

Tesis de Posgrado

Estudio de los carragenanos "solubles" del alga roja *Iridaea undulosa* Bory (Familia: Cigartinaceae)

Stortz, Carlos Arturo

1984

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:

Stortz, Carlos Arturo. (1984). Estudio de los carragenanos "solubles" del alga roja *Iridaea undulosa* Bory (Familia: Cigartinaceae). Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1866_Stortz.pdf

Cita tipo Chicago:

Stortz, Carlos Arturo. "Estudio de los carragenanos "solubles" del alga roja *Iridaea undulosa* Bory (Familia: Cigartinaceae)". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1984. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1866_Stortz.pdf

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

Tema de Tesis

ESTUDIO DE LOS CARRAGENANOS " SOLUBLES "
DEL ALGA ROJA *IRIDAEA UNDULOSA* BORY
(Familia: Gigartinaceae)

Autor

CARLOS ARTURO STORTZ

Director de Tesis

Dr. Alberto S. CEREZO

Lugar de trabajo

Departamento de Química Orgánica

Tesis presentada para optar al título de
DOCTOR EN CIENCIAS QUIMICAS

1984

- 1866 -
ej 2

* A mis padres

* A Miriam, mi esposa

Mi más sincero agradecimiento al Doctor Alberto S. Cerezo, Director de este trabajo de Tesis, quien me guió a lo largo de estos años, porque además de haber sido Jefe, supo ser un compañero más, y a su valioso aporte científico agregó su excepcional calidad humana.

Agradezco también;

A los Doctores Eduardo G. Gros y Elizabeth E. Percival, por las muestras de galactosas metiladas.

A la Dra. Elsa N. Lacoste de Díaz, por las criteriosas sugerencias y la bibliografía suministrada para la preparación del Capítulo I ("Las algas") de esta Tesis.

Al Dr. O. Kuhnemann y al CIBIMA (Centro de Investigación en Biología Marina) por el asesoramiento en la clasificación del alga *Iridaea undulosa*.

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

A las Lic. María Rivero y María M. de Moglia por las cromatografías gas-líquido realizadas.

Al Sr. Jorge Aznarez por la realización de espectros de masa y cromatografías gas-líquido acopladas a espectrómetro de masa.

Al Dr. Gerardo Burton y al Sr. Gustavo Arabehty por la realización de espectros de resonancia magnética nuclear.

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

A la Srta. Alicia Arenaza por los espectros infrarrojo realizados.

A mis queridas compañeras de laboratorio, Lic. Hélen Tortorella y Ma. Angélica Di Giacomo, y Dras. Adriana E. Manzi, Ma. Nélida Mazzini y Ma. Cristina Matulewicz, por su comprensión, compañerismo y tolerancia, indispensables para la realización de este trabajo. A la Dra. Matulewicz agradezco además su minuciosa revisión de los manuscritos de esta Tesis, y las muestras de carragenano TTI y residuo insoluble.

A todos los buenos amigos que me hicieron sobrellevar estos años de trabajo en un ambiente de camaradería y cordialidad.

A todo el personal del Departamento de Química Orgánica, profesores, docentes auxiliares, personal técnico y no docentes por su disposición y apoyo.

INDICE

<u>CAPITULO I: LAS ALGAS</u>	1
Generalidades	2
Taxonomía de algas	2
Las rodófitas	9
Reproducción de las florídeas	12
Clave taxonómica dentro de las florídeas	13
Ubicación taxonómica de la <i>Iridaea undulosa</i> Bory	14
<hr/>	
<u>CAPITULO II: LOS CARRAGENANOS</u>	17
Primeros estudios	18
Ultimos estudios	25
Factores ecológicos, estacionales y sexuales	28
Estudios realizados en la República Argentina	31
Los carragenanos de <i>Iridaea undulosa</i> Bory	31
Tratamiento alcalino del carragenano	36
<hr/>	
<u>CAPITULO III: INDUSTRIA Y COMERCIO DE LAS ALGAS Y SUS MUCILAGOS EN EL MUNDO</u>	38
Introducción	39
Evolución industrial	39
Estado actual de la industria	40
Prospectiva industrial y precios	42
Mercados y usos del carragenano y otros mucílagos	43
Procesado del alga productora de carragenanos	46
Cultivo del alga (maricultura)	47
<hr/>	

<u>CAPITULO IV: METODOS DE DESULFATACION</u>	49
Desulfatación ácida	50
Desulfatación solvolítica	55

<u>CAPITULO V: APLICACIONES DE RESONANCIA MAGNETICA NUCLEAR DE ¹³C A LA DETERMINACION DE LA ESTRUCTURA DE POLISACARIDOS</u>	63
Introducción	64
Monosacáridos sulfatados	66
Aplicación a oligosacáridos	68
Aplicación a polisacáridos	69
Aplicación a carragenanos y compuestos similares	71

<u>CAPITULO VI: USO DE LOS ALDONONITRILOS ACETILADOS EN LOS ESTUDIOS ESTRUCTURALES DE POLISACARIDOS</u>	79
Reseña histórica	80
Espectrometría de masa de los aldononitrilos acetilados y de sus derivados metilados	85
Espectrometría de masa por ionización química	97

<u>CAPITULO VII: DESCRIPCION Y DISCUSION DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS</u>	99
Aislamiento y purificación del carragenano	100
Obtención de la fracción soluble	100
Estudios de metilación	104
Ajuste de los resultados de metilación	121
Análisis de los resultados de metilación	124

Acción del dimetilsulfóxido sobre el carragenano soluble	127
Estudios de metilación de ambas fracciones	139
Fracción insoluble en dimetilsulfóxido	140
Fracción soluble en dimetilsulfóxido	144
Comparación de los carragenanos	148
Tratamiento alcalino del carragenano C	151
Tratamiento alcalino de los carragenanos SD e ID	157
Estudio de metilación de los productos tratados	162
Composición de los carragenanos "solubles" de <i>Iridaea undulosa</i>	170
Factores solubilizantes	176
Estudios de autohidrólisis	182
Autohidrólisis del carragenano de <i>Iridaea undulosa</i>	183
Autohidrólisis de un producto rico en 3,6-anhidro-galactosa	187
Autohidrólisis del carragenano soluble C	196
Autohidrólisis del carragenano SD	197
Autohidrólisis del carragenano ID	200
Conclusión	202
Estudios de resonancia magnética nuclear de ^{13}C	205
Ampliación de los datos de literatura	206
Utilización de un programa de computadora	212
Espectros de los carragenanos TTI degradados	216
Interpretación de los espectros de los carragenanos TTIm y TTIm-R	219
Espectro de la κ -carrabiosa	223
Los espectros de TTIf y TTIf-R	227
Espectro del carragenano total autohidrolizado	231
Espectro del carragenano "soluble" C autohidrolizado	233
Espectro del carragenano SD autohidrolizado	237
Conclusiones	240

Separación e identificación de los 0-acetil-0-metilgalactononitrilos por cromatografía gas-líquido y espectrometría de masa	245
Espectrometría de masa de los 0-acetil-0-metilgalactononitrilos	253
Galactononitrilos monometilados y tetraacetilados	264
Estudio del residuo proveniente de la purificación del carragenano crudo	273
Extracción acuosa del residuo insoluble	276
Separación preparativa y fraccionamiento del producto RS	279
Análisis preliminar de dos fracciones	283

<u>CAPITULO VIII: PARTE EXPERIMENTAL</u>	288
--	-----

Consideraciones generales	289
Cromatografía sobre geles	291
Cromatografía gas-líquido	292
Determinación de los azúcares componentes	294
Determinación de 3,6-anhidrogalactosa	296
Determinación cuantitativa de los hidratos de carbono totales	298
Determinación de sulfato	300
Determinación del 6-sulfato	302
Dosaje de grupos reductores	303
Determinación cuantitativa de las proteínas totales	307
Determinación de los aminoácidos componentes	308
Determinación del contenido de fósforo	310
Oxidación con periodato	311
Viscosimetría	314
Características del material	318
Aislamiento del carragenano	318
Fraccionamiento: obtención de la fracción soluble	318
Residuo insoluble	319

Acción del DMSO sobre el carragenano soluble	322
Determinación de las curvas de solubilidad en KCl por turbidimetría	324
Tratamiento alcalino	325
Estudios de metilación	325
Hidrólisis de los polisacáridos metilados	327
Estudios de autohidrólisis	330
Espectroscopía de resonancia magnética nuclear	331

RESUMEN	333
---------	-----

BIBLIOGRAFIA	340
--------------	-----

INDICE DE AUTORES	353
-------------------	-----

INTRODUCCION

El alga roja *Iridaea undulosa* Bory sintetiza, en función de sus necesidades biológicas y ecológicas, un conjunto (sistema) de carragenanos cuyas estructuras forman parte de lo que se ha denominado una familia de polisacáridos, es decir un conjunto con estructuras variantes sin solución de continuidad entre dos estructuras límite, pese a que tomados individualmente pueden presentar diferencias considerables. Este concepto de "familia" ha sido muy útil, y se espera poder extenderlo al ágar, para relacionar así los productos más importantes sintetizados por las algas rojas.

En un trabajo anterior se había comenzado a estudiar el sistema de carragenanos producido por este alga cosechada en invierno en las costas patagónicas. Se determinó así su distribución en función de la solubilidad de sus componentes en soluciones de cloruro de potasio de diferente concentración, con lo que se obtuvo un panorama claro de la composición del sistema, y se estudiaron en particular las llamadas "fracciones intermedias".

La determinación estructural en polisacáridos altamente polidispersos como éstos tiene fundamentalmente sentido estadístico, por lo cual los estudios realizados buscaron principalmente relacionar los factores estructurales con propiedades como la solubilidad y la formación de geles que dependen de las estructuras secundarias y terciarias de estos productos.

Además del mero interés académico de estos trabajos, el valor económico de los carragenanos introduce un interés práctico; dicho valor depende precisamente de la capacidad de gelificar, y esa capacidad se puede aumentar en algunos casos en forma sorprendente, mediante una

reacción sencilla. Es así que puede comprenderse la importancia de la determinación de las variables moleculares que inducen a la gelificación y las que no lo hacen, y el conocimiento de la relación que existe entre unos y otros productos.

En este trabajo de Tesis se encaró fundamentalmente el estudio de otra fracción importante de dicho sistema, los carragenanos "solubles", es decir aquellas moléculas solubles en cloruro de potasio 2M, límite de concentración utilizada en el estudio de estos sistemas. La investigación de esos productos es la más complicada de todo el conjunto, dado que : a) en la fracción "soluble" se acumulan todos los carragenanos no precipitables, y b) es previsible que -al menos en parte- dicha solubilidad provenga de la presencia de zonas aperiódicas en las moléculas. Estas dificultades explican los pocos antecedentes que existen del estudio de estos productos.

El interés principal de este trabajo radica en:

- a) El estudio de la composición de la fracción soluble a fin de obtener evidencias sobre el tipo de moléculas que la componen.
- b) La identificación de los factores estructurales que determinan las propiedades físicas de los carragenanos, profundizando la búsqueda de las zonas aperiódicas, su distribución y su influencia sobre la estructura secundaria de la molécula.
- c) Dados los resultados del ítem anterior, se investigaron los mecanismos de gelación, la existencia de unidades de "doblado" (kinks) diferentes de las conocidas por ser irreversibles, y su influencia en las estructuras secundarias y terciarias de estos polisacáridos, y por ende sobre su capacidad gelificante.
- d) El hallazgo de métodos experimentales que pueden facilitar el estudio de estos y otros productos, y aportar datos estructurales que con otras técnicas se harían trabajosos y/o imposibles.

Los resultados obtenidos han sido fructíferos y han permitido ampliar considerablemente los conocimientos sobre las estructuras de estos productos y las relaciones entre las mismas y sus propiedades.

Capítulo I

LAS ALGAS

GENERALIDADES

Dentro de lo que los botánicos denominan "algas" existe un número de vegetales muy numeroso y diferenciado, que vive en el mar, en aguas dulces o en terrenos semiacuáticos. Las hay unicelulares, pero también multicelulares, con diferenciación morfológica bien marcada; su tamaño puede variar entre 1 μm y 30 metros. Los caracteres reproductivos son diversos, ya que la reproducción por esporas asexuales móviles o inmóviles, en algunos casos coexiste con reproducción sexual. Existe división directa en algas unicelulares y fragmentación del talo (cuerpo del alga, carente de raíz, tallo y hojas) en algunas pluricelulares.

Es por eso que el nombre ALGA resulta en sí demasiado amplio para acunar como phylum a todas las especies, y la agrupación como tal es realmente artificial. El estudio taxonómico tienen entonces gran importancia para distinguirlas.

TAXONOMIA DE ALGAS

Los criterios taxonómicos son muy diversos, y han dado origen a numerosas controversias que aún hoy subsisten. Antiguamente¹ se hablaba de una división (Thallophyta) que abarcaba a algas y a hongos. Las algas, a su vez, podían dividirse según el color de sus pigmentos en cuatro clases: verdes, verde-azuladas, pardas y rojas.

Clasificaciones más modernas dividieron a las algas en diez clases²: clorofíceas, dinofíceas, rodofíceas, sifonales, feofíceas, bacilariofíceas, crisofíceas, xantofíceas, criptofíceas y cianofíceas. Estudios taxonómicos posteriores han agregado a esas clases a las euglenoides y las carofíceas, y eliminaron las sifonales. De cualquier modo, las diferencias eran tan marcadas en algunos casos que alcanzaron para transformar las clases en divisiones (phyla),

pese a que aún subsisten diferencias entre los distintos textos. Las modificaciones se fueron sucediendo; en una clasificación aceptada en 1982 se determinó la presencia de 10 divisiones y 17 clases³:

División 1: PROCHLOROPHYTA

Clase única: PROCHLOROPHYCEAE, introducida en 1976 para una única especie (*Prochloron didemni*), y cuya separación de las Cyanophyta ha sido criticada.

División 2: CYANOPHYTA (algas azul-verdosas)

Clase única: CYANOPHYCEAE, antes llamada MYXOPHYCEAE y también SCHIZOPHYCEAE, con 150 géneros y más de 1.200 especies cuya clasificación está discutida. Silva³ acepta la presencia de cinco órdenes: Chroococcales (*Anacystis*, *Aphanocapsa*, *Gloeocapsa*, *Chroococcus*, *Microcystis*, *Chlorogloea*, *Tubiella*), Chamaesiphonales (*Chamaesiphon*, *Siphononema*, *Clastidium*, *Cyanocystis*), Pleurocapsales (*Hyella*, *Dermocarpa*, *Pleurocapsa*, *Hydrococcus*), Nostocales (*Arthrospira*, *Lyngbya*, *Oscillatoria*, *Phormidium*, *Anabaena*, *Nostoc*, *Calothrix*, *Rivularia*, *Scytonema*) y Stigonematales (*Stigonema*, *Loriella*, *Mastigocladus*, *Capsosira*). Algunos autores¹ incluyen los dos últimos órdenes en Hormogonales y Oscillatoriales.

División 3: RHODOPHYTA (algas rojas)

Ver luego (pag. 9) la clasificación.

División 4: CRYPTOPHYTA (criptomonadas)

Clase única: CRYPTOPHYCEAE: comprende unos pocos organismos unicelulares, de dudosa inclusión entre las algas. Comprende dos órdenes: las Cryptomonadales (*Chilomonas*, *Cryptomonas*, *Hillea*) y Tetragonidiales (*Tetragonidium*).

División 5: CHLOROPHYTA

Ira.Clase: PRASINOPHYCEAE, clase de fitoflagelados relativamente nueva, cuyos miembros antes se distribuían entre las cloro-, cripto-, criso- y xantofíceas. Se divide en cinco órdenes: Pedinomonadales (*Pedinomonas*), Nephroselmidales (*Dolichomastis*, *Nephroselmis*), Pterospermatales (*Coccopterum*, *Pterocystis*),

Pyramimonadales (*Asteromonas*, *Halosphaera*, *Prasinochloris*) y Prasinocladales (*Prasinocladus*, *Tetraselmis*, *Platymonas*).

2da.clase: CHLOROPHYCEAE, de las algas verdes, compuesta por 450 géneros y 6500 especies, casi todas de agua dulce. Pese a las controversias, hay que reconocer hoy su división en dieciseis órdenes, agrupables en cuatro subclases. Los órdenes son: Volvocales (*Chlamydomonas*, *Hematococcus*, *Gonium*, *Volvox*), Tetrasporales (*Gloeocystis*, *Tetraspora*), Chlorococcales (*Chlorococcum*, *Hydrodictyon*, *Pediastrum*, *Chlorella*, *Coelastrum*, *Oocystis*, *Prototheca*, *Scenedesmus*), Chlorosarcinales (*Chlorosarcina*, *Plaonphylla*, *Tetracystis*), Ulotrichales (*Microspora*, *Stichococcus*, *Ulothrix*), Ulvales (*Enteromorpha*, *Ulva*, *Ulvaria*), Chaetophorales (*Chaetophora*, *Coleochete*, *Ulvella*), Trentepohliales (*Trentepohlia*), Sphaeropleales (*Sphaeroplea*), Prasiolales o Schizogoniales (*Prasiola*, *Schizogonium*), Cladophorales (*Basycladia*, *Chaetomorpha*, *Cladophora*), todos ellos agrupados en la subclase Chlorophycidae; Oedogoniales (*Bulbochaete*, *Oedogonium*), de la subclase Oedogoniophycidae; Zygnematales, antes llamadas conyugadas (*Spirogyra*, *Cosmarium*, *Desmidium*, *Euastrum*, *Penium*, *Roya*, *Spirotacnia*) de la subclase Zygnematophycidae; Siphonocladales (*Valonia*, *Dictyosphaeria*), Caulerpales (*Caulerpa*, *Bryopsis*, *Codium*, *Derbesia*, *Chlorodesmis*, *Halimeda*) y Dasycladales (*Dasycladus*, *Acetabularia*), agrupados en la subclase Siphonocladophycidae, anteriormente comprendidas en la clase sifonales².

3ra.clase: CHAROPHYCEAE, compuesta por un único orden: las Charales y una única familia: Characeae. Los 200 carófitos vivientes se agrupan en seis géneros de los cuales son fundamentales *Chara* y *Nitella*. Se las conoce como ovas o brozas de agua⁴.

División 6: EUGLENOPHYTA

Clase única: EUGLENOPHYCEAE, compuesta por las euglenoides, especies unicelulares de algas flageladas, con cerca de 500 especies. Al orden fundamental, Euglenales (*Astasia*, *Euglena*, *Phacus*), se agregaron otros cinco : Rhabdomonadales (

Rhabdomonas, *Menoidium*), Eutreptiales (*Eutreptia*, *Distigma*), Sphenomonadales (*Anisonema*, *Calycimonas*, *Petalomonas*, *Sphenomonas*), Heteronematales (*Dinema*, *Entosiphon*, *Urceolus*) y Euglenamorphales (*Euglenamorpha*).

División 7: CHROMOPHYTA, que agrupa algas de diversos tipos, antes separadas.

1ra.Clase: CHRYSOPHYCEAE, o algas doradas, con 80 géneros y 300 especies, distribuidas en once órdenes: Chromulinales o Chrysocapsales (*Chromulina*, *Gloeochrysis*, *Phaeaster*, *Hydrurus*), Chrysosphaerales (*Chrysosphaera*), Rhizochrysidales (*Chrysamoeba*, *Heliopsis*, *Stylococcus*), Chrysosaccales (*Phaeosphaera*), Phaeoplacales (*Chrysonema*, *Phaeoplaca*), Ochromonadales (*Ochromonas*, *Dinobryon*, *Microglena*, *Synura*), Chrysapiales (*Chrysapion*), Phaeotamniales (*Apistonema*, *Nematochrysis*), Sarcinochrysidales (*Phaeosaccion*, *Sarcinochrysis*, *Chrysomeris*), Bicosoccales (*Bicosooca*, *Hydracophysa*), y Pedinellales (*Apedinella*, *Palatinella*, *Pedinella*).

2da.Clase: DICTYOPHYCEAE o SILICOFLLAGELLATOPHYCEAE, grupo relativamente nuevo y escaso que comprende únicamente al orden Dictyochales, con una única familia y cuatro géneros: *Dictyocha*, *Distephanus*, *Mesocena*, *Octactis*.

3ra.Clase: BACILLARIOPHYCEAE, de las diatomeas, caracterizada por tener una pared silicificada (frústula). Es la clase más numerosa, ya que dentro de 170 géneros engloba más de 6.000 especies. Se divide en dos subclases: las Centrobacillariophycidae (llamadas también céntricas o centrales) y las Pennacillariophycidae (pennadas o pennales). Las primeras se subdividen en tres órdenes: Eupodiscales o Disciales (*Coscinodiscus*, *Cyclotella*, *Lauderia*, *Skeletonema*, *Thalassiosira*), Rhizosoleniales o Soleniales (*Rhizosolenia*, *Ditylum*) y Biddulphiales (*Biddulphia*, *Lithodesmium*). Las Pennadas, comprenden siete órdenes: Fragilariales (*Tabellaria*, *Fragilaria*, *Opephora*), Eunotiales (*Actinella*, *Desmogonium*), Achnanthesales (*Achnanthes*, *Cocconeis*),

Naviculales (*Amphipleura, Navicula, Pinnularia, Amphora, Cymbella, Gomphonema*), Epithemiales (*Denticula, Epithemia*), Bacillariales o Nitzchiales (*Bacillaria, Nitzchia, Hantzchia*) y Surirellales (*Cymatopleura, Surirella*).

4ta.Clase: PHAEOPHYCEAE o algas pardas; antiguamente representaba un phylum con tres clases: Isogeneratae, Heterogeneratae y Cyclosporeae. Hoy³ se aceptan quince órdenes agrupados en tres subclases para el millar de especies que la componen; la subclase Phaeophycidae engloba los siguientes órdenes: Ectocarpales (*Ectocarpus, Giffordia*), Ralfsiales (*Nemoderma, Analipus*), Chordariales (*Chordaria, Elachista*), Sporochnales (*Sporochnus, Nereia*), Desmarestiales (*Desmarestia, Arthrocladia*), Cutleriales (*Cutleria*), Sphacelariales (*Halopteris, Sphacelaria, Cladostephus*), Tilopteridales (*Haplospora, Tilopteris*), Dictyosiphonales (*Dictyosiphon, Punctaria, Coiloderma*), Scytosiphonales (*Scytosiphon, Petalonia*) y por último Laminariales (*Chorda, Costaria, Laminaria, Macrocystis, Nereocystis, Alaria, Ecklonia, Undaria, Lessonia*); en éste último orden las familias Laminariaceae y Lessoniaceae son conocidas por la producción del ácido algínico. La subclase Dictyotophycidae comprende al orden Dictyotales (*Dictyopteris, Dictyota, Padina*); la subclase Fucophycidae que se corresponde con la antigua clase Cyclosporeae , comprende tres órdenes: Ascoseirales (*Ascoseira*), Fucales, productoras en muchos casos de fucoídina (*Hormosira, Fucus, Ascophyllum, Himanthalia, Cystoseira, Halidrys, Sargassum*) y Durvillaeales (*Durvillaea*).

5ta.Clase: XANTOPHYCEAE o algas amarillo-verdosas, antiguamente llamadas Heterokontae; comprende 400 especies distribuidas en seis órdenes: Rhizochloridales (*Myxochloris, Rhizochloris*), Chloramoebales o Heterochloridales (*Nephrochloris, Chloramoeba, Polykyrtos*), Heterogloales (*Pelagocystis, Gloeochloris*), Mischococcales o Heterococcales (*Chlorosaccus, Dioxys, Mischococcus, Monodus*

entre muchos otros), Tribonematales o Heterotrichales (*Heterotrichella*, *Tribonema*, *Heterothrix*, *Bumilleria*), y Vaucheriales o Heterosiphonales (*Vaucheria*, *Botrydium*).

6ta.Clase: RAPHDOPHYCEAE o CHLOROMONADOPHYCEAE, pequeña clase de organismos unicelulares biflagelados, compuesta por un único orden, Raphidomonadales y dos familias para sus diecisiete géneros. Los principales son: *Reckertia*, *Raphidomonas*, *Trentonia*, *Vacuolaria*, *Hornellia*.

División 8: EUSTIGMATOPHYTA

Clase única: EUSTIGMATOPHYCEAE, recientemente separada de las Xantophyceae, y a la que se agregaron algunas especies de Chlorophyceae, totalizando doce eustigmatófitos. Los tres géneros que la integran son *Chlorobotrys*, *Pseudocharaciopsis* y *Vischeria*.

División 9: HAPTOPHYTA

Clase única: HAPTOPHYCEAE o PRYMNESIOPHYCEAE, también recientemente escindidas de las Chrysophyceae. Comprende tres órdenes: Pavloales (*Diacronema*, *Pavlova*), Prymnesiales (*Chrysotila*, *Phaeocystis*, *Isochrysis*, *Prymnesium*), y Coccolithophorales o Cocco-sphaerales (*Ochrosphaera*, *Chrysonema*, *Calcidiscus*, *Hymenomonas*, *Pleurochrysis* entre muchos otros).

División 10: DINOPHYTA, antes llamado PYRROPHYTA

Clase única: DINOPHYCEAE, incluye cerca de 150 géneros y 1.000 especies de dinoflagelados. Se divide en dos subclases, que antes se consideraban clases: las Desmophycidae (antes Desmophyceae o Desmokontae) con sólo treinta especies repartidas en cuatro órdenes: Desmomastigales (*Desmomastix*, *Adinomonas*), Prorocentrales (*Prorocentrum*), Protaspidales (*Protaspis*) y Desmocapsales (*Desmocapsa*); las Dinophycidae, con doce órdenes: Blastodiniales (*Diplomorpha*, *Haplozoon*), Chytriodiniales (*Chytriodinis*), Gymnodiniales (*Amphidinium*, *Gymnodinium*, *Oxyrrhis*), Peridinales (*Glenodinium*, *Peridinium*, *Gonyaulax*),

Dinophysales (*Dinophysis, Dinoceras, Oxyphysis*), Noctilucales (*Noctiluca*),
Gloeodinales (*Gloeodinium*), Dinamoebales (*Dinamoeba*), Pyrocystales (*Diplodinium, Pyrocystis*), Phytodinales (*Cystodinium, Dinococcus, Tetradinium*),
Zooxanthellales (*Endodinium, Zooxanthella*) y Dinotrichales (*Dinotrinx, Dinoclonium*).

También se incluyen en esta división tres clases de monadas parásitas, pero que no se consideran algas: las Ebriphyceae, Ellobiophyceae y Syndiniophyceae.

Se han efectuado algunos estudios quimiotaxonómicos generales, que permiten diferenciar algunas clases^{2,3} sobre la base de los siguientes componentes:

Clorofilas: todas las clases contienen clorofila-a ; además, las clorofíceas contienen importantes proporciones de clorofila-b, que también se encuentra en procloro- , prasino- , caro- y euglenofíceas. Existe clorofila-c en cripto- , dictioco- , bacilario- , feo- , xanto- , rafido- , hpto- y dinofíceas.

Carotenos: salvo las criptofíceas, en las que priva el α -caroteno, el resto tiene como componente principal al β -caroteno. Hay también cantidades menores de α -caroteno en rodo- , prasino- y clorofíceas y γ -caroteno en esta última clase.

Xantofilas: son muy variadas en proporción y número; las fundamentales son: de cloro- , caro- y rodofíceas la luteína ; de feo-, rafido- , hpto- , criso- y bacilariofíceas la fucoxantina; de eustigmatofíceas la violaxantina; de dinofíceas la peridinina; de cianofíceas la mixoxantina; de criptofíceas la aloxantina; de prasinofíceas la sifoneína y de xantofíceas la diadinoxantina.

Ficobilinas: en las rodofíceas la principal es la r-ficoeritrina, y les da color rojo; en las cianofíceas la c-ficocianina que da color azul.

Productos de reserva: tienen grasas y aceites las bacilariofíceas y xantofíceas ; leucosina las crisofíceas , manitol las feofíceas, almidón de florídeas y floridósido (2-gliceril- α -D-galactopiranosido) las rodofíceas ; casi todo el resto

contiene almidón y otros glucanos con uniones α -(1→4), aunque las eugleno- , hapto- , criso- , bacilario- y feofíceas presentan glucanos con uniones β -(1→3) (laminarano, crisolaminarano, paramilón).

Polisacáridos de pared: en las cripto-, eugleno- , dictioco- , rafido- y hapto-fíceas no hay pared celular; en otros casos hay predominio de la celulosa (rodofíceas florídeas, cloro- , caro- , criso- , feo-,xanto- y dinofíceas), acompañada de material péctico (crisofíceas), galactanos sulfatados (rodofíceas florídeas), ácidos algínicos y mucopolisacáridos sulfatados (feofíceas). Existen pectinas y mucopolisacáridos en cianofíceas; xilanos y mananos en rodofíceas bangiofícidias y clorofíceas ; en muchos casos la pared está calcificada o silicificada.

LAS RODOFITAS

Las rodófitas son en un 95 % marinas. Son de agua dulce los géneros *Batrachospermum*, *Lemanea*, *Hildenbrandtia* entre otros y hay géneros que son indistintamente de mar o agua dulce. La única clase, RHODOPHYCEAE se divide en dos subclases que en algún momento se elevaron a la categoría de clases; se compone de 560 géneros y cerca de 4.000 especies^{4,5}.

Subclase 1ra: BANGIOPHYCIDAE. Son las más sencillas; incluyen 25 géneros y 100 especies, agrupadas en cinco órdenes:

Orden Porphyridiales: incluye la familia Porphyridiaceae (*Porphyridium*), unicelulares que a veces forman agregados mucilaginosos irregulares.

Orden Goniotrichales: filamentosos, con la familia Goniotrichaceae (*Goniotrichum*) y Phragmonemataceae (*Phragmonema*, *Cyanodesma*).

Orden Bangiales: el más importante, con dos familias: Erythropeltidaceae (*Smithora*, *Erythrotrichia*) y Bangiaceae (*Bangia*, *Porphyra*), siendo estos dos últimos géneros los más importantes y conocidos por la producción del

porfirano, mucílago extensamente estudiado.

Orden Compsopogonales: con la familia Compsopogonaceae (*Compsopogon*).

Orden Rhodochaetales: con la familia Rhodochaetaceae y el único género *Rhodochaete*.

Subclase 2da.: FLORIDEOPHYCIDAE. Es la más importante; los seis órdenes originales⁵ ahora han sido ampliados a diez³:

Orden Acrochaetiales: es el más primario; formaba parte antiguamente⁵ de las Nemalionales, como familia (Acrochaetiaceae o Chantransiaceae). Agrupa cinco géneros, de los cuales los principales son *Acrochaetium* y *Rhodochorton*.

Orden Nemaliales (antes Nemalionales): sufrió varias divisiones, que originaron los órdenes Acrochaetiales, Chaetangiales y Bonnemaisoniales. Algunas especies son de agua dulce. Se divide en cinco familias: Batrachospermaceae (*Batrachospermum*, *Tuomeya*), Lemnaceae (*Lemanea*), Helminthocladiaceae (*Helminthocladia*, *Nemalion*, *Liagora*), Thoreaceae (*Thorea*) y Naccariaceae (*Naccaria*).

Orden Chaetangiales: también originado en el anterior, sólo compuesto por la familia Chaetangiaceae (*Chaetangium*, *Galaxaura*, *Scinaia*).

Orden Gelidiales: incluye únicamente la familia Gelidiaceae, conocida por la producción de ágar; comprende 11 géneros y 70 especies (*Acanthopeltis*, *Gelidium*, *Pterocladia*).

Orden Bonnemaisoniales: formó parte de las Nemalionales⁵ e incluye sólo tres géneros: *Asparagopsis*, *Bonnemaisonia* y *Delisea*.

Orden Cryptonemiales: comprende 100 géneros y 900 especies, distribuidas en doce familias: Dumontiaceae (*Dilsea*, *Dumontia*, *Dudresnaya*), Rhizophyllidaceae (*Rhizophyllis*, *Ochtodes*), Polyideaceae (*Rhodopeltis*, *Polyides*), Squamariaceae (*Peysonnelia*), Hildenbrandtiaceae (*Hildenbrandia*), Corallinaeaceae (*Epilithon*, *Lithothamnion*, *Lithophyllum*, *Corallina*, *Melobesia*, *Bossiella* entre muchos otros),

Endocladaceae (*Gloiopeltis*), Tichocarpaceae (*Tichocarpus*), Cryptonemiaceae o Grateloupiaceae (*Grateloupia*, *Phyllimena*, *Aeodes*, *Cryptonemia*), Gloiosiphonaceae (*Gloiosiphonia*), Callymeniaceae (*Callophyllis*) y Choreocolaceae (*Choreocolax*).

Orden Gigartinales: comprende 80 géneros y cerca de 800 especies, y según Kylin^{5,6} se divide en veintiún familias: Gracilariaceae (*Gracilaria*, *Gelidiopsis*), Cruoriaceae (*Petrocelis*, *Cruoria*), Nemastomataceae (*Nemastoma*, *Schizymenia*), Calosiphoniaceae (*Calosiphonia*), Sebdeniaceae (*Sebdenia*), Plocamiaceae (*Plocamium*), Sphaerococcaceae (*Caulacanthus*, *Sphaerococcus*), Stictosporaceae (*Stictosporum*), Sarcodiaceae (*Sarcodia*, *Nizymenia*), Furcellariaceae (*Furcellaria*, *Neurocaulon*), Solieriaceae (*Sarconema*, *Opuntiella*, *Agardhiella*, *Solieria*, *Eucheuma*, *Anatheca*), Rissoellaceae (*Rissoella*), Rhabdoniaceae (*Catenella*, *Rhabdonia*), Rhodophyllidaceae (*Rhodophyllis*, *Acanthococcus*), Hypneaceae (*Hypnea*), Mychodeaceae (*Mychodea*), Dicranemaceae (*Dicranema*), Acrotylaceae (*Acrotylus*), Phylloporaceae (*Phyllophora*, *Ahnfeltia*), Gigartinaceae (*Chondrus*, *Iridaea*, *Rhodoglossum*, *Gigartina*) (el género *Gigartina* sólo ya comprende noventa especies), y Chondriellaceae (*Chondriella*).

Orden Rhodymeniales: comprende 35 géneros y 200 especies distribuidas en dos familias: Lomentariaceae (*Lomentaria*) y Rhodymeniaceae (*Hymenocladia*, *Botyroccladia*, *Rhodymenia*, *Chrysymenia*, *Erythrocolon*, *Faucheia*).

Orden Palmariales: recientemente introducido para los géneros *Coriophyllum*, *Halosaccion*, *Leptosarca*, *Palmaria* y *Rhodophysema* , antiguamente incluidos entre las Cryptonemiales (familia Squamariaceae) y Rhodymeniales.

Orden Ceramiales: con 200 géneros y casi mil especies, a este orden se lo divide en cuatro familias^{3,5} : Ceramiaceae (*Callithammion*, *Ceramium*, *Corynospora*, *Ptilota*, *Microcladia*, *Plumaria*), Dasyaceae (*Heterosiphonia*), Delesseriaceae (*Delesseria*, *Phycodrys*, *Polyneura*, *Botryoglossum*, *Nitrophyllum*,

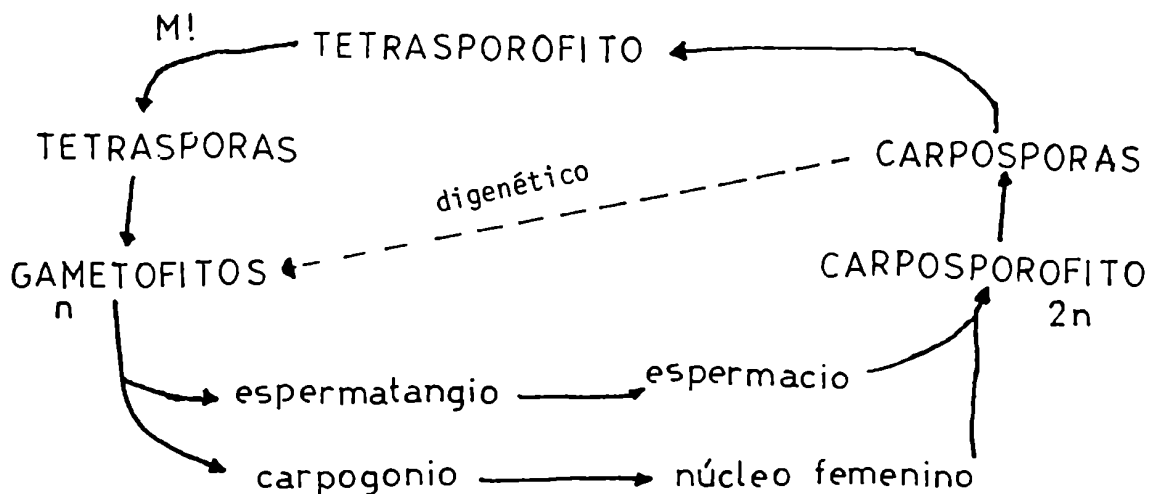
Membranoptera) y Rhodomelaceae (*Chondria*, *Digenea*, *Laurencia*, *Odonthalia*, *Polysiphonia*, *Rhodomela*).

REPRODUCCION DE LAS FLORIDEAS

Las rodófitas, y especialmente las florídeas están entre las algas de más elevada organización ; la multiplicación de las mismas es muy diferente en los distintos órdenes.

Presentan reproducción sexual (oogámica) y asexual ; rara vez se reproducen por fragmentación del talo. Los órganos sexuales masculino y femenino se llaman espermatangio y carpogonio, respectivamente ; tienen también órganos reproductivos asexuales . Del espermatangio (o espermatocisto) salen los espermacios o gametas masculinas inmóviles; éstas son llevadas por las aguas y llegan a la planta femenina, la cual como prolongación de su carpogonio presenta una proyección externa llamada tricógino ; al llegar el espermacio se produce la fecundación. Se forma una cigota u oóspora que genera filamentos gonimoblasticos cuyas células terminales producen las carposporas; éstas pueden formarse directa o indirectamente, en el último caso el núcleo cigótico se transfiere a una célula auxiliar formada antes o después de la fecundación; todo ese conjunto de células se denomina carposporofito. En las florídeas más sencillas se produce la división meiótica de la cigota de modo que el carposporofito origina carposporas haploides. En el resto de las florídeas, en cambio, la cigota genera un carposporofito diploide por mitosis, sus carposporas también son diploides y en lugar de producirse a partir de ellas el gametofito (planta sexual) se origina otro vegetal autónomo, el tetrasporofito, diploide. Es aquí donde se produce la meiosis para dar tetrasporas haploides que originan el

gametofito. Existe entonces alternancia entre una generación sexual (el gametofito) y una fase (el carposporofito), aunque en la mayoría (trigenética) no puede haber producción directa del gametofito a partir del carposporofito sino por intermedio de una tercera generación: la tetrasporofítica. El ciclo vital resulta:



CLAVE TAXONOMICA DENTRO DE LAS FLORIDEAS

Fue Kylin^{5,6} quien estableció los criterios taxonómicos dentro de cada orden. El origen de la clasificación está generalmente basado en la forma de reproducción ; por ejemplo, dentro de las florídeas, se dividen en 3 grupos:

- Las que carecen de célula auxiliar.
- Las que tienen la célula auxiliar preformada para la fecundación.
- Las que producen la célula auxiliar a partir de la base del talo luego de la fecundación.

Con los seis órdenes de Kylin^{5,6} en el grupo (a) las que presentan generación carposporofítica haploide son las NEMALIONALES; las que presentan el estado tetrasporofítico son las GELIDIALES. En el grupo (b) existen tres

variantes para la célula auxiliar: que ésta se encuentre en una división accesoria (CRYPTONEMIALES), que actúe como célula auxiliar una célula normal del talo (GIGARTINALES) o que se produzca a partir de un filamento bicelular de la base del carpogonio (RHODYMENIALES). En el grupo (c) se ubica el orden CERAMIALES. Deben agregarse ahora, con la nueva clasificación, al grupo (a) las Acrochaetiales, Chaetangiales y Bonnemaisoniales, y al (b) las Palmariales.

Dentro del orden Gigartinales, existen tres criterios fundamentales para la clasificación:

- a) Si el gonimoblasto se genera de la parte interna o externa del talo.
- b) Si los tetrasporangios están divididos en forma seriada o cruciada.
- c) Si el talo es de construcción central (uniaxial) o es de tipo surtidor.

UBICACION TAXONOMICA DE LA *IRIDAEA UNDULOSA* BORY

La clasificación del alga investigada es:

División: RHODOPHYTA
Clase: RHODOPHYCEAE
Subclase: FLORIDEOPHYCIDAE
Orden: GIGARTINALES
Familia: GIGARTINACEAE
Género: *IRIDAEA*

A partir del trabajo original de descripción del género *Iridaea* por el biólogo francés Bory de Saint-Vincent⁷ en 1826, se han sucedido controversias acerca de la exacta ubicación de la misma.

En primer lugar fue Levring⁸ en 1960 al estudiar la flora marina

chilena , que determinó que las especies sudamericanas del género *Iridaea* clasificadas por Bory necesitaban una revisión, ya que muchas habían sido caracterizadas con unos pocos especímenes. Es más, el número de especies podía reducirse considerablemente, quedando a lo sumo tres o cuatro, ya que existían numerosas formas transicionales. Así determinó que la *Iridaea undulosa* Bory, la *Iridaea ciliata* Kützting y la *Iridaea crispata* Bory son probablemente "formas ecológicas" de una misma especie, que en algún momento se denominó *Iridaea augustinae* Bory. De cualquier modo, Levring reconoció que esa revisión no podía efectuarse con especies de herbario, ya que hubiese necesitado de observaciones de campo.

Luego fue Kim⁹ quien a fin de obtener su Doctorado evaluó la taxonomía de los géneros *Chondrus*, *Gigartina*, *Iridaea*, *Rhodoglossum* y *Besa* dentro de las Gigartinaceae y estableció criterios taxonómicos adecuados para distinguir los géneros y cada especie dentro de aquellos. Con ese criterio dedujo que la clave vigente hasta el momento era inapropiada, concluyendo que deberían existir sólo dos géneros entre las Gigartinaceae : *Chondrus* y *Gigartina*, quedando *Rhodoglossum* e *Iridaea* como sinónimos de *Gigartina* , reclasificando y cambiando de familia a otros. Efectuó un estudio sumamente detallado de todas las especies conocidas, concluyendo que los dos géneros podían diferenciarse por las siguientes características:

Chondrus : plantas sin envoltura en el gonimoblasto; soros tetrasporongiales formados en el medio de la médula; células medulares habitualmente cortas y gruesas; células jóvenes del gonimoblasto elongadas, con sus filamentos entrelazados con células alargadas de los filamentos femeninos.

Gigartina : plantas con envoltura en el gonimoblasto; soros tetrasporongiales formados en cualquier nivel del talo; células medulares delgadas; células jóvenes del gonimoblasto habitualmente redondeadas; filamentos no entrelazados.

Las pequeñas diferencias existentes con los géneros *Iridaea* y *Rhodoglossum* se descartan y la *Iridaea undulosa* Bory resultaría reclasificada como *Gigartina undulosa*(Bory) Kim.

En cambio, un grupo chileno¹⁰ que realizó un estudio posterior sobre las algas *Iridaea boryana*, *I. laminarioides*, *I. caespitipes*, *I. crispata*, *I. ciliata* e *I. undulosa* se manifestó en desacuerdo con Kim⁹ y su inclusión de esas especies en el género *Gigartina*.

Caracterizaron para ello al género *Iridaea* de acuerdo a la siguiente descripción: talo membranoso con una o más frondes erectas creciendo de un sostén adhesivo discooidal; dicho fronde es multiaxial y tiene un ápice agudo y una base redondeada; la estructura histológica presenta una médula filamentosa y una corteza compuesta de filamentos anticlinales lateralmente adjuntados formando la epidermis de la capa externa; la planta tetraspórica heterotálica con soros encastrados y tetrasporos con división transversal; la cistocárpica con cistocarpos globosos, encajados y distribuidos en la superficie de la fronde con o sin pericarpo; una rama carpogonial tricelular; el soporte actúa como célula auxiliar y produce el gonimoblasto; tiene como hábitat las costas rocosas.

De cualquier modo, observando las especies coinciden con Levring⁸ que las *Iridaea boryana*, *laminarioides* y *caespitipes* son la misma alga, mientras las *I. crispata*, *I. ciliata* e *I. undulosa* constituyen otro complejo. Todas estas últimas tienen apófisis ribeteada, base de la fronde cuneada o reniforme con emergencias simples (*I. undulosa*), ramificadas (*I. ciliata*); por otra parte la *I. crispata* tiene base cordada con emergencias. De cualquier modo, son inseguras ya que existen formas de transición cuando se examinan muchos especímenes del mismo lugar. Proponen como nombre prioritario *Iridaea crispata* Bory, manteniendo al resto como sinónimos.

Capítulo II

LOS CARRAGENANOS

PRIMEROS ESTUDIOS

Todo lo concerniente a los cuatro períodos de la historia del estudio químico de los carragenanos ha sido recopilado convenientemente en la Tesis Doctoral de la Dra. M.C. Matulewicz¹¹.

Se había dividido en un primer período, de "descubrimiento", en el que inicialmente Schmidt, en 1844 aisló el mucílago de *Chondrus crispus*¹², y luego estudios posteriores determinaron que se trataba de un galactano sulfatado que contendría fructosa¹³⁻¹⁷, estimando en 28 % el contenido de galactosa¹⁶. Haas¹⁸ y Russell-Wells¹⁹ informaron al mismo tiempo -cerca de 1921- de la obtención de la entonces llamada "carragenina", comprobando que se trataba de un éster sulfato de un galactano, en forma de sal cálcica.

Posteriormente los mismos autores²⁰ describieron las condiciones en las cuales se eliminaba el sulfato, y la resistencia mayor de un tipo de sulfato respecto de otro al tratamiento con solución de hidróxido de sodio caliente.

Butler²¹ informó del aislamiento del mucílago y observó que al dializar una solución de carragenina al 1 % contra cloruro de potasio acuoso, el polisacárido gelificaba,

Luego se llegó a un segundo período, que comenzó a mediados de la cuarta década de este siglo y correspondió a las primeras determinaciones estructurales y al descubrimiento de mucílagos similares provenientes de otras algas. En base a los primeros estudios de metilación de la carragenina de *Chondrus crispus* se determinó la presencia de 2,6-di-O-metilgalactosa y 2-O-metilgalactosa²², por lo que se supuso que el tipo de unión era (1→3), y en el C-4 de la galactosa estaba ubicado un éster sulfato. La forma

de unión fue confirmada posteriormente por metilación de la carragenina desulfatada²³ y por acetólisis, metilación y oxidación con periodato²⁴. Paralelamente se descubrieron mucílagos provenientes de otras algas que tenían características similares a los del *Chondrus*, comenzando a utilizarse el nombre "carragenina" para todos ellos²⁵⁻²⁸. El análisis de los mucílagos de *Iridaea laminarioides* y *Chondrus ocellatus* hizo considerar la posible presencia de uniones (1→3) y (1→4)^{29,30}, aunque luego se optó por la primera, adjudicándose la posición del sulfato a C-6²⁸.

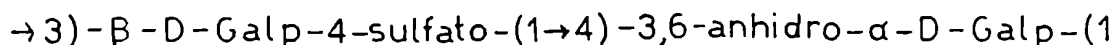
En el tercer período, que comenzó cerca de 1950 se demostró experimentalmente la presencia de más de un "componente" en los carragenanos, y que aquellos podían separarse por la propiedad que tenía uno (el llamado κ-carragenano) de formar geles en presencia de cloruro de potasio 0,125 M, permaneciendo el resto (λ-carragenano) en solución³¹. Dos trabajos anteriores ya daban cuenta de la polidispersión del mucílago^{32,33}.

El ion potasio, utilizado para la gelificación podía reemplazarse por cesio, rubidio o amonio, pero no por sodio o litio que no tenían efecto alguno^{31,34}. El método de fraccionamiento se aplicó a mucílagos de diversas algas; también se demostró³⁴ la polidispersión de los κ- y λ-carragenanos al añadir gradualmente etanol a una solución del polisacárido; se comprobó así que el fraccionamiento con cloruro de potasio no estaba ocasionado por el tamaño del polisacárido sino que las diferentes solubilidades reflejaban distintas composiciones o estructuras³⁴.

Otro descubrimiento importante de este período estuvo dado por el hallazgo de un nuevo azúcar constituyente de los carragenanos: la 3,6-anhidro-D-galactosa, responsable de las anteriores reacciones positivas de

cetosas. En primer lugar, E. Percival en 1954³⁵ y luego O'Neill³⁶ en 1955 lograron determinar la presencia de este azúcar que fue dosado como 5-hidroximetilfurfural, producto en el que se transforma cuantitativamente por hidrólisis controlada³⁶.

A partir de allí comenzaron a efectuarse estudios estructurales de las fracciones κ - y λ - del carragenano por separado; O'Neill³⁷ determinó la estructura del κ -carragenano de *Chondrus crispus*: el aislamiento por mercaptólisis parcial de 4-O- β -D-galactopiranosil-3,6-anhidro-D-galactosa dietilditioacetal con alto rendimiento y el no consumo de periodato sugerían una estructura que fue la que luego se confirmó para el κ -carragenano:



Algunos estudios de este período intentaron describir estructuras de carragenanos con poco éxito^{38,39}, y en otros^{40,41} se ha informado de la existencia de polisacáridos cuya estructura era similar a la del κ -carragenano.

Del mismo período proviene la aplicación de la espectroscopía infrarroja a la determinación de las posiciones de los grupos sulfato del polisacárido. Así, trabajando con compuestos modelo se determinó que además de la banda a 1240 cm^{-1} correspondiente a la tensión $S=0$ e independiente de la posición del sulfato, existe una zona a $800-900 \text{ cm}^{-1}$ que depende de la posición del hidroxilo esterificado. Se concluyó^{38,41-45} que los ésteres sulfato sobre hidroxilos primarios absorben a 820 cm^{-1} , los ubicados sobre hidroxilos secundarios ecuatoriales a 830 cm^{-1} y los que están sobre secundarios axiales a 850 cm^{-1} . Con ello se confirmó la presencia de unidades de galactosa-4-sulfato en el κ -carragenano⁴⁴. La espectroscopía infrarroja es hasta hoy una herramienta importante en los estudios químicos de carragenanos, especialmente en determinaciones estructurales de productos

con uno o a lo sumo dos tipos de sulfato.

En el cuarto período, que comenzó cerca de 1963 se llegó a la conclusión que el carragenano no es un producto puro ni una mezcla de dos o más polisacáridos sino una verdadera familia de compuestos, con estructuras y propiedades que varían continuamente dentro de lo que podrían considerarse extremos idealizados. Estos estudios fueron encarados paralelamente por la escuela inglesa de Rees y la escuela noruega de Haug.

La escuela inglesa, con más de una decena de trabajos publicados en el tema carragenanos y otros paralelos, plantea la posibilidad de relacionar a los polisacáridos a través de una estructura básica variante, en cambio la escuela noruega, con dos trabajos publicados, considera que el modelo que se basa en las estructuras del λ - y K -carragenanos es una "super-simplificación"⁴⁶.

El problema puede tener tres respuestas:

- a) El carragenano consiste de sólo dos compuestos, químicamente bien definidos (K y λ)
- b) Consiste de tres o más fracciones bien definidas.
- c) Consiste de una mezcla de moléculas con una composición química variante, sin solución de continuidad.

Mediante fraccionamiento con cloruro de potasio se demostró⁴⁶ que la primera respuesta es falsa. Los trabajos de la escuela noruega apuntan a confirmar la tercer alternativa, mientras que lo elaborado por la escuela inglesa se acerca más a la segunda respuesta.

El fraccionamiento con cloruro de potasio permitió también a los autores de la escuela noruega⁴⁶ definir operativamente tres fracciones: una insoluble, que precipita a concentraciones de cloruro de potasio menores que 0,125 M y concuerda con la llamada fracción K -, otra intermedia, que

precipita a concentraciones de cloruro de potasio mayores que 0,125 M, y otra soluble a todas las concentraciones de cloruro de potasio (la máxima concentración utilizada fue 1,5 M). Este sistema de fraccionamiento fue utilizado paralelamente en los trabajos de Cerezo^{47,48} y complementado con el tratamiento alcalino de los productos⁴⁹.

En el análisis de estructuras de fracciones definidas aplicado por la escuela inglesa se llegó a constatar la estructura del λ -carragenano, tanto aprovechando el tratamiento alcalino del mismo^{50,51} como mediante un estudio de metilación⁵². Estudios posteriores la confirmaron por medio de otros métodos^{53,54} (Fig.1).

Se amplió la definición estructural del λ -carragenano⁵² a un polisacárido exento de unidades de D-galactosa-4-sulfato y 3,6-anhidro-D-galactosa en el extremo de un espectro de estructura básica variante.

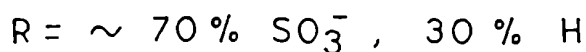
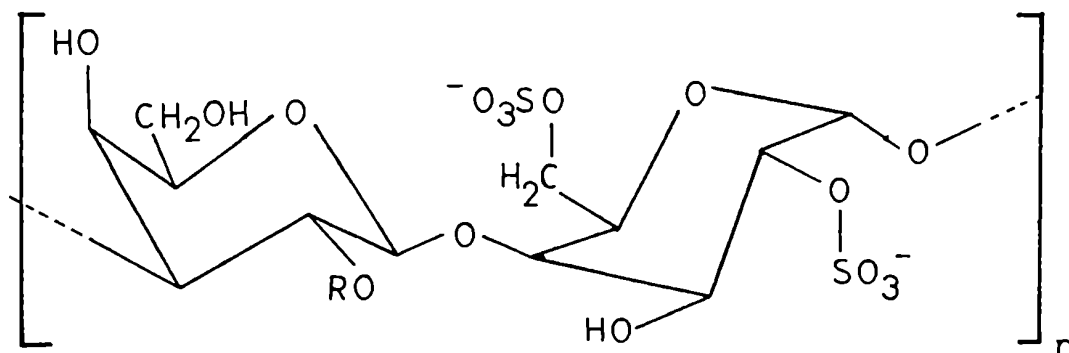


Figura 1: λ -carragenano.

Posteriormente la escuela inglesa fue descubriendo nuevas fracciones, algunas naturales y otras producto del tratamiento alcalino de las primeras. Así se definió un μ -carragenano (Fig.2) a través de un producto resultante del tratamiento alcalino de un carragenano soluble^{53,55} refraccionado con cloruro de potasio; el ι -carragenano, aislado del alga *Eucheuma spinosum*⁵⁶ (Fig.3); el ν -carragenano (Fig.4), obtenido también a través del tratamiento alcalino y refraccionamiento de un carragenano⁵⁷, y el ξ -carragenano (Fig.5), presente en el carragenano de *Gigartina atropurpurea*⁵⁸.

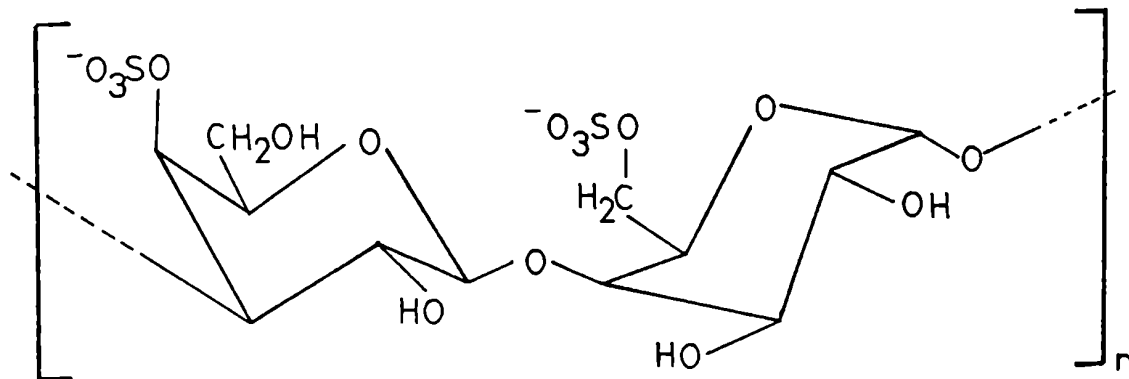


Figura 2: μ -carragenano

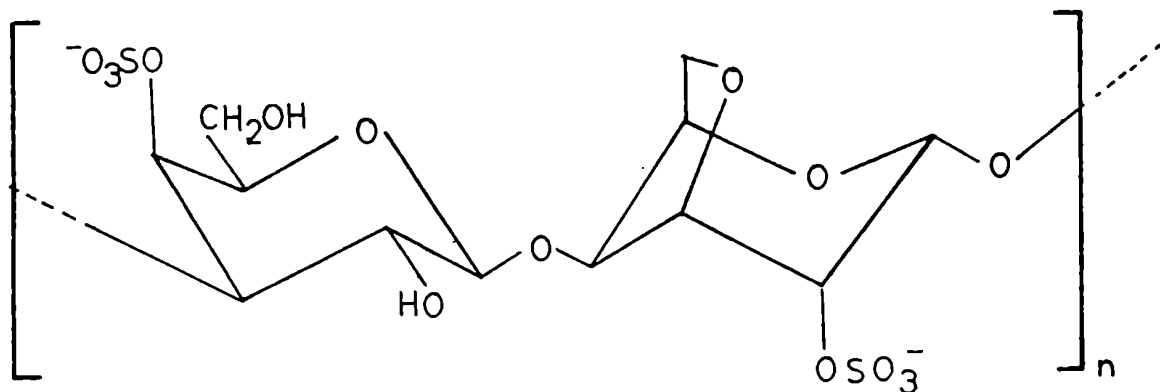


Figura 3: ι -carragenano

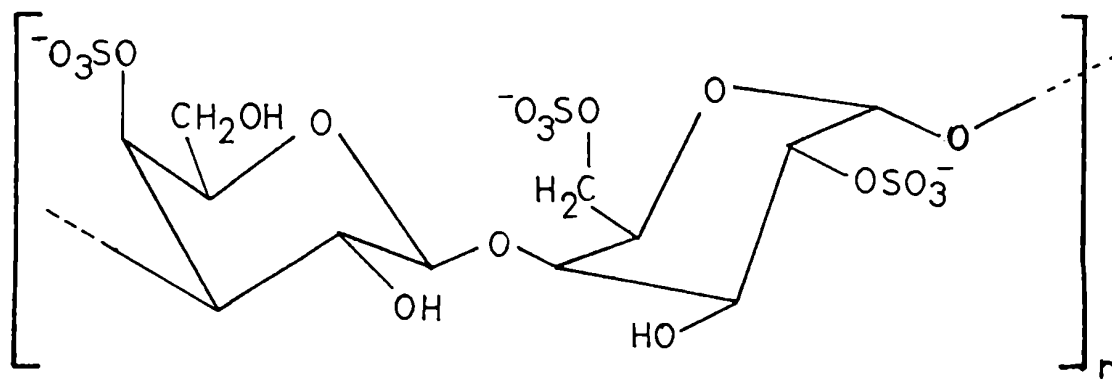


Figura 4: ν -carragenano

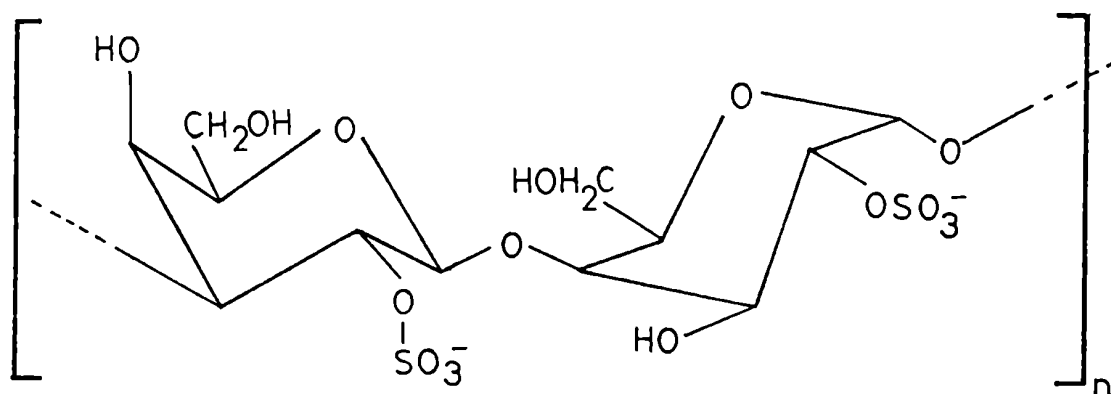


Figura 5: ξ -carragenano

Al mismo tiempo se confirmó la estructura del κ -carragenano previamente propuesta por O'Neill³⁷ (Fig.6); se mencionó la posibilidad que algunas unidades de 3,6-anhidrogalaactosa estén reemplazadas por otras de galaactosa 6-sulfato ó galaactosa 2,6-disulfato y/o que otras de aquellas

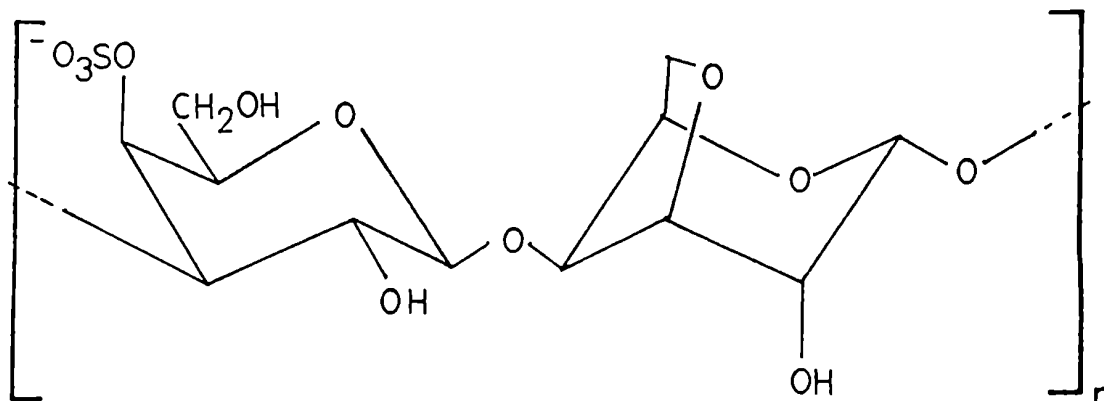


Figura 6: K -carragenano

unidades estén sulfatadas en el oxhidrilo del C-2, para poder explicar la relación molar galactosa/ 3,6-anhidrogalactosa/ sulfato de 1:0,83:1,17⁵⁹; diversos estudios confirmaron la estructura propuesta^{53,59-61}.

ULTIMOS ESTUDIOS

En los últimos años, los trabajos sobre carragenanos han sido encarados desde un punto de vista fundamentalmente industrial, con las consiguientes interrelaciones botánicas y/o ecológicas (ver pag. 28), pero sin mayores estudios estructurales.

Sin embargo, un grupo del Instituto Zelinsky de Moscú, a cargo de Anatoly I. Usov comenzó en 1967 la publicación de una serie "Polisacáridos de algas" en la revista local *Zhurnal Obshchei Khimii* , y posteriormente,

tras su creación, en *Bioorganicheskaya Khimiya* . La serie, que comprendió 32 artículos hasta 1981 se abocó a estudios estructurales de diversos polisacáridos de algas, fundamentalmente rodófitas. Los estudios incluyeron análisis previos, fraccionamientos, métodos degradativos parciales (desulfatación solvolítica, metanólisis, acetólisis, tratamiento alcalino, hidrólisis parcial), análisis por metilación y en los últimos años, espectroscopía de resonancia magnética nuclear de ^{13}C .

Si bien la mayor parte de los polisacáridos estudiados eran galactanos sulfatados con cantidades variables de 3,6-anhidrogalactosa, muchos de ellos no podían definirse como carragenanos, algunos debido a la presencia de unidades metiladas, como la 2-O-metilgalactosa en el polisacárido de *Laingia pacifica*⁶²⁻⁶⁸ o la 6-O-metilgalactosa en el polisacárido de *Odonthalia corymbifera* bautizado odontalano^{69,70}; otros debido a la presencia de unidades de L-galactosa, como en el polisacárido de *Grateloupia divaricata*⁷¹⁻⁷⁴, u otras unidades L- en polisacáridos agaroides como el de *Rhodomela larix*^{75,76}.

De cualquier forma, los polisacáridos extraídos del alga *Tichocarpus crinitus* tienen estructuras típicas de carragenanos⁷⁷⁻⁷⁹. Para el λ -carragenano de allí obtenido los autores determinaron una desviación de la estructura alternante ideal por degradación de Smith del producto desulfatado; dada la aparición de ácido fórmico y el rendimiento relativamente bajo en 2-O- β -galactopiranosiltreitol (que teóricamente debería ser el único producto para la estructura ideal) sugirieron la existencia de uniones (1 \rightarrow 6)⁷⁷.

También en su estudio sobre polisacáridos de algas del Mar de Japón, Usov⁸⁰ describió seis nuevas fuentes de carragenanos.

Resulta importante señalar el aporte de este grupo a la química estructural de carragenanos al estudiar las aplicaciones de la espectroscopía de resonancia magnética nuclear de ^{13}C a los mismos⁸¹⁻⁸³ y a oligosacáridos

relacionados⁷⁴ (ver Cap. V).

Otros trabajos vinculados con el tema son los del grupo sudafricano de J.R.Nunn y H.Paroli, que publicaron una serie de 9 artículos: "Polisacáridos sulfatados de Grateulopiaceae", haciendo análisis estructurales de los polisacáridos de *Aeodes orbitosa*^{84,85} (aeodano), *Phyllimena cornea*^{86,87} (filimenano), *Aeodes ulvoidea*⁸⁸⁻⁹⁰ y *Pachymenia carnososa*^{91,92}.

El resto de los trabajos ha traído información sobre nuevas fuentes de carragenanos y estudios preliminares de los mismos (carbohidratos totales, monosacáridos presentes, 3,6-anhidrogalactosa, sulfato, poder rotatorio, viscosidad, poder gelificante); como único dato estructural se consignó el espectro infrarrojo. Trabajos de este tipo se han realizado en Chile⁹³, Hawaii⁹⁴⁻⁹⁶, Tanzania⁹⁷⁻¹⁰¹, Rusia⁸⁰, Perú^{102,103} y Nueva Zelanda¹⁰⁴⁻¹⁰⁶.

Un trabajo del grupo canadiense de Mc Candless¹⁰⁷ presenta la extracción de un carragenano que contiene unidades de ácido pirúvico, obtenido de algas del género *Petrocelis*. Al estudiar su estructura proponen un nuevo tipo de carragenano, al que continuando con la nomenclatura usual, denominan π -carragenano, consistente idealmente de unidades alternantes de 4,6-O-(1-carboxietiliden)- β -D-galactopiranosil-2-sulfato unido en 3-, y α -D-

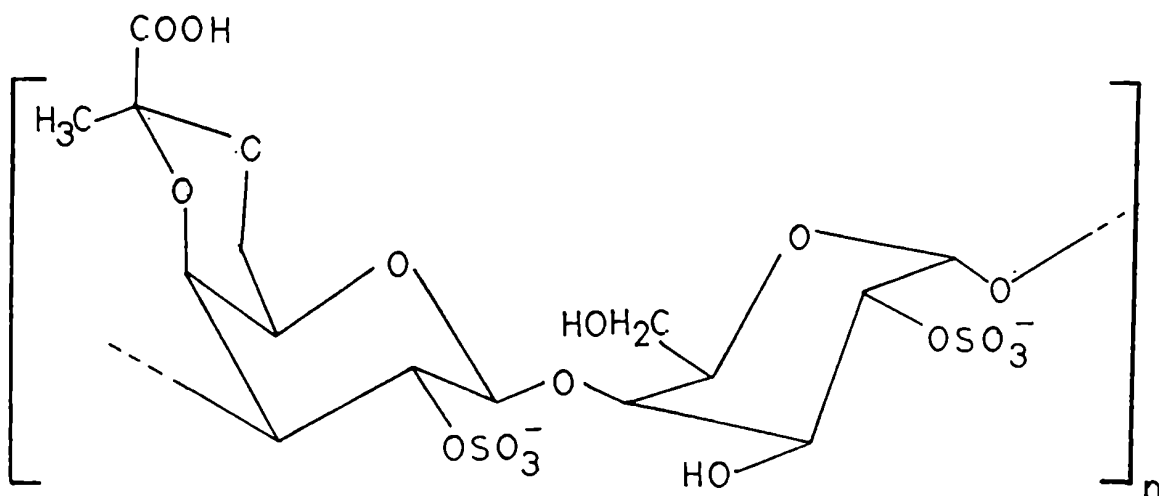


Fig.7: π -carragenano.

galactopiranosil-2-sulfato unido en 4- (Fig.7).

FACTORES ECOLOGICOS, ESTACIONALES Y SEXUALES

Como ya se ha mencionado anteriormente, los botánicos han prestado especial atención a estos aspectos. En el primer trabajo¹⁰⁸ (1965) se sugirió que existían variaciones estacionales para el carragenano de *Chondrus crispus* recogido de ciertas regiones. En el proveniente de Nova Scotia las muestras de otoño daban menores rendimientos. Además desde el verano hasta el fin del otoño, la rotación específica del K-carragenano crecía de +50° a + 148°, mientras que la del λ - decrecía de + 24° a + 7°, lo que no ocurrió con muestras de otras zonas.

Posteriormente, para 1972 comenzaron a efectuarse estudios más completos. En un trabajo, también con *C. crispus*¹⁰⁹ se postuló que la edad, hábitat y estación no tienen mayor efecto sobre la relación κ/λ , pero que los carragenanos de poblaciones sublitorales tienen mayor viscosidad y menor fuerza de gel que los litorales. Otro trabajo posterior¹¹⁰ llegó a concluir la inexistencia de efectos estacionales en *C. crispus*, lo cual se confirmó luego^{105,106} para otras algas.

Un aspecto al que se dio especial interés es a las variaciones producidas sobre los carragenanos originados en distintos tipos sexuales de la planta: en una especie simple existen tres formas diferentes para la mayoría de las algas rojas (ver Cap. I): las plantas masculina y femenina (los gametófitos) que producen células reproductivas (gametos), los cuales se fusionan y de las esporas que desarrollan como resultado de esa unión se origina una planta asexual, el tetrasporófito. Este último luego produce tetrasporas que

dan origen a las plantas sexuales. Las tres formas suelen ser de tamaño y forma similares ; se las encuentra juntas y sólo se las distingue cuando son fértiles¹⁰⁴.

En uno de los primeros trabajos efectuados al respecto¹⁰⁴ se determinó el rendimiento total de carragenanos y la relación κ/λ en cada una de las formas para cuatro especies de *Gigartina* neocelandesas (*G. decipiens*, *angulata*, *atropurpurea* y *lahicata*). Los niveles totales de carragenano no variaron entre las generaciones gametofítica y esporofítica, excepto en un caso en que los estados sexuales produjeron un mayor rendimiento. En cuanto a las relaciones κ/λ , las diferencias son marcadas. En los carragenanos obtenidos a partir de gametófitos se evidenciaron grandes variaciones de esa relación (0,28 - 4,8), aunque generalmente estuvo por encima de 1. En cambio la relación en los tetrasporófitos siempre se halló por debajo de 0,23 y llegó hasta 0,02. Estos resultados sugieren una virtual ausencia de κ -carragenano en la generación tetrasporofítica, si bien dichas plantas conservan niveles típicos (50-60 % del peso seco del alga) de carragenano total. Se sugirió al respecto que la enzima postulada por Rees⁵⁰ que cataliza la conversión del λ - al κ -carragenano estaría ausente en el tetrasporófito o bien que el λ - presente sería inmune a su acción. Es de destacar que los carragenanos aquí mencionados como κ - y λ - indican diferencia de solubilidad en cloruro de potasio y no estructuras definidas. Como se sabe, el "precursor" del κ -carragenano es el μ -⁵⁵ y no el λ - , aunque ambos son solubles.

Otro trabajo¹¹¹ confirmó que en *Chondrus* el rendimiento total no variaba y que las relaciones κ/λ eran 2,0-4,1 en los gametófitos y 0,02-0,17 en los tetrasporófitos.

Paralelamente otro grupo¹¹² efectuó sus estudios con la misma alga, arrogándose sus autores el descubrimiento. Si bien el material presentado es

cuantioso, su único aval químico es la espectroscopía infrarroja, los datos analíticos y la solubilidad en cloruro de potasio. Al mismo tiempo, el esquema sigue los lineamientos de la "escuela inglesa".

Las conclusiones a que arribaron fueron:

- a) Los tetrasporófitos producen carragenano soluble "indistinguible del λ -carragenano", el cual tratado con álcali es "igual" al λ -carragenano purificado modificado. El escaso material insoluble "no es" κ -carragenano.
- b) Los gametófitos producen fundamentalmente fracciones insolubles, más algo de intermedia (0,15-1,0 M de KCl) y soluble. El insoluble se "identificó" (espectro IR) como un κ -carragenano, mientras la fracción intermedia es curiosamente definida como una "mezcla de κ -carragenano y fracción soluble", también por datos de infrarrojo. La porción soluble contiene una cantidad de 3,6-anhidrogalactosa mayor del 10 % lo que la "distingue" del λ -carragenano. El tratamiento alcalino de esta última fracción ocasiona la aparición de dos fracciones: un κ -carragenano, insoluble en KCl y una fracción soluble cuyo espectro infrarrojo la distingue de los λ - ó μ -carragenanos tratados, por lo que la consideran un nuevo carragenano.

Lamentablemente esta y las otras fracciones no fueron estudiadas con un criterio químico estructural, lo que hubiera servido para caracterizarlas más claramente.

De cualquier forma queda clara la presencia de carragenanos solubles fundamentalmente en el tetrasporófito, e insolubles en los gametófitos; ese mismo comportamiento se confirmó en otras especies productoras de carragenanos¹¹³ (*Iridaea cordata*, *I. heterocarpa*, *I. lineana*, *I. cornucopiae*, *Gigartina exasperata* y *G. papillata*), obteniéndose 93 % de κ -carragenano en los gametófitos y 95 % del λ - en los tetrasporófitos.

ESTUDIOS REALIZADOS EN LA REPUBLICA ARGENTINA

Los primeros estudios estuvieron dirigidos hacia los ficocoloides de *Iridaea laminarioides* e *I. cordata* y sus comparaciones con el carragenano de *Chondrus crispus*. De ese modo, en la década del 50' se sucedieron las Tesis doctorales de Luzzati¹¹⁴, Barón¹¹⁵, Steinitz¹¹⁶, Torcat Rojas¹¹⁷, Hajdu¹¹⁸, Bludau¹¹⁹ y Cassini¹²⁰; Lacoste de Díaz¹²¹ publicó un trabajo y Gómez Artero¹²² en 1961 efectuó un resumen de todos esos estudios.

Más adelante, los carragenanos de *Iridaea cordata*, reclasificada como *Gigartina skottsbergii* fueron estudiados desde un punto de vista estructural por Cerezo^{47,48,123,124}.

LOS CARRAGENANOS DE *IRIDAEA UNDULOSA* Bory

Los estudios fueron abordados por la Dra. M.C. Matulewicz en su Tesis Doctoral¹¹. El carragenano, obtenido por extracción acuosa del alga *Iridaea undulosa* B., y posterior precipitación con isopropanol, se aisló con un rendimiento del 53 % y fue purificado ulteriormente por redisolución en agua y reprecipitación. Al disolver en este caso el carragenano en agua quedó un producto insoluble (8-10 %) que fue centrifugado y cuyos análisis denotaron la presencia de hidratos de carbono (glucosa y galactosa) y alta proporción de proteína.

El análisis del carragenano purificado indicó una relación molar galactosa/ 3,6-anhidrogalactosa/ sulfato de 1,00:0,18:1,39 con poder gelificante nulo. El poder rotatorio de + 70,1° era del orden del encontrado para otros

carragenanos, aunque la viscosidad intrínseca (5,6 dl/g) era algo menor, lo que indicaría un menor peso molecular.

Antes de efectuar el fraccionamiento se determinó la curva de precipitación analítica (por el método también desarrollado en dicha Tesis^{11,125}), donde se evidenció la ausencia de fracción K- y se observó que gran parte del carragenano estaba constituido por fracción intermedia.

El fraccionamiento final permitió aislar ocho fracciones (Tabla 1), todas las cuales precipitaron en estrechos rangos de concentración de cloruro de potasio, con precipitaciones difusas, de poca importancia, entre ellas.

Los datos analíticos de esas ocho fracciones¹²⁶ permitieron reagruparlas en cuatro:

I) *Fracción insoluble a 0,10 M de cloruro de potasio*

De acuerdo con la definición operativa, debería corresponder a un K-carragenano, pero el bajo contenido de 3,6-anhidrogalactosa, su nula capacidad de gelificación y el espectro infrarrojo indicaron que se trataba de una fracción típicamente soluble cuya precipitación pudo depender de otros factores como la contaminación con un alto porcentaje de proteína. De cualquier modo, dado el bajo rendimiento (0,5 %) esta fracción careció de interés para ser estudiada posteriormente.

II) *Fracción insoluble a 0,10-1,05 M de cloruro de potasio.*

Corresponde a tres subfracciones del carragenano (2, 3 y 4) que precipitaron a 0,70-0,90 ; 0,90-0,95 y 0,95-1,05 M de KCl. Las tres evidencian similitudes analíticas (Tabla 1), con una relación molar promedio galactosa/3,6-anhidrogalactosa/sulfato de 1,00:0,50:1,20, es decir que esta fracción es la más rica en anhidrogalactosa y la más pobre en sulfato de todo el carragenano. El espectro infrarrojo indicó, mediante el pico a 840 cm^{-1} la presencia de unidades de galactopiranososa-4-sulfato. Un estudio de metilación posterior

TABLA 1: Composición y propiedades del carragenano de Iridaea undulosa B.y las fracciones obtenidas del mismo por precipitación con cloruro de potasio.

Fracción	Rango de ppción. (M KCl)	Rendim. (%)	Galactosa anhidro (%)	3,6-AHG ^a anhidro (%)	Sulfato (SO ₃ K %)	Gal:AHG:SO ₃ K ^b (Relac.molar)	6-Sulfato (SO ₃ K %)	NaIO ₄ ^c	[α] _D ²⁰ (°)	[η] (dl/g)	Proteína (%)
Original			39,7	6,4	40,6	1,00:0,18:1,39	10,1 ^d (4,3) ^e	4,9	+70,1	5,60	3,0
1	0-0,125	0,5	20,7	4,1	30,0	1,00:0,22:1,97	3,9(ND) ^f	ND	ND	ND	13,0
2	0,70-0,90	5,8	37,6	18,9	37,0	1,00:0,57:1,34	2,3(0)	2,2	+56,0	3,02	1,8
3	0,90-0,95	7,4	39,3	17,4	32,9	1,00:0,50:1,14	4,3(0)	1,6	+49,3	1,26	3,4
4	0,95-1,05	6,8	41,2	17,0	33,7	1,00:0,46:1,11	3,6(0)	4,0	+54,0	2,42	2,3
5	1,20-1,25	15,0	41,6	3,5	44,6	1,00:0,09:1,46	12,8(7,6)	4,4	+71,0	4,20	1,5
6	1,35-1,40	7,2	40,9	1,8	44,5	1,00:0,05:1,48	11,9(10,0)	5,9	+66,5	5,58	1,1
7	1,55-1,65	13,2	40,2	1,6	42,2	1,00:0,04:1,43	10,4(8,3)	2,2	+62,2	5,30	1,7
8	2,00 ^g	13,0	34,6	5,8	40,1	1,00:0,19:1,57	3,0(1,8)	4,7	+39,8	4,48	2,0

^a 3,6-anhidrogalactosa.

^b Galactosa/3,6-anhidrogalactosa/sulfato. ^c Unidades promedio consumidas por mol de periodato.

^d Sulfato unido a hidroxilo primario. ^e Sulfato unido a hidroxilo primario después de la oxidación con periodato.

^f No determinado. ^g Soluble a 2,00 M de cloruro de potasio.

de esta fracción¹²⁷ confirmó la presencia de esa unidad en gran proporción.

Los resultados obtenidos (Tabla 2) indican una estructura básica de κ - ó ι - carragenano con algunas desviaciones de la estructura clásica, tal como lo indica su relación molar de azúcares y sulfato.

TABLA 2: Composición de la mezcla de azúcares producida en la metilación e hidrólisis de la fracción insoluble en 0,70-1,05 M de cloruro de potasio del carragenano de Iridaea undulosa.

Azúcar	Relación molar %
2,6-di-0-metilgalactosa	51,3
4,6-di-0-metilgalactosa	25,6
3-0-metilgalactosa	4,6
4-0-metilgalactosa	13,4
6-0-metilgalactosa	3,2

Rel.molar de 2-0-metil-3,6-anhidrogalactosa/3,6-anhidrogalactosa = 3,5:1

Puede verse además, una alta cantidad de 4,6-di-0-metilgalactosa, indicativa de galactosa 2-sulfato unida en 0-3, además de la clásica unidad que indica la galactosa 4-sulfato unida por 0-3. No han sido detectadas, en cambio, unidades trimetiladas ni 2,3-di-0-metilgalactosa que indican galactosas unidas en 0-4, sulfatadas en 0-6 ó sin sulfato, consideradas como "kinks"^{126,128}.

En cambio se encontró un alto porcentaje (21,2 %) de unidades mono-metiladas, las que seguramente determinaron las propiedades de solubilidad del carragenano. Estas podrían responder a puntos de ramificación monosulfatados o unidades disulfatadas; ambas incrementarían la solubilidad de la molécula.

III) *Fracción insoluble a 1,05-2,00 M de cloruro de potasio.*

También corresponde a tres fracciones de parecidas características analíticas, precipitadas a cloruro de potasio 1,20-1,25 M ; 1,35-1,40 M y 1,55-1,60 M (Tabla 1). La relación molar promedio Gal/3,6-a.h.g./sulfato de 1,00:0,05:1,45 es la típica de un λ -carragenano. Además esta fracción presenta una proporción relativamente alta de 6-sulfato, lo cual fue corroborado por su banda a 815 cm^{-1} en el espectro infrarrojo. Una de las subfracciones ha sido sometida a análisis por metilación¹²⁷ (Tabla 3). Aquí la aparición de cantidades relativamente altas

TABLA 3: Composición de la mezcla de azúcares producida en la metilación e hidrólisis de la fracción 7.

Azúcar	Relación molar %
2,3,4,6-tetra-0-metilgalactosa	4,6
2,3,6-tri-0-metilgalactosa	4,2
2,4,6-tri-0-metilgalactosa	10,7
2,6-di-0-metilgalactosa	4,2
4,6-di-0-metilgalactosa	24,1
3,6-di-0-metilgalactosa	8,0
2,3-di-0-metilgalactosa	3,4
2,4-di-0-metilgalactosa	4,6
3-0-metilgalactosa	19,5
4-0-metilgalactosa	9,6
6-0-metilgalactosa	3,1
Galactosa	3,4

de 4.6-di-0-metilgalactosa (G-2-S unido en 0-3) y 3-0-metilgalactosa (G-2,6-di-S unido en 0-4) confirma la estructura de tipo λ -, con desviaciones producidas por

cantidades menores de otros azúcares dimetilados (G-4-S y G-6-S unidas en 0-3 ; G-2-S unida en 0-4) y trimetilados (galactosa no sulfatada unida en 0-3 u 0-4).

De cualquier modo resultó significativo el alto contenido en azúcares monometilados, lo que sumado al alto porcentaje de tetrametilgalactosa, sería indicativo de ramificaciones.

IV) *Fracción soluble en cloruro de potasio 2,00 M.*

Esta fracción, por su relación molar (Tabla 1) curiosamente evidenció más 3,6-anhidrogalactosa y menos 6-sulfato que las fracciones del grupo anterior. El espectro infrarrojo mostró una banda ancha centrada a 830 cm^{-1} , característica de 2-sulfato. El tratamiento alcalino de esta fracción¹²⁶ dio un producto con bajo rendimiento, en cuyo espectro IR un pico agudo a 845 cm^{-1} reemplazó a la banda ancha antes citada. Ello se atribuyó a la presencia de residuos de galactosa-2-sulfato unidos en 0-4, característicos del ξ -carragenano, que se eliminarían en medio alcalino para dar un epóxido⁵⁸. Esta fracción daba trazas de xilosa por hidrólisis.

TRATAMIENTO ALCALINO DEL CARRAGENANO

El carragenano de *Iridaea undulosa*, que se sometió a tratamiento con borohidruro alcalino hasta contenido constante de 3,6-anhidrogalactosa¹¹, se obtuvo con un rendimiento del 86 %. El producto obtenido formó geles en presencia de cloruro de potasio, y mostró menor viscosidad y poder rotatorio que el carragenano de partida.

Este carragenano modificado fue fraccionado también con cloruro de potasio, obteniéndose dos fracciones fundamentales: un κ -carragenano (54 %) y una fracción soluble (31 %) con cantidades insignificantes de fracciones intermedias (Tabla 4). El alto rendimiento en fracción soluble, que duplicó la del carragenano de partida indicó que el tratamiento alcalino provocó un incremento

TABLA 4: Composición y propiedades del carragenano modificado con álcali y de las fracciones obtenidas del mismo por precipitación con KCl.

Fracc.	Rango de ppción. (M KCl)	Rendim. (%)	Gal Anh.%	AHG ^a Anh.%	SO ₃ K %	Gal:AHG:SO ₃ K (Relac.molar)	[α] _D (°)	[η] (dl/g)
Total		86,0	22,2	22,8	37,4	1,00:1,15:2,30	+37,1	2,76
1	0-0,125	53,6	27,7	25,5	32,3	1,00:1,03:1,58	+48,2	2,15
2	0,125-0,50	1,9	25,2	23,1	36,4	1,00:1,03:1,97	+52,8	ND ^b
3	0,50-1,00	1,0	22,5	16,4	44,4	1,00:0,82:2,68	+48,5	ND
4	2,00 ^c	31,4	29,1	18,7	33,9	1,00:0,72:1,58	+21,9	2,14

^a3,6-anhidrogalactosa. ^b no determinado. ^c soluble a 2,00 M.

de la solubilidad de algunos carragenanos intermedios.

La fracción insoluble (1, Tabla 4) muestra una relación molar G/A/S concordante con la esperada para un K-carragenano, pero con un exceso de sulfatos.

Además de la banda característica de G-4-S, su espectro infrarrojo mostró la que corresponde a la 3,6-anhidrogalactosa 2-sulfato (805 cm⁻¹).

La fracción soluble evidenció en su espectro infrarrojo un predominio de las unidades de galactosa 2-sulfato y 3,6-anhidrogalactosa 2-sulfato. Resulta curiosa la solubilidad de esta molécula a pesar del alto contenido de 3,6-anhidrogalactosa, lo que se explicó tentativamente por la presencia del sulfato en 0-2.

Método turbidimétrico: Matulewicz y Cerezo¹²⁵ también elaboraron un método para la determinación de curvas de precipitación mediante el cual pudieron evaluar la existencia de fracciones por la turbidez producida a distintas concentraciones de cloruro de potasio. El método es igualmente útil al anteriormente utilizado⁴⁶, pero se efectúa en un tiempo menor y con inferior cantidad de sustancia.

Capítulo III

INDUSTRIA Y COMERCIO
DE LAS ALGAS Y SUS
MUCILAGOS EN EL MUNDO

INTRODUCCION

El aprovechamiento de las algas resulta de creciente importancia en un gran número de países en desarrollo, que conservan las reservas de las mismas.

Como alimento han sido utilizadas por varios siglos y su demanda actual se estima en 200.000 toneladas anuales, fundamentalmente en Oriente. Encuentran aplicación como forraje algunas algas pardas, por ser fuentes de iodo y otros elementos, utilizándose además como fertilizantes por su contenido en materia orgánica y potasio ; éstos dos últimos usos han disminuído drásticamente en los últimos tiempos.

En cambio, la demanda de algas se ha tornado de fundamental importancia por la obtención de los ficocoloides o mucílagos de las mismas (carragenanos, ágar, alginatos), la cual ha crecido rápidamente en la década pasada. En 1970 el consumo de algas y subproductos alcanzaba los 50 millones de dólares, mientras que diez años después excedió los 350 millones¹²⁹.

Los datos publicados sobre el comercio de algas y subproductos son poco abundantes, en algunos casos debido a los requerimientos de secreto por parte de la industria. Sin embargo, el ITC (International Trade Centre) del UNCTAD-GATT (Acuerdo General de Tarifas Aduaneras y Comercio) ha publicado¹²⁹ en 1981 un informe al respecto basado en investigaciones personales en la industria, el comercio y los laboratorios de investigación, para lo cual ha sido muy útil el Décimo Simposio Internacional sobre Algas (Göteborg, Suecia, 1980).

EVOLUCION INDUSTRIAL

Los tres mucílagos ya mencionados se producen a partir de varias algas rojas y pardas.

El ágar es elaborado por los japoneses desde hace 350 años, y esa industria fue un monopolio hasta el advenimiento de la Segunda Guerra Mundial, en que se dispersó por el mundo; las principales fuentes están ahora en Africa, Sudamérica y Asia.

La producción de alginatos con fines comerciales se inició en los Estados Unidos en 1929, pero la industria se expandió en gran escala en los últimos veinticinco años. Las principales fuentes están en Noruega, la costa pacífica de América, Islandia, Irlanda, Sudáfrica, Australia (Tasmania) y Gran Bretaña.

Los carragenanos (Cap.II) se extraen de ciertas algas rojas y su producción industrial se inició en el Reino Unido en 1948, incrementándose en estos últimos años. Se halla vinculado con este mucílago el furcellarano, producido por primera vez en 1940 en Dinamarca y denominado por ello " agar danés ". Químicamente guarda grandes similitudes con el K-carragenano y por eso se lo incluye en el mismo grupo. El alga utilizada para su manufactura se encuentra en el Mar del Norte , al sur del Mar Báltico y en Canadá (Isla Príncipe Eduardo y estuario del río San Lorenzo).

ESTADO ACTUAL DE LA INDUSTRIA

Como puede apreciarse en la Tabla 5, la industria mundial de algas procesa 150.000 toneladas de las mismas anualmente, valuadas en 61 millones de dólares; se producen 40.000 toneladas de mucílagos, equivalentes de 300 millones de dólares.

En la Tabla 6 puede observarse la producción de alga y carragenano discriminada entre los distintos países. Las naciones en desarrollo producen

TABLA 5: Producción mundial de algas y sus mucílagos (1980)

Producto		AGAR	ALGINATOS	CARRAGENANOS ^a	TOTAL
ALGAS	Cantidad (toneladas)	28.000	80.000	40.000	148.000
	Valor (millones U\$S)	25	20	16	61
MUCILAGOS	Cantidad (toneladas)	7.000	22.000	10.000	39.000
	Valor (millones U\$S)	117	125	55	297

Fuente : ITC¹²⁹. ^a incluye furcellarano.

TABLA 6: Producción de alga seca productora de carragenano y del correspondiente mucílago por país (1980) y exportación del mismo.

PAIS	ALGA (toneladas)	CARRAGENANO (toneladas)	No.de FABRICAS	EXPORTACION (toneladas)
Argentina	-	poco	1	
Canadá	7.000	-		
Corea	300	100	1	
Chile	4.650	-		
Dinamarca	6.000	4.400 ^a	2 ^a	4.250 ^a
España	2.000	500	2	ND
Estados Unidos	-	4.500	2 ^b	1.700
Filipinas	15.000	-		
Francia	-	2.800	2	ND
Japón	1.600	400	4	100
Méjico	600	-		
Perú	470	-		
Portugal	400	100	1	
Reino Unido	-	100	1 ^c	
Singapur	1.000	-		
Tanzania	150	-		
TOTAL	40.000	12.900		

Fuente: ITC¹²⁹. ^aIncluye 1.000 toneladas de furcellarano en una fábrica.

^bUna fábrica se cerró en 1980. ^c Se cerró en 1979. ND= no hay datos.

cerca del 50 % del total de algas, pero sólo alcanzan el 12 % de la elaboración de las mismas, la que es mayoritariamente llevada a cabo en los países industrializados por unas pocas compañías.

La mayor parte de las algas obtenidas en los países en desarrollo se cosechan en las Filipinas (Tabla 6), fundamentalmente debido al cultivo (maricultura) de las mismas introducido en los últimos años. Chile es otro de los países en desarrollo que produce gran cantidad de algas; sin embargo, la producción de carragenano en dichos países es casi nula. Para poder compartir la elaboración esos países deberían en primer lugar producir más alga por maricultura y luego concentrar sus esfuerzos en el procesado de esas fuentes¹²⁹.

Las compañías danesas, francesas y norteamericanas producen el 90 % de los carragenanos del mundo; la danesa es la única productora mundial de furcellarano. Japón y España también producen algunas cantidades del mucílago; de los países en desarrollo sólo Corea y la Argentina operan pequeños volúmenes, mientras en Filipinas se comenzó a efectuar una semi-refinación. También en Chile se planea alguna facilidad de procesado en el futuro cercano.

Las algas utilizadas para la producción de carragenanos son fundamentalmente de los géneros *Eucheuma* (Filipinas), *Iridaea* (Chile), *Gigartina* (Perú), *Chondrus* (Irlanda y Canadá) e *Hypnea* (otros países).

PROSPECTIVA INDUSTRIAL Y PRECIOS

Cerca del 60 % del alginato es utilizado en la industria; la recesión mundial ha afectado esa aplicación, pero pese a ello la demanda sigue siendo abundante.

La declinación de la producción del ágar por parte de Japón fue acompa-

ñada por un incremento proporcional de la misma por parte de Chile y España.

Sin embargo, la producción total permanece estática, lo cual ha modificado los precios; los efectos del cultivo (maricultura) pueden llegar a incrementar la producción, y por ende a estabilizar los precios.

La demanda del ágar de grado bacteriológico crece, especialmente por los programas de control de enfermedades de los países desarrollados, lo cual ha provocado escasez de este tipo de ágar.

En el caso de los carragenanos, la provisión por parte de la maricultura del alga correspondiente, ha contribuido a estabilizar los precios; el K-carragenano se cotizaba en el Reino Unido a £ 3/kg. en 1975, pasando a £ 4 en 1978 y a 5,08 en 1981; el L-carragenano costaba un 10 % más; el carragenano semirrefinado utilizado en alimentos para animales domésticos se vendía a £ 2,20/kg. en 1981. En los Estados Unidos, los precios del producto de viscosidad media eran de U\$S 5,50 /kg. en 1978 y de 6,10 en 1980.

Como puede deducirse a partir de todo lo anteriormente discutido, los factores que controlan la expansión de la industria de algas son: el precio de los mucílagos (y su comparación con los precios de otros productos competidores), la disponibilidad de materias primas (algas) y la habilidad de la industria de crear nuevos usos comerciales y mercados, lo cual puede demandar algunos años. En el futuro cercano se espera que la expansión provenga de la industria alimentaria, para la cual los tres mucílagos son ampliamente utilizados.

MERCADOS Y USOS DEL CARRAGENANO Y OTROS MUCILAGOS

La demanda proviene fundamentalmente de los países industrializados. Solamente el Japón ocupa el 22% de la demanda total de carragenanos (2.200

toneladas por año), mientras que se calcula que otro 25 % es consumido por los Estados Unidos y Europa occidental. El resto se reparte entre todo el mundo, siendo pequeña la proporción que corresponde a los países en desarrollo.

El carragenano es un agente estabilizante y gelatinizante en comidas, pastas dentales, cosméticos y refrescantes de ambientes. Los usos en el Japón pueden apreciarse en la Tabla 7.

TABLA 7: Usos de los carragenanos en el Japón (1980)

Uso final del producto	Proporción (%)
Dulces y confituras	15
Cosméticos	15
Helados	13
Saborizantes (flavourings)	12
Productos cárneos	12
Pastas de pescado	10
Salsas	10
Industria de la seda	10
Otros usos	3

Como se observa, cerca del 70 % se consume en la industria alimentaria; en otros mercados diferentes del Japón el patrón de usos es similar, con la diferencia que Japón es el único país que utiliza el carragenano en la industria de la seda, y en cambio no lo usa en alimentos enlatados para animales domésticos, mercado que en Reino Unido y Australia es fundamental.

Entre los usos alimentarios, el carragenano es ampliamente conocido por sus propiedades como agente suspensivo y gelificante, en proporción cercana al 1 %. Se lo usa en gran número de productos que incluyen desayunos

instantáneos, comidas dietéticas, mermeladas, jarabes, caldos, comidas para niños, productos lácteos (helados, yoghurts, chocolates líquidos). En parte se podría recuperar un antiguo mercado: la industria licorera.

Entre los usos no alimentarios, ha sido sustituido en parte por otros productos; por ejemplo, las emulsiones de pintura ahora utilizan la CMC (carboximetilcelulosa). Una sola empresa (en el Reino Unido) utiliza al carragenano en la impresión textil de cortinas de alta calidad y géneros para tapicería; hasta 1979 esa empresa producía 100 toneladas por año para su propio uso; hoy importa el producto.

Tal como en la alimentación, el uso del carragenano con fines no alimentarios se basa en sus propiedades espesantes y estabilizantes. En los refrescantes de ambientes es un gelatinizante; da textura, enjuagabilidad, y forma a los dentífricos; es un suavizante de champúes; actúa como hidratante y da viscosidad a lociones, cremas y otros cosméticos. También se lo usa como agente de suspensión en las "comidas" de bario empleadas como contrastantes de rayos X. La mayor parte del mercado no alimentario está en los refrescantes sólidos de ambientes y las pastas dentales.

El furcellarano se utiliza en contadas ocasiones, fundamentalmente en productos lácteos (postres instantáneos) y pastas de pescado.

El ágar se utiliza también principalmente con fines alimentarios, en mermeladas y sopas, lo mismo que en dulces, mezclado con gelatina. También se utiliza como medio de cultivo y como laxante.

El alginato, en cambio, sólo se utiliza en la alimentación en un 30 %, y su aplicación fundamental está en la impresión textil, principalmente de algodón. También se utiliza en la industria papelera, en varillas de soldadura, en odontología y en medicina.

PROCESADO DEL ALGA PRODUCTORA DE CARRAGENANOS

En sus orígenes, todo el carragenano se producía a partir de *Chondrus crispus* y *Gigartina stellata*. La industria utiliza ahora diferentes algas rojas para producir distintos tipos de carragenanos.

El alga se limpia en primer lugar de distintas formas. Se la suele pretratar con soluciones de cloruro de sodio, potasio o calcio de acuerdo al tipo de gel requerido: el sodio da un producto viscoso con baja fuerza de gel, el calcio un gel elástico mientras que el tratamiento con sales de potasio origina un gel firme. En esta etapa se suele blanquear al producto mediante el agregado de solución de hipoclorito de sodio, cuyo exceso es eliminado posteriormente por el agregado de tiosulfato de sodio.

Para extraer el alga, se la agita en agua, en proporción del 3 % y se suele calentar a 90-95° durante 2 horas; se filtra en caliente lo más rápido posible pues gelifica al enfriar. La solución (al 1 % aproximadamente) se concentra al 3-4% en evaporadores de vacío.

Inicialmente se aislaba el carragenano por secado en tambores, método que aún hoy se utiliza, pero se obtiene un producto de mejor calidad por precipitación con iguales volúmenes de isopropanol. Entonces se enfría la mezcla, se separa el carragenano, se lo seca y muele; el inconveniente de este método son los efluentes industriales que contienen isopropanol y sólidos de alta demanda biológica de oxígeno.

Suele agregarse a las aguas de extracción algún fosfato soluble (1 kg/ 10.000 litros) para aumentar el rendimiento, y en algunos casos se lleva a pH levemente alcalino (7,2); a veces se modifica el proceso básico tratando a presión el producto con hidróxido de sodio, a fin de obtener un producto con alta fuerza de gel.

Ya que la separación del carragenano en sus fracciones κ - y λ - no es fácil en la industria, se está investigando en Nova Scotia (Canadá) la posibilidad de cultivar plantas diploides de *Chondrus crispus* que produzcan el λ -carragenano, y gametofíticas que produzcan el κ -carragenano. Se intenta explotar este descubrimiento¹¹² aunque el secreto industrial impide conocer los progresos reales; sólo la empresa CECA S.A. informó¹³⁰ algo al respecto.

CULTIVO DE ALGAS (MARICULTURA)

Las algas utilizadas con fines industriales fueron tradicionalmente las "silvestres" , pero en la década pasada se comenzaron a cultivar algunas algas de importancia comercial, lo que puede llegar a alterar en algunos años la distribución industrial.

La maricultura ofrece la ventaja de la facilidad de cosechado y control del mismo, haciendo igualmente posible el cultivo de mejores cepas, con mayores rendimientos. Filipinas es uno de los pocos países que ha trabajado en ese aspecto y de ese modo ha aumentado extraordinariamente la producción de *Eucheuma*; otros países en desarrollo estudian su aplicación.

El cultivo de *Eucheuma* es desarrollado en Filipinas en "granjas" que cubrían en total 4 hectáreas en 1973; hoy día la proporción ha crecido enormemente , con setecientos predios de aproximadamente media hectárea cada uno, produciendo cerca de 15.000 toneladas de alga para exportar. El rendimiento anual por hectárea es cercano a los U\$S 20.000.

En Taiwán se cultivan también varias especies de *Gracilaria*¹³¹, en 300 hectáreas, conjuntamente con peces. Se cortan piezas de alga y se ponen en un gigantesco estanque que contiene además mil peces (*Chanos chanos*) por ha. A veces en lugar de ese pez se utilizan camarones (*Penaeus monodon*) o cangrejos

(*Scyllia serrata*). El alga crece rápidamente, mientras el animal se alimenta de los epífitos. Así se obtienen 40 toneladas/hectárea de *Gracilaria* de alta calidad. Del mismo modo se cultiva *Laminaria* en China¹³².

Como se ha expresado existen prespectivas de cultivar por separado *Chondrus crispus* gametofítico y tetrasporofítico que contienen distintos carragenanos¹¹². Los primeros intentos han sido exitosos; para el cultivo se han puesto en evidencia los siguientes criterios¹²⁹:

- a) En cultivo, el alga *C. crispus* flota; en la naturaleza está adherida a las rocas.
- b) Es deseable un enriquecimiento con nitrógeno y fosfato.
- c) El cultivo es más eficiente a pH 7,8.
- d) La temperatura óptima está entre los 15 y los 20°.
- e) El tanque puede ser de 2 m de profundidad si la agitación es adecuada.
- f) El contenido en carragenano en algas crecidas en agua de mar enriquecida es bajo, mientras el contenido en nitrógeno es anormalmente alto.
- g) Ambos contenidos se normalizan cultivando las algas en agua de mar común por dos o tres semanas; la iluminación ayuda a blanquear las algas.
- h) El peso del alga crece tres a cuatro veces por mes.

Actualmente se llevan a cabo varias investigaciones respecto de la maricultura. Muchas de ellas fueron presentadas en el Simposio ya mencionado (Suecia, 1980).

Capítulo IV

METODOS DE DESULFATACION

DESULFATACION ACIDA

Los estudios de metilación de polisacáridos sulfatados, y entre ellos de los carragenanos presentan el inconveniente que no permiten precisar en forma unívoca la posición de la unión glicosídica y del éster sulfato; se obtienen así grandes cantidades de azúcares di- y monometilados.

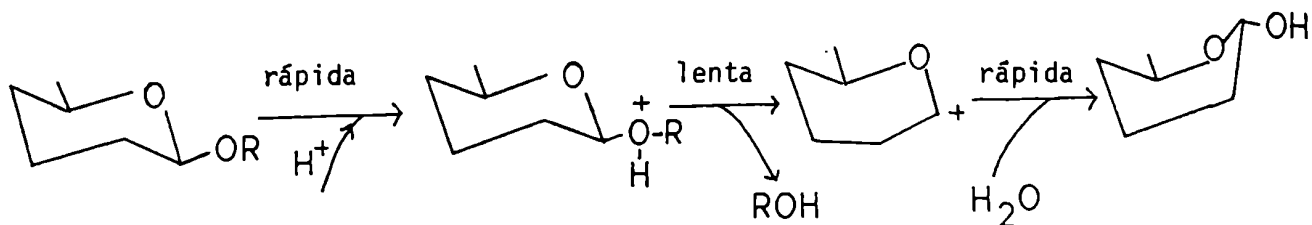
En los primeros estudios la obtención de 2,6-di-O-metilgalactosa a partir de los productos metilados de *Chondrus crispus*²² y *Gigartina stellata*²⁷ hicieron suponer que la unión estaba sobre O-3 y el sulfato en O-4 ya que éste era resistente a la hidrólisis alcalina. Tomando como antecedente el trabajo efectuado por Hassid³⁰, aquello fue confirmado por Percival, en 1950²³: se trató el polisacárido con ácido oxálico 0,1 N, a 100° y de ese modo se produjo una degradación parcial del producto, éste se tornó dializable y perdió al mismo tiempo un 25 % de su sulfato original; se obtuvo como producto de metilación e hidrólisis la 2,4,6-tri-O-metilgalactosa, lo cual confirmó lo antes postulado, es decir la unión en O-3 y el sulfato en O-4.

Poco después, en otro trabajo²⁴ se efectuó la acetólisis del carragenano de *Chondrus crispus*, obteniéndose un producto fuertemente degradado pero exento de sulfato. Se apreció que en ambos casos se produjo una gran proporción de ruptura de los enlaces glicosídicos, que representaba la fuerte competencia de estos métodos hidrolíticos.

Es así que se efectuaron algunos estudios cinéticos semicuantitativos para comparár las velocidades de hidrólisis de la unión glicosídica y del éster sulfato, y al mismo tiempo determinar la influencia de la posición de este último. Con respecto a este punto, Rees¹³³ comparó las velocidades de liberación de sulfato de algunos monosacáridos sulfatados con ácido clorhídrico 0,25 N a 100°, observando rápida liberación de los sulfatos unidos a oxhidrilos ecua-

toriales (2- y 3- para la galactosa), intermedia para los axiales (4-) y más lenta para los primarios (6-) permitiéndose así diferenciar el tipo de sulfato en un polisacárido con la realización de un estudio cinético.

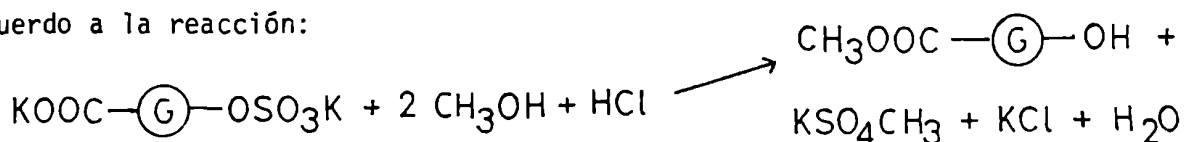
En otro trabajo¹³⁴ se demostró que la ruptura de las uniones glicosídicas es mayor que la hidrólisis de los sulfatos primarios, pudiéndose de ese modo obtener , por hidrólisis controlada (proceso inverso a la desulfatación) monosacáridos sulfatados. Al mismo tiempo¹³⁵ se midieron las velocidades de hidrólisis de varios metilglicósidos sulfatados y no sulfatados con ácido clorhídrico 1,5 N. Se observó que el metil-β-D-galactopiranosido se hidroliza cerca de ocho veces más rápidamente que su derivado sulfatado en 6- , mientras los metil-D-glucopiranosidos lo hacen tres veces más rápido que sus derivados sulfatados en 3- , lo que indica que esos grupos sulfato estabilizan las uniones glicosídicas de los azúcares a los que están esterificados, y que el efecto del 6-sulfato sería mayor que el del 3-sulfato. Ello puede justificarse por la formación de un ion carbonio en C-1 como paso determinante de la velocidad en las hidrólisis ácidas de glicósidos¹³⁶ , en cuyo caso se produce un cambio conformacional de la silla a semisilla^{137,138}:



y se sugirió que durante esta etapa los sustituyentes voluminosos que ocupaban posiciones ecuatoriales incrementan las interacciones estéricas y como consecuencia aumentan la estabilidad a la hidrólisis ácida, lo que ha sido comprobado con otros sustituyentes^{137,138} .

Un importante método de desulfatación, que ya había sido indirectamente sugerido en un trabajo anteriormente citado²³ fue utilizado por Kantor y

Schubert¹³⁹ para la condroitina-sulfato, empleando cloruro de hidrógeno metanólico. En este caso, se efectuó a temperatura ambiente y partiendo de un producto con 19,3 % de sulfato (como SO₃K) se llegó, mediante dos tratamientos con HCl 0,06 M a una muestra prácticamente exenta de azufre. Con dicho tratamiento los grupos carboxilo propios de ese polisacárido se metilaron de acuerdo a la reacción:



El rendimiento en producto desulfatado no dializable fue del 80 % y la recuperación del KSO₄CH₃ (pesado luego como sulfato de bario) del 90 %.

En ese trabajo, dado el buen rendimiento en producto no dializable se supuso que no existió una disminución significativa en la longitud de la cadena, pese a que el HCl metanólico se utiliza - a mayores concentraciones y temperaturas - para la metanólisis de polisacáridos; con éste método se mejoró sensiblemente la forma anterior de desulfatación de la condroitina, que era la acetólisis¹⁴⁰.

Este método fue utilizado por el grupo de Rees⁵², en 1965 para el λ-carragenano; debieron forzarse las condiciones y el tiempo de reacción, pero a partir de un producto con 31,1 % de SO₃ se obtuvo otro con un 2 % del mismo, con un 60 % de rendimiento, sin efectuar diálisis. Los espectros infrarrojo tomados en fases intermedias de la desulfatación demostraron que existe una rápida eliminación del sulfato ecuatorial seguida de una más lenta de los unidos a oxhidrilos axiales y primarios, tal como se había visto para los monosacáridos¹³³. El método, de cualquier modo, resultó fuertemente despolimerizante tal como lo demostró el alto porcentaje de 2,3,4,6-tetra-O-metilgalactosa obtenida por metilación e hidrólisis del λ-carragenano desulfatado. Los cálculos indican que se rompieron catorce de cada cien uniones glicosídicas; sin embargo lograron aislarse cantidades iguales de dos

unidades trimetiladas lo que evidenció que existía en el λ -carragenano la misma proporción de uniones (1 \rightarrow 3) y (1 \rightarrow 4); esos estudios, complementados con la metilación del carragenano intacto permitieron concluir con la estructura propuesta para el λ -carragenano⁵².

El método de desulfatación con cloruro de hidrógeno metanólico es evidentemente apropiado para polisacáridos del tipo de la condroitina, que al contener ácidos urónicos posee uniones sumamente difíciles de hidrolizar, por lo que la degradación es mínima. Es así que el método fue utilizado por Percival¹⁴¹ para el polisacárido del alga verde *Enteromorpha compressa* que contenía ramnosa (45 %), ácidos urónicos (18 %), cantidades menores de glucosa y xilosa, y sulfato (16 %, como SO₄). La acción de HCl metanólico 0,09 M ocasionó la producción de un polisacárido con 0,75 % de sulfato; en ese caso la presencia de ácidos urónicos provocaba una estabilización de las uniones glicosídicas.

El mismo método fue utilizado por el grupo de Nunn y Parolis⁸⁶ para el polisacárido del alga roja *Phyllimena cornea* denominado filimenano; se demostró en un posterior análisis por metilación⁸⁷ que dicho polisacárido era muy parecido al λ -carragenano en cuanto a la alternancia de uniones α -(1 \rightarrow 3) y β -(1 \rightarrow 4) entre unidades de D-galactosa, mostrando además trazas de xilosa y 3,6-anhidrogalactosa, aunque difiere fundamentalmente de los carragenanos por tener una alta proporción (\approx 25 %) de unidades de galactosa metiladas (fundamentalmente en 0-2, y en menor proporción en 0-4 y 0-6) en el polisacárido original. Su contenido de SO₄ era de 19,6 % y este producto fue desulfatado totalmente por la acción del HCl metanólico 0,15 M durante 48 horas, con excelente rendimiento; una concentración de reactivo 0,1 M hizo decrecer el contenido de sulfato al 8 % en 48 horas y al 4,7 % en 72 horas. Aquí si bien no existen ácidos urónicos el gran porcentaje de unidades metiladas

estabiliza las uniones glicosídicas^{137,138} y por ende no se produce degradación aparente.

Cerezo¹²⁴ también aplicó el método para un carragenano intermedio de *Gigartina skottsbergii*, pero la cantidad de sulfato llegó sólo a la mitad en el intento de obtener un buen rendimiento.

También se utilizó el cloruro de hidrógeno metanólico en el Instituto Zelinsky de Moscú, por el grupo que posteriormente comenzara a aplicar la desulfatación solvolítica. En el caso la aplicaron a un λ -carragenano de *Tichocarpus crinitus* (Gigartinales, Tichocarpaceae)⁷⁷. Para evaluar la posible destrucción del polímero se controló por filtración en geles de Sephadex, observando que se mantiene el pico principal en el producto desulfatado, pero acompañado de una extendida zona de fragmentos de menor peso molecular, lo que indica que la desulfatación estuvo acompañada de ruptura de las uniones glicosídicas (Fig. 8)

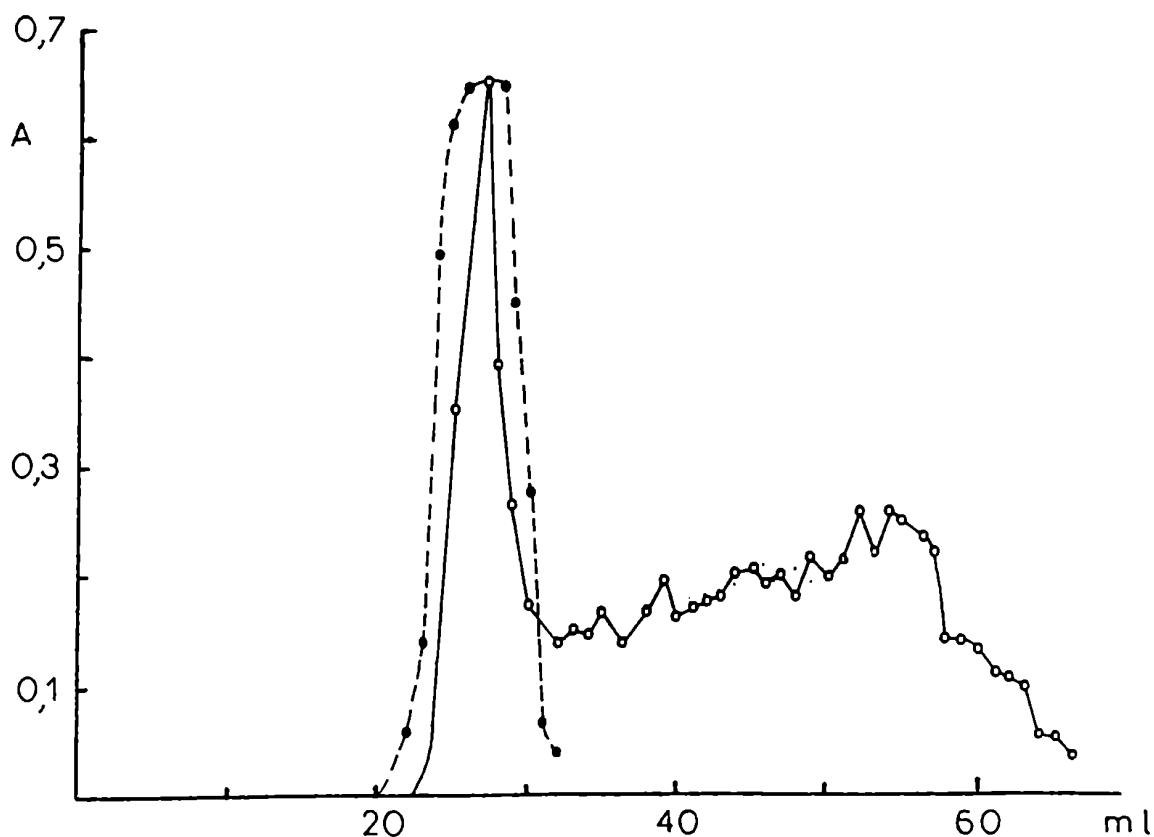


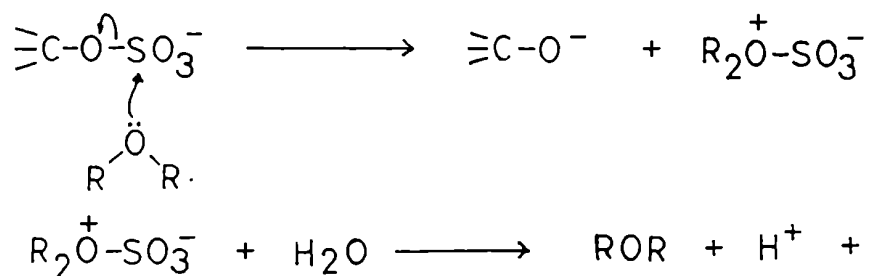
Fig.8 : Filtración en geles de Sephadex del λ -polisacárido (•-•-•) y su derivado desulfatado (○-○-○) en Sephadex G-75 (columna 65 x 1, KCl 1 M- Ref.77)

Los K-carragenanos o polisacáridos similares son imposibles de desulfatar por este método debido a la gran labilidad de la unión 3,6-anhidrogalactosídica.

DESULFATACION SOLVOLITICA

Vistos los inconvenientes que tenían las soluciones de HCl en metanol para eliminar los grupos sulfato, debido a la destrucción de la cadena polimérica, y luego de infructuosos trabajos con diferentes ácidos, se encaró la investigación hacia otros métodos. Es así que uno de los grupos del químico ruso Kochetkov, dirigido por Usov se abocó a estudiar la desulfatación por solvólisis, es decir por la acción de solventes orgánicos.

Tomaron como base la reversibilidad de la reacción del trióxido de azufre con monosacáridos en piridina¹⁴²; además, en 1957 algunos sulfatos de esteroide se habían sometido a solvólisis¹⁴³: se demostró que con los sulfatos de piridinio y potasio del colestano-3 β -ol y del colesterol se producía rápida solvólisis en dioxano aún a temperatura ambiente. En piridina, acetona o etanol la reacción era lenta, pero se completaba por calentamiento; la sal de piridinio era más efectiva que la de potasio; en cloroformo aún forzando las condiciones los sulfatos eran inertes. Cuando se probó la facilidad de solvólisis de esos esteroides utilizando distintos éteres como solvente se comprobó que la reacción disminuía en el orden: dioxano \approx tetrahydrofurano > éter etílico > éter isopropílico > anisol, es decir en orden decreciente de disponibilidad del par electrónico del oxígeno. De acuerdo a ello se postuló un mecanismo del tipo:



El mecanismo requiere cantidades equimoleculares de agua; los autores aclararon que si bien usaron solventes secos, no se tomaron precauciones para excluir trazas de agua.

Otro trabajo¹⁴⁴ describió el mecanismo y la cinética de esas solvólisis, pero con el sulfato en forma ácida; se comprobó que la reacción era de primer orden, por lo menos hasta el 70 % de iniciada; las determinaciones se hicieron en varios solventes (Tabla 8).

TABLA 8: Velocidades de la desulfatación solvolítica de la dehidroisoandrosterona sulfato de hidrógeno¹⁴⁴.

SOLVENTE	k (seg ⁻¹)	Temp. (°C)
Agua con HCl 2 N	muy chica	27
Etanol	3,2 x 10 ⁻⁶	26
Benceno + 10% etanol	5,1 x 10 ⁻⁵	26
Cloroformo + 10% etanol	8,0 x 10 ⁻⁶	26,5
Cloruro de metileno	1,2 x 10 ⁻⁴	26
Acetona	1,5 x 10 ⁻³	26
Eter etílico	2,1 x 10 ⁻³	27
Tetrahidrofurano (THF)	7,0 x 10 ⁻²	29
THF + 3% agua	3,4 x 10 ⁻⁴	26
THF + 6% agua	1,7 x 10 ⁻⁵	26

Puede observarse que un incremento en la polaridad provoca una disminución en la velocidad de reacción. En este caso los sulfatos están en su forma ácida, y al agregar piridina se observó un descenso de la velocidad debido a la formación de la sal.

El método se usó luego en sulfolípidos¹⁴⁵ calentando a éstos simplemente en dioxano. Se observó retención de la configuración, y se confirmó el esquema solvolítico antes postulado¹⁴³ favorecido además por la estabilidad del complejo dioxano-trióxido de azufre.

Con esos antecedentes el grupo antes mencionado se abocó en primer lugar a la desulfatación de monosacáridos sulfatados^{146,147}. Utilizaron como solventes dioxano, piridina y dimetilsulfóxido (Tabla 9), obteniendo los mejores

TABLA 9: Desulfatación solvolítica de monosacáridos sulfatados.

Azúcar reactante	Producto	Solvente	Rendimiento (%)
Metil-2,3,6-tri-O-benzoil- α -D-galactopiranosido-4-sulfato (sal de pirid.)	Metil-2,3,6-tri-O-benzoil- α -D-galactopiranosido	Dioxano	90
		Piridina	72
		DMSO	97
Metil-2,3,4-tri-O-acetil- α -D-glucopiranosido-6-sulfato (sal de piridinio)	Metil-2,3,4-tri-O-acetil- α -D-glucopiranosido	Dioxano	76
		Piridina	68
		DMSO	70
1,2:3,4-di-O-isopropiliden- α -D-galactopiranososa-6-sulfato (sal de bario) (sal de piridinio)	1,2:3,4-di-O-isopropiliden- α -D-galactopiranososa	Dioxano	74
		Piridina	27
		Dioxano	70
		Piridina	47

rendimientos por solvólisis en dioxano, tal como fue anticipado para los esteroides^{143,144}. El dimetilsulfóxido (DMSO) también da buenos resultados, mientras que en piridina la reacción ocurre dificultosamente. Es interesante destacar que no se destruyen grupos lábiles como el acetilo, benzoiilo o

isopropilideno. De todos esos datos dedujeron que el mejor medio para la eliminación del grupo sulfato en monosacáridos protegidos, solubles en dioxano, es trabajar en este solvente con la sal piridínica; como ésta es a veces de difícil obtención, los autores demostraron que agregando clorhidrato de piridina al medio de reacción, la desulfatación es activada, y los rendimientos son excelentes cualquiera sea el catión utilizado.

El método solvolítico, dado su éxito, se aplicó rápidamente a un polisacárido, en este caso el del alga roja *Laingia pacifica*^{146,68}. El estudio realizado fue bastante exhaustivo; se concluyó que no existe desulfatación en un medio heterogéneo: no varía la proporción de sulfato cuando el polisacárido es calentado en dioxano⁶⁸. Por otro lado, al trabajar en dimetilsulfóxido es efectiva la sal de piridinio pero no la de sodio. Aún en los casos en que la desulfatación es efectiva, la filtración en geles de Sephadex muestra que se produce una considerable ruptura de las uniones glicosídicas, la que se evita en gran parte cuando se agrega al medio de reacción un 2 % de piridina, pese a que en este caso la velocidad de solvólisis es menor. En la Tabla 10 pueden apreciarse los efectos de diferentes medios desulfatantes.

Los autores comprobaron⁶⁸ que una segunda solvólisis no reduce del todo el contenido de sulfato residual salvo que sea precedida por una reconversión del polisacárido a su sal de piridinio, en cuyo caso el sulfato baja hasta casi desaparición (Tabla 10, ítem 8). Se justificaría entonces la presencia de sulfato residual luego de la primera desulfatación por conversión incompleta del producto original a su sal piridínica por el tratamiento con intercambiador catiónico.

Por otra parte puede apreciarse en la Tabla 10 como en el polisacárido, rico en 3,6-anhidrogalactosa se destruye la tercera parte de este azúcar por tratamiento con HCl metanólico, mientras que permanece inalterado por desulfa-

tación solvolítica; lo mismo ocurre con la relación de los otros azúcares.

TABLA 10: Desulfatación solvolítica del polisacárido de *Laingia pacifica*⁶⁸.

MEDIO DE REACCION	CONDICIONES	R% ^a	SO ₄ ²⁻ %	3,6-a ^b %	G/M/X ^c
Polisacárido original	-	-	12	9	5,4:0,6:1
1. 0,09M HCl en metanol	sal de Na-20°-3x7 h.	40	1,2	3,6	4 :0,7:1
2. Dioxano	sal de Na ó Py-eb.	70	12	ND	ND
3. Dimetilformamida	sal de Py-100°-8 h.	80	4,1	ND	ND
4. Dimetilsulfóxido	sal de Na-100°-3 h.	75	12	ND	ND
5.	sal de Py-100°-4 h.	75	2,9	10,6	5,4:0,6:1
6. DMSO + 2 % piridina	sal de Py-100°-4 h.	90	3,2	ND	5,5:0,7:1
7. DMSO + 2 % piridina	sal de Py-100°-8 h.	86	1,4	9,5	5,9:0,7:1
8. DMSO + 2 % piridina	s.de Py de 6.-8 h.	80	0,28	ND	5,2:0,7:1

^a Rendimiento % . ^b 3,6-anhidrogalactosa. ^c Relación molar galactosa/2-0-metilgalactosa/xilosa.

Posteriormente, y a fin de evaluar mejor las condiciones de desulfatación, los autores rusos efectuaron un estudio con un dextrano sulfatado¹⁴⁸ por su accesibilidad y alto contenido de sulfato (48 %). En primer lugar estudiaron la metanólisis ácida (Tabla 11). Se encontraron con lo que ya conocían, es decir la tremenda ruptura de uniones glicosídicas que acompañó a la desulfatación cuando ésta se completó. Además se detectó la presencia en el hidrolizado de manosa y xilosa, azúcares que no estaban presentes originalmente lo que sugiere a los autores que el método tendría reacciones laterales; ya que el metanol no es un desulfatante efectivo^{143,144} los autores ensayaron

su reemplazo parcial por DMSO o dioxano (Tabla 11).

TABLA 11: Efecto de la metanólisis ácida en la desulfatación del dextrano sulfatado (HCl 0,2 M; cuatro tratamientos de 8 h c/u, a 20°).

SOLVENTE	SULFATO (SO ₄ %)	RENDIMIENTO (%)
Metanol	0,62	7,4
Metanol / dioxano (80:20)	25	32,6
Metanol / dioxano (50:50)	9,45	28
Metanol / dioxano (20:80)	29	33
Metanol / dioxano (4:96)	39	42
Metanol / DMSO (80:20)	7,08	32,4
Metanol / DMSO (50:50)	8,4	31,3
Metanol / DMSO (20:80)	18,7	24,3
Metanol / DMSO (4:96)	30	23,3

La variación de las proporciones metanol/dioxano y metanol/DMSO indica que al disminuir la proporción de metanol se produce un decremento en el proceso de desulfatación, pero al mismo tiempo se mantiene un nivel similar de degradación como lo mostró la cromatografía en geles de Sephadex.

Continuando su estudio los autores evaluaron la desulfatación del dextrano al calentarlo en dimetilsulfóxido, investigando la influencia del catión (sodio, cetavión, amonio o piridinio); esta última era la más efectiva en la desulfatación como se aprecia en la Tabla 12. Puede verse además que, en contraste con el polisacárido de *Laingia pacifica*, el dextrano se desulfata en forma de sal sódica, aunque con menor rendimiento. Por otra parte no es necesario convertir el polisacárido a su sal piridínica, ya que alcanza con

agregar clorhidrato de piridina o cloruro de amonio en cantidades equimolares al polisacárido; en cambio, la sal de cetavión es inerte a la desulfatación, aún en presencia de cloruro de amonio.

TABLA 12: Desulfatación del dextrano sulfatado con DMSO (100°, 10-15 hr)

SAL DE	SOLVENTE	AGREGADO	SULFATO (% SO ₄)		RENDIMIENTO %
			inicial	final	
Sodio	DMSO		48	11	29
Sodio	DMSO + 2% piridina		48	24	76
Sodio		Py.HCl	48	11	60
Sodio		NH ₄ Cl	48	12	54
Sodio		Et ₃ N.HCl	48	13	25
Piridinio			40	9,6	50
Amonio			49	9,7	32
Cetavión			20,6	21	73
Cetavión		NH ₄ Cl	20,6	19,3	43

Para favorecer la solubilidad del dextrano en dioxano, buen agente desulfatante de monosacáridos pero pobre para polisacáridos, se probaron las sales de trietil-, tri-n-butil- y tri-n-octilamonio de dicho dextrano. Las dos primeras no se disuelven en dioxano y no ocurre desulfatación; en cambio, la sal de trioctilamonio se "hincha" en dioxano, da buena desulfatación en condiciones suaves y excelente rendimiento, siendo la recomendada por los autores para productos naturales.

Matulewicz y Cerezo¹⁴⁹ utilizaron el método solvolítico para el carragenano de *Iridaea undulosa* (sal piridínica). Lo efectuaron en dimetilsulfóxido

con un 2% de piridina, es decir las mejores condiciones de Usov y col.¹⁴⁶.

La desulfatación total fue del 81 %, con un alto rendimiento (80 %) en 9 horas; un mayor calentamiento produjo despolimerización sin cambio de la composición. Los autores hicieron toma de alícuotas a distintos tiempos, y los datos analíticos para las mismas pueden observarse en la Tabla 13.

TABLA 13: Etapas en la desulfatación del carragenano de *Iridaea undulosa*.

TIEMPO (h)	SULFATO (SO ₄ %)	RENDIMIENTO (%)	[α] _D (°)	VISCOSIDAD RELATIVA	3,6-AHG % ^a
0	30,8		77,5	1,00	16,5
2,5	13,6	82,7	108,1	0,81	14,4
4,5	9,8	95,6	102,3	0,74	13,8
6,5	9,8	79,7	100,0	0,77	12,4
9	5,8	78,3	99,5	0,73	12,7
12	5,8	62,2	98,7	0,73	13,8

^aValores normalizados para el carragenano no sulfatado.

Se observa disminución de la viscosidad, pero no existe pérdida notoria de 3,6-anhidrogalactosa.

El método solvolítico ha sido poco usado por el momento pero aparece como promisorio para la complicada química estructural de los polisacáridos sulfatados.

APLICACIONES DE RESONANCIA
MAGNETICA NUCLEAR DE ^{13}C
A LA DETERMINACION DE LA
ESTRUCTURA DE POLISACARIDOS

INTRODUCCION

En los últimos años se han popularizado las aplicaciones de la espectroscopía de resonancia magnética nuclear de ^{13}C debido al amplio interés que presentaban y dada la comercialización de aparatos destinados a la misma (Bruker, de origen alemán ; JEOL japonés y Varian norteamericano), con generadores de pulso y computadores que ejecutan la acumulación de señales (FID) y producen la correspondiente transformada de Fourier.

Las aplicaciones a hidratos de carbono se vieron inmensamente facilitadas por los estudios sobre influencias estéricas en los desplazamientos de RMN de ^{13}C de ciclohexanos sustituidos¹⁵⁰⁻¹⁵³, inositoles¹⁵⁴ y las leyes generales para polioles¹⁵⁵⁻¹⁵⁷.

Los primeros estudios datan de 1969; Perlin¹⁵⁸ trabajó con glucosa enriquecida, y luego Hall y Jonson¹⁵⁹ interpretaron los espectros de casi todos los monosacáridos sencillos (con riqueza isotópica natural) y sus metilglicósidos, con lo que pudieron distinguir tres tipos de desplazamientos:

Del carbono anomérico	a δ 91-105 ppm.
De los carbonos con oxhidrilo secundario	a δ 67-77 ppm.
Del carbono con oxhidrilo primario	a δ 61-63 ppm.

En esos trabajos y otros posteriores^{160,161} se verificaron algunas regularidades en los desplazamientos producidos por anomerización y/o epimerización; más adelante se extendieron a otros cambios. Shashkov y Chizhov¹⁶² y Perlin¹⁶³ recopilaron los trabajos publicados hasta ese momento y efectuaron las siguientes generalizaciones:

- 1) La anomerización altera el δ del C-1 de la D-glucosa, galactosa, arabinosa y xilosa (en aproximadamente 4 ppm a campos más altos al pasar del anómero β al α), pero tiene poco efecto sobre el C-1 de D-alosa, manosa, lixosa y

ribosa.

- 2) La anomerización afecta más nítidamente a los desplazamientos de los carbonos 3 y 5 (por interacción 1,3-diaxial), menos al del carbono vecino C-2, y tiene muy poco efecto sobre los carbonos 4 y 6, más alejados. Es por eso que el δ del C-4 en hexosas, pentosas y sus glicósidos siempre aparece a 69-72,5 ppm.
- 3) Al pasar los azúcares libres a glicósidos, el C-1 se desprotege en algunas ppm. En este caso, la diferencia de desplazamiento entre los anómeros α y β permanece aproximadamente constante.
- 4) El reemplazo de un oxhidrilo ecuatorial en C-2 por uno axial (glucosa \rightarrow manosa), afecta la posición del C-1 de forma diferente: en el anómero α la inversión causa un desplazamiento a campos más bajos de 2 ppm; en el β el mismo corrimiento es hacia campos más altos. Perlin^{163,164} describió un método con el cual se pueden sumar contribuciones por epimerización y así calcular los δ de cada carbono.
- 5) Las furanosas muestran, en general, las señales a campos más bajos que las piranosas a ellas relacionadas.
- 6) La O-metilación provoca un desplazamiento hacia campos más bajos del carbono α de 7-11 ppm; los que poseen metoxilos axiales siempre se encuentran en un campo 3-4,5 ppm más alto que los ecuatoriales; el carbono β se desplaza cerca de 1 ppm a campos más altos si su oxhidrilo es ecuatorial igual que el metoxilo α , y 4-5 ppm si es axial. Si el metoxilo está en posición axial, su efecto sobre el carbono β es chico¹⁶⁴. El efecto γ es casi insignificante (0-0,3 ppm).
- 7) El reemplazo de una unión C-O por una C-H (desoxiazúcares) o C-C (azúcares ramificados) causa un marcado desplazamiento a campos más altos de la señal dada la menor electronegatividad de los átomos reemplazantes. Tanto

en los 2-desoxi como en los 6-desoxiazúcares el desplazamiento es de 38 a 45 ppm¹⁵⁹.

- 8) Las señales de carbonos unidos a amino o acetamido se desplazan a campos 15-20 ppm más altos que los del carbono oxhidrílico¹⁶⁵. El efecto β es de 2-3 ppm a campos más altos.

MONOSACARIDOS SULFATADOS

La influencia de la sulfatación fue estudiada en primer lugar por Honda y col.¹⁶⁶ y luego por otros¹⁶⁷⁻¹⁶⁹.

Los japoneses¹⁶⁶ compararon el espectro de la glucosa con los de sus derivados sulfatados en 3- y 6-. Allí comprobaron que el carbono cuyo oxhidrilo está sulfatado se desprotege en 8,5-9,5 ppm (3-0-sulfato) o en 6,5 ppm (6-0-sulfato). Los carbonos β y γ sufren una protección de 1,1-2,2 ppm en el primer caso y 0-0,3 ppm en el segundo, es decir que el efecto es similar al de la 0-metilación. Un grupo ruso¹⁶⁷ utilizó los espectros de RMN de ¹³C para confirmar la estructura de productos sintetizados como metil-3-0-metilmanopiranosidos sulfatados en 2- , 4- y 6- ; el canadiense Ragan¹⁶⁸ estudió la influencia de la sulfatación en fenoles, pero sin lugar a dudas el estudio más completo lo efectuó un grupo australiano¹⁶⁹ utilizando un método de desplazamiento isotópico diferencial (d.i.s.) inducido por deuterio desarrollado en 1979 a fin de facilitar las asignaciones¹⁷⁰. Analizaron los espectros de los 2- , 3- , 4- y 6- 0-sulfatos de D-glucosa y D-galactosa, del 2,3,4,6-tetra-0-acetil- β -D-glucosa 1-sulfato y de 2-acetamido-2-deoxi-D-glucosa 6-sulfato. Los desplazamientos de los derivados de la galactosa pueden observarse en la Tabla 14.

TABLA 14: Desplazamientos químicos^a de RMN de ¹³C de los derivados sulfatados de la D-galactosa.

AZUCAR	CARBONO					
	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6
α-D-galactosa 2-sulfato	91,3(-1,8)	76,6(+7,4)	68,0(-2,0)	70,3(+0,2)	71,2(+0,1)	61,9(-0,1)
β-D-galactosa 2-sulfato	95,7(-1,6)	81,0(+8,2)	72,6(-1,1)	69,7(+0,1)	76,0(0)	61,7(-0,1)
α-D-galactosa 3-sulfato	93,1(0)	67,2(-2,0)	78,5(+8,5)	68,5(-1,7)	71,0(-0,3)	61,8(-0,2)
β-D-galactosa 3-sulfato	97,0(-0,3)	70,7(-2,0)	81,2(+7,6)	67,8(-1,7)	75,5(-0,4)	61,7(-0,1)
α-D-galactosa 4-sulfato	93,0(-0,1)	69,3(+0,1)	69,0(-1,0)	78,5(+8,3)	70,7(-0,6)	61,9(-0,1)
β-D-galactosa 4-sulfato	97,2(-0,1)	72,8(+0,1)	72,6(-1,0)	77,5(+7,9)	75,1(-0,9)	61,8(0
α-D-galactosa 6-sulfato	93,2(+0,1)	69,1(-0,1)	69,8(-0,3)	69,9(-0,2)	69,1(-2,2)	68,5(+6,5)
β-D-galactosa 6-sulfato	97,3(0)	72,6(-0,1)	73,4(-0,2)	69,4(-0,2)	73,5(-2,4)	68,1(+6,3)

^a En ppm respecto del tetrametilsilano, en solución acuosa; entre paréntesis se dan las diferencias con respecto a la correspondiente galactosa no sulfatada (valores positivos indican campos más bajos).

Se observó que los sulfatos sobre 0-3 y 0-4 causan un mayor desplazamiento (7,1-9,4 ppm) sobre el carbono α , mientras que el efecto del sulfato sobre C-6 es menor (6,3-6,6 ppm). En cambio, el compuesto sulfatado en 1-, sólo presenta un desplazamiento de su carbono α de 2,3 ppm lo que se explicó por el diferente entorno hallado. La influencia sobre el carbono β se encuentra dentro de lo antes expresado: entre 1 y 2,5 ppm, pero en general cerca de 1,5 ppm a campos más altos. Crece levemente en los compuestos sulfatados en 6- y desciende a 0,6-1 ppm cuando se trata de la galactosa 4-sulfato, que contiene ese grupo axial (Tabla 14).

APLICACION A OLIGOSACARIDOS

Las primeras aplicaciones a oligosacáridos fueron efectuadas paralelamente por distintos grupos, cerca de 1971. Se interpretaron los espectros de sacarosa, turanosa, melecitosa, estaquiosa¹⁷¹⁻¹⁷³, celobiosas, lactosas, maltosas y sus metilglicósidos y octaacetatos¹⁷⁴, trehalosa, melibiosa^{175,176} y ciclodextrinas¹⁷⁷.

Se supuso que la glicosilación afecta a la señal del mismo modo que la metilación, y que aquella no afecta a los carbonos en γ ó δ respecto de la unión glicosídica.

La comparación de los oligómeros con derivados metilados fue llevada a cabo por Usui y col.^{178,179} quienes estudiaron los espectros de glucobiosas, glucotriosas y glucanos y los compararon con los de glucopiranosas metiladas en distintas posiciones, equivalentes a la otra unidad. Para los disacáridos concluyeron las siguientes reglas:

- 1) La señal de C-1 de la unidad reductora se encuentra en el mismo campo que la correspondiente piranosa, salvo en disacáridos 1→2 (kajibiosa y

- soforosa), donde el efecto β difiere entre glicosilación y metilación.
- 2) La señal de C-1' (no reductora) con unión α , resuena a 97,5-101 ppm, y con unión β a 104-105 ppm. En las α,α - y β,β - trehalosas (unión 1 \rightarrow 1) los δ son 94,8 y 100,7 ppm respectivamente, es decir que la diferencia entre ambas se mantiene.
 - 3) Es sabido que la metilación de oxhidrilos causa una desprotección de 7-11 ppm a los carbonos α , ubicando las señales de C-2, C-3 ó C-4 en la zona de 80-87 ppm; estas reglas se mantienen para las glucobiosas: si el monosacárido unido lo hace por enlace β el corrimiento es análogo a la metilación; si fuera α el desplazamiento químico del carbono correspondiente (C-2, 3, 4 ó 6) sufre un corrimiento a campos más altos de 1,5 a 5 ppm al comparar con los correspondientes éteres.
 - 4) Los desplazamientos de los carbonos de la unidad reductora no enlazados coinciden con los de los éteres metílicos, habiéndose observado pequeñas diferencias para el carbono β a la unión por distinto efecto de metoxilo y glicosilo.
 - 5) Los desplazamientos de los carbonos C-2' — C-6' de la unidad no reductora son comparables a los de los correspondientes metilglicósidos.

APLICACION A POLISACARIDOS

La espectroscopía de RMN de ^{13}C de polisacáridos resultó desde el comienzo la más complicada, aún considerando la solución del problema inverso, o sea la asignación de líneas del espectro de un polisacárido de estructura conocida. Además, el ensanchamiento de señales debido a la viscosidad de la solución jugó un rol fundamental, pese a la variedad de desplazamientos; por otra parte se produce otro tipo de ensanchamiento de las señales debida a la

inhomogeneidad conformacional de la cadena produciéndose una "dispersión" (spreading-out) de las señales de carbonos monotípicos. Todos esos aspectos hacen que en algunos casos se dificulte el análisis de líneas de la zona donde resuenan los carbonos no anoméricos ni enlazados, llegando - para polímeros de baja regularidad - a una amplia zona no resuelta, similar a la región metilénica en RMN protónica de esteroides¹⁶².

En algunos casos, el espectro sólo presenta utilidad en la zona del carbono anomérico o los carbonos enlazados donde la resolución es suficiente aún cuando las líneas sean anchas. En cambio, el espectro de polisacáridos altamente regulares es relativamente sencillo; incluso, en cierto sentido, es menos complejo que el de di- u oligosacáridos pues no se complica por las señales del extremo reductor.

Como modelos para la interpretación se utilizan monosacáridos metilados y oligómeros de estructura relacionada; los primeros estudios fueron realizados por el canadiense Gorin¹⁸⁰⁻¹⁸². En algunos casos, con polímeros poco solubles es preciso degradar previamente enzimática o químicamente la muestra, dada la alta concentración requerida; de cualquier modo, es imprescindible una gran acumulación de pulsos para lograr un buen espectro, y en gran parte de los casos éste se favorece por calentamiento a fin de disminuir la viscosidad. Gorin¹⁸³ recopiló todo lo concerniente a aplicaciones a polisacáridos hasta 1979.

Se han efectuado numerosos estudios con dextranos unidos en distintas posiciones, pululanos, mananos lineales y ramificados, glicomananos diversos, galactofurananos, heparinas y condroitinas, polisacáridos sulfatados de algas (ver más adelante), glucanos fosforados, ácidos teicoicos, polisacáridos que contenían ácido siálico y 3-desoxi-octulosilónico (KDO), ácido algínico, xilanos, etc.

También se estudiaron derivados sintéticos solubles en solventes orgánicos, como acetatos y éteres metílicos o bencílicos¹⁸³. En gran parte de los casos se han resuelto problemas que antes eran de difícil solución, ya que puede detectarse rápidamente la presencia de grupos poco comunes (acetatos, fosfatos, metilos, sulfatos, carboxilatos, carbonos aldehídicos, etc.).

APLICACION A CARRAGENANOS Y COMPUESTOS SIMILARES

Hasta 1977 (salvo una breve mención previa¹⁸⁴) no se habían efectuado estudios de RMN de ¹³C de galactanos sulfatados de algas rojas. Simultáneamente dos grupos, uno ruso y otro canadiense iniciaron su tarea.

El primer aporte fue efectuado por Usov y col.¹⁸⁵ al registrar y comparar el espectro del metil-3,6-anhidro- α -D-galactopiranosido y sus 2-O-metil-, 4-O-metil y 2,4-di-O-metil éteres, todo ello fundamental punto de partida para la interpretación de los espectros de esos galactanos. En todos los casos el carbono anomérico apareció cerca de 99 ppm y el C-6 se desplazó cerca de 70 ppm.

Luego vinieron los trabajos de aplicación directa. El grupo ruso⁸¹ logró obtener, tras numerosísimas dificultades técnicas relacionadas con la capacidad de los galactanos sulfatados de gelificar, los espectros de agarosa, un odontalano y dos K-carragenanos provenientes de distintas fuentes. Como se sabe, la agarosa presenta una estructura alternante de unidades de β -D-galactopiranosida unida en 3- y 3,6-anhidro- α -L-galactosa unida en 4; el odontalano difiere por estar sulfatado en el O-4 y metoxilado en algunos C-6 de la unidad de galactosa.

El K-carragenano, en cambio, también está sulfatado en 4- pero no presenta unidades metiladas y la 3,6-anhidrogalactosa es de configuración D.

Se distinguieron tres regiones del espectro: A(100-105 ppm) del C-1 de la galactosa; B (92-99 ppm) del C-1 de la 3,6-anhidrogalactosa , y C (55-62 ppm) con los C-6 de la galactosa y los carbonos metoxílicos (Tabla 15).

TABLA 15: Picos característicos en los espectros de RMN de ^{13}C de algunos polisacáridos de algas.

POLISACARIDO	REGION ESPECTRAL		
	A	B	C
Agarosa	102,3	98,2	61,3
Odontalano	102,4	98,3 y 96,6	59,0
K -carragenano ^a	102,5	95,1 y 94,6	61,3
K -carragenano ^b	102,6	95,1 y 94,6	61,2

^a De *Tichocarpus crinitus* . ^b De *Phyllophora nervosa*.

Como se observa, en la región A no existe mayor variación. En la B, en cambio, a 98,2 ppm aparece la señal característica del carbono anomérico de la 3,6-anhidro- α -L-galactosa. En el espectro del odontalano se agrega otra señal a 96,6 ocasionada por la influencia del sulfato de la unidad vecina; los dos picos de la región B del K-carragenano también coinciden con el carbono anomérico de las unidades de 3,6-anhidro- α -D-galactosa unidas a galactosa sulfatada y sin sulfatar. La región C muestra en tres casos el pico característico del carbono unido a oxhidrilo primario; el del odontalano, en cambio exhibe a 59,0 ppm el carbono metoxílico, y a consecuencia de esa metoxilación hay un neto desplazamiento del C-6 a otras regiones del espectro.

El grupo canadiense de Yaphe, en primer lugar analizó los espectros de los oligosacáridos obtenidos por hidrólisis enzimática de agarosa¹⁸⁶, y luego¹⁸⁷ los de ágar, K-carragenano e λ -carragenano, pero tomando en cuenta

únicamente las señales correspondientes al carbono anomérico. Para el ágar las señales aparecieron a 103,4 y 99,2 ppm; para el K-carragenano a 103,4 y 96,2 ppm; para un K-carragenano parcialmente desulfatado a 103,6 , 96,1 y 95,6 ppm y para el L-carragenano a 103,2 y 93,1 ppm. Como se aprecia hay una diferencia de ~ 1 ppm con el trabajo del grupo ruso; ello fue posteriormente adjudicado⁸³ a diferentes métodos de cálculo por la utilización de TMS como standard interno o externo.

Prosiguiendo con sus estudios, el grupo ruso efectuó un análisis más detallado de los espectros de polisacáridos de la familia del ágar¹⁸⁸ y también de la del K-carragenano⁸²: se estudiaron K- y L-carragenanos con distintas irregularidades, asignándose todos los picos. También se determinaron las estructuras de algunos otros galactanos con estructuras no aclaradas hasta entonces. Todos estos trabajos se hicieron en soluciones al 5 % en agua deuterada, pero calentando a 80 ó 95° para disminuir la viscosidad.

Otra importante contribución estuvo dada por la aplicación del método al estudio estructural de un galactano sulfatado de *Grateloupia divaricata*⁷⁴ con cantidades insignificantes de 3,6-anhidrogalactosa. Ya se había demostrado químicamente^{72,73} que la molécula de ese polisacárido presenta una estructura alternante de unidades $\alpha(1\rightarrow3)$ - y $\beta(1\rightarrow4)$ -galactosa; la unidad 3-O-sustituída es D-galactosa, y la 4-O-sustituída es en algunos casos D- y en otros L-galactosa; dichas unidades se encuentran sulfatadas en distintas posiciones. Se combinan así las características del ágar y el carragenano.

Es así que se separaron por acetólisis del galactano cinco oligosacáridos que se utilizaron como compuestos modelo, y al adjudicar las señales se observó que el desplazamiento químico de la señal de C-1 no sólo dependía de la configuración del centro glicosídico y la posición de la unión con la unidad vecina sino también de la configuración absoluta de ambas unidades;

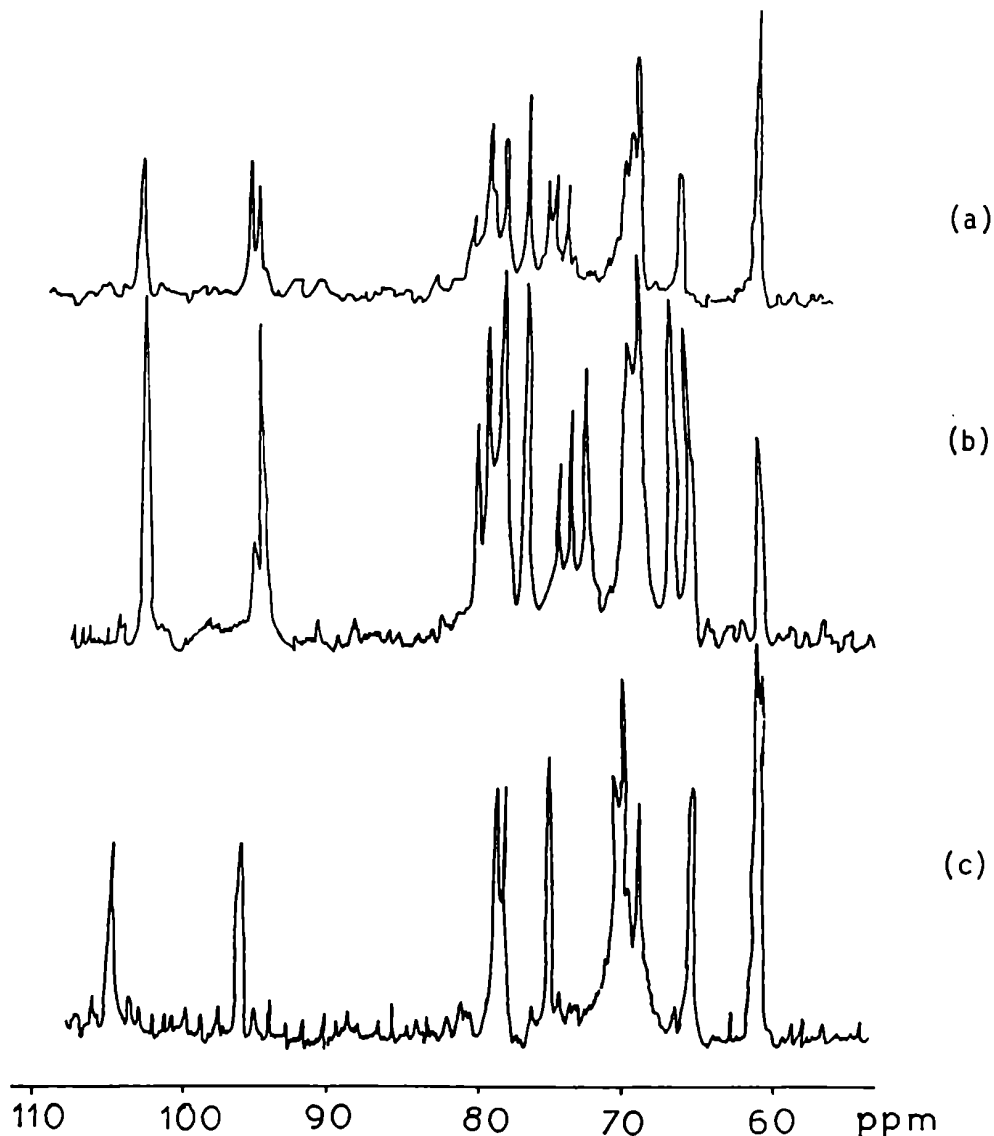


Figura 9. Espectros de RMN de ^{13}C del κ -carragenano de *Tichocarpus crinitus* (a), κ -carragenano de *Phyllophora nervosa* (b) y λ -carragenano desulfatado.

estos estudios permitieron la interpretación completa del espectro del galactano desulfatado. Se observaron cuatro señales anómericas y de su integración se dedujeron las características principales del producto. El espectro del polisacárido sulfatado es bastante más complicado, debido a la presencia de grupos sulfato ocupando diferentes posiciones, y también por la xilosa y 3,6-anhidrogalactosa (que eran destruidas en la desulfatación).

La región anomérica puede interpretarse, pero la de los C-2—C-6 es de imposible interpretación. En la figura 9 se observan algunos espectros característicos.

Otro trabajo de un grupo australiano¹⁸⁹ interpretó los espectros de carrabiosa y agarobiosa, es decir los disacáridos formados por hidrólisis controlada de K-carragenano y ágar, respectivamente.

Usov y col. resumieron⁸³ posteriormente todo lo realizado en espectroscopía RMN de ¹³C de galactanos de algas rojas. Allí se desarrollaron los espectros de varios tipos distintos de polisacáridos de ese origen, tanto de las familias del ágar y porfirano (con unidades L-) como de la familia de los carragenanos; los valores principales de δ para cada tipo de unidad se pueden encontrar en la Tabla 16.

Puede apreciarse que los desplazamientos químicos de los carbonos de la unidad en estudio están influenciados por las unidades que la preceden y suceden en la cadena. Por ejemplo, el C-4 de la galactosa 4-sulfato sufre un corrimiento de 2 ppm al estar sulfatado el O-2 de la unidad 3,6-anhidrogalactosídica precedente, posiblemente por interacción entre ambos sulfatos. Las estructuras híbridas κ - ι , muy comunes en la naturaleza pueden reconocerse y caracterizarse por sus espectros, por integración de los picos a 95,1 y 92,1 ppm. Otros híbridos encontrados aúnan estructuras de K-carragenano y su derivado desulfatado; el furcelarano sería un triple híbrido entre ι -, κ - y K-carragenano desulfatado. Los λ -carragenanos solamente pudieron dar buenos espectros al estar desulfatados (fig. 9 c).

El análisis del espectro del 'K-carragenano' de *Phyllophora nervosa* permitió detectar algunas peculiaridades interesantes de la estructura del polisacárido⁸² (fig. 9 b). Si bien una serie de señales concuerda con las del K-carragenano (fig. 9a) o su derivado desulfatado, se observó un

TABLA 16. Desplazamientos químicos de ^{13}C en algunos carragenanos (Ref. 82 y 83).

UNIDAD ^a	CARBONO					
	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6
A	102,5 (103,4) ^b	69,9	78,8	74,0	74,8	61,3
B	102,3 (103,2)	70,0	78,8	72,0	74,8	61,3
C	102,3	70,0	78,8	74,0	74,8	61,3
D	102,6	69,9	80,2	66,0	73,0	67,1
E	102,5 (103,6)	70,2	80,4	66,3	75,3	61,3
F	104,8	70,6	79,0	65,7	75,4	61,2
G	96,2	69,2	70,9	78,5	70,6	61,5
H	95,1 (96,2)	69,7	78,3	79,1	76,8	69,4
I	94,6 (95,6)	69,9	78,1	79,3	76,8	69,5
J	95,1 (96,1)	69,9	78,1	79,3	76,8	69,5
K	94,6	69,7	78,4	79,4	76,8	69,4
L	95,1	69,7	78,4	79,4	76,8	69,4
M	92,1 (93,1)	75,4	77,9	79,1	76,8	69,4

^aCada letra corresponde a la unidad en estudio que se indica en la página siguiente ^bLos datos entre paréntesis corresponden a las asignaciones de Yaphe y col. (ref.187)

TABLA 16 (Continuación)

LETRA	UNIDAD			POLISACARIDO
	EN ESTUDIO	PRECEDENTE	POSTERIOR	
A	→3)-β-D-Gal 4-sulfato (1→	3,6-α-D-AHG (1→	→4)-3,6-α-D-AHG	κ-carragenano
B	→3)-β-D-Gal 4-sulfato (1→	3,6-α-D-AHG 2-S (1→	→4)-3,6-α-D-AHG ó →4)-3,6-α-D-AHG 2-S	ι-carragenano o híbrido ι-κ
C	→3)-β-D-Gal 4-sulfato (1→	3,6-α-D-AHG (1→	→4)-3,6-α-D-AHG 2-S	Híbrido ι-κ
D	→3)-β-D-Gal 6-sulfato (1→	3,6-α-D-AHG (1→	→4)-3,6-α-D-AHG	κ - de <i>P.nervosa</i>
E	→3)-β-D-Galactosa (1→	3,6-α-D-AHG (1→	→4)-3,6-α-D-AHG	κ-carrag. desulf.
F	→3)-β-D-Galactosa (1→	α-D-Galactosa (1→	→4)-α-D-Galactosa	λ-carrag. desulf.
G	→4)-α-D-Galactosa (1→	β-D-Galactosa (1→	→3)-β-D-Galactosa	λ-carrag. desulf.
H	→4)-3,6-α-D-AHG (1→	β-D-Gal-4-S (1→	→3)-β-D-Gal-4-S	κ-carragenano
I	→4)-3,6-α-D-AHG (1→	β-D-Gal (1→ ó β-D-Gal-4-S (1→	→3)-β-D-Gal	κ-carrag. total o parc. desulfatado
J	→4)-3,6-α-D-AHG (1→	β-D-Gal (1→	→3)-β-D-Gal-4-S	κ-carr. parc. desulf.
K	→4)-3,6-α-D-AHG (1→	β-D-Gal-6-S (1→	→3)-β-D-Gal-6-S	κ - de <i>P.nervosa</i>
L	→4)-3,6-α-D-AHG (1→	β-D-Gal-6-S (1→	→3)-β-D-Gal-4-S	κ - de <i>P.nervosa</i>
M	→4)-3,6-α-D-AHG 2-sulfato (1→	β-D-Gal-4-S (1→	→3)-β-D-Gal-4-S	ι-carragenano

desdoblamiento de la señal correspondiente a C-6; la comparación de intensidades permitió concluir que la mayoría de las unidades de β -D-galactopiranosas estarían sulfatadas en C-6, y una menor proporción en C-4, mientras que estarían ausentes las 4,6-disulfatadas o las no sulfatadas. Esta distribución de sulfatos es completamente inusual en carragenanos.

Un trabajo francés más reciente¹⁹⁰ efectuó un estudio sobre lo que ellos llaman "precursores biológicos" de carragenanos, que no son más que fracciones purificadas de los carragenanos de *Eucheuma spinosum*, *Eucheuma cottonii*, *Chondrus crispus*, *Gigartina stellata*, *Ahnfeltia concinna* y *Ahnfeltia gigartinoides*. Efectuaron los espectros de todos esos productos antes y después del tratamiento alcalino, obteniendo con ello información sobre el tipo de precursor presente en cada carragenano.

En conclusión, la resonancia magnética nuclear de ^{13}C permite determinar estructuras básicas de galactanos de algas rojas por un método no degradativo.

Capítulo VI

USO DE LOS ALDONONITRILOS
ACETILADOS EN LOS
ESTUDIOS ESTRUCTURALES
DE POLISACARIDOS

RESEÑA HISTORICA

Con el avance de las técnicas de cromatografía gaseosa en los laboratorios, comenzó la búsqueda de derivados apropiados para los hidratos de carbono, que tuvieran la suficiente volatilidad como para ser utilizados en esos sistemas; para ello había que proteger los oxhidrilos libres. Los sistemas a resolver eran de dos tipos: por un lado mezclas de monosacáridos diferentes, provenientes de hidrolizados de heteropolisacáridos o polisacáridos complejos, y por el otro lado mezclas de derivados O-metilados, obtenidos por permetilación de polisacáridos y posterior hidrólisis con el objeto de adquirir información estructural de los polímeros.

Se ha pretendido utilizar varios derivados de azúcares, entre ellos los acetatos¹⁹¹, trifluoroacetatos^{191,192}, isopropilidén-acetales¹⁹³, butanoboronatos¹⁹⁴, y fundamentalmente los derivados trimetilsililados de los azúcares^{195,196}, de sus metilglicósidos¹⁹¹ o alditoles^{191,197}. Dichos métodos tienen la desventaja de dar cromatogramas complejos, ya que algunas sustancias suelen dar más de un pico debido a diferentes configuraciones anoméricas y/o distintas formas cíclicas; en ciertos casos son difíciles de preparar y/o inestables. Todos esos problemas se solucionaron con el advenimiento de los acetatos de alditol¹⁹⁷⁻¹⁹⁹, método que fue mejorado por Albersheim y col.²⁰⁰ para hidrolizados de paredes celulares vegetales, para lo que recomendaron el uso de una columna cromatográfica de 0,2% de poli(succinato de etilenglicol), 0,2% de poli(adipato de etilenglicol) y 0,4% de silicona XF-1150 en Gas-Chrom P. Los acetatos de alditol también fueron utilizados con éxito por el grupo sueco de Lindberg^{201,202} para la separación de metiléteres provenientes de la hidrólisis de polisacáridos permetilados. Estos trabajos fueron complementados con estudios de fragmentación por espectrometría de masa por

impacto electrónico (e.m.-i.e.)²⁰³⁻²⁰⁷. Debido a la extensión de los estudios el método fue rápidamente aceptado y es el más comunmente utilizado hoy en cromatografía gas-líquido (c.g.l.) de hidratos de carbono. Sin embargo, presenta una limitación ocasionada por la simetría de la molécula del alditol; así, por ejemplo, la 3-0-metilgalactosa y la 4-0-metilgalactosa dan por reducción el mismo alditol, al igual que la 2,3-di-0-metilxilosa y la 3,4-di-0-metilxilosa; se requiere entonces el uso del borodeuteriuro de sodio para la reducción de las aldosas obtenidas para diferenciarlas por e.m.

La preparación de los alditoles acetilados lleva algún tiempo, pese a la sencillez del método. El paso de reducción se efectúa rápidamente, pero luego hay que destruir el exceso de borohidruro de sodio, mediante el uso de resina ácida y/o ácido acético. Tras la evaporación del agua, debe eliminarse el ácido bórico formado pues interfiere en el posterior paso de acetilación; ésto se efectúa mediante consecutivos agregados y evaporaciones de metanol (x 5), para eliminarlo en forma de borato de metilo, volátil. Recién luego de llevado a seco se deja en desecador de vacío y posteriormente se acetila.

Lance y Jones²⁰⁸ superaron las dificultades provenientes de la simetría del alditol preparando, para una serie de metiléteres de D-xilosa, los acetatos de los D-xilononitrilos parcialmente metilados. En el método de preparación simplemente hay que producir la oxima y luego, en un solo paso en el mismo frasco de reacción, ésta se deshidrata y se acetilan los oxhidrilos libres por calentamiento con anhídrido acético y piridina. El método permitió separar casi todos los metiléteres de xilosa utilizados (Tabla 17). En el mismo trabajo los autores²⁰⁸ prepararon en gran escala el derivado de la 2-0-metilxilosa (3,4,5-tri-0-acetil-2-0-metil-D-xilononitrilo), probaron su estructura por resonancia magnética nuclear y demostraron su estabilidad al calentamiento a 190°C.

TABLA 17. Separación de los metiléteres de D-xilosa como aldononitrilos acetilados.

D-XILOSA		TIEMPO DE RETENCION ^a
O-metilo en	O-acetilo en	
2,3,5-	4-	0,345
2,3,4-	5-	0,394
2,5- y 3,5-	3,4- y 2,4-	0,650
2,4-	3,5-	0,743
3,4- y 2,3-	2,5- y 4,5-	1,00
4-	2,3,5-	1,55
2-	3,4,5-	1,64
3-	2,4,5-	2,07

^aRelativo al 2,5-di-O-acetil-3,4-di-O-metil-D-xilononitrilo, en LAC-4R-886 al 10%, isotérmica a 200°.

La facilidad de preparación del derivado, su alta estabilidad y las ventajas separativas que presentaba dieron lugar a nuevos trabajos sobre el tema.

Se los utilizó para identificar un hidrolizado de pulpa de madera²⁰⁹ y en la demostración de la existencia natural de metiléteres de xilosa²¹⁰ y galactosa²¹¹ en vegetales.

En 1971, Kochetkov y col.²¹² informaron la separación de una mezcla que contenía los principales monosacáridos en forma de sus aldononitrilos acetilados, y efectuaron un estudio por e.m.-i.e. de algunos glicononitrilos acetilados parcialmente metilados, y los consideraron aptos para la identificación espectrométrica, aunque no informaron los tiempos de retención de c.g.l. Estos fueron proporcionados posteriormente por Kováč y col.²¹³. Otros grupos informaron sobre derivados de monosacáridos sencillos, tanto en cuanto a separación²¹⁴

como a su fragmentación²¹⁵, sugiriendo en este último caso rutas de ruptura mediante marcación con deuterio. Otro grupo ruso informó de la separación y principales características espectrales de aldononitrilos derivados de metiléteres de xilosa, arabinosa²¹⁶ y 6-desoxiazúcares²¹⁷.

En una importante contribución a la e.m. de derivados metilados de los manonitrilos acetilados, Seymour y col.²¹⁸ informaron la separación de los di-, tri- y tetrametiléteres de D-manopiranosas por c.g.l. Por introducción de grupos trideuterometilo, se identificaron fragmentos constituyentes de los espectros de masa, que permitieron relacionarlos con las estructuras originales.

En otro trabajo posterior²¹⁹, también aplicado a derivados de D-manosa, se informó su separación y algunas características espectrales, pero empleando también derivados metilados de la forma furanósica de ese azúcar en adición a los piranósicos ya conocidos²¹⁸.

En estos trabajos se acortó notablemente el tiempo de reacción sugerido por Lance y Jones²⁰⁸ para la formación de los aldononitrilos, como sugirió Kochetkov²¹²; Seymour y col.²¹⁸ mejoraron la calidad del cromatograma por extracción clorofórmica del derivado y lavado con agua del extracto; en otro trabajo²²⁰ se sugirió un lavado con HCl 3 M, posteriormente agua, solución saturada de NaCO₃H y nuevamente agua para completar la eliminación de piridina y anhídrido acético. Posteriormente^{221,222} se sugirió el uso de 1-metilimidazol en reemplazo de la piridina como catalizador y solvente en la formación de la oxima y acetilación; de ese modo se acortó notablemente el tiempo de reacción (10 minutos en total) y se bajó - al mismo tiempo - la temperatura de trabajo.

En los últimos trabajos^{221,223} se utilizaron técnicas de espectrometría de masa por ionización química (e.m.-i.q.), que permiten indicar el peso molecular del derivado y la cantidad de oxhidrilos acetilados y metilados que posee.

En un extenso trabajo, Seymour y col.²²³ informaron la separación de distintas aldosas derivatizadas como aldonitrilos, algunas conteniendo grupos acetamido, amino, desoxi o tío, en diversas columnas; pudieron resolver todas las familias de compuestos estudiadas, salvo los pares ribosa-fucosa y manosa-talosa. Los autores intentaron correlacionar la configuración de las moléculas con el tiempo de retención; a igualdad de número de acetoxilos presentes, ordenaron los azúcares de acuerdo a la cantidad de pares de acetoxilos *cis* en la fórmula de Fischer de la molécula. Así, para las aldohexosas, la alosa tiene 3 pares, altrosa, manosa y talosa 2, glucosa, gulosa y galactosa 1 y la idosa ninguno; se observó que a mayor cantidad de esos pares, menor era el tiempo de retención, lo cual se adjudicó a que los acetoxilos *cis* promueven un enroscamiento (*twist*) de la cadena carbonada principal, la molécula tiene una forma menos lineal en la cual los acetatos están menos expuestos y por ende, es menor el tiempo de retención.

Además los acetoxilos pueden reemplazarse por grupos más polares que aumentan el tiempo de retención (p.ej. un acetamido) o por grupos menos polares que los disminuyen (p.ej. un desoxi); también aclaran que el efecto de un grupo desoxi terminal hace disminuir mucho más el tiempo de retención que un grupo no terminal (2-desoxi); incluso sugieren aditividad de los efectos.

Este fue el primer trabajo que intentó correlacionar los tiempos de retención con las configuraciones; los hechos experimentales no parecen contradecir lo esbozado. Sin embargo Seymour no relaciona los t_r con las conformaciones, que son las que tienen verdadero sentido físico. Como se sabe, los pares *cis* en la proyección de Fischer suelen ocupar una posición *anti* en la conformación preferida de la molécula, que en el caso de los manono- y galactonitrilos es planar, en zig-zag y extendida para la cadena carbonada, mientras que en el gluconitrilo hay una pequeña desviación de esa conformación²²⁴.

Los autores no explican, entonces, cual es el efecto de esos grupos

anti en la disminución del tiempo de retención.

ESPECTROMETRIA DE MASA DE LOS ALDONITRILOS ACETILADOS Y DE SUS DERIVADOS

METILADOS

Como se expuso anteriormente, se han analizado los espectros de masa de varios derivados metilados de los aldononitrilos acetilados. Es muy fácil además, correlacionar algunas de esas rupturas con las de los alditoles acetilados, que han sido ampliamente estudiadas²⁰³⁻²⁰⁷, y que sólo difieren de éstos en el C-1.

Los primeros estudios del tema fueron encarados por el grupo de Kochetkov²¹² y luego bien complementados por marcación con deuterio^{215,218}. En primer lugar se trabajó con derivados de monosacáridos sencillos²¹²; ninguno de los mismos da el ion molecular, pero todos dan los iones a m/e (M-73) y (M-98), correspondientes a la pérdida de -CH₂OAc y NC-CH^I-OAc, respectivamente. Ambos iones, así como los formados por ruptura de otras uniones carbono-carbono son los fragmentos primarios (Figura 10) que dan series de otros fragmentos, más intensos, secundarios, por eliminación simple o consecutiva de ácido acético (60)y cetena (42), tal como en la fragmentación de alditoles acetilados. En ninguno de los espectros estudiados aparecen los iones de las unidades C-1—C-2 (m/e 98) y C-1—C-2—C-3 (m/e 170).

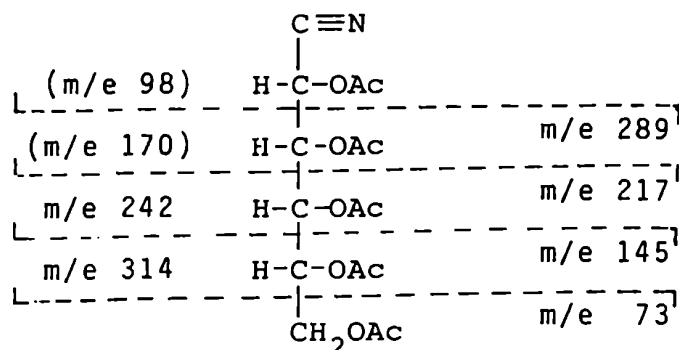


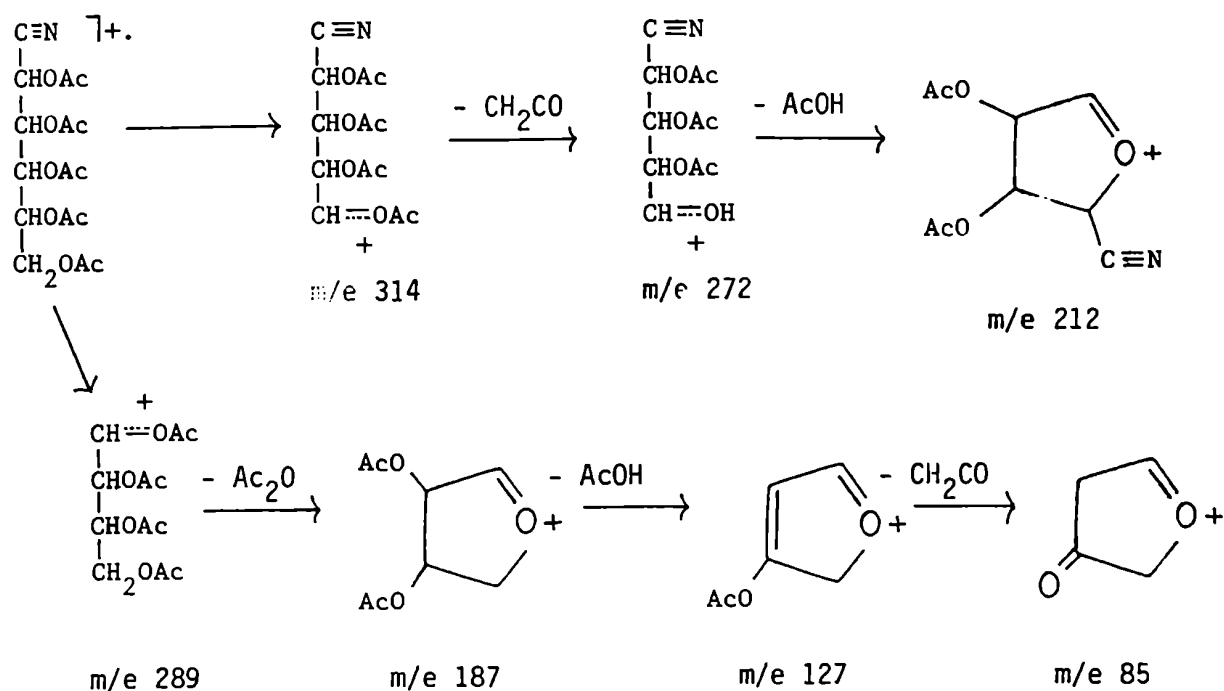
Figura 10.

En el caso de los derivados parcialmente metilados, tal como en el de los correspondientes alditoles acetilados, la ruptura se verifica fundamentalmente entre átomos de carbono que llevan metoxilos vecinales. Los fragmentos primarios así formados eliminan moléculas de formaldehído (30), metanol (32), cetena (42), ácido acético (60) o acetato de metoximetilo (104) para dar los fragmentos secundarios. Los picos principales de los espectros obtenidos por Kochetkov y su grupo²¹² pueden observarse en la Tabla 18.

También se registraron los espectros de masa de aldonitrilos acetilados con la utilización de marcación con deuterio que permitió sugerir algunos caminos de fragmentación.

Los estudios indicaron pérdida de cetena, radical acetato, ácido acético y anhídrido acético a partir de los fragmentos primarios producidos por ruptura de las uniones C-C, o bien a partir del ion molecular.

En los compuestos estudiados el grupo ciano- protege al derivado de la ruptura C-1—C-2; el espectro de masa del per-0-acetilglucononitrilo presenta el modelo de fragmentación que se aprecia en el Esquema 1.



ESQUEMA 1 (continuación):

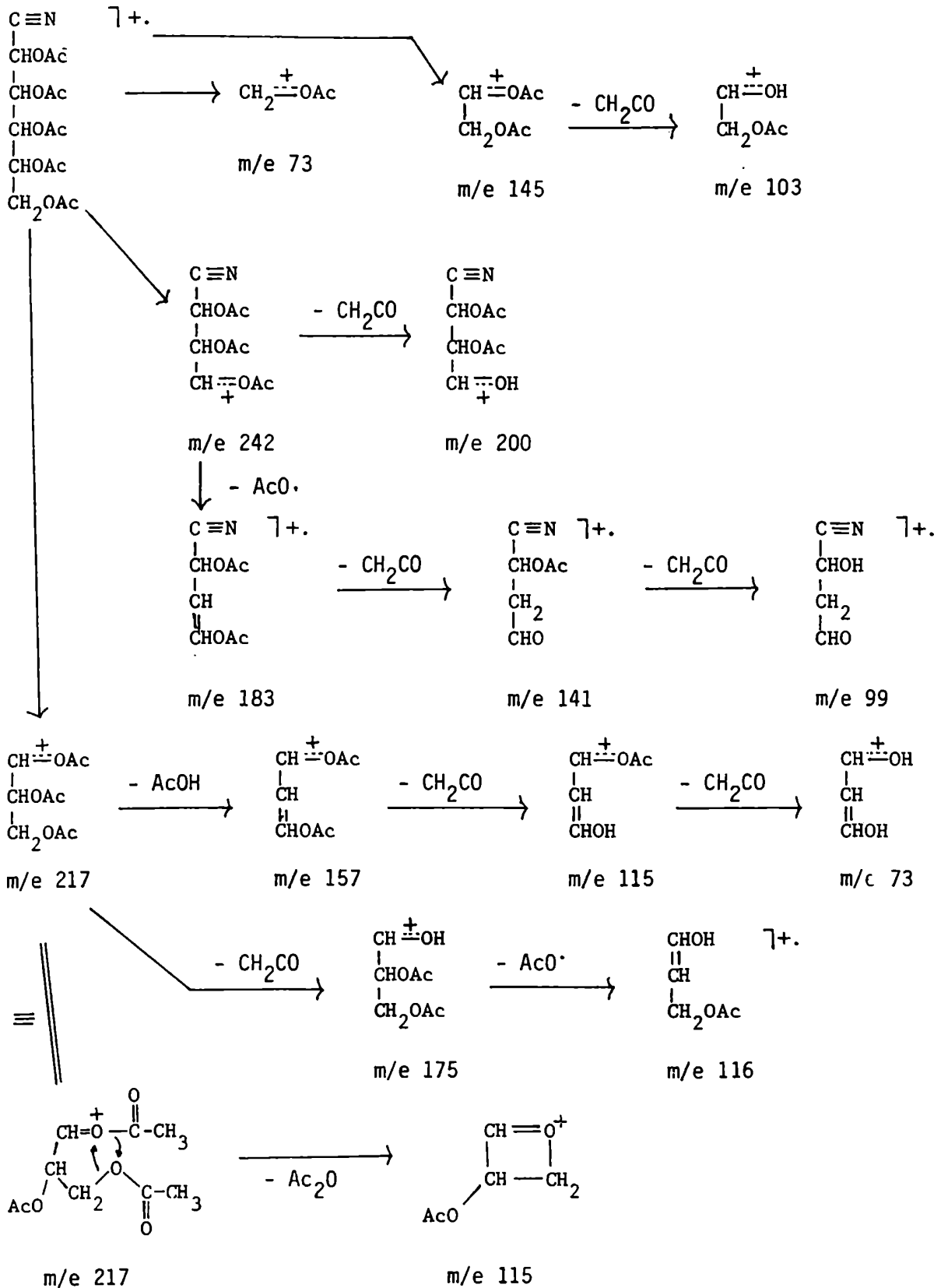


TABLA 19. Picos principales de los espectros de masa del glucononitrilo acetilado y su análogo trideuteroacetilado.

PER-O-ACETILGLUCONONITRILO		PER-O-ACETIL(d ₃)GLUCONONITRILO	
m/e	Intensidad (m/e 145=100)	m/e	Intensidad (m/e 151=100)
314	16	326	20
289	2	301	4
272	5	282	4
242	12	251	18
225	14	232	16
217	19	226	23
212	36	218	45
200	8	207	6
		194	14
187	36	193	38
183	18	190	16
175	7	182	7
157	22	163	29
		157	19
		155	10
153	10		
145	100	154	42
		151	100
144	16	150	15
		145	15
		141	10
127	16	130	25
123	15	129	16
116	8	120	9
115	57	119	49
		118	52
		113	16
103	72	110	69
		107	42
		106	19
		98	15
		86	28
85	17	85	20
73	11	76	14
		75	14
60	55	63	95
54	14	54	19
51	11	51	19
45	83		
44	41	47	70
43	base	46	base
42	67		

Los autores realizaron el espectro de masa del glucononitrilo per-

acetilado y de un derivado análogo acetilado con anhídrido acético perdeuterado (Tabla 19).

La mayoría de los iones que no contienen al C-1 se encuentran en los espectros de compuestos similares, aunque los autores explican la presencia del fragmento m/e 115 ya que en el e.m. del compuesto marcado se encuentran dos picos que equivalen a aquel, a m/e 118 y m/e 119; la estructura de este último es bien conocida, pero el otro derivaría del ion m/e 217 por expulsión de anhídrido acético (Esquema 1).

Un significativo aporte a los estudios de fragmentación de derivados parcialmente metilados estuvo dado por el trabajo de Seymour y col.²¹⁸ que analizó todos los posibles derivados dimetilados, trimetilados y tetrametilado de la D-manopiranososa; también se introdujeron grupos trideuterometilo en distintas posiciones, de modo de identificar algunos de los fragmentos constituyentes del espectro de masa. Se observó asimismo, y tal como se esperaba, un gran parecido con los espectros de derivados de D-glucosa metilados en las mismas posiciones, aseverándose entonces que los modelos de fragmentación de estos derivados dependen únicamente de la ubicación de los grupos metoxilo y son independientes de la configuración del azúcar, de modo que sirven para los análisis por metilación de aldohexanos en general.

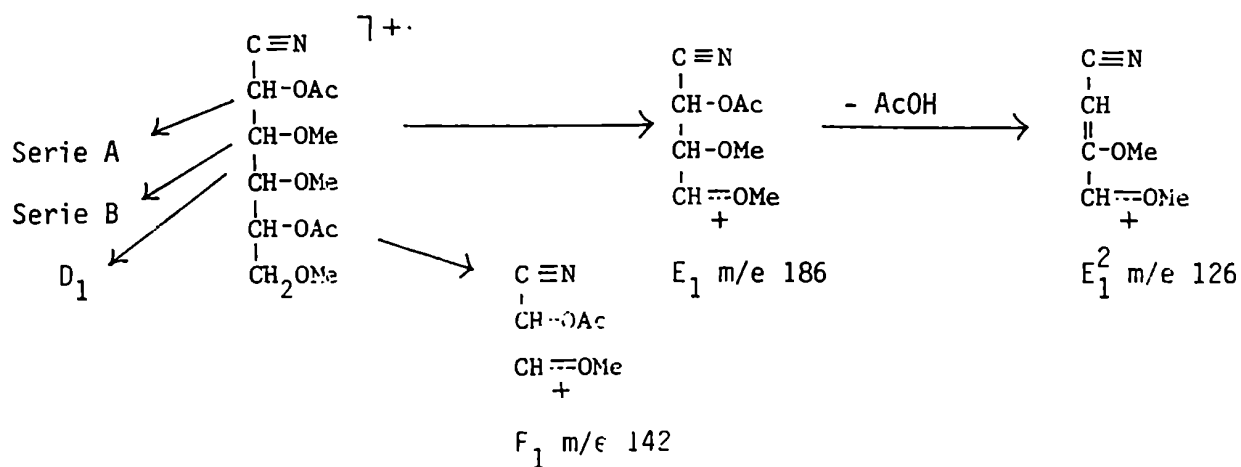
Reiteraron que los modelos de los aldononitrilos son similares a los de los alditoles, porque los fragmentos cargados procedentes del extremo no nitrílico de la molécula son idénticos a los de los correspondientes alditoles. De cualquier modo, los modelos dados por los nitrilos son más definitivos porque se halla presente en la molécula sólo un grupo hidroxilo primario.

Los autores deuterometilaron algunos compuestos y los analizaron por c.g.l.-e.m. Los espectros de algunos de esos productos eran débiles y se confundían con el 'background', de modo que sólo se pudieron analizar los caminos de fragmentación principales que llevaron a los iones más intensos. Por

Dos fragmentos importantes, A_2^3 y A_3^3 de m/e 129 y 87, respectivamente mostraron que el metoxilo que lleva la carga (el de C-4) es el que no se pierde como metanol, tal como se verificó por sustitución con deuterio. Respecto del fragmento C_1 , de m/e 88 se demostró que existía igual probabilidad que proviniera de C-2—C-3 o de C-3—C-4. Para el D_1 , m/e 45, no deriva obligatoriamente de C-6 (el 65 % proviene por ruptura simple de allí), sino que puede derivar de otros carbonos que porten un metoxilo, posiblemente con alguna transferencia de protón durante la ruptura. No han podido explicar, en cambio, los fragmentos de m/e 186 y m/e 96. El primero no contiene al grupo CN y tendría los carbonos 3, 4 y 6. En este compuesto los autores no analizaron los fragmentos del lado del nitrilo, porque eran de poca intensidad o estaban ausentes.

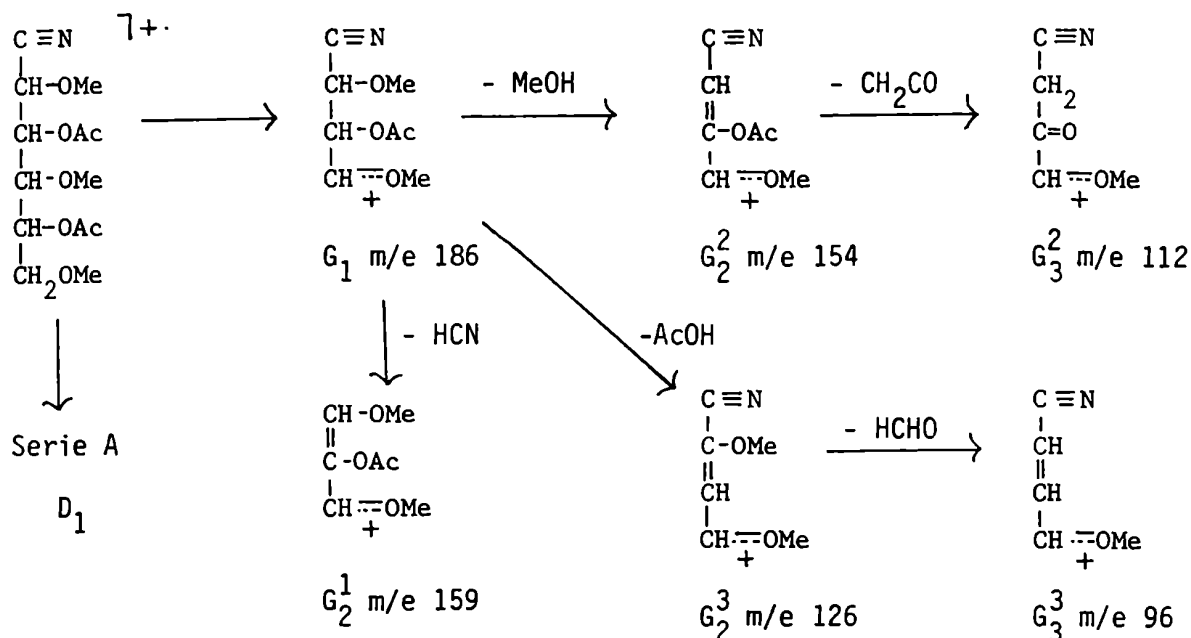
Los derivados de los cuatro trimetiléteres también fueron objeto de espectros, conjuntamente con algunos derivados trideuterometilados que confirmaron algunas fragmentaciones.

El e.m. del derivado de la 3,4,6-tri-O-metilmanosa (Esquema 3) es similar al del tetrametilado: aparecen las series A, B y el fragmento D_1 originados en los mismos caminos; además aparecen tres iones de m/e par, provenientes del extremo nitrílico (Esquema 3), evidenciándose que fueron estabilizados por la presencia de un acetoxilo cerca de C-1.



ESQUEMA 3

En el derivado de la 2,4,6-tri-0-metilmanosa aparece la serie A completa, pero además cinco fragmentos importantes de m/e par (Esquema 4).

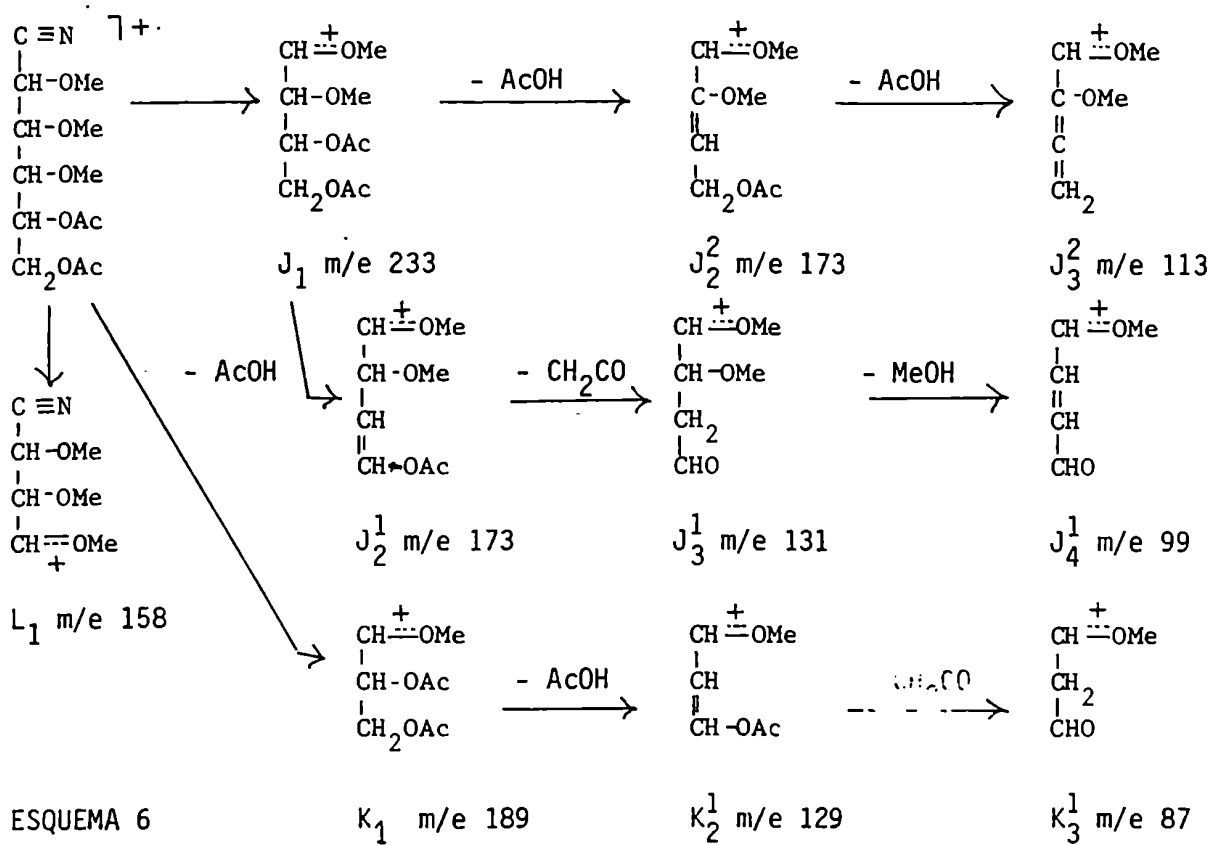
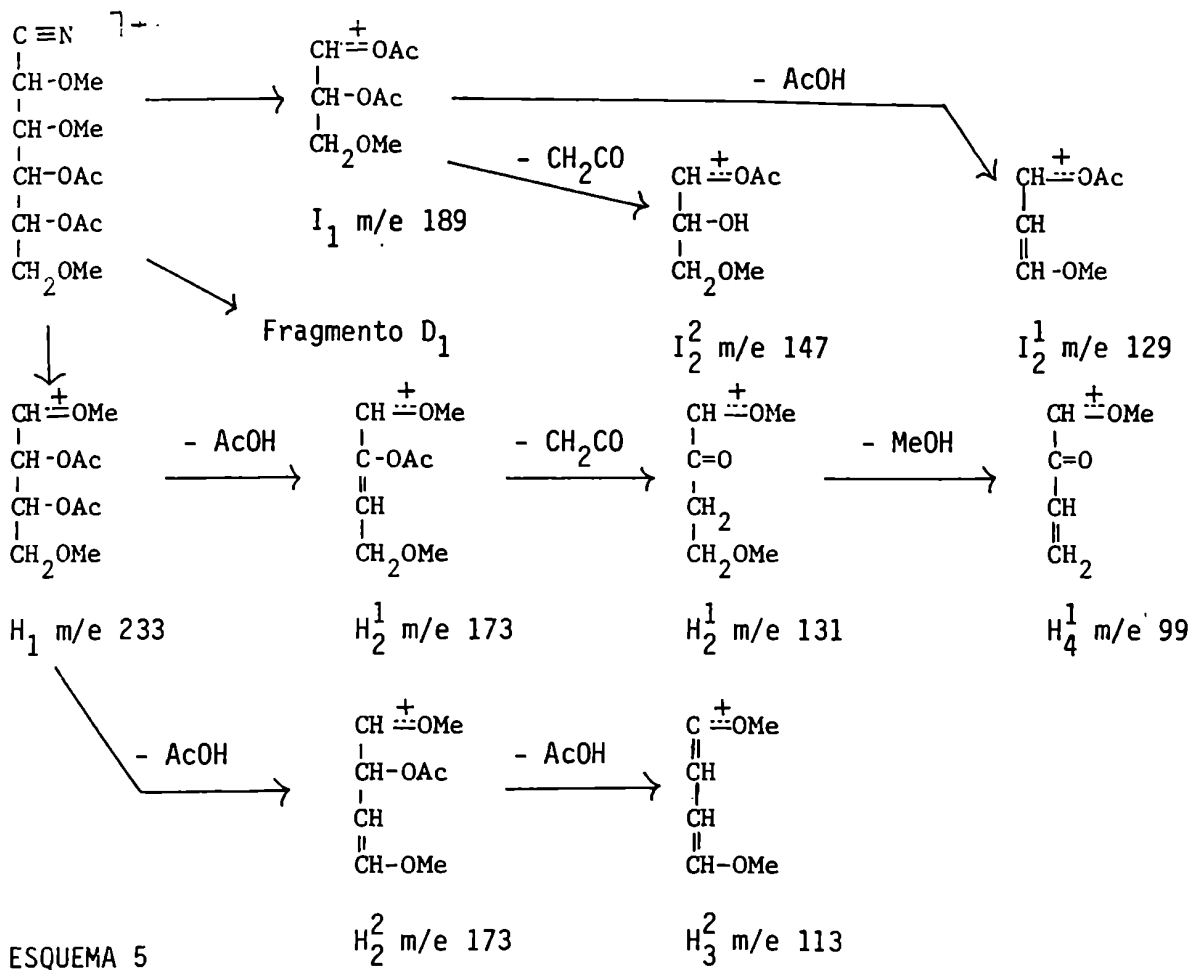


ESQUEMA 4

Tanto los derivados de la 2,3,6- como de la 2,3,4-tri-0-metilmanosa dieron espectros completamente diferentes de aquel del tetrametilderivado, debido a la influencia de los nuevos acetoxilos introducidos en la terminal no nitrílica de esos compuestos.

Las fragmentaciones del derivado 2,3,6-tri-0-metilauo se explican en el Esquema 5. Se postularon dos fragmentos primarios fundamentales. Uno, H_1 que puede originar una serie de otros cuatro fragmentos secundarios, por pérdida de ácido acético de distintas posiciones. El otro fragmento primario, I_1 presenta la carga estabilizada por el acetoxilo; no existe un desplazamiento total del ion m/e 189 por deuterometilación de C-6, lo que sugiere que otro fragmento con el mismo m/e provendría de otra fuente.

El derivado de la 2,3,4-tri-0-metilmanosa (Esquema 6) da fragmen-



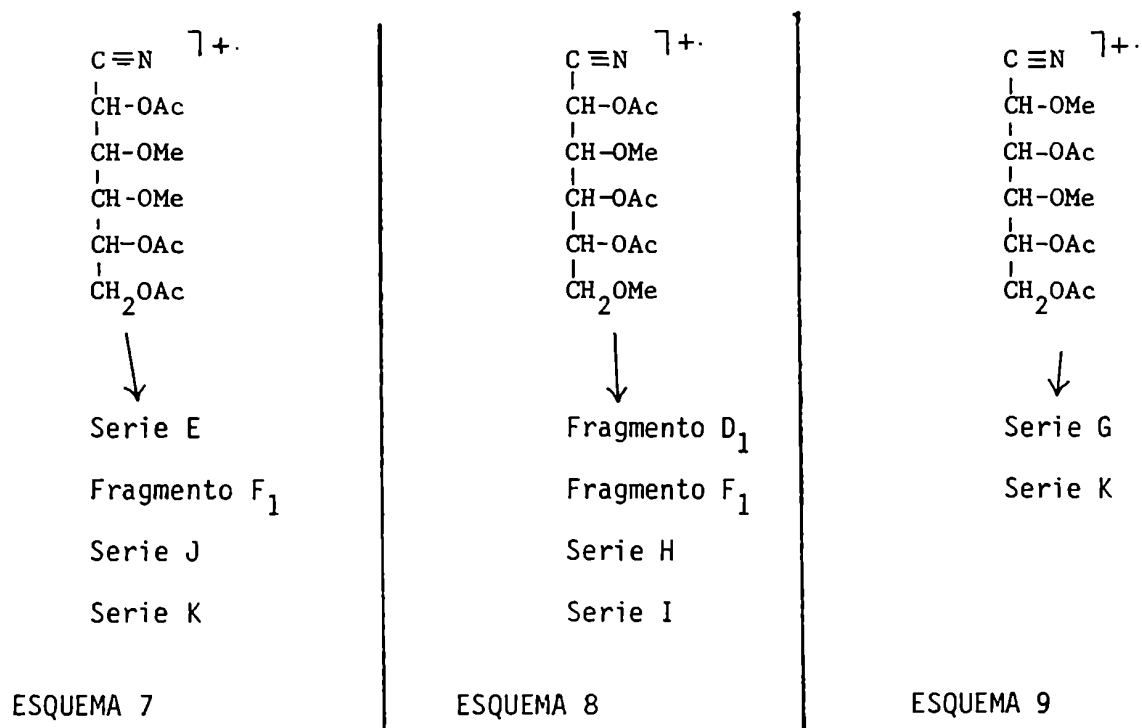
tos con valores de m/e ya observados, pero aparentemente provenientes de diferente camino. Los valores de m/e de la serie J son iguales a los de la H (Esquema 5), pero sus asignaciones (al igual que las de los picos de las series K y L) se hicieron en base a los e.m. de los compuestos deuterometilados.

Para los di-O-metilderivados no se hicieron compuestos con sustitución isotópica, pero de cualquier modo la información es suficiente como para proponer algunos caminos de fragmentación.

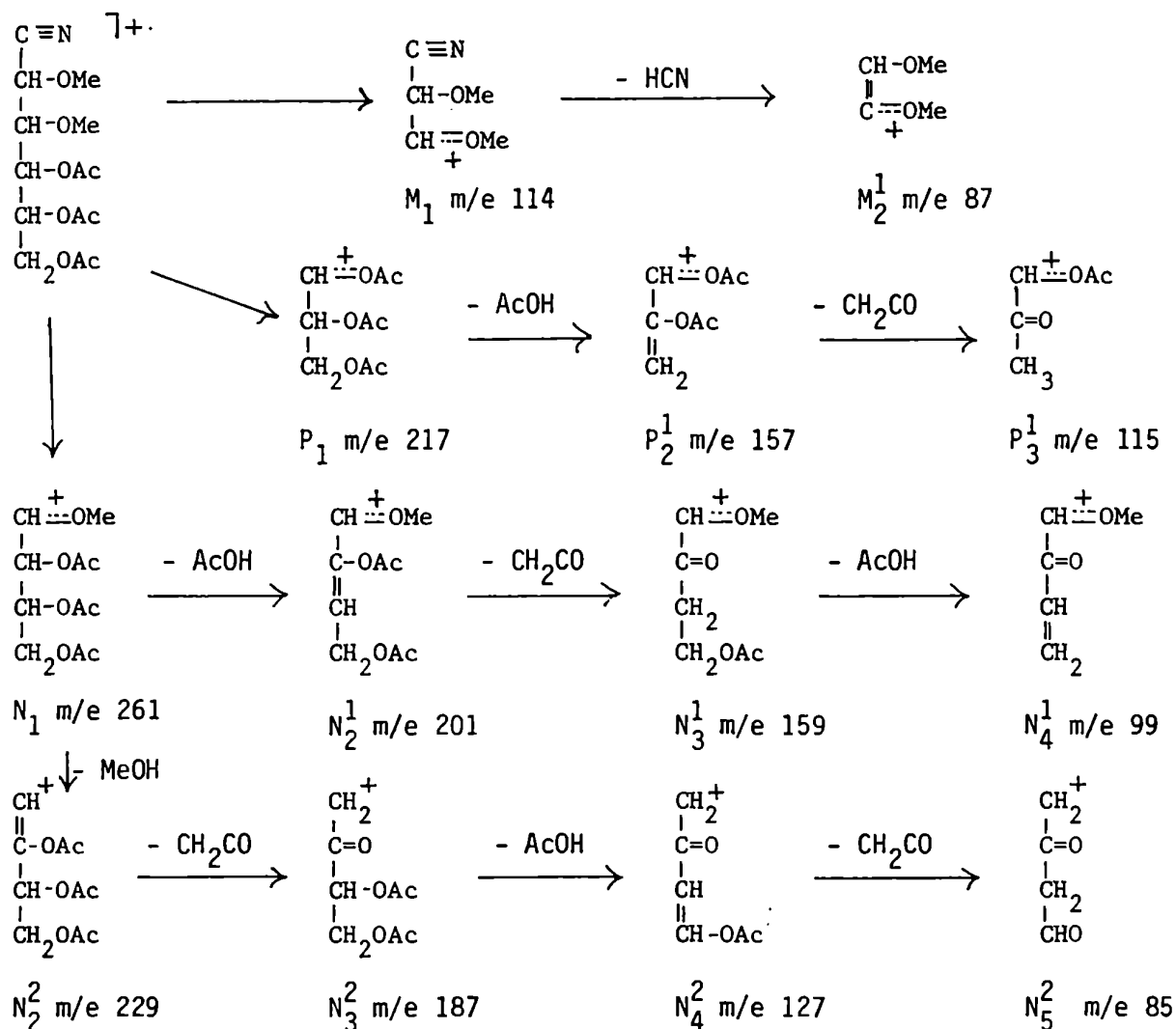
El derivado de la 3,4-di-O-metilmanosa (Esquema 7), da un espectro parecido al del 2,3,4-trimetil derivado, conteniendo fragmentos de las series J y K, pero también la serie E y el fragmento F₁ correspondientes al 3,4,6-trimetilderivado.

El espectro del derivado de la 3,6-di-O-metilmanosa (Esquema 8) es también la yuxtaposición de caminos previamente descritos en los Esquemas 2, 3 y 5.

Los fragmentos producidos en el terminal no nitrílico del derivado de 2,4-dimetil éter (Esquema 9) corresponden a los del 2,3,4-trimetilado, mientras que los correspondientes al terminal nitrílico son los del 2,4,6-



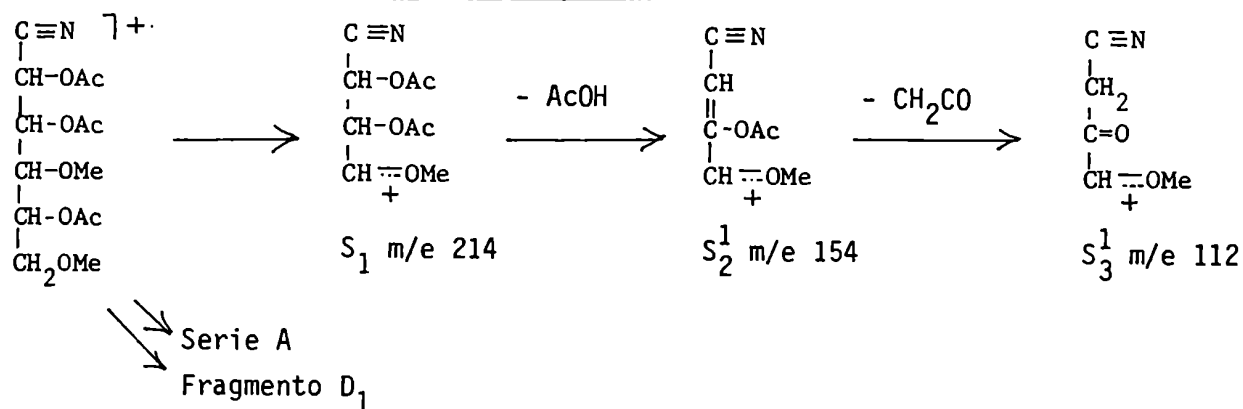
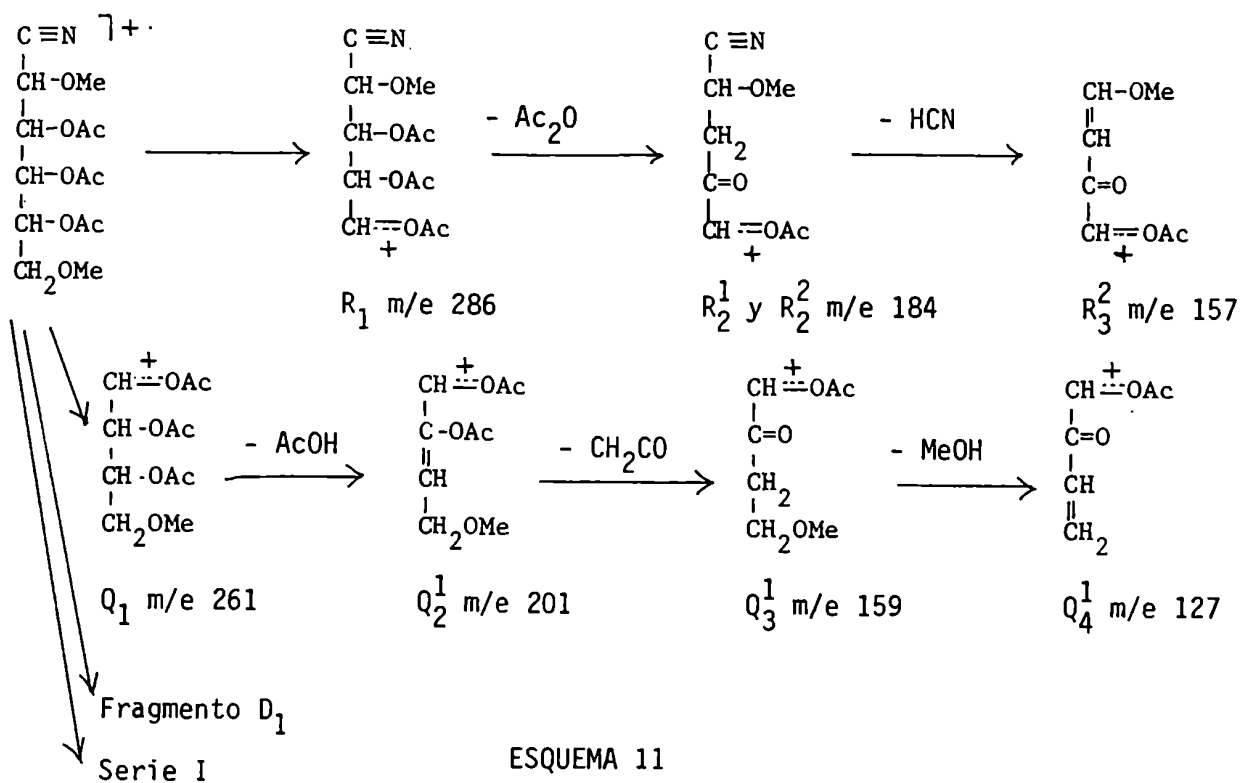
El derivado de la 2,3-di-O-metilmanosa da el espectro más complicado de todos los estudiados, posiblemente debido a la gran cantidad de acetoxilos juntos en el extremo no nitrílico. En el caso de la serie P (Esquema 10), el camino propuesto difiere del postulado por Szafrank y col.²¹⁵ (Esquema 1), respecto del átomo de carbono que pierde el acetilo.



ESQUEMA 10

Las fragmentaciones fundamentales del derivado de 2,6-dimetilmanosa pueden apreciarse en el Esquema 11. El derivado de la 4,6-di-O-metilmanosa (Esquema 12) da un espectro de masa con ruptura fundamental en la posi-

ción 4, dando origen a las series A y S.



ESPECTROMETRIA DE MASA POR IONIZACION QUIMICA

Una forma alternativa de espectrometría de masa, por ionización química (e.m.-i.q.) ha sido empleada para el análisis de azúcares^{226,227}.

En este método se utilizan presiones mayores en la cámara de ionización

debido a la introducción de una pequeña presión constante de algún gas ionizante en el sistema (amoníaco, isobutano o metano); ese gas es ionizado por la corriente electrónica y la carga es transferida al derivado de azúcar vaporizado. Los espectros producidos son diferentes de los obtenidos por impacto electrónico, pero ambos se complementan en la elucidación estructural.

Una utilidad del método está dada en c.g.l.-e.m. de compuestos que no se resuelven por c.g.l. y son difíciles de diferenciar por e.m.-i.e., pero cuyo peso molecular es diferente, de modo que puede determinarse su presencia por i.q.

El método se ha aplicado a los aldononitrilos. Se analizaron los e.m. correspondientes a los derivados de fucosa, ramnosa, xilosa, ribosa, arabinosa, glucosa, galactosa y manosa; también trabajaron con productos parcialmente metilados como el 2,4-di-0-metil , 2,4,6-tri-0-metil y 2,3,4,6-tetra-0-metilglucononitrilo acetilados²²⁰. El pico base fue en todos los casos el (M+1-60) y se obtuvo como pico importante el (M+1); también aparecieron, en menor proporción, algunos fragmentos ya observados en impacto electrónico. También se utilizó e.m.-i.q. empleando como gas ionizante al metano²²³. El espectro obtenido es intermedio entre el que utilizó amoníaco y el de impacto electrónico.

Se evidencia que el método de ionización química en e.m. presta su utilidad a la elucidación estructural, pero sólo como complemento del impacto electrónico.

DESCRIPCION Y DISCUSION
DE LOS
RESULTADOS OBTENIDOS

AISLAMIENTO Y PURIFICACION DEL CARRAGENANO

El alga *Iridaea undulosa* Bory, previamente molida, se sometió a una extracción con agua a temperatura ambiente, se centrifugó y el polisacárido se precipitó por agregado lento de la solución acuosa sobre tres volúmenes de isopropanol.

El carragenano así obtenido se purificó por redisolución en agua y reprecipitación con isopropanol. En este último paso se obtuvo un residuo insoluble en agua que se separó por centrifugación y se secó por intercambio de solventes. Las propiedades del carragenano concuerdan con las ya informadas por Matulewicz y Cerezo^{11,126} (Tabla 1, Cap.II).

La cromatografía gas-líquido de los aldononitrilos acetilados derivados de la hidrólisis ácida del carragenano indicaron la presencia de galactosa y trazas de xilosa, como únicos azúcares estables en medio ácido.

OBTENCION DE LA FRACCION SOLUBLE

Los estudios de Matulewicz y Cerezo^{11,126} arribaron a la conclusión que el carragenano de *Iridaea undulosa* Bory podía fraccionarse haciendo uso del método habitual de agregado de cloruro de potasio a una solución acuosa del mismo y posterior separación del gel precipitado⁴⁶. Así obtuvieron ocho fracciones de carragenano, que precipitaban a concentraciones definidas de cloruro de potasio, con diferentes rendimientos. Los datos analíticos (Tabla 1, Cap.II) indicaron que esas ocho fracciones podían reagruparse en cuatro: una insoluble a 0,10 M pero que no respondía a las características de un K-carragenano, sino que su precipitación se produciría

por un porcentaje relativamente alto de proteína (13 %) y que, dada su pequeña contribución al sistema total, no fue estudiada en detalle ; las seis fracciones intermedias originales podían reunirse en dos subgrupos: aquellas numeradas 2, 3 y 4 que precipitaban a concentraciones de cloruro de potasio entre 0,70 y 1,05 M, ricas en 3,6-anhidrogalactosa, y las fracciones denominadas 5,6 y 7, precipitadas a concentraciones 1,20-1,65 M de cloruro de potasio, muy pobres en 3,6-anhidrogalactosa, y en cambio enriquecidas en el éster sulfato; por último, quedaba la fracción soluble en cloruro de potasio 2 M (Capítulo II).

Considerando que se han efectuado detallados estudios de metilación sobre ambas fracciones intermedias¹²⁷, restaba un estudio más exhaustivo acerca de la fracción soluble. Esta fracción, curiosamente, presenta un contenido de 3,6-anhidrogalactosa mayor que la segunda de las fracciones intermedias, lo que indica la existencia de otros factores que favorecen su alta solubilidad. Esto se contrapone con los resultados obtenidos por representantes de la escuela noruega⁴⁶, para los cuales el contenido de 3,6-anhidrogalactosa era inversamente proporcional a la concentración de cloruro de potasio a la cual la fracción precipitaba.

Resulta muy interesante el estudio de esta fracción soluble dado su contenido relativamente alto de 3,6-anhidrogalactosa, y la presencia de una ancha banda de sulfatos en su espectro infrarrojo, indicativa de diferentes tipos de sulfatación. Es de destacar que por tratamiento alcalino del carragenano de *Iridaea undulosa* Bory, se obtuvo un producto (rendimiento 86,0 %) que al ser fraccionado con cloruro de potasio no daba fracciones intermedias sino una insoluble (un K-carragenano, 53,6 %) y otra soluble (rendimiento, 31,4 %) en mayor proporción que en el producto inicial (Tabla 4, Cap.II). Esto indica que dicho tratamiento ocasiona,

además de la esperada insolubilización de parte de las fracciones intermedias, una mayor solubilidad de otra parte de dichas fracciones intermedias, aún conteniendo éstas un alto porcentaje de 3,6-anhidrogalactosa. También el carragenano de *Chondrus crispus*⁴⁶ dio, por tratamiento alcalino y fraccionamiento, una fracción soluble que tenía alto contenido de 3,6-anhidrogalactosa. Sin embargo, el tratamiento alcalino y posterior fraccionamiento de los carragenanos de *Gigartina stellata* y *Gigartina skottsbergii*⁴⁶ no ocasionó variación en el contenido de 3,6-anhidrogalactosa de la fracción soluble, aunque disminuyó el rendimiento de la misma.

En términos generales, no se han efectuado estudios estructurales sobre fracciones solubles de carragenanos. Los trabajos de Rees denominan λ -carragenano al material que permanece soluble luego de la precipitación del K-carragenano; sin embargo, para la escuela noruega⁴⁶ dicho λ -carragenano sería una mezcla de fracciones intermedia y soluble, con predominio de la primera. Lo mismo ocurre con todas las fracciones "solubles" estudiadas.

Solamente (además de los noruegos) Stancioff y Stanley⁵⁷ estudiaron una fracción de *Eucheuma uncinatum* soluble en cloruro de potasio 3 M, que contendría al ν -carragenano.

Esta conjunción de causas hace especialmente interesante el estudio de la fracción soluble del carragenano de *Iridaea undulosa*, ya que puede aportar muchos datos acerca de los factores estructurales que promueven su solubilidad.

La fracción soluble se obtuvo por agregado de cloruro de potasio hasta una concentración 2 M, con agitación, a una solución del carragenano purificado en agua. Finalmente el gel precipitado se separó por centrifugación, y tras posterior diálisis, concentración y liofilización se obtuvo la fracción

soluble en forma de un producto blanco y algodonoso. Obtenida de este modo, la fracción representa un 18,2 % del peso del carragenano, lo cual resulta mayor que lo informado por Matulewicz¹¹ para el fraccionamiento en etapas. Es de destacar que esta fracción muestra una variación de características analíticas entre diversos "batches" más acentuada que otras fracciones. Ello resulta lógico considerando que en la misma se acumulan influencias debidas a las condiciones de precipitación del resto de las fracciones. Al ser ésta una fracción soluble resulta, en consecuencia, de menor constancia analítica, pero esas diferencias (Tabla 20) no afectan las conclusiones del presente trabajo.

TABLA 20. Rendimiento, composición y propiedades del carragenano soluble de *Iridaea undulosa*.

CARRAGENANO SOLUBLE	Obtenido por precipitación en etapas ¹¹ .	Obtenido por precipitación en bloque
Rendimiento (%)	13,0	18,2
Galactosa (% anhidro)	34,6	48,3
3,6-anhidrogalactosa (% anhidro)	5,8	4,0
Sulfato (% SO ₃ K)	40,1	44,2
Rel.molar Gal:3,6-anhgal:sulfato	1:0,19:1,57	1:0,09:1,24
6-sulfato (% SO ₃ K)	3,0	7,3
Viscosidad intrínseca (dl/g)	4,48	2,72
[α] _D en NaCl 0,1 M (°)	39,8	56,0

Resulta de interés destacar que una de las diferencias más notorias entre ambos productos (Tabla 20) está dada por las proporciones relativas de 3,6-anhidrogalactosa y galactosa 6-sulfato (su precursor biosintético o por tratamiento alcalino). Mientras que en el producto aquí obtenido hay 8 unidades de 3,6-anhidrogalactosa y 19 de galactosa 6-sulfato por cada 100 residuos, en el obtenido previamente¹¹ había 16 del anhidroazúcar y 10 de su precursor; la cantidad total se mantiene (3,6-anhidrogalactosa + galactosa 6-sulfato), pero en el producto aquí obtenido la existencia del anhidroazúcar está más "enmascarada"⁵⁵.

ESTUDIOS DE METILACION

El carragenano soluble se metiló por el método de Haworth²²⁸, que consiste en la adición consecutiva de sulfato de dimetilo e hidróxido de sodio 30 % al polisacárido previamente reducido con borohidruro de sodio y disuelto en hidróxido de sodio 30 %. Este es el único método que permite obtener derivados metilados sin degradar a la molécula, ya que los métodos modernos - mucho más rápidos y menos tediosos- producen alquitranes imposibles de trabajar (A.S.Cerezo, comunicación personal). Sólo en un caso, Rees⁵² logró metilar un carragenano por el método de Kuhn y Trischmann²²⁹, pero se trataba de un λ -carragenano desulfatado, y por lo tanto de un producto exento de 3,6-anhidrogalactosa y sulfato. El intento de utilizar el método para otro carragenano más rico en el anhidroazúcar provocó la destrucción del producto⁴⁸.

Se decidió trabajar a baja temperatura (- 2°), a fin de evitar la degradación observada por Matulewicz y Cerezo^{11,127} en la primera secuencia

de metilaciones. En este primer estudio de metilación se comenzó la tarea con un gramo de producto a fin de controlar adecuadamente el rumbo tomado por la metilación y efectuar los correspondientes dosajes de metoxilo y sulfato.

El final de la metilación se controló por constancia de la composición de azúcares al cabo de dos etapas de metilación sucesivas.

Se efectuaron cinco pasos de metilación, todos ellos a -2°. Los rendimientos, contenidos de metoxilo, sulfato y 3,6-anhidrogalactosa pueden apreciarse en la Tabla 21.

TABLA 21. Rendimiento y contenidos de metoxilo, sulfato y 3,6-anhidrogalactosa del polisacárido obtenido al cabo de cada etapa de metilación del carragenano soluble.

Etapa de metilación	Rendimiento % ^a	Metoxilo (OCH ₃ %)	Sulfato (SO ₃ Na %)	3,6-anhidro- galactosa %
Original		0	30,6	5,8
1ra.	86,6	8,1	26,5	9,6
2da.	61,5	13,2	28,0	10,3
3ra.	99,7	12,6	26,7	8,0
4ta.	100,0	13,2	28,2	6,6
5ta.	95,2	15,2	25,9	5,7

^aTomando en cuenta el metoxilo introducido y el sulfato perdido de acuerdo a:

$$\text{Rendimiento}_f (\%) = \frac{W_f (100 - 14 M_f/31 - 102 S_f/103)}{W_i (100 - 14 M_i/31 - 102 S_i/103)} \times 100 ,$$

donde W, M y S representan los pesos del producto y sus contenidos respectivos de metoxilo y sulfato, mientras los subíndices i y f indican previo o posterior al paso de metilación pertinente.

El porcentaje final de metoxilo fue del 15,2 %, lo cual concuerda con lo obtenido para otros carragenanos, oscilante entre 9,8 y 16,3 %^{52,55} y con lo informado por Matulewicz y Cerezo¹²⁷ para sus dos fracciones intermedias (10,8-13,2 %). El máximo contenido de metoxilo teórico para esta fracción es del 13,5 %, el cual no se encuentra muy lejos del valor obtenido considerando además que hubo desulfatación parcial (los datos analíticos indican que la pérdida no fue muy pronunciada).

Contrariamente a lo observado por Matulewicz¹¹, el rendimiento en la primer secuencia de metilación fue alto, y en cambio disminuyó en la segunda etapa. De cualquier manera, el rendimiento total (50,5 %) fue bueno teniendo en cuenta que fueron necesarias cinco etapas de metilación.

Se aprecia también que existió degradación durante el curso de la metilación, asociada con la desaparición de 3,6-anhidrogalactosa (Tabla 21); también desapareció algo de sulfato (~10 %) con formación concomitante de las unidades 3,6-anhidrogalactosídicas, lo cual es consistente con la ciclación alcalina de galactosa 6-sulfato y 2,6-disulfato unidas por la posición 4.

La hidrólisis del polisacárido metilado se efectuó con ácido fórmico 45 % (100°, 16 h); en estas condiciones se destruyen los derivados de la 3,6-anhidrogalactosa, por lo que se analizó una mezcla de galactosas metiladas.

En este primer análisis por metilación se efectuó una evaluación conveniente de las condiciones de cromatografía gaseosa más aptas para la separación de los derivados de las galactosas parcialmente metiladas. Una mezcla de éstas, obtenida por hidrólisis y disuelta posteriormente en etanol, se separó en dos porciones. Una fue derivatizada en forma de alditoles acetilados y la otra en forma de aldononitrilos acetilados; ambos derivados

fueron cromatografiados en cuatro sistemas diferentes.

Los alditoles fueron identificados por sus tiempos de retención relativos y por el uso del sistema acoplado cromatografía gas líquido-espectrometría de masa, tomando como referencia los datos de Lindberg y colaboradores^{201,204-206}. Los datos de los tiempos de retención en los cuatro sistemas pueden apreciarse en la Tabla 22.

TABLA 22. Tiempos de retención relativos^a de los alditoles acetilados derivados de galactosas parcialmente metiladas en cuatro sistemas cromatográficos diferentes.

Galactosa metilada en posición:	SISTEMA ^b			
	A	B	C	D
2,3,4,6-tetra	0,26(0,10)	0,27(0,11)	0,72(0,37)	0,59(0,32)
2,4,6 + 2,3,6-tri	0,48(0,19)	0,48(0,19)	0,84(0,44)	0,76(0,41)
2,6 + 4,6-di	0,75(0,30)	0,75(0,30)	0,93(0,48)	0,89(0,48)
6-mono	1,00(0,40)	1,00(0,40)	1,00(0,52)	1,00(0,54)
2,3-di	1,14(0,46)			
2,4-di	1,24(0,50)			
2-mono	1,58(0,63)	1,55(0,61)	1,08(0,57)	1,11(0,61)
3(4)-mono	2,11(0,85) ^c	2,07(0,83) ^c	1,16(0,60)	1,21(0,65)
Sin metilar	2,23(0,90) ^c	2,21(0,89) ^c	1,20(0,62)	1,26(0,68)

^aValor principal: relativo al 1,2,3,4,5-penta-0-acetil, 6-0-metilgalactitol; valor entre paréntesis, relativo a ($t_{tetra} + t_{Gal}$), ver página 248. ^bVer en la Parte Experimental las características de cada sistema. ^c Los derivados de 3-0-metilgalactosa y galactosa no se resuelven en estos sistemas.

Con respecto a los aldononitrilos, considerando que no había información suficiente sobre los mismos para derivados metilados de la galactosa, se efectuó un estudio más exhaustivo sobre la base de sus fragmentaciones por espectrometría de masa y datos de literatura^{218,219}.

Todos los detalles pueden apreciarse a partir de la página 245 de este Capítulo, y han dado origen a una publicación²³⁰. El sistema ya había sido utilizado por Matulewicz y Cerezo¹²⁷ para diferenciar la 3-0-metil- y la 4-0-metilgalactosa, indistinguibles como alditoles dada la simetría de la molécula; de cualquier modo, existen otras ventajas a favor de estos derivados.

En las Tablas 23 y 24 se muestran los porcentajes de azúcares metilados después de la primera etapa de metilación, derivatizados como alditoles y aldononitrilos acetilados, respectivamente.

Luego, de la misma forma, las Tablas 25 y 26 informan sobre la segunda etapa en forma de cada uno de los derivados, las Tablas 27 y 28 informan sobre la tercera etapa, las Tablas 29 y 30 sobre la cuarta etapa y las Tablas 31 y 32 sobre la quinta y última etapa de metilación, en la cual se considera al producto totalmente metilado.

En todos los casos se informan relaciones molares.

TABLA 23. Composición (moles %) de los azúcares (derivatizados como O-acetil-0-metilalditoles) obtenidos del carragenano soluble después de la 1ra. etapa de metilación.

Galactosa metilada en:	SISTEMA			
	A	B	C	D
2,6- + 4,6-di	34,8	34,0	33,1	32,0
6-mono	15,5	↑	↑	11,8
2,3-di	↑	17,2	17,9	↑
2,4-di	2,3 ↓	↓	↓	12,7
2-mono	8,8	8,1	9,9	↓
3-(4-)-mono	↑	↑	↑	12,4
Sin metilar	38,7 ↓	40,6 ↓	39,2 ↓	31,0

TABLA 24. Composición (moles %) de los azúcares (derivatizados como O-acetil-0-metilaldononitrilos) obtenidos del carragenano soluble después de la 1ra. etapa de metilación.

Galactosa metilada en:	SISTEMA			
	A	B	C	D
2,6- + 4,6-di	32,8	35,4	33,4	32,9
6-mono (incluye dimetiladas)	17,5	19,1	19,1	15,9
2-mono	12,5	9,5	11,5	9,3
3-mono	7,0	2,2	↑	↑
4-mono	4,1	1,9	10,8 ↓	12,0 ↓
Sin metilar	26,1	31,8	25,2	30,0

TABLA 25. Composición (moles %) de los azúcares (derivatizados como 0-acetil-0-metilalditoles) obtenidos del carragenano soluble después de la 2da. etapa de metilación

Galactosa metilada en:	SISTEMA			
	A	B	C	D
2,3,4,6-tetra	0,4	0,7	2,1	1,5
Trimetiladas	3,1	3,8	5,9	5,7
2,6- + 4,6-di	47,5	48,0	37,3	42,4
6-mono	8,6	↑	↑	↑
2,3-di	2,1	12,4	14,7	10,4
2,4-di	1,8	↓	↓	↓
2-mono	4,0	3,6	5,3	4,3
3-(4-)mono	↑	↑	16,4	16,5
Sin metilar	32,5	31,5	18,3	19,3
	↓	↓		

TABLA 26. Composición (moles %) de los azúcares (derivatizados como 0-acetil-0-metilaldononitrilos) obtenidos del carragenano soluble después de la 2da. etapa de metilación.

Galactosa metilada en:	SISTEMA			
	A	B	C	D
2,3,4,6-tetra	2,1	0,7	0,5	2,4
2,4,6-tri	3,1	2,4	2,7	1,9
2,3,6-tri	1,8	1,9	1,0	1,3
2,6- + 4,6-di	47,0	51,5	40,1	44,5
6-mono (incluye dimetiladas)	12,8	11,6	14,3	11,0
2-mono	4,8	3,5	7,0	7,0
3-mono	7,6	6,7	↑	↑
4-mono	6,1	6,2	17,1	15,5
			↓	↓
Sin metilar	14,6	15,6	17,2	16,4

TABLA 27. Composición (moles %) de los azúcares (derivatizados como O-acetil-O-metilalditoles) obtenidos del carragenano soluble después de la 3ra. etapa de metilación.

Galactosa metilada en:	SISTEMA			
	A	B	C	D
2,3,4,6-tetra	0,8	1,9	2,2	1,4
Trimetiladas	4,6	5,3	7,3	6,3
2,6- + 4,6-di	50,7	51,2	39,4	45,3
6-mono	6,7	↑	↑	↑
2,3-di	2,4	5,9	13,7	10,5
2,4-di	2,1	↓	↓	↓
2-mono	3,2	3,3	4,2	3,9
3-(4-)mono	↑	↑	↑	21,2
Sin metilar	29,4	32,4	33,2	11,1
	↓	↓	↓	

TABLA 28. Composición (moles %) de los azúcares (derivatizados como O-acetil-O-metilaldononitrilos) obtenidos del carragenano soluble después de la 3ra. etapa de metilación.

Galactosa metilada en:	SISTEMA			
	A	B	C	D
2,3,4,6-tetra	1,6	0,8	1,1	2,7
2,4,6-tri	3,2	3,3	3,8	2,5
2,3,6-tri	1,9	1,9	2,8	1,1
2,6-di	36,8	↑	↑	↑
4,6-di	18,2	55,7	50,0	53,7
		↓	↓	↓
6-mono (incluye dimetiladas)	10,3	10,0	11,7	8,4
2-mono	3,1	2,3	3,7	4,0
3-mono	9,9	8,3	↑	↑
			17,0	18,6
4-mono	7,6	7,4	↓	↓
Sin metilar	7,5	10,3	9,8	9,0

TABLA 29. Composición (moles %) de los azúcares (derivatizados como O-acetil-0-metilalditoles) obtenidos del carragenano soluble después de la 4ta. etapa de metilación.

Galactosa metilada en:	SISTEMA			
	A	B	C	D
2,3,4,6-tetra	1,7	2,9	6,2	2,9
Trimetiladas	7,1	7,5	10,8	10,2
2,6- + 4,6-di	56,4	58,3	56,4	58,8
6-mono	3,1	2,7	↑	↑
2,3-di	3,6	↑	6,1	7,0
2,4-di	2,7	2,1	↓	↓
2-mono	2,9	3,2	2,1	2,0
3-(4-)mono	↑	↑	16,1	16,6
Sin metilar	22,4	23,3	2,4	2,5

TABLA 30. Composición (moles %) de los azúcares (derivatizados como O-acetil-0-metilaldononitrilos) obtenidos del carragenanos soluble después de la 4ta. etapa de metilación

Galactosa metilada en:	SISTEMA			
	A	B	C	D
2,3,4,6-tetra	1,4	2,0	3,4	4,0
2,4,6-tri	↑	↑	8,6	4,8
2,3,6-tri	2,4	7,5	6,3	4,8
3,4,6-tri	↓	↓	5,2	4,2
2,6-di	2,6	2,0	5,2	4,2
4,6-di	↑	↑	↑	43,4
6-mono (incluye dimetiladas)	61,2	65,1	54,2	12,7
2-mono	↓	↓	↓	9,3
3-mono	9,6	3,7	7,8	9,3
4-mono	2,9	2,9	4,4	2,9
Sin metilar	10,4	9,3	↑	↑
	5,8	5,0	9,3	12,5
	↓	↓	↓	↓
	3,7	2,4	1,0	1,5

TABLA 31. Composición (moles %) de los azúcares (derivatizados como O-acetil-0-metilalditoles) obtenidos del carragenano soluble después de la 5ta. etapa de metilación.

Galactosa metilada en:	SISTEMA			
	A	B	C	D
2,3,4,6-tetra	4,7	5,6	5,6	4,9
Trimetiladas	8,7	8,3	12,6	13,4
2,6- + 4,6-di	51,4	52,3	60,8	64,8
6-mono	↑	1,9	↑	↑
2,3-di	12,2	↓	6,1	7,6
2,4-di	10,6	4,7	↓	↓
2-mono	4,0	8,5	4,1	2,8
3-(4-)mono + sin metilar	8,5	18,5	11,0	6,5

TABLA 32. Composición (moles %) de los azúcares (derivatizados como O-acetil-0-metilaldononitrilos) obtenidos del carragenano soluble después de la 5ta. etapa de metilación.

Galactosa metilada en:	SISTEMA			
	A	B	C	D
2,3,4,6-tetra	1,3	1,2	2,0	1,5
2,4,6-tri	1,9	↑	2,6	↑
2,3,6-tri	2,2	4,0	3,4	5,2
3,4,6-tri	0,6	↓	2,8	↓
2,6-di	34,5	0,5	↑	↑
4,6-di	28,9	46,4	55,5	56,3
6-mono (incluye dimetiladas)	15,4	21,3	↓	↓
2-mono	1,5	8,0	14,2	16,4
3-mono	1,5	1,4	2,1	0,8
4-mono	8,2	9,9	10,3	9,5
Sin metilar	5,4	6,1	6,0	5,4
	tr.	1,3	1,1	1,0

Puede apreciarse que existió coincidencia entre las relaciones molares obtenidas en las distintas columnas y aún entre los dos derivados diferentes.

Determinados azúcares se separaron en algunos casos y en otros no lo hicieron dependiendo de factores tales como sus relaciones cuantitativas. Sin embargo, la complementación de los dos derivados y el uso de cuatro sistemas cromatográficos diferentes permitieron en todas las secuencias la completa identificación y cuantificación de los azúcares componentes. Los aldono-nitrilos aportaron la resolución de: a) 2,3,6-, 2,4,6- y 3,4,6-tri-0-metilgalactosa, b) 2,6- y 4,6-di-0-metilgalactosa, fundamentales en metilación de carragenanos, y c) 3-, 4-0-metilgalactosa y galactosa sin metilar; las dos primeras logran separarse de la tercera mediante el uso de los sistemas C y D para los correspondientes acetatos de alditol.

El uso de los alditoles como derivados, en cambio, produce un agrupamiento de los trimetilados entre sí, de los dos dimetilados fundamentales entre sí, y el 3-0-metilgalactitol que es indistinguible por simetría del 4-0-metilgalactitol, logra resolverse del hexa-0-acetilgalactitol sólo en los sistemas C y D. Sin embargo, el uso de los alditoles presenta la ventaja de resolver la 2,3- y la 2,4-di-0-metilgalactosas entre sí y de la 6-0-metilgalactosa, lo cual no es factible con el uso de los aldono-nitrilos acetilados²³⁰.

Con todos los datos obtenidos en las Tablas 23-32 se puede efectuar un promedio, presentando así un cuadro final con los resultados de la metilación que puede observarse en la Tabla 33.

TABLA 33. Composición (moles %) en azúcares de los polisacáridos metilados obtenidos al cabo de las distintas etapas de metilación del carragenano soluble.

Galactosa metilada en:	ETAPA DE METILACION				
	1ra.	2da.	3ra.	4ta.	5ta.
2,3,4,6-tetra	-	1	2	3	3
2,3,6-tri	-	2	2	3	4
2,4,6-tri	-	3	3	3	3
3,4,6-tri	tr.	tr.	tr.	2	2
2,3-di	↑ 3	2	2	3	3
2,4-di	↓	2	2	2	5
2,6-di	↑ 33	↑ 45	34	↑ 58	36
4,6-di	↓	↓	17	↓	23
2-mono	10	5	3	3	3
3-mono	7	8	10	10	9
4-mono	5	7	9	6	5
6-mono	14	8	6	3	3
Sin metilar	28	17	10	3	1

Es de notar que en el hidrolizado del carragenano soluble se detectó la presencia de xilosa. Por hidrólisis del polisacárido metilado y posterior cromatografía gaseosa- espectrometría de masa de los correspondientes alditoles y aldononitrilos acetilados sólo se la detectó en la forma de 2,3,4-tri-0-metilxilosa (Tabla 34). Este azúcar ya había sido determinado en la hidrólisis de un carragenano metilado por Johnston y Percival²³;

TABLA 34. Espectros de masa del 1,5-di-0-acetil-2,3,4-tri-0-metilxilitol y del 5-0-acetil-2,3,4-tri-0-metilxilononitrilo^a.

1,5-di-0-acetil-2,3,4-tri-0-metilxilitol			5-0-acetil-2,3,4-tri-0-metilxilononitrilo		
m/e	Intensidad relativa	Intensidad ^b relativa	m/e	Intensidad relativa	Asignación ^c
43	100	100	43	91	Ac ⁺
45	5	11	45	27	
58	8	8	87	9	3C
71		5	88	19	2M
87	8	9	101	33	3C
101	58	53	117	100	2C
117	60	52	126	5	4CN
161	13	8	129	6	3C
			161	5	3C

^aSólo se indican los picos con intensidad relativa ≥ 5 %. ^bDato de literatura (ref.231). ^cVer la explicación a partir de la página 253.

el hecho de no detectar unidades con menor grado de metilación sería un claro indicio que la xilosa no proviene de xilanos contaminantes²³, sino que formaría parte de la cadena del carragenano como unidad terminal y/o ramificación. Además debe destacarse que en los pasos intermedios de metilación tampoco se detectaron unidades submetiladas en cantidades sensibles, lo cual indicaría la facilidad con que este producto se metila totalmente, un indicio más de su carácter de unidad terminal. Los porcentajes de este azúcar, referidos al 100 % de galactosa pueden apreciarse en la Tabla 35.

TABLA 35. Contenido de 2,3,4-tri-O-metilxilosa (moles/100 moles de galactosas metiladas) en los polisacáridos obtenidos al cabo de la metilación del carragenano soluble.

Derivado	Sistema	Etapa de metilación				
		1ra.	2da.	3ra.	4ta.	5ta.
Alditoles acetilados	A	0,1	1,2	1,7	3,9	9,1
	B	0,3	1,2	1,4	2,0	4,3
	C				3,1	4,6
	D	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Aldononitrilos acetilados	A		3,2	1,9	2,1	2,2
	B		1,3	1,9	2,2	5,2
	C		2,4	4,7	3,5	2,9
	D		1,9	2,4	4,6	4,0
PROMEDIO		-	1,7	2,1	3,0	4,1

n.d.= no determinado.

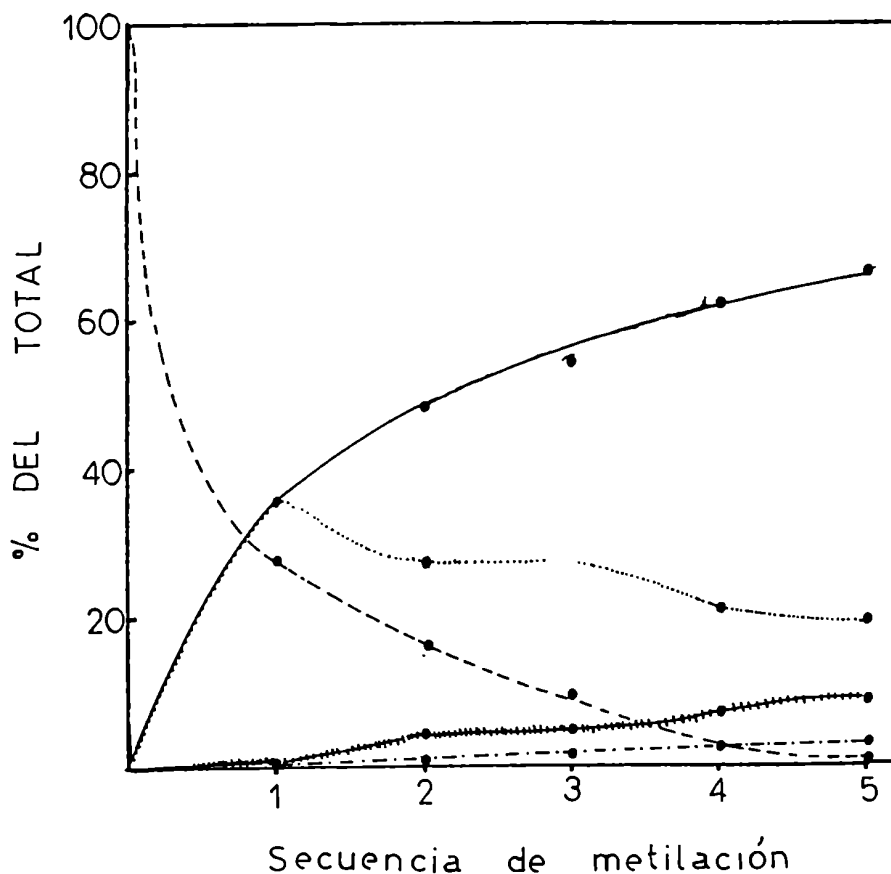


FIGURA 11. Aparición y desaparición de galactosas en función de la etapa de metilación.

- sin metilar
- monometiladas
- dimetiladas
- + + + + + trimetiladas
- . - . - tetrametilada

La aparición de unidades de galactosa parcialmente metiladas en función de la etapa de metilación se observa en la figura 11.

Puede apreciarse que la curva de la galactosa sin metilar es una exponencial que tiende a cero a "metilación infinita"; la proporción de unidades monometiladas es máxima en la primera etapa, y luego va decreciendo levemente, ya que a su desaparición por pasar a azúcares más metilados se contrapone su aparición por metilación de la galactosa. La proporción de unidades dimetiladas, trimetiladas y tetrametiladas va creciendo continua-

mente, en estos dos últimos casos se mantiene en valores bajos, pero en el de las unidades dimetiladas llegó cerca del 70 % para la última etapa de metilación.

Por otra parte, y de los resultados parciales obtenidos, puede observarse la reactividad relativa de los distintos oxhidrilos de la galactosa frente a la metilación. En la Tabla 36 puede apreciarse el porcentaje de cada oxhidrilo que aparece metilado en cada etapa de metilación (tomado a partir de los datos de la Tabla 33).

TABLA 36. Porcentaje de metilación de cada oxhidrilo de la galactosa en cada etapa de metilación.

Oxidrilo	Etapa de metilación				
	1ra.	2da.	3ra.	4ta.	5ta.
2-OH	35	45	48	53	57
3-OH	8	13	16	21	21
4-OH	17	28	33	38	41
6-OH	47	59	64	72	74

Considerando que al cabo de la quinta etapa de metilación, ésta ha sido total, es decir que los oxhidrilos que permanecen sin metilar están implicados en uniones o se encuentran sulfatados, se puede graficar el porcentaje de oxhidrilos metilados de cada tipo en función del número de etapas (dichos porcentajes se determinan con respecto a la última etapa). Ese gráfico se aprecia en la figura 12.

Las curvas tienen formas de tipo exponencial inversa, que se va haciendo asintótica al valor 100 %. Sin embargo, al apreciar la forma en

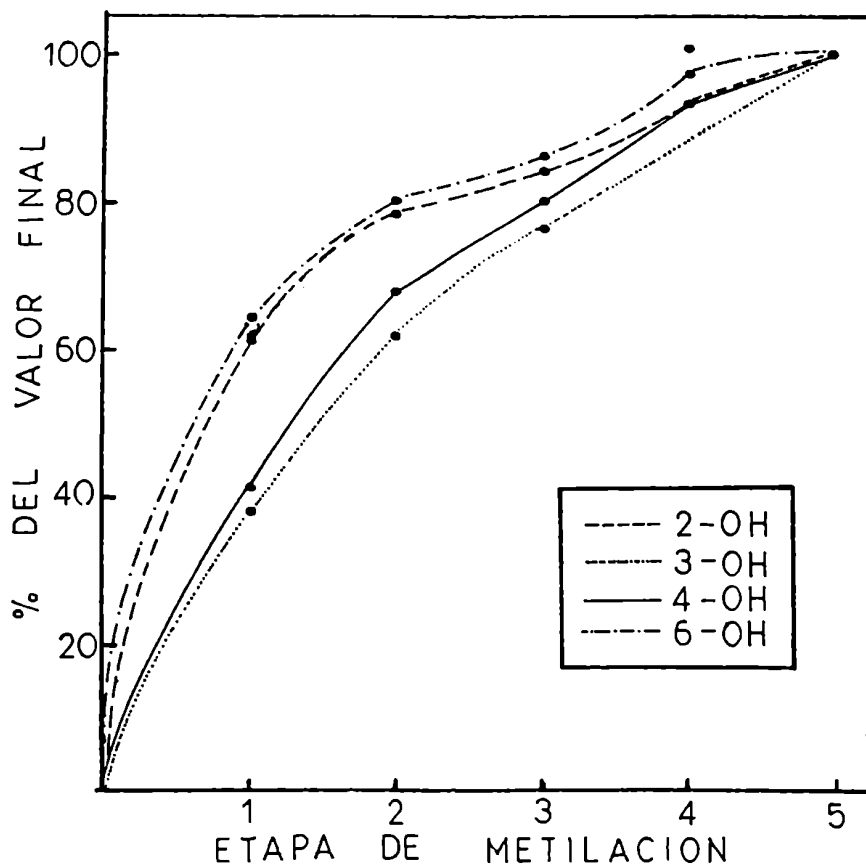


Figura 12. Metilación de cada oxhidrilo en función de la etapa de metilación.

que van creciendo, fundamentalmente en los primeros pasos, cuando el grado de metilación es inferior, se concluye del gráfico (Fig.12) que la capacidad de metilación aumenta en el orden $3\text{-OH} < 4\text{-OH} < 2\text{-OH} < 6\text{-OH}$, lo cual concuerda con lo observado por Norrman²³² para la D-glucosa; en el caso del metilmanósido, para el que se ha estudiado su reactividad frente a diversos agentes metilantes²³³, las reactividades del 3-OH y 4-OH aparecen invertidas.

En este caso, en cambio, la metilación parece seguir el curso más lógico de reactividad: el oxhidrilo de 6-, más expuesto por ser primario es el más "fácil" de metilar; luego el 2-, más ácido que el resto de los oxhidrilos secundarios, y finalmente los de 3- y 4-.

Según Norman²³⁴ el oxhidrilo de 4- también presenta un efecto inductivo del oxígeno del anillo y por ende es también algo más ácido , lo cual explica también su mayor reactividad, respecto del 3-OH. Ya se había demostrado la mayor reactividad del 4-OH (axial) frente a la bencilación²³⁵. Sin embargo, se habían sugerido dificultades para la metilación de oxhidrilos axiales (4-OH) de galactosas unidas en la posición 3-²³⁶ y en la de polisacáridos sulfatados⁸⁴.

AJUSTE DE LOS RESULTADOS DE METILACION

Luego de efectuado el estudio, se rellenó una nueva columna de ECNSS-M al 3 % (sistema A). Esta fase, que suele ser inestable, presentó una excelente resolución en esta columna recién preparada, y es así que se recurrió a ella para rever los resultados.

Los tiempos de retención de los aldononitrilos en la nueva columna se encuentran en la página 250 , donde se profundizará el estudio de estos derivados; los que corresponden a los alditoles, pueden observarse en la Tabla 37.

Con la nueva resolución brindada por los alditoles, se logran algunas separaciones adicionales: los trimetilados, que antes aparecían como pico único ahora se resuelven en dos picos distintos, y la 3,6-di-0-metilgalactosa logra resolverse del resto aún en pequeña cantidad. Además por intermedio de los aldononitrilos (ver página 250) se puede resolver la 6-0-metilgalactosa de algunas unidades dimetiladas antes inseparables.

TABLA 37. Tiempos de retención de los alditos acetilados parcialmente metilados derivados de la galactosa, en el sistema A.^a

Galactosa metilada en:	T_{6-0-Me}^b	σ^d	T_{t+g}^c	σ^d
2,3,4,6-tetra	0,256	0,003	0,105	0,002
2,4,6-tri	0,459	0,002	0,188	0,002
2,3,6- + 3,4,6-tri	0,493	0,004	0,202	0,003
2,6- + 4,6-di	0,741	0,009	0,303	0,004
3,6-di	0,866	0,005	0,355	0,005
6-mono	1		0,409	0,005
2,3-di	1,161	0,006	0,473	0,006
2,4-di	1,261	0,006	0,516	0,006
2-mono	1,595	0,007	0,652	0,007
3-(4-)mono + sin metilar	2,190	0,097	0,894	0,002
2,3,4-tri-0-Me-xilosa	0,147	0,001	0,060	0,001

^aPromedio de diez determinaciones. ^bRelativo al tiempo de retención del 1,2,3,4,5-penta-0-acetil-6-0-metilgalactitol. ^cRelativo a la suma de los tiempos de retención del 1,5-di-0-acetil-2,3,4,6-tetra-0-metilgalactitol y del hexa-0-acetilgalactitol. ^dDesviación standard.

Es así que se obtiene un panorama completo de los resultados de metilación del carragenano soluble en la Tabla 38.

TABLA 38. Composición (moles %) de azúcares metilados de los polisacáridos obtenidos al cabo de las distintas etapas de metilación del carragenano soluble.

Galactosa metilada en:	Etapa de metilación				
	1ra.	2da.	3ra.	4ta.	5ta.
2,3,4,6-tetra	0,4	0,5	0,7	2,2	3,1
2,4,6-tri	0,6	1,5	2,5	2,5	3,5
2,3,6-tri	0,3	1,3	2,0	2,9	1,3
3,4,6-tri	0,1	0,4	0,3	3,2	2,6
2,6-di	↑	37,5	37,2	39,0	40,3
4,6-di	34,7 ↓	9,3	15,3	17,1	19,4
3,6-di		1,2	1,5	1,5	1,1
2,3-di	↑	1,9	2,1	2,6	3,1
2,4-di	1,6 ↓	1,8	2,0	1,7	4,2
6-mono	16,6	8,7	6,3	2,0	1,6
2-mono	9,6	4,0	3,1	4,1	3,2
3-mono	6,1	9,2	10,4	11,8	7,8
4-mono	4,5	8,7	7,6	4,5	4,0
Sin metilar	25,5	12,2	7,0	1,9	1,0
2,3,4-tri-O-metilxilosa	-	1,7	2,1	2,9	3,8

ANALISIS DE LOS RESULTADOS DE METILACION

Como ya es conocido, la formación de geles en presencia del ion potasio depende de la posibilidad que tienen los carragenanos de formar dobles hélices inducidas por ese catión. Ya que la formación de dobles hélices está condicionada a la conformación de la molécula, y ésta queda determinada por la estructura primaria de la misma, nuestro estudio se abocó a conocer los factores estructurales que promueven la solubilidad.

La estructura más insoluble es la adjudicada al K-carragenano (Fig.6, Cap.II), en la que se alternan unidades de D-galactopiranososa 4-sulfato y 3,6-anhidro-D-galactosa, en perfecta sucesión de uniones $\alpha(1\rightarrow3)$ y $\beta(1\rightarrow4)$. Esta secuencia da como resultado una estructura en conformación naturalmente helicoidal (fig. 13a).

Alguna proporción de las unidades de 3,6-anhidrogalactosa puede haber sido reemplazada por unidades de galactosa 6-sulfato^{55,237}, lo cual tiene profundas implicancias en la forma total, ya que si bien ambas presentan uniones $\beta(1\rightarrow4)$, se encuentran en conformación diferente, ya que la silla 1C_4 ligada por dos uniones ecuatoriales fue reemplazada por la 4C_1 que presenta una unión axial. El modelo computado²³⁸ indica que ese reemplazo ha producido un "kink" (pliegue) en la secuencia helicoidal regular (fig. 13b).

Aparecen así zonas con la capacidad de formar dobles hélices separadas por secuencias que actúan como kinks. Se forma un reticulado entrecruzado, y por lo tanto se produce un gel cuando esa estructura es lo suficientemente regular y cuando los kinks no son muchos. Sin kinks, se forma una doble hélice que no tiene posibilidad de entrecruzarse, y por lo tanto no hay gelificación²³⁸. Por el contrario, la presencia de numerosas unidades "kink" hace que las zonas de interacción sean muy cortas y que se difi-

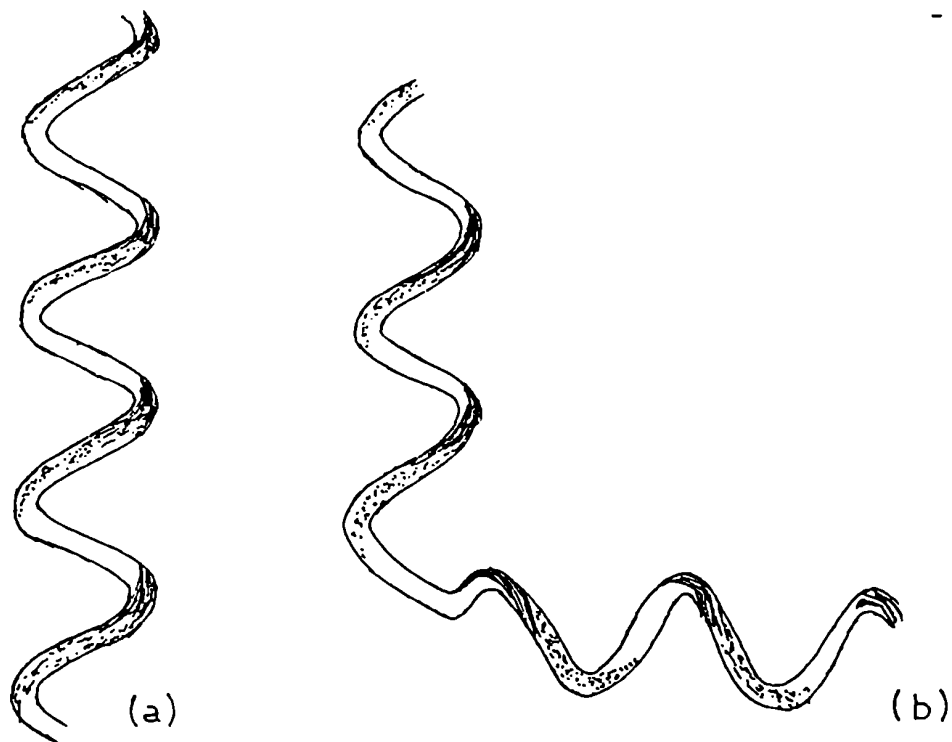


Figura 13. Influencia de la estructura primaria en la conformación de la molécula. a) sin kinks; b) con un kink.

culte así la formación de dobles hélices; para formarse los geles se requieren mayores concentraciones de cloruro de potasio, o bien su formación resulta impedida. Extrapolando esos resultados, todo aquello que interrumpa la regularidad de las moléculas, y que impida el entrecruzamiento de las dobles hélices resultará en un incremento de la solubilidad.

En el caso de la fracción precipitada entre 0,70 y 1,05 M de cloruro de potasio, analizada por Matulewicz y Cerezo¹²⁷, rica en 3,6-anhidrogalactosa, se evidenciaron claras desviaciones de la estructura de un K-carragenano, que incluían grandes cantidades de galactosa 2-sulfato unidas por la posición 3-, y además un alto porcentaje de unidades monometiladas (21,2 %), provenientes de puntos de ramificación o unidades disulfatadas, que determinarían la solubilidad del producto.

La otra fracción intermedia^{126,127} encaja dentro de las características de un λ -carragenano, dada la aparición de 4,6-di-0-metilgalactosa y 3-0-metilgalactosa como productos preponderantes de hidrólisis del carragenano metilado¹²⁷. Sin embargo existen otras unidades; sobresale fundamentalmente la presencia de una tercera parte de unidades monometiladas: a la antes indicada, proveniente de galactosa 2,6-disulfato unida por la posición 4- se suman otras indicativas de ramificación, lo cual podría quedar justificado por el alto contenido (4,6 %) de 2,3,4,6-tetra-0-metilgalactosa.

Con respecto a la fracción que estamos analizando, más soluble que la anterior pese a que contiene mayor proporción de 3,6-anhidrogalactosa, no se asemeja a la segunda fracción intermedia, ya que entre las unidades de galactosa ligadas por la posición 3-, predominan las que están sulfatadas en 0-4 (y que indicarían una estructura de tipo μ - o ν -) y es menor la proporción de las sulfatadas en 0-2, que representarían a un λ - o ξ -carragenano. Existe casi un 70 % de estas unidades monosulfatadas, de las cuales la mayor parte está representada por esos dos azúcares. Sin embargo hay otros tipos de unidades, cubriendo casi todas las posibilidades. Entre las otras unidades dimetiladas se cuenta un 3 % de 2,3-di-0-metilgalactosa, característica de un μ -carragenano, y un 4 % de 2,4-di-0-metilgalactosa, que podría representar una unidad de galactosa ligada por la posición 3- y que porte un sulfato en 0-6. tal como se halló en un κ -carragenano de *Phyllophora nervosa*⁸³ por ¹³C-RMN; también se ha atribuido esa posición 6- a ramificaciones⁵⁸: en este caso concuerda el porcentaje de 2,3,4-tri-0-metilxilosa con el de 2,4-di-0-metilgalactosa, lo que avalaría esa postulación. Llama la atención la virtual ausencia de 3,6-di-0-metilgalactosa, típica del ξ -carragenano, y que había sido sugerida para esta fracción¹²⁶.

Existe también un 17 % de unidades monometiladas: el 8 % es 3-O-metilgalactosa, característica de λ -carragenanos. Las otras unidades pueden representar galactosas disulfatadas o puntos de ramificación monosulfatados.

Las unidades trimetiladas son relativamente escasas, pero llama la atención la presencia de 3,4,6-tri-O-metilgalactosa, indicativa de unión (1 \rightarrow 2), hecho completamente nuevo en carragenanos. Esa unión en 2- introduciría un neto cambio de ángulo de la molécula, haciéndola volver sobre sí misma, lo cual representa un "kink" más activo, que impediría la formación de agregados y podría ser una de las causas de la solubilidad de este carragenano. Considerando el peso molecular relativamente alto de esta fracción, el 3 % de 2,3,4,6-tetra-O-metilgalactosa sumado a la presencia de xilosa terminal, indicarían la existencia de ramificaciones.

Puede concluirse que esta fracción muestra características intermedias entre las de un λ - y un μ -carragenano, con algunos factores nuevos como la presencia de ramificaciones, las uniones (1 \rightarrow 2) y la existencia de unidades atípicas. Estas aparecen también en estudios posteriores sobre las dos subfracciones del carragenano soluble y serán discutidas más adelante.

ACCION DEL DIMETILSULFOXIDO SOBRE EL CARRAGENANO SOLUBLE

Como ya se explicó en el Capítulo IV, Usov y col.^{68,146} utilizaron el método solvolítico para producir la desulfatación de polisacáridos sulfatados, de modo de poder luego determinar inequívocamente las

posiciones de unión y sulfatación por metilación ulterior.

El método solvolítico fue utilizado por Matulewicz y Cerezo¹⁴⁹ para la desulfatación del carragenano total de *Iridaea undulosa*. Por calentamiento durante 9 horas en dimetilsulfóxido conteniendo un 2 % de piridina lograron disminuir el contenido de sulfato de 30,8 a 5,8 % (expresado como SO_4) con un rendimiento del 80 %.

Cuando se intentó aplicar dicho método al carragenano soluble, en primer lugar se encontraron dificultades por no ser dicho polisacárido totalmente soluble en dimetilsulfóxido. Lo mismo ya le había acontecido a Matulewicz y Cerezo (comunicación personal) con la segunda fracción intermedia. De ese modo la toma de alícuotas debió verificarse sobre una suspensión; los resultados se presentan en la Tabla 39.

TABLA 39. Desulfatación del carragenano soluble.

Tiempo (h)	Sulfato (SO_4 %)	$[\alpha]_D$ (°)	Viscosidad ^a	3,6-anhidrogala- tosa ^b
0	32,4	37,0	1,00	24,6
1	25,6	38,0	0,96	17,7
2,5	25,8	34,5	0,87	14,5
4,5	28,7	34,0	0,90	21,3
6,5	22,5	37,0	0,82	12,1
9,5	25,3	39,5	0,86	15,1
12	29,0	41,0	0,91	22,1

^aRelativa a la viscosidad a t=0. ^b Porcentaje considerando un polímero exento de sulfato.

Pese a la dispersión de los valores se observó que la pérdida total de sulfato no superó el 20 %, que existió disminución de la viscosidad, lo que podría indicar degradación parcial; lo mismo estaría siendo sugerido por la disminución en el contenido de 3,6-anhidrogalactosa.

El poder rotatorio se mantuvo prácticamente invariable, lo cual es lógico considerando la pequeña pérdida de sulfato experimentada.

Si bien la reacción de desulfatación no puede considerarse un éxito, la observación del recipiente de reacción luego de 12 horas indujo a creer que parte del polisacárido se había solubilizado en el dimetilsulfóxido (ya que la solución era viscosa) y parte quedaba insoluble (aunque "hinchado"). Se centrifugó la mezcla, se disolvió el residuo en agua, y ambos se dializaron contra agua. Por liofilización se obtuvieron los dos polisacáridos; los análisis indicaron que si bien los contenidos de sulfato eran similares (28,5 % en el soluble en DMSO y 25,6 % en el insoluble), la diferencia más notoria entre ambos era que el insoluble estaba prácticamente exento de 3,6-anhidrogalactosa, mientras que en el soluble se concentraba toda la 3,6-anhidrogalactosa de la fracción; además la viscosidad del producto soluble era menor que la del insoluble. Resultó por ende interesante la separación ejercida por el dimetilsulfóxido.

Se tomaron entonces 100 mg de la sal de piridinio del carragenano soluble con 15 ml de dimetilsulfóxido (en ausencia de piridina), y se dejaron durante 24 horas con agitación violenta y constante, a temperatura ambiente. Cuando se intentó centrifugar se observó que casi todo era insoluble, lo cual denotaba que a temperatura ambiente prácticamente no se verifica solubilización. Luego se dejó en estufa a 100° y se fueron tomando alícuotas a distintos tiempos, las cuales se centrifugaron, y se

hicieron sobre las soluciones reacciones colorimétricas de azúcares (Figura 14).

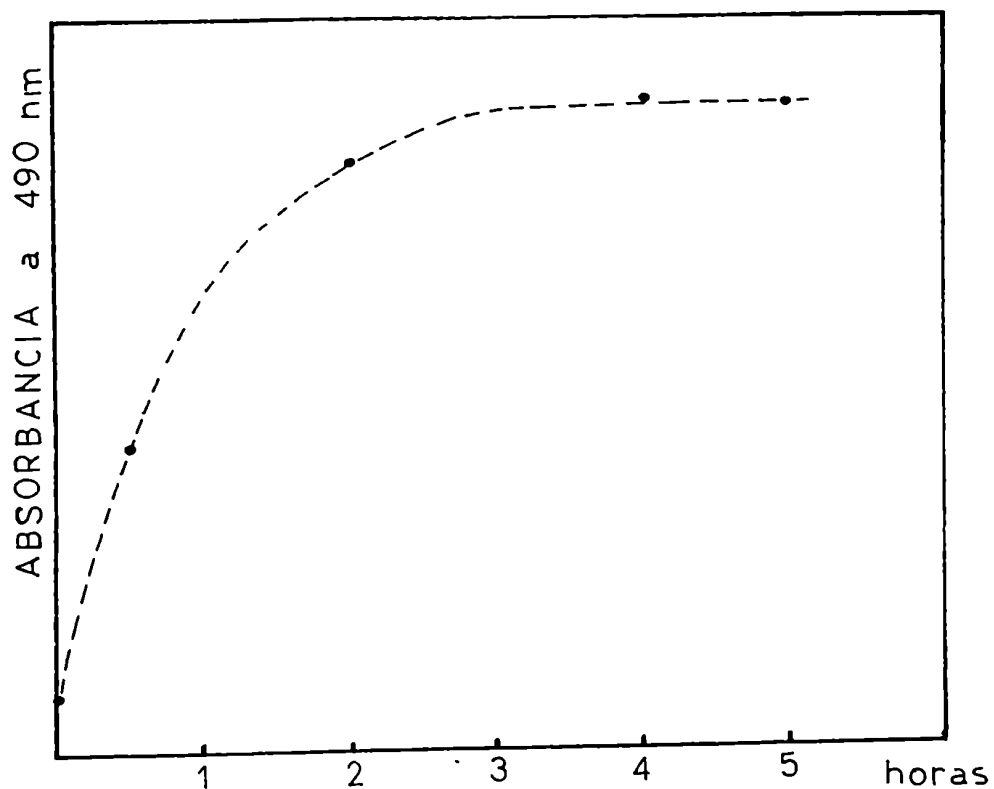


Figura 14. Solubilización de la sal de piridinio del carragenano soluble a 100°, en estufa.

Como se observa, en aproximadamente 3 horas de calentamiento se llega al máximo de solubilización. También se efectuó la misma reacción, durante 4 horas, partiendo de la sal de potasio del producto. Los resultados obtenidos pueden apreciarse en las Tablas 40 y 41.

TABLA 40. Fraccionamiento de la sal de piridinio del carragenano soluble con dimetilsulfóxido

Producto	Rendimiento (%)	Relación molar Gal:3,6-ahg:SO ₃ K	[α] _D (°)	[η] (dl/g)
Original		1:0,21:1,35	39,8	4,48
Soluble DMSO	55	1:0,31:0,99	44,9	1,84
Insoluble DMSO	26	1:0,05:1,20	42,0	3,45

TABLA 41. Fraccionamiento de la sal de potasio del carragenano soluble con dimetilsulfóxido.

Producto	Rendimiento (%)	Relación molar Galactosa:3,6-anhgal:sulfato
Original		1:0,26:1,28
Soluble DMSO	44	1:0,13:0,96
Insoluble DMSO	17	1:0,15:0,88

En ambos casos se produjo desulfatación parcial; sin embargo, en el caso de la sal potásica ésta fue acompañada por destrucción de la 3,6-anhidrogalactosa y bajo rendimiento, claro indicio de degradación, lo cual ya había sido observado por Usov y colaboradores^{68,148}.

Además de la ya observada degradación de la sal de potasio por efecto del DMSO, puede observarse (Tabla 40) que mientras sobre la sal

de piridinio se produce la separación de dos productos de características analíticas evidentemente diferentes, la sal de potasio da dos productos similares entre sí, en los cuales posiblemente la solubilización en el dimetilsulfóxido está gobernada por otros factores, y que, dada la destrucción parcial del polisacárido allí producida, no se estudiaron.

Dado que 3 horas de calentamiento es un tiempo algo prolongado, y ante la evidencia de desulfatación que allí ocurría, se efectuó el calentamiento en dimetilsulfóxido mejorando las condiciones de agitación, a fin de acortar los tiempos y obtener fracciones no modificadas. Por agitación mecánica violenta, se observó la curva de solubilización que se aprecia en la figura 15:

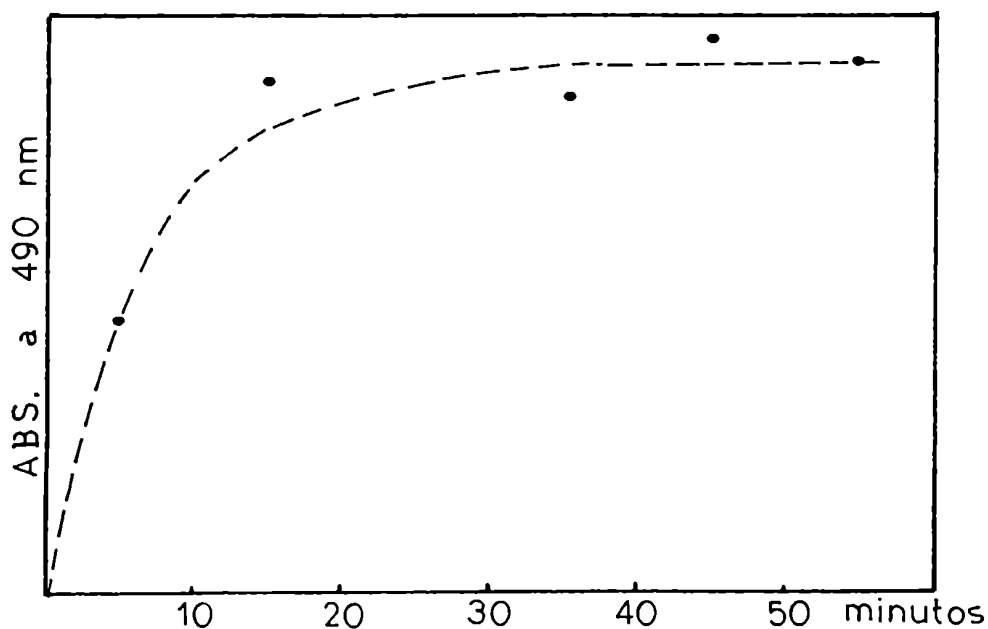


Figura 15. Solubilización de la sal de piridinio del carragenano soluble, a 100° , con agitación.

En 40-50 minutos se llegó a un máximo de solubilización, aunque la reacción se mantuvo durante una hora.

Los datos analíticos de las fracciones obtenidas en forma preparativa se indican en la Tabla 42.

TABLA 42. Características de los productos separados con DMSO a partir del carragenano soluble.

Producto	Carragenano soluble en KCl 2M (C)	Fracción soluble en DMSO (SD)	Fracción insoluble en DMSO (ID)
Galactosa (anhidro %)	48,3	35,7	44,0
3,6-anhidrogalactosa (anh.%)	4,0	6,8	0,8
Sulfato (SO ₃ K %)	44,2	31,6	40,1
Relación molar galactosa:3,6-anhidrogalactosa:sulfato	1:0,09:1,25	1:0,21:1,21	1:0,02:1,24
6-sulfato (% SO ₃ K)	7,3	5,6	8,4
Viscosidad intrínseca (dl/g)	2,72	0,97	3,18
[α] _D (°)	56,0	39,6	74,2
Oxidación con periodato ^a	2,3	2,2	2,7
Xilosa ^b	n.d.	2,9	9,3
Rendimiento (%)		57,7	38,8

^aUnidades anhidro promedio consumidas por mol de periodato. ^b moles / 100 moles de galactosa.

En este caso el producto de partida (carragenano C) tenía bajo contenido de 3,6-anhidrogalactosa, pero de cualquier modo se ha producido una separación neta, con un insoluble en dimetilsulfóxido (carragenano ID, 38,8 %) prácticamente exento del anhidroazúcar y un soluble (carragenano SD, 57,7 %) que lo contiene. Los datos sugieren que la desulfatación fue nula como puede desprenderse de las relaciones molares del producto de partida y ambas subfracciones; la degradación - si existió - no fue apreciable.

De los espectros infrarrojo de los tres productos (figura 16) pueden obtenerse algunos datos adicionales: en el del carragenano C se observa una banda ancha ubicada entre 820 y 850 cm^{-1} que indicaría la presencia de distintos tipos de sulfatación, con preminencia de los sulfatos ubicados sobre oxhidrilos axiales (μ - o ν -carragenano). El espectro del producto SD muestra el mismo esquema, pero la señal ancha aparece más desplazada hacia 845 cm^{-1} y existiría un hombro a 805 cm^{-1} que representa el 2-sulfato de unidades de 3,6-anhidrogalactosa; se observa también el pico a 930 cm^{-1} característico del anillo 3,6-anhidrogalactosídico. En el producto ID la banda principal de sulfato aparece desplazada hacia un máximo en 830 cm^{-1} , lo cual indicaría la presencia de unidades de galactosa 2-sulfato (λ - o ξ -carragenanos).

La cromatografía en geles de Sephadex G-100 utilizando urea 7M como solvente (figura 17) indica que las fracciones SD e ID resultan excluidas del gel, lo que indicaría un peso molecular mayor que 40.000; el carragenano C en cambio, penetra en el gel, dando un pico ancho y asimétrico centrado en una zona de peso molecular aparente 19.000 (figura 17), determinado por referencia a polisacáridos no sulfatados. En cambio, la utilización de la ecuación de Mark-Houwink a estos productos, con los datos de las

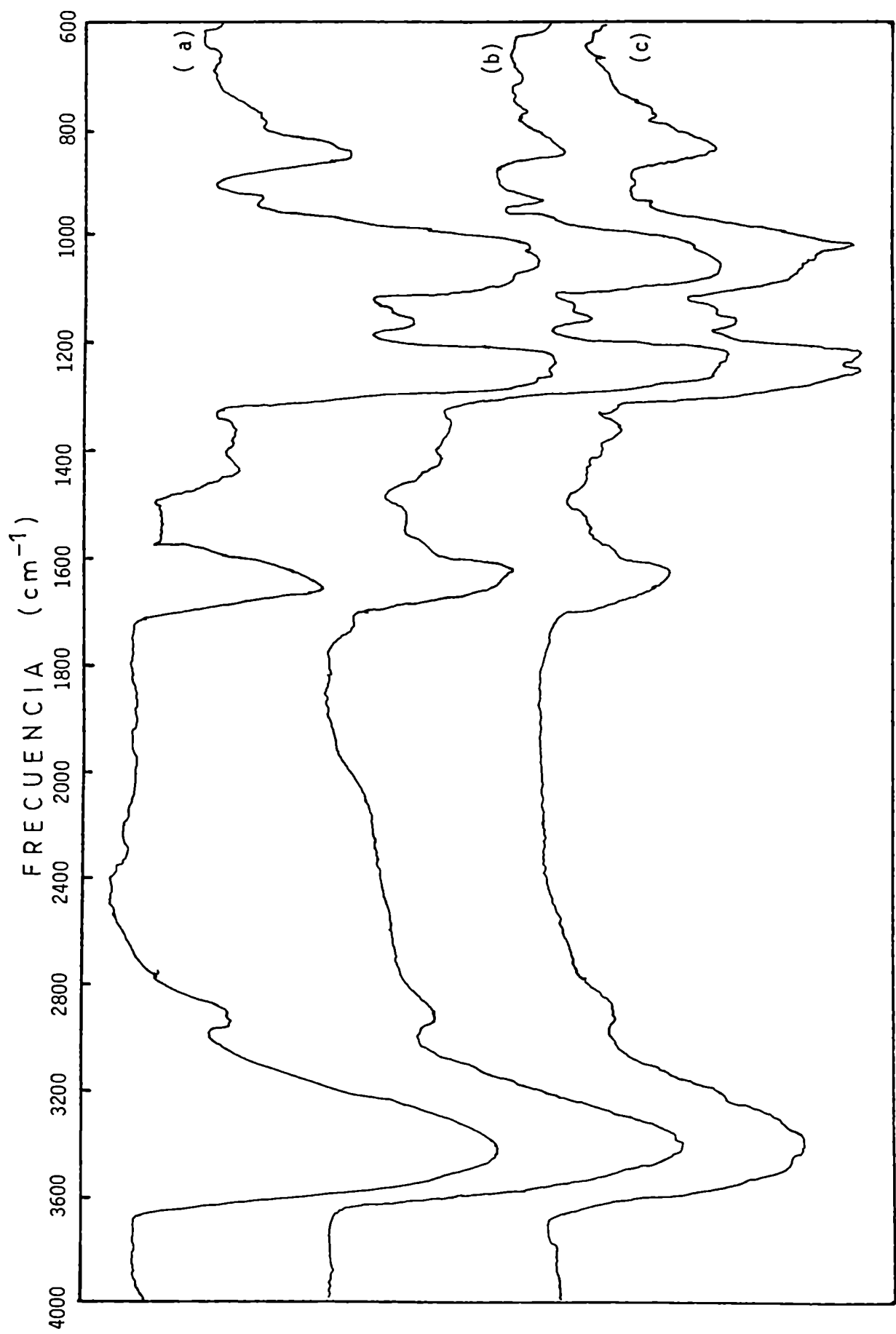


Figura 16. Espectros infrarrojo de: a) carragenano soluble en DMSO (SD) y c) fracción insoluble en DMSO (ID)

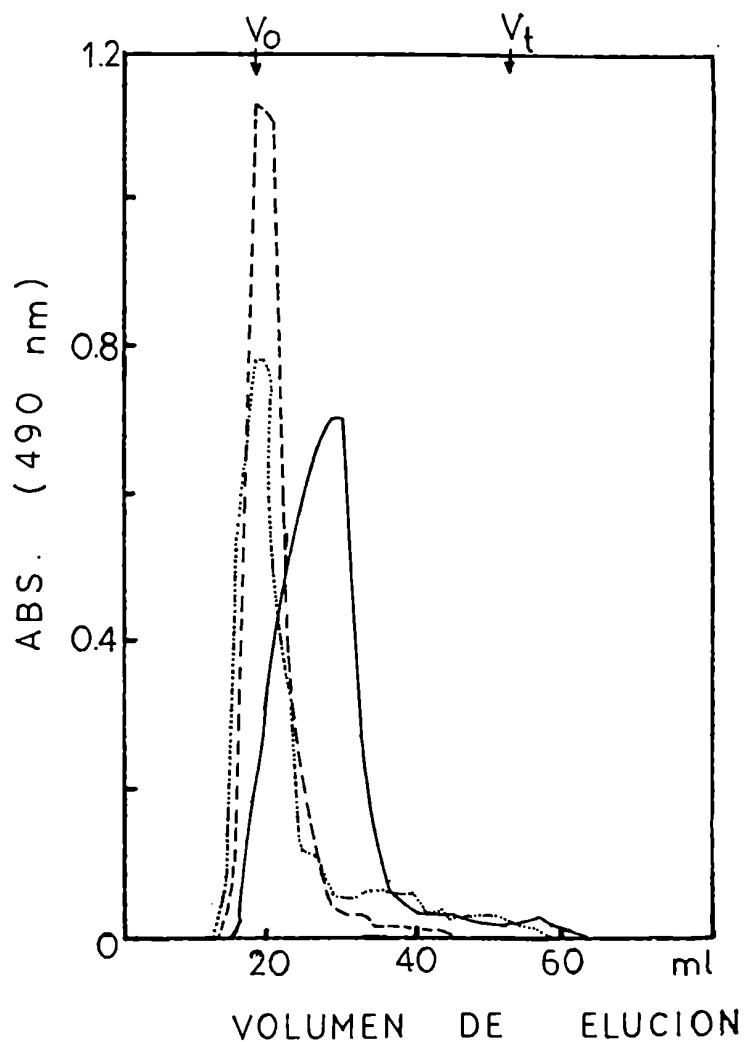


Figura 17. Cromatografía en geles de Sephadex G-100 con urea 7M de:
 (—) carragenano C; (---) carragenano SD y (-·-·-) carra-
 genano ID.

las constantes brindados por Masson²³⁹ para el carragenano de *Chondrus crispus* llevan a un peso molecular de 42.000 para el carragenano C; 18.000 para el SD y 48.000 para el ID; los datos obtenidos por dosaje de grupos reductores avalan aproximadamente estos últimos valores (ver luego, en los estudios de autohidrólisis). Eso podría indicar que el límite de exclusión para polisacáridos sulfatados estaría por encima del valor 40.000 determinado para los no sulfatados; por otro lado

los pesos moleculares aparentemente mayores obtenidos para la fracción SD podría indicar algún tipo de asociación no impedida por la urea 7M.

Esa asociación debe ser del tipo "no-ordenante" ya que los poderes rotatorios de los productos (Tabla 43) no se alteran mayormente en soluciones de urea 7M, cloruro de sodio o cloruro de potasio 2M.

TABLA 43. Poderes rotatorios de los carragenanos en distintos medios.

CARRAGENANO	Medio			
	NaCl 0,1 M	NaCl 2 M	KCl 2 M	Urea 7 M + NaCl 0,1M
C	56,0	60,7	61,6	61,9
SD	39,2	46,3	40,7	40,3
ID	70,9	52,8	73,1	72,9

En todos los casos existió un leve crecimiento del poder rotatorio en presencia de cloruro de potasio o urea, pero la diferencia fue pequeña.

La relación molar del producto SD (Tabla 42) se asemeja a la de un μ - o ν -carragenano. Su menor peso molecular también lo asimilaría a esos productos. En cambio el producto ID, de mayor peso molecular se vincularía más, por su relación molar galactosa:3,6-anhidrogalactosa: sulfato a la definición de Rees de un λ -carragenano.

De acuerdo a lo que se conoce hasta el momento, el dimetilsulfóxido es un excelente solvente para los hidratos de carbono en general²⁴⁰.

Disuelve, por ejemplo, tanto a la amilosa como a la amilopectina, y el almidón puede fraccionarse, con su ayuda, por acción de otro solvente.

Se ha comprobado también un aumento de la solubilidad con la temperatura; dicho aumento está relacionado con la posibilidad de romper el reticulado cristalino, y dado el alto punto de ebullición del dimetilsulfóxido la temperatura puede incrementarse en forma considerable; por otra parte el alto momento dipolar y la alta constante dieléctrica lo hacen un buen solvente para los azúcares en general.

En el caso de los carragenanos solubles de *Iridaea undulosa*, lo observado, es decir la producción de un fraccionamiento por solubilización a 100° y la inexistencia de este último a temperatura ambiente parecerían indicar que el paso determinante de la solubilización es la ruptura del reticulado, seguida de posterior solvatación. Los caracteres analíticos evidencian que los productos obtenidos por solubilización (Tabla 42) no son artificios producidos por el calentamiento breve, sino productos originalmente presentes. Considerando que las estructuras de las dos fracciones son similares se podría suponer, en primera aproximación, que las interacciones al estado sólido serían parecidas, y por ende las diferencias de energía de ruptura del reticulado estarían dadas únicamente por diferencias en el tamaño de las moléculas. Se conoce ya que los λ -carragenanos son de mayor peso molecular que los κ - o ι -, y al ser los μ - o ν - los precursores biológicos de esos carragenanos es lógico suponer que el λ -carragenano será de mayor peso molecular que el μ -/ ν - carragenano. Esto resulta de acuerdo con las viscosidades intrínsecas de las fracciones SD e ID, y sería por ende factible que el fraccionamiento estuviera determinado por la diferencia de pesos moleculares.

ESTUDIOS DE METILACION DE AMBAS FRACCIONES

Dado que - aparentemente - los productos SD e ID representaban componentes diferentes, éstos fueron sometidos al correspondiente análisis por metilación, la cual se efectuó por el ya mencionado método de Haworth²²⁸.

Sin embargo, debido a las pequeñas cantidades de material disponible había necesidad de adaptar el método a las mismas. Se optó por efectuar la reacción en balones de 25 ml provistos de tapones plásticos herméticos que quedaban atravesados por dos agujas unidas a sendas jeringas desde las cuales se hicieron caer, gota a gota, los reactivos. Cada balón llevaba en su interior un pequeño buzo magnético al que se hizo rotar con energía.

El control de la metilación se efectuó verificando la constancia de composición de monosacáridos tras dos etapas de metilación sucesivas, por cromatografía gas-líquido. Fueron necesarias cuatro secuencias de metilación, las tres primeras a 0°, y la última a temperatura ambiente, para llegar a tener ambos productos totalmente metilados. Las masas utilizadas y obtenidas en cada secuencia pueden apreciarse en la Tabla 44.

TABLA 44. Rendimientos obtenidos en cada etapa de la metilación de ambas fracciones del carragenano "soluble", SD e ID

		ETAPA DE METILACION			
		1°	2°	3°	4°
SD	Se partió de	50,5 mg	36,8 mg	30,6 mg	26,1 mg
	Se obtuvieron	39,8 mg	35,4 mg	27,7 mg	22,2 mg
ID	Se partió de	53,8 mg	50,8 mg	42,2 mg	39,9 mg
	Se obtuvieron	54,5 mg	45,6 mg	42,1 mg	28,5 mg

FRACCION INSOLUBLE EN DIMETILSULFOXIDO

Los resultados de la metilación de la fracción insoluble en dimetil-sulfóxido (ID), por derivatización a los correspondientes alditoles acetilados y aldononitrilos acetilados pueden apreciarse en las Tablas 45 y 46, respectivamente.

TABLA 45. Composición (moles %) de azúcares (derivatizados como 0-acetil-0-metilalditoles) obtenidos del carragenano ID tras cada etapa de metilación.

Galactosa metilada en:	ETAPA DE METILACION			
	1ra.	2da.	3ra.	4ta.
2,3,4,6-tetra	-	0,1	1,7	↑ 5,2
2,4,6-tri	↑ 0,4	↑ 0,6	2,3	↓
2,3,6- + 2,4,6-tri	↓	↓	2,6	3,8
2,6- + 4,6-di	6,4	18,2	46,4	51,8
3,6-di	0,4	1,7	4,9	3,4
6-mono	↑ 12,7	↑ 14,3	↑ 13,1	9,3
2,3-di	↓	↓	↓	1,1
2,4-di	0,9	1,8	6,8	7,3
2-mono	2,8	2,8	3,2	1,1
3-(4-)mono + sin metilar	76,3	60,7	18,9	17,0

TABLA 46. Composición (moles %) de azúcares (derivatizados como O-acetil-O-metilaldononitrilos) obtenidos del carragenano ID tras cada etapa de metilación.

Galactosa metilada en:	ETAPA DE METILACION			
	1ra.	2da.	3ra.	4ta.
2,3,4,6-tetra	-	-	-	tr.
2,4,6- + 2,3,6-tri	3,6	↑ 9,2	5,8	6,8
3,4,6-tri	↑ 3,5	↓	↑ 12,1	3,8
2,6-di	↓	7,1	↓	12,6
4,6- + 3,6-di	6,2	19,1	40,5	53,8
2,3-di	0,9	1,0	1,6	1,6
6-mono + 2,4-di	14,4	12,9	10,0	4,6
2-mono	2,5	1,7	-	0,9
3-mono	4,9	13,3	11,0	6,8
4-mono	8,1	12,9	12,0	9,0
Sin metilar	56,0	22,8	6,9	0,1

Por último, en la Tabla 47 se pueden apreciar los resultados finales de metilación de esta fracción.

La metilación del carragenano ID (Tabla 47) se verificó en forma lenta, como puede desprenderse del bajo grado de metilación en la 1ra. etapa donde la galactosa sin metilar prácticamente llegaba al 60 % del total, y otro 30 % se repartía entre las unidades monometiladas, de las cuales

TABLA 47. Composición (moles %) de azúcares metilados de los polisacáridos obtenidos al cabo de las distintas etapas de metilación del carragenano ID.

Galactosa metilada en:	ETAPA DE METILACIÓN			
	1ra.	2da.	3ra.	4ta.
2,3,4,6-tetra	-	0,1	0,9	tr.
2,4,6-tri	↑ 2,0	↑	3,1	5,3
2,3,6-tri	↓	4,8	1,4	0,8
3,4,6-tri	-	↓	2,2	3,2
2,6-di	3,0	6,1	9,3	10,9
4,6-di	4,7	14,6	36,0	43,3
3,6-di	0,5	2,0	4,7	3,5
2,3-di	0,8	1,1	2,2	1,8
2,4-di	1,0	1,7	5,3	4,2
6-mono	12,5	12,0	8,1	5,3
2-mono	2,7	2,2	1,6	1,0
3-mono	5,2	14,7	8,9	6,7
4-mono	8,4	14,2	9,7	8,8
Sin metilar	58,7	25,2	5,5	0,1
2,3,4-tri-O-metilxilosa	0,5	1,4	1,2	5,0

sobresalía la 6-0-metilgalactosa. En la segunda etapa disminuyó en más de la mitad el contenido de galactosa, mientras que creció sensiblemente el porcentaje del resto de las unidades, fundamentalmente 3-, 4- y 4,6-di-0-metilgalactosa; éste último monosacárido resultó ser el componente principal del producto permetilado. Al llegar a la tercera etapa, se observan valores muy cercanos a los del producto final, y muy pocos indicios de submetilación.

El análisis del producto permetilado indica que el carragenano ID está compuesto fundamentalmente por unidades monosulfatadas (64 %), con menor proporción de galactosas no sulfatadas (9 %) y disulfatadas (22 %), aunque en realidad algunos de estos últimos residuos pueden representar puntos de ramificación sustituidos por un único residuo de xilopiranososa (5 %). Solamente se detectaron trazas de tetra-0-metilgalactosa, lo cual confirma el alto peso molecular de esta fracción. La proporción de 3,6-anhidrogalactosa aumentó de 0,8 % en el carragenano ID a 8,2 % en el producto permetilado; ésto demuestra que gran parte de las unidades enlazadas en la posición 4- que portaban sulfato en 0-6 o en 0-2 y 0-6 han sufrido transformación alcalina en el medio de metilación, y consecuentemente los porcentajes de los correspondientes azúcares metilados (2,3-di- y 3-0-metilgalactosa) exhibidos en la Tabla 47 son menores que los reales.

Como puede apreciarse, las unidades que se encuentran en mayor proporción son las que caracterizan a un carragenano del tipo λ -: 4,6-di-0-metilgalactosa, indicativa de la unión en 3- y el sulfato en 2-, más 3-0-metilgalactosa, indicativa de unión en 4- y sulfato en 2- y 6-. También se aprecia un 11% de 2,6-di-0-metilgalactosa, que indica una galactosa-4-sulfato unida por la posición 3-, característica de ν - y μ -carragenanos.

Existen otras unidades que son inusuales, a saber: a) galactosas enlazadas por la posición 2- (indicadas por la 3,4,6-tri-0-metilgalactosa),

que como ya se explicó provocan un giro en la dirección de la cadena, impidiendo la formación de agregados ordenados y favoreciendo un entrecruzamiento de las cadenas que ocasiona altas viscosidades; b) la representada por la 4-0-metilgalactosa (9 %), también encontrada en importantes proporciones en otros carragenanos permetilados de *Iridaea undulosa*¹²⁷ que se originaría en un residuo de galactosa ligado por la posición 3- y disulfatado en 2- y 6-, o con una ramificación y un sulfato en esos puntos; en cualquiera de los casos se inhibe la función de esos oxhidrilos como formadores de uniones hidrógeno que estabilizan las dobles hélices; c) las ya mencionadas ramificaciones de xilopiranosas, posiblemente unidas a la cadena principal a través de la posición 6- de galactosas ligadas por 3-, tal como se sugirió previamente⁵⁸, lo cual está de acuerdo con el hecho que la 2,4-di-0-metilgalactosa y el derivado de xilosa fueron hallados en cantidades similares.

FRACCION SOLUBLE EN DIMETILSULFOXIDO

Los resultados de la metilación, es decir la composición molar aproximada (%) en monosacáridos, por derivatización a los correspondientes alditoles acetilados y aldononitrilos acetilados se encuentran en las Tablas 48 y 49, respectivamente.

TABLA 48. Composición (moles %) de azúcares (derivatizados como O-acetil-O-metilalditoles) obtenidos del carragenano SD tras cada etapa de metilación

Galactosa metilada en:	ETAPA DE METILACION			
	1ra.	2da.	3ra.	4ta.
2,3,4,6-tetra	-	0,3	2,2	2,4
2,4,6-tri	↑	2,0	2,1	4,9
2,3,6- + 3,4,6-tri	2,4 ↓	1,8	2,5	4,1
2,6- + 4,6-di	28,8	49,8	49,2	55,5
3,6-di	2,0	3,1	5,0	6,4
6-mono	↑	↑	↑	6,8
2,3-di	11,2 ↓	8,5 ↓	9,3 ↓	0,6
2,4-di	1,8	3,1	6,7	2,6
2-mono	10,4	4,1	5,7	3,9
3-(4-)mono + sin metilar	43,3	27,3	17,4	12,8

TABLA 49. Composición (moles %) de azúcares (derivatizados como O-acetil-O-metilaldononitrilos) obtenidos del carragenano SD tras cada etapa de metilación.

Galactosa metilada en:	ETAPA DE METILACION			
	1ra.	2da.	3ra.	4ta.
2,3,4,6-tetra	tr.	1,3	1,7	0,4
2,4,6-tri	↑	↑	↑	7,0
2,3,6- + 3,4,6-tri	3,3 ↓	5,1 ↓	7,6 ↓	3,8
2,6-di	35,7	37,5	40,8	45,7
4,6 + 3,6-di	11,1	22,5	23,7	26,2
2,3-di	2,1	4,9	5,2	1,0
6-mono + 2,4-di	8,6	6,9	7,4	5,1
2-mono	10,4	1,5	1,0	1,0
3-mono	4,2	3,8	3,6	5,5
4-mono	7,2	8,0	7,8	4,3
Sin metilar	17,5	8,5	1,2	0,1

Por último, los resultados finales, incluyendo ambos derivados promediados se observan en la Tabla 50.

TABLA 50. Composición (moles %) de azúcares metilados de los polisacáridos obtenidos al cabo de las distintas etapas de metilación del carragenano SD.

Galactosa metilada en:	ETAPA DE METILACION			
	1ra.	2da.	3ra.	4ta.
2,3,4,6-tetra	-	0,8	1,9	1,3
2,4,6-tri	2,8 ↑ ↓	2,2	2,7	5,7
2,3,6- + 3,4,6-tri		2,0	3,2	3,9
2,6-di	29,4	34,2	36,1	41,1
4,6-di	7,5	17,4	15,7	16,9
3,6-di	1,7	3,2	5,3	6,7
2,3-di	2,3	4,7	5,7	0,9
2,4-di	1,6	3,0	5,8	2,0
6-mono	8,0	3,7	2,3	4,9
2-mono	10,3	2,7	3,3	2,4
3-mono	5,2	4,4	4,1	6,1
4-mono	9,0	9,1	8,9	4,7
Sin metilar	21,8	9,7	1,3	0,1
2,3,4-tri-0-metilxilosa	0,5	2,7	3,7	3,3

La metilación de este producto ha sido mucho más rápida que la del carragenano ID. Tras la primera etapa había sólo un 20 % de galactosa, mientras el producto principal, 2,6-di-O-metilgalactosa llegaba al 30 % y aparecían repartidas el resto de unidades. Puede observarse como llegada la segunda etapa son pocos los indicios de submetilación, y el producto de la tercera etapa es similar al permetilado (compárese con lo ya enunciado para la metilación del carragenano ID, página 141-143).

Al igual que con el carragenano ID, el estudio de metilación del carragenano SD permite apreciar el predominio de las unidades monosulfatadas (68 %), con cantidades menores de disulfatadas (18 %) y no sulfatadas (10 %). Nuevamente se observa la presencia de xilosa como unidad terminal, posiblemente en forma de ramificación. El porcentaje de 3,6-anhidrogalactosa se incrementó a 8,3 % tras la metilación, demostrando que el medio alcalino de metilación produjo la formación de ese azúcar a expensas de galactosas unidas en 4- y sulfatadas en 6-, las cuales, por ese motivo, están subvaluadas en la Tabla 50.

Contrariamente a lo que ocurría con el carragenano ID, la mayor proporción de unidades dimetiladas la tiene la 2,6-di-O-metilgalactosa, que caracteriza a μ -carragenanos, con cantidades menores de 4,6- (λ -carragenano) y 3,6-di-O-metilgalactosa (ξ -carragenano). También se encuentran, en menores proporciones todas las demás unidades - usuales e inusuales - antes halladas.

COMPARACION DE LOS CARRAGENANOS

Como ya pudo apreciarse a partir de los datos del análisis y los espectros infrarrojo existen notorias diferencias entre las fracciones SD e ID. Mientras la primera sería fundamentalmente un carragenano de "tipo-

μ ", la segunda estaría constituida por un carragenano del tipo- λ . La existencia de esos dos carragenanos diferenciados fue postulada por Rees⁵⁵, quien no pudo separarlos al estado nativo sino que debió recurrir al tratamiento alcalino, con lo cual la fracción μ -, transformada allí en κ -carragenano, pudo separarse del λ -carragenano tratado por precipitación en soluciones de cloruro de potasio.

Como se sabe (figura 1), la estructura ideal del λ -carragenano consiste en una cadena de D-galactosas con uniones alternadas α -(1 \rightarrow 3) y β -(1 \rightarrow 4), con el azúcar unido en 3- generalmente sulfatado en 2- y a veces sin sulfato, y el unido en 4-, con sulfatos en 2- y 6-. Los estudios de Rees^{52,55} sobre metilación de fracciones solubles demostraron claramente la presencia de 3-O-metil, 4,6-di-O-metil, 2,6-di-O-metil y 2,4,6-tri-O-metilgalactosa como azúcares principales, y mientras aumentaba progresivamente la proporción de galactosas metiladas en 3-, 4,6- y 2,4,6- al aumentar el carácter λ - del carragenano, crecía la proporción de 2,6-di-O-metilgalactosa y 3,6-anhidrogalactosa (o su derivado 2-O-metilado) al aumentar el carácter μ - del producto. En este caso también se incrementaba la proporción de galactosa tetrametilada, lo que careció de significación en aquel momento, pero puede asimilarse al ya mencionado decremento del peso molecular en productos de ese tipo. El estudio de metilación del λ -carragenano de *Chondrus crispus* determinó la presencia de un 31 % de 4,6-di-O-metilgalactosa, 13 % de 2,4,6-tri-O-metilgalactosa, 8 % de 2,6-di-O-metilgalactosa y el resto de 3-O-metilgalactosa⁵². En otros carragenanos solubles, obtenidos a partir de las algas *Gigartina canaliculata* y *Gigartina chamissoi*⁵⁸, el monosacárido preponderante junto a la 4,6-di-O-metilgalactosa fue la 3,6-di-O-metilgalactosa, e indicó la existencia del ξ -carragenano.

En cuanto a los resultados de la metilación de los carragenanos C, SD e ID llama primeramente la atención la gran variedad de unidades metiladas, indicativas de diversos tipos de sulfatación y unión. Si bien los resultados no pueden compararse con otros obtenidos anteriormente, donde la poca sensibilidad de los métodos hacía que sólo se enumeraran los productos más importantes de metilación y posterior hidrólisis, la comparación con otros carragenanos de *Iridaea undulosa*¹²⁷ indica claramente la relación directa entre el rango de concentraciones de cloruro de potasio en que precipita la fracción y el número de diferentes unidades metiladas que aparecen: en el producto que precipita entre 0,70 y 1,05M de KCl no se observan unidades tetra- ni trimetiladas, sólo dos dimetiladas y tres monometiladas (cinco en total); en el producto que precipita entre 1,55 y 1,65M de KCl ya aparece una gran diversidad (doce diferentes) entre las cuales se destacan fundamentalmente las que representan estructuras de tipo λ - o ξ -. En los carragenanos solubles aparecen prácticamente todas las posibilidades (catorce en total); es evidente que la regularidad, indicada por la presencia de pocas unidades diferentes, ayuda a la agregación ordenada inducida por el potasio, mientras que la irregularidad de la molécula es un factor contra esa agregación, es decir, un factor de solubilidad.

Si bien la variedad de unidades es común a ambas fracciones, la proporción de azúcares en los mismos permiten determinar el carácter- λ del carragenano ID, y el carácter- μ del SD, tal como lo indican sus proporciones relativas de 2,6- y 4,6-di-O-metilgalactosa. Ello no obsta para que ambos presenten además algunas características cruzadas, lo cual se observa en mayor medida en la fracción SD, que presenta mayor tipo λ - de lo que la fracción ID hace con el carácter- μ . Todo el resto de las características, incluyendo unidades inusuales es común a ambos, con

diferencias de grado y no de clase.

TRATAMIENTO ALCALINO DEL CARRAGENANO C

A fin de confirmar que ambos productos obtenidos en el fraccionamiento con dimetilsulfóxido, eran de la misma naturaleza que la de los que separó Rees⁵⁵ por tratamiento alcalino, se hacía imperioso efectuar ese tratamiento a los carragenanos solubles de *Iridaea undulosa*. Matulewicz y Cerezo^{11,126} habían efectuado ese tratamiento al carragenano total, pudiendo fraccionar al producto tratado en dos subproductos: uno soluble y otro insoluble en cloruro de potasio, mientras que estaba prácticamente exento de fracciones intermedias.

El carragenano soluble a una concentración 2M de KCl de *Iridaea undulosa* se sometió al tratamiento alcalino en las condiciones habituales, aislándose un producto tratado con un rendimiento del 91,7 %, cuyas características se aprecian en la Tabla 51.

TABLA 51. Tratamiento alcalino del carragenano "soluble" C.

Producto	3,6-anhidrogactosa %	Sulfato (SO ₃ K %)	Galactosa %	Rel.molar Gal:ahg:SO ₃ K
Original (C)	4,0	44,1	48,3	1:0,09:1,24
Tratado (C-T)	15,4	39,8	39,6	1:0,44:1,37

El análisis de los resultados de ésta, y las otras Tablas subsiguientes se efectuarán en base a las relaciones molares galactosa:3,6-anhidrogactosa:sulfato, ya que los datos porcentuales pueden estar afectados por

la retención de agua de estos productos¹⁰⁸. Se desprende (Tabla 51) que previamente al tratamiento, por cada 100 azúcares en la cadena, había 114 sulfatos y 8 unidades de 3,6-anhidrogalactosa; luego del tratamiento, pasaron a haber 95 sulfatos y 31 residuos del anhidrozúcar, es decir que hubo una pérdida concomitante de sulfato (6-sulfato) para formar 3,6-anhidrogalactosa. El espectro infrarrojo del carragenano C-T (Fig. 18) muestra una banda centrada a 840 cm^{-1} , junto a otras a 930 y 805 cm^{-1} , ésta última indicativa de 3,6-anhidrogalactosa 2-sulfato, sugiriendo que algunos residuos modificados por el álcali estaban unidos por la posición 4- y disulfatados en 2- y 6-.

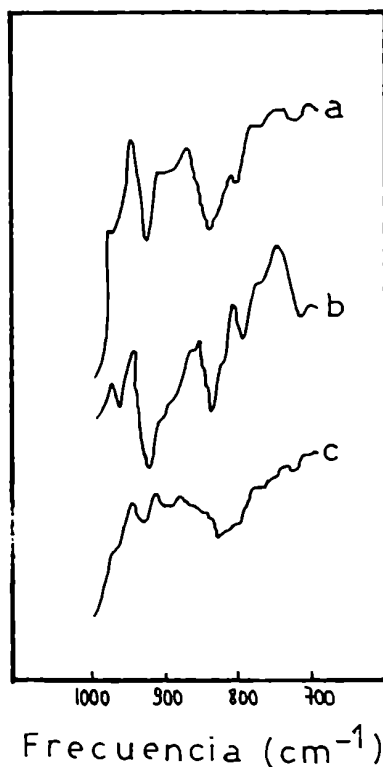


Figura 18. Espectros infrarrojo de los carragenanos: a) C-T; b) C-TI y c) C-TS.

Al fraccionar el carragenano C-T con cloruro de potasio, se obtuvo un 34,7 % de un producto que precipitaba a concentración 0,4M de KCl, y un 59,2 % de un soluble a KCl 2M, siendo el resto (6,1 %) fracciones intermedias, con un rendimiento total de fraccionamiento del 95 % (Tabla 52).

TABLA 52. Fraccionamiento del carragenano C-T.

Producto	Rango de ppción. M KCl	Rendimiento ^a %	Relación molar Gal:ahg:sulfato
C-T	Total		1:0,44:1,37
C-TI	0-0,4	33,0 (34,7)	1:0,97:1,25
C-TN	0,4-2	5,8 (6,1)	n.d.
C-TS	sol. 2M	56,3 (59,2)	1:0,35:1,22

^aEntre paréntesis se indica el rendimiento respecto al total recuperado.

Este fraccionamiento es consistente con el producido en dimetilsulfóxido y con los resultados de Rees⁵⁵ por los cuales el carragenano soluble (antes llamado λ -carragenano) se divide tras tratamiento alcalino en dos porciones: una insoluble, que por su relación molar galactosa:3,6-anhidro-galactosa:sulfato debe corresponder a un κ -carragenano, originada seguramente en un μ -carragenano tratado, y otra soluble que debería corresponder (aunque sea en parte) a lo definido como un λ -carragenano tratado en medio alcalino.

El poder rotatorio de la fracción C-TI en NaCl 0,1M era de 36,3°, mientras que en KCl 0,1M fue de 53,8°, lo que indica claramente la formación de hélices de este producto en solución, por influencia del potasio, de acuerdo a las postulaciones y teorías efectuadas por Rees y otros investi-

gadores desde inicios de la década pasada:

En primer lugar, dados los inconvenientes que traía la gelificación del K-carragenano, se obtuvieron (por tratamiento químico), segmentos de L-carragenano de estructura ideal, para los que se comprobó claramente la existencia de una transición arrollamiento al azar \rightarrow hélice al descender la temperatura, por medición del incremento de rotación óptica²⁴¹. Ese aumento era del 68 %; un cálculo teórico del valor que deberían haber tomado esas rotaciones en conformaciones promedio para esa transición daba un incremento del 85 %, no muy distinto del valor experimental, y además con valores absolutos de la rotación óptica muy similares, lo que sugirió la existencia real de dicha transición²⁴². Por otra parte, la existencia de dobles hélices de K- y L-carragenanos al estado cristalino ya había sido probada por difracción de rayos X²⁴³, con uniones hidrógeno entre el 0-2 de la unidad de galactosa enlazada (1 \rightarrow 3) de una hélice y el 0-6 de la misma unidad correspondiente a otra hélice²⁴⁴, como uniones interiores a la doble hélice. También se llegó a calcular la entalpía y entropía involucradas en la transición y a compararlas con las de otras dobles hélices naturales²⁴⁵. En todos estos trabajos no se había evaluado el efecto de las sales que, como se sabe, en el caso de las de potasio promueven la gelificación de algunos carragenanos. Posteriormente se observó²⁴⁶ que la temperatura de transición aumentaba con la concentración de KCl o NaCl, aunque el efecto de ambas sales era distinto; esos datos eran compatibles con una inducción de la transición arrollamiento \rightarrow doble hélice por parte de las sales. Más adelante²⁴⁷ se apreció que la formación de dobles hélices en el L-carragenano era producida en la misma medida por Li⁺, Na⁺, (CH₃)₄N⁺, K⁺, Rb⁺, Cs⁺ ó NH₄⁺, pero los últimos cuatro iones, al mismo tiempo, producían gelificación, lo que indujo a Rees^{247,248}

a formular la "teoría del dominio", por la cual un número limitado de dobles hélices se agrupan en racimos o dominios solubles, los que luego se asocian con requerimientos catiónicos específicos en enrejados cohesivos (geles); en el K-carragenano, en cambio, la formación de dobles hélices y su agregación estarían vinculadas. Si bien su rol es desconocido, se observó influencia del potasio, tanto en la formación de la hélice como en su posterior agregación²⁴⁹; en este último caso posiblemente el catión quede inmovilizado en las zonas de unión del gel, aunque se desconoce el origen molecular de este efecto²⁵⁰.

Los representantes de la escuela noruega²⁵¹ se manifestaron en desacuerdo con las postulaciones de Rees, y dudaron de la formación de las dobles hélices, o por lo menos de su importancia en el mecanismo de gelificación, acentuando la posible acción de fuerzas intramoleculares y de puentes salinos. Sin embargo, trabajos posteriores de Rees^{252,253} confirmaron - al menos para sus muestras de l-carragenano - la existencia de las dobles hélices y descartaron la posibilidad del mecanismo intramolecular; también dedujeron que el incremento de rotación óptica al pasar de un estado "todo-arrollamiento al azar" al estado "todo-hélice" era del 61,1 %²⁵². La inhibición de la gelificación por la urea²⁵⁰ apoya los postulados de Rees^{248, 252} contra los de los investigadores noruegos²⁵¹.

En nuestro caso, el incremento del poder rotatorio de ~ 50 % de esta fracción indicaría que el carragenano C-TI forma dobles hélices en presencia de potasio pero prácticamente no lo hace en la de sodio, indicando la especificidad catiónica, pero al mismo tiempo que la estructura primaria permite la formación de hélices, y tal como demuestra su insolubilidad en cloruro de potasio 0,4M, su posterior agregación.

Análogamente el producto soluble C-TS presenta en NaCl 0,1M un poder

rotatorio de $12,0^\circ$; en urea 7M (conteniendo NaCl 0,1M) $12,0^\circ$; en NaCl 2M era de $13,3^\circ$ y en KCl 2M de $17,0^\circ$. Aquí, dada la pequeña diferencia en el valor absoluto de los datos, los resultados deben tomarse con cuidado, pero podría desprenderse que pese a su imposibilidad de agregación, este carragenano podría formar dobles hélices en presencia de ion potasio 2M, y en mucha menor medida en presencia de sodio a la misma concentración; el efecto de la urea sería nulo indicando que en NaCl 0,1M el carragenano se encontraría en un estado de "todo-arrollamiento". El efecto sería, en este caso del $\sim 40\%$, lo que indicaría que factores estructurales le impedirían a la molécula alcanzar el estado de "todo-hélice". El bajo valor absoluto del poder rotatorio de esta fracción ya se había observado en productos similares¹²⁶.

La relación molar Gal:3,6-ahg:sulfato del carragenano C-TI de 1:0,97:1,25 conjuntamente con la absorción a 805 cm^{-1} evidenciada en su espectro infrarrojo (Fig.18) sugerirían para este carragenano una estructura de tipo híbrido κ -/ ι - con predominio del primero, lo que indicaría consecuentemente la presencia de estructuras de tipo μ -/ ν - en el carragenano C. Otras bandas de su espectro infrarrojo (Fig.18) a 845 y 930 cm^{-1} también concuerdan con esa clasificación, mientras que la aparición de un pequeño hombro a 820 cm^{-1} sugeriría la existencia de pequeñas cantidades de 6-sulfato, pese al tratamiento alcalino efectuado; esa presencia es consistente con la determinación de 2,4-di-O-metilgalactosa por permetilación del carragenano C y sugiere la existencia de galactosas enlazadas por la posición 3- y sulfatadas en 6- en C-TI, tal como fue determinado en otros κ -carragenanos naturales como el de *Phyllophora nervosa*^{82,83}; también es consistente con la determinación de 4-O-metilgalactosa, que mostraría la existencia de galactosas ligadas en 3- y disulfatadas en 2- y 6-, tal como

se encontró en el polisacárido de *Pachymenia hymantophora* ²⁵⁴.

El carragenano modificado C-TS presenta una relación molar Gal: 3,6-ahg:sulfato de 1:0,35:1,22, lo que sugeriría la sulfatación de varias unidades de 3,6-anhidrogalactosa, tal como sería de prever por tratamiento alcalino de un carragenano de tipo λ -. En el espectro infrarrojo se observa (Fig.18) una banda ancha a $800-850\text{ cm}^{-1}$ que indicaría la presencia de todo tipo de sulfato, irregularidad que puede ser uno de los factores de solubilidad.

TRATAMIENTO ALCALINO DE LOS CARRAGENANOS SD E ID.

Para confirmar que la separación con dimetilsulfóxido producía las fracciones que originaban los productos C-TI y C-TS, cada una de las fracciones (SD e ID) se sometieron por separado al tratamiento alcalino en la forma habitual, con los resultados que se observan en la Tabla 53.

TABLA 53. Tratamiento alcalino de los carragenanos SD e ID.

Carragenano	Rendimiento %	3,6-ahg %	Sulfato (% SO ₃ K)	Galactosa %	Relación molar Gal:ahg:SO ₃ K
SD-T	89,9	11,5	22,7	32,5	1:0,40:0,95
ID-T	91,1	11,3	33,5	29,6	1:0,43:1,54

Ambos tratamientos han originado productos con similar relación molar galactosa/3,6-anhidrogalactosa, aunque el ID-T presenta un grado de sulfatación más alto que el SD-T.

El producto SD-T, obtenido con 90 % de rendimiento presenta una relación molar Gal:3,6-ahg:sulfato de 1:0,40:0,95, o sea 29 unidades de

3,6-anhidrogalactosa y 68 sulfatos por cada 100 azúcares, contra los 17 y 100, respectivamente, que había originalmente en el SD ; estos datos indican una pérdida de sulfato anómala.

La composición no es usual en carragenanos naturales, ya que los solubles contienen mayores proporciones de sulfato y los que gelifican en cloruro de potasio, mayor cantidad de 3,6-anhidrogalactosa. El espectro infrarrojo (Fig.19) muestra tres picos fundamentales a 930, 850 y 805 cm^{-1} para el ciclo 3,6-anhidrogalactosídico, los sulfatos sobre oxhidrilos axiales de la galactosa (0-4) y la 3,6-anhidrogalactosa (0-2), característico de un ι -carragenano pese al bajo contenido de 3,6-anhidrogalactosa. Un hombro a 820 cm^{-1} sugeriría la presencia de 6-sulfato, el que lógicamente no puede estar ubicado en galactosas enlazadas en 4-.

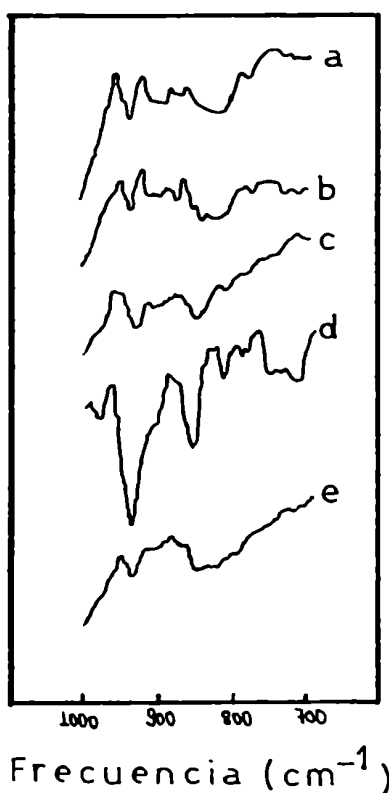


Figura 19. Espectros infrarrojo (700-1000 cm^{-1}) de los carragenanos: a) ID-T ; b) ID-TS ; c) SD-T ;d)SD-TI, e) SD-TS.

La comparación de las relaciones molares del carragenano ID-T con la del producto de partida ID (Tablas 42 y 53) indica que de 122 sulfatos y 2 unidades de 3,6-anhidrogalactosa por cada cien unidades de azúcar se llegó a 108 y 30 respectivamente, lo que indica que habría una retención de sulfato anómala, que quizá se deba a la pérdida por diálisis de fragmentos de bajo grado de sulfatación, como se observó en otros casos²⁵⁵. El espectro infrarrojo de ID-T (Fig.19) muestra una absorción ancha entre 795 y 850 cm^{-1} , centrada a 825 cm^{-1} junto a un pico a 930 cm^{-1} evidenciando el predominio de los sulfatos ubicados sobre oxhidrilos ecuatoriales de C-2 frente a los axiales de C-4; también las unidades de 3,6-anhidrogalactosa presentarían su 0-2 sulfatado como lo indica la alta proporción de sulfato.

Su relación molar se asemeja a la de los carragenanos de *Eucheuma uncinatum*, *Eucheuma isiforme*, *Aghardiella tenera* y *Gymnogongrus furcellatus*¹²⁸ pero difiere de la de los λ -carragenanos.

El fraccionamiento de ambos productos con cloruro de potasio aporta pruebas más concluyentes acerca de su naturaleza. En el caso del producto ID-T (Tabla 54) se observa que se ha producido una fracción principal con 89 % de rendimiento, y proporciones menores de fracciones insolubles.

TABLA 54. Fraccionamiento con cloruro de potasio del carragenano ID-T.

Fracción	Rango KCl	Rendimiento ^a	Relación molar Gal:3,6-ahg:sulfato
ID-TI	0-0,4 M	3,4 (4,3)	1:0,31:0,95
ID-TN	0,4-2 M	5,1 (6,5)	1:0,56:1,60
ID-TS	sol. 2 M	70,5(89,2)	1:0,48:1,55

^aEntre paréntesis se indica el rendimiento respecto al total recuperado.

El carragenano ID-TI muestra una inusual relación molar Gal:3,6-anhg:sulfato dado el bajo contenido de 3,6-anhidrogalactosa para una fracción que gelifica. El ID-TN ha incrementado notoriamente la proporción de sulfato (42 %) y eso puede explicar su mayor solubilidad pese al aumento de la proporción de 3,6-anhidrogalactosa (35 %), en función de una estructura más cercana a la del ι -carragenano, respecto del otro, más cercano a un K-carragenano en lo que respecta a la proporción de sulfato. Pese a un contenido de carrabiosa del 72 % (el doble de la 3,6-anhidrogalactosa) este polisacárido es soluble en 0,4M de cloruro de potasio.

El producto principal ID-TS se asemeja bastante al ID-TN, pero como es lógico suponer, se asemeja mucho más al producto de partida ID-T, del cual es parte fundamental. La alta proporción de este producto indica claramente que el carragenano ID estaba prácticamente exento de estructuras del tipo de μ - o ν -carragenanos.

Este producto, similar por composición al producido en el tratamiento alcalino del carragenano total de *Iridaea undulosa*¹²⁶ y cuyo espectro infrarrojo (Fig. 19) indica la presencia de cantidades importantes de 2-sulfato en ambas unidades (y la ausencia de galactosa 4-sulfato) , también presenta un contenido de carrabiosa del 65 %. Obsérvese que el carragenano ID-TI es insoluble con un contenido de carrabiosa menor (47 %); la solubilidad de esta fracción podría deberse a que la carrabiosa no es consecutiva, o bien a que a causa de la sulfatación no se produce la agregación de las dobles hélices o su formación.

El fraccionamiento del carragenano SD-T (Tabla 55) con cloruro de potasio produjo dos fracciones principales y una menor. El carragenano SD-TI es relativamente pobre en 3,6-anhidrogalactosa aunque la relación galactosa/sulfato es la usual en carragenanos insolubles. En su espectro

TABLA 55. Fraccionamiento con cloruro de potasio del carragenano SD-T.

Fracción	Rango KCl	Rendimiento ^a %	Relación molar Gal:3,6-ahg:sulfato
SD-TI	0-0,4 M	48,6 (50,9)	1:0,57:0,84
SD-TN	0,4-2 M	6,0 (6,3)	1:0,59:1,34
SD-TS	sol.2 M	40,9 (42,8)	1:0,26:0,92

^aEntre paréntesis se indica el rendimiento respecto al total recuperado

infrarrojo (Fig.19) se observan absorciones a 805, 845 y 930 cm^{-1} que indican que gran parte de las unidades 3,6-anhidrogalactosídicas están sulfatadas, como ocurre con el espectro de un μ -carragenano, lo cual es coherente con la solubilidad de este producto en cloruro de potasio 0,1M. El producto SD-TN, obtenido en baja proporción como suele ocurrir con los carragenanos intermedios en productos tratados, presenta, con respecto a la fracción anterior un incremento de sulfato del 60 %, lo cual podría explicar su mayor solubilidad.

El carragenano SD-TS obtenido con 43 % de rendimiento, muestra un contenido de sulfato extrañamente bajo para carragenanos de tal solubilidad. Su ancha banda en el espectro infrarrojo (Fig.19) centrada a 830 cm^{-1} indicaría el predominio de sulfatos sobre oxhidrilos ecuatoriales (0-2) por sobre los ubicados en 0-4 y 0-6, y la virtual ausencia de sulfatos sobre el ciclo 3,6-anhidrogalactosídico.

Se confirma que - al obtenerse ambos productos - SD era una mezcla de carragenanos de tipo μ - y λ - con predominio del primero; ID también era una mezcla de ambos, pero con clara preminencia del λ -

carragenano, lo cual sugeriría que la separación producida con el dimetilsulfóxido estaría originada principalmente por diferencias de peso molecular y no estructurales. La fracción SD-TI se corresponde con el carragenano de Rees⁵⁵ luego del tratamiento alcalino, mientras las SD-TS e ID-TS responden al λ -carragenano tratado.

ESTUDIO DE METILACION DE LOS PRODUCTOS TRATADOS

A partir de los estudios de metilación de los carragenanos C, SD e ID, y los resultados de los tratamientos alcalinos de esos mismos productos, se obtuvo información sobre sus estructuras y los factores que determinaron la separación con el dimetilsulfóxido. Con el objeto de investigar más a fondo los mismos, y conocer algo más sobre los factores estructurales que promueven solubilidad, se decidió efectuar la metilación de los tres productos principales obtenidos por tratamiento alcalino de los carragenanos SD e ID y fraccionamiento de los productos obtenidos. Ellos eran: a) el carragenano SD-TI, insoluble en cloruro de potasio 0,4M y para el cual habíamos determinado, por los datos preliminares, una estructura de tipo K-/ (-; b) el SD-TS, con estructura básica de λ -carragenano tratado, al igual que c) el ID-TS. Previamente a la metilación podría suponerse que las diferencias básicas entre estos dos últimos productos son básicamente de peso molecular.

Las metilaciones se efectuaron por el método de Haworth²²⁸, y se recurrió a cuatro etapas de metilación (cada una comprendida por cinco pasos), a temperatura ambiente, ya que al tratarse de productos modificados por álcali caliente, poco era el efecto nocivo adicional que podía

acarrear la metilación alcalina. Los productos de las primeras etapas de metilación se hidrolizaron y derivatizaron como alditoles acetilados; al verificarse constancia, el producto permetilado (de la cuarta etapa) también se hidrolizó y derivatizó en forma de aldononitrilos acetilados.

La composición de los polisacáridos parcialmente metilados, obtenidos al cabo de cada etapa de metilación, tras hidrólisis y derivatización como 0-acetil-0-metilalditoles, y de los polisacáridos permetilados derivatizados de aquel modo, y además como 0-acetil-0-metilaldononitrilos obtenidos del carragenano SD-TI se aprecia en la Tabla 56; los obtenidos a partir del carragenano SD-TS, en la Tabla 57, y los del carragenano ID-TS en la Tabla 58.

Puede apreciarse en las Tablas 56, 57 y 58 que existió una mayor rapidez en la metilación de estos productos tratados respecto de los correspondientes previo al tratamiento, lo que puede deberse a la mayor temperatura utilizada; además, análogamente a lo antes observado, es más rápida la metilación de los carragenanos de tipo μ - / ν - / κ - / ι - que los de la familia λ -. El producto SD-TI (Tabla 56) se ha metilado con mayor rapidez, lo que se desprende de las pequeñas variaciones de composición al pasar de la 2da. a la 4ta. etapa de metilación. En cambio, el producto ID-TS (Tabla 58) presenta una variación más marcada, y la del carragenano SD-TS es intermedia. Dichas diferencias de velocidad, ya observadas para las fracciones SD e ID, también pueden estar ocasionadas por diferencias de peso molecular.

La composición en azúcares de los tres carragenanos permetilados, promediando los datos obtenidos con ambos derivados, se observa en la Tabla 59.

TABLA 56. Composición (moles %) en azúcares de los polisacáridos obtenidos al cabo de cada etapa de metilación del carragenano SD-TI.

Derivado Etapa Galactosa metilada en:	Alditoles acetilados			Aldononitrilos acetilados
	2da.	3ra.	4ta.	4ta.
2,3,4,6-tetra	1,3	n.d.	n.d.	0,6
2,4,6-tri	↑	↑	↑	6,3
2,3,6-tri	5,2	12,9	23,0	0,6
3,4,6-tri	↓	↓	↓	6,0
2,6-di	↑	↑	↑	53,0
4,6-di	65,2	66,3	54,7	6,7 ^a
3,6-di	0,2	2,8	↓	
2,4-di	↑	-	↑	16,3
2,3-di	4,3	1,4	20,6	
6-mono	7,7	4,6	↓	4,1
2-mono	1,5	-	-	0,9
3-mono	↑	↑	↑	0,6
4-mono	14,5	12,1	1,7	4,8
Sin metilar	↓	↓	↓	-

^aEl pico está desplazado sobre el tiempo de retención del derivado de 3,6-di-O-metilgalactosa.

TABLA 57. Composición (moles %) en azúcares de los polisacáridos obtenidos al cabo de cada etapa de metilación del carragenano SD-TS.

Derivado	Alditoles acetilados			Aldonitrilos acetilados
	Etapa	2da.	3ra.	4ta.
Galactosa metilada en:				
2,3,4,6-tetra		n.d.	n.d.	4,0
2,4,6-tri		↑	↑	1,4
2,3,6-tri		2,1	6,2	↑
3,4,6-tri		↓	↓	3,9
2,6-di		↑	↑	↑
4,6-di		32,1	32,3	38,4
3,6-di		↓	↓	↓
2,4-di		↑	4,3	3,9
2,3-di		28,1	13,5	↑
6-mono		↓	18,1	17,2
2-mono		0,6	0,3	0,1
3-mono		↑	↑	↑
4-mono		26,7	20,6	23,0
Sin metilar		↓	↓	↓
				9,1
				53,7
				2,5
				2,1
				10,4 ^a
				1,2
				2,5
				8,5

^aEl pico está desplazado sobre el tiempo de retención del derivado de la 6-0-metilgalactosa.

TABLA 58. Composición (moles %) en azúcares de los polisacáridos obtenidos al cabo de cada etapa de metilación del carragenano ID-TS.

Derivado	Alditales acetilados			Aldononitrilos acetilados	
	Etapa	2da.	3ra.	4ta.	
Galactosa metilada en:					
2,3,4,6-tetra		n.d.	3,4	3,5	n.d.
2,4,6-tri		↑	↑	↑	6,2
2,3,6-tri		1,6	7,2	12,6	4,5
3,4,6-tri		↓	↓	↓	4,1
2,6-di		↑	↑	↑	6,7
4,6-di		42,4	42,2	37,4	38,6
3,6-di		1,7	5,6	12,6	26,0 ^a
2,4-di		-	2,0	1,7	
2,3-di		-	6,1	3,5	
6-mono		12,8	11,7	6,2	
2-mono		2,4	1,8	-	4,0
3-mono		↑	↑	↑	1,7
4-mono		39,9	20,0	22,5	7,3
Sin metilar		↓	↓	↓	0,9

^aEl pico está desplazado sobre el tiempo de retención del derivado de la 6-O-metilgalactosa.

TABLA 59. Composición en azúcares (moles %) parcialmente metilados, estables en medio ácido, de los carragenanos SD-TI, SD-TS e ID-TS.

Galactosa metilada en:	CARRAGENANO		
	SD-TI	SD-TS	ID-TS
2,3,4,6-tetra	0,6	4,0	3,5
2,4,6-tri	8,7	5,5	5,7
2,3,6-tri	0,8	2,3	4,1
3,4,6-tri	8,4	1,9	3,7
2,6-di	50,7	7,7	6,0
4,6-di	a	36,3	34,6
3,6-di	6,4 ^a	9,5	12,9
2,4-di	16,3 ^b	2,9	1,7
2,3-di	b	c	3,6
6-mono	4,1	12,6 ^c	6,4
2-mono	0,5	0,6	1,9
3-mono	0,4	3,8	2,7
4-mono	3,2	13,0 ^d	11,8
Sin metilar	-	d	1,5

^aEl contenido de 4,6-di-0-metilgalactosa (minoritario) se incluye con el de la 3,6-di-0-metilgalactosa. ^bEl de 2,3-di-0-metilgalactosa (min.) con el de la 2,4-di-0-metilgalactosa. ^cEl de 2,3-di-0-metilgalactosa (min.) con el de la 6-0-metilgalactosa. ^dEl de galactosa (min.) con el de la 4-0-metilgalactosa.

La fracción SD-TI, a la que se había adjudicado una estructura de tipo ϵ - (pag.161) presenta por metilación (Tabla 59) cantidades fundamentales de 2,6-di-0-metilgalactosa (50,7 %) formada a partir de galactosa unida por la posición 3- y sulfatada en C-4, y también cantidades significativas de 2,4,6-tri-0-metilgalactosa (8,7 %), originada en las unidades enlazadas de igual modo, pero exentas de sulfato; la presencia de ambas unidades está de acuerdo con sus propiedades de gelificación en KCl 0,4M. Aparecen otras unidades no usuales, como un 16,3 % de una mezcla cuyo componente fundamental es la 2,4-di-0-metilgalactosa, originada probablemente en galactosas enlazadas por la posición 3- y sulfatadas en C-6, tal como se encontró en el carragenano de *Phyllophora nervosa*⁸²; este resultado concuerda con la pequeña absorción a 820 cm^{-1} en el espectro infrarrojo de SD-TI (Fig.19). Estas unidades también podrían actuar como puntos de ramificación⁵⁸. De la misma forma, la 4-0-metilgalactosa (3,2 %) podría derivar de galactosa 2,6-disulfato unida por la posición 3- (ref.254), mientras que para la 6-0-metilgalactosa se puede postular su origen en galactosa 2,4-disulfato enlazada por la posición 3-, en virtud de que nunca se han encontrado grupos sulfato sobre C-3.

La 3,6-di-0-metilgalactosa sugiere la presencia de unidades sulfatadas en C-2 y ligadas por la posición 4-, características del ξ -carragenano, y que en medio alcalino podrían formar el 2,3-epóxido y entonces, quizás, convertirse en otros productos, por lo cual el porcentaje que aparece en la Tabla 59 para este azúcar podría estar subvaluado; sin embargo, la comparación de los porcentajes de 3,6-di-0-metilgalactosa, similares en la permetilación de los carragenanos SD, SD-TI y SD-TS (Tablas 50 y 59) indicaría que por tratamiento alcalino de SD no se han destruido estas unidades.

El carragenano metilado SD-TS produce por hidrólisis, una mezcla de galactosas parcialmente metiladas entre las que se destaca la proveniente de un residuo sulfatado en C-2 y unido en 3- (36,3 %), el que sumado a los que tienen igual unión, pero sulfatados en 4- (7,7 %) o sin sulfato (5,5 %), constituye la mezcla usualmente hallada como mayoritaria en carragenanos solubles a altas concentraciones de cloruro de potasio.

Resulta sorprendente hallar en un carragenano modificado por álcali, 3-0-metilgalactosa (3,8 %) , que ha sido tradicionalmente adjudicada a unidades enlazadas por la posición 4- y disulfatadas en C-2 y C-6. Como en este caso ese tipo de unidad no es posible, ya que la acción del álcali la hubiera transformado en 3,6-anhidrogalactosa 2-sulfato, podría suponerse, entre otras posibilidades, que parte de las galactosas unidas en 4- podrían actuar como puntos de ramificación a través de C-6 (con sulfato en C-2), o que algunas unidades estarían unidas por la posición 6- (y disulfatadas en C-2 y C-4).

Otros residuos no usuales están representados por la 2,3,6-tri-0-metilgalactosa (2,3 %) y la 3,4,6-tri-0-metilgalactosa (1,9 %), y nuevamente se ha encontrado una proporción significativa (9,5 %) de 3,6-di-0-metilgalactosa, evidencia que confirma la contradicción con la supuesta labilidad alcalina⁵⁸ de la unidad que la origina. La 2,4-di-0-metilgalactosa (2,9 %) y la 4-0-metilgalactosa (aprox. 11 %) se originarían en las unidades ya antes mencionadas, ligadas por 3- y sulfatadas en 6-, o en 2- y 6-, respectivamente, y tal como se había sugerido^{82,254}, lo que resulta confirmado por la absorción débil a 820 cm^{-1} en el espectro infrarrojo de SD-TS (Fig.19).

La composición del carragenano ID-TS permetilado es similar a la del carragenano SD-TS (Tabla 59). Se destaca la presencia de 4,6-di-0-metilgalactosa (34,6 %), característica de λ -carragenanos, tratados o no en medio alcalino, y aparece también un 5,7 % de 2,4,6-tri-0-metilgalactosa

que caracteriza a esos productos. En cambio el 6,0 % de 2,6-di-0-metilgalactosa indicaría la presencia de alguna estructura de tipo κ -/ ι - que podría integrar (en pequeña proporción) bloques de polisacárido del tipo λ -, o bien podría responder a la presencia de moléculas contaminantes con esas estructuras.

Además de la 3-0-metilgalactosa (2,7 %), ya discutida para el carragenano SD-TS, se destaca la presencia de 2,3-di-0-metilgalactosa (3,6 %, Tabla 59), lo cual podría indicar tanto la presencia de ramificaciones en la posición 6-, como la unión de residuos de galactosa 4-sulfato por la posición 6-. La flexibilidad de la unión (1→6) incrementaría la solubilidad de la molécula²⁵⁶ y dificultaría la formación de agregados. Todas las otras unidades poco usuales, halladas para SD-TS también aparecen aquí: 2,3,6-tri-0-metilgalactosa (4,1 %), 3,4,6-tri-0-metilgalactosa (3,7 %), 2,4-di-0-metilgalactosa (1,7 %), alta proporción de 3,6-di-0-metilgalactosa (12,9 %) y 4-0-metilgalactosa (11,8 %). Su posibles significado estructural fue discutido previamente. En todos los casos se encontraron pequeñas proporciones de 2,3,4-tri-0-metilxilosa (ver luego, Tabla 60).

COMPOSICION DE LOS CARRAGENANOS "SOLUBLES" DE *IRIDAEA UNDULOSA*

En primer lugar, debe considerarse que la composición real de los carragenanos debe corregirse respecto de los valores obtenidos en el análisis por metilación, por dos factores: a) la transformación alcalina que ocurre durante la metilación en los productos no tratados (C, SD e ID) de galactosa 6-sulfato y galactosa 2,6-disulfato enlazadas por la posición 4-; la proporción de dicha transformación puede estimarse dado que se conoce

el contenido de 6-sulfato lábil de esas fracciones (Tabla 42), y b) la presencia de 3,6-anhidrogalactosa o su derivado sulfatado en 0-2, no detectable en el análisis por metilación dada la inestabilidad en medio ácido de estos azúcares. Su contenido es importante en el caso de los productos tratados (SD-TI, SD-TS e ID-TS) aunque también es significativo en el de los productos C y SD. Los resultados corregidos y expresados en forma de posibles unidades estructurales se aprecian en la Tabla 60.

El carragenano "soluble" obtenido del alga *Iridaea undulosa* (C) tiene una composición y rotación óptica (Tabla 20) similar a las de los carragenanos de *Gigartina canaliculata* y *Gigartina chamissoi* solubles en cloruro de potasio 0,3M y a los del de *Gigartina atropurpurea*¹²⁸, que fueron clasificados como carragenanos "solubles". La relación molar galactosa/sulfato (2:2,5) es similar a la supuesta para la estructura "ideal" del λ -carragenano^{52,53} (2:2,7), aunque con menor proporción de sulfato, y con una cantidad pequeña, pero significativa, de 3,6-anhidrogalactosa (4,0 %).

Al tratar el polisacárido C con borohidruro alcalino, y fraccionar el producto con cloruro de potasio, se obtuvieron dos fracciones principales, una soluble y otra insoluble en cloruro de potasio (Tabla 52), lo que indica que el polisacárido original contenía moléculas con estructuras λ - y μ - separadas⁵⁵, y ello fue coherente con la separación producida por el dimetilsulfóxido.

La composición corregida del carragenano C es más complicada que la de los carragenanos de la misma alga que precipitaron a 0,70-1,05 y 1,55-1,65M de cloruro de potasio¹²⁷.

TABLA 60. Composición de los carragenanos "solubles" y de sus principales productos de tratamiento alcalino^a.

UNIDAD	CARRAGENANO					
	C	SD	ID	SD-TI	SD-TS	ID-TS
<i>Unida por la posición 3-</i>						
Galactosa	2,9	4,0	4,2	5,4	4,3	3,8
Gal 2-sulfato	16,2	11,8	34,4	4,0 ^b	28,4	22,8
Gal 4-sulfato	33,6	28,6	8,7	31,6	6,1	4,0
Gal 6-sulfato	3,5	1,4	3,3	9,5 ^c	2,3	1,1
Gal 2,4 -disulfato	1,4	3,4	4,2	3,2	9,8 ^d	4,2
Gal 2,6-disulfato	3,4	3,3	7,0	2,0	9,0	7,8
Gal 4,6-disulfato	2,6	1,7	tr.	tr.	tr.	1,3
<i>Unida por la posición 4-</i>						
Galactosa	1,1	2,7 ^e	tr.	tr.	1,8	2,7
Gal 2-sulfato	tr.	4,6	2,7	4,0 ^b	7,4	8,5
Gal 6-sulfato	3,3	↑ 17,5	↑ 25,5	9,5 ^c	9,8 ^d	2,4
Gal 2,6-disulfato	6,5	↓	↓	tr.	3,0	1,8
3,6-anhidrogalactosa o su 2-sulfato	15,9	17,6	2,0	36,3	20,6	32,4
<i>Otras</i>						
Galactosa unida por 2-	2,2	2,7 ^e	2,6	5,2	1,5	2,4
Gal terminal no reductora	2,6	tr.	tr.	tr.	3,1	2,3
Xil terminal no reductora	3,2	2,4	3,8	1,3	1,0	1,7

^aLas proporciones menores del 1% se indican como trazas (tr.). ^bEl porcentaje indica la suma de galactosa 2-sulfato enlazada por las posiciones 3- y 4-, pero priva este último. ^{c,d}Se indica la suma, pero priva el ligado en 3-. ^eSe indica la suma, pero priva el ligado en 4-.

Las cantidades fundamentales de residuos unidos en 3-, no sulfatados (2,9 %) o sulfatados en C-2 (16,2 %) o C-4 (33,6 %) y los unidos en 4-, sulfatados en 6- (3,3 %) o en 2- y 6- (6,5 %), junto a las 3,6-anhidrogalactosas (15,9 %) (total, 78,4 %) están de acuerdo con adjudicarle al carragenano C estructuras fundamentales de tipo μ - y de tipo λ -. Como es lógico suponer, la distribución de sulfato no es estadística; debe puntualizarse la presencia de unidades de xilopiranosas (3,2 %) como azúcares terminales no reductores, indicativos de pequeña proporción de ramificaciones, que seguramente tendrán una sola unidad de este azúcar. Pese a que antiguamente se había descartado su presencia en carragenanos, por considerarla parte de un xilano contaminante²³, Parolis detectó su existencia como terminal no reductora en los polisacáridos de *Phyllymenia hieroglyphica* y *Pachymenia hymantophora*²⁵⁴ en proporción de 1,8-2,5 %. Este último polisacárido había sido estudiado por Penman y Rees⁵⁸ quienes no detectaron la presencia de xilosa, lo cual se adjudicó²⁵⁴ a la extrema volatilidad del metilglucósido derivado, que habría desaparecido durante la etapa de evaporación a presión reducida.

El análisis muestra la presencia de menores, pero significativas cantidades de unidades estructurales antes desconocidas (Tabla 60). Algunas de las galactosas parcialmente metiladas provenientes de las mismas habían sido detectadas en los productos de hidrólisis de los derivados permetilados de carragenanos "intermedios" de *Iridaea undulosa* pero no había sido discutida su presencia¹²⁷. Esas nuevas unidades fueron confirmadas en los estudios efectuados sobre los carragenanos soluble (SD) e insoluble (ID) en dimetilsulfóxido, y en el análisis de los productos obtenidos a partir de ellos por tratamiento alcalino.

El carragenano ID contiene aprox. 65 % de unidades definidas como componentes clásicos del λ -carragenano (Tabla 60), pero también contiene cantidades importantes (≈ 15 %) de unidades que pueden considerarse integrantes de los ν -/ μ -carragenanos. El hecho de haber encontrado un 10 % de productos insolubles en cloruro de potasio por tratamiento alcalino de ID (ID-TI + ID-TN), sugeriría que el μ -carragenano existe como polisacárido separado. Si esto fuera cierto, el carragenano ID no sería un copolímero de bloques heterogéneos compuesto por regiones "tipo- λ " y regiones "tipo- μ " ni un polisacárido compuesto por unidades λ - y μ - con residuos "inusuales" diseminados entre ellos, sino una mezcla de dos carragenanos conteniendo estructuras de tipo λ - y de tipo μ -, respectivamente y unidades inusuales completando las moléculas.

Las unidades inusuales ya fueron discutidas anteriormente, y comprenden - entre otras - galactosas enlazadas (1 \rightarrow 2), galactosa 2,6-disulfato unida por la posición 3-, y ramificaciones con xilosa. Estas dos últimas fueron detectadas en el polisacárido de *Pachymenia hymantophora*²⁵⁴.

Los resultados del análisis del producto ID-TS resultan similares a los de los productos C e ID en lo que respecta a la diversificación de unidades estructurales y a la distribución de los grupos sulfato (Tablas 38, 47 y 59). Un examen de la composición de ID-TS sugiere la existencia de proporciones similares de 3,6-anhidrogalactosa (32,4 %) y unidades de galactosa enlazadas por la posición 3- de tipo λ - (es decir, excluidas aquellas que portan sulfato en C-4), (35,5 %). La distribución de grupos sulfato en las unidades enlazadas por la posición 3- sugiere que, aún si el contenido de carrabiosa es consecutivo, la formación de la estructura terciaria se vería impedida debido a la imposibilidad de

ligarse por puentes de hidrógeno de cada hebra de la doble hélice.

La estructura de ID-TS es de un tipo nunca hallado en la naturaleza, formalmente similar a la de un κ - ó ι -carragenano en la que los grupos sulfato de las galactosas unidas por la posición 3-, han sido transferidos del C-4 a C-2 y/o C-6 de esas mismas unidades. Se agrega también la ya discutida posible presencia de uniones (1→6) y/o (1→2), indicadas por la presencia de 2,3-di- y 3-O-metilgalactosa en los productos tratados.

Cerca de un 80 % de las unidades constitutivas del carragenano SD (Tabla 60), responden a las estructuras clásicas de λ - y μ -carragenanos. Considerando que por tratamiento alcalino de SD se obtienen 57 % de productos insolubles y 43 % de soluble (Tabla 55) en cloruro de potasio, puede deducirse, que tal como sucedía con ID, SD es una mezcla de carragenanos tipo- μ y tipo- λ , lo cual está de acuerdo con la hipótesis que el fraccionamiento provocado por el dimetilsulfóxido no estaría basado en estructuras, sino en pesos moleculares. De cualquier forma, y contrariamente a lo que ocurre con ID, SD está constituido fundamentalmente por productos de tipo μ -/ λ -.

SD-TI tiene la composición de un ι -carragenano, aunque con contenido relativamente bajo de 3,6-anhidrogalactosa. Su contenido de carrabiosa (72,6 %, doble del porcentaje de 3,6-anhidrogalactosa) está de acuerdo con el porcentaje de estructura ι - (67,9 %, Tabla 60) y podría justificar su insolubilidad en cloruro de potasio considerando que hemos incluido en la estructura ι -, únicamente las unidades clásicas (3,6-anhidrogalactosa y su 2-sulfato y galactosa 4-sulfato). El resto de la molécula se completa con las unidades inusuales ya discutidas anteriormente.

El producto SD-TS representa una estructura nueva, similar a la de ID-TS, ambas derivadas de polisacáridos con estructura parcial del tipo- λ ,

con la presencia de residuos inusuales, y la posible existencia de fragmentos del tipo K-/ I- (no más del 10 %); dichos fragmentos integrarían bloques de tipo- λ en forma de copolímero o pequeñas inserciones, dada la solubilidad del producto.

Las moléculas de SD-TS contienen todo el resto de factores promotores de solubilidad antes mencionados, pero, tal como en el caso de ID-TS se suma a ellos el porcentaje de galactosa terminal (Tabla 60), que podría sugerir que algunas cadenas laterales podrían estar constituidas por residuos únicos de galactosa.

Como ya se ha expresado, la presencia de 3,6-di-O-metilgalactosa en estos carragenanos tratados permetilados, y que sugeriría la presencia de unidades de galactosa sulfatadas en C-2 y unidas por la posición 4-, no se considera subvaluada debido a que su proporción no ha disminuído al pasar del carragenano SD al SD-TI ni al SD-TS. Ello haría suponer que el tratamiento alcalino no provoca la destrucción de esas unidades, como lo había sugerido Rees⁵⁸. Además, la integración manual de los cromatogramas de los productos de metanólisis de la fracción ξ - del carragenano de *Gigartina canaliculata* permetilada⁵⁸, indica una relación molar de 4,6-di-O-metil/3,6-di-O-metilgalactosa de 55:45, consecuente con la estructura propuesta para el ξ -carragenano⁵⁸, pero no con una degradación alcalina excesiva.

FACTORES SOLUBILIZANTES

Los carragenanos solubles en cloruro de potasio son aquellos que carecen de la sustitución y/o la estereoquímica necesarias para formar dobles hélices potasio-inducidas⁵⁸. Algunas estructuras con esas

características han sido definidas y llamadas ν -, μ -, λ - ó ξ -, y si bien es probable que no exista molécula alguna con un 100 % de esas estructuras, sigue siendo válido que aquéllas pueden formar importantes porciones de los polisacáridos solubles, constituidos en bloques en copolímeros heterogéneos o diseminados entre otras estructuras con otros factores solubilizantes.

Evidentemente, las solubilidades no sólo están determinadas por el balance entre los factores hidrófóbicos y los hidrofílicos, sino por estructuras cuya conformación impide o dificulta la formación de hélices y su posterior agregación²⁴⁸. Como se sabe, el prototipo de carragenano gelificable es el κ -carragenano, en el cual se alternan unidades de β -D-galactosa 4-sulfato y 3,6-anhidro- α -D-galactosa, enlazadas respectivamente (1 \rightarrow 3) y (1 \rightarrow 4) (Fig.6). En el llamado ι -carragenano, que también gelifica pero suele hacerlo a concentraciones mayores de cloruro de potasio, el residuo 3,6-anhidrogalactosídico se encuentra sulfatado en C-2.

La doble hélice se estabiliza por uniones hidrógeno entre los oxhidrilos de C-2 y C-6 de los residuos de D-galactosa correspondientes a distintas hebras²⁴⁸. Dado que son los únicos oxhidrilos libres del ι -carragenano, la doble hélice se conoce como una estructura "totalmente hidrógeno-ligada".²⁴⁸

Parte de la secuencia disacáridica regular se encuentra usualmente enmascarada por la presencia de otros residuos unidos (1 \rightarrow 4), que presentan diferente conformación (ver página 124). Ese cambio se refleja en una variación de la flexibilidad del "ovillo" desordenado en solución²⁵⁷, y cuando por algún factor (temperatura, presencia de catión potasio) se ordena la conformación, el residuo enmascarante interrumpe

en ese punto la formación de la hélice plegando ("kinking") la cadena²⁴⁸. En pequeña proporción, la existencia de esos residuos es esencial para la formación del gel²³⁸, ya que determina la combinación de cada cadena con más de una cadena vecina para formar el reticulado; sin embargo, cuando la proporción de kinks se hace mayor, el polisacárido se torna más soluble, y cuando esa proporción supera a la de 3,6-anhidrogalactosa, los polisacáridos se hacen solubles en soluciones de cloruro de potasio, y se los llama μ - ó ν -carragenanos en lugar de κ - ó ι -¹²⁸.

El hecho que un polisacárido no pueda llegar a un 100 % de "carrabiosa consecutiva"¹²⁸ o que el producto no alcance la relación molar galactosa/3,6-anhidrogalactosa de 1:1 al ser tratado con borohidruro alcalino, indican la presencia de kinks que no son unidades de galactosa ligadas por la posición 4- y sulfatadas en C-6^{58,128}, como ocurre en el ξ -carragenano de *Gigartina atropurpurea*⁵⁸.

Una estructura de λ -carragenano "ideal" puede transformarse en medio alcalino en un polisacárido cuya geometría debe ser similar a la del ι -carragenano²⁵⁷. Sin embargo, ha sido puntualizado que el sulfato sobre la posición 2- de la unidad galactosídica previene de la formación de dobles hélices, y por lo tanto el polímero se mantiene en el estado de arrollamiento al azar²⁵⁷.

A todos esos factores de solubilidad ya conocidos, se pueden agregar algunos nuevos, que comprenden dos grupos:

a) Un tipo de factor, que afecta la estructura secundaria, deriva de la existencia de uniones atípicas, como (1→2) y (1→6). La existencia de la primera de las uniones se confirmó por la presencia de 3,4,6-tri-O-metilgalactosa en los seis carragenanos estudiados, permetilados e hidrolizados. Ese tipo de unión, rara en sistemas biológicos, impide

las conformaciones ordenadas^{238b}, por causar giros de las cadenas. Existen otros azúcares metilados que también podrían indicar (entre otras cosas) esa unión, como la 3,6-di-0-metilgalactosa o la 3-0-metilgalactosa en los productos tratados. De no ser así, este último azúcar al igual que la 2,3-di-0-metilgalactosa podrían indicar la presencia de uniones (1→6), las que incrementan la flexibilidad del polímero^{256,257} y por ende su posibilidad de enrollamiento y su solubilidad. El mismo efecto sería producido por la presencia de azúcares que actúan como ramificaciones (xilosas o galactosas) posiblemente unidos al C-6 de galactosas de la cadena principal. Esta posibilidad, de uniones (1→6) ya había sido sugerida por Usov y col.⁷⁷ para el λ -carragenano de *Tichocarpus crinitus*.

b) El otro tipo de factor afectaría la estructura terciaria al dificultar la formación de puente hidrógeno que, como se sabe, existe entre los oxhidrilos de C-2 de una hebra y de C-6 de la otra hebra de galactosas unidas (1→3). Cualquier sustituyente sobre C-2 y/o C-6 de esa unidad de galactosa dificultaría la unión hidrógeno, y por ende debilitaría la doble hélice. La galactosa 2-sulfato unida (1→3), componente fundamental de los λ -carragenanos sería uno de los factores que promueven la solubilidad de los λ -carragenanos modificados por álcali.

Sin embargo, es de hacer notar que no se han efectuado estudios acerca de la solubilidad exacta de esos productos, ya que Rees⁵⁵ lo denomina soluble, pero trabajando a 0,3M de KCl; eso no implica que el producto no pueda precipitar a concentraciones mayores de la sal. En nuestro caso se verificó que las fracciones SD-TS e ID-TS eran "solubles", pero en ellas habían grandes cantidades de diversos factores solubilizantes sumados a las importantes características λ - de esos productos.

Por el contrario, Usov y col.^{82,83} determinaron por RMN de ^{13}C que el "K-carragenano" de *Phyllophora nervosa* presentaba gran parte de sus unidades galactosídicas sulfatadas en C-6 en lugar de C-4, en alternancia con unidades 3,6-anhidrogalactosídicas. Ese producto se aislaba por precipitación en soluciones de KCl 0,5M⁸².

Debe puntualizarse que las concentraciones de cloruro de potasio utilizadas en ambos casos, debieron calcularse a partir de datos suministrados por los autores de esos trabajos en la Parte Experimental, que no fueron considerados en absoluto factores determinantes de la solubilización o precipitación. Sin embargo, un rápido análisis de esos resultados, llevaría a la conclusión, seguramente errónea, que es el compromiso del 2-OH el que realmente importa para la sujeción de la doble hélice, y que el del 6-OH tendría un papel menor. Si bien la última palabra estaría dada por la determinación de las curvas de precipitación de uno y otro producto (en soluciones de cloruro de potasio), es probable, que aún existiendo esa diferencia, ésta sea de grado y no de clase.

De cualquier modo, la presencia de 4-O-metilgalactosa, ya asignada a galactosa 2,6-disulfato enlazada por la posición 3-, presente en el polisacárido de *Pachymenia hymantophora*²⁵⁴, tiene que ser un importantísimo factor solubilizante, que ha sido hallado en significativa proporción en todos los carragenanos aquí estudiados (Tabla 60), pero fundamentalmente en ID, SD-TS e ID-TS, todos pertenecientes a la familia λ -, y que podría ser una causa más de la solubilidad de los productos tratados.

Esta unidad también fue hallada en importantes proporciones en los estudios de metilación de otros carragenanos intermedios de *Iridaea undulosa*¹²⁷, y aunque no fue discutido, el 13 % hallado en los productos precipitados a 0,70-1,05M de cloruro de potasio (que fueron caracterizados

con estructuras parciales de tipo K- / (-) explicaría ampliamente el porqué de la alta concentración de sal que se precisa para precipitar un polisacárido que - de acuerdo a los factores clásicos - debería ser más insoluble.

La presencia de 2,4-di-O-metilgalactosa en los carragenanos metilados también indica la existencia de galactosas enlazadas por la posición 3- , presentando además una ramificación (xilosa, por ejemplo) o un sulfato en la posición 6-. Ambas bloquearían el oxhidrilo de esa posición, impidiendo su susceptibilidad a las uniones hidrógeno.

ESTUDIOS DE AUTOHIDROLISIS

Dado que la aplicación de la espectroscopía de resonancia magnética nuclear a los carragenanos requiere que las soluciones concentradas de los mismos sean de baja viscosidad, era necesario buscar un método degradativo para los polisacáridos ya que el calentamiento de las soluciones - otro de los métodos utilizados para bajar la viscosidad - se hacía imposible con el equipo que contamos.

Además, el método degradativo a emplear tenía que ser suave, es decir, debía romper unas pocas uniones glicosídicas (si fuera posible, específicamente) y nada (o muy poco) de éster sulfato a fin de conservar en el producto degradado las características estructurales del polisacárido original.

El método elegido fue la autohidrólisis. Painter²⁵⁸ la utilizó en 1959, con la intención de obtener mono- y oligosacáridos sulfatados, y basó la reacción en la presencia de grupos ácidos fuertes y uniones lábiles en un mismo producto. Se aplicó en un tipo especial de K-carragenano (ahora llamado furcellarano, caracterizado por su incompleta sulfatación), obtenido del alga *Furcellaria fastigiata*, cuya relación molar galactosa:3,6-anhidrogalactosa:sulfato era de 1:0,79:0,73. La autohidrólisis se efectuó por agitación de una solución acuosa del polisacárido con resina catiónica (H^+) a 60°. Luego de filtrar, se dializó a 80° contra un gran volumen de agua que contenía carbonato de bario suspendido. Painter notó que a las 6 horas el poder reductor del dializado llegó a constancia; una vez aislado, ese dializado representaba un 40 % del peso original. En experiencias posteriores ese porcentaje se elevó hasta el 60 % por agregado de resina a la bolsa de diálisis, a fin de compensar

la solubilidad finita del carbonato de bario.

Los análisis efectuados indicaron que se perdió menos del 20 % del sulfato original, y que el dializado estaba compuesto por: D-galactosa, 3,6-anhidro-D-galactosa, 4-O- β -D-galactopiranosil-3,6-anhidro-D-galactosa (entre todos 35 %) y por lo menos cinco mono- y oligosacáridos sulfatados diferentes (60 %). Posteriormente²⁵⁹ se diferenció, analizando los autohidrolizados de distintos carragenanos, a los 2- , 4- y 6- sulfatos de D-galactosa y al 2-sulfato de 3,6-anhidrogalactosa, más alguna unidad (no caracterizada) de galactosa disulfatada. También la autohidrólisis fue utilizada¹⁰⁸ para degradar K- y L-carragenanos y hacerlos aptos para experiencias biológicas con animales. Se demostró total retención del sulfato, alto rendimiento y claro descenso de la viscosidad (7,2 a 0,5 de viscosidad inherente) en 2 horas.

Los estudios de químicos noruegos²⁶⁰ sobre la hidrólisis parcial del ácido algínico llegaron a la conclusión que la concentración local del protón es diferente en las cercanías de la unión glicosídica y en el seno de la solución, motivo por el cual los dextranos sulfatados o los poliurónidos se hidrolizan más lentamente que sus análogos neutros en solución fuertemente ácida, pero lo hacen más rápidamente a $\text{pH} > 1$.

AUTOHIDROLISIS DEL CARRAGENANO DE *IRIDAEA UNDULOSA*

Los primeros estudios, efectuados a fin de controlar el método de autohidrólisis se efectuaron a temperatura ambiente. Se hizo pasar por resina ácida una solución al 1% del carragenano total, diluyendo el eluido hasta el 0,3%. El pH de la solución era de 2,45 y con ese valor permaneció a lo largo del tiempo. Se determinó la viscosidad relativa del producto a distintos intervalos (Fig.20); la temperatura promedio fue

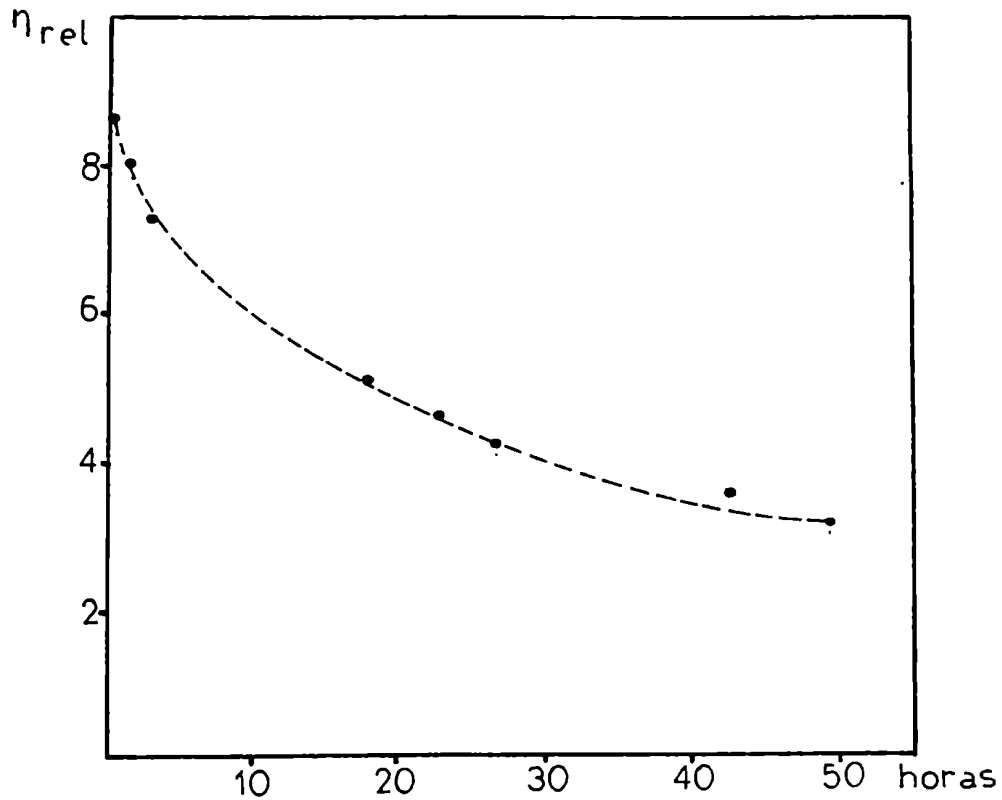


Figura 20. Autohidrólisis del carragenano a temperatura ambiente.

de 27°. A las 50 horas se cortó la autohidrólisis por pasaje a través de resina sódica. Esa solución se dializó contra un volumen grande de agua, obteniéndose 90 % de un producto que no atravesaba el tubo de diálisis y 9 % de un dializable que análisis posteriores determinaron que estaba compuesto fundamentalmente por sales.

En la Tabla 61 pueden apreciarse algunas características del producto degradado que no ha atravesado el tubo de diálisis, comparado con las del carragenano de partida.

Puede observarse que la pérdida de sulfato fue pequeña ($\sim 15\%$), y que no ha existido destrucción de la 3,6-anhidrogalactosa; al mismo tiempo disminuyó el peso molecular a la sexta parte, y la viscosidad

TABLA 61. Análisis del producto autohidrolizado no dializable a temperatura ambiente, y del carragenano original.

	Producto original	Autohidrolizado no dializable
Peso Molecular	200.000	34.000
$[\alpha]_D$	70,1°	116,8°
Sulfato (SO ₃ K %)	40,6	34,2
3,6-anhidrogalactosa (% anh.)	6,4	6,6
$[\eta]$ (dl/g)	5,56	3,02

intrínseca a la mitad.

Con los ensayos subsiguientes, a mayores temperaturas, se observó que la caída en la viscosidad era mucho más rápida; en un caso, a 50° se tomaron muestras para la determinación de viscosidades intrínsecas y pesos moleculares (Tabla 62).

TABLA 62. Autohidrólisis del carragenano a 50°.

Tiempo (horas)	0	0,5	1,5	3	5
$[\eta]$ (dl/g)	4,66	3,91	2,60	1,71	n.d.
Peso molecular	276.000	178.000	64.000	22.000	21.000

En otro caso se efectuó a 60°, observándose la caída en la viscosidad que se aprecia en la Tabla 63.

TABLA 63. Autohidrólisis del carragenano a 60°.

Tiempo (horas)	0	2	3	4
η_{rel}	5,15	1,56	1,34	1,21

En este caso, se obtuvo un 72 % de producto no dializable, con un poder rotatorio de 49,3°, viscosidad intrínseca 0,14 y 26,4 % de sulfato (expresado como SO_3K); su diagrama de elución en Sephadex G-25 (con NaCl 0,5 M de solvente) indicó un único pico en el volumen de exclusión (Fig.21). Este producto se sometió posteriormente a espectroscopía de RMN de ^{13}C (ver más adelante).

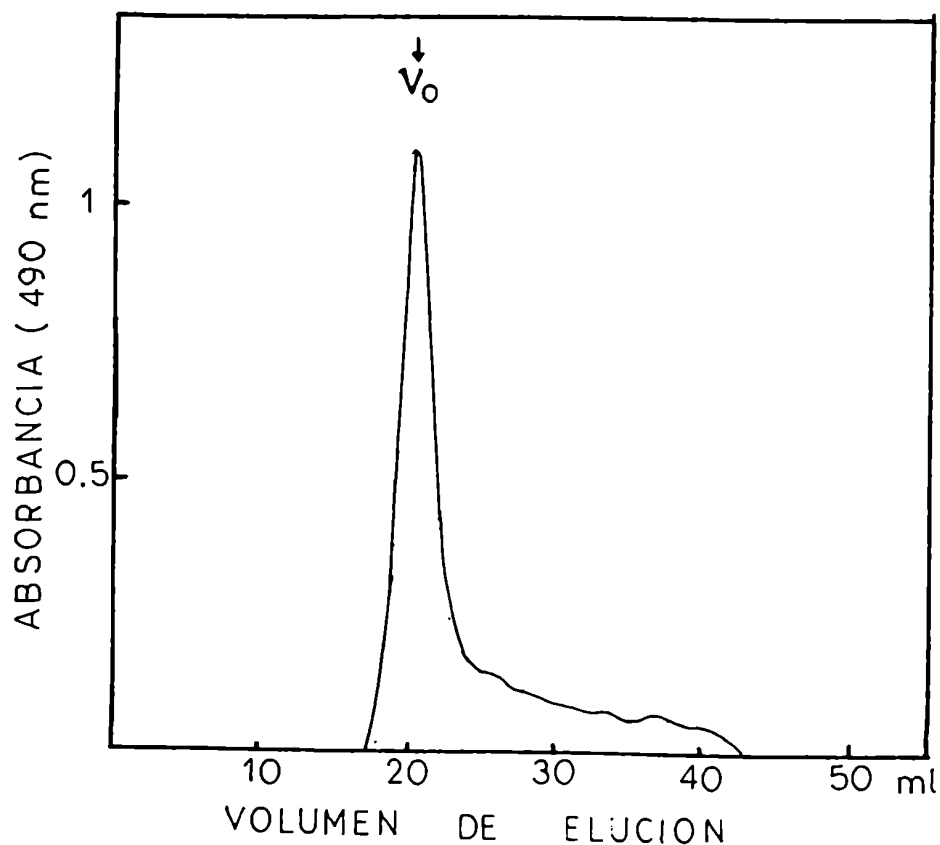


Figura 21. Cromatografía en geles de Sephadex G-25 con NaCl 0,5M del carragenano autohidrolizado no dializable.

Finalmente se efectuó una autohidrólisis a 60°, pero llegando hasta constancia, obteniéndose los resultados que se aprecian en la Tabla 64.

TABLA 64. Autohidrólisis del carragenano a 60°.

Tiempo (h)	0	1	2	3	4	5	6	8	10	16
η_{rel}	11,36	2,49	1,44	1,27	1,13	1,12	1,11	1,04	1	1
P.M.						33000	6700	2000	2000	1900

El peso molecular llega cerca de 2,000; originalmente el producto contenía 6,4 % de 3,6-anhidrogalactosa, por lo cual el peso molecular promedio de cada unidad que contiene un residuo de 3,6-anhidrogalactosa es de $144/0,064 = 2.200$. Esa concordancia entre ambos valores permite suponer que la ruptura verificada es la 3,6-anhidrogalactosídica, que, como se sabe, es la más lábil.

AUTOHIDROLISIS DE UN PRODUCTO RICO EN 3,6-ANHIDROGALACTOSA

A fin de calcular la constante de velocidad de la reacción, y comprobar que ésta se verifica por ruptura de la unión 3,6-anhidrogalactosídica, se sometió a autohidrólisis (de aquí en más, a 60°) a la fracción insoluble a una concentración 0,125M de cloruro de potasio, resultante del tratamiento alcalino del carragenano de *Iridaea undulosa*^{11,126} (TTI, cedida por la Dra.M.C.Matulewicz), que contenía

25,5 % de 3,6-anhidrogalaactosa (relación molar galaactosa:3,6-anhidrogalaactosa:sulfato de 1,00:1,03:1,58), lo que implica un peso molecular por cada unidad de 3,6-anhidrogalaactosa de 570 (promedio). Los resultados obtenidos en esa autohidrólisis pueden apreciarse en la Tabla 65.

TABLA 65. Autohidrólisis de un carragenano rico en 3,6-anhidrogalaactosa

Tiempo(h)	P.M.	A _{3,6-ahg} ^a	Tiempo(h)	P.M.	A _{3,6-ahg} ^a
0	n.d.	5,19	9,5	1.325	2,95
0,5	68.600	3,04	11	1.223	2,23
1	18.500	5,06	13	928	2,00
2	6.400	2,64	15	824	4,41
3	3.700	4,63	18,5	768	1,19
4	2.650	4,61	21	719	2,13
5	2.400	3,60	24	779	0,92
6	1.820	3,60	28	711	1,82
7,5	1.480	3,73	32,5	676	3,31
			42	787	0,66

^aAbsorbancia debida a la 3,6-anhidrogalaactosa multiplicada por el factor de dilución, luego de reducir con borohidruo de sodio.

Además de la determinación de los pesos moleculares sobre las alícuotas, una porción se neutralizó con carbonato de calcio, se redujo con borohidruo de sodio y luego se determinó la 3,6-anhidrogalaactosa por reacción con resorcinol-ácido clorhídrico²⁶¹. Ya que no se obtiene

color por reacción del 3,6-anhidrogalactitol con el reactivo, la absorción se debe únicamente a la 3,6-anhidrogalactosa no reducida, es decir aquella que presenta unión glicosídica; por ende, la disminución de esa absorción está originada en la ruptura de uniones 3,6-anhidrogalactosídicas.

A las 7,5 horas de autohidrólisis se separó parte de la mezcla de reacción y se aisló tras neutralización, el carragenano TTI_m (rendimiento, 82 %), en el cual se había perdido ~15 % del sulfato original (relación molar galactosa/sulfato de 1:1,32).

Deducción cinética

Si M_0 , M_t y M_∞ son los pesos moleculares inicial, al tiempo t y al tiempo infinito, respectivamente (este último debería ser teóricamente igual a m , el peso molecular de cada unidad), y u_0 y u_t son el número de uniones lábiles inicialmente, y escindidas al tiempo t , respectivamente, por largo de cadena medio:

$$\frac{du_t}{dt} = k (u_0 - u_t) \quad [1]$$

pero $u_0 = \frac{M_0}{M_\infty} - 1 \quad [2]$ y $u_t = \frac{M_0}{M_t} - 1 \quad [3]$

Entonces, de [1], [2] y [3]

$$\frac{du_t}{dt} = k \left(\frac{M_0}{M_\infty} - \frac{M_0}{M_t} \right) \quad [4]$$

Diferenciando [3]

$$du_t = - (M_0/M_t^2) \cdot dM_t \quad [5]$$

De [4] y [5]

$$-\frac{M_0}{M_t^2} \cdot \frac{dM_t}{dt} = k \left(\frac{M_0}{M_\infty} - \frac{M_0}{M_t} \right) \quad [6]$$

o bien

$$\frac{dM_t}{dt} = \frac{-k}{M_\infty} (M_t^2 - M_\infty M_t) \quad [7]$$

Integrando

$$t = \int_{M_0}^{M_t} \frac{-M_\infty dM_t}{k (M_t^2 - M_\infty M_t)} \quad [8]$$

O sea que

$$\ln \left(\frac{1 - \frac{M_\infty}{M_t}}{1 - \frac{M_\infty}{M_0}} \right) = kt \quad [9]$$

En los casos en que $M_t \gg M_\infty$, la ecuación puede aproximarse

a:

$$\frac{M_\infty}{M_t} = \frac{M_\infty}{M_0} - kt \quad [10]$$

De la ecuación [9] se desprende que de una gráfica de $-\ln(1 - M_\infty/M_t)$ en función del tiempo, si la ruptura verificada es de primer orden y existe un único tipo de unión lábil, debe obtenerse una

recta cuya ordenada al origen es $-\ln(1 - M_\infty/M_0)$, término que es aproximadamente igual a M_∞/M_0 , lo cual en muchos casos es cercano a cero, y pendiente k , la constante de velocidad de la reacción.

Cálculo de la constante de velocidad k

Puede observarse en la Tabla 65 que los valores de pesos moleculares de los productos obtenidos en los últimos tramos de la autohidrólisis se muestran aproximadamente constantes. El promedio de los mismos es 734, y como tal se ha tomado el M_∞ . Ese valor no se encuentra muy lejos del teórico 570, y es lógico - con esos datos - considerar que las rupturas verificadas fueron 3,6-anhidrogalactosídicas. Debemos tener en cuenta, además, que ya que tenemos como dato la absorbancia debida a 3,6-anhidrogalactosa no reducida, puede calcularse independientemente la constante de velocidad debida a ruptura de uniones anhidrogalactosídicas, de acuerdo al método utilizado por Rees⁵⁰ y Cerezo⁴⁷ para rupturas ácidas, es decir un gráfico de $\ln \left[(A_0 - A_\infty) / (A_t - A_\infty) \right]$, donde A son los valores de absorbancia ya informados. En la Tabla 66 pueden apreciarse los valores que toman esos parámetros a distintos tiempos.

TABLA 66. Parámetros para el cálculo de k.

Tiempo (horas)	$-\ln\left(1 - \frac{M_{\infty}}{M_t}\right)$	$\ln\left(\frac{A_0 - A_{\infty}}{A_t - A_{\infty}}\right)$ ^a
0		0
0,5	0,0108	0,644
1	0,0405	0,029
2	0,122	0,828
3	0,221	0,132
4	0,324	0,137
5	0,365	0,432
6	0,516	0,432
7,5	0,685	0,389
9,5	0,807	0,682
11	0,917	1,060
13	1,565	1,218
15	2,214	0,189
18,5	3,117	2,146
21	∞	1,125
24	2,851	2,858
28	∞	1,362
32,5	∞	0,536
42	2,698	

^a $A_0 = 5,19$ y $A_{\infty} = 0,66$.

En la determinación de k por disminución de pesos moleculares, que brinda mayor seguridad, sólo puede aprovecharse el gráfico para las primeras 11 horas, ya que luego el peso molecular tiende a tornarse constante, y el error en el valor del logaritmo crece infinitamente.

Cuando se graficaron los resultados obtenidos (Fig.22) se obtuvo una recta bastante bien ajustada, pese a existir una anomalía: la recta no parte del origen, lo que indicaría la existencia de un "tiempo de inducción" para la reacción, de 20-30 minutos.

La pendiente de la recta (o sea el valor de k) es de $8,84 \cdot 10^{-2}$, lo que indica una vida media ($t_{1/2} = \ln 2/k$) de 7,8 horas.

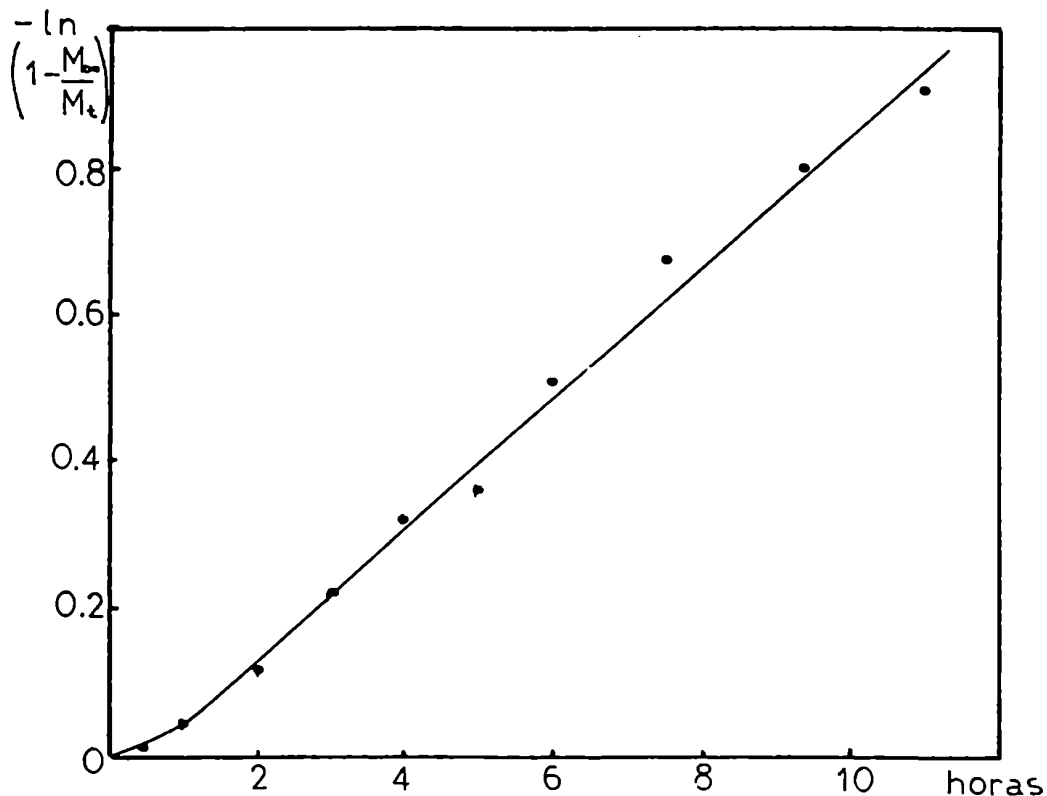


Figura 22. Determinación de la constante de velocidad de autohidrólisis del carragenano tratado TTI.

La determinación de k considerando la ruptura de uniones 3,6-anhidrogalactosídicas presenta un cúmulo de dificultades experimentales que provocan grandes oscilaciones entre tubo y tubo. Sin embargo, descartando los puntos muy alejados puede efectuarse el gráfico y obtenerse una línea recta (Fig.23) cuya pendiente (igual a k) de $8 \cdot 10^{-2}$ indica una vida media de 8,7 horas considerando todos los puntos, o una pendiente de $8,14 \cdot 10^{-2}$

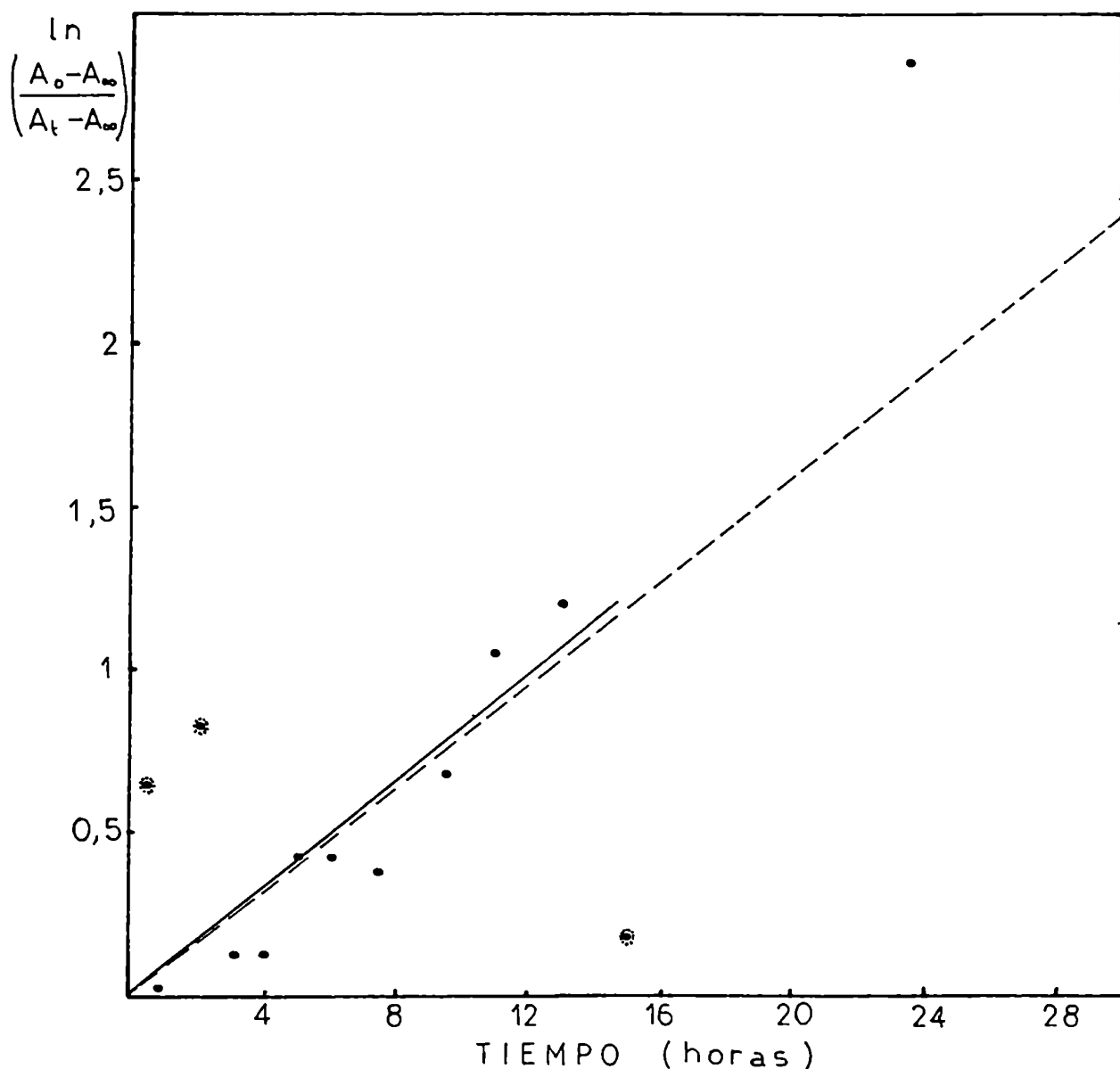


Figura 23. Determinación de la constante de velocidad de ruptura de uniones 3,6-anhidrogalactosídicas del carragenano tratado TTI; (----) considerando todos los puntos; (—) considerando la primer parte.

(vida media de 8,5 horas) considerando el gráfico en su primer parte, o sea hasta las 13 horas.

La similitud de ambos valores llevaría a la conclusión que la ruptura se verifica a través de uniones 3,6-anhidrogalactosídicas.

Los productos obtenidos TTIm (PM= 1.480) y su equivalente totalmente degradado TTIf (PM=734) se cromatografiaron en geles de Sephadex G-25 con NaCl 0,5M como solvente, obteniéndose los diagramas que se aprecian en la figura 24.

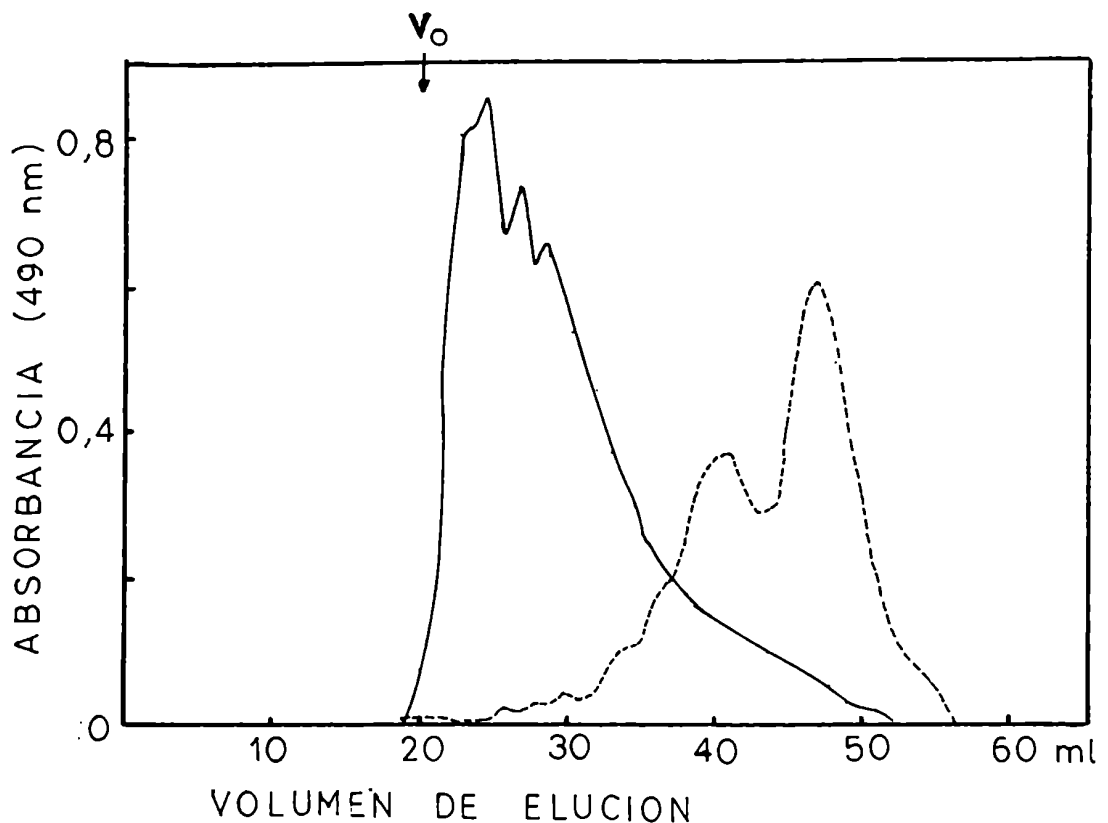


Figura 24. Cromatografía en geles de Sephadex G-25 con NaCl 0,5M de los carragenanos autohidrolizados (—) TTIm y (----) TTIf.

Se observa que el producto TTIm se incluye en la columna, dando una serie de picos cuya envolvente es una "gaussiana", típica de

una degradación al azar. En cambio el producto TTIf da un pico principal que seguramente comprende el disacárido "ideal" y otro pico menor que corresponde a una entidad mayor, que probablemente contiene "kinks" no modificables en medio alcalino y podría ser fundamentalmente un tetrasacárido.

AUTOHIDROLISIS DEL CARRAGENANO SOLUBLE C

Se efectuó del modo habitual, a 60°, con una fracción que contenía 7,6 % de 3,6-anhidrogalactosa (PM promedio de cada unidad de 1.900). Los valores obtenidos pueden observarse en la Tabla 67.

TABLA 67. Autohidrólisis del carragenano C.

Tiempo (horas)	η_{rel}	P.Molecular	$\ln((1-M_w/M_0)/(1-M_w/M_t))^a$
0	5,48	35.700	
1	1,57	15.900	0,0810
2	1,27	14.300	0,0982
3	1,17	11.600	0,139
4	1,12	9.400	0,192
6	1,09	6.500	0,330
8	1,06	5.500	0,420
12	1,04	3.600	0,815
22	1	2.100	

^a $M_w = 2.100$

El rendimiento del producto final aislado fue del 68 %; del gráfico de $\ln((1-M_{\infty}/M_0)/(1-M_{\infty}/M_t))$ versus tiempo se obtiene una recta (Fig.25) cuya pendiente de 0,053, da una vida media de 13,1 horas, lo cual está por encima del valor antes obtenido, pero la diferencia no es lo suficientemente grande para justificar otro tipo de ruptura.

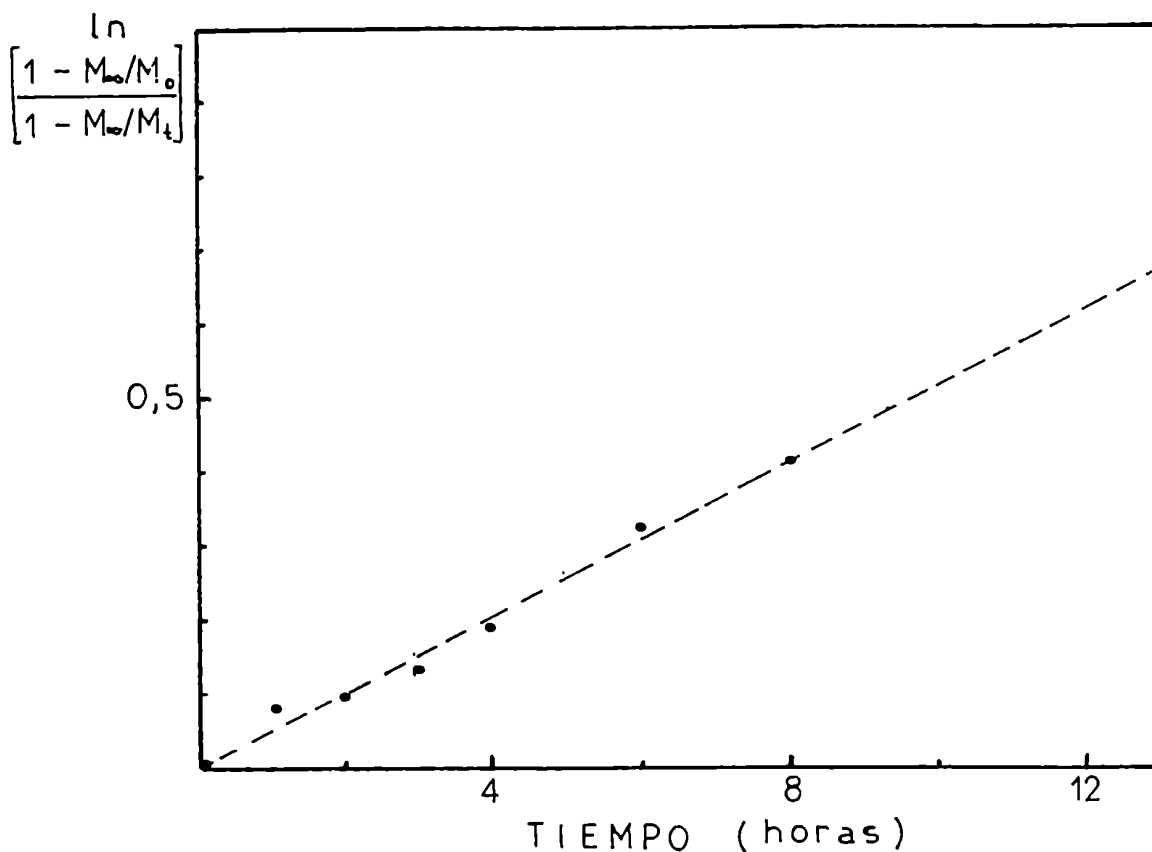


Figura 25. Determinación de la constante de velocidad de autohidrólisis del carragenano C.

AUTOHIDROLISIS DEL CARRAGENANO SD

La fracción SD contenía 6,8 % de 3,6-anhidrogactosa (Tabla 42), lo que indica que el valor teórico de M_{∞} debería ser de 2.100. Los resultados de la autohidrólisis de esta fracción, cuyo producto final se aisló con un rendimiento del 68 % se aprecian en la Tabla 68. El conte-

nido de sulfato decreció en un 30 % (la relación molar galactosa/sulfato pasó a 1:0,86).

TABLA 68. Autohidrólisis del carragenano SD.

Tiempo (h)	η_{rel}	P.Mol.	$-\ln \left(1 - \frac{M_{\infty}}{M_t}\right)^a$	$A_{3,6-ahg}^b$	$\ln \left(\frac{A_0 - A_{\infty}}{A_t - A_{\infty}}\right)^c$
0	1,92	24.300	0,072	0,486	0
1	1,26	18.000	0,099	0,441	0,141
2	1,15	10,200	0,181	0,405	0,270
3	1,10	6.700	0,291	0,540	-0,147
4,5	1,08	4.800	0,434	0,387	0,342
6	1,05	4.150	0,523	0,451	0,108
9	1	3.100	0,788	0,670	-0,430
12	1	2.550	1,087	0,378	0,379
16	1	2.260	1,377	0,315	0,693
23,5	1	1.710		0,660	-0,411
30	1	1.650		0,166	2,744
36	1	1.720		0,144	

^a $M_{\infty} = 1.690$. ^bAbsorbancia debida a la 3,6-anhidrogactosa unida.

^c $A_{\infty} = 0,144$ y $A_0 = 0,486$.

Se observa un notorio decremento del peso molecular y la viscosidad; el valor final del peso molecular resultó algo inferior al esperado, pero la diferencia fue pequeña, y no permite conjeturar sobre la existencia de rupturas diferentes a las ya establecidas. El gráfico de $-\ln \left(1 - \frac{M_{\infty}}{M_t}\right)$ vs. tiempo se observa en la figura 26.

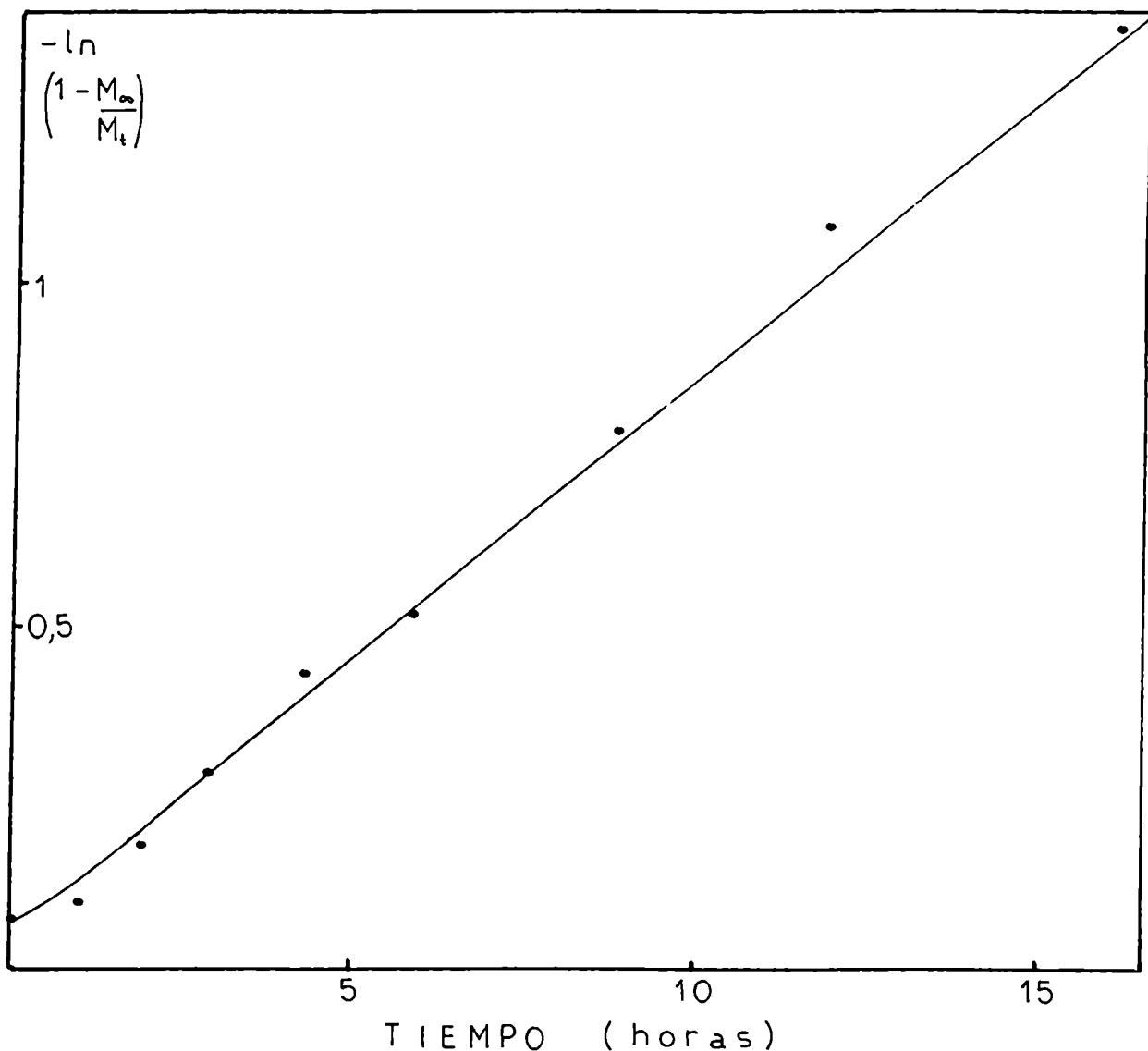


Figura 26. Determinación de la constante de velocidad de autohidrólisis del carragenano SD.

Nuevamente se aprecia la existencia de un corto período de inducción para la reacción, a juzgar por la suave curva a comienzo de la misma. La pendiente de la recta obtenida (k) fue de 0,079 e indica una vida media de 8,7 horas, similar a la ya obtenida para el producto TTI.

Si se consideran los datos referidos al contenido de 3,6-anhidro-

galactosa enlazada (columnas 5 y 6 de la Tabla 68) vuelven a observarse las fluctuaciones naturales originadas en el considerable error experimental del método. Sin embargo, si se descartan los puntos muy dispersos respecto de una recta que pasa por el origen y se calcula la pendiente de la misma utilizando los valores correspondientes a 1; 2; 4,5 ; 12; 16 y 30 horas :

$$\text{Pendiente} = k = \frac{\sum t_i \cdot \ln \left(\frac{A_0 - A_\infty}{A_{t_i} - A_\infty} \right)}{\sum (t_i)^2} = \frac{100,2}{1265,2} = 0,079$$

El valor obtenido es exactamente igual al hallado por el otro método.

AUTOHIDROLISIS DEL CARRAGENANO ID

Podría haberse supuesto que dada la baja proporción de 3,6-anhidrogalactosa de la fracción ID (0,8 %, Tabla 42) su autohidrólisis iba a progresar en forma muy lenta y los fragmentos obtenidos seguirían siendo de alta viscosidad, con lo que el método sería de poco provecho; pese a ello se efectuó la autohidrólisis. El M_∞ teórico con ese contenido de 3,6-anhidrogalactosa, debería ser de 18.000, es decir un valor del orden del de polímeros naturales, como el del carragenano SD intacto.

En la Tabla 69 se muestran los resultados obtenidos. Curiosamente puede apreciarse como la viscosidad relativa se ha reducido en forma considerable, pasando a la tercera parte de su valor en sólo 2 horas; ese dato indicaría que el pequeño porcentaje de 3,6-anhidrogalactosa

TABLA 69. Autohidrólisis del carragenano ID

Tiempo (h)	η_{rel}	Peso molecular	$-\ln(1 - M_{\infty}/M_t)^a$
0	3,16	70.000	
2	1,24	68.000	0,178
7	1,02	49.000	0,257
14	1	17.700	0,986
23	1	13.300	1,799
36	1	11.100	∞

^a $M_{\infty} = 11.100.$

estaba integrando partes centrales de cadena y no únicamente bloques de polisacáridos contaminantes, es decir que tanto la pequeña porción μ -, como la mayor λ - que la integran presentan una pequeña proporción de 3,6-anhidrogalactosa cuya distribución es estadística. El peso molecular decreció por debajo del valor esperado, y el sulfato, tal como en los productos anteriores, disminuyó notoriamente ($\sim 25\%$), pasando la relación molar galactosa/sulfato a 1:0,52.

El gráfico que permite calcular la constante k se aprecia en la Figura 27. Pese a la presencia de unos pocos valores, y a la relativa dispersión de los mismos (en especial los primeros, en los cuales la determinación del peso molecular tiene más error), puede apreciarse la existencia del ya citado período de inducción; la recta más ajustada para los puntos tiene una pendiente de 0,087, que indica una vida media de 8,0 horas, similar a las obtenidas anteriormente.

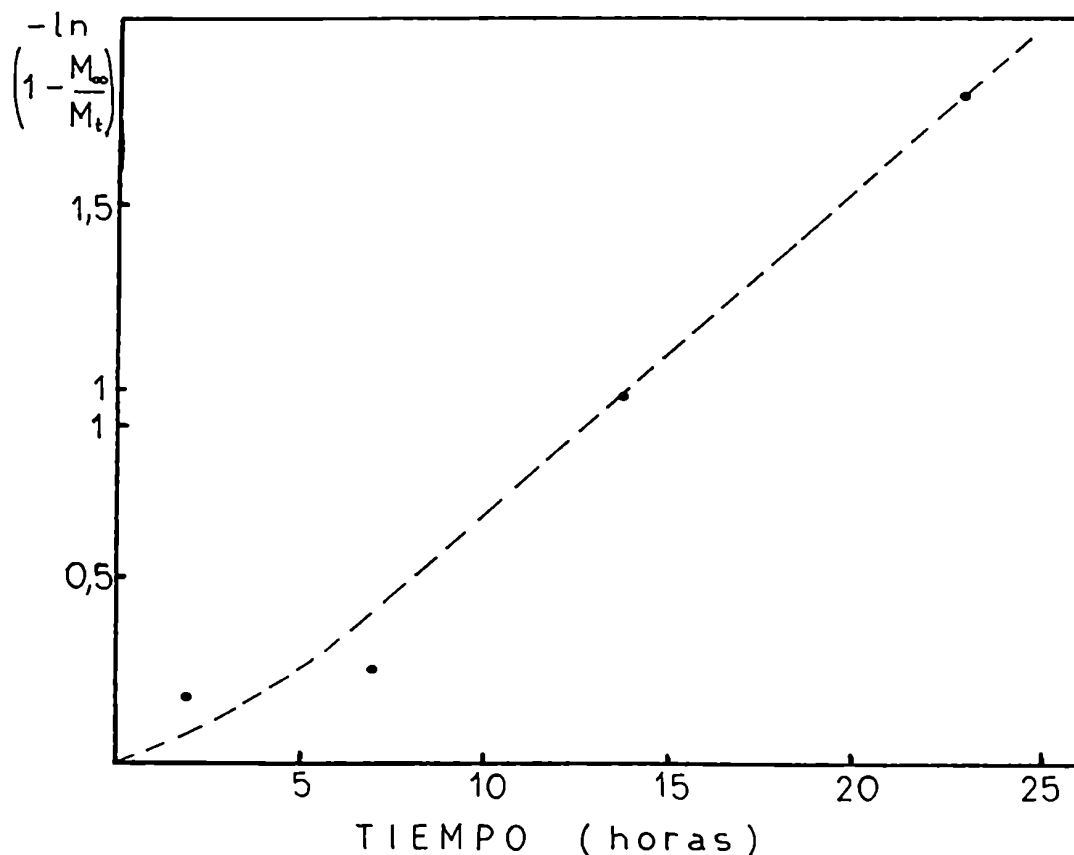


Figura 27. Determinación de la constante de velocidad de autohidrólisis del carragenano ID.

CONCLUSION

De los datos anteriormente obtenidos se desprende que la autohidrólisis a 60° es un método que permite romper selectivamente las uniones 3,6-anhidrogalactosídicas, en una reacción que es de primer orden respecto de la concentración de uniones de ese tipo, y cuya constante de velocidad es de 0,079-0,088 (vida media de 7,8-8,7 horas).

Pese a que dentro del error experimental los valores obtenidos fueron similares, debe considerarse que las pequeñas diferencias entre las mismas pueden deberse a las distintas características del material ya que es de suponer que tenga influencia sobre la velocidad de reacción

la concentración local de ácido, que depende de la distribución y cantidad de grupos sulfato en la zona de la unión glicosídica. Si bien ese factor ha sido considerado constante, y por lo tanto incluido en la constante k , podría presentar algunas variaciones, con lo cual la reacción sería, más bien, de pseudo-primer orden. Se evidenció además una considerable ($\sim 25\%$) pérdida de sulfato, que fue mayor en los productos "solubles".

La filtración en geles de Sephadex G-25 de los carragenanos C, SD e ID autohidrolizados se observa en la Figura 28. Los diagramas de elución de C y SD son similares, con un pico importante en el volumen de exclusión de la columna, pero también con áreas anchas en la zona que se incluye en la columna, inclusive llegándose a resolver como picos. La zona incluida es de mayor importancia en SD que en C, tal como era de esperar dado su mayor contenido de 3,6-anhidrogalactosa inicial; el producto ID prácticamente no se incluye en el gel, aunque presenta zonas que sí lo hacen, pero en menor magnitud que en los casos anteriores, lo cual confirma la existencia de polímeros separados de tipo μ -, más ricos en 3,6-anhidrogalactosa, que llegan a resolver un pequeño pico, y una zona amplia en la cual la distribución de 3,6-anhidrogalactosa puede ser estadística.

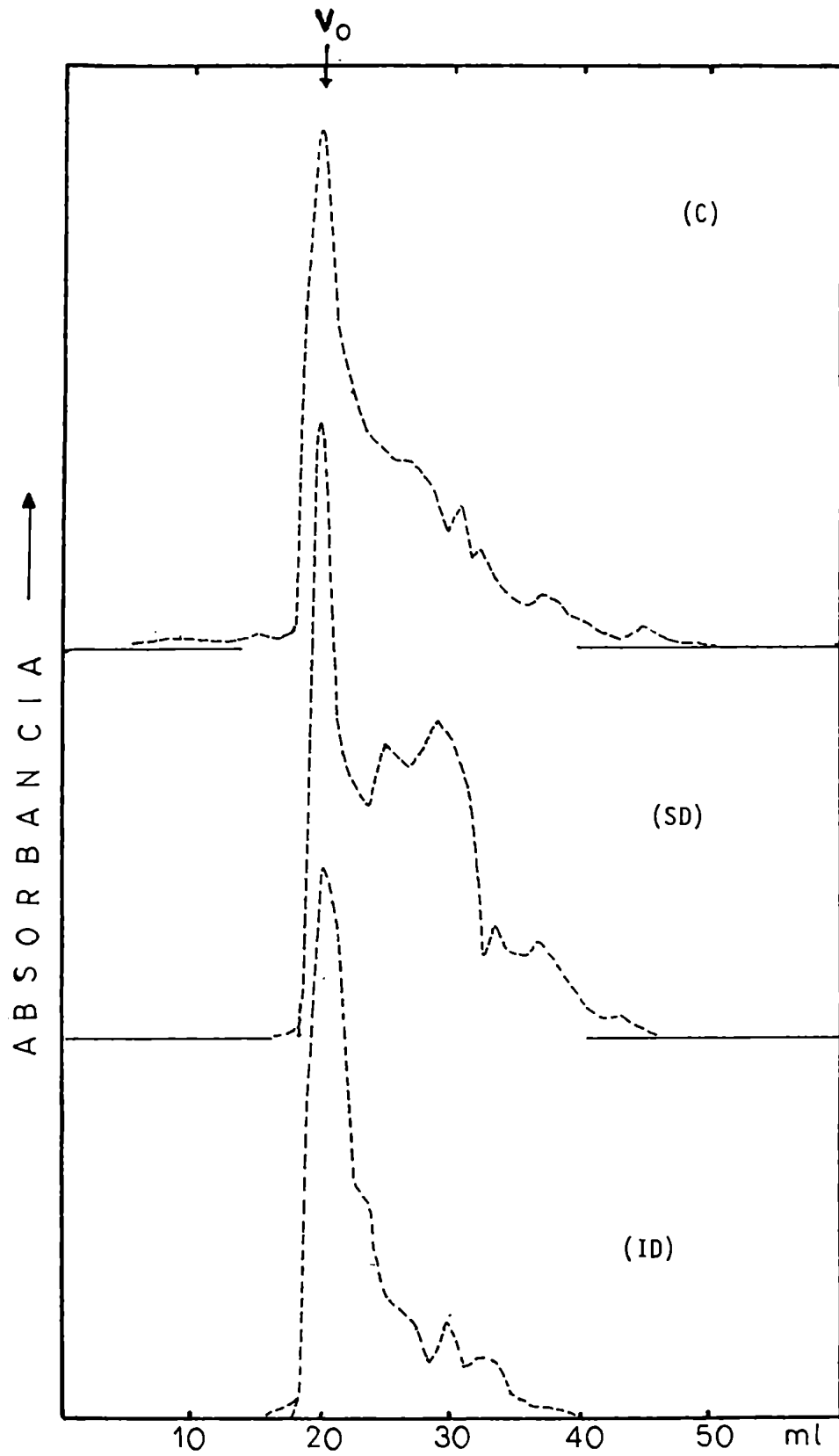


Figura 28. Cromatografía en geles de Sephadex G-25 con NaCl 0,5M de los carragenanos C, SD e ID.

ESTUDIOS DE RESONANCIA MAGNETICA NUCLEAR DE ^{13}C

Como se ha explicado en el capítulo V de esta Tesis, la viscosidad de las soluciones de polisacárido hace que la determinación de los espectros de RMN de ^{13}C se vea dificultada debido al ensanchamiento de las señales correspondientes. Sin embargo hay dos respuestas diferentes para el problema, ambas basadas en reducir la viscosidad de las soluciones concentradas de polisacárido. Una forma es efectuar el espectro a alta temperatura (80-95°), y la otra, buscar un método degradativo que permita obtener fragmentos representativos de la estructura original, y cuyas soluciones sean poco viscosas. Como ya se describió a partir de la página 182, en este trabajo se utilizó el método de autohidrólisis, mediante la cual se rompieron selectivamente las uniones 3,6-anhidrogalactosídicas y la pérdida de sulfato, si bien fue significativa, nunca superó el 30 %.

Las determinaciones espectroscópicas se efectuaron en un equipo de 100 MHz, lo cual implica, para ^{13}C una frecuencia de 25,2 MHz. El ángulo de pulso utilizado fue de 90°, tal como es habitual en moléculas que contienen carbonos cuyo tiempo de relajación es bajo; el tiempo de adquisición de datos fue de 0,8 segundos (máximo posible) sin demora entre pulsos. En todos los casos, dada la amplia variedad de carbonos, y pese a que la concentración de material fue de 90 mg/ml, se hicieron imprescindibles alto número de pulsos (90.000-300.000).

AMPLIACION DE LOS DATOS DE LITERATURA

La interpretación de los espectros a obtener requiere las asignaciones de las resonancias de compuestos modelo; en el capítulo V se presentaron los estudios realizados al respecto, que básicamente corresponden a los productos ricos en 3,6-anhidrogalactosa, como K-, L-carragenanos, sus productos híbridos o exentos de sulfato. En cambio, no se ha informado acerca de las asignaciones de productos "solubles" del tipo de μ - ó λ -carragenanos, salvo un derivado desulfatado de este último^{74,83}; los autores puntualizan las dificultades en la interpretación o en la obtención de espectros de productos naturales de la familia λ -. Para la interpretación de espectros era, por lo tanto necesario ampliar la información obtenida hasta el momento.

Se consideró, en primera aproximación, que los efectos de los distintos grupos sulfato sobre los carbonos del ciclo son aditivos; se aplicaron dos formas distintas de cálculo, dependiendo del tipo de unidad a asignar. El método (a), que utiliza únicamente comparaciones con las asignaciones ya efectuadas a carragenanos (Tabla 16, pag. 76) se considera más seguro. Este método se empleó, por ejemplo, para calcular las asignaciones de un residuo enlazado por la posición 3- de β -galactosa 4-sulfato ubicado entre α -galactosas, característico de μ -carragenanos; se tomó como base a la unidad F de la Tabla 16, o sea la β -galactosa ubicada entre α -galactosas; a las asignaciones de esa unidad F se le sumó la diferencia entre las asignaciones de las unidades A y E, que corresponden a galactosas ubicadas entre 3,6-anhidrogalactosas, sulfatada en C-4 y no sulfatada, respectivamente (Tabla 16). También pudo utilizarse este

método para calcular la asignación de una unidad analoga a la anterior, pero sulfatada en C-6, sumándole a las asignaciones de la unidad F las diferencias entre las de las unidades D y E (Tabla 16).

El método (b), si bien es similar es menos confiable ya que se basa en las diferencias que existen en los desplazamientos de los carbonos de α - y β -galactosas sulfatadas en distintas posiciones y los de los correspondientes monosacáridos¹⁶⁹ (Tabla 14). Esas diferencias de desplazamiento debidas a la presencia de grupos sulfato se sumaron a los desplazamientos de los carbonos de una unidad base y así se obtuvieron los datos para distintas unidades. Por ejemplo, para obtener las asignaciones de los carbonos de un residuo enlazado por la posición 3- de β -galactosa 2-sulfato ubicado entre α -galactosas, característico de λ -carragenanos, se volvió a tomar como base a la unidad F de la Tabla 16, y se sumó a la misma la diferencia de asignaciones entre la β -galactosa 2-sulfato y la β -galactosa¹⁶⁹. El mismo método se utilizó para calcular los desplazamientos de unidades similares pero disulfatadas en C-2 y C-4, en C-2 y C-6, o en estos dos residuos y el anterior, pero cuando se hallan entre unidades 3,6-anhidrogalactosídicas, y para unidades de α -galactosa unida por la posición 4- y sulfatadas en C-2, C-6 ó en C-2 y C-6 ubicadas entre β -galactosas.

En el caso de las unidades de β -galactosa disulfatadas en C-2 y C-4 o en C-2 y C-6 ubicados entre residuos de 3,6-anhidrogalactosa, se puede aplicar el método (b) de dos formas: utilizando como base el carragenano totalmente desulfatado o bien utilizando como base el carragenano con uno de esos grupos sulfato, dato que fue informado⁸³; en este último caso lo llamamos método (b'); por otra parte los desplazamientos de los carbonos de esas mismas unidades, pero ubicadas entre residuos de α -

galactosa pueden calcularse por el método (b), de sumar las contribuciones de ambos grupos sulfato separadamente sobre la base, o bien sumando el efecto del sulfato 2- (por el método (b)) sobre la unidad monosulfatada que previamente se había calculado por el método (a). A esa combinación de métodos se la denominó método (c).

En todos los casos se consideran aditivos los efectos de los grupos sulfato, y se ignoran los posibles efectos cooperativos de ambos, por ejemplo sobre el C-3 de los disulfatados en C-2 y C-4.

Debe considerarse que en los espectros que luego se detallarán se ha encontrado una diferencia constante de +0,6 ppm con los datos de Usov y col.⁸³; esa diferencia ya se ha incorporado a la Tabla 70, en la que pueden apreciarse los desplazamientos de diferentes unidades calculadas que amplían los datos de literatura.

Puede observarse en la Tabla que hay algunas unidades cuyos desplazamientos se calcularon por dos métodos distintos. En lo que respecta a las unidades contiguas a la que se estudia, si bien en los primeros casos se ha puesto genéricamente " α -galactosas" y en los últimos " β -galactosas" es de suponer que la sulfatación de esas unidades pueda producir alguna variación en la que se estudia. Por analogía con las diferencias que produce la sulfatación de una unidad de 3,6-anhidrogalactosa sobre la galactosa vecina, puede suponerse que el efecto mayor se producirá cuando la unidad de α -galactosa anterior a la que se estudia (es decir, la más próxima al extremo no reductor) está sulfatada en C-2, produciendo un desplazamiento campo arriba del C-4 que es difícil de evaluar, pero que seguramente rondará 1-2 ppm cuando ese carbono se encuentre sulfatado, y será menor cuando no lo esté. Esa influencia, en menor medida puede llegar a extenderse hasta el carbono anomérico.

TABLA 70. Desplazamientos químicos de ^{13}C -RMN calculados de diferentes unidades presentes en carragenanos.

UNIDAD	UBICADA ENTRE	DESPLAZAMIENTO						METODO ^a
		C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	
II 3)- β -Galactosa 2-sulf.	α -galactosas	103,8	79,4	78,5	66,4	76,0	61,7	(b)
III 3)- β -Galactosa 2,4-di-S	α -galactosas	103,9	79,5	77,5	74,3	75,2	61,7	(b)
		103,8	79,2	76,9	74,1	75,5	61,7	(c)
IV 3)- β -Galactosa 2,6-di-S	α -galactosas	103,8	79,3	78,3	66,2	73,6	68,0	(b)
		103,9	79,2	78,3	66,1	73,7	67,5	(c)
V 3)- β -Galactosa 4-sulf.	α -galactosas	105,4	70,9	78,0	74,0	75,5	61,8	(a)
VI 3)- β -Galactosa 6-sulf.	α -galactosas	105,5	70,9	79,4	66,0	73,7	67,6	(a)
VIII 3)- β -Galactosa 2-sulf.	3,6-a.h.g.	101,5	79,0	79,9	67,0	75,9	61,8	(b)
IX 3)- β -Galactosa 2,4-di-S	3,6-a.h.g.	101,4	79,0	78,9	74,9	75,1	61,8	(b)
		101,5	78,7	78,3	74,7	75,4	61,8	(b')
X 3)- β -Galactosa 2,6-di-S	3,6-a.h.g.	101,5	78,8	79,7	66,8	73,5	67,1	(b)
		101,6	78,7	79,7	66,7	73,6	67,6	(b')
XV 4)- α -Galactosa 2-sulf.	β -galactosas	95,0	77,2	69,5	79,3	71,1	62,0	(b)
XVI 4)- α -Galactosa 2,6-di-S	β -galactosas	95,1	77,1	69,3	79,1	68,9	68,5	(b)
XVII 4)- α -Galactosa 6-sulf.	β -galactosas	96,9	69,7	71,2	78,9	69,0	68,6	(b)

^aVer texto

En lo que respecta a las unidades de α -galactosa estudiadas es probable que un sulfato sobre C-4 de la unidad de β -galactosa vecina desplace en aproximadamente 0,5 ppm a campos más bajos a la señal de C-1 de las unidades XV, XVI ó XVII (Tabla 70) por analogía con lo que ocurre con las 3,6-anhidrogalactosas correspondientes. El efecto de un sulfato sobre C-2 de la unidad vecina resulta más difícil de evaluar, pero es probable que tenga la misma dirección, y su magnitud sea del mismo orden. El sulfato de C-6 aparentemente no produciría efecto sobre el carbono anomérico, pero sí (0,2-0,3 ppm) sobre el resto de los carbonos, como se desprende de lo que ocurre con la 3,6-anhidrogalactosa (Tabla 71).

Para las unidades de β -galactosa estudiadas VIII, IX y X, es de suponer que el efecto de un sulfato sobre la unidad de 3,6-anhidrogalactosa vecina será similar al ya estudiado en el cambio K- \rightarrow L-, es decir un desplazamiento de 2 ppm a campos más altos del C-4 y de 0,2 ppm a campos más altos del C-1.

Los datos de literatura⁸³ modificados en 0,6 ppm y expresados como en la Tabla anterior, pueden apreciarse en la Tabla 71.

Puede apreciarse que, por simplicidad, las 13 unidades que figuraban en la Tabla 16 se han reducido a 10 en la Tabla 71. Ello se debe a que cuando las unidades anterior y posterior a la que se estudia no son iguales, el efecto que produce la posterior (la más cercana al extremo reductor) generalmente se verifica sobre el C-1 de la unidad en estudio, mientras que el efecto de la unidad anterior suele verificarse sobre el carbono al que se une o sobre sus vecinos inmediatos. Así, por ejemplo, para una unidad de 3,6-anhidrogalactosa cuya unidad posterior de galactosa está sulfatada en C-4, y cuya anterior no porta sulfato, el desplazamiento de C-1 es igual al de la unidad XIX, mientras que los del resto de los carbonos son iguales a los de la unidad XVIII (Tabla 71).

TABLA 71. Desplazamientos químicos de ^{13}C -RMN de diferentes unidades presentes en carragenanos.

UNIDAD	UBICADA ENTRE	DESPLAZAMIENTO					
		C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6
I	3)- β -Galactosa	105,4	71,2	79,6	66,3	76,0	61,8
VII	3)- β -Galactosa	103,1	70,8	81,0	66,9	75,9	61,9
XI	3)- β -Galactosa 4-sulfato	103,1	70,5	79,4	74,6	75,4	61,9
XII	3)- β -Galactosa 4-sulfato	102,9	70,6	79,4	72,6	75,4	61,9
XIII	3)- β -Galactosa 6-sulfato	103,2	70,5	80,8	66,6	73,6	67,7
XIV	4)- α -Galactosa	96,8	69,8	71,5	79,1	71,2	62,1
XVIII	4)-3,6-anhidrogalactosa	95,2	70,5	78,7	79,9	77,4	70,1
XIX	4)-3,6-anhidrogalactosa	95,7	70,3	78,9	79,7	77,4	70,0
XX	4)-3,6-anhidrogal 2-sulfato	92,7	76,0	78,5	79,7	77,4	70,0
XXI	4)-3,6-anhidrogalactosa	95,2	70,3	79,0	80,0	77,4	70,0

De la misma forma, para una unidad de galactosa 4-sulfato cuya unidad anhidrogalactosídica posterior porta sulfato en C-2, y cuya anterior no lo porta, los C-1 y C-2 presentan el desplazamiento de la unidad XII y el resto los de la XI. Análogamente una unidad de 3,6-anhidrogalactosa cuya galactosa anterior está sulfatada en C-6 y cuya posterior está sulfatada en C-4, presentará su C-1 como si estuviera entre las sulfatadas en C-4 (unidad XIX) y sus C-2—C-6 como si estuviera entre sulfatadas en C-6 (unidad XXI).

UTILIZACION DE UN PROGRAMA DE COMPUTADORA

Con los datos habidos, de literatura y calculados (Tablas 70 y 71) era posible comparar cada espectro obtenido. Sin embargo, dado lo trabajoso del mismo, se diseñó un programa que cumpliera dos finalidades: a) comparar individualmente cada señal obtenida con las asignaciones tabuladas y b) agrupar los picos comparados por unidades, y dar un porcentaje de acuerdo del espectro con cada tipo de unidad.

El programa CARRAG.FOR se efectuó en el lenguaje FORTRAN IV, y se utilizó la computadora recientemente adquirida por la Facultad para su compilación y ejecución. El listado del programa es el siguiente:

```

100     DIMENSION G(25,6),D(40),DELTA(25,6,40),AG(25,15),PR(8)
200     OPEN(UNIT=7,NAME='CARRAG.DAT',TYPE='OLD')
300     OPEN(UNIT=8,NAME='CARRAG.RES',TYPE='NEW')
400     WRITE(8,10)
500     DATA(G(I,1),I=1,21)/105.4,2*103.8,2*103.9,105.4,105.5,103.1,
600     1 2*101.5,101.6,103.1,102.9,103.2,96.8,95.,95.1,96.9,95.2,95.7,92.7
700     2 ,95.2/, (G(I,2),I=1,21)/71.2,79.4,2*79.2,2*70.9,70.8,79.,2*78.7,
800     3 70.5,70.6,70.5,69.8,77.2,77.1,69.7,70.5,70.3,76.,70.3/, (G(I,3),
900     4 I=1,21)/79.6,78.5,76.9,78.3,78.,79.4,81.,79.9,78.3,79.7,2*79.4,
1000    5 80.8,71.5,69.5,69.3,71.2,78.7,78.9,78.5,79./, (G(I,4),I=1,21)/
1100    6 66.3,66.4,74.1,66.1,74.,66.,66.9,67.,74.7,66.7,74.6,72.6,66.6,
1200    7 79.1,79.3,79.1,78.9,79.9,2*79.7,80./, (G(I,5),I=1,21)/2*76.,75.5,
1300    8 73.7,75.5,73.7,2*75.9,75.4,73.6,2*75.4,73.6,71.2,71.1,68.9,69.,

```

```

1400      9 4*77.4/, (G(I,6), I=1,21)/61.8,2*61.7,67.5,61.8,67.6,61.9,2*61.8,
1500      0 67.6,2*61.9,67.7,62.1,62.,68.5,68.6,70.1,3*70./
1600      DO 15 K=1,40
1700      DO 15 J=1,6
1800      DO 15 I=1,21
1900      DELTA(I,J,K)=1.
2000      15 CONTINUE
2100      DO 16 I=1,21
2200      READ(7,20) (AG(I,L),L=1,15)
2300      16 CONTINUE
2400      READ(7,25) N, (PR(M),M=1,8)
2500      WRITE(8,26) (PR(M),M=1,8)
2600      READ(7,28) (D(K),K=1,N)
2700      DO 100 K=1,N
2800      WRITE(8,27) D(K)
2900      DO 100 J=1,6
3000      DO 100 I=1,21
3100      IF (I.GE.2.AND.I.LE.6) GO TO 35
3200      IF (I.GE.8.AND.I.LE.10) GO TO 35
3300      IF (I.GE.15.AND.I.LE.17) GO TO 35
3400      IF (J.EQ.1) GO TO 35
3500      EPS=.31
3600      GO TO 45
3700      35 EPS=1.01
3800      45 IF (ABS(G(I,J)-D(K)).GT.EPS) GO TO 100
3900      DELTA(I,J,K)=ABS(G(I,J)-D(K))/(EPS*2.)
4000      WRITE(8,50) J, (AG(I,L),L=1,15)
4100      100 CONTINUE
4200      WRITE(8,110)
4300      DO 200 I=1,21
4400      DTOT=0.
4500      DO 150 J=1,6
4600      DEL=1.
4700      DO 130 K=1,N
4800      IF(DELTA(I,J,K).GE.DEL) GO TO 130
4900      DEL=DELTA(I,J,K)
5000      130 CONTINUE
5100      DTOT=DTOT + DEL
5200      150 CONTINUE
5300      PCEN= (1.-DTOT/6.)*100.
5400      WRITE(8,160) (AG(I,L),L=1,15),PCEN
5500      200 CONTINUE
5600      10 FORMAT (1H ,15X,'ASIGNACION DE SEÑALES DE RMN C-13 DE CARRAGENAN
5700      1 OS')
5800      20 FORMAT(15A4)
5900      25 FORMAT(5X,I2,8A4)
6000      26 FORMAT(7X,'ESPECTRO DE:',8A4)
6100      28 FORMAT(12F6.1)
6200      27 FORMAT(2X,F5.1,3X,'PUEDE CORRESPONDER A')
6300      50 FORMAT(9X,'CARBONO ',I1,' DE ',15A4)
6400      110 FORMAT(1H /15X,'PORCENTAJE DE SIMILITUD CON VALORES TABULADOS'//)
6500      160 FORMAT(5X,'CON ',15A4,': ',F5.1,'%')
6600      STOP
6700      END

```

Este programa busca los datos correspondientes en el archivo CARRAG.DAT, que contiene una serie de datos fijos, que son los nombres de las veintiún unidades diferentes, y otra serie de datos variables, que son dependientes de cada espectro obtenido: el número de picos, el nombre del producto y los desplazamientos químicos de los picos. El archivo CARRAG.DAT tiene la siguiente forma:

100	3)-BETA-GALACTOSA	ENTRE ALFA-GALACTOSAS
200	3)-BETA-GALACTOSA-2-SULFATO	ENTRE ALFA-GALACTOSAS
300	3)-BETA-GALACTOSA-2,4-DISULF	ENTRE ALFA-GALACTOSAS
.		
1100	3)-BETA-GALACTOSA-4-SULFATO	ENTRE 3,6-ANHIDROGALACTOSAS
.		
2100	4)-3,6-ANHIDROGALACTOSA	ENTRE GAL-6-SULFATO

y luego, a continuación, los datos variables, por ejemplo:

2200	17KAPPA-CARRAG.TRAT.ALC.0,125M											
2300	61.8	69.9	70.1	71.6	72.6	74.2	75.4	75.7	77.1	77.4	78.3	78.9
2400	79.7	92.5	95.2	103.0	103.1							

Como ya se ha expresado, el programa cumple dos funciones: en la primera, hasta la sentencia 4100 compara cada uno de los picos incógnita con los datos de las Tablas 70 y 71; cada pico es cotejado contra todos los datos, y es listado en los siguientes casos:

- a) para los datos de U_{ov}^{83} , cuando su diferencia es menor o igual a 0,3 ppm.
- b) para datos calculados, cuando su diferencia es menor o igual a 1 ppm.
- c) para todos los datos de carbono 1, cuando su diferencia es menor o igual a 1 ppm.

Este último caso se efectuó considerando que en el C-1 suele haber diferencias de desplazamiento mayores, debidas a las influencias de las

unidades vecinas. De esa forma, en el archivo CARRAG.RES se obtiene la lista de cada pico y sus posibles asignaciones, por ejemplo:

5400	71.6	PUEDE CORRESPONDER A	
5500		CARBONO 2 DE 3)-BETA-GALACTOSA-4-SULFATO	ENTRE ALFA-GALACTOSAS
5600		CARBONO 2 DE 3)-BETA-GALACTOSA-6-SULFATO	ENTRE ALFA-GALACTOSAS
5700		CARBONO 3 DE 4)-ALFA-GALACTOSA	ENTRE BETA-GALACTOSAS
5800		CARBONO 3 DE 4)-ALFA-GALACTOSA-6-SULFATO	ENTRE BETA-GALACTOSAS

A partir de la sentencia 4200 comienza la segunda parte del programa, titulada "PORCENTAJE DE SIMILITUD CON VALORES TABULADOS", que efectúa la integración de lo antes evaluado, es decir en cuanto se aproxima el espectro a cada unidad.

Para ello se utilizó el siguiente artificio matemático:

- a) Se definió una variable $DELTA(I,J,K) = \left| G(I,J) - D(K) \right| / (2 \times EPS)$, donde I, J y K son los subíndices que se refieren a la unidad (I varía entre 1 y 21), el número de carbono (J varía entre 1 y 6) y el número de pico incógnita (K varía entre 1 y N, donde N es el número total de picos incógnita), respectivamente; los G son los datos tabulados y los D los datos de los picos del espectro, y EPS vale 0,31 para las unidades registradas en literatura y 1,01 para las calculadas. Esta igualdad sólo es válida cuando el pico entra dentro del rango de error prefijado, en caso contrario $DELTA(I,J,K)=1$.
- b) Para cada unidad y cada carbono, se buscó entre todos los picos del espectro aquel que tuvo el DELTA más chico, es decir el que esté más cerca, y se lo igualó al parámetro DEL (de no haber picos dentro del rango fijado, $DEL = DELTA_{\max} = 1$).
- c) Se evaluó el DEL para cada carbono, obteniéndose para cada unidad el parámetro $DTOT = \sum_{j=1}^6 DEL_j$

Obsérvese que, para cada unidad, el valor DTOT sería igual a cero si existiera perfecta coincidencia del espectro incógnita y el tabulado, y sería igual a 6 cuando no exista ninguna coincidencia. Con un sencillo paso aritmético se lo puede llevar a porcentaje de similitud:

PCEN = $(1 - DTOT/6) \times 100$. Una vez obtenido el PCEN para la unidad, este se escribe en el archivo CARRAG.RES, y el trabajo se repite para cada una de las veintiún unidades. La respuesta queda en la forma:

	PORCENTAJE DE SIMILITUD CON VALORES TABULADOS		
19200			
19300			
19400	CON 3)-BETA-GALACTOSA	ENTRE ALFA-GALACTOSAS	39.2 %
19500	CON 3)-BETA-GALACTOSA-2-SULFATO	ENTRE ALFA-GALACTOSAS	70.1 %
19600	CON 3)-BETA-GALACTOSA-2,4-DISULF	ENTRE ALFA-GALACTOSAS	88.4 %

De este modo se obtienen datos de similitud, que si bien no pueden compararse en forma absoluta entre sí, ya que aquellos calculados (Tabla 70) presentan porcentajes de acuerdo más altos, dada la forma de cálculo que los registrados en literatura (Tabla 71), la comparación puede efectuarse en forma relativa, permitiendo así determinar más rápidamente algunos datos estructurales.

ESPECTROS DE LOS CARRAGENANOS TTI DEGRADADOS

Se determinaron los espectros de RMN de ^{13}C de los productos resultantes de la degradación autohidrolítica del carragenano tipo K- (ver página 187), obtenido por tratamiento alcalino del carragenano de *Iridaea undulosa* y posterior precipitación con cloruro de potasio 0,125M^{11,126}, en una etapa media de degradación (TTIm) y en el estado

final (TTIf), es decir de hidrólisis máxima; también se obtuvieron los espectros de los productos resultantes de la reducción con borohidruro de sodio de los carragenanos anteriormente citados (TIm-R y TTIf-R). Los espectros de los productos TIm y TIm-R pueden apreciarse en la Figura 29; los de TTIf y TTIf-R en la Figura 30; los valores de desplazamiento químico correspondientes a los cuatro espectros se encuentran en la Tabla 72.

TABLA 72. Desplazamientos químicos de los picos principales obtenidos en los espectros de RMN de ¹³C de los productos de autohidrólisis del carragenano TTI^a.

CARRAGENANO			
TIm	TIm-R	TTIf	TTIf-R
103,1(m)	103,0(m)	103,8(m)	104,0(m) h
103,0(m)	102,8(m)	103,0(d) h	103,0(d) h
97,1(md)		90,7(m)	
95,2(m)	95,1(m)	87,8(m)	88,3(m)
92,5(d)	92,5(d)		87,5(d)
79,7(m)	79,6(m)	83,2(m)	82,6(d)
78,9(f)	78,8(f) h	79,5(d)	79,1(d) h
78,3(m)	78,2(m)	78,7(d) h	
77,4(f)	77,3(f)	77,2(f)	77,4(f)
77,1(m)	77,1(m)	76,2(m)	76,7(f)
	76,6(d)	75,3(f)	75,4(f)
75,7(d)	75,7(d)	75,2(f)	74,4(d)
75,4(f)	75,3(f)	73,7(f)	73,8(f)
74,2(m)	74,2(m)	73,6(f)	
73,6(d)	73,6(d)	72,5(f)	72,5(f)
72,6(f)	72,5(m)	71,6(m) h	71,8(f) h
71,6(m)	71,5(m)		70,5(d)
70,1(f)	70,0(f) h	70,0(d) h	70,1(d) h
69,9(f) h	69,9(f) h	67,0(md)	67,1(md)
67,1(md)	63,7(d) h	63,3(md)	63,9(m)
61,8(f)	61,7(f)	61,8(f)	62,0(f) h

^aAbreviaturas: f=fuerte; m=medio; d=débil; md=muy débil; h= tiene hombro/s.

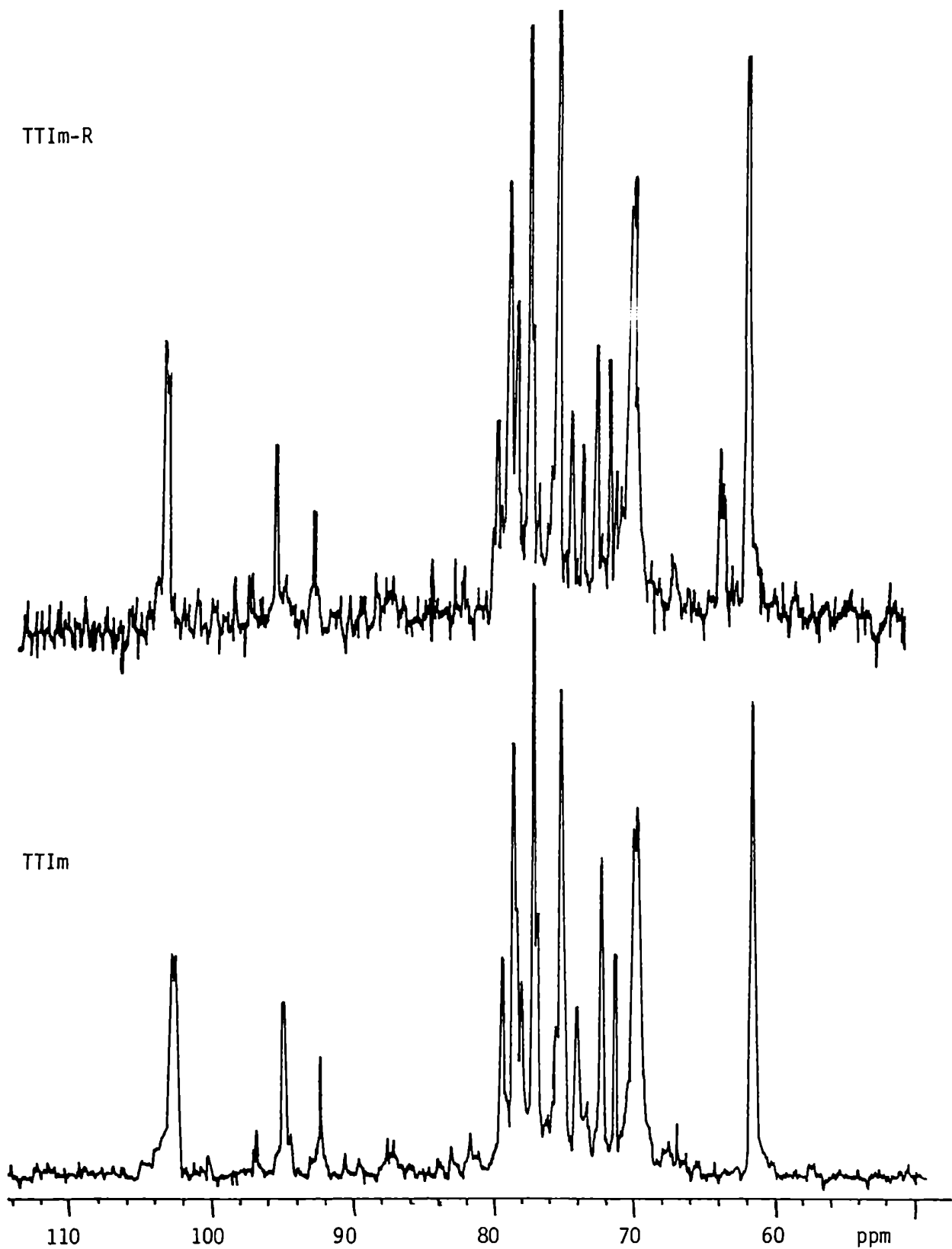


Figura 29. Espectros (25,2 MHz) de RMN de ^{13}C de los carragenanos TTIm-R y TTIm.

INTEPRETACION DE LOS ESPECTROS DE LOS CARRAGENANOS TTim Y TTim-R

Puede apreciarse (Tabla 72, Fig.29) que el espectro del producto TTim contiene más señales que las doce características del K-carragenano "ideal"⁸² (Tabla 71, unidades XI y XIX).

De las comparaciones puede considerarse que:

Zona anomérica : la señal partida a 103,0-103,1 ppm corresponde al C-1 de unidades de β -D-galactosa 4-sulfato (G-1) unida a 3,6-anhidrogalactosa; la partición de la misma se origina en la presencia de algunas de esas unidades 3,6-anhidrogalactosídicas portando sulfato en C-2 (ι -carragenano); sus intensidades relativas se asemejan a las de los picos a 95,2 y 92,5 ppm, confirmando la asignación efectuada. Las otras dos señales anoméricas importantes son esas dos citadas, es decir las que corresponden al C-1 de unidades de 3,6-anhidrogalactosa sin (95,2 ppm) y con sulfato (92,5 ppm) en C-2 (A-1 y AS-1), unidas a residuos de galactosa 4-sulfato, en concordancia con los valores informados para carragenanos de tipo K-/ ι - (Tabla 71). De acuerdo con los datos consignados en la Tabla 70, las otras señales menores a 97,1 y 94,7 ppm podrían representar "kinks" producidos por α -galactosas sin sulfato y con sulfato en C-2, respectivamente, ya que la existencia de un sulfato en C-6 en α -galactosas unidas por la posición 4- es inconsistente con el tratamiento alcalino efectuado a la fracción. La pequeña señal a 92,7 ppm, apenas separada de la correspondiente al C-1 de 3,6-anhidrogalactosa 2-sulfato unida a β -galactosa 4-sulfato, podría indicar la presencia de unidades de ese tipo, pero con un azúcar enlazado diferente, como podría ser una β -galactosa 2-sulfato, que caracterizaría algún pequeño bloque de carragenano de tipo λ -tratado.

Zona C-2—C-5: De acuerdo con la nomenclatura ya empleada (G, A y AS para las unidades XI, XIX y XX, características de κ -carragenano las dos primeras, y de ι -carragenano la tercera), y a los datos de literatura^{82,83}, puede interpretarse que la señal a 79,7 ppm corresponde a A-4 y AS-4; 78,9 a A-3 y/o G-3; 78,3 a AS-3 ó algún kink (C-2 de β -galactosa sulfatada en C-2, C-4 de α -galactosa, etc.); 77,4 ppm, el pico más alto, a A-5 y AS-5; su hombro a 77,1 ppm podría tener el mismo origen o podría derivar de kinks como C-2 de α -galactosa 2-sulfato, ó C-3 de una β -galactosa 4-sulfato ubicada entre α -galactosas; 75,7 ppm a AS-2; 75,4 ppm a G-5; los picos a 74,2 y 72,6 ppm son de más difícil asignación pero si bien no se ajustan exactamente con los datos de literatura, podrían corresponderse con el G-4 de κ - y ι -carragenanos. La señal a 71,6 ppm debería corresponder a kinks del tipo de C-2 de β -galactosa unida a galactosa, C-3 de α -galactosa ó C-5 de α -galactosa o su derivado sulfatado en C-2. La señal a 70,1 ppm puede asignarse a A-2; la de 69,9 ppm a A-6 y AS-6. Todas las asignaciones de las señales que sugerirían la presencia de kinks se obtuvieron en base a los datos de la Tabla 70.

Zona primaria : La señal a 61,8 ppm corresponde a G-6, mientras que la pequeña señal a 67,1 ppm podría indicar parcial sulfatación del C-6, lo cual, dado el tratamiento alcalino no puede corresponder a galactosas unidas por la posición 4-; esta señal podría provenir de unidades de β -galactosa 6-sulfato enlazada por la posición 3-, cuya presencia se determinó en los estudios de metilación (pag. 168); dicha unidad había sido detectada en el polisacárido de *Phyllophora nervosa*^{82,83}.

Espectro del producto TTI_m-R: La observación de la Tabla 72 y la Fig.29 indican que no existen grandes diferencias entre los espectros del producto

sin reducir y el reducido, salvo la aparición de un pico partido a 63,7-63,6 ppm, evidentemente correspondiente a un carbono primario, y que deriva del C-1 de la unidad terminal reductora por el tratamiento con borohidruro. La partición de dicha señal podría originarse en la presencia y ausencia de sulfato en el C-2 de la correspondiente unidad 3,6-anhidrogalactosídica. Llama la atención, sin embargo, la alta intensidad del pico considerando que en el espectro de TIm (Fig.29), prácticamente no aparece la señal correspondiente al C-1 de la 3,6-anhidrogalactosa terminal reductora. En parte, ese efecto podría originarse en el conocido crecimiento de las señales de carbonos primarios dada la disminución de su tiempo de relajación, y además a que, tal vez, las señales de los C-1 libres aparezcan con menor intensidad que el resto de las señales, por tener un mayor tiempo de relajación, tal como parece ocurrir con los carbonos anoméricos enlazados; sin embargo, el efecto observado es demasiado grande como para tener ese unico motivo. Otras pequeñas diferencias con el espectro de TIm son un corrimiento constante de 0,1 ppm y algunas alteraciones en las intensidades relativas de las señales, como por ejemplo el crecimiento de la que corresponde a G-5 (75,3 ppm) y de los picos menores a 76,6 y 73,6 ppm.

Conclusión : Al observar los picos ubicados en la zona anomérica del espectro del carragenano TIm, puede observarse que la relación de áreas de los carbonos anoméricos que presentan unión β - a los que presentan unión α - es aproximadamente 1:1, a pesar que algunas uniones α -, las 3,6-anhidrogalactosídicas se rompieron a causa de la autohidrólisis; esa relación es coherente con la postulada alternancia de uniones α -(1 \rightarrow 3) y β -(1 \rightarrow 4) entre galactosas.

Dentro de las que presentan configuración α -, habría aproxima-

damente un 25 % de 3,6-anhidrogalactosa, 18 % de su 2-sulfato y 7% de residuos de α -galactosa que actúa como kink; esos datos indicarían que TIm tiene una estructura de tipo híbrido κ -/ ι - con algunas desviaciones, en las que se presenta un 50 % de carácter κ -, 35 % de carácter ι - y 15 % de desviaciones. Esos datos son consistentes con la relación galactosa/sulfato obtenida luego de la autohidrólisis de 1:1,32, evidenciándose que se ha perdido sulfato con respecto al producto original (relación molar galactosa/sulfato de 1:1,58). Dadas las intensidades de los picos correspondientes a carbonos anoméricos podría deducirse que el sulfato perdido seguramente estaba unido a la posición 2- de la unidad de 3,6-anhidrogalactosa, por lo cual el carácter ι - del producto original era mayor.

En lo que respecta a los datos de literatura para la unidad G existe perfecta coincidencia con las señales asignadas a los carbonos 1, 5 y 6. Las que deberían corresponder a C-2 y C-3 no coinciden exactamente con los datos de literatura, (70,5 y 79,4 ppm respectivamente) pero se aproximan a las ubicadas a 70,1 y 78,9 ppm; en lo que respecta al C-4 este desplazamiento es el que sufre mayor influencia cuando la unidad 3,6-anhidrogalactosídica anterior se halla sulfatada, ya que según los datos de literatura se halla en 74,6 ppm en κ -carragenanos y en 72,6 ppm en ι -carragenanos⁸³ (recuérdese la modificación de + 0,6 ppm efectuada a los datos de literatura). Aparecen dos señales en el espectro, pero sus intensidades se encuentran invertidas respecto de lo que ocurre con los carbonos anoméricos. Esas señales se encuentran a 74,2 y 72,6 ppm.

Al ser alimentada la computadora con los picos del espectro, se observó un 87,8 % de similitud con el de la unidad XIX (A), 82,2 % con XX (AS), pero menores con los de las unidades G: 55,9 % (unidad XI) y 71,8 % (unidad XII, Tabla 71).

ESPECTRO DE LA K-CARRABIOSA

Dado que el producto TTIf, es decir el autohidrolizado hasta constancia de peso molecular, tiene que estar compuesto por una importante proporción de K-carrabiosa, es decir el disacárido que forma la unidad repetitiva del K-carragenano, cuya unidad reductora terminal es la 3,6-anhidrogalactosídica, previamente debe interpretarse el espectro de dicho disacárido. Como quedó demostrado por la filtración en geles (Fig.24), el producto TTIf presenta cantidades importantes de disacárido, aunque también se observó la presencia de otros picos, atribuibles a la existencia de productos con mayor grado de polimerización, posiblemente conteniendo "kinks" de α -galactosa que no son lábiles, o bien unidades de 3,6-anhidrogalactosa que no se han roto.

En literatura están descriptos los espectros de la K-carrabiosa y su derivado desulfatado¹⁸⁹; en realidad corresponden a los productos de la hidrólisis controlada del K-carragenano (Tabla 73).

TABLA 73. Desplazamientos químicos de ^{13}C -RMN del K-carragenano⁸³ y la K-carrabiosa¹⁸⁹.

Carbono	K- carragenano	K - carrabiosa
G-1	102,5	104,4
G-2	69,9	72,3
G-3	78,8	73,0
G-4	74,0	77,9
G-5	74,8	75,9
G-6	61,3	62,4
A-1	95,1	91,4
A-2	69,7	74,3
A-3	78,3	84,0
A-4	79,1	88,4
A-5	76,8	76,9
A-6	69,4	74,4

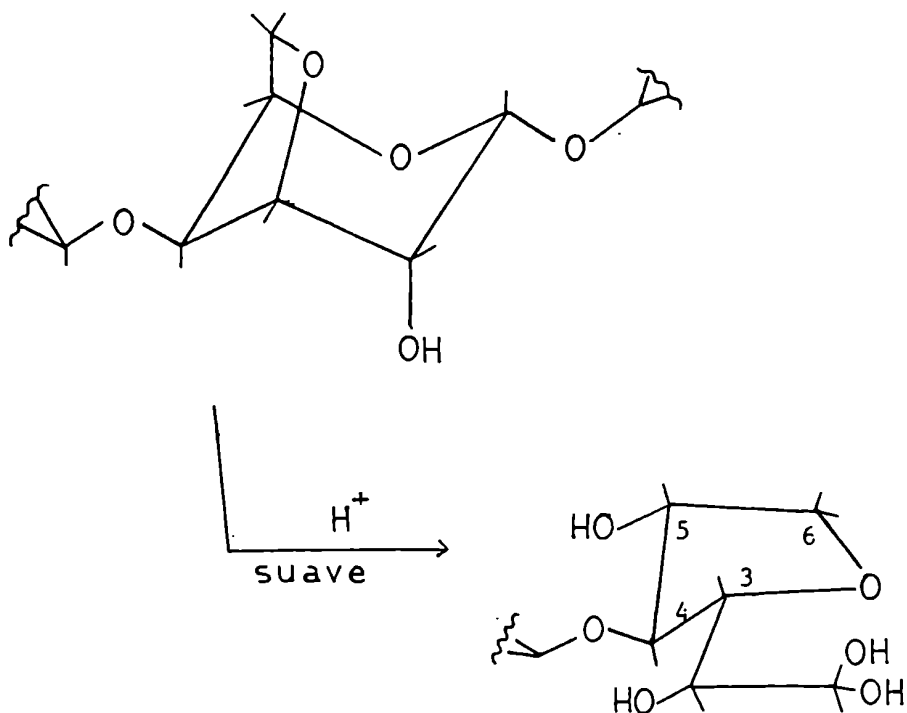
En primer lugar, el δ de G-6 indica que existe una diferencia constante de 1,1 ppm entre ambos espectros, sólo atribuible a los distintos equipos utilizados; además de esa diferencia, existen otras muy notorias, que lamentablemente no fueron analizadas por los autores del segundo trabajo¹⁸⁹ quienes sólo expresaron que "las señales tienden a resultar más separadas (en el disacárido) que en el polisacárido".

Para las señales correspondientes a la unidad G (β -galactosa 4-sulfato), las diferencias resultan muy fáciles de explicar, considerando que en el polímero, su O-3 se encuentra glicosilado, hecho que no ocurre en el disacárido, y sirve para explicar la protección en 4,7 ppm del G-3 al pasar al disacárido, y la consiguiente desprotección en 1,3 y 2,8 ppm de G-2 y G-4 por el conocido efecto β . No existe alteración de los desplazamientos de G-5 y G-6 (siempre considerando la diferencia constante de 1,1 ppm) y existe un pequeño desplazamiento (0,8 ppm a campos más bajos) del G-1, que seguramente se debe originar en los cambios conformacionales producidos en el anillo vecino de 3,6-anhidrogalactosa.

Las grandes diferencias, que merecen una explicación son, en cambio, aquellas que competen al anillo A y no han sido - hasta ahora - satisfactoriamente explicadas; sin embargo, la teoría de Beierbeck y col.²⁶² puede explicar algunas de ellas.

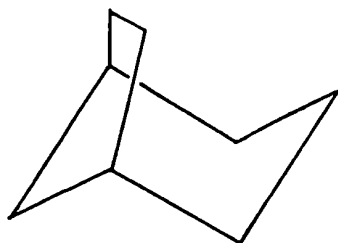
La diferencia se origina en que el anillo de 3,6-anhidrogalactosa al estar en una cadena de κ -carragenano, forma naturalmente un puente, cuyo ciclo piranósico se encuentra en conformación rígida 1C_4 ; cuando la unión 3,6-anhidrogalactosídica se rompe, se libera la tensión del puente, se abre el hemiacetal sobre O-5 y queda un anillo de cinco

miembros, con una cadena lateral sobre C-3, y la continuación de la cadena (un galactosilo en el caso del disacárido) sobre O-4:

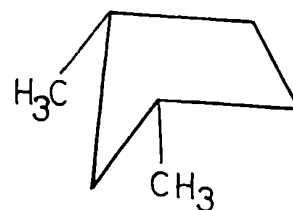


Este anillo de cinco miembros, cuando es parte del puente, se encuentra en conformación rígida 4E (es decir, un sobre en el cual el C-4 se halla por encima del plano del resto de los carbonos); en ese caso los sustituyentes sobre C-3, C-4 y C-5 se encuentran en posición axial. Al liberarse la tensión, ese anillo queda en libertad de adoptar cualquier conformación, y seguramente tomará las más estables, en las cuales los grupos sobre C-3 y C-4 queden ecuatoriales (E_4 ó 3E), isoclinales-ecuatoriales (E_0 ó 5E) o en menor grado isoclinales (E_6 ó 6E), mientras que eludirá las conformaciones que dejen esos grupos isoclinales-axiales (0E ó E_5) y más aún las axiales (4E ó E_3), ya que son menos estables²⁶³.

Debido a ese cambio conformacional se habrán de promover desplazamientos por creación de nuevas interacciones o por desaparición de las antiguas; según Beierbeck y col.²⁶², cada interacción entre hidrógenos 1,3-*sin*-diaxiales aumentará en $\sim 4,5$ ppm el desplazamiento de los carbonos a los que se unan; ese efecto es aplicable a este tipo de sistemas, y también puede explicar los desplazamientos análogos producidos entre los espectros del biciclo- [3,2,1] -octano²⁶⁴ y del *cis*-1,3-dimetilciclopentano²⁶⁵, cuya similitud geométrica (y mayor sencillez estructural) respecto de los compuestos en estudio es evidente:



Biciclo- [3,2,1] -octano

*cis*-1,3-Dimetilciclopentano

El carbono A-1 se ha desplazado a 91,4 ppm, es decir la zona donde aparecen los carbonos que forman parte de un aldehído que se ha hidratado. El A-2 se ha desprotegido en 3,5 ppm; considerando que es un carbono exocíclico, no pueden aplicarse en plenitud los efectos diaxiales, dada la libre rotación de esta cadena lateral; de cualquier modo, ha aparecido una interacción del H-2 con los hidrógenos de los oxhidrilos recientemente formados por hidratación del aldehído de C-1, y además también hay una nueva interacción con el hidrógeno de C-4, si es que el anillo se encuentra en su conformación preferencial E_4 ó 3E .

Dada la libre rotación, el efecto total es un promedio, y llega en este caso a 3,5 ppm. La señal de C-3 también se desplaza a campos más bajos, 4,6 ppm, lo cual podría tener su justificación en que, en la conformación E_4 se origina una interacción *sin*-diaxial entre los hidrógenos H-3 y H-5.

La desprotección de 8,2 ppm experimentada por el carbono 4, resulta más difícil de explicar: no pueden justificarse interacciones con el C-1 de la vecina unidad de galactosa, ya que el δ de ese carbono sólo varió en 0,8 ppm. En cambio, se han generado nuevas interacciones con el hidrógeno del oxhidrilo de C-5, y con el H-2 (ambas sólo en parte, dada la libre rotación), pero además, existe una interacción nueva con el hidrógeno de C-6, que en la conformación E_4 es axial-isoclinal, pero en la 5E , que también puede considerarse probable, es diaxial; en cualquiera de los dos casos, existiría una neta desprotección (cuando la interacción es isoclinal-axial, el efecto decrece levemente a $\sim 3,5$ ppm), que sumada a las anteriores puede justificar la diferencia. La señal de A-5 sólo cambió en 1 ppm; si bien ese carbono tiene a su hidrógeno con una nueva interacción con el H-3, existe un cambio electrónico debido al pasaje $OR \rightarrow OH$ que puede compensar en parte esa interacción. La señal de A-6 se ha desprotegido en 4 ppm, lo cual puede tener su explicación en la ya referida interacción de uno de sus hidrógenos con el H-4, o en parte con el hidrógeno del 5-OH. Todas esas consideraciones no fueron tenidas en cuenta por Miller y col.¹⁸⁹, pero pueden explicar razonablemente todos los efectos indicados.

LOS ESPECTROS DE TTIf Y TTIf-R

En la Tabla 72 y la Fig.30 se aprecian los espectros de TTIf

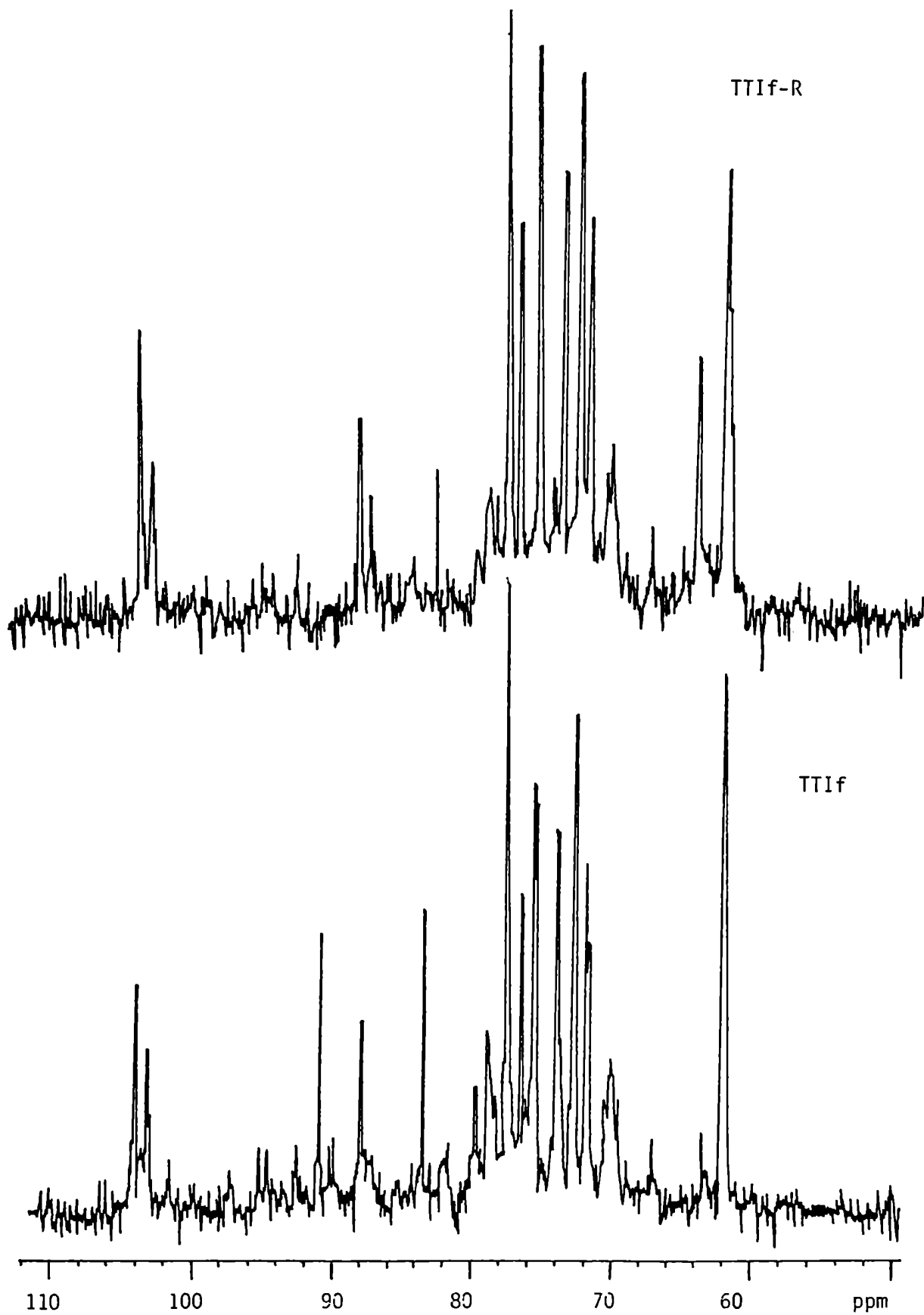


Figura 30. Espectros de RMN de ^{13}C (25,2 MHz) de los carragenanos TTIf-R y TTIf.

y TTIf-R. Teniendo en cuenta una diferencia constante de 0,5-0,6 ppm a campos más altos con respecto a los datos de Miller y col.¹⁸⁹, el espectro de TTIf tiene varios de los picos asignados a la K-carrabiosa, pese a que como sabemos, no es realmente un disacárido puro.

En la zona anomérica aparecen dos señales a 103,8 y 103,0 ppm, esta última con un hombro a 102,8 ppm. La primera corresponde a G-1 unida a una 3,6-anhidrogalactosa terminal reductora, es decir, el G-1 del disacárido. La señal a 103,0 ppm corresponde a G-1 unida a 3,6-anhidrogalactosa no reductora, de oligosacáridos mayores, mientras que el pequeño hombro a 102,8 ppm indicaría un C-1 de una unidad enlazada a 3,6-anhidrogalactosa 2-sulfato. La intensidad relativa de las señales a 103,8 y 103,0 ppm es similar a la observada entre el pico principal y el menor en la filtración en geles de Sephadex de este producto (Fig.24). La otra señal importante, a 90,7 ppm corresponde a la forma hidrato del carbono aldehídico A-1. Existen otros picos menores; uno ubicado a 101,3 ppm que podría corresponder a β -galactosas sulfatadas en C-2, mientras que otros responderían a residuos enlazados por unión α -: los de 97,0 y 94,4 ppm representarían galactosa sin y con sulfato en C-2 que actuarían como "kink", mientras que las que corresponden a 95,1 y 92,3 ppm pueden atribuirse a 3,6-anhidrogalactosas (sin y con sulfato en C-2) que no han sido hidrolizadas. Todas estas señales comprenden azúcares incluidos en unidades más grandes que las disacarídicas.

En la zona de C-2 \rightarrow C-6, aparecen varios picos que se corresponden con los datos de Miller y col.¹⁸⁹ las señales a 87,8 (A-4), 83,2 (A-3), 77,2(G-4), 76,2(A-5), 75,3(G-5), 73,7(A-6), 73,6(A-2), 72,5(G-3), 71,6(G-2), y 61,8(G-6), es decir que completan todas las señales correspondientes al espectro de la K-carrabiosa.

Las señales correspondientes a otras unidades son mucho menores en intensidad, debido posiblemente a la dispersión y variedad de las mismas; se observa a 89,7 ppm un pequeño pico que podría corresponder a AS-1, es decir al C-1 de la α -carrabiosa, que difiere de la α - por presentar sulfato en la posición 2- de la unidad de 3,6-anhidrogalactosa; también a 81,5 ppm aparece una señal atribuible a AS-3 y a 79,5 ppm a AS-2. Dada la baja intensidad de estas señales, y considerando que el producto TTim poseía un 35 % de carácter α - (página 221), los datos sugerirían que en la última parte de la reacción se ha producido pérdida parcial del 2-sulfato de la 3,6-anhidrogalactosa.

También aparecen otros picos (Tabla 72) que pueden asimilarse a carbonos pertenecientes a unidades mayores que el disacárido; entre ellos pueden mencionarse los ubicados a 78,7 ppm (C-4 de α -galactosas), 70,0 ppm (que puede incluir los C-2, C-3 y C-5 de α -galactosas), 67,0 ppm (C-6 de β -galactosa 6-sulfato, ya analizada en el espectro de TTim) y 63,3 ppm (que a falta de otra explicación, podría provenir del C-6 de α -galactosas ó del C-5 de α -xilosas). Si bien la intensidad de las mismas representa un pequeño porcentaje del total, la del C-1 (103,0 ppm) de β -galactosas unidas a ellas es mucho más importante.

El espectro del correspondiente producto de reducción TTim-R muestra muy pocas diferencias, salvo un corrimiento constante de 0,1-0,2 ppm y un incremento de la relación de intensidades G-1(disacárido)/G-1 (oligosacárido) que no tiene explicación. La diferencia más importante está dada por la desaparición de la señal a 90,7 ppm de A-1, la cual por reducción pasó a ser un carbono primario, a 63,9 ppm. La pequeña señal a 89,7 ppm (AS-1) también desapareció, y alguno de los hombros de ese pico podría representar a su producto de reducción. Las señales

correspondientes a la 3,6-anhidrogalactosa se han reducido en intensidad y además se han desplazado; ya que los cambios producidos por la reducción sobre A-4 y A-5 deben ser chicos, asignamos las señales a 76,7 y 88,3 ppm a esos carbonos. Sería lógico suponer que el carbono A-2 se ha protegido por la desaparición de uno de los oxhidrilos del hidrato de aldehído, por lo que el hombro a 71,4 ppm podría asignarse a ese carbono. Para el A-3, en cambio, aparece un nuevo hidrógeno por reducción del C-1, y es de esperar que se produzca un desplazamiento inverso que puede justificar la señal a 87,5 ppm. Con esas consideraciones, no pueden justificarse la señal a 82,6 ppm ni la evidente disminución de intensidad de los carbonos del anhidroazúcar.

ESPECTRO DEL CARRAGENANO TOTAL AUTOHIDROLIZADO

El espectro del carragenano total de *Iridaea undulosa* muestra, como es de esperar, gran dispersión de señales (Figura 31) debido a la presencia de unidades muy diversas, y entre las que únicamente se puede visualizar a las más importantes. Como señal anomérica sólo puede apreciarse con seguridad la correspondiente al C-1 de β -galactosa no sulfatadas en la posición 2-, ubicadas entre α -galactosas, y que caracterizan a carragenanos de la familia μ -/ ν -, que como sabemos^{126, 127} constituyen una porción importante del carragenano total. El resto de las unidades aparece como señales anchas y pequeñas, indicando la diversidad de las mismas.

El resto de las señales del espectro (salvo la que corresponde al carbono primario, a 61,9 ppm) son anchas, con hombros, lo que indica la variedad de carbonos presentes.

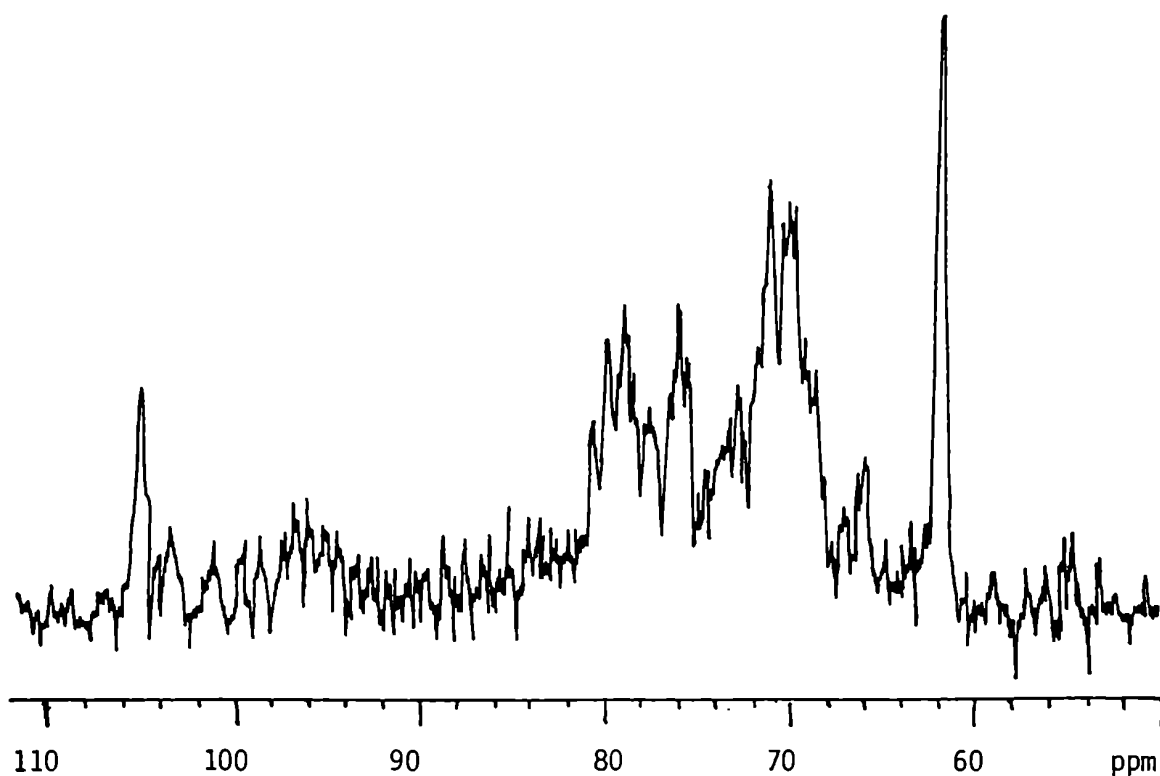


Figura 31. Espectro de RMN de ^{13}C (a 25,2 MHz) del carragenano total autohidrolizado.

Las asignaciones tentativas efectuadas son:

79,7-79,6 ppm: carbonos enlazados por unión glicosídica (C-3 de galactosas unidas por la posición 3- ó C-4 de galactosas unidas por la posición 4-) ó C-2 de β -galactosa 2-sulfato.

78,7 ppm: igual asignación que la señal anterior, o también C-3 de 3,6-anhidrogalactosa.

77,3 ppm: C-5 de 3,6-anhidrogalactosa y/o C-3 de β -galactosa 4-sulfato y/o C-2 de α -galactosa 2-sulfato.

Señal centrada a 75,7 ppm: C-5 de β -galactosas (con o sin sulfato).

Señal centrada a 72,7 ppm: C-4 de β -galactosa 4-sulfato.

- Señal centrada a 70,8 ppm: C-2 de β -galactosas no sulfatadas en C-2.
- 70,0 ppm: igual asignación que la señal anterior, y/o C-3 de α -galactosas y/o C-6 de 3,6-anhidrogalactosa.
- 69,6 ppm: C-6 de α -galactosa 6-sulfato, y/o C-2, C-3 y C-5 de α -galactosas.
- 68,5 ppm: igual asignación que la señal anterior.
- 61,9 ppm: la más alta del espectro, indica C-6 de cualquier unidad de galactosa; es la señal menos alterada por los factores conformacionales que afectan la molécula.

Se evidencia amplia variedad de carbonos, pero el espectro está representado fundamentalmente por los que integran unidades de tipo μ -, y algo menores de tipo λ -. Ello es lógico, considerando que al haber sufrido diálisis, esta muestra está exenta de la porción del polisacárido autohidrolizado que era rica en 3,6-anhidrogalactosa (fracción K-/ L-) y que comprende la fracción insoluble en KCl 0,70-1,05M (Tabla 1).

ESPECTRO DEL CARRAGENANO "SOLUBLE" C AUTOHIDROLIZADO

Pese a que se mantiene la variedad de señales, en este espectro se observan líneas mucho más claras (Figura 32). En la Tabla 74 se indican los picos principales del mismo.

En la región anomérica se pueden distinguir con facilidad siete señales diferentes, entre las que se destaca la ubicada en 105,1

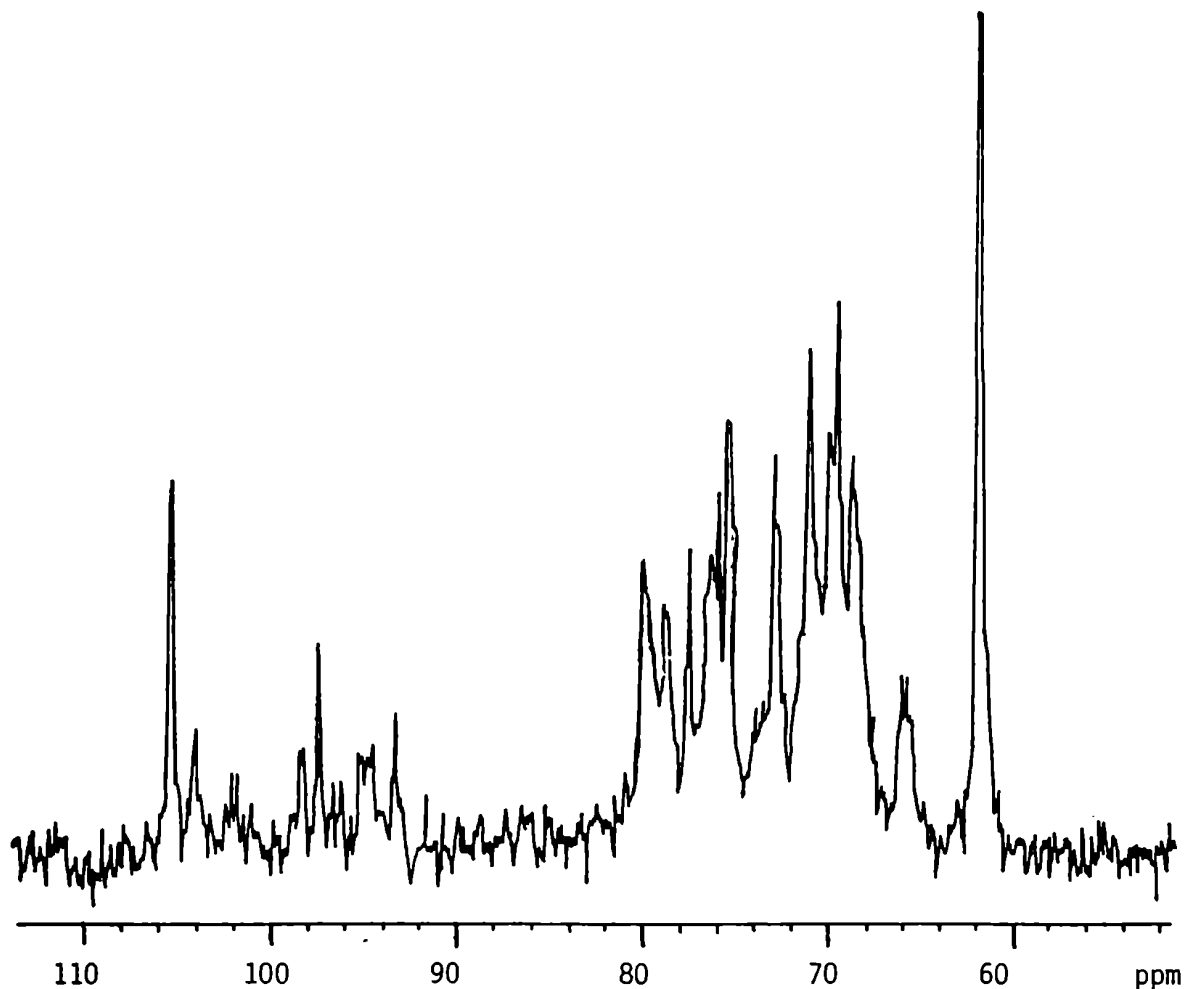


Figura 32. Espectro de RMN de ^{13}C (a 25,2 MHz) del carragenano C autohidrolizado.

ppm, que corresponde al C-1 de una β -galactosa sin sulfato o sulfatada en C-4 ó C-6, unida a α -galactosa, y que según la composición calculada (Tabla 60) no comprendía más del 40 % del carragenano. La señal más pequeña, a 103,8 ppm podría ser la equivalente, pero ubicada entre 3,6-anhidrogalactosas o bien la sulfatada en C-2, unida a α -galactosas. La baja intensidad de la misma, comparada con el resultado obtenido por metilación podría indicar parcial desulfatación de las unidades de β -galactosa 2-sulfato. Las señales pequeñas, a 98,3-98,1 ppm tendrían

TABLA 74. Desplazamientos químicos de los picos principales del espectro de RMN de ^{13}C del carragenano C autohidrolizado^a.

105,1 (m)	79,8 (m) h	70,9 (f) h
103,8 (md)	78,6-78,5 (m)	69,9 (f)
98,3 (md)	77,4 (m)	69,4 (f) h
98,1 (md)	76,3-76,1 (m)	68,5 (f) h
97,3 (d)	75,8 (m)	65,9 (d)
95,1-94,3 (md)	75,3 (f) h	65,8 (d)
93,1 (md)	72,8 (f) h	61,9 (f)

^aAbreviaturas: f=fuerte; m=medio ; d=débil ; md=muy débil ; h= presenta hombro/s
que originarse en carbonos anoméricos enlazados por unión α -; dada su baja intensidad podrían ser α -galactopiranosidos enlazados a la posición 2- de la unidad vecina o bien α -xilopiranosidos (ver página 116). La otra señal, a 97,3 ppm y la zona posterior a 95,1-94,3 ppm representan diferentes unidades de α -galactosa. Si bien en el estudio de metilación sólo se observó un 11 % de estas unidades, al ser esta fracción más rica en unidades enmascarantes y menos rica en 3,6-anhidrogalactosa que la utilizada en el estudio de metilación (Tabla 20, página 104), ese porcentaje podría crecer hasta ~ 20 %. Es posible suponer que la señal fina a 97,3 ppm corresponde a unidades que no portan sulfato en C-2, mientras que la zona amplia a $\sim 94,9$ ppm sí lo contiene, fundamentalmente en forma del 2,6-disulfato (unidad enmascarante). Esta última región ancha podría contener también al carbono anomérico de 3,6-anhidrogalactosa y la señal a 93,1 ppm su 2-sulfato, ambas enlazadas por unión glicosídica (esta última señal se discutirá luego).

El resto de las asignaciones podrían ser:

79,8 ppm: C-4 de α -galactosas y/o C-4 de 3,6-anhidrogalactosas y/o C-3 de β -galactosas no sulfatadas en C-4 y/o C-2 de β -galactosa

2-sulfato.

- 78,6-78,5 ppm: igual asignación que la señal anterior, más C-3 de β -galactosa 4-sulfato y C-3 de 3,6-anhidrogalactosa o su 2-sulfato.
- 77,4 ppm: C-5 de 3,6-anhidrogalactosa y/o posiblemente C-3 de β -galactosa 4-sulfato de μ -/ ν - carragenanos.
- 76,3 a 75,3 ppm: C-5 de todas las β -galactosas presentes, pero pueden incluirse en las señales a campos más bajos los C-2 de 3,6-anhidrogalactosa 2-sulfato.
- 72,8 ppm: C-4 de β -galactosa 4-sulfato, en particular si la unidad precedente posee un 2-sulfato.
- 70,9 ppm: C-2 de β -galactosas no sulfatadas en C-2 y/o C-5 de α -galactosas no sulfatadas en C-6. Los hombros que posee esta señal podrían indicar el C-2 de diferentes unidades de 3,6-anhidrogalactosa.
- 69,9 y 69,4 ppm: C-2, C-5 y C-6 de α -galactosa 6-sulfato y/o C-3 de α -galactosa 2-sulfato. El pico a 69,9 ppm o alguno de sus hombros comprenden al C-6 de 3,6-anhidrogalactosa.
- 68,5 ppm: C-3 de α -galactosa 2-sulfato y/o C-5 ó C-6 del 6-sulfato, y/o C-6 de β -galactosa 6-sulfato.
- 65,9-65,8 ppm: puede corresponder a C-4 de β -galactosas no sulfatadas en C-4 ; si bien se podría sumar el C-5 de unidades de β -D-xilopiranosido que integran cadenas laterales, estas últimas deberían aparecer a δ mayores.
- 61,9 ppm: todos los C-6 libres.

Las conclusiones que pueden obtenerse son similares a las brindadas por los métodos químicos; se observa el predominio de los carragenanos

de tipo μ - por sobre los de tipo λ -; los resultados obtenidos podrían sugerir la pérdida de 2-sulfato de las unidades de β -galactosa que caracterizan a los λ -carragenanos, ya que además del ya mencionado decremento de la intensidad del C-1 correspondiente, no se observan señales de importancia que puedan caracterizar a ese 2-sulfato. Para la computadora, los datos más afinados se obtienen con unidades de β -galactosa 4-sulfato entre α -galactosas (μ -/ ν - carragenano) y α -galactosa 6-sulfato (μ -carragenano), mientras que también son importantes la α -galactosa 2,6-disulfato (ν - y λ -carragenanos), α -galactosa 2-sulfato (ξ - carragenano) y entre las 3,6-anhidrogalactosas, la que posee sulfato en el C-2 (ι -carragenano).

ESPECTRO DEL CARRAGENANO SD AUTOHIDROLIZADO

Pese a la amplia similitud del espectro de este producto (Fig. 33) con el del producto total C, del que es parte fundamental (Fig.32), las líneas son mucho más claras y finas denotando la parcial "purificación" de aquel producto. Los desplazamientos principales aparecen en la Tabla 75.

TABLA 75. Desplazamientos químicos de los picos principales del espectro de RMN de ^{13}C del carragenano SD autohidrolizado^a.

105,2 (f)	77,4 (f)	70,8 (f) h
103,9 (md)	76,3-76,2 (m)	69,8 (f)
98,1 (d) h	75,8 (m)	69,4 (f) h
97,2 (m)	75,3 (f) h	68,3 (m) h
93,1 (d)	74,0-73,8(d)	65,9 (d) h
79,7 (m) h	72,7 (f) h	61,9 (f)
78,6-78,5 (m)	71,4 (m)	

^aAbreviaturas: f=fuerte; m=medio; d=débil; md=muy débil; h=presenta hombro/s

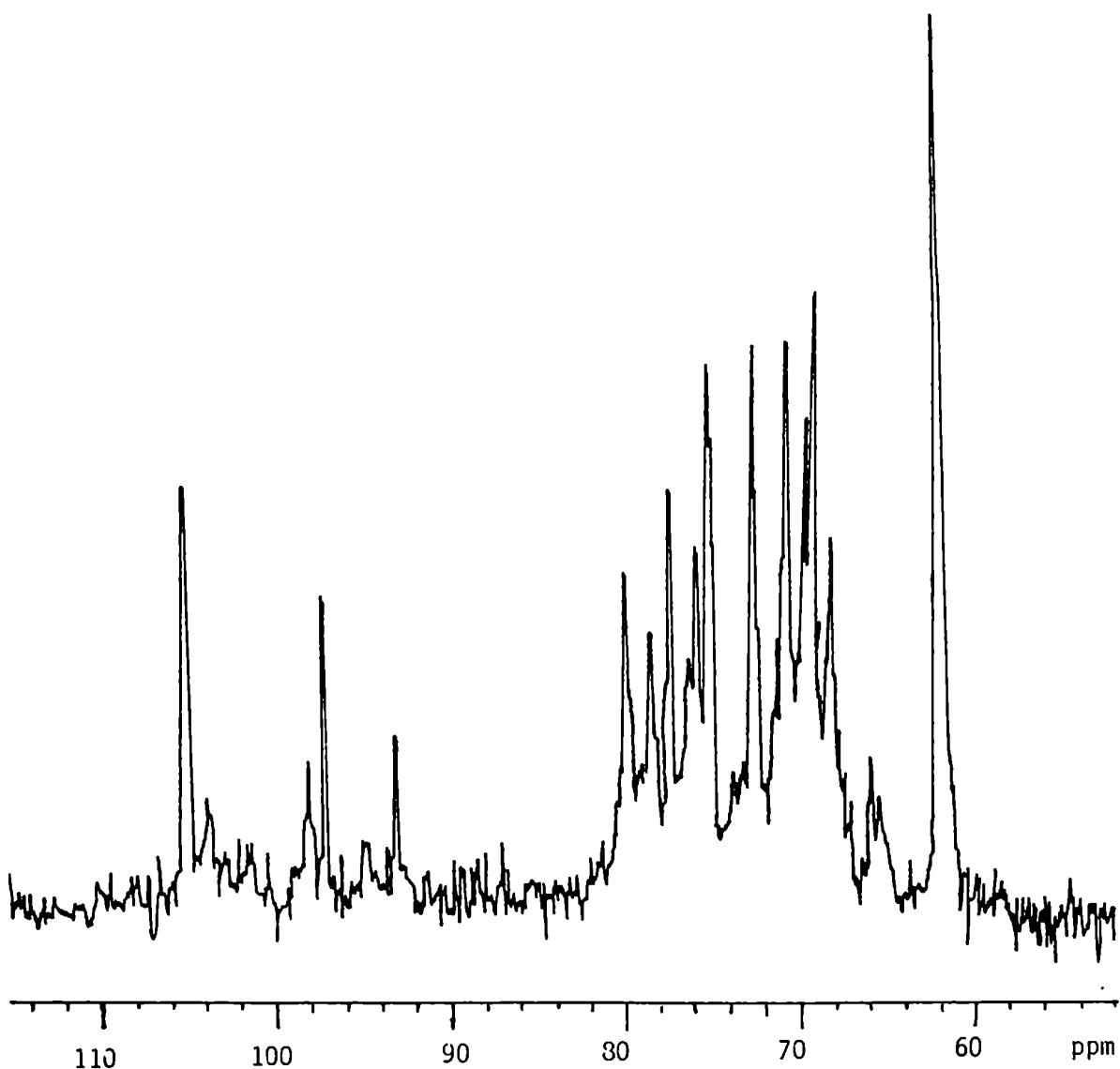


Figura 33. Espectro de RMN de ^{13}C (a 25,2 MHz) del carragenano SD auto-hidrolizado

Puede apreciarse que la Tabla 75 es muy similar a la Tabla 74, pese a que los espectros (Fig.33 y 32) no son tan similares. Dadas las asignaciones anteriormente efectuadas, es innecesario repetirlas, y resulta más interesante comparar este espectro con el anterior y con los

correspondientes datos químicos, ya que, de acuerdo a lo que sabemos, la fracción SD está (con respecto a la C) enriquecida en carragenanos de tipo μ -, y empobrecida en los de tipo λ -.

La región anomérica es la de más fácil interpretación; con respecto al espectro del carragenano C, ha crecido notoriamente la relación de intensidades entre las señales a 105,2 y 103,9 ppm, indicando un enriquecimiento en unidades de β -galactosa que no poseen sulfato en C-2, unidas a α -galactosa; si bien estos resultados concuerdan con los datos químicos, deben analizarse con cuidado ya que dado el mayor tiempo de autohidrólisis de esta fracción (Tablas 67 y 68), podría haberse incrementado la desaparición del 2-sulfato. Por otra parte, las señales correspondientes a las α -galactosas han crecido notablemente, tal como ocurría con los resultados obtenidos mediante métodos químicos (Tabla 60); entre ellas se destaca como línea fina la señal a 97,2 ppm que caracterizaría a los residuos no sulfatados en C-2; seguramente se ha producido una notoria pérdida del 2-sulfato de esas unidades, ya que el producto preponderante del tratamiento alcalino del carragenano SD (SD-TI) presentaba características de λ -carragenano (pag.161) por los que sus unidades precursoras debían estar disulfatadas en C-2 y C-6. Se observa también el doble pico a $\sim 98,1$ ppm, ya analizado, y resulta muy pequeña la señal a 95,0 ppm que indicaría α -galactosas sulfatadas en la posición 2-; todos estos datos son consistentes con una desulfatación de los C-2 prácticamente total. En cambio, llama la atención el pico a 93,1 ppm, de más difícil asignación (luego será discutido); la señal tabulada más cercana es la que indica 3,6-anhidrogalactosa 2-sulfato enlazada por unión glicosídica, a 92,7 ppm; sería curioso que esa unión no se haya roto cuando los datos de autohidrólisis indican una vida media similar para la ruptura

de uniones totales y para la de uniones 3,6-anhidrogalactosídicas, y este producto llegó a peso molecular constante. El resto de las señales del espectro es muy similar a las ya observadas para el producto C, con pequeñas diferencias de intensidad.

CONCLUSIONES

Los trabajos realizados han demostrado que la espectroscopía de RMN de ^{13}C permite determinar estructuras híbridas que de otro modo se harían muy dificultosas; por ejemplo, obsérvese las netas diferencias que existen en las regiones anoméricas de los productos que precipitan en soluciones de cloruro de potasio y aquellos que no lo hacen. La región de los C-2—C-6 es de interpretación más compleja, y los resultados sólo tienen utilidad para descartar la presencia de algunas unidades, o para sugerir la presencia de otras cuyo desplazamiento se distingue claramente del de las demás señales.

En la región anomérica habíamos distinguido diversas señales, cuya asignación, de acuerdo a los datos de literatura y calculados, podría ser:

- a) 105,2-105,1 ppm: β -galactosa sin sulfato en C-2, unida a α -galactosa.
- b) 104,0-103,8 ppm: β -galactosa sulfatada en C-2, unida a α -galactosa, o β -galactosa 4-sulfato unida a 3,6-anhidrogalactosa terminal.
- c) 103,1-103,0 ppm: β -galactosa 4-sulfato unida a 3,6-anhidrogalactosa enlazada.
- d) 103,0-102,8 ppm: β -galactosa 4-sulfato unida a 3,6-anhidrogalactosa 2-sulfato enlazada.
- e) 98,3-98,1 ppm: posible α -xilopiranosido o α -galactosa unida por enlace

atípico.

- f) 97,3-97,1 ppm: α -galactosa no sulfatada en C-2, unida a β -galactosa.
- g) 95,2-95,1 ppm: 3,6-anhidrogactosa unida a β -galactosa 4-sulfato.
- h) 94,9-94,3 ppm: α -galactosa sulfatada en C-2 unida a β -galactosa.
- i) 93,1 ppm: ver discusión más adelante.
- j) 92,7-92,5 ppm: 3,6-anhidrogactosa 2-sulfato unida a β -galactosa 4-sulfato.

Debe tenerse en cuenta que para todas estas asignaciones se han tomado como base los datos de los trabajos publicados por el grupo de Usov⁸³; sin embargo, quedan algunas incógnitas planteadas, muy difíciles de evaluar debido a la dificultosa correlación con los datos químicos por la pérdida de los 2-sulfato, que como ya es conocido¹³³ es el más ácido-lábil de todos los sulfatos.

No existen dificultades para la asignación de las señales a), b), c), d), g) y j). Las señales de las α -galactosas f) y h) se basan en los datos de Usov⁸³ para el λ -carragenano desulfatado, en el que la correspondiente señal (Tabla 71) aparece a 96,8 ppm, al igual que en los oligosacáridos obtenidos por acetólisis del polímero de *Grateloupia divaricata* y el mismo desulfatado⁸³. La región anomérica del espectro de este último producto pero con los sulfatos es más compleja y no fue analizada en detalle⁸³, pero como es lógico la señal se desplaza a campos más altos a causa de la sulfatación del C-2; otra señal que aparece a 98,5 ppm ha sido atribuida a una porción agaroides (con unidades L-) de la molécula.

Sin embargo, en otros trabajos publicados recientemente por otros grupos^{190,266} se describieron los espectros de productos de tipo

μ - / ν - antes y después del tratamiento alcalino; en base a unos pequeños picos que desaparecen por ese tratamiento, y que han sido atribuidos a unidades enmascarantes, se asignó la resonancia del C-1 de β -galactosa 4-sulfato unida a "kinks" a 105,4 ppm (considerando el corrimiento constante)^{190,266} y las de los C-1 de α -galactosa 6-sulfato a \sim 98,5 ppm¹⁹⁰ y de α -galactosa 2,6-disulfato a 98,9 ppm²⁶⁶ - 99,1 ppm¹⁹⁰; el resto de los carbonos anoméricos coincidían con nuestros datos. La asignación de 105,4 ppm también concuerda con la nuestra; en cambio, las de las señales de galactosas unidas en configuración α -son muy distintas y alterarían notoriamente las asignaciones antes efectuadas.

Pese a que estos datos se encontrarían avalados por los resultados experimentales de esos autores, resulta sorprendente que el desplazamiento químico de una galactosa sulfatada en C-2 sea mayor que el correspondiente a la misma sin ese sulfato; dicha diferencia no fue justificada¹⁹⁰ y además, la gran diferencia (\sim 2 ppm) con los datos de Usov⁸³ no puede atribuirse a la introducción del 4-sulfato en la unidad de β -galactosa vecina, cuya influencia difícilmente supere las 0,5 ppm. Por otra parte, nuestros datos, en los cuales el principal C-1 de α -galactosa aparece a 97,2 ppm, resultarían un aval a nuestras asignaciones, efectuadas en la Tabla 70 en base a los datos de Usov⁸³. Es de remarcar que esa señal aparece aún en el producto tratado TTI, caracterizando seguramente a una α -galactosa que actúa como kink. Resulta sorprendente la contraposición de asignaciones; esperemos que futuros trabajos con compuestos modelo puedan resolver las ambigüedades. Obsérvese que si se tomaran como base los datos de Bellion *et al.*^{190,266} la señal e) debería atribuirse a α -galactosas "clásicas" y se haría de

difícil asignación la unidad f).

Otro detalle curioso de los espectros es la señal a 93,1 ppm (i) que aparece en los de los productos C y SD autohidrolizados, pero no en los de los productos TTI. La asignación de 3,6-anhidrogalactosa 2-sulfato para la misma no estaría avalada por los datos de autohidrólisis ya que esas uniones deberían haberse roto, salvo que se suponga que el 2-sulfato dificulta la autohidrólisis del producto y que la coincidencia observada en las vidas medias determinadas por los dos métodos es meramente casual. Además ya se había observado (Tabla 72) que esa señal aparecía a 92,5 ppm, por lo que la señal i) debería indicar otro tipo de unidad, que entre otras podría ser:

- 1) α -galactosa no enlazada glicosídicamente, lo cual, si bien podría estar avalado por el hecho que estos productos lleguen a un peso molecular menor que el teórico, se contradice con los datos de autohidrólisis; por otra parte, la aparición de estas señales implicaría la existencia de otras equivalentes que corresponden a β -galactosa por mutarrotación.
- 2) α -galactosa sulfatada en C-2 y enlazada glicosídicamente; si bien por los datos de la Tabla 70 estas señales deberían aparecer 2 ppm a campos más bajos, podría suponerse que la presencia del 2-sulfato causa, además de la pérdida de una interacción diaxial con el hidrógeno de C-1, una distorsión de la unión que disminuiría la interacción con el hidrógeno del C-3 de la unidad vecina, ocasionando un desplazamiento adicional; obsérvese que en la 3,6-anhidrogalactosa existe un desplazamiento de ese tipo: al sulfatarse el C-2, se desplaza en 2,5 ppm aunque según algunos autores²⁶⁶ supera las 3 ppm a campos más bajos; ese efecto es mayor que el producido en la α -galactosa libre¹⁶⁹ utilizada como base para el cálculo, y podría indicar que realmente la asignación de 95,0 ppm para

el carbono anomérico de esas unidades está sobre-estimada.

Se puede concluir que la aplicación de la espectroscopía de resonancia magnética nuclear de ^{13}C a estos carragenanos solubles recién está en su primer etapa, por lo que subsisten algunas dudas; en el futuro se intentará profundizar a fin de aprovechar todas las posibilidades y ventajas del método.

SEPARACION E IDENTIFICACION DE LOS O-ACETIL-O-METILGALACTONONITRILOS

POR CROMATOGRAFIA GAS-LIQUIDO Y ESPECTROMETRIA DE MASA

Tal cual se ha esbozado en el capítulo VI, los alditoles acetilados parcialmente metilados han sido y son utilizados exitosamente en cromatografía gas-líquido-espectrometría de masa para la elucidación estructural de oligosacáridos y polisacáridos por per-metilación y posterior hidrólisis²⁰¹⁻²⁰⁵.

Si bien los derivados son de fácil preparación y los cromatogramas producidos son sencillos, el método está limitado por la simetría de algunos alditoles que hacen que, por ejemplo, la 3-0-metil- y la 4-0-metilgalactosa den por reducción el mismo alditol, lo que requeriría del uso de borodeuteriuro de sodio para la reducción de las aldosas a fin de diferenciarlas.

Los O-acetil-O-metilaldononitrilos son aún de más fácil preparación, dan cromatogramas simples y retienen además la disimetría²⁰⁸ del C-1.

Si bien se habían publicado algunos trabajos sobre separación por cromatografía gas-líquido e identificación por espectrometría de masa de los aldononitrilos acetilados derivados de los di-, tri- y tetrametil éteres de D-glucosa^{212,213}, D-manosa^{218,219}, D-xilosa^{208,216}, L-arabinosa²¹⁶ y 6-desoxiazúcares²¹⁷, no había información completa²¹² sobre la fragmentación de los monometiléteres de ninguna hexosa ni dato alguno de los metiléteres de la D-galactosa, pese a que este azúcar es un constituyente fundamental de numerosos polisacáridos

naturales, al igual que sus derivados monometilados, habitualmente presentes en cantidades importantes en diversos galactanos producidos por las algas.

Es por ello que decidimos abocarnos a ese trabajo de separación e identificación de los metiléteres del D-galactononitrilo aprovechando las grandes cantidades de material proveniente de la metilación en etapas de la fracción soluble en cloruro de potasio 2M del carragenano de *Iridaea undulosa*, complementando las separaciones en diferentes columnas (ver página 104 y subsiguientes), con la identificación por espectrometría de masa y la confirmación con derivados patrón sintetizados a partir de los azúcares libres (cedidos por los Dres. E. G.Gros y E.E.Percival), los que fueron co-cromatografiadas y sometidos a fragmentación por impacto electrónico.

El uso de estos derivados, que permite diferenciar la 3-0-metilgalactosa de la 4-0-metilgalactosa dado que se retiene la disimetría del C-1 fue iniciado por Matulewicz y Cerezo¹²⁷, quienes analizaron la presencia de dichos azúcares monometilados en los hidrolizados de las fracciones intermedias, insolubles en KCl 0,70-1,05M y 1,55-1,65M, y registraron los correspondientes espectros de masa de los aldononitri-
los acetilados derivados de esos azúcares monometilados (comunicación personal).

En la Tabla 76 se pueden apreciar los tiempos de retención relativos de los diferentes 0-acetil-0-metil-D-galactononitri-
los en los cuatro sistemas cromatográficos utilizados. Las características de los mismos pueden apreciarse en la Parte Experimental (Cap.VIII), correspondiendo el sistema A a una columna de ECNSS-M al 3%, el B a una columna formada por una mezcla de fases propuesta por Albersheim²⁰⁰

y las C y D a dos condiciones diferentes en la columna de OV-225 al 3%.

TABLA 76. Tiempos de retención de los 0-acetil-0-metilgalactononitrilos.

0-metilo en	0-acetilo en	TIEMPOS DE RETENCION ^{a,b}			
		SISTEMA			
		A	B	C	D
2,3,4,6	5	0,11	0,11	0,31	0,27
2,4,6	3,5	0,14	0,13	0,44	0,37
2,3,6	4,5	0,16	0,15	0,45	0,40
2,3,4	5,6	0,19			
3,4,6	2,5	0,20	0,20	0,47	0,44
2,6	3,4,5	0,25	0,25 ^c	0,51	0,48
4,6	2,3,5	0,27	0,28 ^c	0,51	0,50
2,4	3,5,6	0,38		0,58	0,52
3,4	2,5,6	0,38			
6 ^d	2,3,4,5	0,38	0,38	0,57	0,57
2	3,4,5,6	0,56	0,55	0,61	0,63
3	2,4,5,6	0,70	0,68	0,64	0,67
4	2,3,5,6	0,77	0,76	0,64	0,67
-	2,3,4,5,6	0,90	0,90	0,69	0,73

^aRelativo a ($t_{2,3,4,6\text{-tetra-0-MeGal}} + t_{\text{Gal}}$); ^bPromedio de cinco determinaciones, como mínimo. ^c Generalmente se obtiene unicamente un pico con un hombro. ^d Los derivados de la 2,3- y 3,6-di-0-metilgalactosa en una mezcla de aldononitrilos de galactosas parcialmente metiladas provenientes de la hidrólisis de un carragenano metilado estaban incluidos en este pico.

Los tiempos de retención informados, como se aprecia, se han referido a dos patrones, el de menor y mayor tiempo de retención, ya que como sugirió Lindberg²⁰¹, de ese modo se reduce notablemente la diferencia debida al envejecimiento de las columnas, que de acuerdo a nuestros experimentos hace disminuir notoriamente el tiempo de retención relativo a un único patrón, en especial para muestras alejadas del mismo.

La Figura 34 muestra un cromatograma típico, con la separación de una mezcla de 0-acetil-0-metilgalactononitrilos obtenida en la hidrólisis del carragenano soluble.

De los datos de la Tabla 76 puede desprenderse que las columnas A y B dan resultados casi idénticos, aunque en la segunda columna no se distinguen generalmente los derivados de 2,6- y 4,6-di-0-metilgalactosa. De los dos programas de la columna de OV-225, el segundo (D) es claramente más eficiente, pero aún en ese caso no pueden diferenciarse los derivados de la 3- y 4-0-metilgalactosas. En conclusión, las mejores separaciones y los cromatogramas más claros se obtuvieron por el uso de la columna de ECNSS-M 3%, lo cual está de acuerdo con los resultados obtenidos con los 0-acetil-0-metilmanononitrilos²¹⁹.

Las grandes ventajas del uso de los nitrilos en reemplazo de, o complementando a los alditoles está en que compuestos como la 2,6- y la 4,6-di-0-metilgalactosa; 3-, 4-0-metilgalactosa y galactosa o los trimetilados entre sí pueden ser diferenciados, lo cual en general no ocurre con los alditoles. El principal inconveniente estaría fundamentalmente en la zona de los dimetilados, donde las 2,3-, 2,4-, 3,4- y 3,6-di-0-metilgalactosas no se resuelven y se superponen con el derivado de la 6-0-metilgalactosa.

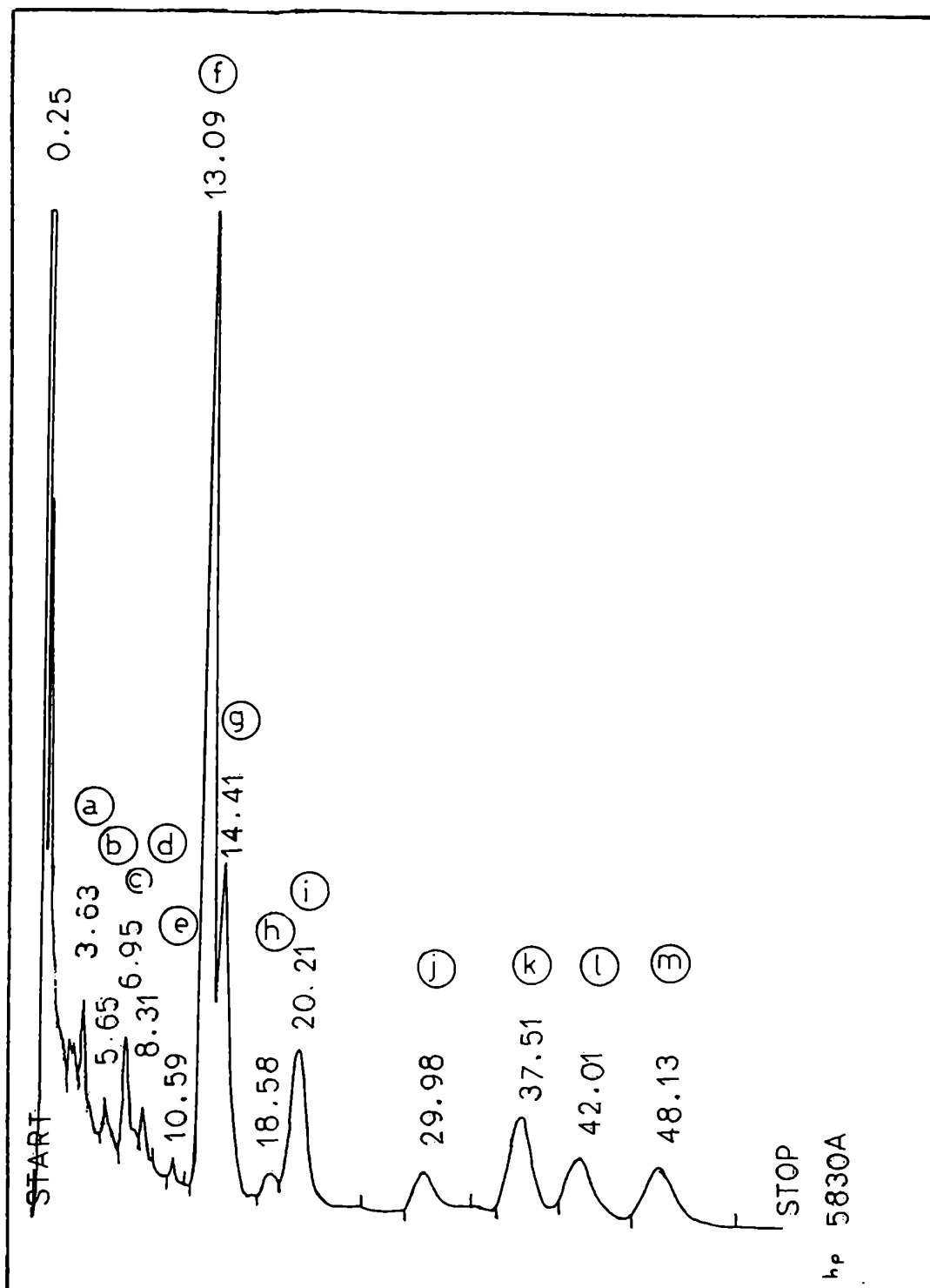


Figura 34. Análisis por c.g.l. de una mezcla de 0-metil-D-galactononitri-
 los acetilados derivados de galactosas parcialmente metiladas
 por hidrólisis del carragenano soluble (sistema A). Derivan de:
 a) 2,3,4-tri-0-metilxilosa; b) 2,3,4,6-tetra-0-metil; c) 2,4,6-
 tri-0-metil; d) 2,3,6-tri-0-metil; e) 3,4,6-tri-0-metil; f)
 2,6-di-0-metil; g) 4,6-di-0-metil; h) 2,3 y 2,4-di-0-metil; i)
 6-0-metil; j) 2-0-metil; k) 3-0-metil; l) 4-0-metilgalactosa y
 m) galactosa sin metilar.

Sin embargo, es de hacer notar que cuando estas mismas muestras y otras fueron cromatografiadas en una columna de ECNSS-M al 3% recién rellenada, los valores de los tiempos de retención se alteraron muy levemente, pero logró resolverse la zona de los dimetilados en dos picos, respecto de la 6-0-metil-, ya que el derivado de 2,3-di-0-metilgalactosa queda en un pico aparte, seguramente junto al 2,4-dimetilado, y la 3,6-di-0-metilgalactosa se uniría a la 4,6-dimetilada. Los nuevos valores de tiempo de retención se aprecian en la Tabla 77.

TABLA 77. Tiempos de retención de los 0-acetil-0-metilgalactononitrosos; columna A recién rellenada.^a

Metilado en: ^b	$t_{6-0-MeGal}$	σ^c	$t_{tetra+Gal}$	σ^c
2,3,4,6	0,279	0,002	0,105	0,001
2,4,6	0,345	0,003	0,130	0,001
2,3,6	0,408	0,004	0,153	0,002
3,4,6	0,522	0,006	0,196	0,002
2,6	0,646	0,009	0,242	0,003
4,6	0,714	0,007	0,268	0,002
2,3	0,904	0,007	0,340	0,004
6	1		0,377	0,002
2	1,476	0,006	0,556	0,004
3	1,852	0,009	0,697	0,006
4	2,073	0,009	0,780	0,006
-	2,377	0,014	0,895	0,001

^aPromedio de 5 a 15 determinaciones. ^bAcetilado en el resto de posiciones.

^cDesviación standard.

Tal como en el caso de los acetatos de alditoles, se observa una disminución del tiempo de retención al reemplazar los O-acetilos por O-metilos. Una excepción estaría constituida por el 6-O-metilgalactononitrilo acetilado, que muestra un tiempo de retención más corto, del orden del observado para los derivados dimetilados.

Observando la Tabla 77, se puede intentar correlacionar los tiempos de retención con factores conformacionales de la molécula. Como expresó Seymour²²³, la molécula queda retenida en la fase líquida de la columna cromatográfica por interacciones polares entre esa fase y los grupos acetoxilo moderadamente polares de la molécula. En la página 84 del capítulo VI, ya habíamos puntualizado ese efecto para aldononitrilos acetilados derivados de hexosas, pentosas, aminoazúcares y desoxiazúcares. En el caso de unidades metiladas, el reemplazo de uno de esos grupos polares (O-acetilo) por uno menos polar (O-metilo) provoca una disminución de las interacciones con la fase estacionaria y por ende, un acortamiento del tiempo de retención. Además, puede razonarse fácilmente que la magnitud de ese acortamiento será mayor cuando el reemplazo se produzca en un acetoxilo más expuesto a la fase líquida, y en cambio será menor cuando ese acetoxilo esté más impedido de interaccionar. El penta-O-acetilgalactononitrilo muestra, en solución piridínica, una conformación extendida, planar y en zigzag para la cadena carbonada^{224,267} y resultaría lógico postular esa conformación de baja energía para la molécula en fase vapor. La observación del modelo molecular del compuesto, indica claramente que la posición del acetoxilo en C-6 es la más expuesta, por lo que resulta lógico que de los derivados monometilados de la forma piranósica, el metilado en C-6 presente el menor tiempo de retención, ya que la metila-

ción afecta notoriamente su posibilidad de interacción.

Del resto de los carbonos, el acetoxilo de C-2 también está orientado hacia afuera²²⁴, quedando esa posición más libre, lo cual resulta avalado experimentalmente (Tablas 76 y 77) : el siguiente tiempo de retención es el del 2-0-metil derivado.

Los factores estéricos que pesan sobre los acetoxilos de C-3 y C-4 son similares, y resulta lógico que en algunos sistemas estos dos derivados monometilados no se separen. Sin embargo, y comparando el penta-0-acetilgalactononitrilo con el hexa-0-acetilgalactitol (en el cual C-3 y C-4 resultan equivalentes) existe un cambio del grupo $-\text{CH}_2\text{OAc}$ de C-1 por el $\text{C}\equiv\text{N}$, mucho menos voluminoso, y además rígido e inmóvil. Por el contrario, el C-6 sigue estando en forma de $-\text{CH}_2\text{OAc}$ y su interacción con el C-4, mayor que con el C-3, hace que aquella posición se vea algo más impedida a interaccionar con la fase estacionaria, lo cual coincide con el resultado experimental (Tablas 76 y 77) de un 3-0-metilgalactononitrilo con menor tiempo de retención que el 4-0-metilado, ya que en este último el metilo "ingresa" a una posición más impedida.

Cuando el C-6 está metilado, esta última diferencia deja de tener validez, ya que el $-\text{CH}_2\text{OMe}$ terminal no interfiere; es así que el derivado de la 2,4,6-tri-0-metilgalactosa tiene menor tiempo de retención que la 2,3,6-tri-0-metilada; también la 3,6-di-0-metilada presenta un tiempo de retención mayor - o a lo sumo igual- que la 4,6-di-0-metilada.

El orden de exposición a interacciones externas sería entonces:



La predicción de la secuencia lógica dentro de cada grupo sería:

Trimetilados: t_r de 2,4,6- \simeq 2,3,6- < 3,4,6- < 2,3,4-

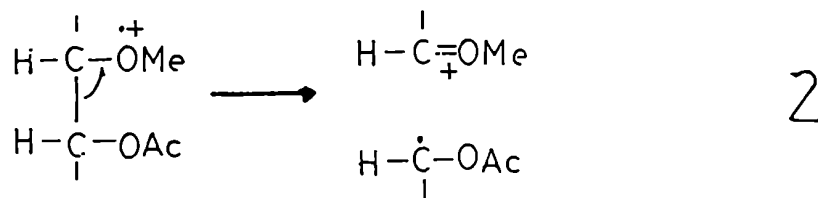
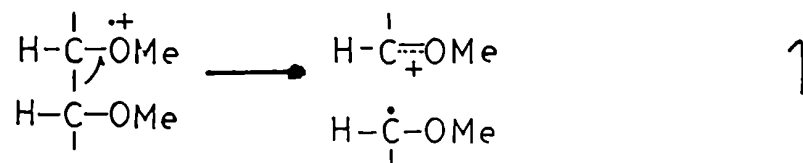
Dimetilados: t_r de 2,6- < 4,6- \simeq 3,6- < 2,3- < 2,4- < 3,4-

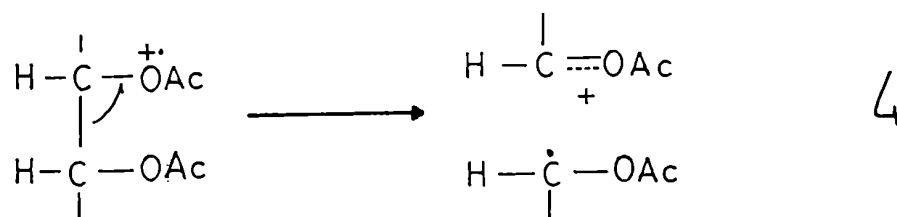
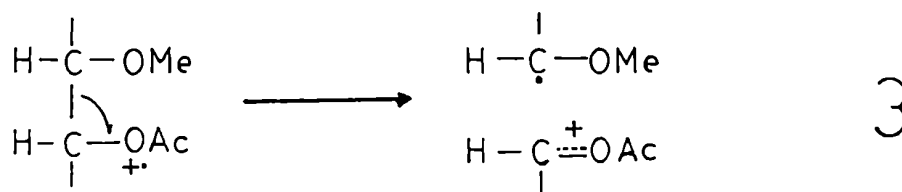
Monometilados: t_r de 6- < 2- < 3- < 4-

La realidad experimental (Tablas 76 y 77) prácticamente concuerda con la predicción teórica.

ESPECTROMETRIA DE MASA DE LOS O-ACETIL-O-METILGALACTONONITRILOS

La fragmentación, tal como se describió en el capítulo VI de esta Tesis, es para los aldononitrilos acetilados y metilados análoga a la de los correspondientes alditoles, es decir que los fragmentos primarios se forman generalmente a partir del ion molecular (éste no aparece) por ruptura α entre dos átomos de carbono de la cadena principal. De las cuatro rupturas posibles:





Las preferidas son aquellas que fijan la carga positiva en el oxígeno del éter (1 y 2), y de entre ellas la 1, porque conduce a un radical metoxilado terminal, más estable que el acetoxilado. Por lo tanto, la ruptura se verifica fundamentalmente entre carbonos que poseen metoxilos vecinales, en menor lugar entre carbonos con metoxilo y acetoxilo (localizándose fundamentalmente la carga en el metoxilo) y menos aún entre carbonos que llevan acetoxilos vecinales. Luego, esos fragmentos primarios así formados, pierden moléculas neutras como ácido acético, cetena, metanol, formaldehído o ácido cianhídrico para dar fragmentos secundarios, generalmente más intensos.

En el caso de los nitrilos, al igual que en el de los alditoles las fragmentaciones son simples y claras; los nitrilos son modelos aún más definatorios dada la asimetría de la molécula; en general, el grupo ciano protege al derivado de la ruptura C-1—C-2²¹⁵.

Las diferentes series de iones producidas suelen denotarse^{215,223} con un número que se corresponde a la cantidad de átomos de carbono de la cadena principal y las letras CN o C dependiente de si se trata del fragmento del extremo nitrílico o no nitrílico de la molécula, como se aprecia en la Figura 35.

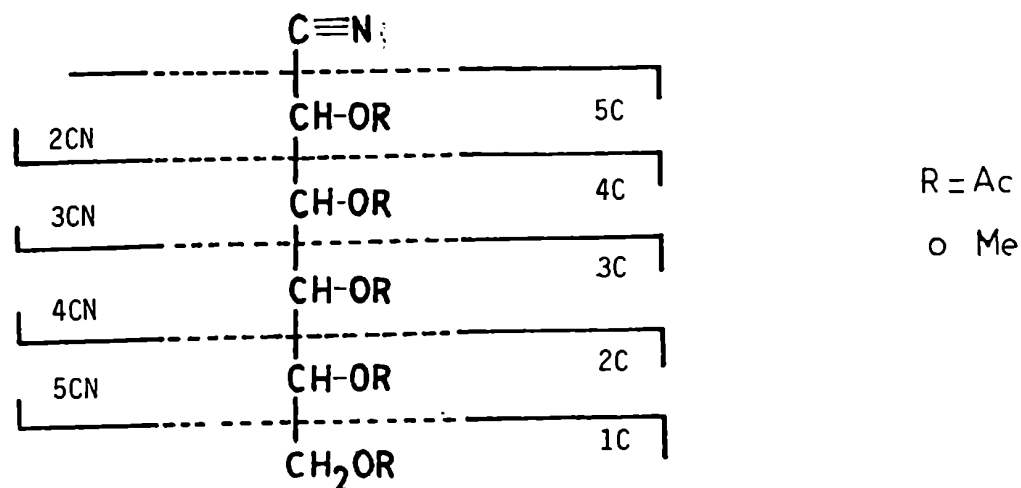
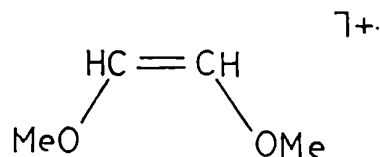


Figura 35. Nomenclatura utilizada para las distintas series.

Existen además otras rupturas originadas en los grupos acetilo libres para dar el CH_3CO^+ , que suele ser el pico base (m/e 43) y los correspondientes diacetil- y triacetil-oxonio de m/e 103 y 145 respectivamente. Otra ruptura corresponde al fragmento de m/e 88, un ion radical formado a partir de moléculas con dos grupos metoxilo vecinales, cuya estructura es



y que denominaremos 2M.

En general los picos de las series C suelen superar en intensidad a los de las CN²²³, y por lo expresado anteriormente, la serie 5C no existe.

El espectro de masa y las asignaciones para el 5-0-acetil-2,3,4,6-tetra-0-metil-D-galactonitrilo se aprecia en la Tabla 78.

TABLA 78. Picos principales y asignaciones en el espectro de masa del 5-0-acetil-2,3,4,6-tetra-0-metil-D-galactonitrilo.

m/e	I(% base)	Asignación
43	100	Ac ⁺
45	54	1C
71	10	3C
74	7	
75	7	2C
85	7	
87	20	3C
88	22	2M

m/e	I(% base)	Asignación
89	7	
101	10	3C
113	7	4C
117	10	2C
129	36	3C
145	27	4C
161	25	3C

El espectro concuerda bien con el informario por Seymour y col.²¹⁸ para el correspondiente derivado de manosa metilada en las mismas posiciones, y como se aprecia no existen fragmentos identificables a la serie CN. Es muy posible que los metoxilos cercanos al grupo ciano desestabilicen los iones de ese tipo, y además, la presencia de metoxilos vecinales haga predominante ese tipo de ruptura, dejando la carga en el metoxilo del extremo no nitrílico: ello justifica la preminencia de las series 3C y 4C.

Los espectros de masa de los derivados trimetilados y diacetilados del galactonitrilo pueden verse en la Tabla 79. Nuevamente existe coincidencia (aproximada) con los datos para los derivados análogos de la glucosa²¹² y manosa²¹⁸. Puede observarse la presencia de picos característicos dentro del grupo, es decir aquellos que permiten

TABLA 79. Picos principales de los espectros de masa de los derivados tri-O-metilados y di-O-acetilados del D-galactonitrilo.

m/e	2,4,6		2,3,6		2,3,4		3,4,6	
	%	Asignación	%	Asignación	%	Asignación	%	Asignación
43	100	Ac ⁺	100	Ac ⁺	100	Ac ⁺	100	Ac ⁺
45	36	1C	24	1C	24		72	1C
70							7	
71	8	3C	6		8		13	3C
73			4				12	3CN
74			3				11	
75			4	2C			7	2C
85			6					
87	13	3C	26	3C	26	3C	34	3C
88			7	2M	17	2M	18	2M
89							9	
95			4					
96	12*	4CN						
99	14	4C	14	4C	26	4C	14	4C
100							12	3CN
101	30	3C	5		6		45	3C
103							5	
112	27*	4CN						
113	5		20	4C	6	4C	8	4C
114			5	3CN			5	
115	4	3C	7	3C				
117	4	2C	6	2C	7	4C		
119							8*	3C
126	6	4CN	3	4CN			4	4CN
127	8*	pos. 4CN						
129	30	3C	25	3C	38	3C	71	3C
131			8*	4C				
142							13*	3CN
145							25*	4C
147			4*	3C				
154	18*	4CN						
157			3	3C				
159					5	4C		
161	13	3C	3				38	3C
186	19	4CN						
189					7*	3C		
205							4*	4C

* pico característico dentro del grupo de trimetilados.
pos.= posiblemente

el reconocimiento de los azúcares metilados en diferentes posiciones.

Es así que, por ejemplo el derivado de la 2,4,6-tri-0-metilgalactosa muestra preminencia de los fragmentos originados en las series 3C y 4CN, ya que no posee metoxilos vecinales, y en estos dos fragmentos se conserva la carga en el metoxilo de C-4. Dichos fragmentos pertenecen a las series que en el Capítulo VI de esta Tesis se denotaron como A y G, respectivamente. La segunda de estas series da en forma característica los picos a m/e 154, 127, 112 y 96. El pico a m/e 186 si bien no aparece en los otros derivados trimetilados de galactosa y glucosa²¹² fue informado por Seymour²¹⁸ para el 3,4,6-tri-0-metilmanononitrilo acetilado aunque en mucha menor proporción. Otras características del espectro de este azúcar es la ausencia del pico a m/e 88, indicativo de moléculas con metoxilos vecinales, o sea del resto de los derivados trimetilados.

El 2,3,6- y 2,3,4-tri-0-metilgalactononitrilo acetilado, y al igual que el galactononitrilo tetrametilado, muestran poca tendencia a la aparición de picos originados en las series CN debido a la presencia desestabilizante de los metoxilos en C-2 y en C-3. Para ambos derivados trimetilados se hacen importantes las series 4C y 3C, aunque esta última localice, para el 2,3,6-trimetilado, la carga sobre el acetoxilo de C-4. Para este azúcar resulta característico el pico a m/e 147 (serie 3C) y en nuestro caso el m/e 131 (serie 4C), pero también puede diferenciarse el azúcar por la alta intensidad del pico a m/e 113.

En el caso del derivado de 2,3,4-tri-0-metilgalactosa, el pico de la serie 3C a m/e 189 es característico y por nuestros resultados también lo es el m/e 159, hecho que no ocurrió para el derivado de

manosa²¹⁸. La intensidad del pico a m/e 99 también resulta característica. En el capítulo VI (página 94) estas series fueron denominadas H, I, J y K, respectivamente. El derivado de 3,4,6-tri-0-metilgalactosa muestra, además de picos notorios de las series 3C y 4C (antes A y B), los de las series 3CN fundamentalmente, y en menor medida los de la 4CN. Son característicos los picos a m/e 205, 145, 142 y 119 y además es importante el pico a m/e 161.

Los cuatro espectros de masa exhiben picos de alta intensidad a m/e 129 y m/e 45. Este último se origina en la pérdida del C-6 (serie 1C), pero también ocurre en el 2,3,4-tri-0-metil derivado, lo cual indica alguna ruptura con transferencia de protón, como sugirió Seymour²¹⁸.

Los espectros de masa de algunos derivados di-0-metilados y tri-0-acetilados del galactononitrilo pueden observarse en la Tabla 80.

Puede apreciarse que sólo figuran cuatro de las seis unidades dimetiladas posibles, derivadas de la forma piranósica. Para determinar la "especificidad" de los picos con los dos compuestos no presentes, se tuvieron en cuenta los datos de Seymour²¹⁸ para los derivados de la manosa, considerando que no existen diferencias.

El derivado de 2,6-di-0-metilgalactosa muestra en su espectro de masa la presencia de la serie 5CN (antes R) por pérdida del radical $\cdot\text{CH}_2\text{OMe}$, resultando entonces característicos los picos a m/e 286 y 157 (el resto de los picos de esta serie aparecen en el espectro del derivado de la 3,6-di-0-metilmanosa²¹⁸). De los fragmentos en el extremo no nitrílico, aparecen por igual las series 4C, 3C y 2C, en las que se mantiene la carga sobre un $\text{RCH}=\text{OAc}$. Todos esos picos carecen de valor comparativo por aparecer en otros compuestos dimetilados.

Tabla 80. Picos principales en los espectros de masa de algunos derivados di-O-metilados y tri-O-acetilados del D-galactononitrilo.

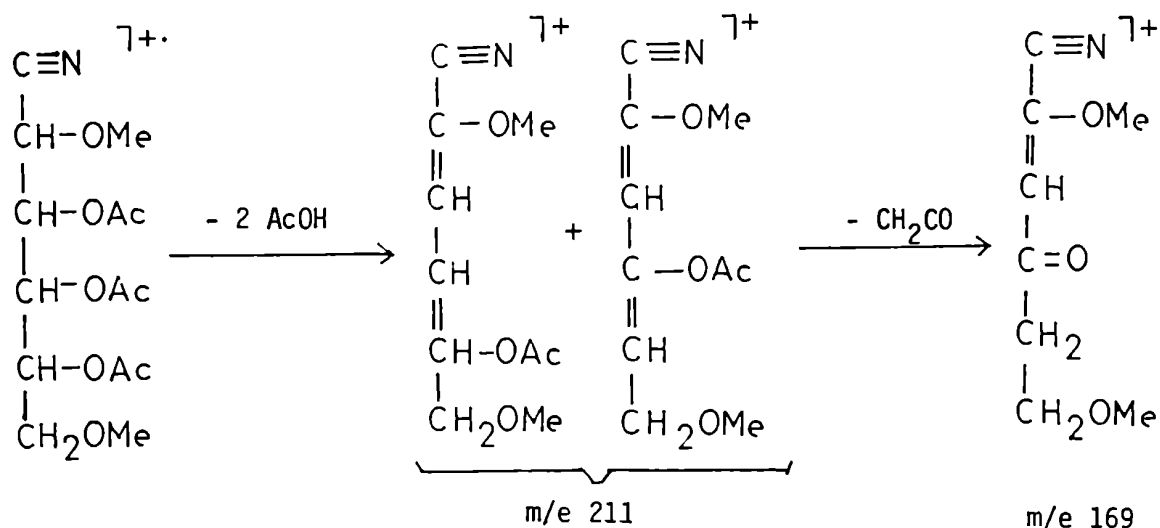
m/e	Metilo en 2,6		4,6		2,4		3,4	
	%	Asignación	%	Asignación	%	Asignación	%	Asignación
43	100	Ac ⁺	100	Ac ⁺	100	Ac ⁺	100	Ac ⁺
45	44	1C	30	1C			5	
70					3	2CN		
71					4			
74					5			
75	5	2C						
87	32	3C	8	3C	18	3C	27	3C
95			4	4CN ^a				
96					11*	4CN		
99	10	4C			10	4C	12	4C
101			20*	3C				
103					3	Ac ₂ OH ⁺		
112			28	4CN	26	4CN		
113			9	4CN ^a				
115	21	5CN						
117	14	2C						
126					3	4CN	28	4CN
127	5	4C			7	4C		
129	16	3C	22	3C	32	3C	56	2C
145					4	Ac ₃ O ⁺		
154			16	4CN	18	4CN		
155			6	4CN ^a				
157	7*	5CN						
159	18	4C			8	4CN		
161			11*	3C				
169	14	6CN						
184	14	5CN						
186					20	4CN	6	4CN
189					9	3C	17	3C
201	1	4C						
211	4	6CN						
214			16*	4CN				
215			2	4CN ^a				
261	1	4C						
286	1*	5CN						

* Pico característico entre las unidades dimetiladas. La especificidad fue evaluada teniendo en cuenta los datos de Seymour y col.²¹⁸ para los 2,3- y 3,6-di-O-metilmanononitrilos acetilados.

^a Ver texto (pag.262-263).

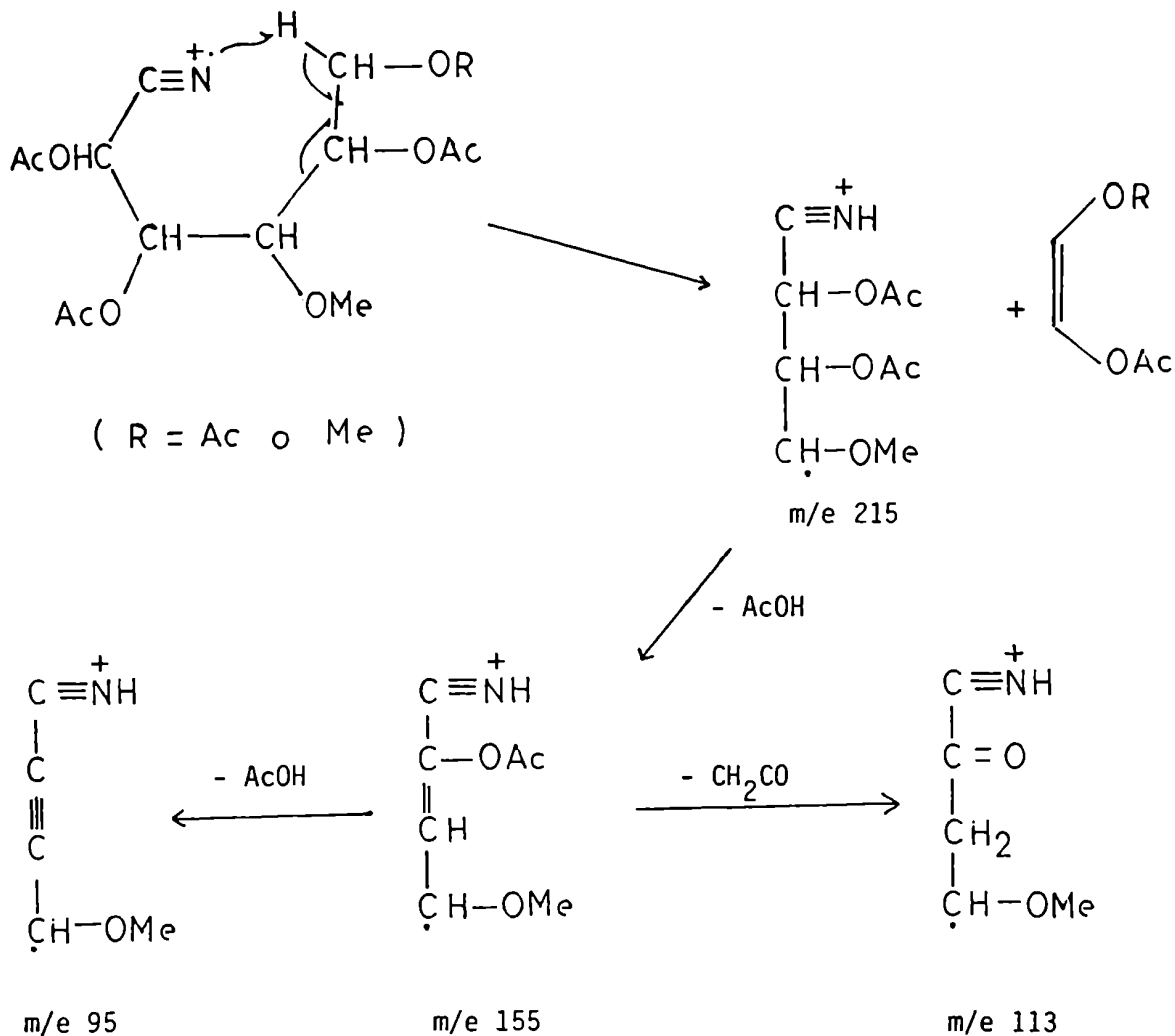
Se produce en cambio en este compuesto y en otros con bajo índice de metilación un nuevo tipo de ruptura originado en la pérdida de fragmentos neutros (ácido acético y cetena) a partir del ion molecular, resultando iones radicales. Esta ruptura es característica de los derivados de aldononitrilos, ya que los iones radicales producidos se estabilizan por conjugación a lo largo de la cadena. Ya había existido una sugerencia para este tipo de pérdida por parte de Szafranek et al.²¹⁵, quienes justificaron algunos fragmentos del glucononitrilo peracetilado. Esto fue avalado por el desplazamiento producido por deuteroacetilación. De este modo se forman los picos a m/e 211 y 169 de este compuesto, en esta serie que denominamos 6CN (Esquema 13).

Esta serie resulta, dentro de los dimetilados y según nuestros resultados, característica para el 2,6-di-O-metil derivado; sin embargo, Seymour y col.²¹⁸, aún sin asignarla informan estos picos en otros derivados dimetilados con metoxilo en C-6, pero con menor intensidad que en este caso.



ESQUEMA 13

El espectro de masa del 4,6-di-O-metilgalactononitrilo acetilado muestra, casi exclusivamente, los picos correspondientes a las series 4CN, 3C y 1C (S, A y D según la nomenclatura anterior). Los correspondientes picos a m/e 214, 161 y 101 distinguen inequívocamente al derivado. Existen además en el espectro de este compuesto cuatro picos, aparentemente relacionados entre sí por la pérdida de ácido acético y cetena, a m/e 215, 155, 113 y 95. La existencia de estos mismos picos en el espectro del derivado de la 4-O-metilgalactosa sería un indicio de la presencia de la unidad C-1—C-4 en esos fragmentos. Existen dos explicaciones posibles para los mismos; una podría originarse en una migración de hidrógeno y pérdida de acetato

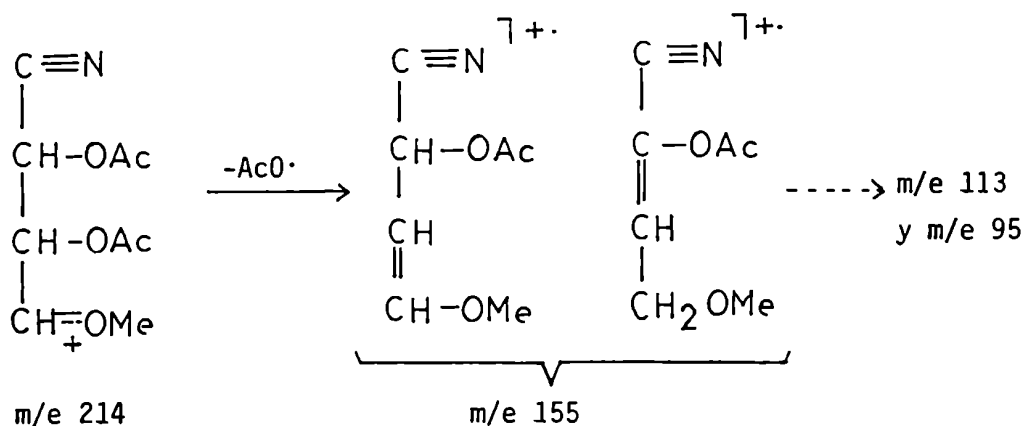


ESQUEMA 14

de vinileno (en el caso del metilado en 0-4) o acetato de 2-metoxivinilo (en el caso del 4,6-dimetilado). (Esquema 14).

Este tipo de ruptura ocurriría únicamente en los aldononitrilos metilados en C-4 debido al efecto estabilizante que tiene el metoxilo en esa posición sobre el radical formado. El hecho de que no se forme en otros derivados con mayor cantidad de metoxilos (como por ejemplo los de las 2,4,6- o 3,4,6-tri-0-metilgalactosa) podría deberse a la ruptura preferencial de otras uniones antes que ésta, dada la existencia de muchos metoxilos, que estabilizan la carga.

Por la otra explicación, quizá más razonable, se podría atribuir la existencia del pico a m/e 215 únicamente a la abundancia isotópica del m/e 214, dada su baja contribución, y el resto de los picos con origen en el fragmento a m/e 214 (serie 4CN) por pérdida de radical acetato (AcO·), para dar un ion radical estabilizado por resonancia:



Este tipo de ruptura es similar a la justificada para la fragmentación del derivado de 3-0-metilgalactosa (ver más adelante).

El derivado de 2,4-di-0-metilgalactosa da fundamentalment:

fragmentos de las series 4CN y 3C (al igual que la 2,4,6-tri-0-metilada), denominadas anteriormente G y K, aunque también se evidencian algunos picos de las series 2CN y 4C (Tabla 80). Resulta característico el pico de la serie 4CN a m/e 96. También el pico a m/e 186 de esa serie aparece en gran proporción, lo que lo distingue del derivado de 3,4-di-0-metilgalactosa. Este último muestra un espectro sencillo con picos originados en las series 3C, 4C y 4CN (K, J y E), pero sólo algunos, y en alta proporción (Tabla 80). Es así, que si bien no existen picos característicos, este azúcar es fácilmente reconocible por la alta intensidad de su pico a m/e 126 (serie 4CN) y también por la importancia relativa de los picos a m/e 189 y 129 (serie 3C).

Teniendo en cuenta los datos de Seymour y col.²¹⁸ para distinguir el 3,6-di-0-metil derivado se pueden utilizar específicamente los picos de la serie 4C a m/e 233 y 131 y semi-específicamente (es decir, aprovechando su alta intensidad) al m/e 113.

En cambio, el 2,3-di-0-metil derivado puede distinguirse fácilmente por los fragmentos de la serie 4C a m/e 261, 201 y 187.

GALACTONONITRILOS MONOMETILADOS Y TETRAACETILADOS

Los modelos de fragmentación de los derivados tetra-0-acetilados de los mono-0-metilgalactononitriilos no habían sido -hasta el momento de publicación del trabajo (ref.230)- analizados en detalle, pero siguen las mismas reglas vistas hasta ahora. Los espectros pueden apreciarse, conjuntamente con el del penta-0-acetilgalactononitrilo en la Tabla 81.

TABLA 81. Picos principales en los espectros de masa de los derivados mono-O-metilados y tetra-O-acetilados del D-galactononitrilo y en el del penta-O-acetilgalactononitrilo.

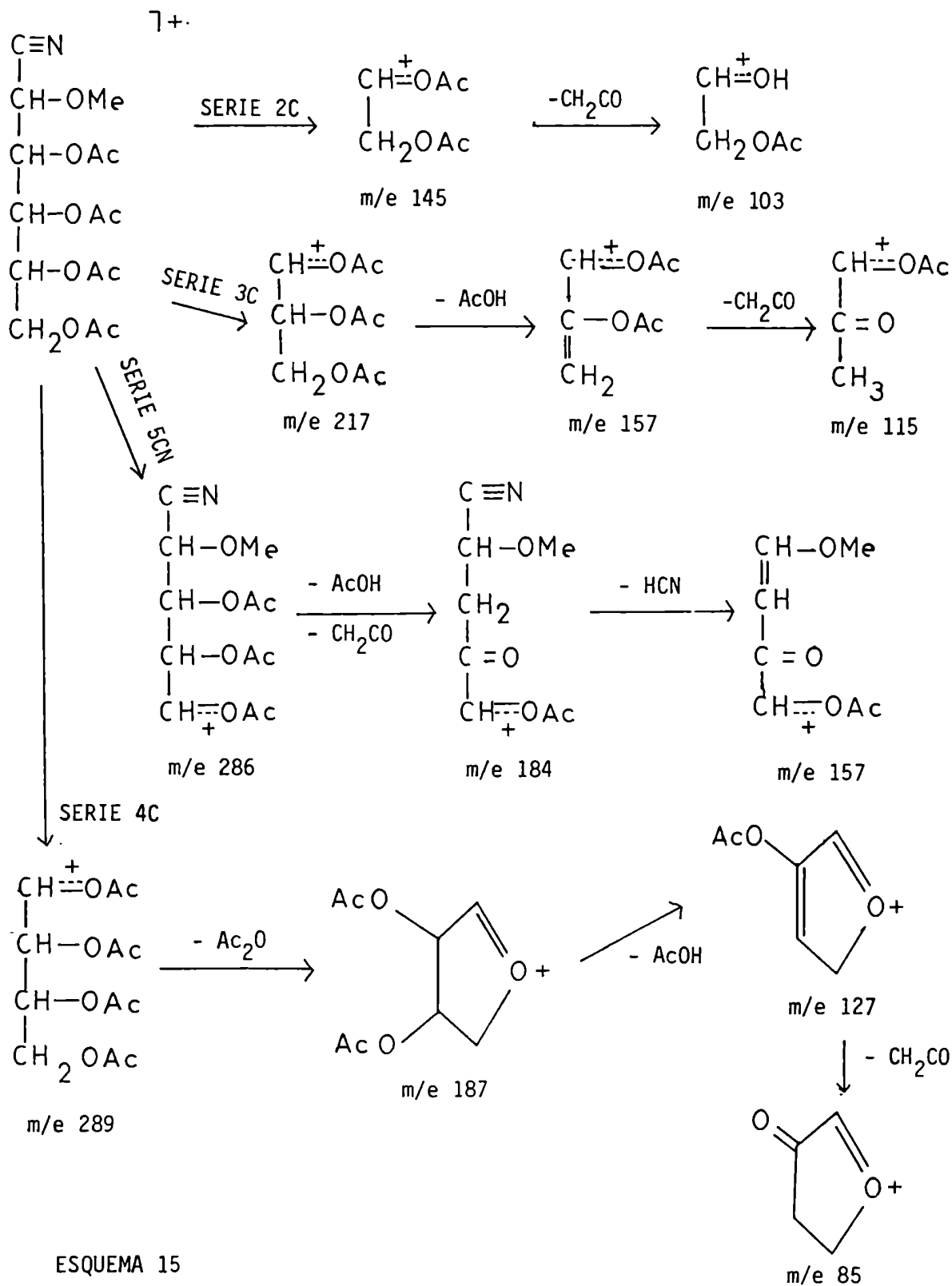
Metilo en m/e	2-		3-		4-		6-		No
	%	Asignación	%	Asignación	%	Asignación	%	Asignación	% Asignación
43	100	Ac ⁺	100	Ac ⁺	100	Ac ⁺	100	Ac ⁺	100 Ac ⁺
45							31*	1C	
74					3				
83			10*	3CN					
85	7	4C	16	4C					
87					12	3C	18	3C	
95					5	4CN			
99			10*	4C					
103	9	2C,Ac ₂ OH ⁺	4	2C,Ac ₂ OH ⁺	6	2C,Ac ₂ OH ⁺			13 2C,Ac ₂ OH ⁺
112					30*	4CN			
113					11	4CN ^a			
115	10	3C	12	3C			9	3C	
117							10*	2C	
127	9	4C	16	4C					
129					23	3C	8	3C	
142			13*	3CN					
145	9	2C,Ac ₃ O ⁺			5	2C,Ac ₃ O ⁺			15 2C,Ac ₃ O ⁺
154					19*	4CN			
155					7	4CN ^a	4	6CN	
157	5	3C,5CN					5	3C	5 3C
159			4	4C			9	4C	
184	9*	5CN							
187	14*	4C							
189					6*	3C			4 4C
197							10*	6CN	
201			5*	4C					
212							5*	5CN	6 5CN
214					12*	4CN			
215					2	4CN ^a			
217	3	3C	4	3C					2 3C
225									2 6CN
261			3	4C	2	4C			
273	2	pos.5C			2	pos.5C			
286	2	5CN							
289	2*	4C							
314									2 5CN

* Pico característico entre las unidades monometiladas.

^a Ver texto (pag.262 y 263).

pos.=posiblemente

Los modelos de fragmentación son realmente característicos. Por ejemplo, el 2-O-metilderivado muestra fundamentalmente las rupturas originadas en las series 4C y 5CN, aunque también aparecen otras series (3C, 2C y posiblemente 5C). (Ver Tabla 81 y Esquema 15).



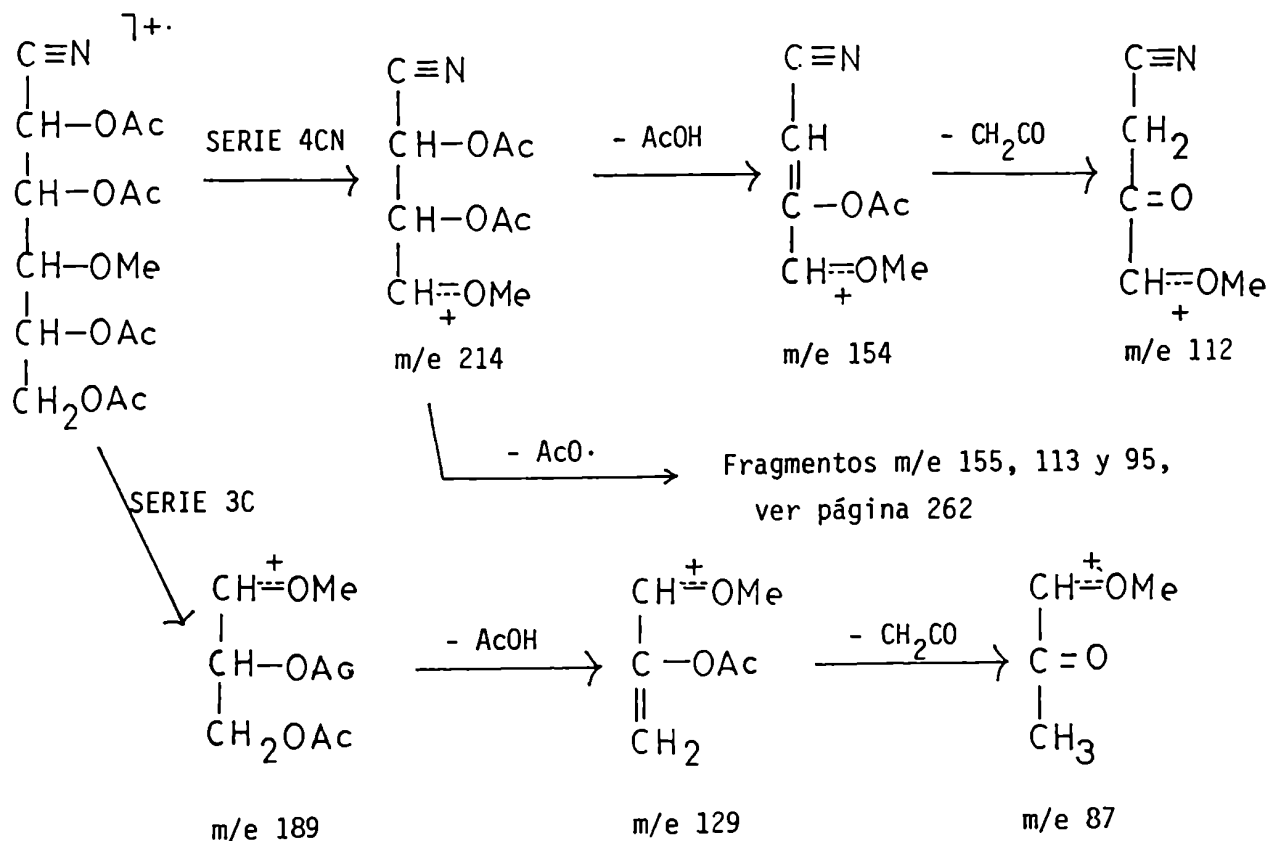
ESQUEMA 15

La serie 5CN es inusual, ya que ocurre por ruptura entre dos carbonos acetoxilados. El pico a m/e 184 de esta serie es característico del compuesto. También resultan característicos los picos de la serie 4C, a m/e 289 y 187, este último de bastante intensidad. Esta serie también aparece en el espectro de masa del galactononitrilo pentaacetilado. El fragmento a m/e 70 que se formaría por ruptura de la unión C-2—C-3, pero manteniendo la carga sobre el metoxilo (serie 2CN) no existe, lo que está de acuerdo con el hecho que un fragmento del terminal nitrílico sólo es estable cuando lleva un acetoxilo vecino al C-1.

El espectro del 3-0-metil derivado muestra análogamente dos series fundamentales, en este caso más predecibles: la 4C y la 3CN, manteniéndose en ambos casos la carga sobre el metoxilo. También aparecen algunos fragmentos de la serie 3C (Esquema 16).

De la serie 4C, resultan característicos los picos a m/e 201 y 99, y de la serie 3CN, m/e 142 y 83. En este último caso, y análogamente a lo postulado para el derivado de 4,6-di-0-metilgalactosa (página 263), la pérdida de radical acetato se justifica por la formación de un ion radical estabilizado por conjugación a lo largo de la cadena. El pico a m/e 83 también había sido informado por Seymour²¹⁸ para el espectro del derivado de 3,6-di-0-metilmanosa.

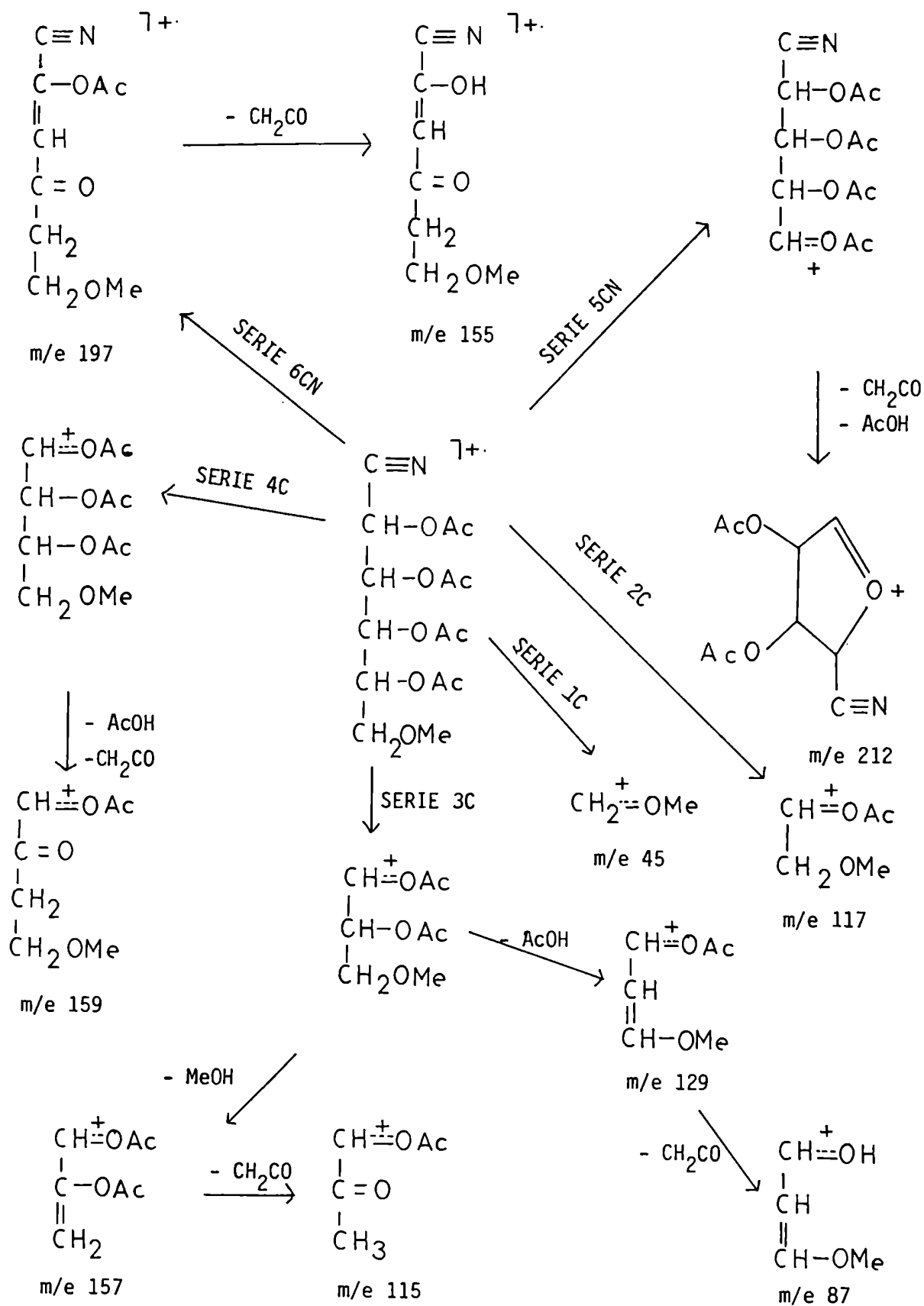
Análogamente al compuesto anterior, el espectro del derivado de 4-0-metilgalactosa muestra dos caminos de fragmentación característicos, o sea el 4CN y el 3C, originados en rupturas que dejan la carga sobre un metoxilo. Además existen pequeñas proporciones de las series 4C, 2C y probablemente también la 5C. Los caminos indicados se pueden apreciar en el Esquema 17.



ESQUEMA 17

Tal como se explicó para el derivado 4,6-di-O-metilado, también aparecen los picos a m/e 155, 113 y 95 (páginas 262 y 263), adjudicados a la serie 4CN, posiblemente por pérdida de radical acetato a partir del ion m/e 214. La serie 3C muestra un único fragmento característico, el m/e 189; la 4CN presenta tres fragmentos que distinguen al derivado. De ellos, el último, m/e 112 es el más importante.

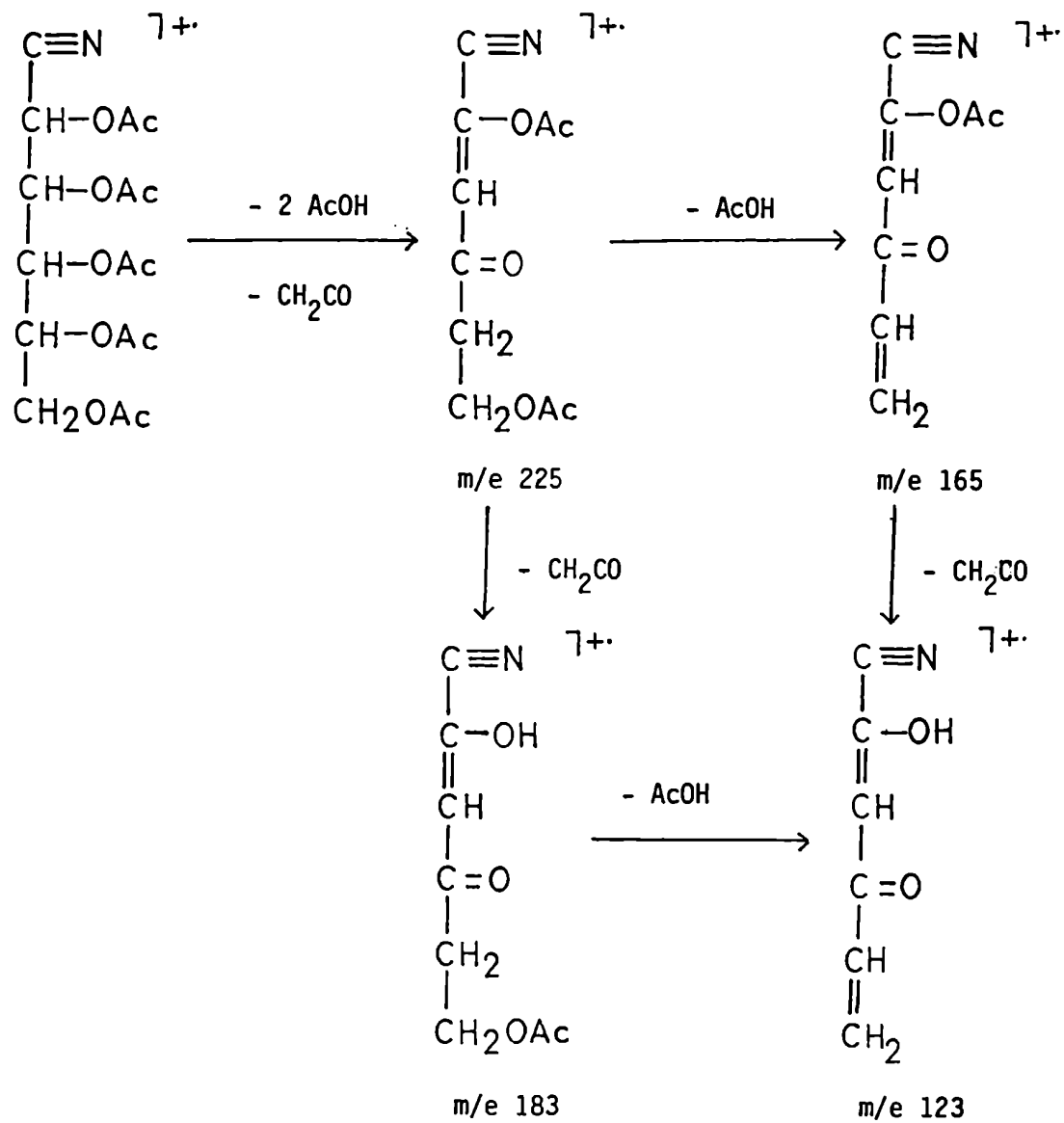
El espectro del derivado de 6-O-metilgalactosa (Esquema 18) muestra característicamente los iones de las series 1C (m/e 45) y 2C (m/e 117), pero también se encuentran muchos iones de las series 3C y 4C, y análogamente al galactononitrilo penta-O-acetilado, el ion de la serie 5CN, m/e 212, que también es característico entre los monometilados.



ESQUEMA 18

Sin embargo, el pico más altamente característico, que no aparece en el espectro de ningún derivado tetra-, tri-, di- o monometilado es el de m/e 197, ya informado por Kochetkov y col.²¹², para el cual no dieron ninguna explicación. Este se origina, análogamente al del derivado de 2,6-di-O-metilgalactosa, en la pérdida de fragmentos neutros para dar un ion radical estabilizado por resonancia, que después da otro fragmento estable (Esquema 18).

Con respecto al penta-O-acetilgalactononitrilo, da un espectro muy sencillo, similar al informado por Szafrank y col.²¹⁵ para el derivado análogo de glucosa. Conteniendo al nitrógeno, aparecen sólo dos fragmentos de la serie 5CN, y luego los ya conocidos (pag. 88) de las series 2C, 3C y 4C , más los aciloxonios de m/e 103 y 145. A ellos hay que sumarles el pico a m/e 225, ion radical formado por la ya conocida pérdida de fragmentos neutros (serie 6CN). La misma ruptura justifica además los fragmentos de m/e 183, 165 y 123 informados por Szafrank y col.²¹⁵ (Esquema 19).



ESQUEMA 19

ESTUDIO DEL RESIDUO PROVENIENTE DE LA PURIFICACION DEL CARRAGENANO CRUDO

Como ya se mencionó (página 100) , el carragenano se obtuvo por precipitación a partir del agregado de su solución acuosa sobre tres volúmenes de isopropanol. Cuando este carragenano se purificó por redisolución en agua, se observó que un 8-10 % de su peso, permanecía insoluble^{11,126}.

Matulewicz¹¹ había informado que ese residuo contenía 6 % de nitrógeno (37,5 % de proteína), 2,5% de azufre (9,3 % de SO₃K) y por hidrólisis de la porción de hidratos de carbono se obtenía una mezcla de glucosa y galactosa en relación 4:1.

Cuando se efectuaron los análisis correspondientes a cinco muestras diferentes de este residuo, obtenidas en distintos fraccionamientos del carragenano, se observaron los resultados que se aprecian en la Tabla 82.

TABLA 82. Análisis de diferentes muestras de residuo insoluble

MUESTRA	PROTEINA (N% x 6,25)	SULFATO (SO ₃ K %)	3,6-ANHIDRO- GALACTOSA %	FOSFORO (P %)	REL.MOLAR GLU:GAL
A	54,1	10,5	1,5	0,12	2,90:1
B	62,2	7,7	1,4	0,18	2,34:1
C	36,8	8,9	1,7	0,12	3,60:1
D	47,1	10,1	1,6	0,30	3,03:1
E	52,2	9,8	1,6	0,17	2,96:1

Se evidencia aproximada concordancia entre las diversas muestras, y también con los resultados de Matulewicz¹¹, aunque salvo la muestra C que encaja mejor con los valores antes hallados, en el resto de las muestras el contenido de proteína es sensiblemente mayor ($\sim 50\%$) y la relación glucosa:galactosa menor ($\sim 3:1$). Se observan también pequeñas cantidades de 3,6-anhidrogalactosa y fósforo.

Matulewicz¹¹ había efectuado el análisis de los aminoácidos componentes de la porción proteica de este residuo. En la Tabla 83 pueden apreciarse los resultados correspondientes a las cinco muestras aquí estudiadas, y la comparación con la determinada por Matulewicz¹¹.

Se observa que los resultados analíticos no difieren mayormente entre las distintas muestras. El único aminoácido cuya variación es grande es la arginina, lo cual podría deberse a su destrucción parcial durante la hidrólisis en algunos casos. Ello podría indicar que la arginina es uno de los aminoácidos más importantes. Otros aminoácidos importantes son los ácidos aspártico y glutámico; todos estos datos evidenciarían el predominio de los aminoácidos polares por sobre los no polares, entre los cuales la leucina y la alanina son los más importantes.

Dadas las parecidas características analíticas de todas las muestras (Tablas 82 y 83), todas ellas se unieron en un solo residuo insoluble (RI).

TABLA 83. Composición en aminoácidos de distintas muestras de residuo insoluble^a.

AMINOACIDO	g/100 g proteína						Promedio
	A	B	C	D	E	F ^b	
Ac. aspártico	13,6	12,7	12,5	11,9	12,0	13,7	12,7 ± 0,4
Treonina	4,5	6,1	5,1	5,2	4,4	2,9	4,7 ± 1,1
Serina	7,0	8,8	6,2	6,3	6,2	6,1	6,8 ± 1,0
Ac. glutámico	16,6	16,5	12,7	11,0	12,4	13,6	13,8 ± 2,1
Prolina	4,0	3,6	3,8	3,4	3,0	7,3	4,2 ± 1,5
Glicina	4,4	5,5	4,8	4,7	4,0	4,4	4,6 ± 0,5
Alanina	7,7	8,1	7,7	6,7	6,0	8,6	7,5 ± 0,9
Valina	6,4	5,9	5,8	5,8	5,2	7,1	6,0 ± 0,6
Metionina	0,2	1,3	0,7	0,4	0,0	1,2	0,6 ± 0,5
Isoleucina	5,0	4,5	4,6	3,9	4,5	4,5	4,5 ± 0,3
Leucina	8,7	9,3	9,3	8,2	7,3	10,0	8,8 ± 0,9
Tirosina	4,8	4,8	5,2	3,8	3,1	4,0	4,3 ± 0,8
Fenilalanina	5,7	4,9	5,0	4,1	4,2	5,9	5,0 ± 0,7
Histidina	1,3	0,4	2,0	3,0	3,5	0,0	1,7 ± 1,4
Lisina	3,7	5,1	4,7	4,9	7,0	3,5	4,8 ± 1,2
Arginina	6,5	2,5	9,8	16,8	17,0	7,0	9,9 ± 5,9

^aEn las condiciones de operación no pueden dosarse triptofano, hidroxiprolina ni hidroxilisina. ^b Datos de Matulewicz (ref.11).

EXTRACCION ACUOSA DEL RESIDUO INSOLUBLE

Debe tenerse en cuenta el extraño comportamiento del residuo insoluble (RI); era extraído del alga por solubilización en agua, junto con el carragenano, y luego, al intentar disolverlo no se solubilizaba.

Dadas esas características, y la presencia de proteína, sulfato, glucosa y galactosa, se hacía interesante ahondar en el estudio del producto para intentar separar diferentes componentes o llegar a identificar - al menos parcialmente - estructuras de productos que contuvieran aquellas porciones.

Se decidió entonces intentar una extracción acuosa del RI. Cuando ésta se efectuó (en una relación 1 % de residuo a agua, varias horas) y se centrifugó el residuo, se observó que la solución obtenida resultaba coloreada y sumamente viscosa. Se aislaron por liofilización los productos soluble e insoluble, y este último volvió a tratarse con agua de la misma forma, repitiendo el proceso de modo tal de completar cuatro extracciones, cuyas características se aprecian en la Tabla 84.

Puede apreciarse que el aumento de la solubilidad (es decir una progresión en la Tabla 84 desde abajo hacia arriba) es paralelo a un incremento en el contenido de sulfato, 3,6-anhidrogalactosa y galactosa, es decir los componentes típicos de un carragenano. En cambio, en el sentido inverso aumentó la proporción de los componentes "extraños", glucosa y proteína.

Ese tipo de separación indicaría la presencia de algún tipo de carragenano - que por algún motivo precipitó de su solución acuosa -, "asociado" a algún glucano y proteína; por extracción acuosa se obtiene un producto que está enriquecido en el carragenano.

TABLA 84. Extracción acuosa del residuo RI. Rendimientos y análisis.

FRACCIÓN	Rendim. %	Proteína %	Sulfato (SO ₃ K %) %	3,6-anh. galactosa %	Hidratos de carbono %	Rel.molar Glu:Gal	Rel.molar.aprox. Gal:3,6-ahg:SO ₃ K
Residuo insoluble orig. (RI)		52,5	9,18	1,5	29,0	2,95:1	1:0,23:1,70
Soluble 1ra.extracción (RS-1)	18	10,4	17,96	2,1	39,5	0,89:1	1:0,11:1,17
Soluble 2da.extracción (RS-2)	5	25,6	9,52	0,9	37,0	1,15:1	1:0,06:0,75
Soluble 3ra.extracción (RS-3)	2	32,4	7,96	1,1	40,0	2,92:1	1:0,12:1,06
Soluble 4ta.extracción (RS-4)	2	32,9	7,03	1,1	37,5	2,69:1	1:0,12:0,94
Insoluble final (RIF)	66	51,2	4,35	0,6	26,1	4,95:1	1:0,15:1,35

Por el otro lado, la relación molar galactosa:3,6-anhidrogalactosa:sulfato obtenida en forma aproximada para los cuatro productos solubilizados es similar (Tabla 84), lo que indicaría que en todos los pasos de solubilización se extrae el mismo tipo de carragenano, mientras que el que queda insoluble en el RIF presentaría un contenido de sulfato relativo algo mayor.

Cuando se efectuó la turbidimetría^{11,125} del producto soluble RS-1, se comprobó la ausencia de fracciones que precipiten con cloruro de potasio, indicando que se trataba de un producto "soluble".

A fin de separar - de ser posible - el "carragenano" del resto de material se recurrió a una resina DEAE Sephadex A-50. Yaphe y col.²⁶⁸⁻²⁷⁰ ya la habían utilizado para separar tres fracciones del ágar de distintas especies; con agua eluían la agarosa neutra, con NaCl 0,5M agarosa sulfatada y con NaCl 2,5M galactanos de grado de sulfatación más alto, no gelificantes y exentos de 3,6-anhidrogalactosa²⁷⁰.

Cuando el producto RS-1 se sembró en una columna de esa resina, ésta se volvió opaca y por elución con agua se obtuvo el diagrama indicado en la figura 36.

Cuando se cambió el solvente a NaCl 0,5M no se eluyó ningún producto, y lo mismo ocurrió con soluciones de cloruro de sodio 1M, 2M y aún 4M, es decir que el producto iónico no era eluido de la columna. Yaphe y col.²⁶⁸ ya habían informado que quedaban productos altamente sulfatados unidos en forma irreversible a la resina.

Por liofilización se aisló el producto no iónico, y éste representaba cerca del 50 % del peso original; cuando se cromatografió en geles de Sephadex G-100 utilizando urea 7M como eluyente se obtuvo un único pico en la zona del volumen de exclusión.

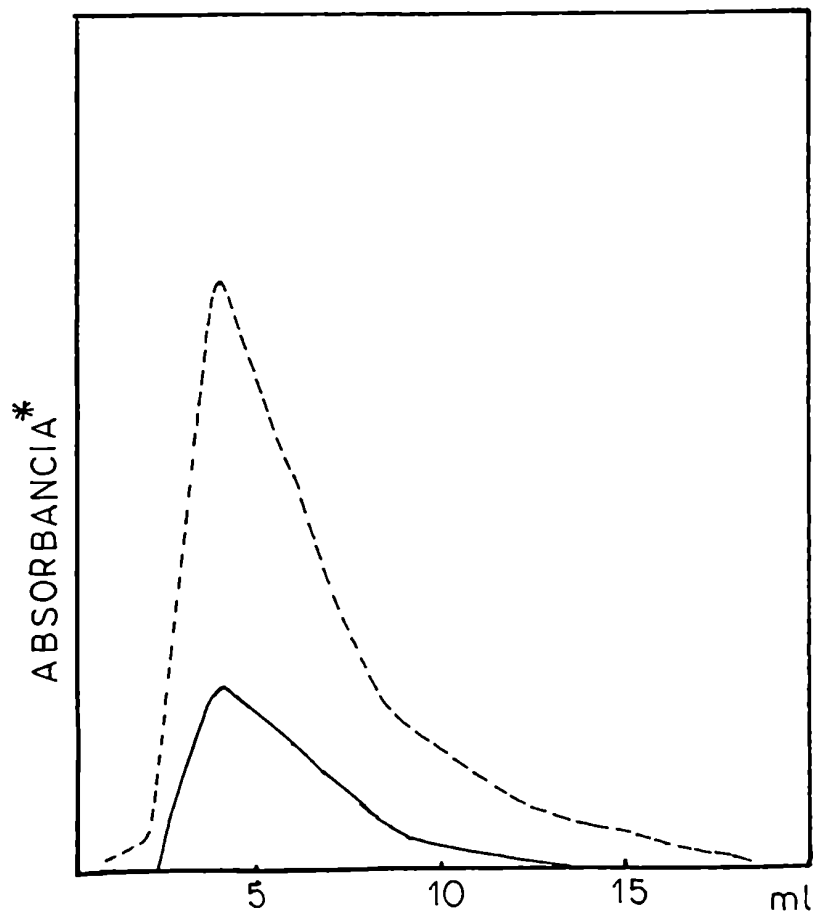


Figura 36. Diagrama de elución del producto RS-1 en una resina DEAE-Sephadex A-50, con agua; * (---) Hidratos de carbono; (—) proteína.

SEPARACION PREPARATIVA Y TRACCIONAMIENTO DEL PRODUCTO RS

Vistos los resultados obtenidos se decidió verificar la separación en forma preparativa partiendo de casi dos gramos de residuo insoluble, con lo que se obtuvo 18,4 % de material soluble (RS) y 73,4 % de insoluble (RIF); en este caso sólo se efectuó una extracción, dadas las exiguas proporciones obtenidas en las subsiguientes (Tabla 84). Los datos analíticos del producto RS se observan en la Tabla 85.

TABLA 85. Composición del producto RS.

Rendimiento .	18,4 %
Hidratos de carbono %	45,8
Proteína %	24,9
3,6-anhidrogalactosa %	2,1
Sulfato (como SO ₃ K %)	16,6
Relación molar (moles %) de azúcares	Glu 44,1
	Gal 51,1
	Xil 2,1
	Ara 0,4
	Man 0,7
	Ram 1,5

Se observa que salvo el contenido de proteína, que creció notoriamente, el resto de los dosajes dieron resultados similares a los del producto RS-1 antes obtenido. Por el otro lado, la hidrólisis total del producto y la cromatografía gaseosa de los correspondientes aldonitrilos acetilados efectuada posteriormente, indicaron, además de la presencia de glucosa y galactosa, la existencia de vestigios de otros azúcares (Tabla 85).

El producto RS se cromatografió sobre DEAE-Sephadex A-50; por elución con agua hasta reacción negativa de hidratos de carbono se obtuvo una solución que por concentración y liofilización dio un 53 % de un producto con aspecto de degradado (RS-N).

Como ya se había mencionado, la resina no permitía la elución de más productos; sin embargo, al dejar la resina con NaCl 4M por varios días, y luego hervir brevemente la solución, reemplazar el decantado por

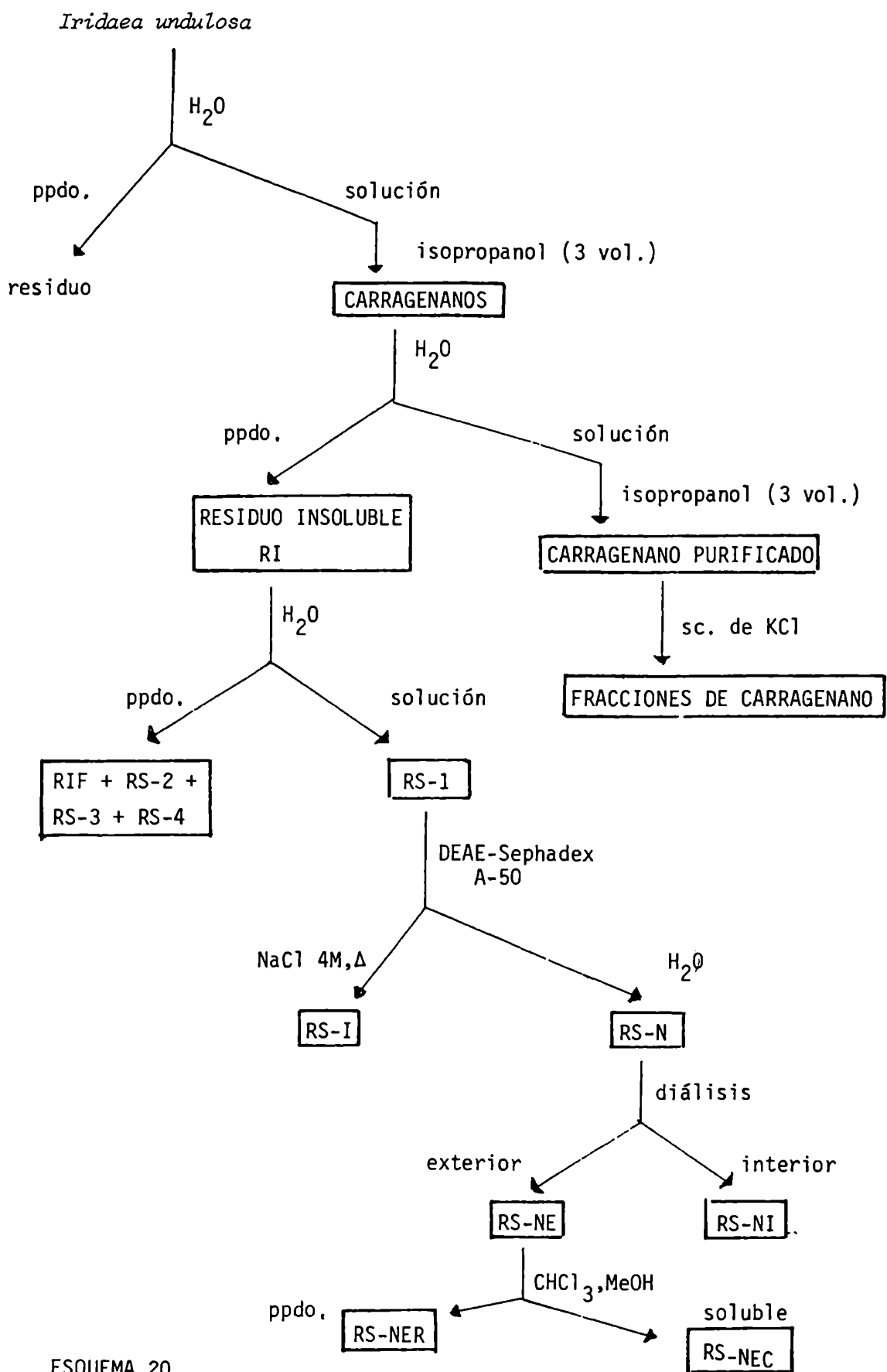
solución salina fresca y repetir el procedimiento, se obtenía una solución acuosa viscosa y que por diálisis y liofilización dio un 37 % de un producto iónico (RS-I).

Dado que el aspecto del producto RS-N indicaba que éste tenía bajo peso molecular, se decidió dializar una solución del mismo contra un volumen grande de agua, y se obtuvo de esa forma una pequeña porción dentro del tubo de diálisis (7%, RS-NI) y el resto (88 %, RS-NE) dializaba, confirmando el bajo peso molecular de esta fracción.

El aspecto del producto RS-NE y algunos caracteres analíticos (porcentaje de proteína + hidratos de carbono de RS-N = 60 %), hicieron pensar en la posible presencia de material liposoluble, por lo que este producto se extrajo con cloroformo/metanol 2:1, del modo clásicamente utilizado para deslipidar material biológico. Esa extracción permitió obtener por centrifugación un residuo RS-NER (28 %) y la evaporación de los solventes orgánicos permitió recuperar 63 % de sólido (RS-NEC).

El sistema total de separación utilizado se indica en el Esquema 20 y las características de los productos obtenidos pueden observarse en la Tabla 86.

En dicha Tabla (pag. 283) se observa nítidamente que se acentuó la diferencia en la composición pues la galactosa era el azúcar principal en el producto RS-I y la glucosa en el RS-N, ya que todas sus subfracciones son ricas en ese azúcar. El carragenano estaría asociado a proteína, la cual está presente en todo el resto de fracciones.



ESQUEMA 20

TABLA 86. Rendimiento y composición de los productos obtenidos por fraccionamiento del material RS

Producto	Rend. ^a %	H.d.C. ^b %	Proteína %	3,6-ag ^c %	SO ₃ K %	Relación molar (moles %) de azúcares					
						Glu	Gal	Xil	Ara	Man	Ram
RS-I	37	36	10	3,2	39,8	6,8	82,0	1,5	4,3	2,6	2,8
RS-N	53	29	30	0	0	— no determinado —					
RS-NI	7	61	24			82,7	11,0	-	0,2	3,6	5,0
RS-NE	88	n.d.	n.d.			— no determinado —					
RS-NER	28	56	16			95,5	d	0,2	1,2	1,9	1,2
RS-NEC	63	22	29	-	-	88,7	-	0,7	7,1	3,5	-

^aRendimiento considerando el producto a partir del cual fue obtenido.

^bHidratos de carbono. ^c3,6-anhidrogalactosa, ^d Hay trazas de galactosa incluidas en el porcentaje de glucosa.

ANALISIS PRELIMINAR DE DOS FRACCIONES

Fracción RS-NER

Desde el punto de vista de su estudio como hidrato de carbono, el más interesante resultaba el producto RS-NER por su bajo peso molecular, su importante proporción de hidratos de carbono y la presencia mayoritaria de glucosa por hidrólisis.

El peso molecular determinado por dosaje de grupos reductores, para la porción de hidratos de carbono, fue de 790, lo que indicaría una

estructura promedio tetra- o pentasacáridica, si es que todas las cadenas poseen su unidad terminal reductora libre. El poder rotatorio (agua, $c=3,385$) fue de $41,1^\circ$, lo cual no concuerda con lo que habitualmente se encuentra en gluco-oligosacáridos enlazados por unión β -, cuyos poderes rotatorios suelen ser menores, ni por unión α -, en los que suele ser bastante mayor, y ello podría indicar la presencia de ambos tipos de unión.

El espectro de $^1\text{H-RMN}$ del producto se encuentra en la Figura 37. Además de la compleja zona de la resonancia de los protones H-2 —H-6, pueden distinguirse en el espectro tres señales que corresponden a carbonos anoméricos, ubicadas a δ 5,44, 5,01 y 4,74 ppm, con una relación aproximada de intensidades de 1:1:2, lo cual, sumado al peso molecular antes calculado podría indicar una estructura de tetrasacárido para la porción de azúcares del producto. Las asignaciones efectuadas a los protones anoméricos de di- y oligosacáridos de glucosa^{271,272} se encuentran en la Tabla 87.

La aparición de las tres señales en este caso, debiendo representar una de ellas a un hidrógeno de un carbono anomérico terminal (no glicosilado) parecería indicar que la señal a 5,44 ppm representa a una unidad de glucosa ligada α -(1→3) ó α -(1→4) o aún otras posibilidades, como una α -(1→2) con la unidad siguiente en configuración β , o un azúcar terminal reductor unido por la posición 2-.

La señal a 5,01 ppm debería indicar inequívocamente la presencia de una unión α -(1→6), mientras que la señal a 4,74 ppm puede indicar glucosa unida β -(1→3) fundamentalmente o bien β -(1→2) y/o terminal. Debe considerarse que dada la mutarrotación, el azúcar terminal debe estar como mezcla de anómeros, aunque se ha encontrado que suele privar el β por

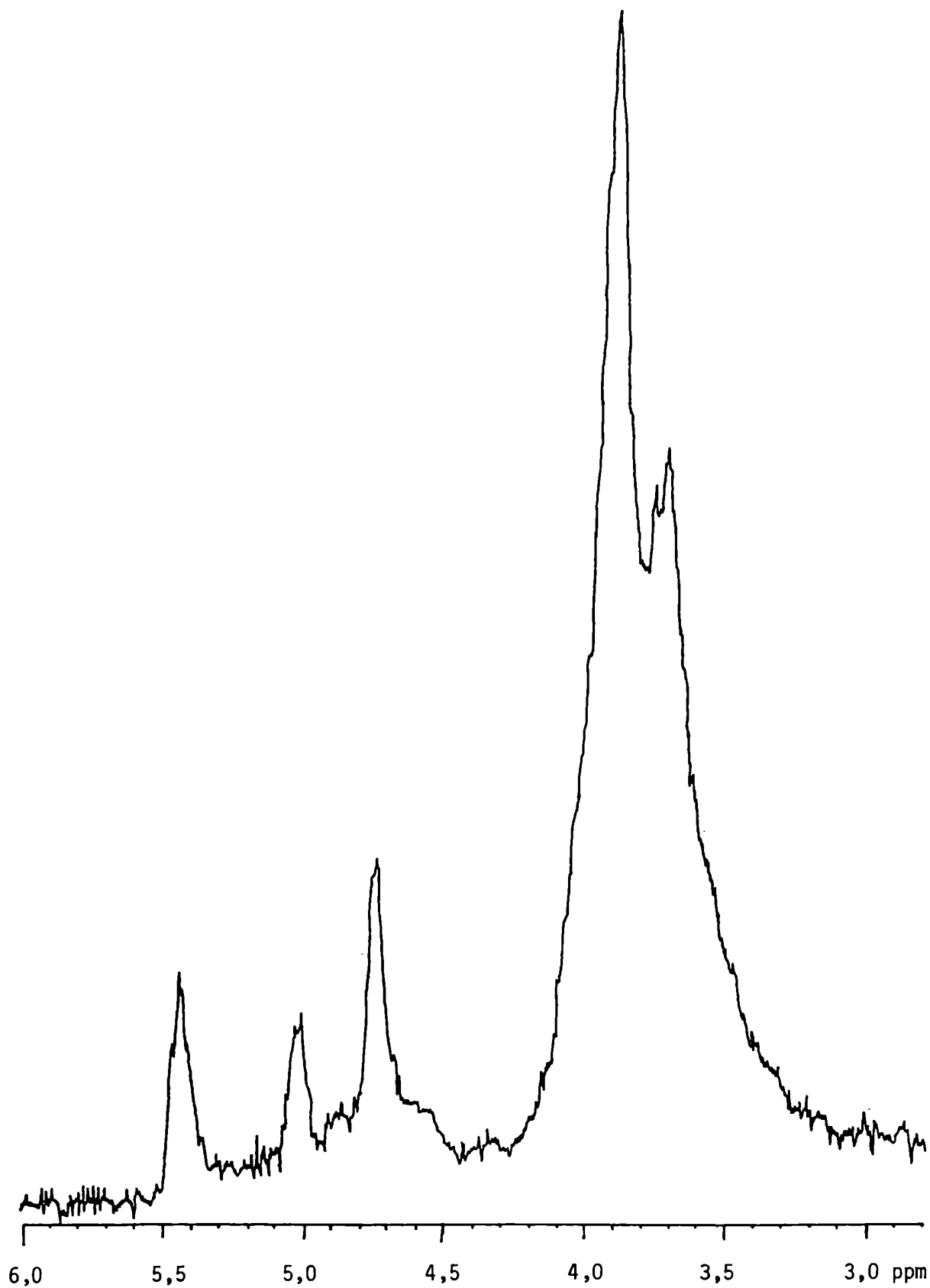


Figura 37. Espectro de ¹H-RMN (a 100 MHz, de 3,0-6,0 ppm) del producto RS-NER.
(con eliminación del pico del HOD).

TABLA 87. Desplazamientos químicos de los protones anoméricos correspondientes a di- y oligoglucósidos^{271,272}.

		CONFIGURACION DEL CARBONO ANOMERICO	
		α	β
Punto al que se une	(1→2) { sig. α^a	5,10-5,13 ppm	4,63-4,65 ppm
	{ sig. β^a	5,39-5,41 ppm	4,74-4,77 ppm
	(1→3)	5,36-5,38 ppm	4,74-4,75 ppm
	(1→4)	5,40-5,41 ppm	4,51-4,52 ppm
	(1→6)	4,98-4,99 ppm	4,50-4,56 ppm
Terminal reductor	Unido por 4- ó 6-	5,23-5,24 ppm _b ó 5,26-5,28 ppm _b	4,66-4,68 ppm
	Unido por 3-		4,69-4,71 ppm
	Unido por 2-	5,45-5,47 ppm	4,77-4,83 ppm

^aEl desplazamiento varía notoriamente si la unidad a la que está enlazado tiene configuración α ó β . ^b La asignación dependió de los autores (ref. 271 y 272).

por sobre el α ²⁷¹, por lo que la señal de éste último podría no verse, o ser un pequeño hombro que alcanza a observarse a δ 5,36 ppm.

El producto fue tratado con α -amilasa, que produce la ruptura de algunas uniones α -(1→4), pero resultó intacto por ese tratamiento lo que indica que el sustrato es inmune a esa acción amilolítica, bien por falta de esas uniones o por la existencia de otras vecinas que bloqueen su acción (como las α -(1→6)).

Queda entonces, como estructura más probable para este producto la de un tetrasacárido de glucosa, con uniones α -(1→3), α -(1→6) y β -(1→3) entre los monómeros, pudiendo ser en realidad 1→2 cualquiera de

las uniones asignadas como 1→3, si es que la unidad siguiente tiene su carbono anomérico con configuración β . La terminal reductora se encontraría fundamentalmente con configuración β , y estaría unida por la posición 2- ó 3-.

La alta viscosidad de la solución, debida posiblemente a la alta concentración utilizada y a la presencia de proteína produjo el ensanchamiento de las señales que impidió determinar las constantes de acoplamiento.

Fracción RS-NI

Podría suponerse que este producto es similar al anteriormente estudiado, con diferencia de peso molecular entre ambos. El espectro de ^1H -RMN del producto (Fig.38) es de más difícil interpretación debido a la imposibilidad de eliminación del pico de HOD del mismo. De cualquier modo, en la zona anomérica alcanzan a verse señales a 5,42, 5,02 y 4,75 ppm; pese a que la relación de intensidades no es la misma que la anteriormente encontrada, especialmente por la disminución de la señal que caracteriza uniones α -(1→6), el tipo de uniones es el mismo que el anteriormente encontrado, lo que permitiría sugerir algún "parentesco" estructural con el producto RS-NER. Se alcanzan a ver también dos picos anchos a δ 1,0 y 1,4 ppm, probablemente debidos a la porción proteica o lipídica del producto.

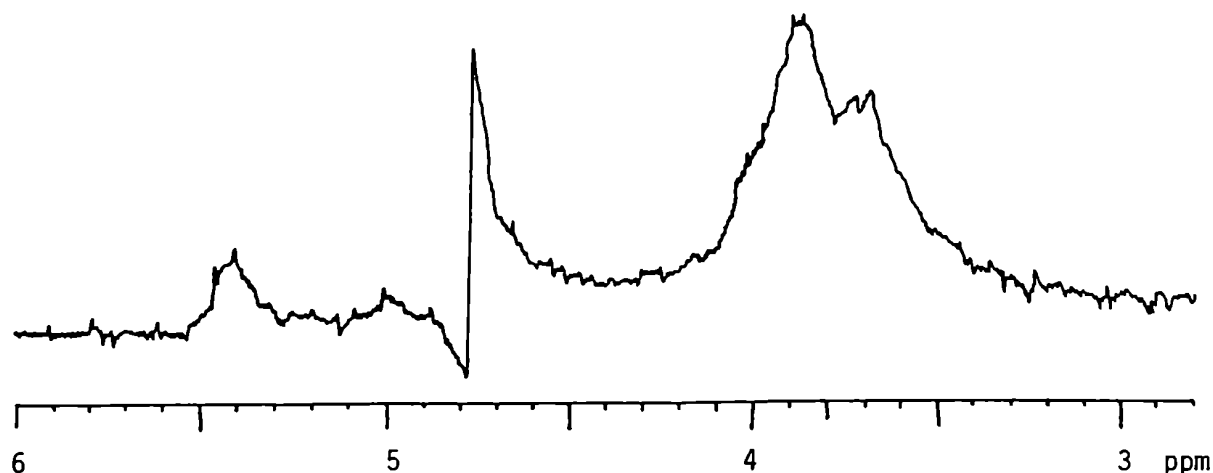


Figura 38. Espectro de ^1H -RMN a 100 MHz (3,0-6,0 ppm) de la fracción RS-NI

Capítulo VIII

PARTE EXPERIMENTAL

CONSIDERACIONES GENERALES

El secado final de los productos se efectuó en desecador a presión reducida, sobre cloruro de calcio, y en algunos casos sobre lentejas de hidróxido de sodio.

Las evaporaciones se realizaron a presión reducida en un evaporador rotatorio Büchi, y a temperaturas del baño por debajo de 45°.

Los productos se llevaron a sequedad por liofilización; éstas se efectuaron en un aparato Eliovac TD 2001, a presiones menores de 150 micrones de Hg, y temperaturas del condensador cercanas a los 40° bajo cero. Las muestras se dejaron en desecador de vacío una noche previamente a ser pesadas y/o manipuladas.

Las extracciones y los fraccionamientos se efectuaron a temperatura ambiente (salvo indicación en contrario) con agitación mecánica constante. Los productos precipitados se separaron por centrifugación y después de ser lavados (y cuando fue necesario, dializados) se concentraron y liofilizaron. El germicida utilizado en todos los casos fue la *m*-toluidina.

Las soluciones y suspensiones utilizadas para las determinaciones cuantitativas se mezclaron con un Rotamixer (Hook & Tucker Ins.,Ltd.).

Las diálisis se efectuaron a temperatura ambiente utilizando tubos de celulosa (Arthur H. Thomas Co., E.E.U.U.), anudados en ambos extremos, y la selección del diámetro del tubo dependió del volumen de solución a dializar. Las diálisis se llevaron a cabo una noche contra agua corriente, y luego contra agua destilada renovada cada 24 horas.

Los poderes rotatorios fueron determinados a temperatura ambiente en un polarímetro Perkin-Elmer 141 con una lámpara de sodio (589 nm), en un tubo de 1 dm, con un volumen interno de aprox. 1 ml; a menos que se indique lo contrario, la concentración utilizada fue de 0,3-0,5 % (p/v). En los casos en que fue necesario se dejó estabilizar la solución en la celda del polarímetro durante una noche.

Las muestras para microanálisis se secaron sobre pentóxido de fósforo.

Las determinaciones colorimétricas se realizaron con un espectrofotómetro Beckman DU, y la concentración se determinó por referencia a curvas patrón; se utilizaron celdas de cuarzo de 1 cm de longitud óptica ó 0,5 cm, dependiendo del volumen de solución disponible.

Los espectros de absorción en el infrarrojo fueron determinados con espectrofotómetros Perkin-Elmer 421, Perkin-Elmer 137B-Infracord o Perkin-Elmer 710B, utilizando películas de polisacárido obtenidas por concentración de soluciones acuosas del producto al 0,5 % a sequedad sobre una superficie de mercurio, o bien en forma de pastillas con bromuro de potasio.

Los espectros de masa fueron realizados con un espectrómetro de masa Varian MAT CH-7A a un potencial de ionización de 70 eV, mediante introducción directa, con distintas temperaturas de entrada, indicándose únicamente los espectros obtenidos en condiciones óptimas. La combinación cromatografía gas-líquido- espectrometría de masa se efectuó con el mismo espectrómetro combinado a un cromatógrafo Varian 1400, y adosado a un procesador de datos de la

misma marca, sistema MAT 166, con una terminal de video Tektronix 4010-1.

Los dosajes de proteína de los productos insolubles se llevaron a cabo por determinación de nitrógeno por el método de Dumas-Pregl²⁷³ y multiplicación de dicho contenido por el factor 6,25.

El contenido de metoxilo se determinó por el método de Belcher²⁷⁴. Tanto este análisis como el anterior se efectuaron en el laboratorio de Microanálisis del Departamento de Química Orgánica (UMYFOR-FCEyN).

CROMATOGRAFIA SOBRE GELES

Sephadex G-25

Los estudios de la composición de las mezclas de diferentes carragenanos autohidrolizados se efectuaron por cromatografía sobre geles de Sephadex G-25 (figuras 21, 24 y 28).

El gel se preparó por agregado del producto comercial (AB Pharmacia, Uppsala) seco a un exceso del solvente utilizado (solución de cloruro de sodio 0,5M); la suspensión se dejó "hinchar" durante tres horas a temperatura ambiente.

Una vez producida la hidratación, se llenó la columna (1,2 x 60 cm) con una suspensión diluída del gel. El volumen de exclusión se determinó por sembrado de una solución de Blue Dextran 2000 (2 mg/ 0,3 ml), recolección de fracciones y lectura de la absorbancia a 254 nm.

Sephadex G-100

El control de homogeneidad de los productos C, SD e ID (figura 17) y RS (página 278) se efectuó por cromatografía sobre geles de Sephadex G-100.

La preparación del gel se efectuó del modo antes indicado, con adecuación del tiempo y temperatura de hidratación al tipo de gel, y con la utilización de solución de urea 7M como solvente; la columna, de dimensiones similares, fue calibrada con dextranos de peso molecular conocido²⁷⁵.

En ambos casos se sembraron muestras de 3-5 mg de producto en 0,3 ml de solvente y se recogieron fracciones de 1 ml utilizando un colector automático con célula fotoeléctrica (Gilson).

CROMATOGRAFIA GAS-LIQUIDO

Las cromatografías gas-líquido se efectuaron en cromatógrafos Hewlett-Packard modelos 5830 y 5840 A, equipados con detector de ionización de llama, graficador e integrador automático.

Se consideró que la masa de cada producto era proporcional al área de cada pico.

Columnas y condiciones utilizadas

En todos los casos se utilizaron columnas de 180 cm de largo

y 2 mm de diámetro interno. La columna A era de vidrio, las correspondientes a B y C de acero inoxidable. El gas portador fue nitrógeno, con un flujo mantenido en 25-30 ml/min.

Los rellenos y las condiciones utilizadas fueron:

A: 3 % de ECNSS-M sobre Gas-Chrom Q (100-120 mesh), isotérmica a 180°C.

B: 0,2 % de poli(succinato de etilenglicol) (HIEFF-2BP); 0,2 % de poli(adipato de etilenglicol) (HIEFF-2AP) y 0,4 % de silicona XF-1150 sobre Gas-Chrom P, isotérmica a 170°C.

C: 3 % de OV-225 sobre Gas-Chrom Q (100-120 mesh) programada desde 150°C hasta 245°C, a una velocidad de 8°/minuto, y luego isotérmica a 245°.

D: igual columna que C, pero programada de 185°C a 245°C, a 4°/minuto y luego isotérmica a 245°.

E: igual columna que A, pero isotérmica a 190°C.

El detector y la cámara de inyección se mantuvieron a 210°C en los casos A, B y E, y a 260°C en C y D.

En las cromatografías gas-líquido acopladas a espectrómetro de masa se utilizó el relleno A, pero en una columna de 120 cm de largo, y se utilizó helio como gas portador.

DETERMINACION DE LOS AZUCARES COMPONENTES

Hidrólisis ácida total de los polisacáridos

Los polisacáridos (2 mg) se hidrolizaron por calentamiento con ácido trifluoroacético 2N (0,5 ml) durante 2 horas, a 121°, en tubo cerrado²⁰⁰. Luego se llevó a sequedad bajo corriente de nitrógeno (tras centrifugación si fuera necesario), se tomó el hidrolizado con agua y se llevó nuevamente a sequedad, repitiendo el procedimiento hasta eliminar totalmente el ácido (lo que se reconoce por el olor). La muestra se dejó en desecador de vacío una noche antes de ser derivatizada.

Preparación de los aldononitrilos peracetilados

La mezcla de azúcares se trató con 10 mg de clorhidrato de hidroxilamina y 1 ml de piridina anhidra en un tubo o vial cerrado, a 85°, durante 20-30 minutos. Luego se abrió el tubo, se dejó enfriar y se agregó 1 ml de anhídrido acético, manteniendo la mezcla de reacción 20-30 minutos más a 85°. La solución se dejó enfriar y extrajo en cloroformo/agua (1:1, 1 ml); la fase acuosa se separó y reextrajo con cloroformo. Los extractos clorofórmicos combinados se lavaron con solución saturada de bicarbonato de sodio, y con agua, y luego se secaron con sulfato de sodio. El extracto clorofórmico se evaporó a sequedad, y el residuo obtenido se disolvió en cloroformo (20 μ l) inmediatamente antes de inyectar en el cromatógrafo.

Cromatografía gas-líquido

La mezcla de aldononitrilos acetilados se cromatografió en el sistema E (página 293). El mismo permite una fácil resolución de los principales azúcares componentes de mezclas de hidrolizados de heteropolisacáridos, aunque también se han sugerido otros rellenos^{212,214,223}. Los tiempos de retención obtenidos (relativos al penta-0-acetilgalactononitrilo) se aprecian en la Tabla 88. Los valores allí registrados son promedio de por lo menos ocho determinaciones independientes, y son iguales a los de standards sintetizados a partir de azúcares comerciales del mismo modo.

TABLA 88. Tiempos de retención relativos^a de los aldononitrilos peracetilados derivados de algunas aldosas.

Nitrilo	T_r^a
Tetra-0-acetil- Ramnonitrilo	0,177 ± 0,006
Tetra-0-acetil- Arabonitrilo	0,313 ± 0,010
Tetra-0-acetil- Xilonitrilo	0,405 ± 0,007
Penta-0-acetil- Manonitrilo	0,690 ± 0,008
Penta-0-acetil- Gluconitrilo	0,901 ± 0,010
Penta-0-acetil- Galactonitrilo	1,000

^aRelativo al $t_{\text{penta-0-acetilgalactononitrilo}} = 36,67$ minutos.

DETERMINACION DE 3,6-ANHIDROGALACTOSA

Se llevó a cabo con el reactivo de resorcinol-ácido clorhídrico desarrollado por Yaphe²⁷⁶, posteriormente modificado por Yaphe y Arsenault²⁶¹.

Soluciones necesarias

Se preparó una solución madre de 1,1-dimetoxietano (acetal) pesando 700 mg del mismo y llevando a 100 ml con agua destilada. La solución de trabajo, de 0,28 mg por mililitro se preparó por disolución 1:25 con agua destilada. Esta solución es estable por un mes.

La solución de resorcinol se preparó disolviendo 15 mg de este producto en 10 ml de agua destilada. Esta solución, guardada en refrigerador, en frasco color caramelo, puede conservarse una semana.

El reactivo de resorcinol se preparó añadiendo 100 ml de ácido clorhídrico 12M (d.1,19, grado analítico) sobre 9 ml de la solución de resorcinol, y agregando a esta mezcla 1 ml de la solución de trabajo del acetal. Este reactivo es estable sólo durante tres horas.

Procedimiento

0,8 ml de una solución conteniendo entre 5 y 40 $\mu\text{g/ml}$ de 3,6-anhidrogalactosa o su equivalente en polisacárido, contenidos en

un tubo de ensayo, se pusieron en baño de hielo, y se agregaron 4 ml del reactivo de resorcinol. Se mezcló, se tapó con una bolita de vidrio y se mantuvo en el baño de hielo entre 3 y 30 minutos. Se puso en baño de agua a 20° durante 4 minutos, y luego se calentó a 80° durante 10 minutos. Se enfrió 1,5 minutos en baño de hielo y se midió la absorbancia del color desarrollado a 555 nm dentro de los primeros 15 minutos. Conviene llevar a cabo la reacción bajo luz difusa ya que el color disminuye por exposición a la luz solar. Paralelamente se efectuó un blanco con agua destilada. La cantidad de 3,6-anhidrogalactosa se determinó por referencia a curvas patrón y se expresó como porcentaje del componente anhidro (162-18).

Observaciones

Si bien el método es específico para la 3,6-anhidrogalactosa (o fructosa) da color en menor proporción con otros azúcares, como puede apreciarse en la Tabla 89.

Construcción de la curva patrón

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

TABLA 89. Especificidad del reactivo de resorcinol²⁶¹.

Azúcar	Relación de color ^a
Fructosa	100
3,6-anhidrogalactosa	92
Ribosa	5
Xilosa	4
Manosa	2,5
Glucosa	2
Galactosa	1
Ramnosa	1
Arabinosa	1
Fucosa	1

$$^a \text{Relación de color} = \frac{\text{Absorbancia de } 0,18 \text{ } \mu\text{moles de azúcar}}{\text{Absorbancia de } 0,18 \text{ } \mu\text{moles de fructosa}} \times 100.$$

DETERMINACION CUANTITATIVA DE LOS HIDRATOS DE CARBONO TOTALES

Se utilizó el método colorimétrico del fenol-ácido sulfúrico, de acuerdo a la técnica descrita por Smith y col.²⁷⁷.

Reactivos necesarios

Acido sulfúrico grado analítico 98 % (Merck).

Solución de fenol al 5 % en agua, obtenida por disolución de 50 g de fenol (bidestilado a presión reducida en corriente de nitrógeno) en 1 litro de agua. Esta solución es estable durante varios meses conservada a temperatura ambiente.

Procedimiento

A 0,5 ml de solución conteniendo hasta 70 μg azúcares/ ml se agregaron 0,5 ml de fenol y se mezcló. Con un dispensador se dejaron caer 2,5 ml de ácido sulfúrico concentrado directamente sobre la superficie de la solución a fin de asegurar un máximo calentamiento. Al cabo de 10 minutos los tubos se agitaron y mantuvieron 20 minutos más a temperatura ambiente; paralelamente se efectuó un blanco con agua destilada. Se midió la absorbancia del color desarrollado a 490 nm. La cantidad de azúcar se determinó por referencia a curvas patrón y se expresó como porcentaje de azúcar anhidro.

Determinación de galactosa en presencia de 3,6-anhidrogalactosa

Si el dosaje se efectúa en un polisacárido sin hidrolizar, la absorbancia medida es suma de las absorbancias de la 3,6-anhidrogalactosa y la galactosa presentes. La contribución del anhidroazúcar

puede determinarse conociendo la concentración del mismo (determinada por el método del resorcinol-ácido clorhídrico) e interpolando en la curva patrón del metil-3,6-anhidrogalactopiranosido; se determina entonces la absorbancia debida a la galactosa por diferencia, y se calcula su contenido a partir de la curva patrón correspondiente.

También puede determinarse la galactosa en un polisacárido hidrolizado, aprovechando la hidrólisis efectuada para la determinación de sulfato inorgánico; en este caso la 3,6-anhidrogalactosa es destruída y la galactosa puede determinarse directamente. Este último método no es recomendable para polisacáridos con gran proporción de 3,6-anhidrogalactosa.

Construcción de curvas patrón

A partir de soluciones madre de galactosa y metil-3,6-anhidrogalactopiranosido se efectuaron las diluciones correspondientes (hasta 70 μg azúcar/ ml) y se graficó la absorbancia en función de la concentración.

DETERMINACION DE SULFATO

La determinación del éster sulfato de los polisacáridos se efectuó tras hidrólisis de los mismos, por el método turbidimétrico de Dodgson^{278,279}.

Soluciones necesarias

El reactivo de cloruro de bario-gelatina debe prepararse cuidadosamente: se disolvieron 200 mg de gelatina (Oxoid, exenta de sulfatos) en 40 ml de agua a 60-70°, y la solución resultante se dejó en heladera durante por lo menos 6 horas. Luego se disolvieron 200 mg de cloruro de bario (grado analítico) en el fluido semigelatinoso y se dejó durante 2-3 horas más. El reactivo así preparado es estable durante una semana en la heladera.

La solución de ácido tricloroacético se preparó pesando 15 g del ácido y llevando a 500 ml con agua destilada. La solución resultante se guardó en la heladera.

Procedimiento

El polisacárido (0,5-2 mg) se disolvió en la cantidad necesaria de ácido clorhídrico 1N para obtener una solución con una concentración final de sulfato de 20-200 $\mu\text{g SO}_4$ / 0,2 ml. Un volumen exactamente medido de esta solución (aproximadamente 0,5 ml) se trasvasó a un tubo de ensayo chico, el cual se cerró a la llama y se mantuvo a 105-110° durante 4-5 horas.

Luego de enfriado, el contenido del tubo se mezcló antes de abrirlo, y 0,2 ml del mismo se adicionaron a 3,8 ml de la solución de ácido tricloroacético. Luego de mezclar se agregó 1 ml del reactivo de gelatina-cloruro de bario, se mezcló y se dejó a temperatura ambien-

te durante 15-20 minutos. Se midió la absorbancia de la solución a 360 nm contra un blanco obtenido en las mismas condiciones con 0,2 ml de HCl 1N. La medición debe hacerse en la primera hora, ya que luego el sulfato de bario tiende a precipitar.

La cantidad de sulfato se determinó por referencia a curvas patrón obtenidas en las mismas condiciones con soluciones de sulfato de sodio en ácido clorhídrico 1N.

Observaciones

Este dosaje no puede efectuarse en presencia de polisacáridos sulfatados sin hidrolizar, ya que estos dan complejos turbios con gelatina.

DETERMINACION DEL 6-SULFATO

Se llevó a cabo por el método de Rees⁵¹.

A una solución de 7 mg de polisacárido en 3,5 ml de agua se adicionaron 7 mg de borohidruro de sodio, y se dejó una noche a temperatura ambiente. Se agregaron entonces 1,75 ml de hidróxido de sodio 3N y 14 mg más de borohidruro de sodio. Se calentó en tubo cerrado a 80° y se extrajeron alícuotas a las 2 , 3 , 4 y 5 horas (según los datos de Matulewicz¹¹ se llega a constancia en el contenido de 3,6-anhidrogalactosa luego de 4 horas de calentamiento). A cada alícuota, convenientemente diluída se le determinó el contenido de

3,6-anhidrogalaactosa por el método del resorcinol-ácido clorhídrico²⁶¹, y se comparó con un control mantenido a temperatura ambiente (Tabla 90).

La diferencia en el contenido de 3,6-anhidrogalaactosa se adjudicó al 6-sulfato originalmente presente, y en base a ello se calculó:

$$\% \text{ 6-sulfato (como SO}_3\text{K)} = \frac{119}{144} \times (\% \text{ 3,6-ahg}_{\text{final}} - \% \text{ 3,6-ahg}_{\text{inic.}})$$

TABLA 90. Determinación del contenido de 6-sulfato en los carragenanos C, SD e ID.

Tiempo (h)	Porcentaje de 3,6-anhidrogalaactosa		
	C	SD	ID
0	3,5	5,2	0,7
2	11,9	11,0	5,2
3	11,6	12,0	9,3
4	12,3	11,6	10,7
5	12,4	12,0	10,9
Diferencia	8,9	6,8	10,2
6-sulfato	7,3	5,6	8,4

DOSAJE DE GRUPOS REDUCTORES

Se utilizaron: a) el método iodométrico de Somogyi^{280,281} que fue utilizado por Masson²³⁹ para la evaluación de pesos moleculares

en la degradación térmica de carragenanos, y b) el método de Nelson.

a) Método de Somogyi

Soluciones necesarias

El reactivo de Somogyi se preparó de la siguiente manera: 7,5 g de sal de La Rochelle (tartrato de sodio y potasio) y 7,5 g de carbonato de sodio anhidro se disolvieron en 50 ml de agua caliente. Se añadieron entonces 10 ml de solución de hidróxido de sodio 1N y luego, con agitación, 2 g de sulfato cúprico pentahidratado disueltos en agua (20 ml), y se llevó a ebullición para eliminar el aire. Paralelamente 45 g de sulfato de sodio anhidro se disolvieron en 120 ml de agua hirviendo. Ambas soluciones calientes se mezclaron, se agregaron 2 g de ioduro de potasio disueltos en un pequeño volumen de agua, y 1,5 ml de iodato de potasio 1N. Se dejó enfriar, y se llevó a 250 ml. Este reactivo es estable.

La solución de tiosulfato de sodio 0,005N se preparó a partir de una solución madre 0,1N por dilución y agregando además 2 ml de hidróxido de sodio 10% por cada litro de solución en el momento de diluir.

Solución de almidón al 1 %.

Procedimiento

1 ml de solución conteniendo hasta 300 μ g de galactosa o su equivalente en polisacárido y 1 ml del reactivo de Somogyi se

dejaron 15 minutos en un tubo tapado con una bolita de vidrio, en baño de agua hirviendo. El tubo se sacó del baño, se dejó enfriar y se agregaron 0,5 ml de ácido sulfúrico 2N con una pipeta de punta ancha. Se tituló con la solución de tiosulfato de sodio 0,005N, utilizando una bureta de 10 ml graduada a 0,05 ml. Cuando el color amarillo del iodo disminuyó notoriamente se agregaron 0,2 ml del reactivo de almidón al 1 % y se prosiguió la titulación hasta desaparición del color azul. Paralelamente se efectuó la misma titulación con un blanco de agua destilada tratado en las mismas condiciones.

Curva patrón y determinación del peso molecular

Se obtuvo una curva patrón con soluciones de galactosa (50-300 $\mu\text{g/ml}$) y se descontó al consumo del blanco el volumen utilizado en cada determinación (B-M), lo cual se graficó contra la correspondiente concentración de galactosa. Con ello se obtuvo una recta de cuya pendiente se tomó el equivalente de tiosulfato a galactosa. Con esos datos, para un polisacárido cuya concentración se conoce:

$$\overline{M}_n = \frac{180 \cdot c \cdot E}{(B - m)}$$

donde

\overline{M}_n : peso molecular promedio numérico del producto

180 : peso molecular de la galactosa

c : concentración del polímero en $\mu\text{g/ml}$

B : ml de tiosulfato 0,005N consumidos en el blanco

m : ml de tiosulfato 0,005N consumidos en la muestra

E : equivalente tiosulfato-galactosa (ml tiosulfato 0,005N que se consumen por cada μg de galactosa).

En los estudios de autohidrólisis el método se utilizó con alícuotas de la solución convenientemente diluídas (1 ml con pesos moleculares mayores de 2.000, 0,5 ml entre 1.200 y 2.000 y así sucesivamente). (Ver más adelante).

b) Método de Nelson

En el caso del carragenano autohidrolizado (Tabla 61 y 62), se utilizó para el dosaje una adaptación del método de Nelson²⁸².

Reactivos necesarios

Solución A: 1,2 g de tartrato de sodio y potasio y 2,4 g de carbonato de sodio anhidro se disolvieron en 25 ml de agua; con agitación se añadió una solución de 0,4 g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ en agua, y a continuación también se agregaron 1,6 g de bicarbonato de sodio. Una solución conteniendo 18 g de sulfato de sodio anhidro en 50 ml de agua se hirvió, y ambas soluciones se mezclaron y llevaron a 200 ml. Luego de una semana, se utilizó la solución sobrenadante clara.

Solución B: A 2,5 mg de molibdato de amonio en 45 ml de agua se añadieron 2,1 ml de ácido sulfúrico concentrado, seguidos de 0,3 g de arseniato de sodio e hidrógeno heptahidratado ($\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) disueltos en 3 ml de agua. La solución se mezcló y dejó 24 horas a 37° en botella color caramelo con tapa de vidrio.

Procedimiento

A 1 ml de solución, conteniendo hasta 150 μg de glucosa o su equivalente en polisacárido se agregó 1 ml de solución A, se calentó 10 minutos en un baño de agua hirviendo y se enfrió en hielo. Se agregaron 0,5 ml de solución B, mezclando hasta disolución total del óxido cuproso, se añadieron 2 ml de agua y se esperó por lo menos 15 minutos. Las absorbancias a 520 nm se midieron antes de los 40 minutos (la sensibilidad es máxima a 660 nm, no así la reproducibilidad). Paralelamente se efectuó un blanco con agua destilada. El contenido de azúcares reductores se determinó por referencia a curvas patrón obtenidas de la misma manera con soluciones de galactosa.

DETERMINACION CUANTITATIVA DE LAS PROTEINAS TOTALES

En el caso de los productos solubles, se llevó a cabo por el método descrito por Lowry y col.²⁸³.

Soluciones necesarias

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

Solución B: sulfato cúprico pentahidratado al 0,5 % en una solución de tartrato de sodio y potasio al 1 %.

Solución C: mezclar 50 ml de solución A con 1 ml de solución B; esta solución sólo es estable por 24 horas.

Solución D: reactivo de Folin-Ciocalteu (Merck o Sigma), diluido al medio inmediatamente antes de ser usado. La absorbancia de la solución resultante debe ser inferior a 0,040 medida contra un blanco

de agua destilada.

Procedimiento

A 0,4 ml de solución conteniendo hasta 0,5 mg de proteína por ml se agregaron 2 ml de solución C; se mezclaron y dejaron a temperatura ambiente por lo menos diez minutos. Se adicionaron rápidamente y con agitación 0,2 ml de solución D y se mezclaron dentro de los dos segundos, y al cabo de 30 minutos o más se midió la absorbancia a 600 nm, contra un blanco obtenido en las mismas condiciones con agua destilada. Esta longitud de onda resulta óptima ya que combina alto coeficiente de extinción con el cumplimiento de la ley de Beer. La cantidad de proteína se determinó por referencia a curvas patrón.

Construcción de la curva patrón

Se obtuvo graficando la absorbancia de soluciones conteniendo hasta 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de albúmina de suero bovino en agua versus la concentración de las mismas.

DETERMINACION DE LOS AMINOACIDOS COMPONENTES

Hidrólisis de las proteínas

El producto a analizar (conteniendo aproximadamente 0,5 mg de proteína) se hidrolizó con ácido clorhídrico 6N (10 ml) que conte-

nía fenol 1 % , por calentamiento en ampolla cerrada al vacío, durante 24 horas a 105°. El hidrolizado se enfrió, centrifugó y el ácido se eliminó por evaporación al vacío hasta casi sequedad, seguida de tres evaporaciones sucesivas de pequeños volúmenes de agua agregada, después de lo cual se dejó en desecador de vacío sobre hidróxido de sodio durante una noche. El hidrolizado se tomó con agua caliente, se centrifugó y llevó a sequedad, repitiendo el procedimiento dos veces más. Finalmente el hidrolizado, disuelto en 1 ml de agua se pasó por una pequeña columna de resina Amberlite IR-120 (H⁺); la columna se lavó con agua para eliminar aniones y material no iónico (azúcares). Los aminoácidos se eluyeron con amoníaco 4N utilizando ninhidrina para determinar el final de la elución. La solución se llevó a seco a presión reducida, seguida de evaporaciones sucesivas de pequeños volúmenes de metanol agregado.

Así se obtuvo la fracción con los aminoácidos que fue utilizada para el análisis que se detalla a continuación.

Dosaje con el analizador automático

La determinación de los aminoácidos estables en medio ácido se llevó a cabo con el método de Spackman y col.²⁸⁴ en un Technicon Sequential MultiSample Aminoacids Analyser TMS2 (Technicon Corporation).

De los datos obtenidos se calculó el porcentaje de cada aminoácido en base a:

$$\frac{\text{g aminoácido anhidro}}{100 \text{ g proteína}} \quad \frac{h_i a_i k_i M_i}{\sum h_i a_i k_i M_i} \times 100$$

, donde:

h_j : altura de cada pico (cm)

a_j : ancho de cada pico a la altura media (cm)

k_j : constante para cada aminoácido (nmol/cm^2)

M_j : peso molecular de cada aminoácido anhidro (PM-18)

DETERMINACION DEL CONTENIDO DE FOSFORO

Se utilizó el método espectrofotométrico de Bartlett²⁸⁵.

Reactivos necesarios

Peróxido de hidrógeno 30 %, exento de fósforo.

Acido sulfúrico grado analítico, 10N.

Solución de molibdato de amonio ($(\text{NH}_4)_6 \text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$), en agua, al 0,22 %.

Reactivo de Fiske y Subba Row: se preparó disolviendo 0,5 g de ácido 1-aminonaft-2-ol-4-sulfónico en 200 ml de solución de bisulfito de sodio 15 % recién preparada; luego se agregó 1 g de sulfito de sodio anhidro, se filtró la solución y se guardó en frasco color caramelo.

Procedimiento

En un tubo de ensayos se colocaron hasta 2 ml de solución de

la muestra, conteniendo menos de 5 μg de fósforo, y 0,5 ml de ácido sulfúrico 10N; ese tubo se dejó en estufa a 150-160° durante 3 horas y se añadieron (luego de enfriar) dos gotas de H_2O_2 30 %. Se volvió a dejar en la estufa 1,5 horas más, para destruir los residuos carbonosos formados; se dejó enfriar, se añadieron 4,6 ml de la solución de molibdato y 0,2 ml del reactivo de Fiske y Subba Row y se mezcló. Se calentó 7 minutos en baño de agua hirviendo; luego de 5 minutos el color alcanza su máximo y permanece estable; se puede determinar su absorbancia a 830 nm.

Construcción de la curva patrón

La cantidad de fósforo se estimó por referencia a curvas patrón, obtenidas para soluciones de diferente concentración de ortofosfato disódico ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$).

Esto se logró con diferentes volúmenes (0,4-2 ml) de una solución madre que contenía 2,5 μg P/ml, llevando las soluciones a 4,1 ml con agua destilada; se añadieron 0,5 ml de ácido sulfúrico 10N, 0,2 ml de solución de molibdato de amonio 5 % y 0,2 ml del reactivo de Fiske y Subba Row; después de calentar, se leyó la absorbancia del modo habitual.

OXIDACION CON PERIODATO

Se disolvieron 2 mg de muestra (C, ID y SD) en 1 ml de solución de metaperiodato de sodio 0,015M, y se dejó en ausencia de luz, a temperatura ambiente; se midió el consumo de periodato a distintos

tiempos hasta que se observó constancia en el consumo del oxidante y/o sobreoxidación.

Determinación del consumo de periodato

Se llevó a cabo por el método espectrofotométrico de Guthrie²⁸⁶. Se midieron las absorbancias a 223 nm de soluciones testigo de metaperiodato de sodio 0,015M y iodato de potasio 0,015M, diluídas 250 veces, y se hizo lo propio con alícuotas de la mezcla de oxidación, diluída también 250 veces. El consumo de periodato se determinó de acuerdo a:

$$\text{Periodato consumido (mM)} = 15 \cdot \left(1 - \frac{\text{Abs}_{\text{periodato}} - \text{Abs}_{\text{muestra}}}{\text{Abs}_{\text{periodato}} - \text{Abs}_{\text{iodato}}} \right)$$

Se graficaron los valores de consumo de periodato en función del tiempo de oxidación hasta constancia (Figuras 39, 40 y 41) y con ese dato se calcularon las unidades de monosacárido oxidadas por mol de periodato consumido, de acuerdo a:

$$\frac{\text{n}^\circ \text{ de unidades}}{\text{mol de IO}_4^-} = \frac{p \cdot 1000}{V \cdot I \cdot M}$$

, donde:

p = peso de la muestra (mg)

V = volumen de solución de muestra (ml)

I = periodato consumido (mM)

M = peso molecular de la unidad de monosacárido, calculado conociendo

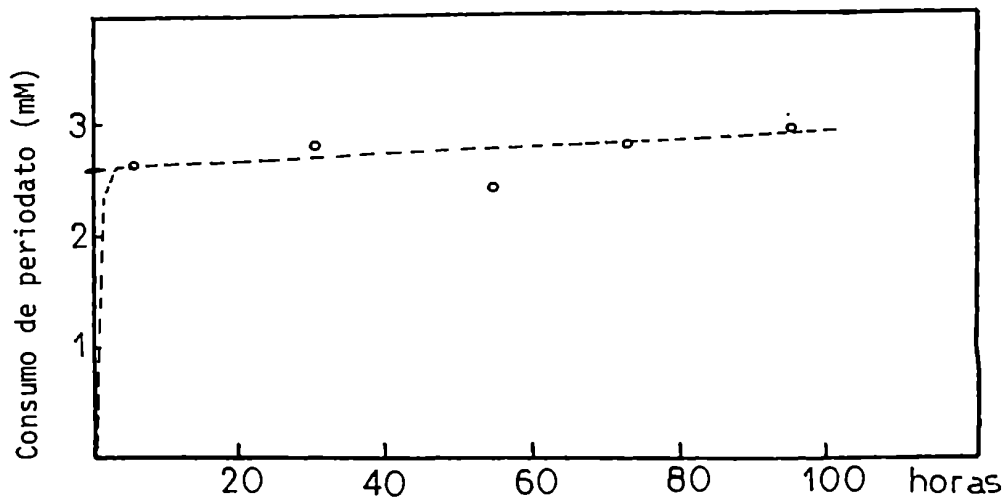


Figura 39. Determinación del consumo de periodato del carragenano C

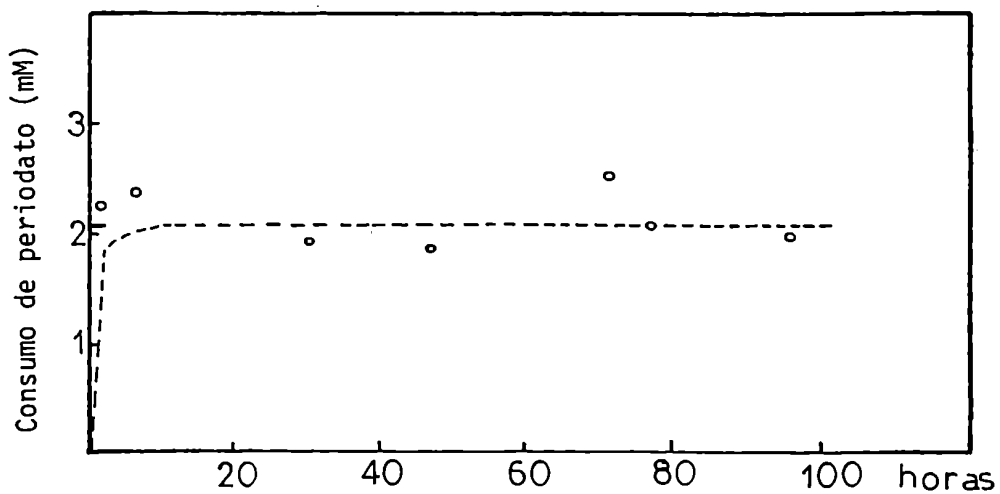


Figura 40. Determinación del consumo de periodato del carragenano ID

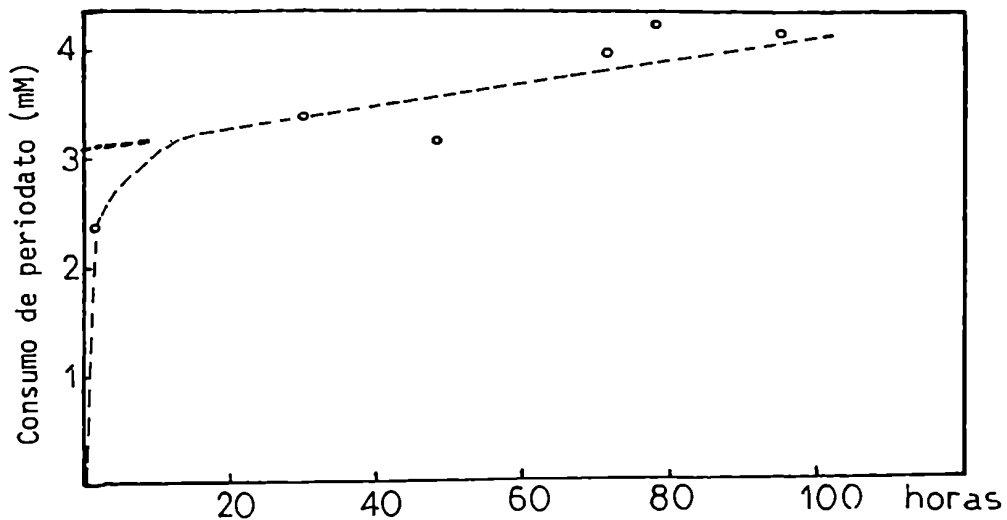


Figura 41. Determinación del consumo de periodato del carragenano SD

la composición del polisacárido y tomando los pesos moleculares de los monosacáridos en la cadena (162 para la galactosa y 144 para la 3,6-anhidrogalactosa) y del sulfato (119, SO_3K).

En el caso de las fracciones C, SD e ID (Tabla 42), esos M eran 342, 322 y 355 respectivamente.

VISCOSIMETRIA

Las viscosidades relativas se determinaron con un viscosímetro tipo Cannon-Fenske, midiendo el tiempo requerido (por la solución del producto y por el solvente) para pasar entre dos marcas.

Entonces:

$$\eta_{rel} = \frac{\eta_{solución}}{\eta_{solvente}} = \frac{t_{solución}}{t_{solvente}}$$

Para la determinación de viscosidades intrínsecas, se efectuó la determinación de la viscosidad relativa para soluciones de diferente concentración de polisacárido en cloruro de sodio 0,1M. En algunos casos (Tabla 93) se utilizó un viscosímetro de tipo Ubbelohde, que permite efectuar todas las determinaciones diluyendo la misma solución original, ya que la viscosidad relativa se hace independiente del volumen total de solución empleado.

Con las viscosidades relativas, se determinaron las viscosidades específicas ($\eta_{esp} = \eta_{rel} - 1$) y se obtuvo el valor de la visco-

sidad intrínseca por gráfica de η_{red} ($=\eta_{esp}/c$) en función de c (concentración, en g/100 ml), y extrapolando a dilución infinita ($c = 0$); la ordenada al origen da el valor de la viscosidad intrínseca $[\eta]$. Paralelamente se graficó $(\ln \eta_{rel})/c$ ($=\eta_{inh}$) en función de la concentración, y una nueva extrapolación a cero permitió obtener otro valor de la viscosidad intrínseca. Cuando el trabajo es cuidadosamente realizado, ambos valores deben ser aproximadamente iguales, y se toma como viscosidad intrínseca ($[\eta]$) al promedio de ambos (Tablas 91-94).

TABLA 91. Determinación de las viscosidades intrínsecas de los carragenanos C, SD e ID

Carragenano	concentración (g/dl)	tiempo (seg)	η_{rel}	η_{red} (dl/g)	η_{inh} (dl/g)
C	0,237	317,9	1,731	3,080	2,311
	0,148	262,9	1,432	2,910	2,419
	0,099	236,1	1,286	2,890	2,541
	-	183,6		↓ 2,73	↓ 2,71
SD	0,225	231,2	1,265	1,177	1,044
	0,141	210,7	1,153	1,086	1,010
	0,094	200,8	1,098	1,050	1,002
	-	182,8		↓ 0,96	↓ 0,97
ID	0,232	377,1	2,048	3,084	4,509
	0,145	289,3	1,571	3,111	3,933
	0,097	249,7	1,356	3,146	3,678
	-	184,1		↓ 3,19	↓ 3,17

TABLA 92. Determinación de las viscosidades intrínsecas de los productos fraccionados en forma analítica con DMSO (Tabla 40).

Producto	Concentración (g/dl)	Tiempo (seg)	η_{rel}	η_{red} (dl/g)	η_{inh} (dl/g)
Sol. DMSO	0,205	261,2	1,434	2,115	1,757
	0,128	228,9	1,256	2,001	1,781
	0,093	215,7	1,184	1,973	1,811
		183,2		↓ 1,84	↓ 1,84
Ins. DMSO	0,202	419,8	2,304	6,440	4,122
	0,127	303,0	1,653	5,237	4,018
	0,092	258,9	1,421	4,571	3,815
		183,9		↓ 3,30	↓ 3,59

TABLA 93. Determinación de las viscosidades intrínsecas del carragenano original y autohidrolizado a temperatura ambiente (Tabla 61).

Carragenano	Concentración (g/dl)	Tiempo (seg)	η_{rel}	η_{red} (dl/g)	η_{inh} (dl/g)
Original	0,2496	121,1	3,392	9,583	4,894
	0,1567	79,4	2,224	7,804	5,098
	0,0998	61,1	1,711	7,126	5,382
	0,0499	46,8	1,311	6,228	5,423
	-	35,7		↓ 5,54	↓ 5,57
Autohidroliz.	0,270	75,4	2,112	4,119	2,769
	0,189	60,3	1,689	3,646	2,773
	0,108	48,9	1,370	3,426	2,915
	0,054	42,0	1,176	3,268	3,002
	-	35,7		↓ 3,01	↓ 3,03

TABLA 94. Determinación de las viscosidades intrínsecas de los productos de la autohidrólisis a 50° (Tabla 62).

Tiempo de autohidrólisis (horas)	Concentración (g/dl)	Tiempo (seg)	η_{rel}	η_{red} (dl/g)	η_{inh} (dl/g)
0	0,0573	332,2	1,356	6,22	5,32
	0,0436	306,9	1,253	5,80	5,17
	0,0352	293,3	1,198	5,61	5,12
		244,9		↓ 4,63	↓ 4,70
0,5	0,0573	310,2	1,267	4,66	4,13
	0,0436	292,6	1,195	4,46	4,08
	0,0352	282,6	1,154	4,37	4,06
		244,9		↓ 3,88	↓ 3,94
1,5	0,0573	289,5	1,182	3,18	2,92
	0,0436	278,0	1,135	3,08	2,89
	0,0352	270,4	1,104	2,97	2,82
		244,9		↓ 2,57	↓ 2,63
3	0,0573	275,3	1,124	2,16	2,04
	0,0436	266,9	1,090	2,05	1,97
	0,0352	262,5	1,074	2,09	2,02
		244,9		↓ 1,69	↓ 1,73

CARACTERISTICAS DEL MATERIAL

Se utilizó el alga roja *Iridaea undulosa* Bory, recogida en invierno en Puerto Deseado, provincia de Santa Cruz. La recolección fue manual, y el secado, al aire libre, bajo fuertes vientos.

AISLAMIENTO DEL CARRAGENANO

El alga seca se pulverizó con un molino Wiley (malla 20); 53,2 g se extrajeron mediante agitación mecánica con 2600 ml de agua, durante 24 horas y a temperatura ambiente. El extracto se centrifugó, se separó el residuo (que se secó con etanol y luego con éter) y la solución acuosa se volcó lentamente y con agitación sobre 10 litros de isopropanol. El carragenano precipitó en forma de fibras, y se secó por intercambio de solventes (etanol y luego éter), y por último en desecador a presión reducida hasta constancia de peso. Se obtuvieron así 23,8 g (45 %) de carragenano, el que se purificó por redisolución en agua (1500 ml), centrifugación y reprecipitación con tres volúmenes de isopropanol, obteniéndose 18,3 g de carragenano purificado (34 %) y 1,6 g de un residuo insoluble en agua (7 % del carragenano a purificar).

FRACCIONAMIENTO: OBTENCION DE LA FRACCION SOLUBLE

Se utilizó para el fraccionamiento la técnica descrita por Matulewicz y Cerezo^{11,126}, pero se efectuó un sólo agregado de cloruro

de potasio para llevar a una concentración de 2M, ya que en nuestro caso resultaba de interés la fracción soluble a estas concentraciones. Para ello, 9,70 g de carragenano purificado se disolvieron en 4 litros de agua mediante agitación mecánica; se efectuaron entonces pequeños agregados de cloruro de potasio finamente molido, y la solución se agitó durante 30-60 minutos. Así se llevó hasta una concentración de 2M (298 g de sal) y se dejó reposar; se centrifugó, enfriando previamente la suspensión en baño de hielo. La porción soluble se recuperó por diálisis contra agua, concentración y liofilización, obteniéndose 1,77 g (18,2 %) del carragenano C. El gel centrifugado se redisolvió en agua, dializó y liofilizó, obteniéndose 6,03 g (62,2 %) de producto insoluble en cloruro de potasio 2M.

RESIDUO INSOLUBLE

Se analizaron varias tandas del residuo insoluble proveniente de la purificación del carragenano crudo, y dadas sus similares características analíticas se reunieron en uno solo (Cap. VII, pag.274).

Redisolución

561 mg de residuo insoluble RI se extrajeron, con agitación magnética con 56 ml de agua, a temperatura ambiente (27°), durante 8 horas. Se dejó reposar durante la noche, y se volvió a agitar dos horas más. Se centrifugó y el residuo (tras agregado de agua) y la solución se liofilizaron; se obtuvieron así 450 mg de residuo (80 %) y 99 mg de producto soluble (18 %, RS-1). El residuo (450 mg) se

volvió a extraer del mismo modo, con 45 ml de agua quedando 413 mg de insoluble (92 %) y 23 mg de soluble (5 %, RS-2). El primero de ellos volvió a tratarse con 42 ml de agua, obteniéndose 8,8 mg de soluble (2 %, RS-3) y 393 mg (95 %) de residuo, el cual se trató con 40 ml de agua, recuperándose finalmente 372 mg (95 %, RIF) de residuo y 8,4 mg (2 %, RS-4) de porción soluble. El producto RS-1 se cromatografió sobre DEAE Sephadex A-50 (5 mg en 4 ml de resina suspendida, obteniéndose por lectura de la absorbancia a 280 nm (directa sobre la solución) y 490 nm (por reacción previa con fenol-ácido sulfúrico) el diagrama que se observa en la Figura 36.

El fraccionamiento en forma preparativa se efectuó con 1,98 g de residuo insoluble original tratados del modo habitual con 200 ml de agua, obteniéndose 362,8 mg (18,4 %) de fracción soluble RS y 1,45 g (73,4 %) de residuo insoluble RIF.

Separación del producto neutro y el producto iónico

215 mg de la fracción solubilizada RS se disolvieron en 20 ml de agua, y se hicieron pasar a través de una columna que contenía aproximadamente 150 ml de resina DEAE Sephadex A-50 (Cl^-) equilibrada con agua. Se eluyó con agua hasta reacción negativa de fenol-ácido sulfúrico²⁷⁷, por concentración y liofilización se obtuvieron 114,5 mg (53 %) de un producto de color caramelo (RS-N).

El material de la columna, cuyo aspecto había cambiado notablemente ya que se había tornado opaco, se trató con cloruro de sodio 4M durante 72 horas y luego el contenido se pasó a un frasco Erlenmeyer

donde se dejó en baño de agua hirviendo durante 15 minutos. Se dejó decantar, se separó la solución, y el gel se volvió a calentar 15 minutos con solución salina fresca. Se juntaron todos los extractos, se dializaron, concentraron y liofilizaron, obteniéndose 79 mg (37 %) de producto iónico RS-I.

El producto no iónico se dializó en sistema cerrado: 5 ml de su solución contra 200 ml de agua destilada con agitación. El contenido del tubo y las aguas externas de diálisis se controlaron por la reacción de fenol-ácido sulfúrico²⁷⁷, comprobándose la presencia de 5 y 35 mg de hidratos de carbono, respectivamente (expresados como galactosa). Finalmente, por liofilización se aislaron ambos productos, obteniéndose 8,3 mg de no-dializable (7 %, RS-NI) (una vez centrifugada una pequeña proporción insoluble) y 99,0 mg de dializable (88 %, RS-NE).

Este último fue extraído con cloroformo/metanol de la forma habitualmente utilizada para la extracción de lípidos : 99 mg de muestra fueron tratados con 15 ml de una mezcla de cloroformo y metanol en relación 2:1 (v/v), 3 horas a temperatura ambiente, con agitación magnética. Se centrifugó, el insoluble se tomó con agua y se liofilizó : 27,7 mg (28 %, RS-NER). La solución orgánica se evaporó en corriente de nitrógeno y sobre un frasco previamente tarado. Una vez seco se dejó 2 horas en desecador de vacío, se pesó (62,3 mg, 63 %, RS-NEC) y se redisolvió en cloroformo, guardándose a -20°.

Acción de la α -amilasa sobre RS-NER

2 mg de producto RS-NER se disolvieron en 0,4 ml de buffer

de fosfato de potasio (0,1M, pH 7) que contenían 16 μg de α -amilasa bacteriana (Merck), y se incubó la solución a 25°, durante 48 horas, con agitación magnética, según la técnica informada por Albersheim y col.²⁸⁷.

Se tomaron alícuotas de la solución a tiempo cero y a las 48 horas, y se determinó el poder reductor de las mismas por el método de Somogyi^{280,281} (pag.304).

ACCION DEL DMSO SOBRE EL CARRAGENANO SOLUBLE

Intento de desulfatación

Se llevó a cabo por la técnica descrita por Matulewicz y Cerezo¹⁴⁹; se disolvió el carragenano soluble (265 mg) en 27 ml de agua, se agregaron 50 mg de borohidruro de sodio y se dejó a temperatura ambiente, una noche. La solución resultante se hizo pasar a través de una columna que contenía resina Dowex 50 (H^+), recogién dose sobre un frasco que contenía solución de piridina en agua al 20 %, y utilizando la reacción de fenol-ácido sulfúrico²⁷⁷ para determinar el final de la elución. La solución se dializó y liofilizó, obteniéndose 219 mg (83 %) de sal piridínica.

A este producto se adicionaron 28 ml de dimetilsulfóxido conteniendo 2 % de piridina, y se calentó a 100°. Se fueron tomando alícuotas de la solución a distintos tiempos, las que se dializaron y liofilizaron, efectuándose los correspondientes análisis de 3,6-anhidro galactosa, sulfato, viscosidad relativa y poder rotatorio (Tabla 39). La mezcla de reacción final se centrifugó, separándose un solu-

ble y un insoluble que se recuperaron por diálisis y posterior liofilización, en relación 6:4 aproximadamente (página 129).

Fraccionamiento de las sales de piridinio y potasio

A 100 mg de carragenano soluble (sal de piridinio) se añadieron 15 ml de DMSO y se dejó la suspensión en un "shaker" durante 24 horas. Se tomó una pequeña porción, se centrifugó y sobre 0,1 ml de soluble se efectuó una reacción de fenol-ácido sulfúrico²⁷⁷ comprobándose muy poca solubilización (menos del 10 % del valor final). Se dejó en estufa a 100° , y a intervalos regulares de tiempo se repitió el procedimiento; al cabo de 5 horas la reacción se detuvo y la mezcla resultante se centrifugó. Por diálisis y liofilización de la solución se obtuvieron 55,8 mg (56 %) de producto soluble en DMSO. El residuo fue disuelto en agua, se lo dializó y liofilizó (26,3 mg, 26 %). El rendimiento total del fraccionamiento fue del 81 %.

Cuando se trabajó con la sal de potasio (110 mg) se obtuvieron 48 mg de soluble y 19 mg de insoluble en DMSO, con un rendimiento total del 61 %.

Fraccionamiento definitivo

La fracción soluble en cloruro de potasio 2M (967 mg) se transformó en la correspondiente sal de piridinio por el procedimiento descrito anteriormente, obteniéndose 886 mg de dicha sal (80 % de rendimiento).

En un balón de dos bocas de 500 ml se colocaron 697 mg de

este producto y 105 ml de dimetilsulfóxido. En una boca se adaptó un agitador mecánico con cierre de Teflón. Con la otra boca tapada, se calentó a 100° y se fueron tomando alícuotas a intervalos de tiempo regulares. Cada alícuota se trató del modo antes indicado para determinar la proporción relativa de hidratos de carbono disueltos; cuando se llegó a los 60 minutos se detuvo la reacción. Ambos productos se aislaron de la forma habitual, obteniéndose 402 mg (57,7 %) de soluble en DMSO (SD) y 270 mg (38,8 %) de insoluble (ID).

El rendimiento total fue del 96 %, lo cual puede atribuirse al corto tiempo de solubilización.

DETERMINACION DE LAS CURVAS DE SOLUBILIDAD EN KCl POR TURBIDIMETRIA

Se llevó a cabo por el método de Matulewicz y Cerezo¹²⁵, con adaptación a menores cantidades de polisacárido: se preparó una solución conteniendo de 12 a 15 mg de polisacárido en 5 ml de agua, y ésta se centrifugó para eliminar material suspendido. Se midió la absorbancia a 450 nm; tras agregar una cantidad medida de cloruro de potasio y homogeneizar 10 segundos en un mixer, se mantuvo 15 minutos a temperatura ambiente y se volvió a homogeneizar en un mixer, midiéndose luego la absorbancia a 450 nm. Se repitió el procedimiento en etapas hasta llegar a una concentración de cloruro de potasio 1,8M. Por gráfica de Absorbancia vs. c_{KCl} y $dAbs/dc_{KCl}$ vs. c_{KCl} se determinó la curva de solubilidad del producto¹²⁵.

TRATAMIENTO ALCALINO

Se utilizó el método descrito por Rees y col.⁵⁵

106,6 mg de fracción soluble C se disolvieron en agua (53 ml) y se adicionaron 50 mg de borohidruro de sodio. Al cabo de 24 horas se agregó más borohidruro de sodio (90 mg) y 26,5 ml de solución de hidróxido de sodio 3M. En base a los antecedentes previos (dosaje de 6-sulfato) se calentó a 80° durante 5 horas. Luego la solución se dializó, concentró y liofilizó, obteniéndose 83,9 mg (92 %, considerando el sulfato eliminado) de producto tratado.

Este tratamiento se repitió de idéntico modo con 61,2 mg de cada una de las fracciones obtenidas por disolución diferencial en DMSO, obteniéndose 42,0 mg (91 %) del ID tratado (ID-T) y 39,3 mg (90 %) del SD tratado (SD-T).

Estos productos tratados se fraccionaron con cloruro de potasio por los procedimientos ya informados (página 318).

ESTUDIOS DE METILACION

Todos los carragenanos fueron metilados por el método de Haworth²²⁸.

1,0 g de carragenano (fracción soluble en KCl 2M) fue disuelto en agua (30 ml) en un balón de tres bocas, a temperatura ambiente, y se adicionaron 100 mg de borohidruro de sodio. Al cabo de 24 horas se agregaron 30 ml de hidróxido de sodio 60 %. Luego, se mantuvo agitación mecánica por la boca superior, y en las laterales, esmeriladas, se aditaron sendas ampollas desde las cuales se agregaron

simultáneamente y gota a gota 8 ml de sulfato de dimetilo y 20 ml de hidróxido de sodio al 30 % (las soluciones alcalinas se burbujearon con nitrógeno antes de ser utilizadas), con agitación violenta durante 2 horas, manteniendo el medio de reacción refrigerado con una mezcla hielo-agua-sal a -2° . Una vez terminado el agregado se mantuvo la agitación durante 7 horas, y luego se conservó el balón en el congelador hasta la mañana siguiente. De ese modo se efectuaron cuatro agregados más de ambos reactivos en las mismas condiciones, durante cinco días consecutivos. El polisacárido parcialmente metilado se recuperó por cuidadosa diálisis, concentración y liofilización (0,860 g, % metoxilo= 8,1).

Este producto se siguió remetilando del mismo modo hasta constancia en la composición de los monosacáridos obtenidos por hidrólisis, lo cual requirió cuatro secuencias de metilación más (cada una de las cuales comprendía cinco agregados). En la segunda secuencia se partió de 0,798 g del polisacárido parcialmente metilado previamente aislado, y se obtuvieron 0,518 g de un producto con 13,2 % de metoxilo. En la tercera, se utilizaron 0,464 g y se obtuvieron 0,452 g (metoxilo, 12,6 %). En la cuarta secuencia se metilaron 0,386 g y se obtuvieron 0,389 g con un contenido de metoxilo de 13,2 %. En la quinta y última, a partir de 0,297 g se obtuvieron 0,276 g del producto permetilado, con 15,2 % de metoxilo. En todos los casos se trabajó a -2° , y las cantidades de álcali y agente metilante se adecuaron en cada caso a la cantidad de polisacárido utilizada. En todos los casos las soluciones resultantes se dializaron y después centrifugaron, ya que presentaban copiosos precipitados; luego se determinó que esos insolubles estaban compuestos fundamentalmente por carbonato de calcio.

Las metilaciones de los otros productos fueron realizadas algunas técnicas experimentales distintas. Las de ambas subfracciones (SD e ID) se realizaron a 0°(agua/hielo) con agitación magnética, en balones de 25 ml tapados con tapones plásticos, los cuales se perforaron y atravesaron con jeringas plásticas, mediante las cuales se inyectaron, en 1 hora , ambos reactivos. Las adiciones efectuadas eran de 0,3 ml de sulfato de dimetilo y 0,75 ml de hidróxido de sodio al 30 %. Las cantidades obtenidas por cada secuencia de metilación (cuatro en total) se pueden observar en la Tabla 44.

Los productos tratados con álcali (SD-TI, SD-TS e ID-TS) fueron metilados del mismo modo, pero las cantidades empleadas fueron aún menores (~15 mg) y a temperatura ambiente:

HIDROLISIS DE LOS POLISACARIDOS METILADOS

El polisacárido resultante de cada etapa de metilación (1-5 mg) se disolvió en 0,5 ml de ácido fórmico 45 % (v/v) y la solución se calentó en un vial cerrado, a 100°, durante 16 horas. El ácido fórmico se eliminó por evaporación a presión reducida hasta casi sequedad, seguida de evaporaciones sucesivas de pequeños volúmenes de agua agregada, después de lo cual se tomó con agua (0,5 ml) y se agregaron gotas de solución de amoníaco diluído para neutralizar el ácido sulfúrico producido por la hidrólisis de los grupos sulfato.

Se llevó a sequedad, se guardó en desecador de vacío una noche y luego el hidrolizado se tomó con etanol (2 ml), se centrifugó, y la solución etanólica se dividió en dos partes iguales, las que se llevaron a sequedad por separado.

Derivatización como aldonitrilos acetilados parcialmente metilados

Uno de los extractos etanólicos, llevado a sequedad se dejó en desecador una noche y se trató del modo indicado para la obtención de los aldonitrilos peracetilados (página 294), aunque se tomaron precauciones especiales para evitar la evaporación de productos de alto grado de metilación. En el primer análisis los productos se sometieron a cromatografía gas-líquido en los sistemas A, B , C y D. En el análisis de rutina posterior se recurrió únicamente al sistema A. Los resultados obtenidos pueden apreciarse en el Capítulo VII, página 250.

Los distintos patrones de galactosa parcialmente metilada se trataron del mismo modo.

Derivatización como alditoles acetilados parcialmente metilados

Al otro extracto etanólico (una vez seco) se lo tomó con agua (0,5 ml) y se adicionó borohidruro de sodio (5 mg) y se dejó a temperatura ambiente durante una noche. A partir de allí se utilizaron dos procedimientos distintos;

a) Siguiendo la técnica de Albersheim y col.²⁰⁰ se destruyó el exceso de borohidruro con ácido acético glacial, gota a gota, hasta cese de efervescencia. Se llevó a seco a presión reducida, y el ácido bórico formado se eliminó por adición sucesiva de 0,5 ml de metanol (x 5 veces) y evaporación. La acetilación se efectuó en vial cerrado, por agregado de 0,5 ml de anhídrido acético, y calentamiento durante 3 horas a 121°, actuando el acetato de sodio formado como catalizador.

El anhídrido acético se eliminó por sucesivos agregados de tolueno, y evaporación a presión reducida. La muestra se extrajo con cloroformo/agua (1:1; 1,5 ml), se lavó la fase clorofórmica y se secó con sulfato de sodio anhidro. Una vez llevado a seco, y por agregado de cloroformo (aprox. 20 μ l) se tuvo la solución lista para la inyección cromatográfica.

b) Siguiendo el método clásico²⁰⁶, se agregaron a la solución unas gotas de ácido acético diluído y luego se descationizó por agregado de resina Dowex 50 (H^+). Se filtró y llevó a seco, y para eliminar el ácido bórico formado se adicionaron y evaporaron consecutivamente cinco agregados sucesivos de 0,5 ml de metanol. Tras llevar a sequedad se dejó en desecador una noche y luego se adicionaron 0,8 ml de una mezcla anhídrido acético/piridina 1:1 y se calentó durante 45 minutos a 100°. Cuando se enfrió se volcó sobre cloroformo/agua (1:1; 1,5 ml); la fase acuosa se re-extrajo con cloroformo, y los extractos orgánicos unidos se lavaron con agua, solución saturada de bicarbonato de sodio y nuevamente agua. Se secó con sulfato de sodio y se evaporó el cloroformo; por agregado de 20 μ l de cloroformo se tuvo la mezcla lista para la inyección.

Para la primera serie de metilaciones se utilizaron los sistemas cromatográficos A, B, C y D, pero el análisis de rutina se efectuó en el sistema A.

Las identificaciones en el sistema c.g.l.-e.m. se efectuaron con una columna del tipo A (ver página 293).

ESTUDIOS DE AUTOHIDROLISIS

Se realizaron experiencias con distintas fracciones. El método general, de autohidrólisis a 60° se inició por disolución de 300 mg de producto en 30 ml de agua. Luego, se hizo pasar la solución a través de una columna (2 x 15 cm) de resina Dowex 50 (H⁺), recogiendo el eluido en una probeta sumergida en un baño de hielo. Se lavó la columna con pequeñas porciones de agua destilada, hasta que en la probeta se completaron 100 ml de solución del carragenano en forma H⁺. La solución se transfirió a un Erlenmeyer, el cual se sumergió en un baño termostático a 60°. A partir del primer momento, y a intervalos de tiempo regulares se determinó la viscosidad relativa con una alícuota de 5 ml, que luego de terminada la medición se reintegró al frasco; con otra alícuota se determinó el peso molecular por dosaje de grupos reductores (página 306), y otra pequeña alícuota se adicionó sobre una punta de espátula de carbonato de calcio contenida en un tubo de ensayos. Esta última serie de tubos se fue guardando en congelador hasta que, completada la autohidrólisis, se agregó borohidruro de sodio a cada tubo, se dejó una noche a temperatura ambiente, y sobre la suspensión decantada se tomó una muestra sobre la que se determinó el porcentaje de 3,6-anhidrogalactosa por el método del resorcinol-ácido clorhídrico²⁶¹.

Una vez finalizada la autohidrólisis (por constancia de peso molecular o por toma de una muestra apta para RMN de ¹³C) se retiró la mezcla de reacción del baño y se agregaron 500 mg de carbonato de bario (exento de cloruros). Se dejó unas horas, con agitación ocasional y luego se centrifugó. La solución se filtró con ayuda de una placa filtrante para eliminar el resto de sales de bario insolubles (las que no contenían hidratos de carbono), y luego se hizo pasar la solución

a través de una columna conteniendo resina Dowex 50 (Na^+) para obtener los productos en forma de sal sódica. Finalmente se concentró y liofilizó, obteniéndose rendimientos entre el 60 y el 80 %.

ESPECTROSCOPIA DE RESONANCIA MAGNETICA NUCLEAR

Los espectros se efectuaron a temperatura ambiente en un equipo Varian XL-100 con computadora 620 L-100 que efectuó la correspondiente transformada de Fourier.

RMN- ^1H

Los espectros de los productos RS-NI y RS-NER se obtuvieron con soluciones de \sim 5 y 10 mg de los mismos, respectivamente, en 0,4 ml de agua deuterada. Previamente las muestras fueron disueltas en agua deuterada y liofilizadas, varias veces, a fin de intercambiar sus protones oxhidríflicos. Dada la variedad de protones existentes, se debieron acumular 300 pulsos en el primer caso y 200 en el segundo. A fin de eliminar el pico debido al HOD se efectuó la siguiente secuencia de pulsos: 180° - τ - 90° .

RMN de ^{13}C

Los espectros de los productos autohidrolizados se obtuvieron a 25,2 MHz, con soluciones de \sim 35 mg de los mismos en 0,4 ml de $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ 1:1, con un ancho espectral de 5000 Hz, ángulos de pulso de 90° , tiempos de repetición máximos (0,8 seg) y sin espera entre pulsos.

Los desplazamientos químicos indicados se refieren al tetrametil-

silano por relación a dioxano como patrón externo.

En todos los casos se efectuó desacople protónico total y se utilizó como frecuencia de cierre de campo la resonancia del deuterio.

El número de pulsos empleado fue el siguiente:

TIm, 271.000 ; TIm-R, 289.200 ; TIf, 95.100 ; TIf-R, 268.500 ; carragenano total autohidrolizado, 93.200 ; carragenano C autohidrolizado, 181.600 y carragenano SD autohidrolizado, 193.500.

Reducción de los productos TIm y TIf

La reducción de los residuos terminales de los productos TIm y TIf se llevó a cabo agregando a una solución acuosa de los mismos (40 mg en 1 ml de agua), 40 mg de borohidruro de sodio; se dejó toda la noche y luego se llevó con ácido colorhídrico diluído hasta pH 5. Se evaporó hasta casi sequedad y se agregó metanol varias veces para eliminar el ácido bórico formado; se llevó a sequedad y los productos obtenidos se analizaron por espectroscopía de resonancia magnética nuclear de ^{13}C .

RESUMEN

Los objetivos de este trabajo de Tesis fueron caracterizar a los carragenanos "solubles" del alga roja *Iridaea undulosa*, poniendo énfasis en los factores estructurales que promueven su solubilidad, y hallar métodos apropiados para profundizar este tipo de estudios.

Se desarrollaron los siguientes temas:

- 1) Una revisión taxonómica de las algas, incluyendo la presentación de los principales géneros, las formas de reproducción de las florídeas y la ubicación taxonómica de la *Iridaea undulosa* Bory.
- 2) Un resumen que abarca los trabajos químicos llevados a cabo sobre los carragenanos desde su descubrimiento hasta la actualidad; por separado se detallan los estudios efectuados sobre los carragenanos de *Iridaea undulosa*.
- 3) Una descripción del estado en que se halla la industria y el comercio de las algas y sus mucílagos (ágar, carragenanos, ácido alginico) en los distintos países productores; también se describen los usos de esos mucílagos y las perspectivas, con el desarrollo del cultivo (maricultura).
- 4) Una reseña histórica de los métodos utilizados para la desulfatación de polisacáridos y otros productos; se analizan las ventajas y desventajas de los distintos procedimientos.
- 5) La descripción de las aplicaciones de la espectroscopía de resonancia

magnética nuclear de ^{13}C para la elucidación estructural de carragenanos y un resumen de los estudios efectuados con compuestos más sencillos, como polisacáridos de estructura más simple, oligo- y monosacáridos y los derivados sulfatados de estos últimos.

6) Ya que el uso de alditoles acetilados como derivados volátiles en aplicaciones útiles en cromatografía gas-líquido y espectrometría de masa para la determinación de la identidad y cuantificación de monosacáridos es ampliamente conocido, se describe la utilidad de los aldononitrilos acetilados como derivados de azúcares con sus oxhidrilos libres y/o metilados; se enuncian también los principales caminos de fragmentación en la espectrometría de masa por impacto electrónico de los aldononitrilos di-, tri- y tetra-O-metilados.

7) La descripción y discusión de los resultados obtenidos en este trabajo de investigación, que pueden subdividirse en siete partes:

7.1.- El carragenano soluble (C) en cloruro de potasio 2M se aisló por precipitación en bloque de los productos insolubles a esa concentración de cloruro de potasio. Los datos analíticos indicaron la presencia de distintos tipos de sulfato.

El carragenano C se metiló por una secuencia de cinco metilaciones de Haworth; la evaluación de los resultados de metilación permitió determinar que paralelamente se produjo degradación parcial, ya que hubo pérdida de sulfato, destrucción de 3,6-anhidrogalactosa y ciclación alcalina de algunas unidades de galactosa sulfatadas en C-6. El análisis del curso de la metilación permitió evaluar también la reactividad de los distintos oxhidrilos frente a la metilación, comprobándose el orden $0-6 > 0-2 > 0-4 > 0-3$. Los resultados evidenciaron el predominio de

unidades monosulfatadas y no ramificadas en el carragenano C, entre las que se destacaban la indicada por 2,6-di-0-metil- (40,3 %) y 4,6-di-0-metilgalactosa (19,4 %), que sugieren que este carragenano está fundamentalmente compuesto por unidades de tipo μ - y λ -. Fue significativa también la determinación de 2,3,4-tri-0-metilxilosa sin haberse encontrado otros derivados metilados de este azúcar, y la presencia de diversos productos metilados que indicaron la existencia de unidades desconocidas hasta el momento.

7.2.- El carragenano soluble C se sometió a la acción del dimetilsulfóxido a fin de desulfatarlo; se comprobó que la pérdida de sulfato era escasa (20 %), pero que en la reacción se producía la separación de un producto que se solubilizaba en el DMSO y otro que permanecía insoluble en el mismo, y que el primero estaba enriquecido en 3,6-anhidrogalactosa; se investigó la acción del DMSO en diferentes condiciones, comprobándose que la separación sólo era efectiva con la sal de piridinio del producto, y que el tiempo de solubilización podía acortarse notoriamente.

Una vez efectuado el fraccionamiento preparativo se obtuvo un producto soluble (SD, rendimiento 57,7 %) y un insoluble (ID, 38,8 %). Los análisis indicaron que la fracción ID estaba prácticamente exenta de 3,6-anhidrogalactosa, mientras que la SD contenía 6,8 % de ese azúcar; pudo observarse también que el motivo del fraccionamiento fue fundamentalmente la diferencia en los pesos moleculares, sin que se haya comprobado desulfatación concomitante ni degradación apreciable.

Los carragenanos SD e ID fueron metilados (Haworth). Los resultados para el carragenano ID confirmaron lo que podía predecirse con los datos preliminares, es decir una estructura en la que predominan los azúcares que caracterizan a un λ -carragenano: 4,6-di-0-metilgalactosa (43,3 %) y 3-0-metilgalactosa (6,7 %), aunque también aparecen unidades

que indican la presencia de carragenano de tipo μ -, y azúcares que indican unidades "inusuales": uniones (1 \rightarrow 2), galactosa 2,6-disulfato enlazada por la posición 3-, residuos de xilopiranosos que actúan como ramificación, posiblemente unida a la cadena principal a través de la posición 6-.

En el carragenano SD metilado, en cambio, predomina la 2,6-di-O-metilgalactosa (41,1 %) que caracteriza a los μ -carragenanos, mientras que se encuentran proporciones importantes de 4,6-di-O-metilgalactosa (16,9 %) que caracteriza a λ -carragenanos; también se hallan las otras unidades inusuales antes determinadas.

7.3.- Por tratamiento alcalino del carragenano C, por cada 100 unidades se produjo un incremento de 23 unidades de 3,6-anhidrogalactosa, con la desaparición concomitante de 19 sulfatos. Por fraccionamiento con cloruro de potasio se observó la presencia de 33,0 % de material insoluble a 0,4M de KCl (C-TI) y 56,3 % de soluble en KCl 2M (C-TS), siendo mínima la proporción de fracciones intermedias; esto indicaba - y confirmaba nuestros resultados anteriores - la presencia de productos de tipo μ - y λ - en el carragenano C.

El tratamiento alcalino del carragenano ID y su posterior fraccionamiento con cloruro de potasio indicaron que sólo se producía una fracción principal, soluble en KCl 2M (ID-TS, 89,2 %), y escasa proporción de material insoluble, lo que estaba de acuerdo con el carácter λ del carragenano ID. En cambio, el tratamiento alcalino y fraccionamiento del carragenano SD dio por resultado la presencia de dos fracciones principales: insoluble en KCl 0,4M (50,9 %, SD-TI) y soluble en KCl 2M (42,8 %, SD-TS), lo que indicaba la gran proporción de material presente en el carragenano SD que no correspondía a un μ -carragenano.

Los carragenanos ID-TS, SD-TI y SD-TS fueron sometidos a metilación;

en SD-TI se comprobó la presencia fundamental de 2,6-di-O-metilgalactosa (50,7 %) que caracteriza una estructura de K- ó L-carragenano, con unidades inusuales y en los carragenanos ID-TS y SD-TS se destaca la presencia de 4,6-di-O-metilgalactosa, indicando que ambos - estructuralmente muy similares - provienen de un producto de tipo λ -, en el que los residuos inusuales comprenden importantes proporciones.

Se ha analizado la composición de los seis carragenanos estudiados, describiendo sus posibles estructuras, las características de las unidades que los forman, y fundamentalmente los factores estructurales que serían los promotores de su solubilidad.

7.4.- Se estudió la autohidrólisis del carragenano; en las primeras experiencias se demostró que a 60° se producía apreciable degradación con pérdida de sulfato del 15 %. Con los estudios realizados sobre los productos C, SD , ID antes obtenidos, y sobre el producto TTI, más rico en 3,6-anhidrogalactosa se demostró que por autohidrólisis a 60° pueden romperse selectivamente las uniones 3,6-anhidrogalactosídicas en una reacción que es de primer orden respecto de la concentración de esas uniones, y cuya vida media es de 7,8-8,7 horas; la pérdida de sulfato fue de aproximadamente 25 %.

7.5.- Los productos autohidrolizados se sometieron a espectroscopía de resonancia magnética nuclear de ^{13}C . Previamente se ampliaron los datos de literatura , calculando los efectos de los grupos sulfato sobre los desplazamientos de unidades tabuladas; por otra parte se desarrolló un programa de computadora que permitió agilizar las comparaciones y cotejar las similitudes de un dado espectro con diferentes productos característicos.

Se informaron los espectros de siete productos diferentes, anali-

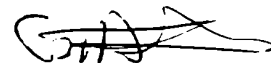
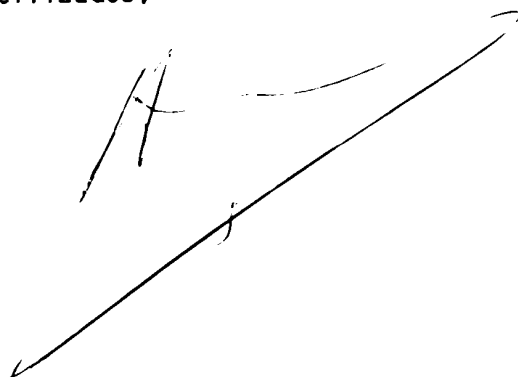
zando sus posibles asignaciones y los significados estructurales de las mismas; por otra parte se justificaron las asignaciones efectuadas en el espectro de la K-carrabiosa, y se discutieron las efectuadas a ciertos carragenanos insolubles naturales antes y después del tratamiento alcalino.

7.6.- Como aporte a la determinación de la estructura de carragenanos y otros galactanos se ha estudiado la separación e identificación de los O-acetil-O-metilgalactononitrilos por cromatografía gas-líquido y espectrometría de masa. Se informaron los tiempos de retención de los distintos azúcares y su posibles relación con factores conformacionales; por otra parte se informaron los picos principales en los espectros de masa de los acetatos de los galactononitrilos parcialmente metilados; los de los di-, tri- y tetrametiléteres concuerdan con los registrados para derivados de otras hexosas. Se estudiaron las rupturas para los monometil derivados, hasta ahora no analizados y se describieron los caminos principales de fragmentación. Se encontró un camino que es específico para algunos aldononitrilos (derivados de galactosa, 6-O-metilgalactosa y 2,6-di-O-metilgalactosa) que presenta la pérdida de fragmentos neutros (ácido acético y cetena) a partir del ion molecular.

7.7.- Se estudió un residuo proveniente de la purificación del carragenano crudo que era insoluble en agua; se efectuaron análisis de diferentes fracciones del mismo y las características fueron similares. El residuo (RI) se extrajo exhaustivamente con agua, comprobándose que un 18 % se solubilizaba en el primer intento (RS). Esta fracción, rica en proteína, y que por hidrólisis mostraba la presencia de glucosa, galactosa y sulfato, se fraccionó con la ayuda de resina Sephadex DEAE A-50, con lo que se obtuvo, por elución con agua un producto no iónico (RS-N, 53 %), y

por elución con NaCl 4M, en caliente, uno iónico (RS-I, 37 %). El segundo tiene las características de un carragenano, y al primero se lo dializó en sistema cerrado obteniéndose un dializable (RS-NE, 88 %) y un no-dializable (RS-NI, 7 %); éste último estaba enriquecido en hidratos de carbono y en ambos el producto principal por hidrólisis era la glucosa. El producto RS-NE se sometió a extracción con cloroformo/metanol, quedando un 28 % de residuo (RS-NER) y un 63 % de soluble (RS-NEC). Se presentan algunos análisis preliminares de las fracciones.

8) La descripción de las técnicas experimentales y los materiales utilizados.



BIBLIOGRAFIA

1. Smith, G.M.; "Cryptogamic Botany, Algae and Fungi, vol.1", McGraw-Hill Book Co.Inc., New York (1955).
2. Chapman, V.J.; "The algae", Macmillan & Co.Ltd., London (1964).
3. Silva, P.C.; "Taxonomic classification of algae", CRC Handbook of Biosolar Resources, Ed.O.R.Saborsky, pp.523-564 (1982).
4. Font Quer, P.; "Botánica Pintoresca", Ed.R.Sopena, Barcelona (1964).
5. Kylin, H.; "Die Gattungen der Rhodophyceen", CWK Gleerups Forlang,Lund (1956).
6. Kylin, H.; *Lunds Univ.Arsskr.N:F.Avd2*, 28(8), 1 (1932).
7. Bory de Saint-Vincent, J.B.; *Iridaea Dict.Class.Hist.Nat.* , 9, 15(1826),cf.8-10.
8. Levring, T.; *Lunds Univ.Arsskr.N.F.Avd.2*, 56(10), 1 (1960).
9. Kim, D.H.; *Nova Hedwigia* , 27(1+2), 1 (1976).
10. Etcheverry, H., Collantes, G. y Ríos, V.; *Proc.Int.Seaweed Symp.* , 10, 163(1981).
11. Matulewicz, M.C.; "Estudios sobre el sistema de carragenanos del alga roja *Iridaea undulosa* Bory", Tesis Doctoral, FCEyN-UBA (1978).
12. Schmidt, C.; *Ann.*, 51, 29 (1844).
13. Flückiger, F.A. y Obermaier, L.; *Neues Repertorium Pharm.* , 380 (1868),cf. 11.
14. Bente, F.; *Ber.*, 8, 416 (1875).
15. Bente, F.; *Ber.* , 9, 1157 (1876).
16. Haedicke, J. , Bauer, R.W. y Tollens, B.; *Ann.* , 238, 302 (1887).
17. Sebor, J.; *Oesterr.Chem.Z.* , 3, 441 (1900).
18. Haas, P.; *Biochem.J.* , 15, 479 (1921).
19. Rusell-Wells, B.; *Biochem.J.* , 16, 578 (1922).
20. Haas, P. y Rusell-Wells, B.; *Biochem.J.* , 23, 425 (1929).
21. Butler, M.R.; *Biochem.J.* , 28, 759 (1934).
22. Buchanan, J. , Percival, E.E. y Percival, E.G.V.; *J.Chem.Soc.* , 51 (1943).
23. Johnston, R. y Percival, E.G.V.; *J.Chem.Soc.* , 1994 (1950).

24. Dillon, T. y O'Colla, P.; *Proc.Royal Irish Acad.* , 54B, 51 (1951).
25. Tseng, C.K.; *Science* , 101, 597 (1945).
26. Newton, L.; *Endeavour* , 4, 69 (1945).
27. Dewar, T.E. y Percival, E.G.V.; *J:Chem.Soc.* , 1622 (1947).
28. Mori, T.; *Advan.Carbohyd.Chem.* , 8, 316 (1953).
29. Hassid, W.Z.; *J.Am.Chem.Soc.* , 55, 4163 (1933).
30. Hassid, W.Z.; *J.Am.Chem.Soc.* , 57, 2046 (1935).
31. Smith, D.B. y Cook, W.H.; *Arch.Biochem.Biophys.* , 45, 232 (1953).
32. Rose, R.C.; *Can.J.Research F*, 28, 202 (1950).
33. Cook, W.H., Rose, R.C. y Colvin, J.R.; *Biochim.Biophys.Acta*, 8, 595 (1952).
34. Smith, D.B., Cook, W.H. y Neal, J.L.; *Arch.Biochem.Biophys.* , 53, 192 (1954).
35. Percival, E.E.; *Chem.& Ind.* , 1487 (1954).
36. O'Neill, A.N.; *J.Am.Chem.Soc.* , 77, 2837 (1955).
37. O'Neill, A.N.; *J.Am.Chem.Soc.* , 77, 6324 (1955).
38. Bayley, S.T.; *Biochim.Biophys.Acta* , 17, 194 (1955).
39. Morgan, K. y O'Neill, A.N.; *Can.J.Chem.*, 37, 1201 (1959).
40. Clingman, A.L. y Nunn, J.R.; *J.Chem.Soc.*, 493 (1959).
41. Painter, T.J.; *Can.J.Chem.* , 38, 112 (1960).
42. Lloyd, A.G., Tudball, N. y Dodgson, K.S.; *Biochim.Biophys.Acta*, 52, 413 (1961).
43. Lloyd, A.G. y Dodgson, K.S.; *Biochim.Biophys. Acta* , 46, 116 (1961).
44. Lloyd, A.G., Dodgson, K.S., Price, R.G. y Rose, F.A., *Biochim.Biophys. Acta* , 46, 108 (1961).
45. Turvey, J.R. y Williams, T.P.; *J.Chem.Soc.* , 2119 (1962).
46. Pernas, J.A., Smidsrød, O., Larsen, B. y Haug, A.; *Acta Chem.Scand.* , 21, 98 (1967).
47. Cerezo, A.S.; *J.Chem.Soc.(C)*, 992 (1967).
48. Cerezo, A.S.; *J.Chem.Soc.(C)*, 2491 (1967).
49. Smidsrød, O., Larsen, B., Pernas, A.J. y Haug, A.; *Acta Chem.Scand.* , 21, 2585 (1967).

50. Rees, D.A.; *J.Chem.Soc.* , 1821 (1963).
51. Rees, D.A.; *J.Chem.Soc.* , 5168 (1961).
52. Dolan, T.C.S. y Rees, D.A.; *J.Chem.Soc.* , 3534 (1965).
53. Anderson, N.S. y Rees, D.A.; *Proc.Int.Seaweed Symp.* , 5, 243 (1966).
54. Lawson, C.J. y Rees, D.A.; *J.Chem.Soc.(C)* , 1301 (1968).
55. Anderson, N.S., Dolan, T.C.S., Lawson, C.J., Penman, A. y Rees, D.A., *Carbohydr.Res.* , 7, 468 (1968).
56. Anderson, N.S., Dolan, T.C.S. y Rees, D.A.; *J.Chem.Soc.Perkin I* , 2173 (1973).
57. Stancioff, D.J. y Stanley, N.F.; *Proc.Int.Seaweed Symp* , 6, 595 (1969).
58. Penman, A. y Rees, D.A.; *J.Chem.Soc.Perkin I* , 2182 (1973).
59. Anderson, N.S., Dolan, T.C.S. y Rees, D.A.; *J.Chem.Soc.(C)* , 596 (1968).
60. Weigl, J., Turvey, J.R. y Yaphe, W.; *Proc.Int.Seaweed Symp.* , 6, 392 (1969).
61. Penman, A. y Rees, D.A.; *J.Chem.Soc.Perkin I* , 2191 (1973).
62. Kochetkov, N.K., Usov, A.I. y Miroshnikova, L.I.; *Zh.Obshch.Khim.* , 37, 792 (1967); *cf.Chem.Abs.* 67, 108885.
63. Kochetkov, N.K., Usov, A.I. y Miroshnikova, L.I.; *Zh.Obshch.Khim.* , 40, 2469 (1970); *cf.Chem.Abs.* 75, 58759.
64. Kochetkov, N.K., Usov, A.I. y Miroshnikova, L.I.; *Zh.Obshch.Khim.* , 40, 2473 (1970), *cf.Chem.Abs.* 75, 58761.
65. Usov, A.I., Miroshnikova, L.I. y Kochetkov, N.K.; *Zh.Obshch.Khim.* , 42, 1623 (1972), *cf.Chem.Abs.* 77, 111553.
66. Kochetkov, N.K., Usov, A.I. y Miroshnikova, L.I.; *Zh.Obshch.Khim.* , 42, 2309 (1972), *cf.Chem.Abs.* 78, 72478.
67. Kochetkov, N.K., Usov, A.I., Miroshnikova, L.I. y Chizhov, O.S., *Zh.Obshch.Khim.* , 43, 1832 (1973), *cf.Chem.Abs.* 79, 137416.
68. Usov, A.I., Miroshnikova, L.I. y Kochetkov, N.K.; *Zh.Obshch.Khim.* , 42, 945 (1972).
69. Usov, A.I. y Kochetkov, N.K.; *Zh.Obshch.Khim.* , 38, 234 (1968), *cf.Chem.Abs.* 69, 19446.
70. Usov, A.I. y Kozlova, E.G.; *Bioorg.Khim.* , 1, 912 (1975).

71. Usov, A.I., Miroshnikova, L.I. y Barbakadze, V.V.; *Zh.Obshch.Khim.*, 45, 1618 (1975), *cf.Chem.Abs.*, 83, 160749.
72. Barbakadze, V.V. y Usov, A.I.; *Bioorg.Khim.*, 4, 1100 (1978).
73. Usov, A.I. y Barbakadze, V.V.; *Bioorg.Khim.*, 4, 1107 (1978).
74. Usov, A.I., Barbakadze, V.V., Yarotskii, S.V. y Shashkov, A.S., *Bioorg.Khim.*, 4, 1507 (1978).
75. Usov, A.I., Lotov, R.A. y Kochetkov, N.K.; *Zh.Obshch.Khim.*, 41, 1154 (1971), *cf. Chem.Abs.* 75, 72782.
76. Usov, A.I. e Ivanova, E.G.; *Bioorg.Khim.*, 1, 665 (1975), *cf.Chem.Abs.*, 84,5271.
77. Usov, A.I., Rekhter, M.A. y Kochetkov, N.K.; *Zh.Obshch.Khim.*, 39, 905 (1969).
78. Usov, A.I., Rekhter, M.A. y Kochetkov, N.K.; *Zh.Obshch.Khim.*, 40, 2732 (1970), *cf.Chem.Abs.* 75, 1289.
79. Kochetkov, N.K., Usov, A.I. y Rekhter, M.A.; *Zh.Obshch.Khim.*, 41, 1160 (1971), *cf.Chem.Abs.* 75, 77212.
80. Usov, A.I.; *Zh.Obshch.Khim.*, 44, 191 (1974), *cf. Chem.Abs.* 81, 35548.
81. Yarotskii, S.V., Shashkov, A.S. y Usov, A.I.; *Bioorg.Khim.*, 3, 1135 (1977).
82. Yarotskii, S.V., Shashkov, A.S. y Usov, A.I.; *Bioorg.Khim.*, 4, 745 (1978).
83. Usov, A.I., Yarotsky, S.V. y Shashkov, A.S.; *Biopolymers*, 19, 977 (1980).
84. Nunn, J.R. y Parolis, H.; *Carbohydr.Res.*, 6, 1 (1968).
85. Nunn, J.R. y Parolis, H.; *Carbohydr.Res.*, 8, 361 (1968).
86. Nunn, J.R. y Parolis, H.; *Carbohydr.Res.*, 9, 265 (1969).
87. Nunn, J.R. y Parolis, H.; *Carbohydr.Res.*, 14, 145 (1970).
88. Allsobrook, A.J.R., Nunn, J.R. y Parolis, H.; *Carbohydr.Res.*, 16, 71 (1971).
89. Allsobrook, A.J.R., Nunn, J.R. y Parolis, H.; *Carbohydr.Res.*, 36, 139 (1974).
90. Allsobrook, A.J.R., Nunn, J.R. y Parolis, H.; *Carbohydr.Res.*, 40, 337 (1975).
91. Farrant, A.J., Nunn, J.R. y Parolis, H.; *Carbohydr.Res.*, 19, 161 (1971).
92. Farrant, A.J., Nunn, J.R. y Parolis, H.; *Carbohydr.Res.*, 25, 283 (1972).
93. Matsuhiro, B. y Zanlungo, A.B.; *Rev.Latinoam.Quim.*, 7, 119 (1976).

94. Santos, G.A. y Doty, M.S.; *J.Pharm.Sci.* , 64, 1704 (1975), cf. *Chem.Abs.* 83, 191586.
95. Doty, M.S. y Santos, G.A.; *Aquat.Bot.* , 4, 143 (1978), cf. *Chem.Abs.* 88, 166737.
96. Santos, G.A. y Doty, M.S.; *Proc.Int.Seaweed Symp.* , 9, 361 (1977), cf. *Chem.Abs.* 90, 200342.
97. Mshigeni, K.E. y Semesi, A.K.; *Bot.Mar.* , 20, 233 (1977), cf. *Chem.Ab.* 87, 114590.
98. Mshigeni, K.E. y Semesi, A.K.; *Bot.Mar.* , 20, 239 (1977), cf. *Chem.Ab.* 87, 114591.
99. Semesi, A.K. y Mshigeni, K.E.; *Mar.Biol.* (Berlin), 42, 165 (1977), cf. *Chem.Abs.* 87, 129186.
100. Semesi, A.K. y Mshigeni, K.E.; *Bot.Mar.* , 20, 271 (1977), cf. *Chem.Ab.* 87, 148708.
101. Mshigeni, K.E. y Nzalelila, E.V.; *Bot.Mar.* , 20, 443 (1977), cf. *Chem.Abs.* 88, 19054.
102. Garay, L.O., Fuertes, C. y Ching Puente, O.A.; *Bol.Soc.Quím.Perú* , 42, 57 (1976).
103. Ching Puente, O.A., Fuertes, C., Cirilo, R., Castro, M.E. y Acleto, C.; *Bol.Soc.Quím.Perú* , 43, 168 (1977).
104. Pickmere, S.E., Parsons, M.J. y Bailey, R.W.; *Phytochemistry* , 12, 2441 (1973).
105. Pickmere, S.E., Parsons, M.J. y Bailey, R.W.; *N.Z.J.Sci.* , 18, 585 (1975).
106. Parsons, M.J., Pickmere, S.E. y Bailey, R.W.; *N.Z.J.Bot.* , 15, 589 (1977).
107. Di Ninno, V., Mc Candless, E.L. y Bell, R.A.; *Carbohydr.Res.* , 71, C1 (1979).
108. Black, W.A.P., Blakemore, W.R., Colquhoun, J.A. y Dewar, E.T.; *J.Sci.Fd. Agric.* , 16, 573 (1965).
109. Fuller, S.W. y Mathieson, A.C.; *J.Exp.Mar.Biol.Ecol.* , 10, 49 (1972), cf. *Chem.Abs.* 78, 94842.
110. Mc Candless, E.L. y Craigie, J.S.; *Bot.Mar.* , 17, 125 (1974).
111. Chen, L.C.M., Mc Lachlan, J., Neish, A.C. y Shacklock, P.F.; *J.Mar.Biol. Ass. U.K.* , 53, 11 (1973), cf. *Chem.Abs.* 78, 133398.
112. Mc Candless, E.L., Craigie, J.S. y Walter, J.A.; *Planta* , 112, 201 (1973).
113. Waaland, J.R.; *Phytochemistry* , 14, 1359 (1975).
114. Luzzati, M.; " Extracción del ficocoloide de la *Iridaea cordata* ", Tesis Doctoral, FCEyN-UBA (1953).

115. Barón, M.; "Estudio de la constitución del ficocoloide de la *Iridaea cordata* ", Tesis Doctoral, FCEyN-UBA (1954).
116. Steinitz, S.; "Estudio del método de obtención y determinación del ficocoloide de la *Iridaea cordata* ", Tesis Doctoral, FCEyN-UBA (1955).
117. Torcat Rojas, J.V.; " Estudio y aplicaciones del ficocoloide de la *Iridaea cordata* ", Tesis Doctoral, FCEyN-UBA (1955).
118. Hajdu, J.; "Extracción del ficocoloide de la *Iridaea laminaroides* ", Tesis Doctoral, FCEyN-UBA (1956).
119. Bludau, D.T.; "Estudio de un nuevo método de obtención de derivados del ficocoloide de la *Iridaea cordata* ", Tesis Doctoral, FCEyN-UBA (1959).
120. Cassini, L.L.; "Estudio de un nuevo método de obtención de derivados del ficocoloide de la *Iridaea laminaroides* ", Tesis Doctoral, FCEyN-UBA (1959).
121. Lacoste de Díaz, E.N.; *Revista de Investigaciones Agrícolas* , 11, 163 (1957).
122. Gómez Artero, J.G.; "Estudios sobre algas marinas realizados en la Argentina", Memoria Crítica, INTI (1961).
123. Cerezo, A.S.; *Carbohydr.Res.* , 26, 335 (1973).
124. Cerezo, A.S.; *Carbohydr.Res.* , 36, 201 (1974).
125. Matulewicz, M.C. y Cerezo, A.S.; *J.Sci.Fd.Agric.* , 26, 243 (1975).
126. Matulewicz, M.C. y Cerezo, A.S.; *J.Sci.Fd.Agric.* , 31, 203 (1980).
127. Matulewicz, M.C. y Cerezo, A.S.; *Phytochemistry* , 19, 2639 (1980).
128. Lawson, C.J., Rees, D.A., Stancioff, D.J. y Stanley, N.F.; *J.Chem.Soc. Perkin I* , 2177 (1973).
129. "Pilot Survey of the World Seaweed Industry and Trade", International Trade Centre UNCTAD/GATT, Ginebra (1981).
130. Braud, J.P. y Delépine, R.; *Proc.Int.Seaweed Symp.* , 10, 553 (1980).
131. Chiang, Y.M.; *Proc.Int.Seaweed Symp.* , 10, 569 (1980).
132. Tseng, C.K.; *Proc.Int.Seaweed Symp.* , 10, 123 (1980).
133. Rees, D.A.; *Biochem.J.* , 88, 343 (1963).

134. Turvey, J.R. y Rees, D.A.; *Nature* , 189, 831 (1961).
135. Clancy, M.J. y Turvey, J.R.; *J.Chem.Soc.* , 2935 (1961).
136. Banks, B.E.C., Mernwald, Y., Rhind-Tutt, A.J., Sheft, I. y Vernon, C.A.;
J.Chem.Soc. , 3240 (1961).
137. Foster, A.B. y Overend, W.G.; *Chem.& Ind.*, 566 (1955).
138. Edward, J.T.; *Chem.& Ind*, 1102 (1955).
139. Kantor, T.G. y Schubert, M.; *J.Am.Chem.Soc.* , 79, 152 (1957).
140. Wolfrom, M.L. y Montgomery, R.; *J.Am.Chem.Soc.* , 72, 2859 (1950).
141. Mc Kinell, J.P. y Percival, E.; *J.Chem.Soc.* , 3141 (1962).
142. Harris, M.J. y Turvey, J.R.; *Carbohydr.Res.* , 9, 397 (1969).
143. Mc Kenna, J. y Norymberski, J.K.; *J.Chem.Soc.* , 3889 (1957) y referencias allí citadas.
144. Burstein, S. y Lieberman, S.; *J.Am.Chem.Soc.* , 80, 5235 (1958).
145. Mayers, G.L., Pousada, M. y Haines, T.H.; *Biochem.* , 8, 2981 (1969).
146. Usov, A.I., Adamyants, K.S., Miroshnikova, L.I., Shaposhnikova, A.A. y Kochetkov, N.K., *Carbohydr.Res.* , 18, 336 (1971).
147. Kochetkov, N.K., Usov, A.I. y Adamyants, K.S.; *Zh.Obshch.Khim.*, 42, 1617 (1972).
148. Usov, A.I. y Adamyants, K.S.; *Bioorg.Khim.* , 1, 659 (1975).
149. Matulewicz, M.C. y Cerezo, A.S.; *Anales Asoc.Quim.Argentina* , 67, 225 (1979).
150. Dalling, D.K. y Grant, D.M.; *J.Am.Chem.Soc.* , 89, 6612 (1967).
151. Dalling, D.K. y Grant, D.M.; *J.Am.Chem.Soc.* , 94, 5318 (1972).
152. Perlín, A.S. y Koch, H.J.; *Can.J.Chem.* , 48, 2639 (1970).
153. Anet, F.A.L., Bradley, C.H. y Buchanan, G.W.; *J.Am.Chem.Soc.* , 93, 258 (1971).
154. Dorman, D.E., Angyal, S.J. y Roberts, J.D.; *J.Am.Chem.Soc.* , 92, 1351 (1970).
155. Pehk, T. y Lippmaa, E.; *Org.Magn.Reson.* , 3, 679 (1971).
156. Weigert, F.J. y Roberts, J.D.; *J.Am.Chem.Soc.* , 92, 1347 (1970).
157. Voelter, W., Breitmaier, E., Jung, G., Keller, T. e Hip, D.; *Angew.Chem.* 82, 812 (1970).

158. Perlin, A.S. y Casu, B.; *Tetrahedron Lett.* , 2921 (1969).
159. Hall, L.D. y Jonson, L.F.; *Chem.Comm.* , 509 (1969).
160. Breitmaier, E., Voelter, W., Jung, G. y Tänzer, C., *Chem.Ber.*, 104, 1147 (1971).
161. Voelter, W., Breitmaier, E., Price, R. y Jung, C., *Chimia* , 25, 168 (1971) *cf.ref.162.*
162. Shashkov, A.S. y Chizhov, O.S., *Bioorg.Khim.* , 2, 437 (1976).
163. Perlin, A.S.; "International Review of Science. Organic Chemistry, series two, vol.7. Carbohydrates". Ed.G.O.Aspinal, Butterworths, London-Boston, pp.1-34.
164. Perlin, A.S., Casu, B. y Koch, H.J.; *Can.J.Chem.* , 48, 2596 (1970).
165. Bundle, D.R., Jennings, H.J. y Smith, I.C.P.; *Can.J.Chem.* , 51, 3812 (1973).
166. Honda, S., Yuki, H. y Takiura, K.; *Carbohydr.Res.* , 28, 150 (1973).
167. Usov, A.I., Yarotskii, S.V. y Vasyanina, L.K.; *Bioorg.Khim.* , 1, 1583 (1975), *cf.Chem.Abs.84, 90508.*
168. Ragan, M.A.; *Can.J.Chem.* , 56, 2681 (1978).
169. Archbald, P.J., Fenn, M.D. y Roy, A.B.; *Carbohydr.Res.* , 93, 177 (1981).
170. Pfeffer, P.E., Valentine, K.M. y Parish, F.W.; *J.Am.Chem.Soc.* , 101, 1265 (1979).
171. Doddrell, D. y Allerhand, A.; *J.Am.Chem.Soc.* , 93, 2779 (1971).
172. Allerhand, A. y Doddrell, D.; *J.Am.Chem.Soc.* , 93, 2777 (1971).
173. Allerhand, A., Doddrell, D. y Komorovski, R.; *J.Chem.Phys.*, 55, 189 (1971).
174. Dorman, D.E. y Roberts, J.D.; *J.Am.Chem.Soc.* , 93, 4463 (1971).
175. Voelter, W., Breitmaier, E. y Jung, G.; *Angew.Chem.* , 83, 1011 (1971).
176. Breitmaier, E., Jung, G. y Voelter, W.; *Chimia* , 25, 362 (1971),*cf.ref.162.*
177. Takeo, K., Hirose, H. y Kuge, T.; *Chem.Lett.* , 1233 (1973),*cf. ref.162.*
178. Usui, T., Yamaoka, N., Matsuda, K., Tuzimura, K., Sugiyama, H. y Seto, S.; *J.Chem.Soc.Perkin I* , 2425 (1973).
179. Yamaoka, N., Usui, T., Matsuda, K., Tuzimura, K., Sugiyama, H. y Seto, S.; *Tetrahedron Lett.* , 2047 (1971).

180. Gorin, P.A.J, y Spencer, J.F.T.; *Can.J.Microbiol.* , 18, 1709 (1972).
181. Gorin, P.A.J.; *Can.J.Chem.* , 51, 2375 (1973).
182. Gorin, P.A.J.; *Can.J.Chem.* , 52, 458 (1974).
183. Gorin, P.A.J.; *Adv.Carbohydr.Chem.Biochem.* , 38, 13 (1981).
184. Bryce, T.A., Mc Kinnon, A.A., Morris, E.R., Rees, D.A. y Thom, D.; *Faraday Discuss Chem.Soc.* , 57, 221 (1974).
185. Shashkov, A.S., Usov, A.I. y Yarotskii, S.V., *Bioorg.Khim.* , 3, 46 (1977).
186. Hamer, G.K., Bhattacharjee, S.S. y Yaphe, W.; *Carbohydr.Res.* , 54, C7 (1977).
187. Bhattacharjee, S.S., Yaphe, W. y Hamer, G.K.; *Carbohydr.Res.* , 60, C1 (1978).
188. Shashkov, A.S., Usov, A.I. y Yarotskii, S.V.; *Bioorg.Khim.* , 4, 74 (1978).
189. Miller, I.J., Wong, H. y Newman, R.H.; *Aust.J.Chem.* , 35, 853 (1982).
190. Bellion, C., Brigand, G., Prome, J-C., Welti, D. y Bociek, S.; *Carbohydr. Res.* , 119, 31 (1983).
191. Dutton, G.G.S.; *Advan.Carbohydr.Chem.* , 28, 11 (1973).
192. Vilkas, M., Hiu-I-Jan, Boussac, G. y Bonnard, M.C.; *Tetrahedron Lett.* 1441 (1966).
193. Anderson, G. y Boggs, L.A.; *Abstr.Papers Amer.Chem.Soc.Meeting* , 152, 18E (1966), cf.ref.191.
194. Eisenberg, F.; *Carbohydr.Res.* , 19, 135 (1971).
195. Sweeley, C.C., Bentley, R., Makita, N. y Wells, W.W.; *J.Am.Chem.Soc.* , 85, 2497 (1963).
196. Sawardeker, J.S. y Sloneker, J.H.; *Anal.Chem.* , 37, 945 (1965).
197. Sawardeker, J.S., Sloneker, J.H. y Jeanes, A.R.; *Anal.Chem.* , 37, 1602 (1965).
198. Gunner, S.W., Jones, J.K.N. y Perry, M.B.; *Chem.& Ind.* , 255 (1961).
199. Gunner, S.W., Jones, J.K.N. y Perry, M.B.; *Can.J.Chem.* , 39, 1892 (1961).
200. Albersheim, P., Nevins, D.J., English, P.D. y Karr, A.; *Carbohydr.Res.* 5, 340 (1967).
201. Björndal, H., Lindberg, B. y Svensson, S.; *Acta Chem.Scand.* , 21, 1801 (1967).
202. Lönngren, J. y Pilotti, A.; *Acta Chem.Scand.* , 25, 1144 (1971).

203. Golovkina, L.S., Chizhov, O.S. y Wulfson, N.S.; *Izv.Akad. Nauk SSSR* , Ser. Khim., 1915 (1966), cf.ref.191.
204. Björndal, H., Lindberg, B. y Svensson, S.; *Carbohydr.Res.* , 5, 433 (1967).
205. Björndal, H., Hellerqvist, C.G., Lindberg, B. y Svensson, S.; *Angew.Chem. Int.Ed.Engl.* , 9, 610 (1970).
206. Björndal, H., Lindberg, B., Pilotti, A. y Svensson, S.; *Carbohydr.Res.* , 15, 339 (1970).
207. Axberg, K., Björndal, H., Pilotti, A. y Svensson, S.; *Acta Chem.Scand.* , 26, 1319 (1972).
208. Lance, D.G. y Jones, J.K.N.; *Can.J.Chem.* , 45, 1995 (1967).
209. Easterwood, V.M. y Huff, B.J.L.; *Svensk Papperstidn.* , 72, 768 (1969).
210. Bouhours, J.F. y Cheshire, M.V.; *Soil Biol.Biochem.* , 1, 185 (1969),cf.211.
211. Bacon, J.S.D. y Cheshire, M.V.; *Biochem.J.* , 124, 555 (1971).
212. Dmitriev, B.A., Backinovskiy, L.V., Chizhov, O.S., Zolotarev, B.M. y Kochetkov, N.K.; *Carbohydr.Res.* , 19, 432 (1971).
213. Anderle, D. y Kováč, P.; *Chem.zvesti* , 30, 355 (1976).
214. Varma, R., Varma, R.S. y Wardi, A.H.; *J.Chromatogr.* , 77, 222 (1973).
215. Szafranek, J., Pfaffenberger, C.D. y Horning, E.C.; *Carbohydr.Res.* , 38, 97 (1974).
216. Elkin, Yu.N., Rozynov, B.V. y Dzizenko, A.K.; *Khim.Prir.Soedin.* , 642 (1972).
217. Elkin, Yu.N., Kalinovskiy, A.I., Pavlenko, A.F., Shulga, N.I., Rozynov, B.V. y Dzizenko, A.K.; *Khim.Prir.Soedin.* , 608 (1973).
218. Seymour, F.R., Plattner, P.D. y Slodki, M.E.; *Carbohydr.Res.* , 44, 181 (1975).
219. Woolard, G.R., Rathbone, E.B. y Dercksen, A.W.; *S.Afr.J.Chem.* , 30, 169 (1977).
220. Li, B.W., Cochran, T.W. y Verdelotti, J.R.; *Carbohydr.Res.* , 59, 567 (1977).
221. Chen, C.C. y Mc Ginnis, G.D.; *Carbohydr.Res.* , 90, 127 (1981).
222. Mc Ginnis, G.D.; *Carbohydr.Res.* , 108, 284 (1982).
223. Seymour, F.R., Chen, E.C.M. y Bishop, S.H.; *Carbohydr.Res.* , 73, 19 (1979).
224. Seldes, A.M., Gros, E.G., Thiel, I.M.E. y Deferrari, J.O.; *Carbohydr.Res.* , 39, 11 (1975).

225. Kochetkov, N.K. y Chizhov, O.S.; *Advan.Carbohydr.Chem.* , 21, 47 (1966).
226. Horton, D., Wander, J.D. y Foltz, R.L.; *Carbohydr.Res.* , 36, 75 (1974).
227. Dougherty, R.C., Roberts, J.D., Binkley, W.W., Chizhov, O.S.,
Kadentsev, V.I. y Solovyov, A.A.; *J:Org.Chem.* , 39, 451 (1974).
228. Haworth, W.N.; *J.Chem.Soc.* , 107, 8 (1915).
229. Kuhn, R. y Trischmann, H.; *Ber.* , 96, 284 (1963).
230. Stortz, C.A., Matulewicz, M.C. y Cerezo, A.S.; *Carbohydr.Res.* ,111, 31
(1982).
231. Jansson, P.-E., Kenne, L., Liedgren, H., Lindberg, B. y Lönngren,J.;
Univ.Stockholm Chem.Commun. , 8 , 1 (1976).
232. Norrman, B.; *Acta Chem.Scand.* , 22, 1623 (1968).
233. Handa, N. y Montgomery, R.; *Carbohydr.Res.* , 11, 467 (1969).
234. Norrman, B.; *Acta Chem.Scand.* , 22, 1381 (1968).
235. Flowers, H.M.; *Carbohydr.Res.* , 39, 245 (1975).
236. Aspinall, G.O. y Fairweather, R.M.; *Carbohydr.Res.* , 1, 83 (1965).
237. Lawson, C.J. y Rees, D.A.; *Nature* , 227, 392 (1970).
238. Rees, D.A.; "Polysaccharide shapes", Ed.Chapman y Hall, Londres,
p.65 y subsiguientes. b) p.43.
239. Masson, C.R.; *Can.J.Chem.* , 33, 597 (1955).
240. Moye, C.J.; *Adv.Carbohydr.Chem.Biochem.* , 27, 85 (1972).
241. Mc Kinnon, A.A., Rees, D.A. y Williamson, F.B.; *Chem.Commun.* , 701 (1969).
242. Rees, D.A., Scott, W.E. y Williamson, F.B.; *Nature* , 227, 390 (1970).
243. Anderson, N.S., Campbell, J.W., Harding, M.M., Rees, D.A. y Samuel,
J.W.B.; *J.Mol.Biol.* , 45, 85 (1969).
244. Rees, D.A.; *Biochem.J.* , 126, 257 (1972).
245. Norton, I.T., Goodall, D.M., Morris, E.R. y Rees, D.A.; *Chem.Commun.* ,
515 (1978).
246. Snoeren, T.H.M. y Payens, T.A.J.; *Biochim.Biophys.Acta* , 437, 264 (1976).
247. Robinson, G., Morris, E.R. y Rees, D.A.; *Chem.Commun.* , 152 (1980).

248. Morris, E.R., Rees, D.A. y Robinson, G.; *J.Mol.Biol.* , 138, 349 (1980).
249. Ablett, S., Lillford, P.J., Baghdadi, S.M.A., y Derbyshire, W.;
Magn.Res.Colloid Interface Sci. , 687 (1980).
250. Morris, V.J. y Belton, P.S.; *Prog.Fd.Nutr.Sci.* , 6, 55 (1982).
251. Smidsrød, O., Andresen, I.-L., Grasdalen, H., Larsen, B. y Painter, T.;
Carbohydr.Res. , 80, C11 (1980).
252. Bryce, T.A., Clark, A.H., Rees, D.A. y Reid, D.S.; *Eur.J.Biochem.*
122, 63 (1982).
253. Rees, D.A., Williamson, F.B., Frangou, S.A. y Morris, E.R.; *Eur.J.*
Biochem. ., 122, 71 (1982).
254. Parolis, H.; *Carbohydr.Res.* , 93, 261 (1981).
255. Masson, C.R. y Caines, G.W.; *Can.J.Chem.* , 32, 51 (1954).
256. Tvaroska, I., Pérez, S. y Marchessault, R.H.; *Carbohydr.Res.* , 61,
97 (1978).
257. Morris, E.R., Rees, D.A., Welsh, E.J., Dunfield, L.G. y Whittington,
S.G.; *J.Chem.Soc. Perkin Trans,II* , 793 (1978).
258. Painter, T.J.; *Chem. & Ind.* , 1488 (1959).
259. Painter, T.J.; *Proc.Int.Seaweed Symp.* , 5th., 305 (1966).
260. Smidsrød , O.; Haug, A. y Larsen, B., *Acta Chem.Scand.* , 20, 1026 (1966).
261. Yaphe, W. y Arsenault, G.; *Anal.Biochem.* , 13, 143 (1965).
262. Beierbeck, H., Saunders, J.K. y ApSimon, J.W.; *Can.J.Chem.*, 55, 2813
(1977).
263. Cyr, N. y Perlin, A.S.; *Can.J.Chem.* , 57, 2504 (1979).
264. Von Carstenn-Lichtenfelde, C., Pascual, C., Pons, J., Rabanal, R.M.,
Rodríguez, B. y Valverde, S.; *Tett.Letters* , 3569 (1975)..
265. Christl, M., Reich, H.J. y Roberts, J.D.; *J.Am.Chem.Soc.*, 93, 3463 (1971).
266. Bellion, C., Hamer, G.K. y Yaphe, W.; *Proc.Int.Seaweed Symp.* , 10th.,
379 (1980).
267. Sweeting, L.M., Coxon, B. y Varma, R.; *Carbohydr.Res.* , 72, 43 (1979).
268. Duckworth, M. y Yaphe, W.; *Carbohydr.Res.* , 16, 189 (1971).

269. Duckworth, M., Hong, K.C. y Yaphe, W.; *Carbohydr.Res.* , 18, 1 (1971).
270. Friedländer, M., Lipkin, Y. y Yaphe, W.; *Bot.Mar.* , 24, 595 (1981).
271. Usui, T., Yokoyama, M., Yamaoka, N., Matsuda, K., Tuzimura, K., Sugiyama, H. y Seto, S.; *Carbohydr.Res.* , 33, 105 (1974).
272. De Bruyn, A., Anteunis, M. y Verhegge, G., *Bull.Soc.Chim. Belg.* 84, 721 (1975).
273. Pregl, F.; "Quantitative organische Mikroanalyse", Springer-Verlag, Viena, pag.91 (1958).
274. Belcher, R., Fildes, J.E. y Nutten, A.J., *Anal.Chim.Acta* , 13, 16 (1955).
275. Manzi, A.E., "Estudio químico del endosperma de la semilla de la leguminosa *Gleditsia triacanthos* ", Tesis Doctoral, FCEyN-UBA (1984).
276. Yaphe, W.; *Anal.Chem.* , 32, 1327 (1960).
277. Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A. y Smith, F.; *Anal.Chem.* , 28, 350 (1956).
278. Dodgson, K.S.; *Biochem.J.*, 78, 312 (1961).
279. Dodgson, K.S. y Price, R.G.; *Biochem.J.* , 84, 106 (1962).
280. Somogyi, M.; *J.Biol.Chem.* , 160, 69 (1945).
281. Somogyi, M.; *J.Biol.Chem.* , 195, 19 (1952).
282. Nelson, N.; *J.Biol.Chem.* , 153, 315 (1944).
283. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. y Randall, R.J.; *J.Biol.Chem.* , 193, 265 (1951).
284. Spackman, D.H., Stein, W.H. y Moore, S.; *Anal.Chem.* , 30, 1190 (1958).
285. Bartlett, G.; *J.Biol.Chem.* , 234, 466 (1959).
286. Guthrie, R.D.; *Methods Carbohydr.Chem.* , 1, 435 (1962).
287. Talmadge, K.W., Keegstra, K., Bauer, W.D. y Albersheim, P.; *Plant Physiol.* , 51, 158 (1973).

INDICE DE AUTORES

Los números indican las referencias bibliográficas en las cuales figura el nombre del autor correspondiente.

- Ablett, Steve : 249
Acleto, C. : 103
Adamyants, K.S. : 146,147,148
Albersheim, Peter : 200, 287
Allerhand, Adam : 171, 172, 173
Allsobrook, A.J.R. : 88, 89, 90
Anderle, Dusan : 213
Anderson, G. : 193
Anderson, Norman S. : 53, 55, 56,
59, 243
Andresen, Inger-Lill : 251
Anet, Frank A.L. : 153
Angyal, Stephen J. : 154
Anteunis, Marc : 272
ApSimon, John W. : 262
Archbald, P. Jane : 169
Arsenault, Guy P. : 261
Aspinall, Gerald O. : 236
Axberg, Karin : 207

Backinovsky, Leon V. : 212
Bacon, John S.D. : 211
Baghdadi, S.M.A. : 249
Bailey, Raymond W. : 104, 105, 106
Banks, Barbara E.C. : 136
Barbakadze, V.V. : 71, 72, 73, 74
Barón, Máximo : 115
Bartlett, Grant : 285
Bauer, R.W. : 16
Bauer, Wolfgang D. : 287
Bayley, Stanley T. : 38

Beierbeck, Helmut : 262
Belcher, Ronald : 274
Belton, Peter S. : 250
Bell, Rusell A. : 107
Bellion, Christine : 190, 266
Bente, F. : 14, 15
Bentley, Ronald : 195
Bhattacharjee, Shyam S. : 186, 187
Binkley, Wendell W. : 227
Bishop, Stephen H. : 223
Björndal, Hakan : 201, 204, 205,
206, 207
Black, William A.P. : 108
Blakemore, William R. : 108
Bludau, Dora T. : 119
Bociek, Stephen : 190
Boggs, Lawrence, A. : 193
Bonnard, M.-C. : 192
Bory de Saint Vincent, J.B. : 7
Bouhours, J.F. : 210
Boussac, Ginette : 192
Bradley, C.H. : 153
Braud, J.P. : 130
Breitmaier, Eberhard : 157, 160,
161, 175, 176
Brigand, Gerard : 190
Bryce, Thomas A. : 184, 252
Buchanan, G.W. : 153
Buchanan, J. : 22
Bundle, D.R. : 165
Burstein, Shlomo : 144

- Butler, Margaret R. : 21
- Caines, G.W. : 255
- Campbell, John W. : 243
- Cassini, Lidia L. : 120
- Castro, María E. : 103
- Casu, Benito : 158, 164
- Cerezo, Alberto S. : 47, 48, 123,
124, 125, 126, 127, 149, 230
- Cirilo, Rosario : 103
- Clancy, Michael J. : 135
- Clark, Allan H. : 252
- Clingman, Abraham L. : 40
- Cochran, T.W. : 220
- Colquhoun, Joseph A. : 108
- Colvin, J. Ross : 33
- Collantes, G. : 10
- Cook, William H. : 31, 33, 34
- Coxon, Bruce : 267
- Craigie, James S. : 110, 112
- Cyr, Natsuko : 263
- Chapman, Valentin J. : 2
- Chen, C.C. : 221
- Chen, Edward C.M. : 223
- Chen, L.C.M. : 111
- Cheshire, Martin V. : 210, 211
- Chiang, Young-Meng : 131
- Ching Puente, Orlando A. : 102, 103
- Chizhov, Oleg S. : 67, 162, 203, 212,
225, 227
- Christl, Manfred : 265
- Dalling, Don K. : 150, 151
- De Bruyn, A. : 272
- Deferrari, Jorge O. : 224
- Delépine, René : 130
- Derbyshire, William : 249
- Dercksen, Arie W. : 219
- Dewar, Eric I. : 27, 108
- Dillon, Thomas : 24
- Di Ninno, Vincent : 107
- Dmitriev, Boris A. : 212
- Doddrell, David : 171, 172, 173
- Dodgson, Kenneth S. : 42, 43, 44,
278, 279
- Dolan, Timothy C.S. : 52, 55, 56, 59
- Dorman, Douglas E. : 154, 174
- Doty, Maxwell S. : 94, 95, 96
- Dougherty, Ralph C. : 227
- Dubois, Michel : 277
- Duckworth, M. : 268, 269
- Dunfield, Lawrence G. : 257
- Dutton, Guy G.S. : 191
- Dzizenko, Anatoly K. : 216, 217
- Easterwood, V. Marie : 209
- Edward, John T. : 138
- Eisenberg, Frank : 194
- Elkin, Yuri N. : 216, 217
- English, Patricia D. : 200
- Etcheverry, H. : 10
- Fairweather, R.M. : 236
- Farr, A.L. : 283
- Farrant, A.J. : 91, 92
- Fenn, M. David : 169
- Fildes, J.E. : 274
- Flowers, Harold M. : 235
- Flückiger, F.A. : 13
- Foltz, Rodger L. : 226
- Font Quer, Pío : 4
- Foster, Allan B. : 137
- Frangou, Sarah A. : 253
- Friedlander, M. : 270

- Fuertes, C. : 102, 103
Fuller, S.W. : 109
Garay, Luz O. : 102
Gilles, Kenneth A. : 277
Golovkina, L.S. : 203
Gómez Artero, Jorge G. : 122
Goodall, D.M. : 245
Gorin, Philip A.J. : 180, 181, 182
183
Grant, David M. : 150, 151
Grasdalen, Hans : 251
Gros, Eduardo G. : 224
Gunner, S.W. : 198, 199
Guthrie, Roy D. : 286

Haas, Paul : 18, 20
Haedicke, J. : 16
Haines, Thomas H. : 145
Hajdu, Juan : 118
Hall, Laurance D. : 159
Hamer, Gordon K. : 186, 187, 266
Hamilton, John K. : 277
Handa, Nobuhiko : 233
Harding, Marjorie M. : 243
Harris, Michael J. : 142
Hassid, William Z. : 29, 30
Haug, Arne : 46, 49, 260
Haworth, Walter N. : 228
Hellerqvist, Carl G. : 205
Hip, D. : 157
Hirose, H. : 177
Hiu-I-Jan : 192
Honda, Susumu : 166
Hong, K.C. : 269
Horning, Evan C. : 215
Horton, Derek : 226
Huff, Byron J.L. : 209

Ivanova, Elena G. : 76

Jansson, Per-Erik : 231
Jeanes, Allene R. : 197
Jennings, H.J. : 165
Johnston, R. : 23
Jones, John Kenyon N. : 198, 199, 208
Jonson, L.F. : 159
Jung, Günther : 157, 160, 161, 175,
176

Kadentsev, V.I. : 227
Kalinovsky, Anatoly I. : 217
Kantor, Thomas G. : 139
Karr, Arthur : 200
Keegstra, Kenneth : 287
Keller, Toni : 157
Kenne, Lennart : 231
Kim, Dong H. : 9
Koch, Hans J. : 152, 164
Kochetkov, Nikolay K. : 62, 63, 64, 65,
66, 67, 68, 69, 75, 77, 78,
79, 146, 147, 212, 225
Komorovski, Richard : 173
Kováč, Pavol : 213
Kozlova, E.G. : 70
Kuge, Takashi : 177
Kuhn, Richard : 229
Kylin, Harald : 5, 6

Lacoste de Díaz, Elsa N. : 121
Lance, D.G. : 208
Larsen, Bjorn : 46, 49, 251, 260
Lawson, Christopher J. : 54, 55, 128,
237

Levring, Tore : 8
Li, Betti W. : 220
Lieberman, Seymour : 144
Liedgren, Helena : 231

Lillford, P.J. : 249
 Lindberg, Bengt : 201, 204, 205,
 206, 231
 Lipkin, Y. : 270
 Lippmaa, Endel : 155
 Lönngren, Jorgen : 202, 231
 Lotov, R.A. : 75
 Lowry, Oliver H. : 283
 Luzzati, Mario : 114

 Lloyd, Alun G. : 42, 43, 44

 Makita, N. : 195
 Manzi, Adriana E. : 275
 Marchessault, Robert H. : 256
 Masson, Charles R. : 239, 255
 Mathieson, A.C. : 109
 Matsuda, Kazuo : 178, 179, 271
 Matsuhiro, Betty : 93
 Matulewicz, Marfa C. : 11, 125, 126,
 127, 149, 230
 Mayers, George L. : 145
 Mc Candless, Esther L. : 107, 110,
 112
 Mc Ginnis, Gary D. : 221, 222
 Mc Kenna, James : 143
 Mc Kinell, J.P. : 141
 Mc Kinnon, Alan A. : 184, 241
 Mc Lachlan, Jack : 111
 Mernwald, Y. : 136
 Miller, Ian J. : 189
 Miroshnikova, L.I. : 62, 63, 64,
 65, 66, 67, 68,
 71, 146
 Montgomery, Rex : 140, 233
 Moore, Stanford : 284
 Morgan, K. : 39
 Mori, T. : 28
 Morris, Edwin R. : 184, 245, 247,
 247, 248, 253, 257
 Morris, Victor J. : 250
 Moye, Clarence J. : 240
 Mshigeni, K.E. : 97, 98, 99, 100, 101

 Neal, Jack L. : 34
 Neish, Arthur C. : 111
 Nelson, N. : 282
 Nevins, Donald J. : 200
 Newman, Roger H. : 189
 Newton, L. : 26
 Norrman, Bengt : 232, 234
 Norton, Ian T. : 245
 Norymbersky, Julius K. : 143
 Nunn, John R. : 40, 84, 85, 86, 87, 88,
 89, 90, 91, 92
 Nutten, A.J. : 274
 Nzalelila, E.V. : 101

 Obermaier, L. : 13
 O'Colla, Proynssias : 24
 O'Neill, A.N. : 36, 37, 39
 Overend, William G. : 137

 Painter, Terence J. : 41, 251, 258, 259
 Parish, F.W. : 170
 Parolis, Haralambos : 84, 85, 86, 87,
 88, 89, 90, 91, 92, 254
 Parsons, Murray J. : 104, 105, 106
 Pascual, C. : 264
 Pavlenko, Anatoly F. : 217
 Payens, Theodoor A.J., : 246
 Pehk, Tonis : 155
 Penman, Alistair : 55, 58, 61
 Percival, Elizabeth E. : 22, 35, 141
 Percival, Edmund G.V. : 22, 23, 27
 Pérez, Serge : 256
 Perlin, Arthur S. : 152, 158, 163,
 164, 263
 Pernas, Alberto J. : 46, 49

Perry, Malcolm B. : 198, 199
 Pfaffenberger, Carl D. : 215
 Pfeffer, Philip E. : 170
 Pickmere, Stuart E. : 104, 105, 106
 Pilotti, Ake : 202, 206, 207
 Plattner, Ronald D. : 218
 Pons, J. : 264
 Pousada, Manuel : 145
 Pregl, Fritz : 273
 Price, Roger : 161
 Price, Robert G. : 44, 279
 Prome, Jean-Claude : 190

 Rabanal, Rosa M. : 264
 Ragan, Mark A. : 168
 Randall, R.J. : 283
 Rathbone, Elnor B. : 219
 Rebers, Paul A. : 277
 Rees, David A. : 50, 51, 52, 53, 54,
 55, 56, 58, 59, 61, 128,
 133, 134, 184, 237, 238,
 241, 242, 243, 244, 245,
 247, 248, 252, 253, 257
 Reich, Hans J. : 265
 Reid, David S. : 252
 Rekhter, M.A. : 77, 78, 79
 Rhind-Tutt, A.J. : 136
 Ríos, V. : 10
 Roberts, John D. : 154, 156, 174,
 227, 265
 Robinson, Geoffrey : 247, 248
 Rodríguez, B. : 264
 Rose, Frederick A. : 44
 Rose, R.C. : 32, 33
 Rosebrough, N.J. : 283
 Roy, Alexander B. : 169
 Rozynov, B.V. : 216, 217
 Russell-Wells, Barbara : 19, 20

 Samuel, John W.B. : 243

 Santos, Gertrudis A. : 94, 95, 96
 Saunders, John K. : 262
 Sawardeker, Jawahar S. : 196, 197
 Scott, William E. : 242
 Schmidt, C. : 12
 Schubert, Maxwell : 139
 Sebor, J. : 17
 Seldes, Alicia M. : 224
 Semesi, A.K. : 97, 98, 99, 100
 Seto, Shuichi : 178, 179, 271
 Seymour, Fred R. : 218, 223
 Shacklock, P.F. : 111
 Shaposhnikova, A.A. : 146
 Shashkov, Aleksandr S. : 74, 81, 82, 83,
 162, 185, 188

 Sheft, Irving : 136
 Shulga, N.I. : 217
 Silva, Paul C. : 3
 Slodki, Morey E. : 218
 Sloneker, James H. : 196, 197
 Smidsrød, Olav : 46, 49, 251, 260
 Smith, David B. : 31, 34
 Smith, Fred : 277
 Smith, Gilbert M. : 1
 Smith, Ian C.P. : 165
 Snoeren, T.H.M. : 246
 Solovyov, A.A. : 227
 Somogyi, Michel : 280, 281
 Spackman, Darrel H. : 284
 Spencer, John F.T. : 180
 Stancioff, Dimitri J. : 57, 128
 Stanley, Norman F. : 57, 128
 Stein, William H. : 284
 Steinitz, Samuel : 116
 Stortz, Carlos A. : 230
 Sugiyama, Hiroshi : 178, 179, 271
 Svensson, Sigfrid : 201, 204, 205,
 206, 207

- Sweeley, Charles C. : 195
Sweeting, Linda M. : 267
Szafranek, Janusz : 215
- Takeo, Kenishi : 177
Takiura, Kiyoshi : 166
Talmadge, Kenneth W. : 287
Tänzer, Christian : 160
Thiel, Inge M.E. : 224
Thom, David : 184
Tollens, Bernhard : 16
Torcat Rojas, Juan V. : 117
Trischmann, H. : 229
Tseng, C.K. : 25, 132
Tudball, Norman : 42
Turvey, James R. : 45, 60, 134,
135, 142
Tuzimura, Katura : 178, 179, 271
Tvaroska, Igor : 256
- Usov, Anatoly I. : 62, 63, 64, 65,
66, 67, 68, 69, 70, 71,
72, 73, 74, 75, 76, 77,
78, 79, 80, 81, 82, 83,
146, 147, 148, 167, 185,
188
- Usui, Taichi : 178, 179, 271
- Valentine, K.M. : 170
Valverde, S. : 264
Varma, Rajendra : 214, 267
Varma, Ranvir S. : 214
Vasyanina, L.K. : 167
Vercelotti, John R. : 220
Verhegge, G. : 272
Vernon, Charles A. : 136
Vilkas, Michel : 192
Voelter, Wolfgang : 157, 160, 161,
175, 176
Von Carstenn-Lichtenfelde, C.: 264
- Waaland, J.R. : 113
Walter, J.A. : 112
Wander, Joseph D. : 226
Wardi, A.H. : 214
Weigert, Frank J. : 156
Weigl, J. : 60
Wells, William W. : 195
Welsh, E. Jane : 257
Welti, David : 190
Whittington, Stuart G. : 257
Williams, T.P. : 45
Williamson, Frank B. : 241, 242, 253
Wolf from, Melville L. : 140
Wong, Herbert : 189
Woolard, Graham R. : 219
Wulfson, N.S. : 203
- Yamaoka, Naotaka : 178, 179, 271
Yaphe, Wilfred : 60, 186, 187, 261,
266, 268, 269, 270, 276
Yarotskii, Sergey V. : 74, 81, 82,
83, 167, 185, 188
Yokoyama, Minoru : 271
Yuki, Hiditaka : 166
- Zanlungo, Alberto B: 93
Zolotarev, B.M. : 212