

Tesis de Posgrado

Polisacáridos de Nothogenia Fastigiata y Georgiella Confluens (Rhodophyta) : nuevos métodos de análisis para polisacáridos de algas

Kolender, Adriana Andrea

2003

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:

Kolender, Adriana Andrea. (2003). Polisacáridos de Nothogenia Fastigiata y Georgiella Confluens (Rhodophyta) : nuevos métodos de análisis para polisacáridos de algas. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3610_Kolender.pdf

Cita tipo Chicago:

Kolender, Adriana Andrea. "Polisacáridos de Nothogenia Fastigiata y Georgiella Confluens (Rhodophyta) : nuevos métodos de análisis para polisacáridos de algas". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2003.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3610_Kolender.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

**POLISACÁRIDOS DE *NOTHOGENIA FASTIGIATA* Y *GEORGIELLA CONFLUENS* (RHODOPHYTA). NUEVOS MÉTODOS DE ANÁLISIS
PARA POLISACÁRIDOS DE ALGAS.**

ADRIANA ANDREA KOLENDER

DIRECTORA: DRA. MARÍA CRISTINA MATULEWICZ

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

**FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÁNICA**

2003

A MARTÍN

Supe que lo sencillo no es lo necio
Que no hay que confundir valor y precio

Agradecimientos:

A la Dra. María Cristina Matulewicz, por permitirme llevar a cabo este trabajo de investigación en un clima de calidez y respeto.

Al Dr. Alberto S. Cerezo, por haberme transmitido una visión amplia de la investigación en polisacáridos de algas.

Al Dr. Robert Anton, por haberme recibido en su laboratorio y por los espectros RMN a alta temperatura.

A la Dra. Anne-Marie Aubertin por los estudios de actividad anti-HIV.

Al Dr. Jean-Marie Lehn por permitirme usar su laboratorio cada vez que lo necesité.

A los operadores de RMN del Dpto. de Química Orgánica por los numerosos espectros nocturnos y de fin de semana. A Gernot y José por su excelente predisposición.

A José Estévez por las fotos de las algas.

A Cecilia Rodríguez por las observaciones a la lupa y el microscopio.

A mis padres por haberme respaldado durante tantos años de estudio. A mi mamá por su presencia incondicional.

A Daniel por su apoyo, comprensión y compañía.

A Martín porque, sin saberlo, me impulsó y tuvo paciencia.

A mis compañeros de laboratorio, Carlos y María Inés, por tantas horas de charlas y trabajo en un clima de amistad.

A los compañeros del otro laboratorio: Marina, Cecilia, Marcelo, María Luján, Andrea L., Silvia, Diego, Andrea P., José, Gustavo, justamente, por ser buenos compañeros.

A Hernán O., Hernán S. y Cristián por los momentos compartidos en charlas, almuerzos, cafés, etc.

A Diego y Gabriela por compartir tantos cuatrimestres de docencia.

A Marc, Marianne, Anne-Frederique y Giselle por hacer tan agradable mi estadía en el laboratorio. A Bernard Kuballa y Bernard Dietrich por su calidez en el trato cotidiano.

A todas aquellas personas que no recuerdo en este momento (pero suelo pensar en ellas, y a aquellas otras que sí recuerdo pero cuyo nombre olvidé) que colaboraron de distintas maneras y me ayudaron a cumplir este objetivo.

POLISACÁRIDOS DE *NOTHOGENIA FASTIGIATA* Y *GEORGIELLA CONFLUENS* (RHODOPHYTA). NUEVOS MÉTODOS DE ANÁLISIS PARA POLISACÁRIDOS DE ALGAS.

Este trabajo de Tesis versa sobre cuatro aspectos principales:

- 1- Estudio de los polisacáridos del alga roja *Nothogenia fastigiata* (Galaxauraceae, Nemaliales) y evaluación de su actividad antiviral. Comprende un sistema de D-mananos con uniones α -(1 $\rightarrow$ 3), sulfatados en las posiciones 2 y 6, y con ramificaciones simples de D-xilosa enlazada β -(1 $\rightarrow$ 2). Los xilomananos contenían mayoritariamente cationes de calcio y magnesio, que estaban involucrados en la formación de complejos entre los polisacáridos del sistema mediante interacciones cooperativas carbohidrato-carbohidrato dependientes de calcio. La fracción F6' fue la más activa frente a varias cepas de HSV tipos 1 y 2, dos de ellas resistentes a aciclovir. Por otra parte, no presentó actividad anticoagulante, lo cual constituye una ventaja para su aplicación potencial como agente antiviral en formulaciones de aplicación local.
- 2- Aplicación de espectrometría de masa UV-MALDI-TOF, para determinar los pesos moleculares y sus funciones de distribución, sobre xilomananos sulfatados y xilanos neutros de *N. fastigiata*.
- 3- Análisis estructural de los polisacáridos de *Georgiella confluens* (Ceramiales). Los resultados indicaron la presencia de una cadena central de agarano altamente metilado con un esquema de sustitución inusual en galactanos de algas rojas: sulfatación en C-3 de unidades de α -L-galactosa y ramificaciones simples de xilosa en la posición 4 de β -D-galactosa.
- 4- Desarrollo de un método de desulfatación para polisacáridos sulfatados empleando clorotrimetilsilano. Permitió completar el análisis estructural de los xilogalactanos de *G. confluens*. También se encontraron las mejores condiciones para la desulfatación de carragenano kappa comercial, a fin de probar su eficacia en un polisacárido con máximo contenido de unidades de 3,6-anhidrogalactosa. El estudio por experimentos RMN mono- y bidimensionales de carragenano beta -obtenido por desulfatación de carragenano kappa- permitió la asignación completa de su espectro protónico.

Palabras clave: polisacáridos sulfatados; xilomananos; xilanos; galactanos; UV-MALDI-TOF; desulfatación.

POLYSACCHARIDES FROM *NOTHOGENIA FASTIGIATA* Y *GEORGIELLA CONFLUENS* (RHODOPHYTA). NEW ANALYTICAL METHODS FOR ALGAL POLYSACCHARIDES.

This Thesis comprises four major sections:

- 1- Analysis of the polysaccharides from the red seaweed *Nothogenia fastigiata* (Galaxauraceae, Nemaliales) and evaluation of their antiviral activities. The sulfated polysaccharides extracted from this seaweed comprise a family of α -(1→3)-linked D-mannans, 2- and 6-sulfated and having single stubs of β -(1→2)-linked D-xylose. The high content of calcium and magnesium cations revealed the complexation –mediated by calcium-dependent, cooperative carbohydrate-carbohydrate interactions– of polysaccharides belonging to the system. Fraction F6' proved to be the most active against several HSV strains, two of them resistant to acyclovir. At the same time, F6' did not exhibit anticoagulant properties, making it interesting for potential use as an antiviral agent in local formulations.
- 2- Application of UV-MALDI-TOF mass spectrometry to xylans and sulfated xylomannans in order to determine their molecular weights and distribution functions.
- 3- Structural analysis of the polysaccharides from *Georgiella confluens* (Ceramiaceae, Ceramiales). The results indicated the presence of a highly methylated agaran backbone with an unusual substitution pattern for red seaweed galactans: sulfation mainly at the 3-position of the α -L-galactose units and the presence of xylose single stubs at the 4-position of the β -D-galactose residues.
- 4- Development of a desulfation method for sulfated polysaccharides using chlorotrimethylsilane. Its application made possible the structural elucidation of the sulfated xylogalactans from *G. confluens*. Besides, in order to determine its efficiency in a polysaccharide with the highest 3,6-anhydrogalactose content, the best conditions for desulfation of commercial kappa carrageenan were tested. Complete assignment of the ^1H NMR resonances of beta carrageenan -obtained by desulfation of kappa carrageenan- was achieved by means of mono- and bidimensional NMR techniques.

Keywords: sulfated polysaccharides; xylomannans; xylans; galactans; UV-MALDI-TOF; desulfation.

ÍNDICE

PARTE I – INTRODUCCIÓN

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN A LOS POLISACÁRIDOS DE ALGAS ROJAS

1.1. Taxonomía	1
1.2. Polisacáridos de algas rojas	2
1.2.1. Xilanos	3
1.2.2. Mananos sulfatados	4
1.2.3. Galactanos sulfatados	5
1.2.3.1. Clasificación	9
1.2.3.2. Antecedentes de Ceramiaceae	14
1.3. Antecedentes de <i>Georgiella confluens</i>	16
1.4. Antecedentes de <i>Nothogenia fastigiata</i>	18
1.4.1. Xilanos	18
1.4.2. Xilogalactanos sulfatados	20
1.4.3. Xilomananos sulfatados	21
1.5. Pureza, homogeneidad, dispersión. Fraccionamiento	22
1.6. Objetivos	27
1.7. Bibliografía	28

CAPÍTULO 2. ACTIVIDAD ANTIVIRAL DE LOS POLISACÁRIDOS SULFATADOS DE *NOTHOGENIA FASTIGIATA*

2.1. Introducción	31
2.2. Antecedentes sobre la actividad biológica de los polisacáridos sulfatados aislados de <i>Nothogenia fastigiata</i>	38
2.2.1. Actividad antiherpética de F1 y F7	38
2.2.2. Actividad antiherpética de los xilomananos sulfatados	41
2.2.3. Efecto de F6 sobre la adsorción viral	43
2.2.4. Acción inhibitoria de F6 sobre la glicoproteína C	46
2.3. Bibliografía	49

PARTE II – ANÁLISIS ESTRUCTURAL DE POLISACÁRIDOS DE NOTHOGENIA FASTIGIATA

CAPÍTULO 3. ANÁLISIS ESTRUCTURAL DEL SISTEMA DE XILOMANANOS SULFATADOS DE NOTHOGENIA FASTIGIATA

3.1. Extracción, aislamiento y fraccionamiento	53
3.2. Metilación y desulfatación–metilación	55
3.3. Espectroscopía infrarroja	59
3.4. Espectroscopía de resonancia magnética nuclear	60
3.4.1. RMN ¹³ C. Introducción	60
3.4.2. RMN ¹³ C. Resultados	75
3.4.3. RMN ¹ H. Introducción	82
3.4.4. RMN ¹ H. Resultados	87
3.5. Actividad biológica de las fracciones F2'-F6'	88
3.6. Conclusiones	91
3.6.1. Análisis estructural	91
3.6.2. Correlación estructura-actividad	98
3.7. Bibliografía	105

CAPÍTULO 4. ANÁLISIS POR ESPECTROMETRÍA DE MASA UV – MALDI – TOF DE POLISACÁRIDOS DE NOTHOGENIA FASTIGIATA

4.1. Introducción	109
4.1.1. Matrices	114
4.1.2. Preparación de muestras	123
4.1.3. Fragmentación	124
4.1.4. Análisis por EM UV-MALDI-TOF de carbohidratos	126
4.2. Resultados. Análisis por EM UV-MALDI-TOF de los xilomananos sulfatados y los xilanos de <i>Nothogenia fastigiata</i>	131
4.2.1. Xilomananos sulfatados	132
4.2.2. Xilanos	140
4.3. Conclusiones	151
4.3.1. Xilomananos sulfatados	151
4.3.2. Xilanos	152
4.4. Bibliografía	155

PARTE III – ANÁLISIS ESTRUCTURAL DE POLISACÁRIDOS SULFATADOS DE GEORGIELLA CONFLUENS

CAPÍTULO 5. ANÁLISIS ESTRUCTURAL DEL SISTEMA DE XILOGALACTANOS SULFATADOS DE GEORGIELLA CONFLUENS

5.1. Extracción, aislamiento y fraccionamiento	159
5.2. Análisis estructural de CP y G2'	165
5.2.1. Análisis de las posiciones de unión	165
5.2.2. Desulfatación	171
5.2.3. Degradación de Smith	173
5.2.4. Espectroscopía RMN ¹³ C	174
5.2.4.1. Introducción	174
5.2.4.2. Resultados	186
5.3. Análisis estructural de G3'	197
5.4. Conclusiones	200
5.5. Bibliografía	206

PARTE IV – DESULFATACIÓN DE GALACTANOS SULFATADOS

CAPÍTULO 6. DESULFATACIÓN DE GALACTANOS SULFATADOS CON AGENTES SILILANTES. APLICACIÓN A CARRAGENANO KAPPA Y CARACTERIZACIÓN DE LOS PRODUCTOS

6.1. Introducción	209
6.1.1. Desulfatación ácida	209
6.1.2. Desulfatación solvolítica	210
6.1.3. Desulfatación con ácido piromelítico	213
6.1.4. Desulfatación selectiva con agentes sililantes	215
6.1.5. Carragenano beta	223
6.1.6. RMN ¹³ C	224
6.1.7. RMN ¹ H	227
6.1.8. RMN bidimensional	230
6.2. Resultados	241
6.2.1. Aplicación a polisacáridos sulfatados de algas	241
6.2.2. Caracterización de carragenano beta	251
6.3. Conclusiones	259

PARTE V – MÉTODOS EXPERIMENTALES

CAPÍTULO 7. PARTE EXPERIMENTAL

7.1. Consideraciones generales	267
7.2. Aislamiento de los polisacáridos de <i>Nothogenia fastigiata</i>	268
7.3. Fraccionamiento del sistema de polisacáridos de <i>Nothogenia fastigiata</i>	268
7.4. Aislamiento de los polisacáridos de <i>Georgiella confluens</i>	269
7.5. Fraccionamiento del sistema de polisacáridos de <i>Geogiella confluens</i>	270
7.6. Fraccionamiento de G2'	270
7.7. Determinación cuantitativa del contenido total de hidratos de carbono	271
7.8. Determinación del contenido de sulfato	273
7.8.1. Método turbidimétrico	273
7.8.2. Cromatografía iónica con detector conductimétrico	274
7.9. Determinación del contenido de α-galactosa 6-sulfato	274
7.10. Determinación del contenido de 3,6-anhidrogalactosa	275
7.11. Dosaje de grupos reductores	276
7.12. Determinación de los monosacáridos componentes	277
7.12.1. Hidrólisis total de los polisacáridos	277
7.12.2. Preparación de alditoles acetilados	277
7.12.3. Preparación de aldononitrilos acetilados	277
7.12.4. Hidrólisis reductiva	278
7.13. Estudios de alquilación	279
7.13.1. Método de Haworth	279
7.13.2. Método de Hakomori	279
7.13.3. Método de Stevenson y Fumeaux	280
7.13.4. Metilación con N-óxido de 4-metilmorfolina	281
7.13.5. Metilación con cloruro de litio	281
7.13.6. Etilación	282
7.13.7. Determinación de la composición de los polisacáridos peralquilados	282

7.14. Determinación de la configuración absoluta de las unidades de galactosa	283
7.14.1. Obtención de 1-desoxi-1-(2-hidroxipropilamino)alditales acetilados	283
7.14.2. Obtención de 1-desoxi-1-(1-feniletilamino)alditales acetilados	284
7.15. Determinación de la configuración absoluta de las unidades de 2,6-di-O-alkilgalactosa	284
7.16. Cromatografía gaseosa	285
7.16.1. Análisis de alditales y aldonicnitrilos acetilados	286
7.16.2. Análisis de aminalditales acetilados	286
7.17. Espectrometría de masa	286
7.17.1. Cromatografía gaseosa-espectrometría de masa	286
7.17.2. Espectrometría de masa UV-MALDI-TOF	286
7.17.2.1. Xilomananos	287
7.17.2.2. Xilanos	289
7.18. Espectroscopía RMN	291
7.18.2. RMN ¹³C	291
7.18.3. RMN ¹H	292
7.18.4. RMN bidimensional	292
7.19. Desulfatación	293
7.19.2. Desulfatación ácida	293
7.19.3. Desulfatación solvolítica	293
7.19.4. Desulfatación con agentes sililantes	295
7.20. Degradación de Smith	299
7.21. Actividad biológica	300
7.21.2. Actividad anti-HSV	300
7.21.3. Actividad anti-HIV	301
7.21.4. Actividad anticoagulante	303
7.22. Bibliografía	304
RESUMEN	307

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

Nota: Teniendo en cuenta que el idioma generalizado para las publicaciones científicas es el inglés, se han traducido al castellano las palabras cuyo significado se mantiene en ambos idiomas, pero se han dejado en inglés frases o giros cuya utilización es universal y cuya traducción carece de aplicación práctica en el castellano. Por ejemplo se retuvo la sigla MALDI (matrix-assisted laser desorption/ionization) dado que su traducción correspondiente carece de aplicación en la jerga cotidiana. En algunos casos junto a la traducción se indicó entre paréntesis la frase original en inglés, a fin de clarificar el concepto.

Análogamente: 1) se utilizaron como sinónimos de “hidrato de carbono”: glúcido, glicano, carbohidrato; 2) se mantuvieron las siglas o acrónimos en inglés.

2,5-DHB	ácido 2,5-dihidroxibenzoico, ácido gentísico
4-HCCA	ácido α -ciano-4-hidroxicinámico
ASE	efecto de supresión del analito
AZT	azidotimidina
BTSA	<i>N,O</i> -bis(trimetilsilil)acetamida
BTSTFA	<i>N,O</i> -bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida
CC₅₀	concentración citotóxica 50%
CID	descomposición inducida por iones, <i>collision-induced decomposition</i>
CTMS	clorotrimetilsilano
D	índice de polidispersión
DAG	3,6-anhidro- α -D-galactosa
DG	α -D-galactosa
DHAP	2,5-dihidroxiacetofenona
DMF	<i>N,N</i> -dimetilformamida
DMSO	dimetilsulfóxido
DP	grado de polimerización
DS8000	dextrán sulfato (PM 8000 Da)
DSS	2,2-dimetil-2-silapentano-5-sulfonato de sodio; 3-(trimetilsilil)-1-propanosulfonato de sodio
EM	espectrometría de masa
ESI	<i>electrospray ionization</i>

F2'Des	Fracción F2' desulfatada
F4'Des	Fracción F4' desulfatada
FAB	bombardeo con átomos rápidos, <i>fast atom bombardment</i>
G	β -D-galactosa
Glc_PA	ácido glucopiranurónico
Glc_PNAc	2-acetamido-2-desoxiglucopiranososa
HCMV	citomegalovirus humano
HIQ	1-hidroxiisoquinolina
HIV	virus de inmunodeficiencia humano
HMDS	hexametildisilazano
HPAEC-PAD	cromatografía de intercambio iónico de alta resolución con detección amperométrica de pulsos
HSV	virus herpes simplex
IC₅₀	concentración inhibitoria 50%
ISD	decaimiento en la fuente, <i>in source decay</i>
LAG	3,6-anhidro- α -L-galactosa
LG	α -L-galactosa
MMNO	N-óxido de 4-metilmorfolina
M_n	peso molecular promedio numérico
MSE	efecto de supresión de la matriz
M_w	peso molecular promedio en masa
PFU	unidades formadoras de placas
PMA	ácido piromelítico
PSD	decaimiento posterior a la fuente, <i>post-source decay</i>
RSV	virus respiratorio sincicial
SEC	cromatografía de exclusión por tamaño
SIV	virus de inmunodeficiencia de simios
TMS	tetrametilsilano
TSP	trimetilsililpropionato de sodio
UV-MALDI-TOF	ultraviolet matrix-assisted laser-desorption ionization time of flight
VZV	virus varicela zoster

Las restantes abreviaturas son las comúnmente aceptadas.

PARTE I

INTRODUCCIÓN

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN A LOS POLISACÁRIDOS DE ALGAS ROJAS

Las algas rojas (Rhodophyta) incluyen unas 6000 especies, mayoritariamente marinas, agrupadas en alrededor de 670 géneros que habitan las costas y plataformas continentales de regiones tropicales y de aguas frías. Algunas algas rojas tienen importancia económica debido a que sus polisacáridos se utilizan principalmente como aditivos alimentarios y como gelificantes. Por eso que se las cultiva o recolecta en numerosas áreas en todo el mundo.

Los objetivos generales de los trabajos de investigación llevados a cabo en esta área son:

- i) El estudio de la composición de los polisacáridos de especies de algas que no hayan sido investigados con anterioridad, a fin de evaluar la diversidad de estructuras naturales.
- ii) El desarrollo y mejoramiento de metodologías adecuadas para el estudio estructural.
- iii) La acumulación de datos relevantes para correlacionar la composición de los polisacáridos con la taxonomía de las algas, o bien la estructura con sus propiedades.
- iv) La detección de especies con usos prácticos potenciales: se han informado numerosos polisacáridos de algas rojas con propiedades antivirales, anticoagulantes y otras que permitirían su aplicación en la industria farmacéutica.

1.1. TAXONOMÍA

Tradicionalmente las algas rojas se dividieron en dos clases, Bangiophyceae y Florideophyceae. Alternativamente, se propuso una clase única –Rhodophyceae– y dos subclases: Bangiophycidae y Florideophycidae. Según evidencias moleculares y de ultraestructura actualmente se acepta a Bangiophyceae como un grupo parafilético, mientras que Florideophyceae se considera monofilético^{1,2}. La clasificación sistemática de los órdenes de Florideophyceae fue revisada recientemente por varios autores³⁻⁶ y continúa en análisis a fin de lograr una hipótesis evolutiva completamente definida. Dentro de Florideophyceae se incluyen 14-17 órdenes, en base a características reproductivas y estructurales⁷. En la Tabla 1.1 se incluyen estos órdenes, con el agregado de las familias a las que pertenecen las dos especies de algas rojas estudiadas en este trabajo de Tesis: *Nothogenia fastigiata* (Bory) Parkinson⁸ y *Geogiella confluens* (Reinsch) Kylin⁹.

Tabla 1.1. Clasificación de Florideophyceae (Rhodophyta)

Clase	Orden	Familia	Especie
Florideophyceae	Acrochaetales		
	Ahnfeltiales		
	Batrachospermales		
	Bonnemaisoniales		
	Ceramiales	Ceramiaceae	<i>Georgiella confluens</i>
	Corallinales		
	Dumontiales		
	Gelidiales		
	Gigartinales		
	Gracilariales		
	Halymeniales		
	Hildenbrandiales		
	Nemaliales	Galaxauraceae	<i>Nothogenia fastigiata</i>
	Palmariales		
	Plocamiales		
	Rhodymeniales		
	Sphaerococcales		

1.2. POLISACÁRIDOS DE ALGAS ROJAS

Las paredes celulares de las algas rojas están constituidas por polisacáridos, proteoglicanos, péptidos, proteínas, lípidos y elementos inorgánicos asociados. Los polisacáridos pueden agruparse de acuerdo con su función biológica como los glicanos de estructuras más rígidas (con uniones β) como celulosa, mananos y xilanos, y los carbohidratos más flexibles, generalmente sulfatados, que constituyen la matriz donde están embebidas las fibras del esqueleto rígido¹⁰. La capacidad de sintetizar polisacáridos ácidos es una propiedad especialmente interesante de las algas rojas. Varias especies de agua dulce producen heteropolisacáridos complejos que contienen ácidos urónicos junto con monosacáridos neutros. Por el contrario, las algas rojas marinas contienen galactanos sulfatados, y en ocasiones xilomananos sulfatados, que no tienen similitud con los polisacáridos de plantas terrestres¹¹.

En la mayoría de las especies, la celulosa es el material que conforma el esqueleto de la pared celular, aunque su contenido suele ser bastante bajo y la estructura química fue determinada sin ambigüedades solamente en algunos casos. En algunos representantes de Bangiophyceae no se detectó celulosa, pero en su reemplazo contenían un manano lineal con enlaces β -(1 $\rightarrow$ 4).

El denominado almidón de las florídeas es un polisacárido de reserva de las algas rojas y su contenido varía según las especies. Se trata de un α -glucano ramificado similar a las amilopectinas de plantas superiores, en ciertos casos se asemeja al glucógeno animal por su grado de ramificación. La ausencia de cualquier tipo de amilosa lineal fue considerada inicialmente como la diferencia principal entre el almidón de las florídeas y el almidón de plantas superiores, pero más tarde también se detectó amilosa en ciertos representantes de los órdenes Bangiales y Porphyridiales (ambos pertenecientes a Bangiophyceae).

1.2.1. XILANOS

Algunas especies de algas rojas contienen cantidades considerables de xilanos neutros lineales, compuestos por residuos de β -D-xilopiranososa con enlaces glicosídicos 1 $\rightarrow$ 3 y 1 $\rightarrow$ 4, por lo que se los denomina xilanos de tipo “enlaces mixtos”. El primer polisacárido de este tipo investigado por métodos químicos^{12,13} y enzimáticos^{14,15} fue un xilano de *Palmaria palmata*. Las fracciones de xilanos que diferían en su solubilidad contenían proporciones diferentes de enlaces 1 $\rightarrow$ 4 y 1 $\rightarrow$ 3, aunque siempre predominaba el primer tipo. Los enlaces 1 $\rightarrow$ 3 estaban distribuidos de manera irregular en la macromolécula y generalmente estaban separados unos de otros por una o más uniones 1 $\rightarrow$ 4¹⁵. Se aislaron xilanos similares de otras especies del orden Palmariales^{16,17} así como de integrantes del orden Nemaliales: *Nothogenia fastigiata*¹⁸ (como *Chaetangium fastigiatum*^{19,20}), *Nothogenia erinacea*²¹ (como *Chaetangium erinaceum*), *Galaxaura rugosa*²² (como *G. squalida*) y *Nemalion vermiculare*^{17,23,24}. Se sugirió el uso de espectroscopía de resonancia magnética nuclear de ¹³C (RMN ¹³C) para la caracterización de estos xilanos, en reemplazo de los métodos químicos^{16,17}, ya que los espectros proporcionan información sobre todas las características estructurales de estos polisacáridos excepto sobre la distribución de los dos tipos de uniones a lo largo de la cadena. El análisis de xilanos de *Nothogenia fastigiata* por espectroscopía RMN ¹³C a 75 MHz a 85°C permitió determinar además que las uniones 1 $\rightarrow$ 3 no estaban agrupadas en bloques sino que estaban dispersas en toda la cadena¹⁸.

1.2.2. MANANOS SULFATADOS

Durante la caracterización preliminar de la composición de los polisacáridos de algas rojas del Mar de Japón, se encontró inesperadamente que la hidrólisis de un polisacárido ácido del alga *Nemalion vermiculare* daba lugar a manosa junto con cantidades menores de xilosa y galactosa. Una investigación detallada reveló que el alga contenía un xilano neutro y un xilomanano sulfatado. Este polisacárido sulfatado constaba de una cadena regular de residuos de α -D-manopiranosas enlazados por la posición 3, con aproximadamente la tercera parte de los mismos sulfatados en la posición 4 ó 6, y una unidad de β -D-xilopiranosas enlazada a la posición 2 por cada 50 unidades de manosa²³⁻²⁷. Más tarde se encontraron polisacáridos sulfatados del mismo tipo en otros miembros del orden Nemaliales pertenecientes a los géneros *Galaxaura*²², *Nothogenia*²⁸ y *Liagora*: en particular, se detectó un contenido elevado de D-xilosa y la presencia de 3-O-metil-D-xilosa en los polisacáridos aislados de *Liagora* sp.²⁹ y *Liagora valida*³⁰.

Los xilomananos sulfatados de las dos especies de *Liagora* presentaron espectros de RMN ¹³C similares pero los autores no pudieron interpretarlos completamente debido a su complejidad. Por lo tanto ambos polisacáridos se estudiaron mediante varios métodos químicos. La hidrólisis parcial en ambos casos dio lugar a una serie de oligosacáridos de α -D-manosa con enlaces 1→3 pertenecientes a la cadena central. Luego de tratar a los polisacáridos nativos por una secuencia de desulfatación y degradación de Smith se obtuvieron (3-O-metilxilo)mananos. Sus espectros RMN ¹³C resultaron similares a los espectros de un xilomanano que se había obtenido a partir de un glucuronoxilomanano de *Cryptococcus neoformans*³¹. Estas observaciones junto con los datos del estudio por metilación proporcionaron evidencias de la unión de los residuos de 3-O-metil- β -D-xilosa a la posición 2 de los residuos de D-manosa de la cadena central. El análisis por metilación de los polisacáridos desulfatados y de los originales mostró que en la misma posición también se encontraban residuos de β -D-xilopiranosas –como ramificaciones simples o como cadenas cortas con uniones 1→4– y una parte de los grupos sulfato. Además había sulfatación en la posición 6 de la cadena central y algunos sustituyentes también podían estar ubicados en C-4 de los residuos de manosa (Sección 3.4.1.).

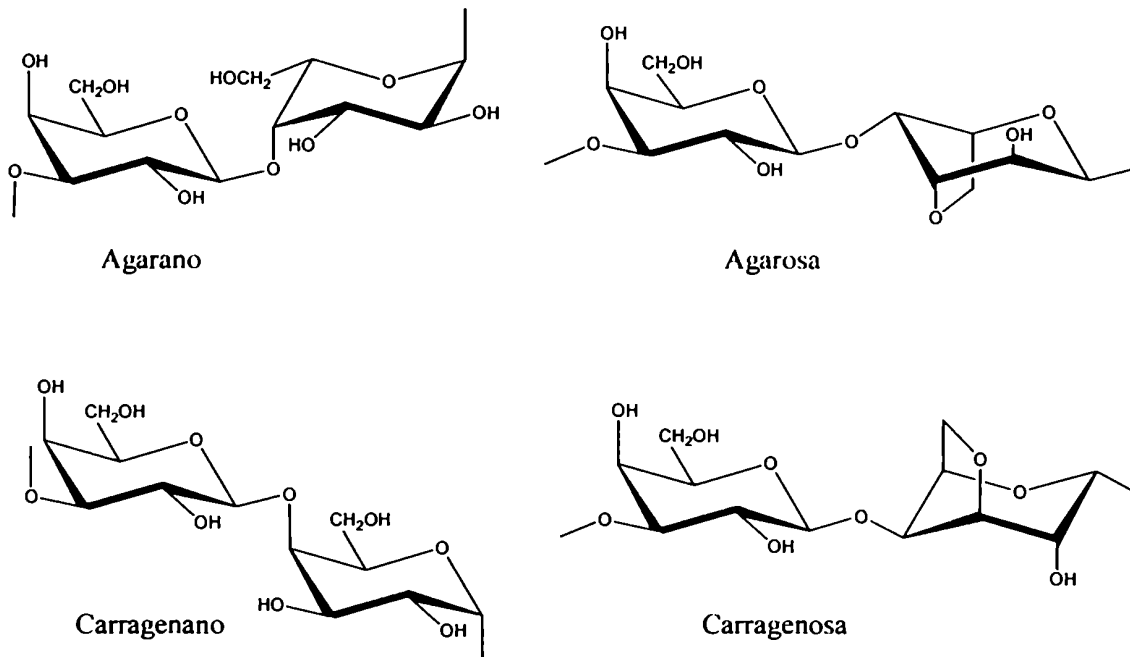
La combinación de xilanos neutros y xilomananos sulfatados podría entonces reemplazar a los galactanos sulfatados en varias especies de algas rojas pertenecientes a Nemaliales. Los xilomananos sulfatados tienen una cadena central común formada por residuos de α -D-

manopiranosos enlazados por la posición 3. Los polisacáridos aislados de varias especies difieren en el contenido de ramificaciones de β -D-xilopiranosilo o 3-O-metil- β -D-xilopiranosilo en la posición 2 de la cadena principal, así como en el contenido y distribución de los grupos sulfato¹¹.

1.2.3. GALACTANOS SULFATADOS

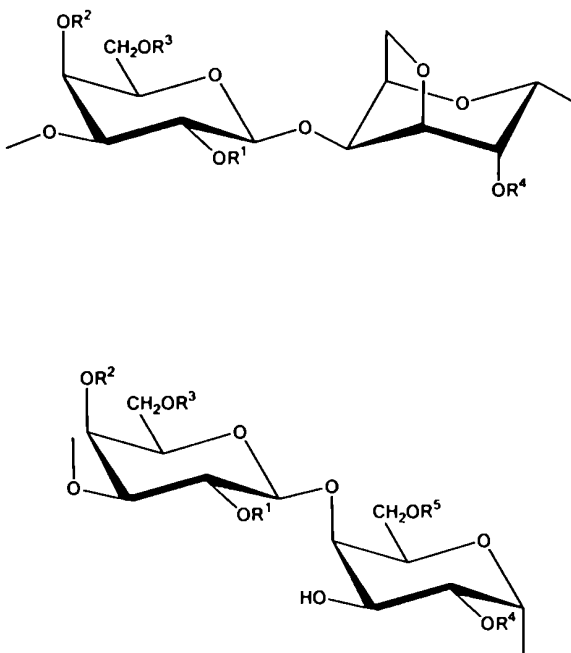
Las moléculas de galactanos sulfatados están conformadas por una cadena central de unidades alternadas de β -D-galactopiranososa (unidad G) enlazada por la posición 3 y α -galactopiranososa enlazada por 4. Existen dos grandes grupos de galactanos (Fig. 1.1) según la configuración absoluta de las unidades enlazadas por 4: la familia del agar posee residuos de la serie L (unidad LG) mientras que la familia de los carragenanos posee residuos de la serie D (unidad DG). Además, los residuos de α -galactosa suelen aparecer como su derivado: 3,6-anhidro- α -galactosa (unidades LAG o DAG, según pertenezcan a la serie L o D). Varios grupos hidroxilo de las cadenas poliméricas suelen estar sulfatados, metilados o glicosilados con ramificaciones simples de galactosa o β -D-xilopiranososa; mientras que las unidades G pueden estar sustituidas además con acetales cíclicos del ácido pirúvico sobre los carbonos 4 y 6. Por lo tanto, los términos agar y carragenano designan una diferencia fundamental entre moléculas diastereoméricas de polisacáridos^{11,32}.

Fig. 1.1. Estructuras generales de galactanos de algas rojas



La agarosa, el integrante de la familia del agar con mayor poder gelificante, es un ejemplo de una estructura sencilla. Su fórmula idealizada (Fig. 1.1) está compuesta por una secuencia completamente regular de unidades disacarídicas –unidades de agarobiosa G-LAG– sin grupos sulfato. Las cadenas reales de agarosa difieren ligeramente de la estructura ideal, ya que poseen algunas unidades de α -L-galactosa 6-sulfato (LG6S) –precursoras de 3,6-anhidro- α -L-galactosa–, algunos acetales del ácido pirúvico sobre los residuos β -D-galactosa y algunos grupos sulfato y metilo. Las agarosas sustituidas están ampliamente distribuidas en las algas rojas. Las desviaciones de la estructura ideal de agarosa influyen mucho la solubilidad de los polisacáridos y pueden disminuir notablemente sus propiedades gelificantes. Es posible aislar distintas fracciones de agarosa con grados de sustitución variable por extracción fraccionada o cromatografía de intercambio iónico, pero el conjunto de polisacáridos debe ser visto como una distribución continua de moléculas, del mismo tipo estructural pero con cantidades variables de sustituyentes. Esta peculiaridad estructural se conoce como “regularidad enmascarada” o “estructura repetitiva enmascarada”.

Fig. 1.2. Unidades repetitivas de carragenanos



Carragenano	R ¹	R ²	R ³	R ⁴
κ	H	SO ₃ ⁻	H	H
ι	H	SO ₃ ⁻	H	SO ₃ ⁻
θ	SO ₃ ⁻	H	H	SO ₃ ⁻
β	H	H	H	H
α	H	H	H	SO ₃ ⁻
ω	H	H	SO ₃ ⁻	H

Carragenano	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	R ⁵
μ	H	SO ₃ ⁻	H	H	SO ₃ ⁻
ν	H	SO ₃ ⁻	H	SO ₃ ⁻	SO ₃ ⁻
ο	H	SO ₃ ⁻	H	SO ₃ ⁻	H
λ	SO ₃ ⁻	H	H	SO ₃ ⁻	SO ₃ ⁻
ξ	SO ₃ ⁻	H	H	SO ₃ ⁻	H
π	SO ₃ ⁻	piruvato		SO ₃ ⁻	
γ	H	H	H	H	SO ₃ ⁻
δ	H	H	H	SO ₃ ⁻	SO ₃ ⁻
ψ	H	H	SO ₃ ⁻	H	SO ₃ ⁻

Los carragenanos (Figs. 1.1 y 1.2) suelen poseer mayor sulfatación que los polisacáridos de la familia del agar, y sus propiedades gelificantes dependen de la interacción con cationes específicos como K^+ . También es necesaria la presencia de residuos de DAG en la unidad repetitiva para la formación de geles. Tradicionalmente se nombra a estos compuestos con letras griegas, de los cuales los tres más importantes comercialmente son los carragenanos kappa, iota y lambda. Los carragenanos kappa y iota son conocidos por sus propiedades gelificantes (Fig. 1.2). Los carragenanos mu, nu, xi y lambda (Fig. 1.2) representan a polímeros no gelificantes. Los polisacáridos reales obtenidos de varias algas pueden tener estructuras muy cercanas a una de las estructuras ideales, pero muy frecuentemente se trata de moléculas híbridas con combinaciones de uno o más tipos de unidades disacarídicas repetitivas dentro de las moléculas componentes (por ejemplo: carragenanos kappa/iota)¹¹.

Por extracción del alga tropical *Kappaphycus alvarezii*, conocida como *Eucheuma cottonii* (o simplemente cottonii) se obtiene carragenano kappa. *Eucheuma denticulatum* (de nombre comercial *Eucheuma spinosum* o simplemente spinosum) es la especie principal para la producción de carragenano iota. Carragenano lambda se obtiene de varias especies de los géneros *Gigartina* y *Chondrus*³³.

A la división general entre polisacáridos de la familia del agar y de los carragenanos, se agrega un tercer grupo con unidades enlazadas por la posición 4 de configuración D y L dispersas en las macromoléculas, que se conocen como galactanos híbridos D/L³⁴.

Las características estructurales de los galactanos de algas rojas suele considerarse como el resultado de una biosíntesis en etapas, donde la primera correspondería a la formación de la cadena central regular de residuos de galactosa, la segunda sería la metilación y sulfatación de algunos grupos hidroxilos, y la última estaría representada por la eliminación enzimática de grupos sulfato de la posición 6 de algunos residuos enlazados por la posición 4 para dar 3,6-anhidro- α -galactosa. De acuerdo con esta secuencia biosintética, los porfiranos son precursores de agarosa, los carragenanos mu y nu son precursores de los kappa y iota respectivamente. La formación de 3,6-anhidrogalactosa también puede llevarse a cabo en el laboratorio por calentamiento en medio básico diluido del precursor correspondiente¹¹.

Existen numerosas razones que justifiquen funcionalmente la sustitución de los polisacáridos³⁵. El efecto físico de los residuos de DG6S y LG6S es la interrupción de la estructura helicoidal del polisacárido en un gel. Así, además de existir estas unidades como indicador de maduración, pueden prevalecer cuando no se requiere firmeza en los geles.

La presencia de ésteres sulfato aumenta la fuerza iónica, regula la humedad, permite la existencia de interacciones –particularmente con bases presentes en proteínas o nucleótidos– y pueden conducir a interacciones específicas con cationes.

La presencia de éteres de metilo crearía zonas no dadoras en la formación de uniones hidrógeno y que forman interacciones más débiles. Sin embargo, sí pueden ser aceptores de uniones hidrógenos: la agarosa es soluble en agua fría. Si el polímero tiene tanto metiléteres como ésteres sulfato, están presentes tipos opuestos de interacciones. Para tener una noción de su función en el polisacárido sería necesario tener conocimiento de su arreglo en regiones extendidas del polímero. Por otra parte, los acetales del ácido pirúvico tienen la posibilidad de regular la acidez en zonas localizadas y de formar entrecruzamientos de cadenas mediante cationes divalentes, sin establecer interacciones tan fuertes con macromoléculas nitrogenadas como lo hacen los grupos sulfato.

Dado que los sustituyentes interactúan de manera diferente con el medio, no sería inesperado encontrar niveles de sustitución distintos en partes distintas de la misma planta, o bien plantas que respondan a estrés ambiental sintetizando preferencialmente un constituyente que en otras condiciones sería minoritario. Como los polisacáridos de algas cuentan con un rango acotado de variaciones para hacer frente a su entorno, las mismas soluciones a los problemas pueden haberse logrado de manera independiente. Por lo tanto, una característica estructural común no necesariamente implica una relación basada en el desarrollo filogenético. No obstante, es posible que la considerable diversidad de estructura y sustitución en los galactanos sea valiosa como característica taxonómica. Estas características pueden depender de la presencia o ausencia de una propiedad determinada, o bien de la medida en que dicha propiedad está presente en la estructura química del galactano. El primer factor – contar o no con una cierta característica– puede resultar más relevante. Miller publicó un trabajo de revisión³⁵ aplicando la teoría de conjuntos, donde encontró evidencias razonables para apoyar la ausencia o presencia de relaciones estructurales a nivel de orden y, posiblemente, de familia taxonómicos. Es importante recalcar la lógica básica de esta teoría: podremos decir que si el género es X, entonces ocurrirá la sustitución Y, pero esto no implica que el esquema de sustitución Y requiera el género X. Sin embargo, la falta de número suficiente de datos hace que las conclusiones sean tentativas hasta ahora. Es en este contexto que es importante examinar los polisacáridos contenidos en un rango amplio de variedades de algas.

1.2.3.1. CLASIFICACIÓN

Duckworth y Yaphe³⁶ propusieron una clasificación de las moléculas pertenecientes a la familia del agar, según estructuras extremas particulares:

- (i) agarosa neutra, con estructura repetitiva ideal G-LAG y capacidad gelificante máxima;
- (ii) agarosa piruvilada con bajo contenido de sulfato, de estructura repetitiva ideal $\rightarrow 3)-4,6-O-(1\text{-carboxietiliden})-\beta\text{-D-galactosa-(1}\rightarrow 4)-3,6\text{-anhidro-}\alpha\text{-L-galactosa-(1}\rightarrow$ ó, en forma abreviada: G4,6P-LAG;
- (iii) galactano sulfatado con contenido nulo de LAG o de G4,6P, de estructura repetitiva ideal G-LG6S, no gelificante.

Los estudios posteriores demostraron que esta clasificación del agar era correcta pero incompleta, ya que la complejidad estructural del agar es mayor que la contemplada en su descripción: además de la sustitución por sulfatación y/o piruvilación, también es frecuente la presencia de metilación y de ramificaciones de xilosa o galactosa.

Knutsen *et al.*³² propusieron la clasificación de los galactanos de algas rojas en dos grupos, definidos en base a sus estructuras repetitivas (Fig. 1.1), y un sistema de notación abreviada para estos polisacáridos. Eligieron como unidades repetitivas fragmentos de agarobiosa y carrabiosa. En este trabajo de Tesis se siguen la clasificación de galactanos y el sistema de nomenclatura –ligeramente modificado– propuestos por estos autores^a.

Se denomina agarano a la estructura básica con unidades alternadas de G y LG. Este esqueleto suele estar enmascarado por sustitución y formación de residuos de 3,6-anhidro- $\alpha\text{-L-galactosa}$ (LAG) y pueden aproximarse a otra estructura extrema denominada agarosa, donde todos los residuos enlazados por la posición 4 corresponden a LAG. Análogamente, en la familia de los carragenanos, el término carragenano define en un sentido químico estricto a una cadena central formada por unidades G-DG. Sugirieron para el otro extremo estructural, formado por G-DAG, la denominación de carragenosa (Fig. 1.1).

Miller³⁵ propuso una clasificación de los polisacáridos elaborados por agarofitas en agarosa, agares y agaroides dependiendo del grado de sustitución y la capacidad gelificante. Define a agarosa como poliagarobiosa, $(\text{G-LAG})_n$. Considera a agares como agarosas “defectuosas” ya que presentan niveles de sulfatación y piruvilación reducidos luego de tratamiento alcalino. Los agares naturales suelen contener cantidades moderadas de unidades

^aEn el trabajo original propusieron DA y LA (en vez de DAG y LAG) como abreviaturas de 3,6-anhidro- $\alpha\text{-D-}$ y 3,6-anhidro- $\alpha\text{-L-galactosa}$; D y L (en lugar de DG y LG) para $\alpha\text{-D-}$ y $\alpha\text{-L-galactosa}$.

de LG6S, que disminuyen la fuerza de los geles, y porcentajes bastante elevados de metilación. Los agaroides presentan mayor diversidad de sustituyentes y forman geles débiles o directamente no gelifican.

Se hicieron algunos intentos de agrupar las unidades disacarídicas repetitivas (díadas) de carragenanos en familias. Los carragenanos sólo ocasionalmente están piruvilados o metilados y las ramificaciones ocurren con muy baja frecuencia. Por lo tanto, las variaciones están originadas básicamente por su esquema de sulfatación y/o la presencia de unidades de 3,6-anhidrogalactosa. Teniendo en cuenta la sulfatación de las unidades de β -D-galactosa, se agruparon en cuatro familias, cada una de ellas comprendiendo varias estructuras idealizadas³⁴:

- i) La familia *kappa* incluye los polisacáridos con unidades de β -D-galactosa 4-sulfato (G4S). Según el tipo de unidad α que la acompañe –DG ó DAG– y la presencia o ausencia de sulfato en C-2, se postulan cuatro estructuras ideales: carragenanos kappa, iota, mu y nu (Fig. 1.2). Los miembros de esta familia de carragenanos son producidos por uno de los estadios (gametofitos) del ciclo de vida de las familias Gigartinaceae y Phyllophoraceae en el orden Gigartinales y por integrantes de familias que no dan productos distintos en ambos estadios. Además se encontró carragenano omicron, una desviación de carragenano iota, en algunas especies de Phyllophoraceae y Solieriaceae.
- ii) La familia lambda, con unidades de β -D-galactosa 2-sulfato (G2S), incluye polisacáridos compuestos a partir de la unidad estructural G2S-DG2S6S. Existen naturalmente tres estructuras ideales: carragenanos lambda, xi y pi, dependiendo de la presencia de unidades α sulfatadas sólo en C-2 o de piruvilación de las unidades β (Fig. 1.2). Son producidas fundamentalmente por los esporofitos de Phyllophoraceae, Petrocelidaceae y Gigartinaceae. La modificación en condiciones alcalinas de carragenano lambda, que produce la ciclación de residuos DG6S a DAG, conduce a carragenano theta (Fig. 1.2).
- iii) La familia beta incluye polisacáridos con unidades β -D-galactosa libres de sulfato (G), comprendiendo carragenanos beta y alfa y sus precursores biológicos, gamma y delta (Fig. 1.2).
- iv) La familia omega contiene polisacáridos con unidades β -D-galactosa 6-sulfato (G6S) y está compuesta por un solo carragenano natural –omega– y su precursor biológico –psi (Fig. 1.2).

Sin embargo, esta clasificación no abarca muchos polisacáridos naturales complejos: el galactano de *Furcellaria lumbricalis*³⁷ según la clasificación precedente debería pertenecer al menos a tres familias –beta, kappa y omega.

En el sistema de notación abreviada de Knutsen *et al.*³², basado en la cadena central común a los galactanos de algas rojas, la posición de los sustituyentes se indica mediante el número del carbono al que está unido. En esta Tesis se utiliza un modificación de este sistema que se detalla en la Tabla 1.2. Las unidades repetitivas de los carragenanos según este sistema están en la Tabla 1.3.

Tabla 1.2. Ejemplos del sistema de nomenclatura abreviada para unidades presentes en galactanos con sus nombre IUPAC correspondientes

Abreviatura	Nombre completo
DG	α -D-galactopiranososa enlazada por la posición 4 (carragenanos)
DAG	3,6-anhidro- α -D-galactopiranososa enlazada por la posición 4 (carragenanos)
G	β -D-galactopiranososa enlazada por la posición 3
LG	α -L-galactopiranososa enlazada por la posición 4 (agares)
LAG	3,6-anhidro- α -L-galactopiranososa enlazada por la posición 4 (agares)
M	O-metil
P	4,6-O-(1-carboxietiliden)
S	éster sulfato
LG2M6S	2-O-metil- α -L-galactopiranososa 6-sulfato enlazada por la posición 4
-G4S-DAG-G	$\rightarrow$ 3)- β -D-galactopiranosil 4-sulfato-(1 $\rightarrow$ 4)-3,6-anhidro- α -D-galactopiranosil-(1 $\rightarrow$ 3)- β -D-galactopiranosil-(1 $\rightarrow$

Se retienen los nombres triviales de los disacáridos carrabiosa (G-DAG) y neocarrabiosa (DAG-G), agarobiosa (G-LAG) y neoagarobiosa (LAG-G). Para oligosacáridos de la serie neocarrabiosa, los residuos de 3,6-anhidro- α -D-galactopiranososa unidos a β -D-galactopiranososa ubicados en el extremo terminal no reductor se designan como DAG_{nr} y G_{nr} respectivamente. Los residuos internos se escriben con la nomenclatura abreviada, sin índices adicionales. Finalmente el residuo de D-galactosa en el extremo terminal reductor y el de 3,6-anhidro- α -D-galactopiranososa precedente se designan como Gr α , Gr β y DAG_r respectivamente. Los oligosacáridos de la serie de neoagarobiosa reciben nomenclaturas similares pero reemplazando DAG por LAG. Se sigue un procedimiento análogo para los oligosacáridos de las series carrabiosa y agarobiosa.

Tabla 1.3. Unidades repetitivas de la familia de carragenanos

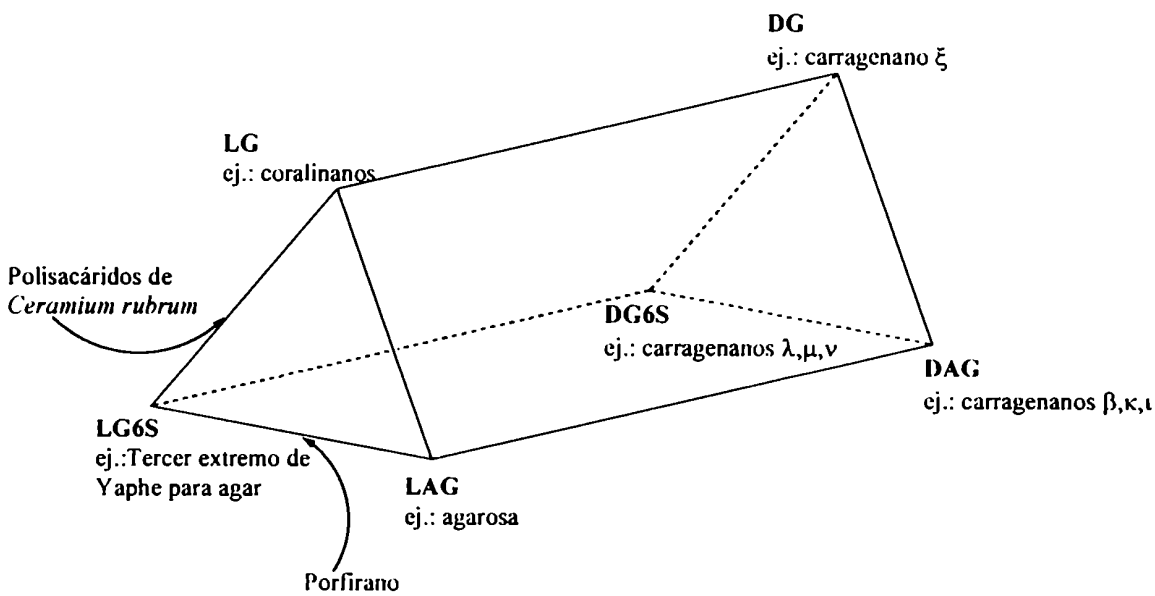
Nombre	Letra	Abreviatura
carragenano ^a		G-DG
alfa	α	G-DAG2S
beta	β	G-DAG
gamma	γ	G-DG6S
delta	δ	G-DG2S6S
theta	θ	G2S-DAG2S
iota	ι	G4S-DAG2S
kappa	κ	G4S-DAG
lambda	λ	G2S-DG2S6S
mu	μ	G4S-DG6S
nu	ν	G4S-DG2S6S
xi	ξ	G2S-DG2S
omicron	$\omicron$	G4S-DG2S
pi	π	G2S4,6P-DG2S
psi	ψ	G6S-DG6S
omega	ω	G6S-DAG

^aObtenido por desulfatación de carragenano lambda.

Stortz y Cerezo^{3,4} propusieron un modelo de prisma triangular (Fig. 1.3) para relacionar las estructuras de los diversos galactanos de algas rojas, que se esboza a continuación. Agarosa y carragenano beta son diastereómeros y este carragenano representa una estructura extrema para los carragenanos. Otros carragenanos más comunes, como kappa y iota, surgen por sustitución con sulfato de carragenano beta. Otro extremo de la estructura de carragenanos está representado por el polisacárido gamma –o sus equivalentes con mayor contenido de sulfato: mu, nu o lambda– cuyas unidades de α -D-galactosa no están en la forma 3,6-anhidro, sino como su precursor DG6S. La mayoría de los carragenanos naturales extraídos de gametofitos están incluidos entre estas dos estructuras extremas. Los acodanos –galactanos complejos extraídos del género *Aeodes* (Halymeniales)– y especialmente carragenano xi representan un tercer vértice ya que carecen tanto de DAG como de su precursor DG6S. Los coralinanos –galactanos de Corallinales– serían el equivalente a estos últimos dentro de la familia del agar: en su estructura están ausentes LAG y LG6S. Más aún, los acodanos –con una cadena central formada solamente por unidades de configuración D– están sustituidos con

4-*O*-metil-L-galactosa, mientras que los coralinanos tienen la misma ramificación pero con la configuración D. Los autores proponen un prisma triangular como un modelo adecuado para representar el comportamiento de los galactanos de algas rojas entre las seis estructuras extremas mencionadas. En este modelo, los polisacáridos pertenecientes exclusivamente a las familias del agar o de los carragenanos se ubican sobre una de las caras triangulares del prisma, mientras que los polisacáridos híbridos D/L lo harían dentro del cuerpo geométrico – con tres variables independientes: proporción de unidades D/L, contenido de 3,6-anhidro- α -galactosa y de sus precursores–, sobre una de las caras rectangulares –con dos variables independientes–, o en los lados más largos –con cambios en una sola variable– tal como se ilustra en los ejemplos de la Fig. 1.3. La ubicación exacta de cada galactano en el prisma dependerá de las proporciones relativas de unidades α -D-: α -L-galactosa, contenido de la forma 3,6-anhidro y de sus precursores sulfatados en la posición 6.

Fig. 1.3. Modelo de prisma triangular según la estructura de las unidades de α -galactosa



1.2.3.2. ANTECEDENTES DE CERAMIACEAE

Como se dijo anteriormente, los esquemas de sustitución de los polisacáridos de algas pueden tener importancia taxonómica. Sin embargo, por cuestiones prácticas, la mayor parte de los trabajos se llevaron a cabo sobre las estructuras más sencillas, como los agares y carragenanos más simples. El alga *Georgiella confluens* pertenece a la familia Ceramiaceae, que junto con Dasyaceae, Delesseriaceae y Rhodomelaceae componen el orden Ceramiales. Todas las algas de Ceramiales investigadas hasta el momento producen agarocoloides con mayores grados de sulfatación y metilación que los polisacáridos de otras agarofitas¹⁰. Solamente existen antecedentes bibliográficos sobre la estructura de los polisacáridos de seis especies de Ceramiaceae.

*Campylaeophora hypnaeoides*³⁸, *Carpoblepharis flaccida*³⁹ y *Euptilota formossissima*⁴⁰ biosintetizan agaranos sulfatados que pueden convertirse en agarosa por tratamiento alcalino. Al mismo tiempo, se observó un alto grado de metilación en *E. formossissima*⁴⁰, *Ceramium boydenii*⁴¹ y *Neoptilota asplenioides*⁴², especies donde se encontró 6-*O*-metil-D-galactosa. *N. asplenioides* contenía además 3,6-anhidro-2-*O*-metilgalactosa.

Varios estudios estructurales de galactanos relativamente simples tomaron como base la espectroscopia RMN ¹³C. En *Campylaeophora hypnaeoides*³⁸ se mostró la presencia de un polisacárido gelificante análogo al porfirano, que por tratamiento alcalino daba básicamente el espectro de agarosa. *Carpoblepharis flaccida*³⁹ dio un polisacárido no gelificante con ~40% de las unidades α -L- como LG6S en vez de LAG, baja piruvilación y sin metilación. Aproximadamente el 12% de las unidades α -L- estaban en la forma precursora LG6S en el polisacárido inicial de *Euptilota formossissima*⁴⁰.

Usov y Klochkova⁴², en cambio, aplicaron el proceso de hidrólisis reductiva sobre la biomasa del alga sin aislar los polisacáridos, a fin de estimar rápidamente la composición de varias especies de algas rojas de la costa este de Kamchatka. Entre la variedad de especies analizadas, sólo una pertenecía a Ceramiaceae: *Neoptilota asplenioides*, cuya composición en monosacáridos presentó relaciones molares para xilosa : 3,6-anhidro-2-*O*-metilgalactosa : 6-*O*-metilgalactosa : 3,6-anhidro-2-*O*-metilgalactosa : manosa : glucosa : galactosa de 0,8 : 2,1 : 8,2 : 9,4 : 0,4 : 8,7 : 12,1. Todos los representantes estudiados de Ceramiales –pertenecientes a Ceramiaceae, Delesseriaceae y Rhodomelaceae– contenían galactanos de la familia del agar, pero estos polisacáridos eran bastante diversos. Por ejemplo, algas pertenecientes a la familia Delesseriaceae (*Hymenea ruthenica* y *Phycordrys riggii*) dieron bajas relaciones 3,6-anhidro-2-*O*-metilgalactosa (y su derivado metilado) : galactosa (incluyendo 6-*O*-metilgalactosa) que no

aumentaron significativamente luego de tratamiento alcalino. Por el contrario, representantes de Ceramiaceae (*Neoptilota asplenioides*) y Rhodomelaceae (*Neorhodomela*, *Odonthalia*, *Pterosiphonia*, *Rhodomela*) contenían galactanos con niveles bastante elevados de 3,6-anhidrogalactosa. Estos galactanos podían considerarse como agarosas sustituidas. Así, una agarosa altamente metilada se encontró en *N. asplenioides*: la hidrólisis reductiva parcial de esta alga dio lugar al rendimiento máximo de agarobitol y sus metiléteres con respecto a todas las demás algas estudiadas en el mismo trabajo. En las especies de *Odonthalia* se encontraron polisacáridos similares, pero que estarían sulfatados en mayor medida, lo que resulta en rendimientos menores de disacáridos neutros reducidos. Se detectaron agarosas con bajos niveles de metilación en especies de *Pterosiphonia*. El contenido más alto de 3,6-anhidro-2-*O*-metilgalactosa se encontró en *Neorhodomela larix*, esta característica ya se había hallado en la misma especie recolectada en el Mar de Japón.

*Ceramium rubrum*⁴³ exhibió características interesantes, informadas en un trabajo de Turvey de 1976, donde se aisló un agarano no gelificante con 6-*O*-metil-D-galactosa, 2-*O*-metil-L-galactosa, 3,6-anhidro-L-galactosa y 3,6-anhidro-2-*O*-metil-L-galactosa, conteniendo 2,5% de sulfato. En este mucílago la relación molar de unidades L-galactosa : 3,6-anhidro-L-galactosa (incluyendo 3,6-anhidro-2-*O*-metil-L-galactosa) era 0,45:0,55 y de cada cinco unidades de L-galactosa sólo una correspondía a la unidad precursora L-galactosa 6-sulfato. La sulfatación restante estaba distribuida sobre los residuos de D-galactosa, principalmente en la posición 6 aunque también con cantidades menores sobre las posiciones 2 y 4. Estos resultados llamaron la atención ya que era la primera vez que se encontraba déficit de 3,6-anhidrogalactosa y de sus unidades precursoras. Este análisis estructural se llevó a cabo por métodos químicos y enzimáticos, pero no espectroscópicos.

Recientemente, Miller y Blunt⁴⁴ estudiaron por espectroscopía RMN ¹³C un nuevo extracto no gelificante de *C. rubrum* y su derivado desulfatado. El polisacárido desulfatado presentó una estructura básica de unidades de β-D-galactosa alternadas con L-galactosa y 3,6-anhidro-L-galactosa (en proporción 0,33:0,67) con alrededor del 8% de las unidades sustituidas con xilosa. El polisacárido nativo estaba sulfatado básicamente en la posición 6 de L-galactosa y sustituido en baja proporción con xilosa, posiblemente en más de una posición. Sólo encontraron muy bajos niveles de sulfatación adicional: G2S estaba presente en el límite de detección, no hallaron evidencia definitiva sobre la presencia de G4S y descartaron la presencia de la díada G4S-LAG en el límite de detección de los espectros. Las unidades de L-galactosa que no se ciclaron luego de tratamiento alcalino correspondían a residuos sin ningún tipo de sustitución. Este análisis estructural fue realizado solamente por espectroscopía RMN

¹³C. Si bien se hicieron modificaciones químicas del polisacárido nativo –como desulfatación, metilación y tratamiento alcalino–, no estudiaron la composición química de los productos por métodos alternativos independientes, tales como hidrólisis seguida de cromatografía gaseosa.

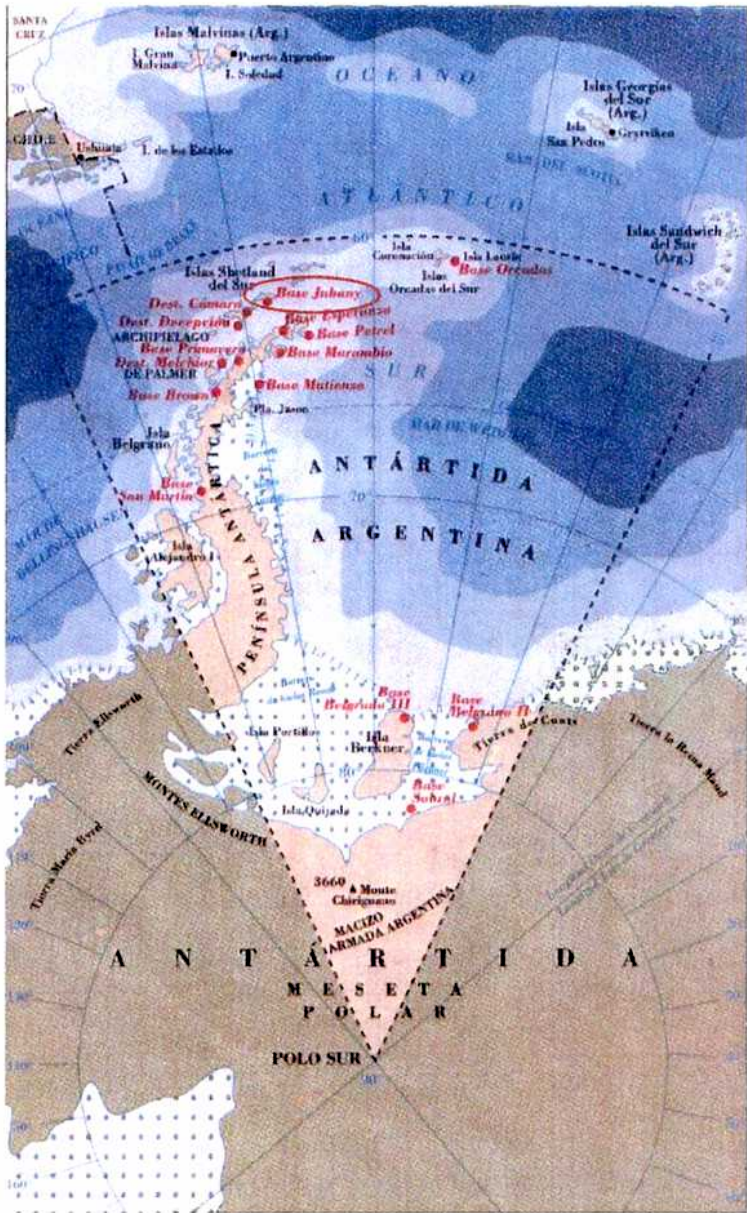
1.3. ANTECEDENTES DE *GEORGIELLA CONFLUENS*

Sólo existe una especie clasificada dentro del género *Georgiella*: *Georgiella confluens*, distribuida en la zona antártica y subantártica⁴⁵ (Fig. 1.4). Moe y Silva⁹ informaron su ubicación en las Islas Georgias del Sur, Sandwich del Sur, Orcadas del Sur y Shetland del Sur, la costa oeste de la Península Antártica (hasta 65,5°S) y en las Islas Balleny (aproximadamente 66°S, 163°E). En la Península Antártica suele aparecer entre 5 y 15 m de profundidad, aunque también se la puede encontrar hasta a 23 m en aguas quietas y claras. Requiere temperaturas menores a 5°C para crecer, siendo el límite máximo de temperatura para su supervivencia de 5-14°C⁴⁶.

Gallardo *et al.*⁴⁷ hallaron 37 especies de Rhodophyta en las Islas Shetland del Sur, durante cuatro expediciones realizadas entre 1986 y 1995. *G. confluens* estaba entre las dos especies más abundantes de la región.

La región de Lions Rump, en la Isla King George (Shetland del Sur) fue declarada sitio de interés científico especial en 1991 por sus características bióticas y geológicas, y por ser considerada como un lugar representativo del hábitat terrestre, limnológico y litoral de la Antártida marítima. El Comité Científico de Investigación en Antártida⁴⁸ (Scientific Committee on Antarctic Research, SCAR) indicó que en esta región hay aproximadamente unos 13 taxones de macroalgas bentónicas, de las cuales *G. confluens* está entre las 5 especies más comunes.

Fig. 1.4. Antártida Argentina



Al comenzar este trabajo de Tesis no había antecedentes en la literatura sobre los polisacáridos ni sobre la composición química general de *G. confluens*. Los únicos artículos que se encontraron son estudios muy recientes vinculados a: (i) la capacidad de retener metales pesados por macroalgas antárticas⁴⁹, y (ii) la composición de ácidos grasos de macroalgas árticas y antárticas⁵⁰. Las proteínas y los polisacáridos de las paredes celulares contienen grupos aniónicos –carboxilo, sulfato, fosfato– que constituirían excelentes sitios de unión para la retención de metales. Si bien *G. confluens* presentó niveles relativamente elevados de Cr, Cu y Mo, no figuró entre las especies relevantes del estudio (i). Entre las tres

especies endémicas recolectadas en la Isla King George del artículo (ii) estaba *G. confluens*, cuyos tres ácidos grasos principales fueron 16:0, 16:1 (n-7) y 20:5 (n-3) y un 63% en masa de ácidos grasos poliinsaturados. El contenido de ácidos grasos poliinsaturados en macroalgas marinas de regiones árticas y antárticas fue extremadamente elevado –en algunos casos llegando al 60-80% del total de ácidos grasos– con respecto a los informados para macroalgas de latitudes menores. Además había diferencias claras entre las composiciones de Rhodophyta, Phaeophyta (algas pardas) y Chlorophyta (algas verdes).

1.4. ANTECEDENTES DE *NOTHOGENIA FASTIGIATA*

El alga roja *Nothogenia fastigiata* (*Chaetangium fastigiatum*) sintetiza un sistema complejo de polisacáridos solubles en agua, cuyo estudio estructural comenzó en 1971¹⁹, que comprende:

- 1- xilanos neutros del tipo denominado “uniones mixtas” β -D-(1→3), β -D-(1→4);
- 2- xilogalactanos sulfatados de la familia del agar;
- 3- xilomananos sulfatados.

A continuación se describen los resultados publicados para cada una de estas familias de polisacáridos, obtenidos en nuestro grupo de investigación, antes de comenzar este trabajo de Tesis.

1.4.1. XILANOS

En 1971, Cerezo *et al.*¹⁹, informaron el aislamiento y la caracterización de un xilano soluble extraído de esta alga roja. El alga seca se extrajo con agua a ebullición y los polisacáridos se precipitaron con isopropanol. Por redisolución en agua y precipitación con cloruro de cetilpiridinio de los polisacáridos ácidos, se recuperó de la solución un xilano neutro, X_T. El xilano X_T se fraccionó en tres, induciendo su precipitación por agregado de etanol sobre una solución acuosa del polisacárido (Tabla 1.4). El estudio por metilación y mediciones de poder rotatorio indicaron que se trataba de polisacáridos con cadenas lineales de residuos de D-xilosa con uniones β -(1→3) y β -(1→4), con escasas ramificaciones. Además los polisacáridos tendrían una conformación fluctuante al azar o “random coil”, sugiriendo que las uniones 1→3 estaban dispersas en la cadena central en lugar de estar agrupadas en bloques.

Tabla 1.4. Análisis de X_T y de las fracciones A, B y C.

Fracción	Rango de precipitación (% EtOH)	Uniones 1→4 (%)
X _T	-	74
A	35,5 – 62	85
B	62 – 70	83
C	70 (soluble)	77

En 1992 se publicó¹⁸ el estudio por espectroscopía de RMN ¹³C y ¹H de alta resolución de los xilanos de tipo “uniones mixtas”. El procedimiento aplicado para el fraccionamiento de X_T fue ligeramente distinto al primero, ya que los rangos de precipitación con etanol fueron (% de etanol, v/v): X1, 38-48 %; X2, 48-58 %; X3, 58-68%. Se asignaron los desplazamientos químicos y las constantes de acoplamiento para los protones anoméricos. A partir de sus intensidades, se calcularon la proporción de β-D-xilopiranosas enlazadas por la posición 3 y 4 y el grado de polimerización (DP) para cada fracción (Tabla 1.5).

Tabla 1.5. Proporción de uniones (1→3):(1→4) y el grado de polimerización de X1, X2, X3.

Fracción	Relación (1→4):(1→3)	DP
X1	4,66:1,00	22
X2	4,41:1,00	34
X3	5,10:1,00	27

El análisis de los espectros RMN ¹H y ¹³C indicó que las uniones β-(1→3) estaban dispersas en toda la cadena central, más que distribuidas en grupos contiguos. Este tipo de distribución coincidía con los resultados informados previamente según métodos químicos^{18,19} y cálculos de poder rotatorio¹⁹, y era consistente con una conformación de enrollamiento al azar (random coil)¹⁹ y con la constancia de la rotación óptica medida en solventes de distinta fuerza iónica o poder caotrópico. Estos resultados sugirieron que estas fracciones no son distintas a nivel estructural, sino que corresponden a porciones arbitrarias pertenecientes a un rango continuo de estructuras moleculares.

1.4.2. XILOGALACTANOS SULFATADOS

En 1987, Matulewicz y Cerezo²⁸ comenzaron con el fraccionamiento y estudio de los polisacáridos de *N. fastigiata* que precipitaban con sales de amonio cuaternario (cetrimida). Aislaron siete fracciones por solubilización secuencial en soluciones de concentraciones crecientes de cloruro de sodio (Tabla 1.6). Los resultados indicaron la presencia de un sistema de polisacáridos que se podía dividir en: (i) fracciones F2-F6, con una relación molar manosa:sulfato constante (1,3-1,5:1,0); y (ii) fracciones F1 y F7, con composición en monosacáridos y contenido de sulfato similares, que sugerían la presencia de un galactano sulfatado.

Tabla 1.6. Composición y rendimiento de los polisacáridos sulfatados aislados de *N.fastigiata*.

Fracción	NaCl	Rend ^a	Sulfato	Proteína	[α] _D ^b	Composición en monosacáridos					
						(mol %)					
	(M)	(%)	(% SO ₃ Na)	(%)		Ram	Ara	Xil	Man	Gal	Glc
F1	0,5	22,9	12,9	16,0	-30,9	3	3	19	12	54	9
F2	1,0	11,8	19,2	5,4	+16,2	3	2	24	57	12	2
F3	1,5	22,9	23,4		+23,7		2	23	68	7	
F4	2,0	11,6	27,6		+27,8		2	10	78	10	
F5	3,0	13,9	27,3		+39,5		2	2	83	13	
F6	4,0	6,6	23,4	3,0	ins. ^c		3	7	74	16	
F7	4,0 ins ^d	10,3	14,0	14,6	ins. ^c	1	4	10	17	65	3

^aLos rendimientos se expresan como porcentajes del total recuperado (38,0 % de los polisacáridos solubles en agua).

^bMedidas en NaCl 0,1 M.

^cLas fracciones 6 y 7 resultaron insolubles en NaCl 0,1 y 1,0 M y en NaOH 10%.

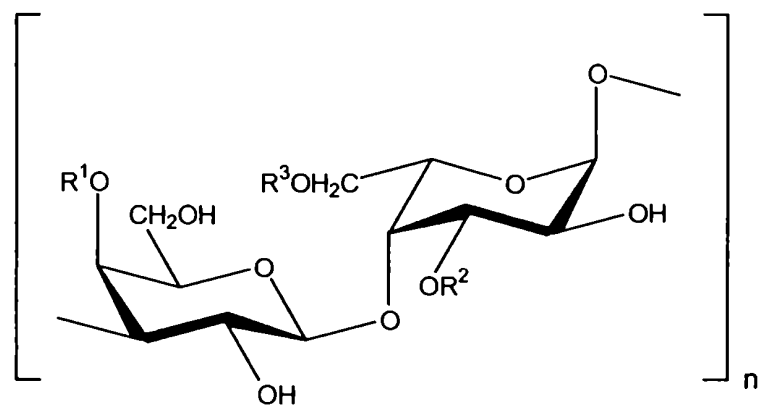
^dInsoluble en NaCl 4,0 M.

Haines *et al.*⁵¹ confirmaron la presencia de un galactano sulfatado, llevando a cabo un estudio sobre la homogeneidad y las propiedades de las fracciones F1 y F7. Tanto F1 y F7 como todas las subfracciones obtenidas por diversos procedimientos de fraccionamiento y purificación se tornaron insolubles luego de liofilizarlas. Estas características erráticas relacionadas con la solubilidad fueron atribuidas a asociaciones moleculares dependientes de composición, temperatura, tiempo y conformación¹⁹, que también se observaron en los sistemas de mananos aislados de esta alga y de *Nemalion vermiculare*^{24,27}, *Liagora* sp.²⁹ y

*Urospora penicilliformis*⁵². La persistencia de manosa a través de todos los procesos aplicados indicó que el sistema de polisacáridos sulfatados de *N. fastigiata* estaba compuesto por xilomananos y xilogalactanos con alta tendencia a la agregación.

Los estudios realizados sobre los xilogalactanos indicaron que: (i) las muestras consistían en polisacáridos heterodispersos en composición y peso molecular, y (ii) estos polisacáridos mostraron una tendencia fuerte a agregarse formando complejos insolubles, y probablemente también solubles. La estructura general de estos xilogalactanos (Fig. 1.5) corresponde a una cadena central de agarano donde: (i) los residuos de α -L-galactosa no tenían sustituyentes o estaban sulfatados en la posición 6 y poseían ramificaciones simples de D-xilosa o D-galactosa con unión 1 $\rightarrow$ 3, o bien estaban sulfatados en la posición 3; (ii) los residuos de β -D-galactosa estaban sulfatados en la posición 4 o no presentaban sustitución.

Fig 1.5. Unidades repetitivas de F1 y F7



Si $R^3=SO_3Na$, entonces R^2 =ramificaciones simples de D-xilosa o galactosa
 Si $R^3=H$, entonces $R^2=H$ ó SO_3Na
 En F1: $R^1=H$; en F7: $R^1=SO_3Na$

1.4.3. XILOMANANOS SULFATADOS

Los análisis por metilación y desulfatación de las fracciones F3 y F5 indicaron la presencia de D-mananos con uniones α -(1 $\rightarrow$ 3), sulfatados en la posiciones 2 y 6, y con ramificaciones simples de D-xilosa enlazadas β -(1 $\rightarrow$ 2)²⁸.

Las cantidades significativas de galactosa halladas en todas las fracciones de xilomananos, aunque no detectadas en los productos de metilación o desulfatación-metilación de F3 ni F5,

sugirieron que este azúcar era un contaminante originado posiblemente por coprecipitación del galactano presente en el sistema.

La insolubilización observada en los xilomananos estudiados implicaba la formación de agregados que excluían su solvatación por moléculas de agua. Estas estructuras terciarias dependían de la presencia de una conformación regular: la cadena central de D-manosa con enlaces α -(1→3) podría tomar una conformación en cinta, pero que no sería estable debido a la imposibilidad de formar uniones hidrógeno intramoleculares y a sus débiles propiedades de empaquetamiento. La solvatación de los grupos cargados negativamente y la presencia de las ramificaciones simples de xilosa promoverían la solubilización. Por otra parte, la flexibilidad de la cadena estaba bastante restringida por la unión axial del oxígeno glicosídico y por la repulsión entre las cargas negativas de los grupos sulfato. Como resultado de estos factores, la cadena adoptaría una conformación al azar en solución y la insolubilización sería producida en condiciones que favorecieran la conformación en cinta, con la subsecuente agregación, es decir, durante el proceso de liofilización de la solución de polisacáridos.

1.5. PUREZA, HOMOGENEIDAD, DISPERSIÓN. FRACCIONAMIENTO

Los conceptos de pureza y homogeneidad pueden resultar obvios en el caso de compuestos de bajo peso molecular o de biopolímeros cuya síntesis está dirigida genéticamente en forma directa, como las proteínas. En los polisacáridos, así como en los polímeros sintéticos y en ciertas glicoproteínas, el panorama es distinto. La estructura de un polisacárido está diseñada más por la interacción de un conjunto de enzimas que participan en su síntesis que por un patrón genético que determina directa y secuencialmente su estructura primaria. Así, las glicosiltransferasas construyen el esqueleto de unidades glicosídicas; las epimerasas, ciclasas, etc. producen modificaciones sobre él y las sulfatasas, esterasas, etc. agregan sustituyentes tales como grupos sulfato, acetilo y metilo. La especificidad de estas enzimas no sólo no es absoluta, sino que en algunos casos es bastante amplia, de modo que los polisacáridos finales estarán compuestos por moléculas que comparten un esquema común, pero con un rango de variaciones de distinto tipo⁵³. Así aparecerán conjuntos de moléculas con distribuciones continuas de peso molecular, grados de sustitución, niveles de ramificación, etc.

Por ejemplo, las variaciones que se han observado en distintos carragenanos híbridos kappa/iota pueden estar originadas por: (i) variaciones en los grados de ciclación de las unidades de α -D-galactosa 6-sulfato en 3,6-anhidro-D-galactosa; (ii) la distribución de las unidades cicladas puede ser al azar o en bloques; ó (iii) la introducción de sustituyentes como

grupos sulfato, metilo, piruvilo, etc. Todos estos factores dan origen a una amplia variabilidad en la formación de estructuras, dentro de un mismo esquema general de polisacárido, de modo que es difícil pensar que en una muestra haya dos moléculas de polisacárido exactamente iguales.

Se dice que un compuesto es puro si el valor de cada una de sus propiedades se mantiene constante para cualquier porción de muestra. Esto equivale a decir que todas las moléculas de la muestra son iguales y, por lo tanto, no puede aplicarse ningún método de fraccionamiento. En este caso, pureza y homogeneidad son sinónimos.

Estos conceptos pueden extenderse a los polisacáridos –con sus distribuciones continuas de composición, estructura y/o peso molecular– reemplazando “constancia en el valor de sus propiedades” por “variabilidad dentro de un cierto rango en el valor de sus propiedades”⁵³.

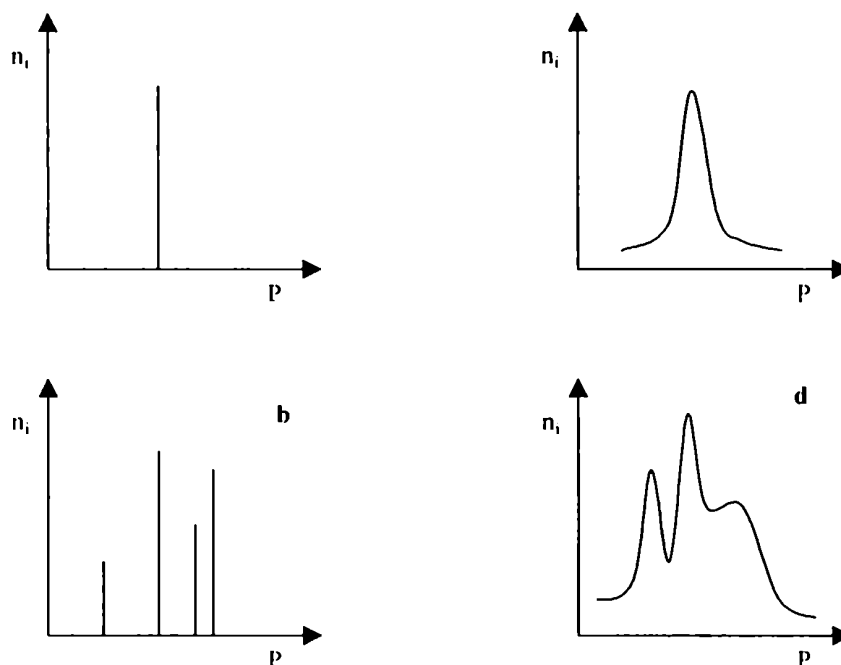
Por cuestiones prácticas, sólo se miden algunas de las propiedades de una muestra determinada y, por lo tanto, la homogeneidad absoluta no puede ser demostrada. En cambio, sí queda demostrada la heterogeneidad de una muestra mediante un solo fraccionamiento que dé un resultado positivo.

Gibbons⁵⁴ definió todas las posibilidades de variaciones estructurales que puede presentar un sistema en función de su dispersión:

- i) Una muestra es monodispersa si la variación de todos los parámetros medidos es cero (Fig. 1.6.a).
- ii) Una muestra es paucidispersa si está compuesta por una mezcla de componentes monodispersos (Fig. 1.6.b).
- iii) Una muestra es polidispersa si presenta una distribución unimodal –la curva de distribución tiene un máximo y dos puntos de inflexión– para todos sus parámetros mensurables (Fig. 1.6.c). Las moléculas que pertenecen al sistema representan estadísticamente a una misma población.
- iv) Una muestra es heterodispersa si presenta una distribución bimodal o polimodal para alguno de sus parámetros (Fig. 1.6.d).

Si las muestras son monodispersas o polidispersas se las considera homogéneas, mientras que sistemas paucidispersos o heterodispersos son heterogéneos.

Fig. 1.6. Curvas de distribución: (a) monodispersa, (b) paucidisversa, (c) polidisversa, (d) heterodispersa: donde n_i es el número de moléculas que tienen una cantidad P de un parámetro determinado.



El tipo de distribución puede ser distinto según la propiedad en estudio, es decir, una muestra puede ser polidisversa con respecto a un parámetro y heterodispersa con respecto a otro, por lo que resulta imprescindible hacer referencia a la propiedad cuya dispersión está en consideración.

En la práctica, por un lado, el fraccionamiento de moléculas muy similares no siempre se logra y, por otro lado, las determinaciones estructurales suelen producir resultados promedio –sin poner en evidencia las distribuciones que les dieron origen. Por lo tanto es frecuente no poder distinguir entre: (i) una mezcla de moléculas con estructuras similares pero variables y (ii) variaciones dentro de una misma molécula.

Es importante tener en cuenta que distintos métodos experimentales utilizados para medir una misma propiedad –pero basados en fundamentos distintos– pueden dar valores distintos y ser todos correctos, ya que esos métodos experimentales proporcionan promedios de tipos diferentes. Los promedios más usados son los denominados promedio numérico, M_n , y promedio pesado, M_w . Por ejemplo, para una muestra con n_i componentes cuyos pesos moleculares son M_i , en concentraciones C_i , estos promedios se definen como:

Se obtiene un promedio numérico cuando la medición es proporcional al número de moléculas, sin tener en cuenta su tamaño, por ejemplo: en determinaciones de peso molecular por cuantificación de extremos reductores o por osmometría. En cambio, se obtienen promedios pesados cuando la respuesta es proporcional al peso o al tamaño de las partículas, por ejemplo: en determinaciones de peso molecular por equilibrio de sedimentación o por dispersión de luz (light scattering). Se cumple que: $M_w \geq M_n$, la igualdad sólo se verifica cuando el sistema es monodisperso con respecto al peso molecular.

El índice de polidispersión, D , da una idea de la dispersión del peso molecular. Si $D \geq 1,6$ se dice que el sistema es polidisperso; si $D \leq 1,1$, entonces es monodisperso.

Es importante elegir metodologías de aislamiento, purificación y fraccionamiento adecuadas, a fin de obtener datos experimentales que permitan definir la homogeneidad de una muestra. La obtención de los polisacáridos debe realizarse de modo tal de conseguir un material tan homogéneo y con un rendimiento tan alto como sea posible. En general, estos objetivos suelen ser contradictorios y hay que evaluar en cada caso cuál es el punto de corte para una sucesión de fraccionamientos, en función de los objetivos que se persiguen al realizar el trabajo de investigación.

El aislamiento y la purificación de los polisacáridos no deben producir degradación. A veces, la degradación de un polisacárido por ácidos o bases se aplica deliberadamente en el análisis estructural, pero el uso de estos métodos en la etapa del aislamiento debe restringirse de modo de minimizar alteraciones incidentales en las moléculas⁵³. Los métodos de extracción más simples para polisacáridos son los que usan agua a varias temperaturas. Los fraccionamientos están basados en precipitaciones selectivas de los polisacáridos o de sus sales o complejos, o en procedimientos cromatográficos. Típicamente los polisacáridos se

aislan de soluciones acuosas por adición de solventes miscibles en agua, como acetona o alcoholes de bajo peso molecular. Si bien estos precipitados pueden secarse por tratamientos sucesivos con solventes orgánicos anhidros, se los obtiene en mejores condiciones físicas para su manipulación posterior cuando son liofilizados a partir de las soluciones acuosas⁵⁵.

La precipitación fraccionada de polisacáridos por formación selectiva de sales o complejos suele ser efectiva para aislar componentes que forman un precipitado a partir del cual se puede regenerar el polisacárido original. Por ejemplo, la formación de sales a partir de polisacáridos ácidos se ilustra por la precipitación de carragenano kappa con cloruro de potasio. La precipitación selectiva con detergentes catiónicos como bromuro de cetiltrimetilamonio (cetavlon o cetrimida) y bromuro de cetilpiridinio también es de uso frecuente.

Si bien existe una región amplia de superposición a nivel de escala operativa, los métodos de precipitación para el fraccionamiento de polisacáridos son generalmente adecuados para cantidades relativamente elevadas (1 g de material de partida o más), mientras que las separaciones cromatográficas pueden llevarse a niveles de miligramos. Los procedimientos cromatográficos también se usan a escala analítica como criterio de homogeneidad. Las separaciones pueden estar basadas en diferencias en:

- i) tamaño molecular: filtración por geles o tamices moleculares;
- ii) composición: principalmente según la proporción de grupos ácidos mediante cromatografía de intercambio iónico.

Las separaciones preparativas de polisacáridos ácidos que contienen grupos carboxilato, sulfato o fosfato suelen hacerse por cromatografía de intercambio iónico en fibras de polisacáridos (celulosa) o en geles entrecruzados (de dextrano, en Sephadex, o de agarosa, en Sepharosa) que poseen grupos funcionales adecuados como *O*-(2-dietilaminoetil) (DEAE). Los geles entrecruzados son los utilizados con mayor frecuencia debido a sus capacidades elevadas, sin embargo presentan la desventaja de cambiar ampliamente su volumen por alteraciones en la fuerza iónica del solvente de elución.

El problema práctico a resolver en presencia de una muestra dada de polisacárido es establecer su pureza –entendida como ausencia de contaminantes externos– y demostrar que no hay separación posible en fracciones que indiquen discontinuidades con respecto al tamaño molecular o la estructura. La evidencia esencial para la ausencia de heterogeneidad en una fracción de polisacáridos, como en cualquier compuesto químico, es la demostración de constancia en la composición química y en sus propiedades físicas cuando el material es

recuperado luego de un intento de separación o purificación. La constancia en la composición química puede demostrarse de alguna de las siguientes formas:

- i) composición en monosacáridos luego de hidrólisis;
- ii) análisis de grupos funcionales o análisis de una clase particular de azúcar;
- iii) examen espectroscópico, especialmente por RMN;
- iv) propiedades físicas y propiedades en solución, como rotación óptica y viscosidad.

1.6. OBJETIVOS

En este trabajo de Tesis se estudiaron los sistemas de polisacáridos extraídos de dos especies de algas rojas de la costa patagónica y antártica: *Nothogenia fastigiata* (Galaxauraceae, Nemaliales) y *Georgiella confluens* (Ceramiceae, Ceramiales), respectivamente.

Las propiedades antivirales demostradas por el sistema de xilomananos de *Nothogenia fastigiata* (ver Cap. 2), así como el interés por determinar de manera exhaustiva la estructura poco frecuente de estos polisacáridos y la posibilidad de establecer una correlación estructura-actividad fueron los factores que motivaron su análisis. Se aplicó además una nueva metodología para determinar el peso molecular y su función de distribución en polisacáridos de algas rojas: los xilomananos sulfatados y los xilanos neutros fueron estudiados por espectrometría de masa UV-MALDI-TOF.

No existían antecedentes bibliográficos sobre los polisacáridos de *Georgiella confluens*, aunque datos sobre otros miembros de Ceramiales permitían esperar la presencia de galactanos sulfatados de la familia del agar. Los polisacáridos aislados podrían ser interesantes por sus propiedades físicas, químicas o biológicas por lo que fueron probados en estos sentidos. En el transcurso del trabajo surgió la necesidad de desarrollar un método de desulfatación que permitiera completar el estudio estructural de *Georgiella confluens*. Paralelamente se estudió la aplicación de esta metodología sobre galactanos sulfatados de la familia de los carragenanos, analizando el grado de desulfatación, degradación y rendimiento de los productos aislados.

Por lo enunciado anteriormente, en este trabajo de Tesis se tomó contacto con las principales familias de polisacáridos presentes en las algas rojas y se desarrollaron nuevos métodos de análisis para los mismos.

1.7. BIBLIOGRAFÍA

- ¹Garbary, D.J.; Gabrielson, P.W. *Biology of the red algae*. Cap. 18: *Taxonomy and evolution*. Editores: Cole, K.M.; Sheath, R.G. 1990, Cambridge University Press, New York, págs. 477-498 y referencias allí mencionadas.
- ²Ragan, M.A.; Bird, C.J.; Rice, E.L.; Gutell, R.R.; Murphy, C.A.; Singh, R.K. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *91*, 7276-7280.
- ³Fredericq, S.; Norris, J.N.; Zimmer, E.A.; Freshwater, D.W.; Hommersand, M.H. *J. Phycol.* **1996**, *32*, 16.
- ⁴Saunders, G.W.; Kraft, G.T. *Can. J. Bot.* **1994**, *72*, 1250-1263.
- ⁵Saunders, G.W.; Kraft, G.T. *Can. J. Bot.* **1996**, *74*, 694-707.
- ⁶Saunders, G.W.; Bailey, J.C. *Can. J. Bot.* **1997**, *75*, 1436-1447.
- ⁷Graham, L.E.; Wilcox, L.W. *Algae*, Cap. 16, págs: 343-396. 2000, Prentice Hall, Upper Saddle River, USA.
- ⁸Parkinson, P. *Taxon* **1983**, *32*, 601-610.
- ⁹Moe, R.; Silva, P.C. *Br. Phycol. J.* **1983**, *18*, 275-298.
- ¹⁰Craigie, J.S. *Biology of the red algae*. Cap. 10: *Cell walls*. Editores: Cole, K.M.; Sheath, R.G. 1990, Cambridge University Press, New York, USA, págs. 221-257 y referencias allí mencionadas.
- ¹¹Usov, A.I. *Food Hydrocolloids* **1992**, *6*, 9-23 y referencias allí mencionadas.
- ¹²Percival, E.G.V.; Chanda, S.K. *Nature* **1950**, *166*, 787-788.
- ¹³Barry, V.C.; Dillon, T.; Hawkins, B.; O'Colla, P. *Nature* **1950**, *166*, 788.
- ¹⁴Howard, B.H. *Biochem. J.* **1957**, *67*, 643-651.
- ¹⁵Bjorndal, H.; Eriksson, K.-E., Garegg, P.J.; Lindberg, B.; Swan, B. *Acta Chem. Scand.* **1965**, *19*, 2309-2315.
- ¹⁶Usov, A.I.; Yarotsky, S.V.; Shashkov, A.S.; Tishchenko, V.P. *Bioorg. Khim.* **1978**, *4*, 57-65.
- ¹⁷Kovac, P.; Hirsch, J.; Shashkov, A.S.; Usov, A.I.; Yarotsky, S.V. *Carbohydr. Res.* **1980**, *85*, 177-185.
- ¹⁸Matulewicz, M.C.; Cerezo, A.S.; Jarret, R.M.; Syn, N. *Int. J. Biol. Macromol.* **1992**, *14*, 29-32.
- ¹⁹Cerezo, A.S.; Lezcovich, A.; Labriola, R. *Carbohydr. Res.* **1971**, *19*, 289-296.
- ²⁰Cerezo, A.S. *Carbohydr. Res.* **1972**, *22*, 209-211.
- ²¹Nunn, J.R.; Parolis, H.; Russell, I. *Carbohydr. Res.* **1973**, *26*, 169-180.
- ²²Usov, A.I. Yarotsky, S.V.; Estevez, M.I. *Bioorg. Khim.* **1981**, *7*, 1261-1270.

- ²³Usov, A.I.; Adamyants, K.S.; Yarotsky, S.V.; Anoshina, A.A.; Kochetkov, N.K. *Carbohydr. Res.* **1973**, *26*, 282-283.
- ²⁴Usov, A.I.; Adamyants, K.S.; Yarotsky, S.V.; Anoshina, A.A.; Kochetkov, N.K. *Zh. Obshch. Khim.* **1974**, *44*, 416-420.
- ²⁵Usov, A.I.; Adamyants, K.S.; Yarotsky, S.V.; Anoshina, A.A. *Zh. Obshch. Khim.* **1975**, *45*, 916-921.
- ²⁶Usov, A.I.; Adamyants, K.S.; Yarotsky, S.V. *Zh. Obshch. Khim.* **1975**, *45*, 1377-1381.
- ²⁷Usov, A.I.; Yarotsky, S.V. *Bioorg. Khim.* **1975**, *1*, 919-922.
- ²⁸Matulewicz, M.C.; Cerezo A.S. *Carbohydr. Polym.* **1987**, *7*, 121-132
- ²⁹Usov, A.I., Dobkina, I.M. *Bioorg. Khim.* **1988**, *14*, 642-651.
- ³⁰Usov, A.I., Dobkina, I.M. *Bioorg. Khim.* **1991**, *17*, 1051-1058.
- ³¹Chernyak, R.; Jones, R.G.; Reiss, E. *Carbohydr. Res.* **1988**, *172*, 113-138.
- ³²Knutsen, S.H.; Mislavsky, D.E.; Larsen, B.; Usov, A.I. *Bot. Mar.* **1994**, *37*, 163-169.
- ³³van de Velde, F.; Knutsen, S.H.; Usov, A.I.; Rollema, H.S.; Cerezo, A.S. *Trends in Food Science and Technology* **2002**, *13*, 73-92.
- ³⁴Stortz, C.A.; Cerezo, A.S. *Curr. Top. in Phytochem.* **2000**, *4*, 121-134 y referencias allí mencionadas.
- ³⁵Miller, I.J. *Recent Res. Devel. in Phytochem.* **1997**, *1*, 531-565.
- ³⁶Duckworth, M.; Yaphe, W. *Carbohydr. Res.* **1971**, *16*, 189-197.
- ³⁷Usov, A.I.; Arkhipova, V.S. *Bioorg. Khim.* **1981**, *7*, 385-390.
- ³⁸Usov, A.I.; Ivanova, E.G.; Shashkov, A.S. *Bot. Mar.* **1983**, *26*, 285-294.
- ³⁹Furieux, R.H.; Miller, I.J. *Bot. Mar.* **1986**, *29*, 3-10.
- ⁴⁰Miller, I.J.; Furieux, R.H. *Bot. Mar.* **1997**, *40*, 333-339.
- ⁴¹Hirase, S.; Araki, C. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1961**, *34*, 1048.
- ⁴²Usov, A.I.; Klockova, N.G. *Bot. Mar.* **1992**, *35*, 371-378.
- ⁴³Turvey, J.R.; Williams, E.L. *Carbohydr. Res.* **1976**, *49*, 419-425.
- ⁴⁴Miller, I.J.; Blunt, J.W. *Bot. Mar.* **2002**, *45*, 1-8.
- ⁴⁵Guiry, M.D.; Nic Dhonncha, E. 2002. AlgaeBase. Publicación electrónica de World-wide Web. www.algaebase.org (mayo de 2003).
- ⁴⁶Bischoff-Basman, B.; Wiencke, C. *J. Phycol.* **1996**, *32*, 525-535.
- ⁴⁷Gallardo, T.; Pérez-Ruzafa, I.M.; Flores-Moya, A.; Conde, F. *Bot. Mar.* **1999**, *42*, 61-69.
- ⁴⁸SCAR Bulletin N° 144, 2002. www.scar.org/Publications/bulletins
- ⁴⁹Fariás, S.; Pérez, Arisnabarreta, S.; Vodopivec, C.; Smichowsky, P. *Spectrochimica Acta Part B* **2002**, *57*, 2133-2140.

⁵⁰Græve, M.; Kattner, G.; Wiencke, C.; Karsten, U. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **2002**, 231, 67-74.

⁵¹Haines, H.H.; Matulewicz, M.C.; Cerezo, A.S. *Hydrobiologia* **1990**, 204/205, 637-643.

⁵²Bourne, E.J.; Megarry, M.L.; Percival, E. *J. Carbohydr. Nucleosid. Nucleotid.* **1974**, 1, 235-264.

⁵³Cerezo, A.S. *Manual de Métodos Ficológicos. Cap.: Polisacáridos. Pureza, homogeneidad y dispersión.* Editores: Alveal, K.; Ferrario, M.E.; Oliveira, E.C.; Sar, F. 1995, Universidad de Concepción, Concepción, Chile, págs. 677-689.

⁵⁴R.A. Gibbons. *Physico-Chemical Methods for the Determination of the Purity, Molecular Size and Shape of Glycoproteins.* Vol. 5, part A: *Glycoproteins. Their Composition, Structure and Function.* Editor: Gottschalk, A.; B.B.A. Library. 1972, Elsevier, Amsterdam, págs. 31-140.

⁵⁵Aspinall, G.O. *The Polysaccharides. Vol. 1. Cap. 2: Isolation and fractionation of polysaccharides.* Editor: Aspinall, G.O. 1982, Academic Press, London, págs: 19-34.

CAPÍTULO 2

ACTIVIDAD ANTIVIRAL DE LOS POLISACÁRIDOS SULFATADOS DE *NOTHOGENIA FASTIGIATA*

2.1. INTRODUCCIÓN

Los virus pertenecientes a la familia Herpesviridae están ampliamente distribuidos en la naturaleza. Se han caracterizado aproximadamente cien herpesvirus, de los cuales ocho fueron aislados de humanos, entre ellos los serotipos I y II del virus herpes simplex (HSV-1 y HSV-2) y el citomegalovirus humano (HCMV).

Ambos serotipos de HSV se asocian generalmente a lesiones mucocutáneas faciales, oftálmicas o genitales. El hombre es el huésped natural del virus herpes simplex. La sintomatología inicial suele ser leve, pero la enfermedad puede complicarse en algunos casos produciendo meningoencefalitis, erupciones variceliformes y eccema herpético. Las lesiones suelen ser localizadas y reflejan una relación parásito-huésped, donde el virus establece una infección latente en las neuronas del ganglio que inerva el área correspondiente a la lesión primaria. El virus puede reactivarse periódicamente y causar lesiones cutáneas autolimitantes a repetición en la misma región inervada. En los pacientes inmunocomprometidos, como los enfermos de SIDA o los sometidos a transplante de órganos, la recurrencia de HSV-1 y HSV-2 puede causar graves lesiones que son refractarias a los tratamientos reiterados con compuestos antivirales¹.

Si bien el hombre es el único huésped natural del HSV, también son sensibles ratones lactantes y adultos, cobayos, hámsters y conejos, lo que facilita el estudio del virus.

Los componentes de una partícula viral de herpesvirus son: el material genético (ADN); la cápside icosaédrica; el tegumento, compuesto por proteínas que se ubican entre la superficie de la cápside y la envoltura; y la envoltura, consistente en una bicapa lipídica que contiene glicoproteínas.

El ciclo de replicación viral correspondiente a la familia Herpesviridae puede ser dividido en etapas:

1. Adsorción: la infección comienza cuando la envoltura del virus se une a los receptores de la membrana celular. Se ha demostrado que el heparán sulfato es el principal receptor celular para diferentes herpesvirus humanos y animales, entre los cuales se encuentran:

HSV-1, HSV-2, HCMV, virus de pseudo-rabia (herpesvirus porcino) y herpesvirus bovino²⁻⁷.

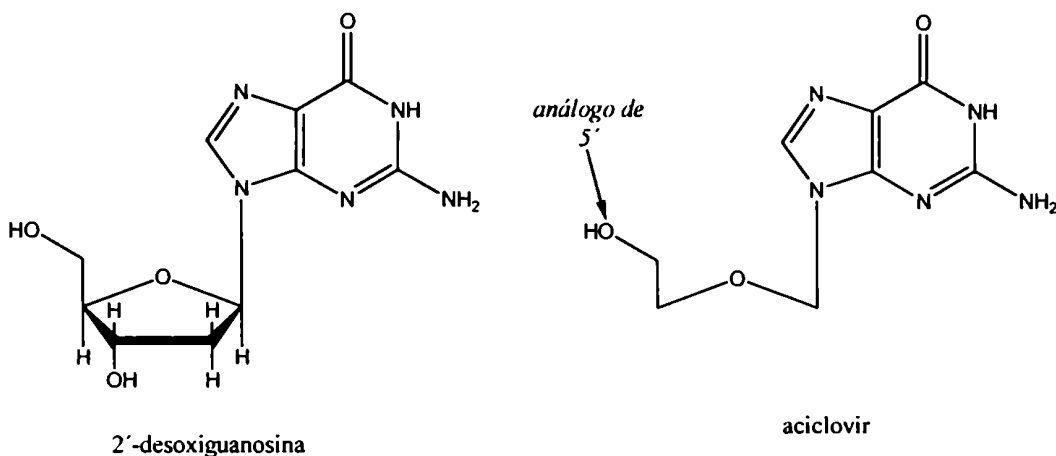
2. Penetración y desnudamiento del ácido nucleico: luego de la unión inicial, la fusión de la envoltura del virus con la membrana plasmática ocurre rápidamente. La nucleocápside es transportada hacia el núcleo de la célula, donde se libera el ADN⁸.
3. Transcripción y traducción de proteínas: el ADN viral es transcrito en el núcleo celular a lo largo del ciclo replicativo por la ARN polimerasa II del huésped, con la participación de distintos factores virales en todas las etapas de la infección.
4. Síntesis del ácido nucleico: el herpesvirus se caracteriza por poseer un gran número de enzimas involucradas en la síntesis del ADN. La mayor parte del ADN viral es sintetizado por un mecanismo denominado “círculo rodante”, por el cual se obtienen concatémeros que son clivados en monómeros y luego incluidos en las cápsides⁹.
5. Ensamblaje de viriones: después que el ADN queda incorporado a la cápside preensamblada, el virus madura y adquiere infectividad al atravesar la membrana nuclear. La envoltura del virus se forma mediante un proceso de brotación, a partir de zonas de la membrana nuclear modificadas por la inserción de proteínas virales.
6. Liberación de viriones: los viriones son transportados a través de vesículas al espacio extracelular.

Para ser considerada como un agente antiviral efectivo, una sustancia debe poseer selectividad: debe ser capaz de inhibir la replicación viral sin alterar las funciones de la célula huésped. La capacidad del HSV de alcanzar un estado de latencia generalmente impide una cura definitiva. En este contexto, es deseable encontrar una droga que tenga un perfil aceptable de efectos secundarios y que produzca beneficios al paciente durante un episodio agudo de la enfermedad, o bien que sea capaz de suprimir episodios recurrentes de la enfermedad. Los mejores resultados de actividad antiviral fueron obtenidos con compuestos análogos de nucleósidos. A su vez, se desarrolló amplia experiencia con las drogas antiherpéticas.

El compuesto antiviral más efectivo contra las infecciones causadas por el HSV es el aciclovir, 9-[(2-hidroxietoxi)metil]guanina (Fig. 2.1), descubierto en la década del 70¹⁰. Se trata de un compuesto análogo de la guanosina, pero con una cadena lateral acíclica en lugar de un ciclo completo de ribosa. Su actividad contra el virus varicela zoster (VZV) es algo menor con respecto al HSV y es relativamente débil contra HCMV. El aciclovir difunde libremente a través de las células, pero sólo se activa en las células infectadas, hecho que le confiere un alto índice de seguridad en el uso clínico. Hay dos aspectos destacables en el

modo de acción del aciclovir: (i) su activación específica por el virus, y (ii) el mecanismo por el cual la droga activada impide la replicación del ADN.

Fig. 2.1. Estructura del aciclovir



Tanto los nucleósidos naturales como sus análogos deben ser fosforilados a su forma trifosfatada para participar en la replicación del ADN. El primer paso de la activación del aciclovir, la formación del monofosfato, es catalizado por la enzima timidina quinasa viral y no por las quinasas celulares¹¹, de ahí su baja toxicidad. Luego, las enzimas celulares son capaces de continuar el proceso hacia la forma trifosfatada.

Durante la replicación del ADN, el aciclovir trifosfato compite con el sustrato natural, dGTP, por la ADN polimerasa y es incorporado al ADN en crecimiento. Dado que este compuesto es más afín por la enzima, queda incorporado preferencialmente a la cadena naciente de ADN. La cadena de aciclovir posee un hidroxilo análogo al 5', que se puede fosforilar, pero carece del hidroxilo 3' presente en el sustrato natural, por lo tanto el nucleótido siguiente no se puede unir y se paraliza la replicación del ADN^{12,13}. Este fenómeno se conoce como terminación obligada de la cadena. Por otra parte, el aciclovir se une irreversiblemente a la polimerasa viral, inactivándola completamente^{14,15}.

Si bien esta droga resultó muy efectiva para reducir la severidad de las infecciones por HSV, la aparición de mutantes resistentes a la misma durante los tratamientos prolongados es una de las razones de la búsqueda continua de nuevos agentes antivirales. La resistencia puede provenir de tres mecanismos¹⁶. El mecanismo más común es la incapacidad de expresar niveles significativos de timidina quinasa, hecho que resulta en un bloqueo del sistema de activación. Estas cepas presentan una virulencia mucho menor en comparación con la cepa salvaje y, en particular, hay pérdida de la neurovirulencia en algunos sistemas animales

modelo¹⁷. Otros mecanismos más sutiles implican alteraciones menores en la timidina quinasa o bien en la ADN polimerasa, de modo que las enzimas son incapaces de reconocer los sustratos relacionados con la droga pero mantienen sus funciones relativamente inalteradas. Estas variantes virales tienen propiedades biológicas más similares a las cepas salvajes^{18,19} y son menos frecuentes, tanto en cultivo como en clínica^{20,21}.

Resulta evidente que, al buscar nuevas drogas antiherpéticas, es ventajoso desarrollar agentes que combatan las cepas resistentes. Para ello, es necesario contar con compuestos que presenten un modo de acción alternativo al aciclovir.

El uso rutinario del método de placas para titular virus animales, llevó a descubrir que los polisacáridos sulfatados, presentes en el agar utilizado para cubrir los cultivos celulares, eran inhibidores de la replicación de algunos de los virus sembrados. Aunque las propiedades antivirales de los polisacáridos sulfatados se conocen desde hace cuarenta años²², el descubrimiento de la inhibición de la replicación del HIV (virus de inmunodeficiencia humano) por heparinas^{23,24} y otras sustancias polianiónicas²⁵⁻²⁷ reactualizó el interés por estos compuestos. Desde 1988, se vio la extensión del espectro de acción de los compuestos polisulfatados a otros virus envueltos²⁸⁻³², incluyendo a virus que emergen como patógenos oportunistas (como HSV y HCMV) en pacientes inmunosuprimidos.

El síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) es el resultado de la infección con HIV tipos 1 y 2. El virus destruye progresivamente los linfocitos T (CD4⁺) y afecta la función de otras células del sistema inmune (macrófagos y linfocitos B). En los pacientes con SIDA, la formación de sincicio (*syncitium*, célula gigante) jugaría un rol importante en la destrucción posterior de los linfocitos T4. Dicha formación es inducida por la interacción entre la glicoproteína gp120, expresada en la superficie de células infectadas con HIV, y el receptor CD4 de células CD4⁺ no infectadas. A su vez, la formación de sincicio lleva a una destrucción selectiva de las células CD4⁺ no infectadas. Los compuestos polisulfatados ofrecen características prometedoras como candidatos potenciales a drogas anti-HIV³³. Tienen la capacidad de inhibir la replicación de HIV en cultivos celulares a concentraciones de 0,01 µg/ml, sin resultar tóxicos para las células huésped a concentraciones hasta 2,5 mg/ml. Algunos de estos compuestos presentan actividad diferenciada contra cepas diferentes de HIV, sugiriendo que existen diferencias marcadas en las moléculas blanco con las que interactúan. No sólo inhiben el efecto citopático de HIV, sino que también evitan la formación de sincicio inducida por este virus. Algunos experimentos llevados a cabo con muestras de dextrán sulfato de peso molecular creciente y con ciclodextrinas sulfatadas, con diferentes

grados de sulfatación, demostraron que la actividad antiviral aumentaba con pesos moleculares y grado de sulfatación crecientes.

No es estrictamente necesario contar con un esqueleto de hidrato de carbono para que los compuestos polisulfatados presenten actividad anti-HIV, ya que existen compuestos con una cadena central de carbonos que también demostraron su actividad *in vitro*. Como se demostró con las ciclodextrinas sulfatadas, este tipo de compuestos pueden actuar sinérgicamente con otras drogas anti-HIV, como azidotimidina (AZT). No se conocen casos de cepas virales que hayan desarrollado resistencia hacia ellos y sí resultaron activos contra mutantes de HIV que se transformaron en resistentes a inhibidores de la transcriptasa reversa, entre ellos el AZT. A partir de estudios llevados a cabo sobre su mecanismo de acción, se concluye que los compuestos polisulfatados ejercen su efecto anti-HIV formando un escudo que cubre los sitios cargados positivamente del loop V3 de la glicoproteína gp120 de la envoltura viral. Este loop V3 es necesario para la adhesión del virus al heparán sulfato de la superficie celular, como sitio de unión primario, antes de unirse más específicamente al receptor CD4 de las células CD4⁺. Este mecanismo también explica de manera general el amplio espectro de actividad de los compuestos polisulfatados contra los virus envueltos. Las diferencias en la susceptibilidad de los diferentes virus envueltos están relacionadas con variaciones en la región de la glicoproteína de la cubierta viral que interactúa con los grupos aniónicos.

Por otra parte, los compuestos polisulfatados presentan ciertas desventajas. Su absorción por administración oral es pobre, como fue demostrado en conejos, aunque su biodisponibilidad puede mejorarse por modificaciones químicas apropiadas. Una ciclodextrina sulfatada modificada por sustitución con grupos bencilo mostró una aceptación oral en conejos, con una vida media en plasma de 4 h. Cuando se administraron por vía intravenosa en conejos, los compuestos polisulfatados presentaron vidas medias desde 20 min hasta 4 h. Cuando se administraron dextrán sulfato y pentosán polisulfato por infusión intravenosa continua a pacientes sintomáticos infectados con HIV, no se encontró actividad contra este virus y los niveles de p24 y CD4 no variaron³⁴. Más aún, una administración intravenosa continua de estos dos compuestos demostró ser tóxica, contraponiéndose al proceso de coagulación y causando trombocitopenia, si bien la actividad anticoagulante podía reducirse drásticamente por modificaciones químicas adecuadas como se probó para la heparina. Queda por demostrar la eficacia de los compuestos polisulfatados en la terapia y/o profilaxis de infecciones retrovirales, tanto en animales como en humanos.

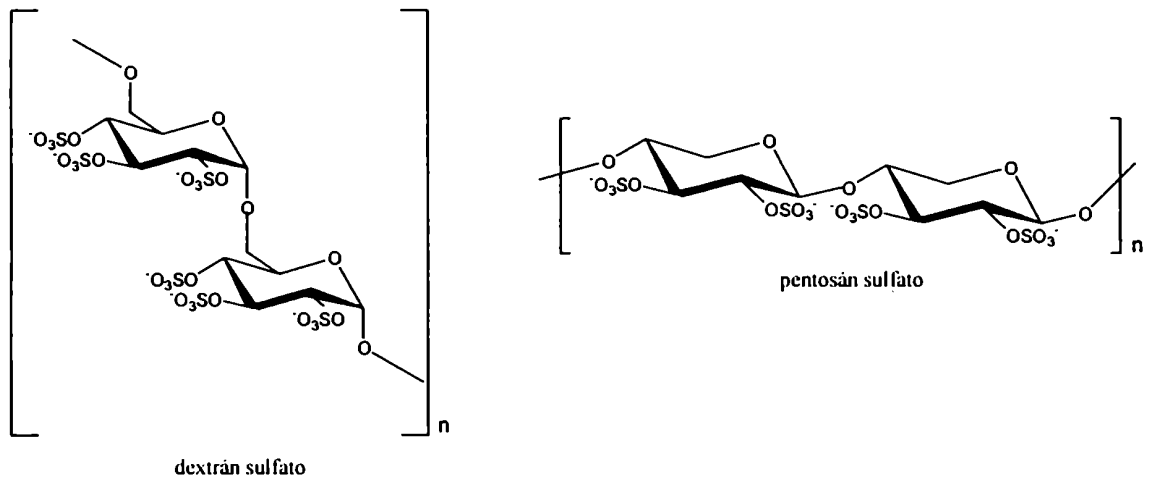
Además de considerar el tratamiento de pacientes que ya fueron infectados con HIV, es importante pensar en la profilaxis y protección contra HIV y/u otras infecciones virales.

Teniendo en cuenta que: (i) la causa de la mayoría de las infecciones con HIV en el mundo entero es la transmisión sexual; (ii) esta transmisión es mediada por células mononucleares que infectan células epiteliales del tracto genital; (iii) los compuestos polisulfatados inhiben eficientemente la adhesión célula-célula; entonces estos compuestos pueden considerarse como potencialmente efectivos en una formulación vaginal para proteger contra una infección con HIV. Lamentablemente, la complejidad de la infección con HIV apagó las esperanzas iniciales de encontrar rápidamente una vacuna. Aún cuando exista una vacuna disponible en el mercado, tardaría años en ser accesible para la mayoría de las mujeres con mayor riesgo de infección. Por eso, no hay que descartar el desarrollo de estrategias alternativas de prevención, una de las cuales consiste en un producto vaginal en forma de gel, crema o espuma. Zacharopoulos y Phillips³⁵ informaron sobre la efectividad de carragenanos para proteger ratones contra la infección con HSV-2. Una solución al 1% en carragenanos kappa, iota o lambda evitaron la infección de casi todos los animales tratados con una dosis viral que infectaba al 50% de los individuos control. Una solución de la misma concentración de carragenano inhibió la infección del 85% de los ratones inoculados con una dosis viral capaz de infectar a la totalidad de los animales control.

A continuación se describen brevemente las características estructurales de los compuestos sulfatados con actividad antiviral empleados como testigos en la evaluación de los polisacáridos de *N. fastigiata*.

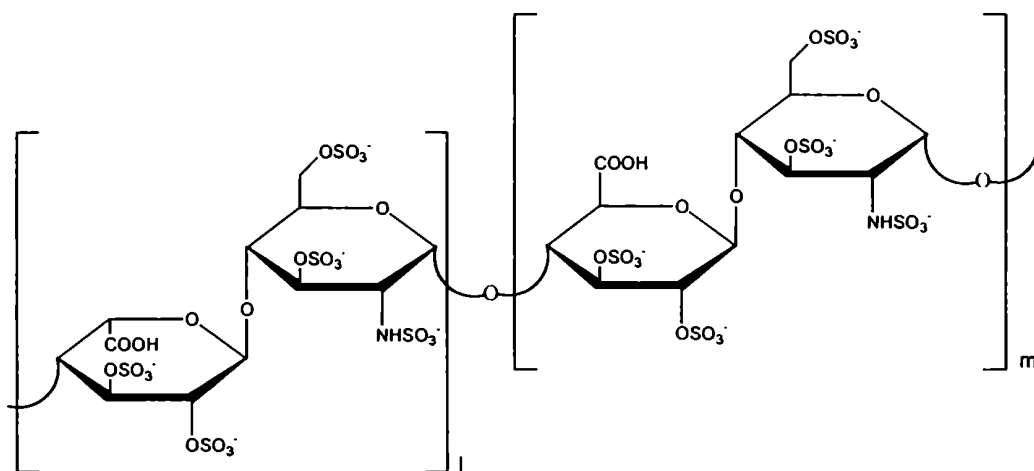
El dextrano es un polisacárido de alto peso molecular producido a partir de sacarosa por varias bacterias, de las cuales *Leuconostoc mesenteroides* y *Leuconostoc dextranicum* son las más importantes comercialmente. La cadena central consiste, en forma predominante, de unidades α -D-glucosa enlazadas por la posición 6; mientras que las ramificaciones ocurren por enlaces α en las posiciones 1 ó 4. Los dextranos pueden diferir en la longitud de la cadena y en el grado de ramificación. Por hidrólisis parcial se obtienen fracciones de distintos pesos moleculares promedio. El dextrán sulfato (Fig. 2.2) se obtiene por sulfatación, con ácido clorosulfónico y piridina, resultando un producto con dos a tres grupos sulfato por unidad de glucosa.

Fig. 2.2. Estructura de dextrán sulfato y pentosán sulfato



El pentosán sulfato (Fig. 2.2) es un producto de semisíntesis obtenido por sulfatación de un D-xilano con enlaces β -(1 $\rightarrow$ 4), logrando prácticamente un 100% de sulfatación.

Fig. 2.3. Estructura de heparina persulfatada



La heparina (Fig. 2.3) es el polisacárido sulfatado natural más importante a nivel terapéutico. Con fines comerciales, se aísla de pulmón bovino o de mucosa intestinal porcina. Las unidades repetitivas poseen pesos moleculares entre 5000 y 40000 Da, están compuestas por residuos alternados de ácido urónico (idurónico o glucurónico) y glucosamina con uniones 1 $\rightarrow$ 4. Las unidades diméricas repetitivas de la heparina son variables, ya que no todos los ácidos glucurónicos están epimerizados a ácido idurónico, las glucosaminas pueden estar parcialmente *N*-acetiladas y las *N*- y *O*-sulfataciones pueden ser incompletas.

2.2. ANTECEDENTES SOBRE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LOS POLISACÁRIDOS SULFATADOS AISLADOS DE *NOTHOGENIA FASTIGIATA*

En el contexto de los antecedentes publicados sobre compuestos polisulfatados, se comenzó el estudio de la actividad de los polisacáridos aislados de *Nothogenia fastigiata* y su mecanismo de acción.

2.2.1. ACTIVIDAD ANTIHERPÉTICA DE F1 Y F7

Damonte *et al.*³⁷ evaluaron la actividad antiherpética de los xilogalactanos F1 y F7 y presentaron evidencia sobre su modo de acción. Se encontró una inhibición de la replicación de HSV-1 cepa F dependiente de la dosis para F1 y F7 (Fig. 2.4). La concentración necesaria para inhibir el número de placas virales en un 50%, IC_{50} , fue de 24,0 y 15,0 $\mu\text{g/ml}$ para F1 y F7 respectivamente. El efecto citotóxico de los polisacáridos se evaluó sobre células Vero (células de riñón de mono verde africano) en el rango de concentraciones permitido por su solubilidad (200 $\mu\text{g/ml}$) y se estimó una concentración requerida para inhibir la viabilidad celular en un 50%, CC_{50} , mayor a 200 $\mu\text{g/ml}$. Por lo tanto, el índice terapéutico –definido como el cociente CC_{50}/IC_{50} – fue estimado como superior a 8,3 para F1 y a 13,3 para F7. Los polisacáridos químicamente desulfatados, F1D y F7D, resultaron totalmente inactivos como inhibidores de HSV-1, aún a una concentración de 100 $\mu\text{g/ml}$.

La actividad antiherpética se evaluó sobre otras cepas de HSV-1, incluyendo dos cepas deficientes en timidinaquinasa (TK⁻) resistentes al aciclovir. Ambos compuestos inhibieron todas las cepas ensayadas en la misma medida aproximadamente, con IC_{50} en el rango 15,0-32,6 $\mu\text{g/ml}$ (Tabla 2.1). Fue por eso que el resto de los experimentos se llevaron a cabo solamente sobre la cepa F de HSV-1. A fin de determinar si F1 y F7 poseían propiedades inactivantes de los virus, se mezcló directamente una suspensión de HSV-1 con cada uno de los polisacáridos disueltos en medio de cultivo de mantenimiento, en concentraciones finales entre 1 y 100 $\mu\text{g/ml}$. Luego de incubar 60 minutos a 37°C, las muestras fueron tituladas. No se encontraron diferencias entre las suspensiones tratadas y sin tratar, aún a concentraciones de xilogalactanos superiores a las IC_{50} determinadas con anterioridad. Por lo tanto, no se encontraron efectos virucidas directos de F1 y F7.

Fig. 2.4. Acción de los polisacáridos sobre la viabilidad celular y la replicación de HSV-1 cepa F en células Vero

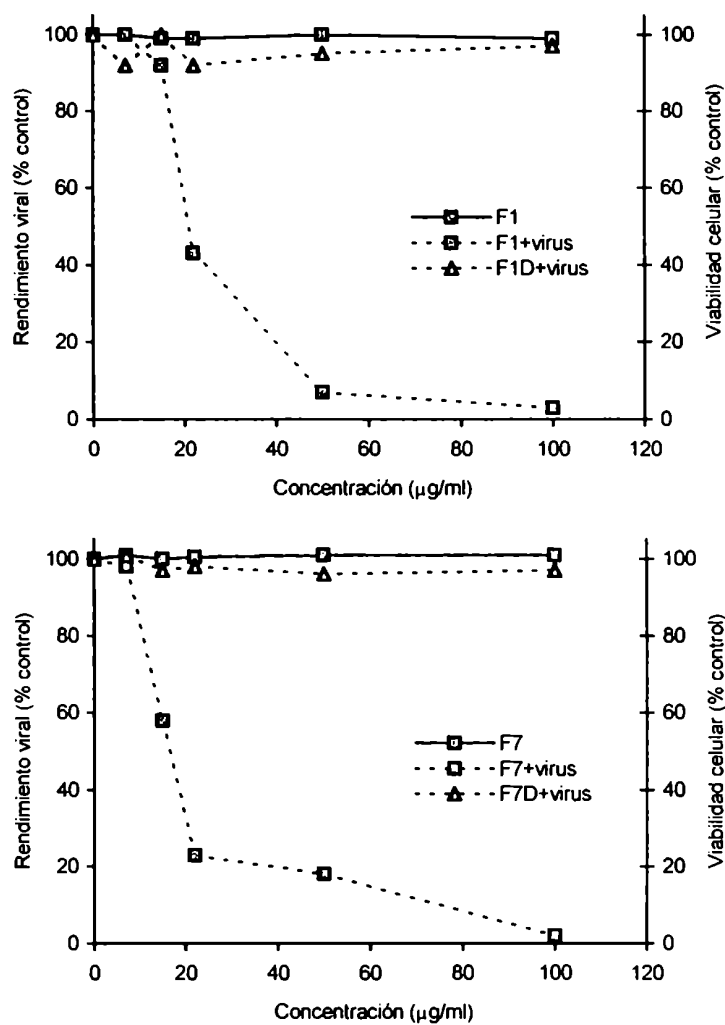


Tabla 2.1. Actividad antiviral de F1 y F7 contra diferentes cepas de HSV-1

Cepa viral	IC ₅₀ (µg/ml)	
	F1	F7
F	24,0	15,0
KOS	21,3	18,7
B2006	24,4	22,5
Field	20,0	32,6

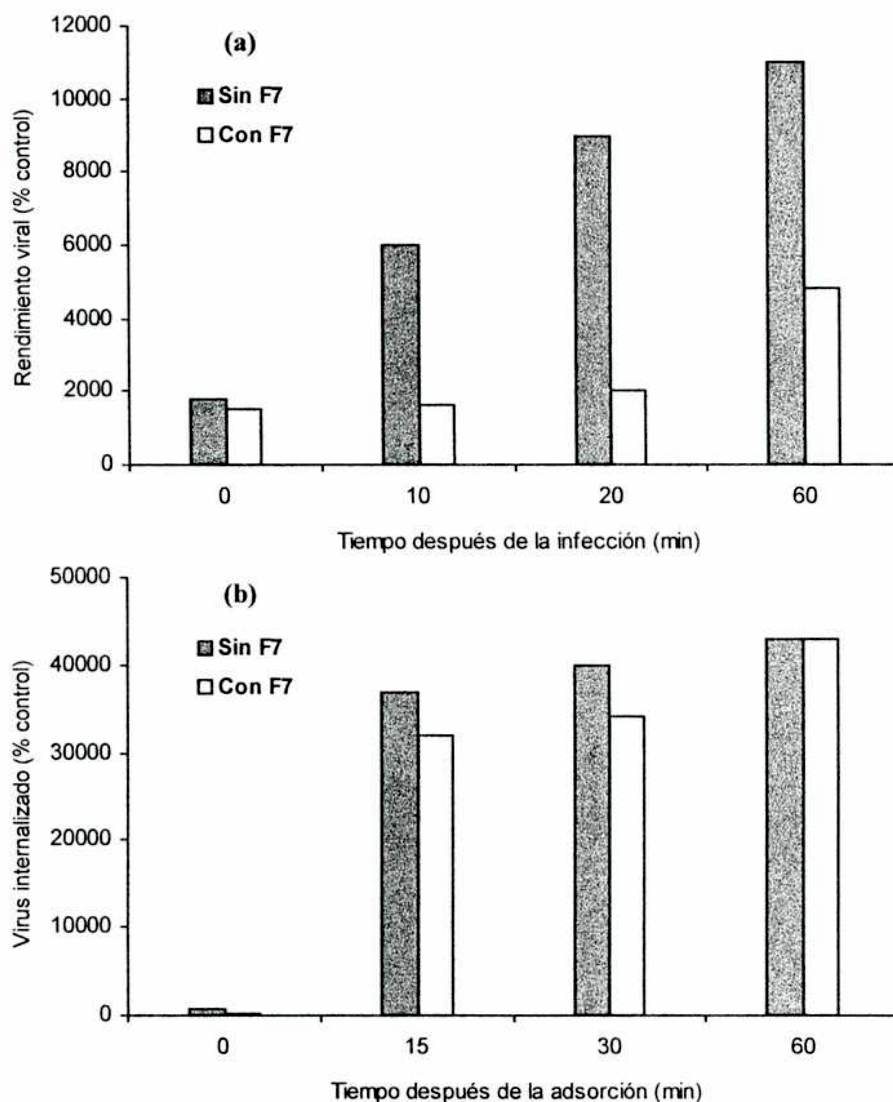
El xilogalactano más activo fue F7, sobre el cual se realizaron estudios posteriores. En una primera aproximación, las células fueron tratadas con esta muestra a tiempos variados durante el ciclo de replicación viral. El tiempo de adición de F7 fue muy importante, porque el

compuesto fue más activo cuando se agregó en las etapas más tempranas del crecimiento (en simultáneo con el virus o durante la primera hora de infección) y no tuvo efecto alguno cuando se lo incorporó luego de 1 hora de infección. Pensando en que el compuesto podía bloquear la adsorción viral, las células Vero fueron expuestas a HSV-1 en presencia o ausencia de F7 y se determinó la infectividad de las células unidas luego de tiempos de incubación variables. Los resultados (Fig. 2.5.a) indicaron que F7 inhibía la adsorción dado que el porcentaje de virus unido disminuyó significativamente en las células infectadas y tratadas con respecto a las células sin tratar.

Con posterioridad se analizó la posibilidad de que F7 ejerciera una acción inhibitoria en un paso post-adsorción, examinando el efecto de F7 sobre la internalización de HSV-1. Primero, las células se infectaron con el virus a 4°C a fin de permitir la adsorción pero no la penetración viral. Después se añadió F7 a los cultivos, elevando la temperatura a 37°C para comenzar la internalización. En estas condiciones se midió la cantidad de virus internalizado, por determinación del número de centros infecciosos después de inactivar los virus extracelulares con proteasa, que resultó similar en las células control y en las tratadas con F7 (Fig. 2.5.b).

En resumen, estos xilogalactanos resultaron activos en IC₅₀ entre 15,0 y 32,6 µg/ml. Al mismo tiempo, no se detectaron efectos citotóxicos en las células Vero a las concentraciones permitidas por sus solubilidad. Los experimentos realizados sugirieron que F7 interfería con un etapa muy temprana del ciclo replicativo de HSV-1. Más específicamente, el efecto inhibitorio sobre la adsorción viral fue confirmado directamente midiendo la cinética de adsorción de los viriones infecciosos en presencia del polisacárido. En contraste, F7 fue completamente inactivo durante el paso subsecuente de internalización y tampoco inactivó al virus directamente, como se determinó por incubación de HSV-1 con F7 antes de inocular las células. Esto sugirió que se requería la presencia simultánea de virus y célula huésped para una acción inhibitoria más efectiva.

Fig. 2.5. a) Efecto de F7 sobre la adsorción de HSV-1 cepa F; b) Efecto de F7 en la internalización de HSV-1 cepa F



2.2.2. ACTIVIDAD ANTIHERPÉTICA DE LOS XILOMANANOS SULFATADOS

Las cinco fracciones de xilomananos sulfatados obtenidas de *N. fastigiata*³⁷ fueron probadas para controlar su actividad antiviral contra HSV-1. Sólo F6 resultó interesante por actividad anti-HSV-1 marcada³², inhibiendo el número de placas virales en un 50% a una concentración de 0,6 µg/ml (IC₅₀). Se analizó entonces su eficacia frente a varios virus ADN y ARN, resultando activa contra HSV-2, HCMV, virus influenza A, virus influenza B, virus respiratorio sincicial (RSV), Junín, Tacaribe, HIV-1, HIV-2 y virus de inmunodeficiencia de simios (SIV) (Tabla 2.2). Esta fracción mostró un espectro de actividad antiviral claramente distinto al de otro polisacárido sulfatado, dextrán sulfato (DS, PM 5000), utilizado como

control. Resultó menos activa frente a HIV-1 y HIV-2, pero tuvo una mejor respuesta frente a SIV. La CC₅₀ de F6 para el crecimiento celular de células Vero, de pulmón de embrión humano (HEL) y HeLa fue de 100 µg/ml; mientras que el crecimiento de las células MT-4 se redujo al 50% a una concentración de F6 de 33 µg/ml.

Tabla 2.2. Efecto inhibitorio de F6 sobre la replicación de varios virus ADN y ARN

Virus	Cultivo celular	IC ₅₀ (µg/ml)		CC ₅₀ (µg/ml) ^a	
		F6	DS	F6	DS
HSV-1 (cepa F)	Vero	0,6	2,1	118	>200
HSV-1 (cepa KOS)	Vero	1,5	1,9		
HSV-2	Vero	2,5	1,8		
HCMV (cepa AD169)	HEL	10	0,4	100	>200
HCMV (cepa Davis)	HEL	2,8	0,1		
Poliovirus	Vero	>50	>200		
Influenza A	MDCK ^b	0,2	8	n.d.	n.d.
Influenza B	MDCK	20	>200		
Parainfluenza 3	Vero	>100	>200		
RSV	HeLa ^c	0,9	1,6	100	>200
Virus Junín	Vero	10	5		
Virus Tacaribe	Vero	7,8	3,2		
HIV-1	MT-4 ^d	13,7	0,1	33	>500
HIV-2	MT-4	13,4	0,03		
SIV	MOLT-4 ^e	0,4	10		

^aDeterminada para la inhibición del crecimiento celular de células Ver, HEL y HeLa y el ensayo MTT para células MT-4.

^bMDCK, células de riñón canino Madin Darby.

^cHeLa, células de adenocarcinoma cervical.

^dMT-4, células T4 transformadas por infección con el retrovirus HTLV-1 (human T-cell leukemia virus type 1).

^eMOLT-4, linfoblastos T en leucemia linfoblástica aguda.

2.2.3. EFECTO DE F6 SOBRE LA ADSORCIÓN VIRAL

Se determinó que la actividad anti-HSV de F6 se expresaba en un estadio temprano del ciclo de replicación de HSV-1³², dado que la replicación se inhibía solamente cuando el compuesto estaba presente durante el período de adsorción viral. A fin de determinar si este polisacárido inhibía la adsorción viral, se hicieron experimentos donde F6 se expuso a las células: (i) sólo durante el período de adsorción, tratamiento A; (ii) sólo después de la adsorción, tratamiento B; (iii) durante y después de la adsorción, tratamiento C. En todos los casos, las células se infectaron con el mismo número de unidades formadoras de placas (PFU) de HSV-1 y se permitió la adsorción viral a 37°C durante 1 h, en presencia o ausencia de F6. Luego se removieron F6 y el virus no adsorbido. Las células fueron cubiertas con medio de cultivo, con o sin F6, e incubadas durante tres días para determinar finalmente el número de placas. El experimento demostró que el compuesto perdía toda su actividad antiviral cuando no estaba presente durante el período de adsorción (Tabla 2.3). Los resultados obtenidos para la presencia de F6 durante la adsorción y durante todo el período de incubación fueron similares.

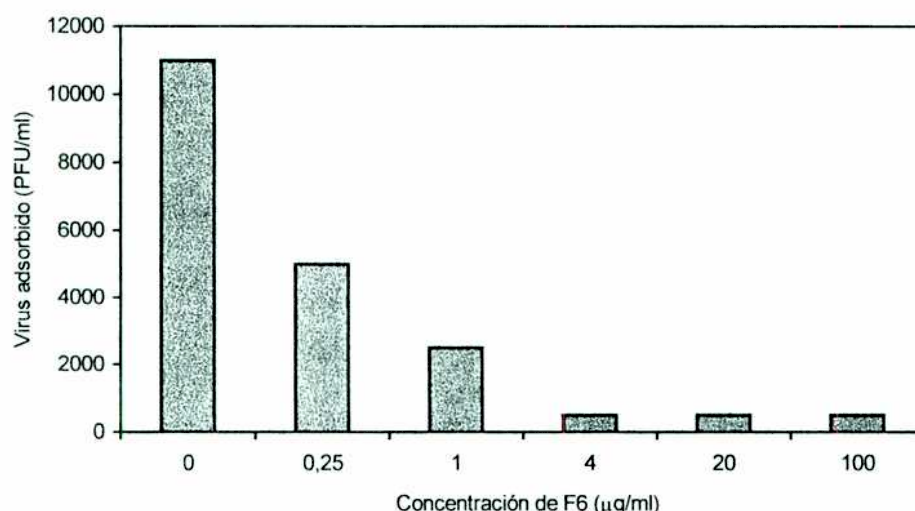
Tabla 2.3. Influencia de la presencia de F6 en períodos de tratamiento variados sobre su actividad anti-HSV-1

Tratamiento	F6 presente (µg/ml)		Número de placas ^a	Inhibición (%)
	durante la adsorción	luego de la adsorción		
Ninguno	0	0	56	0
A	3,3	0	6	90
B	0	3,3	54	4
C	3,3	3,3	8	85

^aCada valor es el promedio de ensayos duplicados.

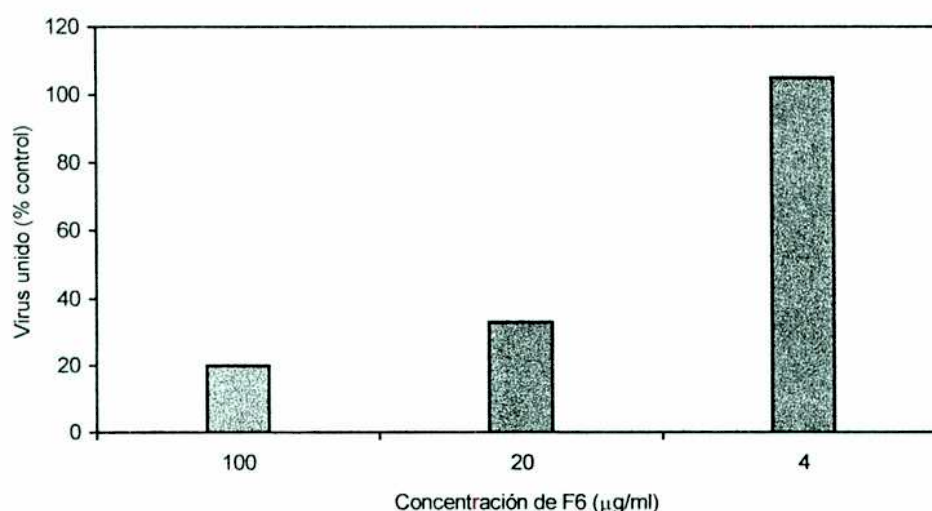
El efecto inhibitorio de F6 sobre el proceso de adsorción a la célula huésped se evaluó monitoreando la unión del virus a las células en presencia del polisacárido. Las células Vero fueron incubadas con HSV-1 durante 30 minutos, a 4°C –para permitir adsorción pero no penetración viral–, en presencia de varias concentraciones de F6. Al cabo de este tiempo se determinó la infectividad de las células unidas a virus (Fig. 2.6). La infectividad asociada a las células Vero resultó inhibida por F6 de una manera dependiente de la concentración, con una IC₅₀ de 0,25 µg/ml.

Fig. 2.6. Efecto de F6 sobre la adsorción de HSV-1



Cuando se midió el efecto de F6 sobre la inhibición de la unión de HCMV (cepa Davis) marcado radioactivamente a células HEL, se obtuvo una IC_{50} de 16 µg/ml (Fig. 2.7); mientras que DS presentó una IC_{50} de 0,8 µg/ml en las mismas condiciones. El experimento se siguió por la radioactividad de las células asociadas luego de 30 minutos de incubación; los datos mostrados son el resultado de tres experimentos separados. Además cuando F6 estaba presente durante la infección a 100 µg/ml, redujo la expresión de antígenos tempranos de HCMV en las 24 h posteriores a la infección en un 96% con respecto a los cultivos control.

Fig. 2.7. Efecto inhibitorio de F6 sobre la unión de HCMV (cepa Davis) a células HEL



A fin de comprobar si F6 también interfería con un evento post-adsorción, se examinó el efecto de F6 sobre la penetración de HSV-1. Las células se infectaron con HSV-1 a 4°C para permitir la adsorción pero no la internalización viral, se incubaron luego con F6 y la temperatura se elevó a 37°C, para iniciar la entrada del virus. En estas condiciones, la cantidad de virus internalizado fue similar en las células tratadas con y sin F6. Por lo tanto, F6 parece no influir en la penetración viral.

En conclusión, el xilomanano F6 demostró ser activo contra una variedad de virus envueltos. Los tipos 1 y 2 de HSV, influenza A, RSV y SIV fueron los más sensibles a F6, con valores de IC₅₀ dos a treinta veces menores que los correspondientes a DS (PM 5000). A su vez, estos valores eran al menos cien veces menores que las concentraciones citotóxicas (Tabla 2.2). Por lo tanto, F6 puede considerarse como un inhibidor selectivo de estos virus. La actividad inhibitoria completa se logró sólo cuando el compuesto estaba presente durante el período de adsorción viral. Las células que habían sido incubadas con F6 durante este período no mostraron unión a HCMV marcado radioactivamente, ni tampoco a HSV-1. Además F6 evitó la expresión de antígenos tempranos de HCMV que se expresan apenas terminada la infección. La internalización, un evento posterior a la unión virus-célula, no fue interferida por el polisacárido sulfatado, por lo cual el mecanismo de acción puede atribuirse a la inhibición de la adsorción viral.

Los resultados encontrados están de acuerdo con estudios previos sobre la actividad antiviral de polisacáridos sulfatados como DS y heparina. El mecanismo de acción de estos compuestos se atribuyó a una interacción de la unión del virus a las células^{2-5,7,40}. Los proteoglicanos de heparán sulfato presentes en la superficie celular podrían actuar como receptores iniciales de HSV tipos 1 y 2, de virus de pseudorrabia, herpes virus bovino y HCMV^{34,37-41}. La heparina interactúa con las glicoproteínas virales que están involucradas en la unión inicial del virus a la célula. De esta manera, por analogía con otros polímeros sulfatados, se propuso que F6 interactuaría con dominios cargados positivamente de estas glicoproteínas, formando un escudo sobre los dominios e impidiendo que el virus se una al heparán sulfato negativamente cargado⁴.

Quedó por elucidar por qué F6 tenía un espectro antiviral distinto de DS, en especial por qué era más activo que DS contra los virus de influenza, RSV y SIV y lo era menos contra HCMV y HIV. Esta actividad diferenciada podría estar relacionada con la distribución de los grupos sulfato sobre la cadena central.

2.2.4. ACCIÓN INHIBITORIA DE F6 SOBRE LA GLICOPROTEÍNA C

Teniendo en cuenta que la glicoproteína C (gC) de HSV-1 está básicamente involucrada en la adhesión del virus al heparán sulfato de la superficie celular⁴², sería probable que la interacción de F6 con gC impidiera la unión inicial del virus a la célula huésped. Se sabe que gC de HSV-1 actúa como un receptor para el tercer componente del complemento C₃b⁴³ y también se propuso un rol de gC en la protección de la envoltura del virus y la infección de la superficie celular contra el daño por el complemento⁴⁴. Esta misma glicoproteína también induce la actividad hemoaglutinante de HSV mediando la unión de HSV al heparán sulfato de la superficie del eritrocito^{45,46}. A fin de confirmar que gC era el blanco principal de la actividad antiherpética de F6, Pujol *et al.*⁴¹ estudiaron el efecto de este compuesto sobre estas propiedades relacionadas con gC de HSV-1.

Está demostrado que gC tiene la habilidad de unirse a C₃b⁴⁷. Para probar el efecto interferente de F6 sobre esta capacidad de unión de gC a C₃b, se empleó una técnica de formación de roseta entre células Vero infectadas por HSV-1 –que exponen gC en la superficie celular– y eritrocitos de carnero recubiertos de C₃b (Fig. 2.8). Se sensibilizaron los eritrocitos con suero subaglutinante de conejo, anti-eritrocito de carnero. Los glóbulos rojos así sensibilizados (EA) se lavaron e incubaron con suero de ratón deficiente en C₅ (para evitar el proceso de lisis subsiguiente a la unión por C₃b). La preparación final, consistente en EAC₃b, se reservó. Por otra parte, se infectaron células Vero con HSV-1 (cepa F) con 24 horas de anticipación y se mezclaron con los eritrocitos recubiertos de C₃b. Se detectó la presencia de rosetas por tinción, requiriendo al menos 5 eritrocitos adheridos a una célula Vero para dar una roseta. A fin de bloquear la unión a C₃b, las células infectadas se pre-incubaron con diferentes concentraciones de F6, antes de incorporar los eritrocitos EAC₃b (Fig. 2.9). La presencia de F6 en la mezcla durante la incubación de las células Vero infectadas con los eritrocitos redujo la formación de rosetas de un modo dependiente de la concentración similar al observado para la inhibición de la producción viral. La concentración requerida para reducir la formación de rosetas en un 50% (IC₅₀) de F6 fue de 0,90 µg/ml, en el mismo orden que la IC₅₀ determinada con anterioridad (0,66 µg/ml). En general, se observaron rosetas con más de 15 eritrocitos unidos a una célula infectada, mientras que ningún glóbulo rojo normal se unió en presencia de F6. Tampoco se formaron rosetas en las mezclas control de células sin infectar cuando se incubaron con eritrocitos, o cuando células infectadas se incubaron con eritrocitos sensibilizados sólo con anticuerpos (pero sin recubrir de C₃b).

Fig. 2.8. Influencia de F6 en la formación de rosetas entre células infectadas con HSV-1 y eritrocitos recubiertos con C₃b

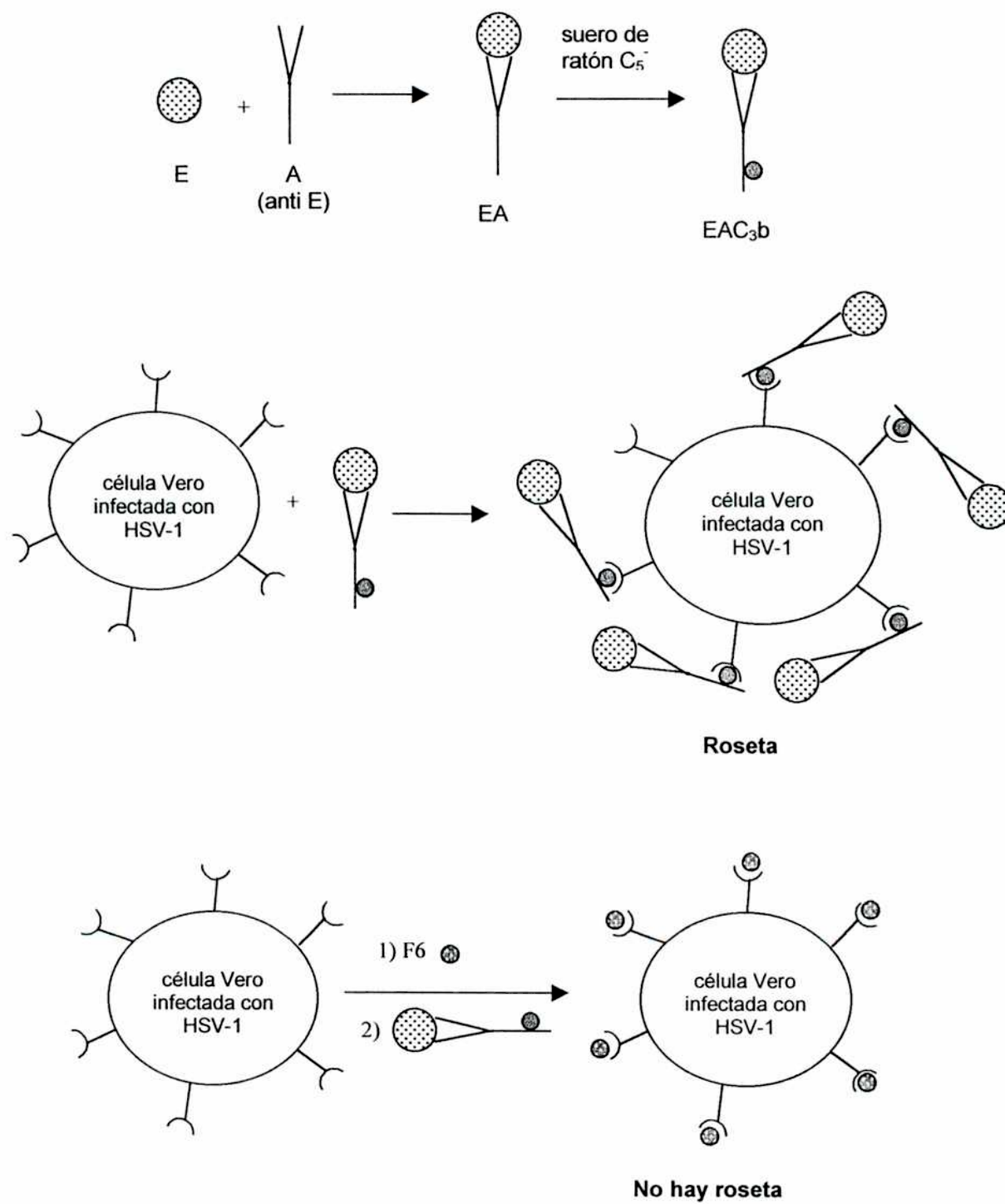
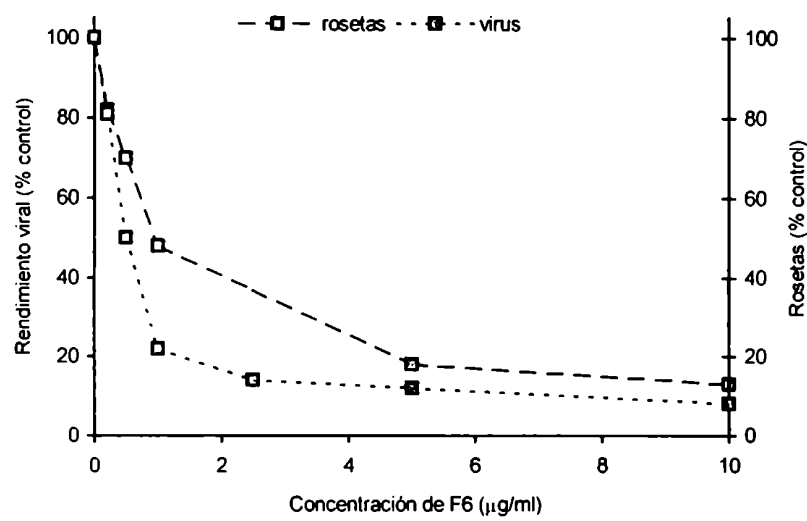


Fig. 2.9. Efecto de F6 sobre el rendimiento viral de HSV-1 y la formación de rosetas



Finalmente, F6 también resultó efectiva en la inhibición de la capacidad hemoaglutinante de HSV-1, una propiedad común a todos las cepas de laboratorio que expresan gC y a las aisladas clínicamente de HSV-1⁴⁶. La menor concentración de F6 que suprimió por completo la hemoaglutinación inducida por 8 unidades hemoaglutinantes de HSV-1 fue de 0.39 $\mu\text{g/ml}$, un valor que también está dentro del orden de la dosis antiviral efectiva.

En conclusión, los resultados confirman que tres actividades mediadas por gC –adsorción viral, unión a C3b y hemoaglutinación– son igual y efectivamente bloqueadas por el xilomanano F6. Esta evidencia es consistente con la interacción de F6, como lo hacen otros polímeros sulfatados, con los dominios cargados positivamente de la glicoproteína, actuando como un escudo para estos dominios y evitando la unión del virus al heparán sulfato cargado negativamente.

Se postula que la interacción de gC con C3b regula negativamente la respuesta innata del huésped a la infección viral. Es claro que gC es esencial para que el virus evada su inactivación mediada por el complemento y la lisis de las células infectadas⁴⁴. Considerando que gC es la única glicoproteína de HSV-1 que se une a C3b, el bloqueo de F6 sobre esta actividad biológica sustenta la teoría de que F6 interactúa con esta glicoproteína.

2.3. BIBLIOGRAFÍA

- ¹Field, A.K.; Biron, K.K. *Clin. Microbiol. Rev.* **1994**, *7*, 1-13.
- ²Kari, B.; Gehrz, R. *J. Virol.* **1992**, *66*, 1761-164.
- ³Mettenleiter, T.C.; Zsak, L.; Zuckerman, F.; Sugg, N.; Kern, H.; Ben-Porat, T. *J. Virol.* **1990**, *64*, 278-286.
- ⁴Neyts, J.; Snoeck, R.; Schols, D.; Balzarini, J.; Esko, J.D.; Schepdael, A.V.; De Clercq, E. *Virology* **1992**, *189*, 48-58.
- ⁵Okazaki, K.; Matsuzaki, T.; Sugahara, Y.; Okada, J.; Hasebe, M.; Iwamura, Y.; Ohnishi, M.; Kanno, T.; Shimizu, M.; Honda, E.; Kono, Y. *Virology* **1991**, *181*, 666-670.
- ⁶Shieh, M.T.; WuDunn, D.; Montgomery, R.I.; Esko, J.D.; Spear, P.G. *J. Cell. Biol.* **1992**, *116*, 1273-1281.
- ⁷WuDunn, D.; Spear, P.G. *J. Virol.* **1989**, *63*, 52-58.
- ⁸Kristensson, K.; Lycke, E.; Roytta, M.; Svennerholm, B.; Vahlne, A. *J. Gen. Virol.* **1986**, *67*, 2023-2028.
- ⁹Roizman, B.; Aurelian, L.; Roane, P.R. *Virology* **1963**, *21*, 482-489.
- ¹⁰Schaeffer, H.; Beauchamp, L.; Miranda, P.; Elion, G.B.; Bauer, D.J.; Collins, P. *Nature* **1978**, *272*, 583-585.
- ¹¹Elion, G.B.; Furman, P.A.; Fyfe, J.A.; de Miranda, P.; Beauchamp, L.; Schaeffer, H.J. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1977**, *74*, 5716-5720.
- ¹²Derse, D.; Cheng, Y.C.; Furman, P.A.; St. Clair, M.H.; Elion, G.B. *J. Biol. Chem.* **1981**, *256*, 11447-11451.
- ¹³Furman, P.A.; McGuirt, P.V.; Keller, P.M.; Fyfe, J.A.; Elion, G.B. *Virology* **1980**, *102*, 420-430.
- ¹⁴Furman, P.A.; St. Clair, M.H.; Spector, T. *J. Biol. Chem.* **1984**, *259*, 9575-9579.
- ¹⁵Reardon, J.E.; Spector, T. *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 7405-7411.
- ¹⁶Darby, G. *Antiviral Chem. Chemother.* **1995**, *6*, 54-63.
- ¹⁷Field, H.J.; Wildy, P. *J. Hyg. Cambridge* **1978**, *81*, 267-277.
- ¹⁸Darby, G.; Field, H.J.; Salisbury, S.A. *Nature* **1981**, *289*, 81-83.
- ¹⁹Larder, B.A.; Darby, G. *Virology* **1985**, *146*, 262-271.
- ²⁰Parker, A.C.; Craig, J.I.O.; Collins, P.; Oliver, N.M.; Smith, I.W. *Lancet* **1987**, *ii*, 1461.
- ²¹Nugier, F.; Colin, J.N.; Aymard, M.; Langlois, M. *J. Med. Virol.* **1992**, *36*, 1-12.
- ²²Nahmias, A.J.; Kibrick, S. *J. Bacteriol.* **1964**, *87*, 1060-1066.

- ²³Ito, M.; Baba, M.; Sato, A.; Pauwels, R.; De Clercq, E.; Shigeta, S. *Antiviral Res.* **1987**, *7*, 361-367.
- ²⁴Baba, M.; Pauwels, R.; Balzarini, J.; Arnout, J.; Desmyter, J.; De Clercq, E. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1988**, *85*, 6132-6136.
- ²⁵Ueno, R.; Kuno, S. *Lancet* **1987**, *i*, 1379.
- ²⁶Baba, M.; Nakajima, M.; Schols, D.; Pauwels, R.; Balzarini, J.; De Clercq, E. *Antiviral Res.* **1988**, *9*, 335-343.
- ²⁷Mitsuya, H.; Looney, D.J.; Kuno, S.; Ueno, R.; Wong-Staal, F.; Broder, S. *Science* **1988**, *240*, 646-649.
- ²⁸Baba, M.; Snoeck, R.; Pauwels, R.; De Clercq, E. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1988**, *32*, 1742-1745.
- ²⁹Lüscher-Mattli, M.; Glück, R. *Antiviral Res.* **1990**, *14*, 39-50.
- ³⁰Hosoya, M.; Balzarini, J.; Shigeta, S.; De Clercq, E. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1991**, *35*, 2515-2520.
- ³¹Witvrouw, M.; Desmyter, J.; De Clercq, E. *Antiviral Chem. Chemother.* **1994**, *5*, 345-359.
- ³²Damonte, E.; Neyts, J.; Pujol, C.A.; Snoeck, R.; Andrei, G.; Ikeda, S.; Witvrouw, M.; Reymen, D.; Haines, H.; Matulewicz, M.C.; Cerezo, A.; Coto, C.E.; De Clercq, E. *Biochem. Pharmacol.* **1994**, *47*, 2187-2192.
- ³³Witvrouw, M.; Pannecouque, C.; De Clercq, E. *Carbohydrates in Drug Design, Cap 5: Polisulfates: Chemistry and potential as antiviral drugs*. Editores: Witczak, Z.J.; Nieforth, K.A. 1997, Marcel Dekker Inc., New York, USA, págs. 157-207.
- ³⁴Lorentsen, K.J.; Hendrix, C.W.; Collins, J.M.; Kornhauser, D.M.; Petty, B.G.; Klecker, R.W.; Flexner, C.; Eckel, R.H.; Lietman, P.S. *Ann. Intern. Med.* **1989**, *111*, 561-566.
- ³⁵Zacharopoulos, V.R.; Phillips, D.M. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **1997**, *4*, 465-468.
- ³⁶Damonte, E.B.; Matulewicz, M.C.; Cerezo, A.S.; Coto, C.E. *Chemotherapy* **1996**, *42*, 57-64.
- ³⁷Matulewicz, M.C.; Cerezo, A.S. *Carbohydr. Polym.* **1987**, *7*, 121-132.
- ³⁸Ito, M.; Baba, M.; Sato, A.; Pauwels, R.; De Clercq, E.; Shigeta, S. *Antiviral Res.* **1987**, *7*, 361-367.
- ³⁹Schols, D.; Pauwels, R.; Desmyter, J.; De Clercq, E. *Virology* **1990**, *175*, 556-561.
- ⁴⁰Sawitzky, D.; Hampl, H.; Habermehl, K.O. *J. Gen. Virol.* **1990**, *71*, 1221-1225.
- ⁴¹Pujol, C.A.; Matulewicz, M.C.; Cerezo, A.S.; Damonte, E.B. *Phytomedicine* **1998**, *5*, 205-208.
- ⁴²Herold, B.C.; WuDunn, D.; Soltys, N.; Spear, P.G. *J. Virol.* **1991**, *65*, 1090-1098.

- ⁴³Friedman, H.M.; Cohen, G.H.; Eisenberg, R.J.; Seidel, C.A.; Cines, D.B. *Nature* **1984**, *309*, 633-635.
- ⁴⁴Hidaka, Y.; Sakai, Y.; Toh, Y.; Mori, R. *J. Gen. Virol.* **1991**, *72*, 915-921.
- ⁴⁵Trybala, E.; Larski, Z.; Wisniewski, J. *Arch. Virol.* **1990**, *113*, 89-94.
- ⁴⁶Trybala, E.; Svennerholm, B.; Bergström, T.; Olofsson, S.; Jeansson, S.; Goodman, J.L. *J. Virol.* **1993**, *67*, 1278-1285.
- ⁴⁷Smiley, M.L.; Hoxie, J.A.; Friedman, H.M. *J. Immunol.* **1985**, *134*, 2673-2678.

PARTE II

ANÁLISIS ESTRUCTURAL DE POLISACÁRIDOS DE *NOTHOGENIA FASTIGIATA*

CAPÍTULO 3

ANÁLISIS ESTRUCTURAL DEL SISTEMA DE XILOMANANOS SULFATADOS DE *NOTHOGENIA FASTIGIATA*

3.1. EXTRACCIÓN, AISLAMIENTO Y FRACCIONAMIENTO



A fin de llevar a cabo el análisis estructural exhaustivo de los xilomananos de *Nothogenia fastigiata* (Bory) Parkinson¹, se comenzó este trabajo de Tesis realizando un nuevo procedimiento de extracción y fraccionamiento según el procedimiento descrito con anterioridad² (Sección 1.4). En líneas generales, este nuevo fraccionamiento (Tabla 3.1, Apéndice A.1) fue coherente con el previo (Tabla 1.6). A fin de asegurar un intercambio efectivo de los cationes alquiltrimetilamonio por sodio, las fracciones F2, F4, F5 y F6 se trataron con soluciones de cloruro de sodio – cada una en la concentración correspondiente a su redisolución– dando las fracciones F2', F4', F5' y F6'.

La composición en hidratos de carbono de los polisacáridos de partida y de los tratados con cloruro de sodio resultaron similares, a pesar de la recuperación incompleta del material. En particular, se mantuvo el contenido de galactosa en F2' y F4'.

El análisis de la Tabla 3.1 sugiere que la solubilización en soluciones de cloruro de sodio de las sales de cetrimida de los xilomananos sulfatados dependió fundamentalmente del contenido de ramificaciones simples de D-xilosa. Sólo aquellas fracciones con niveles de xilosa similares se separaron de acuerdo con su grado de sulfatación. Así por ejemplo, F2' y F3, con porcentajes molares similares de xilosa, se resolvieron según su contenido de sulfato; F3 y F4', con el mismo porcentaje de sulfato, se fraccionaron siguiendo un orden decreciente de ramificaciones; F5' y F6', verdaderos mananos, presentaron una redisolución dirigida por el contenido de sulfato.

Tabla 3.1. Composición, rendimiento y peso molecular de los xilomananos sulfatados

<i>Xilo-manano</i>	NaCl	Rend.	Sulfato	Proteína	Peso molecular	Xil:S:Man ^a (relación molar)	Composición en monosacáridos (% molar)		
							Man	Xil	Gal
	(M)	(%)	(% SO ₃ Na)	(%)					
F2	1,0	5,8 ^b	n.d.	n.d.	11000		61	23	16
F2'	1,0	69,7 ^c	17,6 (~14) ^d	10,1	12000	34:59:100	62	22	16
F3	1,5	10,8	26,1 (~29)	10,6	39100	28:84:100	74	20	6
F4	2,0	8,7	n.d.	n.d.	35500		78	18	4
F4'	2,0	59,9	26,0 (~32)	4,8	21900	20:72:100	82	16	2
F5	3,0	18,2	n.d.	n.d.	14300			n.d.	
F5'	3,0	32,2	15,3 (~16)	5,9	6400	2:31:100	98	2	
F6	4,0	14,9	31,3	n.d.	n.d.			n.d.	
F6'	4,0	39,8	31,7 (~33)	6,6	30000	2:82:100	98	2	-

^aXilosa:sulfato:manosa.

^bRendimientos: porcentajes del total recuperado (52,7 % sobre polisacáridos solubles en agua).

^cRendimientos de F2'-F6': porcentajes de masa recuperada luego del tratamiento con soluciones de NaCl de la concentración indicada.

^dEntre paréntesis se indica el porcentaje calculado a partir del análisis por metilación.

Las rotaciones ópticas de F3, F5'y F6' resultaron similares cuando se midieron en agua, DMSO, agua-DMSO 1:1, NaCl 0,1 M y NaCl 0,5 M, a saber: F3, $[\alpha]_D$ +13,1 a +18,6°; F5', $[\alpha]_D$ +74,3 a +79,5°; F6', $[\alpha]_D$ +55,2 a +64,2°. Las correspondientes a F2'y F4' se determinaron solamente en agua y en NaCl 0,5 M, siendo los valores respectivos: F4', +21,7 y +23,3°; F2', -1,3 y 13,0°. El manano F5' desulfatado había presentado una rotación óptica en agua de +93,2°, similar a la informada para el metil 3-(*O*- α -D-manopiranosil- α -D-manopiranosido) (+94,8°, en agua)³. La rotación medida en agua para el producto de desulfatación de F6', F6'Des (ver Sección siguiente), fue algo menor: +80,3°, pero al aumentar la fuerza iónica el valor alcanzó prácticamente al del disacárido (+92,6°, NaCl 0,1 M). Estos datos sugirieron que estos xilomananos poseen una conformación al azar en solución y que los grupos sulfato presentes no son determinantes de una forma más ordenada.

En la Tabla 3.2 se muestran el contenido de sulfato, la composición de los cationes que actúan como contraiones de los grupos sulfato y el grado de polimerización determinado por un método químico (cuantificación colorimétrica del contenido de extremos reductores⁴). Teniendo en cuenta que el fraccionamiento de estos polisacáridos se efectuó por precipitación

con cetrimida y redisolución en soluciones de cloruro de sodio, el predominio de contraiones calcio y magnesio resultó completamente inesperado.

Tabla 3.2. Composición y grado de polimerización promedio de los xilomananos de *N. fastigiata*

<i>Xilo-manano</i>	Sulfato (% SO ₃ Na)	Contraión (% equiv)			Masa promedio de cada unidad ^a	DP promedio ^b
		Ca ²⁺	Mg ²⁺	Na ⁺		
F2'	17,6	73,8	17,2	9,0	271	44
F3	26,1	48,1	20,8	31,0	288	136
F4'	26,0	72,5	22,1	5,4	264	83
F5'	15,3	49,7	15,0	35,3	197	32
F6'	31,7	77,1	17,6	5,2	249	120

^aCalculado a partir de las relaciones molares xilosa:manosa:sulfato de la Tabla 3.1.

^bCalculado a partir de los pesos moleculares de la Tabla 3.1.

3.2. METILACIÓN Y DESULFATACIÓN-METILACIÓN

El análisis estructural de los polisacáridos comenzó con un estudio por metilación. Teniendo en cuenta que F5' y F6' tenían relaciones molares xilosa:sulfato:manosa de 2:31:100 y 2:82:100 respectivamente, se tomó a estas fracciones como punto de partida para seguir un orden de complejidad creciente. Ambos mananos revelaron la presencia de una cadena lineal de residuos de D-manosa con uniones 1→3, con muy baja proporción de ramificaciones simples de D-xilosa (Tabla 3.3), por lo tanto casi todas las unidades sustituidas derivaban de residuos sulfatados. El manano F5' presentó un grado de sulfatación del 33 %, con respecto al total de las unidades de manosa, con sustitución casi exclusiva en la posición 6. En cambio, F6' estaba sulfatado tanto en la posición 2 (56 %) como en la 6 (37 %), además de existir la posibilidad de proporciones menores de unidades disulfatadas. En ambas fracciones se consideró que las ramificaciones simples de xilosa estaban ubicadas sobre la posición 2 de las unidades de manosa, por extensión con respecto a los resultados observados para F2' y F4', como se verá más adelante.

La desulfatación de F6', con cloruro de hidrógeno en metanol, dio un producto –F6'Des– poco soluble en agua, con un 87 % de reducción de los grupos aniónicos (Tabla 3.3) y escasa degradación (PM 11600). El mismo tratamiento aplicado sobre F2' y F4' permitió obtener F2'Des y F4'Des con 75 y 77 % de desulfatación respectivamente (Tabla 3.4).

Tabla 3.3. Composición (moles por 100 moles de manosa) de F3, F5'y F6' permetilados y F6'desulfatado permetilado

Monosacárido	F3 ^a	F5'	F6'	F6' Des ^b
2,3,4-Me ₃ Xil	31	5	3	5
2,4,6-Me ₃ Man	7	61	9	76
2,3,6-Me ₃ Man		tr	tr	
4,6-Me ₂ Man	45	3	52	7
2,4-Me ₂ Man	15	29	31	6
6-Me Man	4		1	1
4-Me Man	29	tr	5	
2-Me Man	tr	2	tr	
Man	-	5	2	3

^aCon fines comparativos (Ref. 2).

^bF6' Des contenía además 2,6-di-*O*-metilmanosa (7 %).

Tabla 3.4. Composición, rendimiento y peso molecular de los xilomananos desulfatados

Xilo-manano	Sulfato	Xil:S:Man ^a	Composición en monosacáridos		
			(% molar)		
	(% SO ₃ Na)	(relación molar)	Man	Xil	Gal
F2' Des	4,4 (~) ^d	51:12:100	57	29	13
F4' Des	5,8 (~)	29:12:100	76	22	2
F6' Des	4,0 (~)	2:7:100	98	2	-

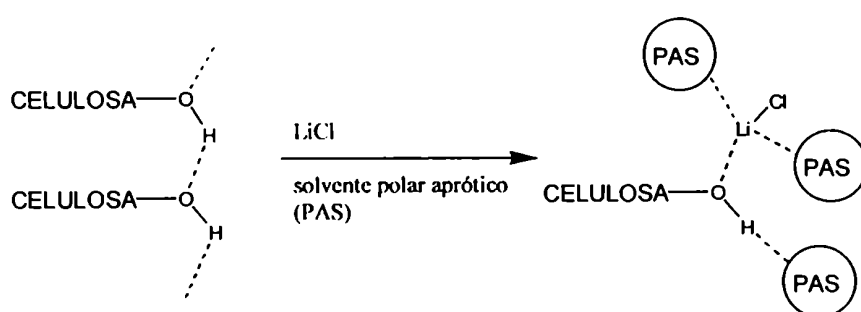
^aXilosa:sulfato:manosa.

^dEntre paréntesis se indica el porcentaje calculado a partir del análisis por metilación.

La metilación por el método de Hakomori⁵, con metilsulfinilmetanuro de sodio (metilsulfinilcarbanión) y yodometano en dimetilsulfóxido, de las sales de trietilamonio⁶ de F2' dio un alto porcentaje de submetilación. Se probaron entonces N-óxido de 4-metilmorfolina (monohidrato)-DMSO⁷ y cloruro de litio-DMSO⁸ como sistemas de solventes propuestos para la alquilación de celulosa, manteniendo la misma base y el agente metilante. Nuevamente se obtuvo un alto grado de submetilación. Para la alquilación de la celulosa o cualquier otro polisacárido se necesitan sistemas disolventes que formen una solución verdadera, ya que debe evitarse cualquier efecto que bloquee a los grupos hidroxilo. Además de su basicidad, el anión dimetilsulfinilmetanuro es reactivo frente a grupos carbonilo y es

sensible a la temperatura. Es por eso que no son convenientes sistemas de solventes que contengan agua o grupos carbonilo para la alquilación de celulosa con este carbanión. Joseleau *et al.*⁷ propusieron al *N*-óxido de 4-metilmorfolina (MMNO), en sus varias formas de hidratación, como solvente verdadero no degradativo de paredes celulares de plantas y de polisacáridos de origen bacteriano, aunque no postularon ningún mecanismo de solvatación. Petruš *et al.*⁸ propusieron el uso de cloruro de litio en DMSO como un solvente para celulosa compatible con procesos eficientes de alquilación. La capacidad de una solución de cloruro de litio en un solvente polar aprótico para disolver a la celulosa puede atribuirse a la interacción de los átomos de litio –pertenecientes a pares iónicos solvatados y no disociados en una molécula de cloruro de litio– con los átomos de oxígeno de los hidroxilos de la celulosa. A concentraciones suficientemente altas, estas interacciones rompen las uniones hidrógeno entre cadenas de celulosa. La acción cooperativa del solvente aprótico parece sólo incrementar este efecto, es decir, el efecto principal es producido por el cloruro de litio no disociado en solución. Las propiedades características del cloruro en el par iónico LiCl relacionadas con la disolución de la celulosa estarían vinculadas con el catión litio más electropositivo, comparado con el bromuro de litio sin disociar, dada la naturaleza de base dura del cloruro (con respecto al anión polarizable bromuro como base blanda). La existencia simultánea de una unión hidrógeno débil por el cloruro sería menos probable, porque la unión hidrógeno-cloro en un solvente aprótico, fuertemente polar y con oxígeno, es muy poco probable. En resumen, los autores proponen que los átomos de litio, de moléculas de cloruro de litio sin disociar en un solvente aprótico polar, interactúan con los átomos de oxígeno de los grupos hidroxilo de una manera análoga a la unión hidrógeno que ocurre entre los protones del agua y los hidroxilos. A diferencia del agua, el cloruro de litio es capaz de interrumpir la formación de uniones hidrógeno entre cadenas de celulosa para lograr su solubilización.

Fig. 3.1. Solvatación de la celulosa por LiCl-DMSO



La metilación completa de F2' y F2'Des se logró con un procedimiento secuencial, aplicando primero una metilación según el método de Haworth⁹, según la técnica descrita por Cerezo¹⁰, seguida de una permetilación según Hakomori. Los datos no pudieron ser interpretados considerando al material como un xilogalactomanano sulfatado, sino como una muestra formada por un complejo de un xilano (7-8 % molar para F2' y 9-10 % molar para F2'Des), un galactano (F2', 10-11 %; F2'Des, 15-16 %) y un xilomanano¹¹ (F2', 81-83 %; F2'Des, 74-76 %) (Tabla 3.5). De acuerdo con este modelo, los residuos de xilosa dimetilados derivaban del xilano tipo “uniones mixtas”, las galactosas provenían del galactano de la familia del agar poco sustituido con xilosa y sulfato, mientras que las manosas y la xilosa trimetilada derivaban del xilomanano.

Tabla 3.5. Composición (moles %) de F2', xilomanano F2', F2'Des y xilomanano F2'Des permetilados

Monosacárido	F2'	Xilomanano F2'	F2'Des	Xilomanano F2'Des
2,3,4-Me ₃ Xil	25	29	18	23
2,3,4,6-Me ₄ Gal			1	
2,4-Me ₂ Xil	1		2	
2,3-Me ₂ Xil	7		8	
2,4,6-Me ₃ Man	8	10	32	43
2,4,6-Me ₃ Gal	7		7	
2,3,6-Me ₃ Man	1	2		
2,3,6-Me ₃ Gal	2		5	
4,6-Me ₂ Man	29	37	18	24
2,6-Me ₂ Gal	1		2	
2,4-Me ₂ Man	4	5	2	3
6-Me Man	1	1	2	2
2-Me Gal	1			
4-Me Man	11	14	2	3
Man	2	2	1	2

Tabla 3.6. Composición (moles %) de F4', xilomanano F4', F4'Des y xilomanano F4'Des permetilados

Monosacárido	F4'	Xilomanano F4'	F4'Des	Xilomanano F4'Des ^a
2,3,4-Me ₃ Xil	12	12	19	20
2,4,6-Me ₃ Man	5	5	47	48
2,4,6-Me ₃ Gal	3		1	
2,3,6-Me ₃ Gal	1			
4,6-Me ₂ Man	43	45	23	24
2,4-Me ₂ Man	10	10		
6-Me Man	2	3	2	1
2-Me Man	1	1		
4-Me Man	21	22		
Xil			1	
Man	2	2	7	7

^aEn F4' se detectó además Glc (1 %).

La fracción F4' presentó un comportamiento similar frente a la metilación, pero el tratamiento en dos etapas aplicado a F2' permitió cumplir el objetivo. En cambio, F4'Des pudo metilarse en un solo paso siguiendo el procedimiento de Hakomori. Esta vez, no se observó la presencia de xilano y solamente una pequeña proporción de galactano fue detectada (1-3 %) en los productos metilados derivados de F4' (Tabla 3.6). En las Tablas 3.5 y 3.6 puede observarse un pequeño porcentaje de submetilación que impidió hacer un balance riguroso de los sustituyentes.

3.3. ESPECTROSCOPIA INFRARROJA

La espectroscopía infrarroja (IR) resulta útil para el estudio de polisacáridos sulfatados debido a que pueden observarse bandas a: (i) 1240 cm⁻¹, correspondientes a la vibración de tensión S=O; y (ii) 800-900 cm⁻¹, correspondientes a la tensión C—O—S, es decir, la de la unión C—O modificada por la presencia de la unión O—S y viceversa¹². Más específicamente, en monosacáridos sulfatados la banda a 1240 cm⁻¹ indica la presencia de grupos sulfato en general; mientras que la sulfatación sobre hidroxilos primarios (sobre C-6) origina una banda a 820 cm⁻¹, en hidroxilos secundarios ecuatoriales (C-3 ó C-4 de manosa) aparece a 830 cm⁻¹ y en hidroxilos secundarios axiales (C-2 de manosa) a 850 cm⁻¹. Estas

señales pudieron ser confirmadas también en polisacáridos^{13,14}. La aplicación de esta espectroscopía se vio impulsada por el desarrollo de la espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FT-IR). Así por ejemplo, en 1993 Chopin y Whalen¹⁵ pudieron diferenciar distintos tipos de carragenanos por la presencia o ausencia de bandas características, con muestras de alga molida sin extracción previa.

El análisis por IR de las fracciones F3 y F5 realizado en 1987² mostró una banda ancha de absorción a 850 cm⁻¹, indicando el predominio de grupos sulfato en posiciones axiales pero sin la resolución suficiente para discriminar entre grupos sulfato primarios o ecuatoriales. Los espectros FT-IR de F6' y F3 (provenientes del fraccionamiento efectuado durante este trabajo de investigación) mostraron señales anchas con máximo a 843 cm⁻¹ (sulfato secundario axial) y un hombro a 815-820 cm⁻¹ (sulfato primario). La segunda derivada de cada gráfico permitió distinguir dos picos a 843 y 825 cm⁻¹. El espectro de F5' mostró una banda ancha centrada en 802 cm⁻¹, mientras que el cálculo de la segunda derivada reveló una absorción fuerte a 823 cm⁻¹ (sulfato primario). Las fracciones F2' y F4' presentaron también bandas anchas con máximo a 843 cm⁻¹ y un hombro a 820-824 cm⁻¹. Estos resultados están de acuerdo con el esquema de sulfatación delineado por el análisis por metilación y desulfatación-metilación: sólo F5' presentaba sulfatación exclusivamente en C-6, las demás fracciones estaban sulfatadas en C-6 y C-2 en proporciones considerables.

3.4. ESPECTROSCOPIA DE RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

La asignación de los espectros RMN de las fracciones F2', F3, F4'-F6', desarrollado en las Secciones 3.4.2 y 3.4.4, se llevó a cabo tomando como base los antecedentes bibliográficos de las Secciones 3.4.1 y 3.4.3 sobre mananos, xilomananos y oligosacáridos relacionados.

3.4.1. RMN ¹³C. INTRODUCCIÓN

La asignación de los espectros de RMN ¹³C de las fracciones F2'-F6' se realizó teniendo en cuenta los antecedentes bibliográficos que se indican a continuación sobre mananos, xilomananos y oligosacáridos relacionados.

En 1982, Hara *et al.*¹⁶ asignaron el espectro RMN ¹³C de un D-manano con uniones α-(1→3) aislado del hongo *Dictyophora indusiata* Fisch.: 102,8 (C-1); 70,6 (C-2); 79,0 (C-3); 67,1 (C-4); 74,4 (C-5); 62,1 ppm (C-6) (a 68°C; desplazamientos químicos relativos a 1,4-dioxano, 67,4 ppm). En 1988, Hara y col. continuaron trabajando con dos fracciones de *D.*

*indusiata*¹⁷, T-3-M y T-3-M', cuyas estructuras correspondían a D-mananos lineales con enlaces α -(1→3). La fracción T-3-M era insoluble en agua y DMSO, pero podía disolverse en hidróxido de sodio de concentración mayor a 2 M; su rotación óptica fue medida en este solvente ($[\alpha]_D^{17} +119,2$). La estructura de la cadena lineal de manosa se determinó por metilación con metilsulfinilcarbanión y yoduro de metilo sobre el material disuelto en MMNO. La segunda fracción, T-3-M', mostró señales a 20,5 y 170,3 ppm en su espectro RMN ¹³C consistentes con la presencia de grupos acetilo, cuya cuantificación demostró que se encontraban en una abundancia de ~1,8 %. Los desplazamientos químicos correspondientes a la cadena de manosa sin sustituir se asignaron a: 101,6 (C-1); 69,4 (C-2); 78,5 (C-3); 65,9 (C-4); 73,6 (C-5); 61,4 ppm (C-6), para un espectro registrado en Me₂SO-*d*₆ a 60°C, con TMS como referencia externa. Observaron además picos a 63,4 y 70,6 ppm que atribuyeron a C-6 y C-5 de unidades 6-*O*-acetiladas. Por adición de NaOD, estas dos últimas señales desaparecieron y las atribuidas al grupo acetilo se desplazaron hacia campos más bajos: 25,0 (CH₃ de CH₃COONa) y 175,1 ppm (C carboxílico de CH₃COONa).

Tabla 3.7. Asignación del espectro de RMN ¹³C de 3-*O*-(α -D-manopiranosil)-D-manopiranosas^a

Residuo	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6
α -D-Man (r) ^b	94,52	70,85	78,41	66,99	73,06	61,42
β -D-Man (r)	94,03	71,39	80,86	66,51	76,44	61,42
α -D-Man	102,79	70,85	70,50	67,28	73,77	61,42

^aDesplazamientos relativos a tetrametilsilano (estándar interno).

^bExtremo reductor.

En 1983, Awad *et al.*¹⁸ publicaron una síntesis del disacárido 3-*O*-(α -D-manopiranosil)-D-manopiranosas e identificaron los desplazamientos químicos correspondientes a todos los carbonos (Tabla 3.7).

Allerhand y Berman¹⁹ publicaron un método de aproximación sistemática al análisis de espectros RMN ¹³C de hidratos de carbono complejos, comenzando por residuos de α -D-manopiranosas en oligosacáridos. Presentaron un método para calcular los desplazamientos químicos de cualquier residuo de α -D-manopiranosas unido a otros (en C-1, C-2, C-3, C-4, C-5, C-6 o combinaciones), tomando como base los desplazamientos químicos de ciertos manooligosacáridos. Para ello, presentaron dos conjuntos de datos: (i) las señales de α -D-manopiranosas terminales no reductoras involucradas en uniones 1→2, 1→3, 1→4, 1→5,

1→6 a otras α-D-manopiranosas; y (ii) los efectos de la sustitución con α-D-manopiranosas sobre C-2, C-3, C-4, C-5 y C-6 de otra α-D-manopiranosas. En la Tabla 3.8 se enumeran los efectos de la α-D-manosilación sobre todos los carbonos de la unidad sustituida. En cada caso, los resultados fueron obtenidos tomando los desplazamientos químicos de un residuo ubicado a continuación del extremo terminal no reductor de un oligosacárido (por ejemplo, el residuo B en C-B-A, donde A es el extremo reductor) y restándole la señal “de referencia” del carbono correspondiente, ubicado en el extremo terminal no reductor del oligosacárido que surge de la remoción del terminal no reductor en el oligosacárido original (el residuo B en B-A). Los desplazamientos químicos de la mayoría de los carbonos de un residuo de manosa se ven afectados de maneras diferentes y específicas por manosilación de C-2, C-3, C-4 y C-6.

Tabla 3.8. Cambios en los desplazamientos químicos de residuos de α-D-manopiranosas y β-D-manopiranosas por α-D-manosilación de uno de sus carbonos no anoméricos

Tipo de unión ^a	Cambios en desplazamientos químicos ^b					
	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6
2α _R	-1,53	+8,23	-0,31	+0,17	+0,02	+0,04
2α	-1,63	+8,34	-0,37 ^c	+0,22 ^c	+0,01	<i>d</i>
2β _R	-0,27	+6,88	+0,32	+0,09 ^c	+0,52	-0,17
3α	-0,08 ^c	-0,42 ^c	+7,45	-0,70	+0,05 ^c	<i>e</i>
3β	0	-0,4	+7,8	-0,6	-0,1	+0,1
4α	-0,14	+0,49	+0,42	+7,36 ^f	-1,50	+0,10 ^g
6α _R	+0,14	-0,02	+0,21	-0,16	-1,79	+4,75
6α	-0,02	-0,03	+0,22	-0,10	-2,00 ^h	+4,59
6β _R	+0,16	-0,06	+0,12	-0,13	-1,88	+4,80

^aEl número indica el carbono de la manosa en consideración que está unido al C-1 de otra α-D-manopiranosas. El subíndice R indica que se trata de una unidad reductora.

^b $\delta_{\text{RESIDUO MODIFICADO}} - \delta_{\text{RESIDUO INTACTO}}$

^cNo se pudieron asignar inequívocamente.

^dDebido a que no se pudieron efectuar asignaciones inequívocas, son posibles valores entre -0,11 y +0,04 ppm.

^eDebido a que no se pudieron efectuar asignaciones inequívocas, son posibles valores entre -0,04 y +0,08 ppm.

^fOtro valor posible es +6,84 ppm.

^gOtro valor posible es -0,02 ppm.

^hOtro valor posible es -2,15 ppm.

Por otra parte, el residuo terminal no reductor de α -D-manopiranososa se ve influenciado por la naturaleza de su enlace glicosídico sobre otras manosas. En la Tabla 3.9 se enumeran los desplazamientos químicos de los residuos de manosa en el extremo terminal no reductor junto con las diferencias de desplazamientos con respecto al monosacárido libre. Allí puede observarse que no sólo los carbonos anoméricos de los extremos terminales no reductores aparecen afectados por el tipo de unión en C-1, sino también resultan modificados C-2, C-3, C-4 y C-5.

Los autores proponen que los datos de las Tablas 3.8 y 3.9 pueden servir para predecir con buena precisión los espectros de RMN ^{13}C de cadenas lineales o ramificadas de α -D-manopiranosas. El punto de partida consiste en tomar un conjunto de desplazamientos químicos de la Tabla 3.9, elegido según el tipo de unión que presente el carbono anomérico en consideración. Por ejemplo, si C-1 está unido al C-2 de un residuo de β -D-manopiranososa entonces corresponde la fila $1 \rightarrow 2\beta_{\text{R}}$. Después hay que modificar este conjunto según valores de la Tabla 3.8, para tener en cuenta un enlace (de unidades de α -D-manopiranososa) sobre C-2, C-3, C-4 ó C-6 del residuo en cuestión.

Tabla 3.9. Efecto de la manosilación sobre el carbono anomérico en los desplazamientos químicos de α -D-manopiranosas: desplazamientos químicos de los extremos terminales no reductores de α -D-manopiranosas involucrados en uniones 1→2, 1→3, 1→4, 1→6 a otras unidades de manosa

Unión ^a	Desplazamientos químicos y efectos debidos a manosilación (ppm) ^b					
	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6
1→2 α_R	103,44	71,39	71,77	68,27	74,54	62,36 ^c
	(+8,00)	(-0,76)	(+0,07)	(-0,03)	(+0,79)	
1→2 α	103,47	71,40 ^c	71,83	68,27	74,55	62,41 ^c
	(+8,03)	(-0,75)	(+0,13)	(-0,03)	(+0,80)	
1→2 β_R	102,70	71,52	71,68	68,06 ^c	74,18	<i>d</i>
	(+7,26)	(-0,63)	(-0,02)	(-0,24)	(+0,43)	
1→3 α	103,46 ^c	71,46 ^c	71,82	68,31	74,67 ^c	62,33 ^c
	(+7,95)	(-0,69)	(+0,12)	(+0,01)	(+0,92)	
1→3 β	103,7	71,8	72,0	68,4	74,8	62,6
	(+8,3)	(-0,4)	(+0,3)	(+0,1)	(+1,1)	(+0,2)
1→4 α	102,74	71,69	71,81	68,00	75,03 ^f	62,34 ^g
	(+7,30)	(-0,46)	(+0,11)	(-0,30)	(+1,28)	(-0,07)
1→6 α_R	100,86	71,35	72,01	68,18	74,04	62,36
	(+5,42)	(-0,80)	(+0,31)	(-0,12)	(+0,29)	(-0,05)
1→6 α	100,63	71,42	72,04	68,21	74,07	62,37
	(+5,19)	(-0,83)	(+0,34)	(-0,09)	(+0,32)	(-0,04)
1→6 β_R	100,88	71,3	72,0	68,2	74,00	62,4
	(+5,45)	(-0,9)	(+0,3)	(-0,1)	(+0,25)	(0)

^aLas designaciones 1→2 α_R y 1→2 α indican que el terminal no reductor de α -D-manopiranosas considerado está involucrado en una unión 1→2 a una α -D-manopiranosas *reductora* y *no reductora*, respectivamente.

^bLos desplazamientos químicos corresponden a ppm con respecto a Me₄Si. Cada efecto de manosilación (indicado entre paréntesis debajo de cada desplazamiento) se obtuvo sustrayendo los desplazamientos correspondientes a la α -D-manopiranosas libre a los listados arriba.

^cNo se pudieron efectuar asignaciones inequívocas, por lo que hay otro valor posible que difiere en menos de 0,1 ppm.

^dNo detectado. Probablemente coincida con el valor de 1→2 α_R .

^eOtro valor posible es 62,49 ppm.

^fOtro valor posible es 75,55 ppm.

^gOtro valor posible es 62,45 ppm.

Cherniak, Jones y Reiss²⁰ aislaron un glucuronoxilomanano parcialmente acetilado (GXM) de *Criptomococcus neoformans* con relaciones molares manosa : xilosa : ácido glucurónico : acetilo (Man:Xil:GlcA:Ac) de 10:4:3:6. La elucidación estructural de este polisacárido se realizó mediante el análisis por RMN ¹³C de varios polisacáridos relacionados, obtenidos por diversos tratamientos físicos y químicos de la muestra inicial. A continuación se discuten algunos de los resultados obtenidos, relevantes para el análisis de los polisacáridos de *Nothogenia fastigiata*. El tratamiento de GXM con litio en etilendiamina dio un xilomanano (XM) con relación Man:Xil 5:2 y remoción del 90 % del ácido glucurónico. La degradación de Smith de XM dio un manano (M) que fue fraccionado en dos según su solubilidad en agua durante la etapa de hidrólisis ácida controlada (M_i; M_s). Por otra parte, una oxidación con periodato de GXM y reducción con borohidruro de sodio del producto dio un manano con polialcoholes como sustituyentes (PM), a partir del cual se obtuvo el polisacárido *O*-desacetilado por reacción con NH₄OH a pH 11 (DPM). Los autores llegaron a las siguientes conclusiones: M es un (1→3)-α-D-manopirano; XM posee la cadena central de M con ramificaciones aisladas de xilosa como grupos 2-*O*-β-D-xilopiranosilo (91 %) ó 4-*O*-D-xilopiranosilo (9 %). El polisacárido nativo, GXM, contiene la estructura de XM y aquellas manosas no xilosiladas están sustituidas con grupos 2-*O*-β-D-glucuronopiranosilo y 6-*O*-acetilo distribuidos en proporciones similares sobre los residuos de manosa portadores de otros sustituyentes y sobre los no sustituidos.

En la Tabla 3.10 se detallan las asignaciones de los espectros de RMN ¹³C obtenidos para algunas de estas muestras. El manano M_s resultó poco soluble en D₂O, por lo que los espectros de M_i y M_s se hicieron en Me₂SO-*d*₆. En ambos casos se obtuvieron resultados esencialmente idénticos: seis señales bien resueltas de intensidades similares, sin evidencias de otras minoritarias. La comparación de las constantes de acoplamiento en las regiones anoméricas con la perteneciente al metil α-D-manopiranosido indicó que los carbonos anoméricos tenían la configuración α.

Con fines comparativos, aplicaron el método de Allerhand y Berman¹⁹ adaptado a Me₂SO-*d*₆ como solvente. Tomaron como base los desplazamientos químicos del metil α-D-manopiranosido en Me₂SO-*d*₆, en lugar de los informados para D₂O, y aplicaron los efectos por 3-*O*-α-manosilación de la Tabla 3.8. Los resultados corresponden a una estructura constituida exclusivamente por D-manopiranosas con enlaces α-(1→3) (α-D-Man *Calc.*, Me₂SO-*d*₆, Tabla 3.10). Además del carbono anomérico, que es sensible a efectos de los sustituyentes, la mayor discrepancia con los datos experimentales está en C-4. Los autores

sugirieron como justificaciones: (i) efectos del solvente, debido a diferencias entre poblaciones de rotámeros del grupo hidroximetilo en Me₂SO-*d*₆ y en D₂O, o bien (ii) formación de uniones hidrógeno del grupo OH-4 no sustituido que equiparen las diferencias de solubilidad observadas para M en agua versus Me₂SO-*d*₆. También incluyeron en su análisis los valores correspondientes a un manano de la misma estructura disuelto en D₂O calculados según el método de Allerhand y Berman, corregidos para DSS sumando 1,04 ppm adicionales (α -D-Man *Calc.*, D₂O, Tabla 3.10). Los cálculos resultaron más aproximados a los valores experimentales del manano de *D. indusiata*¹⁶ (corregidos por la referencia, incluidos en la Tabla 3.10), obtenidos en soluciones acuosas. En todos los casos, pudo apreciarse buena concordancia entre los datos espectroscópicos obtenidos para polisacáridos de distintos orígenes, así como entre datos experimentales y valores calculados. Por lo tanto, la cadena central de GXM corresponde a un manano, lo mismo que la de XM y los otros derivados estudiados.

Tabla 3.10. Asignación de los espectros de RMN ¹³C de polisacáridos obtenidos a partir de GXM^a

Polisacárido	Solvente	T	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6
Residuo		(°C)						
<i>M_n</i> , <i>M_s</i> ^b								
α -D-Man	Me ₂ SO- <i>d</i> ₆	70	101,49	69,45	78,51	66,01	73,56	61,16
α -D-Man <i>Calc.</i> ^c	Me ₂ SO- <i>d</i> ₆	70	100,68	69,60	78,39	66,46	73,50	
α -D-Man ^d	D ₂ O	68	104,3	72,1	80,5	68,6	75,9	63,6
α -D-Man <i>Calc.</i> ^e	D ₂ O	30	104,4	72,1	80,3	68,6	75,7	63,4
<i>XM</i> ^b								
α -D-Man	D ₂ O	70	104,32	72,18	80,69	68,71	76,01	63,62
α -D-Man 2X	D ₂ O	70	102,44	80,32	80,97	69,13	76,15	63,24
β -D-Xil	D ₂ O	70	105,46	75,28	78,17	71,83	67,66	
Me β -D-Xil	D ₂ O	70	106.35	75.29	78.18	71.66	67.48	

^aDesplazamientos químicos relativos a 4,4-dimetil-4-silapentansulfonato de sodio (DSS), externo, a 0,00 ppm.

^bDesplazamientos químicos relativos a Me₂SO-*d*₆ a 39,60 ppm.

^cCalculado tomando como referencia al metil α -D-manopiranosido en Me₂SO-*d*₆,

^dCorrespondientes a *D. indusiata*, corregidos a la escala de DSS por adición de 1,5 ppm.

^eCorregidos a la escala de DSS por adición de 1,04 ppm.

Los datos relativos a XM, obtenidos en D₂O, no mostraron picos que pudieran atribuirse a carbonos metílicos de acetilo. Las relaciones Man:Xil en GXM y XM se mantuvieron constantes, indicando la pérdida buscada de ácido glucurónico de acuerdo con el tratamiento químico aplicado. Por lo tanto, XM poseería una cadena central de manopirano idéntica a la de M, con sustitución frecuente, y probablemente regular, de β -xilopiranosas unidas a la posición 2 de la cadena. La región anomérica del espectro de XM muestra cuatro señales más intensas, de las cuales hay dos a $\sim 104,4$ ppm que se condicen con el C-1 reportado por Hara¹⁶ y corresponden a unidades de manosa no sustituidas. La señal anomérica a 105,46 ppm es propia de β -xilopiranosas como sustituyente por las razones que se explican a continuación. Según Allerhand y Berman¹⁹ y Gorin²¹, la manosilación de un residuo de α -manopiranosas (incluido en la cadena central) produce desplazamientos hacia campos menores en el carbono anomérico menores a 0,2 ppm. Además, el C-1 del metil β -xilopiranosido tiene un desplazamiento químico de 106,35 ppm (medido en D₂O, relativo a DSS). Una aglicona mayor que un metilo daría un desplazamiento menor para el carbono anomérico, tal como el observado a 105,46 ppm. La constante de acoplamiento C-H observada (160 Hz) es consistente con una configuración β para la xilosa, si se tiene en cuenta que esta constante es similar en el metil β -xilopiranosido (161 Hz).

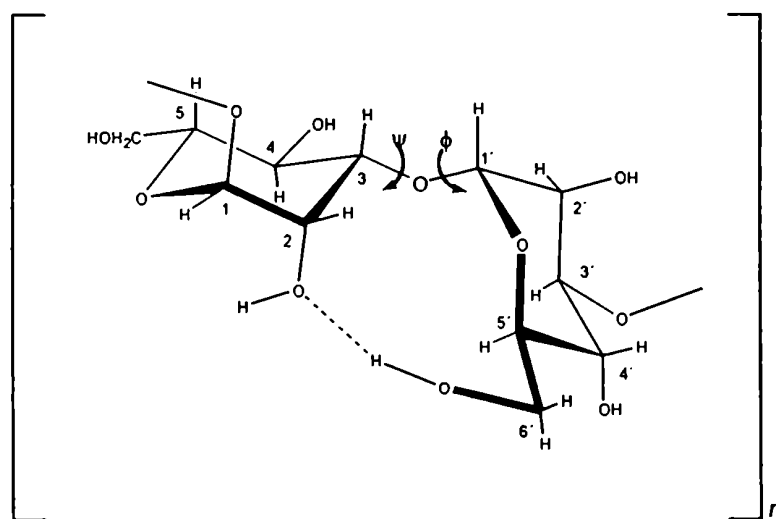
La señal a 102,44 ppm corresponde al C-1 de un residuo de manosa sustituido en la posición 2 con un grupo β -xilopiranosilo. Este desplazamiento químico difiere en 2 ppm, hacia campos mayores, con respecto a la unidad no sustituida, lo cual está de acuerdo con una α -manopiranosas glicosilada en la posición 2^{19,21}. Finalmente se observa una señal anomérica menor a 106,30 ppm, que corresponde a β -xilopiranosas unida a la posición 4 de la cadena central. Este dato está de acuerdo con el análisis por metilación de este polisacárido.

La región no-anomérica del espectro (60-82 ppm) de XM contenía cuatro señales con desplazamientos químicos cercanos en $\pm 0,2$ ppm a C-2-C-5 del metil β -xilopiranosido. Tres de estos picos presentaron líneas más finas que las demás del espectro, como es de esperar para sustituyentes con libertad de movimiento. El cuarto pico, a 67,66 ppm, es más ancho. Estas cuatro señales se atribuyeron a las β -xilopiranosas unidas a la posición 2 de la cadena de manano. En la región no-anomérica se observaron además cinco picos intensos, con desplazamientos consistentes con los informados por Hara¹⁶ (corregidos), que se asignaron a α -manopiranosas no sustituidas.

La β -xilosilación de un tercio de las posiciones 2 del manano debería producir señales características para las manopiranosas sustituidas, de menor intensidad con respecto a las

agua que sus análogos parcialmente 6-*O*-acetilado¹⁶ ó 2-*O*-xilosilado (XM), por lo tanto cabe preguntarse si existen propiedades conformacionales que puedan contribuir a estas diferencias. Es posible encontrar conformaciones energéticamente favorables por rotación simple alrededor de las uniones que forman el enlace glicosídico, variando los ángulos diedros ϕ —determinado por H-1'-C-1'-O-3-C-3— y ψ —determinado por C-1'-O-3-C-3-H-3— (Fig.3.2). La insolubilidad del manopiranano requería una aproximación indirecta al estudio experimental de sus conformaciones, de modo que Ogawa *et al.*²² informaron resultados de difracción de rayos X para un film modificado físicamente de un D-manano α -(1→3) como dihidrato. Este se obtuvo a partir de un manano parcialmente *O*-acetilado que se mantuvo como film en el estado sólido mientras se realizaba la modificación química. La geometría encontrada para los centros anoméricos fue similar al residuo α -D-Manp(1→3)- α -D-Manp de un trisacárido, medida por difracción de rayos X del material cristalino²³. Cherniak y col.

Fig. 3.3. Estructura propuesta para el manopiranano



calcularon un mapa conformacional para el disacárido α -D-Manp(1→3)- α -D-Manp, tomando como aproximación inicial las coordenadas atómicas de la unidad de manobiosa informadas para el trisacárido analizado por rayos X. Utilizaron el programa de mecánica molecular MM2, sin aplicar restricciones para las posiciones atómicas en la minimización de la energía potencial correspondiente a la estructura de la biosa libre y variando los valores de los ángulos diedros ϕ y ψ . La construcción de un mapa preliminar reveló tres regiones de orientaciones anoméricas con mínimos similares de energía potencial. Cada región se refinó y obtuvieron los siguientes valores aproximados para los tres mínimos: I, $\phi = -36^\circ$, $\psi = 51^\circ$, 0 kJ/mol; II, ϕ

= -49° , $\psi = -16^\circ$, 12 kJ/mol; III, $\phi = -22^\circ$, $\psi = -168^\circ$, 22 kJ/mol (un ángulo diedro de 0° representa una orientación eclipsada *cisoid*e para el primero y el cuarto átomo; un ángulo diedro positivo implica una rotación en sentido horario para restituir la orientación *cis*). La interconversión de los mínimos I y II no estaba impedida por barreras torsionales de magnitud significativa (~ 14 kJ/mol); en cambio la conversión en la estructura III a partir de I ó II presentaba una barrera torsional de ~ 57 kJ/mol.

Aunque este cálculo no fue refinado analizando los efectos de uniones hidrógeno, las geometrías calculadas para la manobiosa en I y III sugieren estas uniones entre OH-6'---O-2 para el mínimo I y OH-6'---O-4 para el mínimo III.

Si las orientaciones adoptadas en los mínimos de la manobiosa se repitieran en una cadena de manopirano, con las uniones hidrógeno interresiduales indicadas, se obtendrían tres conformaciones diferenciadas correspondientes a mínimos de energía:

1. La conformación del manopirano que surge del mínimo II correspondería a una estructura helicoidal, con una periodicidad de 2 vueltas, bastante cercana a la encontrada en el estudio de rayos X²². Según los cálculos por MM2, se trataría de una conformación bastante flexible capaz de convertirse en otras, entre ellas conformaciones relacionadas con el mínimo I.
2. La conformación del manopirano vinculada con el mínimo I, como unidad repetitiva de manobiosa, sería una estructura helicoidal hacia la izquierda, con una periodicidad de tres vueltas y con cada unión hidrógeno OH-6'---O-2 intacta. Esta conformación sugiere una estructura rígida, con forma de varilla, de modo que cadenas paralelas podrían empacarse fácilmente. Este modelo es especialmente atractivo porque la presencia de grupos 6-O-acetilo ó 2-O-xilopiranosilo impedirían la unión hidrógeno mencionada, disminuiría la habilidad de empacamiento de las cadenas paralelas y aumentaría la solubilidad en agua, como se observa experimentalmente para estos derivados.
3. La tercera conformación del manopirano, relacionada con el mínimo III, sería una estructura helicoidal hacia la derecha, pero con un giro mucho más suave alrededor del eje que en el caso 2 y con todos los átomos O-2 ubicados en el borde más interno (y más corto) de la molécula y orientados hacia el eje de la hélice. Esta no parece ser una conformación probable para el manopirano, debido a la mayor energía potencial del mínimo III y a las barreras de interconversión entre I y III, o entre II y III. Sin embargo, la presencia de grupos β -D-xilopiranosilo unidos a los átomos O-2 del manopirano

alterarían apreciablemente los valores energéticos del polímero y harían más probable a esta conformación.

Usov y Dobkina llevaron a cabo el análisis estructural de xilomananos sulfatados extraídos de *Liagora* sp.²⁴ y *Liagora valida*²⁵. Por hidrólisis parcial del polisacárido de *Liagora* sp. aislaron oligosacáridos desulfatados con grados de polimerización 2-5. El espectro RMN ¹³C correspondiente al disacárido coincidió con los datos informados por Awad¹⁸ para 3-*O*-(α -D-manopiranosil)-D-manopiranososa. Los oligómeros superiores demostraron que se trataba de oligosacáridos de D-manopiranososa con uniones α -(1 $\rightarrow$ 3). Los autores publicaron las figuras donde constaban los desplazamientos químicos, pero no realizaron una asignación explícita de los oligosacáridos. El análisis propuesto de los datos se indica en la Tabla 3.11.

Tabla 3.11. Asignación del espectro de RMN ¹³C de oligomananos^a

Oligosacárido	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6
Residuo						
DP 2						
α -D-Man (r) ^b	95,28	71,32	79,17	67,52	73,83	62,14
β -D-Man (r) ^b	94,79	71,63	81,63	~67,4	77,23	62,14
α -D-Man	103,59	71,32	71,63	68,04	74,58	62,27
DP 3						
α -D-Man (r)	95,25	71,31	79,24	67,45	73,83	62,4
α -D-Man	103,59	70,96	79,36	67,45	74,87	62,14
α -D-Man (nr) ^c	103,59	71,31	71,63	68,14	74,87	62,14
DP 4						
α -D-Man (r)	95,25	71,31	79,36	~67,5	73,83	~62,2
α -D-Man	103,49	70,95	79,36	67,46	74,88	62,18
α -D-Man (nr)	103,49	71,31	71,63	68,16	74,88	62,18

^aEspectros registrados a 80°C; desplazamientos químicos relativos a DMSO (39,5 ppm) ó metanol (50,1 ppm).

^bExtremo reductor.

^cExtremo no reductor.

El espectro del polisacárido desulfatado presentó señales principales coincidentes con residuos de α -D-manopiranososa unidos por la posición 3, cuyos desplazamientos químicos eran concordantes con los descriptos para el manano de *Dictiophora indusiata*^{16,17}. Entre las

señales de menor intensidad se encontraron una serie relacionada con unidades de α -D-manopiranosas pertenecientes a la cadena central xilosilada en la posición 2 (α -D-Man 2X) y otra serie relacionada con unidades de β -D-xilopiranosas terminal (Fig. 3.4; Tabla 3.12).

Fig. 3.4. Estructura del xilomanano desulfatado aislado de *Liagora* sp

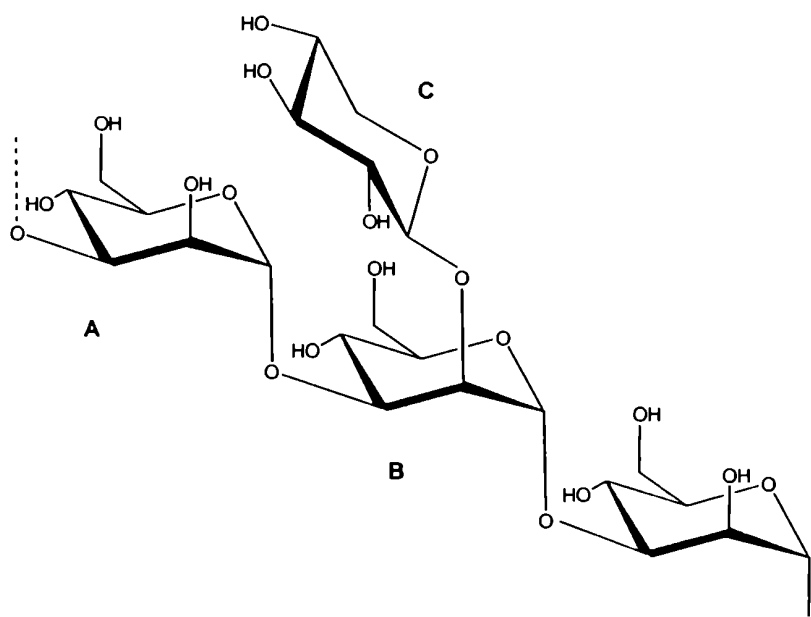


Tabla 3.12. Asignación del espectro de RMN ^{13}C del xilomanano desulfatado de *Liagora* sp

Residuo	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6
α -D-Man (A)	102,29	70,17	76,71	66,74	74,00	61,63
α -D-Man 2X (B)	100,37					
β -D-Xil (C)	103,4					

El análisis por metilación del material inicial indicó que los grupos sulfato estaban ubicados sobre las posiciones 2 y 6 de las unidades de manosa, en una relación 2:1 (los autores supusieron que todos las ramificaciones de xilosa estaban en la posición 2), con pequeñas proporciones de unidades sulfatadas en 6 y ramificadas en 2. Sin embargo, no lograron asignar los datos espectroscópicos del polisacárido nativo.

Más tarde, efectuaron el análisis estructural del xilomanano aislado de *L. valida*²⁴, cuyo contenido de sulfato era de 24 % (como SO₃Na). Nuevamente se llevó a cabo una hidrólisis parcial, que permitió aislar y caracterizar manooligosacáridos con grados de polimerización 2-6 provenientes de una cadena central lineal de D-manopiranosas con uniones α -(1→3). Por

otro lado, el polisacárido nativo se desulfató (polisacárido IIA) y luego se sometió a una degradación de Smith (polisacárido III). Cada uno de los productos fue estudiado por metilación y espectroscopía de RMN ^{13}C . El espectro de III contenía seis señales principales correspondientes a los residuos de manopiranosos unidos por 3 pertenecientes a la cadena central (Fig. 3.5; Tabla 3.13), cuya asignación se hizo por analogía a los mananos antes mencionados^{17,24}. Las señales de menor intensidad se interpretaron por comparación con el espectro del xilomanano XM, obtenido por tratamiento del glucuronoxilomanano de *Cryptococcus neoformans* con litio en etilendiamina²⁰. La característica distintiva del producto III reside en la presencia de residuos 3-*O*-metil-D-xilosa, con picos diagnósticos a 59,6 ppm (OCH₃) y 85,4 ppm (C-3). Toda esta familia de polisacáridos tienen regiones anoméricas prácticamente idénticas. Esto significa que los principales puntos de unión de las ramificaciones de xilosa metilada, en la configuración β (103,6 ppm), son posiciones 2 de los residuos de manosa. Un sustituyente en esta posición produce un desplazamiento hacia campos mayores del carbono anomérico de la manosa, como consecuencia del efecto β . También dedujeron la presencia de residuos de β -D-xilopiranosos sustituidos en la posición 4 (por la señal de C-5 a 63,2 ppm) y de algunos sustituyentes en la posición 6 de la cadena principal (por las señales de C-5 y C-6 a 72,5 y 69,1 ppm). El espectro del polisacárido desulfatado IIA fue consistente con un contenido mayor de ramificaciones de xilosa. El espectro del polisacárido inicial I fue más complejo, observándose una disminución en la intensidad relativa correspondiente a grupos hidroximetilo sin sustituir, lo cual indicaba sulfatación en C-6, pero también se apreció sulfatación considerable en C-4 por datos de metilación (Fig. 3.5; Tabla 3.13).

En conclusión, la estructura general hallada para los xilomananos sulfatados aislados de *L. valida* era una cadena lineal de α -D-manopiranosas unidas por la posición 3, donde aproximadamente la mitad de los residuos estaban sustituidos en la posición 2 con unidades de β -D-xilopiranosos, 3-*O*-metil- β -D-xilopiranosos o cadenas cortas de xilano. Algunos de estos sustituyentes se ubicaban también en la posición 6 de la cadena central. Los grupos sulfato estaban sobre los residuos de α -D-manopiranosos en posiciones 4 y 6.

Fig. 3.5. Estructura del xilomanano aislado de *Liagora valida*

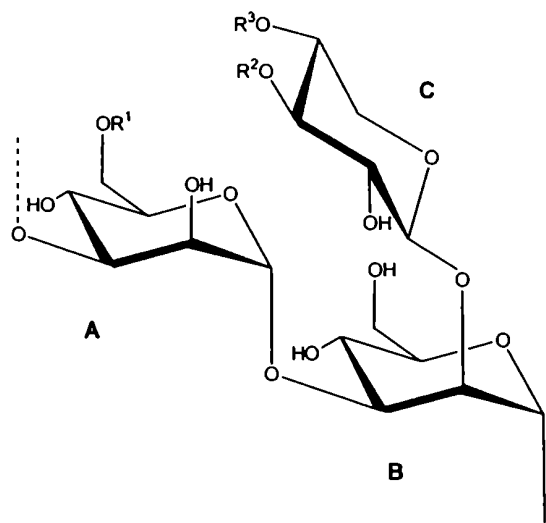


Tabla 3.13. Asignación del espectro de RMN ¹³C del xilomanano aislado de *Liagora valida*

Residuo	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6
α-D-Man (A); R ¹ =H	102,4	70,2	78,7	66,7	74,0	61,6
α-D-Man (A); R ¹ =Xil	102,4	70,2	78,7	66,7	72,5	69,1
α-D-Man (A); R ¹ =SO ₃ ⁻	102,4	70,2	78,7	66,7	72,5	68,2
α-D-Man 2X (B)	100,5	78,4	79,0	67,2	73,7	61,2
β-D-Xil (C); R ² =R ³ =H	103,6	73,3	76,2	69,8	65,6	
β-D-Xil (C); R ² =CH ₃ ^a ; R ³ =H	103,6	73,3	85,4	69,8	65,6	
β-D-Xil (C); R ² =H; R ³ =CH ₃	103,6	73,3	85,4	76,6	63,2	

^aδ (OCH₃) 59,6 ppm.

Por otra parte, Usov, Yarotskii y Vasyanina²⁶ sintetizaron el metil 3-*O*-metil-α-D-manopiranosido y sus tres isómeros sulfatados, a fin de evaluar la influencia de la sulfatación en los desplazamientos químicos de los carbonos (Tabla 3.14).

Tabla 3.14. Asignación del espectro de RMN ¹³C del metil 3-*O*-metil- α -D-manopiranosido y sus tres isómeros sulfatados

Monosacárido	Desplazamientos químicos y efectos debidos a la sulfatación (ppm) ^a							
	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	CH ₃ (C-1)	CH ₃ (C-3)
Me α -D-Man <i>p</i> ^b	101,8	70,9	71,7	67,8	73,4	61,9	55,5	
Me α -D-Man <i>p</i> 3Me	101,7	66,1	81,0	66,6	73,4	61,8	55,6	57,2
Me α -D-Man <i>p</i> 3Me 2S ^c	99,5	73,1	79,3	66,4	73,4	61,7	55,9	57,6
	(-2,2)	(+7,0)	(-1,7)	(-0,2)	(0,0)	(-0,1)	(+0,3)	(+0,4)
Me α -D-Man <i>p</i> 3Me 4S	101,3	68,2	79,7	74,8	72,1	61,6	55,8	58,3
	(-0,4)	(+2,1)	(-1,3)	(+8,2)	(-1,3)	(-0,2)	(+0,2)	(+1,1)
Me α -D-Man <i>p</i> 3Me 6S	101,7	66,3	80,8	66,7	71,4	68,1	55,8	57,3
	(0,0)	(+0,2)	(-0,2)	(+0,1)	(-2,0)	(+6,3)	(+0,2)	(+0,1)

^aDesplazamientos químicos relativos a Me₄Si. El efecto de la sulfatación (indicado entre paréntesis) se obtuvo sustrayendo los desplazamientos del metil 3-*O*-metil- α -D-manopiranosido (Me α -D-Man *p* 3Me) a los carbonos correspondientes de los derivados sulfatados.

^bMetil α -D-manopiranosido.

^cMetil 3-*O*-metil- α -D-manopiranosido 2 sulfato.

3.4.2. RMN ¹³C. RESULTADOS

Al igual que en el análisis por metilación, la interpretación de los espectros se describe en orden de complejidad creciente, comenzando por los espectros registrados a 50 MHz y 25°C. Los espectros de RMN ¹³C con desacoplamiento protónico del manano F5' (Fig. 3.6) exhibieron seis señales predominantes que fueron atribuidas a unidades de α -D-manosa enlazadas por la posición 3 (α -D-Man), teniendo en cuenta el patrón de metilación de esta muestra. Las asignaciones del espectro (Tabla 3.15) estuvieron de acuerdo con:

- i) las informadas por Usov²⁴ para el oligomanopiranano con grado de polimerización 4, aislado de *Liagora* sp, sumando a estos desplazamientos químicos una corrección constante de -0,3 ppm (Tabla 3.11).
- ii) las correspondientes al residuo α -D-Man (A) del xilomanano sulfatado de *Liagora valida*²⁵, sumando una corrección constante de +0,4 ppm (Tabla 3.13). El carbono anomérico estaba desplazado en unas 0,3 ppm hacia campos menores con respecto a los valores de Usov aún luego de aplicar la corrección.

iii) los valores calculados para un D-manopirano con enlaces α -(1 $\rightarrow$ 3) empleando la aproximación de Allerhand y Berman¹⁹, corregidos en -0,5 ppm (Tablas 3.8 y 3.9).

Esta fracción contenía además el 29 % de sus unidades sulfatadas en la posición 6 (α -D-Man 6S, Tabla 3.3). Los desplazamientos químicos esperados para esta unidad se calcularon tomando como base las seis señales predominantes en el espectro, a las que se sumaron las contribuciones debidas a sulfatación en C-6 según la Tabla 3.13: 103,1 (C-1); 70,8 (C-2); 78,9 (C-3); 67,1 (C-4); 72,4 (C-5); 68,3 ppm (C-6). En la región anomérica también se observaron resonancias de baja intensidad correspondientes a extremos terminales reductores: 95,0 (C-1 α) y 94,3 ppm (C-1 β), consistente con el bajo peso molecular de esta fracción.

Fig. 3.6. Espectros de RMN ^{13}C de F3 (a), F5' (b) y F6' (c) registrados a 50 MHz y 25°C

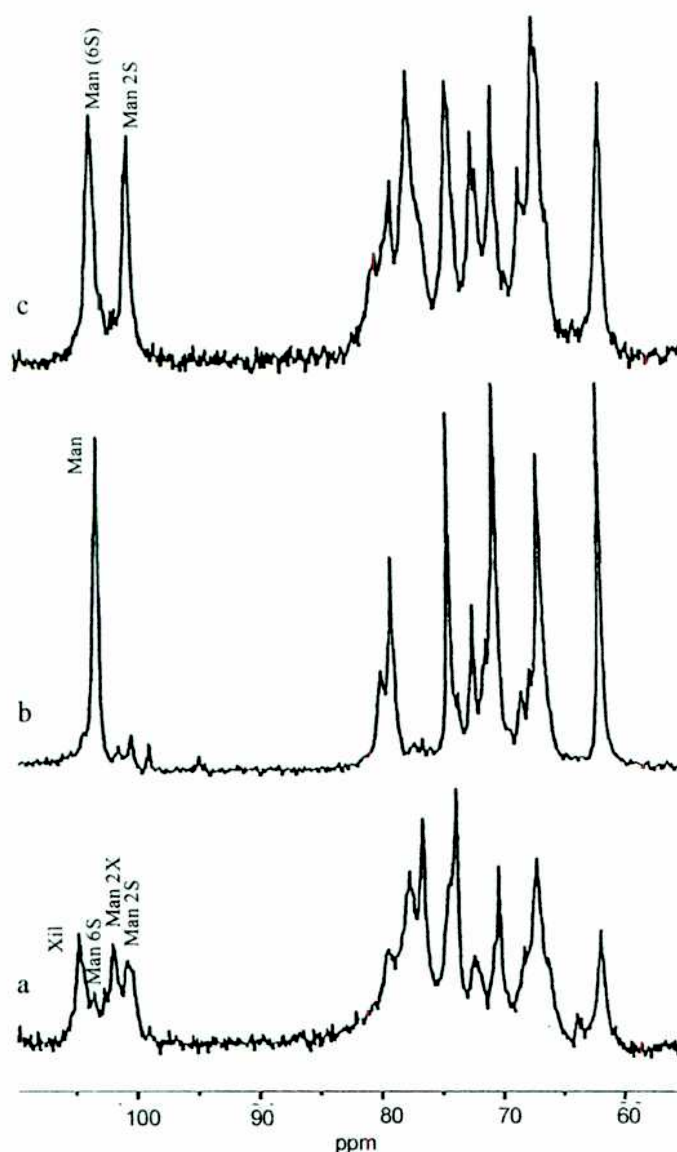


Tabla 3.15. Asignaciones de los espectros de RMN ¹³C de xilomananos de *Nothogenia fastigiata* (a 25°C)

Residuo	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6
<i>F2^a</i>						
β-D-Xil	104,6	73,7	76,3	70,1	65,9	
α-D-Man	103,2	70,6	79,3	67,2	74,2	61,6
α-D-Man 6S	103,2	70,6	79,3	67,2	72,2	68,2
α-D-Man 2X 6S	101,9	79,3	79,3	67,2	72,2	68,2
α-D-Man 2X	101,9	79,3	79,3	68,2	74,2	61,6
α-D-Man 2S	100,5	77,3	77,3	67,2	74,2	61,6
<i>F3</i>						
β-D-Xil	104,6	73,7	76,4	70,2	67,1	
α-D-Man	103,4	70,8	79,3	67,1	74,6	61,8
α-D-Man 6S	103,4	70,8	79,3	67,1	72,3	68,2
α-D-Man 2X 6S	101,8	79,3	79,3	68,2	72,3	68,2
α-D-Man 2S	100,7	77,5	77,5	67,1	74,6	61,8
<i>F4'</i>						
β-D-Xil	104,7	73,6	76,3	70,1	65,9	
α-D-Man	103,2	70,6	79,1	67,2	74,2	61,8
α-D-Man 6S	103,2	70,6	79,1	67,2	72,2	68,2
α-D-Man 2X 6S	102,0	79,1	79,1	68,2	72,2	68,2
α-D-Man 2X	102,0	79,1	79,1	68,2	74,2	61,6
α-D-Man 2S	100,4	77,4	77,4	67,2	74,2	61,8
<i>F5'</i>						
α-D-Man	103,1	70,6	79,1	67,0	74,4	62,0
α-D-Man 6S	103,1	70,6	79,1	67,0	72,4	68,1
α-D-Man 2S	100,4	77,2	77,2	67,0	74,4	62,0
<i>F6'</i>						
α-D-Man	103,4	70,6	78,9	67,1	74,3	61,7
α-D-Man 6S	103,4	70,6	78,9	67,1	72,3	68,4
α-D-Man 2S	100,4	77,5	77,5	66,7	74,3	61,7

^aLas señales a δ 102,6 (C-1); 73,7 (C-2); 74,7 (C-3); 77,7 (C-4) y 63,9 ppm (C-5) fueron asignadas a unidades de β-D-xilopiranosas enlazadas por la posición 4, pertenecientes al xilano neutro²⁷. También se observó la señal anómérica del galactano a 104,1 ppm (β-D-galactosa enlazada por 3); la señal anómérica correspondiente a α-L-galactosa enlazada por 4 está incluida en el pico a 101,9 ppm.

La fracción F6', un manano con unidades sulfatadas en las posiciones 2 (α -D-Man 2S, 52 %) ó 6 (α -D-Man 6S, 31 %) (Tabla 3.3), dio un espectro algo más complejo con picos más intensos a 72,3 y 68,4 ppm, relacionados con α -D-Man 6S, y otros que se atribuyeron a α -D-Man 2S (Tablas 3.14 y 3.15). Los desplazamientos calculados para α -D-Man 2S, aplicando los efectos correspondientes de la Tabla 3.14, resultaron: 100,9 (C-1); 77,6 (C-2); 77,4 (C-3); 66,8 (C-4); 74,4 (C-5); 61,9 ppm (C-6). Por lo tanto, hay buena concordancia entre los valores calculados y los datos experimentales asignados.

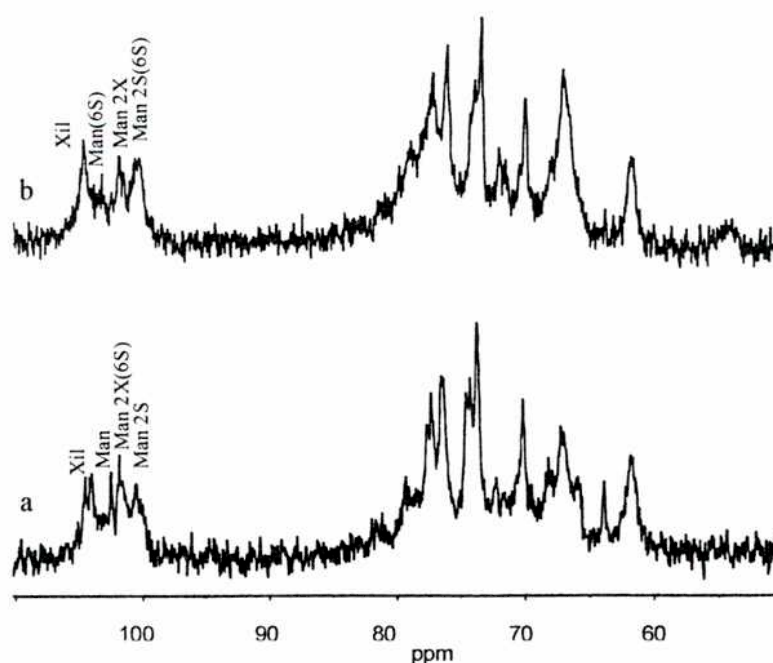
La fracción F3' estaba conformada por un xilomanano sulfatado en las posiciones 2 ó 6, y con unidades xilosiladas en 2 y sulfatadas en 6 (Man 2X 6S). En su espectro se encontraron las señales esperadas para α -D-Man 2S y α -D-Man 6S. Los desplazamientos químicos calculados para α -D-Man 2X 6S se obtuvieron combinando el efecto de la sulfatación en 6 (Tabla 3.14) con los valores informados para α -D-Man 2X en *Liagora valida* (Tabla 3.13), corregidos en +0,7 ppm: 101,2 (C-1); 79,3 (C-2); 79,5 (C-3); 68,0 (C-4); 72,4 (C-5); 68,2 ppm (C-6). Las asignaciones indicadas en la Tabla 3.15 coinciden con estos valores, hay una desviación mayor en el carbono anomérico que es razonable teniendo en cuenta el efecto de la temperatura según se explica más adelante. Los valores atribuidos a las unidades de D-xilosa con enlaces β -(1 $\rightarrow$ 2) (β -D-Xil) tienen buena concordancia con los datos de *Cryptococcus neoformans*²⁰ (Tabla 3.10) (corregidos en -1,7 ppm) y *L. valida* (corregidos en +0,3 ppm) para todos los carbonos salvo el anomérico, que aparecía desplazado hacia campos mayores. Este fue asignado a la señal de 104,7 ppm, ausente en los espectros de los mananos verdaderos F5' y F6'.

El espectro de F2' permitió asignar las unidades de α -D-Man 2X, por comparación con los datos de *L. valida* y *Cryptococcus neoformans*. Los demás residuos fueron asignados teniendo en cuenta las fracciones descritas anteriormente. Si bien F2' tiene, en total, aproximadamente 15 % de unidades α -D-Man y α -D-Man 6S, la señal correspondiente a sus carbonos anoméricos aparece como un pico ancho de baja intensidad a 103,2 ppm. Pudieron observarse señales correspondientes a los polisacáridos asociados a este xilomanano (Secciones 1.4.1. y 1.4.2.): (i) los carbonos anoméricos de las unidades de β -D-galactosa enlazada por 3 y α -L-galactosa enlazada por 4, pertenecientes al galactano sulfatado, aparecían a 104,1 ppm la primera y la segunda quedaba incluida en la señal a 101,9 ppm; (ii) las unidades de xilosa enlazadas por 4 pertenecientes al xilano con "uniones mixtas" (Tabla 3.15).

La fracción F4' presentó señales consistentes con su complejo esquema de sustitución. Si bien se esperaba la presencia de unidades α -D-Man 2,6 disulfato, sus desplazamientos químicos quedarían totalmente superpuestos con los de α -D-Man 2S y α -D-Man 6S.

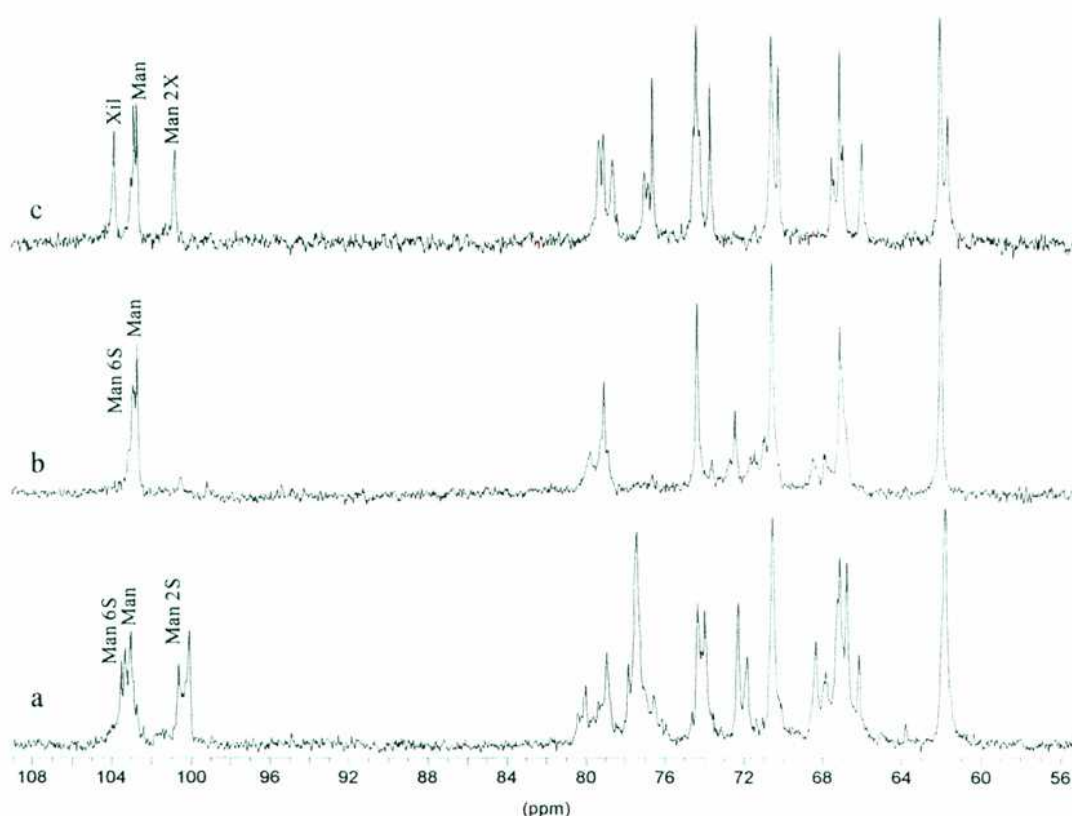
También se registraron los espectros de todas las fracciones mencionadas y de F4'Des a 75 MHz y 80°C, (Figs. 3.9 y 3.10). En la Tabla 3.16 se indican las asignaciones correspondientes a cada uno de los residuos presentes en estos polisacáridos. Los desplazamientos químicos de α -D-Man fueron tomados de F6', ya que presenta el esquema de sustitución más simple de la serie. En la región anomérica de F4'Des se vieron señales a 102,5; 102,6 y 102,8 ppm; mientras que F2' y F3' presentaron sólo la de 102,4 ppm. Los carbonos restantes presentaron desplazamientos químicos que coincidían con sus correspondientes en todas las fracciones. Las discrepancias detectadas surgen de la mayor resolución de estos espectros (registrados a 75 MHz y 80°C) que permite distinguir díadas o tríadas similares pero no idénticas, cuyas diferencias se observan fundamentalmente en los carbonos anoméricos. Por otra parte, la asignación de la unidad α -D-Man coincidió con el espectro de 25°C, excepto en el carbono anomérico, y resultó totalmente concordante con los valores informados para *Liagora valida*, también obtenidos a 80°C. En conclusión, los carbonos anoméricos son los más sensibles frente a diferencias de entorno químico y de temperatura de adquisición del espectro.

Fig. 3.7. Espectros de RMN ^{13}C de F2' (a) y F4' (b) registrados a 50 MHz y 25°C



El residuo α -D-Man 6S se asignó en base a F5', tomando como referencia los valores calculados para una unidad α -D-Man (Tabla 3.16) sulfatada en C-6 (Tabla 3.14). Nuevamente hay ciertas diferencias entre las fracciones: (i) Las regiones anoméricas de F5' y F6' aparecen desdobladas (102,8; 102,9 ppm para F5' y 103,1; 103,3; 103,5 ppm para F6'); (ii) F2' y F3 tienen desplazamientos anoméricos a 102,3 ppm; (iii) C-5 de F2', F3 y F6' presenta dos señales posibles (71,8 y 72,3 ppm); (iii) en F2', F4', F5' y F6' apareció una señal a 67,9 ppm que podía corresponder también a C-6. Los desplazamientos químicos de esta unidad están de acuerdo tanto con los informados para *L. valida* como con los registrados para estas fracciones a 25°C.

Fig. 3.8. Espectros de RMN ^{13}C de F4' Des (a), F5' (b) y F6' (c) registrados a 75 MHz y 80°C

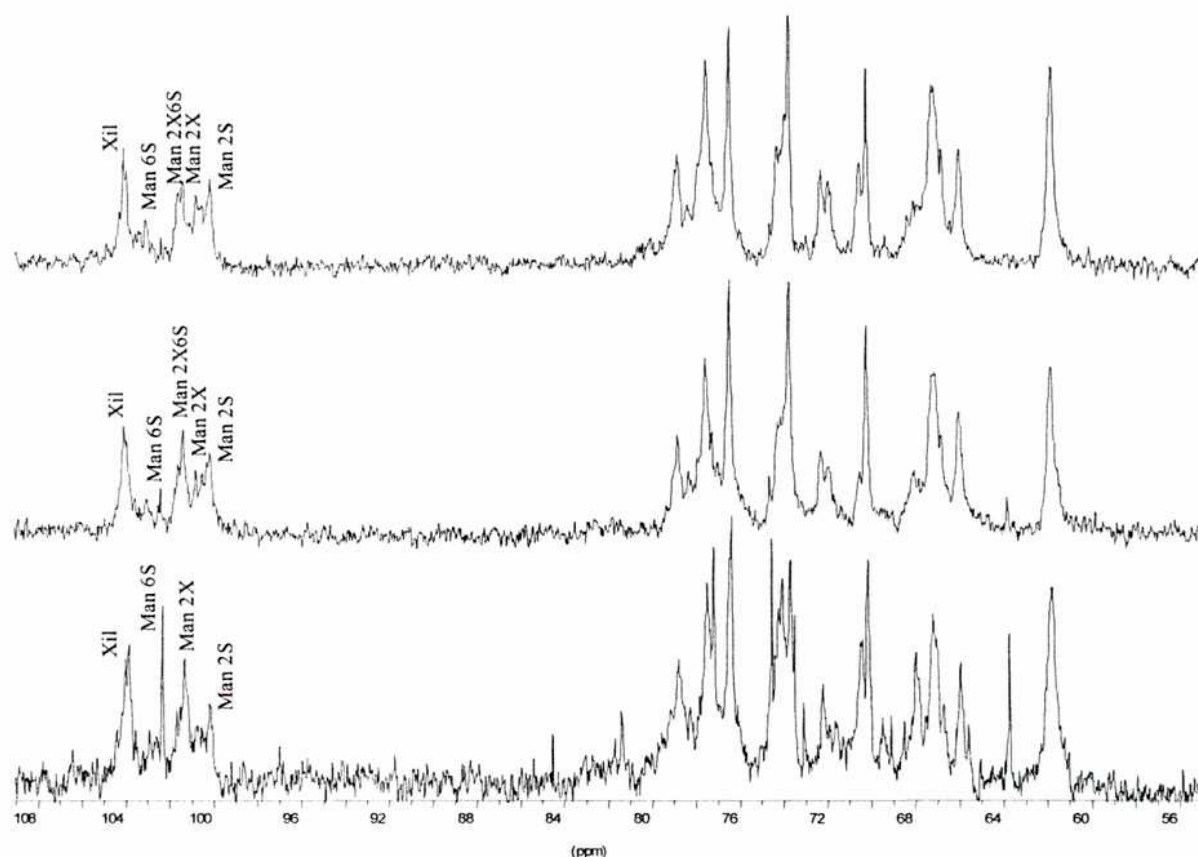


El residuo α -D-Man 2S se asignó en base a F6', tomando como referencia los valores calculados para una unidad α -D-Man (Tabla 3.16) sulfatada en C-2 (Tabla 3.14). La región anomérica del espectro de F6', en la región cercana a 100,5 ppm –valor calculado para C-1– presentó dos picos importantes a 100,1 y 100,6 ppm, mientras que en F2' y en F3 aparecieron desplazamientos a 100,1; 100,5 ppm y 100,1; 100,2; respectivamente. Además de los tabulados, se encontraron otros valores posibles para C-2/C-3 (77,2 ppm), C-4 (67,0 ppm) y

C-5 (74,3 ppm). Las asignaciones de esta unidad coinciden con las atribuidas en los espectros de 25°C.

El espectro de F4'Des permitió asignar fácilmente las señales de β -D-Xil y α -D-Man 2X por comparación con los datos bibliográficos. Así, los valores de la Tabla 3.16 coinciden exactamente con los informados por Cherniak para XM de *Cryptococcus neoformans* (Tabla 3.10), corregidos en -1,6 ppm, y están ligeramente desplazados hacia campos menores con respecto a las asignaciones realizadas para *L. valida* (Tabla 3.13).

Fig. 3.9. Espectros de RMN ^{13}C de F2' (a), F3 (b) y F4' (c) registrados a 75 MHz y 80°C



Las unidades de α -D-Man 2X 6S son predominantes en el esquema de sustitución de F3, y están en proporciones comparables a α -D-Man 2X en F2'. Por lo tanto, α -D-Man 2X 6S se asignó en base al espectro de F3 y se diferenció de α -D-Man 2X en el espectro de F2'. Tomando como base los valores encontrados experimentalmente para α -D-Man 2X en F4'Des, se calcularon los desplazamientos esperados para el residuo sulfatado en la posición 6 (Tabla 3.14). El espectro de F2' mostró intensidad baja para α -D-Man 2X (a 100,8 ppm) y alta para α -D-Man 2X 6S (a 101,3 ppm), a pesar de los esperado en base a resultados de

metilación. El espectro de F3' tenía picos a 68,0 y 78,8 poco intensos con respecto a lo esperado.

Tabla 3.16. Asignaciones de los espectros de RMN ¹³C de xilomananos de *Nothogenia fastigiata* (a 80°C).

Residuo	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6
β-D-Xil	103,8	73,7	76,6	70,2	66,0	
α-D-Man	102,7 ^a	70,5	78,9	67,1	74,3	61,8
α-D-Man 2S	100,1-100,6	77,4	77,4	66,8	74,0	61,8
α-D-Man 6S	102,9-103,1	70,5	78,8	66,9	72,4	68,5
α-D-Man 2X 6S	101,4	78,8	78,8	67,9	72,2	67,9
α-D-Man 2X	100,8	78,6	79,3	67,5	74,5	61,6

Los residuos de α-D-Man 2X y α-D-Man 2X 6S presentaron desplazamientos químicos similares a los registrados a 25°C y 50 MHz. Sin embargo los espectros adquiridos a 80°C y 125 MHz presentaron mayor resolución, que permitió diferenciar bien entre ambos residuos, especialmente los carbonos 1 a 4.

El espectro de F2' obtenido en estas condiciones mostró, además, señales que pudieron asignarse a los polisacáridos asociados al xilomanano F2': (i) las señales a 104,0 y 101,7 ppm corresponderían a los carbonos anoméricos de las unidades de β-D-galactosa unida por 3 y α-L-galactosa unida por 4, respectivamente, pertenecientes al xilogalactano sulfatado; (ii) los residuos de xilosa unidos por 4, del xilano con "uniones mixtas", a 104,0 (C-1 unido a una posición 3); 102,3 (C-1 unido a una posición 4); 74,2 (C-2 de un residuo unido a una posición 3); 73,4 (C-2 de un residuo unido a una posición 4); 74,5 (C-3); 77,1 (C-4); 63,7 ppm (C-5).

3.4.3. RMN ¹H. INTRODUCCIÓN

Si bien los desplazamientos químicos de los protones son muy sensibles a pequeños cambios en su entorno, la espectroscopía de resonancia magnética nuclear protónica (RMN ¹H) no ha sido muy utilizada en la determinación estructural de polisacáridos de algas rojas. Esto se debe a la complejidad de los espectros y a la superposición de señales, principalmente porque los picos son muy anchos. La asignación de los protones puede efectuarse aplicando técnicas bidimensionales, pero suelen aparecer problemas en polisacáridos complejos, cuando

hay fuerte superposición de señales, o cuando las constantes de acoplamiento son pequeñas y producen correlaciones débiles.

A diferencia de los aminoácidos en las proteínas, los sistemas de espín originados por varios residuos de monosacáridos, incluidos en un polisacárido, presentan desplazamientos químicos similares y deben diferenciarse en base a las constantes de acoplamiento entre sus protones.

Tabla 3.17. Desplazamientos químicos y esquemas de acoplamiento típicos, frecuentemente asignados en espectros de RMN ¹H de polisacáridos²⁸

Residuo	Desplazamiento químico típico (ppm)	Esquema de acoplamiento
H-1 de anómeros α ^a	5,5-5,0	d, 3,5 Hz
H-1 de anómeros β ^a	4,4-5,0	d, 8 Hz
H-1 de azúcares con configuración α-mano	5,5-4,9	d, <2 Hz
H-1 de azúcares con configuración β-mano	5,0-4,6	d, <2 Hz
H-2 de azúcares con configuración α-mano	3,9-4,4	d, 4 Hz

^aExcepto aquellos de configuración mano.

La comparación de los desplazamientos químicos protónicos observados experimentalmente con los correspondientes a sistemas modelo de mono- y oligosacáridos resulta útil para determinar la configuración y la posición de glicosilación, cuando no es posible aplicar experimentos bidimensionales para la asignación de los espectros. No hay recopilaciones completas de datos de RMN ¹H de oligosacáridos, análogas a las existentes para RMN ¹³C. En la Tabla 3.17 se indican algunas generalidades relativas a desplazamientos químicos y constantes de acoplamiento observadas frecuentemente en espectros de polisacáridos. La mayor parte de las señales no anoméricas aparece en la región de 3-4 ppm; mientras que las señales anoméricas de los polisacáridos aparecen a campos menores. Es por este motivo que los protones anoméricos suelen brindar la información más útil sobre la configuración y la sustitución del monosacárido al cual pertenecen.

Debido a la complejidad de los espectros protónicos obtenidos para los polisacáridos de *N. fastigiata*, han resultado útiles las interpretaciones de espectros de compuestos modelo

indicados en la Tabla 3.18-3.20. Jansson *et al.*²⁹ publicaron la asignación completa de varios monosacáridos en solución de D₂O, a 70°C, entre los cuales figuraban ambos anómeros de D-manosa y D-xilosa (Tabla 3.18). Ogawa y Sasajima³ identificaron solamente las señales correspondientes a los hidrógenos anoméricos de oligosacáridos de manosa con estructuras vinculadas a los polisacáridos de *N. fastigiata*, registrando los espectros en D₂O, a 60°C (Tabla 3.18). Brisson *et al.*³⁰ pudieron efectuar una asignación completa de todos los hidrógenos pertenecientes a oligomanósidos análogos de estructuras ricas en manosa, naturalmente abundantes en glicopéptidos N-enlazados provenientes de glicoproteínas (Tabla 3.18). El grupo de investigación de Kamerling y Vliegthart³¹ caracterizó, por espectroscopía RMN ¹H, oligosacáridos derivados de arabinoxilanos de endosperma de trigo. Estos oligosacáridos poseían un núcleo de residuos de β-D-xilopiranosas unidos por la posición 4, monosustituídos en 2 ó en 2 y 3 con grupos α-L-arabinofuranosilo. En la Tabla 3.19 se indican los desplazamientos químicos de los protones correspondientes a xilosa, xilobiosa, xilotriosa y xilotetraosa aislados a partir de los anteriores. Otro trabajo del grupo de Kamerling y Vliegthart³² estuvo vinculado a la síntesis y asignación de los espectros RMN ¹H y ¹³C de oligosacáridos sintéticos que eran elementos estructurales de cadenas de hidratos de carbono de N-glicoproteínas. Entre ellos estaban incluidos un disacárido y un tetrasacárido con unidades de β-D-xilosa unida a la posición 2 de β-D-manopiranosas, que se incluyen en la Tabla 3.20. No se encontraron datos bibliográficos sobre α-D-manopiranosas sulfatadas ni xilosiladas en la posición 2.

Tabla 3.18. Asignaciones de los espectros de RMN ¹H de compuestos modelo

Residuo	Ref	H-1	H-2	H-3	H-4	H-5	H-6	H-6'
<i>Monosacáridos</i>								
α-D-Man	29 ^a	5,18	3,94	3,86	3,68	3,82	3,74	3,86
β-D-Man	29	4,89	3,95	3,66	3,60	3,38	3,75	3,91
α-D-Man-1→OMe	30 ^b	4,762	3,930	3,756	3,636	3,611	3,899	3,754
β-D-Man-1→OMe	30	4,575	3,982	3,632	3,560	3,373	3,934	3,733
<i>Metil manobiósidos</i>								
→2)-α-D-Man-1→OMe	3 ^c	4,94						
α-D-Man-(1→		4,97						
→3)-α-D-Man-1→OMe	3	4,73						
α-D-Man-(1→		5,12						
→3)-α-D-Man-1→OMe	30	4,742	4,078	3,867	3,752	3,657	3,900	3,766
α-D-Man-(1→		5,110	4,064	3,878	3,662	3,754	3,883	3,760
→4)-α-D-Man-1→OMe	3	4,73						
α-D-Man-(1→		5,21						
→6)-α-D-Man-1→OMe	3	4,74						
α-D-Man-(1→		4,91						
<i>Metil manotriósido</i>								
α-D-Man-1	3	4,91						
6 3 ↓ α-D-Man-1		4,70						
3 ↓ α-D-Man-1		5,11						
α-D-Man-1	30	4,908	3,994	3,838	3,661	3,689	3,892	3,763
6 3 ↓ α-D-Man-1		4,729	4,089	3,856	3,898	3,804	3,737	4,017
3 ↓ α-D-Man-1		5,097	4,062	3,879	3,665	3,760	3,883	3,761
<i>Metil manotetraaósido</i>								
α-D-Man-1	30	5,154	4,069	3,885	3,661	3,763	3,880	3,760
3 ↓ α-D-Man-1		4,894	4,141	3,944	3,783	3,735	3,894	3,774
6 3 ↓ α-D-Man-1		4,730	4,088	3,860	3,905	3,804	3,749	4,013
3 ↓ α-D-Man-1		5,099	4,069	3,885	3,661	3,763	3,880	3,760

^aCon TSP como estándar interno (δ 0,00).
^bRegistrado a 23°C, en D₂O, con acetona como estándar interno (2,225 ppm).
^cCon 2,2,3,3-tetradeuterio-4,4-dimetil-4-silapentanoato de sodio como estándar interno (δ 0,00).

Tabla 3.19. Asignaciones de los espectros de RMN ¹H^a de xilosa y oligoxilopiranos obtenidos por hidrólisis parcial de un β-D-xilano con uniones 1→4³¹

Residuo	H-1	H-2	H-3	H-4	H-5	H-5'
α-D-Xil	5,187	3,514	3,58	3,62	3,68	3,67
β-D-Xil	4,569	3,218	3,423	3,617	3,921	3,314
<i>Xilobiosa</i>						
α-D-Xil (r)	5,184	3,545		3,73-3,82		
β-D-Xil (r)	4,584	3,249	3,547	3,776	4,055	3,378
β-D-Xil (α)	4,453	3,263	3,428	3,628 ^b		
β-D-Xil (β)	4,457	3,255	3,426	3,625 ^b	3,972	3,307
<i>Xilotriosa</i>						
α-D-Xil (r)	5,184	3,545		3,73-3,82		
β-D-Xil (r)	4,584	3,249	3,548	3,777	4,055	3,378
β-D-Xil (α)	4,476	3,299	3,555	3,785 ^b		
β-D-Xil (β)	4,479	3,291	3,553	3,787 ^b	4,107	3,378
β-D-Xil (nr)	4,460	3,256	3,428	3,625	3,971	3,307
<i>Xilotetraosa</i>						
α-D-Xil (r)	5,183	3,545		3,73-3,82		
β-D-Xil (r)	4,584	3,249	3,548	3,778	4,055	3,378
β-D-Xil (α)	4,476	3,299 ^b				
β-D-Xil (β)	4,479	3,291 ^b	3,555	3,788	4,106	3,378
β-D-Xil	4,482	3,293 ^b				
β-D-Xil (nr)	4,460	3,256	3,428	3,625	3,971	3,307

^aEn ppm, relativo a DSS (con acetona como estándar interno a 2,225 ppm).

^bEstas señales pueden tener asignaciones invertidas.

Tabla 3.20. Asignaciones de los espectros de RMN ¹H^a de oligosacáridos que contienen xilosa³²

Residuo	H-1	H-2	H-3	H-4	H-5	H-5'	H-6	H-6'
<i>Disacárido</i>								
→2)-β-D-Man-1→OMe	4,645	4,163	3,637	3,520	3,400		3,938	3,728
β-D-Xil-(1→	4,489	3,348	3,429	3,621	3,268	3,944		
<i>Tetrasacárido</i>								
α-D-Man-1	5,138	4,035	3,854	3,679	3,918		3,893	3,750
α-D-Man-1	4,900	4,010	3,831	3,679	3,676		3,892	3,759
6 3 2)-β-D-Man-1→OMe	4,681	4,197	3,836	3,800	3,588		3,977	3,774
β-D-Xil-1	4,474	3,360	3,425	3,624	3,249 ^b	3,998 ^c		

^aRegistrados a 500 MHz, 25°C, en D₂O.

^bH-5 axial.

^cH-5 ecuatorial.

3.4.4. RMN ¹H. RESULTADOS

Teniendo en cuenta los antecedentes bibliográficos y las características estructurales de los polisacáridos de *N. fastigiata* fue posible asignar la región anomérica de los espectros de RMN ¹H, registrados en D₂O a 30°C (Fig. 3.10). El manano F5', constituido casi exclusivamente por unidades α-D-Man y α-D-Man 6S, presentó una señal a 5,07 ppm, consistente con los desplazamientos tabulados de compuestos modelo. El manano F6', con predominio de residuos α-D-Man 2S y α-D-Man 6S, mostró dos señales principales a 5,50 y 5,12 ppm. Los xilomananos F3 y F4' revelaron tres señales principales a 5,52; 5,20 y 5,12 ppm, que fueron atribuidas a α-D-Man 2S, α-D-Man 2X y α-D-Man 6S respectivamente. La fracción F2', formada por el complejo xilomanano-galactano-xilano, dio cuatro picos a 5,52 (α-D-Man 2S); 5,30; 5,21 (α-D-Man 2X) y 5,12 ppm (α-D-Man 6S), donde la resonancia a 5,30 ppm está asociada a las unidades de α-L-galactosa del galactano. Las señales anoméricas de β-D-galactosa del galactano y de los residuos del xilano aparecen a 4,4 y 4,7-4,5 ppm, respectivamente. Teniendo en cuenta los valores informados para las unidades de β-D-xilosa incluidos en las Tabla 3.19 y 3.20, los desplazamientos químicos de los protones anoméricos de las ramificaciones simples de xilosa, sobre la cadena de manano, deberían aparecer cercanos a 4,5 ppm.

Fig. 3.10. Espectros de RMN ¹H de (a) F2', (b) F3, (c) F5' y (d) F6' registrados a 500 MHz y 30°C



3.5. ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LAS FRACCIONES F2'-F6'

Teniendo en cuenta los antecedentes relacionados con la actividad biológica de los xilomananos aislados en el fraccionamiento llevado a cabo en 1987^{2,33}, durante este trabajo de Tesis se evaluó la actividad antiviral de las fracciones cuyo análisis estructural se llevó a cabo. Los ensayos de actividad antiherpética y anticoagulante fueron realizados en colaboración con los Dres. Carlos A. Pujol y Elsa B. Damonte, del Laboratorio de Virología, Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA. En la Tabla 3.21 se indican las IC₅₀ de las muestras en estudio contra varias cepas de HSV tipos 1 y 2, entre las cuales había dos cepas deficientes en timidina quinasa (TK⁻), resistentes al aciclovir. Las células Vero se infectaron con virus en ausencia o presencia de varias concentraciones de cada fracción aislada, luego se cubrieron con medio de cultivo con o sin polisacárido agregado. El manano F6' fue el compuesto más activo con valores entre 0,6 y 1,3 µg/ml, mientras que las actividades de F2' y F3 resultaron algo menores. En cambio, el manano F5' no inhibió la replicación viral en niveles significativos. Como compuestos de referencia se emplearon DS de peso molecular 8000 (DS 8000) y heparina. La actividad antiherpética de F6' resultó comparable con los compuestos de referencia, con un amplio espectro de acción contra ambos serotipos de HSV y las variantes TK⁻, resistentes al aciclovir.

Por otra parte, los polisacáridos no fueron tóxicos para células Vero a concentraciones de 120-300 µg/ml o mayores.

Tabla 3.21. Composición, rendimiento y peso molecular de los xilomananos sulfatados

Xilo- manano	Sulfato	PM	Xil:S:Man ^a	IC ₅₀ (µg/ml)				CC ₅₀
				HSV-1	HSV-2	HSV-1 TK ⁻	HSV-1 TK ⁻	
	(% SO ₃ Na)		(relación molar)	F	G	B2006	Field	(µg/ml)
F2'	17,6	12000	34:59:100	7,1	7,1	2,6	2,0	>1000
F3	26,1	39100	28:84:100	14,4	6,1	19,6	9,5	300
F4'	26,0	21900	20:72:100	28,2	27,6	12,9	7,3	>1000
F5'	15,3	6400	2:31:100	>100	96,3	100	73,0	250
F6'	31,7	30000	2:82:100	0,7	0,7	1,3	0,6	120
DS 8000		8000		2,1	1,0	1,7	2,7	>1000
Heparina				1,3	2,1	3,6	5,0	>1000

En una etapa posterior, los Dres. Pujol y Damonte investigaron más sobre el mecanismo de acción de F6', en especial su acción inhibitoria sobre la glicoproteína C (Sección 2.2.4.).

Por otra parte, se midió el tiempo de trombina (TT) para evaluar la actividad anticoagulante de los xilomananos. El valor de TT para el plasma sin tratar fue de 15,6 s. El tratamiento del plasma con cualquiera de las cinco fracciones, en un rango de concentraciones de 5-200 µg/ml, no cambió significativamente el valor de TT control.

Se probó la actividad anti-HIV-1 en células MT-4 y CEM-SS de todas las fracciones (Tabla 3.22), en colaboración con la Dra. Anne-Marie Aubertin, del Institut de Virologie, INSERM U74, y el Dr. Robert Anton, del Laboratoire de Pharmacognosie, Faculté de Pharmacie, ambos pertenecientes a la Université Louis Pasteur, Strasbourg, Francia.

En el primer tipo de ensayo, la multiplicación de HIV-1 (cepa IIIB) en células MT-4 (células T4 transformadas por infección con el retrovirus HTLV-1 [*human T-cell leukemia virus tipe I*]) se siguió por el efecto citopatógeno inducido por el virus. Las células se infectaron con una dosis de HIV-1 que produce, luego de 5 días de cultivo, una disminución del 90% en el número de células vivas. Los compuestos ensayados se agregaron a distintas concentraciones, en el medio de cultivo, después de la adsorción del virus.

En el segundo tipo de ensayo, la multiplicación de HIV-1 (cepa LAI) en células CEM-SS – infectadas de modo tal de lograr el mismo porcentaje en la reducción de viabilidad celular que

en el experimento anterior– se evaluó, luego de 5 días de cultivo, por dosaje de la transcriptasa reversa presente en el sobrenadante de cultivo. También en este caso las muestras ensayadas se agregaron al medio de cultivo luego de la adsorción del virus.

En ambos casos la viabilidad de las células se midió por reacción colorimétrica por el método MTT, basado en la capacidad de deshidrogenasas mitocondriales de las células vivas para reducir bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio a formazán. La cantidad producida de formazán, medida por su absorbancia a 540 nm, se correlacionó con el número de células vivas³⁵. El porcentaje de protección de las células infectadas y tratadas con los compuestos se calculó aplicando la fórmula propuesta por Pauwels *et al.*³⁵:

$$P = \frac{T - I}{U - I} \times 100$$

- donde: *P*, porcentaje de protección;
 T, absorbancia a 540 nm de las células infectadas y tratadas con la muestra;
 I, absorbancia a 540 nm de las células infectadas control;
 U, absorbancia a 540 nm de las células no infectadas control.

La concentración inhibitoria IC₅₀ corresponde a la concentración de compuesto ensayado que confiere un 50% de protección.

Tabla 3.22. Actividad anti-HIV de los xilomananos sulfatados

<i>Xilo</i> -manano	IC ₅₀	CC ₅₀	IC ₅₀	CC ₅₀
	(µg/ml)	(µg/ml)	(µg/ml)	(µg/ml)
	HIV-I _{LA1}	CEM-SS	HIV-I _{III B}	MT4
F2'	36,8	>500	240	>500
F3	36,8	>500	218	>500
F4'	5,0	10	>500	20
F5'	1,7	14	>500	20
F6'	1,4	19	>500	20

La toxicidad de los compuestos sobre las células MT-4 y CEM-SS no infectadas se midió también por el método MTT. Se definió como CC₅₀ a la concentración de compuesto que producía un 50% de la absorbancia medida a 540 nm con respecto a las células testigo.

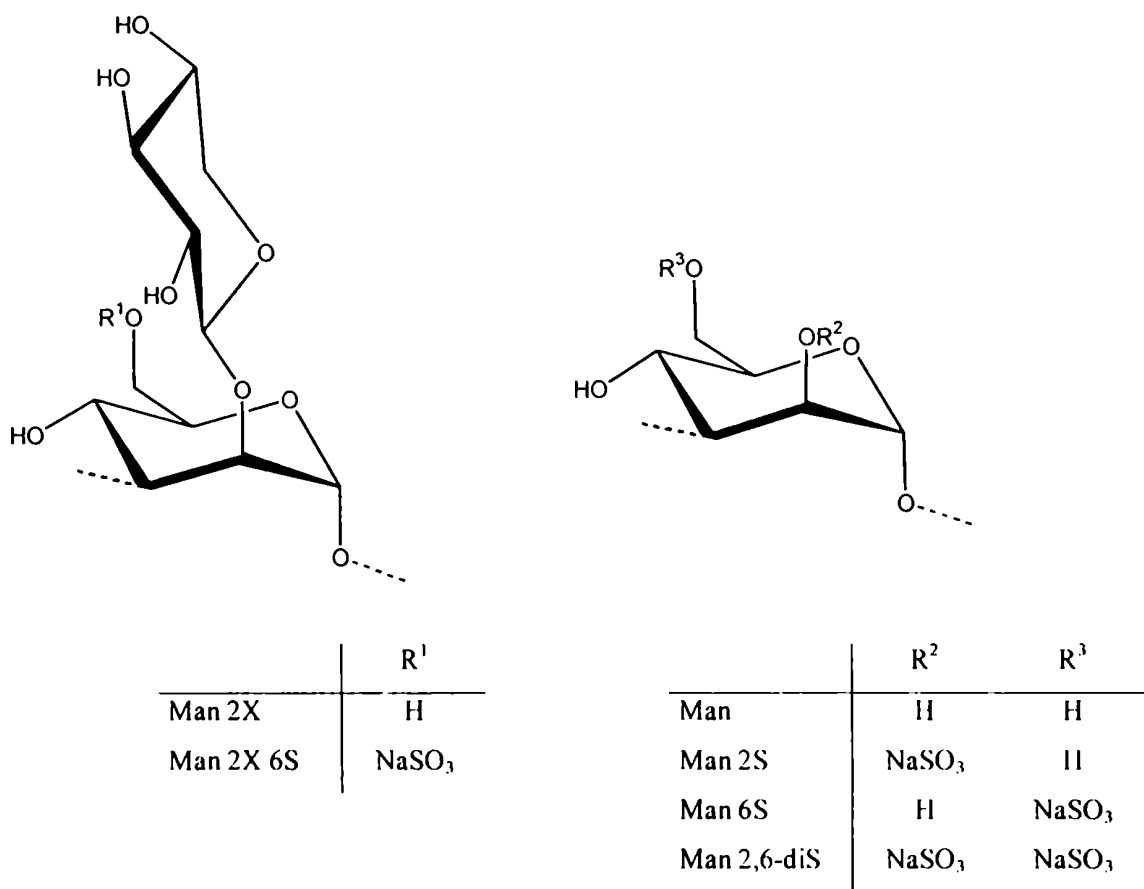
Sólo resultó interesante la actividad inhibitoria de las fracciones F4', F5' y F6' frente a HIV-1 (LAI), aunque la citotoxicidad elevada produjo como resultado índices de selectividad bajos a moderados (2-14). Esto hizo que estas fracciones no resultaran interesantes para estudios posteriores de actividad anti-HIV.

3.6. CONCLUSIONES

3.6.1. ANÁLISIS ESTRUCTURAL

El alga roja *Nothogenia fastigiata* biosintetiza un sistema de D-mananos con uniones α -(1→3) sulfatados en las posiciones 2 y 6, y con ramificaciones simples de D-xilosa enlazada β -(1→2) a la cadena central (Fig. 3.11). En la Tabla 3.23 se indica la composición en unidades estructurales de los xilomananos estudiados. La complejidad de las muestras sólo permite una aproximación semicuantitativa: se supuso que la xilosa estaba unida prioritariamente a las unidades de manosa sulfatadas en la posición 6, el remanente se asignó a la posición 2 de las unidades no sulfatadas. En otras palabras, se supuso que las ramificaciones estaban distribuidas de modo tal que las unidades disulfatadas fueran mínimas. Los xilomananos F2' y F4' siguen el mismo esquema general pero difieren en la distribución cuantitativa de las diferentes unidades estructurales. La fracción F4' tiene un contenido menor de ramificaciones de xilosa y mayor sulfatación que F2', además de presentar unidades inusuales de manosa 2,6-disulfato (Tabla 3.23). Ambos xilomananos se aislaron como complejos con otros polisacáridos coexistentes en el alga^{2,11,27,34,36}: un xilano del tipo "enlaces mixtos" y un galactano de la familia del ágar. Previamente se habían aislado complejos similares donde predominaba un xilogalactano sulfatado a partir del mismo extracto crudo^{11,36}. Por otra parte, las fracciones F5' y F6' son mananos verdaderos, con bajas cantidades de ramificaciones de xilosa. El manano F5' tiene el peso molecular más bajo de todos los polisacáridos del sistema, además de contener menor grado de sulfatación en general y en especial en la posición 2.

Fig. 3.11. Esquema de sustitución general para los xilomananos de *N. fastigiata*.



El fraccionamiento de las sales de cetrimida no depende del contenido de sulfato (Tabla 3.1), hecho que sugiere que el factor principal que induce la insolubilización es la formación de agregados de moléculas, y este proceso sería facilitado por la formación de sales insolubles de cetrimida³⁷. Los polímeros más estereoregulares podrían formar empaquetamientos más compactos en razón de su regularidad estructural. Así, un D-manano con uniones α -(1→3) puro, de origen sintético, resultó prácticamente insoluble en agua luego de precipitar durante un proceso de diálisis; mientras que otros menos regulares, con algunos enlaces de configuración β , fueron algo solubles en agua debido a la existencia de una estructura menos ordenada³⁷. En los trabajos publicados^{11,36} sobre los xilogalactanos sulfatados se había encontrado la formación de agregados insolubles entre los xilogalactanos, los xilomananos y los xilanos tipo “enlaces mixtos” producidos por el alga, y posiblemente la formación de agregados solubles.

Tabla 3.23. Composición (moles %) en unidades estructurales de los xilomananos

Xilomanano	manosa sulfatada en						manosa con ramificaciones de xilosa		Xilosa
	sin sulfato	2	6	2,4	2,6	4,6	2X 6S	2X	
F2 ^a	10	22	5	1	-	-	14	16	30
F3 ^b	5	32	12	3			22	2	24
F4'	5	46	10	3	10	1	12		12
F5'	61		29			2		3	5
F6'	9	52	31	1	1	-	3	-	3

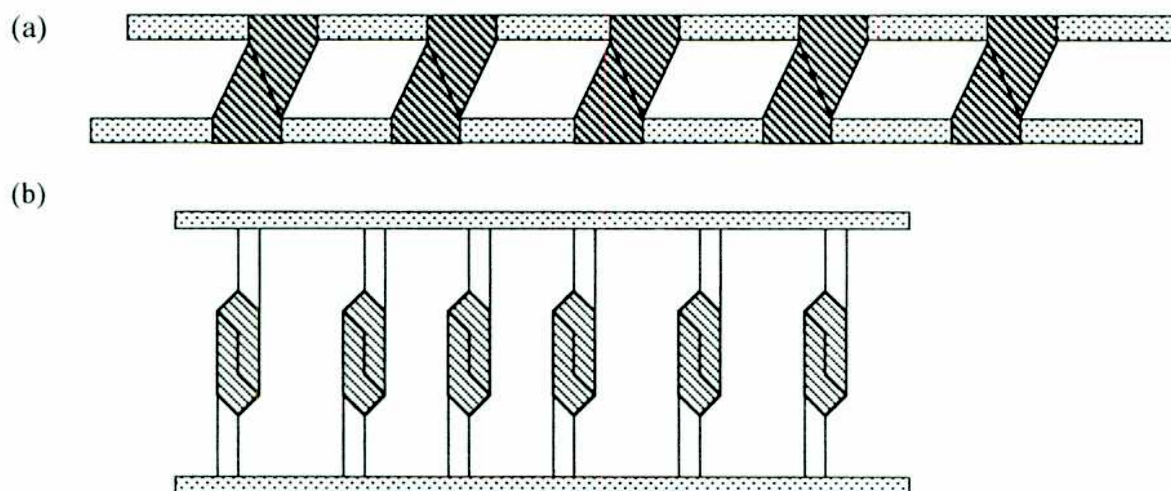
^aF2' tiene 2% de unidades de manosa enlazadas por la posición 4.

^bCalculado en base a los datos de la ref. 2.

El estudio de los procesos de reconocimiento que involucran a los hidratos de carbono está en desarrollo: se propuso que las uniones hidrógeno y las interacciones lipofílicas eran las fuerzas principales en la especificidad del autoensamblaje (self-assembly) entre hidratos de carbono en los sistemas naturales³⁸. Para comprender las bases de estos procesos de reconocimiento es fundamental el estudio de las energías de unión hidrógeno entre los hidroxilos de estas moléculas, la cooperatividad (ver Sección 3.6.2) y la influencia de las uniones hidrógeno intramoleculares en la formación de otras uniones intermoleculares del mismo tipo³⁹. La posibilidad de generar estructuras supramoleculares sintéticas autoensambladas basadas en uniones hidrógeno intermoleculares entre grupos hidroxilo fue demostrada hace unos diez años^{40,41}. Diferentes líneas de investigación concluyeron un concepto similar: existen interacciones polivalentes carbohidrato-carbohidrato de baja afinidad involucradas en el reconocimiento y adhesión específicos, como constituyentes del primer paso dentro de un esquema de interacciones celulares en varias etapas. Las interacciones postuladas proporcionan energías de unión suficientemente fuertes entre dos moléculas, debido a un arreglo ordenado y polivalente de los sitios de unión. A su vez, las características estructurales de los hidratos de carbono ofrecen una amplia variedad de sitios de interacción: la forma que adquiere una cadena está determinada por la estructura básica de los ciclos, los grupos hidrofílicos, las regiones hidrofóbicas, los grupos cargados, los residuos prominentes (ramificaciones) y la variedad de posiciones de unión de los residuos entre sí. Este conjunto de variables, inherentes a los hidratos de carbono, los diferencia de los péptidos definidos estrictamente por la secuencia de enlaces peptídicos. Es por este motivo que su

estudio conformacional está menos desarrollado, a diferencia del conocimiento de las fuerzas que regulan las estructuras secundarias y terciarias de las proteínas. Si bien las cadenas de carbohidratos son flexibles en general, hay regiones que tienen un rango estrecho de conformaciones óptimas. La combinación de estas dos características proporcionan a estos compuestos un excelente sistema de reconocimiento. Los sitios de reconocimiento importantes podrían mantener una conformación óptima, mientras que su presentación al entorno es facilitada por una cadena flexible. De esta manera, es fácil imaginar al modelo del “cierre de cremallera” (zipper) como una manera eficiente de mantener juntas a dos superficies en interacción, y también como un mecanismo de unión adecuado para dos cadenas complementarias de carbohidratos. Este modelo requiere el cumplimiento de dos condiciones: (i) la existencia de sitios de reconocimiento e interacción complementarios; (ii) su disposición en un arreglo polivalente y ordenado para asegurar la fuerza de unión necesaria. Hay varias maneras de crear un arreglo repetitivo polivalente, entre ellas: puede haber secuencias espaciadas regularmente dentro de una cadena de hidratos de carbono (Fig 3.13,a); o pueden existir ramificaciones proyectadas hacia el exterior a partir de una cadena central inerte, de naturaleza proteica, lipídica o de carbohidrato (Fig 3.13, b). Las uniones ocurrirían a través de las secuencias de reconocimiento específicas, mientras que la estructura de soporte no participaría de la unión propiamente dicha pero sí determinaría la arquitectura general, afectando la especificidad y la fuerza del enlace⁴².

Fig. 3.12. Representación esquemática del modelo propuesto para interacciones carbohidrato-carbohidrato



Las áreas rayadas representan las superficies involucradas en el proceso de reconocimiento y unión, las áreas punteadas influyen la arquitectura, y por lo tanto la especificidad y la fuerza de unión finales. (a) Todo el carbohidrato participa. (b) El esqueleto puede ser proteico, lipídico o glucídico.

Adicionalmente, los xilomananos contenían contraiones divalentes en proporción mayoritaria (Tabla 3.2) luego de haber sido precipitados con cetrimida y redisoluidos dos veces, en procesos sucesivos, en soluciones con concentraciones elevadas de cloruro de sodio. Este hecho indica que los cationes divalentes no son simples contraiones de los grupos sulfato, sino que están fuertemente complejados con los polisacáridos, de manera coherente con la tendencia demostrada por estos compuestos a formar agregados solubles e insolubles. En particular, la fracción F2' fue aislada como un complejo de xilomanano con galactano sulfatado y xilano neutro, también presentes en el alga. En el caso de F4' sólo se encontró asociación con el galactano. Estas dos fracciones junto con F6' poseen los contenidos más altos en cationes divalentes (Ca^{2+} : 73-77 %; Mg^{2+} : 17-22 %). Existen antecedentes bibliográficos sobre interacciones carbohidrato-carbohidrato mediadas por cationes Ca^{2+} entre oligosacáridos de Lewis^x (Le^x) pertenecientes a glicosfingolípidos^{43,44}. Los glicosfingolípidos Le^x están orientados con la porción glucídica hacia la capa externa de las membranas celulares. La orientación en cruz encontrada para los trisacáridos Le^x ligados covalentemente a través de un espaciador permiten contactos homofilicos entre glicoconjugados Le^x sin tener que recurrir a distintos fenómenos de reconocimiento. Estos trisacáridos se ensamblan cooperativamente y forman un nuevo sitio receptor bivalente con una afinidad mayor hacia Ca^{2+} que cada uno de los residuos por separado ($K_{bi} \geq K_{mono} \times K_{mono}$). Un contacto hidrofóbico estabiliza un sitio de unión polar para el catión entre ambos trisacáridos que conforma una cavidad hidrofílica rodeada por cinco grupos hidroxilo, donde el calcio queda ubicado a distancias Ca-O de aproximadamente 2,5 Å. Los contactos homofilicos *cis* estabilizan microdominios glicolipídicos dentro de una misma membrana. Los contactos homofilicos *trans* median adhesiones célula-célula entre capas externas de membranas pertenecientes a células distintas. El reconocimiento molecular paralelo o antiparalelo entre glicolípidos de Lewis individuales puede explicar ambos procesos. Así, pares de dímeros de membranas celulares adyacentes pueden apilarse uno sobre otro y estabilizar contactos intercelulares⁴⁴.

Las interacciones carbohidrato-carbohidrato entre células de mamíferos parecen ser mediadas por interacciones tanto heterofilicas entre estructuras diferentes, como en la interacción del gangliósido GM3 con el glicolípido Gg3Cer (gangliotriaosilceramida)⁴⁵, como homofilicas involucrando estructuras similares, como en el caso de los glicolípidos de Lewis⁴⁶. La interacción carbohidrato-carbohidrato en el reconocimiento celular sólo se expresa cuando los glicolípidos están distribuidos en clusters que forman microdominios en las superficies de las membranas celulares. Los polisacáridos cumplen con los requisitos para

el reconocimiento carbohidrato-carbohidrato que pueden delinearse por analogía con los glicolípidos: muchos fragmentos repetitivos (glicotopes) de polisacáridos regulares están firmemente ordenados, mientras que varias cadenas adyacentes pueden formar una superficie semejante a la distribución de carbohidratos en los glicolípidos de membrana⁴⁷. Makhalchik *et al.*⁴⁸ estudiaron las interacciones entre zymosano y algunos glicoconjugados. El zymosano, principal polisacárido componente de la pared celular de *Saccharomyces cerevisiae*, es un complejo que contiene aproximadamente 15 % de proteína y 85 % de hidratos de carbono. A su vez, los hidratos de carbono están compuestos por: (i) un glucano con uniones β -(1 $\rightarrow$ 3) y ramificaciones β -(1 $\rightarrow$ 6) (60 %) y (ii) un manano altamente ramificado (25 %). Se demostró que existen interacciones carbohidrato-carbohidrato entre el β -glucano y ciertos glicoconjugados formando una unión cooperativa, reversible, dependiente de Ca^{2+} , y que puede ser inhibida por oligosacáridos y polisacáridos. La especificidad de la interacción puede interpretarse de manera ambigua. Los siguientes datos constituyen evidencias a favor de la interacción: (1) la afinidad del β -glucano del zymosano hacia los glicoconjugados depende directamente de la naturaleza del ligando, siendo independiente de la molécula soporte a la que esté unido; (2) la unión es reversible y dependiente de la concentración, siendo inhibida por carbohidratos monovalentes; (3) la unión puede ser inhibida por análogos estructurales de ambos componentes del complejo carbohidrato-carbohidrato. Por otra parte, la baja afinidad y la capacidad inhibitoria encontrada para mono-, oligo- y polisacáridos con estructuras distintas a las cadenas de manosa y β -glucano no permiten postular que la especificidad de la interacción es alta, sino que es más correcto hablar de poliespecificidad, que también es característica de la mayoría de las lectinas (de naturaleza proteica), capaces de interactuar con un amplio rango de hidratos de carbono más que con una sustancia en particular. Al parecer, las interacciones carbohidrato-carbohidrato descritas por Hakomori y colaboradores para varios glicoesfingolípidos^{46,49} son más específicas que las encontradas para el zymosano. Esto puede explicarse en base a los fragmentos relativamente grandes de oligosacáridos (de tri- a pentasacáridos) involucrados en el caso de los glicolípidos. Además ambos glicolípidos componentes del par son homogéneos en su porción glucídica, mientras que el glucano de la levadura es irregular. El mecanismo de la interacción carbohidrato-carbohidrato mediada por calcio puede describirse como sigue: el cation forma un complejo con varios grupos hidroxilo de uno de los componentes del par, el segundo componente completa la esfera de coordinación del Ca^{2+} con sus hidroxilos. En caso de existir una complementariedad espacial del par, tiene lugar un efecto cooperativo positivo que refuerza la unión⁴⁷. Puede considerarse

que la fuerza impulsora de la interacción carbohidrato-carbohidrato no es solamente la formación del puente a través del Ca^{2+} , sino también la formación de uniones hidrógeno adicionales e interacciones de van der Waals⁴⁹, que refuerzan la afinidad y la especificidad. Si predomina el efecto adicional, la interacción carbohidrato-carbohidrato tiene una especificidad característica, como en el caso $\text{Le}^x\text{-Le}^x$, donde los oligosacáridos son complementarios entre sí geométricamente y el Ca^{2+} sólo promueve la unión. Por el contrario, si predomina el puente a través del Ca^{2+} , la especificidad sería considerablemente menor. Este parece ser el caso de la interacción descrita para el β -glucano con los manósidos⁴⁸.

Las células disociadas de la esponja marina *Microciona prolifera* se reagregan de una manera específica según la especie⁵⁰. La reagregación depende de la presencia de un gran proteoglicano extracelular de adhesión y de una concentración elevada de Ca^{2+} . Se identificaron dos dominios funcionales: un sitio de interacción proteoglicano-proteoglicano, homofilico, dependiente de Ca^{2+} , y un segundo sitio de interacción célula-proteoglicano, heterofilico, independiente de Ca^{2+} . Los glicanos presentes en el proteoglicano de adhesión promueven la agregación específica para la especie en ausencia del esqueleto proteico, sugiriendo la existencia de interacciones carbohidrato-carbohidrato mediadas por múltiples interacciones de baja afinidad. Hay dos residuos de oligosacáridos que actúan como sitios funcionales distintos, con características estructurales y reactividades frente a anticuerpos diferentes, involucrados en la reagregación de células de esponjas y constituyen otro ejemplo de interacciones intercelulares mediadas por uniones carbohidrato-carbohidrato dependientes de calcio.

Ruggiero *et al.*⁵¹ estudiaron la distribución de cargas y la afinidad por Ca^{2+} de L-galactanos sulfatados lineales y altamente ramificados, extraídos de ascidianos, por titulaciones conductimétricas y un indicador metalocrómico. Se encontró, por determinación de la densidad de carga y la distancia entre grupos sulfato, que los residuos de L-galactosa sulfatados estarían concentrados en la cadena central del polisacárido y no intercalados entre residuos neutros. Por otra parte, los grupos sulfato de estos galactanos presentan aproximadamente la misma afinidad por el calcio observada en el condroitin sulfato de vertebrados; mientras que los grupos sulfato de heparina y de condroitin sulfato fucosilado poseen una afinidad 3-5 veces mayor. A su vez, existen diferencias entre las afinidades registradas para los L-galactanos sulfatados de distintas especies de ascidianos. Sorprendentemente, la afinidad por el calcio aumenta con la proporción de ramificaciones no sulfatadas en la cadena, correspondiente a un porcentaje menor de sulfato en el polisacárido. Aunque los autores no pudieron explicar este resultado, dedujeron que la unión al calcio no es

una función que depende únicamente de la disponibilidad de sitios de unión aniónicos, sino que estaría asociada a una interacción Ca-polisacárido más compleja. En los tres polisacáridos estudiados, la afinidad aumenta cuando disminuye la distancia entre grupos cargados, lo que indicaría que se requiere más de un grupo sulfato para cada catión Ca^{2+} .

Las propiedades de agregación observadas para los polisacáridos de *N. fastigiata* pueden explicarse en base a los modelos de interacciones citados arriba: el xilano podría interactuar con un arreglo regular de ramificaciones de xilosa o con una región elongada del xilogalactano sulfatado y/o de la cadena central de manano, dando lugar a la formación de complejos muy estables aun en solución acuosa originados por interacciones cooperativas carbohidrato-carbohidrato, dependientes de calcio.

3.6.2. CORRELACIÓN ESTRUCTURA-ACTIVIDAD

La evaluación de las propiedades antiherpéticas de estos xilomananos sulfatados reveló una actividad inhibitoria selectiva contra la replicación varias cepas de HSV-1 y HSV-2 *in vitro*. El manano F6' fue el más activo con valores de IC_{50} de 0,6-1,3 $\mu\text{g/ml}$. La fracción F2' también puede ser considerada como un antiviral efectivo, aunque menos que la fracción anterior, con IC_{50} de 2,0-7,1 $\mu\text{g/ml}$. Teniendo en cuenta que esta última fracción corresponde a un complejo formado por un xilano neutro (~ 7 % molar), un galactano sulfatado (~ 10 % molar) y un xilomanano sulfatado (~ 83 % molar), y que los galactanos sulfatados tenían IC_{50} de 15-33 $\mu\text{g/ml}$, es indudable que la actividad antiherpética de F2' está vinculada principalmente al xilomanano, constituyente principal de esta muestra. No es posible determinar si la dosis efectiva observada corresponde a una combinación lineal de los valores individuales de cada uno de los polisacáridos componentes de esta fracción, o si existe un efecto sinérgico entre ellos.

La actividad antiviral de los polisacáridos sulfatados depende en la mayoría de los casos de su capacidad de bloquear los receptores virales necesarios para la adsorción a las células blanco⁵²⁻⁵⁵. Esta actividad no depende directamente de la estructura primaria ya que la cadena central actúa como soporte de los grupos sulfato⁵⁴⁻⁵⁸.

El “complejo” polímero sulfatado-virus podría estabilizarse si hay involucrado un mecanismo cooperativo⁵⁹ de interacción entre los grupos sulfato y los receptores positivamente cargados del virus. La energía de interacción entre residuos individuales pertenecientes a cada una de las moléculas –polímero sulfatado y receptor viral– es

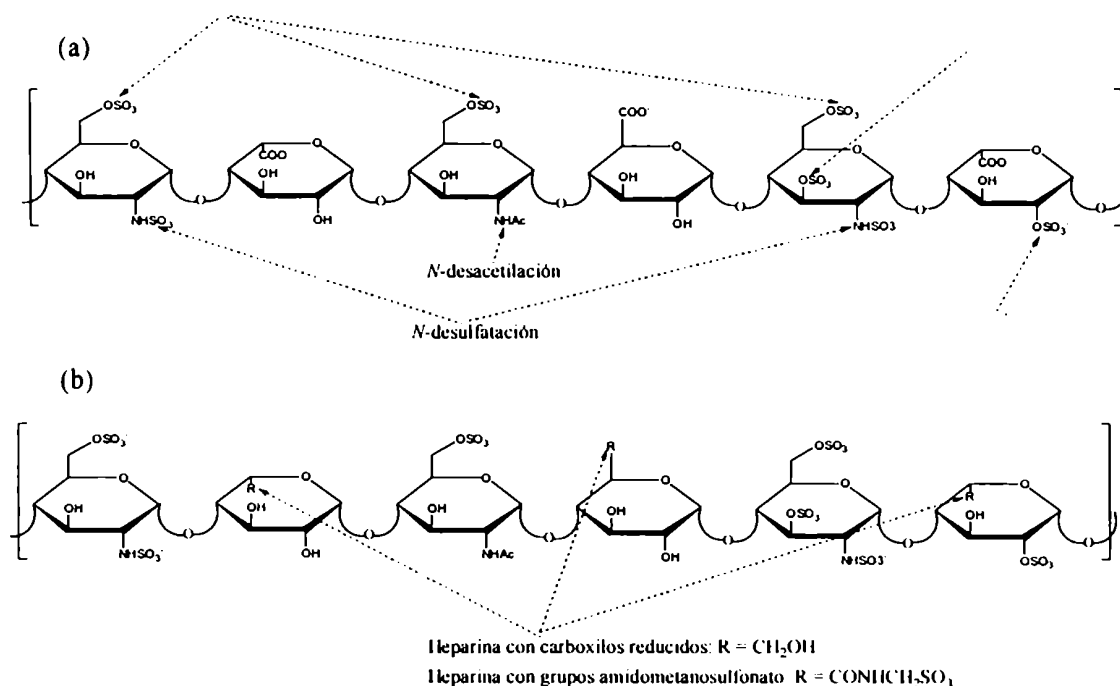
insuficiente para inducir una conformación ordenada global. Esto ocurriría por un mecanismo cooperativo donde cada uno de los términos individuales se refuerzan entre sí para superar la entropía conformacional, dando lugar a la estabilización del “complejo”. Nuevamente se aplican los conceptos ya explicados sobre las interacciones carbohidrato-carbohidrato. De esta manera podría entenderse la variación de la actividad con el contenido de sulfato^{52,56,58,60} y el peso molecular^{54,56,58} (F5' y F6'). Por otra parte, una cadena central altamente sustituida (F3) dificultaría la formación del “complejo”, provocando una disminución de la actividad. La selectividad de un polisacárido sulfatado frente distintos virus podría estar vinculada a la distribución topográfica de los receptores en la superficie viral^{52,61}.

La actividad antiviral de un manano sulfatado sería el resultado de una combinación adecuada de: (i) la conformación de la cadena central de unidades de α -D-manosa con uniones 1 $\rightarrow$ 3; (ii) el tamaño molecular; y (iii) el contenido y la distribución de los grupos sulfato.

La distribución más adecuada de los grupos aniónicos, para lograr una elevada actividad antiviral de la cadena central de manano, puede visualizarse en base a las interacciones entre los receptores de heparán sulfato de la superficie celular y las glicoproteínas de la envoltura viral⁶². Ciertas secuencias de glicosaminoglicanos de heparán sulfato, perteneciente a su vez a los proteoglicanos de la superficie celular, sirven como receptores para la unión de ambos serotipos de HSV a las células. Los glicosaminoglicanos de heparán sulfato también actúan como receptores para la unión celular de: otros miembros de la familia de los herpesvirus alfa, entre ellos el virus de pseudorrabia y el herpes virus bovino; un miembro de la familia de los herpesvirus beta (el citomegalovirus); y de otros patógenos humanos incluyendo bacterias y protozoos. La diversidad de microbios para los cuales funcionan como receptores puede explicarse en base a la complejidad de los glicosaminoglicanos de mamíferos: se trata de heteropolisacáridos lineales sulfatados que se unen covalentemente a las proteínas para formar los proteoglicanos. Los proteoglicanos se expresan en la superficie de todas las células de mamíferos, al menos en cultivo y son entonces blancos ideales para la unión de microbios. Los glicosaminoglicanos del heparán sulfato exhiben gran diversidad estructural, que surge de distintos arreglos de unidades disacarídicas compuestas por residuos alternantes de: (i) *N*-acetil o *N*-sulfato glucosamina (GlcN) con o sin sulfatación en las posiciones 3 y/o 6, y (ii) ácido glucurónico (GlcA) o idurónico (IdoA) con o sin sulfatación en la posición 2. El heparán sulfato consiste en un arreglo irregular de dominios ricos en *N*-sulfato y *O*-sulfato, en los cuales la unidad repetitiva básica es GlcA/IdoA-GlcNSO₃, espaciados entre sí por regiones de baja sulfatación donde predominan los disacáridos *N*-acetilados GlcA-GlcNAc. Herold *et al.*⁶³ postularon que una interacción fuerte entre HSV y el heparán sulfato de la superficie

celular debería requerir una secuencia estrictamente definida de monosacáridos sulfatados, de una manera análoga al pentasacárido específico de heparina que tiene alta afinidad por antitrombina III. Estos autores aprovecharon la similitud del heparán sulfato con la heparina y realizaron ensayos con heparinas modificadas para inhibir la unión de HSV a las células.

Fig. 3.13. Estructuras de heparina y heparán sulfato, y las modificaciones químicas realizadas sobre heparina. (a) Estructura representativa de heparina y heparán sulfato. Las posiciones modificadas químicamente están indicadas. (b) Sitios con grupos carboxilos modificados.



Heparán sulfato y heparina (Fig. 3.13) están compuestos por las mismas unidades monoméricas y se caracterizan por su composición heterogénea y su alta densidad de carga negativa. En general, las secuencias con residuos *N*-sulfatados tienden a contener más IdoA sulfatado, más que GlcA, mientras que las regiones *N*-acetiladas retienen sus residuos de GlcA y carecen de unidades *O*-sulfatadas. En la heparina hay una gran proporción de residuos de glucosamina *N*-sulfatados; por lo tanto el polisacárido resulta con alto contenido de *O*-sulfatación y una relación IdoA/GlcA elevada. En contraste, el heparán sulfato tiene una proporción menor de unidades $GlcNSO_3^-$, un contenido menor de IdoA y un menor grado de *O*-sulfatación general.

La interacción de HSV con el heparán sulfato de la superficie celular es compleja, probablemente involucra múltiples interacciones entre las glicoproteínas virales y los

dominios de heparán sulfato. Hay dos glicoproteínas independientes expresadas por HSV-1, gC y gB, ambas son capaces de unirse a heparina. Cuando gC está presente en la cubierta viral predomina la actividad de gC, y gB parece no contribuir de manera significativa a la adsorción inicial del virus. En ausencia de gC, es gB quien media la unión al heparán sulfato de la superficie celular. La situación se complica un poco más, ya que el heparán sulfato también juega un papel importante en la fusión celular posterior, inducida por el virus, posiblemente a través de interacciones con gB. En el estudio mencionado de Herold *et al.* se compararon los efectos de heparinas modificadas sobre tres tipos de cepas de HSV-1: salvaje, deficiente en gB (gB⁻, gC⁺) y deficiente en gC (gB⁺, gC⁻). Encontraron que tanto los grupos sulfato como los carboxilo, responsables de la carga negativa característica de ambos polisacáridos, eran importantes para la unión viral. En particular la N-sulfatación y la sulfatación en O-6 de los residuos de α -D-glucosamina del heparán sulfato juegan un rol fundamental. Los resultados resumidos figuran en la Tabla 3.24 y las modificaciones químicas efectuadas sobre la heparina se esquematizan en la Fig. 3.13.

Tabla 3.24. Actividad anti-HSV de heparina y sus derivados modificados químicamente.

Compuesto	IC ₅₀ (µg/ml)	
	HSV-1 (KOS) (cepa salvaje)	HSV-1 (KOS) gCA2-3 (cepa gC ⁻)
Heparina	< 1	7
Heparina N-desulfatada	1000	1000
Heparina N-desulfatada, N-reacetilada	10	~ 1000
Heparina N-desacetilada	< 1	3
Heparina 2-,3-O-desulfatada	10	1000
Heparina N-desulfatada, 2-,3-O-desulfatada	10	1000
Heparina N-desulfatada, N-reacetilada, 2-,3-O-desulfatada	450	1000
Heparina 6-O-desulfatada	200	300
Heparina con carboxilos reducidos	30	> 1000
Heparina AMS ^a	1	40

^aHeparina con grupos amidometanosulfonato.

La N-desulfatación de la heparina suprimió la actividad antiviral para las cepas salvaje y gC⁻, hecho que no se observó por N-desacetilación. Sin embargo, algo de la actividad fue

recuperada —en especial para la cepa salvaje— por reacetilación de los sitios desulfatados. Teniendo en cuenta que la *N*-desulfatación implica la aparición de una carga positiva, mientras que la reacetilación implica una carga neutra, es posible que no se requiera absolutamente la presencia de una carga negativa para la actividad antiviral, sino la ausencia de una carga positiva en este sitio. Además los dominios involucrados en la adsorción viral fueron independientes de los responsables de la actividad anticoagulante de la heparina. También notaron que las heparinas con los grupos carboxilos reducidos y desulfatadas en las posiciones 2 y 3 podían inhibir selectivamente la unión de virus gC' a las células, pero no tenían efectos inhibitorios importantes sobre la unión de HSV-1 gC'. La desulfatación de la posición 6 de la heparina redujo marcadamente la actividad antiviral frente a la cepa salvaje y gC', lo cual sugirió que esta posición constituía un factor determinante para las interacciones entre el virus y el heparán sulfato. La desulfatación de las posiciones 2 y 3, tanto de galactosamina libre o acetilada, retuvo cierta actividad contra la cepa salvaje, pero no contra la cepa deficiente en gC. Dado que gC predomina en la adsorción de la cepa salvaje a la célula, mientras que en la cepa gC' median las interacciones entre gB y heparán sulfato, el efecto diferencial observado sugiere que la sulfatación de las posiciones 2 y 3 son determinantes para la unión de gB al heparán sulfato de la superficie celular. De ser cierto, gC y gB interactuarían con esquemas estructurales distintos y quizá solapados. Por otra parte, la reducción del grupo carboxilo suprimió la actividad de la heparina frente al virus deficiente en gC, pero la mantuvo en las cepas salvaje y deficiente en gB. Esto indicaría que la heparina con los grupos carboxilos reducidos competían por porciones estructurales del heparán sulfato capaces de unirse a gC, pero no a gB. La sustitución del grupo carboxilo por uno amidometilsulfonato restableció la actividad, lo cual demostró que es importante la presencia de una carga negativa, más que la composición química de dicha carga.

En resumen, el estudio se llevó a cabo partiendo de la premisa que las heparinas modificadas que retuvieran los motivos estructurales del receptor (o de los receptores) del heparán sulfato inhibirían la unión viral. Se encontraron posiciones específicas de sulfatación (*N*-sulfatación y *O*-sulfatación en la posición 6) que eran importantes para la adsorción de cepas virales salvajes y mutantes de HSV-1 sobre la superficie celular. Por el contrario, regiones menos sulfatadas, ricas en *N*-acetilgalactosamina del heparán sulfato no serían importantes para la unión al virus, pues las modificaciones efectuadas sobre estas regiones no alteraron la actividad antiviral de la heparina.

Aquellos polisacáridos cuya distribución de sulfatos se asemeje estructuralmente a la distribución de cargas negativas de los sitios de unión del heparán sulfato podrán inhibir

competitivamente la unión viral. La presencia de grupos 2- y 6-sulfato parece ser importante para que exista actividad antiviral, pero también se requiere su distribución adecuada en dominios, que imiten el sitio de unión aniónico del heparán sulfato. En este sentido, el manano F6', con alto contenido de sulfato distribuido tanto en la posición 2 como en la 6 (Tabla 3.23), es el que reproduciría mejor el dominio correspondiente a la unión viral. El xilomanano F2', con el menor contenido total de cargas aniónicas y, simultáneamente, la mayor sustitución con ramificaciones simples de xilosa (Tabla 3.23), puede ser considerado como un inhibidor aceptable de la adsorción viral. En este último caso no queda claro cómo influenciaría la presencia de xilosa sobre la conformación del polisacárido y cómo se vería afectada la distribución de cargas en la cadena central, aunque también existen grupos sulfato en las posiciones 2 y 6. Las fracciones F3 y F4' son menos activas, a pesar de que el contenido de xilosa disminuye y aumenta la sulfatación. Como regla general se acepta que la actividad antiviral de los polisacáridos sulfatados aumenta con el peso molecular y la sulfatación⁶⁰. Esto es cierto dentro de ciertos límites, como fuera demostrado por la evaluación de la actividad anti-HSV de carragenano kappa comercial [con unidades repetitivas de $\rightarrow 3$)- β -D-galactosa 4-sulfato-(1 $\rightarrow$ 4)-3,6-anhidro- α -D-galactosa-(1 $\rightarrow$) sometido a sulfatación: la sustitución completa con sulfato de la posición 6 de las unidades de β -D-galactosa disminuyó la actividad antiviral. Esto sugirió que un grupo sulfato en esta posición no determina la actividad y que la sustitución elevada en posiciones no activas dificultaría la formación del complejo virus-polisacárido, disminuyendo la actividad⁶⁴. Como fuera descrito en el trabajo de Herold *et al.*, probablemente la sustitución en la posición 2 sea una condición necesaria –pero no suficiente– para mostrar actividad, otro requisito estaría vinculado con una distribución tridimensional adecuada de cargas negativas. El manano F5', el menos activo de la serie, carece prácticamente de sustitución en la posición 2, ya sea con grupos neutros (xilosa) o aniónicos (sulfato), y posee el menor peso molecular.

La actividad anticoagulante de la heparina es el resultado de su unión y activación sobre la proteína anticoagulante: la antitrombina. La interacción involucrada es de alta afinidad y especificidad, relacionada con una secuencia pentasacáridica particular. El residuo de glucosamina en el centro de este pentasacárido presenta una sulfatación inusual en la posición 3, que junto con otras posiciones sulfatadas y características estructurales son esenciales para la unión a la antitrombina. Aproximadamente dos tercios de las cadenas de heparina presentes en una preparación típica carecen de la secuencia específica y por lo tanto carecen de actividad anticoagulante⁶⁵. Los polisacáridos sulfatados suelen poseer propiedades anticoagulantes, sin embargo, los xilomananos estudiados resultaron inactivos. Como fuera

previamente determinado para heparinas modificadas químicamente^{62,65} y para carragenanos⁶⁶, los datos obtenidos para las fracciones estudiadas de *N. fastigiata* confirman que no hay correlación entre las actividades anticoagulante y antiviral. Este hecho constituye una ventaja para la aplicación de estos polisacáridos sulfatados como agentes antivirales, al menos para formulaciones de aplicación local, con menores efectos secundarios adversos. Con un fin similar, a partir del año 2003 se llevará a cabo la evaluación de un microbicida vaginal, conteniendo un carragenano como principio activo, contra la infección con HIV y otras enfermedades de transmisión sexual sobre una población de 6000 mujeres HIV-negativas, no embarazadas, en Sudáfrica y Botswana⁶⁷.

3.7. BIBLIOGRAFÍA

- ¹Parkinson, P. *Taxon* **1983**, 32, 601-610.
- ²Matulewicz, M.C.; Cerezo, A.S. *Carbohydr. Polym.* **1987**, 7, 121-132.
- ³Ogawa, T.; Sasajima, K. *Carbohydr. Res.* **1981**, 97, 205-227.
- ⁴Park, J.T.; Johnson, M.J. *J. Biol. Chem.* **1949**, 181, 149-151.
- ⁵Hakomori, S. *J. Biochem. (Tokyo)* **1964**, 55, 205-208.
- ⁶Stevenson, T.T.; Furneaux, R.H. *Carbohydr. Res.* **1991**, 210, 277-298.
- ⁷Josleau, J.-P.; Chambat, G.; Chumpitazi-Hermoza, B. *Carbohydr. Res.* **1981**, 90, 339-344.
- ⁸Petruš, L.; Gray, D.G.; Be Miller, J.N. *Carbohydr. Res.* **1995**, 268, 319-323.
- ⁹Haworth, W.N. *J. Chem. Soc.* **1915**, 107, 8-16.
- ¹⁰Cerezo, A.S. *Carbohydr. Res.* **1973**, 26, 335-340.
- ¹¹Matulewicz, M.C.; Haines, H.H.; Cerezo, A.S. *Phytochem.* **1994**, 36, 97-103.
- ¹²Lloyd, A.G.; Dogdson, K.S. *Biochem. Biophys. Acta* **1961**, 46, 116-120.
- ¹³Lloyd, A.G.; Dogdson, K.S.; Price, G.; Rose, F.A. *Biochem. Biophys. Acta* **1961**, 46, 108-105.
- ¹⁴Stancioff, D.J.; Stanley, N.F. *Proc. Int. Seaweed. Symp.* **1969**, 6, 595-609.
- ¹⁵Chopin, T.; Whalen, E. *Carbohydr. Res.* **1993**, 246, 51-59.
- ¹⁶Hara, C.; Kiho, T.; Ukai, S. *Carbohydr. Res.* **1982**, 111, 143-150.
- ¹⁷Hara, C.; Yokomori, Y.; Kiho, T.; Nagai, K.; Ukai, S. *Carbohydr. Res.* **1988**, 173, 332-338.
- ¹⁸Awad, L.F.; El Ashry, E.S.H.; Schuerch, C. *Carbohydr. Res.* **1983**, 122, 69-79.
- ¹⁹Allerhand, A.; Berman, E. *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, 106, 2400-2412.
- ²⁰Cherniak, R.; Jones, R.G.; Reiss, E. *Carbohydr. Res.* **1988**, 172, 113-138.
- ²¹Gorin, P.A.J. *Carbohydr. Res.* **1975**, 39, 3-10.
- ²²Ogawa, K.; Miyanishi, T.; Yui, C.; Hara, C.; Kiho, T.; Ukai, S.; Sarko, A. *Carbohydr. Res.* **1986**, 148, 115-120.
- ²³Warin, V.; Baert, F.; Fourret, R.; Strecker, G.; Spik, G.; Fournet, B.; Montreuil, J. *Carbohydr. Res.* **1979**, 76, 11-22.
- ²⁴Usov, A.I.; Dobkina, I.M. *Bioorg. Khim.* **1988**, 14, 642-651.
- ²⁵Usov, A.I.; Dobkina, I.M. *Bioorg. Khim.* **1991**, 17, 1051-1058.
- ²⁶Usov, A.I.; Yarotskii, S.V.; Vasyanina, L.K. *Bioorg. Khim.* **1975**, 1, 1583-1588.
- ²⁷Matulewicz, M.C.; Cerezo, A.S.; Jarret, R.J.; Syn, N. *Int. J. Biol. Macromol.* **1992**, 14, 29-32.

- ²⁸Jones, C.; Mulloy, B. *Methods in Molecular Biology, Vol. 17: Spectroscopic Methods and Analyses: NMR, Mass Spectrometry, and Metalloprotein Techniques*. Editores: Jones, C.; Mulloy, B.; Thomas, A.H. 1993, Humana Press Inc., Totowa, USA.
- ²⁹Jansson, P.-E.; Kenne, L.; Widmalm, G. *Carbohydr. Res.* **1989**, *188*, 169-191.
- ³⁰Brisson, J.-R.; Winnik, F.M.; Krepinsky, J.J.; Carver, J.P. *J. Carbohydr. Chem.* **1983**, *2*, 41-55.
- ³¹Hoffman, R.A.; Leeftang, B.R.; de Barse, M.M.J.; Kamerling, J.P.; Vliengenthart, J.F.G. *Carbohydr. Res.* **1991**, *221*, 63-81.
- ³²Bowstra, J.B.; Kerekgyarto, J.; Kamerling, J.P.; Vliegthart, J.F. *Carbohydr. Res.* **1989**, *186*, 39-49.
- ³³Damonte, E.; Neyts, J.; Pujol, C.A.; Snoeck, R.; Andrei, G.; Ikeda, S.; Witvrouw, M.; Reymen, D.; Haines, H.; Matulewicz, M.C.; Cerezo, A.; Coto, C.E.; De Clercq, E. *Biochem. Pharmacol.* **1994**, *47*, 2187-2192.
- ³⁴Cerezo, A.S.; Lezerovich, A.; Labriola, R.; Rees, D.A. *Carbohydr. Res.* **1971**, *19*, 289-296.
- ³⁵Pauwels, R.; Balzarini, J.; Baba, M.; Snoeck, R.; Schols, D.; Herdewijn, P.; Desmyter, J.; De Clercq, E. *J. Virol. Methods* **1988**, *20*, 309-321.
- ³⁶Haines, H.H.; Matulewicz, M.C.; Cerezo, A.S. *Hydrobiologia* **1990**, *204-205*, 637-643.
- ³⁷Kong, F.; Schuerch, C. *Macromolecules* **1984**, *17*, 983-989.
- ³⁸Dammer, U.; Popescu, O.; Wagner, P.; Anselmetti, D.; Güntherodt, H.-J.; Misevic, G.N. *Science* **1995**, *267*, 1173-1175.
- ³⁹López de la Paz, M.; Ellis, G.; Penadés, S.; Vicent, C. *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 1659-1662.
- ⁴⁰Lehn, J.-M.; Mascal, M.; De Cian, A.; Fischer, J. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **1992**, *4*, 461-468.
- ⁴¹Hanessian, S.; Simard, M.; Roelens, S. *J. Amer. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 7630-7645.
- ⁴²Spillman, D. *Glycoconjugate J.* **1994**, *11*, 169-171.
- ⁴³Geyer, A.; Gege, C.; Schmidt, R.R. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 1466-1468.
- ⁴⁴Geyer, A.; Gege, C.; Schmidt, R.R. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 3246-3249.
- ⁴⁵Kojima, N.; Hakomori, S. *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 17552-17558.
- ⁴⁶Eggens, I.; Fenderson, B.; Toyokuni, T.; Dean, B.; Stroud, M.; Hakomori, S. *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 9476-9484.
- ⁴⁷Bovin, N.V. *Biochemistry (Moscow)* **1996**, *61*, 694-704.
- ⁴⁸Mikhailchik, E.V.; Shiyan, S.D.; Bovin, N.V. *Biochemistry (Moscow)* **2000**, *65*, 581-589.
- ⁴⁹Hakomori, S. *Pure Appl. Chem.* **1991**, *63*, 473-482.

- ⁵⁰Spillmann, D.; Thomas-Oates, J.E.; van Kuik, J.A.; Vliegthart, J.F.G.; Misevic, G.; Burger, M.M.; Finne, J. *J. Biol. Chem.* **1998**, *270*, 5089-5097.
- ⁵¹Ruggiero, J.; Fossey, M.A.; Santos, J.A.; Mourão, P.A.S. *Carbohydr. Res.* **1998**, *306*, 545-550.
- ⁵²Witvrouw, M.; Desmyter, J.; De Clercq, E. *Antiviral Chem. Chemother.* **1994**, *5*, 345-359.
- ⁵³Schols, D.; Pauwels, R.; Desmyter, J.; De Clercq, E. *Virology* **1990**, *175*, 556-561.
- ⁵⁴Witvrouw, M.; Schols, D.; Andrei, G.; Snoeck, R.; Hosoya, M.; Pauwels, R.; Balzarini, J.; De Clercq, E. *Antiviral Chem. Chemother.* **1991**, *2*, 171-179.
- ⁵⁵Béress, A.; Wassermann, O.; Bruhn, T.; Béress, L.; Kraiselburd, E.N.; Gonzalez, L.V.; de Motta, G.E.; Chavez, P.I. *J. Nat. Prod.* **1993**, *56*, 478-488.
- ⁵⁶Baba, M.; De Clercq, E. *Design of Anti-Aids Drugs*. Editor: De Clercq, E. 1990, Elsevier, Amsterdam, págs. 87-101.
- ⁵⁷Gama Sosa, M.A.; Fazely, F.; Koch, J.A.; Vercellotti, S.V.; Ruprecht, R.M. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1991**, *174*, 489-496.
- ⁵⁸Koizumi, N.; Sakagami, H.; Utsumi, A.; Fujinaga, S.; Takeda, M.; Asano, K.; Sugawara, I.; Ichikawa, S.; Kondo, H.; Mori, S.; Miyatake, K.; Nakano, Y.; Nakashima, H.; Murakami, T.; Miyano, N.; Yamamoto, N. *Antiviral Res.* **1993**, *21*, 1-14.
- ⁵⁹Rees, D.A.; Morris, E.R.; Thom, D.; Madden, J.K. *The polysaccharides. Vol. 1*. Editor: Aspinall, G.O. 1982, Academic Press, London, págs. 195-290.
- ⁶⁰Nakashima, H.; Yoshida, O.; Baba, M.; De Clercq, E.; Yamamoto, N. *Antiviral Res.* **1989**, *11*, 233-246.
- ⁶¹Witvrouw, M.; Pannecouque, C.; De Clercq, E. *Carbohydrates in Drug Design, Cap. 5: Polysulfates: Chemistry and Potential as Antiviral Drugs*. Editores: Witczak, Z.J.; Nieforth, K.A. 1997, Marcel Dekker Inc., New York, USA, págs. 157-207.
- ⁶²Baba, M.; De Clercq, E.; Schols, D.; Pauwels, R.; Snoeck, R.; Van Boeckel, C.; Ven, Dedem, G.; Kraaijeveld, N.; Hobbelen, P.; Ottenheijm, H.; Den Hollander, F. *J. Infect. Dis.* **1990**, *161*, 208-213.
- ⁶³Herold, B.C.; Gerber, S.I.; Polonsky, T.; Belval, B.J.; Shaklee, P.N.; Holme, K. *Virology* **1995**, *206*, 1108-1116.
- ⁶⁴Kolender, A.A.; Pujol, C.A.; Damonte, E.B.; Cerezo, A.S.; Matulewicz, M.C. *An. Asoc. Quím. Argentina* **1998**, *86*, 304-311.
- ⁶⁵Barzu, T.; Level, M.; Petitou, M.; Lormeau, J.C.; Choay, J.; Schols, D.; Baba, M.; Pauwels, R.; Witvrouw, M.; De Clercq, E. *J. Med. Chem.* **1993**, *36*, 3546-3555.

⁶⁶Carlucci, M.J.; Pujol, C.A.; Cíancía, M.; Noseda, M.D.; Matulewicz, M.C.; Damonte, E.B.; Cerezo, A.S. *Int. J. Biol. Macromol.* **1997**, *20*, 97-105.

⁶⁷Spieler Trager, R. *Science* **2003**, *299*, 39.

CAPÍTULO 4

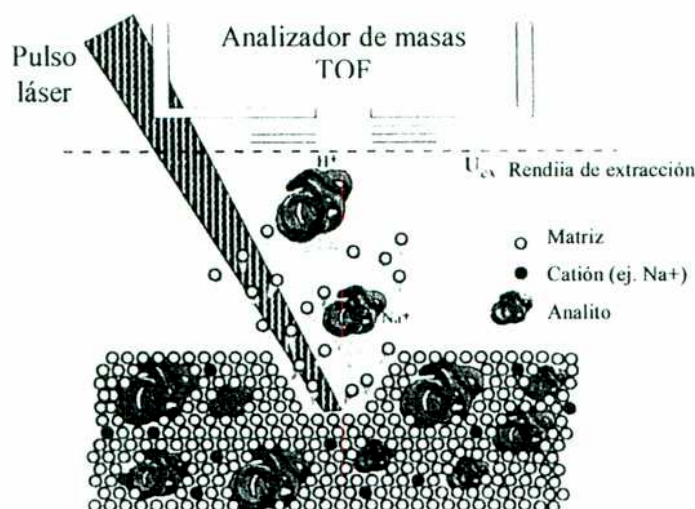
ANÁLISIS POR ESPECTROMETRÍA DE MASA UV-MALDI-TOF DE POLISACÁRIDOS DE *NOTHOGENIA FASTIGIATA*

4.1. INTRODUCCIÓN

La amplia variabilidad estructural de los hidratos de carbono hace que el análisis por espectrometría de masa (EM) de estos compuestos abarque un gran número de técnicas, sin que haya un método ideal para todos. La ionización por impacto electrónico, por ejemplo, sólo es aplicable a las moléculas más pequeñas, previa derivatización. Por otra parte, EM MALDI (matrix-assisted laser desorption/ionization, desorción/ionización por láser asistidas por la matriz) es una alternativa más versátil, ya que la mayoría de los compuestos dan señal en su estado nativo, proporcionando información sobre varios aspectos del análisis estructural. Esta técnica fue desarrollada en la segunda mitad de la década de 1980 para el análisis de biomoléculas de alto peso molecular por el Dr. K. Tanaka^{1,2}, quien recibió el premio Nobel en el año 2002 por este motivo, y por los Dres. M. Karas y F. Hillenkamp^{3,4}. El analito se mezcla con un compuesto usado como matriz, generalmente una molécula orgánica pequeña, se deja cristalizar por evaporación del solvente y se somete a un pulso de láser, a fin de obtener una señal. La mayor parte de la energía del láser, usualmente en la región del ultravioleta (UV), es absorbida por la matriz y transferida al analito, que se ioniza por procesos tales como unión a un protón o a un catión de un metal alcalino (Fig. 4.1). La absorción en el UV de las matrices más comunes fueron estudiadas⁵ y resultaron similares a las registradas para estos compuestos en solución.

La técnica fue desarrollada inicialmente para el análisis de proteínas, pero en términos generales es capaz de producir iones moleculares intactos a partir de compuestos muy polares como proteínas, oligosacáridos, oligonucleótidos y polímeros sintéticos (polietilenglicol, polimetacrilato de metilo, etc.).

Fig. 4.1. Desorción/ionización en EM MALDI



El estudio de polisacáridos por espectrometría de masa con técnicas de ionización “suaves” como ESI (electrospray ionization) o MALDI es más complejo, con respecto a la situación de las proteínas, debido a la existencia simultánea de varias distribuciones, a saber:

- i) como resultado de la biosíntesis del polisacárido no hay un peso molecular único, sino una *distribución de pesos moleculares*;
- ii) las cadenas centrales pueden tener extremos terminales reductores o no reductores diferentes, lo que genera una *distribución de grupos terminales*;
- iii) la composición de las moléculas del polisacárido tiene cierta variabilidad estructural, a pesar del proceso de fraccionamiento que pueda haber dado lugar a la muestra, dando origen a una *distribución de unidades monoméricas* y a una eventual *distribución de bloques* constituyentes del polisacárido.

La sensibilidad de EM MALDI resultó 10-100 veces mayor que la espectrometría FAB (fast atom bombardment) para el análisis de glicoproteínas, oligosacáridos y glucanos cíclicos. Sin embargo, la ionización en EM MALDI de los hidratos de carbono como especies cargadas (principalmente $[M+Na]^+$) no es tan sensible como la ionización de péptidos, donde la especie predominante es $[M+H]^+$. En consecuencia, es necesario emplear mayores potencias de láser, lo que a su vez lleva a que las muestras depositadas se evaporen más rápidamente que en el análisis de péptidos. Por lo tanto, el punto de incidencia del láser debe moverse a través de la superficie de la muestra a fin de mantener la señal. Este efecto es relativamente insignificante para la adquisición de la señal de un ion molecular en un

instrumento de tiempo de vuelo (TOF, time-of-flight), aunque adquiere importancia para el enfoque del instrumento y para la adquisición de los espectros de fragmentación.

Los láseres de nitrógeno que emiten a 337 nm (UV) son utilizados universalmente para el análisis por EM MALDI, aunque los láseres de infrarrojo tienen cierta aplicación en el análisis de glicoproteínas y glicanos.

El alto grado de desarrollo de EM UV-MALDI como método analítico presenta un contraste notorio con el escaso entendimiento sobre el mecanismo teórico del proceso de desorción/ionización. Los iones pueden formarse en el estado sólido, o bien en fase gaseosa por reacciones ion-molécula inmediatamente después de la desorción por el láser. Es probable que ocurran ambos procesos en proporciones diferentes según la matriz y la muestra. Lehman, Knochenmuss y Zenobi⁶ sugirieron que la mayor parte de la ionización está presente en el estado sólido para muestras que contienen complejos de metales de transición, mientras que otras muestras, por ejemplo aquellas que contienen poliestireno, están ionizadas en forma predominante en la fase gaseosa. Knochenmuss *et al.*⁷ también apoyaron la ionización rápida en fase sólida y propusieron un mecanismo que incluye protonación, formación del catión y efectos de supresión de matriz que involucran a moléculas de matriz excitadas fotoquímicamente, pero no ionizadas, como las especies reactivas inductoras.

Recientemente Knochenmuss *et al.*⁸ propusieron que las reacciones secundarias ion-molécula, en particular las reacciones de transferencia de carga y de protón entre ion y molécula, que tienen lugar en la pluma de desorción son los determinantes principales de los espectros de masa observados. El alcance de las reacciones secundarias de ionización puede ser tan amplio que los complejos eventos primarios de ionización no necesariamente quedan reflejados en el espectro. Se postula una ionización primaria de la matriz, seguida de reacciones secundarias entre matriz ionizada y analito neutro. Por supuesto, al mismo tiempo las reacciones matriz ionizada-matriz neutra son igualmente probables.

Los espectros de masa UV-MALDI registrados en modo de detección positivo presentan tres características generales a tener en cuenta:

- i) Los espectros consisten fundamentalmente en iones monocargados.
- ii) Existe un fenómeno denominado efecto de supresión de la matriz (MSE, matrix suppression effect) por el cual los analitos de peso molecular bajo a medio, en concentración suficientemente elevada, pueden suprimir fuerte o completamente las señales de la matriz en el espectro. Esto constituye una evidencia de la saturación de las reacciones secundarias matriz-analito a concentraciones elevadas de analito. También

existen efectos de supresión analito-analito (ASE, analyte suppression effect) que implican reacciones secundarias similares.

- iii) Se requiere una mezcla eficiente de matriz y analito antes de la desorción, de modo de promover colisiones o interacciones adecuadas entre matriz y analito, minimizando las regiones ricas en matriz.

Si la pluma de UV-MALDI llegara a alcanzar un estado de equilibrio completo, no habría iones (excepto las cargas netas positivas generadas por pérdidas de electrones) debido a reacciones de neutralización entre cationes y aniones. Los iones son especies minoritarias y por lo tanto los encuentros entre iones son muy poco frecuentes y no se logra completar el equilibrio. Este es un requisito obvio para obtener información útil de un espectro UV-MALDI. Las colisiones ion-molécula son abundantes, debido a la abundancia de matriz y de analito, por lo que este tipo de reacciones sí alcanzan o se aproximan a una distribución iónica delimitada termodinámicamente. En ciertos rangos de concentraciones, las reacciones ion-molécula de analito son significativas y se ponen de manifiesto en los espectros registrados.

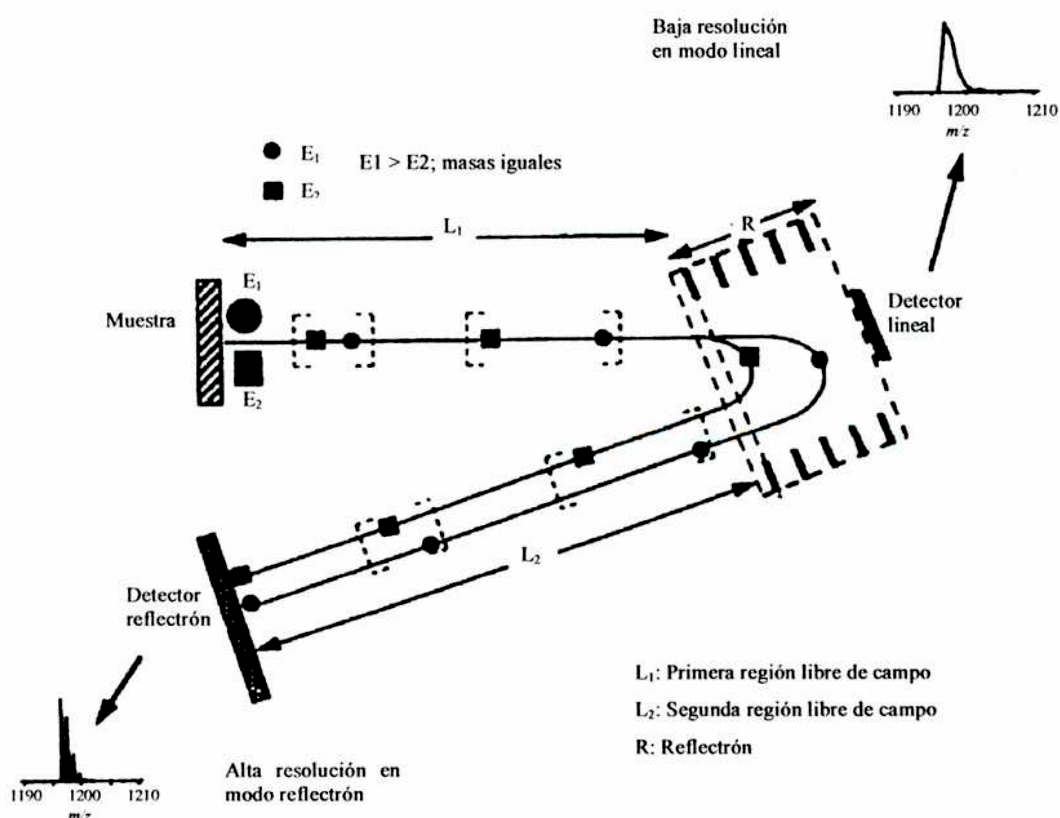
Las reacciones de transferencia de carga y de protón pueden explicar tanto el predominio de iones monocargados, como los efectos MSE y ASE. La termodinámica de las reacciones ion-molécula es tal que los iones altamente cargados son reducidos rápidamente, aunque los iones monovalentes no se neutralizan por el mismo camino. Si existen colisiones en la pluma en cantidad suficiente, el espectro UV-MALDI consistirá predominantemente de iones con carga simple, o eventualmente de aquellos donde los múltiples sitios monovalentes estén separados. Las reacciones secundarias ion-molécula en la pluma estarían frecuentemente bajo control termodinámico, más que cinético. Si los valores de los parámetros termodinámicamente relevantes fueran conocidos y las condiciones experimentales se eligieran adecuadamente, sería posible planear y predecir muchos experimentos UV-MALDI. Las condiciones básicas parecen ser una mezcla eficiente de la matriz y los analitos antes de la desorción de la muestra y una incidencia suficiente del láser como para generar una pluma rica en colisiones.

La naturaleza pulsada de la fuente de ionización por láser y su capacidad para ionizar moléculas grandes hacen que la aplicación de un analizador TOF sea ideal. Este analizador se basa en la separación de iones de acuerdo con su relación masa/carga (m/z), para iones acelerados con el mismo potencial a partir de un punto fijo, a un mismo tiempo inicial, cuando se los deja derivar hacia el detector. Con este arreglo instrumental se logra alta sensibilidad ya que la mayoría de los iones generados en la fuente llegan a ser registrados por el detector. Los iones producidos pueden ser analizados en modo de extracción continua, o

bien en modo de extracción demorada (delayed extraction). Cuando los iones son acelerados tienen una amplia dispersión en su contenido energético, pero si los iones se forman en un campo eléctrico débil y luego se los acelera mediante un pulso de alto voltaje después de un tiempo predeterminado, se minimiza esta dispersión energética, disminuye el ancho del pico detectado, y mejoran la resolución y la exactitud.

Amplias diferencias de energía cinética entre los iones producidos hacen que los analizadores TOF lineales (Fig. 4.2) no produzcan señales con alta resolución para masas elevadas, ya que no hay un mecanismo de compensación para la distribución inicial de energía cinética (esta distribución es más amplia a masas mayores). El analizador TOF en modo reflectrón está compuesto por dos regiones lineales, libres de campo, y un espejo iónico (Fig. 4.2) que compensa las diferencias de energía cinética en iones de igual m/z .

Fig. 4.2. Esquema de un espectrómetro de masa MALDI-TOF con modo de detección lineal y reflectrón



Cuando dos iones (1 y 2) de igual m/z pero diferente energía cinética inicial ($E_1 > E_2$) se desorben de una superficie y analizan en modo reflectrón ocurren los procesos que se indican a continuación. Ambos iones atraviesan la primera región libre de campo (L_1), pero el ion 1 lo

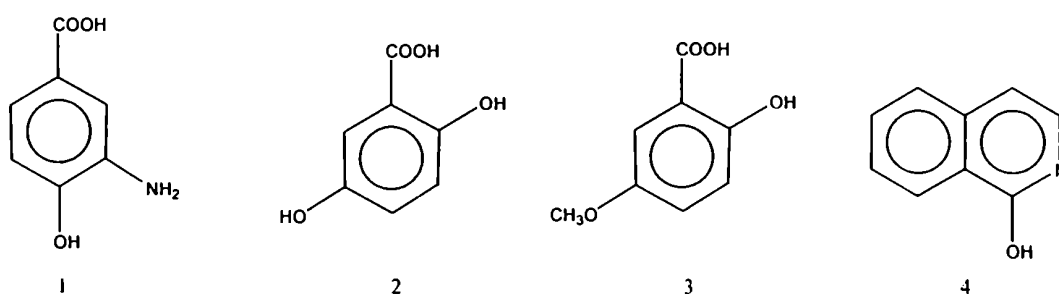
hará más rápidamente ya que tiene una energía cinética mayor que el 2. En la región de reflexión (R), el ion con mayor energía cinética avanzará más internamente en la región del espejo iónico pues la distancia que recorra dentro del espejo, proporcional al tiempo de vuelo, depende de su energía. Por lo tanto el ion 1 entrará a mayor profundidad dentro del campo y estará más tiempo dentro de la región R. Cuando los iones dejan el campo de reflexión entran en una segunda región libre de campo (L_2) y finalmente chocan con el detector. A la salida del espejo iónico, el ion 2 está adelante del 1 a pesar de seguir teniendo menor energía cinética. El enfoque de los iones se logra cambiando R (la longitud de la región de reflexión), mediante variaciones del voltaje del espejo iónico, ya que experimentalmente no es posible cambiar las longitudes de L_1 y L_2 . Mientras los iones viajan a través de L_2 , se enfocan temporalmente en el plano del detector porque el ion 1 alcanza al 2 gracias a su energía cinética mayor. Este fenómeno de enfoque que opera en el modo reflectrón tiene varias ventajas: (i) filtra moléculas neutras; (ii) corrige dispersiones en el tiempo debido a distribuciones de energía cinética inicial; y (iii) mejora notablemente la resolución y exactitud de masa.

El objetivo final de la elección de matriz, solvente y preparación de la muestra en un experimento MALDI es la cocrystalización homogénea de las moléculas de muestra y matriz, para obtener señales intensas a partir de hidratos de carbono. A continuación se describen las matrices más utilizadas según los hidratos de carbono analizados (Sección 4.1.1, Tabla 4.1) y las técnicas más frecuentes para la preparación de muestras (Sección 4.1.2).

4.1.1. MATRICES

1. MATRICES PARA HIDRATOS DE CARBONO NEUTROS

1.1. Ácidos benzoicos sustituidos



La primera matriz diseñada específicamente para el análisis por EM MALDI de hidratos de carbono fue el ácido 3-amino-4-hidroxibenzoico (1)⁹. El ácido 2,5-dihidroxibenzoico (2,5-DHB, ácido gentísico, 2) pronto desplazó al compuesto anterior¹⁰. Los iones mayoritarios

producidos corresponden a $[M+Na]^+$, que suelen estar acompañados por iones $[M+K]^+$ menos intensos. Por adición de las sales inorgánicas adecuadas es posible generar otras especies, como $[M+Li]^+$. Esta última matriz cristaliza de mezclas de acetonitrilo o etanol y agua como cristales largos, con forma de aguja, que se originan en la periferia del portamuestras y se proyectan hacia el centro. La región central suele contener una mezcla amorfa de azúcares, contaminantes y sales. Stahl *et al.*¹¹ encontraron evidencias del fraccionamiento de constituyentes de la muestra en 2,5-DHB: en una mezcla de azúcares y glicoproteínas, los azúcares se obtenían de la región amorfa central y los espectros de las glicoproteínas provenían de los cristales periféricos.

Otros isómeros de 2,5-DHB produjeron señales relativamente pobres para hidratos de carbono, excepto aquellos que contenían un grupo hidroxilo en posición orto¹². Para comportarse como una matriz, los compuestos deberían ser capaces de sufrir una transferencia de hidrógeno entre los grupos fenólico y carboxílico. De todas las matrices ensayadas, el ácido 2,5-dihidroxibenzoico fue el más efectivo dentro de los compuestos *orto*-sustituídos. Su efectividad estaría relacionada con su descomposición fotoquímica¹³: los ácidos benzoicos tienden a eliminar CO₂ como respuesta a la luz UV, una oxidación posterior produciría la *p*-benzoquinona, relativamente estable.

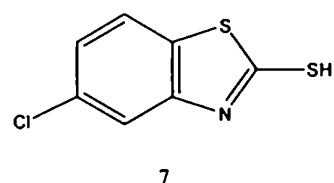
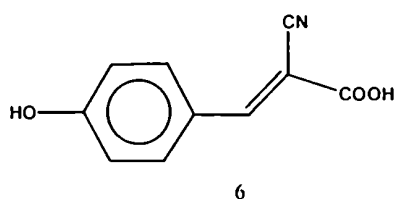
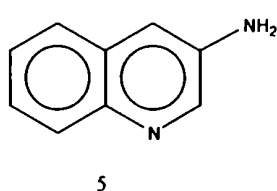
Tabla 4.1. Matrices utilizadas para el análisis de hidratos de carbono.

Matriz	Ref	Observaciones
<i>Ácidos benzoicos sustituidos</i>		
ác. 3-amino-4-hidroxibenzoico (1)	9	Primera matriz utilizada para hidratos de carbono.
ác. 2,5-dihidroxibenzoico (2,5-DHB, 2)	10	Aplicación general a oligosacáridos neutros, detección en modo positivo.
	23	Aplicación a dextranos de PM 7500 Da, detección en modo negativo.
	30	Aplicación a oligosacáridos con 12 residuos de ác. galacturónico, detección en modo positivo.
super 2,5-DHB: mezcla 2,5-DHB-ác. 2-hidrox-5-metoxibenzoico (3)	14	
mezcla 2,5-DHB-1-hidroxiisoquinolina (HIQ, 4)	15	
mezcla 2,5-DHB-spermina (18)	35	Aplicación a glicanos sialilados, detección en modo negativo

Matriz	Ref	Observaciones
3-aminoquinolina (5)	16	Aplicación a inulinas (PM $\leq$ 6000 Da).
	11	Aplicación a azúcares sialilados.
	17	Aplicación a fructanos.
mezcla 3-aminoquinolina-ác. α -ciano-4-hidroxicinámico (4-HCCA, 6)	18	
5-cloro-2-mercaptobenzotiazol (CMBT, 7)	20	Aplicación a N-glicanos con alto contenido de manosa.
<i>β-carbolinas</i>		
<i>nor</i> -harmano (8), harmano (9), harmina (10), harmol (11), harmalina (12), harmalol (13)	21	Aplicación a ciclodextrinas (PM $\sim$ 1000 Da) y oligosacáridos acíclicos (PM 342-828 Da), detección en modos positivo y negativo.
<i>nor</i> -harmano (8), harmano (9)	34	Aplicación a oligosacáridos sulfatados de carragenano lambda (PM 549-1733 Da), detección en modo negativo.
arabinosazona (14)	24	Aplicación a laminarano, detección en modo positivo.
	25	Aplicación a oligosacáridos con ácido siálico, detección en modo negativo.
2,5-dihidroxiacetofenona (DHAP, 15)	12	Detección en modos positivo y negativo.
mezcla 2,4,6-trihidroxiacetofenona (THAP, 16)-citrato de amonio	31	Aplicación a oligosacáridos sialilados.
6-aza-2-tiotimina (17)	31	Aplicación a oligosacáridos sialilados.
7-amino-4-metilcumarina (19)	36	Aplicación a disacáridos monosulfatados.
mezcla 7-amino-4-metilcumarina-6-aza-2-tiotimina	36	Aplicación a oligosacáridos monosulfatados.
ácido sinapínico (21) y formación de par iónico con bases	37, 38	Aplicación a oligosacáridos sulfatados derivados de heparina.

Mezclas de otros compuestos con 2,5-DHB mejoraron la sensibilidad o la resolución. Así, Karas *et al.*¹⁴ agregaron pequeñas cantidades de otros ácidos benzoicos sustituidos o compuestos relacionados con el fin de causar desorden en la red cristalina, permitiendo una desorción más suave. El mejor aditivo fue el ácido 2-hidroxi-5-metoxibenzoico (3) al 10 %, formando una mezcla que se conoce como “super 2,5-DHB”. La adición de las co-matrices parecen mejorar la homogeneidad de los cristales más que cambiar su estructura morfológica.

Mohr *et al.*¹⁵ encontraron que una mezcla de 2,5-DHB y 1-hidroxiisoquinolina (HIQ, **4**), en una relación molar cercana a 3:1, era muy efectiva en la ionización de hidratos de carbono. La hidroxiisoquinolina en sí era una matriz pobre para este fin, pero su presencia en 2,5-DHB causó la formación de cristales mucho más finos con respecto al 2,5-DHB solo. Al ser menos soluble en la mezcla agua:acetonitrilo empleada como solvente, HIQ cristalizaba primero y se pensó que inducía la cristalización de 2,5-DHB. El espectro resultante carecía de picos correspondientes a 2,5-DHB, aunque aparecían otros provenientes de HIQ. Esta matriz toleró la presencia de sales y aditivos y aun de compuestos tales como dodecilsulfato de sodio.



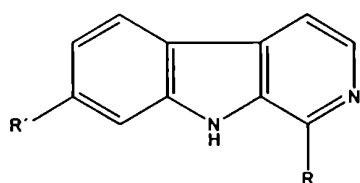
1.2. 3-Aminoquinolina

Metzger *et al.*¹⁶ aplicaron exitosamente 3-aminoquinolina (**5**) para la ionización de inulinas de plantas con masas hasta 6000 Da, con una línea de base y una resolución mejores que las obtenidas para 2,5-DHB. Stahl *et al.*¹¹ informaron que era superior al 2,5-DHB para azúcares sialilados, pero esta matriz era más sensible que 2,5-DHB a la presencia de contaminantes¹⁷. Kolli y Orlando¹⁸ mezclaron 3-aminoquinolina con ácido α -ciano-4-hidroxicinámico (4-HCCA, **6**) para obtener una matriz líquida que fue capaz de dar señales de larga duración a partir de un disparo de láser. Sin embargo, la aplicación de 3-aminoquinolina para el análisis de hidratos de carbono parece limitada ya que Harvey y Hunter¹⁹ observaron que los azúcares reductores pueden formar bases de Schiff con esta matriz, especialmente en el entorno ácido creado por la presencia de 4-HCCA.

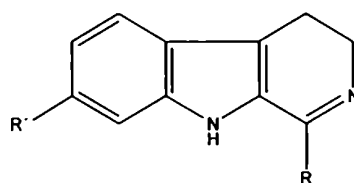
1.3. Mercaptobenzotiazoles

De los cinco mercaptobenzotiazoles examinados por Xu *et al.*²⁰, sólo 5-cloro-2-mercaptobenzotiazol (CMBT, **7**) fue efectivo para el análisis de *N*-glicanos con alto contenido de manosa, aislados de glicoproteínas. Sin embargo, si bien se observaron señales para dextrano 5000 correspondientes a compuestos con masas hasta 5500 Da, se encontró cierta discriminación en desmedro de los iones de masa elevada.

1.4. β -carbolinas



- 8, R = H; R' = H
9, R = CH₃; R' = H
10, R = CH₃; R' = OCH₃
11, R = CH₃; R' = OH



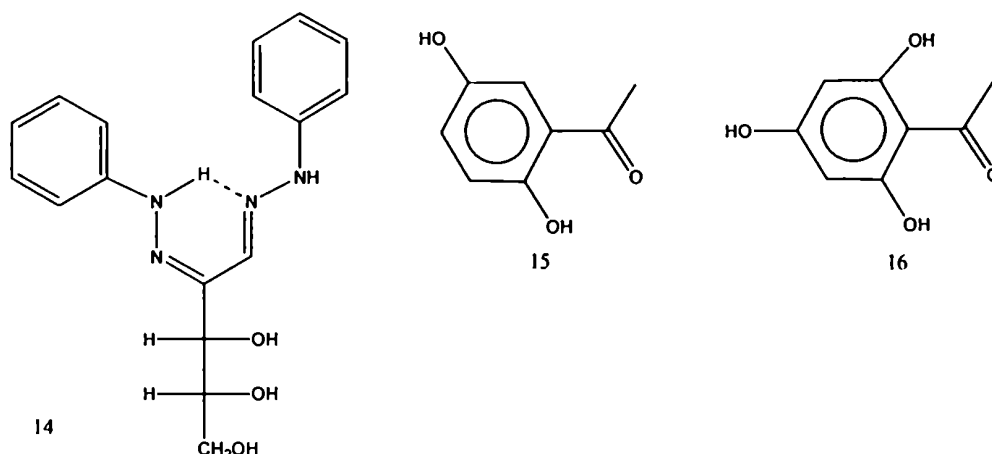
- 12, R = CH₃; R' = OCH₃
13, R = CH₃; R' = OH

Las β -carbolinas (9H-pirido[3,4-b]indoles): *nor*-harmano (9H-pirido[3,4-b]indol, **8**), harmano (1-metil-9H-pirido[3,4-b]indol, **9**), harmina (7-metoxi-1-metil-9H-pirido[3,4-b]indol, **10**), harmol (1-metil-9H-pirido[3,4-b]indol-7-ol, **11**), harmalina (3,4-dihidro-7-metoxi-1-metil-9H-pirido[3,4-b]indol, **12**) y harmalol (3,4-dihidro-1-metil-9H-pirido[3,4-b]indol-7-ol, **13**) demostraron ser matrices útiles para hidratos de carbono cíclicos (ciclodextrinas en la región de 1000 Da) y acíclicos (PM 342-828)²¹. Dieron señales comparables en intensidad a las obtenidas con 2,5-DHB, pero con iones $[M+H]^+$ en vez de $[M+Na]^+$ para ciclodextrinas en modo positivo. Sin embargo, cuando estas matrices se aplicaron a maltooligosacáridos y otros oligosacáridos²² produjeron iones $[M+Na]^+$, junto con un fragmento originado por pérdida de agua de intensidad elevada. Además se informó²¹ que estas matrices producían iones $[M-H]^-$ para azúcares neutros pequeños, lo cual representa una ventaja con respecto a matrices tradicionales para azúcares neutros –como 2,5-DHB– que no son eficaces en la ionización en modo negativo. La eficiencia de estas matrices estaría asociada con la presencia simultánea de un grupo dador de protón (N-H indólico) y uno aceptor (N piridínico), así como su orientación relativa en la molécula. Hao *et al.*²³ también encontraron espectros de iones negativos a partir de azúcares neutros, pero en este caso los compuestos eran dextranos con peso molecular mucho mayor (7500 Da). Estos iones fueron obtenidos con 2,5-DHB, hecho que llevó a los autores a concluir que los procesos MALDI para polisacáridos debían diferir en ciertos aspectos de los que operan para hidratos de carbono más pequeños.

1.5. Osazonas

Chen, Baker y Novotny²⁴ hallaron que la arabinosazona (**14**) era una matriz adecuada para el análisis de laminarano, un D-glucano lineal de algas pardas, que mostró picos más intensos para la región de masas mayores con respecto al espectro registrado con 2,5-DHB. Este efecto

se atribuyó a una menor fragmentación, resultante de la energía menor del láser necesaria para obtener señal con arabinosazona. Wheeler y Harvey²⁵ encontraron que arabinosazona produce espectros intensos de iones negativos (con iones moleculares $[M-H]^-$) a partir de oligosacáridos pequeños que contienen ácido siálico, y que la posición de unión de este residuo puede ser deducida a partir de fragmentos iónicos característicos.



1.6. Hidroxiacetofenonas

Varias acetofenonas sustituidas demostraron ser matrices eficientes para péptidos¹², y también podría aplicarse su uso a hidratos de carbono. Análogamente a lo observado para los ácidos benzoicos sustituidos, sólo aquellos compuestos con grupos hidroxilos en posición *orto* fueron efectivos en la ionización de péptidos, pero a diferencia de los ácidos benzoicos, las acetofenonas resultaron más eficientes en la producción de iones negativos. El compuesto más interesante, tanto en modo positivo como negativo, fue 2,5-dihidroxiacetofenona (DHAP, 15). Este compuesto no ofrece ventajas significativas con respecto a 2,5-DHB, sino que puede considerarse como una matriz alternativa.

1.7. Matrices dopadas con aniones

La utilización de cationes, generalmente de metales alcalinos, como aditivos para las matrices es bastante común y ya fue introducido más arriba (inciso 1.1). Mohr, Börnsen y Widmer¹⁵ estudiaron la afinidad relativa de distintos iones de metales alcalinos hacia hidratos de carbono y encontraron que el orden de afinidad es $Cs > K > Na > Li > H$. Aunque el cesio es el más eficiente para la formación de iones, no es capaz de ionizar hidratos de carbono pequeños²⁶. Los metales di- y trivalentes también son capaces de producir ionización, pero solamente se forman iones moleculares monocargados²⁷.

Por otra parte, el empleo de aniones como dopantes es muy poco común. Wong *et al.*²⁸ informaron el agregado de ácido sulfúrico a harmano; 2,5-DHAP; 2,4,6-trihidroxiacetofenona (THAP, 16) y 3-aminoquinolina. Las señales más intensas se registraron para harmano, observándose dos productos: (i) a una concentración de sulfato de 1×10^{-3} M los oligosacáridos formaron un aducto $[M+HSO_4]^-$, mientras que (ii) a concentraciones mayores de sulfato, 1×10^{-2} M, hubo reacción para dar el derivado $[M+HSO_4-H_2O]^-$. El aducto fue estable mientras que el derivado dio un espectro CID (collision-induced dissociation) intenso con fragmentaciones importantes, especialmente a partir del extremo reductor. Sólo los oligosacáridos neutros dieron aductos con sulfato, proporcionando un método para detectar simultáneamente hidratos de carbono neutros y ácidos en modo negativo. Los neutros daban naturalmente iones $[M-H]^-$ y los ácidos daban $[M+HSO_4]^-$ con intensidades casi iguales.

1.8. Compuestos ineficaces

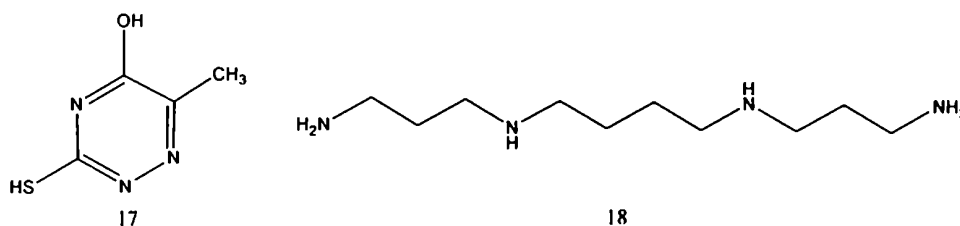
Las siguientes matrices, que resultaron adecuadas para compuestos que no fueran hidratos de carbono, proporcionaron espectros con señales débiles o inexistentes para azúcares neutros: 2-amino-5-nitropiridina; ácido antranílico; ácido 3-hidroxipicolínico y su amida; ácido ferúlico; ácido salicílico¹⁵; ácido 2,3-dihidroxibenzoico; ácido 2,4-dihidroxibenzoico y ácido sinapínico^{13,15}.

2. MATRICES PARA HIDRATOS DE CARBONO CON GRUPOS ÁCIDOS LIBRES

Los hidratos de carbono ácidos, como los azúcares sialilados, en general dan espectros MALDI pobres cuando se utilizan matrices como 2,5-DHB. Se obtienen iones positivos $[M+Na]^+$ y negativos $[M-H]^-$, con la presencia de varios picos debido a la formación de sales de sodio y potasio. La fragmentación de los azúcares sialilados o de algunos compuestos sulfatados por pérdida de ácido siálico, CO_2 o sulfato también suele ser un problema. En cambio, los ácidos urónicos parecen ser estables en las condiciones experimentales habituales²⁹. Oligosacáridos conteniendo hasta 12 residuos de ácido galacturónico dieron señales intensas en modo positivo con 2,5-DHB como matriz³⁰.

Algunas matrices adecuadas para carbohidratos sialilados ya fueron comentadas más arriba. Papac, Wong y Jones³¹ encontraron que 6-aza-2-tiotimina (17), previamente informada como matriz para gangliósidos³², dio un aumento significativo de la sensibilidad para oligosacáridos ácidos con respecto a las matrices comunes, como 2,5-DHB. Sin embargo, se vieron fragmentaciones por pérdida de ácido fórmico y, a veces, de ácido siálico a partir del

ion $[M-H]^-$ cuando se registraron espectros en modo lineal negativo. Cuando se operó en modo reflectrón, apareció un incremento en la pérdida de ácido siálico y algo de CO_2 .



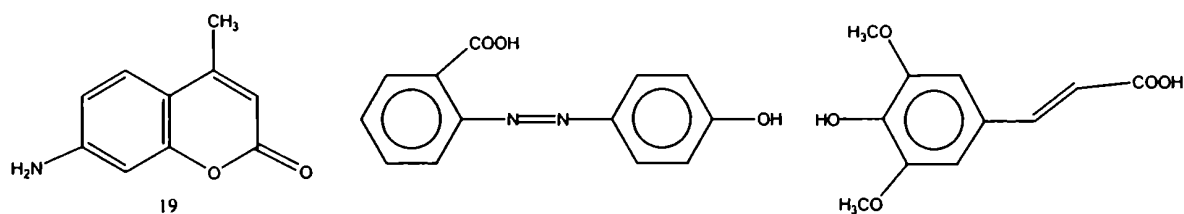
Otra matriz adecuada para el análisis de hidratos de carbono sialilados fue una mezcla de THAP y citrato de amonio³¹. El citrato de amonio se agregó para impedir la formación de sales a partir de la muestra. Las condiciones de preparación de la muestra fueron cruciales para maximizar la sensibilidad y evitar fragmentaciones. Otras desventajas de esta matriz son la formación de aductos con citrato $[M+191]^-$, registrada en ocasiones³³, y su ineficacia para la ionización de hidratos de carbono sulfatados³⁴.

Mechref y Novotny³⁵ utilizaron la base spermina (**18**) como co-matriz de 2,5-DHB para el análisis de glicanos sialilados en modo negativo.

3. MATRICES PARA HIDRATOS DE CARBONO SULFATADOS

El estudio por EM MALDI resulta particularmente difícil en muchos polisacáridos sulfatados, en parte debido a la labilidad de los grupos sulfato en ciertas posiciones. Si bien es posible obtener señales con las matrices empleadas normalmente para los compuestos neutros, los resultados pueden ser erráticos y varios laboratorios intentaron desarrollar métodos alternativos. Así, Nonami, Fukui y Erra-Balsells³⁴ demostraron que β -carbolinas como *nor*-harmano (**8**) y harmano (**9**) producían iones negativos a partir de oligosacáridos de carragenano lambda (PM 549, 712, 1570, 1733). Dai *et al.*³⁶ encontraron que el compuesto básico 7-amino-4-metilcumarina (**19**) era una buena matriz para disacáridos monosulfatados. Los iones moleculares también pudieron obtenerse con ácido 2-(*p*-hidroxifenilazo)benzoico (HABA, **20**) y ácido sinapínico (**21**), pero la presencia de iones provenientes de la matriz en la región del ion molecular interfirieron con la detección. Se encontró que la eficiencia de la ionización dependía de la naturaleza del analito. Por ejemplo, los tri- y tetrasacáridos monosulfatados y aquellos que contenían ácido siálico eran ionizados mejor por una mezcla

de 7-amino-4-metilcumarina y 6-aza-2-tiotimina que a partir de 7-amino-4-metilcumarina solamente.



Otra aproximación para la ionización de hidratos de carbono sulfatados involucra la formación de pares iónicos con bases. Los glicosaminoglicanos, altamente sulfatados y con pesos moleculares entre 5 y 40 kDa, son difíciles de ionizar por MALDI y tienden a dar fragmentaciones por pérdida de sulfato. Juhasz y Biemann^{37,38} obtuvieron espectros excelentes para fragmentos provenientes de heparina por neutralización de los grupos ácidos por formación de complejos iónicos 1:1 con péptidos básicos o una proteína básica. Fue posible obtener espectros de los complejos, para muestras homogéneas hasta 6 unidades sacarídicas y 8 grupos sulfato, por ionización con láser UV e IR, correspondiendo los mejores resultados a ácido sinapínico (**21**) como matriz y láser UV como fuente de excitación.

3.1. COMPUESTOS INEFICACES

Las siguientes matrices dieron resultados negativos para los hidratos de carbono sulfatados: ácido antranílico, varias hidroxiacetofenonas, harmalol, carbazoles sustituidos y ácido indolacrílico³¹.

4.1.2. PREPARACIÓN DE MUESTRAS

La relación molar analito/matriz en la preparación de la muestra a analizar determina si el espectro de masa será obtenido o no. El aumento excesivo de la proporción de matriz puede producir la formación no deseada de *clusters* de matriz, registrados en la región de masas mayores, que pueden ser fuente de error en la determinación de distribuciones de peso molecular.

Existen varios procedimientos para transferir la mezcla analito/matriz al portamuestras. El procedimiento más antiguo es el denominado de la gota seca o *dried-droplet*⁴, según el cual las soluciones de analito y de matriz se mezclan primero y aproximadamente 0,5-1 μ l de mezcla se aplica sobre el pocillo del portamuestras, dejando secar al aire a temperatura ambiente. La cristalización es relativamente lenta, aumentando el riesgo de segregación entre la matriz y el analito, o bien de fragmentación siguiendo alguna de las distribuciones posibles para la muestra (pág. 113). Más tarde se introdujo el método de cristalización rápida³⁹, donde el portamuestras se introduce en una cámara de vacío para promover la velocidad de cristalización. Como resultado se obtienen cristales más pequeños, con menor segregación, mejorando la reproducibilidad, intensidad de la señal y resolución. Alternativamente, puede emplearse una corriente de nitrógeno de alta pureza.

En el método de capa delgada (*thin layer*), se prepara una capa de matriz que se deja cristalizar, para luego añadir una solución de muestra y evaporar el solvente (con disolución parcial de la matriz), sobre este depósito se coloca finalmente más solución de matriz y se seca el sistema. Esta manera de preparación de muestra tiene la ventaja de requerir menor cantidad de analito.

Nonami *et al.*⁴⁰ intentaron realizar un estudio sistemático de la estructura de los cristales de la matriz en la muestra y su correlación con el análisis por MALDI. Encontraron que ciertas matrices presentaban el mismo comportamiento cristalino con muestras de proteínas y de ciclodextrinas, pero no se registraron señales para las muestras proteicas y sí hubo buenas señales para las ciclodextrinas trabajando en modo lineal positivo. Por lo tanto, una cristalización similar para una matriz dada no sería suficiente para esperar un comportamiento similar en muestras que contengan analitos distintos. Por otro lado, al comparar las mismas matrices aplicadas a proteínas encontraron que el método de capa delgada producía mayor número de *sweet spots* (regiones de muestra que producen buenos espectros), de mayor tamaño y distribuidos homogéneamente en la superficie de la muestra, en comparación con el

método de la gota seca. En estas condiciones se obtenían señales más intensas y picos más agudos, tanto en modo positivo como negativo.

4.1.3. FRAGMENTACIÓN

La espectrometría de masa MALDI se caracteriza por la suavidad del método de ionización, por lo que generalmente no se observan fragmentaciones pronunciadas en los experimentos. Sin embargo, bajo condiciones experimentales e instrumentales específicas, es posible registrar fragmentos en EM MALDI-TOF. Con potencias de láser elevadas puede ocurrir fragmentación en la región de la cámara de ionización, a la que suele denominarse *prompt fragmentation*. Adicionalmente, en fuentes de ionización con extracción retrasada (*delayed extraction*) de iones puede ocurrir fragmentación rápida de iones metaestables durante el tiempo de espera antes de la extracción, en una escala de tiempo del orden de 100-1200 ns, que se denomina decaimiento en la fuente (ISD, *in-source decay*). El aumento de la fragmentación ISD con la energía del láser a un tiempo de espera fijo es causado por un mayor número de colisiones en la pluma en expansión, llevando a una activación colisional mayor en la fuente de ionización. Las fragmentaciones *prompt* e ISD producen fragmentos iónicos que se detectan tanto en modo de detección lineal como reflectrón. En contraste, la fragmentación metaestable en la región libre de campo, llamada “decaimiento posterior a la fuente” (PSD, *post-source decay*), ocurre en una escala de tiempo de $\sim 10 \mu\text{s}$ y produce fragmentos iónicos que sólo se detectan con el detector operando en modo reflectrón.

Los fragmentos *prompt*, ISD y PSD suelen observarse en un mismo espectro en instrumentos TOF con *delayed extraction* operando en modo reflectrón. Los iones originados por ISD aparecen como picos finamente enfocados, acompañados por otras señales más anchas y difusas, a masas aparentes mayores, generadas por los iones PSD desenfocados. La relación de intensidades entre ambos tipos de señales varía con el tiempo de espera, con el pico PSD disminuyendo en intensidad a medida que aumenta el tiempo de espera. Harvey *et al.*⁴¹ encontraron una ecuación que correlaciona las masas de los iones padre, fragmento y metaestable, de modo que permite calcular la masa de uno de los tres conociendo la masa de los otros dos. La apariencia de estos conjuntos de iones en un espectro es de valor diagnóstico en el espectro de un carbohidrato porque la diferencia de masa entre ellos y su abundancia relativa reflejan el tipo de fragmentación involucrada. La pérdida de grupos ácidos, ácido siálico y sulfato, producen iones metaestables particularmente abundantes.

Es posible obtener un espectro PSD EM/EM, para determinar la “secuencia genética” de formación de iones, si se cuenta con un selector adecuado de iones precursores en la región libre de campo del camino lineal y con la posibilidad de hacer un barrido de voltaje en la región del reflectrón. A pesar de la baja energía interna de los iones y la baja eficiencia de la fragmentación, un experimento MALDI PSD puede ser muy útil para lograr una fragmentación controlada en secuenciación de péptidos u oligosacáridos. Otro dispositivo instrumental adicional que puede montarse en la zona libre de campo de un sistema MALDI-TOF es una celda pulsada para colisión con gas, de esta manera se pueden lograr colisiones de alta energía (del orden de keV) que dan fragmentos adicionales. Este proceso se conoce como descomposición inducida por colisiones (CID, collision-induced decomposition).

En términos generales, los tipos de fragmentaciones observadas para los hidratos de carbono bajo condiciones de ionización diferentes (FAB, ESI, MALDI) son similares y dependen de factores tales como el tipo de ion formado ($[M+H]^+$, $[M+Na]^+$, etc.), la carga neta, la energía depositada en el ion y el tiempo disponible para la fragmentación. En general, los caminos de fragmentación pueden clasificarse en dos tipos: (i) rupturas a través del enlace glicosídico, resultantes de la escisión de una unión entre dos monosacáridos, o bien (ii) rupturas a través de un mismo ciclo monosacárido, que implican la escisión de dos uniones. En general, la ruptura glicosídica proporciona información sobre secuencia y ramificaciones, mientras que las fragmentaciones a través del ciclo revelan información sobre las posiciones de unión²².

El tipo de ion padre producido a partir de la molécula de carbohidrato tiene un efecto significativo en su fragmentación, aunque el espectro resultante parece ser relativamente independiente de la manera en que fue formado dicho ion padre. Ngoka, Gal y Lebrilla⁴² y Cancilla *et al.*²⁶ encontraron que las especies protonadas descomponen más fácilmente que las especies asociadas a metales, el orden de descomposición vinculado a estas especies es $Li^+ > Na^+ > K^+ > Cs^+$. El carácter exotérmico de la unión al catión también sigue este orden, sugiriendo que los iones litiados y protonados se forman con energía en exceso que promueve su fragmentación. Más aún, se encontró que los hidratos de carbono lineales tienden a fragmentarse más que los ramificados. Este hecho fue atribuido a la coordinación del catión con el azúcar; los cationes más voluminosos, como el cesio, no inducen ionización en las moléculas más pequeñas.

La fragmentación PSD dependiente de la matriz puede disminuir la resolución y la precisión de la determinación de la relación m/z en el análisis de glicoproteínas, debido a un aumento en la distribución de velocidades de los iones. Estas fragmentaciones serían

producidas por colisiones bimoleculares en la pluma de la matriz, con transferencia de un protón de la matriz al analito⁴³. La matriz que produce fragmentaciones más intensas es 4-HCCA, que es a su vez el ácido más fuerte en fase gaseosa entre las matrices más comunes; este hecho es consistente con la teoría propuesta anteriormente. En general, las matrices con menores afinidades protónicas, como 4-HCCA, son las más efectivas en el proceso de ionización y también producen fragmentaciones intensas²².

Muchos de los caminos de fragmentación presentados por los hidratos de carbono, en especial la formación de iones que contienen al extremo terminal reductor de la molécula, producen especies que coexisten con los iones moleculares. Por lo tanto, si estos iones son el resultado de fragmentaciones en la fuente de ionización, serán enfocados junto con los iones moleculares de los carbohidratos intactos y resultarán indistinguibles unos de otros. Esto representa un problema significativo para el análisis de mezclas, donde es importante asegurar que el espectro sea representativo del perfil original de los carbohidratos componentes. Los fragmentos iónicos formados por reacciones PSD no ocasionan problemas en espectros registrados en modo lineal, pero pueden llevar a resultados erróneos cuando se emplea el modo reflectrón.

4.1.4. ANÁLISIS POR EM UV-MALDI-TOF DE CARBOHIDRATOS

En esta sección se presentan algunos ejemplos del análisis de hidratos de carbono por EM UV-MALDI-TOF, relevantes para el estudio de los polisacáridos de *Nothogenia fastigiata*.

1. CARBOHIDRATOS NEUTROS

Los polisacáridos de alto peso molecular suelen ser demasiado grandes como para poder hacer un análisis directo por espectrometría de masa y usualmente son degradados a moléculas más pequeñas por tratamientos químicos o enzimáticos antes de su análisis.

1.1. FRUCTANOS

Las inulinas, que junto con el almidón constituyen los polisacáridos de reserva de las plantas superiores, son un tipo especial de fructanos con enlaces β -(2 $\rightarrow$ 1). Los fructanos de *Dahlia variabilis*, consistentes fundamentalmente en inulina, fueron estudiados por MALDI¹⁷ empleando 3-aminoquinolina como matriz en un equipo TOF operando en modo reflectrón. Si bien se encontraron picos correspondientes a unos 50 compuestos, con masas hasta 10000 Da, sólo pudieron resolverse adecuadamente aquellos hasta 7000 Da. Los fructanos de *Allium*

cepa L. (cebolla) son más variables en estructura pero de menor peso molecular. Cuando fueron analizados por MALDI con 2,5-DHB, los iones principales correspondían a $[M+K]^+$ más que a $[M+Na]^+$, reflejando el elevado contenido de potasio del vegetal de partida.

1.2. PECTINAS

Las pectinas son polisacáridos de alto peso molecular pertenecientes a las paredes celulares de las plantas superiores. Están compuestas por cadenas parcialmente esterificadas (como metilésteres) de ácido galacturónico (regiones suaves) separadas por cadenas con L-ramnosa ramificadas (regiones “con pelos”). Körner *et al.*⁴⁴ utilizaron una digestión parcial con pectina-liasa para reducir los pesos moleculares, de modo de poder ser examinados por espectrometría de masa. Los mejores resultados se obtuvieron con una mezcla de THAP y nitrocelulosa como matriz, registrando los espectros en modo negativo. Fue posible detectar productos con grados de polimerización hasta 45 (8000 Da).

1.3. XILANOS

Los xiloglucanos son polisacáridos hemicelulósicos presentes en las paredes celulares de la mayoría de las plantas superiores y en algas. Están vinculados estructuralmente a la celulosa, pero poseen ramificaciones adicionales en la posición 6 de los residuos de glucosa. York *et al.*⁴⁵ estudiaron la ubicación de las ramificaciones en plantas solanáceas usando una combinación de cromatografía, EM MALDI y FAB y espectroscopía RMN. Los polisacáridos fueron degradados con una endo- β -(1 $\rightarrow$ 4)-D-glucanasa a oligosacáridos con masas cercanas a 1000 Da. Rydlund y Dalman⁴⁶ estudiaron la composición de la pulpa de árboles de madera dura, como el abedul. El tratamiento de las cadenas con una endoxilanas dio fragmentos de 400-1000 Da que fueron analizados por electroforesis capilar y EM MALDI. De manera similar fueron tratados los xiloglucanos de *Acer pseudoplatanus* en fragmentos que contenían 17-20 residuos glicosídicos, cuyo análisis se llevó a cabo por MALDI, FAB y RMN (a partir de los productos reducidos previamente con borohidruro de sodio) y reveló que las cadenas laterales contenían xilosa, galactosa y fucosa. La unidad repetitiva heptasacarídica de los xiloglucanos de las semillas de tamarindo fue estudiada por PSD, luego de un tratamiento con galactosidasa y glucosidasa⁴⁷. Este glicano poseía cuatro unidades de glucosa con uniones β -(1 $\rightarrow$ 4), tres de los cuales tenían xilosa enlazada en la posición 6. Los fragmentos observados provenían preferencialmente de pérdidas de residuos unidos por la posición 6^{48,49}.

1.4. GLUCANOS

Stahl *et al.*¹⁰ utilizaron EM UV-MALDI-TOF como herramienta para determinar masas moleculares y su distribución en muestras complejas de maltodextrinas –glucanos con enlaces α -(1→4)– con pesos moleculares entre 500 y 3500 Da y dextranos –glucanos con enlaces α -(1→6)– de peso molecular hasta 7000 Da. Para cada glucano se obtuvieron señales correspondientes a iones $[M+Na]^+$ y $[M+K]^+$, sin que se apreciaran iones moleculares protonados ni fragmentaciones de ningún tipo. En el rango de masas analizado no se registró discriminación de iones dependiente de la masa.

Garozzo *et al.*⁵⁰ analizaron muestras comerciales de dextranos extendiendo el rango de pesos moleculares. El espectro de masa UV-MALDI-TOF del dextrano de peso molecular 12000 no reflejó la distribución obtenida por métodos cromatográficos tradicionales. Si bien detectaron una serie de picos separados por 162 uma, con buena resolución hasta algo más de 10000 Da, la intensidad de las señales en función de m/z no coincidía con la distribución esperada para una muestra de su peso molecular. Para dextranos superiores, con PM 25000, 50000 y 80000, las discrepancias entre el peso molecular promedio numérico obtenido del espectro y el esperado para la muestra fueron en aumento, independientemente de los cambios aplicados en las relaciones matriz:analito y en la potencia del láser. Las muestras permetiladas dieron resultados similares. Se supuso entonces que existía una desorción y ionización preferencial de los componentes más livianos en el proceso UV-MALDI, que suprimía la desorción/ionización de las moléculas mayores. Esta hipótesis fue verificada por fraccionamiento por cromatografía de exclusión por tamaño (SEC, size exclusion chromatography) y análisis por EM UV-MALDI de las fracciones aisladas. De esta manera, a partir del dextrano 50000 detectaron picos a m/z 34000, 42000 y 50000 para tres de las fracciones, junto con señales menores correspondientes a iones moleculares doblemente cargados y a dímeros con carga simple. Los autores concluyeron que era posible obtener espectros de masa UV-MALDI-TOF de polisacáridos con peso molecular promedio numérico, M_n , hasta 100000 Da para muestras monodispersas con índice de polidispersión – cociente entre peso molecular promedio en masa (M_w) y M_n – menor que 1,1.

Recientemente Broberg *et al.*⁵¹ estudiaron la distribución de longitudes de cadena de amilopectinas (componente principal del almidón) de trigo y de papa. Los perfiles determinados por UV-MALDI-TOF y cromatografía de intercambio aniónico con detección amperométrica de pulsos (HPAEC-PAD, high-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection) fueron similares: se detectaron cadenas con grado de polimerización de 6 a 61, con máximos en 12-16. Los espectros de masa UV-MALDI-TOF

presentaron resultados reproducibles en base a las áreas relativas de cada pico medidas en forma directa. En cambio, los datos de HPAEC-PAD requirieron la aplicación de correcciones (determinadas previamente) debido a la respuesta del detector, ya que esta respuesta disminuye con la longitud de las cadenas poliméricas. Este hecho constituye una ventaja para extender la aplicación de la técnica MALDI a otros polisacáridos cuyos factores de respuesta para HPAEC-PAD sean desconocidos.

2. CARBOHIDRATOS DE ALGAS

2.1. XILANOS

Yamagaki *et al.*⁵² demostraron que los xilanos del alga marina *Caulerpa brachypus* están formados por un polisacárido lineal con más de 25 residuos de xilosa con enlaces β -(1→3). Estos compuestos fueron extraídos del alga con agua caliente, sometidos a hidrólisis parcial en medio ácido y fraccionados por SEC antes de ser examinados por EM MALDI con super-DHB. La fracción correspondiente a los compuestos de mayor peso molecular contenía oligosacáridos con DP 13-25, con máximo en 15-17.

2.2. CARRAGENANOS

Nonami, Fukui y Erra-Balsells³⁴ llevaron a cabo un análisis de oligosacáridos derivados de carragenano lambda, de pesos moleculares conocidos (549, 712, 1570, 1733 Da), utilizando matrices clásicas y β -carbolinas. Dentro de las matrices clásicas, los mejores resultados se obtuvieron con 2,5-DHB y 6-aza-2-tiotimina; todas las β -carbolinas ensayadas (compuestos 8-13) dieron buenos espectros. En todos los casos, los oligosacáridos sulfatados se detectaron como aniones $[M-H]^-$ en modo negativo, lo cual sugirió que la presencia de grupos sulfato podía estabilizar la forma aniónica.

Muy recientemente, Fukuyama *et al.*⁵³ estudiaron por UV-MALDI-TOF siete oligosacáridos de neocarrabiosa, de origen comercial, derivados de carragenano kappa con pesos moleculares 426-2468 Da, utilizando *nor*-harmano y 2,5-DHB como matrices. Con 2,5-DHB se observaron abundantes iones provenientes de *clusters* de matriz, tanto en modo positivo como negativo, que interfirieron con la detección del ion molecular del compuesto de peso molecular 1345 Da (neocarrahexaosa tetrasulfato). Esta matriz fue especialmente adecuada en modo positivo de detección, en particular para el compuesto de peso molecular 733 Da (neocarratetraosa 4¹-sulfato), con el menor contenido de sulfato. En modo de

detección negativo, todos los oligosacáridos dieron solamente el ion molecular $[M-Na]^+$, a excepción del compuesto de peso molecular 2468 Da (ncocarradodecaosa hexasulfato) que presentó un ion muy intenso correspondiente a la pérdida de un grupo sulfato. Por otra parte, se observó una baja eficiencia de desorción/ionización con *nor*-harmano en modo positivo; mientras que en modo negativo se registraron buenos espectros pero con numerosas señales correspondientes a desulfatación, originadas por fragmentación *prompt*. Además pudieron correlacionar los fragmentos PSD con la secuencia de monosacáridos componentes.

2.3. β -GLUCANOS

Los laminaranos son β -glucanos encontrados en algas pardas, consistentes en residuos de β -D-glucopiranososa enlazados por la posición 3, con algunos enlaces 1 $\rightarrow$ 6, y con ramificaciones sobre la posición 6 de la cadena central. La mayoría de los laminaranos contienen cadenas de dos tipos: cadenas G conteniendo sólo unidades de glucosa, y cadenas M que terminan con un residuo de D-manitol. Las variaciones estructurales de estos polisacáridos surgen de distintas relaciones M:G, de proporciones variables de uniones 1 $\rightarrow$ 3 y 1 $\rightarrow$ 6, del grado de ramificación y del grado de polimerización (hasta 50 unidades monoméricas, generalmente el DP es cercano a 25). Chizov *et al.*⁵⁴ compararon los resultados de EM FAB y MALDI para el análisis de laminaranos extraídos de diversas algas. Concluyeron que la espectrometría MALDI presenta ventajas ya que no se observó el mismo grado de pérdida de señal para masas superiores que apareció en FAB. Estudiaron los laminaranos de ocho especies y mostraron que poseían perfiles diferentes, en particular en la distribución de pesos moleculares de los oligómeros más abundantes. Los espectros de los laminaranos nativos generalmente dieron iones desde m/z 800 hasta 6000, correspondientes a grados de polimerización entre 5 y 40, con señales intensas correspondientes a $[M+Na]^+$ acompañadas de señales menores atribuidas a $[M+K]^+$. Los autores no hicieron comentarios sobre discriminación de iones dependiente de la masa en las condiciones experimentales utilizadas. Aplicaron la permetilación de los polisacáridos para aumentar la diferencia de 2 Da entre las cadenas G y M a 16 Da.

4.2. ANÁLISIS POR EM UV-MALDI-TOF DE LOS XILOMANANOS SULFATADOS Y LOS XILANOS DE *NOTHOGENIA FASTIGIATA*

La utilidad de la técnica de EM MALDI para determinar las distribuciones de pesos moleculares fue demostrada recientemente para laminaranos⁵⁴, fructanos¹⁵, dextranos⁶ y maltodextrinas, operando en modo positivo. En este modo iónico, los polisacáridos que contienen ácido siálico generalmente dieron iones $[M+Na]^+$ ó $[M+K]^+$ correspondientes al ácido libre y también aductos con sodio o potasio de las sales de sodio o potasio del ácido siálico⁵⁵, dando señales mucho más débiles que los azúcares neutros. La permetilación de estos compuestos simplificó el esquema a iones $[M+Na]^+$ solamente.

Al comenzar esta etapa del trabajo de investigación solamente se habían encontrado tres antecedentes bibliográficos de aplicación de EM MALDI a hidratos de carbono sulfatados: oligosacáridos sulfatados derivados de heparina³⁸, de oligosacáridos derivados de carragenano lambda³⁴ y oligosacáridos monosulfatados³⁶, todos ellos con pesos moleculares inferiores a 2000. Estos compuestos fueron detectados en modo negativo y se sugirió que la presencia de grupos sulfato en la molécula estabilizaba la forma aniónica³⁴. En el año 2002 apareció publicado un estudio de oligosacáridos derivados de carragenano kappa⁵³ donde se mantiene esta hipótesis.

El análisis de los pesos moleculares de las fracciones aisladas de *N. fastigiata* fue motivado por:

- 1- el interés de comparar los resultados de EM UV-MALDI-TOF con los pesos moleculares promedio numérico determinados por un método químico (cuantificación de extremos terminales reductores⁵⁶), en el caso de los xilomananos sulfatados, y por espectroscopía RMN ¹H, en el caso de los xilanos tipo “uniones mixtas”;
- 2- la ausencia de experimentos realizados sobre polisacáridos sulfatados de peso molecular tan elevado.

No fue posible la comparación de los resultados con determinaciones de pesos moleculares por métodos cromatográficos, como cromatografía de exclusión por geles (SEC) por no disponer de un equipo adecuado con detector por dispersión de luz (light scattering), o bien de polisacáridos sulfatados similares estructuralmente y de peso molecular conocido, que pudieran ser utilizados como agentes calibrantes.

Los polisacáridos de *N. fastigiata* fueron analizados por UV-MALDI-TOF en colaboración con la Dra. Rosa Erra-Balsells, del Departamento de Química Orgánica, Facultad de Ciencias

Exactas y Naturales, UBA, y el Dr. Hiroshi Nonami, Plant Biophysics / Biochemistry Research Laboratory, College of Agriculture, Ehime University, Japón.

Los xilomananos sulfatados se analizaron en un espectrómetro de masa Shimadzu Kratos, Kompact MALDI III. Se diseñaron experimentos empleando diferentes matrices: ácido sinapínico (21); 4-HCCA (6); 2,5-DHB (2); β -carbolinas (*nor*-harmano 8, harmano 9 y harmina 10) y matrices dopadas como 2,5-DHB-HIQ (4) y 2,5-DHB- β -carbolina (*nor*-harmano y harmano). Las muestras se prepararon según tres métodos. Los espectros se registraron en modos lineal y reflectrón, tanto positivo como negativo, sobre un promedio de 50 disparos de láser. También se analizaron las muestras preparadas justo antes de introducir al espectrómetro, a fin de ver la influencia de los polisacáridos sulfatados sobre la cristalización de la matriz.

Los xilanos neutros tipo “uniones mixtas” –X1, X2, X3 y X_T, pertenecientes a las muestras analizadas por espectroscopía RMN⁵⁷ (sección 1.4.1)– fueron analizados en dos equipos con analizador TOF: (i) Shimadzu Kratos, Kompact MALDI 4, y (ii) Applied Biosystems Voyager DE-STR, ambos equipados con láser pulsado de nitrógeno ($\lambda=337$ nm). En todos los casos, los espectros se registraron en modo lineal y reflectrón, tanto en modo iónico positivo como negativo, con un promedio de 100 disparos de láser. Se emplearon como matrices *nor*-harmano y 2,5-DHB, y dos métodos distintos de preparación de muestras.

4.2.1. XILOMANANOS SULFATADOS

La evaluación de los espectros registrados se hizo en términos de: (i) intensidad de la señal de analito, en valor absoluto y teniendo en cuenta la relación señal/ruido; (ii) ausencia de señales interferentes originadas por la matriz y (iii) ausencia de fragmentaciones a partir del ion molecular. De todos compuestos ensayados, solamente las mezclas 2,5-DHB-HIQ y 2,5-DHB-*nor*-harmano funcionaron como matrices adecuadas. En particular, se obtuvo mayor número de espectros, y por lo tanto mayor representatividad estadística sobre la composición de la muestra, cuando se empleó la mezcla 2,5-DHB-HIQ, por lo que sólo se presentan estos resultados. Aunque se hicieron experimentos en modo lineal y reflectrón, con detección de iones tanto negativos como positivos, las muestras sólo fueron detectadas en modo lineal positivo.

En la Tabla 4.2 se indican las intensidades normalizadas (alturas de las señales, I_n) de todos los picos observados en los espectros registrados para cada fracción usando 2,5-DHB–

HIQ como matriz. Además se incluyen las intensidades corregidas (I_c) considerando la contribución en masa de cada fracción a la “muestra total”. Se definió como muestra total a la masa total de las fracciones sulfatadas precipitadas con cetrimida (F2-F6). Dichas intensidades se calcularon mediante las siguientes ecuaciones:

$$I_n = I_p / I_t$$

$$I_c = I_n \times X$$

$$X = \frac{m_{F_i}}{\sum_i m_{F_i}}$$

donde: I_n , intensidad normalizada de la señal;

I_p , intensidad de la señal (en mV);

I_t , intensidad total del espectro (en mV);

I_c , intensidad corregida;

X , contribución en masa de la fracción a la muestra total;

m_{F_i} , masa de F_i recuperada luego de tratar a F_i con solución de NaCl;

$\sum_i m_{F_i}$, sumatoria sobre i (2-6) de las masas de las fracciones F_i aisladas inicialmente.

En el caso de F3, que no fue redisueltada en solución de cloruro de sodio, m_{F_i} corresponde a m_{F_3} , la masa de F3 recuperada.

Los espectros individuales registrados no dieron una distribución unimodal de pesos moleculares, como era de esperar para una muestra de polisacáridos de origen vegetal, posiblemente debido a la escasa intensidad de las señales. Los picos en general mostraron un máximo pronunciado, rodeado por señales satélite de menor intensidad que sugerían una envolvente asimétrica. Si bien los picos aparecieron al azar, cada fracción dio siempre el mismo conjunto de señales. Este esquema es consistente con la obtención de intensidades de señales que no son representativas de su concentración en la muestra, y estaría relacionado con procesos erráticos de desorción/ionización. Dicho en otras palabras, cada uno de los espectros sería el resultado de una discriminación de masas moleculares, pero no de carácter sistemático sino al azar. A fin de ilustrar este punto, en la Fig. 4.3 se muestran dos espectros típicos de F4' realizados en condiciones experimentales idénticas.

Fig. 4.3. Espectros de masa UV-MALDI-TOF típicamente obtenidos para F4', registrados en idénticas condiciones experimentales (matriz 2,5-DHB-HIQ, λ 337 nm)

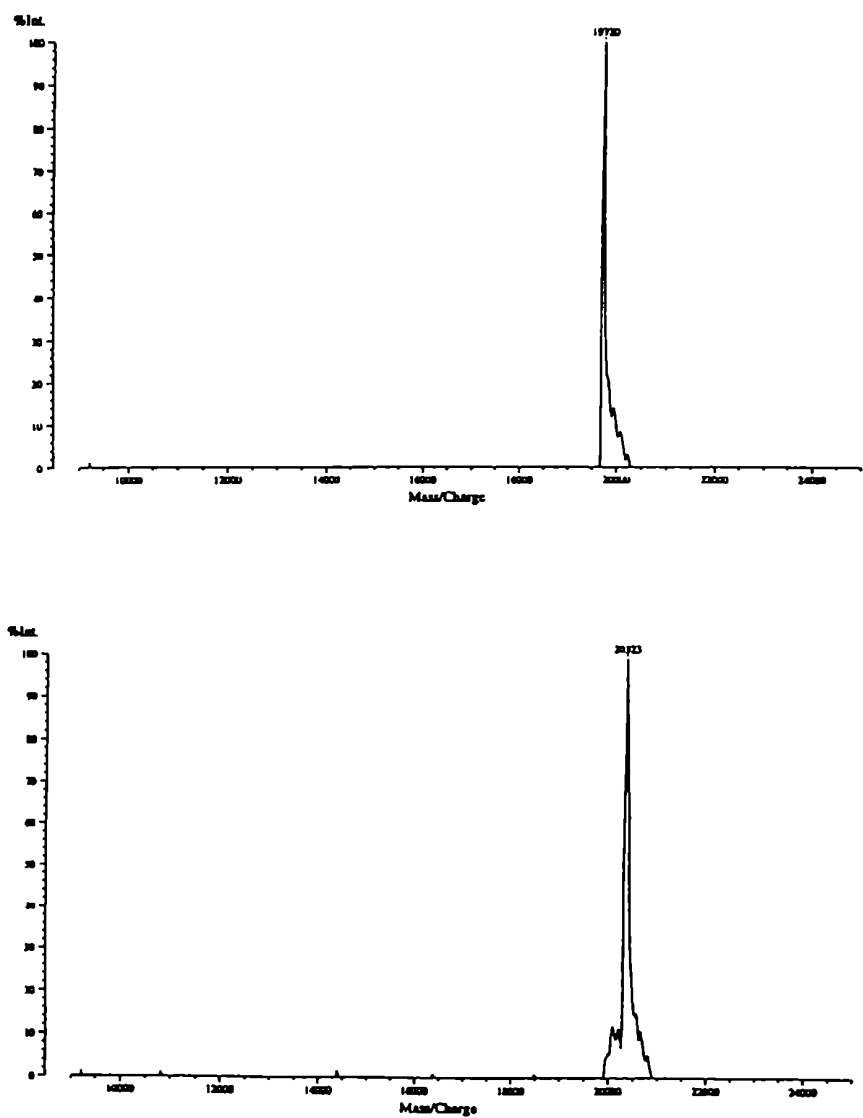


Tabla 4.2. Intensidades normalizadas y valores corregidos de m/z para las señales registradas en los espectros UV-MALDI-TOF de las fracciones de *N. fastigiata*

Pico	m/z	Fracción	I_n	I_c	Pico	m/z	Fracción	I_n	I_c
1	45270	3	0,0229	0,776	30	12275	2'	0,0587	0,740
2	45000	3	0,0200	0,678	31	12137	2'	0,0784	0,988
3	44930	3	0,0221	0,749	32	11633	2'	0,0312	0,393
4	44200	3	0,0024	0,081	33	11568	2'	0,0263	0,331
5	42000	3	0,0057	0,193	34	11082	2'	0,0133	0,168
6	41701	3	0,0167	0,566	35	10373	6'	0,0376	0,699
7	40400	3	0,0048	0,163	36	9997	3	0,0130	0,441
8	33607	6'	0,0345	0,642	37	9989	4'	0,0870	1,418
9	31270	3	0,0048	0,163	38	9405	2'	0,0189	0,238
10	30790	3	0,0164	0,556	39	9302	2'	0,0526	0,663
11	30750	3	0,0714	2,420	40	9250	2'	0,0072	0,907
12	29000	6'	0,0179	0,333	41	8491	2'	0,0667	0,844
13	25400	3	0,0067	0,227	42	8091	2'	0,0051	0,064
14	22270	3	0,0023	0,078	43	6602	5'	0,0185	0,344
15	20797	3	0,0188	0,637	44	6190	2'	0,0127	0,160
16	20323	4'	0,0185	0,302	45	6016	5'	0,0161	0,299
17	20300	6'	0,0179	0,333	46	5982	5'	0,0179	0,333
18	19720	4'	0,0851	1,387	47	5710	5'	0,0179	0,333
19	19300	2'	0,0048	0,060	48	5600	5'	0,0145	0,270
20	19237	3	0,0196	0,664	49	5500	2'	0,0313	0,394
21	17500	2'	0,0080	0,101	50	5260	3	0,0087	0,295
22	17000	3	0,0164	0,556	51	5238	2'	0,0652	0,821
23	16245	2'	0,0555	0,699	52	4850	5'	0,0145	0,270
24	14330	6'	0,0392	0,729	53	4000	2'	0,0070	0,088
25	13673	2'	0,0070	0,088	54	3533	2'	0,0141	0,178
26	13600	3	0,0103	0,349	55	3300	2'	0,0101	0,127
27	13326	3	0,0156	0,529	56	2556	6'	0,0329	0,611
28	13180	3	0,0049	0,166	57	2439	2'	0,0175	0,221
29	12439	2'	0,0266	0,335	58	2113	2'	0,0093	0,116

Teniendo en cuenta que no se conoce la composición exacta de la molécula o conjunto de moléculas que dieron origen al valor de m/z más intenso de cada pico, no es posible estimar la exactitud ni la precisión del método, ni tampoco establecer la naturaleza del catión que le dio origen ($[M+H]^+$, $[M+Na]^+$, $[M+Mg]^+$, $[M+Ca]^+$, etc.). Por lo tanto, los valores registrados sólo tienen un carácter estimativo del peso molecular, pero no de su composición.

En la Tabla 4.3 se muestran los pesos moleculares (M_n), promedio numérico, calculados para cada una de las fracciones de xilomananos sulfatados según:

$$M_n = \frac{\sum_i M_i I_{ni}}{\sum_i I_{ni}}$$

donde: I_{ni} , intensidad normalizada del pico i (conjunto de espectros registrados para una fracción dada);

M_i , valor de m/z correspondiente al pico i .

Tabla 4.3. Pesos moleculares promedio numérico obtenidos por EM UV-MALDI-TOF y cuantificación de grupos reductores de las fracciones de *N. fastigiata*

Fracción	M_n	
	UV-MALDI-TOF ^a	Extremos reductores ^b
2'	9808	12000
3	29234	39100
4'	15337	21900
5'	5833	6400
6'	17099	30000

^aCalculado a partir de los valores de m/z y las intensidades normalizadas correspondientes.

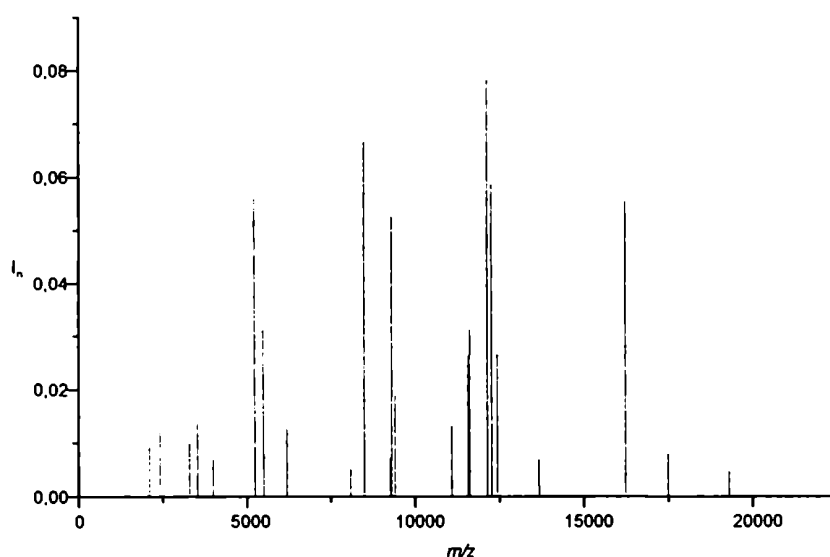
^bCalculado por determinación de extremos terminales reductores.

Las mayores coincidencias entre ambos métodos para determinar el peso molecular se dan en las fracciones F2' y F5'.

En la Fig. 4.4 se reconstruye un espectro total de F2' mediante los 23 picos hallados en todos los espectros registrados para esta fracción (Tabla 4.2). El espectro reconstruido sugiere una función unimodal de distribución de pesos moleculares para F2'. La distorsión de la envolvente es consistente: (i) con su formación a partir de señales que no reflejan fielmente su concentración en la muestra –error, al azar, de la técnica–, (ii) con el hecho de que la muestra es sólo una pequeña parte de F2' –error inherente a la reconstrucción de un todo a partir de cada uno de sus componentes– y (iii) con la composición intrínseca de la muestra –un xilomanano complejado con un galactano sulfatado y xilano neutro. Para las demás fracciones

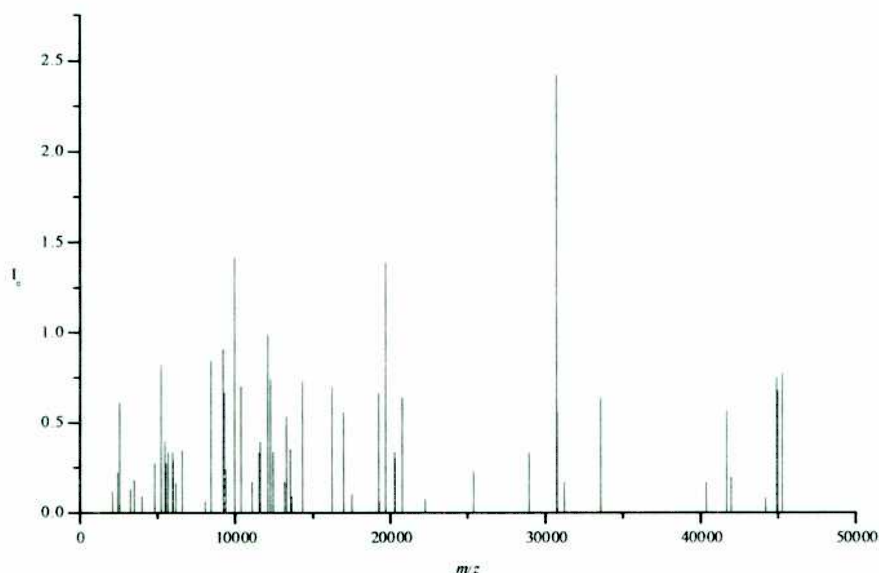
no fue posible realizar un espectro similar porque no se obtuvo un número de experimentos que fuera representativo estadísticamente.

Fig. 4.4. Espectro reconstruido de F2'



Considerando que las fracciones de xilomananos fueron obtenidas por un fraccionamiento con límites arbitrarios, no es correcto considerarlas como xilomananos sulfatados diferentes sino como integrantes de una familia o un sistema de estos polisacáridos. Sobre esta base se reconstruyó un espectro para el total de las fracciones a partir de las intensidades normalizadas y sus m/z de los 58 picos que aparecieron en los espectros registrados, considerando además la contribución en masa de cada fracción al sistema total de xilomananos (Tabla 4.2, Fig. 4.5). Nuevamente, el espectro reconstruido insinuó un perfil estadístico de distribución de pesos moleculares, aunque con mayor representación de las especies de m/z menores.

Fig. 4.5. Espectro reconstruido del sistema de xilomananos



Mohr, Börnsen y Widmer¹⁵ informaron que el cloruro de cesio inducía un aumento en la formación de cationes a partir de carbohidratos. En los experimentos realizados en el presente estudio no se apreciaron efectos importantes causados por la adición de esta sal como dopante de la matriz.

Los cristales de los sólidos listos para analizar fueron inspeccionados con un microscopio con una magnificación de 400 $\times$ y se registraron imágenes digitales con un microscopio de alta resolución digital con magnificación de 150 $\times$. Las imágenes (Figs. 4.6-4.9) muestran que:

- 1- Cuando se deposita sólo 2,5-DHB, se observan grandes cristales blancos con cristalización preferencial desde los bordes del depósito (Fig. 4.6.a).
- 2- En un depósito de *nor*-harmano solo se aprecian cristales en el borde o bien cristales más pequeños distribuidos en la zona central (Figs. 4.6.b y 4.6.c).



Fig. 4.6. Imágenes de las matrices: (a) 2,5-DHB, (b) y (c) harmano. Magnificación 150 $\times$.

3- Se observa cristalización preferencial de 2,5-DHB a partir de los bordes del depósito de polisacárido y aparecen cristales blancos pequeños (Fig. 4.5.a).

4- Después de cargar la matriz en el portamuestras, el harmano se apreció como una emulsión blanca que luego pasó a ser transparente, dando cristales bastante uniformes distribuidos de manera no homogénea en la superficie de la muestra (Fig. 4.7.b).



Fig. 4.7. Imágenes de sistemas analito-matriz: (a) Fracción F4'-2,5-DHB y (b) Fracción F4'-harmano. Magnificación 150 $\times$. Método B.

5- Las matrices dopadas, 2,5-DHB-HIQ y 2,5-DHB-harmano (Fig. 4.8), mostraron menor cantidad de cristales distribuidos en la superficie del depósito al comparar con el sistema constituido por la matriz dopada y el polisacárido, 2,5-DHB-HIQ-polisacárido y 2,5-DHB-harmano-polisacárido (Fig 4.9).

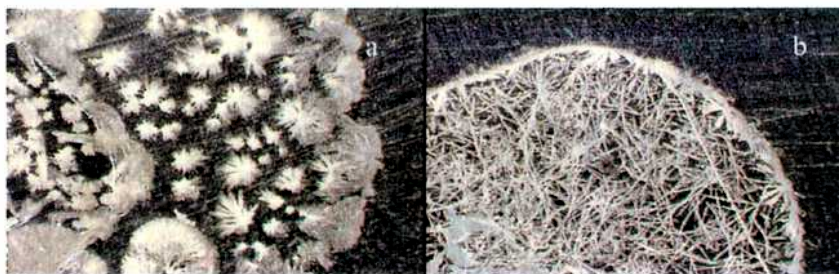


Fig. 4.8. Imágenes de matrices dopadas: (a) 2,5-DHB-HIQ y (b) 2,5-DHB-harmano. Magnificación 150 $\times$. Método C.



Fig. 4.9. Imágenes de sistemas analito-matriz dopada: (a) Fracción F4'-2,5-DHB-HIQ y (b) Fracción F4'-2,5-DHB-harmano. Magnificación 150 $\times$. Método C.

En conclusión, la cristalización de 2,5-DHIB mejoró no solamente por adición de la co-matriz dopante (HIQ, *nor*-harmano, harmano) sino también por el agregado del xilomanano.

4.2.2. XILANOS

La evaluación de los espectros registrados se hizo en términos de: (i) intensidad de la señal de analito, en valor absoluto y teniendo en cuenta la relación señal/ruido; (ii) ausencia de señales interferentes originadas por la matriz y (iii) ausencia de fragmentaciones a partir del ion molecular. Los mejores resultados se obtuvieron en el espectrómetro Kompact MALDI 4, operando en modo lineal, con *nor*-harmano como matriz. Los resultados que se presentan a continuación corresponden a una selección de los mejores espectros obtenidos para las fracciones analizadas. Las señales correspondientes al modo reflectrón fueron muy poco intensas, con señales de intensidad máxima menores a 1 mV, por lo que no se intentaron experimentos PSD.

Con fines comparativos, todos los espectros que se presentan en esta sección tienen un eje de ordenadas correspondiente a la intensidad normalizada (I_n), según:

$$I_n = I_p / I_t$$
$$I_t = \sum I_p$$

donde: I_n , intensidad normalizada de la señal;

I_p , intensidad de la señal (en mV);

I_t , intensidad total del espectro (en mV).

La fracción X1 (Fig. 4.10) dio espectros intensos solamente al registrar en modo iónico positivo. Cuando la relación analito/matriz fue de 1:4 (Fig. 4.10.a) se observó una distribución unimodal de picos consistentes con oligómeros de xilosa con un máximo en DP 17, cuyos m/z corresponden a $[M+Na]^+$. El peso molecular promedio numérico que surge de este espectro es 2813 Da ($[M+Na]^+$), equivalente a 2790 (M_n) y DP 21. También se encontraron señales a m/z 1554, 1798, 2040, 2282, 2524, 2766, 3010 (separadas en 242-244 uma, marcados con * en la figura) que derivarían de la matriz. Se registraron algunos espectros con relación analito/matriz 1:8 donde estas señales eran las predominantes, sin que se apreciaran iones originados por moléculas de carbohidratos (Fig. 4.11). El espectro con relación analito/matriz 1:8 (Fig. 4.10.b) también mostró una distribución unimodal de pesos moleculares originadas por iones $[M+Na]^+$ con grados de polimerización que van desde 8, con un máximo en DP 17. Además aparecen señales menores correspondientes a $[M+H]^+$ y $[M+K]^+$, indicadas con x y ∇ respectivamente en la Fig. 4.10.b. El peso molecular promedio numérico que surge de este espectro teniendo en cuenta solamente los iones $[M+Na]^+$ es 2997 (DP 22,6), mientras que resulta de 2890 (DP 21,8) cuando se consideran además las contribuciones de los iones $[M+H]^+$ y $[M+K]^+$ (Tabla 4.4). Para obtener el peso molecular promedio partiendo de iones $[M+Na]^+$, $[M+H]^+$ y $[M+K]^+$ se hizo primero el cálculo del grado de polimerización promedio, a partir del cual se calculó el peso molecular ($M = 132 \text{ DP} + 18$). El número así obtenido corresponde al denominado ion desnudo (naked ion), equivalente a la molécula de carbohidrato nativa que dio origen a los iones registrados.

Fig. 4.10. Espectros registrados para X1 en modo lineal positivo, empleando relaciones analito:matriz
(a) 1/4 y (b) 1/8

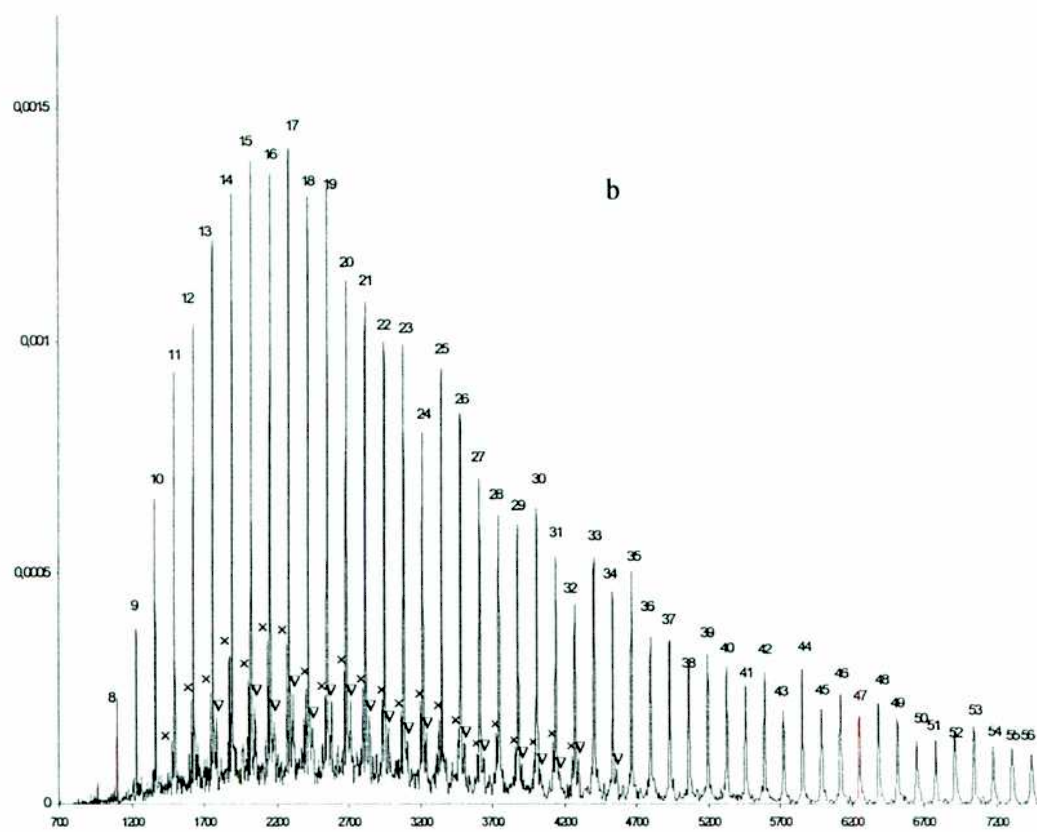
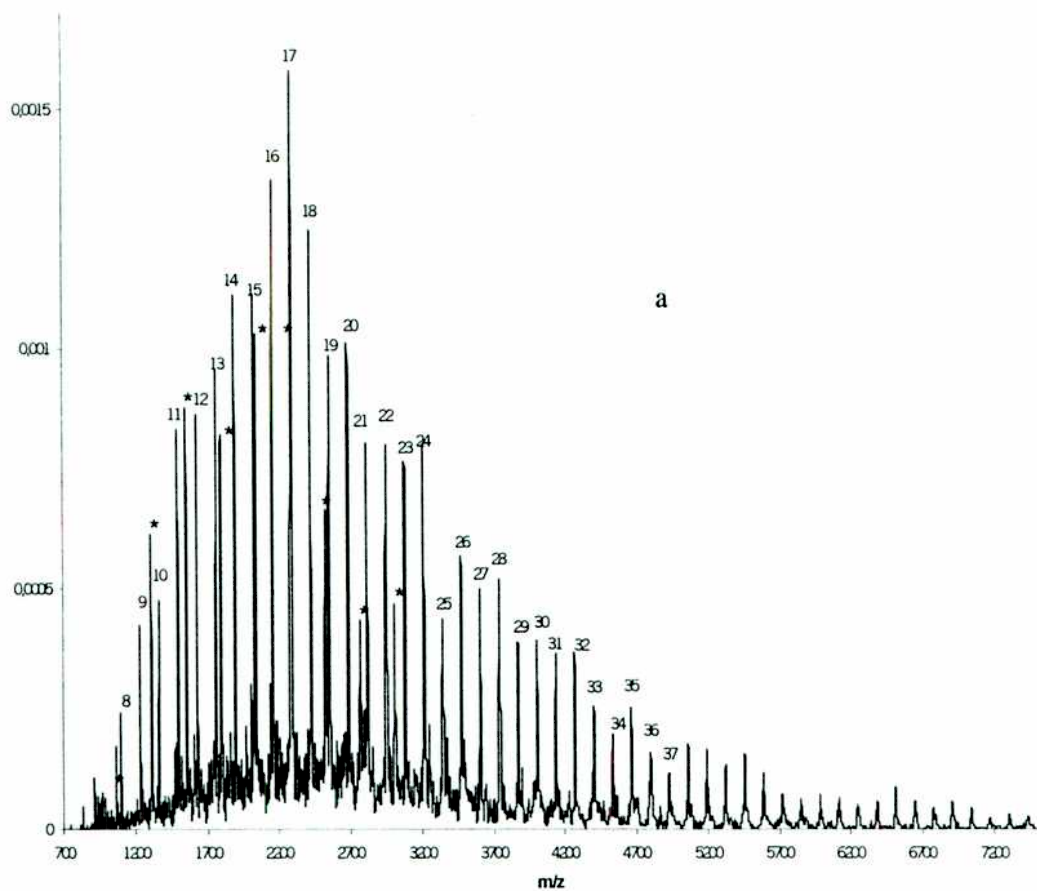
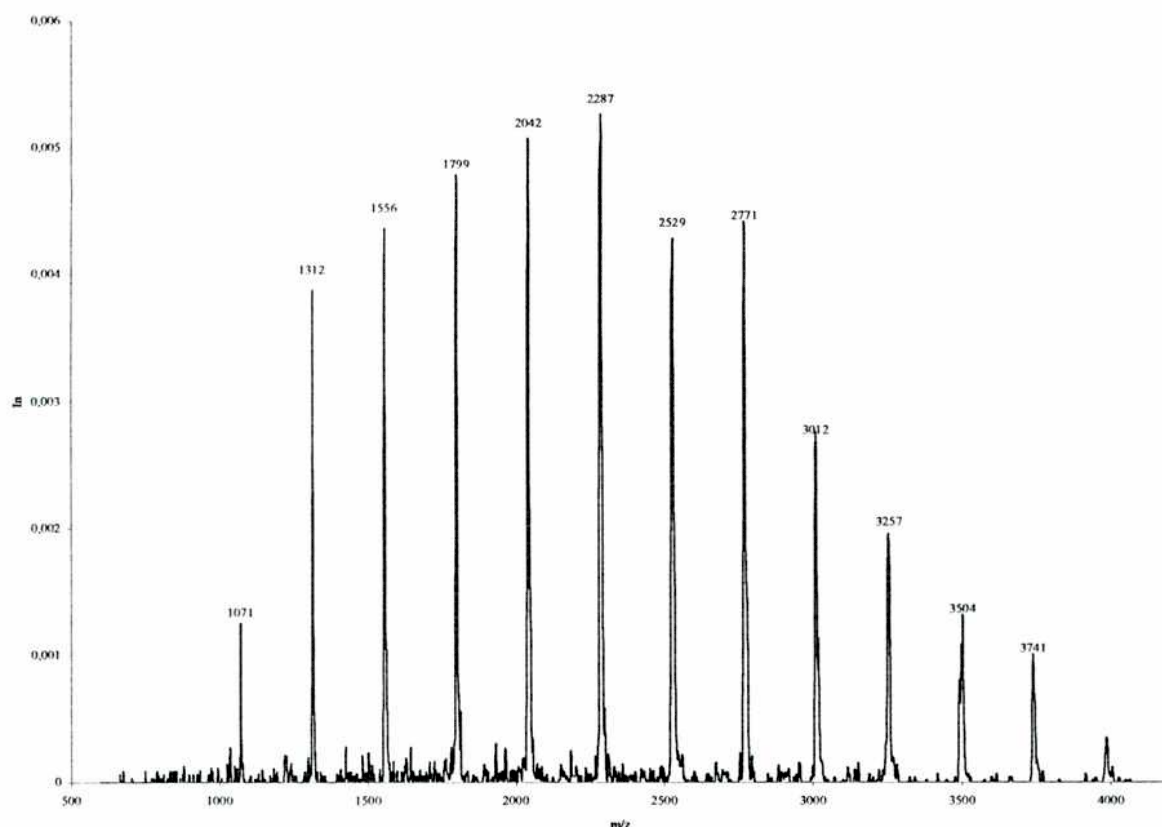


Fig. 4.11. Espectro registrado en modo lineal positivo, empleando relación X1/matriz 1:8, donde se observa el predominio de señales derivadas de la matriz



En la Tabla 4.4 se indican además los pesos moleculares promedio en masa, M_w , y los índices de polidispersión, D , para cada experimento analizado:

$$M_n = \frac{\sum_i M_i I_{ni}}{\sum_i I_{ni}} \quad DP_n = \frac{\sum_i DP_i I_{ni}}{\sum_i I_{ni}}$$

$$M_w = \frac{\sum_i M_i^2 I_{ni}}{\sum_i M_i I_{ni}} \quad DP_w = \frac{\sum_i DP_i^2 I_{ni}}{\sum_i DP_i I_{ni}}$$

$$D = \frac{M_n}{M_w}$$

Tabla 4.4. Pesos moleculares promedio numérico obtenidos por EM UV-MALDI-TOF y por espectroscopía RMN ¹H de los xilanos de *N. fastigiata*

Fracción	UV-MALDI-TOF						RMN ¹ H	
	espectro ^a	DP _{máx} ^b	DP _n ^c	M _n ^d	M _w ^d	D	DP _n ^e	M _n
X1	+ (1:4)	17	21,0	2790	3005	1,07	22	2922
	+ (1:8)	17	21,8	2890	3345	1,15		
	Suma ^f	17	22,5	2989	3546	1,19		
X2		n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	34	4506
X3	+ (1:4)	22	22,0	2924	3065	1,05	27	3582
	+ (1:8)	24	22,9	3035	3165	1,04		
	- (1:4)	26	25,3	3354	3469	1,03		
	- (1:8)	29	30,7	4048	4232	1,04		
	Suma	24	25,3	3352	3548	1,05		

^aModo iónico de detección, entre paréntesis: relación analito/matriz.

^bGrado de polimerización correspondiente a la señal más intensa del espectro.

^cCalculado a partir de los valores de DP y las intensidades normalizadas correspondientes, considerando todos los iones.

^dCalculado a partir de los valores de *m/z* y las intensidades normalizadas, considerando todos los iones. Corresponden a valores de iones “desnudos”.

^eRef. 57.

^fDatos calculados a partir del espectro suma.

Los espectros registrados para X2 (figuras no incluidas) presentaron señales consistentes con xilanos, pero no mostraron una distribución unimodal sino que todos los picos tuvieron intensidades similares, con una relación señal/ruido muy baja. Por lo tanto no fue posible calcular un peso molecular promedio confiable.

La fracción X3 dio buenos espectros en modo lineal registrando tanto en modo positivo (Fig. 4.12) como negativo (Fig. 4.13). El espectro de iones positivos con relación analito/matriz 1:4 dio una distribución unimodal simétrica, con grados de polimerización entre 11 y 32, con máximo de intensidad para DP 22 (Fig. 4.12.a). Los iones de mayor intensidad provenían de [M+Na]⁺, sólo se detectaron dos iones poco intensos que podrían ser originados por [M+K]⁺ (DP 16; 31; marcados con ∇). Se detectaron además picos a *m/z* 1548;

1730; 1867 y 2035 (* en la Fig. 4.12.a), cuyo origen no pudo determinarse. Podrían derivar de la matriz o de complejos analito-matriz, aunque parece raro que en las muestras con mayor concentración de analito prevalezca la aparición de este tipo de interferencias. El peso molecular promedio numérico que surge de considerar todos los cationes en este espectro es 2924 Da (DP 22) (Tabla 4.4). Cuando se utilizó una relación 1:8 la distribución, en el rango DP 13-35, resultó algo asimétrica con un máximo localizado en DP 24 (Fig. 4.12.b). Nuevamente la mayoría de los iones correspondían a $[M+Na]^+$ y sólo se detectaron iones $[M+H]^+$ y $[M+K]^+$ aislados (indicados con $\times$ y ∇ respectivamente). El peso molecular promedio numérico calculado es 3035 Da (DP 22,9), considerando todos los cationes (Tabla 4.4).

El espectro de X3 en modo negativo con relación analito/matriz 1:4 mostró la distribución unimodal más simétrica de la serie, consistente con xilanos de grados de polimerización 16-40, con el máximo de intensidad ubicado en DP 26 (Fig. 4.13.a). Los iones más intensos derivan de $[M-H]^-$ y se observa una distribución paralela originada por $[M+Na-2H]^-$ (designada con #), además se insinúa una correspondiente a $[M+K-2H]^-$ pero no llega a resolverse completamente. El peso molecular promedio numérico calculado considerando solamente $[M-H]^-$ es de 3358 Da, prácticamente coincidente con el obtenido al tener en cuenta además los aniones $[M+Na-2H]^-$, 3354 Da (DP 25,3), lo cual confirma que estos aniones acompañan la distribución de los aniones principales $[M-H]^-$. En cambio, al utilizar una relación analito/matriz 1:8 el espectro resultó menos intenso en general, compuesto por iones derivados de xilanos de grados de polimerización 19-46 y con la señal más intensa en DP 29 (Fig. 4.13.b). Los iones más intensos corresponden a $[M-H]^-$. Otros aniones como $[M+Na-2H]^-$ y $[M+K-2H]^-$ aparecen mezclados con el ruido de fondo, aunque se pudieron distinguir dos iones $[M+K-2H]^-$ correspondientes a DP 35 y 46. El peso molecular promedio numérico derivado es de 4048 Da (DP 30,7) (Tabla 4.4).

En todos los espectros se observó que la relación señal/ruido mejoraba a m/z mayores.

Fig. 4.12. Espectros registrados para X3 en modo lineal positivo, empleando relaciones analito:matriz (a) 1/4 y (b) 1/8

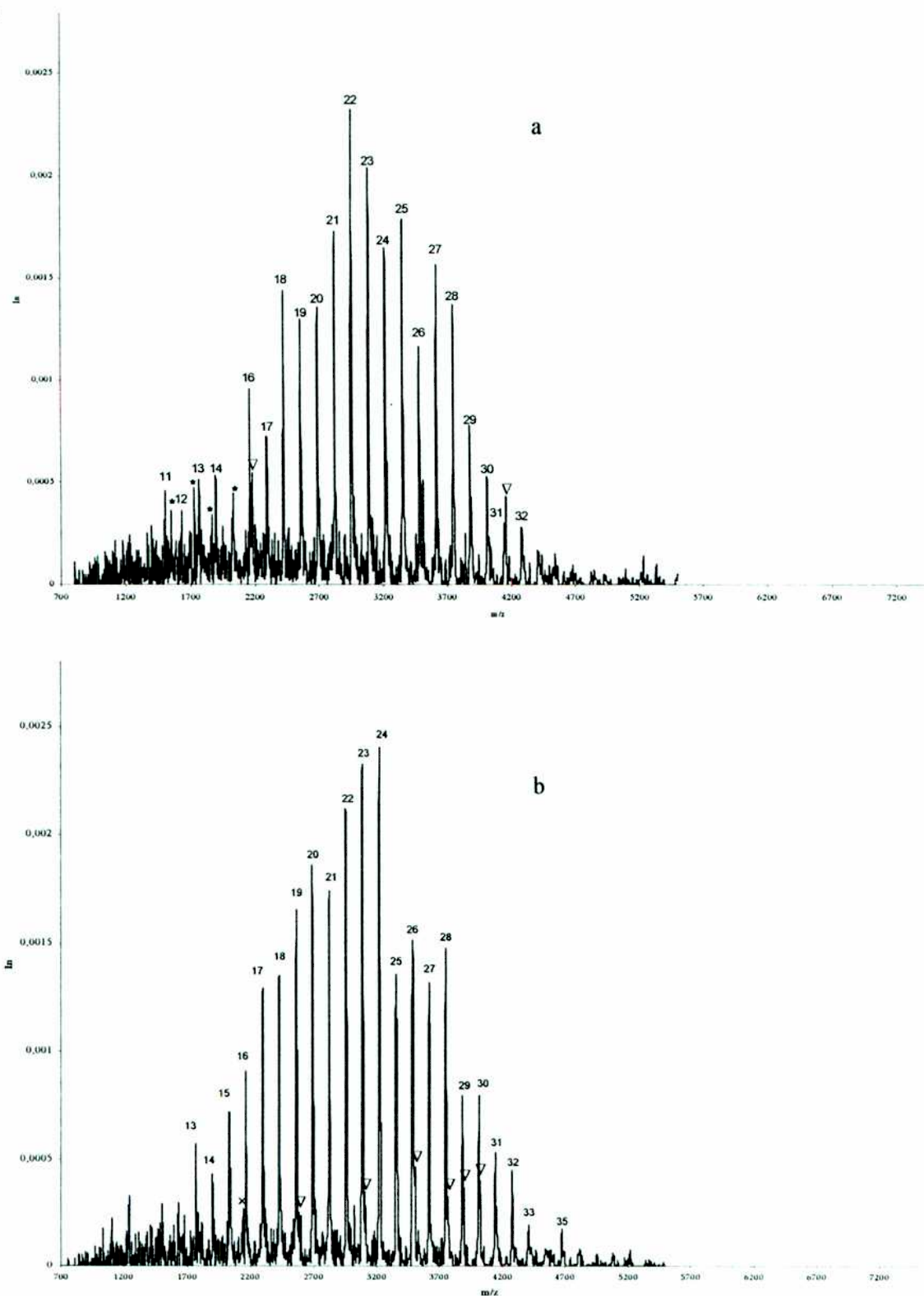
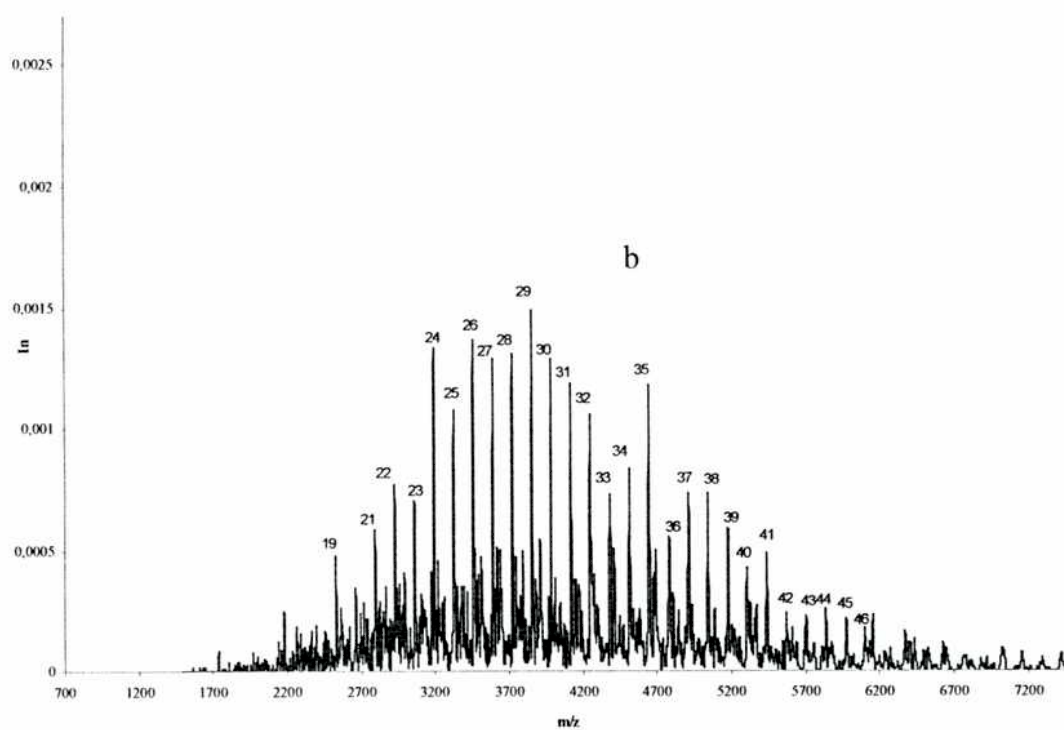
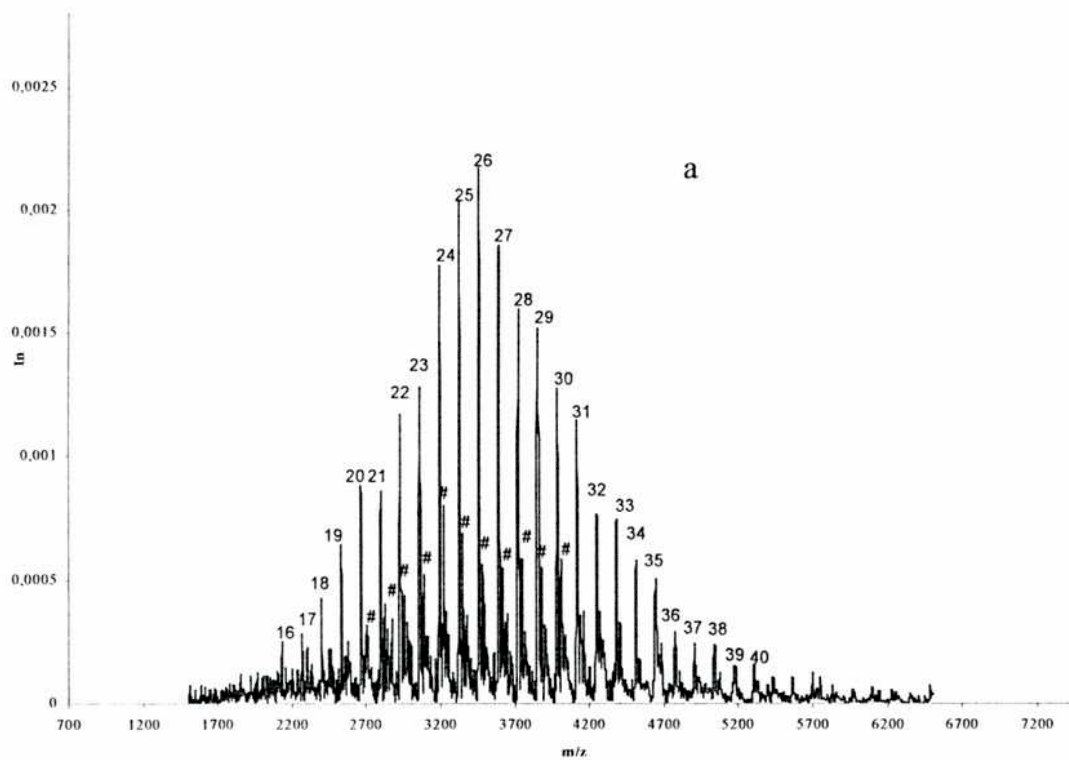
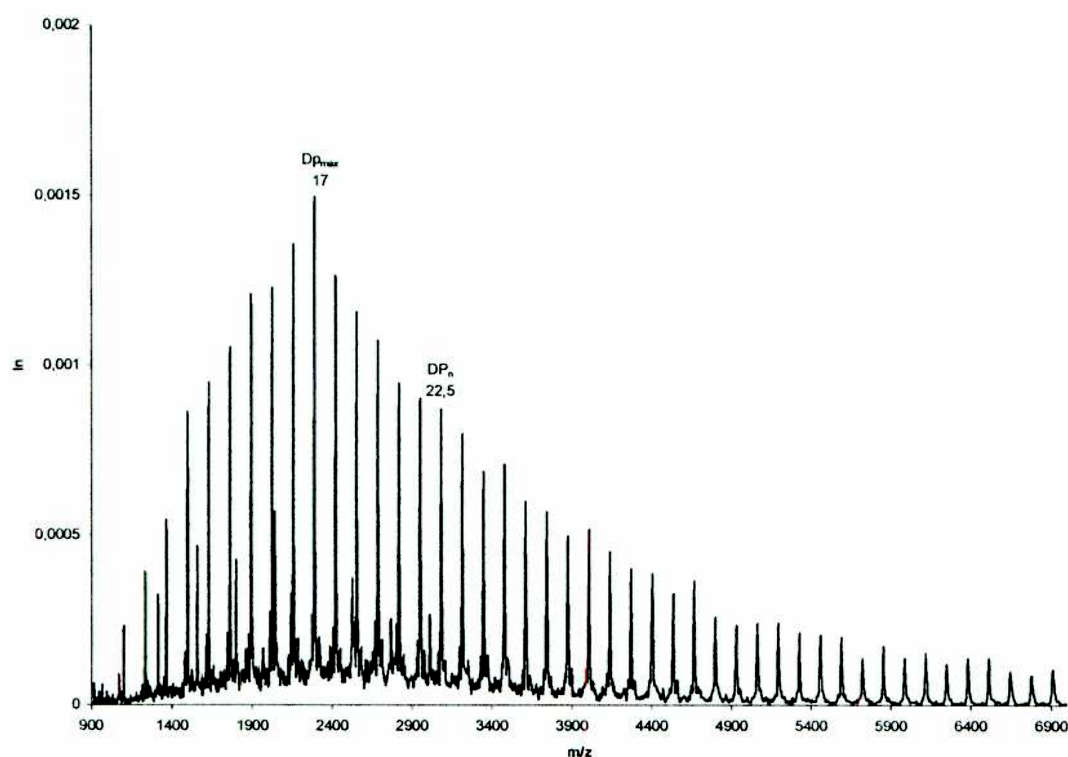


Fig. 4.13. Espectros registrados para X3 en modo lineal negativo, empleando relaciones analito:matriz (a) 1/4 y (b) 1/8



Un análisis global de los espectros de X1 indica que el experimento con mayor proporción de matriz dio mejores resultados en términos de relación señal/ruido, picos espúreos y resolución de las señales. En la Fig. 4.14 se muestra un espectro “suma” de la fracción X1, construido a partir de los espectros de la Fig. 4.10 corrigiendo las pequeñas diferencias en la escala de m/z , para lo cual se hicieron coincidir los picos máximos de cada espectro individual. El eje de ordenadas corresponde a la semisuma de las intensidades normalizadas. Si bien el grado de polimerización promedio numérico obtenido para este espectro suma, DP_n 22,5, es concordante el valor determinado por RMN ^1H (DP_n 22, Tabla 4.4), la asimetría de la curva de distribución con una rama extendida hacia la región de m/z superiores es similar a las registradas en experimentos donde se detectó discriminación de iones de masas mayores. Para discernir si existe este fenómeno sería necesario subfraccionar los xilanos por SEC y analizar nuevamente por UV-MALDI-TOF las subfracciones aisladas.

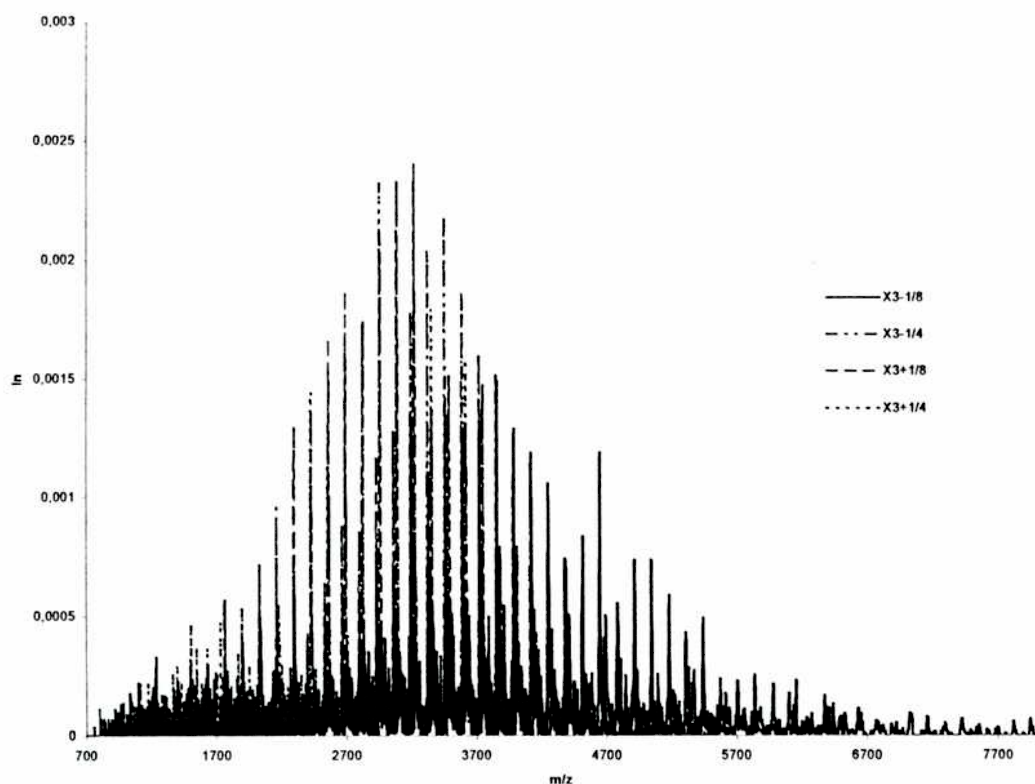
Fig. 4.14. Espectro “suma” de X1



La comparación de los espectros de X3 indica que los resultados obtenidos en modo iónico positivo son similares. Si bien la relación analito/matriz 1/8 dio una distribución más regular hasta DP 24 con mejor relación señal/ruido, a partir del máximo de la curva parece haber discriminación de masas en detrimento de los iones más pesados. El espectro en modo

negativo con relación X3/matriz 1:8 es el menos intenso de la serie y presenta una distribución más irregular. Por lo tanto, las mejores condiciones experimentales parecen haberse logrado en el espectro de la Fig. 4.13.a correspondiente a modo iónico negativo y relación X3/matriz 1:4: el resultado es una curva de distribución unimodal y simétrica, con resolución de iones $[M-H]^-$, $[M+Na-2H]^-$, $[M+K-2H]^-$.

Fig. 4.15. Superposición de los espectros obtenidos para X3 en modo positivo y negativo



Los espectros registrados para X3 tienen máximos de intensidad entre DP 22 y 29 (Tabla 4.4; Figs. 4.12 y 4.13). Resulta evidente que los espectros en modo positivo presentan señales más intensas en la región de masas menores, con respecto a los espectros de aniones. En la Fig. 4.15 se muestra una superposición de los cuatro espectros correspondientes a la fracción X3, registrados en modo positivo y negativo con relaciones analito/matriz 1:4 y 1:8. La envolvente mantiene una distribución unimodal simétrica de pesos moleculares, con un máximo en DP 24. Tomando como antecedente esta comparación, se construyó un espectro “suma” (Fig. 4.16) a partir de los cuatro mostrados en las Fig. 4.12 y 4.13, en las condiciones siguientes:

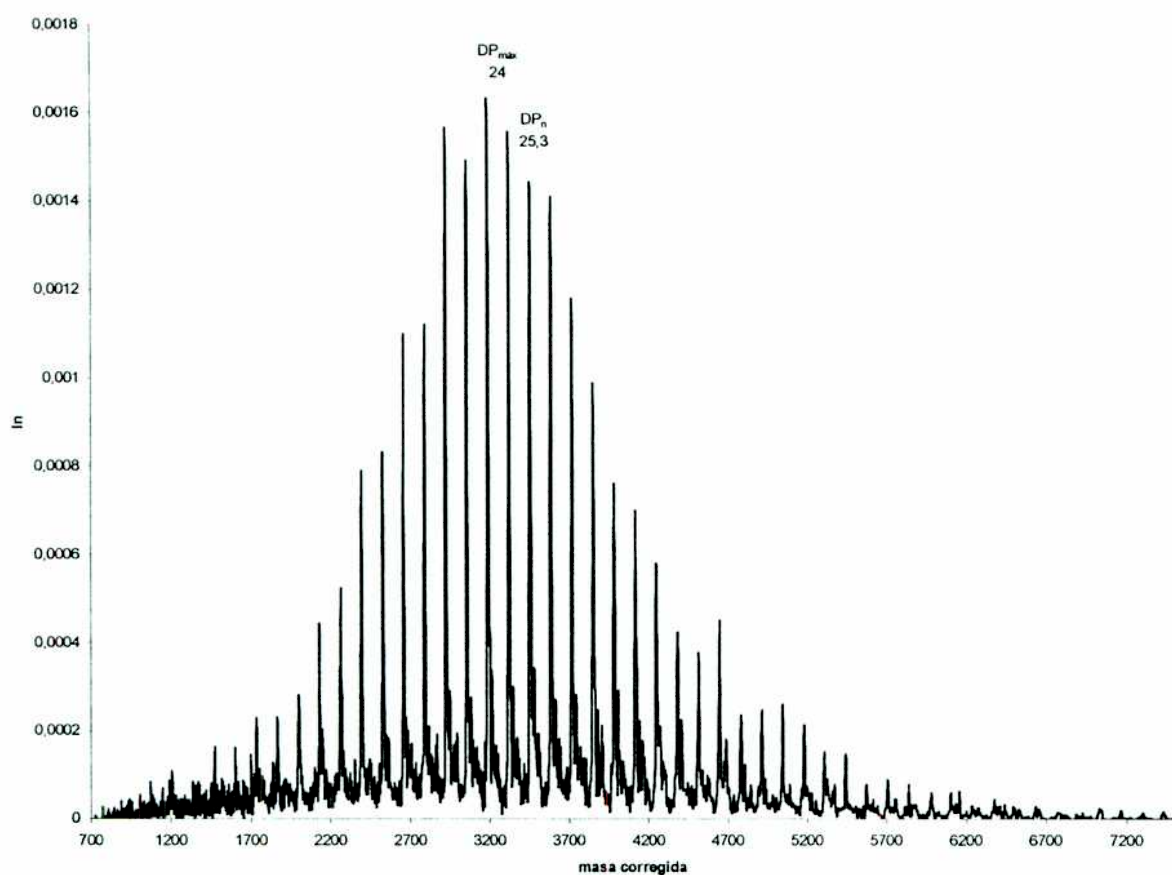
i) se hicieron coincidir los máximos correspondientes a cada grado de polimerización aunque fueran originados por iones distintos ($[M-H]^-$ y $[M+Na]^+$);

ii) a cada señal se le asignó la masa correspondiente al oligosacárido que la originó: *masa corregida* = $DP \times 132 + 18$;

iii) se graficó la intensidad normalizada, de modo tal que la integral del área bajo el espectro sea 1, versus la masa corregida (Fig.4.16).

Este espectro suma retiene la distribución simétrica de pesos moleculares, con máximo en DP 24. Se obtuvo un DP_n de 25,3 —equivalente a M_n 3352 Da— bastante cercano a la estimación del peso molecular obtenida por RMN 1H (DP_n 27, Tabla 4.4).

Fig. 4.16. Espectro “suma” de X3



4.3. CONCLUSIONES

4.3.1. XILOMANANOS SULFATADOS

Los espectros registrados para las fracciones de xilomananos sulfatados presentan varias características interesantes:

- 1- Abarcan un rango amplio de valores de m/z (2113-45270 uma). El presente trabajo constituye el primer antecedente bibliográfico sobre espectros de masa UV-MALDI-TOF de polisacáridos sulfatados de pesos moleculares tan altos.
- 2- No muestran la distribución unimodal de pesos moleculares esperada para polisacáridos de plantas^{10,17,54}.
- 3- Están compuestos por pocos picos, y en algunos casos uno único. Además aparecen al azar, sugiriendo la existencia de procesos de desorción/ionización erráticos y de baja eficiencia¹³.

Las fracciones F2' y F5', de bajo peso molecular, presentan similitud entre el peso molecular calculado por espectrometría de masa y el determinado por un método químico (Tabla 4.3), por lo que la mayoría de los iones observados corresponderían a iones moleculares. En las fracciones F3, F4' y F6' los pesos moleculares calculados a partir de los espectros son menores que los encontrados por cuantificación de extremos terminales reductores. La diferencia entre ambos valores es mayor a medida que aumenta el peso molecular, indicando mayores dificultades en el paso de desorción/ionización y la consecuente discriminación de masas, con defecto de iones de m/z mayores^{8,50}. En EM MALDI la desviación entre la distribución real y aparente de pesos moleculares se debe fundamentalmente a la desorción y la ionización preferenciales de las moléculas más pequeñas de analito, en desmedro de las moléculas mayores^{8,50}, que en algunos casos impiden tener un espectro representativo de la distribución real para muestras polidispersas⁵⁰. La tendencia constante observada entre los valores de pesos moleculares calculados químicamente y por espectrometría de masa implica que no se registraron iones correspondientes a *clusters* monocargados –con valores de m/z mayores que el perteneciente al ion molecular–, aunque no es posible descartar la presencia de iones policargados. Si bien los espectros fueron registrados en condiciones experimentales tales que las fragmentaciones *prompt* fueran mínimas, tampoco se puede descartar absolutamente la observación de iones de este origen.

El análisis de un espectro total de F2' (Fig. 4.4), construido por adición de los 23 picos encontrados para esta fracción, revela una distribución unimodal velada, a pesar de la intensidad dispar de las señales individuales. Además se reconstruyó un espectro total correspondiente a toda la familia de xilomananos biosintetizada por el alga (Fig. 4.5) a partir de todos los espectros registrados para las cinco fracciones, utilizando intensidades ponderadas por la contribución en masa de cada fracción al sistema total y considerando a cada una de las fracciones como una parte representativa de este sistema de polisacáridos. El espectro total resultante sugiere una distribución unimodal de pesos moleculares, incluyendo distorsiones en la envolvente provenientes de (i) el proceso aditivo de reconstrucción de un todo a partir de sus componentes individuales; (ii) la naturaleza compleja del sistema, formado por polisacáridos con alta tendencia a formar agregados; y (iii) las intensidades normalizadas y corregidas (I_c) de los picos no son representativas de la concentración de la fracción que los origina en el sistema total de xilomananos. Trabajos publicados sobre muestras de maltodextrinas y dextranos con pesos moleculares relativamente bajos ($PM < 6000$) no mostraron discriminación de los iones vinculada con su masa¹⁰. Sin embargo, el resultado de la Fig. 4.5 sugiere que pueden ocurrir este tipo de discriminaciones en muestras tales como los polisacáridos estudiados, con pesos moleculares superiores y fuerte tendencia a formar agregados. Dicha tendencia asociativa puede estar vinculada a características estructurales de los xilomananos sulfatados, así como a la formación de complejos no estequiométricos asociados a calcio (Cap. 3).

4.3.2. XILANOS

Los espectros de X1 y X3 presentan las siguientes características relevantes:

- 1- Mostraron distribuciones unimodales de pesos moleculares en el rango DP 8-46.
- 2- Se registraron en modo lineal tanto negativo como positivo.
- 3- Las señales principales aparecieron bien resueltas, con diferencias de m/z de 132 uma, equivalentes a una unidad de anhidroxilosa.
- 4- Los iones principales fueron $[M+Na]^+$ y $[M-H]^-$ en modos positivo y negativo respectivamente, además pudieron identificarse iones minoritarios correspondientes a $[M+H]^+$, $[M+K]^+$, $[M+Na-2H]^-$ y $[M+K-2H]^-$.

El *nor*-harmano resultó una matriz apropiada para el estudio de estas muestras tanto en modo iónico positivo como negativo. Si bien se detectaron en algunos casos señales

originadas por la matriz, éstas fueron identificadas claramente como ajenas a la muestra y no causaron inconvenientes en los cálculos.

La coincidencia entre los pesos moleculares promedio numérico determinados por UV-MALDI-TOF y por espectroscopía RMN ^1H indica que los iones detectados provienen de iones moleculares, con ausencia de iones derivados de clusters monocargados de analitos y de iones policargados. Los espectros se efectuaron en condiciones experimentales de modo de minimizar las fragmentaciones *prompt* por lo que no se detectaron iones que pudieran atribuirse a este origen. Además, la concordancia entre ambos métodos indica que los experimentos de espectrometría de masa dieron resultados que reflejan en forma confiable la composición de estas muestras en relación a la distribución de pesos moleculares. El análisis de las otras distribuciones relacionadas con los polisacáridos —en particular de los enlaces en la cadena y de bloques constituyentes del polisacárido— sólo puede efectuarse si existen fragmentaciones de las moléculas.

Se han informado desviaciones dependientes de la masa en las distribuciones de peso molecular de dextranos⁵⁰ con peso molecular mayor que 12000 Da. Para obtener espectros de masa UV-MALDI-TOF fieles a la concentración de los componentes a partir de polisacáridos de alto peso molecular es necesario contar con muestras monodispersas, con índice de polidispersión D menor que 1,1. Los pesos moleculares promedio en masa para X1 y X3, determinados sobre los espectros suma de las Figs. 4.14 y 4.16, son 3546 y 3548 respectivamente (Tabla 4.4). Por lo tanto los coeficientes de polidispersión para estas fracciones son de 1,2 y 1,1 y cumplen entonces con la condición propuesta por Garozzo *et al.*⁵⁰, además de tratarse de compuestos de peso molecular relativamente bajo.

La fracción X2 y el xilano total X_T (no se muestran los datos) no dieron buenos espectros UV-MALDI-TOF. En particular X2 es la fracción intermedia, con el mayor peso molecular estimado dentro de la serie. Viendo los resultados de X1 y X3, sería de esperar que esta fracción tuviera una amplia dispersión de pesos moleculares, provocando la aparición de fenómenos de discriminación de iones dependiente de la masa. Un efecto de supresión de analito⁸ (ASE) donde los iones más livianos inhibieran al menos parcialmente la ionización de los más pesados —mayoritarios en este caso— resultaría en una disminución importante de las intensidades de los iones originados por los oligosacáridos de mayor concentración en la muestra. Por lo tanto, se obtendría una curva poco representativa de la distribución real de los componentes de la muestra. En una situación como esta, X_T tendría una dispersión aún mayor de oligosacáridos componentes por lo que tampoco daría espectros que reflejen la

composición real de la muestra. Para corroborar esta hipótesis habría que subfraccionar a X2 por SEC y analizar nuevamente por UV-MALDI-TOF las subfracciones aisladas.

La aplicación de EM UV-MALDI-TOF para la determinación de la distribución de pesos moleculares de carbohidratos está todavía en desarrollo. El enfoque general de los trabajos publicados en el tema consiste en la comparación de estos resultados con otros obtenidos por métodos convencionales, a fin de ajustar y optimizar las condiciones experimentales de la técnica. Los experimentos realizados sobre los xilanos X1 y X3 y sobre los xilomananos sulfatados de *N. fastigiata* demostraron que es interesante su aplicación a polisacáridos de algas rojas, si se hace una elección adecuada de la matriz, de la preparación de la muestra, incidencia del láser y demás variables experimentales.

4.4. BIBLIOGRAFÍA

- ¹Tanaka, K.; Ido, Y.; Akita, S.; Yoshida, Y.; Yoshida, T. *Proceedings of the Second Japan-China Joint Symposium on Mass Spectrometry* (Osaka, Japón) **1987**.
- ²Tanaka, K.; Waki, H.; Ido, Y.; Akita, S.; Yoshida, Y.; Yoshida, T. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1988**, *2*, 151-.
- ³Karas, M.; Hillenkamp F. *Adv. Mass Spectrom.* **1988**, *11A*, 354-356.
- ⁴Karas, M.; Hillenkamp F. *Anal. Chem.* **1988**, *60*, 2299-2301.
- ⁵Allwood, D.A.; Dreyfus, R.W.; Perera, I.K.; Dyer, P.E. *Rapid Commun. Mass. Spectrom.* **1996**, *10*, 1575-1578.
- ⁶Lehmann, E.; Knochenmuss, R.; Zenobi, R. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1997**, *11*, 1483-1492.
- ⁷Knochenmuss, R.; Dubois, F.; Dale, M.J.; Zenobi, R. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1996**, *10*, 871-877.
- ⁸Knochenmuss, R.; Stortelder, A.; Breuker, K.; Zenobi, R. *J. Mass Spectrom.* **2000**, *35*, 1237-1245.
- ⁹Mock, K.K.; Davy, M.; Cottrell J.S. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1991**, *177*, 644-651.
- ¹⁰Stahl, B.; Steup, M.; Karas, M.; Hillenkamp, F. *Anal. Chem.* **1991**, *63*, 1463-1466.
- ¹¹Stahl, B.; Thurl, S.; Zeng, J.; Karas, M.; Hillenkamp, F.; Steup, M.; Sawatzki, G. *Anal. Biochem.* **1994**, *223*, 218-226.
- ¹²Krause, J.; Stoeckli, M.; Schlunegger, U.P. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1996**, *10*, 1927-1933.
- ¹³Harvey, D.J. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1993**, *7*, 614-619.
- ¹⁴Karas, M.; Ehring, H.; Nordhoff, E.; Stahl, B.; Strupat, K.; Hillenkamp, F.; Grehl, M.; Krebs, B. *Org. Mass Spectrom.* **1993**, *28*, 1476-1481.
- ¹⁵Mohr, M.D.; Börnsen, K.O.; Widmer, H.M. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1995**, *9*, 809-814.
- ¹⁶Metzger, J.O.; Woisch, R.; Tuszyński, W.; Angermann, R. *Fresenius J. Anal. Chem.* **1994**, *349*, 473-474.
- ¹⁷Stahl, B.; Linos, A.; Karas, M.; Hillenkamp, F.; Steup, M. *Anal. Biochem.* **1997**, *246*, 195-204.
- ¹⁸Kolli, V.S.K.; Orlando, R. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1996**, *10*, 923-926.
- ¹⁹Harvey, D.J.; Hunter, A.P. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1998**, *12*, 1721-1726.

- ²⁰Xu, N.; Huang, Z.-H.; Watson, J.T.; Gage, D.A. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **1997**, *8*, 116-124.
- ²¹Nonami, H.; Tanaka, K.; Fukuyama, Y.; Erra-Balsells, R. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1998**, *12*, 285-296.
- ²²Harvey, D.J. *Mass Spectrom. Rev.* **1999**, *18*, 349-451.
- ²³Hao, C.; Ma, X.; Fang, S.; Liu, Z.; Liu, S.; Song, F.; Liu, J. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1998**, *12*, 345-348.
- ²⁴Chen, P.; Baker, A.G.; Novotny, M.V. *Anal. Biochem.* **1997**, *244*, 144-151.
- ²⁵Wheeler, S.F.; Harvey, D.J. *Anal. Chem.* **2000**, *72*, 5027-5039.
- ²⁶Cancilla, M.T.; Penn, S.G.; Lebrilla, C.B. *Anal. Chem.* **1996**, *70*, 663-672.
- ²⁷Wong, C.K.L.; Chan, T.-W.D. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1997**, *11*, 513-519.
- ²⁸Wong, A.W.; Cancilla, M.T.; Voss, L.R.; Lebrilla, C.B. *Anal. Chem.* **1999**, *71*, 205-211.
- ²⁹Simpson, S.D.; Ashford, D.A.; Harvey, D.J.; Bowles, D.J. *Glycobiology* **1998**, *8*, 579-583.
- ³⁰Daas, P.J.H.; Arisz, P.W.; Schols, H.A.; De Ruiter, G.A.; Voragen, A.G.J. *Anal. Biochem.* **1998**, *257*, 195-202.
- ³¹Papac, D.I.; Wong, A.; Jones, A.J.S. *Anal. Chem.* **1996**, *68*, 3215-3223.
- ³²Juhasz, P.; Costello, C.E. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **1992**, *3*, 785-796.
- ³³Papac, D.I.; Briggs, J.B.; Chin, E.T.; Jones, A.J.S. *Glycobiology* **1998**, *8*, 445-454.
- ³⁴Nonami, H.; Fukui, S.; Erra-Balsells, R. *J. Mass Spectrom.* **1997**, *32*, 287-296.
- ³⁵Mechref, Y.; Novotny, M.V. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **1998**, *9*, 1292-1302.
- ³⁶Dai, Y.; Whittall, R.M.; Bridges, C.A.; Isogai, Y.; Hindsgaul, O.; Li, I. *Carbohydr. Res.* **1997**, *304*, 1-9.
- ³⁷Juhasz, P.; Biemann, K. *Proc. Acad. Sci. USA* **1994**, *91*, 4333-4337.
- ³⁸Juhasz, P.; Biemann, K. *Carbohydr. Res.* **1995**, *270*, 131-147.
- ³⁹Nicola, A.J.; Gusev, A.I.; Proctor, A.; Jackson, E.K.; Hercules, D.M. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1995**, *9*, 1164-1171.
- ⁴⁰Nonami, H.; Wu, F.; Thummel, R.P.; Fukuyama, Y.; Yamaoka, H.; Erra-Balsells, R. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2001**, *15*, 2354-2373.
- ⁴¹Harvey, D.J.; Hunter, A.P.; Bateman, R.H.; Brown, J.; Critchley, G. *Int. J. Mass Spectrom. Ion. Processes* **1999**, *188*, 131-146.
- ⁴²Ngoka, L.C.; Gal, J.-F.; Lebrilla, C.B. *Anal. Chem.* **1994**, *66*, 692-698.
- ⁴³Karas, M.; Bahr, U.; Strupat, K.; Hillenkamp, F.; Tsarbopoulos, A.; Pramanik, B.M. *Anal. Chem.* **1995**, *67*, 675-679.

- ⁴⁴Körner, R.; Limberg, G.; Mikkelsen, J.D.; Roepstorff, P. *J. Mass Spectrom.* **1998**, *33*, 836-842.
- ⁴⁵York, W.S.; Kolli, V.S.K.; Orlando, R.; Albersheim, P.; Darvill, A.G. *Carbohydr. Res.* **1996**, *285*, 99-128.
- ⁴⁶Rydlund, A.; Dahlman, O. *Carbohydr. Res.* **1997**, *300*, 95-102.
- ⁴⁷Yamagaki, T.; Mitsuishi, Y.; Nakanishi, H. *Biosci. Biotech. Biochem.* **1997**, *61*, 1411-1414.
- ⁴⁸Yamagaki, T.; Mitsuishi, Y.; Nakanishi, H. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1998**, *10*, 1887-1890.
- ⁴⁹Yamagaki, T.; Mitsuishi, Y.; Nakanishi, H. *Tetrahedron Letts.* **1998**, *39*, 4051-4154.
- ⁵⁰Garozzo, D.; Impallomeni, G.; Spina, E.; Sturiale, L.; Zanetti, F. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1995**, *9*, 937-941.
- ⁵¹Broberg, S.; Koch, K.; Andersson, R.; Kenne, L. *Carbohydr. Polym.* **2000**, *43*, 285-289.
- ⁵²Yamagaki, T.; Maeda, M.; Kanazawa, K.; Ishizuka, Y.; Nakanishi, H. *Biosci. Biotech. Biochem.* **1996**, *60*, 1222-1228.
- ⁵³Fukuyama, Y.; Ciancia, M.; Nonami, H.; Cerezo, A.S.; Erra-Balsells, R.; Matulewicz, M.C. *Carbohydr. Res.* **2002**, *337*, 1553-1562.
- ⁵⁴Chizov, A.O.; Dell, A.; Morris, H.R.; Reason, A.J.; Haslam, S.M.; McDowell, R.A.; Chizov, O.S.; Usov, A.I. *Carbohydr. Res.* **1998**, *310*, 203-210.
- ⁵⁵Harvey, D.J.; Rudd, P.M.; Bateman, R.H.; Bordoli, R.S.; Howes, K.; Joyes, J.B.; Vickers, R.G. *Org. Mass. Spectrom.* **1994**, *29*, 753-765.
- ⁵⁶Park, J.T.; Johnson, M.J. *J. Biol. Chem.* **1949**, *181*, 149-151.
- ⁵⁷Matulewicz, M.C.; Cerezo, A.S.; Jarret, R.J.; Syn, N. *Int. J. Biol. Macromol.* **1992**, *14*, 29-32.

PARTE III

ANÁLISIS ESTRUCTURAL DE POLISACÁRIDOS SULFATADOS DE *GEORGIELLA CONFLUENS*

CAPÍTULO 5

ANÁLISIS ESTRUCTURAL DEL SISTEMA DE GALACTANOS SULFATADOS DE *GEORGIELLA CONFLUENS*

5.1. EXTRACCIÓN, AISLAMIENTO Y FRACCIONAMIENTO



El alga roja *Georgiella confluens* (Reinsch) Kylin¹ fue recolectada en el verano de 1993 en la Base Jubany (Antártida). Existe un depósito de un ejemplar representativo del material en el Museo Argentino de Ciencias Naturales Bernardino Rivadavia (N° 35806). El alga contenía diatomeas epífitas^a, identificadas como *Rhoicosphaenia marina*, *Odontella aurita* y *Entopyla australis*², que fueron removidas por tratamiento del material seco con etanol 70% y luego por lavado rápido y vigoroso en un tamiz fino, bajo agua corriente a presión. La observación del alga al microscopio óptico determinó que las diatomeas habían sido eliminadas.

El alga seca se extrajo entonces cinco veces con agua a temperatura ambiente, dando lugar a los extractos E1-E5. Luego de comparar su composición en monosacáridos y contenido de sulfato se decidió juntar estos extractos, dando lugar a PE con un 16,7% del material libre de diatomeas. Una porción de PE fue redisueltada en agua para dar CP como producto soluble, con 71,9% de rendimiento. Se procedió a un fraccionamiento de CP con solución acuosa de cetrimida, a fin de precipitar los polisacáridos sulfatados. El precipitado se sometió a una solubilización fraccionada en soluciones de cloruro de sodio de concentraciones crecientes (Esquema A.2). Así se obtuvieron siete fracciones (Tabla 5.1) con un rendimiento total del 79,2% con respecto a la masa inicial de CP.

^a Algas marinas unicelulares que crecen sobre la superficie de la macroalga, utilizándola como sustrato pero sin modificar la composición de su pared celular.

Tabla 5.1. Fraccionamiento de los polisacáridos de *G. confluens*

Fracción	Concentración de redisolución M NaCl	Rend. ^a %
G1 ^b		11,0
G2	0,5	60,8
G3	1,0	25,2
G4	2,0	1,8
G5	3,0	0,4
G6	4,0	0,3
G7 ^c	4,0	0,5

^aRendimientos expresados como porcentajes del total recuperado (79,2% de CP).

^bSoluble en solución acuosa de cetrimida.

^cInsoluble en NaCl 4,0 M.

Tabla 5.2. Composición de las fracciones G1-G6 aisladas a partir de CP

Fracción	Sulfato (% SO ₃ Na)	Composición en monosacáridos (% molar)							
		Xil	2-Me Gal	6-Me Gal	Gal	AnGal	2-Me AnGal	Man	Glc
G1	5.5	4	1	6	34	-	10	15	28
G2	15.0	12	1	10	60	2	8		7
G3	21.3	14	1	26	46	1	8		4
G4	n.d. ^a	8	7	19	53	1	5	4	3
G5	n.d.	29			9		2	42	17
G6	n.d.	20		3	13	3		31	30

^an.d.: no determinado.

Se decidió llevar a cabo el análisis estructural de las dos fracciones mayoritarias, G2 y G3, cuyos rendimientos suman el 86% de la masa total recuperada. Fueron redisueltas en soluciones de cloruro de sodio de la concentración correspondiente, de modo de asegurar un exhaustivo intercambio de cationes, dando las fracciones G2' y G3' respectivamente (contenido total de hidratos de carbono: G2', 75% y G3', 81%). En la Tabla 5.3 se muestran el peso molecular, el contenido de sulfato y la composición en monosacáridos de CP, G2' y

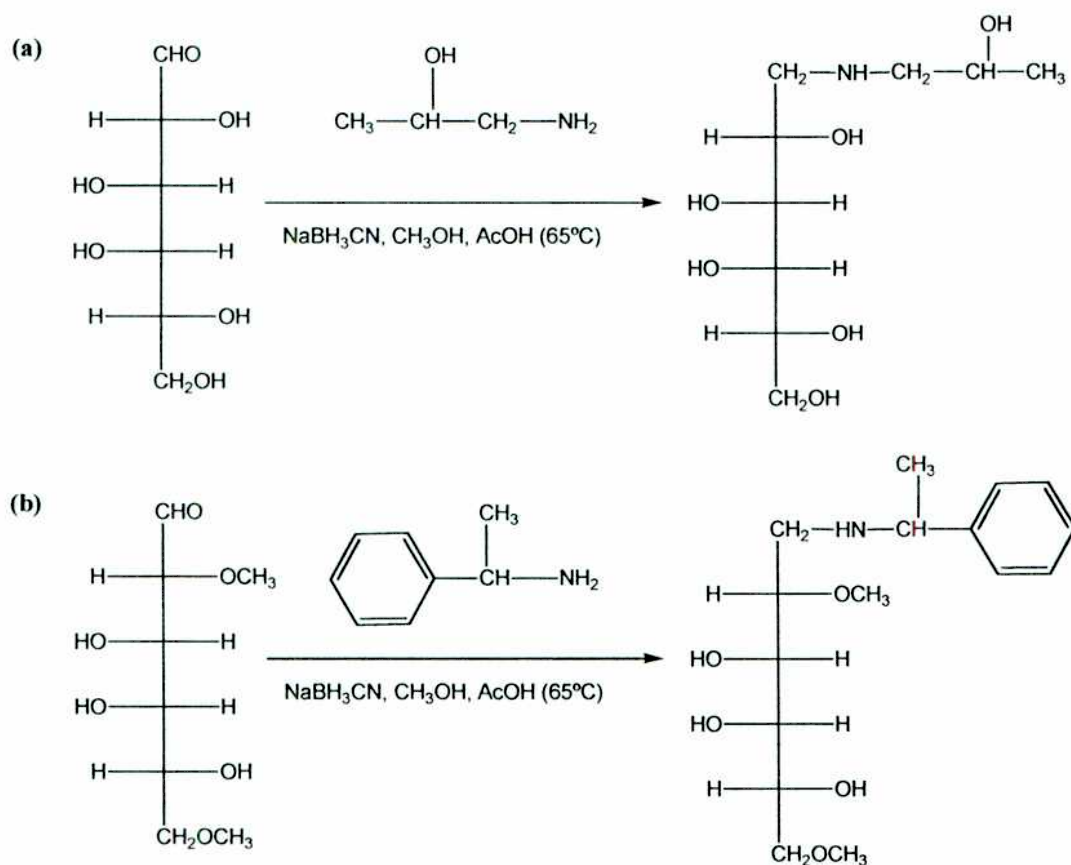
G3'. Resultó notable el contenido elevado de monosacáridos naturalmente metilados que aparecía en estos polisacáridos (33-38%).

Tabla 5.3. Composición de CP, G2', G3' y sus polisacáridos derivados

Fracción	Sulfato (% SO ₃ Na)	Peso molecular	Composición en monosacáridos					
			(% molar)					
			Xil	2-Me L-Gal	6-Me D-Gal	Gal	1-AnGal	2-Me 1-AnGal
CP	12,6	13500	13	7	19	47 (1,0) ^a	2	12
CPDes	4,5	3200	13	6	23	46	3	9
CPSD	8,7	2700	1	8	25	64	1	1
G2'	12,6	19600	11	8	18	53 (1,2)	3	7
G2'Des	4,6	3400	11	8	22	52	1	6
G2'SD	12,0	4600	2	9	25	53	2	9
G3'	16,3	17800	9	6	22	51 (1,5)	3	9
G3'Des	6,1	n.d.	10	5	21	58	1	5

^aLa relación D-:L-galactosa se indica entre paréntesis.

La configuración absoluta de 6-*O*-metil-D-galactosa y la relación D-:L-galactosa se determinaron por hidrólisis de las muestras y posterior derivatización de los monosacáridos con 1-amino-2-propanol quiral, para dar los 1-desoxi-1-(2-hidroxipropilamino)alditoles diastereoméricos (Esquema 5.1.a) que fueron acetilados y analizados por cromatografía gaseosa. La asignación de la configuración de 2-*O*-metil-L-galactosa se efectuó por un procedimiento análogo, usando 1-feniletilamina quiral ya que los derivados obtenidos a partir de 1-amino-2-propanol no se resuelven adecuadamente por cromatografía gaseosa³. La etapa de hidrólisis previa a la aminación reductiva impide la determinación de las configuraciones absolutas de las unidades de 3,6-anhidrogalactosa y 3,6-anhidro-2-*O*-metilgalactosa. En nuestro laboratorio se ha desarrollado un método químico para determinar la configuración absoluta de 3,6-anhidrogalactosa⁴ pero no fue extendido al derivado 2-*O*-metilado. El escaso contenido de 3,6-anhidrogalactosa de las muestras no justificó su aplicación, por lo que la pertenencia a la serie L se realizó en base a los espectros RMN ¹³C (ver sección 5.2.4.2). Las relaciones globales de unidades D-:L- para las tres muestras resultaron consistentes con una cadena central de agarano. Este hecho se confirmó también por datos espectroscópicos de RMN ¹³C.

Esquema 5.1. Formación de derivados diastereoméricos de monosacáridos por aminación reductiva

La fracción G2' fue sometida a una cromatografía de intercambio iónico en escala analítica (11,55 mg de G2') en una columna de DEAE Sephadex A-25 (Cl⁻) eluyendo con soluciones de cloruro de sodio, cuya concentración se aumentó en forma escalonada hasta llegar a 2 M (Fig. 5.1). Teniendo en cuenta las concentraciones de cloruro de sodio que fueron relevantes en la elución, G2' fue fraccionada en escala preparativa (135 mg de muestra) en las mismas condiciones eluyendo con agua y NaCl 0,3; 0,5; 0,7 y 1,0 M (Fig. 5.2).

Fig. 5.1. Perfil de elución de la cromatografía de intercambio iónico en escala analítica de G2'

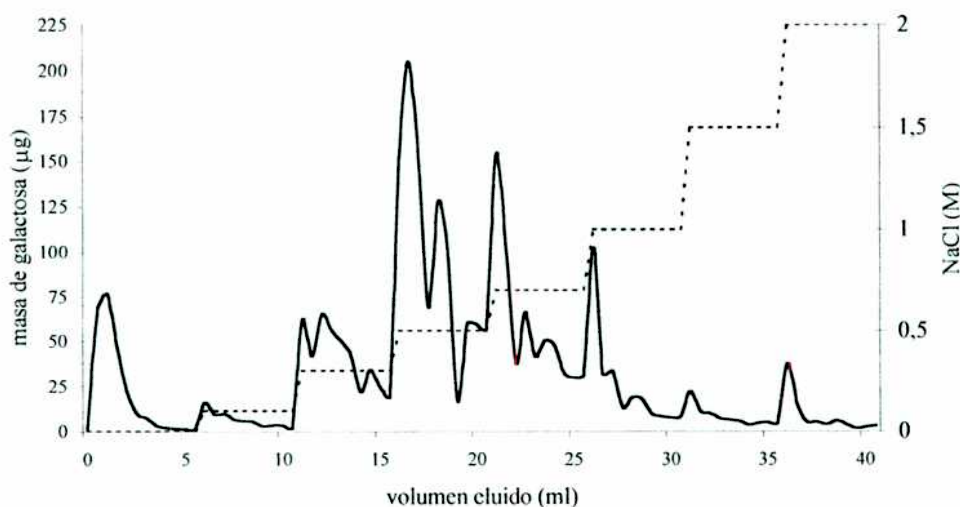
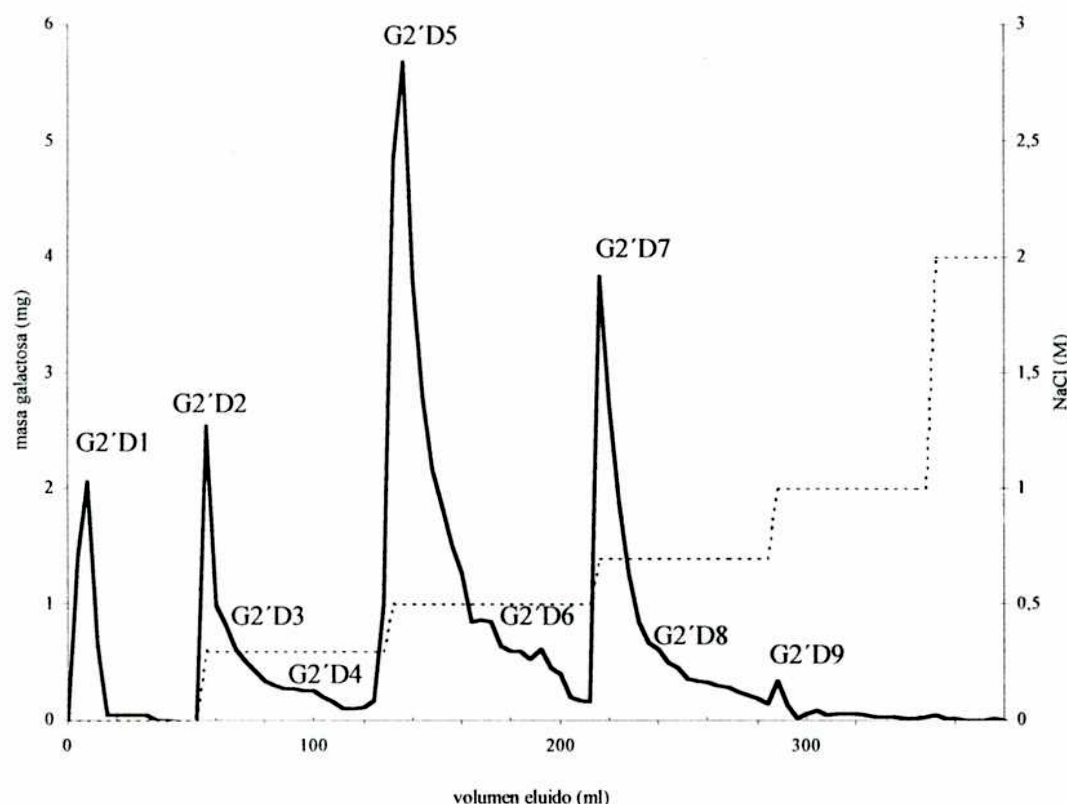


Fig. 5.2. Perfil de elución de la cromatografía de intercambio iónico en escala preparativa de G2'



Las fracciones se separaron según la concentración de la solución de cloruro de sodio empleada como eluyente, y dentro de la misma concentración se dividieron teniendo en cuenta el pico principal y el hombro correspondiente. En la Tabla 5.4 se muestran el rendimiento y la composición de las fracciones obtenidas a partir de G2'. Las composiciones en monosacáridos resultaron ser similares entre ellas y la muestra original. El fraccionamiento estuvo determinado fundamentalmente por el contenido de sulfato, variando desde 4,1% para G2'D1 hasta 19,8% para G2'D9. Se encontraron pequeñas diferencias cuantitativas en los contenidos de 3,6-anhidro-2-*O*-metilgalactosa (8-14% molar) y xilosa (10-14% molar) que condujeron a la separación de las fracciones eluidas con NaCl 0,5 (G2'D5 y G2'D6) y 0,7 M (G2'D7), con contenidos de sulfato semejantes.

Tabla 5.4. Rendimiento, contenido de sulfato y composición en monosacáridos de las fracciones obtenidas por cromatografía de intercambio iónico de G2’

Fracción	NaCl	Rend ^a	Sulfato	Composición en monosacáridos (mol %)								
	(M)	(%)	(% NaSO ₃)	Xil	2-Me Gal	6-Me Gal	Gal	AnGal	2-Me	AnGal	Man	Glc
G2 ^{'b}			12,6	11	8	21	45	2		7	2	5
G2'D1 ^c	0,0	14,5	4,1	15	6	12	51			3	2	8
G2'D2 ^c	0,3	4,4	12,7	12	5	16	50	2		6	3	5
G2'D3 ^c	0,3	3,4	19,0	11	4	13	52	2		4	5	7
G2'D4	0,3	2,2	19,0	15		12	54	2		5	7	5
G2'D5	0,5	34,1	14,2	13	5	24	37	2		14	2	3
G2'D6	0,5	10,3	14,7	14	5	25	35	2		14	2	2
G2'D7	0,7	15,2	14,7	10	6	22	48	2		8	2	2
G2'D8	0,7	12,6	17,5	12	6	23	43	3		8	3	2
G2'D9	1,0	3,2	19,8	21	5	14	31	4		7	13	5

^aRendimiento expresado como porcentaje de la masa total recuperada (84,1%).

^bIncluida con fines comparativos.

^cSe detectó además 3-Me Gal en las fracciones G2’D1, G2’D2 y G2’D3 (3; 2 y 2% respectivamente).

Es notorio que G2’D5 y G2’D6, que suman el 44,4% del total recuperado, cluyeron con la misma concentración de cloruro de sodio utilizada para redissolver a G2’ a partir de su precipitación con cetrimida.

Las dos fracciones minoritarias eluidas con NaCl 0,3 M (G2’D3 y G2’D4), correspondientes al hombro del pico principal a esta concentración, exhibieron una sulfatación mayor a la esperada en comparación con G2’D2 y G2’D5. La razón de este hecho no está clara, aunque es posible ver que la composición en monosacáridos de las tres fracciones eluidas con NaCl 0,3 M muestran un incremento en los contenidos de galactosa y manosa y una disminución en las unidades de galactosa metilada, que podrían inducir un cambio conformacional de la cadena y causar el orden de elución observado. Las discrepancias entre la masa recuperada para estas tres fracciones y el área correspondiente a cada pico en el cromatograma pueden deberse a que el cromatograma sólo indica masa de galactosa, independientemente del grado de sulfatación de la muestra, así como a pérdidas de masa debidas a la subdivisión de la muestra.

Las fracciones G2'D1, G2'D5 y G2'D7 fueron estudiadas por espectroscopía RMN ^{13}C , obteniéndose espectros similares a los registrados para CP y G2' (ver sección 5.2.4.2).

El perfil de elución de la cromatografía de intercambio iónico sugiere una función de distribución unimodal consistente con una muestra polidispersa, de composición homogénea⁵. Por lo tanto, la complejidad estructural delineada en los estudios preliminares surge de las características intrínsecas de estos polisacáridos y no de contaminantes.

El proceso de fraccionamiento previo con cctrimida, aplicado sobre CP, fue eficiente y permitió obtener una fracción G2' polidispersa y homogénea en composición, que fue sujeta a análisis estructural. Al mismo tiempo se llevó a cabo el análisis estructural del polisacárido nativo CP.

5.2. ANÁLISIS ESTRUCTURAL DE CP Y G2'

5.2.1. ANÁLISIS DE LAS POSICIONES DE UNIÓN

Debido al porcentaje elevado de monosacáridos metilados presentes en CP y G2', fue necesario llevar a cabo análisis de metilación (Tabla 5.5) y etilación (Tabla 5.6), a fin de identificar los residuos con posiciones metiladas inicialmente. Ambos procesos de alquilación dieron resultados compatibles que indicaron que:

1. las unidades de xilosa se ubicaban como ramificaciones simples sobre la cadena central;
2. las unidades de 6-*O*-metil-D-galactosa estaban unidas por la posición 3 y dos tercios de las mismas permanecían sin sustituir;
3. las unidades de 3,6-anhidro-2-*O*-metil-L-galactosa estaban enlazadas por la posición 4;
4. las unidades de 2-*O*-metil-L-galactosa estaban unidas por la posición 4 y dos tercios permanecían sin sustituir;
5. la presencia de 2,6-di-*O*-alquilgalactosa podía atribuirse tanto a unidades D- enlazadas por 3 y sustituidas en 4, como a unidades L- enlazadas en 4 y sustituidas en 3.

El esquema de sustitución que dio origen a las unidades de 2,6-di-*O*-etilgalactosa se elucidó mediante el desarrollo de un método para determinar la configuración absoluta de 2,6-di-*O*-metilgalactosa ó 2,6-di-*O*-etilgalactosa obtenidas a partir de polisacáridos peralquilados –por metilación o etilación–, en colaboración con la Dra. M.I. Errea. En particular, en este trabajo de Tesis se investigó la configuración absoluta de los residuos de 2,6-di-*O*-etilgalactosa a partir de la determinación de la configuración de 2,6-di-*O*-metilgalactosa como se describe a

continuación. Partiendo del monosacárido 2,6-di-*O*-metil-D-galactosa, como compuesto modelo, se lo hizo reaccionar con ($\pm$)-1-feniletilamina en condiciones de aminación reductiva para dar el par de diastereómeros (1'*S*)-1-desoxi-1-(1'-feniletilamino)-2,6-di-*O*-metil-D-galactitol y (1'*R*)-1-desoxi-1-(1'-feniletilamino)-2,6-di-*O*-metil-D-galactitol (Esquema 5.1 b), que fueron acetilados y analizados por cromatografía gaseosa y cromatografía gaseosa-espectrometría de masa. El cromatograma dio dos picos bien resueltos, con un factor de separación de 1,015, de áreas equivalentes (relación L:D: 0,9 : 1,2-1,0). Ambos picos dieron espectros de masas idénticos y mostraron las señales esperadas a los siguientes valores de m/z : 481 (M^{+*}), 438 ($[M - Ac]^+$), 220 ($[M - CH_2OMe(CHOAc)_3]^+$), 105 (pico base, $[PhCHCH_3]^+$) junto con el esquema de fragmentaciones correspondiente a un residuo de 2,6-di-*O*-metilgalactitol acetilado⁶. Por comparación de los resultados obtenidos con (*S*)-(-)-1-feniletilamina y la amina racémica, se determinaron los tiempos de retención relativos a *myo*-inositol acetilado para los derivados de ambos enantiómeros (D: 2,450; L: 2,486). Esta asignación tiene en cuenta que el par (1'*R*)-1-desoxi-1-(1'-feniletilamino)-2,6-di-*O*-metil-D-galactitol y (1'*S*)-1-desoxi-1-(1'-feniletilamino)-2,6-di-*O*-metil-L-galactitol son enantiómeros y por lo tanto coeluyen cuando son analizados por cromatografía gaseosa en columnas no quirales^{7,8}. Los polisacáridos CP y G2' permetilados fueron hidrolizados y posteriormente sometidos al mismo proceso de aminación reductiva, con (*S*)-1-feniletilamina como reactivo quiral (Tabla 5.5). Las relaciones finales 2,6-di-*O*-etil-D- : L-galactosa se calcularon teniendo en cuenta que los residuos de 2,6-di-*O*-metil-D-galactosa en el producto permetilado se distribuirían entre 2,6-di-*O*-etil-D-galactosa y 2-*O*-etil-6-*O*-metil-D-galactosa en el peretilado. Simultáneamente, fue posible determinar la configuración absoluta de las unidades monometiladas. La combinación de los resultados de metilación, etilación y aminación reductiva dio lugar a los esquemas de sustitución delineados en las Tablas 5.7 para CP y 5.8 para G2'.

Existe una concordancia general entre los estudios de metilación y etilación, lo cual indica que las unidades monoalquiladas detectadas –por ejemplo, 2-*O*-metil-L-galactitol pentaacetato de la Tabla 5.5 derivado de L-galactosa unida por 4 y disustituida– no están relacionadas con subalquilación de la muestra.

Tabla 5.5. Análisis por metilación (moles %) de CP, CPDes, G2', G2'Des y G2'SD

	CP	CPDes	G2'	G2'Des	G2'SD
2,3,4-Me ₃ Xil	4	5	8	8	-
2,3,4,6-Me ₄ Gal	3		5	7	
2,4,6-Me ₃ Gal	26	30	23	33	33
2,3,6-Me ₃ Gal	5	24	11	27	8
2-Me AnGal	4	10	6	5	8
2,6-Me ₂ Gal	45 ^a	17 ^b	29 ^c	12 ^d	33 ^e
3,6-Me ₂ Gal	2	4	2	4	
2,3-Me ₂ Gal			4	2	2
2,4-Me ₂ Gal	2	2	4	1	3
6-Me Gal	5	5	4	1	1
2-Me Gal	4	3	4	-	5

^aRelación 2,6-di-*O*-metil-D- : -L-galactosa 20:25.

^bRelación 2,6-di-*O*-metil-D- : -L-galactosa 12:5.

^cRelación 2,6-di-*O*-metil-D- : -L-galactosa 14:15.

^dRelación 2,6-di-*O*-metil-D- : -L-galactosa 10:2.

^eRelación 2,6-di-*O*-metil-D- : -L-galactosa 10:23.

Las unidades de 3,6-anhidrogalactosa pueden formarse a partir de galactosa 6-sulfato pero no a partir de galactosa 3-sulfato⁹, debido a que la ciclación ocurre en medio alcalino mediante una reacción S_N2 donde el nucleófilo ataca del lado contrario al que se encuentra el grupo saliente. Este hecho se confirmó al efectuar un tratamiento alcalino sobre G2' con hidróxido de sodio 3 M a 80°C que dio como resultado constancia en el contenido de 3,6-anhidrogalactosa (variación ~1%). La ausencia de aumento en los contenidos de 3,6-anhidrogalactosa y 3,6-anhidro-2-*O*-metilgalactosa luego del proceso de metilación con metilsulfinilmetanuro de sodio (por comparación de los resultados de las Tablas 5.5 y 5.6 con los de la Tabla 5.3, correspondiente a las muestras nativas), junto con el esquema de sustitución propuesto en las Tablas 5.7 y 5.8, es consistente con la ausencia de unidades sulfatadas en la posición 6 que pudieran ser precursoras de 3,6-anhidrogalactosa.

La presencia simultánea de grupos sulfato y de ramificaciones simples de xilosa impidió la asignación directa de la estructura mediante el análisis por alquilación únicamente.

Tabla 5.6. Análisis por etilación (moles %) de CP, CPDes, CPSD, G2', G2'Des y G2'SD

	CP	CPDes	CPSD	G2'	G2'Des	G2'SD
2,3,4-Xil	7	7	-	8	7	-
2,3,4,6-Gal	2			1	3	2
2,4,6-Gal	8	16	17	10	14	15
2,4,VI-Gal ^a	16	16	16	14	15	15
2,3,6-Gal		13	4	5	13	4
II,3,6-Gal	3	5	3	5	5	4
II-AnGal	7	3	5	8	6	6
2,6-Gal	39	20	37	28	18	27
2,VI-Gal	5	5	3	3	5	5
3,6-Gal	2	5	1	3	4	2
2,4-Gal	1			4	5	6
6-Gal	4	2	2	4	2	2
VI-Gal	3	4		2	1	
2-Gal	3	4	5	5		
AnGal					2	4

^a2,4-di-*O*-etil-6-*O*-metilgalactosa.

Tabla 5.7. Análisis de las posiciones de unión (moles %) de CP, CPDes y CPDS

Posiciones de unión y de sustitución deducidas	CP ^a	CPDes ^b	CPSD ^{a,c}
→3) D-Gal (1→			
sin sustituir	8	15	17
4	14	8	8
6	1	2	
2,4	4	2	2
→3) 6-Me D-Gal (1→			
sin sustituir	16	15	16
4	5	4	3
2,4	3	3	
→4) L-Gal (1→			
sin sustituir		17	4
2	2	4	1
3	25	5	29
3,6	3	3	5
→4) 2-Me L-Gal (1→	3	7	3
→4) 2-Me L-AnGal (1→	7	10	5
T-Xil ^d	7	5	
T-Gal ^d	2	-	-

^aBasado en datos de etilación.

^bBasado en datos de metilación.

^cCalculado sobre un total de 93%.

^dXilosa y galactosa terminales.

Tabla 5.8. Análisis de las posiciones de unión (moles %) de G2', G2'Des y G2'SD

Posiciones de unión y de sustitución deducidas	G2' ^a	G2'Des ^b	G2'SD ^{a,c}
→3) D-Gal (1→			
sin sustituir	10	16	15
4	11	7	4
6	4	1	6
2,4	4	1	2
→3) 6-Me D-Gal (1→			
sin sustituir	14	17	15
4	3	3	5
2,4	2		
→4) L-Gal (1→			
sin sustituir	5	20	4
2	3	4	2
3	17	2	23
6		2	
3,6	5		
→4) 2-Me L-Gal (1→	5	7	4
→4) L-AnGal (1→		2	4
→4) 2-Me L-AnGal (1→	8	5	6
T-Xil ^d	8	8	
T-Gal ^d	1	7	2

^aBasado en datos de etilación.

^bBasado en datos de metilacion.

^cCalculado sobre un total de 92%.

^dXilosa y galactosa terminales.

5.2.2. DESULFATACIÓN

A fin de determinar inequívocamente las posiciones de unión y el esquema de sustitución sobre la cadena central, era necesario llevar a cabo un análisis de desulfatación-etilación y/o desulfatación-metilación sobre los polisacáridos. El procedimiento de desulfatación por metanólisis en medio ácido, que se había aplicado sobre los xilomananos de *N. fastigiata*, produciría despolimerización de los galactanos con residuos lábiles de 3,6-anhidrogalactosa¹⁰ por lo que quedaba descartado en el caso de *G. confluens*. La primera aproximación fue una desulfatación solvolítica, que en términos generales implica el calentamiento de la sal de piridinio del polisacárido sulfatado en dimetilsulfóxido-piridina en presencia de metanol y/o agua¹¹⁻¹⁴ (ver Cap. 6). Sin embargo, no se observó una remoción significativa de grupos sulfato a pesar de ensayar varias condiciones de reacción (Tabla 5.9).

Tabla 5.9. Desulfataciones solvolíticas aplicadas sobre G2^a

Solvente	(% v/v)	Temp. (°C)	Tiempo (h)	Sulfato (% SO ₃ Na)	Desulfatación (%)
DMSO-Piridina	98:2	100	2	9,7	23
DMSO-Piridina	98:2	100	4	12,5	0
DMSO-Piridina	98:2	100	6	10,6	16
DMSO-Piridina	98:2	100	8	9,6	24
DMSO-Piridina	80:20	100	10	10,1	20
DMSO-MeOH-Piridina	89:10:1	100	4	13,0	0
DMSO-MeOH-Piridina	79:20:1	100	5	13,0	0
DMSO-MeOH-Piridina	79:20:1	100	9	12,1	0
DMSO-H ₂ O-MeOH-Piridina	89:5:5:1	100	5	12,5	0
DMSO-H ₂ O-Piridina	89:10:1	105	4,5	12,3	0

^aContenido de sulfato de G2': 12,6 % SO₃Na.

Teniendo en mente la desulfatación de monosacáridos sulfatados mediada por agentes sililantes y la ausencia de selectividad informada para clorotrimetilsilano (CTMS)¹⁵, se desarrolló un método de desulfatación para estas muestras con CTMS en piridina anhidra, empezando con CP como compuesto modelo (Tabla 5.10). El primer ensayo (Tabla 5.10, línea 1) dio indicios de desulfatación, por lo que se intentaron condiciones extremas de temperatura y tiempo, aumentando a la vez el exceso de agente sililante (Tabla 5.10, línea 2). El producto reveló un 52% de desulfatación con 57% de rendimiento (considerando como

100% a la muestra con el mismo contenido de sulfato que el producto obtenido). Luego se moderaron las condiciones reduciendo el tiempo de calentamiento a 8 h (Tabla 5.10, línea 3): el producto redujo en 60% su nivel de sulfatación, mientras que el rendimiento alcanzó el 78%. A fin de comprobar la reproducibilidad del método se hizo un segundo tratamiento sobre otra porción de CP (Tabla 5.10, línea 4), dando un 64% de desulfatación y 85% de rendimiento. Estos dos últimos productos se juntaron, denominándose CPDes, y fueron destinados a su análisis estructural por métodos químicos y espectroscópicos.

Tabla 5.10. Desulfataciones con CTMS aplicadas sobre CP

	Relación molar sulfato-CTMS	Temperatura (°C)	Tiempo (h)	Sulfato (% SO ₃ Na)	Desulfatación (%)
1	1 : 90	95	4,5	11,6	8
2	1 : 470	(i) 100	11		
		(ii) 100→40 ^a	16	6,1	52
3	1 : 390 ^b	100	8	5,0	60
4	1 : 380 ^b	100	8	4,5	64

^aCondiciones de reacción: 100°C durante 11 h, luego de 100 a 40°C en 16 h.

^bLa combinación de estos dos productos dio lugar a CPDes.

La desulfatación de G2' se hizo con una relación sulfato-CTMS 1:470, calentando a 100°C durante 8 h. El producto desulfatado, G2'Des, se obtuvo con un rendimiento del 60% y contenía 4,6% de sulfato, equivalente a una desulfatación del 64%. Las composiciones de los productos originales y desulfatados fueron similares para CP y G2' (Tabla 5.3).

Los polisacáridos CPDes y G2'Des fueron sujetos a análisis por metilación (Tabla 5.5) y etilación (Tabla 5.6). En ambos productos desulfatados se encontró un aumento considerable de galactosa sin sustituir unida por la posición 4, acompañado de una disminución significativa de D-galactosa sustituida en 4 y unida por 3 y/o L-galactosa sustituida en 3 y unida por 4. Además se detectó un incremento menor de D-galactosa sin sustituir unida por 3.

Por otra parte aparecieron diferencias importantes entre los resultados de metilación y etilación para dos residuos, tanto en el caso de CPDes como en G2'Des:

- 1- los porcentajes de 2,3,6-tri-O-metilgalactosa (24 para CPDes y 27 para G2'Des) fueron mayores que los valores calculados para la suma de 2,3,6-tri-O-etil- y 3,6-di-O-etil-2-O-metilgalactosa (18 para ambos);

2- había porcentajes menores de 2,6-di-*O*-metilgalactosa (17 para CPDes y 12 para G2'Des) con respecto a los correspondientes a la suma de 2,6-di-*O*-etilgalactosa y 2-*O*-etil-6-*O*-metilgalactosa (25 para CPDes y 23 para G2'Des).

Dado que es poco probable que hubiera una desulfatación selectiva durante la metilación, este hecho sugeriría una subetilación selectiva en la posición 3 de unidades de L-galactosa unidas por 4, posiblemente relacionada con efectos conformacionales en las cadenas de galactanos con menor densidad de carga. Esta hipótesis es consistente con el orden de selectividad semejante informado para la bencilación de metil 2,6-di-*O*-bencilgalactopiranosidos, donde el grupo hidroxilo en 3 resultó menos reactivo que el de la posición 4 para los dos anómeros¹⁶.

Los productos permetilados fueron hidrolizados y sometidos a aminación reductiva con 1-feniletilamina para completar el esquema de sustitución descrito en las Tablas 5.7 y 5.8.

Todos los resultados presentados hasta este punto eran consistentes con una cadena central de agarano altamente sulfatado en la posición 3 de unidades de L-galactosa enlazada por 4 y con menor porcentaje de sulfatación en la posición 4 de residuos de D-galactosa unida por 3.

5.2.3. DEGRADACIÓN DE SMITH

A fin de confirmar el punto de unión de las ramificaciones de xilosa, CP y G2' fueron tratadas en condiciones de degradación de Smith¹⁷, para dar CPSD y G2'SD con rendimientos de 46,4 y 64,4% respectivamente (Tabla 5.3). Para evitar la degradación por hidrólisis selectiva de las unidades de 3,6-anhidrogalactosa durante la etapa de hidrólisis controlada, se modificó la técnica descrita por Usov¹⁸ agregando al medio de reacción una solución del complejo 4-metilmorfolina-borano (MMB), en la misma concentración utilizada en la hidrólisis reductiva desarrollada por Stevenson y Furneaux¹⁹. Los extremos reductores lábiles de 3,6-anhidro ó 2-*O*-metil-3,6-anhidrogalactosa, eventualmente liberados en esta etapa, se redujeron al alditol correspondiente estable en el medio de reacción. Se detectó una disminución en el contenido de 3,6-anhidro-2-*O*-metilgalactosa y de grupos sulfato en CPSD pero no en G2'SD.

Ambos productos de degradación de Smith fueron etilados y metilados. Se encontró submetilación para CPSD (no se muestran los datos), por lo que el polisacárido parcialmente metilado no fue sujeto a aminación reductiva. La relación D-galactosa unida por 3 y sustituida en 4 : L-galactosa unida por 4 y sustituida en 3 se calculó entonces considerando una relación general 1:1 para los residuos D-:L-, típica de agaranos (Tabla 5.7). La aminación reductiva con 1-feniletilamina quiral sí fue efectuada sobre G2'SD permetilada (Tablas 5.5 y 5.8).

La presencia de unidades de 2,3,6-tri-*O*-etilgalactosa en ambos polisacáridos degradados y etilados podría deberse a oxidación incompleta del material de partida. Un hemiacetal cíclico entre un grupo aldehído de un residuo oxidado de xilosa y un grupo hidroxilo de una galactosa enlazada por 4, adyacente pero aún sin oxidar, podría proteger a la unidad de galactosa frente a la reacción con periodato. Se ha informado la formación de hemiacetales inter-residuales para varios polisacáridos²⁰.

El cambio principal detectado en los polisacáridos luego de la degradación de Smith fue el aumento significativo de D-galactosa unida por 3 y sin sustituir. Esto puede provenir solamente de la pérdida de cadenas laterales de xilosa ubicadas sobre la posición 4 de D-galactosas unidas por 3. Esta observación es consistente con el esquema de sustitución deducido para las muestras desulfatadas, donde los residuos que mantienen algún tipo de sustitución (distinta de sulfato) corresponden a D-galactosa unida por 3 y sustituida en 4 (Tablas 5.7 y 5.8). Los resultados de la degradación de Smith no son concluyentes *per se*, pero sí permiten confirmar la deducción realizada a partir de la desulfatación.

Todos los resultados descriptos en las secciones 5.2.1-5.2.3 llevan a la conclusión que las características estructurales fundamentales de los agaranos altamente metilados aislados de *G. confluens* son: sulfatación en la posición 3 de unidades de α -L-galactosa, con una proporción menor sobre la posición 4 de residuos de β -D-galactosa, y la presencia de ramificaciones simples de xilosa sobre la posición 4 de β -D-galactosa.

5.2.4. ESPECTROSCOPIA RMN ^{13}C

La asignación de los espectros RMN ^{13}C de los polisacáridos de *G. confluens* que se detalla en la sección 5.2.4.2 fue realizada partiendo de los datos bibliográficos desarrollados en 5.2.4.1.

5.2.4.1. INTRODUCCIÓN

La espectroscopía RMN ^{13}C constituye una herramienta indispensable en el análisis estructural de los galactanos sulfatados de algas rojas.

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

La interpretación de los espectros de hexosas y metil hexósidos permitieron encontrar tres zonas en los espectros de estos compuestos: (i) región anomérica, δ : 105-91 ppm; (ii) región de los carbonos con hidroxilos secundarios, δ : 67-77 ppm; (iii) región de los carbonos con hidroxilos primarios, δ : 61-63 ppm.

El cambio de la configuración del carbono anomérico modifica el desplazamiento químico del C-1 de galactosa en varias ppm hacia campos más altos al pasar del anómero β al α . Además afecta los carbonos 3 y 5 por interacción 1,3-diaxial, algo menos al C-2 y se observa muy poco efecto sobre C-4 y C-6. Al pasar de los azúcares libres a los glicósidos, el C-1 se desprotege en algunas ppm, permaneciendo aproximadamente constante la diferencia de desplazamientos entre los anómeros α y β .

Por otro lado, la *O*-metilación u *O*-glicosilación de un grupo hidroxilo resulta en un desplazamiento, generalmente en 8-11 ppm, del carbono más cercano hacia campos más bajos –efecto α –, mientras que las señales de los carbonos vecinos se mueven hacia campos más altos en 2-4 ppm –efecto β –; los cambios sobre los carbonos restantes son generalmente menores. Los carbonos con metoxilos axiales se encuentran 3-4,5 ppm a campos más altos que los ecuatoriales. Si el metoxilo está en posición axial, el efecto sobre el carbono β es chico²¹.

Teniendo en cuenta estos resultados, se usaron metil éteres de metil 3,6-anhidro- α -D-galactopiranosido²² y de metil α - y β -D-galactopiranosido²³ como compuestos modelo de diferentes unidades de polisacáridos.

Honda *et al.*²⁴ demostraron que para la glucosa 3- y 6-sulfato los efectos α y β causados por la sulfatación de un grupo hidroxilo son similares, aunque algo menores, que los producidos por metilación. Archbald *et al.*²⁵ realizaron un estudio sobre D-galactosa monosulfatada en distintas posiciones (Tabla 5.11). En términos generales, la sulfatación de un hidroxilo desplaza la señal correspondiente al carbono a 6-10 ppm hacia campos más bajos, mientras que sus vecinos lo hacen 1-2,5 ppm hacia campos más altos. Una excepción a esta regla se encontró para galactosa 4-sulfato, con efectos β menores (0,6-1,0 ppm) relacionados con la configuración axial del grupo sustituyente.

Tabla 5.11. Desplazamientos químicos (en ppm) de los espectros RMN ¹³C de galactosa y sus derivados sulfatados^a

Unidad	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6
α-D-Gal	93,11	69,18	70,01	70,14	71,30	62,00
β-D-Gal	97,28	72,72	73,63	69,58	75,96	61,81
α-D-Gal 2S	91,28	76,63	68,02	70,33	71,16	61,88
β-D-Gal 2S	95,67	80,97	72,55	69,66	75,96	61,68
α-D-Gal 3S	93,09	67,19	78,52	68,46	71,02	61,84
β-D-Gal 3S	97,02	70,74	81,20	67,84	75,52	61,68
α-D-Gal 4S	93,01	69,28	69,03	78,45	70,66	61,91
β-D-Gal 4S	97,21	72,77	72,63	77,50	75,11	61,81
α-D-Gal 6S	93,18	69,06	69,75	69,93	69,14	68,48
β-D-Gal 6S	97,27	72,57	73,39	69,35	73,54	68,14

^aEspectros registrados en D₂O, a 30°C; desplazamientos químicos relativos a 1,4-dioxano.

Posteriormente, se estudiaron los espectros de metil α-D-galactopiranosidos sulfatados²⁶, con las mismas conclusiones en cuanto a los efectos de sulfatación (Tabla 5.12).

Tabla 5.12. Desplazamientos químicos (en ppm) de los espectros RMN ¹³C de metil α-D-galactopiranosido y sus derivados sulfatados^a

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

^aEspectros registrados D₂O a 27°C; desplazamientos químicos relativos a acetona (31,55 ppm).

En los espectros RMN ¹³C de los polisacáridos se observa un ensanchamiento de las señales, asociado con la formación de geles o la alta viscosidad de las soluciones. La resolución puede mejorarse pero las señales de los polisacáridos son más anchas que aquellas de las especies mono u oligoméricas relacionadas. Esto se debe a que en estos espectros se reflejan las estructuras individuales que conforman el polisacárido, dentro de cuya estructura promedio pueden existir ciertas variaciones. La resolución de las señales puede mejorarse

registrando los espectros a temperaturas superiores, de modo que las moléculas estén en una conformación al azar. Al disminuir la temperatura, la asociación de las cadenas disminuye la movilidad de algunos segmentos de los polisacáridos y aumentan las interacciones, causando el ensanchamiento de las señales²⁷. Las señales resultan afectadas por cambios en la temperatura²⁸, tanto en ancho como en desplazamiento químico, especialmente las de los carbonos involucrados en la unión glicosídica. La reducción en la movilidad de los residuos produce una disminución en los tiempos de relajación spin-spin (T_2) de los núcleos. El ensanchamiento de las señales puede ser tal que ciertos picos se pierden totalmente en el espectro²⁹.

La espectroscopía RMN ^{13}C proporciona información valiosa a nivel estructural no sólo por los valores de los desplazamientos químicos sino también por la integración de las intensidades de las señales. En términos generales, la intensidad de la señal correspondiente a cada átomo de carbono depende de su tiempo de relajación (T_1) y del efecto nuclear de Overhauser (nOe), por lo tanto la comparación de las intensidades derivadas de átomos de carbono con entornos químicos diferentes puede no ser legítima. Sin embargo, bajo las condiciones usuales empleadas en los espectros de polisacáridos, todos los átomos de carbono se encuentran completamente relajados y la amplificación de resonancias diferentes debidas al efecto Overhauser es de la misma magnitud y cercana al valor máximo. Por lo tanto, las relaciones entre las intensidades de las señales (por ejemplo para carbonos anoméricos) reflejan las proporciones reales de los diferentes residuos en un polisacárido y pueden usarse como una aproximación cuantitativa. Esto se confirma por el hecho que los espectros RMN ^{13}C de galactanos de algas rojas muy regulares conformados por unidades repetitivas disacarídicas contienen doce señales cuyas intensidades integradas son prácticamente iguales²⁹.

A partir de 1977 comenzó a aplicarse la espectroscopía RMN ^{13}C de galactanos de algas rojas para elucidar su estructura primaria^{30,31}. Los espectros de polisacáridos regulares como agarosa, carragenano kappa o iota son lo suficientemente simples como para lograr espectros satisfactorios a 15 ó 22,6 MHz, consistentes en doce líneas que corresponden a doce carbonos en unidades repetitivas disacarídicas. Las resonancias anoméricas poseen una peculiaridad interesante: la señal del C-1 de la unidad de galactosa ocupa aproximadamente la misma posición en espectros de agarosa y carragenanos, pero los desplazamientos químicos de C-1 de 3,6-anhidrogalactosa no coinciden para estas dos familias de polisacáridos. Si bien la posición de esta última señal en cada polisacárido está influenciada además por el esquema de sustitución de la cadena central, no hay superposición entre las regiones correspondientes a la

familia de la agarosa y la familia de los carragenanos. El mismo fenómeno se observa para los residuos de galactosa unidos por la posición 4 que no tienen el anillo 3,6-anhidro³². De esta manera, esta espectroscopía es sensible a la configuración absoluta de las unidades de α -galactosa enlazadas por 4 en estos polisacáridos y proporciona un método físicoquímico directo de análisis que permite atribuir un polisacárido a una de estas dos grandes familias, inmediatamente después de su aislamiento y sin degradación del mismo²⁹.

Rochas *et al.*³³ describieron las señales de varios oligosacáridos obtenidos por hidrólisis enzimática con α -agarasa a partir de agarosa. En la Tabla 5.13 se detallan los desplazamientos químicos, registrados a temperatura ambiente, del pentasacárido de la Fig. 5.3.

Fig. 5.3. Estructura del pentasacárido liberado por acción enzimática a partir de agarosa

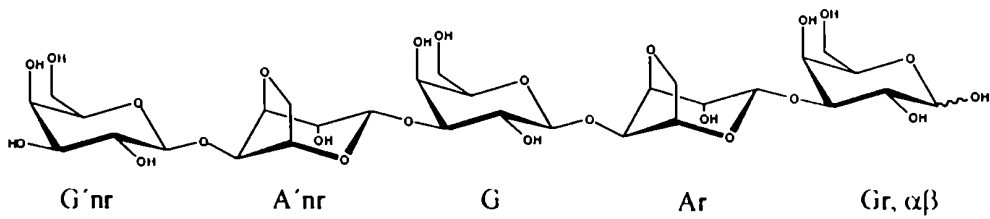


Tabla 5.13. Desplazamientos químicos (ppm) del pentasacárido obtenido a partir de agarosa

Unidad	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6
G'nr	103,0	71,3	73,5	69,5	76,2	61,9
G	102,7	70,6	82,5	69,1	75,8	61,8
Gr β	97,1	71,9	83,0	69,2	75,6	61,8
Gr α	93,1	68,4	79,8	69,9	71,0	62,0
A'nr	98,8	70,1	80,4	77,7	75,9	69,8
Ar	98,8	70,1	80,4	77,7	75,9	69,8

En la Tabla 5.14 se muestran los desplazamientos químicos de las distintas díadas según los valores informados en la bibliografía, aplicando el sistema de nomenclatura abreviada de la Tabla 1.2. Existen discrepancias en las asignaciones de los distintos autores, en la Tabla se incluyen los datos más confiables o los más recientes.

Tabla 5.14. Desplazamientos químicos (ppm) de las díadas presentes en polisacáridos de la familia del agar

Unidad	Ref.	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	OMe
G	34 ^a	102,7	70,5	82,5	69,1	75,7	61,8	
LAG		98,7	70,1	80,4	77,7	75,9	69,7	
G6M	34 ^a	102,7	70,5	82,5	69,4	74,0	72,3	59,5
LAG		98,9	70,1	80,5	77,8	75,9	69,8	
G	34 ^a	102,7	70,2	82,7	68,8	75,3	61,4	
LAG2M		98,7	78,9	78,5	77,6	75,7	69,5	59,2
G6M	35 ^b	102,2	69,6	82,2	68,6	73,1	71,4	58,5
LAG2M		98,3	78,3	78,0	77,2	75,3	69,0	58,6
G6S	36 ^c	102,6	70,1	82,2	68,4	73,0	67,5	
LAG		98,4	69,8	80,1	77,4	75,6	69,4	
G4S	34 ^a	102,4	70,8	80,0	77,0	75,0	61,4	
LAG		96,8	69,9	80,1	77,4	75,6 ^b	69,5	
G4S6M	23 ^d	102,4	70,0	80,0	71,5	70,8	70,0	59,0
LAG		96,2	70,0	80,0	77,4	75,6	69,0	
G4S	34 ^a	102,5	70,5	79,8	76,6	75,2	61,4	
LAG2M		98,2	79,1	78,5	77,7	75,7	69,9	59,1
G2S	37 ^b	101,1	78,2	80,9	69,0	75,1	61,4	
LAG		98,3	69,9	79,6	77,4	75,7	69,4	
G4,6P	38 ^c	102,1	69,9	79,4	71,5	66,6	65,2	
LAG		98,2	69,9	80,0	77,3	75,6	69,3	
G6Sust	39 ^f	102,2	70,0	82,0	68,9	73,2	71,4	
LAG		98,0	69,8	79,9	77,1	75,4	69,2	
LG4M (T)		98,4	68,6	69,5	79,2	70,7	61,2	61,6

Tabla 5.14. Continuación

Unidad	Ref.	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	OMe
G	40 ^b	103,8	69,9	81,0	68,8	75,6	61,4	
LG		100,9	69,3	71,0	79,3	72,2	61,2	
G	34 ^a	103,7	69,8	81,2	69,1	75,9	61,6	
LG6S		101,3	69,2	71,0	79,0	70,2	67,7	
G2S	41 ^e	101,9	77,6	79,3	68,1	75,3	61,7	
LG2S3S		96,2	73,2 [*]	73,7 [*]	76,7 [*]	72,4 [*]	60,6	
G4S	42 ^h	104,1	71,5	78,0	77,8	75,4	61,6	
LG2S3S		98,9	73,2	73,5	76,7	72,0	60,9	
G	43 ^c	103,6	69,8	80,6	68,9	75,6	61,3	
LG2M6S		100,1	78,0	68,1	78,8	70,1	67,4	57,9

^aAsignaciones tentativas, las resonancias pueden ser intercambiadas dentro de este grupo.

^bEspectros registrados en D₂O, a temperatura ambiente; desplazamientos químicos relativos a DMSO (39,6 ppm).

^bEspectros registrados en D₂O, a 80°C; desplazamientos químicos relativos a DMSO (39,6 ppm).

^cEspectros registrados en D₂O, a 80°C; desplazamientos químicos relativos a DMSO (39,45 ppm).

^dNo se informan datos de las condiciones de adquisición del espectro.

^eEspectros registrados en D₂O/H₂O (1:1), a 90°C; desplazamientos químicos relativos a DMSO (39,47 ppm). Cuando el carbono asimétrico del cetel está en la configuración *R* la señal del grupo metilo aparece a 26-27 ppm, cuando posee la configuración *S* lo hace a 15-18 ppm. En ambos casos el carbono carboxílico resuena a 176 ppm y el carbono asimétrico lo hace a 101 ppm.

^fUnidad G sustituida en la posición 6 con LG4M (como ramificación simple) y enlazada a LAGi. Espectros registrados en H₂O, a 90°C, desplazamientos químicos relativos a TMS.

^gEspectros registrados en D₂O/H₂O, a 90°C; desplazamientos químicos relativos a DMSO (39,4 ppm). C-1 de LG2S3S también fue informado a 98,9 ppm⁴².

^hEspectros registrados en D₂O/ H₂O, a 90°C, desplazamientos químicos relativos a DMSO (39,4 ppm).

Si bien la presencia de xilosa como cadena lateral se detectó hace bastante tiempo e incluso se determinó su posición como ramificación en la estructura de ciertos galactanos sulfatados por métodos químicos, sólo en pocos casos pudo determinarse su presencia y ubicación por RMN ¹³C, siempre como β-D-xilosa. Generalmente, este monosacárido se encuentra en bajas proporciones y es más abundante en polisacáridos de estructura muy compleja, con varios sustituyentes en la cadena central con lo que los espectros resultan de difícil interpretación.

Usov y Elashvili⁴⁴ determinaron la estructura de un pentasacárido disulfatado que contenía xilosa (Fig. 5.4), obtenido por hidrólisis reductiva parcial del galactano sulfatado aislado de *Laurencia nipponica*. Asignaron los desplazamientos químicos de todos los átomos de carbono (Tabla 5.15).

Fig. 5.4. Estructura del pentasacárido reducido aislado de *Laurencia nipponica*

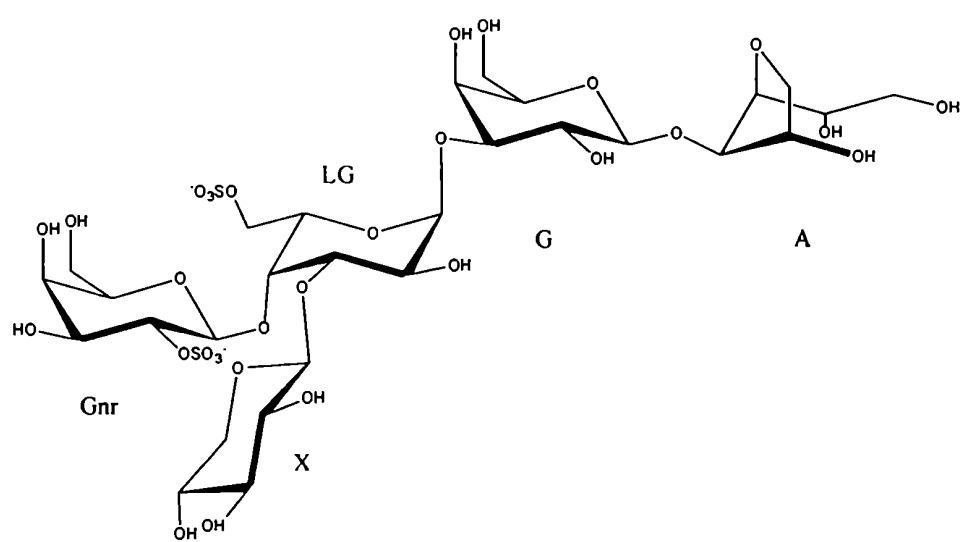


Tabla 5.15. Desplazamientos químicos (ppm) del pentasacárido obtenido del galactano sulfatado de *Laurencia nipponica*^a

Unidad	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6
Gnr	101,4	79,7	72,8	69,4	76,0	61,9
Anr	101,4	67,3	73,5	76,2	70,2	67,5
Gr	102,6	70,6	81,2	69,2	75,8	61,4
Ar	63,5	71,6	84,0	86,1	75,8	73,6
X	101,0	73,8	78,9	69,8	65,6	

^aEspectro registrado en D₂O a 30°C, desplazamientos químicos referidos a metanol (50,15 ppm).

Los polisacáridos aislados de *Corallina officinalis* presentaron una estructura compleja constituida por una cadena central de agarano, sustituida con grupos sulfato y cadenas laterales de β -D-xilosa en la posición 6 de las unidades de β -D-galactosa, y en las posiciones 2 y 3 de las unidades de α -L-galactosa con grupos metoxilo y sulfato^{45,46}. En los espectros RMN ^{13}C de las fracciones estudiadas se observaron como señales principales, cinco picos agudos correspondientes a ramificaciones de β -D-xilosa unidas todas sobre la misma posición –C-6 de β -galactosa– (Tabla 5.16). Posiblemente la movilidad del enlace 1 $\rightarrow$ 6 fuera la responsable de la agudeza de las señales. Se observaron también señales anoméricas a 106,0 y 105,8 ppm, atribuidas a G6X y G6S, y otro par a 103,2 y 103,0 ppm que deberían corresponder a LG sustituidas en 3 o sin sustituir. Los carbonos anoméricos de LG2S y LG2M tenían desplazamientos químicos a 101,2 y 100,8 ppm.

Takano *et al.*⁴⁷ informaron que el polisacárido soluble en agua de *Joculator maximus* tenía una cadena central de agarano con el 50% de las unidades de D-galactosa sustituidas con ramificaciones simples de xilosa unidas a la posición 6 (Tabla 5.16).

Falshaw, Furneaux y Stevenson⁴⁸ realizaron un estudio comparativo sobre la estructura química de nueve especies del género *Curdiea*. Todas ellas contenían agarosas metiladas en la posición 6 de galactosa y/o 2 de 3,6-anhidrogallactosa. En tres especies, *C. flabelata*, *C. irwinii*, *C. obesa*, se encontraron señales que fueron adjudicadas a unidades de xilosa y 4-(O-metilxilosa unidas a la posición 6 de los residuos de galactosa (Tabla 5.16). Además identificaron resonancias a 102,4 y 69,0 ppm que se atribuyeron a C-1 y C-6 de galactosa sustituida con xilosa.

Miller y Blunt⁴⁹ encontraron evidencias espectroscópicas de la presencia de bloques formados por la díada G-LG3X6S en el polisacárido de *Pachimenia lusoria*. Informaron los desplazamientos químicos de las unidades de xilosa (Tabla 5.16) y descartaron su ubicación sobre la posición 6 de LG, aunque no completaron la asignación de los residuos de L-galactosa sobre los que se encontraban unidas. Llama la atención que, a pesar de citar los residuos de LG3X6S hallados en *Laurencia nipponica*, atribuyeran el carbono anomérico de xilosa a una señal a 103,7 ppm en vez de 101 ppm como lo hicieran Usov y Elashvili (Tabla 5.15).

Recientemente, Miller y Blunt⁴⁰ asignaron el conjunto de señales vinculado a un residuo de xilosa unido a la posición 3 de L-galactosa a partir del espectro del polisacárido de *Chondria macrocarpa* luego de su desulfatación (Tabla 5.16). Al mismo tiempo proponen una reasignación tentativa del pico a 70,5 ppm como correspondiente a C-2 de LG3X y de la señal

de 78,4 ppm como C-3 ó C-4 de la misma unidad, con respecto a lo informado por Usov y Elashvili en 1991⁴⁴ (Tabla 5.15).

Tabla 5.16. Desplazamientos químicos (ppm) de ramificaciones de xilosa

Unidad	Diada que sustituye	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	O-Me
X unida a C-6 de G ^a	G-LG	106,0	75,6	78,3	71,9	67,7	
X unida a C-6 de G ^b	G-LG	105,9	75,5	78,1	72,9	67,6	
X unida a C-6 de G ^c	G-LAG	103,8		76,3	69,7	65,6	
X4M unida a C-6 de G ^c	G-LAG	103,6	73,5	75,0	79,2	63,1	58,3
X unida a C-3 de LG6S ^d	G-LG6S	101,3	73,5	76,1	69,8	65,8	
X unida a C-3 de LG ^e	G-LG	103,7	73,3	75,9	69,6	65,3	

^aEspectro registrado en D₂O/H₂O, a 70°C, desplazamientos químicos relativos a acetona (32,06 ppm relativo a 3-trimetilsililpropanosulfonato de sodio).

^bEspectro registrado en D₂O, a 80°C, desplazamientos químicos relativos a metanol (51,60 ppm relativo a 3-trimetilsilil-1-propanosulfonato de sodio).

^cEspectro registrado en D₂O/H₂O, a 90°C, desplazamientos químicos relativos a DMSO (39,47 ppm).

^dEspectro registrado en D₂O, a 80°C, desplazamientos químicos relativos a DMSO (39,6 ppm).

^eEspectro registrado en D₂O/H₂O, a 90°C, desplazamientos químicos relativos a DMSO (39,6 ppm).

En ciertos casos la complejidad de los polisacáridos estudiados es tal que sólo es posible el análisis estructural por combinación de métodos químicos y espectroscópicos. Así, Usov *et al.*¹⁸ llevaron a cabo el análisis estructural del xilogalactano sulfatado de *Corallina pilulifera* –compuesto por D-galactosa, L-galactosa, 2-*O*-metil-L-galactosa, 3-*O*-metil-L-galactosa, 6-*O*-metil-D-galactosa, D-xilosa y sulfato en relación molar 29:20:5:2:1:20:23– por metilación antes y después de procesos de desulfatación o degradación de Smith, así como espectroscopía RMN ¹H y ¹³C 1D y 2D (Fig. 5.5). Entre otros datos relevantes, el espectro NOE 2D (ROESY) del polisacárido sometido a degradación de Smith y posterior desulfatación indicó proximidad espacial de H-1 de la unidad de β-D-galactosa y H-4 de la unidad de α-L-galactosa, por un lado, y de H-1 de la unidad de α-L-galactosa y H-3 de la unidad de β-D-galactosa, por otro. La ausencia de correlación entre H-1 del residuo α y H-4 del β es indicativa de configuraciones absolutas distintas entre ambos residuos.

Fig. 5.5. Estructura representativa del xilogalactano sulfatado de *Corallina pilulifera*

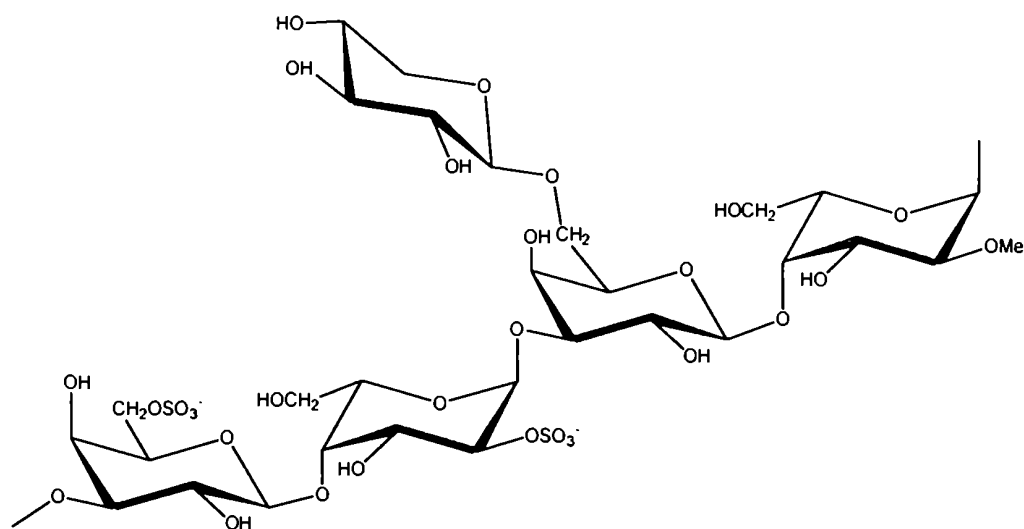


Tabla 5.17. Asignaciones (en ppm) de los espectros RMN ¹³C de los polisacáridos de *Corallina pilulifera*^a

Unidad	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	OMe
LG	101,9	70,2	70,7	80,1	73,1	62,0	
LG2S	100,1	77,1	68,1	79,9	73,1	62,0	
LG2M	99,4	79,5	70,0	79,9	73,1	62,0	58,9
LG3M	99,4	70,0	78,9	76,7	73,1	62,0	58,0
G	104,6	72,0	81,3-82,9 ^b	69,8	76,5	62,0	
G6M	104,6	72,0	81,3-82,9 ^b	69,2	74,1	62,3	59,9
G6S	104,6	72,0	81,3-82,9 ^b	68,1	74,1	72,8	
G6X	104,6	71,9	81,9	~70	75,2	68,5	
X	104,8	74,5	77,1	70,8	66,5		

^aEspectros registrados en D₂O, a 50°C, desplazamientos químicos relativos a metanol (50,15 ppm).

^bDependiendo de la sustitución del residuo y sus vecinos.

La interpretación completa del espectro RMN ¹³C de este polisacárido degradado y desulfatado (Tabla 5.17) se logró mediante espectroscopía de correlación ¹H/¹³C 2D (HMQC). La asignación de la mayoría de las señales de agarano coinciden con los valores que se habían informado en literatura (Tabla 5.14), aunque las resonancias de C-2 de G y C-3 de LG deberían invertirse de acuerdo con sus resultados. Encontraron diferencias sistemáticas en los desplazamientos químicos de ~0,7 ppm, probablemente relacionadas con diferencias en las

condiciones experimentales. Todos los datos de RMN llevaron a concluir que se trata de un agarano parcialmente metilado con grupos *O*-metilo en las posiciones 2 (~25%) y 3 (~7%) de LG y en la posición 6 (~7%) de G.

En orden de complejidad creciente, el espectro RMN ^{13}C del polisacárido sometido solamente a degradación de Smith contenía una sola señal adicional a 100,1 ppm al comparar con el espectro anterior. La integración total de las intensidades de las tres señales de LG a 99,4; 100,1 y 101,9 ppm resultó aproximadamente igual a la de G, a 104,6 ppm. El análisis del espectro completo confirmó la ubicación de grupos sulfato en las posiciones 2 de LG (~35%) y 6 de G (~20%), sin que se encontraran indicios de sulfatación en otras posiciones.

El espectro del compuesto nativo incluía picos ensanchados de residuos de galactosa junto con 5 picos agudos, identificados como un subespectro de β -D-xilopiranososa. La posición de estas señales y su agudeza mostró que estaban todos unidos de manera similar a la cadena central, como ramificaciones simples sin sustituyentes adicionales. El espectro del polisacárido nativo no pudo ser interpretado en su totalidad.

El espectro del polisacárido desulfatado presentó señales mucho mejor resueltas que las del compuesto nativo. En la región anomérica se distinguieron tres señales principales a 104,8; 104,6 y 101,9 ppm pertenecientes a X, G y LG respectivamente. También se vieron otras cuatro resonancias adicionales, agudas e intensas, que se atribuyeron a X. Mediante un experimento APT (attached proton test) se encontró, además de los grupos hidroximetilo sin sustituir de ambas unidades de galactosa (en la región 61,7-62,5 ppm, la señal de la unidad G a 62,3 ppm era mucho menos intensa que la de la unidad LG a 62,0 ppm) y del grupo metileno de X (66,5 ppm), una señal intensa a 69,7 ppm correspondiente a un grupo hidroximetilo sustituido. Este hecho indicaba que las posiciones 6 de G estaban sustituidas con las ramificaciones simples de xilosa.

En resumen, el xilogalactano aislado del alga roja calcárea *C. pilulifera* pertenece a la familia del agar. Al mismo tiempo difiere de los representantes típicos de esta familia –como agarosa y porfirano– en parámetros estructurales importantes:

- i) no contiene LAG ni tampoco G6S, el precursor biológico o químico de LAG;
- ii) presenta una distribución específica de los sustituyentes: la mayoría de los grupos *O*-metilo y *O*-sulfato ocupan la posición 2 de LG, algunos están sobre la posición 3 de LG, mientras que la metilación y sulfatación en C-6 del G ocurre en mucha menor medida;
- iii) el polisacárido contiene β -D-xilopiranososa como ramificaciones simples en C-6 de G.

Es de destacar que la naturaleza compleja del polisacárido nativo impidió la interpretación completa de las señales de su espectro y la determinación de la composición exacta de las

díadas observadas en los espectros de sus derivados, a pesar de la aplicación de técnicas espectroscópicas mono- y bidimensionales.

5.2.4.2.RESULTADOS

Los espectros RMN ^{13}C con desacoplamiento protónico de CP y G2' fueron muy complejos (Fig. 5.6 y 5.7), en concordancia con el complejo esquema de sustitución elucidado mediante el análisis de las posiciones de unión incluido en las secciones anteriores. La interpretación directa de los espectros habría sido imposible si no se hubiera contado previamente con el análisis químico completo de las muestras. Inversamente, fue posible asignar residuos importantes basándose en el conocimiento del complejo patrón de sustitución de estos polisacáridos.

Las relaciones totales de unidades D-:L- calculadas a partir de la composición en monosacáridos de la Tabla 5.3 son: CP, 49:51; G2', 53:47, mientras que de las Tablas 5.7 y 5.8 surgen: CP, 51:40; CPDes, 49:46; G2', 48:43; G2'Des, 45:42; G2'DS, 47:43. Estos resultados sugieren la presencia de exceso de unidades D- en la cadena central, sin embargo las resonancias observadas en todos los espectros RMN ^{13}C fueron consistentes con una estructura alternante del tipo de los agaranos. La ausencia de señales anoméricas a menos de 98 ppm indicó la ausencia de residuos de α -D-galactosa enlazados por 4, pertenecientes a carragenanos.

Se realizó un experimento de intensificación sin distorsión por transferencia de polarización⁵⁰ (distorsionless enhancement by polarization transfer, DEPT 135) sobre G2' para identificar los carbonos metilénicos (Fig. 5.7.D). Dos grupos de señales a 65-66 y 60,5-62 ppm dieron picos invertidos que correspondían a C-5 de xilosa y C-6 de galactosa respectivamente.

Fig. 5.6. Espectros RMN ^{13}C de CPSD (a), CP (b) y CPDes (c) registrados a 75 MHz y 80°C. Abajo: ampliación de regiones anoméricas.

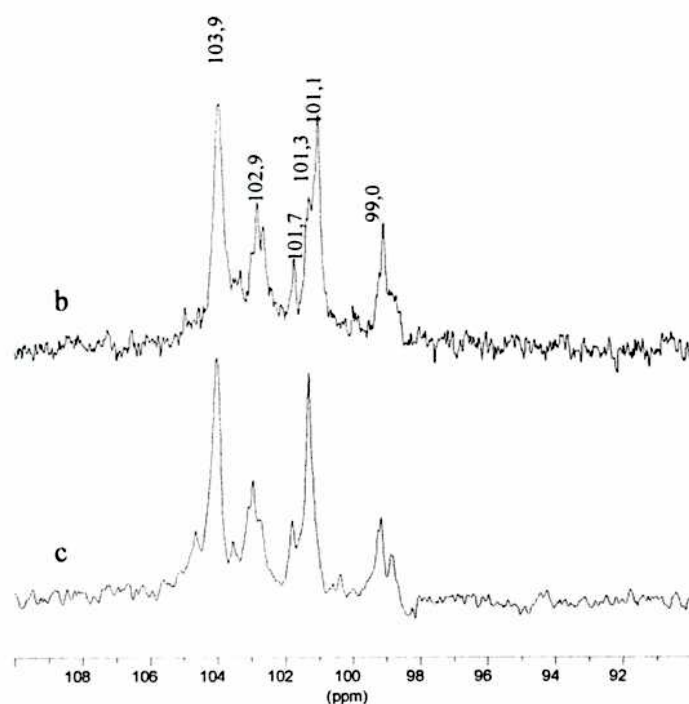
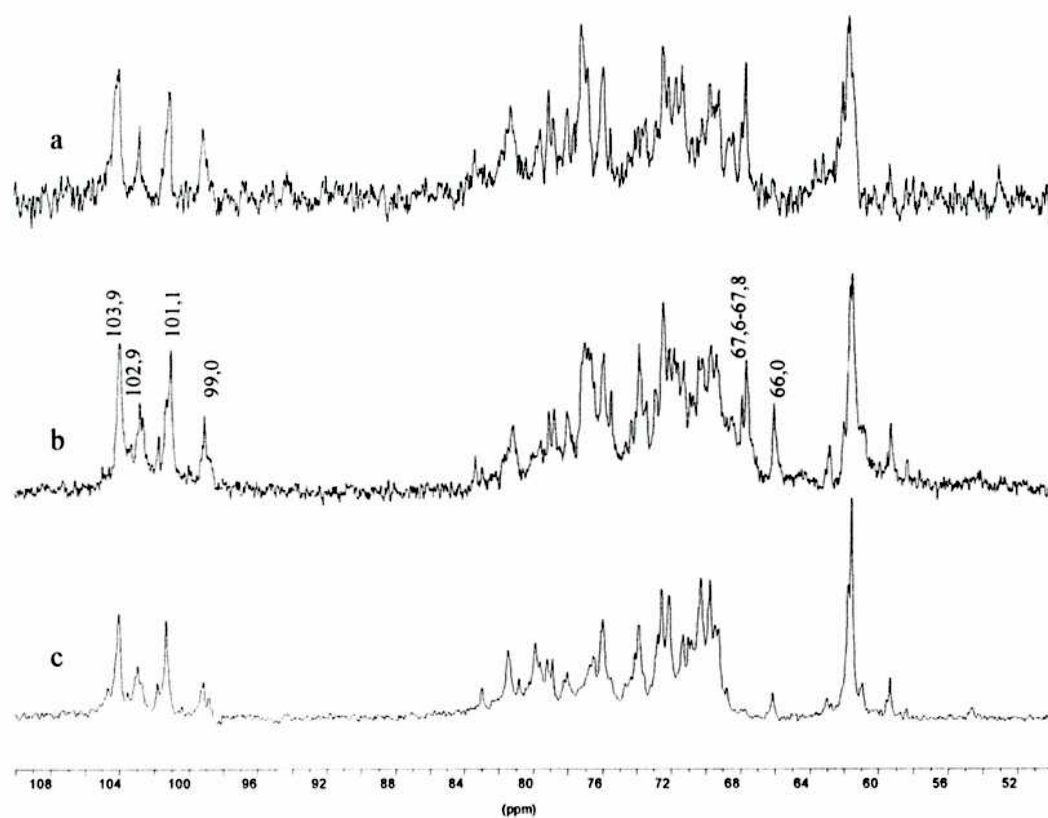


Fig. 5.7. Espectros RMN ^{13}C de G2'SD (a), G2' (b), G2'Des (c) y G2' DEPT 135 (d); (a) y (d) registrados a 125 MHz y 30°C; (b) y (c) registrados a 75 MHz y 80°C. Abajo: ampliación de regiones anoméricas

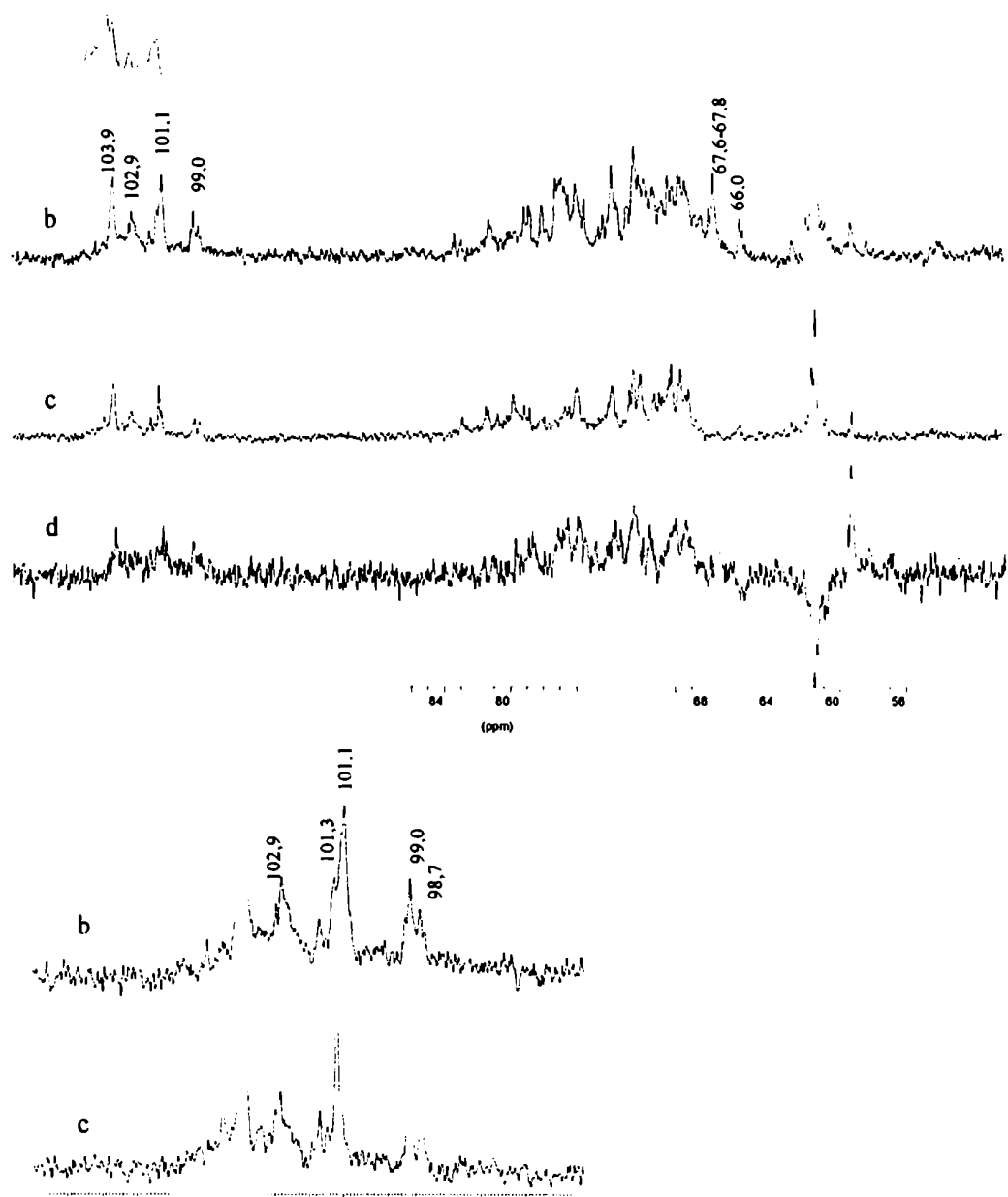


Tabla 5.18. Asignaciones (en ppm) de los espectros RMN ¹³C de CP, G2' y sus derivados desulfatados

Unidad	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	OMe
G	102,9	70,4	82,9	68,6	75,5	61,4	
G6M	102,9	70,4	82,9	69,1	73,8	72,1	59,2
LAG2M	98,7	79,1	78,7	77,9	75,9	69,6	59,3
G	103,9	70,1	81,3	69,1	75,9	61,6	
G6M	103,9	70,1	81,2	69,1	73,8	72,1	59,2
LG	101,3	69,6	71,3	79,0	72,1	61,4	
LG2M	99,0	79,1	69,7	79,7	72,7	61,4	59,2
LG3S	101,1	67,6-67,8 ^a	79,0	77,1	71,6	61,4	
X	101,7	73,8	76,5	70,4	66,0		

^aDependiendo de la sustitución del residuo y de sus unidades vecinas.

A partir de los resultados de alquilación, las díadas que podrían aparecer para estos polisacáridos tenían que estar formadas por pares de alguno de los siguientes residuos principales de la serie D: G, G6M, G4S, G4X, junto con otro de la serie L: LG, LG3S, LG2M, LAG2M. Como no se observaron señales provenientes de las díadas G4S-LAG^{34,51} o G4S-LAG2M³⁴ (Tabla 5.14), fueron excluidas del esquema de sustitución posible. Las muestras desulfatadas presentaron espectros simplificados (Figs. 5.6.c y 5.7.c) que permitieron la asignación de algunas señales diagnósticas^{18,34,35} (Tabla 5.18), aunque no fue posible establecer una única composición de las díadas para todos los conjuntos de señales encontrados. No obstante, las díadas G-LAG2M³⁴ y G6M-LAG2M³⁴ pudieron ser identificadas claramente.

Para calcular la contribución de la sulfatación en la posición 3 y los desplazamientos químicos del residuo de LG3S se aplicó la aproximación de Miller y Blunt⁵² para predecir espectros posibles de galactanos nuevos o de fragmentos estructurales nuevos dentro de estos polisacáridos. Para ello, se hacen asignaciones provisionarias basadas en cambios en los espectros debidos a una sustitución determinada. Luego se intentan explicar cambios regulares en los desplazamientos químicos originados por sustitución. Se considera que las modificaciones más significativas en los desplazamientos químicos llegan hasta el carbono β respecto del sustituyente y que la diferencia en el esquema de sustitución –la ausencia o presencia de un éster sulfato, por ejemplo– tiene lugar en un entorno localizado, en un esqueleto básicamente constante. En este contexto es posible suponer constancia de ciertos factores que podrían complicar la aproximación: cambios localizados de solvatación, cambios

en efecto dador de electrones y efectos estéricos que alteren los ángulos de unión. Los desplazamientos químicos correspondientes a cada conformación para una estructura dada se presentan como una matriz. Los cambios debidos a una sustitución determinada se representan entonces como una diferencia de matrices, con la salvedad que el significado físico de los valores que componen los elementos de la matriz diferencia es válido solamente si la conformación se mantiene constante. De esta manera sería posible estimar los espectros de nuevos ficocoloides con un grado razonable de incertidumbre.

Para calcular la matriz diferencia correspondiente a la sulfatación en 3 de una unidad de α-L-galactosa se tomaron como base los pares de matrices formados por los conjuntos de señales atribuidas a:

(i) metil α-D-galactopiranosido 3-sulfato; metil α-D-galactopiranosido²⁶ (Tabla 5.12) cuya matriz diferencia correspondiente es:

$$\text{Me } \alpha\text{-D-Gal 3S} - \text{Me } \alpha\text{-D-Gal} = [-0,24 \quad -2,08 \quad +8,28 \quad -1,25 \quad -0,36 \quad -0,21]$$

o bien ,

(ii) α-L-galactopiranososa 3-sulfato; α-L-galactopiranososa, informadas para α-L-galactanos con enlaces (1→4) y sulfatados en la posición 3, extraídos de *Herdmania monus* (ascidianos, tunicados)⁵³:

α-L-Gal 3S (polisacárido nativo) =	[102,7	69,9	78,8	78,8	73,9	62,2]
α-L-Gal (polisacárido desulfatado) =	[103,1	71,8	71,8	81,4	74,1	62,9]
α-L-Gal 3S – α-L-Gal =	[-0,4	-1,9	+7,0	-2,6	-0,2	-0,7]

Cada contribución fue sumada al conjunto de desplazamientos químicos correspondientes a LG en la díada G-LG o G6M-LG (Tabla 5.18), para dar dos conjuntos de desplazamientos químicos calculados para LG3S en las díadas derivadas de las dos anteriores: { 101,1; 67,5; 79,6; 77,7; 71,7; 61,2 ppm} (según i) y { 100,9; 67,7; 78,3; 76,4; 71,9; 60,7 ppm} (según ii), para C-1–C-6 respectivamente. Se consideró además que no habría desviaciones significativas sobre los residuos β por este tipo de sulfatación. Las asignaciones finales se hicieron teniendo en cuenta que:

(i) los desplazamientos químicos observados deberían ser cercanos a los esperados según los cálculos; y

(ii) estos picos deberían poseer mayor intensidad en los espectros de las muestras nativas y ser más débiles en los registrados para las desulfatadas.

Así, se encontró que en los espectros de CP y G2' existía una señal importante a 101,1 ppm con un hombro a 101,3 ppm, mientras que para CPDes y G2'Des las intensidades aparecieron invertidas (ver ampliación de las regiones anoméricas de las Figs. 5.6 y 5.7) siendo la señal principal la de 101,3 ppm y el hombro a 101,1 ppm. Por lo tanto, la señal a campos mayores se atribuyó a LG3S y la otra a unidades LG.

Dos señales, a 67,6 y 67,8 ppm, desaparecieron luego de la desulfatación y ambas podían asignarse a C-2 de LG3S. Considerando los residuos de L-galactosa sustituida en 3 y de D-galactosa que podrían estar unidos para dar una diada, surge del análisis de las posiciones de unión que el par más probable sería G6M-LG3S y que G-LG3S, G4S-LG3S ó G4X-LG3S serían menos abundantes. Se supuso que la suma de las intensidades de las señales a 67,6 y 67,8 ppm correspondía a la suma de las unidades de L-galactosa sustituidas en 3 (CP, 28; G2', 22, obtenidas del análisis de las posiciones de unión, Tablas 5.7 y 5.8), luego se aplicó la relación de intensidades $I_{67,6 \text{ ppm}} : I_{67,8 \text{ ppm}}$ (CP, 58:42; G2', 63:37) al total de estas unidades a fin de estimar un porcentaje para los dos tipos de residuos rodeados por un entorno diferente, lo cual daría lugar a picos diferentes. Los porcentajes molares así estimados para las señales a 67,6 ppm (CP, 17; G2', 14) fueron coincidentes con los contenidos de 6-O-metil-D-galactosa en los resultados de alquilación (CP, 16; G2', 14, Tablas 5.7 y 5.8). A la vez, los porcentajes menores correspondientes a 67,8 ppm (CP, 13; G2', 8) fueron similares a los contenidos de D-galactosa sin sustituir, D-galactosa 4-sulfato o D-galactosa 4-xilosa (Tablas 5.7 y 5.8). La señal a 67,6 ppm puede ser asignada a C-2 de LG3S en la diada G6M-LG3S, mientras que la señal menor a 67,8 ppm podría atribuirse a C-2 de LG3S en la diada G-LG3S. Esta última está de acuerdo con la evidencia encontrada sobre sulfatación en la posición 3 de α -L-galactosa unida a β -D-galactosa para polisacáridos aislados de *Gimnogongrus torulosus*, donde se encontró una señal a 67,8 ppm⁵⁴.

La señal a 67,6-67,8 ppm puede considerarse como diagnóstica para LG3S, ya que en la región 66,5-68,5 ppm suelen aparecer pocas señales, de las cuales las más frecuentes corresponden a C-6 de unidades de galactosa sustituida en C-6 y pueden diferenciarse por experimentos DEPT 135. El resto de los desplazamientos químicos de los carbonos de LG3S están en regiones más pobladas del espectro y fueron asignados por un razonamiento semejante al explicado. La asignación completa de la unidad LG3S coincide con los valores calculados por el análisis matricial.

Hasta donde se tienen registros de los datos de literatura, esta asignación es la primera que se realiza en forma completa sobre los desplazamientos químicos de la unidad inusual de LG3S. Con posterioridad a la publicación del artículo que dio lugar el análisis estructural de los polisacáridos de *G. confluens*, apareció un trabajo de Duarte *et al.*⁵⁵ vinculado a un galactano sulfatado de *Bostrychia montagnei*. Allí se asigna a 103,9 ppm el carbono anomérico de G en la díada G-LG3S y se describen los desplazamientos químicos de LG3S y G-LG como se indican en la Tabla 5.19. Se observa un corrimiento sistemático de las señales en ~0,7 ppm con respecto a los informados para *G. confluens*, haciendo esta corrección las asignaciones resultan coincidentes (con variaciones $\leq 0,3$ ppm; en general se consideran aceptables variaciones $\leq 0,5$ ppm) salvo en el C-4 de LG y LG3S, donde se encuentran diferencias de 0,6 y 0,9 ppm respectivamente. Si se toma como parámetro la díada G-LG informada por Miller y Blunt⁴⁰ de la Tabla 5.14, ambas asignaciones son consistentes tomando como variación aceptable $\leq 0,5$ ppm.

Con respecto a las diferencias entre LG3S de *B. montagnei* y de *G. confluens*, las matrices diferencia LG3S – LG que dan la contribución derivada de la sulfatación en 3 son básicamente coincidentes:

$$\begin{aligned} \text{LG3S} - \text{LG} (B. montagnei) &= \begin{bmatrix} -0,1 & -2,2 & +7,5 & -1,6 & -1,1 & 0 \end{bmatrix} \\ \text{LG3S} - \text{LG} (G. confluens) &= \begin{bmatrix} -0,2 & -2,0 / -1,8 & +7,7 & -1,9 & -0,5 & 0 \end{bmatrix} \end{aligned}$$

Duarte *et al.* informan 78,0 ppm (valor corregido) para el C-3 de LG3S; si bien esta señal aparece en los espectros de CP y G2' de *G. confluens*, la misma desaparece en G2'Des pero persiste con cierta intensidad en CPDes. La resonancia de 77,1 ppm corresponde a una señal ancha y compleja, de mayor intensidad que la anterior, en los espectros de CP y G2' que desaparece en ambos casos luego de desulfatar. Teniendo en cuenta que la desulfatación en la posición 3 fue de 80%, para CP, y de 88 %, para G2' (Tablas 5.7 y 5.8), se confirma la asignación de 77,1 como correspondiente a C-3 de LG3S en *G. confluens*, mientras que el pico de 78,0 ppm permanece por ahora asignada a C-4 de LAG2M. Las diferencias puntuales en el desplazamiento químico de C-3 de LG3S quizá se deban a la inclusión de este residuo en díadas distintas. Como se dijo más arriba, es probable que la díada G6M-LG3S sea más abundante que la díada G-LG3S para los polisacáridos en estudio. Además la señal 104,6 ppm (103,9 ppm corregida en 0,7 ppm), atribuida a C-1 de G unida a LG3S en *B. montagnei* es una señal muy minoritaria en *G. confluens* que aparece tanto en G2' como en G2'Des y es menor

en CP que en CPDes, por lo que no es posible que en estos polisacáridos corresponda al carbono anomérico de una díada sulfatada.

Tabla 5.19. Asignaciones (en ppm) de algunas díadas contenidas en los galactanos sulfatados de *Bostrychia montagnei*^a y comparación con otras asignaciones

Unidad	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6
G	103,3	69,5	80,7	68,5	75,2	61,0
LG	100,5	69,0	70,6	78,9	71,7	60,7
LG+ 0,7 ^b	101,2	69,7	71,3	79,6	72,4	61,4
LG (Tabla 5.14) ^c	100,9	69,3	71,0	79,3	72,2	61,1
LG (<i>G. confluens</i>) ^d	101,3	69,6	71,3	79,0	72,1	61,4
G	103,9					
LG3S	100,4	66,8	78,1	77,3	70,6	60,7
LG3S + 0,7 ^b	101,1	67,5	78,8	78,0	71,3	61,4
LG3S (<i>G. confluens</i>) ^d	101,1	67,6-67,8 ^a	79,0	77,1	71,6	61,4

^aEspectros registrados en D₂O, a 70°C, desplazamientos químicos relativos a acetona a 30,2 ppm.

^bDesplazamientos químicos corregidos en 0,7 ppm, con fines comparativos.

^cDesplazamientos químicos de LG en la díada G-LG (Tabla 5.14), con fines comparativos.

^dDesplazamientos químicos de la Tabla 5.18, con fines comparativos.

Las resonancias de los residuos LG2M se corresponden con las publicadas previamente por Usov, corregidas por un desplazamiento constante de ~0,4 ppm¹⁸.

En la Tabla 5.18 no se indicaron los componentes de las díadas para el conjunto de residuos formado por G, G6M, LG, LG3S y LG2M porque se consideró que en estos casos la influencia del sustituyente sobre un residuo sería despreciable sobre el residuo vecino.

La contribución correspondiente a la sulfatación en 4 para G4S, en una díada del tipo G4S-LG, puede calcularse de tres maneras posibles:

i) a partir de la matriz diferencia G4S – G en las díadas G4S-LAG y G-LAG (Tabla 5.14);

G4S-LAG –	unidad β-D-	[-0,3	+0,3	-2,5	+7,9	-0,7	-0,4]
G-LAG =	unidad α-L-	[-1,9	-0,2	-0,3	-0,3	-0,3	-0,2]

ii) a partir de la matriz diferencia entre las díadas G4S-LAG2M y G-LAG2M (Tabla 5.14):

G4S-LAG2M –	unidad β-D-	[-0,2	+0,3	-2,9	+7,8	-0,1	0,0]
G-LAG2M =	unidad α-L-	[-0,5					-]

iii) a partir de la matriz diferencia entre las díadas G4S-DAG y G-DAG⁵⁶, pertenecientes a la familia de los carragenanos (Tabla 5.20):

Tabla 5.20. Asignaciones (en ppm) de díadas pertenecientes a carragenanos y matriz diferencia correspondiente a la contribución de sulfatación en la posición 4 de β-D-galactosa

Unidad		C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6
G4S		102,5	69,6	78,9	74,1	74,8	61,3
DAG		95,3	69,9	79,2	78,3	76,8	69,5
G		102,5	69,5	80,4	66,4	75,3	61,3
DAG		94,7	70,2	79,4	78,0	76,8	69,5
G4S-DAG –	unidad β-D-	[0,0	+0,1	-1,5	+7,7	-0,5	0,0]
G-DAG =	unidad α-D-	[+0,6	-0,3	-0,2	+0,3	0,0	0,0]

Si se cumple la condición de conformación constante (págs. 193-194) entre las díadas G-LG y G4S-LG y si además la variación en los desplazamientos químicos es semejante (a pesar de tratarse de una extrapolación de unidades LAG a LG), la aplicación de la aproximación matricial da como valores relevantes:

- i) Para la unidad G4S: 103,6 (C-1); 78,8 (C-3); 77,0 (C-4); 75,2 ppm (C-5); y para la unidad LG: 99,4 ppm (C-1);
- ii) Para la unidad G4S: 103,7 (C-1); 78,4 (C-3); 76,9 (C-4); 75,4 ppm (C-5); y para la unidad LG: 100,8 ppm (C-1);
- iii) Para la unidad G4S: 103,9 (C-1); 79,8 (C-3); 76,8 (C-4); 75,4 ppm (C-5); y para la unidad LG: 101,9 ppm (C-1).

Las señales observadas en la región anomérica de los espectros muestran una señal algo más ancha a 103,9 ppm en las muestras nativas que se hace más aguda en los productos desulfatados (Figs. 5.6 y 5.7). A 99,1 ppm hay un pico que fue asignado a LG2M, aunque también podría estar constituido por otras resonancias de unidades distintas cuyos desplazamientos químicos coinciden. Por lo tanto, es posible atribuir tentativamente estas señales a 103,9 y 99,1 ppm a los carbonos anoméricos de las unidades β y α en una díada

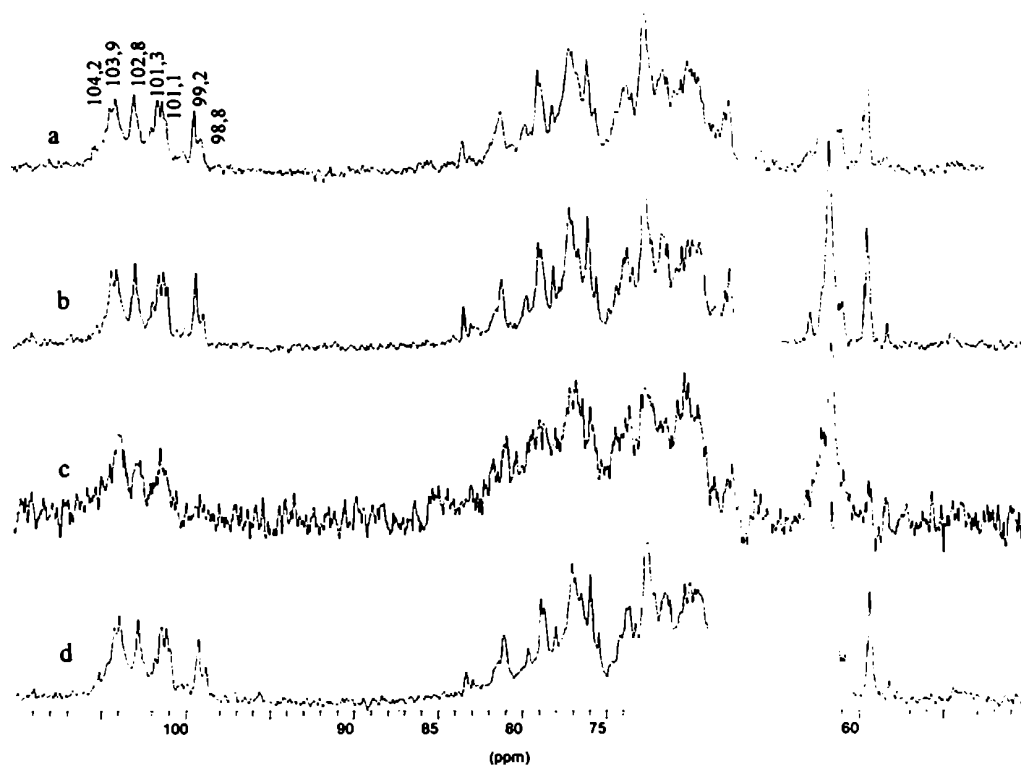
G4S-LG. El C-3 de G4S fue estimado a 78,4-79,8 ppm, sin embargo no hay señales en los espectros registrados que disminuyan su intensidad en esta región al desulfatar los polisacáridos. La señal a 77,9 ppm –asignada a C-4 de LAG2M– está presente en CP y G2', es poco intensa en G2'Des y mediana en CPDes, y podría vincularse a C-3 solamente si se infiere que en CPDes hay sustitución remanente con sulfato en la posición 4, además de xilosa en la misma posición, luego de la desulfatación. Existe una señal a 75,5 ppm que correspondería a C-5 de G4S, ya que su intensidad es mucho menor en los espectros de muestras desulfatadas. Finalmente, el mayor corrimiento debido al efecto α de la sustitución con sulfato tendría que observarse en C-4 de G4S, cuyo desplazamiento químico estimado es de 76,8-77,0 ppm. La señal ancha y compleja entre 77,1 y 76,9 ppm que aparece en los espectros de CP y G2', en parte atribuida a C-3 de LG3S, también puede asociarse a C-4 de G4S.

Los espectros obtenidos para las muestras sometidas a degradación de Smith fueron también muy complejos (Fig 5.6.a y 5.7.a). No hay antecedentes bibliográficos de residuos de G4X ni hay datos que permitan hacer una estimación de sus desplazamientos químicos. Lamentablemente no se pudo detectar la desaparición de los picos derivados de G4X, aunque se notó la ausencia de las señales a 101,7 y 66,0 ppm. El carbono anomérico de unidades de β -D-xilopiranosas fue relacionado con el pico a 101,7 ppm¹⁸, mientras que el C-5 se atribuyó a la señal a 66,0 ppm^{40,48,57} (Tabla 5.16), ambas estaban presentes en los espectros de las muestras nativas y desulfatadas y ausentes en los productos de degradación de Smith.

También se registraron los espectros de G2'D1, G2'D5 y G2'D7 (Fig. 5.8), las fracciones principales aisladas a partir de G2' por cromatografía de intercambio aniónico. Las fracciones G2'D5 y G2'D7, con contenido de sulfato y composición en monosacáridos similares, mostraron espectros semejantes entre sí y a G2'. Sin bien el espectro de G2'D1 –con menor sulfatación y contenido de 3,6-anhidrogalactosa– resultó con peor resolución que los demás de la serie, mostró dos diferencias relevantes en la región anomérica. Un pico más intenso a 101,3 y un hombro a 101,1 ppm resultaron consistentes con un porcentaje menor de sulfatación, en particular con menor contenido de unidades LG3S. La ausencia de señales a 98-99 ppm reflejó el bajo contenido de 3,6-anhidrogalactosa y su derivado 2-O-metilado. En los espectros de G2'D7, G2'D5 y G2' se observan dos señales bien resueltas a 104,2 y 103,9 ppm, mientras que la intensidad a campos menores disminuye en el espectro de G2'D1. Este hecho constituye una evidencia adicional a favor de la asignación tentativa de los carbonos anoméricos de la díada G4S-LG que se realizó anteriormente. El esquema de sustitución general que se deduce para estas subfracciones a partir de los espectros RMN ¹³C es

consistente con la conclusión que G2' es una muestra polidispersa homogénea en composición.

Fig. 5.8. Espectros RMN ^{13}C de G2'D7 (a), G2'D5 (b), G2'D1 (c) y G2' (d) registrados a 125 MHz y 30°C.



En resumen estos polisacáridos aislados de *Georgiella confluens* son agaranos altamente metilados con bajo contenido de 3,6-anhidrogalactosa, cuyas unidades de β-D-galactosa poseen ramificaciones simples de xilosa en la posición 4 ó están sulfatadas en la misma posición, la sulfatación principal ocurre sobre la posición 3 de las unidades de α-L-galactosa.

5.3. ANÁLISIS ESTRUCTURAL DE G3'

Conociendo los resultados del análisis estructural de CP y G2', se llevó a cabo un estudio estructural abreviado sobre G3'.

Los resultados de la metilación de G3' se indican en la Tabla 5.21. También se realizó una aminación reductiva con 1-fenilamina quirál sobre el producto de metilación hidrolizado, a fin de determinar la relación 2,6-di-O-metil-D- : 2,6-di-O-metil-L-galactosa.

Tabla 5.21. Análisis por metilación (moles %) de G3' y G3'Des^a

	G3'	G3'Des	G2'	G2'Des
2,3,4-Me ₃ Xil	7	6	8	8
2,3,4,6-Me ₄ Gal	2	2	5	7
2,4,6-Me ₃ Gal	26	35	23	33
2,3,6-Me ₃ Gal	8	25	11	27
2-Me AnGal	6	7	6	5
2,6-Me ₂ Gal	31 ^b	16 ^c	29 ^d	12 ^e
3,6-Me ₂ Gal	3	5	2	4
2,3-Me ₂ Gal	3	tr	4	2
2,4-Me ₂ Gal	5	1	4	1
6-Me Gal	4	2	4	1
2-Me Gal	5	1	4	-

^aSe incluyen G2' y G2'Des (Tabla 5.5) con fines comparativos.

^bRelación 2,6-di-O-metil-D- : -L-galactosa 15:16.

^cRelación 2,6-di-O-metil-D- : -L-galactosa 11:5.

^dRelación 2,6-di-O-metil-D- : -L-galactosa 14:15.

^eRelación 2,6-di-O-metil-D- : -L-galactosa 10:2.

Esta fracción fue sometida a desulfatación con una relación sulfato-CTMS 1:380, calentando a 100°C durante 8 h. El producto desulfatado, G3'Des, dio un rendimiento del 75% y contenía 6,1% de sulfato, equivalente a una desulfatación del 63%. Las composiciones del polisacárido nativo y el desulfatado fueron similares (Tabla 5.3).

El producto G3'Des fue metilado (Tabla 5.21) y se llevó a cabo el procedimiento de aminación reductiva para determinar la configuración absoluta de las unidades parcialmente metiladas. La composición de los monosacáridos parcialmente metilados fue muy similar a la de G2', mientras que al comparar con CP (Tabla 5.5 y resumen en la Tabla 5.22) se vio que los residuos que presentaban las diferencias más notorias son 2,4,6-tri-*O*-metilgalactosa (CP: 26, CPDes: 30), 2,6-di-*O*-metil-D-galactosa (CP: 20, CPDes: 12) y 2,6-di-*O*-metil-L-galactosa (CP: 25, CPDes: 5). El polisacárido crudo, CP, contenía mayor proporción de 2,6-di-*O*-metil-D- y 2,6-di-*O*-metil-L-galactosa que las fracciones G2' y G3', lo que indicaría que en el polisacárido total hay mayor grado de sustitución en la posición 4 de las unidades de D-galactosa enlazada por 3 y en la posición 3 de las unidades de L-galactosa enlazada por 4. Paralelamente, CP tiene el mayor contenido de xilosa (Tabla 5.3) –aunque generalmente el contenido de 2,3,4-tri-*O*-metilxilosa en el análisis por metilación suele ser menor que el informado en la composición en monosacáridos debido a la volatilidad elevada del monosacárido trimetilado⁵⁸ –y presenta la mayor disminución en las unidades de 2,6-di-*O*-metil-D-galactosa luego de la desulfatación. Esto resultaba consistente con un mayor porcentaje de sustitución en la posición 4 tanto con sulfato como con xilosa. Si bien el aumento de 2,4,6-tri-*O*-metilgalactosa entre CPDes y CP sólo fue de 4 unidades, esta variación debería haber sido mayor ya que 2,6-di-*O*-metil-D-galactosa sólo puede derivar en 2,4,6-tri-*O*-metilgalactosa (o 2,3,4,6-tetra-*O*-metilgalactosa, que no se observa), siendo el origen de la discrepancia de tipo experimental.

Tabla 5.22. Resumen comparativo del análisis por metilación (moles %) de CP, G2', G3' y sus derivados desulfatados CPDes, G2'Des y G3'Des

	CP	CPDes	G2'	G2'Des	G3'	G3'Des
2,4,6-Me ₃ Gal	26	30	23	33	26	35
2,3,6-Me ₃ Gal	5	24	11	27	8	25
2,6-Me ₂ D-Gal	20	12	14	10	15	11
2,6-Me ₂ L-Gal	25	5	15	2	16	5

En los tres casos fue claro el aumento de 2,3,6-tri-*O*-metilgalactosa a expensas de 2,6-di-*O*-metil-L-galactosa. Para CP el aumento fue de 19 unidades y la merma de 20, para G2' las variaciones fueron de +16 versus -13, mientras que para G3' fueron de +17 versus -9. Esto significaría que en G2' y especialmente en G3' las unidades de 2,3,6-tri-*O*-metilgalactosa derivaban no solamente de 2,6-di-*O*-metil-L-galactosa sino también de 2,3-di-*O*-

metilgalactosa y 2-*O*-metil-L-galactosa, equivalentes a la presencia de residuos LG6S y LG3S6S en los polisacáridos iniciales.

De todas maneras es importante recordar que CP es el polisacárido crudo, de cuyo fraccionamiento surgieron G2' y G3' como fracciones mayoritarias. Es de esperar que estas fracciones sean más homogéneas en composición que el material de partida, con menor contribución de cadenas de bajo peso molecular, y que los resultados correspondientes a las mismas sean más relevantes.

Se registraron los espectros RMN ^{13}C tanto de G3' –a 80°C, operando a 75 MHz– como de G3'Des –a 30°C, operando a 125 MHz– (no incluidos como figuras). En ambos casos las señales observadas fueron consistentes con las asignaciones incluidas en la Tabla 5.18.

La señal a 78,0 ppm, que había sido asignada por Duarte *et al.*⁵⁵ a C-4 de LG3S y que tentativamente se sugirió correspondiente a C-3 de G4S en la sección anterior, persistió nuevamente en el espectro de G3'Des. Por lo tanto, no parece atribuible a ninguna unidad sulfatada dentro de este sistema de galactanos y permanece vinculada solamente a C-4 de LAG2M.

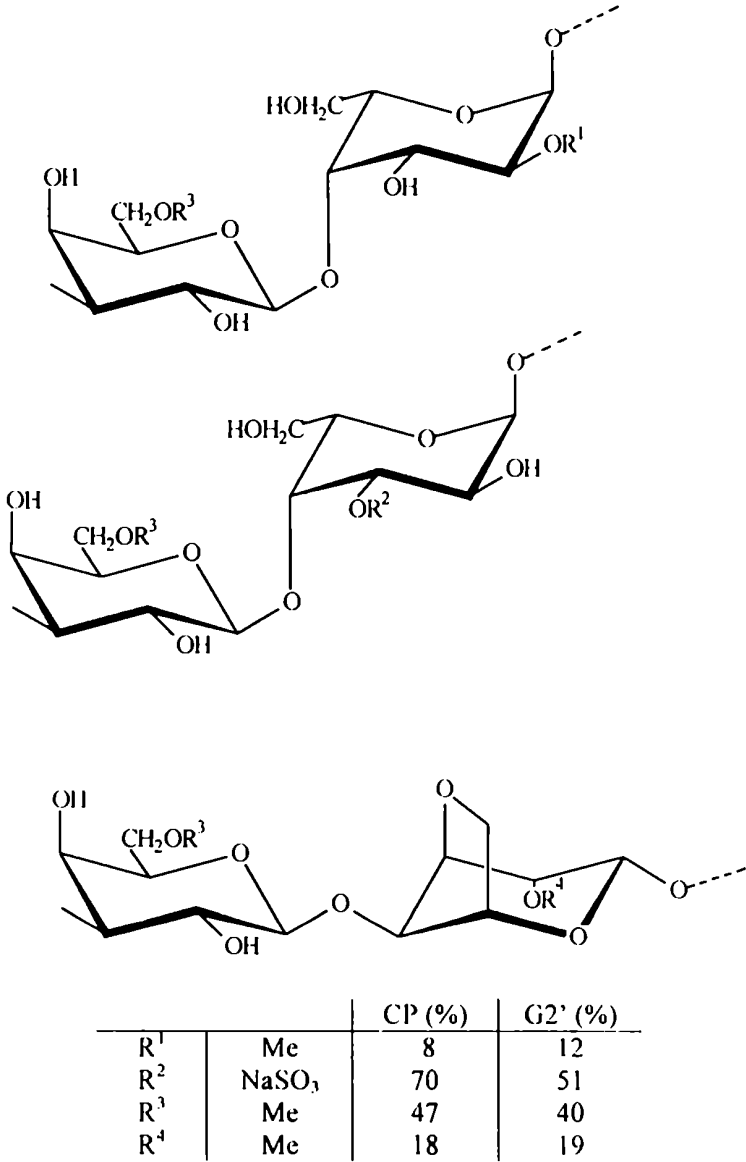
Sólo se encontraron algunas diferencias sutiles al comparar los espectros de G3' con CP y G2', que también surgieron cuando se observaron los correspondientes a G3'Des frente a CPDes y G2'Des. Las señales de C-4 y C-5 de G y G6M aparecieron como algo más intensas para G3', hecho que estaría de acuerdo con la existencia de bloques de agarano con menor sustitución en la posición 4 de estas unidades tanto con sulfato como con xilosa. Por lo demás la composición de la cadena central de galactano y su esquema de sustitución resultaron coincidentes con las estructuras básicas delineadas para CP y G2'.

5.4. CONCLUSIONES

En conclusión, los polisacáridos estudiados de *G. confluens* presentan las características siguientes:

- 1- poseen una cadena central de agarano altamente metilado;
- 2- un bajo contenido de 3,6-anhidrogalactosa y sus unidades precursoras;
- 3- ramificaciones simples de xilosa unidas a la posición 4 de unidades de β -D-galactosa;
- 4- sulfatación principalmente en la posición 3 de α -L-galactosa;
- 5- sulfatación menor en la posición 4 de β -D-galactosa.

Fig. 5.9. Estructuras predominantes propuestas para los polisacáridos de *G. confluens* (los porcentajes están basados en la sustitución de los residuos de α - ó β -galactosa en las posiciones indicadas)



Si bien no fue posible determinar cuáles eran los residuos que se encontraban formando díadas con las unidades de β -D-galactosa sustituidas en 4, las demás estructuras predominantes propuestas para estos polisacáridos se muestran en la Fig. 5.9. Tres de las características mencionadas (puntos 2, 3 y 4) son relevantes y se desarrollan a continuación.

La presencia de ramificaciones simples de xilosa sobre la posición 4 de unidades de β -D-galactosa fue informada con anterioridad solamente para los polisacáridos de *Lenormandia angustifolia*, *Lenormandia chauvinii*⁵⁹ y en *Laurencia undulata*⁶⁰, todas ellas pertenecientes a la familia Rhodomelaceae del orden Ceramiales.

La sulfatación en C-3 de las unidades de α -L-galactosa es algo más frecuente y fue detectada en los siguientes galactanos sulfatados no gelificantes. Dentro de Corallinaceae, Corallinales, fue encontrada en:

- i) *Corallina officinalis*⁴⁵ donde aproximadamente el 25% de las posiciones 3 de las unidades de LG estaban sulfatadas.
- ii) *Joculator maximus*⁴⁷ donde un 15% de unidades LG presentaban esta sulfatación.
- iii) *Corallina pilulifera*¹⁸ y *Bossiella cretacea*⁶¹ donde se detectaron pequeñas proporciones en el análisis por metilación.

También fue hallada en *Khallymenia berggrenii*⁶² (Cryptonemiales), cuyo agarano estaba sulfatado en casi todos, si no en todos, los grupos hidroxilo disponibles sugiriendo una sulfatación casi al azar.

El análisis de las posiciones de unión del galactano sulfatado de *Plocamium costatum*⁵⁹ (Plocamiaceae, Plocamiales) reveló que las unidades enlazadas por 4 estaban casi completamente sulfatadas en 3 y un porcentaje elevado de las unidades enlazadas por 3 lo estaban en 4. Por espectroscopía RMN ¹³C se determinó que las unidades α estaban presentes tanto en configuración L como en D, aproximadamente en cantidades iguales, aunque los autores no pudieron estimar la proporción de unidades sulfatadas en C-3 ni su configuración absoluta.

Los galactanos de dos especies de *Trematocarpus*, *T. acicularis* y *T. dichotomus*⁶³ (Gigartinales, aunque este género también fue asociado a Plocamiales), fueron analizados por RMN ¹³C y se determinó que en ambos casos las díadas principales correspondían a G2S(4,6P)-LG2S3S y G2S-LG3S, donde aproximadamente la cuarta parte de los carbonos primarios están sustituidos con sulfato o xilosa. El 80% de las unidades α enlazadas por 4 poseían configuración L y todas ellas estaban sulfatadas en C-3, cerca de la mitad tenían

sulfatación adicional en C-2. Estos resultados plantean para los autores una revisión de la taxonomía del género *Trematocarpus*.

También fue informada en varias especies de Ceramiales:

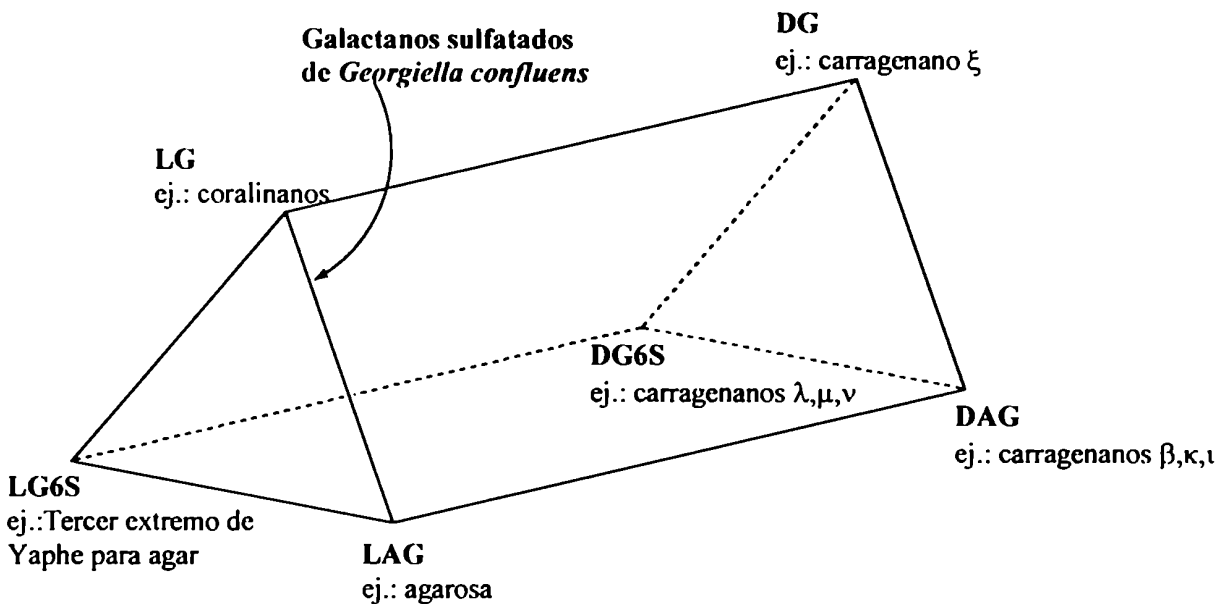
- i) *Cladhymenia oblongifolia*³⁷ (Rhodomelaceae), cuyo agaróide tenía niveles elevados de sulfatación en casi todas las posiciones salvo en los hidroxilos axiales. Todas las unidades α poseían la configuración L, el 40% de las cuales era galactosa (el resto era LAG), y a su vez el 10% poseía sulfato en C-3. Sin embargo los autores no pudieron establecer si se trataba de residuos LG3S ó LG2S3S.
- ii) *Bostrychia montagnei*⁵⁵ (Rhodomelaceae) mostró la presencia de un agarano sulfatado y metilado con una dispersión estructural inusualmente estrecha. Aproximadamente el 50-60% de las unidades α enlazadas por 4 eran L-galactosa (el resto estaba presente como 3,6-anhidro-L-galactosa) y estaban completamente sulfatadas en la posición 3, con proporciones menores de sulfatación adicional en C-2 y C-6.
- iii) El polisacárido extraído de *Myriogramme denticulata*⁴² (Delesseriaceae) y algunos de sus derivados fueron estudiados por RMN ¹³C. El galactano nativo es un agaróide constituido ampliamente por la díada repetitiva G4S-LG2S3S. Miller propuso que los datos bibliográficos disponibles sugerían que el predominio de unidades LG y niveles elevados de sulfatación podían ser característicos de la familia Delesseriaceae.

En resumen, es la primera vez que se encuentra sulfatación en C-3 de α -L-galactosa en Ceramiaceae, aunque esta sustitución sí había sido informada para otras familias (Rhodomelaceae y Delesseriaceae) del orden Ceramiales. La xilosilación en C-4 de β -D-galactosa fue hallada con anterioridad solamente en Ceramiales (dentro de la familia Rhodomelaceae). Además, los agaranos de *G. confluens* no muestran propiedades gelificantes de acuerdo con otros agaranos de especies del mismo orden: *Ceramium rubrum*^{40,64} y *Carpoblepharis flaccida*⁶⁵ (Ceramiceae); y *Chondria decipiens*³⁶, *Lenormandia chauvinii*⁵⁹, *L. angustifolia*⁵⁹, *Bryocladia ericoides*⁵⁹, *Osmundaria colensoi*⁵⁹, *Laurencia thyrsoifera*⁵⁹, *Cladhymenia oblongifolia*³⁷ y *Bostrychia montagnei*⁵⁵ (Rhodomelaceae).

Si bien la proporción de unidades LAG/LG6S no es de importancia taxonómica, debido a que es una función estacional en la vida de las algas, sí es importante la presencia o ausencia de LAG y su precursora LG6S dentro del polisacárido. Stortz y Cerezo⁶⁶ propusieron un modelo de esquemas de sustitución presentes en galactanos de algas rojas representado por un prisma triangular cuyos vértices están determinados por el tipo de unidades de α -galactosa, enlazadas por la posición 4, presentes en el polisacárido (Fig. 5.10). Cada uno de los seis

vértices corresponde a una estructura extrema y están representados por: DAG, DG, DG6S, LAG, LG y LG6S. Dentro de este modelo, los polisacáridos de *G. confluens* –con contenido bajo de LAG y casi despreciable de G6S– se ubican muy cercanos al vértice correspondiente a los coralinanos y sobre el lado formado por el segmento LAG-LG.

Fig. 5.10. Modelo de prisma triangular según la estructura de las unidades de α -galactosa.



La utilidad de los polisacáridos de algas rojas como indicadores quimiotaxonómicos está directamente relacionada con la variabilidad limitada de la composición de la cadena central de estos polisacáridos (aún bajo extremos ambientales) y el tipo y la frecuencia de sus modificaciones, cuando tienen lugar. La introducción o remoción de grupos *O*-metilo como sustituyentes con el fin de cambiar las conformaciones de los polímeros y sus características físicas sin alterar la composición básica del polisacárido, en respuesta a un estímulo ambiental, es un aspecto básico de la bioquímica de estas macromoléculas. La capacidad de producir dichas modificaciones puede estar vinculada con características genéticas inducidas por el ambiente en las paredes celulares de algas rojas⁴³.

Se ha sugerido una relación entre la fuerza de los geles y el esquema de sustitución de los agarocoloides. La interrupción de las unidades disacarídicas repetitivas que conforman la cadena central de los agaroides por distintos sustituyentes podría interferir con cationes divalentes pequeños y uniones hidrógeno entre los polisacáridos de la pared, y también

alterarían el contenido de agua y la actividad de la pared celular. Estos cambios afectan a su vez las características de la matriz tridimensional formada durante la gelificación⁴³.

Reed⁶⁷ propuso que las células que poseen paredes lo suficientemente flexibles para acomodar ligeros cambios de volumen eran más tolerantes a cambios bruscos de salinidad evadiendo el daño causado por la separación entre membrana y pared celulares. Una disminución en la fuerza del gel de los polímeros de la pared, causada por sustitución elevada por grupos metilo, daría como resultado una pared más blanda. Esto puede representar una adaptación para evitar el daño celular. Inversamente, un alga sujeta a un descenso brusco de la salinidad está en riesgo a causa de un aumento de la presión de turgencia. En este caso, la respuesta más apropiada sería contar con una pared celular más rígida.

Adicionalmente, cambios en la metilación pueden afectar el grado de hidratación de la pared celular. La O-metilación puede excluir agua de la pared. En cambio, una disminución puede aumentar la hidratación, afectando la partición del agua del protoplasto y promoviendo el uso de la pared como elemento amortiguador de los cambios en el nivel de agua del protoplasto. De todas maneras, el grado de sulfatación es la propiedad química con mayor probabilidad de estar asociada a la retención de agua de estos polímeros. Otro aspecto a tener en cuenta es que estos polisacáridos complejos pueden actuar como protección contra patógenos que carezcan de sistemas enzimáticos capaces de degradar estas paredes celulares⁴³.

Es posible que la considerable diversidad de estructura y sustitución en los galactanos sea valiosa como característica taxonómica. Estas características pueden depender de la presencia o ausencia de una propiedad determinada, o bien de la medida en que dicha propiedad está presente en la estructura química del galactano. El primer factor puede resultar más relevante y Miller publicó un trabajo de revisión⁶⁸ aplicando la teoría de conjuntos, donde encontró evidencias razonables para apoyar la ausencia o presencia de relaciones estructurales a nivel de orden y, posiblemente, de familia taxonómicas. Es importante recalcar la lógica básica de esta teoría: podremos decir que si el género es X, entonces ocurrirá la sustitución Y, pero esto no implica que el esquema de sustitución Y requiera el género X. Sin embargo, la falta de número suficiente de datos hace que las conclusiones sean tentativas hasta ahora. Es en este contexto que es importante examinar los polisacáridos contenidos en un rango amplio de variedades de algas. Los polisacáridos extraídos del alga roja *Georgiella confluens* son muy interesantes a nivel estructural ya que es la primera vez que se encuentra un sistema de polisacáridos que reúnen dos características inusuales en galactanos de algas rojas: sulfatación

en la posición 3 de unidades de α -L-galactosa y sustitución con ramificaciones simples de xilosa en la posición 4 de β -D-galactosa.

5.5. BIBLIOGRAFÍA

- ¹Moe, R.; Silva, P.C. *Br. Phycol. J.* **1983**, *18*, 275-298.
- ²Ferrario, M.; Sar, E. (Cátedra de Sistemática de Plantas Celulares, Facultad de Ciencias Naturales y Museo, Universidad Nacional de La Plata), comunicación personal.
- ³Cases, M.R.; Cerezo, A.S.; Stortz, C.A. *Carbohydr. Res.* **1995**, *269*, 333-341.
- ⁴Errea, M.I.; Ciancia, M.; Matulewicz, M.C.; Cerezo, A.S. *Carbohydr. Res.* **1998**, *311*, 235-238.
- ⁵R.A. Gibbons. *Physico-Chemical Methods for the Determination of the Purity, Molecular Size and Shape of Glycoproteins*. Vol. 5, part A: *Glycoproteins. Their Composition, Structure and Function*. Editor: Gottschalk, A.; B.B.A. Library. 1972, Elsevier, Amsterdam, págs. 31-140.
- ⁶Lindberg, B. *Methods Enzymol.* **1972**, *28*, 178-195.
- ⁷Gerwig, G.J.; Kamerling, J.P.; Vliegthart, J.F.G. *Carbohydr. Res.* **1978**, *62*, 349-357.
- ⁸Leontin, K.; Lindberg, B.; Lönngrén, J. *Carbohydr. Res.* **1978**, *62*, 359-362.
- ⁹Peat, S. *Adv. Carbohydr. Chem.* **1946**, *2*, 37-77.
- ¹⁰Usov, A.I. *Food Hydrocolloids* **1992**, *6*, 9-23.
- ¹¹Nagasawa, K.; Inoue, Y. *Carbohydr. Res.* **1974**, *36*, 265-271.
- ¹²Nagasawa, K.; Inoue, Y.; Kamata, T. *Carbohydr. Res.* **1977**, *58*, 47-55.
- ¹³Usov, A.I.; Adamyants, K.S.; Miroshnikova, L.I.; Shaposhnikova, A.A.; Kochetkov, N.K. *Carbohydr. Res.* **1971**, *18*, 336-338.
- ¹⁴Miller, I.J. *Carbohydr. Res.* **1998**, *309*, 39-43.
- ¹⁵Takano, R.; Kanda, T.; Hayashi, K.; Yoshida, K.; Hara, S. *J. Carbohydr. Chem.* **1995**, *14*, 885-888.
- ¹⁶Flowers, H.M. *Carbohydr. Res.* **1975**, *39*, 245-251.
- ¹⁷Goldstein, I.J.; Hay, G.W.; Lewis, B.A.; Smith, F. *Methods Carbohydr. Chem.* **1965**, *5*, 361-370.
- ¹⁸Usov, A.I.; Bilan, M.I.; Shashkov, A.S. *Carbohydr. Res.* **1997**, *303*, 93-102.
- ¹⁹Stevenson, T.T.; Furneaux, R.H. *Carbohydr. Res.* **1991**, *210*, 277-298.
- ²⁰Aspinall, G.O. *The Polysaccharide. Vol. 1*. Editor: Aspinall, G.O. 1982, Academic Press, London, págs: 35-131.
- ²¹Perlin, A.S.; Casu, B.; Koch, H.J. *Can. J. Chem.* **1970**, *48*, 2596-2598.
- ²²Shashkov, A.S.; Usov, A.I.; Yarotsky, S.V. *Bioorg. Khim.* **1977**, *3*, 46-49.
- ²³Usov, A.I.; Yarotsky, S.V.; Shashkov, A.S. *Biopolym* **1980**, *19*, 977-990.

- ²⁴Honda, S.; Yuki, H.; Takiura, K. *Carbohydr. Res.* **1973**, *28*, 150-153.
- ²⁵Archbald, P.J.; Fenn, M.D.; Roy, A.B. *Carbohydr. Res.* **1981**, *93*, 177-190.
- ²⁶Ruiz Contreras, R.; Kamerling, J.P.; Breg, J.; Vliegthart, J.F.G. *Carbohydr. Res.* **1988**, *179*, 411-418.
- ²⁷Rochas, C.; Rinaudo, M.; Vincendon, M. *Biopolymers* **1980**, *19*, 2165-2175.
- ²⁸Greer, C.W.; Rochas, C.; Yaphe, W. *Bot. Mar.* **1985**, *28*, 9-14.
- ²⁹Usov, A.I. *Bot. Mar.* **1984**, *27*, 189-202.
- ³⁰Yarotsky, S.V.; Shashkov, A.S.; Usov, A.I. *Bioorg. Khim.* **1977**, *3*, 1135-1137.
- ³¹Bhattacharjee, S.S.; Yaphe, W.; Hamer, G.K. *Carbohydr. Res.* **1978**, *60*, C1-C3.
- ³²Usov, A.I.; Barbakadze, V.V.; Yarotsky, S.V.; Shashkov, A.S. *Bioorg. Khim.* **1978**, *4*, 1507-1512.
- ³³Rochas, C.; Potin, P.; Kloareg, B. *Carbohydr. Res.* **1994**, *253*, 69-77.
- ³⁴Lahaye, M.; Yaphe, W.; Viet, M.T.P.; Rochas, C. *Carbohydr. Res.* **1989**, *190*, 249-265.
- ³⁵Tako, M.; Higa, M.; Mcdoruma, K.; Nakasone, Y. *Bot. Mar.* **1999**, *42*, 513-517.
- ³⁶Usov, A.I.; Ivanova, E.G.; Shashkov, A.S. *Bot. Mar.* **1983**, *26*, 285-294.
- ³⁷Miller, I.J.; Blunt, J.W. *Bot. Mar.* **2000**, *43*, 263-271.
- ³⁸Falshaw, R.; Furneaux, R.H.; Pickering, T.D.; Stevenson, D.E. *Bot. Mar.* **1999**, *42*, 51-59.
- ³⁹Craigie, J.S.; Jurgens, A. *Carbohydr. Polym.* **1989**, *11*, 265-278.
- ⁴⁰Miller, I.J.; Blunt, J.W. *Bot. Mar.* **2002**, *45*, 1-8.
- ⁴¹Miller, I.J.; Falshaw, R.; Furneaux, R.H. *Hydrobiologia* **1996**, *326/327*, 505-509.
- ⁴²Miller, I.J. *Bot. Mar.* **2001**, *44*, 253-259.
- ⁴³Youngs, H.L.; Gretz, M.R.; West, J.A.; Sommerfeld, M.R. *Phycol. Res.* **1998**, *46*, 63-73.
- ⁴⁴Usov, A.I.; Elashvili, M.Ya. *Bot. Mar.* **1991**, *34*, 553-560.
- ⁴⁵Cases, M.R.; Stortz, C.A.; Cerezo, A.S. *Int. J. Biol. Macromol.* **1994**, *16*, 93-97.
- ⁴⁶Stortz, C.A.; Cases, M.R.; Cerezo, A.S. *Techniques in Glycobiology*. Editor: Townsend, R.R.; Hotchkiss, A.T.Jr. 1997, Marcel Decker, Inc., New York, págs. 567-593.
- ⁴⁷Takano, R.; Hayashi, J.; Hayashi, K.; Hara, S.; Hirase, S. *Bot. Mar.* **1996**, *39*, 95-102.
- ⁴⁸Falshaw, R.; Furneaux, R.H.; Stevenson, D.E. *Carbohydr. Res.* **1998**, *308*, 107-115.
- ⁴⁹Miller, I.J.; Blunt, J.W. *Bot. Mar.* **2000**, *43*, 251-261.
- ⁵⁰Doddrell, D.M.; Pegg, D.T.; Bendall, M.R. *J. Magn. Reson.* **1982**, *48*, 323-327.
- ⁵¹Miller, I.J.; Falshaw, R.; Furneaux, R.H. *Hydrobiologia* **1993**, *260/261*, 647-651.
- ⁵²Miller, I.J.; Blunt, J.W. *Bot. Mar.* **2000**, *43*, 239-250.
- ⁵³Santos, J.A.; Mulloy, B.; Mourão, P.A.S. *Eur. J. Biochem.* **1992**, *204*, 669-677.
- ⁵⁴Estévez, J.M.; Ciancia, M.; Cerezo, A.S. *Carbohydr. Res.* **2001**, *331*, 27-41.

- ⁵⁵Duarte, M.E.R.; Nosedá, M.D.; Cardoso, M.A.; Tulio, S.; Cerezo, A.S. *Carbohydr. Res.* **2002**, *337*, 1137-1144.
- ⁵⁶Usov, A.I.; Shashkov, A.S. *Bot. Mar.* **1985**, *28*, 367-373.
- ⁵⁷Bock, K.; Pedersen, C.; Pedersen, H. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **1984**, *42*, 193-225.
- ⁵⁸Falshaw, R.; Furneaux, R.H.; Miller, I.J. *Bot. Mar.* **1999**, *42*, 431-435.
- ⁵⁹Miller, I.J.; Falshaw, R.; Furneaux, R.H. *Bot. Mar.* **1993**, *36*, 203-208.
- ⁶⁰Hirase, S.K.; Watanabe, R.; Takano, R.; Tamura, J. *Abstracts of the XI International Seaweed Symposium*; Institute Oceanology, Academia Sinica: Qingdao, People's Republic of China, 1983; pág. 93
- ⁶¹Usov, A.I.; Bilan, M.I. *Russian J. Bioorg. Chem.* **1998**, *24*, 123-129. Traducción de *Bioorg. Khim.* **1998**, *24*, 139-146.
- ⁶²Miller, I.J.; Furneaux, R.H. *Bot. Mar.* **1996**, *39*, 141-147.
- ⁶³Miller, I.J. *Bot. Mar.* **2002**, *45*, 432-437.
- ⁶⁴Turvey, J.R.; Williams, E.L. *Carbohydr. Res.* **1976**, *49*, 419-425.
- ⁶⁵Furneaux, R.H.; Miller, I.J. *Bot. Mar.* **1986**, *29*, 3-10.
- ⁶⁶Stortz, C.A.; Cerezo, A.S. *Current Topics in Phytochemistry* **2000**, *4*, 121-134.
- ⁶⁷Reed, R.H. *Proc. Int. Seaweed Symp.* **1980**, *10*, 509-513.
- ⁶⁸Miller, I.J. *Recent Res. Devel. in Phytochem.* **1997**, *1*, 531-565.

PARTE IV

DESULFATACIÓN DE GALACTANOS SULFATADOS

CAPÍTULO 6

DESULFATACIÓN DE GALACTANOS SULFATADOS CON AGENTES SILILANTES. APLICACIÓN A CARRAGENANO KAPPA Y CARATERIZACIÓN DE LOS PRODUCTOS

6.1. INTRODUCCIÓN

El análisis estructural de galactanos de algas rojas requiere frecuentemente de la determinación de la posición de unión de los ésteres sulfato presentes en los polisacáridos. Esto se puede lograr por comparación entre un estudio por metilación del polisacárido nativo y un estudio por metilación del polisacárido desulfatado. La diferencia entre las posiciones sustituidas en uno y otro caso da la ubicación de los grupos sulfato. Por lo tanto, una determinación estructural rigurosa implica contar con un método que remueva los ésteres sulfato sin modificar el resto del polisacárido.

El presente Capítulo contiene una Introducción (Sección 6.1) donde se describen los antecedentes vinculados a: métodos de desulfatación aplicados a polisacáridos (6.1.1-6.1.4); carragenano beta (6.1.5); espectroscopía RMN de carragenanos de las familias kappa y beta (6.1.6-6.1.8).

En la Sección 6.2 se describen resultados concernientes a:

- i) el desarrollo de un nuevo método de desulfatación para polisacáridos de algas rojas y, en particular, su aplicación a carragenano kappa comercial (Sigma) (6.2.1);
- ii) la caracterización por espectroscopía RMN de carragenano beta —el producto de desulfatación obtenido a partir de carragenano kappa (6.2.2).

6.1.1. DESULFATACIÓN ÁCIDA

El primer método de desulfatación aplicado a polisacáridos fue utilizado por Kantor y Schubert¹ para condroitin sulfato, empleando cloruro de hidrógeno metanólico (0,06 M, 24 h a temperatura ambiente). Esta reacción es adecuada para polisacáridos cuyas características estructurales confieren cierta estabilidad a la unión glicosídica. Así el contenido de ácidos urónicos de condroitin sulfato dificulta la hidrólisis de las uniones, minimizando la despolimerización.

Dolan y Rees² desulfataron carragenano lambda, forzando las condiciones y el tiempo de reacción (35°C, 48 h). Registraron espectros infrarrojos en etapas intermedias de la reacción y confirmaron que las velocidades de eliminación del sulfato eran las mismas que se habían encontrado para monosacáridos: la desulfatación de la posición ecuatorial (C-2 y C-3 de galactosa) es más rápida que la del sulfato en posición axial (C-4 de galactosa) y en posición primaria. Sin embargo, el producto aislado, sin diálisis, presentaba despolimerización elevada.

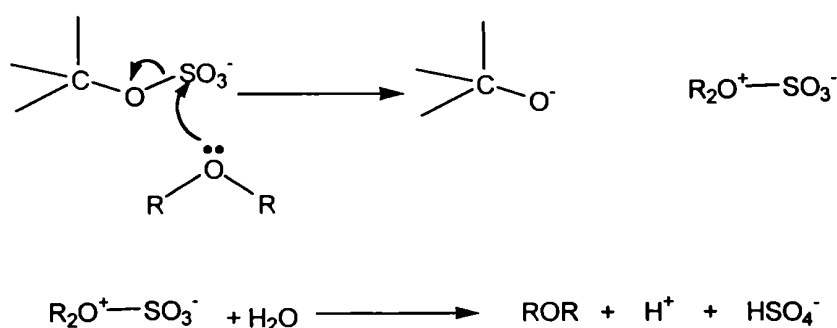
El método se utilizó sobre el polisacárido del alga roja *Phyllimena cornea*³, que contenía una alta proporción de galactosa metilada –un 25% de metilación total, fundamentalmente sobre C-2 y en cantidades menores en C-4 y C-6–, logrando desulfatación por tratamiento con cloruro de hidrógeno 0,15 M durante 48 horas. Se atribuyó al gran porcentaje de unidades metiladas la estabilización de las uniones glicosídicas y la menor degradación.

Los carragenanos kappa o polisacáridos similares son imposibles de desulfatar por esta técnica debido a la gran labilidad de la unión 3,6-anhidrogalactosídica.

6.1.2. DESULFATACIÓN SOLVOLÍTICA

Tomando como base la reversibilidad de la reacción del trióxido de azufre con monosacáridos en piridina⁴ y los datos previos sobre solvólisis de esteroides y sulfolípidos sulfatados, Usov y Kochetkov desarrollaron la desulfatación solvolítica. En el esquema 6.1 se indica el mecanismo propuesto para sulfatos de esteroides sometidos a solvólisis utilizando distintos éteres como solvente⁵. Este mecanismo requiere cantidades equimoleculares de agua. Los autores aclararon que si bien usaron solventes secos, no tomaron precauciones para excluir trazas de agua.

Esquema 6.1. Mecanismo propuesto para desulfatación solvolítica de esteroides sulfatados



El método solvolítico se aplicó a la desulfatación de monosacáridos sulfatados, utilizando como solventes dioxano, piridina, *N,N*-dimetilformamida (DMF) y DMSO^{6,7}. Los mejores resultados se obtuvieron con dioxano, DMSO dio resultados buenos también y con piridina la reacción procedió dificultosamente. No se perdieron grupos lábiles como acetilo, benzoílo o isopropilideno. El catión, la posición del sulfato y la naturaleza de los sustituyentes vecinos influenciarían el curso de la reacción. Las mejores condiciones para la eliminación del grupo sulfato en monosacáridos protegidos, solubles en dioxano, eran trabajar en este solvente y partir de la sal piridínica correspondiente. Agregando clorhidrato de piridina al medio de reacción, ya que a veces la sal de piridinio es difícil de obtener, la desulfatación resultaba activada y los rendimientos eran excelentes para cualquier catión inicial.

El procedimiento solvolítico fue aplicado al galactano sulfatado de *Laingia pacifica*⁶. El contenido de sulfato no varió cuando se trató la sal de sodio en DMSO, mientras que la sal de piridinio fue desulfatada –con despolimerización considerable– por tratamiento tanto en DMSO como en DMF (contenido final de sulfato: 1,4%). A fin de disminuir la degradación, la reacción se llevó a cabo en DMSO con 2% de piridina dando lugar al polisacárido desulfatado con alto rendimiento, menor despolimerización y manteniendo la composición del galactano original. Con fines comparativos, se realizó una desulfatación de la sal de sodio del mismo polisacárido con cloruro de hidrógeno 0,09 M en metanol, obteniéndose un rendimiento de sólo 40% y reduciendo el contenido de 3,6-anhidrogalaactosa a la tercera parte para lograr el mismo grado de eliminación de sulfato.

Los autores comprobaron que una segunda solvolisis no era efectiva a menos que el polisacárido fuera reconvertido a la sal de piridinio⁷. Por lo tanto, la presencia de sulfato residual luego del primer tratamiento estaba originada por conversión incompleta de la sal de sodio en la sal de piridinio mediante el intercambiador catiónico.

Posteriormente, los autores profundizaron el estudio de la reacción utilizando dextran sulfato (48% sulfato) en varias formas salinas y distintos solventes orgánicos⁸. Cuando trataron la sal de sodio en las condiciones usuales de metanólisis ácida, fueron necesarios cuatro tratamientos sucesivos para eliminar completamente el sulfato. La ruptura de los enlaces glicosídicos fue muy elevada. Estudiaron la influencia del reemplazo parcial de metanol por dioxano o DMSO. En todos los casos disminuyó la velocidad de la reacción, sin mejorar significativamente las desventajas encontradas con metanol puro.

Evaluaron además la influencia del catión (sodio, cetiltrimetilamonio, amonio y piridinio) al desulfatar el dextrano por calentamiento en DMSO con 2% de piridina. La sal de piridinio dio sin dudas el mejor resultado en términos de reducción del contenido de sulfato,

rendimiento y composición del producto. No era necesario convertir la sal sódica del polisacárido en otra forma catiónica, sólo era suficiente con agregar a la mezcla de reacción cloruro de piridinio en cantidades equimolares al polisacárido. La sal de cetiltrimetilamonio (cetavlon) fue inerte en ambos casos, probablemente debido a insolubilidad en DMSO.

Finalmente probaron con la sal de una amina terciaria que asegurara la solubilidad –o al menos su “hinchamiento” (swelling)– en dioxano. Las sales de trietilamonio y tributilamonio fueron ineficientes, mientras que la sal de trioctilamonio se desulfató por calentamiento con rendimiento excelente y degradación mínima.

Más tarde, se informó la desulfatación del 81% del carragenano obtenido de *Iridaea undulosa*⁹ –con 30,8% de sulfato y 16,5% de 3,6-anhidrogalactosa– por solvólisis de su sal de piridinio en DMSO conteniendo 2% de piridina. Luego de 9 h de calentamiento el rendimiento fue cercano al 80% sin que hubiera señales de degradación. Tiempos mayores de reacción produjeron despolimerización, sin cambios en la composición.

En 1977, Nagasawa, Inoue y Kamata¹⁰ informaron la desulfatación solvolítica de sales de piridinio de polisacáridos sulfatados por calentamiento en DMSO conteniendo 10% de agua o metanol. Probaron la reacción de heparina (como sal de piridinio) en DMSO con 1; 5 y 10% de agua o metanol a varias temperaturas y tiempos de reacción. La velocidad de desulfatación a 100°C aumentó ligeramente al aumentar el contenido de agua o metanol de 1 a 10%, siendo los mejores resultados correspondientes a metanol. Ocurría una desulfatación rápida debida a *N*-desulfatación de heparina, dentro de la primera hora de reacción, y luego se eliminaban los sustituyentes de las demás posiciones. Se aplicaron a otros glicosaminoglicanos (condroitin sulfato, dermatan sulfato, heparan sulfato) las condiciones encontradas para heparina. Estos compuestos fueron desulfatados más fácilmente que la heparina utilizando DMSO con 10% de agua a 80°C.

En 1990, Furneaux y Stevenson¹¹ publicaron una ligera modificación al procedimiento, al desulfatar un xilogalactano de *Chondria macrocarpa* calentando la sal de piridinio en DMSO-metanol-piridina (89:10:1) a 100°C durante 4 h. El polisacárido redujo el contenido de sulfato de 16 a 3% y mantuvo su composición en monosacáridos. El análisis por metilación reveló que las unidades de galactosa estaban sulfatadas en las posiciones 2 y 6 fundamentalmente.

La gran mayoría de los trabajos publicados sobre análisis estructural de galactanos sulfatados de algas rojas que utilizan la desulfatación como herramienta de análisis aplica el método solvolítico en alguna de las tres variantes enunciadas (DMSO-piridina, DMSO-H₂O/MeOH, DMSO-MeOH-piridina). El procedimiento suele dar buenos resultados pero requiere la elección de un catión y un solvente adecuados para cada polisacárido¹². En algunos

casos la reacción no es eficiente, como fuera informado por Stortz y Cerezo¹³ para polisacáridos aislados de *Iridaea undulosa* y como se viera para los galactanos sulfatados de *Georgiella confluens* (Cap. 5).

6.1.3. DESULFATACIÓN CON ÁCIDO PIROMELÍTICO

En un intento por lograr un método de desulfatación alternativo y que diera mejores resultados, Miller y Blunt desarrollaron en 1998¹⁴ un procedimiento que emplea ácido piromelítico (ácido bencen-1,2,4,5-tetracarboxílico, PMA). Utilizaron carragenano iota, carragenano lambda y porfirano como compuestos modelo. Los productos fueron estudiados por espectroscopía RMN ¹³C, a sabiendas que la presencia de cantidades pequeñas (< 5%) de otras unidades podía pasar desapercibida pero con la ventaja de analizar el producto de manera directa, sin recurrir a la formación y el aislamiento de derivados químicos que llevaran a posibles pérdidas selectivas de compuesto.

Así como la presencia de ácido cataliza la desulfatación, también promueve la despolimerización. Por eso se agregó piridina al DMSO usado como solvente, de modo que la única fuente de protones fuera el ion piridinio y se minimizaran los efectos de los contraiones aniónicos. Sin embargo, cuando la reacción se llevó a cabo con dioxano y ácido piromelítico el carragenano beta –producto totalmente desulfatado de carragenano iota– representó el 90% de los productos, y con ácido tricloroacético sólo un 20% del producto era carragenano beta. Probablemente, el efecto del contraión estuviera relacionado con un anión grande y con carga difusa. Eligieron al ácido piromelítico como el reactivo para el resto de los experimentos.

En la Tabla 6.1 se muestran los efectos de temperatura, tiempo y concentración de ácido en la desulfatación de carragenano iota. Como era de esperar, un aumento de la temperatura produjo mayor desulfatación y degradación del polímero: la reacción 7 tuvo solamente 10% de rendimiento. Metanol, agua y fluoruro inhibieron la reacción. La desulfatación del carragenano iota procedería en etapas, en la secuencia iota→kappa→beta. No encontraron mezclas de reacción que contuvieran los tres polisacáridos ni tampoco carragenano alfa (G-DAG2S). Si bien informaron la composición del producto, no aclararon cuáles fueron los rendimientos de estos ensayos.

Tabla 6.1. Desulfataciones con PMA sobre carragenano iota (2 g)

	PMA (g)	Temp. (°C)	Tiempo (h)	Reactivos (g)	Productos ^a (% β)
1	0,5	110	4	MeOH (5)	0
2	0,5	110	2	H ₂ O (4)	0
3	0,5	110	4	H ₂ O (4)	20
4	0,5	110	4		50
5	1,5	110	4		79
6	0,3	140	2		80
7	0,3	140	3		98
8	1,5	80	4	–	50
9	1,5	130	1,5		70
10	1,5	130	3	–	70

^aLos productos consistían en carragenanos kappa o beta solamente.

Al comparar las reacciones 5, 9 y 10 de la Tabla 6.1, los autores concluyeron que la reacción se detenía cuando llegaba a un cierto punto, presumiblemente, porque uno de los productos de reacción –quizá SO₃– inhibía la reacción. Entonces llevaron a cabo nuevos experimentos en condiciones anhidras en presencia de aceptores de SO₃, como As₂O₃ o Sb₂O₃. En estas condiciones se obtuvieron rendimientos elevados de carragenano beta (Tabla 6.2). El uso de fluoruro como aceptor de sulfato muestra que es posible remover el sulfato de la posición 2 selectivamente a partir de carragenano iota para obtener carragenano kappa. Si bien se logra el mismo resultado con agua o metanol, también hay mayor hidrólisis del polisacárido. El uso de fluoruro sobre carragenano lambda llevó a la eliminación del sulfato en 2 pero también del sustituyente en 6. Cuando el material de partida fue carragenano kappa, el 30% del éster sulfato fue removido en 3 h en presencia de fluoruro. Por lo tanto, la selectividad de esta desulfatación debe aplicarse con cautela.

Tabla 6.2. Desulfataciones con PMA de galactanos sulfatados^a

Sustrato	Aceptor	Tiempo (h)	Producto	Rend. ^b (%)
Carragenano iota	MeOH	1,25	Carragenano kappa	63
Carragenano iota	MeOH	2,5	Carragenano kappa	49
Carragenano iota	NaF	3	Carragenano kappa	82
Carragenano iota	As ₂ O ₃	3	Carragenano beta	67
Carragenano iota	Sb ₂ O ₃	2-4 ^c	Carragenano beta	68
Carragenano lambda	As ₂ O ₃	3	Lambda desulf. ^d	71
Carragenano lambda	NaF	3	Lambda desulf. ^e	75
Carragenano kappa	NaF	3	Ver texto	87
Porfirano	As ₂ O ₃	3	Porfirano desulf. ^f	~72 ^g

^aTodas las reacciones se hicieron partiendo de 2 g de material de partida; 1,5 g de PMA y proporciones constantes de DMSO y piridina, a 120°C.

^bBasado en valores teóricos de polímeros anhidros.

^cEn ambos casos dio el mismo rendimiento del mismo producto.

^dProducto libre de sulfato en las tres posiciones.

^eProducto libre de sulfato en posición ecuatorial, remoción del 85% del sulfato primario.

^fProducto libre de sulfato.

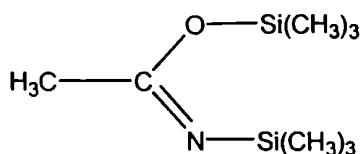
^gBasado en el valor estimado de sulfatación en el material inicial.

En conclusión, Miller y Blunt lograron el desarrollo de un método adecuado de desulfatación de polisacáridos por “disolución” en DMSO y calentamiento a 120°C durante 3 h, en presencia de ácido piromelítico, piridina y un aceptor de sulfato anfotérico y que no forme uniones hidrógeno, entre los cuales se prefieren As₂O₃ y Sb₂O₃. En este trabajo, los autores no hacen en ningún momento determinaciones adicionales de pesos moleculares ni de contenido de sulfato de los productos aislados.

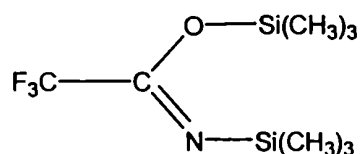
6.1.4. DESULFATACIÓN SELECTIVA CON AGENTES SILILANTES

En 1992, Takano *et al.*¹⁵ publicaron el primer trabajo de una serie vinculada a la desulfatación regioselectiva de posiciones primarias mediante agentes sililantes. Así, *N,O*-bis(trimetilsilil)acetamida (BTSA, 1) y *N,O*-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida (BTSTFA, 2) fueron efectivas en la desulfatación específica de sulfatos de alcoholes primarios en condiciones suaves –calentamiento de las sales de piridinio en piridina a 80°C. El método

también se aplicó con éxito a la eliminación de sulfato unido a la posición 6 de metil galactósidos. Obtuvieron entonces dodecanol, ciclohexilmetanol y metil galactósido desulfatados y trimetilsililados, mientras que no fue posible detectar la formación de ciclohexanol o galactósidos sililados a partir de ciclohexilsulfato o de metil galactopiranosido 2-, 3- ó 4-sulfato.



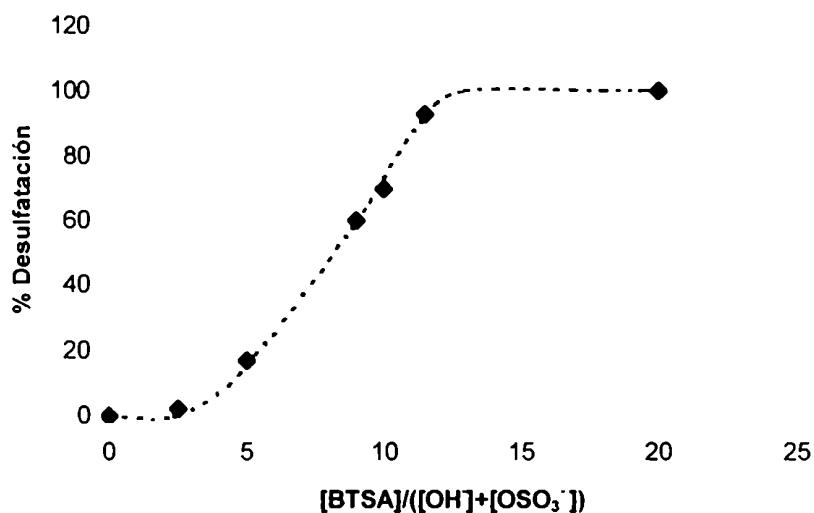
1



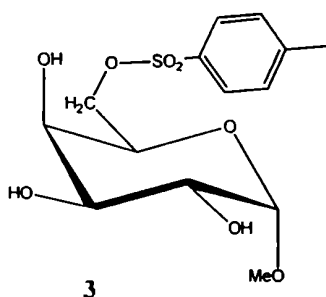
2

Investigaron más profundamente la reacción de metil α -D-galactopiranosido 6-sulfato con BTSA, estimando el grado de desulfatación para varias concentraciones de BTSA. Posiblemente la sililación de grupos hidroxilos consumió el reactivo sin dar desulfatación para las concentraciones de BTSA inferiores a cuatro equivalentes de hidroxilos, incluyendo los libres y los sulfatados. A 80°C durante 1 h, el requerimiento mínimo de BTSA para desulfatación completa fue una relación molar BTSA : (hidroxilos libres y sulfatados) de 15:1 (Fig. 6.1). Para una relación de 20 equivalentes de BTSA a 40, 60 y 80°C las curvas de desulfatación versus tiempo de reacción siguieron una ecuación cinética de pseudo-primer orden, de acuerdo con el exceso de BTSA respecto del monosacárido. Las constantes de velocidad estimadas fueron $5,5 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$; $1,2 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ y $3,0 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ para 40, 60 y 80°C respectivamente. Todas ellas resultaron mucho mayores que el valor de $9,3 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ informado para la hidrólisis de galactosa 6-sulfato con ácido clorhídrico 0,25 M (solución acuosa) a 100°C¹⁶.

Fig. 6.1. Efecto de la concentración de BTSA sobre la desulfatación de metil α -D-galactopiranosido 6-sulfato.



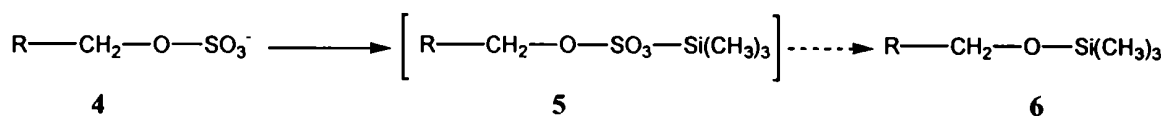
Otros intentos de desulfatación resultaron infructuosos cuando los reactivos fueron trimetilsililimidazol, iodotrimetilsilano y *N,O*-bis(trimetilsilil)carbamato. Por otra parte, el tratamiento de metil 6-*O*-*p*-tolilsulfonil- α -D-galactopiranosido **3** –compuesto análogo al galactósido sulfatado– no dio el metil galactósido desulfatado y trimetilsililado. Tampoco hubo desulfatación cuando se trató la sal de piridinio de metil galactósido 6-sulfato en ausencia de BTSA, en un experimento control.



Los autores hicieron ciertas consideraciones relativas al mecanismo posible de la reacción. Dado que BTSTFA es capaz de sililar el ion sulfato inorgánico para dar bis(trimetilsilil)sulfato¹⁷, sería probable que BTSTFA y BTSA fueran capaces de transformar al hemiéster **4** en el diéster **5** (Esquema 6.2).

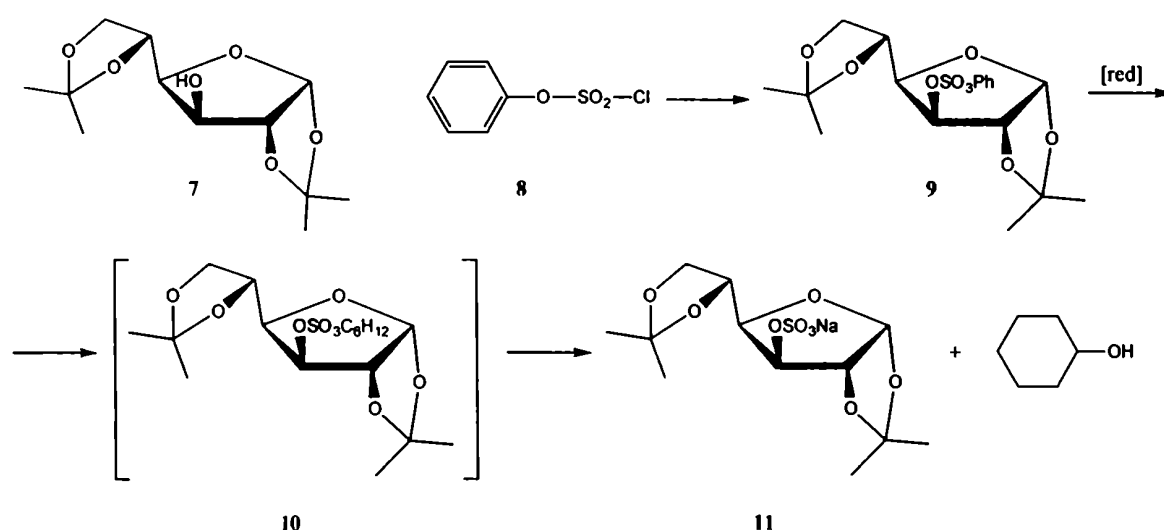
La formación de **5** parece ser necesaria para el progreso de la desulfatación porque BTSA no desesterificó el metil 6-*O*-*p*-tolilsulfonil- α -D-galactopiranosido **3**.

Esquema 6.2. Reacción de desulfatación-sililación



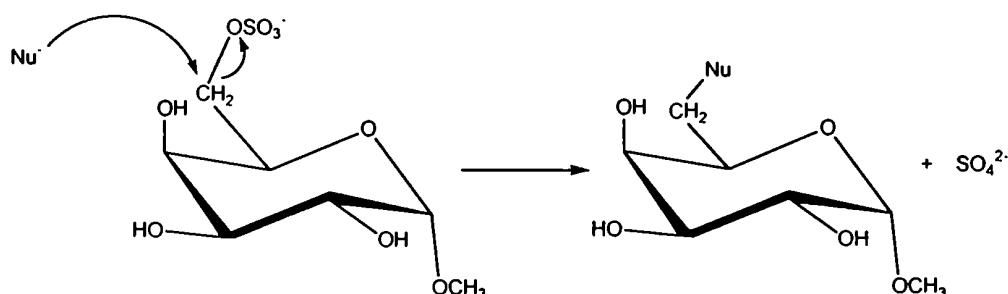
El mecanismo de la desulfatación con BTSA no puede ilustrarse por simple analogía como la reacción inversa a la sulfatación con arilsulfato¹⁸—basada en la esterificación y subsecuente fisión de alquilo del intermediario inestable diéster sulfato **10** (Esquema 6.3)— ya que trimetilsililimidazol y iodotrimetilsilano son compuestos fuertemente dadores de sililo que deberían convertir a **4** en **5**, pero no dieron **6**.

Esquema 6.3. Sulfatación con intermediario arilsulfato



Los autores sugieren que la desulfatación podría proceder a través de la formación de un intermediario que involucre a BTSA. Dado que la desulfatación procedió con BTSA aun luego de tratar con trimetilsililimidazol y iodotrimetilsilano, podría formarse otro intermediario a partir de **5** y BTSA que produjera el compuesto **6**. La especificidad hacia los sulfatos unidos a O-6 puede explicarse en términos de una configuración particular de este segundo intermediario que favorecería estéricamente una ruptura concertada de la unión del éster y la formación de un enlace sililéter. La selectividad también puede justificarse por otro camino que involucra una sustitución nucleofílica iniciada por el ataque de un anión sobre el átomo de carbono adyacente al éster sulfato (Esquema 6.4), que es análoga a la desulfatación alcalina de carbohidratos^{19,20}. Sin embargo, este esquema requiere una explicación para la formación de un nucleófilo tal como el anión sililoxilo.

Esquema 6.4. Desulfatación por sustitución nucleofílica



La sal de piridinio de metil α -D-galactósido 2,6-disulfato fue tratada con BTSA a 60°C, durante 2 h, a escala preparativa. La desililación del producto y su aislamiento de la mezcla de reacción en resinas de intercambio iónico dieron metil α -D-galactósido 2-sulfato en cantidades cuantitativas.

En 1993 publicaron la aplicación de la desulfatación específica en la posición 6 a polisacáridos²¹ mediante BTSA. Los polisacáridos utilizados fueron:

- i) funorano, extraído del alga roja *Gloiopeltis complanata*, con una estructura repetitiva G6S-LAG;
- ii) porfirano, extraído del alga roja *Porphyra yezoyensis*, con una estructura repetitiva G-LG6S;
- iii) dermatan sulfato, constituido básicamente por la díada repetitiva $\rightarrow 4)-\beta\text{-D-GlcpA}-(1\rightarrow 3)-\beta\text{-D-GlcpNAc4S}-(1\rightarrow$
- iv) condroitin sulfato, que contiene las díadas $\rightarrow 4)-\beta\text{-D-GlcpA}-(1\rightarrow 3)-\beta\text{-D-GlcpNAc6S}-(1\rightarrow$ y $\rightarrow 4)-\beta\text{-D-GlcpA}-(1\rightarrow 3)-\beta\text{-D-GlcpNAc4S}-(1\rightarrow$

Las reacciones se llevaron a cabo en piridina anhidra, a partir de las sales de piridinio correspondientes y con una relación molar BTSA : moles totales de grupos hidroxilo (incluyendo los sulfatados) 20:1. Al finalizar, el exceso de reactivo y los grupos trimetilsililoxilo fueron destruidos por agregado de agua.

Funorano resultó desulfatado completamente por tratamiento con BTSA en piridina y la mayoría de los grupos sulfato de porfirano fueron removidos (Tabla 6.3). En cambio, dermatan sulfato prácticamente no se modificó y menos del 50% de los sulfatos de condroitin sulfato resistieron la reacción con BTSA. La posición de los grupos sulfato para los cuatro polisacáridos se determinó por espectroscopía RMN ^{13}C antes y después del tratamiento. Una

cromatografía de filtración por geles indicó que la reacción con BTSA no afectó significativamente los pesos moleculares de dermatan sulfato y condroitin sulfato.

Tabla 6.3. Contenido de azufre (% en masa) de los polisacáridos antes y después de ser tratados con agentes sililantes

Polisacárido	Nativo	Con BTSA ^a	Sin BTSA ^a	Con TSIM ^{a,b}	Sin BTSA ^c
Funorano	6,2	0	6,0	6,1	4,0
Porfirano	4,4	1,1	4,3	4,2	
Dermatan sulfato	5,1	4,7	5,0	5,1	4,6
Condroitin sulfato	6,6	2,2	6,5	6,4	-

^aEn piridina a 60°C por 2 h.

^bTSIM: *N*-trimetilsililimidazol.

^cEn DMSO a 80°C por 5 h.

Las condiciones de reacción fueron similares a las empleadas en la desulfatación solvolítica, salvo por la presencia de BTSA. Cuando las sales de piridinio de los polisacáridos fueron tratadas en las mismas condiciones pero con *N*-trimetilsililimidazol (TSIM) en vez de BTSA, no hubo pérdida de sulfato (Tabla 6.3). Las sales de piridinio de un polisacárido sulfatado son poco solubles en piridina, por adición de TSIM los grupos hidroxilo serían sililados dando un derivado soluble en piridina, pero sin que ocurra desulfatación de ningún tipo (ni siquiera solvolítica). Es posible desulfatar a dermatan sulfato por calentamiento a 80°C durante 5 h en DMSO con algo de agua; sin embargo cuando el tratamiento se hizo en DMSO 5 h pero en presencia de BTSA tampoco hubo desulfatación. Por lo tanto, el agente sililante no colaboró en el proceso solvolítico sino que lo impidió eliminando la humedad residual del sistema. Los autores sugirieron que BTSA juega un rol particular en la desulfatación específica, que involucra un mecanismo desconocido pero que no es solvolítico. Además la piridina parece mejorar la efectividad de BTSA ya que la reacción de funorano con BTSA en DMSO fue mucho menos eficiente que en piridina.

En 1995 publicaron la evaluación de varios reactivos sililantes para la desulfatación de hidratos de carbono²². Hicieron reaccionar las sales de piridinio de metil α -D-galactósido 3- ó 6-sulfato con gran exceso de agente sililante en piridina a 40°C. Dado el exceso de reactivo, las reacciones fueron de pseudo-primer orden y las constantes de velocidad se estimaron por el grado de desulfatación logrado para cada compuesto ensayado.

Clasificaron a los agentes sililantes en tres grupos de acuerdo con su constante de desulfatación k_{sil} , respecto de la correspondiente a la reacción solvolítica k_{sol} (Tabla 6.4). Los reactivos del grupo A no producían desulfatación, los del grupo B aceleraban la desulfatación de la posición 6 pero eran ineficientes para la posición 3 y los del grupo C removían los grupos sulfato de manera no específica. Los reactivos del grupo A disminuyen la velocidad de desulfatación solvolítica presumiblemente por remover el agua residual del sistema. Los reactivos de los grupos B y C promoverían la desulfatación por un mecanismo distinto del solvolítico.

Aunque la eficiencia de los compuestos del grupo C es menor que la demostrada por los agentes selectivos, podrían ser reactivos potenciales para la desulfatación de hidroxilos primarios y secundarios.

Tabla 6.4. Relación de las constantes de velocidad de metil α -D-galactósido 3- y 6-sulfato con (k_{sil}) y sin (k_{sol} ^a) agente sililante

Grupo	Reactivo sililante	k_{sil}/k_{sol}	
		6-sulfato	3-sulfato
A	<i>N</i> -(trimetilsilil)imidazol	0	0
	1-(trimetilsilil)-1,2,4-triazol	0,6	0,2
	<i>N</i> -(trimetilsilil)acetamida	0,2	0,5
	3-(trimetilsilil)-2-oxazolidinona	0,9	0,2
	nonatrimetiltrisilazano	0	0,2
	<i>N,N</i> -dimetilaminotrimetilsilano	0,5	0
	hexametildisiloxano	0,5	0,1
	isopropenoxitrimetilsilano	0	0
	1-metoxi-3-(trimetilsililoxi)-1,3-butadieno	0,1	0,2
	1-(trimetilsilil)propino	0,7	0,1
	bis(trimetilsilil)acetileno	0,5	0
B	<i>N,O</i> -bis(trimetilsilil)acetamida	21,6	0
	<i>N</i> -metil- <i>N</i> -(trimetilsilil)acetamida	14,9	0
	<i>N</i> -metil- <i>N</i> -(trimetilsilil)trifluoroacetamida	36,4	0
	hexametildisilazano	1,2	0,4
	heptametildisilazano	4,5	0
	<i>N,N</i> -dietilaminotrimetilsilano	1,4	0
	1-metoxi-1-(trimetilsililoxi)-2-metil-1-propeno	1,1	0,2
C	trimetilsililazida	1,7	3,1
	trimetilsililisocianato	2,4	3,8
	bis(trimetilsilil)carbodiimida	2,1	7,8
	1-metoxi-2-(trimetilsililoxi)propano	2,1	3,1
	trimetiletoxisilano	2,1	4,2
	4-(trimetilsililoxi)-3-penten-2-ona	4,5	3,8
	acetato de trimetilsililo	1,5	3,8
	trifluoroacetato de trimetilsililo	2,3	2,0
	adipato de bis(trimetilsililo)	1,9	3,4
	clorotrimetilsilano	3,9	3,4

^aLos valores estimados para k_{sol} a 40°C para los sulfatos en las posiciones 6 y 3 fueron de $9,0 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ y $1,8 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ respectivamente.

6.1.5. CARRAGENANO BETA

El carragenano beta, de estructura disacarídica repetitiva G-DAG, se encontró algunas veces en la naturaleza como parte de carragenanos híbridos o bien de moléculas mezcladas, pero nunca como un polisacárido puro. A continuación se enumeran aquellos casos cuya estructura fue confirmada por espectroscopía RMN.

El primero en ser caracterizado por espectroscopía RMN (los datos espectroscópicos se detallan más adelante) fue el carragenano de *Eucheuma gelatinae*²³, que se identificó como un carragenano híbrido compuesto predominantemente por carragenano beta, con carragenanos kappa (G4S-DAG) y gamma (G-DG6S, precursor de beta) como componentes minoritarios. Los autores no informaron el contenido de sulfato de las muestras, sólo estimaron su ausencia o presencia por espectros IR.

El polisacárido de *Furcellaria fastigiata*²⁴, se parece al carragenano de *E. gelatinae* pues ambos poseen carragenanos kappa y beta. La diferencia entre ambos parece ser la organización de los componentes mayoritarios y minoritarios en la cadena central: en *E. gelatinae* estaban en bloques mientras que en *F. fastigiata* las díadas de beta y kappa aparecían mezcladas. Greer y Yaphe fueron los primeros en proponer al carragenano beta y a su precursor, denominado carragenano gamma, como constituyentes de la familia beta de estos polisacáridos de algas rojas (Sección 1.2.3.1).

Knutsen y Grasdalen²⁵ estudiaron los polisacáridos insolubles en solución de cetavlon de *Furcellaria lumbricalis*. Luego de ser sometidos a tratamiento alcalino, presentaron espectros RMN ¹³C con señales típicas de carragenanos kappa y beta en proporción aproximadamente equimolar. También detectaron señales minoritarias de carragenano gamma.

Los polisacáridos estudiados de *Tylotus obtusatus*, modificados previamente en medio alcalino, tienen estructuras correspondientes a carragenanos beta y kappa en relación molar aproximada 70:30²⁶.

Renn *et al.*²⁷ aislaron carragenano beta con contenido de sulfato menor a 0,85% a partir de extractos acuosos, sometidos a tratamiento alcalino previo, obtenidos de *Eucheuma gelatinae*, *Eucheuma speciosa* y *Endocladia muricatum*. Para ello, precipitaron los componentes con mayor contenido aniónico mediante una sal de amonio cuaternaria, separaron las fracciones que permanecían solubles (51,2% del material inicial) y las cromatografiaron en una columna de intercambio aniónico de DEAE-celulosa (60,8% rendimiento de la columna).

Los polisacáridos de la pared celular de *Melanema nodosum* están compuestos principalmente por carragenano kappa/iota, con algo de beta como componente minoritario²⁸.

El alga *Catenella nipae* contiene otro integrante de la familia beta: el carragenano alfa, cuya unidad repetitiva es G-DAG2S y fue informado por primera vez para muestras recolectadas en Birmania por Zablackis y Santos en 1986²⁹. Años más tarde, Liao *et al.*³⁰ detectaron carragenano iota como componente mayoritario de preparaciones de la misma especie pero obtenidas de ejemplares de Australia y Filipinas. Finalmente en 1996, Falshaw *et al.*³¹ reexaminaron las muestras de Birmania y estudiaron otras de Tailandia usando técnicas químicas y espectroscópicas modernas como hidrólisis reductiva parcial, metilación y espectroscopía IR y RMN monodimensional y bidimensional. Ambas muestras estaban constituidas por carragenanos alfa y iota, con la diferencia que la birmana tenía algo más de carragenano alfa y la tailandesa poseía proporciones minoritarias de beta y kappa.

En las secciones 6.1.6-6.1.8 se hacen referencia solamente a los datos de literatura sobre espectroscopía RMN vinculados a la familia beta y otros carragenanos relevantes para su estudio.

6.1.6. RMN ¹³C

Rochas *et al.*³² asignaron todas las señales registradas a temperaturas distintas de los espectros de di-, tetra- y octasacáridos de fórmula general (DAG-G4S)_n, obtenidos por hidrólisis enzimática de un carragenano kappa (Tablas 6.5 y 6.6).

Tabla 6.5. Desplazamientos químicos (ppm) del espectro RMN ¹³C de neocarrabiosa kappa (DP 1) a 30 y 90°C

Unidad	Temp (°C)	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6
G4Srα	30	91,95	66,85	74,9	74,6	69,2	61,1
	90	92,4	67,5	76,0	75,3	70,3	61,3
G4Srβ	30	96,15	70,2	78,05	73,45	74,15	61,0
	90	96,7	70,9	79,2	74,3	74,6	61,3
DAG	30	94,3	69,1	80,5	69,7	77,0	68,6
	90	95,2	70,3	80,9	70,3	77,5	69,1

Tabla 6.6. Desplazamientos químicos (ppm) del espectro RMN ¹³C correspondiente a las unidades internas de neocarraoctosa kappa (DP 4) a 30 y 80°C

Unidad	Temp (°C)	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6
G4S	30	102,0	69,0	78,0	73,4	74,3	60,8
	80	102,2	69,3	68,7	73,8	74,5	61,1
DAG	30	94,3	69,2	78,8	77,8	76,3	69,0
	80	94,9	69,7	78,9	78,0	76,2	69,2

Análogamente, Greer, Rochas y Yaphe³³ utilizaron oligosacáridos derivados de carragenano iota, como compuestos modelo para el análisis estructural de dicho polisacárido por RMN ¹³C a distintas temperaturas (Tabla 6.7). La temperatura de registro del espectro afectaba los valores de los desplazamientos químicos. Los efectos más notorios involucraban a los carbonos del enlace glicosídico (C-1 de G y de DAG, C-3 de G y C-4 de DAG). Estos resultados, junto con los correspondientes a oligosacáridos de carragenano kappa, demostraron un ligero cambio conformacional de los oligosacáridos relacionado con la temperatura.

Tabla 6.7. Desplazamientos químicos (ppm) del espectro RMN ¹³C correspondiente a las unidades internas de oligosacáridos (DP 3) y polisacárido iota a 30 y 80°C

Unidad	Temp (°C)	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6
G4S (DP 3)	30	102,56	69,49	77,32	72,32	75,13	61,62
G4S (DP 3)	80	102,29	69,46	77,15	72,26	74,95	61,40
G4S (polímero)	80	102,22	69,43	77,15	72,20	75,00	61,34
DAG2S (DP 3)	30	92,33	75,21	78,05	78,75	77,10	70,11
DAG2S (DP 3)	80	92,03	75,06	77,86	78,37	76,89	69,89
DAG2S (polímero)	80	92,11	74,86	77,85	78,34	76,89	69,85

En la Tabla 6.8 se indican las asignaciones informadas para las díadas componentes de los carragenanos de la familia beta y de carragenanos kappa y iota.

El espectro de carragenano kappa a 80°C en D₂O dio 11 señales³⁴, de las cuales una a 69,6 ppm era más ancha y se dividió al variar la composición del solvente (Tabla 6.8). El espectro era característico de una estructura regular disacarídica con 12 átomos de carbono distintos. Había dos señales a 73,8 y 61,1 ppm más intensas que las demás (al menos dos veces la altura normal de los picos), probablemente debido a diferencias en el tiempo de relajación de los carbonos correspondientes. El espectro de carragenano iota, registrado en las mismas

condiciones, también mostró diferencias en las alturas de C-4 y C-6 de la unidad G. Por lo tanto, este efecto era independiente de la presencia de otros grupos sulfato en la cadena. También era independiente de la naturaleza del contraión (Na^+ o K^+) y de la temperatura, en condiciones donde se mantenía la conformación al azar. Además era independiente del tiempo de adquisición y del campo, como se mostró en espectros registrados a 63; 22 y 15 MHz.

Tabla 6.8. Desplazamientos químicos (ppm) de las díadas presentes en carragenanos kappa, iota y los pertenecientes a la familia beta

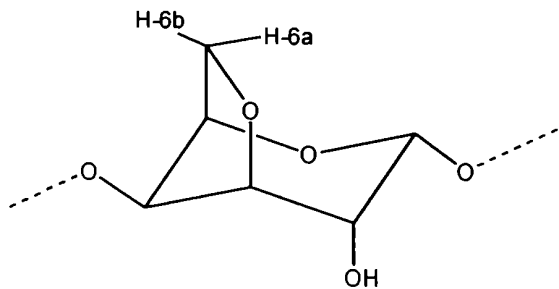
Carragenano	Unidad	Ref.	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6
κ (D_2O)	G4S	34 ^a	102,2	69,6	78,7	73,8	74,5	61,1
	DAG		94,9	69,8	78,9 ^b	78,0 ^b	76,5	69,55
κ (DMSO)	G4S	34 ^b	104,3	70,4	80,3	72,5	75,3	61,2
	DAG		96,8	71,4	81,0 ^b	79,4 ^b	77,3	69,9
	G4S	31 ^c	102,4	69,4	77,0	72,2	75,0	61,5
	DAG2S		92,2	75,2	77,9	78,5	77,3	69,9
β	G	35 ^d	102,5	69,5	80,4	66,4	75,3	61,3
	DAG		94,7	70,2	79,4	78,0	76,8	69,5
α	G	31 ^e	102,7	69,6	81,9	66,9	75,3	61,6
	DAG2S		94,7	75,4	78,1	78,3	77,1	70,0
α piruvilado	G4,6P	36 ^{f,g}	101,9	69,1	76,7	67,4	66,7	65,5
	DAG2S		91,4	75,2	77,7	78,3	77,1	69,9
α metilado	G6M	37 ^h	102,4	69,5	76,9	72,6	73,2	71,9
	DAG2S		92,1	75,1	78,0	78,6	77,3	69,8

^aEspectros registrados en D_2O , a 80°C; desplazamientos químicos relativos a HMDS externo.
^bEspectros registrados en $\text{DMSO}-d_6$, a 80°C; desplazamientos químicos relativos a HMDS externo.
^cEspectros registrados en D_2O , a 30°C; desplazamientos químicos relativos a DMSO (39,6 ppm).
^dEspectros registrados en D_2O , a 90°C; desplazamientos químicos relativos a DMSO (39,5 ppm).
^eEspectros registrados en D_2O , a 50°C; desplazamientos químicos relativos a DMSO (39,6 ppm).
^fEspectro registrado en D_2O a 80°C; desplazamientos químicos relativos a DMSO (39,6 ppm).
^gDesplazamientos químicos de metilo, acetal (configuración *R*) y carbonilo a 25,5; 101,6 y 175,7 ppm, respectivamente.
^hSeñal de metilo a 59,0 ppm.

Del carragenano gamma, precursor del beta, sólo se informaron los desplazamientos químicos de los carbonos diagnósticos C-1 (104,8 ppm) y C-4 (65,8 ppm) de la unidad G y también C-1 (96,3 ppm) y C-6 (68,3 ppm) de la unidad DG6S²³.

6.1.7. RMN ¹H

Los hidrógenos metilénicos de 3,6-anhidro-D-galactosa presentan desplazamientos químicos distintos y se denominan H-6a y H-6b según:



Los primeros estudios vinculados a carragenanos se realizaron con compuestos modelo. Izumi³⁸ asignó el espectro de metil 3,6-anhidro-α-D-galactopiranosido en D₂O (Tabla 6.9), donde había solapamiento parcial de las señales de H-2 y H-6b –deducido por comparación con el espectro del derivado acetilado 2,4-di-O-acetil-3,6-anhidro-α-D-galactopiranosido.

Tabla 6.9. Datos de RMN ¹H correspondientes a metil 3,6-anhidro-α-D-galactopiranosido^a

Desplazamientos químicos (ppm)							Constantes de acoplamiento (Hz)						
H-1	H-2	H-3	H-4	H-5	H-6a	H-6b	J _{1,2}	J _{2,3}	J _{3,4}	J _{4,5}	J _{5,6^a}	J _{5,6b}	J _{6a,6b}
5,15	5,99	5,63	5,51	5,59	5,78	5,95	2,8	5,8	<0,5	2,0	2,9	<0,5	10,8

^aEspectro registrado en D₂O, a 20°C; desplazamientos químicos relativos a DSS.

Ruiz Contreras *et al.*³⁹ estudiaron los espectros protónicos de las sales de sodio de metil α-D-galactopiranosidos monosulfatados (Tabla 6.10). La comparación con metil α-D-galactopiranosido mostró que el grupo sulfato desprotegía los protones vecinales y geminales. La sustitución en posiciones secundarias causó efectos α de 0,6-0,7 ppm, mientras que el sulfato primario produjo un efecto α de 0,4-0,5 ppm. Los efectos β variaron en 0,1-0,4 ppm según la orientación axial o ecuatorial del protón vecinal. Los valores de ³J_{H,H} en todos los

casos fueron similares, indicando que la sulfatación no producía distorsión significativa de la conformación 4C_1 ni cambios en las poblaciones de rotámeros alrededor del enlace C-5–C-6.

Tabla 6.10. Datos de RMN 1H correspondientes a metil α -D-galactopiranosido (Me α -D-Galp) y sus derivados monosulfatados^a

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

^aEspectros registrados en D₂O, a 27°C; desplazamientos químicos relativos a acetona (2,225 ppm).

Los acetales del ácido pirúvico se detectan fácilmente por la señal del grupo metilo en la región de $\sim 1,56$ ppm⁴⁰, muy lejos de otras características de los azúcares.

Lamba *et al.*⁴¹ llevaron a cabo un estudio sobre neocarrabiosa (disacárido DAG-G, Tabla 6.11). Algunas de las señales aparecían desdobladas, dando lugar a intensidades menores que un protón como consecuencia del equilibrio entre anómeros α y β . Los espectros medidos sobre muestras recién preparadas mostraron que predominaba el anómero β , pero el equilibrio se alcanzaba en menos de una hora.

Tabla 6.11. Asignación de los desplazamientos químicos y constantes de acoplamiento de neocarrabiosa^a

Unidad	Desplazamientos químicos (ppm)						
	H-1	H-2	H-3	H-4	H-5	H-6a	H-6b
DAG	5,102	4,095	4,413	4,538	4,461	4,081	4,236
G	4,655	3,626	3,880	4,170	3,711	3,811	3,772

Unidad	Constantes de acoplamiento (Hz)							
	J _{1,2}	J _{2,3}	J _{3,4}	J _{3,5}	J _{4,5}	J _{5,6a}	J _{5,6b}	J _{6a,6b}
DAG	2,5	5,5	-0,2 ^b	1,2	1,9	3,5	-0,2 ^b	-10,7
G	7,9	9,9	3,4		0,9	7,9	4,4	-11,6

^aEspectro registrado en D₂O, a 15°C; desplazamientos químicos relativos a acetona (2,225 ppm).

^bValores dentro del error experimental.

Rashid y Mackie⁴² sintetizaron metil carrabiósido (Me G-DAG) y determinaron los desplazamientos químicos de los protones junto con las constantes de acoplamiento correspondientes (Tabla 6.12).

Tabla 6.12. Asignación de los desplazamientos químicos y constantes de acoplamiento de metil carrabiósido^a

Unidad	Desplazamientos químicos (ppm)							
	H-1	H-2	H-3	H-4	H-5	H-6a	H-6b	OMe
Me DAG	4,846	4,042	4,525	4,550	4,660	3,975	4,20	3,525
G	4,552	3,520	3,652	3,924	3,716		3,750	

Unidad	Constantes de acoplamiento (Hz)						
	J _{1,2}	J _{2,3}	J _{3,4}	J _{4,5}	J _{5,6a}	J _{5,6b}	J _{6a,6b}
Me DAG	2,5	5,4	<0,5	1,9	3,0	<0,5	-10,9
G	7,6	10,0	3,5	<0,5			

^aEspectro registrado en D₂O; desplazamientos químicos relativos a acetona (2,225 ppm).

Knutsen *et al.*^{25,43} llevaron a cabo estudios de espectroscopía RMN ¹H aplicada a carragenanos de *Furcellaria lumbricalis* y oligosacáridos derivados. Determinaron por datos espectroscópicos que el galactano sulfatado poseía una cadena central compuesta por una estructura repetitiva G-DAG, donde el 50% de las unidades de β-D-galactosa estaban

sulfatadas en la posición 4. Los datos obtenidos por RMN ^{13}C de la muestra tratada con base indicaron que la relación de intensidades para los carbonos anoméricos de DAG en las díadas DAG-G4S y DAG-G era cercana a la unidad. El espectro protónico de furcellarano, denominación que recibe el polisacárido extraído de esta alga, luego de ser sometido a tratamiento alcalino presentaba señales de intensidades aproximadamente iguales a 5,09 y 5,11 ppm, que se asignaron a los protones anoméricos de la unidad DAG unida a G4S y a G respectivamente. La señal de H-4 de G4S fue atribuida a 4,81 ppm, mientras que no reconocieron la correspondiente a H-4 del residuo desulfatado. En el espectro de la muestra nativa, antes del tratamiento que promoviera su ciclación, vincularon el pico a 5,20 ppm y un hombro a 4,87 ppm a los protones anoméricos de la díada G4S-DG6S, precursora de G4S-DAG, y la señal a 5,3 ppm se relacionó con H-1 de DG6S en carragenano gamma (G-DG6S).

6.1.8. RMN bidimensional

En 1992, Knutsen y Grasdalen⁴⁴ publicaron un trabajo muy interesante sobre el uso de oligosacáridos de neocarrabiosa con diferentes longitudes y grados de sulfatación como compuestos modelo para espectroscopía RMN ^1H . Informaron la asignación de los espectros RMN a temperatura ambiente de varios oligosacáridos derivados de carragenanos (Tablas 6.13-6.16). Las asignaciones se hicieron en base a experimentos DQCOSY (double-quantum COSY) y de correlación ^1H - ^{13}C y por comparación con varios oligosacáridos sulfatados en C-4 del tipo neocarrabiosa informados por Rochas³².

Los residuos se nombran siguiendo las reglas de nomenclatura de la Sección 1.2.3; el núcleo en cuestión se indica con números. Se agrega la terminación “nr” para las unidades del extremo no reductor, mientras que las del extremo reductor se designan DAGr y $\text{G}\alpha,\beta$ (o $\text{G4S}\alpha,\beta$). Cuando se aprecian efectos del equilibrio α,β sobre los residuos DAG del extremo reductor, estos se indican como $\text{DAG}\alpha$ o $\text{DAG}\beta$ (por ejemplo, para el hexasacárido neocarrahexaosa 4¹,4³,4⁵-trisulfato: $\text{Anr-G4Snr-A-G4S-Ar-G4S}\alpha,\beta$). Cuando la identidad de los residuos vecinos en la cadena no produce un corrimiento apreciable para un protón determinado, se denomina R' al conjunto de unidades ubicadas hacia el extremo reductor y R a aquellas hacia el extremo no reductor.

Tabla 6.13. Desplazamientos químicos de neocarratetraosa 4¹,4³-disulfato (DAG-G4S-DAG-G4S)^a

Unidad	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6
G4S α	92,77	67,60	75,58	75,28	70,49	61,95
G4S β	96,94	70,97	78,65	74,19	74,97	61,84
G4S η r	102,84	69,78	78,52	74,15	75,15	61,64
DAG η r	95,00	69,89	81,28	70,44	77,79	69,45
DAG η r	95,00 (β) 94,94 (α)	69,96 (β) 70,10 (α)	79,56	78,83	77,02	69,78

^aEspectro registrado en D₂O, a 25°C.

Las señales de los protones anoméricos se usaron como puntos de entrada para el análisis del espectro COSY homonuclear. Las conectividades con los respectivos H-2 se observaron fácilmente. Las resonancias a campos mayores (~3,6 ppm) correspondían a H-2 de unidades G del extremo reductor en la forma β (Tabla 6.14). Para los residuos de galactosa unida por la posición 3, no se vieron las correlaciones entre H-4 α y H-5 α debido a las constantes de acoplamiento pequeñas. Debido a la superposición de los desplazamientos químicos de H-5 y H-6a,6b de las unidades G y G4S, no fue posible asignarlos en base al espectro COSY. Sin embargo, luego de comparar los espectros de los oligosacáridos tipo kappa, era razonable suponer que H-5 y H-6a,b pertenecientes al extremo reductor resonaran a campos ligeramente más altos que los mismos protones en el extremo no reductor y en los residuos G internos. En esta región, las señales de H-6b en R-G4S α (~3,71 ppm) estaban completamente separadas de los H-5 y H-6 restantes de unidades enlazadas por 3, mientras que la de H-6a de R-G4S α estaba separada sólo en parte de este grupo de señales. Las asignaciones de los demás H-6 y H-5 se hicieron a partir del espectro de correlación heteronuclear.

Para las unidades DAG todas las conectividades se vieron claramente, excepto aquellas entre H-3/H-4 y H-5/H-6b. Sin embargo, como cada uno de estos protones estaban acoplados con otros dos, fue posible asignarlos sin ambigüedades (Tabla 6.15).

El equilibrio α,β mostró influencia sobre las resonancias de algunos protones en las unidades DAG vecinas.

Tabla 6.14. Desplazamientos de RMN-¹H de las unidades G de oligosacáridos de neocarrabiosa^a

Protón	(DAG-G4S) ₃	(DAG-G4S) ₂	DAG-G4S	DAG-G-DAG-G4S	DAG-G
G1α	5,320	5,320	5,320	5,320	5,299
G1β	4,654	4,653	4,650	4,650	4,615
G1nr	4,658	4,656		4,618	
G1	4,660				
G2α	3,917	3,919	3,919	3,921	3,909
G2β	3,593	3,595	3,594	3,597	3,587
G2nr	3,596	3,601		3,603	
G2	3,599				
G3α	4,165	4,174	4,165	4,171	4,055
G3β	3,983	3,979	3,967	3,974	3,837
G3nr	4,003	4,000		3,866	
G3	4,013				
G4α	4,901	4,899	4,895	4,897	4,185
G4β	4,835	4,840	4,835	4,837	4,128
G4nr	4,855	4,855		4,139	
G4	4,855				
G5α	4,186	4,186	4,190	4,185	4,066
G5β	3,774	3,774	3,774	3,77	3,670
G5nr	3,817	3,817		3,72	
G5	3,817				
G6aα	3,790	3,79	3,793	3,79	3,726
G6aβ	3,783	3,785	3,780	3,78	3,772
G6anr	3,800	3,800		3,70-3,72	
G6a	3,800				
G6bα	3,731	3,731	3,731	3,73	3,723
G6bβ	3,783	3,783	3,783	3,78	3,733
G6bnr	3,800	3,800		3,70-3,72	
G6b	3,800				

^aEspectros registrados en D₂O, a 25°C; desplazamientos químicos relativos a DSS (acetona a 2,225 ppm).

Tabla 6.15. Desplazamientos de RMN-¹H de las unidades DAG de oligosacáridos de neocarrabiosa^a

Protón	(DAG-G4S) ₃	(DAG-G4S) ₂	DAG-G4S	DAG-G-DAG-G4S	DAG-G
DAG1α	5,120	5,121	5,102	5,119	5,080
DAG1β	5,103	5,104	5,084	5,101	5,062
DAG1nr	5,084	5,085		5,065	
DAG1	5,103				
DAG2α	4,142	4,144	4,106	4,143	4,055
DAG2β	4,142	4,144	4,106	4,143	4,055
DAG2nr	4,102	4,103		4,048	
DAG2	4,138				
DAG3α	4,535	4,535	4,357	4,529	4,372
DAG3β	4,535	4,535	4,357	4,529	4,372
DAG3nr	4,352	4,352		4,367	
DAG3	4,529				
DAG4α	4,607	4,606	4,478	4,592	4,500
DAG4β	4,607	4,606	4,478	4,592	4,500
DAG4nr	4,479	4,483		4,502	
DAG4	4,607				
DAG5α	4,650	4,648	4,408	4,667	4,423
DAG5β	4,650	4,648	4,408	4,667	4,423
DAG5nr	4,409	4,409		4,423	
DAG5	4,650				
DAG6aα	4,061	4,062	4,020	4,053	4,032
DAG6aβ	4,061	4,062	4,020	4,053	4,032
DAG6anr	4,020	4,021		4,032	
DAG6a	4,061				
DAG6bα	4,234	4,234	4,218	4,236	4,214
DAG6bβ	4,224	4,224	4,202	4,219	4,195
DAG6bnr	4,203	4,203		4,196	
DAG6b	4,224				

^aEspectros registrados en D₂O, a 25°C; desplazamientos químicos relativos a DSS (acetona a 2,225 ppm).

Tabla 6.16. Constantes de acoplamiento (Hz) para oligosacáridos del tipo neocarrabiosa 4-sulfato

G4S		DAG	
J _{1,2α}	3,9	J _{1,2α}	2,4
β/nr/int ^a	7,9		
J _{2,3α}	10,3	J _{2,3}	5,4
β/nr/int	9,9		
J _{3,4α}	3,1 (2,5) ^b	J _{3,4α}	p ^c
β/nr/int	3,3		
J _{4,5α}	p	J _{4,5}	1,9
β/nr/int	0,95		
J _{5,6αα}	4,4 (6,2)	J _{5,6α}	3,1
β/nr/int	8,2 ^d (7,7)		
J _{5,6βα}	8,1 (6,2)	J _{5,6b}	p
β/nr/int	4,3 ^d (4,4)		
J _{6α,6βα}	-11,9 (nm) ^e	J _{6α,6b}	-10,6
β/nr/int	-12,0 ^d (11,6)		

^aUnidades G4S internas.
^bLas constantes de acoplamiento medidas para neocarrabiosa aparecen entre paréntesis.
^cDemasiado pequeña para ser medida.
^dTomado de Ref. 45.
^eNo medida debido a desplazamientos químicos semejantes.

Las constantes de acoplamiento (Tabla 6.16) para DAG resultaron J_{6α,6b} -10,6 Hz y J_{5,6α} 3,1 Hz mientras que J_{5,6b} era muy pequeña para ser medida. En la literatura se habían informado valores cercanos a estos para derivados de 3,6-anhidrogalactosa^{38,41}.

Es de interés especial el análisis de los espectros del tetrasacárido parcialmente desulfatado y de neocarrabiosa, por su vinculación con los resultados de este trabajo de Tesis. La remoción del sulfato en la posición 4 de la unidad de galactosa, para dar DAG-G-DAG-G4S o DAG-G, produjo un desplazamiento de las resonancias de H-1 en DAGr y DAGnr de 0,02 ppm hacia campos mayores (Tabla 6.15). Se encontraron diferencias similares en los espectros RMN ¹H de carragenanos extraídos de *Furcellaria lumbricalis*^{25,43}, *Eucheuma gelatinae* y *Endocladia muricata* (resultados citados como no publicados en ese momento ni hallados en búsqueda bibliográfica posterior), correspondientes a carragenanos kappa sub-sulfatados. La mayor diferencia causada por el reemplazo de G4S por G se vio en la

resonancia de H-2 de la unidad DAG vecina hacia el extremo no reductor: había un desplazamiento de $\sim 0,05$ ppm hacia campos mayores. Se encontraron corrimientos similares entre sí en los desplazamientos químicos de H-3, H-4 y H-5 de DAG en las secuencias de DAGnr-G4S-R' con respecto a DAGnr-G-R', en la región 4,35-4,5 ppm. Los datos para los dos pares de tetra- y disacáridos mostraron que H-6a y H-6b, en posiciones fijas debido al anillo 3,6-anhidro, se veían afectados de manera diferente por la presencia de un grupo 4-sulfato. Para H-6a y H-6b tanto de DAGnr-G-R' como de DAGr-G α/β , la sustitución por sulfatación en 4 causaba un pequeño desplazamiento hacia campos menores de $\sim 0,007$ ppm para H-6b y uno hacia campos mayores de $\sim 0,012$ ppm para H-6a.

En el oligosacárido DAGnr-Gnr-DAGr-G4S α/β , las señales de H-1 y H-2 de DAGr estaban en la misma posición que las correspondientes a los mismos protones en el tetrasacárido y el hexasacárido tipo kappa puros. Esto demostró que la desulfatación del residuo de galactosa no afectaba significativamente las resonancias de los protones más distantes en la unidad DAG más cercana hacia el extremo reductor. Sí se apreciaron diferencias en H-3, H-4 y H-5 debido a la proximidad con O-4 en el residuo vecino.

Los desplazamientos químicos de los protones del extremo reductor (R-G4S) en oligosacáridos distintos fueron similares y casi no variaron con el DP (Tabla 6.14). Las resonancias de los anómeros β en general tuvieron los mismos valores, o muy parecidos, a los de las unidades G4Snr o G4S internas en oligo- o polisacáridos.

La remoción del grupo 4-sulfato afectaba a los protones del mismo anillo de manera diferente, al comparar con los análogos sulfatados, siendo el mayor efecto en H-4 ($\sim 0,7$ ppm) (Tabla 6.14). Al mismo tiempo, el valor de $J_{3,4}$ para el anómero α se reducía de 3,1 Hz (G4S) a 2,5 Hz (G). La introducción de sulfatación en C-4 desplazó las resonancias de H-1 de ambos anómeros G4Sr hacia campos menores (0,02 ppm, para α ; 0,035 ppm, para β), comparando con los protones anoméricos del extremo reductor de neocarrabiosa.

Recientemente, Yu *et al.*⁴⁶ llevaron a cabo un estudio de oligosacáridos derivados de carragenano kappa. En particular, aislaron un pentasacárido, un heptasacárido y un undecasacárido de estructura G4S-(DAG-G4S)_n (n = 2; 3; 5) mediante hidrólisis ácida suave de carragenano kappa de *Kappaphycus striatum* y posterior cromatografía de intercambio aniónico de alta resolución. Analizaron sus estructuras por espectrometría de masa ESI y espectroscopía RMN ¹H y ¹³C. Informaron desplazamientos químicos de protones y carbonos coincidentes con los publicados por Knutsen en 1992 y sólo aportaron datos nuevos sobre los residuos G4Snr (Tablas 6.16 y 6.17).

Tabla 6.17. Desplazamientos químicos (ppm) de RMN ¹H de G4Snr en oligosacáridos de carragenano kappa^a

G4Snr en:	H-1	H-2	H-3	H-4	H-5	H-6 ^a ,6b
pentasacárido	4,60	3,49	3,78	4,65	3,67-3,88	3,67-3,88
heptasacárido	4,52	3,42	3,60-3,80	4,56	3,60-3,80	3,60-3,80
undecasacárido	4,49	3,41	3,60-3,78	4,57	3,60-3,78	3,60-3,78

^aEspectros registrados en D₂O, a 25°C; desplazamientos químicos relativos a DOH (4,76 ppm).

El espectro HMQC ¹H-¹³C permitió asignar los carbonos en base a las asignaciones de los protones. En la Tabla 6.18 se indican las señales de RMN ¹³C informadas para la unidad G4Snr del pentasacárido G4S-(DAG-G4S)₂. No se detectaron picos a 66,4 ppm correspondientes a C-4 de G, por lo que el espectro HMQC confirmó que todas las unidades de β-D-galactosa estaban sulfatadas en la posición 4 en estos oligosacáridos. Si bien los datos informados en este trabajo fueron coincidentes con los publicados por Knutsen 1992, presentaban un desplazamiento constante hacia campos menores de 2 ppm.

Tabla 6.18. Desplazamientos químicos (ppm) de RMN ¹³C de G4Snr en el pentasacárido derivado de carragenano kappa^a

Unidad	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6
G4Snr	105.0		76.0	79.2	74.3	63.8

^aEspectro registrado en D₂O, a 25°C; desplazamientos químicos relativos a HOD (4,76 ppm).

El estudio por espectroscopía RMN ¹³C y ¹H llevado a cabo por Falshaw *et al.*³¹ en 1996 sobre polisacáridos de *Catenella nipa* también es interesante. Mediante experimentos COSY y TOCSY ¹³C ¹H de segmentos de los polisacáridos en estudio y también de carragenano iota (como compuesto modelo) pudieron:

- i) verificar en forma independiente la asignación de RMN ¹³C y ¹H de carragenano iota (comparando con los datos de Usov y Shashkov³⁵);
- ii) identificar por primera vez las señales características de ¹H y ¹³C de carragenano alfa.

Por RMN ¹³C no detectaron los componentes minoritarios de carragenanos beta y kappa en las muestras, que sí vieron por RMN ¹H en aquella originaria de Tailandia. Esto se debe en parte a la sensibilidad relativamente pobre de la técnica para los núcleos ¹³C y en parte a que los desplazamientos químicos de los carbonos anoméricos correspondientes a estos polisacáridos son muy similares a los de los constituyentes mayoritarios, alfa y iota.

Para evitar al máximo el uso de argumentos basados en analogías de desplazamientos químicos, los autores realizaron experimentos RMN 2D COSY ^1H - ^1H y ^{13}C - ^1H (HETCOR). Para ello usaron muestras sometidas a despolimerización por oxidación con periodato, reducción con borohidruro de sodio e hidrólisis ácida suave. Así obtuvieron fragmentos de viscosidad y peso molecular reducidos.

La asignación de los espectros RMN ^{13}C y ^1H obtenidos para segmentos de carragenano iota se realizaron en forma independiente, a partir de los espectros 2D aplicando solamente:

- i) el conocimiento de valores típicos de constantes de acoplamiento ^1H - ^1H en residuos de β -galactopiranosido y 3,6-anhidrogallactopiranosido (según Welti⁴⁵) para poder predecir la ausencia de ciertas correlaciones ^1H - ^1H ;
- ii) datos de experimentos DEPT para identificar las dos resonancias correspondientes a metilenos;
- iii) analogías entre desplazamientos químicos para diferenciar las señales de carbonos anoméricos y metilénicos como pertenecientes a ιG ó ιDAG (unidades G4S ó DAG2S de carragenano iota), a fin de contar con puntos de entrada para el análisis de los espectros 2D.

A modo de ejemplo se comenta la metodología aplicada para asignar algunos residuos.

Unidad ιG . Suponiendo que 102,4 ppm era el desplazamiento químico de C-1 (Tabla 6.8), luego los desplazamientos de H-1-H-4 y C-1-C-4 se identificaban rápidamente. La constante de acoplamiento entre H-4 y H-5 es muy baja en β -D-gallactopiranosidos, por eso no se observó la correlación $\iota\text{G}4,5$. Esta situación también fue hallada en oligosacáridos de neocarratetraosa kappa⁴⁴ y en β -gallactósidos en general^{47,48}. Por otra parte, si 61,4 ppm era la señal de C-6, entonces los picos de H-6a, H-6b y H-5 se ubicaban juntos en un multiplete centrado a 3,84 ppm. Los desplazamientos químicos se parecían lo suficiente como para que no existieran correlaciones distinguibles de la diagonal. Teniendo ubicado a H-5, determinaron C-5.

Unidad ιDAG . Si 92,2 ppm era atribuido a C-1 (Tabla 6.8), entonces quedaban asignados H-1 y H-2 sin ambigüedades (Tabla 6.19). La señal de H-2 estaba a 4,67 ppm como parte de una señal compleja en el rango 4,65-4,70 ppm correspondiente a cuatro protones. Las constantes de acoplamiento H-3-H-4 y H-5-H-6b son muy pequeñas en 3,6-anhidrogallactopiranosidos por lo cual no se esperarían correlaciones intensas entre estos protones^{45,49}. Entonces distinguieron a H-3 por la correlación intensa que debía corresponder a $\iota\text{DAG}2,3$ más que a $\iota\text{DAG}3,4$, a partir de esto se encontró a C-3. Por el otro extremo del

residuo, si la señal a 69,9 ppm –correspondiente a metileno según un experimento DEPT– era C-6, entonces se podían identificar H-6a, H-6b, H-5 y C-5. Sin embargo, como los desplazamientos químicos de H-2 y H-5 de esta unidad eran muy similares, no se pudieron identificar inequívocamente por el espectro COSY ^1H - ^{13}C . Se registró un espectro TOCSY ^{13}C - ^1H núcleos de carbonos e hidrógenos vecinos (correlaciona más intensamente los átomos de H-x y C-x, unidos entre sí, y además se ve una correlación menor entre H-x/C-x y H-[x+1]/C-[x+1]). En este experimento se conectó DAG1 (92,2/5,28 ppm) con DAG2, y a su vez DAG2 correlacionaba fuertemente con DAG3 (77,9/4,85). Entonces, DAG2 se asignó a 75,2/4,67 ppm. Además la posición de DAG5 quedaba confirmada por su conexión con DAG6a y DAG6b, resultando DAG5 igual a 77,3/4,67 ppm. El pico remanente en 78,5/4,69 ppm se asignó a DAG4. Aunque el desplazamiento químico de H-4 era algo mayor que los de H-2 y H-5, no se resolvieron en la región compleja del espectro COSY ^1H - ^1H . Como las resonancias de H-4 y H-5 eran muy cercanas entre sí, no había una correlación DAG4,5 discernible de la diagonal.

Segmentos alfa/iota. Para los segmentos alfa y iota de *C. nipae* tailandesa se aplicó la misma metodología que la utilizada en los segmentos de carragenano iota comercial. Los espectros COSY ^1H - ^1H y ^{13}C - ^1H se registraron a 50°C para desplazar el pico de agua residual a una zona libre de señales de interés.

En este punto los autores se cuestionaron si la yuxtaposición de una unidad disacarídica de alfa y una de iota carragenano darían las resonancias características en el espectro RMN 2D de un carragenano alfa/iota. Dadas las bandas relativamente anchas encontradas, pensaron que sólo hacía falta considerar la influencia de los vecinos más próximos. En ambos tipos de polisacáridos las unidades G estaban rodeadas por DAG2S. Sólo diferían en la presencia o ausencia de un grupo sulfato directamente unido en la posición 4 y se podían identificar simplemente como ιG y αG respectivamente. Sus espectros deberían ser independientes de la distribución relativa de diadas alfa y iota.

Tabla 6.19. Asignaciones de los desplazamientos químicos (ppm) de los espectros RMN ¹H de carragenanos^a

carragenano		Ref.	H-1	H-2	H-3	H-4	H-5	H-6b	H-6a
κ	G4S	45 ^b	4,611	3,595	3,952	4,814	3,769	3,805	3,785
	DAG		5,091	4,125	4,505	4,625 ^c	4,605 ^c	4,187	4,045
	G4S	31 ^d	4,65	3,61	4,02	4,91	3,81	3,82	
	DAG2S		5,28	4,67	4,85	4,69	4,67	4,26	4,09
α	G	31 ^e	4,61	3,62	3,82	4,10	3,65	~3,8	
	DAG2S		5,22	4,61	4,73	4,65	4,67	4,21	4,09
	G4S	31 ^e	4,65	3,62	4,00	4,89	3,78	3,80	
	DAG2S		5,28	4,67	4,83	4,67	4,66	4,27	4,09
β	G	31 ^e							
	DAG		5,04	4,06	4,52				
α piruvilado	G4,6P	36 ^f	4,61	3,71	3,91	4,49	3,59	4,06	3,97
	DAG2S		5,48	4,70	4,83	4,65	4,67	4,36	4,13
λ desulfatado	DG	50 ^g	5,29	3,85	3,95	4,22	4,16	3,78	
	G		4,40	3,78	3,75	4,12	3,73	3,78	

^aLos núcleos cuyos desplazamientos químicos no fueron asignados tienen las celdas en blanco.

^bEspectro registrado en D₂O, a 80°C.

^cDeberían invertirse según ref. 44.

^dPolisacárido comercial (Sigma). Espectro adquirido a 40°C en D₂O; desplazamientos químicos relativos a DMSO (2,70 ppm).

^eEspectro adquirido a 50°C en D₂O; desplazamientos químicos relativos a DMSO (2,70 ppm).

^fEspectro registrado en D₂O, a 80°C; desplazamientos químicos relativos a DMSO (2,71 ppm). Señal de metilo a 1,45 ppm.

^gEspectro registrado en D₂O, a 60°C; desplazamientos químicos relativos a ácido trimetil-sililpropiónico (0 ppm).

La situación de los residuos DAG2S era más compleja, ya que un residuo de DAG2S podía estar rodeado de G ó G4S en cuatro combinaciones distintas, a saber: (i) G4S-DAG2S-G4S; (ii) G-DAG2S-G4S; (iii) G4S-DAG2S-G; (iv) G-DAG2S-G. Knutsen y Grasdalen⁴⁴ habían demostrado en estudios de oligosacáridos de neocarrabiosa kappa/beta (con anchos de línea mucho menores) que la sulfatación en 4 de un residuo de β-D-galactosa tenía un efecto mucho

mayor sobre el residuo de 3,6-anhidrogalactosa que estaba hacia el extremo terminal no reductor del oligosacárido (Tabla 6.15). A pesar de no haber datos de RMN ^{13}C equivalentes y que la situación podía ser distinta en un carragenano alfa/iota, los autores propusieron que las resonancias de ^1H y ^{13}C en unidades DAG2S serían afectadas de la misma manera en carragenanos alfa/iota por el residuo adyacente de β -D-galactosa que estuviera hacia el extremo terminal reductor. Así, las unidades DAG2S en las secuencias (i) y (ii) darían señales características de carragenano iota y las secuencias (iii) y (iv) tendrían señales de carragenano alfa. En conclusión, sería difícil de detectar diferencias en los espectros de RMN entre muestras conteniendo díadas alfa y iota adyacentes y muestras con secuencias alfa y iota contiguas.

Chiovitti *et al.*³⁶ estudiaron y asignaron las señales de RMN ^1H de galactanos del género *Callophycus* que poseían la unidad repetitiva disacarídica 4',6'-O-(1-carboxietiliden) carrabiosa 2-sulfato (G4,6P-DAG2S) y cantidades menores de la unidad repetitiva de carragenano alfa (carrabiosa 2-sulfato, G-DAG2S). Primero asignaron los espectros RMN ^{13}C y luego atribuyeron las resonancias correspondientes a los protones por experimentos heteronucleares HMQC y HMQC-TOCSY (Tabla 6.19).

Farias *et al.*⁵⁰ analizaron la estructura de un galactano sulfatado de *Botryocladia occidentalis* cuya cadena central estaba compuesta por la estructura repetitiva G-DG, con un esquema de sulfatación variable. Por experimentos TOCSY, COSY y HMQC del polisacárido nativo y desulfatado determinaron que un tercio de las unidades de α -D-galactosa correspondían a DG2S3S y otro tercio a DG2S. La asignación completa de las señales protónicas de la díada G-DG figuran en la Tabla 6.19. Con respecto a las unidades DG2S y DG2S3S sólo informaron las resonancias de H-1–H-3: 5,27; 4,59; 4,05 ppm para DG2S y 5,62; 4,73; 4,58 ppm para DG2S3S.

Para minimizar el solapamiento de ciertas resonancias en los espectros de los hidratos de carbono con el agua residual, la temperatura del experimento se debe fijar en un valor apropiado. A temperatura ambiente, el pico del agua aparece en la región de H-4 de G4S (~4,8 ppm) mientras que a temperaturas superiores se desplaza hacia 4,2 ppm. Una aproximación alternativa puede ser irradiar selectivamente el pico del agua mediante una técnica de presaturación o aplicando una secuencia doble de pulsos, teniendo en cuenta el tiempo de relajación relativamente prolongado para moléculas pequeñas como el agua. Sin embargo, tales técnicas pueden influenciar las áreas de resonancias vecinas. El corrimiento de los desplazamientos químicos inducido por la temperatura puede ocurrir aun en oligosacáridos

chicos. En general, los efectos son mayores para los protones unidos a átomos de carbono involucrados en uniones glicosídicas, menores para los protones unidos a los carbonos vecinos y muy pequeños para los más distantes. A 25°C se obtiene una información estructural más detallada que a 90°C y hay mayor coalescencia de resonancias a temperaturas elevadas⁵¹.

6.2. RESULTADOS

6.2.1. APLICACIÓN A POLISACÁRIDOS SULFATADOS DE ALGAS

En vista de los antecedentes bibliográficos de las secciones 6.1.1-6.1.4, en este trabajo de Tesis se desarrolló un método de desulfatación adecuado para los galactanos sulfatados de *Georgiella confluens* y para carragenano kappa comercial (Sigma). En la sección 5.2.2 del Capítulo 5 (Tabla 5.9) se indicó que numerosos intentos de desulfatación solvolítica llevados a cabo sobre G2' resultaron infructuosos. Por eso se decidió intentar el uso de clorotrimetilsilano como reactivo no selectivo para la desulfatación de estos galactanos. En la Tabla 6.4 se ve que 4-(trimetilsililo)-3-penten-2-ona y clorotrimetilsilano (CTMS) son los dos reactivos del grupo C que presentan menores diferencias entre las constantes de velocidad correspondientes a las posiciones 3 y 6, y a la vez tienen los valores más altos. El clorotrimetilsilano era más fácilmente asequible, por eso fue el compuesto elegido para los ensayos.

Las condiciones experimentales de Takano *et al.*²² para los monosacáridos monosulfatados eran: 100 µg de metil galactósido 3- ó 6-sulfato en 100 µl de piridina, con 50 µg de metil glucopiranosido como estándar interno, sobre los cuales se agregaban 40 µl de CMTS. Esto es equivalente a relaciones molares de sulfato:CTMS de 1:926 y de hidroxilo (libres y sulfatados, incluyendo al estándar interno):CTMS de 1:138, en una solución de carbohidrato al 0,1% en piridina. A fin de contar con valores aplicados a polisacáridos, se calcularon las proporciones utilizadas en la desulfatación selectiva de porfirano y funorano con BTSA²¹: las relaciones molares de sulfato:BTSA eran de 1:60 (porfirano) ó 1:100 (funorano) correspondientes a relaciones de hidroxilo (libres y sulfatados):BTSA de 1:20, en una solución de polisacárido al 1% en piridina. Las condiciones iniciales para CP, la muestra utilizada en los ensayos preliminares, fueron elegidas de modo de tener una alta proporción de CTMS y una solución concentrada de ambos reactivos, pensando en las constantes de velocidad menores registradas para este reactivo con respecto a BTSA. Se comenzó con una

relación molar sulfato:CTMS de 1:90 y una solución de polisacárido al 1% (p/v) en piridina, logrando solamente 8% de desulfatación (Tabla 5.10). Luego se hizo un ensayo en condiciones extremas de concentración de CTMS (1:470) y tiempo de reacción (calentando a 100°C durante 11 h y luego enfriando de 100 a 40°C en un período de 16 h) que dio 52% de desulfatación y 57% de rendimiento. A fin de minimizar la degradación, el tiempo se redujo a 8 h y los productos mejoraron en rendimiento y porcentaje de desulfatación. Se mantuvo la concentración de polisacárido en piridina y la relación molar sulfato:CTMS varió entre 1:380-470, calentando a 100°C durante 8 horas. Los polisacáridos fueron recuperados por agregado de agua a la mezcla, de modo de destruir el exceso de CTMS y revertir los hidroxilos trimetilsililados a su forma libre, seguido de diálisis contra agua, soluciones de cloruro de sodio –para asegurar un intercambio efectivo de las sales de piridinio remanentes a la forma sódica– y agua. Los rendimientos variaron alrededor de 60-85%, acompañados de porcentajes de desulfatación de 60-64%. Las composiciones de los polisacáridos desulfatados fueron muy similares a los compuestos de partida y los pesos moleculares promedio (determinados por dosaje de extremos reductores) se redujeron solamente 4-6 veces (Tabla 5.3).

Este método de desulfatación, seguido de análisis por alquilación, permitió completar el estudio estructural de los galactanos sulfatados complejos de *G. confluens* cuyas características inusuales hubieran sido imposibles de elucidar por otros medios. Teniendo en cuenta que estas muestras poseían grupos sulfato secundarios, tanto en posiciones axiales (en unidades G4S) como en ecuatoriales (en unidades LG3S), queda demostrada la aplicabilidad de la reacción a ambos tipos de ésteres en presencia de unidades lábiles de xilosa y 3,6-anhidro-2-*O*-metilgalactosa.

La misma técnica fue aplicada con posterioridad en nuestro laboratorio a otros polisacáridos. Uno de ellos corresponde a un galactofucano extraído del alga parda *Adenocystis utricularis*⁵², cuya desulfatación no se había logrado por solvólisis ni siquiera por tratamiento con cloruro de hidrógeno en metanol. Un tratamiento en dos etapas sucesivas con CTMS en piridina permitió obtener los polisacáridos (21-24% SO₃Na inicial) con reducciones en el contenido de sulfato superiores al 65%, manteniendo la composición original en monosacáridos. El análisis estructural completo de los galactofucanos permitió determinar que contenían unidades de α -L-fucopiranososa 4-sulfato, fucofuranosa 2-sulfato y D-galactopiranososa 4-sulfato.

También fueron desulfatados polisacáridos del alga roja *Pterocladia capillacea*, donde se puso en evidencia la presencia inesperada de unidades α -D-galactosa 3-sulfato (DG3S) en muestras aisladas de un alga productora de agarosa (G-LAG) por excelencia⁵³.

Como parte de este trabajo de Tesis, la reacción fue ensayada además en carragenano kappa comercial (carragenano tipo III, de *Eucheuma cottonii*, Sigma) a fin de analizar la desulfatación en un polisacárido con el contenido máximo de unidades de 3,6-anhidrogalactosa y buscar las mejores condiciones de reacción. El producto de desulfatación aislado fue carragenano beta, cuya caracterización por RMN 1D (¹H, ¹³C) y RMN 2D (¹H-¹H, ¹H-¹³C) se describe en la Sección 6.2.2.

Tabla 6.20. Desulfataciones con CTMS aplicadas sobre carragenano kappa

muestra	Relación molar sulfato : CTMS	Temp. (°C)	Tiempo (h)	Relación molar G4S : G C-1 DAG ^a
0	carragenano nativo	–	–	97 : 3
1	0 (blanco)	100	3	92 : 8
2	0 (blanco)	100	8	90 : 10
3	1:200	100	3	8 : 92
4	1:100	100	3	10 : 90
5	1: 50	100	3	13 : 87
6	1: 10	100	3	14 : 86
7	1: 4	100	3	79 : 21
8	1: 1	100	3	78 : 22
9	1:10	60	3	75 : 25
10	1:200	100	6	4 : 96
11	1:100	100	6	10 : 90
12	1: 50	100	6	11 : 89
13	1:200	100	8	4 : 96

^aDeterminada por relación de intensidades en RMN ¹³C a partir de las señales de C-1 de DAG en DAG-G4S y DAG-G.

Con el objetivo de encontrar las mejores condiciones de reacción, se realizaron ensayos sobre la sal de piridinio de carragenano kappa variando condiciones de temperatura, relación molar sulfato:CTMS y tiempo (Tabla 6.20). La composición y el contenido de sulfato de los productos obtenidos se analizaron por espectroscopía RMN ¹³C operando a 125 MHz a temperatura ambiente, excepto en el caso de carragenano kappa nativo y la reacción 13 cuyos espectros fueron registrados además a 75 MHz y 80°C. Las únicas señales detectadas derivaban de díadas de carragenano kappa y/o beta. Todos los espectros tenían relaciones de áreas 1:1 para los picos correspondientes a los carbonos anoméricos de unidades de α-D-

galactosa enlazadas por la posición 4 y β -D-galactosa enlazadas por 3, indicando que se mantenía la composición básica de la cadena central. En ningún caso se observaron señales indicativas de extremos terminales, ni siquiera luego de 8 horas de calentamiento. Como se indicó en la sección 5.2.4.1, a partir de relaciones de intensidades de carbonos similares es posible tener una estimación cuantitativa de las proporciones reales de los diferentes residuos en un polisacárido. Por eso, la relación de intensidades de C-1 de DAG en carragenano kappa y beta –a 95,0 y 94,7 ppm respectivamente– permitió obtener una cuantificación de la relación molar G4S : G, que luego se comparó con los resultados obtenidos por métodos cromatográficos.

Paralelamente, se hicieron determinaciones analíticas del contenido de sulfato y del peso molecular promedio (Tabla 6.21).

La Tabla 6.20 contiene sólo datos de RMN ^{13}C , análogamente al análisis de los resultados publicados por Miller y Blunt¹³ (ver sección 6.1.3).

Las relaciones molares G4S : G de los dos controles (reacciones 1 y 2), realizados calentando la sal de piridinio en piridina a 100°C durante 3 y 8 h (en condiciones de solvólisis), indican que el contenido de sulfato permanece prácticamente inalterado en ambos casos.

Los espectros de los productos 3 y 4 presentan señales prácticamente indistinguibles del ruido de la línea de base en las zonas correspondientes a unidades de díadas sulfatadas, por lo que se podría inferir desulfatación completa para estas condiciones en un examen preliminar. Para las reacciones 5 y 6 las señales son apenas perceptibles y también se diría a primera vista que la remoción de sulfato fue total.

Las reacciones 7 y 8 presentan predominio de unidades G4S-DAG, aunque las señales de G-DAG se ven claramente, indicando desulfatación parcial. Lo mismo ocurre al usar una relación sulfato : CTMS 1:10 –que a 100°C era la menor concentración de CTMS con predominio de unidades desulfatadas– a 60°C durante 3 h (reacción 9).

Los espectros correspondientes a 10-13 también dieron señales de G4S-DAG indistinguibles del ruido de la línea de base, mostrando desulfatación completa como era de esperar para reacciones que con tiempos más cortos habían dado sólo díadas G-DAG (comparar con 3-5).

El análisis de los espectros de RMN ^{13}C indica entonces que utilizando una relación molar mínima sulfato : CTMS 1:10, calentando 3 h a 100°C, se logra desulfatación completa de carragenano kappa, sin reducir apreciablemente el peso molecular del polímero (ya que no se observan extremos terminales en los espectros).

Tabla 6.21. Pesos moleculares y contenidos de sulfato de los productos de desulfatación

Prod.	Relación molar sulfato : CTMS	Temp. (°C)	Tpo. (h)	R ^a (%)	PM ^b	Sulfato ^c (% SO ₃ Na)	Relación molar G4S : G	
							CI-DC ^d	C-I DAG ^e
0	carragenano nativo	–	–	–	82800	20,0 ^f	99 : 1	97 : 3
1	0 (blanco)	100	3	91	4900	18,1	84 : 16	92 : 8
2	0 (blanco)	100	8	66	2700	18,8	89 : 11	90 : 10
3	1 : 200	100	3	65	1500	5,5	18 : 82	8 : 92
4	1:100	100	3	82	2600	7,0	24 : 76	10 : 90
5	1:50	100	3	96	6700	5,0	16 : 84	13 : 87
6	1:10	100	3	90	7300	12,1	47 : 53	14 : 86
7	1:4	100	3	40	2800	16,3	72 : 28	79 : 21
8	1:1	100	3	46	2200	16,5	73 : 27	78 : 22
9	1:10	60	3	68	2800	16,5	73 : 27	75 : 25
12	1:50	100	6	87	5800	5,3	18 : 82	11 : 89
13	1:200	100	8	64	n.d.	6,9 ^g	24 : 76	4 : 96

^aPorcentaje de recuperación: corresponde al porcentaje de hidratos de carbono, corregido por el contenido de sulfato (medido por cromatografía iónica) en el material de partida y en el producto

según:
$$R = \frac{m_r \times (1 - S_r)}{m_o \times (1 - S_o)} \times 100$$

donde *m_r*: masa recuperada; *S_r*: contenido de sulfato del producto recuperado; *m_o*: masa inicial; *S_o*: contenido de sulfato inicial del polisacárido.

^bDeterminado por cuantificación de extremos reductores.

^cDeterminado por cromatografía iónica con detección conductimétrica (CIDC).

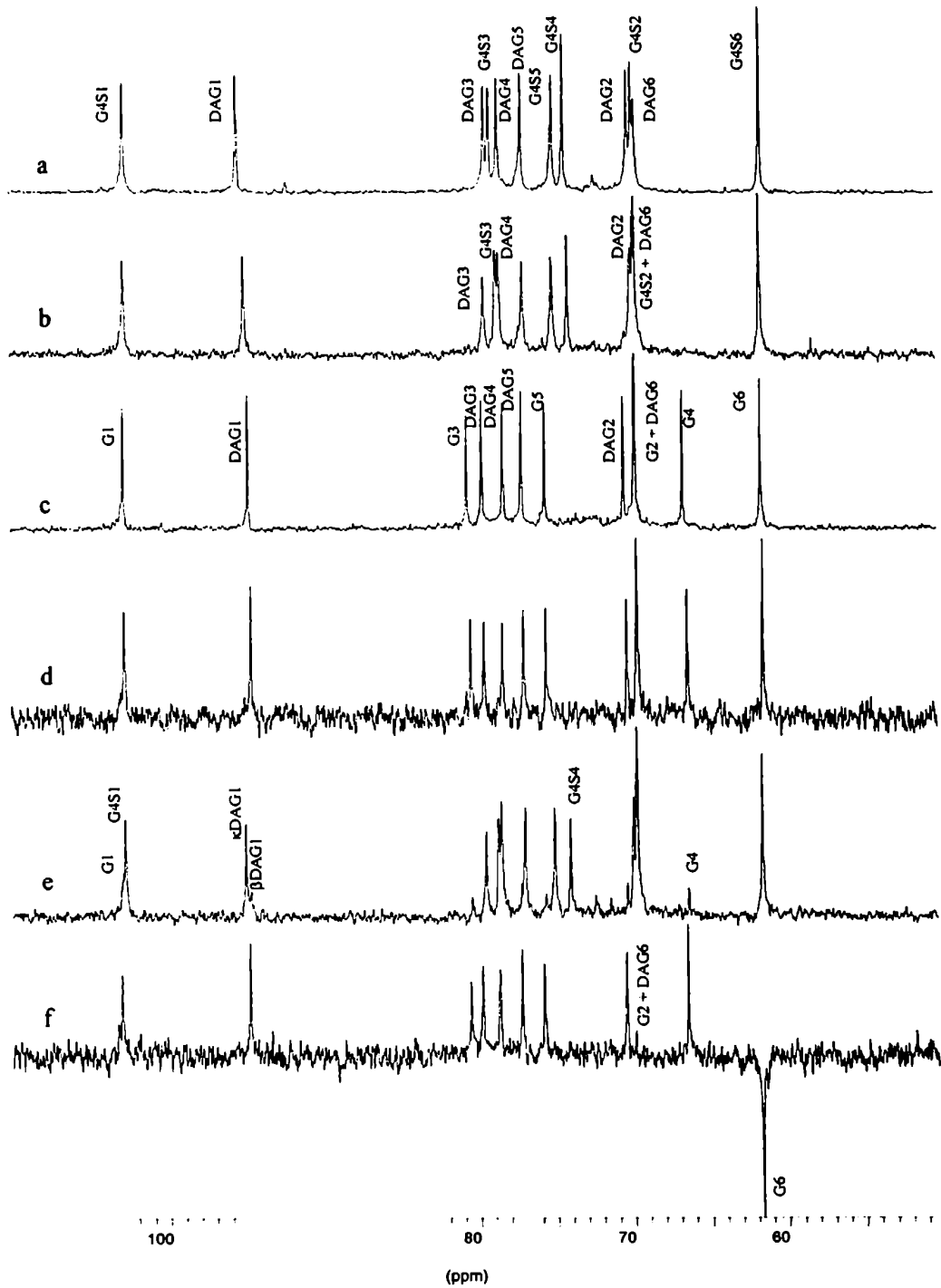
^dDeterminada a partir del contenido de sulfato medido por cromatografía iónica.

^eDeterminada por relación de intensidades en RMN ¹³C a partir de las señales de C-1 de DAG.

^fContenido de sulfato determinado por método turbidimétrico: 22,2% SO₃Na.

^gContenido de sulfato determinado por método turbidimétrico: 11,3% SO₃Na.

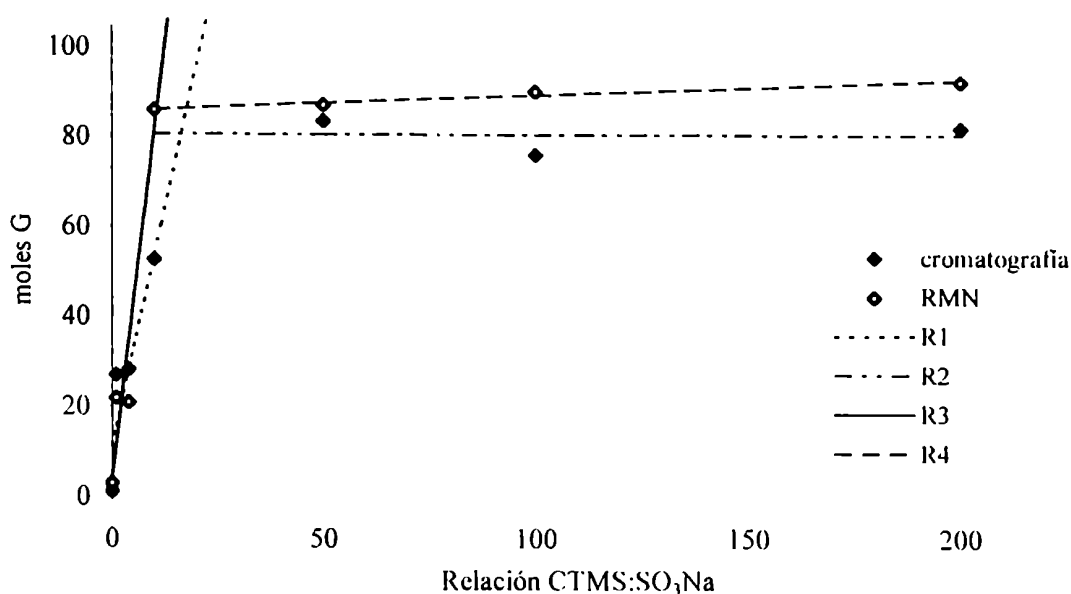
Fig. 6.2. Espectros RMN ^{13}C de carragenano kappa (a) y los productos de reacción 2 (b), 13 (c), 5 (d), 7 (e). Espectro DEPT 135 del producto 5 (f). Los espectros (a) y (c) fueron registrados a 80°C y 75MHz; los espectros (b), (d)-(f) fueron registrados a 25°C y 125 MHz



Un análisis más profundo de los productos 1-9, 12 y 13 (Tabla 6.21), mediante estimación del peso molecular promedio (determinado por cuantificación de extremos reductores del polisacárido⁵⁴) y determinación del contenido de sulfato, reveló que:

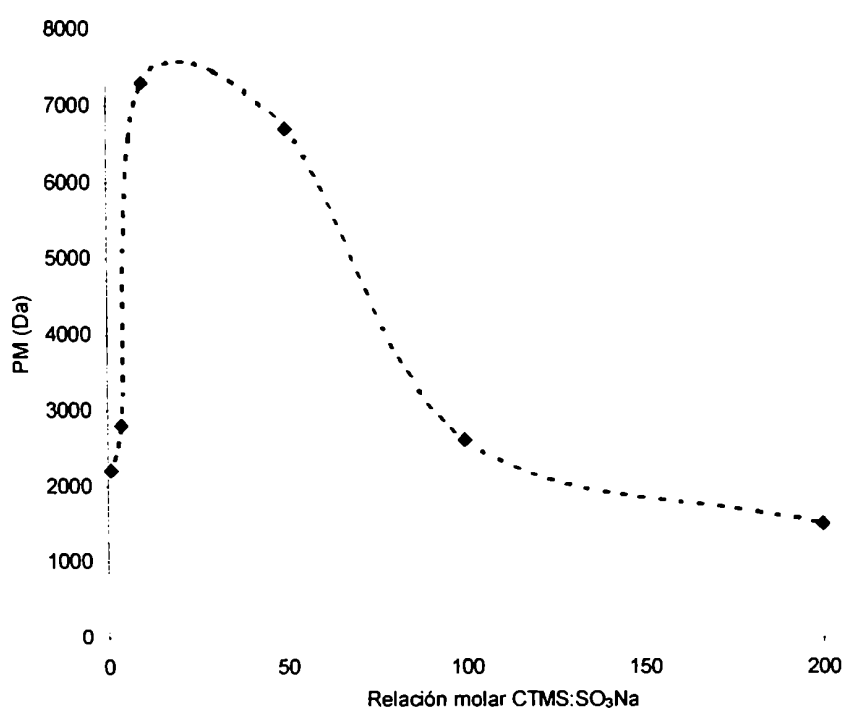
- i) En ninguna de las muestras se llegó a desulfatación total. El menor contenido de sulfato se logró en las muestras 3, 5 y 12, tratadas 3-6 h con un exceso de 50-200 equivalentes de CTMS a 100°C. Un tratamiento más prolongado (8 h) en las mismas condiciones que el producto 3 dio lugar al producto 13, con 6,9% SO_3Na . Por lo tanto la reacción llegó a completarse al cabo de 3 h.
- ii) El contenido de sulfato se determinó además por el método turbidimétrico de Dogdson y Price⁵⁵ para el polisacárido inicial (22,2% SO_3Na) y para el producto de la reacción 13 (11,3% SO_3Na). Estos valores son mayores a los obtenidos por cromatografía iónica debido a la presencia de otros componentes en la muestra que contribuyen a la turbidez. En cambio el método cromatográfico detecta cada uno de los aniones por separado, en particular se cuantifica el ion SO_4^{2-} .
- iii) Los valores derivados de espectroscopía RMN ^{13}C ilustran el riesgo de subestimar los componentes minoritarios con respecto al contenido determinado por cromatografía iónica. Los contenidos de unidades G son menores que los cromatográficos en las muestras con relaciones de CTMS:sulfato 1:1 y 4:1 (8 y 7 respectivamente), y son mayores en los productos con relaciones 10:1, 50:1, 100:1 y 200:1. Esto era previsible, ya que la determinación cromatográfica es mucho más exacta y precisa.

Fig. 6.3. Curva de desulfatación de carragenano kappa a 100°C durante 3 horas (ensayos 3-8)



- iv) Al graficar desulfatación (como cantidad de unidades G) versus relación molar CTMS:sulfato se obtienen dos gráficos según se trate de los valores de cromatografía iónica o de RMN (Fig. 6.3). Los datos cromatográficos se pueden representar por dos rectas (R1 y R2), donde R2 corresponde al nivel de saturación con CTMS que se alcanza para una relación 1:16. Los datos espectroscópicos se aproximan mediante otro par de rectas (R3 y R4), donde R4 corresponde al nivel de saturación con CTMS a partir de la relación 1:11. Estos resultados son coincidentes con el nivel de saturación 1:15 de la Fig. 6.1. Por otra parte, la concordancia en el método espectroscópico y el cromatográfico demuestra la validez de una aproximación cuantitativa mediante espectroscopía RMN ^{13}C , siempre y cuando se recuerde que es solamente una estimación con un error de ~5-10% dependiendo de la relación señal:ruido del espectro.
- v) El peso molecular de ambas muestras control (1 y 2) se reduce notablemente. A las 3 h de calentamiento en piridina en condiciones de solvólisis, el peso molecular se reduce 17 veces y a las 8 h, 31 veces.

Fig. 6.4. Curva de variación de peso molecular por tratamiento con CTMS a 100°C durante 3 horas (ensayos 3-8)



- vi) A simple vista, los valores de pesos moleculares de la Tabla 6.21 indicarían que en todos los ensayos, incluyendo los controles, hubo despolimerización considerable y en niveles

similares con respecto al peso molecular inicial. Sin embargo, al graficar el peso molecular de los productos obtenidos por tratamiento a 100°C durante 3 h, con proporciones distintas de CTMS (Fig. 6.4), se observa una particularidad interesante: hay una curva regular con máximo en 7300 Da. El peso molecular promedio de la muestra control calentada solamente en piridina durante 3 h resultó de 4900 Da. Entonces el agregado de agente sililante en baja proporción promueve inicialmente la ruptura de uniones glicosídicas. A medida que aumenta su proporción en la mezcla de reacción --aumentando la sililación de los hidroxilos y la desulfatación-- hay un efecto inhibitor de la degradación que eleva el peso molecular aun con respecto al control. Este efecto protector podría estar vinculado a una o a ambas reacciones que también están ocurriendo en el sistema: sililación de hidroxilos libres y desulfatación-sililación de posiciones sulfatadas.

Con los datos experimentales con que se cuenta no es posible decir nada acerca de las velocidades relativas de sililación y desulfatación, pero sí puede suponerse que en 3 h la desulfatación llega a completarse como surge de comparar los pares de reacciones 3 versus 13 y 5 versus 12. No se encontraron antecedentes bibliográficos sobre la sililación de polisacáridos sulfatados, aunque un trabajo reciente sobre sililación de dextranos con hexametildisilazano (HMDS) con 10% de CTMS indica que se alcanza 100% de sustitución para una relación molar 2:1 de agente sililante:hidroxilo luego de 20 h de calentamiento a 50°C en DMSO⁵⁶.

La relación sulfato:CTMS 1:1 implica en realidad 4 moles de hidroxilos (libres o sulfatados) por cada mol de CTMS. En el producto 8, aislado de esta reacción, hay 25% de desulfatación. Para la relación sulfato:CTMS 1:4, equivalente a una relación 1:1 entre hidroxilos totales y CTMS, hubo 28% de desulfatación. Por lo tanto la sililación no está favorecida con respecto a la desulfatación, sino que son dos procesos similares o prevalece la desulfatación.

El punto de degradación mínima, es decir el máximo de la curva de peso molecular, se logra en el producto 6 (relación sulfato:CTMS 1:10, hidroxilos totales:CTMS 1:2,5) a pesar del 50% de desulfatación determinado por cromatografía (por RMN se tiene 86% de desulfatación). La relación sulfato:CTMS 1:50 (hidroxilos totales:CTMS 1:12,5) muestra una degradación algo superior, con el mayor porcentaje de desulfatación detectado por cromatografía y remoción completa según los datos de RMN. A partir de aquí los polisacáridos están completamente desulfatados y la degradación es pronunciada al pasar a la reacción 4 (sulfato:CTMS 1:100), luego se mantiene aproximadamente constante. En

resumen, la desulfatación *per se* no reduciría la degradación (reacciones 5 y 6) y el efecto protector estaría vinculado a la sililación.

A bajas concentraciones de CTMS predomina la ruptura de uniones glicosídicas. A medida que aumenta la relación hidroxilos totales:CTMS, aumentaría la velocidad de sililación y el grado de sustitución de los hidroxilos por grupos trimetilsililo, y en consecuencia se produciría un cambio conformacional en la cadena polisacarídica. Es posible que esta nueva conformación facilitara el proceso de desulfatación. La despolimerización podría estar inhibida estéricamente por el aumento del grado de sustitución con grupos trimetilsililo y quizá también por el cambio conformacional asociado. El efecto protector de la primera etapa puede atribuirse al alcance de un cierto umbral de sililación (según lo encontrado para 6 con sililación parcial y desulfatación parcial) en combinación con la ausencia de alta concentración de productos formados por la desulfatación o a la ausencia de CTMS en exceso, que promoverían la despolimerización.

- vii) Los productos 5 y 12, obtenidos en las mismas concentraciones de reactivos y la misma temperatura, con diferencia en el tiempo total de reacción tienen contenidos de sulfato y pesos moleculares no muy diferentes (6700 y 5800 Da). Es decir, una exposición más prolongada del carragenano desulfatado y parcialmente sililado no aumentaría significativamente la degradación. El producto 9 fue sometido a las mismas condiciones de tiempo y concentración que el 6, pero el peso molecular del compuesto a 60°C (2800 Da) resultó inesperadamente menor que el de 100°C (7300 Da). Esto podría indicar que una reacción de sililación más lenta –a menor temperatura– con CTMS permitiría la degradación de las uniones glicosídicas en el polisacárido sulfatado y no permitiría llegar al grado de sustitución que induce la protección y/o el cambio conformacional.

Para verificar la reproducibilidad del método, las reacciones 3 y 13 se repitieron 2 y 4 veces respectivamente, los rendimientos promedio en cada caso fueron de 65 y 64% respectivamente. El cálculo se hizo en base al contenido de sulfato determinado cromatográficamente. Si se consideran productos totalmente desulfatados, los rendimientos alcanzan a 68 y 69%. Los mejores rendimientos correspondieron a los productos 5 y 6, con 96 y 90% respectivamente.

En conclusión las mejores condiciones –en términos de reducción del contenido de sustituyentes con menor degradación polimérica y mejor recuperación del producto– determinadas para desulfatar al carragenano kappa corresponden a 3 h de calentamiento a 100°C con relación molar sulfato:CTMS 1:50.

6.2.2. CARACTERIZACIÓN DE CARRAGENANO BETA

La caracterización de carragenano beta se llevó a cabo por espectroscopía RMN monodimensional (^1H y ^{13}C) y bidimensional (COSY ^1H ^1H y HETCOR ^1H ^{13}C). Además se registraron espectros RMN ^1H y ^{13}C del carragenano kappa utilizado como material de partida.

Los espectros de RMN ^{13}C registrados para todos los productos mostraron señales consistentes con lo esperado, según los antecedentes bibliográficos que figuran en la Tabla 6.8. Así aparecieron las resonancias de las díadas G4S-DAG y G-DAG pertenecientes a carragenanos kappa y beta, según los datos informados por Rochas³⁴ y Usov³⁵ (Fig. 6.2). En los espectros de aquellas muestras con proporciones apreciables de ambos tipos de estructuras, se observaron solamente los picos asociados a las díadas y no se encontraron evidencias de señales que pudieran atribuirse a tríadas de tipo mixto kappa/beta (por ejemplo G4S-DAG-G ó G-DAG-G4S).

En el espectro HETCOR ^1H ^{13}C del producto 5 (5% SO_3Na) se vieron 11 correlaciones (Fig. 6.5.a y Tabla 6.22), por lo que dos de ellas estarían superpuestas o bien una estaría ausente. Las señales se asignaron inicialmente teniendo en cuenta las informadas por Usov en 1980 para RMN ^{13}C y por analogía con los datos bibliográficos de RMN ^1H incluidos en las secciones 6.1.7 y 6.1.8.

Sólo se observaron picos atribuibles a carragenano beta. Las regiones de picos diagnósticos correspondientes a carragenano kappa –C-4/H-4 de la unidad G4S y C-1/H-1 de la unidad DAG– no mostraron correlaciones en el umbral de detección seleccionado.

Tabla 6.22. Correlaciones encontradas en el espectro HETCOR ^1H ^{13}C del producto 5 (D_2O , 25°C, 500/125 MHz)

Carragenano	Unidad	Núcleo	1	2	3	4	5	6
β	G	^{13}C	102,9	69,8	80,4	66,4	75,7	61,6
		^1H	4,59	3,57	3,83	4,11	3,67	3,73-3,68
	DAG	^{13}C	94,7	70,4	79,7	78,5	77,1	
		^1H	5,06	4,05	4,53	4,59	4,66	

^aVer texto.

Fig. 6.5. (a) Espectro HETCOR ^1H ^{13}C registrado para el producto 5 (D_2O , 25°C); (b) Cortes del espectro a desplazamientos químicos de ^{13}C correspondientes a algunos núcleos seleccionados

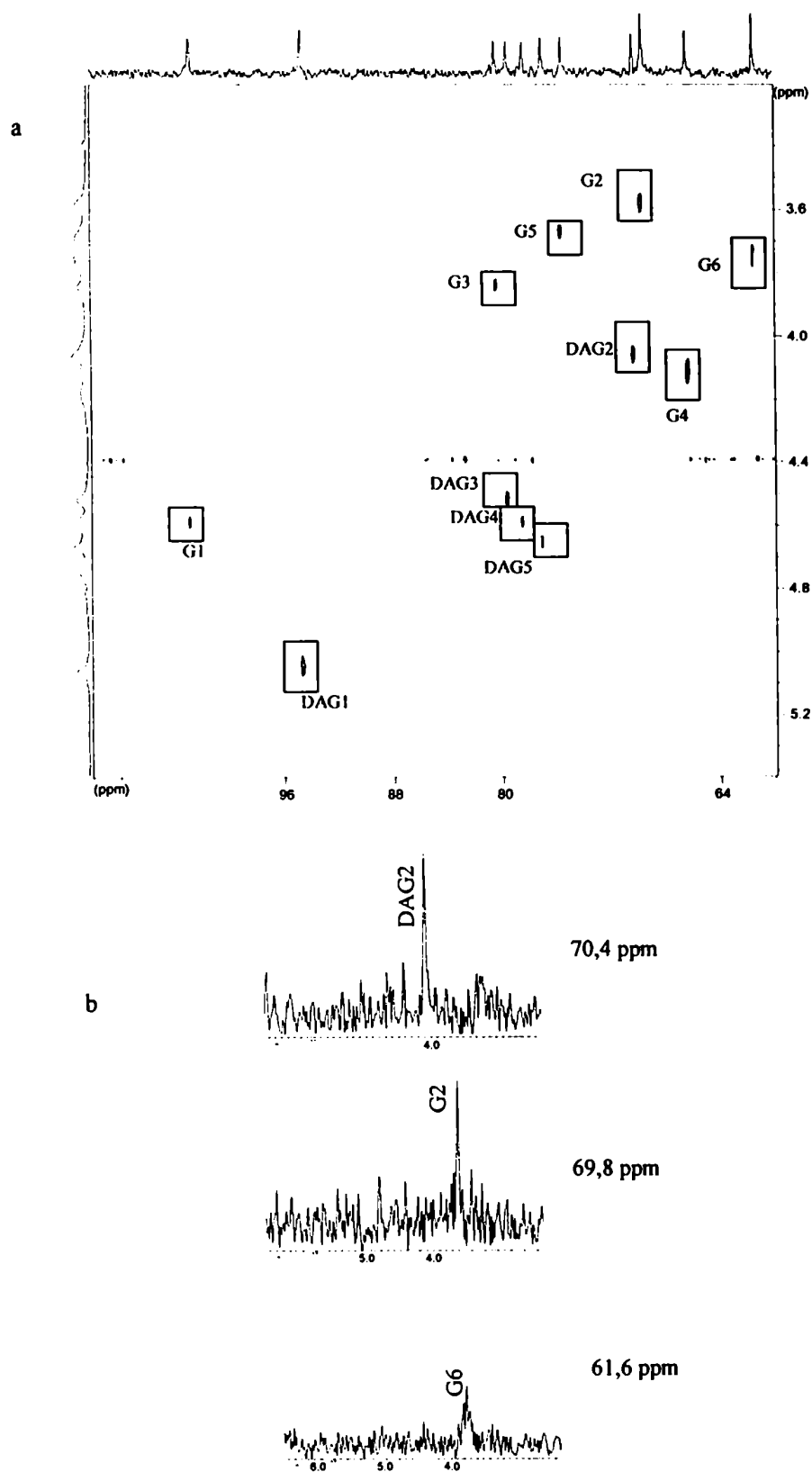
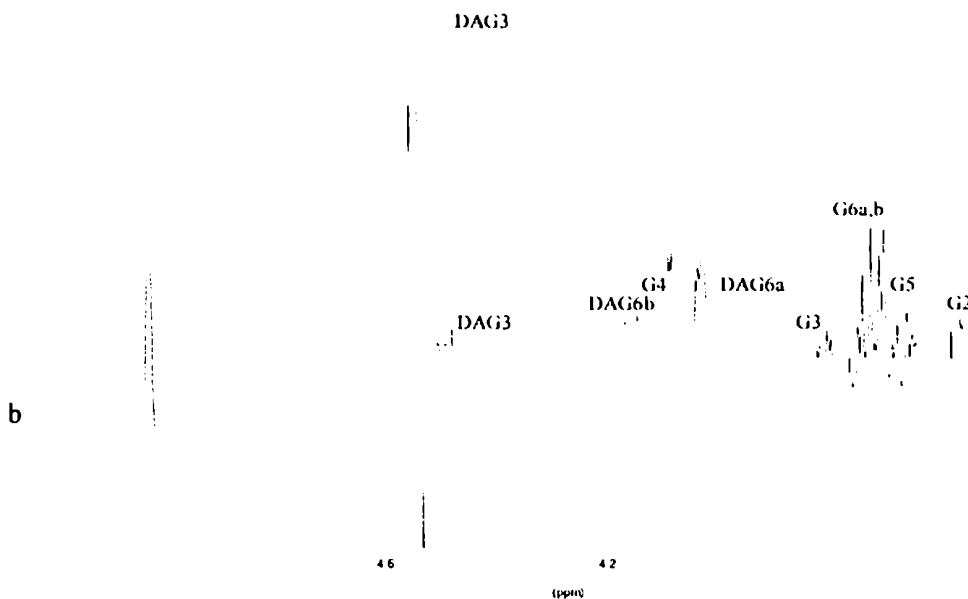


Fig 6.6. Espectros de RMN ^1H 500 MHz (a) del producto 5, registrado a 25°C y (b) del producto 13, registrado a 45°C



La asignación definitiva de las señales correspondientes a RMN ^1H de carragenano beta se hizo teniendo en cuenta:

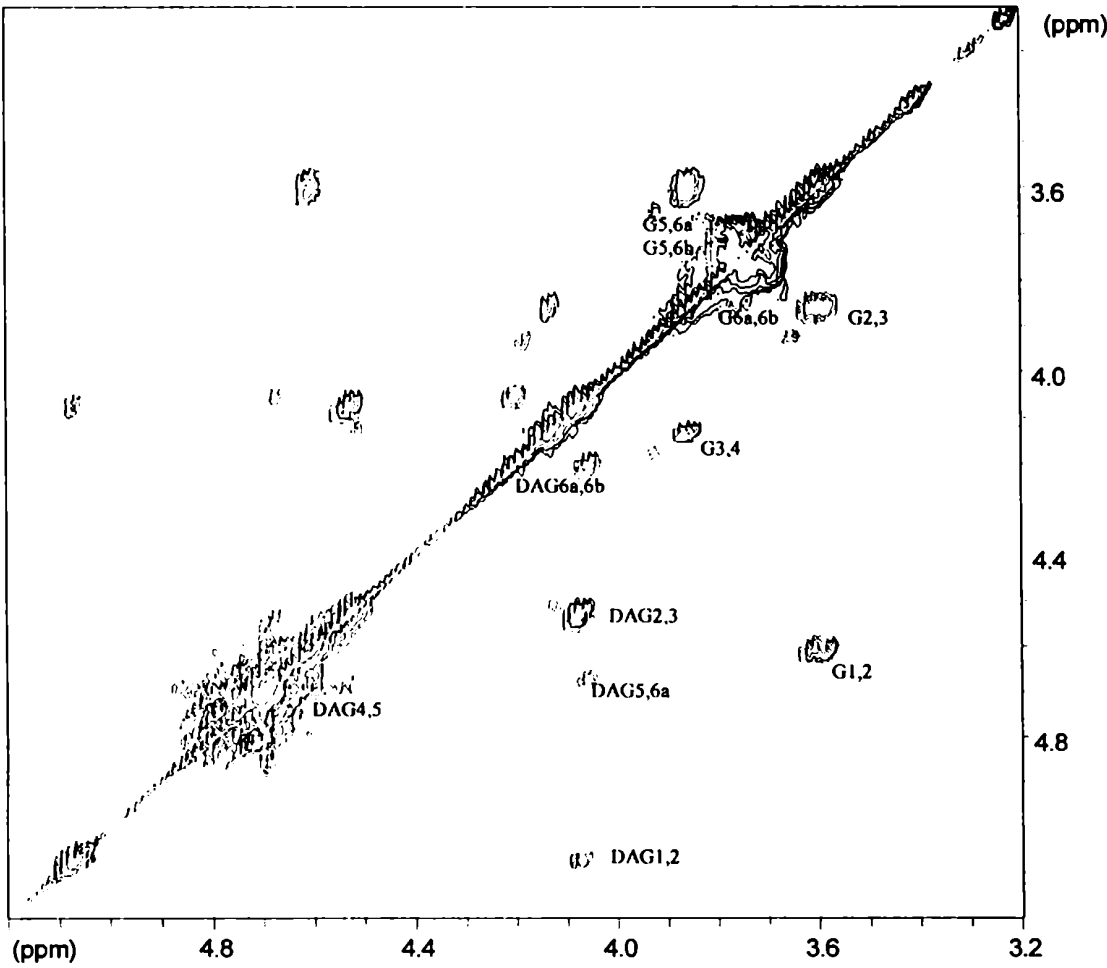
- los valores típicos de las constantes de acoplamiento ^1H - ^1H en residuos de β -D-galactopiranosidos y 3,6-anhidro- α -D-galactopiranosidos (según los datos de Welti⁴⁵, Knutsen⁴⁴ y Falshaw³¹), para predecir la ausencia de picos cruzados ^1H - ^1H ;
- datos de experimentos DEPT 135⁵⁷ para identificar las dos resonancias correspondientes a metilenos;
- analogías en los desplazamientos químicos, para diferenciar los núcleos –tanto ^1H como ^{13}C – anoméricos y los metilénicos como correspondientes a residuos de β -D-galactopiranososa o 3,6-anhidro- α -D-galactopiranososa y proveer puntos de entrada para el análisis de los espectros bidimensionales.

En la Fig. 6.6 se muestran los espectros RMN ^1H obtenidos para los productos 5 (Fig. 6.6.a) y 13 (Fig. 6.6.b) donde se observa el desplazamiento del pico de agua, su superposición con algunas señales a 45°C y el aumento de resolución logrado a mayor temperatura.

Tabla 6.23. Correlaciones observadas en el espectro COSY ^1H ^1H registrado para el producto **5** (D_2O , 25°C , 500 MHz)

Correlación	Coordenadas (ppm)
DAG1-DAG2	5,07 / 4,08
DAG2-DAG3	4,07 / 4,52
DAG4-DAG5	4,60 / 4,67
DAG5-DAG6a	4,67 / 4,06
DAG6a-DAG6b	4,06 / 4,21
G1-G2	4,61 / 3,60
G2-G3	3,60 / 3,86
G3-G4	3,86 / 4,14
G5-G6a,G6b	3,70 / 3,78
G6a-G6b	3,79 / 3,74

Fig. 6.7. Espectro COSY ^1H ^1H registrado para el producto **5** (D_2O , 25°C , 500 MHz, desplazamientos químicos relativos a DMSO: 2,71 ppm)



En la Tabla 6.23 se detallan las conectividades ^1H - ^1H que surgen del espectro COSY (Fig. 6.7). Tomando como punto de partida para el residuo G el desplazamiento químico del carbono anomérico a 102,9 ppm, el hidrógeno anomérico debía resonar a 4,59 ppm. La correlación asociada en el espectro COSY estaba en 4,61/3,60 ppm, y a su vez se vinculaba con las señales G2/G3 a 3,60/3,86 ppm y G3/G4 a 3,86/4,14 ppm. No se observó correlación G4/G5, como era de esperar para protones con constantes de acoplamiento pequeñas³¹. El otro extremo de la misma unidad era C-6 (61,6 ppm), que correlacionaba con H-6a, H-6b a 3,68-3,73 ppm. En la región de la diagonal del espectro COSY se distinguieron dos señales a 3,70/3,78 y 3,79/3,74 atribuibles a G5/G6a,b y G6a/G6b respectivamente (Tabla 6.25).

Este espectro bidimensional tampoco mostró correlaciones que indicaran la presencia de carragenano kappa sin desulfatar. En particular, la resonancia a campos más bajos esperada para el residuo G4S pertenecía a H-4 (4,8 ppm). Si bien no se especulaba con encontrar un pico cruzado con H-5 vecino, sí debería ser posible observar una correlación con H-3 (~3,9 ppm). La región cercana a 4,8/3,9 ppm carecía de señales. En cambio, en el espectro RMN ^1H registrado a 45°C para el producto 13 (6,9% SO_3Na) (Fig. 6.6.b), la señal anomérica de DAG presentó un hombro correspondiente al protón anomérico de DAG vecina a G4S con una relación de áreas 95:5. La otra señal característica del polisacárido kappa, H-4 de G4S, apareció a 4,82 ppm y presentaba una relación de áreas de 7:93 con respecto a DAG-1. Ambas determinaciones son coincidentes con la cuantificación por datos de RMN ^{13}C de la Tabla 6.21 para el mismo producto. Análogamente, el espectro obtenido a 25°C para el producto 5 (Fig. 6.6.a) tenía una señal anomérica principal a 5,07 ppm con un hombro apenas perceptible a 5,09 ppm cuyas integraciones eran 98:2. La resonancia de H-4 de G4S apareció a 4,83 ppm con una relación de áreas G4S:G de 17:83, cuando se lo comparó con H-1 de DAG. Este último resultado es consistente con los valores de la Tabla 6.21 para este producto.

Para la unidad DAG se tomó como punto de entrada el carbono anomérico a 94,7 ppm, que correlacionaba con H-1 a 5,06 ppm en el espectro bidimensional heteronuclear. El espectro homonuclear permitió establecer la ubicación de los protones H-1, H-2, H-3 mediante la secuencia de correlaciones DAG1/DAG2 a 5,07/4,08 ppm y DAG2/DAG3 a 4,07/4,52. No se observó señal asociada a DAG3/DAG4, de acuerdo con la constante de acoplamiento pequeña esperada para estos núcleos^{31,44}. Por la misma razón tampoco se esperaba un pico que vinculara DAG5 con DAG6b.

Para tener el otro extremo del residuo de DAG hacía falta contar con datos de un experimento DEPT 135, ya que se esperaba que C-6 tuviera un desplazamiento químico coincidente con otro carbono del polisacárido. Según datos de Usov, se debería superponer

con C-2 de la unidad G. En el espectro DEPT (Fig 6.2.f) desapareció de la señal a 69,7 ppm, indicando que los desplazamientos químicos de C-2 de la unidad G y C-6 de DAG coincidían exactamente. En el espectro HETCOR (Fig 6.5.a) se observó sólo una correlación a 69,7 ppm, correspondiente a H-2/C-2 de G (3,6/69,7 ppm). A partir de los datos de bibliografía relacionados con H-6a y H-6b de residuos de DAG (Tabla 6.19) se infería que deberían aparecer a ~4,10 y 4,20 ppm respectivamente. Cabe recordar que estos datos de RMN ^1H de literatura fueron determinados por técnicas bidimensionales aplicadas a oligosacáridos de estructura conocida, por lo que resultan confiables. Por otra parte, la correlación para el metileno debería ser poco intensa ya que (i) el carbono debía presentar interacciones con dos protones cuyos desplazamientos químicos están bien resueltos, y (ii) el acoplamiento de protones geminales no se elimina en el experimento HETCOR, por lo tanto la intensidad total de la correlación quedaría dividida en cuatro señales que bien podrían confundirse con el ruido de fondo.

En la Fig. 6.5.b se muestran cortes del espectro HETCOR a 70,4; 69,8 y 61,6 ppm –a la altura de los desplazamientos químicos de DAG2, G2/DAG6 y G6 respectivamente. Claramente la intensidad de la señal protónica de G2 (3,60 ppm) es mucho mayor que la de cada uno de los picos a los que da origen G6 (3,74-3,79 ppm). A 69,8 ppm sólo se aprecia la resonancia de G2 pero no se puede afirmar nada sobre DAG6a ó DAG6b.

Se descartó la superposición de los protones G2 y DAG6a: si así fuera, debería existir una correlación a 3,57/4,66 ppm (Fig. 6.7) coincidente con la correlación atribuida a G1/G2. Si bien estas señales podrían coincidir, quedarían en el espectro dos correlaciones intensas sin asignar a 4,06/4,67 y 4,06/4,21 ppm que sí entraron en el sistema de carragenano beta cuando se consideró que la correlación heteronuclear C-6/H-6a,b de la unidad DAG no era observable como se explica a continuación.

En el espectro COSY homonuclear (Fig. 6.7) se apreciaron dos picos cruzados intensos a 4,06/4,67 ppm y a 4,06/4,21 ppm, consistentes con correlaciones DAG5/DAG6a y DAG6a/DAG6b respectivamente. Del espectro heteronuclear surgió que el protón a 4,67 ppm estaba unido al carbono que resonaba a 77,1 ppm (DAG5), mientras que C-4 fue asignado a 78,5 ppm y su hidrógeno correspondiente a 4,59 ppm. Esto implicaba que la señal DAG4/DAG5 debería aparecer a 4,59/4,66 ppm donde existía una correlación, aunque ubicada en una zona muy cercana a la diagonal y al pico de agua. Con este esquema de asignaciones quedaron tres correlaciones muy poco intensas que no pertenecían al sistema de núcleos de carragenano beta: 3,65/3,92; 3,93/4,18 ppm (que implican una secuencia de tres hidrógenos relacionados) y 4,13/4,51 ppm. Algunas de ellas presentaron picos cruzados en el

espectro heteronuclear, pero no hay ninguna señal de ¹³C en el rango 50-115 ppm –la región característica para este tipo de compuestos– que se pueda asociar a la de 3,92-3,93 ppm. Por lo tanto podrían corresponder a algún tipo de impureza cuya estructura no fuera un hidrato de carbono.

Tabla 6.24. Asignación de los desplazamientos químicos y constantes de acoplamiento correspondientes al espectro RMN ¹H de carragenano beta (D₂O, 25°C, 500 MHz, referencia: acetona 2,20 ppm)

Unidad	Desplazamientos químicos (ppm)						
	H-1	H-2	H-3	H-4	H-5	H-6a	H-6b
G	4,60	3,60	3,86	4,14	3,70 ^a	3,79 ^a	3,74 ^a
DAG	5,07	4,08	4,53	4,60	4,67 ^a	4,07	4,21

Unidad	Constantes de acoplamiento (Hz) ^b						
	J _{1,2}	J _{2,3}	J _{3,4}	J _{4,5}	J _{5,6a}	J _{5,6b}	J _{6a,6b}
G	8,59	9,47	2,8	n.m.	7,72	4,21	11,58
DAG	n.m. ^c	n.m.	n.m.	n.m.	n.m.	n.m.	9,47

^aDe espectros bidimensionales.
^bValores absolutos, medidos sobre el espectro del producto 13 registrado a 45°C.
^cn.m.: no medible.

Tabla 6.25. Desplazamientos químicos (ppm) de los espectros RMN ¹³C (en D₂O) de diadas correspondientes a carragenanos kappa y beta a distintas temperaturas

Carragenano	Muestra	Unidad	T (°C)	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6
κ	0	G4S	80 ^b	102,7	69,9	79,1	74,3	75,0	61,5
		DAG		95,4	70,1	79,4	78,5	77,0	69,7
	1	G4S	25 ^a	102,7	69,7	78,7	74,0	75,0	61,6
		DAG		95,0	70,0	79,5	78,5	76,9	69,7
β	12	G	80 ^b	102,8	69,8	80,6	66,7	75,6	61,6
		DAG		94,8	70,5	79,7	78,3	77,1	69,8
β	13	G	25 ^a	102,9	69,8	80,4	66,4	75,7	61,6
		DAG		94,7	70,4	79,7	78,5	77,1	69,8

^aEspectros registrados a 25°C; desplazamientos químicos relativos a DMSO (39,5 ppm).
^bEspectros registrados a 80°C; desplazamientos químicos relativos a DMSO (39,7 ppm).

La asignación final de los espectros de RMN ^1H y ^{13}C de carragenano beta se detallan en las Tablas 6.24 y 6.25. Los valores de las constantes de acoplamiento que pudieron medirse fueron consistentes con los publicados por Welti⁴⁵ y Knutsen⁴⁴.

Los desplazamientos químicos asignados para el residuo G coinciden –con un corrimiento constante de 0,3 ppm– con los valores informados por Knutsen⁴⁴ para la unidad análoga en el tetrasacárido DAG-G-DAG-G4S (Tabla 6.14). Era predecible que existiera esta similitud ya que en ambos casos el entorno del residuo en cuestión es semejante y la diferencia fundamental está dada por la longitud de la cadena donde está incluido.

Para la unidad DAG había menos antecedentes bibliográficos para comparar. El único trabajo donde se encontraron desplazamientos químicos de RMN ^1H de carragenano beta fue la referencia 31, que informó solamente H-1, H-2 y H-3 (Tabla 6.19) de DAG determinados por métodos espectroscópicos modernos. Estos tres valores coincidieron con los resultados que se presentan en este trabajo de Tesis. Por otra parte, H-3, H-4, H-5 y H-6a,b tienen asignaciones consistentes con las atribuidas a los mismos protones en metil carrabiósido (Tabla 6.12). Además, H-5, H-6a y H-6b –los núcleos menos influenciados por la presencia o ausencia de sulfatación en la unidad vecina debido a su distribución espacial– coinciden con los desplazamientos químicos de DAG en el hexasacárido de carragenano kappa analizado por Knutsen⁴⁴. Finalmente, a fin de contar con una predicción para DAG en carragenano beta, se calculó la contribución por sulfatación en el residuo de β -D-galactosa comparando los desplazamientos químicos de DAG en el extremo no reductor de los tetrasacáridos DAG-G-DAG-G4S y DAG-G4S-DAG-G4S (Tabla 6.15) y se aplicó esta corrección sobre la unidad DAG del hexasacárido kappa. Los valores calculados obtenidos son consistentes con los asignados.

La presente es la primera asignación completa del espectro RMN ^1H de carragenano beta. Estos resultados confirman además la asignación informada por Usov³⁵ para RMN ^{13}C .

6.3. CONCLUSIONES

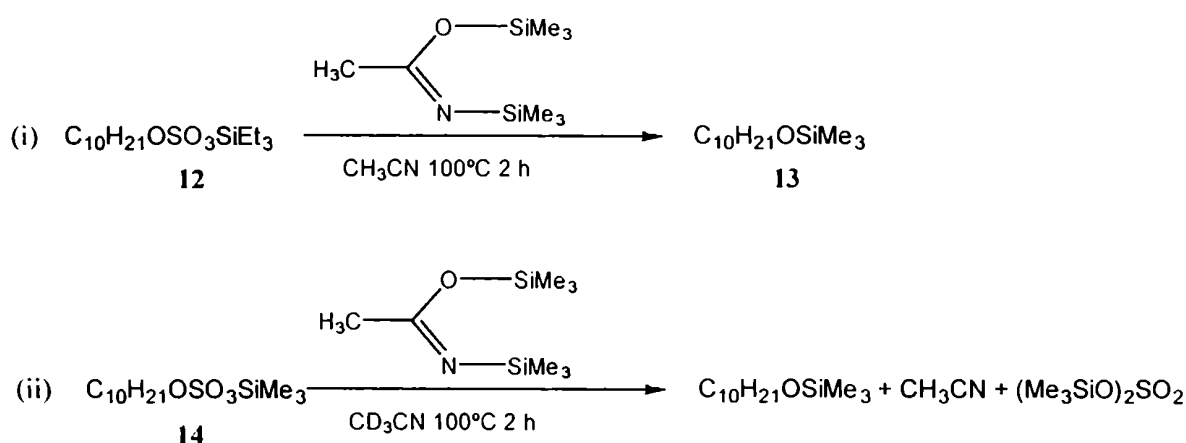
La desulfatación con CTMS en piridina demostró ser un método útil y versátil para la remoción de grupos sulfato en posiciones distintas y en varios tipos de polisacáridos – agaranos, carragenanos, polisacáridos con estructuras híbridas agar-carragenanos, galactofucanos–, en algunos casos en presencia de uniones lábiles como las 3,6-anhidrogalactosídicas. Además, en el caso de las fracciones aisladas de *Georgiella confluens* y *Adenocystis utricularis* resultó la única técnica de desulfatación adecuada para llevar a cabo el análisis estructural.

Se llevó a cabo un estudio completo de las condiciones de reacción aplicadas a carragenano kappa comercial y de los productos aislados en función de su contenido de sulfato, peso molecular y composición. El análisis de los ensayos de desulfatación, en términos de reducción del contenido de sulfato con menor degradación y máxima recuperación de producto, permitió concluir que las mejores condiciones para hacerlo eran calentamiento a 100°C durante 3 horas, con una relación molar sulfato:CTMS 1:50.

Como se indicó en la sección 6.1.4, al comenzar el presente trabajo de investigación se contaba con escasos antecedentes sobre el mecanismo posible de la reacción de desulfatación selectiva de posiciones primarias con BTSA¹⁵ (ver Esquema 6.2) aunque se descartaba un mecanismo solvolítico²¹ (ver Tabla 6.3).

En 2001, Horibe y Oshita⁵⁸ investigaron la desulfatación de bistrimetilsililéster de 1-*O*-decilglicerol 2,3-disulfato con varios agentes sililantes. Comprobaron que sólo aquellos reactivos que contenían nitrógeno eran capaces de desulfatar selectivamente posiciones primarias. A fin de elucidar el mecanismo de la reacción, llevaron a cabo ciertos experimentos adicionales:

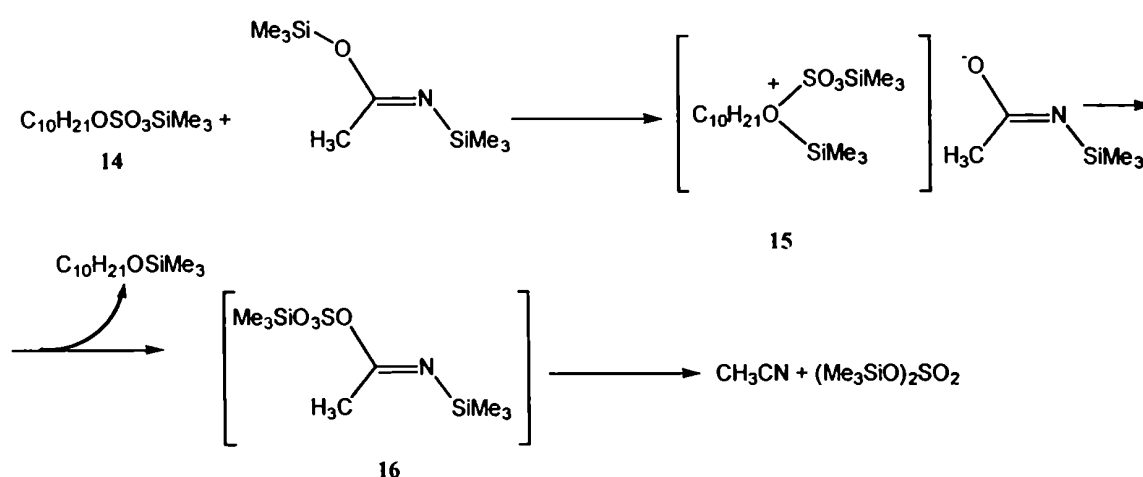
Esquema 6.5. Desulfatación de ésteres de sulfato de decilo



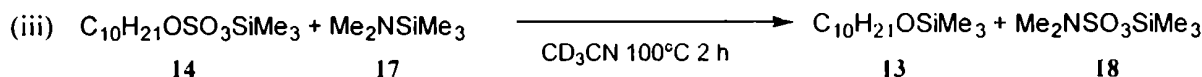
- (i) La reacción de trietilsulfato de decilo **12** con 2 moles de BTSA en acetonitrilo dio deciltrimetilsililéter **13** como producto principal (63%) (Esquema 6.5). Este resultado sugirió que el grupo trimetilsililo de BTSA atacaba al oxígeno nucleofílico de **12**.
- (ii) La desulfatación de trimetilsulfato de decilo **14** en acetonitrilo deuterado fue monitoreada por espectroscopía de RMN ^1H y ^{29}Si . En la mezcla de reacción detectaron bis(trimetilsilil)sulfato y acetonitrilo junto con deciltrimetilsililéter como productos principales (Esquema 6.5).

A partir de estos resultados, los autores postularon un mecanismo de desulfatación según el Esquema 6.6. Dado que el grupo trimetilsililo parecía atacar el oxígeno del éster sulfato en **14**, debería generarse una sal de oxonio **15**. Esta sal debería ser capaz de liberar el catión trimetilsiloxisulfonilo, que sería atrapado por el anión imidato para dar **16**, con descomposición subsecuente a acetonitrilo y bis(trimetilsilil)sulfato. La sal de oxonio **15** sería un intermediario, por lo tanto un impedimento estérico en la proximidad del átomo de oxígeno de **15** causaría una diferencia en la formación de este catión entre el sulfato primario y secundario, que afectaría la selectividad de la reacción.

Esquema 6.6. Mecanismo propuesto para la desulfatación de ésteres de sulfato de decilo

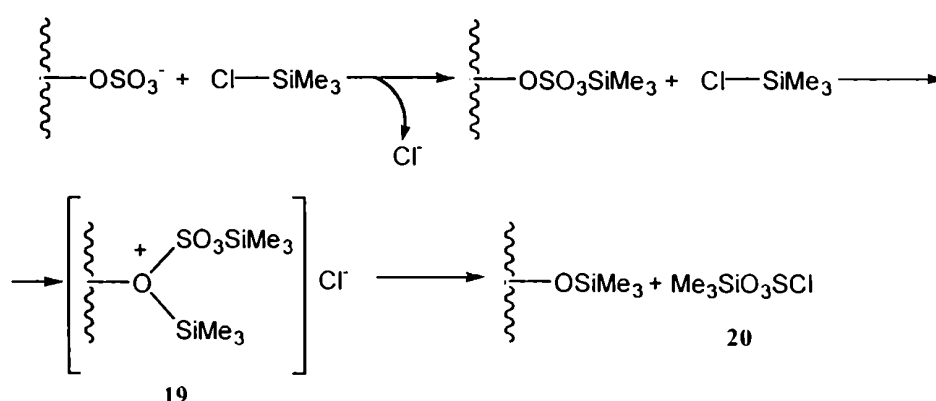


El mecanismo postulado requería el ataque electrofílico del catión trimetilsiloxisulfonilo sobre el anión imidato para formar bis(trimetilsilil)sulfato. Se obtuvo evidencia de este proceso en la reacción de **14** con (dimetilamino)trimetilsilano **17** (Esquema 6.7) ya que apareció *N,N*-dimetiltrimetilsililamina **18** como subproducto, además de deciltrimetilsililéter **13**. Este resultado mostró que hubo un ataque electrofílico del catión trimetilsiloxisulfonilo sobre Me_2N^- durante la reacción.

Esquema 6.7. Desulfatación con (dimetilamino)trimetilsilano

La reacción de desulfatación de bistrimetilsililéster de 1-*O*-decilglicerol 2,3-disulfato con trifluorometanosulfonato de trimetilsililo no procedió. Parecería razonable suponer que la sal de oxonio formada en este caso era muy estable debido a la estabilidad del anión trillato. Por lo tanto el catión trimetilsiloxisulfonilo no habría sido transferido a partir del ion oxonio.

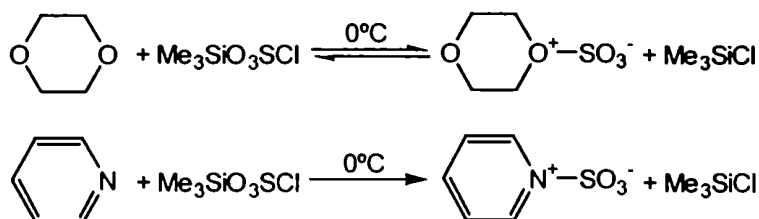
Los autores ensayaron la desulfatación de bistrimetilsililéster de 1-*O*-decilglicerol 2,3-disulfato con CTMS, hallando 26% del producto desulfatado en la posición 2, 6% de desulfatación en posición 3 sin indicios de desulfatación en ambas posiciones a la vez. Sin embargo no hicieron comentarios acerca de esta reacción.

Esquema 6.8. Mecanismo posible para la desulfatación de galactanos con CTMS

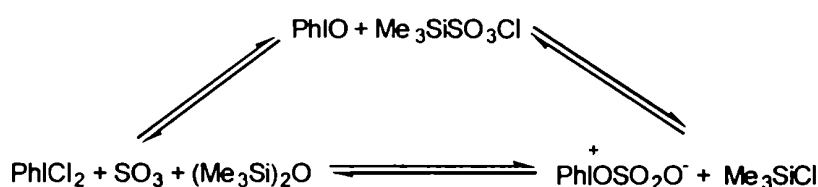
Teniendo en cuenta estos antecedentes es posible plantear el mecanismo del Esquema 6.8 para la desulfatación de polisacáridos sulfatados con CTMS. En primera instancia, a partir del grupo sulfato se obtendría el sililéster correspondiente, que a su vez daría la sal de oxonio **19** –equivalente a **15**– con cloruro como contraión. En un ataque electrofílico del catión trimetilsiloxisulfonilo sobre el cloruro se formaría clorosulfonato de trimetilsililo **20**. Hofmann y Simchen⁵⁹ informaron sobre la aplicación de clorosulfonato de trimetilsililo en la obtención de los aductos trióxido de azufre-piridina y trióxido de azufre-1,4-dioxano (Esquema 6.9). Bassindale, Katampe y Taylor publicaron un método simple de obtención de sulfatos cíclicos empleando **20** y iodosobenceno⁶⁰. Sugirieron que el sistema iodosobenceno-clorosulfonato de trimetilsililo existía en una serie de equilibrios que se muestra en el Esquema 6.10. En ambos casos se considera la formación subsecuente de CTMS, sin embargo

las relaciones molares sulfato:CTMS necesarias para que ocurra la desulfatación descartan a este agente sililante como catalizador del proceso.

Esquema 6.9. Obtención de aductos de trióxido de azufre



Esquema 6.10. Equilibrios del sistema iodosobenceno-clorosulfonato de trimetilsililo



El presente trabajo de investigación no fue realizado con fines mecanísticos, por lo cual no se buscaron evidencias de subproductos en las mezclas de reacción que dieran indicios sobre los intermediarios posibles. A fin de verificar la certeza del mecanismo propuesto sería interesante buscar evidencias de la presencia de clorosulfonato de trimetilsililo y de hexametildisiloxano (formado a partir del compuesto anterior). Por otra parte, hacer ensayos en presencia de un aceptor de sulfato –del tipo de los empleados por Miller y Blunt (Sección 6.1.3)– proporcionaría información sobre la liberación de trióxido de azufre.

Finalmente, el estudio por espectroscopía de RMN ^1H y ^{13}C aplicando técnicas mono- y bidimensionales permitió realizar por primera vez la asignación completa del espectro protónico de carragenano beta.

6.4. BIBLIOGRAFÍA

- ¹Kantor, T.G.; Schubert, M. *J. Am. Chem. Soc.* **1957**, 79, 152-153.
- ²Dolan, T.C.S.; Rees, D.A. *J. Chem. Soc.* **1965**, 3534-3539.
- ³Nunn, J.R.; Parolis, H. *Carbohydr. Res.* **1969**, 9, 265-276.
- ⁴Harris, M.J.; Turvey, J.R. *Carbohydr. Res.* **1969**, 9, 397-405.
- ⁵McKenna, J.; Norymberski, J.K. *J. Chem. Soc.* **1957**, 3889-3893.
- ⁶Usov, A.I.; Adamyants, K.S.; Miroshnikova, L.I.; Shaposhnikova, A.A.; Kochetkov, N.K. *Carbohydr. Res.* **1971**, 18, 336-338.
- ⁷Usov, A.I.; Miroshnikova, L.I.; Kochetkov, N.K. *Zh. Obshch. Khim.* **1972**, 42, 945-949.
- ⁸Usov, A.I.; Adamyants, K.S. *Bioorg. Khim.* **1975**, 1, 659-664.
- ⁹Matulewicz, M.C.; Cerezo, A.S. *An. Asoc. Quím. Arg.* **1979**, 67, 225-227.
- ¹⁰Nagasawa, K.; Inoue, Y.; Kamata, T. *Carbohydr. Res.* **1977**, 58, 47-55.
- ¹¹Furneaux, R.H.; Stevenson, T.T. *Hydrobiologia* **1990**, 240/205, 615-620.
- ¹²Usov, A.I. *Food Hydrocolloids* **1992**, 6, 9-23.
- ¹³Stortz, C.A.; Cerezo, A.S. *An. Asoc. Quím. Argent.* **1986**, 74, 353-360.
- ¹⁴Miller, I.J.; Blunt, J.W. *Carbohydr. Res.* **1998**, 309, 39-43.
- ¹⁵Takano, R.; Matsuo, M.; Kamei-Hayashi, K.; Hara, S.; Hirase, S. *Biosc. Biotech. Biochem.* **1992**, 56, 1577-1580.
- ¹⁶Roy, A.B.; Turner, J. *Carbohydr. Res.* **1983**, 124, 338-343.
- ¹⁷Butts, W.C.; Rainey, W.T. Jr. *Anal. Chem.* **1971**, 43, 538-542.
- ¹⁸Penney, C.L.; Perlin, A.S. *Carbohydr. Res.* **1981**, 93, 241-246.
- ¹⁹Rees, D.A. *J. Chem. Soc.* **1961**, 5168-5171.
- ²⁰Percival, E.; Wold, J.K. *J. Chem. Soc.* **1963**, 5459-5468.
- ²¹Matsuo, M.; Takano, R.; Kamei-Hayashi, K.; Hara, S. *Carbohydr. Res.* **1993**, 241, 209-215.
- ²²Takano, R.; Kanda, T.; Hayashi, K.; Yoshida, K.; Hara, S. *J. Carbohydr. Chem.* **1995**, 14, 885-888.
- ²³Greer, C.W.; Yaphe, W. *Bot. Mar.* **1984**, 27, 473-478.
- ²⁴Peats, S. *Proc. Int. Seaweed Symp.* **1981**, 10, 495-502.
- ²⁵Knutsen, S.H.; Grasdalen, H. *Bot. Mar.* **1987**, 30, 497-505.
- ²⁶Liao, M.-L.; Kraft, G.T.; Munro, S.L.A.; Craik, D.J.; Bacic, A. *J. Phycol.* **1993**, 29, 833-844.
- ²⁷Renn, D.W.; Santos, G.A.; Dumont, L.E.; Parent, C.A.; Stanley, N.F.; Stancioff, D.J.; Guiseley, K.B. *Carbohydr. Polym.* **1993**, 22, 247-252.

- ²⁸Chiovitti, A.; Liao, M.-L.; Kraft, G.T.; Munro, S.L.A.; Craik, D.J.; Bacic, A. *Phycologia* **1995**, *34*, 522-527.
- ²⁹Zablackis, E.; Santos, G.A. *Bot. Mar.* **1986**, *29*, 319-322.
- ³⁰Liao, M.-L.; Munro, S.L.A.; Craik, D.J.; Kraft, G.T.; Bacic, A. *Bot. Mar.* **1993**, *36*, 189-193.
- ³¹Falshaw, R.; Furneaux, R.H.; Wong, H.; Liao, M.-L.; Bacic, A.; Chandkrachang, S. *Carbohydr. Res.* **1996**, *285*, 81-98.
- ³²Rochas, C.; Rinaudo, M.; Vincendon, M. *Int. J. Biol. Macromol.* **1983**, *5*, 111-115.
- ³³Greer, C.W.; Rochas, C.; Yaphe, W. *Bot. Mar.* **1985**, *28*, 9-14.
- ³⁴Rochas, C.; Rinaudo, M. *Biopolymers* **1980**, *19*, 2165-2175.
- ³⁵Usov, A.I.; Shashkov, A.S. *Bot. Mar.* **1985**, *28*, 367-373.
- ³⁶Chiovitti, A.; Bacic, A.; Craik, D.J.; Munro, S.L.A.; Kraft, G.T.; Liao, M.-L. *Carbohydr. Res.* **1997**, *299*, 229-243.
- ³⁷Chiovitti, A.; Kraft, G.T.; Bacic, A.; Craik, D.J.; Munro, S.L.A.; Liao, M.-L. *J. Phycol.* **1998**, *34*, 515-535.
- ³⁸Izumi, K. *Carbohydr. Res.* **1973**, *27*, 278-281.
- ³⁹Ruiz Contreras, R.; Kamerling, J.P.; Breg, J.; Vliegthart, J.F.G. *Carbohydr. Res.* **1988**, *179*, 411-418.
- ⁴⁰Gorin, P.A.J.; Ishikawa, T. *Can. J. Chem.* **1967**, *45*, 521-523.
- ⁴¹Lamba, D.; Segre, A.L.; Glove, S.; Mackie, W.; Sheldrick, B.; Pérez, S. *Carbohydr. Res.* **1990**, *208*, 215-230.
- ⁴²Rashid, A.; Mackie, W. *Carbohydr. Res.* **1992**, *223*, 147-155.
- ⁴³Knutsen, S.H.; Myslabodsky, D.E.; Grasdalen, H. *Carbohydr. Res.* **1990**, *206*, 367-372.
- ⁴⁴Knutsen, S.H.; Grasdalen, H. *Carbohydr. Res.* **1992**, *229*, 233-244.
- ⁴⁵Walti, J. *J. Chem. Res. (M)* **1977**, 3566-3587.
- ⁴⁶Yu, G.; Guan, H.; Ioanoviciu, A.S.; Sikkander, S.A.; Thanawiroon, C.; Tobacman, J.K.; Toida, R.; Linhardt, R.J. *Carbohydr. Res.* **2002**, *337*, 433-440.
- ⁴⁷Agrawal, P.K. *Phytochem.* **1992**, *31*, 3307-3330;
- ⁴⁸Feeny, J.; Frenkiel, T.A.; Hounsell, E.F. *Carbohydr. Res.* **1986**, *152*, 63-72.
- ⁴⁹Usov, A.I. *Bot. Mar.* **1984**, *27*, 189-202.
- ⁵⁰Farias, W.R.L.; Valente, A.-P.; Pereira, M.S.; Mourão, P.A.S. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 29299-29307.
- ⁵¹van de Velde, F.; Knutsen, S.H.; Usov, A.I.; Rollema, H.S.; Cerezo, A.S. *Trends in Food Science & Technology* **2002**, *13*, 73-92.

- ⁵²Ponce, N.M.A.; Pujol, C.A.; Damonte, E.B.; Flores, M.L.; Stortz, C.A. *Carbohydr. Res.* **2003**, *338*, 153-165.
- ⁵³Errea, M.I.; Matulewicz, M.C. *Carbohydr. Res.* **2003**, *338*, 943-953 .
- ⁵⁴Park, J.T.; Johnson, M.J. *J. Biol. Chem.* **1949**, *181*, 149-151.
- ⁵⁵Dodgson, K.S.; Price, R.G. *Biochem. J.* **1962**, *84*, 104-110.
- ⁵⁶Nouvel, C.; Idens, I.; Degée, P.; Dubois, P.; Dellacherie, E.; Six, J.-L. *Polymer* **2002**, *43*, 1735-1743.
- ⁵⁷Doddrell, D.M.; Pegg, D.T.; Bendsall, M.R. *J. Magn. Reson.* **1982**, *48*, 323-327.
- ⁵⁸Horibe, M.; Oshita, H. *Bull. Soc. Chem. Jpn.* **2001**, *74*, 181-182.
- ⁵⁹Hoffman, K.; Simchen, G. *Synthesis* **1979**, 699-700.
- ⁶⁰Bassindale, A.R.; Katampe, I.; Taylor, P.G. *Can. J. Chem.* **2000**, *78*, 1479-1483.

PARTE V

MÉTODOS EXPERIMENTALES

CAPÍTULO 7

PARTE EXPERIMENTAL

7.1. CONSIDERACIONES GENERALES

Los productos se secaron en desecador a presión reducida sobre cloruro de calcio.

Las evaporaciones se realizaron en un evaporador rotatorio Büchi a presión reducida, con temperaturas del baño de agua inferiores a 45°C.

Las muestras en solución acuosa se llevaron a sequedad por liofilización, en un equipo Virtis Freezemobile 3, a presiones inferiores a 100 mTorr y temperaturas del condensador cercanas a - 40°C.

Las diálisis se realizaron a temperatura ambiente utilizando tubos de celulosa (SpectraPor), cuyo diámetro se eligió teniendo en cuenta el volumen de muestra a dializar. El corte de peso molecular (MWCO) empleado, excepto aquellos casos en los que se indica lo contrario, fue de: 6000-8000 Da, para los productos crudos; 3500 Da, para las fracciones obtenidas por tratamiento con cetrimida y las fracciones obtenidas por cromatografía de intercambio iónico; y 1000 Da, para los productos de desulfatación, metilación, etilación y degradación de Smith. Las diálisis se efectuaron dos días contra agua corriente y dos días contra agua destilada, renovada cada 3-8 horas.

Los poderes rotatorios se determinaron a temperatura ambiente en: a) un polarímetro Perkin-Elmer 141, o bien, b) en un polarímetro Perkin-Elmer 343, ambos cuentan con una lámpara de sodio (589 nm), una celda de 1 dm de longitud y aproximadamente 1,2 ml de volumen interno. Las soluciones de muestra empleadas tenían concentraciones de 0,3-0,5 % (m/v).

Las determinaciones colorimétricas se hicieron en un espectrofotómetro Spectronic 20D (Milton Roy Company) o Hewlett-Packard 8451 A, empleando celdas de 1 cm de camino óptico. Las concentraciones se determinaron por referencia a curvas de calibración.

Los espectros infrarrojos con transformada de Fourier se realizaron en un espectrofotómetro Nicolet FTIR 510P, en pastillas de KBr y barriendo 32-64 scans entre 4000-250 cm⁻¹, con una resolución de 2-4 cm⁻¹.

7.2. AISLAMIENTO DE LOS POLISACÁRIDOS DE *NOTHOGENIA FASTIGIATA*

El alga roja *Nothogenia fastigiata* fue recolectada cerca de Puerto Deseado, Pcia. de Santa Cruz, y secada al aire libre.

La extracción y el fraccionamiento de los polisacáridos se realizaron según el trabajo publicado por Cerezo *et al.*¹ El alga molida (141,90 g de material seco) se extrajo con agua a ebullición (3 l), con agitación mecánica durante 4 h. El extracto se centrifugó, se separó el residuo y la solución acuosa se volcó lentamente, con agitación, sobre isopropanol (12 l). De esta manera precipitaron los polisacáridos que posteriormente se secaron por intercambio con solventes (etanol, éter etílico). El residuo se extrajo dos veces más según el mismo procedimiento. Los rendimientos obtenidos fueron: 30,7 g (21,6 % del material de partida), para la primera extracción; 10,4 g, para la segunda extracción; 0,213 g, para la tercera extracción.

7.3. FRACCIONAMIENTO DEL SISTEMA DE POLISACÁRIDOS DE *NOTHOGENIA FASTIGIATA*

Una parte del material obtenido en la primera extracción (19,80 g) se disolvió en agua (1,7 l), luego de centrifugar se separaron: a) un residuo, R1, que se liofilizó (0,132 g), y b) una solución, S1, sobre la cual se realizó el fraccionamiento. Los polisacáridos sulfatados se precipitaron de S1 por agregado de una solución de cetrimida 10% (p/v) (bromuro de hexadeciltrimetilamonio, $C_{19}H_{42}NBr$, Sigma H 5882), hasta prueba de precipitación negativa (20 ml). El precipitado, P1, se separó por centrifugación, se lavó y suspendió en agua (1,5 l); mientras que el sobrenadante se dializó y liofilizó, dando la fracción X (7,375 g) (Apéndice A.1).

Sobre P1 se aplicó un fraccionamiento por redisolución en soluciones de concentración creciente de cloruro de sodio, según se detalla a continuación. A la suspensión de P1 en agua se agregó cloruro de sodio hasta llegar a una concentración de 0,5 M, dejando con agitación mecánica durante 16 h. El precipitado remanente, P2, se separó por centrifugación y se lavó con solución NaCl 0,5 M (3 x 20 ml). La solución obtenida, junto con las porciones utilizadas para lavar el precipitado, se extrajo con 1-pentanol (3 x 300 ml), seguido de diálisis, concentración y liofilización, para dar la fracción F1 (1,503 g). El precipitado P2 se sometió a procedimientos similares y sucesivos con soluciones de cloruro de sodio de concentraciones: 1,0; 1,5; 2,0; 3,0 y 4,0 M; el material solubilizado en cada etapa dio lugar a las fracciones F2

(0,4771 g), F3 (0,8878 g), F4 (0,7128 g), F5 (1,4935 g) y F6 (1,2284 g), respectivamente. Se denominó F7 (1,9184 g) a la fracción insoluble en NaCl 4,0 M (Apéndice A.1).

A partir de F2 (293,6 mg), F4 (208,5 mg), F5 (1427 mg) y F6 (1009 mg) se obtuvieron las fracciones F2' (202,5 mg), F4' (124,9 mg), F5' (460,0 mg) y F6' (402,0 mg), por redisolución en soluciones de NaCl 1,0 (150 ml); 2,0 (200 ml); 3,0 (1400 ml) y 4,0 M (1000 ml). Las soluciones se re-extrajeron con 1-pentanol, dializaron, concentraron y liofilizaron, tal como se había procedido con las fracciones originales.

7.4. AISLAMIENTO DE LOS POLISACÁRIDOS DE *GEORGIELLA CONFLUENS*

El alga roja *Georgiella confluens* se recolectó en la Antártida, en la Base Jubany, en enero de 1993, y se secó al aire libre. Una muestra se encuentra depositada en el Herbario del Museo Argentino de Ciencias Naturales Bernardino Rivadavia, bajo el N° 35806.

El alga seca (54,0 g) contenía algas diatomeas epífitas, que fueron identificadas como *Rhoicosphaenia marina*, *Odontella aurita* y *Entopyla australis*². Se procedió a su remoción por lavados con etanol 70 % (3 x 1 l, con agitación durante 1 h) y luego por lavado con agua corriente a presión, sobre un tamiz fino, durante un breve lapso. Este tratamiento permitió obtener un material libre de diatomeas, como se pudo observar al microscopio óptico.

La muestra seca (28,0 g) se extrajo con agua (1,0 l) a temperatura ambiente, durante 20 h, con agitación mecánica. El residuo se separó por centrifugación y el sobrenadante se filtró, dializó, concentró y liofilizó. El residuo se re-extrajo (x 2), dando lugar a los extractos E1 (1,03845 g), E2 (0,7133 g), E3 (0,5311 g). Antes de continuar con las extracciones, se lavó nuevamente el residuo bajo agua corriente a presión a fin de eliminar algunas diatomeas remanentes en suspensión. Finalmente, se continuó con el procedimiento obteniéndose dos extractos más: E4 (0,95475 g) y E5 (1,4600 g). Luego de analizar la composición en monosacáridos y el contenido de sulfato, se decidió juntar los extractos, PE, (4,690 g; 16,7 % del material libre de diatomeas). Una parte de PE (1,313 g) se disolvió en agua (400 ml) y, luego de centrifugar, concentrar, filtrar y liofilizar, dio lugar al conjunto de polisacáridos que se denominó CP (935 mg)

7.5. FRACCIONAMIENTO DEL SISTEMA DE POLISACÁRIDOS DE *GEORGIELLA CONFLUENS*

Sobre una solución de CP (903 mg) en agua (175 ml), se fue agregando lentamente y con agitación una solución de cetrimida 10% (9 ml), hasta prueba de precipitación negativa. La mezcla se dejó agitando durante 7 h adicionales, se centrifugó y el precipitado se lavó con agua. La solución obtenida, junto con el agua de lavado, fue filtrada, dializada y liofilizada para dar la fracción G1 (78,9 mg) (Apéndice A.2). Por otra parte, el precipitado se sometió a un fraccionamiento por redisolución en soluciones de cloruro de sodio de concentraciones crecientes, según se indica a continuación. Se suspendió en una solución de NaCl 0,5 M (60 ml), con agitación durante 16 h, luego se centrifugó y lavó con solución de cloruro de sodio. El sobrenadante, al cual se agregó la solución de lavado, se extrajo con 1-pentanol (3 x 30 ml), dializó, concentró y liofilizó, dando la fracción G2 (434,35 mg). El precipitado remanente se trató de manera análoga con soluciones de cloruro de sodio de concentraciones 1,0; 2,0; 3,0 y 4,0 M; el material solubilizado en cada etapa dio lugar a las fracciones G3 (180,05 mg), G4 (12,85 mg), G5 (3,1 mg) y G6 (2,0 mg). La fracción insoluble en NaCl 4,0 M se denominó G7 (3,45 mg) (Apéndice A.2).

A partir de G2 (386,3 mg) y G3 (121,3 mg) se obtuvieron las fracciones G2' (310,1 mg) y G3' (80,2 mg), por redisolución en soluciones de NaCl 0,5 (500 ml) y 1,0 M (200 ml), respectivamente. Las soluciones se re-extrajeron con 1-pentanol, dializaron, concentraron y liofilizaron, tal como se había procedido con las fracciones originales.

7.6. FRACCIONAMIENTO DE G2'

La fracción mayoritaria obtenida, G2', fue subfraccionada por cromatografía de intercambio iónico sobre DEAE Sephadex A-25 (Cl⁻) primero en escala analítica y luego a escala preparativa. El gel se preparó por suspensión en agua durante 16 h y calentamiento a ebullición durante 2 h, a fin de separar las partículas finas por decantación.

La columna analítica, realizada en una jeringa plástica de 1 ml, se preparó por agregado de una suspensión diluida de gel (45 mg de resina), dando un volumen final de lecho de aproximadamente 0,15 ml. Se sembró una solución concentrada de G2' (11,55 mg en 0,3 ml de agua), eluyendo con agua y soluciones de NaCl 0,1; 0,3; 0,5; 0,7; 1,0; 1,5 y 2,0 M. Se tomaron grupos de 10 tubos con fracciones de 0,5 ml para cada solvente de elución, mediante un colector automático (BioRad 2210). El contenido de hidratos de carbono de los tubos se

analizó por el método de fenol-ácido sulfúrico³ (Fig. 5.1), tomando como referencia una curva de calibración confeccionada con una solución de galactosa.

La columna preparativa, realizada en una columna de 1,0 x 10 cm, se preparó por agregado de una suspensión diluida de gel (630 mg de resina). Se sembró una solución concentrada de G2' (135 mg en 0,7 ml de agua), eluyendo con agua y aquellas soluciones de cloruro de sodio que resultaron significativas según los resultados obtenidos en la columna analítica (0,3; 0,5; 0,7 y 1,0 M). Se recogieron fracciones de 4 ml cada una; el contenido de hidratos de carbono se analizó por el método de fenol-ácido sulfúrico³, tomando como referencia una curva de calibración de galactosa. Luego de obtener lecturas consistentes con ausencia de hidratos de carbono, se pasó a la solución siguiente de mayor concentración. La solución eluida se fraccionó de la siguiente manera: G2'D1, de 0 a 16 ml (16,55 mg); G2'D2, de 52 a 60 ml (5,05 mg); G2'D3, de 60 a 80 ml (3,80 mg); G2'D4, de 80 a 128 ml (2,55 mg); G2'D5, de 128 a 164 ml (38,95 mg); G2'D6, de 164 a 208 ml (11,75 mg); G2'D7, de 212 a 236 ml (17,40 mg); G2'D8, de 236 a 284 ml (14,40 mg); G2'D9, de 284 a 360 ml (3,65 mg) (Fig. 5.2).

7.7. DETERMINACIÓN CUANTITATIVA DEL CONTENIDO TOTAL DE HIDRATOS DE CARBONO

Se empleó el método colorimétrico del fenol-ácido sulfúrico según la técnica descripta por Dubois et al.³

REACTIVOS NECESARIOS

- 1- Ácido sulfúrico 98 %, grado analítico.
- 2- Solución acuosa de fenol 5 % (p/v). Esta solución es estable durante varios meses conservada en frasco color caramelo a temperatura ambiente.

PROCEDIMIENTO

A una solución (0,5 ml) conteniendo entre 10-70 µg de hidratos de carbono/ml se agregó fenol (0,5 ml) y mezcló. Se dejó caer ácido sulfúrico concentrado (2,5 ml), mediante un dispensador automático, directamente sobre la superficie de la solución a fin de asegurar un calentamiento máximo. Al cabo de 10 min, los tubos se agitaron y se mantuvieron 20 min más a temperatura ambiente. En forma paralela se efectuó un blanco con agua destilada. La absorbancia del color desarrollado se registró a 490 nm. La cuantificación del contenido de

hidratos de carbono se refirió a curvas de calibración hechas con manosa o galactosa, según el alga de origen de la muestra analizada. El resultado se expresó como porcentaje de azúcar anhidro.

El porcentaje de hidratos de carbono de un heteropolisacárido puede calcularse tomando como referencia una curva de calibración construida sólo con uno de los monosacáridos componentes (galactosa, por ejemplo) y aplicando la siguiente expresión⁴:

$$\%HC = \frac{A}{p \times \sum_i \frac{x_i \epsilon_i}{\epsilon_{gal}}} \times \frac{\sum_i x_i (M_i - 18)}{180} \times \frac{100}{m} \times d$$

donde: A , absorbancia de la solución
 x_i , fracción molar del componente i
 M_i , masa molar del componente i
 d , factor de dilución utilizado
 p , pendiente de la recta de calibración
 ϵ_i , coeficiente de absorción para el componente i
 ϵ_{gal} , coeficiente de absorción para la galactosa
 m , masa de muestra pesada

La ecuación anterior permite corregir las diferencias entre los coeficientes de absorción para cada uno de los monosacáridos componentes del polisacárido. Para ello es necesario determinar por cromatografía gaseosa los azúcares componentes y su proporción.

Por otra parte, se corrige el peso molecular de la galactosa por el “peso molecular promedio anhidro” que surge de tener en cuenta nuevamente la composición del polisacárido.

Los coeficientes de absorción (en $\text{ml} \cdot \mu\text{g}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) considerados para los distintos azúcares⁴ son: galactosa, 0,0089; 2-*O*-metilgalactosa, 0,0080; 6-*O*-metilgalactosa, 0,0062; xilosa, 0,0125.

7.8. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE SULFATO

El contenido de sulfato de las muestras se determinó mediante el método turbidimétrico de Dodgson y Price⁵, o bien, mediante cromatografía de intercambio iónico con detector conductimétrico. La determinación del contenido de éster sulfato se efectuó previa hidrólisis de las muestras.

7.8.1. MÉTODO TURBIDIMÉTRICO

REACTIVOS NECESARIOS

1- Cloruro de bario-gelatina: Se disolvió la gelatina (Oxoid, libre de sulfato) (200 mg) en agua (40 ml) a 60-70°C; la solución resultante se dejó en la heladera durante por lo menos 6 h. Luego, se agregó el cloruro de bario (grado analítico) (200 mg) al fluido viscoso, que se dejó en la heladera 2-3 horas más. El reactivo así preparado es estable durante una semana en heladera.

2- Ácido tricloroacético (TCA) 3% (p/v).

PROCEDIMIENTO

Se disolvió el polisacárido (1-2 mg) en HCl 1 M (1 ml), de modo tal de obtener una solución madre que permitiera obtener, por diluciones adecuadas, soluciones con una concentración final de sulfato dentro del rango 20-200 $\mu\text{g SO}_4^{2-}/0,5 \text{ ml}$. La muestra disuelta se hidrolizó por calentamiento en vial con cierre de teflon a 105-110°C durante 4-5 h. Una vez enfriada, se tomaron alícuotas cuyas concentraciones finales quedaran incluidas en el rango de linealidad indicado al llevar a un volumen final de 0,5 ml (en HCl 1 M). Sobre estas se adicionó la solución de TCA (3,5 ml), se mezcló y agregó el reactivo de cloruro de bario-gelatina (1 ml). Se mezcló nuevamente y, luego de dejar reposar a temperatura ambiente 15-20 min, se midió la absorbancia a 360 nm. Paralelamente, se realizó un blanco partiendo de 0,5 ml de HCl 1 M. La medición debe hacerse dentro de la primera hora ya que luego el sulfato de bario tiende a precipitar.

La cuantificación del sulfato se realizó por referencia a una curva de calibración obtenida en las mismas condiciones, preparada a partir de soluciones de sulfato de sodio en HCl 1 M.

7.8.2. CROMATOGRAFÍA IÓNICA CON DETECTOR CONDUCTIMÉTRICO

Las muestras (~1 mg) se disolvieron en ácido trifluoroacético (TFA) 2 M (1 ml) e hidrolizaron por calentamiento en vial cerrado a 105-110°C durante 4-5 h. Una vez enfriadas, se llevaron a sequedad bajo corriente de aire seco y se redisolviaron en 4 ml de agua (grado conductimétrico). La determinación de sulfato se realizó en un cromatógrafo iónico DIONEX DX-100, equipado con una columna AS4A y un detector conductimétrico. La elución se hizo con una solución de Na_2CO_3 1,8 mM y NaHCO_3 1,7 mM, a un flujo de 2 ml/min.

7.9. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE α -GALACTOSA 6-SULFATO

El contenido de α -galactosa 6-sulfato se determinó por el método de Rees⁶, que cuantifica el contenido de 3,6-anhidrogallactosa antes y después de someter la muestra a un tratamiento alcalino.

TRATAMIENTO ALCALINO

A una solución al 0,2 % del polisacárido (5 ml) se agregó NaBH_4 (20 mg) y se dejó a temperatura ambiente durante 24 h. Una alícuota (4 ml) de la solución se mezcló con NaOH 3 M (2 ml) y más NaBH_4 (40 mg). Esta mezcla se dividió en 4 alícuotas (1,5 ml) que se calentaron en viales cerrados a 80°C durante 2; 3,5 y 5 h; la porción restante se mantuvo en baño de hielo.

Se determinó el contenido de 3,6-anhidrogallactosa en cada una por el método de Yaphe⁷. Se calculó el porcentaje de unidades de α -galactosa 6-sulfato en la muestra por diferencia entre el contenido de 3,6-anhidrogallactosa de la solución inicial, mantenida en baño de hielo, y el correspondiente a las alícuotas sometidas al tratamiento alcalino.

7.10. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO 3,6-ANHIDROGALACTOSA

Se aplicó el método de resorcinol-ácido clorhídrico, según la técnica descrita por Yaphe⁷.

REACTIVOS NECESARIOS

Se preparó una solución de resorcinol (130 mg) en alcohol absoluto (100 ml), esta solución es estable durante 1 mes si se guarda en heladera en frasco color caramelo.

El reactivo se prepara por agregado de 10 ml de la solución anterior a 100 ml de HCl (c)

PROCEDIMIENTO

A una solución (0,6 ml) conteniendo 5-40 µg de 3,6-anhidrogalactosa o su equivalente en polisacárido, colocada en un tubo de ensayo en baño de hielo, se agregó el reactivo de resorcinol (3 ml). Luego de mezclar, se tapó y mantuvo en baño de hielo. Se llevó a temperatura ambiente y luego se calentó a 80°C durante 10 min. Se enfrió en baño de hielo y la absorbancia del color desarrollado fue medida a 550 nm dentro de los primeros 15 min. Paralelamente, se efectuó un blanco con agua destilada. El contenido de 3,6-anhidrogalactosa se determinó por referencia a una curva de calibración, realizada con soluciones de fructosa, y se expresó como porcentaje del componente anhidro.

La conversión de la curva de calibración, expresada en masa de fructosa, a masa de 3,6-anhidrogalactosa se hizo según:

$$m_{36AG} = m_{fru} \times 0,92$$

donde: m_{36AG} , masa de 3,6-anhidrogalactosa

m_{fru} , masa de fructosa

0,92, factor de corrección de fructosa en 3,6-anhidrogalactosa

Cuando el dosaje de azúcares totales se realiza sobre un polisacárido sin hidrolizar, la absorbancia medida es la suma de las contribuciones de cada uno de los monosacáridos componentes. La contribución de la 3,6-anhidrogalactosa puede calcularse conociendo su concentración, obtenida por el método de resorcinol-HCl. La absorbancia debida a los demás monosacáridos se determina como la diferencia entre el valor de los azúcares totales y el correspondiente al contenido de 3,6-anhidrogalactosa.

7.11. DOSAJE DE GRUPOS REDUCTORES

Se determinó por el método colorimétrico de Park y Johnson⁸.

REACTIVOS NECESARIOS

- 1- Solución A: ferricianuro de potasio (0,05% p/v), almacenado en botella color caramelo.
- 2- Solución B: carbonato de sodio (0,53%) + cianuro de potasio (0,065%)
- 3- Solución C: sulfato amónico-férrico (1,5 g) + dodecilsulfato de sodio (SDS) (1 g) en ácido sulfúrico 0,025 M (1 l).

PROCEDIMIENTO

A una solución (0,5 ml) conteniendo 1-10 µg de galactosa, manosa, o su equivalente en polisacárido –según corresponda–, se le agregaron la solución A (0,5 ml) y la solución B (0,5 ml), mezclando después de cada adición. El tubo de ensayo se tapó con una bolita de vidrio y se calentó en baño de agua hirviendo durante 15 min. Se llevó la solución a temperatura ambiente, se agregó la solución C (2,5 ml) y se dejó durante 15 min adicionales, para permitir el desarrollo del color. Se determinó la absorbancia a 690 nm contra un blanco realizado con agua en las mismas condiciones.

El poder reductor de la muestra se determina por referencia a una curva de calibración de galactosa –o de manosa–; el peso molecular (promedio numérico) se calculó según la siguiente ecuación:

$$M_n = \frac{m_{mra}}{P_r} \times 180 \times d$$

donde: M_n , peso molecular promedio numérico

m_{mra} , masa de muestra

P_r , poder reductor, expresado como masa correspondiente del monosacárido empleado en la curva de calibración

d , factor de corrección por diluciones

7.12. DETERMINACIÓN DE LOS MONOSACÁRIDOS COMPONENTES

7.12.1. HIDRÓLISIS TOTAL DE LOS POLISACÁRIDOS

Los polisacáridos (1-3 mg) se hidrolizaron por calentamiento con TFA 2 M (0,5 ml) durante 2 h, a 121°C, en un vial con cierre de teflon⁹. Luego se llevó a sequedad bajo corriente de aire seco. El hidrolizado se redisolvió en agua y nuevamente se llevó a sequedad hasta evaporar totalmente el ácido.

7.12.2. PREPARACIÓN DE ALDITOLES ACETILADOS

La mezcla de monosacáridos se disolvió en agua (3 ml) y se redujo con NaBH₄, dejando reaccionar durante toda la noche, según el procedimiento de Lindberg¹⁰. Se agregó luego resina Amberlite IR 120 plus (H⁺) para destruir el exceso de agente reductor y descationizar. Se filtró y evaporó a sequedad. El borato residual se eliminó como borato de metilo, por agregado de metanol y evaporación a sequedad (5 x 0,5 ml). Se dejó en desecador al vacío durante una noche y los alditos así obtenidos se acetilaron con anhídrido acético (0,2 ml) y piridina (0,2 ml), calentando 45 min a 100°C. La solución se enfrió y extrajo con cloroformo-agua 1:1 (5 ml). La fase acuosa se separó y reextrajo con cloroformo (2 ml). Los extractos clorofórmicos combinados se lavaron con una solución saturada de NaHCO₃ (3 x 2 ml) y finalmente con agua (2 x 2 ml). El extracto clorofórmico, secado con Na₂SO₄ (anh), se evaporó a sequedad y el residuo obtenido se disolvió en 20 µl de cloroformo inmediatamente antes de inyectar en el cromatógrafo gaseoso.

7.12.3. PREPARACIÓN DE ALDONONITRILOS ACETILADOS

Se prepararon siguiendo el procedimiento de Turner y Cherniak¹¹. A la mezcla de azúcares proveniente de la hidrólisis se le agregó clorhidrato de hidroxilamina (10 mg) y piridina (0,5 ml), calentando en vial con cierre de teflon a 85°C durante 20-30 min. Se dejó enfriar y se añadieron 0,5 ml de anhídrido acético, manteniendo la mezcla 20-30 min más a 85°C. Los aldononitrilos acetilados se extrajeron tal como se describió para los alditos.

7.12.4. HIDRÓLISIS REDUCTIVA

La hidrólisis de los polisacáridos indicada en 7.12.1 degrada las unidades de 3,6-anhidrogalactosa. El método de hidrólisis reductiva, descrito por Stevenson y Furneaux¹², permite el análisis completo de los monosacáridos componentes y puede dividirse en dos etapas. En la primera, se hidrolizan selectivamente y reducen las unidades de 3,6-anhidrogalactosa. En la segunda etapa, el polisacárido se hidroliza y reduce totalmente.

REACTIVOS NECESARIOS

- 1- TFA 3 M
- 2- 4-metilmorfolina-borano (MMB) 8% (p/v), solución preparada en el momento
- 3- TFA
- 4- Anhídrido acético

PROCEDIMIENTO

Al polisacárido (1-3 mg) se le agregaron TFA 3 M (0,4 ml) y la solución acuosa de MMB (0,1 ml), calentando en vial con cierre de teflon a 80°C durante 10-20 min. Una vez a temperatura ambiente, se agregó una nueva porción de MMB (0,1 ml) e hidrolizó en estufa a 121°C durante 120 min.

Luego de dejar enfriar, se añadió una nueva porción de MMB (0,2 ml) justo antes de comenzar a evaporar bajo corriente de aire seco a 50°C. Al residuo seco se agregó acetonitrilo (0,5 ml), llevando a sequedad otra vez. El producto de hidrólisis se dejó en desecador al vacío durante por lo menos 1 h.

Los alditos obtenidos se acetilaron con anhídrido acético (0,1 ml) y TFA (0,1 ml), a 55-60°C durante 10 min. La mezcla acetilada se trató según se describe en 7.12.2.

7.13. ESTUDIOS DE ALQUILACIÓN

7.13.1. MÉTODO DE HAWORTH

Algunos xilomananos de *Nothogenia fastigiata*, específicamente las fracciones F2', F2'desulfatada y F4', se metilaron en una primera etapa por el método de Haworth¹³ según la técnica descrita por Cerezo¹⁴. El tratamiento subsecuente del producto parcialmente metilado según el método de Hakomori¹⁵ dio como resultado los polisacáridos permetilados.

El polisacárido (20 mg) se disolvió en agua (0,60 ml) a temperatura ambiente, y se redujo con NaBH₄ (2-3 mg), agitando durante 16 h. Después se agregó NaOH 30% (120 µl); se mantuvo la agitación mecánica vigorosa mientras se agregaban, simultáneamente y gota a gota, NaOH 30% (840 µl) y sulfato de dimetilo (280 µl) manteniendo todo el sistema en baño de hielo y bajo corriente de nitrógeno. La agitación se mantuvo durante 5 h 30 min (en este lapso la solución se tornó más viscosa). Se hicieron dos agregados más de NaOH y sulfato de dimetilo en las mismas condiciones. Luego de diluir con un poco de agua, el sistema se dializó y liofilizó.

7.13.2. METODO DE HAKOMORI¹⁵

REACTIVOS NECESARIOS

- 1- Metilsulfinilmetanuro de sodio
- 2- Ioduro de metilo

PREPARACIÓN DEL METILSULFINILMETANURO DE SODIO (CARBANIÓN SÓDICO)

Se suspendió NaH (1,8-2 g) en dimetilsulfóxido (15 ml) (secado sobre tamices moleculares de 4 Å) en un balón de dos bocas. A una de las bocas se acopló un refrigerante con circulación de agua, en cuyo extremo se anexó una trampa de CaCl₂ (anh); la segunda boca se selló con un séptum de goma por el cual se hizo pasar una corriente continua de N₂ seco. El balón se calentó a 50-60°C, en baño de aceite o vaselina líquida. Al cabo de aproximadamente 3 h de reacción, la evolución de gas cesó y la solución gris-verdosa resultante se trasvasó para ser utilizada directamente en la metilación. El reactivo se conservó en freezer a -17°C, en frasco cerrado y contenido dentro de un recipiente con CaCl₂ (anh). La concentración del carbanión se determinó, inmediatamente antes de su empleo, por titulación con HCl 0,05 M,

con fenolftaleína como indicador. El reactivo se consideró adecuado si la concentración de base era mayor que 2 M.

METILACIÓN DE LOS POLISACÁRIDOS

La muestra (15 mg) se disolvió en DMSO (1 ml) con agitación. Se agregó carbanión sódico (1 ml) y sonicó durante 3 h, en atmósfera de N₂. La mezcla se enfrió en baño de hielo, mientras se agregaba gota a gota el yoduro de metilo (1 ml). Se continuó con la agitación a temperatura ambiente, en atmósfera de N₂, durante 1 h. Se hizo un segundo agregado de carbanión sódico (0,5 ml), colocando la mezcla sobre baño de hielo; luego de agitar durante 1 h 30 min, se hizo una nueva adición de yoduro de metilo (0,5 ml) en las mismas condiciones anteriores. Después de 1 h 30 min se cortó la reacción por agregado de agua, dializó y liofilizó, para dar los polisacáridos permetilados.

7.13.3. MÉTODO DE STEVENSON Y FURNEAUX¹²

Este método se trata de una modificación del descripto por Hakomori. Implica la conversión de los polisacáridos en las sales de trietilamonio correspondientes, en una etapa previa a la metilación propiamente dicha, a fin de mejorar la solubilidad del material de partida en DMSO.

SALES DE TRIETILAMONIO

Se preparó una columna (1 x 10 cm) rellena con Amberlite IR 120 plus (H⁺), equilibrando con una solución de clorhidrato de trietilamonio 20% de modo de cambiar el catión de intercambio. Una vez lavada con agua, hasta prueba de precipitación negativa del eluido con una solución de AgNO₃ 5 %, se sembró el polisacárido (5-10 mg) disuelto en un volumen mínimo de agua. Las sales de trietilamonio de los polisacáridos se recuperaron por elución con agua y liofilización, manteniendo en desecador al vacío hasta su utilización.

METILACIÓN

Los polisacáridos (5 mg), como sal de trietilamonio, se disolvieron en DMSO (0,5 ml), con agitación. A la solución se añadió carbanión sódico (0,5 ml), agitando 2 h en atmósfera de N₂. El yoduro de metilo (0,5 ml) se incorporó sobre la mezcla enfriada en baño de hielo, gota a gota, después se agitó durante 1 h. Se efectuó un segundo agregado de carbanión sódico (0,5 ml) y de yoduro de metilo (0,5 ml), siempre sobre baño de hielo y atmósfera de N₂,

continuando con la agitación durante 2 h y 1 h respectivamente. La reacción se cortó por agregado de agua, el exceso de yoduro de metilo se eliminó por evaporación con aire bajo campana. Los productos metilados se recuperaron por diálisis y liofilización.

Las metilaciones realizadas sobre carragenano kappa y sus derivados desulfatados se llevaron a cabo con un solo agregado de carbanión sódico y yoduro de metilo, en las condiciones arriba indicadas, dejando con agitación durante 30 min cada vez.

7.13.4. METILACIÓN CON *N*-ÓXIDO DE 4-METILMORFOLINA

Este método se desarrolló a fin de proporcionar un mejor solvente para la metilación de celulosa y otros polisacáridos estructurales de plantas¹⁶. Se intentó la metilación de la fracción F2' siguiendo el procedimiento que se detalla.

Las muestras (20 mg) en *N*-óxido de 4-metilmorfolina monohidrato (500 mg) se calentaron durante 30 min a 120°C en un vial cerrado (Wheaton-V de 5 ml). Se agregó DMSO (2 ml) sobre la mezcla fundida y se agitó durante 1 h a 55°C. Se llevó a temperatura ambiente y se añadió carbanión sódico (1 ml), agitando durante 2 h. Luego se incorporó yoduro de metilo (1 ml), sobre baño de hielo, agitando durante 2 horas más. El contenido del vial se volcó sobre 20 ml de agua. El producto de reacción se recuperó por diálisis y liofilización.

7.13.5. METILACIÓN CON CLORURO DE LITIO

Esta modificación del método de Hakomori utiliza como solvente un sistema de LiCl/DMSO, fue desarrollada para alquilar celulosa en medio homogéneo¹⁷. Se intentó metilar la fracción F2' siguiendo esta técnica.

El polisacárido (25 mg) se disolvió en una mezcla de LiCl (200 mg) y DMSO (2,8 ml), por sonicación, y se dejó en reposo durante 24 h. Se agregó carbanión sódico (1 ml), se sonicó durante 1 h y luego se dejó con agitación durante 4 h. Se adicionó yoduro de metilo (0,5 ml), se sonicó durante 30 min y se dejó agitando durante 14 h. Se realizó un segundo agregado de carbanión sódico (0,5 ml) y de yoduro de metilo (0,5 ml), con períodos de agitación de 3 h luego de cada uno. La reacción se volcó sobre agua (20 ml). El producto se dializó y liofilizó.

7.13.6. ETILACIÓN

Los polisacáridos naturalmente metilados de *Georgiella confluens* fueron etilados, luego de convertirlos en sus sales de trietilamonio, siguiendo el procedimiento descrito por Cases *et al.*¹⁸

REACTIVOS NECESARIOS

- 1- Metilsulfonilmetanuro de sodio (carbanión sódico, ver Sección 7.13.2)
- 2- Ioduro de etilo

ETILACIÓN

Las sales de trietilamonio de los polisacáridos (3-5 mg) se disolvieron en DMSO (0,5 ml), todo el proceso se realizó bajo atmósfera de N₂ y con agitación. Se agregó carbanión sódico (0,5 ml), luego de 2 h se incorporó ioduro de etilo (0,5 ml) gota a gota y enfriando en baño de hielo, se dejó reaccionar durante 30 min. Se efectuó un segundo agregado de carbanión sódico (0,5 ml) y de ioduro de etilo (0,5 ml), agitando durante 60 y 30 min respectivamente después de cada adición. La reacción se cortó por agregado de agua, el exceso de ioduro de etilo se evaporó con corriente de aire bajo campana. Los productos etilados se recuperaron por diálisis y liofilización.

A fin de asegurar su etilación completa, G2' etilada y G2'SD etilada se sometieron a un segundo proceso de etilación.

7.13.7. DETERMINACIÓN DE LA COMPOSICIÓN EN MONOSACÁRIDOS DE LOS POLISACÁRIDOS PERALQUILADOS

Los polisacáridos permetilados de *Nothogenia fastigiata* se hidrolizaron en las condiciones descriptas en 7.12.1 y se transformaron en los acetatos de alditos o de nitrilos, según 7.12.2 y 7.12.3.

Los polisacáridos peralquilados de *Georgiella confluens* y los carragenanos permetilados se sometieron a hidrólisis reductiva en las condiciones descriptas en 7.12.4, pero realizando la evaporación a seco después de agregar la tercera porción de MMB (0,2 ml) bajo corriente de aire a 30°C, en vez de 50°C.

7.14. DETERMINACIÓN DE LA CONFIGURACIÓN ABSOLUTA DE LAS UNIDADES DE GALACTOSA

La configuración absoluta de las unidades de galactosa que componían los polisacáridos de *G. confluens* se determinó por aminación reductiva, según el método desarrollado por Cases *et al.*¹⁹ Las aminaciones reductivas de las muestras se llevaron a cabo sobre los polisacáridos hidrolizados, en las condiciones indicadas en 7.12.1, con (*S*)-1-amino-2-propanol, para dar los 1-desoxi-1-(2-hidroxi-1-propilamino)alditales correspondientes. En aquellos casos en los que se quería analizar específicamente la configuración absoluta de los residuos de 2-*O*-metilgalactosa se derivatizaron con (*S*)-1-feniletilamina, obteniéndose entonces los 1-desoxi-1-(1-feniletilamino)alditales.

REACTIVOS NECESARIOS

- 1- Solución AA: (*S*)-1-amino-2-propanol en metanol (1:8 v/v)
- 2- Solución AF: (*S*)-1-feniletilamina en metanol (1:8 v/v)
- 3- Solución B: Ácido acético glacial en metanol (1:4 v/v)
- 4- Solución C: Cianoborohidruro de sodio en metanol (3% p/v)

7.14.1. OBTENCIÓN DE 1-DESOXI-1-(2-HIDROXI-1-PROPILAMINO)-ALDITALES ACETILADOS

Al polisacárido hidrolizado (1-5 mg) se agregaron las soluciones AA (20 µl), B (17 µl) y C (13 µl) y se calentó en un vial con cierre de teflon a 65°C, durante 2 h. Luego de enfriar se agregó, gota a gota, TFA 3 M hasta pH 1-2. La mezcla se evaporó a sequedad, se co-evaporó con agua (3 x 0,5 ml) y metanol (5 x 0,5 ml). El residuo se mantuvo en desecador al vacío, para ser acetilado con anhídrido acético-piridina (1:1) a 100°C durante 45 min. Los derivados se purificaron por extracciones, según el procedimiento indicado en 7.11.2.

7.14.2. OBTENCIÓN DE 1-DESOXI-1-(1-FENILETILAMINO)ALDITOLES ACETILADOS

Se siguió el procedimiento indicado para la obtención de 1-desoxi-1-(2-hidroxiopropilamino)alditole, pero utilizando solución AF (32 µl) en lugar de la solución AA.

7.15. DETERMINACIÓN DE LA CONFIGURACIÓN ABSOLUTA DE LAS UNIDADES DE 2,6-DI-O-ALQUILGALACTOSA

Se siguió la técnica desarrollada en colaboración con la Dra. M.I. Errea. El estándar de 2,6-di-O-metilgalactosa fue preparado y cedido gentilmente por el Dr. A.S. Cerezo. El estándar de 2,6-di-O-etilgalactosa se obtuvo por etilación e hidrólisis (TFA 2 M, 121°C, 2 h), a partir de carragenano kappa comercial (carragenano tipo III, de *Eucheuma cottonii*, Sigma: C 1263).

REACTIVOS NECESARIOS

- 1- Solución A: (S)-1-feniletilamina en metanol (1:8 v/v)
- 2- Solución B: Ácido acético glacial en metanol (1:4 v/v)
- 3- Solución C: Cianoborohidruro de sodio en metanol (3% p/v)

PROCEDIMIENTO

El polisacárido (1-3 mg) se hidrolizó en las condiciones indicadas en 7.12.1, luego se agregaron las soluciones A (32 µl), B (17 µl) y C (13 µl) y se calentó en vial con cierre de teflon a 65°, durante 2 h. Luego de enfriar se agregó TFA 3 M, gota a gota, hasta pH 1-2. La mezcla se evaporó a sequedad y luego se co-evaporó con agua (3 x 0,5 ml) y metanol (5 x 0,5 ml). El residuo se acetiló con anhídrido acético-TFA (1:1), a 65°C durante 15 min. Luego de enfriar, los derivados se extrajeron en las condiciones descriptas en 7.12.2. El rendimiento del (1'S)-1-desoxi-1-(1'-feniletilamino)-2,6-di-O-metilgalactitol fue del 80 %.

7.16. CROMATOGRAFÍA GASEOSA

Los análisis de las muestras hidrolizadas y derivatizadas se realizaron en un cromatógrafo gaseoso Hewlett-Packard 5890A con detector de ionización de llama, nitrógeno como gas carrier, relación de split 80:1, conectado a un integrador Hewlett-Packard 3395A. Las proporciones menores al 1% se consideran trazas.

7.16.1. ANÁLISIS DE ALDITOLES Y ALDONONITRILOS ACETILADOS

Los monosacáridos componentes de los polisacáridos y de sus productos de peralquilación se analizaron con una columna capilar SP-2330 (Supelco) de 30 m de longitud; 0,25 mm de diámetro interno y 0,20 µm de espesor del film, bajo una presión de cabeza de 15 psi y flujo de gas carrier de 1 ml/min. La conversión de las áreas de cada pico a porcentajes molares se calculó de acuerdo a la teoría de respuesta efectiva de carbono (effective carbon response theory, ecr) propuesta por Albersheim²⁰; para el 1,4,5-tri-*O*-acetil-3,6-anhidro-2-*O*-metilgalactitol se utilizó un factor de respuesta de 0,64¹². Los programas de temperatura utilizados fueron los siguientes:

PROGRAMA A: isotérmica a 220°C, temperaturas de inyector y detector: 240°C, para alditoles y nitrilos acetilados de *N. fastigiata*.

PROGRAMA B: isotérmica a 210°C, temperaturas de inyector y detector: 240°C, para acetatos de alditoles y nitrilos metilados de *N. fastigiata*.

PROGRAMA C: de 180 a 200°C a 2°/min, 2 min a 200°C, de 200 a 230°C a 4°/min, 30 min a 230°C, temperaturas de inyector y detector: 240°C, para acetatos de alditoles y nitrilos metilados de *N. fastigiata*.

PROGRAMA D: de 160 a 210°C a 2°/min, de 210 a 240°C a 5°/min, 30 min a 240°C, temperaturas de inyector y detector: 220 y 240°C respectivamente, para alditoles y nitrilos acetilados de *G. confluens*.

PROGRAMA E: 2 min a 180°C, de 180 a 210°C a 1°/min, de 210 a 230°C a 2°/min, 30 min a 230°C, temperaturas de inyector y detector: 220 y 240°C respectivamente, para acetatos de alditoles y nitrilos metilados de *G. confluens*.

7.16.2. ANÁLISIS DE AMINOALDITOLES ACETILADOS

Los productos obtenidos por aminación reductiva se cromatografiaron con una columna Ultra-2 (Hewlett-Packard) de 50 m de longitud; 0,2 mm de diámetro interno y 0,11 μm de espesor de film; bajo una presión de cabeza de 20 psi y flujo de gas carrier de 0,65 ml/min. Los programas de temperatura utilizados fueron los siguientes:

PROGRAMA F: de 180 a 220°C a 4°/min, 2 min a 220°C, de 220 a 270°C a 1°/min, temperaturas de inyector y detector: 240 y 270°C respectivamente, para 1-desoxi-1-(2-hidroxipropilamino)alditole acetilados.

PROGRAMA G: 3 min a 180°C, de 180 a 220°C a 3°/min, 2 min a 220°C, de 220 a 270°C a 1°/min, temperaturas de inyector y detector: 240 y 270°C respectivamente, para 1-desoxi-1-(1-feniletilamino)alditole acetilados.

7.17. ESPECTROMETRÍA DE MASA

7.17.1. CROMATOGRFÍA GASEOSA-ESPECTROMETRÍA DE MASA

Para las muestras analizadas por cromatografía gaseosa-espectrometría de masa se utilizaron un cromatógrafo gaseoso HP-5890 Series II acoplado a un espectrómetro de masa Trío-2 VG Masslab y/o un cromatógrafo gaseoso GC17A acoplado a espectrómetro de masa GCMS QP5050A (Shimadzu), en ambos casos a un potencial de ionización de 70 eV. Las condiciones de corrida fueron las mismas que en 7.16.1 y 7.16.2, con la única diferencia que el gas carrier era helio en este caso.

7.17.2. ESPECTROMETRÍA DE MASA UV-MALDI-TOF

Los experimentos de espectrometría de masa UV-MALDI-TOF (matrix-assisted laser desorption/ionization, desorción/ionización por láser asistidas por la matriz) se llevaron a cabo en colaboración con la Dra. R. Erra-Balsells y el Dr. H. Nonami (Plant Biophysics/Biochemistry Research Laboratory, College of Agriculture, Ehime University, Japón).

7.17.2.1. XILOMANANOS

Se utilizó un equipo Shimadzu Kratos, Kompact MALDI III (Shimadzu, Kyoto, Japón), equipado con un láser pulsado de nitrógeno ($\lambda=337$ nm, ancho de pulso=3 ns). El analizador se utilizó a un voltaje de aceleración de 20 kV para medir muestras de peso molecular elevado. Los iones se obtuvieron por irradiación de la muestra justo por encima de la potencia mínima del láser, por lo tanto, la irradiancia empleada para obtener un espectro de masa dependió del analito. Se acumularon 50 espectros. Todas las muestras se analizaron en los modos lineal y reflectrón, tanto en modo positivo como negativo.

Las matrices que se ensayaron fueron:

β -carbolinas: *nor*-harmano (9*H*-pirido[3,4-*b*]indol); harmano (1-metil-9*H*-pirido[3,4-*b*]indol); harmina (1-metil-7-metoxi-9*H*-pirido[3,4-*b*]indol);
ácido 2,5-dihidroxibenzoico (2,5-DHB, ácido gentísico);
ácido sinapínico (SA, ácido 3,5-dimetoxi-4-hidroxicinámico);
ácido α -ciano-4-hidroxicinámico (4-HCCA);
1-hidroxiisoquinolina (HIQ).

Como agentes calibrantes externos se utilizaron: insulina bovina (PM 5733,5), aprotinina (PM 6512), ribonucleasa A (PM 13700), lisozima (PM 14307), mioglobina (PM 16950), tripsina (PM 23290) y proteasa (PM 27288,4). Los espectros se calibraron mediante el uso de Na^+ , compuestos estándares como calibrantes externos y matrices como calibrantes internos (β -carbolinas), aplicando el programa de calibración Kratos Kompact.

Las muestras se colocaron en soportes de acero inoxidable para 20 muestras cada uno (Shimadzu).

PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

Se prepararon soluciones stock disolviendo los compuestos seleccionados como matriz (*nor*-harmano, harmano, 2,5-DHB, 20 mg) en mezclas 2:3 v/v de MeCN-TFA 0,1% (1 ml). Cuando se utilizó HIQ como aditivo de 2,5-DHB, se usaron soluciones de 2,5-DHB 0,2 M y HIQ 0,06 M en H_2O -MeCN 1:1, que se mezclaron en proporción 3:1 para dar la solución inicial de matriz en los métodos A y B (ver más adelante). Cuando se usaron β -carbolinas (*nor*-harmano y harmano) como aditivos de 2,5-DHB se siguió el mismo protocolo. Las soluciones de analito se prepararon disolviendo los polisacáridos en agua pura (grado MilliQ,

56-59 nS/cm) en concentraciones de 0,10 mg/ml. Para calibrar se prepararon soluciones de cada una de las proteínas (10 pmol/ μ l) en TFA 0,1%.

Se utilizaron tres métodos de preparación de muestras:

MÉTODO A: antes de colocar la muestra, se colocó solución de matriz (1 μ l) en cada portamuestras (2 x 1,5 mm) y luego se removi6, a fin de lavar la superficie. Luego se deposit6 la soluci6n de analito (0,5 μ l), la soluci6n de matriz (1,0 μ l) cubriendo a la anterior y el solvente se evapor6 por corriente de aire.

MÉTODO B: primero se deposit6 la soluci6n de matriz (0,5 μ l) en el portamuestras, se evapor6 el solvente bajo corriente de aire, despu6s se cubri6 la matriz con soluci6n de analito (0,5 μ l) y se evapor6 el solvente. Finalmente se hicieron dos nuevos dep6sitos de matriz (0,5 μ l de soluci6n cada uno). Esto da como resultado una relaci6n de soluciones analito-matriz 1:3 (v/v).

MÉTODO C: los mejores resultados para matrices “dopadas” 2,5-DHB-HIQ se obtuvieron cuando las soluciones de analito y matriz se depositaron y secaron en la secuencia: (i) 2,5-DHB (0,5 μ l); (ii) 2,5-DHB (0,5 μ l); (iii) HIQ (0,5 μ l); (iv) 2,5-DHB (0,5 μ l); (v) analito (0,5 μ l). Esto da como resultado una relaci6n de soluciones analito-2,5-DHB-HIQ 1:3:1 (v/v). Se emple6 el mismo protocolo para todas las matrices “dopadas” 2,5-DHB- β -carbolinas.

USO DE CsCL COMO DOPANTE I6NICO

Los m6todos B y C se siguieron cuando las matrices involucradas eran β -carbolina; 2,5-DHB; 2,5-DHB-IHC y 2,5-DHB- β -carbolina y se agreg6 CsCl como dopante i6nico. Las secuencias para cargar el portamuestras fueron:

M6todo B: (i) matriz (0,5 μ l); (ii) analito (0,5 μ l); (iii) CsCl 0,25 M (0,5 μ l); (iv) matriz (0,5 μ l); (v) matriz (0,5 μ l).

M6todo C: (i) 2,5-DHB (0,5 μ l); (ii) 2,5-DHB (0,5 μ l); (iii) HIQ (0,5 μ l); (iv) 2,5-DHB (0,5 μ l); (v) analito (0,5 μ l); CsCl 0,25 M (0,5 μ l).

Los cristales de los s6lidos listos para analizar fueron inspeccionados con un microscopio Stereoscopic (NIKON Optiphot), con una magnificaci6n de 400 $\times$ y se registraron im6genes digitales con un microscopio de alta resoluci6n digital (Keyence VH-6300, Keyence Corporation) con magnificaci6n de 150 $\times$. Las im6genes logradas corresponden a las Figs. 4.6-4.9 (Capítulo 4).

7.17.2.2. XILANOS

Las muestras de xilanos (X_T , $X1$ - $X3$) se analizaron en dos equipos: (a) un espectrómetro de masa Shimadzu Kratos, Kompact MALDI 4 (pulsed extraction) (TOF) (Shimadzu, Kyoto, Japón) y (b) un espectrómetro de masa Applied Biosystems Voyager DE-STR (TOF). Ambos estaban equipados con láser pulsado de nitrógeno ($\lambda_{em}=337$ nm, ancho de pulso=3 ns), modos PDE y PSD (MS/MS) variables.

Los experimentos se hicieron usando primero el intervalo completo de posiciones para disparos del láser, a fin de seleccionar la posición óptima para la recolección de datos. Después se fijaron los disparos sobre las zonas elegidas (*sweet spots*) de las muestras. Las muestras se irradiaron justo por encima del umbral de potencia del láser necesario para obtener iones y con una potencia mayor para analizar la formación de *clusters*. Por lo tanto, la irradiación empleada para cada espectro de masa dependió del analito. En general se acumularon 100 espectros. Todas las muestras se analizaron en los modos lineal y reflectrón, tanto en modo iónico positivo como negativo. Como las señales registradas no fueron suficientemente intensas, no se hicieron experimentos PSD en modos positivo o negativo.

Las matrices que se usaron fueron:

β -carbolinas: *nor*-harmano (9*H*-pirido[3,4-*b*]indol);

ácido 2,5-dihidroxibenzoico (2,5-DHB, ácido gentísico);

ácido sinapínico (SA, ácido 3,5-dimetoxi-4-hidroxicinámico, para las proteínas calibrantes).

Los espectros se calibraron con calibrantes externos: (i) proteínas comerciales (neurotensina: PM 1672,96; insulina bovina: PM 5733,5) con SA como matriz en modos iónicos negativo y positivo; y (ii) α -ciclodextrina (ciclohexaamilosa, PM 972,9); β -ciclodextrina (cicloheptaamilosa, PM 1135,0); γ -ciclodextrina (ciclooctaamilosa, PM 1297,1) con *nor*-harmano como matriz en modos iónicos negativo y positivo. Se aplicaron los programas de calibración Kratos Kompact y Voyager DE-STR.

Las muestras se colocaron en soportes de acero inoxidable para 20 muestras cada uno (Shimadzu) o en soportes de oro para 199 muestras cada uno (Applied Biosystems Voyager DE-STR).

PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

Se prepararon soluciones stock disolviendo los compuestos seleccionados como matriz (*nor*-harmano, 2,5-DHB, 2 mg) en mezclas 1:1 (v/v) de MeOH-H₂O (0,2 ml) ó 2:3 v/v de MeCN-H₂O (0,2 ml). Las soluciones de analito se prepararon en el momento, disolviendo los polisacáridos (1 mg) en agua pura (grado MilliQ, 56-59 nS/cm) (0,5 ml).

Se utilizaron dos métodos de preparación de muestras:

MÉTODO A (*SANDWICH*): primero se depositó la solución de matriz (0,5 µl) en el portamuestras, se evaporó el solvente bajo corriente de aire a temperatura ambiente. Después se cubrió la matriz, disolviéndola parcialmente, con solución de analito (0,5 µl) y se evaporó el solvente. Finalmente se hicieron dos nuevos depósitos de matriz (0,5 µl de solución cada uno), produciendo una disolución parcial de las capas de matriz y analito previamente depositadas. Esto da como resultado una relación de soluciones analito-matriz 1:3 (v/v), siguiendo una secuencia: (i) matriz; (ii) analito; (iii) matriz; (iv) matriz.

MÉTODO B (MEZCLA): la solución de analito se mezcló con la de matriz en proporciones 1:1 a 1:12 (v/v). Se depositó una alícuota (0,5 µl) de esta mezcla en el portamuestras y se secó bajo corriente de aire a temperatura ambiente. Luego se colocó una porción adicional (0,5 µl) sobre la capa sólida formada, redisolviéndola parcialmente, y el solvente se evaporó nuevamente con aire.

Las capas sólidas, parcialmente cristalinas, resultaron relativamente homogéneas en ambos casos. Los cristales de los sólidos listos para analizar fueron inspeccionados con un microscopio Stereoscopic (NIKON Optiphot), con una magnificación de 400 × y se registraron imágenes digitales con un microscopio de alta resolución digital (Keyence VH-6300, Keyence Corporation) con magnificación de 800 ×. Se obtuvieron señales de mejor calidad con *nor*-harmano como matriz, utilizando el Método B en relaciones xilano:matriz 1:4 y 1:8 (v/v). Por lo tanto, se presentan sólo los resultados obtenidos en condiciones experimentales óptimas.

7.18. ESPECTROSCOPÍA RMN

Los espectros se realizaron en tres equipos: 1) Bruker AC 200, 2) Bruker AM 500, 3) Bruker DPX 300 (Faculté de Pharmacie, Université Louis Pasteur, Strasbourg, Francia).

7.18.1. RMN ^{13}C

Los espectros RMN ^{13}C con desacoplamiento protónico de las fracciones aisladas de *N. fastigiata* se registraron en un equipo Bruker AC 200 a 50 MHz, a temperatura ambiente, con referencia externa de TMS. Las muestras (ca. 40 mg) se disolvieron en una mezcla de H_2O - D_2O 1:1 (0,5 ml) y se colocaron en tubos de 5 mm de diámetro. Los parámetros empleados fueron: ángulo de pulso, 45° ; tiempo de adquisición, 0,4 s; ancho espectral, 11 kHz, 518000-603000 scans.

Para los espectros RMN ^{13}C con desacoplamiento protónico de las fracciones estudiadas de *G. confluens* se disolvieron las muestras (10-20 mg) en una mezcla de H_2O - D_2O 1:1 (0,5 ml) y se colocaron en tubos de 5 mm de diámetro. Los espectros correspondientes a CP y G2' iniciales, así como los de sus derivados CPDes, G2'Des y CPSD, se registraron en un equipo Bruker DPX 300 a 75 MHz, a 80°C . Los parámetros empleados fueron: ángulo de pulso, 90° ; tiempo de adquisición, 0,700 s; tiempo entre pulsos, 1 s; ancho espectral, 9,1 kHz, 39000-100000 scans. Para el espectro de F4'Des de *Nothogenia fastigiata* se aplicaron las mismas condiciones. El espectro de G2'SD se realizó a temperatura ambiente en un Bruker AC 200 a 50 MHz con un ancho espectral de 11,1 kHz, ángulo de pulso de 45° , tiempo de adquisición de 0,4 s, registrando 298000 scans. Los espectros de G2', G2'D1, G2'D4 y G2'D5 se hicieron a temperatura ambiente en un Bruker AM 500, con un ancho espectral de 29,4 kHz; ángulo de pulso de $51,4^\circ$; tiempo de adquisición de 0,4 s; tiempo entre pulsos de 0,6 s, con 28200-42400 scans. Los carbonos metilénicos de G2' se asignaron mediante un experimento de intensificación sin distorsión por transferencia de polarización²¹ (distorsionless enhancement by polarization transfer, DEPT 135) realizado en el equipo Bruker AM 500 con un ancho espectral de 26,3 MHz; tiempo de adquisición de 0,56 s y relaxation delay de 0,6 s, registrando 5376 scans. En todos los espectros de *G. confluens* se usó DMSO como referencia interna a 39,6 ppm a 80°C y a 39,5 ppm a temperatura ambiente.

Los espectros de 75 MHz del carragenano kappa inicial y del producto de desulfatación con CTMS a 100°C durante 8 h (relación 1:200) se registraron en el equipo Bruker DPX 300 a

80°C, con DMSO como referencia interna, y los siguientes parámetros: ángulo de pulso, 90°; tiempo de adquisición, 0,70 s; tiempo entre pulsos, 1 s; ancho espectral, 9,1 kHz; número de scans, ca. 60000.

Los espectros de 125 MHz de los demás productos de desulfatación del carragenano kappa se registraron en el equipo Bruker AM 500, a temperatura ambiente, con DMSO como referencia interna, y los siguientes parámetros: con un ancho espectral de 27,8 kHz; ángulo de pulso de 51,4°; tiempo de adquisición de 0,4 s; tiempo entre pulsos de 0,6 s; número de scans, ca. 3000.

7.18.2. RMN ^1H

Los espectros RMN ^1H de 500 MHz de las fracciones de *N. fastigiata* se registraron en el equipo Bruker AM 500, con 3-(trimetilsilil)-1-propanosulfonato de sodio como referencia interna. Se utilizaron soluciones de polisacáridos, previamente intercambiados con D_2O , en D_2O (10 mg en 0,5 ml) y colocadas en tubos de 5 mm de diámetro. Los parámetros aplicados fueron los siguientes: ángulo de pulso, 90°; tiempo de adquisición, 4,4 s; ancho espectral, 7,5 kHz; número de scans, 120.

Los espectros RMN ^1H de 500 MHz de los productos de desulfatación del carragenano kappa se realizaron en el equipo Bruker AM 500, con acetona como referencia interna (a 2,20 ppm) a temperatura ambiente y a 45°C. Los polisacáridos se intercambiaron con D_2O , luego se disolvieron en el mismo solvente (7-10 mg en 0,5 ml) y se colocaron en tubos de 5 mm de diámetro. Los parámetros aplicados fueron los siguientes: ángulo de pulso, 90°; tiempo de adquisición, 4,4 s; ancho espectral, 5,7 kHz; número de scans, 144.

7.18.3. RMN BIDIMENSIONAL

Los espectros RMN bidimensionales de correlación homonuclear ^1H - ^1H (COSY ^1H - ^1H) y heteronuclear ^{13}C - ^1H (HETCOR ^{13}C - ^1H) fueron realizados a 500 y 125 MHz en el equipo Bruker AM 500, aplicando la secuencia de pulsos proporcionada por el software del fabricante.

7.19. DESULFATACIÓN

7.19.1. DESULFATACIÓN ÁCIDA

Los xilomananos sulfatados de *N. fastigiata* se desulfataron con cloruro de hidrógeno metanólico 0,1 M (preparado por reacción de 250 µl de cloruro de acetilo con 35 ml de metanol anhidro) según la técnica aplicada previamente²². Una porción de polisacárido (21,4 mg) se suspendió en cloruro de hidrógeno 0,1 M en metanol (16 ml), agitando a temperatura ambiente durante 72-96 h. Luego de agregar agua (5 ml), la mezcla se neutralizó con NaHCO₃ (s.s.) y se dializó contra agua corriente y destilada. Los polisacáridos desulfatados se recuperaron por liofilización. Masas iniciales: F2', 21,4 mg; F4', 90,1 mg; F6', 102,0 mg. Masas de producto desulfatado: F2', 14,3 mg; F4', 52,8 mg; F6', 53,15 mg.

7.19.2. DESULFATACIÓN SOLVOLÍTICA

Las técnicas de desulfatación solvolítica implican calentamiento de la sal de piridinio del polisacárido sulfatado en DMSO-piridina en presencia de metanol y/o agua²³⁻²⁵. Las muestras se transformaron en las sales de piridinio por pasaje a través de una columna de Amberlite IR 120+ (H⁺), eluyendo con agua y recogiendo sobre piridina 20 %. Las sales de piridinio se recuperaron por diálisis contra agua destilada y liofilización.

DESULFATACIÓN DE G2' CON PIRIDINA 20 % EN DMSO

Una porción de la fracción G2' como sal de piridinio (11,45 mg) se suspendió en piridina 20 % en DMSO (1,4 ml), se sonicó y agitó vigorosamente a fin de lograr una suspensión homogénea. De esta mezcla se colocó en un vial con cierre de teflon y se calentó en estufa a 100°C durante 10 h. La mezcla inicial se transformó en una solución límpida durante el calentamiento. El producto se recuperó por diálisis y liofilización; el contenido de sulfato se determinó por cromatografía iónica: 10,1 % SO₃Na.

DESULFATACIÓN DE G2' CON PIRIDINA 2 % EN DMSO

El polisacárido como sal de piridinio (9,0 mg) se mezcló con piridina 2% en DMSO (1,4 ml), se sonicó y agitó vigorosamente a fin de lograr una suspensión homogénea. Esta mezcla

se dividió en alícuotas de 200 μ l (0,96 mg) que se colocaron en viales con cierre de teflon y calentaron en estufa a 100°C a tiempos variables (2, 4, 6 y 8 h). La mezcla inicial se transformó en una solución límpida durante el calentamiento. Por otra parte, el remanente de la solución inicial se tomó como blanco y dializó. Los productos se recuperaron por diálisis y liofilización; el contenido de sulfato se determinó por cromatografía iónica: 9,7; 12,5; 10,6; 9,6 % SO_3Na para 2, 4, 6 y 8 h respectivamente.

DESULFATACIÓN DE G2' CON DMSO-METANOL- PIRIDINA 89:10:1

El polisacárido como sal de piridinio (6,05 mg) se disolvió en una mezcla DMSO-metanol-piridina 89:10:1 (2,4 ml). La mezcla se calentó en vial con cierre de teflon durante 4,5 h a 105°C. El producto se recuperó por diálisis y liofilización; el contenido de sulfato se determinó por el método turbidimétrico de Dogdson⁵: 13,0 % SO_3Na .

DESULFATACIÓN DE G2' CON MEZCLAS DMSO-METANOL-H₂O-PIRIDINA

El polisacárido como sal de piridinio se calentó a 100°C durante 5 h con distintos solventes (0,4 ml solvente/mg de muestra):

- 1- DMSO-H₂O-piridina 89:10:1; masa inicial: 6,05 mg; masa recuperada: 3,7 mg; 12,3 % SO_3Na .
- 2- DMSO-metanol-piridina 79:20:1; masa inicial: 5,25 mg; masa recuperada: 3,65 mg; 13,0 % SO_3Na .
- 3- DMSO-metanol-H₂O-piridina 89:5:5:1; masa inicial: 7,45 mg; masa recuperada: 4,2 mg; 12,5 % SO_3Na .

Otra porción de muestra (5,3 mg) se trató con DMSO-metanol-piridina 79:20:1 (2,10 ml) a 100°C durante 9 h, siguiendo el procedimiento habitual (masa recuperada: 2,95 mg; 12,1 % SO_3Na).

En todos los casos, los productos se recuperaron por diálisis y liofilización; el contenido de sulfato se determinó por el método turbidimétrico de Dogdson⁵.

7.19.3. DESULFATACIÓN CON AGENTES SILILANTES

REACTIVOS NECESARIOS

clorotrimetilsilano (CTMS)

piridina anhidra (p.a., secada sobre tamices moleculares 4 Å)

PROCEDIMIENTO

Los polisacáridos, como sus sales de piridinio, se agitaron unos 15 min en piridina anhidra (solución al 1% p/v) a la temperatura de trabajo. Luego se desulfataron por agregado de CTMS sobre la suspensión y calentando, con agitación constante, durante el tiempo y la temperatura indicados en cada caso. La reacción se cortó por agregado de agua, gota a gota y en baño de hielo, para destruir el exceso de agente sililante y desililar los grupos hidroxilo. Los productos desulfatados se dializaron (MWCO 6000-8000 para carragenano kappa y 3500 para polisacáridos de *G. confluens*) contra agua corriente, destilada, NaCl 0,1 M, agua destilada, y finalmente se liofilizaron.

Las muestras (se detallan las masas de las sales de piridinio) y las condiciones ensayadas sobre polisacáridos de *G. confluens* se indican a continuación. El contenido de sulfato de los productos obtenidos se determinó por el método turbidimétrico de Dogdson⁵.

1- RELACIÓN MOLAR SULFATO-CTMS 1:90

8,75 mg CP + 1 ml piridina + 150 µl CTMS

calentamiento a 95°C durante 4,5 h

Rendimiento: 4,4 mg; 11,6% SO₃Na

2- RELACIÓN MOLAR SULFATO-CTMS 1:470

10,00 mg CP + 1 ml piridina + 150 µl CTMS

calentamiento a 100°C durante 11 h, luego de 100 a 40°C, 16 h

Rendimiento: 5,80 mg; 6,1% SO₃Na

3- RELACIÓN MOLAR SULFATO-CTMS 1:390

20,86 mg CP + 2,09 ml piridina + 1,05 ml CTMS

calentamiento a 100°C durante 8 h

Rendimiento: 14,98 mg; 5,0% SO₃Na

4- RELACIÓN MOLAR SULFATO-CTMS 1:380

19,23 mg CP + 1,92 ml piridina + 970 µl CTMS

calentamiento a 100°C durante 8 h

Rendimiento: 14,88 mg; 4,5% SO₃Na

5- RELACIÓN MOLAR SULFATO-CTMS 1:470

29,65 mg G2' + 3 ml piridina + 1,80 ml CTMS

calentamiento a 100°C durante 8 h

Rendimiento: 16,34 mg; 4,6% SO₃Na

6- RELACIÓN MOLAR SULFATO-CTMS 1:380

24,80 mg G3' + 2,5 ml piridina + 1,50 ml CTMS

calentamiento a 100°C durante 8 h

Rendimiento: 16,50 mg; 6,1% SO₃Na

Las condiciones ensayadas para carragenano kappa (se detallan las masas de las sales de piridinio) se indican a continuación. El contenido de sulfato de los productos obtenidos se determinó por cromatografía iónica, a menos que se indique lo contrario.

1. BLANCO: 29,0 mg + 2,9 ml piridina

calentamiento a 100°C durante 3 h

Rendimiento: 25,85 mg; 18,1% SO₃Na

2. BLANCO: 35,0 mg + 3,5 ml piridina

calentamiento a 100°C durante 8 h

Rendimiento: 22,65 mg; 18,8% SO₃Na

3.1 RELACIÓN MOLAR SULFATO-CTMS 1:200

39,6 mg + 4,0 ml piridina + 2,1 ml CTMS

calentamiento a 100°C durante 3 h

Rendimiento: 22,75 mg

3.2 RELACIÓN MOLAR SULFATO-CTMS 1:200

43,1 mg + 4,3 ml piridina + 2,15 ml CTMS

calentamiento a 100°C durante 3 h

Rendimiento: 22,15 mg; 5,5% SO₃Na

4. RELACIÓN MOLAR SULFATO-CTMS 1:100

47,75 mg + 4,8 ml piridina + 1,17 ml CTMS

calentamiento a 100°C durante 3 h

Rendimiento: 33,6 mg; 7,0% SO₃Na

5. RELACIÓN MOLAR SULFATO-CTMS 1:50
50,1 mg + 4,0 ml piridina + 0,49 ml CTMS
calentamiento a 100°C durante 3 h
Rendimiento: 40,45 mg; 5,0% SO₃Na
6. RELACIÓN MOLAR SULFATO-CTMS 1:10
30,45 mg + 3,0 ml piridina + 0,075 ml CTMS
calentamiento a 100°C durante 3 h
Rendimiento: 24,95 mg; 12,1% SO₃Na
7. RELACIÓN MOLAR SULFATO-CTMS 1:4
43,0 mg + 4,3 ml piridina + 0,042 ml CTMS
calentamiento a 100°C durante 3 h
Rendimiento: 16,60 mg; 16,3% SO₃Na
8. RELACIÓN MOLAR SULFATO-CTMS 1:1
39,0 mg + 4,0 ml piridina + 0,010 ml CTMS
calentamiento a 100°C durante 3 h
Rendimiento: 17,75 mg; 16,5% SO₃Na
9. RELACIÓN MOLAR SULFATO-CTMS 1:10
53,55 mg + 5,4 ml piridina + 0,132 ml CTMS
calentamiento a 60°C durante 3 h
Rendimiento: 34,70 mg; 16,5% SO₃Na
- 10.1. RELACIÓN MOLAR SULFATO-CTMS 1:200
41,35 mg + 4,1 ml piridina + 2,2 ml CTMS
calentamiento a 100°C durante 6 h
Rendimiento: 21,35 mg
- 10.2. RELACIÓN MOLAR SULFATO-CTMS 1:200
55,85 mg + 5,6 ml piridina + 2,8 ml CTMS
calentamiento a 100°C durante 6 h
Rendimiento: 33,6 mg
11. RELACIÓN MOLAR SULFATO-CTMS 1:100
59,85 mg + 6,0 ml piridina + 1,46 ml CTMS
calentamiento a 100°C durante 6 h
Rendimiento: 43,15 mg

12. RELACIÓN MOLAR SULFATO-CTMS 1:50

54,3 mg + 5,4 ml piridina + 0,66 ml CTMS

calentamiento a 100°C durante 6 h

Rendimiento: 40,1 mg; 5,3% SO₃Na

13.1. RELACIÓN MOLAR SULFATO-CTMS 1:200

18,45 mg + 1,84 ml piridina + 0,93 ml CTMS

calentamiento a 100°C durante 8 h

Rendimiento: 5,3 mg (parte de la solución se perdió por proyección al agregar agua);

9,7% SO₃Na (turbidimetría)

13.2. RELACIÓN MOLAR SULFATO-CTMS 1:200

30,0 mg + 3,0 ml piridina + 1,6 ml CTMS

calentamiento a 100°C durante 8 h

Rendimiento: 16,35 mg; 11,3% SO₃Na (turbidimetría)

13.3. RELACIÓN MOLAR SULFATO-CTMS 1:200

31,7 mg + 3,2 ml piridina + 1,7 ml CTMS

calentamiento a 100°C durante 8 h

Rendimiento: 15,4 mg

13.4. RELACIÓN MOLAR SULFATO-CTMS 1:200

36,75 mg + 3,7 ml piridina + 1,84 ml CTMS

calentamiento a 100°C durante 8 h

Rendimiento: 22,65 mg; 6,9% SO₃Na (cromatografía iónica); 11,3% SO₃Na (turbidimetría)

7.20. DEGRADACIÓN DE SMITH

Los polisacáridos CP y G2', de *G. confluens*, se sometieron a una degradación de Smith²⁶ en las condiciones descritas por Usov *et al.*²⁷ pero agregando además MMB, a fin de evitar la degradación de unidades lábiles durante la etapa de hidrólisis controlada.

REACTIVOS NECESARIOS

- 1- NaIO₄ 0,02 M
- 2- Etilenglicol
- 3- Borohidruro de sodio
- 4- Ácido acético
- 5- Ácido acético 1,5 %
- 6- 4-metilmorfolina-borano (MMB) 80 mg/ml

PROCEDIMIENTO

A una solución acuosa de xilogalactano sulfatado (CP, 51 mg; G2', 49,7 mg; disueltos en 20 ml) se agregó NaIO₄ 0,02 M (20 ml) y se dejó agitando en oscuridad, a temperatura ambiente, siguiendo el consumo de oxidante por su absorbancia a 222 y 304 nm. Una vez que cesó el consumo de NaIO₄ se destruyó el exceso con etilenglicol (0,5 ml), agitando durante 1 h. La mezcla de reacción se dializó, concentró a aproximadamente 10 ml, y se redujo durante 16 h con exceso de NaBH₄. Luego de acidificar con ácido acético, se dializó y liofilizó dando el polisacárido oxidado y reducido (CP, 36,4 mg; G2', 38,3 mg). Estos productos (CP, 32,4 mg; G2', 38,3 mg) se sometieron a una hidrólisis suave por tratamiento con la solución de MMB (2 ml) y el ácido acético 1,5 % (4 ml), con calentamiento a 100°C durante 2 h. Se evaporó a sequedad, el residuo se redisolvió y dializó para dar los productos CPSD (23,7 mg) y G2'SD (32,0).

7.21. ACTIVIDAD BIOLÓGICA

Los ensayos de actividad anti-HSV y anticoagulante fueron realizados en el Departamento de Química Biológica de la Facultad de Ciencias Exactas, Universidad de Buenos Aires, por los Dres. E.B. Damonte y C.A. Pujol. Los ensayos de actividad anti-HIV fueron realizados en el Institut de Virologie, INSERM U74, Strasbourg, Francia.

7.21.1. ACTIVIDAD ANTI-HSV

COMPUESTOS, CÉLULAS Y VIRUS

Los polisacáridos se disolvieron en agua, fueron esterilizados por filtración y se hicieron diluciones adecuadas para los ensayos en medio de cultivo.

Se usaron las siguientes cepas de virus: herpes simplex tipo 1 (HSV-1) cepa F, las cepas deficientes en timidina quinasa HSV-1 (TK⁻) B2006 y Field; HSV-2 (cepa G). Todas las cepas se propagaron y titularon sobre células Vero (células de riñón de mono verde africano).

PROCEDIMIENTO

La actividad antiviral se evaluó mediante un ensayo de reducción de placas. Monocapas de células Vero, distribuidas en microplacas de 24 pocillos (6×10^5 células/pocillo), se infectaron con 80 unidades formadoras de placas (PFU) por pocillo en ausencia o presencia de los polisacáridos en concentraciones variadas. Luego se cubrieron con medio esencial mínimo de Eagle (MEM) conteniendo 0,5 % de metilcelulosa y la dosis correspondiente de agente antiviral o polisacárido. Luego de la adsorción, las células se lavaron y cubrieron con medio de cultivo de mantenimiento que incluía al polisacárido en la misma concentración. Las placas se contaron luego de 2 días de incubación a 37°C. La concentración inhibitoria 50% (IC₅₀) se definió como la concentración de compuesto requerida para reducir el número de placas virales al 50%, con respecto a controles realizados en ausencia de compuestos antivirales. Los datos informados son el promedio de experimentos duplicados para cada dilución de muestra.

La citotoxicidad de los polisacáridos se evaluó, paralelamente a la actividad antiviral, por determinación de la viabilidad de células por el método de exclusión de trypan blue (tinción de las células muertas)²⁸. Las monocapas de células Vero se incubaron durante 48 h a 37°C, con medio de cultivo de mantenimiento que contenía además diluciones en serie (1:2) de los compuestos estudiados. Después se removió el medio, las células se tripsinizaron y se

determinó el número de células viables. Se usaron dextran sulfato de 8000 Da de peso molecular (DS8000) y heparina como compuestos referencia. La concentración citotóxica 50% (CC₅₀) se definió como la concentración de compuesto que reducía el número de células viables al 50%.

7.21.2. ACTIVIDAD ANTI-HIV²⁹

COMPUESTOS, CÉLULAS Y VIRUS

Los polisacáridos se disolvieron en agua, fueron esterilizados por filtración y se hicieron diluciones adecuadas para los ensayos en medio de cultivo RPMI 1640. Los cultivos de control recibieron los mismos volúmenes de solvente, sin exceder nunca el 1%.

Los cultivos se mantuvieron a 37°C en atmósfera con CO₂ 5%. Se estudiaron los efectos de los compuestos en la replicación de HIV en células MT-4 y CEM-SS.

PROCEDIMIENTO

1- HIV-1_{IIIb} SOBRE CÉLULAS MT-4

En el primer ensayo, la actividad de los polisacáridos contra HIV-1_{IIIb} estaba basada en la inhibición del efecto citopatogénico inducido por el virus sobre células MT-4. Las células se infectaron con HIV-1_{IIIb} con 5 veces la dosis infectiva de cultivo celular 50% (TCID₅₀) –que se determinó por evaluación de la actividad de la transcriptasa reversa (RT) liberada por células MT-4 infectadas luego de 5 días. Esta dosis infectiva disminuye el número de células viables en un 90% luego de 5 días. Luego de la adsorción a 37°C durante 30 min., las células infectadas se ajustaron a una concentración de 2×10^5 células/ml en medio RPMI 1640 suplementado con 20% de suero fetal bovino (FCS) inactivado con calor, 100 IU/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina, 2 mM de glutamina, y se cultivaron en placas de cultivo de 96 pocillos con 100 µl de compuesto a varias concentraciones. En el quinto día, la viabilidad celular se midió por reacción colorimétrica de MTT, basada en la capacidad de la deshidrogenasa mitocondrial de las células vivas para reducir a 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio a formazán. La cantidad producida de formazán, medida por su absorbancia a 540 nm, se correlacionó con el número de células vivas³⁰. El porcentaje de protección de las células infectadas y tratadas con los compuestos se calculó aplicando la fórmula propuesta por Pauwels *et al.*³⁰:

$$P = \frac{T - I}{U - I} \times 100$$

donde: P , porcentaje de protección;

T , absorbancia a 540 nm de las células infectadas y tratadas con la muestra;

I , absorbancia a 540 nm de las células infectadas control;

U , absorbancia a 540 nm de las células no infectadas control.

La concentración inhibitoria IC_{50} corresponde a la concentración de compuesto ensayado que confiere un 50% de protección.

2- HIV-1_{LA1} SOBRE CÉLULAS CEM-SS

El procedimiento seguido para medir la actividad anti-HIV en células CEM-SS estaba basado en la detección cuantitativa de la actividad de RT en el sobrenadante del cultivo. Las células CEM-SS se infectaron con HIV-1_{LA1} a 20 TCID₅₀ (evaluado de la misma manera que en el ensayo anterior). Luego de permitir la adsorción durante 30 min, las células se lavaron dos veces para eliminar partículas virales no adsorbidas y cultivadas a una concentración final de 1×10^5 células/ml en presencia de varias diluciones de los compuestos probados. En el quinto día siguiente a la infección se evaluó la actividad de RT en el sobrenadante como se indica a continuación.

3- ENSAYO DE TRANSCRIPTASA REVERSA

Las partículas virales (65 µl de sobrenadante del cultivo) se disociaron en 10 min, a 4°C, por tratamiento con buffer de lisis (10 µl) conteniendo: 0,5% de Triton X-100; cloruro de potasio 0,75 M y ditioneitol (DTT) 50 mM. Los ensayos de RT se hicieron a 37°C durante 60 min, añadiendo 25 µl de una mezcla de reacción conteniendo: Tris-HCl 0,2 M (pH 7,8); MgCl₂ 20 mM; EGTA 4 mM; 3 µCi de [³H]timidina trifosfato (48 Ci/mmol); 5 µg de oligo(rA)-oligo(dT). La reacción se detuvo con 20 µl de difosfato de tetrasodio decahidratado en 60% de ácido tricloroacético. Los precipitados se recolectaron sobre un filtro y se midió la radioactividad. Los ensayos se hicieron por duplicado.

4- CITOTOXICIDAD

La toxicidad de los compuestos sobre las células MT-4 y CEM-SS no infectadas (mock-infected cells) se midió también por el método MTT. Se definió como CC₅₀ a la concentración de compuesto que producía un 50% de la absorbancia medida a 540 nm con respecto a las células testigo.

7.21.3. ACTIVIDAD ANTICOAGULANTE

El tiempo de trombina se midió utilizando plasma humano y varias concentraciones de los xilomananos. Se mezclaron plasma humano (170 μ l) y la solución ensayada (30 μ l), incubando 2 min a 37°C. A la mezcla se le agregó trombina bovina (7,5 U/ml; 100 μ l) y se registró el tiempo de coagulación.

7.22. BIBLIOGRAFÍA

- ¹Cerezo, A.S.; Lezerovich, A.; Labriola, R.; Rees, D.A. *Carbohydr. Res.* **1971**, *19*, 289-296.
- ²Ferrario, M.; Sar, E. (Cátedra de Sistemática de Plantas Celulares, Facultad de Ciencias Naturales y Museo, Universidad Nacional de La Plata), comunicación personal.
- ³Dubois, M.; Gilles, K.A.; Hamilton, J.K.; Rebers, P.A.; Smith, F. *Anal. Chem.* **1956**, *28*, 350-356.
- ⁴Cases, M.R. *Tesis Doctoral*, Dpto. Química Orgánica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires **1995**.
- ⁵Dodgson, K.S.; Price, R.G. *Biochem. J.* **1962**, *84*, 104-110.
- ⁶Rees, D.A. *J. Chem. Soc.* **1961**, 5168-5171.
- ⁷Yaphe, W. *Anal. Chem.* **1960**, *32*, 1327-1330.
- ⁸Park, J.T.; Johnson, M.J. *J. Biol. Chem.* **1949**, *181*, 149-151.
- ⁹Albersheim, P.; Nevins, D.J.; English, P.D.; Karr, A. *Carbohydr. Res.* **1967**, *5*, 340-345.
- ¹⁰Bjorndal, H.; Lindberg, B.; Pilloti, A.; Svensson, S. *Carbohydr. Res.* **1970**, *15*, 339-349.
- ¹¹Turner, S.H.; Cherniak, R. *Carbohydr. Res.* **1981**, *95*, 137-144.
- ¹²Stevenson, T.T.; Furneaux, R.H. *Carbohydr. Res.* **1991**, *210*, 277-298.
- ¹³Haworth, W.N. *J. Chem. Soc.* **1915**, *107*, 8-16.
- ¹⁴Cerezo, A.S. *Carbohydr. Res.* **1973**, *26*, 335-340.
- ¹⁵Hakomori, S. *J. Biochem. (Tokyo)* **1964**, 205-208.
- ¹⁶Joseleau, J.-P.; Chambat, G.; Chumpitazi-Hermoza, B. *Carbohydr. Res.* **1981**, *90*, 339-344.
- ¹⁷Petruš, L.; Gray, D.G.; BeMiller, J.N. *Carbohydr. Res.* **1995**, *268*, 319-323.
- ¹⁸Cases, M.R.; Stortz, C.A.; Cerezo, A.S. *J. Chromatogr. A* **1994**, *662*, 293-299.
- ¹⁹Cases, M.R.; Cerezo, A.S.; Stortz, C.A. *Carbohydr. Res.* **1995**, *269*, 333-341.
- ²⁰Sweet, D.P.; Shapiro, R.H.; Albersheim, P. *Carbohydr. Res.* **1975**, *40*, 217-225.
- ²¹Doddrell, D.M.; Pegg, D.T.; Bendsall, M.R. *J. Magn. Reson.* **1982**, *48*, 323-327.
- ²²Matulewicz, M.C.; Cerezo, A.S. *Carbohydr. Polym.* **1987**, *7*, 121-132.
- ²³Nagasawa, K.; Inoue, Y. *Carbohydr. Res.* **1974**, *36*, 265-271.
- ²⁴Nagasawa, K.; Inoue, Y.; Kamata, T. *Carbohydr. Res.* **1977**, *58*, 47-55.
- ²⁵Usov, A.I.; Adamyants, K.S.; Miroshnikova, L.I.; Shaposhnikova, A.A.; Kochetkov, N.K. *Carbohydr. Res.* **1971**, *18*, 336-338.
- ²⁶Goldstein, I.J.; Hay, G.W.; Lewis, B.A.; Smith, F. *Methods Carbohydr. Chem.* **1965**, *5*, 361-370.
- ²⁷Usov, A.I.; Bilan, M.I.; Shashkov, A.S. *Carbohydr. Res.* **1997**, *303*, 93-102.

²⁸Patterson, M.K. Jr. *Methods Enzymol.* **1979**, *58*, 141-152.

²⁹Moog, C.; Wick, A.; Le Ber, P.; Kirn, A.; Aubertin, A.-M. *Antiviral Res.* **1994**, *24*, 275-288.

³⁰Pauwels, R.; Balzarini, J.; Baba, M.; Snoeck, R.; Schols, D.; Herdewijn, P.; Desmyter, J.; De Clercq, E. *J. Virol. Methods* **1988**, *20*, 309-321.

RESUMEN

Las investigaciones llevadas a cabo sobre polisacáridos de algas rojas son relevantes a partir de dos aspectos básicos:

- 1- El análisis estructural de los polisacáridos, a fin de evaluar la diversidad de estructuras naturales y de establecer su aplicación como indicadores quimiotaxonómicos.
- 2- La detección de especies con usos prácticos potenciales debido a ciertas propiedades – como actividad antiviral– y el estudio de correlaciones estructura-actividad.

Además se intenta desarrollar y mejorar las metodologías utilizadas para el estudio estructural de los hidratos de carbono de interés.

En este trabajo de Tesis se estudiaron los sistemas de polisacáridos extraídos de dos especies de algas rojas de la costa patagónica y antártica: *Nothogenia fastigiata* (Galaxauraceae, Nemaliales) y *Georgiella confluens* (Ceramiaceae, Ceramiales), respectivamente. El contenido está dividido en cinco partes, de las cuales la primera es una introducción al tema, las tres siguientes corresponden a resultados obtenidos y la última a los métodos experimentales aplicados.

Parte I. En el Cap. I se introducen las clasificaciones y estructuras de los polisacáridos de algas rojas marinas. Se detallan los antecedentes bibliográficos vinculados al análisis estructural de galactanos sulfatados extraídos de Ceramiaceae.

El estudio del sistema de polisacáridos de *N. fastigiata* había sido iniciado con anterioridad. Dicho sistema comprende:

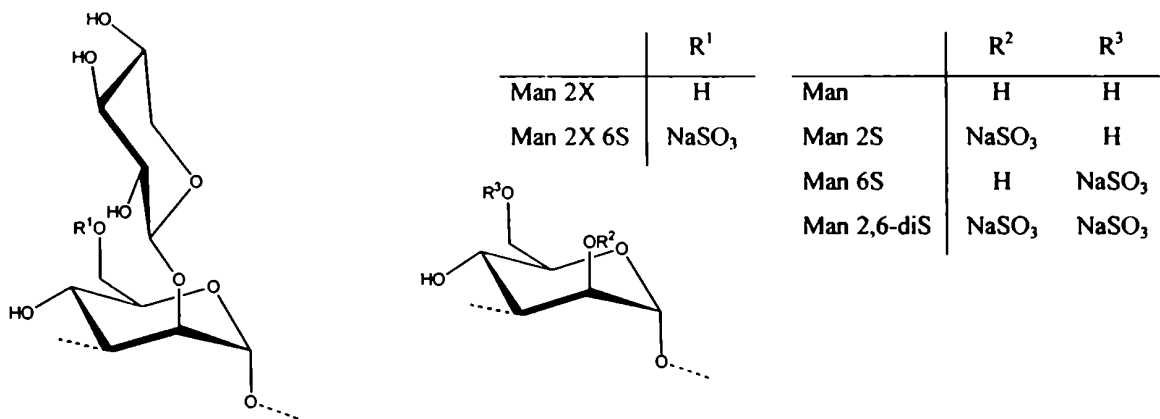
- 1- D-Xilanos neutros del tipo denominado “uniones mixtas” con enlaces β -(1→3) y β -(1→4). Se aislaron tres fracciones (X1-X3) por precipitación con etanol. Su estudio indicó que las uniones β -(1→3) estaban dispersas en toda la cadena.
- 2- Xilogalactanos sulfatados (F1, F7) de la familia del agar, que mostraron características erráticas de solubilidad, atribuidas a asociaciones moleculares.
- 3- Xilomananos sulfatados (F2-F6). El análisis preliminar de dos fracciones indicó la presencia de D-mananos con uniones α -(1→3), sulfatados en las posiciones 2 y 6, con ramificaciones simples de xilosa sobre C-2.

En el Cap. 2 se desarrollan los antecedentes vinculados a la actividad antiviral de los polisacáridos sulfatados de *N. fastigiata*. Las cinco fracciones de xilomananos sulfatados fueron probadas para controlar su actividad contra HSV-1, resultando interesante solamente F6. Se analizó entonces su eficacia frente a varios virus a ADN y ARN. La actividad

inhibitoria completa se logró sólo cuando el compuesto estaba presente durante el período de adsorción viral.

Posteriormente, y en simultáneo con este trabajo de Tesis, se demostró que tres actividades mediadas por la glicoproteína gC –vinculada a la adhesión de HSV-1 al heparán sulfato de la superficie celular– eran igual y efectivamente bloqueadas por F6. Esto confirmó la interacción de F6 con los dominios cargados positivamente de la glicoproteína viral, evitando la adsorción del virus a la célula.

Parte II. Las propiedades antivirales demostradas por el sistema de xilomananos de *N. fastigiata*, así como el interés por determinar exhaustivamente la estructura poco frecuente de estos polisacáridos y la posibilidad de establecer una correlación estructura actividad fueron los factores que motivaron la investigación (Cap. 3). Se comenzó llevando a cabo un nuevo procedimiento de extracción y fraccionamiento, basado en la precipitación de los polisacáridos sulfatados con cetrimida y su redisolución en soluciones de concentración creciente de NaCl. A fin de asegurar un intercambio eficiente de los cationes Na^+ , se redisolvieron las fracciones F2, F4-F6 en sendas soluciones de NaCl, dando lugar a F2', F4'-F6'. El fraccionamiento de los xilomananos dependió fundamentalmente del contenido de ramificaciones simples de xilosa. Sólo aquellas fracciones con niveles de xilosa similares se separaron según su grado de sulfatación. Estos polisacáridos poseían una conformación al azar en solución. Se llevaron a cabo estudios de metilación, desulfatación-metilación y espectroscopía RMN ^{13}C y ^1H .



El alga roja *N. fastigiata* biosintetiza un sistema de D-mananos con uniones α -(1→3) sulfatados en las posiciones 2 y 6, y con ramificaciones simples de D-xilosa enlazada β -(1→2). Se estableció la composición en unidades estructurales de los xilomananos, considerando que la abundancia de unidades disulfatadas era mínima. Tanto F2' como F4'

contienen xilomananos que se aislaron como complejos con otros polisacáridos existentes en el alga. Las fracciones F5' y F6' son mananos verdaderos.

La falta de dependencia directa entre el contenido de sulfato y el orden de fraccionamiento de las muestras, sugirió que el factor principal para la precipitación y redisolución de los polisacáridos era la formación de agregados de moléculas. Los xilogalactanos, xilomananos y xilanos pertenecientes al sistema formarían agregados insolubles y solubles. Estas propiedades de agregación podrían explicarse mediante el modelo de “cierre de cremallera” (sugar zipper) para interacciones carbohidrato-carbohidrato. Además, los xilomananos contenían mayoritariamente cationes Ca^{2+} y Mg^{2+} a pesar de haber sido sometidos a dos tratamientos sucesivos con NaCl. Dichos cationes no actuaban como simples contraiones, sino que estaban complejados con los polisacáridos. En particular, F2' (con 91% de grupos aniónicos asociados a cationes divalentes, baja sulfatación y alto contenido de xilosa) fue aislada como un complejo de xilomanano con galactano y xilano. Ciertas regiones de los hidratos de carbono podrían interactuar entre sí –mediante interacciones cooperativas carbohidrato-carbohidrato dependientes de calcio– formando complejos muy estables.

Se evaluó la actividad biológica de los xilomananos cuyo análisis estructural se llevó a cabo. Si bien algunas fracciones resultaron activas frente a HIV, su citotoxicidad elevada les restó interés para llevar a cabo estudios posteriores. El manano F6' fue el compuesto más activo frente a varias cepas de HSV tipos 1 y 2, dos de ellas resistentes a aciclovir. Las actividades de F2' y F3' resultaron algo menores, mientras que F5' no inhibió significativamente la replicación viral. Los polisacáridos no fueron citotóxicos. Aquellos xilomananos cuya distribución de sulfato simule la distribución de cargas negativas de los sitios de unión del heparán sulfato podrán inhibir competitivamente la unión de HSV. La presencia de grupos 2- y 6- sulfato parece ser importante, pero también se requiere su distribución en dominios que imiten el sitio de unión del receptor celular. El manano F6' es el que reproduciría mejor el dominio para la unión viral.

Los polisacáridos sulfatados suelen poseer propiedades anticoagulantes. Sin embargo, las fracciones de xilomananos estudiadas no resultaron activas. Esto constituye una ventaja para la aplicación potencial de estos polisacáridos como agentes antivirales en formulaciones de aplicación local, con menores efectos secundarios adversos.

En el Cap. 4 se trata la aplicación de una nueva metodología para determinar el peso molecular y su función de distribución en polisacáridos de algas rojas: los xilomananos sulfatados y los xilanos fueron estudiados por EM UV-MALDI-TOF.

Los espectros de los xilomananos presentaron ciertas características interesantes:

- 1- Abarcaron un rango amplio de valores de m/z (~2100-45300 uma), siendo este el primer antecedente sobre espectros de masa UV-MALDI-TOF de polisacáridos sulfatados de pesos moleculares tan altos.
- 2- Individualmente, no mostraron una distribución unimodal de pesos moleculares.
- 3- Estaban compuestos por pocos picos que aparecieron al azar, sugiriendo la existencia de procesos de desorción/ionización erráticos y de baja eficiencia.

El cálculo de los pesos moleculares promedio numérico dio mayores coincidencias para las fracciones de menor peso molecular, con respecto a los valores obtenidos por dosaje de extremos reductores. En las demás, los pesos moleculares calculados por EM MALDI eran menores. Las diferencias aumentaban con el peso molecular, indicando mayores dificultades en la etapa de desorción/ionización y la consecuente discriminación de masas, con defecto de iones de m/z mayores.

El análisis de un espectro total de I²' reveló una distribución unimodal velada. La reconstrucción de un espectro total para la familia de xilomananos mostró una distribución unimodal, con distorsiones de la envolvente causadas por el proceso de obtención y cálculo y por la naturaleza compleja del sistema de polisacáridos.

Con respecto a los xilanos, sólo se obtuvieron buenos espectros par X1 y X3, con las siguientes características:

- 1- Mostraron distribuciones unimodales de pesos moleculares.
- 2- Se registraron en modo lineal tanto positivo como negativo.
- 3- Las señales principales, bien resueltas, diferían en una unidad de anhidroxilosa.
- 4- Los iones principales fueron $[M+Na]^+$ ó $[M-H]^-$ (modos positivo o negativo).

La coincidencia entre los pesos moleculares promedio numérico determinados por UV-MALDI-TOF y por espectroscopia RMN ¹H indicó que los experimentos de EM dieron resultados que reflejaban en forma confiable la composición de estas muestras en relación a su distribución de pesos moleculares.

La aplicación de EM UV-MALDI-TOF a la determinación de la distribución de pesos moleculares de carbohidratos está todavía en desarrollo. El enfoque general de los trabajos publicados consiste en la comparación con los resultados obtenidos por métodos convencionales. Los experimentos realizados sobre *N. fastigiata* demostraron que es interesante su aplicación a polisacáridos de algas rojas, si se cuenta con una buena combinación de las variables experimentales.

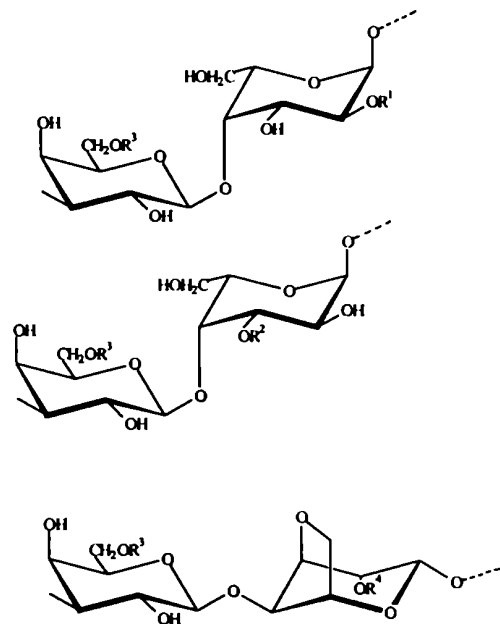
Parte III. El Cap. 5 comprende el análisis estructural de los polisacáridos de *G. confluens*. No existían antecedentes bibliográficos sobre esta especie, aunque datos de otros miembros de

Ceramiales permitían esperar la presencia de galactanos sulfatados de la familia del agar. Por tratamiento con cetrimida y redisolución en soluciones de NaCl, se aislaron siete fracciones de las cuales dos –G2 y G3– sumaban el 86% de la masa recuperada. Cada una fue redisuelta en solución de NaCl dando las fracciones G2’ y G3’, sobre las que se llevó a cabo el análisis estructural. Además se estudió CP, el material antes del fraccionamiento.

El análisis de las subfracciones aisladas por cromatografía de intercambio iónico de G2’ en columna de DEAE Sephadex A-25 (Cl⁻) permitió concluir que G2’ era una muestra polidispersa de composición homogénea. Por lo tanto, se desestimó el estudio exhaustivo de las subfracciones y se continuó con el de G2’ como tal.

Las metodologías utilizadas fueron: metilación, etilación, desulfatación-etilación, desulfatación-metilación, degradación de Smith, espectroscopía RMN ¹³C y determinación de la configuración absoluta de monosacáridos a partir de derivados diastereoméricos. Se aplicaron dos técnicas desarrolladas durante este trabajo de Tesis: desulfatación de polisacáridos sulfatados con CTMS en piridina y determinación de la configuración absoluta de residuos de 2,6-di-*O*-metilgalactosa por aminación reductiva con (*S*)-1-feniletilamina.

El análisis de los espectros RMN ¹³C, a la luz de los resultados provenientes de análisis químicos, permitió la asignación de ciertas unidades relevantes dentro del complejo esquema de sustitución de estos polisacáridos.



		CP (%)	G2' (%)
R ¹	Me	8	12
R ²	NaSO ₃	70	51
R ³	Me	47	40
R ⁴	Me	18	19

En conclusión, las muestras aisladas de *G. confluens* presentan las siguientes particularidades estructurales:

- 1- Una cadena central de agarano altamente metilado.

- 2- Bajo contenido de 3,6-anhidrogalactosa y sus unidades precursoras.
- 3- Ramificaciones simples de xilosa unidas a la posición 4 de unidades de β -D-galactosa.
- 4- Sulfatación mayoritariamente en la posición 3 de α -L-galactosa.
- 5- Sulfatación menor en la posición 4 de β -D-galactosa..

Los polisacáridos de *G. confluens* son muy interesantes a nivel estructural, ya que es la primera vez que se encuentra un sistema de polisacáridos que reúnen dos características inusuales en galactanos de algas rojas: sulfatación en C-3 de unidades α -L-galactosa y ramificaciones simples de xilosa en la posición 4 de β -D-galactosa.

Parte IV. En el Cap. 6 se desarrolla la reacción de desulfatación con CTMS de carragenano kappa comercial, a fin de probar su eficacia en un polisacárido con máximo contenido de unidades de 3,6-anhidrogalactosa y optimizar las condiciones de reacción. Los productos de desulfatación aislados se caracterizaron por espectroscopía RMN, contenido de sulfato, peso molecular y porcentaje de recuperación. Se determinaron las mejores condiciones experimentales –en términos de desulfatación con menor degradación y mayor recuperación del producto.

Se llevó a cabo además el estudio por RMN 1D (^{13}C , ^1H) y RMN 2D (COSY ^1H - ^1H , HETCOR ^{13}C - ^1H) de carragenano beta –obtenido por desulfatación total de carragenano kappa– que permitió la asignación completa de su espectro protónico.

El método de desulfatación desarrollado demostró ser útil y versátil para la remoción de grupos sulfato en posiciones distintas y en varios tipos de polisacáridos. En algunos casos fue la última técnica de desulfatación adecuada que permitió completar el análisis estructural de las muestras.

Parte V. El Cap. 7 incluye los métodos experimentales utilizados.

Parte de esta Tesis dio lugar a las siguientes publicaciones:

Kolender, A.A.; Matulewicz, M.C. “Sulfated polysaccharides from the red seaweed *Georgiella confluens*” *Carbohydr. Res.* **2002**, 337, 57-68.

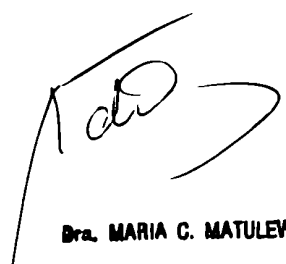
Errea, M.I.; Kolender, A.A.; Matulewicz, M.C. “Absolute configuration of 2,6-di-O-alkylgalactose obtained from peralkylated red algal polysaccharides” *Bot. Mar.* **2001**, 44, 133-138.

Erra-Balsells, R.; Kolender, A.A.; Matulewicz, M.C.; Nonami, H.; Cerezo, A.S. "Matrix-assisted ultraviolet laser-desorption ionization time-of-flight mass spectrometry of sulfated mannans from the red seaweed *Nothogenia fastigiata*" *Carbohydr. Res.* **2000**, 329, 157-167.

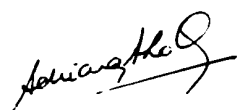
Kolender, A.A.; Pujol, C.A.; Damonte, E.B.; Cerezo, A.S.; Matulewicz, M.C. "Sulfation of kappa carrageenan and antiviral activity" *An. Asoc. Quím. Argent.* **1998**, 86, 304-311.

Kolender, A.A.; Pujol, C.A.; Damonte, E.B.; Matulewicz, M.C.; Cerezo, A.S. "The system of sulfated α -D-(1 $\rightarrow$ 3)-linked D-mannans from the red seaweed *Nothogenia fastigiata* - Structures, antiherpetic and anticoagulant properties" *Carbohydr. Res.* **1997**, 304, 53-60.

Kolender, A.A.; Matulewicz, M.C.; Cerezo, A.S. "Structural analysis of antiviral sulfated α -D-(1 $\rightarrow$ 3)-linked D-mannans" *Carbohydr. Res.* **1995**, 273, 179-185.



Dra. MARIA C. MATULEWICZ

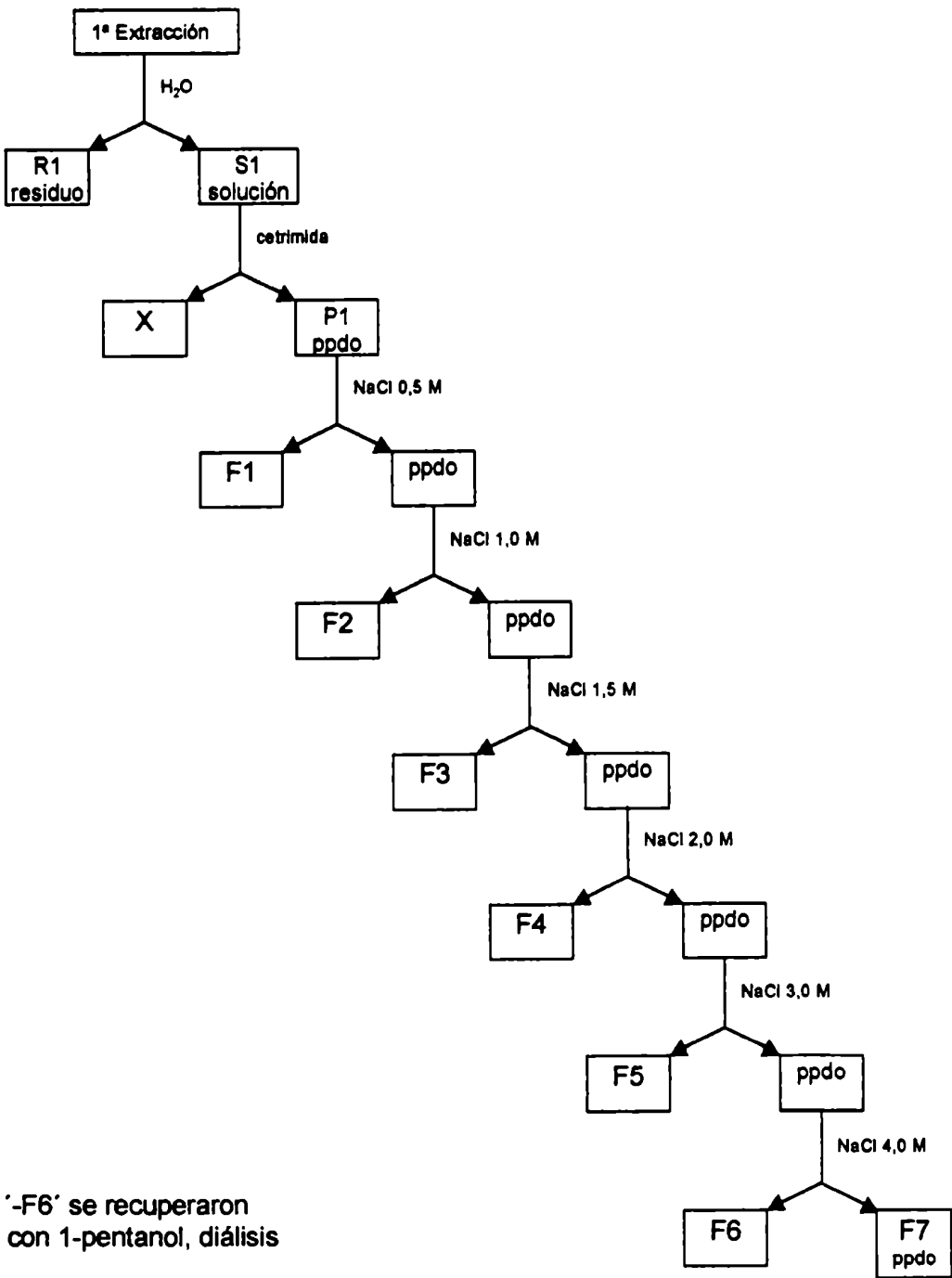


ADRIANA KOLENDER

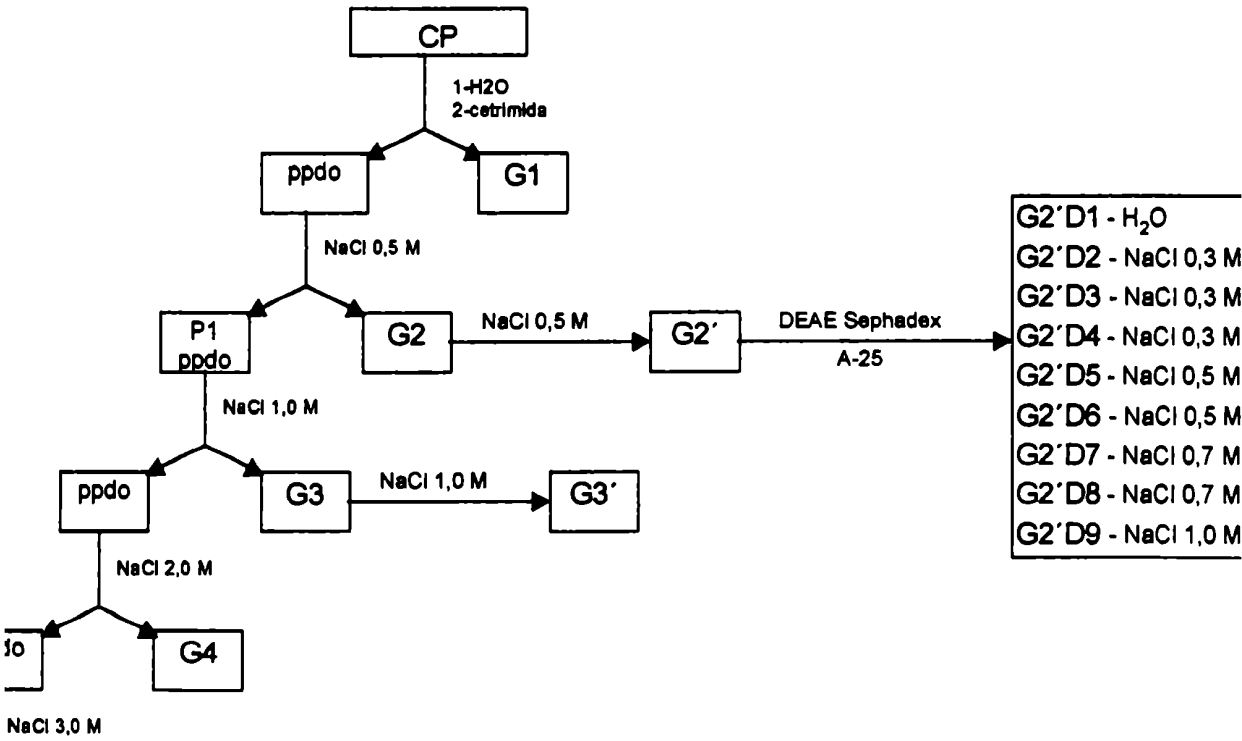
APÉNDICE A.1. AISLAMIENTO Y FRACCIONAMIENTO DEL SISTEMA DE POLISACÁRIDOS DE *NOTHOGENIA FASTIGIATA*



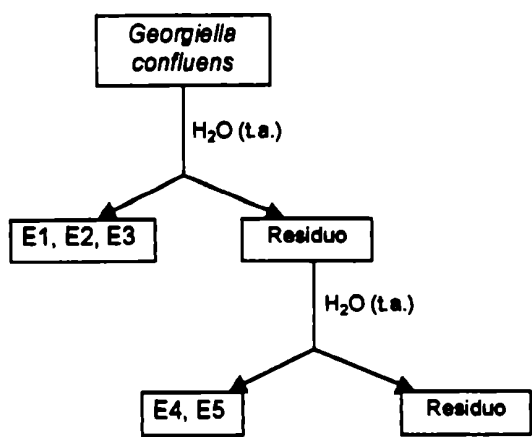
4STIGLATA



DE GEORGIELLA CONFLUENS



APÉNDICE A.2. AISLAMIENTO Y FRACCIONAMIENTO DEL SISTEMA DE POLISACÁRIDOS DE *Georgiella confluens*



$E1 + E2 + E3 + E4 + E5 = PE$

