

Tesis de Posgrado

Estudio de los carragenanos de plantas cistocárpicas del alga roja *Gigartina skottsbergii*

Ciancia, Marina

1994

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:

Ciancia, Marina. (1994). Estudio de los carragenanos de plantas cistocárpicas del alga roja *Gigartina skottsbergii*. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2694_Ciancia.pdf

Cita tipo Chicago:

Ciancia, Marina. "Estudio de los carragenanos de plantas cistocárpicas del alga roja *Gigartina skottsbergii*". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1994. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2694_Ciancia.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

Estudio de los carragenanos de plantas cistocarpicas del
alga roja *Gigartina skottsbergii*

Marina Ciancia

Director de Tesis
Dra. María Cristina Matulewicz

Departamento de Química Orgánica

Tesis presentada para optar al título de

DOCTOR DE LA UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

1994

tesis
26/8/94
E.C.

A Jorge

A mis padres

A mis abuelos

A Edi

A la Dra. María Cristina Matulewicz,
quien dirigió este trabajo de Tesis,
por los inapreciables aportes
científicos, estímulo y afecto que me
ha brindado.

Al Dr. Alberto Saúl Cerezo, quien me transmitió su amplia experiencia científica con dedicación, paciencia y cariño.

Agradezco también:

A la Dra. Norma S. Nudelman por haberme orientado en los estudios de la cinética de la reacción de los carragenanos en medio alcalino.

A la Lic. María Luz Piriz por la recolección y selección de las plantas cistocarpicas de *Gigartina skottsbergii*.

Al Dr. Carlos Arturo Stortz por su predisposición a transmitir sus ideas y conocimientos a través de interesantes conversaciones científicas, contribuyendo así a mi formación.

A la Dra. María Cecilia Rodríguez por su afectuosa ayuda, tanto en temas relacionados con la Biología, como en muchos otros.

A la Lic. María Inés Errea por su amistad incondicional y su compañerismo en todo momento.

Al Lic. Miguel Daniel Nosedá por su compañerismo en este camino que recorrimos en el estudio del alga *Gigartina skottsbergii*.

A mis compañeros de laboratorio, los Lic. Hernán Horacio Heines, Marcelo Roberto Cases, Adriana Kolender, Susana Feldman, Andrea Lavigne y María Luján Flores, la Sta. Silvia Colavecchia y las Dras. María Eugenia Duarte y Adriana Elba Manzi por su apoyo y comprensión.

A los profesores, docentes auxiliares y demás miembros del Departamento de Química Orgánica por la colaboración que me brindaron.

A la Universidad de Buenos Aires por las Becas de Iniciación y Perfeccionamiento que me otorgó.

Introducción

El alga roja *Gigartina skottsbergii*, así como muchas otras pertenecientes a la subclase Florideophycidae, presenta un ciclo de vida complejo con alternancia de generaciones, dando lugar a individuos haploides (gametofitos) y diploides (tetraesporofitos) macroscópicos, independientes, de aspecto semejante.

Se ha informado que en las algas pertenecientes a la familia Gigartinaceae los carragenanos producidos por estas dos fases sexuales son muy diferentes, tanto en su estructura como en sus propiedades físicas, mientras que esto no sucede en algas pertenecientes a otras familias. Los carragenanos de gametofitos tienen básicamente una estructura de tipo kappa, forman geles a bajas concentraciones de cloruro de potasio (carragenanos kappa/iota) o pueden convertirse en carragenanos gelificantes mediante un tratamiento alcalino (carragenanos mu/nu); en cambio, los carragenanos de tetraesporofitos (carragenanos lambda) no gelifican a bajas concentraciones de cloruro de potasio, aún después de ser tratados con álcali.

Antes de este descubrimiento, se estudiaban los carragenanos extraídos de mezclas de gametofitos y tetraesporofitos, de este modo, sólo podían aislarse los carragenanos kappa/iota, mientras que los carragenanos mu/nu y lambda se obtenían como mezclas solubles a altas concentraciones de cloruro de potasio que no podían separarse, ya que presentan peso molecular y grado de sulfatación semejante; por este motivo, no era posible estudiar las estructuras de estos productos en su estado

nativo. Entonces, por medio de un tratamiento alcalino se convertía a los carragenanos μ/ν en κ/ι , insolubles a bajas concentraciones de cloruro de potasio, mientras que los carragenanos λ ciclados permanecían solubles en estas condiciones y, así, a través del estudio estructural de los productos modificados se infería la estructura de los carragenanos de partida.

Gigartina skottsbergii es una de las algas rojas productoras de carragenanos más abundantes en las costas patagónicas. Los carragenanos de este alga habían sido estudiados por Cerezo, sin tener en cuenta la fase sexual de la que provenían.

En este trabajo de Tesis se estudiaron los carragenanos de la fase cistocárpica (gametifitos femeninos) de *Gigartina skottsbergii*, que es la forma más abundante en la naturaleza.

La primera tarea fue comprobar que los polisacáridos extraídos de estas algas respondían a las características esperadas. Acto seguido, se realizó el estudio estructural de estos productos, particularmente el de la fracción soluble en cloruro de potasio 2,00 M. Se presenta aquí el primer estudio estructural completo de este tipo de carragenanos.

El tratamiento alcalino y posterior fraccionamiento con cloruro de potasio de la fracción soluble permitió aislar ciertos galactanos sulfatados que se encuentran en porcentajes muy bajos y presentan, entre otras, unidades de α -L-galactosa y 3,6-anhidro- α -L-galactosa. Estos residuos no son propios de los carragenanos, pero son característicos de otros polisacáridos, como los agaranos y productos relacionados, que son constituyentes mayoritarios de algas

rojas pertenecientes a otras familias.

Además de las aplicaciones mencionadas, el tratamiento alcalino de carragenanos es el método que se usa industrialmente para mejorar el poder gelificante de estos polisacáridos, sin embargo, la cinética de esta reacción no había sido estudiada hasta el momento.

Se han obtenido importantes resultados que contribuyen al conocimiento de la estructura y propiedades físicas de los carragenanos, así como a la modificación de estas últimas. Estos resultados han contribuido a la publicación de los siguientes trabajos:

1. "Carrageenan systems from tetrasporic and cystocarpic stages of *Gigartina skottsbergii*", M. C. Matulewicz, M. Ciancia, M. D. Nosedá y A. S. Cerezo, *Phytochemistry* 28, 2937 (1989).
2. "Methylation analysis of carrageenans from tetrasporic and cystocarpic stages of *Gigartina skottsbergii*", M. C. Matulewicz, M. Ciancia, M. D. Nosedá y A. S. Cerezo, *Phytochemistry* 29, 3407 (1990).
3. "Room temperature, low-field ^{13}C n.m.r. spectra of degraded carrageenans. Part II. On the specificity of the autohydrolysis reaction in kappa/iota and mu/nu structures", M. Ciancia, M. C. Matulewicz, C. A. Stortz y A. S. Cerezo, *Int. J. Biol. Macromol.* 13, 337 (1991).
4. "Determination of the structures of cystocarpic carrageenans from *Gigartina skottsbergii* by methylation analysis and NMR spectroscopy", M. Ciancia, M. C.

Matulewicz, P. Finch y A. S. Cerezo, *Carbohydr. Res.* **238**,
241 (1993).

5. "Alkali-modification of carrageenans: mechanism and kinetics in the kappa/iota-, mu/nu- and lambda-series", M. Ciancia, M. D. Nosedá, M. C. Matulewicz y A. S. Cerezo, *Carbohydr. Pol.* **20**, 95 (1993).
6. "L-Galactose-containing galactans from the carragenophyte *Gigartina skottsbergii*", M. Ciancia, M. C. Matulewicz y A. S. Cerezo, *Phytochemistry*, **34**, 1541 (1993).

Indice

<u>Primera Parte</u> . Introducción.....	1
<u>Capítulo 1</u> . Consideraciones generales.....	2
Galactanos sulfatados de algas rojas.....	3
Familia de los carragenanos.....	3
Familia del ágar.....	8
Aspectos biológicos.....	10
Reproducción de las Florídeas.....	10
Carragenanos de gametofitos y tetraesporofitos.....	12
Biosíntesis de galactanos sulfatados de algas rojas.....	18
Estudios químicos de los carragenanos de <i>Gigartina</i> <i>skottsbergii</i>	23
Polisacáridos polianiónicos como agentes antivirales....	26
<u>Capítulo 2</u> . Formación de geles.....	39
<u>Capítulo 3</u> . Espectroscopía de resonancia magnética nuclear.....	56
Resonancia magnética nuclear de ^{13}C	57
Resonancia magnética nuclear de ^1H	81
<u>Capítulo 4</u> . Hidrólisis ácida y autohidrólisis.....	97
Hidrólisis de uniones glicosídicas de glicósidos que contienen grupos ácidos.....	101
Hidrólisis de grupos sulfato.....	106
Hidrólisis de polisacáridos de algas.....	107
Reacciones de autohidrólisis.....	108
Primeros estudios.....	108

Autohidrólisis de carragenanos (estudios recientes).....	110
<u>Capítulo 5.</u> Tratamiento alcalino de carragenanos.....	119
<u>Segunda Parte.</u> Resultados y discusión.....	128
<u>Capítulo 1.</u> Estudio estructural de los carragenanos....	129
Aislamiento y purificación del carragenano.....	130
Curvas de precipitación de los carragenanos con cloruro de potasio.....	132
Fraccionamiento con cloruro de potasio.....	132
Análisis por metilación de los carragenanos 1C ₁ , 1C ₂ y 1C ₃	138
Espectroscopía de r.m.n.- ¹³ C de 1C ₁ , 1C ₂ y 1C ₃	145
Espectroscopía de r.m.n.- ¹ H de 1C ₁ , 1C ₂ y 1C ₃	156
<u>Capítulo 2.</u> Tratamiento alcalino de carragenanos.....	166
Reacción de ciclación en medio alcalino.....	167
Tratamiento alcalino preparativo. Estudio estructural de los carragenanos modificados.....	189
<u>Capítulo 3.</u> Autohidrólisis del carragenanos 1C ₁	227
Reacción de autohidrólisis.....	228
Fraccionamiento del producto final.....	245
<u>Capítulo 4.</u> Actividad antiviral.....	254

<u>Tercera Parte.</u> Materiales y Métodos.....	260
Consideraciones generales.....	261
Determinación de azúcares componentes.....	262
Determinación de 3,6-anhidrogalactosa.....	265
Determinación cuantitativa de azúcares totales.....	267
Determinación de galactosa en presencia de 3,6-anhidrogalactosa.....	268
Determinación de sulfato total.....	268
Determinación de α -galactosa 6-sulfato y 2,6-disulfato..	269
Dosaje de grupos reductores.....	271
Asignación de la configuración absoluta de las unidades de galactosa.....	272
Características del material.....	273
Aislamiento del carragenano.....	273
Curvas de precipitación con cloruro de potasio.....	274
Fraccionamiento preparativo del carragenano con cloruro de potasio.....	275
Estudio de la cinética del tratamiento alcalino.....	275
Tratamiento alcalino preparativo.....	276
Electroforesis sobre geles de poliacrilamida.....	276
Estudios de metilación.....	278
Estudios de autohidrólisis.....	282
Cromatografía sobre geles.....	284
Autohidrólisis preparativa.....	284
Espectroscopía de resonancia magnética nuclear.....	285
<u>Apéndice</u>	289
<u>Resumen</u>	301

Abreviaturas utilizadas

Para nombrar los residuos de azúcares se emplearon, en ciertos casos, las siguientes abreviaturas: β -D-Gal 4S= β -D-galactopiranososa 4-sulfato, 2Me- α -L-3,6-AnGal=2-O-metil-3,6-anhidro- α -L-galactopiranososa, etc.

Los grupos o compuestos escritos entre paréntesis indican asignaciones alternativas (y/o); por ejemplo, β -Gal (2S) indica la posibilidad de sulfatación en la posición 2.

Las restantes abreviaturas utilizadas en este trabajo de Tesis son las comunmente aceptadas.

PRIMERA PARTE

INTRODUCCION

CAPITULO 1

CONSIDERACIONES GENERALES

a.- Galactanos sulfatados de algas rojas

En la mayoría de las algas rojas, los galactanos sulfatados son los polisacáridos que se encuentran en mayor abundancia. Consisten esencialmente en cadenas lineales con una secuencia alternante de unidades de β -D-galactopiranosas enlazadas por la posición 3 y residuos de α -galactopiranosas unidos por la posición 4.

Hay dos grandes grupos de galactanos: en uno de ellos, los residuos de α -galactosa pertenecen a la serie D (familia de los carragenanos), en cambio, en el otro, a la serie L (familia del ágar). Además, se han encontrado galactanos en los cuales parte de los residuos de α -galactosa pertenecen a la serie D y parte a la serie L¹. Las unidades de β -galactosa se encuentran siempre en la configuración D.

Una parte importante de los residuos de α -galactosa puede encontrarse como 3,6-anhidro- α -galactosa. Varios grupos hidroxilo en estas cadenas poliméricas pueden estar sulfatados o metilados y las unidades de β -galactosa pueden encontrarse sustituidas formando un cetol cíclico con ácido pirúvico en las posiciones 4 y 6².

Familia de los carragenanos

En un principio, los carragenanos se clasificaron en base a su solubilidad en cloruro de potasio³. Así, se llamó carragenano kappa a aquél que precipitaba a una concentración 0,125 M de cloruro de potasio y carragenano lambda al que permanecía soluble. Aunque esta definición se

siguió utilizando (con variaciones en la concentración de cloruro de potasio considerada) no tiene sentido estructural y se presta a confusiones.

En base a los extensos estudios realizados sobre la estructura de los carragenanos, Rees y col. introdujeron un sistema de nomenclatura en el que las letras griegas representan estructuras repetitivas idealizadas; dicho sistema ha sido ampliado y levemente modificado posteriormente. Según la sulfatación sobre las unidades β , estos polisacáridos se han clasificado en distintas familias⁴⁻⁶, a saber:

1. Familia kappa

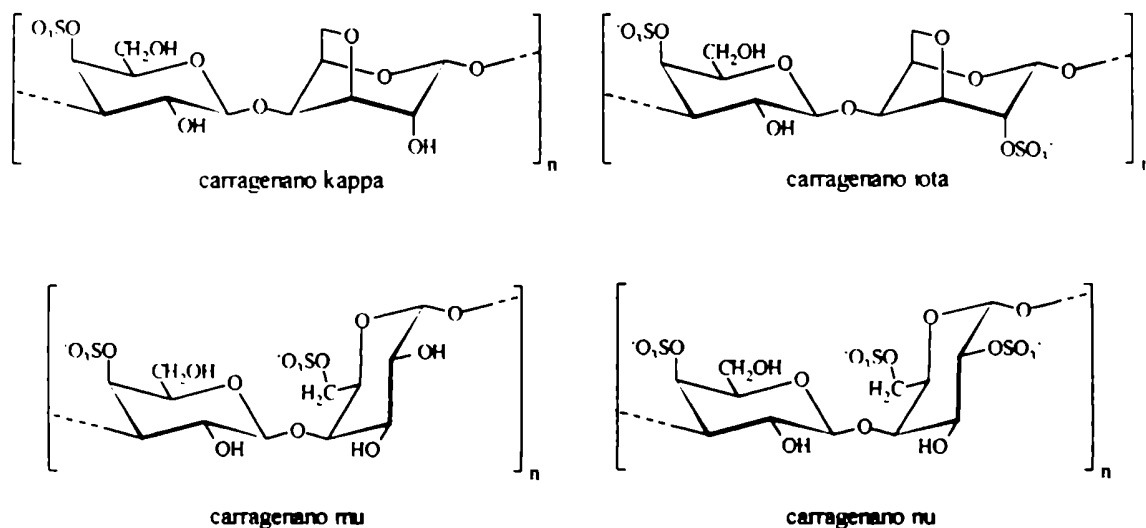
Se caracteriza por la presencia de un grupo sulfato esterificando el hidroxilo en C-4 de la unidad β (Figura 1). O'Neill⁷ describió en 1955 la estructura del carragenano kappa, aunque propuso la presencia de ramificaciones de galactosa disulfatada cada diez unidades de la cadena principal. Esta estructura se confirmó posteriormente⁸⁻¹⁰, si bien no se encontró evidencia alguna de ramificaciones^{8,9}.

El carragenano iota difiere del kappa por la presencia de grupos sulfato esterificando el hidroxilo en C-2 de las unidades de 3,6-anhidro- α -D-galactosa^{11,12}.

Otros carragenanos pertenecientes a esta familia son los "precursores biológicos" de los anteriores (ver d)). El carragenano mu es aquel formado por unidades alternantes de β -D-galactosa 4-sulfato y α -D-galactosa 6-sulfato¹³, el cual, por ciclación enzimática o en presencia de álcali, da

una estructura kappa, y el carragenano nu está formado por unidades de β -D-galactosa 4-sulfato y α -D-galactosa 2,6-disulfato¹⁴ y es el "precursor" del carragenano iota.

Figura 1. Familia kappa



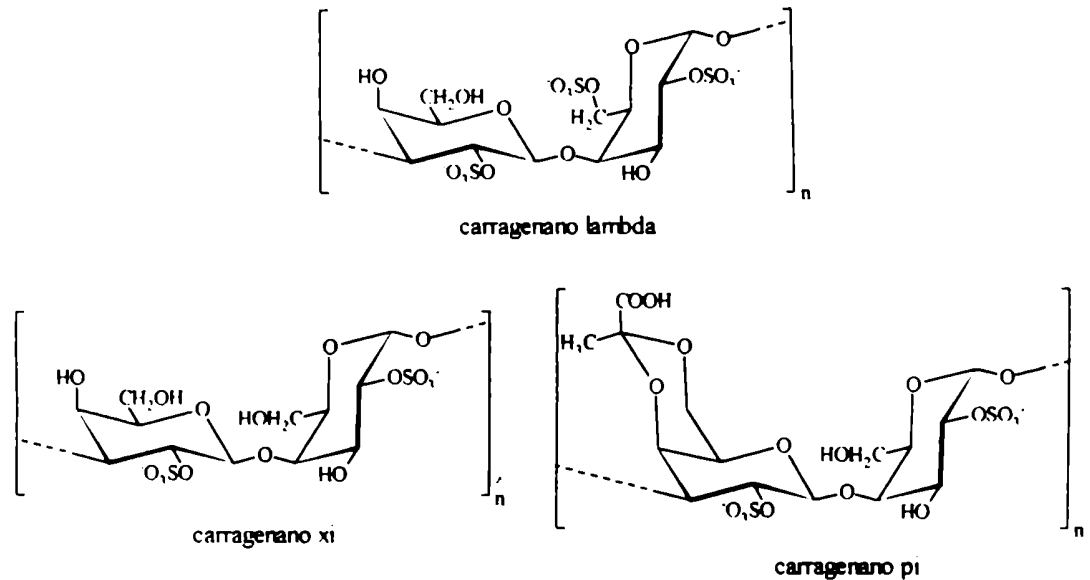
2. Familia lambda

Se caracteriza por la presencia de un grupo sulfato esterificando el hidroxilo en C-2 de la unidad β (Figura 2). Si bien hay estudios anteriores^{15,16} sobre la estructura del carragenano lambda, la primera definición con sentido estructural¹⁷ lo describe como un polisacárido formado por unidades alternantes de β -D-galactosa sulfatada en un 70% en C-2 y unidades de α -D-galactosa 2,6-disulfato, el cual carece de 3,6-anhidrogalactosa y de grupos sulfato en C-4 de la unidad β . En este trabajo de Tesis se llama carragenano lambda a aquel en el cual todas las unidades de β -galactosa se encuentran sulfatadas en C-2.

El carragenano xi es un polímero formado por unidades de β - y α -D-galactosa 2-sulfato enlazadas por las posiciones

3 y 4, respectivamente¹⁹. Un carragenano xi extraído de algas del género *Petrocelis* que contenía grupos 4,6-O-(1-carboxietilideno) sobre las unidades β se llamó carragenano pi¹⁹.

Figura 2. Familia lambda



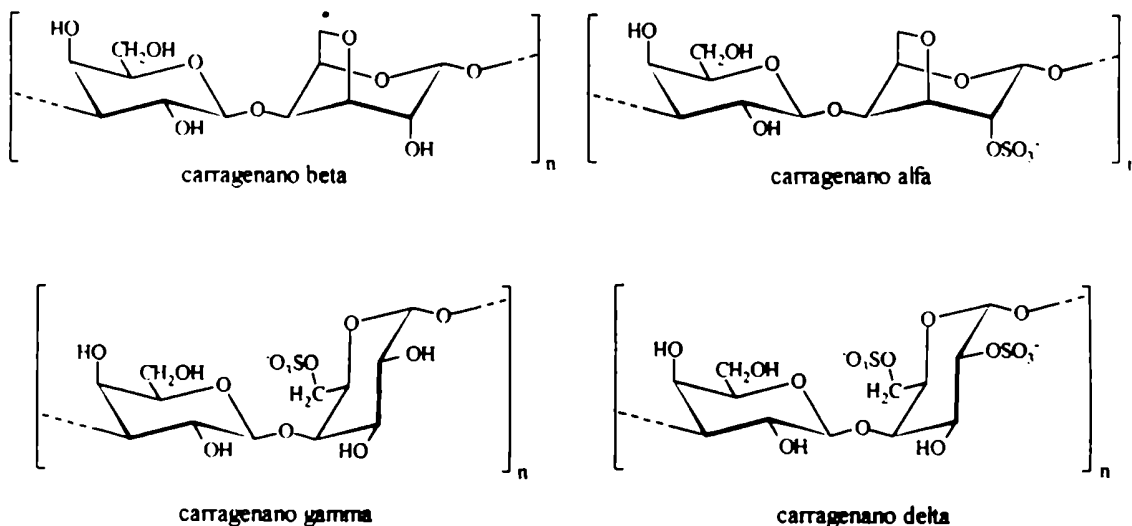
3. Familia beta

Los carragenanos de la familia beta son aquellos en los cuales las unidades β no se encuentran sulfatadas (Figura 3).

Si bien esta estructura había sido encontrada anteriormente^{14,18,20,21}, Greer y Yaphe⁶ llamaron carragenano beta a aquél formado por unidades alternantes de β-D-galactosa y 3,6-anhidro-α-D-galactosa. Los polisacáridos con altos porcentajes de esta unidad repetitiva se llamaron furcellaranos porque se encontraron en un principio en algas del género *Furcellaria*. El carragenano gamma es "precursor"

del anterior, es decir, aquél formado por unidades alternantes de β -D-galactosa y α -D-galactosa 6-sulfato.

Figura 3. Familia beta



Otros carragenanos pertenecientes a esta familia son el carragenano alfa, que difiere del beta por tener las unidades de 3,6-anhidrogalactosa sulfatadas en C-2, y el correspondiente "precursor", llamado carragenano delta formado por unidades alternantes de β -D-galactosa enlazada por la posición 3 y α -D-galactosa 2,6-disulfato unida por la posición 4²².

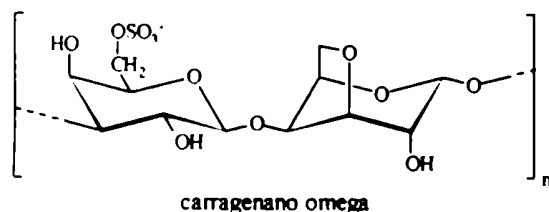
4. Familia omega

Se caracteriza por la sulfatación sobre el C-6 de la unidad β (Figura 4).

A pesar de los esfuerzos realizados para detectar el "precursor" correspondiente²³, el único integrante de esta familia que ha sido encontrado es el carragenano omega, formado por unidades alternadas de β -D-galactosa 6-sulfato y

3,6-anhidro- α -D-galactosa²³⁻²⁵.

Figura 4. Familia omega



Familia del ágar

Araki²⁶ describió al ágar como formado por dos polisacáridos: la agarosa neutra y la agarpectina ácida.

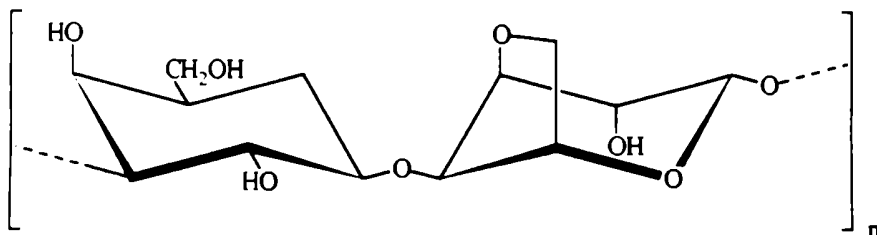
Para esta familia de galactanos no se ha planteado una clasificación similar a la que existe para los carragenanos.

La agarosa es el polímero de este grupo que presenta mayor poder gelificante y tiene la estructura más simple. Su fórmula idealizada es una secuencia de unidades alternantes de β -D-galactosa y 3,6-anhidro- α -L-galactosa que no presentan grupos sulfato (Figura 5). Las estructuras reales de agarosa generalmente difieren levemente de la idealizada, pues contienen algunas unidades de α -L-galactosa 6-sulfato en lugar de 3,6-anhidro- α -L-galactosa, cetales derivados del ácido pirúvico en los residuos de β -D-galactosa y grupos metilo y/o sulfato, muchas veces en la posición 6 de la unidad β ²⁷.

Rees²⁸ llamó porfiranos a los polisacáridos extraídos de *Porphyra umbilicalis* formados por unidades alternantes de β -D-galactosa y α -L-galactosa 6-sulfato ("precursores" de la

agarosa).

Figura 5. Estructura repetitiva de la agarosa.



Los agares sustituidos se encuentran ampliamente distribuidos entre las algas rojas²⁹ (agares desviantes). La presencia de 4,6-O-(1-carboxietiliden)-D-galactosa se encontró en polisacáridos de algas pertenecientes a las familias Gelidiaceae³⁰ y Gracilariaceae³¹.

Contrariamente a lo que sucede en los carragenanos, la presencia de grupos metilo es común; de hecho, la mayor parte (sino toda) de la agarosa comercial contiene algunas unidades repetitivas metiladas. Se describió la presencia de grupos metilo en las posiciones 6, 4 y 2 de las unidades β y en C-2 de la unidad α , incluso se encontró la díada 4-O-(6-O-metil- β -D-galactopiranosil)-3,6-anhidro-2-O-metil- α -L-galactosa, es decir, dos grupos metilo en una sólo unidad repetitiva³². Además, las unidades de β -D-galactosa pueden encontrarse sulfatadas en las posiciones 6, 4 o 2. Se han encontrado unidades de 6-O-metil- β -D-galactosa 4-sulfato³³, así como cadenas laterales de xilosa³² y 4-O-metil-L- α -galactosa^{34,35}.

La mayor parte de estas modificaciones, a excepción de los precursores biológicos, ocurre en sitios que no afectan

la conformación helicoidal de estos polisacáridos (C-6 y C-4 de las unidades de β -galactosa y C-2 de los residuos de 3,6-anhidrogalactosa); sin embargo pueden afectar la agregación de las hélices y, por consiguiente, la gelificación³⁶.

b.- Aspectos biológicos

En este trabajo de Tesis se estudiaron los carragenanos de plantas cistocárpicas del alga roja *Gigartina skottsbergii*, cuya ubicación taxonómica es la siguiente:

División: Rhodophyta.

Clase: Rhodophyceae.

Subclase: Florideophycidae.

Orden: Gigartinales.

Familia: Gigartinaceae.

Género: *Gigartina*.

Especie: *skottsbergii*.

Reproducción de las Florídeas

Introducción

En las algas rojas ocurre tanto la reproducción sexual como asexual. La reproducción sexual a nivel celular involucra la unión de células, de sus núcleos, la asociación de sus cromosomas y genes y la meiosis. Esto lleva al intercambio y la formación de nuevas combinaciones de material genético. La reproducción asexual es un aumento de la progenie sin unión celular ni asociación de material genético.

Reproducción asexual

Algunos tipos de algas multicelulares se reproducen por fragmentación; estos fragmentos tienen la capacidad de convertirse, por crecimiento continuo, en nuevos individuos. Este proceso se conoce como reproducción vegetativa.

Además, las algas producen agentes especiales de reproducción asexual llamados esporas.

Reproducción sexual

Las algas rojas presentan un ciclo de vida en el que existen dos tipos distintos de individuos de vida libre: una planta haploide, productora de gametas (gametofito) y una diploide que produce esporas (esporofito). Las gametas se unen formando cigotas que se convierten en esporofitos diploides. Cuando éstos maduran forman esporas, la meiosis ocurre durante la esporogénesis. Estas esporas se desarrollan dando gametofitos.

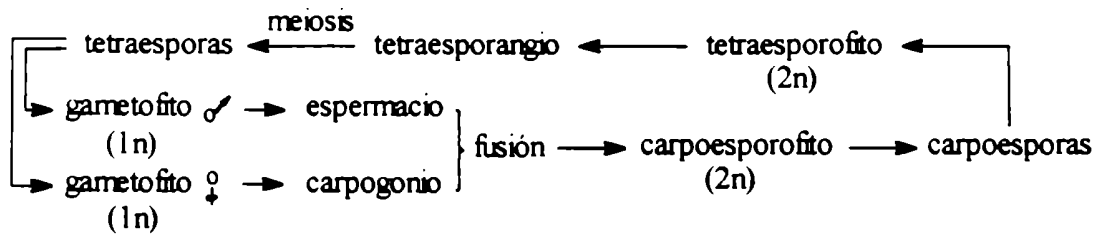
Una característica distintiva de la división Rhodophyta es la ausencia de células flageladas. La reproducción sexual es oogámica e involucra gametas masculinas que carecen de movilidad propia llamadas espermacios y células femeninas especializadas llamadas carpogonio.

En la subclase Florideophycidae el ciclo de vida es una variante del anterior que se caracteriza por la presencia de una tercera fase: el carposporofito, que está unido y depende del gametofito, a partir del que se forma por reproducción sexual (Figura 6).

Los espermacios se producen en estructuras reproductivas llamadas espermatangios. El carpogonio es una célula elongada que se agranda en la base y se extiende

distalmente en una porción llamada tricógino a la cual pueden unirse los espermacios. Después de la fertilización, el carpogonio produce una fase llamada carposporofito, que consiste en filamentos gonimoblásticos que contienen al carposporangio, el que libera una sóla carpospora.

Figura 6. Ciclo de vida trifásico característico de las algas rojas de la subclase Florideophycidae.



El conjunto formado por el carposporofito y el tejido del gametofito femenino que lo rodea se llama cistocarpio.

Por este motivo, cuando el gametofito femenino lleva unidos carposporofitos, se habla de fase cistocárpica. Las plantas de las cuales se extrajeron los carragenanos estudiados en esta Tesis se encontraban en este estadio.

La carpospora es liberada y germina dando una fase diploide, el tetraesporofito, que madura produciendo tetraesporangios que constituyen el lugar donde se produce la meiosis. Los cuatro núcleos formados durante este proceso se incorporan a cuatro productos llamados tetraesporas, las cuales, al ser liberadas, pueden desarrollarse, dando lugar a la formación de plantas gametofíticas³⁷.

c.- Carragenanos de gametofitos y tetraesporofitos

La historia del estudio químico de los carragenanos se encuentra descripta en las Tesis Doctorales de M. C. Matulewicz³⁸ y C. A. Stortz³⁹, donde ha sido dividida en

cuatro períodos. Un quinto período comienza con el descubrimiento, en forma paralela por varios grupos, que en ciertas algas, los carragenanos producidos por generaciones cariológicamente diferentes son distintos⁴⁰⁻⁴³.

La variación en la composición de los carragenanos de una misma especie de algas había sido atribuída a diferencias en el habitat en el que se desarrolló, la época del año en que fue recolectada y la edad de la planta^{44,45}.

Sin embargo, ya en 1949, Marshall y col.⁴⁶ sugirieron que la variación en la fuerza de gel del carragenano del alga *Chondrus crispus* podría relacionarse con la fase sexual, pero esto no se investigó en los años siguientes. En 1972, Chen y McLachlan⁴⁷ consideraron nuevamente esta posibilidad, en base a las observaciones realizadas en su trabajo sobre cultivos de la misma alga. Posteriormente, Chen y col.⁴⁸ determinaron la relación entre carragenano kappa y lambda presentes en gametofitos y tetraesporofitos de *Chondrus crispus* a partir de determinaciones colorimétricas*. Estos autores llamaban carragenano kappa a aquél que tenía 3,6-anhidrogalactosa y lambda a aquél que no la contenía. Vieron que la relación kappa/lambda variaba entre 1,7-4,1 en el caso de los gametofitos, tanto femeninos como masculinos, en muestras naturales y de cultivo. En cambio, para los tetraesporofitos, esta relación variaba entre 0,04-0,17. Los carragenanos de gametofitos de *Gigartina stellata* dieron resultados similares. Sin embargo, los autores no establecieron la naturaleza de los

*Las definiciones de carragenano kappa y lambda varían según los autores, por lo que se aclaran en cada caso.

polisacáridos presentes.

McCandless y col.⁴¹ llevaron a cabo un estudio químico de los carragenanos de gametofitos femeninos y masculinos y tetraesporofitos de *Chondrus crispus* que incluyó fraccionamiento con cloruro de potasio y análisis de las fracciones obtenidas (determinación del contenido de 3,6-anhidrogalactosa y sulfato, y espectro infrarrojo). Observaron que los carragenanos extraídos de gametofitos femeninos y masculinos contenían carragenanos kappa (aquellos que precipitaban a una concentración 0,15 M de cloruro de potasio), una fracción intermedia y una soluble. Por tratamiento alcalino de la fracción soluble se obtuvo un producto que, por agregado de cloruro de potasio 0,15 M, dió dos subfracciones, una insoluble, cuyo espectro infrarrojo indicó que se trataba de un carragenano kappa, y otra soluble que no identificaron. Por otro lado, en la fase tetraesporofítica, se detectaron sólo carragenanos lambda (aquellos que permanecían solubles y no presentaban la banda de infrarrojo típica de los grupos sulfato en posición axial). Además, los autores sugirieron que había un patrón de sulfatación enzimática específica: en los carragenanos de tetraesporofitos la sulfatación de la unidad B se produciría sobre el C-2, mientras que, en los de gametofitos en el C-4.

Simultáneamente, Pickmere y col.⁴² obtuvieron resultados similares. Se estudiaron los carragenanos de gametofitos femeninos y masculinos y de tetraesporofitos de cuatro especies del género *Gigartina*. Llamaron carragenano kappa a aquel que precipitaba en soluciones de cloruro de potasio 0,25 M y lambda a aquel que permanecía soluble. En

este caso, para los gametofitos la relación kappa/lambda variaba entre 0,28-4,8 y era generalmente mayor que 1; en cambio, para los tetraesporofitos era 0,02-0,23. En un segundo trabajo⁴⁶, sometieron la fracción soluble obtenida a partir de los gametofitos a un tratamiento alcalino, definiendo como carragenano mu a aquel carragenano soluble que, una vez tratado, precipitaba en cloruro de potasio 0,25 M. Tomaron muestras a lo largo del año de tres especies del género *Gigartina* y concluyeron que los tetraesporofitos producían carragenanos lambda y los gametofitos carragenanos kappa, mu y lambda. Sin embargo, el porcentaje de carragenanos mu dependía del grado de madurez de la planta; las plantas juveniles contenían mayor proporción de carragenano mu. Este hecho respaldaría la hipótesis de Rees⁴⁹, según la cual el carragenano mu sería el "precursor" del kappa⁴⁶ (ver d)).

Los mismos autores publicaron, posteriormente, un trabajo analizando los carragenanos de doce especies del género *Gigartina* y obtuvieron conclusiones similares⁵⁰.

Waaland^{43,51} estudió las diferencias entre los carragenanos de gametofitos y tetraesporofitos de algas de los géneros *Gigartina* e *Iridaea*. Se llevó a cabo la extracción del alga por medio de una solución acuosa 0,54 M de hidróxido de sodio a 90-100°C (en estas condiciones las unidades de α -galactosa 6-sulfato se ciclan, al menos en parte, para dar 3,6-anhidrogalactosa). El polisacárido obtenido se fraccionó y se llamó carragenano kappa a aquel que precipitaba en cloruro de potasio 0,33 M y lambda a aquel que permanecía soluble. El 87-96% de los carragenanos

extraídos de gametofitos femeninos y masculinos de las algas estudiadas era kappa y el 76-100% de los carragenanos de tetraesporofitos era lambda.

En los años siguientes, se publicaron varios trabajos⁵²⁻⁵⁶ donde se estudiaron los carragenanos de las dos fases sexuales separadamente de algas pertenecientes a la familia de la familia Gigartinaceae, utilizando, además del análisis químico y espectroscopía infrarroja, técnicas de inmunoquímica. Así, se observó que los resultados anteriores podían generalizarse para estas algas. Para carragenanos extraídos de algas pertenecientes a las Phylloporaceae⁵⁷ se obtuvieron resultados similares.

Por otro lado, en algas de otras familias del mismo orden (Gigartinales), las dos fases del ciclo de vida producen carragenanos similares. Hosford y McCandless⁵² encontraron sólo pequeñas diferencias en los carragenanos de gametofitos y tetraesporofitos del alga *Hypnea musciformis* (Hypneaceae). Los carragenanos de *Furcellaria fastigiata* eran similares a los carragenanos kappa pero las unidades β se encontraban sólo parcialmente sulfatadas en C-4⁵⁸ y los carragenanos extraídos de tetraesporofitos precipitaban el suero anti-carragenano kappa⁵². Análogamente, se determinó que los carragenanos de gametofitos y tetraesporofitos de varias especies pertenecientes al género *Eucheuma*^{59,60} (Solieriaceae) y los de *Cystoclonium purpureum*⁶¹ (Rhodophylidaceae) producen carragenanos similares. En todos estos casos, los carragenanos estudiados pertenecían a la familia kappa o beta; es decir, que gelificaban a bajas concentraciones de cloruro de potasio o producían

carragenanos gelificantes por tratamiento alcalino.

A partir de estos resultados podría generalizarse que en las algas rojas de las familias Gigartinaceae y Phylloporaceae los gametofitos producen mayoritariamente carragenanos que gelifican a bajas concentraciones de cloruro de potasio o que pueden convertirse en ellos por tratamiento alcalino, en cambio, los tetraesporofitos producen carragenanos solubles.

Una excepción fue informada por Ayal y Matsuhiro⁶² quienes determinaron, en un trabajo que incluyó el análisis de estos polisacáridos, fraccionamiento, análisis y espectro infrarrojo de las fracciones obtenidas y metilación, que los carragenanos de gametofitos y tetraesporofitos de *Chondrus canaliculatus* eran similares.

De estos resultados se desprende que los carragenanos lambda forman una familia de polisacáridos diferente del resto de los carragenanos⁶³ que es exclusiva de los tetraesporofitos de las algas pertenecientes a las Gigartinaceae y Phylloporaceae.

Así, se realizó una nueva evaluación de la influencia de los factores estacionales sobre el porcentaje de carragenanos sobre peso seco del alga y la composición de los mismos.

Los resultados obtenidos indicaron que los carragenanos de una dada fase sexual del alga *Chondrus crispus* eran similares, independientemente de la época del año o lugar de la recolección^{41,64}. En un trabajo posterior, Chopin y col.⁶⁵ informaron un mínimo en el porcentaje total de carragenanos

en primavera, pero el tipo de polisacáridos presente, estudiado por espectroscopía infrarroja y de r.m.n.-¹³C, era similar. También, se investigaron las variaciones estacionales en los carragenanos de gametofitos y tetraesporofitos de varias especies del género *Gigartina*⁵⁰ y se vió que, considerando ambas fases por separado, no había variaciones apreciables, tanto en el porcentaje total de carragenanos, como en la composición.

Piriz y Cerezo⁶⁶ hallaron resultados similares trabajando, tanto con gametofitos, como tetraesporofitos y plantas "estériles" de *Gigartina skottsbergii*.

d.- Biosíntesis de galactanos sulfatados de algas rojas

Se sabe que la biosíntesis de polisacáridos comienza generalmente por conversión de los monosacáridos en los nucleótidos azúcares correspondientes y que estos intermediarios de alta energía son usados posteriormente en la reacción de polimerización⁶⁷. La biosíntesis de los galactanos sulfatados de algas rojas parece comenzar con un proceso de este tipo.

Su y Hassid⁶⁸ informaron la presencia de UDP-D-galactosa y GDP-L-galactosa en el alga roja *Porphyra perforata*. Estos nucleótidos azúcares participarían en la formación del esqueleto de la molécula.

En las células animales el donador de sulfato activado es adenosina 3'-fosfato 5'-fosfosulfato (PAPS). El sulfato es activado primero por la ATP sulfurilasa (ATP sulfato

adenililtransferasa) dando adenosina 5'-fosfosulfato (APS) y pirofosfato. La APS es fosforilada posteriormente por la APS-kinasa, dando PAPS y ADP. Se ha demostrado la síntesis de PAPS en las algas rojas y se supone que es el intermediario en la sulfatación de los galactanos⁶⁷.

Cuando se incubó el alga *Chondrus crispus* en presencia de $\text{Na}_2^{35}\text{SO}_4$, tanto los carragenanos solubles como los insolubles aislados contenían grupos sulfato radiactivos⁶⁹. Jackson y McCandless⁷⁰ sugirieron que el grado de incorporación de sulfato es similar para gametofitos y tetraesporofitos de *Chondrus crispus* y Tveter-Gallagher y col.⁷¹ determinaron por estudios autoradiográficos la presencia de ³⁵S tanto en el citoplasma como en las paredes celulares de la misma alga.

Se considera²⁷ que el galactano no sulfatado y las sulfotransferasas son secretados por el aparato de Golgi y el retículo endoplasmático, respectivamente. El sulfato libre en la pared celular se une al polisacárido precursor, dando lugar a la formación del carragenano. Estas sulfotransferasas parecen ser bastante específicas, por ejemplo, aquellas capaces de sulfatar el C-4 de la unidad β no actuarían en el C-2 de dicha unidad⁷².

Rees⁷³ aisló una enzima de *Porphyra umbilicalis* que eliminaba el sulfato en C-6 de las unidades de α -L-galactosa del porfirano con la formación de 3,6-anhidro- α -L-galactosa. Posteriormente, Lawson y Rees⁷⁴ aislaron un preparado de enzimas de *Gigartina stellata* que catalizaba la conversión de las unidades de α -D-galactosa 6-sulfato a 3,6-anhidro- α -D-galactosa. Wong y Craigie⁷⁵ demostraron la presencia de la

enzima, tanto en gametofitos como en tetraesporofitos de *Chondrus crispus*. Esta sulfoeliminasa actúa a nivel del polímero, produciendo 3,6-anhidrogalactosa con pérdida estequiométrica de sulfato. La máxima actividad de la misma se registró a pH=6,5 y a 40°; se encontraron los siguientes inhibidores: molibdato, fosfato, sulfato, tungstato, cisteína, ATP, GTP, UDP y carragenano lambda. Este resultado indica que la ubicación del éster sulfato de la unidad β determina la actividad de la misma. Entonces, a pesar que la fase diploide tiene la enzima que cataliza la ciclación, ésta no ocurre pues el carragenano lambda, que es el principal constituyente de los galactanos de la fase diploide, no es un sustrato adecuado para esta enzima. Por este motivo, la fase diploide no contiene 3,6-anhidrogalactosa.

Por tratamiento alcalino de los carragenanos se produce la ciclación de las unidades de α -galactosa 6-sulfato para dar 3,6-anhidrogalactosa⁷⁶. Posiblemente, la secuencia de pasos de la reacción *in vivo* sea similar a los de la ciclación química. Si esto es así entonces la reacción de ciclación de los carragenanos lambda *in vivo* no se produciría debido a que la presencia de los grupos sulfato en estos polisacáridos impediría la polarización o ionización del hidroxilo en C-3 de la unidad α , inhibiendo la reacción. Más aún, modelos moleculares sugirieron que esta reacción podría estar impedida por la interacción entre el hidroxilo en C-3 de la unidad α y el grupo sulfato en C-2 de la unidad β ⁷⁷ (ver Segunda Parte, Cap. 2). Además, recientemente se han encontrado en un carragenano lambda

pequeñas cantidades de 3,6-anhidrogalactosa que formarían parte de la cadena del polisacárido. Entonces, éste no inhibiría, sino que retardaría la reacción⁷⁸.

En conclusión, se considera que la biosíntesis de los carragenanos sucede en tres etapas, a saber: a) formación del esqueleto de galactano, b) sulfatación selectiva del mismo y c) la formación de unidades de 3,6-anhidrogalactosa²⁷.

Sin embargo, estudios de determinación de estructura de carragenanos extraídos de distintas algas sugirieron que la biosíntesis de los carragenanos podría ser más compleja de lo que se había supuesto anteriormente. El carragenano aislado de *Eucheuma gelatinae*⁷⁹ resultó ser un híbrido gamma-beta-kappa. Yaphe sugirió que el carragenano beta podía ser precursor del kappa; es decir, que la sulfatación de la unidad β podría producirse con posterioridad a la ciclación de la unidad α . Estudios realizados sobre los carragenanos de *Rissoella verrucosa*⁸⁰ y *Furcellaria lumbricalis*⁸¹ llevaron a conclusiones similares.

Además de la sulfoeliminasa que convierte la α -galactosa 6-sulfato en 3,6-anhidro- α -galactosa, Craigie sugirió que podrían existir sulfohidrolasas que hidrolizaran específicamente el grupo sulfato en C-2 de la unidad α ⁷², sin embargo, hasta el momento no se ha encontrado ningún indicio de la existencia de las mismas.

Bellion y col.⁸² encontraron que entre los carragenanos de *Eucheuma spinosum* y *Eucheuma cottonii* (Solieriaceae), así como en los de *Ahnfeltia concinna* y *Ahnfeltia gigartinoides* (Phyloporaceae) el único precursor presente era el

carragenano nu, a pesar de encontrarse carragenanos kappa y iota. En base a estos resultados, se sugirió que para estas algas, el carragenano nu sería el precursor común de los carragenanos kappa y iota. El carragenano nu se desulfataría dando el iota, que a su vez se desulfataría para dar el kappa, todo esto por medio de un sistema enzimático adecuado. Estos autores encontraron estructuras de tipo mu en algas de la familia Gigartinaceae, lo cual indicaría que los carragenanos en las diferentes familias de algas rojas son producidos por vías biosintéticas distintas.

Sin embargo, todos estos resultados pueden explicarse perfectamente en base a la teoría clásica de la biosíntesis de carragenanos²⁷. Así, puede suponerse que el carragenano mu es mejor sustrato para la sulfhidrolasa que cataliza la reacción de ciclación que el carragenano gamma, con lo cual, el carragenano mu se ciclaría con preferencia al carragenano gamma; esto explicaría, por ejemplo, la ausencia de estructura mu en el carragenano de *Eucheuma gelatinae*⁷⁹. En este caso, el grupo sulfato en C-4 de la unidad β favorecería la reacción de ciclación. Un razonamiento de este tipo justificaría la ausencia de carragenano mu encontrada por Bellion y col.⁸² en los polisacáridos de ciertas algas de las familias Solieriaceae y Phylophoraceae.

Como se deduce de lo descripto más arriba, se necesitarán nuevos estudios sobre la biosíntesis de estos polisacáridos para obtener conclusiones que abandonen el terreno especulativo y se basen en resultados concretos.

e.- Estudios químicos de los carragenanos de *Gigartina skottsbergii*.

Cerezo estudió los carragenanos del alga roja *Gigartina skottsbergii* extraídos de plantas, recolectadas en primavera y en otoño en la Estación de Biología Marina de Puerto Deseado, que no había sido separadas según sus fases sexuales.

Por hidrólisis ácida de los polisacáridos de las algas recolectadas en primavera^a y cromatografía en papel de los monosacáridos se determinó la presencia de galactosa como único azúcar constituyente. El fraccionamiento con cloruro de potasio de estos carragenanos dió los resultados que se indican en la Tabla 1.

Tabla 1. Fraccionamiento de los carragenanos extraídos de *Gigartina skottsbergii* (plantas recolectadas en primavera).

Fracción	Rendimiento ^a %	Concentración de KCl M	Sulfato como SO ₃ K %	Nitrógeno %	[α] _D °
A	8	0,10	15,9	3,9	-
B	5	0,40	23,3	1,4	+ 71,0
C	40	0,65	26,7	1,6	+ 54,0
D	13,3	0,75	31,1	-	+ 55,1
E	13,3	1,5 ^b	31,2	-	+ 60,0

^aRendimiento del fraccionamiento. ^bSoluble en cloruro de potasio 1,5 M.

Las fracciones C y D se juntaron y se estudiaron como fracción C'. Los espectros infrarrojos de las fracciones B, C' y E presentaban una fuerte absorción a 850 cm⁻¹, que corresponde a grupos sulfato en posición secundaria axial; esto sugirió la presencia de galactosa 4-sulfato. Las diferencias entre estas fracciones se encontraron en la zona del espectro que es específica para sulfato primario (820 cm⁻¹) y sulfato secundario ecuatorial (830 cm⁻¹). Para la fracción E, la banda tenía un máximo a 850 cm⁻¹ y disminuía gradualmente hasta 810 cm⁻¹, lo que sugirió la presencia de

galactosa 2-sulfato y una pequeña proporción de galactosa 6-sulfato. La fracción B mostró un pico de poca intensidad a 820 cm^{-1} que no se observó en la fracción C'.

A pesar que en el espectro infrarrojo de la fracción C' no se detectó la presencia de sulfato primario, por el método de Rees⁸⁴ se estimó alrededor de 20 % de estas unidades, mostrando que un resultado negativo en el infrarrojo no asegura la ausencia del correspondiente grupo funcional.

Por oxidación con periodato de la fracción C' (relación molar Gal:3,6-AnGal:sulfato 1,00:0,78:1,20) se determinó la presencia de unidades de galactosa que no se encontraba unida a la cadena por la posición 3.

La desulfatación de C' redujo el contenido de sulfato y 3,6-anhidrogalactosa a 1/6 y 1/2 de los valores originales, respectivamente. La oxidación del producto desulfatado indicó un consumo de periodato debido a la formación de nuevos α -glicoles, que se crearon por hidrólisis de uniones 3,6-anhidrogalactosídicas en el esqueleto de la molécula. Por hidrólisis de este producto se encontró una relación galactosa:xilosa de 94:6. Por tratamiento alcalino del mismo mostró que la proporción de sulfato primario presente había aumentado de 20 a 61 % del total, respecto al producto de partida, de acuerdo con la alta resistencia del grupo sulfato primario a la hidrólisis ácida.

Para la fracción C' se determinó que el 60% de unidades de 3,6-anhidrogalactosa estaban sulfatadas en C-2 a partir de la diferencia en la velocidad de hidrólisis de la unión 3,6-anhidrogalactosídica. Cuando se sometió el producto desulfatado a una hidrólisis ácida en las condiciones anteriores, se determinó que 54,5 % de las unidades de 3,6-anhidrogalactosa estaban sulfatadas en C-2. La fracción C' tratada con álcali dió por hidrólisis ácida 38,5 % de estas

unidades; es decir que las unidades de α -galactosa 6-sulfato que se ciclaron no llevaban sulfato en C-2.

Por otra parte, por hidrólisis de C' en condiciones más drásticas, se pudo determinar las posiciones de sustitución de los grupos sulfato presentes. La fracción C' tratada presentó dos grupos sulfato diferentes en porcentajes similares, con vidas medias de 0,22 y 1,36 hs, que correspondían a unidades de 3,6-anhidrogalactosa 2-sulfato y galactosa 4-sulfato. La curva obtenida para el producto desulfatado mostró dos tipos diferentes de grupos sulfato correspondientes a 3,6-anhidrogalactosa 2-sulfato y galactosa 6-sulfato (44 y 56 %, respectivamente). Este resultado confirmó que, durante la desulfatación se había producido hidrólisis selectiva del grupo sulfato de las unidades de galactosa 4-sulfato, a pesar que tanto estos grupos sulfato, como los de las unidades de 3,6-anhidrogalactosa 2-sulfato se encontraban en posición axial.

Basándose en los resultados anteriores, el autor propuso que la fracción C' estaba formada por moléculas con un esqueleto de cuatro unidades de galactosa en conformación 4C_1 y tres residuos de 3,6-anhidrogalactosa en conformación 1C_4 . Cinco grupos sulfato se encontrarían distribuidos en la siguiente forma: 2 unidades de 3,6-anhidrogalactosa 2-sulfato, 2 de galactosa 4-sulfato y 1 de galactosa 6-sulfato, esta última unida por la posición 4.

Los carragenanos extraídos de algas recolectadas en otoño⁸⁵ (primera extracción) se fraccionaron con cloruro de potasio, obteniéndose una fracción que precipitaba a una concentración 0,30-0,40 M (relación molar Gal:3,6-AnGal:sulfato 1,00:0,62:1,00, rendimiento 35%) y un producto que permaneció soluble a una concentración 1,5 M de cloruro de potasio (20%).

El estudio estructural por metilación de la fracción insoluble⁶⁶, dió como azúcar mayoritario 2,6-di-O-metilgalactosa, indicando que en las unidades de galactosa enlazadas por la posición 3 el grupo sulfato se hallaba en C-4. Se detectaron además pequeñas cantidades de 2,4,6- y 2,3,6-tri-O-metil-galactosa. La metilación del producto desulfatado⁶⁷ mostró, como era de esperar, un aumento del porcentaje de 2,4,6-tri-O-metilgalactosa a expensas de 2,6-di-O-metilgalactosa.

Smidsrød y col.^{68,69} estudiaron los carragenanos de *Gigartina skottsbergii*, comparándolos con los de *Chondrus crispus* y *Gigartina stellata* (las muestras no habían sido separadas según su fase sexual). Así, determinaron que los carragenanos de *G. skottsbergii* eran los que presentaban menor poder gelificante⁶⁸, aunque éste aumentaba notablemente por tratamiento alcalino⁶⁹. La relación molar Gal:3,6-AnGal:sulfato de los productos tratados era similar para las tres algas; sin embargo, el poder gelificante de los carragenanos de *G. skottsbergii* seguía siendo el menor.

Estos resultados podrían deberse a que, entre los ejemplares estudiados de este alga, había mayor proporción de tetraesporofitos que en los de las otras.

f.- Polisacáridos polianiónicos como agentes antivirales

Un agente antiviral debe interaccionar con el virus bloqueando alguna de las etapas del ciclo de vida del mismo, pero debe causar el mínimo trastorno posible en los tejidos infectados. Además, es deseable que pueda ser administrado en forma oral y que se produzca con bajos costos.

Si bien hay informes anteriores, en la década del sesenta surgieron un gran número de trabajos donde se indicaba la actividad antiviral de los polisacáridos aniónicos⁹⁰. Takemoto y Spicer⁹¹ estudiaron la inhibición de la infección de cultivos celulares por herpesvirus usando dextrán sulfato. Observaron que la actividad de este polisacárido dependía de su peso molecular y sugirieron que la inhibición se debía a la unión del mismo a los sitios receptores del virus. Los ensayos realizados *in vivo* resultaron negativos.

Nigrelli y col.⁹² encontraron que los carragenanos de *Chondrus crispus* presentaban actividad hacia los virus de influenza B y paperas en huevos embrionados de pollo. Posteriormente se vió que polisacáridos extraídos de ciertas algas rojas^{93,94} inhibían la actividad de Herpes simplex tipos 1 y 2 (HSV-1 y HSV-2). En estos trabajos no se caracterizó debidamente la estructura de los polisacáridos utilizados.

En los últimos años, en gran medida debido a la necesidad de encontrar drogas para controlar la infección por el virus de inmunodeficiencia humano (HIV) y prevenir el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), la búsqueda de compuestos que presentaran actividad antiviral tomó gran impulso⁹⁵. El interés en el potencial antiviral de los polisacáridos sulfatados reapareció con el descubrimiento que el dextrán sulfato y la heparina producían una importante inhibición de la replicación de los HIV-1 y HIV-2 *in vitro*⁹⁶⁻⁹⁸.

Baba y col.⁹⁹ estudiaron la actividad antiviral de varios polianiones con una serie de virus de diferentes

tipos (Tabla 2) y concluyeron que estos polímeros son inhibidores potentes y muy selectivos de los virus con envoltura, ya sean virus ADN o ARN pero no resultan efectivos hacia los que carecen de la misma.

Además, se encontró que estos compuestos no son tóxicos para la célula huésped en los cultivos celulares en concentraciones hasta por lo menos 100 veces mayores que las necesarias para inhibir la replicación de los virus.

Para determinar la influencia del peso molecular en la actividad antiviral de los productos, utilizaron detranos sulfatados con pesos moleculares en un rango de 1.000 a 500.000. Se vió que, más allá del virus estudiado, la actividad aumentaba con el incremento del peso molecular hasta 10.000 y luego se hacía independiente del mismo.

WuDunn y Spear¹⁰⁰ demostraron que el paso inicial en la infección celular por HSV-1 y HSV-2 era la unión de los viriones a heparán sulfato en la superficie de las células huésped; ésta es la primera en una cascada de interacciones que culmina con la fusión de la envoltura del virión con la membrana plasmática. Entonces, los agentes que puedan bloquear esta primera interacción en forma efectiva, impedirán la adsorción e infección de los tejidos con el HSV. Los polisacáridos sulfatados interaccionan con los dominios cargados positivamente de las glicoproteínas virales involucradas en la unión de las partículas virales a la superficie celular.

Del mismo modo, se ha determinado que el factor plaquetario 4, una proteína pequeña, ligeramente básica, con afinidad específica por los glicosaminoglicanos, se une al

Tabla 2. Actividad antiviral de diferentes polianiones frente a distintos virus^a.

Virus	Cultivo celular	Dextran sulfato (PM=10.000)	Heparina	Pentosan sulfato	Fuicoidano	Carragenano kappa	Carragenano lambda
HSV-1	PRK	2	37	3,7	1,7	3,7	1,6
HSV-2	PRK	0,5	32	5,3	1,1	2	1,5
Citomegalovirus	PRK	1,3	20	4,5	1,5	15	4,5
Adenovirus tipo 2	HEL	>200	>200	>200	>200	>200	>200
Virus Vaccinia	HEL	16	>200	10	>200	36	16
Virus de estomatitis vesicular	PRK	0,3	7	24	0,3	0,3	0,2
Virus de estomatitis vesicular	HeLa	0,5	300	8	11	7	4
Poliovirus tipo 1	HeLa	>400	>400	>400	>400	>400	>400
Parainfluenza virus tipo 3	Vero	>400	>400	>400	>400	>40 ^b	>4 ^b
Reovirus tipo 1	Vero	>400	>400	70	>400	>40 ^b	>4 ^b
HIV-1	MT-4	0,5	1,9	0,7	2,8	12	1,9

^aConcentración (µg/ml) del compuesto que incluye la citopatogenicidad del virus en 50%. ^bSe alteró la morfología celular a ésta o menores concentraciones.

heparán sulfato de la superficie celular, ocupando los sitios a los que se une normalmente el virión.

La remoción enzimática del heparán sulfato de la superficie celular redujo significativamente la eficiencia con la cual las células podían ser infectadas. Además, se vió que el HSV-1 y HSV-2 se unen y producen infección de las células CHO (células ováricas de hamster). Sin embargo, CHO mutantes deficientes en heparán sulfato resultaron refractarias a la infección por el virus.

Recientemente, se encontró que la primera etapa en la infección de células HEL (de pulmón de embrión humano) por el citomegalovirus es también la unión al heparán sulfato de la superficie celular¹⁰¹ y es posible que un mecanismo de este tipo pueda generalizarse para todos los virus de envoltura, lo que explicaría el efecto que sobre ellos producen los polisacáridos sulfatados.

Se encontró que la inhibición producida por heparina y heparán sulfato en la adsorción del HSV por las células dependía del contenido de sulfato y el tamaño molecular¹⁰², además, parecen estar involucrados factores estructurales¹⁰¹.

Eficacia clínica

Debido a su excelente actividad *in vitro* contra HIV-1, se introdujo el uso de dextrán sulfato y pentosán sulfato en el tratamiento clínico de pacientes con SIDA. Sin embargo, si bien no produjo efectos laterales, la administración oral de dextrán sulfato en dosis de 900 a 5.400 mg, 3 veces por día durante 8 semanas tampoco tuvo efectos positivos¹⁰³. Esto

se debe a la poca capacidad de absorción de estos productos en el tracto gastrointestinal. La administración intravenosa de glicosaminoglicanos es difícil, ya que estos compuestos tienen propiedades anticuagulantes; sin embargo, las dosis en las que se utilizan con esta finalidad son mucho mayores que las que se emplearon para lograr inhibición de las infecciones virales. Por otra parte, la administración por esta vía de carragenanos y otros polisacáridos de algas rojas no es posible debido a su capacidad de formar geles y soluciones viscosas.

Estos polisacáridos no penetran fácilmente la barrera hematoencefálica, en cambio ciertos virus como el HIV pueden atravesarla. Por este motivo, en estos casos sería conveniente una terapia combinada con nucleósidos como el AZT. De hecho, se ha demostrado que la combinación de dextrán sulfato con AZT tiene un efecto sinérgico, o al menos aditivo sobre el virus HIV *in vitro*¹⁰².

Bibliografía

1. A. I. Usov, *Bot. Mar.* 27, 189 (1984).
2. A. I. Usov, V. V. Barbakadze, S. V. Yarotsky y A. S. Shashkov, *Bioorg. Khim.* 4, 1507 (1978).
3. D. B. Smith y W. H. Cook, *Arch. Biochem. Biophys.* 45, 232 (1952).
4. E. Percival en "Carbohydrate Sulphates" (ed. R. G. Schweigr), Am. Chem. Soc., Washington, DC, p. 213 (1978).

5. E. L. McCandless y J. S. Craigie, *Ann. Rev. Plant Physiol.* 30, 41 (1979).
6. C. W. Greer y W. Yaphe, *Bot. Mar.* 28, 473 (1984).
7. A. N. O'Neill, *J. Am. Chem. Soc.* 77, 6324 (1955).
8. N. S. Anderson y D. A. Rees, *Proc. Int. Seaweed Symp.* 5, 243 (1966).
9. N. S. Anderson, T. C. S. Dolan y D. A. Rees, *J. Chem. Soc.*, 596 (1968).
10. J. Weigl, J. R. Turvey y W. Yaphe, *Proc. Int. Seaweed Symp.* 6, 329 (1969).
11. D. A. Rees, *Adv. Carbohydr. Chem.* 24, 267 (1969).
12. N. S. Anderson, T. S. C. Dolan y D. A. Rees, *J. Chem. Soc.*, (C) Perkin Trans, 2173 (1973).
13. N. S. Anderson, T. S. C. Dolan, C. J. Lawson, A. Penman y D. A. Rees, *Carbohydr. Res.* 7, 468 (1968).
14. D. J. Stancioff y N. F. Stanley, *Proc. Int. Seaweed Symp.* 6, 595 (1969).
15. D. A. Rees, *J. Chem. Soc.*, 5168 (1961).
16. D. A. Rees, *J. Chem. Soc.*, 1821 (1963).
17. T. C. S. Dolan y D. A. Rees, *J. Chem. Soc.*, 3534 (1965).
18. A. Penman y D. A. Rees, *J. Chem. Soc. Perkin Trans.*, 2182 (1973).
19. V. DiNinno, E. L. McCandless y R. A. Bell, *Carbohydr. Res.* 71, C1 (1979).
20. T. J. Painter, *Can. J. Chem.* 38, 112 (1960).
21. S. Peats, *Proc Int. Seaweed Symp.* 10 (1981).
22. E. Zablackis y G. A. Santos, *Bot. Mar.* 29 (1986).
23. J. Mollion, H. Morvan, F. Bellanger y S. Moreau,

- Phytochemistry* 27, 2023 (1988).
24. J. Mollion, S. Moreau y D. Christiaen, *Bot. Mar.* 29, 549 (1986).
 25. A. I. Usov, S. V. Yarotsky y A. S. Shashkov, *Biopolymers* 19, 977 (1980).
 26. M. Duckworth y W. Yaphe, *Carbohydr. Res.* 16, 189 (1971).
 27. E. Percival y R. H. McDowell en "Encyclopedia of Plant Physiology" (ed. W. Tanner y F. A. Loewus), Springer Verlag, Berlin, Vol. 13B, p. 277 (1981).
 28. D. A. Rees, *Biochem. J.* 81, 347 (1961).
 29. A. I. Usov, *Food Hydrocolloids* 6, 9 (1992).
 30. S. Hirase, *Bull. Chem. Soc. Japan* 30, 75 (1957).
 31. M. Lahaye y W. Yaphe, *Bot. Mar.* 32, 369 (1989).
 32. R. H. Furneaux, I. J. Miller y T. T. Stevenson, *Hidrobiologia* 204/205, 454 (1990).
 33. J. F. Bate y J. R. Turvey, *Carbohydr. Res.* 60, C-1 (1975).
 34. J. S. Craigie y A. Jugens, *Carbohydr. Pol.* 11, 265 (1989).
 35. Y. Karamanos, M. Ondarza, F. Bellanger, D. Christiaen y S. Moreau, *Carbohydr. Res.* 187, 93 (1989).
 36. M. Lahaye y C. Rochas, *Hydrobiologia* 221, 137 (1991).
 37. H.C. Bold y M. J. Wynne, en "Introduction to the algae", Second Edition, (Prentice-Hall Inc., Englewood Cliffs, New Jersey) (1985).
 38. M. C. Matulewicz, "Estudios sobre el sistema de carragenanos del alga roja *Iridaea undulosa* Bory", Tesis Doctoral, FCEyN-UBA (1978).

39. C. A. Stortz, "Estudio de los carragenanos "solubles" del alga roja *Iridaea undulosa* Bory", Tesis Doctoral, FCEyN-UBA (1984).
40. L. C-M. Chen, J. McLachlan, A. C. Neish y P. F. Shacklock, *J. Mar. Biol. Ass. U.K.* 53, 11 (1973).
41. E. L. McCandless, J. S. Craigie y J. A. Walter, *Planta* 112, 201 (1973).
42. S. E. Pickmere, M. J. Parsons y R. W. Bailey, *Phytochemistry* 12, 2441 (1973).
43. J. R. Waaland, *J. Phycol.* 9, 12 (1973).
44. W. A. P. Black, W. R. Blackmore, J. A. Colquhoun y E. T. Dewar, *J. Sc. Food Agric.* 16, 573 (1965).
45. S. W. Fuller y A. Mathienson, *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 10, 49 (1972).
46. S. M. Marshall, L. Newton y A. P. Orr, *H.M.S.O.* (1949).
47. L. C-M. Chen y J. M. McLachlan, *Can. J. Bot.* 50, 1055 (1972).
48. S. E. Pickmere, M. J. Parsons y R. W. Bailey, *New Zealand J. Sc.* 18, 585 (1975).
49. D. A. Rees, *Ann. Reports Progress Chem.* 62, 469 (1965).
50. M. J. Parsons, S. E. Pickmere y R. W. Bailey, *New Zealand J. Bot.* 15, 589 (1977).
51. J. R. Waaland, *Phytochemistry* 14, 1359 (1975).
52. S. P. C. Hosford y E. L. McCandless, *Can. J. Bot.* 53, 2835 (1975).
53. M. J. Eveleigh, C. M. Vollmer y E. L. McCandless, *J. Phycol.* 14, 89 (1978).
54. V. DiNinno y E. L. McCandless, *Carbohydr. Res.* 67, 235 (1978).

55. V. DiNinno y E. L. McCandless, *Carbohydr. Res.* 72, 157 (1979).
56. E. L. McCandless, J. A. West y M. D. Guiry, *Biochem. Syst. Ecol.* 11, 175 (1983).
57. E. L. McCandless, J. A. West y M. D. Guiry, *Biochem. Syst. Ecol.* 10, 275 (1982).
58. E. Percival y R. McDowell en "Chemistry and Enzymology of Marine Algal Polysaccharides", Academic Press, Londres p. 127 (1967).
59. M. S. Doty y G. A. Santos, *Aquatic Bot.* 4, 143 (1978).
60. V. DiNinno y E. L. McCandless, *Carbohydr. Res.* 66, 85 (1978).
61. M. Bert, R. Ben Said, E. Deslandes y J. Cosson, *Phytochemistry* 28, 71 (1989).
62. H. A. Ayal y B. Matsuhira, *Phytochemistry* 25, 1895 (1986).
63. C. A. Stortz y A. S. Cerezo, *Carbohydr. Res.* 242, 217 (1993).
64. E. L. McCandless y J. S. Craigie, *Bot. Mar.* 17, 125 (1974).
65. T. Chopin, C. Bodeau-Bellion, J-Y. Floc'h, E. Guittet y J-Y. Lallemand, *Hydrobiologia* 151/152, 535 (1987).
66. M. L. Piriz y A. S. Cerezo, *Hydrobiologia* 226, 65 (1991).
67. D. M. James, J. Preiss y A. D. Elbein en "The Polysaccharides", Vol 3 (ed. G. O. Aspinall), Academic Press, p.107 (1985).
68. J. C. Su y W. Z. Hassid, *Biochemistry* 1, 474 (1962).
69. F. Loewus, G. Wagner, J. A. Schiff y J. Weistrop, *Plant*

- Physiol.* **48**, 373 (1971).
70. S. G. Jackson y E. L. McCandless, *Plant Physiol.* **64**, 585 (1979).
 71. E. Tveter-Gallagher, D. Cheney y A. C. Mathienson, *Proc. Int. Seaweed Symp.* **10**, 521 (1980).
 72. J. S. Craigie en "Biology of the Red Algae" (ed. K. M. Cole y R. G. Sheath) Cambridge University Press, p. 221 (1990).
 73. D. A. Rees, *Biochem. J.* **81**, 347 (1961).
 74. C. J. Lawson y D. A. Rees, *Nature* **227**, 392 (1970).
 75. K. F. Wong y J. S. Craigie, *Plant Physiol.* **61**, 663 (1978).
 76. E. J. V. Percival *Quart. Rev.* **3**, 369 (1949).
 77. M. Ciancia, M. D. Nosedá, M. C. Matulewicz y A. S. Cerezo, *Carbohydr. Pol.* **20**, 95 (1993).
 78. M. D. Nosedá y A. S. Cerezo, *Int. J. Biol. Macromol.* **15**, 177 (1993).
 79. C. W. Greer y W. Yaphe, *Bot. Mar.* **28**, 473 (1984).
 80. J. Mollion, H. Morvan, F. Bellanger y S. Moreau, *Phytochemistry* **27**, 2023 (1988).
 81. S. H. Knutsen y H. Grasdalen, *Carbohydr. Res.* **206**, 367 (1990).
 82. C. Bellion, G. Brigand, J-C. Prome, D. Welte y S. Bociek, *Carbohydr. Res.* **119**, 31 (1983).
 83. A. S. Cerezo, *J. Chem. Soc.*, 992 (1967).
 84. D. A. Rees, *J. Chem. Soc.*, 5168 (1961).
 85. A. S. Cerezo, *J. Chem. Soc.*, 2491 (1967).
 86. A. S. Cerezo, *Carbohydr. Res.* **26**, 335 (1973).
 87. A. S. Cerezo, *Carbohydr. Res.* **36**, 201 (1974).

88. A. J. Pernas, O. Smidsrod, B. Larsen y A. Haug, *Acta Chem. Scand.* 21, 98 (1967).
89. O. Smidsrød, B. Larsen, A. J. Pernas y A. Haug, *Acta Chem. Scand.* 21, 2585 (1967).
90. R. R. Colwell, en "Biotechnology of Marine Polysaccharides" (ed. R. R. Colwell, E. R. Pariser y A. J. Sinskey) Hemisphere Publishing Corp., p. 363 (1984).
91. K. K. Takemoto y S. S. Spicer, *Ann. NY Acad. Sci.* 130, 365 (1965).
92. R. F. Nigrelli, M. F. Stempien, G. D. Ruggieri, V. R. Lagori y J. T. Cecil, *Fed. Proc.* 26, 1197 (1967).
93. E. F. Deig, D. W. Ehresmann, M. T. Hatch y D. J. Riedlunger, *Antimicrob. Agents Chemother.* 6, 524 (1974).
94. J. T. Richards, E. R. Kern, R. A. Glasgow, J. C. Overall, E. F. Deig y M. T. Hatch, *Antimicrob. Agents Chemother.* 14, 24 (1978).
95. D. J. Jeffries, *J. Infection* 18 Suppl. I, 5 (1989).
96. R. Ueno y S. Kuno, *The Lancet*, 1379 (1987).
97. H. Mitsuya, D. J. Looney, S. Kuno, R. Ueno, F. Wong-Staal y S. Broder, *Science* 240, 646 (1988).
98. M. Baba, R. Pauwels, J. Balzarini, J. Arnout, J. Desmyter y E. De Clercq, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 6132 (1988).
99. M. Baba, R. Snoeck, R. Pauwels y E. De Clercq, *Antimicrob. Agents Chemother.* 32, 1742 (1988).
100. D. WuDunn y P. G. Spear, *J. Virol.* 63, 52 (1989).
101. J. Neyts, R. Snoeck, D. Schols, J. Balzarini, J. D. Esko, A. Van Schepdael y E. De Clercq, *Virology*, 48, (1992).

102. E. Lycke, M. Johansson, B. Svennerholm y I. Lindhahl,
J. Gen. Virol., 72, 1131 (1991).
103. M. Baba y E. De Clercq, en "Design of Anti-Aids Drugs"
(ed. E. De Clercq) Elsevier, p. 85 (1990).

.

CAPITULO 2

FORMACION DE GELES

Bajo ciertas condiciones, las soluciones acuosas de los carragenanos beta, kappa y iota tienden a formar geles termoreversibles. A una concentración dada, la rigidez del gel, turbidez, histéresis térmica y la tendencia a la sinéresis siguen el orden: furcellarano (carragenano beta/kappa)>carragenano kappa>carragenano iota, lo cual indica que estas características se ven favorecidas por el bajo grado de sulfatación¹. Además, para que la gelificación se produzca es necesaria la presencia de cationes, ya sea mono o divalentes².

Se han propuesto varios modelos para explicar este fenómeno y en muchos casos los resultados parecen contradecirse. Esto puede deberse, en parte, a que las condiciones experimentales fueron diferentes y en parte, a que las experiencias se realizaron generalmente sobre muestras cuya estructura no había sido estudiada en forma conveniente; así, todavía hoy subsisten muchos interrogantes respecto al proceso de gelificación.

Una característica importante del cambio conformacional que se produce es que, como consecuencia del mismo, se produce un cambio en la rotación óptica de la solución. Este hecho experimental se debe a la variación en los ángulos diedros de las uniones glicosídicas que ocurre durante la transición³. Por este motivo, la determinación de la variación del poder rotatorio en función de la temperatura es uno de los métodos más utilizados para realizar estos estudios.

También se puede estudiar este proceso a partir de los cambios en el peso molecular aparente del polímero. Una

técnica muy utilizada para estimar el peso molecular promedio pesado (M_w) es la de dispersión de la luz. De este modo, se determinó la duplicación del peso molecular cuando se producía la transición y un aumento considerable del mismo con la formación de agregados. Los nuevos instrumentos utilizan un haz láser que permite detectar la luz que se dispersa con ángulos pequeños ($2-6^\circ$) y con soluciones diluídas; así, se puede determinar M_w sin necesidad de extrapolación⁴.

Como se explicó en la Tesis Doctoral de M. C. Matulewicz⁵, Anderson y col.⁶ propusieron un modelo de gelificación basado en un cambio conformacional de los polisacáridos que pasan de un enrollamiento al azar a la formación de dobles hélices, ordenamientos similares se observaron en los estudios de difracción de rayos X de estos productos.

Estas dobles hélices formarían las zonas de unión entre las distintas cadenas para dar lugar a una red tridimensional. El modelo supone la presencia de "kinks", es decir unidades de α -galactosa en la conformación 4C_1 en reemplazo de ciertas unidades de 3,6-anhidro- α -galactosa que se encuentran en la conformación 1C_4 . Estas unidades producen un cambio en la dirección de la molécula, según se muestra en la Figura 1, de tal modo que una misma cadena de polisacárido puede formar dobles hélices con varias otras. Con la agregación de las dobles hélices se produciría la formación del gel (Figura 2).

El argumento más evidente en contra de este modelo es que, durante la fusión del gel una cadena debería

desenrollarse simultaneamente con muchas otras situadas a considerable distancia. Así, topológicamente la destrucción del gel resultaría improbable⁷. Además, no se tuvo en cuenta la influencia de la concentración y la naturaleza de los cationes en el proceso de gelificación.

Figura 1. Cadenas de carragenanos.

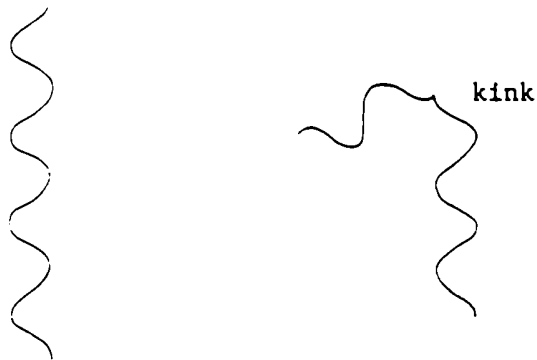
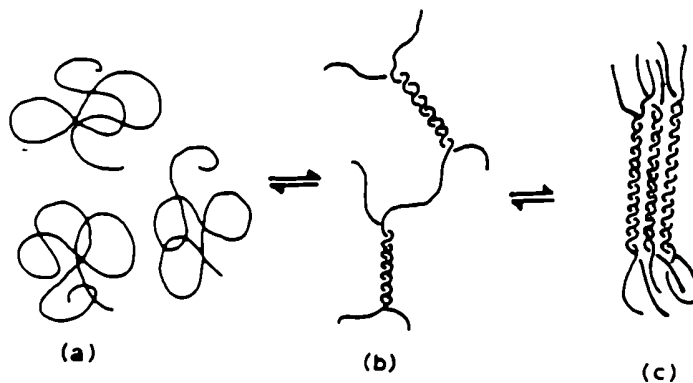


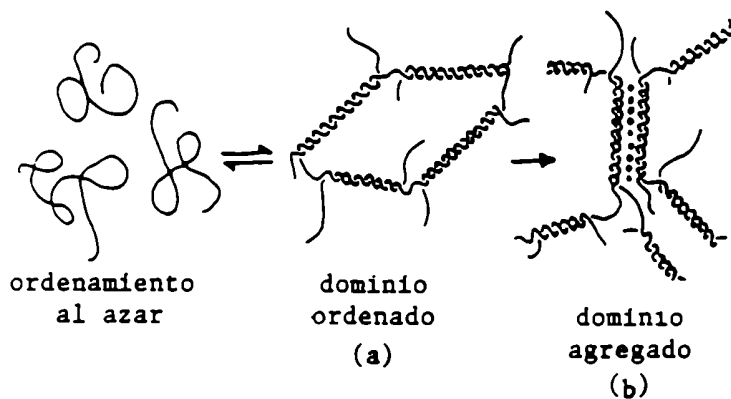
Figura 2. Modelo de doble hélice: a) sol, b) dobles hélices unidas formando una red tridimensional y c) hélices formando agregados.



Estas observaciones llevaron a Rees y col.^{8,9} a postular

otro modelo de gelificación, en términos del cual la asociación intermolecular directa a través de dobles hélices está restringida a la formación de pequeños dominios independientes que involucran un número limitado de cadenas y el entrecruzamiento a mayor distancia se produciría por la asociación, mediada por cationes, entre dobles hélices que pertenecen a diferentes dominios (Figura 3).

Figura 3. Modelo de gelificación por formación de dominios ordenados.

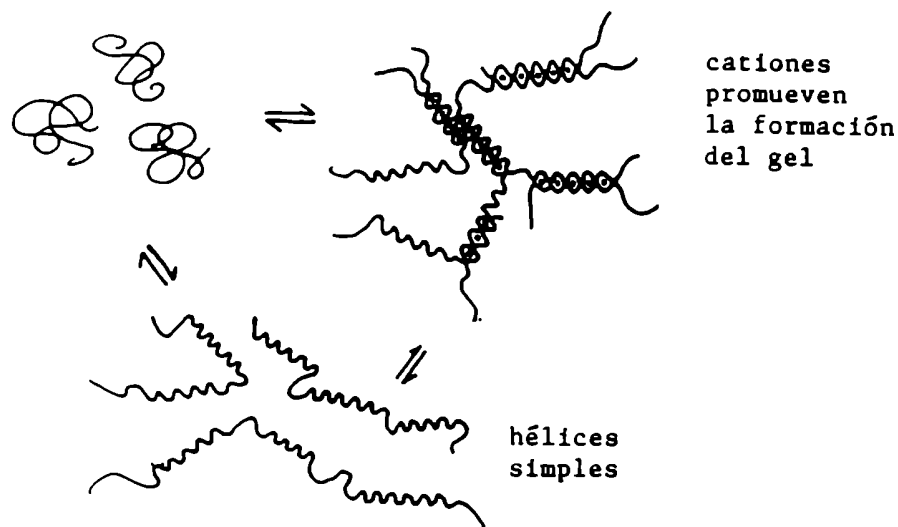


El comportamiento diferente de los distintos cationes se relacionó con la eficiencia de los mismos para contribuir a la agregación de las dobles hélices. También se observó un comportamiento distinto en el proceso de gelificación de los carragenanos kappa y iota. Para el carragenano iota, la conformación ordenada es estable en solución en determinadas condiciones (Figura 3a), mientras que en el caso del carragenano kappa, las hélices sólo parecen formarse en condiciones que también promueven la agregación de las cadenas (Figura 3b). Esto sugirió que, mientras que para el carragenano iota, las dobles hélices pueden existir en forma

aislada, para el carragenano kappa solamente resultarían estables en forma de agregados.

Smidsrød y col.¹⁰ propusieron un modelo alternativo que suponía la formación de uniones iónicas específicas entre monohélices (Figura 4).

Figura 4. Modelo de hélices simples.



A partir del estudio del proceso de gelificación para el carragenano iota¹⁰ concluyeron que, con el aumento de la fuerza iónica, se producía un cambio conformacional que implica un "congelamiento" de las uniones glicosídicas en una disposición particular. Supusieron que, cuando la fuerza iónica era baja, la repulsión electrostática entre los grupos sulfato vecinos resultaba suficientemente fuerte como para superar las preferencias estéricas, las cuales se hacían dominantes con el aumento de la fuerza iónica. Para el carragenano iota, la transición no dependía marcadamente

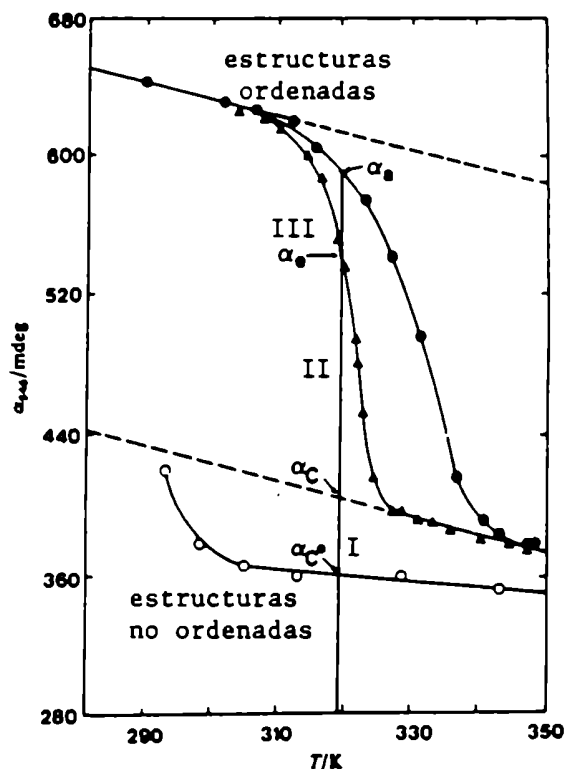
del catión utilizado; en cambio, sucedía lo contrario para el carragenano kappa¹¹, si bien el mecanismo de gelificación sería similar. En conclusión, la formación del gel sería un proceso en dos etapas, que involucra un cambio conformacional intramolecular, seguido de una disminución en la solubilidad, dependiente de la presencia de iones.

La presencia de monohélices se demostró en solventes orgánicos como dimetilsulfóxido y formamida¹² pero este grupo reconoce actualmente que hay mayor evidencia a favor de la formación de dobles hélices para estos polisacáridos en solución acuosa¹³.

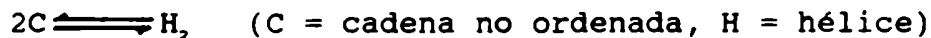
En los últimos años dos grupos estudiaron los cambios conformacionales que se producen en solución y el modo en que se llega a la formación de geles.

Los investigadores de la escuela inglesa¹⁴⁻¹⁶ perfeccionaron el modelo propuesto anteriormente^{8,9} en base a estudios sobre la cinética del cambio conformacional. Observaron la variación de la rotación óptica en función de la temperatura. La Figura 5 muestra un típico proceso de ordenamiento para un carragenano kappa. El primer paso es un cambio conformacional entre dos formas no ordenadas C° ---> C (I), luego, se produce un ordenamiento (II) y finalmente, un lento proceso de agregación (III).

Figura 5. Rotación óptica en función de la temperatura para un carragenano kappa (c. $1,3 \times 10^{-2}$ mol l^{-1}). Las curvas se realizaron para soluciones del mismo en agua destilada (o) y en KCl 0,10 M enfriando desde 350°K (▲) y calentando desde 290°K (●).

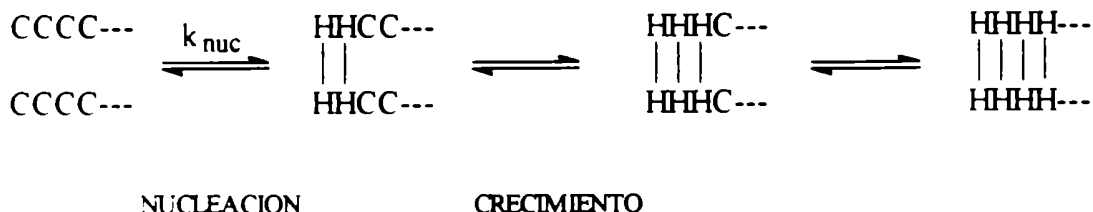


Para los carragenanos kappa y iota, la cinética de transición a la forma ordenada resultó de segundo orden, mientras que la reacción inversa es de primer orden, lo que resulta consistente con la formación de dobles hélices.



La formación de dobles hélices es un proceso cooperativo positivo, durante el cual se produce primero una

nucleación, seguida por una secuencia de pasos de crecimiento que dan lugar a una conformación ordenada estable. Este proceso se puede representar de la siguiente forma^b:



Se encontró una muy buena correlación entre la constante de velocidad de nucleación y la estructura del polisacárido. Por ejemplo, para la agarosa sulfatada k_{nuc} es 2-3 órdenes de magnitud mayor que para los carragenanos, los cuales presentan una estructura más compacta y, como consecuencia, mayor impedimento estérico.

Los estudios realizados sobre el agregado de sales sugirieron que la influencia de las mismas se producía además sobre las formas no ordenadas de las moléculas de carragenanos. Cuando estos polisacáridos se encuentran en una solución a la que no se han agregado sales, las moléculas presentan forma de varillas que pasan a una forma enrollada con el aumento de la fuerza iónica a medida que la repulsión entre los grupos sulfato a lo largo de la cadena va quedando enmascarada; ésto es lo que sucedería en el proceso I (Figura 5).

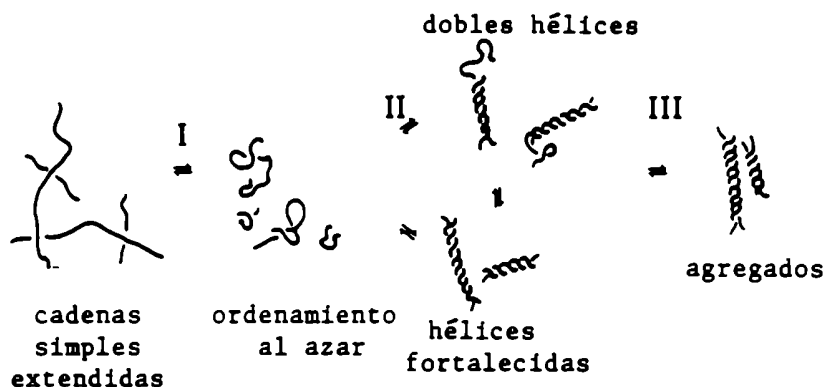
La Figura 5 muestra, además, que hay histéresis térmica entre el calentamiento y enfriamiento de una solución de

^bH y C representan residuos individuales que se encuentran en una conformación ordenada y no ordenada, respectivamente.

carragenano kappa en presencia de cloruro de potasio, este fenómeno indica que se produce agregación del polisacárido. De este modo, el fortalecimiento de las dobles hélices y la formación del gel desplazan el equilibrio hacia el estado ordenado, disminuyendo la proporción de moléculas que se encuentran enrolladas al azar.

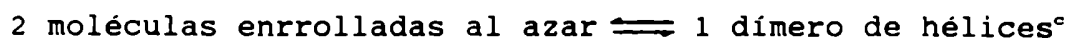
En base a estos resultados, la secuencia de ordenamiento conformacional puede describirse como un rápido cambio entre conformaciones no ordenadas (I), seguido de la unión de las cadenas para dar dobles hélices (II), las cuales se pueden fortalecer y sufrir una lenta asociación lateral para dar agregados más estables (III) (Figuras 5 y 6).

Figura 6. Secuencia de hechos que siguen a un aumento en la concentración de sales en una solución diluida de un galactano sulfatado.



Rinaudo y Rochas^{17,7} mostraron que en solución acuosa el carragenano kappa puede adoptar una conformación ordenada estable en ausencia de gel, como se había demostrado para el carragenano iota⁷. Este cambio conformacional depende de la

naturaleza de los contraiones que se fijan selectivamente a la cadena, ya antes de la transición conformacional. Las mediciones potenciométricas, conductimétricas y calorimétricas asociadas a las determinaciones de rotación óptica indicaron que había un aumento en la densidad de carga durante la transición que consistiría en una dimerización de dos cadenas independientes según el equilibrio:



Para una dada temperatura, este cambio depende de la concentración total de iones (C_T):

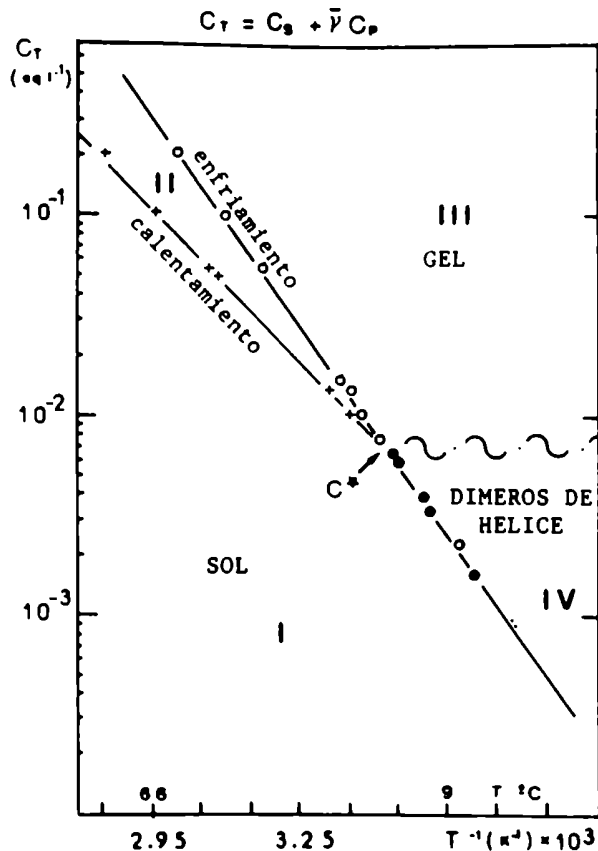
$$C_T = \bar{\gamma} C_p + C_s$$

donde C_p y C_s son la concentración total del polielectrolito y de sal externa, respectivamente, y $\bar{\gamma}$ es el valor promedio del coeficiente de actividad de los contraiones en los dos estados.

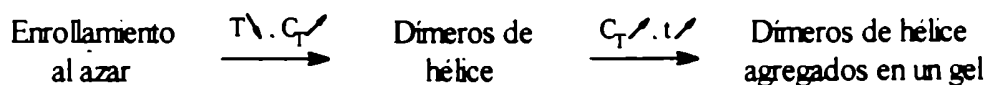
Se observó que solamente a partir de una concentración total determinada se producía gelificación (C^*). La Figura 7 muestra el diagrama de fases que relaciona la inversa de la temperatura de transición y el logaritmo de la concentración total de iones (C_T) para un carragenano kappa^{4,18}.

^cLos autores consideran más adecuado referirse a la conformación ordenada como "dímero de hélices", en lugar de "dobles hélices", pues esta denominación, sugieren la presencia de interacciones más fuertes que las que realmente se producen entre las cadenas de carragenanos.

Figura 7. Variación de la temperatura de transición con la concentración total de iones para un carragenano kappa (como sal de potasio).



Así, los cambios conformacionales y la formación de geles pueden resumirse:

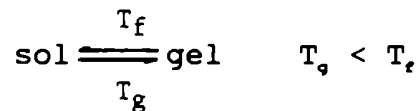


T = temperatura. C_T = concentración total de iones. t = tiempo

Entonces, se ve que a partir de una concentración total C^* (por ejemplo, 7×10^{-3} M para un carragenano kappa con K^+ como contraión), la transición conformacional implica la formación del gel; en cambio cuando $C_T < C^*$, se obtiene una

conformación ordenada en solución. Es de destacar que se pueden obtener idénticas propiedades cuando se reemplaza parcialmente al polielectrolito por una sal externa.

El gráfico muestra también que se produce histéresis, es decir, que la temperatura de gelificación (T_g) es menor que la temperatura de fusión del gel (T_f).



y cuanto menor es la densidad de carga del polisacárido, mayor es la histéresis, es decir, la diferencia $|T_f - T_g|$ para el mismo rango de concentración.

Un diagrama de fases de este tipo se obtuvo también para el carragenano iota, pero en este caso la histéresis es más estrecha¹⁹.

La formación del gel se produce por asociación de los dímeros de hélice, lo que implica una disminución de la solubilidad por formación de pares iónicos que disminuyen su carga neta. Esta transición es un proceso termodinámico irreversible. Durante el envejecimiento del gel se observa una contracción de las cadenas que depende de la concentración de iones y del polisacárido en cuestión. Este proceso aumento la densidad de la red polimérica.

Rochas y Rinaudo²⁰ encontraron una importante variación en la temperatura de gelificación del carragenano kappa según cuál fuera el contraión. Para iones monovalentes, la conformación ordenada en los carragenanos es inducida preferencialmente por la secuencia

Rb⁺>Cs⁺>K⁺>NH₄⁺>N(CH₃)₄⁺>Na⁺>Li⁺ (como cloruros); para iones divalentes el efecto es menor y sigue la secuencia Ba⁺⁺>Ca⁺⁺>Sr⁺⁺>Mg⁺⁺>Zn⁺⁺>Co⁺⁺ (como cloruros). Se ha demostrado que esta selectividad se debe a la desolvatación del sitio en que se encuentran el grupo sulfato y el contraión, la que favorece la gelificación. Esto se debe a que la desolvatación existe no sólo en la conformación ordenada, sino también cuando las moléculas se encuentran enrolladas al azar y, probablemente sea ésta la clave para comprender la formación de las hélices y después, del gel. De hecho, los geles se forman porque la carga neta en la conformación de hélice es menor que en la enrollada, lo que produce una disminución en la solubilidad. Entonces, la naturaleza del contraión es otro parámetro para tener en cuenta en el diagrama de fases (Figura 7); de hecho, para cada contraión existe un diagrama diferente.

Estos autores no encontraron variaciones en la temperatura de gelificación del carragenano kappa como sal de potasio por variación del anión. Sin embargo, Austen y col.²¹ encontraron un efecto del anión en la temperatura de transición del carragenano kappa en la forma N(CH₃)₄⁺; con un aumento de la estabilización según la secuencia F⁻<Cl⁻<NO₃⁻<Br⁻<I⁻. No se observó efecto del anión en la gelificación del carragenano iota. Para el carragenano iota, la gelificación se encuentra favorecida por la presencia de iones Ca⁺⁺ frente a K⁺.

El rol del peso molecular en la formación de geles no está claro. Para el carragenano kappa se determinó que el

módulo de elasticidad aumenta con el peso molecular hasta un valor crítico, $M_w^* = 180.000$, que es independiente de la concentración del polisacárido y de la fuerza iónica del medio. Este parámetro da idea de la rigidez del gel, por lo que este valor probablemente represente la longitud máxima de la molécula que puede ser usada para construir la red²².

En conclusión, la transición conformacional implica la formación de un dímero, en el que las moléculas se encuentran ordenadas en una conformación helicoidal, ya sea en una doble hélice o un dímero de hélices. Esta estructura ordenada es estable en solución en determinadas condiciones. El aumento de la fuerza iónica y la disminución de la temperatura producen una disminución en la solubilidad de las cadenas poliméricas que se agregan formando un gel.

La presencia de iones, como K^+ , Cs^+ y Rb^+ inducen la transición conformacional para el carragenano kappa; para el carragenano iota, ésta se ve favorecida por la presencia de iones Ca^{++} .

Bibliografía

1. D. A. Rees, *Chem. Ind.*, 630 (1972).
2. V. J. Morris, "Gelation of Polysaccharides" p. 121 en "Functional Properties of Food Macromolecules" (ed. J. M. Mitchell y D. A. Ledward) Elsevier Applied Science Publishers, Londres, (1986).
3. D. A. Rees, W. E. Scott y F. B. Williamson, *Nature* 227, 390 (1970).

4. A. Heyraud, M. Rinaudo y C. Rochas, "Physical and Chemical Properties of Phycocolloids", p. 151 en "Introduction to Applied Phycology" (ed. I. Akatsuka) SPB Academic Publishing, La Haya (1990).
5. M. C. Matulewicz, "Estudios sobre el sistema de carragenanos del alga roja *Iridaea undulosa* Bory", Tesis Doctoral, FCEyN-UBA (1978).
6. N. S. Anderson, J. M. Campbell, M. M. Harding, D. A. Rees y J. W. B. Samuel, *J. Mol. Biol.* **45**, 85 (1969).
7. C. Rochas, "Etude de la transition sol-gel du kappa-carraghenane", Université Scientifique et Médicale, Institut National Polytechnique de Grenoble, Grenoble, Francia (1982).
8. G. Robinson, E. R. Morri y D. A. Rees, *J. Chem. Soc. Chem. Comm.*, 152 (1980).
9. E. R. Morris, D. A. Rees y G. Robinson, *J. Mol. Biol.* **138**, 349 (1980).
10. O. Smidsrød, I-L Andresen, H. Grasdalen, B. Larsen y T. Painter, *Carbohydr. Res.* **80**, C11 (1980).
11. O. Smidsrød y H. Grasdalen, *Carbohydr. Pol.* **2**, 270 (1982).
12. C. Rochas y M. Rinaudo, *Carbohydr. Res.* **105**, 227 (1982).
13. O. Smidsrød y B. E. Christesen, "Molecular Structure and Physical Behaviour of Seaweed Colloids as Compared with Microbial Polysaccharides", p. 185 en "Seaweed Resources in Europe: Uses and Potential" (ed. M. D. Guiry y G. Bhenden) John Wiley and Sons Ltd. (1991).
14. I. T. Norton, D. M. Goodall, E. R. Morris y D. A. Rees, *J. Chem. Soc. Faraday Trans. I* **79**, 2489 (1983).

15. I. T. Norton, D. M. Goodall, E. R. Morris y D. A. Rees, *J. Chem. Soc. Faraday Trans. I* **79**, 2501 (1983).
16. D. M. Goodall y I. T. Norton, *Acc. Chem. Res.* **20**, 59 (1987).
17. M. Rinaudo y C. Rochas, ACS Symposium Series N°150, "Solution Properties of Polysaccharides" p. 367 (ed. D. A. Brant) (1981).
18. C. Rochas y M. Rinaudo, *Biopolymers* **23**, 735 (1984).
19. C. Rochas, *Food Hydrocolloids* **1**, 215 (1987).
20. C. Rochas y M. Rinaudo, *Biopolym.* **19**, 1675 (1980).
21. K. R. J. Austen, D. M. Goodall y I. T. Norton, *Carbohydr. Res.* **140**, 251 (1985).
22. C. Rochas, M. Rinaudo y S. Landry, *Carbohydr. Pol.* **12**, 255 (1990).

CAPITULO 3

**ESPECTROSCOPIA DE RESONANCIA
MAGNETICA NUCLEAR**

a) Espectroscopía de resonancia magnética nuclear de ^{13}C .

La espectroscopía de resonancia magnética nuclear de ^{13}C es, hoy en día, una herramienta indispensable en el estudio estructural de los galactanos sulfatados de algas rojas, si bien no es conveniente usar esta técnica como método único, aún en la determinación de la estructura de polisacáridos muy regulares¹.

Los estudios realizados en los primeros años han sido descriptos por C. A. Stortz en su Tesis Doctoral² y se incluyen aquí sólo brevemente.

Las primeras asignaciones de las señales de los espectros de polisacáridos se basaron casi exclusivamente en los datos obtenidos a partir de los espectros de compuestos modelo.

La interpretación de los espectros de hexosas y metil hexósidos permitieron encontrar tres zonas en los espectros de estos compuestos: a) región anomérica (δ 91-105 ppm); b) región de los carbonos con hidroxilos secundarios (δ 67-77 ppm) y c) región de los carbonos con hidroxilos primarios (δ 61-63 ppm). El cambio de configuración modifica el desplazamiento químico de la señal del C-1 de la galactosa en varias partes por millón hacia campos más altos al pasar del anómero β al α ; además, afecta los δ de los carbonos 3 y 5 por interacción 1,3-diaxial, menos el del C-2 y tiene muy poco efecto sobre los de los C-4 y C-6.

Por otro lado, se sabe que la metilación o glicosilación de un grupo hidroxilo resulta en un desplazamiento, generalmente de 8-11 ppm, del carbono más

cercano a campos más bajos (efecto α), mientras que las señales de ambos átomos de carbono vecinos se mueven a campos más altos en 2-4 ppm (efecto β), los cambios sobre los δ de los restantes átomos de carbono son generalmente menores.

Teniendo en cuenta estos resultados, se usaron metil éteres del metil 3,6-anhidro- α -D-galactósido³ y del metil α - y β -D-galactopiranosido⁴, como compuestos modelo de diferentes unidades de polisacáridos.

En los desoxiazúcares, el reemplazo de una unión C-O por una C-H produce un importante desplazamiento de la señal a campos más altos.

Honda y col.⁵ demostraron que para la glucosa 3- y 6-sulfato los efectos α y β causados por la sulfatación de un grupo hidroxilo son similares, aunque algo menores, que los producidos por la metilación. En términos generales, se encontró que la sulfatación de un grupo hidroxilo causa un desplazamiento de la señal a campo más bajos de 6-10 ppm en el átomo de carbono al que está unido, mientras que las de los adyacentes se desplazan a campos más altos en 1-2,5 ppm. La Tabla 1 indica las señales de los espectros de los monosacáridos de galactosa sulfatados en distintas posiciones⁶. Una excepción a esta regla general se advierte en el espectro de la galactosa 4-sulfato, para la cual los desplazamientos menores de las señales de los carbonos adyacentes (0,6-1,0 ppm) se deben, probablemente, a la configuración axial del grupo sulfato.

Tabla 1. Desplazamiento químico de las señales (en ppm) en los espectros de r.m.n. -¹³C de la galactosa y sus derivados monosulfatados.

Monosacárido	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6
α-D-galactosa	93,11	69,18	70,01	70,14	71,30	62,00
β-D-galactosa	97,28	72,72	73,63	69,58	75,96	61,81
α-D-galactosa 2-sulfato	91,28	76,63	68,02	70,33	71,16	61,88
β-D-galactosa 2-sulfato	95,67	80,97	72,55	69,66	75,96	61,68
α-D-galactosa 3-sulfato	93,09	67,19	78,52	68,46	71,02	61,84
β-D-galactosa 3-sulfato	97,02	70,74	81,20	67,84	75,52	61,68
α-D-galactosa 4-sulfato	93,01	69,28	69,03	78,45	70,66	61,91
β-D-galactosa 4-sulfato	97,21	72,77	72,63	77,50	75,11	61,81
α-D-galactosa 6-sulfato	93,18	69,06	69,75	69,93	69,14	68,48
β-D-galactosa 6-sulfato	97,27	72,57	73,39	69,35	73,34	68,14

Posteriormente, se estudiaron los espectros de los metil α-D-galactósidos sulfatados' (Tabla 2). Las conclusiones en cuanto a los efectos de la sulfatación fueron las mismas.

Tabla 2. Desplazamiento químico (en ppm) de las señales en los espectros de r.m.n.-¹³C del metil α-D-galactopiranosido y de sus derivados monosulfatados.

Compuesto	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	OCH ₃
metil-α-D-galactósido	100,67	69,47	70,76	70,50	71,99	62,50	56,31
metil-α-D-galactósido 2S	98,63	76,64	68,61	70,60	71,81	62,32	56,32
metil-α-D-galactósido 3S	100,43	67,39	79,04	68,75	71,63	62,29	56,25
metil-α-D-galactósido 4S	100,50	69,53	69,78	78,74	71,35	62,44	56,42
metil-α-D-galactósido 6S	100,62	69,30	70,23	70,49	69,73	68,83	56,36

Así como sucede con otras macromoléculas, en los espectros de r.m.n.-¹³C de estos polisacáridos se observa un ensanchamiento de las señales que se encuentra asociado con la formación de geles o la alta viscosidad de sus soluciones. A pesar que la resolución puede mejorarse, las

señales de los polisacáridos son más anchas que aquellas de las especies mono u oligoméricas relacionadas⁸. Esto se debe a que como estructura de un polímero se entiende un promedio, no sólo de peso molecular sino que además puede haber pequeñas variaciones estructurales.

La resolución se puede incrementar realizando los espectros a altas temperaturas, a las que las moléculas se encuentran en una conformación al azar. Al descender la temperatura, la asociación de las cadenas resulta en una disminución de la movilidad de las unidades monoméricas o segmentos de la cadena y mayores interacciones dipolares, lo que causa ensanchamiento de las señales e incluso en algunos casos, la pérdida de picos⁹.

Greer y col.¹⁰ informaron un desplazamiento de las señales debido a cambios de la temperatura. Los efectos más pronunciados se observaron sobre los átomos de carbono involucrados en la unión glicosídica. Esto se debe a que como consecuencia de la restricción en el movimiento de las unidades monoméricas, se produce una marcada disminución en los tiempos de relajación spin-spin (T_2) de los núcleos de estos átomos de carbono¹¹.

Entonces, una forma de lograr buenos espectros es realizarlos a altas temperaturas¹². Otra forma consiste en fragmentar el polisacárido del modo más selectivo posible, para dar fragmentos pequeños pero representativos de la molécula de partida. En este trabajo de Tesis se ha utilizado la reacción de autohidrólisis para producir la degradación parcial de los carragenanos con esta finalidad (ver Segunda Parte, Cap. 3).

Hamer y col.¹³ estudiaron los productos de hidrólisis enzimática de la agarosa. Para ello, utilizaron β - y α -agarasa, que dan lugar a la formación de oligosacáridos originados por ruptura de las uniones β y α , respectivamente (Figura 1). Los autores asignaron las señales de los C-1 y C-6, tanto de las unidades reductoras como no reductoras (Tabla 3).

El uso de la espectroscopía de r.m.n.-¹³C permite obtener información valiosa, no sólo a partir de la posición de los picos, sino también de la integración de los mismos. Estrictamente, el area de los picos depende del tiempo de relajación de cada átomo de carbono (T_1) y del efecto nuclear de Overhauser (nOe); por lo cual, la comparación de las mismas para átomos químicamente diferentes puede no resultar legítima. Entonces, es necesario tener noción de los valores de T_1 , de modo de poder elegir los intervalos de tiempo adecuados entre pulsos sucesivos. Idealmente, este intervalo no debe ser menor que cinco periodos de T_1 ; tiempos muy cortos llevan a la saturación progresiva de las señales de los átomos de carbono con mayores valores de T_1 , resultando en una disminución progresiva de las mismas, que incluso pueden desaparecer del espectro. Esto sucede con frecuencia con los átomos de carbono que no tienen hidrógeno como sustituyente, como por ejemplo los átomos de carbono carbonílicos. Además, los valores de T_1 aumentan con la disminución de la concentración y también varían con la temperatura¹⁴. Las condiciones en las que se suelen realizar los espectros, en los trabajos mencionados en esta Tesis fueron tales, que los átomos de carbono llegaban a relajarse

Figura 1. Hidrólisis enzimática de la agarosa.

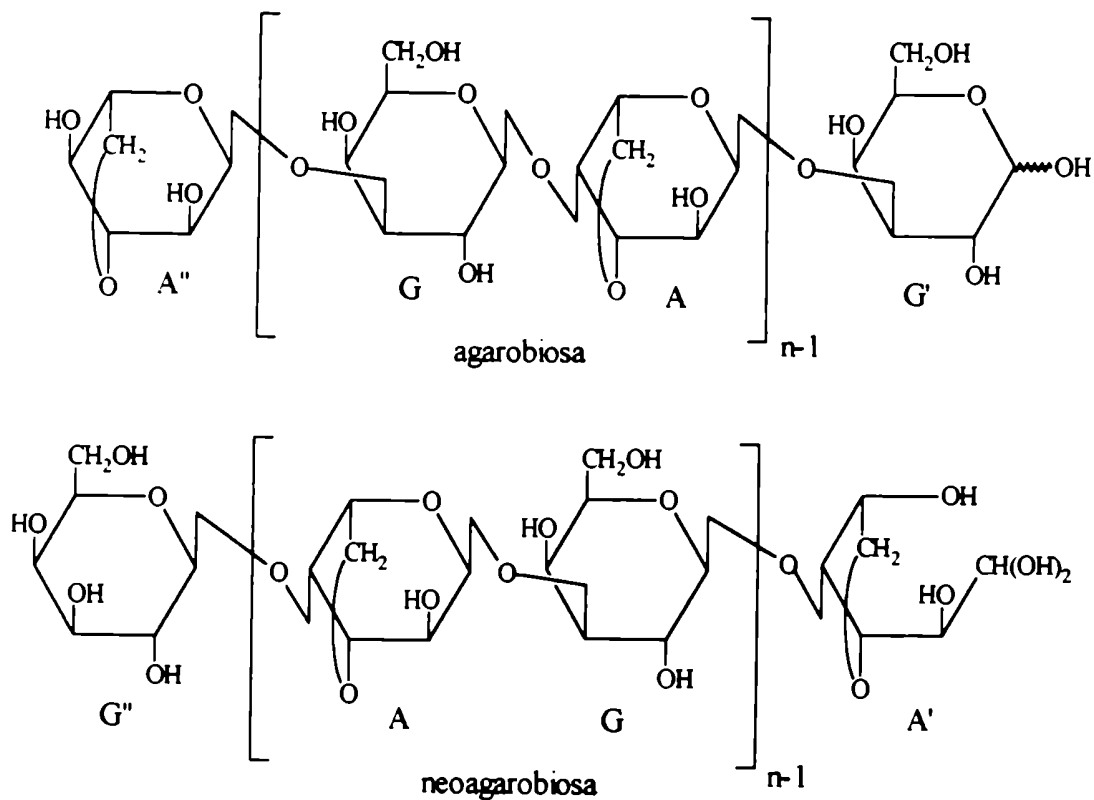


Tabla 3. Desplazamiento químico (en ppm) de las señales de los carbonos anoméricos de oligosacáridos obtenidos por hidrólisis enzimática de la agarosa.

Compuesto	G-1	G'-1	G''-1	A-1	A'-1	A''-1
Agarosa	103,53	-	-	99,30	-	-
Neoagarobiososa (A''-G')	-	93,80 97,79	-	-	-	99,29
Neoagarotetraosa (A''-G-A-G')	103,42	93,78 97,79	-	99,49	-	99,29
Agarobiososa (G''-A')	-	-	103,96	-	91,45	-
Agarotetraitol (G''-A-G-A')	103,63	-	103,54	99,47	64,32	-

completamente y la amplificación de las diferentes resonancias debida al nOe era del mismo nivel, cercano al valor máximo¹¹. Esto permitió la asignación de los desplazamientos químicos sobre la base de los valores de integración de las señales de los carbonos anoméricos, dado que la relación entre las áreas de las mismas representa la relación entre las distintas unidades monoméricas presentes en el oligosacárido.

Teniendo en cuenta las consideraciones anteriores, se puede utilizar la espectroscopía de r.m.n.-¹³C en forma muy efectiva para la caracterización de oligosacáridos más complejos, como los obtenidos por degradación con β -agarasa del ágar de *Porphyra umbilicalis*¹⁵. Esto permitió asignar, además de los picos de los oligosacáridos de agarosa, las señales de los C-1 y C-6 del tetrasacárido α -L-Gal 6S \rightarrow β -D-Gal \rightarrow α -L-3,6-AnGal \rightarrow D-Gal y el correspondiente derivado metilado en C-6 de la unidad de β -galactosa y, a partir de las mismas, los espectros de oligosacáridos de mayor peso molecular.

Del mismo modo, se realizó la degradación de carragenanos por medio de carragenasas kappa y iota (ambas son β -carragenasas) y la caracterización de los oligómeros obtenidos¹⁶. Rochas y col.¹² asignaron todas las señales de los espectros de los di-, tetra- y octasacáridos obtenidos por hidrólisis enzimática de un carragenano kappa a

distintas temperaturas (Tablas 4, 5 y 6^a), a partir de las cuales pudieron confirmar las asignaciones del carragenano kappa realizadas por otros autores⁴.

Tabla 4. Desplazamientos químicos (en ppm) del espectro de r.m.n.-¹³C de la neocarrabiosa kappa (DP=1) a 30° y 90°C.

Unidad	Temp. (°C)	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6
<i>Grα</i>	30	91,95	66,85	74,9	74,6	69,2	61,1
	90	92,4	67,5	76,0	75,3	70,3	61,3
<i>Grβ</i>	30	96,15	70,2	78,05	73,45	74,15	61,0
	90	96,7	70,9	79,2	74,3	74,6	61,3
A	30	94,3	69,1	80,5	69,7	77,0	68,6
	90	95,2	70,3	80,9	70,3	77,5	69,1

Tabla 5. Desplazamientos químicos (en ppm) en el espectro de r.m.n.-¹³C del oligómero kappa de DP=2 (tetrasacárido) a 30°C.

Unidad	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6
<i>Grα</i>	92,0	66,9	74,9	74,55	69,2	61,1
<i>Grβ</i>	96,2	70,25	78,0	73,5	74,2	61,0
<i>Anr</i>	94,3	69,0	80,5	69,65	77,0	68,65
G	102,0	69,0	78,0	73,4	74,3	60,8
A	94,3	69,2	78,8	77,8	76,3	69,0

⁴En las Tablas 4-8, en las que se informan datos de oligosacáridos provenientes de hidrólisis enzimática, se utilizó la siguiente nomenclatura: *Gr*=Gal terminal reductora, *Ar*=3,6-AnGal vecina a la anterior, *Anr*=3,6-AnGal terminal no reductora, *Gnr*=Gal vecina a la anterior, *G*=Gal interna y *A*=3,6-AnGal interna.

Tabla 6. Desplazamientos químicos (en ppm) del espectro de r.m.n.-¹³C del carragenano kappa y de las unidades internas del oligómero de DP=4 a diferentes temperaturas.

Unidad	Muestra	Temp. (°C)	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6
A	DP=4	30	94,3	69,2	78,8	77,8	76,3	69,0
	DP=4	80	94,9	69,7	78,9	78,0	76,2	69,2
	Polímero	80	94,9	69,8	78,9	78,0	76,5	69,55
G	DP=4	30	102,0	69,0	78,0	73,4	74,3	60,8
	DP=4	80	102,2	69,3	68,7	73,8	74,5	61,0
	Polímero	80	102,2	69,6	78,7	73,8	74,5	61,1

Del mismo modo, Greer y col.¹⁰ estudiaron los oligosacáridos producidos por hidrólisis enzimática de un carragenano iota (Tablas 7 y 8), a partir de los que asignaron completamente el espectro del carragenano de partida.

Tabla 7. Desplazamientos químicos (en ppm) del espectro de r.m.n.-¹³C para el oligosacárido iota de DP=3 (hexasacárido) a 30°C.

Unidad	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6
<i>Gnr</i>	102,48	69,49	77,32	72,32	75,13	61,62
G	102,56	69,49	77,32	72,32	75,13	61,62
<i>Grβ</i>	96,89	70,76	77,19	72,40	74,99	61,84
<i>Grα</i>	92,49	67,39	73,94	73,30	70,76	61,84
<i>Anr</i>	92,20	75,21	78,05	70,74	79,89	69,74
A	92,33	75,21	78,05	78,75	77,10	70,11
<i>Ar</i>	92,12	75,21	78,02	78,62	76,99	70,11

Tabla 8. Desplazamientos químicos (en ppm) de los espectros de r.m.n. -¹³C de las unidades internas para el oligosacárido de DP=3 y para el carragenano iota a 80°C.

Unidad	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6
G DP=3	102,29	69,46	77,15	72,26	74,95	61,40
G polímero	102,22	69,43	77,15	72,20	75,00	61,34
A DP=3	92,03	75,06	77,86	78,37	76,89	69,89
A polímero	92,11	75,06	77,85	78,34	76,89	69,85

Miller y col.¹⁷ realizaron la asignación de los espectros de la agarobiosa, 6-O-metilagarobiosa, carrabiosa y carrabiosa 4-sulfato obtenidas por hidrólisis ácida de los polisacáridos correspondientes (Tabla 9).

Tabla 9. Asignación del espectro de r.m.n. -¹³C de disacáridos obtenidos por hidrólisis ácida de carragenanos y ágar.

Carbono ^a	Agarobiosa	Agarobiosa metilada en G-6	Carrabiosa desulfatada	Carrabiosa kappa
A-1	91,4	91,3	91,2	91,4
A-2	74,2	73,9	74,1 ^b	74,3
A-3	84,3	84,1	83,7	84,0
A-4	87,1	86,9	88,0	88,4
A-5	76,7	76,5	76,5 ^c	76,9
A-6	74,5	74,3	74,2	74,4
G-1	103,8	103,7	104,3	104,4
G-2	72,2	72,0	72,1	72,3
G-3	74,2	73,9	73,9 ^b	73,0
G-4	70,1	70,2	69,9	77,9
G-5	76,7	74,5	76,7 ^c	75,9
G-6	62,6	72,9	62,3	62,4
6Me		58,8		

^aA=unidad de 3,6-anhidrogalactosa y G=unidad de galactosa. ^{b,c}Estas asignaciones pueden intercambiarse.

En los últimos años se ha utilizado mucho esta metodología de trabajo; el punto clave es la separación de los oligosacáridos obtenidos, lo cual muchas veces es difícil.

Normalmente, estos galactanos están compuestos por unidades de disacáridos de distintos tipos, por lo que se considera a estas moléculas híbridos. Sin embargo, esta propiedad es muy difícil de probar, dado que se obtendría un espectro muy parecido a partir de una molécula híbrida o de una mezcla de polisacáridos más sencillos. Se ha intentado obtener esta información por hidrólisis enzimática de los polisacáridos y análisis de los productos por espectroscopía de r.m.n.-¹³C; los resultados sugirieron que estos polisacáridos tienen una estructura de bloques^{15,18-20}.

Hasta 1977 no se había usado la espectroscopía de r.m.n.-¹³C para la elucidación de la estructura primaria de los polisacáridos de algas rojas. A partir de los primeros trabajos^{4,21,22}, se vio que, incluso con equipos de baja resolución, se podía obtener espectros aceptables, si éstos se llevaban a cabo a altas temperaturas. Los espectros de polisacáridos regulares como la agarosa resultaron bastante simples, dando lugar a doce señales correspondientes a los doce átomos de carbono del disacárido repetitivo.

En estos primeros trabajos, se observó que las señales de los carbonos anoméricos presentan una importante particularidad: la señal del C-1 de la β-galactosa ocupa aproximadamente la misma posición en los espectros de la agarosa y del carragenano kappa, pero los desplazamientos

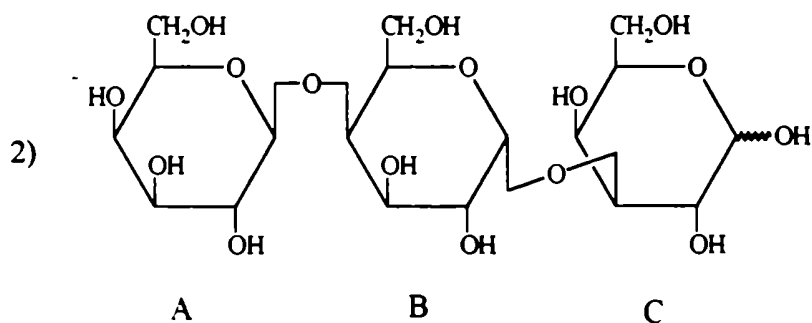
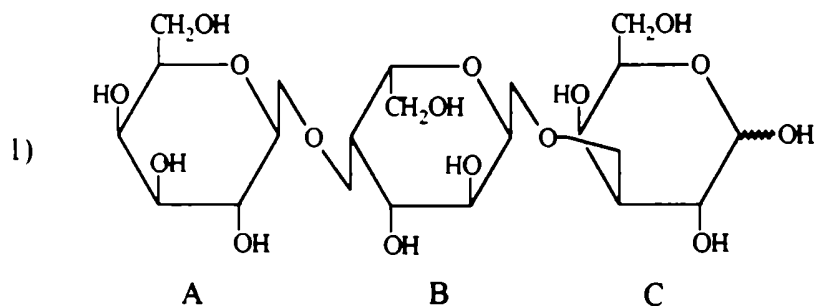
químicos de los C-1 de 3,6-anhidro- α -L-galactosa y 3,6-anhidro- α -D-galactosa aparecen en distintas zonas del espectro. Así, se encontró un método directo que permitía atribuir un dado polisacárido a uno de estos dos grupos inmediatamente después del aislamiento y sin degradación del mismo¹¹.

Sin embargo, como se señaló arriba, frecuentemente los galactanos sulfatados contienen varios disacáridos diferentes como unidades repetitivas, las que dan lugar a espectros complejos. Por ejemplo, los espectros de los llamados porfiranos (ver Cap. 1 a)) presentaban en la región anomérica cuatro señales que correspondían a las cuatro unidades monoméricas que forman estos polisacáridos, dos de las cuales coincidían con las de los C-1 de la agarosa y las otras desaparecieron por tratamiento alcalino del producto de partida (ver Cap. 5). Así, comparando los espectros del polímero antes y después del tratamiento alcalino, se dedujo que las señales de átomos de carbono lábiles al álcali corresponden a los carbonos anoméricos de la díada β -D-Gal \rightarrow α -L-Gal 6S¹⁵. Estos resultados se utilizaron en los estudios del polisacárido de *Bangia fuscopurpurea*⁴ y luego los de *Porphyra columbina*^{23,24} y *Campylaeophora hypnaeoides*²⁵.

En forma similar, se asignaron las señales de los C-1 de los carragenanos μ y ν ²⁶. Estos resultados indicaron por un lado, que los picos de los carbonos anoméricos de los isómeros D- y L- de las unidades de α -galactosa enlazadas por C-4 ocupan posiciones diferentes en el espectro. Este hecho se demostró a partir del análisis de los espectros de dos trisacáridos que sólo diferían en la configuración

Tabla 10. Asignación de las señales del espectro de dos trisacáridos que difieren en la configuración de la unidad α .

Trisacárido	Unidad	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6
1	A	104,5	72,3	73,8	69,9	76,6	62,3
	B	101,9	70,3	69,9	79,6	70,5	61,8
	C $_{\alpha}$	93,6	68,8	79,0	69,9	71,7	62,3
	C $_{\beta}$	97,6	73,0	82,3	69,9	76,2	62,3
2	A	105,8	72,9	74,2	69,9	76,5	62,3
	B	96,9	69,9	71,1	79,6	69,9	61,7
	C $_{\alpha}$	93,6	69,9	76,1	66,9	71,5	62,3
	C $_{\beta}$	97,7	72,9	79,0	66,4	72,9	62,3



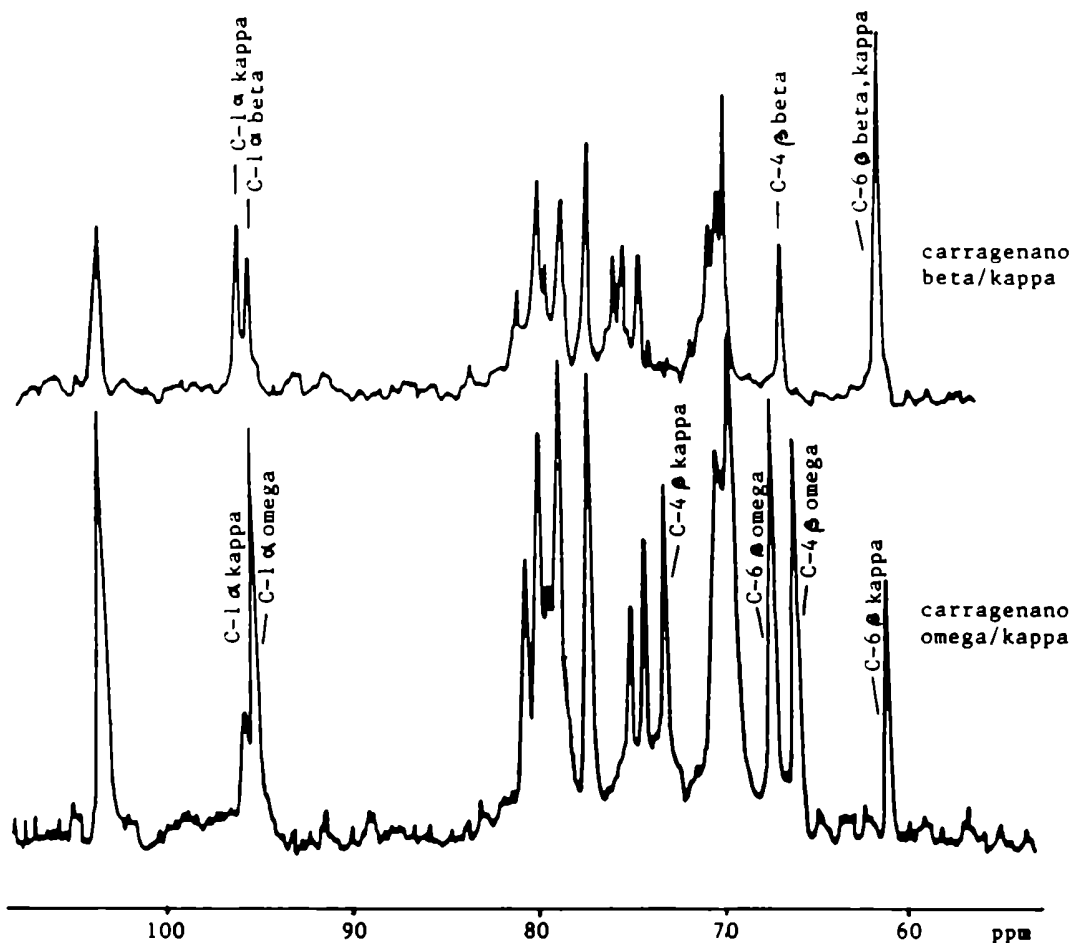
absoluta de la unidad interna (Tabla 10)²⁷.

Por otro lado, el cambio de conformación de una silla 4C_1 a una 1C_4 que se produce con la ciclación de la unidad α (tanto D- como L-) implica un desplazamiento de la señal del carbono anomérico de dicha unidad, así como el de la unidad β vecina anterior, a campos más altos.

La sulfatación o metilación parcial de estas moléculas contribuye a complicar la región anomérica de los espectros de estos polisacáridos. Así, según la posición en que se encuentre la sustitución, ésta afecta en mayor o menor grado al δ de los carbonos anoméricos de la correspondiente unidad o de las vecinas.

Para obtener mayor información es necesario asignar todas las señales presentes en estos espectros. Cuando se comenzó a trabajar de este modo, se pudo determinar la existencia de desviaciones de las estructuras conocidas. Por ejemplo, la región anomérica del polisacárido de *Phyllophora nervosa* resultó idéntica a la de un carragenano kappa parcialmente desulfatado²². Sin embargo, el análisis del espectro completo mostró que los grupos sulfato ocupaban mayoritariamente la posición 6 de la unidad β^4 . Esto se dedujo a partir de la observación que la señal del C-4 de las unidades de β -D-galactosa y el C-1 del residuo de 3,6-anhidrogalactosa ocupaban la misma posición que en el espectro del carragenano kappa desulfatado (carragenano beta), pero el pico del C-6 de la β -D-galactosa se encontraba fuertemente desplazado a campos más bajos (Figura 2).

Figura 2. Espectro de r.m.n.- ^{13}C de un carragenano beta/kappa (a) y un carragenano omega/kappa (b).



Sin embargo, a pesar de todas las variaciones estructurales conocidas de estos polisacáridos, los espectros que se han asignado completamente son pocos. En 1980 Usov y col.⁴ habían asignado todas las señales de los espectros de los carragenanos kappa, iota, omega, lambda desulfatado y beta. En los años posteriores, algunas de estas asignaciones fueron corregidas y se realizaron otras a partir de los espectros de carragenanos y de oligosacáridos obtenidos por degradación de los mismos^{10-12,16,26,28-31}.

Stortz y Cerezo²² calcularon los desplazamientos químicos de las señales de todas las díadas que se podrían encontrar en estos polisacáridos a partir de los espectros de las ya conocidas y Stortz² desarrolló un programa de computación como ayuda para la interpretación de los mismos.

En forma estricta, se debería tomar como base de datos a las correspondientes tríadas, dado que los desplazamientos químicos de los átomos de carbono de una unidad depende principalmente de las dos unidades a las cuales está enlazada. Sin embargo, en general la influencia de la unidad anterior es pequeña, con lo que el uso de díadas es, por el momento, una buena aproximación. De este modo, cinco díadas cuyos espectros habían sido interpretados previamente y las asignaciones realizadas para los metil glicósidos sulfatados⁷ se utilizaron para calcular las restantes díadas; esta tarea se realizó por distintos métodos, los cuales se encuentran descritos en parte en la Tesis Doctoral de C. A. Stortz². La Tabla 11 muestra los desplazamientos químicos para todas las posibles díadas de los carragenanos.

Bellion y col.²⁶ determinaron que los valores de δ de los C-1 de α -galactosa 6-sulfato y 2,6-disulfato unidas a β -galactosa 4-sulfato (unidad α , díadas 17 y 18) eran 98,2 y 98,8 ppm, respectivamente*; es decir, a 0,9 y 3,5 ppm hacia campos más bajos de donde se había predicho por cálculos². Estas asignaciones fueron confirmadas posteriormente por Greer y Yaphe¹⁸. Furneaux y Miller²³ obtuvieron resultados similares, pero no pudieron distinguir

*Se considera un corrimiento constante de + 0,7 ppm.

Tabla 11. Desplazamientos químicos de las señales de las posibles diadas presentes en los carragenanos.

	Diada	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6
1	β -Gal ^a	103.0	70.3	80.9	66.8	75.8	61.8
	α -3,6-AnGal	95.1	70.7	79.8	78.5	77.3	70.0
2	β -Gal	102.7	70.1	79.0	66.8	75.8	61.8
	α -3,6-AnGal 2S	92.1	75.9	79.0	78.5	77.6	70.3
3	β -Gal ^a	105.3	71.1	79.5	66.2	75.9	61.7
	α -Gal	96.7	69.7	71.4	79.0	71.1	62.0
4	β -Gal	105.3	71.1	79.5	66.2	75.9	61.7
	α -Gal 2S	94.7	76.9	69.3	79.1	70.9	61.8
5	β -Gal	105.3	71.1	79.5	66.2	75.9	61.7
	α -Gal 6S	96.7	69.5	70.9	79.0	68.8	68.3
6	β -Gal	105.3	71.1	79.5	66.2	75.9	61.7
	α -Gal 2,6S	94.7	76.7	68.8	79.1	68.6	68.1
7	β -Gal 2S	101.4	78.5	79.8	66.9	75.8	61.7
	α -3,6-AnGal	95.1	70.7	79.8	78.5	77.3	70.0
8	β -Gal 2S	101.1	78.3	77.9	66.9	75.9	61.8
	α -3,6-AnGal 2S	92.1	75.9	79.0	78.5	77.6	70.3
9	β -Gal 2S	103.7	79.3	78.4	66.3	75.9	61.6
	α -Gal	96.7	69.7	71.4	79.0	71.1	62.0
10	β -Gal 2S	103.7	79.3	78.4	66.3	75.9	61.6
	α -Gal 2S	94.7	76.9	69.3	79.1	70.9	61.8
11	β -Gal 2S	103.7	79.3	78.4	66.3	75.9	61.6
	α -Gal 6S	96.7	69.5	70.9	79.0	68.8	68.3
12	β -Gal 2S	103.7	79.3	78.4	66.3	75.9	61.6
	α -Gal 2,6S	94.7	76.7	68.8	79.1	68.6	68.1
13	β -Gal 4S ^a	103.0	70.1	79.3	74.5	75.2	61.8
	α -3,6-AnGal	95.7	70.3	79.6	78.8	77.3	70.0
14	β -Gal 4S ^a	102.7	69.9	77.4	72.7	75.3	61.8
	α -3,6-AnGal 2S	92.7	75.5	78.4	78.8	77.6	70.3
15	β -Gal 4S	105.3	70.8	78.8	73.9	75.3	61.7
	α -Gal	98.2	69.3	71.2	79.3	71.1	62.0
16	β -Gal 4S	105.3	70.8	80.5	73.9	75.3	61.7
	α -Gal 2S	98.8	76.5	69.1	79.4	70.9	61.8
17	β -Gal 4S	105.3	70.8	78.8	73.9	75.3	61.7
	α -Gal 6S	98.2	69.1	70.7	79.3	68.8	68.3
18	β -Gal 4S	105.3	70.8	80.5	73.9	75.3	61.7
	α -Gal 2,6S	98.8	76.3	68.6	79.4	68.6	68.1
19	β -Gal 6S ^a	103.1	70.1	80.7	66.5	73.5	67.6
	α -3,6-AnGal	95.1	70.5	79.9	78.9	77.3	69.9
20	β -Gal 6S	102.8	69.9	78.8	66.5	73.4	67.6
	α -3,6-AnGal 2S	92.1	75.7	78.7	78.9	77.6	70.2

	Diada	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6
21	β -Gal 6S	105.4	71.1	79.3	65.9	73.6	67.5
	α -Gal	96.7	69.7	71.5	79.4	71.1	61.9
22	β -Gal 6S	105.4	71.1	79.3	65.9	73.6	67.5
	α -Gal2S	94.7	76.9	69.4	79.5	70.9	61.7
23	β -Gal 6S	105.4	71.1	79.3	65.9	73.6	67.5
	α -Gal 6S	96.7	69.5	70.8	79.4	68.8	68.2
24	β -Gal 6S	105.4	71.1	79.3	65.9	73.6	67.5
	α -Gal 2.6S	94.7	76.7	68.7	79.5	68.6	68.0
25	β -Gal 2.4S	101.4	78.3	78.2	74.6	75.2	61.7
	α -3.6-AnGal	95.7	70.3	79.6	78.8	77.3	70.0
26	β -Gal 2.4S	101.1	78.1	76.3	72.8	75.3	61.8
	α -3.6-AnGal 2S	92.7	75.5	78.4	78.8	77.6	70.3
27	β -Gal 2.4S	103.7	79.0	77.7	74.0	75.3	61.7
	α -Gal	98.2	69.3	71.2	79.3	71.1	62.0
28	β -Gal 2.4S	103.7	79.0	79.4	74.0	75.3	61.7
	α -Gal 2S	98.8	76.5	69.1	79.4	70.9	61.8
29	β -Gal 2.4S	103.7	79.0	77.7	74.0	75.3	61.7
	α -Gal 6S	98.2	69.1	70.7	79.3	68.8	68.3
30	β -Gal 2.4S	103.7	79.0	79.4	74.0	75.3	61.7
	α -Gal 2.6S	98.8	76.3	68.6	79.4	68.6	68.1
31	β -Gal 2.6S	101.5	78.3	79.6	66.6	73.5	67.5
	α -3.6-AnGal	95.1	70.5	79.9	78.9	77.3	69.9
32	β -Gal 2.6S	101.2	78.1	77.7	66.6	73.4	67.5
	α -3.6-AnGal 2S	92.1	75.7	78.7	78.9	77.6	70.2
33	β -Gal 2.6S	103.8	79.3	78.2	66.0	73.6	67.4
	α -Gal	96.7	69.7	71.5	79.4	71.1	61.9
34	β -Gal 2.6S	103.8	79.3	78.2	66.0	73.6	67.4
	α -Gal 2S	94.7	76.9	69.4	79.5	70.9	61.7
35	β -Gal 2.6S	103.8	79.3	78.2	66.0	73.6	67.4
	α -Gal 6S	96.7	69.5	70.8	79.4	68.8	68.2
36	β -Gal 2.6S	103.8	79.3	78.2	66.0	73.6	67.4
	α -Gal 2.6S	94.7	76.7	68.7	79.5	68.6	68.0
37	β -Gal 4.6S	103.1	69.9	79.1	74.2	72.9	67.6
	α -3.6-AnGal	95.7	70.1	79.7	79.2	77.3	69.9
38	β -Gal 4.6S	102.7	69.8	77.2	72.5	72.9	68.1
	α -3.6-AnGal 2S	92.7	75.5	78.4	78.8	77.6	70.3
39	β -Gal 4.6S	105.3	71.0	80.0	73.8	72.7	67.5
	α -Gal	98.2	69.3	71.2	79.3	71.1	62.0
40	β -Gal 4.6S	105.3	71.0	81.7	73.8	72.7	67.5
	α -Gal 2S	98.8	76.5	69.1	79.4	70.9	61.8
41	β -Gal 4.6S	105.3	71.0	80.0	73.8	72.7	67.5
	α -Gal 6S	98.2	69.1	70.7	79.3	68.8	68.3
42	β -Gal 4.6S	105.3	71.0	81.7	73.8	72.7	67.5
	α -Gal 2.6S	98.8	76.3	68.6	79.4	68.6	68.1

^aAsignaciones realizadas a partir del correspondiente espectro.

las dos señales separadamente, debido a que el espectro se realizó con un equipo de baja resolución. Esta diferencia entre los valores reales y los calculados se explicó en base al efecto del grupo sulfato en C-4 de la unidad de β -galactosa, que cambia probablemente la conformación de la molécula al variar los ángulos de torsión preferenciales alrededor de la unión glicosídica y modificando así, la relación espacial entre el H-1 de la unidad α y el H-3 de la β ³³.

Nosedá y Cerezo³⁴ publicaron el espectro de r.m.n.-¹³C a temperatura ambiente de un carragenano lambda parcialmente autohidrolizado (ver Cap. 4); los valores obtenidos para los desplazamientos químicos de los carbonos anoméricos coincidían con los calculados. Además, observaron que la señal del C-1 de la α -D-galactosa 2,6-disulfato unida a β -D-galactosa 2-sulfato, que aparece a 94,7 ppm se desplaza a 94,2 ppm por pérdida del grupo sulfato en C-2 de la unidad β .

Recientemente, Stortz y col.³⁵ obtuvieron el espectro de un carragenano lambda "puro" a 70°C y 100 MHz, donde se observaron sólo doce señales de aproximadamente la misma intensidad (Tabla 12). Los valores de los C-1 resultaron en este caso 103,9 y 92,0 ppm. Las discrepancias observadas en los valores de los δ de la unidad α informadas en este trabajo y las obtenidas para productos parcialmente degradados³⁴ podrían deberse a diferencias en la conformación de los dos carragenanos probablemente producidas por las diferencias de tamaño o por la temperatura a la que se llevaron a cabo los espectros. Un δ

menor que el esperado para el C-1 de esta unidad (Tabla 11) sugiere que el fuerte efecto protector del sulfato en C-2 de la unidad β sobre el carbono anomérico de la unidad de α -galactosa 2,6-disulfato en los carragenanos lambda causa una modificación en los ángulos de torsión alrededor de la unión glicosídica. El desplazamiento de la señal del C-3 de la unidad β (que es el otro átomo de carbono involucrado en la unión glicosídica) hacia campos más altos confirma esta sugerencia³⁵.

Tabla 12. Asignación de las señales presentes en el espectro de r.m.n.-¹³C de un carragenano lambda.

Señal (ppm)	Asignación ^a
103,9	1 β
92,0	1 α
80,9	4 α
77,9	2 β
76,2	↑
75,3	2 α ,3 β ,5 β
74,6	↓
70,0	↑
69,1	3 α ,5 α ,6 α
68,5	↓
64,5	4 β
61,7	6 β

^a β = β -D-Gal 2S. α = α -D-Gal 2,6S

Al mismo tiempo, Falshaw y Furneaux³⁶ publicaron el espectro de un carragenano lambda extraído de los tetraesporofitos de *Gigartina decipiens* (Tabla 13); los valores informados en ambos trabajos^{35,36} son coincidentes. Además, estos autores asignaron el espectro del carragenano lambda ciclado (Tabla 13), que muestra importantes

diferencias con los valores predichos a partir de cálculos³², y del carragenano lambda desulfatado, cuyas señales ya habían sido asignadas por Usov y col.⁴.

Tabla 13 Asignación de las señales de los espectros de r.m.n.-¹³C de un carragenano lambda y su derivado ciclado^a.

Unidad	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6
β-Gal 2S enlazada por 3	103,9	77,9 ^b	76,3 ^b	64,7	74,7	61,8
α-Gal 2,6S enlazada por 4	92,1	75,3	70,0	80,8	69,2 ^c	68,6 ^c
β-Gal 2S enlazada por 3	100,8	78,1 ^d	77,7 ^d	68,3	75,2	68,6
α-3,6-AnGal 2S enlazada por 4	96,1	75,2	77,9	80,0	77,5 ^d	70,3

^aSe ha aplicado un corrimiento constante de +0.5 ppm a los valores publicados para permitir la comparación con los restantes. ^{b,c,d}Las asignaciones se pueden intercambiar.

En 1980 Usov y col.⁴ también habían asignado las señales de los espectros de la agarosa, 2-O-metilagarosa (β-D-Gal-->2Me α-L-3,6-AnGal), 6'-O-metilagarosa (6Me β-D-Gal-->α-L-3,6-AnGal) y porfirano (β-D-Gal-->α-L-Gal 6S). Trabajos posteriores³⁷⁻⁴⁶ corrigieron algunas de estas asignaciones e interpretaron los espectros producidos por otras variedades estructurales. En la Tabla 14 se dan los desplazamientos químicos de las distintas díadas, según los valores que se encuentran en la bibliografía^f.

En la Tabla 15, para la díada β-D-Gal 2S-->α-L-3,6-AnGal se informan los valores reportados por Usov y Elashvili⁴⁰ para oligosacáridos obtenidos por degradación de los polisacáridos de *Laurencia nipponica*. Sin embargo, Miller y col.⁴⁷ asignaron señales a 102,8, 77,7 y 82,7 ppm

^fSe corrigieron las diferencias sistemáticas existentes entre los valores presentados por los distintos autores para permitir la comparación de los mismos.

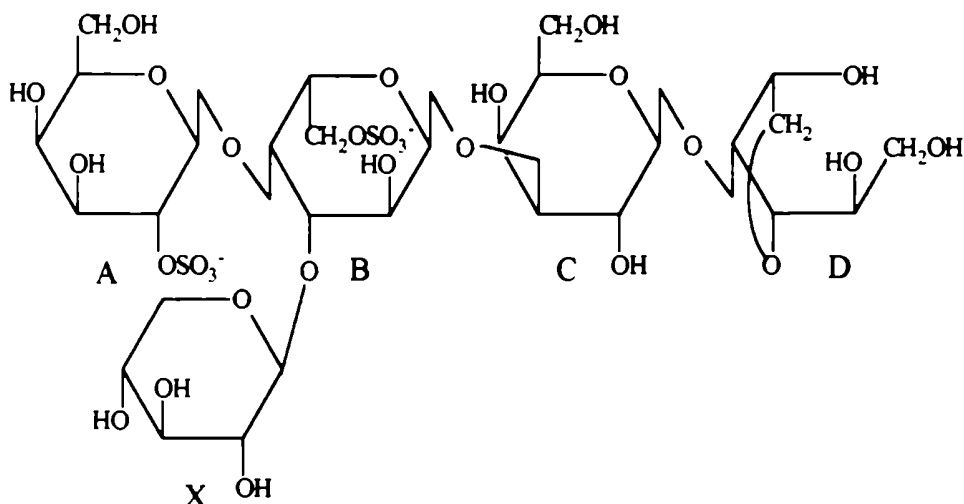
Tabla 14. Desplazamientos químicos de las díadas presentes en polisacáridos de la familia del ágar^a.

Diada	Ref.	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	OMe
β -D-Gal enlazada por 3	37	102.4	70.3	82.2	68.8	75.6	61.4	-
α -L-3,6-AnGal enlazada por 4		98.2	69.9	80.1	77.4	75.7	69.4	
6-Me- β -D-Gal enlazada por 3	38	102.4	70.2	82.0	69.0	73.6	71.8	59.1
α -L-3,6-AnGal enlazada por 4		98.3	69.9	80.2	77.4	75.7	69.4	-
β -D-Gal enlazada por 3	38	102.7	70.2	82.7	68.8	75.3	61.4	-
2-Me- α -3,6-AnGal enlazada por 4		98.7	78.9	78.5	77.6	75.7	69.5	59.2
β -D-Gal 6S enlazada por 3	46	102.6	70.1	82.2	68.4	73.0	67.5	
α -L-3,6-AnGal enlazada por 4		98.4	69.8	80.1	77.4	75.6 ^b	69.3	
β -D-Gal 4S enlazada por 3	38	102.4	70.8	80.0	77.0	75.0	61.4	
α -L-3,6-AnGal enlazada por 4		96.8	69.9	80.1	77.4	75.7	69.4	
β -D-Gal 4S enlazada por 3	38	102.5	70.5	79.8	76.6	75.2	61.4	-
2-Me- α -3,6-AnGal enlazada por 4		98.2	79.1	78.5	77.7	75.7	69.9	59.1
β -D-Gal 2S enlazada por 3 ^c	40	101.2	77.4	80.8	68.9	75.9	61.5	
α -L-3,6-AnGal enlazada por 4		98.7	69.8	80.0	78.2	75.3	69.6	
Pir- β -D-Gal enlazada por 3 ^d	38	102.2	70.0	79.5	71.6	66.7	65.3	
α -L-3,6-AnGal enlazada por 4		98.4	69.9	80.1	77.5	75.7	61.4	
6-Sust- β -D-Gal enlazada por 3	41	102.5	70.2	82.2	69.0	73.6	71.8	
α -L-3,6-AnGal enlazada por 4		98.3	69.9	80.2	77.4	75.7	69.4	-
4-Me- α -L-Gal Term		98.5	69.9	70.7	79.4	72.7	61.4	61.9
β -D-Gal enlazada por 3	43	103.7	69.8	81.2	69.1	75.9	61.6	
α -L-Gal 6S enlazada por 4		101.3	69.2	71.0	79.0	70.2	67.7	
β -D-Gal enlazada por 3	43	103.7	70.0	81.0	68.9	75.7	61.4	-
α -L-Gal enlazada por 4		100.9	69.4	71.0	79.3	72.2	61.2	-

^aEntre los distintos autores aparecen discrepancias en las asignaciones. Los datos que aparecen en la Tabla son los más confiables o los más recientes. ^bMiller y col.⁴⁶ sugirieron que el valor correcto era 72.8 ppm. ^cAproximación hecha a partir de resultados obtenidos para oligosacáridos. ^dCuando el carbono asimétrico del cetil se encuentra en la configuración R la señal del grupo metilo aparece a 27.7 ppm, la señal para la configuración S aparecería a 15-18 ppm. En ambos casos el carbono carboxílico da un pico a 176.3 ppm.

Tabla 15. Desplazamientos químicos (en ppm) de las señales presentes en el oligosacárido de la Figura.

Unidad	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6
A	101,4	79,7	72,8	69,4	76,0	61,9
B	101,4	67,3	73,5	76,2	70,2	67,5
C	102,6	70,6	81,2	69,2	75,8	61,4
D	63,5	71,6	84,0	86,1	75,8	73,6
X	101,0	73,8	75,9	69,8	65,6	



(valores corregidos para permitir la comparación) a los C-1, C-2 y C-3 de unidades de β -galactosa 2-sulfato enlazadas a α -L-3,6-anhidrogalactosa en el espectro del polisacárido de *Osmundaria colensoi*. Estas diferencias podrían provenir de razones similares a las que se supone que causan las diferencias entre los espectros de oligo y polisacáridos de

tipo lambda.

Si bien la presencia de xilosa como cadena lateral se detectó hace bastante tiempo e incluso, en algunos casos, se había determinado su posición en la estructura de ciertos galactanos sulfatados por métodos químicos, sólo recientemente se determinó su presencia por r.m.n.-¹³C. Esto se debe a que este monosacárido se encuentra generalmente en pequeñas proporciones y muchas veces en galactanos cuya estructura es muy compleja debido a la presencia de distintos sustituyentes sobre la cadena principal, como grupos sulfato y/o metilo, con lo que los espectros resultantes son muy difíciles de interpretar.

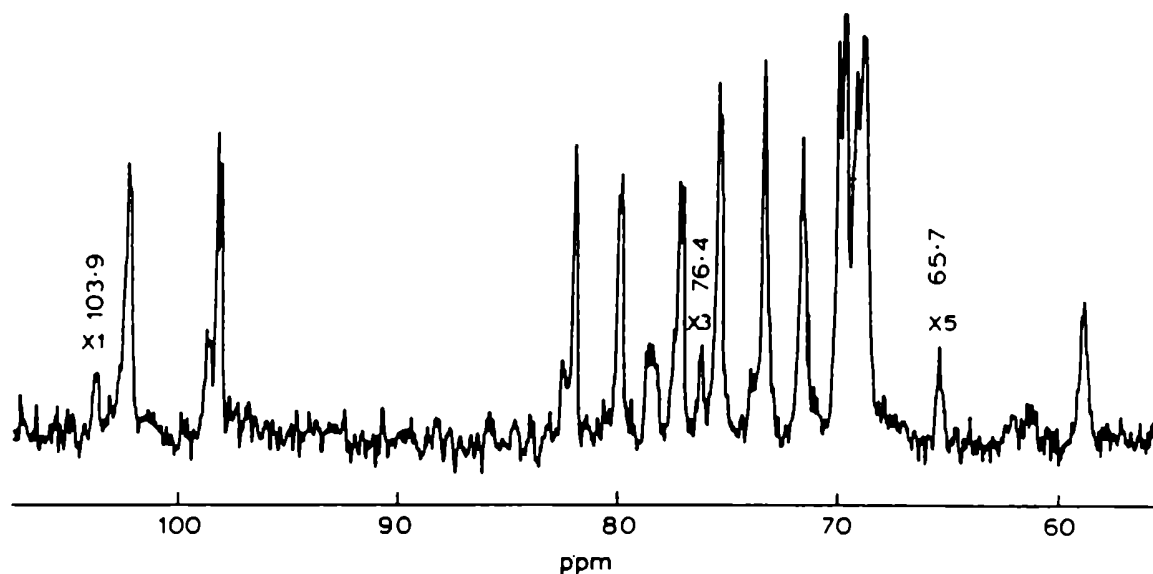
Furneau y col.⁴⁹ asignaron los picos correspondientes a los C-1, C-3 y C-5 de unidades de β -D-xilosa como cadena lateral en el espectro del componente gelificante de *Melanthalia abscissa* (Gracilariaceae) (Figura 3). El análisis por metilación sugirió que ésta se encontraba como sustituyente en la posición 6 de las unidades de β -D-galactosa de las díadas de agarosa.

Cases y col.⁵⁰ encontraron β -D-xilosa en la misma posición en el galactano sulfatado de *Corallina officinalis* que carece de 3,6-anhidrogalactosa (Corallinaceae-Cryptonemiales), asignando todas las señales.

Por otra parte, Usov y Elashvili⁴⁰ interpretaron el espectro del oligosacárido que se indica en la Tabla 15. Los picos de C-2 - C-5 son los característicos del anómero β en la forma piranósica. El desplazamiento a campos más bajos de la señal del C-1 se debe a que el residuo de β -D-xilopiranososa se encuentra unido al C-3 del residuo de L-

galactosa unida a β -D-galactosa 2-sulfato (Tabla 15).

Figura 3. Espectro de r.m.n.- ^{13}C del polisacárido gelificante de *Melanthalia abscissa*.



X1, X3 y X5 son las señales correspondientes de los C-1, C-3 y C-5 de las unidades de β -D-xilosa.

Matulewicz y col.⁵¹ detectaron β -D-xilosa en la misma posición en un galactano de *Nothogenia fastigiata* (Nemaliales).

b) Espectroscopía de resonancia magnética nuclear protónica.

Es bien sabido que los desplazamientos químicos de los protones son muy sensibles a pequeños cambios en su entorno. Sin embargo, la espectroscopía de resonancia magnética nuclear protónica no ha sido muy utilizada para la determinación de la estructura de polisacáridos de algas.

Esto se debe a la complejidad de los espectros y a la superposición de las señales, principalmente debido a que los picos son muy anchos, aún en los espectros realizados a alta temperatura.

Los primeros estudios se realizaron con compuestos modelo. Izumi⁵² asignó todas las señales del espectro del metil 3,6-anhidro- α -D-galactopiranosido, mostrando que la formación del anillo de 3,6-anhidro produce un considerable desplazamiento de las señales de H-3, H-4 y H-5 ($\approx 0,5$ ppm) a campos más bajos que las del metil α -D-galactopiranosido. Las constantes de acoplamiento de las señales también varían con la formación del anillo; $J_{2,3}$ y $J_{3,4}$ decrecen en $\approx 3-5$ Hz y $J_{4,5}$ aumenta en $\approx 1-2$ Hz.

Harris y Turvey⁵³ encontraron que la sulfatación de un hidroxilo en los galactopiranosidos produce una significativa desprotección de los protones geminales y vecinos. Ruiz Contreras y col.⁷ estudiaron los espectros protónicos de los metil α -D-galactopiranosidos monosulfatados confirmando los efectos observados anteriormente (Tabla 16). Los grupos sulfato secundarios producen un desplazamiento de la señal del protón en α de $0,6-0,7$ ppm, mientras que los primarios de $0,4-0,5$ ppm. Los efectos sobre el hidrógeno que se encuentra en β son de $0,1-0,4$ ppm, dependiendo de la orientación ecuatorial o axial del protón vecino. La señal de un protón ecuatorial vecino a un grupo sulfato ecuatorial produce el mayor desplazamiento hacia campos bajos, respecto de las otras posibles posiciones relativas. Los valores de las constantes de acoplamiento para los distintos galactósidos monosulfatados

Tabla 16. Desplazamiento químico de las señales en los espectros de r.m.n. ^1H del metil α -D-galactopiranosido y de sus derivados monosulfatados.

Compuesto	Desplazamiento químico (ppm)							OCH_3
	H-1	H-2	H-3	H-4	H-5	H-6	H-6'	
Me- α -D-Gal	4,837	3,819	3,811	3,968	3,897	3,741	3,752	3,414
Me- α -D-Gal 2-sulfato	5,131	4,443	3,940	4,048	3,923	3,749	3,763	3,428
Me- α -D-Gal 3-sulfato	4,899	3,982	4,477	4,324	3,935	3,751	3,759	3,430
Me- α -D-Gal 4-sulfato	4,867	3,855	3,941	4,713	4,030	3,810	3,755	3,425
Me- α -D-Gal 6-sulfato	4,842	3,830	3,828	4,018	4,148	4,214	4,158	3,421
Constantes de acoplamiento (Hz)								
	$J_{1,2}$	$J_{2,3}$	$J_{3,4}$	$J_{4,5}$	$J_{5,6}$	$J_{5,6'}$	$J_{6,6'}$	
Me- α -D-Gal	3,2	10,2	2,7	1,2	4,1	8,3	-11,8	
Me- α -D-Gal 2-sulfato	3,8	10,2	3,7	1,0	4,2	8,1	-11,8	
Me- α -D-Gal 3-sulfato	3,8	10,3	3,2	1,1	4,1	8,2	-11,8	
Me- α -D-Gal 4-sulfato	3,9	10,4	3,3	n.d.	4,1	8,3	-12,0	
Me- α -D-Gal 6-sulfato	3,0	10,3	3,3	0,8	4,1	8,3	-10,8	

son similares entre sí y a las del producto sin sulfatar, indicando que la sulfatación no causa una distorsión significativa en la conformación 1C_1 ni cambios en la población de los rotámeros alrededor de la unión C-5 - C-6.

Los grupos metilo en los derivados monometilados de glicopiranosas puede detectarse facilmente pues dan lugar a singuletes agudos en la región de δ 3,40-3,65 ppm de los correspondientes espectros. El desplazamiento-químico de la señal de los protones de un metoxilo determinado es independiente de su orientación ecuatorial o axial, pero depende de la configuración de los grupos OH o CH_2OH adyacentes^{54,55}. Cuando ambos grupos hidroxilo adyacentes son ecuatoriales, la resonancia del grupo metoxilo ocurre a δ 3,62-3,65 ppm; cuando uno es axial y el otro ecuatorial, a 3,47-3,48 ppm; cuando uno de los dos grupo ecuatoriales adyacentes es CH_2OH , aparece a 3,55-3,57 ppm y cuando el grupo metoxilo está en C-6, a 3,40-3,41 ppm.

Los cetales del ácido pirúvico se detectan facilmente en el espectro de r.m.n.- 1H por la señal de los protones del grupo metilo en la región a \approx 1,56 ppm⁵⁶, esta señal se encuentra muy alejadas de las otras características de los espectros de azúcares.

Izumi⁵⁷ estudió los espectros de la agarobiosa, D-galactosa 6-sulfato, 4,6-(1-carboxietiliden)-agarobiosa y los productos de hidrólisis ácida de diferentes fracciones de polisacáridos de *Gelidium amansii*, *Gracilaria verrucosa* y *Gloiopeltis furcata* realizados a 100 MHz en soluciones al 5-10 % en D_2O a 20°C y comparó estos resultados con los obtenidos por métodos químicos. La relación Gal(6-O-metil-

Gal):3,6-AnGal en estos polisacáridos se determinó por la relación entre las señales de los H-4 y H-5 (4,35-4,45 ppm) de la 3,6-anhidrogalactosa respecto a las señales de todos los otros protones del espectro menos los anoméricos (3,5-4,1 ppm). El contenido de 6-O-metilgalactosa se determinó a partir del área de la señal a 3,40 ppm; La relación molar de galactosa 6-sulfato respecto al total de azúcares neutros se calculó en base al área del pico del H-6 de esta unidad a 4,2-4,3 ppm y el contenido de ácido pirúvico a partir del área de la señal a 1,56 ppm.

El espectro protónico de la agarobiosa presenta una señal a 5,05 ppm (doblete, J 6,0 Hz) debida al H-1 del aldehído hidratado del residuo de 3,6-anhidrogalactosa reductora. En el espectro de la agarotetraosa aparece una señal adicional a 5,15 ppm (doblete, J 2,0 Hz) debido al H-1 de las unidades de 3,6-anhidrogalactosa internas. En cambio, en los productos de degradación enzimática, además del doblete a 5,15 ppm se observa una señal a 5,32 ppm debido al H-1 de la α -Gal reductora¹¹.

Los espectros de r.m.n.-¹H de polisacáridos se hicieron posible con el surgimiento de instrumentos de mayor resolución. Welte³⁸ obtuvo los espectros de la agarosa, su derivado sulfatado en C-6, y de los carragenanos kappa y iota en D₂O, a 300 MHz y 80°, así como los espectros del metil- β -D-galactopiranosido y metil-3,6-anhidro- α -D-galactopiranosido en las mismas condiciones (Tablas 17 y 18).

Estos espectros se usaron para la identificación de estructuras en los de otros polisacáridos, por ejemplo: 1)

Tabla 17. Desplazamientos químicos (en ppm) en los espectros de r.m.n. ^1H de metilglicosidos y polisacáridos realizados a 80°C .

Proton	Me- glicósido	Agarosa	Carrag. kappa	Carrag. iota	Agarosa sulfato	Me- glicósido	Agarosa kappa	Carrag. iota	Agarosa sulfato
Unidad de β -galactosa									
1	4,292	4,556	4,611	4,640	4,585	4,792	5,136	5,091	5,130
2	3,512	3,630	3,595	3,622	3,628	3,988	4,100	4,125	4,101
3	3,624	3,755	3,952	3,922	3,770	4,316	4,526	4,839	4,559
4	3,924	4,117	4,814	4,897	4,158	4,459	4,661	4,625	4,651
5	3,662	3,710	3,769	3,768	3,941	4,376	4,550	4,663	4,541
6	3,786	3,804	3,805	3,828	4,201	4,169	4,192	4,252	4,181
6'	3,754	3,753	3,785	3,812	4,188	4,019	4,018	4,098	4,018
CH_3	3,560					3,500			

Tabla 18. Constantes de acoplamiento (en Hz) en los espectros de r.m.n. ^1H de metilglicosidos y polisacáridos realizados a 80°C .

J_{xv}	Me- glicósido	Agarosa	Carrag. kappa	Carrag. iota	Agarosa sulfato	Me- glicósido	Agarosa kappa	Carrag. iota	Agarosa sulfato
Unidad de β -galactosa									
1,2	7,85	7,8	7,8	9,5	7,5	2,8	2,7	2,0	2,0
2,3	9,85	9,5	9,5	9,0	9,5	5,6	5,0	5,1	6,0
3,4	3,5	3,2	3,0	3,5	3,5	0,4	0,4	0,4	0,4
4,5	1,0	1,1	1,25	1,0	1,1	1,9	2,1	2,1	1,0
5,6	7,4	7,5	8,0	8,0	6,0	0,4	2,0	2,0	2,0
5,6'	4,85	5,5	4,3	4,25	7,0	3,0	3,0	3,0	4,0
6,6'	-11,7	-12,5	-12,0	-12,0	-15,0	-10,5	-10,0	-9,5	-10,5

Se determinó a partir de las señales de los protones anoméricos en el espectro de un "carragenano kappa" de *Chondrus crispus*, que éste contenía unidades de 3,6-anhidrogalactosa sulfatadas en la posición 2. 2) La presencia de unidades de β -D-galactosa sin sulfatar en un carragenano kappa de *Furcellaria fastigiata* se evaluó a partir del area del pico del H-1 de la 3,6-anhidrogalactosa y el del la galactosa 4-sulfato. 3) El espectro del ágar aislado de *Gloiopeltis cervicornis* mostró que la mayor parte de los grupos sulfato se hallaban en C-6 de la unidad β , pero además, un 15 % de los residuos de 3,6-anhidro- α -L-galactosa se encontraban sulfatados en C-2 y también había grupos sulfato probablemente en C-4 de la unidad β .

En los años siguientes, los espectros de r.m.n.- ^1H se usaron principalmente para la cuantificación del contenido de metoxilo y piruvilo en estos polisacáridos.

Como parte de un estudio del patrón de sustitución en los polisacáridos de algas de la familia Gracilariaceae, Lahaye⁵⁹ realizó los espectros de varios oligómeros obtenidos por degradación enzimática de los mismos y observó cambios en la región anomérica del espectro según la combinación de grupos metilo y sulfato que se encontraban presentes (Tabla 19). Las señales a 5,17 y 5,23 ppm fueron utilizadas por Rochas y col.⁶⁰ para determinar el contenido de sulfato en una agarosa que contenía metilo en C-2 de la unidad α .

En los últimos años, Knutsen y col. realizaron importantes estudios de espectroscopía de r.m.n.- ^1H aplicada a carragenanos y a los oligosacáridos obtenidos por

hidrólisis enzimática de los mismos.

Tabla 19. Desplazamientos químicos de las señales de los H-1 para distintas unidades α de diadas presentes en ágar y otros polisacáridos relacionados.

Unidad α	Enlazada a β -	δ_{H-1} (ppm)
L-3,6-AnGal	D-Gal 6S	5,12
L-3,6-AnGal	D-Gal	5,13
L-3,6-AnGal	6Me-D-Gal	5,14
2Me-L-3,6-AnGal	D-Gal	5,17
L-3,6-AnGal 2S	D-Gal	5,18 ^a
L-3,6-AnGal	Pir-D-Gal	5,21
2Me-L-3,6-AnGal	D-Gal 4S	5,23
L-3,6-AnGal	D-Gal 4S	5,25

^aDato de Welte⁹

El espectro de 500 MHz realizado a 80°C de un carragenano tratado con álcali y parcialmente degradado de *Furcellaria lumbricalis* y su derivado parcialmente desulfatado contenían señales perfectamente resueltas a 5,09 y 5,11 ppm que corresponden a H-1 de 3,6-anhidro- α -D-galactosa unida a D-galactosa y D-galactosa 4-sulfato, respectivamente, se observaba, además, el H-4 de la unidad de β -D-galactosa 4-sulfato a 4,83 ppm, cuya intensidad era igual a la de la señal a 5,11 ppm. Entonces, la relación entre las señales a 5,11 y 5,09 ppm indicó en forma directa la relación kappa:beta en el carragenano en estudio⁶¹.

Por otra parte, por fraccionamiento de un carragenano del mismo alga se obtuvo una fracción soluble en cloruro de potasio en cuyo espectro se identificó una señal a 5,26-5,28 ppm que correspondía a H-1 de α -galactosa 6-sulfato unida a β -galactosa 4-sulfato, mientras que la que aparecía a 5,17-5,19 ppm corresponde al H-1 de unidades de α -galactosa 6-sulfato unidas a β -galactosa sin sulfatar⁶².

Además, se realizó la asignación de todas las señales del espectro de la neoagarobiosa, así como de otros oligosacáridos parcialmente sulfatados a temperatura ambiente⁶³ (Tablas 20 y 21).

Stortz y col.³⁵ obtuvieron los espectros de dos carragenanos lambda extraídos de tetraesporofitos de *Iridaea undulosa* y determinaron que la señal del H-1 de las unidades de α -galactosa 2,6-disulfato en estos polisacáridos aparece a 5,58 ppm. Además de esta última, las tres únicas señales que se encuentran a campos más bajos que la del HOD, aquellas a 4,71, 4,59 y 4,54 ppm, se asignaron tentativamente a H-2 de la unidad α y H-1 y H-2 de la unidad β .

Knutsen⁶² estudió los efectos de la temperatura en los picos de los espectros de r.m.n-¹H. Por aumento de la misma, se produjo una mejora en la resolución de las señales, debida a la disminución en la viscosidad de las soluciones, y un desplazamiento en el pico del agua que pasa de 4,70-4,85 ppm a 25° a \approx 4,2 ppm a 90°C. Además, el aumento de temperatura altera los desplazamientos químicos de los protones en un grado pequeño pero variable. En general, el mayor efecto se observa para los protones unidos a los átomos de carbono involucrados en las uniones glicosídicas, el efecto es menor para los protones unidos a los carbonos vecinos y muy pequeño para los distantes. Sin embargo, el aumento de temperatura produce superposición de algunas señales, según se observó en los espectros de oligosacáridos. En definitiva, parece conveniente realizar los espectros de estos polisacáridos a alta temperatura y

los de los oligosacáridos a temperatura ambiente.

Tabla 20 Desplazamientos químicos de las señales en los espectros de r.m.n. ^1H de oligosacáridos de neocarrabiosa a 25°C.

Protón	(A-G4S) ₃	(A-G4S) ₂	A-G4S	A-G-A-G4S	A-G
GH-1 α	5,320	5,320	5,320	5,320	5,299
GH-1 β	4,654	4,653	4,650	4,650	4,615
GnrH-1	4,658	4,656		4,618	
GH-1	4,660				
GH-2 α	3,917	3,919	3,919	3,921	3,909
GH-2 β	3,593	3,595	3,594	3,597	3,587
GnrH-2	3,596	3,601		3,603	
GH-2	3,599				
GH-3 α	4,165	4,174	4,165	4,171	4,055
GH-3 β	3,983	3,979	3,967	3,974	3,837
GnrH-3	4,003	4,000		3,866	
GH-3	4,013				
GH-4 α	4,901	4,899	4,895	4,897	4,185
GH-4 β	4,835	4,840	4,835	4,837	4,128
GnrH-4	4,855	4,855		4,139	
GH-4	4,855				
GH-5 α	4,186	4,186	4,190	4,185	4,066
GH-5 β	3,774	3,774	3,774	3,77	3,670
GnrH-5	3,817	3,817		3,72	
GH-5	3,817				
GH-6 $\alpha\alpha$	3,79	\approx 3,79	3,793	3,79	3,726
GH-6 $\alpha\beta$	3,783	3,785	3,78	3,78	3,726
GnrH-6a	3,800	3,800		3,70-3,72	
GH-6a	3,800				
GH-6 $\beta\alpha$	3,731	3,731	3,731	3,73	3,723
GH-6 $\beta\beta$	3,783	3,783	3,783	3,78	3,733
GnrH-6b	3,800	3,800		3,70-3,72	
GH-6b	3,800				

Tabla 20. Desplazamientos químicos de las señales en los espectros de r.m.n.-¹H de oligosacáridos de neocarrabiosa a 25°C (continuación).

Protón	(A-G4S) ₃	(A-G4S) ₂	A-G4S	A-G-A-G4S	A-G
AH-1α	5,120	5,121	5,102	5,119	5,080
AH-1β	5,103	5,104	5,084	5,101	5,062
AnrH-1	5,084	5,085		5,065	
AH-1	5,103				
AH-2α	4,142	4,144	4,106	4,143	4,055
AH-2β	4,142	4,144	4,106	4,143	4,055
AnrH-2	4,102	4,103		4,048	
AH-2	4,138				
AH-3α	4,535	4,535	4,357	4,529	4,372
AH-3β	4,535	4,535	4,357	4,529	4,372
AnrH-3	4,352	4,352		4,367	
AH-3	4,529				
AH-4α	4,607	4,606	4,478	4,592	4,500
AH-4β	4,607	4,606	4,478	4,592	4,500
AnrH-4	4,479	4,483		4,502	
AH-4	4,607				
AH-5α	4,650	4,648	4,408	4,667	4,423
AH-5β	4,650	4,648	4,408	4,667	4,423
AnrH-5	4,409	4,409		4,423	
AH-5	4,650				
AH-6aα	4,061	4,062	4,020	4,053	4,032
AH-6aβ	4,061	4,062	4,020	4,053	4,032
AnrH-6a	4,020	4,021		4,032	
AH-6a	4,061				
AH-6bα	4,234	4,234	4,218	4,236	4,214
AH-6bβ	4,234	4,234	4,218	4,236	4,214
AnrH-6b	4,203	4,203		4,196	
AH-6b	4,224				

Tabla 21. Constantes de acoplamiento (en Hz) para los oligosacáridos del tipo neocarrabiosa 4-sulfato.

D-galactosa		3,6-anhidro-D-galactosa	
J _{1,2α}	3,9	J _{1 2}	2,4
J _{1,2β/nr/int} ^a	7,9		
J _{2,3α}	10,3	J _{2 3}	5,4
J _{2,3β/nr/int}	9,9		
J _{3,4α}	3,1 (2,5) ^b	J _{3 4}	m.p.
J _{3,4β/nr/int}	3,3		
J _{4,5α}	m.p.	J _{4 5}	1,9
J _{4,5β/nr/int}	0,95		
J _{5,6αα}	4,4 (6,2)	J _{5 6a}	3,1
J _{5,6αβ/nr/int}	8,2		
J _{5,6bα}	8,1	J _{5,6b}	m.p.
J _{5,6bβ/nr/int}	4,3		
J _{6a,6bα}	- 11,9	J _{6a,6b}	- 10,6
J _{6a,6bβ/nr/int}	- 12,0		

^aint=unidades de galactosa 4-sulfato internas. ^bLos valores para la neocarrabiosa se dan entre paréntesis. ^cMuy pequeño para ser medido.

Bibliografía

1. A. I. Usov, *Food Hydrocolloids* 6, 9 (1992).
2. C. A. Stortz, "Estudio de los carragenanos "solubles" del alga roja *Iridaea undulosa* Bory", Tesis Doctoral, FCEyN-UBA (1984).
3. A. S. Shashkov, A. I. Usov y S. V. Yarotsky, *Bioorg. Khim.* 3, 46 (1977).
4. A. I. Usov, S. V. Yarotsky y A. S. Shashkov, *Biopolym.* 19, 977 (1980).
5. S. Honda, H. Yuki y K. Takiura, *Carbohydr. Res.* 28, 150 (1973).

6. P. J. Archbald, M. D. Fenny A. B. Roy, *Carbohydr. Res.* **93**, 177 (1981).
7. R. Ruiz Contreras, J. P. Kamerling, J. Breg, J. F. G. Vliegenhart, *Carbohydr. Res.* **179**, 411 (1988).
8. B. Casu en "Polysaccharides. Topics in Structure and Morphology" (ed. E. d. T. Atkins) p. 1 (1985).
9. C. Rochas, M. Rinaudo y M. Vincendon, *Biopolymers* **19**, 2165 (1980).
10. C. W. Greer, C. Rochas y W. Yaphe, *Bot. Mar.* **28**, 9 (1985).
11. A. I. Usov, *Bot. Mar.* **27**, 189 (1984).
12. C. Rochas, M. Rinaudo y M. Vincendon, *Int. J. Biol. Macromol.* **5**, 111 (1983).
13. G. K. Hamer, S. S. Bhattacharjee y W. Yaphe, *Carbohydr. Res.* **54**, C7 (1977).
14. K. Bock y K. D. Hall, *Carbohydr. Res.* **40**, C3 (1975).
15. L. M. Morrice, M. W. McLean, W. F. Long y F. B. Williamson, *Eur. J. Biochem.* **133**, 673 (1983).
16. C. Bellion, G. K. Hamer y W. Yaphe, *Proc. Int Seaweed Symp.* **10**, 379 (1981).
17. I. J. Miller, H. Wong y R. H. Newman, *Austr. J. Chem.* **35**, 853 (1982).
18. C. W. Greer y W. Yaphe, *Bot. Mar.* **27**, 479 (1984).
19. C. W. Greer, I. Shomer, M. E. Goldstein y W. Yaphe, *Carbohydr. Res.* **129**, 189 (1984).
20. A. I. Usov y E. G. Ivanova, *Bot. Mar.* **30**, 365 (1987).
21. S. S. Bhattacharjee, W. Yaphe y G. K. Hamer, *Carbohydr. Res.* **60**, C1 (1978).
22. S. S. Bhattacharjee, W. Yaphe y G. K. Hamer, *Proc. Int.*

- Seaweed Symp.* 9, 379 (1979).
23. D. J. Brasch, C. T. Chuah y L. D. Melton, *Carbohydr. Res.* 97, 113 (1981).
 24. D. J. Brasch, C. T. Chuah y L. D. Melton, *Austr. J. Chem.* 34, 1095 (1981).
 25. A. I. Usov, E. G. Ivanova y A. S. Shashkov, *Bot. Mar.* 26, 285 (1983).
 26. C. Bellion, G. Brigand, J-C Prome, D. Welti y S. Bociek, *Carbohydr. Res.* 119, 31 (1983).
 27. A. I. Usov, V. V. Barbakadze, S. V. Yarotsky y A. S. Shashkov, *Bioorg. Khim.* 4, 1507 (1978).
 28. C. W. Greer y W. Yaphe, *Bot. Mar.* 27, 473 (1984).
 29. J. Mollion, S. Moreau y D. Christiaen, *Bot. Mar.* 29, 549 (1986).
 30. J. Mollion, H. Morvan, F. Bellanger y S. Moreau, *Phytochemistry* 27, 2023 (1988).
 31. A. I. Usov y A. S. Shashkov, *Bot. Mar.* 28, 367 (1985).
 32. C. A. Stortz y A. S. Cerezo, *Carbohydr. Polym.* 18, 237 (1992).
 33. R. H. Furneaux y I. J. Miller, *Bot. Mar.* 28, 419 (1985).
 34. M. D. Nosedá y A. S. Cerezo, *Int. J. Biol. Macromol.*, 15, 177 (1993).
 35. C. A. Stortz, B. E. Bacon, R. Cherniak y A. S. Cerezo, *Carbohydr. Res.* 261, 317 (1994).
 36. R. Falshaw y R. H. Furneaux, *Carbohydr. Res.* 252, 171 (1994).
 37. C. Rochas, M. Lahaye, W. Yaphe y M. T. Phan Viet, *Carbohydr. Res.* 148, 199 (1985).
 38. M. Lahaye, W. Yaphe, M. T. Phan Viet y C. Rochas,

- Carbohydr. Res.* 190, 249 (1989).
39. F. M. Nicolaissen, I. Meyland y K. Shaumburg, *Acta Chem. Scand. Ser. B* 34, 103 (1980).
 40. A. I. Usov y M. Ya. Elashvili, *Bot. Mar.* 34, 553 (1991).
 41. J. S. Craigie y A. Jurgens, *Carbohydr. Polym.* 11, 265 (1989).
 42. Y. Karamanos, M. Ondarza, F. Bellanger, D. Christiaen y S. Moreau, *Carbohydr. Res.* 187, 93 (1989).
 43. M. Lahaye, W. Yaphe y C. Rochas, *Carbohydr. Res.* 143, 240 (1985).
 44. M. Lahaye y C. Rochas, *Hydrobiologia* 221, 137 (1991).
 45. M. Lahaye, J. F. Revol, C. Rochas, J. McLahlan y W. Yaphe, *Bot. Mar.* 31, 491 (1988).
 46. A. I. Usov, E. G. Ivanovna y A. S. Shaahkov, *Bot. Mar.* 26, 285 (1983).
 47. I. J. Miller, R. Falshaw y R. H. Furneaux, *Bot. Mar.* 36, 203 (1993).
 48. P. J. Garegg, B. Lindberg y I. Kvarnstrom, *Carbohydr. Res.* 77, 71 (1979).
 49. R. H. Furneaux, I. J. Miller y T. T. Stevenson, *Hydrobiologia* 204/205, 645 (1990).
 50. M. R. Cases, C. A. Stortz y A. S. Cerezo, *Int. J. Biol. Macromol.* 16, 93 (1994).
 51. M. C. Matulewicz, H. H. Haines y A. S. Cerezo, *Phytochemistry* 36, 97 (1994).
 52. K. Izumi, *Carbohydr. Res.* 27, 278 (1973).
 53. M. J. Harris y J. R. Turvey, *Carbohydr. Res.* 15, 57 (1970).
 54. E. G. Gros, I. O. Mastronardi y A. R. Frasca, *Carbohydr.*

- Res.* 16, 232 (1971).
55. E. B. Rathbone, A. M. Stephen y K. G. R. Pachler, *Carbohydr. Res.* 20, 357 (1971).
56. P. A. J. Gorin y T. Ishikawa, *Can. J. Chem.* 45, 521 (1967).
57. K. Izumi, *Biochim. Biophys. Acta* 320, 311 (1973).
58. D. Welti, *J. Chem. Res. (S)*, 312, *(M)*, 3566 (1977).
59. M. Lahaye, "Agar from *Gracilaria spp.*" Tesis Doctoral, McGill University, Montreal (Canadá) (1986), según D. Myslabodski, "Red-Algae galactans: Isolation and recovery procedures, effects on the structure and rheology", Tesis Doctoral, Division of Biotechnology, Norwegian Institute of Technology, Trondheim (Noruega) (1990).
60. C. Rochas, M. Lahaye y W. Yaphe, *Bot. Mar.* 29, 335 (1986).
61. S. H. Knutsen, D. E. Myslabodski y H. Grasdalen, *Carbohydr. Res.* 206, 367 (1990).
62. S. H. Knutsen "Isolation and analysis of red algal galactans", Tesis Doctoral, Division of Biotechnology, Norwegian Institute of Technology, Trondheim (Noruega) (1992).
63. S. H. Knutsen y H. Grasdalen, *Carbohydr. Res.* 229, 233 (1992).

CAPITULO 4

**HIDROLISIS ACIDA Y
AUTOHIDROLISIS**

Una herramienta muy utilizada en el estudio de la composición química y la estructura de los polisacáridos es la hidrólisis ácida¹. La despolimerización puede llevarse a cabo utilizando diferentes ácidos y en distintas condiciones, pero el grado y tipo de hidrólisis dependerá, tanto de las condiciones experimentales, como de la estructura del polisacárido en cuestión.

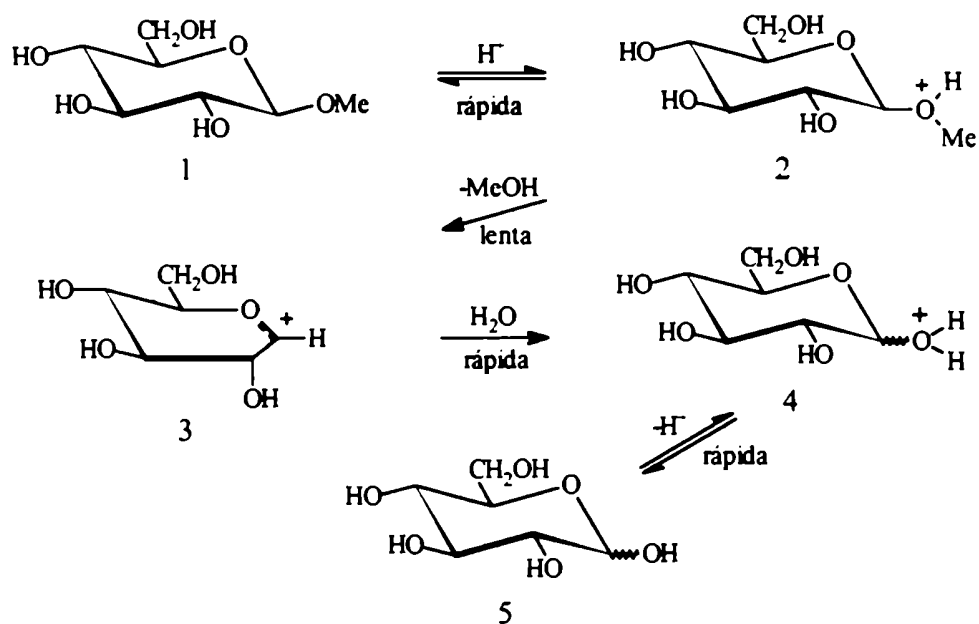
Los polisacáridos neutros y con uniones glicosídicas con estabilidad similar pueden hidrolizarse completamente para dar la correspondiente mezcla de monosacáridos (hidrólisis total) o, por medio de tratamientos más suaves, dar fragmentos de menor peso molecular (hidrólisis parcial); en este caso se obtiene una mezcla estadística de oligosacáridos y monosacáridos. Cuando los polisacáridos presentan enlaces de diferente estabilidad la situación es distinta: las uniones glicosídicas que involucran ácidos urónicos o hexosaminas son más difíciles de romper que aquéllas entre dos monosacáridos neutros en la forma piranósica; mientras que las uniones entre azúcares furanósicos, anhidro o desoxiazúcares se hidrolizan rápidamente. De este modo, en los dos primeros casos se obtendrá una mezcla rica en ácidos aldobiurónicos y aminodisacáridos, respectivamente; en cambio, los oligómeros con unidades furanósicas, anhidro o desoxi no reductoras no serán estables².

El mecanismo aceptado para la hidrólisis ácida de enlaces glicopiranosídicos se esquematiza en la Figura 1 para el metil β -D-glucopiranosido (1)².

El proceso involucra la protonación del átomo de

oxígeno glicosídico para formar el ácido conjugado (2), seguida de la heterólisis del enlace C-1 - oxígeno exocíclico para dar un ion carbonio-oxonio cíclico (3), el cual se encuentra en forma de semisilla. Por reacción con agua, se obtiene el azúcar reductor protonado (4) y, a partir del mismo, el correspondiente azúcar reductor (5). La protonación del oxígeno es un paso de equilibrio rápido, en cambio, la heterólisis es lenta, determina la velocidad de la reacción y es unimolecular.

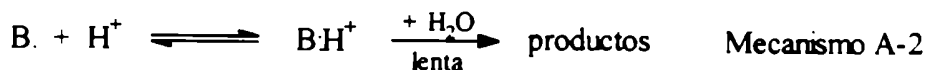
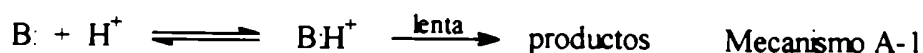
Figura 1. Mecanismo de hidrólisis ácida de glicopiranosidos.



Estos hechos son consistentes con un mecanismo de tipo A-1.

La hidrólisis de glicofuranósidos sucede por otro mecanismo³. Overend y col.⁴ encontraron un valor de entropía

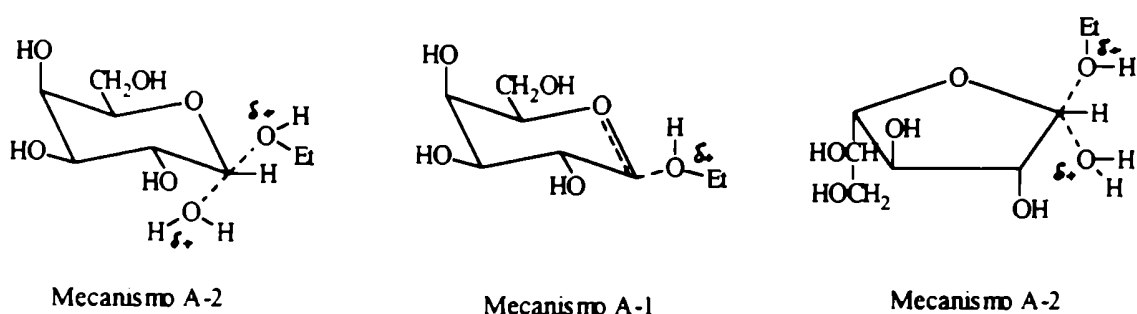
de activación negativo para la hidrólisis ácida del etil β-D-galactofuranósido, el cual implica un mecanismo de tipo A-2, en contraste con los valores positivos encontrados para un gran número de piranósidos.



El valor de ΔS^\ddagger es una medida de la diferencia en la restricción en el movimiento libre de las moléculas entre el estado inicial y el estado de transición. Cuando la reacción es bimolecular, los reactivos se encuentran más ordenados a medida que se alcanza el estado de transición, la entropía desciende y el valor de ΔS^\ddagger tiende a ser negativo. Por otra parte, si la reacción es unimolecular, la estructura es menos ordenada en el estado de transición que en el ácido conjugado, la entropía aumenta y el valor de ΔS^\ddagger resulta positivo y, probablemente, alto⁴.

Los autores supusieron que un mecanismo bimolecular no estaría favorecido para piranósidos debido a las interacciones no enlazantes en el estado de transición, pero para furanósidos, la conformación aproximadamente planar del anillo de cinco miembros daría un estado de transición menos congestionado (Figura 2).

Figura 2. Estados de transición para el paso lento de la hidrólisis en medio ácido.



Hidrólisis de uniones glicosídicas de glicósidos que contienen grupos ácidos:

Tanto en polisacáridos sulfatados como en aquéllos que contienen grupos carboxilo, la presencia de estos sustituyentes influye en la velocidad de hidrólisis de las uniones glicosídicas.

En un estudio acerca de la influencia del pH en la velocidad de hidrólisis ácida de polisacáridos ácidos, Smidsrod y col.⁵ determinaron la velocidad de hidrólisis para un dextrano, dextrano sulfato, carboximetildextrano, carboximetilcelulosa, ácido péctico y un oligourónido (DP = 13) a distintos valores de pH (Figura 3). La constante de velocidad para el dextrano (1) resultó, como era de esperar, proporcional a la concentración de ácido. La curva que representa la degradación del dextrano sulfatado (2) también es una línea recta, pero con una pendiente significativamente menor que la del dextrano. La velocidad de hidrólisis del dextrano sulfatado es menor que la del dextrano a valores bajos de pH (menores que 1), lo que indica que, en este caso, el grupo sulfato estabiliza la unión glicosídica⁶ (ver más adelante), pero el derivado

sulfatado se hidroliza a velocidades mayores que el polisacárido neutro a valores más altos de pH. En base a estos resultados, los autores concluyeron que, debido a la carga negativa del polisacárido, la concentración de protones cerca de la cadena es considerablemente mayor que en el seno de la solución cuando la concentración total de protones es baja. Las curvas para el carboximetildextrano (3) y la carboximetilcelulosa (4) se explicaron de igual modo, tomando en cuenta que la falta de linealidad se debe a la variación del grado de disociación de los grupos carboxilo en función del pH de la solución.

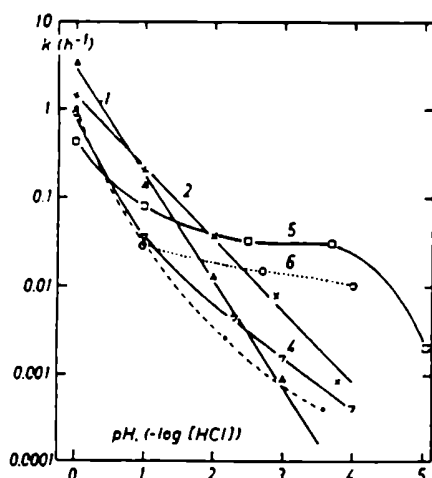


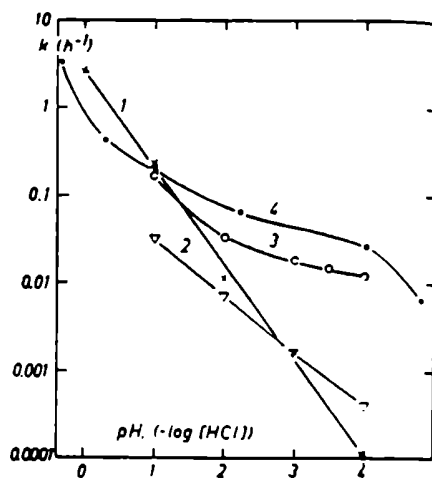
Figura 3.
Hidrólisis a 100°C.
(1) Dextrano,
(2) dextran sulfato,
(3) carboximetildextrano,
(4) carboximetilcelulosa,
(5) oligourónido (DP=13),
(6) ácido péctico.

Luego, se compararon las velocidades de degradación de algunos productos de bajo peso molecular (Figura 4). La celobiosa, ácido celobiurónico, ácido pseudo-celobiurónico y un producto de degradación del alginato (DP promedio 2) se redujeron (para evitar degradación durante la hidrólisis) y se hidrolizaron a distintos valores de pH a 100°.

La celobiosa reducida (1) se hidrolizó con una

velocidad proporcional a la concentración de ácido (como se observó para el dextrano neutro); el ácido pseudo-celobiurónico reducido (ácido 3-O-β-D-glucopiranosil-L-gulónico) (3) y la mezcla oligomérica (4) se hidrolizaron con una velocidad que mostró el mismo comportamiento inusual observado anteriormente con los poliurónidos. La curva que representa la degradación del ácido aldobiurónico (2) es casi una línea recta pero con una pendiente menor a la que corresponde a la celobiosa, esto se debe al efecto inductivo del grupo carboxilo sobre el átomo de oxígeno glicosídico².

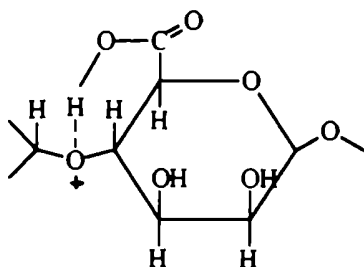
Figura 4. Hidrólisis a 100°. (1) 4-O-β-D-glucopiranosil-D-glucitol, (2) 4-O-β-D-glucopiranourosil-D-glucitol, (3) ácido 3-O-β-D-glucopiranosil-L-gulónico, (4) oligourónido (DP=2), reducidos con borohidruro de potasio.



La rápida degradación de los poliurónidos (4) observada a valores de pH mayores que 2 está relacionada con la posición de la unión glicosídica respecto al grupo carboxilo; se produciría así, la catálisis intramolecular

del ácido carboxílico no disociado cuando la unión glicosídica es del tipo (1-->4) (Figura 5).

Figura 5. Catálisis de un grupo carboxilo en la hidrólisis de una unión (1-->4).



Clancy y Turvey⁶ estudiaron la hidrólisis de la unión glicosídica de ciertos glicósidos sulfatados y la compararon con la de los correspondientes glicósidos sin sulfatar (Tabla 1).

Tabla 1. Hidrólisis ácida de uniones glicosídicas y grupos sulfato.

Compuesto	Temperatura (°C)	Constantes de velocidad x 10 ⁵ a	
		Hidrólisis del éster sulfato	Hidrólisis del glicósido
Me-β-D-galactósido 6-sulfato	65	2,21	1,68
Me-β-D-galactósido 6-sulfato	100	39,1	27,9
Me-β-D-galactósido galactosa 6-sulfato	65	-	13,04
galactosa 6-sulfato	65	1,86	-
galactosa 6-sulfato	100	33,2	-
Me-α-D-glucósido 3-sulfato	65	4,38	0,64
Me-α-D-glucósido	65	-	1,82
Me-β-D-glucósido 3-sulfato	65	1,92	1,43
Me-β-D-glucósido glucosa 3-sulfato	65	-	4,09
glucosa 3-sulfato	65	5,91	-

^a 1 mmol de producto se disolvió en 100 ml de ácido clorhídrico 1.5 M.

Así, la velocidad de hidrólisis del metil β -D-galactopiranosido es varias veces mayor que la de su derivado sulfatado en la posición 6; para los α - y β -D-glucopiranosidos es apreciablemente mayor que para los glucopiranosidos 3-sulfato correspondientes, pero el efecto es menor que el observado con el galactopiranosido 6-sulfato. Los autores sugirieron que este efecto estabilizante se debe a que, durante la hidrólisis de la unión glicosídica, se produce un cambio de conformación a una semisilla para dar el ion carbonio-oxonio. Durante esta etapa, los sustituyentes voluminosos en posición ecuatorial aumentan las interacciones entre los sustituyentes y, en consecuencia, la estabilidad de estos glicósidos frente a la hidrólisis ácida. Tanto el sulfato en C-3 de la glucosa, como el sulfato en C-6 de la galactosa, ocupan posiciones ecuatoriales en la conformación 4C_1 , que es la más estable.

Lloyd y Forrester⁷ informaron que los gluco- y galactopiranosidos 2-sulfato son más lábiles que otros gluco- y galactopiranosidos sulfatados, aún más que los sulfatados en C-3 (siendo ambos ecuatoriales). Efectivamente, mientras que el metil α -D-glucopiranosido 3-sulfato requiere un tratamiento con ácido sulfúrico 0,5 M a 100°C para hidrolizarse fácilmente, el metil α -D-glucopiranosido 2-sulfato se hidroliza completamente en ácido sulfúrico 5 mM a 60°C en 5 h. Este efecto se debería, al menos en parte, a la atracción electrostática del grupo sulfato sobre cationes, como H_3O^+ , así éstos se acercarían al enlace glicosídico adyacente. También podrían estar involucrados factores

estéricos.

Los enlaces 3,6-anhidrogalactosídicos son mucho más lábiles que los galactosídicos frente a la hidrólisis ácida, debido a la mayor tensión característica de estructuras dicíclicas. Por otra parte, como era de esperar, la unión 3,6-anhidrogalactosídica es más estable a valores de pH bajos cuando esta unidad tiene como sustituyente un grupo sulfato en C-2°.

Hidrólisis de los grupos sulfato:

Otro punto de interés es el efecto de la glicosilación en la velocidad de hidrólisis de los grupos sulfato. Se encontró un aumento en la velocidad de hidrólisis del grupo sulfato de la D-glucosa 3-sulfato, comparando con el correspondiente metil glicósido (208% mayor que el β y 35% mayor que el α)⁶ (Tabla 1).

Rees⁸ estudió la estabilidad de los grupos sulfato de polisacáridos de algas rojas en medio ácido y encontró el siguiente orden: sulfato en hidroxilo primario > sulfato en hidroxilo secundario axial > sulfato en hidroxilo secundario ecuatorial.

Roy y Turner⁹ estudiaron el comportamiento de galactosas monosulfatadas en medio ácido (Tabla 2) y encontraron un patrón de estabilidad similar al informado por Rees⁸, aunque la diferencia entre la velocidad de hidrólisis de los grupos sulfato de la galactosa 3-sulfato (ecuatorial) y la galactosa 4-sulfato (axial) no resultó muy marcada.

Tabla 2. Velocidad de desulfatación de azúcares sulfatados en ácido clorhídrico 0,25 M a 100°

Compuesto	k (x 10 ⁴ s ⁻¹)	t _{1/2} (min)
galactosa 2-sulfato	3,8	30
galactosa 3-sulfato	2,3	51
galactosa 4-sulfato	1,7	69
galactosa 6-sulfato	0,93	120

Por otra parte, se determinó que el grupo sulfato en las unidades de 3,6-anhidrogalactosa 2-sulfato presentes en los carragenanos es muy lábil a los ácidos, a pesar de ser axial. La explicación de esta aparente incongruencia es que, por hidrólisis de la unión 3,6-anhidrogalactosídica, el anillo piranósico se abre, así C-1 y C-2 quedan en una cadena abierta, con lo cual la labilidad del grupo sulfato en C-2 frente a los ácidos aumenta en forma considerable⁹.

Hidrólisis de polisacáridos de algas:

Miller y col.¹⁰ realizaron la hidrólisis ácida de agarosa y carragenano kappa comercial (10% p/v) en ácido clorhídrico concentrado. La hidrólisis ácida produjo preferentemente la ruptura de las uniones α ; así, a los 20 minutos se obtuvo prácticamente el disacárido puro, mientras que a las 3 horas se encontró una mezcla de disacáridos y monosacáridos.

Furieux y Miller¹¹ realizaron la hidrólisis del ágar de *Suhria vittata* (Gelidiaceae) en estas mismas condiciones. De este modo, se pudo realizar el espectro de r.m.n.-¹³C de una solución más concentrada del polisacárido parcialmente degradado, de baja viscosidad y a 30°. Se obtuvo un espectro

en el que las señales más importantes correspondían a la agarobiosa. Además, se observaron los picos de la díada β -D-Gal $\rightarrow\alpha$ -L-Gal 6S, indicando que las uniones α -galactosídicas no se hidrolizaron en estas condiciones pero los autores informaron sobre la posibilidad de pérdida de una pequeña cantidad de sulfato. Este procedimiento se aplicó al ágar de *Carpoblepharis flaccida* con resultados similares.

Reacciones de autohidrólisis

Primeros estudios:

La autohidrólisis de polisacáridos, es decir la hidrólisis de los mismos por medio de sus propios grupos ácidos, ha sido utilizada desde hace mucho tiempo en los estudios estructurales de exudados de plantas¹²⁻¹⁷. Con esta técnica se lograba la hidrólisis selectiva de las uniones glicosídicas más lábiles (en las que estaban involucrados residuos furanósicos y desoxiazúcares). En cambio, aquellos oligosacáridos en los que había grupos carboxilo eran especialmente resistentes. Se obtenían así polisacáridos parcialmente degradados, que facilitaban los estudios estructurales.

Por autohidrólisis del exudado de la leguminosa *Cercidium australe*¹⁸ (goma brea) (solución al 6,7% p/v, a 100°C durante 70 h) se obtuvo importante despolimerización. Sin embargo, el análisis por metilación de este polisacárido mostró que ninguno de los azúcares presentes se encontraba en la forma furanósica o tenía uniones glicosídicas lábiles, lo que indica que la reacción no fue específica, ni

selectiva.

La posibilidad de utilizar esta reacción en forma selectiva depende de la búsqueda de condiciones cuidadosamente elegidas, que deben determinarse para cada polisacárido, pues dependen principalmente de la estructura de la muestra en cuestión. A pesar de esto, la reacción de autohidrólisis se continuó usando en los estudios estructurales de estos polisacáridos¹⁹⁻²¹ y resultó muy útil en muchos casos.

La autohidrólisis de un xiloarabinogalactano sulfatado de *Cladophora rupestris*²² y de un glucuronoxilofucano sulfatado de *Ascophyllum nodosum*²³ se llevaron a cabo con fines preparativos.

Painter²⁴ fue el primero en aplicar la reacción de autohidrólisis a un carragenano de tipo kappa de *Furcellaria fastigiata* con el objeto de estudiar la distribución de los grupos sulfato en dicha molécula. En este caso, se eligió la autohidrólisis pues el polisacárido era fuertemente ácido y presentaba uniones 3,6-anhidrogalactosídicas, muy lábiles.

Una solución acuosa al 2% p/v del polisacárido a 60°C se agitó con exceso de resina catiónica, se filtró y el filtrado (pH=1,5) se dializó a 80°C en un tubo de celofán en el que se adicionó una pequeña porción de resina. La diálisis se realizó contra un volumen de agua relativamente grande que contenía carbonato de barro en suspensión.

Después de 6 h, el pH dentro del tubo de diálisis era 7,5. Las aguas de diálisis contenían un producto que representaba 60% p/p del polisacárido de partida; durante la

reacción se perdió el 20% del sulfato original. El autohidrolizado contenía a) D-galactosa, 3,6-anhidro-D-galactosa y 4-O-B-D-galactopiranosil-3,6-anhidro-D-galactosa y b) al menos cinco monosacáridos sulfatados.

Posteriormente, se identificaron entre estos últimos D-galactosa 2-sulfato, D-galactosa 4-sulfato, D-galactosa 6-sulfato, 3,6-anhidro-D-galactosa 2-sulfato y pequeñas cantidades de unidades de galactosas disulfatadas (que no se identificaron)²⁵.

La reacción en las condiciones utilizadas no resultó selectiva pero el alto rendimiento en carrabiosa y oligosacáridos sulfatados sugirió que, buscando las condiciones adecuadas, sería posible obtener degradaciones específicas.

Autohidrólisis de carragenanos (estudios recientes):

Con el objeto de profundizar en el estudio de la estructura fina de los carragenanos, se aplicó la reacción de autohidrólisis a estas moléculas intentando producir una mezcla de oligosacáridos de los que se pudieran separar aquéllos que presentaran estructuras repetitivas mayoritarias de aquellos en los cuales las secuencias que no responden a las estructuras clásicas se hallaran concentradas²⁶.

La autohidrólisis se llevó a cabo calentando una solución (0,3% p/v) de la forma ácida de los carragenanos (pH 2,45) a 60°C. Sobre alícuotas tomadas a distintos intervalos de tiempo se midió la viscosidad relativa, el poder reductor y el contenido de 3,6-anhidrogalactosa

después de reducción de las muestras con borohidruro de sodio. A partir de estos datos, se calcularon las constantes de velocidad de la reacción, considerando que la misma era de primer orden (Tabla 3).

Tabla 3. Autohidrólisis de carragenanos.

Producto	k (hs ⁻¹) ^a	k (hs ⁻¹) ^b
fracción soluble de <i>Iridaea undulosa</i> (A)	0,11	-
fracción de A soluble en Me ₂ SO	0,08	0,08
fracción de A insoluble en Me ₂ SO	0,09	-
carragenano tratado de <i>I. undulosa</i> insoluble en KCl 0,125 M	0,09	0,09
carragenano kappa de <i>Eucheuma cottonii</i>	0,05	0,06

^aA partir del peso molecular. ^bA partir de la 3,6-anhidrogalactosa unida.

Los valores obtenidos a partir del poder reductor y la 3,6-anhidrogalactosa interna resultaron similares, lo que sugirió a los autores que la hidrólisis de la unión 3,6-anhidrogalactosídica era la única reacción que ocurría durante la autohidrólisis. Además, no se observó degradación de las unidades de 3,6-anhidrogalactosa a ácidos levulínico y fórmico.

Los productos obtenidos se cromatografiaron sobre Sephadex G-25 (Figura 6). Por r.m.n.-¹³C se vió que el fragmento más pequeño (DP=2) obtenido a partir de un carragenano kappa comercial (Sigma) de *Eucheuma cottonii* era carrabiosa 4-sulfato.

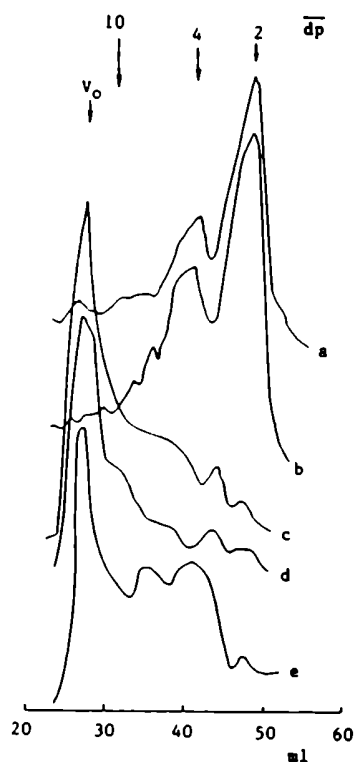


Figura 6.

a) Carragenano kappa de *Eucheuma cottonii*, b) carragenano modificado de *Iridaea undulosa* insoluble en KCl 125 mM, c) carragenano soluble de *I. undulosa*, d) fracción del carragenano de *I. undulosa* insoluble en DMSO y e) fracción del carragenano de *I. undulosa* soluble en DMSO.

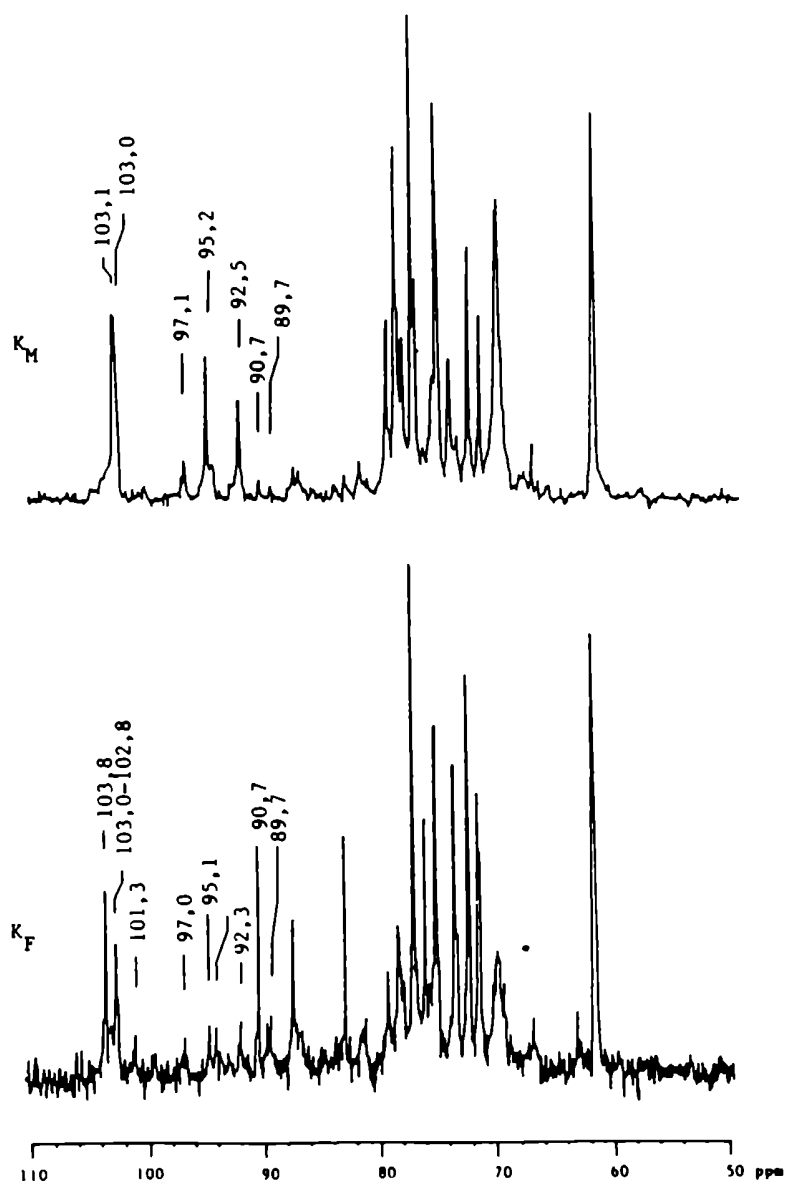
A continuación, se aplicó la reacción de autohidrólisis a los carragenanos²⁶ con el objeto de obtener soluciones concentradas de baja viscosidad, con las que se pudiera realizar espectros de r.m.n.-¹³C a temperatura ambiente y con un espectrómetro de baja resolución, (ver Cap.3). Sin embargo, para utilizar los espectros obtenidos como una herramienta en la determinación estructural de estos polisacáridos, es necesario conocer la selectividad de la misma respecto a las distintas uniones glicosídicas y estudiar las reacciones laterales que pueden producirse.

Los primeros pasos realizados en ese sentido²⁷ se llevaron a cabo con un carragenano tratado de *Iridaea*

undulosa insoluble en cloruro de potasio 0,125 M (tipo kappa/iota, relación molar Gal:3,6-AnGal:sulfato 1,00:1,03:1,58) (Tabla 3). Se extrajo una alícuota a las 7,5 h de reacción (K_w); a las 42 hs la reacción se había terminado y el peso molecular del producto aislado (K_r) era 740. El peso molecular final teórico calculado en base a la relación molar del carragenano de partida, considerando que todas las uniones 3,6-anhidrogalactosídicas se habían roto y que la pérdida de sulfato era del 25-30%, sería 570. Sin embargo, el 32% de las uniones 3,6-anhidrogalactosídicas no se hidrolizó. La Figura 7 muestra los espectros de K_w y K_r . En la región anomérica de ambos, se encuentran las señales correspondientes a un carragenano kappa/iota. Los extremos terminales resultan apenas visibles en el espectro de K_w , a las 7,5 h de reacción no se han formado cantidades significativas de carrabiosa. A partir de las áreas de los picos de los carbonos anoméricos de K_r se concluyó que, al finalizar la reacción, el 60% del carragenano se hidrolizó a carrabiosa y que el 35% de las uniones 3,6-anhidrogalactosídicas no se hidrolizó. Por otra parte, la mayoría de las unidades de 3,6-anhidrogalactosa que permanecieron unidas no se encontraban sulfatadas en C-2. Esto sugirió que la hidrólisis está restringida a las unidades de 3,6-anhidrogalactosa 2-sulfato, donde el grupo sulfato en C-2 y el que se encuentra en C-4 de la unidad vecina promueven la reacción. Después de la hidrólisis de la unión 3,6-anhidrogalactosídica, el grupo sulfato queda unido a un átomo de carbono de cadena abierta haciéndose más lábil al medio ácido⁸. Por este motivo, la mayor parte de las

moléculas de carrabiosa no se encuentran sulfatadas en C-2 de esta unidad. Si bien a valores bajos de pH el grupo sulfato estabiliza la unión 3,6-anhidrogalactosídica, a pH más altos (> 2,5) se observa el efecto contrario⁶.

Figura 7. Espectros de r.m.n.-¹³C de un carragenano kappa/iota después de 7,5 h (K_M) y 42 h (K_F) de autohidrólisis.



En el espectro de K_{α} se observaron señales pequeñas a 67,1 y 73,6 ppm que se asignaron a los C-5 y C-6 de las unidades de β -D-galactosa 6-sulfato y en el espectro de K_{β} los picos a 101,3, 97,0 y 94,4 ppm a los carbonos anoméricos de unidades de β -D-galactosa 2-sulfato unida a 3,6-anhidrogalactosa y a α -D-galactosa 2-sulfato.

Hasta hace poco tiempo no se había publicado un espectro de r.m.n.- ^{13}C de un carragenano lambda. Nosedá y Cerezo²⁸ estudiaron la reacción de autohidrólisis para un carragenano lambda (relación molar Gal:3,6-AnGal:sulfato 1,00:0,03:1,12). La reacción resultó mucho más lenta que para los carragenanos kappa/iota; la constante de velocidad de la reacción fue $0,45 \times 10^{-2} \text{ h}^{-1}$. Se extrajeron muestras a distintos tiempos de reacción sobre las que se realizaron los espectros de r.m.n.- ^{13}C de 20 MHz a temperatura ambiente (Figura 8). El espectro de la muestra sometida a 26 hs de reacción indicó que inicialmente se produjo la hidrólisis de las uniones 3,6-anhidrogalactosídicas, dando una solución de baja viscosidad.

Estos datos sugieren que las unidades de 3,6-anhidrogalactosa no provienen de un polisacárido contaminante, sino que son parte de la molécula de carragenano lambda y probablemente, se encuentren unidas a residuos de β -D-galactosa sin sulfatar. Recién en el espectro realizado a las 410 hs de reacción se observaron claramente los picos correspondientes a α - y β -galactosa reductoras. Durante la reacción se produce una disminución de la señal a 103,7 ppm (C-1 de β -galactosa 2-sulfato unida a α -galactosa

2,6-disulfato) y un aumento del pico a 105,1 ppm (C-1 de β -galactosa unida a α -galactosa 2,6-disulfato), lo que indica la pérdida del grupo sulfato en C-2 de la unidad β . Como al finalizar la autohidrólisis todavía había unidades de α -galactosa 2,6-disulfato, en cambio los residuos de β -galactosa se encontraban desulfatados, se concluyó que el grupo sulfato en C-2 de la unidad β es más lábil que el que se encuentra en la misma posición pero de la unidad α . Por otra parte, la desulfatación de esta unidad produjo un desplazamiento de la señal correspondiente al C-1 del residuo α vecino de 94,2 a 94,7 ppm.

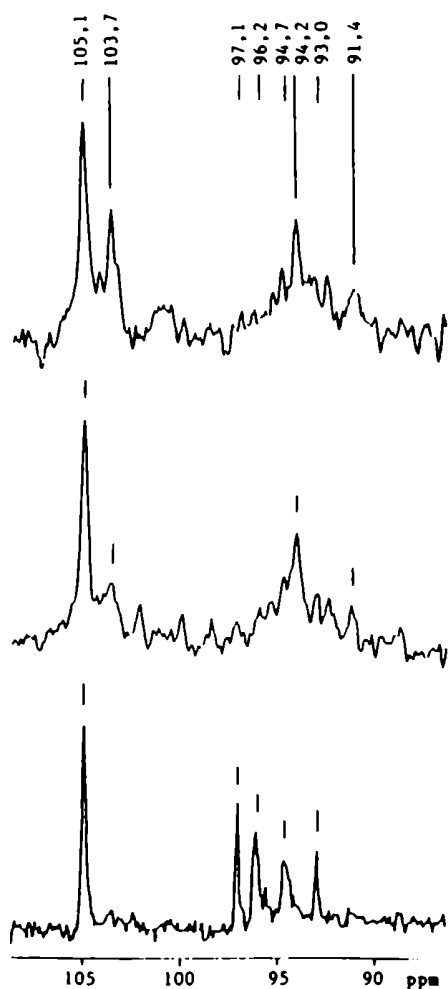


Figura 8. Región anomérica de los espectros de r.m.n.- ^{13}C de un carragenano lambda después de a) 26 h, b) 35 h y c) 410 h de autohidrólisis.

La constante de velocidad de la reacción para un carragenano lambda ciclado²⁷ resultó $3,4 \times 10^{-2} \text{ hs}^{-1}$ y $4,9 \times 10^{-2} \text{ h}^{-1}$, calculada a partir del peso molecular y el porcentaje de la 3,6-anhidrogalactosa interna, respectivamente. La reacción procede principalmente por hidrólisis de las uniones entre unidades de 3,6-anhidrogalactosa 2-sulfato y β -galactosa (2-sulfato), probablemente debido a la presencia del grupo sulfato en C-2 de la primera.

Bibliografía

1. G. O. Aspinall en "The Polysaccharides", Vol. 1, p. 35 (Ed. G. O. Aspinall) Academic Press (1982).
2. J. N. BeMiller, *Adv. Carbohydr. Chem.* 22, 25 (1967).
3. J. W. Green, *Adv. Carbohydr. Chem.* 21, 95 (1966).
4. W. G. Overend, C. W. Rees y J. S. Sequeira, *J. Chem. Soc.*, 3429 (1962).
5. O. Smidsrod, A. Haug y B. Larsen, *Acta Chem. Scand.* 20, 1026 (1966).
6. M. J. Clancy y J. R. Turvey, *J. Chem. Soc.*, 2935 (1961).
7. P. F. Lloyd y P. F. Forrester, *Carbohydr. Res.* 19, 430 (1971).
8. D. A. Rees, *J. Chem. Soc.*, 1821 (1963).
9. A. B. Roy y J. Turner, *Carbohydr. Res.* 124, 338 (1983).
10. I. J. Miller, H. Wong y R. H. Newman, *Austr. J. Chem.* 35, 853 (1982).
11. R. H. Furneaux y I. J. Miller, *Bot. Mar.* 29, 3 (1986).
12. E. L. Hirst y J. K. N. Jones, *J. Chem. Soc.*, 1174

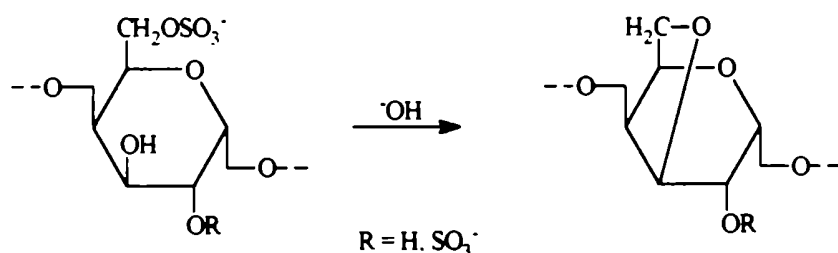
- (1938).
13. F. Smith, *J. Chem. Soc.*, 744 (1939).
 14. D. M. W. Anderson y J. F. Stoddart, *Carbohydr. Res.* 2, 104 (1966).
 15. D. M. W. Anderson, E. L. Hirst y J. F. Stoddart, *J. Chem. Soc.*, 1959 (1966).
 16. A. M. Stephen, *J. Chem. Soc.*, 1974 (1963).
 17. A. S. Cerezo, M. Stacey y J. M. Webber, *Carbohydr. Res.* 9, 505 (1969).
 18. G. O. Aspinall y C. C. Whitehead, *Can. J. Chem.* 48, 3840 (1970).
 19. S. Basu, *Carbohydr. Res.* 81, 200 (1981).
 20. S. Basu y C. V. N. Rao, *Carbohydr. Res.* 94, 215 (1981).
 21. P. K. Mandal y A. K. Mukherjee, *Carbohydr. Res.* 84, 147 (1980).
 22. E. J. Bourne, P. G. Johnson y E. Percival, *J. Chem. Soc.*, 1561 (1970).
 23. E. Percival, *Carbohydr. Res.* 7, 272 (1968).
 24. T. J. Painter, *Chem. & Ind.*, 1488 (1959).
 25. T. J. Painter, *Proc. Int. Seaweed Symp.* 5, 305 (1966).
 26. C. A. Stortz y A. S. Cerezo, *Carbohydr. Res.* 166, 317 (1987).
 27. C. A. Stortz y A. S. Cerezo, *Int. J. Biol. Macromol.* 13, 101 (1991).
 28. M. D. Nosedá y A. S. Cerezo, *Int. J. Biol. Macromol.*, 15, 177 (1993).

CAPITULO 5

REACCIONES EN MEDIO ALCALINO

En medio alcalino las unidades de α -galactosa 6-sulfato y 2,6-disulfato de los carragenanos reaccionan para dar 3,6-anhidro- α -galactosa y 3,6-anhidro- α -galactosa 2-sulfato, respectivamente (Figura 1). La reacción de ciclación se conoce desde hace muchos años^{1,2} y se utiliza comercialmente para aumentar el poder gelificante de estos polisacáridos³.

Figura 1. Reacción de ciclación en medio alcalino.



Percival² estableció que la liberación del grupo sulfato no es un proceso hidrolítico, sino el resultado de la eliminación de sulfato con catálisis básica y la concomitante formación del anillo de 3,6-anhidro; esta eliminación va acompañada por inversión de la configuración del átomo de carbono al que estaba unido el grupo sulfato (reacción de sustitución nucleofílica bimolecular, S_N2), como sucede en las reacciones de los ésteres de ácidos sulfónicos análogos⁴⁻⁷.

Como resultado de esta reacción, los residuos de α -galactosa pasan de una conformación ⁴C₁ a ¹C₄. Esto hace que la molécula de carragenano pueda adquirir una conformación helicoidal y, en consecuencia, pueda gelificar.

Es de destacar que no todas las unidades de α -galactosa presentes en los carragenanos llevan sulfato en la posición

6 y el tratamiento alcalino sólo modificará la conformación de las unidades que puedan dar 3,6-anhidrogalactosa, mientras que las restantes seguirán en la conformación 4C_1 . Este hecho tiene gran importancia en el mecanismo de gelificación (ver Cap. 2).

El proceso industrial de extracción de los carragenanos suele llevarse a cabo en medio alcalino y con calentamiento; la concentración de álcali, la temperatura y el tiempo de reacción controlarán la proporción de 3,6-anhidrogalactosa formada³.

Por otra parte, durante el tratamiento alcalino se produce la degradación del polisacárido que comienza, en general, por el extremo reductor, este proceso se conoce como "peeling"⁴.

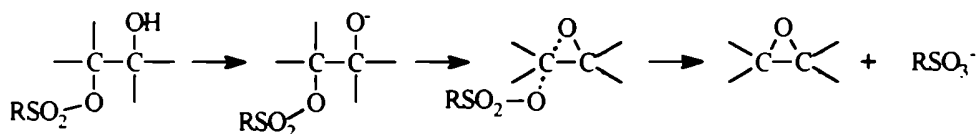
El tratamiento alcalino se ha utilizado en el laboratorio para la determinación cuantitativa de las unidades de α -galactosa 6-sulfato a partir de la diferencia en el porcentaje de sulfato presente en la muestra antes y después del mismo. Por otra parte, la forma clásica de separación de distintos tipos de carragenanos para su posterior estudio estructural involucraba un tratamiento alcalino y seguido de fraccionamiento con cloruro de potasio del producto tratado (ver Segunda Parte, Cap. 2). En estos casos, los polisacáridos se reducen previamente con borohidruro de sodio o potasio, se disminuye así, la degradación de los mismos. La técnica usual implica dos agregados del agente reductor: uno 24 horas antes y otro justo en el momento de comenzar la reacción, de modo que, si durante la misma se expone un nuevo extremo reductor, éste

quede protegido tan pronto como se forme⁹.

Si bien este tipo de reacciones se ha utilizado frecuentemente en moléculas pequeñas y es muy conocido, se presenta a continuación una breve revisión de los principales aspectos:

La formación de éteres cíclicos a partir de derivados tosilados de azúcares ha sido extensamente estudiada^{8,9}. Se ha demostrado que el mecanismo de formación de epóxidos involucra el desplazamiento del grupo saliente por el ataque del anión óxido del lado contrario al mismo; éste es un proceso S_N2 que requiere una orientación anti para el grupo saliente y el anión óxido y lleva a una inversión de la configuración en el centro de sustitución¹⁰ (Figura 2).

Figura 2. Mecanismo de formación de epóxidos.

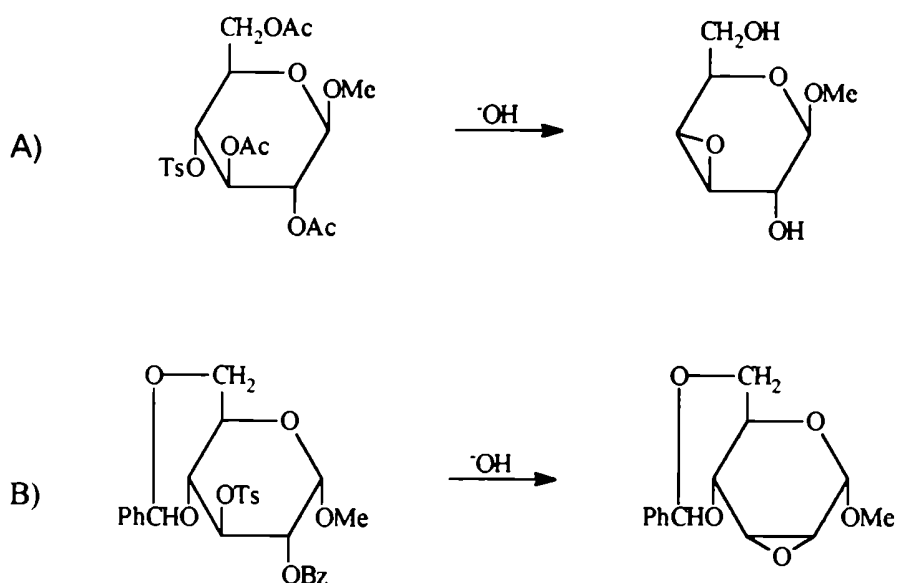


Por tratamiento del metil 2,3,6-tri-O-acetil-4-O-tosil-β-D-glucósido con metóxido de sodio se obtuvo el metil 3,4-anhidro-β-D-galactósido¹¹ (A), y el 2-O-benzoil-4,6-O-benciliden-3-O-tosil-α-D-glucósido dió el metil 2,3-anhidro-4,6-benciliden-α-D-alósido (B) en condiciones similares¹² (Figura 3).

Para que la reacción se produzca, los dos grupos que reaccionan deben encontrarse en una distribución diaxial. Sin embargo, en la reacción (A) se encuentran en posición diecuatorial. La facilidad con que estos compuestos

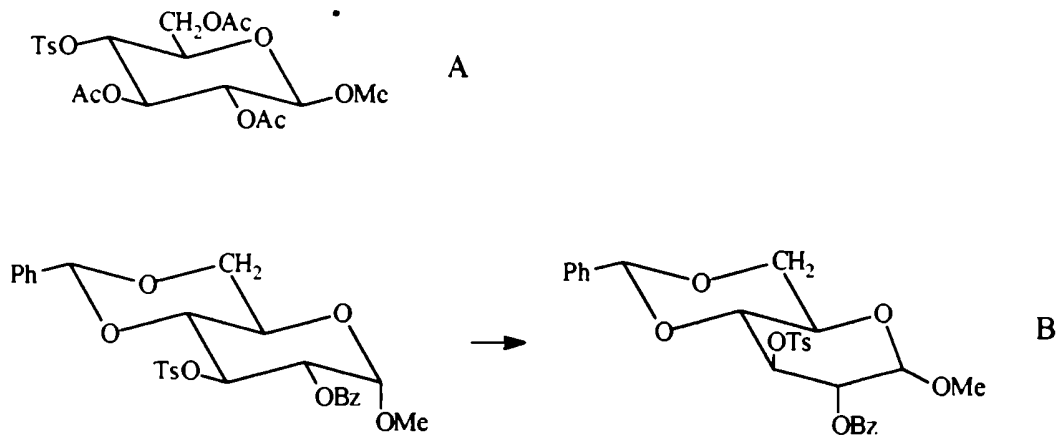
reaccionan indica que se desplaza el equilibrio conformacional hacia la silla 1C_4 , a medida que avanza la reacción.

Figura 3. Reacciones de derivados tosilados de metil glicósidos en medio alcalino



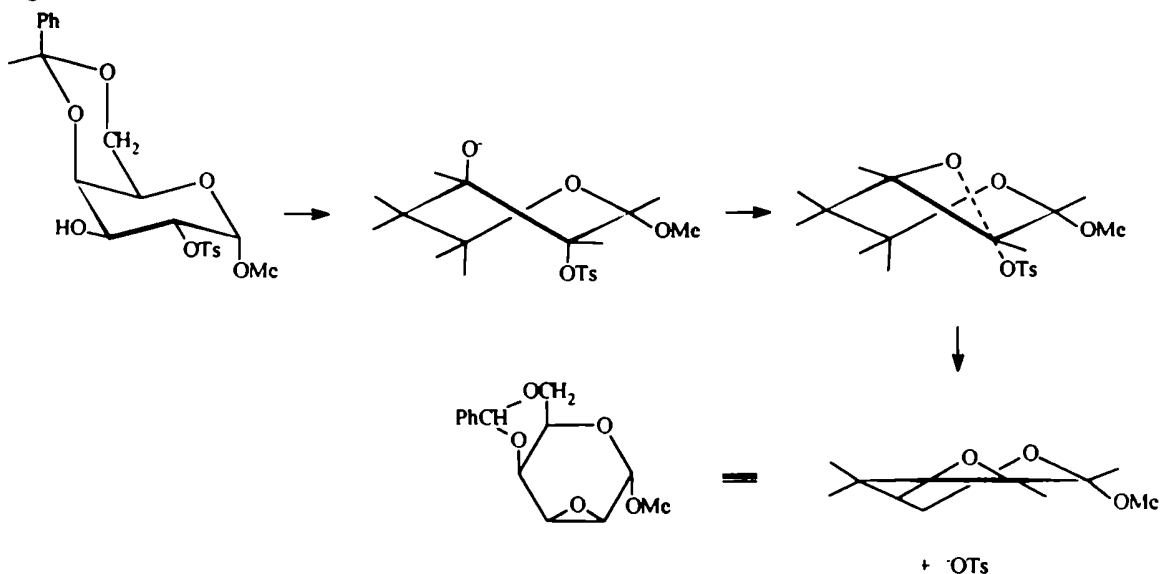
Este cambio conformacional se puede dar fácilmente en compuestos monocíclicos, pero en la reacción (B) el grupo 4,6-O-bencilideno confiere rigidez a la silla 1C_4 . En este caso, el anillo puede dar una conformación en la cual los grupos tosilo e hidroxilo se dispongan en forma sesgada, dando una distribución adecuada para reaccionar; en consecuencia, se necesitan condiciones más drásticas para que la reacción se produzca (Figura 4).

Figura 4. Conformaciones de los compuestos A y B.



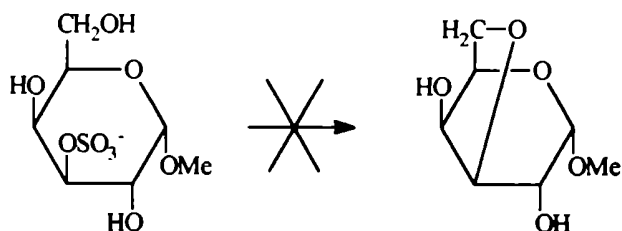
Se ha observado que la velocidad de reacción para el metil 6-desoxi-2-O-tosil- α -D-glucopiranosido es mucho menor que la del isómero con el grupo tosilo en C-4. Por otra parte, el metil 4,6-O-benciliden-2-O-tosil- β -D-galactopiranosido reacciona rápidamente en condiciones muy suaves para dar el epóxido correspondiente, mientras que el anómero α no reacciona aún después de 24 horas en las mismas condiciones. En ambos casos, la reacción es más lenta cuando el grupo saliente en C-2 se encuentra en posición cis respecto del grupo metoxilo. Entonces, las interacciones polares y de origen estérico entre estos dos grupos aumentan la energía del estado de transición, disminuyendo la velocidad de la reacción⁹ (Figura 5).

Figura 5. Reacción del 4,6-O-benciliden-2-O-tosil- α -D-galactopiranosido en medio alcalino.



Teniendo en cuenta que en una reacción S_N2 el nucleófilo ataca del lado contrario al que se encuentra el grupo saliente, resulta claro que la formación de unidades de 3,6-anhidrogalactosa a partir de galactosa 3-sulfato no puede producirse pues el grupo sulfato se encuentra en una posición tal, que el oxígeno en C-6 no puede acercarse al C-3 del lado contrario al mismo (Figura 6). Se ha demostrado para el metil 3-O-tosilglucósido que la formación del anillo de 3,6-anhidro no ocurre⁴.

Figura 6. A partir del metil- α -galactósido 3-sulfato no se forma el anillo de 3,6-anhidrogalactosa.



Rao y Smith¹³ obtuvieron por tratamiento alcalino del metil 2,6-di-O-tosilgalactósido la formación del metil 3,6-anhidrogalactósido tosilado en C-2.

Existe también información sobre las reacciones de los glicósidos sulfatados en medio alcalino. Los metil hexopiranosidos 6-sulfato de la D-glucosa, D-galactosa y D-manosa producen por tratamiento alcalino el 3,6-anhidrohexósido correspondiente¹⁴.

En este trabajo se presentan los estudios realizados sobre la reacción de ciclación de las unidades de α -galactosa 6-sulfato y 2,6-disulfato de los carragenanos de la familia kappa.

Bibliografía

1. E. J. V. Percival, *Quart. Rev.* 3, 369 (1949).
2. J. R. Turvey, *Adv. Carbohydr. Chem.* 20, 183 (1965).
3. M. Glicksman en "Food Hydrocolloids", Vol. II (ed. M. Glicksman), CRC Press, Boca Raton, Florida, p. 83 (1983).
4. S. Peat, *Adv. Carbohydr. Chem.* 2, 37 (1946).
5. R. S. Tipson, *Adv. Carbohydr. Chem.* 8, 107 (1953).
6. F. H. Newth, *Quart. Rev.* 13, 30 (1959).
7. N. R. Williams, *Adv. Carbohydr. Chem.* 25, 109 (1970).
8. R. L. Whistler y J. N. BeMiller, *Adv. Carbohydr. Chem.* 13, 289 (1958).
9. D. A. Rees, *J. Chem. Soc.*, 5168 (1961).
10. R. E. Parker y N. S. Issacs, *Chem. Rev.* 59, 737 (1959).
11. D. S. Mathers y G. J. Robertson, *J. Chem. Soc.*, 1076

(1933).

12. G. J. Robertson y C. F. Griffith, *J. Chem. Soc.*, 1193
(1935).

13. P. A. Rao y F. Smith, *J. Chem. Soc.*, 229 (1944).

14. R. B. Duff y E. G. V. Percival, *J. Chem. Soc.*, 830
(1941).

SEGUNDA PARTE

RESULTADOS Y DISCUSION

CAPITULO 1

**ESTUDIO ESTRUCTURAL DE LOS
CARRAGENANOS**

Aislamiento y purificación del carragenano

Los gametofitos femeninos del alga roja *Gigartina skottsbergii*, previamente molidos, se extrajeron con agua a temperatura ambiente, la solución se centrifugó y el polisacárido se precipitó de la misma con isopropanol. El carragenano así obtenido se secó por intercambio de solventes.

El residuo de la centrifugación se extrajo dos veces más; la cantidad de producto obtenida en la tercera extracción resultó despreciable.

Los carragenanos se purificaron por redisolución en agua, procediendo luego del mismo modo que con el producto crudo.

Los rendimientos de extracción fueron muy elevados. Se obtuvo 49,1% de carragenano en la primera extracción (1C) y 13,9% en la segunda extracción (2C) sobre el peso seco del alga molida.

Este método de extracción ha sido utilizado en nuestro laboratorio desde hace muchos años¹ y se ha comprobado que para las algas *Gigartina skottsbergii* (A. S. Cerezo, comunicación personal) e *Iridaea undulosa*², después de la extracción exhaustiva a temperatura ambiente, la extracción con agua a ebullición sólo produce un pequeño porcentaje de carragenanos, cuyas características son similares a las del producto obtenido a temperatura ambiente.

Sin embargo, otros investigadores^{3,4} realizan la extracción de los carragenanos con un buffer a ebullición o a una temperatura cercana a la misma. En muchos casos, se

lleva a cabo un tratamiento previo con un ácido diluído a temperatura ambiente.

Resulta deseable que el método de extracción sea lo más suave posible, para evitar que, durante la misma, se produzcan alteraciones en la estructura de los polisacáridos que se van a estudiar. Por estos motivos, el método de extracción utilizado en este trabajo de Tesis es adecuado.

La cromatografía gaseosa de los acetatos de alditoles de los monosacáridos obtenidos por hidrólisis ácida del carragenano crudo indicó la presencia de galactosa y glucosa en porcentajes de 89,7% y 10,3%, respectivamente para 1C y 95,5% y 4,5% para 2C, como únicos azúcares estables en medio ácido. Sin embargo, después de la purificación, se detectaron sólo trazas de glucosa.

El residuo insoluble proveniente de la purificación de 1C (3,4%) se hidrolizó; la cromatografía gaseosa de los acetatos de alditoles de los correspondientes monosacáridos indicó la presencia de galactosa y glucosa en relación 1:1. A partir del alga *Iridaea undulosa*^{5,6} se obtuvo un producto similar (8% del carragenano crudo) que contenía una proporción importante de proteínas asociadas a un carragenano soluble, glucanos de bajo peso molecular y material lipídico. No se estudió el residuo insoluble, pero es probable que tenga características similares.

Curvas de precipitación de los carragenanos con cloruro de potasio

Desde hace tiempo se sabe⁷ que ciertos carragenanos forman geles en soluciones de distintas concentraciones de cloruro de potasio, mientras que otros permanecen solubles en estas condiciones⁸ (ver Primera Parte, Cap. 2).

Con el objeto de apreciar cualitativamente y en forma rápida el comportamiento de los carragenanos en soluciones de cloruro de potasio, se realizó la precipitación analítica de los mismos por el método de Matulewicz y Cerezo⁸.

Las curvas de precipitación de los carragenanos 1C y 2C (Figura 1) resultaron similares en ambos casos. Para 1C se observó un aumento de la absorbancia con la concentración de cloruro de potasio hasta 0,6 M; para 2C, ésta se mantuvo en constante a partir de 0,8 M.

Resulta interesante la comparación de estas curvas con las obtenidas para carragenanos extraídos de plantas de *Gigartina skottsbergii* que no habían sido separadas de acuerdo a su fase sexual⁸. La Figura 2 muestra que en ese caso, se obtuvo una precipitación continua hasta una concentración 1,5 M. Esto indica que en estas muestras había carragenanos diferentes de los presentes en 1C y 2C, probablemente provenientes de plantas tetraesporicas.

Fraccionamiento con cloruro de potasio

El fraccionamiento preparativo del carragenano 1C dió lugar a tres fracciones, dos insolubles, 1C₁ que precipitaba

Figura 1. Curva de precipitación con cloruro de potasio de los carragenanos 1C y 2C.

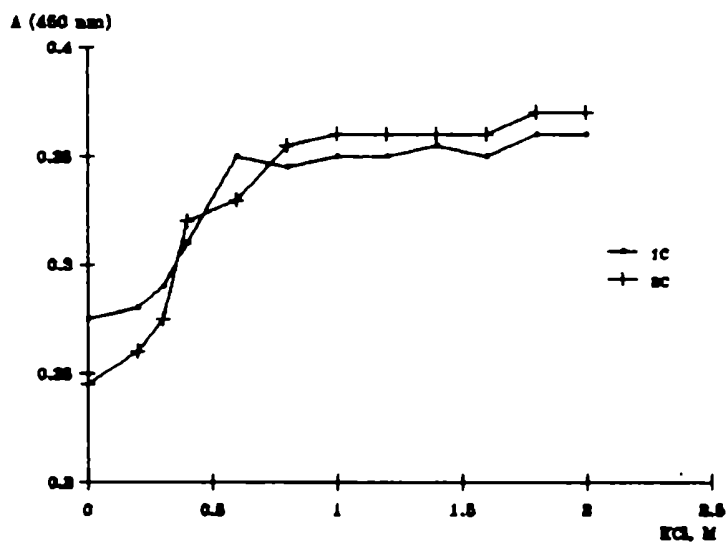
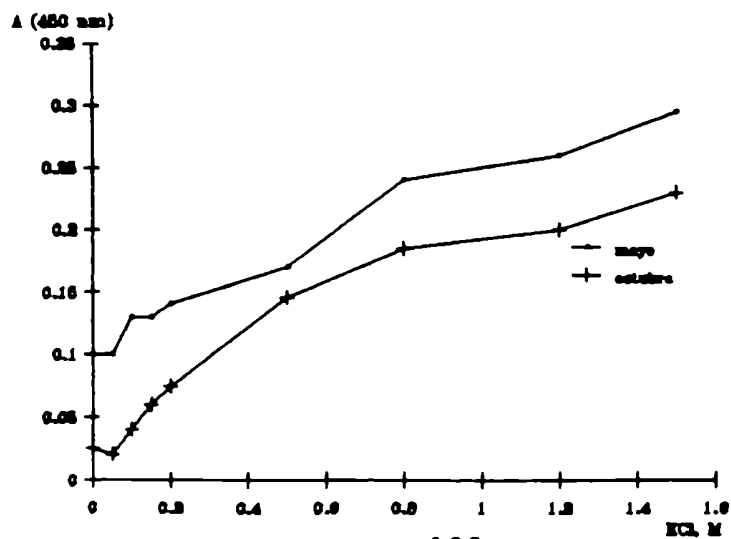


Figura 2. Curvas de precipitación con cloruro de potasio de carragenanos de ejemplares de *Gigartina skottsbergii* recolectados en mayo y octubre.



en el rango 0,30-0,31 M y 1C₂ que precipitaba a 0,40-0,42 M, y una fracción que permanecía soluble a una concentración de 2,00 M (1C₃). La Tabla 1 muestra el rendimiento, rango de precipitación y peso molecular de las fracciones obtenidas. Los rendimientos indican que 1C está compuesto por cantidades similares de carragenanos gelificantes y solubles.

Tabla 1. Rango de precipitación, rendimiento y peso molecular de los carragenanos 1C₁, 1C₂ y 1C₃.

Fracción	Rango de precipitación M, KCl	Rendimiento ^a %	Peso molecular
1C ₁	0,30 - 0,31	33,0 (42,6)	75.000
1C ₂	0,40 - 0,42	2,7 (3,5)	124.000
1C ₃	2,00 ^b	41,7 (53,9)	198.000

^aPor 100 g de carragenano (entre paréntesis, porcentaje del total recuperado). ^bSoluble en cloruro de potasio 2,00 M.

El peso molecular de estas fracciones aumenta en función de su solubilidad en cloruro de potasio. Estos valores se obtuvieron en base al poder reductor de las muestras⁹, a partir del que se estimó el peso molecular promedio numérico; tiene el inconveniente que, si los extremos reductores de las cadenas poliméricas no están libres, el valor obtenido tendrá error por exceso. En la actualidad el peso molecular de este tipo de productos se suele estimar por medición de la dispersión de la luz con ángulos pequeños. Este método tiene el inconveniente que, si las moléculas se encuentran formando agregados, se sobreestima el peso molecular del polímero y resulta extremadamente difícil asegurarse de que esto no suceda. Por este motivo, las determinaciones se llevan a cabo sobre

soluciones diluías de polisacárido. Esta técnica da el peso molecular promedio pesado.

Los valores que figuran en la Tabla 1 para los carragenanos de gametofitos femeninos de *Gigartina skottsbergii* se encuentran en el rango de los que se han informado en la literatura para otros carragenanos de la familia kappa¹⁰.

Los espectros infrarrojos, tanto de los carragenanos 1C y 2C, como los de las fracciones 1C₁, 1C₂ y 1C₃ (Figura 3) son similares. La banda a 930 cm⁻¹ indica la presencia de 3,6-anhidrogalactosa¹¹. Si bien el espectro de la galactosa 4-sulfato¹², así como los de otros azúcares sulfatados¹³ dan una banda a 920-930 cm⁻¹ no es posible extrapolar los resultados obtenidos para monosacáridos a polisacáridos¹⁴, con lo que la asignación realizada es válida.

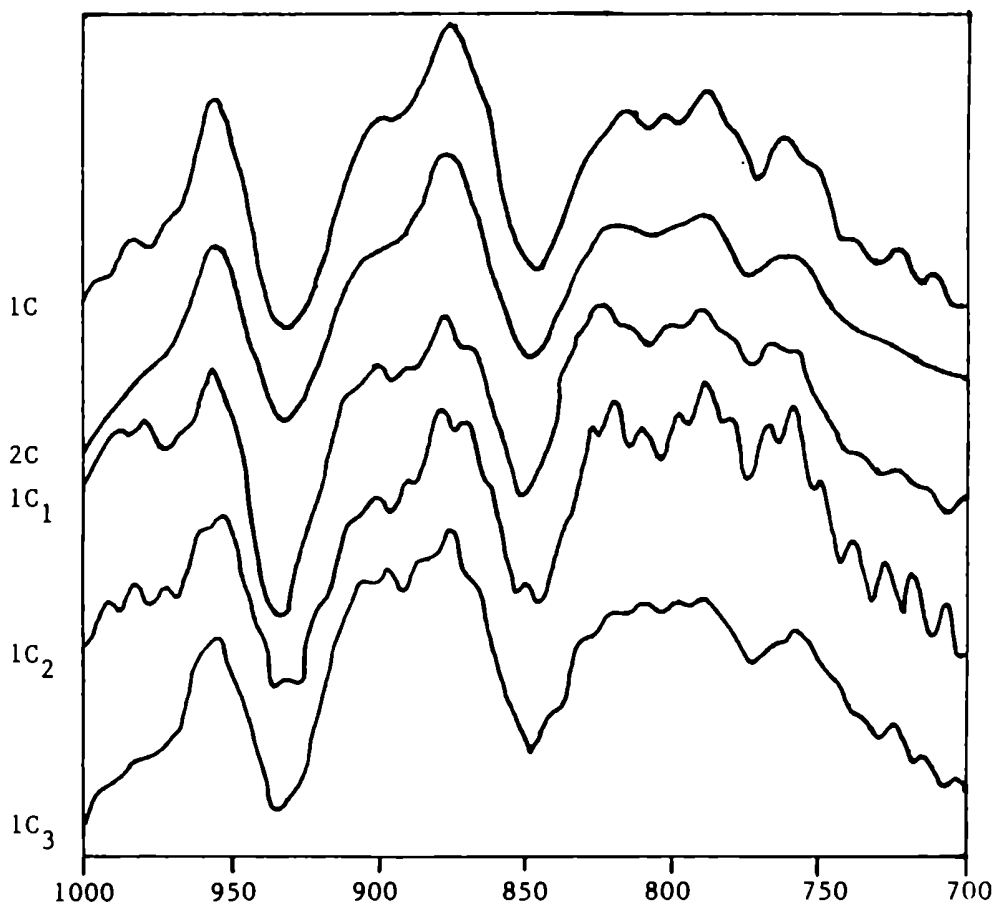
La señal debida a la vibración del enlace O-S en la estructura C-O-S aparece en el rango 810-855 cm⁻¹. En todos los espectros se observa una banda a 845-855 cm⁻¹ debida a grupos sulfato en posición secundaria axial. Además aparecen señales muy pequeñas a 820-840 cm⁻¹ que indican la presencia de grupos sulfato secundarios en posición ecuatorial y primarios.

En todos los espectros se distingue el pico a 805 cm⁻¹ que se ha atribuido a las unidades de 3,6-anhidrogalactosa 2-sulfato¹⁶.

Por hidrólisis de estas fracciones y cromatografía gaseosa de los monosacáridos obtenidos, derivatizados como acetatos de alditoles, se determinó que 1C₁ y 1C₂ presentan galactosa como único azúcar estable en medio ácido, en

cambio 1C, está constituido por 96,6% de galactosa y 3,4% de glucosa. Esto indica que la pequeña proporción de glucosa que había quedado en 1C después de la purificación se halla concentrada en esta fracción. Este azúcar proviene, probablemente, del almidón de las florideas, polisacárido de reserva característico de estas algas, soluble en soluciones de cloruro de potasio.

Figura 3. Espectros infrarrojos de los carragenanos 1C, 2C, 1C₁, 1C₂ y 1C₃ (1000-700 cm⁻¹).



El análisis y la rotación óptica de las fracciones 1C₁, 1C₂ y 1C₃, así como de los carragenanos 1C y 2C se muestran en la Tabla 2. Como era de esperar, la relación 3,6-anhidrogalactosa:galactosa disminuye con el aumento de la solubilidad en cloruro de potasio.

Tabla 2. Análisis y rotación óptica de los carragenanos 1C y 2C y de los carragenanos obtenidos por fraccionamiento de 1C con cloruro de potasio.

Carragenano	Gal:3,6-AnGal:sulfato relación molar	α -Gal 6S como SO ₃ Na %	α -Gal 2,6S como SO ₃ Na %	[α] _D °
1C	1,00:0,77:1,25	n.d. ^a	n.d.	+ 61,6
2C	1,00:0,63:0,98	n.d.	n.d.	+ 61,7
1C ₁	1,00:0,64:1,32	-	4,1	+ 66,5
1C ₂	1,00:0,62:1,20	3,7	6,5	+ 56,1
1C ₃	1,00:0,37:1,14	7,4	22,2	+ 55,1

^an.d. = no determinado.

El porcentaje de unidades de de α -D-galactosa 6-sulfato y 2,6-disulfato¹⁶ aumenta con la solubilidad en cloruro de potasio. El alto contenido de estas unidades en 1C₃ explica la banda ancha observada en el espectro infrarrojo de este polisacárido a 855-820 cm⁻¹ (Figura 3).

El rango de precipitación y el contenido de 3,6-anhidrogalactosa de las fracciones 1C₁ y 1C₂ indica que las mismas tienen básicamente una estructura de tipo kappa/iota. Respecto a 1C₃, teniendo en cuenta el alto porcentaje de α -D-galactosa 6-sulfato y 2,6-disulfato y que estos polisacáridos se obtuvieron a partir de gametofitos femeninos de un alga perteneciente a la familia Gigartinaceae (ver Primera Parte, Cap.1 c)), podría inferirse que se trata de un carragenano mu/nu parcialmente

ciclado.

Análisis por metilación de los carragenanos 1C₁, 1C₂ y 1C₃

El análisis por metilación es el método clásico utilizado para el estudio estructural de carragenanos. Sin embargo, en muchos casos es difícil obtener metilación completa de estos polisacáridos debido al impedimento estérico y la supresión de la ionización de los grupos hidroxilo vecinos grupos sulfato. Por otra parte es difícil metilar hasta contenido de metoxilo constante, ya que ninguno de los grupos sulfato es completamente estable en medio básico, por lo que el porcentaje de metoxilo nunca deja de aumentar¹⁷ (ver Primera Parte, Cap.5).

El método de Hakomori¹⁸ no puede aplicarse debido a la baja solubilidad de los carragenanos en dimetilsulfóxido. Por este motivo, es necesario recurrir al método de Haworth¹⁹, como lo describe Cerezo²⁰. En estas condiciones, se requieren varias metilaciones sucesivas para lograr permetilación del polímero.

Para evaluar si los productos obtenidos son el resultado de una metilación completa, se determinó la composición de la muestra después de cada etapa de metilación, pudiendo así dar significado estructural a componentes minoritarios. Este método insume mucho tiempo y requiere una importante cantidad de muestra, ya que después de cada paso es necesario dializar, liofilizar y separar unos miligramos para determinar su composición. Recientemente se ha publicado una variante del método de

Hakomori²¹, adecuada para la metilación de estos polisacáridos sulfatados, que se tratará más adelante (ver Cap.2).

Los polisacáridos permetilados, así como los obtenidos después de cada etapa de metilación, se hidrolizaron y los monosacáridos resultantes se derivatizaron a los correspondientes alditoles y aldononitrilos acetilados, que se analizaron por cromatografía gaseosa y cromatografía gaseosa-espectrometría de masa.

Durante la hidrólisis se produce la degradación de la 3,6-anhidrogalactosa; por este motivo, para determinar la estructura de los carragenanos es necesario estimar el contenido de este azúcar por otro método.

Los rendimientos de cada etapa resultaron de 80-95 % es decir que fueron similares a los obtenidos por Stortz²². Las Tablas 3, 4 y 5 muestran los azúcares obtenidos después de cada paso de metilación de los carragenanos 1C₁, 1C₂ y 1C₃, respectivamente. En todos los casos se obtuvo permetilación en el tercera etapa.

Para las tres fracciones el azúcar metilado mayoritario fue la 2,6-di-O-metilgalactosa, que indica la presencia de unidades de β-D-galactosa 4-sulfato en el polisacárido de partida, indicando predominio de estructuras de la familia kappa.

El hecho de no haber detectado 2,3-di-O-metilgalactosa y la presencia de sólo pequeñas cantidades de 3-O-metilgalactosa entre los azúcares metilados provenientes de la hidrólisis de los polisacárido 1C₃ permetilado indicó que, durante la metilación por el método de Haworth, las

unidades de α -D-galactosa 6-sulfato y 2,6-disulfato se ciclaron para dar 3,6-anhidrogalactosa y 3,6-anhidrogalactosa 2-sulfato, respectivamente, como ocurre durante el tratamiento alcalino de carragenanos (ver Primera Parte, Cap. 5). Resulta evidente que, a pesar de haber llevado a cabo la reacción a $\approx 0^\circ\text{C}$, en medio fuertemente alcalino, la reacción de ciclación se encuentra favorecida frente a la metilación.

Tabla 3. Composición en monosacáridos producidos por metilación e hidrólisis del carragenano 1C₁.

Monosacárido metilado en	Paso de metilación			
	1	2	3	4
Derivatizados a acetatos de alditoles:				
2,3,4,6	-		tr.	3,3
2,3,6	-	-	tr.	2,7
2,4,6	1,0	1,2	4,8	3,3
2,6 + 4,6	67,5	89,0	90,8	87,8
6	13,5	3,3	1,2	3,0
2	12,2	3,4	1,6	tr.
3 + 4	1,3	-	-	-
-	4,6	-	-	-
Derivatizados a aldononitrilos acetilados:				
2,3,4,6	-	-	-	tr.
2,4,6	1,5	4,3	2,0	3,4
2,6	66,4	88,7	91,7	92,5
6	14,4	3,0	3,9	3,8
2	12,0	4,0	1,1	tr.
3	1,5	-	1,3	-
-	4,2	-	-	-

Tabla 4. Composición en monosacáridos producidos por metilación e hidrólisis del carragenano 1C₂.

Monosacárido metilado en	Paso de metilación			
	1	2	3	4
Derivatizados a acetatos de alditoles:				
2,3,4,6	-	1,1	-	-
2,4,6	2,0	2,5	-	1,7
2,6 + 4,6	71,8	91,2	-	90,6
6	11,1	2,8	-	1,4
2,4	1,6	-	-	-
2	9,4	1,1	-	1,7
3 + 4 + -	4,2	1,2	-	-
Derivatizados a aldononitrilos acetilados:				
2,3,4,6	-	2,3	-	-
2,4,6	2,3	4,9	5,6	4,4
2,3,6	-	-	1,6	tr.
2,6	67,6	75,0	91,7	95,6
6	18,4	5,5	1,6	tr.
2	4,5	6,8	tr.	tr.
3	1,3	5,5	tr.	tr.
4	2,2	-	-	-
-	3,6	-	-	-

Tabla 5. Composición en monosacáridos producidos por metilación e hidrólisis del carragenano 1C₃.

Monosacárido metilado en	Paso de metilación			
	1	2	3	4
Derivatizados a acetatos de alditoles:				
2,3,4,6	-	-	2,5	1,2
2,3,6	-	1,4	2,5	2,6
2,4,6	1,0	4,3	6,1	5,7
2,6 + 4,6	31,3	78,9	83,9	82,4
6	19,4	4,0	1,3	1,2
2,4	5,7	-	-	-
2	8,9	6,3	1,0	1,9
3 + 4 + -	33,7	5,0	2,8	3,3
Derivatizados a aldononitrilos acetilados:				
2,3,4,6			-	1,3
2,3,6			2,3	3,4
2,4,6			7,6	6,5
2,6			84,3	75,4
4,6			-	6,9
6			-	1,4
2			2,9	2,1
3			2,8	3,0

La composición de 1C₁, 1C₂ y 1C₃ en unidades estructurales (Tabla 6) indica que los gametofitos femeninos de *Gigartina skottsbergii* producen carragenanos de tipo kappa/iota (1C₁ y 1C₂) y mu/nu (1C₃). Estos polisacáridos se separaron fácilmente por precipitación con cloruro de potasio.

Tabla 6. Composición en unidades estructurales de IC₁, IC₂ y IC₃ obtenida a partir del análisis y metilación de los mismos^a.

Carragenano	Porcentaje de unidades con grupos sulfato en las posiciones indicadas									
	Gal enlazada por 3			Gal enl. por 4			3,6-AnGal enl. por 4			
	4	2	6	2,4	4,6	-	6	2,6	-	2
IC ₁	2,0	52,7	-	2,0	tr.	tr.	-	4,3	←	39,0
IC ₂	1,0	51,0	-	tr.	1,0	tr.	3,1	5,6	←	38,3
IC ₃	2,8	36,4	3,4	tr.	tr.	1,2	7,3	21,2	←	27,8

^aCorregido teniendo en cuenta la ciclación producida durante la metilación.

La composición de $1C_1$ y $1C_2$ es muy similar. Presentan una estructura kappa/iota, con una pequeña cantidad de unidades precursoras (μ/ν), mayor en $1C_2$ que en $1C_1$. Se detectaron también pequeños porcentajes de unidades no sulfatadas y disulfatadas (en este último caso, no es posible descartar submetilación).

$1C_2$ representa aproximadamente la mitad de los carragenanos aislados a partir de los gametofitos de *Gigartina skottsbergii* y es soluble en cloruro de potasio 2,00 M a pesar que el contenido de unidades de 3,6-anhidrogalactosa es bastante alto. Hasta el momento no se había realizado el análisis por metilación de una estructura con estas características. $1C_2$ contiene β -galactosa 4-sulfato enlazada por C-3 (36,4 %), α -galactosa 6-sulfato y 2,6-disulfato enlazadas por C-4 (7,3 % y 21,2%, respectivamente) y 3,6-anhidro- α -galactosa (27,8%) como componentes mayoritarios. Es de destacar la presencia de 4,6-di-O-metilgalactosa que correspondería a unidades de β -D-galactosa 2-sulfato (3,4%), características de carragenanos de la familia lambda. Lestang-Bremond y col.²³ informaron que los gametofitos de *Chondrus crispus* producían 10% de carragenano lambda. Sin embargo, esta conclusión se basa en el espectro infrarrojo (el carragenano nu también presenta grupos sulfato en posición secundaria ecuatorial y primarios) y en el espectro de r.m.n.-¹³C que tiene una región anomérica compleja, que los autores no analizaron.

Espectroscopía de r.m.n.-¹³C de 1C₁, 1C₂ y 1C₃

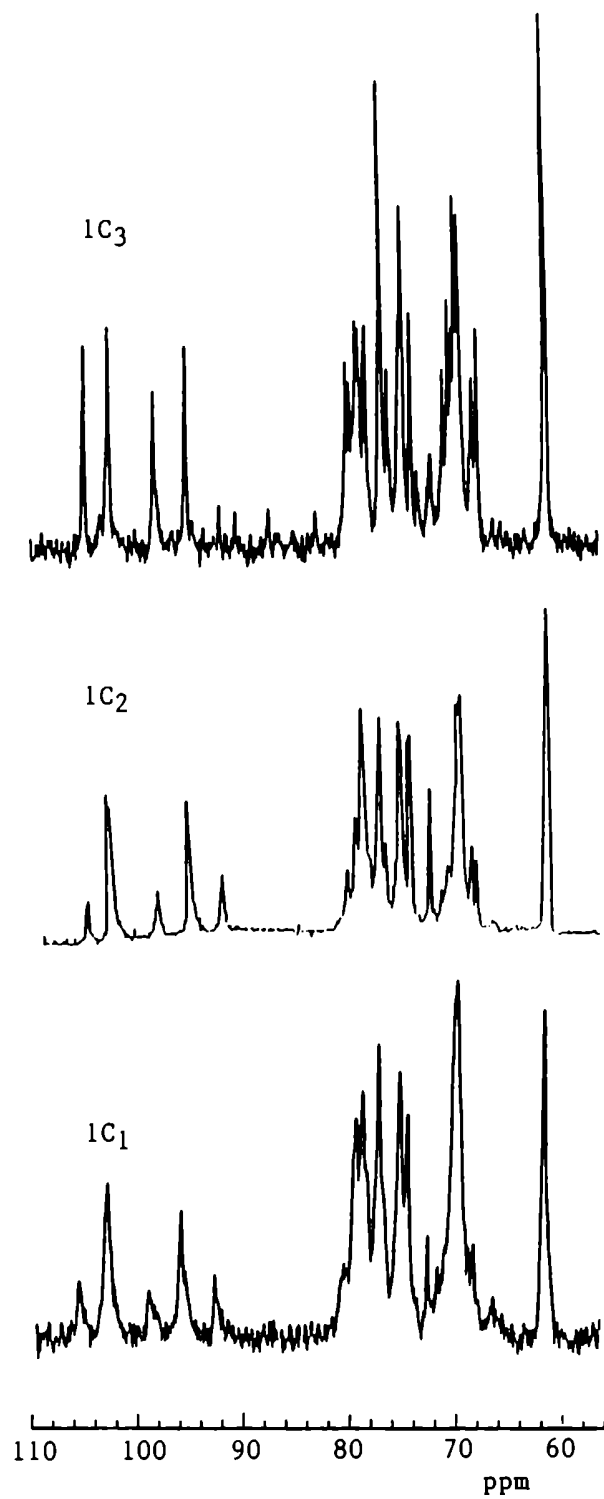
Los espectros de r.m.n.-¹³C de 100 MHz de 1C₁, 1C₂ y 1C₃ se muestran en la Figura 4.

La asignación de los mismos se realizó de la siguiente manera: Se tomaron como base los espectros publicados por distintos autores (ver Primera Parte, Cap. 3) y los resultados obtenidos por métodos analíticos y estudio estructural por metilación. A partir de estos datos, se buscaron las señales de los carbonos anoméricos de las díadas principales y luego se comprobó si las señales de los átomos de carbono restantes se hallaban presentes. De este modo, se confirmó la asignación realizada en un principio.

Después, se buscaron en la región anomérica las señales minoritarias y, teniendo en cuenta las unidades metiladas presentes en pequeñas proporciones, se determinaron las posibles díadas, verificando la presencia de las señales correspondientes a los restantes átomos de carbono. En muchos casos estas últimas se superponen con señales correspondientes a las díadas principales. Sin embargo, en algunos espectros, una de estas señales se encuentra en una zona donde no aparecen otros picos. En estos casos, es posible confirmar la presencia de una díada minoritaria.

Las díadas presentes en 1C₁, 1C₂ y 1C₃ y las áreas de los correspondientes carbonos anoméricos se indican en las Tablas 7, 8 y 9. Los espectros presentan un patrón básicamente semejante.

Figura 4. Espectros de r.m.n.- ^{13}C de 1C_1 , 1C_2 y 1C_3 .



El espectro de ^{13}C , presenta en la región anomérica cuatro señales principales a 105,1, 102,8, 98,6 y 95,6 ppm. Teniendo en cuenta que el análisis por metilación indicó la presencia de β -galactosa 4-sulfato como azúcar mayoritario y que este carragenano contiene 27,8% de 3,6-anhidrogalactosa, los picos a 102,8 y 95,6 ppm pueden asignarse a la díada β -Gal 4S \rightarrow α -3,6-AnGal. Además, el 21,2% de unidades de α -galactosa 2,6-disulfato sugirió que las señales a 105,1 y 98,6 ppm corresponderían a la díada β -Gal 4S \rightarrow α -Gal 2,6S.

El estudio de las otras señales del espectro confirmó la presencia de la primera díada, ya que se encontraron las esperadas de acuerdo a los datos de la literatura. Esta estructura es una de las primeras estudiadas por r.m.n.- ^{13}C y los desplazamientos químicos de todos los picos se han confirmado en muchos casos²⁵.

Respecto a la segunda díada, ésta es la primera vez que se obtuvo el espectro de un carragenano donde la estructura no fuera una de las mayoritarias. Por este motivo sólo se había podido comprobar experimentalmente la asignación de las señales de los carbonos anoméricos. Como se ve en la Tabla 7, los valores de δ obtenidos concuerdan con los esperados^{26,27}, a excepción de la señal del C-4 de la unidad de β -galactosa 4-sulfato. El valor estimado en base a cálculos era 73,9 ppm²⁷; en esta región del espectro se encontró solamente un pico muy pequeño en comparación con las restantes señales que corresponden a la estructura nu. Sin embargo, aparece un pico a 71,4 ppm, es decir, desplazado en 2,5 ppm hacia campos más altos de lo esperado.

Recientemente, Stortz y col.²⁸ obtuvieron el espectro

de un carragenano lambda, que también presenta unidades de α -galactosa 2,6-disulfato aunque las unidades β se encuentran sulfatadas en C-2. El análisis del mismo mostró que la señal del C-4 de las unidades de β -galactosa 2-sulfato aparecía a 64,6 ppm, es decir, desplazada en 1,7 ppm hacia campos más altos respecto al valor calculado previamente. Estos autores interpretaron que este desplazamiento se debía al apantallamiento producido por el grupo sulfato en C-2 de la unidad vecina (ver Primera Parte, Cap.3).

Un efecto similar debe producirse en este caso, por lo que el valor correcto para la señal del C-4 de la unidad β en una estructura de tipo nu es 71,4 ppm.

También podría esperarse un desplazamiento de este tipo en otras díadas en las cuales las unidades de α -galactosa se encuentran sulfatadas en C-2.

Desde hace ya tiempo se sabe por comparación entre los espectros de los carragenanos kappa y iota que la presencia de grupos sulfato en en C-2 las unidades de 3,6-anhidro- α -galactosa causa un desplazamiento de 1,8 ppm hacia campos más altos en la señal correspondiente al C-4 de la unidad β vecina (díada kappa, $\delta_{C-4} = 74,5$ ppm; díada iota, $\delta_{C-4} = 72,7$ ppm). Si bien las unidades de 3,6-anhidrogalactosa se encuentran en la conformación 1C_4 , el efecto es similar al observado para los carragenanos mu y nu, donde las unidades α se encuentran en la conformación 4C_1 .

Se analizó luego la presencia de posibles díadas minoritarias. Por el método de Rees¹⁵ se determinó un 7,3% de unidades de α -galactosa 6-sulfato. Considerando que el

carragenano 1C₃, tiene la díada kappa como una de las mayoritarias, se evaluó la presencia del correspondiente precursor, es decir de la díada β -Gal 4S \rightarrow α -Gal 6S. Según los valores informados²⁶, la señal correspondiente al C-1 de la unidad β coincide con la del C-1 de la misma unidad en la díada nu y el C-1 de la unidad α da una señal a 98,2 ppm. En el espectro se observa un hombro del pico a 98,6 ppm que podría corresponder a la díada buscada. Las restantes señales se superpondrían con las correspondientes a otras estructuras que se encuentran en mayor proporción. La excepción es el C-4 de la unidad β , que es un pico pequeño a 73,9 ppm, desplazamiento que anteriormente²⁷ había sido asignado tanto al C-4 de la díada mu como a la nu (ver arriba). Esto indicaría que 1C₃ está constituido en forma minoritaria por díadas de tipo mu.

Otra señal pequeña, a 92,4 ppm, corresponde a unidades de 3,6-anhidrogalactosa 2-sulfato unida a β -galactosa. Analizando el espectro en su totalidad y teniendo en cuenta los resultados de la metilación y la presencia de estructura nu como una de las mayoritarias, se concluyó que la señal a 92,4 ppm indica la presencia de la díada β -Gal 4S \rightarrow α -3,6-AnGal 2S.

También se encuentra una señal muy pequeña a 90,9 ppm, que junto con los picos a 87,8 y 83,1 ppm, indica la presencia de unidades terminales reductoras de 3,6-anhidrogalactosa unidas a β -galactosa 4-sulfato (C-1, C-3 y C-4, respectivamente de estas unidades de 3,6-anhidrogalactosa)²⁹.

Tabla 7. Asignación del espectro de r.m.n.-¹³C de IC₃^a.

Diada	C-1 ^b	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6
β-D-Gal 4S enlazada por 3	102,8 (26)	70,0	79,1	74,5	75,2	61,7
α-D-3,6-AnGal enlazada por 4	95,6 (21)	70,2	79,4	78,6	77,4	69,9
β-D-Gal 4S enlazada por 3	105,1 (21)	70,9	80,4	71,4	75,2	61,7
α-D-Gal 2,6S enlazada por 4	98,6 (16)	76,6	68,7	79,4	68,7	68,2
β-D-Gal 4S enlazada por 3	105,1 (21)	70,9	78,6	73,8	75,2	61,7
α-D-Gal 6S enlazada por 4	98,2 (3)	69,9	70,5	79,4	68,7	68,2
β-D-Gal 4S enlazada por 3	102,8 (26)	69,9	77,3	72,5	75,2	61,7
α-D-3,6-AnGal 2S enlazada por 4	92,4 (4)	75,5	78,4	78,6	77,4	70,2
β-D-Gal 2S enlazada por 3 ^c	103,8 (4)	79,4	78,6	66,4	75,5	61,7
α-D-Gal 6S enlazada por 4	97,0 (2)	69,7	70,9	79,0	68,7	68,2
β-D-Gal 2S enlazada por 3 ^c	103,8 (4)	79,4	78,6	66,4	75,8	61,7
α-D-Gal enlazada por 4	97,0 (2)	69,7	71,4	79,0	70,9	61,9
β-D-Gal enlazada por 3 ^c	102,8 (26)	70,5	80,8	66,4	75,5	61,9
α-D-3,6-AnGal enlazada por 4	94,8 (2)	70,9	79,8	78,6	77,4	70,0

^aTambién se detectaron pequeñas señales a 90,9, 83,1 y 87,8 ppm que indican la presencia de unidades de 3,6-AnGal terminal unidas a β-Gal. ^bEntre paréntesis se indica el área % de las correspondientes señales anómalas. ^cAsignación tentativa.

En el análisis por metilación se detectaron unidades de β - y α -galactosa sin sulfatar y residuos de β -galactosa 2-sulfato. Las señales minoritarias del espectro sugieren la presencia de las díadas β -Gal 2S \rightarrow α -Gal 6S, β -Gal 2S \rightarrow α -Gal y β -Gal \rightarrow α -3,6-AnGal²⁷.

El espectro de $1C_2$, como era de esperar, presenta mayor proporción de díadas correspondientes a carragenanos gelificantes que $1C_3$ (Tabla 8). El análisis por metilación indicó que, al igual que para $1C_3$, en $1C_2$ predominan las unidades de β -galactosa 4-sulfato. Además, $1C_2$ contiene 38,3% de unidades de 3,6-anhidro- α -galactosa y 3,1 y 5,6% de unidades de α -galactosa 6-sulfato y 2,6-disulfato, respectivamente. En base a estos datos, se asignaron las señales a 103,1 y 95,5 ppm como correspondientes a los carbonos anoméricos de la díada kappa (β -Gal 4S \rightarrow α -3,6-AnGal), los picos de los restantes átomos de carbono coinciden con los valores esperados^{24,25}. Del mismo modo, se comprobó la presencia de las díadas β -Gal 4S \rightarrow α -3,6-AnGal 2S³⁰ y β -Gal 4S \rightarrow α -Gal 2,6S²⁶. En base al espectro, no se pudo decidir la presencia de la díada β -Gal 4S \rightarrow α -Gal 6S, ya que ésta se encontraría en muy pequeña proporción.

El análisis por metilación indicó la presencia de unidades de β -galactosa sin sulfatar. Los hombros de las señales a 95,5 y 92,5 ppm sugieren que estas unidades se encuentran formando estructuras beta (β -Gal \rightarrow α -3,6-AnGal) y alfa (β -Gal \rightarrow α -3,6-AnGal 2S). Esta suposición no pudo confirmarse a partir de las restantes señales del espectro.

Tabla 8. Asignación del espectro de r. m. n. - ^{13}C de IC_2 .

Diada	C-1 ^a	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6
β -D-Gal 4S enlazada por 3	103,1 (31)	70,2	79,0	74,4	75,3	61,8
α -D-3,6-AnGal enlazada por 4	95,5 (27)	70,2	79,7	78,9	77,3	70,0
β -D-Gal 4S enlazada por 3	102,9 (9)	69,9	77,3	72,5	75,3	61,8
α -D-3,6-AnGal 2S enlazada por 4	92,5 (9)	75,3	78,5	78,9	77,5	70,2
β -D-Gal 4S enlazada por 3	105,3 (10)	70,9	80,4	71,5	75,3	61,8
α -D-Gal 2,6S enlazada por 4	98,7 (7)	76,8	68,7	79,4	68,7	68,3
β -D-Gal 4S enlazada por 3	105,3 (10)	70,9	78,9	73,9	75,3	61,8
α -D-Gal 6S enlazada por 4	98,4 (1)	69,1	70,7	79,3	68,7	68,3
β -D-Gal enlazada por 3 ^b	103,1 (31)	70,3	80,9	66,7	75,8	61,8
α -D-3,6-AnGal enlazada por 4	95,1 (3)	70,7	79,8	78,5	77,3	70,0
β -D-Gal enlazada por 3 ^b	102,9 (9)	70,1	79,0	66,7	75,9	61,8
α -D-3,6-AnGal 2S enlazada por 4	92,1 (1)	75,9	79,0	78,5	77,6	70,3

^aEntre paréntesis se indica el área % de las correspondientes señales anómicas. ^bAsignación tentativa.

El espectro de $1C_1$ es muy similar al de $1C_2$ (Tabla 9). $1C_1$ tiene la díada β -Gal 4S \rightarrow α -3,6-AnGal como mayoritaria^{24,25} y las díadas β -Gal 4S \rightarrow α -3,6-AnGal 2S³⁰ y β -Gal 4S \rightarrow α -Gal 2,6S²⁶ en porcentajes similares. Además, se observó un pico a 98,2 ppm casi separado del que se encuentra a 98,7 ppm, indicando la presencia de la díada β -Gal 4S \rightarrow α -Gal 6S.

En este espectro los picos a 95,7 y 92,5 ppm, al igual que en el espectro de $1C_2$, presentan hombros; la presencia de unidades de β -galactosa sin sulfatar detectada por metilación sugiere estructuras de tipo beta y alfa. En este caso, se observa claramente una señal a 66,4 ppm que corresponde al C-4 de unidades de β -galactosa que no llevan sulfato en esta posición, confirmando la asignación realizada.

En el espectro de $1C_1$ se observa un pequeño pico a 101,7 ppm. Teniendo en cuenta que los datos obtenidos a partir de la metilación sugieren la presencia de unidades de β -galactosa 2,4-disulfato, esta señal podría corresponder al carbono anomérico de la misma unida a residuos de 3,6-anhidrogalactosa²⁷. Si esta asignación pudiera confirmarse, tendría importancia biosintética, ya que significaría que el grupo sulfato en C-2 de la unidad β no inhibe totalmente a la enzima responsable de la ciclación de las unidades de α -Gal 6S, como se supone habitualmente, sino que dificulta dicha ciclación. Sin embargo, no pudo descartarse que la presencia de residuos de 6-O-metilgalactosa se deba a submetilación.

Tabla 9. Asignación del espectro de r. m. n. ^{13}C de IC_I.

Diada	C-1 ^a	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6
β -D-Gal 4S enlazada por 3	102,8 (43)	70,0	79,3	74,5	75,3	61,8
α -D-3,6-AnGal enlazada por 4	95,7 (28)	70,4	79,4	78,8	77,3	69,9
β -D-Gal 4S enlazada por 3	102,8 (43)	69,9	77,3	72,5	75,3	61,8
α -D-3,6-AnGal 2S enlazada por 4	92,5 (9)	75,4	78,3	78,8	77,6	70,3
β -D-Gal 4S enlazada por 3	105,3 (9)	70,9	80,4	71,6	75,3	61,8
α -D-Gal 2,6S enlazada por 4	98,7 (7)	76,7	68,8	79,3	68,8	68,3
β -D-Gal 4S enlazada por 3	105,3 (9)	70,9	78,8	73,9	75,3	61,8
α -D-Gal 6S enlazada por 4	98,2 (3)	69,0	70,9	79,3	68,8	68,3
β -D-Gal enlazada por 3	102,8 (43)	70,3	80,6	66,4	75,7	61,8
α -D-3,6-AnGal enlazada por 4	95,1 (2)	70,9	79,8	78,5	77,3	70,3
β -D-Gal enlazada por 3	102,8 (43)	70,1	79,0	66,4	75,7	61,8
α -D-3,6-AnGal 2S enlazada por 4	92,1 (1)	75,9	79,0	78,5	77,6	70,3
β -D-Gal 2,4S enlazada por 3 ^b	101,7 (1)	78,4	78,3	74,5	75,3	61,8
α -D-3,6-AnGal enlazada por 4	95,7 (28)	70,3	79,6	78,8	77,3	70,0

^aEntre paréntesis se indica el área % de las correspondientes señales anómeras. ^bAsignación tentativa.

Para esta señal existe otra asignación posible: junto con los carragenanos, se extraen pequeñas cantidades de otros polisacáridos que contienen L-galactosa y coprecipitan en parte con los carragenanos gelificantes (ver Cap. 2); entonces el pico a 101,7 ppm podría deberse a la presencia de este tipo de productos.

La Tabla 10 muestra la contribución de las distintas díadas a la estructura de $1C_1$, $1C_2$ y $1C_3$, según se determinó a partir de los espectros de r.m.n.- ^{13}C .

Tabla 10. Contribución de las diferentes díadas a la estructura de $1C_1$, $1C_2$ y $1C_3$.

Carragenano	Díada	Area %
$1C_1$	β -D-Gal 4S \rightarrow α -D-3,6-AnGal	56
	β -D-Gal 4S \rightarrow α -D-3,6-AnGal 2S	18
	β -D-Gal 4S \rightarrow α -D-Gal 2,6S	13
	β -D-Gal 4S \rightarrow α -D-Gal 6S	6
	β -D-Gal \rightarrow α -D-3,6-AnGal	4
	β -D-Gal \rightarrow α -D-3,6-AnGal 2S	2
	β -D-Gal 2,4S \rightarrow α -D-3,6-AnGal	2
$1C_2$	β -D-Gal 4S \rightarrow α -D-3,6-AnGal	57
	β -D-Gal 4S \rightarrow α -D-3,6-AnGal 2S	15
	β -D-Gal 4S \rightarrow α -D-Gal 2,6S	16
	β -D-Gal 4S \rightarrow α -D-Gal 6S	2
	β -D-Gal \rightarrow α -D-3,6-AnGal	6
	β -D-Gal \rightarrow α -D-3,6-AnGal 2S	4
$1C_3$	β -D-Gal 4S \rightarrow α -D-3,6-AnGal	45
	β -D-Gal 4S \rightarrow α -D-3,6-AnGal 2S	7
	β -D-Gal 4S \rightarrow α -D-Gal 2,6S	30
	β -D-Gal 4S \rightarrow α -D-Gal 6S	6
	β -D-Gal \rightarrow α -D-3,6-AnGal	4
	β -D-Gal 2S \rightarrow α -D-Gal 6S	4
	β -D-Gal 2S \rightarrow α -D-Gal	4

Estos resultados indican que $1C_1$ está formada en un 74% por las díadas β -Gal 4S $\rightarrow\alpha$ -3,6-AnGal y β -Gal 4S $\rightarrow\alpha$ -3,6-AnGal 2S en relación 3:1, junto con 19% de unidades precursoras (mu/nu). También se detectó 6% de unidades de la familia beta y 2% de unidades inusuales.

Las díadas más importantes que contribuyen a la estructura de $1C_2$ son similares a las de $1C_1$; $1C_2$ está formada en un 72% de por las díadas β -Gal 4S $\rightarrow\alpha$ -3,6-AnGal y β -Gal 4S $\rightarrow\alpha$ -3,6-AnGal 2S en relación 4:1, junto con 18% de unidades precursoras y 10% de unidades correspondientes a la familia beta, no se detectaron unidades inusuales.

$1C_3$ es un carragenano mu/nu parcialmente ciclado que contiene 52% de estructura kappa/iota y 36% de díadas precursoras (mu/nu). Además, se detectó 4% de díadas de la familia beta y 8% de tipo lambda (llevan sulfato en C-2 de la unidad β).

Espectroscopía de r.m.n.- 1H de $1C_1$, $1C_2$ y $1C_3$

Durante este trabajo de Tesis se ha explorado la aplicación de la espectroscopía de r.m.n.- 1H a la determinación de la estructura de los carragenanos. Esta técnica se considera más sensible que la espectroscopía de r.m.n.- ^{13}C en la detección de productos minoritarios. Por otra parte, la cuantificación se puede realizar en forma más segura. Sin embargo, para los carragenanos, las señales se encuentran mal definidas y se produce superposición de las mismas, en parte, debido a que los picos son anchos. Por estos motivos, resulta sólo posible el uso de los picos

correspondientes a los protones anoméricos de las unidades α en la determinación estructural de estos polisacáridos.

La Tabla 11 resume los desplazamientos químicos de las señales de los protones anoméricos de las unidades α presentes en los carragenanos que se han asignado hasta el momento.

Tabla 11. Señales de los H-1 de las unidades α en carragenanos.

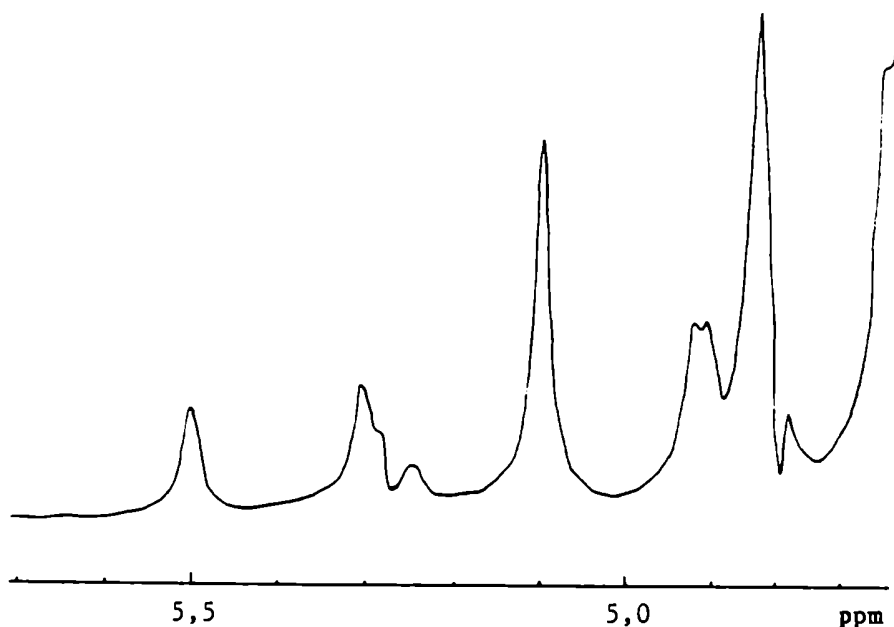
Unidad	Enlazada a	δ (ppm)	Referencia
α -D-Gal 2,6S	β -D-Gal 2S	5,58	28
α -D-Gal 2,6S	β -D-Gal 4S	5,52	a
α -D-Gal 6S	β -D-Gal 4S	5,26	4
α -D-Gal 6S	β -D-Gal	5,17	4
α -D-3,6-AnGal 2S	β -D-Gal 4S	5,32	31
α -D-3,6-AnGal	β -D-Gal 4S	5,11	31
α -D-3,6-AnGal	β -D-Gal	5,09	32

^aSe asignó en el presente trabajo.

Los espectros de r.m.n.-¹H de 400 MHz de 1C₁, 1C₂ y 1C₃, se encuentran en la Figura 5, 6 y 7. Estos espectros presentan señales anchas que se superponen en parte, impidiendo la asignación completa de los mismos. Sin embargo, la región a campos más bajos, donde aparecen las señales de los protones anoméricos de las unidades α resulta de gran utilidad.

Se comenzó el análisis por el espectro de 1C₁ (el mejor resuelto); se distinguen en esta región claramente cuatro señales a 5,52, 5,32, 5,26 y 5,11 ppm; las tres últimas corresponden a los H-1 de las unidades de 3,6-anhidro- α -galactosa 2-sulfato, α -galactosa 6-sulfato y 3,6-anhidro- α -galactosa, respectivamente unidas a β -galactosa 4-sulfato³¹.

Figura 5. Espectro de r.m.n.-¹H de 1C₁ (5,7-4,6 ppm).



Respecto a la señal a 5,52 ppm, en base al análisis estructural por metilación y espectroscopía de r.m.n.-¹³C, la misma se asignó, por primera vez, al H-1 de las unidades de α -galactosa 2,6-disulfato unidas a β -galactosa 4-sulfato. Esta asignación es además consistente con el desplazamiento a campos más bajos que sufre la señal del protón anomérico del metil α -D-galactopiranosido por sulfatación en C-2, que pasa de 4,837 a 5,131 ppm³³ (ver Primera Parte, Cap. 3).

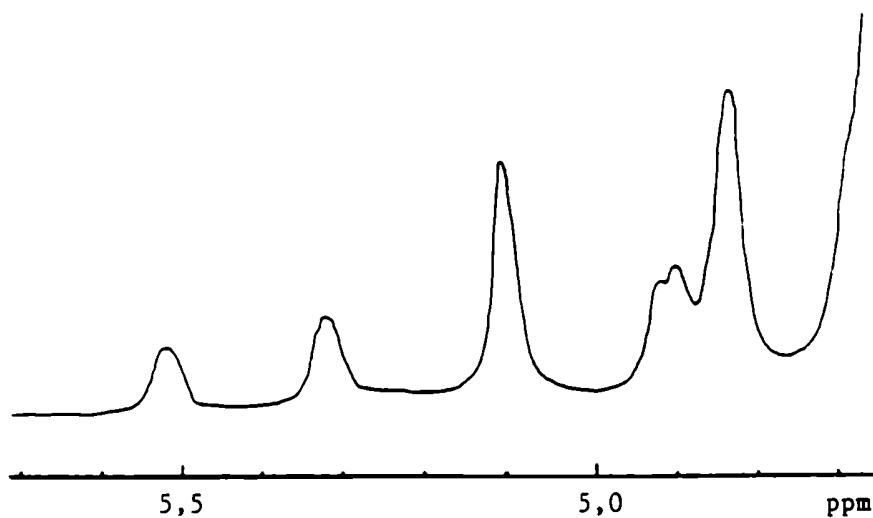
La señal a 5,32 ppm presenta un hombro a 5,30 ppm. Teniendo en cuenta que el pico a 5,11 ppm, que corresponde al H-1 de las unidades de 3,6-anhidro- α -galactosa enlazadas a β -galactosa 4-sulfato se desplaza a 5,09 ppm por desulfatación de la unidad β ³², es posible que la señal a 5,30 ppm se deba al H-1 de unidades de 3,6-anhidro- α -galactosa 2-sulfato enlazadas a β -galactosa. Esta asignación

se encuentra avalada por los resultados de metilación y espectroscopía de r.m.n.-¹³C.

En la región del espectro inmediatamente al lado de la anterior hacia campos más altos, se observan dos señales a 4,91 y 4,84 ppm, que no se encuentran completamente resueltas. La primera corresponde al H-4 de las unidades de β-galactosa 4-sulfato unidas a 3,6-anhidro-α-galactosa 2-sulfato y el segundo resulta de la superposición del H-4 de los residuos de β-galactosa 4-sulfato unidos a 3,6-anhidro-α-galactosa y el H-3 de las unidades de 3,6-anhidro-α-galactosa 2-sulfato enlazadas a β-galactosa 4-sulfato³¹. Estas señales también aparecen en los espectros de ¹C₂ y ¹C₃. La señal correspondiente al H-4 de las unidades de β-galactosa 4-sulfato unidas a α-galactosa 6-sulfato debería presentar un desplazamiento intermedio entre los de las anteriores⁴, justificando que éstas no se encuentren completamente resueltas. Hasta el momento, no se sabe cuál es el δ del H-4 de la unidad β del carragenano nu.

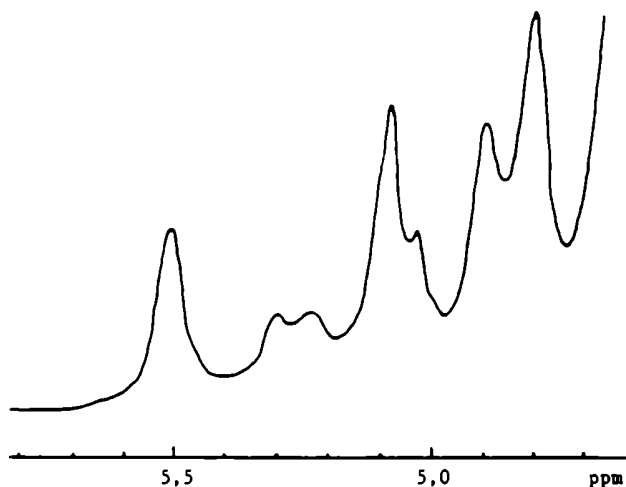
En la región correspondiente a los H-1 de las unidades α del espectro de ¹C₂, se observan sólo tres señales a 5,52, 5,32 y 5,11 ppm. Es decir, que en el mismo no fue posible detectar la señal correspondiente al H-1 de las unidades de α-Gal 6S unidas a β-Gal 4S; de todas formas, estas unidades se hallarían en muy baja proporción. En líneas generales, este espectro es similar al de ¹C₁ pero se encuentra peor resuelto.

Figura 6. Espectro de r.m.n.-¹H de 1C₂ (5,7-4,6 ppm).



En el espectro de 1C₃, la región donde aparecen los picos de los protones anoméricos de las unidades α se encuentran las mismas señales que en el de 1C₁, aunque las áreas de las mismas son diferentes. Además, la señal a 5,11 ppm, presenta un hombro; esta señal podría indicar la presencia de unidades de 3,6-anhidro- α -galactosa unidas a β -galactosa sin sulfatar³².

Figura 7. Espectro de r.m.n.-¹H de 1C₃ (5,7-4,6 ppm).



La Tabla 12 indica la asignación de las unidades α enlazadas a β -galactosa 4-sulfato en los carragenanos 1C₁, 1C₂ y 1C₃.

Tabla 12. Asignación de las señales anoméricas de las unidades α enlazadas a β -galactosa 4-sulfato en los espectros de r.m.n.-¹H de 1C₁, 1C₂ y 1C₃.

Carragenano	δ (ppm)	unidad α	Area % ^a
1C ₁	5,52	Gal 2,6S	10
	5,32 ^b	3,6-AnGal 2S	11
	5,26	Gal 6S	3
	5,11	3,6-AnGal	28
1C ₂	5,52	Gal 2,6S	7
	5,32	3,6-AnGal 2S	12
	5,11	3,6-AnGal	28
1C ₃	5,52	Gal 2,6S	15
	5,32	3,6-AnGal 2S	5
	5,26	Gal 6S	9
	5,11 ^c	3,6-AnGal	22

^aEl área % total de unidades α se estimó como un promedio de los datos determinados por métodos analíticos y espectroscopia de r.m.n.-¹³C.

^bPresenta un hombro a 5,30 ppm. ^cPresenta un hombro a 5,09 ppm.

La Tabla 13 indica la composición en unidades estructurales de los carragenanos 1C₁, 1C₂ y 1C₃, según el análisis por metilación y espectroscopia de r.m.n.-¹³C y r.m.n.-¹H. Estos resultados coinciden bastante bien entre sí. Sin embargo, por métodos analíticos y metilación se sobreestima el porcentaje de unidades β presentes y lo contrario sucede a partir del espectro de r.m.n.-¹³C. La espectroscopia de r.m.n.-¹H daría, probablemente, la mejor aproximación a los porcentajes de las distintas unidades que contribuyen a la estructura de estos polisacáridos.

Lamentablemente, por medio de esta técnica sólo ha sido posible determinar el porcentaje de unidades α enlazadas a β -galactosa 4-sulfato.

Tabla 13. Composición de $1C_1$, $1C_2$ y $1C_3$ en unidades estructurales.

Carr.	Porcentaje de unidades con grupos sulfato en las posiciones indicadas										
	Galactosa enlazada por 3					Gal enlazada por 4			3,6-AnGal		
	-	4	2	6	2,4	4,6	-	6	2,6	-	2
$1C_1^{a,b}$	2,0	52,7	-	-	2,0	tr. ^a	tr.	-	4,3	← 39,0 →	
$1C_1^c$	3,6	39,9			tr.	-	-	2,3	3,9	42,1	8,2
$1C_1^d$								2	5	36	8
$1C_2^{a,b}$	1,0	51,0	-	-	tr.	1,0	tr.	3,1	5,6	← 38,6 →	
$1C_2^c$	3,2	39,7			-	-	-	tr.	4,0	43,7	9,4
$1C_2^d$								-	4	36	9
$1C_3^{a,b}$	2,8	36,4	3,4	tr.	tr.	tr.	1,2	7,3	21,2	← 27,0 →	
$1C_3^c$	← 41,5 →		1,8	-	-	-	← 4,4 →		10,2	37,3	4,7
$1C_3^d$								7	9	31	4

^aA partir del análisis por metilación. ^bCorregido respecto a la ciclación producida durante la metilación.

^cA partir de las señales anoméricas del espectro de r.m.n.-¹³C. ^dA partir de las señales anoméricas de las unidades α en el espectro de r.m.n.-¹H.

Estos hechos hacen que la complementación de las técnicas utilizadas sea indispensable para lograr una buena aproximación a la estructura de estos polisacáridos. La Tabla 14 indica la estructura de $1C_1$, $1C_2$ y $1C_3$, según el promedio de las tres determinaciones, considerando que la relación de unidades $\beta:\alpha$ es 1:1.

Tabla 14. Composición de $1C_1$, $1C_2$ y $1C_3$ en unidades estructurales como promedio de las determinaciones realizadas a partir de la metilación y los espectros de r.m.n.-¹³C y ¹H^a.

Carr.	Porcentaje de unidades con grupos sulfato en las posiciones indicadas									
	Galactosa enlazada por 3					Gal enlazada por 4			3,6-AnGal	
	-	4	2	2,4	4,6	-	6	2,6	-	2
$1C_1$	3,0	45,7	-	1,3	-	-	2,0	4,4	36,1	7,6
$1C_2$	2,3	47,7	-	-	-	-	2,2	4,5	35,0	8,3
$1C_3$	3,4	43,6	3,1	-	-	tr. ^b	5,8	12,3	28,4	3,5

^aSe consideró que la relación de unidades $\beta:\alpha$ es 1:1.

1C₁ y 1C₂ son híbridos kappa/iota. El carragenano 1C₂ (peso molecular 124.000) tiene una composición similar a 1C₁ (peso molecular 75.000) pero presenta mayor solubilidad en cloruro de potasio. Hasta el momento no se conocen las causas que determinan estas diferencias.

La relación biosintética entre los carragenanos gelificantes y solubles resulta evidente a partir de la Tabla 14. Las unidades de 3,6-anhidro- α -galactosa 2-sulfato presentes en 1C₁ y 1C₂ se forman a partir de los residuos de α -galactosa 2,6-disulfato en 1C₃. Por otra parte, las unidades de 3,6-anhidro- α -galactosa que se encuentran en 1C₃ se formarían selectivamente a partir de un hipotético precursor μ/ν , es decir que se ciclarían preferentemente las unidades de α -galactosa 6-sulfato frente a las de α -galactosa 2,6-disulfato. Esto indicaría que la transformación de un carragenano μ/ν en uno kappa/iota no es una simple reacción de ciclación, sino que involucra una serie de etapas selectivas cuyos mecanismos no se conocen hasta el momento. Además, la secuencia biosintética 1C₃-->1C₁ podría involucrar un paso de despolimerización.

Bibliografía

1. A. S. Cerezo, *J. Chem. Soc.*, 992 (1967).
2. C. A. Stortz y A. S. Cerezo, *Carbohydr. Res.* 242, 217 (1993).
3. J. S. Craigie y C. Leigh, Carrageenans and agars, en "Handbook of phycological, physiological and biochemical methods" (eds. J. A. Hellebust y J. S. Craigie)

- Cambridge University Press, p. 110 (1978).
4. S. H. Knutsen, "Isolation and Analysis of Red Algal Galactans", Tesis Doctoral, Department of Chemistry, University of Trondheim, Trondheim (Noruega) (1992).
 5. M. C. Matulewicz, "Estudios sobre el sistema de carragenanos del alga roja *Iridaea undulosa* Bory", Tesis Doctoral, FCEyN-UBA (1978).
 6. C. A. Stortz y A. S. Cerezo, *An. Asoc. Quím. Argent.* **79**, 201 (1991).
 7. D. B. Smith y W. H. Cook, *Arch. Biochim. Biophys.* **45**, 232 (1952).
 8. M. C. Matulewicz y A. S. Cerezo, *J. Sci. Fd. Agric.* **26**, 243 (1975).
 9. J. T. Park y M. J. Johnson, *J. Biol. Chem.* **18**, 149 (1949).
 10. A. Heyraud, M. Rinaudo y C. Rochas en "Introduction to Applied Phycology" (ed. I. Akatsuka), p. 151 (1990).
 11. D. J. Stancioff y N. F. Stanley, *Proc. Int. Seaweed Symp. 6th*, 595 (1969).
 12. C. Rochas, M. Rinaudo y M. Vincendon, *Int. J. Biol. Macromol.* **5**, 111 (1983).
 13. P. J. Archbald, D. F. Fenn y A. B. Roy, *Carbohydr. Res.* **93**, 177 (1981).
 14. C. Rochas, M. Lahaye y W. Yaphe, *Bot. Mar.* **29**, 335 (1986).
 15. D. A. Rees, *J. Chem. Soc.*, 1821 (1963).
 16. D. A. Rees, *J. Chem. Soc.*, 5168 (1961).
 17. C. A. Stortz y A. S. Cerezo, *Carbohydr. Res.* **145**, 219 (1986).

18. S. Hakomori, *J. Biochem.* 55, 205 (1964).
19. W. N. Haworth, *J. Chem. Soc.* 107, 8 (1915).
20. A. S. Cerezo, *Carbohydr. Res.* 26, 335 (1973).
21. T. T. Stevenson y R. H. Furneaux, *Carbohydr. Res.* 210, 277 (1991).
22. C. A. Stortz, "Estudio de los carragenanos "solubles" del alga roja *Iridaea undulosa* Bory", Tesis Doctoral, FCEyN-UBA (1984).
23. G. Lestang-Bremond, M. Quillet y M. Bremond, *Phytochemistry* 26, 1705 (1987).
24. A. I. Usov, S. V. Yarotsky y A. S. Shashkov, *Biopolymers* 19, 977 (1980).
25. C. Rochas, M. Rinaudo y M. Vincendon, *Int. J. Biol. Macromol.* 5, 111 (1983).
26. C. Bellion, G. Brigand, J-C Prome, D. Welti y S. Bociek, *Carbohydr. Res.* 119, 31 (1983).
27. C. A. Stortz y A. S. Cerezo, *Carbohydr. Pol.* 18, 237 (1992).
28. C. A. Stortz, R. Cherniak, B. Bacon y A. S. Cerezo, *Carbohydr. Res.* 261, 317 (1994).
29. I. J. Miller, H. Wong y R. H. Newman, *Austr. J. Chem.* 35, 853 (1982).
30. C. W. Greer, C. Rochas y W. Yaphe, *Bot. Mar.* 28, 9 (1985).
31. D. Welti, *J. Chem. Soc. (S)* 312, (M) 3566 (1977).
32. S. H. Knutsen, D. E. Myslabodski y H. Grasdalen, *Carbohydr. Res.* 206, 367 (1990).
33. R. Ruiz Contreras, J. P. Kamerling, J. Breg y J. F. G. Vliegenhart, *Carbohydr. Res.* 179, 411 (1988).

CAPITULO 2

TRATAMIENTO ALCALINO

a) Reacción de ciclación en medio alcalino

En la mezcla de azúcares metilados obtenidos por hidrólisis de los polisacáridos 1C₁, 1C₂ y 1C₃, permetilados no se detectó 2,3-di-O-metilgalactosa y se encontraron muy pequeñas cantidades de 3-O-metilgalactosa. Este resultado contradecía los datos obtenidos a partir del análisis de estos polisacáridos y de los espectros de r.m.n.-¹³C y r.m.n.-¹H (ver Cap. 1).

Por otra parte, Noseda y Cerezo¹ detectaron cantidades apreciables de 3-O-metilgalactosa por metilación de un carragenano de tipo lambda extraído de tetraesporofitos de *Gigartina skottsbergii*.

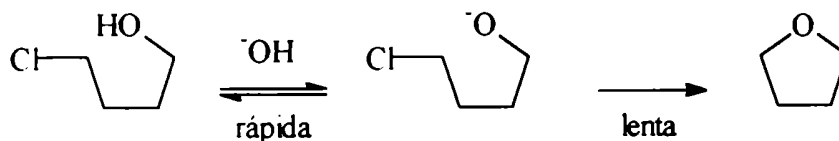
Estos resultados indicaron que en el medio fuertemente alcalino en el que se llevó a cabo la metilación de los carragenanos 1C₁, 1C₂ y 1C₃ por el método de Haworth², se produjo la ciclación de las unidades de α -galactosa 6-sulfato y 2,6-disulfato para dar 3,6-anhidro- α -galactosa y 3,6-anhidro- α -galactosa 2-sulfato, respectivamente. En estas condiciones, la reacción de ciclación se encuentra favorecida frente a la metilación, mientras que no ocurre lo mismo con los carragenanos de la familia lambda¹.

Estos hechos indicaron que debía existir una diferencia en la velocidad de la reacción de ciclación en medio alcalino para los carragenanos de ambas familias.

A pesar del gran interés que presenta esta reacción tanto desde el punto de vista comercial como académico (ver Primera Parte, Cap. 5), la cinética de la misma no había sido estudiada hasta el momento.

Esta reacción se produce por un mecanismo de sustitución nucleofílica bimolecular (S_N2) intramolecular, probablemente similar al de la hidrólisis de halohidrinas en medio alcalino^{3,4}. Para estos compuestos se ha probado que la reacción ocurre en dos etapas: 1) una reacción de equilibrio, donde se produce la ionización del grupo hidroxilo, esta etapa es rápida y 2) la reacción de sustitución nucleofílica bimolecular intramolecular para dar el éter cíclico. La reacción es de segundo orden: de primer orden respecto de la concentración de la halohidrina y de primer orden respecto a la concentración de álcali. Este mecanismo se ha probado, por ejemplo para el 4-cloro butanol (Figura 1).

Figura 1. Reacción del 4-cloro-butanol en medio alcalino.



Obviamente, en este caso el hidróxido de sodio no actúa como catalizador sino que se consume durante la reacción.

Para la reacción de las unidades de α -galactosa 2,6-disulfato en medio alcalino, se ha sugerido que, además de las unidades de 3,6-anhidrogalactosa 2-sulfato, como reacción lateral se formaría el epóxido por ataque del átomo de oxígeno en C-3 al C-2 con el correspondiente

desplazamiento del grupo sulfato⁵. Sin embargo, hasta el momento no se han obtenido evidencias de que esta reacción ocurra. Este hecho posiblemente se deba a la interacción entre el grupo saliente y la unidad de galactosa vecina, que aumentaría la energía del estado de transición. Esto hace que la reacción no se produzca, como se observó en metil glicósidos con geometría similar⁶ (ver Primera Parte, Cap. 5).

En el laboratorio la reacción se llevó a cabo por el método de Rees^{5,7}. Smidsrod y col.⁸ midieron el contenido de 3,6-anhidrogalactosa en función del tiempo en soluciones alcalinas de carragenanos extraídos de varias algas pertenecientes a la familia Gigartinaceae. De este modo, encontraron que, en todos los casos, si se realizaba la reacción a 100°C en hidróxido de potasio 1 M, después de una hora de reacción, el porcentaje de 3,6-anhidrogalactosa había llegado a un máximo valor y, a partir de allí, se mantenía constante.

Con estos antecedentes se comenzó el estudio de la reacción para 1C₁, 1C₂ y 1C₃. Durante la misma, se extrajeron alícuotas a distintos tiempos sobre las que se realizó el ensayo del resorcinol-ácido clorhídrico por el método de Yaphe⁹. No se utilizó el método de Yaphe y Arsenault¹⁰, ya que se obtenía una coloración parda en lugar de la coloración fucsia esperada. La Tabla 1 indica los valores de absorbancia a distintos tiempos de reacción. La pequeña cantidad de unidades de α -galactosa 6-sulfato presente en 1C₁ y 1C₂ impidió el análisis de la cinética de la reacción

para estos carragenanos.

Tabla 1. Variación de la absorbancia en función del tiempo durante el tratamiento alcalino.

Tiempo min	1C ₁ a 80°C	1C ₂ a 60°C	1C ₃ a 80°C
0	0,51	0,46	0,30
2	0,54	0,48	0,35
4	0,54	0,52	0,38
6	0,52	0,48	0,42
8	0,55	0,50	0,48
10	0,54	0,56	0,52
20	0,55	0,55	0,50
120	0,54	0,55	0,53

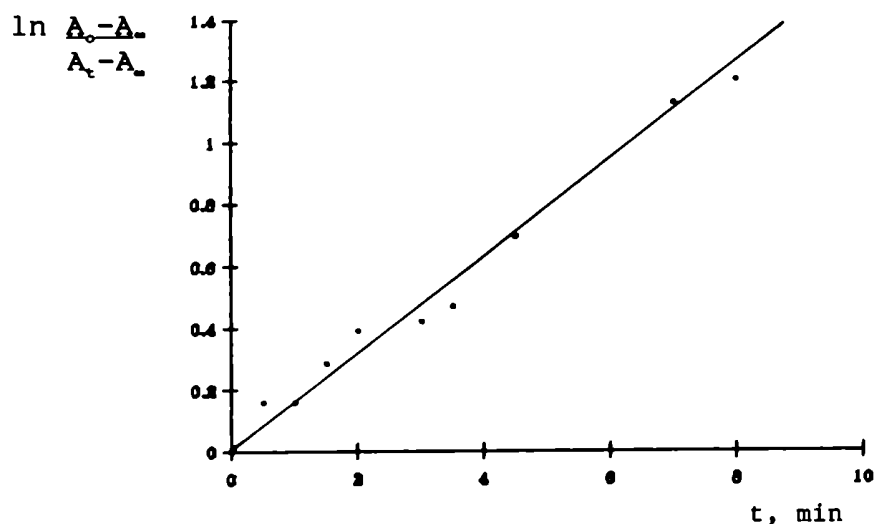
1C₃ presenta una cantidad apreciable de unidades de α -galactosa 6-sulfato y 2,6-disulfato, con predominio de estas últimas (ver Cap. 1); por este motivo, se decidió estudiar la cinética de la reacción para este carragenano⁹. La diferencia entre la absorbancia a tiempo infinito de reacción (A_{∞}) y la absorbancia inicial (A_0) indica la concentración inicial de unidades reaccionantes (unidades de α -galactosa 6-sulfato + α -galactosa 2,6-disulfato) y la diferencia entre la absorbancia a tiempo infinito y la absorbancia a tiempo t (A_t) indica la concentración de unidades que a tiempo t aún no han reaccionado (Tabla 1). Entonces,

$$\ln[(A_0 - A_{\infty}) / (A_t - A_{\infty})] = kt$$

⁹Los datos de absorbancia en función del tiempo para la reacción en las diferentes condiciones empleadas se indican en el Apéndice.

El gráfico de $\ln[(A_0 - A_\infty)/(A_t - A_\infty)]$ en función del tiempo dió una recta que pasa por el origen, cuya pendiente (k) representa la constante de velocidad de pseudo primer orden (ver más adelante) de la reacción (Figura 2).

Figura 2. Gráfico de $\ln[(A_0 - A_\infty)/(A_t - A_\infty)]$ en función del tiempo para $1C_3$ a $80^\circ C$.



La Tabla 2 muestra los valores obtenidos para distintas temperaturas de reacción.

Tabla 2. Variación de la constante de pseudo primer orden en función de la temperatura en hidróxido de sodio 1 M.

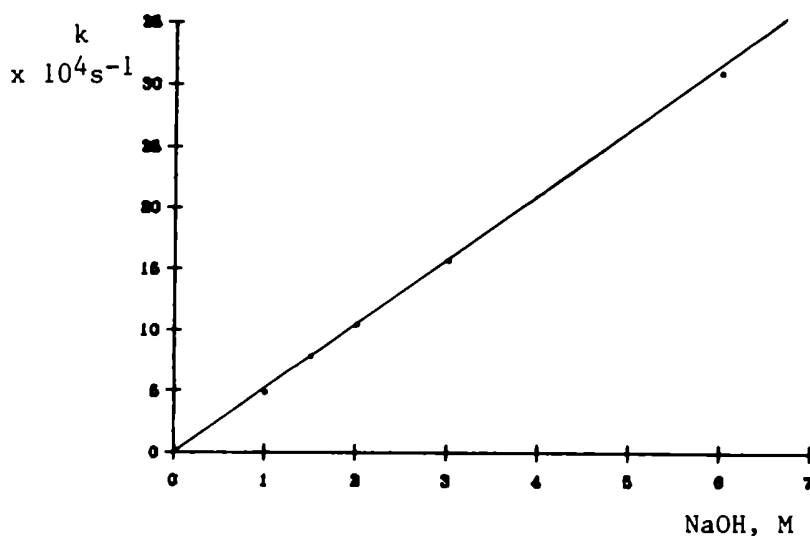
Temperatura °C	k $\times 10^4 \text{ s}^{-1}$
35	0,46
50	2,3
60	4,8
70	13,0
80	26
90	59

A continuación, se determinó la variación de la constante de velocidad de primer orden con la concentración de álcali a una dada temperatura (60°C). Los resultados (Tabla 3) indicaron un aumento lineal de la constante de velocidad de la reacción de pseudo primer orden (ver más adelante) con la concentración de hidróxido de sodio (Figura 3).

Tabla 3. Variación de la constante de pseudo primer orden en función de la concentración de hidróxido de sodio a 60°C.

NaOH M	k $\times 10^4 \text{ s}^{-1}$
1,0	4,8
1,5	7,8
2,0	10,4
3,0	15,7
4,0	26
6,0	31

Figura 3. Variación de la constante de pseudo primer orden con la concentración de álcali.



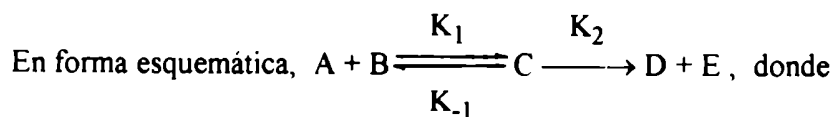
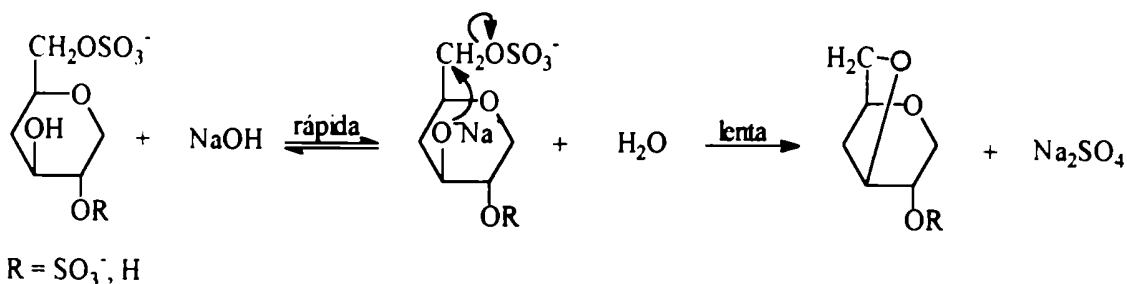
Estos resultados indican que la reacción es de segundo orden, de primer orden respecto a la concentración de unidades de α -galactosa 6-sulfato y 2,6-disulfato y de primer orden respecto a la concentración de base. Entonces, el hidróxido de sodio es uno de los reactivos (como sucede en la reacción de ciclación de halohidrinás^{3,4}) y no un catalizador como propuso Percival¹¹ (ver Primera Parte, Cap.5). Como la concentración de hidroxido de sodio es por lo menos mil veces mayor que la de las unidades reaccionantes, se puede considerar que la misma se mantiene constante durante toda la reacción. Este tipo de reacciones se conoce como de pseudo primer orden y las constantes que se informaron en las Tablas 2 y 3 son las constantes de pseudo primer orden de la reacción. La pendiente del gráfico de la Figura 3 da la verdadera constante de segundo orden para la reacción a esa temperatura ($k_2=5,2 \times 10^{-4} \text{ l mol}^{-1}\text{s}^{-1}$).

Si se dividen los valores de las constantes de velocidad de pseudo primer orden (k) a cada temperatura (Tabla 2) por la concentración de álcali, se obtiene la constante de velocidad de segundo orden para la reacción a esa temperatura, aunque con mayor error que en el valor calculado a partir de los resultados para distintas concentraciones de hidróxido de sodio (ver Tabla 3, Figura 3). La Tabla 4 muestra los valores de la constante de velocidad de segundo orden y los tiempos de vida media para las distintas temperaturas. En este caso, como la concentración de hidróxido de sodio es 1 M, se obtiene el mismo valor numérico para k y k_2 .

Tabla 4. Constante de velocidad de segundo orden y tiempos de vida media para la reacción en hidróxido de sodio 1 M a distintas temperaturas.

Temperatura °C	k_2 $\times 10^4 \text{ l s}^{-1} \text{ mol}^{-1}$	$t_{1/2}$ min
35	0,46	250
50	2,3	50
60	4,8	24
70	13,0	9,0
80	26	4,5
90	59	2,0

Como no se realizó un estudio mecanístico de la reacción, no se puede saber si ésta ocurre en forma concertada o en dos etapas (como en la ciclación de halohidrinás) pero, si suponemos que lo que sucede es esto último, los resultados obtenidos pueden racionalizarse de la siguiente forma:



A = α -Gal 6S + α -Gal 2,6S, B = NaOH, C = unidades de A polarizadas o ionizadas, D = α -3,6-AnGal + α -3,6-AnGal 2S y E = Na₂SO₄.

$$-\frac{d(A)}{dt} = K_1(A)(B) - K_{-1}(C) \quad 1$$

En el estado estacionario,

$$\frac{d(C)}{dt} = K_1(A)(B) - K_{-1}(C) - K_2(C) = 0 \Rightarrow (C) = \frac{K_1(A)(B)}{K_{-1} + K_2}$$

$$\text{Reemplazando en 1, } -\frac{d(A)}{dt} = \underbrace{\frac{K_1 K_2}{K_{-1} + K_2}}_{\text{constante de segundo orden (k}_2\text{)}} (A)(B),$$

Como (B) se puede considerar constante, $k = \frac{K_1 K_2}{K_{-1} + K_2} (B)$ constante de pseudo primer orden

$$\text{Entonces, } -\frac{d(A)}{dt} = kt, \text{ integrando, } \ln \frac{(A)_t}{(A)_0} = -kt$$

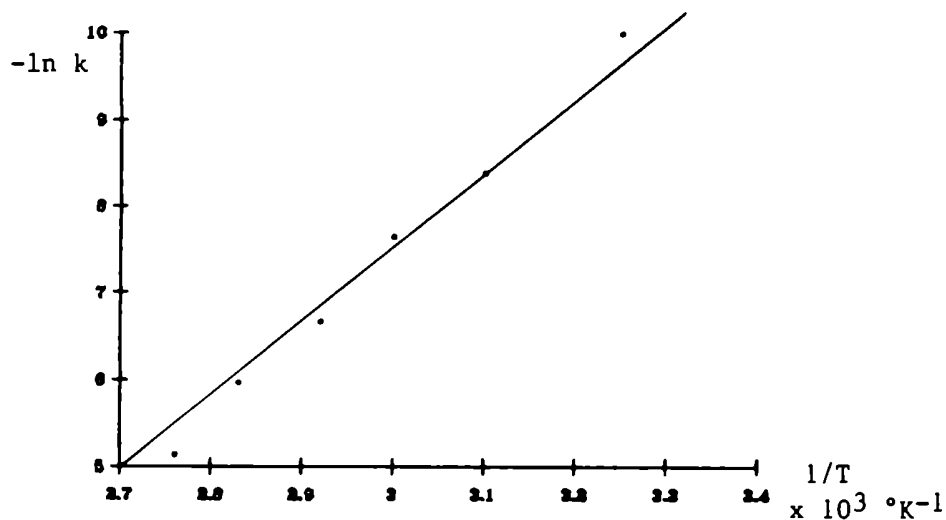
$$\text{Si } (A)_t = (A)_0/2, \text{ entonces, } t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k}$$

La ecuación de Arrhenius describe la variación de la constante de velocidad de la reacción con la temperatura: $k = Ae^{-E_a/RT}$ o $\ln k = \ln A - E_a/RT$, donde k es la constante de velocidad de la reacción, E_a la energía de activación, T la temperatura absoluta, R la constante universal de los gases y A el factor pre-exponencial. La energía de activación de la reacción es independiente de la temperatura en un rango determinado de temperatura; luego, del gráfico de $\ln k$ versus $1/T$ puede determinarse E_a y A^{12} (Tabla 5, Figura 4).

Tabla 5. Valores de $\ln k$ y $1/T$ utilizados en la determinación de E_a y A .

Temperatura °C	$1/T$ $\times 10^3 \text{ } ^\circ\text{K}^{-1}$	$-\ln k$
35	3,25	9,99
50	3,10	8,38
60	3,00	7,64
70	2,92	6,65
80	2,83	5,95
90	2,76	5,13

Figura 4. Gráfico de $-\ln k$ en función de la inversa de la temperatura absoluta.



Los resultados obtenidos fueron $A=2,8 \times 10^9 \text{ l s}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ y $E_a= 81 \text{ kJ/mol}$; estos valores son importantes, no sólo porque a partir de ellos puede estimarse la constante de velocidad a una temperatura a partir de resultados obtenidos a otra temperatura, sino que además permite el cálculo de los parámetros de activación de la reacción (ΔG^{**} , ΔH^{**} y ΔS^{**}). Estos parámetros se calcularon para la reacción a 60° . Si

bien los mismos dependen de la temperatura, como la variación es muy pequeña en el rango de temperatura estudiado, ésta cae dentro del error experimental, con lo que estos parámetros pueden considerarse constantes en ese rango de temperatura.

La energía molar standard de activación, ΔG° , puede calcularse según la ecuación: $\Delta G^{\circ} = -RT \ln(k_2 h / k_b T)$, donde h es la constante de Planck y k_b la constante de Boltzmann. Análogamente, la entalpía molar standard, ΔH° , es $\Delta H^{\circ} = E_a - RT$ y la entropía molar standard, ΔS° , es $\Delta S^{\circ} = R \ln(Ah / k_b T e)^{12}$.

Los valores obtenidos fueron los siguientes: $\Delta G^{\circ} = 103$ kJ/mol, $\Delta H^{\circ} = 78$ kJ/mol y $\Delta S^{\circ} = -73$ J/°K mol.

Estos parámetros son importantes porque están relacionados con el mecanismo de la reacción, pero son útiles principalmente cuando pueden compararse con los de reacciones similares que se han estudiado previamente. Para otras reacciones de ciclación que transcurren por un mecanismo S_N2 se ha demostrado que la tensión en el anillo formado es el factor más importante que contribuye al valor de ΔH° ¹³.

Respecto a los valores de ΔS° , la teoría de Ruzicka¹⁴ sostiene que cuanto más larga sea la cadena que une los dos extremos del precursor bifuncional, menor es la probabilidad de que el anillo se cierre, con lo que ΔS° se hace más negativo. Sin embargo, en este caso como el nucleófilo y el sustrato se encuentran en un ciclo, el valor de ΔS° probablemente dependa de la capacidad de la unidad reaccionante de adquirir la conformación adecuada.

Otro factor que contribuye al valor de ΔS° es el hecho

que la reacción sucede sobre unidades que se encuentran enlazadas formando un polímero; entonces, un cambio de conformación en la unidad reaccionante lleva a un cambio conformacional en toda la molécula. Para poder evaluar este factor sería necesario llevar a cabo la reacción sobre una unidad aislada. Un compuesto modelo adecuado sería el metil α -D-galactopiranosido 2,6-disulfato, que también daría una idea de la influencia de las unidades vecinas en el polisacárido sobre la velocidad de la reacción. Por el momento no se cuenta con este compuesto modelo que no es comercial; en el futuro se espera realizar la síntesis del mismo.

La Tabla 6 muestra la influencia de la fuerza iónica sobre la velocidad de la reacción a 80°C. Los resultados indicaron que un aumento en la fuerza iónica incrementa la constante de velocidad de pseudo primer orden en un valor intermedio respecto al que se obtiene cuando este mismo aumento se produce por un incremento en la concentración de álcali.

Tabla 6. Influencia de la fuerza iónica sobre la velocidad de la reacción a 80°C.

I	k x 10 ⁴ s ⁻¹	k ₂ x 10 ⁴ l s ⁻¹ mol ⁻¹	t _{1/2} min
0,5 (0,5 M NaOH)	8,3	16,6	14,0
1,0 (0,5 M NaOH, 0,17 M Na ₂ SO ₄)	13,8	28	8,4
1,0 (1,0 M NaOH)	26	26	4,5

Dividiendo los valores de las constantes obtenidas por la concentración de hidróxido de sodio se obtiene el valor

de la verdadera constante de la reacción segundo orden. Es de destacar que para un valor de fuerza iónica determinado, la constante de velocidad resultó aproximadamente la misma (dentro del error experimental), e independiente de la concentración de álcali. Es decir que k_2 depende no sólo de la temperatura, sino también de la fuerza iónica del medio. Es decir que si se disminuye la concentración de álcali pero se mantiene la fuerza iónica en un valor determinado, la constante de velocidad será la misma. Esto se cumplirá mientras la concentración de hidróxido de sodio sea mucho mayor que la de las unidades de α -galactosa 6-sulfato (condiciones de pseudo primer orden).

Se realizó la reacción de ciclación en condiciones de metilación (solución al 1,2 % del carragenano en NaOH 7,5 M a 0°). La constante de pseudo primer orden para la reacción en estas condiciones resultó $k = 5,6 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ y el tiempo de vida media de 3,4 horas. Estos resultados explican perfectamente los datos obtenidos por metilación por el método de Haworth².

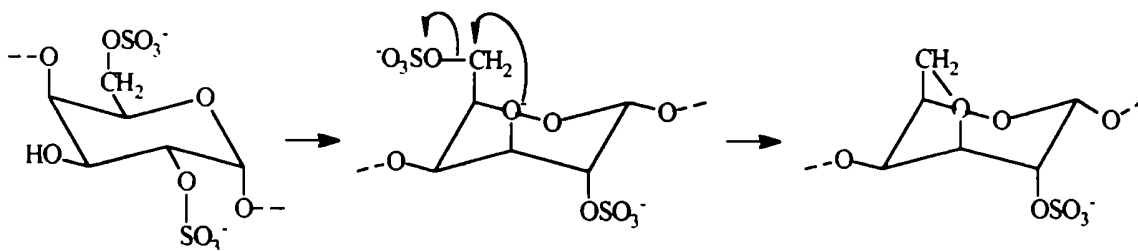
Los resultados sugieren que la reacción de ciclación de las unidades de α -galactosa 2,6-disulfato a los correspondientes residuos de 3,6-anhidrogalactosa 2-sulfato en los carragenanos de la familia kappa involucra los siguientes pasos consecutivos:

- 1) La polarización o ionización de los grupos hidroxilo en la molécula, entre ellos, el que se encuentra en C-3 de la unidad α , lo que produce la repulsión entre el oxígeno

- en C-3 y el grupo sulfato en C-2 de la misma unidad, ambos ecuatoriales, y, en consecuencia, la desestabilización de la conformación 4C_1 (en la que se encuentra esta unidad).
- 2) El cambio de la conformación 4C_1 a la 1C_4 . De este modo, los grupos en C-2 y C-3 quedan lo más alejados posible. En este ordenamiento, el oxígeno en C-3 y el grupo sulfato en C-6 se encuentran en posiciones cis diaxiales.
 - 3) La reacción S_N2 intramolecular, con formación del anillo de 3,6-anhidro y el concomitante desplazamiento del grupo sulfato en C-6.
 - 4) Finalmente, el reacomodamiento de la conformación de la molécula como un todo.

De este modo, la fuerza desencadenante de la reacción sería la polarización o ionización del grupo hidroxilo en C-3 (Figura 5).

Figura 5. Reacción de ciclación de las unidades de galactosa 2,6-disulfato de los carragenanos en medio alcalino.



El estudio estructural de 1C_3 (ver Cap. 1) indicó que, además de las unidades de α -galactosa 2,6-disulfato, se

encuentran presentes en este polisacárido unidades de α -galactosa 6-sulfato, aunque en menor proporción. Para estas unidades, la reacción sucedería en forma similar a la que se describió para las unidades de α -galactosa 2,6-disulfato. En los gráficos de $\ln[(A_0 - A_\infty)/(A_t - A_\infty)]$ en función del tiempo se observó una sólo recta. Estos resultados pueden deberse a: 1) velocidades de reacción similares para las unidades de α -galactosa 6-sulfato y 2,6-disulfato; esto se explicaría por un balance de efectos opuestos en éstas últimas (la repulsión entre el oxígeno en C-3 y el grupo sulfato en C-2 de la unidad de α -galactosa 2,6-disulfato favorecerían el cambio de conformación, pero este nuevo arreglo colocaría al grupo sulfato en posición axial) o bien, 2) simplemente, la cantidad de unidades de α -galactosa 6-sulfato es demasiado pequeña como para que sea posible detectar diferencias en la constante de velocidad de la reacción.

Muchos investigadores realizan en el laboratorio la extracción de los carragenanos en medio alcalino suave a altas temperaturas¹⁵. Nuestros resultados indican que, aún llevando a cabo la extracción a bajas temperaturas, los productos aislados podrían no ser iguales a los que se encuentran en la planta. Estos resultados deberían tenerse muy en cuenta, principalmente cuando se intenta sacar conclusiones sobre la biosíntesis de estos productos a partir de estudios estructurales.

En nuestro laboratorio se ha estudiado la reacción de ciclación para los carragenanos lambda¹⁶.

Los carragenanos de las familias kappa y lambda difieren principalmente en la distribución de los grupos sulfato; los carragenanos lambda llevan sulfato en C-2 de las unidades β , mientras que los carragenanos kappa se encuentran sulfatados en C-4 de esa unidad (ver Primera Parte, Cap. 1 a)).

Los resultados obtenidos indicaron que la reacción para estos polisacáridos es 20-60 veces más lenta que para los carragenanos de la familia kappa. En los carragenanos lambda el agrupamiento de los grupos sulfato alrededor del hidroxilo en C-3 de la unidad α posiblemente dificulte la ionización del mismo reduciendo, así, la velocidad de la reacción.

Además, para el carragenano 1T₂ (de tipo lambda¹⁷) se determinó que la constante de velocidad de segundo orden aumentaba de $1,4 \times 10^{-5} \text{ l mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ en NaOH 1M hasta $3,7 \times 10^{-5} \text{ l mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ en NaOH 4M y luego se mantenía constante¹³. Esta variación se debería a la interacción entre el grupo sulfato en C-2 de la unidad β y el hidroxilo en C-3 de la unidad α (Figura 6). El estudio de modelos moleculares sugirió que la geometría era adecuada para este tipo de interacciones.

En un trabajo sobre la oxidación con periodato de glicanos de la familia de las heparinas, Fransson y col.¹⁸ observaron que ciertas unidades de ácido glucurónico eran resistentes a la oxidación. Estas unidades se hallaban enlazadas por la posición 4 a residuos de α -glucosamina 2-sulfato. Los autores sugirieron que el grupo sulfamido podría estar involucrado en una interacción de tipo puente de hidrógeno con el hidroxilo de la unidad de ácido

glucurónico vecina (Figura 7).

Figura 6. Interacción entre el hidroxilo en en C-3 de la unidad α y el grupo sulfato en C-2 de la unidad β .

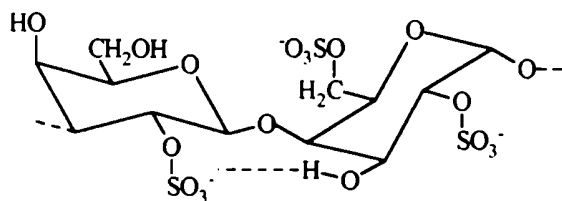
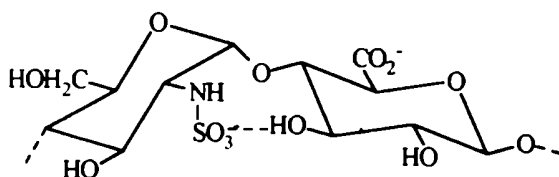


Figura 7. Interacción observada en heparinas.



Una interacción de este tipo (si bien es difícil suponer puentes de hidrógeno debido al alto pH del medio) explicaría por qué la constante de velocidad de la reacción de segundo orden aumenta para la reacción de los carragenanos lambda hasta un cierto valor con la concentración de álcali y luego se mantiene constante (a una dada concentración de álcali esta interacción no se podría mantener).

A pesar que ambas fases nucleares de algas pertenecientes a la familia Gigartinaceae contienen la sulfhidrolasa que convierte las unidades de α -galactosa 6-

sulfato y 2,6-disulfato en los correspondientes residuos de 3,6-anhidrogalactosa, los carragenanos lambda inhiben la actividad de la enzima, lo que sugiere que el grupo sulfato en C-2 de la unidad β es responsable de este efecto¹⁹ (ver Primera Parte, Cap. 1 d)). Suponiendo que la secuencia de pasos de la ciclación *in vivo* sean similares a los de la ciclación en medio alcalino, el agrupamiento de los grupos sulfato alrededor del hidroxilo en C-3 de la unidad α y la interacción del mismo con el grupo sulfato en C-2 de la unidad β vecina (que se mencionaron arriba) explicaría la ausencia en la naturaleza de derivados ciclados de los carragenanos lambda.

La Tabla 7 indica los valores de los parámetros de activación obtenidos para dos carragenanos lambda extraídos de tetraesporofitos de *Gigartina skottsbergii* (M. D. Nosedá, comunicación personal).

Tabla 7. Parámetros de activación para el tratamiento alcalino de carragenanos lambda.

Carragenano	$\Delta G^{\circ\ddagger}$ kJ/mol	$\Delta H^{\circ\ddagger}$ kJ/mol	$\Delta S^{\circ\ddagger}$ J/°K mol
1T ₁	113	91	-64
1T ₂	114	79	-104

Comparando estos resultados con los obtenidos para 1C₃, se puede ver que $\Delta G^{\circ\ddagger}$ es 10 kJ/mol mayor para los carragenanos lambda que para 1C₃, lo que refleja la diferencia de velocidad de la reacción para ambos tipos de carragenanos. Respecto a los valores de $\Delta H^{\circ\ddagger}$ y $\Delta S^{\circ\ddagger}$, hasta el momento no ha sido posible interpretar las diferencias observadas. El mecanismo de reacción para ambos carragenanos

debe ser el mismo; estas diferencias se pueden atribuir a las diferencias estructurales en las unidades vecinas a las reaccionantes.

La facilidad con que tiene lugar la reacción de ciclación para los carragenanos de la familia kappa indica que los tratamientos alcalinos que se usan industrialmente para aumentar la capacidad gelificante de los carragenanos crudos²⁰ podría llevarse a cabo bajo condiciones más suaves. De este modo, se podría disminuir la degradación de los mismos, logrando así un producto con mayor fuerza de gel y, por lo tanto, mejor calidad. Respecto a los tiempos de reacción, sólo sería necesario continuar la reacción hasta que todas las unidades de α -galactosa 6-sulfato y 2,6-disulfato de los carragenanos de la familia kappa hayan reaccionado, dado que no es necesario lograr la ciclación completa de estas unidades en los carragenanos lambda, pues esto no mejora el poder gelificante de la mezcla.

Estos resultados son particularmente importantes para nuestro país, pues en el litoral patagónico las algas productoras de carragenanos explotables industrialmente contienen $\approx 50\%$ de unidades α sin ciclar (ver Cap. 1 y Ref. 21).

Una forma de determinar para una dada muestra de algas las condiciones más adecuadas para llevar a cabo la reacción sería seguirla en forma similar a la descrita para los estudios cinéticos. De este modo, sería posible evaluar las condiciones y determinar el tiempo de reacción necesario.

Como primer paso se realizó la reacción de ciclación a

60°C en hidróxido de sodio 1 M para una mezcla de 1C₃ y 1T¹⁷ en relación 1:1. Como se puede ver en la Figura 8, en los primeros minutos de reacción la pendiente de la curva es mayor. Despreciando los puntos intermedios se calcularon las constantes de velocidad de la reacción según las dos rectas obtenidas.

Se repitió este procedimiento en condiciones similares pero con una mezcla de 1C₃ y 1T pero en relación 70:30, que es más representativa de lo que se suele encontrar en muestras naturales de *Gigartina skottsbergii* recogidas de arribazones (mezcla de gametofitos y tetraesporofitos) (M. L. Piriz, comunicación personal) (Figura 8). Los resultados obtenidos se encuentran en la Tabla 8, donde se han incluido los valores de las constantes de velocidad para los carragenanos 1C₃ y 1T₂^{16,17} en forma separada en las mismas condiciones^h. Los valores de k_c son mucho menores que lo esperado, principalmente para la mezcla en relación 1:1; en cambio, para k_r son más cercanos a los obtenidos para un carragenano lambda puro. Hasta el momento no se sabe a qué se debe la diferencia en el comportamiento de los carragenanos de la familia kappa cuando se encuentran aislados o en una mezcla.

A continuación se llevó a cabo la reacción para carragenanos de *Gigartina skottsbergii* extraídos de algas que no habían sido separadas según su fase sexual²². Los

^hEn estos estudios se utilizó 1T por no contar con el carragenano 1T₂, para el que se habían realizado los estudios cinéticos. De todos modos, 1T₂ es el principal constituyente de 1T y es de esperar que ambos se comporten en forma similar en este caso.

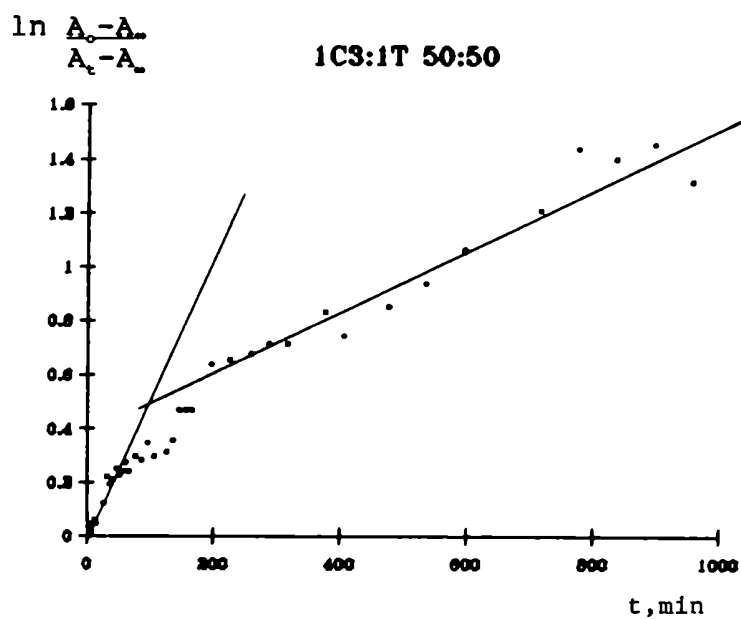
resultados se muestran en la Figura 8. En este caso también se distinguen las dos reacciones en forma separada.

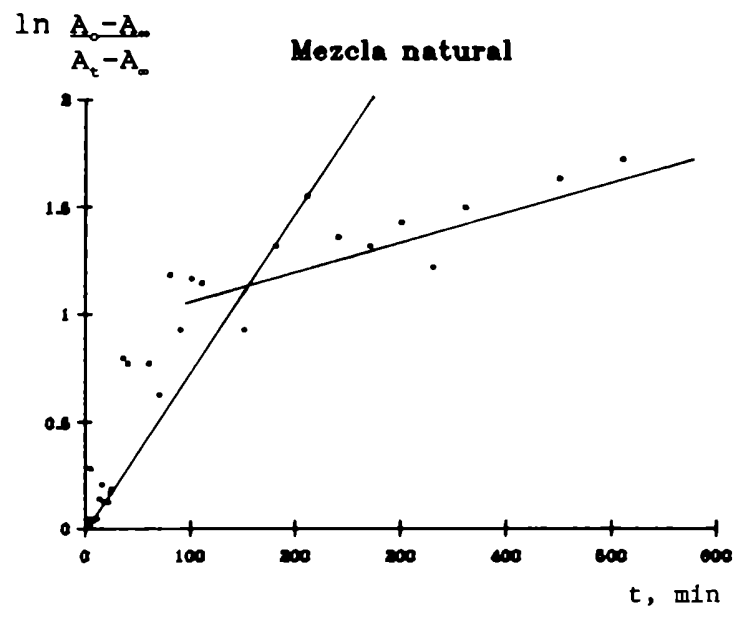
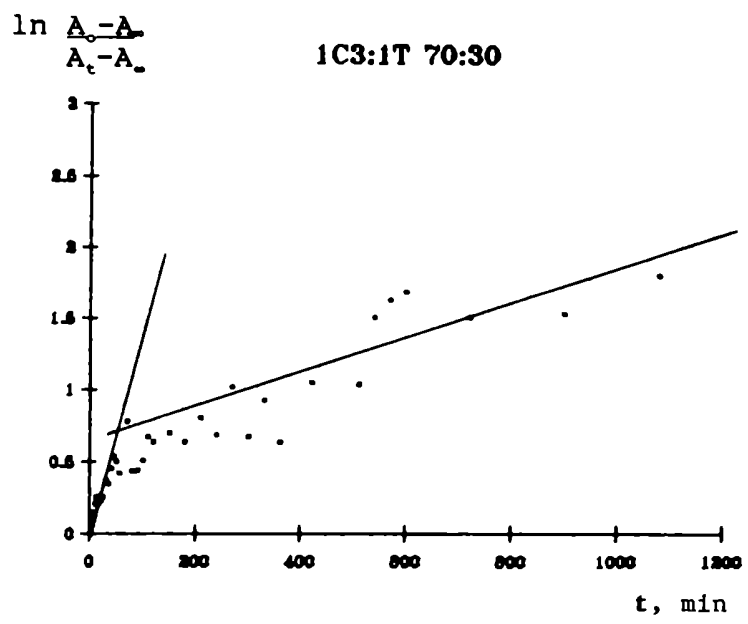
Tabla 8. Velocidad de la reacción de ciclación para mezclas de carragenanos.

Muestra	k_C^a $\times 10^4 \text{ s}^{-1}$	k_T $\times 10^4 \text{ s}^{-1}$
1C ₃	4,8	-
1T ₂	-	0,14
1C ₃ + 1T (1:1)	0,89	0,20
1C ₃ + 1T (70:30)	2,8	0,19
Mezcla natural	1,1	0,17

^aA la pendiente obtenida en la primera etapa se le restó la de la segunda y, así, se calculó la constante para los carragenanos de la familia kappa en mezclas.

Figura 8. Tratamiento alcalino de mezclas de carragenanos.





En base a este tipo de gráficos podría evaluarse la forma más adecuada para realizar la reacción. Por ejemplo, en este caso sería necesario continuar el calentamiento durante ≈ 100 minutos para lograr la ciclación de las unidades de α -galactosa 6-sulfato y 2,6-disulfato de los carragenanos kappa. Un aumento adicional en el porcentaje de 3,6-anhidrogalactosa de la muestra no incrementará la capacidad gelificante de la misma, sino que ésta podría disminuir por degradación.

Este método podría ser aplicado industrialmente; de hecho los resultados presentados arriba se encuentran en trámite de patentamiento.

b) Tratamiento alcalino preparativo. Estudio estructural de las fracciones modificadas.

Antes del descubrimiento que en las algas pertenecientes a la familia Gigartinaceae los carragenanos producidos por plantas cistocárpicas y tetraesporicas eran diferentes^{23,24}, estos polisacáridos se estudiaban sin tener en cuenta la fase sexual de los ejemplares de los que se extraían. De este modo, el fraccionamiento de la mezcla de carragenanos daba lugar a una fracción soluble en cloruro de potasio 2,00 M, que era una mezcla de carragenanos mu/nu y lambda, imposibles de separar en su estado nativo. Para estudiar estos productos, era necesario someterlos previamente a un tratamiento alcalino. Así, los carragenanos mu/nu se transformaban en kappa/iota, que gelificaban a

bajas concentraciones de cloruro de potasio, mientras que los carragenanos lambda ciclados permanecían solubles. Entonces, por fraccionamiento con cloruro de potasio y posterior estudio estructural de las fracciones modificadas podían inferirse las estructuras de los productos de partida²⁵.

Hoy en día no es necesario recurrir a esta metodología para estudiar separadamente la estructura de los carragenanos de las familias kappa y lambda. Las investigaciones realizadas en los últimos años indicaron que los carragenanos extraídos de gametofitos son mayoritariamente de la familia kappa, mientras que los tetraesporofitos producen carragenanos lambda (ver Primera Parte, Cap. 1 c)). Luego, la estructura de estos polisacáridos puede estudiarse en el estado nativo.

Sin embargo, el tratamiento alcalino de carragenanos sigue siendo una herramienta importante en el estudio de la estructura fina de estos polisacáridos. Este método contribuye a la determinación de la homogeneidad de las fracciones estudiadas previamente, pues existe la posibilidad que carragenanos pertenecientes a distintas familias o de la misma familia pero con ciertas variaciones estructurales coprecipiten a una dada concentración de cloruro de potasio. La asociación de estas moléculas diferentes puede dar lugar a la formación de complejos cuya solubilidad sea diferente de la de los productos puros.

Las electroforesis en geles de poliacrilamida de 1C₁, 1C₂ y 1C₃ dieron bandas anchas, sugiriendo la hetero-

dispersión de estas fracciones.

En base a las consideraciones anteriores, se decidió realizar el tratamiento alcalino de estas fracciones y el posterior subfraccionamiento con cloruro de potasio de los productos modificados.

La reacción se llevó a cabo según el método de Rees⁷, ya que los estudios de la misma indicaron que en esas condiciones (NaOH 1N, 1 hora 20 minutos a 80°) la reacción se había completado.

Los rendimientos y análisis de las fracciones tratadas se muestran en la Tabla 9.

Durante la reacción podría producirse cierto grado de degradación; por otra parte, fragmentos de peso molecular bajo, que se hallaban agregados en el carragenano de partida después del tratamiento alcalino se pudieron haber desagregado. Sin embargo, los rendimientos obtenidos fueron buenos y del orden de los informados para el tratamiento alcalino de otros carragenanos²⁶.

Tabla 9. Rendimiento, análisis y rotación óptica de 1C₁T, 1C₂T y 1C₃T.

Fracción	Rendimiento ^a %	Gal:3,6-AnGal:sulfato relación molar	[α] _D °
1C ₁ T	92,8	1,00:0,72:1,36	+ 53,2
1C ₂ T	86,8	1,00:0,68:1,38	+ 53,6
1C ₃ T	94,6	1,00:0,62:1,12	+ 48,3

^aRendimiento considerando la pérdida de sulfato que se produce durante la reacción.

Para dializar las fracciones modificadas se usaron tubos de diálisis de corte de peso molecular 6.000-8.000, calibrados en base a proteínas globulares. Se ha determinado

para oligosacáridos obtenidos por degradación enzimática de los carragenanos que el corte efectivo para tubos de diálisis de corte de peso molecular 1.000 está en el rango del dímero ($PM \approx 3-400$) y para los de 3.500, del tetrámero ($PM \approx 700$)²⁷. No hay información acerca de los tubos de corte de peso molecular 6000-8000, sin embargo, probablemente éste será mucho menor para los carragenanos. Entonces, sólo podrían perderse por diálisis fragmentos pequeños.

El estudio estructural de $1C_1$, $1C_2$ y $1C_3$ indicó que la relación molar Gal:3,6-AnGal para $1C_1T$, $1C_2T$ y $1C_3T$ debería ser cercana a 1:1. Sin embargo, los porcentajes de 3,6-anhidrogalactosa fueron un poco menores. Estos resultados pueden deberse, al menos en parte, a una subestimación del contenido de 3,6-anhidrogalactosa determinado por el método del resorcinol-ácido clorhídrico¹⁰ que ya se había observado para $1C_1$, $1C_2$ y $1C_3$ por comparación con los datos obtenidos a partir de los espectros de resonancia magnética nuclear. Sin embargo, en las fracciones obtenidas a partir de $1C_1T$ y $1C_3T$ la relación Gal:3,6-AnGal fue la esperada.

$1C_1T$ y $1C_2T$ tienen un grado de sulfatación y una rotación óptica similares, en cambio, estos valores son un poco más bajos para $1C_3T$.

Por cromatografía gaseosa y espectrometría de masa de los acetatos de alditoles obtenidos por hidrólisis y posterior derivatización de $1C_1T$, $1C_2T$ y $1C_3T$ se determinó la composición en monosacáridos estables en medio ácido (Tabla 10) que resultó similar para las tres fracciones modificadas. Además de galactosa, contenían pequeños porcentajes de glucosa y cantidades del orden de trazas de

otros azúcares.

Tabla 10. Composición en monosacáridos obtenidos por hidrólisis de las fracciones modificadas^a.

Fracción	Rha	Xil	Man	Gal	Glc
1C ₁ T	tr.	tr.	tr.	97,8	2,2
1C ₂ T	tr.	1,2	tr.	94,4	4,4
1C ₃ T	tr.	tr.	-	98,4	1,6

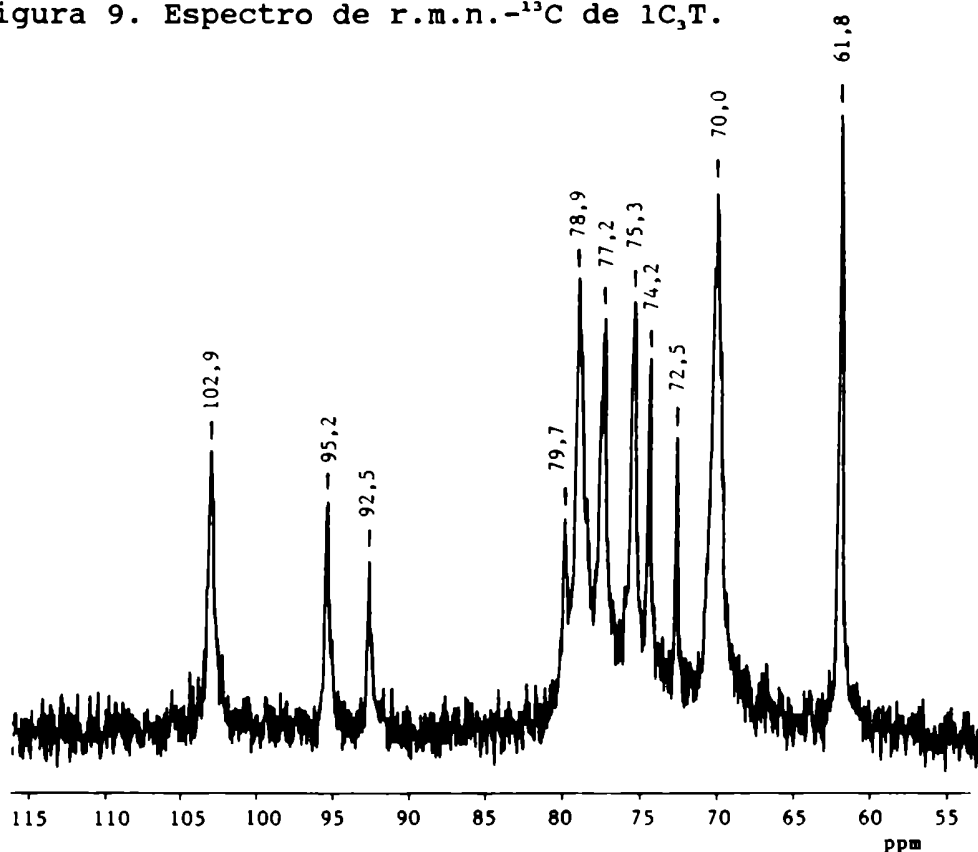
^aDeterminada por derivatización a los correspondientes acetatos de alditoles.

Los espectros infrarrojos de los productos tratados presentan la banda a 930 cm⁻¹, que se atribuye a la presencia de unidades de 3,6-anhidrogalactosa²⁸. En los tres espectros el pico correspondiente a la vibración del enlace O--S en la estructura C--O--S se encuentra a 845 cm⁻¹ y es agudo, esto indica la presencia de grupos sulfato en posición secundaria axial⁵. Una señal muy pequeña a 805 cm⁻¹ muestra que cierta cantidad de unidades de 3,6-anhidro- α -galactosa 2-sulfato también contribuyen a la estructura de estos polisacáridos²⁹.

La Figura 9 muestra el espectro de r.m.n.-¹³C de 50 MHz de 1C₃T realizado a temperatura ambiente. El análisis del mismo indicó la presencia de β -Gal 4S--> α -3,6-AnGal y β -Gal 4S--> α -3,6-AnGal 2S como díadas mayoritarias (Tabla 11). En la región anomérica sólo se distinguen las señales a 102,9, 95,2 y 92,5 ppm. Esto significa que no se encuentran presentes en 1C₃T díadas del tipo β -Gal--> α -Gal, al menos en cantidades suficientes como para ser detectadas en estas condiciones. Una señal pequeña a 66,5 ppm corresponde al C-4 de unidades de β -galactosa, probablemente unidas a 3,6-

anhidrogalactosa 2-sulfato. Las señales de los carbonos anoméricos de estas unidades tienen desplazamientos químicos muy cercanos a los que corresponden a una estructura iota y no se distinguen de los mismos en las condiciones empleadas. La díada β -D-Gal $\rightarrow\alpha$ -D-3,6-AnGal puede descartarse por la ausencia de una señal a 80,9 ppm, correspondiente al C-3 de la unidad β .

Figura 9. Espectro de r.m.n.- ^{13}C de $1\text{C}_3\text{T}$.



Considerando que la cantidad de unidades β es igual a la de unidades α , hasta el límite de detección del método la relación β -Gal (4S): α -3,6-AnGal (2S) resultó 1:1, como era de esperar.

Tabla 11. Asignación del espectro de r.m.n.-¹³C de 1C₃T.

Díada	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6
β-D-Gal 4S enlazada por 3	102,9	70,0	79,1	74,2	75,3	61,8
α-D-3,6-AnGal enlazada por 4	95,2	70,1	79,7	78,8	77,2	70,0
β-D-Gal 4S enlazada por 3	102,8	69,9	77,3	72,5	75,3	61,8
α-D-3,6-AnGal 2S enlazada por 4	92,5	75,4	78,5	78,9	77,4	70,3
β-D-Gal enlazada por 3 ^a	102,8	70,1	79,0	66,5	75,8	61,8
α-D-3,6-AnGal 2S enlazada por 4	92,2	75,8	79,0	78,5	77,6	70,3

^aAsignación tentativa.

La metilación de 1C₃T y las siguientes se realizaron por el método de Stevenson y Furneaux³⁰. El método de Hakomori³¹, no se puede usar para metilar los carragenanos debido a su baja solubilidad en dimetilsulfóxido. Se ha intentado realizar la metilación de los carragenanos previamente acetilados, pero los resultados obtenidos no fueron muy buenos³².

Recientemente, Stevenson y Furneaux³⁰, utilizaron el método de Hakomori, pero el polisacárido se convirtió previamente en la sal de trietilamonio, soluble en DMSO y luego se realizó la metilación con muy buenos resultados. Stortz y Cerezo²¹ optimizaron los tiempos de reacción para carragenanos de distintos tipos.

La Tabla 12 indica la composición en monosacáridos obtenidos por metilación e hidrólisis de 1C₃T y la Tabla 13 muestra la composición en unidades estructurales de este carragenano. 1C₃T (peso molecular 112.000) contiene 90% de estructura kappa/iota, en relación 3,2:1,0. Además, se detectaron 3,8% de unidades de β-Gal sin sulfatar, que

confirmaría la presencia de la díada β -Gal \rightarrow α -3,6-AnGal 2S, 1,3% de unidades de β -Gal 2S que no es característica de los carragenanos extraídos de gametofitos de estas algas (ver más adelante) y trazas de otros azúcares. En el análisis por metilación se determinó que el polisacárido contenía casi 5% de unidades de xilosa; este valor es demasiado alto, si se compara con el porcentaje menor del 1% detectado en 1C₃T antes de metilar.

En general, los resultados obtenidos sobre la estructura de 1C₃T son los que cabía esperar considerando la estructura de 1C₃.

Tabla 12. Composición en azúcares metilados producidos por permetilación e hidrólisis de 1C₃T.

Monosacárido	con grupos metilo en la posición.	moles %
Xilosa	2,3,4	3,7
	2,4	4,7
Galactosa	2,3,4,6	1,1
	2,4,6	7,0
	2,3,6	tr.
	2,6	81,2
	4,6	2,3
	6	tr.
	2	tr.
-	tr.	

Tabla 13. Composición de 1C₃T en unidades estructurales^a.

Porcentaje de unidades con grupos sulfato en las posiciones indicadas									
galactosa enlazada por 3					Gal enl. por 4	3,6-AnGal ^b		Gal T ^c	
-	2	4	2,4	4,6	-	-	2	-	-
3,8	1,3	44,9	tr.	tr.	tr.	38,2	11,8	tr.	tr.

^aTambién se detectaron pequeñas cantidades de 2,3,4-tri-*O*-metil- y 2,4-di-*O*-metil-xilosa. ^bLa relación 3,6-AnGal:3,6-AnGal 2S se estimó a partir de las áreas de las correspondientes señales anómericas en el espectro de r.m.n.-¹³C. ^cGalactosa terminal.

Con el objeto de profundizar el estudio de la estructura de los polisacáridos de partida, se realizó el fraccionamiento de 1C₁T y 1C₃T, por ser los productos mayoritarios. Las Tabla 14 y 15 indican el rendimiento, rango de precipitación y análisis de las fracciones obtenidas a partir de 1C₁T y 1C₃T, respectivamente.

Tabla 14. Rendimiento, rango de precipitación y análisis de las fracciones obtenidas por fraccionamiento de 1C₁T con cloruro de potasio.

Fracción	Rango de precipitación	Rendimiento ^a	Gal:3,6-AnGal:sulfato	[α] _D
	M, KCl	%	relación molar	°
1C ₁ T ₁	0,05-0,10	72,8 (81,7)	1,00:0,95:1,77	+ 54,5
1C ₁ T ₂	0,25-0,29	13,7 (15,4)	1,00:0,72:1,31	+ 67,0
1C ₁ T ₃	2,00 ^b	2,6 (2,9)	1,00:0,43:0,93	+ 7,8

^aEntre paréntesis se indica el porcentaje sobre el total recuperado. ^bSoluble en KCl 2,00 M.

Tabla 15. Rendimiento, rango de precipitación y análisis de las fracciones obtenidas por fraccionamiento de 1C₃T con cloruro de potasio.

Fracción	Rango de precipitación	Rendimiento ^a	Gal:3,6-AnGal:sulfato
	M, KCl	%	relación molar
1C ₃ T ₁	0,08-0,10	34,9 (45,0)	1,00:1,08:1,77
1C ₃ T ₂	0,10-0,13	21,8 (28,1)	1,00:1,11:1,72
1C ₃ T ₃	0,15-0,20	11,3 (14,6)	1,00:0,96:1,76
1C ₃ T ₄	0,20-0,40	2,0 (2,5)	1,00:1,05:1,77
1C ₃ T ₅	0,80-0,90	1,0 (1,3)	1,00:0,97:1,74
1C ₃ T ₆	0,90-2,00 ^b	0,5 (0,6)	1,00:0,60:1,57
1C ₃ T ₇	2,00 ^c	6,1 (7,8)	1,00:0,47:1,31

^aEntre paréntesis se indica el porcentaje sobre el total recuperado. ^bPrecipitación difusa.

^cSoluble en KCl 2,00 M.

1C₁T contiene 97% de carragenanos gelificantes, 1C₁T₁ (81,7%) y 1C₁T₂ (15,4%) y una pequeña cantidad de un carragenano soluble en cloruro de potasio 2,00 M, 1C₁T₃ (2,9%).

1C₃T contiene 90% de carragenanos gelificantes, 1C₃T₁ (45,0%), 1C₃T₂ (28,1%), 1C₃T₃ (14,6%) y 1C₃T₄ (2,5%); una pequeña cantidad de productos intermedios, 1C₃T₅ (1,3%) y 1C₃T₆ (0,6%) y un carragenano soluble (1C₃T₇, 7,8%).

Las electroforesis en geles de poliacrilamida de los productos tratados, así como los de las fracciones obtenidas a partir de 1C₃T dieron bandas anchas.

Los espectros infrarrojos de las subfracciones son muy similares a los de los productos no fraccionados y no aportan información adicional.

El carragenano 1C₁ precipitó en un rango estrecho de concentración de cloruro de potasio (0,30-0,31 M), sin embargo, el procedimiento descrito en este capítulo puso en evidencia que, si bien hay un producto mayoritario, se trata de una mezcla de estructuras. Esto muestra que los carragenanos pueden coprecipitar o formar agregados y que los carragenanos "puros" sólo se obtienen luego del procedimiento descrito³³, ya que no se han podido separar por cromatografía de intercambio iónico^{34,35}.

Las Tablas 14 y 15 indican que la relación molar Gal:3,6-AnGal:sulfato encontrada para las fracciones insolubles se aproxima a la esperada para un carragenano kappa/iota (el porcentaje de 3,6-anhidrogalactosa de 1C₁T₂ resultó un poco menor). En cambio las fracciones solubles presentan un porcentaje de 3,6-anhidrogalactosa mucho menor,

así como menor contenido de sulfato que las fracciones gelificantes. Llama la atención el bajo poder rotatorio observado para 1C₁T₃.

Los fraccionamientos realizados a partir de 1C₁T y 1C₃T siguen un patrón similar. Estos carragenanos tienen una estructura mayoritaria kappa/iota y una pequeña proporción de un producto cuyas características (solubilidad, poder rotatorio, contenido de 3,6-anhidrogalactosa) no corresponden a las de los carragenanos de la familia kappa.

Se decidió realizar el estudio estructural de las fracciones obtenidas a partir de 1C₃T, comenzando por 1C₃T, cuyo comportamiento difería del esperado. La Tabla 16 indica su composición en monosacáridos. Además de galactosa y 3,6-anhidrogalactosa, 1C₃T, contenía cantidades pequeñas pero significativas de glucosa, xilosa, ramnosa y trzas de manosa.

Tabla 16. Composición en hidratos de carbono y contenido de sulfato de 1C₃T₇^a.

Composición en hidratos de carbono							Sulfato ^b
Rha	Xyl	Man	Glc	3-O-Me-Gal	Gal	3,6-AnGal	(SO ₃ K)
3,4	1,5	tr.	4,4	←—58,8—→		31,9	89,1

^aLa mezcla de monosacáridos obtenidos por hidrólisis se derivatizó a los correspondientes alditoles acetilados. ^bMoles por 100 moles de hidratos de carbono.

La Tabla 17 muestra la composición en monosacáridos obtenida por metilación e hidrólisis de 1C₃T₇. El azúcar metilado mayoritario es la 2,6-di-O-metilgalactosa, como era de esperar para un carragenano extraído de gametofitos

femeninos de *Gigartina skottsbergii*. Sin embargo, el porcentaje en que se halla este monosacárido es bastante bajo (35,2%) y se encontraron cantidades apreciables de 4,6-di-O-metilgalactosa (13,6%) y 2,4,6-tri-O-metilgalactosa (3,8%). Esto indica que, además de β -galactosa 4-sulfato, contribuyen a la estructura de esta fracción unidades de β -galactosa 2-sulfato, propias de los carragenanos de la familia lambda, y unidades de β -galactosa sin sulfatar. La presencia de 2,3,4-tri-O-metilxilosa (6,0%) y 2,3,4,6,-tetra-O-metilgalactosa (8,3%) sugieren que 1C₃T₇ cuenta también con una importante cantidad ramificaciones simples. En trabajos previos^{36,37}, se había informado la presencia de pequeñas cantidades de xilosa en otros carragenanos; Cerezo³⁸ detectó xilosa en los carragenanos de *Gigartina skottsbergii*. Se han encontrado ramificaciones de galactosa sólo en algunos polisacáridos de la familia del ágar, al menos en porcentajes significativos^{39,40}.

Otra característica inusual de 1C₃T₇, es la presencia de cantidades apreciables de monosacáridos monometilados que corresponderían a unidades disustituídas. Es de destacar que estos monosacáridos no parecen ser producto de submetilación, ya que, en forma aproximada, la cantidad de ramificaciones sumada a la de grupos sulfato corresponde a la cantidad de posiciones a sustituir en la cadena principal.

Los derivados metilados de glucosa y ramnosa podrían provenir de otros polisacáridos que, por ser solubles en cloruro de potasio se aislaron en esta fracción. Las unidades de 2,4- y 2,3-di-O-metilxilosa podrían derivar un

Tabla 17. Composición en monosacáridos producidos por permetilación e hidrólisis de IC₃T₇^{a,b}.

Rha	Xilosa				Man				Galactosa					
	2,3,4	2,4	2,3	2	2,3,4,6	2,3,6	2,4,6	2	2,3,4,6	2,3,6	2,4,6	2,3	2	4
5,1	6,0	tr.	3,7	1,3	8,3	4,4	3,8	35,2	13,6	3,0	3,3	5,7	4,9	1,9

^aLos azúcares metilados se derivatizaron a los correspondientes alditoles y aldonitrilos acetilados. ^bMoles % de monosacáridos con grupos metilo en las posiciones indicadas.

Tabla 18. Asignación del espectro de r.m.n.-¹³C de IC₃T₇.

Diada	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6
β-D-Gal 4S enlazada por 3	102,8	70,2	79,3	74,2	75,2	61,8
α-D-3,6-AnGal enlazada por 4	95,2	70,2	79,7	78,8	77,3	69,9
β-D-Gal 4S enlazada por 3	102,8	69,9	77,4	72,5	75,4	61,8
α-D-3,6-AnGal 2S enlazada por 4	92,5	75,5	78,4	78,8	77,6	70,2
β-D-Gal 2S enlazada por 3 ^a	101,4	78,4	79,7	66,1	75,8	61,8
α-D-3,6-AnGal enlazada por 4	95,1	70,9	79,7	78,4	77,3	70,0
β-D-Gal 2S enlazada por 3 ^a	101,4	78,4	77,8	66,1	75,8	61,8
α-D-3,6-AnGal 2S enlazada por 4	92,5	75,9	79,0	78,4	77,6	70,2
β-D-Gal enlazada por 3	103,0	70,3	80,4	66,1	75,8	61,8
α-D-3,6-AnGal enlazada por 4	95,1	70,9	79,7	78,4	77,3	70,0
β-D-Gal enlazada por 3	102,8	70,1	79,0	66,1	75,9	61,8
α-D-3,6-AnGal 2S enlazada por 4	92,1	75,9	79,0	78,4	77,6	70,3

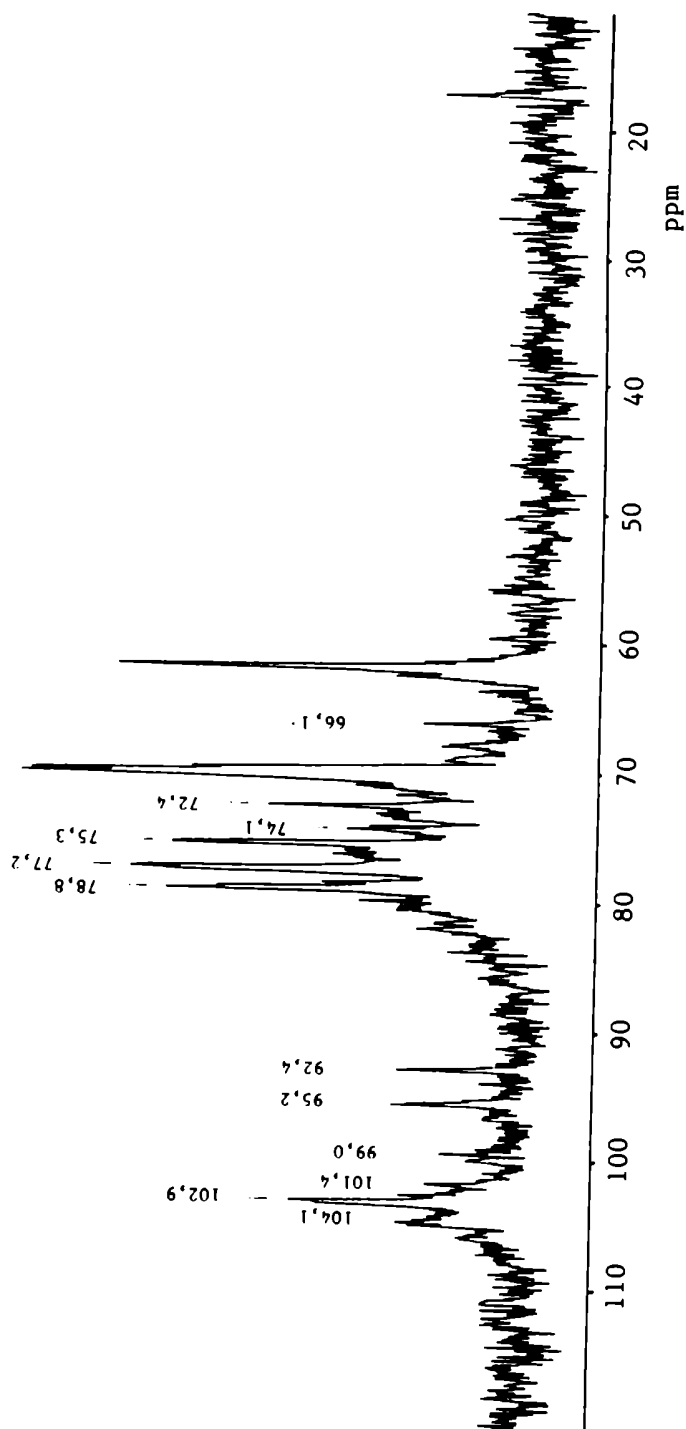
^aAsignación tentativa.

xilano contaminante. La observación microscópica del alga de partida indicó la ausencia de microalgas epífitas, por lo que estos productos forman parte del sistema de polisacáridos sintetizados por los gametofitos de *Gigartina skottsbergii*.

El espectro de r.m.n.-¹³C de 50 MHz de 1C₃T, realizado a temperatura ambiente se muestra en la Figura 10 y las asignaciones realizadas se indican en la Tabla 18. El espectro presenta las señales características de las díadas β-Gal 4S-->α-3,6-AnGal y β-Gal 4S-->α-3,6-AnGal 2S como las principales, a pesar de tratarse de una fracción soluble en cloruro de potasio 2,00 M. Este hecho, junto con la presencia de varias señales pequeñas, que no corresponden a las díadas clásicas, sugiere que las unidades "inusuales" intercaladas en las cadenas del polisacárido no permiten a la molécula adquirir la conformación adecuada para poder gelificar.

La señal a 101,4 ppm indica la presencia de unidades de β-galactosa 2-sulfato enlazadas posiblemente a residuos de 3,6-anhidrogalactosa 2-sulfato. Si la díada β-Gal 2S-->3,6-AnGal 2S realmente contribuye a la estructura de 1C₃T,, ésta no se encontraría formando una cadena larga como en los carragenanos lambda, sino que sólo habría unas pocas unidades que darían en el espectro de r.m.n.-¹³C señales similares a las observadas para los oligosacáridos provenientes de carragenanos de estas familias. Podría encontrarse presente la díada β-Gal-->α-3,6-AnGal. La díada β-D-Gal 2S-->α-D-Gal 2S no puede descartarse en base al espectro, pero la ausencia de 3,6-di-O-metilgalactosa entre

Figura 10. Espectro de r.m.n.- ^{13}C de IC_3T_7 .



los azúcares obtenidos a partir del polisacárido permetilado indica que la misma no contribuye a la estructura de $1C_3T_1$. Las señales a 104,1 y 66,1 ppm (ésta última se asignó también a unidades de β -galactosa sin sulfato en C-4) coinciden con las informadas para el C-1 y C-5, respectivamente de ramificaciones de β -xilosa enlazadas al C-6 de unidades de β -galactosa, pero por metilación de este producto no se detectó 2,4-di-O-metilgalactosa, entonces, estas ramificaciones podrían encontrarse en unidades disustituídas.

Hay varias señales importantes en la región anomérica de este espectro que no se pudieron asignar, entre ellas, la que aparece a 99,0 ppm y las que se encuentran alrededor de 104 ppm, de las cuales una corresponde al C-1 de las unidades de β -xilosa (ver más adelante). La señal a 17,5 ppm confirma la presencia de ramnosa.

Con el objeto de obtener un espectro de r.m.n.- ^{13}C con mayor cantidad de muestra y poder determinar el grado de heterogeneidad de $1C_3T_1$, se realizó otro fraccionamiento de $1C_3T_1$.

Contrariamente a lo esperado, los resultados no fueron iguales a los obtenidos antes (Tabla 19).

El fraccionamiento con cloruro de potasio es una técnica que ha sido muy usada en los estudios de carragenanos y su reproducibilidad se consideró un hecho. En otras palabras, se supone que la solubilidad de los carragenanos en soluciones de cloruro de potasio depende fundamentalmente de su estructura. Sin embargo, comparando

los resultados de las Tablas 15 y 19 se ve que, si bien existe un patrón general similar, según lo supuesto anteriormente⁴¹, los rangos de precipitación y la composición de las fracciones difieren de uno a otro fraccionamiento.

Tabla 19. Rendimiento, rango de precipitación y análisis de las fracciones obtenidas en un nuevo fraccionamiento de 1C₃T.

Fracción	Rango de precipitación M, KCl	Rendimiento ^a %	Gal:3,6-AnGal:sulfato relación molar
IF ₁	0,08-0,10	69,4 (92,1)	1,00:0,87:1,22
IF ₂	0,13-1,15	3,9 (5,2)	1,00:1,00:1,45:
IF ₃	0,35-0,40	0,6 (0,7)	1,00:0,90:1,39
IF ₄	1,10-1,20	0,3 (0,4)	1,00:0,81:n.d. ^c
SF	2,00 ^b	1,2 (1,4)	1,00:0,29:0,90

^aEntre paréntesis se indica el porcentaje sobre el total recuperado. ^bSoluble en KCl 2,00M. ^cNo determinado.

Por otra parte, la comparación de los resultados obtenidos en ambos fraccionamientos de 1C₃T con el de 1C₁T indica que las diferencias entre ellos son similares. Esto confirmaría la relación biosintética propuesta para 1C₁, 1C₂ y 1C₃, según la cual estos polisacáridos se formarían a partir de un único precursor mu/nu, difiriendo entre sí en el grado de ciclación de las unidades de α-galactosa 6-sulfato. Esta hipótesis indicaría que 1C₁T, 1C₂T y 1C₃T deben tener la misma estructura (ver Cap. 1). En este caso, 1C₁T, y 1C₃T, derivarían de polisacáridos del mismo tipo que habrían coprecipitado en parte junto con una estructura kappa/iota (1C₁) y en parte permanecido solubles durante el fraccionamiento de los polisacáridos de partida (1C).

En consecuencia, el objetivo perseguido al realizar

este segundo fraccionamiento, es decir, contar con la cantidad de muestra suficiente para realizar todas las determinaciones necesarias, no pudo alcanzarse, ya que no pudieron juntarse las fracciones correspondientes obtenidas en ambos fraccionamientos.

En el segundo fraccionamiento se obtuvo 98% de carragenanos gelificantes, IF_1 (92,1%), IF_2 (5,2%), IF_3 (0,7%), un porcentaje del orden de trazas (IF_4 0,4 %) precipitó a una concentración intermedia, y una pequeña fracción permaneció soluble (SF, 1,6%). La proporción de carragenanos gelificantes resultó del mismo orden en este fraccionamiento (98 %) que en el primero (97 %). Sin embargo, en este segundo caso, la mayor parte (IF_1) precipitó a concentraciones muy bajas de cloruro de potasio (0,08-0,10 M).

Desde un primer momento llamó la atención el valor bajo obtenido para el poder rotatorio de $1C_1T_3$. La determinación de la rotación óptica de $1C_3T$, se realizó con una solución muy diluída debido a que no se contaba con suficiente cantidad de muestra (c. 0,10, agua) y el valor observado fluctuaba alrededor de cero. El poder rotatorio de la fracción SF resultó $[\alpha]_D = -13,0^\circ$ (c. 0,53, agua). Este valor es sorprendente para una fracción obtenida a partir de un alga carragenófito y sugiere la presencia de unidades de α -L-galactosa y/o 3,6-anhidro- α -L-galactosa, característica de polisacáridos de la familia del ágar y otros relacionados. Con los conocimientos con que se contaba hasta el momento, no era lógico suponer que se encontrarían azúcares en la configuración L en los polisacáridos de un alga

perteneciente a la familia Gigartinaceae.

Para comprobar esta suposición, se realizó la hidrólisis y derivatización de las fracciones solubles ($1C_1T_3$, $1C_3T_7$, y SF) a los correspondientes (-)-2-octilglicósidos acetilados. Como indica la Tabla 20, en las tres fracciones se detectó L-galactosa.

Tabla 20. Relación D-Gal:L-Gal en las fracciones solubles obtenidas por fraccionamiento de $1C_1T_3$ y $1C_3T_7$ con cloruro de potasio.

Fracción	D-Gal:L-Gal
$1C_1T_3$	9,0:1,0
$1C_3T_7$	3,4:1,0
SF	2,0:1,0

En base a este resultado, se volvió a examinar el espectro de $1C_3T_7$, (Figura 10) y se asignó que la señal a 99,0 ppm al C-1 de unidades de 3,6-anhidro- α -L-galactosa enlazadas a β -D-galactosa, no se pudo determinar la sustitución sobre esta última unidad. Las señales a ≈ 104 ppm (ancha) y 101,2 ppm indicarían una secuencia de tipo β -D-Gal $\rightarrow\alpha$ -L-Gal, pero que no presentaría sulfato en C-6 de la unidad α , pues, de ser así, estas unidades se hubieran ciclado durante el tratamiento alcalino para dar 3,6-anhidro- α -L-galactosa.

Este descubrimiento es muy importante desde el punto de vista de la biosíntesis de estos polisacáridos, ya que a pesar de tratarse de algas carragenófitas, parecen contar con las enzimas características de agarófitas y algas relacionadas.

A continuación se estudió la fracción SF. La Tabla 21 muestra la composición en hidratos de carbono y el contenido de sulfato de esta fracción. Los resultados obtenidos son similares a los encontrados para 1C₃T₁; las diferencias principales son el menor contenido de 3,6-anhidrogalactosa y sulfato. Se detectó además 3,0% de 3-O-metilgalactosa.

Tabla 21. Composición en hidratos de carbono y contenido de sulfato de SF^a.

Composición en hidratos de carbono							Sulfato ^b
Rha	Xyl	Man	Glc	3-O-Me-Gal	Gal	3,6-AnGal	(SO ₃ K)
1,2	2,4	4,3	5,3	3,0	61,4	22,5	70,0

^aLa mezcla de monosacáridos obtenidos por hidrólisis se derivatizó a los correspondientes alditoles y aldononitrilos acetilados. ^bMoles por 100 moles de hidratos de carbono.

Los resultados obtenidos por metilación de SF se encuentran en la Tabla 22. Lo primero que se observa es que la metilación no fue completa, pues se obtuvo 10,4% de galactosa sin metilar. Cuando se metilaron carragenanos de la familia lambda por el método de Haworth, en las condiciones usadas normalmente se obtenía submetilación²³, pero este efecto no se había observado en la metilación de carragenanos de la familia kappa.

Se realizó un segundo paso de metilación, pero esta vez la muestra se agitó durante 3 horas antes de agregar yodometano; en estas condiciones se logró permetilación (Tabla 22). Como para 1C₃T₁, se obtuvieron 2,6- (21,4%) y 4,6-di-O-metilgalactosa (18,6%) que indicarían la presencia de unidades de β-D-galactosa 4-sulfato y β-D-galactosa 2-

sulfato, respectivamente, esta vez, en cantidades similares. No se pudo determinar la posición de enlace en la cadena principal de la importante cantidad de ramificaciones de galactosa y xilosa.

Tabla 22. Composición en monosacáridos producidos por permetilación e hidrólisis de SF^a.

Paso de metilación	Rha		Xilosa			Man		Glc	
	3,4	2,3,4	2,4	2,3	2	2,3,6			
1 ^b	tr.	7,1	4,1	1,3	1,6	-			
2 ^c	tr.	8,0	tr.	tr.	tr.	4,9			

Paso de metilación	Galactosa									
	2,3,4,6	2,3,6	2,4,6	2,6	4,6	2,3	6	2	4	-
1 ^b	7,9	3,8	5,2	20,7	17,4	2,1	4,4	5,6	8,3	10,4
2 ^c	24,7	3,3	6,2	21,4	18,6	2,8	1,3	2,3	6,4	-

^aMoles % de monosacáridos con grupos metilo en las posiciones indicadas. ^bLos azúcares metilados se derivatizaron a los correspondientes alditoles y aldononitrilos acetilados. ^cDerivatizado a los correspondientes aldononitrilos acetilados.

Se ha informado³⁰ que después de una tercera etapa de metilación, los carragenanos iota sufren degradación, presumiblemente por ruptura con catálisis básica de la unión glicosídica de las unidades de galactosa enlazadas por la posición 3, dejando unidades terminales de 3,6-anhidrogalactosa 2-sulfato. Sin embargo, esta degradación alcalina no puede explicar el altísimo porcentaje de 2,3,4,6-tetra-O-metilgalactosa (24,7%) detectado en la muestra permetilada.

A diferencia de 1C₃T₇, SF presenta cantidades insignificantes de derivados dimetilados de ramnosa y xilosa, lo que confirmaría que la ramnosa y parte de la xilosa no forman parte de estos galactanos. Se detectó 4,9%

de 2,3,6-tri-O-metilglucosa que corresponde a un α -(1 \rightarrow 4)-glucano, conocido como almidón de las florídeas, que es el polisacárido de reserva de estas algas.

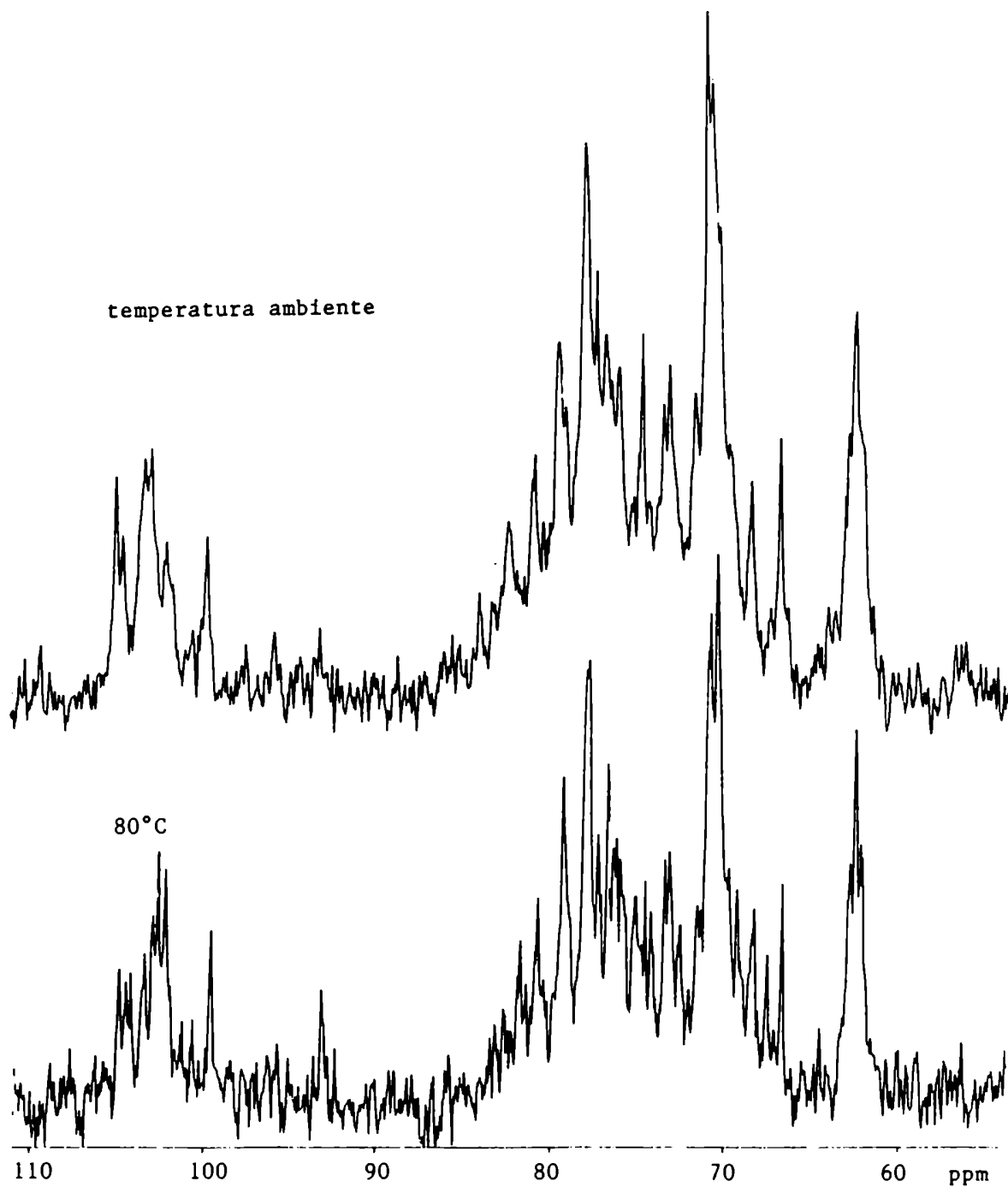
Entre los azúcares metilados obtenidos a partir de SF permetilado se detectó también 2,3-di-O-metilgalactosa (2,8%); si se mantiene la secuencia alternante característica de los carragenanos, este monosacárido provendría de unidades de α -galactosa sustituidas en C-6 y este sustituyente no sería un grupo sulfato, ya que probablemente se hubiera eliminado durante el tratamiento alcalino de $1C_3$.

El porcentaje de azúcares monometilados es bastante alto, principalmente el de 4-O-metilgalactosa (6,4%) que correspondería a unidades de β -galactosa sustituidas en las posiciones 2 y 6.

El espectro de r.m.n.- ^{13}C de 50 MHz de SF se realizó a temperatura ambiente y a 80°C (Figura 11) y resultó de difícil interpretación, esto indica que se trata de una molécula compleja o una mezcla de ellas. A altas temperaturas aumenta la resolución de las señales (ver Primera Parte, Cap. 3 a)), algunos de los picos que se encuentran resueltos en el espectro realizado a 80°C se superponen en el que se llevó a cabo a temperatura ambiente, por lo que el análisis se realizó sobre el primero. Por otra parte, no se observaron corrimientos importantes de las señales por variación de la temperatura.

Lo primero que surge de la comparación del espectro de SF con el de $1C_3T$, es la desaparición de la señal a 95,2 ppm y la disminución del pico a 92,5 ppm respecto a las otras

Figura 11. Espectro de r.m.n.- ^{13}C de SF a temperatura ambiente y a 80°C .



señales presentes en la región anomérica, es decir, que en la fracción SF las estructuras inusuales detectadas en 1C₃T, se encuentran concentradas ya que no se produjo la importante cosolubilización de estructuras kappa/iota que se había observado antes. Este hecho explica porqué el rendimiento de 1C₃T, fue mucho mayor que el de SF (7,8% y 1,4%, respectivamente).

Hasta el momento se desconocen los motivos por los cuales los fraccionamientos de 1C₃T dieron resultados diferentes, ya que se utilizaron en ambos casos condiciones similares. Los factores que no se controlaron fueron: 1) la temperatura, pues la precipitación se realizó a temperatura ambiente y ésta pudo haber sido diferente en ambos casos y 2) la velocidad de agitación de la mezcla que se fraccionó; sin embargo, como la agitación se mantuvo durante 16 horas después de cada agregado de cloruro de potasio, la solución debería haber alcanzado el equilibrio, independientemente de la velocidad de agitación.

La Tabla 23 muestra las díadas más importantes que contribuyen a la estructura de SF; algunas de ellas incluyen unidades en la configuración L como β -D-Gal 2S \rightarrow α -L-3,6-AnGal y β -D-Gal \rightarrow α -L-Gal (podría haber variantes de esta díada), mientras que otras se encuentran en los carragenanos de la familia kappa (β -D-Gal 4S \rightarrow α -D-3,6-AnGal 2S) y de la familia lambda (β -D-Gal 2S \rightarrow 3,6-AnGal 2S). Las díadas β -D-Gal (6S) \rightarrow α -L-3,6-AnGal, características de las agarófitas no se encuentran presentes en SF. Este hecho se dedujo a partir de la ausencia de una señal a 82,6 ppm que correspondería al C-3 de las unidades de β -D-Gal (6S). No se

detectaron derivados metilados en el espectro de SF.

Probablemente, el porcentaje de 3-O-metilgalactosa (Tabla 21) era muy bajo como para detectar la señal del metilo en un espectro como el de la Figura 11.

A pesar de los esfuerzos realizados, no se ha logrado completar la asignación del espectro de SF. Más aún, algunas de las señales más importantes de la región anomérica, que aparecen a 103,7, 102,4 y 102,1 ppm, no han sido asignadas. Sin embargo, el desplazamiento químico de estas señales sugiere que se trata de unidades de β -galactosa.

Tabla 23. Asignación del espectro de r.m.n.- ^{13}C de SF.

Diada	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6
β -D-Gal 4S enlazada por 3	102,9	70,1	77,4	72,9	75,6	62,0 ^a
α -D-3,6-AnGal 2S enlazada por 4	92,5	70,2	79,7	78,8	77,3	69,9
β -D-Gal 2S enlazada por 3	101,5	78,5	78,0	67,1	76,0	62,0 ^a
α -D-3,6-AnGal 2S enlazada por 4	92,5	76,0	79,0	78,5	77,6	70,4
β -D-Gal 2S enlazada por 3	101,7	77,6	81,3	69,3	76,3	62,0 ^a
α -L-3,6-AnGal enlazada por 4	99,1	70,1	80,3	78,5	75,8	70,1
β -D-Gal enlazada por 3	104,0	70,1	81,0	68,9	75,8	61,6
α -L-Gal enlazada por 4	101,5	69,3	71,2	79,4	72,9	61,4
β -D-Gal enlazada por 3	102,9	70,1	79,0	67,1	75,8	62,0 ^a
α -D-3,6-AnGal 2S enlazada por 4	92,5	75,8	79,0	78,5	77,6	70,3
β -D-Xyl terminal	104,4	74,2	76,9	70,4	66,2	
α -D-Glc enlazada por 4 ^b	100,8	72,9	74,2	78,6	72,2	61,8 ^a

^aSeñal ancha centrada en 62,0 ppm. ^bAlmidón de las florideas.

En base a los resultados del análisis por metilación, se infiere que alguna de estas señales correspondería a las

unidades de galactosa que se encuentran como cadena lateral; entonces, la configuración del C-1 de estas unidades debe ser β , de acuerdo a estos desplazamientos químicos. En caso de poder confirmar esta asignación, ésta sería la primera vez que se encontraron unidades de β -galactosa como cadena lateral en galactanos sulfatados de algas rojas.

En conclusión, los gametofitos femeninos de *Gigartina skottsbergii* sintetizan pequeñas cantidades de galactanos sulfatados que contienen D- y L-galactosa y 3,6-anhidro-D-galactosa y 3,6-anhidro-L-galactosa, así como ramificaciones de xilosa y galactosa. Estos polisacáridos se extraen junto con los carragenanos y sólo se ponen en evidencia después del elaborado fraccionamiento descripto.

Craigie y Rivero-Carro⁴² informaron recientemente el aislamiento de galactanos que contenían D- y L-galactosa y xilosa terminal a partir de gametofitos de cuatro algas carragenófitas.

Un galactano que contenía L-galactosa se encontró en la fracción soluble obtenida por fraccionamiento de carragenanos extraídos de tetraesporofitos de *Iridaea undulosa*²¹ con cloruro de potasio.

Estos resultados sugieren que este tipo de productos se encuentran ampliamente distribuidos en las algas de la familia Gigartinaceae aunque en pequeñas cantidades.

Estudio estructural de las fracciones insolubles

La Tabla 24 muestra la composición en monosacáridos obtenida por permetilación e hidrólisis de las fracciones $1C_3T_1$ - $1C_3T_6$ a excepción de $1C_3T_3$. Esta última se contaminó y no pudo ser metilada; sin embargo, su estructura debería ser intermedia entre las de $1C_3T_2$ y $1C_3T_4$.

Como era dado esperar, en todos los casos la 2,6-di-O-metilgalactosa resultó ser el azúcar mayoritario.

Tabla 24. Composición en monosacáridos producidos por permetilación e hidrólisis de las fracciones insolubles obtenidas a partir de $1C_3T$ por fraccionamiento con cloruro de potasio^{a,b}.

Fracción	Moles % the galactosa con grupos metilo en las posiciones indicadas						
	2,3,4,6	2,4,6	2,3,6	2,6	4,6	6	2
$1C_3T_1$	2,5	6,3	9,3	77,6	-	1,4	2,9
$1C_3T_2$	tr.	3,3	1,2	92,0		1,4	2,1
$1C_3T_4$	2,1	18,1	2,3	73,3		tr.	4,1
$1C_3T_5$	1,9	3,5	1,6	81,2	-	2,5	9,4
$1C_3T_6$	1,9	26,2	3,7	58,1	2,9	7,2	-

^aLos azúcares metilados se derivatizaron a los correspondientes alditoles y aldononitrilos acetilados.

^bSe detectaron pequeñas cantidades de 2,3,4-tri-O-metil-, 2,3-di-O-metil y 2,4-di-O-metil-xilosa.

La fracción $1C_3T_6$, que precipitó en un rango muy amplio de concentraciones de cloruro de potasio (Tabla 16), es una mezcla de polisacáridos. En esta fracción se detectó un pequeño porcentaje de 4,6-di-O-metilgalactosa, que indicaría que el galactano sulfatado presente en $1C_3T$, coprecipitó en parte con esta fracción, junto con estructuras características de carragenanos insolubles. En todas las fracciones se observan cantidades apreciables de otros azúcares metilados, sugiriendo que la estructura de las

mismas está constituida por las clásicas secuencias de tipo kappa/iota que podrían estar interrumpidas por una cantidad apreciable de unidades inusuales.

Con el objeto de obtener mayor información acerca de estas unidades estructurales, se realizaron los espectros de r.m.n.- ^{13}C de las fracciones $1\text{C}_3\text{T}_4$ y $1\text{C}_3\text{T}_5$, que en principio serían las más interesantes, debido a su solubilidad. El espectro de r.m.n.- ^{13}C de $1\text{C}_3\text{T}_4$ indicó una estructura kappa/iota en relación molar 1:0,5, calculada a partir de las áreas de las señales a 95,2 y 92,6 ppm (Figura 12, Tabla 25).

Figura 12. Espectros de r.m.n.- ^{13}C de $1\text{C}_3\text{T}_4$ y $1\text{C}_3\text{T}_5$.

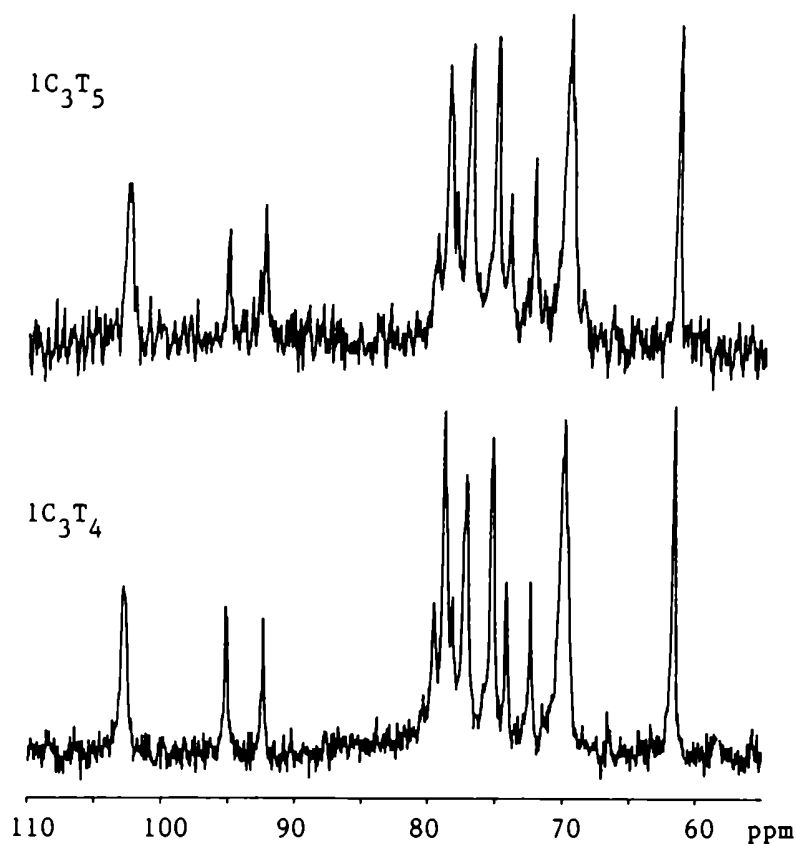


Tabla 25. Asignación del espectro de r.m.n.-¹³C de 1C₃T₄.

Diada	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6
β-D-Gal 4S enlazada por 3	102,8	70,0	79,0	74,3	75,3	61,8
α-D-3,6-AnGal enlazada por 4	95,2	70,2	79,7	78,8	77,2	70,0
β-D-Gal 4S enlazada por 3	102,8	69,9	77,4	72,5	75,3	61,8
α-D-3,6-AnGal 2S enlazada por 4	92,6	75,5	78,5	78,9	77,6	70,3
β-D-Gal enlazada por 3	103,0	70,3	80,8	66,8	75,8	61,8
α-D-3,6-AnGal enlazada por 4	95,2	71,0	79,7	78,5	77,2	70,0
β-D-Gal enlazada por 3 ^a	102,7	70,1	79,0	66,8	75,9	61,8
α-D-3,6-AnGal 2S enlazada por 4	92,1	75,9	79,0	78,5	77,6	70,3

^aAsignación tentativa.

Por otra parte, el importante porcentaje de 2,4,6-tri-O-metilgalactosa en el polisacárido permetilado y la relación Gal:3,6-AnGal ≈ 1:1 en el producto original, sugirió la presencia de las díadas β-Gal-->3,6-AnGal y β-Gal-->3,6-AnGal 2S. La presencia de la primera se confirmó en base a las señales a 80,8, 66,8 y 71,0 ppm (Tabla 25), que se encuentran separadas de las que corresponden a las estructuras mayoritarias (kappa/iota), en cambio esto no sucedió con la segunda.

El espectro de 1C₃T₅ es similar al de 1C₃T₄ (Figura 12); presenta una estructura kappa/iota en relación 1:1, lo que justifica en parte, su mayor solubilidad. El porcentaje de 2,4,6-tri-O-metilgalactosa es pequeño; esto explica porqué no se encontraron las díadas β-Gal-->α-3,6-AnGal (2S) en este espectro. Sin embargo, se observa una pequeña señal a

66,5 ppm que correspondería a unidades de β -galactosa que no llevan grupos sulfato en C-4.

El alto porcentaje de unidades monometiladas (Tabla 24) sugiere residuos disustituídos en el polisacárido de partida. La señal a 93,0 ppm no ha sido asignada, pero podría estar relacionada con éstas últimas; no se detectó galactosa sin metilar, por lo que se descartó que estas unidades sean el resultado de submetilación. En el análisis de los espectros de carragenanos cuyas estructuras presentan cantidades apreciables de unidades inusuales se hacen evidentes las limitaciones que se tienen hasta el momento por contar sólo con diadas como compuestos modelo para interpretarlos.

La Tabla 26 indica la composición en unidades estructurales de las fracciones $1C_3T_1-1C_3T_6$. A excepción de ésta última las estructuras de las mismas son similares entre sí, la diferencia de solubilidad se debería no sólo a un aumento en el carácter iota del polisacárido con la solubilidad, sino también a la distribución de las unidades inusuales en la cadena polimérica.

La metilación de las fracciones IF_1-IF_4 (Tabla 27), indicó estructuras más simples. En los cromatogramas se observaba casi exclusivamente un pico que correspondía a las unidades de 2,6-di-O-metilgalactosa. También se observaron pequeños porcentajes de 2,4,6-tri-O-metilgalactosa pero no se encontraron cantidades significativas de otros azúcares.

En la Figura 13 se muestran los espectros de r.m.n.- ^{13}C de las fracciones IF_1-IF_4 , en los que se distingue

Tabla 26. Composición en unidades estructurales de las fracciones insolubles obtenidas a partir de IC₃T por fraccionamiento con cloruro de potasio (1° fraccionamiento)^{a,b}.

Fracción	Unidades estructurales									
	β-Gal	β-Gal4S	β-Gal2S	α-Gal	GalT	GalI ^c	Gal2 ^d	α-3,6-AGE	α-3,6-AG2Se	
IC ₃ T ₁	3,2	40,4	-	4,9	1,3	1,5	-	←	48,7	→
IC ₃ T ₂	1,7	47,2		tr.	tr.	1,1		←	50,0	→
IC ₃ T ₄	9,1	36,7		1,2	1,1	2,2		32,9 ^f	17,1 ^f	
IC ₃ T ₅	1,8	41,2		tr.	1,0	4,8	1,3	24,2 ^f	25,0 ^f	
IC ₃ T ₆	16,4	36,3	1,8	2,3	5,7	-	4,5	←	37,5	→

^aPromedio de la derivatización a alditoles y aldononitrilos acetilados. ^bSe detectaron pequeñas cantidades de 2,3,4-tri-*O*-metil-, 2,3-di-*O*-metil- y 2,4-di-*O*-metil-xilosa. ^cA partir de la 2-*O*-metilgalactosa. ^dA partir de la 6-*O*-metilgalactosa. ^eCalculado por el método del resorcinol. ^fLa relación 3,6-AnGal:3,6-AnGal2S se estimó a partir de las áreas de las señales de los C-1 en los espectros de r. m. n. -¹³C.

claramente el aumento del caracter iota con la solubilidad de soluciones de cloruro de potasio, hasta IF₄, en cuyo espectro apenas pueden verse las señales correspondientes a la díada kappa y no se observan picos característicos de las estructuras de la fracción soluble. Entre los azúcares metilados provenientes de IF₄ permetilado tampoco se encontraron unidades propias de SF, como se había observado con 1C₃T₆ y 1C₃T₇ (se encontró 4,6-di-O-metilgalactosa entre los monosacárido obtenidos a partir de 1C₃T₆).

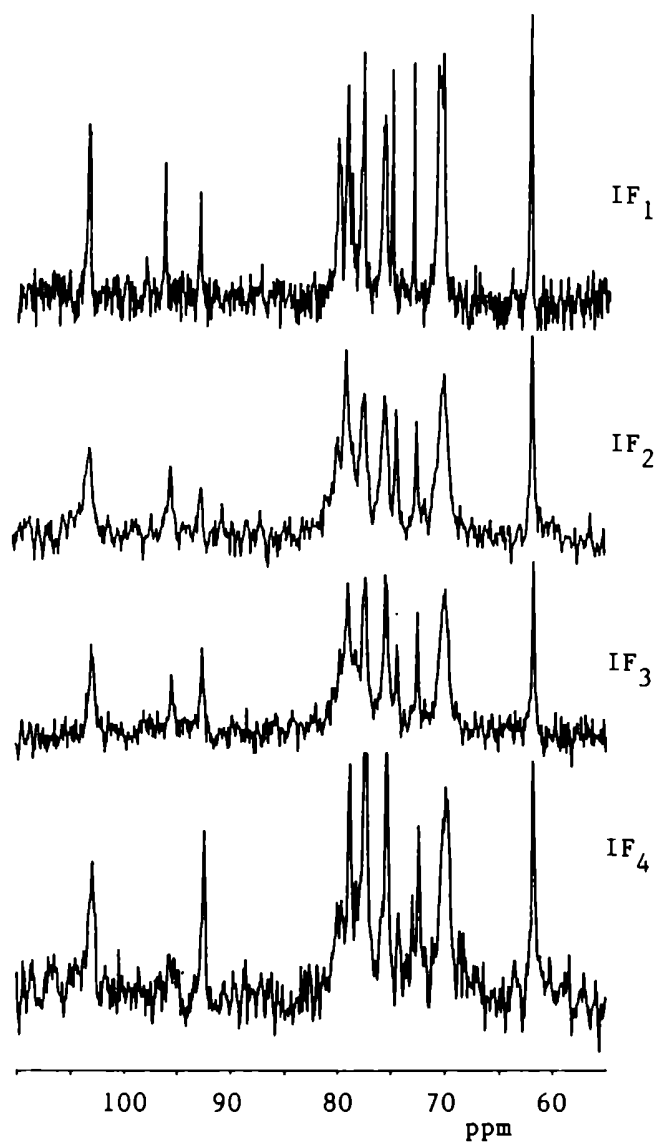
Tabla 27. Composición en monosacáridos producidos por permetilación e hidrólisis de IF₁-IF₄^a.

Fracción	Moles % de monosacáridos con grupos metilo en las posiciones indicadas				
	Xilosa		Galactosa		
	2,3,4	2,3,4,6	2,4,6	2,6	4
IF ₁	-	-	3,6	96,4	-
IF ₂	tr.	-	6,4	93,6	-
IF ₃	-	2,1	tr.	97,9	tr.
IF ₄	-	tr.	-	100	-

^aLos azúcares metilados se derivatizaron a los correspondientes alditoles y aldononitrilos acetilados.

A excepción del espectro de IF₁, que se realizó a 80°C, todos los restantes se llevaron a cabo a temperatura ambiente. Teniendo en cuenta este hecho, los espectros se pueden considerar muy buenos, aunque fue necesaria una concentración de muestra (20-30 mg/0,4 ml) y número de pulsos (≈300.000) altos. No se observaron variaciones significativas en los valores de los desplazamientos químicos de las señales con la variación de la temperatura, pero se necesitó menor tiempo para lograr un buen espectro a 80°C.

Figura 13. Espectros de r.m.n.- ^{13}C de IF_1 - IF_4 .



La Tabla 28 indica la relación kappa:iota calculada a partir de las señales a $\approx 95,3$ y $92,4$ ppm. La fracción IF_4 ,

que precipitó a 1,10-1,20 M de cloruro de potasio (Tabla 19), es un carragenano iota casi puro.

Tabla 28. Relación kappa/iota en las estructuras de IF₁-IF₄.

Fracción	kappa/iota ^a relación molar
IF ₁	1,00:0,41
IF ₂	1,00:0,42
IF ₃	1,00:1,02
IF ₄	iota

^aCalculada a partir de los espectros de r.m.n.-¹³C

Por otra parte, como se mostró más arriba, la fracción 1C₃T₅, que precipitó a 0,80-0,90 M de cloruro de potasio es un carragenano kappa/iota. El análisis de estas estructuras rompe con la concepción clásica, según la cual, los carragenanos kappa/iota son insolubles a bajas concentraciones de cloruro de potasio. Estos carragenanos se comportan de acuerdo a su solubilidad en forma más parecida a los carragenanos lambda^{21,1}. Estos resultados no pueden atribuirse a bajo peso molecular, ya que, ni por análisis por metilación ni por espectroscopía de r.m.n.-¹³C, se detectaron cantidades de extremos terminales mayores que trazas.

La Tabla 29 muestra la composición en unidades estructurales de las fracciones IF₁-IF₄. Resulta llamativo que la estructura de estas fracciones sea mucho más regular que la de los productos obtenidos en el fraccionamiento anterior.

Tabla 29. Composición en unidades estructurales de las fracciones insolubles obtenidas a partir de 1C₃T (2° fraccionamiento)^a.

Fracción	Unidades estructurales				
	β -Gal	β -Gal4S	α -3,6-AnGal ^b	α -3,6-AG2S ^b	GalT
IF ₁	2,2	50,3	33,1	14,3	-
IF ₂	3,2	47,7	33,2	15,9	-
IF ₃	tr.	51,5	23,5	23,7	1,1
IF ₄	-	55,2	-	44,8	tr.

^aPromedio de la derivatización a alditoles y aldononitrilos acetilados. ^bLa relación 3,6-AG:3,6-AG2S se determinó a partir de las áreas de las señales de los C-1 en el espectro de r.m.n.-¹³C.

Los estudios realizados con los carragenanos de *Iridaea undulosa*³⁹ mostraron que la solubilidad de las moléculas de los carragenanos no es la misma en una mezcla que en las fracciones más homogéneas. En este Capítulo se vió que, si bien el patrón de precipitación en los diferentes fraccionamientos es el mismo, los rangos de precipitación, rendimiento y composición varían. Hasta el momento no están claros los motivos de este comportamiento.

Los resultados presentados en este Capítulo dan una idea clara de la complejidad de la mezcla de carragenanos biosintetizados por los gametofitos femeninos de *Gigartina skottsbergii*.

Bibliografía

1. M. C. Matulewicz, M. Ciancia, M. D. Nosedá y A. S. Cerezo, *Phytochemistry* **29**, 3407 (1990).

2. A. S. Cerezo, *Carbohydr. Res.* **26**, 335 (1973).
3. B. Capon, *Quart. Rev.* **18**, 45 (1964).
4. H. W. Heine y W. Siegfried, *J. Am. Chem. Soc.* **76**, 489 (1954).
5. D. A. Rees, *J. Chem. Soc.*, 1821 (1963).
6. N. R. Williams, *Adv. Carbohydr. Chem.* **25**, 109 (1970).
7. D. A. Rees, *J. Chem. Soc.*, 5168 (1961).
8. O. Smidsrod, B. Larsen, A. J. Pernas, A. Haug, *Acta Chem. Scand.* **21**, 2585 (1967).
9. W. Yaphe, *Anal. Chem.* **32**, 1327 (1960).
10. W. Yaphe y G. P. Arsenault, *Anal. Biochem.* **13**, 143 (1965).
11. E. J. V. Percival, *Quart. Rev.* **3**, 369 (1949).
12. H. Maskill en "The physical basis of organic chemistry", Oxford University Press, p. 216 (1985).
13. L. Mandolini y P. Tamborra, *J. Am. Chem. Soc.* **100**, 550 (1978).
14. F. DeTar y N. P. Lutra, *J. Am. Chem. Soc.* **102**, 4505 (1980).
15. J. S. Craigie y C. Leigh, en "Handbook of Phycological Methods. Phycological and Biochemical Methods" (ed. J. A. Hellebust y J. S. Craigie) Cambridge University Press, p. 109 (1978).
16. M. Ciancia, M. D. Nosedá, M. C. Matulewicz y A. S. Cerezo, *Carbohydr. Polym.* **20**, 95 (1993).
17. M. C. Matulewicz, M. Ciancia, M. D. Nosedá y A. S. Cerezo, *Phytochemistry* **28**, 2937 (1989).
18. L-A. Fransson, A. Maemström, I. Sjöberg y T. N. Huckerby, *Carbohydr. Res.* **80**, 131 (1980).

19. K. F. Wong y J. S. Craigie, *Plant Physiol.* 61, 663 (1978).
20. M. Glicksman en "Food Hydrocolloids", Vol. II (ed. M. Glicksman), CRC Press, Boca Raton, Florida, p. 83 (1983).
21. C. A. Stortz y A. S. Cerezo, *Carbohydr. Res.* 242, 217 (1993).
22. A. S. Cerezo, *J. Chem. Soc.*, 2491 (1967).
23. S. E. Pickmere, M. J. Parsons y R. W. Bailey, *Phytochemistry* 12, 2441 (1973).
24. E. L. McCandless, J. S. Craigie y J. A. Walters, *Planta* 112, 201 (1973).
25. D. A. Rees, en "Polysaccharide shapes", ed. Chapman and Hall, A Halsted Press Book, John Wiley and Son, New York, p. 65 (1977).
26. M. C. Matulewicz, "Estudios sobre el sistema de carragenanos del alga roja *Iridaea undulosa* Bory", Tesis Doctoral, FCEyN-UBA (1978).
27. S. H. Knutsen, S. T. Moe, B. Larsen y H. Grasdalen, *Hydrobiologia* 260/261, 667 (1992).
28. D. J. Stancioff y N. F. Stanley, *Proc. Int. Seaweed Symp.* 6, 595 (1969).
29. N. S. Anderson, T. C. S. Dolan, A. Penman, D. A. Rees, G. P. Mueller, D. J. Stancioff y N. F. Stanley, *J. Chem. Soc.*, 602 (1968).
30. T. T. Stevenson y R. H. Furneaux, *Carbohydr. Res.* 210, 277 (1991).
31. S. Hakomori, *J. Biochem.* 55, 205 (1964).
32. D. J. Brasch, H. M. Chang, C. T. Chuang y L. D. Melton,

- Carbohydr. Res.* 97, 113 (1981).
33. C. A. Stortz y A. S. Cerezo, *Carbohydr. Res.* 172, 139 (1988).
 34. J. Mollion, H. Morvan, F. Bellanger y S. Moreau, *Phytochemistry* 27, 2023 (1988).
 35. J. Mollion, S. Moreau y D. Christianen, *Bot. Mar.* 29, 549 (1986).
 36. R. Johnston y E. G. V. Percival, *J. Chem. Soc.*, 1994 (1950).
 37. C. A. Stortz y A. S. Cerezo, *Carbohydr. Res.* 145, 219 (1986).
 38. A. S. Cerezo, *J. Chem. Soc.*, 992 (1967).
 39. J. S. Craigie y A. Jurgens, *Carbohydr. Pol.* 11, 265 (1989).
 40. Y. Karamanos, M. Ondarza, F. Bellanger, D. Christiaen y S. Moreau, *Carbohydr. Res.* 187, 93 (1989).
 41. A. J. Pernas, O. Smidsrod, B. Larsen y A. Haug, *Acta Chem. Scand.* 21, 98 (1967).
 42. J. S. Craigie y H. Rivero-Carro, XIVth Int. Seaweed Symp., *Abstracts*, p. 71 (1992).

CAPITULO 3

REACCION DE AUTOHIDROLISIS

El carragenano 1C₁ se sometió a una reacción de autohidrólisis. Los objetivos perseguidos fueron:

- a) Degradación parcial del polisacárido, de modo de obtener soluciones acuosas concentradas de baja viscosidad, adecuadas para realizar espectros de r.m.n.-¹³C en un espectrómetro de baja resolución y a temperatura ambiente.
- b) Obtención de oligosacáridos para estudiar la estructura fina de 1C₁.
- c) Estudio de la selectividad de la reacción para determinar las secuencias de díadas en el polímero.

Reacción de autohidrólisis

Se tomaron alícuotas a distintos tiempos de reacción, sobre las que se determinó el peso molecular¹ y el porcentaje de 3,6-anhidrogalactosa² después de reducir la muestra con borohidruro de sodio (Tabla 1). A partir de estos datos, considerando que la reacción es de primer orden, se calculó la constante de velocidad de la misma, que resultó 0,077 hs⁻¹ y 0,071 hs⁻¹, respectivamente.

Los porcentajes de 3,6-anhidrogalactosa que se indican en la Tabla 1 son mucho más altos que los que verdaderamente corresponden a estas muestras. El incremento en la sensibilidad de la determinación de 3,6-anhidrogalactosa con el reactivo de resorcinol-ácido clorhídrico podría deberse a la presencia de ion borato.

También se midió la viscosidad relativa al agua; este parámetro bajó rápidamente en la primera hora y a las 3

horas de reacción resultó igual a 1.

Después de 62,5 horas de autohidrólisis, la reacción se había completado (constancia en el valor de peso molecular y 3,6-anhidrogalactosa unida); la pérdida de sulfato fue de 19 % y el porcentaje de 3,6-anhidrogalactosa que permaneció unida fue el 11 % de la original.

Tabla 1. Autohidrólisis del carragenano IC₁.

Tiempo (hs.)	3,6-AnGal unida (%)	Peso molecular	viscosidad relativa ^a
0	37,5	22.200	5,64
1	34,5	6.680	1,09
2	31,7	3.730	1,03
3	28,8	2.830	1,00
4	25,6	2.370	
5	18,6	2.070	
6	18,3	1.880	
7	17,8	1.340	
8	16,9	1.230	
11,5	16,2	1.030	
15,5	15,6	911	
19	14,5	911	
23	12,1	878	
25,5	11,5	787	
28,5	10,6	770	
32,5	8,9	761	
36,5	7,5	751	
42,5	6,5	716	
46,5	6,2	668	
51	5,4	752	
58	4,3	752	
62,5	4,2	668	

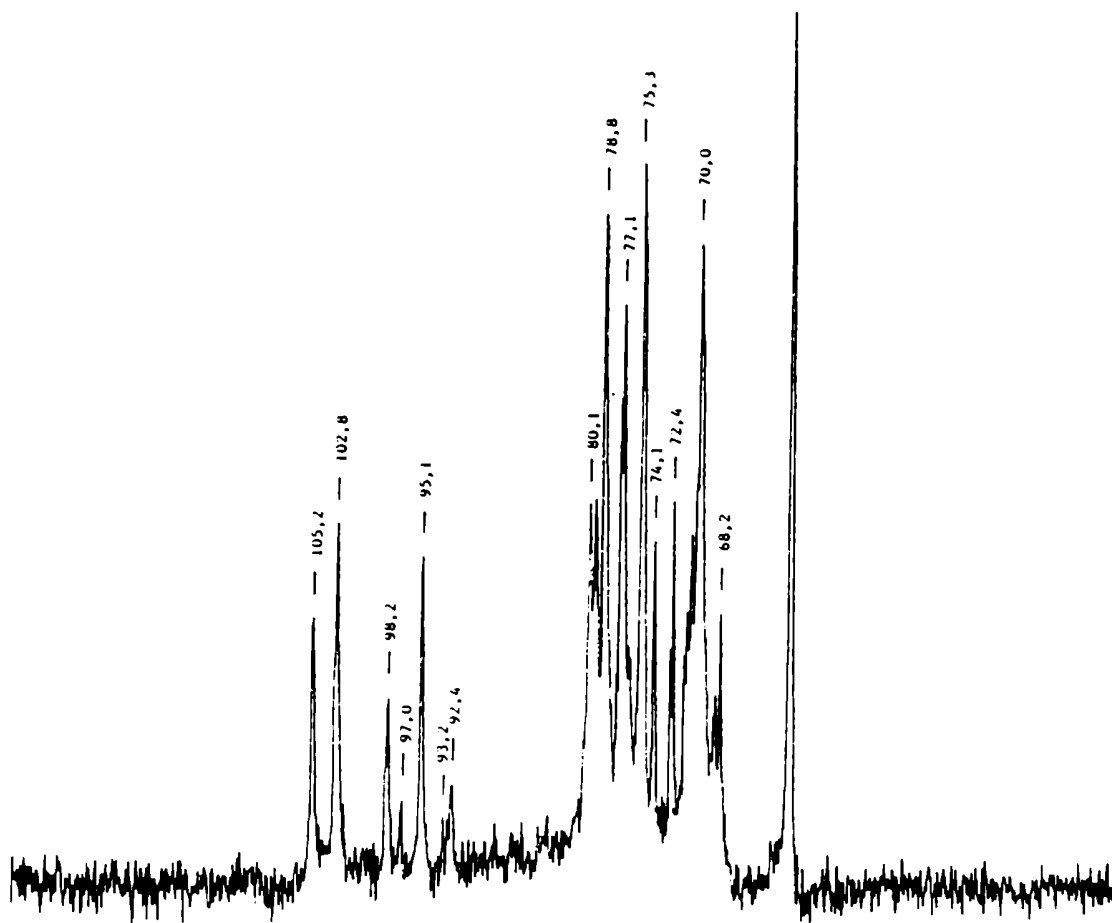
^aA 26°C.

Se repitió la reacción en las mismas condiciones y se realizaron los espectros de r.m.n.-¹³C de 25 MHz a temperatura ambiente de muestras extraídas después 6, 13, 35

y 51 horas, así como el del producto final.

El espectro del carragenano $1C_1$ después de 6 horas de autohidrólisis ($1C_1A_1$) se muestra en la Figura 1.

Figura 1. Espectro de r.m.n.- ^{13}C de $1C_1A_1$.



La Tabla 2 indica las asignaciones realizadas. La comparación del espectro de $1C_1A_1$ con el del polisacárido de

Tabla 2. Asignación del espectro de r. m. n. -¹³C de IC₁A₁.

Diadas	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6
β-Gal 4S enlazada por 3	102,8	70,0	78,8	74,2	75,3	61,8
α-3,6-AnGal enlazada por 4	95,1	70,3	79,6	78,8	77,3	70,0
β-Gal 4S enlazada por 3	105,2	70,8	80,1	71,2	75,3	61,8
α-Gal 2,6S enlazada por 4	98,5	76,5	68,6	79,6	68,6	68,2
β-Gal 4S enlazada por 3	102,8	69,9	77,3	72,7	75,3	61,8
α-3,6-AnGal 2S enlazada por 4	92,4	75,3	78,4	78,8	77,6	70,3
β-Gal 4S enlazada por 3	105,2	70,8	78,9	74,2	75,3	61,8
α-Gal 6S enlazada por 4	98,2	69,2	70,7	79,2	68,8	68,2
Unidades terminales						
β-Gal 4S NR ^a	105,2	72,8-72,5 ^b	70,9-70,5	77,5	75,3	61,8
β-Gal 6S R ^c	97,0	72,8-72,5		80,4-78,4		68,2
α-Gal 6S R ^d	93,2					

^aExtremo no reductor. ^bEstos rangos de δ indican que no se pudo determinar dentro de los mismos cuál es el pico que corresponde a la asignación realizada. ^cExtremo reductor. ^dEsta unidad se halla en muy pequeña proporción, por lo que no se intentó asignar las restantes señales.

partida, realizado a 100 MHz y 65°C, indicó que, si bien era bueno, la resolución no era suficiente, al menos a esta altura de la reacción, como para observar los detalles estructurales que se encontraron en el espectro del polisacárido de partida (ver Cap. 1).

Al igual que en el espectro de $^{13}\text{C}_1$, las señales principales en la región anomérica son las que aparecen a 102,8 y 95,1 ppm que corresponden a la díada β -Gal 4S \rightarrow α -3,6-AnGal. El pico a 92,4 ppm indica que la díada β -Gal 4S \rightarrow α -3,6-AnGal 2S también contribuye a la estructura de $^{13}\text{C}_1\text{A}_1$, pero en menor proporción que la anterior, como se había observado para $^{13}\text{C}_1$. Las señales a 105,2 y 98,2 ppm con un hombro a 98,5 ppm corresponden a las díadas β -Gal 4S \rightarrow α -Gal 6S y β -Gal 4S \rightarrow α -Gal 2,6S, respectivamente³.

Es de destacar que, contrariamente a lo que sucede en el espectro de $^{13}\text{C}_1$, la señal a 98,5 ppm aparece como un hombro del pico a 98,2 ppm. Este resultado, junto con las señales a 97,0 y 93,2 ppm, indica o bien que se ha producido la hidrólisis parcial de las uniones entre las unidades de α -galactosa 2,6-disulfato y β -galactosa 4-sulfato, o bien se ha hidrolizado el grupo sulfato en C-2 de la unidad α , dando lugar a un incremento en la proporción de la díada β -Gal 4S \rightarrow α -Gal 6S. Los valores de los desplazamientos químicos para los C-1 de las unidades terminales reductoras (97,0 y 93,2 ppm) indican que los mismos no llevan sulfato en C-2. Sin embargo, también podrían encontrarse presentes pequeñas cantidades de unidades de α -galactosa 2,6-disulfato terminales reductoras, ya que, en este caso, el δ de la señal del C-1 de la β -galactosa 2,6-disulfato terminal

reductora coincidiría con el del C-1 de las unidades de 3,6-anhidro- α -galactosa (95,1 ppm) en los carragenanos kappa y la señal del C-1 para la unidad de α -galactosa 2,6-disulfato terminal reductora (a \approx 91 ppm) sería demasiado pequeña para poder detectarla¹.

No se detectaron unidades de β -galactosa sin sulfatar enlazadas a 3,6-anhidro- α -galactosa (2-sulfato). Estas unidades se encontraban presentes en $1C_1$ y las señales de las mismas en el espectro de r.m.n.-¹³C se diferencian de las secuencias de tipo kappa/iota principalmente por el pico a 66-67 ppm (C-4 de las unidades de β -galactosa). Tampoco se encontró una señal a 101,7 ppm, presente en el polisacárido de partida.

Las señales correspondientes a los restantes átomos de carbono de las díadas propuestas se hallan presentes en el espectro (Tabla 2).

En las regiones del espectro de $1C_1A_1$ que no corresponden a las señales anoméricas se observan algunos picos que no se encontraban presentes en el polisacárido de partida y cuya intensidad aumentó con el avance de la reacción. Se realizó la asignación tentativa de los mismos en base a cálculos realizados a partir de compuestos modelo (ver Primera Parte Cap. 3).

Así, para la galactosa 6-sulfato en el disacárido β -Gal 4S-->Gal 6S se consideraron como base las señales del espectro del monosacárido sulfatado⁴ y se corrigieron para

¹Estos valores se basan en los hallados para el C-1 de la D-galactosa 2-sulfato, ya que se supone que el grupo sulfato en C-6 no tendrá apreciable influencia en el δ del C-1.

dar cuenta del efecto de glicosilación⁵.

Para la unidad de β -galactosa 4-sulfato, las aproximaciones se realizaron de dos modos diferentes: 1) Los resultados obtenidos por Usov y col.⁶ para el residuo de β -galactosa terminal no reductora en el espectro del trisacárido 4-O- β -D-galactopiranosil-3-O- α -D-galactopiranosil-D-galactopiranososa se corrigieron teniendo en cuenta la sulfatación en C-4⁷. 2) Se tomó como base la díada β -Gal 4S--> α -Gal 6S³ y se estimó el efecto producido por la ruptura de la unión α ⁵. En base a estos cálculos se pudieron asignar en forma tentativa algunos de los picos del espectro de $1C_1A_1$ que no estaban presentes en $1C_1$ (Tabla 3).

Tabla 3. Asignación tentativa de algunas de las señales de los espectros de $1C_1A_1$ - $1C_1A_5$ que no se encuentran presentes en el espectro de $1C_1$.

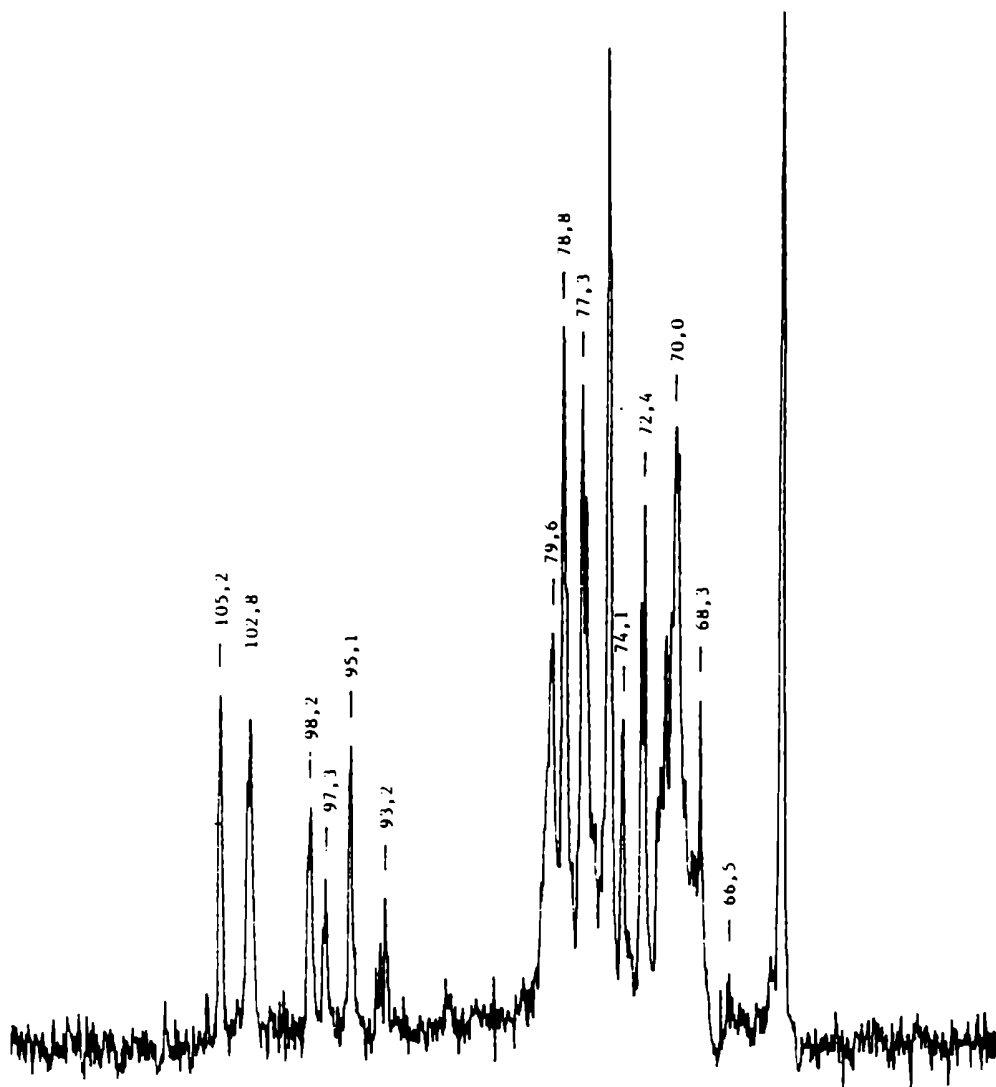
δ (ppm)	Asignación tentativa ^a
81,9-79,9	C-4 α -Gal 6SR
79,8	C-4 β -Gal 6SR
72,8-72,5	C-2 β -Gal 6SR, C-3 β -Gal 6SR y/o C-2 β -Gal 4SN
70,9-70,5	C-3 β -Gal 6SR, C-3 β -Gal 4SN y/o C-5 β -Gal 6SR
69,4	C-3 β -Gal 6SR y/o C-5 β -Gal 6SR
69,1	C-2 α -Gal 6SR
68,1-68,4	C-6 β -Gal 6SR y/o C-6 α -Gal 6SR
67,9	C-3 α -Gal 6SR
65,8	C-3 α -Gal 6SR y/o C-5 α -Gal 6SR

^a β -Gal 4SN = unidad terminal no reductora, β -Gal 6SR y α -Gal 6SR = unidades terminales reductoras.

El espectro de la muestra después de 13 horas de reacción ($1C_1A_2$, Figura 2), si bien es muy similar al de $1C_1A_1$, presenta una pequeña diferencia en la intensidad relativa de las señales. Los picos correspondientes a la díada kappa son menos intensos que aquél que aparece a 105,2

ppm (C-1 de unidades de β -galactosa enlazadas a galactosa).

Figura 2. Espectro de r.m.n.- ^{13}C de $1\text{C}_1\text{A}_2$.



Esta variación se debe a que, por ruptura de la unión 3,6-anhidro- α -galactosídica, el C-1 de la unidad β vecina se desplaza hacia campos más bajos (de $\approx 103,0$ ppm a $\approx 103,9$ ppm), en cambio, la ruptura de una unión α -galactosídica no influye apreciablemente en el desplazamiento químico del C-1 de la unidad β vecina (a 105,2 ppm).

Los picos correspondientes a los extremos reductores de galactosa son más importantes que en el espectro de $1C_1A_1$.

A 66,5 ppm se observa una pequeña señal que correspondería al C-4 de unidades de β -galactosa no sulfatadas en esa posición³. Sin embargo, no se puede descartar que esta señal corresponda al C-3 o C-5 de una unidad de α -Gal 6S terminal reductora.

El espectro de $1C_1$ después de 35 horas de reacción ($1C_1A_3$, Figura 3) presenta las mismas señales que el de $1C_1A_1$, pero la intensidad de los picos de las díadas β -Gal 4S--> α -3,6-AnGal (2S) es mucho menor.

El espectro de $1C_1$ después de 51 horas de reacción ($1C_1A_4$, Figura 4, Tabla 4) es bastante diferente de los anteriores. Se observan señales a 90,9, 87,9 y 83,4 ppm que corresponden a unidades de 3,6-anhidrogalactosa terminal reductora⁷.

En la mezcla de reacción, a juzgar por las áreas de los picos de los átomos de carbono anoméricos, la cantidad de unidades de α -galactosa 6-sulfato aún enlazadas glicosídicamente es mucho menor que la de las unidades que se encuentran formando parte de disacáridos u otras cadenas cortas. Además, la ausencia de una señal a $\approx 80,5$ ppm (C-3 de la unidad β en la díada β -Gal 4S--> α -Gal 2,6S) indica que

las unidades de α -galactosa que todavía se encuentran unidas a la cadena llevan sulfato sólo en la posición 6.

Figura 3. Espectro de r.m.n.- ^{13}C de $1\text{C}_1\text{A}_3$.

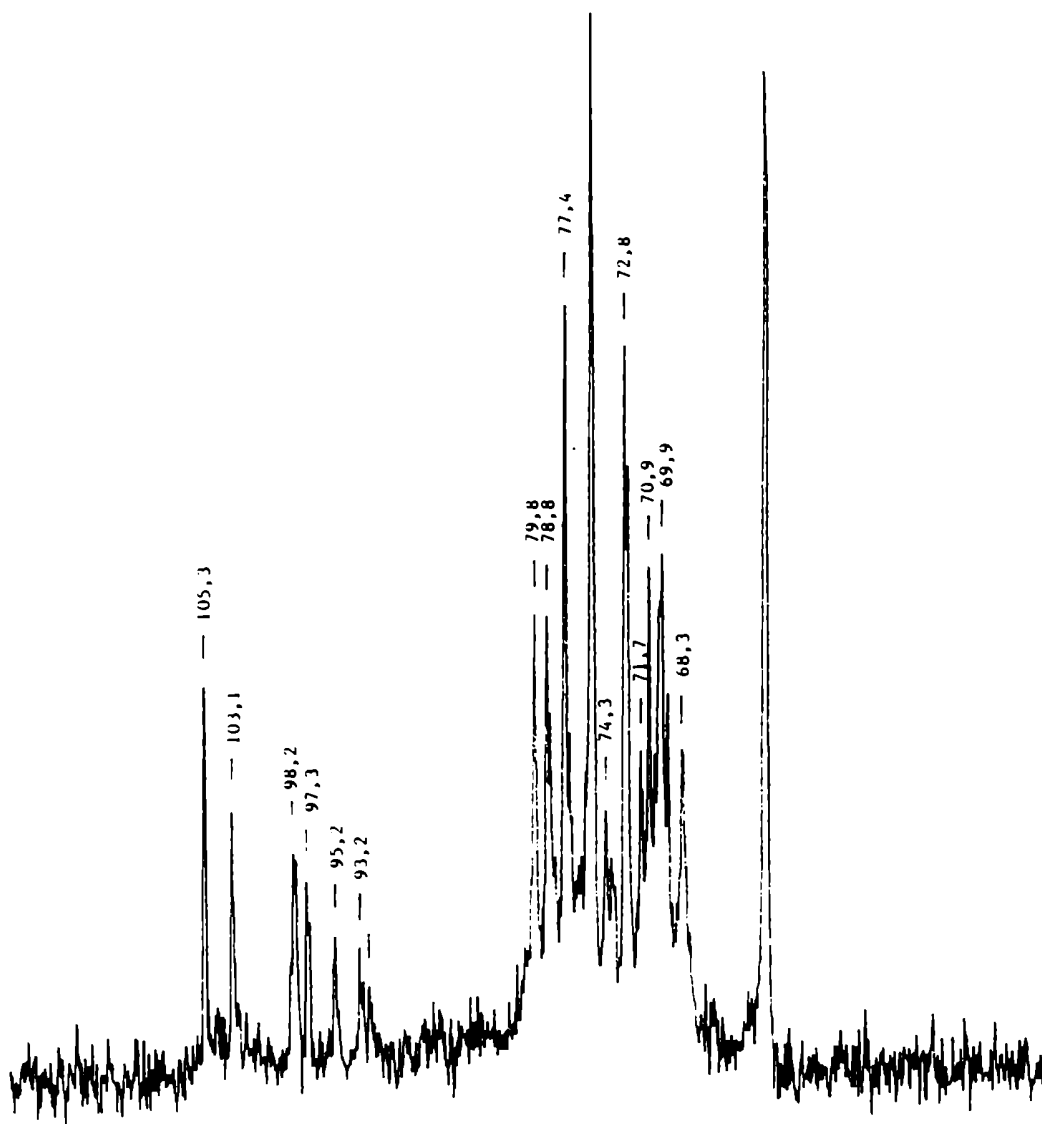
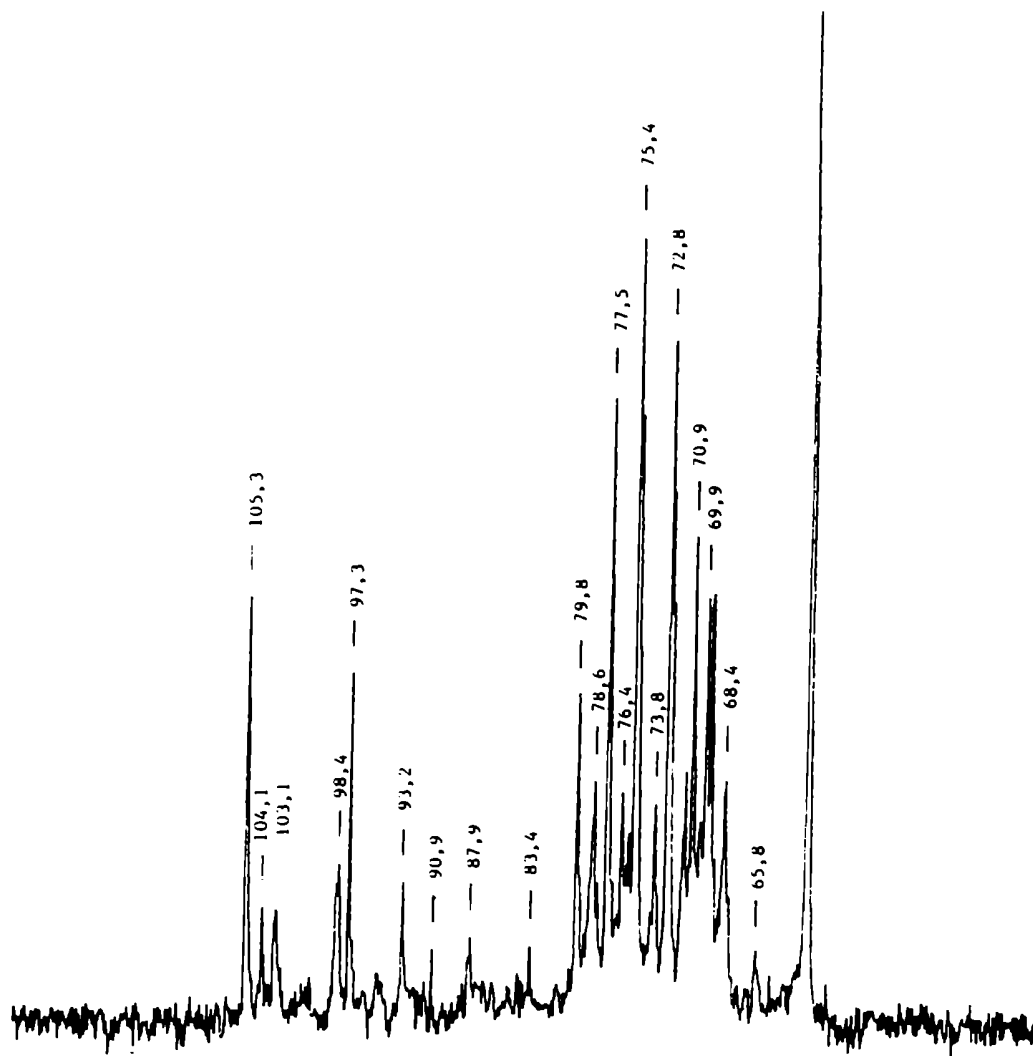


Figura 4. Espectro de r.m.n.- ^{13}C de $1\text{C}_1\text{A}_4$.



En el espectro de $1\text{C}_1\text{A}_4$ se observa también una señal a 103,1 ppm que corresponde al C-1 de unidades de β -galactosa enlazadas en la díada $\beta\text{-Gal}\rightarrow\alpha\text{-3,6-AnGal}$ (2S) pero no se distinguen las señales de los C-1 de estas últimas unidades, que probablemente se encuentren en porcentajes

Tabla 4. Asignación del espectro de r. m. n. ^{13}C de IC_{14} .

Díadas	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6
β -Gal 4S NR ^a	104,1	71,5	72,6	77,5	75,4	62,0
α -3,6-AnGal R ^b	90,9	73,8	83,4	87,9	76,4	73,8
β -Gal 4S NR	105,3	72,8-72,5 ^c	70,9-70,5	77,5	75,4	62,0
β -Gal 6S R	97,3	72,8-72,5	70,9-69,5	79,8	70,9-69,9	68,4
α -Gal 6S R	93,2	69,1	67,9 ó 65,8		65,8	68,4
β -Gal 4S enlazada por 3	105,3	70,9	78,6	73,8	75,4	62,0
α -Gal 6S enlazada por 4	98,4	69,2	70,9	79,5	69,0	68,4

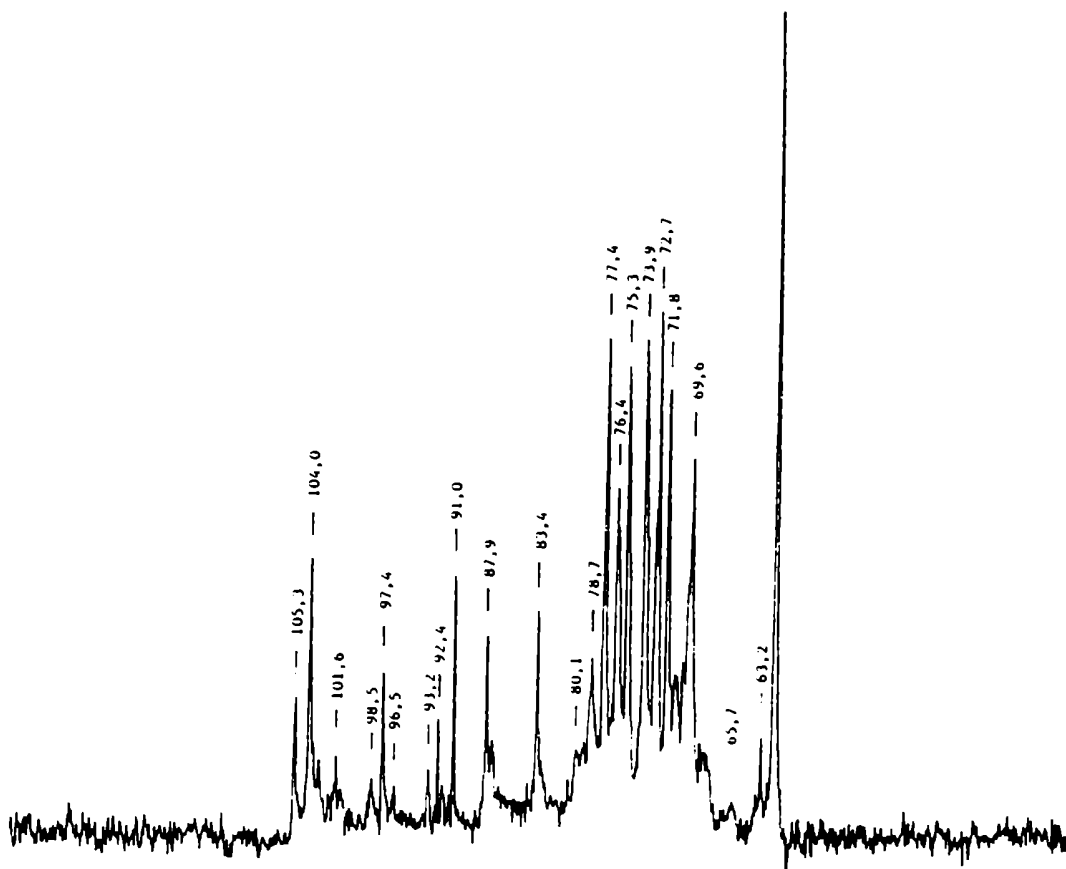
^aExtremo no reductor. ^bExtremo reductor. ^cEstos rangos de δ indican que no se pudo determinar dentro de los mismos cuál es el pico que corresponde a la asignación realizada.

individualmente demasiado bajos para ser detectados. En este caso, no se pudo determinar la sulfatación sobre la unidad β .

En el espectro del producto final de la reacción ($1C_1A_3$, Figura 5, Tabla 5) predominan las señales de la carrabiosa kappa. Se distinguen también picos a 87,4 y 83,1 ppm que sugieren la presencia de carrabiosa beta⁷ (es decir, sin sulfato en C-4 de la unidad β) y los picos característicos del disacárido β -Gal 4S \rightarrow Gal 6S. Además, se encuentran todavía señales correspondientes a estructuras de mayor peso molecular. Los picos a 103,2 y 92,4 ppm sugieren la presencia de la díada β -Gal $\rightarrow\alpha$ -3,6-AnGal 2S (no se pudo determinar la sulfatación sobre la unidad β). La señal a 101,6 ppm que podría derivar de residuos de α -L-galactosa unida a β -D-galactosa había sido detectada en $1C_1$ (ver Cap. 2), pero no se encontró en los productos con menor grado de degradación.

En todos los espectros descritos en este Capítulo, así como en otros correspondientes a carragenanos de mayor peso molecular (fracciones tratadas), se observó que la señal del C-1 de las unidades de 3,6-anhidro- α -galactosa enlazadas a β -galactosa 4-sulfato se encuentra desplazada en $\approx 0,6$ ppm hacia campos más altos que los valores que se informan en la literatura, que son los mismos hallados en este trabajo en los espectros de los carragenanos realizados a mayor temperatura. Este efecto ya había sido observado por Rochas y col.⁶ para los carragenanos kappa (ver Primera Parte Cap.

Figura 5. Espectro de r.m.n.- ^{13}C de $1\text{C}_3\text{A}_5$.



3). Un efecto similar pero de menor magnitud se observó para los C-1 de las unidades de 3,6-anhidrogalactosa 2-sulfato unidas a β -galactosa 4-sulfato.

Tabla 5. Asignación del espectro de r.m.n.-¹³C de IC₁A₅.

Unidad	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6
β-Gal 4S NR ^a	104,0	71,8	72,7	77,4	75,3	62,0
α-3,6-AnGal R ^b	91,0	73,8	83,4	87,9	76,4	73,9
β-Gal NR	104,0	71,8	73,4	69,3	76,1	61,8
α-3,6-AnGal R	91,0	73,7	83,1	87,4	76,1	73,9
β-Gal 4S NR	105,3	72,8-72,5 ^c	70,9-70,5	77,5	75,4	62,0
β-Gal 6S R	97,4	72,8-72,5	70,9-69,5	80,4-79,3	70,9-70,5	68,1
α-Gal 6S R	93,2	69,1	65,7	81,9-79,9	65,7	68,5
β-Gal enlazada por 3	104,0					
α-L-Gal (6S) enlazada por 4	101,6					
β-Gal (4S) enlazada por 3	103,2					
α-3,6-AnGal (2S) enlazada por 4	92,4 ó 92,0					
β-Gal 4S enlazada por 3	105,3					
α-L-Gal 6(2,6S) enlazada por 4	98,5					

^aExtremo no reductor. ^bExtremo reductor. ^cEstos rangos de δ indican que no se pudo determinar dentro de los mismos cuál es el pico que corresponde a la asignación realizada.

Conclusiones:

Estudios previos⁹ indicaron que la autohidrólisis de los carragenanos kappa/iota sucede a través de la ruptura de los enlaces glicosídicos entre los residuos de 3,6-anhidro- α -galactosa (2-sulfato) y β -galactosa 4-sulfato. Sin embargo, la autohidrólisis de 1C₁ produjo dos disacáridos: a) carrabiosa kappa, según la ruptura esperada, y b) 4-O-(4-sulfo- β -D-galactopiranosil)-D-galactosa 6-sulfato. Esto indica que, además de la ruptura esperada, también se hidrolizaron ciertos enlaces α -galactosídicos.

El hecho que las constantes de velocidad calculadas a partir del peso molecular y el porcentaje de 3,6-anhidrogalactosa que permaneció unida sean similares, indica que las energías de ambos enlaces α (3,6-anhidro-galactosídico y galactosídico) son del mismo orden, posiblemente por compensación de la labilidad de las uniones 3,6-anhidrogalactosídicas con la influencia de los grupos sulfato presentes en C-2 de las unidades α -galactosídicas, los cuales favorecen la ruptura de la unión glicosídica al pH=2,4, al que se realizó la reacción (ver Primera Parte Cap. 4).

Se sabe que durante la reacción de autohidrólisis, parte de los grupos sulfato se hidrolizan (ver Primera Parte Cap. 4). De la comparación de los productos de reacción con el análisis estructural del carragenano 1C₁ (ver Cap. 1) se concluye que estos grupos se hallaban en C-2 de las unidades α , por un lado, por el aumento de la díada β -Gal4S $\rightarrow\alpha$ -Gal 6S en función del tiempo y, por otro, porque los extremos terminales no llevan sulfato en C-2. Nosedá y Cerezo¹⁰

encontraron que los grupos sulfato en C-2 de las unidades de α -galactosa 2,6-disulfato de los carragenanos lambda también se hidrolizaban durante la reacción.

La velocidad de autohidrólisis de los carragenanos kappa es menor que la de los carragenanos iota; esto indica que la sulfatación en C-2 de las unidades de 3,6-anhidro- α -galactosa aumenta la velocidad de la reacción, al igual que sucede en la hidrólisis ácida cuando la concentración de protones es baja.

Con la hidrólisis de la unión 3,6-anhidrogalactosídica, el anillo piranósico se abre, quedando C-1 y C-2 en una cadena abierta y así, la labilidad del grupo sulfato aumenta considerablemente. De hecho, la señal a ≈ 89 ppm, que corresponde al C-1 de las unidades de 3,6-anhidrogalactosa 2-sulfato⁹ terminales no ha sido detectada durante la autohidrólisis de $1C_1$.

Respecto a las unidades de α -galactosa, la observación de la secuencia de espectros realizados a distintos tiempos de reacción sugirió que la sulfatación del C-2 de esta unidad es necesaria para que el enlace se hidrolice (la unión α -Gal 6S \rightarrow β -Gal 4S no parece romperse durante la reacción). Sin embargo, al menos la mayor parte de las unidades de α -galactosa que se encuentran en el extremo terminal reductor no llevan sulfato en C-2 (ver arriba); estas observaciones hacen evidente que los grupos sulfato en C-2 se hidrolizan después de la ruptura de la unión glicosídica. Por otra parte, el aumento proporcional de la intensidad de las señales correspondientes a la díada β -Gal 4S \rightarrow α -Gal 6S en función del tiempo de reacción sugiere que

la hidrólisis del grupo sulfato en C-2 de las unidades de α -galactosa 2,6-disulfato es paralela a la hidrólisis de la unión glicosídica.

La autohidrólisis de $1C_1$ produjo $\approx 50\%$ de carrabiosa kappa; este hecho y las rupturas mencionadas indican la presencia de cantidades importantes de la tríada β -Gal 4S \rightarrow 3,6-AnGal (2S) \rightarrow β -Gal 4S.

Los resultados para la estructura de $1C_1$ presentados en este capítulo son similares a los obtenidos a partir de los espectros de r.m.n.- ^{13}C de alta resolución. Esto demuestra que el procedimiento descrito es una herramienta válida para el estudio estructural de estos polisacáridos.

Fraccionamiento del producto final

A continuación se encaró la separación de los oligosacáridos formados en la reacción. El producto final (62,5 horas) se cromatografió sobre Sephadex G-25, utilizando agua como solvente de elución. La Figura 6 muestra el perfil de elución obtenido. Si bien la separación no fue buena, hizo posible el aislamiento de ocho fracciones.

La Tabla 6 indica el rendimiento y análisis de las mismas. El porcentaje de 3,6-anhidrogalactosa aumenta en función del volumen de elución hasta que en la fracción 7 la relación Gal:3,6-AnGal es 1:1. Los resultados obtenidos para la fracción 8 no se pudieron explicar en base a los conocimientos que se tienen de la estructura de los

carragenanos y la reacción de autohidrólisis, pues éstos indicarían que hay mayor cantidad de unidades α que β .

Figura 6. Cromatografía sobre Sephadex G-25 del producto final obtenido por autohidrólisis de $1C_1$.

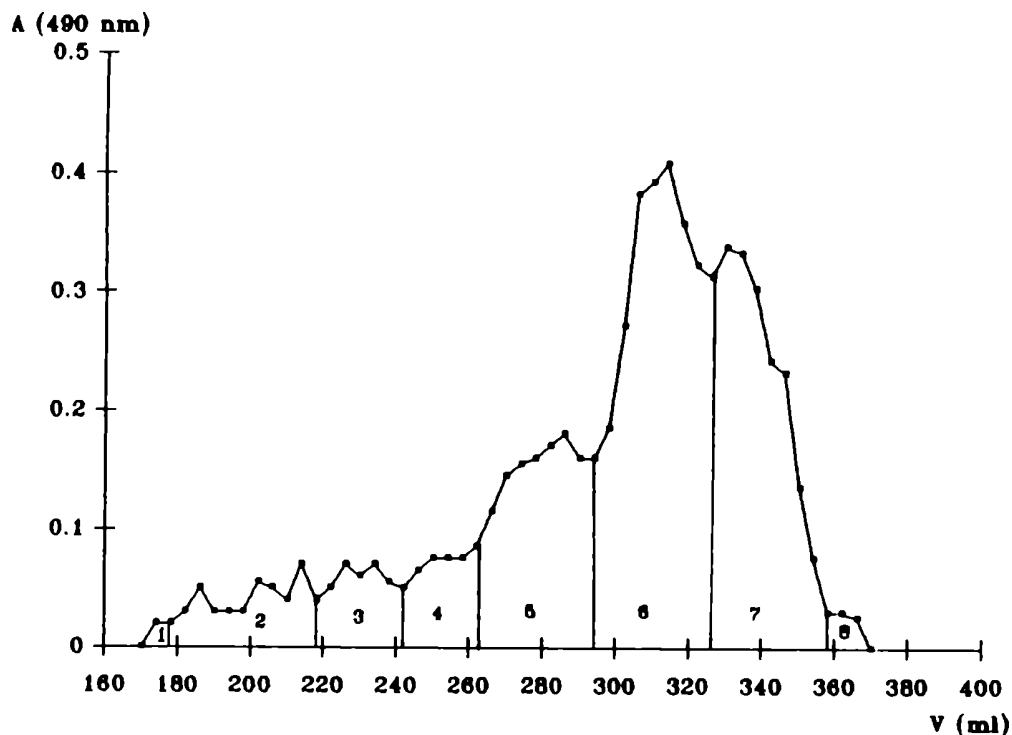


Tabla 6. Rendimiento, composición y propiedades de las fracciones aisladas por cromatografía sobre Sephadex G-25 del carragenano $1C_1$ autohidrolizado.

Fracción	Rendimiento ^a %	Peso molecular	Gal:3,6-AnGal:sulfato relación molar
1	3,2	1528	1,00:0,16:0,46
2	4,2	933	1,00:0,29:1,11
3	4,1	551	1,00:0,47:1,04
4	8,6	492	1,00:0,57:1,07
5	12,1	454	1,00:0,59:0,91
6	30,6	448	1,00:0,85:1,64
7	28,5	448	1,00:0,99:1,31
8	8,6	457	1,00:1,59:1,15

^aSobre el total recuperado (75.3 %).

Hasta el momento se han realizado los espectros de r.m.n.-¹³C de las fracciones 2 y 6 de 50 MHz a temperatura ambiente (Figuras 7 y 8).

La fracción 6 tiene, como señales principales, las que corresponden a carrabiosa kappa⁷. Además, el pico a 89,7 ppm indica la presencia de una pequeña proporción de carrabiosa iota⁹ (que no había sido detectada en el producto autohidrolizado sin fraccionar, ver arriba), lo cual implica que, a pesar de la labilidad frente al ácido del grupo sulfato en C-2 de las unidades de 3,6-anhidrogalactosa 2-sulfato terminales, una pequeña cantidad del mismo no se ha hidrolizado. Las señales a 105,2, 97,3 y 93,1 ppm corresponden al disacárido β-D-Gal 4S-->Gal 6S; el pico a 98,7 ppm y la ausencia de una señal a 80,6 ppm (C-3 de la unidad de β-D-Gal 4S unida a la cadena) sugieren la presencia del tetrasacárido β-D-Gal 4S-->α-D-Gal 6(2,6)S-->β-D-Gal 4S-->Gal 6S. Por otra parte, las señales a 95,1 y 92,2 ppm indican que algunas unidades de α-D-3,6-AnGal y α-D-3,6-AnGal 2S se encuentran aún unidas glicosidicamente; con los datos que contamos hasta el momento, no fue posible determinar la sulfatación sobre las unidades β vecinas aunque debido al pico a 103,1 ppm se descarta la sulfatación en C-2. Es posible que se trate de residuos de β-galactosa sin sulfatar; la ausencia de sulfato en C-4 justificaría que no se hayan hidrolizado.

La señal a 101,4 ppm sugiere sulfatación en C-2 de la unidad β. El estudio realizado por Noseda y Cerezo⁹ sobre la hidrólisis de carragenanos lambda y lambda tratados mostró que estos últimos se hidrolizan con una velocidad menor que

Figura 7. Espectro de r.m.n.- ^{13}C de la fracción 2.

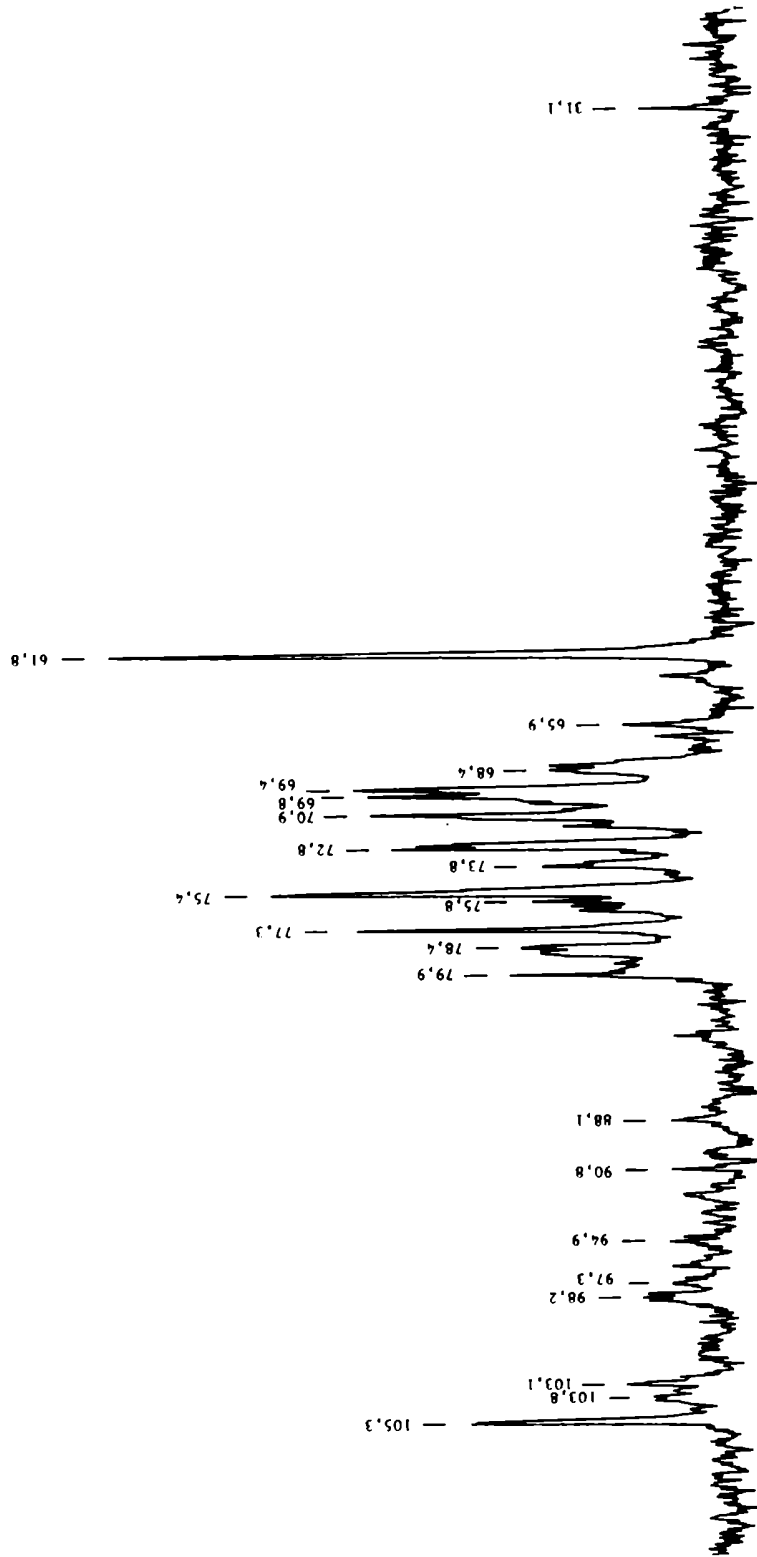
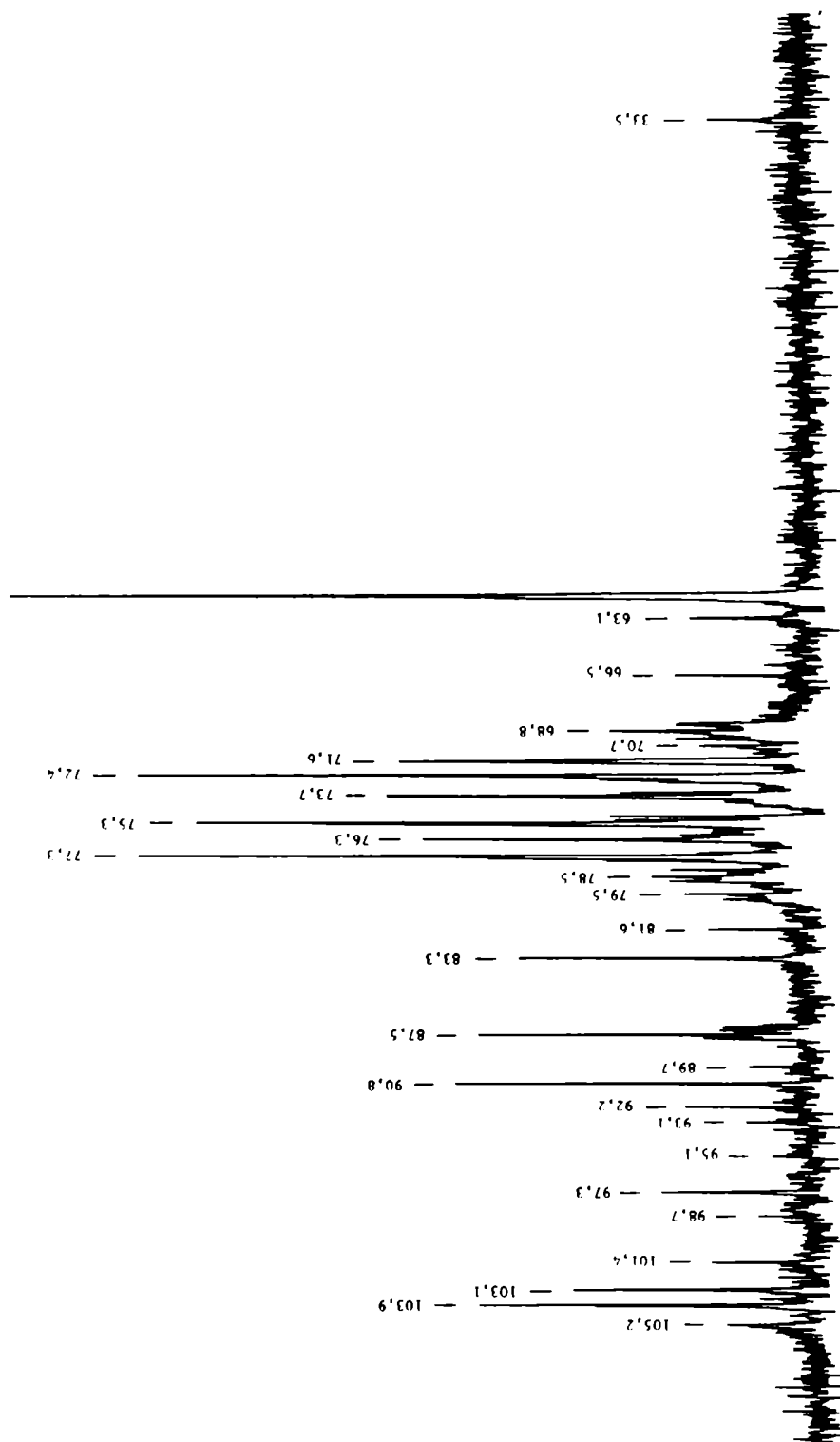


Figura 8. Espectro de r.m.n.- ^{13}C de la fracción 6.



los carragenanos de la familia kappa, pero además se produce la hidrólisis del grupo sulfato en C-2 de la unidad β con una velocidad del mismo orden. Una interpretación más probable para esta señal es que, junto con una a 104,0 ppm, se debería a la presencia de unidades de α -L-galactosa enlazadas a β -galactosa que derivarían de otros polisacáridos que se extrajeron junto con los carragenanos y precipitaron en cloruro de potasio, probablemente, por hallarse asociados a carragenanos insolubles (ver Cap. 2).

A 33,5 ppm aparece una señal que no ha sido asignada.

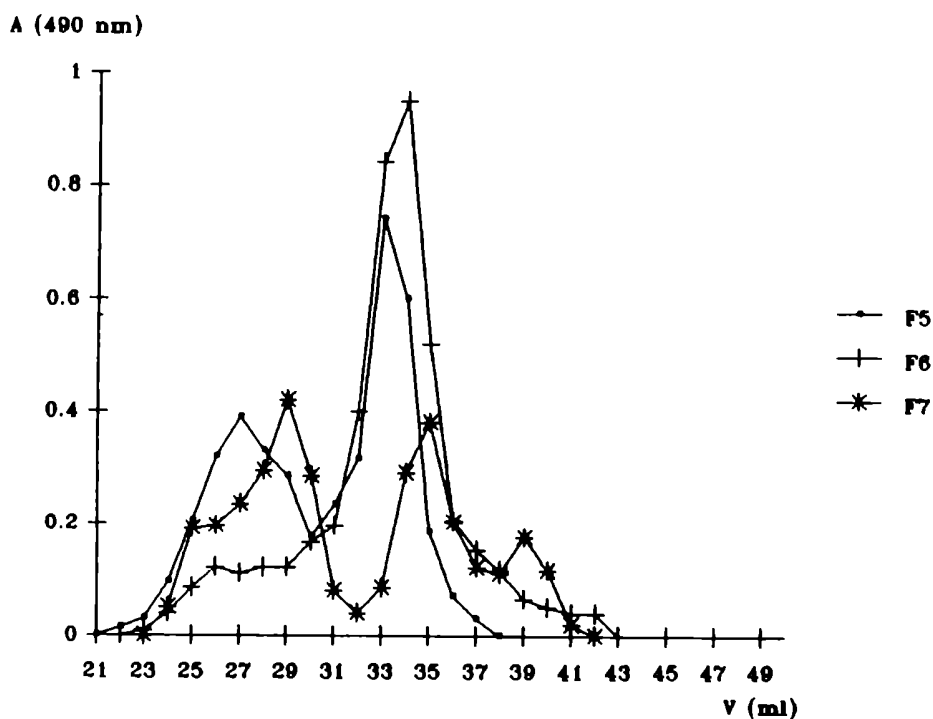
Como era de esperar, la fracción 2 es de mayor peso molecular que la fracción 6. La señal más importante de la región anomérica es la que aparece a 105,3 ppm, que corresponde al C-1 de las unidades de β -D-galactosa unida a α -D-galactosa, los picos a 98,3, 98,2 y 97,9 ppm sugieren que estas unidades α presentan más de un tipo de sustitución o entornos diferentes, estos efectos no pudieron precisarse. Se distinguen los picos correspondientes a los extremos reductores de 3,6-anhidrogalactosa⁷ y 3,6-anhidrogalactosa 2-sulfato⁹ y una pequeña señal a 97,3 ppm que indica la presencia de β -D-Gal terminal reductora⁴. Los picos a 103,1, 94,9 y 92,2 ppm indican la presencia de díadas β -D-Gal \rightarrow α -D-3,6-AnGal y β -D-Gal \rightarrow α -D-3,6-AnGal 2S³; la sulfatación de las mismas sobre la unidad β aún no ha sido determinada. En ambos espectros se observa una señal a 63,1 ppm que no ha sido asignada; por el valor de δ podría corresponder a un carbono primario unido a un hidroxilo. Además, aparece una señal a 31,1 ppm que no ha sido asignada.

Estos espectros muestran claramente que, si bien existe en estas fracciones una separación incipiente, no se ha logrado obtener oligosacáridos puros. Por este motivo, no se continuó el estudio estructural de las fracciones obtenidas.

Se intentó la purificación de las fracciones 5, 6 y 7 por cromatografía sobre Bio-Gel P-2 y Bio-Gel P-6 y las fracciones de mayor peso molecular por cromatografía sobre Sephadex G-100, obteniéndose en todos los casos un sólo pico.

Una alícuota de las fracciones 5, 6 y 7 se recromatografió sobre una columna analítica de Sephadex G-25. La Figura 9 muestra la heterogeneidad de estas fracciones.

Figura 9. Cromatografía sobre Sephadex G-25 de las fracciones 5, 6 y 7.



No fue posible separar las distintas subfracciones obtenidas debido a la pequeña cantidad de muestra que representaba cada una.

Han aparecido ultimamente algunos fraccionamientos preparativos exitosos de oligosacáridos obtenidos por degradación enzimática de carragenanos¹¹. En el futuro se tratará de aplicar estas técnicas para lograr la separación de los productos de autohidrólisis y, recién entonces, realizar un estudio estructural de los oligosacáridos.

Bibliografía

1. J. T. Park y M. J. Johnson, *J. Biol. Chem.* **181**, 149 (1949).
2. W. Yaphe y G. P. Arsenault, *Anal. Biochem.* **13**, 143 (1965).
3. C. A. Stortz y A. S. Cerezo, *Carbohydr. Pol.* **18**, 237 (1992).
4. P. J. Archbald, M. D. Fanny y A. B. Roy, *Carbohydr. Res.* **93**, 177 (1981).
5. A. S. Perlin, B. Casu y H. J. Koch, *Can. J. Chem.* **48**, 2696 (1970).
6. A. I. Usov, V. V. Barbakadze, S. V. Yarotskii y A. S. Shashkov, *Bioorg. Khim.* **4**, 1507 (1978).
7. I. J. Miller, H. Wong y R. H. Newman, *Austr. J. Chem.* **35**, 853 (1982).
8. C. Rochas, M. Rinaudo u M. Vincendon, *Biopolymers* **19**, 2165 (1980).
9. C. A. Stortz y A. S. Cerezo, *Int. J. Biol. Macromol.* **13**,

101 (1991).

10. M. D. Nosedá y A. S. Cerezo, *Int. J. Biol. Macromol.* 15, 177 (1993).

CAPITULO 4

ACTIVIDAD ANTIVIRAL

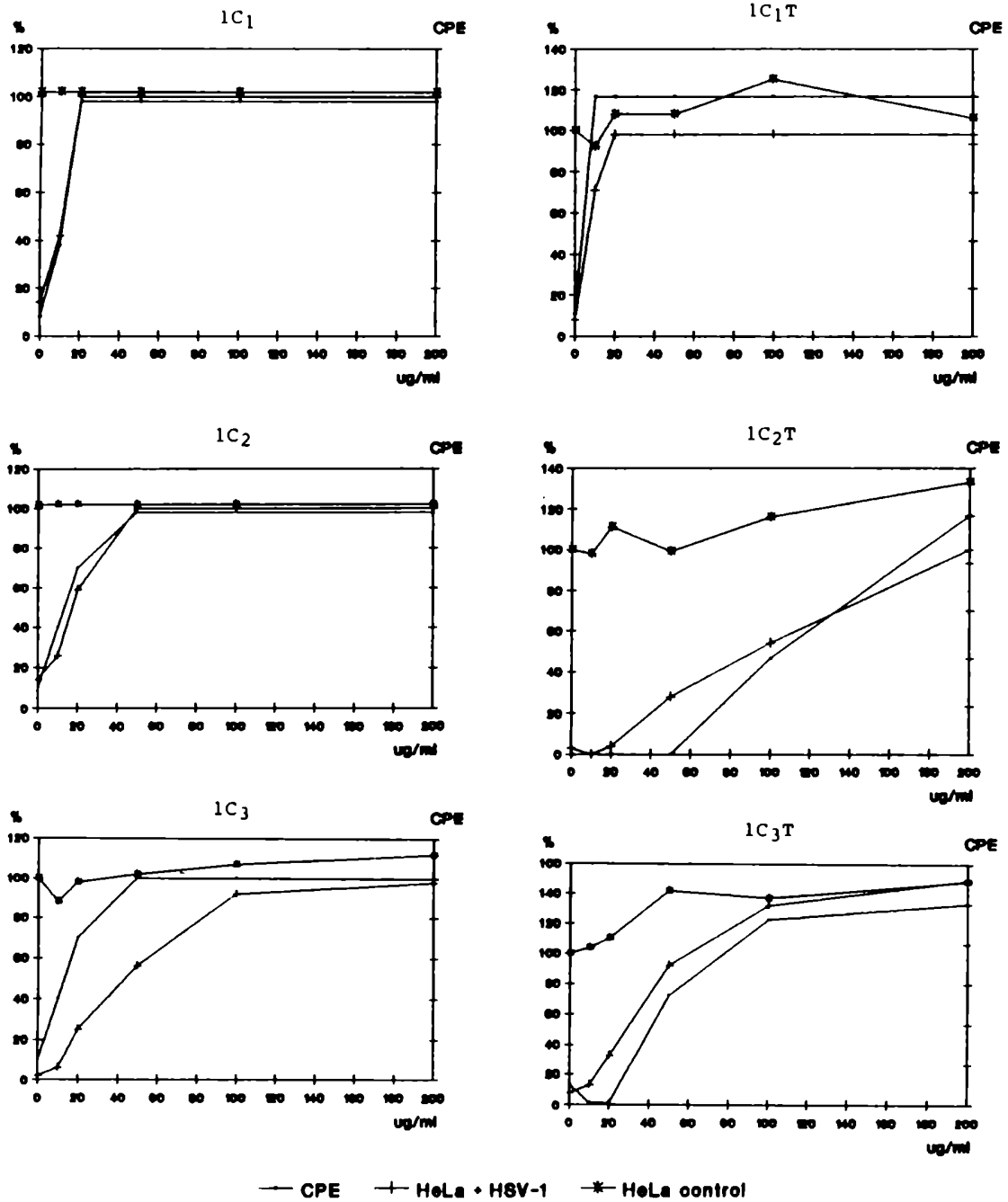
Los estudios de actividad antiviral de los carragenanos, así como de los oligosacáridos obtenidos a partir de los mismos por autohidrólisis fueron realizados por el Dr. Luis Carrasco del Centro de Biología Molecular de la Universidad Autónoma de Madrid.

Células HeLa se infectaron con Herpes simplex tipo 1 a baja multiplicidad e inmediatamente se añadió el polisacárido en distintas concentraciones. Con el objeto de conocer la toxicidad de los carragenanos, éstos se agregaron también a células no infectadas. Después de varios ciclos de replicación viral se observó el efecto citopático al microscopio óptico y se marcó con [³⁵S]-metionina durante 1 hora para determinar la síntesis de proteínas en el cultivo celular.

Estos ensayos se realizaron para los carragenanos 1C₁, 1C₂ y 1C₃, así como con los correspondientes derivados tratados. Como se muestra en la Figura 1, todos ellos presentaron actividad y ninguno resultó tóxico para el tejido celular.

En vista de los resultados positivos, teniendo en cuenta que los carragenanos no son adecuados para su administración como droga (ver Primera Parte Cap. 1 f)), se decidió ensayar la actividad de oligosacáridos derivados de los mismos. Con tal finalidad, se sometió al carragenano 1C₃T₁ a una autohidrólisis preparativa. Se eligió este polisacárido por contar con muestra suficiente, considerando que, por fraccionamiento con cloruro de potasio del carragenano 1C₃T, que era activo, se obtuvo 1C₃T₁ como producto principal.

Figura 1. Actividad antiviral de los carragenanos 1C₁, 1C₂ y 1C₃ y de los correspondientes polisacáridos modificados.



La reacción se llevó a cabo en la forma que se describió en el capítulo de Autohidrólisis. Se extrajeron muestras a diferentes tiempos, cuyos pesos moleculares se indican en la Tabla 1. Los resultados obtenidos se encuentran en la Figura 2. Los oligosacáridos así como el producto de partida, no mostraron actividad antiviral. Es probable que esto se deba al bajo peso molecular de las muestras, ya que la estructura y el grado de sulfatación de las mismas es comparable a los de otras fracciones que resultaron activas. Otros ensayos realizados en nuestro laboratorio con un carragenano kappa autohidrolizado también fueron negativos (C. A. Stortz, comunicación personal).

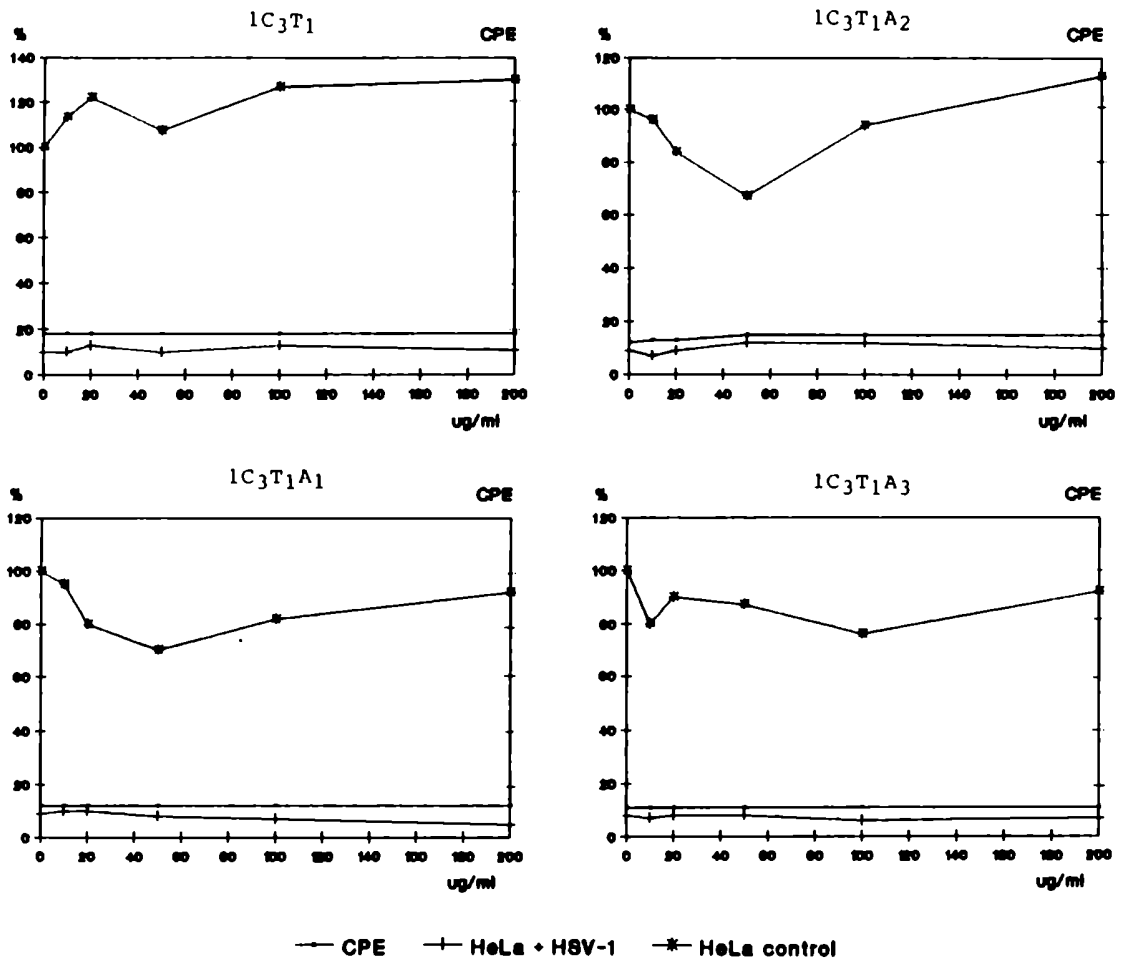
Tabla 1. Autohidrólisis del carragenano 1C₃T₁.

Muestra	Tiempo de reacción	Peso molecular
1C ₃ T ₁	-	8.500
1C ₃ T ₁ A ₁	30 min	5.600
1C ₃ T ₁ A ₂	1hs	5.300
1C ₃ T ₁ A ₃	1 hs 30 min	2.900
1C ₃ T ₁ A ₄	2 h	2.700
1C ₃ T ₁ A ₅	2 hs 30 min	2.400
1C ₃ T ₁ A ₆	3 hs 30 min	2.400
1C ₃ T ₁ A ₇	5 hs 30 min	1.900
1C ₃ T ₁ A ₈	6 hs 30 min	1.700

En conclusión, los carragenanos presentan actividad antiherpética pero la disminución del peso molecular de los mismos lleva a una rápida pérdida de esta actividad.

Se ha reportado actividad antiviral para un grupo bastante variado de polisacáridos sulfatados, lo que

Figura 2. Actividad antiviral del carragenano $1C_3T_1$ y de los productos obtenidos por degradación parcial del mismo^a.



^aNo se muestran los resultados obtenidos para todos los oligosacáridos de la Tabla 1 pues los gráficos son similares.

indicaría que los sitios de unión de la envoltura del virus no son específicos para el heparán sulfato de la membrana celular, sino que existen otras moléculas que presentan una flexibilidad, peso molecular y distribución de sustituyentes en la cadena polimérica como para interactuar con las proteínas de la envoltura del virus, bloqueando así la unión de éste a la membrana celular.

Al evaluar los resultados negativos obtenidos con los productos de degradación de los carragenanos, hay que tener en cuenta que aún cuando la secuencia de unidades es la misma que en los polisacáridos de partida, la diferencia entre ambos no se limita al peso molecular, sino que está dada por la forma que toma la molécula cuando se encuentra en solución, que determina además cuales son los grupos que se encuentran disponibles para interactuar con la envoltura viral y en qué forma.

En base a estos resultados se puede descartar a estos productos como potenciales drogas anti-herpes y, probablemente, tampoco sean activos para el tratamiento de infecciones de otros virus con envoltura.

TERCERA PARTE

MATERIALES Y METODOS

Consideraciones generales

Los productos se secaron en desecador a presión reducida sobre cloruro de calcio.

Las evaporaciones se realizaron en un evaporador rotatorio Büchi a presión reducida, la temperatura del baño no superó los 45°C.

Las muestras se llevaron a sequedad por liofilización en un aparato Virtis Freezemobile 3, a presiones menores que 100 miliTorr y temperaturas del condensador menores de 50°C bajo cero.

Las soluciones y suspensiones utilizadas para las determinaciones cuantitativas se mezclaron en un rotamixer (Hook & Tucker Ins., Ltd.).

Las diálisis se realizaron a temperatura ambiente utilizando tubos de celulosa (SpectraPor) de corte de peso molecular 6.000-8.000, a excepción de las diálisis posteriores a la metilación de los polisacáridos en las que se usaron tubos de corte de peso molecular 3.500. La selección del diámetro del tubo dependió del volumen de solución a dializar. Las diálisis se llevaron a cabo contra agua corriente durante 2 días y luego contra agua destilada renovada cada 8-24 horas.

Los poderes rotatorios se determinaron 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. La concentración utilizada fue 0,3-0,55% (p/v) en agua. Las soluciones se centrifugaron y, cuando se obtuvo precipitado, éste se descartó. En la mayor parte de

los casos fue necesario estabilizar la solución en la celda del polarímetro durante una noche antes de realizar la medición.

Las determinaciones colorimétricas se realizaron en un espectrofotómetro Spectronic 20 y la concentración se determinó por referencia a curvas patrón; se utilizaron celdas de 1 cm longitud óptica.

Los tiempos de escurrimiento se midieron con un viscosímetro de Ostwald a 25°C. La viscosidad relativa se calculó dividiendo el tiempo de escurrimiento de la solución por el valor que se obtuvo para el agua en las mismas condiciones.

Los espectros infrarrojos con transformada de Fourier de 1C, 2C, 1C₁, 1C₂ y 1C₃ se realizaron con un espectrofotómetro 510P Nicolet-FT, usando pastillas de bromuro de potasio a 1000-700 cm⁻¹, el número de pulsos fue 32 y la resolución 4 cm⁻¹.

Los restantes espectros infrarrojos se determinaron con un espectrofotómetro Perkin-Elmer 710B, utilizando películas del polisacárido obtenidas por concentración de soluciones acuosas del producto al 0,5 % a sequedad sobre una superficie de mercurio.

Determinación de azúcares componentes

Hidrólisis ácida total de los polisacáridos:

Los polisacáridos obtenidos en la primera y segunda extracción (4 mg) se hidrolizaron en ácido sulfúrico 0,5 M (1 ml) durante 7-8 horas a 95°C en un vial cerrado¹. La

solución ácida se enfrió, se neutralizó con carbonato de bario, el sulfato de bario formado y el material insoluble se separaron por centrifugación. El sobrenadante se evaporó a presión reducida para insolubilizar las sales suspendidas. El hidrolizado se tomó con agua (1 ml), se separó por centrifugación el material insoluble y se llevó nuevamente a sequedad. Se repitió el proceso a fin de eliminar las sales suspendidas.

Los restantes polisacáridos (≈ 3 mg) se hidrolizaron por calentamiento con ácido trifluoroacético 2 M durante 90 min a 121°C en un vial cerrado². La solución se evaporó a presión reducida hasta casi sequedad, se tomó el hidrolizado con agua y se llevó nuevamente a sequedad, repitiendo el procedimiento hasta eliminar totalmente el ácido.

Cuando se contó con muestra suficiente, el residuo se tomó con agua (1 ml) y se separó en partes iguales que se derivatizaron separadamente:

a) Derivatización a los alditoles acetilados.

A una de las partes se le adicionó borohidruro de sodio y se dejó a temperatura ambiente durante una noche. Luego, se agregó resina Amberlite IR-120 (H^+) hasta neutralidad, se filtró y se llevó a sequedad. Para eliminar el ácido bórico formado, se adicionó metanol (0,5 ml) y se llevó a seco, esta operación se repitió cuatro veces y finalmente se dejó en desecador una noche. Se agregó 1 ml de anhídrido acético/piridina 1:1 y se calentó durante 45 min a 100°C . Una vez enfriada, la muestra se volcó sobre cloroformo/agua (1:1, 1,5 ml), la fase acuosa se extrajo con cloroformo y

los extractos clorofórmicos unidos se lavaron con agua, solución saturada de bicarbonato de sodio y nuevamente con agua. La fase orgánica se secó con sulfato de sodio anhidro y se evaporó el cloroformo³. Por agregado de $\approx 50 \mu\text{l}$ de cloroformo se tuvo la muestra lista para su análisis por cromatografía gaseosa.

b) Derivatización a los aldononitrilos acetilados.

La solución acuosa restante de polisacárido hidrolizado se evaporó y la muestra se dejó en desecador al vacío durante una noche. Luego, se trató con clorohidrato de hidroxilamina (5 mg) y piridina anhidra (0,5 ml) en un vial cerrado a 85°C durante 20-30 min. Se abrió el vial, se dejó enfriar y se agregó anhídrido acético (0,5 ml), manteniendo la mezcla de reacción 20-30 min más a 85°C ⁴. La solución se dejó enfriar y luego se procedió del mismo modo que en la derivatización a los alditoles acetilados.

La cromatografía gaseosa de los alditoles⁵ y aldononitrilos acetilados⁴ se realizó en un cromatógrafo Hewlett-Packard 5890 con detector de ionización de llama y una columna SP-2330 de Supelco (Bellefonte, Estados Unidos) (30 m x 0,25 mm d.i., WCOT, espesor de la película 0,20 μm). La temperatura del horno se mantuvo a 220°C , la del inyector y de la FID fue 240°C , se utilizó N_2 como gas portador con un flujo de 1 ml/min y una relación de split 100:1.

Se consideró que la masa de cada producto era proporcional al área del pico correspondiente.

En la mayor parte de los casos no fue necesario

recurrir a la espectrometría de masa, ya que los picos de los cromatogramas se identificaron fácilmente por comparación con patrones.

Determinación de 3,6-anhidrogalactosa

Se llevó a cabo por el método del resorcinol-ácido clorhídrico de Yaphe y Arsenault⁶. A excepción de las determinaciones realizadas durante el estudio de la cinética de la reacción de ciclación donde se usó el método original⁷.

Método de Yaphe y Arsenault:

Soluciones necesarias:

Se preparó una solución madre de 1,1-dimetoxietano (acetal) al 0,81 % (p/v). La solución de trabajo se obtuvo por dilución de la anterior 1:25 con agua destilada. Esta solución es estable por un mes.

La solución de resorcinol se preparó disolviendo este producto (15 mg) en agua destilada (10 ml). Esta solución, guardada en la heladera en frasco color caramelo, puede conservarse una semana.

El reactivo de resorcinol-ácido clorhídrico se preparó añadiendo ácido clorhídrico 12 M (d. 1,19, grado analítico) (100 ml) sobre la solución de resorcinol (9 ml) y agregando a esta mezcla la solución de trabajo del acetal (1 ml). Este reactivo es estable sólo durante 3 horas.

Procedimiento:

A 0,6 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 en un baño de hielo se agregaron 3 ml del reactivo de resorcinol. Se mezcló, se tapó con una bolita de vidrio y se mantuvo en baño de hielo durante unos minutos. Se llevó a temperatura ambiente y luego se calentó a 80°C durante 10 min. Se enfrió en baño de hielo y se midió la absorbancia del color desarrollado a 555 nm dentro de los primeros 15 min. Paralelamente, se efectuó un blanco con agua destilada. La cantidad de 3,6-anhidrogalactosa se determinó por referencia a una curva patrón (ver abajo) y se expresó como porcentaje del componente anhidro.

Si bien el método es específico para 3,6-anhidrogalactosa (o fructosa) da color en menor proporción con otros azúcares, pero esta contribución resulta despreciable en el caso de las muestras dosadas en este trabajo⁷.

Método de Yaphe:

Soluciones necesarias:

Se disolvió resorcinol (130 mg) en alcohol absoluto (100 ml), la solución se puede guardar en la heladera en un frasco color caramelo durante un mes. El reactivo se preparó por agregado de 10 ml de esta solución a 100 ml de ácido clorhídrico 12 M.

El procedimiento es idéntico al descrito más arriba⁸.

Construcción de la curva patrón:

Se disolvió 3,6-anhidrogalactosa dietilmercaptopal (33 mg) en agua (50 ml); a esta solución (5 ml) se agregó cloruro de mercurio (33 mg) y carbonato de cadmio (13 mg) y se calentó a 50°C durante 30 min. Se llevó entonces a 50 ml, obteniendo 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 las soluciones testigo en función de la concentración.

Determinación cuantitativa de azúcares totales

Se utilizó el método colorimétrico del fenol-ácido sulfúrico según la técnica de Dubois y col.⁹.

Reactivos necesarios:

Acido sulfúrico grado analítico 98%.

Solución de fenol al 5% en agua, esta solución es estable durante varios meses conservada a temperatura ambiente.

Procedimiento:

A la solución conteniendo hasta 70 µg de azúcar/ml (0,5 ml) se agregó fenol (0,5 ml) y se mezcló. Se dejó caer ácido sulfúrico concentrado (2,5 ml) directamente sobre la superficie de la solución a fin de asegurar un máximo de 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 de galactosa y se expresó como porcentaje de azúcar anhidro.

Determinación de galactosa en presencia de 3,6-anhidrogalactosa

Cuando el dosaje de azúcares totales se realiza sobre un sin hidrolizar, la absorbancia medida es la suma de las absorbancias de la 3,6-anhidrogalactosa y la galactosa (cuando se encuentran presentes otros azúcares, estos también contribuyen al valor de la absorbancia). La contribución del anhidroazúcar puede determinarse conociendo la concentración del mismo (determinada por el método del resorcinol-ácido clorhídrico). La absorbancia debida a la galactosa se determina como la diferencia entre el valor de azúcares totales y el que se obtiene por estimación de la contribución de la 3,6-anhidrogalactosa utilizando la curva de azúcares totales.

Determinación de sulfato total

La determinación del contenido de éster sulfato de los polisacáridos se efectuó, previa hidrólisis de los mismos, por el método turbidimétrico de Dodgson y Price¹⁰.

Soluciones necesarias:

Reactivo de cloruro de bario-gelatina: Se disolvió la gelatina (Oxoid, exenta de sulfato) (200 mg) en agua (40 ml) a 60-70°C y la solución resultante se dejó en la heladera durante por lo menos 6 horas. Luego, se disolvió cloruro de bario (grado analítico) (200 mg) en el fluido semigelatinoso y se dejó durante 2-3 hs más. El reactivo así preparado es estable durante una semana en la heladera.

Se preparó una solución de ácido tricloroacético al 30 % p/v.

Procedimiento:

El polisacárido (1-2 mg) se disolvió en la cantidad necesaria de ácido clorhídrico 1 M, de modo de obtener una solución con una concentración final de sulfato de 20-200 $\mu\text{g SO}_4/0,5 \text{ ml}$ y se calentó en vial cerrado a 105-110°C durante 4-5 hs.

Una vez enfriado, a la solución (0,5 ml) se adicionó la solución de ácido tricloroacético (3,5 ml). Se mezcló y se agregó el reactivo de cloruro de bario-gelatina (1 ml). Se mezcló y se dejó a temperatura ambiente durante 15-20 min. Se midió la absorbancia de la solución a 360 nm contra un blanco obtenido en las mismas condiciones con 0,5 ml de ácido clorhídrico 1 M.

Determinación de α -galactosa 6-sulfato y 2,6-disulfato

El contenido de α -galactosa 6-sulfato y α -galactosa 2,6-disulfato se determinó por el método de Rees¹¹ que comprende las siguientes etapas:

- 1) Determinación del contenido total de 6-sulfato a partir de la diferencia entre la absorbancia obtenida antes y después del tratamiento alcalino con el reactivo del resorcinol-ácido clorhídrico⁷.
- 2) Determinación del porcentaje de unidades de α -galactosa 2,6-disulfato por oxidación con periodato de una porción del polisacárido y posterior repetición del proceso explicado en 1).

- 3) Determinación del porcentaje de unidades de α -galactosa 6-sulfato por diferencia entre los valores obtenidos en 1) y 2).

Tratamiento alcalino

A una solución al 0,2 % del polisacárido en agua (10 ml) se adicionó borohidruro de sodio (2 mg) y se dejó a temperatura ambiente durante 12 horas. Se agregó entonces hidróxido de sodio 3 M (5 ml) y borohidruro de sodio (1,5 mg). Se extrajeron alícuotas que se calentaron en viales cerrados a 80°C durante 2, 4 y 6 hs; una porción de la solución de partida se mantuvo en baño de hielo. Se determinó el contenido de 3,6-anhidrogalactosa, observándose que ya a las 2 horas de reacción se había llegado a un valor constante y, a partir de la diferencia entre los valores obtenidos para la solución inicial (que se había mantenido en baño de hielo) y las que se sometieron a la reacción, se dedujo el porcentaje de 6-sulfato en las unidades α .

Para la determinación de 6-sulfato en el polisacárido oxidado, se destruyó el exceso de periodato por adición de etilenglicol, se agregó borohidruro de sodio y se procedió del mismo modo.

Oxidación con periodato

En un matraz aforado se disolvió la muestra en una solución de metaperiodato de sodio 0,015 M con agitación y se llevó la solución a volumen con la misma solución (concentración de la sustancia a oxidar 0,2-0,3 %). La oxidación se realizó a temperatura ambiente en ausencia de

luz. Se midió el consumo de periodato a distintos tiempos hasta que se observó constancia en la concentración del mismo. Paralelamente, se efectuó un blanco libre de azúcar en las mismas condiciones.

El consumo de periodato se determinó por el método de Guthrie¹².

Se prepararon soluciones de metaperiodato de sodio y ioduro de potasio 0,015 M. Se midió la absorbancia de estas soluciones a 223 nm, previamente diluídas 250 veces y se graficaron en función de las concentraciones de las soluciones originales.

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

Dosaje de grupos reductores

Se llevó a cabo por el método de Park y Johnson¹³.

Soluciones necesarias:

Solución de ferricianuro (A): ferricianuro de potasio (0,5 g) disolvió en agua (1 l), esta solución se guardó en botella color caramelo.

Solución de carbonato-cianuro (B): carbonato de sodio (5,3 g y cianuro de potasio (0,65 g) se disolvieron en agua (1 l).

Solución de ion férrico (C): sulfato férrico y de

amonio (1,5 g) y monolaurilsulfato de sodio (1 g) se disolvieron en una solución de ácido sulfúrico 0,05 N (1 l).

Procedimiento:

A una solución conteniendo 1 a 10 $\mu\text{g/ml}$ de galactosa o su equivalente en polisacárido (0,5 ml) (es importante que la solución sea neutra) se le agregó la solución de ferricianuro A (0,5 ml) y la solución de carbonato-cianuro B (0,5 ml). Después de mezclar, el tubo de ensayo se tapó con una bolita de vidrio y se calentó en baño de agua hirviendo durante 15 min. Se llevó la solución a temperatura ambiente, se agregó la solución del ion férrico C (2,5 ml) y se dejó a temperatura ambiente durante 15 min para permitir el desarrollo de color. Se determinó la absorbancia a 690 nm contra un blanco realizado en las mismas condiciones.

Estimación del peso molecular:

El poder reductor de la muestra se determina por referencia a una curva patrón de galactosa; a partir de este valor el peso molecular se obtiene según la expresión:

$$M_n = \frac{180xp}{r}$$

donde p es el peso y r el poder reductor de la muestra.

Asignación de la configuración absoluta de la galactosa

Se realizó por hidrólisis del polisacárido, y posterior derivatización a los correspondientes (-)-2-octilglicósidos acetilados¹⁴.

La hidrólisis del polisacárido se realizó con ácido trifluoroacético 2 M en la forma habitual. Al hidrolizado (3 mg) se le agregó (-)-2-octanol (0,5 ml) y una gota de ácido trifluoroacético y se calentó en un vial cerrado a 130°C durante una noche. La solución se evaporó entonces al vacío, conectando el sistema a una bomba de aceite y a una temperatura del baño de 55°C. Luego se acetiló por agregado de anhídrido acético-piridina 1:1 (1 ml) y calentamiento a 100°C durante 20 min el producto acetilado se trató del mismo modo que se describió para los alditoles y aldononitrilos acetilados.

Las muestras se cromatografiaron utilizando una columna HP-5 (50m x 0,32 mm d.i., espesor de la película 0,17 µm) a 210°C, la temperatura de la FID y del detector fue de 230°C.

Características del material

El alga roja *Gigartina skottsbergii* se recogió en Bahía Camarones (Chubut) y se separó de acuerdo a su fase sexual en el Instituto Nacional Patagónico (Puerto Madryn, Chubut). En este trabajo se utilizaron las plantas cistocárpicas de dicho alga.

La observación microscópica de las plantas indicó la ausencia de microalgas epífitas.

Aislamiento del carragenano

El alga seca se molió mediante un molino Wiley (malla 20). El alga molida (50 mg) se suspendió en agua (2,5 l) y

se extrajo con agitación mecánica a temperatura ambiente durante 24 horas. El extracto se centrifugó, se separó el residuo y la solución acuosa se volcó lentamente y con agitación sobre isopropanol (7,5 l). El carragenano precipitó en forma de fibras que se secaron primero con papel de filtro y luego por intercambio de solventes (etanol y después éter), y por último en desecador a presión reducida hasta constancia de peso; el residuo se extrajo dos veces más de la misma forma. Los carragenanos así obtenidos se purificaron; la solución se centrifugó y el sobrenadante se concentró y liofilizó. En la primera extracción obtuvieron 24,6 g (49,1 %) de carragenano, en la segunda extracción el rendimiento fue de 13,9 % y en la tercera resultó despreciable. El residuo insoluble resultó ser ≈ 3 % del peso seco del alga.

Curvas de precipitación de los carragenanos con cloruro de potasio

Se llevaron a cabo por el método de Matulewicz y Cerezo¹⁵.

Una solución del carragenano en agua se centrifugó para eliminar el material suspendido; se tomaron alícuotas de 2 ml se colocaron en tubos de ensayo. A cada uno de éstos se le agregó igual volumen de solución de cloruro de potasio, variando la concentración entre 0,2 y 4,0 M. La solución se homogeneizó y se midió la absorbancia a 450 nm. Las curvas de precipitación se obtuvieron graficando la absorbancia en función de la concentración de cloruro de potasio.

Fraccionamiento preparativo del carragenano con cloruro de potasio

El polisacárido (1-15 g) se disolvió en agua (0,4-6 l, 0,25 %). Se agregó cloruro de potasio finamente dividido en pequeñas porciones con agitación mecánica constante y violenta, incrementando la concentración de la solución en 0,01-0,1 M cada vez. Después de cada agregado, se mantuvo la agitación durante 16 hs de modo de asegurar la equilibración del sistema. Cuando se obtuvo un gel, éste se separó por centrifugación y se continuó el agregado de cloruro de potasio sobre la solución resultante. El límite superior de concentración de cloruro de potasio fue 2,00 M. Los precipitados, así como las soluciones residuales, se dializaron, concentraron y liofilizaron.

Estudio de la cinética del tratamiento alcalino

El procedimiento fue similar al descrito anteriormente¹¹. La muestra (25 mg) se disolvieron en agua (12,5 ml) y se agregó borohidruro de sodio (1,3 mg). Después de 12 hs a temperatura ambiente, se agregó hidróxido de sodio 3 M (6,3 ml) y borohidruro de sodio (1 mg). La solución resultante se dividió en alícuotas de 0,5 ml, se colocó en viales que se cerraron y se calentaron a 80°C en un baño de agua. Se extrajeron muestras a intervalos regulares y la reacción se interrumpió, colocandolos rápidamente en un baño de hielo. Estas soluciones se neutralizaron con ácido clorhídrico 1 M y se determinó el

contenido de 3,6-anhidrogalactosa por el método del resorcinol-ácido clorhídrico⁸. La reacción se repitió a distintas temperaturas 35-90°C, con diferentes concentraciones finales de hidróxido de sodio (a 60°C) y con agregado de sulfato de sodio (ver Apéndice). Se graficó $\ln[(A_0 - A_\infty)/(A_t - A_\infty)]$ en función del tiempo de reacción. Las pendientes de las rectas obtenidas, que representan las constantes de velocidad de pseudo primer orden, se calcularon por cuadrados mínimos. A partir de estos resultados se determinaron las vidas medias ($t_{1/2}$) en las distintas condiciones, así como los parámetros de activación (ΔH^{**} , ΔS^{**} y ΔG^{**}).

Se determinó que el error experimental sobre estos parámetros oscila entre 5 y 10 %.

Tratamiento alcalino preparativo

El tratamiento alcalino preparativo se realizó en forma similar a la descrita más arriba, partiendo de 1-3 g de carragenano. En este caso, la reacción se llevó a cabo durante 1 hs 20 min a 80°C. Una vez finalizada la reacción, la mezcla se dializó, concentró y liofilizó.

Electroforesis sobre geles de poliacrilamida

Se llevó a cabo siguiendo el método de Usov y Arkhipova¹⁶.

Soluciones necesarias:

Solución A: A una solución de ácido clorhídrico 1M (48

ml) se agregó Tris (2-amino-2-(hidroximetil)-1,3-propanodiol) (36,6 mg) y Temed (N,N,N',N'-tetrametil-etilendiamina) (0,46 ml). La solución resultante se llevó a 100 ml con agua. El pH de la misma es 8,9.

Solución B: A una solución de ácido clorhídrico 1 M (48 ml) se agregó Tris (5,98 g) y Temed (0,46 ml), y se llevó a 100 ml con agua. El pH de la solución es 6,7.

Solución C: Se disolvieron acrilamida (28,0 g) y Bis (N,N'-metilenbisacrilamida) (0,735 g) en agua; la solución resultante se llevó a 100 ml.

Solución D: Se disolvieron acrilamida (10,0 g) y BIS (2,5 g) en agua, llevando la solución a 100 ml.

Solución E: Se disolvió riboflavina (4 mg) en agua y la solución se llevó a 100 ml.

Solución F: Solución de sacarosa en agua (40 % p/v).

Solución G: Se disolvieron Tris (6,0 ml) y glicina (28,8 g) en agua y la solución resultante se llevó a 1000 ml con agua.

Gel separador: Se mezcló la solución A (5 ml) con solución C (10 ml) y agua (5 ml) y se agregó solución de persulfato de amonio al 0,14 % p/v (20 ml).

Gel espaciador: Se mezcló la solución B (1 ml) con la D (2 ml) E (1 ml) y F (4 ml). El pH de la solución resultante es 6,7. A la mezcla anterior (0,6 ml) se le agregó una solución de 5-10 mg de la muestra en agua (0,6 ml).

Solución de azul de toluidina: Se disolvió azul de toluidina (0,1 g) en ácido acético 7 % en agua y la solución resultante se llevó a 100 ml con agua.

Preparación del gel:

Los tubos de 3 ml se cerraron por un extremo con parafilm y luego se los colocó sobre bases de goma. Se llevaron a 3/4 de su volumen con solución del gel separador, se añadieron 3 o 4 gotas de agua y se iluminaron 30 min. Se eliminaron las gotitas de agua con papel absorbente y con una pipeta Pasteur marcada a los 0,2 ml se agregó el gel espaciador. Se iluminó durante 15 min antes de agregar 3 o 4 gotas de agua.

Procedimiento:

Se colocaron los tubos sin sus bases de goma en el aparato de electroforesis y se volcó en cada compartimiento electródico solución de buffer Tris (dilución 1:10 de la solución G) hasta cubrir los tubos. Se aplicó una corriente de 2 a 5 mAmp/tubo y, para visualizar la corrida, se agregó en la parte superior una solución de azul de bromofenol 0,01 % en agua (1 ml) y luego, igual volumen de agua. Completada la migración (1-1,5 hs), se desprendieron los cilindros del gel y se sumergieron durante 15 min en la solución de azul de toluidina. Se lavó con agua para eliminar el exceso y, después con una solución de ácido acético 7 % hasta completar la decoloración. Los geles pueden guardarse, previo secado al agua.

Estudios de metilación

Los carragenanos 1C₁, 1C₂ y 1C₃ se metilaron por el método de Haworth¹⁷ según lo descripto por Cerezo¹⁸.

El carragenano (50-100 mg) se disolvió en agua (1,5-3 ml) a temperatura ambiente, se adicionó borohidruro de sodio (5-10 mg) y se agitó durante 16 hs. Luego, se agregó hidróxido de sodio 45 % (2,5-5 ml); se mantuvo la agitación mecánica y se agregaron simultaneamente y gota a gota sulfato de dimetilo (0,4-0,8 ml) e hidróxido de sodio al 30 % (1-2 ml) lentamente y con agitación violenta, manteniendo todo el sistema bajo corriente de nitrógeno y en un baño de hielo. Todas las soluciones alcalinas se burbujearon con nitrógeno antes de ser utilizadas. Una vez terminado el agregado, se mantuvo la agitación hasta el día siguiente. Se efectuaron cuatro agregados más de los reactivos en las mismas condiciones durante cinco días consecutivos. Después de cada etapa de metilación, el polisacárido parcialmente metilado se recuperó por diálisis, concentración y liofilización. 6 mg de este producto se separaron y se derivatizaron a los correspondientes alditoles acetilados y aldononitrilos acetilados.

El proceso se repitió hasta constancia en la composición en monosacáridos obtenidos por hidrólisis. Esto requirió tres secuencias de metilación, cada una de las cuales comprendía cinco agregados.

Los restantes polisacáridos se metilaron por el método de Hakomori¹⁹ según la modificación de Stevenson y Furneaux²⁰ del modo descripto por Stortz y Cerezo²¹.

Preparación del carbanión de dimetilsulfinilo²²:

Se colocó hidruro de sodio (0,75 g) en un balón de dos bocas y se adicionó dimetilsulfóxido seco (15 ml). A una de

las bocas se acopló un condensador, en cuyo extremo se colocó una trampa de cloruro de calcio, y por la otra se hizo pasar una corriente de nitrógeno seco, de modo de mantener la reacción bajo esa atmósfera. Se produjo una reacción vigorosa con desprendimiento de hidrógeno. El contenido del balón se calentó en baño de aceite a 55°C hasta que cesó el desprendimiento de hidrógeno. Se determinó la molaridad (≈ 2 M) por titulación con una solución de ácido clorhídrico 0,1 M.

Con anterioridad a la etapa de metilación propiamente dicha, los polisacáridos se convirtieron a sus sales de trietilamonio por intercambio iónico con resina Amberlite IR-120, tratada previamente con cloruro de trietilamonio y lavada con agua; los polisacáridos se liofilizaron y guardaron en un desecador al vacío.

La muestra, como sal de trietilamonio, (5 mg) se disolvió en dimetilsulfóxido (0,7 ml) mediante agitación. Luego, se agregó carbanión de dimetilsulfínilo 2 M en dimetilsulfóxido (0,7 ml) a cada vial y se agitó durante 40 min. Las muestras se colocaron en un baño de hielo y se agregó iodometano (0,6 ml). La reacción se continuó a temperatura ambiente durante 30 min con agitación. Se agregó agua (6 ml), se dializó exhaustivamente y se liofilizó.

En todos los casos, a excepción de la metilación de SF, se logró permetilación en estas condiciones. SF se remetiló en forma similar, pero en esta segunda metilación se dejó reaccionar la mezcla durante 3 horas antes de agregar el iodometano, en estas condiciones la metilación fue completa.

Hidrólisis de los polisacáridos metilados:

Los polisacáridos resultantes de cada etapa de metilación por el método de Haworth, así como los polisacáridos permetilados obtenidos por el método de Hakomori se hidrolizaron del modo siguiente: El polisacárido se disolvió en ácido fórmico 45% (v/v) (0,5 ml) y la solución se calentó en un vial cerrado a 100°C durante 16 hs. El ácido fórmico se evaporó a presión reducida hasta casi sequedad, seguida por evaporaciones sucesivas de pequeños volúmenes de agua agregada previamente. Se llevó a sequedad, se dejó en desecador al vacío durante una noche y luego se tomó el hidrolizado con etanol (2 ml), se centrifugó y la solución etanólica se dividió en dos partes iguales, las que se llevaron a sequedad por separado.

Los azúcares parcialmente metilados se derivatizaron a los correspondientes alditoles acetilados y aldononitrilos acetilados, en forma similar a la que se describió para los hidrolizados obtenidos a partir de los polisacáridos sin metilar (pag. 263).

La cromatografía gaseosa de los alditoles⁵ y aldononitrilos⁴ acetilados se realizó utilizando el mismo equipo y columna empleados para la determinación de azúcares componentes (pag. 264). La temperatura del horno se mantuvo a 210°C y la temperatura del inyector y de la FID fue 230°C, se utilizó N₂ como gas portador con un flujo 1 ml/min y una relación de split 100:1.

Espectrometría de masa:

Primeramente se utilizó un espectrómetro de masa Shimadzu GCMS-QP 1000. Las cromatografías se realizaron en la columna capilar SP-2330 a 210°C, el flujo de He fue 1 ml/min.

Luego, se utilizó un cromatógrafo Hewett-Packard 5890 acoplado a un espectrómetro de masa Trio-2 VG, Masslab (Manchester, Gran Bretaña). Las cromatografías se realizaron en la misma columna con una temperatura inicial de 150°C, que se mantuvo durante 2 min, luego se incrementó a razón de 10°C/min hasta 230°C, temperatura a la que se mantuvo 25 min; el flujo de He fue 1 ml/min.

Los espectros de masa se realizaron en un rango de 40-500 unidades atómicas de masa, con un potencial de ionización de 70 eV^{4,23}.

Estudios de autohidrólisis

La autohidrólisis de los carragenanos se llevó a cabo por el método descrito por Stortz y Cerezo²⁴.

El carragenano (100 mg) se disolvió en agua (10 ml); la solución resultante se hizo pasar a través de una columna de resina Amberlite IR-120 (H⁺) (15 x 2 cm), recogiendo el eluido en una probeta sumergida en un baño de hielo. Se lavó la columna con pequeñas porciones de agua destilada hasta completar un volumen de 33 ml de solución del carragenano en forma H⁺. El pH de la solución (2,38) se determinó con un pHmetro (CG 819 Schott Geräte, Alemania) con un electrodo de

vidrio, previamente calibrado. La solución se transfirió a un erlenmeyer, que se sumergió en un baño termostatzado a 60°C. A partir del primer momento y a intervalos regulares, se determinó la viscosidad relativa sobre una alícuota (4 ml), que una vez terminada la determinación se reintegró al frasco. Con otra alícuota (0,1-0,5 ml) se determinó el peso molecular por dosaje de grupos reductores¹³ y a una tercera (0,5 ml) se agregó a una punta de espátula de carbonato de calcio y borohidruro de sodio, se dejó una noche a temperatura ambiente. Sobre la suspensión decantada de esta última se tomó una muestra y se determinó el porcentaje de 3,6-anhidrogalactosa por el método del resorcinol-ácido clorhídrico⁶. Durante la autohidrólisis de 1C₃T₁ se extrajeron muestras para realizar la determinación de la actividad antiviral, las que se neutralizaron con carbonato de bario (según se describe para el producto final, ver más adelante).

Una vez terminada la autohidrólisis (por constancia de peso molecular o del contenido de 3,6-anhidrogalactosa después de reducción), se retiró la mezcla de reacción del baño y se agregó carbonato de bario (exento de cloruros) (150 mg). Se dejó unas horas a temperatura ambiente con agitación ocasional y luego se centrifugó. La solución se filtró con ayuda de una placa filtrante para eliminar las sales de bario insolubles y luego la solución se hizo pasar por una columna, conteniendo resina Amberlite IR-120 (Na⁺), para obtener los productos en forma de sal sódica. Finalmente se concentró y liofilizó.

Cromatografía sobre geles

La mezcla obtenida por autohidrólisis de $1C_1$ se cromatografió sobre Sephadex G-25 (Pharmacia, Uppsala, Suecia), usando agua como solvente de elución.

Se preparó una columna (85 x 3 cm d.i.) 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; el volumen final se determinó por sembrado de cloruro de cobalto (20 mg/0,2 ml); los valores obtenidos fueron $V_o = 182$ ml y $V_r = 370$ ml.

Teniendo en cuenta el perfil de elución obtenido, se separaron distintas fracciones que se concentraron y liofilizaron (Figura 6, Segunda Parte Cap. 3). Para determinar la homogeneidad de las principales, 1-2 mg de las mismas se cromatografiaron sobre distintos tipos de geles. La fracción 2 se cromatografió sobre una columna (68 x 0,8 cm d.i.) de Sephadex G-100 ($V_o = 20,5$ ml, $V_r = 40$ ml); las fracciones 6 y 7 se cromatografiaron en una columna (55 x 0,8 cm d.i.) de Bio-Gel P-2 ($V_o = 20$ ml, $V_r = 43$ ml) y en una columna (60 x 0,8 cm d.i.) de Bio-Gel P-6 ($V_o = 23,5$ ml, $V_r = 40,5$ ml) (Bio-Rad, CA Estados Unidos); las fracciones 5, 6 y 7 se cromatografiaron en una columna (50 x 0,8 cm d.i.) de Sephadex G-25 ($V_o = 12$ ml $V_r = 32$ ml), utilizando siempre agua como solvente de elución.

Autohidrólisis preparativa

La autohidrólisis preparativa de $1C_1$ se llevó a cabo en

forma similar a la descrita anteriormente, pero en este caso, se partió de 500 mg de muestra. Por este motivo, resultó conveniente realizar el tratamiento con la resina en "batch" en lugar de hacerlo por medio de una columna, de modo de acelerar esta etapa. Durante la reacción, así como una vez finalizada la misma, se tomaron muestras que se trataron de la misma forma que el producto final para la reacción realizada a escala analítica y se utilizaron para realizar los espectros de r.m.n.-¹³C de 25 MHz a temperatura ambiente.

Espectroscopía de resonancia magnética nuclear

Resonancia magnética nuclear de ¹H:

Los espectros de r.m.n.-¹H de 1C₁, 1C₂ y 1C₃ se realizaron en un equipo Bruker a 400 MHz a 65°C en soluciones de D₂O (15 mg de polisacárido en 0,4 ml), utilizando como referencia externa 3-trimetilsililpropionato de sodio-d₄. Las muestras se cromatografiaron sobre Amberlite IR-120 (Na⁺) para eliminar los iones K⁺ y se liofilizaron. El polisacárido se disolvió en agua deuterada y la solución resultante se liofilizó; este proceso se repitió 3-4 veces antes de realizar los espectros. Los parámetros elegidos fueron los siguientes: ángulo de pulso de 45°, tiempo de adquisición 3,277-3,408 seg, tiempo de relajación 1,6 segundos, ancho espectral de 5 KHz y número de pulsos 270-1785.

Resonancia magnética nuclear de ^{13}C :

Los espectros de r.m.n.- ^{13}C de 1C_1 , 1C_2 y 1C_3 se realizaron en un equipo Bruker a 100 MHz a 50-65°C en soluciones de D_2O (15 mg de polisacárido en 0,4 ml), usando como referencia externa trimetilsilano para 1C_3 y 3-trimetilsililpropionato de sodio- d_4 para 1C_1 y 1C_2 . Las muestras se cromatografiaron sobre Amberlite IR-120 (Na^+) de modo de eliminar los iones K^+ . Los parámetros empleados fueron los siguientes: ángulo de pulso 90°, tiempo de adquisición 0,328-0,655 segundos, tiempo de relajación 1,0-0,4 segundos, ancho espectral 25 KHz y número de pulsos 44.142-168.489.

Los espectros de r.m.n.- ^{13}C de las fracciones tratadas así como los de las subfracciones obtenidas a partir de ellas se realizaron en un Bruker ACE 200 a 50 MHz y temperatura ambiente en soluciones del polisacárido (20-40 mg/0,4 ml) en $\text{H}_2\text{O}:\text{D}_2\text{O}$ 1:1. Los parámetros empleados fueron: ángulo de pulso 90° tiempo de adquisición 0,737 y ancho espectral 11 KHz; el número de pulsos fue de 100.000-300.000.

El espectro de SF se repitió a 80°C, las restantes condiciones fueron similares a las descriptas antes.

Los espectros de r.m.n.- ^{13}C de los productos de autohidrólisis del carragenano 1C_1 se llevaron a cabo en un Varian XL-100, equipado con una computadora 620 L-100, a 25 MHz y temperatura ambiente sobre soluciones de \approx 35 mg de muestra en 0,4 ml de $\text{D}_2\text{O}:\text{H}_2\text{O}$ 1:1. Los parámetros fueron: ángulo de pulso de 90°, tiempo de adquisición máximo (0,8 segundos); los desplazamientos químicos se midieron usando dioxano como standard externo, referido a trimetilsilano, el

número de pulsos fue 100.000-200.000.

Bibliografía

1. M. C. Matulewicz, "Estudios sobre el sistema de carragenanos del alga roja *Iridaea undulosa* Bory", Tesis Doctoral, FCEyN-UBA (1978).
2. P. Albersheim, D. J. Nevins, P. D. English y A. Karr, *Carbohydr. Res.* 5, 340 (1967).
3. H. Björndal, B. Lindberg, A. Pilotti y S. Svensson, *Carbohydr. Res.* 15, 339 (1970).
4. C. A. Stortz, M. C. Matulewicz y A. S. Cerezo, *Carbohydr. Res.* 111, 31 (1982).
5. E. M. Shea y N. C. Carpita, *J. Chromatography* 445, 424 (1988).
6. W. Yaphe y G. Arsenault, *Anal. Biochem.* 13, 143 (1965).
7. C. A. Stortz, "Estudio de los carragenanos "solubles" del alga roja *Iridaea undulosa* Bory", Tesis Doctoral, FCEyN-UBA (1984).
8. W. Yaphe, *Anal. Chem.* 32, 1327 (1960).
9. M. Dubois, C. A. Gilles, J. K. Hamilton, P. A. Revers y F. Smith, *Anal. Chem.* 28, 150 (1956).
10. K. S. Dodgson y R. G. Price, *Biochem. J.* 84, 106 (1962).
11. D. A. Rees, *J. Chem. Soc.*, 5168 (1961).
12. R. D. Guthrie, *Methods Carbohydr. Chem.* 1, 435 (1962).
13. J. T. Park y M. J. Johnson, *J. Biol. Chem.* 181, 149 (1949).
14. K. Loentein, B. Lindberg y J. Lönngren, *Carbohydr. Res.* 62, 359 (1978).

15. M. C. Matulewicz y A. S. Cerezo, *J. Sci. Fd. Agric.* **26**, 243 (1975).
16. A. I. Usov y V. S. Arkhipova, *Bioorg. Khim.* **1**, 1303 (1975).
17. W. N. Haworth, *J. Chem. Soc.* **107**, 8 (1915).
18. A. S. Cerezo, *Carbohydr. Res.* **26**, 335 (1973).
19. S. Hakomori, *J. Biochem.* **55**, 205 (1964).
20. T. T. Stevenson y R. H. Furneaux, *Carbohydr. Res.* **210**, 277 (1991).
21. C. A. Stortz y A. S. Cerezo, *Carbohydr. Res.* **242**, 217 (1993).
22. D. Snadford y H. E. Xonrod, *Biochem.* **5**, 1508 (1966).
23. B. Lindberg, *Methods Enzymol.* **28**, 178 (1972).
24. C. A. Stortz y A. S. Cerezo, *Carbohydr. Res.* **166**, 317 (1987).

APENDICE

Tabla 1. Tratamiento alcalino de IC₃ a 35°C en hidróxido de sodio 1 M^a.

Primera determinación			Segunda determinación		
Tiempo (min)	A (555nm)	$\ln[(A_0 - A_{\infty}) / (A_t - A_{\infty})]$	Tiempo (min)	A (555nm)	$\ln[(A_0 - A_{\infty}) / (A_t - A_{\infty})]$
0	0,25	0	0	0,28	0
60	0,295	0,255	10	0,29	0,069
80	0,28	0,162	20	0,30	0,143
140	0,31	0,357	30	0,30	0,143
160	0,31	0,357	40	0,32	0,310
180	0,30	0,287	50	0,32	0,310
200	0,355	0,744	60	0,30	0,143
625	0,45		70	0,30	0,143
			220	0,35	0,629
			240	0,35	0,629
			260	0,355	0,693
			280	0,35	0,629
			300	0,37	0,916
			410	0,38	1,099
			430	0,40	1,609
			800	0,43	

^aLa constante de velocidad se calculó como un promedio de las constantes obtenidas en ambas determinaciones.

Tabla 2. Tratamiento alcalino de $1C_3$ a $50^\circ C$ en hidróxido de sodio 1 M.

Tiempo (min)	A (555nm)	$\ln[(A_0-A_x)/(A_t-A_x)]$
0	0,325	0
5	0,345	0,160
10	0,37	0,405
15	0,38	0,523
20	0,38	0,523
25	0,39	0,657
30	0,40	0,811
35	0,42	1,216
40	0,42	1,216
50	0,43	1,504
60	0,43	1,504
80	0,44	1,910
300	0,46	

Tabla 3. Tratamiento alcalino de $1C_3$ a $60^\circ C$ en hidróxido de sodio 1 M.

Tiempo (min)	A (555nm)	$\ln[(A_0-A_x)/(A_t-A_x)]$
0	0,29	0
5	0,33	0,288
10	0,36	0,575
20	0,38	0,827
30	0,40	1,163
40	0,41	1,386
50	0,42	1,674
80	0,425	1,856
200	0,45	

Tabla 4. Tratamiento alcalino de IC_3 a $70^\circ C$ en hidróxido de sodio $1 M^a$.

Primera determinación			Segunda determinación		
Tiempo (min)	A (555nm)	$\ln[(A_0-A_\infty)/(A_t-A_\infty)]$	Tiempo (min)	A (555nm)	$\ln[(A_0-A_\infty)/(A_t-A_\infty)]$
0	0,30	0	0	0,31	0
2	0,31	0,061	2	0,34	0,207
4	0,345	0,307	3	0,345	0,247
6	0,365	0,482	4	0,355	0,329
8	0,37	0,531	5	0,365	0,419
10	0,38	0,636	6	0,375	0,519
15	0,405	0,961	7	0,375	0,519
20	0,405	0,961	8	0,39	0,693
25	0,425	1,329	9	0,40	0,829
30	0,43	1,447	10	0,41	0,982
35	0,44	1,730	12	0,42	1,163
40	0,45	2,140	13	0,43	1,163
50	0,46	2,833	14	0,43	1,163
150	0,47		15	0,43	1,163
			16	0,445	1,856
			17	0,44	1,673
			18	0,45	2,079
			19	0,45	2,079
			130	0,47	

^aLa constante de velocidad se calculo como un promedio de las constantes obtenidas en ambas determinaciones.

Tabla 5. Tratamiento alcalino de IC₃ a 80°C en hidróxido de sodio 1 M.

Tiempo (min)	A (555nm)	$\ln[(A_0-A_\infty)/(A_t-A_\infty)]$
0	0,34	0
1	0,345	0,038
2	0,355	0,118
3	0,40	0,588
4	0,405	0,657
5	0,405	0,657
8	0,43	1,099
11	0,45	1,686
100	0,475	

Tabla 6. Tratamiento alcalino de IC₃ a 90°C en hidróxido de sodio 1 M.

Tiempo (min)	A (555nm)	$\ln[(A_0-A_\infty)/(A_t-A_\infty)]$
0	0,32	0
1	0,34	0,148
1,5	0,37	0,425
2	0,38	0,534
2,5	0,405	0,884
3	0,415	1,065
3,5	0,42	1,169
4	0,43	1,449
4,5	0,43	1,449
5	0,445	1,981
5,5	0,445	1,981
50	0,465	

Tabla 7. Tratamiento alcalino de 1C₃ a 60°C en hidróxido de sodio 1,5 M.

Tiempo (min)	A (555nm)	$\ln[(A_0-A_\infty)/(A_t-A_\infty)]$
0	0,31	0
2	0,32	0,006
3	0,345	0,216
4	0,345	0,216
5	0,355	0,288
6	0,365	0,365
7	0,37	0,406
8	0,375	0,448
9	0,375	0,448
10	0,375	0,448
12	0,385	0,539
14	0,40	0,693
16	0,405	0,750
18	0,415	0,876
20	0,42	0,945
25	0,43	1,099
30	0,44	1,281
35	0,46	1,792
40	0,46	1,792
200	0,49	

Tabla 8. Tratamiento alcalino de 1C₃ a 60°C en hidróxido de sodio 2,0 M.

Tiempo (min)	A (555 nm)	$\ln[(A_0-A_\infty)/(A_t-A_\infty)]$
0	0,315	0
1	0,325	0,006
2	0,35	0,210
3	0,355	0,244
4	0,36	0,279
5	0,365	0,315
6	0,375	0,392
7	0,385	0,475
8	0,40	0,615
10	0,405	0,667
12	0,42	0,838
14	0,42	0,838
18	0,44	1,126
22	0,445	1,213
35	0,485	2,225
200	0,50	

Tabla 9. Tratamiento alcalino de $1C_3$ a $60^\circ C$ en hidróxido de sodio 3,0 M.

Tiempo (min)	A (555 nm)	$\ln[(A_0 - A_\infty)/(A_t - A_\infty)]$
0	0,34	0
2	0,365	0,150
3	0,38	0,252
4	0,385	0,287
5	0,42	0,588
7	0,43	0,693
8	0,435	0,750
10	0,455	1,018
12	0,46	1,100
14	0,47	1,281
16	0,475	1,386
20	0,495	1,974
200	0,52	

Tabla 10. Tratamiento alcalino de $1C_3$ a $60^\circ C$ en hidróxido de sodio 4,0 M.

Tiempo (min)	A (555 nm)	$\ln[(A_0 - A_\infty)/(A_t - A_\infty)]$
0	0,40	0
1	0,425	0,121
2	0,46	0,318
3	0,455	0,287
4	0,48	0,452
5	0,54	1,012
6	0,54	1,012
7	0,54	1,012
8	0,55	1,145
10	0,57	1,482
11	0,58	1,705
12	0,57	1,482
13	0,60	2,398
150	0,62	

Tabla 11. Tratamiento alcalino de $1C_3$ a $60^\circ C$ en hidróxido de sodio 6,0 M.

Tiempo (min)	A (555 nm)	$\ln[(A_0 - A_\infty)/(A_t - A_\infty)]$
0	0,39	0
1	0,40	0,006
2	0,425	0,247
2,5	0,43	0,287
3	0,455	0,521
3,5	0,47	0,693
4	0,485	0,901
4,5	0,485	0,901
5	0,49	0,981
5,5	0,49	0,981
6	0,50	1,163
7	0,51	1,386
8	0,50	1,163
10	0,53	2,079
100	0,55	

Tabla 12. Tratamiento alcalino de $1C_3$ a $80^\circ C$ en hidróxido de sodio 0,5 M.

Tiempo (min)	A (555 nm)	$\ln[(A_0 - A_\infty)/(A_t - A_\infty)]$
0	0,23	0
3	0,25	0,119
4	0,27	0,255
5	0,28	0,330
6	0,29	0,411
7	0,29	0,411
8	0,28	0,330
9	0,30	0,500
12	0,305	0,547
15	0,32	0,704
18	0,325	0,763
21	0,345	1,039
25	0,36	1,311
30	0,36	1,311
35	0,37	1,544
40	0,385	2,046
45	0,39	2,291
50	0,395	2,617
250	0,408	

Tabla 13. Tratamiento alcalino de $1C_3$ a $80^\circ C$ en hidróxido de sodio 0,5 M, con agregado de sulfato de sodio hasta una concentración 0,17 M.

Tiempo (min)	A (555 nm)	$\ln[(A_0 - A_\infty)/(A_t - A_\infty)]$
0	0,25	0
2	0,28	0,208
4	0,29	0,287
6	0,31	0,47
8	0,31	0,47
10	0,335	0,758
12	0,291	1,068
14	0,36	1,163
16	0,37	1,386
18	0,375	1,52
20	0,38	1,674
150	0,41	

Tabla 14. Tratamiento alcalino de una mezcla de 1C₃ y 1T 50:50 a 60°C en hidróxido de sodio 1 M.

Tiempo (min)	A (555nm)	$\ln[(A_0 - A_\infty)/(A_t - A_\infty)]$
0	0,208	0
2	0,227	0,042
3	0,212	0,009
4	0,219	0,024
5	0,211	0,006
7	0,224	0,035
11	0,234	0,057
13	0,229	0,046
25	0,263	0,125
30	0,300	0,219
35	0,290	0,193
40	0,296	0,209
45	0,311	0,249
50	0,303	0,227
55	0,308	0,241
60	0,319	0,274
65	0,307	0,238
75	0,328	0,297
85	0,323	0,283
95	0,333	0,345
105	0,328	0,297
125	0,333	0,345
135	0,348	0,356
145	0,361	0,466
155	0,361	0,466
165	0,361	0,466
195	0,382	0,638
225	0,400	0,653
258	0,406	0,678
285	0,413	0,713
315	0,413	0,713
375	0,437	0,833
405	0,420	0,742
475	0,441	0,853
535	0,492	0,937
595	0,514	1,065
655	0,448	0,721
715	0,536	1,212
775	0,564	1,437
835	0,560	1,401
895	0,566	1,455
955	0,550	1,318
3035	0,675	

Tabla 15. Tratamiento alcalino de 1C₃ y 1T 70:30 a 60°C en hidróxido de sodio 1 M

Tiempo (min)	A (555nm)	$\ln[(A_0 - A_\infty)/(A_t - A_\infty)]$
0	0,352	0
1	0,352	0
2	0,371	0,050
3	0,380	0,075
4	0,377	0,067
5	0,381	0,078
7	0,402	0,138
9	0,396	0,120
11	0,424	0,205
13	0,436	0,244
15	0,423	0,202
17	0,439	0,254
19	0,440	0,257
21	0,429	0,221
23	0,438	0,251
25	0,439	0,254
30	0,472	0,370
35	0,465	0,344
40	0,493	0,452
45	0,513	0,536
50	0,505	0,501
55	0,484	0,416
70	0,562	0,779
80	0,488	0,432
90	0,490	0,439
100	0,506	0,506
110	0,542	0,673
120	0,534	0,633
150	0,546	0,693
180	0,534	0,633
210	0,566	0,802
240	0,544	0,682
270	0,600	1,019
300	0,542	0,673
330	0,586	0,924
360	0,534	0,633
420	0,604	1,048
450	0,534	1,034
510	0,602	1,034
540	0,654	1,507
570	0,664	1,630
600	0,668	1,604
660	0,706	2,435
720	0,654	1,507
780	0,698	2,233
900	0,656	1,530
1080	0,676	1,802
3010	0,740	

Tabla 16. Tratamiento alcalino de los carragenanos de ejemplares de *Gigartina skottsbergii* recolectados en mayo a 60°C en hidróxido de sodio 1 M.

Tiempo (min)	A (555nm)	$\ln[(A_0 - A_\infty)/(A_t - A_\infty)]$
0	0,222	0
1	0,224	0,011
2	0,226	0,023
3	0,225	0,017
4	0,230	0,046
5	0,227	0,028
7	0,228	0,034
11	0,230	0,046
13	0,246	0,144
15	0,252	0,211
17	0,244	0,131
21	0,243	0,125
23	0,250	0,170
25	0,253	0,190
35	0,320	0,793
40	0,318	0,769
60	0,318	0,769
70	0,305	0,623
80	0,346	1,180
90	0,330	0,925
100	0,345	1,162
110	0,344	1,144
150	0,330	0,924
180	0,353	1,316
210	0,363	1,550
240	0,355	1,359
270	0,353	1,316
300	0,358	1,426
330	0,348	1,217
360	0,361	1,499
390	0,340	1,077
420	0,341	1,093
450	0,366	1,632
510	0,369	1,722
2010	0,401	

RESUMEN

En este trabajo de Tesis se realizó el estudio estructural de los carragenanos de gametofitos femeninos del alga roja *Gigartina skottsbergii* y se profundizaron los conocimientos de la estructura fina de este tipo de polisacáridos relacionándola con sus propiedades físicas. En este mismo sentido, se estudió la reacción de ciclación de las unidades de α -galactosa 6-sulfato y 2,6-disulfato en medio alcalino que mejora el poder gelificante de dichos productos.

En la Primera Parte se trataron los siguientes temas:

1.- Se cubrieron ciertos aspectos generales que incluyen: a) Presentación de los tipos de estructuras características de los galactanos sulfatados de algas rojas; b) descripción del ciclo de vida de estas algas; c) historia reciente del estudio estructural de los carragenanos a partir del descubrimiento que los polisacáridos producidos por gametofitos y tetraesporofitos de las algas pertenecientes a la familia Gigartinaceae son diferentes; d) teorías acerca de la biosíntesis de los carragenanos; e) estudios previos realizados sobre los carragenanos de *Gigartina skottsbergii* y f) teorías sobre el modo en que actúan los polisacáridos polianiónicos como agentes antivirales.

2.- Una reseña de los estudios realizados sobre el comportamiento de estos polisacáridos en solución, en particular, sobre el proceso de gelificación.

3.- La espectroscopía de resonancia magnética nuclear es una

herramienta fundamental en el estudio estructural de los polisacáridos de algas rojas. La resonancia magnética nuclear de ^{13}C se utiliza desde hace muchos años, sin embargo, en los últimos tiempos se han aislado nuevas estructuras cuyos espectros han sido asignados.

Sólo recientemente se comenzó a usar la espectroscopía de resonancia magnética nuclear protónica en el estudio estructural de galactanos sulfatados de algas rojas y todavía sus aplicaciones son limitadas; se describieron los avances logrados hasta el momento.

4.- Una de las formas de realizar el estudio de la estructura fina de los polisacáridos de algas rojas es degradarlos parcialmente y luego analizar los fragmentos obtenidos. Se realizó una revisión de las aplicaciones de la reacción de autohidrólisis al estudio estructural de polisacáridos, así como de los conocimientos con que se contaba acerca de la selectividad de la misma, comparándola con las reacciones de hidrólisis ácida producida por un ácido externo.

5.- La reacción de ciclación de las unidades de α -galactosa 6-sulfato y 2,6-disulfato de los carragenanos para dar 3,6-anhidrogalactosa y 3,6-anhidrogalactosa 2-sulfato es de fundamental importancia para aumentar el poder gelificante de estos polisacáridos. Sin embargo, esta reacción no había sido estudiada hasta el momento. Se describieron los conocimientos existentes acerca de este tipo de reacciones, fundamentalmente sobre derivados de glicósidos tosilados en

distintas posiciones.

En la Segunda Parte se realizó la descripción y discusión de los resultados que comprende los siguientes puntos:

1.- Aislamiento, purificación de los carragenanos y fraccionamiento con cloruro de potasio del producto obtenido en la primera extracción (rend. 49,1% del peso seco del alga). Se obtuvieron tres fracciones que se analizaron ($1C_1$, rend. 42,6 %, rango de precipitación 0,30-0,31 M KCl; $1C_2$, 3,5 % 0,40-0,42 M KCl y $1C_3$, 53,9 %, soluble en KCl 2,00 M).

El estudio estructural por metilación y espectroscopía de r.m.n.- ^{13}C y $-^1H$ mostró que $1C_1$ y $1C_2$ son carragenanos kappa/iota, aunque ambos presentan pequeños porcentajes de unidades de α -galactosa 6-sulfato y 2,6-disulfato y cierto número de unidades inusuales; $1C_3$ es un carragenano mu/nu parcialmente ciclado. Los resultados obtenidos evidencian la relación biosintética entre los carragenanos gelificantes y solubles: Las unidades de 3,6-anhidrogalactosa 2-sulfato presentes en $1C_1$ y $1C_2$ se forman a partir de los residuos de α -galactosa 2,6-disulfato de $1C_3$. Por otra parte, las unidades de 3,6-anhidrogalactosa que se encuentran en $1C_3$ se formarían selectivamente a partir de un hipotético precursor común mu/nu. Además, la secuencia biosintética $1C_3 \rightarrow 1C_1$ involucraría un paso de despolimerización.

2.- La reacción de ciclación de las unidades de α -D-galactosa 6-sulfato y 2,6-disulfato para dar 3,6-anhidro- α -

D-galactosa y 3,6-anhidro- α -D-galactosa 2-sulfato, respectivamente es muy importante tanto desde el punto de vista académico como industrial. Se trata de una reacción de pseudo primer orden que depende de la concentración de álcali, la temperatura y la fuerza iónica del medio. A partir de la variación de esta constante de velocidad en función de la concentración de hidróxido de sodio a 60°C fue posible calcular la verdadera constante de segundo orden para la reacción ($k_2 = 5,2 \times 10^{-4} \text{ l mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$).

Por otra parte, la reacción es mucho más rápida para los carragenanos μ/ν que para los λ . Este hecho tiene significado desde el punto de vista industrial, ya que son los primeros los que dan lugar a productos gelificantes por medio del tratamiento alcalino. Luego, en mezclas naturales obtenidas de arribazones bastaría con continuar la reacción sólo hasta obtener ciclación de las unidades de α -galactosa 6-sulfato y 2,6-disulfato de los carragenanos de la familia κ , aún cuando estas unidades en los carragenanos de la familia λ no se hayan ciclado. Mayor tiempo de reacción no mejora las propiedades de los carragenanos, sino que puede llevar a degradación del producto con la concomitante disminución del poder de gelificación.

Algunos autores llevan a cabo la extracción de los carragenanos en medio alcalino; hay que tener en cuenta que los productos aislados en estas condiciones pueden ser diferentes de los que se encuentran originariamente en la planta, principalmente, si se busca extraer conclusiones acerca de la biosíntesis de estos productos.

Se realizó el tratamiento alcalino preparativo de los

carragenanos 1C₁, 1C₂ y 1C₃ y posterior subfraccionamiento con cloruro de potasio de los derivados mayoritarios (1C₁T y 1C₃T). Tanto los productos modificados como las fracciones obtenidas se analizaron.

Un nuevo fraccionamiento de 1C₃T mostró que este método no era tan reproducible como se pensaba anteriormente, a pesar de haber cuidado las condiciones en que se llevó a cabo. Sin embargo, el patrón general de precipitación se mantuvo: además de las fracciones que precipitaban a bajas concentraciones de cloruro de potasio, se obtuvieron pequeñas cantidades de polisacáridos que gelificaban a concentraciones intermedias, así como una fracción que permanecía soluble.

El estudio estructural de las fracciones insolubles indicó una estructura kappa/iota; el caracter iota aumentaba con el incremento de la solubilidad.

Para las fracciones intermedias se encontró una estructura kappa/iota (1C₃T, 0,80-0,90 M KCl) y iota "pura" (IF₄, 1,10-1,20 M KCl) a pesar de su alta solubilidad en soluciones de cloruro de potasio. Se descartó que este comportamiento se deba a un peso molecular bajo, ya que por r.m.n.-¹³C no se detectaron las señales correspondientes a los extremos reductores.

La fracción soluble en cloruro de potasio 2,00 M presenta una estructura diferente a la de las otras fracciones. Se trata de un galactano sulfatado que contiene D- y L-galactosa e importantes cantidades de cadenas laterales de unidades de galactosa y xilosa.

3.- Se realizó la autohidrólisis de $1C_1$. El estudio de la selectividad de dicha reacción indicó que, además de la ruptura de las uniones 3,6-anhidrogalactosídicas (que había sido determinada anteriormente), también se producía la hidrólisis de las uniones α -galactosídicas cuando las mismas llevaban sulfato en las posiciones 2 y 6; en cambio ésto no sucedía cuando dicha unidad se hallaba sulfatada sólo en la posición 6. Por otra parte, el grupo sulfato en C-2 no era completamente estable en las condiciones en que se realizaba la reacción. Se efectuaron ensayos preliminares de separación de los oligosacáridos obtenidos.

La degradación parcial por autohidrólisis resultó una herramienta alternativa para el estudio estructural de carragenanos, ya que los productos obtenidos dan soluciones acuosas concentradas de baja viscosidad, adecuadas para realizar espectros de r.m.n.- ^{13}C con equipos de baja resolución y a temperatura ambiente. Así, a partir del conocimiento de la selectividad de la reacción, se puede deducir la estructura del polisacárido de partida.

4.- Se determinó la actividad antiviral de los carragenanos $1C_1$, $1C_2$ y $1C_3$, así como de sus derivados tratados con álcali. Todos resultaron activos hacia el virus Herpes simplex tipo 1. Sin embargo, los productos de menor peso molecular no fueron activos en las mismas condiciones.

En la Tercera Parte se describieron los materiales y métodos utilizados.