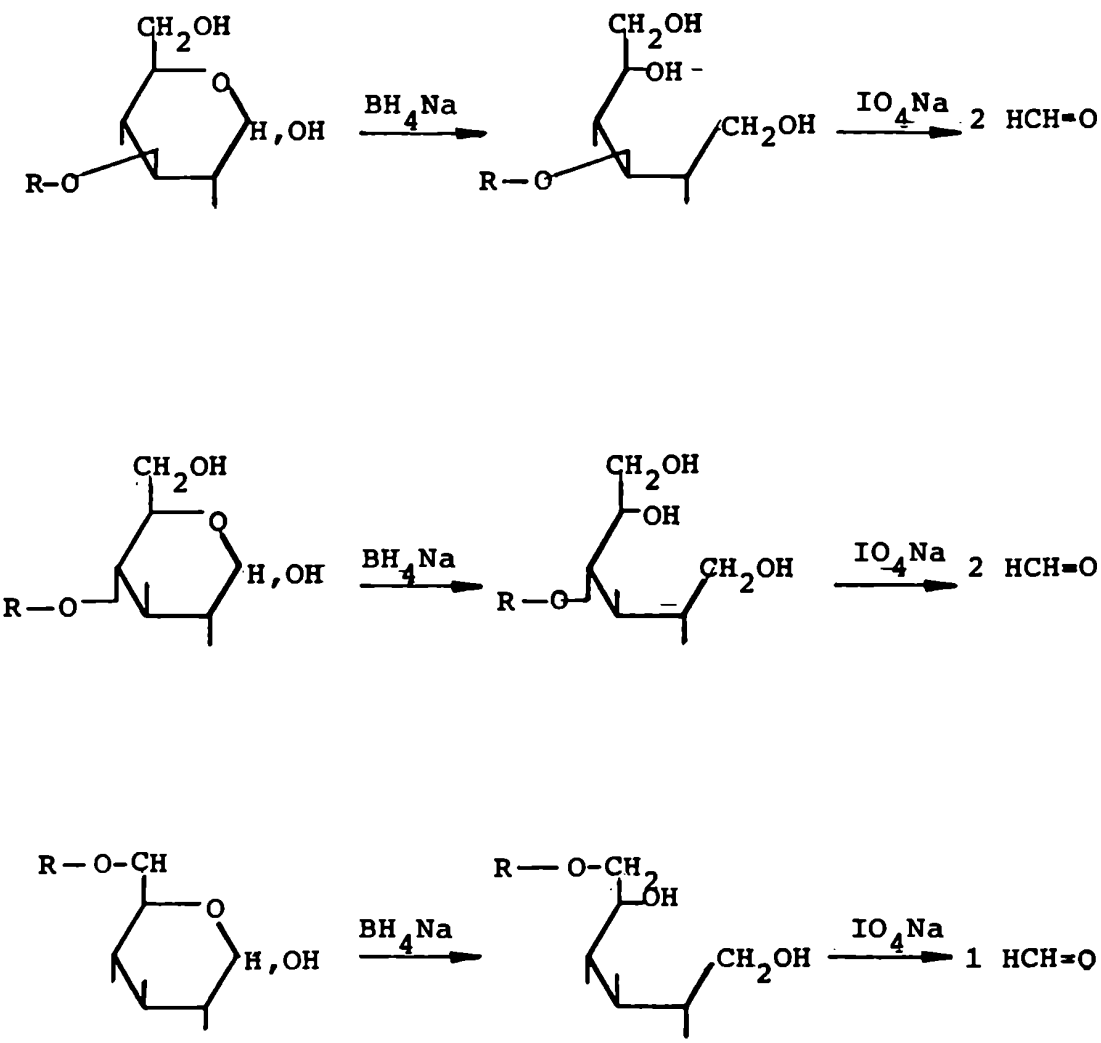


TABLA V

PODERES ROTATORIOS DE β-(1→3) GLUCANOS DE HONGOS.

TIPO	ORIGEN	$[\alpha]_D^{20}$
β(1→3)	micolaminarano de zoosporas de *Phytophthora palmivora.*	-15 (aqua)
β(1→3)	micolaminarano de micelio de *Phytophthora palmivora.*	-10 (aqua)
β(1→3) ; (1→6)	G.U.-3 de *Grifora Umbellata.*	-11 (aqua)
β(1→3) ; (1→6)	*Sacharomyces cerevisiae.*	-10 (DMSO)
β(1→3)	"pachimano"de *Poria cocos.*	+21 (NaOH) -13 (DMSO)
β(1→3) ; (1→6)	"lentinano" de *Lentinus edodes.*	+21 (NaOH)
β(1→3) ; (1→6)	*Cyttaria harioti.*	+11 (KOH)
β(1→3) ; (1→6)	*Cyttaria johowii.*	-34 (DMSO)

AZUCARES COMPONENTES DEL POLISACARIDO.

Por hidrólisis total del polisacárido se obtuvo glucosa y fructosa caracterizadas por cromatografía gas-líquido y cromatografía en papel.

La proporción de D-glucosa en el hidrolizado (89 %) se estimó por el método de glucosa-oxidasa peroxidasa. Dado que en las condiciones de hidrólisis total parte de la fructosa se destruye no fue posible cuantificar directamente la cetosa, pero siendo glucosa y fructosa los únicos monosacáridos componentes es posible por diferencia atribuir un 11 % a la cetosa.

Debido a que el polisacárido forma geles, resultó imposible lograr una hidrólisis total con ácido sulfúrico. Sin embargo era conocida la propiedad de los β(1→3)glucanos de disolverse en ácido fórmico 90 % (Misaki y col. 1968, Jones y col. 1953, Edwards y col. 1958) y por lo tanto el polisacárido fue sometido a hidrólisis en este solvente. Luego de eliminar los grupos formiato (Ogawa y Tsurugi 1973) se consiguió una hidrólisis total calentandocon ácido sulfúrico durante 24 hs a 100°

Por c.g.l. se encontró una relación glucosa:fructosa de 92:3 (Fig.12) que por las razones indicadas anteriormente no coincide exactamente con la cuantificación por el método enzimático.

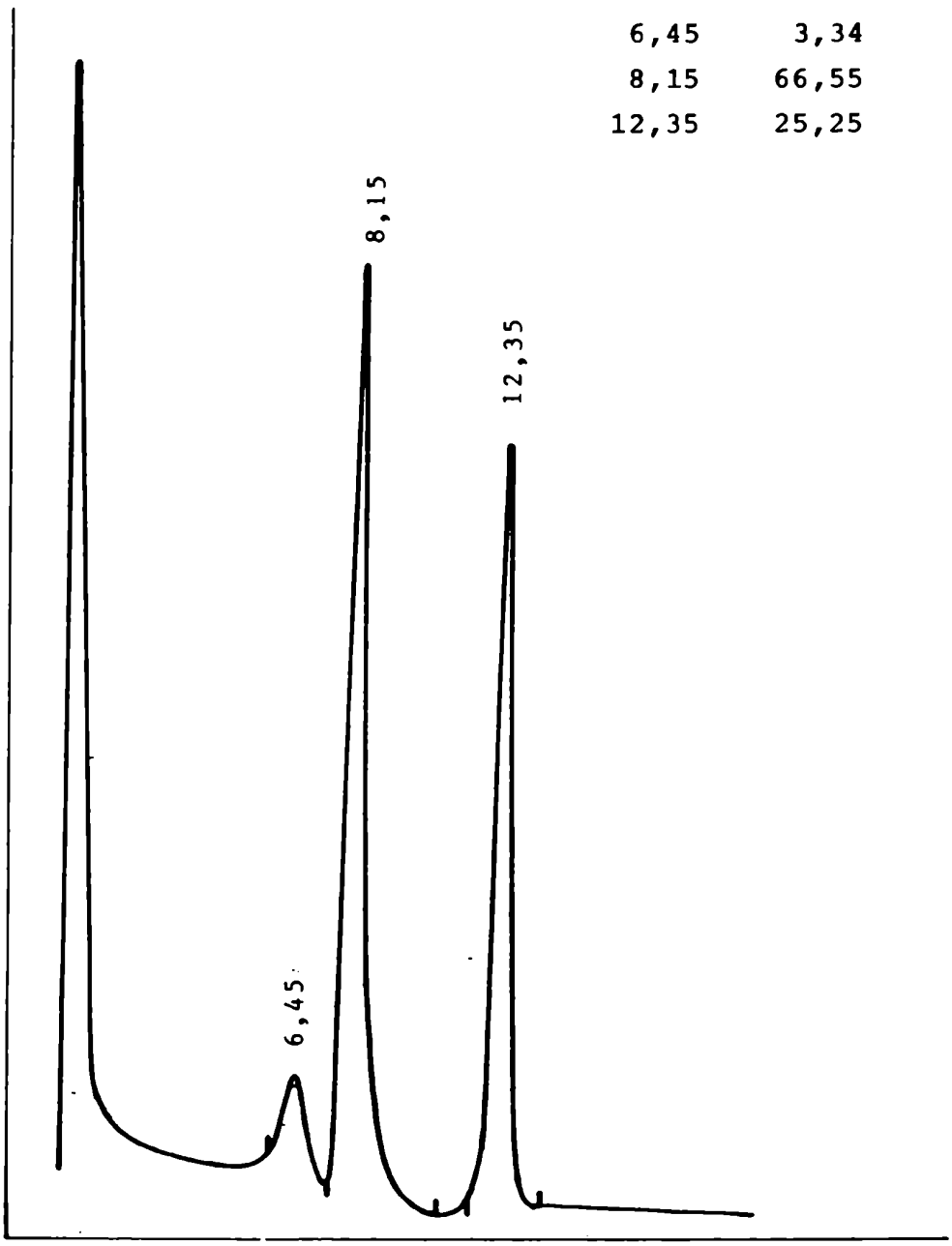
HIDROLISIS ACIDA PARCIAL.

El polisacárido se degradó según el Esquema 2:
Por tratamiento con ácido fórmico 90 % a 100°se hidrolizó el 24 % del producto original quedando el resto insoluble. En el hidrolizado se identificaron por cromatografía en papel y por c.g.l. comparando con muestras auténticas tratadas en las mismas condiciones, glucosa y fructosa como productos principales y muy pequeñas proporciones de laminaribiosa (26), genciobiosa (27), y un disacárido de cetosa no descripto en

FIGURA 12

CROMATOGRAFIA GAS-LIQUIDO DEL HIDROLIZADO TOTAL DEL POLISACARIDO DE *Cyttaria johowii*.

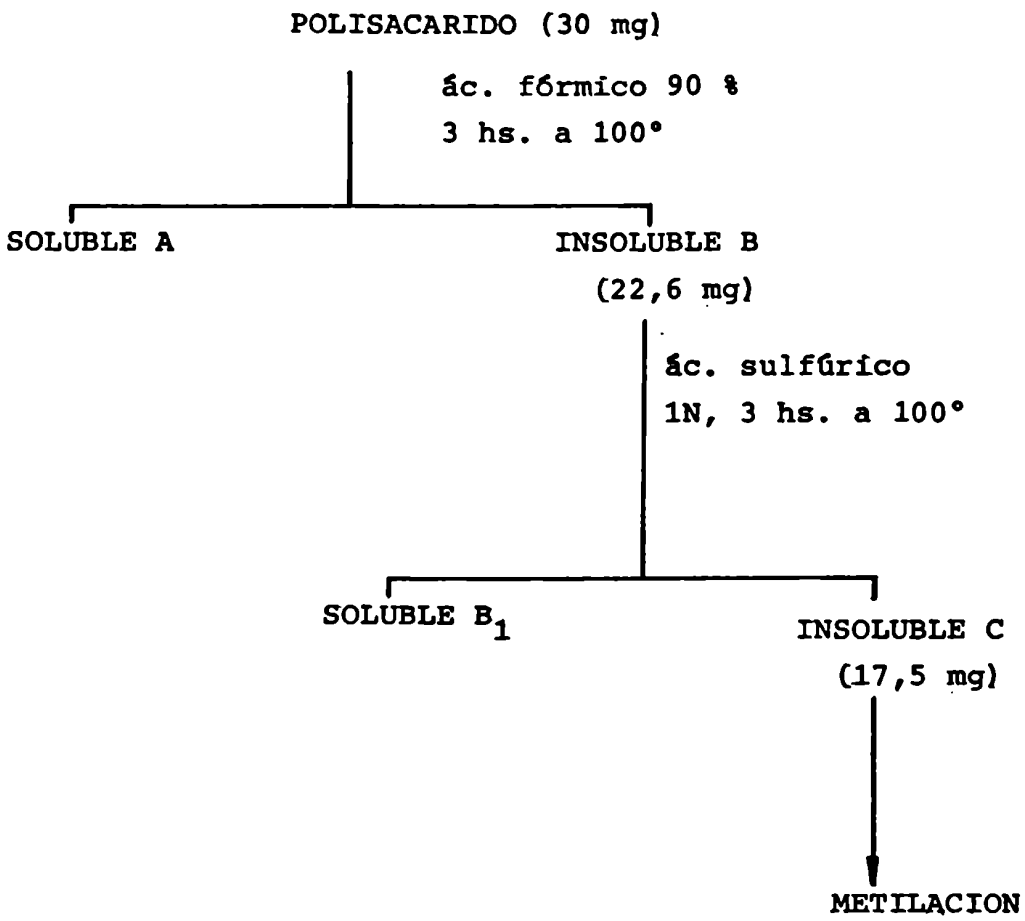
Rt	Area %
6,45	3,34
8,15	66,55
12,35	25,25

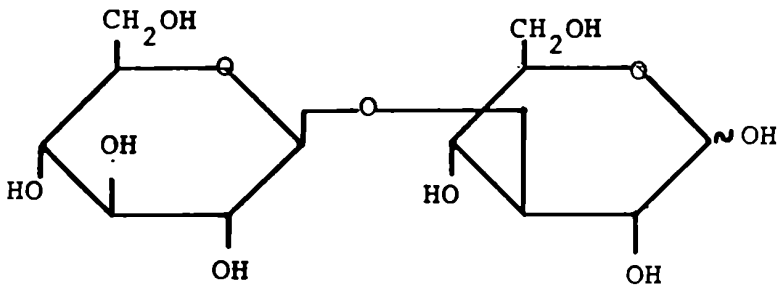


Tiempos de retención (min) de TMSi derivados: 6,45 fructosa, 8,15 y 12,35 α y β glucosa.

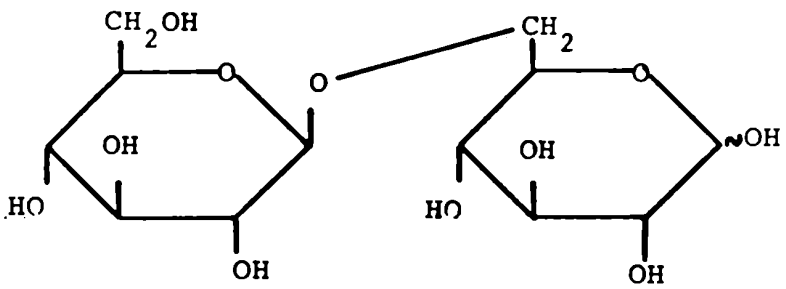
ESQUEMA 2

FRACCIONES OBTENIDAS EN LA HIDROLISIS ACIDA PARCIAL DEL POLISACARIDO DE *Cyttaria johowii*.

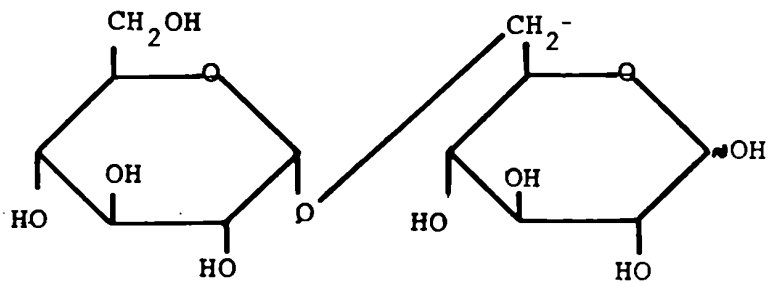




LAMINARIBIOSA (**26**)



GENCIOBIOSA (**27**)



ISOMALTOSA (**28**)

la literatura que se determinó posteriormente como 3-O-β-D-glucopiranosil-D-fructosa (29), laminaribiulosa. Fig. 22 .

Es conocida la dificultad de diferenciar genciobiosa (27) de isomaltosa (28) con las técnicas comunes de cromatografía en papel y c.g.l. Sin embargo los alditoles sililados se pudieron separar por c.g.l. utilizando una columna capilar. Se pudo así identificar la presencia de genciobitol derivado de la unión 6-O-β-D-glucopiranosil-D-glucosa.

CROMATOGRAFIA GAS-LIQUIDO DE LOS O-TRIMETILSILIL ALDITOLES OBTENIDOS A PARTIR DE A.

Muestra	Tr
isomaltitol	14,22
genciobitol	12,96
sorbitol	9,64
formólisis reducida.	12,88

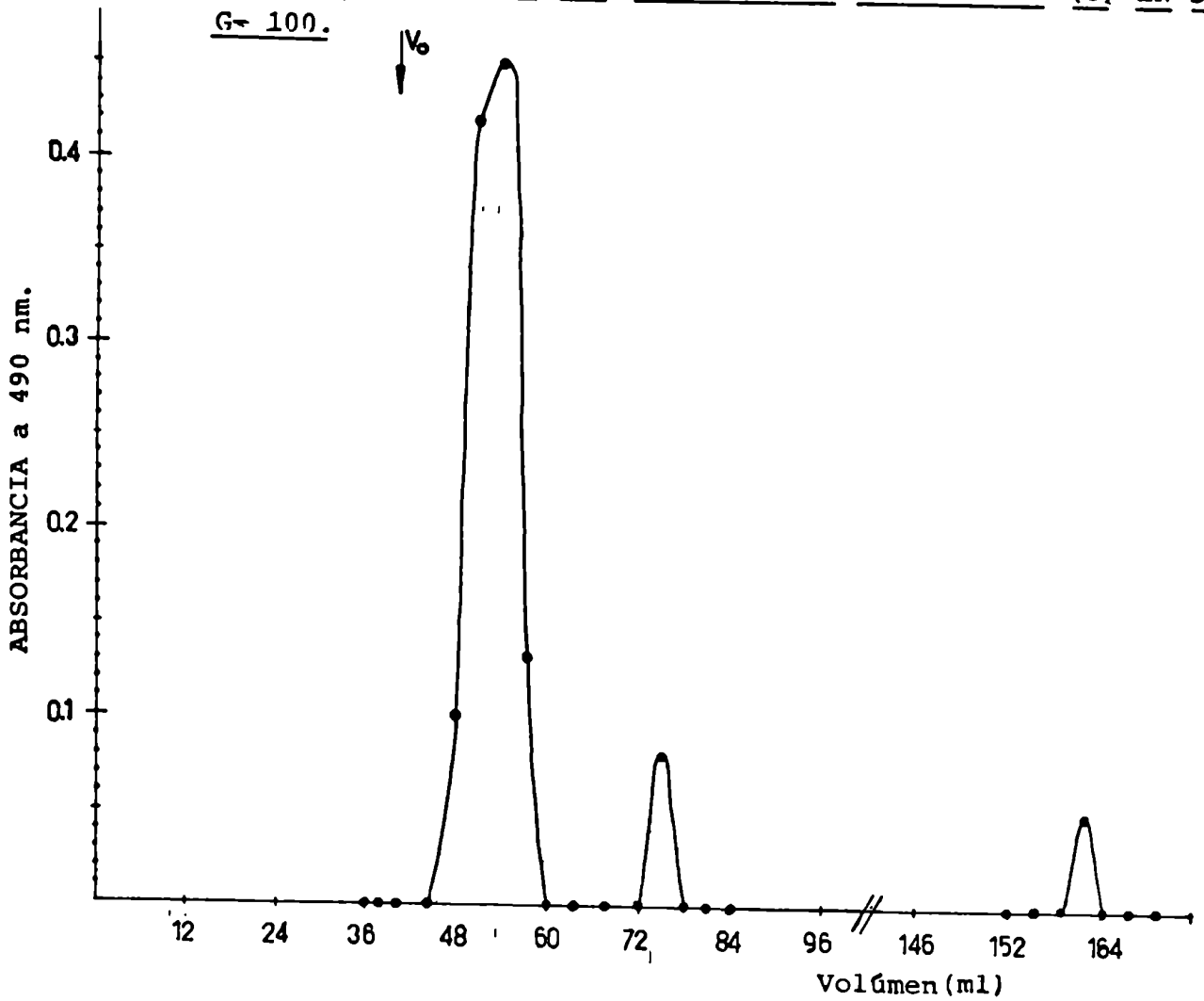
La hidrólsis parcial con ácido sulfúrico de B dió un producto soluble B_1 y un insoluble C (58 % del original). Por c. p. y c.g.l. B_1 dió una gran proporción de glucosa y trazas de laminaribiosa (26) y genciobiosa (27).

El insoluble C por cromatografía en geles se eluyó como un pico principal de peso molecular algo menor que el original y dos picos menores (Fig. 13). Los resultados indican que por hidrólisis parcial se rompen casi exclusivamente las ramificaciones.

C se metiló como se detalla posteriormente.

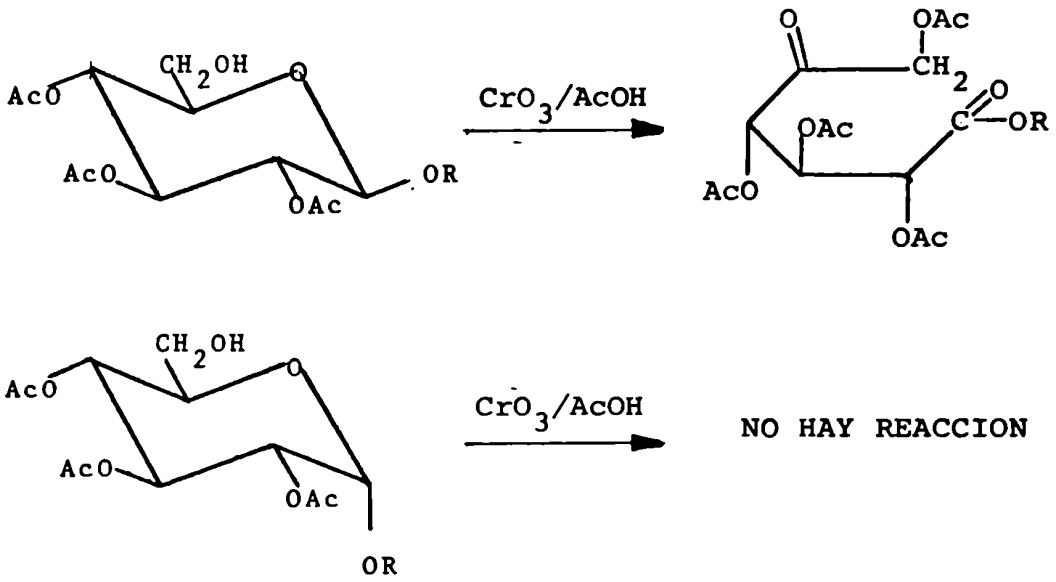
FIGURA 13

FILTRACION EN GELES DEL POLISACARIDO HIDROLIZADO (C) EN SEPHADEX G- 100.



OXIDACION CON TRIOXIDO DE CROMO.

Angyal y James (1969, 1970) demostraron que aldopiranósidos totalmente acetilados que están unidos a agliconas en forma ecuatorial en la forma silla más estable, generalmente la forma β , se oxidan con trióxido de cromo en ácido acético a metil-5-hexulosonatos acetilados. Los anómeros con agliconas unidas en forma axial, generalmente los anómeros α sólo se oxidan muy lentamente en estas condiciones. Furanósidos acetilados se oxidan en forma independiente de la configuración anomérica.



La secuencia de oxidación-reducción ha sido ya usada para degradar polisacáridos (Lindberg y col. 1977, Kochetkov y Obruchnikov 1977). En el estudio presente el polisacárido fue reducido previamente con borohidruro de sodio para evitar la degradación de la cadena desde el extremo reductor. El producto reducido fue acetilado con anhídrido acético y piridina en presencia de formamida para ayudar a la disolución, y

posteriormente fue oxidado. El producto de la oxidación dió por el método de fenol-ácido sulfúrico un 20 % de azúcar que resistió la oxidación, lo cual indicaría en concordancia con los datos de poder rotatorio e hidrólisis parcial que por lo menos un 80 % del polisacárido presenta uniones β .

El producto de la oxidación fue hidrolizado con ácido sulfúrico 1N. La determinación de glucosa en el hidrolizado por el método enzimático de glucosa-oxidasa demostró que sólo un 10 % del azúcar que resistió la oxidación sería glucosa. Este valor estaría dentro del error (10 %) que se atribuye al método. La diferencia con el valor de azúcar total indicaría que la fructosa presente en el polisacárido no se oxida con este reactivo, aunque no se encontraron en literatura datos sobre la oxidación con trióxido de cromo de O-acetil cetósidos.

ESTUDIOS DE METILACION:

El polisacárido se metiló con hidruro de sodio, ioduro de metilo y dimetilsulfóxido según la técnica descripta por Hakomori (1964) y adaptada por Sjöberg (1966).

Con el método utilizado se genera el anión metilsulfinilo (CH_3-SO-CH_2^-) por reacción entre el hidruro de sodio y el dimetilsulfóxido de acuerdo al procedimiento descripto por Corey y Chaykovsky (1965). Este anión produce el alcóxido del polisacárido que reacciona con ioduro de metilo.

$$ROH + CH_3SO\text{-}CH_2^-Na^+ \longrightarrow RO^-Na^+ + CH_3SOCH_3$$

$$RO^-Na^+ + ICH_3 \longrightarrow ROCH_3 + INa$$

El polisacárido metilado se hidrolizó disolviéndolo en ácido sulfúrico 72 % a temperatura ambiente, diluyendo luego el ácido a 12 % y calentando la solución durante cuatro horas. De acuerdo a Croon y col. (1960) estas condiciones producen el menor porcentaje de demetilación y degradación (3-6 %).

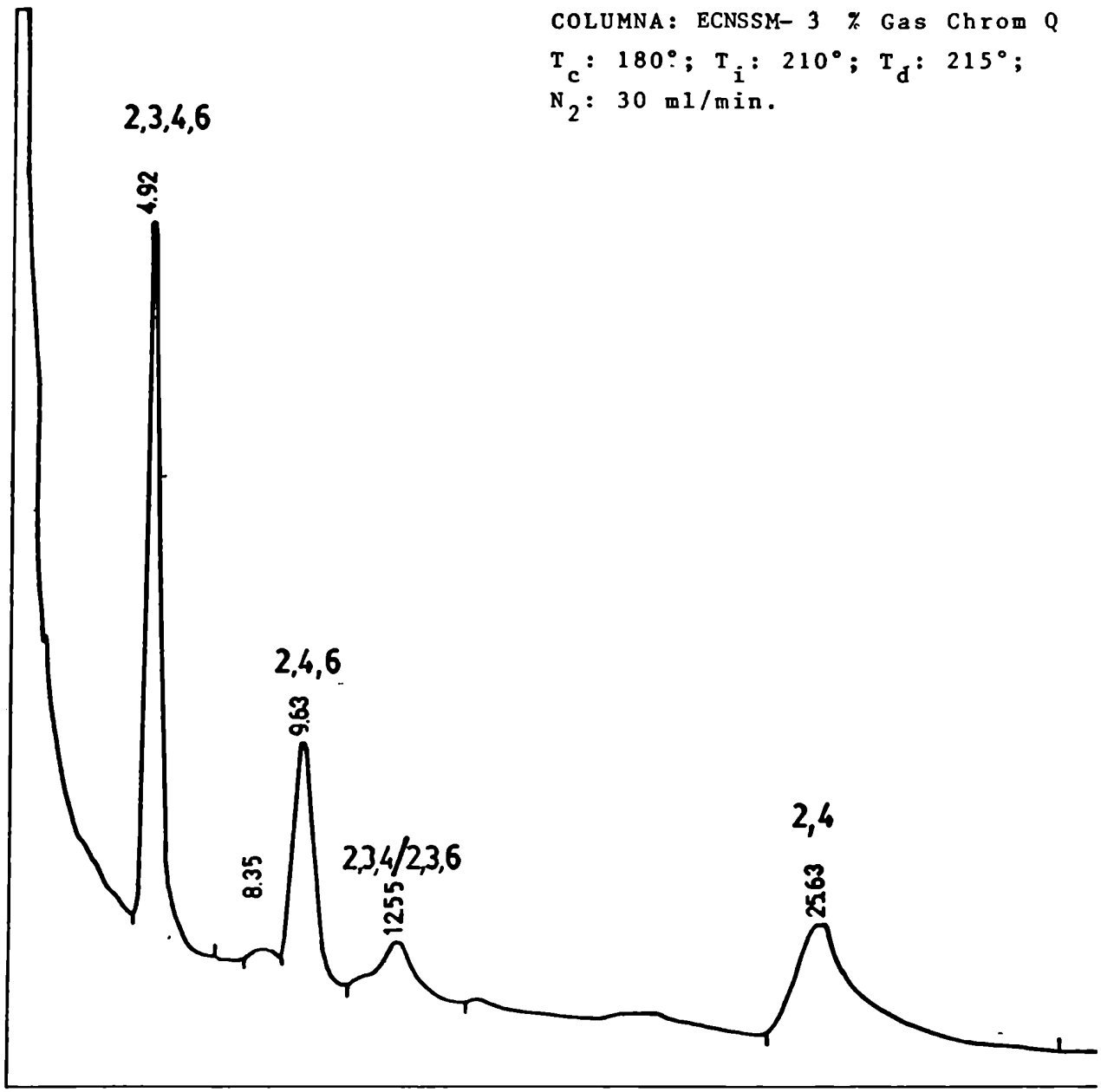
Los azúcares parcialmente metilados obtenidos se identificaron por cromatografía en papel y cromatografía gas-líquido (como alditoles acetilados). Así se detectaron los derivados de 2,3,4,6-tetra-; 2,4,6; 2,3,4 y 2,3,6-tri- y 2,4-di-O-metil glucosas comparando con testigos tratados en las mismas condiciones (Fig.14).

El pico de Tr 8,35 podría corresponder al derivado trimetilado de la fructosa que en parte se destruiría en las condiciones de metilación e hidrólisis.

Dado que con la fase ECNSSM-3% los acetatos de alditoles derivados de la 2,3,4 y 2,3,6-tri-O-metil glucosa no se resuelven bien fue necesario utilizar la fase NPGS-8% para identificarlas (Fig.15). Por c.g.l-e.m. se confirmó la identidad de las glucosas parcialmente metiladas. Las fragmentaciones obtenidas se compararon con las de literatura. (Tabla VI)

FIGURA 14

CROMATOGRAFIA GAS-LIQUIDO DE LOS PRODUCTOS DE LA METILACION TOTAL DEL POLISACARIDO.



Los porcentajes de los azúcares metilados pueden verse en la Tabla VII. La proporción aproximadamente igual del derivado tetrametilado y dimetilado, así como el hecho de no observarse formación de derivado monometilado evidenciaron que la metilación había sido total. Las posiciones de los sustituyentes indicaban la presencia de uniones (1→3) como hecho estructural principal y algunas uniones (1→6) y (1→4). La relación de tetra-O-metil a tri-O-metil y di-O-metil glucosa sugiere que se trata de un polisacárido altamente ramificado.

Tabla VII

ESTUDIOS DE METILACION

Producto de hidrólisis (O-metil glucosa)	Hecho estructural indicado.	Porcentaje.	
		Polisacárido original	Polisacárido degradado
2,3,4,6-tetra-	Glp-(1-	30,52	5,42
2,4,6-tri-	→3)-Glp-(1-	23,27	69,01
2,3,4-tri-	→6)-Glp-(1-	5,76	9,70
2,3,6-tri-	→4)-Glp-(1-	5,54	trazas
2,4-di-	→6) →3) -Glp-(1-	31,28	5,77

FIGURA 15

CROMATOGRAFIA GAS-LIQUIDO DE LOS PRODUCTOS DE METILACION TOTAL DEL POLISACARIDO.

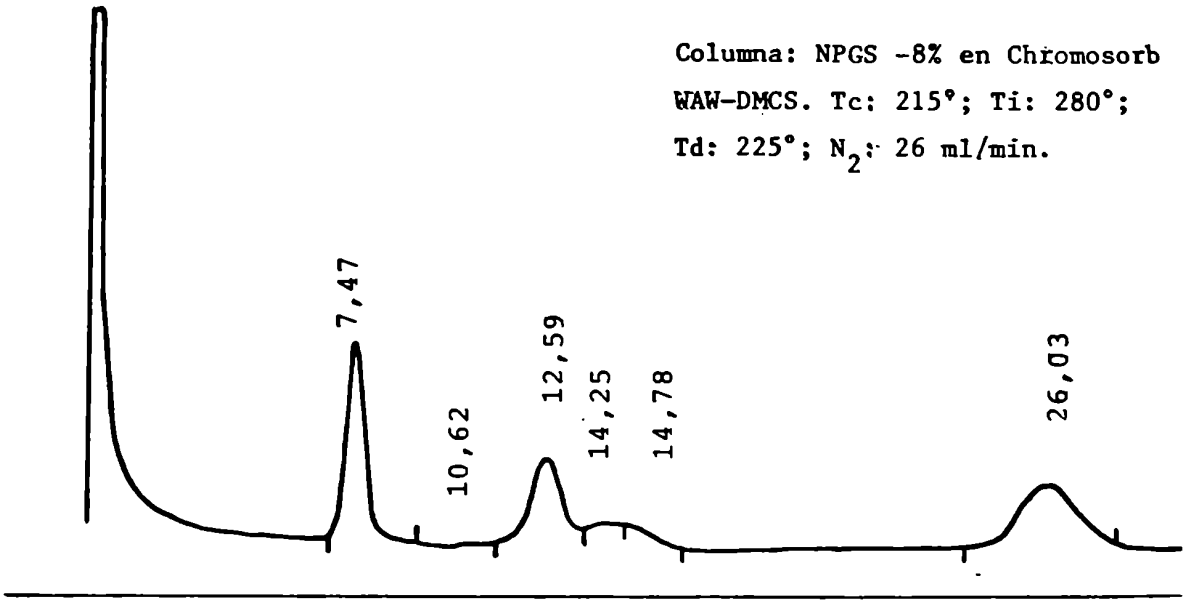


FIGURA 16

CROMATOGRAFIA GAS-LIQUIDO DE LOS PRODUCTOS DE METILACIÓN DEL POLISACARIDO DEGRADADO(C)

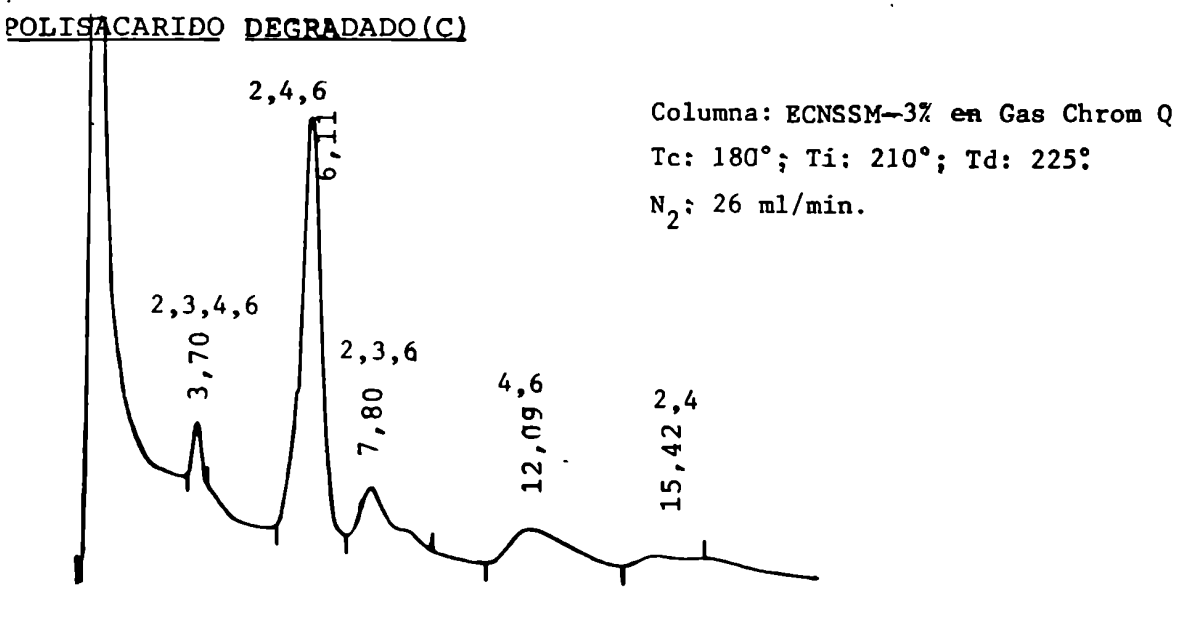
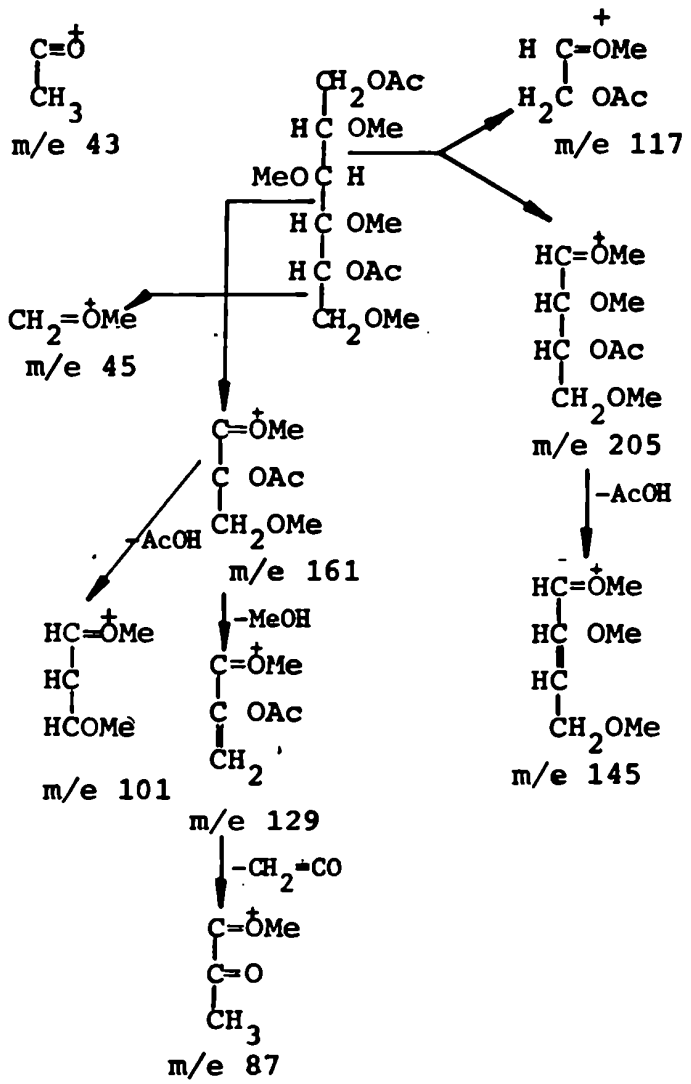


TABLA VI

2,3,4,6-tetra-O-metil-1,5-di-acetil-D-glucitol.

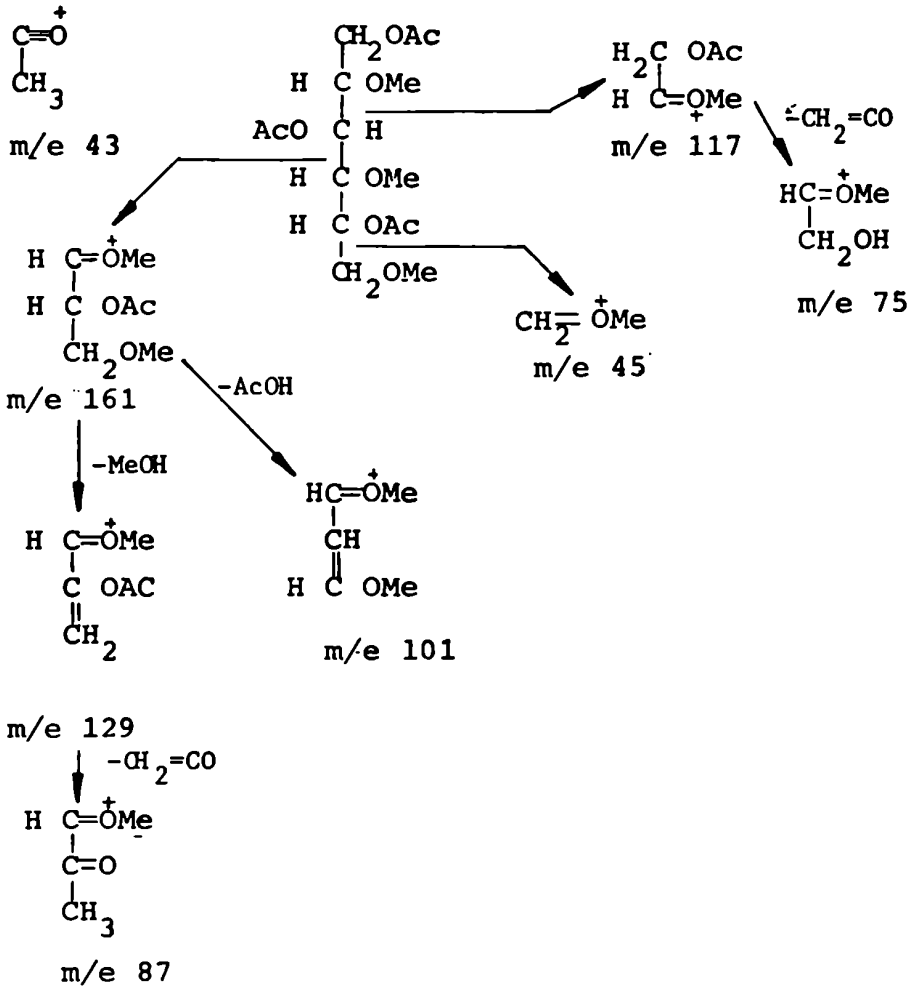


m/e	%	m/e	%
43	100	43	100
45	36	45	21
59	4	59	1
87	15	87	9
88	6	88	3
89	6	89	3
99	4	99	3
101	60	101	32
102	7	102	3
117	34	117	16
129	32	129	14
130	3	130	1
131	4	131	2
145	28	145	14
161	31	161	15

* Datos obtenidos por Björndal y Svensson (1967)

Tabla VI

2,4,6-tri-O-metil-1,3,5-tri-O-acetil-D-glucitol.

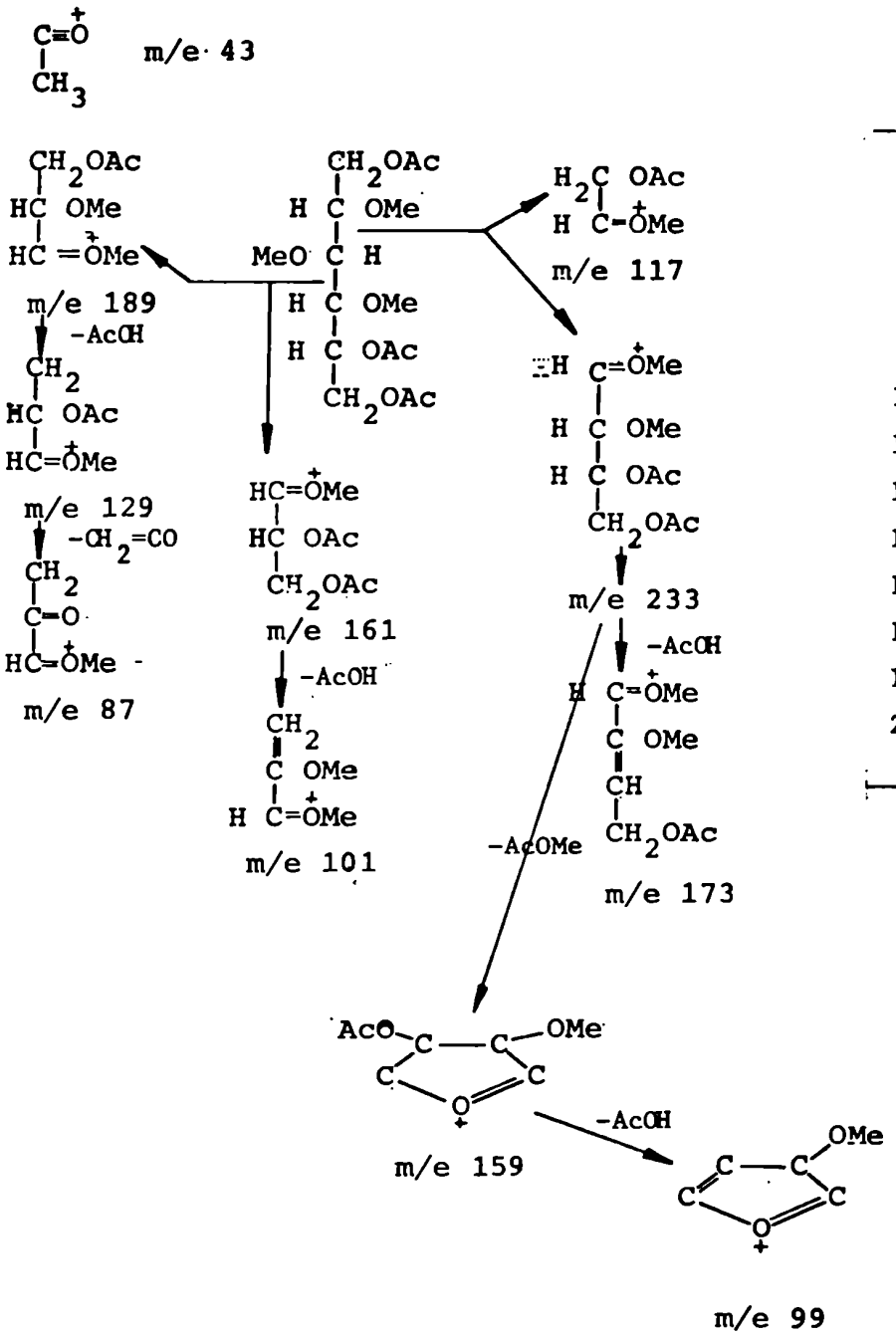


m/e	%
* 43	100
* 45	29
58	8
71	1
74	4
75	2
* 87	7
99	5
* 101	18
* 117	49
118	3
127	5
* 129	30
143	2
159	6
* 161	15
173	2
233	7

* Picos principales según Björndal y Svensson (1967)

TABLA VI

2,3,4-tri-O-metil-1,5,6-tri-O-acetil-D-glucitol.

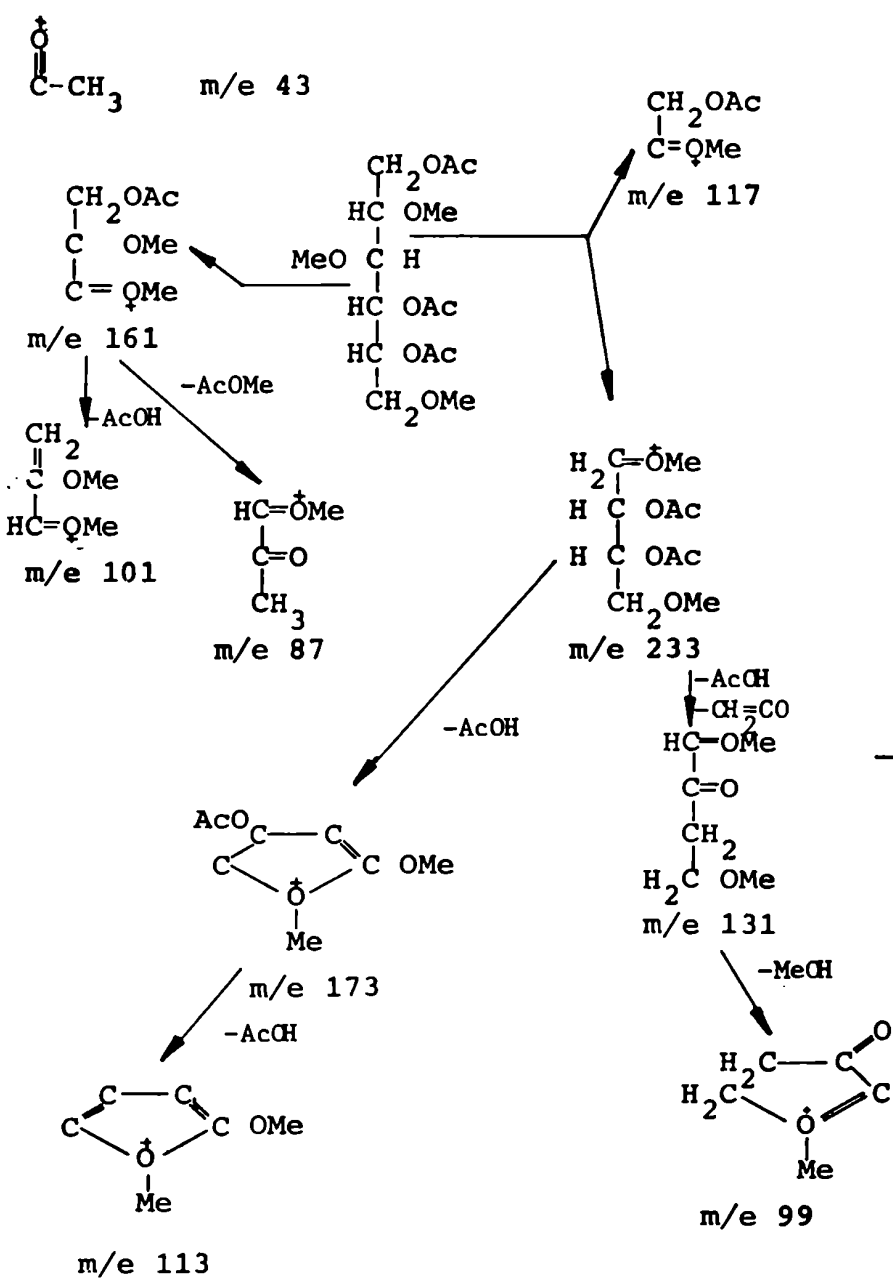


* m/e	%	m/e	%
43	100	43	100
45	11	45	32
87	21	87	11
88	9	88	2
99	26	99	15
101	45	101	28
102	5	102	5
117	32	117	44
129	24	129	28
161	11	161	11
171	4	171	3
189	8	189	2
233	4	233	2

*Datos obtenidos por Axberg y Svensson (1972).

TABLA VI

2,3,6-tri-O-metil-1,4,5-tri-O-acetil-D-glucitol.

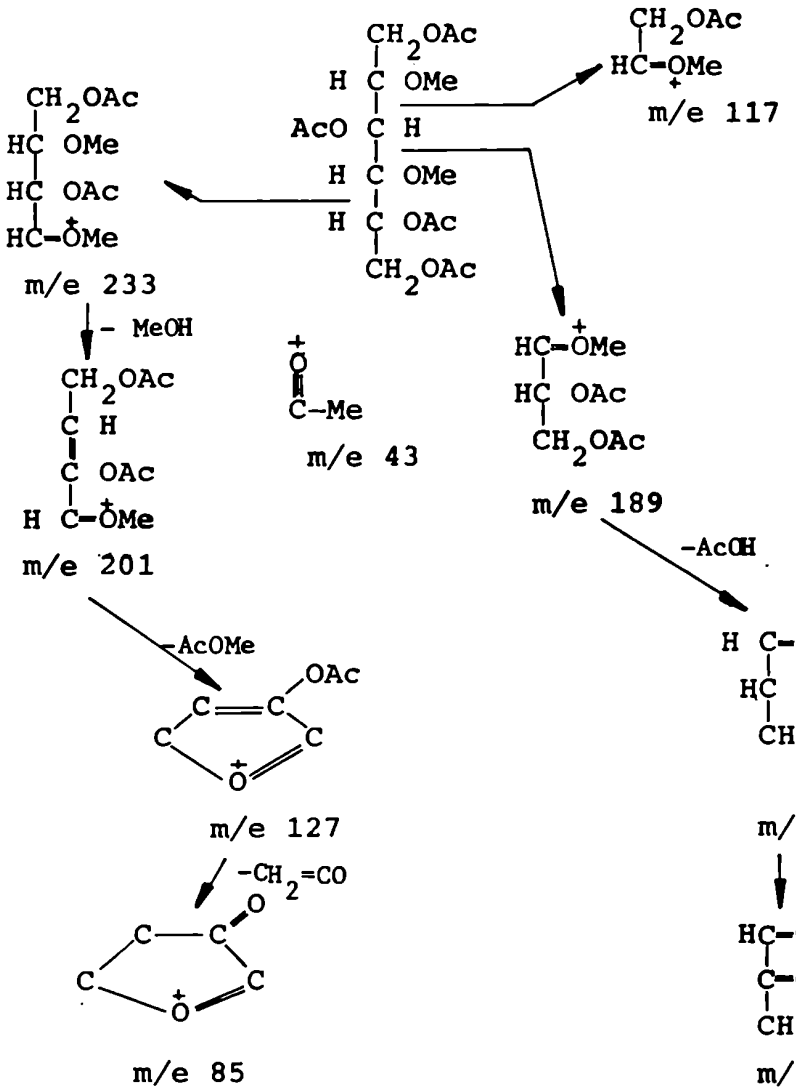


m/e*	%	m/e	%
43	100	43	100
45	20	45	25
59	9	59	3
85	6	85	1
87	17	87	10
99	16	99	7
101	20	101	20
113	28	113	25
117	50	117	35
129	9	129	13
131	9	131	12
161	5	161	5
173	7	173	1
233	16	233	14

* Datos obtenidos por Axberg y Svensson (1972).

TABLA VI

2,4-di-O-metil-1,3,5,6-tetra-O-acetil-D-glucitol.



m/e	%
* 43	100
45	3
57	1
58	9
71	5
85	6
* 87	25
99	8
101	4
* 117	91
* 129	48
139	8
159	9
* 189	19
231	4
233	8

* Picos principales según Björndal y Svensson (1967).

METILACION DEL INSOLUBLE DE LA HIDROLISIS ACIDA PARCIAL (C).

El insoluble de la hidrólisis ácida parcial (C, Esquema 2) del polisacárido en estudio se metiló e hidrolizó por el método usado para el polisacárido original. Los derivados metilados fueron analizados por c.g.l. Por comparación con testigos se detectó 2,3,4,6-tetra-O-; 2,4,6-tri-O-; 2,3,4-tri-O-; 2,3,6-tri-O- y 2,4 y 4,6-di-O-metil glucosas. (Fig. 16).

La relación de azúcares metilados puede verse en la Tabla VII.Como puede observarse el polisacárido degradado presenta una estructura prácticamente lineal (5,4 % de tetra-O-metil-glucosa que está en concordancia con la proporción de 2,4-di-O-metil-glucosa). O sea que en la degradación ácida parcial se perdieron en su mayor parte los azúcares involucrados en las ramificaciones evidenciándose una estructura fundamental de β-(1→3) glucano.

Utilizando la columna NPGS-8% se observó que el pico de Tr 7,8(Fig. 16) correspondía al derivado de la 2,3,6-tri-O-metil glucosa obteniéndose sólo trazas de 2,3,4-tri-O-metil glucosa. Este hecho indicaría que en las ramificaciones que se sueltan en la hidrólisis estarían las uniones (1→6).

La identificación de la 4,6-di-O-metil glucosa que se llevó a cabo por c.g.l.-e.m. (Tabla VIII)y que no había sido encontrada en el análisis del polisacárido original parecía indicar que la metilación no había sido completa.

Otra muestra del polisacárido hidrolizado (C) se metiló por el método de Hakomori y el producto se remetiló por el método de Purdie obteniéndose un resultado similar. En el análisis por metilación del glucano de pared de *Saccharomyces cerevisiae*, Bell y Northcote (1950) encontraron 4,6-di-O-metil glucosa entre los productos, lo cual atribuyeron a la presencia de ramificaciones (1→2) unidas a la cadena principal de β (1→3) glucano. Sin embargo Misaki y col.(1968)

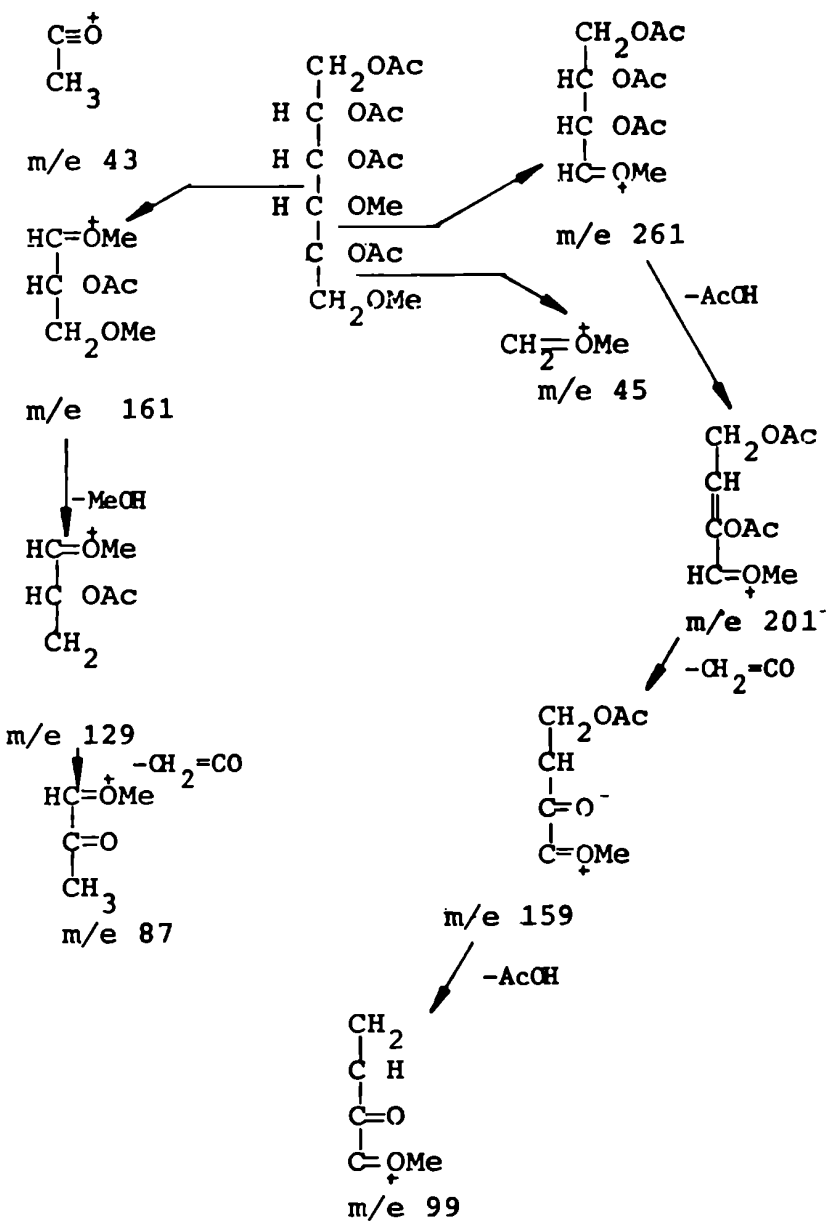
encontraron sólo ramificaciones en C-6 y no pudieron explicar los resultados anteriores aunque presentan la posibilidad de que las diferencias se deban a las condiciones de cultivo.

La presencia de 4,6-di-O-metil glucosa entre los productos de metilación del polisacárido degradado de *C. johowii* podría deberse a que la posición -2 se halla impedida ya sea por un cambio de conformación en el polisacárido degradado o por asociación molecular. Esto estaría de acuerdo con el hecho de que la eliminación de las ramificaciones sólo produce una pequeña variación en el volúmen de elución del mismo en Sephadex G-100 (Fig.13) En concordancia con esto Miyasaki y col (1979) encontraron que un polisacárido de *Grifora umbellata* al cual le eliminaron las ramificaciones (1→6) se eluye cerca del volúmen de exclusión en una columna de Sefarosa 2B, mientras que el polisacárido original se incluía en el gel.

En vista de los resultados obtenidos con *Cyttaria johowii* podría pensarse que el glucano de *S. cerevisiae* estudiado por Bell y Northcote tendría una estructura más lineal que el estudiado por Miyasaki y col.

TABLA VIII

4,6-di-O-metil-1,2,3,5-tetra-O-acetil-D-glucitol.



m/e	%
* 43	15
* 45	17
59	8
75	14
* 87	10
99	32
* 101	19
113	5
127	7
* 129	39
157	12
* 161	100
201	28
* 261	73

* Picos importantes según Björndal y Svensson (1967).

ESTUDIOS DE OXIDACION CON METAPERIODATO DE SODIO.

Es conocido (Bobbit, 1956)que los datos de consumo de periodato y producción de ácido fórmico dan idea del tipo y proporción de uniones glicosídicas presentes en el polisacárido. Los residuos piranósicos unidos a través de C-1 y C-4 o C-1 y C-2 consumen un mol de oxidante. Las uniones piranósicas (1→3) y las ramificadas en C-2 y C-4 son resistentes a la oxidación, mientras que las uniones 1→6 y los grupos terminales no reductores consumen dos moles de periodato y liberan un mol de ácido fórmico. (Fig.17)

Los resultados obtenidos por oxidación con periodato de sodio del polisacárido en estudio corresponden a un consumo de 0,65 moles de periodato de sodio con formación de 0,29 moles de ácido fórmico por mol de glucosa anhidra. Las determinaciones se hicieron según el método de Fleury y Lange (1933).

El ácido fórmico proviene de las uniones 1→6 más las unidades terminales, que representan un porcentaje total del 29 %. El hecho de que haya un consumo de periodato levemente superior al que correspondería a la producción de fórmico estaría de acuerdo con la presencia de uniones (1→4), que consumen un mól de periodato sin producción de ácido fórmico.

El análisis de los productos obtenidos por reducción e hidrólisis total del polisacárido (luego de oxidación con periodato) también permite conocer el tipo de uniones glicosídicas presentes.(Fig. 18) . Por lo tanto el oxopolisacárido se redujo con borohidruro de sodio y el polialcohol resultante se hidrolizó con ácido fórmico y luego con ácido sulfúrico. Se usó este método de hidrólisis pues utilizando sólo ácido sulfúrico 1 N, el polialcohol se insolubilizaba a medida que transcurría la hidrólisis.

La cromatografía gas-líquido de los productos de hidrólisis mostró la presencia de glucosa y glicerol como com-

FIGURA 17

ACCION DEL PERIODATO SOBRE UNIDADES PIRANOSICAS CON DISTINTO TIPO DE UNION.

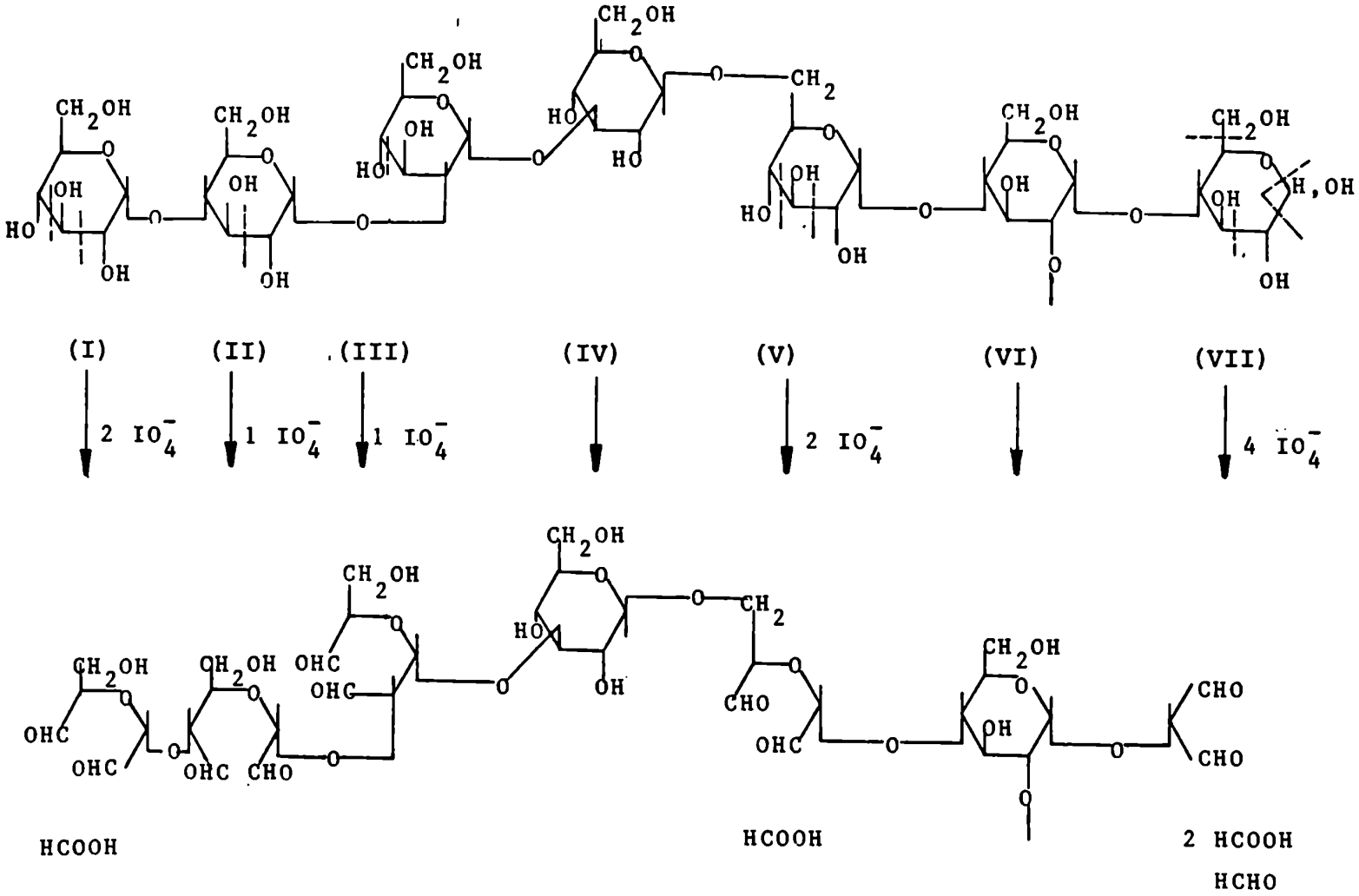
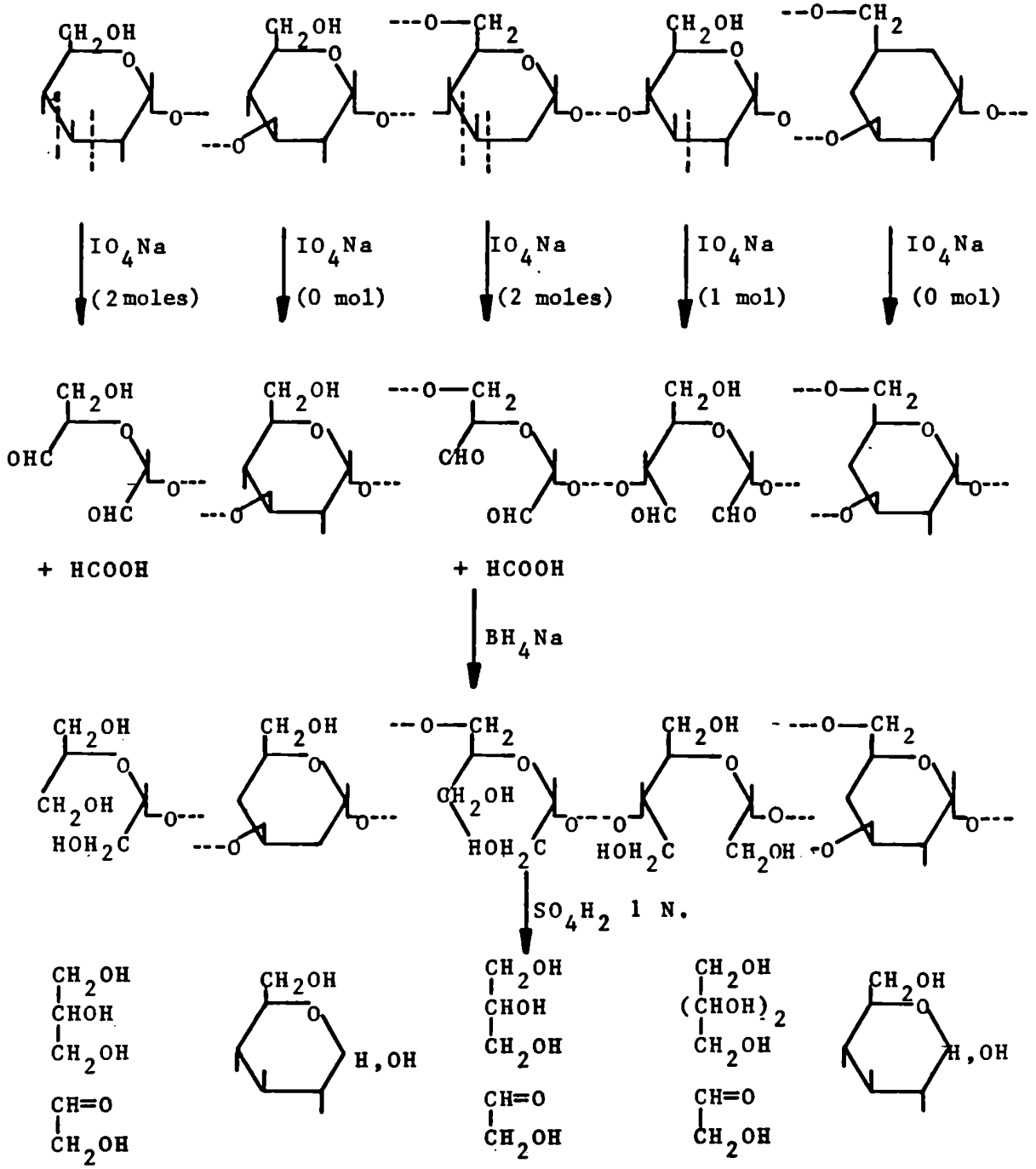


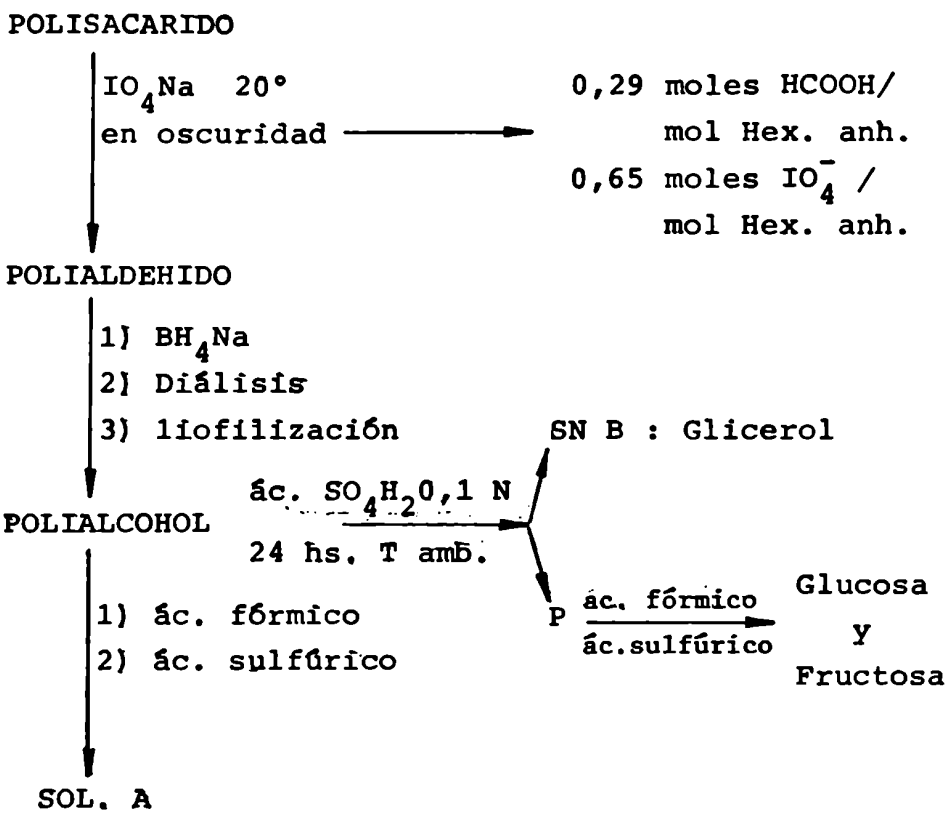
FIGURA 18

ESTUDIOS DE OXIDACION CON PERIODATO.



ESQUEMA 3

RESUMEN DE LOS ESTUDIOS DE OXIDACION CON PERIODATO



Glucosa, Glicerol, Eritritol, Fructosa

ponentes mayoritarios, observándose también fructosa y trazas de eritritol (Fig.19) Esquema 3 .

El polialcohol se sometió a una degradación por el método de Smith en las condiciones descriptas por Misaki y Kanamaru (1968) que consiste en una hidrólisis suave (ácido sulfúrico 0,1 N, 25°, 24 hs) del polialdehido reducido, en forma tal que se rompen las uniones acetálicas pero no las glicosídicas de los residuos no oxidados. En estas condiciones se recuperó el 70 % del polisacárido degradado insoluble (P). En el hidrolizado (B), se observó por cromatografía en papel sólo glicerol, lo cual se confirmó por c.g.l. (Fig.20).

No fue posible detectar glucosilglicerol lo que indicaría la ausencia de uniones (1→6) y (1→3) alternadas.

El polisacárido degradado insoluble dió por hidrólisis ácida total glucosa y fructosa como componente menor.

El hecho de que aparezca fructosa sin oxidar indicaba que la mayor parte no se encontraba como unidad terminal sino unida a través del O-3 u O-4.(Fig.21)

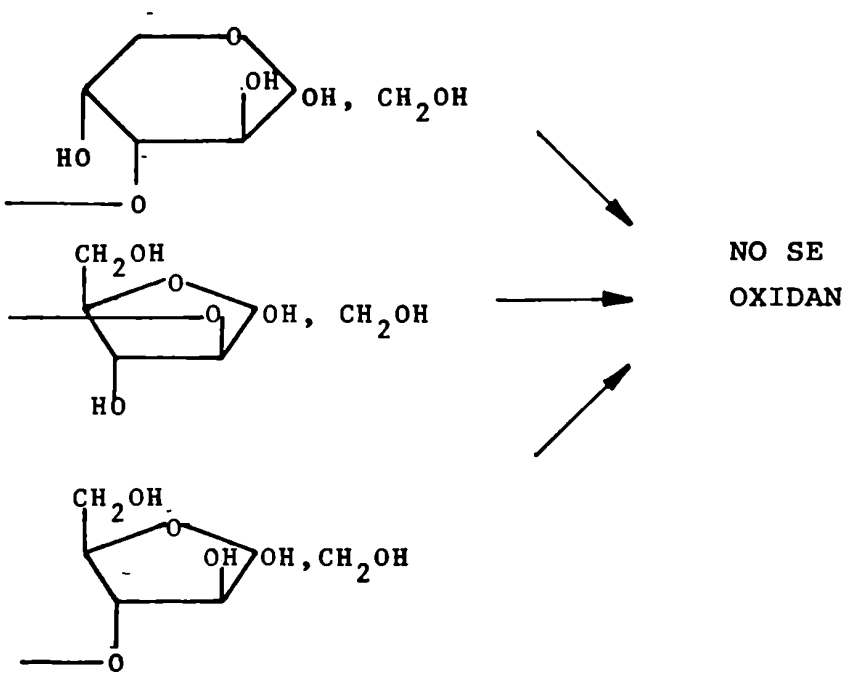


FIGURA 21

FIGURA 19

C.G.L. de los O-trimetilsilil derivados de los Productos de hidrólisis total del polialcohol

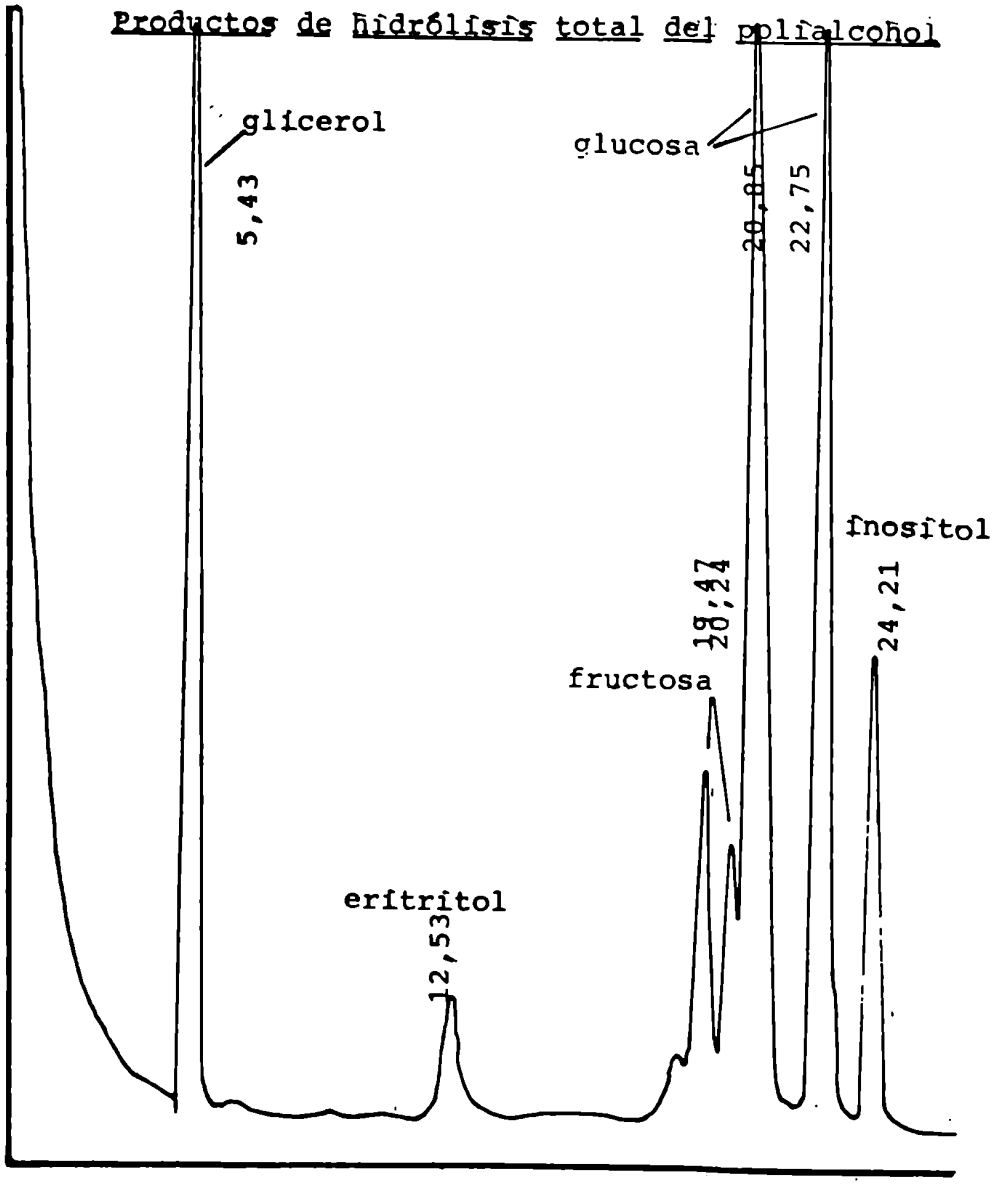
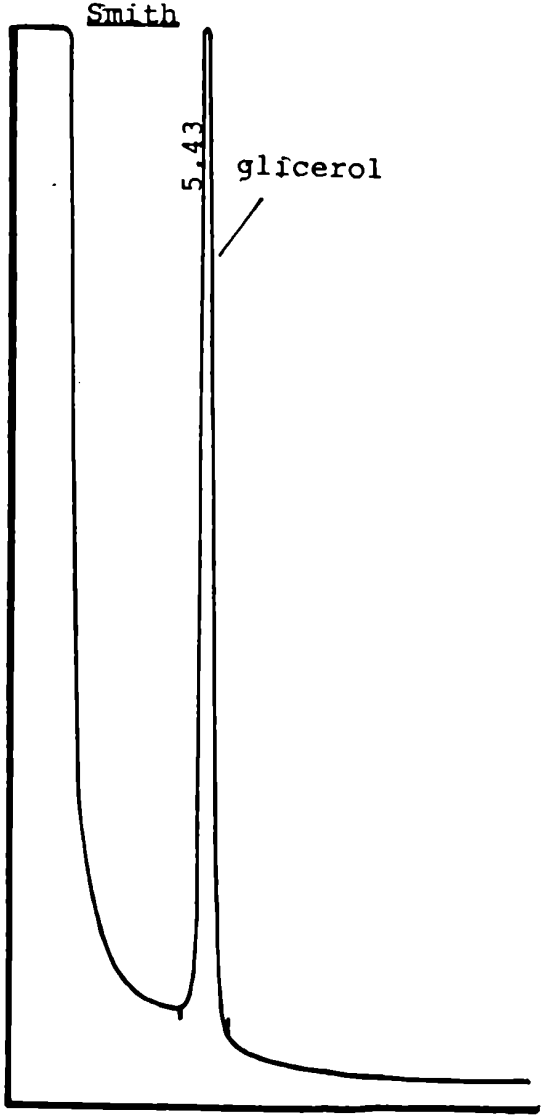


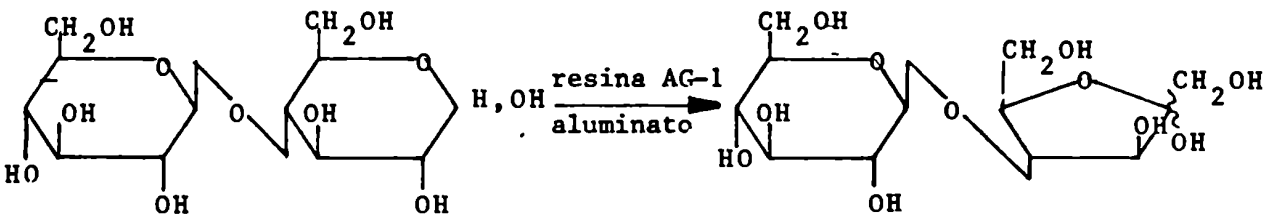
FIGURA 20

C.G.L. de los O-trimetilsilil derivados de los productos de la de degradación de Smith



De los datos obtenidos de la oxidación con periodato de sodio se concluyó que el disacárido que se había obtenido por formólisis del polisacárido que se revelaba con reactivo de cetosas (Esquema 2), podría ser una glucosil fructosa con unión (1→3) o (1→4) α o β . De los cuatro disacáridos posibles, tres de ellos son conocidos: turanosa(18) 3-O-α-D-glucopiranosil-D-fructosa); maltulosa (19 , 4-O-α-D-glucopiranosil-D-fructosa) y celobiulosa (20 ,4-O-β-D-glucopiranosil-D-fructosa). Sin embargo sólo la turanosa es comercial, por lo tanto fue necesario obtener 19 y 20 por isomerización de maltosa (29) y celobiosa (30)respectivamente con resina básica (aluminato) como se describe en la parte experimental.

MALTOSA (29) MALTULOSA (19)



CELOBIOSA (30) CELOBIULOSA (20)

Los productos de isomerización 19 y 20 no fueron purificados del disacárido de partida y algo de fructosa y glucosa que se forman en la reacción pues se distinguían fácilmente de los mismos por su movilidad y por revelarse específicamente con el reactivo para cetosas.

La síntesis de 3-O-β-D-glucopiranosil-D-fructosa (31) se describe posteriormente.

Los disacáridos 18 , 19 , 20 y 31 se compararon por cromatografía en papel utilizando solventes 1, 2 y 3 y revelador c. (Tabla IX)

TABLA IX

Rg DE GLUCOSIL FRUCTOSAS

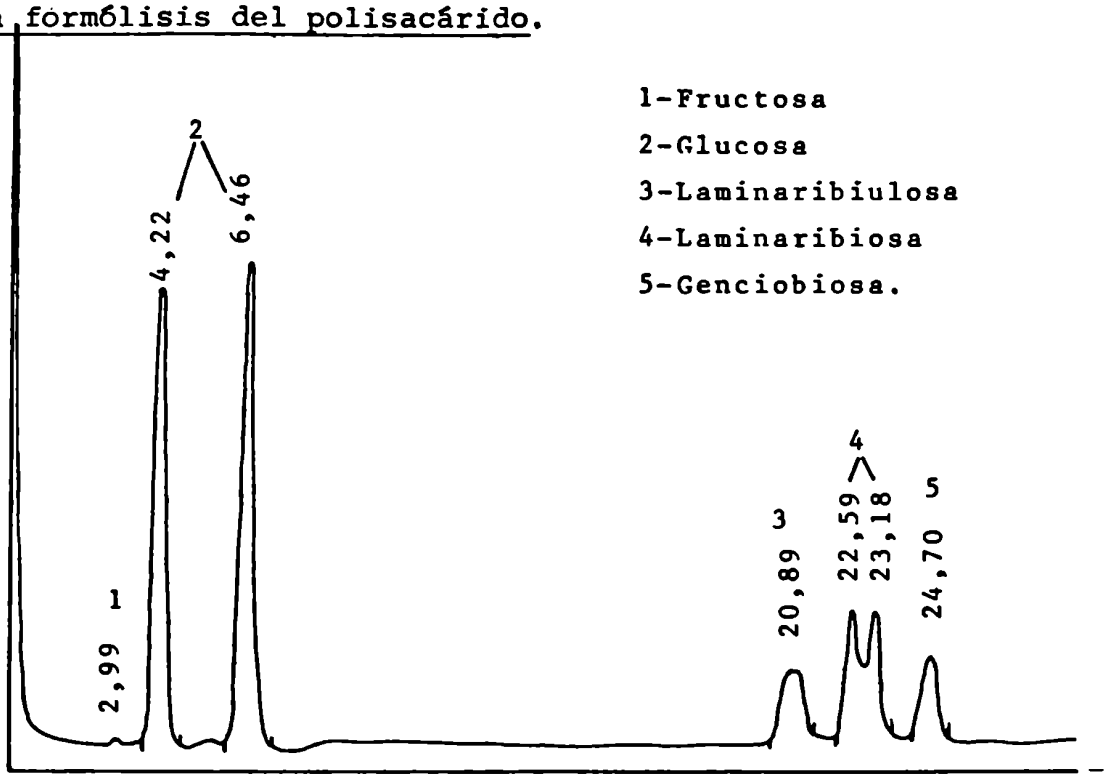
	solvente 1[a]	solvente 2[b]	solvente 3[c]
maltulosa	0,75	0,70	
celobiulosa	0,57	0,45	
turanosa	0,76	0,62	
laminaribiulosa	0,90	0,75	0,60
Disacárido obtenido por hidrólisis	0,90	0,75	0,60

a Butanol:piridina:agua (6:4:3).
b Butanol:etanol:agua (10:4:4)
c Acetato de etilo:piridina:agua (10:4:3)

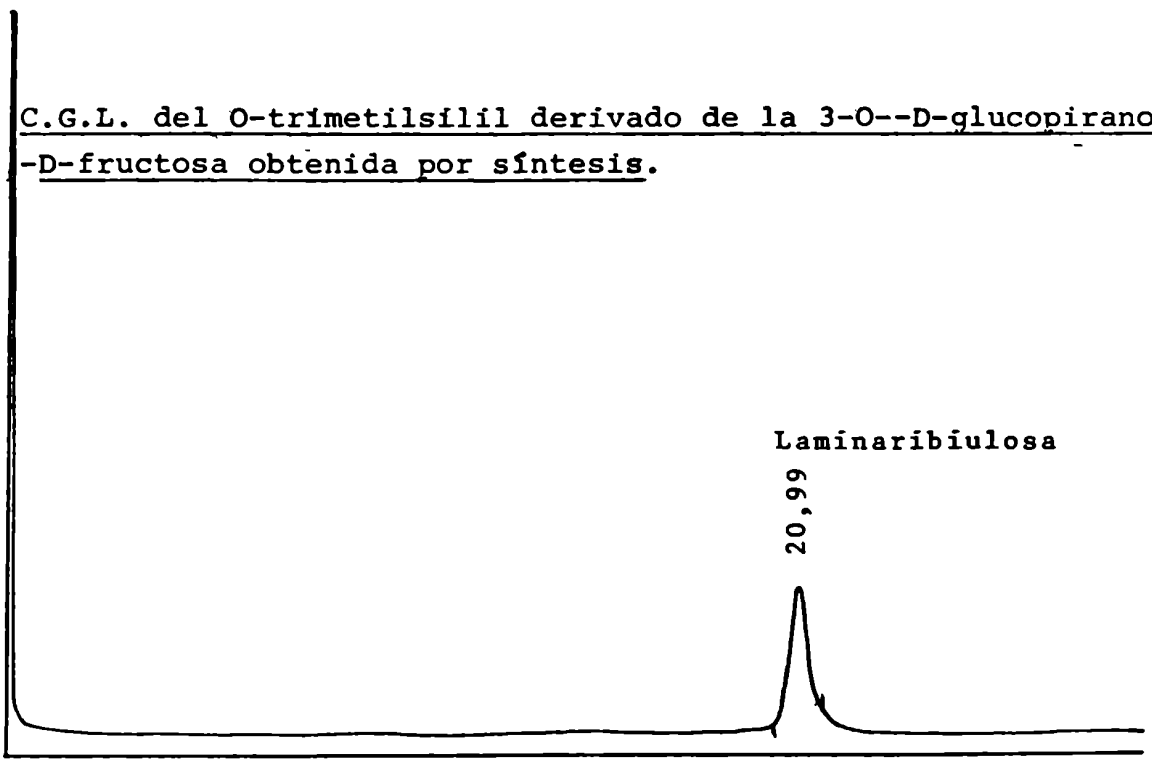
En la Tabla se observa que el Rg del disacárido de cetosa obtenido en la formólisis del polisacárido coincidió con el del 3-O-β-D-glucopiranosil-D-fructosa de síntesis. Se confirmó la identificación por c.g.l. de los O-trimetilsilil derivados obteniéndose Tr coincidente en ambos derivados (Fig.22).

FIGURA 22

Ć.G.L. de los O-Trimetilsilil derivados de los productos de la formólisis del polisacárido.



C.G.L. del O-trimetilsilil derivado de la 3-O--D-glucopiranosil -D-fructosa obtenida por síntesis.



ACCION ANTITUMORAL DEL POLISACARIDO DE *CYTTARIA JOHOWII*

El efecto antitumoral de glucanos de hongos con uniones β-(1→3) y (1→6) había sido descripto(Whistler y col. 1976) por lo cual resultó de interés investigar si el polisacárido aislado de *Cyttaria johowii* inhibía el crecimiento del Sarcoma 180 en ratones.

Si bien los mecanismos por los cuales los polisacáridos promueven el rechazo del tumor no están aún totalmente esclarecidos, su actividad sería fundamentalmente mediada a través del huésped, más que por efecto directo sobre la célula tumoral.

Los resultados obtenidos en los grupos estudiados fueron los siguientes:

a) Inhibición del crecimiento de Sarcoma i.p.: la inoculación de 5 x 10^5 células de Sarcoma 180, produjo la muerte del 100% de los ratones en un lapso de 18 días, mientras que en los tratados con polisacárido después del inóculo tumoral se observó una sobrevida del 44 %.

El aumento del peso corporal como medida del crecimiento tumoral, evidenció al 8° día un incremento del 21,5% respecto al peso inicial en los animales inoculados solamente con tumor, mientras que en el grupo tratado con polisacárido no hubo modificación.(Tabla X)

b) Inhibición del crecimiento del Sarcoma 180 i.d.: el tratamiento con polisacárido inhibió el desarrollo tumoral permitiendo una sobrevida del 93 % a los 75 días, mientras que en los ratones que no recibieron polisacárido se observó 0% de sobrevida. La media de días de sobrevida fue significativamente superior en el grupo tratado con polisacárido.(Tabla XI).

TABLA X

ACCION DEL POLISACARIDO SOBRE EL CRECIMIENTO DEL S 180 I.P.

GRUPO	N°de ratones	Peso del ratón (grs)				% Sobrevida a los 75 días	Días de Sobrevida	
		Inicial		8 Días				
		X	ES	X	ES		X	ES
S 180	18	20,4	±0,6	24,8	±0,7	0 [a]	18,7	± 1,3 [b]
S 180 + PLS	18	17,3	±0,9	16,2	±0,6	44 [a]	24,7	± 1,7 [b]

(a) P 0,001 por test X^2

(b) P 0,01 por test t

% de crecimiento S 180 IP 8 día = 21,5 % grupo S 180.

% de crecimiento S 180 IP 8 día = 0 % grupo S 180 +PLS.

TABLA XI

ACCION DEL POLISACARIDO SOBRE EL CRECIMIENTO DEL S 180 Id.

GRUPO	N°de ratones	Medida del tumor (cm^2) 8° día X	Medida del tumor (cm^2) 8° día ES	% de Sobrevida a los 75 días	Días de Sobrevida X	Días de Sobrevida ES
S 180	15	0,36	0,10	0 (c)	65,0	1,0 (d)
S 180 + PLS	15	0,15	0,06	93 (c)	94,0	3,9 (d)

(c) P 0,001 por test X^2.

(d) P 0,001 por test t .

Por lo tanto fue posible observar un franco porcentaje de inhibición del crecimiento del Sarcoma 180 ascítico, inoculado tanto por vía i.p. como i.d.. Se comprobó además que el polisacárido inducía menor mortalidad y aumento en los días de sobrevida.

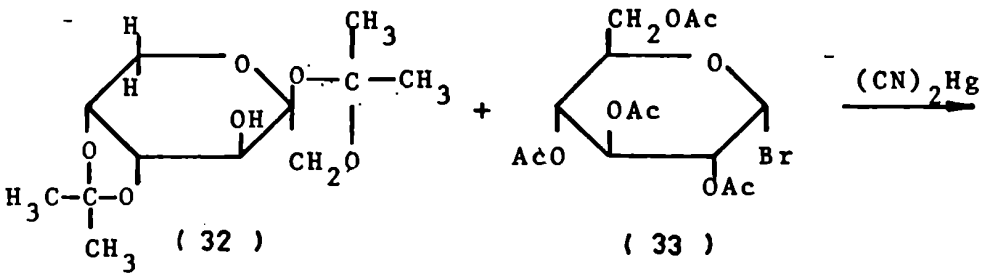
SINTESIS DE 3-O-β-D-GLUCOPIRANOSIL-D-FRUCTOSA.(31)

Todas las evidencias experimentales indicaban que el disacárido detectado entre los productos de hidrólisis del polisacárido en estudio sería la 3-O-β-D-glucopiranosil-D-fructosa (31) no descripta en la literatura.

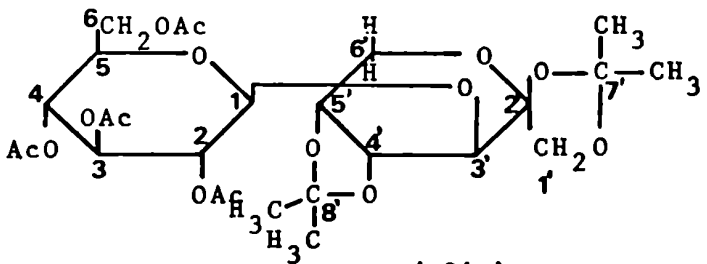
Así como la designación maltulosa (19) indica que se trata de la glicosilfructosa derivada de la maltosa (29) por reemplazo de la unidad reductora por fructosa, podemos llamar a la 3-O-β-D-glucopiranosil-D-fructosa, laminaribiulosa, para señalar su relación con la laminaribiosa (26).

A fin de corroborar la presencia de esa unidad en el polisacárido se procedió a su síntesis. Esta se encaró a partir de una reacción de tipo Koenigs-Knorr por condensación del bromuro de 2,3,4,6-tetra-O-acetil-α-D-glucopiranosilo(33) y de 1,2:4,5-di-O-isopropiliden-β-D-fructopiranosa (32) aplicando la técnica descripta por Lipták y col. (1980) para la condensación de 33 con 1,2:5,6-di-O-isopropiliden-α-D-glucofuranosa (35).

Los compuestos 32 y 33 fueron preparados a partir de glucosa y fructosa respectivamente como se describe en la parte experimental.



(32) (33)



(34)

La condensación se llevó a cabo en dos condiciones diferentes:

A) en benceno:nitrometano (1:1) durante cinco horas a 45°, utilizando cianuro de mercurio como catalizador. El 1,2:4,5-di-O-isopropiliden-3-O-(2,3,4,6-tetra-O-acetil-β-D-glucopiranosil)-β-D-fructopiranosa (34) se obtuvo en forma cristalina p.f. 149-151°, luego de cromatografiar la mezcla de reacción por columna de sílica gel H. Después de esta primera cristalización se pudo obtener el disacárido sustituído directamente de la mezcla sembrando con cristales de 34 , con un rendimiento de 26 %.

En la separación por columna se recuperó también 1,2:4,5-di-O-isopropiliden-β-D-fructopiranosa (32) que no reaccionó y 2,3,4,6-tetra-O-acetil-D-glucopiranosa producto proveniente de la descomposición del compuesto 33 .

La estructura de 34 fue establecida en base a datos químicos y espectroscópicos.

El análisis elemental de C e H estaba de acuerdo con la estructura propuesta y el compuesto presentaba un $[\alpha]_D^{20}$ -81,5° (c 0,8; Cl_2CH_2).

El espectro i.r. mostraba entre otras absorciones a 1760 cm^{-1} que correspondería a los carbonilos de los grupos acetatos presentes y a 859-833 cm^{-1} característica de los anillos 1,3-dioxolano. A 890 cm^{-1} se observa una señal que correspondería a la unión β-glucosídica. Estos datos coinciden con los asignados para el β-metil 2,3,4,6-tetra-O-acetil-glucopiranósido (Tipson e Isbell 1960) y para la 1,2:4,5-di-O-isopropiliden-β-D-fructopiranosa (Tipson y col. 1959).(32)

El espectro de resonancia magnética protónica (Fig.23) presentaba las siguientes señales: cuatro singuletes a δ 1,33; 1,38; 1,48 y 1,52 que integraban para 12 H, correspondientes a los cuatro grupos metilo de los sustituyentes O-isopropiliden. A δ 1,98; 2,0; 2,06 y 2,1 cuatro singuletes que integraban para 12 H característicos de los cuatro grupos acetato presentes en la molécula.

Entre las señales correspondientes a los protones de los dos anillos de hexosas se pueden distinguir las siguientes: A campos más altos, δ 3,7 aparece un doblete que integra para un hidrógeno que podría atribuirse al H-3´de la fructosa con un $J_{3,4}$= 7 Hz. Herve y col. (1979) dan para la 3-O-metil-1,2: 4,5-di-O-isopropiliden-β-D-psicopiranosa un δ 3,49 para el H-3.

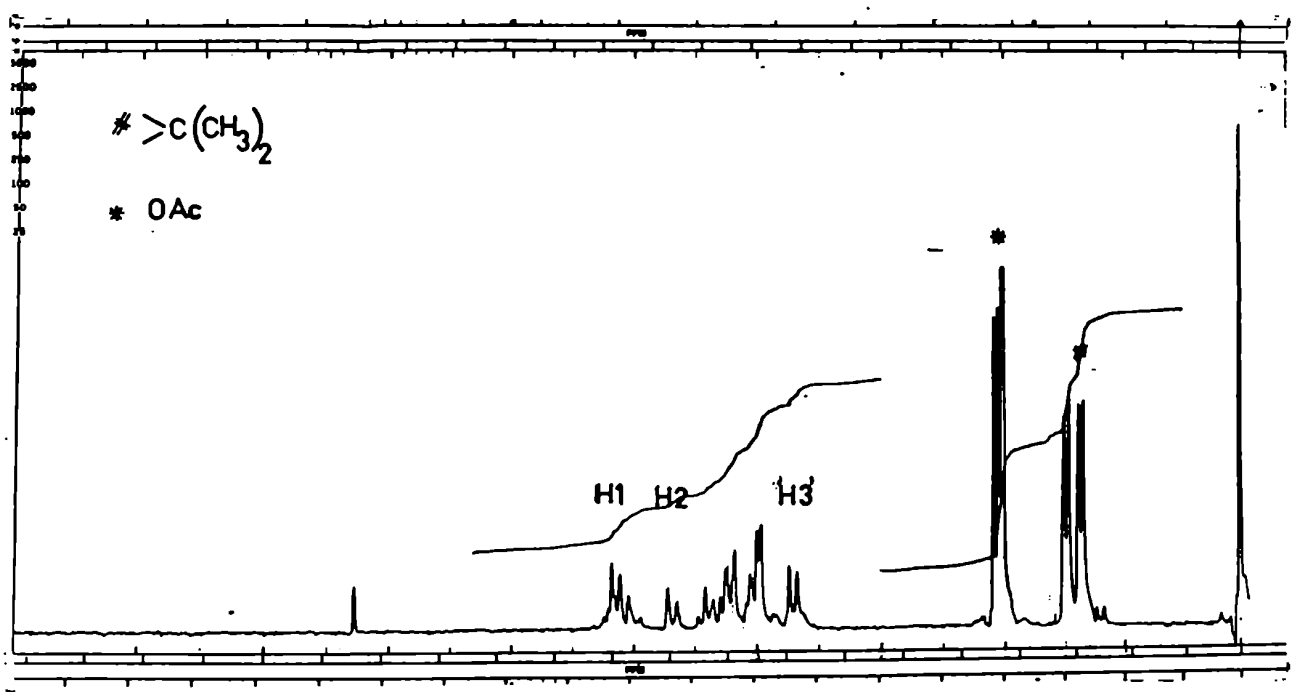
A campos más bajos aparece el H-1 de la glucosa como un doblete fácilmente distinguible a δ 5,15 con $J_{1,2}$ 8Hz. Esta partición indicaría una relación axial-axial con el H-2 lo que confirmaría la unión β del disacárido.

Los H-3 y H-4 aparecen parcialmente superpuestos entre sí y con el H-1 a δ 4,95-5,15.

El H-2 de la glucosa aparece a δ 4,68 con un $J_{1,2}$ y $J_{2,3}$de 8 Hz. Los protones metilénicos de las dos unidades en la zona de δ 4- 4,5 son difíciles de diferenciar.

FIGURA 23

ESPECTRO DE RMN-^{1}H DEL COMPUESTO 34.

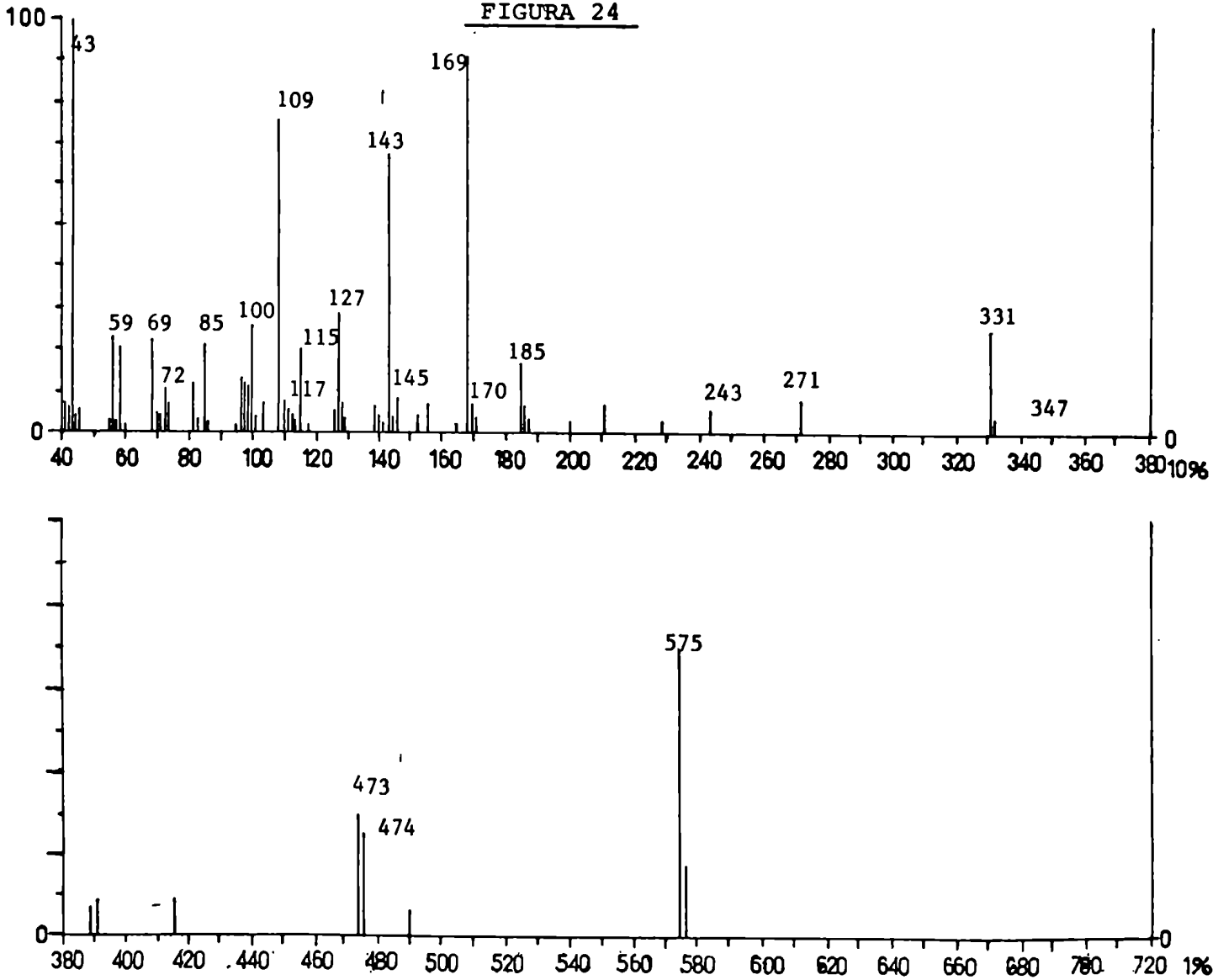


El espectro de masa del compuesto 34 (Fig. 24) no mostró el ión molecular, lo cual es característico de este tipo de compuestos, pero sí el ión M-15 formado por pérdida de un grupo $-CH_3$ de uno de los grupos isopropiliden.

Los fragmentos que asegurarían la estructura propuesta son aquellos que involucran al grupo dioxolano entre los C-1´y C-2´que indicarían ausencia de reordenamientos durante la reacción. Estos serían el m/e 117 que aparece por ruptura del anillo fructopiranósico entre C-2´y C-3´con reordenamienro posterior y el m/e 72 que se origina a partir de aquel. Estos fragmentos son también característicos de la 1,2:4,5-di-O-isopropiliden-β-D-fructopiranosa (32) (Johngh y Biemann 1964) e indican las posiciones de los dos anillos dioxolano. También se observa el pico de m/e 473 que corresponde a M-117. (Esquema 4).

El resto de las fragmentaciones se originarían por ruptura del disacárido en dos partes, conteniendo cada una de ellas la estructura de uno de los monosacáridos involucrados. Así aparecen los fragmentos de m/e 331 derivado del resto tetra-O-acetil-glucopiranósido y el ión m/e 243 del di-O-isopropiliden fructopiranósico. De estos dos fragmentos se derivan los iones característicos de los hidratos de carbono acetilados y por otra parte de las di-O-isopropiliden hexopiranosas. En la Tabla XI pueden verse los iones formados más significativos y sus intensidades relativas.

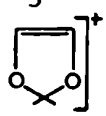
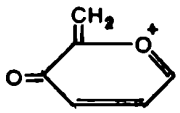
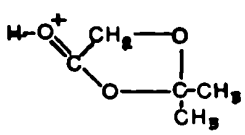
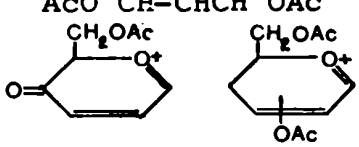
FIGURA 24

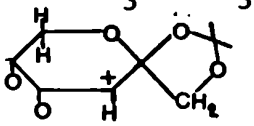
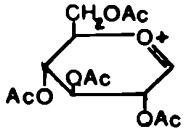
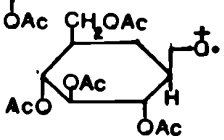


ESPECTRO DE MASA DE LA 1,2:4,5-di-O-isopropiliden-3-O-(2,3,4,6-tetra-O-acetil-β- D-glucopiranosil)-β-D-fructopiranosa.(34).

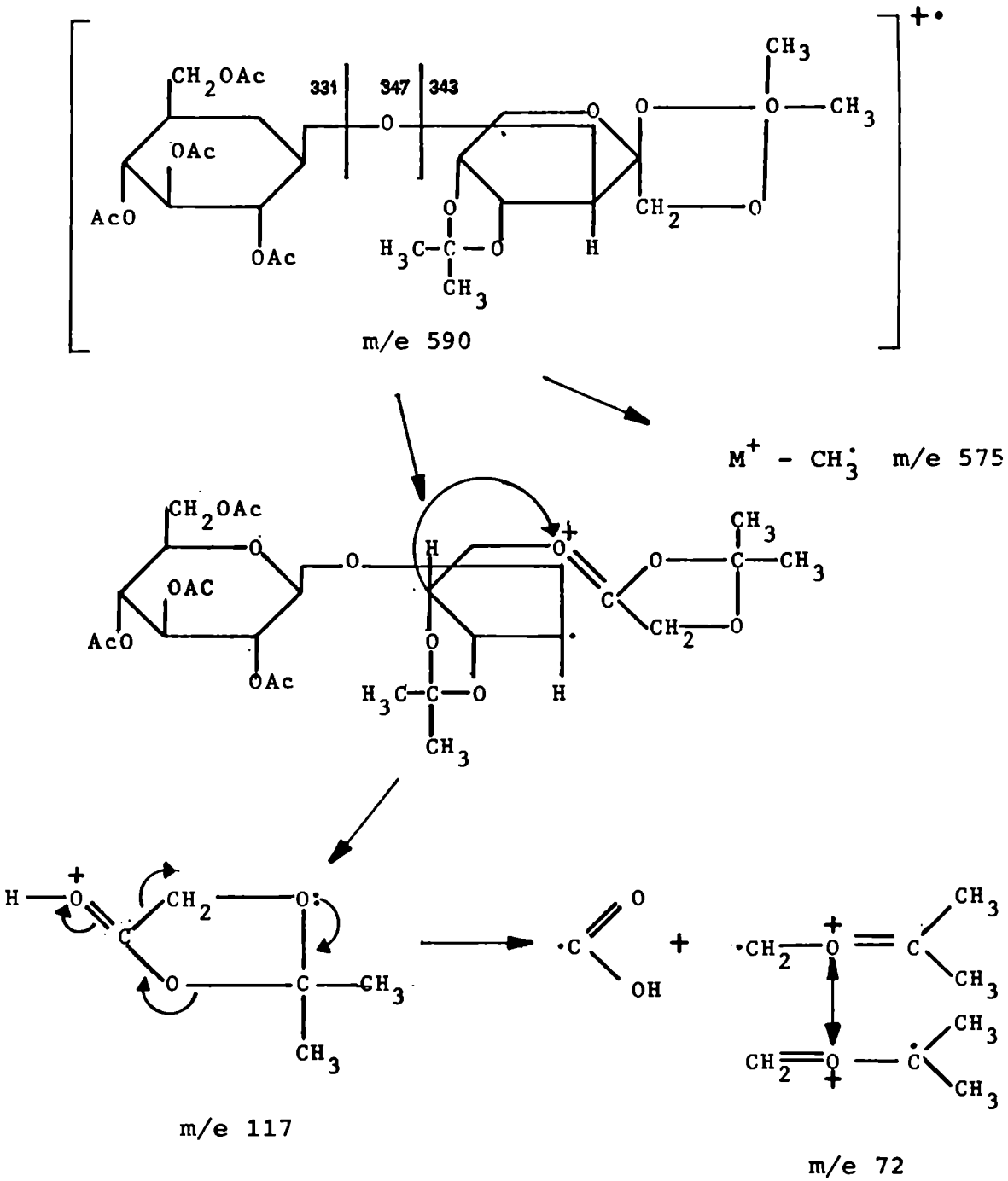
TABLA XI

FRAGMENTOS PRINCIPALES DEL ESPECTRO DE MASA DEL COMPUESTO

ION m/e	INTENSIDAD RELATIVA	FRAGMENTO
43	100	$CH_3C{\equiv}O^+$
59	22,2	$CH_3C(OH)=CH_3$
69	23,2	
72	11,6	$CH_2O{=}C^+(CH_3)CH_3$
85	23,2	$100-CH_3$
100	29,5	
109	74,4	
115	22,6	$157-CH_2CO$
117	3,2	
127	32,6	$243-2\ CH_3CO\ CH_3$
143	66,1	$M^+-(331+\ 2\ CH_3CO\ CH_3)$
145	11,9	$CH_3CO-O^+(COCH_3)-CO\ CH_3$
157	9,1	$AcO\ CH{=}CH\overset{+}{C}H\ OAc$
169	92,12	
170	13,4	$243-CH_3COCH_3\ CH_3$

ION m/e	INTENSIDAD RELATIVA	FRAGMENTO
185	18,9	243-$CH_3CO\ CH_3$
243	5,8	
271	8,6	331-AcOH
331	26,3	
347	1,4	
473	1,5	M-117
474	1,1	M^+-$CH_3CO\ CH_3$
575	3,4	M^+- CH_3

ESQUEMA 4 -



El espectro de RMN-^{13}C (Fig.25 , Tabla XII) mostró a δ 170,4; 170,0; 169,1 y 169,0 cuatro señales debidas a los carbonos carbonílicos de los cuatro grupos acetato presentes en la molécula, así como a δ 20,6 y 20,7 dos señales que se deberían a los $-CH_3$ de dichos grupos, que por ser practicamente equivalentes aparecerían en parte superpuestos. A δ 25,8 26,1; 26,3 y 27,8 aparecen cuatro señales correspondientes a los cuatro grupos isopropiliden presentes y a δ 111,6 y 108,8 dos señales correspondientes a los carbonos cuaternarios de los anillos dioxolano presentes. A pesar de que ambos anillos son de tipo dioxolano, uno de ellos (el que se encuentra entre C-1´y C-2´aparece a campos menores por estar involucrado en su formación el C-1´primario.

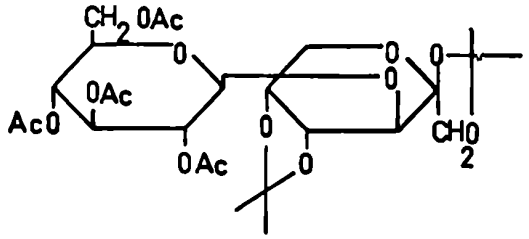
Los valores obtenidos estarían de acuerdo con los desplazamientos de los carbonos cuaternarios de la 1,2:4,5-di-O-isopropiliden-β-D-fructopiranosa(32) que aparecen a 111,9 y 109,5 respectivamente. (Prisbe,y col. 1976) En el caso de la 2,3:4,5-di-O-isopropiliden-β-D-fructopiranosa (35) donde ambos anillos dioxolano están formados por carbonos secundarios, los carbonos acetálicos aparecen a δ 108,9 y 108,7.

Las señales a δ 103,5 y 101,4 están en la zona de los carbonos anoméricos. La señal a campos menores podría asignarse al C-2´de la fructosa por comparación con la 1,2:4,5-di-O-isopropiliden -β-D-fructopiranosa (32), mientras que la señal a δ 101,5 correspondería al C-1 ,β-glucosídico. Esta señal estaría de acuerdo con la obtenida para β-D-glucopiranosil glucosas sustituídas en forma similar (compuestos 36 , 37) (Tabla XII).

La Tabla XIII resume los corrimientos observados en los carbonos del anillo de la glucopiranosa sustituída cuando el acetilo de C-1 en la β-penta-O-acetil-D-glucopiranosa es reemplazado por un grupo 1,2:4,5-di-O-isopropiliden-β-D-fructopiranósico y se comparan con los corrimientos por glicosidación en la laminaribiosa (36) y genciobiosa(37) derivatizadas de la misma forma. Se incluyen también los datos

FIGURA 25

ESPECTRO DE RMN-^{13}C DE LA 1,Ø:4,5-di-O-isopropiliden-3-O-(2,3,4,6-tetra-O-acetil-β-D-glucopiranosil)-β-D-fructopiranosa (34).



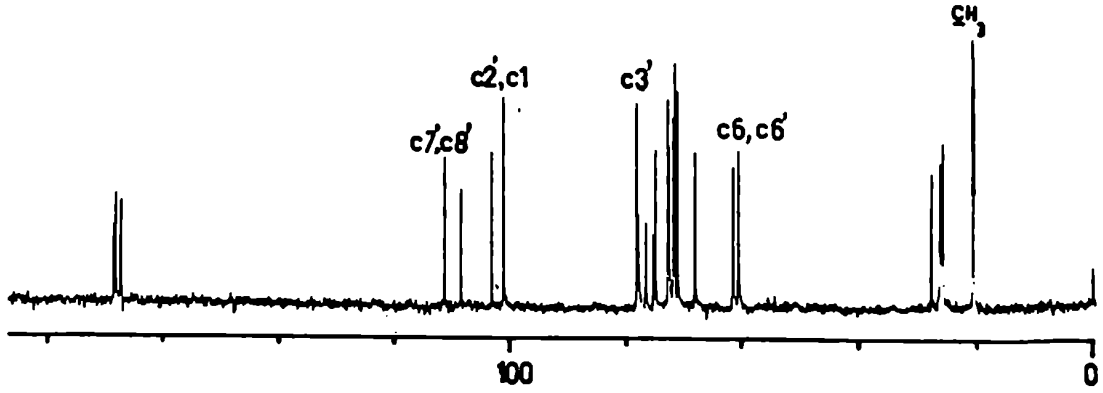


TABLA XII

COMPUESTO	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	C-1'	C-2'	C-3'	C-4'	C-5'	C-6'	C-7'	C-8'
β-metil-D-glucopiranósido	104,3	74,2	76,9	70,8	76,9	61,9								
α-metil-D-glucopiranósido	100,3	72,5	74,2	70,6	72,7	61,7								
β-metil-2,3,4,6-tetra-O-acetil-D-glucopiranósido	95,4	73,3	72,7	68,7										
α-metil-2,3,4,6-tetra-O-acetil-D-glucopiranósido	89,2	69,4	70,0	68,1	70,0	61,6								
1,2:5,6-di-O-isopropiliden 3-O-(2,3,4,6-tetra-O-acetil β-D-glucopiranosil)α-D-glucofuranosa	99,4	72,9	73,1	68,4	71,6	62,0	105,1	83,0	81,3	80,6	72,3	66,3	112,0	108,6
1,2:3,5-di-O-isopropiliden 6-O-(2,3,4,6-tetra-O-acetil β-D-glucopiranosil)α-D-glucofuranosa	101,3	72,1	73,1	68,9	71,8	62,2	106,5	84,2	75,2	79,2	71,6	70,2	112,3	111,0
1,2:4,5-di-O-isopropiliden 3-O-(2,3,4,6-tetra-O-acetil β-D-glucopiranosil)β-D-fructopiranosa	101,5	72,9	71,5 *	68,5	71,9	61,9	72,3	103,5	78,6	75,3	71,4 *	61,0	111,6	108,8
2,3:4,5-di-O-isopropiliden 1-O-(2,3,4,6-tetra-O-acetil β-D-glucopiranosil)β-D-fructopiranosa	100,1	71,8	71,3	68,3	70,9	62,2	73,0	101,8	70,0	69,7	69,5	61,1	108,8	108,6
1,2:4,5-di-O-isopropiliden β-D-fructopiranosa							72,4	104,7	70,3	77,4	73,5	60,9	111,9	109,5
2,3:4,5-di-O-isopropiliden β-D-fructopiranosa							65,5	102,9	70,9 *	70,7 *	70,0 **	61,2	108,9	108,4
1,2,3,4,6-penta-O-acetil β-D-glucopiranosa	91,8	70,5	72,9	68,0	72,9									
1,2:5,6-di-O-isopropiliden α-D-glucofuranosa							104,5	85,0	73,1	80,9	72,2	66,0	110,5	107,8
1,2:3,5-di-O-isopropiliden α-D-glucofuranosa							106,5	84,3	75,3	79,2	72,8	63,6	112,3	101,0
1,2:4,5-di-O-isopropiliden 3-O-(β-D-glucopiranosil) - D-fructopiranosa.	103,9	73,6	76,6 *	70,1	76,2 *	62,0	71,9	104,1	79,5	76,1 *	73,4	60,7	112,0	108,9
laminaribiosa	103,1	73,8	75,8	69,8	75,8	61,8	96,3	73,8	85,8	69,3	75,8	61,8		

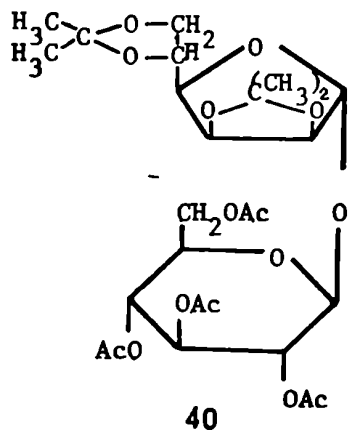
TABLA XIII

VARIACION DEL DESPLAZAMIENTO QUIMICO CUANDO SE REEMPLAZA EL 1-$COCH_3$ DE LA PENTA-O-ACETIL-D-GLUCOPIRANOSA POR DI-O-ISOPROPILIDEN HEXOSILOS.

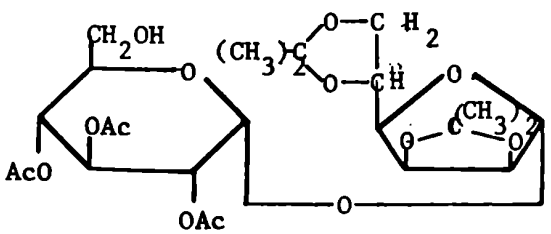
COMPUESTO	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6
34	+9,68	+2,4	-1,4	+0,48	-1,0	+0,3
36[a]	+7,6	+2,4	+0,2	+0,6	-1,3	+0,4
42	+8,31	+1,3	-1,6	+0,5	-2,0	+0,56
37[a]	+9,5	+1,6	+0,2	+0,9	-1,1	+0,6
40[b]	+7,0	+1,0	0	+0,2	-0,5	+0,3
41[b]	+2,2	+0,8	+0,1	+0,5	-1,8	+0,2

a- Lipták y Nánási (1980).

b- Komura y col. (1978).



40



41

por glicosidación con 2,3:5,6-di-O-isopropiliden-α-D-manofuranosa (38) obtenida por Komura y col.(1978). El derivado del disacárido con unión α que se utilizó para la comparación fue el único encontrado en la literatura con los mismos sustituyentes. Se observa un gran corrimiento a campos menores del C-1 en los casos en que la unión es β (7-9 ppm) mientras que en el caso de la glicosidación en α el corrimiento es muy pequeño (2,2 ppm). Estas diferencias están de acuerdo con las observadas para las glucobiosas totalmente acetiladas donde el átomo de carbono anomérico de la forma α está desplazado 4 a 5 ppm a campos más altos con respecto a la señal del C-1 en la forma β (Gagnaire,Taravel y Vignon 1976).

Un corrimiento en el mismo sentido se observa en el carbono β al glucosídico coincidiendo exactamente la magnitud de ese corrimiento en el caso del compuesto 34 y del derivado de la laminaribiosa (36). La variación en el desplazamiento del C-3 de 34 hacia campos mayores con respecto a los compuestos de referencia en. los cuales no se observa influencia sobre este carbono, podrían deberse a efectos de compresión estérica mayores en los glicósidos de fructosa.

Por otra parte, la señal a δ 78,6 (Tabla XII) ha sido asignada al C-3' del anillo fructopiranósico desplazado con respecto a la 1,2:4,5-di-O-isopropiliden-β-D-fructopiranosa (32) por la glicosidación. Este desplazamiento confirmaría también la unión glicosídica pues estaría de acuerdo con los valores encontrados (6-8 ppm) por Gagnaire y col. (1976) para glucobiosas totalmente acetiladas unidas en forma β , mientras que la glicosidación en α produce corrimientos menores (~5ppm).

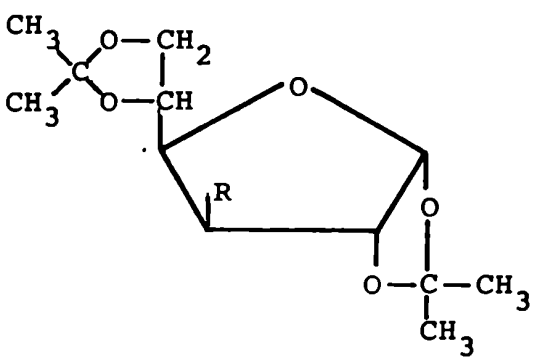
En la Tabla XIV podemos ver los corrimientos de los C' del anillo fructopiranósico con respecto a los desplazamientos de los carbonos de la 1,2:4,5-di-O-isopropiliden-β-D-fructopiranosa (32) y compararlos con los corrimientos para los derivados de la laminaribiosa (36) y genciobiosa (37) con respecto a las correspondientes di-O-isopropiliden hexosas. (38, 39)

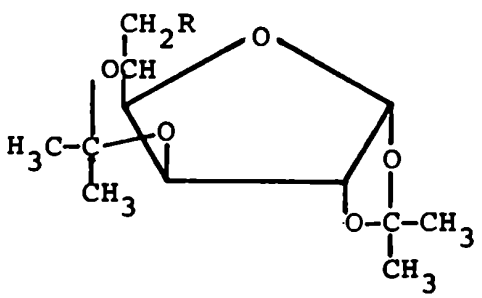
TABLA XIV

δ_c EN LAS DI-O-ISOPROPILIDEN-HEXOSAS CORRESPONDIENTES POR GLUCOSIDACION.

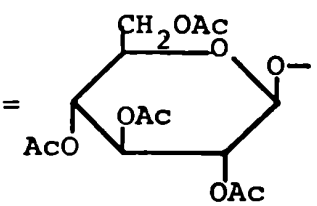
COMPUESTO	C-1'	C-2'	C-3'	C-4'	C-5'	C-6'
34	-0,17	-1,19	+8,2	-2,0	-2,0	+0,15
36[a]	+0,6	-2,0	+8,2	-0,3	+0,1	+0,3
42	+7,6	-1,15	-0,7	-0,5	-0,5	-0,13
37[a]	0	-0,1	-0,1	0	-0,2	+6,6

a- Liptak y Nánási (1980).





36 y 37 R =



38 y 39 R = OH

Se observa que el δ del C-3' del compuesto **34** (+8,2) coincide exactamente con el encontrado para el compuesto **36** y es comparable con el del C-6' del compuesto **37** (+6,6).

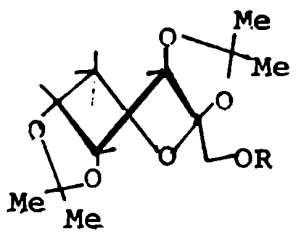
También se observa un corrimiento correspondiente al C-2' en el mismo sentido que el corrimiento del C-2' del compuesto **36** , siendo su magnitud menor. Esto podría deberse a que el C-2' del compuesto **34** es el carbono anomérico de la fructopiranosa. Además el corrimiento del C-4' (C-β) del compuesto **34** (-2,0 ppm) coincidiría con el corrimiento del C-2 de la laminaribiosa derivatizada (**36**). Estos carbonos serían comparables ya que ambos son β a la glicosidación y ambos están unidos a un grupo acetálico.

B) En otra preparación en la cual el tiempo de reacción se prolongó a 24 hs, con un nuevo agregado del bromuro de 2,3,4,6-tetra-O-acetil-α-D-glucopiranosilo (**33**) se aisló por cromatografía en columna de sílica gel H el 2,3:4,5-di-O-isopropiliden-1-O-(2,3,4,6-tetra-O-acetil-β-D-glucopiranosil)-β-D-fructopiranosa (**42**) de Rf 0,69 en solvente 7; p.f. 161-162°; $[\alpha]_D^{20}$ -32° (c 0,9; Cl_2CH_2). Estos datos coincidieron con los informados por Pacsu, Wilson y Graf (1939) que lo obtuvieron por condensación de 2,3:4,5-di-O-isopropiliden-β-D-fructopiranosa (**35**) y el compuesto **33** en cloroformo utilizando óxido de plata como catalizador.

El espectro de RMN-^{1}H del compuesto **42** presentaba las siguientes señales: tres singuletes a δ 1,34; 1,46; y 1,52 que integraban para 12 H característicos de los cuatro grupos O-isopropiliden presentes, dos de los cuales estarían superpuestos. A δ 2,15; 2,25; 2,35 y 2,8 aparecen cuatro singuletes que integraban para 12 H característicos de los cuatro grupos acetato presentes en la molécula. (Fig. 26)

Entre las señales correspondientes a los protones de los dos anillos de hexosas se observa a campos bajos, δ 5-5,2

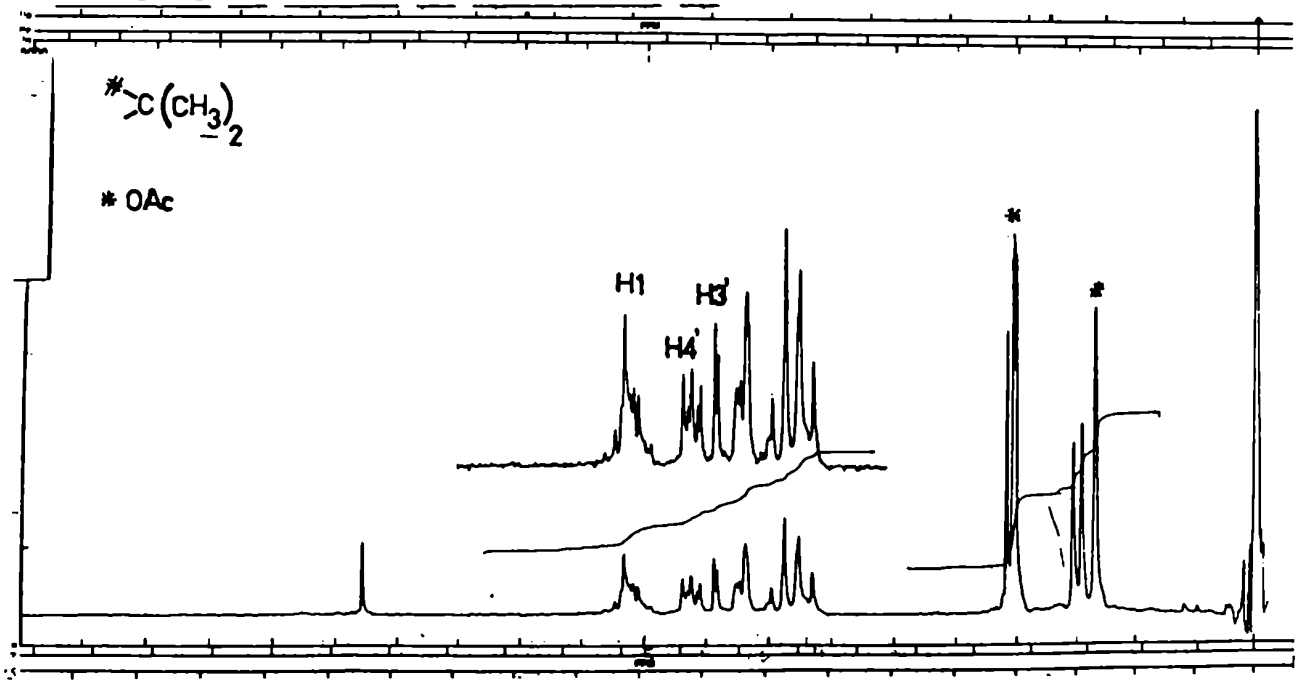
el H-1 de la glucosa parcialmente superpuesto con el H-3 y H-4 A δ 4,6 aparece un doble doblete correspondiente a H-4' del anillo fructopiranósico parcialmente superpuesto con el H-2 del anillo glucopiranósido y a δ 4,43 aparece un doblete correspondiente al H-3' de la fructosa. El $J_{3,4}$ 2,5 Hz muy pequeño sería concordante con el valor encontrado por Maeda y col (1969) para la 2,3,4,5-di-O-isopropiliden-β-D-fructopiranosa(35) lo cual explican considerando una conformación de bote torcido(skew) para el anillo de cetosa. El H-5 y los seis hidrógenos metilénicos aparecen parcialmente superpuestos a campos más altos.



Forma de bote torcido(skew).

FIGURA 26

ESPECTRO DE RMN-^{1}H DEL COMPUESTO 42.



Resultó interesante comparar el espectro de RMN-^{13}C de las glicosil fructosas sustituidas **34** y **42** y los desplazamientos de **42** con respecto a la 2,3:4,5-di-O-isopropiliden-β-D-fructopiranosa (**35**) (Tabla XII). El espectro de **35** no se encontró descripto en la literatura por lo tanto fue necesario sintetizarlo como se describe en la parte experimental y asignar las señales.

La asignación del carbono anomérico (δ 102,9) y del C-6 (δ 61,2) resultó sencilla pues son los más desplazados a campos menor y más alto respectivamente. La señal a δ 65,5 se asignó al C-1, pues es un carbono primario, sin embargo no fue posible distinguir las señales de los C-3, C-4 y C-5 pues están muy próximas entre sí (70,0-70,9) Fig.27 .

El RMN-^{13}C del compuesto **42** (Fig.28) presentó señales a δ 170,4; 170,1; 169,2 y 169,0 correspondientes a los carbonos carbonílicos de los grupos acetato presentes en la molécula y a 20,74 y 20,65 correspondientes a los metilos de los grupos acetato.

Las señales a 108,8 y 108,6 corresponderían a los carbonos cuaternarios de los grupos isopropiliden presentes. El valor similar de las señales de estos carbonos y el campo al que aparecen indican la presencia de dos grupos dioxolano similares. Además los desplazamientos de los carbonos acetálicos en **42** coinciden con los valores asignados a los grupos isopropiliden de la 2,3:4,5-di-O-isopropiliden-β-D-fructopiranosa. (35)

El corrimiento (+8,31 ppm) de la señal del C-1 del anillo glucopiranósido con respecto a la penta-O-acetil-β-D-glucopiranosa (Tabla XIII) confirmaría que la unión en el disacárido **42** es β-glucosídica. Se puede observar también un corrimiento a campos menores (+1,3 ppm) en el C-β al carbono de la glicosidación. La magnitud de este corrimiento es menor que en el compuesto **36** , pero comparable al de la genciobiosa derivatizada (**37** ,+1,6 ppm). Este hecho se debería a que en ambos casos un carbono primario es el que participa en la unión glicosídica.

FIGURA 27

ESPECTRO DE RMN-^{13}C DE LA 2,3:4,5-di-O-isopropiliden- -D-fructopiranosa (35).

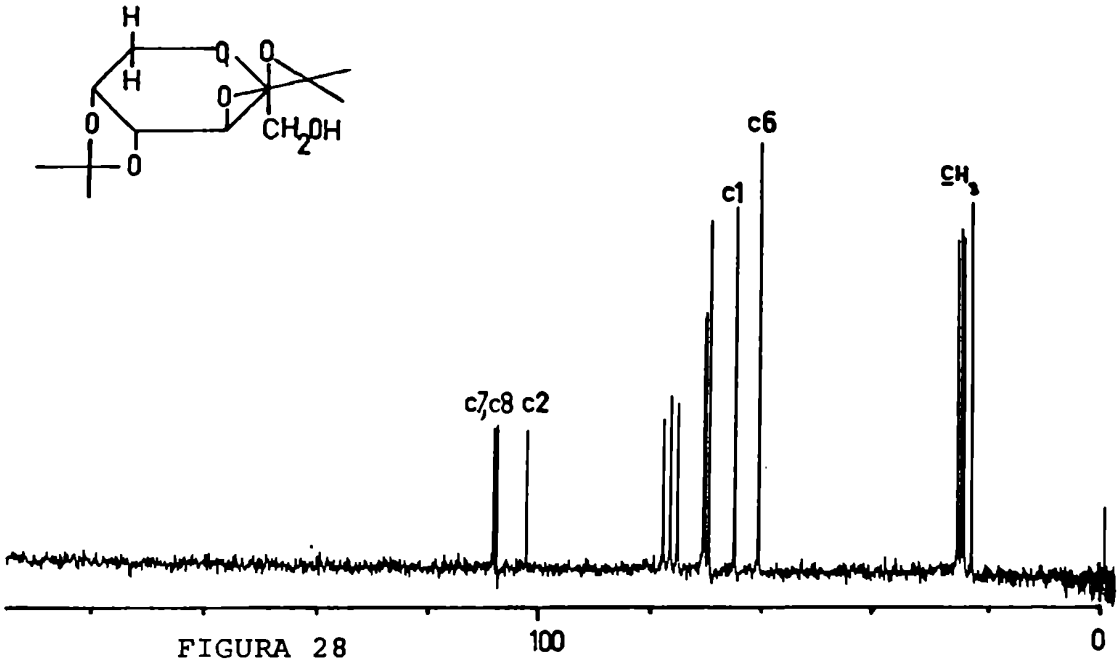
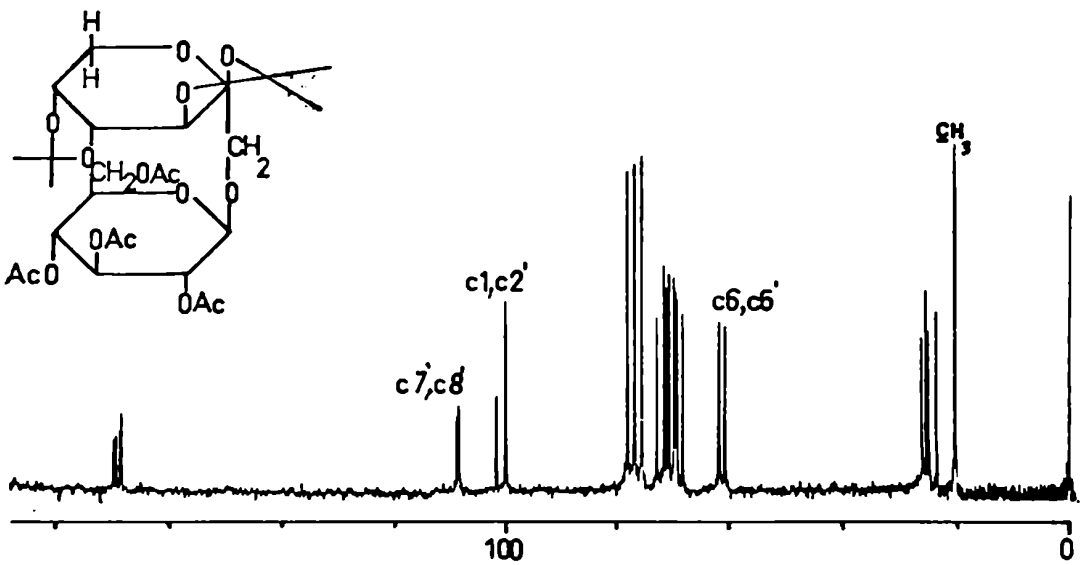


FIGURA 28

ESPECTRO DE RMN-^{13}C DE LA 2,3:4,5-di-O-isopropiliden-1-O-(2,3,4,6-tetra-O-acetil- -D-glucopiranosil)- -D-fructopiranosa (42).



En el compuesto 42 vuelve a encontrarse el corrimiento a campos mayores del C-3 y una magnitud mayor en el corrimiento del C-5. Esto indicaría la mayor compresión estérica en los glicósidos de fructopiranosa con respecto a los de glucosa.

La señal de C-1' del anillo fructopiranósico en el disacárido 42 aparece 7,5 ppm a campos menores con respecto a la 2,3:4,5-di-O-isopropiliden-β-D-fructopiranosa (35). Este corrimiento estaría de acuerdo con el observado para el C-3', que es el que interviene en la unión glucosídica, en el compuesto 34 y en el derivado de la laminaribiosa (36). (Tabla XIV) El desplazamiento menor que se obtiene para el C-1' de 42 en la glucosidación se debería a que este es un carbono primario. Para el derivado de la genciobiosa (37) el corrimiento es aún menor pues en este caso no sufre influencia del carbono anomérico vecino.

El C-2' del anillo fructopiranósico (β a la glicosidación) se correría a campos mayores en una magnitud comparable a la del corrimiento en el compuesto 34 y mayor que la del C-5' de la genciobiosa. La diferencia observada se debería a la influencia del carbono anomérico vecino que produce un desplazamiento a campos menores con respecto al derivado de la genciobiosa (37). Los valores de los desplazamientos químicos de los C-3', C-4' y C-5' son comparables con los del 2,3:4,5-di-O-isopropiliden-β-D-fructopiranosa (Tabla XII).

La formación del producto de condensación en el C-1' de la fructosa podría ser explicada por una migración del grupo isopropiliden de los C-1 y C-2 a los C-2 y C-3 en el producto de partida. Una migración en la reacción de Koenigs-Knorr ha sido descripta por Liptàk y col. (1980). Estos autores encuentran en la condensación de 1-Bromo-2,3,4,6-tetra-O-acetil-α-D-glucopiranosilo (33) con 1,2:5,6-di-O-isopropiliden-α-D-glucofuranosa (38) una relación de 1:1 o de 2:3 del producto con unión (1→3) al producto con unión (1→6) dependiendo la relación de la temperatura de reacción.

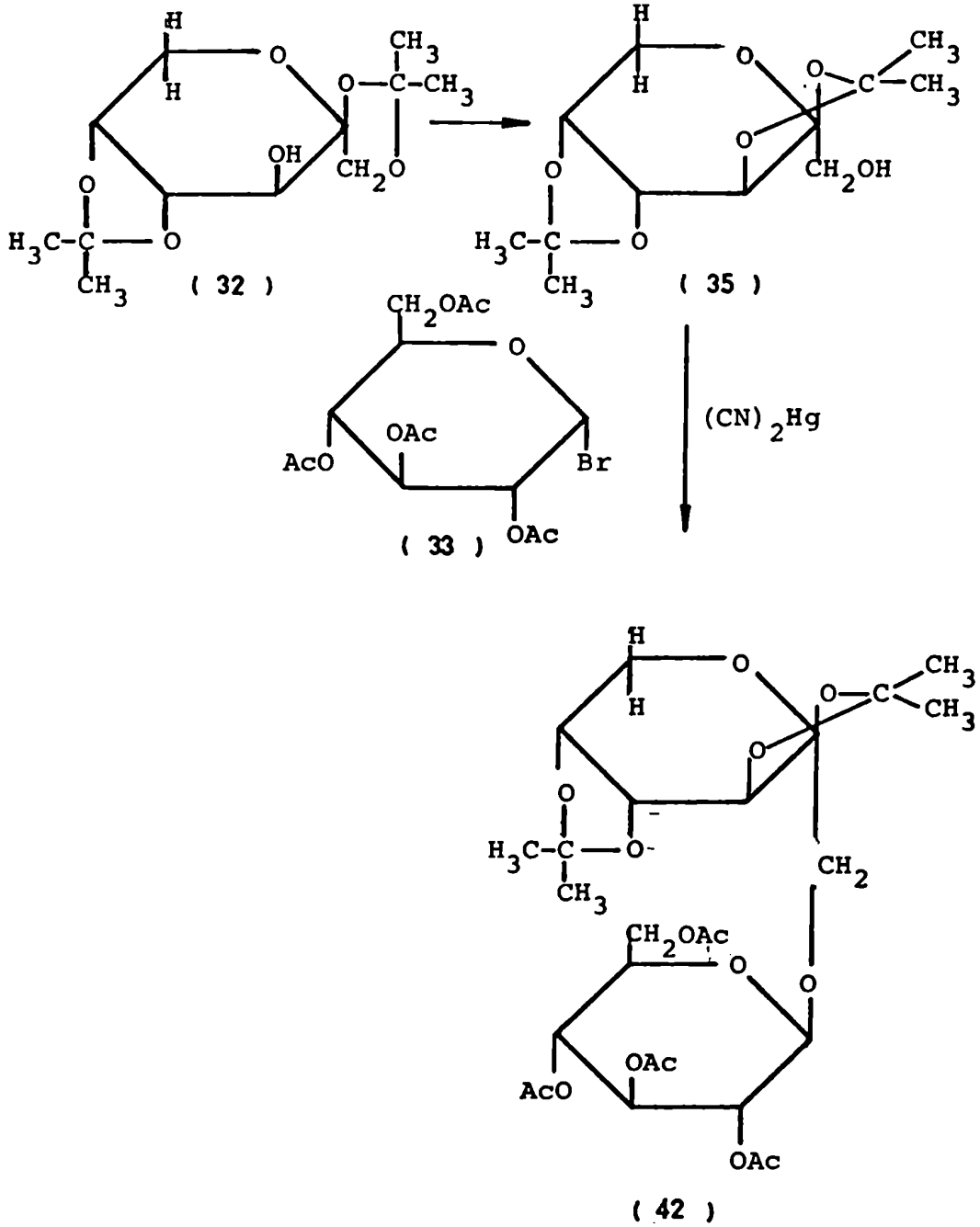
Es conocida la migración de acetales en medio ácido (Clode 1979) Brady (1970) encontró que en la condensación de fructosa con acetona en presencia de ácido sulfúrico, la 1,2:4,5-di-O-isopropiliden-β-D-fructopiranosa (32) era el producto formado por control cinético de la reacción y que se isomerizaba a la 2,3:4,5-di-O-isopropiliden-β-D-fructopiranosa (35) termódinámicamente más estable. Cuando se usaba cloruro de zinc como catalizador no se producía la isomerización de 32 a 35 .

Por lo tanto la formación de 42 podría explicarse por la fácil descomposición de la 1-Bromo-2,3,4,6-tetra-O-acetil-α-D-glucopiranosilo (33) con formación de ácido bromhídrico que daría el medio ácido suficiente para la migración del grupo isopropiliden y formación de la 2,3:4,5-di-O-isopropiliden-β-D-fructopiranosa (35) más estable y que posee un OH primario más reactivo para la glicosidación. A tiempos mayores (preparación B) esta migración se vería favorecida y por ello el producto 42 sería el mayoritario (Fig. 29).

DETERMINACION DE LA RELACION DE LOS PRODUCTOS FORMADOS POR CROMATOGRAFIA GAS-LIQUIDO DE LA MEZCLA DE REACCION.

La cromatografía gas-líquido de la mezcla de reacción a) Fig. 30) permitió determinar la presencia de 1,2:4,5-di-O-isopropiliden-β-D-fructopiranosa, Tr 0,54'; 2,3,4,6-tetra-O-

FIGURA 29



acetil-α-D-glucopiranosa,Tr 2,25' que provendría de la descomposición rápida que sufre la acetobromoglucosa (33) liberando ácido BrH al medio de la reacción; un pico de Tr 21,03' el disacárido sustituído 34 Tr 22,88'y un pequeño pico de Tr 26,73' coincidente con 2,3:4,5-di-O-isopropiliden-1-O-(2,3,4,6-tetra-O-acetil-β-D-glucopiranosil)-β-D-fructopiranosa (42)

Se demostró por c.g.l.-e.m. que el pico de Tr 21,03 (43) correspondería al derivado con unión α-(1→3) lo cual se explica pues generalmente la estereoespecifidad de la reacción no es del 100 %, pero debido a su baja proporción no ha podido ser aislado. El espectro de masa (Fig.31) de dicho pico dió rupturas coincidentes con las del compuesto 34 , lo cual confirmaría que se diferencian sólo en la configuración anomérica.

Se observa que el producto 34 es el que se forma con mayor rendimiento. La relación de los disacáridos sustituídos 34 : 42 : 43 fue de 7,7:1:1,28.

FIGURA 30

C.G.L. de la mezcla de reacción a)

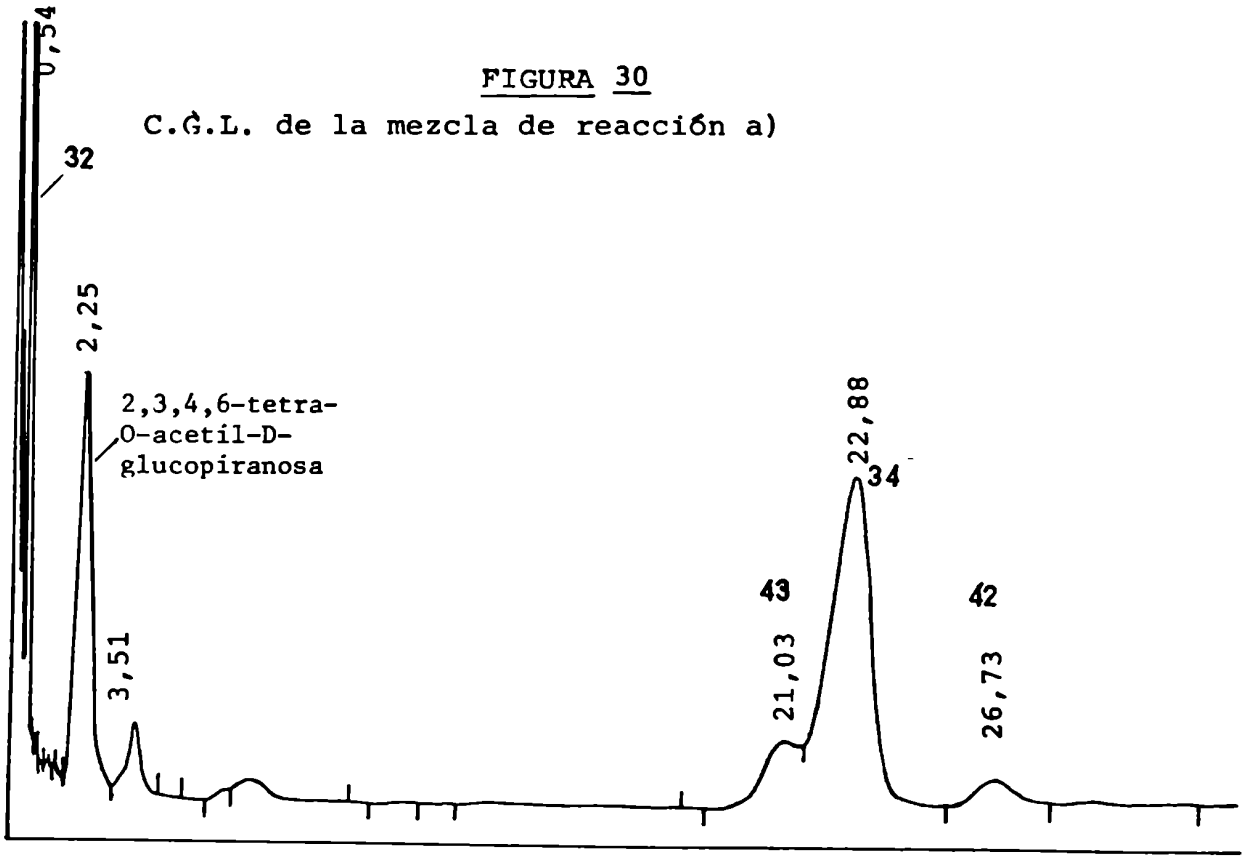
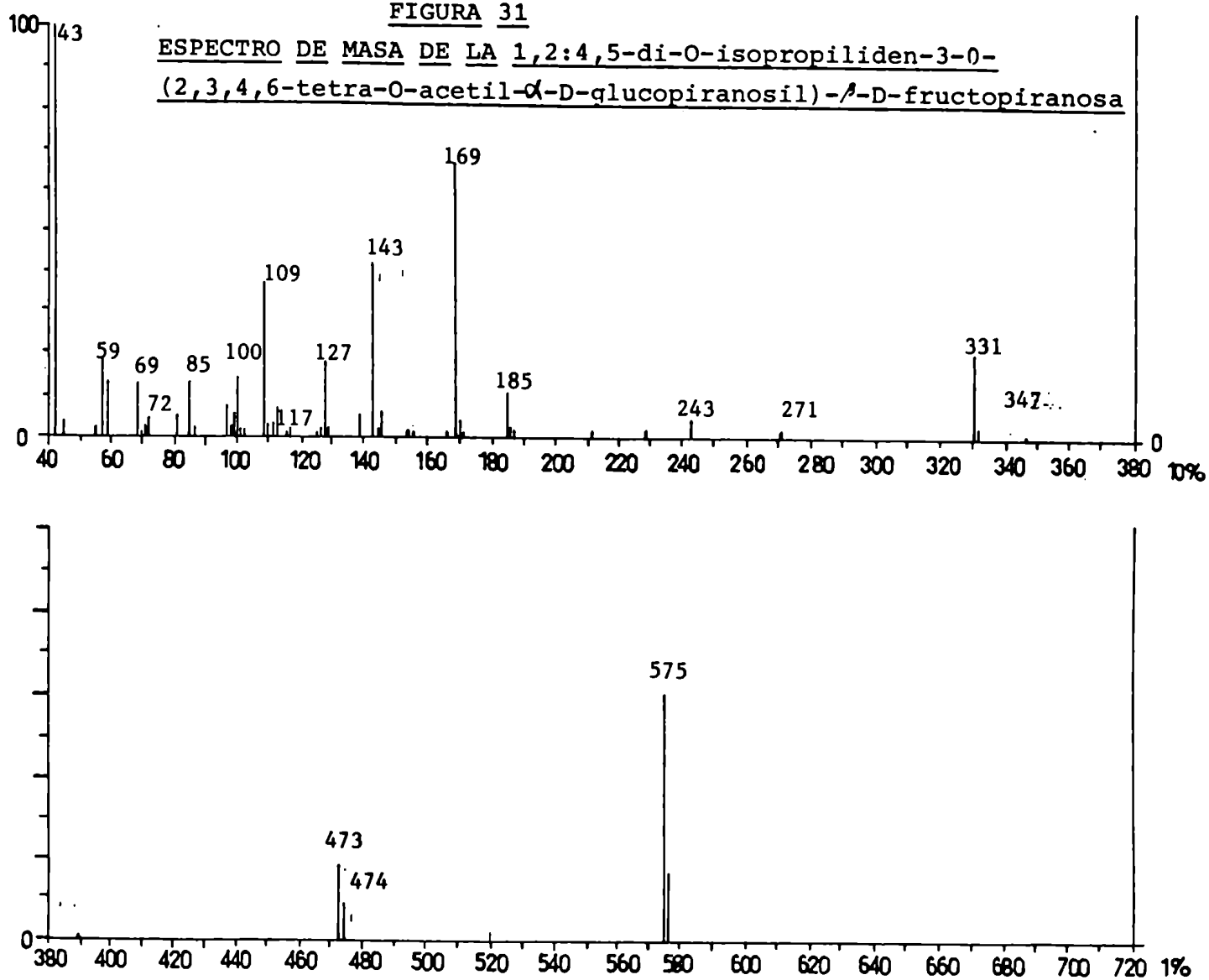


FIGURA 31

ESPECTRO DE MASA DE LA 1,2:4,5-di-O-isopropiliden-3-O-(2,3,4,6-tetra-O-acetil-α-D-glucopiranosil)-β-D-fructopiranosa



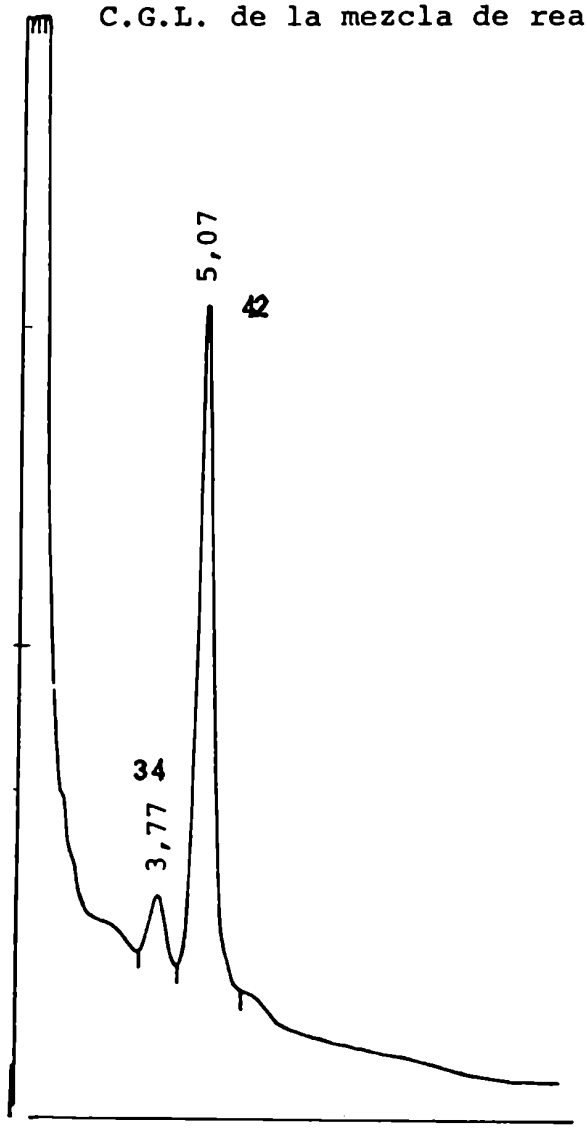
Condiciones: Columna OV-101 2 %,

T-1: 190°; T-2: 280°; P helio: 25 ml/min. Tiny.: 250°.

La cromatografía gas-Líquido de la mezcla de reacción B) (fig. 32) mostró la presencia del 2,3:4,5-di-O-isopropiliden-1-O-(2,3,4,6-tetra-O-acetil-β-D-glucopiranosil)-β-D-fructopiranosa (**42**) como producto mayoritario y un pico menor de Tr coincidente con el del 1,2:4,5-di-O-isopropiliden-3-O-(2,3,4,6-tetra-O-acetil-β-D-glucopiranosil)-β-D-fructopiranosa (**34**) en una relación 10:1. La baja proporción del compuesto **34** explicaría que no haya sido posible aislarlo de esta preparación.

FIGURA 32

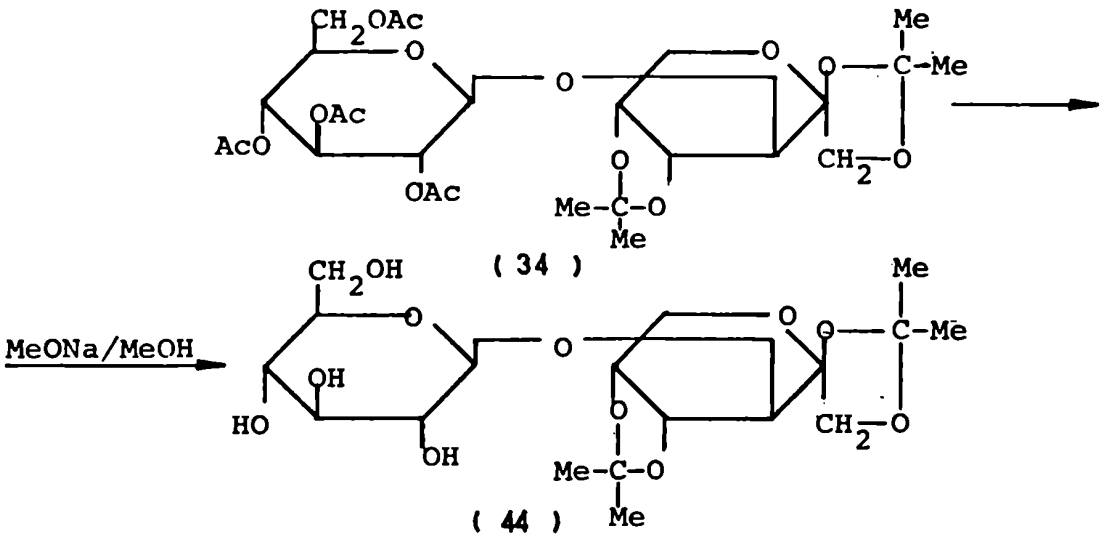
C.G.L. de la mezcla de reacción b)



Tr (~~min~~) : 3,77 compuesto **34** ; ~~5,07~~ compuesto **42**

OBTENCION DE 3-O-β-D-GLUCOPIRANOSIL-D-FRUCTOSA (31)

El producto 34 fue desacetilado con metóxido de sodio en metanol y desionizado por pasaje por una columna de resina Dowex 50 (H^+). El jarabe obtenido no se pudo cristalizar aunque resultó homogéneo por cromatografía en capa delgada, Rf 0,60 en solvente 8 $[\alpha]_D^{20}$ -112° (c 0,7, Cl_2CH_2) y se caracterizó como la 1,2:4,5-di-O-isopropiliden-3-O-(β-D-glucopiranosil)-β-D-fructopiranosa (44)



El espectro i.r. de 44 mostró la desaparición de la señal a 1760 cm^{-1} característica del grupo acetato, que confirmaría la desacetilación del producto 34 y dos pequeñas señales a 830-850 cm^{-1} que serían las características de los grupos 1,3 dioxolano presentes.

El espectro de RMN-^{1}H (Fig. 33) presentó cuatro singuletes a δ 1,34; 1,46; 1,48 y 1,52 correspondientes a los grupos metilo de los sustituyentes O-isopropiliden que integra para 12 hidrógenos y la desaparición de las señales de los grupos acetato.

Los hidrógenos de ambos anillos piranósicos aparecen como un gran multiplete entre δ 3,3 y 4,5 que integra para 14 hidrógenos. No ha sido posible sacar más información

de este espectro debido a la gran superposición de señales. Sin embargo la estructura pudo ser caracterizada por el espectro de RMN-^{13}C.

El espectro de RMN-^{13}C de **44** mostró tres señales a δ 27,92; 26,11 y 25,9 atribuibles a los grupos $-CH_3$ de los dos grupos isopropiliden presentes. La señal a δ 26,11 que es la más intensa correspondería a dos de los grupos metilos. Como en el caso del compuesto **34** aparecen dos señales a δ 112,0 y 108,9 atribuibles a carbonos cuaternarios, hecho que confirma la presencia de los dos grupos isopropiliden y su posición 1,2:4,5 ya que aparecen a los mismos δ que en el compuesto **34** y en la 1,2:4,5-di-O-isopropiliden-β-D-fructopiranosa (**32**). Se observa también la desaparición de las señales a δ 169-170 y 20,6-20,7 que asegura la desacetilación de **34** (Fig. 34 , Tabla XII).

Los carbonos anoméricos aparecen a 104,11 y 103,95ppm Estas señales pueden asignarse al C-1 de la glucosa y C-2 de la fructosa, aunque es muy difícil diferenciar entre ambas. El valor para el C-2 de la fructosa sería así muy similar al que tiene en el compuesto **34** . Con respecto al corrimiento a campos menores producido en el C-1 de la glucosa por desacetilación es similar al valor encontrado para el β-metil-glucopiranósido. Por otra parte el C-1 del α-metil-glucopiranósido aparece a δ 100,3. El resto de las señales de los carbonos pertenecientes al anillo glucopiranósido aparecen a campos menores que las señales correspondientes del compuesto **34** debido a la desacetilación (Komura, Matsuno e Ishido1978) y pudieron ser asignadas por comparación con el β-metil-glucopiranósido. Los desplazamientos del C-3 y del C-5 que son los más afectados por la glucosidación son comparables también con los del β-metil-glucopiranósido y con los de la laminaribiosa (**26**)diferenciándose en más de 2 ppm de los respectivos valores para el α-metil-glucopiranósido.

FIGURA 33

ESPECTRO DE RMN-^{1}H DEL COMPUESTO 44.

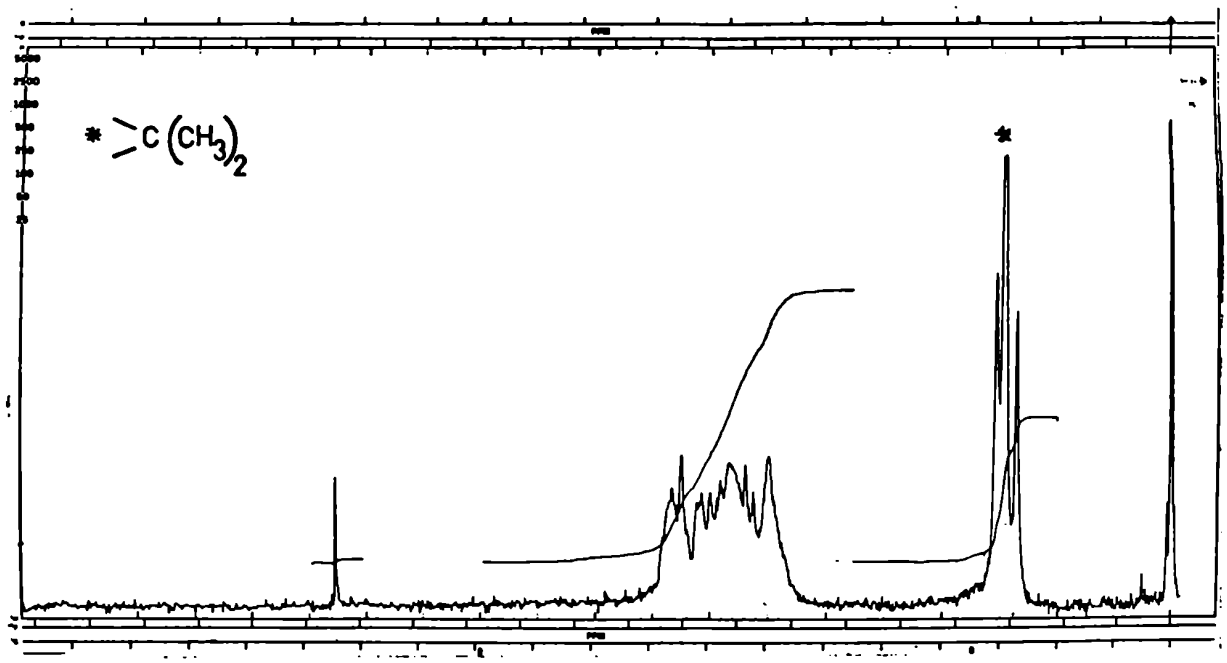
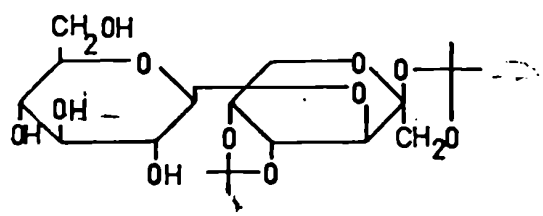
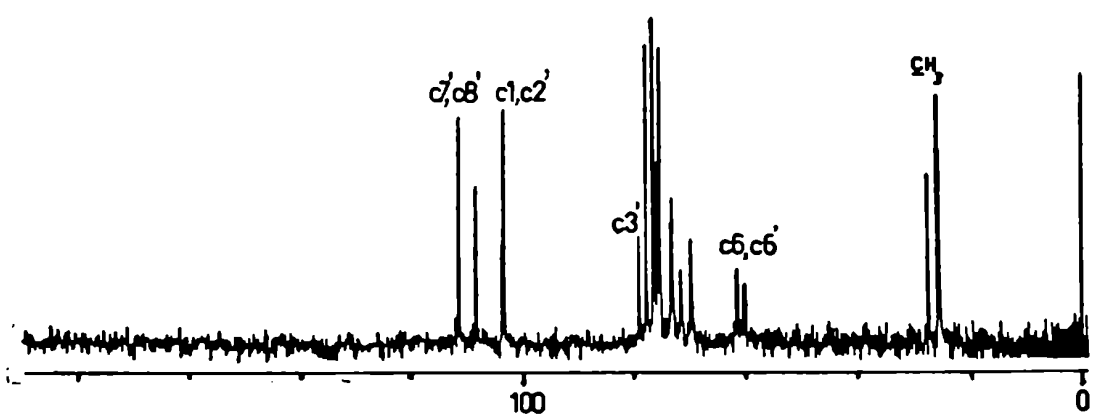


FIGURA 34

ESPECTRO DE RMN-^{13}C DEL COMPUESTO 44.





El compuesto 44 en solución acuosa se trató a 60° con resina Bio-Rad 50 (H^+). La hidrólisis se siguió por c.c.d. hasta desaparición de la mancha de Rf 0,60 (solvente 8) correspondiente al producto 44 y aparición de una mancha en el orígen. Por cromatografía en papel se observó una única mancha de Rg 0,90 (sv 1), Rg 0,60 (sv 2) y Rg 0,60(sv 3) que se reveló rosada con el reactivo c para cetosas (Tabla IX).

La 3-O-β-D-glucopiranosil-D-fructosa o laminaribiulosa (31) se obtuvo como jarabe con un poder rotatorio de $[\alpha]_D^{20}$ -43°(c 0,5; agua). El poder rotatorio negativo confirmaría la unión β -glucosídica.

La laminaribiulosa podría existir potencialmente en cinco formas tautoméricas en solución (Fig. 35). Debido a ello la interpretación de los resultados espectroscópicos se torna muy dificultosa. Existen varios trabajos sobre la determinación de los isómeros de cetosas presentes en solución acuosa. La espectroscopía RMN-^{1}H es poco útil debido a que sólo algunas señales pueden ser asignadas a 100 MHz e incluso a 300 MHz la información obtenida es limitada (Bruyn, Anteunis y Verhegge 1975). Más útil ha resultado la espectroscopía de RMN-^{13}C pues los espectros obtenidos son más simples de analizar.

Dodrell y Allerhand (1971) y Que y Gray (1974) describieron el espectro de RMN-^{13}C de la fructosa; los primeros asignaron las señales por comparación con aldosas y los segundos con anhidrohexitoles y aproximadamente la mitad de las señales presentan diferente asignación. Angyal y Bethel (1976) utilizando fructosas deuteradas, pudieron finalmente asignar las señales y fueron Funcke y von Sonntag en 1979, quienes cuantificaron los isómeros en el equilibrio.

Utilizando los datos de estos autores junto con los obtenidos por Koener y col. (1978) para la 3-O-metil fructosa fueron asignadas tentativamente las señales de la laminaribiulosa (Fig. 36).

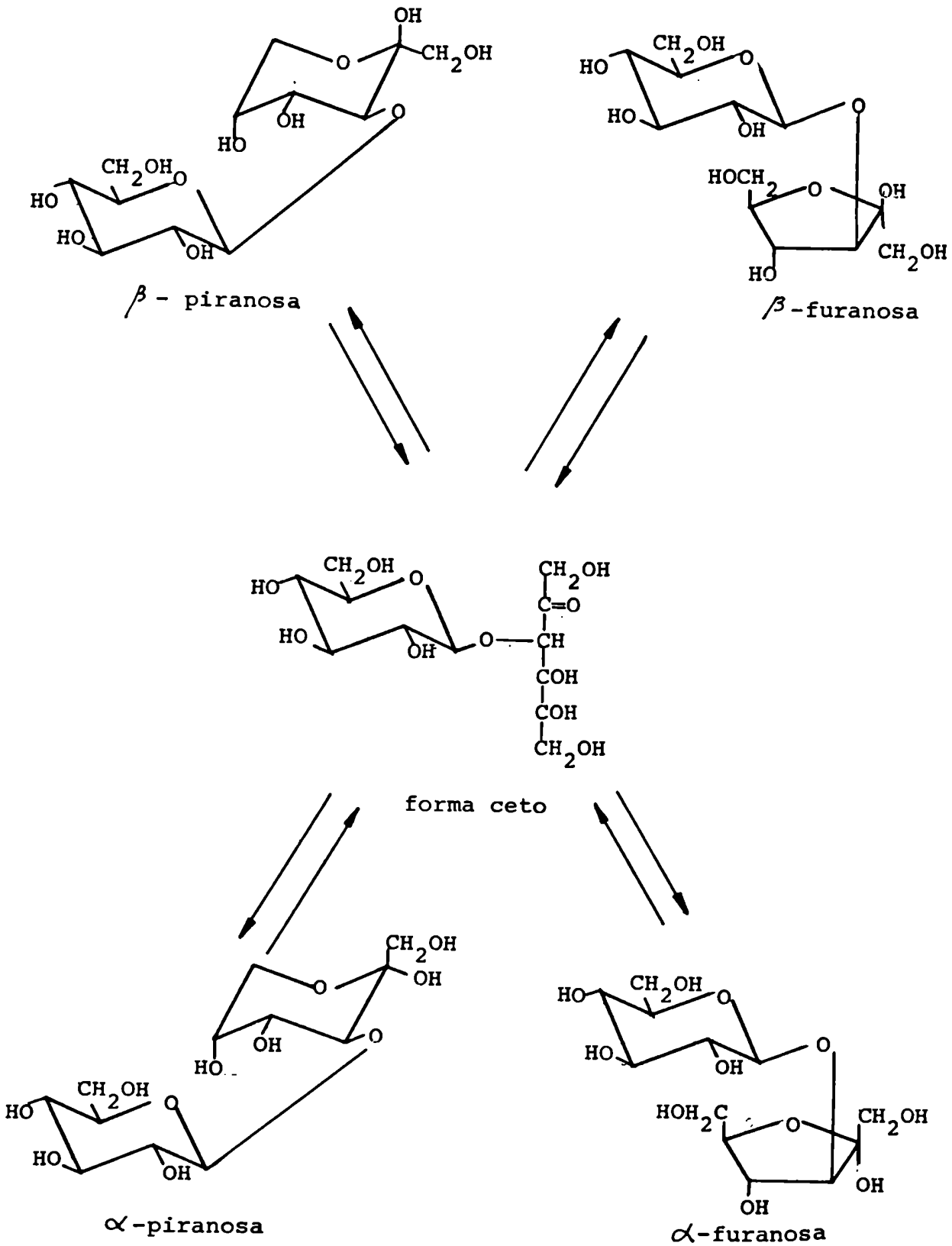
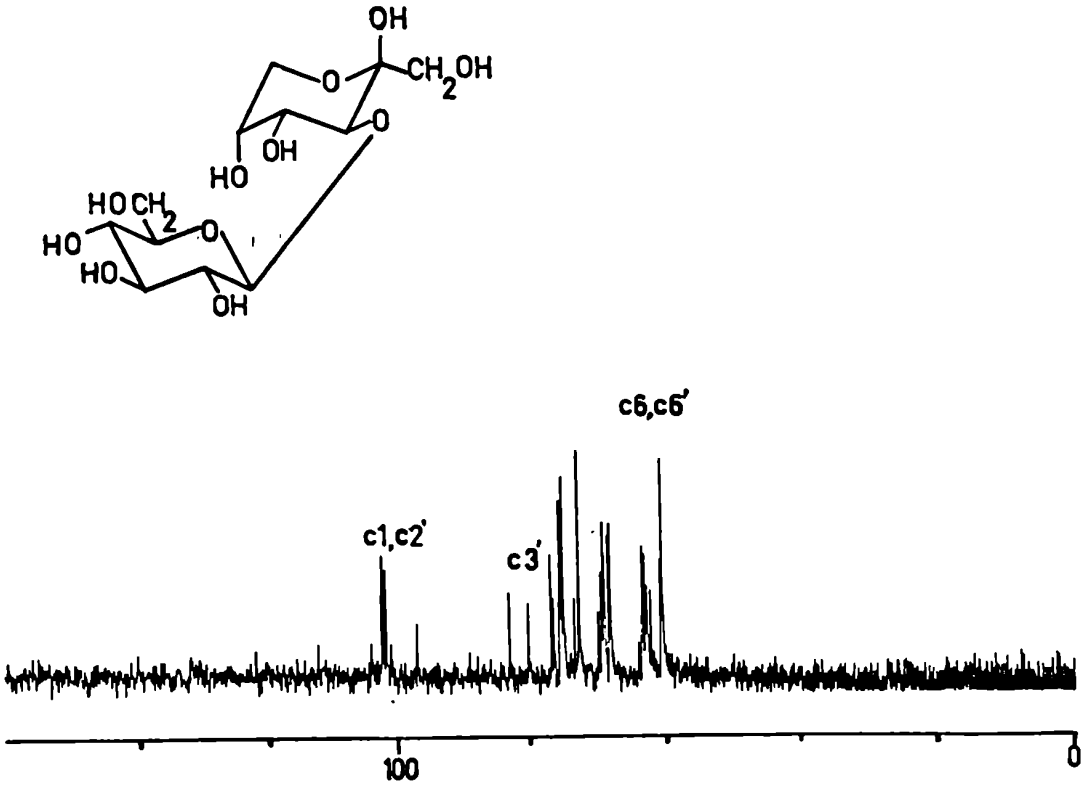


FIGURA 35

FIGURA 36

ESPECTRO DE RMN-^{13}C de la 3-O-β-D-glucopiranosil-D-fructosa(31).



La asignación de los carbonos anoméricos de la unidad reductora es relativamente simple ya que los valores coinciden casi exactamente con los obtenidos para la 3-O-metil fructosa. Se observa como en el espectro de la turanosa (18), maltulosa (19) y celobiulosa (Tabla XV), la presencia de tres formas en equilibrio del disacárido: α y β furanósicas y β-piranósica. No aparece ninguna señal que se pueda atribuir a la forma α- piranósica en la cual el grupo hidroximetileno ($-CH_2OH$) más voluminoso está axial. En concordancia, también se desdobla en tres la señal del carbono anomérico de la glucosa que aparece a 103,98; 103,83 y 103,35. Los otros carbonos también aparecen como tres señales cada uno lo cual confirma la presencia de las tres formas en el equilibrio.

Los desplazamientos de los C-3' se encuentran a campos bajos debido a la glicosidación, siendo los corrimientos con respecto a la fructosa libre menores que para el C-3 de la 3-O-metil fructosa, pero del orden de los corrimientos observados para los C-3' de la turanosa. Las proporciones en el equilibrio fueron estimadas considerando la intensidad de las señales de este carbono en cada forma. En general no se utilizan las de los carbonos anoméricos ya que por ser estos carbonos cuaternarios, generalmente dan señales más pequeñas que las otras (Angyal y Bethell 1976). Sin embargo para la laminaribiulosaestas también estarían en proporción similar. Se obtuvo así una relación de αf, βf, βp de 1:1:1,6 en agua:D_2O a 30°. Koerner y col. (1978) postularon que la sustitución en O-3 de la fructosa desestabilizaría el tautómero β-piranósico y desplazaría el equilibrio hacia las formas furanósicas y α-piranósica. Esto se cumple parcialmente para la turanosa y para la laminaribiulosa.Como puede observarse en la Tabla XVI en ambas aumenta la proporción de formas furanósicas a expensas de la forma β-piranósica aunque no se observa la presencia de α-fructopiranosa. Por otra parte es notable que las proporciones de las formas furanósicas en la laminaribiulosa son comparables.

TABLA XV

DESPLAZAMIENTOS QUIMICOS DE LOS CARBONOS ANOMERICOS DE LA LAMINARIBIULOSA Y COMPUESTOS RELACIONADOS

COMPUESTO	C-1' α'-f	C-1' β-f	C-1' α-p	C-1' β-p	C-1
Fructosa[a]	105,5	102,6	99,1	99,1	
3-O-metil-fructosa[b]	104,9	102,4	99,0	98,7	
Turanosa[c]	104,3	103,2	-	97,8	no informados
Maltulosa[d]	106,4	103,1	-	99,4	101,48; 99,35; 98,87
Celobiulosa[d]	105,9	103,2	-	99,1	101,10; 103,10;103,50
Laminaribiulosa	105,6	102,6	-	98,6	103,98; 103,83;103,35

a- Que y Gray (1972).

b- Koerner y col. (1978).

c- Doddrell y Allerhand (1971).

d- Pfeffer y Hicks (1982).

TABLA XVI

PORCENTAJE DE LAS FORMAS TAUTOMERICAS DE CETODISACARIDOS COMPARADOS CON FRUCTOSA.

COMPUESTO	α f	βf	α p	β p
Fructosa[a]	9%	31%	3%	57%
3-O-metil[b] fructosa	11%	34%	18%	37%
Turanosa[c]	20%	41%	-	39%
Maltulosa[d]	12%	22%	-	64%
Celobiulosa[d]	10%	28%	-	61%
Laminaribiulosa	27%	28%	-	45%

a- Que y Gray (1972).

b- Koerner y col. (1978).

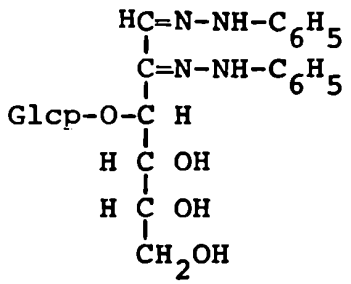
c- Doddrell y Allerhand (1971).

d- Pfeffer y Hicks (1982).

Funcke y von Sonntag (1979) detectaron por primera vez por RMN-^{13}C la presencia de la forma de cadena abierta para la D-fructosa y L-sorbosa en solución, señal que ya había sido asignada para la fructosa 1,6 difosfato y fructosa-6 fosfato (Midelfort, Gupta y Rose 1976). Recientemente Pfeffer y Hicks (1982) también asignaron la forma ceto que se encuentra en aproximadamente 2 % en el equilibrio en la maltulosa(19) celobiulosa(20) y lactulosa (4-O-(α-D-galactopiranosil-D-fructosa) por desplazamiento isotópico por deuterio. Sin embargo, por ser la proporción de esta forma de cadena abierta muy pequeña, es muy difícil de detectar y no pudo ser considerada para el equilibrio de la laminaribiulosa.

OBTENCION DE 3-O-β-D-GLUCOPIRANOSIL-D-ARABINO-HEXOSA FENIL OSAZONA (45)

Con el fin de corroborar la estructura de la 3-O-β-D-glucopiranosil-D-fructosa se llevó a cabo la síntesis de la fenilosazona correspondiente, pues por ser la fructosa el extremo reductor este derivado coincidiría con el de la laminaribiosa (26) que está descripto.



3-O-β-D-Glucopiranosil-D-arabino-hexosa fenilosazona
(45)

Por reacción de la laminaribiulosa con clorhidrato de fenilhidracina y acetato de sodio se obtuvo la fenilosazona (45) en forma de agujas prismáticas de color amarillo de p.f. 196-198°; $[\alpha]_D^{20}$ -70,9 (etanol).

Los datos se literatura no son totalmente coincidentes. Freudenberg y Oertzen (1951) informan p.f. 229°, $[\alpha]_D^{20}$ -71° (etanol), Zeichmeister y Thót (1934), p.f. 198°; $[\alpha]_D^{20}$ -75 (etanol), Garard y col. (1918) p.f. 202°; $[\alpha]_D^{20}$ -76,5° (etanol). Como puede observarse el punto de fusión del producto obtenido es muy similar a dos de los datos de literatura y el poder rotatorio es comparable a todos los valores informados.

CONCLUSION SOBRE LA ESTRUCTURA DEL POLISACARIDO.

Los datos experimentales indican que el polisacárido de *C.jóhowii* está formado por glucosa y fructosa en relación 9:1.

Siendo más frecuente en hongos la presencia de fructanos que de fructoglucanos se pensó en la posibilidad de que se tratase de una mezcla de polisacáridos, pero este hecho quedó descartado por los criterios de homogeneidad considerados y por la determinación de una glucosil-fructosa como producto de hidrólisis ácida parcial.

En un polisacárido de *Cyttaria harioti* (Fernandez Cirelli y Lederkremer 1971, 1972)se detectó también la presencia de la cetosa, pero siendo su proporción muy pequeña no se determinó el tipo de unión. También en los primeros estudios realizados sobre el "lentinano" de *L entinus edodes* se encontró fructosa como componente menor, aunque en estudios posteriores no se hace mención de ésta como parte de la estructura.

La determinación de laminaribiosa y genciobiosa por hidrólisis ácida parcial además del poder rotatorio negativo y la banda característica a 890 cm^{-1} en el espectro i.r. indicó la presencia de configuraciones β en el polisacárido.

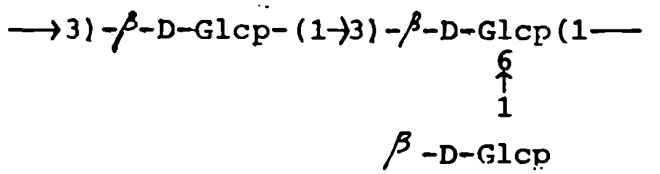
Los estudios de metilación indican una estructura muy ramificada ya que existe prácticamente la misma proporción de unidades terminales, lineales y ramificadas. Las uniones principales son (1→3) y se encontró también una pequeña proporción de uniones (1→4) y (1→6) lineales.Los datos mostraron que las ramificaciones partían de C-6.

El hecho de que en la metilación del polisacárido degradado por hidrólisis ácida parcial haya aumentado en forma significativa la proporción de 2,4,6-tri-O-metil-glucosa indica que tenemos una cadena central de β(1→3)glucano. Estos datos se confirmaron por los estudios de oxidación con periodato de sodio pues se recuperó el 70 % del polisacárido insoluble luego de la degradación de Smith. Este producto por hidrólisis

total dió sólo glucosa y fructosa.

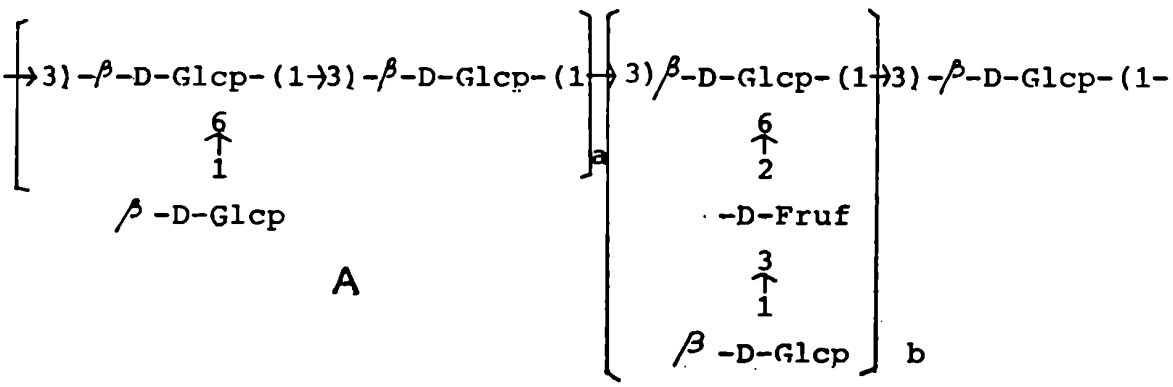
En general la fructosa se encuentra en la configuración furanósica en los oligosacáridos naturales (sacarosa, rafinosa, melezitosa, estaquiosa) y en fructanos(Ebisu, Kato y Misaki 1975) Se demostró que en el polisacárido de *Cyttaria johowii* la fructosa se encuentra unida por O-3; en ese caso se confirmaría la estructura furanósica pues en la configuración piranósica se hubiera oxidado con periodato entre C-4 y C-5.

Para postular una posible unidad repetitiva debemos tener en cuenta que por los estudios de metilación confirmados por el consumo de periodato y producción de ácido fórmico las ramificaciones se encontrarían alternadas en la cadena central y estarían constituídas en su mayor parte de una sola unidad de glucosa. Esto justificaría las proporciones prácticamente iguales de derivados tetra,tri y di metilados de glucosa encontradas en el análisis por metilación.



La presencia de laminaribiulosa, cuya estructura se confirmó por síntesis, luego de la hidrólisis suave indicaría que la cetosa se ubica en las ramificaciones, no como azúcar terminal sino como cabeza de ramificación.

Una estructura consistente con los datos experimentales sería:



El porcentaje de fructosa presente en el polisacárido indicaría que aproximadamente una de cada tres cadenas laterales se iniciarían con la cetosa. Por lo tanto se podría asignar a=2 y b=1.

En esta unidad repetitiva no se considera la presencia de unidades (1→4) dada su baja proporción.Unas pocas ramificaciones podrían estar formadas por más de una unidad de glucosa con unión (1→6), lo cual explicaría que se haya encontrado un 5 % de 2,3,4-trí-O-metil glucosa en el análisis por metilación del polisacárido original y que sólo se encontraron trazas en el polisacárido degradado, además esto estaría de acuerdo con la presencia de genciobiosa entre los productos de hidrólisis parcial.

La estructura (A) representa una de las varias alternativas que satisfacen los datos experimentales.

Comparando el polisacárido de*Cyttaria johowii* con los polisacáridos aislados de *Cyttaria harioti* el primero se podría asemejar al polisacárido soluble en agua de *C. harioti* que también tiene una cadena central de β-(1→3) glucano con ramificaciones en C-6, algunas de ellas comenzando con ácido D-arabino hexulosónico. Es interesante notar que en el polisacárido objeto del presente trabajo este ácido estaría sustituído por fructosa, cuya única diferencia se encuentra en el nivel de oxidación del C-1.

CONSIDERACIONES GENERALES

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

Los poderes rotatorios fueron medidos en un polarímetro Perkin-Elmer 141 a temperatura ambiente con lámpara de sodio (589 nm).

Las evaporaciones se realizaron a presión reducida y a temperaturas menores de 40°.

Las determinaciones colorimétricas se realizaron con un espectrofotómetro Spectronic 20. Los espectros de absorción en el infrarrojo fueron determinados en un espectrofotómetro Perkin-Elmer 421. Los espectros de resonancia magnética nuclear de H^1 y de C^{13} se determinaron con un aparato Varian XL 100-15 con computadora 620-L/100 usando tetrametilsilano como referencia interna.

Los espectros de masas se realizaron a 70 eV en un espectrómetro de masas Varian Mat CH-7A con inserción directa. Las cromatografías gas-líquido combinadas con espectrometría de masas se realizaron en un cromatógrafo Varian 1400 acoplado a un espectrómetro de masas Varian-Mat-CH-7A con procesador de datos.

METODOS CROMATOGRAFICOS

Las cromatografías sobre papel se realizaron por el método descendente empleando papel Whatmann N°1. Rg= movilidad respecto de D-glucosa.

Para las cromatografías en columna se empleó:

a) sílica gel H (Merck), como fase fija.

b) celulosa Whatmann CF 11 como fase fija.

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

SOLVENTES:

1) n-butanol, piridina, agua; 6:4:3 en vol.
2) n-butanol, etanol, agua; 10:4:4 en vol.
3) butanona, agua; 95:5 en vol.
4) n-butanol, etanol, agua; 10:1:2 en vol.
5) acetato de etilo, ác. acético, ác. fórmico, agua; 18:3:1:4 en vol.
6) acetato de etilo, piridina, agua; 10:4:3 en vol.
7) cloruro de metileno, acetato de etilo; 4:1 en vol.
8) cloroformo, metanol; 9:1 en vol.

REACTIVOS DE REVELADO:

a) NITRATO DE PLATA-HIDROXIDO DE SODIO:

Preparado según la técnica descripta por Trevelyan y col (1950). Se agregaron 0,1 ml de una solución acuosa saturada de nitrato de plata a 20 ml de acetona. El precipitado de nitrato de plata formado se redisolvió por agregado de la mínima cantidad de agua. Los cromatogramas se sumergieron en la solución anterior y se secaron a temperatura ambiente. Después de 3-4 min se pulverizaron con solución de hidróxido de sodio 0,5 N en etanol 50 %.

Los azúcares reductores y polialcoholes aparecen como manchas de color marrón oscuro. Las manchas se fijaron por inmersión en una solución acuosa de tiosulfato de sodio 5 %. La cantidad mínima detectable de azúcares reductores es de 2-20 ug.

b) CLORHIDRATO DE P-ANISIDINA:

Preparado según la técnica de Hough y col. (1950). Se pulverizaron los cromatogramas con una solución de clorhidrato de p-anisidina 3-4 % (peso/volúmen) en n-butanol-etanol- agua (4:1:1 en vol.), que contenía trazas de cloruro

estannoso. Se secaron a temperatura ambiente y se revelaron calentando en estufa a 100-120°durante 10 minutos. Las aldopentosas dan color rosado; las aldohexosas, marrón y las hexulosas, amarillo. Se detectan 1-5 ug del azúcar reductor.

c) RESORCINOL-ACIDO CLOHIDRICO:

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

d) RESORCINOL-ACIDO SULFURICO:

Se empleó una modificación de la técnica anterior para el revelado de cromatogramas en capa delgada. La placa se pulverizó con una solución 1 % de resorcinol en n-butanol y luego con una solución de ácido sulfúrico 50% en ácido acético. La placa se reveló por calentamiento en estufa a 80° durante 5 minutos. Las cetosas dan color rosado. En estas condiciones otro tipo de sustancias no se revelan.

Para la cromatografía gas-Líquido se utilizó un equipo Hewlett-Packard modelo 5840 A con columnas de vidrio. Las fases utilizadas fueron:

1) 2 % OV 101 en Chromosorb WAW-DMCS (60-80), 4 ft, Ø 2 mm.
2) 3 % SE-30 en Chromosorb WAW-DMCS (80-100), 6ft, Ø 2 mm.
3) SP 2100, columna capilar, 12 m.
4) ECNSSM-3 % en Gas Chrom Q, 6 ft, Ø 2 mm.
5) 8 % NPGS en Chromosorb WAW-DMCS, 6 ft, Ø 2 mm.

PREPARACION DE O-TRIMETILSILIL ETERES:

La sililación se llevó a cabo tratando la muestra en piridina anhidra con igual volúmen de Tri-Sil (Pierce) y calentando a 60°durante 10 minutos. Las muestras se centrifugaron antes de inyectar en el c.g.l.

PREPARACION DE ACETATOS:

La muestra se trató con una mezcla de anhídrido acético: piridina (1:1) durante una hora a 100° en estufa. La solución se evaporó repetidamente con agregados de tolueno para eliminación de la piridina. Los acetatos se extrajeron con cloruro de metileno y se llevaron a sequedad.

DETERMINACION DE D-GLUCOSA.

se usó para la determinación selectiva y cuantitativa de glucosa según la técnica de Fleming y Pegler (1963). Se disolvieron 60 mg de glucosa oxidasa, 6 mg de peroxidasa y 20 mg de O-dianisidina en 200 ml de buffer tris pH 7,0. Este buffer se preparó disolviendo 15,25 g de 2-amimo-2(hidroximetil)propano 1,3 diol en 21,5 ml de ácido clorhídrico 5N, se diluyó a 250 ml en matraz aforado con agua destilada, se agregaron 165 ml de glicerol analítico y se ajustó el pH a 7,0 con un pHmetro marca Orion , modelo 211 . El reactivo es estable a 4° en frasco oscuro durante 3-4 semanas.

Técnica general

Se mezclaron 2 ml del reactivo glucosa oxidasa-peroxidasa con 1 ml de la solución de glucosa (0-100 ug). Se incubó una hora a 25 °. Se agregaron 4 ml de ácido sulfúrico concentrado analítico y se determinó la absorbancia a 525 nm. Se usó como patrón una solución de glucosa de 1 mg/ ml.

DETERMINACION DE AZUCARES TOTALES.

Método colorimétrico de fenol-ácido sulfúrico:

Se procedió de acuerdo a la técnica descripta por Smith y col. (1956). Se mezcló 0,5 ml de una solución conteniendo entre 10 y 70 ug de azúcar con 0,5 ml de una solución de fenol 5 %. Se agitó. Se agregaron 2,5 ml de ácido sulfúrico concentrado agitando durante la adición. Luego de 10 minutos se agitaron los tubos nuevamente y se dejaron reposar durante 20 minutos a temperatura ambiente. Apareció un color amarillo naranja. Se midió la absorción a 490 nm para hexosas.

DETERMINACION DE AZUCARES REDUCTORES:

Método colorimétrico de Somogyi Nelson (1945).

Reactivos:

a) Se disolvieron 7 g de fosfato disódico anhidro y 10 g de tartrato de sodio y potasio en 175 ml de agua. Se agregaron 25 ml de hidróxido de sodio 1 N y luego, con agitación, 20 ml de una solución 10 % de sulfato cúprico. Se agregaron 45 g de sulfato de sodio y se llevó a 250 ml en matraz aforado.Se dejó reposar uno o dos días y se usó la parte superior clara.

b) Se disolvieron 8,3 g de molibdato de amonio en 150 ml de agua y se agregaron 7 ml de ácido sulfúrico concentrado. A esta solución se agregó 1 g de arseniato disódico en 80 ml de agua. se mezcló y se colocó a 37°. Se usó luego de transcurridas 40 hs.

Técnica

Se tomó 1 ml del reactivo a)y 1 ml de la solución del azúcar. Se calentó en un baño de agua hirviente durante 10 minutos. Se enfrió a temperatura ambiente y se agregaron 0,5 ml del reactivo b). Se llevó a volúmen en 10 ml, se mezcló y midió la absorbancia a 520 nm.

OXIDACIONES CON PERIODATO DE SODIO.

Técnica general

Se colocó en matraz aforado una solución de metaperiodato de sodio),1 M y el polisacárido en una concentración del 0,1% llevando a volúmen con agua destilada. La oxidación se llevó a cabo a temperatura ambiente en ausencia de luz. Se midió a distintos tiempos, el consumo de periodato y la producción de ácido fórmico hasta que se observó constancia en el consumo de oxidante y/o sobreoxidación. Paralelamente se realizó un blanco libre de azúcar en las mismas condiciones.

DETERMINACIÓN DEL CONSUMO DE PERIODATO.

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

Soluciones:

SOLUCIÓN DE TRIÓXIDO DE ARSÉNICO 0,1 N (0,025 M)

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

SOLUCIÓN DE TRIOXIDO DE ARSENICO 0,01 N .

Se preparó por dilución de la solución anterior.

SOLUCION DE IODO 0,1 N .

Se agregaron 3,125 g de iodo bisublimado a una solución de 10 g de IK en 10 ml de agua. Se agitó hasta disolución

total y se llevó a volúmen en un matraz aforado de 250 ml.

SOLUCION DE IODO 0,01 N.

Se preparó por dilución de la solución anterior.

VALORACION DE LAS SOLUCIONES

Solución de trióxido de arsénico 0,1N: se considera patrón. Solución de iodo 0,1 N: 1 ml de la solución patrón de trióxido de arsénico 0,1 N, se tituló con la solución de iodo, usando almidón como indicador. La ecuación de óxido reducción correspondiente es:

$$AsO_2^- + 2OH \longrightarrow AsO_3^- + H_2O + 2e^-$$
$$I_2 + 2e^- \longrightarrow 2\,I^-$$

$$AsO_2^- + 2\,OH + I_2 \longrightarrow AsO_3^- + 2I^- + H_2O$$

$$f_{I_2} = \frac{Va}{Vb} = \frac{\text{volúmen de la solución de trióxido de arsénico}}{\text{volúmende la solución de } I_2 \text{ utilizada en la titulación}}$$

PROCEDIMIENTO

Se extrajeron alícuotas de la mezcla de oxidación que se agregaron a una solución de 5 ml de trióxido de arsénico 0,01N, 1 ml de solución saturada de bicarbonato de sodio y 0,2 ml de ioduro de potasio 20%. Se dejó una hora en la oscurídad y se tituló el exceso de arsenito de sodio con la solución de iodo 0,01 N, empleando almidón como indicador. De manera idéntica se procedió con el blanco. Se calculó el periodato consumido según las siguientes ecuaciones:

$5 \times 0{,}01 - a \times 0{,}01 \times f_{I_2} = c =$ meq. de IO_4^- presentes en el blanco.

$5 \times 0{,}01 - b \times 0{,}01 \times f_{I_2} = d =$ meq. de IO_4^- presentes en la muestra.

c-d = e =meq. de IO_4^- consumidos.
e/2 = milimoles de IO_4^- consumidos.
Donde a = ml de iodo consumidos por el blanco.
b = ml de iodo consumidos por la muestra.

De ahí surge que, si V es el volúmen de la mezcla de oxidación y A es la alícuota tomada para titular, el número de moles totales de IO_4^- consumidos será:

$$\frac{e}{2} \times \frac{V}{A} \times 10^{-3}$$

DETERMINACION DE LA PRODUCCION DE ACIDO FORMICO.

Soluciones necesarias:
Solución de hidróxido de sodio 0,01 N:

Se preparó por dilución de una solución de 25 g de hidróxido de sodio en 25 ml de agua destilada; 0,65 ml de esta solución se llevaron a un litro en matraz aforado. Se tituló con una solución patrón de ácido clorhídrico 0,01 N.

PROCEDIMIENTO:

Se extrajeron alícuotas de la mezcla de oxidación (muestra y blanco) y se recogieron sobre 0,2 ml de etilenglicol libre de acidez y se mantuvieron una hora en la oscuridad, para que se consuma el exceso de oxidante. Se tituló con una solución de hidróxido de sodio 0,01 N, utilizando una solución de fenolftaleína como indicador.

Cálculos:

$(m - b) \times 0{,}01 \times f_{OHNa} = a$ = meq. de ácido fórmico presente en la alícuota a.

$a \times \frac{V}{A} \times 10^{-3}$ = moles de ácido fórmico producido.

m = ml de OHNa consumidos por la muestra.
b = ml de OHNa consumidos por el blanco.

DETERMINACION DE FORMALDEHIDO

Se aplicó el método espectrofotométrico descripto por Eegrive (1937) y se adaptó por Lambert y Neish (1950).

Reactivo de ácido cromotrópico:

Se preparó según la técnica descripta por Mac Fadyen (1945). Un gramo de ácido cromotrópico se disolvió en 100 ml de agua y se llevó a 500 ml en un matraz aforado por agregado de ácido sulfúrico 12,5 M. La solución se conserva inalterada dos o tres semanas en la oscuridad.

Curva de titulación:

Se oxidaron 0,1 milimoles de manitol con 6 ml de periodato de sodio 0,1 M. A la mezcla de oxidación se le agregaron 2 ml de bicarbonato de sodio 1 M y se dejó a 25° durante una hora para completar la oxidación. Se acidificó con 15 ml de ácido sulfúrico 1 N y se agregaron 5 ml de metaarsenito de sodio 1 M agitando suavemente hasta la desaparición total del iodo.

- Se tomó 1 ml de esta solución y de soluciones diluídas al 1/2, 1/4, 1/5 y 1/10 y se hizo con ellas la reacción de color.

PROCEDIMIENTO:

Se tomó 1 ml de cada una de las soluciones testigo, muestra y blanco y se le agregó 10 ml de reactivo de ácido cromotrópico. Se calentaron los tubos durante 30 minutos en un baño de agua hirviente. Las soluciones tomaron color púrpura. Se dejaron enfriar a temperatura ambiente y se midió la absorbancia en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 570 nm.

Con los datos obtenidos se construyó una curva patrón, que se utilizó para calcular la concentración de formaldehido (en micromoles por ml) presentes en la muestra.

CARACTERISTICAS DEL MATERIAL:

Se utilizaron estromas maduros de *Cyttaria johowii* que parasitaban *Nothofagus dombeyi* (coihue), y que fueron recolectados en el mes de enero en Villa Angostura, Neuquén, Argentina.

AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE LOS AZUCARES LIBRES Y ALDITOLES

El material secado en estufa de vacío y molido(20 g) se extrajo con agua (2 l) a temperatura ambiente en un "Waring blender" que se hizo funcionar en forma intermitente tres veces durante un minuto con intervalos de cinco minutos.

Se centrifugó y el residuo se extrajo dos veces más en las mismas condiciones. Los sobrenadantes se juntaron y se filtró a través de lienzo cubierto de una capa de celite. La solución se concentró a presión reducida hasta 500 ml a temperatura menor de 40° y se separaron los polisacáridos por precipitación con etanol. Se centrifugó y el sobrenadante se llevó a sequedad a presión reducida. Se obtuvieron 1,02 g de jarabe.

La cromatografía en papel del extracto, utilizando los solventes 1,2 y 5 y el revelador a) mostró la presencia de sustancias cuya movilidad correspondía a glicerol, arabinitol, manitol, glucosa, sacarosa, trehalosa y ácido arabinohexulosónico.(Tabla XVII)Con el reactivo b) específico para azúcares reductores, se revelaron glucosa, una mancha de movilidad semejante a trehalosa y el ácido arabinohexulosónico.Con el reactivo c) se observó una mancha tenue de movilidad igual a sacarosa.

Una alícuota fue evaporada y luego de secada sobre pentóxido de fósforo se analizaron los componentes como trimetilsililéteres por cromatografía gas-líquido. Las condiciones de operación fueron:

Columna: 1). Temperatura de inyección: 250°.
Temperatura de columna programada: T_1:100°, T_2: 250°,
Velocidad: 10°/min. Gas portador: nitrógeno.
Caudal: 29 ml/ min.

Los resultados pueden verse en el capítulo VII.

FRACCIONAMIENTO EN COLUMNA DE CELULOSA.

El jarabe (2 g) se disolvió en agua, se empastó con celulosa y se agregó a una columna de celulosa en polvo (2,5 x 50 cm) y se eluyó con solvente 4. Se recogieron fracciones de 15 ml.

Las fracciones 71-80 por cromatografía en papel utilizando solventes 1 y 2 y reactivo a) dieron una mancha principal de Rg coincidente con el de glicerol. Las fracciones se juntaron y evaporaron. El jarabe resultante se disolvió en piridina (0,5 ml) y se benzoiló con cloruro de benzoilo(0,5 ml) durante 2 hs. La solución se volcó sobre hielo, se extrajo con cloroformo y la fase orgánica se lavó sucesivamente con agua, ácido sulfúrico, agua, solución saturada se bicarbonato de sodio y finalmente con agua. Se secó con sulfato de sodio anhidro y se evaporó. El residuo cristalizó de metanol (21 mg) y fue recristalizado del mismo solvente dando tri-O-benzoil-glicerol p.f. 74-75° que no varió al mezclar con una muestra auténtica. Krafft indica p.f.76? (1903).

Las fracciones 81-104 presentaron por cromatografía en papel manchas que coincidían con glucosa, glicerol y arabinitol.

Las fracciones 111-115 se juntaron, filtraron y concentraron, Por agregado de acetona apareció un precipitado que por c.p. utilizando solventes 1 y 5 respectivamente daba una única mancha de Rg coincidente con arabinitol. Luego de recristalización dió p.f. 101-103° que no presentó depresión al mezclarlo con material auténtico.

La muestra se acetiló según la técnica general obteniéndo

TABLA XVII

TABLA DE Rg DE ALDITOLES Y AZUCARES LIBRES.

	Solvente 1	Solvente 2	Solvente 5
glicerol	1,59	1,92	-
arabinitol	1,17	1,15	1,69
manitol	0,98	1,03	1,24
eritritol	1,30	1,52	-
glucosa	1	1	1
sacarosa	-	0,71	0,65
trehalosa	0,52	-	0,42
arabino-hexulosónico.	0,23	0,41	0,51

penta-O-acetil-D-arabinitol de p.f. y p.f. mezcla 75-76º Smith y col. (1959) dan p.f. 76°.

Las fracciones 116-130 eran mezclas de glucosa, arabinitol y manitol.

Las fracciones 131-157 que estaban enriquecidas en el producto de Rg 0,98 (sv 1) y Rg 1,24 (sv 5), se juntaron y evaporaron a sequedad. Por acetilación del jarabe se obtuvo hexa-O-acetil-D-manitol (11,2 mg) de p.f. y p,f, mezcla 123-124º

Lohmar y Goepp (1949) dan un valor que coincide con el indicado.

En las fracciones posteriores de la columna se obtuvieron mezclas de glucosa, sacarosa, trehalosa y ácido D-arabinohexulosónico. La presencia del ácido ya había sido determinada.

DETERMINACION CUANTITATIVA DE LA GLUCOSA PRESENTE.

El jarabe (280 mg) se llevó a 10 ml con agua en un matraz aforado (s-1). Una alícuota de esta solución (100 ul) fue diluída a 1 ml (s-2). De la solución 2 se tomaron muestras de 100 y 200 ul para cuantificar la glucosa por el método de glucosa-oxidasa.

MUESTRA	ALICUOTA (ul)	ABSORBANCIA	AZUCAR
Glucosa 10 mg/ml	200	0,250	20
Glucosa 10 mg/ml	300	0,385	30
Glucosa 10 mg/ml	400	0,465	40
Glucosa 10 mg/ml	500	0,540	50
muestra 1	100	0,260	22
muestra 2	200	0,510	44

Una alícuota de la solución 1 (50 ul) se utilizó para la determinación de azúcares reductores por el método de Somogyi Nelson.

MUESTRA	ALICUOTA (ul)	ABSORBANCIA	AZÚCAR(%)
Glucosa 1 mg/ml	50	0,225	50
Glucosa 1 mg/ml	100	0,335	100
Glucosa 1 mg/ml	150	0,550	150
Glucosa 1 mg/ml	200	0,620	200
Glucosa 1 mg/ml	250	0,705	250
Muestra	50	0,645	240

La cuantificación del resto de los componentes se realizó por cromatografía gas-líquido de los O-trimetilsililéteres utilizando inositol como patrón interno y comparando la respuesta con la de una mezcla de testigos procesada en las mismas condiciones. Los tiempos de retención absolutos y la composición porcentual se encuentran en el caítulo de discusión de los resultados.

AISLAMIENTO Y PURIFICACION DEL POLISACARIDO.

Estromas molidos y secos (50 g) se extrajeron sucesivamente con cloroformo (250 ml) y luego con metanol (250 ml) en un aparato Soxhlet modificado.

El residuo (45 g) se extrajo con 2 l de agua a temperatura ambiente. La extracción se realizó en un "Waring blender" que se hizo funcionar intermitentemente tres veces durante un minuto, con intervalos de cinco minutos. El extracto acuoso se separó por centrifugación y el residuo se extrajo dos veces más sucesivamente en las mismas condiciones. Los sobrenadantes se juntaron y se filtraron al vacío a través de lienzo cubierto con una capa celite. El filtrado se concentró hasta un volúmen final de 2 litros a presión reducida y se precipitó por agregado de etanol hasta 16% un polisacárido (A) (0,204 g) de aspecto gelatinoso que se separó por centrifugación, $[\alpha]_D^{20}$ +5,1° (DMSO).

Al sobrenadante se le agregó etanol hasta 25 % y se precipitó un segundo polisacárido, (B) (0,308 g) que se separó por centrifugación $[\alpha]_D^{20}$ +45,5° (DMSO).

Las aguas madres de B se llevaron a una concentración de etanol de 28 % y precipitó un tercer polisacárido, C (1,29g) que fue separado por centrifugación .

El polisacárido C (200 mg) se disolvió en 100 ml de agua con agitación durante una noche. Se filtró al vacío a través de lecho de celite, con agregado de carbón y se reprecipitó el polisacárido por agregado de etanol (30 %). Se separó por centrifugación, lavándose con etanol 50 %, 95 %, etanol absoluto y finalmente con acetona. Por secado se obtuvieron 153 mg de polisacárido (75 % sobre producto crudo).

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

Producto obtenido en la primera purificación:

$[\alpha]_D^{20}$ -14,7°(c 0,3; DMSO)

Producto obtenido de la segunda purificación:

$[\alpha]_D^{20}$ -29,0°(c 0,3; DMSO)

Producto obtenido de la tercera purificación:

$[\alpha]_D^{20}$ -34,0°(c 0,3; DMSO).

DETERMINACION DE HOMOGENEIDAD POR PRECIPITACION FRACCIONADA CON ETANOL.

Se realizó siguiendo la técnica descripta por Whistler y BeMiller (1956). El polisacárido purificado (0,15 g) se disolvió en 100 ml de agua con agitación. Se agregó etanol gota a gota con agitación hasta turbidez incipiente. La suspensión se centrifugó y el material precipitado se lavó varias veces con etanol y se secó en desecador.

CONCENTRACION DE ETANOL (% v/v)	% DE POLISACARIDO PRECIPITADO
0 - 29	-
30	92
30 - 35	8
35 - 50	-

PROPIEDADES DEL POLISACARIDO:

El polisacárido es poco soluble en agua y en álcali, pero se disuelve gradualmente en ácido fórmico (90 %) y en dimetilsulfóxido.

El polisacárido secado a 60°/0,1 mm durante 6 horas sobre pentóxido de fósforo dió un poder rotatorio:

$$[\alpha]_D^{20} - 34 \text{ (c 0,3; DMSO)}$$

El contenido de nitrógeno resultó menor de 0,5 % y no se encontraron cenizas.

El espectro infrarrojo del film dió absorciones a 3 300, 2 900 y 890 cm^{-1}.

DETERMINACION DE HOMOGENEIDAD POR CROMATOGRAFIA EN GELES

El polisacárido (5 mg) se disolvió en DMSO (1 ml) y se sembró en una columna (2 x 72 cm) de Sephadex G-100 equilibrada con DMSO y eluída con el mismo solvente. Se recogieron fracciones de 3 ml. La elución se siguió por dosaje de azúcares totales por el método de fenol-ácido sulfúrico sobre alícuotas de 0,2 ml de cada tubo, y se cuantificó por extrapolación en una curva patrón realizada con glucosa. Para la determinación del peso molecular se utilizaron dextranos de pesos moleculares conocidos.

TUBO	ABSORBANCIA	ug/TUBO
12	0	0
13	0,02	35
14	0,06	210
15	0,09	300
16	0,23	750
17	0,32	1050
18	0,30	950
19	0,20	270
20	0,08	150
21	0,04	75
22	0	0

HIDROLISIS TOTAL DEL POLISACARIDO

El polisacárido (10,5 mg) se hidrolizó por calentamiento con ácido fórmico 90 % (2 ml) en tubo cerrado durante 3 horas en estufa a 100°. El hidrolizado se diluyó con agua hasta 50 % y se calentó durante 3 horas más a 100° La solución se evaporó a presión reducida con sucesivos agregados de agua hasta eliminación total del ácido y se hidrolizó con ácido sulfúrico 1 N a 105° durante 24 horas.

El hidrolizado se enfrió, se neutralizó con carbonato de bario y se filtró a través de un lecho de celite. El filtrado se descationizó por agitación con resina Dowex 50 (H^+), se llevó a seco y se tomó en 1 ml de agua. Con una alícuota se determinó azúcares totales por comparación con una curva patrón realizada con glucosa y se cuantificó glucosa, por el método de glucosa-oxidasa(Fleming y Pegler 1963).

DETERMINACION DE AZUCARES TOTALES EN LA HIDROLISIS TOTAL

MUESTRA	ALICUOTA TOMADA (ul)	ABSORBANCIA	AZUCAR(ug)
Glucosa (1mg/ml)	10	0,09	10
Glucosa (1mg/ml)	20	0,16	20
Glucosa (1mg/ml)	40	0,39	40
Glucosa (1mg/ml)	60	0,68	60
Glucosa (1mg/ml)	80	0,75	80
Polisacárido hidro-	5	0,49	52
lizado	7	0,70	73

DETERMINACION DE GLUCOSA EN EL HIDROLIZADO TOTAL.

MUESTRA	ALICUOTA TOMADA (ul)	ABSORBANCIA	GLUCOSA(ug)
Glucosa (1mg/ml)	10	0,100	10
Glucosa (1mg/ml)	20	0,200	20
Glucosa (1mg/ml)	30	0,295	30
Glucosa (1mg/ml)	40	0,385	40
Glucosa (1mg/ml)	50	0,450	50
Polisacárido hidro-	2	0,200	20
lizado	5	0,440	47

Por cromatografía en papel utilizando solventes 1 y 2 se observó glucosa y trazas de una mancha de Rg 1,1 (sv 1) y Rg 1,2 (sv 2) que se reveló rosado con reactivo c.

Se llevó a cabo la cromatografía gas-líquido del hidrolizado total sililado utilizando la columna 2 con las siguientes condiciones:

T columna programada desde 160-210° Velocidad : 1°/min.

T detector :225° , T inyector: 250°
Gas portador: nitrógeno. Flujo: 32 ml/min.

Se observaron dos picos de Tr 4,17 y 4,71 min que coincidían con el Tr de una muestra auténtica de fructosa tratada en las mismas condiciones, y otros dos picos de Tr 5,34 y 7,29 min que correspondían con los tiempos de retención de una muestra auténtica de glucosa sililada en las mismas condiciones.La relación de áreas fue de 92:3 (glucosa:fructosa).

HIDROLISIS ACIDA PARCIAL DEL POLISACARIDO.

El polisacárido (30 mg) se hidrolizó con ácido fórmico 90 % durante tres horas a 100°en tubo cerrado. El hidrolizado se diluyó con agua hasta el 50 % y se calentó durante tres horas más a 100°. Se evaporó a presión reducida hasta eliminación del ácido. Se tomó con agua y se centrifugó un insoluble (B). Por cromatografía en papel del soluble (A) se observaron manchas de Rg correspondientes a glucosa Rg 1, Fructosa (Rg 1,2 sv 1; Rg 1,2-sv 2), laminaribiosa (Rg 0,9 sv 1; Rg 0,59 sv 2), genciobiosa o isomaltosa (Rg 0,5 sv 1, Rg 0,73 Sv 2), un disacárido (Rg 0,9 sv 1, Rg 0,73 sv 2) que se reveló rosado con reactivo de cetosas, y dos oligosacáridos de Rg 0,44 y 0,28 en sv 2.

La cromatografía gas-líquido de A se llevó a cabo en las siguientes condiciones:
Columna 1, T inyector: 250°, T detector:225°,
T columna programada desde 160-210°, velocidad: 1°/ min.
Gas portador:nitrógeno, flujo: 32 ml/min.
Se obtuvieron picos con los siguientes tiempos de retención:

Tr DE LOS TRI-O-METILSILIL DERIVADOS DE LOS AZUCARES OBTENIDOS POR HIDRÓLISIS CON HCOOH 90 % DEL POLISACARIDO.

COMPUESTO	Tr (min)
glucosa	5,31; 7,24
fructosa	4,21; 4,67
laminaribiosa	26,14; 26,99
genciobiosa e isomaltosa	29,00
disacárido x	24,50

Otra muestra de A reducida y sililada se cromatografió para determinar genciobitol o isomaltitol.
Se utilizaron las siguientes condiciones:
Columna 3, T inyector: 280°, T detector: 280°.
T columna :235°, Gas portador : helio, Flujo: 1 ml/min.

El insoluble (B) se trató con ácido sulfúrico 1 N (3 ml) y se calentó a 100°durante 3 horas en tubo cerrado. Se centrifugó y separó un insoluble C que se lavó reiteradamente con agua, con solución de bicarbonato de sodio y luego con agua y se secó al vacío (17,5 mg).

En el soluble B_1 por cromatografía en papel se detectó glucosa, fructosa, laminaribiosa y genciobiosa.

El insoluble C (2,5 mg) se disolvió en dimetilsulfóxido (1 ml) y se sembró en una columna de Sephadex G-100. La elución se llevó a cabo como se describió anteriormente.

TUBO	ABSORBANCIA	ug/TUBO
14	0	0
15	0	0
16	0,10	165
17	0,42	660
18	0,45	675
19	0,13	210
20	0	0
21	0	0
.....	.....	.....
24	0	0
25	0,08	132
26	0	0
.....	.....	.....
53	0	0
54	0,05	114
55	0	0

OXIDACION CON TRIOXIDO DE CROMO

Se siguió la técnica de Kochetkov y col. (1975). El polisacárido (4 mg) se disolvió en agua (2 ml) con agitación. Se agregó borohidruro de sodio (50 mg) y se continuó la agitación durante 24 hs. La solución se dializó contra agua corriente y luego contra agua destilada y se liofilizó.

El liofilizado se trató con anhídrido acético (1 ml) piridina (1 ml) y formamida (1 ml) con agitación durante dos horas. Se dializó durante 3 tres días contra agua corriente y luego 1 día contra agua destilada y se liofilizó.

El polisacárido acetilado se disolvió en ácido acético glacial (o,3 ml) y se agregó trióxido de cromo (30 mg) calentándose a 50° durante dos horas. La solución se diluyó con agua y se extrajocon cloroformo. El extracto se lavó con agua y se

evaporó a presión reducida. El producto oxidado se llevó a 5 ml en matraz aforado y con una alícuota de la solución se determinó azúcares totales por el método de fenol-ácido sulfúrico.

Con estos datos se calculó el porcentaje de azúcar remanente y de uniones β -presentes en el polisacárido.

La solución del polisacárido oxidado (1 ml) se hidrolizó con ácido sulfúrico 1 N a temperatura ambiente durante tres días y luego a 100°durante 8 hs. El hidrolizado se neutralizó con carbonato de bario, se filtró por lecho de celite, se concentró y se llevó a 2 ml. Con una alícuota se determinó glucosa por el método de glucosa-oxidasa.

DETERMINACION DE AZUCARES TOTALES EN EL OXIDADO

MUESTRA	ALICUOTA TOMADA (ul)	ABSORBANCIA	AZUCAR (ug)
Glucosa 1 mg/ml	10	0,110	10
Glucosa 1 mg/ml	20	0,350	20
Glucosa 1 mg/ml	30	0,515	30
Glucosa 1 mg/ml	40	0,800	40
Glucosa 1 mg/ml	50	1,020	50
Polisacárido oxidado	100	0,300	16

DETERMINACION DE GLUCOSA EN EL OXIDADO.

MUESTRA	ALICUOTA TOMADA (ul)	ABSORBANCIA	AZUCAR (ug)
Glucosa 1 mg/ml	10	0,05	10
Glucosa 1 mg/ml	20	0,12	20
Glucosa 1 mg/ml	30	0,195	30
Glucosa 1 mg/ml	40	0,255	40
Glucosa 1 mg/ml	50	0,315	50
Polisacárido oxidado, hidrolizado	500	0,120	20

Con estos datos se calculó el porcentaje de glucosa presente en el polisacárido luego de la oxidación.

DETERMINACION DEL GRADO DE POLIMERIZACION:

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

El polisacárido (32,5 mg) se suspendió en 10 ml de agua, se agregaron 25 mg de borohidruro de sodio y se mantuvo con agitación constante durante 20 hs. El exceso de borohidruro de sodio se detruyó por agregado de ácido acético gota a gota, se ajustó el pH a 7,5 con solución saturada de bicarbonato de sodio y se agregaron 25 mg de metaperiodato de sodio. La mezcla se dejó en oscuridad a temperatura ambiente durante 4 días. El exceso de oxidante se destruyó por agregado de 7,5 ml de ácido sulfúrico 1 N y 2,5 ml de arsenito de sodio 1 M. La mexcla (25 ml) se dializó contra agua destilada (31 ml) en un sistema cerrado durante 24 hs. Se tomaron alícuotas (1 ml) del dializado y se realizó sobre ellas la determinación de formaldehido ~~según la técnica general~~ descripta.

MUESTRA	ABSORBANCIA	FORMALDEHIDO (umoles)
Testigo 1	0,160	0,076
Testigo 2	0,400	0,152
Testigo 3	0,660	0,228
Testigo 4	0,950	0,304
Polisacárido	0,080	0,030

Se encontró que 32,5 mg del polisacárido dan orígen a 1,68 umoles de formaldehido, lo que implica un peso molecular de 19 047 (si se considera que el monosacárido terminal está unido a través del O-6 y que por lo tanto da una molécula de formaldehído por mol de polisacárido) o 38 095 (si se considera que el azúcar terminal está unido a través del O-3 y da dos moléculas de formaldehido por mol de polisacárido).

Por los datos obtenidos se calculó que el grado de polimerización es de 117 si se considera que la unidad terminal está unida por O-6 o de 235 en caso que estuviera unida por O-3.

ESTUDIOS DE METILACION .

Se aplicó el método descripto por Hakomori (1964).

Preparación del metil sulfinil sodio.

El metil sulfinil sodio se preparó según la técnica de Sjöberg (1966). Una dispersión de hidruro de sodio 80 % en aceite mineral (1 g) se lavó con hexano (3 x 30 ml) en un recipiente tapado. El hidruro de sodio lavado se secó a presión reducida y se disolvió en dimetilsulfóxido (15 ml) previamente destilado sobre hidruro de calcio a presión reducida y guardado sobre tamiz molecular Linde tipo 4 A. La solución se mantuvo en atmósfera de nitrógeno y se agitó en baño ultrasónico durante una hora, hasta que la solución tomó color verdoso.

Metilación :

El polisacárido (12 mg) previamente secado sobre pentóxido de fósforo durante dos horas, se disolvió en dimetilsulfóxido (4 ml) en un erlenmeyer tapado. Se mantuvo con corriente de nitrógeno y se agitó en baño ultrasónico. Se inyectó con jeringa la solución del metil sulfinil sodio (6 ml) y se agitó durante una hora. Luego de ocho horas a temperatura ambiente, se agregó ioduro de metilo (2 ml) gota a gota a la solución enfriada a 0° y se agitó durante 30 minutos en baño ultrasónico. Se volcó sobre agua (20 ml), se dializó contra agua corriente una noche y luego contra agua destilada. Se extrajo con cloruro de metileno (3 x 10 ml) y se llevó a seco a presión reducida. El residuo se redisolvió en éter, se filtró y se evaporó.

Hidrólisis del polisacárido metilado:

El polisacárido metilado se disolvió en ácido sulfúrico 72 % (0,5 ml) enfriando en baño de hielo. Se dejó a

TABLA XVIII

CROMATOGRAFIA GAS-LIQUIDO DE GLUCOSAS PARCIALMENTE METILADAS

MUESTRA	Tr* ACETATOS (a)	Tr*ACETATOS (b)
2,3,4,6-tetra-O-metil-glucitol	1,00 (4,92 min)	1,00 (7,47 min)
2,4,6-tri-O-metil glucitol	1,95	1,68
2,3,4-tri-O metil glucitol	2,55	1,99
2,3,6-tri-O-metil glucitol	2,55	1,90
2,4-di-O-metil glucitol	5,20	3,48

*Relativo a 2,3,4,6-tetra -O-metil glucitol

a) columna 4. T columna: 180º T inyector: 210°;
T detector: 215°; Gas portador: nitrógeno;
Flujo : 30 ml/min.

b) columna 5. T columna 215°; T inyector: 280º
T detector: 225°; Gas portador: nitrógeno.
Flujo: 26 ml/min.

temperatura ambiente durante dos horas, luego se diluyó hasta una concentración de 12 % y se calentó a 100 °durante cuatro horas en tubo cerrado. El hidrolizado se neutralizó con hidróxido de bario y los sólidos se separaron por filtración a través de lecho de celite, lavándose el filtro con agua y metanol caliente. El filtrado se descationizó por agitación con resina Dowex 50 (H^+).

La cromatografía en papel del hidrolizado usando solvente 3 y revelador b) presentó manchas cuyos valores de Rf y colores coincidían con los de 2,3,4,6-tetra-O-metil glucosa (Rf 0,86, rosada); 2,3,4-tri-O-metil glucosa (Rf 0,60, rosada); 2,4,6-tri-O-metil glucosa (Rf 0,50, rosada) y 2,4-di-O-metil glucosa (Rf 0,30, marrón).

El testigo de tetra-O-metil glucosa era comercial y los demás azúcares metilados se habían aislado e identificado de *Cyttaria harioti* Fischer (Fernandez Cirelli y Lederkremer 1972).

Se prepararon los acetatos del hidrolizado previamente reducido con borohidruro de sodio y de muestras auténticas (reducidas) de glucosas parcialmente metiladas y se analizaron por cromatografía gas-líquido. Los resultados obtenidos así como las condiciones empleadas pueden verse en la Tabla XVIII.

Una alícuota de la misma muestra fue analizada por cromatografía gaseosa-espectrometría de masa utilizando las siguientes condiciones: columna 4, Tcolumna programada de 120°a 190°, velocidad 4°/min.

METILACION DEL POLISACARIDO DEGRADADO POR HIDROLISIS ACIDA PARCIAL(C).

El polisacárido degradado (C), (5 mg) obtenido luego de una hidrólisis con ácido fórmico y posteriormente con ácido sulfúrico 1N en las condiciones anteriormente descriptas, fue metilado con la técnica de Hakomori (1964). El producto se remetiló por el método descripto por Purdie e Irvine (1903) con 10 ml de ioduro de metilo y 0,5 g de óxido de plata recién preparado, agregado en pequeñas porciones durante 2,5 hs. La mezcla de reacción se calentó a reflujo con agitación en baño de agua a 60° durante 10 hs. Se separó el óxido de plata por filtración a través de un lecho de celite, lavándose cuidadosamente con cloroformo caliente (5 x 2 ml). El filtrado se secó con sulfato de sodio anhidro y se llevó a seco a presión reducida.

El polisacárido metilado se hidrolizó, redujo y acetiló como se describió anteriormente. Los productos resultantes fueron analizados por cromatografía gas-líquido, utilizando la columna 4. Se obtuvieron picos de Tr 3,70; 6,11; 7,80; 12,09 y 15,42 identificados como 2,3,4,6-tetra-O-; 2,4,6-tri-O-; 2,3,6-tri-O-; 4,6-di-O- y 2,4-di-O- metil glucosas con porcentajes respectivos de 5,42%, 69,01%, 9,70 %, 9,98% y 5,77%. Utilizando la columna 5 se confirmó la presencia de un pico de Tr coincidente con 2,3,6-tri-O-metil glucosa, observándose sólo trazas de 2,3,4-tri-O-metil glucosa.

La identidad de las glucosas parcialmente metiladas se confirmó por cromatografía gaseosa-espectrometría de masa utilizando las condiciones anteriormente descriptas.

ESTUDIOS DE OXIDACION CON PERIODATO DE SODIO .

Se realizó de acuerdo a la técnica descripta en la parte general. El polisacárido (30 mg), se suspendió en periodato de sodio 0,1 M (15 ml) y se completó el volúmen a 30 ml con agua destilada. La oxidación se llevó a cabo a 5° en la oscuridad con agitación. Se tomaron alícuotas a diferentes tiempos para determinar el consumo de oxidante y la producción de ácido fórmico. Se realizó paralelamente un blanco sin azúcar.

Dosaje de periodato de sodio:

Se tomaron alícuotas de 0,5 ml, las que se agregaron a una solución de 5 ml de arsenito de sodio 0,01 N; 0,5 ml de solución saturada de bicarbonato de sodio y 0,2 ml de ioduro de potasio 20 %. Se procedió de acuerdo al método descripto. Las titulaciones se llevaron a cabo con solución de iodo 0,01 N, f=1,04. Todas las determinaciones se efectuaron por duplicado. El consumo de periodato se expresó como moles de periodato/ mol de hexosa anhidra. Los resultados pueden verse en la Tabla XIX .

Dosaje de ácido fórmico:

Se tomaron alícuotas de 1 ml que se agregaron a 0,2 ml de etilenglicol. La determinación se efectuó de acuerdo a la técnica general descripta. Las titulaciones se realizaron con hidróxido de sodio 0,01 N, f = 0,926. Todas las determinaciones se efectuaron por duplicado. Los resultados obtenidos se expresaron como moles de ácido fórmico/mol de hexosa anhidra. Tabla XX

TABLA XIX

DETERMINACION DEL CONSUMO DE PERIODATO

TIEMPO	MUESTRA	I_2 CONSUMIDO (ml)	MOLES DE IO_4^-/mol hexosa anhidra
24 hs	blanco	0,50	
	polisacárido	0,75	0,56
48 hs	blanco	0,60	
	polisacárido	0,86	0,65
72 hs	blanco	0,70	
	polisacárido	0,95	0,65
96 hs	blanco	0,65	
	polisacárido	0,80	0,65

TABLA XX

DETERMINACIÓN DEL ACIDO FORMICO PRODUCIDO

TIEMPO	MUESTRA	NaOH CONSUMIDO (ml)	MOLES DE HCOOH/ mol hexosa anh.
24 hs	blanco	0,20	
	polisacárido	0,30	0,14
48 hs	blanco	0,20	
	polisacárido	0,40	0,29
72 hs	blanco	0,20	
	polisacárido	0,40	0,29
96 hs	blanco	0,20	
	polisacárido	0,40	0,29

Reducción del polialdehido

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

Se agregó borohidruro de sodio (150 mg) y a las 10 hs y a las 20 hs se hicieron nuevos agregados de 50 mg de borohidruro de sodio, agitando durante 10 hs más. No se logró disolución total del producto. Se destruyó el exceso de borohidruro de sodio por agregadode ácido acético gota a gota hasta pH 5. La suspención se desionizó por diálisis contra agua corriente y luego contra agua destilada y se liofilizó (20,5 mg).

Hidrólisis ácida total del polialcohol.

El polialcohol (4,5 mg) se hidrolizó con ácido fórmico 90 % durante tres horas a 100°; se diluyó al 50 % con agua destilada y se calentó a 100°durante tres horas más. Se evaporó a presión reducida hasta jarabe y se volvió a hidrolizar con ácido sulfúrico 1 N (1 ml) en estufa a 100°durante 8 hs.

El hidrolizado se neutralizó con carbonato de bario, se filtró por lecho de celite y se evaporó a presión reducida. Por cromatografía en papel se detectaron glucosa y glicerol Rg 1,59 (sv 1) Rg 1,92 (sv 2).

La cromatografía gas-líquido de los O-trimetilsilil derivados se realizó en las siguientes condiciones:
Columna 1, T columna: programada de 80-220°; Velocidad: 4°/ min.
T inyector: 300°; T detector: 300°
Gas portador: nitrógeno; Flujo: 39 ml/min.

Por comparación con patrones tratados en las mismas condiciones se determinó la presencia de glicerol (Tr 5,43); fructosa (Tr 19,47 y 20,24); glucosa (Tr 20,85 y 22,75) y eritritol(Tr 12,53).

Hidrólisis ácida suave del polialcohol.

El polialcohol se degradó por el método de Smith siguiendo la técnica descripta por Misaki y Kanamaru (1968). El polialcohol (22 mg) se trató con ácido sulfúrico 0,1 N (10 ml) a temperatura ambiente durante 24 hs. El material insoluble se separó por centrifugación (P).

El hidrolizado (B) se neutralizó con carbonato de bario, se descationizó por agitación de la solución con resina Dowex 50 (H^+) y luego de filtrar se llevó a seco a presión reducida. Por cromatografía en papel en solventes 1 y 4 se observó una mancha de Rg coincidente con glicerol. No se observaron manchas correspondientes a glucosil glicerol o glucosil eritritol.La cromatografía gas-líquido de la muestra derivatizada como O-trimetilsilil éteres, utilizando las condiciones descriptas para la hidrólisis ácida total del polialcohol, mostró un pico de Tr 5,44 min coincidente con un testigo de glicerol tratado en las mismas condiciones.

El insoluble (P) fue hidrolizado en las condiciones descriptas para la hidrólisis total del polisacárido. Por cromatografía en papel utilizando solventes 1 y 2 se observaron manchas de movilidad coincidente con glucosa y fructosa.

ISOMERIZACION DE MALTOSA Y CELOBIOSA RESPECTIVAMENTE EN MEDIO ALCALINO.

Se utilizó la técnica descripta por Rendleman y Hodge (1979).

Preparación de la resina aluminato.

La resina Bio-Rad AG-1-X_8 en forma formiato (20 ml) se agitó durante 5 minutos con una solución de aluminato de sodio 1,3 M (30 ml) previamente llevado a pH 12,2 por agitación con resina Dowex 50 (H^+). Después de filtrar, la resina se lavó repetidamente con agua destilada hasta que los lavados fueron neutros.

Isomerización:

La aldosa (100 mg), maltosa (29) o celobiosa (30), se disolvió en agua (0,5 ml) y se sembró en una columna de resina Bio-Rad AG-1-X_8 en forma aluminato (3-4 ml) preparada como se describió anteriormente. Se hizo penetrar la solución en el lecho por agregado de agua (1,5 ml), se tapó la columna y se dejó a temperatura ambiente durante 8 hs. Al cabo de ese tiempo, se eluyó la columna con agua (500 ml) y se condentró.

Por cromatografía en papel se determinó:

Mezcla de reacción de 29 : un producto mayoritario de Rg 0,75 (sv 1) y Rg 0,70 (sv 2) que se reveló con reactivo de cetosas, y tres manchas de Rg coincidentes con maltosa, glucosa y fructosa.

Mezcla de reacción de 30 : un producto mayoritario de Rg 0,57 (sv 1) y Rg 0,45 (sv 2) que se reveló rosado con reactivo de cetosas y tres manchas de movilidades coincidentes con glucosa, fructosa y celobiosa.

PREPARACION DE 1,2:4,5-DI-O-ISOPROPILIDEN-β-D-FRUCTOPIRANOSA .

Se utilizó la técnica de Fisher y Taube (1927) modificada por Brady (1970).

A 5 gr de D-fructosa se adicionó 60 ml de acetona anhidra conteniendo 7 g de cloruro de zinc. Luego que la mezcla fue agitada mecánicamente durante 6 hs, se dejó a temperatura ambiente durante una noche. La solución se llevó hasta pH alcalino por adición de solución concentrada de hidróxido de sodio y la mezcla resultante fue extraída repetidamente con éter etílico. Los extractos etéreos combinados se secaron sobre sulfato de magnesio anhidro y luego se evaporaron hasta cristalización (55 % de rendimiento). Luego de una recristalización usando como solvente éter-hexano, se obtuvo el 1,2:4,5-di-O-isopropiliden-β-D-fructopiranosa (32) de p.f. 119-120°y Rf 0,64 en solvente 7. Briql y Schinledan (1934) dan p.f.119-120°

PREPARACION DE 1-Br-2,3,4,6-TETRA-O-ACETIL-α-D-GLUCOPIRANOSA.

Se adaptó la técnica que Ness,Fletcher y Hudson (1951) utilizan para la obtención del 1-Br-2,3,4,6-tetra-O-benzoil-α -D-glucopiranosa.

Una solución de 5,65 g de penta-O-acetil-D-glucopiranosa en 6 ml de 1,2 dicloroetano se trató con 5,8 ml de BrH 30-32 % P/P en acético glacial. Luego de dos horas a temperatura ambiente en oscuridad se adicionaron 140 ml de tolueno y se evaporó el solvente a presión reducida. Se agregó otra porción de tolueno (140 ml) y se evaporó nuevamente hasta jarabe, se agregó éter (50 ml) y se llevó a seco. La masa semicristalina se disolvió en 50 ml de éter, se diluyó con hexano y se dejó a cero grado. El precipitado obtenido se recristalizó de éter-hexano p.f. 88-89° Barczai, Martos y Korosy-(1950) dieron p.f.88-89°

DETERMINACION DE LA ACCION ANTITUMOR DEL POLISACARIDO

Animales: se utilizaron ratones de la cepa BALB/C endocriados de ambos sexos y de dos meses de edad.

Tumor: Sarcoma 180 ascítico mantenido por repiques seriados cada 7 días en ratones BALB/C con 5×10^5 células viables por animal.

Transplante tumoral: el Sarcoma 180 fue inoculado por vía intraperitoneal (i.p.) o por vía intradérmica (i.d.). En el primero de los casos se inocularon 5×10^5 células viables y en el segundo 2×10^6 células viables. El desarrollo tumoral se expresó como aumento del peso del ratón en gramos para el grupo desafiado con tumor i.p. y en cm^2 para el grupo con Sarcoma 180 i.d., utilizando un calibre aplicado sobre la superficie del animal.

Inoculación del polisacárido: la inoculación del polisacárido se realizó por vía i.p., 24 hs después del desafío tumoral durante cinco días consecutivos. La dosis de polisacárido empleada para este grupo fue de 10 mg/Kg ratón/día, y de 5 mg/kg de ratón /día para el grupo desafiado por vía i.d.. Paralelamente se inocularon ratones normales con las mismas dosis de polisacárido, como control.

Grupos experimentales: se realizaron 4 grupos experimentales con un total de 100 ratones: 2 grupos desafiados con S 180 i.p. uno de los cuales fue tratado con polisacárido. En los grupos inoculados con S 180 i,d, se siguió el mismo esquema.

DETERMINACION DEL PORCENTAJE DE INHIBICION DEL DESARROLLO TUMORAL.

El porcentaje de inhibición del crecimiento del S 180

i.p. se determinó según la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Inhibición S 180} = \% \text{ crecimiento S 180.}$$

$$\% \text{ Crecimiento S 180} = \frac{\text{Peso del ratón - Peso inicial (8°día)}}{\text{Peso inicial}} \times 100$$

El % de Inhibición del crecimiento del S 180 i.d. se determinó según la siguiente fórmula:

$$\% \text{ radio de Inhibición S 180} = \frac{\text{medida cm}^2 \text{ (S 180)} - \text{medida cm}^2 \text{ (S 180+Pls)}}{\text{medida cm}^2 \text{ S 180}} \times 100$$

Los resultados se observan en las Tablas XXI y XXII y XXIII.

TABLA XXI

ACCION DEL POLISACARIDO SOBRE EL CRECIMIENTO DEL S 180 I.p.

n°de animal	peso del ratón(gr)											
	día 0		día 5		día 8		día 10		día 15		día 20	
	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
1	20	19	22	17	30	15	30	19	38	24	36	26
2	24	19	24	18	28	18	32	18	41	24	40	32
3	24	18	22	18	28	16	22	18	39	21	34	28
4	22	19	25	9	24	10	27	19	36	26	34	31
5	22	10	25	16	25	15	26	16	30	34	-	31
6	22	19	24	20	24	19	-	21	-	36	-	34
7	14	19	-	15	-	14	-	14	-	33	-	36
8	22	22	24	19	24	20	-	20	-	18	-	30
9	19	24	24	18	22	19	24	18	34	32	-	-
10	19,5	20	20	18	21	18	22	-	32	-	34	-
11	21	21	24	19	24	16	28	-	28	-	32	-
12	16	13	20	14	26	14	30	32	28	24	33	25
13	21	14	24	16	20	14	24	20	32	24	29	26
14	21	16	24	14	24	14	28	16	28	14	32	16
15	20	10	24,5	14	24	18	28	20	34	16	-	14
16	22	14	24	14	24	18	24	16	34	32	-	20
17	18	20	18	20	24	20	22	30	34	38	-	40
18	22	14	24	17	30	14	-	28	-	-	-	-

TABLA XXII

ACCION DEL POLISACARIDO SOBRE EL CRECIMIENTO DEL S 180 I.d.

N°de animal	medición del tumor (cm^2)											
	día 5		día 8		día 10		día 15		día 20		día 30	
	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
1	0,49	0,25	0,56	0,64	0,60	0,64	0,7	0,60	0,60	1.4	1.1	0,72
2	0,48	0,30	0,45	0,72	0,63	0,64	0,80	0	0,84	0	0,72	0
3	0,49	0,35	0,72	0,56	0,97	0,80	0,80	0,64	0,50	0,96	0,90	1,3
4	0	0	0	0	0	0,70	0,30	0,56	1,17	0,64	1,5	1,5
5	0	0,54	0	0	0	0	0,45	0,54	1,3	0,80	1,80	1,30
6	0	0,04	0	0,25	0	0,80	0,42	0,45	1,1	0,90		
7	0	0	0	0	0	0	0,50	0,49	0,70	0,64	1,70	0,63
8	0	0	0	0	0	0	0	0,64	1,20	0,80	2.0	1,69
9	0	0	0	0	0	0	0	0,49	2,85	2,60	1,32	2,20
10	0	0	0	0	0	0	0,4	1,65	2,10	0,80	-	0,84
11	1,2	0	0,56	0	2,0	1,5	0,64	0,25	1,80	1,50	-	-
12	0,25	0	0,25	0	0,25	0,2	0,25	1,60	2,2	2,55	-	-
13	0,25	0	0,25	0	1,32	0,8	1,60	2,06	1,98	1,08	-	-
14	0,30	0	1,30	0	2,3	0	2,50	0,40	-	2,16	-	-
15	0	0	1,30	0	1,9	1,6	0,60	0,50	-	-	-	-

A: S 180 (Id). B: S180 (Id)+ Pls.

TABLA XXIII

SOBREVIDA DE LOS ANIMALES A DISTINTOS TIEMPOS

	V/T	
	40 días	75 días
normales	9/9	9/9
S 180 (Id)	15/15	0/15
S 180 (Id) +Pls	14/15	14/15
S 180 (Ip)	0/7	0/7
S 180 (Ip) + Pls	10/18	8/18

V/T = vivos /totales

SINTESIS DE 1,2:4,5-DI-O-ISOPROPILIDEN-3-O-(2,3,4,6-TETRA-O-ACETIL-β-D-GLUCOPIRANOSIL)-β-D-FRUCTOPIRANOSA (34).

Se llevó a cabo una reacción de tipo Koenigs-Knorr a partir de 1,2:4,5-di-O-isopropiliden-β-D-fructopiranosa(32) y 1-Br-2,3,4,6-tetra-O-acetil-α-D-glucopiranosa siguiendo la técnica de Liptàk y Nánási (1980) para la 1,2:5,6-di-O-isopropiliden-3-O- (2,3,4,6-tetra-O-acetil-β-D-glucopiranosil)--α-D-glucofuranosa.

a) Una solución de 32 (3,24 g) en benceno (55 ml) y nitrometano (55 ml) fue evaporada a presión atmosférica a la mitad de su volúmen. Se enfrió a 45°y se agitó con $Hg(CN)_2$ (3,5 g) y 33 (5,7 g) durante 5 hs en condiciones anhidras hasta desaparición total de 33 . La reacción se siguió por cromatografía en capa delgada.

La mezcla se filtró, se evaporó a presión reducida y se disolvió en cloruro de metileno (200 ml). Se extrajo consecutivamente con una solución acuosa de IK 5 % (50 ml), agua (2 x 50 ml), solución saturada de bicarbonato de sodio (50 ml) y agua (2 x 50 ml). La fase orgánica se secó con sulfato de magnesio anhidro, se filtró y se llevó a seco. Se obtuvieron 7,02 g de jarabe.

Por cromatografía en capa delgada (solvente 7) revelador c) se observó una mancha principal de Rf 0,72 y otras minoritarias de Rf o,64; 0,47 y una mancha en el orígen, las dos últimas de color marrón.

Una porción del jarabe (3,5 g) se purificó por cromatografía en columna de sílica gel H (Merck) (15 x 5 cm). Se eluyó con solvente 7.

Las fracciones 12-22 mostraron una única mancha de Rf 0,72 por cromatografía en capa delgada. Estas fracciones se juntaron, se evaporaron y por agregado de isopropanol, cristalizó 0,53 g de un compuesto que se caracterizó como la 1,2:4,5 -di-O-isopropiliden-3-O-(2,3,4,6-tetra-O-acetil-β-D-glucopira-

nosil)-β-D-fructopiranosa (34). Por recristalización del mismo solvente dió p.f. 149-151°; $[\alpha]_D^{20}$ -81,5 (c 0,8; Cl_2CH_2).

Por cromatografía gas-líquido, utilizando la columna 1 se detectó un único pico de Tr 22,88 min. (T columna programada de 190-280°, velocidad: 1°/ min, T inyector: 280°; Tdetector : 290°. Gas portador: nitrógeno. flujo: 18 ml/min.)

El espectro i.r. mostró señales a 1760, 890, y 859-833 cm^{-1}.

El espectro de RMN-H (100 MHz) Fig. 23 mostró señales a δ (ppm)= 1,42 (12 H); 2,05 (12 H); 3,7 (H); 4,0-4,5(8 H), 4,68(1 H) y 5,15 (3 H).

El espectro de RMN-^{13}C presentó señales a δ 111,65; 108.82; 103,52; 101,48; 78,56; 75,30; 73,20; 72,90; 72,6; 71,9 71,4; 68,48; 61,97 y 61,04.

Análisis calculado para $C_{26}H_{38}O_{15}$: C 52,80%; H 6,44 %
encontrado : C 53,03%; H 6,70 %

Las fracciones 23-30 presentaron por cromatografía en capa delgada un producto minoritario de Rf 0,72 identificado como 34 y un compuesto de Rf 0,64 identificado como 32 .

En las fracciones 35-40 se reveló por c.c.d. una mancha mayoritaria de Rf 0,42 (marrón) que se identificó como 2,3,4,6-tetra-O-acetil-D-glucopiranosa. Por c.g.l. en las condiciones mencionadas anteriormente esta fracción presentó un pico mayoritario de Tr 2,25 min coincidente con el de una muestra auténtica del mismo compuesto y otros tres productos minoritarios de Tr 21,03 y 22,88 respectivamente.

El remanente de la mezcla de reacción (3,51 g) se disolvió en isopropanol caliente y luego de filtrar se sembró con cristales del producto 34 , obteniéndose 0,93 g (26 %) de 1,2:4,5-di-O-isopropiliden-3-O- (2,3,4,6-tetra-O-acetil-β-D-glucopiranosil) -β-D-fructopiranosa (34).

b) Una solución de 32 (2,5 g) en nitrometano (50 ml) y benceno

(50 ml) se evporó a presión atmosférica a la mitad de volúmen. Se enfrió a 45°y se agitó con $Hg(CN)_2$ (3,0g) y **33** (2,5 g) se agitó durante 20 hs a 45° Luego del agregado de otra porción de **33** (2,5 g) se agitó durante 6 hs más y se trató la mezcla como se describió en a). La cromatografía por placa delgada de la mezcla de reacción (solvente 7) mostró manchas de Rf 0,69 (rosada), Rf 0,64 (rosada) y Rf 0,47 (marrón).

El jarabe (5,6 g) se cromatografió en una columna de sílica gel H (Merck) (25 x 5 cm) y se eluyó con solvente 9. La elución se siguió por cromatografía en capa delgada.

Las fracciones 3-5 que mostraban compuestos de Rf 0,69 y Rf 0,64 (solvente 7) se evaporaron y la mezcla resultante (0,7 g) se recromatografió por una columna de sílica gel H (Merck) (20 x 3 cm) utilizando solvente 10. Las fracciones 17-24 que presentaban el producto de Rf 0,69 en solvente 7 se llevaron a seco y por agregado de isopropanol cristalizó la 2,3:4,5-di-O-isopropiliden-1-O-(2,3,4,6-tetra-O-acetil-β-D-glucopiranosil)-β-D-fructopiranosa (**42**).

Luego de una recristalización con isopropanol presentó p.f. 161-162°, $[\alpha]_D^{20}$ -32 (c 0,9, Cl_2CH_2). Pacsú , Wilson y Graf (1939) dieron p.f. 162-163°, $[\alpha]_D^{20}$ -32 (Cl_3CH).

El espectro de RMN-H mostró señales a δ 2,15;2,25; 2,35 y 2,8 (4 s, 12H), 1,34; 1,46 y 1,52 (3 s,12 H), 5-5,2 multiplete(2 H);4,6 (d.d. 2 H);4,43 (d.d. 1H);3,6-4,0 (m,7H).

El espectro de RMN-^{13}C mostró señales a δ 170,4; 170,0; 169,2; 169,0; 108,86; 108,58; 101,79; 100,11; 73,08; 71,83; 71,44; 70,90; 70,05; 69,74; 69,50; 68,51; 62,16; 61,08; 26,63; 25,86; 25,45; 24,02; 20,74; 20,65.

Las fracciones 25-30 dieron mezclas del producto **42** y el producto **32** de Rf 0,64.

OBTENCION DE LA 2,3:4,5-DI-O-ISOPROPILIDEN-β-D-FRUCTOPIRANOSA.

Se utilizó la técnica descripta por Brady (1970). Una suspención de D-fructosa (1 g) en acetona (20 ml) conteniendo ácido sulfúrico concentrado (1 ml), se agitó a temperatura ambiente hasta que todo el azúcar estuvo disuelto. La solución se mantuvo durante una hora a temperatura ambiente y luego se enfrió en baño de hielo. Se adicionó una solución de hidróxido de sodio en agua (2 N) gradualmente con agitación y el producto fue aislado por extracción con cloruro de metileno (3 x 50 ml). Los extractos combinados se lavaron con agua (2 x 50 ml), se secaron con sulfato de sodio anhidro y se evaporaron hasta un sólido cristalino (70 %). Por recristalización dió el 2,3:4,5-di-O-isopropiliden-β-D-fructopiranosa de p.f. 96-97; Fisher y Taube dieron p.f. 97°.

DETERMINACION DE LA COMPOSICION DE LA MEZCLA OBTENIDA EN LA REACCION DE KOENIGS-KNORR.

a) Una alícuota del jarabe de la mezcla de reacción (70 mg) se disolvió en 2 ml de cloruro de metileno. Se inyectó en c.g.l. 1 ul de dicha solución en las condiciones descriptas en la pág. 167.. Se obtuvieron picos de Tr 0,54; 2,25;21,03; 22,88 y 26,73 min.coincidentes con testigos de 1,2:4,5-di-O-isopropiliden-β-D-fructopiranosa (32); 2,3,4,6-tetra-O-acetil-D-glucopiranosa (35); el disacárido sustituído 34 , el disacárido sustituído 43 y 2,3:4,5-di-O-isopropiliden-1-O-(2,3,4,6-tetra-O-acetil-β-D-glucopiranosil)-β-D-fructopiranosa (42) respectivamente, La relación de áreas de estos tres últimos fue de 1,28:7,7:1.

b) Un alícuota del jarabe de la mezcla de reacción (3,1 g) se diolvió en 2 ml de cloruro de metileno. Se inyectó en c.g.l. 1 ul de dicha solución (Columna 1, T columna: 235; T inyector:

300; T detector: 300°, Gas portador:nitrógeno, Flujo:20 ml/min.) Se detectaron un pico de Tr 3,77 coincidente con el disacárido **42** y otro pico de Tr 5,07 coincidente con una muestra de **34** en una relación de áreas de 10:1.

OBTENCION DE 3-O-β-D-GLUCOPIRANOSIL-D-FRUCTOSA (**31**)

El compuesto **34** (0,36 g) se trató con metóxido de sodio 0,1N (10 ml) a 5º. La desacetilación se siguió por cromatografía en capa delgada (solvente 7) hasta desaparición total del compuesto de partida de Rf 0,72 (dos horas). Se agregó agua hasta disolver el precipitado formado y se pasó por columna de resina Dowex 50 (H^+) (10 x 0,5cm) utilizando agua como solvente de elución. La solución se evaporó hasta jarabe que no pudo cristalizarse (0,174 g). Por capa delgada se observó (solvente 8, reactivo c) un producto único de Rf 0,60 y $[\alpha]_D^{20}$ -112°(c 0,7 , Cl_2CH_2). (**44**)

El espectro de I.R. mostró señales a 830-850 cm^{-1} y a 890 cm^{-1}. El espectro de RMN-H (Fig.27) presentó señales a δ 1,36; 1,46; 1,48; 1,54 (4 s, 12 H); y una señal ancha de δ 3,3-4,5 (14 H) .

El espectro de RMN-C^{13} mostró señales a : 112.0; 108,9; 104,11; 103,9; 79,49; 76,16; 76,09; 73,64; 73,45; 71,96; 70,12; 62,05; 60,73; 60,52; 27,92; 26,11 y 25,92.

El compuesto **44** (70 mg) se disolvió en agua (10 ml) se agregó resina Bio-Rad 50 (H^+) (5 ml) y se agitó a 60°durante 4 hs. La reacción se siguió por cromatografía en capa delgada (solvente 8) hasta desaparición total del producto de Rf 0,60. La suspención se filtró, neutralizó con carbonato de bario, filtró nuevamente y se evaporó a presión reducida. Se desaló por pasaje por una columna de resina mixta (1 x 5 cm) usando agua como eluyente. Se concentró y se obtuvo un jarabe incoloro que se caracterizó como el disacárido **31**

$[\alpha]_D^{20}$-43 (c 0,5, agua).

Por cromatografía en papel se observó una única mancha de Rf 0,90 (sv 1); Rf 0,73 (sv 2) y Rf0,60 (sv 3) que se reveló rosado con reactivo c).

El espectro de RMN-^{13}C mostró señales a δ 105,55; 103,98; 103,83; 103,35; 102,62; 98,62; 84,56; 81,72; 78,26; 77,91; 76,87; 76,75; 76,57; 76,39; 76,22; 74,77; 74,18; 74,05 71,20; 70,74; 70,39; 70,25; 69,62; 69,39; 65,21; 64,74; 64,67; 64,54; 64,18; 63,94; 63,86; 63,59; 63,33; 61,79y 61,53.

OBTENCION DE LA 3-O-β-D-GLUCOPIRANOSIL-D-ARABINO-HEXOSA FENIL OSAZONA.

Se utilizó la técnica de Pazur (1953) descripta para la fenilosazona de la allolactosa (6-O-β-D-galactopiranosil-D-glucosa).

La 3-O-β-D-glucopiranosil-D-fructosa (31)(30 mg) se disolvió en agua (0,5 ml) y se agregó clorhidrato de fenilhidracina (50 mg) y acetato de sodio (100 mg). La solución se calentó durante 30 minutos a ebullición. Al enfriar cristalizó el producto (45) (28 mg) que luego de recristalización utilizando agua como solvente, dió agujas prismáticas de color amarillo de p.f.196-198° $[\alpha]_D^{20}$ -70,9°(c 0,5; etanol).

RESUMEN.

El presente trabajo tuvo por objeto el estudio de los polioles, azúcares simples y la estructura de un polisacárido de *Cyttaria johowii* En relación con la misma se llevó a cabo la síntesis de la 3-O-β-D-glucopiranosil-D-fructosa producto de hidrólisis ácida parcial del polisacárido. Se presentan:

1) Una descripción de los hongos del género *Cyttaria* su ubicación geográfica, clasificación sistemática y caracteres morfológicos. Se detallan los trabajos químicos realizados sobre *Cyttaria harioti* Fischer que era la única especie estudiada hasta el momento.
2) Un resúmen de los estudios sobre polioles y azúcares simples en hongos, su rol fisiológico y enzimología.
3) Las características estructurales de los β -glucanos encontrados en hongos.
4) Una descripción de los estudios realizados sobre polisacáridos con acción antitumor; las características estructurales y su relación con la actividad.
5) Los estudios realizados sobre glucosilfructosas, sus orígenes características y métodos de obtención.
6) Una descripción de la síntesis de disacáridos por el método de Koeniqs-Knorr: características de la reacción, mecanismo y estereoquímica.
7) La interpretación y discusión de los resultados obtenidos que incluye: a) la caracterización y cuantificación de glicerol(3), D-arabinitol(6), D-manitol(10), eritritol (4), D-glucosa, sacarosa y trehalosa(2) como componentes del extracto acuoso.
   b) los métodos estructurales empleados en la elucidación de la estructura del polisacárido aislado de *Cyttaria johowii*
   c) su actividad antitumor en ratones.
   d). la síntesis de la 3-O-β-D-glucopiranosil-D-fructosa.

El polisacárido se aisló de un extracto acuoso de estromas de *Cyttaria johowii* por precipitación con etanol hasta una concentración del 28 %. Se purificó por redisolución en agua y reprecipitación con etanol hasta que su poder rotatorio permaneció constante $[\alpha]_D^{20}$ -34° (DMSO). El polisacárido así obtenido daba un solo pico por filtración en geles y dado que precipitaba en un rango estrecho de concentración etanólica se consideró homogéneo para su estudio.

Se encontraron como componentes del polisacárido D-glucosa y D-fructosa en una relación 9:1. La presencia de fructoglucanos es rara en hongos.

El grado de polimerización dió un valor de 235, considerando que la unidad terminal está unida a través de su o-3, lo cual está de acuerdo con el peso molecular de aproximadamente 40000 determinado por filtración en geles y comparación con patrones.

Los estudios de metilación e hidrólisis del polisacárido metilado permitieron la identificación de 2,3,4,6-tetra-O-metil glucosa (unidades terminales); 2,4,6-tri-O-metil-D-glucosa (unión (1→3)); 2,3,4-tri-O-metil-D-glucosa (unión 1→6) y 2,3,6-tri-O-metil-D-glucosa (unión 1→4) y 2,4-di-O-metil-D-glucosa (ramificaciones en O-3 y O-6) en una relación tetra:tri:di de 30:34:31 lo que indica una estructura muy ramificada. Se determinó que la unión (1→3) es la que predomina en el polisacárido por la mayor proporción de 2,4,6-tri-O-metil glucosa con respecto a los otros derivados trimetilados.

Los estudios de oxidación con periodato y determinación del consumo de oxidante y producción de ácido fórmico sugirieron la presencia de ramificaciones alternadas y los productos de hidrólisis del polialcohol indican predominio de uniones (1→3) con ramificaciones en O-6. La ausencia de glucosilglicerol en la degradación por el método de Smith indica que no hay uniones (1→3) y (1→6) alternadas. La fructosa no se ataca en la oxidación por lo tanto no es una unidad

terminal y su unión debería ser a través de O-3 u O-4. La determinación de 3-O-β-D-glucopiranosil-D-fructosa como producto de hidrólisis ácida parcial y su confirmación por síntesis indicó que la fructosa estaría también con unión (1→3).

La 3-O-β-D-glucopiranosil-D-fructosa (laminaribiulosa) no había sido descripta en la literatura por lo cual se sintetizó por el método de Koenigs-Knorr a partir de 1,2:4,5 di-O-isopropiliden-β-D-fructopiranosa (32) y 1-Br 2,3,4,6-tetra-O-acetil-α-D-glucopiranosa (33). Se analizaron los espectros de RMN-^{13}C del disacárido sustituído formado en la condensación, su producto de condensación y de la 3-O-β-D-glucopiranosil-D-fructosa (31).

El poder rotatorio negativo y la presencia de laminaribiosa (26) y genciobiosa(27) como productos de hidrólisis parcial indican la configuración β del polisacárido.

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

Se describen los resultados de los ensayos realizados sobre la acción del polisacárido en la inhibición del crecimiento de Sarcoma 180 en ratones.

BIBLIOGRAFIA:

1.- Aitken W.B.,Niederpruem D.J.; Arch. für Mikrobiologie 88, 331 (1973).

2.- Alekhine A.; Ann. Chim. Phys. 18, 532 (1889).

3.- Alekhine A.; Bull. Soc. chim. 46, 824 (1886).

4.- Angyal S.J., Bender V.J., Ralph B.J.; Biochem. Biophys. Acta 362, 175 (1974).

4.- Angyal S.J., Bethel G.S.; Australian J.Chem. 29,1249 (1976).

5.- Angyal S.J., James K. ; J. Chemical Society 617, (1969).

6.- Angyal S.J.; James K. ; Carbohyd. Res. 12, 147 , (1970).

7.- Aronson J., Lin C.; Mycologia 70, 363 (1978).

8.- Avigad G.; Biochem. J. 73, 587 (1959).

9.- Axberg K., Björdal H., Pilotti A., Svensson S.; Acta Chem. Scand., 26,1319 (1972).

10.--Bacon J.S.D., Farmer V.C., Jones D., Taylor F.; Biochem. J. 114, 555 (1969).

11.- Bayley R.W., Bourne E.J.; Nature (London) 184, 904 (1959).

12.- Bárczai-Martos M., Körosy F.; Nature 165, 369 (1950).

13.- Barker S.A., Bourne E.J., Stacey-M.; Chem. and Ind. (London) J. Chem. Soc. 171 (1954).

14.- Basden R.; Proc. Linn. Soc. N.S.W. 97, 95 (1972). C.A. 78: 55532 r.

15.- Bell D.J., Northcote D.H.; J.Chem. Soc. 1944 (1950).

16.- Bhatti D.J., Clamp J.R.; Clin. Chim. Acta 22, 563 (1968).

17.- Björdal H., Lindberg B., Pilotti A., Svensson S., Carbohyd. Res. 15, 339 (1967 a).

18.- Björdal H., Lindberg B., Svensson S., Carbohyd. Res. 15, 433 (1970).

19.- Björdal H., Lindberg B., Svensson S.; Acta Chem. Scand. 21, 1801 (1967 b).

20.- Bluhm T, Deslandes Y, Marchessault R.; Carbohyd. Res. 100,117 (1982).

21.- Bluhm T.L., Sarko A.; Canad. J. Chem. 55, 293 (1977).

22.- Bobbit J.M.; Adv. Carb. Chem. 11, 1 (1956).
23.- Bonnet J.L.; Bull. Soc. Mycol. Fr.;75, 215 (1959).
24.- Bottom C.B., Siehr D.J.; Can. J. Biochem. 58, 147 (1980).
25.- Bourne E.J., Hutson D.H., Weigel H.; Biochem.J. 79,549 (1961).
26.- Bradner C, Clarke J., Stock L.; Cancer Res. 18,347 (1958).
27.- Brady C.; Carohyd. Res. 15, 335 (1970).
28.- Brigl P., Schinle S.; Ber. 67, 127 (1934).
29.- Brown J.; Adv. in Microbial Physiology 181 (1978).
30.- Bulanov P.A., Malama A.A.; Dokl. Akad. Nauk. Belorrusk S.S.R. 9, 270 (1965). C.A. 63: 8919 (1965).
31.- Bulanov P.A., Malama A.A.; Dokl. Akad. Nauk. Belorrusk. S.S.R. 10, 430 (1966). C.A. 65:14066 (1966).
32.- Brown A.D. Simpson J.R.; J.of General Microbiology 72, 589 (1974).
33.- Bruyn A., Anteunis M., Verhegge G.; Carbohyd. Res. 41, 295 (1975).
34.- Bulman R.A., Chittenden G.F.; Biochem. Biophys. Acta 444, (1976).
35.- Cabib E., Leloir L.F.; J.Biological Chem. 231, 259 (1958).
36.- Chiba S., Shimomura T.; Agric. Biol. Chem. 35, 1292 (1971).
37.- Chihara G., Maeda Y., Hamuro J., Sasaki T., Fukuoka F.; Nature 222, 687 (1969).
38.- Chihara G., Hamuro J., Maeda Y., Arai Y., Fukuoka F.: Cancer Res. 30, 2776 (1970).
39.- Clode D.M.; Chemical Reviews 79, 491 (1979).
40.- Cochrane V.W.; Physiology of Fungi, New York, John Wiley & Sons.
41.- Corbett W.M., Kenner J.; J.Chem. Soc. 1789 (1954).
42.- Corbett W.M., Kenner J.; J. Chem. Soc.1345 (1965).
43.- Corey E.J., Chaycovsky M.; J.Am. Chem. Soc. 87, 1345 (1965).
44.- Corina D.L., Munday K.A.; J. of Gen. Microbiology 65, 253 (1971).
45.- Corina D.L., Munday K.A.; J. of Gen. Microbiology 60, 221 (1971).
46.- Croon J., Herrström G., Kull G., Lindberg B.; Acta Chem. Scand. 14, 1338 (1960).

47.- Crueger W., Draht L., Munir M.; Ger. Offen 2, 741 (1978). C.A. 90: 184932 t.

48.- Davies D.D.; Intermediary Metabolism in Plants, Cambridge.

49.- Dodrell D., Allerhand A.; J. Am. Chem. Soc. 93, 2779 (1971).

50.- Dubourdeau D., Fournet B., Bertrand A., Ribereau-Gayon P.; Comp. Rend. 287-D-571 (1978).
286-D-229 (1978).

51.- Eby R., Schuerch C.; Carbohyd. Res. 50, 203 (1976).

52.- Ebisu J., Kato K.,Misaki A.; J. Biochem.(Japan) 78, 879 (1975).

53.- Earl J.C., Mc. Gregor G.M.; J.Proc. Roy. Soc. N.S. Wales 68, 149 (1934).

54.- Eduards T., Peats E., Whelan J.; J. Chem. Soc. 3862 (1958).

55.- Eegrive E.; Z. Anal. Chem. 110, 22 (1937).

56.- A. Fernandez Cirelli, R.M.de Lederkremer; Chem. Ind. 1139 (1971).

57.- A. Fernandez Cirelli, R.M.de Lederkremer;Anales Asoc. Quim. Argentina 60, 299 (1972).

58.- A. Fernandez Cirelli, R.M.de Lederkremer; Anales Asoc. Quim. Argentina, 60,141 (1974).

59.- A. Fernandez Cirelli, R.M.de Lederkremer; Carbohyd. Res. 48, 217 (1976).

60.- Fleming I.D., Pegler H.F.; Analyst 88, 967 (1963).

61.- Fisher E.; Ber. 27, 2486 (1894).

62.- Fisher H.O., Taube C.; Ber. 60, 485 (1927).

63.- Fleury P., Lange J.J.; Pharm. Chim. 17, 107 (1933).

64.- Freunderberg K., Oertzen K.; Liebigs Annalen der Chemie 574 37,(1951)

65.- Fufuda K.; Biochem. Biophys. Acta 538, 580 (1978).

66.- Funcke N., von Sonntag C., Triantaphylides C.; Carbohyd. Res. 75, 305 (1979).

67.- Gagnaire D., Taravel F., Vignon M.; Carbohyd. Res. 51, 157 (1976).

68.- Gamundi I.J.; De Darwiniana 16 461 (1971).

69.- Garad D., Sherman H.C.; Am. Soc. 40, 955 (1918).

70.- Gorin P., Mazurek M.; Canad. J. Chem. 53, 1212 (1975).

71.- Gorin P., Spencer J.F.T.; Adv. in Carbohyd. Chem. 28,367(1968)

72.- Hakomori S.; J. Biochem. (Tokio) 55, 205 (1964).
73.- Harris J.L., Taber W.A.; Canad. J. Bot. 51, 1147 (1973).
74.- Helferich B.,Wedemeyer K.F.; Ann 563, 139 (1949).
75.- Helferich B.,Weisk ; Chem. Ber. 89, 314 (1956).
76.- Helferich B.,Zirner J.; Chem. Ber. 95, 2604 (1962).
77.- Hellerquist C.G.,Lindberg B., Samuelson K.; Acta Chem. Scand. 22, 2736 (1968).
78.- Herve M.,Perlin A.; Carbohyd. Res. 71, 135 (1979).
79.- Hoffman G.C., Sunson B.W., Timell T.E.; Carbohyd. Res. 20, 185 (1971).
80.- Holligan P.M., Jennings D.H.; New Physiologyst 71, 569 (1972).
81.- Hough L., Jones J.K.N., Wadman W.H.; J. Chem. Soc. 1702, (1950).
82.- Hough L., Jones J.K.N., Richards E.L.; J. Chem. Soc. 2005 (1953).
83.- Hudson C.S.; Adv. Carbohyd. Chem 2, 1 (1946).
84.- Ikekawa T., Vehara N., Maeda Y., Nakanishi M.,Fukuoka F.; Cancer Res. 29, 734 (1969).
85.- Jelsma J.; Carbohyd. Res. 43, 200 (1975).
86.- Jenning D.H., Austin S.; J. of General Microbiology 75, 287 (1973).
87.- Johng D, Biemann K.; J. Am. Chem. Soc. 67 (1964).
88.- JonesJ.N.K., Andrews P., Hough L.;J. Chem. Soc. 1186 (1953).
89.- Kanasuka T., Momoki Y., Sakai S.; Gann 59, 443 (1968).
90.- Krafft F.; Ber. 36, 4341 (1903).
91.- Kochetkov N., Dmitriev B., Bachinowsky L., Jacheslay L., Yuri L., Knirel A.; Carbohyd. Res. 41, 329 (1975).
92.- Kochetkov N., Obruchnikov N.; Tet. Lett. 57 (1977).
93.- Koenigs W, Knorr E.;Ber. 34, 957 (1901).
94.- Koepsell H.J., Tsuchiya H.M., Hellman N.N., Kazenko A., Hoffman C.A., Sharpe E.S., Jackson R.W.; J. of Biol. Chem. 200, 793 (1953).
95.- Koerner T., Voll R.J., Cary L.W., Younathan E.S.; Biochem. Biophys. Res. Commun. 82, 4, 1273 (1978).

96.- Komatsu N., Okubo S., Kikumoto K.,Kimura K., Saito G., Sakai S.; Gann 60, 137 (1969).
97.- Komura, Matuno M., Ishido K; Cabohyd. Res. 65, 271 (1978).
98.- Kreger D.R.; J. Gen. Microbiology 92, 207 (1976).
99.- Kreger D.R., Kopecka M.; J.Gen. Microbiology 108, 264 (1978).
100.- Kulin R., von Grundherr S.E.; Ber 59, 1655 (1926).
101.- Laker M.F.; J. of Chromatography 163, 818 (1979).
102.- Lederkremer R.M., Ranalli M.E.; Anales Asoc. Quim. Argentina 55, 199 (1967).
103.- Lederkremer R.M., Waksman N., Svec B., Fenandez Cirelli A.; Phytochemistry 14, 1009 (1975).
104.- Lee W.A.; Biochem. Biophys. Res. Comm. 29, 337 (1967).
105.- Leighton T.J., Stock J.J., Kelln R.; J. of Bacteriology 103, 439 (1970).
106.- Lewis D.H., Smith D.C.; New Phytol. 66, 143 (1967).
107.- Lindberg B., Lindquist B., Lönngren J.; Carbohyd. Res. 58, 443 (1977).
108.- Lipták A., Nánási P., Neszmélyi A., Wagner H.; Carbohyd. Res. 132 (1980).
109.- Lohmar R.L., Goepp R.M.; Adv. Carbohyd. Chem. 4, 211 (1949).
110.- Loss F.; Z. Zuckerind 19, 323 (1969).
111.- Lund B.M., Wyatt G.M; J. Gen. Microbiology 78, 331 (1973).
112.- Mac Fadyen D.A.; J. Biol. Chem. 158, 107 (1945).
113.- Mac William, Phillips A.W.; Chem and Ind. (London) 364 (1959).
114.- Maeda T.; Tori K., Satoh S., Tokuyama K.; Bull. of the Chem. Soc. of Japan 42, 2635 (1969).
115.- Mahadevan P.R., Tatum E.L.; J. Bacteriology 90, 1073 (1965).
116.- Manners D.J., Masson A.J., Patterson J.; Biochem. J. 135 1931 (1973).
117.- Manners D.J., Masson A.J., Patterson J.: J. of Gen. Microbiology 80, 111 (1974).
118.- Manners D.J., Melvist M.; Carbohyd. Res. 57, 189 (1977).
119.- Manners D.J., Marshall J.J.; Phytochemistry 12, 547 (1973).

121.- Maret R.; Arch. Microbiology 81, 68 (1972).
122.- Marletto F., Manino A., Patetta A., Lombard A., Buffa M. Apic. Mod. 70, 35 (1972). C.A. 106:746 (1972).
123.- Martos M., Körosy F.; Nature 165, 369 (1950).
124.- Matsuda K., Tamari K.; Plant Cell Physiology 17, 1243 (1976).
125.- Midelfort C.F., Gupta R.K., Rose I.A.; Biochemistry 15, 10, 2178 (1976).
126.- Misaki A., Johnson Jr. J., Kirkwood S., Scarletti J., Smith F.; Carbohyd. Res. 6, 150 (1968).
127.- Misaki A., Kakuta M., Sasaki T., Tanaka M., Miyaji H.; Carbohyd. Res. 92, 115 (1981).
128.- Misaki A., Kanamaru S.; Agr. Biol. Chem. 32, 432 (1968).
129.- Miyasaki T., Nishijima M.; Chem. Pharm. Bull. 29, 3611 (1981)
130.- Miyasaki T., Naoi Y.; Chem. Pharm. Bull Japan) 22, 2058 (1974).
131.- Miyasaki T., Oikawa T., Yadomae T., Yamada H., Yamada Y., Hong-Yen Hsu, Ito H.; Carbohyd. Res 65, 235 (1978).
132.- Miyasaki T., Oikawa T., Yadomae T., Yamada H., Yamada Y., Hong-Yen Hsu, Ito H.;,Carbohyd. Res. 69, 165 (1979).
133.- Mollard A., Barnoud F.; Physiol. Veg 14, 233 (1976).
134.- Montand C., Thomas L.; Ann. Sci. Nat. Bot. Biol. Veg. 18, 185 (1977).
135.- Montgomery M., Hudson J.; J. Am. Chem. Soc. 52, 2101 (1930).
136.- Nakayoshi H., Watanabe T., Yamamura Y., Ono M.; Japan J. Exp. Med. 38, 6, 437 (1968).
137.- Ness R., Fletcher H., Hudson C.;J.Am.Chem.Soc.73,959(1951).
138.- Norisuye T., Yanaki T., Fujita H.; J. Polym. Sci. 18, 547 (1980).
139.- Ogawa K., Tsurugi J., Watanabe T.; Carbohyd. Res. 29, 397 (1973).
140.- Ogawa K., Okamura K., Oka S., Misaki A.; Fiber Diffraction methods A.C.S. Symp. Ser N°141 (1980).
141.- Onishi H., Perry M.B.; Canad. J. Microbiology II, 929 (1965).
142.- Pacsu E., Hudson C. S.; Sciense 69,278 (1929).

143.- Pacsu E., J. Am. Chem. Soc. 54, 3649 (1932).
144.- Pacsu E.,Cramer F.B.; J. Am. Chem. Soc. 59, 711 (1937).
145.- Pacsu E., Wilson Jr. E., Graf L.; J. Am. Chem. Soc. 61, 2, 2675 (1939).
146.- Panek A.; Arch. Biochem. Biophys; 98, 349 (1962).
147.- Pavia A.A, Rochenville J., Ung S.N.; Carbohyd. Res. 79, 79 (1980).
148.- Pazur J.H.; Sciense 117, 355 (1953).
149.- Peat S., Roberts P., Whelan W.; Biochem. J. 51, XVII (1952).
150.- Pfeffer P.E., Hicks K.B.; Carbohyd. Res. 102 11 (1982).
151.- Prisbe E., Smejkal J., Verheyden P., Moffatt J.G.; J. Org. Chem. 41, 10, 1836 (1976).
152.- Purdie T., Irvine J.C.; J. Chem. Soc. 83, 102 (1903).
153.- Que L., Gray G.R.; Biochemistry 13, 146 (1974).
154.- Quillet M., Legrand M; C. M. hebd. Séanc. Acad. Sci. Paris 234, 876 (1952).
155.- Radomski M.W., Smith M.D.; Cereal Chem. 39, 30 (1962).
156.- Raoult W.; U.S. 4, 217413, C.A.93, 184621 c.(1979).
157.- Rees. D.A.; Adv. Carbohyd. Chem 24, 267 (1968).
158.- Rees D.A.; Biochem. J. 126, 257 (1972).
159.- Rees D.A., Scott N.E.; Chem. Commun. 1037 (1969).
160.- Rendleman J.A., Hodge J.; Carbohyd. Res. 75, 83 (1979).
161.- Saito H., Ohki T., Tkasuka N., Sasaki T.; Carbohyd. Res. 68, 293 (1977).
162.- Saito H., Ohki T., Sasaki T.; BIOchemistry 16, 5, 908, (1977).
163.- Saito H., Ohki T., Yoshika Y., Fukuoka F.; Febs. Letters 68, 15 (1976).
164.- Sakai S., Takada S., Kamasuka T., Momoki K., Sugayama J.; Gann 59, 507 (1968).
165.- Santamaría F., Reyes F., Lahoz R.; J. Gen. Microbiology 109, (1978).
166.- Sasaki T., Takasuka N.; Carbohyd. Res. 47, 99 (1976).
167.- Sathyanarayama B.K., Rao V.S.R.; Biopolymers 10, 1605 (1971)
168.- Schaefer H.D.; Arch. Mikrobiol 113 (1977).

169.- Schmid F., Sxhmid M.M., Sugiura K.; Cancer Res. 23, 607 (1963).

170.- Sharpe E.S.S, Stodola F., Koepsell H.J.; J. Org. Chem. 1062 (1960).

171.- Singh P.P., Whistler R.L., Tokuzen R., Nakahara N.; Carbohyd. Res. 37, 245 (1974).

172.- Sjöberg K.;Tet . Lett.63, 3 (1966).

173.- Smith F., Johnson Jr. J., Kirkwood, Misaki A., Nelson E. Scaletti J.V.; Chem. and Ind. (London) 820 (1963).

174.- Smith F., Prentice N., Cuendet L.S., Gedales W.F.; J. Am. Chem. Soc. 81, 684 (1959).

175.- Smith D., Muscatina L., Lewis D.; Biological Reviews 44, 17 (1969).

176.- Somogyi y Nelson; J. Biol. Chem. 160,61 (1945).

177.- Stodola F.H., Sharpe E.S., Koepsell; J.;J. Am. Chem. Soc. 78, 2514 (1956).

178.- Strobel G.A., Kosuge T.; Arch. Biochem. Biophys. 109, 622 (1965).

179.- Sukagoshi T., Ohashi F.; Gann 65, 557 (1974).

180.- Sundaralingam M.; Biopolymers 6, 189 (1968).

181.- Susumu H., Sachika N., Takayoshi F.; Yakusaku Zasshi 96 419, (1976), C.A. 85: 17132 x.

182.- Sussman A.S.; The Fungus Spore 235 (1966). Edited by M.F.Madelin(London).

183.- Täeufel A., Krause W., Haenell H., Täeufel K.; Nährung 11,39 (1967).

184.- Tipson R.S., Isbell H.S., Stewat J.E.; J. of Reaearch of the National Bureau of Standards 62, 6, 257 (1959).

185.- Tipson R.S., Isbell H.S.; ibid. 64A 405 (1960).

186.- Touster D., Shaw D.R.D.; Physiol. Rev. 42, 181 (1962).

187.- Trevelyan W.E., Procter D.P., Harrison J.S.; Nature 166 , 444 (1950).

188.- Ueno Y., Okamoto Y., Yamauchi R., Kato K.; Carbohyd. Res. 101, 160 (1982).

189.- Unrau A.M., Smith F.; Chem. and Ind. 330 (1957).

190.- Vinning L.C., Taber W.A.; Canad. J. of Microbiology 10, 647 (1964).

191.- Vliegenthart J.F.G., Heeseijk W.,Wassenburg F.R.; Carbohyd. Res. 62, 281 (1978).

192.- Waksman N.; Trabajo de Tesis (1977).

193.- Waksman N., de Lederkremer R.M.; Phytochemistry 15, 1097 (1976).

194.- Waksman N., de Lederkremer R.M., Cerezo A.S.; Carbohyd. Res. 59, 505 (1977).

195.- Wang M.C., Bartnicki-García S.; J. Gen. Microbiology 64, 41 (1970).

196.- Wang M.C.; Arch. Biochem. Biophys. 175, 351 (1976).

197.- Warsi S.A., Whelan W.J., Chem. and Ind. (London) 1573 (1957).

198.- Weidenhagen R., Lorenz S.; Z.Zuckerind 82, 533 (1957).

199.- Weidenhagen R., Lorenz S.; Angew. Chem. 69, 641 (1957).

200.- Whistler R.L., BeMiller J.N.; J. Am. Chem. Soc. 78, 163 (1956).

201.- Whistler R.L., Bushway A.A., Singh P.P., Nakahara W., Tokuzen R.; Adv. Carbohyd. Chem. Biochem. 32, 235 (1976).

202.- White J.W., Hobau N.; Arch. Biochem. Biophys. 80, 386 (1959).

203.- Wiernik M.; Anales Asoc. Quím. Argentina 50, 347 (1962).

204.- Wulff G.,Röhle G.; Angw. Chem.Int.Ed.Engl. 13,157 (1974).

205.- Zeichmeister L., Thót G.; Biochem. Z. 270, 309 (1934).

ABREVIATURAS UTILIZADAS.

C.G.L.	Cromatografía gas-líquido.
C.G.L.-E.M.	Cromatografía gas-líquido- espectrometría de masa.
C.c.d	Cromatografía en capa delgada.
C.p.	Cromatografía en papel.
Col.	colaboradores.
DMSO	dimetilsulfóxido.
I.d.	intradérmico.
I.p.	intraperitoneal.
I.r.	infrarrojo.
Pls.	polisacárido.
RMN	resonancia magnética nuclear.
S 180	Sarcoma 180.

Indice

pág.

Introducción..... 1

Capítulo I
Hongos del género Cyttaria.
Estudios químicos realizados.

Distribución geográfica..... 2
Cyttaria johowii..... 3
Estudios químicos realizados..... 4

Capítulo II
Azúcares simples y polioles en hongos.

Introducción..... 9
Rol fisiológico..... 11
Intermediarios metabólicos y enzimología... 15

Capítulo III
β-Glucanos en hongos.

Introducción..... 18
β-(1→4) glucanos 18
β-(1→3) glucanos..... 18
Glucanos con uniones β(1→3) y β(1→6)..... 20
Glucanos con uniones β(1→6)..... 22

Capítulo IV
Glucanos con acción antitumor.

Estructura y actividad antitumor..... 24

Capítulo V pág.
Glucosilfructosas.

1-O-β-D-glucopiranosil-D-fructosa y
1-O-α-D-glucopiranosil-D-fructosa..... 29
Turanosa..... 31
Maltulosa..... 32
Celobiulosa..... 33
Leucrosa..... 33
Palatinosa..... 34

Capítulo VI
Sintesis de disacáridos por reacciones
de tipo Koenigs-Knorr.

Mecanismo..... 36
Estereoquímica..... 38

Capítulo VII
Descripción y discusión de los resultados obtenidos. 41

Capitulo VIII
Parte experimental..... 125

Resumen..... 172

Bibliografía..... 175

Abreviaturas utilizadas..... 184