

Tesis de Posgrado

Estudio del sistema de polisacáridos del alga roja calcárea Corallina Officinalis

Cases, Marcelo Roberto

1995

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:

Cases, Marcelo Roberto. (1995). Estudio del sistema de polisacáridos del alga roja calcárea Corallina Officinalis. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2755_Cases.pdf

Cita tipo Chicago:

Cases, Marcelo Roberto. "Estudio del sistema de polisacáridos del alga roja calcárea Corallina Officinalis". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1995. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2755_Cases.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

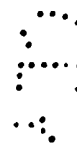
Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

Tema de Tesis

"ESTUDIO DEL SISTEMA DE POLISACÁRIDOS DEL ALGA ROJA CALCÁREÁ:
CORALLINA OFFICINALIS".



Autor

MARCELO ROBERTO CASES

Director de Tesis

DR. ALBERTO S. CEREZO

Lugar de trabajo

Departamento de Química Orgánica

Tesis presentada para optar al título de
DOCTOR DE LA UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

1995

A mis padres

A María Andrea, mi esposa

A la memoria de mi tía Antonia

*Quiero agradecer sinceramente al
Dr. Carlos A. Stortz, cuya amistad,
dedicación y capacidad científica fueron
fundamentales para este trabajo de Tesis*

Mi profundo agradecimiento al Dr. Alberto S. Cerezo, Director de esta Tesis, por sus valiosos aportes científicos, su constante interés en mi formación, su afecto y su excepcional calidad humana.

Quiero agradecer a las siguientes personas e Instituciones, cuya ayuda fue muy importante para este trabajo.

Al Dr. Eduardo G. Gros por la donación de las muestras de galactosas metiladas.

Al Dr. Robert Cherniak, de la Georgia State University, por la realización de los espectros de RMN de ^1H y ^{13}C .

A la Dra. Elsa Damonte y al Dr. Carlos Pujol por los ensayos de actividad antiviral de los polisacáridos.

A la Dra. Carmen Pujals, del Museo Nacional de Ciencias Naturales Bernardino Rivadavia, por su colaboración en la clasificación de los ejemplares de *Corallina officinalis*.

Al Sr. Jorge Aznárez, por los análisis por cromatografía gas-líquido acoplada a espectrometría de masa.

A la Lic. Marta Marcote y a UMYMFOR por los microanálisis realizados.

Al Dr. Jorge Stripeikis del INQUIMAE, por los análisis de absorción atómica.

A los Dres. Jorge Palermo, Gustavo Revelli y Sergio Giacopello, y a la Lic. Cristina Tettamanzi, por los espectros de RMN de ^1H y ^{13}C .

A los Lic. Eduardo Sproviero y Adriana Kolender por su ayuda en el manejo de distintos programas de computación.

Al Dr. Jorge Palermo por su entusiasmo y colaboración en la recolección y clasificación del material.

A la Dra. Cristina Matulewicz por su ayuda y afecto en todos estos años.

A Alejandro P. Nin por su gran amistad y por tantos momentos compartidos.

A Cecilia Rodríguez por su constante colaboración y amistad en cada paso de este trabajo.

A mis queridos compañeros de laboratorio, Marina Ciancia, María Inés Errea, Andrea Lavigne, Miguel Nosedá, Hernán Haines, María Luján Flores, Adriana Kolender,

Susana Feldman, Silvia Colavecchia, Adriana Manzi y María Eugenia Duarte, por su amistad y ayuda en todo momento, y porque fue grato compartir con cada uno de ellos el trabajo diario. A Andrea Lavigne agradezco además, su ayuda en la preparación de las figuras (y los mates).

A Gerardo Caballero, Jorge Aznárez, Gustavo Revelli, Osvaldo Teme Centurión, Patricia Zunszain, Leonardo Iglesias, José Dadon, Alberto Ghini, Juan Bautista Rodríguez y Carlos Lima, porque su amistad y compañerismo hicieron más agradable estos años de trabajo.

A las Dras. Inge Thiel y Norma D'accorso por su interés y colaboración.

A los demás compañeros y Profesores del Departamento de Química Orgánica, agradezco su cordialidad y colaboración permanente.

Al personal no docente del Departamento, en especial al Sr. Eduardo López y la Sra. María del Carmen Ares, por su ayuda y disposición constante.

PRÓLOGO

Las algas sintetizan diferentes polisacáridos de acuerdo a sus necesidades biológicas. Una de las funciones fundamentales de estos compuestos es la de actuar como sostén de la planta, trabajando como un esqueleto flexible que permite al alga adaptarse a la vida acuática. En las algas calcáreas sin embargo, la función de sostén es cumplida por la cubierta de carbonato de calcio y es probable que los polisacáridos, presentes en menor proporción, tengan características distintivas.

Los polisacáridos de algas rojas han sido intensamente estudiados debido a que son económicamente importantes y muy utilizados en diversas industrias. Los compuestos más conocidos, junto con los alginatos de algas pardas, son el ágar y los carragenanos. Estos últimos constituyen sendas familias de polisacáridos, con estructuras que varían entre extremos ideales pero bien definidos.

Dentro de la familia del ágar existen una serie de compuestos cuyas estructuras presentan desviaciones respecto de un agarano típico. Dichos compuestos suelen ser bastante complejos, y en general no han sido estudiados detalladamente.

Los polisacáridos del alga roja calcárea *Corallina officinalis* fueron caracterizados superficialmente hace tres décadas, e incluidos dentro de la familia del ágar. Se determinaron los azúcares componentes y se hicieron estudios de homogeneidad, que mostraban características atípicas. Si bien los autores indicaron que continuaban con los estudios, no publicaron posteriormente ningún trabajo sobre el tema.

Por lo tanto la razón para estudiar estos productos, más allá de su interés académico, consiste en que se conoce muy poco acerca de la estructura y propiedades de este tipo de polisacáridos, siendo el conocimiento de la estructura un punto clave para determinar sus funciones y sus posibles usos, considerando que el alga *Corallina*

officinalis es muy abundante en todo el mundo, particularmente en el litoral marítimo argentino, incluyendo la costa bonaerense.

Los objetivos principales de este trabajo de Tesis fueron:

- i) Determinar la estructura del polisacárido de *Corallina officinalis*, enfatizando el análisis de aspectos particulares de la misma.
- ii) Analizar los factores estructurales que determinan sus propiedades y su posible aprovechamiento, y eventualmente estudiar su injerencia en los procesos de calcificación.
- iii) Desarrollar nuevos métodos de análisis diseñados especialmente para estudiar las características de este tipo de polisacáridos, que resultan difíciles de analizar por otros métodos.

Los resultados obtenidos son sumamente interesantes y permiten ampliar los conocimientos existentes sobre esta clase de compuestos. Además se desarrolló un nuevo método de análisis, y se extendió el uso de un método preexistente, que significan una contribución importante a las técnicas existentes para el análisis de polisacáridos en general.

Los trabajos desarrollados dieron origen a las siguientes publicaciones:

- 1) Marcelo R. Cases, Carlos A. Stortz y Alberto S. Cerezo.
"Methylated, sulphated xylogalactans from the red seaweed *Corallina officinalis*".
Phytochemistry **31** (11), 3897-3900 (1992).
- 2) Marcelo R. Cases, Carlos A. Stortz y Alberto S. Cerezo.
"Separation and identification of partially ethylated galactoses as their acetylated aldononitriles and alditols by capillary gas-chromatography and mass spectrometry".
J. Chromatogr. A **662**, 293-299 (1994).

3) Marcelo R. Cases, Carlos A. Stortz y Alberto S. Cerezo.

"Structure of the 'corallinans' – sulfated xylogalactans from *Corallina officinalis*".

Int.J. Biol. Macromol. **16 (2)**, 93-97 (1994).

4) Marcelo R. Cases, Alberto S. Cerezo y Carlos A. Stortz.

"Separation and quantitation of enantiomeric galactoses and their mono-*O*-methylethers as their diastereomeric acetylated 1-deoxy-1-(2-hydroxypropylamino)alditols".

Carbohydr.Res. **269**, 333-341 (1995).

INDICE

PRIMERA SECCIÓN: INTRODUCCIÓN

CAPÍTULO I: ESTRUCTURAS DE LOS GALACTANOS DE ALGAS ROJAS	2
1.1 INTRODUCCIÓN.....	3
1.2 ESTRUCTURAS DE LOS CARRAGENANOS.....	7
1.2.1 Familia kappa	9
1.2.2 Familia lambda	11
1.2.3 Familia beta	12
1.2.4 Familia omega	13
1.2.5 Carragenanos de distintas fases sexuales	14
1.3 AGAR Y AGAROIDES.....	15
1.3.1 Enmascaramiento de la estructura	17
1.3.1.1 Porfiranos	18
1.3.1.2 Polisacáridos del orden Ceramiales	20
1.3.1.3 El polisacárido de <i>Anatheca dentata</i>	22
1.4 POLISACÁRIDOS DEL ORDEN CRYPTONEMIALES.....	25
1.4.1 Familia Grateloupiaceae	25
1.4.1.1 Aeodanos	26
1.4.2 Familia Endocladiaceae	39
1.4.3 Familia Tichocarpaceae	40
1.4.4 Familia Kallymeniaceae	41
1.4.5 Familia Gloiosiphonaceae	42
1.4.6 Familia Dumontiaceae	42
1.5 XILOSA EN GALACTANOS DE ALGAS ROJAS.....	43
1.5.1 El polisacárido de <i>Corallina officinalis</i>	49
1.6 GRUPOS METOXILO EN GALACTANOS DE ALGAS ROJAS.....	50

SEGUNDA SECCIÓN: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

CAPÍTULO II: AISLAMIENTO, PURIFICACIÓN Y DETERMINACIÓN ESTRUCTURAL DE LOS POLISACÁRIDOS DE *CORALLINA OFFICINALIS*

	56
2.1 AISLAMIENTO DE LOS POLISACÁRIDOS.....	57
2.2 CARACTERIZACIÓN DE LOS POLISACÁRIDOS.....	61
2.2.1 Factor de corrección para la cuantificación de hidratos de carbono	61
2.2.2 Análisis de la determinación del poder reductor	65
2.2.3 Caracterización	66
2.2.3.1 Determinación de galactosa 6-sulfato	69
2.2.3.2 Determinación del poder rotatorio	70
2.2.4 Composición del residuo de extracción	73
2.3 FRACCIONAMIENTO DEL POLISACÁRIDO FS.....	75
2.4 CARACTERIZACIÓN DE LAS FRACCIONES.....	79
2.5 AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE LOS POLISACÁRIDOS DE <i>CORALLINA OFFICINALIS</i> DE LA COSTA BONAERENSE.....	82
2.5.1 Fraccionamiento del polisacárido FS _M	84
2.6 CARACTERIZACIÓN DE LAS FRACCIONES.....	86
2.6.1 Azúcares componentes	89
2.6.2 Determinación del poder rotatorio	93
2.7 ANÁLISIS POR METILACIÓN.....	99
2.7.1 Análisis de los resultados	109
2.8 ANÁLISIS POR ETILACIÓN.....	112
2.8.1 Análisis de los resultados	115
2.9 ANÁLISIS POR DESULFATACIÓN-METILACIÓN.....	119
2.9.1 Desulfatación ácida	119
2.9.2 Desulfatación solvolítica	120

2.9.3	Desulfatación de los polisacáridos de <i>Corallina officinalis</i>	121
2.9.3.1	Desulfatación solvolítica	121
2.9.3.2	Desulfatación ácida	124
2.9.4	Metilación de los polisacáridos desulfatados	126
2.10	DETERMINACIÓN DE LA CONFIGURACIÓN DE LOS AZÚCARES COMPONENTES.....	131
2.10.1	Aplicación de los 1-amino-1-desoxialditoles en la cuantificación de los azúcares componentes: comparación con las técnicas de aldononitrilos y alditoles acetilados	134
2.11	DATOS EMPLEADOS EN LA DETERMINACIÓN ESTRUCTURAL.....	136
2.12	ESPECTROSCOPIA DE RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR.....	139
2.12.1	RMN de ^{13}C	139
2.12.2	RMN de ^1H	145
2.13	ESTRUCTURA DE LOS CORALINANOS.....	148
2.13.1	Grupo Principal	150
2.13.1.2	Oxidación con periodato	151
2.13.2	Grupo Variante I-A	152
2.13.3	Grupo Variante I-B	154
2.13.4	Grupo Variante II	155
2.13.4.1	Fracción 4I	155
2.13.4.2	Fracciones 2I-3I	156
2.13.4.3	Fracción II	157
2.14	CONCLUSIONES.....	159
2.15	ACTIVIDAD ANTIVIRAL DE LOS POLISACÁRIDOS.....	162
CAPÍTULO III: USOS DE LA ETILACIÓN EN LA DETERMINACIÓN ESTRUCTURAL DE POLISACÁRIDOS		163
3.1	PROPIEDADES CROMATOGRÁFICAS DE LOS AZÚCARES ETILADOS.....	165

3.2	ENVEJECIMIENTO DE LAS COLUMNAS CROMATOGRÁFICAS	172
3.3	ESPECTROS DE MASA DE LOS <i>O</i> -ACETIL- <i>O</i> - ETILGALACTONONITRILOS.....	173
3.3.1	Espectros de masa de algunos derivados tetra- <i>O</i> -alquilados	176
3.3.2	Espectros de masa de algunos derivados tri- <i>O</i> -alquilados	180
3.3.3	Espectros de masa de algunos derivados di- y mono- <i>O</i> -etilados	187
3.3.4	Espectro de masa del 5- <i>O</i> -acetil-2,3,4-tri- <i>O</i> -etilxilononitrilo	190
3.4	ESPECTROS DE MASA DE LOS <i>O</i> -ACETIL- <i>O</i> -ETILGALACTITOLES...	191
3.4.1	Espectros de masa de algunos derivados tetra- <i>O</i> -alquilados	192
3.4.2	Espectros de masa de algunos derivados 2,3,6-tri- y 2,4-di- <i>O</i> - alquilados	196
3.4.3	Espectros de masa de los derivados tri-, di-, y monoetilados	199
 CAPÍTULO IV: SEPARACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE AZÚCARES ENANTIOMÉRICOS COMO SUS 1-AMINO-1- DESOXIALDITOLES DIASTEREOMÉRICOS		 201
4.1	ESTUDIO DE LAS CONDICIONES DE LA REACCIÓN.....	203
4.1.1	Aminación reductiva utilizando α -metilbencilamina	204
4.1.2	Aminación reductiva utilizando 1-amino-2-propanol	208
4.1.2.1	Juego de reacciones I: variación de la relación azúcar / amina	210
4.1.2.2	Juego de reacciones II: variación del pH	212
4.1.2.3	Juego de reacciones III: efecto del agua en el rendimiento de la reacción	214
4.1.2.4	Juego de reacciones IV: acción del ácido acético glacial y variación de la proporción de cianoborohidruro	215
4.1.2.5	Juego de reacciones V: variación de la temperatura y el tiempo de reacción	216
4.1.3	Conclusiones	219
4.2	APLICACIÓN DE LA REACCIÓN AL ANÁLISIS DE AZÚCARES.....	220
4.2.1	Empleo de la (<i>S</i>)- α -metilbencilamina para la resolución de la 2- <i>O</i> -metilgalactosa	223

4.3 CONCLUSIONES.....	225
-----------------------	-----

TERCERA SECCIÓN: PARTE EXPERIMENTAL

CAPÍTULO V: MATERIALES Y MÉTODOS	227
---	------------

5.1 Consideraciones generales	228
5.2 Características del material	228
5.3 Extracción y aislamiento del polisacárido	229
5.4 Fraccionamiento del polisacárido	230
5.5 Determinación cuantitativa de los hidratos de carbono totales	230
5.6 Determinación de 3,6-anhidrogalactosa	231
5.7 Determinación de sulfato	234
5.8 Determinación del 6-sulfato	235
5.9 Determinación de ácidos urónicos	236
5.10 Determinación del peso molecular	236
5.11 Determinación cuantitativa de las proteínas totales	238
5.12 Determinación de los azúcares componentes	239
5.13 Cromatografía gas-líquido	240
5.14 Estudios de metilación	242
5.15 Estudios de etilación	244
5.16 Desulfatación solvolítica	245
5.17 Desulfatación ácida	246
5.18 Oxidación con periodato	246
5.19 AMINACIÓN REDUCTIVA.....	248
5.19.1 Aminación reductiva en buffer ácido acético / acetato de sodio de pH=5,9	248
5.19.2 Aminación reductiva empleando la técnica de Tang y Williams	248
5.19.3 Aminación reductiva empleando la técnica de Oshima <i>et al</i>	250
5.19.4 Juego de reacciones I: variación de la relación azúcar-amina	251
5.19.5 Juego de reacciones II: variación del pH	252
5.19.6 Juego de reacciones III: variación de la proporción de agua	253
5.19.7 Juego de reacciones IV: acción del ácido acético glacial y variación de la proporción de cianoborohidruro	253

5.19.8	Juego de reacciones V: variación de la temperatura y el tiempo de reacción	254
5.19.9	Técnica optimizada	254
5.20	Síntesis del 4,6-(<i>O</i>)-bencilidén- α -metilgalactósido	255
5.21	Reacciones de sub-alkilación intencional	257
5.22	Espectroscopía de resonancia magnética nuclear	258
5.23	Construcción de las tablas de estructura	259
5.24	Actividad antiviral	265
RESUMEN		267
BIBLIOGRAFÍA		273

PRIMERA SECCIÓN

INTRODUCCIÓN

CAPÍTULO I

ESTRUCTURA DE LOS GALACTANOS DE ALGAS ROJAS

1.1 INTRODUCCIÓN

Si bien los polisacáridos de algas han sido tema de intensas investigaciones, los estudios químicos sobre estos polisacáridos se han realizado en pocas especies en forma detallada. Los alginatos extraídos de algas pardas (Phaeophyceae) y los galactanos de algas rojas (Rhodophyceae) han recibido la mayor atención debido a su valor económico.

El interés en dichos polisacáridos se debe a que, dependiendo de su estructura y del medio, son capaces de formar soluciones altamente viscosas o geles rígidos, que permanecen estables aún en presencia de diferentes aditivos. Estos compuestos, por lo tanto, son usados ampliamente en las industrias alimentaria, del papel, textil, petroquímica, etc. Sus propiedades reológicas están basadas en la conformación de las cadenas del polisacárido, la cual depende fundamentalmente de la estructura primaria de dichos compuestos.

Los galactanos son los principales polisacáridos componentes de la matriz intercelular en la mayoría de las Rhodophyceae. En esencia, todos consisten en cadenas lineales de $\rightarrow 3$)-Gal β -(1 \rightarrow [unidad A] y $\rightarrow 4$)-Gal α -(1 \rightarrow [unidad B] en forma alternada. Las unidades A corresponden siempre a galactosa de la serie D-, mientras que las B pueden incluir residuos tanto de la serie D- (Figura 1), como de la serie L- (Figura 2).

Esta estructura regular puede estar enmascarada por sustitución con hemiéster sulfato, restos de ácido pirúvico (como cetal en las posiciones 4 y 6), grupos metoxilo, por formación del 3,6-anhidro azúcar (unidad B), e incluso con cadenas laterales de longitud variable (Figura 3, página 5).

Los extractos obtenidos de algas de diferentes géneros difieren en la proporción de D- y L-galactosa, y en el grado de sustitución y modificación de los residuos.

Precisamente son estas diferencias las que en definitiva determinan la conformación de las macromoléculas y en consecuencia, las propiedades físicas de los productos extraídos. Dado el número de variaciones estructurales posibles, es evidente que pueden esperarse grandes diferencias en las propiedades de los extractos de diferentes algas.

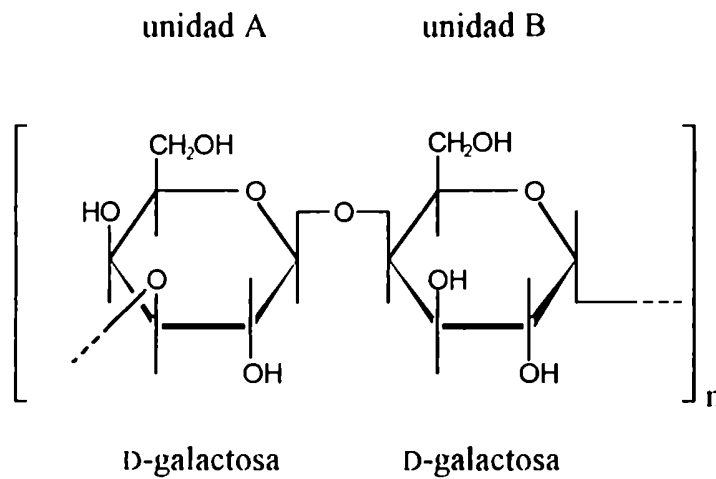


Figura 1. Galactano con unidades D- alternantes.

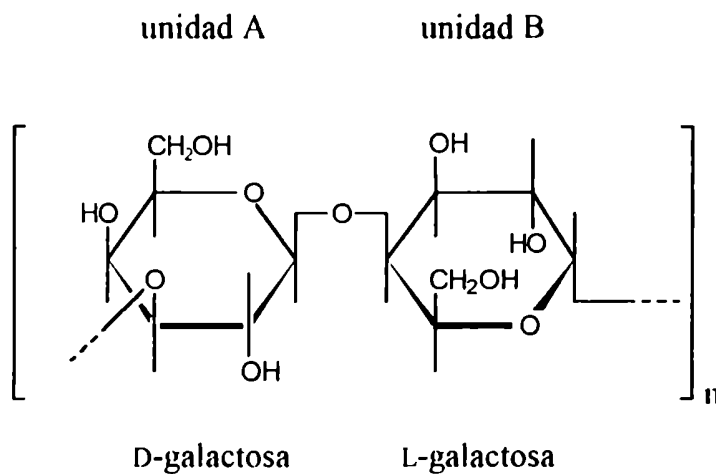


Figura 2. Galactano con unidades D- y L- alternantes.

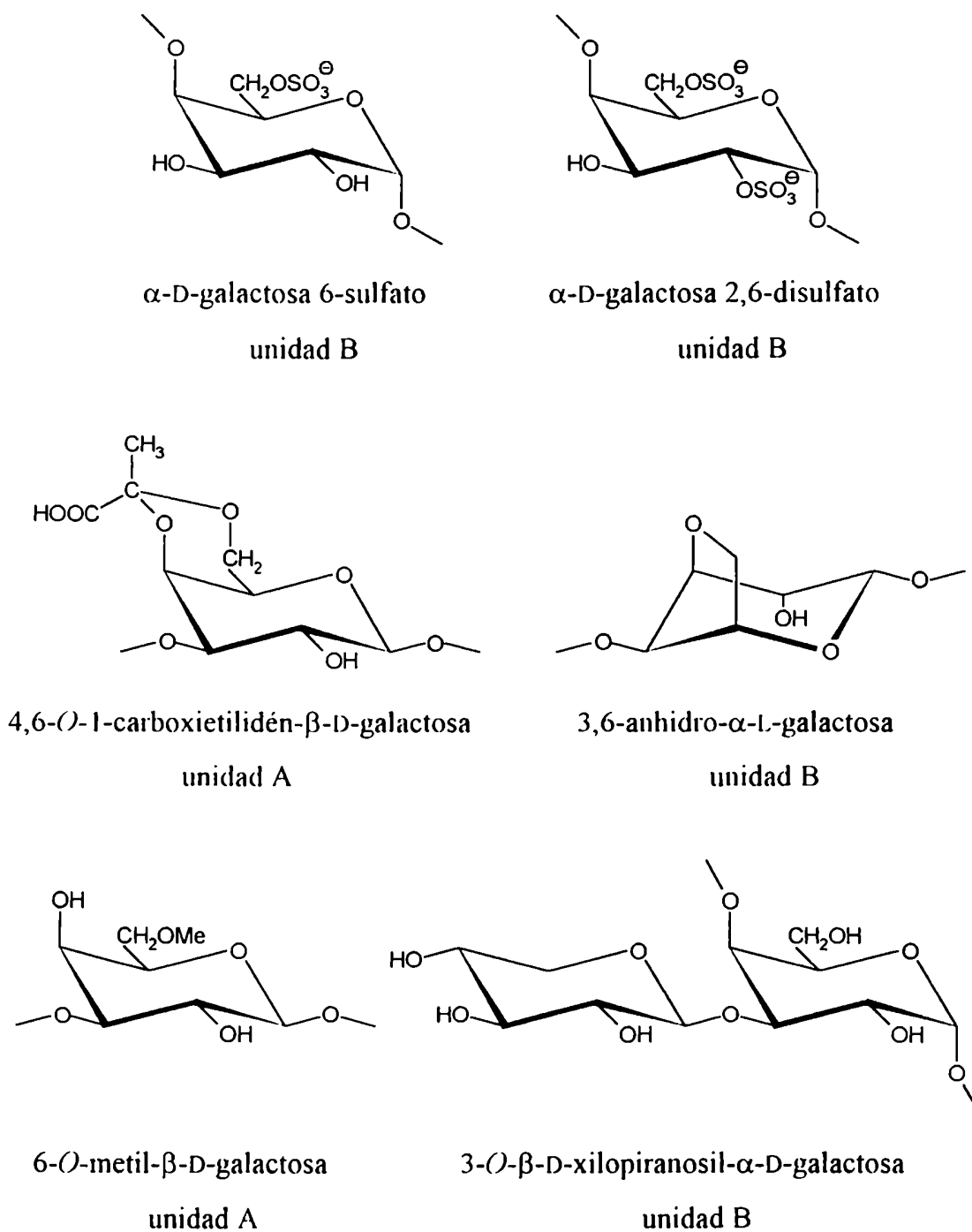


Figura 3. Algunas modificaciones en los residuos de galactosa encontrados en las Rhodophyceae.

Por ejemplo, hay extractos que forman geles firmes aún en solución diluida, y otros que no tienen propiedad gelificante alguna. Se observó que la presencia de 3,6-anhidrogalactosa como unidad B, induce la gelificación. Cuando ésta es reemplazada por galactosa 6-sulfato, o bien la posición 2 del residuo de galactosa unida por C-3 está sulfatado, el poder gelificante es nulo¹. Estos ejemplos revelan la importancia práctica de determinar la estructura fina de los polisacáridos de algas.

Los galactanos se han clasificado en dos grandes grupos: polisacáridos tipo carragenano, unidades alternadas de $\rightarrow 3$)- β -D-Galp-(1 \rightarrow 4)- α -D-Galp-(1 \rightarrow (Figura 4); o polisacáridos tipo ágar, en el cual las unidades de α -galactosa pertenecen a la serie L- (Figura 5). Existen además algunos compuestos cuyas estructuras son intermedias entre las del ágar y los carragenanos.

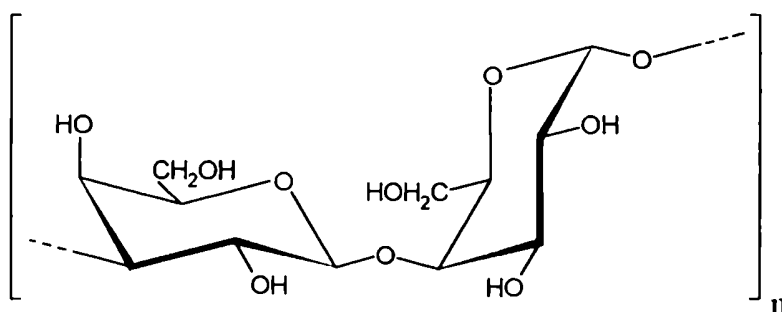


Figura 4. Estructura básica tipo carragenano.

Las estructuras aquí exhibidas representan modelos ideales. En cada caso el extracto consiste en una familia de moléculas que pueden diferir en detalles estructurales finos, y es la estructura promedio de estas moléculas la que es determinada por el químico.

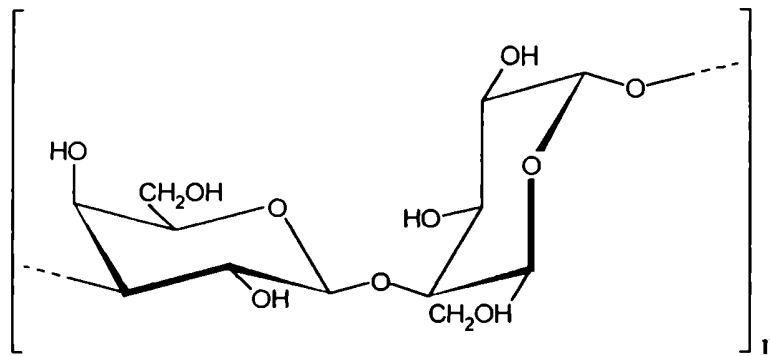


Figura 5. Estructura básica tipo ágar.

1.2 ESTRUCTURA DE LOS CARRAGENANOS

Los carragenanos fueron aislados por primera vez por Schmidt² en el año 1844, cuando extrajo el mucílago del alga roja *Chondrus crispus*. Actualmente, los carragenanos son obtenidos principalmente de los géneros *Chondrus*, *Gigartina*, *Iridaea*, *Hypnea* y *Eucheuma*, todos ellos correspondientes al orden Gigartinales.

Los primeros estudios estructurales comenzaron en la década de 1940 cuando Buchanan *et al*³ analizaron el tipo de unión del polisacárido de *Chondrus crispus*.

Alrededor de 1950 se demostró experimentalmente la presencia de más de un componente en los carragenanos, y que éstos podían fraccionarse por la propiedad que tenía uno de ellos, el llamado κ -carragenano, de formar geles en presencia de KCl 0,125M, permaneciendo el resto, λ -carragenano, en solución⁴.

Posteriormente Percival⁵ en 1954 y luego O'Neill⁶ en 1955 determinaron la presencia de 3,6-anhidrogactosa como constituyente de los carragenanos. A partir de allí comenzaron a efectuarse estudios estructurales de las fracciones κ y λ por separado. O'Neill⁷ sugirió una estructura para el κ -carragenano de *Chondrus crispus*, la cual fue luego confirmada (Figura 6).

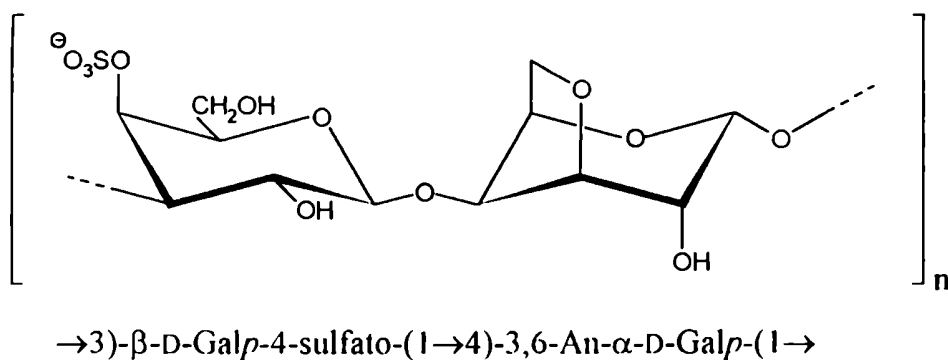


Figura 6. κ-carragenano.

El grupo de Rees logró determinar la estructura del λ-carragenano, tanto analizando el tratamiento alcalino del mismo^{8,9}, como mediante un análisis por metilación¹⁰. Estudios posteriores la confirmaron empleando otros métodos (Figura 7).

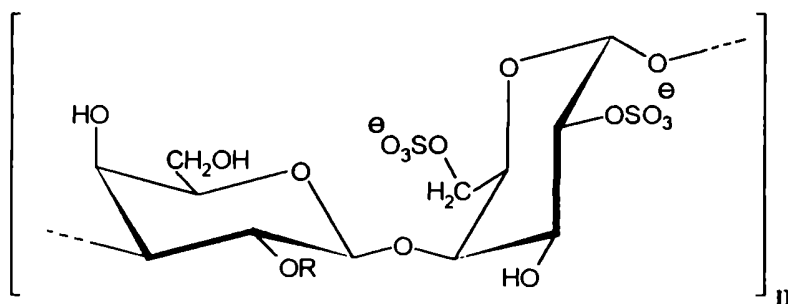


Figura 7. λ-carragenano. R = 70% SO₃, 30% H.

Durante la década de 1960 gracias a los trabajos de Rees en Inglaterra y de Haug^{11,12} en Noruega, se llegó a la conclusión de que el carragenano no es un producto puro ni una mezcla de dos o más polisacáridos, sino una verdadera familia de

compuestos con estructuras y propiedades que varían continuamente dentro de lo que podrían considerarse como extremos idealizados.

Con ese criterio se pueden definir dos familias dentro de la "gran familia" de los carragenanos: las familias del κ -carragenano, y del λ -carragenano.

1.2.1 Familia kappa

La familia del κ -carragenano incluye aquellos polisacáridos contruidos a partir de la siguiente unidad estructural: $[\rightarrow 3)\text{-}\beta\text{-D-Galp-4-sulfato-(1}\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-D-Galp-(1}\rightarrow]$. Estos son el κ -carragenano (Figura 6), ι -carragenano (Figura 8) aislado del alga *Eucheuma spinosum*¹³; μ -carragenano^{14,15} (Figura 9); y ν -carragenano¹⁶ (Figura 10).

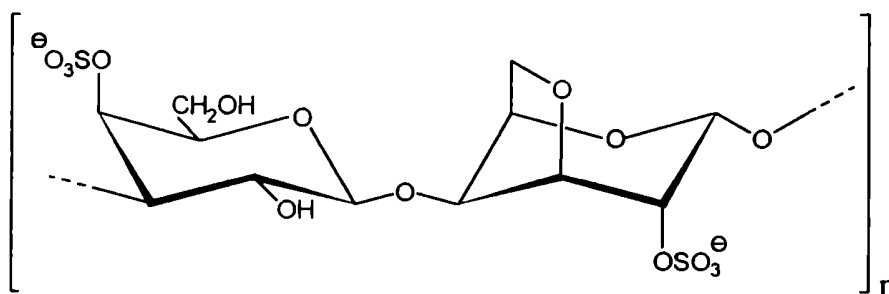


Figura 8. ι -carragenano.

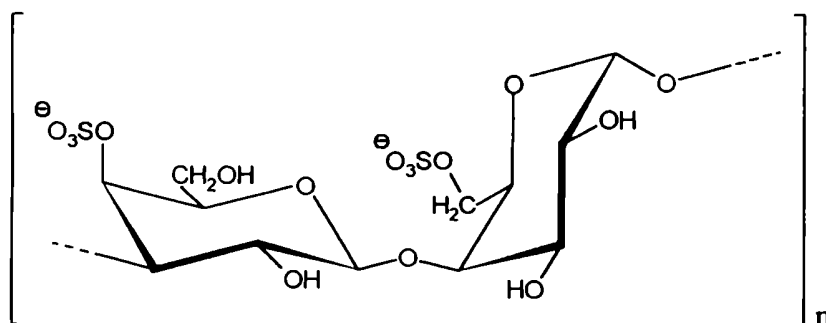


Figura 9. μ -carragenano.

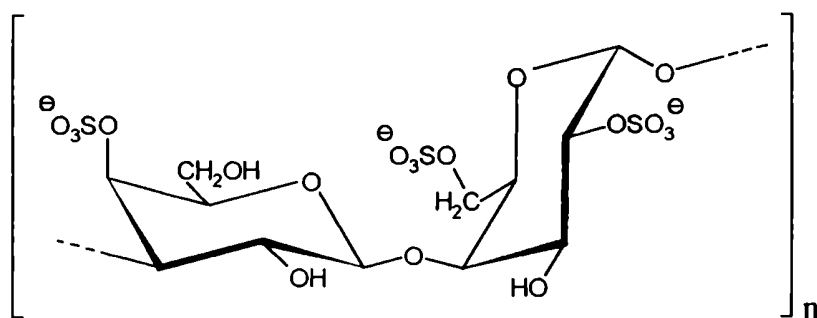
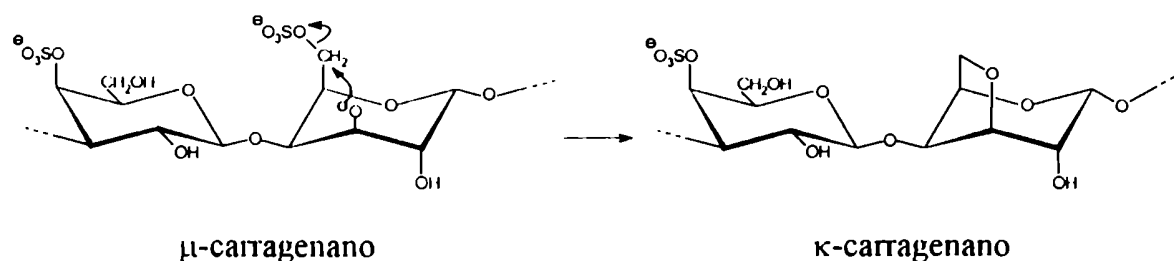


Figura 10. ν -carragenano.

Los κ - y ι -carragenanos pueden obtenerse a partir de los μ - y ν -carragenanos respectivamente, por tratamiento alcalino o enzimático transformando la galactosa 6-sulfato (unidad B) en 3,6-anhidrogalactosa¹⁷. La reacción, por tratamiento alcalino, procede de la siguiente manera: en medio básico se genera un ión alcóxido en el C-3 de la galactosa 6-sulfato el cual, siguiendo un mecanismo tipo SN_2 , desplaza al grupo sulfato del C-6 formando el éter cíclico intramolecular, como se observa en el esquema.



Estudios más recientes¹⁸⁻²⁰ muestran, sin embargo, que los κ - y ι -carragenanos no tienen una estructura estrictamente repetitiva, sino que son moléculas híbridas, con una parte κ - ó ι - más dominante dependiendo del caso.

1.2.2 Familia lambda

La familia del λ -carragenano fue definida por Rees¹⁷ como la de aquellos polisacáridos exentos de unidades de β -D-Galp-4-sulfato y 3,6-An- α -D-Galp. El λ -carragenano propiamente dicho constituye el extremo de un espectro de estructura básica variante. Estos polisacáridos están idealmente constituidos por la repetición regular de la unidad $[\rightarrow 3)\text{-}\beta\text{-D-Galp-2-sulfato-(1}\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-D-Galp-2,6-disulfato-(1}\rightarrow$] (Figura 7). Una característica notable de estos productos es que, por tratamiento alcalino o enzimático, la unidad B (α -D-Galp-2,6-disulfato) puede ciclar a 3,6-An- α -D-Galp-2-sulfato sin dar un producto gelificante. Como ya se mencionó, el responsable de que el λ -carragenano tratado no gelifique, es el éter sulfato en el C-2 de la unidad A¹.

También pertenecientes a la familia del λ -carragenano, son el ξ -carragenano²¹ (Figura 11), presente en el carragenano de *Gigartina atropurpurea*; y el π -carragenano²², cuya estructura se deriva de la anterior por la presencia del cetal del ácido pirúvico en las posiciones 4 y 6 de la unidad B (Figura 12).

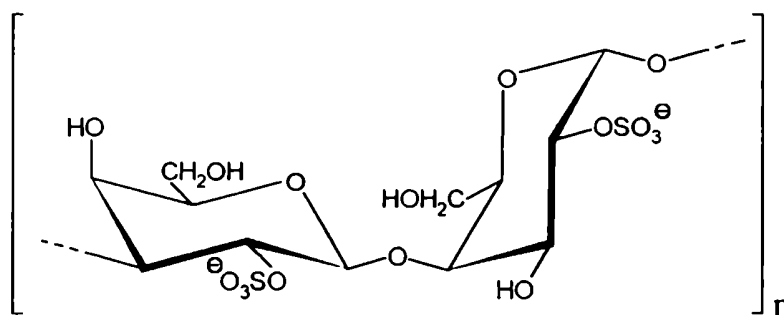


Figura 11. ξ -carragenano.

Es interesante notar que tanto el ξ - como el π -carragenano, son los únicos carragenanos que no contienen 3,6-anhidrogalactosa ni su precursor, galactosa 6-

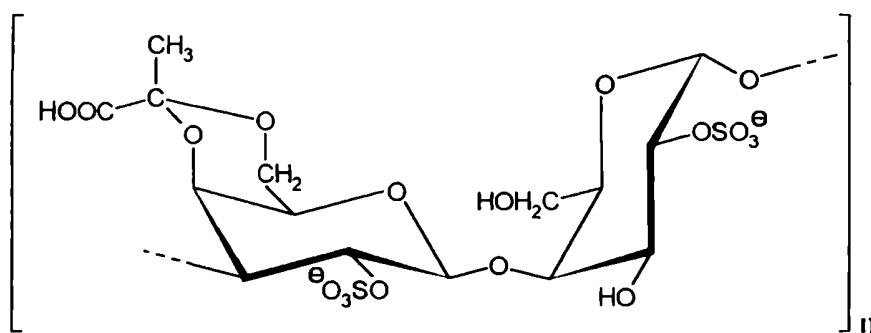


Figura 12. κ -carragenano.

sulfato. Se verá más adelante que este hecho representa un concepto importante en el estudio de todos los polisacáridos de algas rojas.

Además de los polisacáridos pertenecientes a las familias del κ - y del λ -carragenano, existe una serie de compuestos cuyas características permiten definir dos nuevas familias: las familias "beta" y "omega".

1.2.3 Familia beta

Los carragenanos de la familia beta se caracterizan por la ausencia de sulfato en la unidad A. Greer y Yaphe²³ llamaron β -carragenano a un polisacárido extraído de *Eucheuma gelatinae*, formado por unidades alternantes de β -D-galactosa y 3,6-anhidro- α -D-galactosa (Figura 13). Este compuesto es un esteroisómero de la agarosa, ya que en esta última el residuo de anhidrozúcar pertenece a la serie L-.

El α -carragenano, perteneciente también a esta familia, fue aislado del alga *Catenella nipae*²⁴ y lo caracterizaron como un β -carragenano sustituido con éster sulfato en la posición 2 de la unidad de 3,6-anhidrogalactosa (Figura 14).

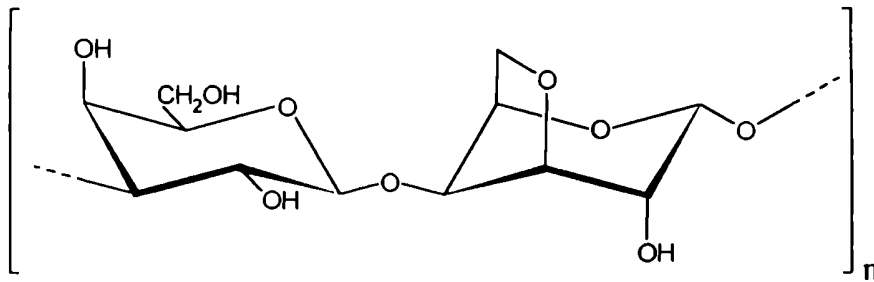


Figura 13. β -carragenano.

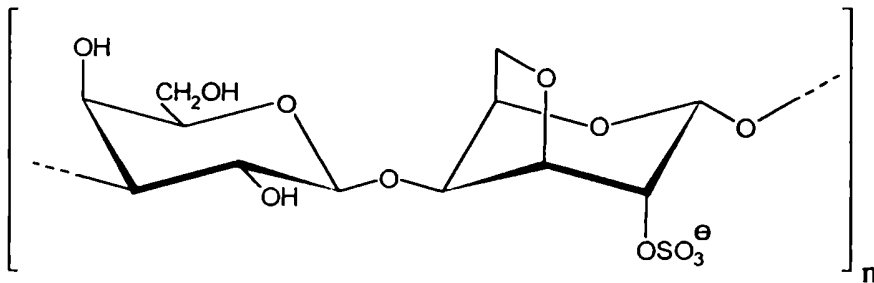


Figura 14. α -carragenano.

1.2.4 Familia omega

Esta familia se caracteriza por la sulfatación en el C-6 de la unidad A (Figura 15). El único integrante es el ω -carragenano aislado de *Rissoella verruculosa*²⁵.

Las estructuras descritas para cada familia son, sin embargo, idealizadas. Los carragenanos comprenden un amplio y continuo espectro de macromoléculas, con dichas estructuras como límite y diferentes compuestos híbridos intermedios.

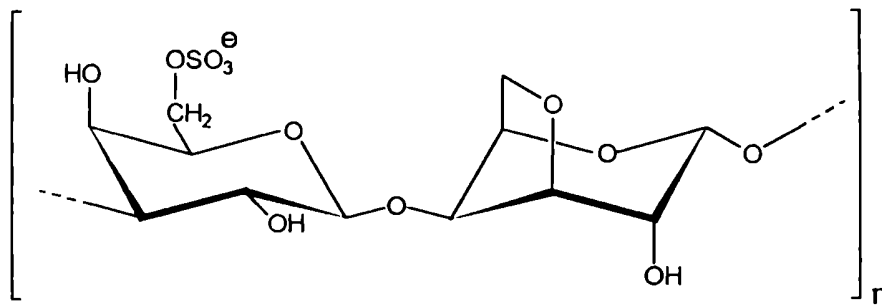


Figura 15. ω-carragenano.

1.2.5 Carragenanos de distintas fases sexuales

Un nuevo enfoque en el estudio de los carragenanos comenzó cuando dos grupos de investigación en forma paralela, descubrieron que en ciertas algas, individuos de distintas fases sexuales producen carragenanos diferentes²⁶⁻²⁹.

Los resultados muestran que los gametofitos, tanto femeninos como masculinos, producen mayoritariamente carragenanos que gelifican a bajas concentraciones de KCl o que pueden convertirse en ellos por tratamiento alcalino (familia κ). En cambio los tetraesporofitos producen carragenanos solubles en KCl (familia λ).

Sin embargo, este comportamiento sólo fue observado en especies de las familias Gigartinaceae y Phylloporaceae. En otras familias estudiadas del mismo orden (Hypneaceae³⁰, Furcellariaceae³⁰, Solieriaceae^{31,32}, Rhodophylidaceae³³), los carragenanos producidos por gametofitos y tetraesporofitos son similares, y en todos los casos pertenecen a las familias κ o β.

1.3 AGAR Y AGAROIDES

Las primeras investigaciones químicas acerca de la estructura del ágar fueron llevadas a cabo sobre el sistema de polisacáridos sin fraccionar^{34,35}, y se encontró que consistía en un galactano con uniones alternadas (1→3) y (1→4). Araki³⁶ en 1937, fraccionó por acetilación el ágar de *Gelidium amansii* en dos fracciones: un polímero virtualmente neutro (agarosa), y una fracción cargada (agarpectina).

Por metilación³⁷ e hidrólisis enzimática^{38,39}, Araki dedujo que la estructura de la agarosa consistía en secuencias repetitivas de 3,6-anhidro- α -L-galactosa unida por C-4 y β -D-galactosa unida en C-3 (Figura 16).

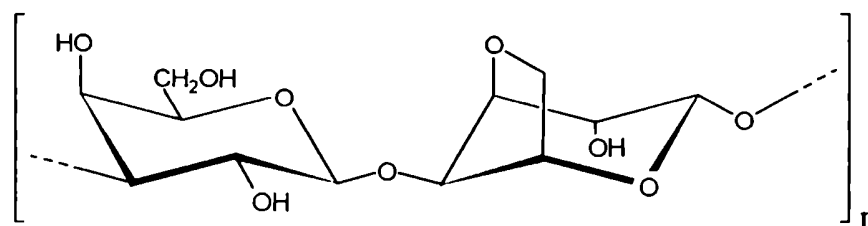


Figura 16. Agarosa

Existían evidencias indicativas de que la agarpectina presentaba las mismas unidades repetitivas, aunque algunos de los residuos de 3,6-anhidro-L-galactosa estaban reemplazados por unidades de L-galactosa sulfatada⁴⁰, y los de D-galactosa por el cetal del ácido pirúvico (4,6- α -(1-carboxietilidén)-D-galactosa)⁴¹. Asimismo se informó sobre la presencia de pequeñas cantidades de ácido D-glucurónico⁴².

El concepto de Araki es, por lo tanto de dos polisacáridos: agarosa neutra y agarpectina cargada. Sin embargo, años más tarde, Duckworth y Yaphé⁴³ en un trabajo clave en el conocimiento de la estructura del ágar y de compuestos

relacionados, establecieron el concepto de que el ágar comercial es un complejo sistema de polisacáridos que varían en términos de "extremos de estructura", desde una estructura prácticamente neutra hasta un galactano altamente cargado. Dichos extremos son los siguientes:

- a. Agarosa neutra: la estructura ideal supuesta por Araki, de una molécula formada por residuos de 3,6-anhidro- α -L-galactosa unida por C-4 y β -D-galactosa unida en C-3 y que, por lo tanto, no contiene grupos cargados (Figura 16).
- b. Agarosa sustituida con ácido pirúvico y baja sulfatación: a partir del primer extremo, agarosa neutra, se incrementa gradualmente el enmascaramiento de la estructura básica con grupos cargados. Los residuos de D-galactosa están sustituidos por 4,6-(1-carboxietilidén)-D-galactosa hasta una relación de aproximadamente 1 en 20. En este punto, la proporción de sulfato es 2% e indica el reemplazo de parte de la 3,6-anhidro- α -L-galactosa por galactosa 6-sulfato.
- c. Galactano sulfatado con ausencia (o muy baja proporción) de 3,6-anhidro- α -L-galactosa o 4,6-(1-carboxietilidén)-D-galactosa: a partir del segundo extremo, la sustitución de D-galactosa por el cetil del ácido pirúvico disminuye gradualmente y la concentración de galactosas sulfatadas aumenta hasta el tercer extremo, un galactano sulfatado no gelificante.

Las proporciones de polisacárido con estructuras correspondientes a cada extremo son diferentes para ágares de distintas especies y posiblemente con la época del año y el estado de crecimiento de la planta.

La agarosa neutra es el componente responsable de las propiedades gelificantes del ágar, mientras los productos cargados proveen el componente viscoso. La

viscosidad varía dependiendo de la especie del alga, el método de extracción y el contenido de sulfato. Un aumento en el contenido de sulfato disminuye la capacidad gelificante. La fuerza de gel de un ágar aumenta entonces con una mayor proporción de agarosa neutra, es decir, con una disminución en el contenido de sulfato y un incremento en los residuos de 3,6-anhidro-L-galactosa⁴³.

1.3.1 ENMASCARAMIENTO DE LA ESTRUCTURA

En 1967, Araki⁴⁴ determinó la presencia, en una muestra de ágar comercial sin fraccionar, de 6-*O*-metil-D-galactosa, 4-*O*-metil-L-galactosa y D-xilosa. Dicho ágar comercial fue extraído de *Gelidium amansii*, mezclado ocasionalmente con extractos de otras varias especies de algas. Este fue el primer informe sobre la presencia de 4-*O*-metilgalactosa en un producto natural.

Posteriormente, en 1972 Izumi⁴⁵ estudió la heterogeneidad del ágar de *Gracilaria verrucosa*. Este producto no contenía ácido pirúvico⁴⁰, pero sí una proporción bastante alta de 6-*O*-metilgalactosa. Izumi encontró que dicho ágar constituye una familia de polisacáridos que varían entre dos extremos de estructura: un galactano no sulfatado y altamente metilado, posiblemente formado por unidades repetitivas de agarobiosa metilada, y un galactano no metilado y altamente sulfatado con menor proporción de 3,6-anhidro-L-galactosa. Con estas características, estos productos se asemejan al primero y tercero de los extremos descritos por Duckworth y Yaphe⁴³, respectivamente.

1.3.1.1 Porfiranos

En 1957, Nunn y Von Holdt⁴⁶ informaron por primera vez la presencia de 6-(*O*)-metil-D-galactosa en un producto natural, estudiando el polisacárido extraído de *Porphyra capensis*. Los azúcares componentes del extracto se aprecian en el siguiente cuadro*

D- + L-Gal	6-(<i>O</i>)-Me-D-Gal	3,6-An-L-Gal	sulfato
25	25	50	25

Posteriormente, Peat *et al*⁴⁷ encontraron en *Porphyra umbilicalis* un galactano constituido por los siguientes componentes.

D-Gal	L-Gal	6-(<i>O</i>)-Me-D-Gal	3,6-An-L-Gal	sulfato
25	27	30	18	34

Estos dos productos aislados de especies de *Porphyra* se asemejan en el contenido de éster sulfato y en los azúcares componentes. La diferencia principal entre ambos es en el contenido de 3,6-anhidro-L-galactosa, el cual es significativamente menor en el polisacárido de *Porphyra umbilicalis*, a expensas de un incremento en la proporción de galactosa.

Turvey y Rees⁴⁸, posteriormente, concluyeron que la mayor parte del sulfato (86%), se encuentra como L-galactosa 6-sulfato, y Rees⁹ determinó que el resto del

* Para facilitar las comparaciones, la composición de todos los polisacáridos descritos en esta Tesis se expresará en moles cada 100 moles de azúcares.

sulfato podría ocupar las posiciones 4 y/ó 6 de la unidad enlazada por C-3.

Luego, Anderson y Rees⁴⁹ en 1965, determinaron que el porfirano está constituido por una estructura lineal perfectamente alternada de D- y L-Gal. Esta regularidad está enmascarada por:

- a) la sustitución de algunas unidades de D-galactosa por su 6-O-metiléter.
- b) la presencia de sulfato en el C-6 de las unidades de L-galactosa, o su reemplazo por 3,6-anhidrogalactosa.

A la luz de estos resultados, y volviendo al concepto definido por Yaphe⁴³, los porfiranos pueden considerarse como estadios intermedios, acercándose gradualmente al tercer extremo (Figura 17).

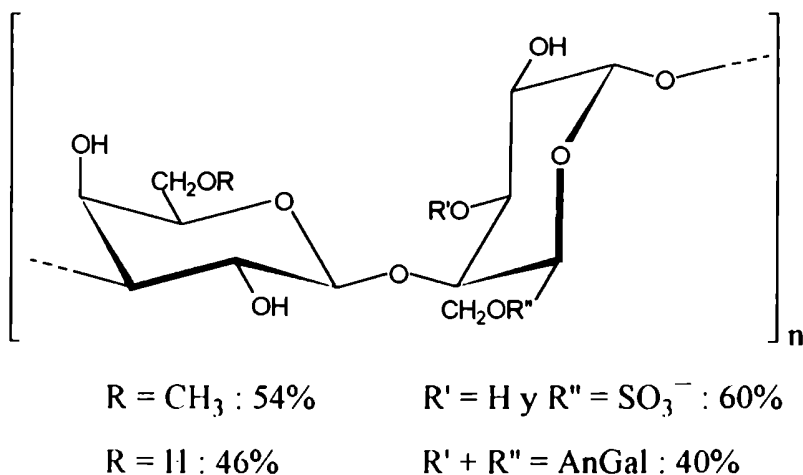


Figura 17. Porfirano.

1.3.1.2 Polisacáridos del orden Ceramiales

En 1968, Bowker y Turvey⁵⁰ aislaron un galactano sulfatado de *Laurencia pinnatifida* constituido por los siguientes componentes.

D-Gal	6-(O)-Me-D-Gal	L-Gal	2-(O)-Me-L-Gal	3,6-An-L-Gal +	sulfato
				3,6-An-2-(O)-Me-L-Gal	
28	18	9	7	38	39

También se encontró ácido D-galacturónico y D-xilosa pero no pudo determinarse si son constituyentes del galactano o de polisacáridos asociados.

El 93% de la L-galactosa y el 71% de la 2-(O)-metil-L-galactosa, estaban sulfatadas en C-6. También había sulfato en el C-2 de las unidades de D-galactosa. Los estudios de metilación⁵¹ sugirieron que tanto la D-galactosa como la 6-(O)-metil-D-galactosa están unidas por la posición 3, mientras que la L-galactosa, 2-(O)-metil-L-galactosa y 3,6-anhidro-L-galactosa, están unidas a través de C-4, como cabía esperar (véase pág. 6)

En 1975, Batey y Turvey⁵² estudiaron el galactano sulfatado de *Polysiphonia lanosa*, cuyos componentes son:

D-Gal	6-(O)-Me-D-Gal	L-Gal	2-(O)-Me-L-Gal	3,6-An-L-Gal	sulfato
42	12	14	1	31	54

Se asemeja al porfirano⁴⁹ por tener residuos de 6-(O)-metil-D-galactosa y L-galactosa 6-sulfato como unidades enmascarantes, pero además contiene residuos de 2-

O-metil-L-galactosa 6-sulfato, D-galactosa 6-sulfato y 6-O-metil-D-galactosa 4-sulfato. Aunque los primeros tres residuos también son constituyentes del galactano sulfatado de *Laurencia pinnatifida*⁵⁰, especie perteneciente a la misma familia, los últimos dos difieren ya que el galactano de dicha alga contiene D-galactosa 2-sulfato como el único derivado sulfatado de D-galactosa.

La presencia de éteres monometílicos de D- y L-galactosa en polisacáridos de algas había sido informada muchas veces, pero este fue el primer informe acerca de la presencia de 6-O-metil-D-galactosa sulfatada.

En conclusión, ambos polisacáridos, el aislado de *Laurencia pinnatifida* como el de *Polysiphonia lanosa*, se ubican dentro de la familia de los ágaros, con estructuras semejantes a la de los porfiranos.

Posteriormente, en 1976 Turvey y Williams⁵³ estudiaron el polisacárido de *Ceramium rubrum*, especie del mismo orden (Ceramiales) que las anteriormente estudiadas *Laurencia* y *Polysiphonia*. Estaba constituido por:

D-Gal	6-O-Me-D-Gal	L-Gal	2-O-Me-L-Gal	3,6-An-L-Gal + 3,6-An-2-O-Me-L-Gal	sulfato
28	21	23	tr	28	12

El galactano sulfatado de *Ceramium rubrum* pertenece a la familia del ágar, en la cual las dos unidades básicas, D-galactosa y 3,6-anhidro-L-galactosa, alternan en la cadena. Al igual que en los porfiranos, tiene algunos de los residuos de D-galactosa metilados en C-6, el anhidro azúcar en algunas unidades está metilado en la posición 2 y es reemplazado en cierta medida por L-galactosa 6-sulfato y 2-O-metil-L-galactosa no sulfatada.

Sin embargo, este polisacárido presenta una diferencia importante respecto de los descritos anteriormente: una proporción del anhidro azúcar es reemplazado por residuos de L-galactosa no sulfatados; sólo alrededor de 1 en 5 de estas unidades está sulfatada en C-6. En los polisacáridos examinados previamente^{49,50,52}, cuando la 3,6-anhidro-L-galactosa es reemplazada por L-galactosa, ésta se encuentra prácticamente en su totalidad sulfatada en C-6.

Según el concepto de Yaphe, esta característica indica que el galactano de *Ceramium rubrum* expande aún más la familia del ágar. Podría establecerse un cuarto extremo de estructura, con ausencia tanto de 3,6-anhidro-L-galactosa como de su precursor, L-galactosa 6-sulfato. De esta forma, el polisacárido de *Ceramium rubrum* sería intermedio entre el tercero y el cuarto extremo.

El resto del sulfato está distribuido en la D-galactosa, principalmente en la posición 6 como en *Polysiphonia lanosa*⁵², pero con cantidades menores en la posición 2 como en *Laurencia pinnatifida*⁵⁰, y en C-4 como en el porfirano⁴⁹.

1.3.1.3 El polisacárido de *Anatheca dentata*

En 1971 el grupo de Nunn y Parolis, comenzó un estudio sobre los polisacáridos de la familia Solieriaceae perteneciente al orden Gigartinales. El primer trabajo fue sobre *Anatheca dentata*⁵⁴. El polisacárido estaba compuesto por:

D-Gal	L-Gal	3-(O)-MeGal	Xil	sulfato
53	33	trazas	14	97

También se encontró una pequeña proporción (3%) de ácido glucurónico y una cantidad no determinada de ácido pirúvico formando el cetal en las posiciones 4 y 6 de la D-galactosa.

El tratamiento con periodato⁵⁵ oxidó todos los residuos de xilosa, y considerando que ésta se encuentra en forma piranósica, debe estar unida en la cadena por uniones (1→2), (1→4), o bien estar presente como grupo terminal no reductor. Estudios posteriores por metilación del polisacárido desulfatado⁵⁶ confirmaron que la xilosa se encuentra en forma piranósica y como grupo terminal no reductor. Además no está sulfatada, ya que al tratar el polisacárido con metóxido de sodio no se obtuvieron monometilpentosas⁵⁵. Esta reacción consiste en el desplazamiento de un grupo sulfato en medio básico por un oxhidrilo vecino para dar lugar al epóxido, el cual a su vez sufre una apertura alcalina por acción del metóxido dando el metiléter correspondiente.

Por estudios de hidrólisis parcial⁵⁵ se pudo determinar que el polisacárido tiene la secuencia alternante típica: galactosas unidas β -D-(1→4) y α -L-(1→3). Sin embargo, debido al predominio de D-Gal sobre L-Gal, y a la presencia de 4-O- β -D-galactopiranosil-D-galactosa entre los productos de hidrólisis parcial, queda claro que la D-galactosa debe reemplazar parte de la L-galactosa en la unidad repetitiva.

Los resultados obtenidos por hidrólisis parcial, complementados con los estudios de desulfatación-metilación del polisacárido⁵⁶, mostraron que el 80% de la cadena está formada por uniones alternadas α -(1→3) y β -(1→4). En el 20% restante está reemplazado el residuo de L-galactosa por D-galactosa en forma intercalada a lo largo del polímero y no en una región separada. Otra característica novedosa es el reemplazo de alrededor del 10% de la D-galactosa unida por C-3 por residuos de ácido D-glucurónico.

En cuanto a la ubicación de los grupos sulfato, luego de la hidrólisis parcial se obtuvo L-galactosa monosulfatada en los carbonos 3 y 6 como únicos azúcares sulfatados, y los autores concluyeron que el sulfato se encontraba sólo en los residuos de L-galactosa. Dado que estos residuos están todos unidos por C-4, los grupos sulfato deberían ser lábiles al álcali: el sulfato en C-6 formando el 3,6-anhidro azúcar y el

sulfato en C-3 dando el 2,3-epóxido. Sin embargo, el tratamiento alcalino reveló que son estables y esto implicaría que los residuos de L-galactosa que llevan sulfato deben ser sitios de ramificación o estar trisulfatados.

A juicio de los autores, la última sería la explicación más adecuada ya que, de acuerdo a los resultados de metilación, los sitios de ramificación probablemente se encuentren en los residuos de D-galactosa. Considerando el alto contenido de sulfato, todas las unidades de L-galactosa deberían estar trisulfatadas lo que concuerda con el resultado analítico, ya que la relación L-galactosa : sulfato encontrada es 1:3. Los datos de oxidación con periodato apoyan también estas conclusiones, ya que teniendo en cuenta que sólo las unidades de xilopiranososa y de D-galactosa unida por C-4 no sulfatadas serían oxidadas, el consumo de periodato esperado sería de 390 mmol por unidad de "anhidroxosa" libre de sulfato, el cual concuerda bien con el valor experimental de 377 mmol.

Sin embargo, dicha aseveración resulta un tanto aventurada, ya que está basada en suposiciones que admiten discusión. En primer lugar, por hidrólisis parcial aislan L-galactosa monosulfatada en 3 y 6, y como no encuentran D-galactosa sulfatada concluyen que todos los grupos sulfato están en la L-galactosa. Pero si la L-galactosa estuviera trisulfatada, la hidrólisis parcial habría producido una severa desulfatación con lo que no podría afirmarse la ausencia de sulfato en la unidad D-. En segundo lugar, los autores sugieren que existirían sitios de ramificación sobre la D-galactosa basados en que por metilación encuentran di-(*-*)-metilgalactosas, pero no informan específicamente cuáles son. Además, metilaron sólo el polisacárido desulfatado ya que no lograron metilar el producto nativo, y por lo tanto no es posible obtener información sobre la ubicación de los grupos sulfato. En conclusión, sería necesario conocer nuevos datos para poder confirmar la estructura que proponen los autores.

El polisacárido de *Anatheca dentata* difiere significativamente de otros

polisacáridos de algas pertenecientes a la familia Solieriaceae^{16,21,71}. Si se comparan sus características estructurales con los resultados de Yaphe sobre la estructura del ágar⁴³, pueden hacerse algunos comentarios. El esqueleto tiene la estructura del ágar "extremo tres" de Yaphe. Además la presencia de xilosa, mono-(*l*-)metilgalactosas y ácido D-glucurónico fue informada en compuestos de la familia del ágar^{42,44}. Sin embargo el alto contenido de sulfato (30%) y la presencia de xilosa parecen colocarlo más allá de la región del ágar verdadero.

Como un ejemplo muy interesante de enmascaramiento de la estructura del ágar, es de notar el producto sintetizado por *Gracilaria eucheumoides*⁵⁷ que tiene una unidad repetitiva metilada en el C-2 del anhidro azúcar. Este azúcar metilado ya había sido descrito como un componente menor en los polisacáridos del orden Ceramiales^{50,53} y en el ágar extraído de *Rhodomela larix*⁵⁸ también de Ceramiales, pero este fue el primer informe donde la agarobiosa metilada es la unidad repetitiva principal. Además el producto no contiene L-galactosa 6-sulfato, y los autores suponen que dicho ágar podría tener un modelo de sulfatación diferente.

1.4 POLISACARIDOS DEL ORDEN CRYPTONEMIALES*

1.4.1 Familia Grateloupiaceae

En 1967, Hirase *et al*⁵⁹ estudiaron los azúcares componentes del polisacárido extraído de *Grateloupia elliptica*, y encontraron que está compuesto por:

D-Gal	L-Gal	3,6-An-D-Gal	sulfato
75	8	17	67

* Orden al que pertenece el alga *Corallina officinalis*.

Además de estos componentes principales, se estableció la presencia de pequeñas cantidades de: D-xilosa, 2-*O*-metil-L-galactosa, 2-*O*-metil-3,6-anhidro-L-galactosa y 4-*O*-metil-D-galactosa. Este fue el primer informe sobre la presencia de 2-*O*-metil-L- y 4-*O*-metil-D-galactosa en polisacáridos de algas.

Los autores sugirieron que el polisacárido de *Grateloupia elliptica* tiene una estructura intermedia entre el κ - y el λ -carragenano. Sin embargo, la presencia de L-galactosa indica que cierta proporción de su estructura es de tipo ágar, con lo cual el polisacárido sería un híbrido carragenano-ágar.

1.4.1.1 Aeodanos

A partir de 1968, Nunn y Parolis publicaron una serie de trabajos sobre polisacáridos extraídos de algas de la familia Grateloupiaceae, pertenecientes al orden Cryptonemiales.

En el primer trabajo⁶⁰ comenzaron el estudio del polisacárido de *Aeodes orbitosa* y encontraron la presencia de:

D-Gal	2- <i>O</i> -Me-D-Gal	sulfato	Xil	Glicerol
86	14	64	trazas	trazas

Según los autores, la molécula estaría compuesta por residuos de D-galactosa unidos (1→3) y (1→4), con los primeros en mayor proporción.

La unidad A es la más sulfatada conteniendo sulfato en C-2, en menor proporción en C-4 y, probablemente, disulfatada en las posiciones 2 y 6.

Posteriormente⁶¹, encontraron la presencia de 6-*O*-metil-D-galactosa unida por C-3 en la cadena, y de 4-*O*-metil-L-galactosa. Este es el segundo informe⁴⁴ acerca del

aislamiento de este azúcar de una fuente natural. Es interesante notar que en *Grateloupiella elliptica*⁵⁹ (pág. 26) se aislaron pequeñas cantidades de 4-*O*-metil-D-galactosa y 2-*O*-metil-L-galactosa, enantiómeros de los presentes en el aeodano.

El aeodano comparte con los carragenanos el esqueleto de D-galactosas con uniones α -(1→3) y β -(1→4) y está altamente sulfatado. Sin embargo, introduce la característica novedosa de tener la mayoría de los residuos unidos por C-4 libres de sulfato y, por lo tanto, una menor proporción de sulfato lábil al álcali.

En 1971, publicaron un estudio sobre el polisacárido de *Aeodes ulvoidea*⁶², compuesto por:

D-Gal	2- <i>O</i> -Me-D-Gal	4- <i>O</i> -Me-L-Gal	6- <i>O</i> -MeGal	Xil	sulfato
83	8	9	trazas	trazas	40

Este producto difiere de los otros polisacáridos de Grateloupiaceae en que la 4-*O*-metil-L-galactosa es un constituyente importante. Los grupos sulfato son resistentes al álcali.

Luego, por medio de hidrólisis parciales⁶³, demostraron que la 4-*O*-metil-L-galactosa actúa como ramificación, unida a la posición 6 de la unidad ligada por C-4; y también aislaron, por primera vez en algas rojas, el disacárido β -D-Gal-(1→6)-D-Gal. Sin embargo, este disacárido había sido previamente informado como componente de un polisacárido sulfatado del alga verde *Cladophora rupestris*⁶⁴. Como *Aeodes ulvoidea* está asociada a menudo a un alga verde endofítica, es posible que el disacárido pueda provenir de este alga contaminante.

Por otra parte obtuvieron evidencia cromatográfica de la presencia del disacárido 4-*O*- β -D-galactopiranosil-L-galactosa, que constituye la unidad repetitiva

básica en compuestos de la familia del ágar.

Finalmente⁶⁵ realizaron un análisis de los productos de acetólisis del polisacárido, encontraron la inesperada presencia de 2-*O*-metil-L-galactosa, y demostraron que está unida del mismo modo que su enantiómero D-. Además pudieron aislar el tetrasacárido α -D-Gal-(1→3)- β -D-Gal-(1→4)- α -D-Gal-(1→3)-D-Gal, sugiriendo que las unidades ligadas α -(1→3) y β -(1→4) son alternantes.

Como conclusión de los tres trabajos y considerando datos obtenidos por oxidación con periodato y desulfatación-metilación, se puede hacer la siguiente descripción del polisacárido, aunque debido a su complejidad no es posible proponer una unidad repetitiva.

- a) El polímero está compuesto principalmente por una cadena alternante de D-galactosa unida α -(1→3) y β -(1→4).
- b) Unos pocos de los residuos de D-galactosa unidos (1→3) están 6-*O*-metilados.
- c) La 2-*O*-metilgalactosa constituye aproximadamente el 19% de los residuos unidos por C-4.
- d) Aproximadamente el 21% de la D-galactosa unida por C-4 lleva 4-*O*-metil-L-galactosa en C-6 como grupo terminal no reductor.
- e) La mayoría de los residuos de 6-*O*-metil-D-galactosa están unidos a 2-*O*-metil-D-galactosa.
- f) La mayoría de los residuos de 2-*O*-metil-D-galactosa parecen estar concentrados en ciertas regiones del polímero. Junto con el punto e) esto equivale a decir que las galactosas metiladas están distribuidas en bloques dentro de la cadena del polisacárido.
- g) Algunas de las D-galactosas y 2-*O*-metil-D-galactosas unidas por C-4 están reemplazadas por sus respectivos enantiómeros L-.

- h) El polisacárido contiene una pequeña cantidad de ácido pirúvico.
- i) La mayoría de los grupos sulfato se encuentran en residuos de D-galactosas unidas por C-3 y por lo tanto, son estables en medio alcalino.

Prosiguiendo sus investigaciones, estudiaron el polisacárido de *Phyllymenia cornea*⁶⁶. Este producto contiene al igual que el aeodano⁶⁰, D-galactosa, 2-(*O*)-metil-D-galactosa, 6-(*O*)-metil-D-galactosa y sulfato; junto con cantidades menores de L-galactosa, 4-(*O*)-metil-L-galactosa, 3,6-anhidrogalactosa y xilosa. La 2-(*O*)-metil-D-galactosa es el azúcar monometilado que se encuentra en mayor proporción.

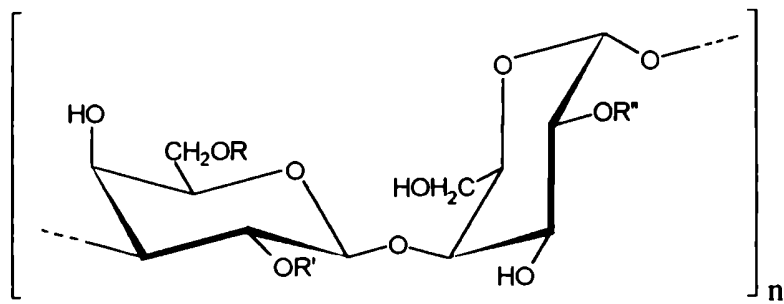
La relación molar entre galactosa, mono-(*O*)-metilgalactosas y sulfato es 64:36:48. La proporción de mono-(*O*)-metilgalactosas es significativamente mayor que en el aeodano de *Aeodes orbitosa*⁶⁰, donde representaba el 14% de los azúcares.

La relación de hexosas a sulfato es de 100:48 contra 100:64 en el aeodano de *Aeodes orbitosa*⁶⁰, mientras que se encontró 0,5% de 3,6-anhidrogalactosa (el polisacárido de *Grateloupia elliptica* contiene 8%).

Además, los grupos sulfato están unidos a residuos ligados por C-3. Estudios de metilación y desulfatación-metilación⁶⁷ permitieron postular, si bien no una estructura definida, si la estructura parcial que se muestra en la Figura 18, consistente con la evidencia acumulada.

En 1971 comenzaron el estudio del polisacárido de *Pachymenia carnos*⁶⁸. El polímero está constituido por:

D-Gal	2-(<i>O</i>)-Me-D-Gal	6-(<i>O</i>)-Me-D-Gal	4-(<i>O</i>)-Me-Gal	xilosa	sulfato
78	12	7	3	tr	83



R : -H, y en menor proporción -CH₃

R': -SO₃⁻, y en menor proporción -H

R'': -CH₃, y en menor proporción -H

Figura 18. Polisacárido de *Phyllymenia cornea*.

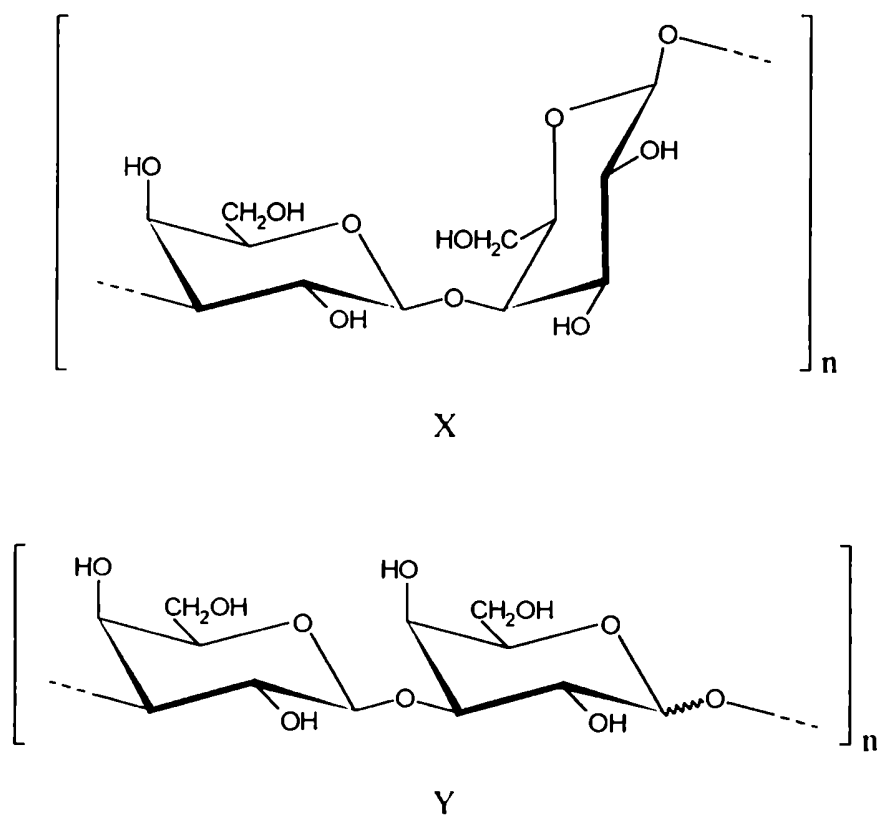
Los estudios de hidrólisis parcial⁶⁸ y acetólisis⁶⁹ establecieron que el polímero consiste principalmente en residuos de $\rightarrow 3$)- α -D-Galp(1 \rightarrow o su 6-(O)-metil éter, y $\rightarrow 4$)- β -D-Galp(1 \rightarrow o su 2-(O)-metil éter, ordenados en una secuencia alternada. Al igual que en *Aeodes ulvoidea*⁶⁵, los grupos metilo parecen estar concentrados en ciertas regiones del polímero.

La mayoría de los grupos sulfato son estables al álcali. Los resultados de metilación⁷⁰ del polisacárido desulfatado muestran que los grupos sulfato se encuentran sólo en las unidades de galactosa enlazadas por C-3. Es decir, la unidad A está monosulfatada sobre las posiciones 2 y 4, y disulfatada en 2 y 6. Estos resultados fueron confirmados por metilación del polisacárido nativo.

Por los estudios de metilación y desulfatación-metilación, los autores sugirieron que la cadena principal del polisacárido estaría compuesta en su totalidad por uniones (1 \rightarrow 3) y (1 \rightarrow 4), siendo las primeras el 70% del total. Esto implicaría que sólo el 60% del polisacárido puede considerarse en términos de uniones (1 \rightarrow 3) y (1 \rightarrow 4) alternadas

lo cual sería una excepción a la estructura clásica. Sin embargo, llama la atención que en la acetólisis del polisacárido desulfatado no encontraran oligosacáridos compuestos por unidades (1→3) consecutivas. Parolis⁷⁰ trató de justificarlo en base a que la desulfatación con HCl / MeOH hidroliza preferentemente las uniones (1→3) sobre las (1→4). Hubiese sido útil estudiar la acetólisis sobre el polisacárido nativo.

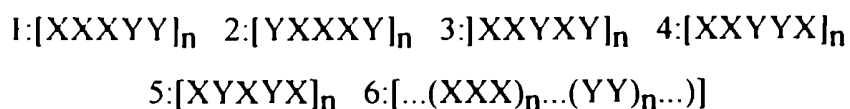
La estructura propuesta puede describirse en términos de unidades X e Y (Figura 15).



X representa el 60% e Y el 40% de la estructura.

Figura 19. Polisacárido de *Pachymenia carnososa*.

Considerando los resultados de metilación, el polímero debería estar compuesto de 3X por cada 2Y. Los posibles arreglos se muestran en las fórmulas 1 a 6.



No es posible afirmar si alguna de las fórmulas o una combinación de ellas representan la cadena real del polímero. Además, como el extracto no fue fraccionado, no es posible decir si las características estructurales propuestas pertenecen a un único polisacárido, o si el extracto consiste de varios tipos de compuestos.

El polisacárido de *Pachymenia carnos*a, y los otros polímeros extraídos de algas pertenecientes a la familia Grateloupiaceae, difieren significativamente de los carragenanos no gelificantes y desprovistos de 3,6-anhidrogalactosa (λ -, μ -, ν - y ξ -carragenano) a pesar de tener la misma estructura básica. Todas las unidades ligadas por C-4 en *Pachymenia carnos*a están desprovistas de sulfato, y por lo tanto todo el sulfato reside en las unidades ligadas por C-3 y es estable al álcali. Por el contrario, esos carragenanos tienen sulfato en los dos tipos de unidades y generalmente, liberan sulfato con formación de 3,6-anhidro-D-galactosa por tratamiento alcalino.

Las estructuras de los polisacáridos de la familia Grateloupiaceae llevaron a sugerir la presencia de una nueva familia de compuestos dentro de los polisacáridos de algas rojas: los acodanos. Estos son polisacáridos compuestos enteramente por D-galactosa unida α -(1→3) y β -(1→4) llevando sulfato solamente los residuos unidos por C-3. La galactosa puede estar reemplazada por metil éteres pero no por su 3,6-anhidro derivado.

Es interesante hacer la siguiente comparación: cuando se discutió la estructura del ágar y de los porfiranos (pág. 22), se estableció que el polisacárido de *Ceramium*

*rubrum*⁵³ podría considerarse intermedio entre el tercer extremo de estructura del ágar de Yaphe y un cuarto extremo hipotético, desprovisto de sulfato lábil al álcali. Este cuarto extremo para los polisacáridos tipo ágar, es equivalente a los aeodanos para los polisacáridos tipo carragenano.

En 1973, Rees *et al*⁷¹ presentaron un estudio sobre los polisacáridos de otro alga de la familia Grateloupiaceae, *Pachymenia hymantophora*. Este polisacárido está compuesto por:

Gal	3,6-AnGal	sulfato
94	6	73

Los estudios de metilación²¹ permiten asignar la estructura que se aprecia en la Figura 20.

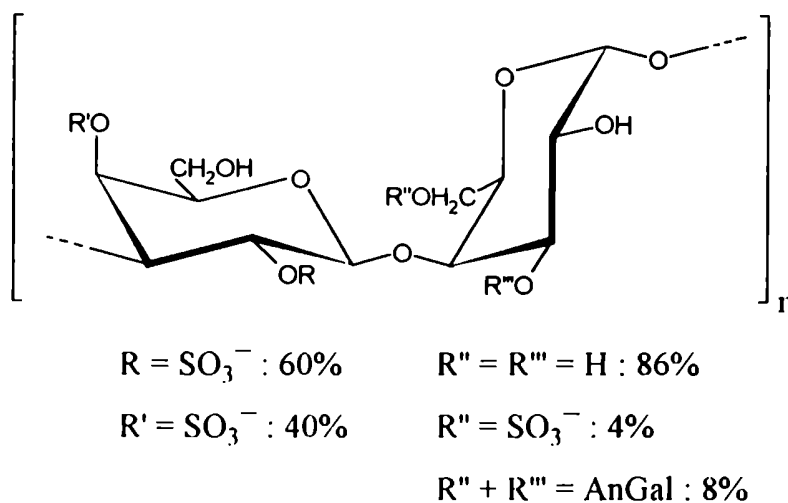
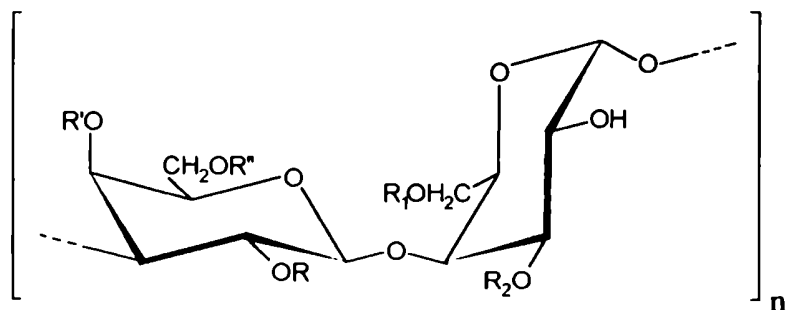


Figura 20. Polisacárido de *Pachymenia hymantophora* (ref. 21).

Rees observó que este compuesto estaba relacionado con el λ -carragenano, pero consideró inusual el hecho de que la mayoría de los residuos unidos por C-4 no estaban sulfatados. Sin embargo, a la luz de los trabajos que se acaban de describir el polisacárido de *Pachymenia hymantophora* pertenece a la familia de los aeodanos.

Por su parte, en 1981 Parolis⁷² presentó un nuevo análisis del polisacárido de *Pachymenia hymantophora*. Los estudios estructurales revelan las siguientes características (Figura 21).



$R = \text{SO}_3^-$, $R'' = \text{H}$: 42%	$R_1 = R_2 = \text{H}$: 82%
$R = R'' = \text{SO}_3^-$: 54%	$R_1 = \text{SO}_3^-$: 2%
$R' = \text{SO}_3^-$: 2%	$R_1 + R_2 = \text{AnGal}$: 8%
$R = R' = R'' = \text{H}$: 2%	

Figura 21. Polisacárido de *Pachymenia hymantophora* (ref. 72).

Los datos para la unidad ligada por C-4 son similares a los obtenidos por Rees. Sin embargo, hay una diferencia significativa en el residuo unido por C-3: Rees²¹ observa un 20% de sulfato en C-4, mientras que según Parolis⁷² hay un 27% de 2,6-disulfato.

En un trabajo publicado recientemente⁷³, Miller *et al* estudiaron los polisacáridos extraídos de *Pachymenia lusoria*. Esta especie y la antes mencionada *Pachymenia hymantophora*, son consideradas actualmente como variaciones clonales de una misma especie. La composición del producto es la siguiente:

D-Gal	1-Gal	6-O-Me-D-Gal	2-O-Me-D-Gal	3,6-An-1-Gal	2-O-Me-3,6-An-1-Gal	Xil
34	9	21	18	10	5	3

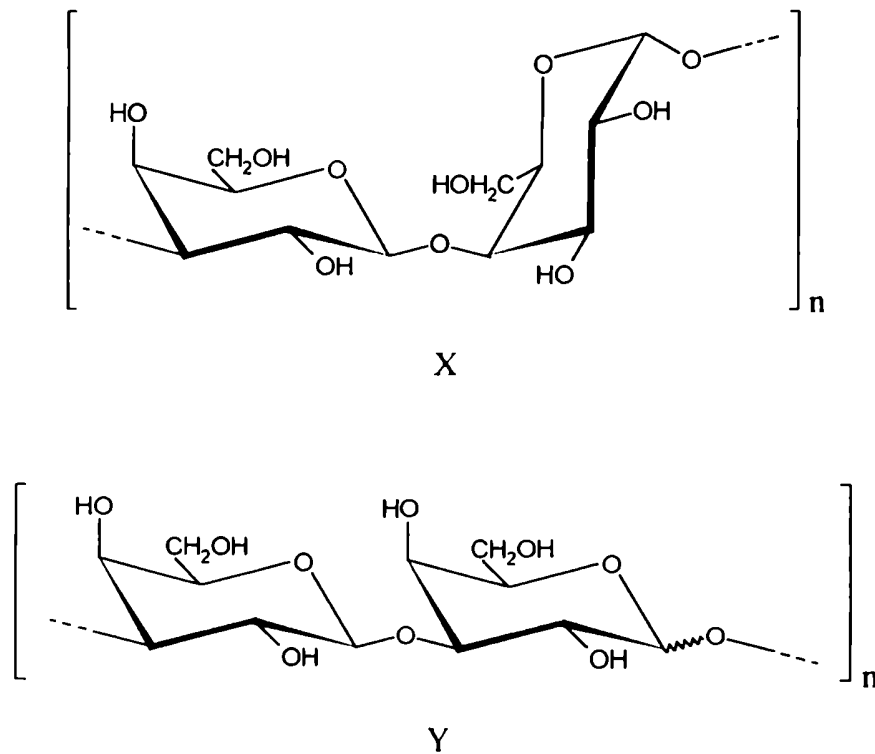
La 6-O-metilgalactosa está unida por la posición 3 (unidad A) mientras que la 2-O-metilgalactosa está ligada por el C-4 (unidad B). Los grupos sulfato se encuentran en el C-2 de la unidad A (prácticamente todos los residuos llevan sulfato) y una pequeña proporción del mismo se encuentra también en la posición 6, junto con la xilosa. La unidad B no contiene sulfato.

La presencia de azúcares de la serie L sugiere la posibilidad de que parte de la estructura del polímero pertenezca a la familia del ágar. Efectivamente, dichas unidades tipo ágar sustituido se encuentran en bloques y constituyen aproximadamente un tercio del total del polisacárido.

Hay importantes diferencias entre las estructuras de los polisacáridos de *Pachymenia lusoria* y *Pachymenia hymantophora*. Por ejemplo, este último estaba desprovisto de galactosas metiladas y presentaba además una alta proporción de galactosa 2,6-disulfato (Parolis⁷²) o galactosa 4-sulfato (Rees²¹). Los autores concluyen que posiblemente exista más de una especie dentro de la actual descripción de *P. lusoria*.

En el trabajo analizado antes⁷², Parolis incluyó los estudios de metilación del polisacárido de *Phyllymenia hieroglyphica*. En base a estos resultados el autor sugiere

que la cadena principal está compuesta en su totalidad por uniones (1→3) y (1→4); sin embargo éstas no estarían presentes en cantidades equimolares, sino en relación 4:1. Esto significaría que sólo el 40% de la estructura puede considerarse en términos de la clásica alternancia de dichas uniones. A este respecto, el polímero muestra un marcado parecido con el de *Pachymenia carnososa*⁷⁰, donde sólo el 60% de la estructura es de tipo alternante. Si se describe el compuesto en términos de las unidades X e Y (Figura 22), X representaría el 40% e Y el 60% del polímero.



X representa el 40% e Y el 60% de la estructura.

Figura 22: Polisacárido de *Phyllymenia hieroglyphica*.

Los grupos sulfato se encuentran ubicados exclusivamente en las unidades ligadas por C-3. El 36% de las unidades están sulfatadas en la posición 2, y el 12% en

la posición 4, mientras que el 45% de las unidades no están sulfatadas. Este modelo de sulfatación es interesante. A diferencia de los polisacáridos de *Pachymenia carnosa*⁷⁰, *P. hymantophora*⁷² o *P. lusoria*⁷³, posee una alta proporción (aproximadamente la mitad), de las unidades ligadas por C-3 no sulfatadas, y no presenta unidades disulfatadas. Esto explica el bajo contenido de sulfato (20,5%) del compuesto, comparado con la mayoría de los polisacáridos de Grateloupiaceae.

Por lo tanto, el polisacárido de *Phyllymenia hieroglyphica* es el único producto de la familia Grateloupiaceae que presenta casi la mitad de las unidades A libres de sulfato, además de la totalidad de las unidades B.

Los productos de *Pachymenia hymantophora*⁷² y *Phyllymenia hieroglyphica*⁷² contienen pequeñas cantidades de xilosa que se oxida completamente cuando los polímeros se tratan con periodato. En *Phyllymenia hieroglyphica* está presente como cadena lateral y unida probablemente a la posición 6 del residuo ligado por C-4. Además, en este producto, hay evidencias de la presencia de ramificaciones simples de galactosa en esa misma posición. Es interesante comparar este hecho con los polisacáridos de *Aeodes ulvoidea*⁶⁵ y *Pachymenia carnosa*⁷⁰ que incluyen en esa misma posición residuos terminales de 4-(*-*)-metil-L-galactosa.

Por último, ambos polisacáridos⁷² son los primeros productos extraídos de Grateloupiaceae que no presentan galactosas metiladas.

En conclusión, las estructuras de ambos compuestos, establecen claramente que estos dos productos son nuevos ejemplos de polisacáridos de la familia de los aeodanos.

Además del grupo de Nunn y Parolis, y los ya nombrados de Rees y de Hirase, otros investigadores también analizaron los polisacáridos de Grateloupiaceae. En 1975, Usov *et al*⁷⁴ estudiaron el galactano sulfatado de *Grateloupia divaricata* que contiene

D- y L-galactosa en relación molar 4:1, 20% de sulfato y una pequeña proporción de D-xilosa y 3,6-anhidro-L-galactosa. Se determinó por métodos químicos^{75,76}, que el polisacárido tiene el siguiente esqueleto: $\rightarrow 3)-\beta\text{-D-Gal-(1}\rightarrow 4)-\alpha\text{-D,L-Gal-(1}\rightarrow$, siendo la relación D : L en la unidad B de 3 a 2. Lamentablemente no hay información acerca de la ubicación de los grupos sulfato. La presencia de L-galactosa en la unidad B, al igual que en *Pachymenia lusoria*⁷³, indica que este compuesto combina elementos estructurales característicos de moléculas tipo ágar y aeodano.

Posteriormente Baeza y Matsuhiro⁷⁷ en 1977, estudiaron el polisacárido de *Grateloupia lanceola* cuyos componentes son:

D-Gal	2-(O)-MeGal	6-(O)-MeGal	3,6-AnGal	sulfato
82	tr	tr	18	73

Esta composición es muy similar a la informada por Hirase *et al*⁵⁹ para *Grateloupia elliptica*, con la salvedad de que en este último caso el 10% de la galactosa era de la serie L-. El contenido de 3,6-anhidrogalactosa (10,2%) es mucho más alto que el de los otros polisacáridos de Grateloupiaceae ya estudiados, aunque es menor que el presente en los carragenanos de la familia κ -.

1.4.2 Familia Endocladiaceae

Los estudios realizados en esta familia muestran un fuerte contraste en la composición del galactano de la pared celular en especies de los dos únicos géneros: *Gloiopeltis* y *Endocladia*.

Se informó que *Endocladia muricata*⁷⁸ sintetiza un "carragenano" parcialmente

desulfatado que contiene cerca del 6% de unidades de agarobiosa. Por lo tanto, este compuesto resulta ser un híbrido carragenano-ágar similar a aquellos encontrados en algunos aeodanos^{73,76}.

Sin embargo, *Gloiopeltis furcata* produce una agarosa no gelificante altamente sulfatada, conocida como funorano^{78,79}, en la cual el residuo de galactosa unido por C-3 está altamente sulfatado (y a veces *O*-metilado) en el C-6. En el residuo unido por C-4, algunos grupos sulfato y metoxilo también sustituyen al C-2.

Posteriormente, Rees *et al*⁷¹ estudiaron el polisacárido de *Gloiopeltis cervicornis*. La composición molar es la siguiente.

D-Gal	3,6-An-L-Gal	sulfato
65	35	62

El compuesto presenta rotación óptica negativa, por lo que se lo incluye dentro de la familia del ágar. Los estudios de metilación²¹ sugieren la estructura que se observa en la Figura 23.

En ambos estudios, los polisacáridos de *Gloiopeltis* muestran características similares. Las estructuras son semejantes a la del porfirano de *Polysiphonia lanosa*⁵², con la particularidad de que en ambas especies de *Gloiopeltis* un alto porcentaje de las unidades A están sulfatadas en C-6.

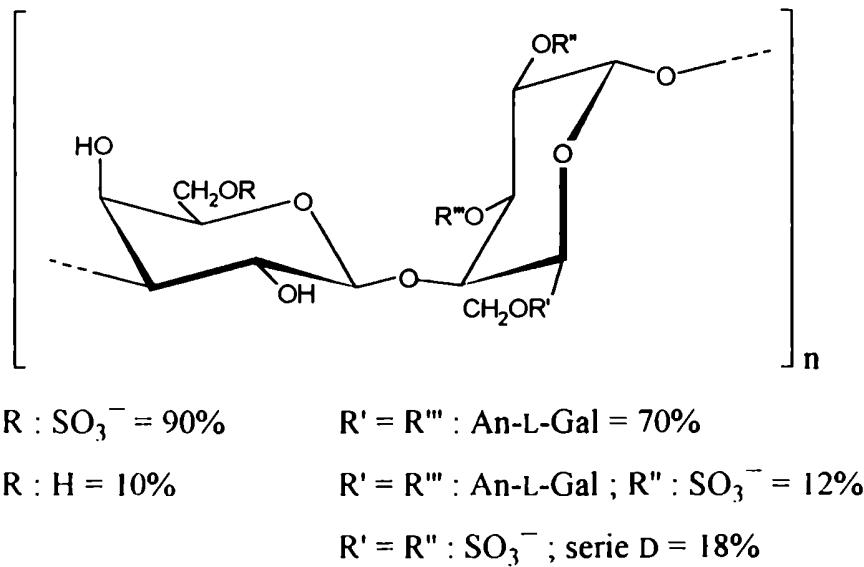


Figura 23. Estructura del polisacárido de *Gloiopeltis cervicornis*.

1.4.3 Familia Tichocarpaceae

En el año 1969 Usov *et al*⁸⁰ estudiaron los polisacáridos del alga *Tichocarpus crinitus* cuyas estructuras son típicas de carragenanos^{81,82}. Para el λ -carragenano obtenido se observó, por degradación de Smith del producto desulfatado, una desviación de la estructura alternante ideal. Dada la aparición de ácido fórmico y el rendimiento relativamente bajo en 2-(α)- β -galactopiranosiltreitol (que teóricamente debería ser el único producto para la estructura ideal) sugirieron la existencia de uniones (1 \rightarrow 6)⁸⁰, pero esto no ha sido confirmado hasta el momento.

1.4.4 Familia Kallymeniaceae

En 1983 Usov *et al*⁸³ presentaron un estudio sobre el alga *Callophyllis rhynchocarpa*, perteneciente también al orden Cryptonemiales, pero de la familia Kallymeniaceae. El polisacárido fue separado en dos fracciones, una que gelifica en presencia de KCl y una no gelificante. La primera tiene la siguiente composición.

Gal	3,6-AnGal	sulfato
88	12	98

Esta composición es semejante a la encontrada por Rees⁷¹ en *Pachymenia hymantophora*, pero no se informaron detalles estructurales como para clasificar la estructura del producto.

En 1990, Deslandes *et al*⁸⁴ estudiaron el polisacárido aislado de *Kallymenia reniformis*, cuya composición es la siguiente.

Gal	3,6-AnGal	sulfato
93	7	110

Si bien no se estudió la configuración de los azúcares, el producto presenta rotación óptica positiva por lo que se lo incluye en la familia de los carragenanos. La proporción de sulfato se reduce sólo de 37% a 33,4% por tratamiento alcalino, es decir que presenta un bajo porcentaje de sulfato en el C-6 de la unidad B. Estas características son semejantes, por ejemplo, a las descritas por Rees⁷¹ para el polisacárido de *Pachymenia hymantophora*.

Sin embargo, el polisacárido está formado por galactosa 2-sulfato unida en forma alternante α -(1→3) y β -(1→4), y hay también presentes residuos ligados en C-4 de galactosa 2,6-disulfato y cantidades menores de 3,6-anhidrogalactosa. Por lo tanto, la base estructural del compuesto es la de un ξ -carragenano.

1.4.5 Familia Gloiosiphonaceae

Usov *et al*⁸³ analizaron el polisacárido extraído de *Gloiosiphonia capillaris*. El producto no gelifica con KCl y sólo se informó su composición, lo cual no permite clasificar estructuralmente al polímero. Dicha composición es la siguiente:

Galactosa	6-(O)-MeGal	Xilosa	Glucosa
96	2	2	tr

1.4.6 Familia Dumontiaceae

Se dejó intencionalmente para el final el primer estudio efectuado sobre un alga del orden Cryptonemiales, *Dilsea edulis* de la familia Dumontiaceae, ya que la estructura del polisacárido es inusual, en comparación con todos los demás polisacáridos extraídos de algas rojas. En 1961, Rees⁹ estudió dicho polisacárido, sobre la base de un trabajo anterior de Barry y McCormick⁸⁵, y llegó a la conclusión de que existían dos "regiones" estructuralmente diferentes. No se determinó si eran distintos bloques dentro de una misma molécula, o si en realidad existían dos polisacáridos diferentes.

La región principal consiste en una cadena de unidades de D-galactopiranosas ligadas (1→3), con alguna posible ramificación, esterificadas con sulfato en el C-4 de algunos de estos residuos. La segunda región es una cadena alternante de galactosas

unidas (1→3) y (1→4). Algunos de los residuos unidos por C-3 llevan sulfato tal vez en la posición 4, y algunos de los residuos unidos por C-4 llevan sulfato en 6 o están reemplazados por 3,6-anhidro-D-galactosa. La cantidad de sulfato total es del 15%, y hay un 0,9% del anhidro azúcar. La estructura de la segunda región es llamativamente parecida al porfirano de *Porphyra umbilicalis*^{9,47,48}.

El compuesto presenta además alrededor de un 10% de ácido glucurónico, pero no se encontraron evidencias suficientes para ubicarlo en alguna de las dos regiones.

En el año 1983, Usov *et al*⁸³ estudiaron un alga de la misma familia, *Hyalosiphonia caespitosa*. Se obtuvieron dos fracciones: una gelificante en KCl y una no gelificante, compuestas por:

	Gal	Glc	Xil	6-O-MeGal	2-O-MeGal	3,6-AnGal	sulfato
Fr. gelificante	100	75	11	2	tr.	9	28
Fr. no gelificante	100	2	5	7	1	n.d.	n.d.

La presencia de glucosa se debe seguramente a un glucano contaminante. No se presentaron estudios estructurales.

1.5 XILOSA EN GALACTANOS DE ALGAS ROJAS

Se han encontrado con frecuencia pequeñas cantidades de xilosa en los galactanos de algas rojas. Antiguamente se atribuyó a la presencia de xilanos contaminantes, pero a lo largo de los años se ha demostrado que la xilosa es, en efecto, un sustituyente del esqueleto del polisacárido. Además, los datos sobre la naturaleza y

posición exacta de estos residuos son escasos. Entre los compuestos revisados hasta aquí, el único que contiene xilosa en proporción importante es el polisacárido de *Anatheca dentata*⁵⁴⁻⁵⁶, con 14 unidades de xilosa cada 100 azúcares, ubicada como cadena lateral.

En los polisacáridos de la familia Grateloupiaceae hay varios ejemplos de la presencia de xilosa, pero siempre en calidad de trazas^{60,62,66,70,71,73}.

Es interesante entonces, analizar los casos en los que la proporción de xilosa es relativamente importante. En 1967, Kochetkov y col.⁸⁶ comenzaron el estudio de los polisacáridos solubles del alga roja *Laingia pacifica*. Por hidrólisis ácida del producto obtuvieron D-galactosa y D-xilosa en relación molar 3,9:1,0. Además contiene sulfato (12,4%), 3,6-anhidrogalactosa (10%), ácido D-glucurónico (5%) y 3,2% de grupos metoxilo.

Posteriormente⁸⁷, por metanólisis del polímero, determinaron que el anhidro azúcar más importante es la 3,6-anhidro-2-(*O*)-metil-L-galactosa, con proporciones menores del isómero D- y de 3,6-anhidro-L-galactosa.

Luego⁸⁸, establecieron que el 93% de la galactosa pertenece a la serie D (por lo tanto el polisacárido contiene una pequeña cantidad de L-galactosa), y encontraron la presencia de 2-(*O*)-metil-L-galactosa por cromatografía en papel. Por medio de electroforesis preparativa pudieron aislar 3-(*O*)-metilgalactosa y 4-(*O*)-metil-D,L-galactosa (con predominio del isómero L). También detectaron pequeñas cantidades de 6-(*O*)-metilgalactosa y otros productos no identificados plenamente y adjudicados a dimetilgalactosas y monometilxilosas.

La composición del polisacárido es muy semejante a la de *Grateloupia elliptica*⁵⁹. Este fue el primer informe sobre la presencia de 3-(*O*)-metilgalactosa en polisacáridos de algas. También fue novedoso el predominio de la 3,6-anhidro-2-(*O*)-metil-L-galactosa sobre la 3,6-anhidro-L-galactosa.

En cuanto a la ubicación de los grupos sulfato, por hidrólisis ácida parcial, pudieron obtener pruebas directas de su presencia en las posiciones 4 y 6 de la galactosa. Además de las galactosas monosulfatadas, pudieron aislar una xilosilgalactosa sulfato y un residuo de xilosil-2-() -metilgalactosa sulfato. Estos resultados confirman que la xilosa es un componente del polisacárido.

Posteriormente⁸⁹, obtuvieron evidencias de que la xilosa ocupa la posición 2 de la 3,6-anhidro-L-Glactosa, y la posición 6 de los residuos de D-galactosa.

El conjunto de resultados muestra que el polisacárido es bastante complejo no presentando los autores, una estructura representativa del compuesto.

En el año 1982, Hirase *et al*⁹⁰ estudiaron el polisacárido de *Laurencia undulata* y pudieron aislar por hidrólisis parcial xilosilagarobiosa metilada, con el residuo β -D-xilopiranosilo en el C-4 de la β -D-galactosa, y grupos metoxilo en la posición 2 del residuo de 3,6-anhidro-L-galactosa (Figura 24). El género *Laurencia* pertenece a la familia Rhodomelaceae y al orden Ceramiales. Ya se han presentado ejemplos de polisacáridos de estos grupos^{50,52,53} (véase pág. 20)

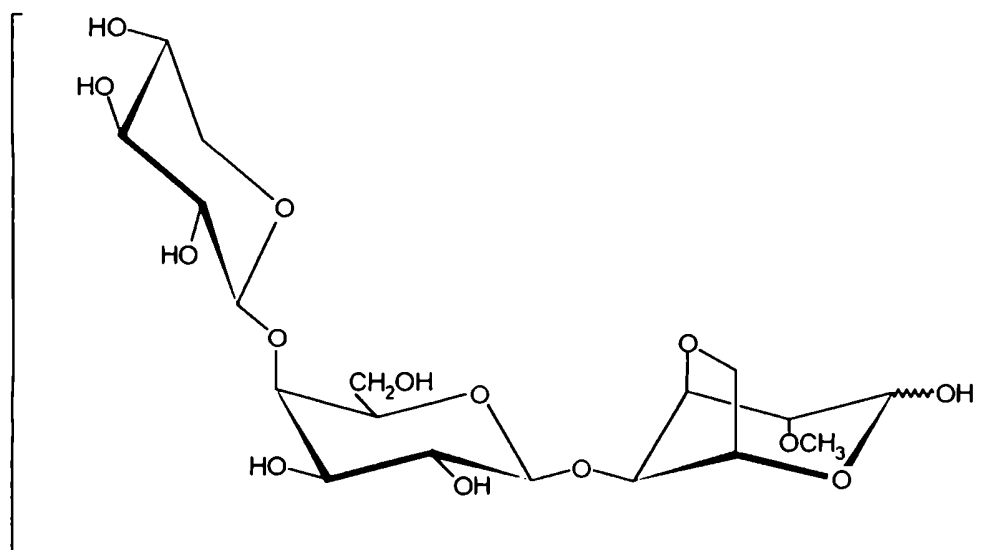
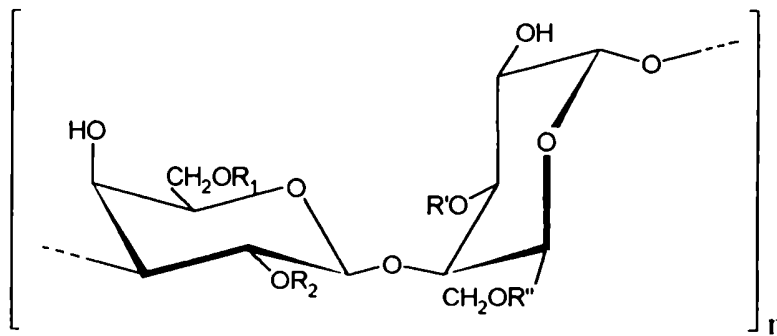


Figura 24. Fragmento obtenido por hidrólisis parcial del polisacárido de *Laurencia undulata*.

En 1990, Furneaux y Stevenson⁹¹ presentaron un trabajo sobre el xilogalactano sulfatado de *Chondria macrocarpa*, perteneciente también a Rhodomelaceae. El polisacárido contiene 16% de sulfato y los siguientes azúcares componentes:

D-galactosa	L-galactosa	3,6-An-L-Gal	D-xilosa
43	26	17	14

Las características del polisacárido han dificultado su estudio, y la estructura es demasiado compleja para poder determinarse por RMN de ¹³C (Figura 25). Sin embargo, dicha estructura es un híbrido entre ágar y porfirano que recuerda a los compuestos aislados de *Laurencia pinnatifida*⁵⁰ y *Polysiphonia lanosa*⁵², y que además pertenecen a la misma familia, Rhodomelaceae.



- $R_1 = \text{SO}_3^-$ y $R_2 = \text{H}$: 20% $R', R'' = \text{anhidrogalactosa}$: 40% ó,
 $R_1 = \text{H}$ y $R_2 = \text{SO}_3^-$: 40% $R'' = \text{SO}_3^-$, $R' = \text{H}$: 25% ó,
 $R_1 = R_2 = \text{H}$: 25% $R'' = \text{SO}_3^-$, $R' = \text{Xilp}$ (proporción significativa)
 $R_1 = R_2 = \text{SO}_3^-$: 10%

Figura 25. Polisacárido de *Chondria macrocarpa*.

En 1989, Usov *et al*⁹² aislaron y caracterizaron en forma preliminar los galactanos sulfatados de cuatro especies del género *Laurencia*. Se demostró por métodos químicos y espectroscopía de RMN de ¹³C, que estos polisacáridos pertenecen a la familia del ágar, siendo derivados de la agarosa con un contenido bastante alto de grupos sulfato estables al álcali y con una reducida cantidad de 3,6-anhidro-L-galactosa. Luego en 1991, Usov y Elashvili⁹³ presentaron una investigación más detallada de uno de estos galactanos, el cual fue aislado de *Laurencia nipponica*, alga roja del Océano Pacífico. El análisis del polímero utilizando hidrólisis reductiva, dio el siguiente resultado:

Gal	3-O-MeGal	6-O-MeGal	3,6-AnGal	2-O-Me-3,6-AnGal	Xil	sulfato
58	1	1	30	4	6	36

Utilizando hidrólisis reductiva parcial prepararon una serie de oligosacáridos reducidos, y con los espectros de RMN de ¹³C correspondientes pudieron obtener valiosa información estructural. Resumiendo toda la evidencia obtenida, se puede concluir que el galactano sulfatado de *Laurencia nipponica* tiene una estructura muy compleja de tipo ágar. El esqueleto es un híbrido entre agarosa y porfirano sulfatado, con grupos O-metilo y residuos β-D-xilopiranosilo como sustituyentes. La mayoría de los grupos sulfato ocupan la posición 2 de la β-D-galactosa unida por C-3, igual que en *Laurencia pinnatifida*⁵⁰. Estos resultados confirman el notable parecido que existe entre los polisacáridos del orden Ceramiales.

En este trabajo, a pesar del bajo contenido de xilosa del polisacárido nativo, se pudo aislar un pentasacárido cuya estructura fue determinada en base a su estabilidad en medio alcalino y por los datos de RMN de ¹³C. Se demostró claramente que los residuos de xilosa están unidos al esqueleto en la posición 3 de la L-galactosa 6-sulfato

ligada por C-4, en la misma posición que en el xilogalactano sulfatado de *Chondria macrocarpa*⁹¹. Tanto *Laurencia* como *Chondria* pertenecen a la familia Rhodomelaceae, por lo que es interesante observar que las cadenas laterales de xilosa están unidas en forma similar en estos polisacáridos. Además es notable que en ambos productos tipo porfirano, la presencia de xilosa en el C-3 de la L-galactosa 6-sulfato, impide su transformación en fragmentos tipo agarosa durante la biosíntesis del galactano.

Además del producto principal, los autores aislaron después de la hidrólisis reductiva parcial, una fracción de "alto peso molecular" que difiere considerablemente del polisacárido nativo en su composición: no tiene 3,6-anhidrogalactosa y está enriquecida en xilosa, galactosas metiladas (6-*O*- y 3-*O*-metilgalactosa) y sulfato (cerca de la mitad en la posición 6 de la L-galactosa unida por C-4). La estructura de esta fracción es idéntica a la de un porfirano sustituido con xilosa. Lamentablemente no hay datos acerca de la ubicación de la xilosa, pero si se supone que está unida en la misma posición que en el producto principal, el C-3 de la L-galactosa 6-sulfato, el compuesto estaría impedido de ser transformado en agarosa.

Finalmente, en 1990 Furneaux *et al*⁹⁴ presentaron la caracterización, entre otros, del polisacárido de *Melanthalia abscissa* perteneciente a la familia Gracilariaceae. Estudiaron distintas muestras del mismo alga y encontraron que la relación molar entre los componentes variaba de la siguiente manera:

	Gal	6- <i>O</i> -MeGal	3,6-AnGal	2- <i>O</i> -Me-3,6-AnGal	2- <i>O</i> -MeGal	Xil
Muestra I	10	45	32	10	tr	6
Muestra II	42	25	17	11	5	11
Muestra III	15	40	32	9	1	8
Muestra IV	31	33	24	8	3	8

Los estudios de metilación indican que la xilosa está presente como cadenas laterales simples en las posiciones 6 ó 4 de la unidad ligada por C-3, o en la posición 3 de la unidad ligada por C-4.

1.5.1 El polisacárido de *Corallina officinalis*

La determinación de la estructura del polisacárido de *Corallina officinalis* fue el objetivo de esta Tesis.

En el año 1965, Turvey y Simpson⁹⁵ presentaron estudios preliminares sobre el alga roja calcárea *Corallina officinalis*, perteneciente a la familia Corallinaceae del orden Cryptonemiales. Sin embargo, dichos estudios fueron publicados en las actas de un Simposio⁹⁵ y no fueron ampliados posteriormente. Además, el grupo de Turvey no continuó con las investigaciones, y este fue el único antecedente sobre el estudio de los polisacáridos de este alga.

El polisacárido extraído contiene residuos de galactosa, glucosa, xilosa y éster sulfato. Los autores sugirieron que la presencia de glucosa se debía a contaminación con almidón de florídeas, pero se preguntaban si la xilosa estaría presente en forma de un xilano aislado, o si formaba parte integrante del polisacárido. Por cromatografía de intercambio iónico sobre DEAE-Sephadex A-50, concluyeron que existía cierto grado de heterogeneidad en el galactano, pero no encontraron evidencias de la existencia de un xilano separado.

La composición del galactano sulfatado⁹⁵ es la siguiente:

D-galactosa	L-galactosa	D-xilosa	sulfato
39	30	31	16

Es importante destacar que el polisacárido no contiene 3,6-anhidrogalactosa.

Por hidrólisis suave obtuvieron una mezcla de azúcares neutros y sulfatados. Pudieron aislar dos galactosas monosulfatadas en pequeñas cantidades: la predominante era L-galactosa 6-sulfato. El otro residuo era galactosa 4-sulfato, pero no pudieron determinar si pertenecía a la serie D o L.

Por oxidación con periodato encontraron que todos los residuos de xilosa fueron oxidados, y por lo tanto sugirieron que estaría unida a través de las posiciones 2 ó 4. Este razonamiento implica considerar a la xilosa como parte integrante de la cadena del polisacárido. Sin embargo, podría encontrarse también como cadena lateral, con lo cual sería oxidada totalmente por acción del periodato (véase pág. 152).

Además, fueron atacados la mayoría de los residuos de L-galactosa, y alrededor de dos tercios de los de D-galactosa, por lo tanto sólo serían posibles unos pocos residuos de galactosa unida por C-3 en el polisacárido.

Los autores concluyeron que el polisacárido de *Corallina officinalis* es similar a los extraídos de otras algas rojas no calcáreas. Este estudio preliminar, lo caracteriza como un xilosil-porfirano semejante a los aislados de algas de la familia Rhodomelaceae. En la sección de Resultados y Discusión se presentará un estudio detallado sobre su estructura.

1.6 GRUPOS METOXILO EN GALACTANOS DE ALGAS ROJAS

Los galactanos de algas rojas pueden contener distintas unidades de galactosas *O*-metiladas. La más comúnmente informada es la 6-*O*-metil-D-galactosa en ágares y porfiranos^{44,46,47,50}, y en segundo término la 2-*O*-metilgalactosa sobre todo en los aeodanos^{50,60,62,68}. La primera se encuentra en las unidades A reemplazando a la galactosa en la cadena, mientras que la 2-*O*-metilgalactosa hace lo propio en las

unidades B.

La distribución de 4-*O*-metil-L-galactosa, parece estar más restringida aunque se estableció su presencia en varios géneros de algas rojas^{44,61,62,66,96}. Por su parte, la 3-*O*-metilgalactosa sólo fue informada en dos oportunidades en calidad de trazas^{54,88}.

Araki⁴⁰ en 1966, consideró que la 4-*O*-metil-L-galactosa no tendría significación estructural, debido a las muy bajas proporciones en que se encontró en los ágaros estudiados hasta ese momento. Agregó además, que debido a que dicho azúcar tiene bloqueado el C-4 por el grupo metilo, no podía estar unido por esa posición en la cadena del polisacárido, como lo hacen los demás azúcares de la serie L-.

Craigie *et al*⁹⁷ determinaron que en los tejidos maduros de *Gracilaria tikvahiae* la 4-*O*-metil-L-galactosa pasa a ser un componente importante. Debido a la relación estequiométrica en que se encuentran los residuos de D- y L-galactosa en la cadena, la 4-*O*-metil-L-galactosa no reemplaza a la D-galactosa, sino que estaría presente como cadena lateral. Como antecedentes para esta posibilidad, se han publicado varios informes sobre la presencia de ramificaciones laterales de monosacáridos^{90,91,93}. Más interesantes aun son los resultados de Allsobrook *et al*⁶³ quienes determinaron que la 4-*O*-metil-L-galactosa se encuentra unida a la posición 6 de la unidad ligada por C-4 en el aeodano de *Aeodes ulvoidea*.

Posteriormente, Craigie y Jurgens⁹⁸ en 1989, determinaron por RMN de ¹³C que la 4-*O*-metil-L-galactosa se encuentra unida al C-6 del residuo de D-galactosa ligado por C-3, junto con la presencia de sulfato en la posición 4 de la misma unidad. Ambos residuos parecen estar agrupados en regiones que son resistentes a la acción de la β -agarasa. Como antecedente, Brasch *et al*⁹⁹ en 1983, encontraron en ágar extraído de *Gracilaria secundata*, que los residuos de 6-*O*-metil-D-galactosa se encuentran en bloques y no distribuidos al azar. Craigie y Jurgens no determinaron si la resistencia a la enzima se debe a la sustitución en C-6 o al sulfato, pero se sabe que la actividad de

la β -agarasa se reduce, si residuos vecinos de agarobiosa están metilados o sulfatados^{100,101}.

Los resultados obtenidos por Karamanos *et al*¹⁰² a partir del ágar extraído de *Gracilaria verrucosa* coinciden con las conclusiones de Craigie y Jurgens⁹⁸. Por medio de degradación enzimática y RMN de ¹³C determinaron que la 4-*O*-metilgalactosa también está unida como cadena lateral, a la posición 6 de la D-galactosa unida por C-3.

El mismo grupo¹⁰³ observó que la relación de 6-*O*-metilgalactosa / 4-*O*-metilgalactosa disminuye a medida que se extrae secuencialmente el alga, correspondiendo al residuo el valor mínimo. Se observa una correspondencia inversa entre esta relación y el contenido de sulfato. Como la proporción de 4-*O*-metilgalactosa es mayor en el residuo del alga, este azúcar parece pertenecer a polisacáridos neutros íntimamente unidos a la pared celular, y por lo tanto con baja extractabilidad.

Los análisis del ágar obtenido de diferentes especies han mostrado variaciones en su composición^{36,43-45}. Además de diferencias habituales como la fuerza de gel y el contenido de sulfato, se observó que al precipitar ágares de determinadas fuentes con isopropanol, se producía una leve gelificación del medio¹⁰⁴. Dado que para formar el gel, el polisacárido debe disolverse en alguna medida en el alcohol, se concluyó que este tipo de agarosa debía ser estructuralmente distinta de aquella que no causa gelificación.

La presencia de éteres metílicos puede conferir cierta solubilidad en alcohol, sobre todo a un polisacárido relativamente pequeño como la agarosa, que ya contiene un grupo hidrofóbico en forma de 3,6-anhidro-L-galactosa. En consecuencia, se realizaron análisis de grupos metoxilo para buscar una correlación entre el contenido de los mismos y la solubilidad en alcohol.

Araki⁴⁰ informó en 1966 que la agarosa de ciertas agarófitas (entre ellas *Gracilaria* spp.) tiene un contenido mucho mayor de 6-*O*-metil-D-galactosa. Además, algunas de las agarosas que formaban geles con isopropanol, se obtenían a partir del ágar de *Gracilaria*. Otra característica general de dicho ágar es su alta temperatura de gelificación. Por lo tanto, es evidente que la solubilidad parcial en alcohol, el contenido de metoxilo y la temperatura de gelificación deben estar relacionadas de alguna forma.

Guiseley¹⁰⁴ en 1970, realizó estos estudios y determinó que la temperatura de gelificación de soluciones de agarosa 1,5% aumenta al incrementarse el contenido de metoxilo de la agarosa. Esta relación se muestra claramente en la Figura 26.

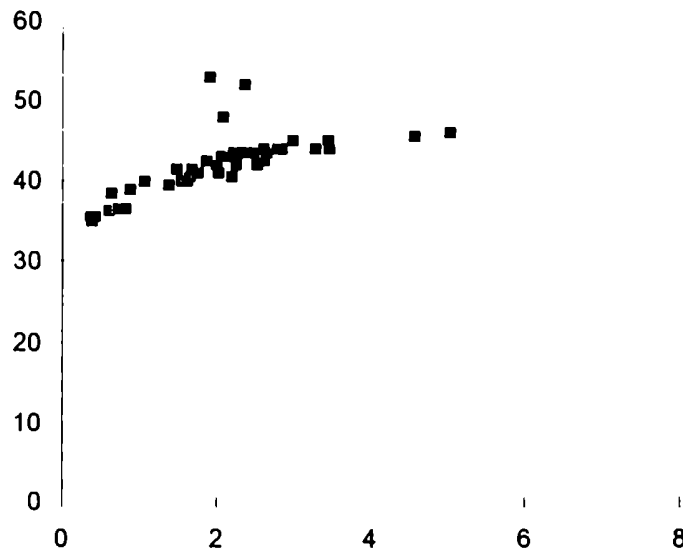


Figura 26. Relación entre la temperatura de gelificación y el contenido de metoxilo de soluciones de agarosa al 1,5 %.

Craigie *et al*⁹⁷ analizaron la composición y el poder gelificante de ágares extraídos de varias especies de *Gracilaria* y concluyeron que los geles más firmes se obtienen con ágares que contienen el menor nivel de 6-*O*-metil-D-galactosa, la menor

proporción de sulfato y la máxima de 3,6-anhidro-L-galactosa de todas las estudiadas, y además no presentan 4-*O*-metil-L-galactosa.

Paralelamente Craigie y Wen¹⁰⁵ estudiaron la composición y el tipo de gel de los productos obtenidos por tratamiento alcalino de ágares extraídos de diferentes partes del talo (zonas jóvenes y maduras) de *Gracilaria tikvahiae*. Los ágares extraídos de zonas más jóvenes dieron geles más fuertes que los extraídos de zonas maduras. En cuanto a la composición, el producto de zonas jóvenes contiene una mayor proporción de 3,6-anhidrogalactosa, mientras que la cantidad de sulfato es mayor en tejidos maduros.

En cuanto a galactosas metiladas, el contenido de 4-*O*-metil-L-galactosa es mayor en tejidos maduros (8,8%) y menor en tejidos jóvenes (0,7%). Lo mismo ocurre para la 6-*O*-metil-D-galactosa. Es decir, la cantidad de galactosa sin sustituir es mayor en tejidos más jóvenes. Durante el envejecimiento y la maduración de los tejidos, el contenido de galactosa sin sustituir disminuye a valores relativamente bajos.

La presencia de metoxilo en la posición 6 de la unidad ligada por C-3, aumenta la temperatura de gelificación¹⁰⁴ del ágar pero no afecta la fuerza del gel⁹⁶. No se tienen muchos datos sobre la influencia de la 4-*O*-metil-L-galactosa, pero los resultados de Craigie^{97,105} demuestran claramente que la fuerza de gel disminuye marcadamente con el incremento de este residuo. Este hecho es lógico, ya que sería poco probable que un polisacárido con ramificaciones de 4-*O*-metil-L-galactosa, pueda adquirir la conformación de doble hélice que se produciría durante el pasaje de sol a gel en ágares¹⁷.

SEGUNDA SECCIÓN

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

CAPÍTULO II

AISLAMIENTO, PURIFICACIÓN Y DETERMINACIÓN ESTRUCTURAL DE LOS POLISACÁRIDOS DE *CORALLINA OFFICINALIS*

2.1 AISLAMIENTO DE LOS POLISACÁRIDOS

Las paredes celulares de *Corallina officinalis* se encuentran altamente calcificadas: se sabe que aproximadamente el 90% del peso seco del alga es carbonato de calcio⁹⁵, y por lo tanto, fue necesario estudiar cómo se comportaba esta pared calcificada frente al procedimiento de extracción acuosa para obtener los polisacáridos.

En una primera experiencia, el alga seca y molida recolectada en la zona de Puerto Madryn (Chubut), se suspendió en agua destilada y se mantuvo con agitación durante 24 horas a temperatura ambiente. El extracto obtenido tras centrifugación contenía una cantidad despreciable de hidratos de carbono. Evidentemente, el carbonato de calcio impedía la extracción del polímero y en consecuencia, el primer paso debía ser la eliminación del calcio.

El alga se trató con HCl 0,1N, manteniendo el pH en un valor mayor que 6,0 y la temperatura en 0°C durante el agregado del ácido. Luego se agitó la misma solución durante 24 horas a temperatura ambiente y por centrifugación se obtuvo el extracto y un residuo. Este proceso debía realizarse cuidadosamente, con el fin de evitar que el tratamiento en medio ácido para eliminar el carbonato degrade a los polisacáridos.

El producto se precipitó por agregado lento de la solución acuosa sobre tres volúmenes de isopropanol, y luego se secó por intercambio de solventes (isopropanol y acetona). El producto (F) se obtuvo con un rendimiento del 2,6% respecto de la masa de alga seca. La solución alcohólica se desechó porque sólo contenía cantidades despreciables de hidratos de carbono.

El residuo obtenido en la primera extracción se extrajo nuevamente con agua, pero en esta oportunidad a ebullición durante 30 horas. El producto (C) se aisló de igual manera que en el caso anterior, obteniéndose con un rendimiento del 1,0%.

Una nueva extracción en caliente del residuo permitió obtener un producto (CII) con un rendimiento del 0,8%.

Los resultados de los análisis de **F** y **C** se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1: Análisis de los productos extraídos de *Corallina officinalis*.

	F	C
Azúcares totales (%)	25,4	50,0
Sulfato (% de NaSO ₃)	34,8	15,4
Proteínas (%)	6,3	5,0
Azúcares componentes^a		
Fucosa	tr	tr
Arabinosa	4,3	2,8
Glucosa	9,7	20,6
Xilosa	22,6	22,7
2- <i>O</i> -metilgalactosa	10,8	8,1
3- <i>O</i> -metilgalactosa	3,4	4,0
4- <i>O</i> -metilgalactosa	2,3	1,6
6- <i>O</i> -metilgalactosa	tr	tr
Galactosa	60,9	63,6
Relación Gal / Xil	2,69	2,80

^a Derivatizados como aldononitrilos acetilados y expresados en moles / 100 moles de xilosa + galactosas totales.

La composición de los polisacáridos muestra características interesantes. Es el primer polisacárido de algas que contiene galactosas monometiladas en las cuatro posiciones posibles, siendo la 2-*O*-metilgalactosa la más importante por su proporción relativa. Además este es uno de los primeros informes acerca de la presencia de 3-*O*-

metilgalactosa en galactanos de algas rojas. En las oportunidades anteriores^{54,88} fue detectada en calidad de trazas y no fue cuantificada, aunque se encontró en otros mucílagos también de algas rojas en pequeñas cantidades^{106,107} y en productos de plantas terrestres¹⁰⁸. Otra particularidad es el alto contenido de xilosa, que hace que este producto, como ya se mencionara en la Introducción, sea el de mayor proporción de dicha pentosa entre los galactanos aislados de Rhodophyta.

La presencia de ésteres del ácido sulfúrico es una característica común a todos los galactanos de las algas rojas. Sin embargo, el porcentaje de sulfato del producto **F** parece estar sobrevaluado, teniendo en cuenta los antecedentes de productos similares y el informe de Turvey y Simpson⁹⁵. La causa podría ser la presencia de sulfato inorgánico o de sales de calcio que interfieren en la determinación de sulfato y que hayan coprecipitado con el polisacárido. Esto estaría de acuerdo con el bajo contenido de hidratos de carbono de este producto. El porcentaje de sulfato en el producto **C** tiene un valor más razonable, e implica que los polisacáridos de *Corallina officinalis* están sólo moderadamente sulfatados en comparación con otros galactanos de algas rojas (véase Capítulo I).

Ambos productos son muy semejantes entre sí. Las diferencias más notorias surgen en los contenidos de sulfato y glucosa. Ya se mencionó el posible origen de la diferencia en el contenido de sulfato, mientras que la presencia de glucosa se debe probablemente a contaminación con almidón de florideas⁹⁵; por la mayor extractabilidad del almidón en agua caliente es de esperar un contenido más alto de glucosa en el producto **C**. En cuanto a la arabinosa, es posible que también forme parte de un arabinano contaminante (véase pág. 66). El mayor contenido de impurezas del producto **F** se nota además en la baja proporción de hidratos de carbono totales respecto de **C**, lo cual es de esperar ya que **F** es el producto de la primera extracción del alga.

Por lo tanto, es probable que las diferencias marcadas no se refieran a la estructura del polímero sino a la presencia de contaminantes. Con respecto a los azúcares componentes del polisacárido, ambos productos también son muy parecidos. Las únicas diferencias se observan en los contenidos de 2-*O*-metil- y 4-*O*-metilgalactosa que son mayores en el producto **F**.

Respecto del producto **CII**, se determinó solamente el contenido de hidratos de carbono totales que fue de sólo 13,8%.

De acuerdo con los análisis de **F** y **C**, se decidió realizar una purificación de los mismos por redisolución en agua y centrifugación. Los productos solubles (**FS** y **CS**) se dializaron y liofilizaron, mientras que los residuos (**Fi** y **Ci**) se lavaron y liofilizaron. El producto **CII** fue descartado debido a su bajo contenido de hidratos de carbono.

En la Tabla 2 se resumen las cantidades y rendimientos obtenidos para cada fracción.

Tabla 2: Rendimiento de las fracciones obtenidas en la purificación de los productos **F** y **C**.

	% producto soluble	% residuo insoluble	% recuperado
Producto F	FS = 21%	Fi = 16%	37%
Producto C	CS = 41%	Ci = 18%	59%

Los resultados indican que se eliminó en la purificación alrededor de 60% de la masa de producto **F** y 40% del producto **C**. Esto está de acuerdo con el bajo contenido de hidratos de carbono de los productos crudos, y con la suposición acerca de la presencia de material inorgánico contaminante que habría sido eliminado en la redisolución y diálisis de los productos. El rendimiento global para **FS** y **CS** fue de 0,5

y 0,4% respectivamente respecto del peso seco del alga.

2.2 CARACTERIZACIÓN DE LOS POLISACÁRIDOS

La diversidad en la composición de los polisacáridos planteó la necesidad de estudiar las posibles diferencias de respuesta de los diferentes monosacáridos en las reacciones utilizadas para su caracterización.

2.2.1 Factor de corrección para la cuantificación de hidratos de carbono

Uno de los métodos más utilizados para cuantificar hidratos de carbono, es la técnica del fenol / ácido sulfúrico desarrollada por Dubois *et al*¹⁰⁹. En dicho método los azúcares se dosan colorimétricamente con relación a una curva standard de absorbancia en función de la concentración del azúcar en estudio, debido a que diferentes azúcares tendrán distintos coeficientes de absorptividad. Además en las pentosas, metilpentosas y ácidos urónicos, el máximo de absorbancia se encuentra en 480 nm, mientras que para las hexosas y sus derivados metilados la $\lambda_{\text{máx}}$ varía entre 485 y 490 nm. Por ejemplo, el coeficiente de absorptividad determinado para la xilosa a 480 nm es aproximadamente el doble que el valor obtenido para la galactosa a 490 nm. La diferencia entre ambos azúcares es de las más importantes, pero también existen diferencias muy significativas entre los coeficientes de absorptividad de diversos monosacáridos, incluidos azúcares metilados y desoxiazúcares.

Por lo tanto, en polisacáridos como el de *Corallina officinalis* cuyos componentes principales son precisamente galactosa y xilosa, y que contienen además cantidades importantes y variables de galactosas monometiladas, es necesario desarrollar algún método práctico que contemple estas diferencias para poder

aprovechar dicha técnica. Debe corregirse así el error que se comete al utilizar como referencia una curva standard construida sólo con galactosa, en un polisacárido que contiene además diversos azúcares componentes.

Para ello se construyeron las curvas de referencia a 490 nm para galactosa, xilosa, 2-*O*-metil-, 3-*O*-metil-, 4-*O*-metil- y 6-*O*-metilgalactosa, utilizando para las galactosas monometiladas muestras sintéticas puras. En la Figura 27 se observan las curvas correspondientes.

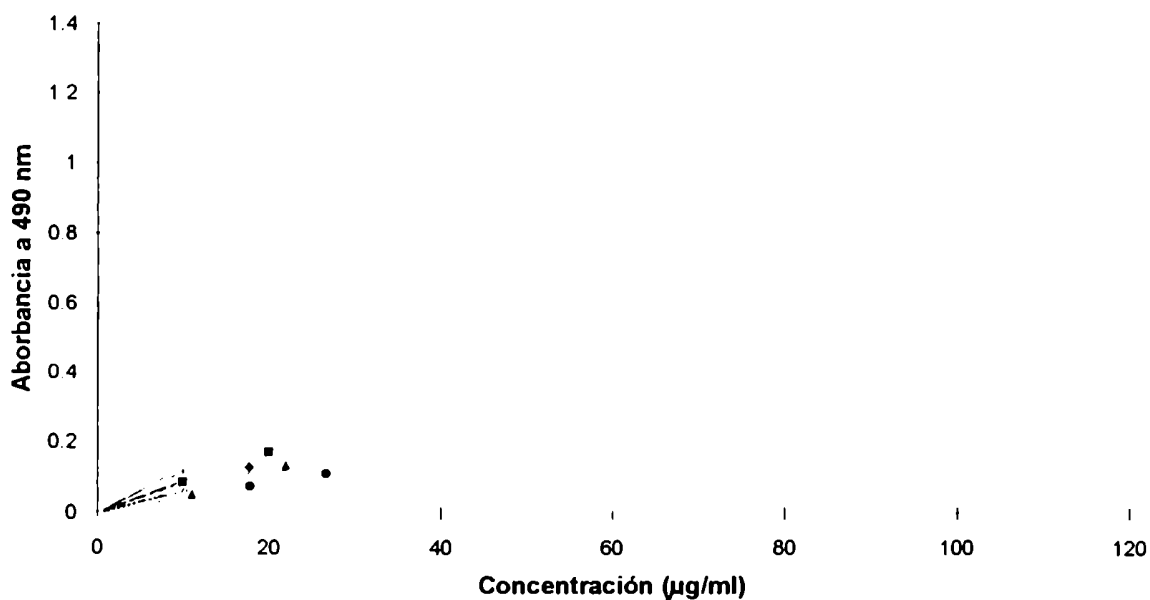


Figura 27: Curvas de referencia a 490 nm para galactosa (■), xilosa (+), 2-*O*-metil- (◆), 3-*O*-metil- (▲), 4-*O*-metil- (●) y 6-*O*-metilgalactosa (×) en la determinación de hidratos de carbono totales por el método del fenol / ácido sulfúrico¹⁰⁹.

La ley de Beer establece que la absorbancia de una solución es directamente proporcional a la concentración del producto coloreado. La ecuación corresponde a una recta de ordenada al origen cero, siendo la pendiente igual al coeficiente de absorptividad si se considera el camino óptico igual a 1 cm. En la Tabla 3 se muestran

las pendientes (coeficiente de absortividad) calculadas por regresión lineal, para cada una de las curvas de la Figura 27.

Tabla 3: Pendientes correspondientes a las rectas de la Figura 27, calculadas por regresión lineal (expresadas en $\text{ml} \cdot \mu\text{gramos}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).

Azúcar	Pendiente
Galactosa	0,0089
2- <i>O</i> -metilgalactosa	0,0080
3- <i>O</i> -metilgalactosa	0,0053
4- <i>O</i> -metilgalactosa	0,0041
6- <i>O</i> -metilgalactosa	0,0062
Xilosa	0,0125

Hay diferencias notables en los coeficientes de absortividad para la 3-*O*-metil-, 4-*O*-metil-, 6-*O*-metilgalactosa y, sobre todo, para la xilosa, respecto de la galactosa. Por lo tanto, es necesario tener en cuenta la diversidad de componentes en la determinación del porcentaje de hidratos de carbono.

Según la ley de Beer, dicho porcentaje se calcula dividiendo la absorbancia de una solución de la muestra tratada con el reactivo cromogénico por el coeficiente de absortividad, que como se mencionó es equivalente a la pendiente de la recta de calibración si el camino óptico es 1 cm. Pero si la curva de calibración se realiza con galactosa, es necesario introducir un factor que corrija las diferencias en los coeficientes de absortividad. Dicho factor de corrección (f) es el siguiente:

$$f = \sum_i \frac{x_i \epsilon_i}{\epsilon_{gal}}$$

donde: x_i son las fracciones molares de cada componente

ε_i es el coeficiente de absorptividad para cada componente

ε_{gal} es el coeficiente de absorptividad para la galactosa

Para poder aplicar este factor, es necesario previamente determinar por cromatografía gaseosa los azúcares componentes del polisacárido y las proporciones en que se encuentran.

Existe además otro hecho a considerar: al formarse la unión glicosídica en un polisacárido se elimina una molécula de agua por cada monosacárido. Por lo tanto la masa molar real de cada monosacárido en el polisacárido, es el peso molecular del monosacárido menos el peso molecular del agua (≈ 18), y esto implica que se necesita menor masa de azúcar para producir la misma intensidad de color en un polisacárido que en un monosacárido. Como la curva de calibración se construye precisamente con un monosacárido, de no corregir este hecho se estaría sobrevaluando la masa de azúcar en el polisacárido. El factor de corrección en este caso es igual al cociente entre el peso molecular de la unidad monosacarídica del polímero menos 18 (peso molecular real o "anhidro"), y el peso molecular de la hexosa de referencia (≈ 180). Sin embargo, en un heteropolisacárido no existe una unidad monosacarídica definida, sino que el peso molecular anhidro es un valor promedio que surge de la siguiente expresión:

$$\overline{PM_{anh}} = \sum_i x_i (M_i - 18)$$

donde: x_i son las fracciones molares de cada componente

M_i es el peso molecular de cada componente

Considerando ambos factores de corrección, el porcentaje de hidratos de

carbono de una solución de un heteropolisacárido puede calcularse tomando como referencia una curva standard construida sólo con galactosa y utilizando la siguiente expresión:

$$\% \text{ H de C} = \frac{A}{\text{pend} \cdot \sum_i \frac{x_i \varepsilon_i}{\varepsilon_{gal}}} \cdot \frac{\sum_i x_i (M_i - 18)}{180} \cdot \frac{100}{m} \cdot d$$

donde: x_i , ε_i , ε_{gal} y M_i representan lo mismo que en las ecuaciones anteriores.

A es la absorbancia de la solución

pend es la pendiente de la recta de calibración

m es la masa de muestra pesada en mg

d es el factor de dilución utilizado

2.2.2 Análisis de la determinación del poder reductor

Con el mismo criterio, se analizó el comportamiento de galactosa y xilosa en la determinación del poder reductor para calcular el peso molecular promedio según la técnica de Park y Johnson¹¹⁰. Se realizaron tres curvas standard: galactosa, xilosa y una mezcla Gal / Xil de relación molar 2,5 : 1,0. En la Figura 28 se observan las curvas obtenidas.

Las pendientes de cada recta calculadas por regresión lineal son las siguientes: para galactosa $12,0 \text{ ml} \cdot \mu\text{mol}^{-1}$; para xilosa $10,8 \text{ ml} \cdot \mu\text{mol}^{-1}$ y para la mezcla $10,1 \text{ ml} \cdot \mu\text{mol}^{-1}$. La respuesta de ambos azúcares es semejante, y por lo tanto el error cometido con la curva standard construida sólo con galactosa es mínimo.

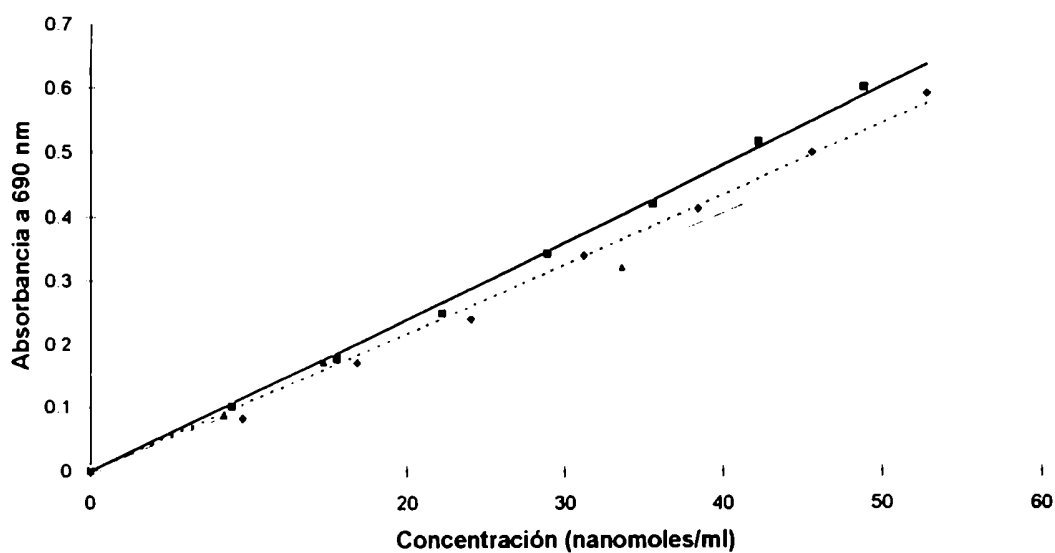


Figura 28: Curvas de referencia para galactosa (■), xilosa (◆), y una mezcla Gal : Xil de relación molar 2,5:1 (▲), en la determinación de poder reductor por el método de Park y Johnson¹¹⁰.

2.2.3 CARACTERIZACIÓN

Se caracterizaron entonces las cuatro fracciones obtenidas en la purificación, determinándose azúcares totales, sulfato, proteínas, peso molecular promedio y azúcares componentes. Los resultados se observan en la Tabla 4.

El alto porcentaje de hidratos de carbono en las fracciones solubles indica que el simple proceso de purificación empleado rindió buenos resultados. Las impurezas solubles se eliminaron en la diálisis de acuerdo a los bajos porcentajes de recuperación, mientras que las insolubles se encuentran en los productos **Fi** y **Ci** cuyos contenidos de hidratos de carbono son muy bajos.

La arabinosa quedó reducida a trazas, lo que confirma la presencia de un arabinano contaminante (posiblemente de bajo peso molecular), y se redujo

Tabla 4: Análisis de los productos purificados.

	FS	CS	Fi	Ci	T-S ^a
Azúcares totales (%)	73,6	53,2	24,5	10,4	nd
Sulfato (% de NaSO ₃)	8,7	10,7	10,2	5,1	9,3
Proteínas totales(%)	8,1	5,5	nd	nd	nd
Peso molecular	8900	12700	nd	nd	nd
Azúcares componentes^b					
Fucosa	tr	tr			nd
Arabinosa		1,0	tr	tr	nd
Glucosa	2,1	17,1		10,9	nd
Xilosa	31,0	30,8	48,8	35,1	45,1
2-(<i>O</i>)-metilgalactosa	20,1	25,8		14,3	nd
3-(<i>O</i>)-metilgalactosa	4,5	6,9		1,2	nd
4-(<i>O</i>)-metilgalactosa	3,6	4,9			nd
6-(<i>O</i>)-metilgalactosa	tr	tr			nd
Galactosa	71,8	62,4	100	84,5	100
3,6-anhidrogallactosa (%)	2,5	2,5	nd	nd	
Sulfato ^b	24,1	46,3	nd	nd	nd
Relación Gal / Xil	2,30	2,58	2,05	2,22	2,21

^a Polisacárido obtenido por Turvey y Simpson⁹⁵.

^b Expresados en moles cada 100 moles de galactosas totales.

notablemente el contenido de glucosa, especialmente en el producto FS. Como en el residuo Fi no se encontró glucosa, los glucanos presentes en F deberían tener un peso

molecular suficientemente bajo como para ser eliminados en la diálisis. Esto concordaría con el hecho de que hayan sido solubilizados en frío en la extracción del alga. Por el contrario, los glucanos presentes en **C** permanecen en un porcentaje importante tanto en **CS** como en el residuo **Ci**.

Se observó también una drástica disminución en el contenido de sulfato, sobre todo en el producto **FS**. Evidentemente las sales presentes interferían en el método turbidimétrico utilizado dando sobrevaluaciones.

El producto **FS** fue el que se purificó en mayor medida y el que tuvo menor porcentaje de recuperación, ya que al obtenerse en la primera extracción, contenía todos los productos solubles en agua fría del alga.

Los productos purificados, **FS** y **CS**, son muy parecidos. Ambos contienen aproximadamente una xilosa por cada tres galactosas totales. El producto **FS** tiene cada 100 residuos de azúcar, apenas 2 de xilosa y 1 de sulfato más que **CS**, y respecto de los azúcares metilados, en **CS** es mayor el contenido de 2-*O*-metil-, 3-*O*-metil- y 4-*O*-metilgalactosa. El porcentaje de 3,6-anhidrogalactosa es muy bajo y coincide en ambos compuestos.

Los datos para **FS** son muy semejantes a los informados por Turvey y Simpson en cuanto a la relación Gal / Xil y el contenido de sulfato. La diferencia principal es que no detectaron la presencia de galactosas monometiladas debido quizás a que las técnicas disponibles no les permitieron distinguir la galactosa de las mono-*O*-metilgalactosas, estando además algunas de estas últimas en baja proporción. Lamentablemente en el trabajo⁹⁵ no indicaron de qué forma determinaron la presencia de los azúcares componentes.

La composición del polisacárido se parece a la de los aeodanos (pág. 32) por carecer prácticamente de 3,6-anhidrogalactosa y por la presencia de varias galactosas monometiladas. Se diferencia de ellos en la baja proporción relativa de éster sulfato y

en la existencia de una cantidad importante de xilosa, si bien en los aeodanos se ha informado la presencia de esta pentosa en pequeñas proporciones^{60,62,66,70,71,73}.

Luego de la buena purificación lograda, se pudo contar con los dos productos, FS y CS, con un alto grado de pureza para comenzar los estudios de homogeneidad y las determinaciones estructurales.

2.2.3.1 Determinación de galactosa 6-sulfato

En primer lugar se midió el porcentaje de sulfato presente en las posiciones 6 de galactosas unidas por C-4 (unidad B). La reacción se basa en el tratamiento alcalino del polisacárido para luego dosar la 3,6-anhidrogalactosa formada por desplazamiento del 6-sulfato⁹. Por diferencia con el contenido original del anhidro azúcar se puede estimar la cantidad de galactosa 6-sulfato. Esta determinación es clave para la clasificación de los polisacáridos en compuestos lábiles o resistentes en medio alcalino, y varios ejemplos de ello fueron enumerados en el capítulo de Introducción.

Ambos productos, FS y CS, dieron valores muy bajos (0,6 y 0,5% respectivamente). Aunque Turvey y Simpson informaron la presencia de L-galactosa 6-sulfato y escasa proporción de galactosas unidas por C-3 en el polisacárido, el tratamiento alcalino de estos compuestos no produce más del 0,6% de 3,6-anhidrogalactosa indicando que, de existir sulfato en 6, el correspondiente O-3 debe estar bloqueado. El mismo hecho se observó en productos de *Anatheca dentata*⁵⁶.

Estos resultados indican que los polisacáridos de *Corallina officinalis* pueden clasificarse en una de las siguientes familias: la familia de los aeodanos o la familia del ágar. Dentro de esta última, la estructura de los polisacáridos sería semejante al hipotético cuarto extremo de estructura en la teoría propuesta por Yaphe (pág. 16 y 22), ya que el nivel de 3,6-anhidrogalactosa es muy bajo, y es prácticamente nulo el porcentaje de sulfato lábil en medio alcalino. Para poder incluirlos en una u otra clase

de compuestos, es necesario determinar la proporción de D- y L-galactosa. De acuerdo a los datos de Turvey⁹⁵, la relación D- : L- es 1,3 : 1 con lo que el producto pertenecería a la familia del ágar.

2.2.3.2 Determinación del poder rotatorio

Se midió entonces el poder rotatorio de ambos productos en agua, y del producto CS además, en urea 7M. La urea actúa como desagregante inhibiendo la formación de puentes hidrógeno y disminuyendo así las interacciones entre las cadenas. Los resultados que se observan en la Tabla 5 para los productos FS y CS son similares en ambos casos. Se incluyen también datos sobre los poderes rotatorios de compuestos de las familias del ágar y de los carragenanos.

Comparando los resultados, los poderes rotatorios negativos de los polisacáridos de *Corallina officinalis* indican que estos compuestos pertenecen a la familia del ágar, y por lo tanto es necesario estimar la proporción de D- a L-galactosa. Para ello se realizó una hidrólisis total de ambos productos y se midió luego el poder rotatorio en el hidrolizado, obteniéndose un valor de + 7.7° para CS mientras que en el producto FS hidrolizado no se observó rotación.

La cantidad de D- y L-galactosa se calculó teniendo en cuenta la contribución al poder rotatorio de los monosacáridos presentes en el hidrolizado: D- y L-galactosa, 2-O- , 3-O- y 4-O-metilgalactosa, D-xilosa y D-glucosa. Para xilosa y glucosa se supuso que ambas pertenecen en su totalidad a la serie D, ya que nunca fueron informados sus enantiómeros en polisacáridos naturales (esto fue confirmado posteriormente, véase pág. 131). Los poderes rotatorios informados por distintos autores para la 2-O- , 3-O- y 4-O-metilgalactosa se muestran en la Tabla 6 y pueden considerarse para los cálculos aproximadamente equivalentes al de la galactosa. La 3-O-metilgalactosa presenta el valor más diferente, pero dada la baja proporción en que se encuentra en los productos

no introduce un error significativo.

Tabla 5: Poderes rotatorios de los productos FS, CS, y de polisacáridos de las familias del ágar y de los carragenanos.

Polisacárido	$[\alpha_D]$
FS	- 52,2°
CS _{agui}	- 44,5°
CS _{irca}	- 48,5°
λ -carragenano de <i>Chondrus crispus</i> ⁸	+ 81°
κ -carragenano de <i>Chondrus crispus</i> ⁶	+ 60,3°
Polisacárido de <i>Grateloupia elliptica</i> ^{59,a}	+ 45°
Polisacárido de <i>Gloiopeltis cervicornis</i> ⁷¹	- 30°
Polisacárido de <i>Laurencia pinnatifida</i> ⁵⁰	- 28,4°

^a Relación D-Gal : L-Gal 9:1

Tabla 6: Poderes rotatorios de galactosa y distintas mono-O-metilgalactosas.

Azúcar	$[\alpha_D]$	Referencia
D-Galactosa	+ 80,2°	111
2-O-metil-D-galactosa	+ 86,2°	112
	+ 94°	113
	+ 80°	114
3-O-metil-D-galactosa	+ 108,6°	115
4-O-metil-D-galactosa	+ 92°	114
	+ 67,8°	116

La expresión utilizada en el cálculo fue la siguiente:

$$[\alpha_{\text{ndr}}] = x_{\text{DXial}} \cdot \alpha_{\text{DXial}} + x_{\text{LXial}} \cdot \alpha_{\text{LXial}} + x_{\text{DXil}} \cdot \alpha_{\text{DXil}} + x_{\text{DXilc}} \cdot \alpha_{\text{DXilc}}$$

donde: x representa las fracciones molares de cada componente

$$[\alpha_{\text{DGal}}] = + 80,2^\circ ; [\alpha_{\text{LGal}}] = - 80,2^\circ ; [\alpha_{\text{DXil}}] = + 18,8^\circ \text{ y } [\alpha_{\text{DXilc}}] = + 52,7^\circ$$

Reemplazando los datos y operando matemáticamente se obtuvieron las relaciones D-Gal : L-Gal que se observan en la Tabla 7.

Tabla 7: Porcentajes de D- y L-galactosa en los polisacáridos FS y CS.

	FS	CS
D-Gal (%)	45,7	49,3
L-Gal (%)	54,3	50,7
Rel. D- : L-	0,84	0,97

Considerando las aproximaciones efectuadas, puede estimarse que cerca de la mitad de las galactosas pertenecen a la serie L, del mismo modo que en la estructura ideal del ágar en el cual existe alternancia de unidades de ambas series.

La relación D- : L- informada por Turvey y Simpson⁹⁵ es 1,3 : 1. Sin embargo, ambos resultados no son contradictorios ya que su determinación está basada sólo en la galactosa presente, mientras que la aquí presentada incluye las galactosas monometiladas. Sabiendo que en polisacáridos de la familia del ágar la 2-(*-*)-metilgalactosa pertenece a la serie L^{50,52}, este hecho compensaría el aparente predominio de la D-galactosa en aquel trabajo.

2.2.4 Composición del residuo de extracción

El próximo paso consistía en investigar la homogeneidad de los polisacáridos, ya que los antecedentes indicaban que estos compuestos serían polidispersos. Previamente, y para concluir la caracterización general del sistema, se estudió la composición del residuo obtenido luego de la segunda extracción en caliente.

El análisis se realizó siguiendo dos técnicas de hidrólisis diferentes: la primera es el método habitual con TFA 2N a 121°C durante 90', y la segunda consiste en un tratamiento con ácido trifluoroacético puro a 37°C, luego se diluye el medio de reacción hasta llegar a una concentración de TFA del 80% y se mantiene a 100°C durante una hora. Esta última técnica se utiliza para la hidrólisis de celulosa¹¹⁷. En la Tabla 8 se observan los resultados obtenidos.

Tabla 8: Azúcares componentes del residuo de la segunda extracción en caliente (expresados en moles / 100 moles de azúcares totales).

Azúcares componentes	Método de hidrólisis	
	TFA 2N	TFA 100%
Arabinosa	tr	1,8
Manosa	7,8	5,2
Glucosa	65,7	69,0
Xilosa	3,6	1,7
2- <i>O</i> -metilgalactosa	3,5	2,9
3- <i>O</i> -metilgalactosa	tr	tr
Galactosa	19,4	19,4

Los datos sugieren que queda una pequeña proporción de polisacárido sin

extraer. Contrariamente a lo observado por Ondarza *et al*¹⁰³ no se obtuvo 4-*O*-metilgalactosa en el residuo de extracción. Además de los azúcares componentes del mismo, también hay manosa y glucosa, esta última en mayor proporción. Los mananos son componentes habituales de los polisacáridos de sostén en algas¹¹⁸. Por su parte, la cantidad de glucosa obtenida por ambos métodos es prácticamente la misma, por lo que ésta debe provenir del almidón o bien de otros glucanos de la pared celular, pero sólo en menor medida de celulosa.

En la hidrólisis con TFA 2N, la proporción de xilosa es algo menor que en los polisacáridos F o C, mientras que la relación de galactosa a 2-*O*-metilgalactosa es semejante. Es posible que debido a la menor (o nula) solubilidad en agua del polisacárido residual, la cantidad de xilosa sea menor.

Los resultados obtenidos con la técnica para componentes celulósicos muestran que la cantidad de xilosa obtenida, es notoriamente menor que la determinada en la hidrólisis con TFA 2N. Esto indicaría que el medio fuertemente ácido de la hidrólisis descompone en alguna proporción a la xilosa.

Para comprobar entonces que en la técnica habitual el ácido trifluoroacético no degrada la xilosa, se realizaron hidrólisis del polisacárido CS con TFA 2N variando los tiempos de reacción. Los resultados se muestran en la Tabla 9, y se observa que la proporción de xilosa respecto de galactosa se mantiene casi constante. El menor valor se obtiene en la primera columna, debido seguramente a que la hidrólisis del polisacárido no se completó con sólo 30' de calentamiento y la xilosa, unida como cadena lateral, es más fácilmente hidrolizable que los azúcares de cadena.

En las mismas condiciones, se trataron mezclas de galactosa y xilosa de proporciones conocidas. Los resultados del tratamiento ácido durante 90' indican que no hay degradación de la xilosa, ya que la relación molar Gal / Xil se mantuvo prácticamente constante (0,75 y 0,74 antes y después del calentamiento

respectivamente). Sin embargo, con 120' de calentamiento parece haber una pequeña disminución en su proporción (la relación molar aumentó de 1,05 a 1,16).

En conclusión, con la técnica hidrolítica habitual usando TFA 2N a 121°C durante 90', no hay degradación apreciable de la xilosa respecto de los demás azúcares y por lo tanto los resultados obtenidos son confiables.

Tabla 9: Análisis de los azúcares componentes del polisacárido CS a diferentes tiempos de hidrólisis.

Azúcares componentes	30'	60'	75'	90'	105'
Arabinosa	0,3	0,4	0,5	0,4	tr
Glucosa	18,4	16,6	16,6	17,8	17,4
Xilosa	36,4	29,9	29,7	28,0	28,0
2-(<i>-</i>)-metilgalactosa	20,5	19,9	20,0	21,5	20,0
3-(<i>-</i>)-metilgalactosa	4,6	4,3	4,9	4,9	4,1
4-(<i>-</i>)-metilgalactosa	1,9	1,7	1,8	1,9	1,9
Galactosa	73,0	74,1	73,3	71,5	74,0
Relación Gal : Xil	2,00	2,48	2,47	2,56	2,64

2.3 FRACCIONAMIENTO DEL POLISACARIDO FS

Finalizada la caracterización, se estudió la homogeneidad del polisacárido. Se decidió seguir trabajando sólo con FS dada la manifiesta similitud entre ambos productos.

Turvey y Simpson⁹⁵ estudiaron la homogeneidad del polisacárido por cromatografía de intercambio iónico sobre DEAE-Sephadex A-50 eluyendo con

soluciones de NaCl en ácido clorhídrico 0,01M. Obtuvieron siete fracciones, seis de las cuales contenían residuos de galactosa y xilosa en proporciones parecidas, y la fracción restante era un glucano. Estos experimentos indicaron que existía cierto grado de heterogeneidad en el polisacárido, pero no encontraron evidencias sobre la presencia de un xilano contaminante.

Sobre esa base, se realizó el fraccionamiento también sobre DEAE-Sephadex A-50. La primera experiencia se llevó a cabo a escala analítica (5 mg) para estudiar el sistema. Se comenzó la elución con agua y luego con soluciones acuosas de NaCl de concentración 0,2M, 0,5M y 1,5M. En la Figura 29 se observa el gráfico correspondiente. Finalmente se eluyó con una solución de NaCl 1,5M en HCl 0,01M, sin obtener nuevas fracciones

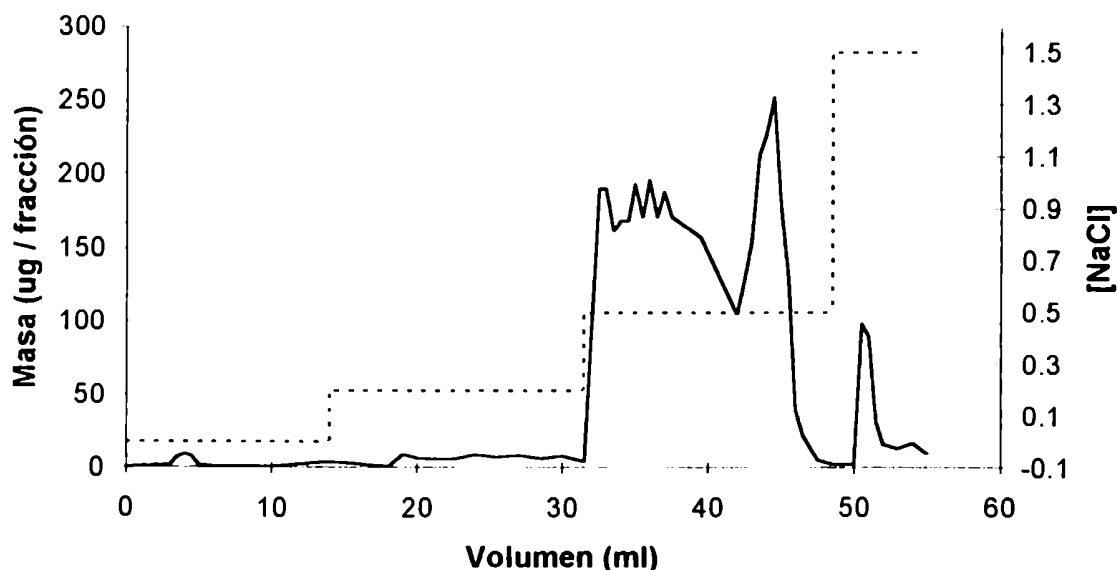


Figura 29: Cromatografía de intercambio iónico sobre DEAE-Sephadex A-50 del polisacárido FS.

El porcentaje de recuperación fue del 91%, pero la resolución no fue buena ya que el 90% del eluido se extrae con NaCl 0,5M sin llegar a resolverse los picos.

Se decidió repetir la experiencia comenzando la elución con NaCl 0,1M, y luego incrementar su concentración a intervalos de 0,1M. En la Figura 30 se observan los resultados.

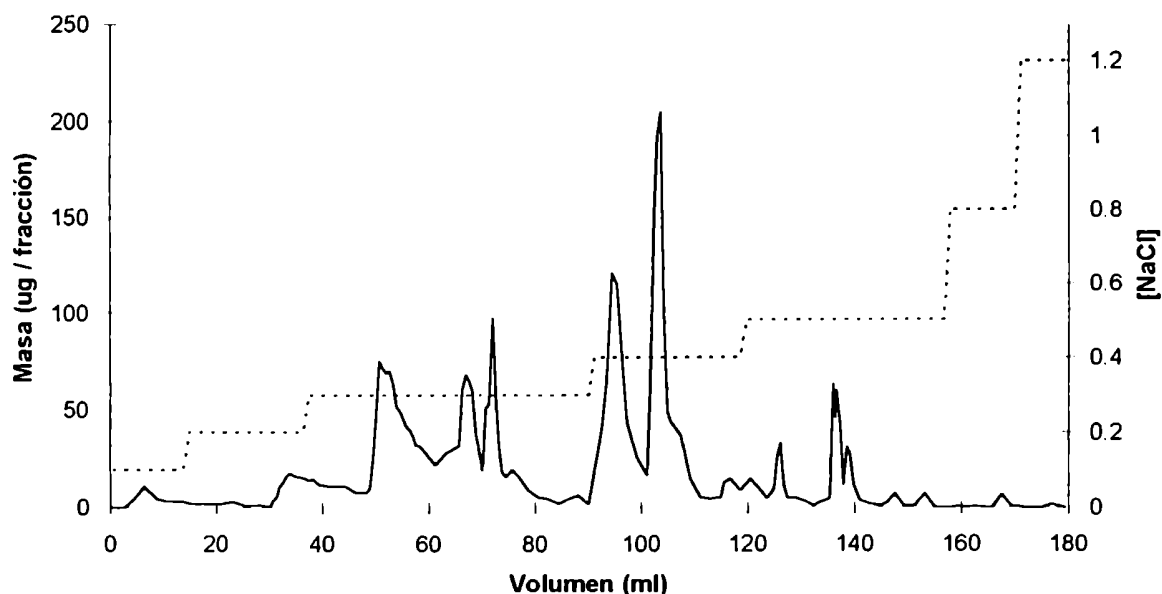


Figura 30: Cromatografía de intercambio iónico de FS utilizando un gradiente de concentraciones de NaCl, escalonado a intervalos de 0,1M.

El porcentaje de recuperación fue del 82%. En este caso la resolución fue muy buena, pudiéndose aislar cada fracción en forma "pura". La mayor proporción (71,4%) eluye con concentraciones de NaCl entre 0,3 y 0,4M.

En líneas generales, el patrón de elución es semejante al anterior (Figura 29), considerando que lo que allí eluía con NaCl 0,5M eluye aquí entre 0,3 y 0,4M con mucha mejor resolución debido al menor incremento de concentraciones de eluyente utilizado. Por último, el producto que en la primera experiencia eluía con 1,5M ahora lo hace con 0,5M, y a mayores concentraciones no se obtienen nuevos productos.

Probablemente lo que eluía con 1,5M no necesitara esa alta fuerza iónica, sino solamente un mayor volumen de elución.

Los resultados muestran que el polisacárido presenta un importante grado de dispersión. Los datos concuerdan con los obtenidos por Turvey, aunque la resolución en este caso fue mejor y el fraccionamiento más eficiente (se obtuvieron más fracciones).

En vista del buen resultado obtenido con el sistema empleado, se fraccionó el polisacárido en forma preparativa. En la Figura 31 se observan los resultados.

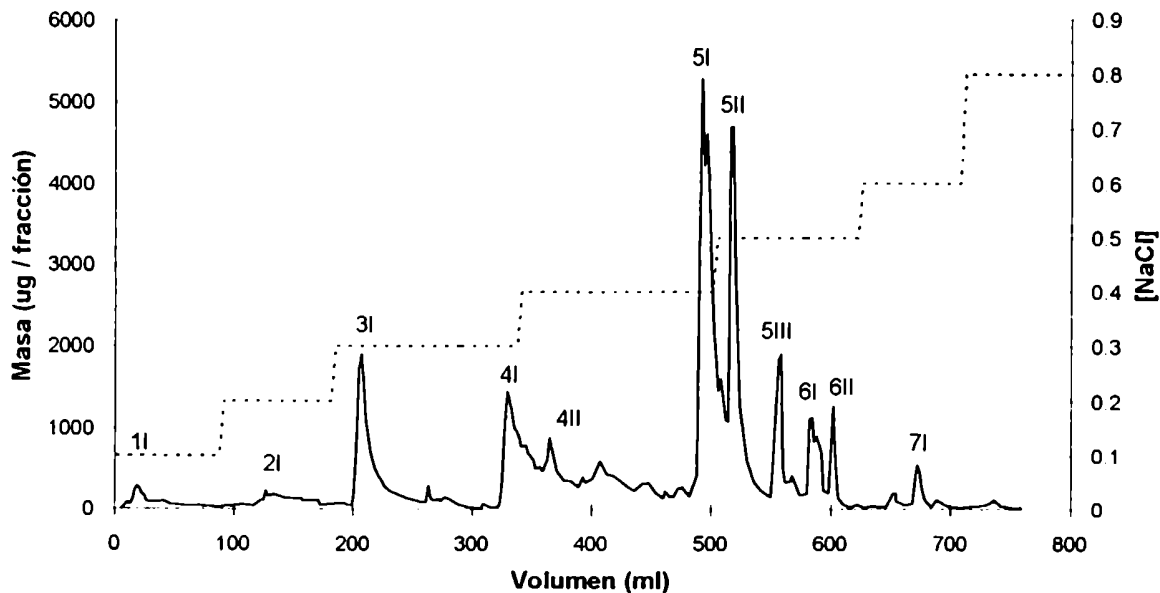


Figura 31: Cromatografía de intercambio iónico de FS a escala preparativa. Se indican las fracciones obtenidas en cada etapa de elución (Tabla 10).

El porcentaje de recuperación fue del 83%, idéntico al caso anterior, y el modelo de elución fue también muy semejante. Sin embargo, la mayor parte (61%) eluye aquí entre 0,4 y 0,5 M en NaCl. No es posible dar una explicación concreta para este hecho, pero al tratarse de una cromatografía preparativa, las condiciones de elución no fueron

equivalentes. Por ejemplo, en la cromatografía preparativa la relación volumen de gel a masa de polisacárido fue mucho mayor (2,5 ml/mg) que en la analítica (0,4 ml/mg). Seguramente la alta concentración de polisacárido sulfatado afecta la fuerza iónica del medio y, en alguna forma, los resultados de la cromatografía.

Se colectaron los volúmenes correspondientes a cada pico, y luego de diálisis y liofilización, se obtuvieron las fracciones que se muestran en la Tabla 10 con su correspondiente porcentaje.

Tabla 10: Fracciones obtenidas en el fraccionamiento del polisacárido FS.

Fracción ^a	Porcentaje	Fracción ^a	Porcentaje
1I	4,2%	5II	12,7%
2I	4,8%	5III	11,2%
3I	15,8%	6I	2,0%
4I	11,1%	6II	1,7%
4II	14,7%	8I	1,5%
5I	20,3%		

^a Los números arábigos corresponden a la concentración de NaCl con la que eluye cada fracción multiplicada por diez, y los números romanos indican el orden de cada pico dentro de una misma concentración de eluyente.

2.4 CARACTERIZACIÓN DE LAS FRACCIONES

Se caracterizaron luego los once productos obtenidos en el fraccionamiento. Las determinaciones realizadas fueron: porcentaje de hidratos de carbono totales, sulfato y proteínas, azúcares reductores para peso molecular promedio, e hidrólisis total con

derivatización como aldononitrilos acetilados para determinar los azúcares componentes. Los resultados se muestran en las Tablas 11, 12 y 13.

Tabla 11: Análisis de las fracciones obtenidas a partir de FS.

Fracción	H de C (%)	Sulfato (%) ^a	Proteínas (%)	PM
1I	16,3	10,0	6,3	2200
2I	24,2	12,6	7,9	2300
3I	40,7	10,3	7,1	5900
4I	60,5	15,1	3,2	19500
4II	40,7	17,5	2,6	6400
5I	70,0	15,3	1,1	17900
5II	82,3	12,8	1,2	32200
5III	35,9	19,6	1,8	9600
6I	51,5	11,9	3,3	6800
6II	80,0	11,2	nd	nd
8I	33,6	13,1	nd	4500

^a Expresado como porcentaje de NaSO₃.

El porcentaje de hidratos de carbono de ciertas fracciones (sobre todo las primeras en eluir), es demasiado bajo; sin embargo las proporciones de sulfato y proteínas son valores normales en este tipo de productos. La causa del bajo porcentaje de azúcares quizás se deba a la presencia de sales inorgánicas que coeluyeron con los polisacáridos, y no pudieron ser separadas en la diálisis posterior.

Tabla 12: Azúcares componentes de las fracciones obtenidas a partir de FS (expresados en moles / 100 moles de galactosas totales).

Fracción	Xyl	2-Gal ^a	3-Gal ^a	4-Gal ^a	6-Gal ^a	Gal
II	37,7	1,1	tr		b	98,9
2I	30,5	10,7		8,9	b	80,4
3I	13,6	18,5	tr	20,3		61,2
4I	17,5	21,0	4,9	8,7	1,8	63,6
4II	22,4	19,9	5,3	2,8	2,2	69,8
5I	22,0	27,3	5,4	2,2	2,2	62,9
5II	22,1	19,7	8,4	tr	1,6	69,8
5III	11,7	22,4	11,1			66,5
6I	12,6	23,4	6,0	3,5	6,4	60,7
6II	14,4	24,0	2,9	1,7	3,2	68,3
8I	4,2	36,2	9,0	9,3	5,9	39,6

^a 2-Gal = 2-*O*-metilgalactosa, etc.

^b La 6-*O*-metilgalactosa se incluye en la xilosa.

La composición de las fracciones se discutirá conjuntamente con los resultados obtenidos en el análisis de los polisacáridos del alga recolectada en la Provincia de Buenos Aires (véase pág. 90).

Tabla 13: Otros azúcares presentes en las fracciones obtenidas a partir de FS (expresados en moles / 100 moles de galactosas totales).

Fracción	Ramnosa	Fucosa	Arabinosa	Manosa	Glucosa
1I			7,6	8,3	17,2
2I		3,4		13,8	27,9
3I		2,0		2,7	9,2
4I	tr	tr		tr	2,1
4II	1,1	tr	1,7	1,3	2,6
5I					
5II	tr	tr	tr	tr	tr
5III		tr	tr	tr	tr
6I		tr	tr	2,2	2,8
6II	tr	tr		1,3	1,3
8I	1,8	2,2	1,0	4,2	7,1

2.5 AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE LOS POLISACÁRIDOS DE *CORALLINA OFFICINALIS* DE LA COSTA BONAERENSE.

Con el fin de contar con una cantidad de polisacárido suficiente para un estudio más completo, fue necesario obtener material fresco para realizar un nuevo extracto, ya que para la primera extracción se dispuso de poca cantidad de alga y el rendimiento del polisacárido es escaso. Por lo tanto, las algas se recolectaron en la localidad de Miramar, ubicada sobre la costa atlántica de la provincia de Buenos Aires, al sudoeste de Mar del Plata. Se buscaron ejemplares de esta localidad por su mayor cercanía con nuestra ciudad, y posteriormente se analizó si las diferentes condiciones ambientales de

las algas de la Provincia de Buenos Aires, por ejemplo, clima más templado, influían en las propiedades de los extractos, en comparación con los productos de Puerto Madryn.

El alga seca y molida se extrajo siguiendo el mismo procedimiento que en la extracción anterior, pero como se partió de mayor cantidad de alga, se usó HCl 1N en lugar de 0,1N para evitar el manejo de volúmenes de extracto demasiado grandes.

El producto crudo (F_M), obtenido con un rendimiento del 1,8%, se purificó por redisolución en agua y centrifugación. El sobrenadante se dializó y por liofilización se obtuvo FS_M (rendimiento = 21,4% respecto de F_M). El residuo de la centrifugación se lavó y se liofilizó obteniéndose el producto FI (rendimiento = 14,4% respecto de F_M). El resto (64,2% respecto de F_M) se eliminó en la diálisis. Las cantidades de cada fracción son equivalentes a las obtenidas en la purificación del polisacárido extraído del alga de Chubut. El rendimiento total para FS_M fue de 0,4%.

Se caracterizaron luego los productos FS_M y FI_M , determinándose azúcares y proteínas totales, sulfato, peso molecular promedio y poder rotatorio. Los resultados se aprecian en la Tabla 14.

Tabla 14: Análisis de los productos FS_M y FI_M , de la Provincia de Buenos Aires.

Producto	H de C (%)	Sulfato (%) ^a	Proteínas (%)	α_D	PM
FS_M	65,3	8,5	2,2	- 78,8°	15500
FI_M	3,7	3,4	nd	nd	nd

^a Expresado como porcentaje de $NaSO_3$.

El producto FI_M carece de interés analítico para este estudio, ya que su porcentaje de hidratos de carbono es prácticamente nulo. Se determinaron los azúcares

componentes de FS_M y los resultados se muestran en la Tabla 15.

Tabla 15: Azúcares componentes y sulfato del producto FS_M , expresados en moles / 100 moles de galactosas.

	Glc	Xil	2-Gal ^a	3-Gal ^a	4-Gal ^a	6-Gal ^a	Gal	NaSO ₃
FS_M	1,6	28,1	26,2	5,7	4,4	tr	63,7	26,1

^a 2-Gal = 2-(*O*)-metilgalactosa, etc.

Se encuentra además un pequeño porcentaje (1,3%) de ácidos urónicos. Comparando el producto FS_M con el FS (pág. 67), se observa que ambos son muy similares. El porcentaje de sulfato es prácticamente el mismo, mientras que en FS_M es menor el contenido de proteínas y mayor el peso molecular. La diferencia más importante es que el poder rotatorio de este último es mayor en valor absoluto que el del producto de Puerto Madryn, lo que se explica considerando que en FS_M son menores las proporciones de glucosa y xilosa (serie D) y es mayor la cantidad de 2-(*O*)-metilgalactosa (serie L, pág. 70 y 72). La proporción de azúcares componentes también es muy parecida, teniendo el producto bonaerense una cantidad levemente mayor de azúcares monometilados.

2.5.1 Fraccionamiento del polisacárido FS_M

El fraccionamiento se hizo de la manera ya descrita, y el perfil de elución se muestra en la Figura 32.

Comparando con el fraccionamiento de los productos del alga proveniente de Puerto Madryn (véase Figura 31, pág. 78), se observa que ambos perfiles de elución

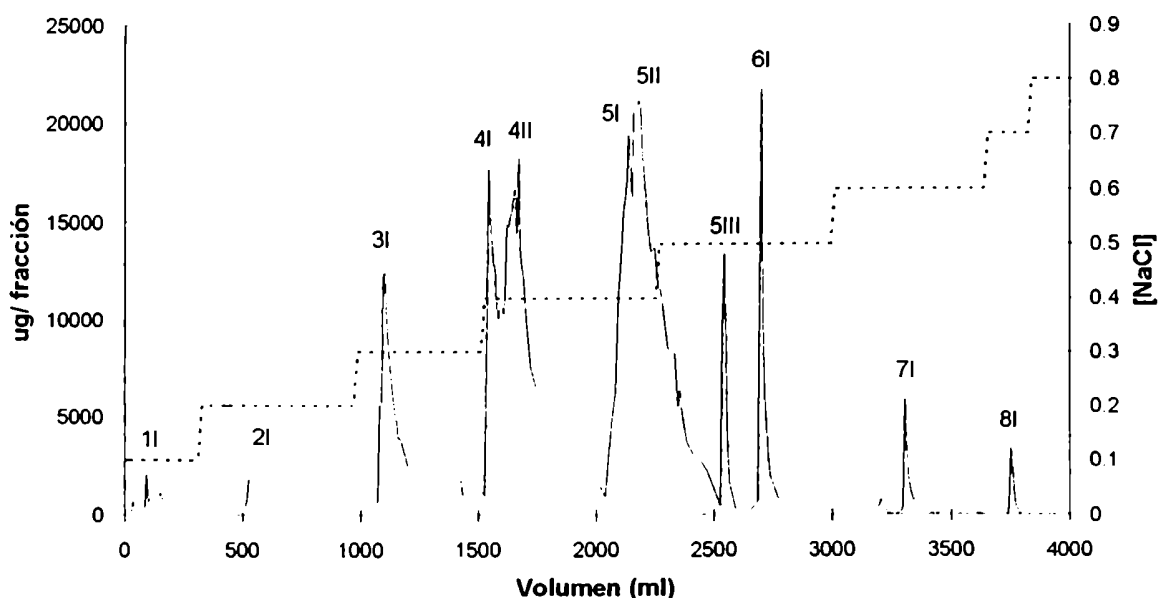


Figura 32: Cromatografía de intercambio iónico del producto FS_M de la Provincia de Buenos Aires, a escala preparativa. Se indican las fracciones obtenidas en cada etapa de elución (Tabla 16).

son muy parecidos, como era de esperar. La primera parte del gráfico (hasta 0,3M inclusive) es idéntica. La mayor proporción de productos eluyó con concentraciones de NaCl entre 0,3 y 0,5M (82% del total recuperado), y se encontraron cantidades menores de productos antes o después de dicho rango de concentraciones.

Al igual que en aquella oportunidad se obtuvieron dos productos con NaCl 0,4 M, aunque en este caso éstos son notoriamente más abundantes, sobre todo la fracción 4II. En las fracciones obtenidas con NaCl 0,5 M, se observó algo semejante. La fracción 5II pasó a ser más importante que la 5I, inversamente a lo que ocurría antes.

Finalmente la fracción 6I también aumentó su proporción relativa y es la única que eluye a 0,6 M, mientras que la "antigua" fracción 6II eluyó aquí con NaCl 0,7M.

Las diferencias observadas ocurren básicamente en las proporciones relativas de

cada fracción, seguramente debido a que los polisacáridos en solución se agregan en forma no específica, formando complejos que se comportan de manera diferente en la cromatografía de intercambio iónico. De todos modos, puede afirmarse que el fraccionamiento es reproducible.

La recuperación fue del 82%, se aislaron nuevamente once fracciones y la proporción de cada una se aprecia en la Tabla 16.

Tabla 16: Fracciones obtenidas en el fraccionamiento del polisacárido FS_M .

Fracción	Porcentaje	Fracción	Porcentaje
1I	3,0%	5II	25,4%
2I	6,8%	5III	2,8%
3I	14,5%	6I	5,6%
4I	7,5%	6II	1,5%
4II	22,4%	8I	0,8%
5I	9,7%		

2.6 CARACTERIZACIÓN DE LAS FRACCIONES

Cada producto fue caracterizado determinándose los porcentajes de hidratos de carbono, sulfato y proteínas, y el peso molecular promedio. En la Tabla 17 se muestran los resultados.

Se observó una correlación directa en cada fracción entre la cantidad de sulfato y la concentración de NaCl correspondiente, sugiriendo que el orden de elución está motivado principalmente por el grado de sulfatación.

Tabla 17: Análisis de las fracciones obtenidas a partir del producto FS_M de la Provincia de Buenos Aires.

Fracción	H de C (%)	Sulfato (%)	Proteínas (%)	PM
1I	47,7	5,2	15,5	1500
2I	53,9	6,4	9,4	2700
3I	56,0	6,3	5,3	5500
4I	84,6	9,8	2,9	12500
4II	75,5	12,5	1,0	21200
5I	81,0	12,3	1,3	32700
5II	85,2	14,7	tr	49100
5III	83,6	15,4	3,0	12300
6I	75,2	14,6	1,6	29300
7I	66,8	15,1	1,9	14900
8I	50,0	19,3	2,2	15100

Los análisis muestran algunos productos con bajo peso molecular, especialmente los dos primeros, que también son los más ricos en proteínas. Es interesante notar que el contenido de proteínas es inversamente proporcional al peso molecular, y esta relación puede observarse en la Figura 33.

La unión covalente carbohidrato-proteína generalmente se produce en el extremo reductor del azúcar, que es el involucrado en la determinación del peso molecular. Por lo tanto, el dosaje de grupos reductores permite obtener el peso molecular promedio real de un polisacárido, sólo si las proteínas están asociadas en forma no covalente o bien unidas covalentemente en otros puntos.

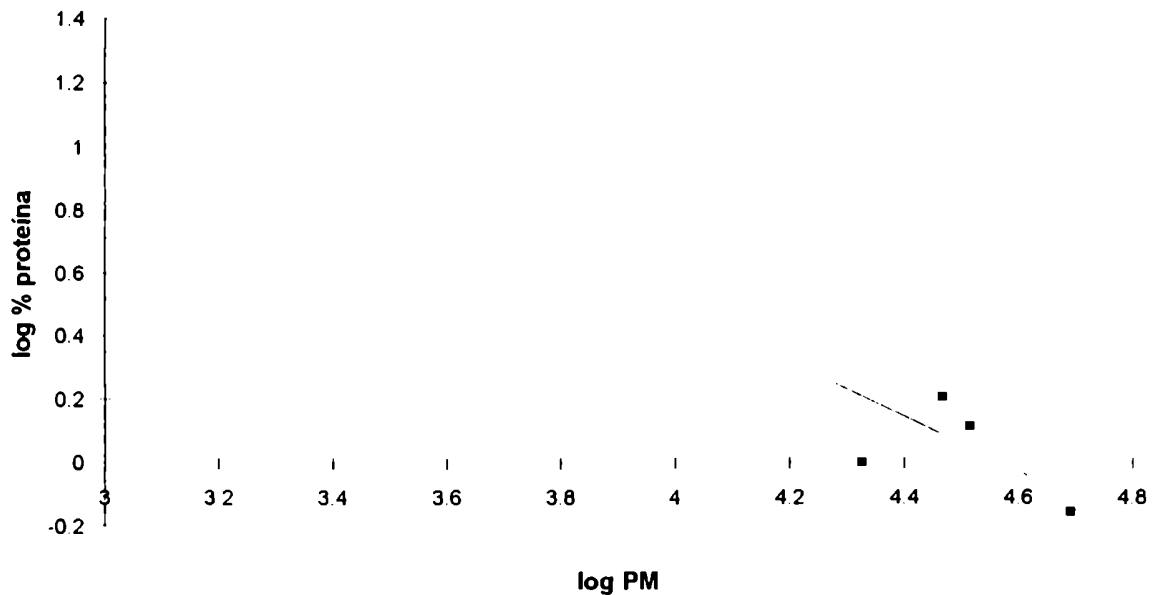


Figura 33: Relación entre el contenido de proteínas y el peso molecular. La pendiente de la recta es $-0,84$ y el coeficiente de correlación $r = -0,99$.

El hecho de que existan grupos reductores libres en estos productos muestra que no todos están bloqueados por proteínas. Además la relación entre los logaritmos del porcentaje de proteínas y del peso molecular es lineal (Figura 33), lo que permite suponer que una cantidad constante de proteína se encontraría unida a polisacáridos de diferentes tamaños, llevando así a un incremento en la proporción de proteína en aquellas fracciones de menor peso molecular, y sugiriendo la posibilidad de uniones covalentes en posiciones diferentes al extremo reductor. Es sorprendente que al extrapolar la recta de la Figura 33 para un porcentaje de proteína del 100%, el peso del "hidrato de carbono" unido es 150 lo que coincide aproximadamente con el peso molecular de un monosacárido.

2.6.1 Azúcares componentes

Se analizaron los azúcares componentes por derivatización como aldononitrilos acetilados y los resultados se muestran en la Tabla 18.

Tabla 18: Azúcares componentes, derivatizados como aldononitrilos acetilados, y sulfato en las fracciones obtenidas del producto FS de la Provincia de Buenos Aires (expresados en moles / 100 moles de galactosas totales).

Fracción	Xil	2-Gal ^a	3-Gal ^a	4-Gal ^a	6-Gal ^a	Gal	Sulfato
1I	21,6	22,6	9,0	9,5	6,4	52,5	27,6
2I	17,4	27,2	4,5	10,6	4,8	52,9	23,7
3I	19,0	28,2	3,5	16,3	tr	52,0	22,5
4I	22,3	22,3	6,1	11,7	tr	59,9	22,9
4II	27,1	23,6	7,0	2,3	tr	67,1	32,7
5I	31,8	22,6	9,4	1,2		66,8	31,2
5II	33,5	23,4	7,1	1,2		68,3	35,3
5III	24,5	25,6	5,1	1,5	4,1	63,7	36,3
6I	20,2	27,9	3,8	3,3	6,0	59,0	37,5
7I	7,9	36,8	2,8	6,8	9,7	43,9	40,4
8I	7,8	40,9	1,7	2,4	12,2	42,8	70,0

^a 2-Gal = 2-(*O*)-metilgalactosa, etc.

Se determinó además la proporción de ácidos urónicos en tres fracciones, obteniéndose valores bajos en todos los casos: 1I (2,2%), 4I (3,7%) y 6I (0,4%), y por ello se decidió no analizarlos en el resto de los productos.

Las once fracciones obtenidas por cromatografía del polisacárido FS tienen

características similares. Las fracciones hacia la mitad de la elución (4II, 5I y 5II), que suman casi el 60% del total de los productos, tienen las proporciones más altas de xilosa (27-34 / 100 galactosas totales) y de galactosa (67-68 / 100 galactosas totales), y mayor peso molecular que el resto de las fracciones. La fracción 5III tiene las mismas características analíticas, pero un menor peso molecular. Las primeras fracciones en eluir tienen cantidades algo menores de xilosa (17-22 / 100 galactosas totales), en cambio los dos últimos productos de la cromatografía tienen proporciones muy bajas (sólo 8 / 100 galactosas totales).

La 2-*O*-metilgalactosa está regularmente distribuida en las primeras nueve fracciones (22-28 / 100 galactosas totales), aunque crece hasta 37-41 en las fracciones 7I y 8I, donde prácticamente iguala a la proporción de galactosa. Las características de estas dos últimas fracciones son las que más se desvían del resto.

No existe ninguna correlación entre la concentración de NaCl y el contenido de 3-*O*-metilgalactosa, aunque disminuye claramente en las últimas fracciones. En los primeros productos fluctúa entre 4 - 9 / 100 galactosas totales, mientras en los dos últimos cae a 2-3.

La 4-*O*-metilgalactosa aparece en altas proporciones en las primeras cuatro fracciones (10 - 16 / 100 galactosas totales) y en la fracción 7I (7 / 100 galactosas totales). En las demás, este azúcar que comúnmente aparece como cadena lateral^{63,98,102}, nunca totaliza más del 3%.

La 6-*O*-metilgalactosa es importante sólo en las fracciones minoritarias del principio y fin de la elución. Las primeras en eluir totalizan 5-6 unidades cada 100 galactosas totales, y a partir de la fracción 5III hasta la 8I, su proporción crece desde 4 hasta 12 unidades.

Comparando la composición de las fracciones provenientes del alga de la Provincia de Buenos Aires con los productos extraídos del alga de Chubut, se deduce

que ambos productos son esencialmente iguales, aunque hay pequeñas diferencias. En los polisacáridos del alga de Chubut, la proporción de xilosa es algo menor en todos los productos, mientras que la cantidad de sulfato es levemente mayor, sobre todo en las primeras fracciones de la cromatografía. Además hay ciertas diferencias puntuales, por ejemplo, en la Fracción II que está desprovista de galactosas metiladas. Los resultados parecen indicar que a pesar de la diferencia de hábitat entre ambas muestras de alga, las características estructurales de los polisacáridos son esencialmente las mismas.

También las fracciones fueron analizadas por derivatización como alditoles acetilados. Se puso mayor énfasis en el estudio por el método de los aldononitrilos, porque al derivatizar los azúcares como alditoles, dos monosacáridos importantes como la 3-*O*-metil- y 4-*O*-metilgalactosa se transforman en alditoles enantioméricos que no pueden resolverse por C.G.L., con la consiguiente pérdida de información. Sin embargo, hay ciertas diferencias a tener en cuenta entre los resultados de ambas derivatizaciones.

No se estudiaron las fracciones 7I y 8I, debido a la poca cantidad con que se contaba, ya que fueron preservadas para futuros estudios. Los resultados se observan en la Tabla 19.

Las diferencias entre aldononitrilos y alditoles son significativas y se manifiestan en que los porcentajes de xilosa y, sobre todo de monometilgalactosas, son menores en los datos obtenidos por alditoles. La subvaluación relativa respecto de xilosa es de 7% en promedio, pero respecto de 2-*O*-metilgalactosa es 34% y de la suma de 3-*O*-metil- y 4-*O*-metilgalactosa es de 49%, igual que para 6-*O*-metilgalactosa. Esta aparente anomalía debe ser tenida en cuenta, y por lo tanto se considerarán los datos provenientes de ambas derivatizaciones por separado, cuando junto con los estudios que se describirán más adelante, se analicen en forma global los resultados estructurales.

Tabla 19: Azúcares componentes de las fracciones obtenidas del producto FS_M, derivatizados como alditoles acetilados (expresados en moles / 100 moles de galactosas totales). Entre paréntesis se muestran los datos de aldononitrilos acetilados para facilitar la comparación entre ambas técnicas.

Fracción	Xil	2-(<i>-</i>)-MeGal	3-(<i>-</i>) + 4-(<i>-</i>)-MeGal	6-(<i>-</i>)-MeGal	Gal
1I	20,5 (21,6)	15,8 (22,6)	9,8 (18,5)	3,8 (6,4)	70,6 (52,5)
2I	19,9 (17,4)	20,9 (27,2)	9,2 (15,1)	1,4 (4,8)	68,5 (52,9)
3I	13,9 (19,0)	18,2 (28,2)	10,9 (19,8)	1,0 (tr)	69,9 (52,0)
4I	19,2 (22,3)	15,5 (22,3)	7,8 (17,8)	1,1 (tr)	75,6 (59,9)
4II	23,7 (27,1)	14,7 (23,6)	5,2 (9,3)	1,2 (tr)	78,9 (67,1)
5I	32,6 (31,8)	15,4 (22,6)	5,1 (10,6)	0,8 (--)	78,7 (66,8)
5II	32,3 (33,5)	14,1 (23,4)	2,6 (8,3)	0,7 (--)	82,6 (68,3)
5III	22,6 (24,5)	16,0 (25,6)	3,3 (6,6)	2,3 (4,1)	78,4 (63,7)
6I	17,8 (20,2)	17,7 (27,9)	4,0 (7,1)	3,5 (6,0)	74,8 (59,0)

Por último, se analizó la existencia de diversos monosacáridos presentes como "contaminantes". En la Tabla 20 se muestran sus proporciones.

En las primeras fracciones de la elución, 1I, 2I, 3I y 4I, hay contaminación con almidón de florídeas en cantidad decreciente. También en la fracción 1I existe una cantidad muy importante de un manano contaminante y, en menor proporción, de ramnosa, fucosa y arabinosa. En los demás productos la presencia de estos azúcares disminuye prácticamente al nivel de trazas.

Tabla 20: Azúcares presentes como "contaminantes" en las fracciones obtenidas por fraccionamiento del producto FS_M , derivatizados como aldononitrilos y alditoles acetilados. Los datos se obtuvieron como promedio entre ambas técnicas (expresados en moles / 100 moles de galactosas totales).

Azúcares	1I	2I	3I	4I	4II	5I	5II	5III	6I	7I	8I
Ramnosa	12,7	1,3		tr	tr	tr		tr	tr	2,7	3,5
Fucosa	14,1	2,9	1,0					tr	tr	2,8	4,4
Arabinosa	6,1	tr	tr	tr		tr		tr	tr	tr	1,3
Manosa	50,2	4,5	1,2	tr	tr	tr	tr	tr	tr	1,3	2,7
Glucosa	33,3	8,0	6,8	3,4	tr	1,3	--	1,9	1,1	1,7	2,8

2.6.2 Determinación del poder rotatorio

Se midió posteriormente la actividad óptica de cada fracción. Los datos se observan en la columna A de la Tabla 21.

Los poderes rotatorios son similares entre todas las fracciones, teniendo todos valores negativos, aunque las primeras dan los menores valores absolutos seguramente por la ya mencionada contaminación con almidón y la alta proporción relativa de proteína. Los poderes rotatorios están influenciados por estos contaminantes, y además por la presencia de sulfato y otros posibles componentes (la cantidad de hidratos de carbono totales, sulfato y proteínas de las fracciones 1I, 2I, 3I y 8I sólo suma el 70% del total).

Entonces, descontando los componentes que no son hidratos de carbono como peso "muerto", y considerando el almidón⁹⁵ con un $[\alpha]_D = +171,2^\circ$ se calculó la rotación óptica del xilogalactano "puro" de cada fracción (columna B), empleando la ecuación 1.

Tabla 21: (A). Poderes rotatorios experimentales, (B). Calculados según el contenido de galactosa, galactosas monometiladas y β -D-xilosa, (C). Calculados según el contenido de galactosa y galactosas monometiladas.

Fracción	A (°)	B (°)	C (°)
1I	- 17,6	- 94	- 97
2I	- 46,8	- 104	- 109
3I	- 52,7	- 109	- 115
4I	- 70,0	- 90	- 92
4II	- 90,7	- 121	- 133
5I	- 85,9	- 109	- 118
5II	- 99,5	- 117	- 129
5III	- 84,7	- 105	- 112
6I	- 82,9	- 113	- 120
7I	- 67,8	- 106	- 108
8I	- 48,1	- 103	- 105

$$\alpha_{Exp} = x_{XG} \cdot \alpha_{XG} + x_{almidón} \cdot \alpha_{almidón} \Rightarrow \alpha_{XG} = \frac{\alpha_{Exp} - x_{almidón} \cdot \alpha_{almidón}}{x_{XG}} \quad [1]$$

donde α_{Exp} : es el poder rotatorio calculado a partir del dato experimental, considerando el porcentaje de hidratos de carbono de cada fracción.

$\alpha_{almidón}$: es el poder rotatorio del almidón⁹⁵.

x_{XG} y $x_{almidón}$: son las fracciones molares del xilogalactano y del almidón.

Los valores (columna B) se acercan mucho uno al otro, entre -90° y -121° , sugiriendo la existencia de semejanzas en el esqueleto de cada producto.

Para estudiar la contribución de dicho esqueleto a la rotación óptica, es necesario eliminar el efecto de las ramificaciones de xilosa. Este efecto puede suprimirse suponiendo que las cadenas laterales de D-xilosa están unidas por enlaces β , ya que siempre se la ha encontrado con dicha configuración, formando ramificaciones de una sola unidad en productos naturales de este tipo. La configuración β en los residuos de xilosa puede inferirse además, por el hecho de que en la mayoría de las fracciones el poder rotatorio aumenta en valor absoluto con un incremento en el contenido de xilosa, contrariamente a lo que ocurriría si tuviese configuración α . Ambas suposiciones serán confirmadas más adelante (véase pág. 140).

Luego hay que considerar la contribución a la rotación óptica de la llamada "rotación de enlace" de la xilosa. Rees¹¹⁹ demostró que la rotación óptica no debe ser considerada como una suma de contribuciones de especies aisladas, sino como una suma de interacciones entre dichas especies. En este contexto, definió el término rotación de enlace $[\Lambda]$, para una dada longitud de onda, según la siguiente ecuación:

$$[\Lambda] = M_{NR} - \{M_{MeN} + M_R\} \quad [2]$$

donde M_{NR} : es la rotación molecular de un disacárido que contiene un extremo no reductor (N) y un extremo reductor (R).

M_{MeN} : es la rotación molecular del metilglicósido de N con la misma configuración anomérica que en el disacárido.

M_R : es la rotación molecular del azúcar del extremo reductor.

Se supone que el equilibrio de mutarrotación del disacárido y del azúcar libre que constituye su extremo reductor, son equivalentes. La expresión de Λ está definida para un disacárido, pero puede aplicarse de igual manera a un oligo o a un polisacárido.

La rotación molecular M se define de la siguiente manera:

$$M = PM \cdot \frac{\alpha}{100} \quad [3]$$

Sin embargo, considerando que en las fracciones principales la xilosa está unida (1→6) a la galactosa (lo cual se confirmará más adelante, pág. 129), resulta que ambos residuos están separados por tres uniones simples en lugar de dos como en el resto de las posiciones de unión. Esto brinda mayor libertad de movimiento y las interacciones a través de la unión glicosídica serán menos importantes para la rotación óptica, con lo cual la rotación de enlace se puede considerar despreciable^{120,121}. Por lo tanto, de la ecuación [2] se deduce que el poder rotatorio del esqueleto de galactosas puede calcularse restando la contribución de la xilosa al poder rotatorio del xilogalactano que se muestra en la columna B de la Tabla 21. La ecuación empleada es la siguiente:

$$\alpha_{XG} = x_G \cdot \alpha_G + x_X \cdot \alpha_X \Rightarrow \alpha_G = \frac{\alpha_{XG} - x_X \cdot \alpha_X}{x_G} \quad [4]$$

donde α_{XG} : es el poder rotatorio del xilogalactano

x_G y x_X : son las fracciones molares de galactosa y xilosa respectivamente

α_G y α_X son los poderes rotatorios de galactosa y del β -metilxilósido respectivamente

El poder rotatorio del xilósido [α_X] se calculó a partir de la rotación molecular¹²² del metil- β -D-xilopiranosido (M = -106) empleando la ecuación [3] y

considerando el peso molecular del residuo xilopiranosilo igual a 133. El valor obtenido es $-79,7$. Reemplazando en la ecuación [4] y calculando las fracciones molares a partir de los datos de la Tabla 18, se obtuvieron los poderes rotatorios calculados para este hipotético esqueleto de galactosas, que se aprecian en la columna C de la Tabla 21.

Para comparar los valores obtenidos se buscó correlacionar los mismos con algunos datos experimentales provenientes de oligosacáridos con estructuras conocidas. Aunque no se encontraron muchos datos, un trisacárido aislado por hidrólisis parcial del polisacárido de *Anatheca dentata*⁵⁴ cuya estructura es β -D-Galp-(1 \rightarrow 4)- α -L-Galp-(1 \rightarrow 3)-D-Gal, tiene un poder rotatorio de -44° . A partir de este dato puede calcularse, utilizando la ecuación [2], la rotación óptica de un polímero sin una estructura secundaria ordenada (es decir un "random-coil"¹²³), compuesto por la secuencia \rightarrow 4)- α -L-Galp-(1 \rightarrow 3)- β -D-Galp-(1 \rightarrow cuya estructura corresponde al esqueleto básico de los agaranos. El procedimiento de cálculo es el siguiente.

La rotación molecular del galactano viene dada por la siguiente expresión:

$$M_{galactano} = M_{\alpha-L-MeGal} + \Lambda_{\alpha-L-(1\rightarrow3)} + M_{\beta-D-MeGal} + \Lambda_{\beta-D-(1\rightarrow4)} \quad [5]$$

Del mismo modo, la rotación molecular del trisacárido se calcula según la ecuación [6]:

$$M_{trisacárido} = M_{\beta-D-MeGal} + \Lambda_{\beta-D-(1\rightarrow4)} + M_{\alpha-L-MeGal} + \Lambda_{\alpha-L-(1\rightarrow3)} + M_{D-Gal} \quad [6]$$

Comparando ambas ecuaciones se deduce que:

$$M_{trisacárido} = M_{galactano} + M_{D-Gal} \quad [7]$$

Las rotaciones moleculares del trisacárido y de la galactosa se obtuvieron a partir de la ecuación [3], siendo -222 y $+144$ respectivamente. De la ecuación [7] se calcula que $M_{galactano}$ es -366 , y por lo tanto el $[\alpha]_D$ para el galactano es -113° . Dicho dato corresponde a la mediana de los valores presentados en la columna C de la Tabla 21. Este importante resultado sugiere que las estructuras de las fracciones del xilogalactano serían variantes del esqueleto básico de los agaranos, con alternancia de galactosas de las series D y L.

Para estimar el porcentaje de galactosas de ambas series, se hidrolizó la fracción 31 y se midió el poder rotatorio del hidrolizado, obteniéndose un valor para $[\alpha]_D$ de $0,0225^\circ$. Sustituyendo por los valores correspondientes, del mismo modo en que se hizo para los productos FS y CS (véase pág. 70), el porcentaje de D-galactosas es $51,3\%$ y el de L-galactosas, $48,7\%$.

Como en aquella oportunidad las proporciones de ambos enantiómeros son equivalentes, reforzando el concepto de que los "coralinos" presentarían el clásico esqueleto alternante de los agaranos.

En conclusión, aún sin mayores datos estructurales puede postularse para esta familia de polisacáridos el típico esqueleto de galactosas unidas α -(1 \rightarrow 3) y β -(1 \rightarrow 4) en forma alternante, siendo las unidades α de la serie L. Hay sustitución por xilosa en una de cada 3 ó 4 galactosas, sulfato en una de cada 3 galactosas, y O-metilo en la misma proporción que el sulfato, lo que origina un balance entre los grupos metilo hidrofóbicos y los sulfato hidrofílicos. Evidentemente el sistema enzimático del alga equilibra dichas proporciones en función de su actividad biológica. Es interesante considerar que en un mucílago extraído de otra alga calcificada, *Limiliana huxleyi*¹²⁴, perteneciente a una clasificación radicalmente distinta (familia Coccolithophoridae de la clase Prymnesiophyceae), se encontró la misma cantidad de azúcares metilados y de otro grupo ácido, el ácido galacturónico.

2.7 ANÁLISIS POR METILACIÓN

Para confirmar la estructura básica propuesta para los coralinanos y determinar el modelo de sustitución, se estudiaron dichos productos por metilación.

Las metilaciones de polisacáridos han resultado a menudo de compleja realización. El reemplazo del antiguo método de Haworth por la técnica de Hakomori significó una gran mejora, pero seguía presentándose el problema de la baja solubilidad en DMSO de ciertos polisacáridos. La solubilidad es un requisito importante ya que la mayoría de las submetilaciones se deben a una incompleta disolución del sustrato. En estos casos, una porción del material puede ser completamente metilado mientras que la parte insoluble restante permanece sin metilar.

Este problema se presenta comúnmente en la metilación de polisacáridos de algas, ya que muchos de estos compuestos están altamente cargados debido a la presencia de grupos sulfato y por lo tanto son insolubles en DMSO. Para superar este problema los polisacáridos sulfatados pueden, por ejemplo, acetilarse para mejorar la solubilidad¹²⁵ o recurrir al método de Haworth¹²⁶. Sin embargo, ambos procedimientos son difíciles de aplicar además de la pérdida de tiempo y las degradaciones de polisacárido que implican.

Estas complicaciones fueron resueltas recién en esta década con la publicación de un excelente trabajo de Stevenson y Furneaux¹²⁷, en el cual presentaron una modificación al método de Hakomori que consiste en convertir los grupos sulfato en sales de trietilamonio. Esta conversión se realiza dializando el polisacárido contra una solución de clorhidrato de trietilamonio, o bien eluyendo el polímero a través de una columna de intercambio catiónico en forma trietilamonio. Las sales de los polisacáridos sulfatados son estables, son completamente solubles en DMSO, y luego se metilan siguiendo el procedimiento habitual de Hakomori. De esta forma, rápida y sencilla, se logran metilaciones completas en un sólo paso.

Se decidió entonces metilar algunas fracciones (2I, 3I, 4II, 5II y 6I) según una leve modificación a la técnica de Stevenson y Fumeaux, que consiste en emplear como carbanión la sal sódica del DMSO en lugar de la sal potásica, una relación levemente mayor de polisacárido a carbanión y mayores tiempos de reacción¹²⁸. Las sales de trietilamonio se prepararon por diálisis. Sin embargo al disolverlas en DMSO anhidro, la única fracción que produjo una solución límpida fue la 2I. Las demás presentaron partículas en suspensión; por observación la más soluble parecía la 3I, luego seguían la 5II y 4II, y la menos soluble era la fracción 6I.

Se siguió adelante con la metilación, suponiendo que ésta no iba a ser completa por la insolubilidad de los productos. Los polisacáridos "permetilados" fueron hidrolizados, y los monosacáridos obtenidos se derivatizaron como aldononitrilos y alditoles acetilados. En las Tablas 22 y 23 se muestran los resultados.

Los datos confirman que la metilación no fue total. Se observan dos zonas bien definidas en las tablas: una muestra que la metilación fue prácticamente completa, y otra zona indica que no hubo metilación. Esto no responde a una submetilación ya que la xilosa y galactosa no metiladas y las monometilgalactosas, se encuentran en una relación molar parecida a la de los polisacáridos nativos. Este hecho indica que en realidad, hubo bloques o cadenas de polisacárido que no se metilaron debido seguramente a la solubilidad parcial de los productos en el medio de metilación. Esto se confirma observando que las fracciones con mayor cantidad de producto sin metilar eran las menos solubles en DMSO. En efecto, la única fracción metilada en su totalidad es la 2I que fue la que se solubilizó totalmente, y la fracción menos metilada fue la 6I, que como se indicó antes, fue la que presentó mayor cantidad de partículas en suspensión.

Por otro lado, hay ciertas discrepancias entre ambos métodos de derivatización. En los aldononitrilos es mayor la proporción de 2,4,6-tri- y 2,4-di-*O*-metilgalactosa;

por su parte, en los alditoles aumenta el porcentaje de 2,3,6-tri-*O*-metilgalactosa. Estas son las diferencias más importantes y serán analizadas más adelante (pág. 108).

Tabla 22: Análisis por metilación de los coralinanos derivatizados como aldononitrilos acetilados (expresados en moles / 100 moles de galactosas).

Azúcar	2I	3I	4II	5II	6I
2,3,4-Xil	12,9	9,2	15,6	24,0	4,1
2,3,4,6-Gal	19,0	18,4	2,3	1,2	2,6
2,4,6-Gal	12,6	9,4	5,1	5,0	6,6
3,4,6-Gal	6,2	9,4	1,0	tr	tr
2,3,6-Gal	18,8	17,2	17,3	18,3	15,0
2,3,4-Gal	3,0	1,2	tr	tr	tr
2,6-Gal	11,4	12,7	8,3	10,6	7,0
4,6-Gal	1,0	tr	tr	tr	tr
3,6-Gal	2,6	2,7	5,6	6,9	2,5
2,4-Gal	20,0	17,2	36,5	44,9	25,8
2,3-Gal	1,6	1,7	1,0	1,0	2,1
6-Gal	1,5	2,4	1,0	1,0	3,1
2-Gal	1,5	2,4	5,3	3,7	9,0
3-Gal	tr	tr	1,1	tr	1,0
4-Gal	tr	1,5	1,0	tr	1,4
Xil		2,5	9,0	6,3	10,6
Gal	tr	3,0	14,1	6,0	23,2

Tabla 23: Análisis por metilación de los coralinanos derivatizados como alditoles acetilados (expresados en moles / 100 moles de galactosas).

Azúcar	2I	3I	4II	5II	6I
2,3,4-Xil	8,1	7,7	12,3	18,8	3,6
2,3,4,6-Gal	13,8	15,5	1,8	1,0	2,1
2,4,6-Gal	9,0	7,3	3,0	3,0	3,1
3,4,6-Gal	6,4	9,1	tr	tr	tr
2,3,6-Gal	24,1	23,0	22,9	25,6	17,5
2,3,4-Gal	tr	tr	tr	tr	
2,6- + 4,6-Gal	11,4	11,9	7,1	8,9	6,1
3,6-Gal	8,2	5,5	5,8	7,6	2,9
2,4-Gal	18,3	14,7	27,5	34,8	19,5
2,3-Gal	1,7	1,7	tr	1,0	1,4
6-Gal	2,1	2,4	tr	tr	2,0
2-Gal	2,0	2,4	5,5	3,5	9,8
3- + 4-Gal	1,4	1,8	2,6	1,6	2,8
Xil	1,0	3,0	8,7	5,4	9,6
Gal	1,0	4,6	21,8	12,5	32,6

Es muy probable que la baja solubilidad de los productos en DMSO se deba a una conversión incompleta en las sales de trietilamonio. Para optimizar entonces la formación de las sales se empleó la siguiente alternativa. En lugar de dializar el polisacárido contra la solución del reactivo, se pasó cada fracción por una columna de intercambio catiónico equilibrada con clorhidrato de trietilamonio al 5% en agua. Las sales formadas se recuperan fácilmente por elución con agua y, luego de liofilizadas, se

disuelven en DMSO obteniéndose soluciones lípidas en todos los casos. Se metilaron todas las fracciones según la modificación de la técnica de Stevenson y Furneaux¹²⁸, y los polisacáridos permetilados se hidrolizaron y derivatizaron como ya se describió. Las relaciones molares de los monosacáridos parcialmente metilados se muestran en las Tablas 24 y 25.

Tabla 24: Análisis por metilación de los coralinanos según la modificación de la técnica de Furneaux, derivatizados como aldononitrilos acetilados (expresados en moles / 100 moles de galactosas).

Azúcar	1I	2I	3I	4I	4II	5I	5II	5III	6I	7I	8I
2,3,4-Xil	12,5	12,9	14,5	15,5	28,4	30,4	26,1	27,0	20,3	7,9	6,0
2,3,4,6-Gal	19,3	19,0	22,1	12,1	3,1	1,9	1,3	2,2	4,6	8,2	3,6
2,4,6-Gal	14,4	12,6	10,2	8,5	5,3	4,4	4,5	6,5	8,1	14,1	15,3
3,4,6-Gal	6,7	6,2	10,3	3,9	0,8	tr	tr	tr	tr	0,6	
2,3,6-Gal	18,7	18,8	19,2	25,1	25,4	24,2	23,9	27,2	27,8	33,6	33,2
2,3,4-Gal	15,1	3,1	0,8	0,6	tr	tr	tr	tr			
2,6-Gal	4,5	11,4	13,1	8,5	10,4	9,6	9,6	11,0	10,1	6,9	5,7
4,6-Gal	2,0	0,9	tr	1,7	1,0	0,9	0,8	tr	0,9	tr	
3,6-Gal	2,1	2,6	3,1	5,4	7,3	8,6	8,9	7,1	5,4	3,1	3,1
2,4-Gal	15,7	20,0	17,9	33,1	43,1	47,6	49,5	44,8	39,0	31,7	35,9
2,3-Gal		1,6			1,2						
6-Gal	0,7	1,5	2,0								
2-Gal	0,8	1,5	1,0	1,1	2,0	1,8	0,6	0,7	3,6	1,6	3,2

Tabla 25: Análisis por metilación de los coralinanos según la modificación de la técnica de Furneaux, derivatizados como alditos acetilados (expresados en moles / 100 moles de galactosas).

Azúcar	1I	2I	3I	4I	4II	5I	5II	5III	6I	7I	8I
2,3,4-Xil	13,9	8,1	17,0	18,4	25,3	30,0	26,8	45,2	18,9	20,0	7,8
2,3,4,6-Gal	23,6	13,8	28,5	10,3	3,5	1,4	1,0	4,0	2,9	19,7	5,0
2,4,6-Gal	11,1	9,0	5,7	6,5	4,1	3,3	3,4	4,2	6,3	8,3	9,3
3,4,6-Gal	10,8	6,4	13,0	3,4	1,1	tr	tr	tr	tr	1,4	
2,3,6-Gal	20,5	24,1	20,3	34,3	41,3	31,8	32,2	27,1	40,4	26,8	33,3
2,3,4-Gal	8,0	0,7				tr				tr	
2,6-Gal ^a	6,0	10,6	14,6	8,1	11,7	9,1	10,2	15,2	9,4	6,8	6,0
4,6-Gal ^a	2,7	0,8	tr	1,6	1,1	0,9	0,9	tr	0,8	tr	
3,6-Gal	2,6	8,2	2,7	3,8	7,3	9,4	8,7	6,5	4,3	2,3	3,4
2,4-Gal	10,8	18,3	10,7	27,8	26,8	40,7	41,9	37,3	32,5	28,4	32,6
2,3-Gal	1,0	1,7	1,0	1,6	1,0	tr	tr	1,2	1,5	3,6	3,7
6-Gal	1,7	2,1	2,3	0,7	1,1	tr	tr	tr	tr	tr	tr
2-Gal	0,6	2,0	tr	1,4	1,0	0,9	0,6	1,0	0,6	0,9	5,3
3- + 4-Gal	0,6	1,4	0,6	tr		tr		1,0		0,7	1,1
Gal	--	0,9	--	tr	--	tr	tr	1,5	tr	--	--

^a Las cantidades de 2,6- y 4,6-Gal fueron calculadas de acuerdo a la proporción entre ambas obtenida de la Tabla 24.

En la mayoría de las fracciones, la 2,3,4-tri-*O*-metilxilosa, 2,3,6-tri-*O*-metil- y 2,4-di-*O*-metilgalactosa son los azúcares principales, junto con cantidades menores de 2,4,6-tri-*O*-metil-, 2,6-di-*O*-metil- y 3,6-di-*O*-metilgalactosa. Las fracciones con bajo peso molecular y/o ricas en 4-*O*-metilgalactosa (1I a 4I, Tabla 17, pág. 87 y Tabla 18, pág. 89), también producen cantidades importantes de 2,3,4,6-tetra-*O*-metilgalactosa.

Este hecho sugiere que la 4-*O*-metilgalactosa se encuentra unida como cadenas laterales en estos polisacáridos, según se informó previamente en productos similares^{63,98,102}.

Para facilitar su análisis, las Tablas 26 y 27 presentan el ordenamiento por equivalente estructural de cada azúcar parcialmente metilado.

Tabla 26: Análisis por metilación de los coralinanos derivatizados como aldononitrilos acetilados, ordenados según equivalente estructural^a (expresados en moles / 100 moles de galactosas).

Unidad	1I	2I	3I	4I	4II	5I	5II	5III	6I	7I	8I
→3)-Gal ^b	14	13	10	8	5	4	4	7	8	14	15
→3,6)-Gal ^b	16	20	18	33	43	48	50	45	39	32	36
→3,2)-Gal	2	1		2	1	1	1		1		
→4)-Gal	19	19	19	25	26	24	24	27	28	34	33
→4,3)-Gal	4	11	13	9	11	10	10	11	10	7	6
→4,2)-Gal	2	3	3	5	7	9	9	7	5	3	3
→4,6)-Gal		2			1						
→4,3,6)-Gal	1	1	1	1	2	2	1	1	4	1	3
→4,3,2)-Gal	1	2	2								
Xil _t ^c	12	13	15	16	29	30	26	27	20	8	6
Gal _t ^c	19	19	22	12	3	2	1	2	5	8	4
→2)-Gal	7	6	11	4	1					1	
→6)-Gal	15	3	1	1	--	--	--	--	--	--	--

^a Se consideró que 2,6-di-*O*-metil-, 2-*O*- y 6-*O*-metilgalactosa se originan en unidades ligadas por C-4.

^b →3)-Gal = galactosa unida por C-3; →3,6)-Gal = galactosa unida por el C-3 y sustituida en C-6; etc.

^c xil_t = xilosa terminal no reductora, etc.

Tabla 27: Análisis por metilación de los coralinanos derivatizados como alditoles acetilados, ordenados según equivalente estructural^a (expresados en moles / 100 moles de galactosas totales).

Unidad ^b	1I	2I	3I	4I	4II	5I	5II	5III	6I	7I	8I
→3)-Gal	11	9	6	7	4	3	4	5	6	8	10
→3,6)-Gal	11	19	11	28	27	41	42	38	33	29	33
→3,2)-Gal	3	1		2	1	1	1		1		
→4)-Gal	20	25	20	34	41	32	32	28	41	27	34
→4,3)-Gal	6	11	15	8	12	9	10	16	9	7	6
→4,2)-Gal	2	8	3	4	7	10	9	7	4	2	3
→4,6)-Gal	1	2	1	2	1	1		1	2	4	4
→4,3,6)-Gal	1	2		1	1	1	1	1	1	1	5
→4,3,2)-Gal	2	2	2	1	1	1					
Xil _t	14	8	17	18	25	30	27	46	19	20	8
Gal _t	24	14	29	10	4	1	1	4	3	20	5
→2)-Gal	11	6	13	3	1					1	
→6)-Gal	8	1	--	--	--	--	--	--	--	1	--

^a Se consideró que 2,6-di-*O*-metil-, 2-*O*- y 6-*O*-metilgalactosa se originan en unidades ligadas por C-4.

^b Ver pie de Tabla 26.

En la Tabla 28 se muestra el grado de sustitución obtenido por metilación (según cada método de derivatización), comparado con los mismos datos obtenidos por análisis de los componentes del polisacárido. El grado de sustitución por metilación se calculó según la siguiente ecuación:

$$\text{sustitución} = \text{dimetilgalactosas} + 2 \times (\text{monometilgalactosas}) + 2,3,4\text{-Gal} + 3,4,6\text{-Gal}$$

No se consideraron las proporciones de $\rightarrow 3$)-Gal y $\rightarrow 4$)-Gal ya que son la base del esqueleto del polímero, y la Xil₁ y Gal₁ porque no están sustituidas. Se duplicó la cantidad de galactosas monometiladas porque éstas llevan dos sustituyentes. Para calcular el grado de sustitución deducido por análisis directo de los componentes, fueron considerados como sustituyentes sulfato, xilosa y 4-*O*-metilgalactosa. También se presentan las proporciones de uniones (1 \rightarrow 3) y (1 \rightarrow 4) calculadas según los datos de las Tablas 26 y 27.

Tabla 28: Tipo de unión, y grado de sustitución de los coralinanos calculado por metilación y análisis (expresados en moles / 100 moles de galactosa + 2-*O*-metil- + 3-*O*-metil- + 6-*O*-metilgalactosa).

Fracción	Grado de sustitución				Tipo de unión			
	Análisis directo		Metilación		Nitrilos		Alditoles	
	Nitrilos	Alditoles	Nitrilos	Alditoles	1 \rightarrow 3	1 \rightarrow 4	1 \rightarrow 3	1 \rightarrow 4
4II	64	58	70	54	52	48	34	66
5I	65	65	72	65	54	46	46	54
5II	71	68	71	65	56	44	47	53
5III	63	60	66	66	53	47	45	55
6I	63	58	65	53	51	49	41	59
7I	59	nd	49	49	50	50	47	53
8I	82	nd	52	59	53	47	45	55
4I	64	50	63	57	52	48	42	58
3I	69	50	62	57	43	57	29	71
2I	58	54	58	63	47	53	37	63
1I	65	56	54	52	54	46	43	57

El grado de sustitución determinado por análisis directo de los componentes derivatizados como aldononitrilos y alditoles es menor utilizando este último, lo que es una consecuencia de las diferencias ya discutidas entre ambos (Tabla 19, pág. 92); es decir, la menor proporción de xilosa y 4-*O*-metilgalactosa determinada por alditoles. El grado de sustitución obtenido por metilación, en general concuerda mejor con los resultados analíticos cuando se utilizan los datos de aldononitrilos. Además, el tipo de unión se acerca al 50% de enlaces (1→3) y (1→4) empleando los primeros.

Comparando las cantidades de xilosa obtenidas por análisis (Tabla 18, pág. 89) y por metilación, ambos datos concuerdan muy bien para las fracciones 4II-8I, sobre todo en los aldononitrilos. Sin embargo, en las fracciones 1I-4I es menor la cantidad de xilosa determinada por metilación en ambos derivados.

Como ya se mencionó (pág. 100), nuevamente existen discrepancias entre los datos de nitrilos y alditoles para ciertas galactosas metiladas. La diferencia más importante, y que se repite prácticamente en todas las fracciones, es que empleando los alditoles disminuye la proporción de 2,4-di-*O*-metilgalactosa (unidades A) y aumenta aproximadamente en la misma proporción la 2,3,6-tri-*O*-metilgalactosa (unidades B). Es notable también la mayor proporción del 2,4,6-tri-*O*-metilgalactononitrilo (unidades A) en relación al correspondiente alditol, sobre todo en las primeras y últimas fracciones. Estas diferencias son clave, porque la 2,4-di- y la 2,3,6-tri-*O*-metilgalactosa son los productos más importantes de la metilación y curiosamente, al analizar el tipo de unión glicosídica (Tabla 28), se observa que los resultados obtenidos con los aldononitrilos muestran un leve predominio de las uniones (1→3), mientras que para los alditoles ocurre lo contrario, sobre todo en las fracciones 4II, 6I, 4I, 3I y 2I, donde existe una gran diferencia entre ambos tipos de unión. Sin considerar estas anomalías, los datos en conjunto sugieren que existe alrededor de 50% de cada tipo de unión.

Hay otras diferencias que no son generales y se dan sólo en algunas fracciones,

como el aumento de xilosa terminal utilizando los alditoles en las fracciones 5III y 7I respecto de los nitrilos. Estos valores contrastan con los datos de análisis, por lo que fueron considerados erróneos.

En conclusión, los datos obtenidos por aldononitrilos parecen concordar mejor y ser más representativos de la estructura de los coralinanos, que los datos de alditoles. Los estudios que se describirán más adelante apoyan esta afirmación, y por lo tanto para los fines estructurales se considerarán los resultados obtenidos por aldononitrilos.

2.7.1 Análisis de los resultados

Los datos de metilación (tabla 26) confirman que los coralinanos están constituidos por una estructura básica de galactosas unidas por C-3 (unidad A) y C-4 (unidad B). La xilosa forma ramificaciones de una sola unidad en su forma piranósica, al igual que la 4-(*O*)-metilgalactosa.

Pueden distinguirse tres grupos bien definidos dentro de esta familia de polisacáridos. El primero de ellos, el más homogéneo y el más importante por su proporción (60%), es el formado por las fracciones 4II, 5I, 5II y 5III. En estos compuestos la unidad A está sustituida casi en su totalidad en C-6, y en calidad de trazas en C-2, mientras que está libre el OII de la posición 4. La unidad B se encuentra sin sustituir en una proporción algo mayor a la mitad de los residuos, y está sustituida en igual proporción en las posiciones 2 y 3. Se supone que la galactosa disustituida en las posiciones 3 y 4 corresponde a una unidad B (ligada por C-4) con un sustituyente en C-3 y no al revés, porque de esa manera la proporción de unidades A y B coincide con la relación 1:1 que cabría esperar. Los resultados de desulfatación (véase pág. 128) confirman esta suposición. Los sustituyentes son xilosa, sulfato y 4-(*O*)-metilgalactosa. Según los antecedentes mencionados en el capítulo de introducción^{63,98,102}, éste último azúcar siempre se encontró en la posición 6 de la unidad A.

Dentro de este grupo las fracciones 5I y 5II son prácticamente idénticas, difieren sólo en que 5II tiene mayor peso molecular, mientras que las otras dos se diferencian por un leve aumento en la proporción de galactosas sin sustituir.

El segundo grupo, fracciones 6I, 7I y 8I, es el menos importante en proporción (8%), pero mantiene las características generales del anterior aún cuando se observa una menor tendencia a la sustitución. Sin embargo hay que tener en cuenta la mayor proporción de galactosas monometiladas naturales las que, al analizar los datos de metilación, aumentan el porcentaje de galactosas no sustituidas. La fracción 6I es de transición entre ambos grupos ya que es muy parecida a 4II y 5III, con un leve aumento de unidades A y B sin sustituir y una menor proporción de xilosas. Las fracciones 7I y 8I muestran menor tendencia a la sustitución, aunque en ellas es mayor el porcentaje de galactosas monometiladas naturales, y hay una pronunciada disminución en la cantidad de xilosa. Ambos productos son casi idénticos, la única diferencia es que la 7I tiene un mayor porcentaje de 4-*O*-metilgalactosa, lo que se traduce en la presencia del doble de galactosas terminales que en la 8I. La proporción de unidades A y B es prácticamente 1:1; se observa además, una cantidad muy elevada de sulfato, sobre todo en 8I, que seguramente se origina en la presencia de sulfato inorgánico (Tablas 18 y 28).

Finalmente, el tercer grupo que representa un 32% de la familia de los coralinanos, comprende las fracciones 1I, 2I, 3I y 4I, las primeras en eluir. Este grupo es el más diferente y complicado estructuralmente. En general se repite el mismo modelo del grupo principal, con algunas particularidades. En las unidades B, hay un ligero aumento en los sustituyentes (principalmente en 3I y 2I). En las unidades A disminuye el grado de sustitución, lo que se hace evidente al pasar de la fracción 4I (de "frontera" con el primer grupo) hacia la 1I, fracción que presenta una drástica disminución del mismo (Tabla 26). Sin embargo, en esta fracción aparece una inesperada e importante sustitución en el C-6. Esto puede deberse a la inusual

presencia de galactosas ligadas por C-6 sin sustituir; o bien, a galactosas terminales no reductoras que están sustituidas en 6 y que podrían constituir los extremos no reductores del polisacárido II que es de bajo peso molecular. El mismo criterio se puede aplicar al alto grado de sustitución en C-2 (en todas las fracciones de este grupo, pero sobre todo en la 3I).

Además, en comparación con los otros dos grupos de fracciones, hay un aumento en la proporción de galactosas terminales que concuerda muy bien con el contenido de 4-*O*-metilgalactosa (sobre todo en 3I y 4I). En 1I y 2I hay que tener en cuenta además su muy bajo peso molecular. Otro hecho notable de este grupo es la disminución de la cantidad de xilosa, lo que fue sugerido de acuerdo al análisis de azúcares componentes (véase Tabla 18, pág. 89).

Por último, en este grupo el grado de sustitución es menor de lo que se esperaría de acuerdo a los datos analíticos, sobre todo para las fracciones 1I y 3I. Respecto de 3I la diferencia puede surgir de una sobrevaluación en la cantidad de 4-*O*-metilgalactosa determinada por nitrilos, teniendo en cuenta el dato analítico de alditoles; mientras que en la 1I, además de la alta proporción de xilosa, parece estar sobrevaluado el sulfato (como en la 8I).

Por otro lado, es notable la menor proporción de xilosa obtenida por metilación respecto de la cuantificada por nitrilos, lo cual también ocurre en el grupo principal aunque en mucha menor medida. Por ahora no es posible dar una explicación a este hecho.

2.8 ANÁLISIS POR ETILACIÓN

Los coralinanos se caracterizan por las proporciones importantes de galactosas monometiladas en las cuatro posiciones posibles. Los estudios de metilación no permiten determinar la posición en la que se encuentran dichas unidades, y para ello se desarrolló un nuevo aspecto del método de etilación. En este capítulo se expondrá su aplicación específica a los coralinanos, mientras que el desarrollo de la técnica y su aplicación general se describirán más adelante (Capítulo III, pág. 164).

Se etilaron todas las fracciones, salvo la 7I y 8I por falta de material suficiente, siguiendo la técnica de Stevenson y Furneaux¹²⁷. Los polisacáridos peretilados fueron hidrolizados y derivatizados como aldononitrilos y alditoles acetilados, y los datos obtenidos se observan en las Tablas 29 y 30.

Los resultados según aldononitrilos y alditoles concuerdan bastante bien, aunque se mantienen las diferencias ya mencionadas entre ambos derivados (pág. 108). La principal es el aumento, en alditoles, de las 2,3,6-tri-*O*-alquilgalactosas (unidades B), y la disminución de la 2,4,6-tri- y 2,4-di-*O*-etilgalactosa (unidades A), respecto de nitrilos. Es decir, los alditoles tienden a sobrevaluar las unidades B. Es de destacar que este comportamiento se observó aún en mayor proporción en el análisis por metilación.

Además en los alditoles de las fracciones 1I a 4I, la relación entre 3,6-di-*O*-etil-2-*O*-metil- y 2,3,6-tri-*O*-etilgalactosa, es mucho mayor que en nitrilos. En efecto, en estos últimos derivados, ambas alquilgalactosas están en proporciones equivalentes, mientras que en alditoles la 3,6-di-*O*-etil-2-*O*-metilgalactosa es 38% mayor en promedio, que la 2,3,6-tri-*O*-etilgalactosa.

Por otra parte, en alditoles no fue posible detectar la presencia de 3,6-di-*O*-etil-4-*O*-metil- y 2,4-di-*O*-etil-6-*O*-metilgalactosa, mientras que en nitrilos, la 3,6-di-*O*-etil-4-*O*-metil- y la 2,3,4-tri-*O*-etilgalactosa no pueden separarse, y no pudo ubicarse el pico correspondiente a la 4-*O*-etil-2-*O*-metilgalactosa.

Tabla 29: Análisis por etilación de los coralinanos derivatizados como aldononitrilos acetilados (expresados en moles / 100 moles de galactosas totales).

Posición del <i>O</i> -alquilo	Posición del <i>O</i> -metilo	Fracción								
		1I	2I	3I	4I	4II	5I	5II	5III ^a	6I
2,3,4-Xil	--	19,1	18,0	27,3	24,9	50,4	46,7	56,0	40,1	25,2
2,3,4,6-Gal		7,0	9,6	9,6	4,0	0,8	0,6	tr	0,8	0,9
2,3,4,6-Gal	2	6,7	6,4	5,9	1,4	tr	tr		tr	tr
2,3,4,6-Gal	3	1,6		--						
2,3,4,6-Gal	4	1,4	6,9	11,4	7,2	2,6	0,7	0,8	1,9	3,4
3,4,6-Gal		4,1	4,4	7,3	1,0	tr	--		--	
3,4,6-Gal ^b	4	3,4	4,3	4,4	3,6	0,9	0,7		0,9	0,7
2,3,4-Gal	3	1,6			tr		tr		--	
2,4,6-Gal		11,2	9,0	9,4	6,3	4,6	3,9	4,4	3,9	4,8
2,4,6-Gal	6	2,5	1,8	1,3	1,4	1,1	0,7	0,6	1,7	3,4
2,3,6-Gal		17,1	9,2	7,6	11,6	12,6	10,9	11,1	12,6	13,8
2,3,6-Gal	2	12,0	9,7	8,8	11,0	11,5	10,9	11,3	13,5	13,0
2,3,6-Gal	3	2,3	1,7	0,6	2,9	4,0	4,5	3,6	3,7	2,5
2,6-Gal		5,6	9,9	9,3	13,3	10,3	11,0	11,0	12,2	11,8
4,6-Gal		1,0			--		--			--
3,6-Gal		3,9	4,0	1,8	5,2	8,3	11,3	9,2	8,1	5,3
2,4-Gal		14,5	17,2	20,1	27,0	41,3	41,6	46,3	37,8	37,4
2,3-Gal		1,9	1,2		0,7		tr		tr	tr
2-Gal			tr		0,6		0,6			tr
3-Gal		tr	1,1		0,7	tr	tr	tr	tr	tr
4-Gal					0,9	0,6	0,7	tr	0,8	0,6
6-Gal		1,6	3,1	2,9	1,2	0,6	0,6	tr	1,0	0,7

^a La fracción 5III contiene trazas de 2,3-di-*O*-etil-4-*O*-metilxilosa.

^b La 2,3,4-tri-*O*-etilgalactosa cocluye con la 3,6-di-*O*-etil-4-*O*-metilgalactosa.

Tabla 30: Análisis por etilación de los coralinanos derivatizados como alditoles acetilados (expresados en moles / 100 moles de galactosas totales).

Posición del <i>O</i> -alquilo	Posición del <i>O</i> -metilo	Fracción								
		11	21	31	41	4II	51	5II	5III	61
2,3,4-Xil		16,9	12,9	20,9	22,0	38,1	45,0	41,6	31,9	17,0
2,3,4,6-Gal		13,0	8,9	8,8	5,3	1,0	0,6	tr	0,8	1,3
2,3,4,6-Gal	2	6,0	4,7	4,4	1,2	0,7	tr	tr	tr	tr
2,3,4,6-Gal	3	3,2	4,5						tr	0,7
2,3,4,6-Gal	4	7,2	9,4	10,9	8,9	1,7	0,9	0,6	1,4	2,9
3,4,6-Gal ^a		8,1	6,0	7,7	1,9	tr	tr		tr	tr
2,3,4-Gal		3,4	1,0		2,2	0,8	0,9	0,6	0,7	
2,4,6-Gal ^a		6,0	5,8	5,3	4,1	2,8	2,6	3,3	2,9	3,8
2,3,6-Gal		8,1	8,3	9,3	8,2	11,9	11,7	13,9	14,4	15,7
2,3,6-Gal	2	11,4	15,0	14,2	14,5	13,5	13,0	14,3	14,9	16,5
2,3,6-Gal	3	1,8	3,8	1,2	3,2	6,3	6,8	5,2	3,9	3,3
2,6-Gal		9,3	9,2	16,4	15,0	11,6	11,3	12,4	11,5	11,0
3,6-Gal		3,5	2,5	3,3	4,8	9,3	10,2	9,9	7,0	5,3
2,4-Gal		10,9	10,5	13,8	18,5	37,4	35,3	37,9	33,7	32,7
2,4-Gal	2	1,3	3,4		4,9	tr	1,7	tr	3,5	2,2
2,3-Gal		2,1	2,1	1,8	1,9	0,7	0,7	0,6	0,9	1,1
2-Gal		0,9	2,2		2,3		2,0		1,4	1,3
3-Gal		1,6			0,9	0,8	1,0		0,8	0,8
6-Gal	--	2,2	2,7	2,9	2,2	0,7	0,7	tr	1,0	0,7

^a No se detectó la presencia de 3,6-di-*O*-etil-4-*O*-metil- y 2,4-di-*O*-etil-6-*O*-metilgalactosa

Las diferencias marcadas entre ambos derivados conducen a que el tipo de unión deducido de los datos de alditoles sea preponderantemente (1→4) en la mayoría de las fracciones, mientras que por nitrilos los datos se aproximan a una relación cercana a la unidad para ambos tipos de unión glicosídica. Sin embargo estas diferencias son menores que en el caso de la metilación. En la etilación, los datos obtenidos por alditoles convergen hacia los resultados de aldononitrilos sugiriendo que éstos son los más precisos. Por lo tanto, para las deducciones estructurales se utilizarán los datos de nitrilos. Los alditoles serán considerados en los casos mencionados en que los aldononitrilos no permiten identificar y/o cuantificar a los azúcares parcialmente alquilados.

2.8.1 Análisis de los resultados

Los datos obtenidos muestran que no hubo subetilación, y los resultados concuerdan bien con los de metilación (véase pág. 103), aunque la cantidad de tri-(*-*)-alquilxilosa es significativamente mayor (80% en promedio, salvo la fracción 6I). Nuevamente, no es posible explicar este hecho. Existe un ligero incremento, proporcional en cada fracción, de las unidades B sin sustituir. De todos modos, la diferencia es pequeña y la relación de unidades A y B es cercana al 50%.

Por otra parte, la suma de los productos provenientes de azúcares monometilados, especialmente 2-(*-*)- y 3-(*-*)-metilgalactosa, es menor que la determinada por análisis directo de los azúcares componentes derivatizados como aldononitrilos (Tabla 18, pág. 89). Sin embargo, coinciden mejor con el análisis de los monosacáridos derivatizados como alditoles, cuya menor estimación de azúcares monometilados fue mencionada en la página 91.

Los datos fueron reordenados por su equivalente estructural como se muestra en la Tabla 31.

Tabla 31: Resultados de etilación ordenados según el equivalente estructural de los azúcares parcialmente alquilados (expresados en residuos cada 100 galactosas de cadena).

Unidad ^a	1I	2I	3I	4I	4II	5I	5II	5III	6I
→3)-Gal	13	11	13	7	5	4	4	4	5
→3)-6-Gal	3	2	2	2	1			2	3
→3,6)-Gal	17	22	28	31	44	43	48	39	40
→3,6)-2-Gal	2	4		6		2		3	2
→3,2)-Gal	1								
→4)-Gal	20	12	10	13	14	11	11	13	15
→4)-2-Gal	14	12	12	12	12	11	12	14	14
→4)-3-Gal	3	2		3	4	5	4	4	3
→4,3)-Gal	7	13	13	15	11	12	11	12	12
→4,2)-Gal	5	5	2	6	9	12	10	8	6
→4,6)-Gal	2	2							
→4,3,2)-Gal	2	4	4	1				1	
Xil ₁	23	23	37	28	54	49	58	41	27
Gal ₁	8	12	13	4					1
4-Gal ₁	2	9	16	8	3			2	4
2-Gal ₁	8	8	8	2					
3-Gal ₁	2								
→2)-Gal	5	6	10	1					
→2)-4-Gal		4	6	1					
→6)-Gal	4	1		2					
→6)-3-Gal	2	--	--	--	--	--	--	--	--

^a →3)-Gal = galactosa unida por C-3; →3)-6-Gal = 6-*O*-metilgalactosa unida por C-3 →3,6)-Gal = galactosa unida por el C-3 y sustituida en C-6; etc.

Al no contar con datos de las fracciones 7I y 8I, los coralinanos se agruparon en dos categorías incluyéndose a la fracción 6I dentro del grupo principal.

Los resultados permiten determinar claramente la ubicación de los grupos metoxilo en el polisacárido. La 4-*O*-metilgalactosa se encuentra como grupo terminal o en algunos casos sustituida en la posición 2. La 2-*O*-metilgalactosa forma parte de la cadena ligada principalmente por C-4, y en baja proporción unida por C-3 y sustituida en la posición 6. En las Fracciones 1I-4I aparece también como grupo terminal. La 3-*O*-metilgalactosa es un componente del esqueleto del polímero unida por C-4, y en una fracción se encuentra como grupo terminal y sustituida en la posición 6. Finalmente, la 6-*O*-metilgalactosa forma parte de la cadena ligada exclusivamente por C-3.

Es decir, las galactosas monometiladas nunca aparecen en la misma unidad monomérica con otro sustituyente, salvo en la pequeña proporción de 2-*O*-metil- y 4-*O*-metilgalactosa sustituidas en C-6 y C-2 respectivamente. Por lo tanto, los azúcares metilados naturales no están sustituidos ni por xilosa ni por sulfato y este hecho notable muestra un importante grado de regularidad en la aparente diversidad estructural de los coralinanos.

La 2-*O*-metilgalactosa, que es la más abundante, aparece en pequeñas proporciones en la unidad A, pero forma alrededor del 43% de las unidades B. La 3-*O*-metilgalactosa sólo aparece en la unidad B, formando en promedio el 14% de las mismas sin sustituir. La 6-*O*-metilgalactosa sólo forma parte de la cadena en la unidad A, en baja proporción, mientras que la 4-*O*-metilgalactosa es un grupo terminal como cabía esperar^{63,98,102}.

Esto permitiría deducir, considerando que las unidades B pertenecen a la serie L, y las A a la serie D, que tanto la 2-*O*-metil- como la 3-*O*-metilgalactosa son de la serie L, mientras que la 6-*O*-metilgalactosa pertenece a la serie D (véase pág. 133).

Estructuralmente, el grupo principal, como ya se dedujo a partir de los

resultados de metilación, es muy homogéneo, observándose alguna divergencia menor en las fracciones 5III y 6I.

En el segundo grupo, hay un aumento de 4-*O*-metilgalactosa terminal que coincide con los datos analíticos, ya que estas fracciones son las más abundantes en dicho azúcar. Existe también 2-*O*-metilgalactosa y, en la fracción 1I, 3-*O*-metilgalactosa terminales, pero esto puede deberse al menor peso molecular de estas fracciones y de ahí la aparición de dichos residuos como unidades terminales.

Finalmente, respecto de la metilación, en la fracción 1I hay una menor proporción de unidades sustituidas en C-6. En aquella oportunidad fue de 15%, mientras que por etilación llega al 3%, al que hay que sumar un 2% de 3-*O*-metilgalactosa sustituidas en C-6.

2.9 ANÁLISIS POR DESULFATACIÓN–METILACIÓN

Resumiendo los resultados obtenidos, la sustitución principal en los coralinanos tiene lugar en la posición 6 de las unidades A, y en las posiciones 2 y 3 de las unidades B. Los sustituyentes son xilosa, sulfato, metoxilo y 4-*O*-metilgalactosa, pero el análisis por metilación o etilación sólo indica las posiciones que están sustituidas y no brinda información sobre la naturaleza del sustituyente. Además, la metilación de esta clase de polisacáridos origina cantidades importantes de azúcares dimetilados, y en consecuencia no puede establecerse cuál es la posición de unión glicosídica y cuál la de sustitución.

En la sección anterior se analizó la técnica de etilación, que permite determinar la ubicación de los grupos metoxilo. Respecto de los grupos sulfato, se han desarrollado diferentes métodos de desulfatación los cuales, por metilación del polisacárido desulfatado, permiten precisar la posición de los ésteres sulfato en el polímero, por comparación con los resultados de metilación del polisacárido nativo.

2.9.1 Desulfatación ácida

Existen dos técnicas de desulfatación: la desulfatación ácida y la solvolítica. La desulfatación ácida es un método eficiente para eliminar los grupos sulfato, pero presenta el inconveniente de producir degradaciones en los polisacáridos por hidrólisis de las uniones glicosídicas. Rees¹⁰ aplicó el método a la desulfatación del λ -carragenano, y si bien logró eliminar el 95 % del sulfato, se produjo una despolimerización importante. Los resultados indicaron que se hidrolizó una de cada siete uniones glicosídicas.

El método de desulfatación ácida resulta adecuado para polisacáridos cuyas características confieren cierta estabilidad a la unión glicosídica. El ejemplo más

común es el de la condroitina¹²⁹, que por poseer ácidos urónicos, tiene uniones glicosídicas difíciles de hidrolizar y por lo tanto la degradación es mínima. Un caso interesante es la desulfatación del polisacárido de *Phyllimena corned*⁶⁶ (véase pág. 29), que presenta una alta proporción (25%) de azúcares metilados principalmente en C-2, y en menor medida en las posiciones 4 y 6. Dicho compuesto fue totalmente desulfatado con HCl metanólico 0,15 M con muy buen rendimiento. Si bien este compuesto no contiene ácidos urónicos, la presencia de galactosas metiladas estabiliza las uniones glicosídicas^{130,131}, y la degradación es menor.

2.9.2 Desulfatación solvolítica

Los hechos enumerados muestran que la desulfatación ácida presenta inconvenientes en su aplicación a polisacáridos que no contengan cantidades importantes de ácidos urónicos o de azúcares metilados, debido a la hidrólisis del polímero. Se intentó el uso de diferentes ácidos sin obtener resultados positivos hasta que el grupo de Usov y Kochetkov decidió encarar el problema por un camino diferente, y es así que comenzaron a estudiar la desulfatación solvolítica, es decir, por la acción de solventes orgánicos.

Dichos autores, considerando la reversibilidad de la reacción del trióxido de azufre con monosacáridos en piridina¹³², estudiaron la desulfatación de monosacáridos sulfatados utilizando como solventes dioxano, dimetilsulfóxido y piridina. Los mejores resultados se obtuvieron utilizando DMSO con 2 % de piridina, sobre la sal de piridinio de los polisacáridos¹³³.

Posteriormente, Nagasawa *et al*¹³⁴ presentaron una modificación del método empleando DMSO con el agregado de 10 % de metanol sobre las sales de piridinio de los polisacáridos. Si bien sus resultados muestran que el uso de DMSO/metanol es superior a la desulfatación ácida, la comparación favorable que los autores establecen

respecto del empleo de DMSO/piridina no es válida ya que éste método no se aplicó sobre las sales de piridinio como aconsejaron Usov y Kochetkov¹³³.

2.9.3 DESULFATACIÓN DE LOS POLISACÁRIDOS DE *CORALLINA OFFICINALIS*

2.9.3.1 Desulfatación solvolítica

En primer lugar, se aplicaron las dos variantes de desulfatación solvolítica: una reacción utilizando DMSO/Py, y otra con DMSO/metanol. Para la preparación de las sales de piridinio se eluye el polímero a través de una resina catiónica fuerte en forma piridinio. Los productos liofilizados se desulfataron en DMSO con 2% de piridina (fracción 5II) y 10% de metanol (fracción 4II); luego de diálisis y liofilización se obtuvieron los productos desulfatados con 96% y 88% de rendimiento respectivamente. Antes de metilar se determinó el porcentaje de sulfato y los azúcares componentes. En la Tabla 32 se observan los resultados.

Tabla 32: Sulfato y azúcares componentes de los productos nativos y de desulfatación solvolítica, derivatizados como aldononitrilos acetilados (en moles / 100 moles de galactosas totales).

Fracción	Xil	2-Gal ^a	3-Gal ^a	4-Gal ^a	6-Gal ^a	Gal	Sulfato
5II	33,5	23,4	7,1	1,2		68,3	14,7
5II-DS ^b	31,1	24,5	6,8	1,6	--	67,1	7,5
4II	27,1	23,6	7,0	2,3	tr	67,1	12,5
4II-DS ^c	29,1	16,9	6,3	1,9	tr	74,9	9,7

^a 2-Gal = 2-(*O*)-metilgalactosa, etc.

^b Fracción desulfatada en DMSO / piridina.

^c Fracción desulfatada en DMSO / metanol.

El grado de desulfatación es de aproximadamente 50% empleando DMSO/piridina, y la composición del polisacárido se mantuvo prácticamente constante, con lo que no hubo pérdidas de xilosa. En la reacción con DMSO/metanol el grado de desulfatación fue sólo de 22% y la composición muestra una disminución en el contenido de galactosas metiladas, sobre todo de 2-*O*-metilgalactosa.

Los polisacáridos desulfatados fueron metilados por el método de Hakomori, pero al intentar disolver en DMSO el producto desulfatado con DMSO/piridina, se obtuvo un residuo insoluble. La parte soluble se metiló directamente, mientras que el residuo fue tratado con clorhidrato de trietilamonio de la manera descrita en la página 102. La sal formada pudo metilarse sin problemas por Hakomori y los resultados para ambas partes, junto con el desulfatado en DMSO/metanol, se muestran en la Tabla 33. Para facilitar su análisis, estos datos se reordenaron por el equivalente estructural de cada azúcar parcialmente metilado y se aprecian en la Tabla 34.

Los resultados muestran que no hubo degradación, ya que no hay aumento de las galactosas terminales, pero tampoco hubo un grado de desulfatación importante, es decir que el sulfato está subvaluado de alguna manera en la determinación analítica. Sin embargo, estos datos permiten inferir la presencia de sulfato en la posición 6 de la unidad A, y en C-2 y C-3 de la unidad B para ambas fracciones.

Por otra parte, las dos fracciones del compuesto desulfatado con DMSO/piridina, soluble e insoluble en DMSO, son prácticamente iguales. En comparación, el producto insoluble tendría más desulfatada la posición 3 de la unidad B (Tabla 34).

Tabla 33: Resultados de metilación de los productos desulfatados en DMSO/Py (Fracción 5II), soluble e insoluble en DMSO, y en DMSO/metanol (Fracción 4II). Se incluyen también, para comparar, los datos de metilación de los polisacáridos nativos (expresados en moles / 100 moles de galactosas totales).

Azúcar	5II	5II-DS _{sol} ^a	5II-DS _{ins} ^a	4II	4II-DS ^a
2,3,4-Xil	26,1	31,4	20,8	28,4	27,7
2,3,4,6-Gal	1,3	1,4	1,1	3,1	3,4
2,4,6-Gal	4,5	6,2	5,1	5,3	7,3
3,4,6-Gal	tr	tr	tr	0,8	1,0
2,3,6-Gal	23,9	25,4	27,9	25,4	27,5
2,3,4-Gal	tr		tr	tr	tr
2,6-Gal	9,6	8,4	7,1	10,4	7,3
4,6-Gal	0,8	0,8	tr	1,0	tr
3,6-Gal	8,9	7,9	9,2	7,2	6,3
2,4-Gal	49,5	46,8	47,4	43,1	44,1
2,3-Gal		tr	0,6	1,2	tr
2-Gal	0,6	1,0	0,6	2,1	1,0
3-Gal		tr	tr		
4-Gal		tr	tr		
Gal	tr	1,3	--	--	0,6

^a DS significa productos desulfatados

Tabla 34: Datos de metilación según el equivalente estructural de cada azúcar parcialmente metilado.

Unidad	5II	5II-DS _{sol} ^c	5II-DS _{ins} ^c	4II	4II-DS ^c
→3)-Gal ^a	4	6	5	5	7
→3,6)-Gal ^a	50	48	48	43	45
→3,2)-Gal	1	1		1	1
→4)-Gal	24	26	28	26	28
→4,3)-Gal	10	9	7	11	7
→4,2)-Gal	9	8	9	7	6
→4,6)-Gal			1	1	1
→4,3,6)-Gal	1	1	1	2	1
Xil _t ^b	26	32	21	29	28
Gal _t	1	1	1	3	3
→2)-Gal	--	--	--	1	1

^a →3)-Gal = galactosa unida por C-3; →3,6)-Gal = galactosa unida por el C-3 y sustituida en C-6; etc.

^b xil_t = xilosa terminal no reductora.

^c DS = productos desulfatados.

2.9.3.2 Desulfatación ácida

Se decidió entonces realizar una desulfatación ácida con HCl/CH₃OH utilizando resina ácida fuerte y NaCl para generar HCl en medio anhidro. Se agita a temperatura ambiente durante 12 horas y por diálisis y liofilización se obtienen los polisacáridos desulfatados. Se trataron las fracciones 3I, 4I, 4II, 5I, 5II y 5III. Los datos analíticos se observan en la Tabla 35.

Se obtuvieron buenos rendimientos para todas las fracciones (alrededor de

Tabla 35: Análisis de las fracciones desulfatadas en HCl / CH₃OH^a.

	3I-DS ^b	4I-DS ^b	4II-DS ^b	5I-DS ^b	5II-DS ^b	5III-DS ^{b,c}
Rend ^d .	90	96	96	88	78	86
Rend.(%) ^c	86	60	74	69	nd	76
Xilosa ^f	14 (-5)	23 (0)	24 (-4)	30 (-1)	31 (-2)	22 (-3)
2- <i>O</i> -MeGal ^f	22 (-6)	18 (-4)	17 (-7)	17 (-6)	18 (-6)	20 (-5)
3- <i>O</i> -MeGal ^f	2 (-1)	4 (-2)	5 (-2)	6 (-3)	5 (-3)	4 (-1)
4- <i>O</i> -MeGal ^f	13 (-3)	7 (-4)	2 (-0)	<1 (-1)	<1 (-1)	2 (+1)
Galactosa ^f	62 (+10)	71 (+11)	76 (+9)	76 (+9)	77 (+9)	73 (+10)
GP ^g	22 (-34%)	25 (-68%)	45 (-66%)	44 (-79%)	nd	38 (-51%)
Sulfato ^h	9 (+38%) ⁱ	6 (-44%)	7 (-42%)	11 (-11%)	6 (-60%)	12 (-19%)

^a Se muestran entre paréntesis las diferencias con los productos nativos.

^b DS = fracción desulfatada.

^c No se encontró 6-*O*-metilgalactosa (4% en el producto nativo).

^d mg de producto desulfatado recuperados cada 100 mg de fracción.

^e Porcentaje recuperado calculado por determinación colorimétrica de azúcares.

^f Expresado en moles cada 100 moles de [galactosa + galactosas metiladas].

^g Grado de polimerización, calculado por mediciones de poder reductor.

^h Porcentaje (expresado como NaSO₃).

ⁱ Ver texto.

nd = no determinado.

90%). Es probable que la proporción de sulfato en los productos desulfatados esté subestimada, ya que los resultados de metilación (Tablas 36 y 37), indican que se perdieron cerca de la mitad de los grupos sulfato. Estos resultados en el análisis de sulfato pueden deberse a la presencia de sales inorgánicas que interfieran en la determinación turbidimétrica (pág. 110), por ejemplo, en la fracción 3I se observa un aumento de 38 % en la proporción de sulfato luego de la desulfatación. Fueron

eliminadas, pequeñas cantidades de xilosa probablemente debido a la mayor susceptibilidad de las cadenas laterales a la hidrólisis ácida. También es significativamente menor, el grado de polimerización de todas las fracciones desulfatadas, aunque los productos siguen siendo poliméricos.

Se produjo además una disminución significativa en los porcentajes de galactosas metiladas. Este hecho podría deberse a demetilación o a pérdidas no estadísticas por diálisis, aunque este resultado, junto con los obtenidos por etilación (pág. 115) y por derivatización como alditoles acetilados de las fracciones originales (pág. 91), puede indicar una sobreestimación de las galactosas monometiladas en los análisis por aldononitrilos de los polisacáridos nativos, que por algún motivo ignorado no se observa en estos polisacáridos desulfatados.

Esta disminución de las galactosas monometiladas en los productos desulfatados, también fue informada por Nunn y Parolis⁶⁰ cuando estudiaron el polisacárido de *Aeodes orbitosa*, quienes encontraron que en la desulfatación con HCl / CH₃OH se eliminaban algunos residuos de galactosa y 2-(-)-metilgalactosa. Además, tampoco lograron condiciones que permitieran una desulfatación completa del polímero.

2.9.4 Metilación de los polisacáridos desulfatados

Los productos desulfatados fueron luego metilados por el método de Furneaux¹²⁷, y los resultados obtenidos se observan en la Tabla 36. Para facilitar su análisis, en la Tabla 37 se reordenaron los datos por la significación estructural de cada derivado parcialmente metilado.

Al analizar los resultados de metilación, hay que tener en cuenta que la desulfatación con cloruro de hidrógeno metanólico produce cierto grado de ruptura de las uniones glicosídicas del polisacárido y además, las diferentes uniones muestran

distinta susceptibilidad al ataque por agentes ácidos. Por lo tanto, cada tipo de unión puede no estar presente en las mismas proporciones en los polisacáridos nativos y desulfatados. Sin embargo, al comparar los resultados de metilación para ambos productos, se pueden obtener conclusiones importantes respecto de la ubicación de los grupos sulfato.

Tabla 36: Resultados de metilación de las fracciones desulfatadas con HCl / CH₃OH (expresados en moles / 100 moles de galactosas totales).

Azúcar	3I-DS^a	4I-DS^a	4II-DS^a	5I-DS^a	5II-DS^a	5III-DS^a
2,3,4-Xil	19,4	24,7	70,7	43,7	36,4	35,3
2,3,4,6-Gal	25,7	9,7	4,3	3,4	1,4	3,5
2,4,6-Gal	13,4	12,1	14,1	11,4	10,8	19,2
3,4,6-Gal	9,2	4,2	1,2	0,6	tr	tr
2,3,6-Gal	24,1	33,3	26,8	41,9	37,5	37,6
2,3,4-Gal	1,1	tr	1,1	1,1	tr	0,6
2,6-Gal	8,8	6,7	3,8	2,1	3,1	2,3
4,6-Gal	tr	tr	tr	0,6	tr	tr
3,6-Gal	tr	1,1	1,2	0,9	2,0	0,6
2,4-Gal	15,6	32,5	47,0	37,8	41,6	35,5
2,3-Gal					1,0	
6-Gal	0,7			tr		
2-Gal	tr				0,9	
4-Gal	tr	--	tr	tr	tr	tr

^a DS significa fracción desulfatada.

Tabla 37: Datos de metilación de los productos desulfatados^a según el equivalente estructural de cada azúcar parcialmente metilado, y comparación con los productos nativos.

Unidad ^b	3I	3I-DS	4I	4I-DS	4II	4II-DS	5I	5I-DS	5II	5II-DS	5III	5III-DS
→3)-Gal	10	14	8	12	5	14	4	11	4	11	7	19
→3,6)-Gal	18	16	33	33	43	48	48	38	50	42	45	36
→3,2)-Gal	--	1	2		1		1	1	1			
→4)-Gal	19	24	25	33	26	27	24	42	24	38	27	38
→4,3)-Gal	13	9	9	7	11	4	10	2	10	3	11	2
→4,2)-Gal	3		5	1	7	1	9	1	9	2	7	1
→4,6)-Gal	--				1					1		
→4,3,6)-Gal	1		1		2		2		1	1	1	
→4,3,2)-Gal	2	1										
Xil ₁	15	19	16	25	29	71	30	44	26	37	27	35
Gal ₁	22	26	12	10	3	4	2	3	1	2	2	3
→2)-Gal	11	9	4	4	1	1		1				
→6)-Gal	1	1	1	--	--	--	--	--	--	--	--	1

^a DS = fracciones desulfatadas.

^b →3)-Gal = galactosa unida por C-3; →3,6)-Gal = galactosa unida por C-3 y sustituida en C-6; etc.

Con la desulfatación ácida se obtuvieron resultados interesantes. Por ejemplo, para la fracción 5II la disminución de 8% en →3,6)-Gal y del 7% en →4,3)-Gal y →4,2)-Gal coincide con un incremento del 7% en →3)-Gal y del 14% en →4)-Gal, indicando que el sulfato está ubicado en el C-6 de las unidades A y en las posiciones 2 y 3 de las unidades B. En estas dos últimas posiciones la sustitución disminuye hasta casi desaparecer, mientras que en la unidad A el C-6 queda sustituido en proporción

importante. Esto indicaría que la xilosa se encuentra unida a esa posición, aunque no puede descartarse su presencia en cantidades menores en las posiciones 2 y 3 de la unidad B.

En el resto de las fracciones se observa una tendencia similar. En general se deduce que en la posición 6 de la unidad A hay una pequeña cantidad de sulfato, pero que mayoritariamente está ocupada por xilosa y, tal vez, por 4-(*O*)-metilgalactosa. Los datos coinciden muy bien para las fracciones 3I, 5I, 5II y 5III, pero no tanto en 4I y 4II donde el incremento en las galactosas ligadas sólo por C-3, no está acompañado de una disminución de las galactosas disustituidas en 3 y 6. En estas mismas fracciones habría indicios de la presencia de sulfato en C-2 de dicha unidad.

En las unidades B, como ya se indicó para la fracción 5II, hay sulfato en las posiciones 2 y 3. En el C-2 parece haber exclusivamente sulfato, ya que en todos los casos las galactosas disustituidas en 2 y 4 prácticamente desaparecen, existiendo un aumento proporcional en $\rightarrow 4$ -Gal. En la posición 3 podría haber otro sustituyente acompañando al sulfato, sobre todo en las fracciones 3I, 4I y 4II, ya que se obtiene una proporción variable de galactosas disustituidas en 3 y 4 en los productos desulfatados, aunque esto también podría provenir de desulfatación incompleta. Sin embargo, en las fracciones 5I y 5III queda muy poca galactosa disustituida, por lo que el sustituyente principal (o excluyente) sería sulfato. En todas las fracciones estudiadas la disminución de las galactosas disustituidas va acompañada de un aumento de galactosa monosustituida en C-4, salvo en la 4II. Por último, esta parecería tener trazas de sulfato en C-6.

Con respecto a las unidades no comunes, la galactosa trisustituida en 3, 4 y 6, pareciera ser una unidad disulfatada, ya que en todos los casos desaparece en los productos desulfatados. La unidad sustituida en 2 que aparece en proporciones importantes en 3I y 4I, y que había sido asignada a galactosa terminal con un

sustituyente en 2, permanece prácticamente constante luego de la desulfatación, con lo que se deduce que dicho sustituyente no sería sulfato.

Por último, al igual que en la etilación, se observa un aumento significativo en la proporción de xilosa terminal en los productos desulfatados (en forma muy grosera, en la fracción 4II). Sin embargo, no es posible dar una explicación para este hecho. Además, contrariando los datos del grado de polimerización de los productos desulfatados, los porcentajes de galactosas terminales se mantienen casi constantes, indicando que no hubo una degradación apreciable.

2.10 DETERMINACIÓN DE LA CONFIGURACIÓN DE LOS AZÚCARES COMPONENTES

Los polisacáridos extraídos de *Corallina officinalis* están compuestos por galactosa y mono-(-)-metilgalactosas pertenecientes a las series D y L. La estimación de la proporción de azúcares de cada serie se realizó midiendo el poder rotatorio de las muestras hidrolizadas y luego, mediante algunas suposiciones y aproximaciones, se determinó analíticamente la cantidad de galactosas totales (incluyendo mono-(-)-metilgalactosas) de cada serie (véase pág. 98).

Sin embargo, para poder determinar directamente la proporción de azúcares enantioméricos, incluso de las mono-(-)-metilgalactosas, se empleó una reacción de aminación reductiva con una amina quiral para obtener 1-amino-1-desoxialditoles diastereoméricos, que puedan separarse y cuantificarse por cromatografía gaseosa. El desarrollo de los detalles inherentes a esta técnica se tratarán más adelante (véase pág. 202). En este capítulo se presentarán los resultados obtenidos por aplicación de la técnica a los productos de *Corallina officinalis*, y las implicancias estructurales que deriven de los mismos.

Los monosacáridos obtenidos por hidrólisis total de los polisacáridos fueron tratados con (S)-1-amino-2-propanol en un medio de metanol y ácido acético glacial, y las iminas formadas, se redujeron con cianoborohidruro de sodio. Luego del aislamiento y purificación, los productos se acetilaron y analizaron por cromatografía gas-líquido, y en la Tabla 38 se presentan los resultados obtenidos. Dichos resultados son muy interesantes y permiten asignar en forma precisa la configuración de cada componente del polisacárido.

La xilosa y la glucosa pertenecen en su totalidad a la serie D. Este resultado era de esperar ya que nunca se encontraron sus enantiómeros en un producto natural.

Tabla 38: Azúcares componentes determinados por aminación reductiva (expresados en moles / 100 galactosas totales).

Azúcares	1I	2I	3I	4I	4II	5I	5II	5III	6I	7I	8I
D-Xil	23,2	17,5	15,1	18,8	27,1	33,2	34,0	28,7	20,1	8,0	11,6
2-D-Gal ^{a,b}	11,8	13,6	14,4	10,9	10,2	9,7	10,0	11,6	13,4	20,6	23,3
2-L-Gal ^b			tr	tr		tr					
4-D-Gal	4,7	6,7	9,5	4,9	3,1	1,8	1,3	1,5	2,8	4,4	1,7
4-L- + 3-D-Gal	3,0	1,6	1,2	1,0	1,7	tr	tr	tr	tr	tr	
3-L-Gal	2,1	2,2	1,6	3,3	4,2	4,7	3,5	2,7	2,1	1,1	0,6
6-D-Gal	4,4	2,4	1,1	1,7	1,2	1,1	1,0	2,0	3,8	8,5	11,0
D-Gal	42,7	38,8	33,5	43,1	51,2	50,0	52,1	51,1	46,3	39,4	41,9
L-Gal	31,3	34,7	38,3	34,7	29,0	31,8	31,7	30,7	30,9	25,3	21,5
L-Ram	13,4	4,6	4,8	4,2	3,9	2,9	tr	2,7	3,1	2,1	5,1
L-Fuc	22,6	3,4	1,1	tr	tr		tr	tr	1,1	2,5	5,1
L-Ara	2,9			tr		tr			tr		
D,L-Glc + D-Man	97,8	12,7	9,7	3,9	1,9	1,7	tr	3,0	1,8	3,7	8,5

^a 2-D-Gal = 2-O-metil-D-galactosa, etc.

^b Determinada por aminación reductiva empleando (S)- α -metilbencilamina.

En relación a los azúcares metilados, utilizando el (S)-1-amino-2-propanol no pueden resolverse los enantiómeros de la 2-O-metilgalactosa. Sin embargo, realizando la aminación reductiva con otra amina, la (S)- α -metilbencilamina, es posible separar perfectamente ambos enantiómeros (véase pág. 223). Los resultados indican que en la mayoría de las fracciones la 2-O-metilgalactosa pertenece a la serie L, salvo en los productos 3I, 4I y 5I en los que existen trazas de 2-O-metil-D-galactosa.

El hecho de que la 2-(*O*)-metilgalactosa pertenezca a la serie L está de acuerdo con lo que se había predicho a partir de los resultados de etilación suponiendo alternancia D, L estricta. En efecto, en esa oportunidad, página 117, se estableció que la 2-(*O*)-metilgalactosa se encontraba mayoritariamente en la unidad B (ligada por C-4), y en productos de la familia del ágar, esto implicaría que debe pertenecer a la serie L.

La configuración de la 3-(*O*)-metil-L-galactosa está de acuerdo también con lo que se predijo por etilación (pág. 117). Lo mismo ocurre con la 6-(*O*)-metilgalactosa. Por etilación se dedujo que este azúcar sólo se encuentra en las unidades A, por lo tanto debe tener configuración D, lo cual se confirma por esta técnica de aminación reductiva.

La conclusión obtenida para la 4-(*O*)-metilgalactosa es particularmente interesante ya que este azúcar, como el isómero L, fue encontrado como cadena lateral en varios polisacáridos de algas rojas^{44,60,63,68,98,102}, mientras que en los coralinanos la 4-(*O*)-metilgalactosa se encuentra mayoritariamente como el enantiómero D, al igual que en *Grateloupia elliptica*⁵⁹. Sería interesante revisar aquellos resultados ya que en general, la configuración se determinó por hidrólisis total de los polisacáridos, separación por cromatografía en papel del hidrolizado y medición del poder rotatorio, metodología que aplicada a componentes minoritarios de un polisacárido podría conducir a errores; o bien directamente por analogía con productos similares.

Los derivados de la 4-(*O*)-metil-L-galactosa y 3-(*O*)-metil-D-galactosa coeluyen en la cromatografía gaseosa y no pueden resolverse. Sin embargo, salvo para la fracción II, la cantidad de ambos azúcares es muy pequeña, particularmente en las fracciones principales en las cuales su proporción es menor al 1%. Se supone que en función de las proporciones de 3-(*O*)- y 4-(*O*)-metilgalactosa determinadas por aldononitrilos (Tabla 18, pág. 89), sería mayoritaria la 3-(*O*)-metil-D- respecto de la 4-(*O*)-metil-L-galactosa, sobre todo en las fracciones principales y en las últimas en eluir.

Por último, ramnosa, fucosa y arabinosa pertenecen todas a la serie L como era de esperar, no detectándose la presencia de sus enantiómeros. Del mismo modo, no se encontró L-manosa.

La Tabla 39 muestra la relación D/L para los azúcares componentes del esqueleto de los polisacáridos. Dicha relación se encuentra alrededor del 50% en todas las fracciones, salvo para la 3I donde existe una desviación notoria en favor de la serie L.

Tabla 39: Relación D/L para los azúcares componentes de los coralinanos, expresada para los azúcares de cadena (sin considerar la 4-(*O*)-metilgalactosa).

	II	2I	3I	4I	4II	5I	5II	5III	6I	7I	8I
D/L	51/49	45/55	39/61	48/52	55/45	53/47	54/46	54/46	52/48	50/50	54/46

2.10.1 Aplicación de los 1-amino-1-desoxialditoles en la cuantificación de los azúcares componentes: comparación con las técnicas de aldonitrilos y alditoles acetilados.

En la Tabla 40 se resumen las proporciones de los azúcares componentes determinados por los diferentes derivados utilizados, aldonitrilos, alditoles y 1-amino-1-desoxialditoles. En general, los datos más coincidentes son los de alditoles y desoxiaminoalditoles, siendo incluso menor la cantidad de galactosas metiladas, particularmente la 2-(*O*)-metilgalactosa, determinada por aminación reductiva. Estos nuevos datos apoyan el concepto de que la derivatización como aldonitrilos sobrevalúa las proporciones relativas de mono-(*O*)-metilgalactosas (pág. 91).

Tabla 40: Resultados obtenidos por derivatización de los azúcares componentes como aldononitrilos, alditoles y 1-amino-1-desoxialditoles acetilados (expresados en moles / 100 moles galactosa + 2-*O*-metilgalactosa + 3-*O*-metilgalactosa + 6-*O*-metilgalactosa).

	II	2I	3I	4I	4II	5I	5II	5III	6I	7I	8I
Sulfato	30	26	27	26	33	32	36	37	39	43	72
Terminales Reductores ^a	15	8	4	2	1	<1	<1	2	<1	1	1
Aldononitrilos											
Xilosa	24	19	23	25	28	32	34	25	21	9	8
2- <i>O</i> -metilgalactosa	25	30	34	25	24	23	24	26	29	40	42
3- <i>O</i> -metilgalactosa	10	5	4	7	7	9	7	5	4	3	2
6- <i>O</i> -metilgalactosa	7	5	tr	tr	tr			4	6	10	12
4- <i>O</i> -metilgalactosa	10	12	19	13	2	1	1	1	3	7	2
Galactosa	58	60	62	68	69	68	69	65	61	47	44
Sustitución ^b	64	58	69	64	63	65	71	63	63	59	82
Alditoles											
Xilosa	22	21	15	20	24	33	32	23	18	nd	nd
2- <i>O</i> -metilgalactosa	17	22	20	16	15	15	14	16	18	nd	nd
3- <i>O</i> -metilgalactosa	4	3	2	3	4	5	2	3	2	nd	nd
6- <i>O</i> -metilgalactosa	4	2	1	1	1	1	1	2	4	nd	nd
4- <i>O</i> -metilgalactosa	5	7	10	5	1	1		1	2	nd	nd
Galactosa	75	73	77	80	80	79	83	79	76	nd	nd
Sustitución ^b	56	53	50	49	58	65	67	61	58	nd	nd
Desoxiaminoalditoles											
Xilosa	25	19	17	20	28	34	34	29	21	8	12
2- <i>O</i> -metilgalactosa	13	15	17	12	11	10	10	12	14	22	24
3- <i>O</i> -metilgalactosa	3	3	2	5	4	5	4	3	2	1	1
6- <i>O</i> -metilgalactosa	5	2	1	2	1	1	1	2	4	9	11
4- <i>O</i> -metilgalactosa	7	9	12	6	4	2	1	2	3	5	2
Galactosa	79	80	80	82	83	84	85	83	80	68	64
Sustitución ^b	58	51	53	49	65	68	71	67	63	55	85

^a Calculado por mediciones de poder reductor.

^b Sustitución = xilosa + sulfato + 4-*O*-metilgalactosa.

2.11 DATOS EMPLEADOS EN LA DETERMINACIÓN ESTRUCTURAL

Empleando el conjunto de los datos presentados, se dedujo la estructura promedio de los polisacáridos de *Corallina officinalis*. En primer lugar, para el análisis de los azúcares componentes, se decidió utilizar un promedio de los datos obtenidos por cada técnica de derivatización (Tablas 18, 19 y 38). En la Tabla 41 se muestran dichos resultados.

Tabla 41: Promedios de los resultados obtenidos por derivatización de los azúcares componentes como aldononitrilos, alditoles y 1-amino-1-desoxialditoles acetilados (expresados en moles / 100 moles galactosa + 2-*O*-metilgalactosa + 3-*O*-metilgalactosa + 6-*O*-metilgalactosa).

Azúcares	1I	2I	3I	4I	4II	5I	5II	5III	6I	7I	8I
Xilosa	23	20	19	22	27	33	34	26	20	8	10
2- <i>O</i> -MeGal	18	23	23	18	17	16	16	18	20	30	33
3- <i>O</i> -MeGal	6	3	3	4	5	6	4	3	3	2	1
6- <i>O</i> -MeGal	5	3	1	1	1	1	1	3	5	10	12
Galactosa	71	71	73	77	77	77	79	76	72	58	54
4- <i>O</i> -MeGal	8	9	14	8	3	1	1	1	3	6	2

En la Tabla 42 se presentan los datos deducidos de las reacciones de metilación y etilación. La proporción de 4-*O*-metilgalactosa determinada por nitrilos (Tabla 40) y por etilación es equivalente en ambos métodos, y el porcentaje de sustitución total coincide aceptablemente bien, salvo en las fracciones minoritarias 1I, 7I y 8I cuyos datos

Tabla 42: Resultados obtenidos a partir de datos de metilación y etilación (expresados en moles / 100 moles galactosa + 2-*O*-metilgalactosa + 3-*O*-metilgalactosa + 6-*O*-metilgalactosa).

	1I	2I	3I	4I	4II	5I	5II	5III	6I	7I	8I
Metilación											
Xilosa	16	15	18	18	29	31	26	27	21	9	6
Terminales NR ^a	40	32	41	19	3	2	1	2	5	9	4
Sustitución ^b	46	54	51	55	69	72	71	65	65	49	52
Tipo de unión(%)^c											
(1→3)	56	47	42	52	52	54	56	53	50	50	53
(1→4)	44	53	58	48	48	46	44	47	50	50	47
Etilación											
Xilosa	23	23	37	28	54	49	58	41	27	nd	nd
2- <i>O</i> -MeGal	24	24	20	20	12	13	12	17	16	nd	nd
3- <i>O</i> -MeGal	7	2		3	4	5	4	4	3	nd	nd
6- <i>O</i> -MeGal	3	2	2	2	1			2	3	nd	nd
4- <i>O</i> -MeGal	2	13	22	9	3			2	4	nd	nd
Terminales NR ^a	41	36	47	19	3			2	5	nd	nd
Sustitución ^b	50	54	58	62	63	69	69	63	58	nd	nd
Tipo de unión (%)^c											
(1→3)	40	43	51	43	50	48	52	46	50	nd	nd
(1→4)	60	57	49	57	50	52	48	54	50	nd	nd

^a Terminales no reductores, calculados a partir de 2,3,4,6-, 2,3,4- y 3,4,6-tri-*O*-alquilgalactosas presentes.

^b Calculado a partir de galactosa di- y monoalquilada, 2,3,4- y 3,4,6-tri-*O*-alquilgalactosas presentes.

^c Calculado suponiendo que la 2,6-di-*O*-metil, 6-*O*- y 2-*O*-metilgalactosa derivan de unidades ligadas por C-4.

analíticos implicarían un mayor grado de sustitución que el determinado por ambas alquilaciones. Esta anomalía puede deberse, como ya se indicara, a una sobreestimación en la determinación de sulfato, posiblemente por contaminación con sulfato inorgánico.

La cantidad de xilosa determinada por metilación coincide muy bien con el promedio de los datos analíticos (Tablas 41 y 42). Sin embargo, en la etilación hay una importante sobrevaluación de la xilosa, sobre todo en las fracciones principales. Ya se mencionó que no es posible explicar este hecho.

Los resultados de ambas alquilaciones para el tipo de unión glicosídica son equivalentes, sobre todo en las fracciones principales, notándose una tendencia a sobrevaluar las uniones (1→4) en la etilación. Sin embargo, los datos coinciden en indicar un porcentaje muy cercano al 50% para ambos tipos de unión.

La 2,3,4,6-tetra-, 3,4,6- y 2,3,4-tri-*O*-alquilgalactosas no fueron consideradas en los cálculos (véase Parte Experimental, pág. 259) ya que estas unidades no formarían parte de la unidad repetitiva, sino que provendrían de unidades terminales no reductoras sin sustituir, y sustituidas en C-2 y C-6 respectivamente. Sin embargo, como las proporciones de azúcares tri-alquilados son mayores que las que cabría esperar basados en los valores de peso molecular, las fracciones del principio de la elución posiblemente presenten uniones (1→2) y/o (1→6). Es improbable que esta divergencia se deba a un mayor grado de ramificación, ya que la proporción de sustitución basada en el análisis de metilación (unidades dimetiladas) iguala a la sustitución basada en las cantidades de xilosa, 4-*O*-metilgalactosa y sulfato presentes (Tablas 40, 41 y 42).

Los resultados de metilación concuerdan muy bien con los datos de aminación reductiva (Tabla 39) considerando que los residuos unidos por C-3 provienen de azúcares de la serie D, y los unidos por C-4 de azúcares de la serie L. Estos hechos,

junto con el análisis de los poderes rotatorios (véase pág. 98), muestran que aunque no hay evidencias absolutas para una unidad repetitiva disacáridica formada por β -D-galactosa unida por C-3 y α -L-galactosa unida por C-4, dicha estructura está claramente apoyada por los datos obtenidos.

2.12 ESPECTROSCOPIA DE RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

2.12.1 RMN de ^{13}C

Desafortunadamente, los espectros de RMN de este tipo de polisacáridos no permiten obtener información estructural de importancia debido a la complejidad y a la diversidad de componentes de su estructura. La aplicación de la espectroscopía de RMN de ^{13}C se ha circunscripto al estudio de polisacáridos más regulares, como agarosas o carragenanos, y aún en estos casos los espectros se complican notablemente al presentarse algunas irregularidades en la estructura.

Los informes sobre estudios de RMN en polisacáridos de algas rojas más complejos son muy escasos y los resultados no son alentadores (Furieux *et al*⁹¹, pág. 46). Es necesario continuar la investigación en este área y para ello es fundamental contar con oligosacáridos de estructura adecuada (por ejemplo, obtenidos a partir de hidrólisis parciales de polisacáridos complejos) que puedan utilizarse como modelos para asignar en forma completa sus espectros, y utilizar dichos resultados en el estudio de los polisacáridos nativos.

Se intentó sin embargo el estudio por RMN de ^{13}C de los coralinanos utilizando equipamiento de 400 MHz y altas temperaturas. Se estudiaron las fracciones 3I, 4II y 5I. En la Figura 34 se observa el espectro correspondiente a la Fracción 5I, y la región de los carbonos anoméricos del mismo espectro a escala aumentada. La señal a δ 57 ppm pertenece al C-1 de la sal sódica del ácido 3-trimetilsilil-1-propanosulfónico

(DSS) utilizado como standard interno. El C-2 (21,7 ppm) y el C-3 (17,7 ppm) no se muestran en el espectro.

Se observan cuatro señales agudas entre δ 67 – 79 ppm correspondientes a los cuatro carbonos de la β -D-xilosa⁹³⁻⁹⁴, sugiriendo que ésta se encuentra ligada a una única posición: el C-6 de las unidades de D-galactosa unidas por la posición 3. Esto puede deducirse en función de que la alta movilidad del enlace (1 \rightarrow 6) induce la aparición de señales agudas en el espectro del azúcar ligado en dicha posición. Esta afirmación coincide con los resultados obtenidos por métodos químicos (véase pág. 129). La asignación de las señales correspondientes se presenta en la Tabla 43.

Tabla 43: Asignación de las señales correspondientes a los carbonos de los residuos de β -D-xilopiranososa unidos en la posición 6 de las unidades de β -D-galactosa ligadas por C-3.

C-1	C-2	C-3	C-4	C-5
106,00	75,64	78,26	71,90	67,72

En la zona alrededor de 63 ppm aparecen los C-6 sin sustituir, y las señales entre 59–60 ppm corresponden a los grupos metoxilo.

La región del espectro entre 69 y 80 ppm agrupa los oxhidrilos secundarios no involucrados en uniones glicosídicas, y no brinda información de particular interés. Dentro de esta zona, entre 69 y 72 ppm se encuentran también las señales de los C-6 sustituidos por sulfato y xilosa.

En la zona entre 80 y 85 ppm se encuentran los carbonos que forman parte de uniones glicosídicas, es decir el C-3 de la β -D-galactosa y el C-4 de la α -L-galactosa. Se observa la superposición de varios picos, que no pueden ser asignados, pero que manifiestan la complejidad del polímero.

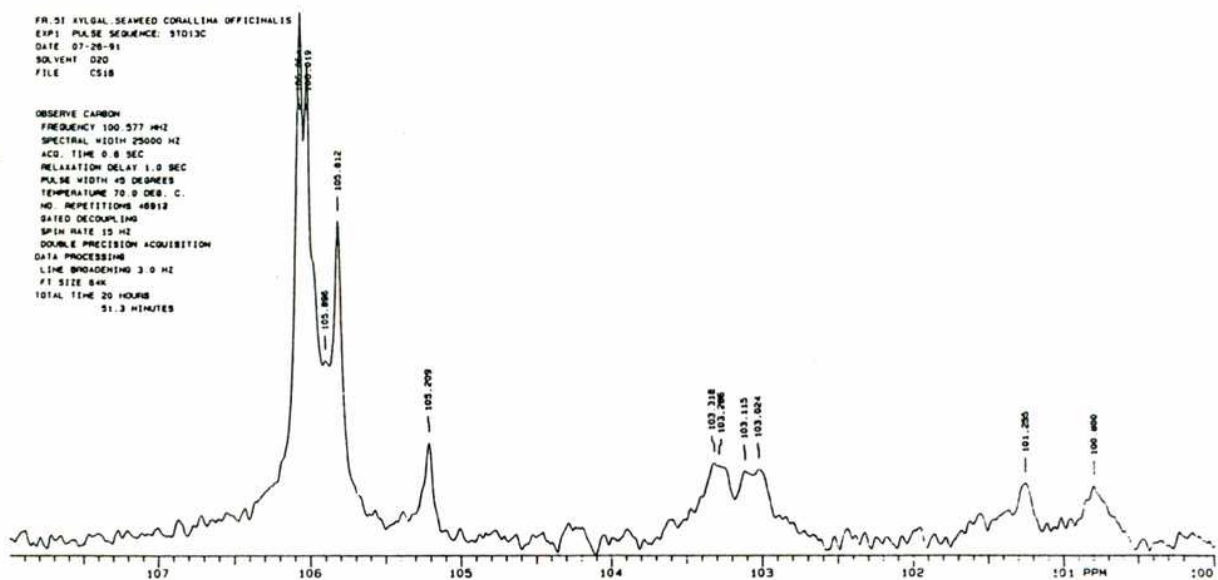
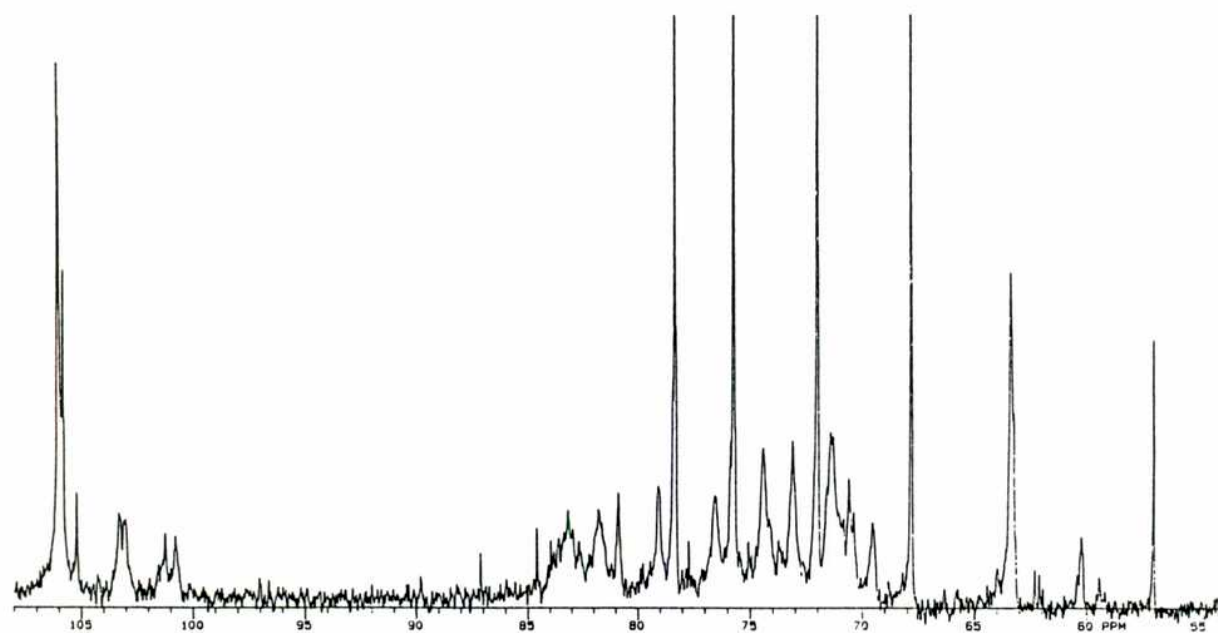


Figura 34: Espectro de RMN de ¹³C de la Fracción 5I.

La región anomérica también presenta varias señales. La señal a campos más bajos (106,1 ppm) correspondería al C-1 de la β -xilosa, mientras que los picos a 106,0 y 105,8 ppm podrían asignarse a los carbonos anoméricos de las unidades de β -D-galactosa sustituida en el C-6 por xilosa y sulfato.

Alrededor de 103,0 ppm aparecen dos señales complejas correspondientes a los carbonos anoméricos de los residuos de α -L-galactosa, mientras que a 100,8 y 101,2 ppm se observan otras dos señales complejas que indican la sustitución en el C-2 de dichas unidades por grupos metoxilo y sulfato.

En la Figura 35 se muestra el espectro de la Fracción 4II. Como era de esperar dada la similitud de ambas fracciones los espectros son prácticamente idénticos.

En la Figura 36 se aprecia el espectro de la Fracción 3I que presenta una relación señal / ruido muy baja. En la región anomérica se observan sólo dos señales para la α -L-galactosa y aparece una señal a $\approx 98,9$ ppm que no se apreciaba en los espectros de las Fracciones 4II y 5I. La zona de los carbonos anoméricos de la unidad β es bastante más compleja que en aquellas fracciones, quizás debido a la 4-(*O*)-metilgalactosa que es abundante en esta fracción.

La intensidad de los picos correspondientes a la xilosa es significativamente menor que en los otros espectros, lo que coincide con la menor proporción de dicho azúcar en la Fracción 3I. Además al ser las señales más pequeñas no es posible afirmar que la xilosa esté ligada a una única posición.

Por último, el área correspondiente a los C-6 no sustituidos es mayor, indicando un menor grado de sustitución en el producto 3I (véase Tabla 44). Además aparecen distintas señales que pueden originarse en las altas proporciones de 4-(*O*)-metilgalactosa presente como cadenas laterales, características de esta fracción.

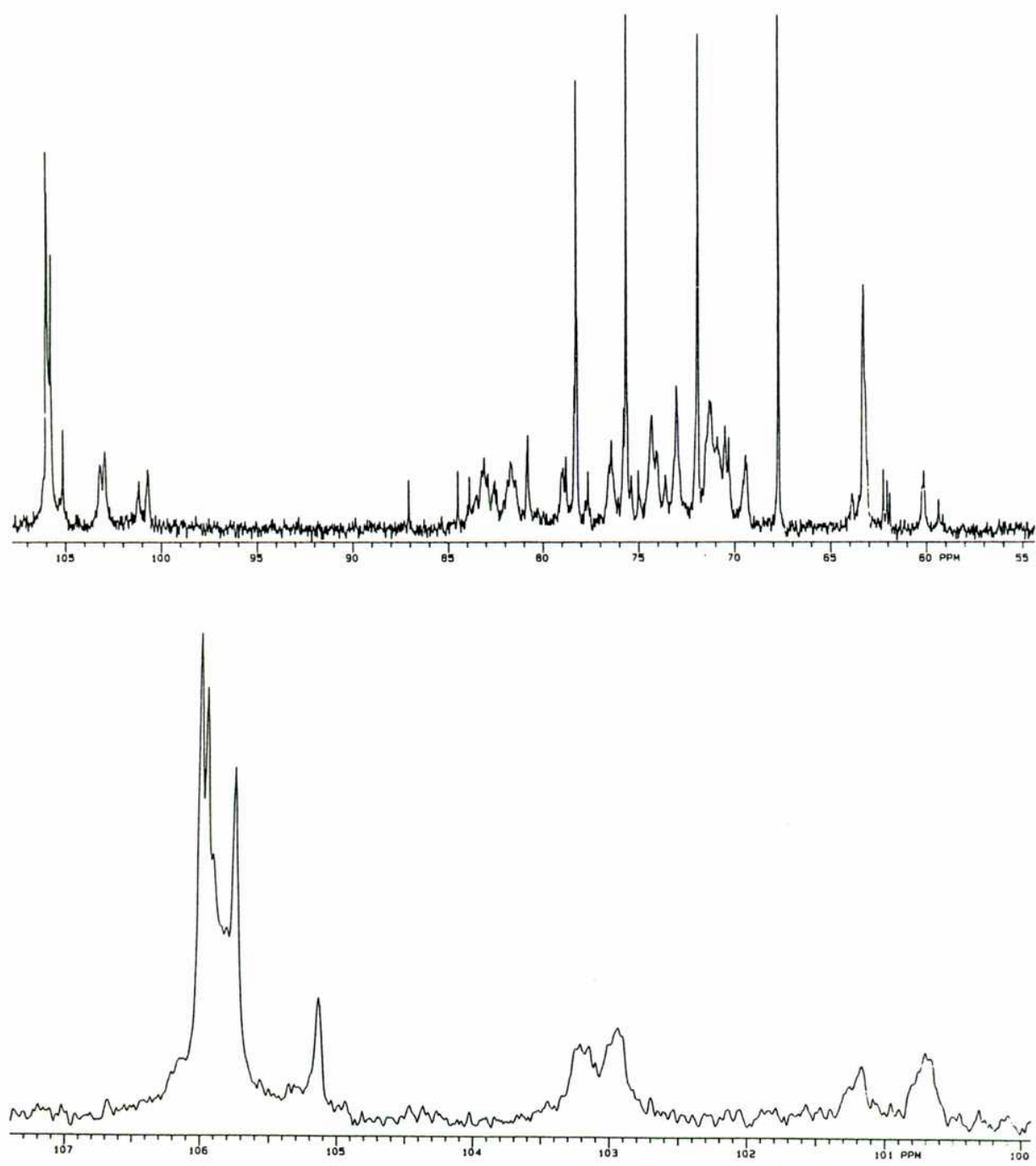


Figura 35: Espectro de RMN de ^{13}C de la Fracción 4II.

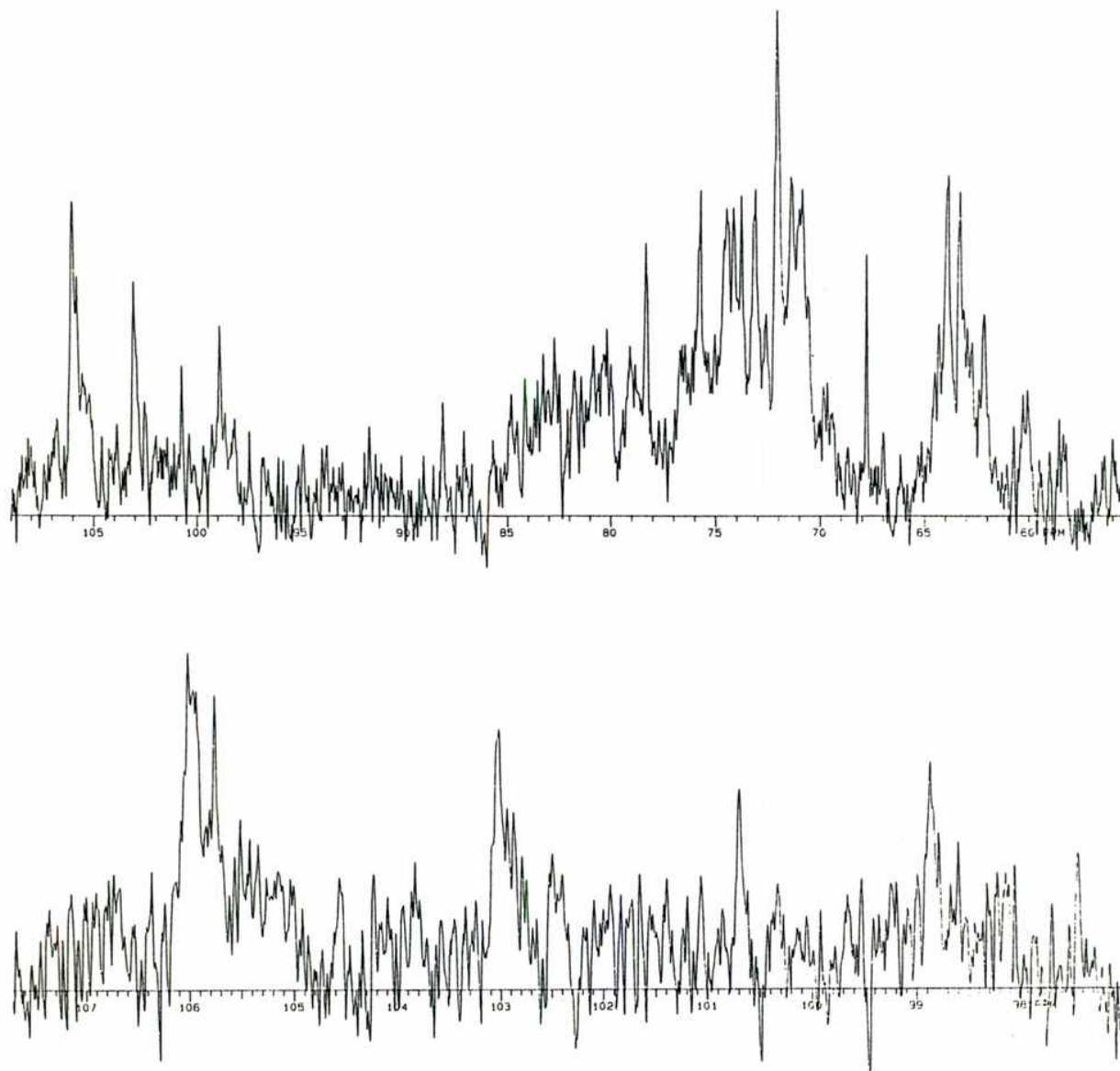


Figura 36: Espectro de RMN de ^{13}C de la Fracción 31.

2.12.2 RMN de ^1H

La Fracción 5I se estudió por RMN protónica y los resultados se aprecian en la Figura 37. Los tripletes a $\delta \approx 0,6$ y $2,9$ ppm y el multiplete a $\delta \approx 1,75$ ppm corresponden a los tres grupos ($-\text{CH}_2-$) de la sal sódica del ácido 3-trimetilsilil-1-propanosulfónico (DSS) utilizado como standard interno. El espectro es bastante pobre, lo que es razonable en función de la complejidad del polímero. Sin embargo, pueden obtenerse algunos datos estructurales.

Los grupos metoxilo en los derivados monometilados de glicopiranosas pueden detectarse en forma precisa, pues dan lugar a señales agudas a $\delta 3,40 - 3,65$ ppm. El desplazamiento químico de los protones de un metoxilo es independiente de su ubicación axial o ecuatorial, pero sí depende de la configuración de los grupos OH o CH_2OH adyacentes^{135,136}. Cuando ambos grupos OH adyacentes son ecuatoriales, la resonancia del grupo metoxilo aparece a $\delta 3,62 - 3,65$ ppm y cuando uno de los grupos ecuatoriales adyacentes es CH_2OH ocurre a $\delta 3,55 - 3,57$ ppm; cuando uno es axial y el otro ecuatorial a $\delta 3,47 - 3,48$ ppm, mientras que si el grupo metoxilo está en C-6 el δ es $3,40 - 3,41$ ppm.

El espectro de la Fracción 5I presenta una señal compleja a $\delta 3,45 - 3,55$ ppm correspondiente a grupos metoxilo con un OH vecino axial y otro ecuatorial, y esta es la situación más probable en polisacáridos con la unidad repetitiva $\rightarrow 3)-\beta\text{-Galp}-(1\rightarrow 4)-\alpha\text{-Galp}-(1\rightarrow$. Existe una única posibilidad de tener dos oxhidrilos ecuatoriales, ubicando el grupo metoxilo en la posición 2 de la β -galactosa pero, a pesar de que aparece una señal a $\delta \approx 3,60$ ppm, los resultados de etilación muestran que existen grupos metoxilo en dicha posición sólo en calidad de trazas (Tabla 31, pág. 116).

Aparece además una señal pequeña a $\delta 3,40$ ppm correspondiente a un metoxilo en C-6, y una señal muy débil a $\delta \approx 3,55$ ppm que pertenece a un grupo CH_2OH vecino ecuatorial, como por ejemplo en la 4-($-$)-metilgalactosa.

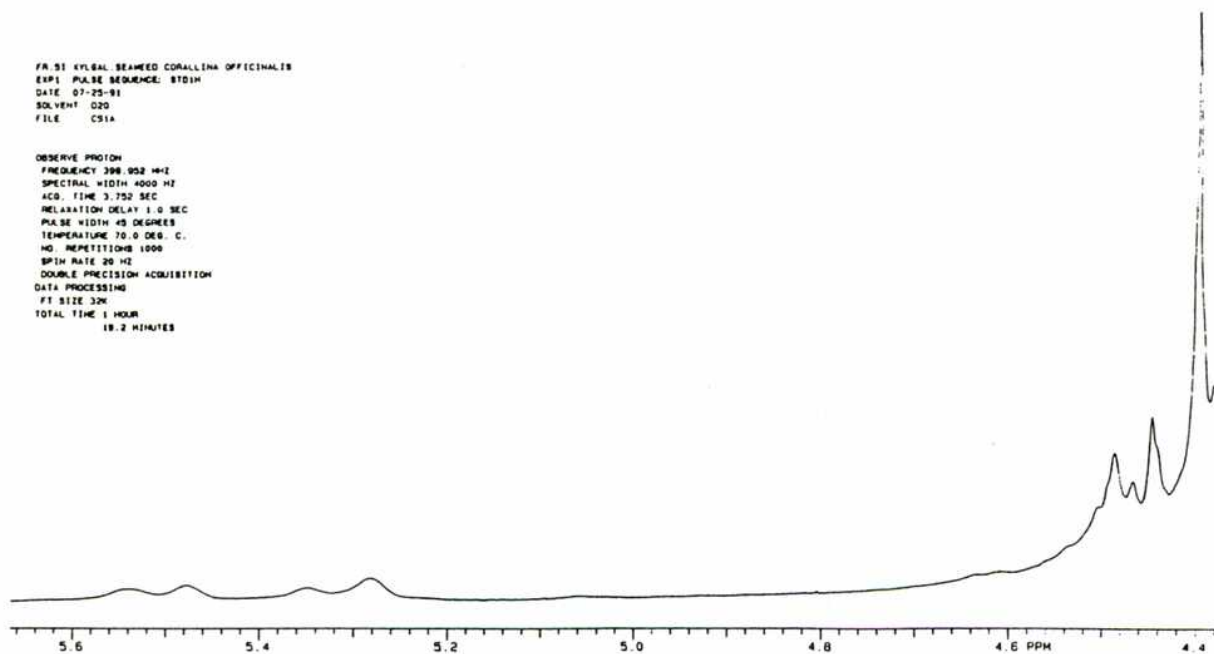
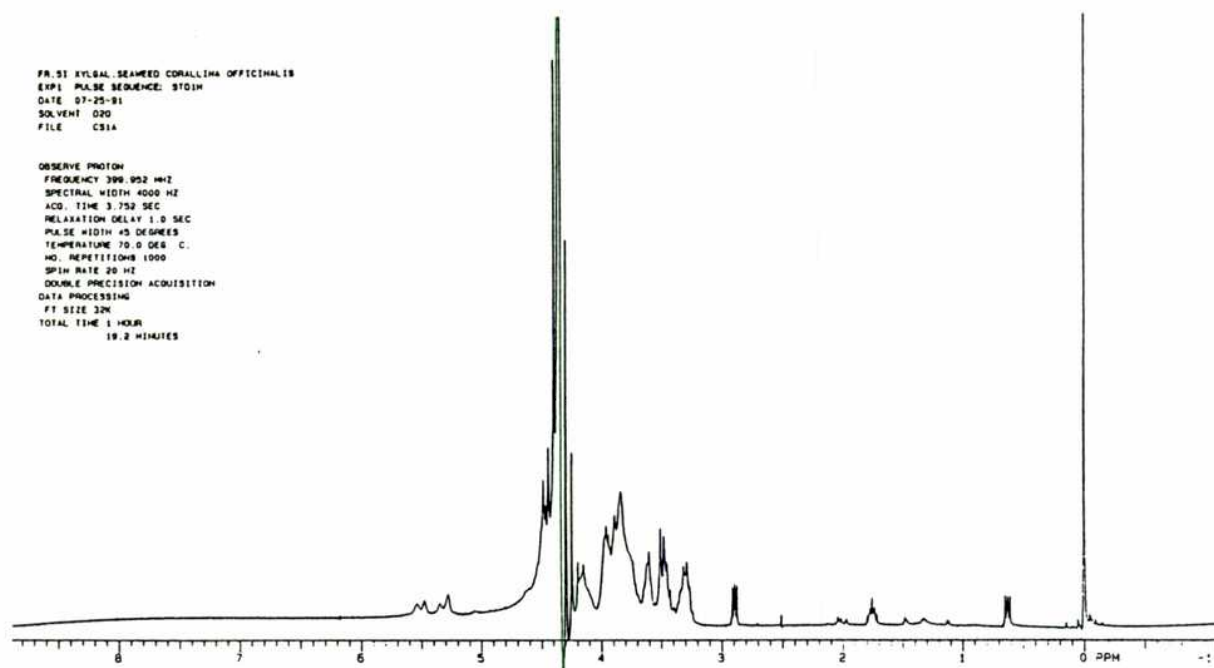


Figura 37: Espectro de RMN de ^1H de la fracción 5I.

En la región anomérica, se observan tres señales a δ 4,44 – 4,48 ppm que corresponden a grupos β -D-galactosilo y β -D-xilosilo, y dos pares de señales bien diferenciadas a δ 5,28 – 5,54 ppm que se deben a las unidades de α -L-galactosa. La separación de ambos picos en cada par es muy parecida y para comprobar que estas señales se originan en cuatro protones distintos, se midió dicha separación. Los valores observados, 25,6 y 26,4 Hz, no corresponden a constantes de acoplamiento por lo tanto las señales se deben a diferentes protones. Esto indica que el carbono anomérico en las unidades de α -galactosa está influenciado en mayor medida por los sustituyentes que en los residuos ligados por enlaces β , lo que está de acuerdo con la presencia de distintos grupos en las posiciones 2 y 3 de las unidades α , mientras que en las β , unidas por C-3, prácticamente no hay sustitución en el C-2 (véase Tabla 44).

Además, ambos espectros muestran la presencia en muy bajas proporciones de cetales del ácido pirúvico por la señal de los protones del grupo metilo a $\delta \approx 1,5$ ppm.

2.13 ESTRUCTURA DE LOS CORALINANOS

Los polisacáridos de *Corallina officinalis* están constituidos por la estructura alternante $[\rightarrow 3)\text{-}\beta\text{-D-Galp-(1}\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-L-Galp-(1}\rightarrow]$ modulada por sustitución en:

- i) la posición 6 de la unidad A por sulfato y cadenas laterales de $\beta\text{-D-xilosa}$, junto con cantidades menores de metoxilo y ramificaciones de 4-(*O*-metilgalactosa).
- ii) las posiciones 2 y 3 de la unidad B por grupos metoxilo y sulfato.

Fueron encontradas también proporciones menores de grupos metoxilo en la posición 2 de la unidad A.

Aunque no puede excluirse la presencia de cantidades menores de $\beta\text{-D-xilosa}$ como cadena lateral en las unidades de $\alpha\text{-L-galactosa}$, los espectros de RMN de ^{13}C de las fracciones principales sugieren que éstas se encuentran unidas a una única posición, el C-6 de las unidades A (véase pág. 140).

Los coralinanos pueden representarse adecuadamente por la estructura que se observa en la Figura 38. Las proporciones de los sustituyentes R_1 , R_2 y R_3 se muestran en la Tabla 44 y fueron calculadas promediando los datos analíticos de nitrilos, alditoles y aminación reductiva, con los datos de metilación y etilación, y considerando los resultados de desulfatación. Para detalles sobre la forma de cálculo véase Parte Experimental, página 259.

Tabla 44: Estructura de los coralinanos, expresada por 100 unidades disacarídicas (véase Figura 38).

Sustituyentes	11	21	31	41	4II	5I	5II	5III	6I	7I ^a	8I ^a
R₁ = Y	51	64	64	79	88	90	90	88	82	69	70
H	40	30	33	18	10	9	9	7	10	12	6
Metilo	9	6	3	3	2	1	1	5	8	19	24
R₂ = SO₃⁻	12	15	14	14	18	22	21	17	13	7	7
H	57	50	48	56	53	51	51	52	53	32	27
Metilo	31	35	38	30	29	27	28	31	34	61	66
R₃ = Y	18	35	40	27	23	23	24	25	25	16	14
H	74	59	56	65	67	66	68	68	70	80	84
Metilo	8	6	4	8	10	11	8	7	5	4	2
Y = SO₃⁻	31	37	36	38	51	42	48	57	62	62	71
β-xilosa	30	40	38	47	54	68	64	52	38	13	11
4-O-MeGal	8	22	30	21	6	3	2	4	7	10	2

^a En estas fracciones sólo se usaron datos de metilación y análisis directo, ya que no se estudiaron por etilación.

Los coralinanos pueden clasificarse en cuatro grupos de acuerdo a sus características estructurales: los Grupos Principal, Variante I-A, Variante I-B y Variante II. La modalidad de cálculo para las estructuras se aprecia en la Parte Experimental, página 262.

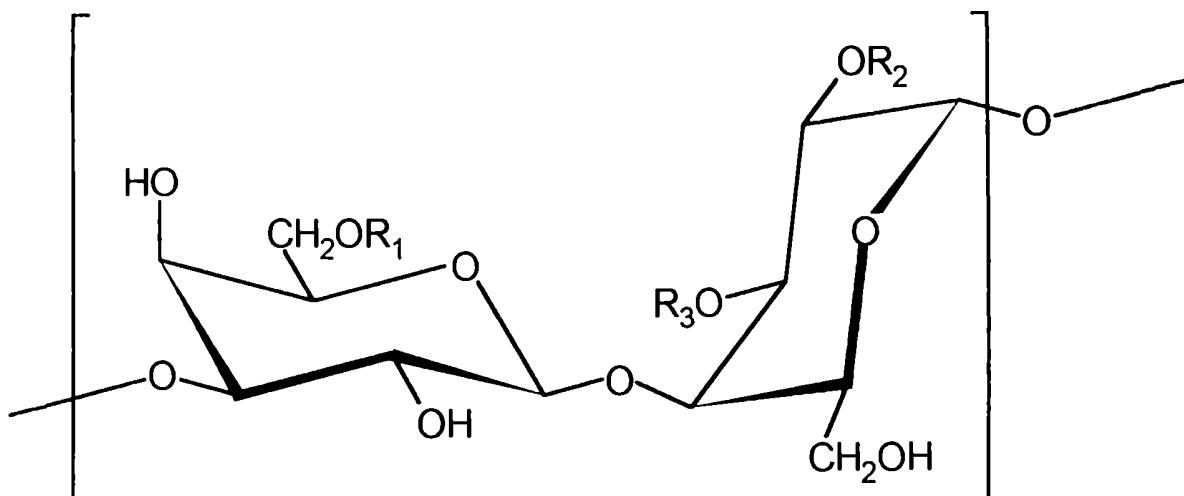


Figura 38: Estructura de los coralinanos (ver texto y Tabla 44).

2.13.1 GRUPO PRINCIPAL.

Las Fracciones 4II, 5I y 5II forman el Grupo Principal y constituyen la estructura básica de los coralinanos, que se aprecia en la Figura 37 y según la Tabla 45.

Tabla 45: Estructura del Grupo Principal (Fracciones 4II, 5I y 5II).

Sustituyentes en la Unidad A (β-D-galactosa)		Sustituyentes en la Unidad A (α-L-galactosa)	
6-O-(β-D-xilopiranosil)-	62	2-sulfato	20
6-O-(4-O-Me-D-galactopiranosil)-	4	3-sulfato	23
6-sulfato	24	2-O-metil-	28
6-O-metil-	1	3-O-metil-	10
No sustituida	9	No sustituida	19

El análisis de la Tabla 44 indica que las fracciones 5I y 5II son prácticamente idénticas. En ellas el sustituyente Y ocupa casi totalmente el C-6 de la unidad A y está constituido por sulfato (45%), 4-*O*-metilgalactosa (2%) y el resto por xilosa.

Si se considera que el C-3 de la unidad B no lleva xilosa (pág. 129), esta posición está ocupada por sulfato en poco más del 20% y por metoxilo en alrededor del 10%, mientras que en el C-2 la proporción de sulfato es parecida, aumentando la sustitución por metoxilo a un 30%.

La fracción 4II presenta diferencias mínimas respecto de 5I y 5II, y que se evidencian más en las primeras fracciones en eluir. En la unidad A, estas diferencias consisten en una menor proporción del sustituyente polar Y, que es reemplazado por OH. En la unidad B, la posición 3 es prácticamente igual en las tres fracciones y el C-2 también es muy semejante, pero presenta menor cantidad de sulfato, reemplazado también por OH. Por último, respecto al sustituyente Y, en la fracción 4II contiene una mayor proporción de 4-*O*-metilgalactosa.

Estas fracciones conforman el Grupo Principal ya que pueden considerarse el núcleo estructural de los coralinanos por varios motivos: representan casi el 60% del total de las fracciones, son muy semejantes y tienen las características estructurales más definidas ya que, como se verá a continuación, las demás fracciones pueden considerarse como desviaciones de esta estructura fundamental. A pesar de la semejanza de todo el Grupo Principal, las diferencias mencionadas en la Fracción 4II se traducen en una disminución de su polaridad y de los factores solubilizantes (el sulfato y la xilosa respectivamente, en lugar de OH y metoxilo). Esta tendencia, como se verá enseguida, se acentúa en las siguientes fracciones.

2.13.1.2 Oxidación con periodato

Para corroborar la estructura y el patrón de sustitución en el Grupo Principal, se

determinó el consumo de periodato en las fracciones 4II y 5I. Las muestras se dejaron reaccionar con periodato de sodio en la oscuridad y se graficaron los valores de consumo de periodato en función del tiempo de oxidación hasta constancia (Figuras 48 y 49, pág. 247).

Con el dato obtenido extrapolando a tiempo cero (5,835 y 5,827 mmoles de periodato para las fracciones 4II y 5I respectivamente), se calcularon las unidades de monosacárido oxidadas por mol de periodato. La fracción 4II da un valor de 1,32 unidades, mientras que en la 5I se oxidan 1,23 unidades por mol de periodato.

El consumo de periodato se puede calcular en forma teórica, determinando las estructuras de las fracciones 4II y 5I de la misma forma en que se hizo para el Grupo Principal. En la unidad A, al estar ligada por uniones (1→3), sólo consumen periodato los residuos de xilosa (2 moles de periodato por mol) y los de 4-*O*-metilgalactosa (1 mol de periodato por mol).

En la unidad B el consumo de periodato sólo ocurre cuando no hay sustituyentes en la cadena, reduciéndose un mol de periodato por cada unidad no sustituida.

De esta manera, teóricamente en la Fracción 4II deberían oxidarse 1,47 unidades de monosacárido por mol de periodato, y en la 5I, 1,28 unidades por mol. Los valores coinciden muy bien con los datos experimentales confirmando las estructuras asignadas. Sin embargo los datos experimentales son levemente inferiores a los teóricos indicando que el consumo de periodato es ligeramente mayor que el esperado, sugiriendo quizás una menor proporción de 2-*O*-metil- y/o 3-*O*-metilgalactosa.

2.13.2 GRUPO VARIANTE I-A

Este grupo está conformado por las Fracciones 5III y 6I y su estructura, considerando nuevamente que en el C-3 de la unidad B no hay xilosa, se presenta en la Tabla 46.

Tabla 46: Estructura del Grupo Variante I-A (Fracciones 5III y 6I).

Sustituyentes en la Unidad A (β -D-galactosa)		Sustituyentes en la Unidad A (α -L-galactosa)	
6-O-(β -D-xilopiranosil)-	45	2-sulfato	15
6-O-(4-O-Me-D-galactopiranosil)-	5	3-sulfato	25
6-sulfato	35	2-O-metil-	33
6-O-metil-	6	3-O-metil-	6
No sustituida	9	No sustituida	21

Las Fracciones 5III y 6I (8% del extracto) pueden considerarse un grupo estructuralmente intermedio entre el Grupo Principal y las Fracciones 7I y 8I. Este grupo tiene características similares al principal pero comienza a marcar una tendencia a la desviación estructural que se manifiesta, respecto de la unidad A, en una menor proporción del sustituyente polar Y en favor del hidrofóbico metoxilo. Sin embargo, en la composición del sustituyente disminuye la cantidad de xilosa en favor de sulfato (lo que compensaría la pérdida de polaridad), y aumenta levemente la 4-O-metilgalactosa, tendencia que se acentúa en las dos últimas fracciones. Este juego con la polaridad de los sustituyentes sugiere que el alga equilibra las proporciones de los sustituyentes polares y no polares, para cumplir su función metabólica (véase pág. 98).

En la unidad B las diferencias respecto del grupo principal son menores. En la posición 3 hay una ligera tendencia a disminuir la cantidad de metoxilo y aumentar el H, mientras el sulfato es aproximadamente constante. Esta tendencia se acentuará en las Fracciones 7I y 8I. En el C-2, se observa una disminución del contenido de sulfato en favor del metoxilo.

2.13.3 GRUPO VARIANTE I-B

Las Fracciones 7I y 8I (2% del extracto), muestran el extremo de las estructuras variantes.

Tabla 47: Estructura del Grupo Variante I-B (Fracciones 7I y 8I).

Sustituyentes en la Unidad A (β -D-galactosa)		Sustituyentes en la Unidad A (α -L-galactosa)	
6-()-(β -D-xilopiranosil)-	12	2-sulfato	7
6-()-4-()-Me-D-galactopiranosil)-	6	3-sulfato	15
6-sulfato	52	2-()-metil-	63
6-()-metil-	21	3-()-metil-	3
No sustituida	9	No sustituida	12

Las dos fracciones que forman este grupo son muy parecidas y en ellas se confirman y acentúan las tendencias mostradas en el grupo anterior. En la unidad A hay un aumento en la cantidad de metoxilo en detrimento de los sustituyentes Y, y en la proporción de Y, existe una drástica disminución en el contenido de xilosa en favor de sulfato. En la unidad B, se observa una menor proporción de sulfato y metoxilo en favor de H en la posición 3, mientras que en C-2 disminuyen notablemente sulfato e H aumentando proporcionalmente el metoxilo.

Observando las estructuras de los Grupos Principal, Variante I-A y Variante I-B, es notorio que desde la fracción 4II a la 8I, los coralinanos forman una verdadera familia de compuestos con estructuras básicas variantes. En dirección a la Fracción 8I aumenta el contenido de sulfato en la unidad A, pero disminuye la proporción de xilosa y aumenta la de metoxilo. Es decir, la unidad A gana en fuerza iónica, pero al mismo

tiempo pierde grupos solubilizantes y gana hidrofóbicos, lo que explica claramente el orden de elución en el fraccionamiento por cromatografía de intercambio iónico.

Por su parte, en la unidad B se observa un notable incremento de la hidrofobicidad, sobre todo en C-2, con un aumento importante en metoxilo y disminución de sulfato.

2.13.4 GRUPO VARIANTE II

¿Cómo se incorporan las primeras cuatro fracciones en este esquema? En las Fracciones 1I - 4I (32% del extracto), no puede afirmarse la presencia de xilosa (o 4-*O*-metilgalactosa) sólo en la posición 6 de la unidad A, existiendo la posibilidad de que ambos sustituyentes estén presentes también en el C-3 de la unidad B (véase pág. 129). Por lo tanto, para el Grupo Variante II no es correcto proponer una estructura definida, sino que es necesario considerar las proporciones de xilosa y 4-*O*-metilgalactosa como un promedio entre ambas posiciones.

2.13.4.1 Fracción 4I

La estructura de la Fracción 4I, que es de transición entre el Grupo Principal y las tres primeras fracciones, se observa en la Tabla 48. La mayor diferencia respecto del Grupo Principal se observa en la unidad A, en donde es sustancialmente menor la proporción del sustituyente Y, que es reemplazado por H, a diferencia de las fracciones 5III - 8I en que es reemplazado por metoxilo. Además, en la composición del sustituyente Y, son menores las cantidades de sulfato y xilosa en favor de 4-*O*-metilgalactosa.

La unidad B es muy parecida al Grupo Principal. Hay una mayor proporción de sustituyente Y y una disminución en la cantidad de sulfato en la posición 2.

Tabla 48: Estructura de la Fracción 4I.

Sustituyentes en la Unidad A (β -D-galactosa)		Sustituyentes en la Unidad A (α -L-galactosa)	
6-O-(β -D-xilopiranosil)-	35	2-sulfato	14
6-O-(4-O-Me-D-galactopiranosil)-	16	3-sulfato	10
6-sulfato	28	2-O-metil-	30
6-O-metil-	3	3-O-metil-	8
No sustituida	18	3-O-(β -D-xilopiranosil)-	12
		3-O-(4-O-Me-D-galactopiranosil)-	5
		No sustituida	21

2.13.4.2 Fracciones 2I - 3I

La estructura de estas Fracciones se observa en la Tabla 49. En ellas se acentúan las tendencias mostradas en la Fracción 4I. En la unidad A es mayor la cantidad de galactosa sin sustituir, y aumenta levemente la cantidad de 6-O-metilgalactosa.

Sin embargo, en la posición 3 de la unidad B hay un notable incremento de Y a expensas de H y sobre todo de metoxilo (Tabla 44). En cuanto a la composición del sustituyente Y, continúa la disminución en la cantidad de xilosa ya evidenciada en la Fracción 4I, manteniéndose constante las proporciones de sulfato y 4-O-metilgalactosa. En el C-2 de la unidad B hay una ligera disminución en la proporción de sulfato e H en favor de metoxilo.

Tabla 49: Estructura de las Fracciones 2I - 3I.

Sustituyentes en la Unidad A (β -D-galactosa)		Sustituyentes en la Unidad A (α -L-galactosa)	
6-O-(β -D-xilopiranosil)-	25	2-sulfato	15
6-O-(4-O-Me-D-galactopiranosil)-	16	3-sulfato	13
6-sulfato	23	2-O-metil-	36
6-O-metil-	4	3-O-metil-	5
No sustituida	32	3-O-(β -D-xilopiranosil)-	14
		3-O-(4-O-Me-D-galactopiranosil)-	10
		No sustituida	7

2.13.4.3 Fracción 1I

La estructura de esta Fracción se aprecia en la Tabla 50. En ella se acentúa aún más la disminución del sustituyente en la unidad A en favor de metoxilo y sobre todo, de galactosa sin sustituir. En el C-3 de la unidad B se observa el mismo fenómeno aún en mayor medida, al igual que en la posición 2 donde bajan levemente sulfato y metoxilo y aumenta el azúcar sin sustituir. La composición de Y respecto de las Fracciones 2I - 3I es muy parecida, siendo algo menor la proporción de 4-O-metilgalactosa.

En el Grupo Variante II (cuyo extremo es la Fracción II) se observa una tendencia global a reducir los sustituyentes polares aumentando ligeramente la proporción de metoxilo respecto del Grupo Principal.

Tabla 50: Estructura de la Fracción II.

Sustituyentes en la Unidad A (β -D-galactosa)		Sustituyentes en la Unidad A (α -L-galactosa)	
6- <i>O</i> -(β -D-xilopiranosil)-	22	2-sulfato	12
6- <i>O</i> -(4- <i>O</i> -Me-D-galactopiranosil)-	6	3-sulfato	8
6-sulfato	22	2- <i>O</i> -metil-	31
6- <i>O</i> -metil-	9	3- <i>O</i> -metil-	8
No sustituida	40	3- <i>O</i> -(β -D-xilopiranosil)-	8
		3- <i>O</i> -(4- <i>O</i> -Me-D-galactopiranosil)-	2
		No sustituida	31

Otra característica particular del Grupo Variante II es que, además de sus bajos pesos moleculares, sus productos son ricos en 4-*O*-metilgalactosa. Después de la etilación, este azúcar produce tanto la 2,3,6-tri-*O*-etil-4-*O*-metilgalactosa como la 3,6-di-*O*-etil-4-*O*-metilgalactosa. El primero sugiere importantes ramificaciones con cadenas laterales de dicho residuo, mientras que el tri-alquilado puede indicar:

- i) la presencia de unidades ligadas por C-2 en el esqueleto
- ii) que algunas cadenas laterales están sulfatadas en C-2
- iii) que están presentes como ramificaciones dobles unidas por C-2.

Lo mismo es aplicable a la presencia de 3,4,6-tri-*O*-etilgalactosa no metilada.

La existencia de un producto 2,3,4-tri-*O*-alquilado (Tablas 24 y 29) puede originarse en terminales no reductores sustituidos en C-6, pero también en uniones (1 \rightarrow 6), no habituales en polisacáridos de algas rojas. Esta posibilidad es apoyada por la presencia de 3-*O*-metilgalactosa que origina este producto trialquilado en la Fracción II.

La 2,3,4,6-tetra-*O*-alquilgalactosa, presente principalmente en las fracciones menores, no proviene sólo de la 4-*O*-metilgalactosa, sino también de galactosa, 2-*O*-metil- y 3-*O*-metilgalactosa, indicando que las ramificaciones son más diversas de lo esperado.

2.14 CONCLUSIONES

El ágar fue definido por Duckworth y Yaphe⁴³ como un sistema de polisacáridos con estructuras que varían desde la agarosa ideal (pág. 16) hasta un polímero en donde la 3,6-anhidro-L-galactosa es reemplazada por L-galactosa 6-sulfato. Los porfiranos⁴⁶⁻⁴⁹ presentan estructuras intermedias entre ambos extremos, con un reemplazo parcial del anhidro-azúcar por galactosa 6-sulfato. Muestran además sustitución por metoxilo en la posición 6 de las unidades A, al igual que en el ágar⁴⁰.

Los polisacáridos de algas pertenecientes al orden Ceramiales^{50-53,86-93} son prácticamente iguales a los porfiranos con la particularidad de tener un alto grado de metilación en el C-2 de la unidad B. En particular el polisacárido extraído de *Ceramium rubrum*⁵³ fue el primer producto de la familia del ágar en presentar un 20% de las unidades B no sulfatadas y por lo tanto no convertibles en 3,6-anhidrogalactosa. Estos compuestos presentan además cadenas laterales de xilosa en C-2 y C-3 de la unidad B^{89,91,93}, y en las posiciones 6 y 4 de la unidad A^{89,90}.

En los carragenanos, familias κ y λ , la unidad B consiste en 3,6-anhidro-D-galactosa o su precursor D-galactosa 6-sulfato. Sin embargo, el ξ -carragenano no contiene galactosa 6-sulfato y por lo tanto no presenta unidades convertibles en el anhidro-azúcar.

Los aeodanos aislados de algas pertenecientes al orden Cryptonemiales, constituyen para los carragenanos, un extremo de la tendencia mostrada por el

polisacárido de *Ceramium rubrum* para la familia del ágar, en el sentido de que no presentan 3,6-anhidrogalactosa ni tampoco sulfato en la unidad B. Contienen además grupos metoxilo en la posición 6 de la unidad A y en el C-2 de la unidad B, también como en los polisacáridos de Ceramiales.

Los residuos de 4-*O*-metilgalactosa, en el aeodano de *Aeodes ulvoidea*⁶³ se encuentran como ramificaciones en el C-6 de la unidad B, mientras que en el ágar de especies de *Gracilaria*^{98,102} aparecen también en el C-6 pero de la unidad A. En todos los casos pertenecen a la serie L.

Los polisacáridos de *Corallina officinalis*, también del Orden Cryptonemiales, pertenecen a la familia del ágar debido a la alternancia de unidades de D- y L-galactosa en la cadena. Al igual que en los aeodanos y en los productos del Orden Ceramiales, contienen galactosas metiladas en distintas posiciones, y la presencia de ramificaciones de xilosa y 4-*O*-metilgalactosa. Sin embargo los coralinanos presentan las siguientes particularidades:

- i) La mayor variedad de galactosas metiladas de los galactanos de algas rojas.
- ii) Son los polisacáridos de algas rojas con mayor proporción de xilosa.
- iii) La 4-*O*-metilgalactosa pertenece a la serie D, mientras que en los demás productos es de la serie L.

Pero la característica principal de estos compuestos es que no contienen 3,6-anhidrogalactosa ni galactosa 6-sulfato, por lo que tampoco pueden formar el anhidroazúcar por un mecanismo enzimático o por tratamiento alcalino.

Este hecho conduce a un concepto importante en el estudio de los galactanos de algas rojas: los polisacáridos de *Corallina officinalis* constituyen el primer ejemplo de la tendencia estructural insinuada por los productos de *Ceramium rubrum* para la

familia del ágar, y que tiene su equivalente en los aeodanos para la familia de los carragenanos. De la misma manera en que el β -carragenano²³ (pág. 12) es un diastereómero de la agarosa, los coralinanos pueden considerarse como diastereómeros de los aeodanos, reemplazando la unidad B por el azúcar de la serie L, con lo cual se cerraría parte del "círculo" estructural de los galactanos de algas rojas.

2.15 ACTIVIDAD ANTIVIRAL DE LOS POLISACÁRIDOS

En la década del sesenta surgieron un gran número de trabajos donde se describía la actividad antiviral de polisacáridos aniónicos. Nigrelli *et al*¹³⁷ encontraron que los carragenanos de *Chondrus crispus* presentaban actividad contra los virus de influenza B y paperas. Posteriormente se determinó que los polisacáridos extraídos de ciertas algas rojas^{138,139} 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 empleados.

En este sentido se probó la acción antiviral de las Fracciones 2I y 4II de los polisacáridos de *Corallina officinalis* contra virus Herpes simplex tipo I (véase Parte Experimental, pág. 265). Los resultados muestran que la actividad es muy baja y que se observa a concentraciones demasiado altas de polisacárido, que ya presentan efectos citotóxicos. La Fracción 4II tiene mayor actividad que la 2I lo que respondería a su mayor peso molecular, ya que se demostró que la acción antiviral, más allá del virus estudiado, aumenta con el incremento del peso molecular hasta un valor de 10.000 uma, y luego es independiente del mismo¹⁴⁰.

CAPÍTULO III

USOS DE LA ETILACIÓN EN LA DETERMINACIÓN ESTRUCTURAL DE POLISACÁRIDOS

La determinación de las posiciones de unión glicosídica en un polisacárido se lleva a cabo usualmente por metilación. La mezcla de azúcares parcialmente metilados liberados por hidrólisis total de los polisacáridos permetilados, se derivatiza generalmente como alditoles o como aldononitrilos acetilados, de manera de obtener derivados volátiles factibles de ser analizados por cromatografía gaseosa.

Sin embargo, en los polisacáridos que contienen azúcares metilados naturales, junto con los monosacáridos no metilados, el análisis por metilación no permite determinar la identidad de los azúcares metilados que componen el polímero. La etilación constituye una de las herramientas más valiosas para superar dicha limitación.

En 1975 el grupo de Albersheim^{141,142} publicó un trabajo en el que describía la etilación de monosacáridos utilizando la técnica de Hakomori y la derivatización de los mismos como alditoles acetilados, con el único objetivo de lograr mejores separaciones cromatográficas que con los derivados metilados. Estos compuestos combinan la simplicidad de la síntesis y las excelentes propiedades cromatográficas de los compuestos metilados, con la facilidad de interpretación de sus espectros de masa, y cuentan con la ventaja adicional de inducir la separación cromatográfica de algunos compuestos que no habían podido separarse como derivados metilados.

La razón de ese desarrollo fue que, a criterio de los autores, la técnica de metilación adolecía de ciertas limitaciones que se tornaban especialmente evidentes cuando se utilizaba para el análisis de polisacáridos complejos extraídos de paredes celulares de vegetales. El mayor problema analítico era la complejidad de los cromatogramas, obteniéndose a menudo dos o más picos superpuestos lo que obviamente dificultaba la identificación y cuantificación de los compuestos. Actualmente sin embargo, con el desarrollo de las columnas capilares de alta resolución, estos inconvenientes fueron superados en buena medida.

En dichos trabajos, Albersheim utilizó columnas empaquetadas y sólo una columna capilar "wide-bore" (diámetro interno relativamente ancho) armada por ellos mismos en el laboratorio. Actualmente las columnas capilares han desplazado a las columnas empaquetadas en la mayoría de las determinaciones analíticas, debido a su mejor resolución y a la menor cantidad de masa que se requiere para el análisis. Por lo tanto, se decidió mejorar y actualizar la técnica de etilación mediante el estudio de los monosacáridos parcialmente etilados en columnas capilares comerciales, no sólo derivatizados como alditoles, sino también como aldononitrilos acetilados, ya que no existían antecedentes en la literatura sobre estos últimos derivados.

En esta Tesis además, se presentan los datos necesarios para determinar la ubicación de los grupos metoxilo en polisacáridos naturalmente metilados. Para ello fue necesario estudiar la separación e identificación de derivados parcialmente etilados de mono-*O*-metilgalactosas, los cuales no habían sido estudiados previamente. En primer lugar se presentan las características cromatográficas de dichos compuestos, y luego se analizan sus correspondientes espectros de masa.

3.1 PROPIEDADES CROMATOGRÁFICAS DE LOS AZÚCARES ETILADOS

En primer lugar se determinaron los tiempos de retención de diferentes derivados de azúcares parcialmente etilados y se estudiaron las mejores condiciones de separación. Los distintos monosacáridos parcialmente etilados se obtuvieron por etilación de carragenanos, cuyos resultados de metilación son bien conocidos¹²⁸, y del polisacárido de *Corallina officinalis* (véase pág. 112). Estos datos se complementaron con muestras de metil- α -D-galactopiranosido intencionalmente subetiladas para obtener una variedad de derivados con diferente grado y posición de etilación¹⁴¹.

Los derivados etilados se preparan rápidamente por adaptación del método de Hakomori, aunque a diferencia de la metilación, se necesita una segunda etapa de

alquilación (véase Parte Experimental, pág. 244). Los azúcares parcialmente etilados, derivatizados como aldononitrilos o alditoles acetilados, se forman con un rendimiento casi cuantitativo¹⁴¹, cada compuesto da un único pico agudo por cromatografía gaseosa, permiten la separación de varios azúcares alquilados que no podían ser resueltos como alditoles metilados, y sus espectros de masa son de fácil interpretación ya que se fragmentan en forma análoga a los derivados metilados^{143,144} (véase pág. 173).

La Tabla 51 contiene los tiempos de retención relativos para galactosas parcialmente etiladas derivatizadas como aldononitrilos acetilados, y la Tabla 52 presenta los mismos datos para los alditoles correspondientes.

Por otra parte, en la Tabla 53 se muestran los tiempos de retención de los galactononitrilos acetilados parcialmente metilados debido a que las características cromatográficas de dichos compuestos fueron informadas previamente sólo en columnas empaquetadas¹⁴⁵, por lo que es necesario determinar los tiempos de retención de estos derivados en columnas capilares comerciales.

Como comparación, en la Tabla 54 se presentan los mismos datos para los alditoles acetilados. Las propiedades cromatográficas de estos derivados fueron analizadas^{146,147}; se incluyen en la Tabla 54 los datos de la ref. 146 utilizando una columna SP-2330. Para poder comparar las Tablas 51-54 se incluye en cada una el tiempo de retención del pentaacetato de xilitol, respecto del standard utilizado en cada tabla.

Tabla 51: Tiempos de retención relativos de galactosas etiladas derivatizadas como aldononitrilos acetilados, en una columna capilar SP-2330.(Relativos al 3,4,5-tri-*O*-acetil-2,6-di-*O*-etilgalactononitrilo = 1000).

<i>Compuesto</i>	<i>Posición del O-etil</i>	<i>Programa A</i>	<i>Programa B</i>
1N	2,3,4,6	358	460
2N	3,4,6	568	714
3N	2,4,6	587	729
4N	2,3,4	640	777
5N	2,3,6	662	796
6N	2,6	1000	1000
7N	4,6	1024	1008
8N	3,6	1046	1016
9N	2,4	1283	1098
10N	2,3	1352	1115
11N	6	1537	1155
12N	2	2085	1260
13N	3	2329	1299
14N	4	2554	1333
	–	≈3400	1488
Xilitol ^a		1505	1152
		(19,38 min)	(30,54 min)

^a Los tiempos de retención absoluto y relativo del pentaacetato de xilitol se muestran como comparación.

Tabla 52: Tiempos de retención relativos de galactosas etiladas derivatizadas como alditoles acetilados, en una columna capilar SP-2330.

(Relativos al 3,4,5-tri-(*O*)-acetil-2,6-di-(*O*)-etilgalactononitrilo = 1000).

<i>Compuesto</i>	<i>Posición del O-etil</i>	<i>Programa A</i>	<i>Programa B</i>	<i>Ref. 141^a</i>
1A	2,3,4,6	418	518	588
3A	2,4,6	652	771	804
2A	3,4,6	659	781	810
5A	2,3,6	676	796	810
4A	2,3,4	738	847	889
6A	2,6	1000	1000	1000
7A	4,6	1016	1005	967
8A	3,6	1128	1061	1018
10A	2,3	1287	1120	1065
9A	2,4	1375	1145	1092
11A	6	1501	1172	1105
12A	2	1952	1264	1209
13A	3 (= 4)	2421	1337	1294
	–	3095	≈1440	1490
Xilitol ^b		1778	1233	1176

^a Datos informados en una columna capilar fabricada con 1% PEGS, 1% PEGA, 4% XF-1150 [ref. 141].

^b Los tiempos de retención relativos del pentacetato de xilitol se muestran como comparación. Los valores absolutos correspondientes se observan en la Tabla 51.

Tabla 53: Tiempos de retención relativos de galactosas metiladas derivatizadas como aldononitrilos acetilados, en una columna capilar SP-2330.

(Relativos al 3,4,5-tri-*O*-acetil-2,6-di-*O*-metilgalactonitrilo = 1000. Se presentan los datos para una columna nueva y otra con mayor uso, ver texto).

<i>Posición del O-metilo</i>	<i>Programa A</i>		<i>Programa B</i>	
	<i>≈3 años</i>	<i>1 año</i>	<i>≈3 años</i>	<i>1 año</i>
2,3,4,6	411	393	576	536
2,4,6	624	612	785	755
3,4,6	678	664	832	803
2,3,6	748	737	878	852
2,3,4	794	782	911	883
2,6	1000	1000	1000	1000
4,6	1082	1082	1028	1030
3,6	1132	1129	1042	1046
2,4	1356	1361	1099	1116
2,3	1458	1461	1125	1139
6	1423	1433	1123	1132
2	1898	1916	1209	1223
3	2357	2372	1292	1298
4	2571	2590	1325	1328
–	2858	2912	1377	1380
Xylitol ^a	1254		1077	

^a Los tiempos de retención relativos del pentacetato de xilitol se muestran como comparación. Los valores absolutos correspondientes se observan en la Tabla 51.

Tabla 54: Tiempos de retención relativos de galactosas metiladas derivatizadas como alditoles acetilados, en una columna capilar SP-2330.

(Relativos al 1,3,4,5-tetra-*O*-acetil-2,6-di-*O*-metilgalactitol = 1000. Se presentan los datos para una columna nueva y otra con mayor uso, véase texto pág. 172).

<i>Posición del O-metilo</i>	<i>Programa A</i>		<i>Programa B</i>		
	<i>≈3 años</i>	<i>1 año</i>	<i>≈3 años</i>	<i>1 año</i>	<i>Ref. 146^a</i>
2,3,4,6	487	466	663	626	606
2,4,6	699	687	840	817	803
3,4,6	752	740	880	859	847
2,3,6	773	760	892	871	859
2,3,4	942	928	982	970	964
2,6	1000 ^b	1000 ^b	1000	1000	1000
4,6	1005 ^b	1005 ^b	1000	1000	1000
3,6	1153	1159	1051	1059	1073
2,3	1433	1436	1119	1136	1175
2,4	1474	1486	1127	1148	1188
6	1270	1283	1079	1094	1150
2	1795	1822	1187	1208	1262
3 (= 4)	2305	2342	1273	1287	1342
–	2352	2406	1282	1298	1353
Xylitol^c	1361		1101		1160

^a Se incluyen datos de literatura obtenidos con el programa B (ref. 146).

^b Picos no resueltos.

^c Los tiempos de retención relativos del pentacetato de xilitol se muestran como comparación. Los valores absolutos correspondientes se observan en la Tabla 51.

Los derivados etilados eluyen considerablemente antes bajo las mismas condiciones cromatográficas que los correspondientes derivados metilados. Este desplazamiento significativo en el tiempo de retención puede atribuirse al incremento de la naturaleza hidrofóbica del grupo etilo respecto del metilo, demostrándose así que la disminución de la interacción con la fase líquida polar de la columna es más importante que el incremento en el peso molecular para determinar el desplazamiento en la elución.

Este fenómeno es una de las claves del valor de los derivados etilados para el análisis de polisacáridos. Se ha observado el siguiente hecho: si los derivados metilados de dos o más compuestos se superponen parcialmente y ellos contienen diferente número de grupos alquilo, los etilados se separarán mejor, siendo el compuesto que contenga el mayor número de grupos alquilo el primero en eluir. Sin embargo, si los compuestos cuyo picos que se solapan contienen el mismo número de grupos alquilo, por etilación en general no podrán resolverse los compuestos aunque puede incrementarse su separación en un pequeño grado¹⁴¹.

Concretamente, el análisis de las Tablas 51 y 53 muestra que la separación de los galactononitrilos acetilados parcialmente etilados es muy buena y comparable a la de los correspondientes derivados metilados. Sin embargo, el orden de elución no es el mismo: hay inversiones para 3,4,6- y 2,4,6-tri-*O*-alquil-, 2,3,4- y 2,3,6-tri-*O*-alquil-, y 6-*O*- y 2,3-di-*O*-alquil derivados.

Comparada con la metilación, la etilación mejora la resolución entre los derivados de 6-*O*- y 2,3-di-*O*-alquilgalactosa pero disminuye la separación entre los 2,6-, 4,6- y 3,6-di-*O*-alquil derivados, aunque no se impide la resolución.

Los acetatos de alditoles etilados (Tabla 52) muestran mayor superposición de picos que los correspondientes aldnonitrilos; por ejemplo 2,4,6- y 3,4,6-tri-*O*-

etilgalactitol, y 2,6- y 4,6-di-(*O*)-etilgalactitol. La misma tendencia se observó para los productos metilados¹⁴⁵.

La única inversión en el orden de elución se encontró para el 6-*O*-alquil-derivado, que en la metilación aparece antes que algunos productos dialquilados (Tabla 54); sin embargo en los derivados etilados aparece a mayor tiempo de retención. Como ya se mencionó, en éstos últimos el aumento en el número de grupos etilo tiene mayor influencia en la determinación del orden de elución.

Según se informó previamente para derivados metilados en columnas empaquetadas¹²⁸, los galactononitrilos etilados rinden mejores resoluciones que los alditoles. Sin embargo, las cromatografías llevan más tiempo ya que los nitrilos son menos volátiles que los alditoles correspondientes (véanse los tiempos de retención relativos al pentaacetato de xilitol).

En las Tablas 55 y 56 se presentan los tiempos de retención de varias mono-(*O*)-metilgalactosas etiladas, derivatizadas como alditoles y aldononitrilos acetilados, encontradas en la etilación de los polisacáridos de *Corallina officinalis* (Tablas 29 y 30). Por medio de estos derivados se pudo determinar la ubicación de los grupos metoxilo en dichos polímeros. Por comparación de ambas Tablas se observa que nuevamente los aldononitrilos conducen a mejores resoluciones.

3.2 Envejecimiento de las columnas cromatográficas

Por otra parte, las Tablas 53 y 54 muestran las diferencias en los tiempos de retención obtenidos empleando una columna con poco uso (menos de un año), y otra columna de aproximadamente 3 años de uso. Es de notar que a medida que la columna envejece los tiempos de retención se aproximan al valor del standard, es decir disminuye la resolución. Sin embargo este efecto no es importante, y aún con la

columna de tres años de uso se logra una buena resolución de los picos. Los tiempos de retención de los derivados etilados fueron obtenidos con dicha columna envejecida.

Tabla 55: Tiempos de retención relativos de mono-*O*-metilgalactosas etiladas, derivatizadas como aldononitrilos acetilados, en una columna capilar SP-2330.
(Relativos al derivado de 2,6-di-*O*-metilgalactosa = 1000).

<i>Compuesto</i>	<i>Posición del O-etilo</i>	<i>Posición del O-metilo</i>	<i>Programa A</i>	<i>Programa B</i>
15N	3,4,6	2		478
16N	2,3,6	4	398	514
17N	2,4,6	3		520
18N	2,4	6	633	762
19N	3,6	4	651	780
20N	3,6	2	705	823
21N	2,4	3		868
22N	2,6	3	776	876
		2,6 ^a	1000 (15,45 min)	1000 (28,36 min)

^a Se muestra como comparación el tiempo de retención relativo del 2,6-di-*O*-metilgalactononitrilo.

3.3 ESPECTROS DE MASA DE LOS *O*-ACETIL-*O*-ETILGALACTONONITRILOS

Los caminos de fragmentación de los aldononitrilos etilados son muy similares a los de los correspondientes derivados metilados^{145,148} y a los de los alditoles etilados¹⁴². En la Tesis Doctoral de C. A. Stortz¹⁴⁹ se realizó una completa descripción

Tabla 56: Tiempos de retención relativos de mono-*O*-metilgalactosas etiladas derivatizadas como alditoles acetilados, en una columna capilar SP-2330.
(Relativos al derivado de 2,6-di-*O*-metilgalactosa = 1000).

<i>Compuesto</i>	<i>Posición del O-etilo</i>	<i>Posición del O-metilo</i>	<i>Programa A</i>	<i>Programa B</i>
15A	3,4,6	2	461	570
16A	2,3,6	4	470	583
17A	2,4,6	3		595
20A	3,6	2	774	864
22A	2,6	3	800	884
23A	4	2	1588	1198
		2,6 ^a	1000 (14,24 min)	1000 (27,74 min)

^a Se muestra como comparación el tiempo de retención relativo del 2,6-di-*O*- metilgalactitol.

del comportamiento de fragmentación de los aldononitrilos metilados y por lo tanto, en esta Tesis sólo se mencionarán someramente las características generales que marcan las fragmentaciones, y se discutirá específicamente cómo asignar la ubicación de los grupos metoxilo en los derivados etilados de las monometilgalactosas.

En los espectros de masa de monosacáridos, pueden distinguirse por lo menos dos tipos de iones bien definidos: los fragmentos primarios y secundarios.

Las fragmentaciones primarias son aquellas en las que se rompe una unión carbono-carbono en el esqueleto del monosacárido. Los fragmentos primarios se forman generalmente a partir del ion molecular, que no aparece, por ruptura α entre dos átomos de carbono de la cadena principal. El grupo de Lindberg¹⁴³, luego de estudiar

las fragmentaciones de los alditoles acetilados parcialmente metilados, concluyó que el punto más probable de fragmentación primaria es entre carbonos vecinos en la cadena principal, cuando ambos carbonos están involucrados en uniones éter con los grupos metilo. Cuando ocurre esta fragmentación la carga puede ser retenida por cada fragmento, de manera que se observan ambos iones. La otra fragmentación primaria probable, ocurre entre carbonos vecinos en la cadena cuando uno de ellos forma una unión éter con un grupo metoxilo, y el otro un éster con un acetilo. En este caso, la carga es retenida casi exclusivamente por el carbono que lleva el grupo metoxilo. La fragmentación primaria menos probable ocurre entre dos carbonos vecinos cuando ambos forman uniones éster con los grupos acetilo. Este orden de fragmentación prioritario es el resultado de la mayor estabilidad de los iones en los cuales el grupo metoxilo soporta la carga positiva, respecto de los iones en los que la carga está sobre los acetilos¹⁴³.

La fragmentación secundaria se origina a partir de los fragmentos primarios por pérdida de moléculas neutras simples. Las moléculas más comunes son ácido acético y cetena, y en menor medida formaldehído y metanol. El pico base de los espectros es, a menudo, un fragmento secundario obtenido por pérdida de ácido acético o cetena.

Estas mismas reglas se extendieron a los aldononitrilos acetilados parcialmente metilados¹⁴⁵, y también se cumplen en la mayoría de los fragmentos que se obtienen en los espectros de masa de los alditoles acetilados parcialmente etilados¹⁴². Los resultados que se presentarán a continuación demuestran que los caminos de fragmentación que se acaban de enumerar también se cumplen para los aldononitrilos etilados.

Las diferentes series de iones producidas se identifican^{150,151} con un número que corresponde a la cantidad de átomos de carbono de la cadena principal, y las letras CN o C que indican si se trata del fragmento del extremo nitrílico o no nitrílico de la

molécula, como se observa en la Figura 39.

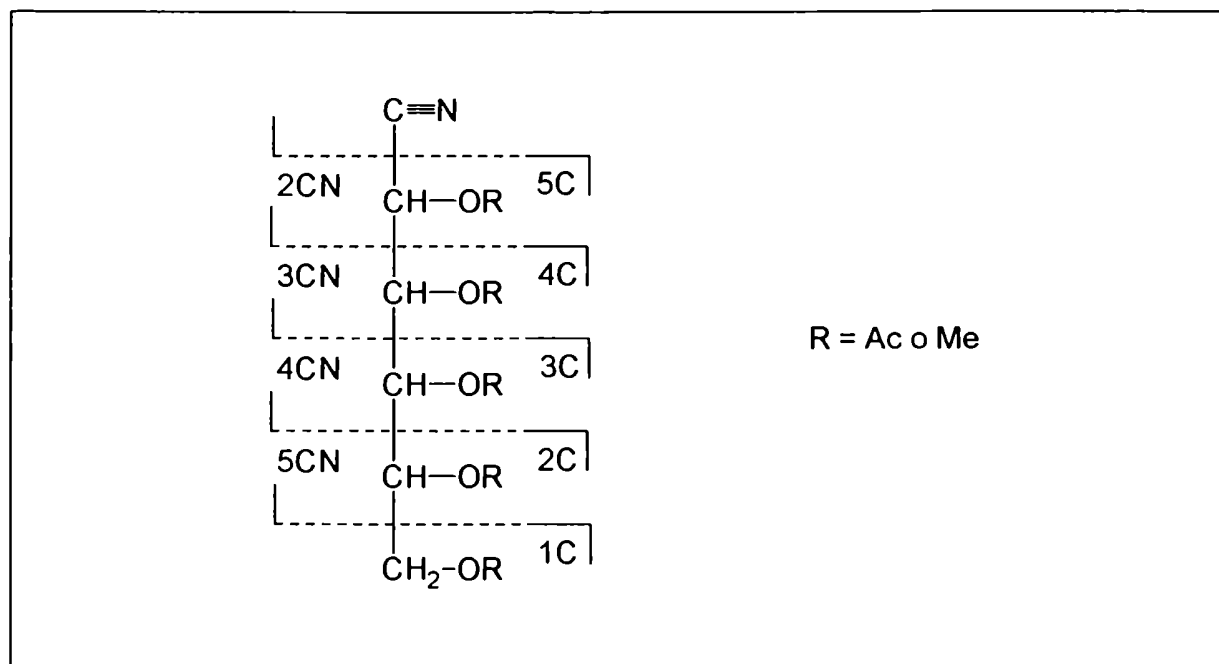


Figura 39: Nomenclatura utilizada para las diferentes series.

3.3.1 Espectros de masa de algunos derivados tetra-*O*-alquilados

En la Tabla 57 se aprecian los espectros de masa de los 5-*O*-acetil-2,3,4,6-tetra-*O*-alquilgalactononitrilos.

El espectro del 5-*O*-acetil-2,3,4,6-tetra-*O*-etilgalactononitrilo concuerda bien con el informado por Stortz *et al*¹⁴⁵ para el compuesto tetrametilado. Los espectros de los distintos compuestos tetraalquilados producen fragmentos que permiten diferenciarlos fácilmente, y por lo tanto puede asignarse con exactitud la ubicación del grupo metilo (véase Tabla 58).

La serie 3C, que se aprecia en el Esquema 1, permite diferenciar al 2,3,6-tri-*O*-etil-4-*O*-metilgalactononitrilo de los demás compuestos.

Tabla 57: Picos principales de los espectros de masa de los derivados 2,3,4,6-tetra-*O*-alquilados y mono-*O*-acetilados del galactonitrilo ($m/e > 44$).

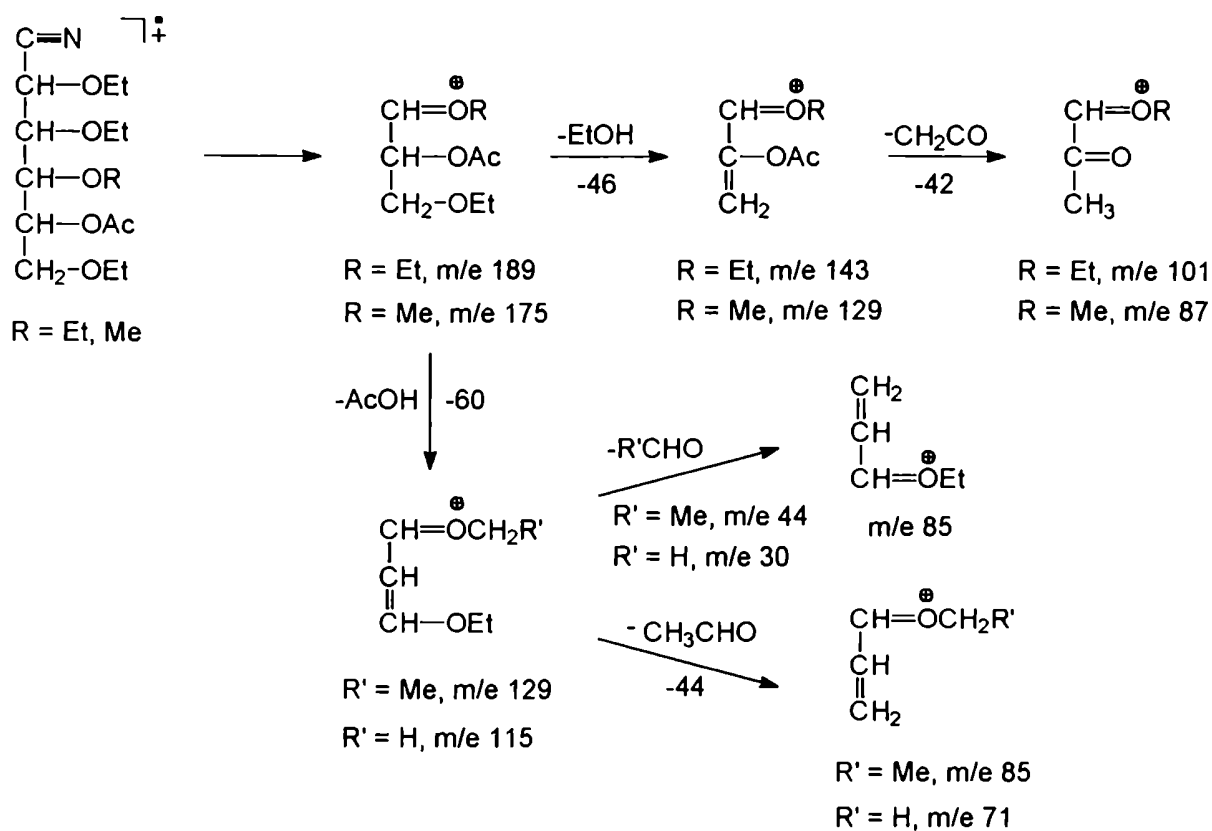
Etilo en	2,3,4,6		3,4,6		2,4,6		2,3,6	
Metilo en	-		2		3		4	
<i>m e</i>	%	Serie	%	Serie	%	Serie	%	Serie
45	15	1C	23	1C	23	1C	16	1C
57					17			
59	57	1C	43	1C	83	1C	69	1C
71					28		41	3C
73	15		19		18			
85	51	3C	42	3C	70	3C	60	3C
87					36		37	3C
99					18			
101	19	3C	23	3C	24	3C	14	
103			24	Ac ₂ OH ⁺	24	Ac ₂ OH ⁺	15	Ac ₂ OH ⁺
113	10		10					
115	14		22		34		54	3C
116	17	2M	13	2M			11	2M
117	16							
127					10	4C		
129	46	3C	32	3C	100	3C	100	3C
131					36	2C	33	2C
142					14			
143	100	3C	100	3C	94	3C		
145	19	Ac ₃ O ⁺	17	Ac ₃ O ⁺	22	Ac ₃ O ⁺		
156	6							
159	5							
173					26	4C	24	4C
175					33		55	3C
186			5	4CN				
187	15	4C	15	4C				
189	59	3C	75	3C	50	3C		
200	2	4CN						
214					2			
233					12	4C	10	4C
247	10	4C	6	4C				

Tabla 58: Asignación de la posición del grupo metoxilo en algunos 5-*O*-acetil-2,3,4,6-tetra-*O*-alquilgalactononitrilos. Los desplazamientos se consideran respecto del compuesto tetra-*O*-etilado.

Serie	Desplazamiento ^a	Distingue ^b
3C (Esquema 1)	189→175 143→129	2,3,IV,6- : de II,3,4,6-; 2,III,4,6- y 2,3,4,6-
4C (Esquema 2)	247→233 187→173	2,3,IV,6- y 2,III,4,6- : de II,3,4,6- y 2,3,4,6-
4CN (Esquema 3)	200→186	II,3,4,6- : de 2,III,4,6-; 2,3,IV,6- y 2,3,4,6-

^a Los derivados marcados en negrita se diferencian por el corrimiento de iones indicado en cada caso.

^b 2,3,IV,6- = 2,3,6-tri-*O*-etil-4-*O*-metilgalactononitrilo, etc.

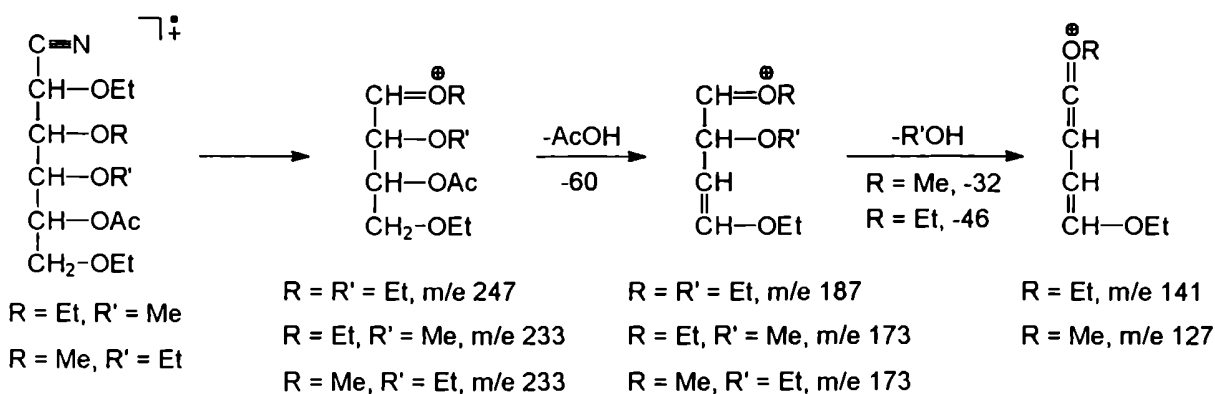


Esquema 1: Serie 3C para el 5-*O*-acetil-2,3,4,6-tetra-*O*-etilgalactononitrilo y el 5-*O*-acetil-2,3,6-tri-*O*-etil-4-*O*-metilgalactononitrilo.

La presencia de los iones de *m/e* 71 y 85 en el compuesto metilado en C-4 indica que a partir del fragmento secundario de *m/e* 129 pueden eliminarse tanto formaldehído como acetaldehído (es decir, pueden eliminarse tanto del C-4 como del C-6), lo que está de acuerdo con lo que se había informado previamente para los compuestos metilados¹⁵¹.

Si bien la serie 3C muestra iones adicionales a los incluidos en la Tabla 58, que teóricamente permitirían diferenciar al compuesto metilado en C-4, dichos iones pueden provenir de otros caminos de fragmentación¹⁴⁵, dificultando el diagnóstico. Sin embargo, aún en estos casos un análisis minucioso de las abundancias relativas de estos iones ayuda a confirmar la identificación.

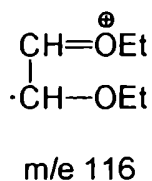
La serie 4C, que se aprecia en el Esquema 2, permite diferenciar a los acetatos del 2,3,6-tri-*O*-etil-4-*O*-metil- y 2,4,6-tri-*O*-etil-3-*O*-metilgalactononitrilo de los otros dos derivados tetraalquilados (Tabla 58).



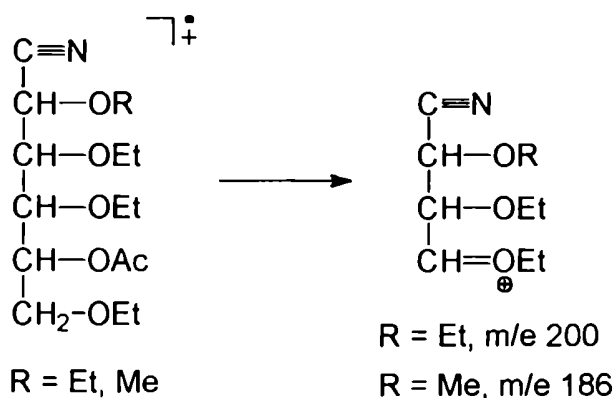
Esquema 2: Serie 4C para el 5-*O*-acetil-2,3,4,6-tetra-*O*-etilgalactononitrilo, el 5-*O*-acetil-2,3,6-tri-*O*-etil-4-*O*-metilgalactononitrilo y el 5-*O*-acetil-2,4,6-tri-*O*-etil-3-*O*-metilgalactononitrilo.

Por otra parte, la serie 4C permite diferenciar a los derivados monometilados en C-3 y C-4 entre sí, por la presencia del ión de *m/e* 127. Además, el compuesto metilado

en C-3 es el único que no presenta el ión a *m/e* 116, la llamada serie 2M¹⁴⁹, porque no contiene dos grupos etilo vecinos, como se muestra en la siguiente estructura.



La diferenciación del derivado tetraetilado del metilado en C-2 es más difícil de realizar ya que no existen fragmentos abundantes de las series CN. Sin embargo, se obtiene un ión de baja intensidad de la serie 4CN, Esquema 3, que permite diferenciar ambos compuestos (Tabla 58).



Esquema 3: Serie 4CN para el 5-*O*-acetil-2,3,4,6-tetra-*O*-etilgalactononitrilo y el 3,4,6-tri-*O*-etil-2-*O*-metilgalactononitrilo.

3.3.2 Espectros de masa de algunos derivados tri-*O*-alquilados.

En la Tabla 59 se muestran los espectros de masa de los compuestos 3,4,6- y 2,4,6-tri-*O*-alquilados.

Ambos derivados 3,4,6-tri-*O*-alquilados pueden diferenciarse fácilmente (Tabla 60) de acuerdo a la serie 3C (Esquema 1) que se describió para los compuestos tetraalquilados (véase pág. 178).

Tabla 59: Picos principales de los espectros de masa de los derivados 3,4,6- y 2,4,6-tri-*O*-alquilados y di-*O*-acetilados del galactonitrilo ($m/e > 44$).

m/e	3,4,6-trietil-		3,6-dietil-4-metil-		2,4,6-trietil-		2,4-dietil-6-metil-	
	%	Serie	%	Serie	%	Serie	%	Serie
45							78	1C
59	25	1C	58	1C	33	1C	21	
71			27	3C				
85	18	3C	24	3C	19	3C	24	3C
87			29	3C			16	
98							20	
101	18	3C	15		14	3C	14	3C
113			16		25		27	
115			50	3C	12		65	3C
117					11		18	
126	16				59	4CN	61	4CN
129	25	3C	100	3C	100	3C	17	
131			23					
140			24	4CN	10		14	
143	100	3C	22		56	3C	100	3C
145	17							
154	18	4CN			9	4CN	12	4CN
156			6	3CN				
157							5	
168					58	4CN	73	4CN
169					5			
175			72	3C			48	3C
189	65	3C			29	3C		
200			8	4CN				
201			2					
203			5					
212			2					
214	6	4CN			48	4CN	85	4CN

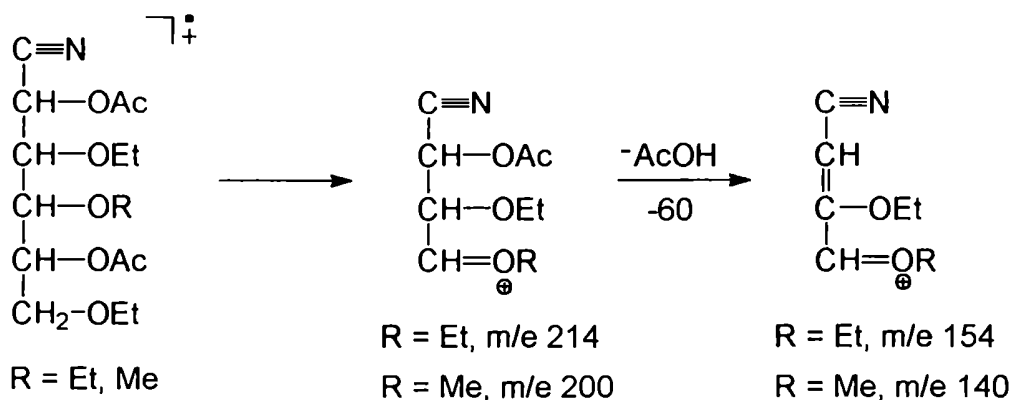
Tabla 60: Asignación de la posición del grupo metoxilo en algunos derivados tri-*O*-alquilados del galactonitrilo. Los desplazamientos se consideran respecto del compuesto tri-*O*-etilado.

Serie	Desplazamiento ^a	Distingue ^b
3C (Esquema 1)	189→175 143→129 129→115 101→87 85→71	3,IV,6- : de 3,4,6- (Tabla 59)
4CN (Esquema 4)	214→200 154→140	
3C (Esquema 1)	189→175 129→115	2,4,VI- : de 2,4,6- (Tabla 59)
1C (Esquema 5)	59→45	
4C (Esquema 6)	261→247 201→187 159→145 141→127 113→99	2,III,6- : de 2,3,6- y II,3,6- (Tabla 61)
5CN (Esquema 7)	244→230	II,3,6- y 2,III,6- : de 2,3,6- (Tabla 61)
4C (Esquema 6)	261→247 201→187 113→99	2,III,4- : de 2,3,4- (Tabla 61)
4CN (Esquema 8)	200→186	

^a Los derivados marcados en negrita se diferencian por el corrimiento de iones indicado en cada caso.

^b 3,IV,6- = 3,6-di-*O*-etil-4-*O*-metilgalactonitrilo, etc.

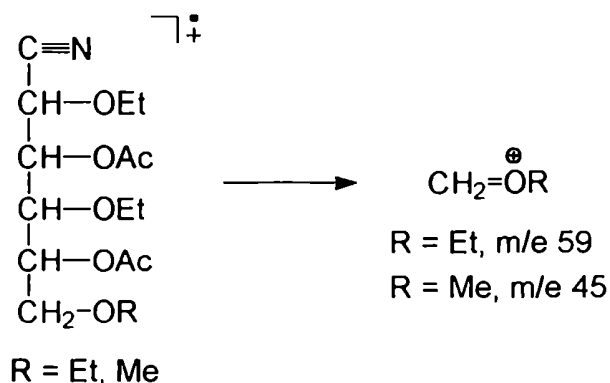
Además, la serie 4CN (Esquema 4) produce dos fragmentos diferentes para cada derivado (Tabla 60).



Esquema 4: Serie 4CN para el 2,5-di-*O*-acetil-3,4,6-tri-*O*-etilgalactonitrilo y el 2,5-di-*O*-acetil-2,6-di-*O*-etil-4-*O*-metilgalactonitrilo.

En los espectros de los dos derivados 2,4,6-tri-*O*-alquilados, la serie 4CN (Tabla 59) da origen a los iones de alta intensidad de *m/e* 214 (fragmento primario), 168 (pérdida de etanol), 126 (pérdida de cetena a partir de este último) y 154 (pérdida de ácido acético desde el fragmento primario), y por lo tanto no permite distinguir entre ambos compuestos. Sin embargo, éstos pueden diferenciarse fácilmente por la serie 3C (véanse Esquema 1 y Tabla 60).

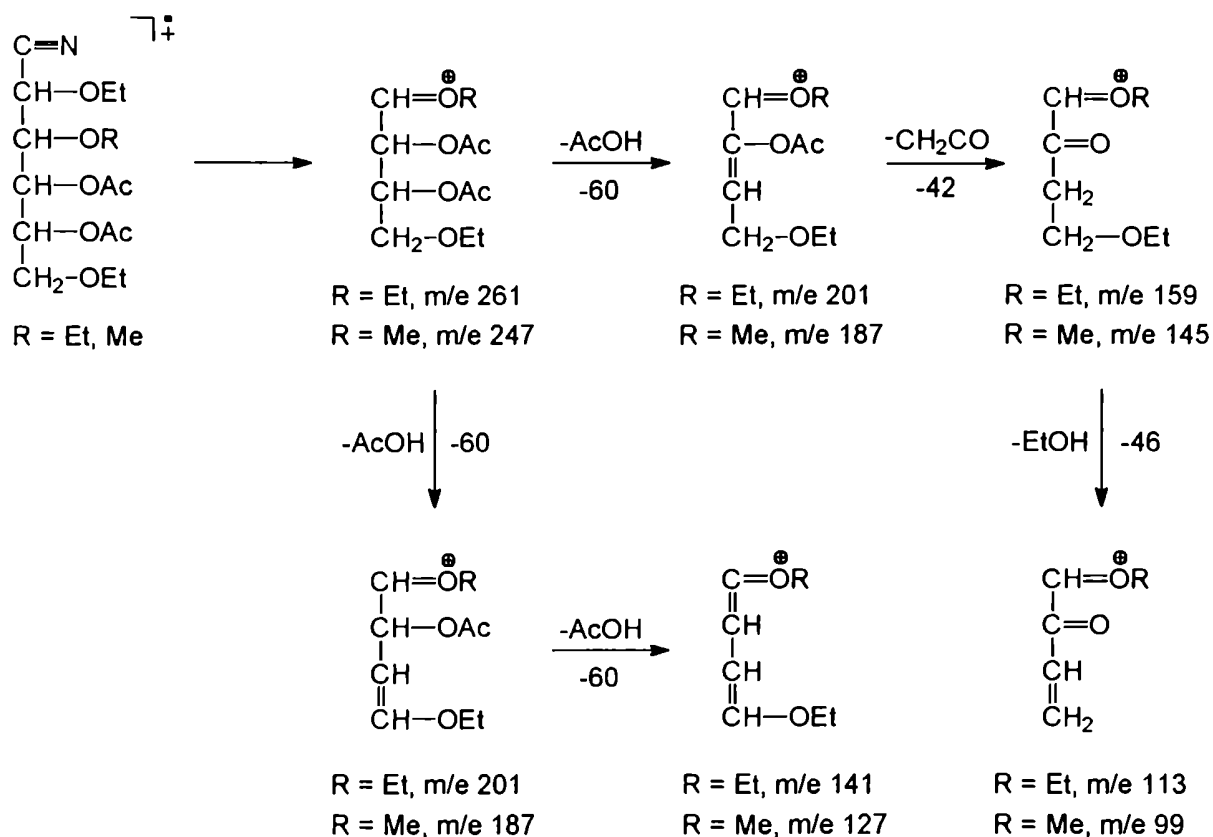
La serie 1C también marca una diferencia importante entre ambos derivados (Tabla 60).



Esquema 5: Serie 1C para el 3,5-di-*O*-acetil-2,4,6-tri-*O*-etil-galactonitrilo y el 3,5-di-*O*-acetil-2,4-di-*O*-etil-6-*O*-metilgalactonitrilo.

En la Tabla 61 se aprecian los iones más importantes en los espectros de masa de algunos derivados 2,3,6- y 2,3,4-tri-*O*-alquilados.

Respecto de los derivados 2,3,6-tri-*O*-alquilados, los iones que surgen de la serie 3C aparecen en los tres compuestos y por lo tanto, no permiten distinguirlos. Sin embargo, el compuesto metilado en la posición 3 puede ser inequívocamente determinado por medio de la serie 4C (Esquema 6 y Tabla 60).

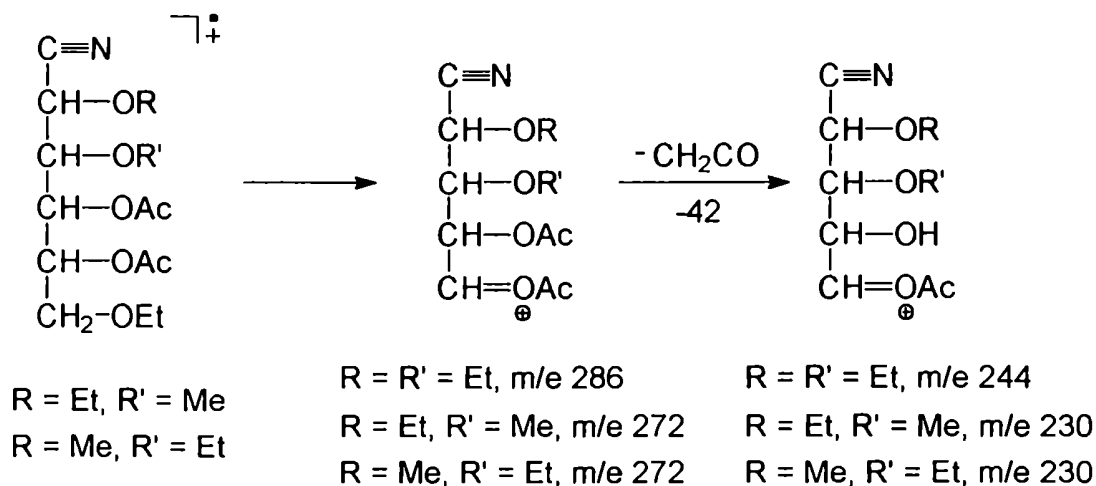


Esquema 6: Serie 4C para el 4,5-di-*O*-acetil 2,3,6-tri-*O*-etilgalactonitrilo y el 4,5-di-*O*-acetil-2,6-di-*O*-etil-3-*O*-metilgalactonitrilo.

El derivado metilado en el C-2 produce un espectro prácticamente idéntico al del compuesto trietilado. Sólo la serie 5CN (Esquema 7) que produce iones de baja intensidad, permite distinguir ambos compuestos (Tabla 60).

Tabla 61: Picos principales en los espectros de masa de los derivados 2,3,6- y 2,3,4-tri-*O*-alquilados y di-*O*-acetilados del galactonitrilo ($m/e > 44$).

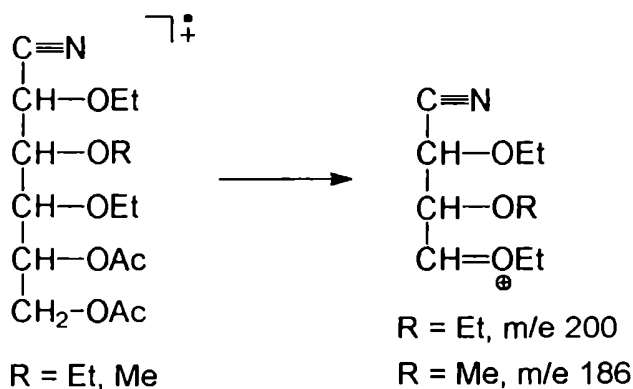
<i>m/e</i>	2,3,6-		3,6-dietil-2-metil		2,6-dietil-3-metil		2,3,4-trietil-		2,4-dietil-3-metil	
	%	Serie	%	Serie	%	Serie	%	Serie	%	Serie
45					48	1C			26	1C
59	64	1C	58	1C	31	1C			30	1C
73			15							
85	30		27		19		23		26	
87					31					
99					33	4C			20	4C
101	100	3C	100	3C	100	3C	18	3C	38	3C
102			18		25				14	2M
103									14	
113	19	4C	16	4C	15		43	4C	43	
114	10									
115			12	3C	13	3C	11		18	
116			12	2M						
127					52	4C				
129					15					
131	10	2C							13	
141	44	4C	31	4C						
142	13	3CN							11	
143	66	3C	70	3C	58	3C	100	3C	100	3C
145					29	4C				
155	6									
156							6			
157	5	3C								
159	26	4C	23	4C					9	4C
161	6	3C	7	3C						
173							5	4C	6	
186									8	4CN
187					12	4C			6	4C
200							3	4CN		
201	10	4C	7	4C			10	4C	3	
203	3		5	5CN	6	5CN	32	3C	29	3C
228					3					
230			2	5CN	4	5CN				
244	2	5CN								
247					10	4C			6	4C
261	7	4C	4	4C			4	4C		



Esquema 7: Serie 5CN para el 4,5-di-*O*-acetil-2,3,6-tri-*O*-etilgalactononitrilo, 4,5-di-*O*-acetil-2,6-di-*O*-etil-3-*O*-metilgalactononitrilo y 4,5-di-*O*-acetil-3,6-di-*O*-etil-2-*O*-metilgalactononitrilo.

Ambos derivados 2,3,4-tri-*O*-alquilados pueden diferenciarse por los iones de la serie 4C (Tabla 60), que es análoga a la descripta para los compuestos 2,3,6-tri-*O*-alquilados (Esquema 6), intercambiando sólo la ubicación de un grupo metilo y el acetilo correspondiente.

Además, la serie 4CN produce un ión que permite diferenciar ambos compuestos, como muestra la siguiente fragmentación (Tabla 60).



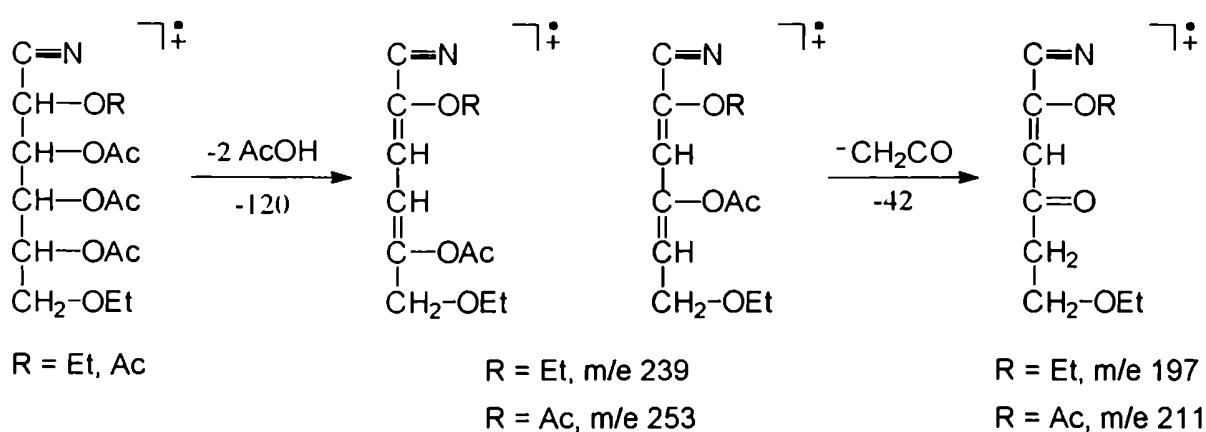
Esquema 8: Serie 4CN para el 5,6-di-*O*-acetil-2,3,4-tri-*O*-etilgalactononitrilo y el 5,6-di-*O*-acetil-2,4-di-*O*-etil-3-*O*-metilgalactononitrilo.

3.3.3 Espectros de masa de algunos derivados di- y mono-*O*-etilados

En las Tablas 62 y 63 se muestran los picos principales en los espectros de masa de los derivados di- y monoetilados del galactononitrilo respectivamente. Los espectros permiten identificar en forma precisa a cada derivado, y los iones obtenidos pueden asignarse a los caminos de fragmentación ya presentados por Stortz¹⁴⁹ para los correspondientes aldononitrilos metilados.

Los 2,6-di-*O*-etil- y 6-*O*-etilgalactononitrilos acetilados experimentan un camino de fragmentación bastante inusual para derivados de monosacáridos y que fue presentado por Stortz *et al*¹⁴⁵ para los correspondientes compuestos metilados. Los iones surgen por pérdida de fragmentos neutros (ácido acético y cetena) a partir del ión molecular, obteniéndose iones radicales (serie 6CN, Esquema 9).

Esta ruptura es característica de los aldononitrilos, ya que los iones radicales producidos se estabilizan por conjugación a lo largo de la cadena, y especialmente en compuestos de bajo índice de alquilación y alquilados en el C-6. Los datos de etilación obtenidos confirman dicho camino (Tablas 62 y 63).



Esquema 9: Serie 6CN para el 3,4,5-tri-*O*-acetil-2,6-di-*O*-etilgalactononitrilo y el 2,3,4,5-tetra-*O*-acetil-6-*O*-etilgalactononitrilo.

Tabla 62: Picos principales en los espectros de masa de los derivados di-*O*-alquilados y tri-*O*-acetilados del galactonitrilo ($m/e > 44$).

m/e	2,6-dietil-		4,6-dietil-		3,6-dietil-		2,4-dietil-		2,3-dietil-	
	%	Serie	%	Serie	%	Serie	%	Serie	%	Serie
59	74	1C	51	1C	41	1C				
73									17	
85	23		20	3C			15		100	4C
98			24							
99									15	
101	100	3C	23	3C	100	3C	10	3C	25	
103	12	Ac ₂ OH ⁺							20	Ac ₂ OH ⁺
109			16	4CN						
113	49	4C					27	4C	94	4C
114									21	
115	77		10				14		32	3C
116									26	
117							14			
126	18		71	4CN			85	4CN		
127	19	4C					11		60	4C
129	12	5CN	100	3C						
131	32	2C							13	
140			18				16			
141					12	4C				
142									11	3CN
143	51	3C	63	3C	59	3C	100	3C		
145			10	Ac ₃ O ⁺			10	Ac ₃ O ⁺		
152	13									
153	21									
154	6									
155							11	4CN		
156					20	3CN			8	
157	19									
159			7		23	4C				
161					6	3C				
168	19		79	4CN			61	4CN		
169			13	4CN			5			
173	48	4C					20		10	4C
187									5	4C
189			27	3C						
196	6									
197	34	6CN								
198	24	5CN	7		6					
201					3	4C				
203	9	3C			3	3C	27	3C		
214							73	4CN		
215	6	4C							13	4C
217									4	3C
228			60	4CN						
239	15	6CN								
240					3					
256	3	5CN								
261					2	4C				
275	3	4C					2		3	4C

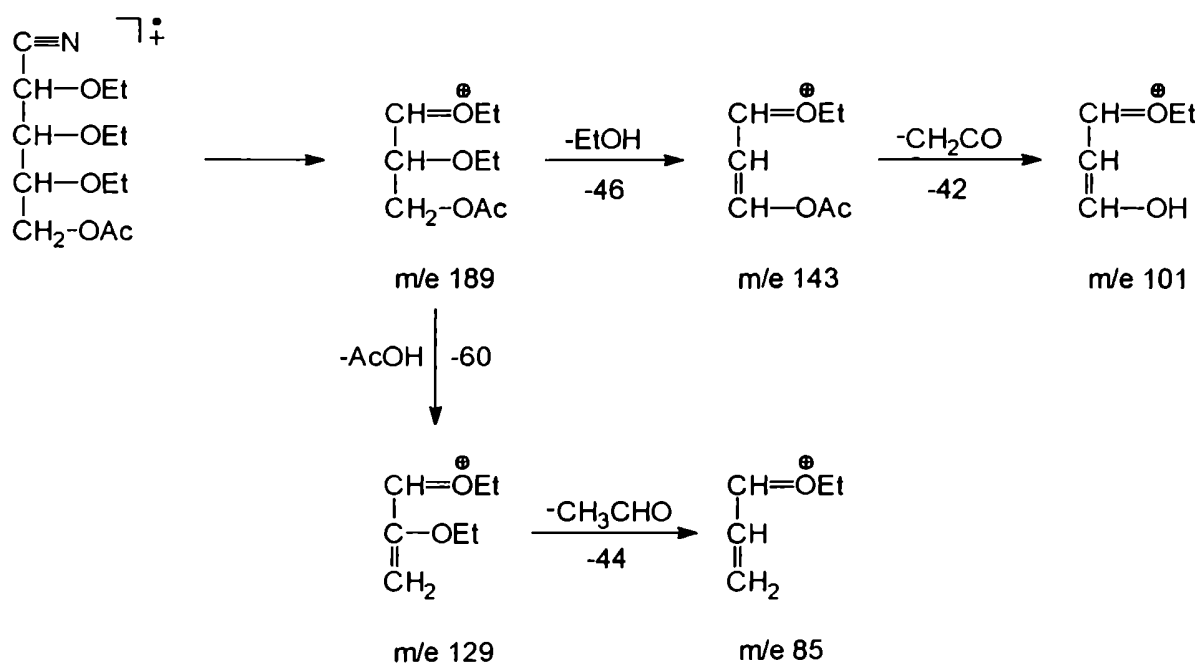
Tabla 63: Picos principales en los espectros de masa de los derivados mono-*O*-etilados y tetra-*O*-acetilados del galactonitrilo, y del 5-*O*-acetil-2,3,4-tri-*O*-etilxilonitrilo ($m/e > 44$).

<i>m/e</i>	2-etil-		3-etil-		4-etil-		6-etil-		2,3,4-trietil-Xil	
	%	Serie	%	Serie	%	Serie	%	Serie	%	Serie
57	18								20	
59							100	1C	34	1C
60									38	
61									27	
71	16									
73	33		15						44	
85	85	4C	100	4C					12	3C
88									12	
89									13	
97			27	3CN						
98			38		26					
99	16		16							
101	29		29		16	3C	57	3C	47	3C
103	84	2C	26	2C					23	
113	11		82	4C						
114			17							
115	89	3C	52	3C	14		28	3C		
116	14								18	2M
126	10				85	4CN				
127	69	4C	55	4C	31	4CN				
128			29							
129	28								95	3C
131			16				14	2C	100	2C
132									23	
140					17					
143	13				100	3C	20	3C		
145	85	2C	12		12	2C				
152							9			
154									14	4CN
155	11									
156			84	3CN					5	
157	21	3C	15	3C			9	3C		
168	9				54	4CN	6			
169	11		5		11	4CN	10	6CN		
173			13	4C			21	4C		
175					5					
186	8									
187	100	4C	9							
189									10	3C
198	56	5CN	9							
203					14	3C	2	3C		
211	10		4				37	6CN		
212	3						11	5CN		
215			12	4C						
217	11	3C	10	3C						
228					26	4CN				
229					3	4CN				
275			3	4C						

El ión de *m/e* 211, en el 6-*O*-metilgalactononitrilo, elimina una molécula de cetena¹⁴⁵ para dar el fragmento de *m/e* 169 (Tabla 63).

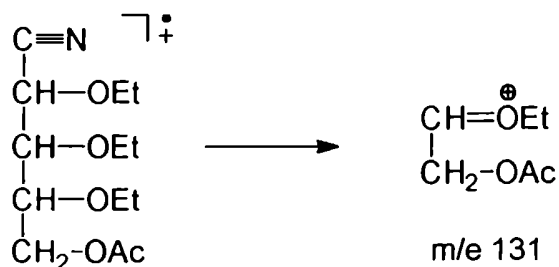
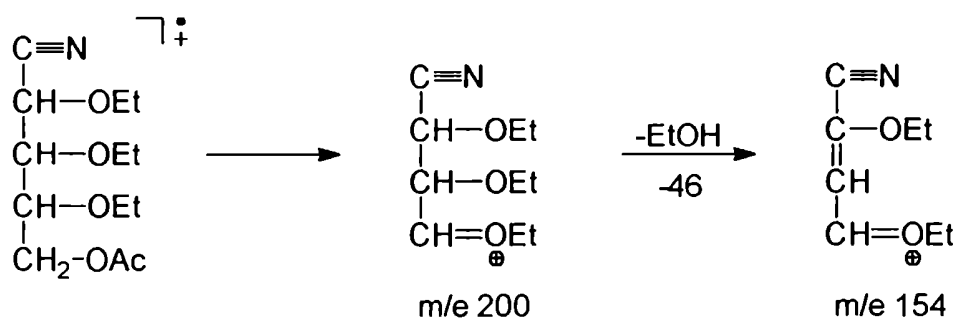
3.3.4 Espectro de masa del 5-*O*-acetil-2,3,4-tri-*O*-etilxilononitrilo

En la Tabla 63 se observan también, los iones más importantes del espectro de masa del 5-*O*-acetil-2,3,4-tri-*O*-etilxilononitrilo. Esta es la primera vez que se presenta dicho espectro, y por ello es conveniente describir brevemente los caminos de fragmentación del mismo. La serie más importante es la 3C que se observa en el Esquema 10.



Esquema 10: Serie 3C para el 5-*O*-acetil-2,3,4-tri-*O*-etilxilononitrilo.

Las series 2C y 4CN se aprecian en los Esquemas 11 y 12 respectivamente; la primera de ellas da origen al pico base, el ión de *m/e* 131.

Esquema 11: Serie 2C para el 5-*O*-acetil-2,3,4-tri-*O*-etilxilononitrilo.Esquema 12: Serie 4CN para el 5-*O*-acetil-2,3,4-tri-*O*-etilxilononitrilo.

Finalmente, se observan iones de las series 1C y 2M que ya fueron mencionadas en el Esquema 5 y en la página 180 respectivamente.

3.4 ESPECTROS DE MASA DE LOS *O*-ACETIL-*O*-ETILGALACTITOLES

Los espectros de masa de los diferentes alditoles parcialmente etilados fueron estudiados en detalle por el grupo de Albersheim¹⁴², quienes concluyeron que las fragmentaciones de dichos compuestos son muy semejantes a las de los derivados metilados.

Los resultados obtenidos con los alditoles etilados concuerdan con los datos informados por Albersheim, por lo tanto no se comentarán en detalle los caminos de

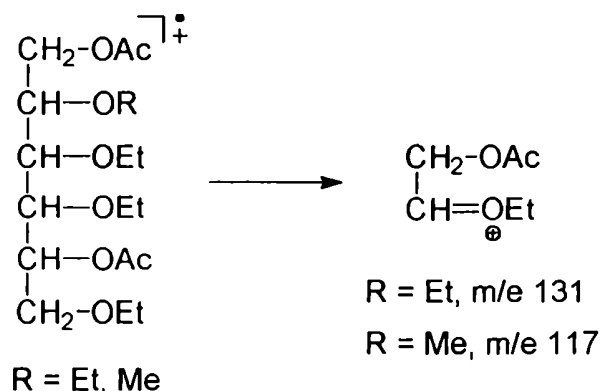
fragmentación, salvo para diferenciar los distintos derivados etilados-metilados de los correspondientes compuestos etilados.

Para facilitar el análisis de los fragmentos se emplea la misma nomenclatura que en los aldonitrilos, es decir, las diferentes series de iones se identifican con un número que corresponde a la cantidad de átomos de carbono de la cadena principal, y las letras CN o C que indican si se trata del fragmento del extremo que contiene al C-1 o al C-6, como se describió en la página 175.

3.4.1 Espectros de masa de algunos derivados tetra-*O*-alquilados

En la Tabla 64 se presentan los picos más importantes de los espectros de masa de los 5-*O*-acetil-2,3,4,6-tetra-*O*-alquilgalactitoles.

El derivado monometilado en el C-2 se diferencia de los demás compuestos (Tabla 65), por el fragmento proveniente de la serie 2CN (Esquema 13).



Esquema 13: Serie 2CN para el 1,5-di-*O*-acetil-2,3,4,6-tetra-*O*-etilgalactitol y el 1,5-di-*O*-acetil-3,4,6-tri-*O*-etil-2-*O*-metilgalactitol.

Tabla 64: Picos principales en los espectros de masa de los 5-*O*-acetil-2,3,4,6-tetra-*O*-etilgalactitoles ($m/e > 44$).

m/e	2,3,4,6-tetraetil-		3,4,6-trietil-2-metil-		2,3,6-trietil-3-metil-		2,4,6-trietil-4-metil-	
	%	Serie	%	Serie	%	Serie	%	Serie
57			27		20		15	
59	56	1C	66	1C	66	1C	42	1C
71							18	3C
73	35	1CN	31	1CN	38	1CN	21	1CN
85	87	3CN + 3C	91	3CN	71	3C	60	3CN
87			44		27		25	3C
89	24		15		24			
99					17			
101	52	3C	36	3C	52	3C	39	
103	17		21		38		16	
113	11		16		14			
115	16		88	3CN	53	3CN	30	3C
116			10		13			
117	26		80	2CN	41			
127					11			
129	100	3CN + 3C	67	3C	100	3C + 4C	100	3CN + 3C
130	14		11		10			
131	89	2CN	29	2C	57	2CN	97	2CN
141	11		11					
143	90	3C	100	3C	37	3C	19	4C
145	16		22		30		12	
157					13	4CN		
159	8		7		5			
173					39	4C	31	4C
175			31	3CN	32	3CN	20	3C
187	28	4C	26	4C	5	4CN		
189	70	3CN + 3C	53	3C	13	3C	24	3CN
201	3	4CN	3	4CN	2			
203	2		2		3			
217					4			
233					28	4C	30	4C
247	31	4C	26	4C	2		2	
261					2			

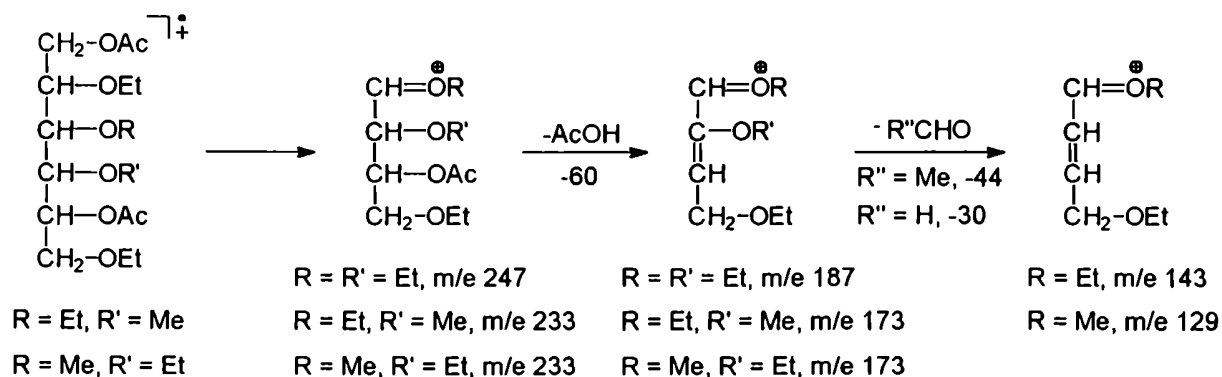
Tabla 65: Asignación de la posición del grupo metoxilo en algunos derivados tetra-*O*-alquilados del galactitol. Los desplazamientos se consideran respecto del compuesto tetra-*O*-etilado.

Serie	Desplazamiento	Distingue ^a
2CN (Esquema 13)	131→117	II,3,4,6- : de 2,3,4,6- ; 2,3,IV,6- y 2,III,4,6-
4C (Esquema 14)	247→233 187→173	2,III,4,6- y 2,3,IV,6- : de II,3,4,6- y 2,3,4,6-
3CN (Esquema 15)	189→175 129→115	II,3,4,6- y 2,III,4,6- : de 2,3,4,6-
3C (Esquema 16)	189→175 143→129 101→87	2,3,IV,6- : de 2,3,4,6-
4C (Esquema 14)	143→129	2,3,IV,6- : de 2,III,4,6-

^a Los derivados marcados en negrita se diferencian por el corrimiento de iones indicado en cada caso.

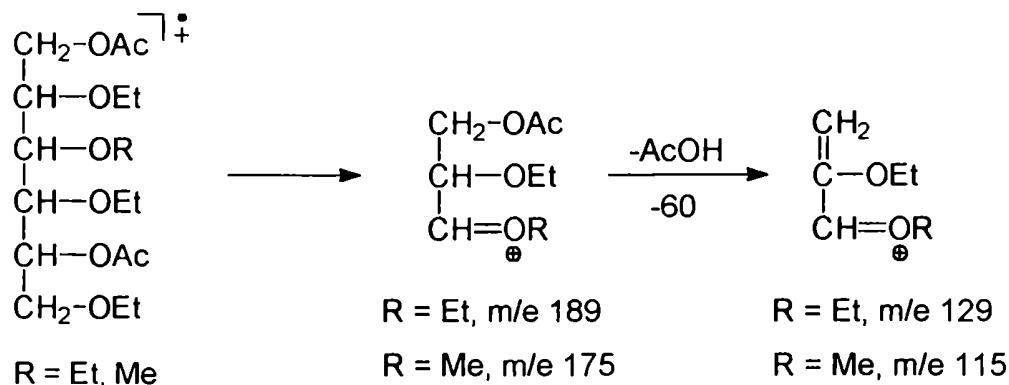
^a II,3,4,6- = 3,4,6-tri-*O*-etil-2-*O*-metilgalactitol, etc.

Los compuestos monometilados en las posiciones 3 y 4, se pueden distinguir claramente de los demás compuestos tetraalquilados (Tabla 65) por los iones que se producen en la serie 4C que se muestra en el Esquema 14.



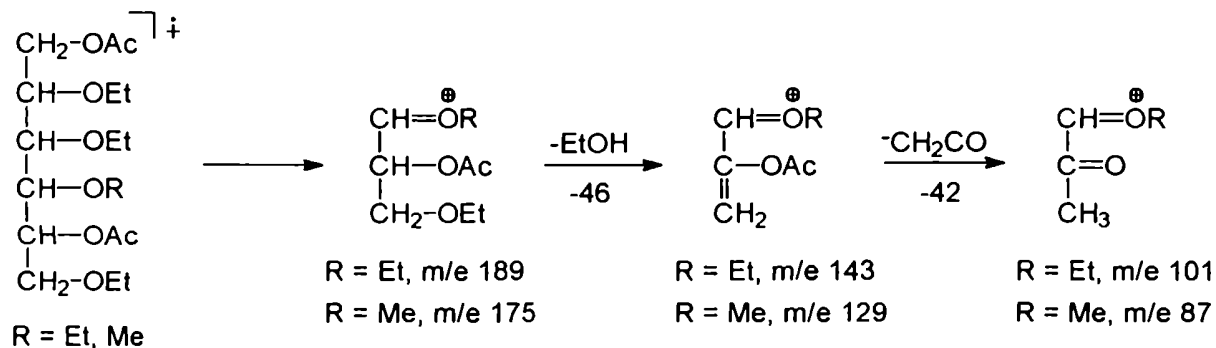
Esquema 14: Serie 4C para el 1,5-di-*O*-acetil-2,3,4,6-tetra-*O*-etilgalactitol, el 1,5-di-*O*-acetil-2,3,6-tri-*O*-etil-4-*O*-metilgalactitol y el 1,5-di-*O*-acetil-2,4,6-tri-*O*-etil-3-*O*-metilgalactitol.

Existen además dos caminos de fragmentación que debido a la simetría de la molécula del alditol, complica la distinción entre los distintos compuestos monometilados pero que permiten diferenciarlos del derivado tetraetilado (Tablas 64 y 65). Esto es especialmente evidente en la diferenciación de los compuestos metilados en C-3 y C-4 entre sí. Dichas fragmentaciones, series 3CN y 3C, se muestran en los Esquemas 15 y 16 respectivamente.



Esquema 15: Serie 3CN para el 1,5-di-*O*-acetil-2,3,4,6-tetra-*O*-etilgalactitol y el 1,5-di-*O*-acetil-2,4,6-tri-*O*-etil-3-*O*-metilgalactitol.

Por ejemplo, la serie 3CN permitiría distinguir el derivado metilado en C-3, del metilado en C-4, por desplazamiento del fragmento de *m/e* 189 a *m/e* 175. Pero la serie 3C (Esquema 16) también produce un ion de *m/e* 189 con abundancias similares, lo que lleva a que los iones de *m/e* 189 y 175 coexistan en ambos espectros (Tabla 64).



Esquema 16: Serie 3C para el 1,5-di-*O*-acetil-2,3,4,6-tetra-*O*-etilgalactitol y el 1,5-di-*O*-acetil-2,3,6-tri-*O*-etil-4-*O*-metilgalactitol.

Este es un ejemplo del tipo de complicaciones que surgen al analizar los espectros de masa de alditos acetilados, y que en general se evitan con el uso de aldononitrilos acetilados. Existe sin embargo, un fragmento de m/e 143 producido por la serie 4C (Esquema 14) que aparece en baja proporción en el derivado metilado en C-4 y que permitiría distinguirlo del resto de los compuestos y en particular del metilado en C-3 (Tablas 64 y 65). Pero la diferencia en la abundancia de dicho ion en ambos espectros no es muy grande y por lo tanto, la asignación inequívoca entre ambos compuestos no puede hacerse sin el uso conjunto de los tiempos de retención.

3.4.2 Espectros de masa de algunos derivados 2,3,6-tri- y 2,4-di-*O*-alquilados.

En la Tabla 66 se muestran los iones que permiten diferenciar algunos 2,3,6-tri-*O*-alquil- y 2,4-di-*O*-alquilgalactitoles acetilados, metilados en las posiciones que se indican, y en la Tabla 67 se presentan los espectros de masa de dichos compuestos.

Tabla 66: Asignación de la posición del grupo metoxilo en algunos derivados tri-*O*-alquilados del galactitol. Los desplazamientos se consideran respecto de los compuestos tri-*O*-etilados.

Serie	Desplazamiento ^a	Distingue ^b
4C (Esquema 17)	261→247	2,III,6- : de 2,3,6- y II,3,6-
3CN (Esquema 15)	189→175 129→115	II,3,6- y 2,III,6- : de 2,3,6-
2CN (Esquema 13)	131→117	II,3,6- : de 2,3,6- y 2,III,6-
4CN (Esquema 18)	261→247 201→187	II,4- : de 2,4-
2CN (esquema 13)	131→117	

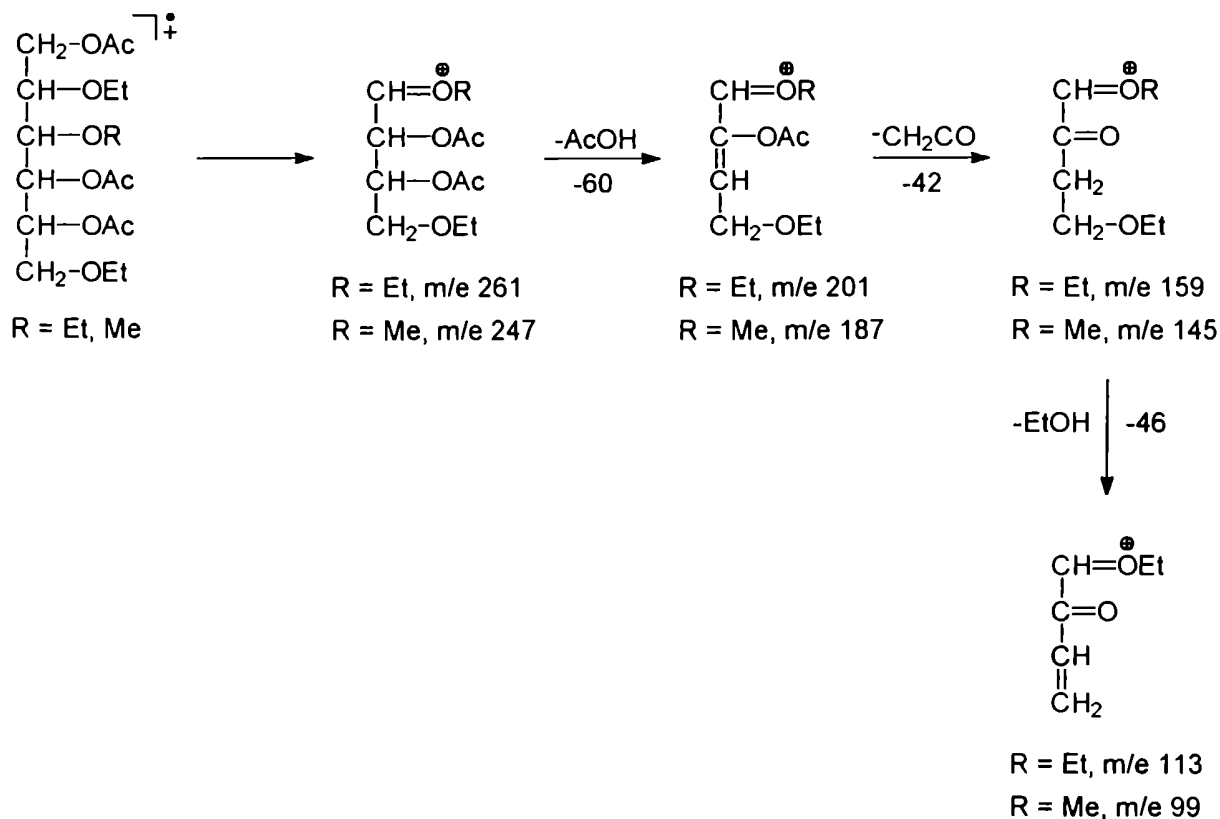
^a Los derivados marcados en negrita se diferencian por el corrimiento de iones indicado en cada caso.

^b II,3,6- = 3,6-di-*O*-etil-2-*O*-metilgalactitol, etc.

Tabla 67: Picos principales en los espectros de masa de los 1,4,5-tri-*O*-acetil-2,3,6-tetra-*O*-etilgalactitoles y de los 1,3,5,6-tetra-*O*-acetil-2,4-di-*O*-alquilgalactitoles ($m/e > 44$).

<i>m/e</i>	2,3,6-tri- <i>O</i> -Et-		3,6-di- <i>O</i> -Et-2- <i>O</i> -Me-		2,6-di- <i>O</i> -Et-3- <i>O</i> -Me-		2,4-di- <i>O</i> -Et-		4- <i>O</i> -Et-2- <i>O</i> -Me-	
	%	Serie	%	Serie	%	Serie	%	Serie	%	Serie
59	22	1C	68	1C						
85	17	3CN	41	3CN						
87			34							
89									19	
101	24	3C	34	3C	11	3C	10	3C	19	3C
103					10		10			
113	11	4C	24	4C					10	4CN
115			47	3CN	13	3CN			10	
117			100	2CN					100	2CN
127					27					
129	18	3CN	10		20					
131	100	2CN	33		100	2CN	100	2CN	21	
141	30		59							
143	30	3C	32	3C			55	3C	56	3C
156			5							
157			5							
159	16	4C	38	4C						
175			15	3CN						
185			3							
187									5	4CN
189	5	3CN								
201	7	4C	15	4C			5	4CN	7	
203							14	3C	19	3C
215							2	4CN		
247			2		9	4C			13	4CN
261	14	4C	29	4C			6	4CN		

El compuesto metilado en C-3 se diferencia por los iones originados en la serie 4C (Tabla 66 y Esquema 17).



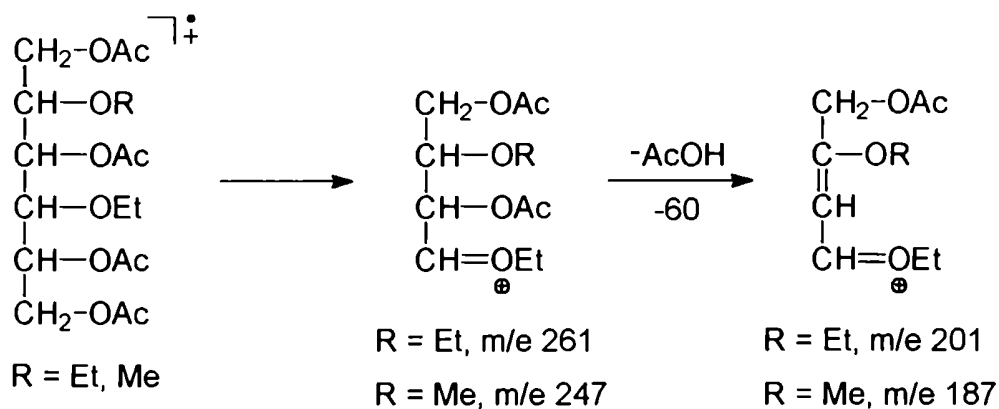
Esquema 17: Serie 4C para el 1,4,5-tri-*O*-acetil-2,3,6-tri-*O*-etilgalactitol y el 1,4,5-tri-*O*-acetil-2,6-di-*O*-etil-3-*O*-metilgalactitol.

Los dos derivados metilados pueden diferenciarse del compuesto 2,3,6-tri-*O*-etilado por los iones producidos en la serie 3CN mostrada en el Esquema 15 (Tabla 66).

Finalmente, el compuesto metilado en C-2 se distingue de los demás compuestos por el fragmento producido en la serie 2CN (Esquema 13).

Respecto de ambos compuestos 2,4-di-*O*-alquilados, la serie 4CN (Esquema 18) produce dos iones que permiten diferenciar claramente a ambos derivados (Tabla 66).

Además por la serie 2CN (Esquema 13, pág. 192) se obtiene un ion, el más importante ya que es el pico base del espectro, que confirma la diferenciación entre ambos derivados.



Esquema 18: Serie 4CN para el 1,3,5,6-tetra-*O*-acetil-2,4-di-*O*-etilgalactitol y el 1,3,5,6-tetra-*O*-acetil-4-*O*-etil-2-*O*-metilgalactitol.

3.4.3 Espectros de masa de los derivados tri-, di- y monoetilados

Finalmente, en la Tabla 68 se presentan los espectros de masa del resto de los derivados etilados. No se analizarán los espectros debido a que coinciden en general con los lineamientos expuestos por Albersheim y col.¹⁴²

Tabla 68: Picos principales en los espectros de masa de galactitoles tri-, di- y mono-*O*-etilados ($m/e > 44$).

m/e	3,4,6-	2,4,6-	2,3,4-	2,6-	4,6-	3,6-	2,3-	6-	2-	3- (=4)
59	18	21			44	28		100		
73			30		21		17			
85	19		21		64		32	27		41
87										
97								21	12	
98								29		
99							28			
101	16		50	13	32	33	26	96		17
103		12	12		16		17	24		
113	17	10	75		90	10	34	13		47
114					12		10			
115	11				22	10		85		16
117										11
127					59		20	16		30
129	13	20	63		57		13			
131		100	100	100	17		100	25	100	17
139								58	17	
141						21				
143	100	44	50	22	100	100		90	12	100
145	10				18			29		
153								13		
156							9	24		
157					5			64		
159						12				
170								7		
171		6		10						
173					8		6	16		7
175										
185								9	6	
187								6		
189	36	29	15		58					
198								25		
199								12		
201	2	7	10			5				
203	18		14			32				36
213				7						
215		4			17		11	2	2	17
217								6		
231		2		2						
245								2		2
247	2									
259								4		
261	2	11	8			10				
275					28		20			20
333				2						
347								3		

CAPÍTULO IV

SEPARACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE AZÚCARES ENANTIOMÉRICOS COMO SUS 1-AMINO-1- DESOXIALDITOLES DIASTEREOMÉRICOS

Ya se ha mencionado que los polisacáridos de *Corallina officinalis* están formados por galactosas y mono-*O*-metilgalactosas de las series D y L en proporciones aproximadamente equivalentes, según se determinó por el poder rotatorio de los polímeros hidrolizados (véase pág. 98).

De esa manera sólo pudo conocerse la relación D / L de todos los azúcares componentes en conjunto y efectuando, además, varias suposiciones. Resultaba necesario entonces, precisar la configuración para cada monosacárido componente, en lo posible en forma directa.

Uno de los métodos más interesantes y prácticos implica convertir los enantiómeros en diastereómeros mediante un reactivo quiral, e intentar la separación de los mismos por cromatografía gaseosa.

El primer método y el más utilizado hasta el momento, fue desarrollado en 1978 por los grupos de Vliegthart¹⁵² y Lindberg¹⁵³, y consiste en transformar los azúcares enantioméricos mediante la reacción con un alcohol quiral para obtener los alquilglicósidos diastereoméricos. Una vez derivatizados se logran buenas separaciones, pero la principal dificultad del método consiste en que cada azúcar da lugar a tres o cuatro picos correspondientes a los anómeros α y β de las formas furanósicas y piranósicas. El método funciona muy bien con polisacáridos que no contengan demasiados componentes, pero si se deben analizar mezclas de monosacáridos puede complicarse la identificación y cuantificación de los mismos.

Otra posibilidad es derivatizar los azúcares con una amina quiral, empleando la reacción de aminación reductiva, lo que produce un sólo derivado para cada monosacárido. El método consiste en hacer reaccionar el azúcar con la amina quiral para formar la imina, que es reducida *in situ* en presencia de cianoborohidruro de sodio para dar el correspondiente 1-amino-1-desoxialditol. Los productos de la reacción se convierten luego en sus derivados acetilados o trimetilsililados. Además de evitar la

multiplicidad de picos, la ventaja del método es la facilidad y rapidez de la síntesis.

Oshima *et al*¹⁵⁴ ya habían efectuado intentos al respecto empleando (*S*)- α -metilbencilamina como amina quiral. Las separaciones que obtuvieron son interesantes aunque hay algunas superposiciones, como entre D-manosa y D-galactosa, D-glucosa y L-galactosa y sobre todo en la región de las pentosas y 6-desoxihexosas.

Sin embargo al intentar aplicar el método a los polisacáridos de *Corallina officinalis* se encontró que uno de los dos aminoalditales diastereoméricos de la galactosa se obtenía en mayor proporción y además el rendimiento de la reacción era muy pobre (véase pág. 207).

A pesar de esos resultados, y considerando que la reacción de aminación reductiva era potencialmente útil para la resolución y cuantificación de azúcares enantioméricos, se decidió estudiar en profundidad la reacción para intentar el desarrollo de un método conveniente para analizar dichos azúcares.

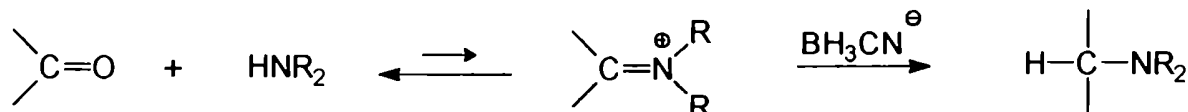
4.1 ESTUDIO DE LAS CONDICIONES DE LA REACCIÓN

En la aminación reductiva la imina formada inicialmente se reduce con cianoborohidruro de sodio para obtener la amina correspondiente.

El cianoborohidruro de sodio es un reactivo versátil¹⁵⁵, de alta selectividad, y estable en medio ácido hasta pH 2. Además, la reducción de aldehídos, cetonas e iminas es dependiente del pH, y un adecuado control del mismo permite un manejo selectivo de las reacciones competitivas. Borch *et al*¹⁵⁵ también demostraron que la reducción del grupo iminio es rápida a pH 6-7 y que la reducción de aldehídos y cetonas, óptima a pH 3-4, es despreciable en aquel rango de pH, por lo que descubrieron el potencial del cianoborohidruro para reducir un grupo iminio sin afectar aldehídos o cetonas presentes.

La formación del iminio es un proceso complejo que involucra muchos pasos;

para simplificar se tratará como una única etapa (véase ref. 156). El paso de equilibrio inicial, desfavorable en la mayoría de los casos, se muestra en el esquema siguiente:



Afortunadamente, el pH óptimo para la formación del iminio es ~ 6 . Es factible entonces, realizar una aminación reductiva sobre un aldehído o una cetona haciendo reaccionar simplemente el compuesto carbonílico con la amina a pH 6 en presencia de cianoborohidruro.

El rango de pH entre 6-8 es óptimo para las aminaciones reductivas; sin embargo se han realizado exitosamente estas reacciones a un pH tan bajo como 4, y tan alto como 8. El único requerimiento parece ser la presencia de una fuente de protones suficiente para generar el grupo iminio cargado positivamente. La ausencia de agua, además, causa una notable mejora en el rendimiento de la reacción¹⁵⁵.

Las aminaciones reductivas se llevan a cabo utilizando un exceso de amina; ésto mejora el equilibrio inicial mostrado en el esquema, aunque el propósito principal es evitar que la nueva amina secundaria formada, reaccione a su vez con el compuesto carbonílico¹⁵⁵.

4.1.1 Aminación reductiva utilizando α -metilbencilamina

En una primera experiencia se realizó la aminación reductiva de galactosa con (\pm)- α -metilbencilamina, como amina quiral racémica para obtener los dos productos de condensación diastereoméricos y así poder estudiar el comportamiento cromatográfico de ambos derivados. La reacción se hizo en un buffer ácido acético / acetato de sodio

de pH 5,9 con una relación molar de azúcar a amina de 1,5. Los productos de la reacción se separaron en una columna de intercambio catiónico utilizando soluciones de amoníaco como eluyente. Se obtuvo el producto de aminación con muy bajo rendimiento (12%). El espectro de RMN de ^{13}C de la mezcla de reacción indicó que se obtuvo el producto de condensación buscado.

Se realizó entonces una nueva reacción para intentar un mejor rendimiento. Se adaptó la técnica empleada por Tang y Williams¹⁵⁷ quienes necesitaban sintetizar carbohidratos conjugados con 2-aminopiridina para introducir dicho cromóforo en la estructura de un azúcar, con el objeto de obtener derivados que puedan detectarse por fluorescencia para ser utilizados en HPLC.

La técnica consiste en tratar al azúcar con cianoborohidruro de sodio y un exceso de 6,6 veces de amina, en *N,N*-dimetilformamida que contiene 10% de ácido acético glacial como solvente, y calentar a 95°C durante 3 horas. Luego se transfiere la mezcla de reacción a una columna de resina de intercambio iónico fuerte en su forma ácida, y se eluye con amoníaco diluido para obtener el producto de condensación.

Se realizaron tres reacciones de condensación con distinto contenido de ácido acético: 10%, 5,7% y 2,8%. El rendimiento más alto (80%) se obtuvo utilizando 5,7% de ácido acético. En la Figura 40 se aprecia el espectro de RMN de ^{13}C del producto de reacción y en la Figura 41 se muestran las asignaciones de cada señal deducidas a partir del espectro del 1-desoxi-1-aminogalactitol¹⁵⁸ para la porción de hidrato de carbono de la molécula, y del espectro de la dimetilbencilamina¹⁵⁹ para la parte de la amina.

Es interesante notar que ciertas señales aparecen desdobladas debido al par de diastereómeros y que los carbonos correspondientes son los más cercanos a las uniones C-N, o sea el "núcleo diastereomérico" de la molécula (Figura 41).

Además de las señales correspondientes al producto esperado, aparecieron una serie de picos (164,0 - 143,8 - 128,3 - 126,7 - 126,6 - 49,0 y 22,3 ppm) que denotan la

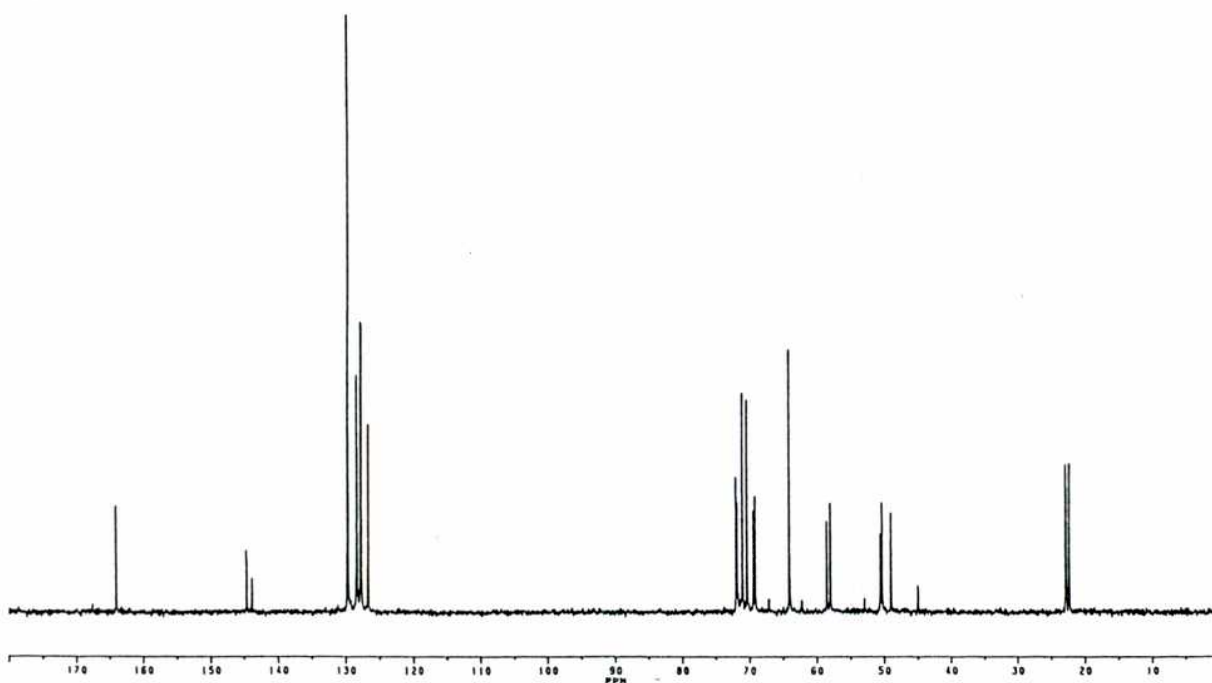


Figura 40: Espectro de RMN de ^{13}C del 1-desoxi-1-(α -metilbencilamino) galactitol.

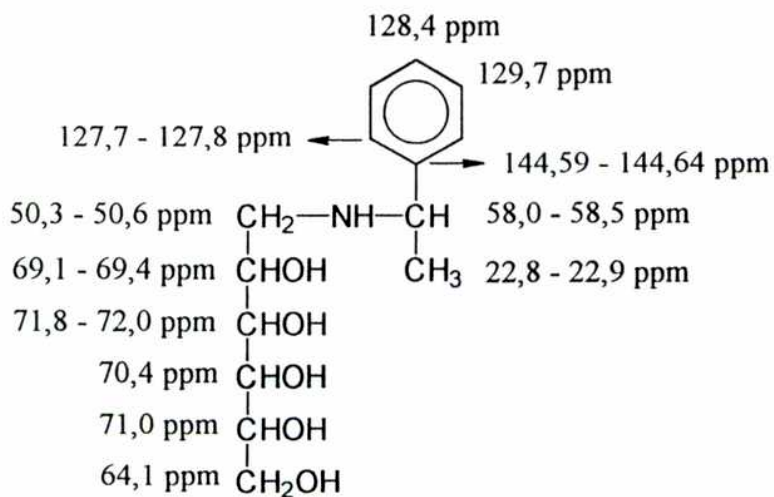


Figura 41: Asignaciones de las señales correspondientes al espectro de la Figura 40.

presencia de una impureza. Sin embargo dicho contaminante no sería un hidrato de carbono, ya que la zona del espectro donde aparecen los azúcares no muestra picos espurios. Para confirmarlo, se realizaron los espectros de RMN de ^{13}C y ^1H (véase Parte Experimental, Figuras 50 y 51, pág. 249). Pudieron asignarse todas las señales en ambos espectros, lo que condujo a que la impureza debía ser la α -metilbencilformamida, cuya estructura se muestra en la Figura 42.

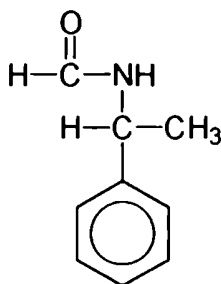


Figura 42: Estructura de la α -metilbencilformamida.

Este producto pudo haberse formado por trans-amidación a partir de la dimetilformamida empleada como solvente, reacción para la que existen antecedentes en la literatura¹⁶⁰.

El espectro de masa del derivado acetilado no fue muy útil porque los fragmentos más importantes del mismo derivan del grupo bencilo y prácticamente no aparecen iones del resto de la molécula.

Una vez purificados los productos, se acetilaron en la forma usual y se analizaron por cromatografía gaseosa usando una columna capilar Ultra-2.

Los cromatogramas muestran la presencia de muchas impurezas, lo que indica que la reacción no fue satisfactoria, y la separación de ambos derivados es muy pobre. Además la relación entre los dos diastereómeros obtenidos no es equimolar, sino por el

contrario, hay un predominio muy grande de un diastereómero respecto del otro.

Estos hechos planteaban una serie de inconvenientes muy serios para poder aplicar la técnica con fines analíticos, y además no coincidía con lo reportado por Oshima *et al*¹⁵⁴. Un primer paso para lograr una mejora en la reacción fue utilizar otra amina, ya que se atribuyó la pobre separación obtenida a las características de la amina. Por otra parte, para optimizar la reacción se decidió realizar un estudio detallado de las distintas variables de la misma.

4.1.2 AMINACIÓN REDUCTIVA UTILIZANDO 1-AMINO-2-PROPANOL

Para estos estudios se utilizó 1-amino-2-propanol como amina quiral, y se empleó la técnica de Oshima *et al*¹⁵⁴ pero aumentando la temperatura de reacción a 67°C. En los primeros estudios se usó D-galactosa y la mezcla racémica de la amina. El espectro de RMN de ¹³C de la mezcla de reacción indicó que se obtuvo el aminoalditol buscado, pudiendo asignarse todas las señales como se verá luego (véanse Figuras 44 y 45, pág. 217).

El análisis por cromatografía gaseosa de los derivados acetilados confirma que ambos diastereómeros se encuentran en proporciones equivalentes, junto con cantidades menores de impurezas y un gran exceso del aminoalcohol. Este resultado se contrapone con el obtenido empleando α -metilbencilamina, con la cual uno de los diastereómeros prevalece claramente.

La resolución de los derivados acetilados de ambos diastereómeros, es buena (véase pág. 221) y en la Figura 43 se muestra el espectro de masa del derivado.

Los iones principales del espectro derivan de las rupturas α al grupo amino (pág. 210) eliminándose en un caso el residuo del azúcar, y en el otro caso el resto alcohólico del aminopropanol. Estos caminos de fragmentación son similares a los observados en los espectros de masa de los acetatos de 1,1-*bis*-(acilamido)-1-desoxialditoles¹⁶¹.

La fragmentación más importante involucra la ruptura de la unión (C-1)-(C-2) del azúcar para dar el ion de relación m/e 172, el cual por pérdida de cetena origina el pico base del espectro de m/e 130. El otro camino de fragmentación es equivalente, produciéndose la ruptura de la unión (C-1)-(C-2) que corresponde al aminopropanol. No se observa el pico perteneciente al ion molecular.

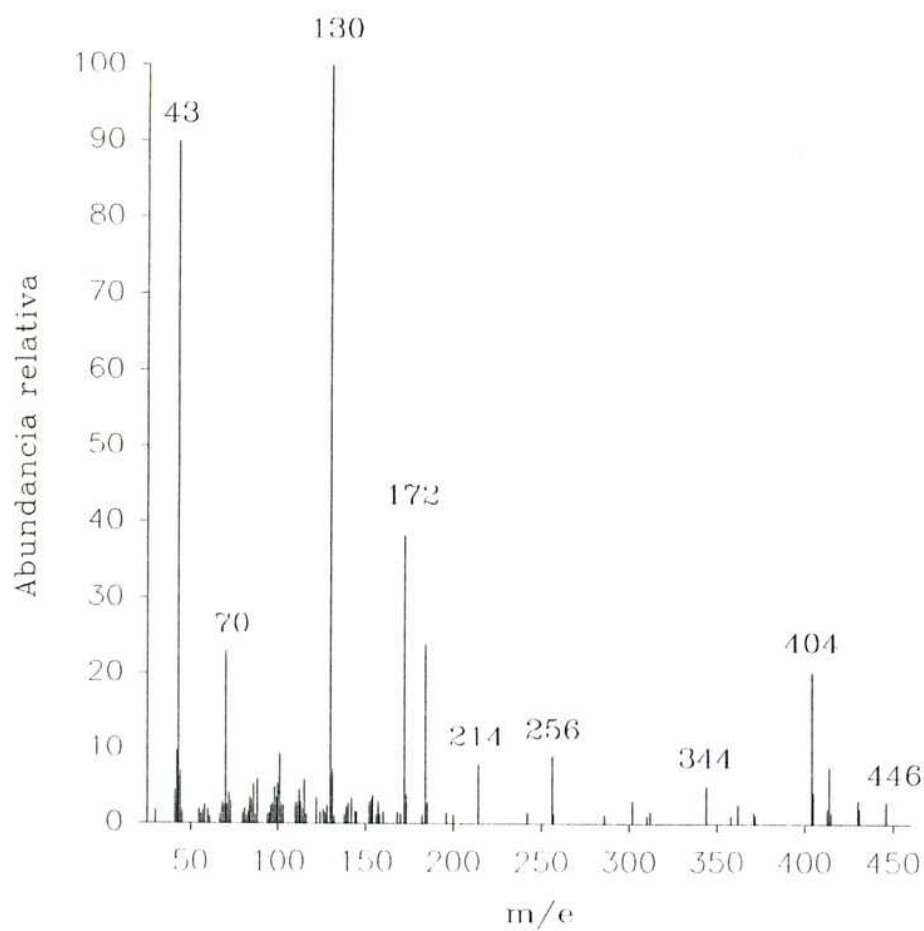
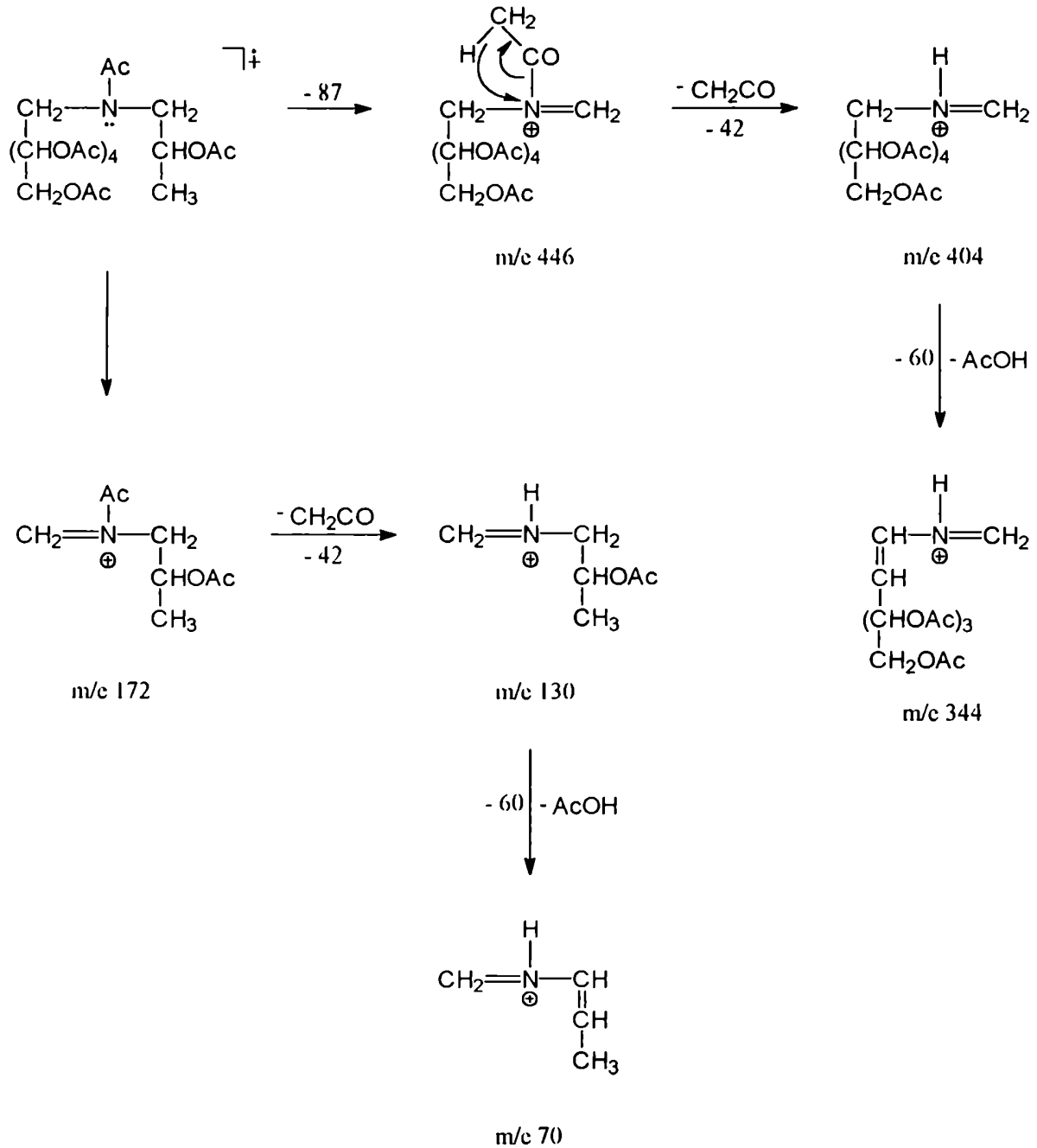


Figura 43: Espectro de masa del 1-desoxi-1-(2-hidroxipropilamino)galactitol acetilado.



4.1.2.1 Juego de reacciones I: variación de la relación azúcar / amina

Se realizaron nuevos ensayos para encontrar la relación óptima de azúcar / amina, variando entre una relación equimolar hasta un exceso de 7 veces de amina.

Para comparar los rendimientos de la reacción se agregó inositol como standard interno. La proporción molar de cianoborohidruro utilizada fue ligeramente superior a la de azúcar (véase Parte Experimental, pág. 251).

Los cromatogramas fueron bastante "limpios" indicando la presencia de menor cantidad de productos secundarios. En la Tabla 69 se observan los resultados obtenidos.

Tabla 69: Rendimientos del Juego de reacciones I en mmoles, respecto de 100 mmoles de inositol.

Rel. azúcar / amina	Amina	Inositol	Galactosa	Productos	
				Diast. I ^a	Diast. II ^a
1:1 inicial	200	100	200		
1:1 final	16	100	54	25	24
1:3 inicial	600	100	200		
1:3 final	150	100	52	35	35
1:4 inicial	800	100	200		
1:4 final	201	100	43	30	30
1:5 inicial	1000	100	200		
1:5 final	640	100	78	58	56
1:6 inicial	1200	100	200		
1:6 final	513	100	46	40	39
1:7 inicial	1400	100	200		
1:7 final	551	100	28	32	31

^a Diast. I, II = par de derivados diastereoméricos.

Se observa claramente que un exceso de cinco veces en la proporción de amina produce los mejores rendimientos en producto, por lo tanto para las siguientes reacciones se utilizará dicha relación entre azúcar y amina. Es decir las proporciones iniciales serán: 1000 mmoles de amina y 200 mmoles de galactosa cada 100 mmoles de inositol.

Para terminar la reacción se modificó el procedimiento de Oshima *et al*¹⁵⁴, quienes utilizaron ácido acético para destruir el cianoborohidruro, ya que como éste es estable hasta pH 1-2 es necesario emplear un ácido más fuerte; se decidió utilizar TFA 3M hasta pH fuertemente ácido.

4.1.2.2 Juego de reacciones II: variación del pH

Se realizó una nueva serie de reacciones variando el pH entre 2 y 8 (véase parte experimental, pág. 252). Los resultados obtenidos se aprecian en la Tabla 70.

El rendimiento varía claramente con la acidez del medio de reacción, obteniéndose la mayor proporción de productos a pH=4. Además en medio más ácido se obtiene menor cantidad de impurezas, ya que en las reacciones realizadas a pH mayor de 4, luego de acetilar, el color del medio de reacción es de color caramelo e incluso negro en los pH más básicos, indicando la presencia de productos de polimerización o de reacciones complejas, aumentando la intensidad del color a medida que el medio se hace más alcalino.

Por otro lado, la proporción de galactosa sin reaccionar es mayor en las reacciones realizadas en medio ácido. A pH 2 y 3 esto es razonable debido al bajo rendimiento de la reacción, pero a pH 8 el rendimiento también es muy bajo y sin embargo la cantidad de galactosa libre es mucho menor. Es decir que en medios alcalinos o sin regular, se forma una mezcla compleja de productos secundarios y por ese motivo no se obtiene galactosa libre.

Tabla 70: Rendimientos del Juego de reacciones II en mmoles^a.

pH de la reacción	Amina	Inositol	Galactosa ^c	Productos ^b	
				Diast. I	Diast. II
pH = 2	134	100	151	2	2
pH = 3	137	100	115	8	8
pH = 4	216	100	29	54	52
pH = 5	179	100	7	42	39
pH = 6	197	100	12	25	24
pH = 6,5	122	100	4	28	28
pH = 7	190	100	7	20	20
pH = 8	169	100	10	10	10
sin regular	219	100	28	22	22

^a Proporciones iniciales: amina (1000 mmoles), galactosa (200 mmoles) e inositol (100 mmoles).

^b Diast. I, II = par de derivados diastereoméricos.

^c Se refiere al galactitol y a las distintas formas de galactosas de cadena abierta, α - y β -piranosa y α - y β -furanosa.

Otra característica de la reacción a pH menores de 4 es que la mayor proporción de galactosa se encuentra como galactosa acetilada, y por lo tanto presente en sus formas furanósica y piranósica. A partir de pH 4 se obtiene únicamente galactitol, mientras que aparece galactosa sin reducir sólo en calidad de trazas.

Finalmente, con fines comparativos se realizó una reacción sin regular el medio, es decir en las mismas condiciones del Juego de reacciones I, pero agregando un volumen de agua igual al que se incorporó con los buffers utilizados en las reacciones con pH regulado. El rendimiento fue mucho menor como se puede apreciar en la última fila de la Tabla 70 por comparación con el dato correspondiente en la Tabla 69. Esta es

una característica fundamental para el desarrollo de la técnica que no fue considerada anteriormente¹⁵⁴.

4.1.2.3 Juego de reacciones III: efecto del agua en el rendimiento de la reacción

El siguiente ensayo consistió en estudiar la influencia del agua en el rendimiento de la reacción utilizando como solvente soluciones de metanol / agua, variando entre 0 y 100% la proporción de agua. Los resultados se muestran en la Tabla 71.

Tabla 71: Rendimientos del Juego de reacciones III en mmoles^a.

% de agua	Amina	Inositol	Galactosa	Productos ^b	
				Diast. I	Diast. II
0 %	365	100	5	88	82
20 %	245	100	17	47	46
40 %	255	100	30	36	35
60 %	188	100	31	24	24
80 %	320	100	37	26	27
100 %	254	100	40	22	23

^a Proporciones iniciales: amina (1000 mmoles), galactosa (200 mmoles) e inositol (100 mmoles).

^b Diast. I, II = par de derivados diastereoméricos.

Los resultados son muy claros y concluyentes; el agregado de agua al medio de reacción produce una disminución sensible del rendimiento de la misma y por lo tanto no es conveniente utilizar buffers acuosos para acidificar el medio.

4.1.2.4 Juego de reacciones IV: acción del ácido acético glacial y variación de la proporción de cianoborohidruro

Se realizó entonces una nueva serie de ensayos utilizando ácido acético glacial en relación molar 2:1 con la amina, lo que brinda un pH de alrededor de 4. Se estudió además la proporción de cianoborohidruro empleada, variando la misma desde equimolar hasta un exceso de 3 veces respecto del azúcar. Los resultados se muestran en la Tabla 72.

Tabla 72: Rendimientos del Juego de reacciones IV en mmoles^a.

Rel. NaCNBH ₃ / azúcar	Amina	Inositol	Galactosa	Productos ^b	
				Diast. I	Diast. II
1 : 1	126	100	3	60	58
1 : 1 / AcOH	413	100	4	135	131
1 : 2	403	100	3	53	48
1 : 2 / AcOH	323	100	4	86	84
1 : 3	217	100	3	44	42

^a Proporciones iniciales: amina (1000 mmoles), galactosa (200 mmoles) e inositol (100 mmoles).

^b Diast. I, II = par de derivados diastereoméricos.

El rendimiento de la reacción disminuye con el aumento de la relación molar del agente reductor, por lo que la proporción óptima es aproximadamente equimolar. Pero el resultado clave es el aumento importante en el rendimiento que se obtiene cuando se emplea ácido acético glacial para acidificar el medio. Es el mayor rendimiento logrado y además se obtiene un cromatograma muy limpio, prácticamente sin impurezas. El

hecho de que el rendimiento supere el 100% sugiere que los factores de respuesta del detector para el inositol y los aminoalditoles son diferentes.

4.1.2.5 Juego de reacciones V: variación de la temperatura y el tiempo de reacción

Se hizo una última serie de reacciones para encontrar la temperatura y el tiempo óptimos de reacción con las relaciones estequiométricas que produjeron el máximo rendimiento en la serie anterior. Se realizaron tres series de reacciones: a 85 y 65°C variando el tiempo de reacción en cada caso, y a temperatura ambiente durante 24 horas. Los resultados se aprecian en la Tabla 73.

Tabla 73: Rendimientos del Juego de reacciones V en mmoles^a.

Condiciones	Amina	Inositol	Galactosa	Productos ^b	
				Diast. I	Diast. II
65°C, 1 hora	223	100	3	115	113
65°C, 2 horas	178	100	3	86	87
65°C, 4 horas	164	100	3	87	86
85°C, 1 hora	280	100	4	95	91
85°C, 2 horas	244	100	3	92	91
85°C, 3 horas	260	100	4	114	107
25°C, 26 horas	209	100	31	95	89

^a Proporciones iniciales: amina (1000 mmoles), galactosa (200 mmoles) e inositol (100 mmoles).

^b Diast. I, II = par de derivados diastereoméricos.

Los mejores resultados se obtienen a 65°C durante 1 hora aunque los rendimientos son buenos en los casos. Nuevamente se observan rendimientos ligeramente superiores al 100% (véase página anterior).

Los espectros de RMN de ^{13}C de galactosa derivatizada con 1-amino-2-propanol racémico y ópticamente activo [isómero (*S*)], se presentan en la Figura 45, y las asignaciones se muestran en la Figura 44 deducidas a partir del espectro del 1-amino-1-desoxigalactitol¹⁵⁸ para la porción de hidrato de carbono, y de los espectros de la propilamina y del isopropanol para el resto de la molécula¹⁵⁹. Las señales correspondientes al 1-amino-2-propanol son: C-1 (46,6 ppm); C-2 (64,9 ppm) y C-3 (20,5 ppm). Los dos cuartetos que aparecen a $\delta \approx 118$ y 163 ppm corresponden a las señales de los C-2 y C-1 respectivamente del ácido trifluoroacético utilizado para destruir el exceso de cianoborohidruro, que se desdoblan por el acoplamiento C-F.

Las señales para ambos diastereómeros son muy semejantes y sólo se desdoblan los C-1 y C-2 del aminoalcohol y el C-4 del residuo del azúcar. Los compuestos sólo se encuentran impurificados por el exceso de amina inicial, pero no hay reacciones laterales.

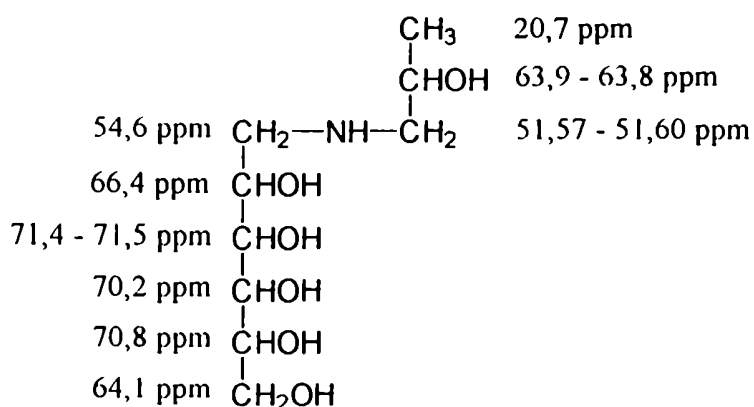


Figura 44: Asignaciones de las señales correspondientes al espectro de la Figura 45.

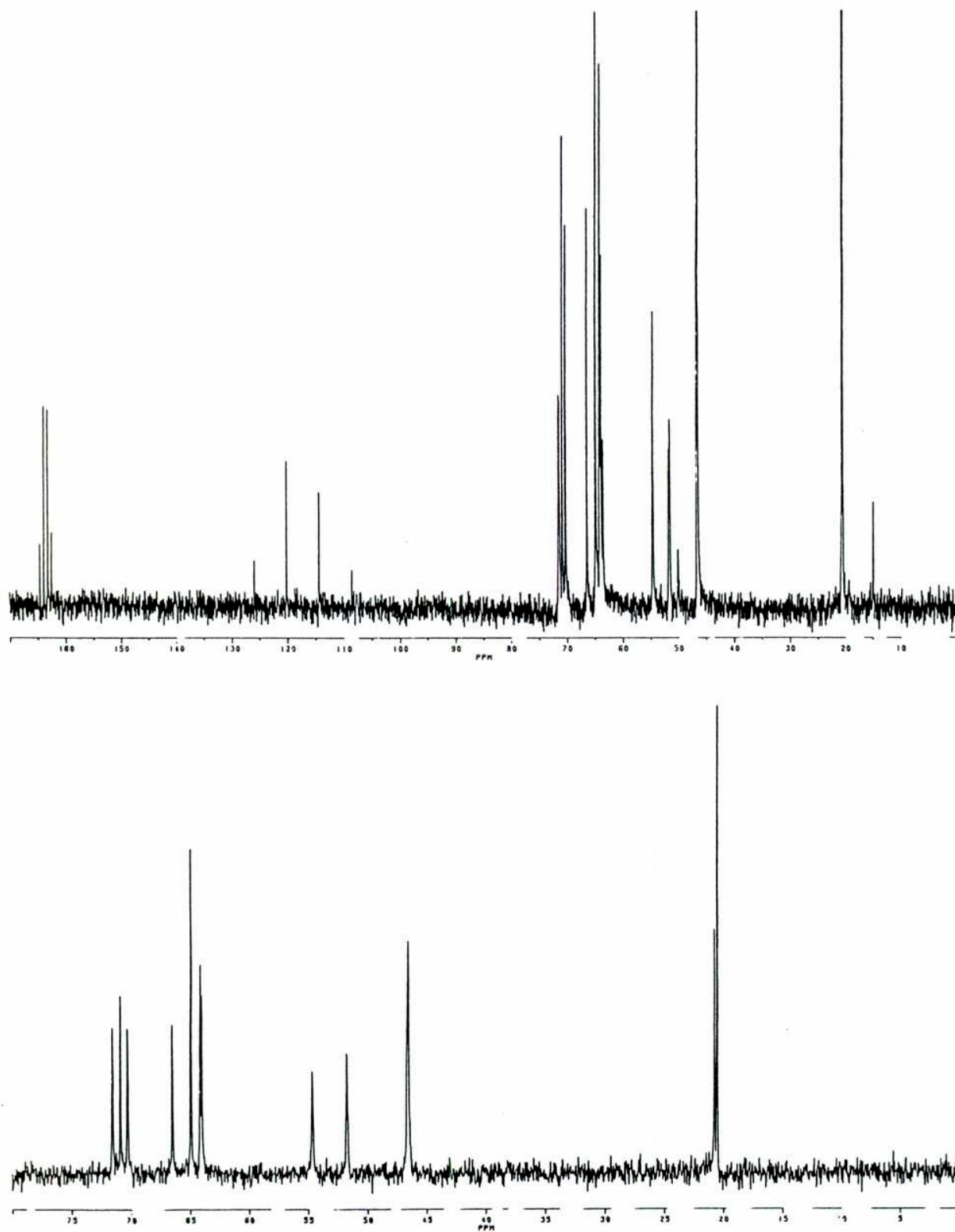


Figura 45: Espectros de RMN de ^{13}C de los 1-desoxi-1-(2'-hidroxipropilamino)galactitoles obtenidos con 1-amino-2-propanol: a) racémico y b) quiral (*S*).

4.1.3 CONCLUSIONES

La utilización de 1-amino-2-propanol como amina quiral permite sintetizar los dos derivados diastereoméricos en proporciones equivalentes, mientras que en las condiciones de Oshima *et al*¹⁵⁴, además de no ser las óptimas en cuanto a rendimiento y pureza de la reacción, el uso de α -metilbencilamina produce uno de los dos derivados en proporciones mucho mayores.

Además se logró mejorar sensiblemente las condiciones de la reacción pudiéndose obtener los compuestos prácticamente puros, libres de productos secundarios. En resumen, la optimización de los parámetros de la reacción arrojó las siguientes conclusiones:

- a) Una relación inicial de amina / azúcar de 5:1 da las proporciones de producto más altas.
- b) La cantidad de producto es máxima a pH = 4. Los resultados de una solución no regulada son cercanos a los obtenidos a pH 6-7.
- c) La disminución de la proporción de agua incrementa el rendimiento; en metanol anhidro éste es máximo ($\approx 85\%$).
- d) Un exceso de NaCNBH_3 mayor de 10% (respecto del azúcar) disminuye el rendimiento de la reacción.
- e) La adición de ácido acético glacial al metanol anhidro rinde una proporción cuantitativa de productos.
- f) Trabajando entre 65°C y 85°C, de 1 a 4 horas, o a temperatura ambiente durante 24 horas, la cantidad de productos obtenida es prácticamente constante (85-100%).

Por lo tanto, 65°C y 1 hora de reacción se eligieron como condiciones standard, usando una relación molar de amina / azúcar / NaBH_3CN / AcOH de 5 : 1 : 1,1 : 10 en metanol anhidro (véase Parte Experimental, pág. 254).

4.2 APLICACIÓN DE LA REACCIÓN AL ANÁLISIS DE AZÚCARES

Luego se aplicó la técnica a xilosa y a las distintas galactosas mono-metiladas, para estudiar el comportamiento cromatográfico de los derivados correspondientes. Salvo la 6-*O*-metil-D-galactosa, las demás galactosas monometiladas no son comerciales. La 3-*O*-metil- y 4-*O*-metil-D-galactosa fueron gentilmente donadas por el Dr. E. G. Gros, mientras que fue necesario sintetizar la 2-*O*-metil-D-galactosa. No era imprescindible obtenerla en forma pura, por lo tanto se intentó una metilación de galactosa bloqueando las posiciones 4 y 6, intentando orientar la metilación hacia la posición 2 ya que, después del C-6, ésta es la posición más reactiva frente a la alquilación en la galactosa^{162,163}.

Se sintetizó entonces el α -metil-4,6-*O*-bencilidéngalactósido a partir de α -metilgalactósido y α,α -dimetoxitolueno, según la técnica de Evans¹⁶⁴. El espectro de RMN de ¹³C de la mezcla de reacción obtenida (véase Parte Experimental, Figura 53, pág. 256) indica que se obtuvo el bencilidén derivado buscado, pero impurificado con aproximadamente un 20% del α -metilgalactósido original. Se metiló luego este producto en condiciones limitantes de agente alquilante, y los compuestos parcialmente metilados obtenidos se sometieron, luego de hidrólisis ácida, a la reacción de aminación reductiva.

El análisis del derivado muestra que, además de galactosa y 2-*O*-metilgalactosa, también se obtuvieron 3-*O*-metil- y 2,3-di-*O*-metilgalactosa, con porcentajes de 29; 32; 9 y 30% respectivamente. De manera que se logró obtener una muestra de 2-*O*-metil-D-galactosa en una proporción adecuada para estudiar su comportamiento cromatográfico, ya que los otros productos obtenidos pueden separarse fácilmente por C.G.L.

Se derivatizaron entonces distintos monosacáridos junto con las galactosas metiladas, todos pertenecientes a la serie D, tanto con (*S*)-1-amino-2-propanol como

con la mezcla racémica. Se derivatizó también una muestra de L-galactosa con la amina quiral.

Se probaron distintas columnas y condiciones cromatográficas (véase Parte Experimental, pág. 241), y en la Tabla 74 se muestran los resultados de las cromatografías en la columna Ultra-2 con las dos condiciones de corrida que dieron los mejores resultados. Se incluyen además los datos obtenidos con una columna HP-5, que también permite separar eficientemente los productos en la mayoría de los casos.

Tabla 74: Tiempos de retención^a y factores de separación *r* de aminoalditoles acetilados originados en la derivatización de azúcares enantioméricos con (S)-1-amino-2-propanol, en diferentes programas cromatográficos.

Azúcar	Ultra-2 (Prog. A)			Ultra-2 (Prog. B)			HP-5		
	D-	L-	<i>r</i>	D-	L-	<i>r</i>	D-	L-	<i>r</i>
Ramnosa	1.644	1.653	1.005	1.738	1.750	1.007			
Fucosa	1.656	1.667	1.006	1.757	1.770	1.007			
Arabinosa	1.694	1.686	1.005	1.803	1.792	1.006			
Xilosa	1.720	1.729	1.006	1.840	1.854	1.008	1.806	1.818	1.007
Glucosa	2.289	2.294	1.002	2.605	2.609	1.002			
Manosa	2.291	2.304	1.006	2.598	2.612	1.005			
Galactosa	2.341	2.356	1.007	2.642	2.659	1.006	2.515	2.530	1.006
2-O-metil-Gal		2.103	1.000						
3-O-metil-Gal	2.234	2.250	1.007				2.399	2.415	1.007
4-O-metil-Gal	2.214	2.225	1.005	2.503	2.519	1.006	2.379	2.396	1.006
6-O-metil-Gal	1.995	2.006	1.006				2.121	2.133	1.006

^a Relativos al *mio*-inositol peracetilado = 1 (20.95 min en Prog.A, 19.40 min en Prog.B, 14.28 min en la columna HP-5).

Comparando los resultados obtenidos con la amina quiral y con la mezcla racémica, se asignaron los tiempos de retención para los azúcares de ambas series enantioméricas, siendo los derivados producidos por la amina (*R*) equivalentes a aquellos producidos por el enantiómero del azúcar con la amina (*S*). En realidad sólo son cromatográficamente equivalentes, ya que ambos son enantiómeros entre sí.

Los derivados de los pares enantioméricos de la 3-, 4- y 6-*O*-metilgalactosa dan resolución a nivel de la línea de base, pero desafortunadamente el correspondiente a la 2-*O*-metilgalactosa no se resuelve.

Sólo los factores de separación mayores de 1,004 permiten una exacta cuantificación. Tanto la columna Ultra-2 como la HP-5 separan casi todos los enantiómeros; para la glucosa sin embargo, la resolución a nivel de la línea de base es imposible de lograr. Además algunos picos se superponen: los del derivado de la 4-*O*-metil-L-galactosa con el de la 3-*O*-metil-D-galactosa, los de la L-ramnosa y D-fucosa, y el del derivado de la D-manosa con los de la glucosa. En todos los casos, salvo para la arabinosa, el isómero D- eluye antes que el L-.

Los resultados indican que la respuesta del detector es aproximadamente equivalente al peso del producto, cuando se comparan derivados similares.

Como se demostró para la galactosa, otros azúcares tampoco presentan enantioselectividad: la amina racémica produjo para cada azúcar dos picos de áreas semejantes para cada diastereómero (relación de áreas 0,9-1,1).

En la Figura 46 se presenta un cromatograma típico, obtenido por aplicación del método a la mezcla de monosacáridos proveniente de la hidrólisis de la Fracción 41, donde se aprecia claramente la asignación de la configuración para cada azúcar.

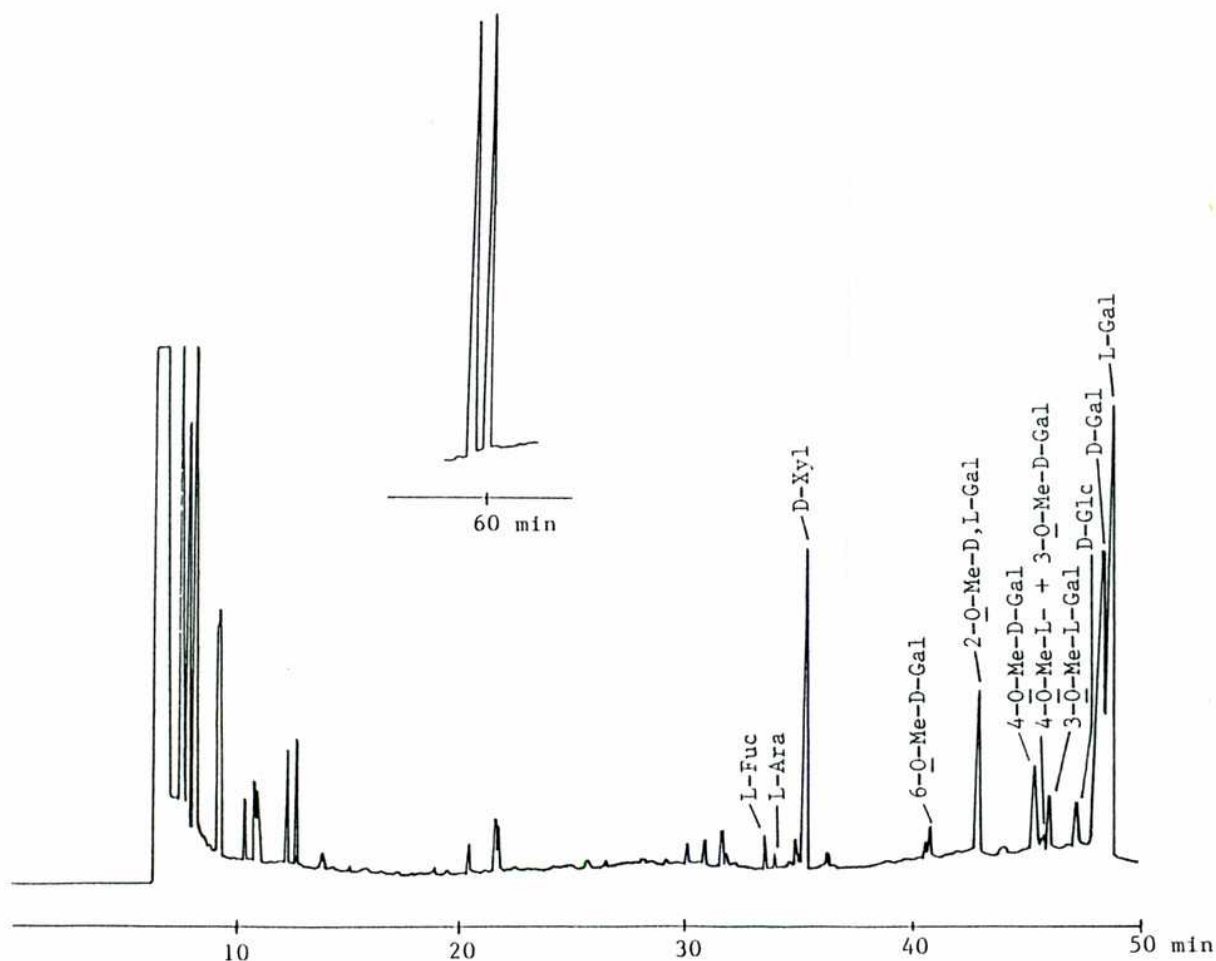


Figura 46: Cromatograma de un hidrolizado de la Fracción 4I derivatizado con (*S*)-1-amino-2-propanol. En la parte superior de la figura se observa la resolución de los enantiómeros de la 2-*O*-metilgalactosa derivatizada con (*S*)- α -metilbencilamina (véase pág. 225).

4.2.1 Empleo de la (*S*)- α -metilbencilamina para la resolución de la 2-*O*-metilgalactosa

Debido a que no fue posible separar el par de enantiómeros de la 2-*O*-metilgalactosa, y éste es un constituyente importante de los polisacáridos de algas, se aplicó la misma técnica para la derivatización utilizando (*S*)- α -metilbencilamina como amina quiral. Para ello se metiló nuevamente el 4,6-*O*-bencilidén- α -metilgalactósido

para obtener una mezcla enriquecida en 2-*O*-metilgalactosa, y se derivatizaron también los demás azúcares estudiados anteriormente. En la Tabla 75 se observan los resultados.

Tabla 75: Tiempos de retención^a, factores de separación *r* y relación de enantioselectividad ratio $r_{D/L}$ ^b de aminoalditales acetilados originados en la derivatización de azúcares enantioméricos con (*S*)- α -metilbencilamina usando la columna Ultra 2 (Programa C).

Azúcar	D-	L-	<i>r</i>	$r_{D/L}$
Ramnosa	2,377	2,316	1,026	0,9
Fucosa	2,343	2,365	1,009	1,6
Arabinosa	2,389	2,375	1,006	0,7
Xilosa	2,440	2,448	1,003	1,5
Glucosa	3,109		1	
Manosa	3,107	3,048	1,019	0,7
Galactosa	3,094	3,114	1,006	2,3
2- <i>O</i> -metil-Gal	2,833	2,867	1,012	1,0
3- <i>O</i> -metil-Gal	3,009		1	
4- <i>O</i> -metil-Gal	2,953	2,968	1,005	3,1
6- <i>O</i> -metil-Gal	2,728	2,748	1,007	1,8

^a Relativos al *mio*-inositol peracetilado = 1 (20,60 min).

^b Relación de áreas de los picos correspondientes a ambos enantiómeros.

La interpretación de los datos experimentales usando esta amina se complica debido a la enantioselectividad ya discutida (pág. 207), la cual es especialmente notable para la galactosa, impidiendo por lo tanto la cuantificación de cada enantiómero. Por otra parte, los azúcares con configuración *mano* se resuelven mucho mejor que con la

otra amina¹⁵⁴. En este caso, tanto en los azúcares con la configuración *mano* como en la arabinosa, los derivados de la serie L eluyen antes que los correspondientes compuestos pertenecientes a la serie D.

Afortunadamente, los enantiómeros de la 2-(*O*)-metilgalactosa se resuelven en forma excelente tras reacción con la α -metilbencilamina, y pueden ser cuantificados en forma precisa debido a que en este caso no se observa diastereoselectividad y entonces ambos diastereómeros se encuentran en proporciones equivalentes (véase Figura 46).

4.3 CONCLUSIONES

La preparación de los 1-desoxi-1-(2'-hidroxipropilamino)alditoles acetilados es tan simple como la de los aldononitrilos y aún más simple que la de los alditoles acetilados, los que constituyen los métodos usuales para analizar y cuantificar los monosacáridos constituyentes de polisacáridos. El método permite además trabajar con cantidades mínimas de polisacárido (≈ 1 mg).

En la mayoría de los trabajos, se presupone que la configuración de los azúcares es la usual para cada uno de ellos, por ejemplo D-glucosa, D-xilosa, L-fucosa, etc., sin analizarla en particular. Aunque debido al solapamiento de ciertos picos, en algunos casos este método no puede usarse para determinar al mismo tiempo tanto la composición como la configuración de los azúcares componentes, en estas circunstancias puede precisarse las configuraciones de una mezcla de azúcares cuya composición fue deducida por los métodos clásicos.

TERCERA SECCIÓN

PARTE EXPERIMENTAL

CAPÍTULO V

MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 CONSIDERACIONES GENERALES

Las evaporaciones se realizaron en un evaporador rotatorio Büchi a presión reducida, con temperatura del baño menor de 45°.

Los productos hidrosolubles se llevaron a sequedad por liofilización; éstas se efectuaron en un aparato Virtis, a presiones menores de 100 militorr y temperaturas del condensador cercanas a los 40°C bajo cero. Las muestras se dejaron en desecador de vacío una noche previamente a ser pesadas y/o manipuladas.

Las diálisis se efectuaron a temperatura ambiente utilizando tubos de celulosa anudados en ambos extremos, y la selección del diámetro del tubo dependió del volumen de solución a dializar. El corte de peso molecular empleado normalmente fue 6000-8000, y en los casos necesarios se utilizaron bolsas de corte 3500. Las diálisis se llevaron a cabo, salvo indicación en contrario, durante dos días contra agua corriente y un día contra agua destilada renovada cada 3-4 horas.

Los poderes rotatorios fueron determinados a temperatura ambiente en un polarímetro Perkin-Elmer 141 con una lámpara de sodio (589 nm), en un tubo de 1 dm con un volumen interno de 1 ml. La concentración utilizada fue de 0,3-0,5 % (p/v).

Las determinaciones colorimétricas se realizaron con espectrofotómetros Spectronic 20D (Bausch y Lomb) o Hewlett-Packard 8451A, y la concentración se determinó por referencia a curvas patrón; se emplearon tubos de vidrio cilíndricos de 11,66 mm de diámetro interno y celdas de cuarzo de 1 cm de longitud óptica respectivamente.

5.2 CARACTERÍSTICAS DEL MATERIAL

Se emplearon ejemplares del alga roja *Corallina officinalis* recolectados en dos

localidades diferentes: en Puerto Madryn, provincia de Chubut (se utilizó sólo para los estudios preliminares), y en Miramar, provincia de Buenos Aires, recogida en el mes de marzo. La recolección fue manual y el alga se secó al aire libre.

5.3 EXTRACCIÓN Y AISLAMIENTO DEL POLISACÁRIDO

El alga seca se pulverizó con un molino Wiley (malla 20). Se tomaron 48,7 g, se suspendieron en 90 ml de agua, y luego se agregaron 560 ml de HCl 0,1N lentamente, para evitar que el pH disminuyera por debajo de 6, hasta que cesó el desprendimiento de CO₂. Todo este procedimiento se realizó en baño de hielo. Luego se mantuvo con agitación durante 24 horas a temperatura ambiente.

El extracto se centrifugó, se separó el residuo y la solución acuosa se concentró hasta 150 ml. Se volcó lentamente y con agitación sobre 525 ml de isopropanol y se dejó toda la noche en heladera. El polisacárido precipitó como un producto blanco, se secó por intercambio de solventes (isopropanol y luego acetona) y por último en desecador a presión reducida. Se obtuvieron 1,28 g (2,6%) de producto F.

El residuo (10,9 g) se extrajo con agua a ebullición durante 30 horas, se centrifugó y el polisacárido C se obtuvo de la manera descrita previamente (0,47 g; 1%).

Los polisacáridos así obtenidos se purificaron por redisolución en agua, centrifugación, diálisis del sobrenadante y liofilización. Se obtuvieron dos fracciones solubles (FS y CS), y dos residuos insolubles (FI y CI).

Finalmente, el residuo de la extracción en caliente (7,0 g) se extrajo nuevamente con agua a ebullición durante 24 horas. El polisacárido CII se obtuvo de la manera descrita (0,40 g, 0,80%). En todos los casos el germicida utilizado fue la *m*-toluidina.

5.4 FRACCIONAMIENTO DEL POLISACÁRIDO

El fraccionamiento del polisacárido FS se realizó por cromatografía de intercambio iónico sobre DEAE-Sephadex A-50. Se realizaron dos tipos de fraccionamiento: analítico y preparativo, los que difieren sólo en las masas sembradas y en el volumen de gel empleado. En las determinaciones analíticas se utilizaron 5-5,5 mg de polisacárido en columnas de 0,9 x 20 cm, y en los fraccionamientos preparativos 200-1870 mg de polisacárido en columnas de 1,3 x 50 cm.

El gel se preparó por agregado de la resina de intercambio seca (Pharmacia), a un exceso del solvente utilizado (agua o cloruro de sodio 0,1M); el gel se dejó "hinchar" durante 2 horas a ebullición, separando por decantación las partículas finas sobrenadantes.

Una vez producida la hidratación se llenaron las columnas con una suspensión diluida del gel. Tras sembrar la muestra disuelta en un mínimo de solvente, se eluyó con soluciones de cloruro de sodio de concentraciones crecientes desde 0,1 hasta 0,8M (preparativas) y hasta 1,5M (analíticas). Se recogieron fracciones de volúmenes variables (0,5 a 2 ml) utilizando un colector automático provisto de célula fotoeléctrica (Bio-Rad), y se determinó su contenido de azúcar por el método del fenol / ácido sulfúrico¹⁰⁹.

5.5 DETERMINACIÓN CUANTITATIVA DE LOS HIDRATOS DE CARBONO TOTALES

Se empleó el método colorimétrico del fenol / ácido sulfúrico según la técnica descrita por Dubois *et al*¹⁰⁹.

Reactivos necesarios

Acido sulfúrico, 98%, grado analítico (Merck).

Solución de fenol al 5% en agua, preparada por disolución de 50 g de fenol p.a. en 1 litro de agua. Esta solución es estable durante varios meses conservada a temperatura ambiente.

Procedimiento

A 0,5 ml de solución, que contenga hasta 70 μg de azúcares / ml, se agregan 0,5 ml de la solución de fenol y se mezcla. Se dejan caer con un dispensador 2,5 ml de ácido sulfúrico concentrado directamente sobre la superficie de la solución para asegurar un máximo calentamiento. Al cabo de 10 minutos, las soluciones se agitan y se mantienen 20 minutos más a temperatura ambiente; paralelamente se realiza un blanco con agua destilada. Se mide la absorbancia del color desarrollado a 490 nm. La cantidad de azúcar se determina por referencia a curvas patrón y se expresa como porcentaje de azúcar anhidro.

Construcción de curvas patrón

Utilizando soluciones madre de galactosa (u otros azúcares, véase Capítulo 2 pág. 61) se efectuaron las diluciones correspondientes (hasta 70 μg de azúcar / ml) y se grafica la absorbancia en función de la concentración.

5.6 DETERMINACIÓN DE 3,6-ANHIDROGALACTOSA

Se llevó a cabo con el reactivo de resorcinol / ácido clorhídrico desarrollado por Yaphe¹⁶⁵, posteriormente modificado por Yaphe y Arsenault¹⁶⁶.

Reactivos necesarios

Se prepara una solución madre con 700 mg de 1,1-dimetoxietano ("acetal") llevados a 100 ml con agua destilada. La solución de trabajo de 0,28 mg / ml se prepara diluyendo 1:25 con agua destilada. Esta solución es estable por un mes.

La solución de resorcinol se prepara disolviendo 15 mg de reactivo p.a. en 10 ml de agua destilada. Esta solución, guardada en heladera en frasco color caramelo, puede conservarse una semana.

El reactivo de resorcinol se prepara añadiendo 100 ml de ácido clorhídrico 12M (grado analítico, δ 1,19) sobre 10 ml de la solución de resorcinol, y agregando a esta nueva solución 1 ml de la solución de trabajo del acetal. Este reactivo es estable sólo durante 3 horas.

Procedimiento

En un tubo de ensayo dentro de un baño de hielo, se colocan 0,6 ml de una solución que contenga entre 0,5 y 40 μg / ml de 3,6-anhidrogalactosa o su equivalente en polisacárido, y se agregan 3 ml del reactivo de resorcinol. Se mezcla, se tapa con una bolita de vidrio y se mantiene en el baño de hielo entre 3 y 30 minutos. Se coloca en un baño de agua a 20°C durante 4 minutos, y luego se calienta a 80°C durante 10 minutos. Se enfría 1,5 minutos en baño de hielo y se mide la absorbancia del color desarrollado a 555 nm dentro de los primeros 15 minutos. Paralelamente se efectúa un blanco con agua destilada.

La cantidad de 3,6-anhidrogalactosa se determina por referencia a curvas patrón y se expresa como porcentaje del componente anhidro (162 – 18). Conviene llevar a cabo la reacción bajo luz difusa ya que el color disminuye por exposición a la luz solar.

Observaciones

Si bien el método es específico para la 3,6-anhidrogalactosa (o fructosa), otros

azúcares también dan color, aunque en menor proporción como se observa en la Tabla 76.

Construcción de la curva patrón

Se disuelven 33 mg de 3,6-anhidrogalactosa dietilditioacetil en 50 ml de agua. A 5 ml de esta solución se le agregan 33 mg de cloruro mercúrico y 13 mg de carbonato de cadmio, y se calienta a 50°C durante una hora. Se lleva entonces a 50 ml, obteniéndose una solución de 40 μg / ml de 3,6-anhidrogalactosa. Se efectúan distintas diluciones de la misma y se grafica la absorbancia de estas soluciones testigo en función de la concentración.

Tabla 76: Especificidad del reactivo de resorcinol¹⁶⁶.

Azúcar	Relación de color ^a
Fructosa	100
3,6-anhidrogalactosa	92
Ribosa	5
Xilosa	4
Manosa	2,5
Glucosa	2
Galactosa	1
Ramnosa	1
Arabinosa	1
Fucosa	1

^a Relación de color = (Absorbancia de 0,18 μmoles de azúcar / Absorbancia de 0,18 μmoles de fructosa) · 100.

5.7 DETERMINACIÓN DE SULFATO

La determinación del éster sulfato en los polisacáridos se llevó a cabo luego de hidrólisis de los mismos, por el método turbidimétrico de Dodgson^{167,168}.

Reactivos necesarios

El reactivo de cloruro de bario / gelatina debe prepararse cuidadosamente: se disuelven 200 mg de gelatina (Oxoid, exenta de sulfatos) en 40 ml de agua a 60-70°C, y la solución resultante se deja en heladera durante, al menos, seis horas. Luego se disuelven 200 mg de cloruro de bario (grado analítico) en el fluido viscoso, y se deja en heladera durante 2-3 horas más. El reactivo así preparado es estable durante una semana en la heladera.

La solución de ácido tricloroacético se prepara pesando 15 g de ácido y llevando a 500 ml con agua destilada. La solución resultante se conserva en heladera.

Procedimiento

El polisacárido (0,5-2 mg) se disuelve en la cantidad necesaria de ácido clorhídrico 1M para obtener una solución madre la cual, por diluciones adecuadas, permita obtener soluciones con una concentración final de sulfato de 20-200 μg de SO_4^{2-} / 0,5 ml. Un volumen exactamente medido de esta solución (usualmente 1,0 ml) se trasvasa a un vial con cierre de teflón y se mantiene a 105-110°C durante 4-5 horas.

Una vez enfriado, el contenido del tubo se mezcla antes de abrirlo y se toman alícuotas de un volumen tal, que una vez llevadas a 0,5 ml por agregado de agua destilada, la concentración final de sulfato esté dentro del rango mencionado. Se agregan luego 3,5 ml de la solución de ácido tricloroacético y luego de mezclar se adiciona 1 ml del reactivo de gelatina / cloruro de bario. Se mezcla y se deja a temperatura ambiente durante 15-20 minutos. Se mide la absorbancia de la solución a

360 nm contra un blanco obtenido en las mismas condiciones con 0,5 ml de HCl 1M. La medición debe hacerse dentro de la primera hora, ya que luego el sulfato de bario tiende a precipitar.

La cantidad de sulfato se determina por referencia a curvas patrón obtenidas en las mismas condiciones con soluciones de sulfato de sodio en ácido clorhídrico 1M.

Observaciones

Este dosaje no puede efectuarse en presencia de polisacáridos sulfatados sin hidrolizar, ya que éstos dan complejos turbios con gelatina.

5.8 DETERMINACIÓN DEL 6-SULFATO

Se llevó a cabo por el método de Rees⁹.

A una solución de 7 mg de polisacárido en 3,5 ml de agua se agregan 7 mg de borohidruro de sodio, y se deja una noche a temperatura ambiente. Luego se adicionan 1,75 ml de hidróxido de sodio 3M y 14 mg más de borohidruro de sodio. Se calienta a 80°C en viales con cierre de teflon y se extraen alícuotas a las 2, 3, 4 y 5 horas (según los datos de Matulewicz² se llega a constancia en el contenido de 3,6-anhidrogalactosa luego de 4 horas de calentamiento). A cada alícuota, convenientemente diluida, se le determina el contenido de 3,6-anhidrogalactosa por el método del resorcinol-ácido clorhídrico¹⁶⁶, y se comparan con un control mantenido a temperatura ambiente.

La diferencia en el contenido de 3,6-anhidrogalactosa de la muestra tratada respecto del control se debe al 6-sulfato originalmente presente, y en base a ello su proporción se determina de la siguiente manera:

$$\% \text{ 6-sulfato (como NaSO}_3) = 103/144 \cdot [\% \text{ 3,6-AnGal}_{\text{final}} - \% \text{ 3,6-AnGal}_{\text{inicial}}]$$

5.9 DETERMINACIÓN DE ACIDOS URÓNICOS

Se empleó la técnica descrita por Blumenkrantz y Asboe-Hansen¹⁶⁹, utilizando *meta*-hidroxibifenilo.

Reactivos necesarios

solución de tetraborato de sodio 0,0125M en H₂SO₄ concentrado.

solución de *meta*-hidroxibifenilo 0,15% en NaOH 0,5%.

Procedimiento

A 0,5 ml de una solución de polisacárido que contenga hasta 40 µg de ácidos urónicos enfriada en un baño de hielo, se le agregan 3 ml de la solución de tetraborato de sodio. Se mezcla y se calienta a 100°C durante 5 min. Se enfría en un baño de agua-hielo y se añaden 50 µl de la solución de *meta*-hidroxibifenilo. Se agita la solución, se deja reposar 20 min, y se mide la absorbancia del color desarrollado a 520 nm.

Construcción de la curva patrón

Utilizando soluciones madre de glucuronolactona se efectúan las diluciones correspondientes (hasta 80 µg de azúcar / ml) y se grafica la absorbancia en función de la concentración.

5.10 DETERMINACIÓN DEL PESO MOLECULAR

Se llevó a cabo por determinación de grupos reductores según la técnica de Park y Johnson¹¹⁰.

Reactivos necesarios

Solución A: ferricianuro de potasio (500 mg / l) en botella color caramelo.

Solución B: cianuro de potasio (0,65 g / l) en solución de carbonato de sodio (5,3 g / l).

Solución C: 1,5 g de sulfato amónico-férrico hidratado y 1 g de dodecilsulfato de sodio (SDS) disueltos en un litro de ácido sulfúrico 0,05 N. Se filtra la solución luego de preparada.

Procedimiento

A 0,5 ml de una solución de la muestra que contenga hasta 30 nanomoles de azúcar reductor, se agregan 0,5 ml de la solución B y 0,5 ml de la solución A. Se mezcla y se calienta en baño de agua hirviente durante 15 minutos. Se enfría y se agregan 2,5 ml de la solución C. Luego de 15 minutos en reposo, se lee la absorbancia del color producido a 690 nm. La cantidad de grupos reductores se determina por referencia a curvas patrón.

Construcción de la curva patrón

Utilizando soluciones madre de galactosa se efectúan las diluciones correspondientes (hasta 30 nanomoles de azúcar reductor / 0,5 ml) y se grafica la absorbancia en función de la concentración del azúcar.

La ecuación utilizada para calcular el peso molecular es la siguiente:

$$\overline{PM} = \frac{m \cdot \%H_{de C} \cdot p \cdot V_{alic} \cdot 10}{A \cdot V_T} \cdot PM_{inh} \cdot \frac{180}{162}$$

donde m : masa de polisacárido en mg

$\%H_{de C}$: porcentaje de hidratos de carbono del polisacárido

p : pendiente de la curva de absorbancia vs concentración del azúcar

V_{alic} : volumen de la alícuota de la solución del polisacárido

V_T : volumen total de la solución (0,5 ml)

$PM_{,inh}$: peso molecular promedio de la unidad monosacáridica

180 / 162: factor que corrige el hecho de que el peso molecular de la unidad monosacáridica tiene 18 unidades (= H₂O) de masa menos que el azúcar empleado como standard.

5.11 DETERMINACIÓN CUANTITATIVA DE LAS PROTEÍNAS TOTALES

Se realizó por el método descrito por Lowry *et al*¹⁷⁰.

Soluciones necesarias

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

Solución B: sulfato cúprico pentahidratado al 0,5% en una solución de tartrato de sodio y potasio al 1%.

Solución C: mezclar 50 ml de solución A con 1 ml de solución B; esta solución sólo es estable por 24 horas.

Solución D: reactivo de Folin-Ciocalteu (Merck o Sigma), diluido al medio inmediatamente antes de ser usado. La absorbancia de la solución resultante debe ser inferior a 0,040 medida contra un blanco de agua destilada.

Procedimiento

A 0,4 ml de una solución que contenga hasta 0,5 mg de proteína / ml se agregan 2 ml de solución C. Se mezclan y se dejan reposar a temperatura ambiente por lo menos 10 minutos. Se adicionan rápidamente y con agitación 0,2 ml de solución D, se mezclan dentro de los dos segundos y luego de al menos 30 minutos, se mide la

absorbancia del color desarrollado a 600 nm contra un blanco de agua destilada obtenido en las mismas condiciones.

Construcción de la curva patrón

Se obtiene graficando la absorbancia de soluciones que contienen hasta 500 µg / ml de albúmina de suero bovino en agua, en función de la concentración de las mismas.

5.12 DETERMINACIÓN DE LOS AZÚCARES COMPONENTES

Hidrólisis ácida total de los polisacáridos

Los polisacáridos (1-3 mg) se hidrolizaron por calentamiento con 0,5 ml de ácido trifluoroacético 2N, durante 90 minutos a 121°C, en un vial con cierre de teflon¹⁷¹. Luego se llevó a sequedad bajo corriente de nitrógeno (de ser necesario se centrifuga previamente). Se tomó el hidrolizado con agua y se llevó nuevamente a sequedad, repitiendo el procedimiento hasta eliminar totalmente el ácido (lo que se reconoce cuando desaparece el olor picante). La muestra se dejó en desecador al vacío durante una noche antes de ser derivatizada.

Hidrólisis ácida para componentes celulósicos¹¹⁷

El producto a hidrolizar (1-6 mg) se trató con 0,2 ml de ácido trifluoroacético puro a 37°C durante una hora. A continuación se diluyó el ácido con el volumen de agua necesario para obtener una solución al 80%, y se calentó durante una hora a 100°C. Luego se siguió el mismo procedimiento que para la hidrólisis ácida total.

Preparación de los aldononitrilos peracetilados¹⁷²

A la mezcla de azúcares proveniente de la hidrólisis se le agregaron 10 mg de

clorhidrato de hidroxilamina y 0,5 ml de piridina anhidra en un vial con cierre de teflon, y se calentó a 85°C durante 20-30 minutos. Luego se abrió el tubo bajo campana extractora, se dejó enfriar y se agregaron 0,5 ml de anhídrido acético manteniendo la mezcla de reacción 20-30 minutos más a 85°C. La solución se dejó enfriar y se extrajo con 1 ml de cloroformo / agua 1:1. La fase acuosa se separó y si fuese necesario se reextrae con cloroformo. Los extractos clorofórmicos combinados se lavaron con 0,5 ml de solución saturada de bicarbonato de sodio (3 lavados), luego con el mismo volumen de agua destilada (2 lavados), y finalmente se secaron sobre sulfato de sodio anhidro. El extracto clorofórmico se evaporó a sequedad y el residuo obtenido se disolvió en 20µl de cloroformo inmediatamente antes de inyectar en el cromatógrafo.

Preparación de los alditos peracetilados

Siguiendo el método de Lindberg y col.¹⁴⁴, a la mezcla de azúcares hidrolizados se le agregaron 0,5 ml de hidróxido de amonio diluido y 5 mg de borohidruro de sodio, y se dejó reaccionar toda la noche. Se adicionaron luego gotas de ácido acético diluido hasta pH ácido y resina Dowex-50 para descationizar. Se filtró y se evaporó a sequedad. Se agregaron luego 0,5 ml de metanol y se evaporó a sequedad para eliminar el borato residual como borato de metilo; este proceso se repitió cinco veces. Se dejó una noche en desecador al vacío y se acetilaron los alditos por agregado de 0,4 ml de piridina, 0,4 ml de anhídrido acético y calentando 45 minutos a 100°C. Finalmente se lavaron y extrajeron los derivados tal como se describió para aldononitrilos.

5.13 CROMATOGRAFÍA GAS-LÍQUIDO

Las cromatografías gas-líquido se efectuaron en un cromatógrafo Hewlett-Packard modelo 5890A, equipado con detector de ionización de llama, con una

relación de split de 100:1, usando nitrógeno como gas carrier. La masa de cada derivado se consideró proporcional al área de cada pico. Las proporciones menores al 1% se consideraron como trazas.

Columnas y condiciones utilizadas

Los análisis de azúcares componentes de los polisacáridos nativos, así como las determinaciones de azúcares parcialmente alquilados obtenidos por metilación o etilación de los mismos se realizaron con una columna capilar SP-2330 (Supelco), de 30 m de largo, 0,25 mm de diámetro interno y 0,20 μm de espesor de la fase líquida, con un flujo de gas carrier de 1 ml / min y una presión en cabeza de columna de 13 psi.

En ambos casos se emplearon dos condiciones de corrida. Para azúcares provenientes de polisacáridos nativos, isotérmica a 220°C o el siguiente programa: 1 min a 210°C, luego 210°C \rightarrow 240°C a 4°C / min.

Para azúcares parcialmente alquilados, isotérmica a 210°C; o programada: 160°C \rightarrow 210°C a 4°C / min y luego de 210°C \rightarrow 240°C a 5°C / min.

En los análisis de productos de aminación reductiva se emplearon dos columnas capilares:

Ultra-2 (Hewlett-Packard): 50 m x 0,2 mm x 0,11 μm , flujo de gas carrier: 0,65 ml / min y presión en cabeza de columna: 20 psi.

HP-5 (Hewlett-Packard): 50 m x 0,32 mm x 0,17 μm , flujo de gas carrier: 2,3 ml / min y presión en cabeza de columna: 15 psi.

Se utilizaron tres programas de temperatura diferentes:

Programa A: 180°C \rightarrow 220°C a 4°C / min, se mantiene 2 min a 220°C, y luego 220°C \rightarrow 250°C a 1°C / min.

Programa B: 180°C → 230°C a 4°C / min, se mantiene 20 min a 230°C, y luego 230°C → 250°C a 1°C / min.

Programa C: 180°C → 220°C a 4°C / min, se mantiene 2 min a 220°C, y luego 220°C → 270°C a 1°C / min. Este programa se empleó para los derivados aromáticos.

Los espectros de masa fueron realizados con un espectrómetro de masa Trio-2 VG Masslab acoplado a un cromatógrafo gaseoso HP-5890A, a un potencial de ionización de 70 eV.

5.14 ESTUDIOS DE METILACIÓN

La metilación de los polisacáridos se realizó por una modificación¹²⁸ a la técnica de Stevenson y Furneaux¹²⁷ que tomo como base el método de Hakomori¹⁷³.

Preparación del metilsulfinilmetanuro de sodio (carbanión sódico)

Se suspendieron 1,5-2,0 g de hidruro de sodio seco en 15 ml de DMSO (secado sobre tamices moleculares de 4Å) dentro de un balón de dos bocas, sellado con un septum de goma provisto de dos agujas de inyección. Se colocó en un baño de aceite a 50-60°C trabajando bajo corriente continua de nitrógeno a través de una de las agujas. La evolución de hidrógeno producida se venteó a través de la otra aguja. Luego de alrededor de 4 horas de reacción cesó la evolución de gas, y la solución gris-verdosa resultante que contiene el carbanión se utilizó directamente para la metilación. El reactivo puede almacenarse en heladera y es estable por un mes. Para determinar la concentración del carbanión, se tituló con HCl 0,05M utilizando fenolftaleína como indicador.

(PRECAUCION: El hidruro de sodio, así como el carbanión sódico, reaccionan violentamente con agua y son altamente corrosivos).

Metilación de los polisacáridos

Los polisacáridos (5 mg) se disolvieron en 0,5 ml de agua y se sembró la solución en una columna que contiene una resina ácida fuerte (Amberlite IR-120Plus) previamente equilibrada con clorhidrato de trietilamonio al 5% y lavada con abundante agua hasta reacción negativa de cloruros en el lavado. La sal de trietilamonio de los polisacáridos se recuperó por elución con agua. Las soluciones acuosas se liofilizaron y los productos secos, tras permanecer en desecador al vacío, se disolvieron en 1 ml de dimetilsulfóxido anhidro. Se agregaron 0,72 ml de carbanión 2,8M, se agitó 1 hora en baño de hielo y luego se colocó una aguja para permitir el escape de gases. Se añadieron entonces 0,75 ml de yoduro de metilo, se llevó a temperatura ambiente y se agitó durante 20 min. Para finalizar, se agregaron aproximadamente 6 ml de agua, y se dializó la solución entre 2 y 3 días contra agua corriente y 1 día contra agua destilada. Finalmente el polisacárido permetilado se obtuvo por liofilización.

Hidrólisis de los polisacáridos permetilados

El polisacárido (1-5 mg) se trató con 0,5 ml de ácido fórmico al 45% v/v durante 16 horas a 100°C. Se añadió una pequeña cantidad de agua y se evaporó a presión reducida hasta casi sequedad. Luego se realizaron evaporaciones sucesivas de pequeños volúmenes de agua hasta eliminar el ácido. Se agregaron entonces 0,5 ml de agua y gotas de amoníaco diluido para neutralizar el ácido sulfúrico producido; se evaporó a sequedad, se agregaron 2 ml de etanol, se centrifugó y el sobrenadante se dividió en dos partes. Los monosacáridos parcialmente metilados se evaporaron a sequedad, se dejaron una noche en desecador a presión reducida, luego se derivatizaron como

alditoles y aldononitrilos acetilados (véase pág. 239) y se analizaron por cromatografía gaseosa. Las cantidades menores de 0,6 % fueron consideradas como trazas.

5.15 ESTUDIOS DE ETILACIÓN

Preparación del ioduro de etilo

Se siguió la técnica de Hunt¹⁷⁴. En un balón de 1 litro enfriado en baño de agua, se colocaron 153 g de iodo (reactivo limitante) y 86 g de etanol 80% p/p. Se agregaron 15,3 g de fósforo rojo en porciones durante 20 min y se calentó a reflujo durante 2 horas. Luego por destilación se separó el ioduro de etilo crudo, y se lavó con volúmenes equivalentes de agua, ácido clorhídrico concentrado, agua, carbonato de sodio al 10% y nuevamente agua. Si quedase coloreada la solución debido al iodo, se pueden agregar algunos cristallitos de tiosulfato de sodio al último lavado. Se secó el producto obtenido sobre cloruro de calcio y se destiló (p.eb. 69-73°C). Se obtuvieron 98 g de ioduro de etilo puro (rendimiento 52%), y para comprobar su pureza se realizó el espectro de RMN de ¹H que se observa en la Figura 47.

Etilación de los polisacáridos

Los polisacáridos fueron etilados de la manera en que se describió para la metilación, pero se hizo un segundo agregado de carbanión y de agente alquilante, y los tiempos de reacción fueron mayores. Luego de cada agregado de carbanión se dejó reaccionar durante 150 min. Se agregaron 0,24 ml de ioduro de etilo en el primer agregado y 0,48 ml en el segundo, y en cada caso se dejó reaccionar con agitación durante una hora. Fue necesario mayor tiempo de diálisis para eliminar el exceso de reactivos que en el caso de la metilación. La hidrólisis y derivatización de los productos peretilados fue análoga a la descripta previamente (pág. 243).

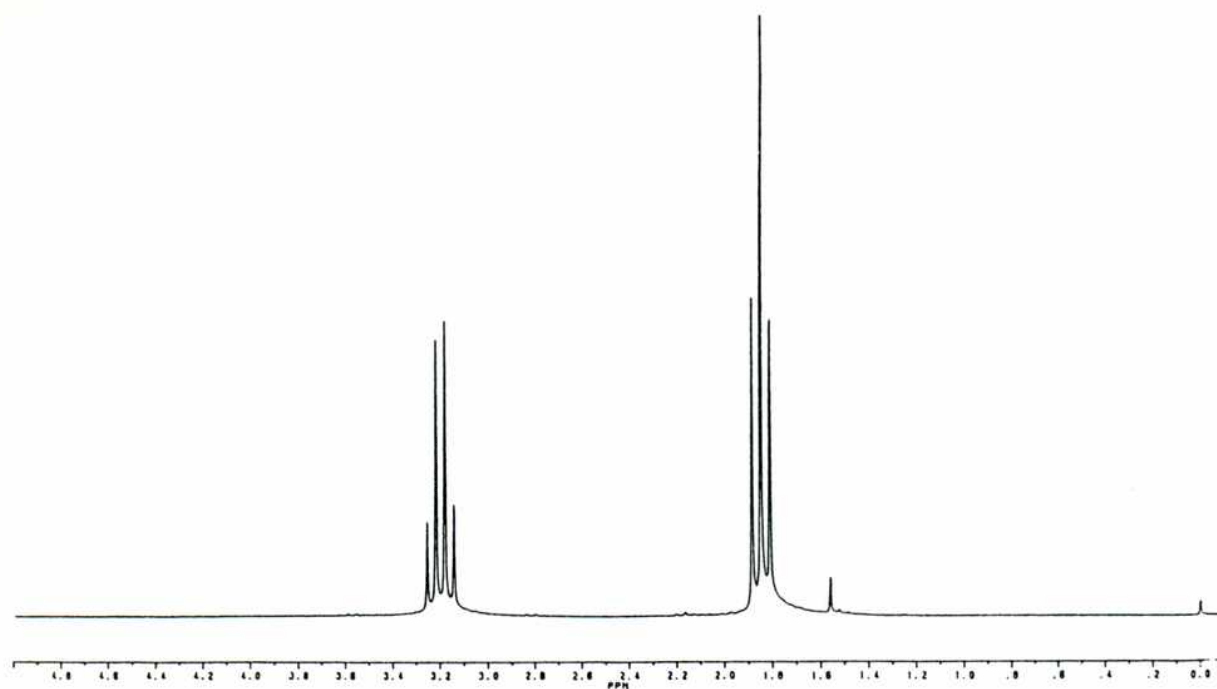


Figura 47: Espectro de RMN de ^1H de ioduro de etilo.

5.16 DESULFATACIÓN SOLVOLÍTICA

Desulfatación solvolítica con DMSO / piridina

Se siguió la técnica descrita por Matulewicz y Cerezo¹⁷⁵. El polisacárido (8-10 mg) se disuelve en 1,5 ml de agua, se trata con 15 mg de NaBH_4 y se deja reaccionar toda la noche. Luego se dializa y se concentra por evaporación a presión reducida hasta aproximadamente 2 ml. La solución resultante se pasa a través de una columna de resina Dowex-50 en forma piridinio y por liofilización se obtiene la sal de piridinio de los polisacáridos (5-10 mg), la cual se trata con 1,25 ml de una solución de DMSO que contiene 2% v/v de piridina y se calienta a 100°C durante 9 horas. El producto de la reacción se dializa y por liofilización se obtiene el polisacárido parcialmente desulfatado, el cual se dividió en tres partes: una para dosar sulfato, otra para analizar azúcares componentes y la última para metilar.

Desulfatación solvolítica con DMSO / piridina

Se siguió la técnica descrita por Nagasawa *et al*¹³⁴. El método es idéntico al descrito anteriormente con la diferencia que se utiliza una solución de DMSO con 10% v/v de metanol.

5.17 DESULFATACIÓN ÁCIDA

Se empleó la técnica de Stortz y Cerezo¹⁷⁶. El polisacárido (10 mg) se suspendió en 1 ml de metanol absoluto y se agregaron 40 mg de resina Dowex-50 (H⁺) y 6 mg de cloruro de sodio seco. Luego de agitar a temperatura ambiente durante 12 horas, se agrega una suspensión de bicarbonato de sodio en agua, y luego de filtrar, dializar y liofilizar se obtiene el polisacárido parcialmente desulfatado, el cual se analiza de la forma descrita antes.

5.18 OXIDACIÓN CON PERIODATO

Se disolvieron 2 mg de muestra (Fr 4II y 5I) en 1 ml de solución de metaperiodato de sodio 0,015M, y se dejó a temperatura ambiente en ausencia de luz. Se midió el consumo de periodato a distintos tiempos hasta que se observó constancia en el consumo del oxidante.

Determinación del consumo de periodato

Se llevó a cabo por el método espectrofotométrico de Guthrie¹⁷⁷. Se midieron las absorbancias a 223 nm de soluciones testigo de metaperiodato de sodio 0,015M y iodato de potasio 0,015M diluidas 250 veces, y se hizo lo propio con alícuotas de la

mezcla de oxidación diluida también 250 veces. El consumo de periodato se determinó de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\text{periodato consumido (mM)} = 15 \cdot [1 - (\text{Abs}_{\text{periodato}} - \text{Abs}_{\text{muestra}} / \text{Abs}_{\text{periodato}} - \text{Abs}_{\text{iodato}})]$$

Se graficaron los valores de consumo de periodato en función del tiempo de oxidación hasta constancia (Figuras 48 y 49) y con ese dato, extrapolando a $t = 0$, se calcularon las unidades de monosacárido oxidadas por mol de periodato consumido, según:

$$n^{\circ} \text{ de unidades / mol de periodato} = p \cdot 1000 / V \cdot I \cdot M, \text{ donde:}$$

p = peso de la muestra (mg)

V = volumen de solución de muestra (ml)

I = periodato consumido (mM)

M = peso molecular de la unidad monosacarídica, calculado conociendo la composición del polisacárido y tomando los pesos moleculares de los monosacáridos en la cadena (162 para la galactosa) y del sulfato (103, NaSO_3). Para las fracciones 4II y 5I dichos valores son 159,3 y 158,2 respectivamente.

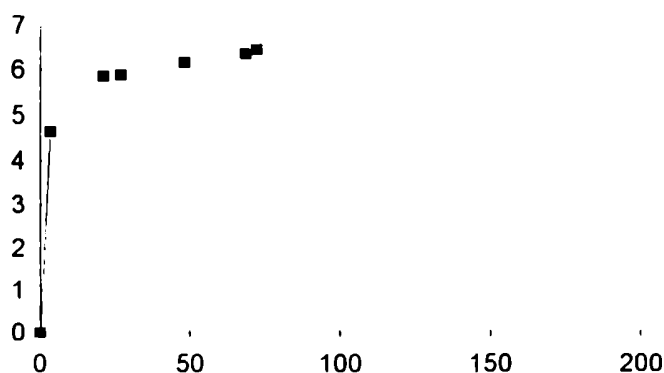


Figura 48: Consumo de periodato en función del tiempo de reacción para la Fracción 4II.

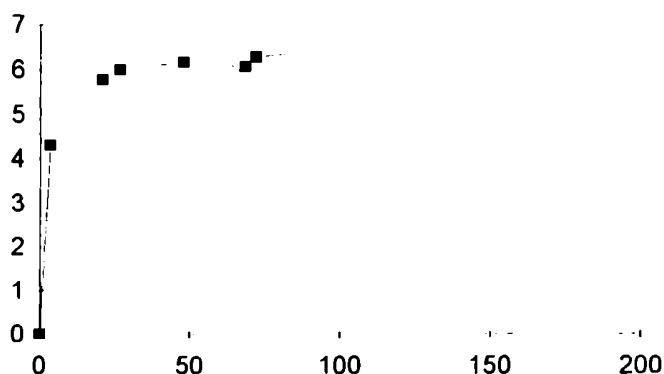


Figura 49: Consumo de periodato en función del tiempo de reacción para la Fracción 5I.

5.19 AMINACIÓN REDUCTIVA

5.19.1 **Aminación reductiva en buffer ácido acético / acetato de sodio de pH = 5,9**

En 5 ml de buffer se disolvieron 100 mg (555,5 μ moles) de D-galactosa y 47,8 μ l (370 μ moles) de (\pm)- α -metilbencilamina. Se agregaron 29,3 mg (555,5 μ moles) de cianoborohidruro de sodio y se agitó la mezcla durante 17 horas a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se colocó en una columna rellena con resina Dowex-50 (H^+), se lavó con agua destilada y se eluyó con amoníaco 0,5 y 1M. Se juntaron estas dos fracciones y se evaporaron a sequedad a presión reducida. Se obtuvieron 25 mg del producto de condensación.

El buffer utilizado se preparó con 0,853 g de acetato de sodio y 34,2 μ l de ácido acético glacial llevados a 100 ml con agua destilada.

5.19.2 **Aminación reductiva empleando la técnica de Tang y Williams¹⁵⁷**

En tres viales con cierre de teflon se colocaron 50 mg (0,28 mmoles) de D-galactosa, 239 μ l (1,85 mmoles) de (\pm)- α -metilbencilamina y 50 mg (0,80 mmoles) de cianoborohidruro de sodio. Se agregaron luego una de estas tres soluciones a cada vial:

A: 0,450 ml de DMF + 45 μ l de ácido acético glacial

B: 0,470 ml de DMF + 27 μ l de ácido acético glacial

C: 0,485 ml de DMF + 13,5 μ l de ácido acético glacial

Se calentaron las soluciones a 95°C durante 3 horas, y luego se agregó una cantidad suficiente de resina Amberlite IR-120 plus (H⁺). Cuando terminó la evolución de gases se transfirió la mezcla a una columna que contenía un volumen de 7,5 ml de la misma resina. Se lavó primero con 75 ml de agua y se eluyó a continuación con el mismo volumen de amoníaco 1M. Los eluatos se evaporaron a presión reducida y se realizaron los espectros de RMN de ¹³C (Figura 40, pág. 206). La solución acuosa que contenía los productos se extrajo con cloroformo, los compuestos presentes en fase acuosa se acetilaron siguiendo la misma técnica empleada para los alditoles (pág. 240), y se analizó por CGL. Sobre la solución clorofórmica se realizaron los espectros de RMN de ¹³C y ¹H que se observan en las Figuras 50 y 51.

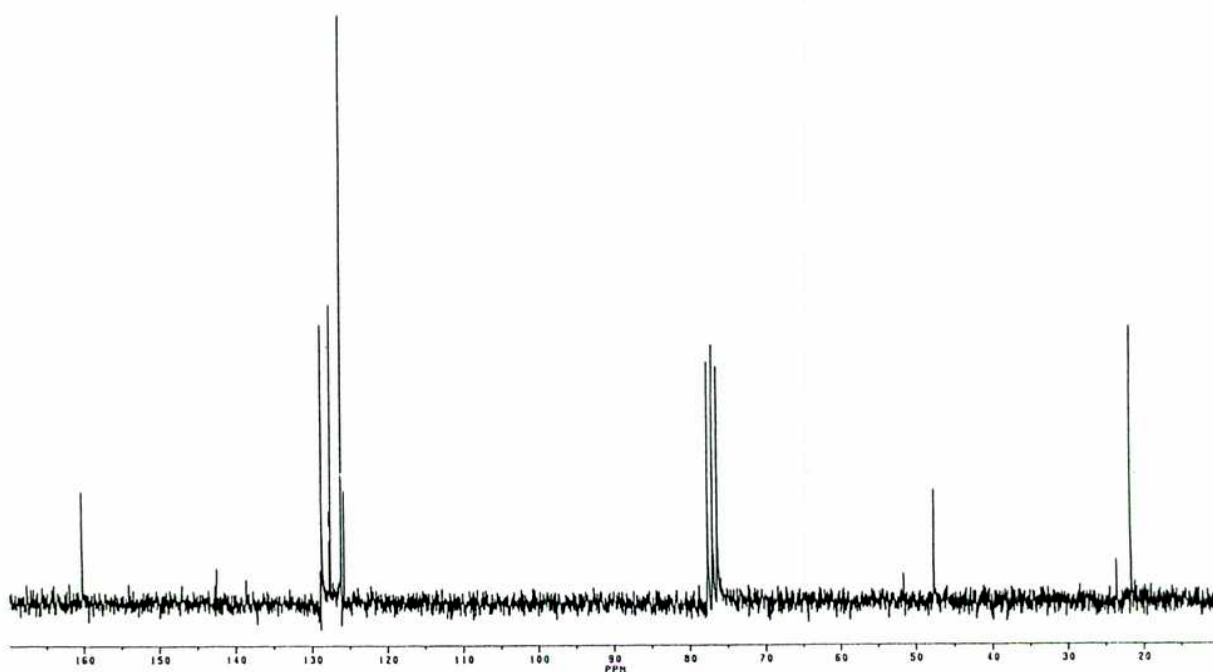


Figura 50: Espectro de RMN de ¹³C del extracto clorofórmico de los productos de la reacción.

Los espectros muestran claramente que la impureza soluble en cloroformo es la *N*-(α -metilbencil)formamida. Las asignaciones de las señales del espectro de ^{13}C se observan en la Figura 52. Aparece además un triplete a $\delta \approx 77,0$ que corresponde al cloroformo deuterado. El espectro protónico coincide perfectamente con los datos de literatura para dicho compuesto¹⁷⁸.

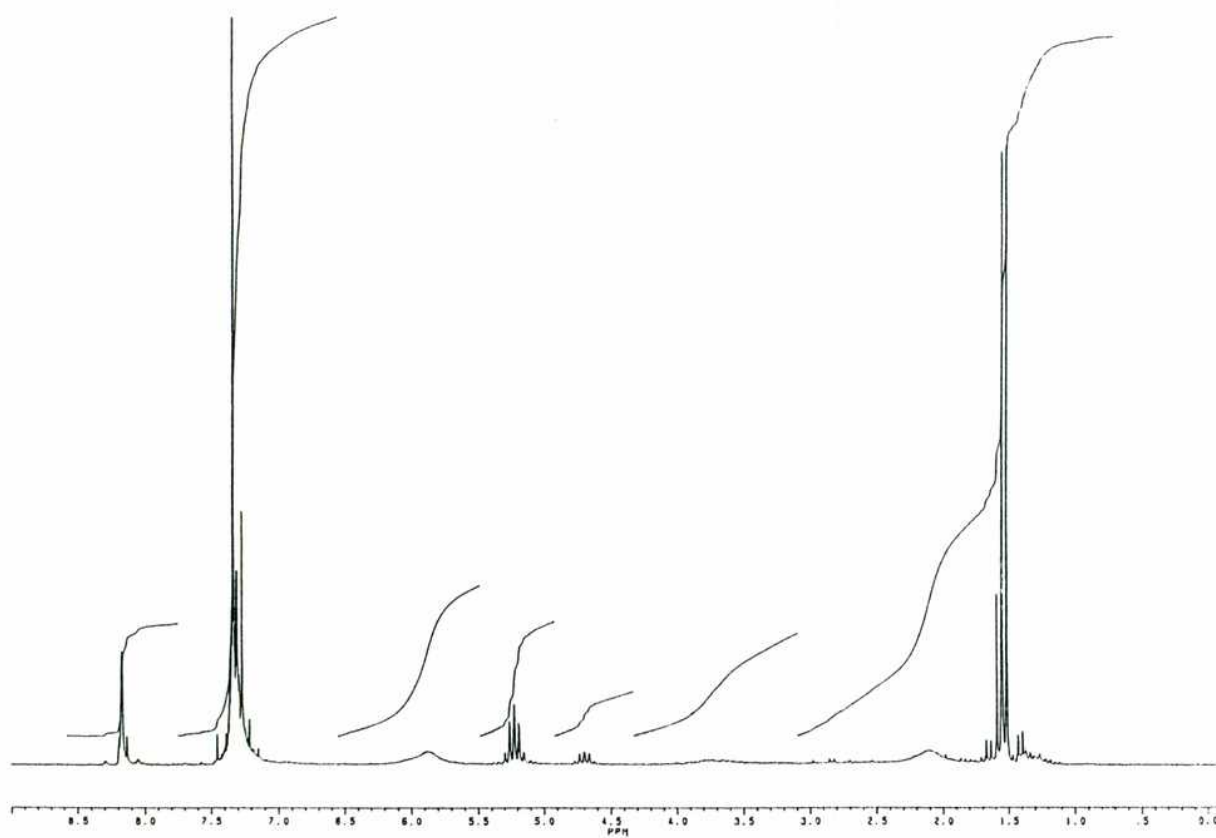


Figura 51: Espectro de RMN de ^1H del extracto cloroformico de los productos de la reacción.

5.19.3 Aminación reductiva empleando la técnica de Oshima *et al*¹⁵⁴

Se disolvieron 50 mg (0,28 mmoles) de D-galactosa en 0,375 ml de agua. Por otro lado, 150 μl (1,85 mmoles) de (\pm)-1-amino-2-propanol y 50 mg (0,80 mmoles) de cianoborohidruro de sodio se disolvieron en 0,375 ml de etanol. Se mezclaron ambas

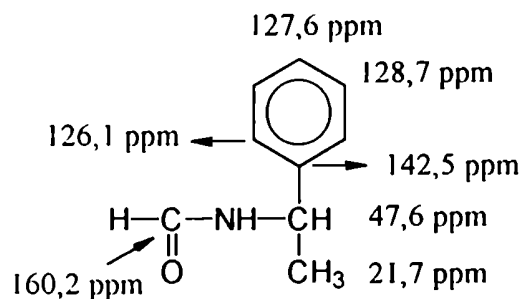


Figura 52: Asignaciones de las señales correspondientes al espectro de la Figura 48.

soluciones y se calentó la solución resultante a 67°C durante 3 horas. Finalmente la reacción se trató como se describió en la experiencia anterior.

5.19.4 Juego de reacciones I: variación de la relación azúcar / amina

Soluciones necesarias

Solución de cianoborohidruro de sodio: 50 mg de NaCNBH₃ disueltos en 1,4 ml de etanol.

Solución de inositol: 334,55 mg de inositol en 5,00 ml de agua.

Procedimiento

En 6 viales provistos con cierre de teflon se colocaron 20 mg (0,111 mmoles) de D-galactosa y 0,15 ml de la solución de inositol como standard interno. Luego se agregó a cada vial distintas cantidades de amina: 8,6 µl (0,111 mmoles); 25,7 µl (0,333 mmoles); 34,3 µl (0,444 mmoles); 42,8 µl (0,554 mmoles); 51,4 µl (0,666 mmoles); 60,0 µl (0,777 mmoles). A la mezcla resultante en cada caso, se le adicionó 0,20 ml de la solución de NaCNBH₃ (0,213 mmoles). Se calentó durante 4 horas a 60°C, se dejó enfriar y se agregaron gotas de ácido trifluoroacético 3M hasta pH fuertemente ácido. Se evaporó a presión reducida cuidando de no llevar a sequedad, luego se realizaron cuatro agregados sucesivos de 0,5 ml de agua hasta eliminar el ácido. Finalmente se

agregaron 0,5 ml de metanol y se evaporó a sequedad; este proceso se repitió cinco veces hasta eliminar el borato formado. Los productos se dejaron en desecador a presión reducida una noche y se acetilaron según la técnica descrita.

5.19.5 Juego de reacciones II: variación del pH

Soluciones necesarias

Buffers ftalato de pH 2 y 3 : Se disolvieron 1,30 g de ftalato ácido de potasio en 10 ml de etanol, se ajustó al pH buscado con la cantidad necesaria de TFA 3M y se llevó a 25,0 ml con agua destilada.

Buffers ácido acético / acetato de pH 4; 5 y 6 : Se tomaron 8,3 ml de una solución que contenía 22,6440 g de acetato de sodio en 50 ml de agua, y se ajustó al pH requerido con el volumen necesario de ácido acético glacial.

Buffers fosfato de pII = 6,5; 7 y 8 : Se disolvieron 3,7780 g de fosfato diácido de potasio en 25,0 ml de agua y se ajustó con una solución de hidróxido de sodio al pII buscado.

Procedimiento

Se siguió el mismo procedimiento que en el Juego de reacciones I pero reduciendo a la mitad la cantidad de D-galactosa e inositol, y se emplearon 21,5 μ l (0.277 mmoles) de amina para cada caso. Se utilizó en cada reacción el volumen de buffer necesario como para agregar 0,555 mmoles del ión respectivo; luego se llevó con agua a un volumen final de 0,57 ml (salvo las reacciones a pH 2 y 3 que se llevaron 2,12 ml por la baja solubilidad del ftalato ácido). Finalmente se agregaron 56 μ l (0,06 mmoles) de la solución de cianoborohidruro de sodio y se calentó a 65°C durante 5 horas.

5.19.6 Juego de reacciones III: variación de la proporción de agua

Soluciones necesarias

Solución de NaCNBH₃ alcohólica: Se preparó disolviendo 31 mg del reactivo en 900 µl de metanol.

Solución de NaCNBH₃ acuosa: Se preparó disolviendo 9 mg del reactivo en 300 µl de agua.

Procedimiento

Se siguió la técnica empleada en la reacción anterior, variando la proporción de agua entre 0 y 100%. Se agregaron 110 µl de la solución alcohólica y 126 µl de la solución acuosa de cianoborohidruro (0,06 mmoles) y completando a 300 µl finales con la cantidad necesaria de metanol y/o agua. Luego de la reacción se agregaron 75,1 µl (5 mg) de la solución de inositol.

5.19.7 Juego de reacciones IV: acción del ácido acético glacial y variación de la proporción de cianoborohidruro

Soluciones necesarias

Solución de NaCNBH₃: Se preparó disolviendo 46,1 mg del reactivo en 800 µl de metanol.

Solución de 1-amino-2-propanol: 120 µl en 1,116 ml de metanol.

Procedimiento

Se siguió la misma técnica anterior pero agregando la amina en solución metanólica [0,2 ml (0,277 mmoles)]. En tres viales se añadieron 65,5; 131 y 200 µl (0,06; 0,12 y 0,18 mmoles) de solución de cianoborohidruro respectivamente, y llevando a 200 µl con metanol en los dos primeros casos. Además, se realizaron dos reacciones más empleando 65,5 y 131 µl de solución de hidruro pero agregando 31,8 µl (0,555 mmoles) de ácido acético glacial.

5.19.8 Juego de reacciones V: variación de la temperatura y el tiempo de reacción

Soluciones necesarias

Solución de 1-amino-2-propanol: 0,1 ml en 0,4 ml de metanol.

Solución de NaCNBH₃: 24,65 mg de reactivo en 0,4 ml de metanol.

Procedimiento

Se siguió la misma técnica anterior pero reduciendo a la mitad la cantidad de moles de cada reactivo utilizado. En todas las reacciones se utilizaron 5 mg de galactosa; 53,8 µl de solución de amina; 30,6 µl de solución del hidruro; 15,9 µl de ácido acético glacial y se diluyó con 116 µl de metanol. Se realizaron tres grupos de reacciones: el primero a 85°C variando el tiempo de reacción en 1, 2 y 3 horas, el segundo a 65°C durante 1, 2 y 4 horas, y el último a temperatura ambiente durante 26 horas.

5.19.9 TÉCNICA OPTIMIZADA

La siguiente técnica, deducida a partir de los distintos ensayos enumerados, es la que debe utilizarse para la derivatización de los azúcares con fines analíticos.

Soluciones necesarias:

Solución de 1-amino-2-propanol: 130 µl en 1040 µl de metanol (dilución 1:9).

Solución de ácido acético glacial: 280 µl en 1140 µl de metanol (dilución 1:5).

Solución de NaCNBH₃: 35 mg de reactivo en 1170 µl de metanol.

Procedimiento

En un vial provisto con cierre de teflon se colocan 5 mg (0,0277 mmoles) de azúcar, se agregan 96,5 µl (0,1385 mmoles) de solución de amina, 81 µl (0,0277 mmoles) de solución de ácido acético y finalmente 63 µl (0,03 mmoles) de solución de cianoborohidruro. Se calienta a 65°C durante 1 hora y luego de enfriar se sigue el procedimiento descrito en el Juego de reacciones I.

5.20 SÍNTESIS DEL 4,6-O-BENCILIDÉN- α -METILGALACTÓSIDO

Se siguió la técnica descrita por Evans¹⁶⁴.

Procedimiento

En un balón de 25 ml se colocaron 1 g (5,15 mmoles) de α -metilgalactósido y 773 μ l (5,15 mmoles) de α,α -dimetoxitolueno, y se agregaron 4,1 ml de DMF y 2,6 mg de ácido *p*-toluensulfónico. Se colocó el recipiente en un evaporador rotatorio, se ajustó la presión a 30 mm de Hg y se calentó a 60°C; en estas condiciones se obtuvo un reflujo constante del solvente. Luego de una hora de reacción, se aumentó la temperatura a 85°C y la presión se llevó a 2 mm de Hg hasta evaporar todo el solvente.

Al producto obtenido se le agregaron 5,2 ml de solución de bicarbonato de sodio al 2% y se calentó a 100°C; aquí surgió una diferencia respecto de lo informado por Evans¹⁶⁴ ya que en lugar de dispersarse, el producto se disolvió. Por enfriamiento, el precipitado formado englobó toda la solución. Se colocó dicho precipitado sobre un filtro y se lavó con agua helada; se produjo una nueva diferencia con la técnica original: una porción del compuesto se disolvió en el agua helada y por lo tanto fue necesario concentrar la solución y precipitar el producto por enfriamiento; se juntaron ambas fracciones del compuesto. El rango de fusión del producto crudo es 145-150°C. Se recrystalizó el compuesto de una mezcla de hexano - etanol 2:1 pero el rango de fusión obtenido no varió. El espectro de ¹³C-RMN del producto se muestra en la Figura 53.

El espectro indica claramente que se obtuvo el bencilidén derivado buscado, pero impurificado con aproximadamente un 20% del metilgalactósido de partida. Las asignaciones de las señales se muestran en la Figura 54. Existen en el espectro una serie de picos [100,3 (C-1) - 71,6 (C-5) - 70,4 (C-3) - 70,1 (C-4) - 69,1 (C-2) - 62,1 (C-6) - 55,9 ppm (metilo)] que corresponden al α -metilgalactósido¹⁵⁸.

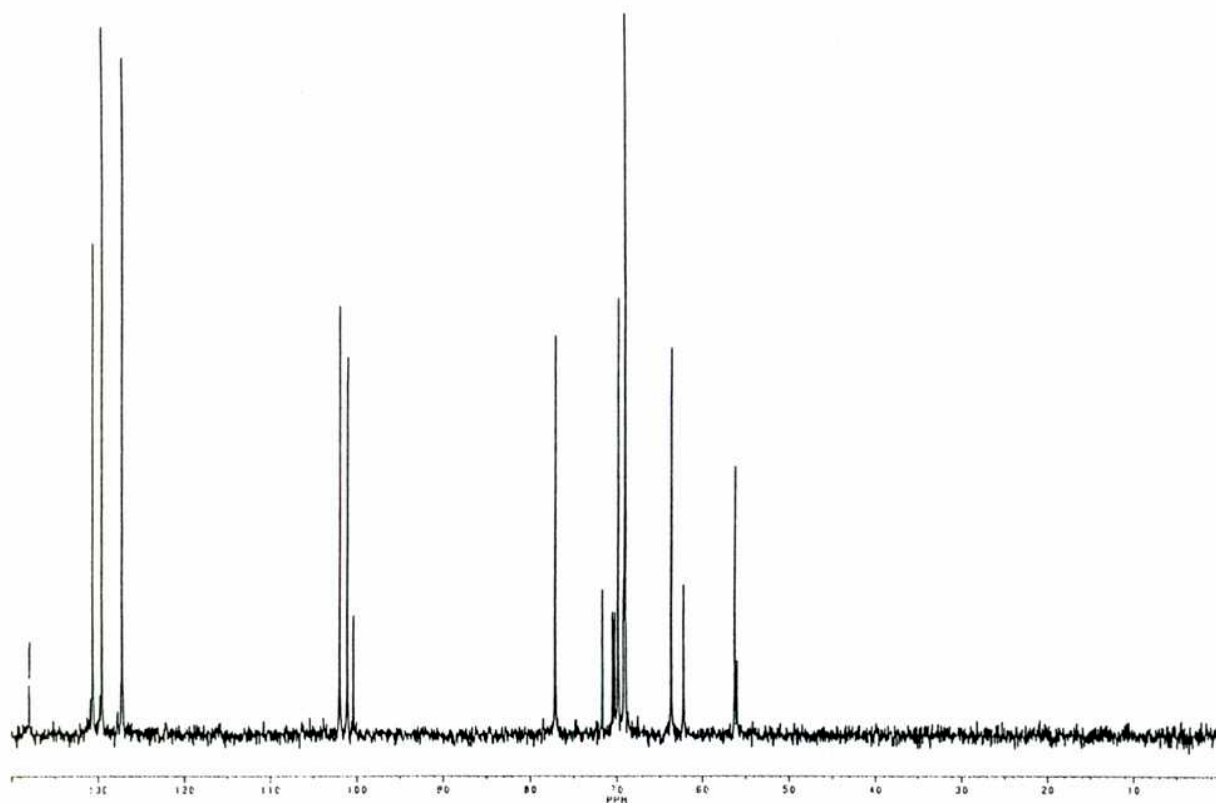


Figura 53: Espectro de RMN de ^{13}C del 4,6-*O*-benzilidén- α -metilgalactósido.

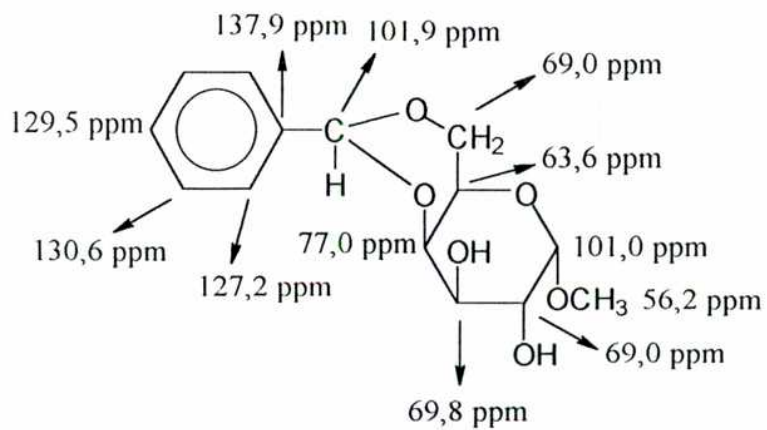


Figura 54: Asignaciones de las señales correspondientes al espectro de la Figura 53.

5.21 REACCIONES DE SUB-ALQUILACIÓN INTENCIONAL

Se realizaron dos reacciones de sub-alquilación intencional diferentes: una para obtener productos di- y trietilados a partir del metilgalactósido (procedimiento A), y otra en la que se deseaban productos monometilados (particularmente 2-O-metilgalactosa) partiendo del 4,6-bencilidén- α -metilgalactósido (procedimiento B).

Procedimiento A

Se siguió la misma técnica descrita para la metilación de los polisacáridos en la página 243, utilizando 6,5 mg de α -metilgalactósido, 64 μ l de carbanión 2,6 M (1,25 equivalentes por cada equivalente de azúcar) y 19 μ l de yoduro de metilo. El aislamiento de los monosacáridos parcialmente alquilados se realizó según la técnica de Mort *et al*¹⁷⁹ empleando cartuchos Sep-Pak C₁₈ (Waters Associates, Inc., Milford, Mass.). Los cartuchos fueron precondicionados con lavados sucesivos de 5 ml de metanol, 5 ml de acetato de etilo, 5 ml de metanol y 10 ml de agua, antes de aplicar la muestra. Las muestras se diluyeron con 5 ml de agua para aumentar la polaridad del medio y asegurar la adsorción de los azúcares, y luego se sembraron lentamente sobre el Sep-Pak por medio de una jeringa de vidrio de 10 ml. Se utilizó la siguiente secuencia de elución:

- 1) 2 lavados con 5 ml (o cantidad necesaria) de agua
- 2) 3 lavados con 2 ml de metanol : agua 1:1
- 3) 2 lavados con 2 ml de metanol absoluto
- 4) 2 lavados con 2 ml de cloroformo : metanol 1:1
- 5) 2 lavados con 2 ml de acetato de etilo
- 6) 2 lavados con 2 ml de metanol
- 7) 5 lavados con 2 ml de agua

Los pasos 4 y 5 lavan el Sep-Pak y los pasos 6 y 7 lo preparan para ser reutilizados. En el paso 1 hay que controlar cuidadosamente el volumen de agua de lavado ya que es posible que algunos azúcares puedan eliminarse en dicha etapa. Los azúcares parcialmente metilados se obtienen en las etapas 2 y 3, se evapora el solvente y los productos se derivatizan de la manera ya descrita.

Procedimiento B

Se utilizaron 15 mg del 4,6-bencilidén- α -metilgalactósido, 38 μ l de carbanión 2,8 M (0,70 equivalentes por cada equivalente de azúcar) y 60 μ l de yoduro de metilo, utilizando la técnica descrita (pág. 243).

5.22 ESPECTROSCOPIA DE RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

Los espectros se realizaron a temperatura ambiente en un espectrómetro Bruker AC-200 y Varian VXR-400, este último en la Georgia State University, Atlanta, E.E.U.U.

¹H-RMN:

Los espectros protónicos del yoduro de etilo y de los productos de aminación reductiva se realizaron a 200 MHz, utilizando CDCl₃ como solvente, con los siguientes parámetros: ancho espectral = 3 KHz, ángulos de pulso = 45°, tiempo máximo de adquisición de datos = 2,736 seg y sin espera entre pulsos, con referencia externa a TMS. Las muestras fueron disueltas en agua deuterada y liofilizadas varias veces antes de realizar los espectros, a fin de intercambiar sus protones oxhidrónicos.

El espectro de la Fracción 5I se realizó a 400 MHz y 70°C de temperatura, con los siguientes parámetros: ancho espectral = 4 KHz, ángulos de pulso = 45°, tiempo máximo de adquisición de datos = 3,752 seg y tiempo de relajación = 1,0 seg, con

referencia externa a TMS. Para suprimir el pico del HOD se utilizó la secuencia de pulsos WEFT¹⁸⁰.

¹³C-RMN:

Los espectros de los productos de aminación reductiva se obtuvieron a 50,32 MHz, empleando CDCl₃ o H₂O / D₂O 1:1 como solvente según corresponda. Los parámetros empleados fueron los siguientes: ancho espectral = 11 KHz, ángulos de pulso = 45°, tiempo máximo de adquisición de datos = 0,737 seg y sin espera entre pulsos. Los desplazamientos químicos se determinaron en relación al dioxano como standard externo, y se indicaron con referencia al tetrametilsilano (TMS) de acuerdo a la siguiente ecuación: $\delta_{\text{TMS}} = \delta_{\text{dioxano}} + 67,4$ ppm. En todos los casos se efectuó desacople protónico total y se utilizó como frecuencia de cierre de campo la resonancia del deuterio. El número de pulsos empleado fue entre 4000-6000.

Los espectros de los polisacáridos se realizaron a 100,577 MHz y 70°C de temperatura, empleando H₂O / D₂O 1:1 como solvente y los siguientes parámetros: ancho espectral = 25 KHz, ángulos de pulso = 45°, tiempo máximo de adquisición de datos = 0,6 seg, tiempo de relajación = 1,0 seg. Los desplazamientos químicos se determinaron en relación al DSS como standard interno; su relación con los carbonos metílicos de la acetona-*d*₆ es: $\delta_{\text{DSS}} = \delta_{\text{acetona-}d_6} + 32,06$ ppm. Respecto de los espectros realizados con dioxano como standard, las señales aparecen a 1,7 ppm a campos más bajos. Se acumularon aproximadamente 50000 pulsos.

5.23 CONSTRUCCIÓN DE LAS TABLAS DE ESTRUCTURA

Para construir la Tabla 44 se calcularon las proporciones de cada sustituyente utilizando los resultados de aldononitrilos metilados (Tabla 24) y el promedio de los

datos de análisis directo (Tabla 4I). Todos estos valores se recalcularon expresándolos en moles por cada 100 galactosas de cadena (es decir todas las galactosas menos la 4-*O*-metilgalactosa). Los datos de sulfato se recalcularon en moles por cada 200 galactosas de cadena.

Las proporciones de cada sustituyente se obtuvieron considerando el porcentaje de cada azúcar parcialmente metilado, de la siguiente manera:

$$R_1 = Y : 2,4\text{-di-}O\text{-MeGal}$$

$$R_1 = H : [2,4,6\text{-tri-}O\text{-MeGal} + 4,6\text{-di-}O\text{-MeGal}] - [6\text{-}O\text{-MeGal}]^*$$

$$R_1 = Me : [6\text{-}O\text{-MeGal}]^*$$

$$R_2 = Y : 2,6\text{-di-}O\text{-MeGal} + 6\text{-}O\text{-MeGal}$$

$$R_2 = H : [2,3,6\text{-tri-}O\text{-MeGal} + 3,6\text{-di-}O\text{-MeGal} + 2,3\text{-di-}O\text{-MeGal}] - [3\text{-}O\text{-MeGal}]^*$$

$$R_2 = Me : [3\text{-}O\text{-MeGal}]^*$$

$$R_3 = \text{SO}_3^- : 3,6\text{-di-}O\text{-MeGal} + 6\text{-}O\text{-MeGal}$$

$$R_3 = H : [2,3,6\text{-tri-}O\text{-MeGal} + 2,6\text{-di-}O\text{-MeGal} + 2,3\text{-di-}O\text{-MeGal}] - [2\text{-}O\text{-MeGal}]^*$$

$$R_3 = Me : [2\text{-}O\text{-MeGal}]^*$$

$$Y = \text{SO}_3^- : [\text{SO}_3^-]^* - [R_3 = \text{SO}_3^-]$$

$$Y = \text{Xil} : [\text{Xil}]^*$$

$$Y = \text{Me} : [4\text{-}O\text{-MeGal}]^*$$

Los resultados obtenidos para el sustituyente Y se recalculan de manera que coincidan con $[R_1 = Y + R_2 = Y]$.

Los datos entre corchetes con un asterisco, por ejemplo $[6\text{-}O\text{-MeGal}]^*$,

indican que dicho azúcar es un azúcar metilado natural determinado por análisis directo y debe considerarse expresado en moles por cada 100 unidades disacarídicas, es decir cada 200 galactosas de cadena. Los resultados se aprecian en la Tabla 77.

Tabla 77: Estructura de los coralinanos deducida a partir de datos de aldononitrilos metilados y análisis directo (véase Figura 38, expresada por 100 unidades disacarídicas).

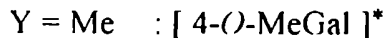
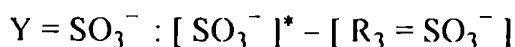
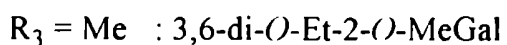
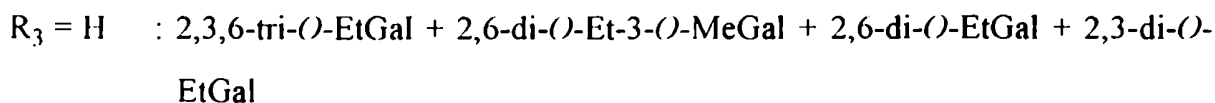
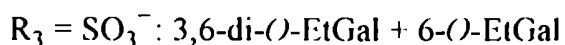
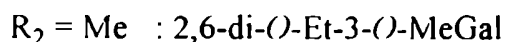
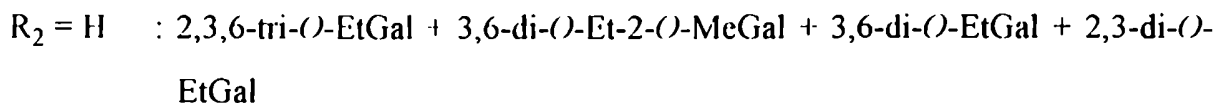
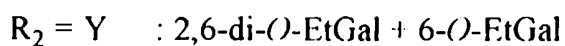
Sustituyente	1I	2I	3I	4I	4II	5I	5II	5III	6I	7I	8I
R₁ = Y	48,9	59,7	63,0	76,5	87,3	90,0	90,3	87,2	81,3	68,9	70,1
H	40,6	34,0	35,2	21,3	10,9	8,7	8,5	7,1	9,6	11,8	6,2
Me	10,5	6,3	1,8	2,2	1,8	1,3	1,2	5,7	9,1	19,3	23,7
R₂ = SO₃⁻	10,8	11,4	13,6	13,8	16,5	20,3	21,0	15,7	12,5	7,1	7,4
H	53,1	43,7	40,1	50,9	50,4	47,3	47,0	48,4	47,0	31,9	27,1
Me	36,1	44,9	46,3	35,3	33,1	32,4	32,0	35,9	40,5	61,0	65,5
R₃ = Y	20,2	35,9	40,4	21,8	23,5	22,6	22,6	24,3	23,3	15,8	13,6
H	68,4	57,1	54,2	69,1	65,8	64,7	68,6	68,6	71,1	79,9	84,1
Me	11,6	7,0	5,4	9,1	10,7	12,7	8,8	7,1	5,6	4,3	2,3
Y = SO₃⁻	30,1	39,1	37,5	36,9	51,3	43,3	47,5	57,7	61,3	61,7	71,1
β-Xil	29,0	38,7	38,7	44,9	54,1	66,5	63,4	51,1	37,8	13,2	10,4
4-Gal	9,8	17,8	27,2	16,5	5,4	2,8	2,0	2,7	5,5	9,8	2,2

De manera análoga se calcularon las proporciones de cada sustituyente usando los datos de aldononitrilos etilados. Los resultados se muestran en la Tabla 78.

R₁ = Y : 2,4-di-*O*-EtGal + 4-*O*-Et-2-*O*-MeGal

R₁ = H : 2,4,6-tri-*O*-EtGal + 4,6-di-*O*-EtGal

R₁ = Me : 2,4-di-*O*-Et-6-*O*-MeGal



Los datos obtenidos para el sustituyente Y se recalcularon de manera que coincidan con $[R_1 = Y + R_2 = Y]$.

Promediando los datos de las Tablas 77-78 se construye la Tabla 44 (pág. 149).

Determinación de la estructura de los coralinanos

Para determinar las proporciones de los sustituyentes en la unidad A, se utilizan directamente los datos de la Tabla 44, considerando en las fracciones 4II - 8I que todos los residuos de xilosa y 4-(O)-metilgalactosa están unidos en la posición 6 de la unidad A. Para la unidad B es importante considerar que los datos de alquilación, metilación y etilación, indican que es prácticamente nula la presencia de galactosas monoalquiladas por lo que nunca se encuentran dos sustituyentes en la misma unidad.

Tabla 78: Estructura de los coralinanos deducida a partir de datos de aldononitrilos etilados (véase Figura 38, expresada por 100 unidades disacarídicas).

Sustituyente	1I	2I	3I	4I	4II	5I	5II	5III	6I
R₁ = Y	52,4	67,8	65,3	81,6	88,0	90,4	90,3	88,2	82,9
H	39,5	26,8	30,5	15,1	9,7	8,1	8,5	8,2	10,0
Me	8,1	5,4	4,2	3,3	2,3	1,5	1,2	3,6	7,1
R₂ = SO₃⁻	12,4	18,3	15,1	13,9	18,8	24,1	20,4	17,7	12,7
H	60,6	56,7	56,5	62,1	56,9	53,8	55,3	56,0	59,9
Me	27,0	25,0	28,4	24,0	24,3	22,1	24,3	26,3	27,4
R₃ = Y	16,2	33,5	39,4	31,6	23,0	23,5	24,3	25,7	26,4
H	78,6	62,1	58,7	62,1	68,5	67,4	67,9	67,1	68,3
Me	5,2	4,4	1,9	6,3	8,5	9,1	7,8	7,2	5,3
Y = SO₃⁻	30,8	35,0	34,5	39,7	49,4	41,3	48,7	56,6	62,6
β-Xil	31,0	41,1	36,4	47,8	54,3	69,6	64,4	51,6	38,6
4-(O)-MeGal	6,8	25,2	33,8	25,7	7,3	3,0	1,5	5,7	8,1

Por ejemplo, para el Grupo Principal el promedio de los datos de la Tabla 44 arroja las siguientes proporciones para los distintos sustituyentes:

Unidad A	Unidad B	
R₁ : Y = 89,3 %	R₂ : SO₃⁻ = 20,3 %	R₃ : Y = 23,3 %
H = 9,3 %	H = 51,7 %	H = 67,0%
Me = 1,3 %	Me = 28,0 %	Me = 9,7 %

La proporción de componentes del sustituyente Y es: sulfato (47,0), xilosa (62,0) y 4-*O*-metilgalactosa (3,7). Por lo tanto, la composición de Y en la unidad A, se calcula de la siguiente manera: hay 62 unidades de xilosa, 4 unidades de 4-*O*-metilgalactosa y la proporción de sulfato se obtiene por diferencia respecto de la cantidad total de Y, es decir 23 grupos sulfato. Estos tres sustituyentes ocupan la posición 6 de las unidades de β -D-galactosa.

Para la unidad B, tomando en cuenta que existe sólo un sustituyente por residuo, si $R_2 = SO_3^-$ (20%) y $R_2 = Me$ (28%) entonces $R_3 = H$ (48%). Además, si $R_2 = H$ (52%), $R_3 = SO_3^-$ (23%) y $R_3 = Me$ (10%), entonces $R_3 = H$ es $52 - 33 = 19\%$.

Entonces:

$R_2 = Me$	$R_3 = H$	28%
$R_2 = H$	$R_3 = SO_3^-$	23%
$R_2 = SO_3^-$	$R_3 = H$	20%
$R_2 = H$	$R_3 = Me$	10%
$R_2 = H$	$R_3 = H$	19%

Con estos datos se determinaron las proporciones de cada componente como se observa en la Tabla 45. Para el resto de los grupos se procedió de la misma manera, pero en el Grupo Variante III se consideró que la xilosa y 4-*O*-metilgalactosa pueden encontrarse en el C-6 de la unidad A y en el C-3 de la unidad B.

5.24 ACTIVIDAD ANTIVIRAL

Citotoxicidad sobre células Vero

El ensayo se realizó sobre monocapas de células Vero crecidas en microplacas de 24 pocillos. Se prepararon soluciones acuosas de 2 mg/ml de las Fracciones 2I y 4II. Se incubaron las células durante 48 horas a 37°C en medio de cultivo MEM con 1,5% de suero bovino, conteniendo diferentes concentraciones de los polisacáridos. Se agregó tripsina para despegar las células y se contaron las células viables utilizando azul tripán (tiñe células muertas).

Se determinó la concentración citotóxica 50 (CC50) definida como la dosis del compuesto requerida para reducir el número de células viables en un 50%. La CC50 para las Fracciones 2I y 4II fue en ambos casos mayor de 50 µg/ml.

Acción antiviral

Se midió la actividad de los polisacáridos contra virus Herpes Simplex tipo 1 (HSV-1) cepa F. Se emplearon células Vero, línea derivada de riñón del mono verde africano *Cercopithecus aethiops*.

Procedimiento

Se agregaron distintas concentraciones de los polisacáridos en la adsorción y se mantuvieron hasta las 24 horas post-infección. Luego se determinó el rendimiento viral por el método de unidades formadoras de placa (UFP). Se realizó también un control sin muestra.

Diluciones seriadas 1/10 de los sobrenadantes correspondientes a cada concentración de compuesto y del control se agregaron a una monocapa de células Vero (por duplicado). La adsorción se realizó durante 1 hora a 37°C. Se retira el inóculo y se incuban 48 horas a 37°C con MEM 1,5% + 0,7% de metilcelulosa. Se contaron las placas, previa tinción con cristal violeta.

Se calculó la concentración inhibitoria 50 (CI50) que es la dosis del compuesto requerida para reducir la acción citopática del virus a un 50%, y en la Tabla 79 se presentan los resultados obtenidos. La CI50 para la Fracción 2I es mayor de 50 $\mu\text{g/ml}$, y para la Fracción 4II es 50 $\mu\text{g/ml}$.

Tabla 79: CI50 para soluciones de distinta concentración de las Fracciones 2I y 4II.

Fracción	Concentración ($\mu\text{g/ml}$)				
	50	25	12,5	6,25	3,12
2I	72 ^a	90	88	84	82
4II	50	80,7	100	100	96

^a Los datos están expresados en porcentajes respecto del control.

RESUMEN

En este trabajo de Tesis se determinó la estructura del sistema de polisacáridos del alga roja calcárea *Corallina officinalis*. Se desarrollaron además dos técnicas de análisis de azúcares: el método de etilación para el estudio de azúcares naturalmente metilados, y la determinación de azúcares enantioméricos derivatizados como sus 1-amino-1-desoxialditoles diastereoméricos, mediante una reacción de aminación reductiva con (*S*)-1-amino-2-propanol y (*S*)- α -metilbencilamina como aminas quirales.

En la Primera Sección de esta Tesis se resumen los estudios realizados hasta el momento sobre polisacáridos de algas rojas, describiéndose las características estructurales de las familias del ágar, de los carragenanos, y de distintos polisacáridos cuyas estructuras se desvían respecto de dichas familias.

La Segunda Sección contiene los resultados obtenidos y la discusión de los mismos. Puede dividirse en nueve partes:

- 1) Se efectuó la extracción, aislamiento y purificación de los polisacáridos provenientes de algas recolectadas en las Provincias de Chubut y Buenos Aires. Previamente fue necesario destruir la cubierta de carbonato de calcio por tratamiento cuidadoso con ácido clorhídrico diluido cuidando que el pH no disminuya de 6. Los productos obtenidos se caracterizaron cuantificando el contenido de hidratos de carbono, sulfato, proteínas, etc., determinando los pesos moleculares promedio y los poderes rotatorios, e identificando y cuantificando los azúcares componentes. Para ello fue necesario considerar ciertos aspectos de la metodología empleada para adecuarla a las características particulares de estos productos.

Los análisis indicaron que los polisacáridos pertenecen a la familia del ágar debido

a la presencia de galactosas de las series D y L en proporciones aproximadamente equivalentes. Como características distintivas mostraron una alta cantidad de xilosa (la mayor encontrada en los polisacáridos de algas rojas), y una elevada proporción de galactosas mono-*O*-metiladas en las cuatro posiciones posibles. El grado de sulfatación de estos productos es moderado en comparación con otros galactanos de algas rojas y los pesos moleculares son relativamente bajos.

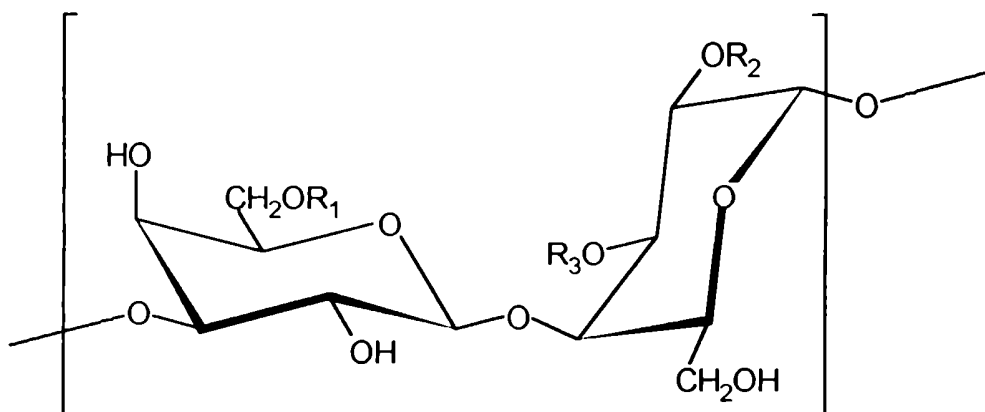
- 2) Los polisacáridos se fraccionaron por cromatografía de intercambio iónico sobre DEAE-Sephadex A-50 eluyendo con soluciones de cloruro de sodio de concentración creciente, y se obtuvieron once fracciones que fueron caracterizadas del mismo modo que los productos nativos. Se observó que el orden de elución está determinado por la cantidad de sulfato, como cabía esperar. El análisis de los poderes rotatorios confirmó que existe alrededor del 50% de galactosas de las series D y L, y que esta familia de polisacáridos estaría formada por el esqueleto típico de los galactanos de algas rojas: galactosas unidas α -(1→3) y β -(1→4), perteneciendo las unidades α a la serie L.
- 3) Las fracciones obtenidas fueron estudiadas por metilación, utilizándose una modificación del método de Hakomori que permite la solubilización de los polisacáridos sulfatados en dimetilsulfóxido. Los resultados confirmaron que los coralinanos están constituidos por la estructura básica de galactosas unidas por C-3 y C-4. En las fracciones principales, la unidad A (D-Gal unida por C-3) está casi en su totalidad sustituida en C-6, mientras que los oxhidrilos de las posiciones 2 y 4 están libres. La unidad B (L-Gal unida por C-4) se encuentra sin sustituir en un porcentaje levemente mayor al 50%, y está sustituida en igual proporción en los C-2 y C-3. Los sustituyentes en las tres posiciones mencionadas son: sulfato, xilosa y 4-*O*-metilgalactosa.

- 4) Se efectuó un estudio por etilación de los polisacáridos para determinar la ubicación de los grupos metoxilo sustituyentes. Se determinó que la 2-(*O*)-metil- y 3-(*O*)-metilgalactosa están presentes en su mayor parte en la unidad B, por lo que en compuestos de la familia del ágar deben pertenecer a la serie L, mientras que la 6-(*O*)-metilgalactosa sólo se encuentra en la unidad A debiendo tener entonces configuración D. Por su parte, la 4-(*O*)-metilgalactosa aparece sólo como cadena lateral. Es de notar que las galactosas monometiladas se encuentran no sustituidas. Este hecho muestra un importante grado de regularidad en la estructura aparentemente diversa de estos polisacáridos.
- 5) Los polisacáridos fueron desulfatados y los productos obtenidos estudiados por metilación. Dados los problemas que se presentan en las desulfataciones ácidas (degradaciones), se probaron distintos métodos de desulfatación solvolítica pero el grado de desulfatación obtenido no permite determinar en forma precisa las proporciones de sulfato en cada posición. Por lo tanto, se decidió llevar a cabo la reacción con HCl / metanol y, si bien se produjo cierta degradación de los polímeros, los resultados permitieron establecer claramente que el sulfato está ubicado en el C-6 de las unidades A y en las posiciones 2 y 3 de las unidades B. Luego de la desulfatación, la presencia de sulfato en estas dos últimas posiciones disminuye hasta casi desaparecer, mientras que el C-6 de la unidad A permanece sustituido en una proporción importante indicando que la xilosa se encuentra unida mayoritariamente en esa posición. Sin embargo, los datos para las fracciones menores no permiten afirmar la ausencia de xilosa en el C-3 de la unidad B (ligada por C-4), ya que la metilación de los productos desulfatados muestra la existencia de cierta cantidad de galactosas disustituidas en las posiciones 3 y 4.
- 6) Se efectuó el estudio de los polisacáridos por derivatización como sus 1-aminoalditales diastereoméricos, obtenidos por aminación reductiva con (*S*)-1-

amino-2-propanol para asignar la configuración de los monosacáridos componentes. La 2-(*O*)-metil- y 3-(*O*)-metilgalactosa pertenecen en su mayor parte a la serie L lo que coincide con lo predicho por etilación, mientras que la 6-(*O*)-metilgalactosa pertenece en su totalidad a la serie D. En los polisacáridos de algas rojas, la 4-(*O*)-metilgalactosa siempre fue encontrada como cadena lateral y con configuración L. Sin embargo, los resultados de aminación reductiva determinan que dicho azúcar, al menos mayoritariamente, pertenece a la serie D en los polisacáridos de *Corallina officinalis*.

- 7) El conjunto de datos obtenidos permitió establecer que los polisacáridos de *Corallina officinalis* están constituidos por la estructura alternante $\rightarrow 3)-\beta\text{-D-Galp-(1}\rightarrow 4)-\alpha\text{-L-Galp-(1}\rightarrow$. Esta estructura está enmascarada por sustitución en la posición 6 de la unidad A por sulfato y ramificaciones de $\beta\text{-D-xilosa}$, junto con cantidades menores de metoxilo y cadenas laterales de 4-(*O*)-metil-D-galactosa. En la unidad B los sustituyentes son metoxilo y sulfato en los C-2 y C-3.

Sin embargo, los coralinanos forman una familia de compuestos con características variantes que puede dividirse en cuatro grupos: los Grupos Principal, Variante IA, Variante IB y Variante II. La estructura promedio del Grupo Principal se presenta en la Figura, y los sustituyentes se describen en la Tabla de la página siguiente.



Sustituyentes en la Unidad A (β -D-galactosa)		Sustituyentes en la Unidad A (α -L-galactosa)	
6-O-(β -D-xilopiranosil)-	62	2-sulfato	20
6-O-(4-O-Me-D-galactopiranosil)-	4	3-sulfato	23
6-sulfato	24	2-O-metil-	28
6-O-metil-	1	3-O-metil-	10
No sustituida	9	No sustituida	19

Es característico de estos compuestos la ausencia de 3,6-anhidrogalactosa y de galactosa 6-sulfato enlazada por C-4, la importante proporción de ramificaciones de xilosa, y la variedad y cantidad de galactosas metiladas.

El Grupo Variante IA es semejante al Principal, pero contiene una menor proporción de xilosa y un aumento de sulfato y metoxilo; esta tendencia se acentúa en el Grupo Variante IB donde la proporción de xilosa es mínima, es alto el porcentaje de sulfato en la posición 6 de la unidad A, y también aumenta la cantidad de 2-O-metil-L-galactosa.

La estructura del Grupo Variante II es más compleja. La diferencia principal respecto de los demás compuestos es un aumento de las unidades de galactosa sin sustituir, y por consiguiente una menor proporción de sulfato y xilosa, pero es característica de estos productos la alta proporción de 4-O-metil-D-galactosa presente como cadena lateral.

- 8) Se estudió la separación e identificación de los O-acetil-O-etil-galactononitrilos y galactitoles, así como de ciertos derivados mono-O-metilados etilados, para su utilización en el análisis de polisacáridos metilados naturalmente. Se informaron los tiempos de retención y los picos principales en los espectros de masa para los distintos azúcares. Por analogía con el comportamiento de los derivados metilados,

se propusieron los caminos de fragmentación de los aldononitrilos parcialmente etilados y se ilustró el empleo de dichos mecanismos para determinar la posición de los grupos metoxilo.

- 9) Se desarrolló un nuevo método para asignar la configuración de azúcares enantioméricos, por reacción con (*S*)-1-amino-2-propanol para obtener los correspondientes 1-amino-1-desoxialditoles diastereoméricos. Se presentaron los tiempos de retención de los derivados de distintos monosacáridos pertenecientes a las series D y L. La técnica es muy sencilla y permite asignar en forma precisa la configuración de diversos azúcares obteniéndose un sólo pico cromatográfico para cada uno, y simplificándose en gran medida los cromatogramas en comparación con otras técnicas de derivatización, lo cual es especialmente valioso en heteropolisacáridos.

Esta técnica puede emplearse simultáneamente para el análisis de azúcares componentes, a modo de complemento de los métodos de derivatización como alditoles o aldononitrilos acetilados.

En la Tercera Sección se presenta una descripción de los materiales y métodos experimentales utilizados.

BIBLIOGRAFÍA

- 1) ELIZABETH E. PERCIVAL y RICHARD H. MCDOWELL. "Algal walls - Composition and Biosynthesis" en *Plant Carbohydrates II - Encyclopedia of Plant Physiology*, New Series, Volume 13 B, 277-316 (1981). W. Tanner y F.A. Loewus Eds., Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- 2) MARÍA C. MATULEWICZ. "Estudios sobre el sistema de carragenanos del alga roja *Iridaea undulosa* Bory". *Tesis Doctoral, FCyN-UBA* (1978).
- 3) J. BUCHANAN, ELIZABETH E. PERCIVAL y EDMUND G. V. PERCIVAL. "The polysaccharides of Carrageen moss (*Chondrus crispus*). Part I. The linkage of the D-galactose residues and the ethereal sulphate". *J.Chem.Soc.*, 51-54 (1943).
- 4) DAVID B. SMITH y WILLIAM H. COOK. "Fractionation of carrageenin". *Arch.Biochem. Biophys.* 45, 232-233 (1953).
- 5) ELIZABETH E. PERCIVAL. "The mercaptolysis of the polysaccharide from *Chondrus crispus*". *Chem. & Ind.*, 1487 (1954).
- 6) A. N. O'NEILL. "3,6-anhydro-D-galactose as a constituent of κ -Carrageenin". *J.Am.Chem.Soc.* 77, 2837-2839 (1955).
- 7) A. N. O'NEILL. "Derivatives of 4-(β -D-galactopyranosyl-3,6-anhydro-D-galactose from κ -Carrageenin". *J.Am.Chem.Soc.* 77, 6324-6326 (1955).
- 8) DAVID A. REES. "The carrageenan system of polysaccharides. Part I. The relation between the κ - and λ -components". *J.Chem.Soc.*, 1821-1832 (1963).
- 9) DAVID A. REES. "Estimation of the relative amounts of isomeric sulphate esters in some sulphated polysaccharides". *J.Chem.Soc.*, 5168-5171 (1961).
- 10) TIMOTHY C. S. DOLAN y DAVID A. REES. "The carrageenans. Part II. The positions of the glycosidic linkages and sulphate esters in λ -carrageenan". *J.Chem.Soc.*, 3534-3539 (1965).
- 11) ALBERTO J. PERNAS, OLAV SMIDSROD, BJORN LARSEN y ARNE HAUG. "Chemical heterogeneity of carrageenans as shown by fractional precipitation with potassium chloride". *Acta Chem.Scand.* 21, 98-110 (1967).
- 12) OLAV SMIDSROD, BJORN LARSEN, ALBERTO J. PERNAS y ARNE HAUG. "The effect of alkali treatment on the chemical heterogeneity and physical properties of some carrageenans". *Acta Chem.Scand.* 21, 2585-2598 (1967).

- 13) NORMAN S. ANDERSON, TIMOTHY C. S. DOLAN y DAVID A. REES. "Carrageenans. Part VII. Polysaccharides from *Eucheuma spinosum* and *Eucheuma cottonii*. Covalent structure of iota-carrageenan". *J.Chem.Soc. Perkin I*, 2173-2176 (1973).
- 14) NORMAN S. ANDERSON y DAVID A. REES. "Repeating structures of some polysaccharide sulfates from red seaweeds". *Proc.Int.Seaweed Symp.* 5, 243-249 (1966).
- 15) NORMAN S. ANDERSON, TIMOTHY C. S. DOLAN, CHRISTOPHER J. LAWSON, ALISTAIR PENMAN y DAVID A. REES. "Carrageenans. Part V. The masked repeating structures of λ - and μ -carrageenans". *Carbohydr.Res.* 7, 468-473 (1968).
- 16) DIMITRI J. STANCIOFF y NORMAN F. STANLEY. "Infrared and chemical studies on algal polysaccharides". *Proc.Int.Seaweed Symp.* 6, 595-609, (1969).
- 17) DAVID A. REES. "Structure, conformation, and mechanism in the formation of polysaccharides gels and networks". *Adv.Carbohydr.Chem.Biochem.* 24, 267-332 (1969).
- 18) CHRISTINE BELLION, GORDON K. HAMER y WILFRED YAPIE. "Analysis of kappa-iota hybrid carrageenans with kappa-carragenase, iota-carragenase and ^{13}C -NMR". *Proc.Int.Seaweed Symp.* 10, 379-384 (1981).
- 19) CHRISTINE BELLION, GORDON K. HAMER y WILFRED YAPIE. "The degradation of *Eucheuma spinosum* and *Eucheuma cottonii* carrageenans by κ -carrageenases and ι -carrageenases from marine bacteria". *Can.J.Microbiol.* 28, 874-880 (1982).
- 20) CHRISTINE BODEAU-BELLION. "Analysis of carrageenan structure". *Physiol.Vég.* 21, 785-793 (1983).
- 21) ALISTAIR PENMAN y DAVID A. REES. "Carrageenans. Part IX. Methylation analysis of galactan sulphates from *Furcellaria fastigiata*, *Gigartina canaliculata*, *Gigartina chamissoi*, *Gigartina atropurpurea*, *Ahnfeltia durvillaei*, *Gymnogongrus furcellatus*, *Eucheuma isiforme*, *Eucheuma uncinatum*, *Aghardhiella tenera*, *Pachymenia hymantophora*, and *Gloiopeltis cervicornis*. Structure of ξ -carrageenan". *J.Chem.Soc.Perkin Trans. I*, 2182-2187 (1973).
- 22) VINCENT L. DININNO, ESTHER L. MCCANDLESS y RUSSELL A. BELL. "Pyruvic acid derivative of a carrageenan from a marine red alga (*Petrocelis* species)". *Carbohydr.Res.* 71, C1-C4 (1979).
- 23) CHARLES W. GREER y WILFRED YAPIE. "Characterization of hybrid (beta-kappa-gamma) carrageenan from *eucheuma gelatinae* J. Agardh. (Rhodophyta, Solieriaceae) using carrageenases, infrared and ^{13}C -nuclear magnetic resonance spectroscopy". *Bot.Mar.* 28, 473-478 (1984).

- 24) EARL ZABLACKIS y GERTRUDES A. SANTOS. "The carrageenan of *Catenella nipae* Zanard., a marine red alga". *Bot.Mar.* **29**, 319-322 (1986).
- 25) JEAN MOLLION, HENRI MORVAN, FABIENNE BELLANGER y SERGE MOREAU. "¹³C NMR study of heterogeneity in the carrageenan system from *Rissoella verruculosa*". *Phytochemistry* **27**, 2023-2026 (1988).
- 26) L. C. M. CHIEN, JACK McLACHLAN, ARTHUR C. NEISH y P. F. SHACKLOCK. "The ratio of kappa- to lambda-carrageenan in nuclear phases of the rhodophycean algae, *Chondrus crispus* and *Gigartina stellata*". *J.Mar.Biol.Assoc.U.K.* **53**, 11-16 (1973).
- 27) ESTHIER L. McCANDLESS, JAMES S. CRAIGIE y J. A. WALTER. "Carrageenans in the gametophytic and sporophytic stages of *Chondrus crispus*". *Planta* **112**, 201-212 (1973).
- 28) J. ROBERT WAALAND. "Experimental studies on propagation of *Iridaea* and *Gigartina*". *J.Phycol.(Suppl.)* **9**, 12 (1973).
- 29) STUART E. PICKMERE, MURRAY J. PARSONS y RAYMOND W. BAILEY. "Composition of *Gigartina* carrageenan in relation to sporophyte and gametophyte stages of the life cycle". *Phytochemistry* **12**, 2441-2444 (1973).
- 30) S. P. C. HOSFORD y ESTHIER L. McCANDLESS. "Immunochemistry of carrageenans from gametophytes and sporophytes of certain red algae". *Can.J.Bot.* **53**, 2835-2841 (1975).
- 31) MAXWELL S. DOY y GERTRUDES A. SANTOS. "Carrageenans from tetrasporic and cystocarpic *Eucheuma* species". *Aquat.Bot.* **4**, 143-150 (1978).
- 32) VINCENT L. DI NINNO y ESTHIER L. McCANDLESS. "The chemistry and immunochemistry of carrageenans from *Eucheuma* and related algal species". *Carbohydr.Res.* **66**, 85-93 (1978).
- 33) M. BERT, RAFIK BEN SAID, ERIC DESLANDES y J. COSSON. "Carrageenans from tetrasporophytic and gametophytic stages of *Cystoclonium purpureum*". *Phytochemistry* **28**, 71-72 (1989).
- 34) EDMUND G. V. PERCIVAL y J. C. SOMMERVILLE. "The acetylation and methylation of agar-agar and the isolation of 2,4,6-trimethyl- α -D-galactose by hydrolysis". *J.Chem.Soc.*, 1615-1619 (1937).
- 35) S. HANDS y S. PEAT. "The presence of anhydro-L-galactose in agar-agar". *Chem.Ind. (London)*, **57**, 937-938 (1938).
- 36) CHOJI ARAKI. "Agar-agar III. Acetylation of the agar-like substance of *Gelidium amansii* L". *J.Chem.Soc.Japan* **58**, 1338-1350 (1937).

- 37) CHOJI ARAKI y SUSUMU HIRASE. "Studies on the chemical constitution of agar-agar. XXI. Re-investigation of methylated agarose of *Gelidium amansii*". *Bull.Chem.Soc.Japan* **33**, 291-295 (1960).
- 38) CHOJI ARAKI y K. ARAI. "The chemical constitution of agar-agar. XVIII. Isolation of a new crystalline disaccharide by enzymic hydrolysis of agar-agar". *Bull.Chem.Soc.Japan* **29**, 339-345 (1956).
- 39) CHOJI ARAKI y K. ARAI. "Studies on the chemical constitution of agar-agar. XX. Isolation of a tetrasaccharide by enzymic hydrolysis of agar-agar". *Bull.Chem.Soc.Japan* **30**, 287-293 (1957).
- 40) CHOJI ARAKI. "Some recent studies on the polysaccharides of agarophytes". *Proc.Int.Seaweed.Symp.* **5**, 3-17 (1966).
- 41) SUSUMU HIRASE. "Chemical constitution of agar-agar. XIX. Pyruvic acid as a constituent of agar-agar. I. Identification and estimation of pyruvic acid in the hydrolysis of agar". *Bull.Chem.Soc.Japan* **30**, 68-70 (1957).
- 42) CHOJI ARAKI. "Agar-agar II. Agar-like substance of *Gelidium amansii* L.". *J.Chem.Soc.Japan* **58**, 1214-1234 (1937).
- 43) M. DUCKWORTH y WILFRED YAPHE. "The structure of agar: Part I. Fractionation of a complex mixture of polysaccharides". *Carbohydr.Res.* **16**, 189-197 (1971).
- 44) CHOJI ARAKI, K. ARAI, y SUSUMU HIRASE. "Studies on the chemical constitution of agar-agar. XXIII. Isolation of D-xylose, 6-(O)-methyl-D-galactose, 4-(O)-methyl-L-galactose and O-methylpentose". *Bull.Chem.Soc.Japan* **40**, 959-962 (1967).
- 45) KUNIIHIKO IZUMI. "Chemical heterogeneity of the agar from *Gracilaria verrucosa*". *J.Biochem.(Tokyo)* **72**, 135-140 (1972).
- 46) JOHN R. NUNN y M. M. VON HOLDT. "Red seaweed polysaccharides. Part II. *Porphyra capensis* and the separation of D- and L-galactose by crystallisation". *J.Chem.Soc.*, 1094-1097 (1957).
- 47) S. PEAT, JAMES R. TURVEY y DAVID A. REES. "Carbohydrates of the red alga, *Porphyra umbilicalis*". *J.Chem.Soc.*, 1590-1595 (1961).
- 48) JAMES R. TURVEY y DAVID A. REES. "Isolation of L-galactose 6-sulphate from a seaweed polysaccharide". *Nature* **189**, 831-832 (1961).
- 49) NORMAN S. ANDERSON y DAVID A. REES. "Porphyran: A polysaccharide with a mask repeating structure". *J.Chem.Soc.*, 5880-5887 (1965).

- 50) D. M. BOWKER y JAMES R. TURVEY. "Water soluble polysaccharides of the red alga *Laurencia pinnatifida*. Part I. Constituent units". *J.Chem.Soc.*, 983-988 (1968).
- 51) D. M. BOWKER y JAMES R. TURVEY. "Water soluble polysaccharides of the red alga *Laurencia pinnatifida*. Part II. Methylation analysis of the galactan sulphate". *J.Chem.Soc.*, 989-992 (1968).
- 52) J. F. BATEY y JAMES R. TURVEY. "The galactan sulphate of the red alga *Polysiphonia lanosa*". *Carbohydr.Res.* **43**, 133-143 (1975).
- 53) JAMES R. TURVEY y E. L. WILLIAMS. "The agar type polysaccharides from the red alga *Ceramium rubrum*". *Carbohydr.Res.* **49**, 419-425 (1976).
- 54) JOHN R. NUNN, HARALAMBOS PAROLIS y I. RUSSELL. "Sulphated polysaccharides of the Solieriaceae family. Part I. A polysaccharide from *Anatheca dentata*". *Carbohydr.Res.* **20**, 205-215 (1971).
- 55) JOHN R. NUNN, HARALAMBOS PAROLIS y I. RUSSELL. "Sulphated polysaccharides of the Solieriaceae family. Part II. The acidic components of the polysaccharides from the red alga *Anatheca dentata*". *Carbohydr.Res.* **29**, 281-289 (1973).
- 56) JOHN R. NUNN, HARALAMBOS PAROLIS y I. RUSSELL. "Sulphated polysaccharides of the Solieriaceae family. Part III. The desulphated polysaccharide of *Anatheca dentata*". *Carbohydr.Res.* **95**, 219-226 (1981).
- 57) JI MINGHOU, MARC LAHAYE y WILFRED YAPIIE. "Structure of agar from *Gracilaria* spp. (Rhodophyta) collected in the People's Republic of China". *Bot.Mar.* **28**, 521-528 (1985).
- 58) ANATOLY I. USOV y ELENA G. IVANOVA. "Polysaccharides of algae XXXI: Enzymatic cleavage of an agar-like polysaccharide from the red alga *Rhodomela larix* (Turn.) C. Ag". *Bioorg.Khim.* **7**, 1060-1068 (1981).
- 59) SUSUMU HIRASE, CHIOJI ARAKI y KYOKO WATANABE. "Component sugars of the polysaccharide of the red seaweed *Grateloupia elliptica*". *Bull.Chem.Soc.Japan* **40**, 1445-1448 (1967).
- 60) JOHN R. NUNN y HARALAMBOS PAROLIS. "A polysaccharide from *Aeodes orbitosa*". *Carbohydr.Res.* **6**, 1-11 (1968).
- 61) JOHN R. NUNN y HARALAMBOS PAROLIS. "Sulphated polysaccharides of the Grateloupiaceae family. Part II. Isolation of 4-O-methyl-1-galactose, 6-O-methyl-1-galactose, and two disaccharides from hydrolysates of aeodan". *Carbohydr.Res.* **8**, 361-362 (1968).

- 62) A. J. R. ALLSOBROOK, JOHN R. NUNN y HARALAMBOS PAROLIS. "Sulphated polysaccharides of the Grateloupiaceae family. Part V. A polysaccharide from *Aeodes ulvoidea*" *Carbohydr.Res.* **16**, 71-78 (1971).
- 63) A. J. R. ALLSOBROOK, JOHN R. NUNN y HARALAMBOS PAROLIS. "Sulphated polysaccharides of the Grateloupiaceae family. Part VIII. The linkage of 4-(*O*)-methyl-1-galactose in the sulphated polysaccharide of *Aeodes ulvoidea*". *Carbohydr.Res.* **36**, 139-145 (1974).
- 64) EDMUND L. HIRST, WILLIAM MACKIE y ELIZABETH E. PERCIVAL. "The water-soluble polysaccharides of *Cladophora rupestris* and of *Chaetomorpha* spp. Part II. The site of ester sulphate groups and the linkage between the galactose residues". *J.Chem.Soc.* 2958-2967 (1965).
- 65) A. J. R. ALLSOBROOK, JOHN R. NUNN y HARALAMBOS PAROLIS. "Sulphated polysaccharides of the Grateloupiaceae family. Part IX. Investigation of the acetolysis products of the sulphated polysaccharide of *Aeodes ulvoidea*". *Carbohydr.Res.* **40**, 337-344 (1975).
- 66) JOHN R. NUNN y HARALAMBOS PAROLIS. "Sulphated polysaccharides of the Grateloupiaceae family. Part II. A polysaccharide from *Phyllymenia cornea*". *Carbohydr.Res.* **9**, 265-276 (1969).
- 67) JOHN R. NUNN y HARALAMBOS PAROLIS. "Sulphated polysaccharides of the Grateloupiaceae family. Part IV. Methylation analysis of phyllymenan and desulphated phyllymenan". *Carbohydr.Res.* **14**, 145-150 (1970).
- 68) A. J. FARRANT, JOHN R. NUNN y HARALAMBOS PAROLIS. "Sulphated polysaccharides of the Grateloupiaceae family. Part VI. A polysaccharide from *Pachymenia carnosa*". *Carbohydr.Res.* **19**, 161-168 (1971).
- 69) A. J. FARRANT, JOHN R. NUNN y HARALAMBOS PAROLIS. "Sulphated polysaccharides of the Grateloupiaceae family. Part VII. Investigation of the acetolysis products of a partially desulphated sample of the polysaccharide of *Pachymenia carnosa*". *Carbohydr.Res.* **25**, 283-292 (1972).
- 70) HARALAMBOS PAROLIS. "Sulphated polysaccharides of the Grateloupiaceae family. Part X. The structure of the polysaccharide of *Pachymenia carnosa*". *Carbohydr.Res.* **62**, 313-320 (1978).
- 71) CHRISTOPHER J. LAWSON, DAVID A. REES, DIMITRI J. STANCIOFF y NORMAN F. STANLEY. "Carrageenans. Part VIII. Repeating structures of galactan sulphates from *Furcellaria fastigiata*, *Gigartina canaliculata*, *Gigartina chamissoi*, *Gigartina atropurpurea*, *Ahnfeltia durvillaei*, *Gymnogongrus furcellatus*, *Eucheuma cottonii*, *Eucheuma spinosum*,

- Eucheuma isiforme*, *Eucheuma uncinatum*, *Aghardhiella tenera*, *Pachymenia hymantophora*, and *Gloiopeltis cervicornis*". *J.Chem.Soc.Perkin Trans.I*, 2177-2182 (1973).
- 72) HARALAMBOS PAROLIS. "The polysaccharides of *Phyllymenia hieroglyphica* (= *P. belangeri*) and *Pachymenia hymantophora*". *Carbohydr.Res.* **93**, 261-267 (1981).
- 73) IAN J. MILLER, RUTH FALSHAW y RICHARD H. FURNEAUX. "Structural analysis of the polysaccharide from *Pachymenia lusoria* (Cryptonemiaceae, Rhodophyta)". *Carbohydr.Res.* **268**, 219-232 (1995).
- 74) ANATOLY I. USOV, L. I. MIROSHNIKOVA y V. V. BARBAKADZE. "Polysaccharides of algae XVII. Water-soluble polysaccharides of the red algae *Grateloupia divaricata* and *Grateloupia turuturu*". *Zh.Obshch.Khim.* **45(7)**, 1618-1624 (1975).
- 75) V. V. BARBAKADZE y ANATOLY I. USOV. "Polysaccharides of algae XXVI. Methylation and periodate oxidation of the polysaccharide from the red alga *Grateloupia divaricata* Okam.". *Bioorg.Khim.* **4(8)**, 1100-1106 (1978).
- 76) ANATOLY I. USOV y V. V. BARBAKADZE. "Polysaccharides of algae XXVII. Partial acetolysis of the sulphated galactan from the red alga *Grateloupia divaricata* Okam.". *Bioorg.Khim.* **4(8)**, 1107-1115 (1978).
- 77) P. BAEZA y BETTY MATSUHIRO. "Polysaccharide from Chilean seaweeds IV. A sulphated galactan from *Grateloupia lanceola*". *Bot.Mar.* **20(6)**, 355-357 (1977).
- 78) J. WHYTE, S. HOSFORD y J. ENGLAR. "Assignment of agar or carrageenan structures to red algal polysaccharides". *Carbohydr.Res.* **140**, 336-341 (1985).
- 79) SUSUMU HIRASE y KYOKO WATANABE. "Fractionation and structural investigation of funoran". *Proc.Int.Seaweed Symp.* **7**, 451-454 (1972).
- 80) ANATOLY I. USOV, M. A. REKITER y NIKOLAY K. KOCHETKOV. "Polysaccharides of algae III. Isolation and preliminary study of the λ -polysaccharide from *Tichocarpus trinitus* (Gmel.) RU PR". *Zh.Obshch.Khim.* **39(4)**, 905-911 (1969).
- 81) ANATOLY I. USOV, M. A. REKITER y NIKOLAY K. KOCHETKOV. "Polysaccharides of algae VI. χ -polysaccharide from *Tichocarpus trinitus* (Gmel.) Rupr". *Zh.Obshch.Khim.* **40(12)**, 2732-2737 (1970).
- 82) NIKOLAY K. KOCHETKOV, M. A. REKITER y ANATOLY I. USOV. "Polysaccharides of algae VIII. Acetolysis of λ -polysaccharides from *Tichocarpus trinitus*". *Zh.Obshch.Khim.* **41(5)**, 1160-1165 (1971).

- 83) ANATOLY I. USOV, ELENA G. IVANOVA y ALEKSANDR S. SHASHKOV. "Polysaccharides of algae XXXIII. Isolation and ^{13}C -NMR spectral study of some new gel forming polysaccharides from Japan Sea red seaweeds". *Bot.Mar.* **26**, 285-294 (1983).
- 84) ERIC DESLANDES, P. POTIN, M. ZINOUN y JEAN Y. FLOU'II. "Contribution on the content and nature of the phycocolloid from *Kallymenia reniformis* (Cryptonemiales, Rhodophyta)". *Hydrobiologia* **204/205**, 603-608 (1990).
- 85) V. C. BARRY y J. E. MCCORMICK. "Properties of periodate-oxidised polysaccharides. Part VI. The mucilage from *Dilsea edulis*". *J.Chem.Soc.*, 2777-2783 (1957).
- 86) NIKOLAY K. KOCHETKOV, ANATOLY I. USOV y L. I. MIROSHNIKOVA. "Polysaccharides of algae I. Water soluble polysaccharides of the red alga *Laingia pacifica*". *Zh.Obshch.Khim.* **37(4)**, 792-796 (1967).
- 87) NIKOLAY K. KOCHETKOV, ANATOLY I. USOV y L. I. MIROSHNIKOVA. "Polysaccharides of algae IV. Fractionation and methanolysis of sulfated polysaccharide from *Laingia pacifica* Yamada". *Zh.Obshch.Khim.* **40(11)**, 2469-2473 (1970).
- 88) NIKOLAY K. KOCHETKOV, ANATOLY I. USOV y L. I. MIROSHNIKOVA. "Polysaccharides of algae V. Further study of composition and structure of sulfated polysaccharide from *Laingia pacifica* Yamada". *Zh.Obshch.Khim.* **40(11)**, 2473-2478 (1970).
- 89) NIKOLAY K. KOCHETKOV, ANATOLY I. USOV, L. I. MIROSHNIKOVA y OLEG S. CHIZHOV. "Polysaccharides of algae XII. Partial hydrolysis of polysaccharide from *Laingia pacifica* Yamada". *Zh.Obshch.Khim.* **43**, 1832-1839 (1973).
- 90) SUSUMU HIRASE, KYOKO WATANABE, R. TAKANO y J. TAMURA. "Structural features of the sulfated polysaccharide isolated from the red seaweed *Laurencia undulata*". *XIth.Int.Carbohydr.Symp.Abstracts, Vancouver, Canada*, 3-12 (1982).
- 91) RICHARD H. FURNEAUX y THOMAS T. STEVENSON. "The xylogalactan sulfate from *Chondria macrocarpa* (Ceramilales, Rhodophyta)". *Hydrobiologia* **204/205**, 615-620 (1990).
- 92) ANATOLY I. USOV, ELENA G. IVANOVA y M. YA. ELASHVILI. "Polysaccharides of algae 41. Characterization of water soluble polysaccharides from several representatives of the genus *Laurencia* (Ceramilales, Rhodophyta)". *Bioorg.Khim.* **15**, 1259-1267 (1989).
- 93) ANATOLY I. USOV y M. YA. ELASHVILI. "Polysaccharides of algae 44. Investigation of sulfated galactan from *Laurencia nipponica* Yamada (Rhodophyta, Rhodomelaceae) using partial reductive hydrolysis". *Bot.Mar.* **34(6)**, 553-560 (1991).

- 94) RICHARD H. FURNEAUX, IAN J. MILLER y THOMAS T. STEVENSON. "Agaroids from New Zealand members of the Gracilariaceae (Gracilariales, Rhodophyta): a novel dimethylated agar". *Hydrobiologia* **204/205**, 645-654 (1990).
- 95) JAMES R. TURVEY y P. R. SIMPSON. "Polysaccharides from *Corallina officinalis*". *Proc.Int.Seaweed Symp.* **5**, 323-327 (1966).
- 96) M. DUCKWORTH, K. C. HONG y WILFRED YAPHE. "The agar polysaccharides of *Gracilaria* species". *Carbohydr.Res.*, **18**, 1-9 (1971).
- 97) JAMES S. CRAIGIE, ZONG C. WEN y J. P. VANDER MEER. "Interspecific, intraspecific and nutritionally-determined variations in the composition of agars from *Gracilaria* spp". *Bot.Mar.* **27**, 55-61 (1984).
- 98) JAMES S. CRAIGIE y A. JURGENS. "Structure of agars from *Gracilaria tikvahiae* Rhodophyta: Location of 4-*O*-methyl-L-galactose and sulphate". *Carbohydr.Polym.* **11**, 265-278 (1989).
- 99) DONALD J. BRASCHI, CHIAW T. CHIAH y LAURENCE D. MELTON. "The agar-type polysaccharide from the red alga *Gracilaria secundata*". *Carbohydr.Res.* **115**, 191-198 (1983).
- 100) LORA M. MORRICE, MATTLAND W. MCLEAN, WILLIAM F. LONG y FRANK B. WILLIAMSON. "Porphyran primary structure: an investigation using β -agarase I from *Pseudomonas atlantica* and ^{13}C -NMR spectroscopy". *Eur.J.Biochem.* **133**, 673-684 (1983).
- 101) LORA M. MORRICE, MATTLAND W. MCLEAN, FRANK B. WILLIAMSON y WILLIAM F. LONG. " β -agarase I and II from *Pseudomonas atlantica*. Purification and some properties". *Eur.J.Biochem.* **135**, 553-558 (1983).
- 102) YANNIS KARAMANOS, MAURICIO ONDARZA, FABIENNE BELLANGER, DANIEL CHRISTIAEN y SERGE MOREAU. "The linkage of 4-*O*-methyl-L-galactopyranose in the agar polymers from *Gracilaria verrucosa*". *Carbohydr.Res.* **187**, 93-101 (1989).
- 103) MAURICIO ONDARZA, YANNIS KARAMANOS, DANIEL CHRISTIAEN y T. STADLER. "Variations in the composition of agar polysaccharides from *Gracilaria verrucosa*, cultivated under controlled conditions". *Food hydrocolloids* **1**, 507-509 (1987).
- 104) KENNETH B. GUISELEY. "The relationship between methoxyl content and gelling temperature of agarose". *Carbohydr.Res.* **13**, 247-256 (1970).

- 105) JAMES CRAIGIE y ZONG WEN. "Effects of temperature and tissue age on gel strength and composition of agar from *Gracilaria tikvahiae* (Rhodophyceae)". *Can.J.Bot.* **62**, 1665-1670 (1984).
- 106) ELIZABETH PERCIVAL y R.A.J. FOYLE. "The extracellular polysaccharides of *Porphyridium cruentum* and *Porphyridium aerugineum*". *Carbohydr.Res.* **72**, 165-176 (1979).
- 107) JAMES R. TURVEY y LEONARD M. GRIFFITHS. "Mucilage from a fresh-water red alga of the genus *Batrachospermum*". *Phytochemistry* **12**, 2901-2907 (1973).
- 108) R. J. BEVERIDGE, WALTER A. SZAREK y JOHN K. N. JONES. "Isolation of three oligosaccharides from the bark of *Ulmus fulva* (slippery-elm mucilage). Synthesis of *O*-(3-*O*-methyl- β -D-galactopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-L-rhamnose". *Carbohydr. Res.* **19**, 107-116 (1971).
- 109) MICHEL DUBOIS, KENNETH A. GILLES, JOHN K. HAMILTON, PAUL A. REBERS y FRED SMITH. "Colorimetric method for determination of sugars and related substances". *Anal.Chem.* **28**, 350-356 (1956).
- 110) J. T. PARK y M. J. JOHNSON. "A submicrodetermination of glucose". *J.Biol.Chem.* **181**, 149-151 (1949).
- 111) "CRC Handbook of Chemistry and Physics", 66th Edition, 1985-1986, Robert C. Weast Ed., CRC Press Inc.
- 112) JOHN W. H. OLDHAM y DAVID J. BELL. "2-methyl and 2,6-dimethylgalactose". *J.Am.Chem.Soc.* **60**, 323-325 (1938).
- 113) D. MC CREATH y F. SMITH. "Derivatives of 3,4-monoacetone β -1,6-anhydrogalactose". *J.Chem.Soc.*, 387-391 (1939).
- 114) EDMUND L. HIRST y JOHN K. N. JONES. "The constitution of Damson gum. Part III. Hydrolysis products from methylated Damson gum". *J.Chem.Soc.*, 506-512 (1946).
- 115) F. REBER y T. REICHSSTEIN. "D-Galactose 3-methyl ether". *Helv.Chim.Acta* **28**, 1164-1176 (1945).
- 116) HANS VOGEL y ALFRED GEORG. *Tavellen der Zucker und ihrer Derivate*, Berlin, Verlag von Julius, Springer, pp. 306 (1931).
- 117) IAN M. MORRISON. "Hydrolysis of plant cell walls with trifluoroacetic acid". *Phytochemistry* **27**, 1097-1100 (1988).

- 118) ANATOLY I. USOV, K. S. ADAMYANTS, SERGEY V. YAROTSKY, A. A. ANOSHIINA y NIKOLAY K. KOCHETKOV. "The isolation of a sulphated mannan and a neutral xylan from the red seaweed *Nemalion vermiculare* Sur". *Carbohydr.Res.* **26**, 282-283 (1973).
- 119) DAVID A. REES. "Conformational analysis of polysaccharides. Part V. The characterization of linkage conformations (chain conformations) by optical rotation at a single wavelength. Evidence for distortion of cyclohexa-amylose in aqueous solution. Optical rotation and the amylose conformation". *J.Chem.Soc. (B)*, 877-884 (1970).
- 120) DAVID A. REES y WILLIAM E. SCOTT. "Polysaccharide conformation. Part VI. Computer model-building for linear and branched pyranoglycans. Correlation with biological function. Preliminary assessment of inter-residue forces in aqueous solution. Further interpretation of optical rotation in terms of chain conformation". *J.Chem.Soc. (B)*, 469-479 (1971).
- 121) DAVID A. REES y R. J. SKERRET. "Conformational analysis of polysaccharides. Part IV. Long-range contacts in some β -glucans by model building in the computer and the influence of oligosaccharide conformation on optical rotation". *J.Chem.Soc. (B)*, 189-193 (1970).
- 122) DAVID A. REES y DAVID THOM. "Polysaccharide conformation. Part 10. Solvent and temperature effects on the optical rotation and conformation of model carbohydrates". *J.Chem.Soc. Perkin II*, 191-201 (1977).
- 123) ALBERTO S. CERIEZO, ALBERTO LEZEROVICH, RAFAEL LABRIOLA y DAVID A. REES. "A xylan from the red seaweed *Chaetangium fastigiatum*". *Carbohydr.Res.* **19**, 289-296 (1971).
- 124) ANNE MARIE J. FICHTINGER-SCHIEPMAN, JOHANNIS P. KAMERLING, JOHANNES F.G. VLIEGENTIART, ELISABETH W. DEJONG, LEENDERT BOSCH y PETER WESTBROEK. "Composition of a methylated, acidic polysaccharide associated with coccoliths of *Emiliana huxleyi* (Lohmann) Kamptner". *Carbohydr.Res.* **69**, 181-189 (1979).
- 125) J. F. CARSON y W. D. MACLAY. "The acylation of polyuronides with formamide as a dispersing agent". *J.Am.Chem.Soc.* **68**, 1015-1017 (1946).
- 126) WALTER N. HAWORTH. "A new method of preparing alkylated sugars". *J.Chem.Soc.* **107**, 8-16 (1915).
- 127) THOMAS T. STEVENSON y RICHARD H. FURNEAUX. "Chemical methods for the analysis of sulphated galactans from red algae". *Carbohydr.Res.* **210**, 277- (1990).

- 128) CARLOS A. STORTZ y ALBERTO S. CEREZO. "The systems of carrageenans from cystocarpic and tetrasporic stages from *Iridaea undulosa*: fractionation with potassium chloride and methylation analysis of the fractions". *Carbohydr.Res.* **242**, 217-227 (1993).
- 129) THOMAS G. KANTOR y MAXWELL SCHUBERT. "A method for the desulfation of chondroitin sulfate". *J.Am.Chem.Soc.* **79**, 152-153 (1977).
- 130) ALLAN B. FOSTER y WILLIAM G. OVEREND. "The acidic hydrolysis of *O*-glycosides". *Chem.&Ind.* 566-567 (1955).
- 131) JOHN T. EDWARD. "Stability of glycosides to acid hydrolysis". *Chem.&Ind.* 1102-1104 (1955).
- 132) MICHAEL J. HARRIS y JAMES R. TURVEY. "Sulphates of monosaccharides and derivatives. Part VII. Synthesis of some disulphates and a new synthesis of D-galactose 4-sulphate". *Carbohydr.Res.* **9**, 397-405 (1969).
- 133) ANATOLY I. USOV, L. I. MIROSHNIKOVA y NIKOLAY K. KOCHNETKOV. "Polysaccharides of algae IX. Solvolytic removal of sulfate groups from polysaccharides obtained from the red alga *Laingia pacifica*". *Zh.Obshch.Chim.* **42(4)**, 945-949 (1972).
- 134) KINZO NAGASAWA, YUKO INOUE y TOSHIO KAMATA. "Solvolytic desulfation of glycosaminoglycuronan sulfates with dimethyl sulfoxide containing water or methanol". *Carbohydr.Res.* **58**, 47-55 (1977).
- 135) EDUARDO G. GROS, IRMA O. MASTRONARDI y ADOLFO R. FRASCA. "P.M.R. spectral assignments for *O*-methyl groups in mono-methylated D-hexoses". *Carbohydr.Res.* **16**, 232-234 (1971).
- 136) E. B. RATHBONE, A. M. STEPHEN y K. G. R. PACHLER. "PMR spectroscopy of monomethyl ethers of D-galactopyranose and its derivatives" *Carbohydr.Res.* **20**, 357-367 (1971).
- 137) ROSS F. NIGRELLI, MARTIN F. STEMPIEN, GEORGE D. RUGGIERI, VINCENT R. LIGUORI y JACK T. CECIL. "Substances of potential biomedical importance from marine organisms". *Fed.Proc.* **26**, 1197-1205 (1967).
- 138) E. FRANK DEIG, DOUGLAS W. EIHRESMANN, MELVIN T. HATCH y DELIMAR J. RIEDLINGER. "Inhibition of herpesvirus replication by marine algae extracts". *Antimicrob.Agents Chemother.* **6**, 524-525 (1974).
- 139) JAMES T. RICHARDS, EARL R. KERN, LOWELL A. GLASGOW, JAMES C. OVERALL, E. FRANK DEIG y MELVIN T. HATCH. "Antiviral activity of extracts from marine algae". *Antimicrob.Agents Chemother.* **14**, 24-30 (1978).

- 140) M. BABA, R. SNOECK, R. PAUWELS y E. DE CLERCQ. "Sulfated polysaccharides are potent and selective inhibitors of various enveloped viruses, including herpes simplex virus, cytomegalovirus, vesicular stomatitis virus and human immunodeficiency virus". *Antimicrob. Agents Chemother.* **32**, 1742-1745 (1988).
- 141) DAVID P. SWEET, PETER ALBERSHEIM y ROBERT H. SHAPIRO. "Partially ethylated alditol acetates as derivatives for elucidation of the glycosyl linkage composition of polysaccharides". *Carbohydr. Res.* **40**, 199-216 (1975).
- 142) DAVID P. SWEET, ROBERT H. SHAPIRO y PETER ALBERSHEIM. "The mass spectral fragmentation of partially ethylated alditol acetates, a derivative used in determining the glycosyl linkage composition of polysaccharides". *Biomed. Mass Spectrom.* **1**, 263-268 (1974).
- 143) HÅKAN BJÖRNDAL, CARL G. HELLERQVIST, BENGT LINDBERG y SIGFRID SVENSSON. "Mass spectrometry of partially methylated alditol acetates". *Carbohydr. Res.* **5**, 433-440 (1967).
- 144) HÅKAN BJÖRNDAL, BENGT LINDBERG, ÅKE PILLOTTI y SIGFRID SVENSSON. "Mass spectrometry of partially methylated alditol acetates. Part II. Deuterium labelling experiments". *Carbohydr. Res.* **15**, 339-349 (1970).
- 145) CARLOS A. STORTZ, MARÍA C. MATULEWICZ y ALBERTO S. CERIEZO. "Separation and identification of *O*-acetyl-*O*-methyl-galactonitriles by gas-liquid chromatography and mass spectrometry". *Carbohydr. Res.* **111**, 31-39 (1982).
- 146) ELAINE M. SHEA y NICHOLAS C. CARPITA. "Separation of partially methylated alditol acetates on SP-2330 and IIP-1 vitreous silica capillary columns". *J. Chromatogr.* **445**, 424-428 (1988).
- 147) J. KLOK, H. C. COX, J. W. DE LEEUN y P. A. SCHENCK. "Analysis of synthetic mixtures of partially methylated alditol acetates by capillary gas chromatography, gas chromatography-electron impact mass spectrometry and gas chromatography-chemical ionization mass spectrometry". *J. Chromatogr.* **253**, 55-64 (1982).
- 148) HÅKAN BJÖRNDAL, CARL G. HELLERQVIST, BENGT LINDBERG y SIGFRID SVENSSON. "Gas-liquid chromatography and mass spectrometry in methylation analysis of polysaccharides". *Angew. Chem. Int. Ed.* **9**, 610-619 (1970).
- 149) CARLOS A. STORTZ. "Estudio de los carragenanos 'solubles' del alga roja *Iridaea undulosa* Bory (Familia: Gigartinales)". *Tesis Doctoral, ICFyN-UBA.* (1984).
- 150) JANUSZ SZAFRANEK, CARL D. PFAFFENBERGER y EVAN C. HORNING. "The mass spectra of some per-*O*-acetylaldonitriles". *Carbohydr. Res.* **38**, 97-105 (1974).

- 151) FRED R. SEYMOUR, EDWARD C. M. CHIEN y STEPHEN H. BISHOP. "Identification of aldoses by use of their peracetylated aldononitrile derivatives: a G.L.C.-M.S. approach". *Carbohydr.Res.* **73**, 19-45 (1979).
- 152) GERRIT J. GERWIG, JOHANNIS P. KAMERLING y JOHANNES F. G. VLIEGENTHART. "Determination of the D and L configuration of neutral monosaccharides by high-resolution capillary G.L.C.". *Carbohydr.Res.* **62**, 349-357 (1978).
- 153) KARIN LEONTEIN, BENGT LINDBERG y JÖRGEN LÖNNGREN. "Assignment of absolute configuration of sugars by g.l.c. of their acetylated glycosides formed from chiral alcohols". *Carbohydr.Res.* **62**, 359-362 (1978).
- 154) RUYICHI OSHIMA, JU KUMANOTANI y CHIICHI WATANABE. "Gas-liquid chromatographic resolution of sugar enantiomers as diastereoisomeric methylbenzylaminoalditols". *J.Chromatogr.* **259**, 159-163 (1983).
- 155) RICHARD F. BORCH, MARK D. BERNSTEIN y H. DUPONT DURST. "The cyanohydridoborate anion as a selective reducing agent". *J.Am.Chem.Soc.* **93**, 2897-2904 (1971).
- 156) JACK HINE y CHUEN YUAN YEH. "Equilibrium in formation and conformational isomerization of imines derived from isobutyraldehyde and saturated aliphatic primary amines". *J.Am.Chem.Soc.* **89**, 2669-2676 (1967).
- 157) PING W. TANG y J. MICHAEL WILLIAMS. "An improved method for the liquid chromatography of the 1-deoxy-L-(2-pyridylamino)alditol derivatives of oligosaccharides and its application to structural studies of the carbohydrate moieties of glycoproteins". *Carbohydr.Res.* **136**, 259-271 (1985).
- 158) KLAUS BOCK y CHRISTIAN PEDERSEN. "Carbon-13 nuclear magnetic resonance spectroscopy of monosaccharides" *Adv.Carbohydr.Chem.Biochem.* **41**, 27-66 (1983).
- 159) EBERHARD BREITMAIER y WOLFGANG VOELTER. "Carbon-13 NMR Spectroscopy. High-resolution methods and applications in organic chemistry and biochemistry". 3rd Ed., Weinheim; New York, VCH 1987.
- 160) JERRY MARCH. "Advanced Organic Chemistry", 4th Ed., Wiley Interscience. pp. 424, Ref. 906 (1992).
- 161) MARÍA C. MATULEWICZ y ALBERTO S. CEREZO. "Mass spectra of bis(acylamido)-1-deoxyalditol acetates" *Org.Mass Spectrom.* **14**, 593-595 (1979).
- 162) BENGT NORRMAN. "Partial methylation studies on pustulan, methyl α - and β -glucopyranoside and some derivatives". *Acta Chem.Scand.* **22**, 1623-1627 (1968).

- 163) MARCUS E. BREWSTER, MING-JU HUANG, EMIL POP, JOSEF PITHA, MICHAEL J. S. DEWAR, JAMES J. KAMINSKI y NICHOLAS BODOR. "An AM1 molecular orbital study of α -D-glucopyranose and β -maltose: Evaluation and implication". *Carbohydr.Res.* **242**, 53-67 (1993).
- 164) M. E. EVANS. "Methyl-4,6-(O)-benzylidene- α -and β -D-glucosides". *Carbohydr.Res.* **21**, 473-475 (1972).
- 165) WILFRED YAPIE. "Colorimetric determination of 3,6-anhydrogalactose and galactose in marine algal polysaccharides". *Anal.Chem.* **32**, 1327-1330 (1960).
- 166) WILFRED YAPIE y G. P. ARSENAULT. "Improved resorcinol reagent for the determination of fructose, and of 3,6-anhydrogalactose in polysaccharides" *Anal.Biochem.* **13**, 143-148 (1965).
- 167) K. S. DODGSON. "Determination of inorganic sulphate in studies on the enzymic and non-enzymic hydrolysis of carbohydrate and other sulphate esters". *Biochem.J.* **78**, 312-319 (1961).
- 168) K. S. DODGSON y R. G. PRICE. "A note on the determination of the ester sulphate content of sulphated polysaccharides". *Biochem.J.* **84**, 106-110 (1962).
- 169) NELLY BLUMENKRANTZ y GUSTAV ASBOE-HANSEN. "New method for quantitative determination of uronic acids". *Anal.Biochem.* **54**, 484-489 (1973).
- 170) OLIVER H. LOWRY, N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR y R. J. RANDALL. "Protein measurements with the Folin phenol reagent". *J.Biol.Chem.* **193**, 265-275 (1951).
- 171) PETER ALBERSHEIM, DONALD J. NEVINS, PATRICIA D. ENGLISH y ARTHUR KARR. "A method for the analysis of sugars in plant cell-wall polysaccharides by gas-liquid chromatography". *Carbohydr.Res.* **5**, 340-345 (1967).
- 172) SUSAN H. TURNER y ROBERT CIERNIAK. "Total characterization of polysaccharides by gas-liquid chromatography". *Carbohydr.Res.* **95**, 137-144 (1981).
- 173) SEN-ITIROU HAKOMORI. "A rapid permethylation of glycolipid and polysaccharides catalyzed by methylsulfinyl carbanion in dimethyl sulfoxide". *J.Biochem. (Tokyo)* **55**, 205-208 (1964).
- 174) BEATRICE E. HUNT. "The preparation of ethyl iodide". *J.Chem.Soc.* **117**, 1592-1594 (1920).
- 175) MARÍA C. MATULEWICZ y ALBERTO S. CEREZO. "Solvolitic desulphation of the carrageenan from *Iridaea undulosa* B.". *Anal.Asoc.Quím.Arg.* **67**, 225-227 (1979).

- 176) CARLOS A. STORTZ y ALBERTO S. CEREZO. "Desulfation of the 'soluble' carrageenans from *Iridaea undulosa* and methylation analysis of its partially desulfated λ -component". *Anal.Asoc.Quim.Arg.* **74**, 353-360 (1986).
- 177) ROY D. GUTHRIE. "Periodate oxidation. Determination of periodate". *Meth.Carbohydr. Chem.* **1**, 435-441 (1962).
- 178) SADTLER RESEARCH LABORATORIES, Inc. "The Sadtler Standard Spectra", (1968), espectro N° 382.
- 179) ANDREW J. MORT, SUSAN PARKER y MAO-SUNG KUO. "Recovery of methylated saccharides from methylation reaction mixtures using Sep-Pak C₁₈ cartridges". *Anal.Biochem.* **133**, 380-384 (1983).
- 180) CARLOS A. STORTZ, BRADLEY E. BACON, ROBERT CIERNIAK y ALBERTO S. CEREZO. "High-field NMR spectroscopy of cystocarpic and tetrasporic carrageenans from *Iridaea undulosa*". *Carbohydr.Res.* **261**, 317-326 (1994).

