



**UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES**

**DESARROLLO DE MÉTODOS PARA EL ANÁLISIS
DE GALACTANOS SULFATADOS.
APLICACIÓN AL SISTEMA DE XILOGALACTANOS
DEL ALGA ROJA *JANIA RUBENS* (CORALLINALES).**

**Tesis presentada para optar al Título de
Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área Química Orgánica**

DIEGO ALBERTO NAVARRO

Director de Tesis: CARLOS A. STORTZ

Lugar de trabajo: Departamento de Química Orgánica-CIHIDECAR, FCEyN-UBA

Buenos Aires, 2008

DESARROLLO DE MÉTODOS PARA EL ANÁLISIS DE GALACTANOS SULFATADOS. APLICACIÓN AL SISTEMA DE XILOGALACTANOS DEL ALGA ROJA *JANIA RUBENS* (CORALLINALES)

Se han realizado estudios de distinta naturaleza vinculados con galactanos sulfatados aislados de algas rojas, apuntados a determinar los sistemas de polisacáridos de las algas calcáreas pertenecientes al orden Corallinales. Se evaluaron tres métodos diferentes de extracción sobre las algas *Corallina officinalis*, *Bossiella orbigniana* y *Jania rubens*. Los resultados demostraron que el proceso extractivo podía realizarse con cualquiera de los métodos, con pequeñas variaciones en los rendimientos y características de los productos. Además, se efectuó un profundo y detallado estudio para determinar las estructuras de los polisacáridos de *J. rubens*. Estos xilogalactanos resultaron estructuralmente similares a aquéllos estudiados anteriormente, aunque poseían características distintivas. La más importante fue la presencia de 3,6-anhidrogalactosa, pero también aparecieron cadenas laterales inéditas, como la de 2,3-di-*O*-metilgalactosa.

Por otra parte, se han desarrollado nuevas metodologías. Se ha posibilitado la determinación de la configuración absoluta de las unidades de 3,6-anhidrogalactosa, de su derivado metoxilado en C-2 y de la α -galactosa 6-sulfato, utilizando (*S*)- α -metilbencilamina en una reacción de aminación reductiva. También se ha contribuido a disminuir la toxicidad de esta última reacción utilizando α -picolina borano como agente reductor. Al optimizar la reacción para evitar productos secundarios, se determinó que la misma debe realizarse en ausencia de ácido y con un exceso de 5 equivalentes de amina. Por otro lado, se determinó que la utilización del horno a microondas permitía una considerable aceleración del tratamiento alcalino y la desulfatación solvolítica de polisacáridos, dos reacciones habituales en las determinaciones estructurales de galactanos.

Por último, se ha efectuado un estudio teórico por modelado molecular de las conformaciones del metilglicósido de la 3,6-anhidro- α -D-galactosa y otros 3,6-anhidroglicósidos. Las conformaciones determinadas coinciden en buena medida con los datos experimentales.

Palabras clave: Algas rojas, Corallinales, galactanos sulfatados, xilogalactanos, extracción de polisacáridos, diastereómero, 3,6-anhidrogalactosa, microondas, modelado molecular.

DEVELOPMENT OF METHODS FOR THE ANALYSIS OF SULFATED GALACTANS. APPLICATION TO THE SYSTEM OF XYLOGALACTANS FROM THE RED SEAWEED *JANIA RUBENS* (CORALLINALES)

Several different studies regarding red seaweed sulfated galactans were carried out, pointed to the comprehension of the polysaccharide systems of calcareous red seaweeds belonging to the order Corallinales. Three different extraction methods were tested on the seaweeds *Corallina officinalis*, *Bossiella orbigniana* and *Jania rubens*. Results demonstrate that the extraction process can be carried out with any method, with small variations regarding yields and the features of the products. Besides, a detailed study was carried out in order to determine the structure of the polysaccharides from *J. rubens*. These xylogalactans are structurally similar to those previously studied, but have features of their own. The most important one was the presence of 3,6-anhydrogalactose, although unexpected side chains (as that of 2,3-di-*O*-methylgalactose) also appeared.

On the other hand, some new techniques were developed. The determination of the absolute configuration of 3,6-anhydrogalactose, its C-2-methoxylated counterpart, and of α -galactose 6-sulfate was made possible, using (*S*)- α -methylbenzilamine in a reductive amination reaction. A contribution to environmental issues was also made, by diminishing the toxicity of the last reaction using α -picoline borane as the reducing agent. When optimizing the procedure to avoid side products, it was determined that the reaction should be carried out without any acid, and with 5 equivalents of amine. On the other hand, two usual reactions in the structural determinations of galactans were quickened considerably by using a microwave oven. They are the alkaline treatment and the solvolytic desulfation of polysaccharides.

At last, a molecular modeling theoretical study was carried out on the methylglycoside of 3,6-anhydro- α -D-galactose and other 3,6-anhydroglycosides. The most stable conformations obtained by these methods agree noticeably with the experimental data.

Key words: Red seaweeds, Corallinales, sulfated galactans, xylogalactans, polysaccharide extraction, diastereomer, 3,6-anhydrogalactose, microwave, molecular modeling.

A Laura, mi amor

A Marta y Horacio, mis padres

A Javier, mi hermano

Agradezco profundamente al Dr. Carlos A. Stortz,
Director de esta Tesis, por su generoso e invaluable esfuerzo,
por su calidez humana y su amistad,
por enseñarme y ayudarme tanto en lo profesional como en lo personal,
por su permanente respaldo y por permitirme realizar este trabajo en libertad.

Agradecimientos:

A Laura, por su permanente amor y comprensión. Por ayudarme en cada momento y por ser mi reserva espiritual.

A mis padres por el amor dado desde siempre, por su apoyo, por creer en mí y estimularme en cada día de mi vida. Por que sin ellos este paso no hubiera sido posible.

Al Dr. Alberto Cerezo, por su afecto, y por ampliar mi visión sobre la ciencia y la vida.

A la Dra. M. Cristina Matulewicz, por la ayuda brindada durante todos estos años, y especialmente por su cariño y generosidad.

A Andrea Ponce, por su amistad y cariño. Por haberme ayudado, alentado y tenido paciencia durante todos estos años.

A Cecilia Rodríguez por brindarme su amistad, afecto y colaboración en todo momento.

A Gustavo Suyama, un amigo que estuvo desde el comienzo, por los muy buenos momentos compartidos.

A mis amigos: Carla S., Olga T., Luciana G., Pablo A., Gastón T., Ariel P., Daniel M. y Rodolfo B., por su amistad de tantos años.

A Adriana Kolender, Marina Ciancia, María Lujan Flores y José Estévez por lograr un clima de trabajo de amistad y por la colaboración brindada.

A las más chicas del laboratorio: Alejandra R., Cecilia C., Mariana L. y Vanina C., por aportar frescura al trabajo.

A Sebastián Sabatini, Agustín Schiariti y Gustavo Suyama por hacer más agradable el trabajo.

Al resto de mis compañeros de laboratorio: Florencia Basanta, Virginia Fernández, Abelardo Sztrum, Silvia Colavechia, Susana Feldman y Andrea Lavigne, por su amabilidad y compañerismo.

A los compañeros del otro laboratorio: María Inés Errea, Mercedes Pérez Recalde y Héctor Prado, por su amabilidad y compañerismo.

Al Dr. Alberto Cerezo por la donación de las muestras del alga *Porphyra columbina*.

A la Dra. Rosa Erra Balsells, por facilitarnos el reactivo α -picolina borano.

Al Dr. Gerardo Burton por la ayuda y enseñanza brindada en el campo de la resonancia magnética nuclear y otras áreas de la química orgánica.

Al Dr. Jorge Palermo por el asesoramiento dado en el campo del RMN y para la obtención y clasificación de las algas.

A todos las personas que trabajan en el Departamento de Química Orgánica, FCEN-UBA, docentes y no docentes, técnicos y tesistas por su ayuda y por tratarme tan cordialmente.

A todo el personal de CIHIDECAR y UMYMFOR, por la colaboración brindada permanentemente. Al Sr. Jorge Aznarez por su colaboración y buena predisposición en todo momento.

A la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires por darme la posibilidad de hacer este trabajo.

Y a todas aquellas personas que de alguna manera colaboraron conmigo durante todos estos años.

INDICE

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN GENERAL

Introducción	1
1.1 Taxonomía de algas rojas.....	1
1.2 Polisacáridos de algas rojas.....	2
1.2.1 Galactanos de algas rojas.....	2
1.2.1.1 Clasificación de los carragenanos.....	5
1.2.1.2 Clasificación de los agaranos.....	9
1.2.1.3 Variantes estructurales de los agaranos.....	12
1.2.1.4 Híbridos D/L.....	14
1.2.1.5 Relación carragenanos-agaranos. Modelo del prisma.....	16
1.3 Usos y comercialización de carragenanos y agaranos.....	17
1.3.1 Industria de los carragenanos.....	17
1.3.2 Industria del ágar.....	20
1.4 Proceso de gelificación de carragenanos y agaranos.....	21
1.5 Estudios químicos sobre carragenanos y agaranos.....	22
1.5.1 Análisis de pureza y homogeneidad del producto.....	22
1.5.2 Análisis de la composición y del tipo de unión.....	24
Bibliografía.....	26

CAPÍTULO 2

ESTUDIO DE MÉTODOS EXTRACTIVOS PARA POLISACÁRIDOS DE ALGAS DEL ORDEN CORALLINALES

2.1 Introducción.....	29
2.1.1 Estructura de los polisacáridos aislados de algas del orden Corallinales.....	30
2.1.1.1 Xilogalactanos aislados de <i>Corallina officinalis</i>	31
2.1.1.2 Xilogalactanos aislados de <i>Corallina pilulifera</i>	34
2.1.1.3 Xilogalactanos aislados de <i>Bossiella cretacea</i>	35
2.1.1.4 Xilogalactanos aislados de <i>Joculator maximus</i>	36
2.1.1.5 Acido algínico en algas del orden Corallinales.....	38
2.1.2 Métodos de extracción de xilogalactanos de algas del orden Corallinales.....	39
2.2 Resultados.....	40

2.2.1 Métodos extractivos para xilogalactanos de Corallinales. Primera extracción.....	40
2.2.1.1 Análisis de los productos.....	41
2.2.1.2 Azúcares componentes.....	44
2.2.1.3 Análisis de la composición de los xilogalactanos.....	48
2.2.2 Segunda extracción.....	51
2.2.2.1 Análisis de los productos.....	51
2.2.2.2 Análisis de los azúcares componentes.....	53
2.3 Conclusiones.....	57
Bibliografía.....	58

CAPÍTULO 3

DETERMINACIÓN DE LA CONFIGURACIÓN DE LA 3,6-ANHIDROGALACTOSA Y LA α -GALACTOSA 6-SULFATO

SECCION 3A Determinación configuracional de 3,6-anhidrogalactosa y α -galactosa 6-sulfato

3.A.1 Introducción.....	59
3.A.1.1 Análisis de los azúcares componentes de polisacáridos de algas rojas.....	60
3.A.1.2 Análisis de la configuración absoluta de azúcares.....	64
3.A.2 Resultados.....	70
3.A.2.1 Técnica para la determinación configuracional de la 3,6-anhidrogalactosa.....	70
3.A.2.2 Estudios realizados con 1-amino-2-propanol.....	72
3.A.2.3 Estudios realizados con α -metilbencilamina	76
3.A.2.4 Aplicaciones de la técnica de doble hidrólisis-doble aminación.....	82
3.A.2.5 Variaciones en la técnica de doble hidrólisis-doble aminación.....	83
3.A.2.6 Determinación configuracional de la 3,6-anhidro-2-O-metil-galactosa.....	84
3.A.2.7 Determinación de la configuración de la α -galactosa 6-sulfato.....	91
3.A.2.8 Aplicación de la técnica de determinación configuracional de la α -galactosa 6-sulfato a otros polisacáridos.....	96
3.A.3 Conclusiones.....	99

SECCION 3B Evaluación de la α -picolina borano como reductor en reacciones de aminación reductiva

3.B.1 Introducción.....	100
-------------------------	-----

3.B.2 Resultados.....	104
3.B.2.1 Reemplazo del NaCNBH ₃ por α -picolina borano.....	104
3.B.2.2 Estudio de las impurezas generadas.....	107
3.B.2.3 Estudio de nuevas condiciones de reacción.....	112
3.B.2.4 Análisis configuracional de azúcares utilizando α -picolina borano.....	118
3.B.2.5 Aminación reductiva con α -picolina borano sin ácido acético.....	119
3.B.3 Conclusiones.....	121
Bibliografía.....	122

CAPÍTULO 4

REACCIONES ASISTIDAS POR MICROONDAS APLICADAS A POLISACÁRIDOS

Introducción.....	125
-------------------	-----

SECCION 4A Aspectos introductorios y estudios preliminares

4.A.1 Introducción.....	126
4.A.1.1 Fundamentos del calentamiento por microondas.....	127
4.A.1.2 Tipos de hornos de microondas.....	136
4.A.1.3 Reacciones asistidas por microondas aplicadas a polisacáridos.....	136
4.A.2 Resultados.....	139
4.A.2.1 Caracterización del horno de microondas.....	139
4.A.2.2 Diseño del recipiente de reacción.....	143
4.A.2.3 Diseño del sistema de calentamiento	144

SECCION 4B Tratamiento alcalino

4.B.1 Introducción.....	145
4.B.1.1 Antecedentes de la reacción de tratamiento alcalino.....	145
4.B.2 Resultados	149
4.B.2.1 Tratamiento alcalino asistido por microondas. Estudios preliminares.....	149
4.B.2.2 Tratamiento alcalino de galactanos de algas rojas prerreducidos.....	152
4.B.2.3 Tratamiento alcalino de galactanos con diferentes bases.....	160
4.B.3 Conclusiones.....	162

SECCION 4C Desulfatación solvolítica de polisacáridos asistida por microondas

4.C.1 Introducción.....	163
-------------------------	-----

4.C.1.1 Antecedentes de las reacciones de desulfatación.....	163
4.C.2 Resultados.....	167
4.C.2.1 Desulfatación solvolítica de polisacáridos asistida por microondas.....	167
4.C.2.2 Desulfatación solvolítica de la sal de piridinio obtenida por otro método.....	168
4.C.2.3 Desulfatación solvolítica de la sal de piridino obtenida por el método C.....	171
4.C.2.4 Metilación <i>in situ</i>	173
4.C.2.5 Aplicaciones a otros polisacáridos.....	176
4.C.2.6 Comparación de técnicas.....	184
4.C.3 Conclusiones.....	185
Bibliografía.....	186

CAPÍTULO 5

AISLAMIENTO, PURIFICACIÓN Y DETERMINACIÓN ESTRUCTURAL DE LOS POLISACÁRIDOS DE *JANIA RUBENS*

5.1 Introducción.....	191
5.2 Resultados.....	192
5.2.1 Aislamiento de los polisacáridos.....	192
5.2.2 Caracterización de los productos.....	194
5.2.3 Determinación de azúcares componentes.....	195
5.2.4 Estudio de los polisacáridos aislados a temperatura ambiente.....	199
5.2.4.1 Purificación del producto PA1	199
5.2.4.2 Fraccionamiento del producto PA1d	201
5.2.4.3 Caracterización de las fracciones.....	204
5.2.4.4 Análisis por metilación de las fracciones.....	210
5.2.4.5 Determinación de la configuración absoluta de la 2,6-di- <i>O</i> -metilgalactosa.....	215
5.2.4.6 Análisis por etilación de las fracciones.....	217
5.2.4.7 Análisis por desulfatación-metilación de las fracciones.....	221
5.2.5 Análisis por espectroscopía de resonancia magnética nuclear.....	224
5.2.5.1 Análisis por RMN de ¹ H.....	226
5.2.5.2 Análisis por RMN de ¹³ C.....	228
5.2.5.3 Análisis por experimentos de RMN bidimensionales de correlación C-H...	232
5.2.5.4 Análisis del espectro HSQC de la fracción 4.1 desulfatada.....	245
5.2.5.5 Análisis del espectro HSQC de la fracción 4.1 despolimerizada.....	247

5.2.5.6 Análisis cuantitativo de la región anomérica de los espectros HSQC.....	251
5.2.6 Estructura de los coralinanos aislados de <i>Jania rubens</i>	253
5.2.6.1 Grupo Principal.....	257
5.2.6.2 Grupo minoritario.....	258
5.2.6.3 Fracción 3.2 . Estructura intermedia.....	260
5.3 Conclusiones.....	261
Bibliografía.....	262

CAPÍTULO 6

MODELADO MOLECULAR DE 3,6-ANHIDROGLICÓSIDOS

6.1 Introducción.....	265
6.1.1 Análisis conformacional.....	266
6.1.2 Análisis conformacional por modelado molecular.....	267
6.1.3 Estudio conformacional computacional de monosacáridos.....	268
6.2 Resultados.....	273
6.2.1 Generación de los mapas de puckering.....	273
6.2.2 Conformaciones de menor energía de los 3,6-anhidroglucósidos.....	275
6.2.3 Búsqueda de las conformaciones de menor energía de los biciclooctanos 4-6	279
6.2.4 Discusión de los resultados.....	281
6.2.4.1 Análisis de las conformaciones.....	281
6.2.4.2 Comparación de los resultados con datos experimentales.....	286
6.2.4.3 Influencia de los grupos exocíclicos.....	289
6.3 Conclusiones.....	293
Bibliografía.....	295

CAPÍTULO 7

MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Consideraciones generales.....	297
7.2 Aislamiento de los polisacáridos.....	298
7.2.1 Obtención de las algas utilizadas.....	298
7.2.2 Métodos extractivos de polisacáridos de Corallinales.....	298
7.2.3 Extracción preparativa de los polisacáridos de <i>Jania rubens</i>	299

7.2.4 Extracción de los polisacáridos de <i>Porphyra columbina</i>	300
7.2.5 Obtención de los polisacáridos de <i>Iridaea undulosa</i>	301
7.3 Fraccionamiento del sistema de polisacáridos de <i>Jania rubens</i>	301
7.4 Métodos generales.....	302
7.4.1 Determinación cuantitativa de los hidratos de carbono totales.....	302
7.4.2 Determinación de ácidos urónicos.....	302
7.4.3 Determinación cuantitativa de proteínas totales.....	303
7.4.4 Determinación de sulfato.....	304
7.4.5 Determinación del peso molecular promedio.....	305
7.5 Determinación de los azúcares componentes.....	306
7.5.1 Hidrólisis ácida total.....	306
7.5.2 Preparación de los alditos peracetilados.....	307
7.5.3 Preparación de los aldonitrilos peracetilados.....	307
7.5.4 Hidrólisis reductiva para la generación de alditos peracetilados.....	308
7.5.5 Preparación de 1-amino-1-desoxialditos.....	308
7.6 Estudios de alquilación.....	310
7.6.1 Metilación.....	310
7.6.2 Etilación.....	310
7.7 Tratamiento alcalino tradicional de polisacáridos.....	311
7.8 Cromatografía gas-líquido.....	311
7.8.1 Análisis de alditos y aldonitrilos acetilados.....	311
7.8.2 Análisis de los 1-amino-1-desoxialditos.....	312
7.9 Cromatografía gas-líquido acoplada a espectrometría de masa.....	312
7.10 Análisis por RMN.....	313
7.11 Técnicas desarrolladas en el Capítulo 3, Sección A.....	313
7.11.1 Determinación de la α -galactosa 6-sulfato en un sistema “one-pot”.....	313
7.11.2 Técnica de doble hidrólisis-doble aminación reductiva para la determinación de la configuración de la 3,6-anhidrogalactosa.....	314
7.11.3 Técnica de doble hidrólisis-doble aminación reductiva utilizando 1-amino-2-propanol.....	315
7.11.4 Variaciones en la técnica de doble hidrólisis-doble aminación.....	315
7.11.5 Determinación configuracional de la 2- <i>O</i> -metil-3,6-anhidrogalactosa.....	316
7.11.6 Determinación de la configuración de la α -galactosa 6-sulfato.....	316
7.11.7 Determinación configuracional de la 2,3,4,6-tetra- <i>O</i> -metilgalactosa.....	317

7.12 Evaluación de la α -picolina borano como reductor.....	317
7.12.1 Aminación reductiva de galactosa en las condiciones de Sato <i>et al.</i>	317
7.12.2 Aminación reductiva de galactosa en las condiciones de Cases <i>et al.</i>	318
7.12.3 Estudio de las condiciones de reacción utilizando α -picolina borano.....	318
7.12.4 Reacciones de aminación reductiva en metanol sin ácido acético.....	319
7.12.5 Condiciones optimizadas para la aminación reductiva con α -picolina borano..	319
7.12.6 Reducción de fructosa con α -picolina borano.....	320
7.13 Reacciones asistidas por microondas.....	320
7.13.1 Generalidades.....	320
7.13.2 Tratamiento alcalino asistido por microondas.....	320
7.13.3 Desulfatación solvolítica asistida por microondas.....	321
7.13.4 Metilación <i>in situ</i>	323
7.14 Modelado molecular.....	323
7.14.1 Métodos de cálculo.....	323
7.14.2 Generación de las superficies de energía.....	324
7.15 Construcción de la Tabla 5.29.....	324
Bibliografía.....	326
RESUMEN FINAL	329

PRÓLOGO

Los galactanos sulfatados de algas rojas han sido extensamente estudiados, en parte debido a que son económicamente importantes y utilizados por diversas industrias. Los estudios en este campo se han dirigido a la búsqueda de nuevas estructuras, al desarrollo de metodologías, al hallazgo de nuevas aplicaciones, a estudios conformacionales, etc.

El interés primario de este trabajo de Tesis fue el de ampliar los estudios sobre los sistemas de polisacáridos de las algas Corallinales, ya que éstos habían sido muy poco estudiados anteriormente. Los primeros resultados llevaron a profundizar el análisis de los xilogalactanos de *J. rubens*, dado que en ellos se había encontrado sorpresivamente 3,6-anhidrogalactosa.

En función de las características preliminares encontradas en los galactanos de *J. rubens*, fue necesario encarar el desarrollo de nuevas metodologías para facilitar el análisis de los mismos. En consecuencia, se logró desarrollar una técnica para determinar la configuración de la 3,6-anhidrogalactosa y otra para desulfatar eficientemente los polisacáridos con asistencia de microondas. La utilización de esta fuente de energía se hizo extensiva también a la reacción de tratamiento alcalino de carragenanos y agaranos para la generación de 3,6-anhidrogalactosa. Esta reacción es muy importante, ya que es utilizada en el ámbito industrial para mejorar las propiedades gelificantes de los ficocoloides.

Dados los antecedentes existentes al comienzo de este trabajo, no se esperaba que los polisacáridos aislados de Corallinales poseyeran 3,6-anhidrogalactosa. Sin embargo, la detección de este azúcar en los xilogalactanos de *J. rubens* lo convirtió, sin imaginarlo, en uno de los hilos conductores de esta Tesis. Inclusive se ha dedicado parte de este trabajo de Tesis al estudio conformacional por modelado molecular de la 3,6-anhidrogalactosa.

Más allá de los resultados obtenidos sobre los galactanos de *J. rubens* y otras Corallinales, el desarrollo del trabajo permitió también estudiar carragenanos y agaranos aislados de algas de otros órdenes, muchos de los cuales poseen un gran interés desde el punto de vista comercial.

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN GENERAL

1. Introducción

1.1 Taxonomía de algas rojas

Las algas rojas constituyen una de las líneas de algas eucarióticas que surgieron como resultado de un proceso endosimbiótico primario. Se estima que existen cerca de 6000 especies de algas rojas, las cuales se agrupan en una única clase denominada Rhodophyceae y en dos subclases: Bangiophycidae y Florideophycidae¹.

La subclase Bangiophycidae comprende algas estructural y reproductivamente simples (células solitarias y filamentos no ramificados o talos laminares), mientras que las algas con estructuras y formas de reproducción más complejas se agrupan dentro de la subclase Florideophycidae¹. La clasificación a distintos niveles (orden, familia, género y especie) está en constante revisión a partir de la aplicación de filogenia molecular. Con ello se logra un sistema de clasificación natural más representativo de la historia evolutiva del grupo. En la Tabla 1.1 se consignan los órdenes que constituyen cada subclase¹.

Tabla 1.1 Clasificación de las Rhodophyceae¹.

Subclase	Órdenes	
Bangiophycidae	Bangiales	Cryptomonadales
	Compsopogonales	Porphyridiales
Florideophycidae	Acrochaetiales	Ahnfeltiales
	Bonnemaisoniales	Ceramiales
	Corallinales	Gelidiales
	Gigartinales	Gracilariales
	Hildenbrantiales	Nemaliales
	Palmariales	Rhodymeniales

Las algas rojas están ampliamente distribuidas en los mares de todo el mundo y poseen un gran interés ecológico y comercial, lo que ha llevado a desarrollar numerosos métodos de cultivo para su explotación, y amplias investigaciones para conocer sus estructuras, ciclos de vida y generación de metabolitos.

1.2 Polisacáridos de algas rojas

La organización y composición de las paredes celulares de las algas rojas difieren de las encontradas en otras algas y plantas superiores. La pared celular, que representa del 30 al 50% del peso seco del alga, está constituida por polisacáridos, proteoglicanos, proteínas, lípidos y elementos inorgánicos asociados².

Los polisacáridos se pueden agrupar en tres dominios:

- a) una matriz celular rígida formada por glicanos con uniones glicosídicas β , como es el caso de la celulosa [$\rightarrow 4$]- β -D-Glc-($1 \rightarrow$).
- b) un dominio glicoproteico poco conocido, donde una dada secuencia de aminoácidos forman zonas denominadas “dominios de unión de celulosa” (celulose binding domains), que complejan las microfibrillas de celulosa³.
- c) una matriz amorfa flexible constituida por polisacáridos sulfatados.

La porción rígida, que representa del 1 al 9% de la pared celular, está formada en la mayoría de las algas rojas por fibras de celulosa. Sin embargo, existen especies en las que las mismas están reemplazadas por mananos β -($1 \rightarrow 4$) (como en las Bangiales) y/o xilanos β -($1 \rightarrow 4$) y β -($1 \rightarrow 3$) (como en las Nemiales y Palmariales).

La mayor parte de la pared celular sin embargo, está constituida por una matriz amorfa que interacciona con el reticulado rígido. Esta matriz está constituida en la algas rojas por galactanos sulfatados de alto peso molecular, salvo en algunas especies del orden Nemiales donde se han encontrado xilomananos sulfatados^{2,4} en su reemplazo.

1.2.1 Galactanos de algas rojas

Los galactanos sulfatados son los polisacáridos más abundantes y comunes que conforman la matriz amorfa de las algas rojas. Son polímeros lineales, constituidos idealmente por unidades de β -galactosa piranósica enlazadas glicosídicamente a la posición C-4 de unidades de α -galactosa piranósica, que a su vez, están unidas glicosídicamente a la posición C-3 de otra unidad β . Puede representarse el galactano como repetición del disacárido: $\rightarrow 3$)- β -galactosa-($1 \rightarrow 4$)- α -galactosa-($1 \rightarrow$.

Mientras que las unidades de β -Gal siempre pertenecen a la serie D, las unidades de α -Gal pueden poseer la configuración D o L, o estar sustituidas por residuos de 3,6-anhidrogalactosa de cualquier configuración⁵. Este azúcar está presente exclusivamente en los productos aislados de las algas marinas y surge de la ciclación enzimática o por tratamiento con álcali de la α -galactosa 6-sulfato⁶ unida en C-4 (Figura 1.1). La reacción con álcali procede por un mecanismo del tipo S_N2 donde el ión alcóxido generado en el C-3 de la α -galactosa-6-sulfato desplaza al grupo sulfato del C-6 formando el éter cíclico intramolecular.

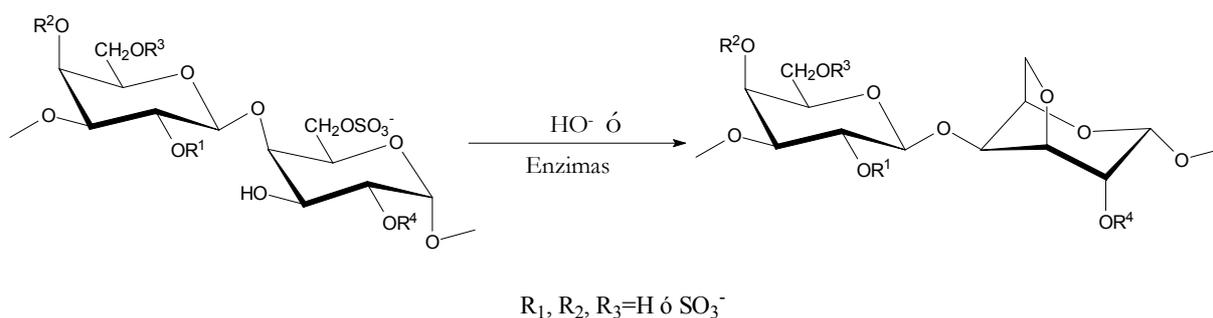
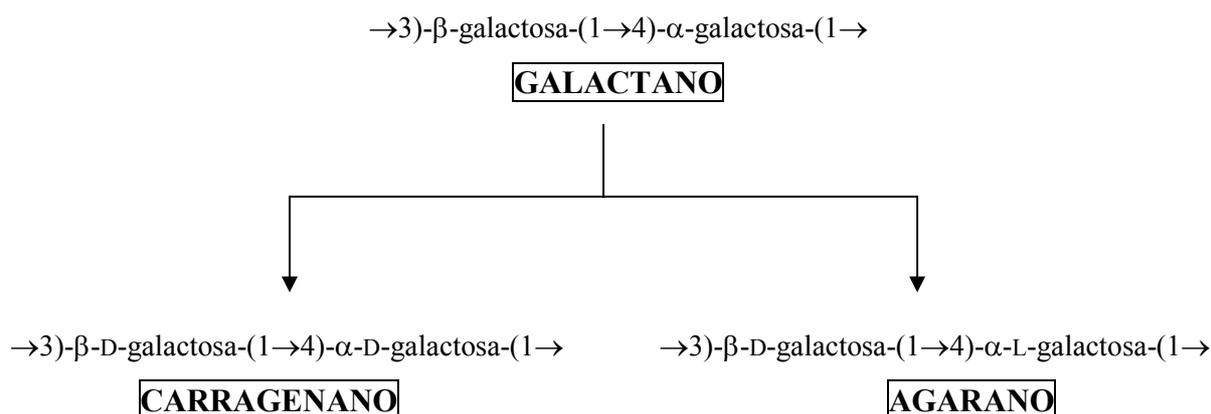


Figura 1.1 Generación de 3,6-anhidrogalactosa a partir de galactosa-6-sulfato en galactanos de algas rojas.

Los galactanos sulfatados presentan generalmente sustituciones de sus grupos hidroxilo con grupos éster sulfato, metoxilo, cetales de ácido pirúvico, y/o cadenas laterales. Todos estos sustituyentes enmascaran la estructura central común a todos los galactanos. La variabilidad en posición y proporción de los sustituyentes da lugar a una variedad estructural de polisacáridos que, en ocasiones, implica poseer diferentes propiedades. Por ejemplo, desde el punto de vista reológico, un galactano rico en galactosa 6-sulfato no gelifica, mientras que al convertirse ésta en 3,6-anhidrogalactosa sí lo hace.

El esqueleto común a todos estos polisacáridos permite realizar una clasificación sencilla: cuando la unidad α pertenece a la serie D, los galactanos pertenecen al grupo de los carragenanos, mientras que cuando pertenece a la serie L, forma parte del grupo de los agaranos. Por lo tanto, los términos agarano y carragenano designan una diferencia entre moléculas diastereoméricas de galactanos^{5,7}.



Esta clasificación se vio afectada en el momento en que se descubrieron polisacáridos donde coexistían unidades α de las dos series⁵, de manera que fue necesario agregar un tercer grupo denominado “híbridos D/L”.

Al haber una gran combinación de sustituyentes, existen numerosas unidades monosacáridicas diferentes que conforman los polisacáridos, de manera que para simplificar la notación se utilizará en este trabajo dos sistemas de nomenclatura según sea necesario.

Uno de los sistemas de nomenclatura se basa en las abreviaturas universales de los azúcares (Gal, Xil, etc), indicando cuando sea necesario la configuración de este. El otro es el sistema empleado por Miller⁸; en éste se indica para cada monosacárido, en orden: posición de unión, configuración e identidad del monosacárido y posición e identidad de los sustituyentes. En la Tabla 1.2 se muestran algunos ejemplos. Este sistema se utilizará en aquellos casos en los que se conozca la identidad completa del azúcar en el contexto del polisacárido.

Tabla 1.2 Nomenclatura de monosacáridos de galactanos sulfatados.

Nomenclatura	Identidad
4DG	→4)-α-D-galactosa-(1→
3DG	→3)-β-D-galactosa-(1→
4DAG	→4)-3,6-anhidro-α-D-galactosa-(1→
4LG6S	→4)-α-L-galactosa 6-sulfato-(1→
3DG3M	→3)-3-O-metil-β-D-galactosa-(1→
3DG6X	→3)-6-O-(β-D-xilopiranosil)-β-D-galactosa (1→

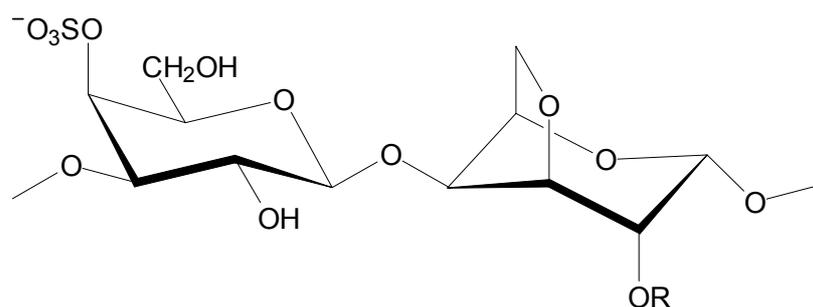
1.2.1.1 Clasificación de los carragenanos

Los carragenanos son galactanos sulfatados lineales, generalmente solubles en agua, en los que todas las unidades de galactosa poseen la configuración D. Como se explicó, estos polisacáridos están compuestos por unidades alternantes de α -galactosas piranósicas enlazadas por C-4 y β -galactosas piranósicas unidas por C-3.

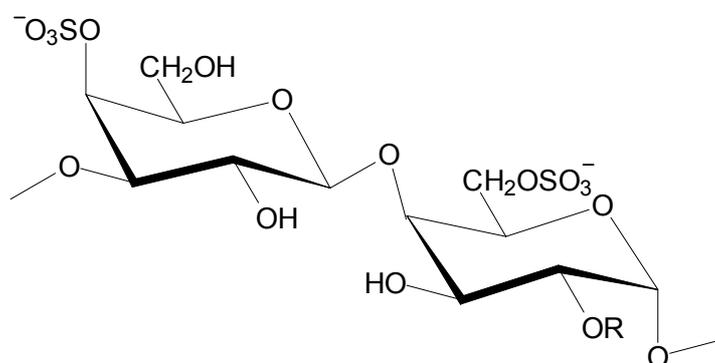
Los carragenanos se obtienen normalmente por extracción con solventes acuosos, principalmente de las algas pertenecientes a los géneros *Chondrus*, *Gigartina*, *Iridaea*, *Hypnea* y *Eucheuma*. En general son capaces de formar geles de alta fuerza o soluciones viscosas⁹. Ya en el año 1862 se había descubierto que el alga *Chondrus crispus* producía un material gelificante (carragenano) que se podía utilizar para la confección de postres.

La clasificación de los carragenanos se basa en estructuras disacarídicas idealizadas, donde cambian la proporción y posición de los diferentes sustituyentes y la proporción de 3,6-anhidrogalactosa. Se han agrupado en 4 familias según la posición en la que está ubicado el hemiéster sulfato en la unidad de β -D-galactosa. Si se encuentra en C-4 pertenece a la familia kappa (κ -), en C-2 a la familia lambda (λ -), en C-6 a la familia omega (ω -) y si está ausente, a la familia beta (β -)^{5,10}.

- a) La familia κ - comprende aquellos carragenanos que poseen las unidades de β -galactosa sulfatadas en la posición C-4 y las unidades de α -D-galactosa sustituidas con grupos sulfato en C-6 o reemplazadas por 3,6-anhidrogalactosa (Figura 1.2). La familia está formada por 4 carragenanos diferentes: κ -, ι -, μ - y ν -. Los carragenanos κ - y ι - son producto de la ciclación enzimática de las unidades de α -D-galactosa de los carragenanos μ - y ν - respectivamente. Estos polisacáridos son producidos principalmente por el estadio gametofítico del ciclo de vida de las algas pertenecientes a las familias del orden Gigartinales². Los carragenanos encontrados naturalmente son combinaciones de estas estructuras idealizadas existiendo variaciones entre especies y ciclos de vida. Se ha determinado que generalmente los carragenanos κ - e ι - aislados no son puros sino que son mezclas híbridas de ambos, de manera que el producto conseguido es una estructura híbrida κ/ι (denominada en ocasiones “kappa-2”)¹¹. Estos carragenanos son los más utilizados comercialmente como agentes gelificantes en soluciones acuosas.



Carragenano	R
κ-	H
ι-	SO ₃ ⁻

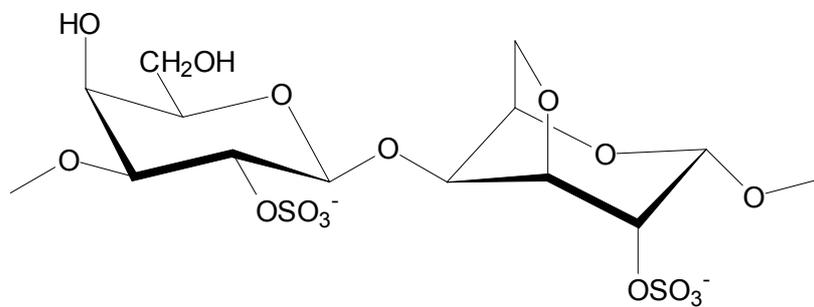


Carragenano	R
μ-	H
ν-	SO ₃ ⁻

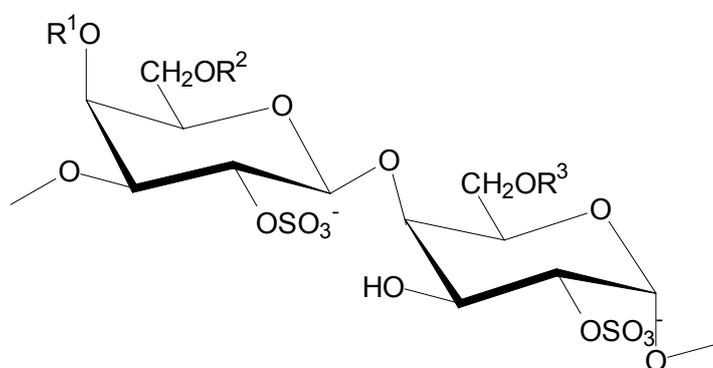
Figura 1.2 Estructuras idealizadas de la familia κ de carragenanos.

b) La familia del λ-carragenano fue definida originalmente por Dolan y Rees¹² como la de aquellos polisacáridos exentos de unidades de β-D-galactosa 4-sulfato y de 3,6-anhidro-α-galactosa. En la actualidad se incluye además a aquellos carragenanos que poseen 3DG2S, la cual además puede estar piruvilada. Con estas características se encuentran tres carragenanos diferentes: λ-, ξ- y π- (Figura 1.3). La modificación alcalina del λ-carragenano da lugar a un cuarto polímero no natural, denominado θ-carragenano. Cabe destacar que tanto el ξ- como el π- son los únicos carragenanos que no contienen 3,6-anhidrogalactosa ni su precursor químico la α-galactosa 6-sulfato. Son producidos fundamentalmente por los esporofitos de especies de Phylloporaceae, Petrocelidaceae y Gigartinaceae⁵. Los carragenanos de esta familia (particularmente el λ-carragenano)

son viscosantes pero no gelificantes, razón por la cual se utilizan como agentes espesantes.



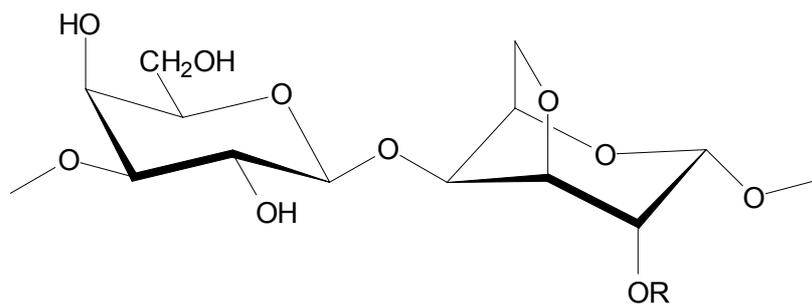
θ -carragenano



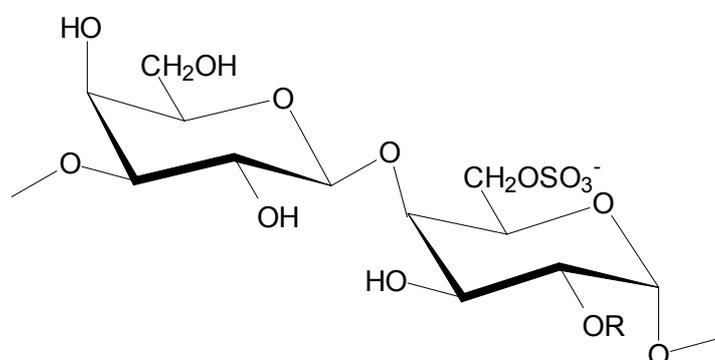
Carragenano	R ¹	R ²	R ³
λ -	H	H	SO ₃ ⁻
ξ -	H	H	H
π -	1-carboxietilidén		H

Figura 1.3 Estructuras idealizadas de la familia λ de carragenanos.

- c) La familia de los carragenanos β - incluye a aquellos cuyas unidades de β -D-galactosa no están sulfatadas. Están incluidos los carragenanos β -, α - y sus precursores γ - y δ - (Figura 1.4). El β -carragenano es un diasterómero de la agarosa (ver luego), ya que en un caso el residuo de anhidro azúcar pertenece a la serie D y en el otro a la serie L. Este grupo de carragenanos es producido por pocas especies, algunas de ellas pertenecientes a la familia Solieriaceae¹³.



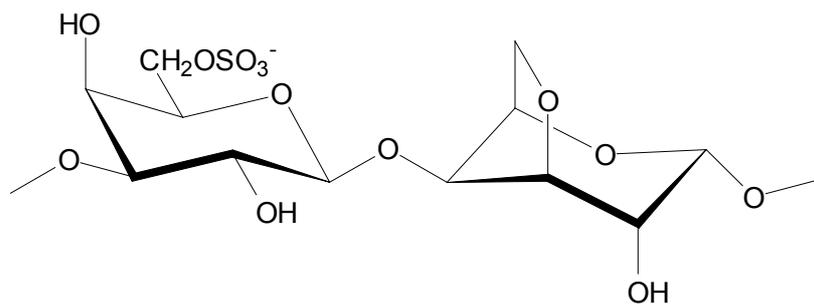
Carragenano	R
β -	H
α -	SO_3^-



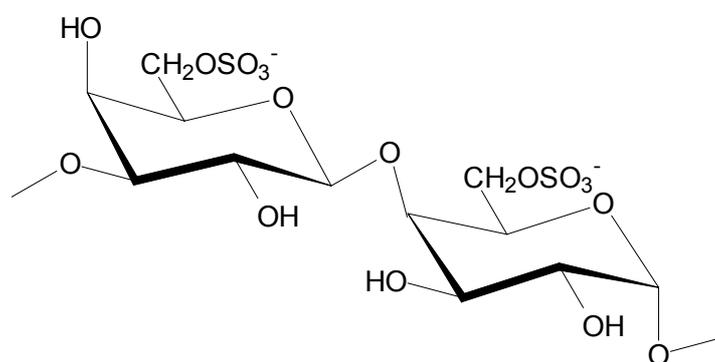
Carragenano	R
γ -	H
δ -	SO_3^-

Figura 1.4 Estructuras idealizadas de la familia β de carragenanos.

- d) La familia ω - se caracteriza por la sulfatación en el C-6 de la unidad de β -D-galactosa. Esta familia también comprende a su precursor biológico el ψ -carragenano. El único ω -carragenano fue aislado de *Rissoella verruculosa*¹⁴.



ω -carragenano



ψ -carragenano

Figura 1.5 Estructuras idealizadas de la familia ω de carragenanos.

Las estructuras descritas para cada familia son idealizadas y forman los límites en que se comprenden los carragenanos reales, los cuales van variando como combinaciones de estructuras modelos.

1.2.1.2 Clasificación de los agaranos

La clasificación de los agaranos no es tan clara como en el caso de los carragenanos, más allá de que han existido algunos intentos de realizar una sistematización¹⁵. Los primeros trabajos en el tema fueron realizados por Araki, sobre los polisacáridos obtenidos de *Gelidium amansii*^{16,17}. El autor describió al polisacárido como una estructura disacáridica repetitiva sin carga y fuertemente gelificante, la cual fue denominada agarosa (Figura 1.6).

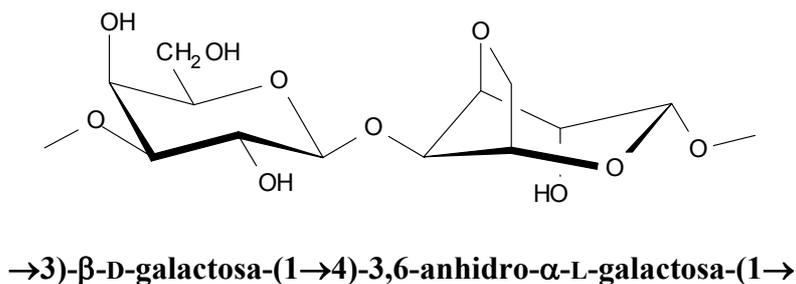


Figura 1.6 Estructura idealizada de la agarosa.

La agarosa fue encontrada junto con una fracción cargada que se denominó agarpectina, la que surge de sustituir algunas unidades L con sulfato y algunas unidades D con ácido pirúvico (4,6-*O*-(1-carboxietilidén)-D-galactosa). El concepto de Araki de dos polisacáridos, agarosa neutra y agarpectina cargada, fue modificada años más tarde por Duckworth y Yaphe¹⁸ al estudiar un ágar comercial. Los autores plantearon un sistema complejo que variaba en forma continua entre estructuras neutras y altamente cargadas. Los extremos definidos por los autores fueron:

- a) Agarosa neutra: Comprende las estructuras idealizadas del tipo 3DG-4LAG (Figura 1.6).
- b) Agarosa sustituida con ácido pirúvico y baja sulfatación: Comprende a las estructuras que poseen porcentajes de sulfatación menores al 2% y proporciones crecientes de D-galactosa sustituidas con cetales del ácido pirúvico.
- c) Galactano altamente sulfatado: Desde el segundo extremo disminuye la cantidad de 4,6-*O*-(1-carboxietilidén)-D-galactosa para generar una estructura con altas cantidades de sulfato sin 4LAG.

El extremo c) surge del reemplazo total de la 3,6-anhidrogalactosa por su precursor químico y se denominó “*Tercer extremo de Yaphe*”¹⁸ (Figura 1.7).

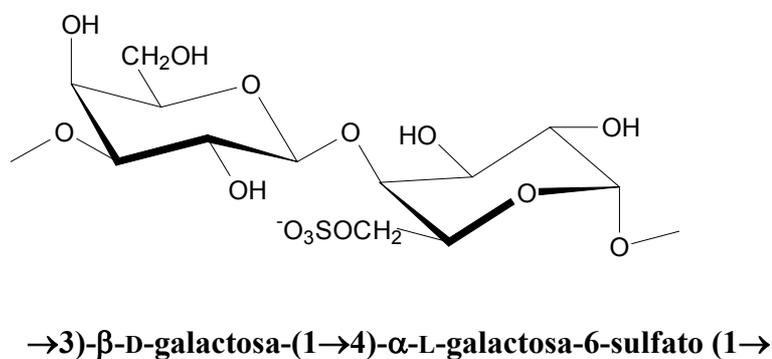


Figura 1.7 Estructura del *Tercer extremo de Yaphe*.

Se ha encontrado que las proporciones de cada estructura en los polisacáridos pueden variar para las distintas especies de algas, en función de la época del año y del estado de crecimiento.

La agarosa neutra es la responsable de las propiedades gelificantes del ágar, mientras que los productos cargados proveen el componente viscoso. Un aumento del contenido de sulfato disminuye la capacidad gelificante, de manera que un incremento de los residuos de 3,6-anhidrogalactosa aumentan la fuerza del gel.

En términos de la 3,6-AnGal o de su precursor químico o enzimático (la α -galactosa 6-sulfato) se puede definir otra estructura extrema donde ambas están ausentes y solo aparece α -L-galactosa (no sulfatada en C-6) en el polisacárido. En este lugar se pueden ubicar los polisacáridos aislados de las algas del orden Corallinales¹⁹⁻²⁴ (coralinanos, ver cap. 2 y 5).

En un intento por clasificar a los agaranos, Miller⁸ definió tres grupos: la agarosa, los ágares y los agaroides. El sistema de clasificación se basaba especialmente en el grado de sustitución y la capacidad gelificante del polímero.

El autor definió a la agarosa como un polisacárido altamente gelificante sin carga con una estructura idealizada $(3DG-4LAG)_n$ (poliagarobiosa), a los ágares como agarosas defectuosas que presentan ciertos niveles de sulfatación y piruvilación, aún luego de haber realizado el tratamiento alcalino para generar la 3,6-anhidrogalactosa, y a los agaroides como estructuras altamente sustituidas (Tabla 1.3).

Tabla 1.3 Estructura idealizada de los agaranos.

Polisacárido	Cadena Central	Sustituyentes
Agarosa	$\rightarrow 3)-\beta\text{-D-Gal-(1}\rightarrow 4)-3,6\text{-An-}\alpha\text{-L-Gal-(1}\rightarrow$	-
Agar	$\rightarrow 3)-\beta\text{-D-Gal-(1}\rightarrow 4)-3,6\text{-An-}\alpha\text{-L-Gal-(1}\rightarrow$	\downarrow Sulfato, \downarrow Cetal de pirúvico
Agaroide	$\rightarrow 3)-\beta\text{-D-Gal-(1}\rightarrow 4)-3,6\text{-An-}\alpha\text{-L-Gal-(1}\rightarrow$ + $\rightarrow 3)-\beta\text{-D-Gal-(1}\rightarrow 4)-\alpha\text{-L-Gal-(1}\rightarrow$	\uparrow Metilo, \uparrow Cetal de pirúvico, \uparrow Sulfato, \uparrow Cadena lateral

Sin embargo, esta clasificación demostró ser muy amplia debido a que el término agaroide se aplicaba a un número demasiado grande de polisacáridos. El sistema se tornaría relevante si se pudiera realizar una subcategorización de los agaroides, la cual no ha sido realizada hasta el momento.

1.2.1.3 Variantes estructurales de los agaranos

Las estructuras idealizadas descritas hasta el momento se pueden modificar a partir de sustituir las distintas posiciones de las unidades de galactosa con grupos sulfato, metoxilo, piruvilo y cadenas laterales de galactosa y/o xilosa.

En la Tabla 1.4 se puede observar diferentes variaciones estructurales en agaranos biosintetizados por algunas especies de algas rojas.

Tabla 1.4 Variaciones estructurales en agaranos de algunas especies².

Alga	β -D-galactosa	α -L-galactosa
Bangiales		
<i>Porphyra haitanensis</i> ²	6-O-Me (D) ^a	6-SO ₄ (F)
<i>Porphyra columbina</i> ²⁵	6-O-Me (F)	6-SO ₄ (M)
Gelidiales		
<i>Gelidium lingulatum</i> ²	6-O-Me (M)	2-O-Me (F)
<i>Gelidium purpurascens</i> ²	6-O-Me (D)	6-SO ₄ (M)
Gigartinales		
<i>Gracilaria blodgettii</i> ²	6-O-Me (Tr)	LAG2M (D)
<i>Gracilaria cervicornis</i> ²	6-O-Me (M)	6-SO ₄ (M)
<i>Gracilaria eucheumoides</i> ²	6-O-Me (D)	LAG2M (F), LG2M6S
<i>Gracilaria verrucosa</i> ²	6-O-Me (D)	6-SO ₄ (D)
Corallinales		
<i>Corallina officinalis</i> ²⁶	6-O-Xil (F) , 6-SO ₄ (M)	2-SO ₄ (M), 3-SO ₄ (M), 2-O-Me (M), 3-O-Me (D)
Ceramiales		
<i>Ceramium boydenni</i> ²	6-O-Me (F)	-
<i>Laurencia pinnatifida</i> ²	2-SO ₄ (F)	LG2M6S (F)
<i>Laurencia undulata</i> ²	4-O-Xil (M)	
<i>Chondria macrocarpa</i> ²⁷	2-SO ₄ (F), 6-SO ₄ (M)	LG3X6S(M)

^a F = sustitución fuerte, M = media, D = débil, Tr = trazas

Muchos agaranos presentan el C-6 de las unidades de β -D-galactosa sustituido con metoxilo y las unidades α mayoritariamente con grupo sulfato en la misma posición. Como estas últimas son los precursores químicos de la 3,6-anhidrogalactosa, las cantidades de ambas unidades en un dado polisacárido varían de manera complementaria. Se han observado proporciones de β -D-galactosa metoxiladas en C-6 entre un 5 y 35%, en productos aislados de *Porphyra*^{2,25}.

La posición 2 de las unidades de α -L-galactosa suele estar metoxilada o sulfatada, especialmente en aquellos productos provenientes de algas pertenecientes a los órdenes Nemaliales², Gigartinales² y Corallinales²⁶. Por otra parte, cuando estas unidades están además sustituidas con grupos sulfato en C-6 puede encontrarse también como consecuencia del proceso de ciclación, 3,6-anhidro-2-O-metil- α -L-galactosa².

Los polisacáridos de Corallinales además de contener altas cantidades de 2-O-metil- α -L-galactosa poseen de manera excepcional cantidades apreciables de unidades metoxiladas en C-3, la cual en general se encuentra en cantidades despreciables en otros polisacáridos. La revisión y reexploración de estos sistemas de polisacáridos son motivo de estudios de este trabajo de Tesis y se profundizarán en los capítulos 2 y 5.

En algunos agaranos se determinó también la presencia de 4-O-metil-L-galactosa, aunque en bajas cantidades, sin que originalmente a este azúcar se le de un significado estructural. Sin embargo, Craigie en dos trabajos realizados posteriormente acerca de los polisacáridos aislados del alga *Gracilaria ticvahiae* y utilizando análisis de metilación, tratamiento con enzimas y RMN de ¹³C, confirmó que la 4-O-metil-L-galactosa se encontraba como ramificación de la cadena central sobre el carbono 6 de la β -D-galactosa 4-sulfato^{28,29}. Similares resultados fueron posteriormente confirmados para agaranos provenientes de las algas *Gracilaria verrucosa*³⁰ y *Corallina officinalis*²¹.

La xilosa es otro de los sustituyentes que pueden encontrarse en los agaranos. Su presencia en cantidades variables en extractos ricos en galactanos sulfatados era explicado en un inicio en términos de la coexistencia de éstos y xilanos solubles en agua¹⁵. Esto era correcto sólo en algunos casos ya que estudios posteriores de metilación demostraron que en muchos casos la xilosa se encontraba formando parte del agarano como ramificación de la cadena central de galactosas^{8,15,21,31}.

Las cantidades de xilosa informadas en los productos aislados de la mayor parte de algas agarófitas^{8,15} no superan el 5%. Sin embargo, algunas especies como las coralinas producen polisacáridos con proporciones de xilosa sensiblemente mayores.

La sustitución con xilosa de las unidades de galactosa de los agaranos puede ocurrir en diferentes posiciones¹⁵. En la Tabla 1.5 se muestran algunos ejemplos.

Tabla 1.5 Agaranos sustituidos con xilosa.

Alga	Sustitución	Galactosa	Relación Gals/Xil
<i>Chondria macrocarpa</i> ²⁷	O-3	α	6.0
<i>Laurencia nipponica</i> ³²	O-3	α	4.0
<i>Corallina officinalis</i> ^{20,21}	O-6	β	2.5
<i>Georgiella confluens</i> ³¹	O-4	β	10.0

Dentro del orden Ceramiales, en especies de los géneros *Laingia*, *Laurencia* y *Chondria* pertenecientes a la familia Rhodomelaceae, se han encontrado galactanos sustituidos con xilosa en distintas posiciones de las unidades α . Por ejemplo, en los productos aislados de *Laurencia nipponica* y *Chondria macrocarpa*, la xilosa está unida al C-3 de las unidades α . Además algunas de estas unidades están también sustituidas con grupos sulfato en la posición C-6.

Todos los galactanos aislados de las algas pertenecientes al orden Corallinales presentan alto grado de sustitución con xilosa, siendo hasta el momento los mayores niveles informados en polisacáridos de algas rojas. Claros ejemplos de esto son los coralinos aislados de *Corallina officinalis*^{20,21}, *Corallina pilulifera*^{23,24} y *Joculator maximus*²². En todos estos casos las xilosas están unidas casi exclusivamente en la posición C-6 de las unidades de β -D-galactosa (ver Capítulo 2).

La sustitución con xilosa en la unidad de β -galactosa también fue informada en productos aislados de la especie *Georgiella confluens* (Ceramiales). A diferencia de los coralinos la sustitución en estos polisacáridos ocurre en el C-4 de la β -D-galactosa³¹.

1.2.1.4 Híbridos D/L

La división de agaranos y carragenanos llevó a denominar a las algas que los producen como agarófitas y carragenófitas, respectivamente. Esta clara división se vio afectada en el momento en que en ciertas algas, se descubrió la coexistencia de polisacáridos con estructuras

del tipo carragenano y agarano. Esto obligó a generar una tercera clasificación de polisacáridos que se denominó híbridos D/L^{15,33}. Los estudios estructurales detallados de sistemas de polisacáridos provenientes de algas del orden Gigartinales (carragenófitas) permitieron demostrar la existencia de galactanos conteniendo pequeñas cantidades de L-galactosa, la cual es propia de los agaranos³³⁻³⁵.

Con el transcurso del tiempo, la utilización de cuidadosos procesos de fraccionamiento y el desarrollo de nuevos métodos de determinación configuracional de los monosacáridos, se amplió significativamente el número de especies para las que se informaron híbridos D/L.

La clasificación de sistemas como híbridos D/L no establece si se trata de una sola estructura mixta del tipo carragenano-agarano, o de mezclas de carragenanos y agaranos separables.

Takano *et al.*³⁶ intentaron la separación de oligosacáridos en el sistema de polisacáridos *híbridos D/L* aislados del alga *Lomentaria catenata*. Todos los oligosacáridos separados y caracterizados eran fragmentos correspondientes a la serie de los carragenanos o a la de los agaranos, pero en ningún caso se encontró un híbrido. Ante estos indicios los autores sugirieron la coexistencia de dos tipos de galactanos: un carragenano y un agarano. A similares conclusiones llegaron Estévez *et al.*³⁷, tras purificar un κ -carragenano de los constituyentes minoritarios del sistema aislado del alga *Kappaphycus alvarezii*. Los autores notaron que al dializar los productos tratados con NaOH, se producía dentro de la bolsa de diálisis la concentración del producto mayoritario (κ -carragenano) y la pérdida de una porción del material de bajo peso molecular del tipo agarano.

Sin embargo, aún ante los resultados expuestos, ninguno de estos estudios ha podido concluir categóricamente cómo es el sistema polisacárido del híbrido D/L. La imposibilidad de separar o purificar por diversos métodos estos sistemas en carragenanos y agaranos es la principal prueba en contra de la hipótesis de polisacáridos separados. La separación de oligosacáridos tampoco es definitiva, ya que en un sistema de bloques, del tipo

A-A-A-A-A-A-C-C-C-C-C-C-C

la posibilidad estadística de aislar un producto del tipo A-C es muy baja.

1.2.1.5 Relación carragenanos-agaranos. Modelo del prisma

En términos de la unidad de α -galactosa, Stortz y Cerezo⁵ propusieron un modelo de prisma triangular para relacionar las diferentes estructuras de los carragenanos y de los agaranos (Figura 1.8). En este modelo, los polisacáridos pertenecientes exclusivamente a las familias de los agaranos y de los carragenanos se ubican en cada una de las caras triangulares del prisma, mientras que los polisacáridos del tipo híbridos D/L lo hacen dentro del cuerpo geométrico (si son considerados como estructuras mixtas).

Un vértice del prisma está formado por la agarosa, mientras que el vértice equivalente para los carragenanos se encuentra el β -carragenano. Estas dos estructuras tienen unidades disacáridicas repetitivas diastereoméricas entre sí del tipo 3DG-4AG.

Otro vértice del prisma es el formado por el tercer extremo de Yaphe, con su equivalente constituido por carragenanos conformados con α -galactosa 6-sulfato en lugar de 3,6-anhidrogalactosa. En este caso nos encontramos con los carragenanos λ , μ y ν entre otros.

Finalmente cada triángulo se cierra con las estructuras libres de 3,6-anhidrogalactosa o de su precursor químico o enzimático. Para los carragenanos esta posición está representada por los ξ -carragenanos y para los agaranos por los corallinanos.

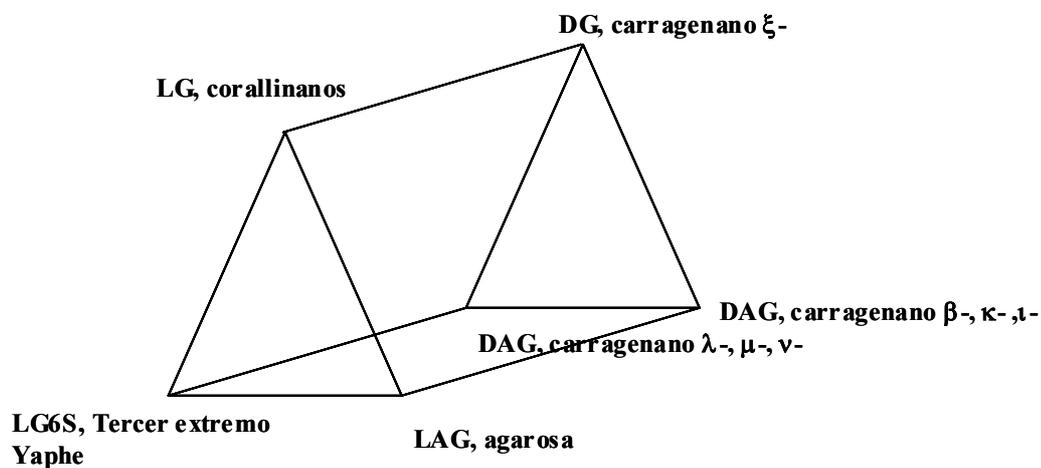


Figura 1.8 Prisma triangular de los galactanos.

Dada la gran variedad estructural de los polisacáridos aislados de algas rojas, la precisa localización de cada uno de ellos dentro del prisma dependerá de la relación entre D y L galactosa (que lo clasifica como agarano, carragenano o híbrido D/L), y de la proporción de 3,6-anhidrogalactosa o de su precursor químico.

1.3 Usos y comercialización de carragenanos y agaranos

La industria de las algas marinas⁹ utiliza anualmente entre 7,5 y 8 millones de toneladas de algas secas, que generan un comercio mundial por US\$ 6.000 millones. Gran parte del comercio (US\$ 5.000 millones) se sustenta en el consumo de productos comestibles para humanos, especialmente en países de oriente como China, Japón y Corea. Estos además de ser los mayores consumidores son también grandes productores de algas y productos derivados. Un ejemplo es la producción de *Porphyra* (Nori) para ser utilizada en la confección de la comida tradicional japonesa Sushi; Japón es el principal productor mundial vendiendo 600.000 toneladas al año a US\$ 16.000 la tonelada seca.

Una porción de las algas marinas son utilizadas para la producción de ficocoloides gelificantes como ácido alginico (de algas pardas), agaranos y carragenanos (de algas rojas). Cerca de 1 millón de toneladas de algas son cosechadas y extraídas para producir 55.000 toneladas de ficocoloides. El valor de la producción se estima en US\$ 660 millones, aportando la mayor parte el comercio de los carragenanos (Figura 1.9). Estos ficocoloides son muy utilizados, dadas sus propiedades gelificantes y espesantes, por las industrias alimentaria y farmacéutica.

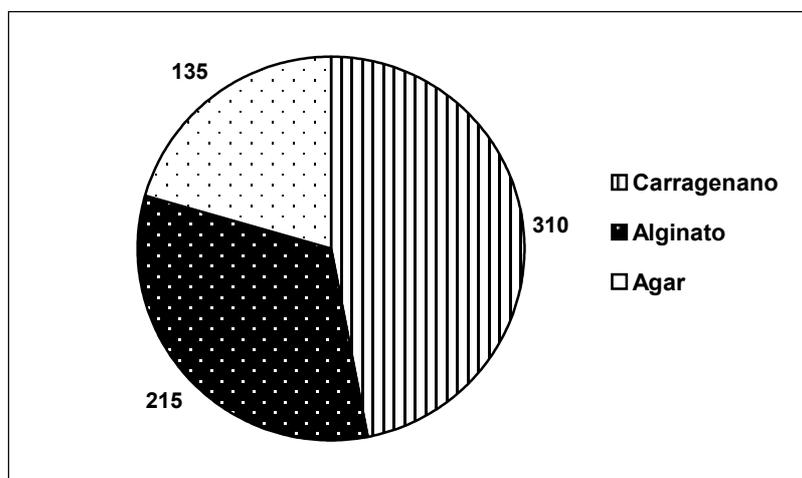


Figura 1.9 Mercado mundial de ficocoloides naturales gelificantes (en millones de dólares).

1.3.1 Industria de los carragenanos

Los carragenanos son obtenidos industrialmente a partir de las algas *Kappaphycus alvarezii*, *Eucheuma denticulatum*, *Chondrus crispus* y *Gigartina skottsbergii*. Tanto

Kappaphycus alvarezii como *Eucheuma denticulatum* son las especies utilizadas por excelencia, dada la calidad de sus productos y la factibilidad de realizar cultivos a gran escala. La cosecha de las dos especies aporta 150.000 toneladas de algas secas al año, lo que representa el 85% de las algas recolectadas para la generación de carragenanos.

El mercado anual de los carragenanos se estima en US\$ 310 millones y tiene una perspectiva de crecimiento estimado del 5% anual¹⁰. En la Tabla 1.6 se puede observar el volumen de algas utilizadas para la producción de carragenanos en los países más importantes.

Tabla 1.6 Algas utilizadas para la producción de carragenanos (Toneladas secas para el año 2001).

<u>Chondrus</u>	
Canadá	2000
Francia, España y Portugal	1400
República de Corea	500
Subtotal	3900
<u>Eucheuma y Kappaphycus</u>	
Indonesia	25000
Filipinas	115000
Tanzania	8000
Otros	1000
Subtotal	149000
<u>Gigartina</u>	
Chile	14000
Marruecos, México y Perú	1500
Subtotal	15500
Total	168400

Los carragenanos de interés comercial son tres: ι -, κ - y λ -, los cuales son obtenidos de diferentes algas:

Kappaphycus alvarezii : predominantemente κ -.

Eucheuma denticulatum : predominantemente ι -.

Chondrus crispus: mezclas de κ - y λ -.

Gigartina skottsbergii : principalmente κ - y poco λ -.

Sarcotalia crispata : mezclas de κ - y λ -.

Sus usos están relacionados con la habilidad para formar soluciones viscosas o geles.

κ - → Geles fuertes y rígidos formados con sales de potasio.

ι - → Geles elásticos formados con sales de calcio.

λ - → Viscosante, no gelifica.

Los carragenanos son utilizados como agentes estabilizantes, viscosantes y/o gelificantes. Se utilizan en alimentos instantáneos, comidas dietéticas, mermeladas y dulces, productos lácteos y caldos. Por ejemplo, mezclas de ι - y κ - carragenanos son utilizados en pequeñas cantidades como agentes estabilizantes en quesos crema y helados para evitar la separación de sus componentes. La industria farmacéutica y cosmética los emplea como texturizante en pastas dentales, espesante en champús e hidratantes en lociones, cremas y otros productos cosméticos.

Una nueva aplicación está siendo probada para los carragenanos. La ONG “Population Council” ha desarrollado y probado con éxito un gel vaginal microbicida, denominado Carraguard[®] (PC-515)³⁸, para evitar la transmisión del virus de inmunodeficiencia humana (HIV) y otras posibles infecciones sexuales. El producto, confeccionado a base de carragenanos λ - y κ -, además de poseer una potente actividad antiviral sustenta su éxito en su formulación del tipo gel y en su bajo costo. Este último factor posibilita que países pobres y con alta incidencia de la enfermedad, como algunos encontrados en el continente africano, puedan controlar eficientemente la propagación del virus. Los informes revelan que las pruebas clínicas de fase tres han sido superadas con éxito, de manera que se espera la presentación del producto para el consumo masivo³⁹.

La actividad antiviral de los carragenanos fue descubierta aproximadamente hace 30 años a partir de demostrarse que poseían actividad inhibitoria contra el virus del herpes simplex (HSV-1 y HSV-2) y HIV. El mecanismo de acción se basa en que la estructura polianiónica de los carragenanos les permite a éstos formar complejos iónicos con glicoproteínas del virus, lo que inhibe la interacción de éste con las células del sistema inmune⁴⁰.

1.3.2 Industria del ágar

Las algas utilizadas para la producción de ágar a gran escala pertenecen a los géneros *Gelidium*, *Gracilaria*, *Pterocladia*, *Gelidiella* y *Ahnfeltia*. Chile es el mayor productor de ágar a partir de *Gracilaria*, ya que cultiva y cosecha 22.000 toneladas de algas al año (dato del año 2000). El resto de los productores de *Gracilaria*, como China, Namibia, India y Argentina, cosechan entre todos menos de 15.000 toneladas al año (Tabla 1.7). Esta desproporción surge porque países como Argentina, que produce 3000 toneladas al año, basan su explotación en las algas silvestres (no cultivadas) y Chile en las cultivadas.

Tabla 1.7 Algas utilizadas para la producción de ágar (Toneladas secas para el año 2001).

<u><i>Gracilaria</i></u>	
Europa	200
Africa	300
América	25000
Asia (Pacífico)	11500
Subtotal	37000
<u><i>Gelidium</i></u>	
Europa	6600
Africa	7200
América	500
Asia (Pacífico)	4300
Subtotal	18600
<u><i>Pterocladia</i></u>	
Europa	50
Total	55650

La producción de ágar en el año 2001 a partir de las algas antes mencionadas, fue de 16.000 toneladas con un valor de US\$ 135 millones. El comportamiento futuro de la demanda de este ficocoloide no está bien estipulado por lo que se supone que se mantendrá estable por un dado período de tiempo.

La utilización del ágar se debe a su habilidad en formar geles. Sus propiedades son únicas y diferentes a los geles de los carragenanos dada la gran diferencia que existe entre la temperatura de formación y fusión. El ágar es utilizado en alimentos como mermeladas, dulces y sopas, y además se usa como medio de cultivo bacteriológico, laxante y material de impresión dental⁹.

1.4 Proceso de gelificación de carragenanos y agaranos

La gelificación de la agarosa consta hipotéticamente de un proceso donde al enfriar la solución, las moléculas pasan de un estado desordenado a formar una doble hélice ordenada (gel I). Estas hélices se agregan formando zonas de unión (mediante uniones puente hidrógeno y/o interacciones hidrofóbicas) para generar un gel firme (gel II)⁴¹. Para formar el gel II, es necesaria la presencia de moléculas de agua o iones⁴². Se observa además una histéresis térmica entre la temperatura de formación (25-45 °C) y la de fusión del gel (90-120 °C) dada por la generación de estados agregados que pueden ser disociados sólo a altas temperaturas. La histéresis térmica disminuye como resultado de la inhibición de la agregación de las hélices cuando aumenta el contenido de grupos sustituyentes en el agar^{43,44}.

Estudios sobre diferentes ágares con distintos porcentajes de 3DG6M, demostraron que este azúcar influye en la temperatura de gelificación y en la fuerza de los geles⁴⁵. A medida que aumentaba la proporción de 3DG6M, aumentaba la temperatura de gelificación.

En el caso específico de los carragenanos, la agregación de las hélices ocurre al enfriar la solución y/o en presencia de ciertos cationes que suprimen las repulsiones electrostáticas entre los sustituyentes del polisacárido. Los iones típicamente utilizados para promover la formación de geles son Ca^{+2} para el ι -carragenano y K^+ para el κ -carragenano.

Los mecanismos de gelificación de los κ - y ι -carragenanos son motivo de debate aún hoy, debido a la existencia de dos teorías. La más aceptada es la que basa el proceso de gelificación en la formación de dobles hélices, que luego se asocian en dominios en presencia de cationes. La segunda teoría plantea la formación de hélices simples que luego se asocian en presencia de cationes^{46,47}. Hay resultados que avalan cada una de estas dos teorías, los mismos fueron obtenidos utilizando técnicas de rayos X, rotación óptica, resonancia magnética nuclear (RMN), calorimetría, reología y difusión de la luz⁴⁴.

La formación y fuerza de los geles se ve afectada por la presencia y posición de grupos metoxilo y/o sulfato como sustituyentes en los polisacáridos. La presencia de grandes cantidades de grupos sulfato en la posición 6 de la unidad α y en la posición 2 de la unidad β previenen la formación de las dobles hélices y en consecuencia evitan la gelificación, como ocurre con el λ -carragenano⁴⁴.

1.5 Estudios químicos sobre carragenanos y agaranos

Los estudios químicos sobre polisacáridos de algas rojas se pueden dividir en dos grandes grupos, unos orientados a la estructura primaria y otros a la estructura secundaria-terciaria^{7,26,48}.

Se ha encontrado que los agaranos y carragenanos varían su estructura primaria entre diferentes batch, en función del origen, del estadio del ciclo de vida del alga, o de factores climáticos. Estas variaciones pueden afectar las propiedades funcionales de los biopolímeros, de manera que las industrias que los utilizan necesitan controles de calidad certeros, efectivos y reproducibles. Las diferentes metodologías de análisis utilizadas en el control de calidad de estos productos están fuertemente relacionadas con las utilizadas por las unidades académicas. En la mayoría de los casos, estas últimas son las encargadas de producir los desarrollos de nuevos métodos de análisis cuya eficiencia y certeza son la base del descubrimiento de nuevos productos o nuevos análisis de los ya conocidos.

El análisis estructural puede dividirse en varias etapas:

1. Análisis de pureza y homogeneidad del producto.
2. Análisis de la composición.
3. Análisis del tipo de unión.
4. Secuenciación.

Dada la complejidad de los polisacáridos analizados, generalmente no es posible realizar una secuenciación de los mismos. Los estudios exitosos en el campo se refieren al análisis de oligosacáridos con pocos azúcares generados a partir de los biopolímeros⁴⁸.

1.5.1 Análisis de pureza y homogeneidad del producto

Para la caracterización inequívoca de cualquier sustancia es un requisito necesario que ésta se encuentre pura. Los conceptos de pureza y homogeneidad son simples de explicar en moléculas pequeñas o en biopolímeros cuya síntesis está dirigida genéticamente, como es el caso de las proteínas. Se dice que un compuesto es puro u homogéneo si el valor de cada una de sus propiedades se mantiene constante para cualquier porción de la muestra.

En el caso de los polisacáridos (y polímeros sintéticos) el concepto es diferente ya que

su estructura está diseñada por un conjunto de enzimas cuya especificidad no es absoluta, de manera que los productos generados varían dentro de un rango en términos de estructura, composición y peso molecular⁴⁹. Por lo tanto el concepto de pureza pierde el significado intuitivo y se debe hablar de variabilidad dentro de un rango en el valor de las propiedades. El concepto se ve también afectado dependiendo de que propiedad se mida, con lo cual puede no coincidir con el de homogeneidad. Un ejemplo altamente demostrativo postulado por Cerezo⁴⁹ es que una muestra puede ser “pura” en términos de monosacáridos constituyentes, pero poseer dos o más polisacáridos, de manera que la muestra sería heterogénea.

La manera de definir la homogeneidad de una muestra es mediante la imposibilidad de su fraccionamiento, que en términos prácticos implica que una muestra que no puede ser fraccionada por ningún método puede inferirse como homogénea y que la generación de cómo mínimo dos fracciones definen un grado de heterodispersión.

Gibbons⁵⁰ definió todas las posibilidades en términos de variables que puede presentar un sistema en función de la dispersión:

- a) Una muestra es **monodispersa** si la variación de todos los parámetros es cero.
- b) Una muestra es **paucidispersa** si esta compuesta por una mezcla de componentes monodispersos.
- c) Una muestra es **polidispersa** si presenta una distribución del tipo gaussiana para todos sus parámetros medibles. Las moléculas que pertenecen al sistema representan estadísticamente a una misma población.
- d) Una muestra es **heterodispersa** si presenta una distribución bimodal o multimodal para algunos de sus parámetros.

El objetivo primordial del proceso de aislamiento es conseguir un determinado producto monodisperso (“puro”) y máximo rendimiento, sin signos de degradaciones o modificaciones estructurales. Los casos en que se consiguen desde el proceso de extracción productos puros son pocos, y están limitados a ciertas moléculas, como en el caso del ácido algínico.

En general las extracciones de polisacáridos generan extractos heterodispersos, que son luego sometidos a procesos de fraccionamiento y purificación para generar fracciones generalmente (idealmente) polidispersas. Estas características están dadas por la variación de algunas propiedades dentro de un determinado rango, pero a la vez éstas son muy diferentes a las medidas en otras fracciones. Para galactanos sulfatados las variables habituales son el peso molecular, la composición de monosacáridos, la estructura y la carga del polímero.

Las metodologías de fraccionamiento se basan en diferencias en:

- Tamaño molecular y/o peso molecular.
Cromatografía de permeación por geles.
Precipitación selectiva con solventes o soluciones iónicas.
Ultracentrifugación.
- Composición y carga.
Cromatografía de intercambio iónico.
Electroforesis.
Precipitación selectiva con solventes o soluciones iónicas.

Estos métodos son utilizados tanto para fraccionar como para determinar la dispersión de una muestra.

1.5.2 Análisis de la composición y del tipo de unión

Los métodos químicos son los primeros que se emplean en el estudio de los agaranos y carragenanos. En estas etapas del estudio se suelen utilizar métodos colorimétricos para determinar en el galactano las proporciones de azúcares, proteínas, sulfato, ácidos urónicos y peso molecular^{7,26,48}. Varias de estas técnicas fueron utilizadas en este trabajo de Tesis y se encuentran descritas en Materiales y métodos (Capítulo 7).

En una segunda etapa se realiza el análisis de los azúcares componentes de los polisacáridos. Esto es realizado por métodos cromatográficos, mayoritariamente utilizando cromatografía gas líquido (CGL) y en menor medida cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)⁴⁸. Para el análisis por CGL, los azúcares que surgen de la hidrólisis total del polisacárido son derivatizados para aumentar la volatilidad de los mismos. Los derivados más utilizados en la actualidad son los alditoles peracetilados y en menor medida los alditoles trimetilsililados y los aldononitrilos peracetilados.

El análisis de los azúcares componentes es completado con la determinación de la configuración absoluta de los mismos. Las técnicas químicas se basan en la generación de diasterómeros a partir de hacer reaccionar los azúcares con diferentes compuestos quirales. El análisis de los mismos es realizado por técnicas cromatográficas^{51,52} (ver Capítulo 3).

La determinación de las posiciones de enlace de los monosacáridos que componen los polisacáridos son realizados fundamentalmente mediante técnicas químicas. La más común es aquella que comprende la permetilación del polímero y posterior hidrólisis total del mismo. Los azúcares parcialmente metilados son analizados por técnicas cromatográficas⁴⁸. Dependiendo de las características de los polisacáridos, en ocasiones es necesario completar el estudio con técnicas de etilación (para polímeros con azúcares metilados naturalmente) y de desulfatación-metilación (para polímeros con azúcares sulfatados)²⁶. La presentación de estas técnicas se realizará a lo largo de la Tesis.

Los resultados obtenidos por métodos químicos usualmente son complementados utilizando espectrometría de masa y espectroscopías de infrarrojo (IR) y de resonancia magnética nuclear (RMN). Las mediciones de RMN son las más utilizadas, y son realizadas sobre dos núcleos, ^1H y ^{13}C en experimentos mono y bidimensionales (ver capítulos 3 y 5)⁴⁸.

La espectroscopía de IR es utilizada primariamente para determinar la posición de los grupos sulfato en polímeros de estructura altamente repetitiva⁴⁸. Los análisis de espectroscopía de masa son realizados con diferentes técnicas como por ejemplo por ionización con electrospray (ESI) o desorción con láser (MALDI). En términos generales éstas son aplicables a oligosacáridos con poca dispersión.

Bibliografía

1. Graham, L. E.; Wilcox L. W. *Algae*, Prentice Hall, New Jersey, **2000**, 640 pp.
2. Craigie, J. S. *Biology of red algae* (Eds. Cole, K. M y Sheath, R. G.), Cambridge University Press, New York, **1990**, 221-258.
3. Flores, M. L.; Stortz, C. A.; Cerezo, A. S., *Int. J. Biol. Macromol.*, **2000**, 27, 21-27.
4. Garbary, D.J.; Gabrielson, P. W. *Biology of red algae* (Eds. Cole, K. M y Sheath, R. G.), Cambridge University Press, New York, **1990**, 477-498.
5. Stortz, C. A.; Cerezo, A. S. *Curr. Top. Phytochem.*, **2000**, 4, 121-134.
6. Rees, D. A. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, **1969**, 24, 195-290.
7. Usov, A. I. *Food Hydrocol.* **1992**, 6, 9-23.
8. Miller, J. I. *Recent Res. Devel. Phytochem.*, **1997**, 1, 531-564.
9. McHugh, D., J. *A guide to the seaweed industry*. FAO, Roma, **2003**, 105 pp.
10. van de Velde, F.; Knutsen, S. H.; Usov, A.; Rollema, S. H.; Cerezo A. S. *Trends Food Sci. Technol.*, **2002**, 13, 73-92.
11. Falshaw, R.; Bixler, H. J.; Johndro, K. *Food Hydrocol.* **2001**, 15, 441-452.
12. Dolan, T. C. S; Rees, D. A. *J. Chem. Soc.* **1965**, 3534-3539.
13. Chiovitti, A.; Bacic, A.; Craik, D. J.; Munro, S. L.; Kraft, G. T.; Liao, M. L., *Carbohydr. Res.* **1997**, 299, 229-243.
14. Mollion, J.; Morvan, H.; Bellanger, F.; Moreau, S.; *Phytochem.*, **1988**, 27, 2023-2026.
15. Takano, R.; Hayashi, K.; Hara, S. *Recent Res. Devel. Phytochem.*, **1997**, 1, 195-201.
16. Araki, C. *Proc. Int. Seaweed Symp.*, **1966**, 5, 3-17.
17. Araki, C.; Arai, K.; Hirase, S. *Bull. Chem. Soc. Japan*, **1967**, 40, 959-962
18. Duckworth, M.; Yaphe, W. *Carbohydr. Res.*, **1971**, 16, 189-197.
19. Turvey, J. R.; Simpson, P.R. *Proc. Int. Seaweed Symp.*, **1965**, 5, 323-327.
20. Cases, M.R.; Stortz, C.A.; Cerezo, A.S., *Phytochemistry*, **1992**, 31, 3897-3900.
21. Cases, M.R.; Stortz, C.A.; Cerezo, A.S., *Int.J. Biol. Macromol.*, **1994**, 16, 93-97
22. Takano, R.; Hayashi, J.; Hayashi, K.; Hara, S.; Hirase, S. *Bot. Mar.*, **1996**, 39, 95-102.
23. Usov, A. I.; Bilan, M. I.; Klotchkova, N. G. *Bot. Mar.*, **1995**, 38, 43-51.
24. Usov, A. I.; Bilan, M. I.; Shashkov, A. S. *Carbohydr. Res.* **1997**, 303, 93-102.
25. Nosedá, M. D.; Viana, A. G.; Duarte M. E. R.; Cerezo, A. S., *Carbohydr. Polym.* **2000**, 42, 301-305.
26. Stortz, C. A.; Cases, M. R.; Cerezo, A. S. *Techniques in Glycobiology* (Eds. Townsend, R. R.; Hotchkiss Jr, A. T.), Marcel Dekker, New York, **1997**, 567-593.

27. Furneaux, R. H.; Stevenson, T. T. *Hydrobiologia* **1990**, 204/205, 615-620
28. Craigie, J. S.; Wen, Z. E., *Can. J. Bot.* **1984**, 62, 1665-1670.
29. Craigie, J. S.; Jurgens, A., *Carbohydr. Polym.* **1989**, 11, 265-278.
30. Bird, K. T. *J. Appl. Phycol.* **1990**, 2, 383-384.
31. Kolender, A. A.; Matulewicz, M. C. *Carbohydr. Res.* **2002**, 337, 57-68.
32. Usov, A. I.; Elashvili, M. Y. *Bot. Mar.* **1991**, 34, 553-560.
33. Stortz, C. A.; Cases, M. R.; Cerezo, A. S., *Carbohydr. Polym.*, **1997**, 34, 61-65.
34. Craigie, J. S.; Rivero-Carro, H., *Proc. Int. Seaweed Symp.*, **1992**, 71.
35. Ciancia, M.; Matulewicz, M. C.; Cerezo, A. S., *Phytochemistry*, **1993**, 34, 1541-1543.
36. Takano, R.; Nose, Y.; Hayashi, K.; Hara, S.; Hirase, S. *Phytochemistry*, **1994**, 37, 1615-1619.
37. Estevez, J. M.; Ciancia, M.; Cerezo, A. S., *Carbohydr. Res.*, **2004**, 339, 2575-2592.
38. Spieler, R., *Lancet*, **2002**, 359, 1675.
39. www.popcouncil.org
40. Damonte, E. B.; Matulewicz, M. C.; Cerezo, A. C. *Curr. Med. Chem.*, **2004**, 11, 2399-2419.
41. Rees, D. A.; Morris, E. R.; Thom, D.; Madden, J. K. *The Polysaccharides*, Vol. 1, (Ed. Aspinall, G. O.), Academic Press, Orlando, **1982**, 195-290.
42. Stortz, C. A. *Handbook of Carbohydrate Engineering*. (Ed. Yarema, J.), Francis and Taylor; Boca Raton, **2005**, 211-246. Y referencias allí citadas
43. Lahaye, M. *J. Appl Phycol.* **2001**, 13, 173-184. Y referencias allí citadas.
44. Lahaye, M. *Cab. Biol. Mar.*, **2001**, 42, 137-157. Y referencias allí citadas.
45. Falshaw, R.; Furneaux, R. H.; Stevenson, D. E. *Carbohydr. Res.*, **1998**, 308, 107-115.
46. Rochas, C.; Rinaudo, M. *Biopolymers*, **1984**, 23, 735-745.
47. Cuppo, F.; Reynaers, H.; Paoletti, S. *Macromolecules*, **2002**, 35, 539-547.
48. Usov, A. I. *Food Hydrocol.* **1998**, 12, 301-308. Y referencias allí citadas.
49. Cerezo, A. S. *Manual de Métodos Ficológicos* (Ed. Alveal, K.; Ferrario, M. E.; Oliveira, E. C.; Sar E.), Universidad de Concepción, Concepción, **1995**, 677-689.
50. Gibbons R. A. *Glycoproteins*. Part A (Ed. Gottschalk, A.), Elsevier, Amsterdam, **1972**, 31-140.
51. Cases, M. R.; Cerezo, A. S.; Stortz, C. A. *Carbohydr. Res.*, **1995**, 269, 333-341.
52. Errea, M. I.; Kolender, A. A.; Matulewicz, M. C. *Bot. Mar.*, **2001**, 44, 133-138.

CAPÍTULO 2

ESTUDIO DE MÉTODOS EXTRACTIVOS PARA POLISACÁRIDOS DE ALGAS DEL ORDEN CORALLINALES

2.1 Introducción

Las algas pertenecientes al orden Corallinales se encuentran habitualmente en las zonas rocosas de las costas marinas, como epífitas de otras algas, y en las formaciones de arrecifes de corales. En este último caso estas algas cumplen un rol primario en la construcción y consolidación de los mismos¹.

Estas algas tienen como carácter distintivo un alto grado de calcificación, ya que aproximadamente el 90% del peso del alga es carbonato de calcio (y en menor medida de magnesio). El CaCO_3 se encuentra depositado en las paredes celulares del alga en forma de calcita². Dado el alto contenido de CaCO_3 que poseen, estas algas son utilizadas en Europa para neutralizar suelos.

El orden está conformado por cerca de 500 especies extintas y 100 vivas. Aquellas que han desaparecido se han agrupado dentro de la familia Solenoporaceae, mientras que las especies más nuevas se encuentran dentro de la familia Corallinaceae³. Se han identificado restos fósiles de algas pertenecientes a la Familia Solenoporaceae que permitieron determinar que aparecieron hace aproximadamente 590 millones de años (período Cámbrico) y desaparecieron hace cerca de 10 millones de años (Mioceno)¹. Algunas especies de la familia Corallinaceae como *Jania*, también han sido encontradas como fósiles. En estos casos la antigüedad es del orden de los 100 millones de años. Las Corallinales fosilizan fácilmente dado el alto contenido de calcita que poseen¹.

Las algas pertenecientes a la familia Corallinaceae se han dividido en dos grupos: las articuladas (o geniculadas) y las incrustantes (o no geniculadas). Las algas articuladas, como las estudiadas en este trabajo, están formadas por segmentos calcificados denominados intergenículas y segmentos no calcificados denominados genículas³.

El alto contenido de CaCO_3 es considerado una adaptación de resistencia de las algas hacia los herbívoros. La formación de la sal de calcio se da en el alga por la fijación del CO_2 durante el proceso fotosintético y se especula que los polisacáridos pueden ser la matriz para la fijación^{2,4}. Esto se debe a las características iónicas de los polisacáridos, que les permiten unir calcio y en consecuencia ser un sitio de nucleación (Figura 2.1)⁴. Cabe destacar sin embargo, que la cantidad de polisacárido en la genícula es mayor que en la zona calcificada (intergenícula)².

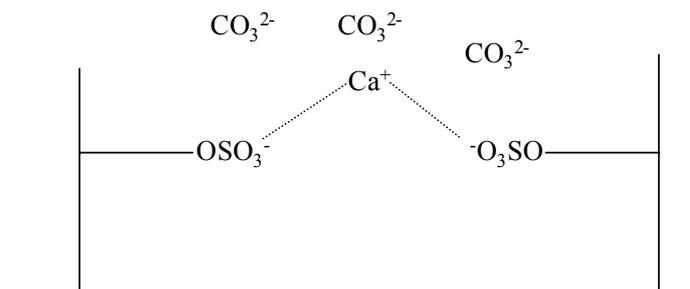


Figura 2.1 Representación esquemática de la interacción de los grupos sulfato de los polisacáridos con el calcio.

En este capítulo se presentan los resultados obtenidos del estudio de los métodos extractivos empleados para aislar polisacáridos de algas de la familia Corallinaceae. La caracterización y localización de los mismos podrían permitir en el futuro ampliar los conocimientos sobre los procesos de calcificación².

2.1.1 Estructura de los polisacáridos aislados de algas del orden Corallinales

Las algas rojas en general producen grandes cantidades de galactanos sulfatados, muchos de ellos utilizados por las industrias alimentaria y farmacéutica (ver Capítulo 1).

Si bien se han realizado un gran número de estudios sobre los polisacáridos provenientes de diferentes algas rojas⁵, los productos obtenidos de aquellas pertenecientes al orden Corallinales han recibido menor atención. El hecho que se hayan realizado pocos estudios sobre estos polisacáridos se ha debido probablemente a los bajos rendimientos que se consiguen en las extracciones (a diferencia de otros galactanos), como consecuencia del alto contenido de carbonato de calcio y magnesio².

En el año 1965, Turvey y Simpson⁶ presentaron los primeros estudios realizados sobre los polisacáridos extraídos del alga *Corallina officinalis*. Los productos aislados fueron identificados como un glucano de reserva (almidón de florídeas) y un xilogalactano sulfatado. Este último poseía características estructurales diferentes a los galactanos encontrados en la mayoría de las algas rojas.

El estudio mostró un polisacárido formado principalmente por galactosa (61%), xilosa (23%) y sulfato (9%). Los autores sugirieron en base a estos datos, una estructura del tipo agarano con sustitución en la posición 4 de algunas galactosas con grupos sulfato y la

posibilidad de que la xilosa estuviera unida a dicha cadena central por 2 o 4.

Muchos años después, en los años 90, Cases *et al.* (en el laboratorio en que se realizó este trabajo) realizaron un estudio mucho más detallado sobre los polisacáridos aislados del alga *Corallina officinalis*⁷⁻⁹. Los autores confirmaron la existencia del almidón de florídeas y de los xilogalactanos. Se probó que éstos últimos poseían estructuras del tipo agarano, es decir una cadena central de unidades de $\rightarrow 3$)- β -D-Gal-(1 \rightarrow y $\rightarrow 4$)- α -L-Gal-(1 \rightarrow enlazadas de manera perfectamente alternante. Encontraron además que la estructura central del galactano estaba fuertemente sustituida con unidades terminales de xilosa y con grupos metoxilo y sulfato. Estos últimos fueron ubicados principalmente en las posiciones C-2 y C-3 de las unidades de α -L-galactosa, mientras que las excepcionalmente altas proporciones de xilosa fueron encontradas mayoritariamente unidas al C-6 de la β -D-galactosa⁷⁻⁹.

Posteriormente otros autores aislaron y estudiaron productos de características similares de otras especies del orden Corallinaceae. Las algas estudiadas fueron: *Corallina pilulifera*^{10,11}, *Joculator maximus*¹² y *Bossiella cretacea*^{13,14}. Todas las estructuras informadas coincidían en poseer una cadena central del tipo agarano, con ausencia de unidades de 3,6-anhidrogalactosa y alta sustitución de la posición C-6 de la β -D-galactosa con β -D-xilosa y con grupos sulfato. La α -L-galactosa se encontraba parcialmente metoxilada en la posición 2 y sulfatada en C-2 o C-3 (ver pág. 32 y subsiguientes). Sin embargo, todos estos estudios fueron menos detallados que los realizados en el estudio de Cases *et al.*⁷⁻⁹, ya que no se efectuó una separación de distintas fracciones y se emplearon métodos más acotados.

Todos los grupos de investigación aislaron, junto con los xilogalactanos, almidón de florídeas. Además sorpresivamente Usov *et al.* aislaron ácido algínico^{10,13}. Si bien este polisacárido es un producto habitual de las algas pardas¹⁵, no suele aparecer en las algas rojas.

A continuación se detallan los resultados obtenidos por los diferentes autores en el estudio de los polisacáridos aislados de las algas Corallinales.

2.1.1.1 Xilogalactanos aislados de *Corallina officinalis*

Turvey y Simpson en primer término, y Cases *et al.* muchos años después, pudieron extraer xilogalactanos del alga *Corallina officinalis*^{6,7-9}. El procedimiento de extracción de los polisacáridos utilizado por ambos grupos fue el mismo: trataron el alga con ácido clorhídrico diluido (controlando el pH) con el objetivo de destruir la capa de carbonato, y posteriormente

realizaron la extracción con agua a temperatura ambiente (ver luego).

Los estudios demostraron la existencia de una estructura del tipo agarano, sustituida con xilosa, grupos metoxilo y grupos sulfato. Estos polisacáridos tenían la particularidad de poseer altas proporciones de galactosas monometiladas naturalmente, lo que los hacía diferentes a otros galactanos sulfatados de algas rojas.

Al igual que Turvey y Simpson, Cases *et al.* fraccionaron los productos crudos por cromatografía de intercambio iónico (DEAE-Sephadex A-50) utilizando como eluyente soluciones acuosas de concentraciones crecientes de NaCl. Como resultado obtuvieron once fracciones diferenciadas de “coralinanos”⁷⁻⁹.

Las fracciones mayoritarias fueron aquellas eluidas con soluciones de NaCl entre 0,3 y 0,5M. Estas fueron las que presentaron mayor peso molecular (de 10 a 30 KDa aproximadamente) y además poseían las mayores cantidades sulfato (de 13 a 17% aproximadamente)^{7,9}.

El análisis de los azúcares componentes de las fracciones permitió determinar la presencia de xilosa, galactosa, 2-*O*-metil-L-galactosa, 3-*O*-metil-L-galactosa, 4-*O*-metil-D-galactosa, 6-*O*-metil-D-galactosa y otros azúcares en proporciones menores como glucosa y manosa. Se determinó que la cantidad de xilosa presente en los polisacáridos disminuía con la concentración de sal utilizada para eluirlos de la columna y que en contrapartida, aumentaba la proporción de 6-*O*-metilgalactosa^{7,9}.

Del estudio estructural realizado por metilación, etilación y desulfatación-metilación de las fracciones^{8,9}, los autores clasificaron a los productos provenientes del fraccionamiento en seis grupos diferentes según la estructura determinada⁹. En la Tabla 2.1 se presentan los resultados obtenidos.

Como puede observarse, la fracción principal (60% del producto crudo aislado) tiene la mayor parte de sus unidades de β -D-galactosa sustituidas en la posición C-6 con xilosa o con grupos sulfato. Las unidades sustituidas en la misma posición con grupos metoxilo y con cadenas laterales de 4-*O*-metil-D-galactosa son menos del 10 % en este grupo.

Las unidades de α -L-galactosa están mayoritariamente monosustituidas en C-2 y C-3 con grupos metoxilo o sulfato: las unidades 4LG2S, LG3S y 4LG2M están presentes cada una en más del 20%. Para el grupo principal no se encontraron proporciones apreciables de unidades de α -L-galactosa sustituidas con otros azúcares.

Tabla 2.1 Composición de los xilogalactanos aislados de *Corallina officinalis*⁹ (por cada 100 unidades disacáridicas).

Sustituyente por unidad	Grupo					
	Principal	I-A	I-B	II-4I	II-2I	II-1I
β-D-galactosa						
3DG6X	62	45	12	35	25	22
3DG6(DG4M)	4	5	6	16	16	6
3DG6S	24	35	52	28	23	22
3DG6M	1	6	21	3	4	9
3DG	9	9	9	18	32	40
α-L-galactosa						
4LG2S	20	15	7	14	15	12
4LG3S	23	25	15	10	13	8
4LG2M	28	33	63	30	36	31
4LG3M	10	6	3	8	5	8
4LG3X	-	-	-	12	14	8
4LG3(DG4M)	-	-	-	5	10	2
4LG	19	21	12	21	7	31

El grupo **I-A** es una variante del grupo principal, intermedio entre este y el grupo **I-B**. Estos polisacáridos poseen menores proporciones de xilosa unidos al C-6 de la β -D-galactosa en comparación con los polisacáridos que conforman el grupo principal. Además, aumenta al 35% la cantidad de grupos sulfato (3DG6S) y en menor medida la de grupos metilo (3DG6M) unidos a la mencionada posición.

La proporción de distintas unidades de configuración α también es diferente a la encontrada en el grupo principal, ya que se determinó un notable aumento de la sustitución en C-2 con metoxilos y una disminución de la de sulfato. En el C-3 de estas unidades no se registran cambios de importancia.

En los polisacáridos pertenecientes al grupo **I-B** se acentúa el aumento de las proporciones de 3DG6S y 4LG2M. En ambos casos representan más del 50 % de las unidades de su tipo. Asimismo, se observa una disminución de la proporción de otras unidades,

especialmente la de β -D-galactosa sustituida con xilosa (3DG6X). Estas fracciones son las que poseen menor proporción de 3DG6X, representando los coralinanos menos ramificados.

Los grupos de la variante **II** poseen como característica distintiva el bajo peso molecular, la gran cantidad de 4-*O*-Me-D-Gal terminal unida al C-6 de la β -D-Gal y la alta proporción de unidades del tipo 4LG. Los autores no pudieron confirmar que en estas fracciones menores la xilosa o la 4-*O*-metilgalactosa estuviesen exclusivamente unidas a la posición 6 de la unidad β -Gal, por lo tanto dejaron abierta la posibilidad que también estén como sustituyentes del C-3 de la unidad α .

En conclusión, Cases *et al.* informaron por primera vez en forma detallada la estructura de varios xilogalactanos aislados del alga *Coralina officinalis*. Estos en forma simplificada se pueden describir como agaranos altamente sustituidos con xilosa, 4-*O*-metilgalactosa y grupos metoxilo y sulfato. Estas características los hicieron notablemente diferentes a los agaranos encontrados en otras algas rojas.

2.1.1.2 Xilogalactanos aislados de *Corallina pilulifera*

Usov *et al.* publicaron una serie de estudios sobre los polisacáridos de diferentes coralininas. Entre ellos se encuentran los realizados sobre los productos obtenidos del alga *Corallina pilulifera*^{10,11}. Estos fueron aislados por tratamiento del alga con ácido clorhídrico concentrado y luego el mismo ácido diluido, a temperatura ambiente. El proceso fue realizado, según expresaron los autores, para destruir completamente la cubierta de carbonato de calcio y hacer más efectiva la extracción. Posteriormente los productos obtenidos fueron purificados y fraccionados por precipitación con bromuro de hexadeciltrimetilamonio (cetavlon) y posterior redisolución con NaCl. Finalmente se sometieron a cromatografía iónica (DEAE-Sephacel) por la cual obtuvieron una fracción mayoritaria eluida con NaCl 0,4M (**Ia**)¹¹. El análisis detallado por metilación y RMN de este polisacárido, del mismo desulfatado, y del tratado por degradación de Smith reveló la presencia de un xilogalactano sulfatado, con sus unidades de α -L-galactosa sustituidas en las posiciones C-2 y C-3 con grupos metoxilo y sulfato, y con las unidades de β -D-galactosa sustituidas en C-6 con xilosa y en menor proporción con grupos metoxilo y sulfato. En la Tabla 2.2 se observan las proporciones de las distintas unidades surgidas del análisis por RMN y por métodos químicos.

Tabla 2.2 Composición de los xilogalactanos aislados de *Corallina pilulifera*¹¹ (por cada 100 unidades disacarídicas).

Sustituyente por unidad	Fracción Ia
β-D-galactosa	
3DG6X	58
3DG6S	29
3DG6M	8
3DG	4
α-L-galactosa	
4LG2S	25
4LG2M	19
4LG3S	9
4LG3M	6
4LG	41

Los sustituyentes más importantes encontrados en las unidades de α -L-galactosa fueron el grupo sulfato y el metoxilo en la posición 2. Estos grupos también se encontraron unidos en C-3, pero en proporciones menores. En el C-6 de la β -D-galactosa se encontraron unidades de xilosa y grupos sulfato, y en menor proporción grupo metoxilo.

El xilogalactano encontrado fue similar al aislado de *C. officinalis*, aunque con un patrón de sustitución más simple.

2.1.1.3 Xilogalactanos aislados de *Bossiella cretacea*

Con un procedimiento de extracción, purificación y fraccionamiento similar al utilizado con el alga *Corallina pilulifera*, Usov *et al.* también aislaron los xilogalactanos del alga *Bossiella cretacea*^{13,14}. Los azúcares componentes del polisacárido presentaron una relación molar aproximada Gal:Xil:sulfato de 2:1:1, con pequeñas cantidades de galactosas monometiladas en C-2, C-3 y C-6 y una relación D-Gal/L-Gal cercana a 1. La estructura deducida fue similar a la descrita anteriormente, pero con la característica distintiva de

poseer proporciones relativamente altas de unidades de β -D-Gal sulfatadas en C-4, las cuales no habían sido encontradas en productos aislados de otras algas del orden Corallinales. En cambio, prácticamente no se registraron unidades sulfatadas en la posición 3. Los datos de RMN informados confirmaron los resultados obtenidos en la metilación.

Luego de analizar los datos publicados de metilación, y de desulfatación-metilación, se pudo construir la Tabla 2.3, donde se puede observar claramente el modelo de sustitución.

Tabla 2.3 Composición de los xilogalactanos aislados de *Bossiella cretacea*^{13,14} (por cada 100 unidades disacarídicas).

Sustituyente por unidad	Fracción 1a
β-D-galactosa	
3DG6X	59
3DG6S	19
3DG6M	3
3DG4S	14
3DG	4
α-L-galactosa^a	
4LG2S	26
4LG2M	19
4LG3M	15
4LG	40

^a Los autores mencionan la posibilidad de un pequeño % de 4LG3S.

2.1.1.4 Xilogalactanos aislados de *Joculator maximus*

Takano *et al.* estudiaron el sistema de xilogalactanos perteneciente al alga *Joculator maximus*¹². Los autores realizaron la extracción de los productos con agua a 100 °C (sin utilizar ácido clorhídrico), con el objetivo de “evitar la posible degradación de los biopolímeros”. El producto aislado fue purificado y fraccionado mediante la precipitación del polisacárido con cloruro de cetilpiridinio y posterior solubilización en soluciones de cloruro de sodio. Por diferencia de solubilidad obtuvieron cuatro fracciones (**PS1-PS4**), más una cantidad no informada de almidón de florideas¹².

El estudio estructural fue realizado sólo sobre la fracción **PS1**. Por análisis de metilación, desulfatación y oxidación con periodato (degradación de Smith) se determinó la existencia de un xilogalactano sulfatado sustituido con grupos metoxilo. En la Tabla 2.4 se observan los datos estructurales junto con los correspondientes a los coralinanos antes mencionados.

Tabla 2.4 Composición de los xilogalactanos aislados de *Joculator maximus*¹² (por cada 100 unidades disacarídicas).

Sustituyente por unidad	<i>J. maximus</i>	<i>C. officinalis</i>	<i>C. pilulifera</i>	<i>B. cretacea</i>
	PS1	Principal	Ia	Ia
β-D-galactosa				
3DG6X	50	62	58	59
3DG6(DG4M)	-	4	-	-
3DG6S	30	24	29	19
3DG6M	-	1	8	3
3DG4S	-	-	-	14
3DG	20	9	4	4
α-L-galactosa				
4LG2S	20	20	25	26
4LG3S	15	23	9	-
4LG2M	30	28	19	19
4LG3M	-	10	6	15
4LG	35	19	41	40

Se observa claramente que la estructura central del xilogalactano está menos sustituida que la de los otros coralinanos. Los autores sólo encontraron la galactosa metilada naturalmente en O-2, lo que marca una notable diferencia con los resultados determinados para los productos de *C. officinalis*, donde existían 4 diferentes galactosas monometiladas.

La unidad de β -galactosa se encontró sustituida en C-6 mayoritariamente con xilosa (50 %) y en menor medida con grupos sulfato (30 %). No se encontró sustitución con grupos metoxilo o unidades de galactosa.

La principal sustitución hallada en las unidades α fue en la posición C-2 con sulfato y metoxilo, mientras que en la posición C-3 sólo fue determinada la presencia de éster sulfato. Todas estas características son demostrativas de la sencillez de la estructura.

La alternancia de unidades de D y L galactosa en la cadena central fue parcialmente demostrada a partir de la realización de una hidrólisis parcial del xilogalactano y posterior separación de disacáridos y trisacáridos no sustituidos con xilosa, sulfato o grupos metoxilo. Esta experiencia confirmó la existencia de una estructura de tipo agarano.

En conclusión, la estructura era similar a la informada previamente para los demás coralinanos, aunque con un grado de sustitución mucho menor.

2.1.1.5 Ácido algínico en algas del orden Corallinales

Además de los xilogalactanos y el almidón de florídeas se encontró en las corallinales ácido algínico. A principios de los años 80 el grupo de Okazaki estudió sustancias capaces de unirse al calcio en las algas marinas. Sorpresivamente aislaron del alga coralina *Serraticardia maxima* (ahora llamada *Joculator maximus*) ácido algínico, es decir un homopolímero 1→4 de ácido β -D-manurónico (M) y ácido α -L-gulurónico (G)¹⁶, sin profundizar demasiado en el tema. El ácido algínico es característico casi exclusivamente de las algas pardas (Phaeophyta) y sólo fue encontrado además en algunas bacterias como *Pseudomonas* y *Azotobacter*². De manera que encontrar este biopolímero en algas rojas fue sorprendente.

Los autores relacionaron rápidamente la existencia de ácido algínico en Corallinales con la capacidad del alga de acumular calcio. Sin embargo, hay que denotar que las algas pardas, que poseen hasta un 30% de su biomasa constituida por este biopolímero, raramente son calcificadas.

La relación M/G (β -D-ácido manurónico/ α -L-ácido gulurónico) es uno de los valores que caracteriza a un alginato. Para productos aislados de algas pardas¹⁵ la relación se ubica en un rango de valores que va de 0,4 a 2,4, aunque en la mayoría de los casos es mayor a 1. Las unidades monoméricas están unidas de diferentes formas generando bloques M, bloques G, y bloques MG. Se cree que se biosintetiza primero una cadena de ácido manurónico y luego una enzima (epimerasa) modifica algunas unidades a ácido L-gulurónico¹⁵, al cambiar la configuración de C-5.

En la década del 90, Usov *et al.*¹⁰ confirmaron la existencia de ácido algínico en 15 especies de algas pertenecientes al orden Corallinales. A diferencia de las algas pardas la cantidad de ácido algínico aislada era muy baja (se ubicaba entre 0,09 y 1,42% de la biomasa). Los autores determinaron que el alginato poseía una relación M/G de 0,7, correspondiendo un 50% al bloque MG. El primer estudio realizado, sobre *Serraticardia maxima*, había determinado la existencia de un alginato con una relación M/G de 0,8 a 1¹⁶.

Con excepción de un trabajo original de Okazaki *et al.*¹⁶ y los posteriores de Usov *et al.*¹⁰, no se han registrado estudios sobre los ácidos algínicos de las Corallinales.

2.1.2 Métodos de extracción de xilogalactanos de algas del orden Corallinales

Los pocos estudios realizados (ya presentados en este trabajo) tuvieron la particularidad de utilizar diferentes métodos extractivos.

Turvey y Simpson⁶, y Cases *et al.*⁷⁻⁹ aislaron los xilogalactanos removiendo la capa de carbonato de calcio agregando cuidadosamente ácido clorhídrico diluido y manteniendo el pH cercano a 6,5. Luego con el mismo solvente realizaban la extracción de los polisacáridos.

Usov *et al.*^{10,11,13,14} también emplearon ácido clorhídrico, pero en este caso lo utilizaron concentrado, para destruir más efectivamente la cubierta de calcita. Luego la extracción de los biopolímeros la efectuaron con ácido 0,1 M.

Takano *et al.*¹² decidieron no utilizar ácidos y realizaron la extracción con agua a 100 °C para evitar posibles procesos de degradación en los polisacáridos.

Debido a la diferencia entre los tres procesos de extracción de polisacáridos, se decidió estudiarlos de manera comparativa con el objetivo de determinar las diferencias en los rendimientos y calidad de productos obtenidos. Estos estudios permitirían además evaluar una posible selectividad de los procesos de extracción, que podría ser útil en los estudios ulteriores de este trabajo de Tesis.

2.2 Resultados.

2.2.1 Métodos extractivos para xilolactanos de Corallinales. Primera extracción

Para el estudio sistemático de los métodos extractivos se eligieron tres algas que habitan en las costas del Mar Argentino: *Corallina officinalis* y *Jania rubens* (L.) Lamouroux recolectadas en las costas de la ciudad de Miramar (Pcia. de Buenos Aires) y *Bossiella orbigniana* (Decaisne) recolectada en costas cercanas a la ciudad de Comodoro Rivadavia (Pcia. de Chubut). Mientras que los polisacáridos de *C. officinalis* fueron estudiados anteriormente⁷⁻⁹, los pertenecientes a *B. orbigniana* y *J. rubens* no habían sido examinados hasta el momento.

Para las cada una de las tres especies de corallinas se utilizaron los procedimientos de extracción informados por Cases *et al.*^{7,9}, Usov *et al.*^{10,11} y Takano *et al.*¹².

Luego de limpiar, secar y moler los ejemplares de cada especie se extrajeron de manera separada según:

Método C^{7,9}: El alga se trató con HCl 0,1 N manteniendo el pH en un valor superior a 6. Luego la solución se mantuvo con agitación mecánica durante 24 h a temperatura ambiente al mencionado pH.

Método U^{10,11}: El alga se trató con HCl (c) y se dejó con agitación 2 h a temperatura ambiente. Luego el residuo se separó por centrifugación y se re-extrajo 3 veces más con HCl 0,1 N.

Método T¹²: El alga se extrajo dos veces por períodos de 10 h con agua a 100 °C.

De esta manera se obtuvieron 9 extractos (a partir de 3 algas extraídas por 3 métodos distintos) que fueron posteriormente dializados y liofilizados. La purificación fue completada por redisolución, diálisis y liofilización (ver Materiales y métodos). Los productos se nombraron en función de la identidad del alga y del proceso de extracción utilizado:

<i>Corallina officinalis</i> (Co)			<i>Bossiella orbigniana</i> (Bo)			<i>Jania rubens</i> (Jr)		
Co-C	Co-U	Co-T	Bo-C	Bo-U	Bo-T	Jr-C	Jr-U	Jr-T

2.2.1.1 Análisis de los productos

En la totalidad de los productos aislados a partir de las tres algas se cuantificaron hidratos de carbono, proteínas, éster sulfato y ácidos urónicos. Además se determinaron los pesos moleculares de los mismos y sus poderes rotatorios. En la Tabla 2.5 se presentan los resultados obtenidos.

Al analizar los rendimientos de los productos aislados no se observó una dependencia definida con respecto al método de extracción utilizado ya que éstos fueron similares para cada una de las algas. Los valores se ubicaron entre el 0,5 y 1 %, con excepción de **Co-T** (por debajo) y **Jr-T** (por encima). En todos los casos los rendimientos obtenidos para las tres algas se ubicaron en valores cercanos a los informados previamente para otras especies de la familia^{7,9,11,12}.

De comparar los rendimientos se desprende que los mejores se lograron al extraer el alga *Jania rubens* por cualquiera de los tres métodos (del 0,7 a 1,1%), mientras que los más bajos se obtuvieron con *C. officinalis* (de 0,28 a 0,48%).

Las cantidades de material de partida recuperadas luego de las extracciones fueron dependientes de los métodos utilizados. En los casos en que se utilizó ácido clorhídrico (-C y -U) los residuos se obtuvieron en menores cantidades. Este resultado era esperado dado que en ese proceso extractivo se destruye la cubierta de carbonato de calcio de las algas y se desprende CO₂ gaseoso.

En los casos en que se utilizó HCl diluido (método C) la destrucción de la cubierta de carbonato fue parcial y en consecuencia el residuo contenía entre el 40 y el 50% del material de partida. Cuando el ácido se agregó concentrado (método U), el efecto de destrucción fue prácticamente completo y el residuo recuperado no superó en ninguno de los casos el 18%.

Se evidencia que las extracciones con agua a 100 °C no afectaron mayormente la capa de carbonato de calcio por lo que el residuo contenía la mayor parte del material de partida (cantidades cercanas al 90%).

Tabla 2.5 Rendimientos y análisis de los productos obtenidos de las tres algas por tres métodos diferentes de extracción.

	<i>Corallina officinalis</i>			<i>Bossiella orbigniana</i>			<i>Jania rubens</i>		
	Co-C	Co-U	Co-T	Bo-C	Bo-U	Bo-T	Jr-C	Jr-U	Jr-T
Rendimiento (%)	0,48	0,40	0,28	0,48	0,67	0,52	0,71	1,00	1,10
Carbohidratos (%)	55	72	46	54	62	54	52	62	48
Proteínas (%)	12	6	18	20	13	30	15	9	29
Sulfato (% NaSO ₃)	7	6	7	7	7	7	8	7	6
Acidos urónicos (%)	4	4	4	6	3	3	4	4	3
[α] _D (°)	-55	-44	-36	-48	-63	-33	-51	-63	-33
Peso Molecular (kDa)	11,7	13,1	10,7	5,3	8,6	3,8	11,3	10,6	7,9
Residuo recuperado (%)	40	11	92	52	4	92	45	18	86

Las proporciones de hidratos de carbono determinadas (Tabla 2.5) en los productos obtenidos con la metodología **U** se ubicaron entre el 62 y el 72%, mientras que para los extractos aislados por los métodos **T** y **C** fueron cercanas al 50%.

La determinación de proteínas indicó que el agua a 100 °C (**-T**) era el solvente más efectivo para extraerlas. Los extractos más ricos en proteínas (aprox. 30%) fueron aquellos aislados de las algas *Bossiella orbigniana* y *Jania rubens*. Mientras que el método **C** generó productos con cantidades de proteínas intermedias (15%), el método **U** extrajo productos con proporciones más bajas (6-9%).

La cantidad de sulfato determinada fue en promedio del 7% y se mantuvo constante en forma prácticamente independiente del método extractivo utilizado y del alga en cuestión. Se observó un comportamiento similar al cuantificar los ácidos urónicos (valores entre 3 y 4%, salvo en **Bo-C**).

Con los resultados presentados hasta aquí se puede afirmar que si bien los rendimientos de los productos no presentan mayor dependencia con los métodos de extracción utilizados, sí lo hacen en términos de proporción de hidratos de carbono y proteínas. Las extracciones realizadas con el método **U** generaron los productos con las mayores proporciones de hidratos de carbono, las menores de proteínas y además con buenos rendimientos.

En la Tabla 2.5 también se pueden observar los valores de poder rotatorio. Todos presentan signo negativo y valores absolutos de 33 a 63°. Anteriormente fue informado que los coralinanos poseían poderes rotatorios con valores^{7,9} entre -60 y -120°, con lo cual el pequeño alejamiento de esos valores para algunos de los productos denotaba la posible dilución de los mismos o la existencia de otros productos quirales.

El peso molecular promedio, determinado por el poder reductor de la muestra, mostró dependencia con el método extractivo utilizado. Contrariamente a lo esperado, aquellos productos aislados por tratamiento con ácido concentrado tuvieron el mayor peso molecular, mientras que los obtenidos con agua a 100 °C fueron los menores. Esto sugeriría que no existió degradación de los productos al emplear medio ácido. Sin embargo, es probable también que las diferencias se deban a la existencia de otros productos (por ejemplo proteínas o almidón de florídeas) que afecten los valores promedio.

2.2.1.2 Azúcares componentes

Sobre los diferentes productos aislados se realizó el análisis de los azúcares componentes. Luego de hidrolizar los polisacáridos presentes en los diferentes productos, los monosacáridos se derivatizaron para ser analizados por cromatografía gaseosa. Para el estudio se emplearon tres métodos de derivatización diferentes con el objetivo de obtener la mayor información posible.

En primer término se generaron los alditoles peracetilados por la técnica de hidrólisis reductiva¹⁷. Esta técnica es especialmente útil ya que además de permitir analizar los azúcares más comunes, permite detectar también a la 3,6-anhidrogalactosa (lábil en medio ácido fuerte). Este método de derivatización es el único capaz de derivatizar correctamente a la 3,6-AnGal (ver Capítulo 3).

Como al utilizar los alditoles peracetilados no se puede diferenciar entre la 3- y la 4-*O*-metilgalactosa (los respectivos alditoles son cromatográficamente equivalentes), se emplearon para tal efecto los aldononitrilos peracetilados.

La configuración de los azúcares se determinó generando los 1-amino-1-desoxialditoles peracetilados¹⁸. Los derivados se formaron por aminación reductiva con (*S*)-1-amino-2-propanol para la mayoría de los azúcares y con (*S*)- α -metilbencilamina para la 2-*O*-metilgalactosa (ver Capítulo 3).

La Tabla 2.6 contiene la información del análisis de los monosacáridos constituyentes de los 9 productos aislados, utilizando los tres métodos de derivatización. Los resultados fueron expresados en moles cada 100 moles de galactosas totales, donde se define como galactosas totales a la suma de galactosa y todas las galactosas naturalmente metiladas.

En su trabajo de Tesis doctoral⁹, el Dr. Cases encontró que existían diferencias numéricas entre los resultados obtenidos a partir de los distintos derivados formados para CGL. Las diferencias se manifestaban principalmente en la subvaluación relativa de la cantidad de xilosa al utilizar los alditoles peracetilados y en contrapartida, las galactosas monometiladas parecían estar sobrevaluadas al utilizar los aldononitrilos. Los resultados obtenidos con los 1-amino-desoxialditoles peracetilados formados con 1-amino-2-propanol arrojaban valores bajos para las galactosas monometiladas y altos para la xilosa.

Tabla 2.6 Monosacáridos constituyentes de los productos obtenidos por extracción de las tres algas (moles/100 moles de galactosas).

Monosacárido	<i>Corallina officinalis</i>			<i>Bossiella orbigniana</i>			<i>Jania rubens</i>		
	Co-C	Co-U	Co-T	Bo-C	Bo-U	Bo-T	Jr-C	Jr-C	Jr-C
Alditoles									
Xil	28	24	18	39	38	22	32	28	18
2-O-Me-Gal	18	16	16	18	17	13	9	9	12
3-O-Me-Gal + 4-O-Me-Gal	7	5	6	6	6	6	7	5	5
6-O-Me-Gal	3	2	3	15	13	16	4	3	4
Gal	71	77	73	61	63	64	75	77	69
3.6-AnGal	-	-	2	1	1	1	5	5	10
Man	3	3	6	6	4	5	2	2	2
Glc	6	10	21	31	8	42	12	5	40
Aldononitritos									
Xil	39	28	24	27	18	19	44	39	28
2-O-Me-Gal	30	21	24	21	21	17	11	11	10
3-O-Me-Gal	7	5	6	9	9	11	9	8	8
4-O-Me-Gal	4	3	4	-	-	-	-	-	-
6-O-Me-Gal	2	2	3	12	11	16	5	5	5
Gal	57	69	63	58	59	56	75	76	50
Man	4	2	7	5	4	5	1	2	2
Glc	8	9	22	24	8	41	2	14	47
1-amino-1-desoxialditoles									
D-Xil	36	37	27	42	37	27	44	45	41
2-O-Me-L-Gal	11	11	12	11	10	8	6	6	6
3-O-Me-L-Gal	4	4	3	6	6	6	4	6	5
3-O-Me-D-Gal + 4-O-Me-L-Gal	-	-	-	-	-	-	2	1	2
4-O-Me-D-Gal	2	2	2	-	-	-	-	-	-
6-O-Me-D-Gal	2	2	3	12	11	16	4	4	5
D-Gal	55	58	51	37	42	37	54	58	54
L-Gal	26	23	29	34	31	34	29	25	28
D-Glc + D-Man	8	8	20	30	9	49	15	7	51

En consecuencia, se determinó que la manera más razonable de utilizar los datos era promediando los valores obtenidos por los tres métodos de derivatización. Estos promedios se realizan ponderando los promedios con la información obtenida en cada caso. De esa forma fue construida la Tabla 2.7.

Como fue informado previamente, para obtener los datos de la configuración de la 2-*O*-metilgalactosa es necesario formar el 1-amino-1-desoxialditol con α -metilbencilamina. Los datos obtenidos fueron volcados directamente en la Tabla 2.7.

Los principales monosacáridos encontrados en todos los extractos fueron galactosa (D y L), xilosa y 2-*O*-metilgalactosa. En los productos aislados con agua a ebullición además se encontraron muy altas proporciones de glucosa (hasta 46 unidades cada 100 galactosas totales). En todos los casos se detectaron también cantidades variables de diferentes galactosas monometiladas.

En los productos de *Jania rubens* se encontraron cantidades apreciables de 3,6-anhidrogalactosa (entre 5 y 11% dependiendo del método utilizado). Su presencia fue sorprendente ya que este monosacárido es común en agaranos y carragenanos, pero nunca se había encontrado en los coralinanos⁵.

Los resultados en base a los antecedentes⁷⁻¹⁴ sobre el tema sugieren la presencia de xilogalactanos en todas las fracciones y además, de almidón de florídeas en aquellas obtenidas por extracción con agua caliente.

La presencia del almidón está confirmada también por los valores de poder rotatorio medidos. Los $[\alpha]_D$ determinados para los productos **T** (Tabla 2.5) fueron de menor valor absoluto. Esto se debe a que mientras que los xilogalactanos⁹ son levógiros, el almidón es dextrógiro⁶ ($[\alpha]_{D \text{ almidón}} \approx +171^\circ$).

Aquellos extractos con mayores proporciones de glucosa, son además los que poseen menor peso molecular promedio (de 5 a 10 KDa). En consecuencia es lógico suponer que estos polisacáridos pueden tener menor peso molecular que los xilogalactanos y sean responsables del bajo valor promedio obtenido.

Tabla 2.7 Monosacáridos constituyentes de los productos obtenidos por extracción de las tres algas (moles/100 moles de galactosas totales).

Monosacárido	<i>Corallina officinalis</i>			<i>Bossiella orbigniana</i>			<i>Jania rubens</i>		
	Co-C	Co-U	Co-T	B0-C	B0-U	B0-T	Jr-C	Jr-U	Jr-T
D-Xil	34	29	23	35	30	23	38	35	29
D-Gal	48	54	46	33	36	33	49	53	45
2-O-Me-D-Gal	-	-	-	3	3	4	-	-	-
3-O-Me-D-Gal	-	-	-	-	-	-	2	Tr.	2
4-O-Me-D-Gal	3	2	3	-	-	-	-	-	-
6-O-Me-D-Gal	2	2	3	13	12	16	4	4	5
L-Gal	22	22	25	30	28	30	26	23	23
2-O-Me-L-Gal	20	16	17	13	13	8	9	9	10
3-O-Me-L-Gal	5	4	4	7	7	8	5	6	5
3,6-AnGal ^a	-	-	2	1	1	1	5	6	11
D-Man	3	2	6	5	3	5	3	2	3
D-Glc	7	8	19	26	7	42	8	8	46
Relación									
D/L ^a	53/47	58/42	52/48	49/51	51/49	53/47	55/45	57/43	51/49
Gals/Xil	2,9	3,4	4,4	2,9	3,3	4,4	2,6	2,8	3,5

^a Se asumió que la 3,6-anhidrogalactosa pertenecía a la serie L.

2.2.1.3 Análisis de la composición de los xilogalactanos

Al analizar las proporciones de los monosacáridos se pudo visualizar la existencia de xilogalactanos con diferentes características, dependiendo del alga y del método de extracción utilizados.

El análisis de la configuración absoluta de las unidades de galactosa y de galactosas monometiladas en los diferentes productos mostró que las relaciones D/L de las mismas son cercanas a 1 (Tabla 2.7), confirmando⁷⁻¹⁴ su identificación como agaranos.

Como se explicó en la parte introductoria, la xilosa es el principal sustituyente en los coralinanos⁶⁻¹⁴ y se encuentra mayoritariamente como unidad terminal unida al C-6 de β -D-galactosa. Los xilogalactanos obtenidos de las tres algas estudiadas presentaron relaciones de unidades de galactosas totales a unidades de xilosa (Gals/Xil) entre 2,6-4,4. Sistemáticamente los productos aislados con agua a 100 °C fueron los que tuvieron menor proporción de xilosa (mayor relación Gals/Xil), mientras que los productos aislados en medio ácido por el método C fueron siempre los que más cantidad de la pentosa contenían. Los productos aislados por el método U tuvieron relaciones Gals/Xil similares a los anteriores.

Los trabajos realizados sobre *Corallina officinalis* indican que al fraccionar los extractos originales por cromatografía de intercambio iónico se obtenían polisacáridos con diferentes proporciones de xilosa⁷⁻⁹, es decir que existían diferentes estructuras (detalladas en la parte introductoria). En base a estos resultados y a los aquí obtenidos se puede sugerir que los procesos extractivos con agua a 100 °C pudieron ser más selectivos en el aislamiento de los productos con bajo contenido de xilosa.

La selectividad en la extracción podría deberse a la diferente localización de cada tipo de xilogalactano en las paredes celulares y la matriz intercelular. En base a estos resultados, podría ser que aquellos polisacáridos menos sustituidos con xilosa sean los que están más expuestos al solvente de extracción, mientras que los más ricos (más ramificados) se encontrarían más accesibles recién cuando se destruye la cubierta de carbonato de calcio con ácido clorhídrico.

Los dos métodos extractivos que utilizan ácido probablemente tengan la misma capacidad de acceso a los xilogalactanos. Sin embargo, el método C extrajo productos con menor relación Gals/Xil que los aislados por el método U. Esto podría deberse a que el método que utiliza HCl concentrado provoca la hidrólisis de algunas cadenas laterales de xilosa cuyas uniones son más lábiles²⁰.

Todos los xilogalactanos aislados poseen también importantes cantidades de unidades de galactosa monometiladas. La identidad y proporción de estos azúcares fueron diferentes en cada producto. En la Tabla 2.7 puede apreciarse que las cantidades de galactosas monometiladas no parecen variar mayormente en función de los procesos extractivos, pero si difieren de acuerdo a que alga se extrajo.

La sustitución más importante con metoxilos se registra en la posición C-2 de las unidades de galactosa: ésta se observa en los productos de las tres algas estudiadas y en las especies estudiadas previamente⁷⁻¹⁴. Mientras que en los productos de *C. officinalis* hay de 16 a 20 unidades de 2-*O*-metilgalactosa cada 100 galactosas totales, en *B. orbigniana* hay de 12 a 16 y en *J. rubens* sólo 9-10.

La determinación de la configuración absoluta de los monosacáridos determinó que la 2-*O*-metil-galactosa era exclusivamente de la serie L en los productos aislados de *C. officinalis* y *J. rubens*. Al analizar los xilogalactanos de *B. orbigniana* la situación fue diferente ya que se detectó que existían unidades de 2-*O*-Me-Gal de ambas configuraciones, aunque con preponderancia de las L (Tabla 2.7). Este resultado fue inesperado ya que en todos los polisacáridos aislados de algas coralinas estudiadas previamente⁷⁻¹⁴ no había sido determinada la existencia de 2-*O*-metil-D-galactosa.

La sustitución con metoxilos de las unidades de galactosa en las posiciones 3, 4 y 6 ocurre en los xilogalactanos estudiados generalmente en menor proporción que la sustitución en C-2 (Tabla 2.7).

Los polisacáridos aislados de las tres algas poseen 6-*O*-metil-D-galactosa, aunque sólo está en altas proporciones en los productos obtenidos de *Bossiella orbigniana* (aprox. 15%). En estos casos las cantidades determinadas son similares (o incluso superiores) a las obtenidas para la 2-*O*-Me-L-Gal. Esto implica una diferencia con los xilogalactanos aislados de otras especies en los cuales existen cantidades muy bajas o nulas de 6-*O*-Me-D-Gal⁷⁻¹⁴.

La sustitución con metoxilo en la posición C-3 de las unidades de galactosa ocurre en los productos aislados de las tres algas, así como en los estudiados previamente (con la excepción de *J. maximus*)⁷⁻¹⁴. Las cantidades halladas han sido similares en todos los casos (de 4 a 8 unidades cada 100 galactosas); sin embargo, mientras que en general la configuración de la 3-*O*-Me-Gal es exclusivamente L, en *Jania rubens* además se detectaron pequeñas cantidades de 3-*O*-metil-D-galactosa. La existencia de 3-*O*-Me-D-Gal en los polisacáridos de *Jania rubens* parecería contraponerse con una estructura del tipo agarano en la que se asume que las unidades D están enlazadas por C-3 (ver Capítulo 1). En el estudio estructural (explicado en el Capítulo 5) se encontró la explicación a esta supuesta anomalía.

Los polisacáridos de *Corallina officinalis* son los únicos coralinanos estudiados hasta el momento que poseen 4-*O*-metil-D-galactosa. Estudios anteriores de estos polisacáridos mostraron que esta galactosa monometilada se encontraba exclusivamente como cadena lateral^{8,9} lo que indica que no hay una modificación de la estructura tipo agarano.

Uno de los datos más sorprendente encontrado al analizar los azúcares componentes (Tabla 2.7) fue la presencia de unidades de 3,6-anhidrogalactosa en los productos de *Jania rubens*. En base a todos los antecedentes que existían hasta el momento se suponía que los polisacáridos aislados de algas de la familia Corallinaceae no contenían este anhidro azúcar⁵. Por lo tanto, su presencia implicó ser una importante excepción a la estructura genérica planteada para los coralinanos⁵. La mayor cantidad de 3,6-AnGal fue obtenida en los productos aislados por el método T (11%), lo que puede significar que el medio ácido degrada parcialmente este azúcar para el que se sabe presenta una unión glicosídica más lábil y además es degradado una vez hidrolizado¹⁷.

Se supuso que la 3,6-AnGal pertenecía a la serie L ya que, dicha configuración es la encontrada en las estructuras del tipo agarano. La determinación experimental no pudo ser realizada a esa altura del trabajo, dado que las técnicas existentes hasta ese momento no eran aplicables a productos con baja proporción de anhidro azúcar como los encontrados en este caso¹⁹⁻²¹. Posteriormente con el desarrollo de la técnica presentada en el Capítulo 3 se pudo determinar claramente la configuración de la 3,6-AnGal. Los resultados son presentados en el Capítulo 5 donde se muestra el estudio estructural detallado de los polisacáridos aislados de *J. rubens*.

Es interesante destacar que el estudio configuracional de los monosacáridos permitió determinar la presencia exclusiva de galactosas monometiladas de configuración D en los productos aislados de cada una de las algas: en *C. officinalis* aparece 4-*O*-Me-D-Gal, en *B. orbigniana* se encuentra 2-*O*-Me-D-Gal y en *J. rubens* 3-*O*-Me-D-Gal. De alguna manera estos azúcares actúan como marcador específico de cada especie.

Se sabe que los coralinanos son xilogalactanos sulfatados. Sin embargo, el análisis de la sustitución con los grupos sulfato no fue realizado en esta etapa del trabajo, ya que para sacar conclusiones certeras deben realizarse estudios detallados de metilación y desulfatación^{8,9}. Para los productos provenientes de *C. officinalis* estos ya fueron realizados por Cases *et al.*, mientras que para *J. rubens* fueron realizados en esta Tesis y presentados en el Capítulo 5.

Las determinaciones analíticas de los xilogalactanos realizadas hasta el momento indicarían que las estructuras están encuadradas dentro de las características generales informadas previamente para los coralinanos, aún cuando se observan algunas características propias de cada producto. Los xilogalactanos aislados de *Bossiella orbigniana* y *Jania rubens* (estudiados aquí por primera vez) poseen características que los diferencian de los otros coralinanos. Los primeros tienen como carácter distintivo altas proporciones de 6-*O*-Me-D-Gal, mientras que los productos aislados de *J. rubens* se diferencian de los demás por poseer 3,6-AnGal y 3-*O*-Me-D-Gal.

2.2.2 Segunda extracción

2.2.2.1 Análisis de los productos

Los nueve residuos provenientes del primer proceso se extrajeron nuevamente, pero ahora con agua a 100 °C. Esta segunda extracción, que fue realizada en la mayoría de los trabajos previamente publicados sobre el tema⁷⁻¹⁴, dio lugar a nueve extractos nuevos. Estos se identificaron sumando un **2** a las siglas identificatorias de la primera extracción. Los rendimientos, análisis y composición de los nuevos productos obtenidos se muestran en la Tabla 2.8.

Los rendimientos de extracción fueron sensiblemente menores a los obtenidos en la primera extracción. En la mayoría de los casos las cantidades aisladas fueron la mitad (aprox.) de aquellas obtenidas en la primera extracción. Para *C. officinalis* y *B. orbigniana* los rendimientos resultaron ser similares entre sí, pero menores que los de *J. rubens*. La extracción con agua a ebullición del residuo de *J. rubens* proveniente de la metodología de C dio un valor notoriamente inferior a los otros dos (0,33%).

Las proporciones de proteínas y carbohidratos de los productos resultaron ser aproximadamente complementarias. Mientras que los extractos obtenidos de *C. officinalis* y *B. orbigniana* están compuestos mayoritariamente por hidratos de carbono, los originados en *J. rubens* poseen proporciones similares de proteínas e hidratos de carbono.

Tabla 2.8 Rendimientos y análisis de los productos obtenidos de las tres algas tras una segunda extracción con agua a 100 °C.

	<i>Corallina officinalis</i>			<i>Bossiella orbigniana</i>			<i>Jania rubens</i>		
	Co-C2	Co-U2	Co-T2	B0-C2	B0-U2	B0-T2	Jr-C2	Jr-U2	Jr-T2
Rendimiento (%)	0,29	0,22	0,20	0,23	0,17	0,23	0,33	0,59	0,65
Carbohidratos (%)	82	96	77	71	82	60	51	40	44
Proteínas (%)	13	6	13	21	15	19	49	52	36
Sulfato (% NaSO ₃)	6	2	5	6	5	6	4	4	4
Acidos urónicos (%)	7	7	4	4	4	7	3	4	3
[α] _D (°)	-44	+64	-28	-20	+17	-44	-45	-18	-37
Peso Molecular (kDa)	15,2	2,7	6,7	5,1	1,6	7,1	4,5	3,0	7,0

La proporción de proteínas fue más dependiente del alga que del método extractivo. Los valores en los extractos de *J. rubens* son los más altos (de 39 a 52%) y muestran complementariedad con respecto a la primera extracción (es decir que su proporción es mayor cuando en el producto original era menor).

Las proporciones de sulfato son inferiores a las determinadas en los productos provenientes de la primera extracción (ca. 4-5%). En cambio, las proporciones de ácidos urónicos fueron similares.

El peso molecular de los productos (Tabla 2.8) provenientes de los residuos tratados originalmente con ácido clorhídrico concentrado (-U) fueron notablemente menores que aquellos determinados en la primera etapa (3-4,5 KDa contra 8,6-13,1 KDa). En cambio, las extracciones realizadas sobre los residuos provenientes de los otros dos métodos (C y T) generaron productos donde el valor de peso molecular no disminuyó tan marcadamente o incluso aumentó. La justificación que puede encontrarse a estos comportamientos es que hayan existido procesos hidrolíticos en la segunda extracción realizada a 100 °C, originados en la presencia de restos de ácido en el método U.

2.2.2.2 Análisis de los azúcares componentes

El análisis de los azúcares componentes de los productos se muestra en la Tabla 2.9 y la resultante de los promedios en la Tabla 2.10.

Los productos **U2** poseen entre sus azúcares componentes altas cantidades de glucosa. Se registró para estos productos la presencia de hasta 265 unidades de glucosa cada 100 unidades de galactosas totales. Este hecho junto con el valor positivo (o cercano a 0) del poder rotatorio evidencia el enriquecimiento de estos productos en almidón de florídeas (Tabla 2.8). El resultado es complementario del primer proceso extractivo ya que en esa primera etapa prácticamente no se había aislado almidón.

La presencia de almidón de florídeas puede ser la causa (además de los procesos hidrolíticos), de que los pesos moleculares promedios de los productos **U2** aislados con agua a 100 °C en la primera extracción (**T**) sean bajos.

Tabla 2.9 Monosacáridos constituyentes de los productos obtenidos tras 2da. extracción con agua a 100 °C (moles/100 moles galactosas totales).

Monosacárido	Corallina officinalis			Bossiella orbigniana			Jania rubens		
	Co-C2	Co-U2	Co-T2	Bo-C2	Bo-U2	Bo-T2	Jr-C2	Jr-C2	Jr-C2
Alditoles									
Xil	18	29	36	26	17	26	23	37	26
2-O-Me-Gal	13	17	13	14	14	14	6	9	7
3-O-Me-Gal + 3-O-Me-Gal	1	-	6	5	-	5	6	3	6
6-O-Me-Gal	2	6	4	13	15	11	4	15	6
Gal	81	77	74	66	71	69	76	73	67
3.6-AnGal	-	-	2	2	-	2	8	-	15
Man	2	6	4	3	5	2	2	6	2
Glc	6	212	35	60	201	7	17	122	8
Aldononitritos									
Xil	24	10	36	25	14	32	18	32	28
2-O-Me-Gal	18	17	4	15	13	11	12	10	10
3-O-Me-Gal	4	11	13	7	8	6	9	5	10
4-O-Me-Gal	3	4	6	-	-	-	-	-	-
6-O-Me-Gal	3	-	2	14	11	10	5	-	5
Gal	72	68	74	65	67	68	76	84	74
Man	3	6	4	5	7	4	3	5	4
Glc	22	276	35	83	180	5	15	180	12
1-amino-1-desoxialditoles									
D-Xil	29	11	20	32	16	30	40	8	40
2-O-Me-L-Gal	12	10	12	8	8	11	7	5	7
3-O-Me-L-Gal	3	7	5	6	8	4	4	-	5
3-O-Me-D-Gal + 4-O-Me-L-Gal	-	-	-	-	-	-	2	-	4
4-O-Me-D-Gal	3	2	4	-	-	-	-	-	-
6-O-Me-D-Gal	2	-	2	14	10	10	5	-	5
D-Gal	59	47	53	42	42	43	51	51	55
L-Gal	21	34	24	30	33	32	32	44	25
D-Glc + D-Man	16	344	38	82	184	11	30	187	15

Tabla 2.10 Monosacáridos constituyentes de los productos obtenidos tras 2da. extracción con agua a 100 °C (moles/100 moles galactosas totales).

Monosacárido	<i>Corallina officinalis</i>			<i>Bossiella orbigniana</i>			<i>Jania rubens</i>		
	Co-C2	Co-U2	Co-T2	B0-C2	B0-U2	B0-T2	Jr-C2	Jr-U2	Jr-T2
Xil	23	17	26	27	15	26	29	16	29
D-Gal	58	43	51	39	40	40	45	47	45
2-O-Me-D-Gal	-	-	-	2	1	2	-	-	-
3-O-Me-D-Gal	-	-	-	-	-	-	2	2	3
4-O-Me-D-Gal	2	2	3	-	-	-	-	-	-
6-O-Me-D-Gal	2	2	3	13	12	10	4	2	5
L-Gal	20	31	23	28	30	30	28	41	21
2-O-Me-L-Gal	14	15	14	11	11	11	7	8	7
3-O-Me-L-Gal	3	7	4	6	6	5	4	-	4
3,6-AnGal	-	-	2	-	-	2	8	-	15
Man	3	7	3	4	6	3	3	6	3
Glc	13	265	35	72	183	6	18	173	9
Relación									
D/L ^a	63/37	47/53	56/44	54/43	53/47	53/47	52/48	51/49	53/47
Gals/Xil	4,3	5,8	3,8	3,7	3,8	3,8	3,4	6,4	3,5

^a Se asumió que la 3,6-anhidrogalactosa pertenecía a la serie L.

El resto de los productos obtenidos en la segunda extracción (**2**) están constituidos, según el análisis de azúcares componentes, por una mezcla en la que los xilogalactanos (con características similares a los obtenidos en la primera extracción) están en mayor proporción que el almidón de florídeas (Tabla 2.10).

Las relaciones Gals/Xil de los productos **2** resultaron ser diferentes a las determinadas para los xilogalactanos aislados en la primera extracción. Mientras que se registró un aumento de la relación en los productos **C2** y **U2**, para los **T2** se observó una disminución. Este comportamiento sugiere que aquellos xilogalactanos no aislados en la primera extracción probablemente fueron pasibles de extracción en la segunda etapa. Debe destacarse que la baja proporción de xilosa presente en los productos **U2** (16% promedio) puede deberse además a la hidrólisis de las mismas por combinación de alta temperatura y trazas de ácido.

Estos resultados confirman la existencia de xilogalactanos de diferentes características, los cuales son extraídos en diferentes condiciones.

La utilización de ácido concentrado en la primera extracción parece también haber tenido consecuencias drásticas sobre la 3,6-anhidrogalactosa, dado que en el producto **Jr-U2** no se detectó este azúcar. En contrapartida, la utilización de agua a ebullición en las dos etapas de extracción generó los productos (**Jr-T** y **Jr-T2**) más ricos en 3,6-AnGal con proporciones de más del 10%.

En la primera extracción con el método **C** se empleó ácido diluido, pero siempre controlando el pH para evitar procesos degradativos. Este cuidado se vio reflejado en la cantidad (de 5 a 8%) de 3,6-AnGal encontrada en los productos aislados de *Jania rubens* (**Jr-C** y **Jr-C2**).

Las proporciones de galactosas monometiladas presentes en los xilogalactanos de los productos aislados en la segunda etapa fueron similares a las determinadas en los polisacáridos aislados en primera instancia. De esta manera puede afirmarse que aún cuando se encontraron algunas diferencias (relaciones Gals/Xil y cantidades de 3,6-AnGal), los xilogalactanos aislados en las dos etapas poseen características analíticas similares.

2.3 Conclusiones

Los resultados obtenidos demostraron que la extracción de los polisacáridos de las algas pertenecientes al orden Corallinales puede efectuarse exitosamente por cualquiera de los métodos habituales: HCl (diluido) y luego agua (C), HCl (c) y luego HCl 0,1M (U) o agua a 100 °C (T). Sin embargo, la composición de los extractos obtenidos mostraron algunas diferencias:

- a) Al realizar la primera extracción con agua a 100 °C, se obtienen en extractos con baja cantidad de xilogalactanos y altas proporciones de almidón de florídeas y proteínas.
- b) Las extracciones realizadas con soluciones acuosas a temperatura ambiente, luego de destruir la capa de carbonato de calcio con ácido, permitieron aislar eficientemente a los xilogalactanos presentes.
- c) Los coralinanos con menor contenido de xilosa fueron aquellos obtenidos con agua a ebullición, mientras que aquellos extraídos luego del tratamiento con HCl diluido fueron los más ramificados con la pentosa.

Las diferentes características de los xilogalactanos aislados por los tres métodos extractivos sugiere que los mismos podrían ubicarse en diferentes zonas de la matriz intercelular del alga y con distinta exposición.

Las composiciones de los productos obtenidos en la segunda etapa con agua caliente fueron complementarias de las de los aislados en la primera extracción. Este segundo paso extractivo confirmó la eficiencia que tiene el agua a 100 °C para extraer almidón y proteínas. Además se encontraron signos de degradación en los xilogalactanos aislados con agua a ebullición de los residuos tratados en la primera etapa con HCl (c).

El estudio permitió determinar que los xilogalactanos de cada una de las algas utilizadas son diferentes, aún cuando siguen un patrón común. En los productos aislados de *Jania rubens* se encontraron cantidades importantes de 3,6-AnGal, hecho que resultó sorprendente y original dado que no se había encontrado en ningún otro polisacárido proveniente de Corallinales. También fue distintiva la alta proporción de 6-O-metil-D-galactosa encontrada en los polisacáridos de *Bossiella orbigniana*. El análisis configuracional permitió detectar pequeñas cantidades de galactosas monometiladas de configuración D, exclusivas de cada alga, que pueden actuar de marcadores.

Bibliografía

1. van den Hoek, C.; Mann, D. G.; Jahns, H. M. *Algae. An introduction to phycology*, Cambridge University Press, New York, **1995**, 623 pp.
2. Usov, A. I.; Bilan, M. I. *Russ. J. Bioorg. Chem.*, **2001**, 27, 2-16.
3. Graham, L. E.; Wilcox L. W., *Algae*, Prentice Hall, New Jersey, **2000**, 640 pp.
4. Borowitzka, M. A. *Crit. Rev. Plant Sci.*, **1986**, 6, 1-45.
5. Stortz, C. A.; Cerezo, A. S. *Curr. Top. Phytochem.*, **2000**, 4, 121-134.
6. Turvey, J. R.; Simpson, P.R. *Proc. Int. Seaweed Symp.*, **1965**, 5, 323-327.
7. Cases, M. R.; Stortz, C. A.; Cerezo, A. S. *Phytochemistry*, **1992**, 31, 3897-3900.
8. Cases, M. R.; Stortz, C. A.; Cerezo, A. S. *Int. J. Biol. Macromol*, **1994**, 16, 93-97.
9. Cases, M. R. Tesis Doctoral. "*Estudio del sistema de polisacáridos del alga calcárea Corallina officinalis*", FCEyN-UBA, **1995**.
10. Usov, A. I.; Bilan, M. I.; Klochkova, N. G. *Bot. Mar*, **1995**, 38, 43-51.
11. Usov, A. I.; Bilan, M. I.; Shashkov, A. S. *Carbohydr. Res.*, **1997**, 303, 93-102.
12. Takano, R.; Hayashi, J.; Hayashi, K.; Hara, S.; Hirase, S. *Bot. Mar.*, **1996**, 39, 95-102.
13. Usov, A. I.; Bilan, M. I. *Bioorg. Khim.*, **1996**, 22, 126-133 (en ruso).
14. Usov, A. I.; Bilan, M. I. *Russ. J. Bioorg. Chem.*, **1998**, 24, 123-129.
15. Stortz, C. A. *Macroalgas de interés económico* (Ed. Ferrario, M.; Sar, E.), Editorial de la UNLP, La Plata, **1995**, 151-174.
16. Okazaki, M.; Furuya, K.; Tsukayama, K.; Nisizawa, K. *Bot. Mar.*, **1982**, 15, 123-131.
17. Stevenson, T. T.; Furneaux, R. H. *Carbohydr. Res.*, **1991**, 210, 277-298.
18. Cases, M. R.; Cerezo, A. S.; Stortz, C. A. *Carbohydr. Res.*, **1995**, 269, 333-341.
19. Usov, A. I., *Hydrobiologia*, **1993**, 260/261, 641-643.
20. Falshaw, R.; Furneaux, R. H., *Carbohydr. Res.*, **1995**, 269, 183-189.
21. Errea, M. I.; Kolender, A. A.; Matulewicz, M. C., *Bot. Mar.*, **2001**, 44, 133-138.
22. Miller, J. I. *Recent Res. Devel. Phytochem.*, **1997**, 1, 531-564.

CAPÍTULO 3

DETERMINACIÓN DE LA

CONFIGURACIÓN DE

3,6-ANHIDROGALACTOSA Y

α -GALACTOSA 6-SULFATO

SECCION 3A

Determinación configuracional de 3,6-anhidrogalactosa y α -galactosa 6-sulfato

3.A.1 Introducción

La determinación de la estructura química primaria de los galactanos provenientes de algas rojas se lleva a cabo habitualmente mediante el análisis cualitativo y cuantitativo de los azúcares componentes, la elucidación de las posiciones de las uniones glicosídicas y la identificación de los grupos sustituyentes y sus posiciones de unión en el polímero.

Los monosacáridos componentes de los polisacáridos son usualmente analizados por métodos cromatográficos (HPLC y/o CGL) luego de hidrolizar completamente el polisacárido^{1,2}.

Una vez que los azúcares componentes se identifican y cuantifican, es también crucial determinar su configuración absoluta, ya que esto determina las características químicas del polisacárido. La configuración D o L de un monosacárido que forma parte de un galactano de alga roja definirá si se trata de un carragenano, de un agarano o de un *híbrido D/L*³ (ver pág. 14).

En la mayoría de los galactanos sulfatados aislados de algas rojas ha sido históricamente complicado realizar el análisis completo de los azúcares componentes, dado que la 3,6-anhidrogalactosa se degrada en las condiciones ácidas fuertes necesarias para la hidrólisis total del biopolímero¹. Uno de los productos de degradación formado en condiciones ácidas, el 5-hidroximetil-2-furaldehído⁴, ha sido tradicionalmente utilizado para cuantificar el anhidroazúcar de manera indirecta por medio de métodos colorimétricos⁵. Sin embargo, esta metodología posee ciertas desventajas como son la de realizar la cuantificación de manera separada de los otros azúcares y la de no poder diferenciar su proporción de la de su derivado natural metoxilado en C-2.

En sintonía con los estudios realizados en los últimos tiempos para solucionar los inconvenientes con la química de la 3,6-anhidrogalactosa y en función de la elucidación de la estructura primaria de los galactanos de algas rojas, se presentará en este capítulo el desarrollo de una nueva metodología para separar y cuantificar los enantiómeros de 3,6-anhidrogalactosa, su derivado metilado en C-2 y su precursor químico o enzimático, la α -galactosa 6-sulfato.

3.A.1.1 Análisis de los azúcares componentes de polisacáridos de algas rojas

Los azúcares componentes son identificados normalmente utilizando HPLC o CGL luego de hidrolizar el polímero. En el caso de utilizar cromatografía gas-líquido, los monosacáridos deben convertirse previamente en derivados volátiles. En general se utilizan los alditoles o los aldononitrilos peracetilados^{1,2}.

Como ya se mencionó, en condiciones de hidrólisis ácida, la unidad de 3,6-anhidrogalactosa se degrada para generar un derivado del furfural. Para evitar esta degradación se han desarrollado metodologías que combinan reacciones para hidrolizar el residuo 3,6-anhidrogalactosídico y modificarlo rápidamente *in situ* para así evitar reacciones degradativas. Las reacciones utilizadas han sido mercaptólisis, metanólisis, acetólisis, formólisis y oxidación con bromo⁴; sin embargo, todas estas técnicas han tenido un éxito limitado y no han sido muy utilizadas sobre los polisacáridos⁶.

En el año 1991, dos grupos de investigación (uno de Nueva Zelanda liderado por R. Furneaux, y otro de Rusia comandado por A. Usov) informaron casi simultáneamente dos metodologías similares para cuantificar eficientemente a la 3,6-anhidrogalactosa y su derivado metilado en C-2, junto con el resto de los monosacáridos. Las técnicas se basan en una prehidrólisis selectiva de las uniones glicosídicas de la 3,6-AnGal y su reducción *in situ* al correspondiente alditol, utilizando como reductor la 4-metilmorfolina borano (MMB)^{6,7}.

El diseño de estas técnicas se sustentó en el conocimiento de que las uniones glicosídicas de la 3,6-anhidrogalactosa presentes en carragenanos y agaranos se hidrolizaban mucho más rápidamente que la uniones de los otros azúcares^{8,9}. Si bien siempre se planteó la utilización de condiciones de hidrólisis ácida suave para romper selectivamente la unión de la anhidrogalactosa, recién en 1991 se pudo aprovechar esta característica eficientemente^{6,7}.

El otro pilar de estas metodologías fue la utilización del MMB para reducir *in situ* en el medio ácido a la 3,6-AnGal. Anteriormente se había determinado que la metilmorfolina borano podía utilizarse para reducir grupos carbonilo de aldehídos y cetonas en medios ácidos acuosos, donde poseía una estabilidad considerable a temperaturas inferiores a los 100 °C¹⁰. Si bien el MMB se hidroliza en medios próticos, la velocidad es lo suficientemente lenta como para poder llevar a cabo las reacciones de reducción en medio ácido. Esta característica lo diferencia de los borohidruros metálicos que se destruyen rápidamente en medio ácido¹⁰.

La técnica para analizar los monosacáridos componentes de los polisacáridos utilizando MMB que tuvo mayor aceptación fue la “hidrólisis reductiva” desarrollada por Stevenson y Furneaux⁶. La secuencia de reacciones se inicia, como se muestra en la Figura

3.1, con un paso de prehidrólisis de la 3,6-AnGal en presencia de MMB para generar su correspondiente alditol *in situ*. La segunda etapa incluye la hidrólisis total del resto de las uniones glicosídicas, también en presencia del mismo agente reductor. Sin embargo, los autores mencionan que la reducción de los monosacáridos generados en esta etapa recién transcurre al evaporar el solvente, por lo cual existe la necesidad de agregar una cantidad extra de MMB al finalizar el período de hidrólisis⁶.

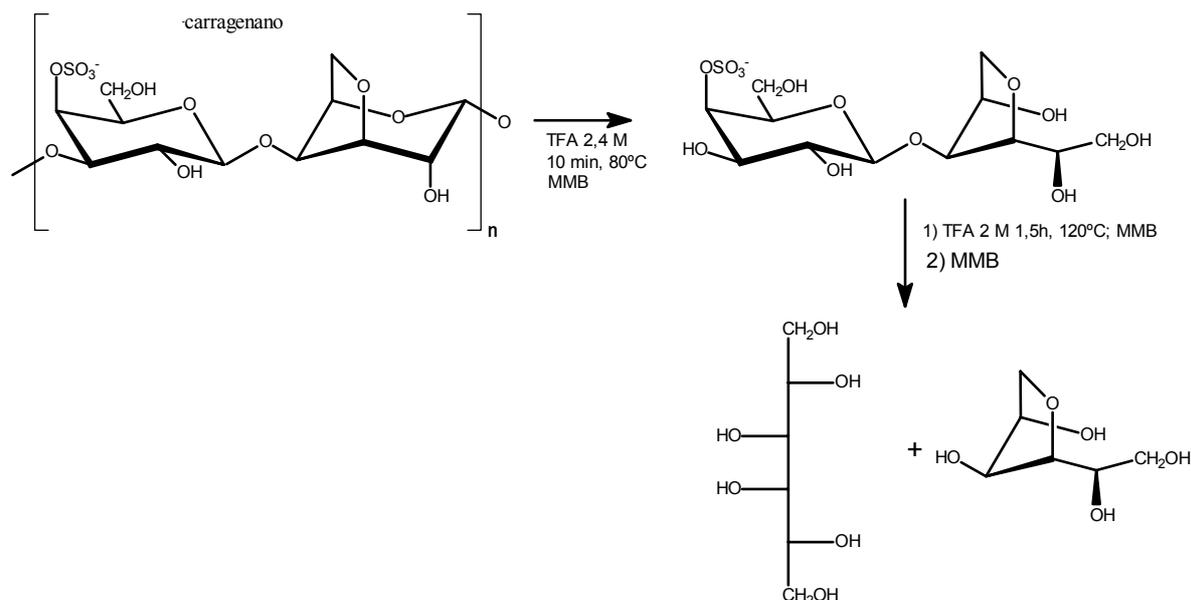


Figura 3.1 Reacción de hidrólisis reductiva para el κ -carragenano.

Los alditoles generados pueden ser identificados y cuantificados por HPAEC-PAD¹¹ o sus peracetatos pueden ser analizados por CGL⁶.

Usov y Elashvili informaron contemporáneamente al trabajo de Stevenson y Furneaux, una metodología similar en la que también se utilizaba MMB como reductor. La diferencia de esta técnica con respecto a la anterior estaba en las condiciones empleadas para la hidrólisis del polisacárido. En ésta se utilizaba ácido trifluoroacético (TFA) 2 M durante 8 h a 100 °C, lográndose de esta manera hidrolizar en una sola etapa todos las uniones glicosídicas. Como sólo la 3,6-anhidrogalactosa aparecía reducida a su correspondiente alditol por acción del MMB, los autores propusieron generar, en un paso adicional, los aldononitrilos del resto de los azúcares. Esta mezcla de aldononitrilos y 3,6-anhidrogalactitol una vez peracetilados eran analizados por cromatografía gaseosa^{7,12}. Evidentemente este proceso de derivatización es más laborioso y extenso que la “hidrólisis reductiva” propuesta por Stevenson y Furneaux.

Posteriormente, la técnica denominada “hidrólisis reductiva” debió ser modificada ya que se observó que, cuando la 3,6-AnGal presente en un polisacárido estaba sulfatada en la posición C-2 (4AG2S)¹³ o que cuando sus unidades vecinas β estaban piruviladas, su unión glicosídica se encontraba más estabilizada frente a la hidrólisis y por lo tanto resultaba subvaluada en los análisis¹⁴. Posteriormente, para obtener cuantitativamente el anhidroazúcar, la reacción fue modificada incrementando los tiempos de prehidrólisis de 10 a 30 minutos y agregando cantidades extras de MMB en cada paso^{11,13,14}.

La utilización de la “hidrólisis reductiva” logró que tanto los análisis de azúcares componentes, como los de azúcares metilados provenientes de las alquilaciones de los biopolímeros fueran más ágiles y certeros.

En el mismo trabajo en que Stevenson y Furneaux⁶ desarrollaron la “hidrólisis reductiva” presentaron también otra técnica para detectar la 3,6-anhidrogalactosa, la cual denominaron “doble hidrólisis”. Sin embargo, este método pasó desapercibido en la literatura posterior ya que era más laborioso que la otra técnica. La secuencia de la reacción puede observarse en la Figura 3.2.

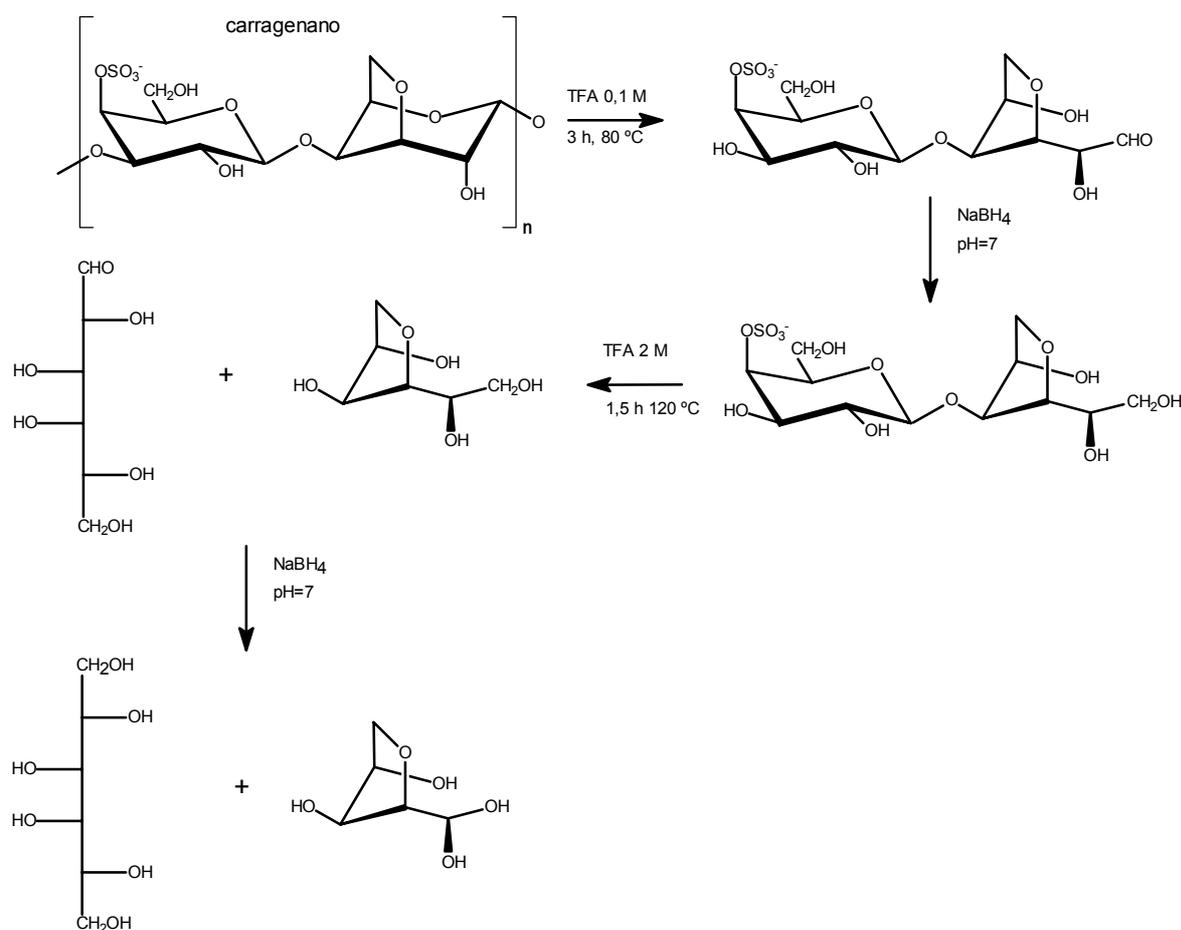


Figura 3.2 Reacción de doble hidrólisis para el κ-carragenano.

Los autores plantearon utilizar dos etapas de hidrólisis y de reducción nuevamente aprovechando las distintas velocidades de ruptura que poseen las uniones glicosídicas de la 3,6-anhidrogalactosa y el resto de los azúcares.

En la primera etapa realizaron la hidrólisis del polímero con TFA 0,1 M a 80 °C durante 3 h y tras evaporar el ácido, redujeron los extremos reductores de la 3,6-AnGal con NaBH₄. A continuación efectuaron la hidrólisis total en las condiciones utilizadas habitualmente para el resto de los azúcares: TFA 2 M a 120 °C durante 2 h. Luego evaporaron el solvente nuevamente y por acción del NaBH₄, a pH neutro o levemente alcalino, generaron los alditoles. Estos se podían analizar por CGL o HPLC.

Aún cuando la técnica es eficiente, los autores informaron que una muy pequeña cantidad de la 3,6-anhidrogalactosa hidrolizada (de 1 a 1,5% de 3,6-AnGal) se podía degradar siguiendo una ruta similar a la que genera el 5-hidroximetil-2-furaldehído⁶ (Figura 3.3). Para minimizar la degradación, es imprescindible realizar la primera reducción inmediatamente después del paso de hidrólisis (en ausencia de ácido).

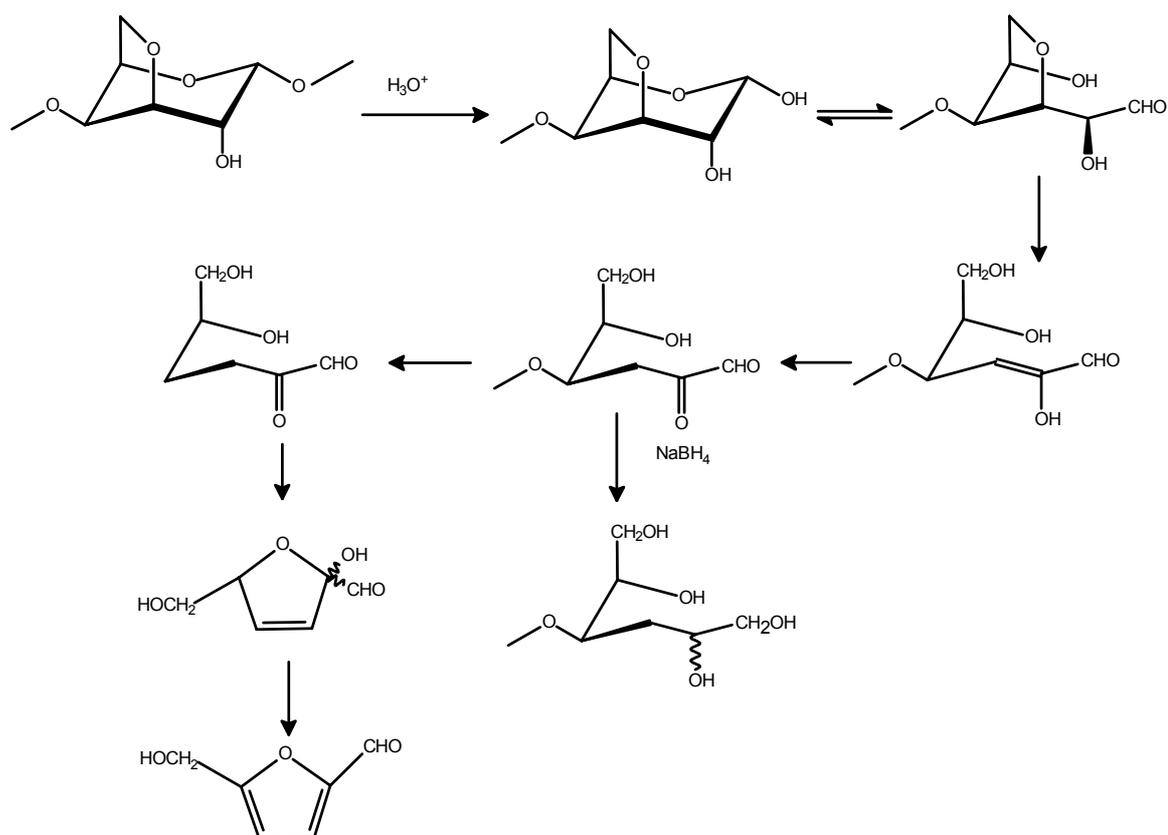


Figura 3.3 Mecanismo de degradación de la 3,6-anhidrogalactosa en medio ácido propuesto por Stevenson y Furneaux⁶.

3.A.1.2 Análisis de la configuración absoluta de los azúcares

La asignación de la configuración absoluta de los monosacáridos componentes de los galactanos provenientes de algas rojas es crucial para definir sus principales características. Como se explicó en el capítulo introductorio, la configuración de la unidad α determina si el polisacárido es un carragenano, un agarano o un híbrido D/L.

Los métodos más utilizados para determinar la configuración absoluta de los azúcares se basan en la conversión de los enantiómeros en diastereómeros mediante reacción con un reactivo quiral y posterior separación de los mismos por cromatografía en fases no quirales.

Los primeros métodos, desarrollados casi simultáneamente por los grupos de Vliegthart y Lindberg, utilizaban alcoholes quirales (2-octanol y 2-butanol) para formar los alquilglicósidos con los monosacáridos, que luego de ser acetilados o trimetilsililados se separaban por CGL^{15,16}. Aún cuando la separación obtenida de los diastereómeros era bastante buena, se presentaba la dificultad de que los cromatogramas obtenidos eran altamente complejos dado que la reacción genera los derivados de los anómeros α y β en sus formas furanósicas y piranósicas para cada azúcar presente. De esta manera para cada azúcar se generan entre tres o cuatro picos, por lo que el método es aprovechable sólo en los casos en que el polisacárido contenga pocos monosacáridos. Además, los derivados formados con 2-octanol son poco volátiles para ser analizados por CGL.

Otros métodos desarrollados posteriormente plantearon formar los 1-amino-1-desoxialditoles de los monosacáridos mediante la reacción de aminación reductiva con aminas quirales. De esta forma era posible transformar enantiómeros en diastereómeros separables por cromatografía¹⁷⁻¹⁹. Además de ser una reacción simple, estos métodos evitaban la multiplicidad de picos encontrada con los alquilglicósidos.

Oshima y Kumanotani plantearon hace 25 años, en una serie de trabajos^{17,18}, la utilización de α -metilbencilamina (MBA) como agente quiral para formar los 1-amino-1-desoxialditoles (Figura 3.4).

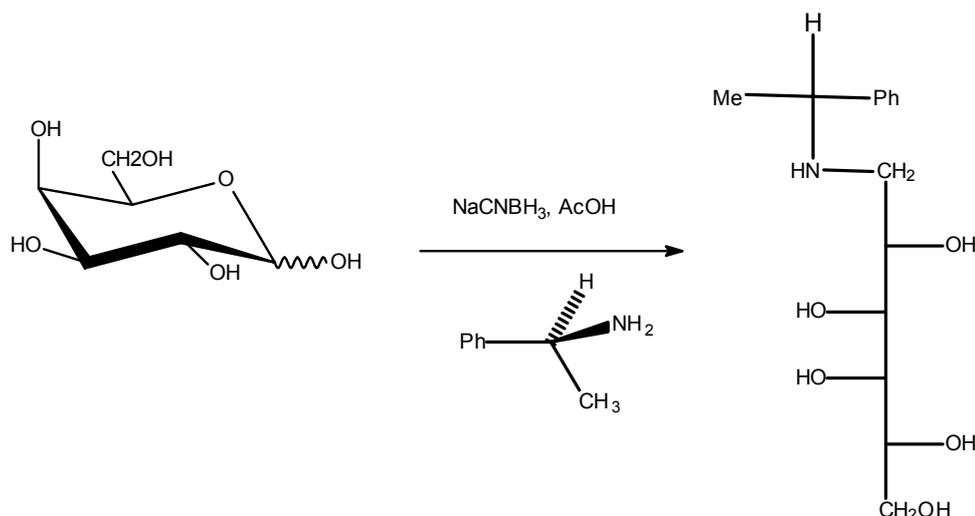


Figura 3.4 Reacción de aminación reductiva con (*S*)-α-metilbencilamina.

La separación de los diastereómeros acetilados o trimetilsililados se podía realizar tanto por HPLC como por CGL^{17,18}. Si bien las separaciones informadas para cada par de diastereómeros eran buenas, existían en el cromatograma numerosas superposiciones de picos correspondientes a distintos azúcares, especialmente en la región de las pentosas y para la D-manosa, D-glucosa y D-galactosa. En consecuencia se terminaba observando un cromatograma poco resuelto en los casos en que los derivados tuvieran tiempos de retención similares.

Cases *et al.*¹⁹ profundizaron el uso de la reacción de aminación reductiva al proponer cuantificar los enantiómeros de los monosacáridos formando sus diastereómeros con (*S*)-1-amino-2-propanol (AP). Los autores informaron la separación por cromatografía gaseosa de los aminodesoxialditoles peracetilados de los monosacáridos y de las galactosas monometiladas comúnmente encontradas en los polisacáridos de algas rojas. Las separaciones logradas resultaron ser eficientes para la mayor parte de los azúcares y el análisis de los cromatogramas en general resultó ser sencillo. Sin embargo, la técnica no logró separar los diastereómeros formados con la 2-*O*-metilgalactosa, la cual suele estar presente en numerosos agaros y carragenanos. Para solucionar este problema los autores propusieron realizar la aminación con (*S*)-α-metilbencilamina. Los resultados obtenidos mostraron que era posible separar y cuantificar eficientemente los diastereómeros de la 2-*O*-metilgalactosa, aunque encontraron que para el resto de los monosacáridos existía una estereoselectividad que impedía la correcta cuantificación de los enantiómeros. Esta característica no fue informada en ninguno de los trabajos realizados por Oshima y Kumantani donde utilizaban también α-metilbencilamina, aunque se puede llegar a apreciar el efecto mencionado al analizar los

cromatogramas publicados. En la Tabla 3.1 pueden observarse las relaciones diastereoméricas determinadas por Cases *et al.* que demuestran la estereoselectividad existente al utilizar MBA para la mayoría de los azúcares.

Tabla 3.1 Relación de áreas para cada par diastereomérico ($r_{D/L}$), originados por derivatización de azúcares con α -metilbencilamina racémica.

Azúcar	$r_{D/L}$
Arabinosa	0,7
Xilosa	1,5
Manosa	0,7
Galactosa	2,3
2- <i>O</i> -metilgalactosa	1,0
4- <i>O</i> -metilgalactosa	3,1
6- <i>O</i> -metilgalactosa	1,8

Por lo tanto para determinar la configuración absoluta de los azúcares comúnmente encontrados en agaranos y carragenanos era necesario la utilización de los dos agentes quirales:

Amina quiral	Azúcar
(<i>S</i>)-1-amino-2-propanol	ramnosa, fucosa, arabinosa, xilosa, manosa, galactosa, 3- <i>O</i> -metilgalactosa, 4- <i>O</i> -metilgalactosa, 6- <i>O</i> -metilgalactosa
(<i>S</i>)- α -metilbencilamina	2- <i>O</i> -metilgalactosa

Estos métodos fueron también aplicados a monosacáridos provenientes de los procesos de metilación de los polisacáridos utilizados para determinar su estructura^{20,21}. Errea *et al.* utilizaron el método de formación de los 1-aminodesoxialditoles con (*S*)- α -metilbencilamina²¹ para determinar la configuración de la 2,6-di-*O*-metilgalactosa y 2,6-di-*O*-etilgalactosa. La asignación configuracional de la 2,6-di-*O*-alquilgalactosa permite obtener información estructural importante ya que, se puede elucidar si se trata de unidades del tipo 4LG3(S,M,X) o 3DG4(S,M,X).

Las técnicas cromatográficas que utilizan fases estacionarias quirales también han sido aplicadas a la determinación configuracional de los monosacáridos, aunque los resultados y costos no alentaron su utilización. Lindqvist y Jansson²² realizaron una detallada evaluación sobre la separación de los enantiómeros de los monosacáridos por cromatografía gaseosa en fases quirales de α -, β - y γ -ciclodextrinas. Los autores derivatizaron los azúcares como aldononitrilos peracetilados, alditoles trifluoroacetilados y dietil ditioacetales de trifluoroacetil aldosa. Las conclusiones del trabajo indicaron que la metodología no servía para la separación de los carbohidratos, ya que la resolución de los picos de los pares enantioméricos era baja o nula en la mayoría de los casos.

La configuración de los azúcares presentes en los carragenanos y agaranos también puede ser asignada por métodos espectroscópicos como la resonancia magnética nuclear (RMN) dado el entorno diastereomérico que existe en los mismos. Por ejemplo como puede observarse en la Tabla 3.2, las señales de RMN de ¹³C de dos galactanos conformados por unidades disacáridicas repetitivas diastereoméricas del tipo (3DG-4DG)_n y (3DG-4LG)_n son diferentes²³.

Tabla 3.2 Desplazamientos químicos (ppm) en RMN de ¹³C de unidades de galactosa presentes en polisacáridos de algas rojas²³.

Díada	Unidad	Desplazamiento químico					
		C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6
3DG-4DG	3DG	104,8	70,6	78,9	65,8	75,3	61,3
	4DG	96,3	69,3	71,0	78,7	75,7	61,5
3DG-4LG	3DG	103,7	70,0	81,0	68,9	75,6	61,4
	4LG	100,9	69,4	71,0	79,3	72,2	61,2

La señal correspondiente al C-1 de la α -L-galactosa se encuentra desplazada en 4,6 ppm a campos más bajos con respecto a la misma unidad pero de configuración α -D. El efecto provocado por la configuración de la unidad α también se observa en la β -D-galactosa adyacente: la señal del C-1 se desplaza en 1,1 ppm según sea la configuración de la unidad a la que se enlaza. Estos desplazamientos ocurren porque se trata de unidades enantioméricas en un medio diastereomérico.

Sin embargo, los espectros de RMN de los polisacáridos de algas rojas en muchas ocasiones son difíciles de interpretar ya que suelen ser complejos y tener poca resolución. Las señales pueden ser anchas y poco intensas, especialmente en los polímeros más heterogéneos. Estas características de los espectros se deben a la viscosidad de la muestra (relacionada con el peso molecular y los grupos iónicos presentes en el polímero) y a la inhomogeneidad conformacional de la cadena que produce una dispersión de las señales de los carbonos monotípicos. Además existen polisacáridos más irregulares con numerosos solapamientos de las señales y diferentes entornos químicos que imposibilitan la detección de estructuras minoritarias²⁴. Por lo tanto, la baja sensibilidad inherente a la espectroscopía de RMN de ¹³C y la complejidad de los espectros impiden muchas veces detectar azúcares con distintas configuraciones. De esta manera, el análisis por espectroscopía de resonancia magnética nuclear debe ser complementado por métodos químicos.

3.A.1.2.1 Determinación de la configuración de la 3,6-anhidrogalactosa

La estructura de los galactanos provenientes de algas rojas no está completa si no se determina la proporción y la configuración de la 3,6-anhidrogalactosa. En literatura se han mostrado pocos intentos por lograr esta determinación, posiblemente por complicaciones prácticas derivadas de su labilidad en medios ácidos de reacción.

Una metodología desarrollada para determinar la configuración absoluta de la 3,6-AnGal se basó en utilizar la reacción de “hidrólisis reductiva” sobre polisacáridos que poseían todas sus unidades α cicladas. Los autores plantearon realizar una hidrólisis selectiva de la unión glicosídica de la 3,6-anhidrogalactosa y reducir su aldehído para generar carrabiitol (3DG-4DAGO), agarobiitol (3DG-4LAGOH) o algunos de sus derivados metilados. Estos disacáridos luego podían ser separados como derivados peracetilados por cromatografía gaseosa o analizados por resonancia magnética nuclear^{12,25}. Sin embargo, el método falla cuando las unidades disacáridicas del tipo 3DG-4AG no están presentes de manera consecutiva, ya que en lugar de disacáridos se forman oligosacáridos de mayor peso molecular no analizables por CGL (o complicados de analizar por RMN). Es decir que, en polisacáridos con baja proporción de 3,6-AnGal es imposible determinar la configuración por este método. Otros grupos han desarrollado metodologías similares despolimerizando mediante reacciones de metanólisis^{26,27}.

En el año 1998 Errea *et al.* informaron un método basado en una reacción inicial de hidrólisis oxidativa de la 3,6-AnGal con bromo y posterior esterificación del ácido anhidrogalactónico formado con *sec*-butanol quiral²⁸. Luego los derivados peracetilados se separaron y cuantificaron por cromatografía gaseosa. Esta técnica resultó ser muy laboriosa y poco sensible, al menos en nuestras manos, debido posiblemente a las numerosas etapas de reacción, por lo cual no pudo aplicarse a polisacáridos con bajos contenidos de 3,6-anhidrogalactosa.

La utilización de espectroscopía de RMN de ¹³C y ¹H si bien permite dilucidar la configuración de la 3,6-AnGal en los polisacáridos, posee las mismas desventajas descritas anteriormente. Por lo tanto, si existiera un enantiómero minoritario de la 3,6-anhidrogalactosa en baja proporción no sería detectado.

El mayor aprovechamiento de la espectroscopía de RMN se remite nuevamente a la detección de las unidades en polímeros repetitivos como por ejemplo la agarosa y el β-carragenano. Como se muestra en la Tabla 3.3, los espectros que se obtienen para este tipo de moléculas son simples y fáciles de interpretar.

Tabla 3.3 Desplazamientos químicos (ppm) en RMN de ¹³C de β-carragenano y agarosa²³.

Polisacárido	Unidad	Desplazamiento químico (ppm)					
		C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6
β-carragenano (3DG-4DG) _n	3DG	102,5	69,5	80,4	66,4	75,3	61,3
	4DAG	94,7	70,2	79,4	78,0	76,8	69,5
agarosa (3DG-4LG) _n	3DG	102,4	70,2	82,2	68,8	75,3	61,4
	4LAG	98,3	69,9	80,1	77,4	75,7	69,4

La señal correspondiente al carbono anomérico de la 3,6-anhidrogalactosa aparece en el espectro de ^{13}C separado en más de 3,5 ppm según sea su configuración. La señal desplazada a campos más bajos es la correspondiente a la unidad α -L. Es interesante notar que en estos casos el desplazamiento del C-1 de las unidades de galactosas adyacentes no sufren prácticamente influencia de la configuración de la 3,6-anhidrogalactosa.

3.A.2 Resultados

3.A.2.1 Técnica para la determinación configuracional de la 3,6-anhidrogalactosa

Como se informó en el Capítulo 1, inesperadamente se encontraron pequeñas cantidades de 3,6-anhidrogalactosa en los polisacáridos extraídos del alga *Jania rubens*. El resultado fue sorprendente ya que hasta el momento en ninguno de los productos aislados de algas pertenecientes al orden Corallinales se había detectado el anhidroazúcar³. Al tratarse de pequeñas cantidades y ante la imposibilidad de cuantificar los enantiómeros de la 3,6-AnGal presentes en bajas proporciones con las técnicas existentes hasta ese momento se decidió desarrollar una nueva metodología. La aplicación de ésta sobre los polisacáridos de *J. rubens* se detalla en el Capítulo 5.

Al diseñar la técnica de análisis configuracional de la 3,6-anhidrogalactosa se pensó en la formación de diastereómeros que pudieran ser separados por cromatografía gaseosa.

Los primeros experimentos se realizaron intentando acilar con un agente quiral el 3,6-anhidrogalactitol proveniente de la hidrólisis reductiva. El agente elegido para la acilación fue el cloruro de (*S*)-2-bromopropanoílo. Como la reacción no pudo realizarse satisfactoriamente, se decidió explorar otra alternativa.

La segunda estrategia se orientó a hidrolizar selectivamente la unión glicosídica de la 3,6-anhidrogalactosa, para posteriormente hacerla reaccionar con un auxiliar quiral.

Para la hidrólisis selectiva de la unión glicosídica de la 3,6-AnGal presente en los polisacáridos se emplearon las condiciones descritas en la técnica de doble hidrólisis⁶ (TFA 0,1 M, 80 °C, 3 h, ver pág. 62), ya que éstas minimizaban los efectos degradativos. A continuación, con el aldehído de la 3,6-AnGal disponible era posible realizar una reacción con un compuesto quiral para generar diastereómeros. Dados los antecedentes¹⁷⁻¹⁹, el paso lógico elegido fue el de realizar una aminación reductiva con una amina quiral.

Para que la técnica sea más amplia, se decidió continuar el proceso con una segunda hidrólisis en condiciones fuertes, de manera que todos los azúcares fuesen hidrolizados.

Posteriormente, con un nuevo paso de aminación sobre todos los monosacáridos, se obtendrían los 1-amino-1-desoxialditoles de todos ellos, incluyendo el correspondiente a la 3,6-anhidrogalactosa formado en la primera etapa.

La secuencia finalizaría peracetilando los derivados para poder analizarlos por cromatografía gaseosa.

Las aminaciones reductivas fueron realizadas en las condiciones utilizadas e informadas por Cases *et al.* para la determinación de la configuración absoluta de los azúcares que conforman los polisacáridos de algas rojas^{19,29}. Los autores habían concluido que el mejor rendimiento de reacción se obtenía en los casos en que se utilizaba una relación de amina/grupo carbonilo de 5. Este resultado coincidía con lo informado anteriormente por Borch *et al.*^{30,31}.

Los autores también determinaron que el solvente óptimo para la reacción era una mezcla de metanol anhidro con ácido acético y no un medio alcalino como se utiliza en la mayoría de los casos²⁹. Los tiempos y temperaturas de reacción recomendados fueron de 1 a 2 horas a 65 °C^{19,29}.

La técnica que surge de la combinación de los dos pasos de hidrólisis y de los dos pasos de aminación, más una etapa de peracetilación necesaria para realizar cromatografía gaseosa, da un proceso de 5 pasos que puede observarse en la Figura 3.5.

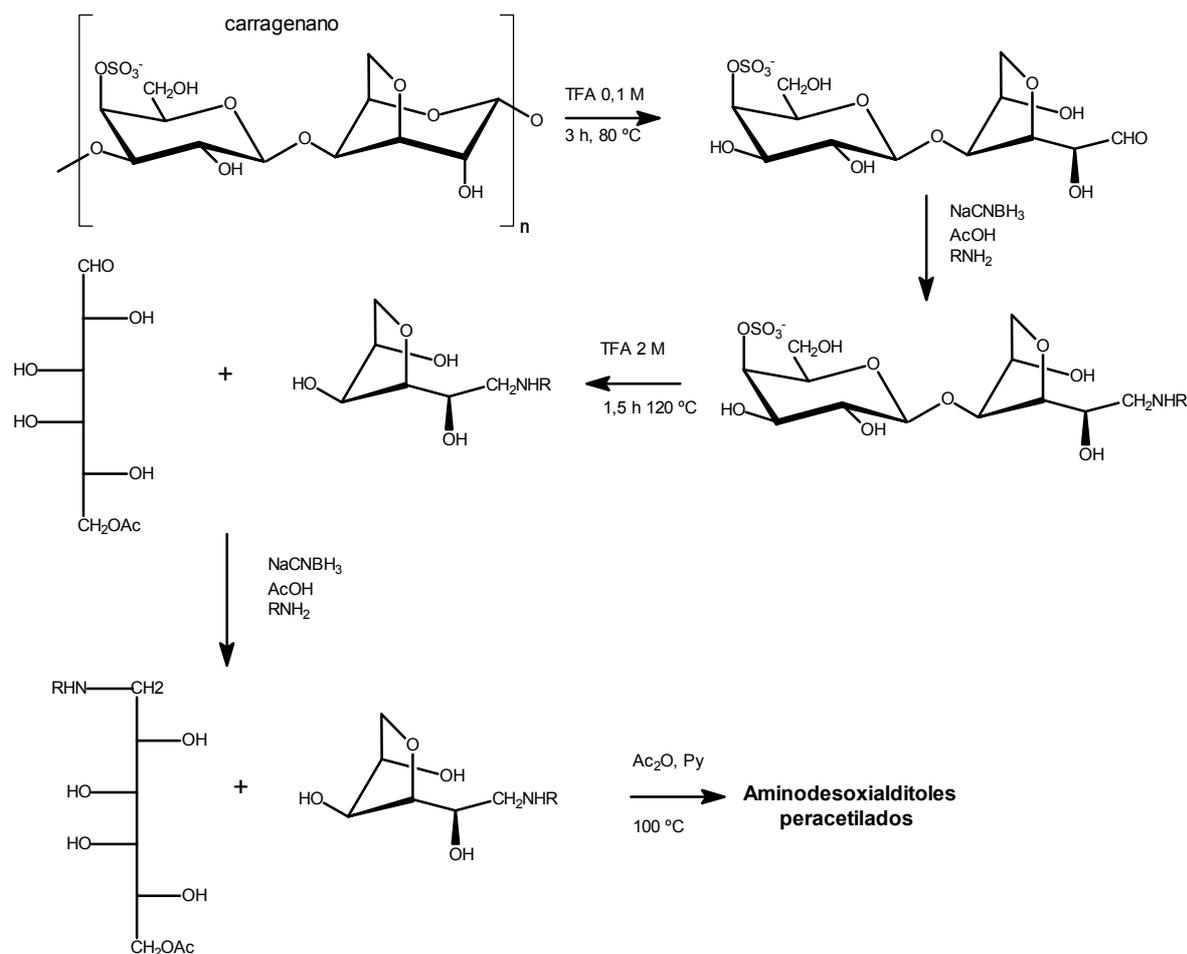


Figura 3.5 Esquema de reacciones de la “doble hidrólisis-doble aminación reductiva”.

Técnica de “doble hidrólisis-doble aminación reductiva”.

1. Hidrólisis suave: TFA 0.1 M, 80 °C, 3 h.
2. Aminación reductiva 1: amina quiral, NaCNBH₄, MeOH-AcOH, pH=4, 65 °C, 1-2 h.
3. Hidrólisis fuerte: TFA, 120 °C, 1,5 h.
4. Aminación reductiva 2: amina quiral, NaCNBH₃, MeOH, pH=4, 65 °C, 1-2 h.
5. Acetilación: piridina-anhídrido Acético (1:1), 100 °C, 45 min.

La reacción de aminación debe realizarse en condiciones anhidras y sin la presencia de ácido trifluoroacético, por lo tanto es indispensable evaporar previamente la solución acuosa ácida.

3.A.2.2 Estudios realizados con 1-amino-2-propanol

La primera experiencia se realizó sobre un carragenano kappa comercial (3DG4S-4DAG)_n con el objetivo de obtener los productos diastereoméricos por condensación de una amina con galactosa y con 3,6-anhidrogalactosa, ambas de la serie D.

En primera instancia se utilizó el 1-amino-2-propanol (AP) racémico. Este fue seleccionado para determinar si los diastereómeros (equivalentes a la reacción de la D y L 3,6-AnGal con una amina quiral) podían ser separados.

Se debe considerar que los productos formados entre la amina racémica y la D-galactosa (por ejemplo), generan los productos D-Gal-amina(*S*) (D/(*S*)) y D-Gal-amina(*R*) (D/(*R*)). Como este último es enantiómero de L-Gal-amina(*S*) (L-Gal/(*S*)), el comportamiento cromatográfico de ambos (en fases no quirales) es idéntico y el sistema equivale a tener D-Gal y L-Gal derivatizadas con la amina quiral de configuración (*S*). Dados los costos de las aminas quirales, el sistema empleado es más conveniente que utilizar (*S*)- y (*R*)-1-amino-2-propanol o azúcares enantioméricos por separado^{19,29}.

Al analizar la muestra se observó un cromatograma con tres picos principales, uno correspondiente al derivado de la 3,6-anhidrogalactosa y los otros dos correspondientes a los diastereómeros de la galactosa. Eso indicaba que los diastereómeros de la 3,6-anhidrogalactosa no podían ser separados. La identificación del derivado de la 3,6-AnGal fue realizada con un espectrómetro de masa acoplado al cromatógrafo gaseoso. En la Figura 3.6 se puede observar el espectro de masa obtenido por impacto electrónico a -70 eV.

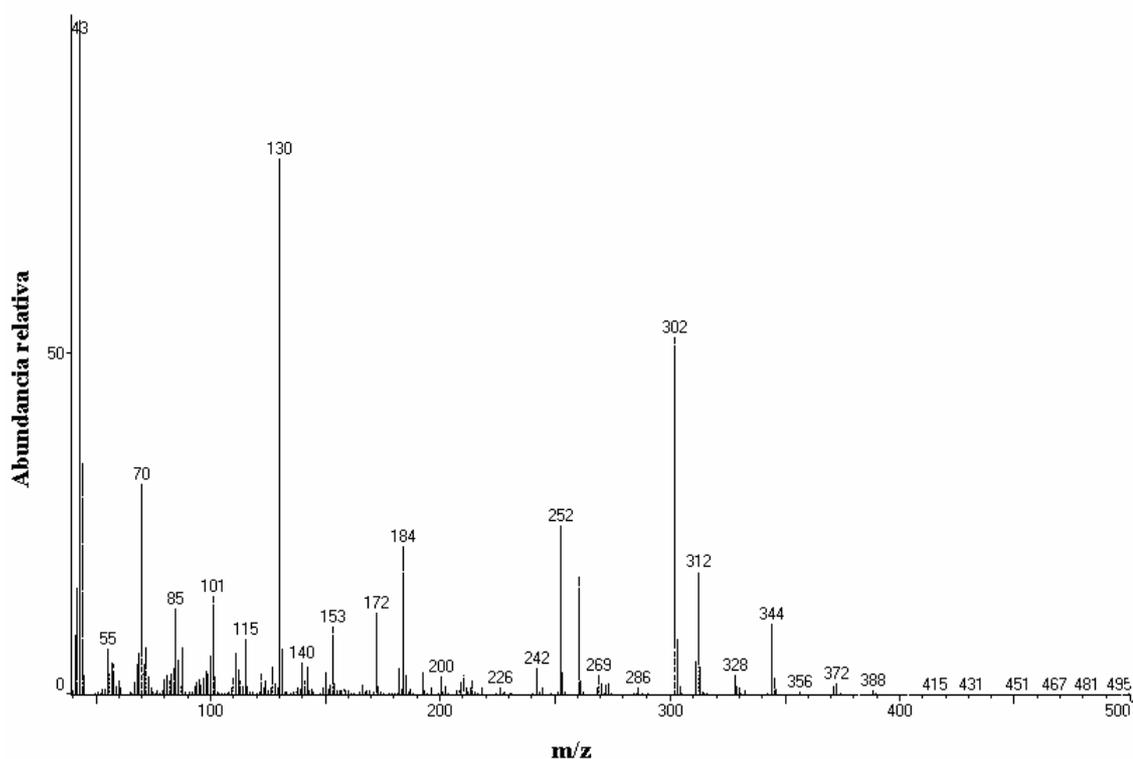


Figura 3.6 Espectro de masa del 3,6-anhidro-1-desoxi-1-(2'-hidroxipropilamino)galactitol acetilado.

Del análisis del espectro de masa del 3,6-anhidro-1-desoxi-1-(2'-hidroxipropilamino)-D-galactitol peracetilado se desprende que, los principales fragmentos se generan por tres vías diferentes (Figura 3.7).

Como fue informado anteriormente²⁹, los principales iones derivan de las rupturas α al nitrógeno, eliminándose en un caso el residuo del azúcar y en otro caso el fragmento del 1-amino-2-propanol. Es decir, que ocurre la fragmentación típica de las amidas N-sustituidas donde se produce la escisión del enlace C-C en el átomo contiguo al nitrógeno. Así, los fragmentos más intensos provienen de la ruptura de la unión C1-C2 de los carbonos del azúcar, dando origen al fragmento de relación m/z 172, que por pérdida de cetena (-42) genera el pico base a m/z 130 (considerando $m/z > 50$). Por otro lado, la fragmentación de los carbonos 1 y 2 del aminopropanol da lugar al pico de m/z 344 que por pérdida de 42 (cetena) origina el de 302. Luego se observan las pérdidas de ácido acético (-60) y cetena (-42), típicas de azúcares peracetilados, para generar los iones de m/z 242 y 260, respectivamente.

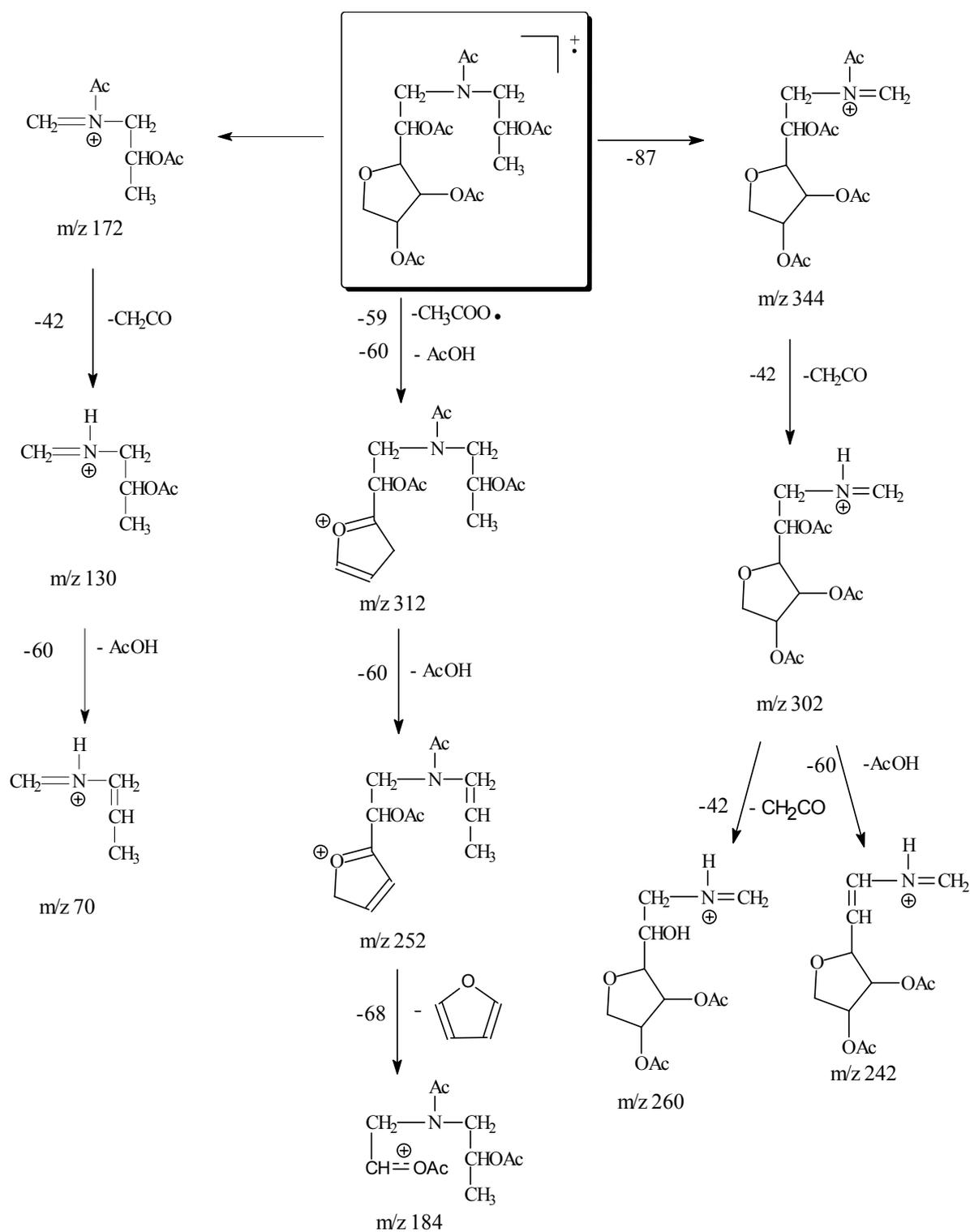


Figura 3.7 Principales fragmentaciones en los espectros de masa del 3,6-anhidro-1-desoxi-1-(2'-hidroxipropilamino)galactitol acetilado.

Un tercer camino de ruptura, no observado para el derivado de la galactosa²⁹, se inicia con la pérdida menos común del radical acetato (59) a partir del ión molecular y posteriormente de ácido acético para generar el *m/z* de 312. Finalmente en esta vía se puede observar la presencia del fragmento *m/z* 252 correspondiente a una nueva pérdida de ácido acético.

En la Tabla 3.4 se pueden observar los valores obtenidos al integrar los picos del cromatograma. Del análisis se dedujo que la relación 3,6-AnGal:Gal fue cercana a 1, como se esperaría para un κ -carragenano ideal. Al igual que en estudios anteriores^{19,29}, al utilizar la amina racémica, ambos picos originados en la galactosa también poseían una relación de áreas entre sí cercana a 1. Además, se observaron pequeñas cantidades de azúcares sin reaccionar o reducidos a su respectivo alditol por acción secundaria del NaCNBH₃.

Tabla 3.4 Composición molar del κ -carragenano sometido a derivatización con 1-amino-2-propanol.

Polisacárido	Amina	Relación molar ^b				
		3,6-AnGal ^a	Gal ^a	3,6-AnGal D/(S) +D/(R)	Gal D/(S) ^b	Gal D/(R)=L/(S) ^c
κ -carragenano	AP racem.	3	2	47	24	24

^a Incluye a los monosacáridos sin reaccionar y sus respectivos alditoles.

^b D/(S) implica el producto de condensación del azúcar D y la amina S.

^c D/(R)=L/(S), enantiómeros cromatográficamente equivalentes.

Los tiempos de retención de los derivados relativos al inositol peracetilado y los factores de separación (*r*) obtenidos en cromatografía gaseosa pueden observarse en la Tabla 3.5. Los valores para los diastereómeros de la galactosa difieren de los informados anteriormente ya que originalmente los autores utilizaron una columna con diámetro interno 0,2 mm y espesor de fase 0,11 μ m, mientras que en este trabajo se utilizó una columna con ID = 0,32 mm y espesor de fase 0,17 μ m. Como es razonable el compuesto formado con 3,6-AnGal eluye más rápidamente que su equivalente de la galactosa.

Tabla 3.5 Tiempos de retención^a y factores de separación (r)^b para los 1-desoxi-1-(2'-hidroxipropilamino) alditos peracetilados.

Azúcar	<i>(R,S)</i> -1-amino-2-propanol (programa D)		
	D	L	r^b
3,6-AnGal		1,840	1
Gal	2,505 (2,341)	2,520 (2,356) ^c	1,006 (1,007)

^a Relativo a *myo*-inositol peracetilado ($t_r = 15,51$ min).

^b Relación de tiempos entre diastereómeros.

^c Entre paréntesis figuran los valores obtenidos por Cases *et al.*^{19,29}.

3.A.2.3 Estudios realizados con α -metilbencilamina

Como los diastereómeros formados con la 3,6-anhidrogalactosa y el 1-amino-2-propanol no pudieron separarse por cromatografía gaseosa en las condiciones empleadas, se decidió utilizar otra amina. Dado se había informado que los diastereómeros de la 2-*O*-metilgalactosa formados con AP no se separaban^{19,29} y si lo hacían aquellos formados con α -metilbencilamina, siguiendo el mismo procedimiento, se decidió generar los derivados de la anhidrogalactosa y de la galactosa (que conforman el κ -carragenano) con MBA racémica (Figura 3.8).

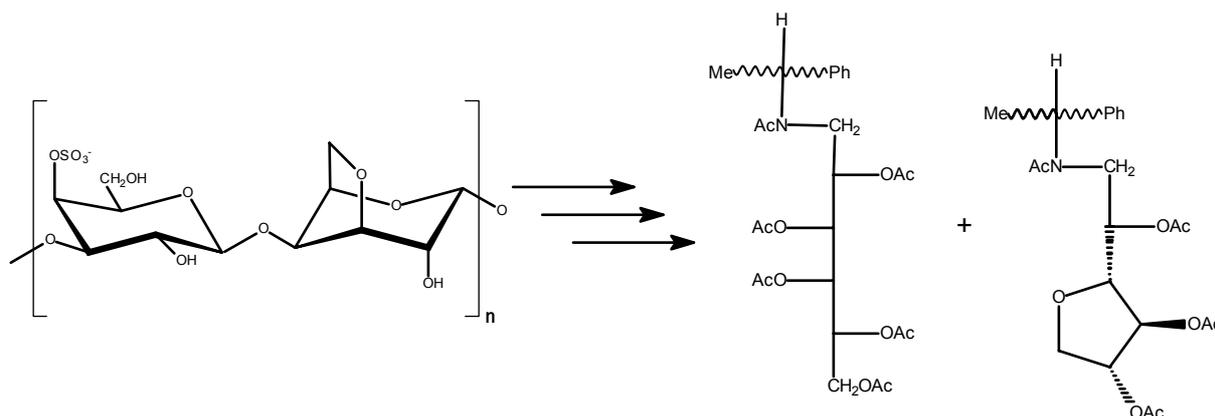


Figura 3.8 Derivatización de κ -carragenano con *(R,S)*- α -metilbencilamina (MBA).

Al analizar por cromatografía gaseosa los derivados peracetilados de la 3,6-AnGal, se observó la presencia dos picos bien resueltos que indicaban la separación de los diastereómeros (Figura 3.9). Además como ya había sido informado¹⁷⁻¹⁹ los diastereómeros de la galactosa también fueron separados.

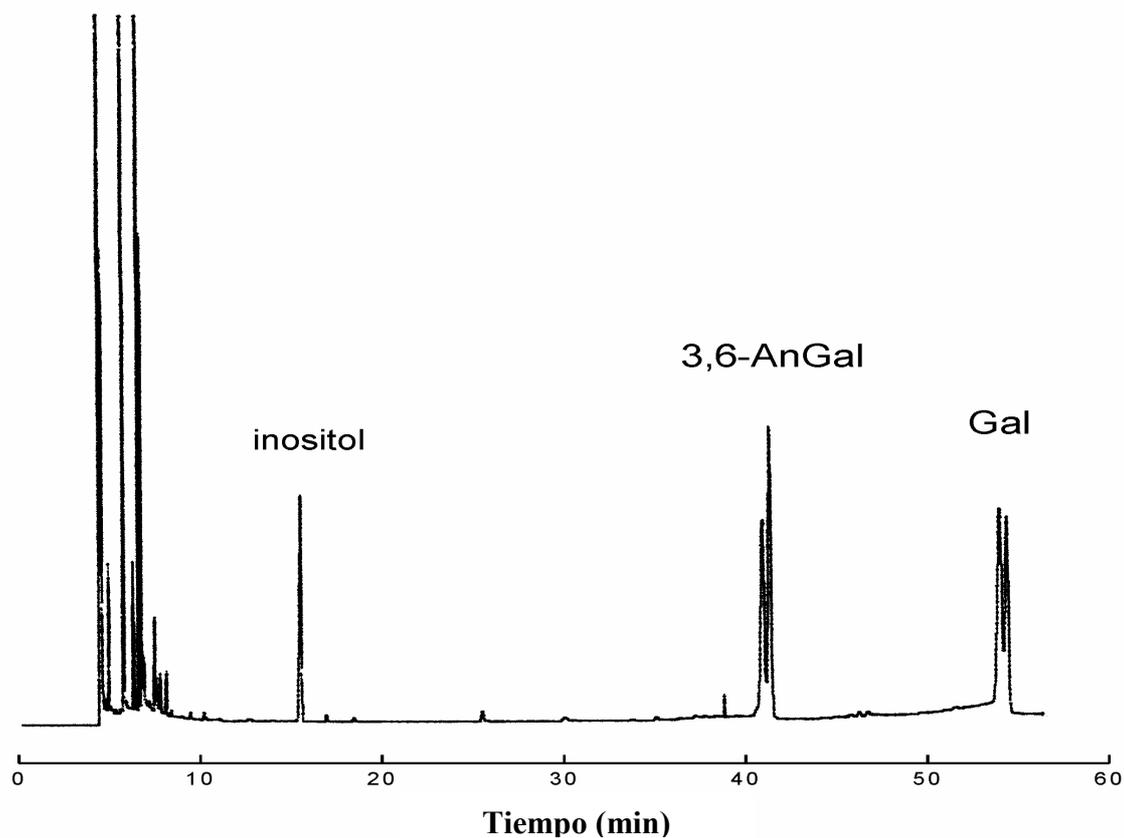


Figura 3.9 Cromatograma del producto de reacción del método de doble hidrólisis aplicado al kappa carragenano, por reacción con *(R,S)*- α -metilbencilamina.

El análisis del cromatograma dio origen a la Tabla 3.6. Se observó que la relación de áreas entre los diastereómeros provenientes de la 3,6-AnGal era cercana a 1, mientras que para la galactosa se observaba la selectividad informada previamente^{19,29}. Además se estableció que la relación de áreas 3,6-AnGal:Gal era mayor a 1, no coincidiendo con la estructura esperada para el κ -carragenano. Este hecho podría tener dos motivos: a) reacción incompleta de la galactosa, justificada por la estereoselectividad obtenida; b) la existencia de un factor cromatográfico.

Tabla 3.6 Rendimiento y composición molar del κ -carragenano derivatizado con α -metilbencilamina.

Polisacárido	Amina	Rend. ^a	Relación molar ^b			
			3,6- AnGal		Gal	
			D/(S) ^c	D/(R)=L/(S) ^d	D/(S)	D/(R)=L/(S) ^d
	MBA					
κ -Carragenano	Racémica	80	30	29	25	16
κ -Carragenano	(S)	74	52	-	44	4

^a Respuesta de los aminoalditales frente a *myo*-inositol=100.

^b Se encontraron trazas (< 2%) de 3,6-anhidrogalactitol y/o galactitol.

^c D/(S) implica el producto de condensación del azúcar D y la amina S.

^d D/(R)=L/(S), enantiómeros cromatográficamente equivalentes.

Una vez lograda la separación de los derivados del anhidroazúcar, se procedió a determinar a cual diastereómero correspondía cada uno de los picos. Para ello, se utilizó la amina de configuración (S) con el fin de generar selectivamente sólo los compuestos de configuración D/(S). Además se determinó el rendimiento de reacción utilizando inositol peracetilado como estándar interno. Los resultados obtenidos también se muestran en la Tabla 3.6. Los rendimientos de reacción determinados por comparación al inositol peracetilado agregado resultaron ser muy buenos. Además, solo se encontraron pequeñas cantidades (menores al 2 %) de azúcares sin reaccionar o reducidos a su correspondiente alditol. Esto se debió al riguroso seguimiento de las condiciones de reacción, especialmente las concernientes a la evaporación del ácido trifluoroacético. Cómo se demostrará luego, es necesario arrastrar el TFA con agua varias veces para evitar que puedan ocurrir reacciones laterales.

Como se esperaba para el κ -carragenano, al utilizar la amina quiral, se determinó que toda la 3,6-AnGal y la mayor parte de Gal pertenecían a la serie D, aún cuando se encontró una cantidad pequeña de L-galactosa. Su presencia en el κ -carragenano comercial aislado de *Kappaphycus alvarezii* coincide con los resultados informados por Estevez *et al.* sobre la existencia de híbridos D/L en esta especie^{32,33}.

Los tiempos relativos de los aminoalditales frente a inositol y los factores de separación entre los diastereómeros determinados por cromatografía gaseosa (columna Ultra-2 y programa E) figuran en la Tabla 3.7. Al igual que para la galactosa, el aminoalditol D/(S) formado con la 3,6-anhidro-D-galactosa fue, de los dos diastereómeros, el menos retenido.

Tabla 3.7 Tiempos de retención^a y factores de separación (*r*) para los 1-desoxi-1-(1'-feniletilamino)alditoles peracetilados.

Azúcar	<i>(R,S)</i> - α -metilbencilamina (programa E) ^b		
	D	L ^c	<i>r</i>
3,6-AnGal	2,708	2,732	1,009
Gal	3,439 ^d (3,094) ^e	3,464 (3,114)	1,007 (1,006)

^a Relativo a *myo*-inositol peracetilado (t_r = 15,51 min).

^b Ver Capítulo 7.

^c Determinado con el enantiómero D/*(R)*=L/*(S)*.

^d Se observó enantioselectividad.

^e Entre paréntesis figuran los valores obtenidos por Cases *et al.*^{19,29}.

La identidad de los compuestos fue comprobada al realizar cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masa (Figura 3.10) y utilizando estándares de galactosa derivatizada con MBA.

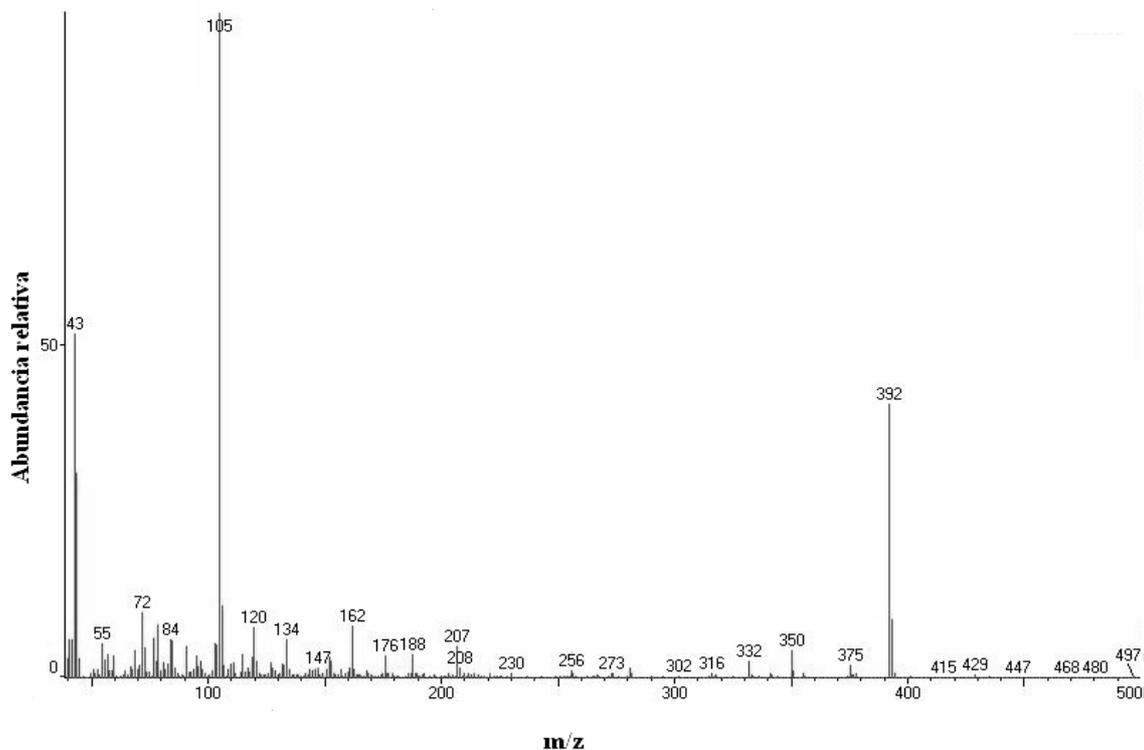


Figura 3.10 Espectro de masa del 3,6-anhidro-1-desoxi-1-(1'-feniletilamino)galactitol peracetilado.

Como se aprecia en la Figura 3.10, estos derivados peracetilados poseen un pico base común de m/z 105, correspondiente al ion tropylio metilado. El resto de los picos observados poseen una abundancia relativa mucho menor, salvo los correspondientes a la pérdida del radical acetilo desde el ion molecular. En los espectros de estos compuestos, independientemente de la identidad del azúcar, puede observarse sistemáticamente la pérdida de un radical acetilo (-43). Luego estos fragmentos dan lugar a otros mucho menos intensos que se generan por pérdida de ceteno y ácido acético. Es así, que la identificación del derivado de la 3,6-anhidrogalactosa se puede realizar con el pico de m/z 392 y el de la galactosa con el de m/z 494.

3.A.2.3.1 Caracterización por RMN del 3,6-anhidro-1-desoxi-1-(1'-feniletilamino)-galactitol

Posteriormente se realizó la reacción de derivatización entre la 3,6-anhidrogalactosa y la α -metilbencilamina (racémica) a mayor escala para aislar el producto y estudiarlo por RMN. El procedimiento realizado sobre 100 mg de κ -carragenano incluyó en la primer etapa las reacciones de hidrólisis con TFA 0,1 M y de aminación reductiva con MBA en las condiciones antes descriptas. Posteriormente el disacárido aminado se hidrolizó para generar galactosa y 3,6-anhidro-1-desoxi-1-(1'-feniletilamino)galactitol. Los compuestos finalmente fueron separados por una columna de intercambio iónico del tipo Amberlite-IR120.

En la Figura 3.11 se muestra el RMN de ^{13}C obtenido para el 3,6-anhidro-1-desoxi-1-(1'-feniletilamino)galactitol. La asignación de las señales fue realizada en base a los antecedentes²⁹ (Figura 3.12).

Como se observa en las figuras, algunas de las señales aparecen desdobladas debido a la existencia de los dos diastereómeros. Este efecto es especialmente importante en los átomos de carbono cercanos al nitrógeno.

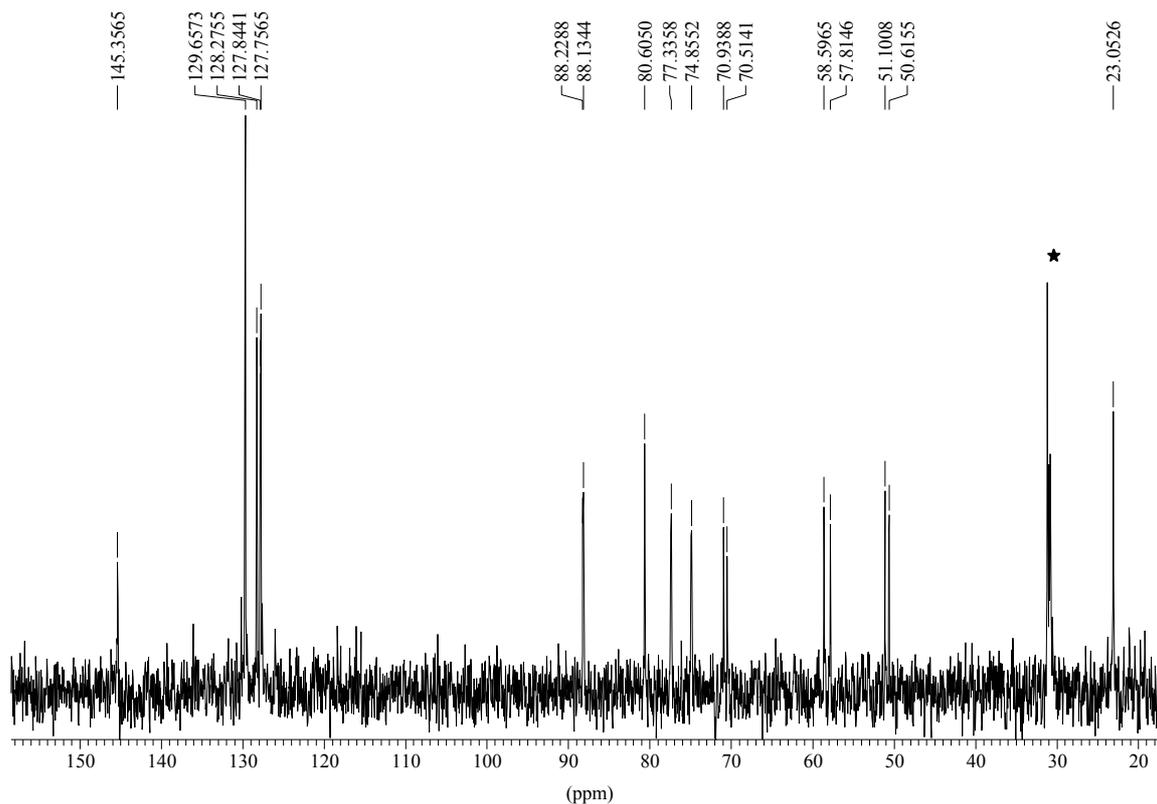


Figura 3.11 Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz) del 3,6-anhidro-1-desoxi-1-(1'-feniletilamino)galactitol generado con amina racémica. (★) Pico correspondiente a la acetona empleada como estándar interno.

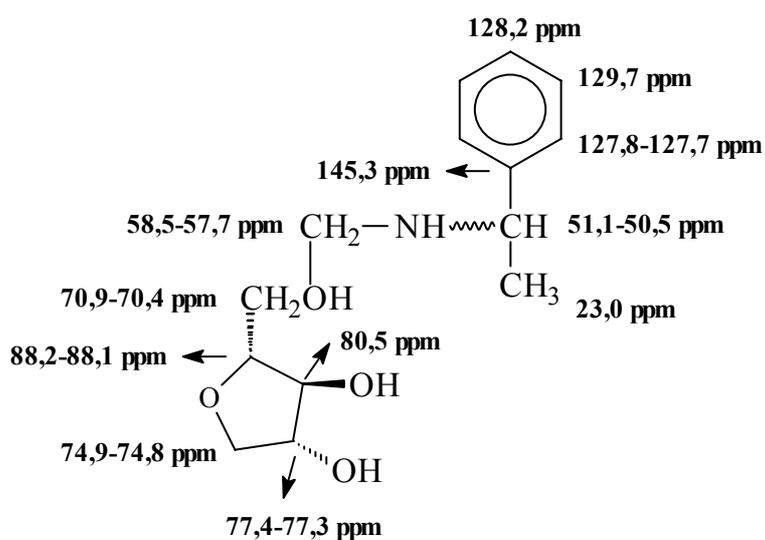


Figura 3.12 Asignación del espectro de RMN de ^{13}C de la mezcla de diastereómeros del 3,6-anhidro-1-desoxi-1-(1'-feniletilamino)galactitol.

3.A.2.4 Aplicación de la técnica de doble hidrólisis-doble aminación

Posteriormente, se decidió ampliar la utilización de la metodología a otros polisacáridos para verificar su funcionamiento y asegurar la identidad de los derivados formados con α -metilbencilamina.

La agarosa comercial ([3DG-4LAG]_n) se trató utilizando las reacciones de aminación tanto con amina racémica como quiral. Al utilizar esta última se pudo confirmar la correcta asignación de los diastereómeros de la 3,6-AnGal, correspondiendo el pico de mayor tiempo de elución al derivado de configuración L/(S) (Tabla 3.8). Los rendimientos de reacción obtenidos para la agarosa rondaron el 90%, lo que ratifica la robustez del sistema de reacciones. Estos rendimientos incluso superaron a los conseguidos al utilizar κ -carragenano.

Tabla 3.8 Resultados de la técnica de doble hidrólisis-doble aminación al aplicarse a diferentes polisacáridos de algas rojas.

Polisacárido	Amina	Rend. ^a	Relación molar ^b			
			3,6- AnGal		Gal	
			D/(S) ^c	D/(R)=L/(S) ^d	D/(S)	D/(R)=L/(S) ^d
ι -Carragenano	Racémica	88	28	28	25	19
Agarosa	Racémica	94	28	29	26	17
Agarosa	(S)	95	-	51	49	-

^a Respuesta de los aminoalditoles frente a *myo*-inositol=100.

^b Se encontraron trazas (< 2%) de 3,6-anhidrogalactitol + galactitol.

^c D/(S) implica el producto de condensación del azúcar D y la amina S.

^d D/(R)=L/(S), enantiómeros cromatográficamente equivalentes.

La técnica también fue aplicada sobre un ι -carragenano comercial ([3DG4S-4LAG2S]_n). Los resultados obtenidos fueron comparables a los logrados para el κ -carragenano, siendo los rendimientos de reacción también muy buenos (Tabla 3.8). Esto último es importante ya que implica que la hidrólisis de la 3,6-anhidro- α -galactosa 2-sulfato transcurre eficientemente en ácido trifluoroacético 0,1 M a 80 °C durante tres horas y de manera comparable a la 3,6-AnGal. Este resultado es diferente al observado en el proceso de “hidrólisis reductiva” original con MMB donde existe una marcada subcuantificación de este anhidroazúcar como consecuencia de una hidrólisis incompleta^{11,13,14}.

3.A.2.5 Variaciones en la técnica de doble hidrólisis-doble aminación

Con el objeto de verificar si era posible minimizar los tiempos y los costos en la determinación enantiomérica de la 3,6-anhidrogalactosa presente en los polisacáridos, se realizaron una serie de modificaciones sobre la técnica descrita en 3.A.2.1.2.

3.A.2.5.1 Reacción de doble hidrólisis-doble aminación sin evaporación de TFA

Uno de los pasos que demanda más tiempo es la rigurosa evaporación del ácido trifluoroacético que debe llevarse a cabo luego de las reacciones de hidrólisis y previo a las reacciones de aminación reductiva. Por lo tanto, se decidió ensayar la metodología evaporando el TFA, pero eliminando los arrastres posteriores con agua recomendados. Los análisis efectuados sobre el κ -carragenano comercial con MBA racémica, demostraron un aumento en la cantidad de alditoles generados en la reacción, con respecto a la técnica original. Mientras que en esta última la proporción de alditoles era menor a un 2%, con la modificación ésta pasó a valores cercanos al 5%. Esto se debe probablemente a que en presencia de ácido (en proporciones pequeñas) disminuye el pH de la solución, con lo que el NaCNBH_3 comienza a tener una acción reductora más importante sobre el grupo carbonilo de los aldehídos y cetonas²⁹.

3.A.2.5.2 Reacción de doble hidrólisis-doble aminación sin segundo agregado de MBA

En otra experiencia, para comprobar si era posible ahorrar parte del reactivo quiral, se decidió realizar la doble hidrólisis y doble aminación, sin agregar amina en la segunda etapa de aminación reductiva y así utilizar el excedente de la primer aminación. Si bien la relación diastereomérica de los productos fue similar a cuando se realizaban los dos agregados de la amina, la reacción producía cantidades cercanas al 12% de galactitol a expensas del aminoalditol. Esto se debe, nuevamente a la acción reductora del NaCNBH_3 sobre el C-1 del azúcar en condiciones de “menor exceso” de amina.

3.A.2.5.3 Reacción de doble hidrólisis-doble aminación combinada con MBA y AP

Con la intención de aprovechar la realización de dos reacciones de aminación se decidió ensayar el agregado de 1-amino-2-propanol en la segunda aminación con el objetivo de realizar determinaciones combinadas, es decir con MBA para 3,6-AnGal y con AP para los azúcares hidrolizados posteriormente con TFA 2M. Los resultados demostraron que la derivatización ocurría tanto con el excedente de MBA agregado en primera instancia, como con el AP agregado en la segunda. De esta manera se generó una mezcla compleja e inutilizable a los fines de las determinaciones analíticas.

3.A.2.5.4 Reacción de doble hidrólisis-aminación combinada con MBA y NaBH₄

La derivatización diferenciada para la segunda etapa que funcionó correctamente fue la reducción con NaBH₄. En esta experiencia se detectaron el 3,6-anhidro-1-desoxi-1-(1'-feniletilamino)-galactitol peracetilado y el resto de los azúcares como alditoles peracetilados. Fue interesante notar que no se detectaron otros aminoalditoles fuera del correspondiente a la 3,6-AnGal. Sin embargo, como hecho negativo se notó que la respuesta de ambos tipos de derivados con respecto al inositol peracetilado era marcadamente diferente, lo que impediría la cuantificación de todos los derivados simultáneamente, salvo que se efectúe una calibración previa.

3.A.2.6 Determinación configuracional de la 3,6-anhidro-2-O-metil-galactosa

La configuración de la 3,6-anhidro-2-O-metil-galactosa no fue históricamente determinada por falta de técnicas apropiadas, salvo en los pocos casos en que los polisacáridos poseían altas proporciones de ese azúcar y podían ser detectadas por RMN²³. Algunas técnicas utilizadas para la 3,6-AnGal se han aplicado para su derivado metilado en C-2, aunque han fallado en la separación de los diastereómeros³⁴.

Por lo tanto, el paso lógico para este trabajo de Tesis fue aplicar la metodología descrita previamente (sección 3.A.2.1) a un polisacárido rico en 3,6-anhidro-2-O-metil-galactosa.

Para tener un producto rico en 2-*O*-Me-3,6-AnGal, se decidió metilar un κ -carragenano, ya que idealmente se espera que sus unidades monosacáridicas se conviertan a 2-*O*-Me-3,6-An-D-Gal y 2,6-di-*O*-Me-D-Gal (Figura 3.13).

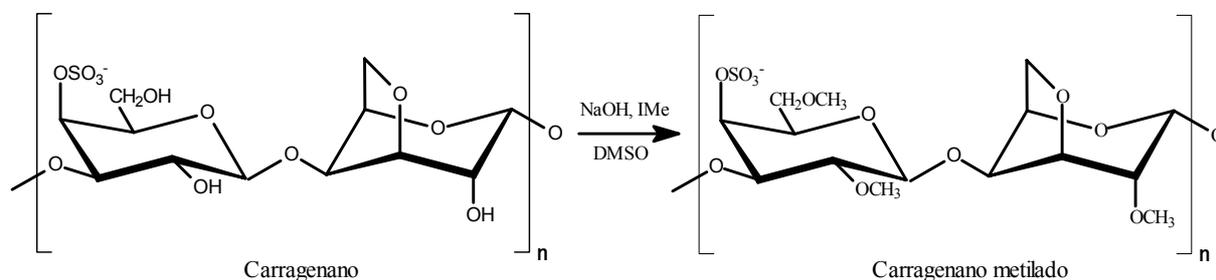


Figura 3.13 Metilación del κ -carragenano.

Al aplicar al κ -carragenano metilado la técnica de “doble hidrólisis-doble aminación” descrita en 3.A.2, se observó que los diastereómeros peracetilados formados entre la 3,6-anhidro-2-*O*-metil-galactosa y MBA racémica eran separables por cromatografía gaseosa, mientras que los formados con AP no lograban separarse, al igual que ocurría con la propia 3,6-AnGal. Además, en el mismo cromatograma se observó, como fuera informado con anterioridad en dos trabajos distintos, la excelente separación de los diastereómeros de la 2,6-*O*-metilgalactosa²⁸ y la 2-*O*-metilgalactosa¹⁹ (ésta última en pequeñas cantidades), generados en la metilación del carragenano. La relación de áreas determinada para los derivados de la 3,6-anhidro-2-*O*-metilgalactosa separados tuvo, en todos los casos, un valor de 1 como era de esperar. Por lo tanto, cuantificando cada diastereómero es posible determinar la proporción de enantiómeros en la muestra original.

Posteriormente se aplicó la misma técnica con el reactivo quiral [(*S*)- α -metilbencilamina] para asignar la configuración de cada uno de los diastereómeros. En la Tabla 3.9 se muestran los tiempos de retención relativos a inositol, para ambos derivados.

Tabla 3.9 Tiempos de retención^a y factores de separación (*r*) para los aminoalditales acetilados.

Azúcar	<i>(S)</i> - α -metilbencilamina ^a			<i>(S)</i> -1-amino-2-propanol ^b			
	D	L	<i>r</i>	D	L	<i>r</i>	
3,6-AnGal	2,708	2,732	1,009	—	1,840	—	1
3,6-An-2- <i>O</i> -Me-Gal	2,322	2,278	1,020	—	1,601	—	1
Gal	3,439	3,464	1,007	2,505	2,520	1,006	

^a Relativo a *myo*-inositol peracetilado (*tr* = 15,51 min).

^b Programa E, ^c Programa D (ver Materiales y métodos).

La caracterización de los derivados peracetilados fue realizada mediante la utilización de cromatografía gaseosa acoplada a un espectrómetro de masa. El 3,6-anhidro-1-desoxi-1-(1'-feniletilamino)-2-*O*-metilgalactitol (Figura 3.14) se identificó, como se explicó anteriormente utilizando el pico diagnóstico de $[M-43]^+$ (*m/z* 364).

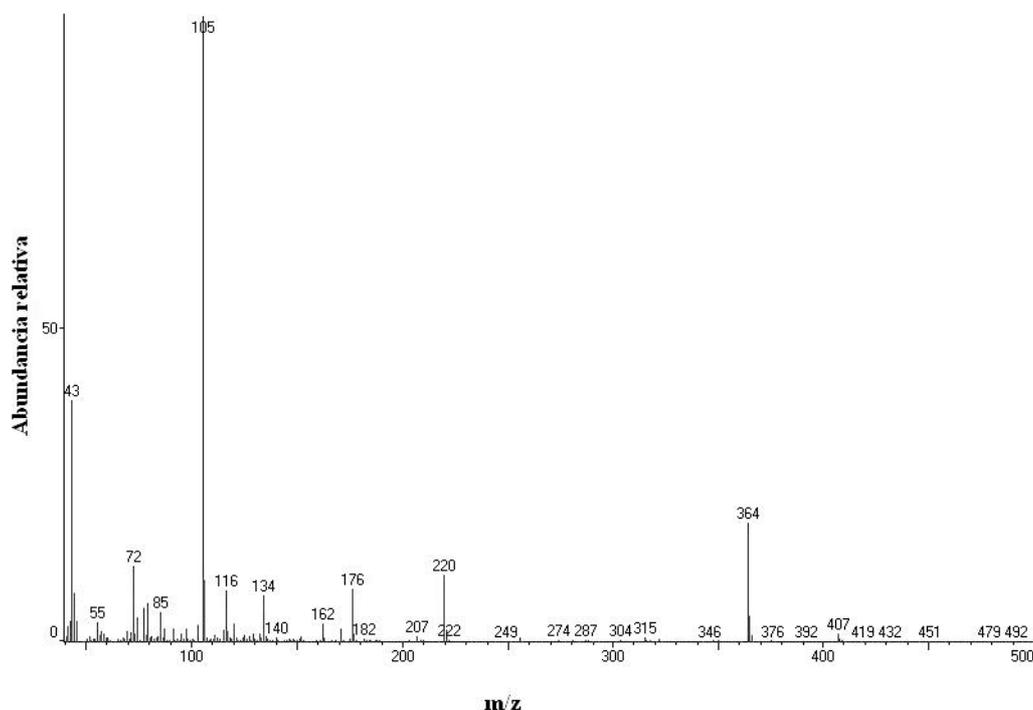


Figura 3.14 Espectro de masa (IE) del 3,6-anhidro-1-desoxi-1-(1'-feniletilamino)-2-*O*-metilgalactitol acetilado.

El espectro de masa obtenido para el 3,6-anhidro-1-desoxi-1-(2'-hidroxipropilamino)-2-*O*-metilgalactitol se observa en la Figura 3.15. Los caminos de fragmentación especificados para la 3,6-AnGal sirvieron para justificar las rupturas de su derivado metilado en C-2, incluida la vía originada por pérdida del radical acetato (Figura 3.16).

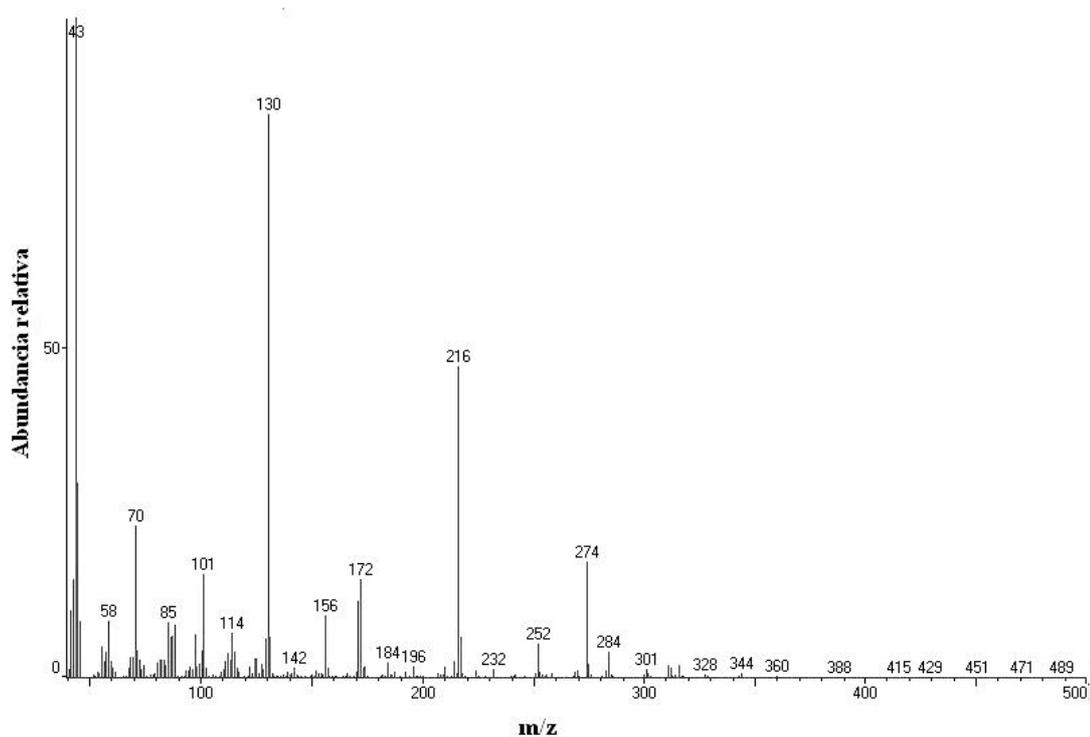


Figura 3.15 Espectro de masa (IE) del 3,6-anhidro-1-desoxi-1-(2'-hidroxipropilamino)-2-*O*-metilgalactitol acetilado.

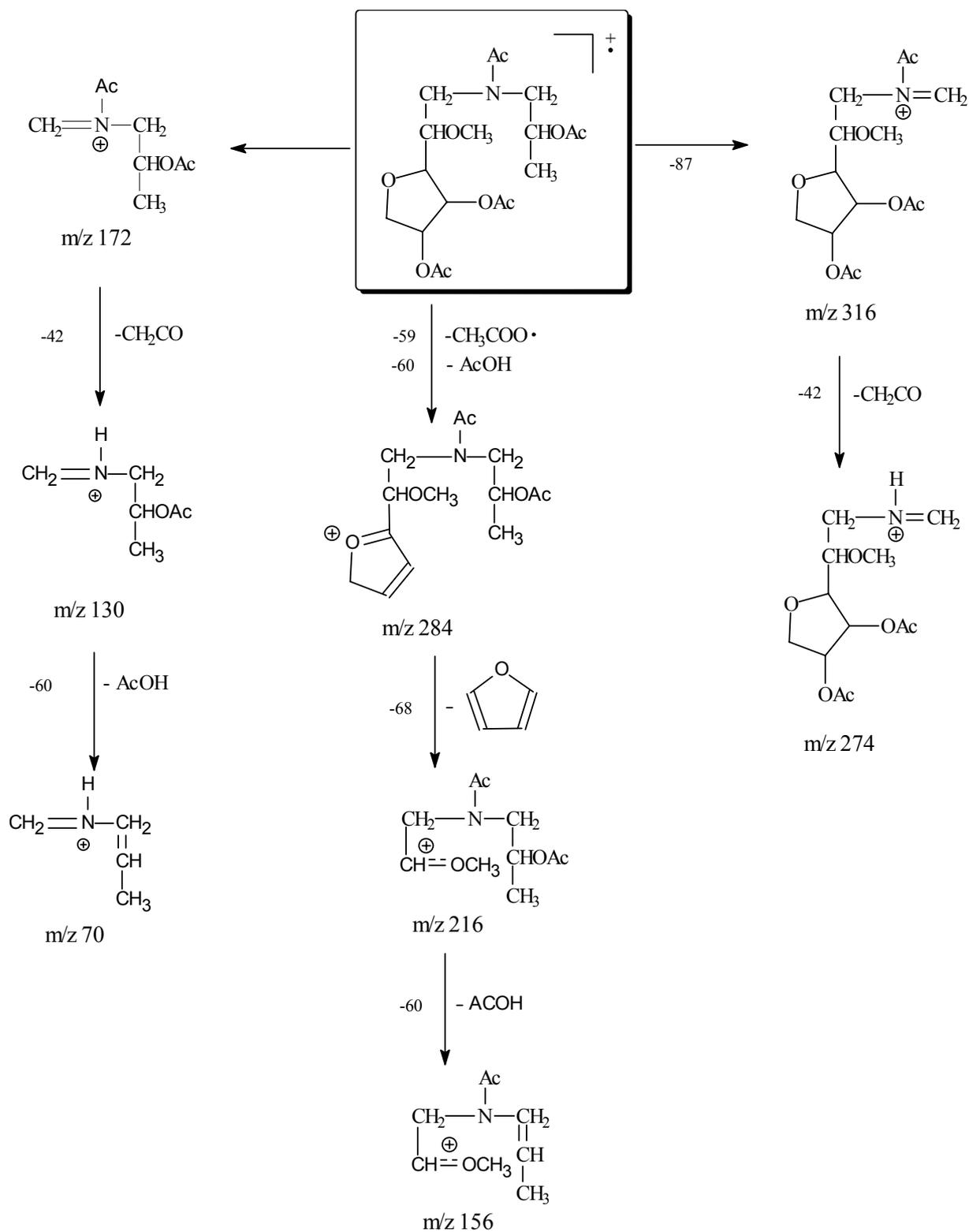


Figura 3.16 Fragmentaciones principales del espectro de masa del 3,6-anhidro-1-desoxi-1-(2'-hidroxipropilamino)-2-O-metilgalactitol acetilado.

Complementariamente, se obtuvieron los espectros de masa de los derivados de la 2-*O*-metilgalactosa con MBA y AP, los cuales no habían sido informados previamente. El espectro obtenido con MBA mostró nuevamente la utilidad del $[M-43]^+$ como pico diagnóstico para este tipo de derivados.

El espectro obtenido para el 1-desoxi-1-(2'-hidroxipropilamino)-2-*O*-metilgalactitol acetilado se presenta en la Figura 3.17 y el detalle de la ruta de generación de los fragmentos de masa se puede observar en la Figura 3.18.

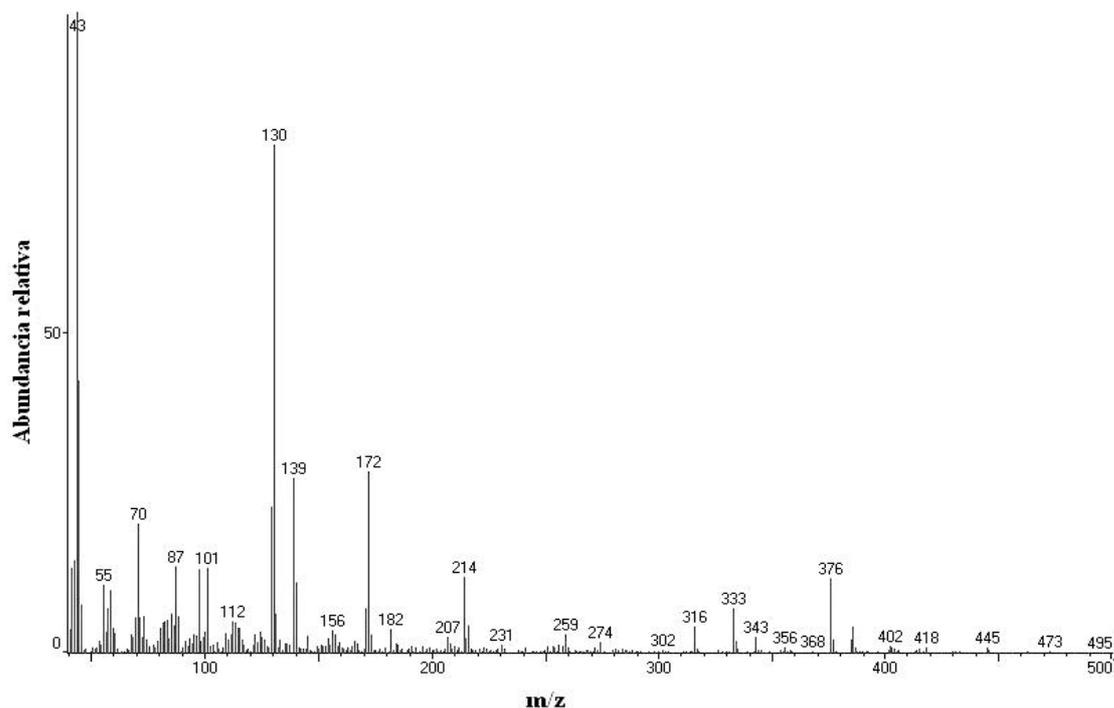


Figura 3.17 Espectro de masa (IE) del 1-desoxi-1-(2'-hidroxipropilamino)-2-*O*-metilgalactitol acetilado.

El espectro del derivado formado entre la 2-*O*-metilgalactosa y el 1-amino-2-propanol es similar a los obtenidos para los diastereómeros de la galactosa con la misma amina. Sin embargo, se puede observar un fragmento que surge de la pérdida de 172 unidades de masa (Figura 3.18) que no se encontraba en los anteriores espectros. Hasta el momento siempre se había observado que la ruptura de la unión de los carbonos 1 y 2 del azúcar generaba el fragmento cargado con m/z 172 y el radical complementario. Pero en el caso de la 2-*O*-metilgalactosa la carga puede ser soportada por los dos fragmentos (172 y 333), ya que el radical metoxilado estabiliza la carga sobre su oxígeno mucho más eficientemente que el acetoxilo (Figura 3.18).

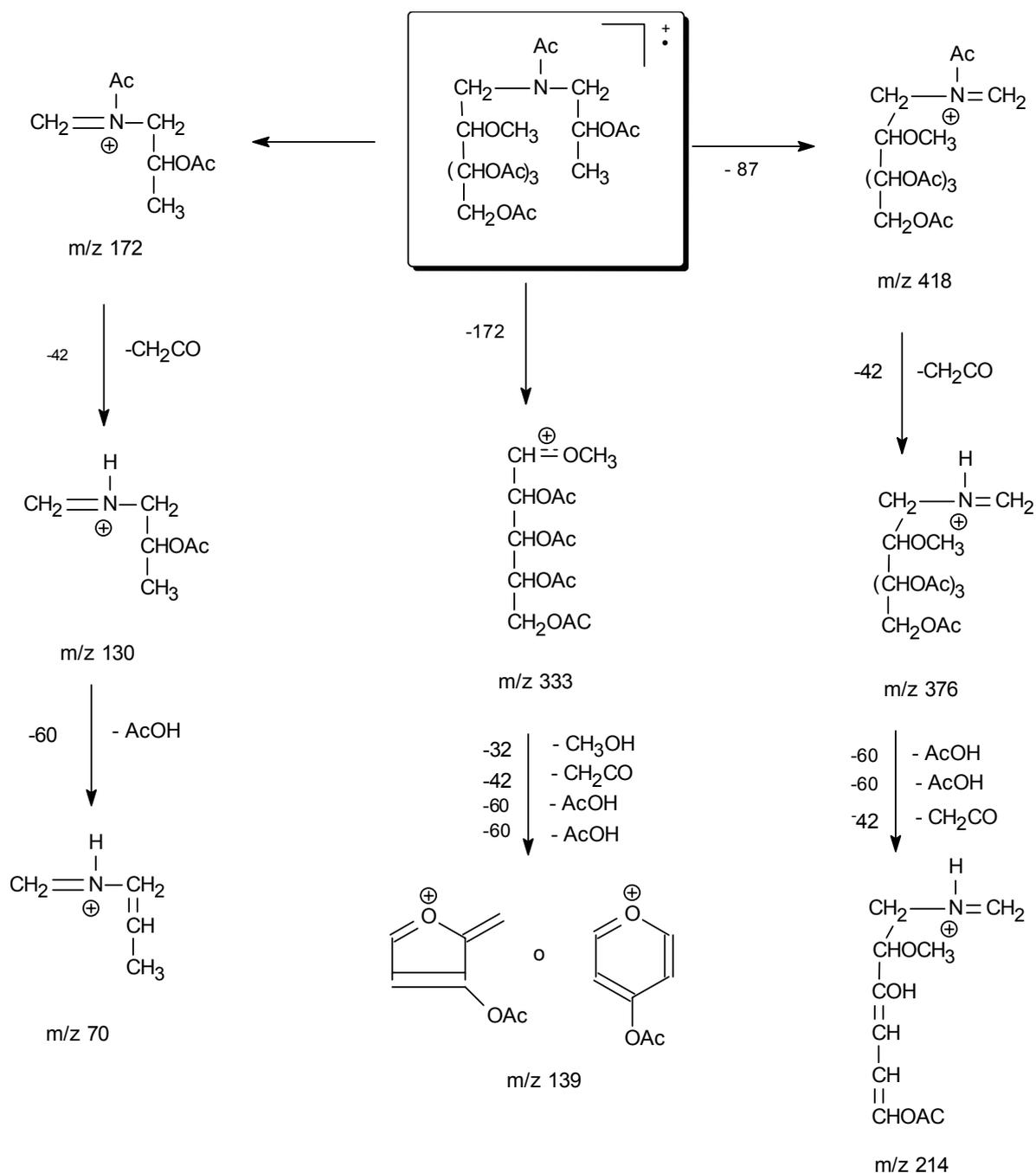


Figura 3.18 Fragmentaciones principales del espectro de masa del 1-desoxi-1-(2'-hidroxipropilamino)-2-O-metilgalactitol acetilado.

3.A.2.7 Determinación de la configuración de la α -galactosa 6-sulfato

Como se explicó en la parte introductoria, las unidades de α -galactosa 6-sulfato enlazadas por la posición 4 presentes en los polisacáridos de algas rojas, sufren en medio alcalino una reacción de ciclación intramolecular del tipo S_N2 que genera 3,6-anhidrogalactosa (Figura 3.19). Esa reacción también ocurre en el alga por acción enzimática, por lo que la 4LG6S es precursor biosintético de la 4AG³⁵. Por lo tanto, determinando la cantidad de 3,6-AnGal presente en el polisacárido antes y después de ser sometido al tratamiento alcalino, es posible cuantificar por diferencia la cantidad de α -galactosa sulfatada en C-6^{5,35,36}. Sin embargo, nunca existieron intentos de determinar la configuración de esa unidad.

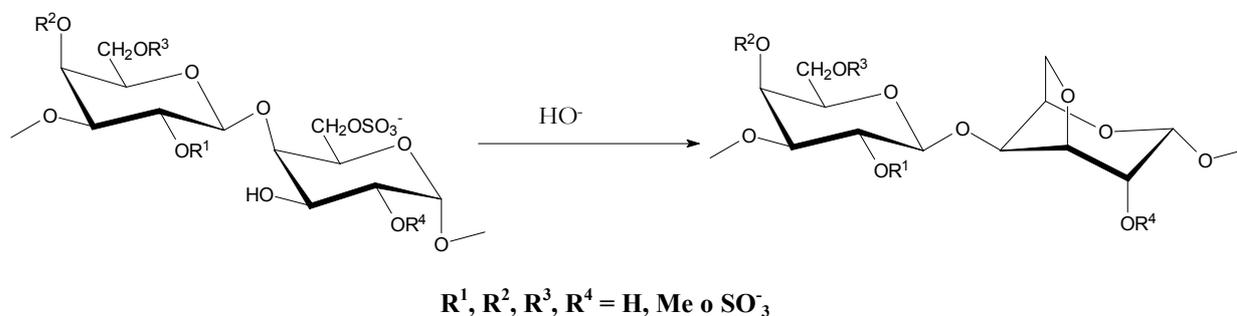


Figura 3.19 Tratamiento alcalino de un carragenano.

En este trabajo, siguiendo la misma línea de razonamiento anterior, se decidió determinar la configuración de α -galactosa 6-sulfato analizando la 3,6-anhidrogalactosa presente en el polisacárido original y en el tratado en medio alcalino con la técnica de doble hidrólisis-doble aminación con MBA.

Los polisacáridos elegidos como modelos fueron un agarano sulfatado aislado del alga *Porphyra columbina* (porfirano)³⁷ y los carragenanos λ y μ/v parcialmente ciclado, aislados del alga *Iridaea undulosa* en sus fases tetraspórica y cistocárpica, respectivamente.

El alga *Porphyra columbina* se extrajo con agua a temperatura ambiente durante 24 h. El porfirano se aisló por precipitación con 3,5 vol. de isopropanol con un rendimiento del 47%. El λ -carragenano se obtuvo por fraccionamiento con KCl de un extracto crudo de polisacáridos aislado de ejemplares tetraspóricos de *Iridaea undulosa* con agua a temperatura ambiente. El rendimiento fue del 70% respecto del extracto crudo. El carragenano μ/v parcialmente ciclado fue aislado de la fase cistocárpica del alga *Iridaea undulosa* por el Dr.

Stortz^{36,38}. Todos estos galactanos fueron seleccionados ya que en estudios previos se había informado que los mismos poseían altas cantidades de α -galactosa 6-sulfato^{36,38}.

En primera instancia, se buscó que el análisis sea rápido y sencillo. Para ello se planeó una secuencia de reacciones que evitara el aislamiento del polisacárido tratado en medio alcalino por diálisis y liofilización como se realiza tradicionalmente. La alternativa diseñada fue la de neutralizar el medio de reacción con ácido trifluoroacético, y luego evaporar todo el solvente para aplicar las reacciones de hidrólisis y aminación reductiva sobre el polisacárido tratado. De esta manera, si la presencia de trifluoroacetato de sodio residual no interfería con la reacción, se podría utilizar un sistema del tipo “one-pot” que evitaría el aislamiento del polisacárido tratado. La elección del ácido trifluoroacético para neutralizar estuvo relacionada con su volatilidad y con el hecho que luego se utiliza en las reacciones de hidrólisis.

3.A.2.7.1 Estudio de la reacción de tratamiento alcalino y posterior formación de los alditoles peracetilados en un sistema del tipo “one-pot”

Antes de aplicar la técnica de aminación reductiva, se decidió evaluar si los resultados del tratamiento alcalino obtenidos en un sistema “one-pot” eran comparables a los conseguidos para el polisacárido tratado en medio alcalino y luego aislado por diálisis y liofilización (sistema tradicional). La experiencia se realizó sobre el porfirano (**P**) con la técnica de derivatización conocida como la de hidrólisis reductiva que genera los alditoles peracetilados de los azúcares componentes.

Como la secuencia “one-pot” tiene un objetivo puramente analítico, se realizó el tratamiento alcalino utilizando sólo 1 ó 2 mg de polisacárido y 0,3 ml de NaOH 1 M (ver detalles en Materiales y métodos). El tiempo de reacción utilizado para garantizar que toda la α -galactosa 6-sulfato presente en el polisacárido se convierta en 3,6-anhidrogalactosa fue de 3 a 5 h, considerando los informes previos sobre la vida media de reacción ($t_{1/2} = 23$ min)³⁷ (ver Capítulo 4).

Luego del tratamiento, el medio se acidificó con ácido trifluoroacético y se evaporó el solvente para, finalmente generar los alditoles peracetilados por medio de la reacción de hidrólisis reductiva. Paralelamente se utilizó la metodología clásica aislando el porfirano

tratado por diálisis y liofilización, para luego generar los alditoles peracetilados³⁷.

Los azúcares componentes determinados para el porfirano y el porfirano tratado se pueden observar en la Tabla 3.10.

Tabla 3.10 Composición del porfirano y el porfirano tratado.

Polisacárido	Relación molar (%)		
	3,6-AnGal	Gal	6-O-Me-Gal
Porfirano (P)	11	54	35
Porfirano tratado/ aislado	46	17	37
Porfirano tratado/ "one-pot"	48	21	31

Se determinó, en coincidencia con los resultados informados en bibliografía³⁷, que el porfirano era un polisacárido rico en galactosa y 6-O-metilgalactosa y que sólo poseía un 11% de 3,6-anhidrogalactosa. En cambio, la proporción determinada de 3,6-AnGal en el polisacárido tratado ascendió hasta cerca del 48%. Esta diferencia en las cantidades de anhidro azúcar registrada entre los dos polisacáridos indica que el producto original contiene entre un 35 y 37% de α -galactosa 6-sulfato capaz de ciclarse.

Los resultados analíticos obtenidos para los polisacáridos no indican mayores diferencias, aunque llama la atención la disminución de la 6-O-metilgalactosa en el procedimiento "one-pot", que podría provenir por pérdida de fragmentos con bajo contenido de 6-O-Me-Gal por diálisis.

Dados los resultados obtenidos, se concluye que se puede utilizar el procedimiento "one-pot" con pequeñas cantidades de polisacárido como método analítico, aunque seguramente en los casos en que se quieran obtener grandes cantidades del polisacárido tratado será necesario utilizar la diálisis como método de purificación.

3.A.2.7.2 Determinación de la configuración de la α -galactosa 6-sulfato en un sistema del tipo “one-pot”

Al comprobar que la secuencia de reacciones “one-pot” funcionaba adecuadamente se procedió a intentar formar los 1-amino-1-desoxi-alditales de los monosacáridos componentes de los polisacáridos con (*S*)-MBA para determinar la configuración de la α -galactosa 6-sulfato.

Los resultados de la aplicación se muestran en la Tabla 3.11 junto a las otras determinaciones analíticas necesarias para sacar las conclusiones estructurales.

Tabla 3.11 Análisis de los azúcares componentes del porfirano y del porfirano tratado en medio alcalino.

Polisacárido, método	Relación molar (%)				
	3,6-AnGal		Gal		6-O-Me-Gal
	D	L	D	L	D
Porfirano nativo (P)					
Hidrólisis reductiva, MMB	—	11	—	54	35
Hidrólisis total, amin. red. AP		ND	23	41	36
Doble hidrólisis, amin. red. AP	—	10	—	19	37
Doble hidrólisis, amin. red. MBA	—	8	25	30	37
Conclusión	—	11	19	35	35
Porfirano tratado con NaOH					
One-pot, hidrólisis red. MMB	—	48	—	21	31
One-pot, hidrólisis total, amin. red. AP		ND	44	2	54
One-pot, doble hidrólisis, amin. red. MBA	4	48	15	2	31
Conclusión	3	45	19	2	31

La proporción de cada azúcar se determinó analizando los alditales peracetilados generados por la técnica de hidrólisis reductiva, mientras que los enantiómeros de cada azúcar fueron cuantificados analizando los correspondientes aminodesoxialditales. La complementación de todas las metodologías aplicadas sobre el porfirano original y el tratado

permitieron deducir sus composiciones. El análisis del producto original muestra un agarano compuesto por un 11% de 3,6-anhidro-L-galactosa, un 35% de 6-O-metil-D-galactosa y un 54% de galactosa. Estos resultados fueron coincidentes con los obtenidos en estudios anteriores, que describen al porfirano como un agarano compuesto por β -D-galactosa, 6-O-metil- β -D-galactosa, α -L-galactosa 6-sulfato y 3,6-anhidro- α -L-galactosa^{37,39,40}.

La principal diferencia encontrada entre el polisacárido aislado en este trabajo y el informado en bibliografía es que la cantidad de 3,6-AnGal es aproximadamente la mitad que la informada en los porfiranos aislados por otros autores.

Al analizar la relación entre las unidades D y L se aprecia un desvío con respecto a los resultados esperados para un agarano, ya que existe un pequeño exceso de unidades D (relación D/L 1,17). En general, estos desvíos suelen ser justificados en base a errores analíticos y no son considerados para sacar conclusiones estructurales.

En el porfirano tratado se detectó la presencia de casi un 35% más de 3,6-AnGal que en el producto original. Esta diferencia es la consecuencia del proceso de ciclación con álcali de las unidades de α -galactosa 6-sulfato enlazadas por la posición 4 presentes en el producto original. Del análisis configuracional se determinó como se esperaba, que la mayor parte de estas unidades pertenecían a la serie L, aunque también se detectó la formación de una pequeña cantidad de 3,6-anhidro-D-galactosa. Este resultado sorprendente indicaba que el polisacárido original contenía una pequeña cantidad de α -D-galactosa 6-sulfato, permitiendo así explicar porqué en el porfirano existía un pequeño exceso de unidades D, que anteriormente pudo ser atribuido a un error experimental.

La existencia de unidades del tipo α -D-galactosa 6-sulfato demuestra la convivencia en el polisacárido del alga *Porphyra columbina* de pequeñas cantidades de unidades del tipo carragenano con las principales del tipo agarano. De esta manera, la estructura puede ser clasificada como del tipo híbrido D/L con clara preeminencia del agarano. Estos resultados no son extraños ya que si bien los híbridos fueron originalmente encontrados en algas carragenófitas, posteriormente (cuando las técnicas de análisis se volvieron más eficientes) también fueron encontrados en algunas algas agarófitas como *Grateloupia indica* y *Digenea simplex*^{26,41}.

La presencia de 4DAG en el polisacárido tratado y su ausencia en el original puede estar sugiriendo además que la enzima que cicla la α -D-galactosa 6-sulfato no estaría presente en el alga, mientras que las que ciclan las unidades L sí lo están.

En la Tabla 3.11, además se incluyeron los resultados obtenidos de aplicar sobre el porfirano la técnica de doble hidrólisis y doble aminación reductiva con 1-amino-2-propanol para demostrar la coincidencia de los resultados con los obtenidos con los alditoles peracetilados. Se observa que aún cuando no se resuelven los derivados formados con 3,6-anhidrogalactosa, la metodología puede utilizarse para determinar la configuración de otros azúcares y cuantificarlos simultáneamente a todos.

El conjunto de los resultados demuestran que es posible determinar la configuración de la α -galactosa 6-sulfato aplicando la técnica de doble hidrólisis-doble aminación con α -metilbencilamina, en una secuencia de reacciones “one-pot”, sobre un polisacárido tratado en medio alcalino y sobre el producto original.

Las condiciones de reacción informadas en 3.A.2.2 fueron modificadas a los fines prácticos para minimizar los posibles efectos adversos de las sales originadas en el tratamiento alcalino y posterior neutralización (trifluoroacetato de sodio). Por lo tanto, luego de realizar el tratamiento alcalino y posterior neutralización, se sugiere la utilización de una resina de intercambio iónico catiónica fuerte del tipo Amberlite 120 para intercambiar los iones sodio por protones.

3.A.2.8 Aplicación de la técnica de determinación configuracional de la α -galactosa 6-sulfato a otros polisacáridos

La secuencia de reacciones para determinar la configuración de la α -galactosa sulfatada en C-6 también fue aplicada a los polisacáridos provenientes del alga *Iridaea undulosa* aislados por Stortz *et al.*^{36,38}. Por un lado se utilizaron los carragenanos μ/ν parcialmente ciclados (familia de los κ -carragenanos) provenientes del alga en su fase cistocárpica (fracción C) y por otro, el λ -carragenano aislado del alga tetraspórica (fracción T₁).

Los análisis previos (realizados por RMN y determinaciones químicas) de las dos fracciones mayoritarias obtenidas de la fase cistocárpica mostraron una mezcla de carragenanos³⁸ de la familia κ (pág. 5). El análisis indicó la presencia de díadas del tipo $\kappa/\iota/\mu/\nu$ con una relación cercana a 55:20:5:20. Posteriormente, fue informada la detección de pequeñas cantidades de L-galactosa en los productos obtenidos por tratamiento alcalino de la fracción C⁴².

Al analizar el polisacárido **C** (en concordancia con los datos obtenidos anteriormente por RMN³⁸) se observó que contenía un 37% de 3,6-AnGal (Tabla 3.12). El dato permite deducir que el carragenano está formado por un 74% de díadas del tipo κ/ι : 3DG4S-4DAG y 3DG4S-4DAG2S.

Tabla 3.12 Análisis de los azúcares componentes del carragenano **C** y su producto tratado en medio alcalino.

Polisacárido/ método	Relación molar (%)			
	3,6-AnGal		Gal	
	D	L	D	L
C nativo				
Hidrólisis reductiva, MMB ^a	—	37	—	63
Doble hidrólisis, amin. red. MBA	35	—	64	1
Conclusión	37	—	62	1
C tratado con NaOH				
One-pot, hidrólisis red. MMB	—	52	—	48
One-pot, doble hidrólisis, amin. red. MBA	49	—	50	1
Conclusión	52	—	47	1

En el análisis de **C** tratado en medio alcalino se determinó que la proporción de 3,6-AnGal ascendía a un 50%. En consecuencia, se puede deducir que el producto original contenía un 13% de α -D-galactosa 6-sulfato, la cual está formando parte de las díadas tipo μ/ν (3DG4S-4DG6S y DG4S-4DG2,6S), las que representan el 26% del producto

Al aplicar la técnica de doble hidrólisis-doble aminación con MBA sobre el polisacárido **C** tratado con NaOH durante 3 h, se observó que toda la α -galactosa 6-sulfato ciclada pertenecía a la serie D. En consecuencia, se pudo concluir que la L-galactosa presente en el polisacárido original no era precursor químico de la 3,6-AnGal.

El carragenano **T₁** aislado del alga en su fase tetraspórica mostró una estructura típica de λ -carragenano (Tabla 3.13), donde prácticamente no se observa la presencia de 3,6-anhidrogalactosa. Este resultado fue similar al encontrado anteriormente por métodos colorimétricos y espectroscópicos³⁸.

Tabla 3.13 Análisis de los azúcares componentes del carragenano **T₁** y su producto tratado en medio alcalino.

Polisacárido/ método	Relación molar (%)			
	3,6-AnGal		Gal	
	D	L	D	L
T₁ nativo				
Hidrólisis reductiva, MMB	—	1	—	99
Doble hidrólisis, amin. red. MBA	1	—	99	—
Conclusión	1	—	99	—
T₁ tratado con NaOH				
One-pot, hidrólisis red. MMB	—	49	—	51
One-pot, doble hidrólisis, amin. red. MBA	49	—	51	—
Conclusión	49	—	51	—

El polisacárido fue tratado con álcali durante 16 h ya que en este tipo de compuestos la cinética de ciclación es muy lenta (ver Capítulo 4). El resultado, como se esperaba, fue la formación de un 50% de 3,6-anhidro-D-galactosa a partir de la ciclación de la α -D-galactosa 6-sulfato presente en el polisacárido original. Estos datos fueron concordantes con la estructura originalmente determinada por espectroscopía de RMN de ^{13}C y por estudios de metilación³⁸. En el espectro de RMN- ^{13}C se informó la presencia de 12 señales, las cuales fueron asignadas a la díada “ideal” de un λ -carragenano: 3DGS-4DG2,6S³⁸.

El análisis configuracional de los monosacáridos que forman el carragenano λ tratado mostró que todas las unidades pertenecían a la serie D. Cabe acotar que en un estudio anterior sobre otra fracción del carragenano tetraspórico (**T₃**) se encontraron cantidades sustanciales de L-galactosa⁴³.

3.A.3 Conclusiones

En esta sección del trabajo se presentó el desarrollo de la técnica de “doble hidrólisis-doble aminación reductiva” con α -metilbencilamina, para la determinación de la configuración de la 3,6-anhidrogalactosa, su derivado metilado en C-2 y para la α -L-galactosa 6-sulfato por cromatografía gaseosa.

La aplicación sobre la 3,6-An-2-O-Me-Gal resultó especialmente original ya que, la configuración absoluta de ésta era hasta el momento sólo determinada ocasionalmente por RMN.

La técnica para la determinación de la configuración absoluta de la α -L-galactosa 6-sulfato involucró además el desarrollo de un sistema del tipo “one pot” para la realización del tratamiento alcalino. El mismo fue aplicado además para la cuantificación de la galactosa sulfatada empleando los respectivos alditoles peracetilados. Esta técnica también es especialmente novedosa.

El análisis de la configuración de la 4G6S presente en el porfirano determinó que ésta pertenecía a las dos series, aunque la mayoritaria era de la serie L. La presencia de 4DAG en el polisacárido tratado con NaOH y no en el original es muy importante desde el punto de vista biosintético ya que sugiere que en el alga sólo pueden ciclarse las unidades 4G6S de configuración L. Este tipo de conjeturas sobre la biosíntesis recién se hizo posible con la determinación analítica presentada en este trabajo.

SECCION 3B

Evaluación de la α -picolina borano como reductor en reacciones de aminación reductiva

3.B.1 Introducción

La reacción de aminación reductiva, ampliamente utilizada en síntesis orgánica, permite la conversión de la funcionalidad carbonilo en amina. La reacción se inicia con la formación de una imina (normalmente desfavorecida) a partir del acoplamiento de un compuesto carbonílico y una amina primaria o secundaria, la cual posteriormente es reducida para generar aminas secundarias o terciarias (Figura 3.20)^{30,44}.

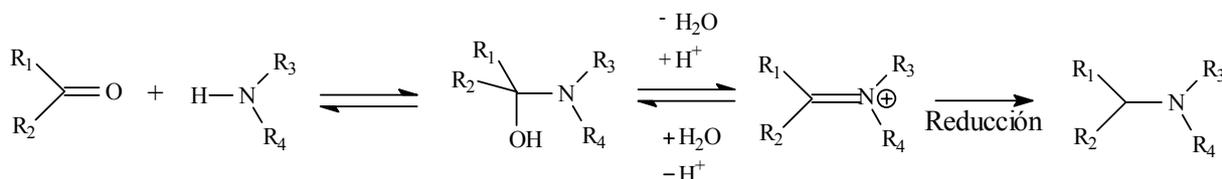


Figura 3.20 Reacción de aminación reductiva.

La reacción se puede llevar a cabo de forma directa en un sistema “one-pot”, donde la formación de la imina y su reducción transcurren en una única etapa operacional, o en forma indirecta, donde la formación de la imina y su reducción se realizan en dos etapas separadas.

La elección de los agentes reductores en este tipo de reacciones es crítica, ya que éstos deben reducir selectivamente la imina sin afectar a los aldehídos y cetonas u otros grupos pasibles de reducción que se presenten en la molécula. Con el transcurso del tiempo, se ha desarrollado un importante número de agentes reductores, aunque muchos presentan propiedades no deseadas, en términos de selectividad, reacciones secundarias, condiciones de reacción y toxicidad.

Entre los métodos más utilizados para realizar las reducciones de iminas, especialmente en las reacciones a gran escala, se encuentran las hidrogenaciones catalíticas realizadas con paladio, platino y níquel como catalizadores⁴⁵. Si bien la reacción es eficiente, se encuentran limitadas a los casos en que la molécula no posea dobles enlaces u otros grupos reducibles como nitro y ciano.

Otros reactivos ampliamente utilizados como reductores son aquellos conformados por hidruros. Entre estos compuestos, se encuentra el cianoborohidruro de sodio (NaBH_3CN), que es el reactivo más utilizado para llevar a cabo las reacciones de aminación reductiva en el laboratorio⁴⁷. Entre sus cualidades se encuentra su alta selectividad, estabilidad en medios ácidos hasta pH 2 y solubilidad en muchos de los solventes utilizados en las reacciones de aminación³⁰. De acuerdo a la literatura el cianoborohidruro de sodio puede utilizarse a pH 3 ó 4 para reducir aldehídos y cetonas, y a pH mayores de 6 para reducir selectivamente las iminas formadas (es decir, sin reducir carbonilos). Además, la versatilidad del reactivo ha permitido que las iminas puedan ser reducidas selectivamente³⁰ a pH tan altos como 10 o tan bajos como 4. Por ejemplo, Cases *et al.*²⁹ encontraron que el pH óptimo de la reacción para la aminación reductiva entre galactosa y 1-amino-2-propanol era 4. Las reacciones son generalmente realizadas utilizando un exceso de amina sobre el compuesto carbonílico para favorecer la formación de la imina⁶ y evitar que las posibles nuevas aminas secundarias formadas (posiblemente más nucleofílicas) reaccionen a su vez con otra molécula de compuesto carbonílico.

Sin embargo, el NaBH_3CN es un reactivo que genera productos de alta toxicidad como ácido cianhídrico o cianuro de sodio, tanto durante el transcurso de la reacción como en el “work-up” de las muestras. Claramente, cuando se trabaja a grandes o medianas escalas, el NaBH_3CN no es recomendable y menos aún en el contexto actual de la “química verde”, en consecuencia a menudo se busca reemplazarlo por otros reductores igualmente selectivos pero menos tóxicos. La búsqueda casi permanente de reactivos alternativos, permitió desarrollar un importante número de agentes reductores, como por ejemplo, triacetoxiborohidruro de sodio ($\text{NaBH}_3(\text{OAc})$)⁴⁷, piridina borano (Pyr-BH_3)^{48,49}, resina de intercambio-borohidruro, Zn/AcOH , $\text{Bu}_3\text{SnH}/\text{SiO}_2$ y $\text{PhSiH}_4/\text{BuSnCl}_2$, entre otros⁴⁴.

Entre los diferentes reductores desarrollados, el triacetoxiborohidruro de sodio ha sido de los más utilizados, especialmente en reacciones realizadas en medios no acuosos como el diclorometano. Dado que los grupos acetoxilo son fuertes atractores de electrones, el reactivo es un agente reductor suave selectivo, que permite reducir las iminas en presencia de otros grupos funcionales como cetonas, ésteres, dobles y triples enlaces y grupos nitro⁴⁹. Si bien el triacetoxiborohidruro de sodio posee la ventaja sobre el cianoborohidruro de sodio de no generar subproductos tóxicos, no se puede utilizar en metanol o agua debido a que reduce rápidamente los grupos carbonilo y porque además se descompone (especialmente en agua). También, se observa que al utilizar temperaturas de reacción mayores a 50 °C, se descompone para dar etanol y acetaldehído⁴⁹, lo que lo transforma en inflamable⁵⁰.

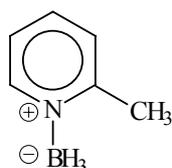
Los aminoboranos son otros de los hidruros muy utilizados en reacciones de reducción de oximas, enaminas e iminas. Estas últimas son reducidas rápidamente a sus respectivas aminas con buen rendimiento y buena selectividad. Los mejores resultados se han logrado en la síntesis de aminas secundarias utilizando ácido acético como solvente. Además, dado que los aminoboranos no son hidrolizados en soluciones acuosas, numerosas aminaciones reductivas se han podido realizar ventajosamente en agua o en metanol⁴⁹.

La piridina borano es la más conocida de los aminoboranos, ya que se determinó que dependiendo de los reactivos, podía dar aún mejores resultados que el cianobohidruro de sodio⁵¹. Sin embargo su utilización es limitada dado que es inestable (al igual que el triacetoxiborohidruro de sodio), especialmente a altas temperaturas. En 2004 se informó que a temperaturas cercanas a los 54 °C el reactivo sufre una autodescomposición exotérmica que puede causar fuego o incluso explosiones⁵².

La lectura de las distintas referencias bibliográficas sobre cada agente reductor desarrollado demuestra que los diferentes autores remarcan las virtudes del agente generado por sus grupos y enfatizan las limitaciones de todos los anteriormente desarrollados. Esto permite inferir, que no existe un reductor ideal y que la decisión de cuál elegir debe ser ensayada en función del trabajo a realizar.

Dado que en las reacciones de aminación reductiva utilizadas para la determinación de la configuración absoluta de los monosacáridos se había utilizado cianobrohidruro de sodio, se decidió evaluar la posibilidad de emplear otro agente reductor menos tóxico. Además, esta modificación se consideró teniendo en cuenta que se planea para un futuro cercano utilizar la metodología desarrollada en la sección 3.A.2 a una escala mayor. El objetivo es generar oligosacáridos adicionados a aminas alifáticas de cadena larga (C-8 a C-18), con el fin de obtener productos con posible actividad antiviral.

El reductor elegido para sustituir al cianoborohidruro de sodio fue la α -picolina borano. En el año 2004 Sato *et al.*⁵² informaron que este reactivo podía ser utilizado, al igual que otros aminoboranos, como reductor en las reacciones de aminación reductiva. En principio el reactivo sólo fue comercializado por una compañía japonesa (Shiroi Yakuhin), pero un tiempo después la firma Aldrich lo incluyó en su catálogo.



α -picolina borano

Las propiedades beneficiosas del reactivo remarcadas por los autores fueron la de no generar desechos tóxicos como los cianoborohidruros, de ser estable al menos hasta temperaturas de 150 °C (a diferencia de otros aminoboranos como la piridina borano), su alta selectividad y la viabilidad de conseguirlo comercialmente a bajo costo⁵².

Los autores evaluaron el nuevo reactivo realizando un gran número de reacciones con diferentes aminas y compuestos carbonílicos. Efectuaron las mismas con cantidades equivalentes de carbonilo, amina y reductor, y tres sistemas de solventes diferentes, metanol-ácido acético, agua-ácido acético y trazas de ácido acético en condiciones libres de solvente⁵².

Las reacciones fueron realizadas típicamente, según los autores, a temperatura ambiente agitando de 1 a 3 horas (con excepción de unas pocas reacciones donde debieron aumentar los tiempos de reacción). En los casos en que se utilizó metanol los rendimientos obtenidos se ubicaron entre un 70 y un 95%, mientras que al utilizar agua fueron algo inferiores. Los autores informaron además que en los casos en que la amina era muy soluble en agua la reacción no transcurría satisfactoriamente.

La utilización de agua como solvente se contradice con todos aquellos estudios previos en los que se sugería que la reacción de aminación reductiva debía realizarse en condiciones anhidras. Las justificaciones de no utilizar agua se basan en que la formación de la imina está más fuertemente desfavorecida en presencia de agua, de manera que no es trivial la justificación de los resultados obtenidos por Sato *et al.*⁵². La utilización de agua como medio de reacción sería una notable ventaja, especialmente a nivel industrial, ya que abre la posibilidad de utilizar un solvente barato y no contaminante con poca pérdida de rendimiento.

En sintonía con una química menos contaminante, la α -picolina borano fue evaluada por el grupo de Sato *et al.* también en sistemas de reacción sin solvente. Con sólo el agregado de trazas de ácido acético las mezclas fueron agitadas a temperatura ambiente entre 1 y 120 horas dependiendo de las aminas y compuestos carbonílicos utilizados. Los rendimientos informados fueron muy buenos, lo que permite aún con un gran gasto de tiempo, realizar las reacciones eficientemente sin solvente⁵².

3.B.2 Resultados

3.B.2.1 Reemplazo del NaCNBH₃ por α -picolina borano

Para evaluar la viabilidad de utilizar α -picolina borano en lugar de cianoborohidruro de sodio en las reacciones de aminación reductiva utilizadas para determinar la configuración de los monosacáridos, se decidió realizar una primera experiencia derivatizando la D-galactosa con (\pm)-1-amino-2-propanol y con (\pm)- α -metilbencilamina. Las condiciones de reacción utilizadas fueron dos de las descritas por Sato *et al.*⁵²: 1 mol de compuesto carbonílico, 1 mol de amina y 1,2 mol de agente reductor. Los solventes utilizados fueron mezclas de agua-ácido acético 10:1 y metanol-ácido acético también 10:1.

Los productos fueron analizados por cromatografía gaseosa como aminodesoxialditoles peracetilados. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 3.14.

Tabla 3.14 Proporción de productos de la reacción^a de aminación reductiva entre D-galactosa y AP o MBA (racémicas) en las condiciones informadas por Sato *et al.*⁵².

Condiciones/ Reactivos ^a	Relación molar (%)			
	Galactosa	Galactitol	Aminogalactitol	
			D/(S)	D/(R)=L/(S) ^c
<u>H₂O:AcOH (10:1)-2 h-Temp. Amb.</u>				
D-Gal + AP 1:1	87,0	2,5	4,8	5,8
D-Gal + MBA 1:1	96,3	2,5	0,6	0,5
<u>MeOH: AcOH (10:1)-2 h-Temp. Amb.</u>				
D-Gal + AP 1:1	20,0	4,5	37,3	37,2
D-Gal + MBA 1:1	93,0	2,0	3,0	2,0

^a Determinada por CGL como aminodesoxialditoles peracetilados.

^b D/(R)=L/(S), enantiómeros cromatográficamente equivalentes.

Los resultados demuestran que la reacción de aminación no funcionó eficientemente ya que la cantidad de galactosa sin reaccionar es muy importante. El único resultado alentador, aún cuando no logra ser óptimo, corresponde a la reacción realizada en metanol entre la galactosa y el 1-amino-2-propanol. Esto permitió inferir, al menos para este caso, que aumentando el tiempo de reacción o la temperatura podrían lograrse resultados satisfactorios.

Se debe destacar que el agente reductor casi no actuó sobre el aldehído del azúcar para generar el respectivo alditol.

A continuación, en función de los resultados obtenidos se decidió utilizar las condiciones de reacción utilizadas en la sección 3.A.2^{19,29}, pero reemplazando el NaCNBH₃ por α -Pic-BH₃. Nuevamente se derivatizó la galactosa con las dos aminas racémicas y se compararon los resultados que se obtenían de utilizar los dos reductores (Tabla 3.15).

Tabla 3.15 Proporción de productos de la reacción^a de aminación reductiva entre D-galactosa y AP o MBA (racémicas).

Condiciones/ Reactivos ^b	Relación molar (%)				
	Galactosa	Galactitol	Pico incógnita	Aminogalacitol	
				D/(S)	D/(R)=L/(S) ^e
α-Pic-BH₃					
<u>MeOH:AcOH (10:1)-1 h-65 °C.</u>					
D-Gal + AP 1:5	-	2,3	4,9 ^c	46,6	46,2
D-Gal + MBA 1:5	8,5	3,2	2,6 ^d	54,5	35,7
NaCNBH₃					
<u>MeOH:AcOH (13:1)-1 h-65 °C.</u>					
D-Gal + AP 1:5	1,3	2,9	-	48,8	47,0
D-Gal + MBA 1:5	2,0	6,0	-	58,0	34,0

^a Determinada por CGL como aminodesoxialditoles peracetilados.

^b En todos los casos se utilizaron 1,2 moles de α -Pic-BH₃ por mol de galactosa.

^c Dos picos equimolares con relación de tiempos (pico 1/ pico 2) = 0,992.

^d Un solo pico.

^e D/(R)=L/(S), enantiómeros cromatográficamente equivalentes.

Del análisis por cromatografía gaseosa se determinó que la reacción transcurría eficientemente con los dos agentes reductores con rendimientos superiores al 90%. Al realizar la reacción con MBA y picolina borano se observó además que permanecía una cantidad apreciable de galactosa, mientras que en presencia de NaCNBH₃ ésta se transformaba mayoritariamente en el alditol.

Los diastereómeros de la galactosa formados con 1-amino-2-propanol aparecían en una relación 1 a 1, mientras que con metilbencilamina se observó la estereoselectividad ya informada anteriormente^{19,29}.

Al analizar en detalle los cromatogramas obtenidos para los aminoalditoles peracetilados, pudieron observarse llamativamente unos picos cercanos a los correspondientes a los derivados de la galactosa, que no aparecían cuando se utilizaba NaCNBH₃. Al estudiar dichos picos por cromatografía gaseosa acoplada a espectroscopía de masa se pudo determinar que los mismos correspondían a los 1-amino-1-desoxialditoles peracetilados de otra hexosa. Dado que se verificó que la galactosa patrón utilizada no estaba contaminada con otro azúcar, se decidió analizar en detalle el mecanismo de reacción de aminación reductiva (Figura 3.21) para la galactosa, con el objetivo de explicar la aparición del subproducto.

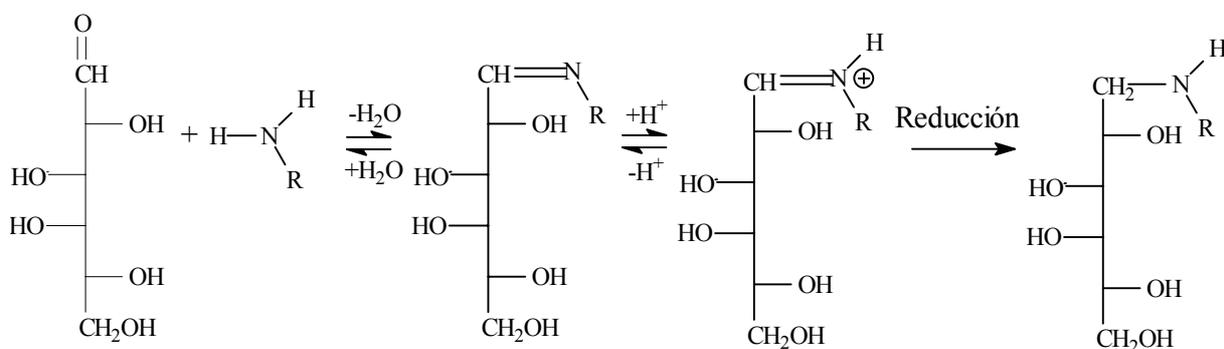


Figura 3.21 Mecanismo aceptado de la aminación reductiva para la galactosa.

La aparición de otro aminodesoxialditol, relacionada con el cambio de reductor, permitía pensar que podía existir algún tipo de isomerización del derivado de la galactosa durante el transcurso de la reacción. Luego de un breve análisis se planteó la hipótesis que podía estar ocurriendo la transposición del doble enlace de la imina hacia la siguiente posición de la hexosa, que originaría la pérdida de un centro quiral (C-2) y que luego éste se regenerara con epimerización parcial.

3.B.2.2 Estudio de las impurezas generadas

En literatura se encontró que dentro del sistema de reacciones de Maillard existía un modelo coherente que podía justificar la mencionada hipótesis. La reacción de Maillard comprende la unión entre un grupo carbonilo de un azúcar y un grupo amino, en general perteneciente a un aminoácido, para generar en una cascada de reacciones una serie de compuestos coloreados comúnmente denominados “melanoidinas”⁵³⁻⁵⁵.

En la primera etapa de reacción el carbonilo y el grupo amino forman, de manera reversible una imina (en equilibrio con su glicosilamina equivalente), que luego a partir de un proceso de enolización entre los carbonos 1 y 2 del azúcar forma una 1-amino-1-desoxicetosa^{53,56-58}. Esta reacción que históricamente se conoce como “reordenamiento de Amadori” se puede observar a modo de ejemplo para la glucosa y una amina genérica en la Figura 3.22.

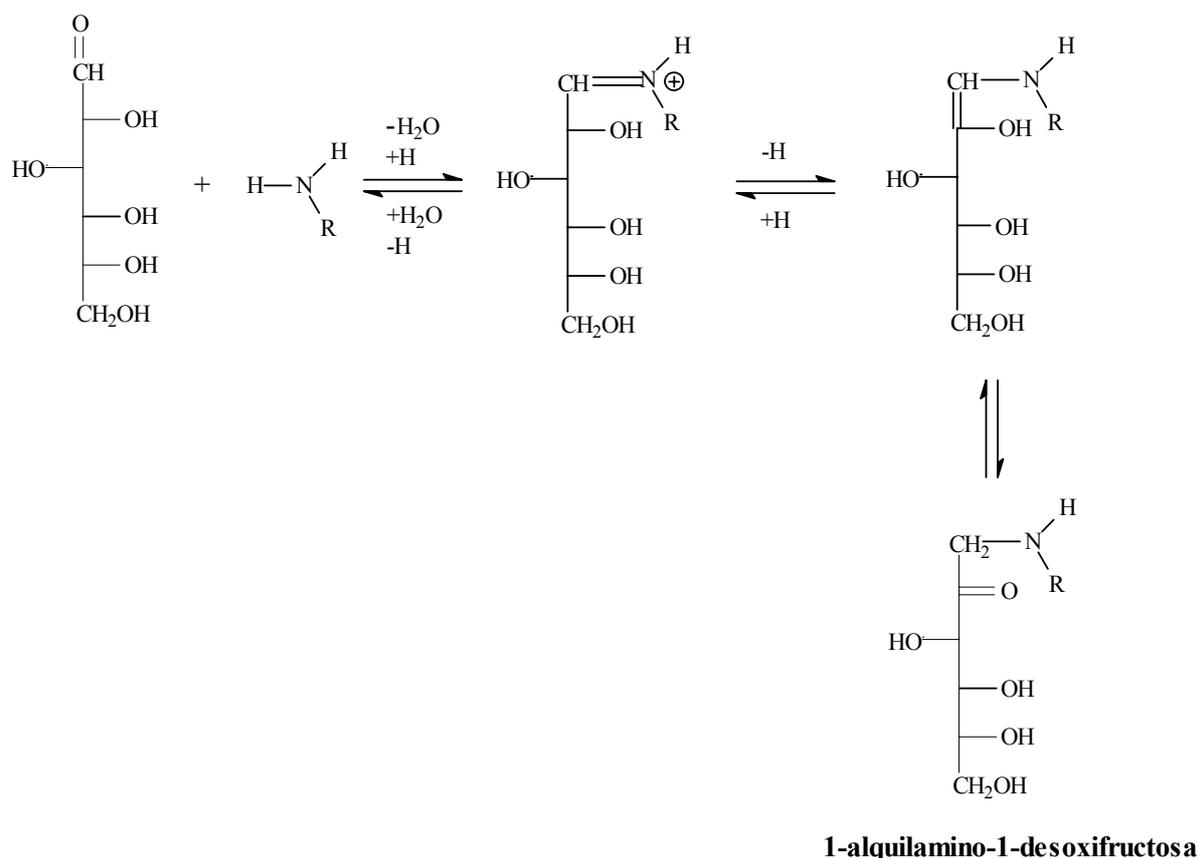


Figura 3.22 Reordenamiento de Amadori para la D-glucosa y una amina genérica.

Para generar cuantitativamente las 1-amino-1-desoxicetosos, el reordenamiento de Amadori se puede realizar (independientemente de la reacción de Maillard) en condiciones de reacción secas o utilizando metanol como solvente⁵⁸. En ambos casos se determinó que es necesario que exista catálisis ácida para que transcurra eficientemente el reordenamiento. Por ejemplo, en condiciones de reacción seca se observó que se podía generar con buen rendimiento el producto de reordenamiento de Amadori (1-desoxi-1-*o*-toluidinofructosa) agregando 0,04 equivalentes de ácido acético⁵³. Sin embargo, los rendimientos eran muy pobres en los casos en que no existía catálisis ácida o cuando se superaban los 0,08 equivalentes de ácido agregado. En este último caso, posiblemente el producto se vea afectado por la iniciación de otros procesos degradativos⁵³.

El mecanismo de reacción con catálisis ácida fue propuesto originalmente por Kuhn y Weygand al estudiar en detalle el reordenamiento (Figura 3.23). Además, dieron el nombre a la reacción, en honor a los primeros estudios realizados por Amadori⁵³.

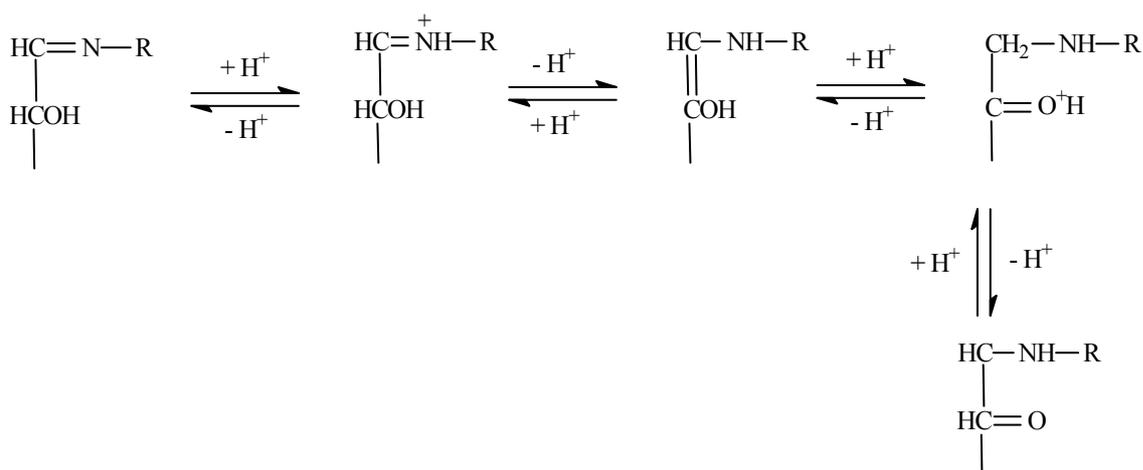


Figura 3.23 Mecanismo del reordenamiento de Amadori bajo catálisis ácida.

Entre las condiciones estándares utilizadas, las 1-amino-1-desoxi-2-cetosos se pueden formar a 50 °C en metanol en presencia de ácido oxálico o ácido acético⁵³. Estas condiciones son parecidas a las utilizadas en las técnicas para la determinación de la configuración de los azúcares descritas en las secciones 3.A.1 y 3.A.2, de manera que podría existir alguna relación entre ambas reacciones.

Retomando la reacción de aminación reductiva, si una porción de la imina formada transpone el doble enlace, por un reordenamiento del tipo de Amadori, es posible obtener una 1-amino-1-desoxi-2-cetosa. Además, como en el medio de reacción está presente un reductor, se pueden plantear dos alternativas para el producto de Amadori:

- a) Si a este producto se lo reduce, se consiguen dos aminoalditoles diferentes, ya que la reducción del carbonilo genera un estereocentro con dos configuraciones posibles

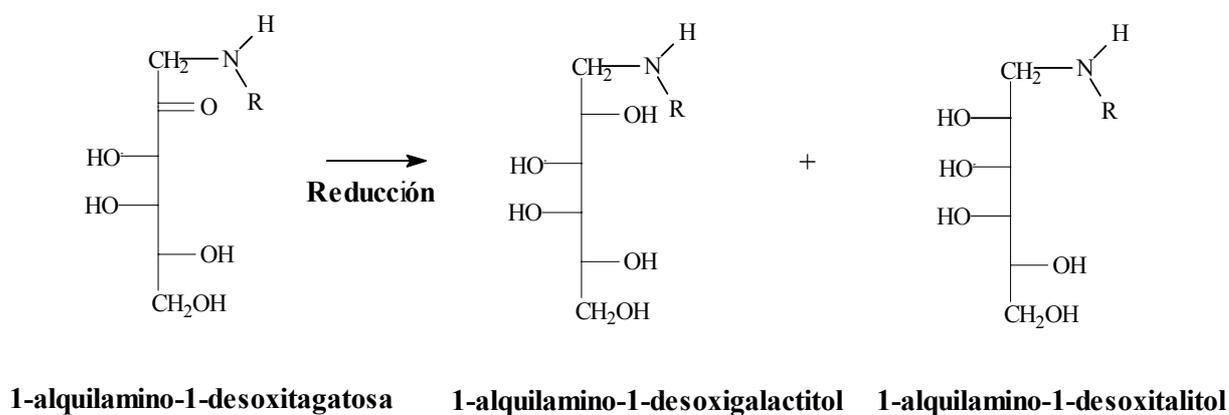


Figura 3.24 Reducción del producto de Amadori de galactosa + amina.

- b) El doble enlace vuelve a tautomerizar hacia C-1 para generar dos iminas, que son reducidas por el agente reductor.

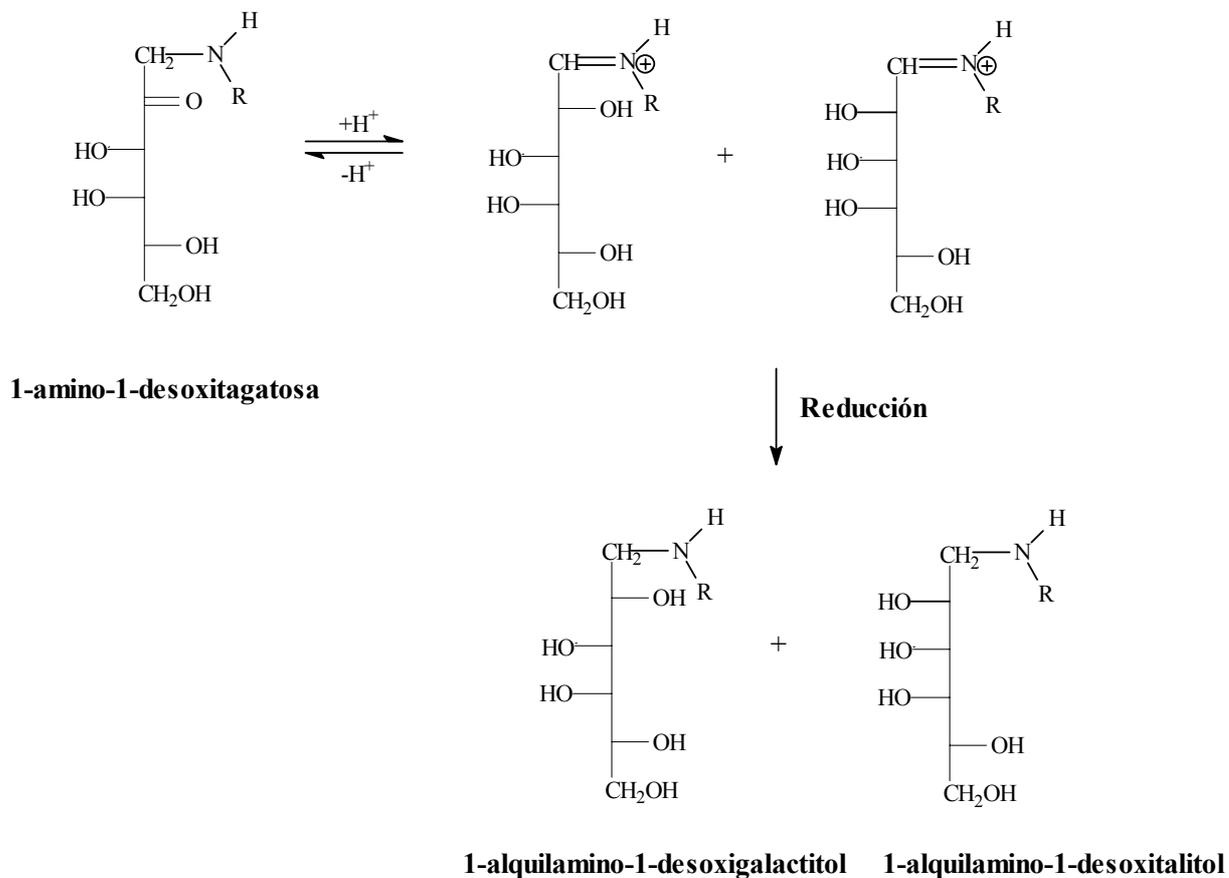


Figura 3.25 Tautomerización del producto de Amadori y posterior reducción.

De manera que en ambos casos, aplicando la hipótesis a la galactosa, ocurriría la epimerización del C-2 y la consecuente obtención de los derivados de la galactosa y de la talosa por una combinación de reacciones esquematizadas en la Figura 3.26

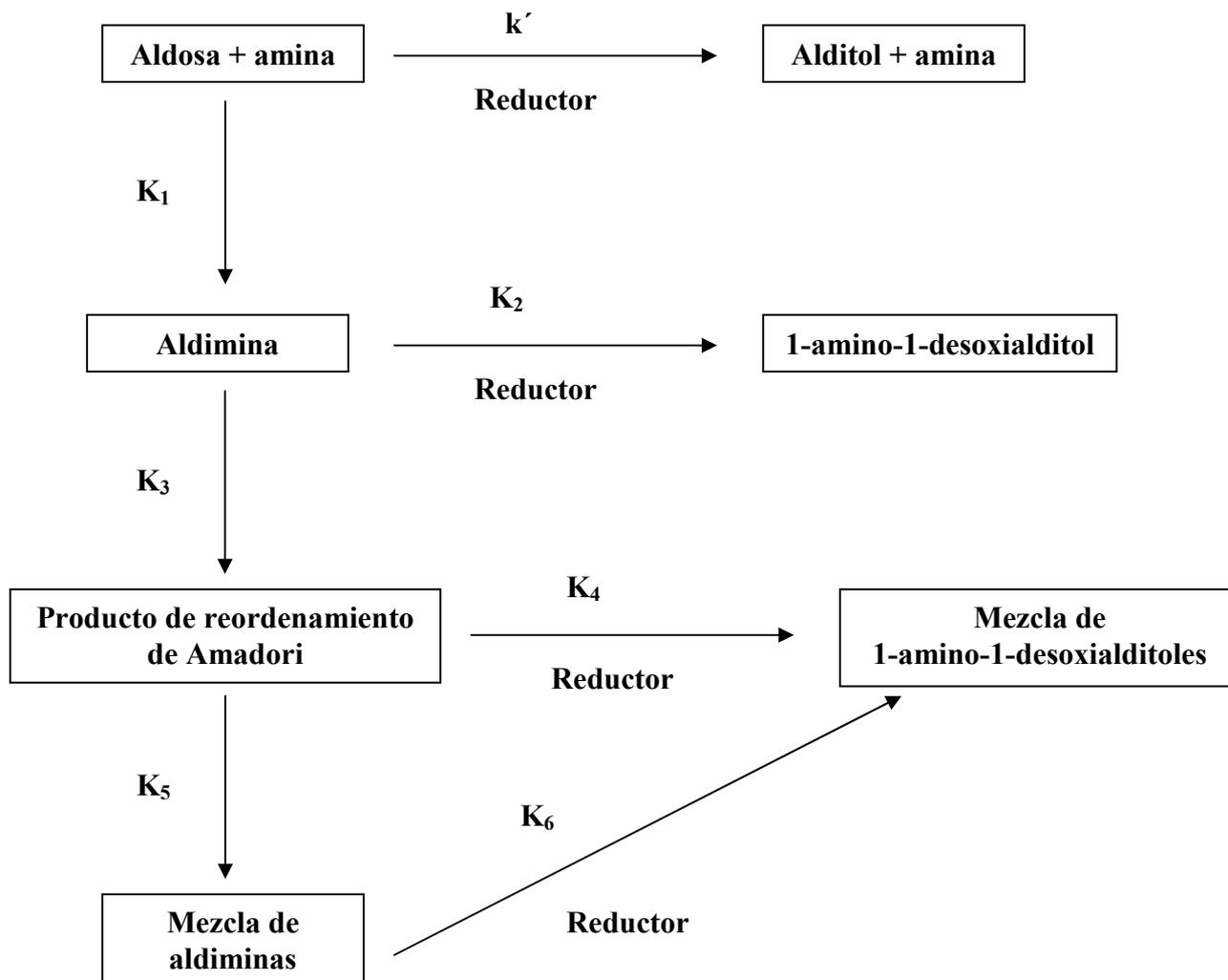


Figura 3.26 Combinación de algunas de las posibles reacciones entre un azúcar y una amina en presencia de un reductor.

Si bien el producto de Amadori es formado por una sucesión de pasos reversibles (K_1+K_3), los estudios previos demuestran que la regeneración de la imina es muy lenta (K_5), especialmente en los productos que están fuertemente estabilizados por la formación del cetalo cíclico correspondiente⁵⁸. De esta manera, es más probable que la generación de los epímeros en C-2 esté ocurriendo por la reducción de la 1-amino-1-desoxi-2-cetosa (K_4).

Sin embargo, aún cuando la reducción del grupo ceto con NaBH_4 suele realizarse para estabilizar los productos de Amadori formados entre azúcares y proteínas^{59,60}, no existían evidencias de que la α -picolina borano tuviera actividad reductora sobre los carbonilos de los aldehídos y cetonas, aún cuando otros amino boranos sí la poseen⁴⁹.

Por lo tanto, se decidió realizar un experimento paralelo para analizar si la α -Pic-BH₃ podía reducir a la fructosa. En condiciones similares de solvente y temperatura a las reacciones de aminación reductiva utilizadas en la sección 3.A.2, se observó por cromatografía gaseosa que cerca de la mitad de la fructosa era reducida a manitol y glucitol, de manera que era factible que la talosa fuese formada por reducción del producto de Amadori.

Para determinar si la hipótesis que los picos incógnita provenían de la epimerización de la galactosa era correcta, se procedió a realizar la aminación reductiva utilizando D-talosa comercial y α -Pic-BH₃ como reductor. Al analizar por cromatografía gaseosa los derivados peracetilados formados con AP racémica, se observó la separación de dos diastereómeros, cuyos tiempos de retención coincidían con aquellos determinados para las 1-amino-1-desoxihexosas incógnitas encontradas junto a los 1-desoxi-1-(2'-hidroxipropilamino) galactitoles. Al utilizar la amina quiral se determinó que el isómero de la talosa que eluía a menor tiempo de retención correspondía al diastereómero D-tal/(S)-amina. Notoriamente en ambos casos se pudo observar la aparición de picos minoritarios correspondientes a los derivados de la galactosa, evidenciando que también estaba produciéndose la epimerización parcial de la talosa en galactosa.

Los diastereómeros formados con α -metilbencilamina racémica y D-talosa no pudieron ser separados por cromatografía gaseosa en las condiciones utilizadas para este tipo de derivados, observándose en consecuencia un único pico cuyo tiempo de retención nuevamente coincidió con los tiempos encontrados para las 1-amino-1-desoxihexosas minoritarias encontradas al analizar el 1-desoxi-1-(1'-feniletilamino)-galactitol.

Estos datos indicaban que la hipótesis planteada era correcta: se formaban derivados de la talosa como reacción secundaria en las reacciones con galactosa, seguramente por epimerización del C-2 mediada por el reordenamiento de Amadori.

Para estudiar la posible reacción de epimerización en otro sistema se decidió evaluar, como prueba adicional otro hidrato de carbono. Para ello se eligieron la ramnosa y la quinovosa, ya que ambos epímeros eran accesibles comercialmente. Nuevamente, al

derivatizar cada uno por separado con las dos aminas, pudo observarse la isomerización propuesta.

En el caso de la formación de la 1-desoxi-1-(2-hidroxiopropilamino)-quinovosa, la epimerización fue especialmente destacada, ya que cerca del 21% del monosacárido original se transformó en el derivado de la ramnosa (determinado por cromatografía gaseosa). Esto implica que (de no existir diastereoselectividad en la reducción) aproximadamente un 40% de la imina de la quinovosa se reordenó para generar el producto de Amadori.

Este análisis de las diferentes 1-amino-1-desoxicetosas formadas, permite concluir que no es posible conocer la proporción de subproductos de epimerización en la reducción.

De los datos obtenidos se puede aseverar que el NaCNBH_3 probablemente reduzca los grupos iminos a mayor velocidad que la $\alpha\text{-Pic-BH}_3$ (K_2), ya que en el mismo medio de reacción no se produce reordenamiento de la imina en el producto de Amadori.

3.B.2.3 Estudio de nuevas condiciones de reacción

Para poder utilizar el Pic-BH_3 en la determinación configuracional de los azúcares, se decidió evaluar nuevas condiciones de reacción a fin de evitar que se produzca la epimerización de los monosacáridos. Se decidió utilizar en un principio, galactosa y 1-amino-2-propanol para realizar un estudio sistemático.

3.B.2.3.1 Variación del tiempo y de la temperatura de reacción

La primera experiencia se orientó a determinar si la proporción de 1-amino-1-desoxitalosa que se generaba era función del tiempo y de la temperatura de reacción (Tablas 3.16 y 3.17). El estudio se realizó utilizando las condiciones indicadas en 3.A.2, es decir que se empleó para la reacción un exceso de 5 veces de amina y 1,2 veces de reductor en metanol-ácido acético (13:1). Los tiempos y las temperaturas de reacción fueron modificados sistemáticamente.

Tabla 3.16 Proporción de productos con la variación del tiempo de reacción de aminación reductiva con AP^a.

Condiciones/ Reactivos ^b	Relación molar (%)			
	Galactosa	Galactitol	Aminoalditol	
			Tal	Gal ^d
<u>MeOH:AcOH (13:1)-65 °C</u>				
0.5 h	1,4	3,2	3,4	92,0
1 h	–	2,3	4,9	92,8
2 h	–	tr. ^c	7,0	93,0
3 h	–	tr.	6,8	93,2

^a Determinaciones realizadas por CGL como aminodesoxialditoles peracetilados.

^b En todos los casos se utilizaron 1,2 moles de α -picolina borano y 5 moles de amina por mol de D-galactosa.

^c Trazas, porcentaje menor a 1%.

^d Diastereómeros D/(S) + (D)/(R)=L/(S).

Aún cuando los resultados observados para cada tiempo (Tabla 3.16) no muestran diferencias significativas, la tendencia marca una dependencia directa entre el tiempo y la cantidad de talosa formada. Esto podría implicar que la reducción del producto de Amadori, en alguna de sus formas, es más lenta que la reducción de la imina formada con la galactosa.

En la Tabla 3.17 se presentan los resultados obtenidos para la reacción a diferentes temperaturas.

Tabla 3.17 Proporción de productos con la variación de la temperatura de reacción de aminación reductiva con AP^a.

Condiciones/ Reactivos ^b	Relación molar (%)			
	Galactosa	Galactitol	Aminoalditol	
			Tal	Gal ^d
<u>MeOH:AcOH (13:1)-1 h.</u>				
40 °C	tr. ^c	2,9	1,0	96,1
50 °C	1,5	2,5	2,5	93,4
65 °C	-	2,3	4,9	92,8

^a Determinaciones realizadas por CGL como aminodesoxialditoles peracetilados.

^b En todos los casos se utilizaron 1,2 moles de α -picolina borano y 5 moles de amina por mol de D-galactosa.

^c Trazas, porcentaje menor a 1%.

^d Diastereómeros D/(S) + (D)/(R)=L/(S).

Se observa que la cantidad del derivado de talosa también aumenta en función de la temperatura de reacción, de manera que el reordenamiento de Amadori seguramente se ve relativamente acelerado a mayores temperaturas.

Aún cuando los resultados obtenidos al realizar la reacción a 40 °C y 1 h son satisfactorios, todavía existe un pequeño porcentaje del producto epimerizado. Considerando que otros azúcares como la quinovosa epimerizaban con mayor facilidad, se decidió continuar la búsqueda de nuevas condiciones de reacción.

3.B.2.3.2 Variación de la proporción de agente reductor utilizada

La siguiente variable a modificar fue la cantidad de α -picolina borano agregada. Esto se realizó para intentar determinar si era posible acelerar el paso de reducción (K₂, Figura 3.26) por sobre las otras reacciones secundarias. El nuevo conjunto de resultados que figura en la Tabla 3.18, fue generado a partir de realizar la reacción durante 1 h a 40 y 65 °C.

Tabla 3.18 Proporción de productos con la variación de la proporción de α -Pic-BH₃ utilizada en la reacción de aminación reductiva con AP^a.

Condiciones/ Reactivos ^b	Relación molar (%)			
	Galactosa	Galactitol	Aminoalditol	
			Tal ^d	Gal ^e
<u>MeOH:AcOH (13:1)-1 h-65 °C</u>				
0,5 mol ^c	2,5	2,7	5,2	89,6
1,2 mol ^c	-	2,3	4,9	92,8
2 mol ^c	2,2	2,3	5,9	89,5
<u>MeOH:AcOH (13:1)-1 h-40 °C</u>				
1,2 mol ^c	tr. ^d	2,9	1,0	96,1
10 mol ^c	tr.	8,4	1,1	90,0

^a Determinaciones realizadas por CGL como aminodesoxialditoles peracetilados.

^b En todos los casos se utilizaron 5 moles de amina por mol de D-galactosa.

^c Moles de α -Pic-BH₃ por mol de D-galactosa.

^d Trazas, porcentaje menor a 1%.

^e Diastereómeros D/(S) + (D)/(R)=L/(S).

Los resultados muestran claramente que la cantidad de reductor no influye sobre la obtención del 1-amino-1-desoxitalitol. No obstante es interesante notar que a 40 °C, en presencia de un gran exceso de α -Pic-BH₃ aumenta la cantidad de galactosa reducida, lo que demuestra cierta capacidad del agente para reducir grupos carbonilo. Este resultado no es sorprendente ya que anteriormente se había realizado la reducción de la fructosa con α -Pic-BH₃ (pág. 56). Sin embargo, queda claro que esta reacción (k') es mucho más lenta que la formación y reducción de la imina (K₁ y K₂), y que el reductor posee una selectividad apreciable.

3.B.2.3.3 Variación de la proporción de ácido acético utilizada

Posteriormente, se decidió evaluar en una nueva serie de reacciones, la influencia del ácido acético en la reacción (Tabla 3.19).

Tabla 3.19 Proporción de productos con la variación en la cantidad agregada de ácido acético en la reacción de aminación reductiva con AP^a.

Condiciones/ Reactivos ^b	Relación molar (%)			
	Galactosa	Galactitol	Aminoalditol	
			Tal ^d	Gal ^d
<u>1 h-65 °C</u>				
MeOH	2,0	2,0	–	96,0
MeOH:AcOH (13:1)	–	2,3	4,9	92,8
MeOH:AcOH (4:1)	1,6	4,4	3,2	90,6

^a Determinaciones realizadas por CGL como aminodesoxialditoles peracetilados.

^b En todos los casos se utilizaron 1,2 moles de reductor y 5 moles de amina por mol de D-galactosa.

^c Trazas, porcentaje menor a 1%.

^d Diastereómeros D/(S) + (D)/(R)=L/(S).

En esta experiencia se pudo visualizar que en ausencia de ácido acético no existía generación del derivado de talosa, y que aumentando la proporción del ácido no aumentaba la cantidad formada de su aminoalditol. Estos resultados parecían estar en concordancia con aquellos encontrados en los primeros trabajos que estudiaban el reordenamiento de Amadori,

donde se demostraba que la formación de las 1-amino-1-desoxicetosas transcurría con catálisis ácida, y sin ésta prácticamente no ocurría⁵³.

Al repetir la reacción con otros azúcares en ausencia de catálisis ácida se pudo comprobar que en ningún caso se detectaba la epimerización.

En función de estos resultados quedaba demostrado que la reacción de aminación reductiva utilizada en la técnica de determinación enantiomérica de los monosacáridos con α -picolina borano debe realizarse en ausencia de ácido para evitar isomerizaciones.

3.B.2.3.4 Reacciones de aminación reductiva sin ácido acético

Las nuevas condiciones de reacción utilizadas fueron similares a las empleadas con NaCNBH₃, con la única diferencia que al sistema de reacción no se le agregó ácido acético.

Los resultados de la reacción de aminación reductiva entre galactosa y 1-amino-2-propanol, utilizando NaCNBH₃ y α -Pic-BH₃ se presentan en la Tabla 3.20.

Tabla 3.20 Determinación de la proporción de productos y los rendimientos de reacción utilizando NaCNBH₃ y α -Pic-BH₃ con AP^a.

Condiciones/ Reactivos ^b	Relación molar (%)			Rend. (%) ^c	
	Galactosa	Galactitol	aminogalactitol D/(S) D/(R)=L/(S) ^d		
NaCNBH₃					
<u>MeOH:AcOH (13:1)-1 h-65 °C.</u>					
D-Gal + AP 1:5	1,3	2,9	48,8	47,0	98
α-Pic-BH₃					
<u>MeOH-1 h-65 °C.</u>					
D-Gal + AP 1:5	1,8	2,0	50,0	46,2	97

^a Determinaciones realizadas por CGL como aminodesoxialditoles peracetilados.

^b En todos los casos se utilizaron 1,2 moles de reductor por mol de D-galactosa.

^c Rendimiento molar frente a inositol peracetilado=100.

^d Diastereómeros D/(R)=L/(S).

Se puede observar que tanto los rendimientos absolutos de las reacciones como la cantidad relativa de cada compuesto son similares para ambos agentes reductores. Las cantidades de galactosa sin reaccionar y de galactitol fueron muy pequeñas y no se registraron productos de epimerización. De esta manera quedaba demostrado que en estas condiciones de trabajo, era posible utilizar la α -picolina borano como reductor, sin desmedro del rendimiento ni de la selectividad.

3.B.2.3.5 Variación de la proporción de amina utilizada

En el trabajo en que Sato *et al.* presentan a la α -picolina borano como agente reductor⁵², realizaron las reacciones de aminación reductiva con iguales cantidades de equivalentes del compuesto carbonílico y de la amina. Sin embargo, se había informado previamente³⁰ que en estas condiciones podía ocurrir que la amina secundaria formada en la reacción de aminación reaccionara con otro grupo carbonílico para generar una nueva amina secundaria o terciaria. Para determinar las mejores condiciones se decidió evaluar esta reacción con diferentes concentraciones de amina (Tabla 3.21).

Tabla 3.21 Proporción de productos con la variación en la relación amina/azúcar en la reacción de aminación reductiva con AP^a.

Condiciones/ Reactivos ^b	Relación molar (%)			Rend (%) ^c
	Galactosa	Galactitol	Aminogalactitol Gal ^e	
<u>MeOH-1 h-65 °C</u>				
1,2 moles AP	5,5	3,8	90,7	93
3 moles AP	4,8	3,2	92,0	94
5 moles AP	3,0	tr. ^d	97,0	97

^a Determinaciones realizadas por CGL como amino alditoles peracetilados.

^b En todos los casos se utilizaron 1,2 moles de α -Pic-BH₃ por mol de D-galactosa.

^c Rendimiento molar frente a inositol peracetilado=100.

^d Trazas, porcentaje menor a 1%.

^e Diastereómeros D/(S) + (D/(R)=L/(S)).

Se puede apreciar que el mejor rendimiento se obtuvo utilizando un exceso de 5 veces de amina, tal como era esperado de acuerdo a los antecedentes^{29,30}. Además se verificó que en estas condiciones se lograba minimizar la cantidad de alditol formado como consecuencia de la reducción directa de la aldosa.

3.B.2.4 Análisis configuracional de azúcares utilizando α -picolina borano

Una vez establecidas las condiciones de reacción de aminación reductiva con 1-amino-2-propanol y α -picolina borano, se decidió analizar la configuración de los monosacáridos de un polisacárido real.

Sobre un coralinano crudo aislado del alga roja *Corallina officinalis* (ver Capítulo 2) se procedió a realizar el estudio configuracional de los azúcares componentes. Por un lado se aplicó la técnica desarrollada con NaCNBH₃ y por el otro la adaptada para la α -Pic-BH₃. Se eligió para la experiencia un polisacárido proveniente del alga *C. officinalis*, ya que éste poseía una diversidad tal de galactosas monometiladas que permitía que la evaluación fuera más variada. Los resultados obtenidos se observan en la Tabla 3.22

Tabla 3.22 Determinación de la configuración de los monosacáridos del polisacárido crudo proveniente de *Corallina officinalis*.

Condiciones/ Reactivos ^a	Relación molar (%)						
	D-Xil	2-O-Me-Gal ^b	4-O-Me-D-Gal	4-O-Me-L-Gal	Glc	D-Gal	L-Gal
<u>NaCNBH₃</u>							
<u>MeOH:AcOH (13:1) 1 h-65 °C.</u>							
<i>C. officinalis</i>	23	6	2	3	13	30	23
<u>α-Pic-BH₃</u>							
<u>MeOH-1 h-65 °C.</u>							
<i>C. officinalis</i>	22	5	2	2	9	35	25

^a En todos los casos se utilizaron 1,2 moles de reductor y 5 moles de 1-amino-2-propanol por mol de D-galactosa.

^b No se puede determinar su configuración utilizando AP.

Ambas técnicas generaron resultados similares y comparables a los informados previamente²⁹ donde se describe un agarano fuertemente metilado y con una alta proporción de xilosas como cadenas laterales.

Las derivatizaciones realizadas con los dos reductores presentan una similitud en los resultados que permite utilizarlos indistintamente sin mayores diferencias si se cuidan las condiciones experimentales.

3.B.2.5 Reacción de aminación reductiva utilizando MBA y α -picolina borano sin ácido acético

Cuando se realizó la reacción de aminación reductiva con galactosa y α -metilbencilamina, en metanol sin ácido acético y en presencia de α -picolina borano, no se detectó la presencia del 1-amino-1-desoxitalitol, al igual que cuando se usó aminopropanol.

Posteriormente, se decidió realizar la secuencia de reacciones indicadas en la sección 3.A.2 para la determinación de la configuración de la 3,6-AnGal en presencia del α -Pic-BH₃. Para ello se utilizó el κ -carragenano comercial ya utilizado en otras secciones. Los resultados figuran en la Tabla 3.23.

Tabla 3.23 Reacción de doble hidrólisis-doble aminación con MBA sobre κ -carragenano^a.

Condiciones/ Reactivos ^b	Relación molar (%)				Rend (%) ^c
	Galactosa	Alditoles ^d	Aminoalditol		
			3,6-AnGal ^e	Gal ^e	
<u>NaCNBH₃</u>					
<u>MeOH:AcOH (13:1) 1 h-65 °C.</u>					
κ -carragenano	1	1	52	46	84
<u>α-Pic-BH₃</u>					
<u>MeOH-1 h-65 °C.</u>					
κ -carragenano	2	tr. ^f	56	42	80

^a Determinaciones realizadas por CGL como amino alditoles peracetilados.

^b En todos los casos se utilizaron 1,2 moles de reductor y 5 moles de amina por mol de D-galactosa.

^c Rendimiento molar frente a inositol peracetilado=100.

^d Comprende al galactitol y al 3,6-anhidrogalactitol.

^e Diastereómeros D/(S) + (D)/(R)=L/(S).

^f Trazas, porcentaje menor a 1%.

El rendimiento obtenido al utilizar NaCNBH_3 pareció ser apenas un poco mayor que en el caso que se utilizó $\alpha\text{-Pic-BH}_3$. Aun cuando esta diferencia es pequeña, se la pudo observar sistemáticamente en todas las experiencias realizadas con α -metilbencilamina. No obstante la diferencia resulta ser mínima, por lo que el reemplazo del reductor es posible sin afectar los resultados.

3.B.3 Conclusiones

Con los resultados obtenidos en esta parte del trabajo se puede aseverar que la α -picolina borano puede ser utilizada en las técnicas de determinación configuracional de los azúcares en reemplazo del NaCNBH_3 . Esta modificación asegura un sistema de reacción con menor toxicidad.

Las condiciones de reacción para poder utilizar la α -picolina borano en las reacciones de aminación reductiva de monosacáridos fueron modificadas en comparación con aquellas empleadas con el NaCNBH_3 . Esto se debió a que, en presencia de ácido acético se producían productos secundarios por un reordenamiento del tipo de Amadori.

Los rendimientos de la reacción de aminación reductiva con α -picolina borano en metanol sin ácido presente fueron comparables con aquellos obtenidos con NaCNBH_3 . Este resultado es especialmente importante ya que se determinó que la reacción con cianoborohidruro de sodio tenía su máximo rendimiento²⁹ a pH 4.

Bibliografía

1. Usov, A. I. *Food Hydrocol.* **1998**, 12, 301-308.
2. Lahaye, M. *J. Appl. Phycol.* **2001**, 13, 173-184.
3. Stortz, C. A.; Cerezo, A. S. *Curr. Top. Phytochem.*, **2000**, 4, 121-134.
4. Painter, T. J.; *The Polysaccharides*, Vol. 2, (Ed. Aspinall, G. O.), Academic Press, Orlando, **1983**, 196-285.
5. Yaphe, W.; Arsenault, G. P. *Anal. Biochem.*, **1965**, 13, 143-148.
6. Stevenson, T. T.; Furneaux, R. H. *Carbohydr. Res.*, **1991**, 210, 277-298.
7. Usov, A. I.; Elashvili, M. Y. *Bot. Mar.*, **1991**, 34, 553-560.
8. Clingman, A. I.; Nunn, J. R.; Stephen, A. M. *J. Chem. Soc.*, **1957**, 197-203.
9. Peat, S.; Turvey, J. R.; Rees, D. A. *J. Chem. Soc.*, **1961**, 1590-1595.
10. Kelly, H. C.; Giusto, M. B.; Marchelli, F. R. *J. Am. Chem. Soc.*, **1964**, 86, 3882-3884.
11. Jol, C. N.; Neiss, T. G.; Penninkhof, B.; Rudolph, B.; De Ruiter, G. A. *Anal. Biochem.*, **1999**, 268, 213-222
12. Usov, A. I. *Hydrobiologia*, **1993**, 260/261, 641-643.
13. Falshaw, R.; Furneaux, R. H. *Carbohydr. Res.*, **1994**, 252, 171-182.
14. Chiovitti, A.; Bacic, A.; Craik, D. J.; Munro, S. L. A.; Kraft, G. T.; Liao M. *Carbohydr. Res.*, **1997**, 299, 229-243
15. Gerwig, G. J.; Kamerling, J. P.; Vliegthart, J. F. G. *Carbohydr. Res.*, **1978**, 62, 349-357.
16. Leontin, K.; Lindberg, B.; Lonngren, J. *Carbohydr. Res.*, **1978**, 62, 359-362.
17. Oshima, R.; Kumanotani, J. *Chem. Lett.*, **1981**, 943-946.
18. Oshima, R.; Kumanotani, J. *J. Chromatogr.*, **1983**, 259, 159-163.
19. Cases, M. R.; Cerezo, A. S.; Stortz, C. A. *Carbohydr. Res.*, **1995**, 269, 333-341.
20. Takano, K.; Kamei-Hayashi, S.; Hara, S.; Hirase, S. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **1993**, 57, 1195-1197.
21. Errea, M. I.; Kolender, A. A.; Matulewicz, M. C. *Bot. Mar.*, **2001**, 44, 133-138.
22. Lindqvist, L.; Jansson, P. E. *J. Chromatogr. A*, **1997**, 767, 325-329.
23. van de Velde, F.; Knutsen, S. H.; Usov, A.; Rollema, S. H.; Cerezo A. S. *Trends Food Sci. Technol.*, **2002**, 13, 73-92.
24. Usov, A. I. *Bot. Mar.*, **2005**, 48, 178-180
25. Falshaw, R.; Furneaux, R. H. *Carbohydr. Res.*, **1995**, 269, 183-189.
26. Sen, A. K.; Das, A. K.; Sarkar, K. K.; Siddhanta, A. K.; Takano, R.; Kamei, K.; Hara, S. *Bot. Mar.*, **2002**, 45, 331-338.

27. Takano, R.; Shiimoto, K.; Kamei, K.; Hara, S.; Hirase, S. *Bot. Mar.*, **2003**, 46, 142-150.
28. Errea, M. I.; Ciancia, M.; Matulewicz, M. C.; Cerezo A. S. *Carbohydr. Res.*, **1998**, 311, 235-238.
29. Cases, M. R. Tesis Doctoral "*Estudio del sistema de polisacáridos del alga calcárea Corallina officinalis*", FCEyN-UBA, **1995**.
30. Borch, R. F.; Bernstein, M. D.; Durst, H. D. *J. Am. Chem. Soc.*, **1971**, 93, 2897-2904.
31. Borch, R. F.; Hassid, A. I. *J. Org. Chem.*, **1972**, 37, 1673-1674.
32. Estevez, J. M.; Ciancia, M.; Cerezo, A. S. *Carbohydr. Res.*, **2000**, 325, 287-299.
33. Estevez, J. M.; Ciancia, M.; Cerezo, A. S. *Carbohydr. Res.*, **2004**, 339, 2575-2592.
34. Estevez, J. M.; Ciancia, M.; Cerezo, A. S., *Carbohydr. Res.*, **2001**, 331, 27-41.
35. Rees, D. A., *J. Chem. Soc.*, **1961**, 5168-5171.
36. Stortz, C. A.; Cerezo, A. S. *Carbohydr. Res.*, **1993**, 242, 217-227.
37. Nosedá, M. D.; Viana, A. G.; Duarte, M. E. R.; Cerezo, A. S. *Carbohydr. Polym.*, **2000**, 42, 301-305.
38. Stortz, C. A.; Bacon, B. E.; Cherniak, R.; Cerezo, A. S. *Carbohydr. Res.*, **1994**, 261, 317-326.
39. Villaroel, L. H.; Zanolungo, A. B. *Carbohydr. Res.*, **1981**, 88, 139-145.
40. Brasch, D. J.; Chang, H. M.; Chuah, C. T.; Melton, L. D. *Carbohydr. Res.*, **1981**, 97, 113-125.
41. Takano, R.; Shiimoto, K.; Kamei, K.; Hara, S.; Hirase, S. *Bot. Mar.*, **2003**, 46, 142-150.
42. Flores, M. L.; Cerezo, A. S.; Stortz, C. A. *J. Argent. Chem. Soc.*, **2002**, 90, 65-76.
43. Stortz, C. A.; Cases, M. R.; Cerezo, A. S. *Carbohydr. Polym.*, **1997**, 34, 61-65.
44. March, J. *Advanced Organic Chemistry*, 4^o ed., Wiley-Interscience Publication, **1992**, 1495 pp.
45. Hayes, K. S. *Appl. Cat. A*, **2001**, 187-195.
46. Lane, C. F. *Synthesis*, **1975**, 135, 135-146.
47. Abdel-Magid, A. F.; Carson, K. G.; Harris, B. D.; Maryanoff, C. A.; Shah, R. D. *J. Org. Chem.*, **1996**, 61, 3849-3862.
48. Pelter, A.; Rosser, R. M.; Mills, S. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*, **1984**, 717-720.
49. Burkhardt, E. R.; Matos, K. *Chem. Rev.*, **2006**, 106, 2617-2650.
50. Heydari, A.; Khaksar, S.; Akbari, J.; Esfandyari, M.; Pourayoubi, M.; Tajbakhsh, M. *Tetrahedron Lett.*, **2007**, 1135-1138.
51. Moormann, A. E. *Synth. Comm.*, 1993, 23, 789-795.
52. Sato, S.; Sakamoto, T.; Miyazawa, E.; Kikugawa, Y. *Tetrahedron*, **2004**, 60, 7899-7906.

53. Hodge, J. E. *Adv. Carbohydr. Chem.*, **1955**, 10, 169-205.
54. Martins, S. I. F. S.; Jongen, W. M. F; van Boekel, M. A. J. S. *Trends. Food Sci. Technol.* **2001**, 11, 364-373.
55. Davidek, T. D.; Clety, N; Aubin, S.; Blank, I., *J. Agric. Food Chem.*, **2002**, 50, 5472-5479.
56. Hodge, J. E.; Rist, C. E. *J. Am. Chem. Soc.*, **1953**, 75, 316-322.
57. Oliver, C. M.; Melton, L. D.; Stanley, R. A. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, **2006**, 46, 337-350.
58. Yaylayan, V. A.; Huyghues-Despointes, A. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, **1994**, 34, 321-369
59. Walton, D. J.; Ison, E. R.; Szarek, W. A. *Carbohydr. Res.*, **1984**, 128, 37-49.
60. Walton, D. J.; Szarek, W. A. *Carbohydr. Res.*, **1985**, 137, 31-38.

CAPÍTULO 4

REACCIONES ASISTIDAS POR MICROONDAS APLICADAS A POLISACÁRIDOS

4. Introducción

Los polisacáridos sulfatados están ampliamente distribuidos en el reino animal y vegetal formando parte de las matrices intercelulares. Como ya ha sido mencionado, las algas rojas y pardas sintetizan una importante variedad de estos biopolímeros, muchos de los cuales poseen aplicaciones industriales¹ y actividad biológica, especialmente como agentes antivirales^{2,3}. Otro grupo importante de polisacáridos sulfatados está compuesto por glicosaminoglicanos como la heparina, el heparán sulfato, el condroitín sulfato y el dermatán sulfato. Todos ellos son muy importantes en muchos eventos fisiológicos⁴.

El estudio estructural de los polisacáridos sulfatados ha demandado el desarrollo de una serie de técnicas químicas basadas en la remoción del grupo sulfato para identificar las posiciones de unión de los sustituyentes. La remoción de los grupos sulfato también se ha utilizado para modificar los polisacáridos con el objetivo de obtener productos con características químicas y físicas diferentes.

En este trabajo de Tesis se decidió estudiar dos reacciones basadas en la pérdida de grupos sulfato en polisacáridos empleando las microondas como fuente de energía. La utilización de esta fuente alternativa de energía fue elegida, dado que ha presentado una serie de ventajas importantes, fundamentalmente el notable aceleramiento de las velocidades de reacción.

Como se verá más adelante, las reacciones elegidas comprenden la pérdida de grupos sulfato por mecanismos distintos:

- a) Tratamiento alcalino del polisacárido.
- b) Desulfatación solvolítica.

SECCION 4A

Aspectos introductorios y estudios preliminares

4.A.1 Introducción

Los hornos de microondas se han transformado en la actualidad en un electrodoméstico común en la mayoría de los hogares, utilizándose como fuente alternativa de calor para cocinar o calentar los alimentos. Si bien las microondas no representan en sí una fuente de calor, éste se genera a partir de la conversión de la energía de esas ondas en el material que las absorbe⁵.

En los procesos de calentamiento convencionales la energía se transfiere al material por convección y conducción del calor desde la superficie en contacto con la fuente. En contraste, la energía de microondas es absorbida y transformada en calor directamente por la molécula irradiada⁶.

La utilización de las microondas como fuente de energía en el campo de la química se inició entre el final de la década del 70 y mediados de la década del 80. Se reconocen los trabajos de Gedye *et al.* y Giguere *et al.*, ambos publicados en 1986, como los pioneros en la utilización de las microondas en síntesis orgánica^{7,8}. A partir de ese momento, y especialmente a mediados de la década del 90, se registró un importante aumento del número de publicaciones donde se informaba la realización de diversas reacciones orgánicas aplicando microondas⁹⁻¹¹.

La utilización de microondas en reemplazo de los procesos de calentamiento tradicionales en síntesis orgánica ha presentado las siguientes ventajas generales¹²:

- 1) La introducción de energía de microondas en una reacción química con al menos un compuesto que las absorba, provee una velocidad de calentamiento mucho más rápida que en los casos en que se utiliza el calentamiento convencional (calentamiento por mecheros, por mantas eléctricas, etc.). En consecuencia, se registra una aceleración notable de la velocidad de reacción.
- 2) Al utilizar microondas no existe contacto entre la fuente de energía y los reactivos químicos. Este factor, en combinación con la gran velocidad de calentamiento, genera un perfil de temperatura alternativo que puede significar una distribución diferente de los productos de reacción.
- 3) Los reactivos (y los materiales contaminantes) no interactúan de igual manera con las

microondas, de manera que se pueden realizar calentamientos selectivos. Esto permite crear además, zonas más calientes (“hot spots”) y otras más frías.

En los primeros trabajos de reacciones asistidas por microondas se sugería además, la existencia de una ventaja adicional relacionada con un factor de aceleración denominado “efecto de microondas”. Estos efectos no térmicos, fueron explicados originalmente en función de la ecuación de Arrhenius: $K=Ae^{-\Delta G/RT}$. Básicamente, los autores sugerían la modificación del valor preexponencial A y del valor de la energía de activación de los estados de transición (ΔG^\ddagger)¹⁰. Sin embargo, algunos estudios posteriores más detallados establecieron que las reacciones eran gobernadas por los mismos principios de la termodinámica y de la cinética que aquéllas realizadas con formas de calentamiento convencional¹²⁻¹⁴. Aún cuando existiera un efecto adicional, como sostienen algunos autores¹⁰, se ha demostrado que éste es mucho menos importante que los efectos térmicos¹¹.

4.A.1.1 Fundamentos del calentamiento por microondas

Las bases físicas del mecanismo de calentamiento serán explicadas a continuación, en función de varios trabajos de revisión^{5,6,12-14}. Las microondas son radiación electromagnética, es decir poseen un componente en el campo eléctrico y otro en el campo magnético. Su longitud de onda se ubica entre 1 mm y 1 m, por lo que sus frecuencias varían entre 0,3 y 300 GHz. Dentro del espectro de frecuencias, las microondas se encuentran entre las de radio y las del infrarrojo. Por convención internacional, la mayoría de los hornos domésticos operan a una longitud de onda de 12,2 cm (2,45 GHz) para evitar interferencias con las telecomunicaciones, teléfonos celulares y radiofonía⁵.

El campo eléctrico componente de las microondas es el responsable de producir el calentamiento de los materiales que interactúan con las ondas. El calentamiento es de origen dieléctrico, ocasionado principalmente por fenómenos de polarización generados por el efecto de las microondas sobre los materiales dieléctricos, y por conducción iónica.

Un material dieléctrico es aquel que contiene dipolos inducidos o permanentes y que al colocarlo entre dos electrodos actúa como un capacitor. La polarización de los dieléctricos se origina por el desplazamiento de cargas o por la rotación de los dipolos cuando se aplica un campo eléctrico externo. A nivel molecular, la polarización genera tanto la distorsión de la nube electrónica de la molécula como la rotación física del dipolo molecular. Este último

fenómeno es particularmente significativo en el calentamiento dieléctrico.

Las propiedades dieléctricas describen como interactúan los materiales con la radiación electromagnética. La permitividad (ϵ) de un material describe la habilidad de la sustancia de almacenar la carga, y la constante dieléctrica o permitividad relativa (ϵ_r) es una medida del efecto de polarización en un campo eléctrico externo.

$$\epsilon_r = \frac{\epsilon}{\epsilon_0} = \text{permitividad relativa}$$

donde ϵ_0 corresponde a la permitividad en el vacío. En la Tabla 4.1 se pueden observar los valores de la permitividad relativa de algunos solventes.

Tabla 4.1 Valores de la permitividad relativa a 20 °C de algunos solventes típicos.

Solvente	Permitividad relativa (ϵ_r)
Benceno	2,3
Tetracloruro de carbono	2,2
Cloroformo	4,8
Acetona ^a	21,4
Etanol ^a	25,7
Metanol ^a	33,7
Agua ^a	80,4

^a Referidas al valor estático.

Es importante notar que aquellas moléculas con momento dipolar permanente son las que poseen mayor permitividad relativa. Esto se debe a que la polarización dieléctrica depende principalmente de la habilidad de los dipolos de reorientarse en un campo eléctrico. De esta manera, la energía que el campo eléctrico aporta es utilizada por la molécula para rotar en función de la oscilación del campo del campo (Figura 4.1).

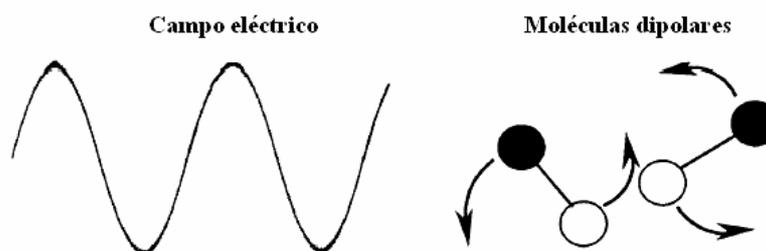


Figura 4.1 Alineamiento de moléculas dipolares con un campo eléctrico oscilante.

En fase gaseosa las moléculas poseen la suficiente separación entre ellas como para que el alineamiento con el campo se produzca fácilmente. En contrapartida, las que se encuentran en estado sólido tienen restricciones para reorientarse.

Cuando las moléculas se encuentran en estado líquido también pueden alinearse fácilmente con el campo, pero existe una dependencia con la frecuencia de irradiación y la viscosidad. A bajas frecuencias ($\leq 10^6$ Hz) las moléculas rotan en fase con el campo oscilante sin disipación de calor. A muy altas frecuencias (10^{12} Hz) éstas no rotan ya que no pueden alcanzar velocidades tan altas de oscilación, por lo que tampoco disipan calor. Entre estos extremos se ubica la región de radiación de microondas, donde la frecuencia permite que los dipolos se reorienten, pero desfasados con respecto a la oscilación del campo eléctrico. Esta diferencia de fase hace que el dipolo pierda energía por fricción molecular y por colisiones que producen el “calentamiento dieléctrico”.

Como el fenómeno de reorientación dipolar es dependiente de la frecuencia de irradiación, la permitividad del material también depende de dicha frecuencia. Los líquidos polares generalmente muestran una disminución de la permitividad con el incremento de la frecuencia de 10^6 Hz (radiofrecuencia) a 10^{12} Hz (zona del infrarrojo). La frecuencia precisa a la que la permitividad cae refleja la frecuencia de rotación molecular; además es función del tamaño y las fuerzas intermoleculares. Para moléculas con peso molecular del orden de los cientos, el proceso de relajación ocurre en la región de las microondas.

El segundo fenómeno en importancia que ocurre en el calentamiento por microondas es el de conducción. En este caso, los iones presentes en una solución migran bajo la influencia del campo eléctrico externo hacia el polo opuesto aumentando su energía cinética. (Figura 4.2). En consecuencia, aumenta sustancialmente el número y la velocidad de las colisiones entre las moléculas, produciéndose la conversión de la energía cinética en calor.

En función de la generación de calor, el mecanismo de conducción es mucho más importante que el mecanismo dipolar. Experimentalmente puede observarse (a tiempos iguales) que la temperatura final que alcanza el agua destilada al calentarla con microondas es inferior a la que alcanza el agua corriente dada la existencia de sales en esta última¹⁰.

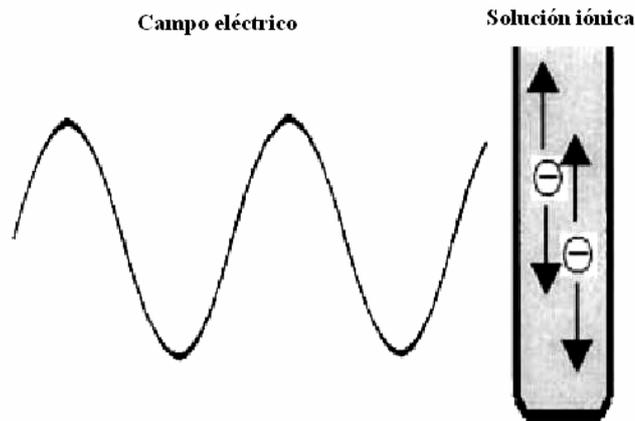


Figura 4.2 Partículas cargadas en solución moviéndose en función del campo eléctrico.

Tanto la reorientación de los dipolos como los desplazamientos de cargas que surgen de la interacción con el campo eléctrico son equivalentes a una corriente eléctrica conocida como “corriente de desplazamiento de Maxwell”. Cuando el dieléctrico es ideal, no existe desfase entre la orientación de la molécula y la variación del voltaje del campo; en consecuencia, la corriente de desplazamiento está desfasada 90° con el campo eléctrico oscilante (Figura 4.3). En esta situación, como ya se mencionó, no ocurre calentamiento dieléctrico.

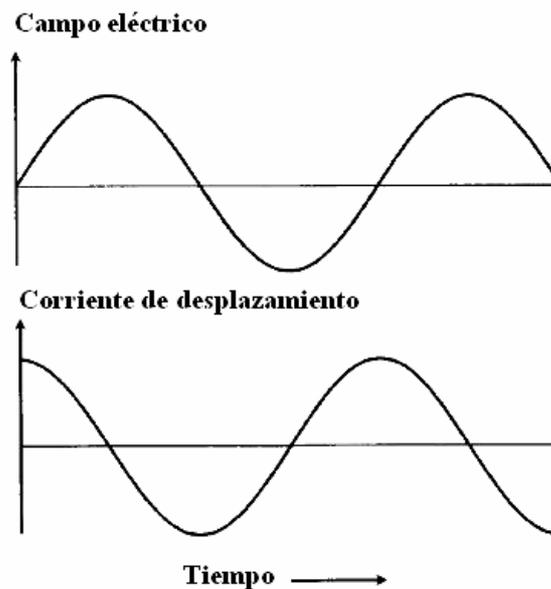


Figura 4.3 Aplicación de un campo eléctrico sinusoidal a un líquido dieléctrico ideal y su corriente de desplazamiento.

Esta situación, explicada matemáticamente con un sistema de vectores (Figura 4.4), implica que no existen componentes de la corriente de desplazamiento en fase con el campo eléctrico y en consecuencia $E \times I = 0$ ya que son perpendiculares.

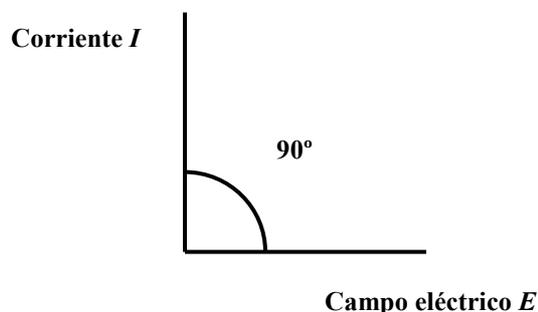


Figura 4.4 Diagrama de fase para un dieléctrico ideal donde la energía es transmitida sin pérdida.

Como se explicó anteriormente, si la radiación electromagnética está en la frecuencia de microondas ($\sim 10^9$ Hz) la rotación de las moléculas se desfasa en relación al campo. El desfase resultante (δ) adquiere una componente $I \cos \delta$ en fase con el campo eléctrico (Figura 4.5) y en consecuencia ocurre el calentamiento resistivo (“pérdida dieléctrica”).

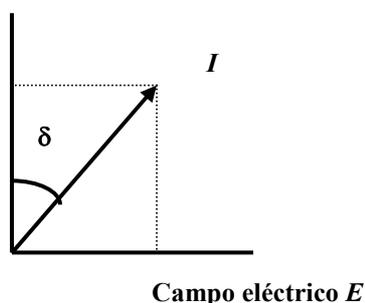


Figura 4.5 Diagrama de fase para un dieléctrico donde existe un desplazamiento δ .

A frecuencias en las que el ángulo de pérdida (δ) difiere significativamente de 90° , un líquido polar se comporta como un dieléctrico y como un conductor. Como el $\cos \delta$ es una componente de la corriente en fase, la permitividad relativa total (ϵ^*) es una magnitud compleja:

$$\epsilon^* = \epsilon' - i\epsilon''$$

El parámetro ϵ' es la parte real y refleja la habilidad del material de almacenar potencial eléctrico, mientras que ϵ'' es el factor de pérdida que refleja la habilidad del material de convertir la energía absorbida en calor. La relación entre estos parámetros está dada en función del diagrama presentado en la Figura 4.6.

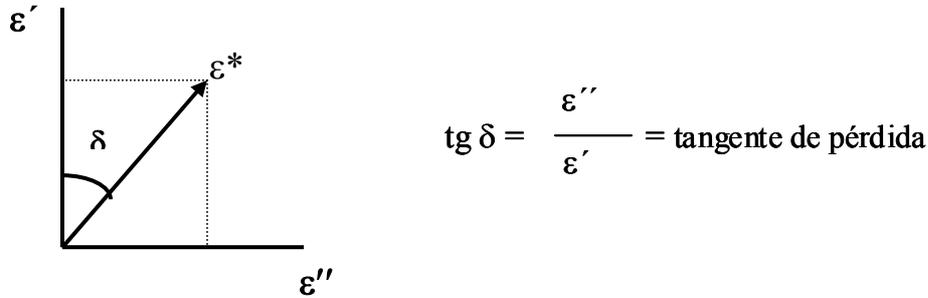


Figura 4.6 Relación entre ϵ'' , ϵ' y δ .

La tangente de δ , denominada tangente de pérdida o factor de disipación de energía, es un parámetro utilizado para comparar la eficiencia de conversión de la energía de las microondas en energía térmica, en el caso de materiales dieléctricos con ϵ' similares.

Para poder realizar una correcta interpretación del fenómeno de calentamiento dieléctrico es necesario analizar de que parámetros (además de la frecuencia) dependen ϵ' y ϵ'' . Sin entrar en deducciones matemáticas complejas, las constantes ϵ^* , ϵ' y ϵ'' se pueden expresar, según la ecuación de Debye como:

$$\epsilon^* = \epsilon_\infty + \frac{\epsilon_s - \epsilon_\infty}{1 + i\omega\tau} \quad \epsilon' = \epsilon_\infty + \frac{\epsilon_s - \epsilon_\infty}{1 + \omega^2\tau^2} \quad \epsilon'' = \frac{(\epsilon_s - \epsilon_\infty)\omega\tau}{1 + \omega^2\tau^2}$$

Donde ω es la frecuencia angular de la radiación electromagnética ($\nu/2\pi$), τ es el tiempo de relajación, mientras que ϵ_s y ϵ_∞ son los valores de la permitividad a frecuencias $\ll \tau^{-1}$ y $\gg \tau^{-1}$ respectivamente.

El tiempo de relajación es la medida del tiempo en que tardan las moléculas en adoptar una orientación al azar luego de la desaparición de un campo eléctrico estático que previamente las había alineado. Este tiempo es dependiente del volumen de la molécula, la viscosidad del medio, la temperatura y una constante de velocidad del proceso de relajación. Utilizando la ecuación de Debye, se lo puede expresar como $\tau = 4\pi r^3 \eta / kT$. Además, $\tau = 1/\omega_0$,

donde ω_0 es la frecuencia angular a la cual ϵ'' alcanza un máximo. Este máximo ocurre cuando ϵ' alcanza la mitad del valor máximo entre ϵ_s (la permitividad en un campo estático) y ϵ_∞ (la permitividad a frecuencias mucho mayores que τ^{-1}) como puede observarse en la Figura 4.7 para el agua a 20 °C. A dicha frecuencia la $\tan \delta$ alcanza su valor máximo.

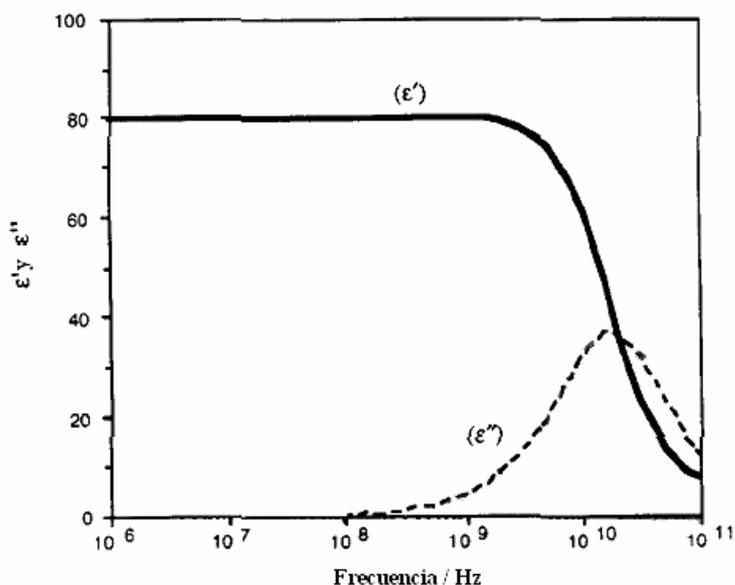


Figura 4.7 Variación de ϵ' y ϵ'' del agua con la frecuencia a 20 °C.

Para el agua el tiempo de relajación es 9×10^{-12} s y la frecuencia de relajación cercana a 18 GHz. Por lo tanto, esta es la región donde se producirá más eficientemente la conversión de la energía de microondas en calor. En la práctica, la frecuencia de trabajo de los microondas hogareños (2,45 GHz) se encuentra un poco desplazada respecto al mencionado máximo. Sin embargo, el agua se calienta eficientemente ya que el valor de la tangente de pérdida, a la mencionada frecuencia, es todavía importante ($\tan \delta = 0,1$).

En la Tabla 4.2 se pueden observar los parámetros determinados para algunos solventes a 2,45 GHz y temperatura ambiente. Por lo expuesto, cuanto más altos sean los valores de la $\tan \delta$, más rápido se calentarán los solventes. Con valores cercanos o superiores a 0,1 se puede predecir que los materiales interaccionarán eficientemente con las microondas.

Tabla 4.2 Valores de la permitividad relativa (constante dieléctrica) y la tangente de pérdida a 20 °C de algunos solventes.¹¹

Solvente	Permitividad relativa ^a	Tangente de pérdida (tan δ) ^b
Hexano	1,9	
Benceno	2,3	
Tetracloruro de carbono	2,2	
Cloroformo	4,8	
Acido acético	6,1	0,09
Acetato de etilo	6,2	0,17
THF	7,6	0,05
Acetona	20,6	0,05
Etanol	24,6	0,94
Metanol	33,7	0,66
DMSO	47,0	0,16
Agua	80,4	0,12

^a Equivalente a la permitividad estática, a temperatura ambiente y bajo la influencia de un campo eléctrico estático.

^b Valores determinados a 2,45 GHz a temperatura ambiente.

Como ya fue mencionado, si en el líquido existen especies iónicas, al aplicar un campo eléctrico externo se genera un movimiento de las mismas. En consecuencia, en estos casos el factor de pérdida depende también de la conductividad iónica (σ) :

$$\epsilon'' = \frac{(\epsilon_s - \epsilon_\infty)\omega\tau}{1 + \omega^2\tau^2} + \frac{\sigma}{\omega}$$

Para soluciones conteniendo sales, el efecto de conducción es más importante que el de relajación dipolar.

Con todos los parámetros evaluados hasta el momento, se pueden generar además dos relaciones matemáticas fundamentales, que deben tenerse en consideración para definir más precisamente el sistema de calentamiento:

$$P = \frac{\epsilon_0(\epsilon_s - \epsilon_\infty)\omega^2\tau}{1 + \omega^2\tau^2} |E|^2 \quad \frac{\Delta T}{t} = \frac{\omega\epsilon_0\epsilon' \tan\delta |E|^2}{\rho C}$$

donde:

P : Disociación de potencia por unidad de volumen en un material de conductividad σ

E : Campo eléctrico en la muestra

ω : Frecuencia angular del campo

$\Delta T/t$: Velocidad de calentamiento

ρ : Densidad del medio

C : Capacidad calorífica específica

En función de todo lo expuesto en esta breve introducción sobre el proceso de calentamiento, se pueden marcar las siguientes propiedades:

- a) Un solvente no polar (sin momento dipolar permanente) no sufre procesos de relajación en la zona de las microondas y por lo tanto no genera calor al irradiarlo (se dice que es transparente a las microondas).
- b) Un solvente polar (con momento dipolar permanente) absorbe y transforma la energía de las microondas en calor. Los solventes con $\tan \delta \geq 0,1$ son buenos solventes para realizar el calentamiento con microondas.
- c) El tiempo de relajación de un solvente disminuye al aumentar la temperatura.
- d) La $\tan \delta$ puede aumentar o disminuir su valor con la temperatura dependiendo del solvente, por lo tanto la velocidad de calentamiento varía con distintos solventes.
- e) Los solventes con tiempo de relajación ≥ 65 ps ($\tan \delta$ se incrementa con la temperatura) pueden sufrir procesos de sobrecalentamiento.
- f) La adición de sales incrementa dramáticamente la velocidad de calentamiento.
- g) En la práctica, el calentamiento depende (además de los parámetros expuestos) de las dimensiones de la cavidad de calentamiento, la difusión térmica del sistema y el volumen de la mezcla de reacción.

4.A.1.2 Tipos de hornos de microondas

Las ondas en un horno de microondas son generadas por tubos de vacío, entre los cuales el más conocido es el magnetrón. Luego las ondas son guiadas a la cavidad donde se produce el calentamiento del material. Como pueden existir zonas de alta irradiación y otras de baja irradiación, los hornos poseen sistemas de distribución de ondas.

Para producir la redistribución homogénea de las ondas dentro de la cavidad, los hornos hogareños están equipados comúnmente con agitadores o ventiladores. A este tipo de hornos se los denomina hornos multimodo. El otro tipo de hornos, denominados monomodo, poseen sistemas de redireccionamiento que orientan las ondas a un punto determinado de la cavidad, logrando que el campo eléctrico sea el máximo posible sólo en ese punto.

Las experiencias determinaron que para realizar reacciones químicas asistidas por microondas, es conveniente utilizar los hornos monomodo ya que la reproducibilidad y eficiencia son superiores. Además, en la actualidad estos equipos comerciales poseen sensores de temperatura y presión.

En los inicios, las reacciones químicas fueron realizadas con hornos hogareños y posteriormente éstos se fueron reemplazando con hornos más sofisticados del tipo monomodo. Sin embargo, dado el alto costo de estos equipos, aún son importantes los estudios realizados con hornos de tipo hogareño (como el utilizado en este trabajo de Tesis).

4.A.1.3 Reacciones asistidas por microondas aplicadas a polisacáridos

Los primeros trabajos que utilizaron microondas como fuente de energía en el campo de la química trataban sobre digestiones ácidas para destruir la materia orgánica y realizar luego análisis elementales y de cenizas^{15,16}. El calentamiento de reacciones químicas orgánicas por microondas^{7,8} se comenzó a utilizar a mediados de la década del 80. A partir de ese momento se registró un importante aumento del número de trabajos al respecto dado el notable aceleramiento que se observaba en las reacciones. El avance también se vio reflejado en el campo de los hidratos de carbono. Se desarrollaron numerosas reacciones, especialmente sobre monosacáridos y oligosacáridos. Entre ellas se encuentran reacciones de acetilación, benzoilación, alquilación, glicosidación, desprotección de grupos funcionales, halogenación, reducción y oxidación, etc¹⁷.

En el campo de los polisacáridos las aplicaciones con microondas fueron mucho más escasas. Las mismas se pueden agrupar en tres categorías:

- a) Extracción y solubilización.
- b) Reacciones de degradación e hidrólisis.
- c) Reacciones de modificación química de la estructura.

Si bien la extracción y solubilización de polisacáridos raramente representa la ruptura de uniones covalentes, las metodologías pueden encuadrarse dentro de las técnicas utilizadas en la química de los productos naturales. La mayor parte de las extracciones con microondas fueron realizadas para aislar hemicelulosa¹⁸ y pectinas¹⁹. Estas últimas poseen un importante valor agregado y son extraídas normalmente con soluciones acuosas ácidas a 85 °C a partir de diferentes fuentes. A modo de ejemplo, Fishman *et al.* ha demostrado que además de realizar las extracciones más rápidamente y con mejor rendimiento, las pectinas poseían mayor viscosidad intrínseca y peso molecular que los productos obtenidos con fuentes de calentamiento convencional¹⁹. Estas características hacían que el material aislado con microondas tuviera un valor agregado mayor.

Dentro del grupo de reacciones de hidrólisis ácida de polisacáridos, la más estudiada ha sido la realizada sobre almidón²⁰⁻²². Entre varios trabajos de diferentes autores sobre el tema, un ejemplo significativo se encuentra en el realizado por Yu *et al.*²¹. Los autores informaron la conversión completa del polisacárido en glucosa luego de calentar durante 5 minutos una suspensión de almidón en ácido clorhídrico 0,5 M. Además de acelerar notablemente la velocidad de reacción, los autores notaron que no se formaban productos secundarios coloreados como sí ocurría al realizar el calentamiento convencional.

Los ejemplos de reacciones de modificación química de los polisacáridos asistidas por microondas (sin considerar las de hidrólisis) no son muchos. Una causa que justifique este hecho parecería ser que las mismas deben ser realizadas con un buen control de la energía entregada, para así evitar procesos degradativos secundarios.

La primera reacción de modificación química informada fue la de esterificación de polisacáridos. En estos casos, el polímero más utilizado ha sido la celulosa, mientras que los agentes acilantes empleados han sido variados^{23,24}.

Con la misma idea de proteger a los hidroxilos, años más tarde se informó la metilación de un polisacárido para realizar un estudio estructural. En este caso los autores utilizaron un manano proveniente de la semilla de la planta *Cyamopsis tetragonolobus* y como agente metilante sulfato de metilo²⁵. Aún cuando la técnica pareciera ser muy útil, los autores no explicaron una serie de cuidados experimentales que se deberían considerar, especialmente teniendo en cuenta el carácter mutagénico del agente metilante.

En otra serie de trabajos realizados con microondas, se ha presentado la modificación de polisacáridos por “*grafting*”, injertándoles distintos monómeros como acrilamida, acrilonitrilo o acrilato de butilo. Estos luego continúan polimerizando de forma que se generan cadenas laterales de mayores dimensiones^{26,27}.

Otro ejemplo de modificaciones químicas de polisacáridos utilizando microondas corresponde al trabajo publicado en el año 2004 por Xing *et al.*²⁸, donde informan la sulfatación de un quitosano utilizando como agente sulfatante DMF-SO₃ y como solvente una mezcla DMF-ácido fórmico. Los resultados que obtuvieron demuestran la factibilidad de realizar la reacción de sulfatación con disminución del peso molecular del quitosano. El proceso de hidrólisis, debido a la presencia del ácido fórmico en el medio, permite obtener oligosacáridos sulfatados como productos.

En el año 2005, simultáneamente a uno de los trabajos presentado en esta Tesis (ver luego) Uy *et al.* publicaron la extracción asistida por microondas de los carragenanos ι y κ de las algas *Eucheuma denticulatum* y *Kappaphycus alvarezii*, respectivamente²⁹. La extracción fue realizada con solventes orgánicos mezclados con soluciones acuosas de hidróxido de sodio, de modo de garantizar que en los productos todas las unidades α estuviesen como 3,6-anhidrogalactosa. Por lo tanto, la energía de las microondas en este caso era utilizada tanto para realizar la extracción como para favorecer la ciclación con álcali de las unidades de α -galactosa 6-sulfato. La utilización de una solución acuosa de NaOH para realizar la extracción es muy común a nivel industrial, con fuentes de calentamiento convencional, para obtener carragenanos y agaranos con buenas propiedades gelificantes.

El trabajo es interesante desde el punto de vista del diseño del equipo de microondas utilizado, ya que permite realizar el proceso de manera continua. Sin embargo, los autores no informan algunos aspectos de importancia como los rendimientos de reacción.

4.A.2 Resultados

4.A.2.1 Caracterización del horno de microondas

En este trabajo de Tesis se utilizó un microondas hogareño para la realización de las reacciones que se enumeran luego. Como este tipo de hornos multimodo poseen una serie de limitaciones, como son la dispersión de las ondas, la ausencia de control de la temperatura y de la presión, se decidió realizar una breve caracterización del equipo.

El equipo utilizado (marca Sharp) posee un magnetrón que genera ondas con una frecuencia de 2,45 GHz y posee una potencia de salida de 1200 watts. Sus dimensiones interiores son: 37,4 cm de ancho, 22,1 cm de alto y 39,9 cm de largo.

El primer experimento se diseñó para analizar si existía dependencia entre la posición del recipiente de reacción dentro del microondas y la velocidad de calentamiento. La idea era determinar la zona de mayor calentamiento y su reproducibilidad.

La evaluación se hizo colocando un erlenmeyer con agua en diferentes posiciones del plato giratorio (diámetro = 33,5 cm) que posee el horno de microondas. Se utilizaron para el experimento 100 ml de agua destilada, potencia del equipo del 50% y tiempo de irradiación 30 s. Se observó que en el tiempo utilizado el plato giraba 1,25 vueltas, por lo tanto las ubicaciones elegidas en función del radio de este para el recipiente fueron los 4 puntos cardinales (Figura 4.8).

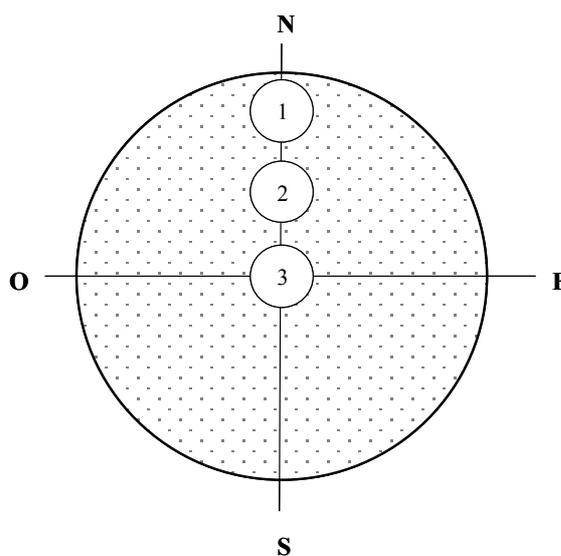


Figura 4.8 Posiciones del recipiente en el plato giratorio del microondas.

En la Tabla 4.3 se pueden observar los valores de incremento de la temperatura para cada posición. La medición fue realizada por duplicado, utilizando un termómetro de mercurio fuera del equipo, de manera sistemática, inmediatamente antes y después de realizar el calentamiento.

Tabla 4.3 Diferencia de temperatura por calentamiento de 100 ml de agua destilada por 30 s a 50% de potencia ($P_{\max}= 1200 \text{ W}$) a 2,45 GHz.

Posición	ΔT (°C) ^a
3	20,7
N1	27,0
N2	25,2
E1	25,0
E2	24,2
S1	25,1
S2	24,2
O1	26,5
O2	25,9

^a Cada medición se realizó dos veces.

Los resultados demuestran que la cavidad del horno posee zonas de mayor y menor calentamiento. Es decir que existe una dispersión no homogénea de las ondas electromagnéticas. Puede visualizarse que la zona “menos caliente” corresponde al centro del plato (**3**) y las “más caliente” al perímetro de este (**1**). Además, la diferencia de temperatura por el calentamiento en esta posición (o en la **2**) depende desde que “punto cardinal” comenzó la rotación.

Ante las evidencias se decidió realizar todos los experimentos ulteriores colocando el recipiente en el centro del plato para tener la menor dependencia posible con la posición, aún cuando no se obtenga el máximo de calentamiento.

La segunda experiencia tuvo el objetivo de analizar los niveles de potencia que ofrecía el equipo. Nuevamente se midió la diferencia de temperatura al calentar 100 ml de agua en un erlenmeyer colocado en la posición **3** durante 30 s.

Las mediciones se realizaron en función de los 5 niveles fijos de energía que ofrece el equipo de microondas. Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 4.4 y en la Figura 4.9.

Tabla 4.4 Diferencia de temperatura por calentamiento de 100 ml de agua destilada por 30 s a diferente potencia a 2,45 GHz ($P_{\max}= 1200$ W)

Nivel de potencia (W)	ΔT (°C) ^a
120 (10%, bajo)	4,2
360 (30%, medio-bajo)	12,2
600 (50%, medio)	20,7
840 (70%, medio-alto)	28,2
1200 (100%, alto)	36,1

^a Cada medición se realizó dos veces.

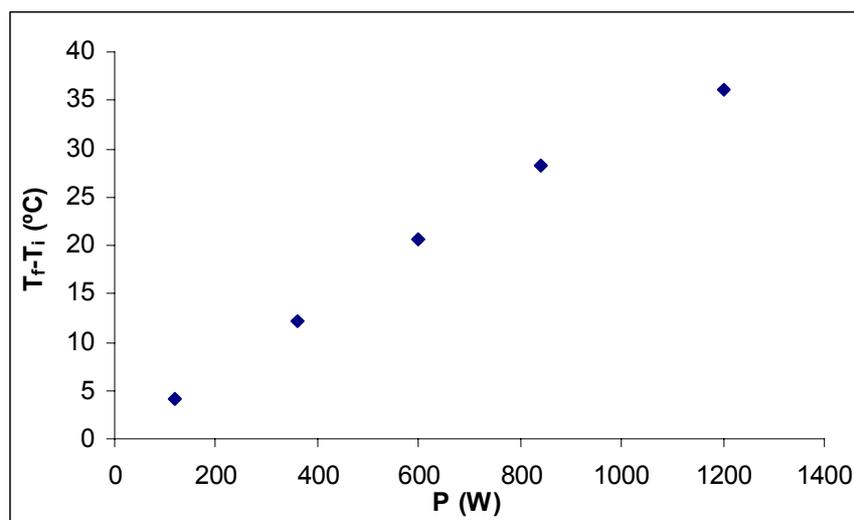


Figura 4.9 Diferencia de temperatura por calentamiento vs Potencia (W).

Como se puede observar en el gráfico, el aumento de temperatura registrado es proporcional a la energía entregada. Es interesante mencionar que aún cuando se trata de un equipo hogareño, éste parece poseer un eficiente sistema de control de la potencia.

Al operar el horno a microondas a diferentes potencias se pudo apreciar por el sonido, que en la realidad el magnetrón no modulaba la energía entregada, sino que se mantenía

encendido durante diferentes lapsos de tiempo. Es decir que al utilizar el 50% de la potencia durante 30s no significaba irradiar ese lapso de tiempo a 600 W, sino que se irradiaba a 1200 W durante 15 s. Este hecho fue corroborado en literatura y es otro de los aspectos limitantes de los equipos no diseñados especialmente para reacciones químicas.

En función de estos hechos, se decidió que en los trabajos posteriores se operaría siempre al máximo de potencia, y en los casos que fuera necesario se procedería a acortar los tiempos de reacción.

Se realizó una nueva experiencia para evaluar la linealidad del incremento de temperatura con el aumento de tiempo de irradiación. Nuevamente se utilizaron 100 ml de agua destilada y una potencia del 100%. Con los datos obtenidos se construyó el gráfico de ΔT vs tiempo (Figura 4.10).

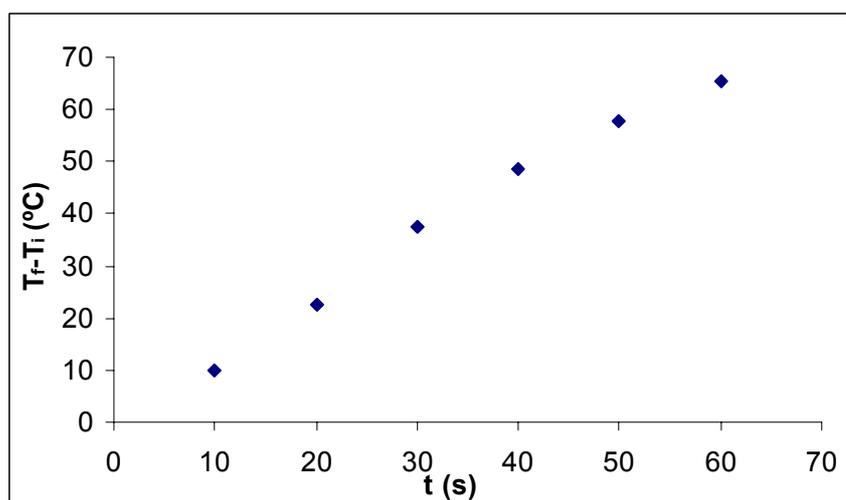


Figura 4.10 Diferencia de temperatura vs tiempo por calentamiento a 1200 W y 2,45 GHz.

El perfil de calentamiento coincide con el obtenido por otros autores. La linealidad entre el incremento de temperatura y el tiempo de irradiación puede observarse en los primeros puntos. En cambio, a temperaturas más cercanas del punto de ebullición del agua se produce un pequeño cambio de pendiente, que podría indicar una tendencia a generar una meseta.

4.A.2.2 Diseño del recipiente de reacción

Las primeras reacciones se realizaron utilizando un sistema abierto conformado por un recipiente de vidrio de aproximadamente 100 ml y un pequeño refrigerante (de aire) del mismo material. El diseño permitía trabajar a presión atmosférica, de manera de evitar el riesgo de explosión por aumento de la presión. Sin embargo, dada la alta velocidad de calentamiento de los solventes utilizados (agua y DMSO) en el horno de microondas, la capacidad del refrigerante era insuficiente. Por las dimensiones del horno era dificultoso diseñar un sistema más grande sin modificar la carcasa del equipo.

En consecuencia, se decidió utilizar un recipiente cilíndrico de polipropileno (3 x 10 cm), con una tapa a presión. A esta se le realizaron dos orificios con el objetivo de liberar la presión interna. El sistema funcionó correctamente en las primeras experiencias, aunque luego sufrió un rápido desgaste que obligaba a reemplazarlo por uno nuevo. Ante esta situación se decidió buscar otro sistema.

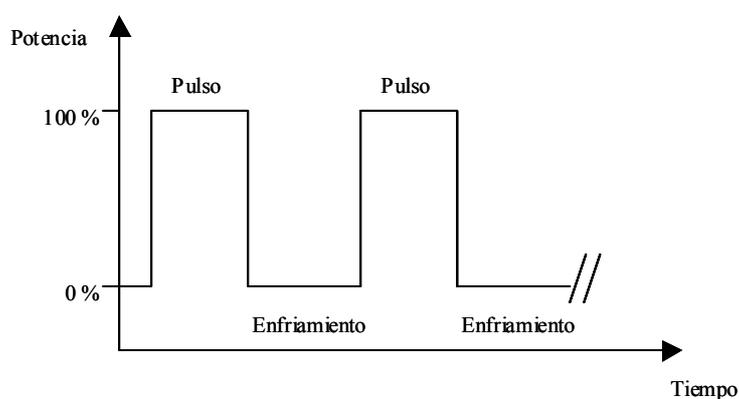
Finalmente se diseñó un recipiente construido en teflón tomando como base aquellos utilizados por los hornos de microondas fabricados especialmente para realizar digestiones de materia orgánica (Figura 4.11). Además de cambiar a un material más resistente y transparente a las microondas, se decidió que el mismo tuviera una tapa a rosca para evitar posibles proyecciones del solvente de reacción. Esto implicó comenzar a trabajar con un sistema donde la presión se elevaba a medida que aumentaba la temperatura. El recipiente fue construido en los tornos del Departamento de Industrias de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, a partir de cilindros de teflón comercial (ver Materiales y métodos).



Figura 4.11 Recipiente de teflón para las reacciones de microondas.

4.A.2.3 Diseño del sistema de calentamiento

Ante la situación de trabajar con un recipiente cerrado en el cual se va generando un aumento de la presión, se decidió (para evitar posibles explosiones) trabajar con un sistema de irradiación de pulsos. Este se diseñó sobre la base de utilizar pequeños períodos de calentamiento y de enfriamiento rápido sobre hielo con el recipiente abierto. La temperatura de enfriamiento tuvo en todos los casos el límite inferior de 55 °C. En el Esquema 4.1 se puede apreciar el sistema utilizado.



Esquema 4.1 Secuencia de pulsos en las reacciones asistidas con microondas.

Los pulsos utilizados se adaptaron a cada reacción. En las experiencias realizadas fueron de 10 s ó 15 s.

SECCION 4B

Tratamiento Alcalino asistida por microondas

4.B.1 Introducción

4.B.1.1 Antecedentes de la reacción de tratamiento alcalino

Como ya se mencionó, la reacción de tratamiento alcalino de galactosas sulfatadas comprende el desplazamiento de un grupo sulfato presente en un polisacárido, por un mecanismo S_N2 intramolecular.

El grupo sulfato de los carbohidratos es químicamente un hemiéster entre un oxhidrilo y el ácido sulfúrico. Mientras que la mayoría de los ésteres de los ácidos carboxílicos pueden hidrolizarse en medio alcalino o ácido, los hemiésteres del ácido sulfúrico son estables en álcali y lábiles en ácido. Además, aún cuando se conoce que el grupo iónico sulfato puede ser reemplazado por un mecanismo de sustitución nucleofílica, la reacción en la práctica es muy difícil que transcurra. La naturaleza iónica del grupo lo hace cinéticamente mucho menos reactivo que por ejemplo el diéster ($ROSO_2OR'$), donde la sustitución sobre uno de los grupos R es más fácil de llevar a cabo.

La carga negativa del sulfato disminuye la polaridad del enlace C-O y la repulsión electrostática entre el grupo saliente y el nucleófilo. Estos efectos son los responsables de incrementar notablemente la energía de activación de la sustitución³⁰.

Entre los pocos ejemplos de sustitución del grupo sulfato se encuentran las reacciones realizadas con el nucleófilo fuerte $LiPPh_2$. En esta reacción puede observarse la completa inversión del centro estereogénico donde estaba unido el grupo sulfato, confirmándose el mecanismo³⁰ del tipo S_N2 .

En el caso de los carbohidratos sulfatados, sólo algunos grupos sulfato pueden ser desplazados nucleofílicamente. La reacción más conocida es la que comprende la formación una unión éter intramolecular a partir de un ataque nucleofílico de un alcóxido generado en un medio alcalino en condiciones de alta temperatura. Una condición necesaria para que la reacción transcurra es que el nucleófilo esté en una configuración estérica favorable.

Como ya se ha explicado en los agaranos y los carragenanos las unidades α -galactosa 6-sulfato y 2,6-disulfato se convierten en medio alcalino en 3,6-anhidrogalactosa (o su 2-sulfato) por el desplazamiento de los grupos sulfato unidos en la posición C-6.

Esta reacción, conocida como “tratamiento alcalino”, es la sustitución nucleofílica del grupo sulfato por acción del oxhidrilo ionizado (o polarizado) unido al carbono 3 (Figura 4.12). Esta sustitución intramolecular sigue un mecanismo del tipo S_N2 y requiere previamente el cambio conformacional^{31,32} de la unidad de 4C_1 a 1C_4 . Se sabe que el ataque inverso, es decir con el oxhidrilo en C-6 y el grupo sulfato en C-3, no transcurre como es de esperar considerando las características mecánicas de una reacción S_N2 (ataque dorsal del nucleófilo).

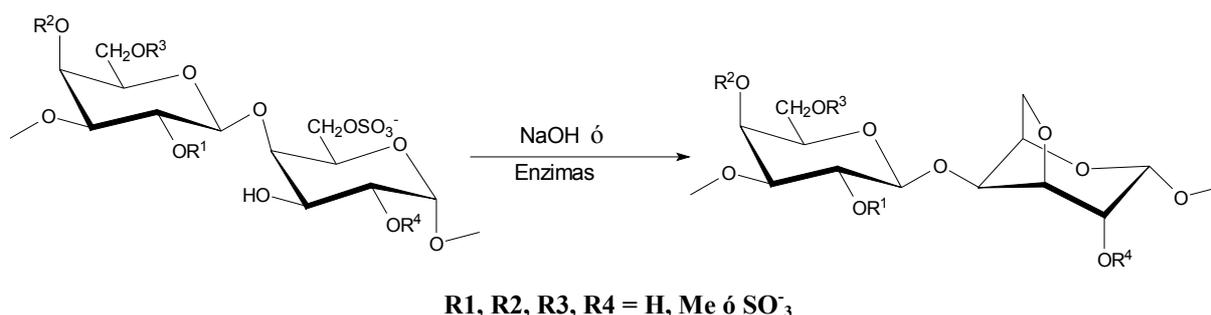


Figura 4.12 Ciclación de la α -galactosa 6-sulfato presente en un carragenano.

Percival y Wood informaron en 1963 que el grupo adyacente a un oxhidrilo libre en configuración *trans*, en unidades de galactosa presentes en un polisacárido de algas verdes, también podría sufrir una sustitución intramolecular en medio alcalino para dar un epóxido³³. Sin embargo, como estos resultados no se pudieron confirmar posteriormente, se asume que la reacción de ciclación sólo involucra a aquellas unidades de α -galactosa enlazadas por C-4 con sulfato en C-6.

La reacción de tratamiento con álcali en carragenanos y agaranos es utilizada tanto a nivel analítico en el laboratorio como a escala industrial. Las industrias realizan las extracciones en medio básico a alta temperatura para obtener los galactanos sulfatados sin unidades de α -galactosa 6-sulfato. De esta manera obtienen directamente productos fuertemente gelificantes y con gran valor agregado³⁴.

La reacción a nivel de laboratorio fue estudiada en detalle desde el punto de vista cinético por Cerezo y colaboradores. Los autores pudieron determinar que se trataba de una reacción de segundo orden, siendo de primer orden respecto a la concentración de unidades de α -galactosa 6-sulfato y de primer orden respecto a la concentración de base. Como en la práctica la concentración de hidróxido de sodio es varios ordenes de magnitud mayor que la de la galactosa sulfatada en C-6, se considera que la primera se mantiene constante durante toda la reacción. Por lo tanto se dice que la reacción es de pseudo primer orden^{32,35,36}.

Además, se determinó que la velocidad de reacción era dependiente de la existencia y de la posición de otros grupos sulfato. En la Tabla 4.5 se pueden observar los valores de las constantes de reacción de pseudo primer orden y las vidas medias determinadas en NaOH 1 M a 80 °C para diferentes unidades disacáridicas presentes en distintos polisacáridos.

Tabla 4.5 Valores de las constantes de reacción (de pseudo primer orden) y de vida media en NaOH 1 M a 80 °C .

Unidad disacáridica	Polisacárido	$k_1(10^4 \text{ s}^{-1})$	$t_{1/2}(\text{min})$
3DG4S-4DG2S6S ³⁹	v-carragenano	77,0 ^a	1,5 ^a
3DG4S-4DG2S6S + 3DG4S-4DG6S ³²	v+μ-carragenano ^b	26,0	4,5
3DG-4DG2S6S ³⁷	λ-carragenano degradado	5,0	25,0
3DG {M _{0,6} ,H} -4LG6S ³⁸	Porfirano	5,0	23,0
3DG2S-4DG2S6S ³²	λ-carragenano	0,7	172,0

^a Determinada a 70 °C.

^b Polisacárido con unidades de: v-carragenano (43%), μ-carragenano (16,6%) y de κ+ι-carragenano (39,4).

Como puede observarse, el v-carragenano es la estructura en la que la galactosa sulfatada se cicla más rápidamente. Los autores encontraron que la sustitución era tan rápida que no pudieron determinar las constantes cinéticas a 80 °C en NaOH 1 M como lo hacían normalmente. En cambio pudieron realizar las determinaciones a 70 °C³⁹.

La segunda reacción más veloz es aquella que involucra al carragenano con estructuras del tipo v+μ y κ+ι aislados del alga *Gigartina skottsbergii*³². Si bien en la mezcla está presente mayoritariamente una estructura del tipo v, llama la atención que la reacción es bastante más lenta que la informada para un polisacárido con predominancia de v-carragenano. La explicación que surge para esta diferencia es que el μ-carragenano reacciona más lentamente³⁹. Por lo tanto, se puede concluir que la presencia de un grupo sulfato en el C-2 de la α-galactosa 6-sulfato acelera la formación de 3,6-AnGal.

La velocidad de formación de 3,6-anhidrogalactosa a partir de α-galactosa 6-sulfato en sistemas disacáridicos sin otros grupos sulfato sobre la unidad β-Gal, como los presentes en el porfirano y el λ-carragenano degradado, es más lenta que la velocidad encontrada en los sistemas de la familia de carragenanos κ. Por lo tanto, se concluyó que estas últimas reaccionan más rápidamente por la presencia del grupo sulfato en el C-4 de la β-galactosa^{37,38}.

Es importante notar que las estructuras encontradas en el λ -carragenano degradado (parcialmente desulfatado y despolimerizado) y en el porfirano, poseen constantes de velocidad similares, aún cuando son unidades disacarídicas diastereoméricas (unidad α -Gal es D en un caso y L en otro). Esto indicaría que la configuración tiene escasa influencia en la cinética de reacción.

La velocidad de reacción más lenta corresponde a las unidades presentes en el λ -carragenano. La presencia de la β -galactosa 2-sulfato contigua a la unidad α es la responsable de hacer más lenta la reacción de sustitución nucleofílica³². Esto indica que las velocidades de reacción aumentan según la presencia de sulfato en la unidad de β -galactosa en el orden: 2-sulfato < sin sulfato < 4-sulfato. Se ha sugerido que las diferentes velocidades de ciclación están justificadas en la facilidad o dificultad que presentan las unidades de α -galactosa 6-sulfato de pasar de una conformación 4C_1 a 1C_4 . Este cambio conformacional es necesario para que se produzca luego el ataque intramolecular. La velocidad del cambio conformacional se podría ver afectada por la presencia de grupos sulfato adicionales en las unidades disacarídicas repetitivas y en consecuencia afectaría la cinética global. Justamente se ha determinado por modelado molecular que la conformación alrededor de la unión glicosídica de la unidad de α -D-galactosa varía con la sulfatación de la unidad de β -Gal: una conformación predomina cuando hay sulfato en C-4, otra con sulfato en C-2, y ambas se equilibran cuando no hay sulfato⁴⁰.

Los estudios permitieron además determinar que la velocidad de la sustitución nucleofílica en medio alcalino se incrementaba con la concentración de hidróxido de sodio, la fuerza iónica de la solución y la temperatura de reacción³⁶. En la Tabla 4.6 se muestran tiempos de reacción utilizados normalmente a nivel laboratorio para garantizar que todas las unidades 4LG6S presentes en los distintos polisacáridos se ciclen.

Tabla 4.6 Tiempos de reacción utilizados para el tratamiento alcalino de diferentes galactanos a 80 °C en NaOH 1 M .

Unidad disacarídica	Polisacárido	T(min)
3DG4S-4DG2S6S	ν -carragenano	30
3DG4S-4DG2S6S + 3DG4S-4DG6S	$\nu+\mu$ -carragenano	120-180
3DG{M _{0,6} ,H}-4LG6S	Porfirano	180-300
3DG2S-4DG2S6S	λ -carragenano	960

4.B.2 Resultados

4.B.2.1 Tratamiento alcalino asistida por microondas. Estudios preliminares

En este trabajo de Tesis se estudió la reacción de tratamiento alcalino asistida por microondas de tres galactanos sulfatados diferentes aislados de algas rojas. El objetivo era evaluar la cinética de reacción y determinar de que factores podía depender la misma. La elección de los polisacáridos a utilizar fue realizada en base a las diferentes velocidades de reacción informadas al utilizar calentamiento convencional (Tabla 4.6)^{32,37-39}.

Uno de los polisacáridos elegidos para realizar el tratamiento alcalino asistido por microondas fue el carragenano μ/v parcialmente ciclado aislado por Stortz y Cerezo de la fase cistocárpica del alga *Iridaea undulosa* (C). Este polisacárido, ya utilizado en el Capítulo 3, posee todas su unidades de β -galactosa sulfatadas en la posición 4, mientras que sus unidades α pueden ser 3,6-anhidro-D-galactosa, D-galactosa 6-sulfato, D-galactosa 2,6-disulfato o 3,6-anhidro-D-galactosa en relación 55:5:20:20^{41,42}.

Otro de los polisacáridos utilizados fue el λ -carragenano (T₁) aislado también del alga *Iridaea undulosa* pero de su fase tetraspórica (analizado en el Capítulo 3, detalles de la extracción en Materiales y métodos). La estructura determinada previamente por Stortz *et al.* corresponde a la de un polisacárido con unidades alternantes de α -D-galactosa 2,6-disulfato y unidades de β -D-galactosa 2-sulfato^{41,42}.

El tercer polisacárido utilizado fue el agarano denominado porfirano, aislado del alga *Porphyra columbina* (P, también utilizado en el Capítulo 3). Como ya fue mencionado, su estructura consiste en unidades alternantes de β -D-galactosa ó 6-O-metil- β -D-galactosa y α -L-galactosa 6-sulfato ó 3,6-anhidro- α -L-galactosa³⁸. Es decir que este polímero posee los grupos sulfato sólo en las posiciones C-6 de las unidades α -L-galactosa.

La composición de estos polisacáridos y los azúcares constituyentes determinados como alditoles peracetilados pueden observarse en la Tabla 4.7.

Tabla 4.7 Composición y azúcares constituyentes de los polisacáridos estudiados.

	C	T ₁	P
Carbohidratos (%)	62	64	67
Sulfato (% SO ₃ Na)	28	45	16
Relación molar (%)			
3,6-AnGal	36	1	11
Gal	64	99	54
6-O-Me-Gal	–	–	35

Las reacciones en el horno de microondas fueron realizadas al 100% de la potencia del equipo y con períodos de calentamiento de 15 s. A continuación de cada paso se dejó enfriar parcialmente (hasta 55 °C) y se liberó la presión generada. La cantidad de 3,6-anhidrogalactosa formada en cada reacción se detectó por CGL utilizando el sistema “one-pot” presentado en el Capítulo 3, para la generación de alditoles peracetilados provenientes de productos tratados con álcali.

Las primeras pruebas fueron realizadas sobre el porfirano disuelto en 10 ml de NaOH 1 M. En los cromatogramas de los hidrolizados se pudo detectar que, además de los azúcares componentes esperados, existía un par de picos nuevos de identidad desconocida y en pequeña proporción. Por análisis de CGL acoplado a masa se obtuvieron los espectros de estos dos compuestos, que llamativamente eran muy similares. (Figura 4.13).

Los espectros de masa y la naturaleza de la reacción permitieron suponer la existencia de reacciones secundarias, que involucraran la degradación de los monosacáridos constituyentes. Es sabido que los carbohidratos al ser tratados en medio básico generan una mezcla compleja de productos. La reacción secundaria más conocida en este medio es la de formación de ácidos sacarínicos⁴³, aunque existen otras menos conocidas como la de generación de ciclopentenodionas volátiles⁴⁴.

Del análisis de los espectros, se puede sugerir que el fragmento de m/z 96 corresponde a una ciclopentenodiona, mientras que el de m/z 140 correspondería a una acetoxiciclopentenona. Dichos productos son compatibles con las reacciones descritas en el párrafo anterior, aunque las mencionadas reacciones no fueron estudiadas en detalle en el presente trabajo de Tesis.

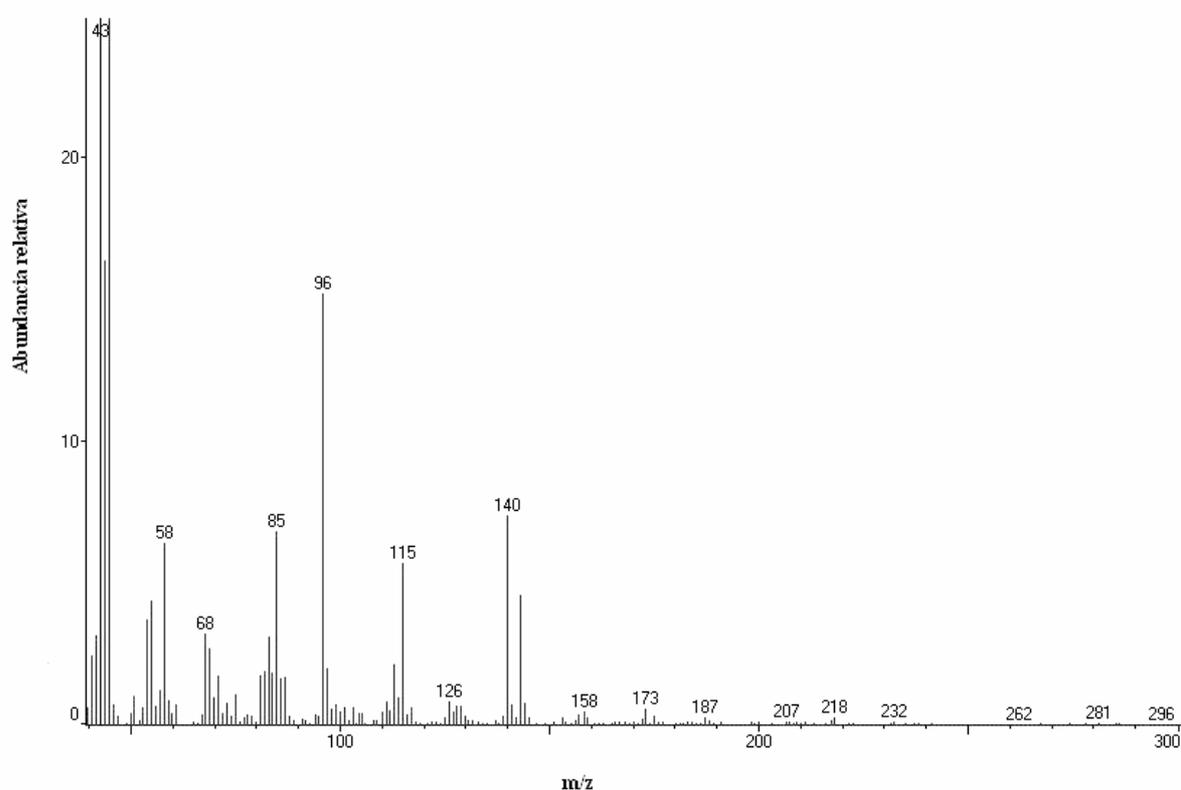


Figura 4.13 Espectro de masa de los picos incógnita tras hidrólisis del porfirano tratado con álcali, luego de reducción y acetilación de los monosacáridos generados.

En 1961, Rees postuló la necesidad de reducir los extremos reductores de los polisacáridos para evitar posibles degradaciones durante el tratamiento con álcali⁴⁵. Por lo tanto, en vista que en las primeras reacciones aparecieron signos de degradación se comenzó a trabajar con los polisacáridos prerreducidos.

Al utilizar fuentes de calentamiento convencional la reducción de los extremos reductores de los polisacáridos se realiza en el mismo medio alcalino de reacción. Sin embargo, se determinó que al utilizar las microondas no era conveniente tener NaBH_4 en el medio, considerando los aumentos abruptos de presión que podrían ocurrir en el reactor motivados por la generación de hidrógeno, el cual además de difundir fácilmente, es inflamable y explosivo. En consecuencia, las reducciones fueron realizadas en un paso anterior a la reacción de ciclación y el producto fue purificado posteriormente por diálisis y liofilización. Efectivamente al realizar el tratamiento alcalino con el producto prerreducido se comprobó que no existían signos de degradación.

4.B.2.2 Tratamiento alcalino de galactanos de algas rojas prerreducidos

4.B.2.2.1 Tratamiento alcalino con NaOH 1 M

Los tres polisacáridos elegidos, previamente reducidos, fueron sometidos a tratamiento alcalino en solución acuosa de NaOH 1 M (10 mg en 10 ml). Se realizó calentamiento en el horno de microondas (períodos de 15 s) y se tomaron pequeñas alícuotas a distintos tiempos para determinar la cantidad de 3,6-anhidrogalactosa formada. En la Tabla 4.8 se pueden observar las proporciones de los azúcares componentes a distintos tiempos.

Tabla 4.8 Azúcares componentes (% molar) de los polisacáridos tratados con NaOH 1 M, determinados como alditoles peracetilados.

Tiempo(s)	C		T ₁ ^b		P ^b		
	3,6-AnGal	Gal	3,6-AnGal	Gal	3,6-AnGal	Gal	6-O-Me-Gal
0	36	64	1	99	10	55	35
15	40	60	ND ^a	ND	21	45	34
30	46	54	ND	ND	26	40	34
45	50	50	ND	ND	33	32	35
60	50	50	9	90	47	19	34
120	-	-	17	83	47	20	33
360	-	-	24	76	-	-	-

^a ND = no determinado.

^b Para T₁ máximo valor de 3,6-AnGal = 46% (ver luego).

Se puede observar claramente en la Tabla 4.8 como al calentar un mayor período de tiempo aumenta la proporción de 3,6-anhidrogalactosa formada. Para C y el porfirano se puede apreciar que el nivel de 3,6-AnGal alcanza el máximo esperado en el período de tiempo utilizado. Sin embargo, para T₁ (λ-carragenano) sólo alcanzó un 24% luego de 6 minutos.

La velocidades de reacción determinadas previamente con calentamiento convencional, como ya se explicó, eran de pseudo primer orden, por lo tanto:

$$-d[\text{Gal-6S}] / dt = k'[\text{Gal-6S}]$$

Integrando esta ecuación se llega a

$$\ln ([\text{Gal-6S}]_t / [\text{Gal-6S}]_0) = -k't$$

Esta expresión había sido utilizada previamente³² para determinar y comparar las constantes de velocidad para los distintos polisacáridos. Sin embargo, esta ecuación no es válida para la reacción realizada en el horno de microondas ya que la temperatura varía permanentemente durante la reacción. Como k es función de la temperatura ($k = A e^{-E_a/RT}$), la ecuación cinética posee una variable más. De manera que los resultados obtenidos no permiten realizar una comparación numérica concreta entre las cinéticas de reacción utilizando fuentes de calentamiento convencional y microondas. De cualquier modo, para determinar de manera relativa el orden de velocidad para cada polisacárido utilizado, se decidió analizar los datos considerando que el perfil de calentamiento en todos los casos era similar y en consecuencia calcular un valor de k (k_{aparente}) “independiente” de la temperatura. Si bien este valor carece de significado cinético, es útil para realizar la comparación de las velocidades de reacción.

Entonces considerando la expresión de velocidad e integrando se tiene que:

$$-d[\text{Gal-6S}] / dt = k_{\text{obs}}[\text{Gal-6S}]$$

$$\ln ([\text{Gal-6S}]_t / [\text{Gal-6S}]_0) = -k_{\text{ap}} t$$

que es equivalente a:

$$\ln \frac{[3,6\text{-AnGal}]_t - [3,6\text{-AnGal}]_{\infty}}{[3,6\text{-AnGal}]_0 - [3,6\text{-AnGal}]_{\infty}} = -k_{\text{ap}} t$$

Por lo tanto, graficando los datos que figuran en la Tabla 4.8 se pueden obtener los valores de k_{ap} para cada polisacárido (Figura 4.14).

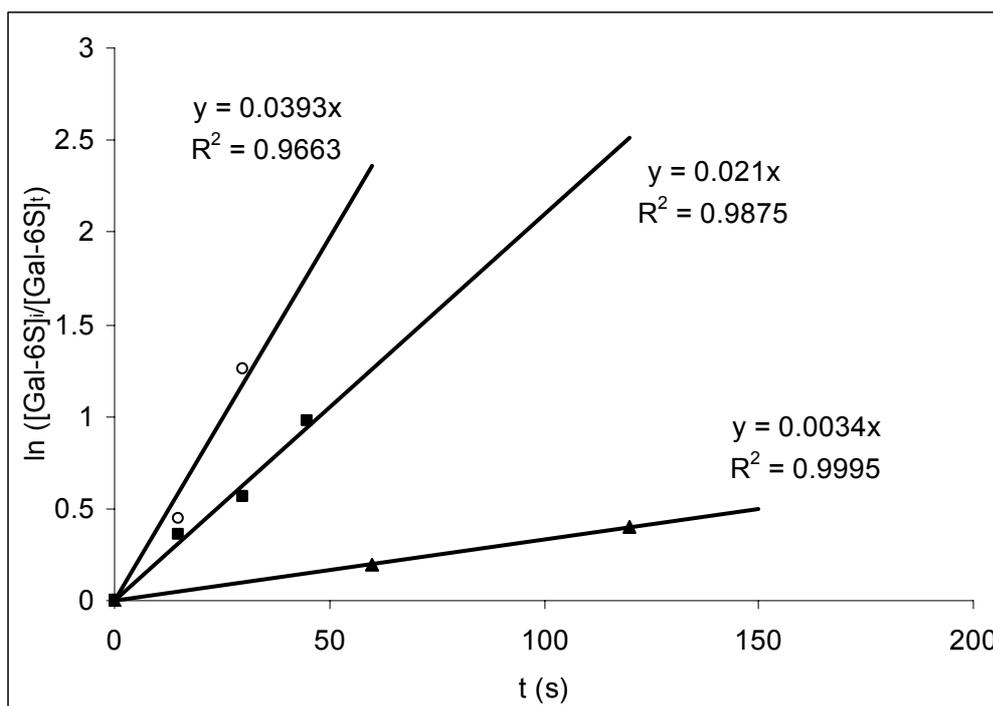


Figura 4.14 Gráfico de $\ln ([\text{Gal-6S}]_i / [\text{Gal-6S}]_t)$ vs tiempo (t). (○) C (μ/v -carragenano), (▲) T₁ (λ -carragenano), y (■) P (porfirano).

Los valores de k_{ap} obtenidos muestran que el orden relativo de las velocidades de reacción es el mismo que se informó al realizar la reacción con calentamiento convencional^{32,38} (Tabla 4.6).

La galactosa 6-sulfato adyacente a la β -galactosa sulfatada en la posición C-4, como la presente en el polisacárido C, es la que reacciona más rápidamente, mientras que la contigua a unidades β sulfatadas en la posición C-2 es la más lenta (λ -carragenano). En el porfirano la velocidad de formación de 3,6-AnGal fue intermedia a la determinada para los dos carragenanos, pero con un orden de magnitud más comparable a la velocidad de ciclación del μ/v -carragenano.

4.B.2.2.2 Tratamiento alcalino utilizando diferentes concentraciones de NaOH

Posteriormente, en otra serie de experimentos se analizó la dependencia de la velocidad de reacción con la concentración de hidróxido de sodio. La primera evaluación se

realizó con el porfirano, ampliando a dos nuevas concentraciones de base (2 y 3 M), estudiadas también a distintos tiempos.

En las Tablas 4.9 y 4.10 se pueden observar los resultados obtenidos y en la Figura 4.15 el correspondiente gráfico de formación de 3,6-anhidrogalactosa.

Tabla 4.9 Azúcares componentes (% molar) del porfirano tratado con NaOH 2 M, determinados como alditoles peracetilados.

Tiempo (s)	% molar		
	3,6-AnGal	Gal	6-O-Me-Gal
0	10	55	35
30	34	31	35
60	47	33	20
90	47	34	19

Tabla 4.10 Azúcares componentes (% molar) del porfirano tratado con NaOH 3 M, determinados como alditoles peracetilados.

Tiempo (s)	% molar		
	3,6-AnGal	Gal	6-O-Me-Gal
0	10	55	35
30	23	42	35
60	36	35	29
90	45	34	20

Los resultados indicaron que la velocidad de reacción aumentó al utilizar NaOH 2 M con respecto a cuando se utilizó la concentración de 1 M. Además del aumento de la pendiente en los primeros puntos, se observó cómo al utilizar NaOH 2 M se llegó más rápidamente al máximo de 3,6-anhidrogalactosa formada. Sin embargo, resultó sorprendente encontrar que la reacción en NaOH 3 M transcurría más lentamente que al utilizar concentraciones menores (1 M y 2 M). Este resultado se contrapone claramente con los

obtenidos anteriormente (por calentamiento convencional) que indicaban que la reacción era de primer orden con respecto a la concentración de base (hasta 6 M al menos)³².

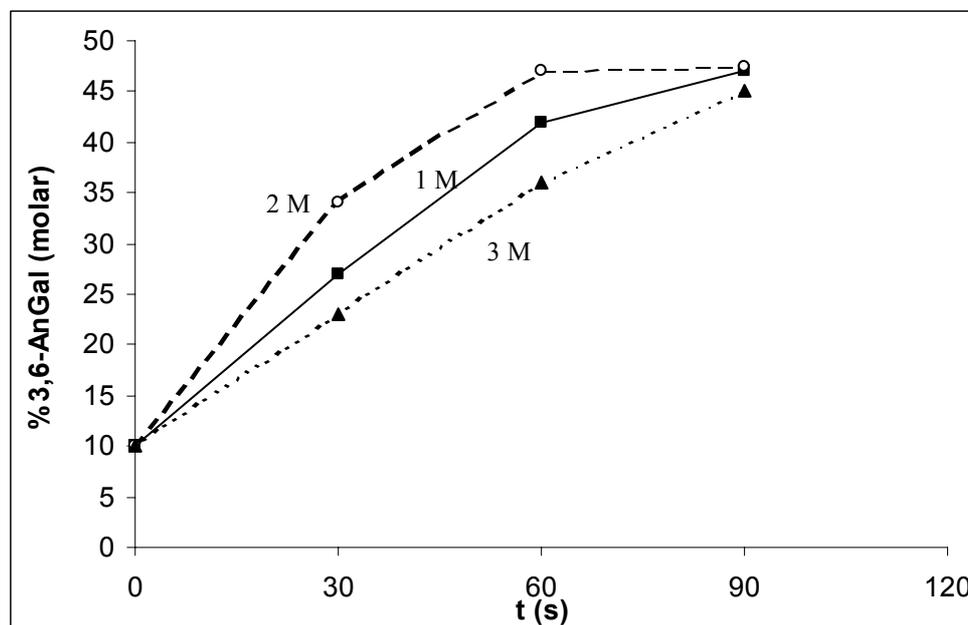


Figura 4.15 Gráfico de proporción de 3,6-AnGal en el porfirano vs tiempo (t) a [NaOH]: (■) 1 M, (○) 2 M y (▲) 3 M.

En base a estos resultados, se decidió estudiar más detalladamente el efecto de la concentración de base en la reacción con los tres polisacáridos utilizados. Para ello se utilizaron diferentes concentraciones de NaOH y un tiempo de calentamiento fijado para producir entre un 10 y un 20% de 3,6-AnGal adicional. Los resultados obtenidos se presentan en la Figura 4.16.

El estudio demostró que la velocidad de formación de 3,6-anhidrogalactosa aumentaba hasta concentraciones de base cercanas a 2 M para los tres polisacáridos utilizados, como ocurre con el calentamiento convencional. Sin embargo, a concentraciones mayores (3 M) se registró un descenso de la velocidad de reacción. Estos resultados no esperados llevaron a pensar que la temperatura de reacción alcanzada con cada concentración de base era diferente.

En un experimento separado se determinó el incremento de la temperatura por calentamiento con microondas de soluciones de NaOH de diferentes concentraciones. Este experimento se repitió también agregándole a la solución 10 mg de polisacárido P. La Figura 4.17 muestra el gráfico obtenido de ΔT vs [NaOH] para un período de calentamiento de 30 s.

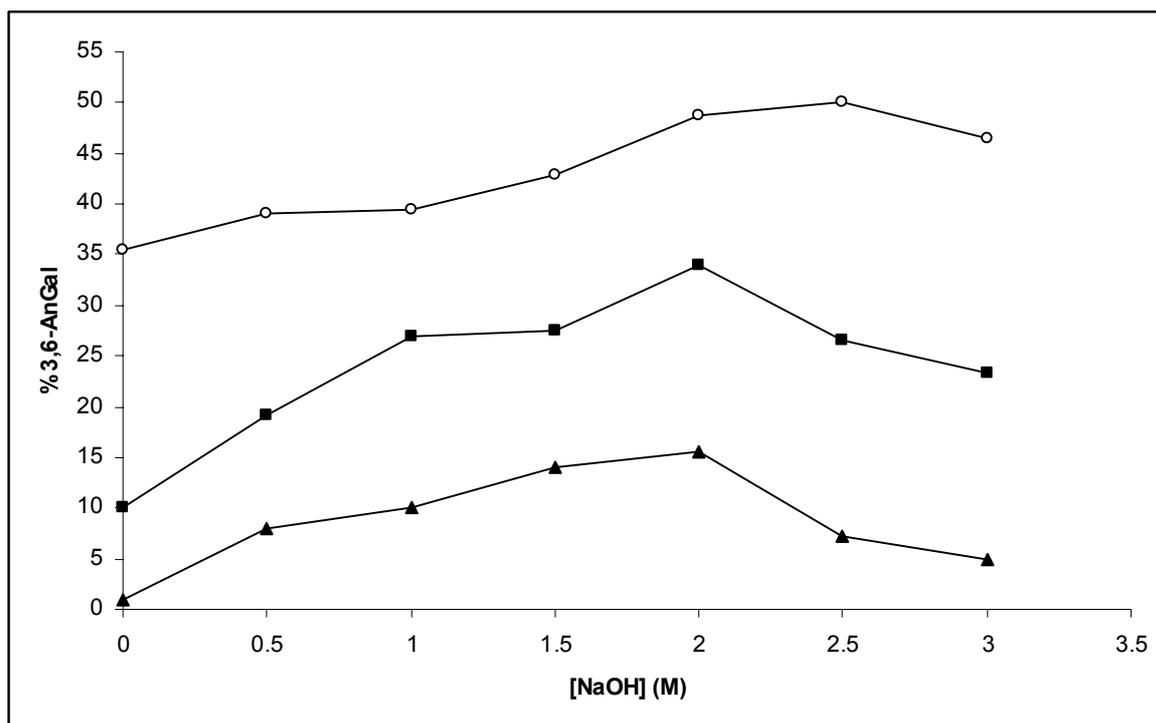


Figura 4.16 Gráfico de proporción de 3,6-AnGal vs [NaOH] para: (○) C (μ/v-carragenano, 15 s de calentamiento), (■) P (porfirano, 30 s de calentamiento), (▲) T₁ (λ-carragenano, 60 s de calentamiento).

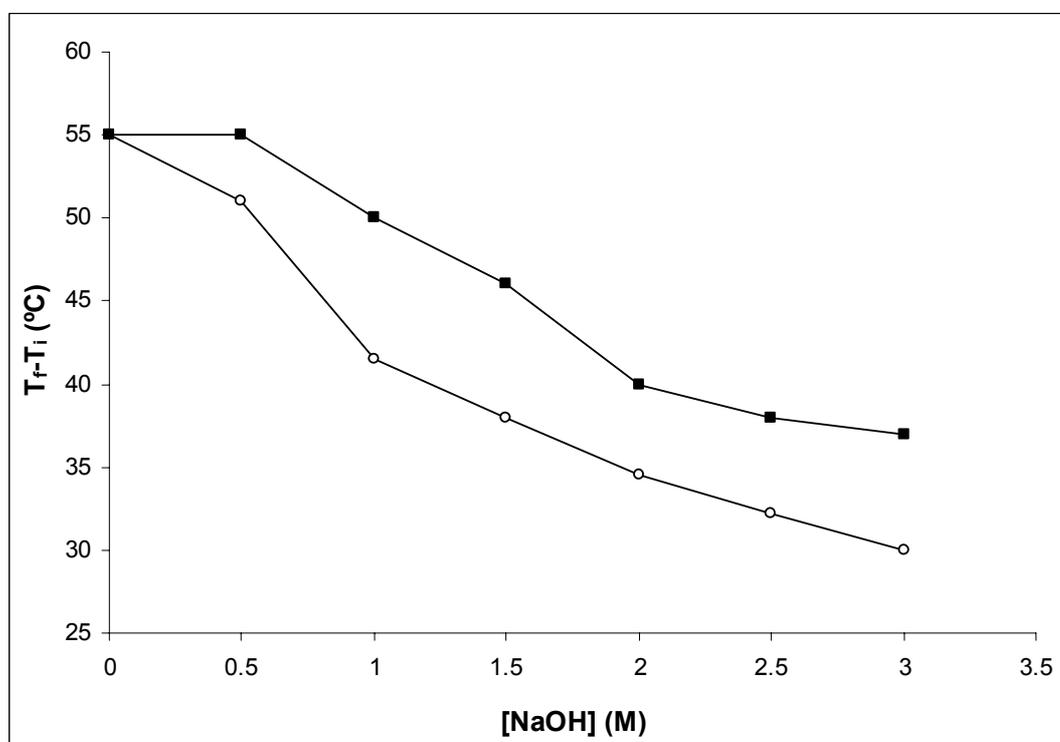


Figura 4.17 Diferencia de temperatura por calentamiento vs [NaOH], con calentamiento de 30 s: (○) sin polisacárido y (■) con polisacárido.

Como muestra la figura, el incremento de la temperatura de la solución disminuye con el aumento de la concentración de álcali, independientemente de la presencia de polisacárido en solución. El agregado de porfirano tuvo efecto en las magnitudes de los incrementos de la temperatura. En los casos en que estaba presente, la diferencia de temperatura registrada fue mayor que en su ausencia, indicando que reducía en parte el efecto del hidróxido de sodio.

Si bien es sabido que la presencia de iones en una solución diluida acelera el calentamiento (conductividad) al utilizar microondas, el comportamiento de la misma no es tan claro cuando se trabaja con elevadas concentraciones de sal, altas temperaturas y con el efecto de la presión. En estos casos, las interacciones moleculares agua-agua, ion-ion y agua-ion son más diversas y sus procesos de relajación son más complejos⁴⁶. Además en soluciones de iones hidróxido están presentes tanto mecanismos de conductividad como de polarización.

Los resultados obtenidos pueden ser explicados por el efecto que causa la base sobre el tiempo de relajación del agua. Al producirse el agregado de base cambia el τ lo que genera una alteración de la tangente de pérdida, y en consecuencia cambia la eficiencia de la conversión de la energía de las microondas. Los resultados indican que esa eficiencia es menor al aumentar la concentración de NaOH.

El efecto del polisacárido podría deberse a la dispersión dieléctrica causada por la unión de las moléculas de agua al polisacárido.

Los resultados mostraron que la concentración óptima para el tratamiento alcalino era 2 M. Esto indica un balance entre un efecto de una temperatura menor (Figura 4.17) y el efecto que produce una mayor concentración de álcali. En consecuencia, se decidió estudiar la cinética de reacción para los tres polisacáridos a la mencionada concentración de base (Figura 4.18).

En la Tabla 4.11 se muestran los rendimientos y la relación de azúcares componentes para los productos generados con NaOH 2 M, tras aislamiento por diálisis y liofilización

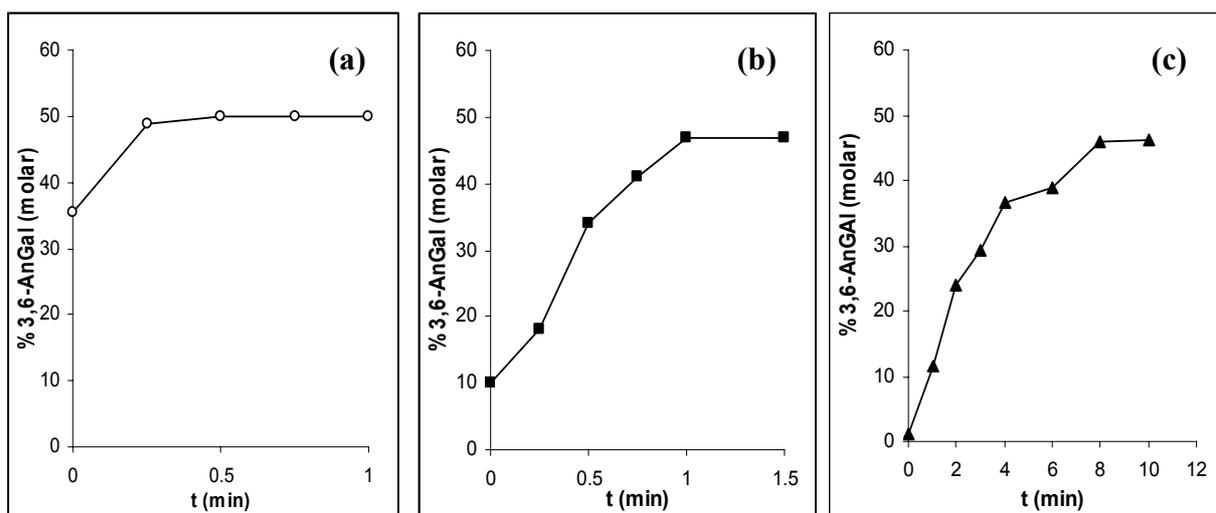


Figura 4.18 Cantidad de 3,6-anhidrogalactosa generada por calentamiento con microondas usando NaOH 2 M en (a) C, (b) P y (c) T₁.

Tabla 4.11 Azúcares componentes (% molar) y rendimiento de los polisacáridos tratados con NaOH 2 M.

Polisacárido	Rendimiento	Relación 3,6-AnGal/Gal ^a
C	83	1,00
P	96	0,90
T ₁	88	0,85

^a Para el porfirano Gal= Gal + 6-O-Me-Gal.

Se observa que el polisacárido C alcanza el valor máximo de 3,6-AnGal a los 30 s, el porfirano al minuto y el λ -carragenano (T₁) a los 8 minutos. Esto demuestra que al igual que cuando se utilizó NaOH 1 M, el orden relativo de las velocidades es idéntico al encontrado al utilizar fuentes de calentamiento tradicional.

De acuerdo al análisis, los productos obtenidos poseen prácticamente todas sus unidades α como 3,6-anhidrogalactosa. Además fueron recuperados con altos rendimientos y con características similares a los generados por calentamiento convencional (Tabla 4.11).

Todos estos resultados muestran la posibilidad de reemplazar la técnica tradicional utilizada a nivel del laboratorio por una que utilice las microondas como fuente de energía, con un importante ahorro de tiempo (Tabla 4.12).

Tabla 4.12 Tiempos de reacción (TR) del tratamiento alcalino de polisacáridos.

Polisacárido	β -Gal sulfatada en	TR con microondas (min)		TR convencional (min)
		NaOH 1 M	NaOH 2 M	NaOH 1 M
C	C-4	0.75	0,50	120-180
P	-	1.5	1,00	180-300
T ₁	C-2	>10.0	8,00	960

4.B.2.3 Tratamiento alcalino de galactanos con diferentes bases

Posteriormente se evaluó la posibilidad de utilizar otra base en la reacción. Tanto usando KOH como NaOH, al calentar con microondas el porfirano (por 30 s) en una solución de base de concentración 2 M se logró que la proporción de 3,6-AnGal llegará al 34%.

Cabe destacar que igualmente es conveniente evitar la utilización de KOH ya que el K^+ puede generar la gelificación de algunos polisacáridos como el κ -carragenano⁴¹.

Cuando se reemplazó el NaOH por Na_2CO_3 se obtuvieron los resultados que se presentan en la Figura 4.19. La reacción se realizó sobre el porfirano calentando 15 s con concentraciones de base 1 M.

La menor basicidad del Na_2CO_3 es la causa de la disminución de la velocidad de formación de la 3,6-AnGal, tal como fue informado con el calentamiento convencional³⁶.

Como la utilización del carbonato genera presión extra en el reactor, no es apropiado utilizarlo en un diseño como el de este trabajo donde no se cuenta con un sistema de medición y liberación de presión. Por lo tanto, en estas condiciones es conveniente utilizar NaOH como base.

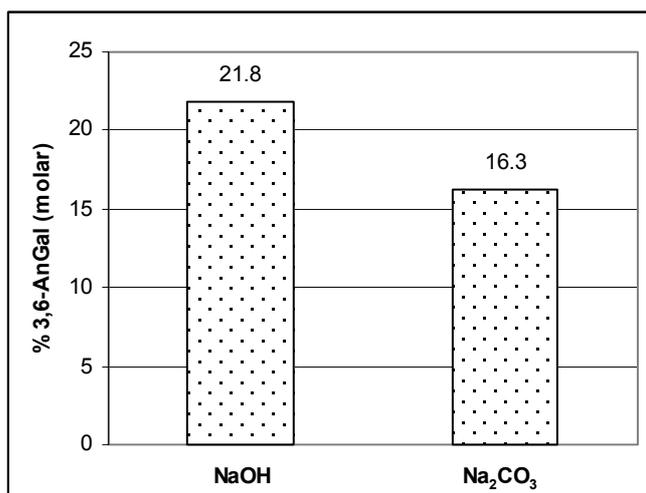


Figura 4.19 Proporción de 3,6-anhidrogalactosa generada en el porfirano por calentamiento con microondas durante 15 s usando NaOH y Na₂CO₃ 1 M.

4.B.3 Conclusiones

Los resultados obtenidos demuestran que las microondas pueden ser utilizadas como fuente de energía en la reacción de tratamiento alcalino para la ciclación intramolecular de la α -galactosa 6-sulfato presente en carragenanos y agaranos.

En concordancia con los resultados obtenidos sobre el tema al mismo tiempo por otro grupo²⁹, se abre la posibilidad de utilizar la mencionada fuente de energía a nivel industrial para la generación de ficocoloides ricos en 3,6-anhidrogalactosa y con fuertes propiedades gelificantes.

Las velocidades de las reacciones asistidas por microondas para los diferentes polisacáridos utilizados fueron más de dos órdenes mayores que aquellas obtenidas por calentamiento convencional en los laboratorios.

El orden relativo de las velocidades de ciclación de las diferentes unidades de 3,6-anhidro- α -galactosa es el mismo al utilizar fuentes de calor convencionales y microondas.

Sorpresivamente se determinó que la velocidad de la reacción de tratamiento alcalino asistida por microondas no tenía una dependencia lineal con la concentración de álcali. En consecuencia, dados estos resultados se determinó que es más conveniente realizar la reacción en una solución de NaOH de concentración 2 M, ya que la velocidad resulta ser máxima.

SECCION 4C

Desulfatación solvolítica de polisacáridos asistida por microondas

4.C.1 Introducción

4.C.1.1 Antecedentes de las reacciones de desulfatación

La determinación estructural de los polisacáridos requiere un detallado estudio de la composición, posiciones de unión y posible secuenciación. Si bien los métodos espectroscópicos proveen información importante, a menudo las estructuras son tan complejas que el estudio debe complementarse con análisis químicos.

La metilación es uno de los métodos más utilizados para determinar las posiciones de unión de las unidades presentes en los polisacáridos⁴⁷. Mediante este proceso se forman los éteres metílicos de todos los oxhidrilos libres presentes en el polisacárido, el que posteriormente se hidroliza y se identifican los monosacáridos metilados que se generan⁴⁸.

El problema es aún más complejo cuando en el polímero hay grupos sustituyentes como los ésteres sulfato, ya que la metilación no permite discriminar entre la posición de unión de estos y las uniones glicosídicas.

Para identificar la posición en que se encuentran unidos los grupos sulfato suelen utilizarse técnicas de desulfatación. Posteriormente los polisacáridos desulfatados generados son analizados por métodos espectroscópicos como RMN y por análisis de metilación. Por comparación de los resultados obtenidos con los del polisacárido sulfatado original, se pueden determinar las posiciones de unión de los grupos sulfato y de las uniones glicosídicas⁴⁷.

Además, las desulfataciones de los biopolímeros también puede ser aplicadas en ocasiones para modular las propiedades biológicas y para crear nuevas estructuras modificadas.

4.C.1.1.1 Desulfatación ácida

La primera técnica de desulfatación de polisacáridos utilizada implicó el uso de un medio ácido. Se realizaba con una solución acuosa ácida o mejor aún con cloruro de hidrógeno metanólico⁴⁹. Este último ha sido muy utilizado en polisacáridos con uniones glicosídicas fuertes capaces de resistir la hidrólisis ácida, como los glicosaminoglicanos. Sin

embargo, en otros polisacáridos la reacción produce fuertes procesos de despolimerización. En 1965, Dolan y Rees estudiaron la cinética de hidrólisis de las uniones de los grupos sulfato presentes en un λ -carragenano. Determinaron que las velocidades de eliminación de los grupos sulfato posicionados sobre oxhidrilos ecuatoriales era más rápida que cuando la orientación era axial⁵⁰. El método fue, sin embargo, fuertemente despolimerizante.

La desulfatación ácida de los agaranos y los carragenanos es prácticamente imposible de realizar con esta técnica dado que se degrada la 3,6-anhidrogalactosa presente (ver Capítulo 3) y el grado de despolimerización es muy alto. Sin embargo, ha podido ser utilizada en agaranos sin 3,6-anhidrogalactosa⁵¹.

4.C.1.1.2 Desulfatación solvolítica

Ante los inconvenientes que generaba la desulfatación ácida, Usov y Kochetkov encararon el problema por un camino diferente, y es así que comenzaron a estudiar la desulfatación solvolítica, es decir por la acción de solventes orgánicos^{52,53}.

Tomando como base la reversibilidad de la reacción del trióxido de azufre con monosacáridos en piridina⁵⁴ (Figura 4.20), y los datos de solvólisis de esteroides⁵⁵, los autores estudiaron la desulfatación de monosacáridos sulfatados utilizando dioxano, dimetilsulfóxido y piridina como solventes.

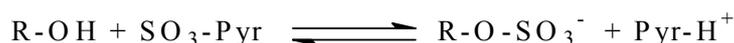


Figura 4.20 Reacción de sulfatación de alcoholes con trióxido de azufre en piridina.

Los resultados obtenidos mostraron que la reacción procedía muy bien en dioxano y DMSO y que era dificultosa en piridina. Pudieron deducir que la eliminación del grupo sulfato se activaba convirtiendo al grupo sulfato del polisacárido en la respectiva sal piridínica^{52,53} y que agregando clorhidrato de piridina al medio de reacción, la desulfatación también era activada, independientemente del contraion.

El proceso de desulfatación solvolítica fue aplicado a un galactano sulfatado de *Laingia pacifica*⁵². El estudio detallado concluyó que el polisacárido era desulfatado eficientemente en DMSO (rendimiento del 75%) cuando estaba en su forma de sal de piridinio, pero al estar como sal de sodio la reacción no ocurría.

Como el producto obtenido evidenciaba un alto grado de despolimerización, los autores decidieron agregar al solvente un 2% de piridina para evitar reacciones de ruptura glicosídica ácida. El producto se obtuvo en estas nuevas condiciones con un 90 % de rendimiento y escasa degradación. Además, en los polisacáridos con 3,6-anhidrogalactosa se determinó que la proporción de este azúcar permanecía inalterado luego de la desulfatación.

Posteriormente el mismo grupo estudió la influencia del catión del hemiéster sulfato en la reacción de desulfatación en un dextrano sulfatado (48% de SO_4^{2-}) en DMSO a 100 °C durante 10 horas⁵⁶. Los mejores resultados fueron obtenidos con el sulfato en forma de sal de piridinio ya que se recuperó el 50% del polisacárido original con un 9,6% de sulfato. Se obtuvieron rendimientos intermedios desulfatando los polisacáridos en la forma de sal de amonio y muy bajos en aquellos como sal de sodio.

Según los autores, con estos resultados se demostraría la importancia de cambiar el contraion natural (sodio) de los grupo sulfato por el piridinio, para aumentar la solubilidad del polisacárido en el DMSO y así favorecer el transcurso de la reacción.

En 1977, Nagasawa *et al.* presentaron una modificación del método, utilizando DMSO con un 10% de metanol o agua⁵⁷. Al probar la reacción sobre heparina, encontraron que la velocidad de desulfatación en presencia de agua o metanol aumentaba con respecto a DMSO puro. También se observó que primero ocurría una *N*-desulfatación rápida y luego se eliminaban los *O*-sulfatos.

Dado que la desulfatación solvolítica fue presentada como una buena alternativa al empleo de medios ácidos, su aceptación fue inmediata. Se ha llevado a cabo la reacción sobre una variedad de polisacáridos utilizando como solventes DMSO-piridina, DMSO-MeOH-H₂O y DMSO-MeOH-piridina^{53,57,58}. Sin embargo, aún cuando los resultados obtenidos han sido satisfactorios con varios polisacáridos, la desulfatación solvolítica no ha sido eficiente con otros, como han informado por ejemplo Stortz y Cerezo⁵⁹. Las continuas modificaciones de la técnica sugieren que esta ineficiencia es más frecuente que lo que hacen suponer las publicaciones al respecto.

4.C.1.1.3 Desulfatación con agentes sililantes

En 1992, Takano *et al.* publicaron la desulfatación regioselectiva de posiciones primarias (alcoholes primarios y C-6 de metilgalactósidos) con agentes sililantes como *N,O*-bis(trimetilsilil)acetamida (BTSA) y *N,O*-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida (BTSTFA)⁶⁰.

Los agentes sililantes se pueden clasificar en tres grupos según el proceso de desulfatación:

Grupo A: Aquellos que no producen desulfatación.

Grupo B: Los que aceleran la desulfatación selectiva de los grupos unidos a la posición C-6.

Grupo C. Los que eliminaban todos los grupos sulfato de manera no específica.

En 1993, el mismo grupo de trabajo comprobó la acción de desulfatación selectiva del BTSA (grupo B) sobre las posiciones C-6 en los galactanos sulfatados aislados de las algas rojas *Gloiopeltis complanata*⁶¹, *Porphyra yezoyensis*⁶² y *Joculator maximus*⁶³. La reacción la llevaron a cabo en piridina anhidra con los polisacáridos en la forma de sal de piridinio. Posteriormente el mismo grupo de investigación publicó el comportamiento de una gran variedad de agentes sililantes en la reacción de desulfatación de hidratos de carbono.

Kolender y Matulewicz publicaron en 2004 la utilización del clorometiltrimetilsilano como agente desulfatante del grupo C⁶⁴. Las autoras estudiaron detalladamente la desulfatación de κ -carragenano y agaranos aislados de *Georgiella confluens*. Las condiciones de reacción utilizadas comprendían la conversión del polisacárido a su sal de piridinio, usando piridina como solvente. Los resultados que obtuvieron mostraron la utilidad de usar el agente sililante como desulfatante, observándose desulfataciones del orden del 75% en términos generales, aunque con productos con un apreciable grado de despolimerización⁶⁴.

La utilización de agentes sililantes es una buena alternativa, al igual que la desulfatación solvolítica, a la desulfatación ácida.

4.C.2 Resultados

4.C.2.1 Desulfatación solvolítica de polisacáridos asistida por microondas

Los experimentos previos con calentamiento convencional demostraron la necesidad que los polisacáridos se encontraran como sal de piridinio para que la desulfatación solvolítica ocurriera eficientemente^{52,53}. El método tradicional de obtención de la mencionada sal es transformando la sal sódica del polisacárido en su forma ácida con una resina de intercambio catiónico y recogiendo el eluato sobre un exceso de piridina. Luego la solución se dializa para eliminar el exceso de piridina y finalmente se liofiliza para obtener el polisacárido en la forma de sal de piridinio. Esta metodología se denominó “Método A” (detalles en Materiales y métodos).

La primera serie de reacciones (no informadas) se realizaron con el objetivo de familiarizarse con el sistema de desulfatación solvolítica en el horno a microondas. Luego se inició un trabajo sistemático que es el informado a continuación.

La primer experiencia presentada en este trabajo se realizó sobre el μ/v -carragenano parcialmente ciclado aislado del alga *Iridaea undulosa* (C)^{41,42} (ya utilizado en otras secciones). Este polisacárido contenía originalmente un 27,9% de NaSO₃ y un peso molecular de 54 KDa.

La sal de piridinio de C generada por el método A se sometió a una desulfatación solvolítica en DMSO con un 2% de piridina, según informa la técnica original. El calentamiento por microondas se realizó durante 1 minuto en períodos de 10 s como se describe en la sección 4.A.2.3. El producto de la reacción fue aislado por diálisis y se le determinó el contenido de sulfato remanente.

Esta primera reacción mostró un importante grado de desulfatación (71%) ya que la cantidad de sulfato disminuyó de 27,9 a 8% (expresada como % de NaSO₃). Sin embargo, se registró en el producto una marcada disminución del peso molecular. La cuantificación de extremos reductores mostró un descenso de 54 a 1,9 KDa. Cabe destacar que una fracción similar proveniente del alga *Iridaea undulosa* no pudo ser desulfatada en más de un 20% al utilizar la metodología original con el método de calentamiento tradicional^{59,65}. Los autores determinaron que la muestra tratada también disminuía su peso molecular.

Si bien en este primer ensayo se observó un buen grado de desulfatación y una aceleración de la reacción, era importante intentar mejorar la técnica, en lo concerniente al rendimiento y especialmente al peso molecular.

El proceso de degradación del polisacárido podía estar ocurriendo tanto en la reacción como en el proceso de intercambio de iones sodio por protones realizado antes de la neutralización con piridina.

Al realizar el intercambio de iones, el polisacárido está un determinado período de tiempo en contacto con una resina en forma ácida, de manera que durante ese contacto podrían existir dentro de ésta procesos hidrolíticos.

Otra posibilidad para que exista despolimerización podría ser la incompleta conversión de los grupos sulfato en sus respectivas sales de piridinio, quedando en el polímero algunos grupos en su forma ácida. Por lo tanto, la presencia de estos grupos ácidos podrían ser los responsables de procesos degradativos posteriores. Esta última posibilidad estaba en concordancia con los resultados obtenidos previamente por Usov *et al.*: los autores encontraron que un segundo proceso de desulfatación sobre un polisacárido no disminuía la proporción de grupos sulfato salvo que el polisacárido sea sometido a una nueva conversión a la sal de piridinio⁵³. Es decir que el remanente de sulfato podía no estar en la forma de sal de piridinio y por lo tanto no desulfatarse.

4.C.2.2 Desulfatación solvolítica de la sal de piridinio obtenida por otro método

En vista de los resultados obtenidos se decidió generar la sal de piridinio de una manera diferente. El proceso se realizó pasando el polisacárido por una columna de intercambio iónico en la forma de sal de piridinio. De esta manera se evitaba que la muestra estuviera en contacto con la resina en su forma ácida. Además este proceso (denominado “Método B”) ahorra considerable tiempo ya que se evitaba la etapa de diálisis necesaria en el método A.

En una nueva experiencia se utilizó la sal de piridinio del μ/v -carragenano (C), pero ahora generada por el método B. Se decidió también ensayar diferentes tiempos de reacción con el objetivo de evaluar las condiciones más favorables. Los resultados pueden observarse en la Tabla 4.13.

Los resultados demuestran que el grado de sulfatación del polisacárido es menor al calentar durante 1 min que a 30 s. Los rendimientos en los casos en que se utilizó este tiempo son similares, más allá del método utilizado para generar la sal.

Tabla 4.13 Desulfatación por microondas de la sal de piridinio del polisacárido **C** (Met. **A** y **B**) en DMSO + 2% de piridina.

	Original		t ^b (min)	Desulfatado		Rend. ^a	Desulfatacion(%)
	NaSO ₃ (%)	PM ^b (KDa)		NaSO ₃ (%)	PM (KDa)		
C ^c	27,9	54	1,0	8,0	1,9	65	71
C ^d	27,9	54	0,5	15,7	4,7	62	44
C ^d	27,9	54	1,0	8,4	2,1	73	70
C ^d	27,9	54	1,5	ND	ND	12	ND

^a Rendimiento de reacción luego de realizar la corrección por pérdida de sulfato.

^b PM= peso molecular, t= tiempo.

^c Sal obtenida por el método **A**

^d Sal obtenida por el método **B**.

Además pudo apreciarse que al extender el tiempo de reacción disminuyó el peso molecular de manera que el proceso degradativo se volvía importante: en este caso se recuperó apenas el 12%.

Los resultados obtenidos hasta ese momento llevaron a continuar el estudio por dos vías diferentes. La primera era evaluar las mejores condiciones de reacción obtenidas hasta el momento con otros polisacáridos, mientras que la segunda implicaba continuar el estudio de desulfatación de μ/v -carragenano en diferentes condiciones de reacción.

Se decidió que para los nuevos polisacáridos la sal de piridinio se generaría por el método **B**, ya que el ahorro de tiempo con respecto al método tradicional **A** era muy importante y además los resultados obtenidos eran similares.

La desulfatación asistida por microondas también se llevó a cabo sobre el **T₁** (λ -carragenano) ya utilizado en este trabajo de Tesis (Capítulos 3 y 4 sección B), y sobre un polisacárido crudo aislado del alga *Corallina officinalis* (**Co** =Coralinano). Este último fue estudiado por Cases *et al.*^{66,67}, y también fue utilizado en el Capítulo 2.

Los resultados obtenidos al desulfatar las respectivas sales de piridinio de estos polisacáridos se pueden observar en la Tabla 4.14.

Tabla 4.14 Desulfatación por microondas de la sal de piridinio de los polisacárido λ y Co (Met. B) en DMSO + 2% de piridina.

	Original		t^b (min)	Desulfatado		Rend. ^a	Desulfatacion (%)
	NaSO ₃ (%)	PM ^b (KDa)		NaSO ₃ (%)	PM (KDa)		
T₁	45,3	600	1,0	6,4	5,3	35	86
Co	12,0	31,6	1,0	1,3	11,4	81	89

^a Rendimiento de reacción luego de realizar la corrección por pérdida de sulfato.

^b PM= peso molecular, t= tiempo.

La desulfatación asistida por microondas logró eliminar más del 85% de los grupos sulfato en los dos polisacáridos utilizados. Sin embargo, el rendimiento de recuperación sólo fue bueno para el coralinano (81%). El rendimiento estaba evidentemente asociado, en ambos casos, con el descenso del peso molecular de los productos, ya que se producían pérdidas por diálisis.

El coralinano desulfatado disminuyó su peso molecular muy poco, ya que pasó de 31,6 KDa a 11,4 KDa. Esto podría implicar que el polímero original sólo se cortó en promedio 2 veces. El caso del λ -carragenano fue muy diferente ya que la disminución del peso molecular del producto desulfatado fue grande. Evidentemente el proceso de degradación era mayor en este último caso. La diferencia registrada entre ambos productos no era la esperada ya que se esperaba que los procesos hidrolíticos fueran mayores en polímeros con altas cantidades de 3,6-AnGal.

Distintos polisacáridos obtenidos de un fraccionamiento del coralinano crudo (similar a **Co**) aislado del alga *Corallina officinalis*, fueron anteriormente sometidos a la desulfatación solvolítica convencional por Cases⁵¹. El grado de desulfatación en los distintos casos fue pobre. Evidentemente, si se comparan estos resultados con los mostrados en la Tabla 4.14 se puede concluir que al utilizar la asistencia de microondas además de acelerar la reacción se logra que esta sea más eficiente. El rendimiento de reacción informado por los autores⁵¹ fue cercano al 90%, es decir un valor semejante al obtenido en este trabajo.

Posteriormente, en un experimento separado se decidió estudiar la desulfatación de **Co** y **T₁** en la forma de sales de trietilamonio. Si bien los informes previos con métodos convencionales demostraron la poca eficiencia de esta sal en los procesos de desulfatación, parecía importante evaluar una sal menos ácida que la de piridinio. Las sales respectivas

fueron generadas por el método **B** utilizado en la conversión a la sal de piridinio, obviamente con la columna de intercambio regenerada con trietilamina. Los resultados son presentados en la Tabla 4.15.

Tabla 4.15 Desulfatación por microondas de la sal de trietilamonio de los polisacárido λ y Co (Met. **B**) en DMSO + 2% de piridina.

	Original		t ^b (min)	Desulfatado		Rend. ^a	Desulfatacion (%)
	NaSO ₃ (%)	PM ^b (KDa)		NaSO ₃ (%)	PM (KDa)		
T₁	45,3	600	1,0	33,7	ND	31	26
Co	12,0	31.6	1,0	7,8	ND	91	35

^a Rendimiento de reacción luego de realizar la corrección por pérdida de sulfato.

^b PM= peso molecular, t= tiempo de reacción.

De los resultados se puede concluir que con el reemplazo de la sal de piridinio la desulfatación transcurre mucho menos eficientemente. Además como en los casos anteriores, el carragenano fue recuperado en un bajo porcentaje, indicando que siguen existiendo procesos degradativos.

Dado que hasta el momento sólo se había logrado que el coralinano fuera desulfatado y recuperado en altos porcentajes se decidió desarrollar la segunda vía de investigación, orientada a modificar las condiciones utilizadas hasta el momento.

4.C.2.3 Desulfatación solvolítica de la sal de piridino obtenida por el método C

El hecho que los carragenanos fueran recuperados del medio de reacción en bajos porcentajes reforzó la idea de la existencia conjunta de mecanismos de reacción de solvólisis e hidrólisis ácida. Los carragenanos serían más susceptibles al último mecanismo, dado que contienen cantidades variables de 3,6-anhidrogalactosa, la cual como ya se explicó es lábil en medio ácido. En contrapartida el coralinano, al no poseer el anhidroazúcar, estaría siendo más resistente a la degradación ácida. Bajo estas suposiciones no se podría explicar certeramente el comportamiento del λ -carragenano que presenta un escaso contenido de 3,6-AnGal.

Dado que se habían observado procesos de degradación al realizar la sal de piridinio por el método **A** (y en menor medida en el método **B**), se decidió medir el pH de las sales de los polisacáridos.

El pH de una solución del carragenano μ/v (0,1% p/v) en la forma de sal de piridinio (generada por el método **B**) fue de 3,9. Este valor fue algo menor al esperado, ya que el pK_a del ion piridinio es de 5,25. También se midió el pH de una solución del mismo polisacárido pero en su forma ácida. Como se esperaba, este valor (2,95) fue menor que en el caso anterior, pero no demasiado.

Al tener la solución del polisacárido un pH bajo cuando se encontraba en la forma piridinio, se reforzó la idea de la existencia de mecanismos de degradación ácidos. La confirmación llegó al medir el peso molecular de la sal de piridinio del μ/v -carragenano luego del paso de liofilización. Este había disminuido de 54000 a 11900 Da sólo en el proceso de conversión y liofilización. Es decir que el pH 3,9 era lo suficientemente ácido para degradar parcialmente al polisacárido.

Este fenómeno puede relacionarse con lo observado por Usov *et al* en 1972. En ese caso el polisacárido aislado del alga *Laingia pacifica* al ser disuelto en DMSO (con un 2% de piridina) a temperatura ambiente luego de 8 horas sufrió un fuerte proceso degradativo⁵³. Kolender y Matulewicz encontraron resultados similares al calentar por 3 horas la sal de un κ -carragenano sin el agente desulfatante. En este último caso el peso molecular del polímero bajo de 82.800 a 4900 Da y el grado de desulfatación fue menor al 10%⁶⁴.

Como la degradación comenzaba antes de producir el calentamiento, posiblemente por el bajo pH de la solución, generado por el polisacárido en su forma de sal de piridinio, se decidió neutralizar la solución resultante de la columna de intercambio iónico. La neutralización se llevó a cabo con el agregado de algunas gotas de piridina. De esta manera la solución a liofilizar quedaba con un pH entre 6,5 y 7. Cuando se midió el peso molecular del polisacárido liofilizado se encontró que era de 23100 Da, es decir que la degradación había disminuido en relación a los casos anteriores.

A esta metodología de obtención de la sal se la denominó método **C**, y fue aplicada a los tres polisacáridos utilizados en esta sección. Los resultados de la desulfatación de estos pueden observarse en la Tabla 4.16.

Tabla 4.16 Desulfatación por microondas de la sal de piridinio de los polisacárido **C**, **T₁** y **Co** (Met. C) en DMSO + 2% de piridina.

	Original		t ^b (min)	Desulfatado		Rend. ^a	Desulfatacion (%)
	NaSO ₃ (%)	PM ^b (KDa)		NaSO ₃ (%)	PM (KDa)		
C	27,9	54,0	1,0	10,0	5,6	83	64
T₁	45,3	600	1,0	5,4	6,3	77	88
Co	12,0	31,6	1,0	4,6	13,4	89	62

^a Rendimiento de reacción luego de realizar la corrección por pérdida de sulfato.

^b PM= peso molecular, t= tiempo de reacción.

Lo más destacado de los resultados son los relacionados con el rendimiento. Puede observarse como en el caso de los carragenanos, la recuperación del producto fue más alta que en los casos en que se generaron las sales de piridinio por los métodos **A** o **B**. Aún cuando el peso molecular disminuyó en ambos casos, la magnitud del cambio fue menor. De ese modo, la neutralización de la solución logró desacelerar el proceso degradativo.

El grado de desulfatación en cada caso se mantuvo cercano a los valores logrados anteriores en este trabajo y comparables a los informados en literatura con métodos convencionales, aún cuando en experiencias propias del laboratorio dichos grados de desulfatación nunca habían podido ser alcanzados por los métodos convencionales (C.Stortz, com. pers.)

De manera que por el método **C** se logra generar la sal más rápidamente que con el método convencional (método **A**) y con una menor degradación.

La desulfatación de estas sales utilizando microondas se aceleró notablemente; el tiempo de reacción disminuye del orden de horas (para métodos convencionales) a 1 minuto.

El grado de desulfatación y los rendimientos de recuperación obtenidos son iguales o superiores a los obtenidos a otras técnicas tradicionales.

4.C.2.4 Metilación *in situ*

Como se explicó en la parte introductoria el estudio de las estructuras de los polisacáridos sulfatados aislados de algas requiere determinar la posición de unión de los

grupos éster sulfato, lo que se logra comparando los datos de metilación del polisacárido original y el polisacárido desulfatado. La diferencia entre ambos análisis permite deducir las posiciones de unión de los grupos sulfatos y de las uniones glicosídicas.

Tradicionalmente la secuencia de reacciones de desulfatación y metilación son tediosas de realizar, demanda largos tiempos, y los resultados obtenidos muchas veces son insatisfactorios. En gran medida los problemas se originan en la reacción de desulfatación, ya que muchas veces éstas son ineficientes y los productos se recuperan en bajas cantidades.

Los productos de la desulfatación normalmente son aislados del medio de reacción por diálisis y liofilización. Estos luego son convertidos a sus respectivas sales de trietilamonio utilizando una resina de intercambio iónico, para finalmente ser metilados. Toda esta secuencia hace que los resultados sean obtenidos luego de tiempos medidos en semanas.

Dado que la desulfatación de los polisacáridos utilizando microondas resultó satisfactoria, se decidió evaluar la posibilidad de realizar la metilación a continuación *in situ*, en el mismo medio de reacción (DMSO y piridina), aunque fuera del horno de microondas.

Las experiencias se realizaron sobre el μ/v -carragenano parcialmente ciclado (**C**), utilizando las tres metodologías de generación de sal de piridinio (**A**, **B** y **C**).

Luego de realizar la reacción de desulfatación en DMSO y piridina (2%), la solución se dividió en dos (ver detalle en Materiales y métodos). Una parte se preservó para medir la cantidad de sulfato remanente y a la otra se le agregaron los reactivos de metilación (NaOH y IMe). De esta manera se evitaban todos los pasos de aislamiento y el proceso de conversión del polisacárido en la correspondiente sal de trietilamonio. Con esta secuencia se modificaron las condiciones de metilación originales informadas por Ciucanu y Kerek⁶⁸ y Stevenson y Furneaux⁶⁹. En lugar de metilar en DMSO, la reacción se realizaba en DMSO con trazas de piridina y además ya no se metilaba la sal de trietilamonio del polisacárido, sino que se hacía sobre su correspondiente sal de piridinio.

Los resultados obtenidos son presentados en la Tabla 4.17. La misma contiene los resultados de la metilación del polisacárido **C** original y de los productos desulfatados. Una de las metilaciones de los productos desulfatados se realizó sobre el producto aislado por diálisis y liofilización, el que fue convertido a la sal de trietilamonio y posteriormente metilado.

Tabla 4.17 Análisis por metilación (% molar)^a del μ/v -carragenano parcialmente ciclado y fracciones desulfatadas. (Determinación realizada por alditoles peracetilados).

Azúcar metilado	C original	C desulfatado			
		Sal de piridinio			
		Met. A	Met. B	Met. C	Met. C
		Tiempo desulf. ^b			
Metilación		Trad. ^c	<i>in situ</i>	<i>in situ</i>	<i>in situ</i>
2,4,6-Tri- <i>O</i> -Me-Gal ^d	9	44	49	32	46
2,3,6-Tri- <i>O</i> -Me-Gal	4	6	8	6	10
2,6-Di- <i>O</i> -Me-Gal	44	14	9	29	12
2- <i>O</i> -Me-Gal	5	–	–	–	–
2- <i>O</i> -Me-3,6-AnGal	30	36	34	33	32
3,6-AnGal	8	–	–	–	–

^a Sólo figuran los azúcares metilados con proporciones mayores al 4%.

^b Tiempo de desulfatación con microondas.

^c Metilación del polisacárido desulfatado luego del aislamiento (diálisis y liofilización).

Las metilaciones *in situ* fueron realizadas sobre los productos desulfatados obtenidos de la reacción de los polisacáridos convertidos en sal de piridinio por los métodos **B** y **C**.

En los resultados se observa claramente que los dos procedimientos de metilación utilizados arrojaron resultados muy similares. Estos muestran que el polisacárido posee una estructura del tipo de la familia de los κ -carragenanos, tal como fuera informado con anterioridad^{41,42}.

Al comparar los resultados obtenidos para el polímero original y el desulfatado se puede apreciar claramente el incremento de la 2,4,6-tri-*O*-Me-Gal a expensas de la 2,6-di-*O*-Me-Gal. Esto indica la existencia de grupos sulfato en la posición C-4 de las galactosas unidas por C-3. La desaparición de la 3,6-AnGal en los productos desulfatados y el aumento en las cantidades detectadas de 2-*O*-Me-3,6-AnGal denotan la existencia de grupos sulfato en la posición C-2 del anhidroazúcar.

Al utilizar el producto de un tiempo menor de desulfatación (0,5 min) la 3,6-AnGal sin metilar ya había desaparecido, de manera que se puede afirmar que el sulfato en C-2 del anhidroazúcar se pierde más rápidamente que el sulfato en C-4 unido a la galactosa.

La presencia de 2-*O*-metilgalactosa en el carragenano original metilado y ausente en el desulfatado puede indicar la presencia de unidades de β -galactosa enlazadas en C-4 y

sulfatadas en C-3. Esta sustitución ha sido encontrada en muy raras ocasiones en carragenanos^{70,71}, por lo cual podrían ser también atribuidas a procesos de submetilación. Estos fenómenos son originados en numerosas ocasiones por el impedimento estérico y electrostático que generan los grupos sulfato. En los productos desulfatados estos impedimentos disminuyen y en consecuencia la metilación se produce más fácilmente.

Se pudo observar que al metilar en presencia de piridina se formaba en la solución iodo ya que esta tomaba un color rojizo intenso. Sin embargo, este producto no interfirió con la reacción principal.

4.C.2.5 Aplicación a otros polisacáridos

La reacción de desulfatación asistida por microondas fue aplicada a otros polisacáridos con el objetivo de continuar su estudio y alcance.

4.C.2.5.1 Desulfatación de fucooidanos

La reacción de desulfatación fue aplicada sobre fucooidanos del alga *Adenocystis utricularis* aislados por la Dra N. Ponce^{3,72}. Fue informado previamente que la desulfatación de estos polisacáridos resulta muy dificultosa de realizar y que los rendimientos de reacción son muy bajos^{3,73}. Al aplicar la desulfatación solvolítica asistida por microondas sobre tres fracciones de fucooidanos se obtuvieron los resultados que se observan en la Tabla 4.18.

Tabla 4.18 Desulfatación por microondas de la sal de piridinio de tres fucooidanos (Met. C) en DMSO + 2% de piridina.

	Original		t ^b (min)	Desulfatado		Rend. ^a	Desulfatacion (%)
	NaSO ₃ (%)	PM ^b (Kda)		NaSO ₃ (%)	PM (KDa)		
EA1	32,0	19,0	1,0	2,4	8,0	ND	93
EA2-5	6,0	8,0	1,0	2,4	10,8	64	60
EA1-20	24,0	≥100,0	1,0	1,6	26,4	74	93

^a Rendimiento de reacción luego de realizar la corrección por pérdida de sulfato.

^b PM= peso molecular, t= tiempo.

Como se observa, la desulfatación de dos de las fracciones (**EA1** y **EA1-20**) transcurrió en forma casi completa, mientras que en la tercera (**EA2-5**, con menor proporción de sulfato original) se llegó a remover el 60% de los grupos. Se debe notar que en los tres casos pareciera llegarse a una pequeña cantidad basal de sulfato que no puede ser eliminado, casi independientemente de la proporción original.

La disminución de los pesos moleculares no fue muy marcada y, en consecuencia, los rendimientos fueron entre buenos y muy buenos. Para la fracción **EA2-5** se registra un aumento en el peso molecular que podría ser justificado por el error de la técnica de medición o por la pérdida de algún material de muy bajo peso molecular durante la diálisis.

Las metilaciones convencionales de estas fracciones o algunas similares han sido muy difíciles de realizar, según lo informado por Ponce *et al.*^{3,72}. Los estudios estructurales se han tenido que realizar remetilando hasta tres veces el mismo polisacárido. De igual manera, las desulfataciones clásicas debieron realizarse en más de un paso.

En la Tabla 4.19 se puede observar el análisis de metilación de dos fracciones de fucoidanos similares realizados con técnicas tradicionales y con la desulfatación por microondas y metilación *in situ*. Estos resultados han sido tomados del trabajo de Tesis de la Dra. Ponce⁷² para ejemplificar la eficiencia de la técnica.

Como se puede apreciar los resultados son similares para ambas fracciones, aunque el grado de metilación alcanzado por la nueva técnica es mayor (comparar 2,4-di-*O*-Me-Fuc y 2-*O*-Me-Fuc). Además, al realizar la desulfatación asistida por microondas y la metilación *in situ* se logró un formidable ahorro de tiempo.

Tabla 4.19 Análisis por metilación (% molar)^a de las fracciones de fucoidanos **EA1-20** y **EW1-20** desulfatadas⁷².

Azúcar metilado	EA1-20		EW1-20
	Desulfatación Metilación	Tradicional (CTMS, 2 veces) ^a	Microondas (1 min)
		Tradicional (2 a 3 veces) ^b	<i>in situ</i>
2,3,4-Tri- <i>O</i> -Me-Fuc		3	9
2,3,5-Tri- <i>O</i> -Me-Fuc		4	4
2,3-Di- <i>O</i> -Me-Fuc		2	1
2,4-Di- <i>O</i> -Me-Fuc		7	15
3,4-Di- <i>O</i> -Me-Fuc		9	10
2- <i>O</i> -Me-Fuc		16	8
3- <i>O</i> -Me-Fuc		2	–
4- <i>O</i> -Me-Fuc		21	18
Fuc		11	9
2,3,4,6-Tetra- <i>O</i> -Me-Gal		tr.	6
2,3,4-Tri- <i>O</i> -Me-Gal		1	9
2,3,6-Tri- <i>O</i> -Me-Gal		6	2
3,4,6-Tri- <i>O</i> -Me-Gal		–	1
2,3-Di- <i>O</i> -Me-Gal		6	3
2,4-Di- <i>O</i> -Me-Gal		3	1
2,6-Di- <i>O</i> -Me-Gal		3	1
3,4-Di- <i>O</i> -Me-Gal		-	1
3,6-Di- <i>O</i> -Me-Gal		2	tr.
2- <i>O</i> -Me-Gal		3	tr.
3 o 4- <i>O</i> -Me-Gal		1	1
6- <i>O</i> -Me-Gal		1	–
Gal		tr.	1

^a Desulfatación realizada con CTMS en piridina (100 °C, 8 h). Método desarrollado por Kolender y Matulewicz⁶⁴.

^b Metilación del producto desulfatado aislado en su forma de sal de trietilamonio.

4.C.2.5.2 Desulfatación de condroitín sulfato

La desulfatación por microondas fue aplicada también sobre el condroitín sulfato (CS). Este es un glicosaminoglicano sulfatado lineal formado por unidades alternantes de N-acetil-β-D-galactosamina (GalNAc) sulfatada en C-4 ó C-6 y β-D-ácido glucurónico (GlcA) o β-L-ácido idurónico (IdoA). De acuerdo a la posición en que se encuentren unidos los grupos sulfato y la identidad del ácido, el CS puede ser clasificado en A, B o C. En la Figura 4.20 se detallan las estructuras.

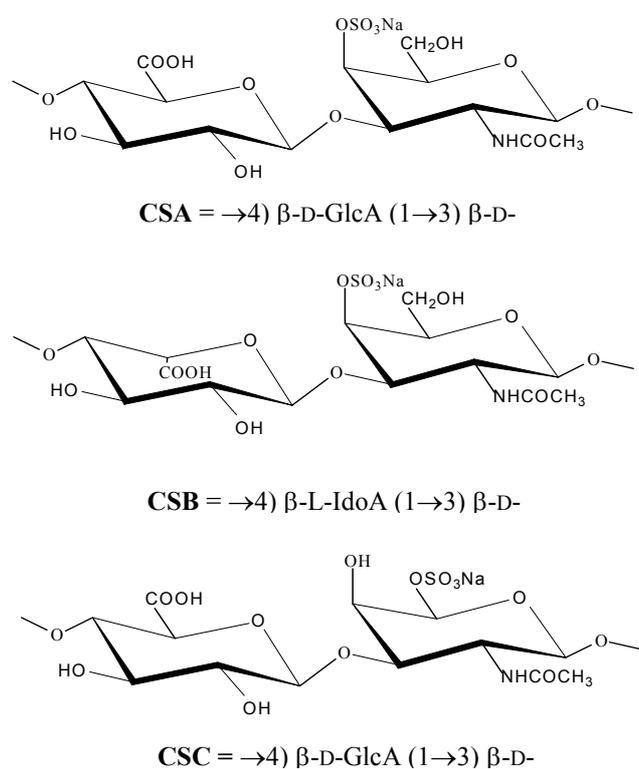


Figura 4.20 Estructura química del condroitín sulfato A, B y C.

Al igual que con los galactanos sulfatados, en la década del 70 los glicosaminoglicanos como el condroitín sulfato y la heparina fueron desulfatados solvolíticamente^{57,74}. La reacción fue realizada utilizando una mezcla de solventes DMSO:piridina:agua o DMSO:piridina:metanol. Los resultados mostraron que el condroitín sulfato, el dermatán sulfato y la heparina eran desulfatados con diferentes eficiencias. Mientras que los condroitín y heparán sulfato se desulfataban eficientemente (75 a 94%), la heparina resultó más resistente (50%). Fue notable en todos los casos, el muy buen rendimiento de recuperación obtenido para todos los productos (del orden del 90%).

La desulfatación solvolítica asistida por microondas se aplicó sobre un condroitín sulfato comercial formado por las variedades A (**CS4S**) y C (**CS6S**) en una relación cercana a 6:4. De esta manera, la mezcla está compuesta por unidades de *N*-acetilgalactosamina sulfatadas en las posiciones 4 y 6. En la Tabla 4.20 se muestran los resultados obtenidos al realizar la reacción durante 0,5 min y 1 min.

Tabla 4.20 Desulfatación por microondas de la sal de piridinio del condroitín sulfato (Met. C) en DMSO + 2% de piridina.

	Original		t ^b (min)	Desulfatado		Rend. ^a	Desulfatacion (%)
	NaSO ₃ (%)	PM ^b (KDa)		NaSO ₃ (%)	PM (KDa)		
CS	24,0	40,2	0,5	10,3	13,7	99	43
CS	24,0	40,2	1,0	4,3	11,3	74	83

^a Rendimiento de reacción luego de realizar la corrección por pérdida de sulfato.

^b PM= peso molecular, t= tiempo.

Se observó que el grado de desulfatación del **CS** aumentaba al incrementar el tiempo de reacción. Sin embargo, se debe destacar que a los 0,5 min gran parte de los grupos sulfato ya habían sido eliminados.

Los rendimientos obtenidos fueron muy buenos al calentar 1 min y excelentes al utilizar menos tiempo (99%). Esto se debe probablemente a que estos polímeros son más resistentes a los procesos hidrolíticos por su estructura química.

Dada la regularidad de las estructuras, tanto los productos como el material de partida pudieron ser analizadas por espectroscopía de RMN de ¹³C. En la Figura 4.21 pueden observarse los espectros obtenidos. Las asignaciones de las señales correspondientes al condroitín sulfato original y a los productos desulfatados fueron realizadas por comparación con el trabajo de Mucci *et al.*⁷⁵ (Tabla 4.21).

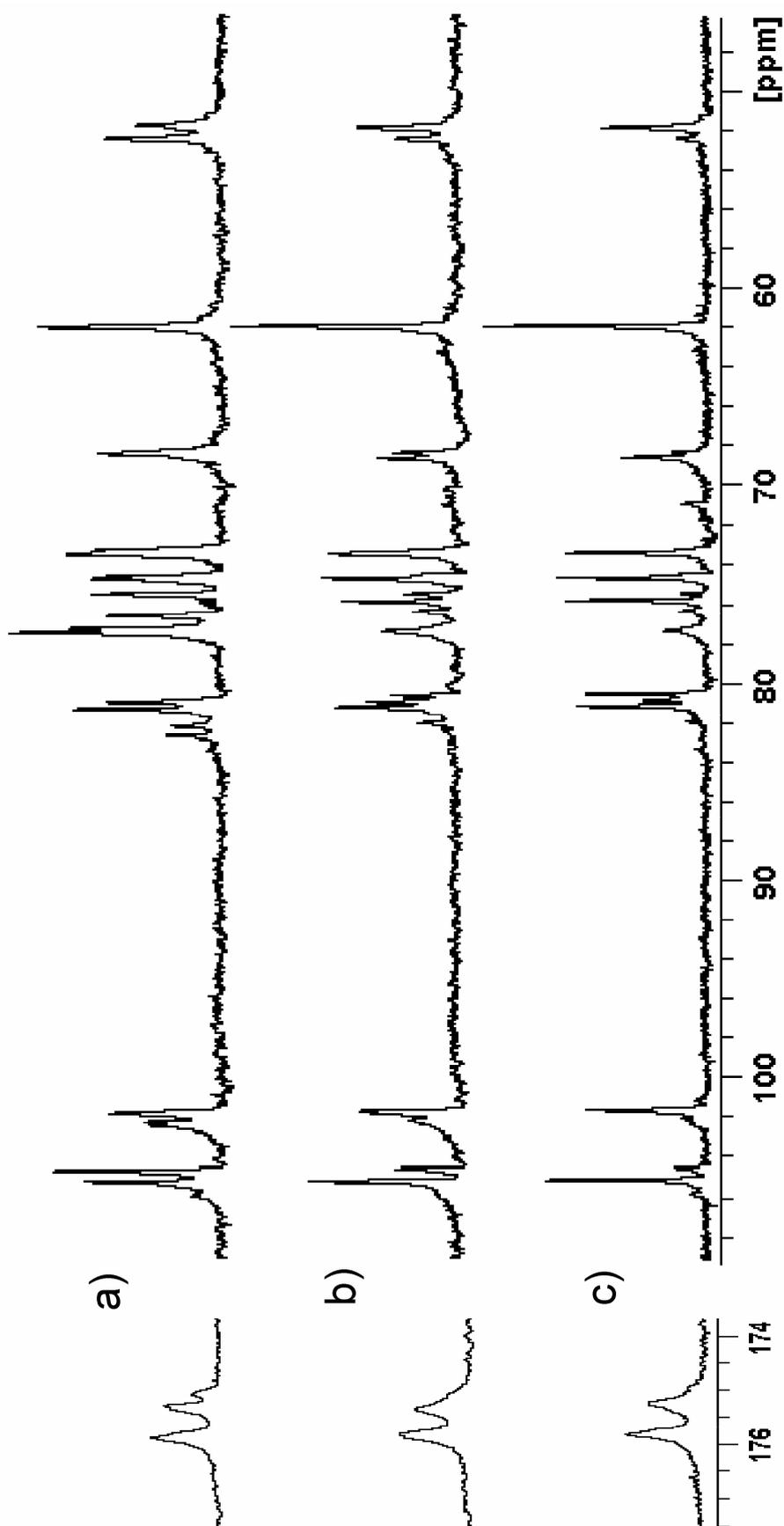


Figura 4.21 Espectros de RMN de ^{13}C (125MHz) de: a) Condroitín sulfato, b) desulfatado 0,5 min, c) desulfatado 1 min. Regiones de 46-110 ppm y 174-177 ppm.

Tabla 4.21 Asignación de señales de los espectros de RMN de ^{13}C de condroitín sulfato original, CS desulfatado 0,5 min y CS desulfatado 1 min.

Señal (ppm)	Polisacárido		
	CS original	CS desulfatado 0,5min	CS desulfatado 1,0 min
175,9	-NCOCH ₃ en 4S, 6S	NCOCH ₃ en 4S, 6S y DS	NCOCH ₃ en 4S, 6S y DS
175,3	UC-6 en 6S	UC-6 en 6S y DS	UC-6 en 6S y DS
175,0	UC-6 en 4S	-	-
105,1	UC-1 en 6S	UC-1 en 6S y DS	UC-1 en 6S y DS
104,6	UC-1 en 4S	UC-1 en 4S	UC-1 en 4S
102,2	NC-1 en 6S	NC-1 en 6S	NC-1 en 6S
101,7	NC-1 en 4S	NC-1 en 4S y DS	NC-1 en 4S y DS
82,1	UC-4 en 6S	-	-
81,2	UC-4 en 4S	UC-4 en 4S; NC-3 en DS	UC-4 en 4S; NC-3 en DS
80,9	NC-3 en 6S	NC-3 en 6S	NC-3 en 6S
80,5	-	UC-4 en DS	UC-4 en DS
77,4	NC-4 en 4S	NC-4 en 4S	NC-4 en 4S
77,1	UC-5 en 4S y 6S	-	-
76,5	NC-3 en 4S	NC-3 en 4S	NC-3 en 4S
75,8	-	NC-5 en DS	NC-5 en DS
75,4	NC-5 en 4S	NC-5 en 4S	NC-5 en 4S
74,6	UC-3 en 6S	UC-3 en 6S y DS; UC-5 en DS	UC-3 en 6S y DS; UC-5 en DS
74,4	UC-3 en 4S	UC-3 en 4S	-
73,3	UC-2 en 4S y 6S	UC-2 en 4S, 6S y DS	UC-2 en 4S, 6S y DS
73,1	NC-5 en 6S	-	-
68,5	-	NC-4 en DS	NC-4 en DS
68,3	NC-4 y NC-6 en 6S	NC-4 en 6S; NC-6 en 6S	NC-4 en 6S; NC-6 en 6S
61,9	NC-6 en 4S y 6S	NC-6 en 4S y DS	NC-6 en 4S y DS
52,3	NC-2 en 4S	NC-2 en 4S	NC-2 en 4S
51,7	NC-2 en 6S	NC-2 en 6S y DS	NC-2 en 6S y DS
23,3/4	-NCOCH ₃ en 4S y 6S	-NCOCH ₃ en 4S, 6S y DS	-NCOCH ₃ en 4S, 6S y DS

Los carbonos correspondientes al ácido urónico se identificaron como **UC**, mientras que los correspondientes a la N-acetilgalactosamina como **NC**. El entorno químico de cada carbono en la unidad disacáridica sulfatada se define por la nomenclatura **4S** (GalA-GalNAc4S), **6S** (GalA-GalNAc6S) y **DS** (GalA-GalNAc).

Los espectros muestran que los productos desulfatados no presentan signos de degradación de la estructura base. Tampoco se observan señales de los extremos reductores aún cuando se ha producido una disminución del peso molecular con respecto al producto original (Tabla 4.20).

En la región anomérica del espectro puede observarse claramente que al irradiar con microondas 0,5 min la intensidad de los picos centrales 104,6 ppm y 102,2 ppm, asignados al carbono 1 de la unidad GlcA unida a GalNAc6S y al carbono 1 de GalNAc6S respectivamente, disminuyen su intensidad notablemente. Al realizar la reacción en 1 min estos picos prácticamente desaparecen dado el bajo nivel de sulfato que queda en el polisacárido. Las señales ubicadas en 105,1 ppm y 101,7 ppm no disminuyen su intensidad al desulfatar porque ambas corresponden a unidades presentes tanto en los productos sulfatados como desulfatados. En la zona poco intensa del espectro correspondiente a los carbonilos (175-176 ppm) se puede apreciar también la desaparición en el producto desulfatado de la señal del carbono 6 del ácido urónico unida a la N-acetilgalactosamina sulfatada en la posición C-4.

4.C.2.5.3 Desulfatación de otros polisacáridos

La secuencia de reacciones de desulfatación asistida por microondas y metilación *in situ* optimizadas fueron aplicadas además sobre otros polisacáridos para realizar el estudio de sus estructuras.

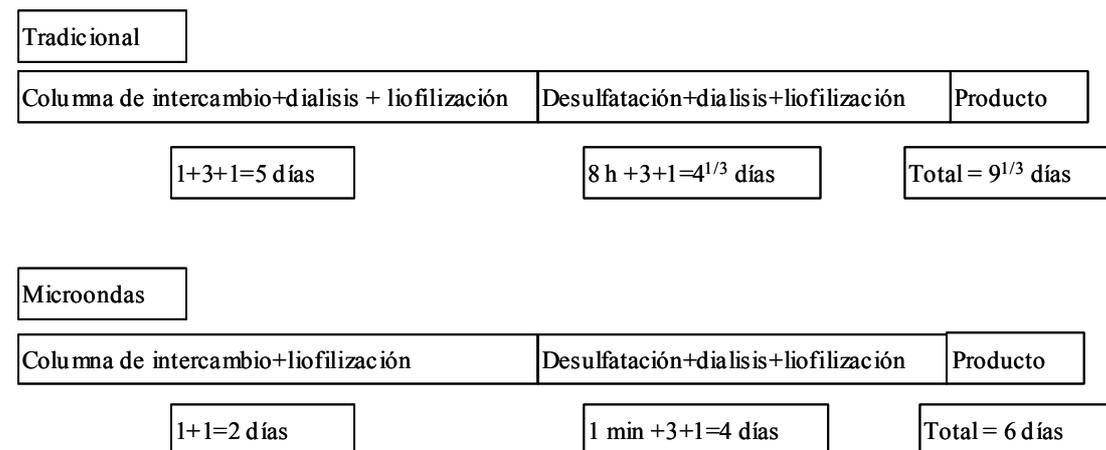
Ciancia *et al.* aplicaron con éxito el proceso de desulfatación sobre arabinogalactanos sulfatados aislados de las algas verdes *Codium fragile* y *Codium verniculara* (luego de publicado el trabajo correspondiente (2007) y antes de la presentación de esta Tesis Doctoral). A modo ilustrativo de la eficiencia de la metodología se puede ver como la fracción V_1 disminuyó su cantidad de sulfato de 30.4% a 3.6%⁷⁶.

En el Capítulo 5 se muestran los resultados obtenidos sobre una variedad de polisacáridos aislados del alga roja *Jania rubens*. En el mencionado capítulo se discuten los detalles estructurales de los mismos.

4.C.2.6 Comparación de técnicas

En la Figura 4.22 se puede observar una línea de tiempo con la comparación de las técnicas convencionales utilizadas hasta ahora en el laboratorio. Al poder metilar en el mismo medio en que se desulfató, se logra obtener el producto muy rápidamente. Las técnicas de desulfatación con microondas y metilación *in situ* permitieron agilizar notablemente el estudio estructural de los polisacáridos.

Desulfatación



Metilación del desulfatado

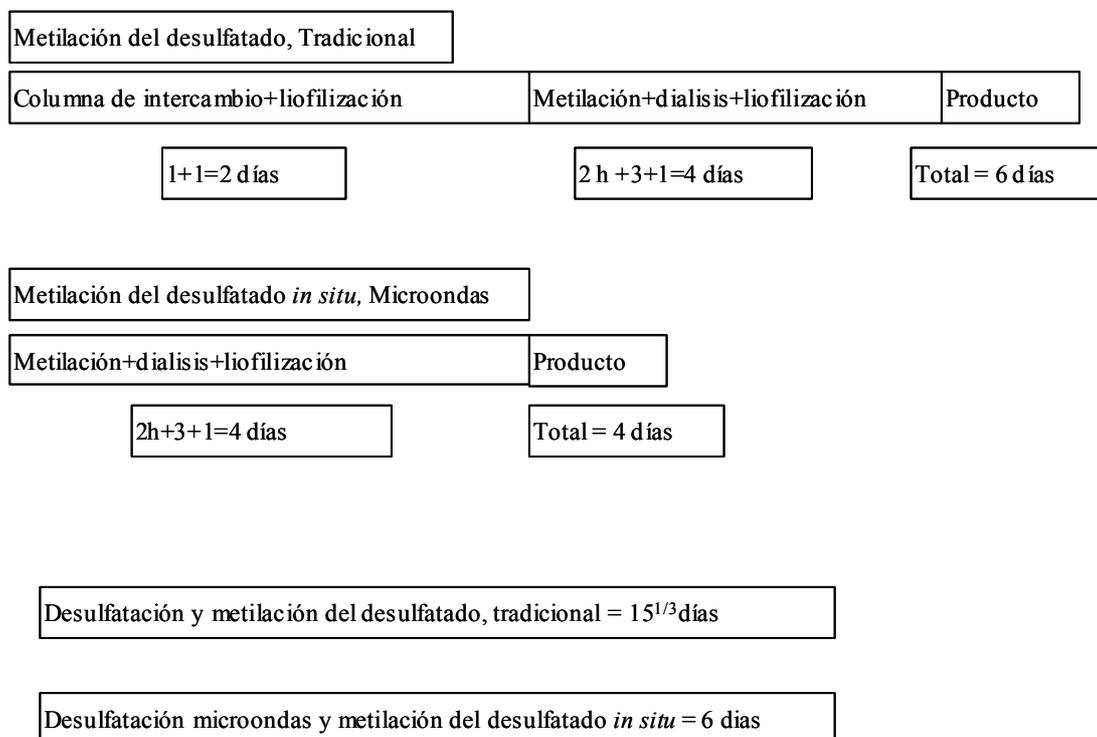


Figura 4.22 Comparación de las técnicas de desulfatación seguidas de metilación.

4.C.3 Conclusiones

Los resultados presentados en esta sección demuestran que la desulfatación solvolítica de polisacáridos puede ser realizada eficientemente utilizando microondas como fuente de energía. Dicha reacción, usualmente complicada de realizar, se llevó a cabo en sólo 1 minuto.

En la mayoría de los casos los rendimientos de la reacción fueron buenos o muy buenos. Además, en las condiciones óptimas se evidenciaron pocos signos de degradación, lo que se debió en gran medida a la modificación realizada para la generación de las sales de piridinio.

La técnica fue aplicada exitosamente sobre carragenanos, agaranos, fucoidanos, arabinogalactanos y condroitín sulfato. Cabe destacar que algunos de estos polisacáridos no se habían podido desulfatar solvolíticamente utilizando fuentes de calor convencionales.

El acople inmediato de la técnica de metilación al medio de reacción de los productos desulfatados arrojó excelentes resultados y permitió ahorrar una importante cantidad de tiempo. Especialmente demostrativo de estos hechos resultó ser la desulfatación y metilación de los fucoidanos.

Bibliografía

1. McHugh, D., J. *A guide to the seaweed industry*. FAO, Roma, **2003**.
2. Damonte, E. B.; Matulewicz, M. C.; Cerezo, A. C. *Curr. Med. Chem.*, **2004**, 11, 2399-2419.
3. Ponce, N. M. A.; Pujol, C. A.; Damonte, E. B.; Flores, M. L.; Stortz, C. A. *Carbohydr. Res.*, **2003**, 338, 153-165.
4. Fransson, L. A. *The Polysaccharides*. (Ed Aspinall, G. O.) New York, Academic Press, **1985**, 337-415.
5. Stuerge, D.; Delmotte, M. *Microwave in Organic Synthesis*. (Ed Loupy A.) Weinheim, Wiley-VCH, 1º Edición, **2002**, 1-33.
6. Venkatesh, M. S.; Raghavan, G. S. V. *Biosyst. Eng.*, **2004**, 88, 1-18.
7. Gedye, R.; Smith, F.; Westaway, K.; Lorraine Baldisera, H. A.; Laberge, L.; Rousell, J. *Tetrahedron Lett.*, **1986**, 27, 279-278.
8. Giguere, R. J.; Bray, T. L.; Duncan, S. M.; Majetich, G. *Tetrahedron Lett.*, **1986**, 27, 4945-4948.
9. Caddick, S. *Tetrahedron*, **1995**, 51, 10403-10432.
10. Perreaux, L.; Loupy, A. *Tetrahedron*, **2001**, 57, 9199-9223.
11. Lidstrom, P.; Tierney, J.; Wathey, B.; Westman, J. *Tetrahedron*, **2001**, 57, 9225-9283.
12. Gabriel, C.; Gabriel, S.; Grant, E. H.; Halstead, B. S. J.; Mingos, M. P. *Chem. Soc. Rev.*, **1998**, 27, 213-223.
13. Lauren, R.; Laporterie, A.; Dubac, J.; Berlan, J.; Lefeuvre, S.; Audhuy, M. *J. Org. Chem.*, **1992**, 57, 7099-7102.
14. Raner, K. D.; Strauss, C. R.; Vyskoc, F.; Mokbel, L. *J. Org. Chem.*, **1993**, 58, 950-953.
15. Abu Samra, A.; Morris, J. S.; Koirtyohann, S. R. *Anal. Chem.*, **1975**, 47, 1475-1477.
16. Richter, R. C.; Link, D.; Kingston, H. M. *Anal. Chem.*, **2001**, 73, 30A-37A.
17. Corsaro, A.; Chiacchio, U.; Pistara, V.; Romeo, G. *Curr. Org. Chem.*, **2004**, 8, 511-538.
18. Jacobs, A.; Palm, M.; Zacchi, G. Dahlman, O. *Carbohydr. Res.*, **2003**, 338, 1869-1876.
19. Fishman, M. L.; Chau, H. K.; Hoagland, P.; Ayyad, K. *Carbohydr. Res.*, **2000**, 323, 126-138.
20. Khan, A. R.; Jonhson, J. A.; Robinson, R. J., *Cereal Chem.*, **1979**, 59, 303-304.
21. Yu, H. M.; Chen, S. T.; Suree, P.; Nuansri, R.; Wang, K. T. *J. Org. Chem.*, **1996**, 61, 9608-9609.

22. Kunlan, L.; Lixin, X.; Jun, L.; Jun, P.; Guoying, C.; Zuwei, X. *Carbohydr. Res.*, **2001**, 331, 9-12.
23. Gourson, C.; Benhaddou, R.; Granet, R.; Krausz, P.; Saulnier, L.; Thibault, J. F. *C. R. Acad. Sci. -IIC*, **1999**, 2, 75-78.
24. Satge, C.; Verneuil, B.; Branland, P.; Granet, R.; Krautz, P.; Rozier, J.; Petit, C. *Carbohydr. Polym.*, **2002**, 49, 373-376
25. Singh, V.; Tiwari, A.; Tripathi, D.; Malviya, T. *Tetrahedron Lett.*, **2003**, 44, 7295-7297.
26. Singh, V.; Tiwari, A.; Tripathi, D.; Sanghi, R. *J. Appl. Polym Sci*, **2004**, 92, 569-575.
27. Singh, V.; Tiwari, A.; Tripathi, D.; Sanghi, R. *Polymer*, **2006**, 47, 254-260.
28. Xing, R.; Liu, S.; Yu, H.; Zhang, Q.; Li, Z.; Li, P. *Carbohydr. Res.*, **2004**, 339, 2515-2519.
29. Uy, S.; Easteal, A. J.; Farid, M. M.; Keam, R. B.; Conner, G. T. *Carbohydr. Res.*, **2005**, 340, 1357-1364.
30. Hegedüs, C.; Madarász, J.; Gulyás, H.; Szöllösy, A.; Bakos, J. *Tetrahedron: Asymmetry*, **2001**, 12, 2867-2873.
31. Percival, E. J. V. *Quart. Rev.*, **1949**, 3, 369-384.
32. Ciancia, M.; Nosedá, M. D.; Matulewicz, M. C.; Cerezo, M. C. *Carbohydr. Polym.*, **1993**, 20, 95-98.
33. Percival, R. J.; Wood, J. K. *J. Chem. Soc.*, **1963**, 5459-5468.
34. Freile-Pelegrín, Y.; Murano, E. *Biores. Technol.*, **2005**, 96, 295-302.
35. Ciancia, M. Tesis Doctoral. "Estudio de los carragenanos de plantas cistocárpicas del alga roja *Gigartina skottsbergii*", FCEyN-UBA, **1994**.
36. Ciancia, M.; Matulewicz, M. C.; Cerezo, A. S. *Carbohydr. Polym.*, **1997**, 32, 293-295.
37. Nosedá, M. D.; Cerezo, A. S. *Carbohydr. Polym.*, **1995**, 26, 1-3.
38. Nosedá, M. D.; Viana, A. G.; Duarte, M. E. R.; Cerezo, A. S. *Carbohydr. Res.*, **2000**, 42, 301-305.
39. Viana, A. G.; Nosedá, M. D.; Duarte, M. E. R.; Cerezo, A. S. *Carbohydr. Polym.*, **2004**, 455-460.
40. Stortz, C. A.; Cerezo, A. S. *J. Carbohydr. Chem.*, **1998**, 17, 1405-1419.
41. Stortz, C. A.; Cerezo, A. S. *Carbohydr. Res.*, **1993**, 242, 217-227.
42. Stortz, C. A.; Bacon, B. E.; Cherniak, R.; Cerezo, A. S. *Carbohydr. Res.*, **1994**, 261, 317-326.
43. Feather, M. S.; Harris, J. F. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, **1973**, 28, 161-24.
44. Koetz, R.; Neukom, H. *Carbohydr. Res.*, **1975**, 42, 365-368.

45. Rees, D. A. *J. Chem. Soc.*, **1961**, 5168-5171.
46. Stuerger, D.; Delmotte, M. Cap 1 en *Microwave in Organic Synthesis*. (Ed Loupy A.) Weinheim, Wiley-VCH, 2º Edición, **2006**, 1-61.
47. Usov, I. A. *Food Hydrocol.*, **1998**, 12, 301-308.
48. Aspinall, G. O. *The Polysaccharides*. (Ed Aspinall, G. O.) New York, Academic Press, **1982**, Vol. 1, 35-131.
49. Kantor, T. G.; Schubert, M. *J. Am. Chem. Soc.*, **1957**, 79, 152-153.
50. Dolan, T. C. S.; Rees, D. A. *J. Chem Soc.*, **1965**, 3534-3539.
51. Cases, M. R. Tesis Doctoral. "*Estudio del sistema de polisacáridos del alga calcárea Corallina officinalis*", FCEyN-UBA, **1995**.
52. Usov, I. A.; Adamyants, K. S.; Miroshnikova, L. I.; Shaposhnikova, A. A.; Kochetkov, N. K. *Carbohydr. Res.*, **1971**, 18, 336-338
53. Usov, I. A.; Miroshnikova, L. I.; Kochetkov, N. K. *Zh. Obshch. Khim.*, **1972**, 42, 945-949 (En ruso).
54. Harris, M. J.; Turvey, J. R. *Carbohydr. Res.*, **1969**, 9, 397-405.
55. McKenna, J; Norymberski, J. K. *J. Chem. Soc.*, **1957**, 3889-3893.
56. Usov, I. A.; Adamyants, K. S.; *Bioorg. Khim.*, **1975**, 1, 659-664.
57. Nagasawa, K.; Inoue, Y.; Kamata, T. *Carbohydr. Res.*, **1977**, 58, 47-55.
58. Furneaux, R. H.; Stevenson, T. T. *Hydrobiologia*, **1990**, 204/5, 615-620.
59. Stortz, C. A.; Cerezo, A. S. *An. Asoc. Quím. Arg.*, **1986**, 74, 353-360.
60. Takano, R.; Matsuo, M.; Kamei-Hayashi, K.; Hara, S.; Hirase, S. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **1992**, 56, 1577-1580.
61. Matsuo, M.; Takano, R.; Kamei-Hayashi, K.; Hara, S. *Carbohydr. Res.*, **1993**, 241, 909-215.
62. Takano, R.; Hayashi, K.; Hara, S.; Hirase, S. *Carbohydr. Polym.*, **1995**, 27, 305-311.
63. Takano, R.; Hayashi, J.; Hayashi, K.; Hara, S.; Hirase, S. *Bot. Mar.*, **1996**, 39, 95-102.
64. Kolender, A. A.; Matulewicz, M. C. *Carbohydr. Res.*, **2004**, 339, 1619-1629.
65. Stortz, C. A. Tesis Doctoral. "*Estudio de los carragenanos solubles del alga roja Iridaea undulosa Bory*", FCEyN-UBA, **1984**.
66. Cases, M. R., Stortz, C. A., Cerezo, A. S. *Phytochemistry*, **1992**, 31, 3897-3900
67. Cases, M.R., Stortz, C.A., Cerezo, A.S. *Int. J. Biol. Macromol.*, **1994**, 16, 93-97.
68. Ciucanu, I.; Kerek, F. *Carbohydr. Res.*, **1984**, 131, 209-217.
69. Stevenson, T. T.; Furneaux, R. H. *Carbohydr. Res.*, **1991**, 210, 277-298.
70. Errea, M. I. ; Matulewicz, M. C. *Carbohydr. Res.*, **2003**, 338, 943-953.

71. Matsuhiro, B.; Conte, A. F.; Damonte, E. B.; Kolender, A. A.; Matulewicz, M. C.; Mejias, E. G.; Pujol, C. A.; Zúñiga, E. A. *Carbohydr. Res.*, **2005**, 340, 2392-2402.
72. Ponce, N. M. A. Tesis Doctoral. "*Estudio del sistema de polisacáridos de Adenocystis utricularis, un alga parda de las costas patagónicas argentinas de posible utilización farmacológica y/o industrial*", FCN-UNPSJB, **2007**.
73. Chizhov, A. O.; Dell, A.; Morris, H. R.; Haslam, S. M.; McDowell, R. A.; Shashkov, A. S.; Nifant'ev, N. E.; Khatuntseva, E. A.; Usov, A. I. *Carbohydr. Res.*, **1999**, 320, 108-119
74. Inoune, I.; Nagasawa, K. *Carbohydr. Res.*, **1976**, 46, 87-95.
75. Mucci, A.; Schenetti, L.; Volpi, N. *Carbohydr. Polym.*, **2000**, 41, 37-45.
76. Ciancia, M.; Quintana, I.; Viscargüenaza, M. I.; Kasulin, L.; de Dios, A.; Estevez, J. M.; Cerezo, A. S. *Int. J. Biol. Macromol.*, **2007**, 41, 641-649.

CAPÍTULO 5

AISLAMIENTO, PURIFICACIÓN Y DETERMINACIÓN ESTRUCTURAL DE LOS POLISACÁRIDOS DE *JANIA RUBENS*

5.1 Introducción

Los polisacáridos de Corallinales estudiados hasta ahora, como se explicó, presentan características estructurales únicas que han originado su clasificación como coralinanos. Sin embargo, el estudio detallado de estos polisacáridos se ha restringido solamente a los productos aislados de 4 diferentes especies¹.

A partir de los primeros resultados sobre los polisacáridos aislados de las algas *Bosiella orbigniana* y *Jania rubens* (Capítulo 2), se decidió ampliar el estudio sobre el sistema de esta última. La principal característica estructural que llevó a elegirla fue la presencia de cantidades importantes de 3,6-anhidrogalactosa, la cual nunca antes había sido detectada en otros coralinanos¹.

En literatura existen dos trabajos sobre supuestos polisacáridos aislados de *Jania*^{2,3}, aunque estos trabajos publicados en una revista local de Egipto tienen muy poco rigor científico y los resultados informados no tienen relación alguna con los encontrados sobre el tema.

En este capítulo del trabajo de Tesis se presentan los resultados obtenidos al estudiar detalladamente los polisacáridos aislados del alga *Jania rubens*. Este estudio conjuga resultados obtenidos con técnicas preexistentes con algunas desarrolladas en esta Tesis y que fueron presentadas en capítulos anteriores.

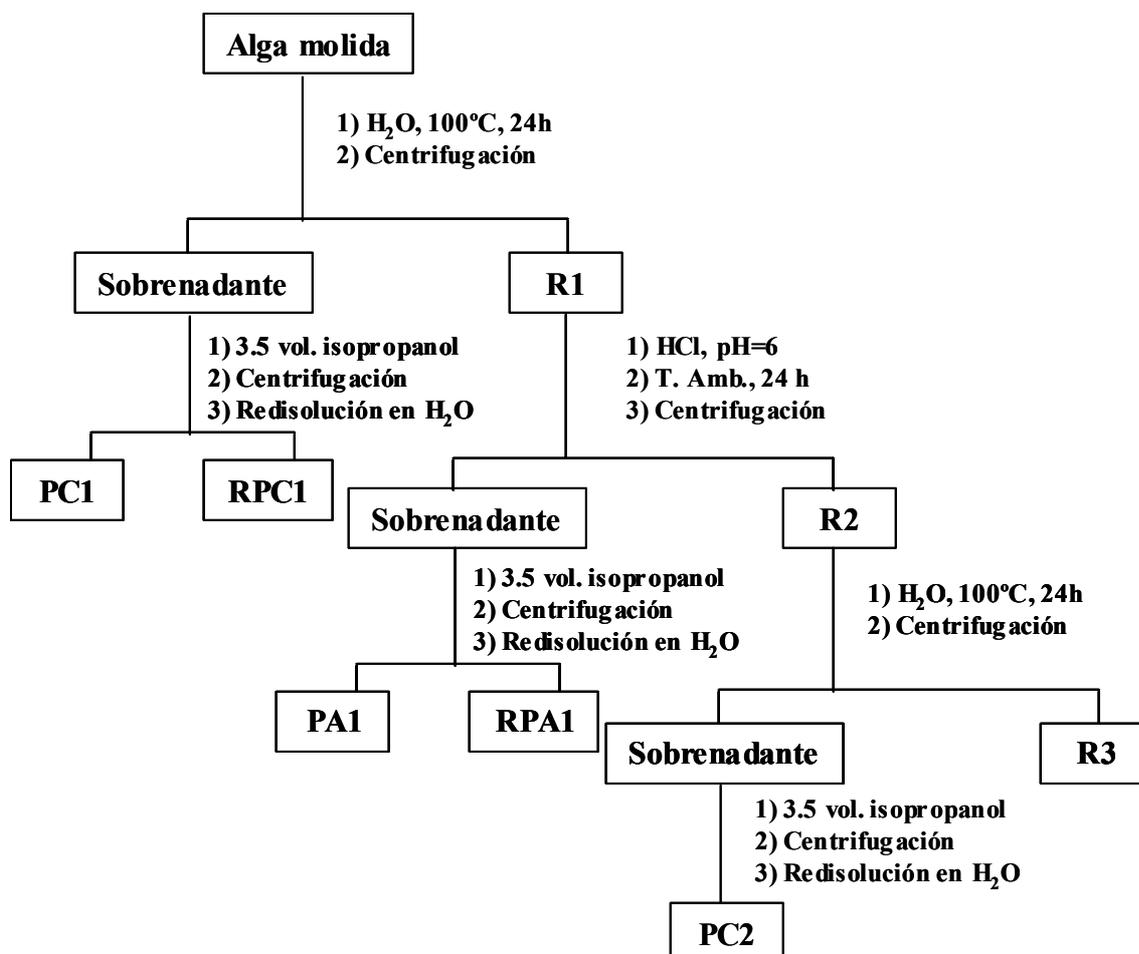
La introducción al tema es común a la desarrollada en el Capítulo 2. Los antecedentes pueden observarse en las páginas 29-39.

5.2 Resultados

5.2.1 Aislamiento de los polisacáridos

El alga *Jania rubens* fue recolectada en las costas de Miramar, partido de Gral. Alvarado. Hasta donde se sabe, ésta es la única especie del género que se encuentra en el litoral de la provincia de Buenos Aires⁴. Su morfología geniculada es similar a las otras algas de la familia Corallinaceae, encontrándose una sección fuertemente calcificada y otra no calcificada.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en el Capítulo 2 al extraer el alga por tres métodos extractivos diferentes, se diseñó un proceso combinado de extracción a mayor escala para intentar minimizar la degradación y maximizar el rendimiento y la selectividad (Esquema 5.1).



Esquema 5.1 Extracción de los polisacáridos de *J. rubens*.

El alga limpia, seca y molida se extrajo en primera instancia utilizando la metodología empleada por Takano *et al.*⁵.

El alga se extrajo con agua a 100 °C durante 24 h y luego se separaron el extracto y el residuo (**R1**) por centrifugación. El extracto fue concentrado para posteriormente realizar la precipitación selectiva de los biopolímeros mediante el agregado de 3,5 vol. de isopropanol a la solución. Luego de ser separados por centrifugación, éstos se disolvieron en agua destilada obteniéndose una fracción soluble y un precipitado (**RPC1**). El soluble fue finalmente liofilizado para obtener la fracción **PC1**.

En la segunda etapa de extracción se utilizó el método de Cases *et al.*^{6,7}, el cual es beneficioso en términos de rendimiento y degradación (ver Capítulo 2).

El residuo **R1** se suspendió en agua y se le agregó HCl 0,1N, manteniendo el pH en un valor aproximado de 6 y la temperatura cercana a 5 °C (ver detalle en Materiales y métodos). El ácido fue agregado hasta que no se observó más desprendimiento de CO₂. La solución resultante se extrajo con agitación durante 24 h a temperatura ambiente. Posteriormente se separó el extracto del residuo por centrifugación. Este último fue sometido a un nuevo proceso de extracción en las mismas condiciones. El residuo final (**R2**) fue utilizado para una nueva extracción (ver luego).

Los sobrenadantes obtenidos se juntaron y se realizó nuevamente una precipitación selectiva con isopropanol, generándose el producto insoluble **PA**. La purificación se continuó redisolviendo **PA** en agua, lo cual generó la fracción soluble **PA1** (obtenida por centrifugación y liofilización) y un residuo insoluble (**RPA1**).

Por último, el residuo del alga **R2** proveniente de la etapa anterior, se extrajo nuevamente con agua a ebullición, utilizando la misma metodología que en la primera etapa. De esta manera se obtuvo un producto soluble denominado **PC2**. En este caso la redisolución de los polisacáridos no generó una fracción insoluble.

En los tres procesos de precipitación con isopropanol utilizados para obtener los productos, quedaron además aguas madres (75% de alcohol). En éstas si bien no se detectaron carbohidratos se observó, utilizando RMN de ¹³C, la presencia de aminoácidos, péptidos y laminitol (un metil inositol) que no fueron estudiados.

5.2.2 Caracterización de los productos

Los productos obtenidos se analizaron para determinar su composición. Los resultados se muestran en la Tabla 5.1.

Tabla 5.1 Composición de los productos extraídos de *Jania rubens*

	PC1	RPC1	PA1	RPA1	PC2
Rendimiento (%)	1,4	0,4	1,0	0,4	0,5
Carbohidratos (%)	71	11	40	50	50
Proteínas (%)	15	ND ^a	5	ND	19
Sulfato (% NaSO ₃)	8,4	7,1	17,4	10,4	9,3
Ac. Urónicos	1,5	ND	1,0	ND	2,5
Peso Molecular (KDa)	11	ND	18	ND	1

^a ND= no determinado debido a la insolubilidad de la muestra.

Los rendimientos de los productos obtenidos se ubican entre 0,4 y 1,4%, siendo estos valores similares a los obtenidos al realizar las extracciones a menor escala (ver Capítulo 2). La fracción de mayor rendimiento fue **PC1**, mientras que la de menor rendimiento correspondió a **RPC1**. Si se agrupan los productos solubles e insolubles de cada extracción se observa que el rendimiento fue disminuyendo en cada etapa.

Los productos aislados con agua caliente fueron más ricos en proteínas que aquellos aislados a temperatura ambiente, obteniéndose un máximo de 19% en **PC2**. Esto indica que el proceso de precipitación con isopropanol también volvió insoluble una importante cantidad de proteínas.

La proporción de carbohidratos en las fracciones extraídas con agua caliente se ubicó entre 50 y 70%, mientras que a temperatura ambiente la proporción fue menor (40%). En los productos insolubles el comportamiento fue desparejo: mientras que **RPC1** estaba conformado por apenas un 11% de carbohidratos, **RPA1** poseía un 50%.

Como puede observarse en la Tabla 5.1 el peso molecular y la cantidad de sulfato fueron notoriamente mayores para la fracción obtenida a temperatura ambiente (**PA1**).

Como era de esperar de acuerdo a los métodos de extracción utilizados, ninguno de los productos contenía una cantidad apreciable de ácidos urónicos. Los resultados analíticos de las fracciones fueron similares a los obtenidos en el Capítulo 2 cuando se realizaron extracciones a menor escala.

5.2.3 Determinación de azúcares componentes

La determinación de los azúcares componentes de los distintos productos fue realizada por cromatografía gaseosa empleando tres métodos de derivatización diferentes.

Por un lado se generaron los alditoles peracetilados utilizando una hidrólisis reductiva⁸ con el objetivo de detectar a todos los azúcares, incluyendo a la 3,6-anhidrogalactosa.

Dado que utilizando los alditoles peracetilados no es posible diferenciar entre la 3-*O*-metilgalactosa y la 4-*O*-metilgalactosa, se realizó el análisis de azúcares componentes generando los respectivos aldononitrilos peracetilados. Con esta técnica se pueden cuantificar todos los monosacáridos incluyendo las galactosas monometiladas, pero no permite detectar la 3,6-anhidrogalactosa.

El tercer método de derivatización utilizado en el análisis de azúcares componentes fue el que genera los aminoalditoles peracetilados por aminación reductiva para determinar la configuración de cada azúcar. Mientras que la aminación para la mayoría de los azúcares se realiza con (*S*)-1-amino-2-propanol, para la 2-*O*-metilgalactosa y la 3,6-anhidrogalactosa se debe realizar con (*S*)- α -metilbencilamina^{7,9} (ver pág. 66). La determinación configuracional de la 3,6-anhidrogalactosa se realizó utilizando la técnica desarrollada en este trabajo de Tesis (Capítulo 3).

En la Tabla 5.2 se muestran los resultados obtenidos con los tres métodos de derivatización, expresados como moles cada 100 moles de galactosas totales (galactosa + galactosas monometiladas + 3,6-anhidrogalactosa).

La determinación de la configuración de la 2-*O*-metilgalactosa se realizó en un experimento separado. El resultado fue en todos los casos que el monosacárido pertenecía a la serie L.

Tabla 5.2 Azúcares componentes, derivatizados como alditoles, aldononitrilos y 1-amino-1-desoxialditoles peracetilados, de los productos extraídos de *Jania rubens* (expresados en moles/100 moles de galactosas totales)

	PC1	RPC1	PA1	RPA1	PC2
Alditoles					
Xil	35	26	43	36	35
2- <i>O</i> -Me-Gal ^a	9	7	10	11	10
3- <i>O</i> -Me-Gal + 4- <i>O</i> -Me-Gal	7	2	6	4	7
6- <i>O</i> -Me-Gal	5	2	2	1	4
Gal	72	85	75	78	73
3,6-AnGal	7	4	8	6	6
Man	1	2	2	1	4
Glc	158	230	7	15	399
Aldononitrilos					
Xil	29	21	49	42	34
2- <i>O</i> -Me-Gal	9	9	14	21	14
3- <i>O</i> -Me-Gal	7	2	8	7	10
6- <i>O</i> -Me-Gal	4	-	3	-	5
Gal	51	68	75	72	71
Man	2	1	-	1	4
Glc	130	228	7	32	476
1-amino-1-desoxialditoles					
D-Xil	40	22	42	32	40
2- <i>O</i> -Me-Gal	7	6	6	6	7
3- <i>O</i> -Me-D-Gal ^a + 4- <i>O</i> -Me-L-Gal	2	1	2	1	1
3- <i>O</i> -Me-L-Gal	4	5	4	2	5
6- <i>O</i> -Me-D-Gal	5	2	2	-	4
D-Gal	49	52	55	48	47
L-Gal	33	34	31	41	35
D-Glc + D-Man	194	261	11	8	535

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

La configuración de la 3,6-anhidrogalactosa también fue determinada por separado. Para la fracción **PA1** la configuración determinada fue exclusivamente L, mientras que para los productos obtenidos a 100 °C (**PC1** y **PC2**) se encontró una mezcla de enantiómeros. La relación D:L para la fracción **PC1** fue 3 a 1 y para **PC2** era de 1,1 a 1.

Tal como se realizó anteriormente (Capítulo 2), se calcularon nuevamente los promedios de los 3 métodos. Los resultados pueden observarse en la Tabla 5.3.

Tabla 5.3 Azúcares componentes de los productos extraídos de *Jania rubens* (expresados en moles/100 moles de galactosas totales).

	PC1	RPC1	PA1	RPA1	PC2
Xil	35	24	42	35	34
2-O-Me-L-Gal	9	8	9	12	10
3-O-Me-D-Gal	2	1	2	1	1
3-O-Me-L-Gal	5	3	4	3	6
6-O-Me-D-Gal	5	2	2	1	4
D-Gal	42	50	48	41	41
L-Gal	30	32	27	36	31
3,6-An-D-Gal	5	↑	–	↑	4
3,6-An-L-Gal	2	4 ^a ↓	8	6 ^a ↓	3
D-Man	2	2	1	1	4
D-Glc	170	248	8	17	444
Relación					
D/L	54/46	–	52/48	–	50/50
Gals/Xil	2,7	4,2	2,4	2,9	2,9

^a No se determinó la configuración de la 3,6-AnGal en estos productos.

El análisis de los azúcares componentes muestra que los productos aislados con agua caliente poseen altas proporciones de glucosa, lo que podría indicar la presencia de almidón de florideas^{7,9-14}. La presencia de altas proporciones de almidón es probablemente responsable de que los pesos moleculares promedio de los productos obtenidos a 100 °C sean inferiores al determinado para el producto aislado a temperatura ambiente **PA1**. Estos resultados, al igual que las diferentes proporciones de proteínas, coinciden con el estudio realizado a menor escala.

Al analizar los otros monosacáridos se observan importantes cantidades de xilosa, galactosa y galactosas monometiladas, lo que confirma la existencia de xilogalactanos en todos los productos. La relación galactosa/xilosa se ubica entre 2,7 y 2,9 para la mayoría de las fracciones, con la excepción del residuo **RPC1** que posee una relación superior (4,2). Esta última característica podría implicar la existencia de un polisacárido muy pobre en cadenas laterales de xilosa, que le conferiría una menor solubilidad en agua.

En todos los productos se determinaron relaciones Gal/Xil similares. Este resultado es diferente al obtenido por extracción a pequeña escala (pág. 48), ya que en ese caso con agua a ebullición se aislaron productos con menos xilosa.

Todos los productos estudiados contenían entre 14 y 21 galactosas monometiladas cada 100 galactosas totales. La 2-*O*-metil-L-galactosa fue siempre la que se encontró en mayor proporción con valores cercanos a 10%. El resultado es similar a los observados en los polisacáridos de otras especies de la familia^{5,6,12,13}.

Además de la 2-*O*-Me-L-Gal fueron detectadas proporciones importantes de 3-*O*-metilgalactosa (ambos enantiómeros, pero principalmente L) y algo de 6-*O*-metil-D-galactosa. Las mayores proporciones de ambos monosacáridos fueron encontradas en los productos aislados con agua caliente, especialmente en el caso del monosacárido metoxilado en O-6.

Mientras que la configuración D de la 6-*O*-metilgalactosa coincide con la encontrada previamente^{6,9,12,13}, fue sorprendente encontrar 3-*O*-metilgalactosa de ambas configuraciones ya que la de la serie D no había sido previamente informada en coralinanos. La aparición de 3-*O*-Me-D-Gal podría implicar una modificación de la estructura típica de los agaranos, ya que se sabe que en estos polisacáridos las unidades de β -D-galactosa están enlazadas a otros azúcares por la posición 3.

En los productos analizados también se hallaron niveles importantes de 3,6-anhidrogalactosa (entre 4 y 8 unidades cada 100 galactosas totales), tal como se había observado en el estudio extractivo realizado (Capítulo 2). Este resultado, como ya se explicó, fue también sorprendente ya que hasta el momento se suponía que los coralinanos no poseían 3,6-AnGal. El estudio configuracional permitió determinar que en **PA1** toda la 3,6-anhidrogalactosa pertenecía a la serie L, mientras que en las fracciones **PC1** y en **PC2** coexistían los dos enantiómeros. Este último resultado también resultó extraño ya que la existencia de 3,6-An-D-Gal no es consistente con una estructura del tipo agarano sino que lo es con una del tipo carragenano. La coexistencia de ambos enantiómeros podía ser indicativa de la existencia de una estructura del tipo híbrido D/L¹.

Otra posibilidad para explicar la coexistencia de los dos enantiómeros de la 3,6-AnGal es suponer la presencia de especies epífitas carragenófitas junto con los ejemplares de *J. rubens* en el momento de realizar la extracción. Sin embargo, esta última opción parece ser muy poco probable, dado que limpieza de las algas se realizó con mucho rigor y además, se verificó la limpieza del material por microscopía.

En el trabajo¹⁵ que dio lugar al Capítulo 2 se había supuesto que la configuración de la 3,6-AnGal era L, dado que aún no se contaba con una técnica capaz de determinar su configuración en un polisacárido con tan baja proporción del anhidrozúcar. Como se observa en la Tabla 5.3 esta suposición fue correcta para el producto aislado a temperatura ambiente (**PA1**).

Ante la aparición de la 3,6-AnGal en los productos aislados de *J. rubens* se decidió determinar si existía su precursor químico y enzimático, la α -galactosa 6-sulfato. Luego de realizar el tratamiento alcalino de los 5 productos (ver Materiales y métodos) se midió nuevamente la cantidad de 3,6-AnGal. Los resultados mostraron que la proporción del anhidrozúcar no variaba, por lo que se pudo concluir que no existían unidades de α -galactosa 6-sulfato.

Salvo por las diferencias en las cantidades de 3-*O*-metilgalactosa y 6-*O*-metilgalactosa, en las configuraciones de la 3,6-anhidrogalactosa y otros detalles menores, los xilogalactanos presentes en los 5 productos poseen características muy similares. Se decidió profundizar el estudio del producto **PA1** ya que era el que se encontraba menos contaminado con almidón y proteínas.

5.2.4 Estudio de los polisacáridos aislados a temperatura ambiente

5.2.4.1 Purificación del producto PA1

Si bien **PA1** estaba conformado mayoritariamente por carbohidratos, la proporción (determinada por el método del fenol/ácido sulfúrico) era relativamente baja. En consecuencia, se decidió redissolver el producto en agua y a la porción soluble someterla a una diálisis contra agua destilada. La solución resultante se liofilizó para obtener una fracción purificada **PA1d**, con un rendimiento del 30%. En las aguas de diálisis no se detectaron hidratos de carbono.

En la Tabla 5.4 se pueden comparar los datos analíticos obtenidos para **PA1d** con los obtenidos para **PA1**.

Tabla 5.4 Composición y azúcares constituyentes de los productos **PA1** y **PA1d** (moles / 100 moles de [galactosas + galactosas metiladas], determinados como alditoles peracetilados).

	PA1	PA1d
Carbohidratos (%)	40	80
Proteínas (%)	5	6
Sulfato (% NaSO ₃)	17,4	12,5
Ac. Urónicos (%)	1	2
Peso Molecular (KDa)	18	14
Azúcar	moles/100 galactosas totales	
Xil	43	51
2- <i>O</i> -Me-Gal	10	11
3- <i>O</i> -Me-Gal	6	6
6- <i>O</i> -Me-Gal	2	2
2,3-di- <i>O</i> -Me-Gal	–	tr. ^a
Gal	75	72
3,6-An-2- <i>O</i> -Me-Gal	–	1
3,6-AnGal	8	8
Man	2	1
Glc	7	7

^a tr. = trazas

La proporción de hidratos de carbono determinada para **PA1d** fue del 80%, de manera que el proceso de diálisis enriqueció fuertemente la fracción en carbohidratos con respecto a **PA1**. Las cantidades de proteínas y ácidos urónicos prácticamente no cambiaron al dializar **PA1**; en cambio disminuyó la cantidad de sulfato, lo que sugiere la presencia de sales inorgánicas en el producto sin dializar.

El proceso de diálisis seguramente purificó el producto por la pérdida de sales, que en su gran mayoría habían sido generadas en la extracción con el ácido clorhídrico (al agregar HCl se forma CaCl₂ como consecuencia de la destrucción del carbonato de calcio). En el proceso de precipitación con isopropanol si bien parte de las sales permaneció soluble, es

posible que otras quedaran ocluidas o adsorbidas en el polisacárido.

Los monosacáridos constituyentes de **PA1d** son muy similares a los encontrados para **PA1** (Tabla 5.4). La principal diferencia se encuentra en que el producto purificado posee mayor cantidad de xilosa.

En **PA1d**, se pudieron detectar dos monosacáridos que no habían sido observados en **PA1**: la 3,6-anhidro-2-*O*-metil-galactosa y la 2,3-di-*O*-metilgalactosa, ambas en pequeña proporción. Mientras que el derivado metilado de la 3,6-AnGal es comúnmente encontrado en agaranos, la 2,3-di-*O*-Me-Gal no ha aparecido naturalmente en los mismos¹. Sin embargo, en un estudio realizado en paralelo en nuestro laboratorio se detectaron cantidades sustanciales de 2,3-*O*-metilgalactosa en xilogalactanos aislados de la coralina incrustante *Liththamnion heterocladum* de las costas fueguinas¹⁶. No puede descartarse que este azúcar haya estado presente en otros coralinanos estudiados anteriormente en los que no se informó su presencia, dado que al no ser “esperado” pudo pasar inadvertido. Sin embargo, en los estudios de *C. officinalis* y *B. orbigniana* (Capítulo 2) se verificó efectivamente que la galactosa dimetilada estaba ausente.

En conclusión, en los xilogalactanos de *J. rubens* se detectaron cuatro monosacáridos no encontrados previamente en coralinanos: 2,3-di-*O*-metil-D-galactosa, 3,6-anhidro-2-*O*-metil-galactosa, 3,6-anhidrogalactosa y 3-*O*-metil-D-galactosa.

5.2.4.2 Fraccionamiento del producto PA1d

Luego de realizar la caracterización de **PA1d** se estudió la homogeneidad del polisacárido.

Turvey y Simpson¹⁴ y Cases *et al.*^{6,7,10} estudiaron la homogeneidad y fraccionaron los polisacáridos de *C. officinalis* por cromatografía de intercambio iónico sobre DEAE-Sephadex A-50, utilizando como solvente de elución soluciones acuosas de NaCl de concentraciones crecientes. Ambos grupos obtuvieron una serie de fracciones que indicaban cierto grado de heterodispersión del polisacárido. Sobre estos antecedentes se procedió también a realizar el fraccionamiento de **PA1d** con la misma técnica (DEAE-Sephadex A-50, utilizando como eluyente soluciones de concentraciones crecientes de NaCl).

La primera experiencia de fraccionamiento fue realizada a escala analítica (10 mg de material) para determinar que el sistema de polisacáridos se comportaba de manera similar a lo informado previamente para *C. officinalis*^{6,7,10,14}. En la Figura 5.1 se observa el perfil de elución elaborado midiendo la cantidad de hidratos de carbono, con el ensayo colorimétrico del fenol-ácido sulfúrico, en función del volumen de solvente de elución utilizado.

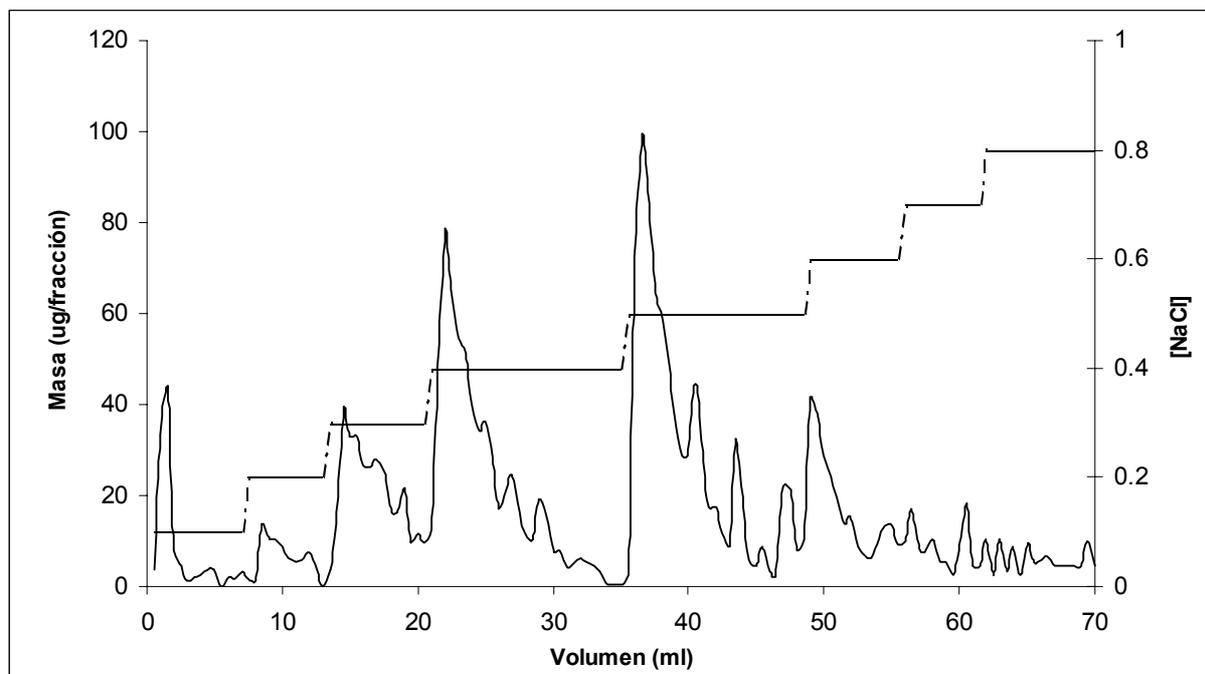


Figura 5.1 Cromatografía de intercambio iónico sobre DEAE-Sephadex A-50 de **PA1d** a escala analítica.

El rango de concentraciones de NaCl usadas se ubicó entre 0,1 y 2,5 M, aunque no se registraron fracciones con hidratos de carbono a concentraciones mayores de 0,8 M. Los intervalos de concentraciones de sal se incrementaron de a 0,1 M por vez.

Se puede apreciar en el gráfico que **Pa1d** era un producto heterodisperso pasible de fraccionamiento. Al aumentar la concentración de sal en cada paso se eluyó siempre una nueva fracción. Al igual que lo que ocurrió con *C. officinalis*^{6,7}, los productos eluidos con NaCl entre 0,3 y 0,6 M fueron los mayoritarios.

A continuación se realizó el fraccionamiento de **Pa1d** en forma preparativa con el total de la muestra (800 mg). En la Figura 5.2 se pueden observar los resultados obtenidos.

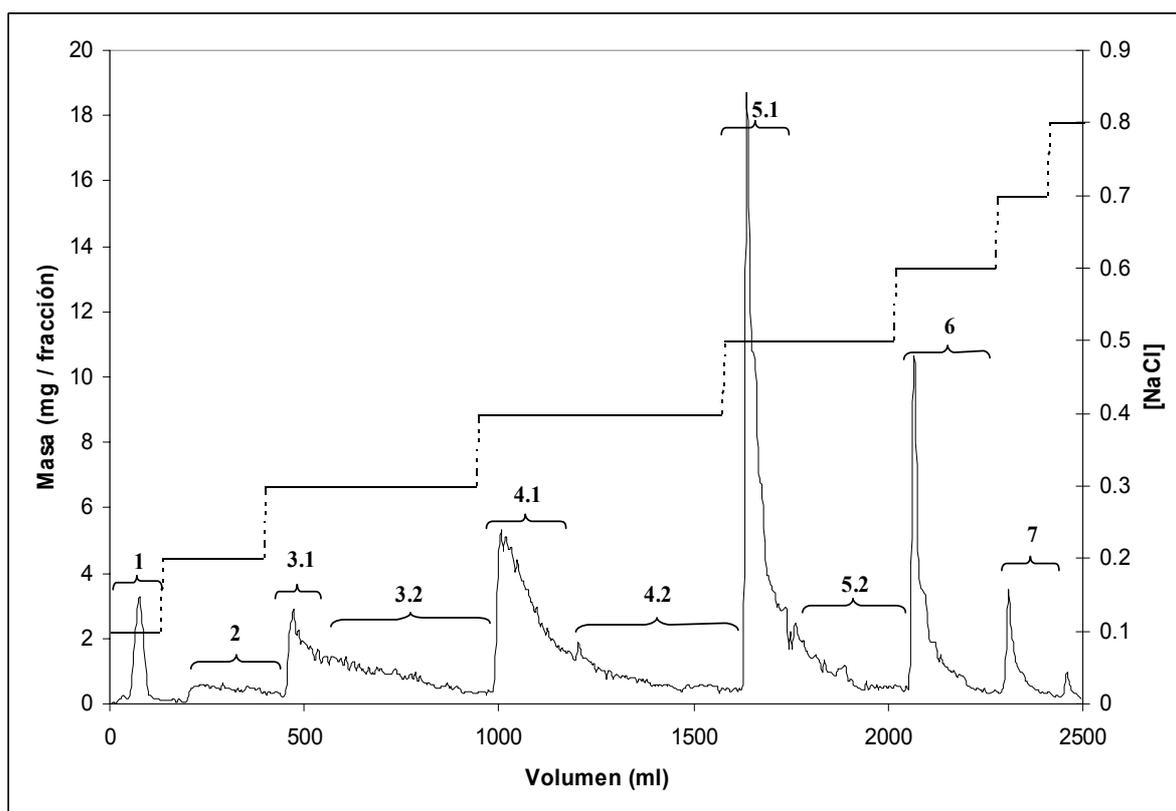


Figura 5.2 Cromatografía de intercambio iónico sobre DEAE-Sephadex A-50 de **PA1d** a escala preparativa.

Nuevamente se usaron soluciones de NaCl con concentraciones de 0,1 M a 2,5 M. Mientras que a concentraciones inferiores a 1 M los incrementos se realizaron en etapas de 0,1 M, por encima de dicha concentración los intervalos fueron de 0,5 M.

Al igual que la cromatografía realizada a escala analítica todos los productos eluyeron con soluciones de sal inferiores a 0,9 M y cada vez que se incrementó la concentración de la solución se registró la elución de una nueva fracción. El último producto fue eluido a 0,8 M, sin embargo su rendimiento fue tan bajo que no fue posible estudiarlo.

Las fracciones fueron identificadas con una nomenclatura que indica las concentraciones utilizadas multiplicadas por 10; por ejemplo, **1** fue eluida con $[\text{NaCl}] = 0,1 \text{ M}$, **2** con $0,2 \text{ M}$, etc.

Dado que algunas fracciones presentaron signos de “tailing” en la cromatografía se decidió dividir las en dos. El criterio de división se basó en separar la primera parte definida del pico y la parte que conformaba la “cola” (Figura 5.3). El punto de división fue elegido arbitrariamente.

Las diez fracciones eluidas con concentraciones de NaCl entre 0,1 y 0,7 M fueron posteriormente purificadas por diálisis y recuperadas por liofilización. El porcentaje de recuperación del material total fue del 70% (respecto del introducido inicialmente en la columna). En la Tabla 5.5 se muestran los rendimientos de cada fracción.

Tabla 5.5 Rendimientos de las fracciones obtenidas a partir de **PA1d**.

Fracción	Rendimiento (%)	Fracción	Rendimiento (%)
1	1,2	4.2	5,1
2	3,7	5.1	13,6
3.1	4,5	5.2	3,3
3.2	8,2	6	9,2
4.1	13,0	7	2,7

Las fracciones mayoritarias fueron aquellas eluidas a concentraciones ente 0,3 y 0,6M, tal como se había observado en la columna analítica y como lo habían informado para los productos aislados de *Corallina officinalis*^{6,7}.

5.2.4.3 Caracterización de las fracciones

Las diez fracciones fueron caracterizadas determinando la cantidad de hidratos de carbono, proteínas, sulfato y peso molecular promedio (por su poder reductor). Además se realizó la determinación de los azúcares componentes por cromatografía gaseosa luego de la hidrólisis total de los polisacáridos utilizando tres métodos de derivatización (alditoles, aldononitrilos y 1-amino-1-desoxialditoles). Los resultados pueden observarse en las Tablas 5.6 y 5.7, respectivamente.

El porcentaje de hidratos de carbono de algunas de las fracciones fue bajo (Tabla 5.6), lo cual podría deberse a la presencia de sales inorgánicas que no pudieron ser separadas completamente en el proceso de diálisis o a la contaminación con proteínas .

Todos los productos contienen cantidades moderadas de sulfato. Las proteínas se concentraron en aquellas fracciones eluidas a bajas concentraciones de NaCl (0,1 a 0,3 M), especialmente en la **2** que llega a ser el 28%. Estas primeras fracciones son también las que tuvieron menor peso molecular, tal como se había observado para *C. officinalis*^{6,7}.

Tabla 5.6 Análisis de las fracciones obtenidas a partir de **PA1d**.

Fracción	Carbohidratos (%)	Proteínas (%)	Sulfato (%NaSO ₃)	Peso Mol. (KDa)	[α] _D (°)
1	51	9	ND	ND	+36
2	40	28	12,2	3,1	-49
3.1	57	10	10,1	6,0	-72
3.2	67	6	10,2	14,1	-61
4.1	72	2	10,6	29,3	-74
4.2	84	1	14,0	18,5	-65
5.1	63	2	11,2	49,5	-83
5.2	55	1	14,8	20,0	-70
6	65	2	11,2	42,9	-71
7	55	2	13,6	33,1	-71

Se puede apreciar en la Tabla 5.6 que el peso molecular promedio de las distintas fracciones se incrementa gradualmente al aumentar la concentración de NaCl utilizada para eluirlo. Este fenómeno ocurre hasta eluir la fracción **4.1**, luego la relación no es tan directa. Se observa claramente a partir de **4.2**, que las fracciones que eluyen como “cola” de las previas (**.2**) tienen menor peso molecular y mayor proporción de sulfato que sus antecesoras. Este comportamiento es esperable ya que el DEAE-Sephadex separa tanto por cargas como por peso molecular. De esta manera, dos moléculas con similar proporción de carga podrían eluir de la columna a diferentes volúmenes, siendo la última la de menor peso molecular.

La fracción **5.1** además de ser la de mayor rendimiento, fue también la de mayor peso molecular. Las fracciones **6** y **7** también son de alto peso molecular, pero menor al determinado para **5.1**. Las fracciones **4.2** y **5.2** tuvieron un peso molecular menor que las fracciones precedentes eluidas con la misma concentración de sal.

Respecto del orden de elución y del contenido de sulfato se observa un leve incremento del mismo a medida que se incrementa la concentración de la solución utilizada para la elución. La proporción de sulfato crece aún más cuando se analiza la fracción proveniente de la “cola” del pico.

Como ha sido mencionado anteriormente, se pueden observar diferencias en los resultados de los monosacáridos constituyentes de los polisacáridos según sea el derivado realizado para el análisis por cromatografía gaseosa. Por ejemplo, se puede apreciar

claramente en la Tabla 5.7 una subvaluación de la cantidad de xilosa que se produce al realizar la cuantificación con los alditoles peracetilados (con respecto a los otros dos métodos), o la sobrevaloración de las galactosas monometiladas que surge al utilizar los aldononitrilos. El uso de los 1-amino-1-desoxialditoles permite determinar cantidades de xilosa semejantes a las conseguidas con aldononitrilos, y cantidades de galactosas monometiladas comparables a los alditoles. En consecuencia, se decidió nuevamente utilizar en el análisis los promedios de los tres métodos de derivatización.

En la Tabla 5.8 se pueden observar los promedios obtenidos, la relación galactosas totales a xilosa y la relación D/L para las galactosas.

Las proporciones de 3,6-AnGal y 3,6-An-2-O-Me-Gal en la Tabla 5.8 corresponden a las determinadas utilizando los alditoles peracetilados (el resto de las áreas fueron normalizadas), mientras que sus configuraciones se determinaron en un experimento separado por doble hidrólisis-doble aminación reductiva con (*S*)- α -metilbencilamina (ver Capítulo 3). Esta amina también fue utilizada para determinar la configuración de la 2-O-Me-Gal.

El análisis de la fracción **1** mostró que ésta posee contenidos de glucosa extremadamente altos. Este dato, sumado al valor positivo del poder rotatorio (Tabla 5.6, $[\alpha]_D = +36^\circ$), permitió concluir que esta fracción contenía una alta proporción de almidón de florídeas. Las fracciones **2** y **3.1** también poseen glucosa, aunque en cantidades sensiblemente menores que su predecesora. En la fracción **2** además se encontraron pequeñas cantidades de manosa (4%), lo que podría ser un indicio de la existencia un manano contaminante. Dados los resultados obtenidos, se decidió no continuar el estudio sobre la fracción **1**.

Los monosacáridos que componen los polisacáridos son similares. Todas las fracciones poseen altas proporciones de galactosa y xilosa, y cantidades algo menores de galactosas monometiladas y 3,6-anhidrogalactosa.

La xilosa está presente en proporciones que superan las 35 unidades cada 100 galactosas en todas las fracciones, por lo que la relación entre las galactosas totales y la xilosa se ubica en valores cercanos a 2,5. Aquellos productos eluidos al principio (**2** y **3.1**) y al final (**7**) de la columna son las que tienen menores proporciones de la pentosa (35 a 37%), mientras que las fracciones centrales llegan a contener entre un 42 y 44%. Este comportamiento en el fraccionamiento fue idéntico al que observaron Cases *et al.* al estudiar los polisacáridos aislados de *C. officinalis*^{6,7}.

Tabla 5.7 Monosacáridos constituyentes de las fracciones obtenidas a partir de **PAId** (moles/100 moles galactosas).

Azúcar	1 ^a	2	3.1	3.2	4.1	4.2	5.1	5.2	6	7
Alditoles										
Xil	33	37	33	40	40	37	48	44	47	37
2-O-Me-Gal	-	9	10	10	9	9	9	10	11	10
3-O-Me-Gal + 4-O-Me-Gal	13	14	16	10	6	4	2	1	2	3
6-O-Me-Gal	26	6	4	2	1	1	2	2	2	3
2,3-di-O-Me-Gal	-	3	3	1	-	-	-	-	-	-
Gal	60	61	62	69	77	80	76	81	78	82
3,6-AnGal	2	5	5	7	7	6	10	6	6	3
3,6-An-2-O-Me-Gal	-	1	1	1	-	-	2	1	1	-
Man	29	4	tr.	tr.	-	tr.	-	tr.	tr.	tr.
Glc	794	9	3	2	-	1	-	tr.	tr.	tr.
Aldononitrilos										
Xil	ND ^c	35	37	46	45	44	49	45	42	37
2-O-Me-Gal	ND	14	14	15	15	15	13	14	15	15
3-O-Me-Gal	ND	24	23	14	10	6	4	3	3	4
6-O-Me-Gal	ND	6	5	3	2	1	1	2	2	3
2,3-di-O-Me-Gal	ND	4	3	1	-	-	-	-	-	-
Gal	ND	52	55	68	73	78	81	81	81	78
Man	ND	3	tr.	tr.	-	tr.	-	tr.	tr.	tr.
Glc	ND	4	3	1	-	-	-	tr.	tr.	tr.
1-amino-1-desoxialditoles										
D-Xil	ND	38	46	46	48	44	44	40	45	40
2-O-Me-L-Gal	ND	7	7	7	6	6	6	7	8	8
3-O-Me-L-Gal	ND	9	9	5	4	2	3	7	8	7
3-O-Me-D-Gal	ND	9	9	6	4	2	1	-	-	-
6-O-Me-D-Gal + 2,3-di-O-Me-D-Gal	ND	7	5	2	1	1	1	1	2	3
D-Gal	ND	38	41	53	56	59	59	57	57	55
L-Gal	ND	30	29	27	29	30	30	33	32	33
D-Glc + D-Man	ND	16	5	2	2	1	1	1	1	2

^a Solo se derivatizó como alditol y se encontraron también trazas de ramnosa y fucosa, ^b tr. = trazas, ^c ND= No determinado

Tabla 5.8 Monosacáridos constituyentes de los productos obtenidos por fraccionamiento de **PA1d** (moles/100 moles galactosa)

Azúcar	2	3.1	3.2	4.1	4.2	5.1	5.2	6	7
Xil	35	37	42	42	40	43	42	43	37
D-Gal	32	35	45	50	51	50	51	50	51
3-O-Me-D-Gal	9	9	6	4	2	1	-	-	-
6-O-Me-D-Gal	5	4	1	1	1	1	1	1	2
2,3-di-O-Me-D-Gal	3	2	1	-	-	-	-	-	-
L-Gal	26	25	23	25	28	26	29	28	30
2-O-Me-L-Gal	10	10	10	10	9	9	10	11	10
3-O-Me-L-Gal	9	9	6	4	3	2	2	2	3
3,6-An-L-Gal	5	5	7	7	6	10	6	7	3
3,6-An-2-O-Me-L-Gal	1	1	1	-	-	2	1	1	-
Man	4	tr. ^a	tr.	-	-	-	-	-	1
Glc	5	2	1	-	-	-	-	-	-
Relación									
D/L	49/51	50/50	53/47	54/46	54/46	51/49	52/48	52/48	53/47
Gals/Xil	2,9	2,7	2,4	2,4	2,5	2,3	2,4	2,4	2,7

^a tr. = trazas

La relación D/L entre las galactosas (Tabla 5.8) en todos los productos es muy cercana a 1. Entre las galactosas no metiladas naturalmente, las unidades con configuración D están presentes en mayor proporción que las L, ya que estas últimas aparecen con mayor proporción de metoxilación.

La 2-*O*-metil-L-galactosa es la galactosa monometilada mayoritaria presente en estos xilogalactanos. Está regularmente distribuida en la 9 fracciones estudiadas, en proporciones cercanas a las 10 unidades cada 100 galactosas totales. Esta unidad aparece en proporciones importantes en todos los coralinanos estudiados anteriormente^{5-7,12,13}.

La 3-*O*-metilgalactosa es la segunda galactosa metilada en términos de abundancia. Las primeras fracciones eluidas de la columna de intercambio iónico son las que poseen mayores proporciones de 3-*O*-Me-Gal, y se observa una marcada disminución de la misma en los productos según aumenta la concentración de la solución de NaCl empleada como eluyente. En las fracciones centrales (y más abundantes) la cantidad de la galactosa monometilada se estabiliza en proporciones cercanas al 2%.

Si se considera la configuración absoluta de la 3-*O*-Me-Gal se observa que en las primeras fracciones coexisten ambos enantiómeros, mientras que en las últimas sólo aparecen unidades de la serie L.

El comportamiento encontrado para la 3-*O*-Me-Gal es similar al encontrado por Cases *et al.* para la 4-*O*-Me-D-Gal en los polisacáridos de *Corallina officinalis*^{6,7,10}. Los autores encontraron que esta se ubicaba en altas proporciones en aquellos polisacáridos eluidos con NaCl entre 0,1 y 0,4 M. Su ubicación en el polisacárido fue determinada como cadena lateral unida a la posición C-6 de la D-Gal.

La 6-*O*-metil-D-galactosa, aunque está presente en muy bajas cantidades en todos los productos, es importante sólo en las dos fracciones eluidas al principio. La 2,3-di-*O*-Me-D-Gal está presente también únicamente en las primeras fracciones, y luego desaparece por completo. Su hallazgo fue sorprendente ya que, como se mencionó, no se había detectado previamente en ningún galactano de algas rojas.

En todos los polisacáridos eluidos de la columna se determinó la existencia de 3,6-anhidrogalactosa y su derivado natural metoxilado en C-2. La 3,6-AnGal está siempre en mayor cantidad que su isómero metilado. Las proporciones varían de 3 a 12 unidades cada 100 unidades de galactosas totales dependiendo el producto, aunque es más abundante en las fracciones centrales.

Utilizando la técnica de doble hidrólisis-doble aminación con metilbencilamina (ver Capítulo 3) se determinó que ambos anhidroazúcares poseían siempre configuración L.

La presencia constante de la 3,6-AnGal en todas las fracciones asegura que este azúcar es integrante del coralinano y no un contaminante. Si bien los resultados obtenidos no son totalmente concluyentes, sería lógico esperar que si existiera un producto contaminante que contenga la 3,6-AnGal, éste debería tener un comportamiento cromatográfico diferente al del sistema de coralinanos.

5.2.4.4 Análisis por metilación de las fracciones

Para determinar la estructura básica de los polisacáridos obtenidos por fraccionamiento se realizó un estudio de metilación. La alquilación fue realizada sobre las sales de trietilamonio de los polisacáridos en DMSO con yoduro de metilo y NaOH pulverizado, según la técnica de Ciucanu y Kerek¹⁷.

Los polisacáridos metilados se hidrolizaron, y los monosacáridos fueron derivatizados como alditoles peracetilados (tras hidrólisis reductiva) y como aldononitrilos peracetilados (tras hidrólisis total) para ser analizados por cromatografía gaseosa. Los resultados se pueden observar en las Tablas 5.9 y 5.10.

En todas las fracciones la 2,3,4-tri-*O*-metilxilosa, la 2,3,6-tri-*O*-metilgalactosa y la 2,4-di-*O*-metilgalactosa fueron los azúcares mayoritarios. En las fracciones **2** y **3.1** también se encontraron cantidades significativas de 2,3,4,6-tetra-*O*-metilgalactosa.

Además se hallaron en las distintas fracciones cantidades menores de 2,4,6-tri-*O*-metil-, 2,6-di-*O*-metil y 3,6-di-*O*-metilgalactosa, y en muy bajas proporciones algunas otras galactosas sin metilar, mono y dimetiladas. También se encontró xilosa sin metilar y dimetilada.

La proporción de xilosa total determinada en el estudio de metilación en todas las fracciones fue inferior al valor determinado en el análisis de azúcares componentes. La subvaluación de la 2,3,4-tri-*O*-metilxilosa fue sensiblemente mayor al derivatizar los azúcares como alditoles que al preparar los aldononitrilos acetilados⁷. La subvaluación de la trimetilxilosa ya había sido observada en otros estudios de metilación⁷. Anteriormente se informó que en la concentración a 50 °C y 50 torr de una solución acuosa de 2,3,4-tri-*O*-metilxilosa se perdía aproximadamente el 67% del producto. También fue observado que cuando a una solución clorofórmica de 2,3,4-tri-*O*-Me-Xil se le evaporaba el solvente con corriente de aire a 20 °C se perdía cerca del 90% del derivado de la pentosa, dada su alta volatilidad¹⁸.

Tabla 5.9 Análisis por metilación de los polisacáridos derivatizados como alditoles acetilados (moles/100 moles galactosas)

Azúcar	Unidad	2	3.1	3.2	4.1	4.2	5.1	5.2	6	7
2,3,4-Xil ^a	Xil _t	13	13	16	20	20	16	15	23	23
2,3-Xil + 3,4-Xil	→4)-Xil + →3)-Xil	5	3	2	2	1	Tr	2	2	1
Xil	→2,3,4)-Xil	4	1	1	2	2	2	5	2	2
2,3,4,6-Gal	Gal _t	13	17	9	1	1	tr.	tr.	tr.	1
2,4,6-Gal	→3)-Gal	12	10	6	6	5	6	4	6	7
2,3,6-Gal	→4)-Gal	25	25	24	25	22	20	19	30	27
2,3,4-Gal	→6)-Gal	2	1	1	1	1	tr.	tr.	tr.	1
2,6-Gal + 4,6-Gal	→4,3)-Gal + →3,4)-Gal + →3,2)-Gal	11	12	6	4	2	2	3	2	2
3,6-Gal	→4,2)-Gal	4	5	7	8	10	11	8	9	8
2,3-Gal	→4,6)-Gal	4	2	3	3	2	Tr	2	4	4
2,4-Gal	→3,6)-Gal	26	22	36	38	48	46	29	37	41
2-Gal	→4,3,6)-Gal + →3,4,6)-Gal	-	1	-	1	2	2	9	3	1
3-Gal + 4-Gal	→4,2,6)-Gal	-	1	-	2	2	2	3	2	3
Gal	→4,2,3,6)-Gal + →3,2,4,6)-Gal	-	-	-	2	1	1	13	-	-
3,6-An-2-Gal	→4)-3,6-AnGal	4	3	4	7	4	6	4	5	3
3,6-AnGal	→4,2)-3,6-AnGal	-	1	3	3	2	3	4	2	1

^a 2,3,4-Xil = 2,3,4-tri-O-metilxilosa, ^b tr = trazas.

Tabla 5.10 Análisis por metilación de los polisacáridos derivatizados como aldononitrilos acetilados (moles/100 moles galactosas)

Azúcar	Unidad	2	3.1	3.2	4.1	4.2	5.1	5.2	6	7
2,3,4-Xil	Xil _t	21	26	40	35	27	32	26	34	37
2,3-Xil	→4)-Xil +	4	tr.	tr.	1	1	tr.	tr.	tr.	tr.
Xil	→2,3,4)-Xil	-	-	-	1	4	2	3	1	2
2,3,4,6-Gal	Gal _t	18	19	11	6	2	2	1	1	1
2,4,6-Gal	→3)-Gal	8	8	6	6	4	4	3	4	5
2,3,6-Gal	→4)-Gal	21	24	19	19	17	22	17	20	22
2,3,4-Gal	→6)-Gal	3	tr.	tr.	2	1	2	tr.	1	1
2,6-Gal	→4,3)-Gal + →3,4)-Gal	8	9	4	3	2	1	3	1	1
4,6-Gal	→3,2)-Gal	tr.	tr.	tr.	1	tr.	tr.	tr.	tr.	tr.
3,6-Gal	→4,2)-Gal	4	7	9	9	10	11	9	9	9
2,3-Gal	→4,6)-Gal	3	tr.	tr.	2	6	3	4	6	6
2,4-Gal	→3,6)-Gal	33	33	51	47	42	49	38	50	46
2-Gal	→4,3,6)-Gal + →3,4,6)-Gal	-	-	-	1	6	3	9	2	3
3-Gal	→4,3,6)-Gal	-	-	-	1	3	1	3	1	3
4-Gal	→3,4,6)-Gal	-	-	-	1	2	1	2	2	2
Gal	→4,2,3,6)-Gal + →3,2,4,6)-Gal	-	-	-	1	3	1	10	tr	-

^a 2,3,4-Xil = 2,3,4-tri-O-metilxilosa, ^b tr = trazas.

Posteriormente, al realizar el estudio de desulfatación y metilación (ver luego) se encontró que también existían diferencias en la cantidad de la trimetilxilosa al formar los alditoles del producto metilado por hidrólisis reductiva, y por la técnica clásica utilizando borohidruro de sodio. El empleo de la técnica de Stevenson y Furneaux subcuantifica más la proporción de xilosa metilada que al utilizar borohidruro de sodio.

Como se explicó en el Capítulo 3, en la técnica de hidrólisis reductiva, los aldehídos se reducen agregando la 4-metilmorfolina borano (MMB) y evaporando del solvente de reacción (TFA 2,4 M). Los autores recomiendan realizar esta etapa a 50 °C para azúcares no metilados y a 30 °C para los azúcares provenientes del polisacárido metilado. Esta diferencia evidentemente está relacionada con la volatilidad de estos últimos. Stevenson y Furneaux determinaron estas condiciones para galactanos con baja o nula cantidad de pentosas, con lo cual puede que no sean totalmente eficientes para productos con pentosas trimetiladas, ya que estas son bastante más volátiles que las hexosas tetrametiladas.

Fue sorprendente encontrar también proporciones sensibles de 2,3-di-metil-*O*-xilosa y xilosa, en mayor proporción en los alditoles que en los aldononitrilos. Hasta el momento, los antecedentes indicaban que la xilosa debía ser casi exclusivamente terminal, dando lugar solamente a 2,3,4-tri-*O*-metilxilosa. Podrían existir unidades de xilosas sustituidas, aunque los resultados no son concluyentes.

Las diferencias entre los resultados obtenidos utilizando alditoles y aldononitrilos son importantes a nivel de algunas galactosas metiladas. Sistemáticamente se encuentra que al emplear los alditoles disminuye la proporción de 2,4-di-*O*-metilgalactosa y aumenta la de 2,3,6-tri-*O*-metilgalactosa con respecto a lo determinado por los aldononitrilos. Estas diferencias habían sido observadas previamente por Cases en su trabajo de Tesis doctoral⁷. En el resto de los azúcares metilados pueden encontrarse diferencias no sistemáticas, que en parte pueden considerarse como provenientes de la incertidumbre experimental.

La fracción **5.2** no pudo ser metilada eficientemente como lo demuestran las altas cantidades de galactosas monometiladas y sin metilar. No fue posible remetilarla por su bajo rendimiento. Algo similar, aunque en menor medida ocurrió, con la fracción **4.2**. Ambas fracciones son las más ricas en éster sulfato, característica que posiblemente dificulta realizar la metilación (debido a efectos de apantallamiento).

Los resultados (Tablas 5.9 y 5.10) muestran que la gran mayoría de las unidades de galactosa están enlazadas al menos por las posiciones C-3 ó C-4. Algunas de estas además presentan sustitución en una o dos posiciones más.

En los agaranos debe existir igual número de unidades de galactosa enlazadas por C-3 y por C-4. Con los resultados obtenidos por metilación esa relación no puede asegurarse dado que existen monosacáridos para los cuales no se puede afirmar si la posición de enlace con otras galactosas es C-3 o C-4. Tal es el caso de la 2,6-di-*O*-metilgalactosa, ya que ésta podría ser generada por $\rightarrow 4,3$ -Gal o $\rightarrow 3,4$ -Gal (ver luego).

El grupo de galactosas enlazadas por la posición C-3, que se suponen de configuración β -D (3DG), está mayoritariamente sustituida también en la posición C-6 (de 33 a 50 unidades promedio cada 100 galactosas). De acuerdo a estudios anteriores y a los resultados aquí obtenidos, los sustituyentes que podrían ubicarse en la posición 6 serían cadenas laterales de xilosa, galactosa o galactosas metiladas, o bien grupos metoxilo o sulfato.

El estudio de metilación sugiere que la xilosa es uno de los sustituyentes mayoritarios de la posición 6 de estas unidades $\rightarrow 3,6$ -Gal (3DG6X). Si se consideran las proporciones de xilosa determinadas en los análisis de azúcares componentes, la relación $Xil_{terminal} / \rightarrow 3,6$ -D-Gal es muy cercana a 1, especialmente en las fracciones mayoritarias. Como es de esperar, esta relación es menor en las fracciones que poseen mayor cantidad de galactosas terminales (ver luego).

La presencia de 10-18% de galactosas terminales en las fracciones **2**, **3.1** y **3.2** podría indicar que al menos parte de éstas también podrían estar unidas al C-6 de unidades de β -D-galactosa. La identidad de las cadenas laterales de galactosa se analizará luego en el estudio por etilación.

Las proporciones de 2,4,6-tri-*O*-metilgalactosa fueron mayores para los polisacáridos eluidos al principio de la columna. Su presencia denota la existencia de unidades del tipo 3DG y 3DG6M.

En el análisis de los azúcares componentes se había determinado que las fracciones con mayor proporción de 6-*O*-metil-D-galactosa eran la **2** y **3.1**. En ellas la proporción de este monosacárido llegaba a las 4 unidades cada 100 galactosas totales, de manera que la sustitución de las unidades β con grupos metoxilo parecería ser baja para todos los productos.

De acuerdo a los datos de literatura¹, las galactosas unidas por C-4 en los coralinanos poseen la configuración α -L (4LG) y un patrón de sustitución más complejo que las unidades β -D enlazadas por 3. Como se explicó en el Capítulo 2, estas unidades además de estar enlazadas por C-4 a otras galactosas pueden tener unidas en otras posiciones grupos metoxilo, sulfato o xilosa.

La presencia de importantes cantidades de 2,3,6-*O*-trimetilgalactosa pone en evidencia la existencia de unidades de galactosa (o de galactosas metiladas naturalmente en C-2 y C-3) unidas sólo por C-4. Dado que no se encontró 6-*O*-metil-L-galactosa en el análisis original, se descarta la sustitución con metoxilos en C-6 en este tipo de unidades.

Como la técnica de metilación no logra diferenciar las posiciones naturalmente metiladas de aquellas alquiladas en la reacción, para identificar las posiciones de unión de los metoxilos fue necesario realizar el estudio por etilación (ver luego).

Existe también una cantidad importante de α -L-galactosas sustituidas en la posición 2 [\rightarrow 4,2)-Gal]. En los coralinanos estudiados previamente, el sustituyente era el grupo sulfato^{5,10,12,13}. La determinación para *J. rubens* se pudo realizar recién luego de desulfatar los polisacáridos (ver luego).

La presencia de cantidades discretas de \rightarrow 4,6)-Gal (unidad indicada por la 2,3-di-*O*-metilgalactosa) en todas las fracciones sugiere la existencia de unidades de α -L-galactosa sustituida en C-6. La identidad del sustituyente se debería restringir a unidades monosacáridicas descartándose la posibilidad de que estén unidos grupos sulfato, ya que no se ha detectado tras tratamiento alcalino la presencia de α -L-galactosa 6-sulfato ciclable (galactosa 6-sulfato enlazada por O-4, con el O-3 libre). En principio, no podría descartarse la presencia de 3-*O*-metilgalactosa sulfatada en O-6, aunque el estudio de etilación arrojó conclusiones definitivas al respecto (ver luego).

5.2.4.5 Determinación de la configuración absoluta de la 2,6-di-*O*-metilgalactosa

En los agaranos (y por ende en los coralinanos) se supone que todas unidades de D-galactosa están enlazadas a otras galactosas por C-3 y las unidades de L-galactosa por la posición C-4. Cuando los polisacáridos poseen estas unidades sustituidas adicionalmente en C-4 ó C-3 (respectivamente), los estudios de metilación no permiten diferenciarlas entre sí, haciéndose necesario recurrir a otras técnicas. Una forma de elucidar la identidad de estas unidades es determinando la configuración de las mismas, de manera que si pertenecen a la serie D se las considera enlazada por C-3 y sustituidas por C-4, y viceversa para las pertenecientes a la serie L. En los coralinanos aislados de *J. rubens* se encontraron cantidades apreciables de 2,6-di-*O*-metilgalactosa al metilar los polisacáridos, por lo que puede utilizarse este método.

Para determinar la configuración de la 2,6-di-*O*-metilgalactosa se utilizó la técnica descrita por Errea *et al.*¹⁹ La técnica se basa en la aplicación de la aminación reductiva con (*S*)- α -metilbencilamina desarrollada por Cases *et al.*⁹ para generar los 1-amino-desoxialditoles peracetilados de los monosacáridos metilados.

La fracción **3.1** metilada (la más rica en 2,6-di-*O*-metilgalactosa) fue hidrolizada y los monosacáridos resultantes se derivatizaron a aminoalditoles. Por cromatografía gaseosa se determinó que toda la 2,6-di-*O*-Me-Gal era de configuración L. En consecuencia, si se acepta la alternancia tradicional¹ se puede afirmar que esas unidades están enlazadas a otra galactosa por C-4 en la cadena principal, mientras que en la posición 3 existe algún sustituyente (cadena lateral de azúcar y/o sulfato).

Debe destacarse que en el cromatograma que permitió determinar la configuración de la 2,6-di-*O*-metilgalactosa, se observó que existían dos picos con tiempos de retención muy próximos, que eluían bastante antes que el derivado dimetilado. Al analizarlos con un cromatógrafo acoplado a un espectrómetro de masa se determinó que ambos correspondían al aminodesoxialditol de la 2,3,4,6-tetra-*O*-metilgalactosa. La identificación fue confirmada con dos estándares de 2,3,4,6-tetra-*O*-metil-D-galactosa derivatizada con α -metilbencilamina racémica y quiral (*S*-). Al analizar por CGL el derivado formado con amina racémica se observó la coincidencia de los tiempos de retención y se verificó la separación de los dos diastereómeros. Cuando la 2,3,4,6-tetra-*O*-metil-D-galactosa se derivatizó con (*S*)- α -metilbencilamina se observó la presencia del diastereómero con menor tiempo de retención de los dos. La relación D/L determinada para el estándar formado con amina racémica (ver Capítulo 3) fue de 1, lo que indica que no existe la selectividad observada en algunos otros casos⁹.

Dado que la fracción **3.1** contiene proporciones importantes de unidades de galactosa terminales de ambas configuraciones, fue posible hacer uso de este método de análisis (nunca antes informado) para determinar la configuración absoluta del derivado tetrametilado.

Del análisis se determinó que la relación D/L de las unidades de galactosas terminales era de 1,8. Este resultado indica que si bien la D-galactosa terminal está en mayor proporción, ambas aparecen como ramificaciones de la cadena central del coralinano. El peso molecular promedio indica que tal proporción de galactosa terminal no puede provenir de las terminales normales de una cadena lineal.

5.2.4.6 Análisis por etilación de las fracciones

Los coralinanos aislados del alga *J. rubens*, al igual que otros previamente estudiados, poseen importantes cantidades de galactosas monometiladas. La determinación de las posiciones de enlace de estas unidades con otros monosacáridos no se puede realizar por estudios de metilación, por lo que es necesario realizar un estudio de etilación. Este permite discriminar entre las unidades naturalmente metiladas y aquellas alquiladas por la correspondiente reacción^{7,10,20}.

Los polisacáridos obtenidos con mayor rendimiento fueron etilados con yoduro de etilo en condiciones similares a las utilizadas en la metilación¹⁷. Luego los productos fueron hidrolizados, y los monosacáridos resultantes fueron derivatizados como aldononitrilos peracetilados para ser analizados por cromatografía gaseosa. La decisión de generar los aldononitrilos por sobre los alditoles se basó en que los primeros poseen espectros de masa más fáciles de interpretar (por falta de simetría) y en consecuencia se consiguen resultados más aprovechables en la identificación de las diferentes unidades⁷. Los resultados de la etilación se presentan en la Tabla 5.11.

Los monosacáridos alquilados que se encontraron fueron equivalentes a los hallados en el estudio por metilación. Los más importantes fueron la 2,3,4-tri-*O*-etilxilosa, distintas 2,3,6-tri-*O*-alquilgalactosas y la 2,4-di-*O*-etilgalactosa. Como era de esperar, para algunas de las unidades alquiladas se observó la coexistencia de posiciones etiladas y metiladas, lo que permite determinar fehacientemente la posición de enlace de las unidades de galactosa monometiladas naturalmente.

Nuevamente, las especies alquiladas de galactosa se pueden agrupar en aquellas enlazadas a otros azúcares por la posición C-3 y por C-4. Además, se encuentran las unidades terminales y aquellas en que no se puede determinar el sitio de unión. Todos estos resultados coinciden en términos generales con los determinados en el estudio de metilación.

La cantidad de xilosa trietilada fue similar a la determinada en el estudio de metilación con aldononitrilos como derivados, y mayor en comparación con el mismo estudio, tras derivatización a los alditoles peracetilados. Sin embargo, las proporciones continuaron siendo menores que las determinadas para la xilosa en el estudio de azúcares componentes.

La proporción de galactosas terminales coincide satisfactoriamente con la determinada al emplear los aldononitrilos en la metilación, pero está sobrecuantificada con respecto a las proporciones determinadas en la metilación tras derivatizar a los alditoles peracetilados.

Tabla 5.11 Análisis por etilación de las fracciones, utilizando como derivados los aldononitrilos peracetilados (moles/ 100 moles de galactosas totales).

Azúcar	Unidad	Posición del O-metilo	3.1	3.2	4.1	4.2	5.1	6
2,3,4-Xil ^a	Xil _t	–	29	30	29	31	31	32
2,4-Xil	→3)-Xil	–	3	–	–	–	3	3
2,3-Xil	→4)-Xil	–	3	1	3	2	–	3
2,3,4,6-Gal	Gal _t	–	2	<1	<1	<1	<1	1
2,3,4,6-Gal	Gal _t	3	11	6	9	3	2	1
2,3,4,6-Gal	Gal _t	2,3	4	–	–	–	–	–
2,4,6-Gal	→3)-Gal	–	5	5	4	5	5	3
2,4,6-Gal	→3)-Gal	6	3	–	1	–	1	2
2,3,4-Gal	→6)-Gal	–	3	6	1	4	1	<1
2,3,6-Gal	→4)-Gal	–	9	20	11	17	10	9
2,3,6-Gal	→4)-Gal	2	5	6	6	8	4	5
2,3,6-Gal	→4)-Gal	3	4	1	2	1	1	1
2,6-Gal	→4,3)-Gal	–	6	5	5	2	3	5
3,6-Gal	→4,2)-Gal	–	5	5	9	9	11	10
2,4-Gal	→3,6)-Gal	–	29	31	34	41	40	34
2,3-Gal	→4,6)-Gal	–	1	6	2	4	2	3
2,3-Gal	→4,6)-Gal	2	1	3	–	3	1	2
2-Gal	→4,3,6)-Gal + →3,4,6)-Gal	–	1	–	3	–	5	3
3-Gal	→4,2,6)-Gal	–	–	–	2	–	2	2
4-Gal	→3,2,6)-Gal	–	1	–	2	–	3	5
Gal	→2,3,4,6)-Gal	–	1	–	–	–	3	–

^a 2,3,4-Xil= 2,3,4-tri-O-alquilxilosa, etc. Si no hay indicación en contrario (en la tercera columna) el grupo alquilo es un etilo.

En el estudio por etilación se encontraron 3 tipos de galactosas tetraalquiladas (Tabla 5.11), que evidencian la existencia en el polisacárido de diferentes tipos de galactosas terminales: aquellas que no poseen sustituyentes adicionales, las que se encuentran naturalmente metoxiladas en la posición C-3 y las dimetoxiladas en C-2 y C-3. Las proporciones determinadas de 3-O-Me-Gal terminal fueron mayores o similares a las

encontradas para la galactosa terminal. La galactosa terminal dimetilada fue importante sólo para la fracción **3.1**, en coincidencia con los resultados de azúcares componentes. Si bien no se tuvo suficiente material para etilar la fracción **2**, seguramente también se hubiera encontrado la galactosa dimetilada en esta fracción.

La existencia de 3-*O*-Me-D-Gal y 2,3-di-*O*-Me-D-Gal en una estructura del tipo agarano, como ya se mencionó, resulta difícil de explicar *a priori* dado que se sabe que las unidades con configuración D están enlazadas a otras galactosas por la posición C-3. La etilación de los polisacáridos permitió determinar precisamente que la 2,3-di-*O*-Me-D-Gal natural está formando parte del coralinano exclusivamente como cadena lateral. De este modo, al no formar parte de la cadena central, no se registra alteración de la estructura típica de agarano. Este resultado es similar al resultado que obtuvieron Cases *et al.* para la 4-*O*-Me-D-Gal en los polisacáridos de *C. officinalis*^{7,10}.

La proporción detectada de 3-*O*-metilgalactosa terminal en el estudio de etilación disminuye marcadamente según aumenta la concentración de la solución de NaCl utilizada para eluir cada fracción de la columna de intercambio iónico. Este comportamiento es similar al registrado para la 3-*O*-Me-Gal en el estudio de azúcares componentes.

La proporción de 3-*O*-Me-Gal terminal determinada en el estudio de etilación es mayor que la determinada en el coralinano para la 3-*O*-Me-D-Gal o para la 3-*O*-Me-L-Gal (Tabla 5.8). Por lo tanto, es probable que existan unidades de 3-*O*-metilgalactosa terminal de ambas configuraciones. Este resultado fue confirmado con la determinación de la configuración de la 2,3,4,6-tetra-*O*-Me-Gal (y sus derivados naturalmente metilados) en la fracción **3.1** (pág. 216). En el mencionado análisis se observó que las terminales de la serie D estaban en exceso con respecto a las de la serie L, aunque ambas coexistían.

Ya que es imposible que la 3-*O*-metil-D-galactosa se encuentre formando parte de la cadena central de los polisacáridos en una estructura del tipo agarano ideal, es altamente probable que estas unidades de galactosa monometiladas se encuentren exclusivamente como cadena lateral en el coralinano, tal como es el caso de la 2,3-di-*O*-Me-Gal.

También fueron detectadas para todas las fracciones (Tabla 5.11) proporciones menores de 3-*O*-metilgalactosa dietiladas enlazadas por C-4 (2,3,6-tri-*O*-alquilgalactosa). Esto indica que parte de las 3-*O*-Me-Gal se encuentran formando parte de la cadena central del coralinano. Los antecedentes indican que éstas pertenecen exclusivamente a la serie L.

De esta manera, en base a los resultados obtenidos es posible concluir que en los xilogalactanos aislados de *Jania rubens*, las unidades de 3-*O*-Me-D-Gal estarían exclusivamente como cadenas laterales terminales, mientras que la 3-*O*-Me-L-Gal estaría

formando parte de la cadena central en cierta proporción, pero también como cadena lateral.

La etilación del polisacárido permitió determinar que la 2-*O*-metilgalactosa se encontraba mayoritariamente en las unidades de 2,3,6-tri-*O*-alquilgalactosa y en menor proporción en la 2,3-di-*O*-alquilgalactosa. Esto indica que la 2-*O*-Me-L-Gal forma parte del grupo de unidades de galactosa enlazadas por la posición C-4, tal como se había observado en otros coralinanos, con muy poca sustitución en las demás posiciones^{5,12,13}.

Las proporciones de 2-*O*-metilgalactosa determinadas por etilación fueron similares a las obtenidas en el estudio de azúcares componentes.

La existencia de unidades del tipo 3-*O*-etil-2-*O*-metilgalactosa vuelve a poner en evidencia la existencia de unidades de α -L-galactosa sustituidas por C-6. Como ya se explicó, si el sustituyente fuera un grupo sulfato la unidad debería sufrir el proceso de ciclación en medio alcalino para generar 3,6-anhidrogalactosa (ver Capítulo 3). Sin embargo (como ya se indicó) cuando se efectuó la reacción de tratamiento alcalino sobre estos polisacáridos no se observó la generación de 3,6-anhidrogalactosa adicional proveniente de unidades sulfatadas en 6. Como se mostrará más adelante, las reacciones de desulfatación tampoco demostraron que existan grupos sulfato en la posición C-6. En consecuencia, es probable que estas unidades tengan enlazadas a la posición 6 una cadena lateral de otro monosacárido. Tampoco aparece la 2-*O*-etil-3-*O*-metilgalactosa que podría provenir de una unidad sulfatada en O-6, pero no ciclable. Estos hechos permiten confirmar que no existe sulfato en la posición 6 de las unidades de α -L-galactosa.

Al igual que en el análisis por metilación, en la etilación se detectaron gran cantidad de unidades de galactosa enlazadas por C-3 y además sustituidas por C-6, ninguna de ellas metilada. Además, dentro del grupo de unidades con unión en la posición 3 se detectaron proporciones menores sin sustituyentes adicionales en C-6 (2,4,6-tri-*O*-etilgalactosa) y muy escasa cantidad de galactosas metiladas en la posición C-6 (2,4-di-*O*-etil-2-*O*-metilgalactosa). Este último resultado permite confirmar que las unidades del tipo 3DG6M forman parte de la cadena central del coralinano.

Puede suponerse que la 2,6-di-*O*-etilgalactosa está enlazada a otra galactosa por la posición C-4 considerando los resultados de la sección 5.2.4 (pág. 216). No se observan contrapartes metoxiladas.

5.2.4.7 Análisis por desulfatación-metilación de las fracciones

Los resultados expuestos hasta aquí permiten afirmar que los polisacáridos de *Jania rubens* son agaranos altamente sustituidos con xilosa y galactosas laterales, grupos metoxilo y grupos sulfato.

La sustitución con xilosa parece producirse mayoritariamente en la posición C-6 de las unidades del tipo β -D-galactosa enlazadas por C-4, las cuales poseen también pequeñas cantidades de grupos metoxilo en la misma posición.

Para las unidades de α -L-galactosa hasta el momento se determinó la sustitución con grupos metoxilo en las posiciones C-2 y C-3 y aparentemente la existencia de alguna cadena lateral (sobre C-6 y C-3), pero en baja proporción.

Sin embargo, en estos estudios aún no se había podido identificar los sitios de sulfatación en las distintas unidades. Para determinar las posiciones de estos grupos se realizó un estudio de desulfatación y posterior metilación. Para desulfatar los polisacáridos de *J. rubens* se utilizó la técnica de desulfatación solvolítica asistida por microondas desarrollada en este trabajo de Tesis, que fue presentada en el Capítulo 4.

Ante la escasa cantidad de material se seleccionaron sólo algunas de las fracciones para realizar la desulfatación. Los resultados generados pueden observarse en la Tabla 5.12.

Tabla 5.12 Proporción de sulfato y rendimiento en los polisacáridos desulfatados.

	3.2	3.2-Ds	4.1	4.1-Ds	5.1	5.1-Ds	6	6-Ds
NaSO ₃ (%)	10,2	4,6	10,6	2,8	11,2	1,7	11,3	4,2
Diferencia	5,6 (-55%)		7,8 (-74 %)		9,5 (-85%)		7,1 (-62%)	
Rendimiento	56%		60 %		70%		84%	

Como puede observarse, el grado de desulfatación siempre fue superior al 50%, llegando a un máximo de 84% para el caso de la fracción **5.1**. Los rendimientos de reacción fueron aceptables o muy buenos dependiendo de la muestra tratada. Como se observa, éstos fueron mejores en las fracciones de mayor peso molecular.

Para verificar que no existió una pérdida específica de carbohidratos en la reacción se tomaron las fracciones **4.1** y **5.1** y se les determinaron los azúcares componentes. En la Tabla 5.13 se presentan los resultados, junto con los correspondientes a los polisacáridos nativos.

Tabla 5.13 Comparación de los análisis de azúcares componentes de los polisacáridos desulfatados y nativos (por alditoles peracetilados, moles/100 moles de galactosas totales).

Monosacáridos	4.1	4.1-Ds	5.1	5.1-Ds
Xil	40	39	48	42
2- <i>O</i> -Me-Gal	9	8	9	9
3- <i>O</i> -Me-Gal	6	3	2	tr.
6- <i>O</i> -Me-Gal	1	1	2	tr.
Gal	77	78	76	80
3,6-AnGal	7	10	10	10
3,6-An-2- <i>O</i> -Me-Gal	–	–	2	tr.

La fracción **4.1** desulfatada está compuesta prácticamente por los mismos monosacáridos que los que se encontraron en el producto aislado originalmente. La única diferencia que se puede marcar entre ambos productos, es la pequeña disminución de la 3-*O*-Me-Gal luego de la reacción, lo que podría deberse a pérdidas de cadenas laterales.

Con respecto a la fracción **5.1** la principal diferencia entre el producto original y el desulfatado radicó en la disminución de xilosa en este último. Sin embargo, como puede observarse, en ambos casos las diferencias son mínimas.

Los cuatro polisacáridos desulfatados fueron metilados para que, por comparación con los originales, se pudieran determinar las posiciones de unión de los grupo sulfato.

La metilación fue realizada inmediatamente después de la reacción de desulfatación asistida por microondas, tal como se describió en el Capítulo 4. Esta metodología permitió obtener excelentes resultados, utilizar menor cantidad de muestra y ahorrar tiempo con respecto a las técnicas comúnmente utilizadas hasta el momento.

En la Tabla 5.14 se presentan los resultados de metilación conseguidos para los polisacáridos desulfatados y para los originales (ya informados en la Tabla 5.9).

Dado que la generación de los alditoles peracetilados mediante hidrólisis reductiva subcuantificaba en demasía la xilosa, se decidió generar los derivados de la manera clásica reduciendo con NaBH₄ y acetilando con piridina. De esta manera no se detecta la 3,6-anhidrogalactosa ni sus derivados, por lo que los resultados de metilación de los polisacáridos

originales que figuran en la Tabla 5.9 fueron reconvertidos para expresar los monosacáridos estables en medio ácido.

Tabla 5.14 Análisis por metilación de los polisacáridos desulfatados y nativos (por alditoles peracetilados, moles/100 moles galactosas)^a.

Unidad	3.2	3.2-Ds	4.1	4.1-Ds	5.1	5.1-Ds	6	6-Ds
2,3,4-Xil ^b	17	28	22	54	17	31	24	41
2,3-Xil	2	1	2	6	1	1	2	2
Xil	1	2	2	–	2	2	3	3
2,3,4,6-Gal	10	11	1	3	tr.	tr.	tr.	3
2,4,6-Gal	7	9	7	10	7	7	7	9
2,3,6-Gal	26	31	27	32	22	32	32	34
2,3,4-Gal	1	2	1	Tr	Tr	1	Tr	–
2,6-Gal	7	6	4	5	2	3	2	3
3,6-Gal	8	2	9	2	12	4	10	3
2,3-Gal	3	3	3	3	1	4	5	5
2,4-Gal	39	33	42	40	50	44	39	38
2-Gal	–	2	1	3	3	3	3	3
3-Gal	–	1	2	2	2	2	2	2
Gal	–	–	2	–	1	–	1	–

^a Sólo se indican los monosacáridos estables en medio ácido.

^b 2,3,4-Xil = 2,3,4-tri-*O*-metilxilosa.

La comparación de los resultados obtenidos antes y después de la desulfatación permitió determinar el aumento de la proporción de 2,3,6-tri-*O*-metilgalactosa a costa de la disminución de 3,6-di-*O*-metilgalactosa en las todas las fracciones desulfatadas. Las magnitudes de las variaciones se ubican en valores cercanos a 6% (cada 100 galactosas totales). Esta variación indica la presencia de unidades de α -L-galactosa con grupos sulfato en la posición C-2. Este patrón de sustitución había sido encontrado anteriormente en todos los polisacáridos aislados de algas de esta familia^{5,7,10,12,13}.

En las fracciones **3.2**, **4.1** y **6** además se registra un pequeño aumento de la 2,4,6-tri-*O*-metilgalactosa con el descenso de 2,4-di-*O*-metilgalactosa, indicativa de la presencia de pequeñas proporciones de β -D-galactosa 6-sulfato.

Fue notorio que prácticamente no se registraron cambios en las proporciones de las galactosas dimetiladas en las posiciones 2,3- y 2,6-. Esto podría indicar que dichas unidades no sufrieron desulfatación o bien que el sustituyente es diferente a un grupo sulfato. Las proporciones de estas especies son bajas, salvo en el caso del producto **3.1** que contiene cantidades apreciables de 2,6-di-*O*-metilgalactosa. Debe recordarse que nunca se logró una desulfatación completa, por lo que las pequeñas cantidades de sulfato remanente podrían corresponder a en algún tipo de ester sulfato resistente al procedimiento de desulfatación.

Las cantidades de xilosa detectadas se acercan más a los valores determinados en el análisis de azúcares componentes, tal como se había observado anteriormente¹⁰.

5.2.5 Análisis por espectroscopía de resonancia magnética nuclear

Los espectros de resonancia magnética nuclear (RMN) de los carragenanos y agaranos son muchas veces complejos ya que las señales en general son anchas y suelen aparecer superpuestas. Estas características de los espectros se originan en la heterogeneidad de algunos productos, sus altos pesos moleculares y su consecuente alta viscosidad. Pese a ello, los estudios por espectroscopía de RMN han proporcionado información estructural valiosa. Son especialmente fructíferos los análisis de las regiones anoméricas, aún cuando en algunas ocasiones las señales son anchas y no siempre están bien resueltas. Los experimentos de RMN de los galactanos sulfatados son realizados habitualmente a alta temperatura para reducir la viscosidad de la muestra y así obtener espectros con señales menos anchas y mejor resueltas²¹.

En este trabajo se estudiaron diferentes fracciones por RMN de ¹H, ¹³C y por técnicas bidimensionales de correlación C-H (HSQC y HMQC) a temperatura ambiente. Pudieron realizarse las mediciones de RMN-¹H sobre la mayoría de las fracciones, mientras que las determinaciones de RMN de ¹³C fueron obtenidas sólo para las fracciones mayoritarias. El estudio espectroscópico además se complementó en algunos casos con técnicas bidimensionales. El acceso que se logró, hacia el final de este trabajo de Tesis a un equipo de resonancia magnética nuclear equipado con una probe de detección inversa, permitió realizar algunos de análisis que anteriormente no se habían podido obtener con un sistema de detección directa. Los experimentos de HSQC fueron exitosos para las fracciones **3.1**, **3.2** y **4.1**, pero para las de mayor peso molecular (**5.1**, **6** y **7**) no se obtuvieron buenos espectros. En el caso de la fracción **5.1** se obtuvo un espectro bidimensional aceptable al realizar el HMQC.

Las señales se asignaron en función de los antecedentes bibliográficos y en combinación con la información estructural obtenida mediante los métodos de análisis químicos anteriormente descritos. Sin toda esta información, la interpretación de los espectros se hubiera dificultado enormemente.

La mayoría de las señales de RMN fueron asignadas en base al estudio hecho por Usov *et al.* sobre los coralinanos aislados del alga *Corallina pilulifera*¹². Los autores realizaron experimentos de RMN de ¹H y ¹³C y otros bidimensionales de correlación C-H sobre los polisacáridos nativos, de los mismos luego de ser desulfatados y luego de ser oxidados con periodato. Con el conjunto de datos obtenidos para los diferentes biopolímeros y la información lograda por métodos de análisis químico, los autores lograron asignar la mayor parte de las señales de los espectros. En la Tabla 5.15 se pueden observar las asignaciones de RMN-¹³C realizadas por los autores para las distintas unidades estructurales.

Tabla 5.15 Desplazamiento químico (en ppm)^a en los espectros de RMN de ¹³C de los polisacáridos de *C. pilulifera*¹².

Unidad	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	Ome
4LG	101,9	70,2	70,7	80,1	73,1	62,0	
4LG2S	100,1	77,1	68,1	79,9	73,1	62,0	
4LG2M	99,4	79,5	70,0	79,9	73,1	62,0	58,9
4LG3M	99,4 ^c	70,0	78,9	76,7	73,1	62,0	58,0
3DG	104,6	72,0	81,3-82,9 ^b	69,8	76,5	62,0	
3DG6M	104,6	72,0	81,3-82,9 ^b	69,2	74,1	62,3	59,9
3DG6S	104,6	72,0	81,3-82,9 ^b	68,1	74,1	72,8	
3DG6X	104,6	71,9	81,9	70,0	75,2	68,5	
X	104,8	74,5	77,1	70,8	66,5		

^a Espectros realizados a 50 °C en D₂O. Desplazamientos químicos relativos a metanol (50,15 ppm respecto a TMS).

^b Depende de la sustitución del residuo y sus vecinos.

^c Asignación tentativa.

Los espectros obtenidos por Usov *et al.*¹² mostraron que la región anomérica correspondiente a las unidades de configuración β-D presente en los xilogalactanos era compleja ya las señales de las galactosas y xilosas con esta configuración aparecían muy

próximas o directamente superpuestas. En consecuencia, la información que se obtiene no resulta muy útil. Por ejemplo, los autores asignaron las señales de los C-1 de β -D-galactosa y β -D-xilosa a 104,6 y 104,8 ppm, respectivamente; o sea muy próximas entre sí, especialmente considerando que las señales de las galactosas suelen ser anchas aún realizando el espectro a 50 °C.

En las otras regiones del espectro la utilidad de las señales originadas en las unidades β -D tampoco es muy aprovechable. Las señales originadas en muchos de los carbonos correspondientes a la β -D-galactosa, la 6-O-Me- β -D-galactosa, la β -D-galactosa 6-sulfato y la 6-O-(xilopiranosil)- β -D-galactosa, todas enlazadas por 3, coinciden en la mayoría de las ocasiones. La región más fructífera para analizar estas unidades es la correspondiente al C-6, donde la señal se desplaza a campos más bajos pero de manera diferenciada: cuando está sustituido con OMe se corre en +10,5 ppm, con sulfato en +6,2 ppm y con xilosa en +7,5 ppm.

La asignación efectuada por Usov *et al.*¹² para el caso de las unidades con configuración α -L es en cambio más útil, especialmente para las especies mayoritarias como la α -L-galactosa, 2-O-metil- α -L-galactosa y la α -L-galactosa 2-sulfato. Sin embargo, las asignaciones de las señales originadas en unidades en menor proporción no fueron definitivas. Por ejemplo, los autores asignaron la señal a 99,4 ppm (coincidente con el C-1 de la 4LG2M) al C-1 de la unidad de 3-O-metil- α -L-galactosa, aunque en otro trabajo de los mismos autores sobre coralinanos, se informó que la señal del mencionado C-1 se desplazaba a 101,9 ppm y coincidía con el C-1 de la 4LG¹³ (Tabla 5.15).

A las asignaciones de la Tabla 5.15 se le puede adicionar también el desplazamiento de 102,1 ppm correspondiente a la señal del C-1 de la α -L-galactosa 3-sulfato. Pudimos efectuar esta asignación en forma tentativa al observar los espectros obtenidos por Cases con los polisacáridos aislados de *C. officinalis*⁷, y en base al trabajo de Kolender *et al.* en el cual se informa la estructura del agarano aislado el alga *Georgiella confluens*²². En su momento Cases no pudo interpretar ese desplazamiento⁷.

5.2.5.1 Análisis por RMN de ¹H

Los espectros RMN-¹H resultaron ser muy similares para todas las fracciones. A modo de ejemplo se presenta en la Figura 5.3 el espectro obtenido para la fracción **5.1**.

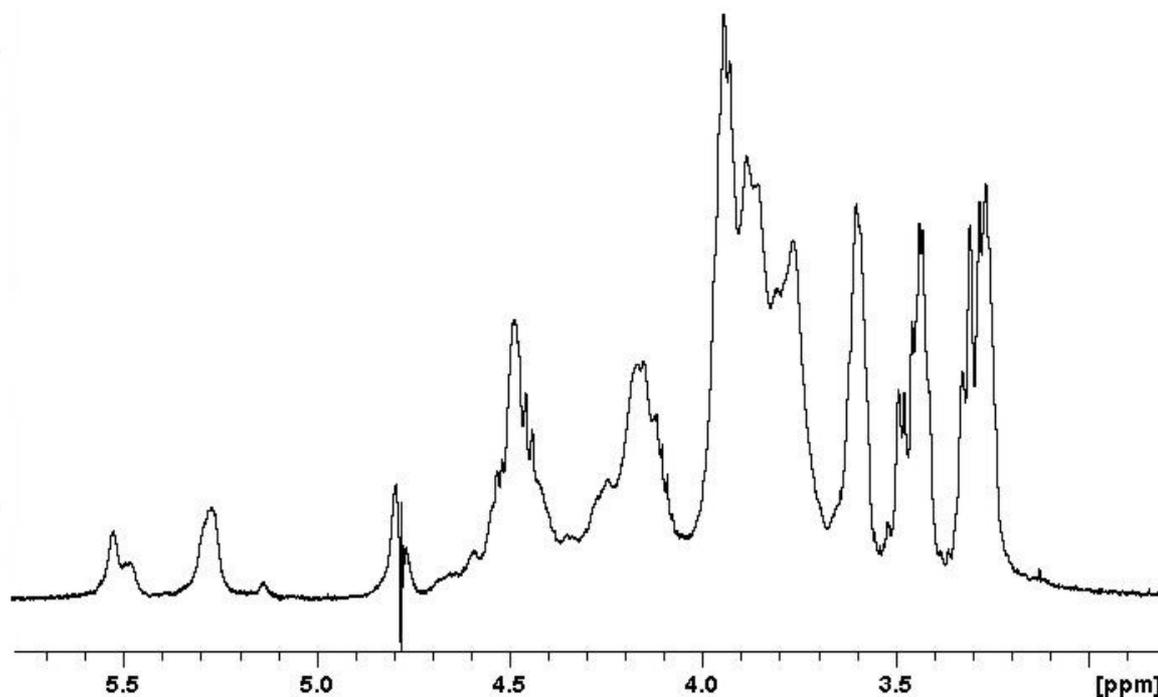


Figura 5.3 Espectro de RMN de ^1H (500 MHz) de la fracción 5.1 en D_2O a temperatura ambiente.

Como se observa en el espectro, las señales están poco resueltas debido principalmente a superposiciones. Las señales de los hidrógenos anoméricos se encuentran por encima de los 4,2 ppm, alrededor de 4,4-4,5 ppm se encuentran las correspondientes a las unidades de configuración $\beta\text{-D}$, mientras que por encima de las 5 ppm están las asignadas a las unidades de $\alpha\text{-L}$ -galactosa.

La superposición de señales en la región a 4,4 ppm es tan grande que impide asignarlas a las diferentes unidades de este tipo, tal como lo informaran Usov *et al*¹².

La zona de las unidades $\alpha\text{-L}$ está mejor resuelta de modo que se posibilita ensayar un análisis; sin embargo, como se verá más adelante hay cierta superposición de señales correspondientes a distintos hidrógenos anoméricos. El análisis de RMN- ^1H se facilitó como se verá luego, con asignaciones realizadas a partir de espectros bidimensionales.

5.2.5.2 Análisis por RMN de ^{13}C

Los espectros de RMN de ^{13}C fueron realizados sobre las fracciones **4.1**, **5.1** y **6** (figuras 5.4, 5.5 y 5.6 respectivamente). En los tres casos, los espectros obtenidos fueron esencialmente similares entre sí y a los publicados anteriormente para otros polisacáridos aislados de coralinas^{5,7,12,13}.

En cada espectro se pueden observar tres zonas bien definidas: la comprendida entre 97 y 105 ppm correspondiente a las señales de los carbonos anoméricos; la región entre 70 y 83 ppm que contiene casi la totalidad de las señales originadas en los carbonos 2, 3, 4 y 5; y la ubicada entre 55 y 69 ppm donde están casi exclusivamente las señales de los C-6 y los metoxilos naturales presentes en las galactosas (como excepción se puede encontrar el C-3 de la 4LG2S). La región del espectro correspondiente a los carbonos 2-5 resulta especialmente compleja de analizar dada la superposición de señales que existe, la baja intensidad de algunas de éstas y el ancho de banda. En consecuencia, la mayor parte de los análisis aprovechables de estos espectros se basaron en la región anomérica.

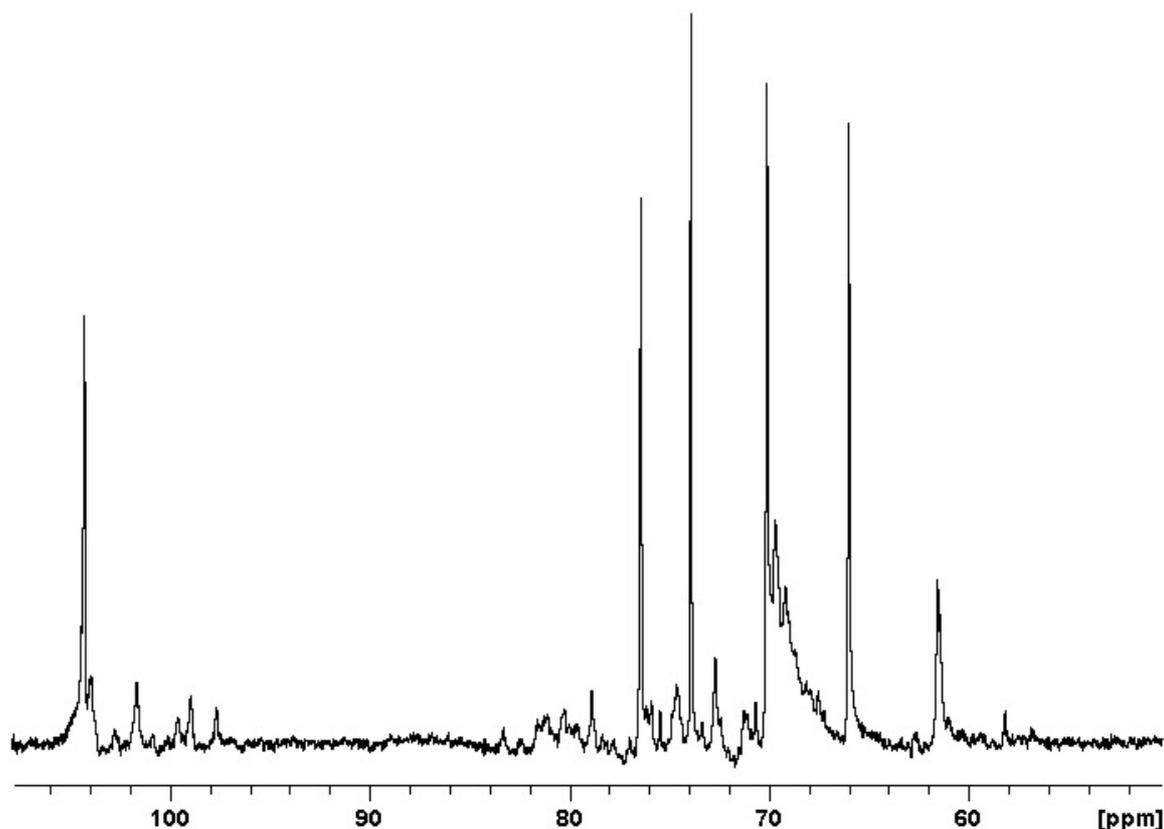


Figura 5.4 Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz) de la fracción **4.1** en D_2O a temperatura ambiente.

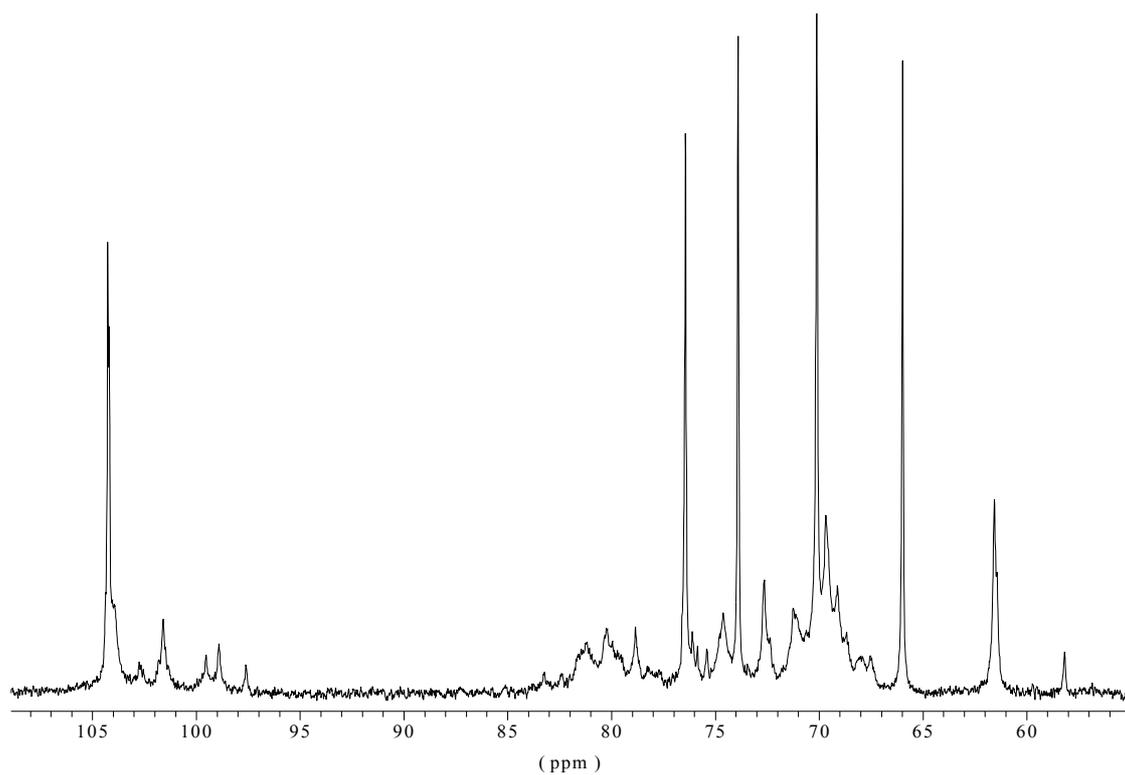


Figura 5.5 Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz) de la fracción 5.1 en D_2O a temperatura ambiente.

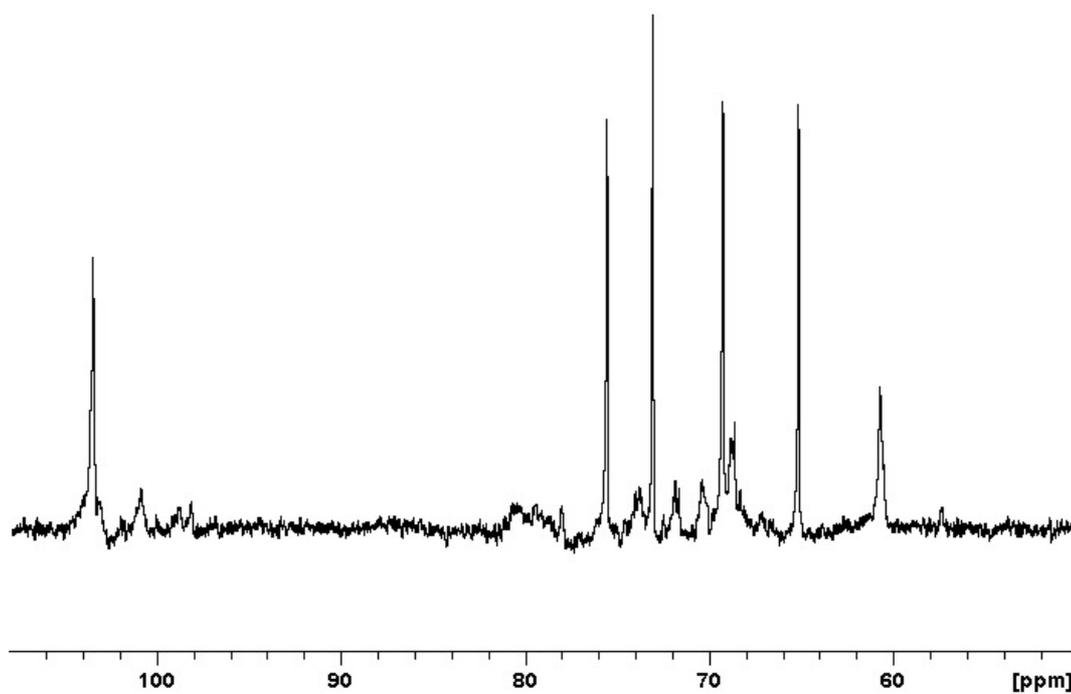


Figura 5.6 Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz) de la fracción 6 en D_2O a temperatura ambiente.

En todos los espectros se observaron 5 señales agudas que corresponden a los carbonos de la β -D-xilosa^{5,7,12,13} (Tabla 5.16).

Tabla 5.16 Desplazamiento químico (en ppm)^a de la cadena lateral β -D-xilosa en los espectros de RMN de ¹³C.

C-1	C-2	C-3	C-4	C-5
104,3	73,9	76,4	70,1	65,9

^a Desplazamientos químicos relativos a acetona (31,1 ppm respecto a TMS).

Los desplazamientos químicos, en coincidencia con los antecedentes bibliográficos y con los resultados obtenidos por métodos químicos, son compatibles con unidades de β -D-xilosa enlazadas principalmente al C-6 de unidades de β -D-galactosas enlazadas por C-3. La altura de estas señales es muy superior a las correspondientes a las galactosas, aunque tienen menor ancho de banda debido a que la movilidad de estos residuos es mayor, afectando así su relajación. De cualquier modo no representan la cantidad real presente en el polisacárido.

La región anomérica de los espectros de ¹³C fue en todos los casos esencialmente similar a la que informaron otros autores^{5,7,12,13}, salvo algunas variaciones que serán analizadas luego.

Al ampliar la región anomérica de los espectros correspondientes a las fracciones **4.1**, **5.1** y **6** se pudieron diferenciar aproximadamente siete señales con los siguientes desplazamientos químicos: 104,3; 104,2; 102,7; 101,6; 99,5; 98,9; 97,6 ppm.

Tomando como referencia el trabajo de Usov *et al.*¹² y teniendo en cuenta que sus desplazamientos químicos están corridos sistemáticamente en aproximadamente +0,6 ppm con respecto a los obtenidos en este trabajo de Tesis (utilizando acetona como estándar interno, $\delta_{\text{CH}_3} = 31,1$ ppm), la asignación de algunas señales de la región anomérica fue realizada sin mayores dificultades (Tabla 5.17).

Como ya se explicó, la señal aguda que aparece a 104,3 ppm corresponde al C-1 de la xilosa terminal. Muy cerca de ésta, pero diferenciadas, aparecen las señales asignadas a los carbonos 1 de las β -D-galactosas con y sin sustituyentes en el C-6. Esta proximidad en los desplazamientos de las señales dificulta la discriminación de las unidades con configuración β -D.

A 102,7 ppm aparece una señal también correspondiente a una unidad con configuración β -D que no se observa en los espectros de los polisacáridos de *C. pilulifera* ni en los de *C. officinalis*, por lo que no había sido asignada hasta aquí.

Tabla 5.17 Asignaciones de algunas señales de RMN- ^{13}C en la región anomérica de los polisacáridos aislados del alga *Jania rubens*.

Unidad	δ (ppm)
DX	104,3
3DG + 3DG6 {X, H, M, S}	104,0
?	102,7
4LG + 4LG3M?	101,6
4LG2S	99,5
4LG2M + 4LG3M?	98,9
?	97,6

Las cuatro señales por debajo de 102 ppm corresponden a unidades del tipo α -L. Los antecedentes y el análisis químico permitieron correlacionar fácilmente las señales de 101,6 y 99,5 ppm con los C-1 de la α -L-galactosa y la α -L-galactosa 2-sulfato, respectivamente.

La señal a 98,9 ppm corresponde al C-1 de la 2-*O*-metil- α -L-galactosa, aunque deja dudas de si también puede ser generada por la 3-*O*-metil- α -L-galactosa. Cuando Usov *et al.* estudiaron los polisacáridos de *C. pilulifera* informaron que el C-1 de las unidades de α -L galactosa metiladas en C-2 y en C-3 poseían el mismo desplazamiento químico (también en el espectro protónico)¹². Sin embargo, los mismos autores informaron luego que la señal correspondiente a la 3-*O*-Me- α -L-Gal coincidía con la correspondiente a la α -L galactosa¹³. De esta manera, la asignación del carbono anomérico de la galactosa monometilada en C-3 estaría en duda de acuerdo a los antecedentes bibliográficos.

La aparición de una señal a 97,6 ppm fue sorpresiva ya que no había sido previamente encontrada en espectros de coralinanos. Una opción lógica hasta aquí sería que la señal esté originada en la 3,6-anhidro- α -L-galactosa, la cual no había aparecido en otros coralinanos.

En la región de 58-60 ppm se observó una señal ancha que corresponde a los metoxilos presentes naturalmente como sustituyentes en las diferentes posiciones de las unidades de galactosa. Como se verá más adelante, en los experimentos bidimensionales fue posible resolver las señales de los metoxilos unidos en las diferentes posiciones.

5.2.5.3 Análisis por experimentos de RMN bidimensionales de correlación C-H

Para ampliar el estudio espectroscópico se realizaron una serie de experimentos bidimensionales de correlación C-H para las diferentes fracciones. Para **3.1**, **3.2** y **4.1** se realizaron experimentos de HSQC y para **5.1** de HMQC. Para las fracciones de mayor peso molecular, como es el caso de **5.1**, los experimentos de HSQC no resultaron satisfactorios. En las figuras 5.7, 5.8, 5.9 y 5.10 se pueden apreciar los espectros.

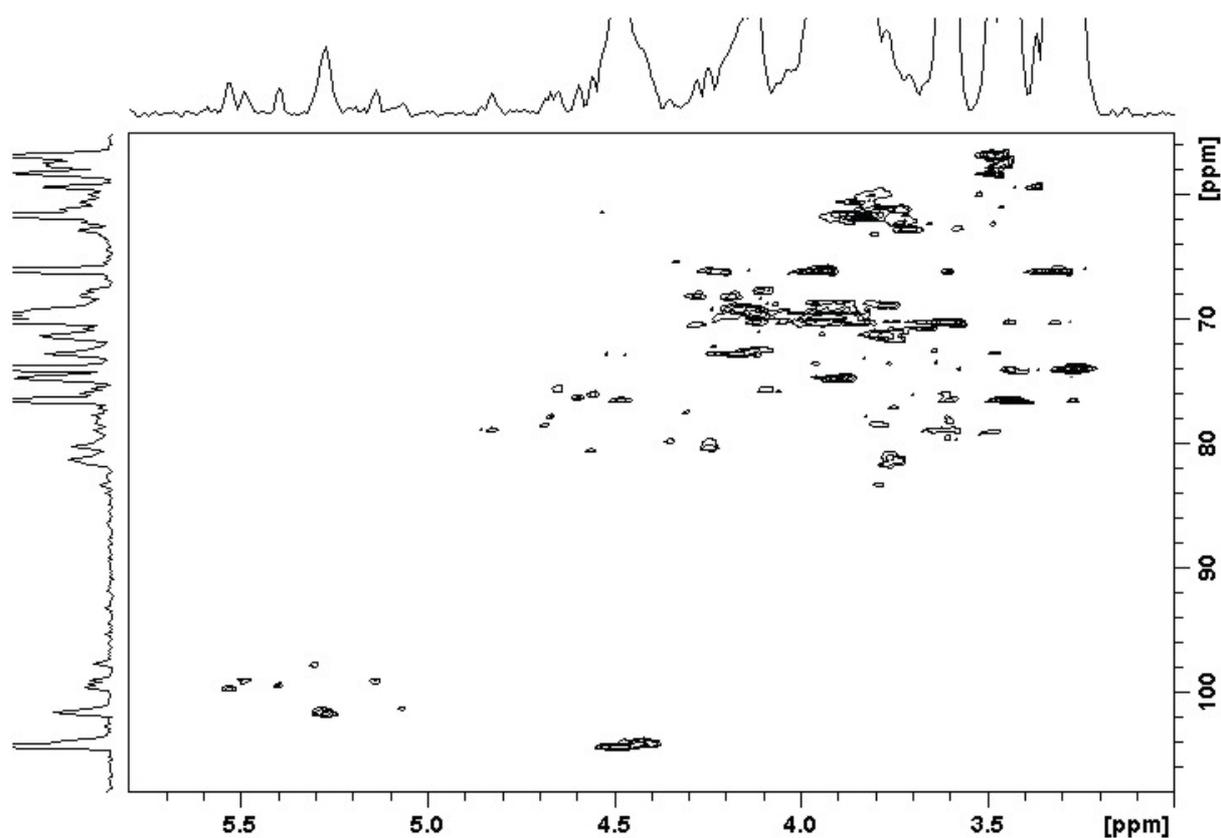


Figura 5.7 Espectro HSQC de la fracción **3.1** en D₂O a temperatura ambiente.

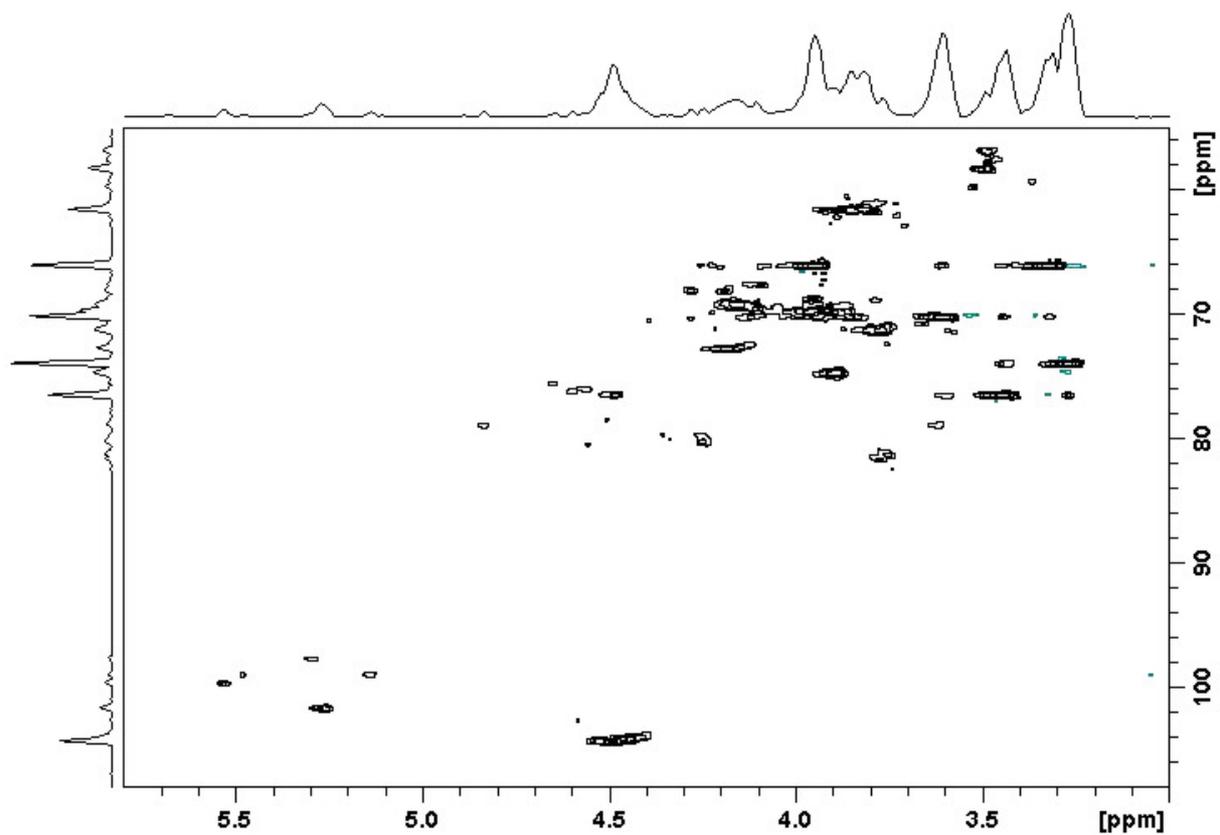


Figura 5.8 Espectro HSQC de la fracción 3.2 en D₂O a temperatura ambiente.

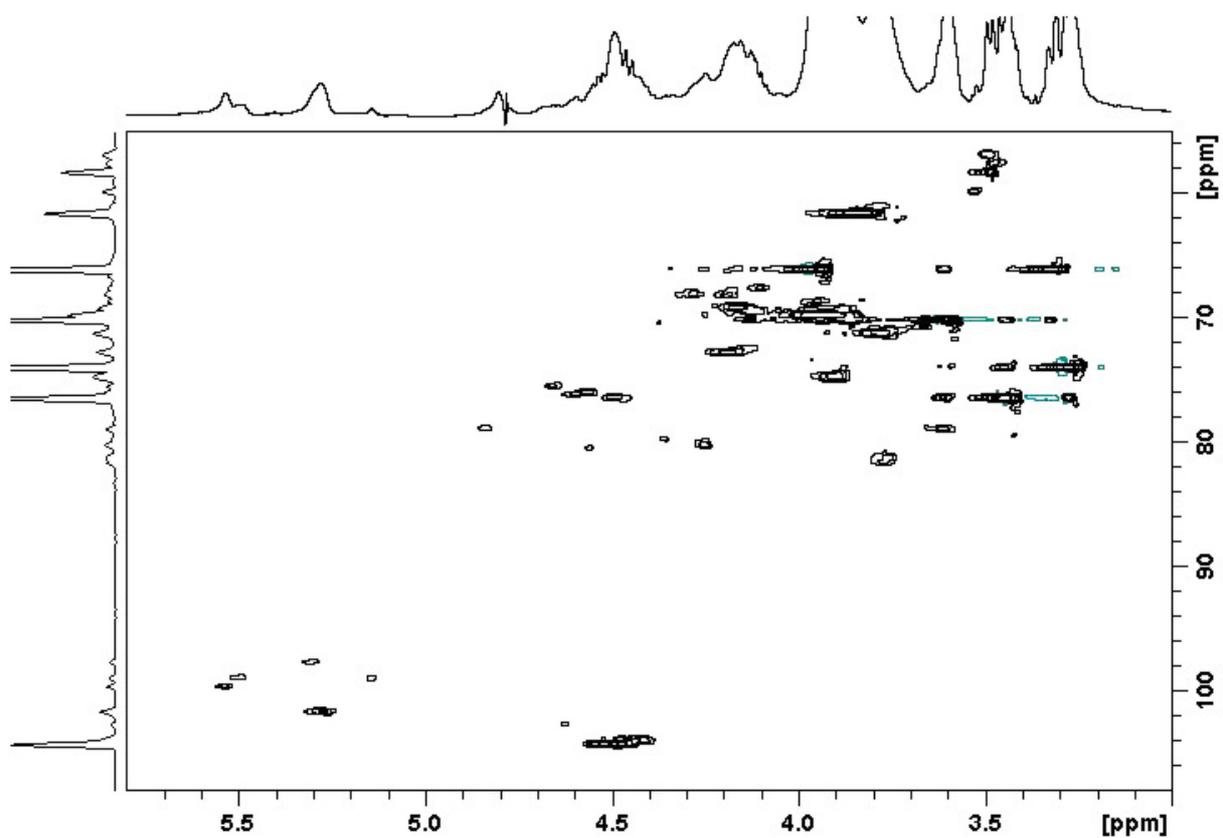


Figura 5.9 Espectro HSQC de la fracción 4.1 en D₂O a temperatura ambiente.

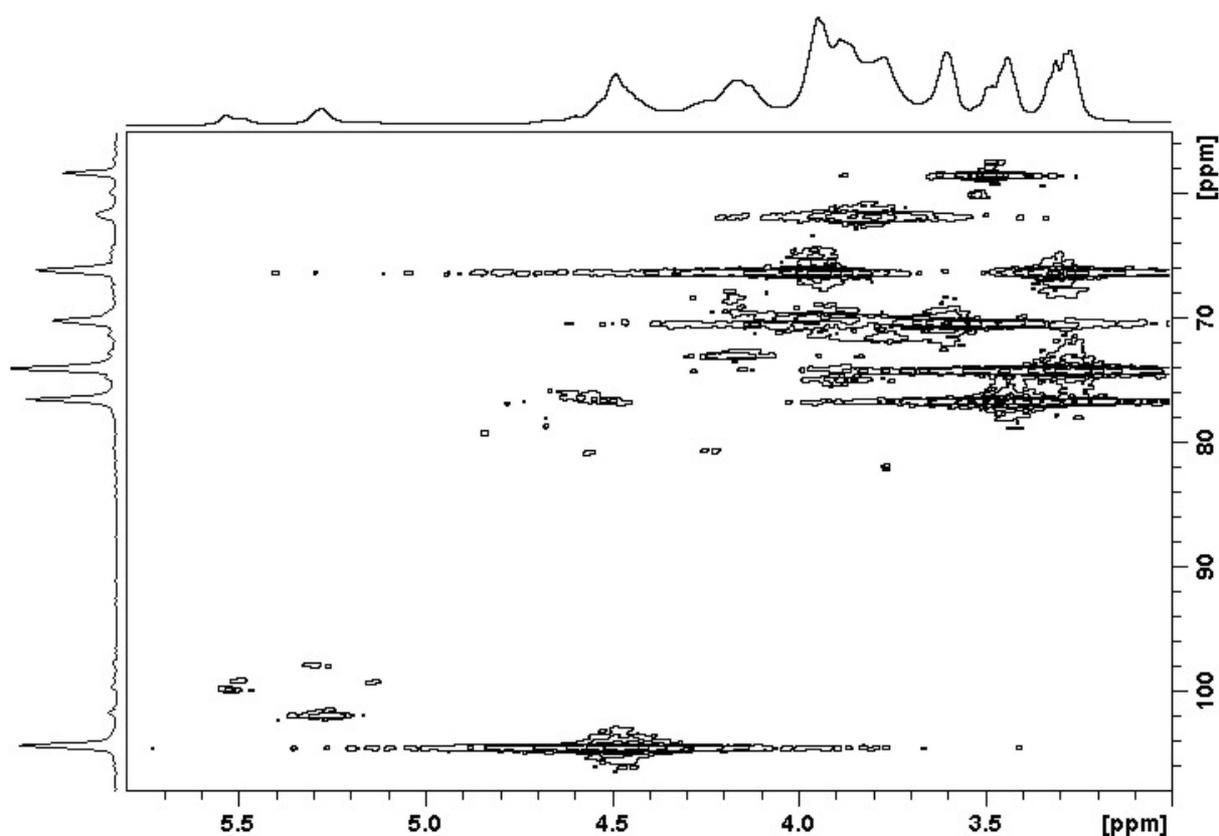


Figura 5.10 Espectro HMQC de la fracción 5.1 en D₂O a temperatura ambiente.

Como puede observarse, los espectros son complejos debido a la cantidad de señales presentes. Los espectros de HSQC presentaron mejor resolución que el espectro HMQC obtenido para la fracción 5.1. En este último espectro sobresalen notoriamente aquellas señales correspondientes a la β-D-xilosa terminal, que en parte cubren a las otras señales más débiles correspondientes a las galactosas.

La señal del protón anomérico de la xilosa en 4,49 ppm es consistente con su configuración β-D. En la Tabla 5.18 se puede observar la asignación de todas de las señales de la xilosa.

Tabla 5.18 Asignaciones de las señales (ppm) de RMN de ¹³C y ¹H de la β-D-xilosa terminal presente en polisacáridos aislados del alga *Jania rubens*.

Posición	1	2	3	4	5
C	104,3	73,9	76,4	70,1	66,0
H	4,49	3,28	3,45	3,61	3,32 y 3,94

Los desplazamientos químicos de los protones de la xilosa terminal también coinciden aproximadamente con los valores informados para las mismas por Nerinckx *et al.* (Tabla 5.19). Nuevamente la mayor diferencia se encuentra en el H-1. En ese caso, la pentosa es el extremo no reductor de oligosacáridos de xilosa con uniones alternantes $\beta(1\rightarrow3)$ y $\beta(1\rightarrow4)$ ²⁴.

Tabla 5.19 Asignaciones de las señales (ppm) de RMN de ¹H de la β -D-xilosa terminal presente en distintos polisacáridos.

Polisacárido	Sitio de unión	H-1	H-2	H-3	H-4	H-5
Agarano ²³	O-3 de α -L-Gal	4,66	3,40	3,50	3,66	3,32 y 4,00
Xilano ²⁴	O-3 de β -D-Xil	4,66	3,33	3,46	3,64	3,31 y 3,97
	O-4 de β -D-Xil	4,46	3,26	3,43	3,63	3,31 y 3,98
Xilomanano ²⁵	O-6 de β -D-Man 2-sulfato	4,45	3,37	3,48	3,66	3,37 y 4,00

Cardoso *et al.*, al estudiar mananos sulfatados aislados de algas rojas del género *Chondrophyucus*, informaron los desplazamientos químicos de la β -D-xilosa unida al O-6 de la β -D-manosa 2-sulfato (Tabla 5.19)²⁵. En este caso, el desplazamiento del H-1 es más cercano al informado en la Tabla 5.18. Este resultado es esperable, ya que en estos casos la xilosa terminal está unida a la posición 6 de una hexosa.

Dada la complejidad que presentaron los espectros bidimensionales por el considerable número de señales y de superposiciones, se decidió analizar en detalle sólo las regiones de los metoxilos (56 a 61 ppm) y anomérica (95 a 105 ppm).

5.2.5.3.1 Análisis de la región de metoxilos de los espectros bidimensionales de correlación C-H

La región del espectro de correlación C-H correspondiente a los metoxilos unidos naturalmente a las galactosas se ubica alrededor de 58 ppm para carbono y 3,5 ppm para protón. Si bien en los espectros de RMN de ¹³C la superposición de las señales no permitía diferenciarlos, al realizar los espectros HSQC de las fracciones **3.1**, **3.2** y **4.1** se obtuvo una

muy buena resolución. En las figuras 5.11, 5.12 y 5.13 se observan las ampliaciones de esa región de los espectros. El experimento de HMQC realizado con la fracción **5.1** sólo permitió determinar la presencia del metilo de la 4LG2M (principal componente metoxilado de la misma), no pudiéndose detectar el resto de las señales.

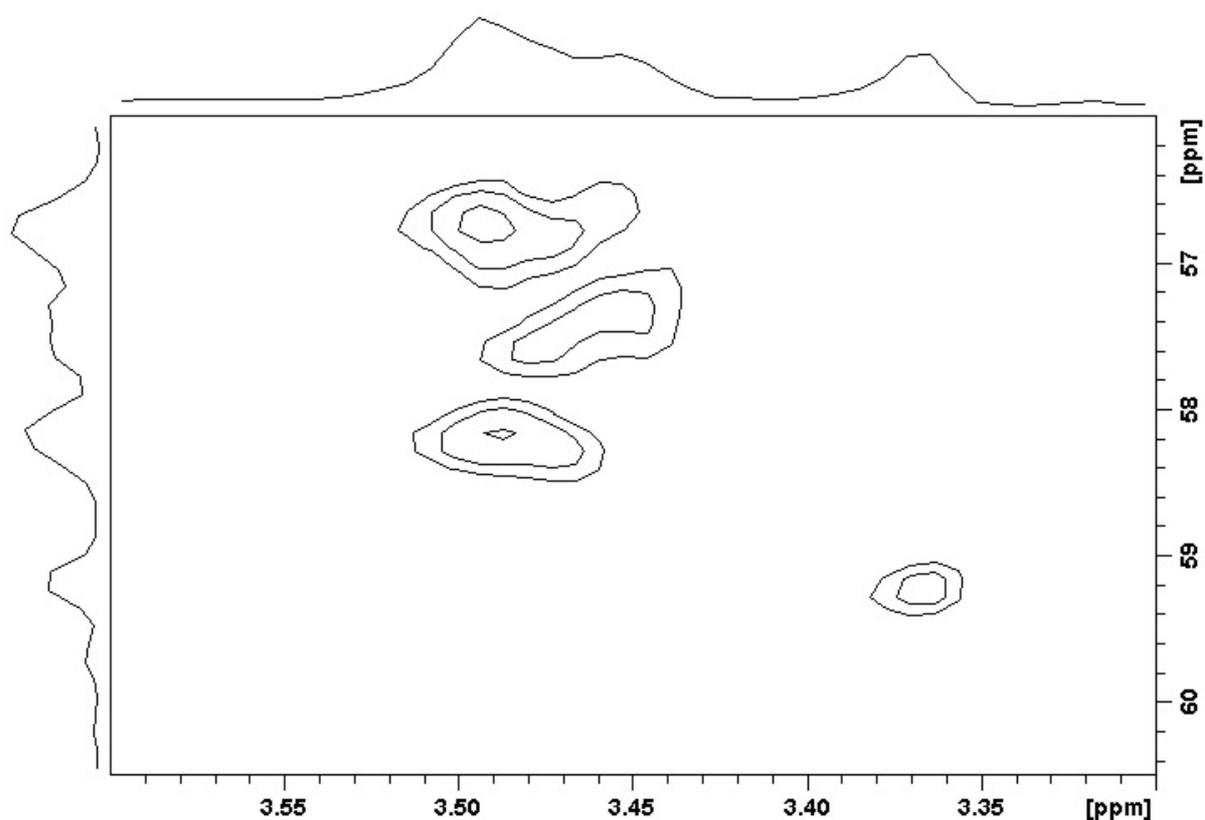


Figura 5.11 Ampliación del espectro HSQC de la fracción **3.1**.

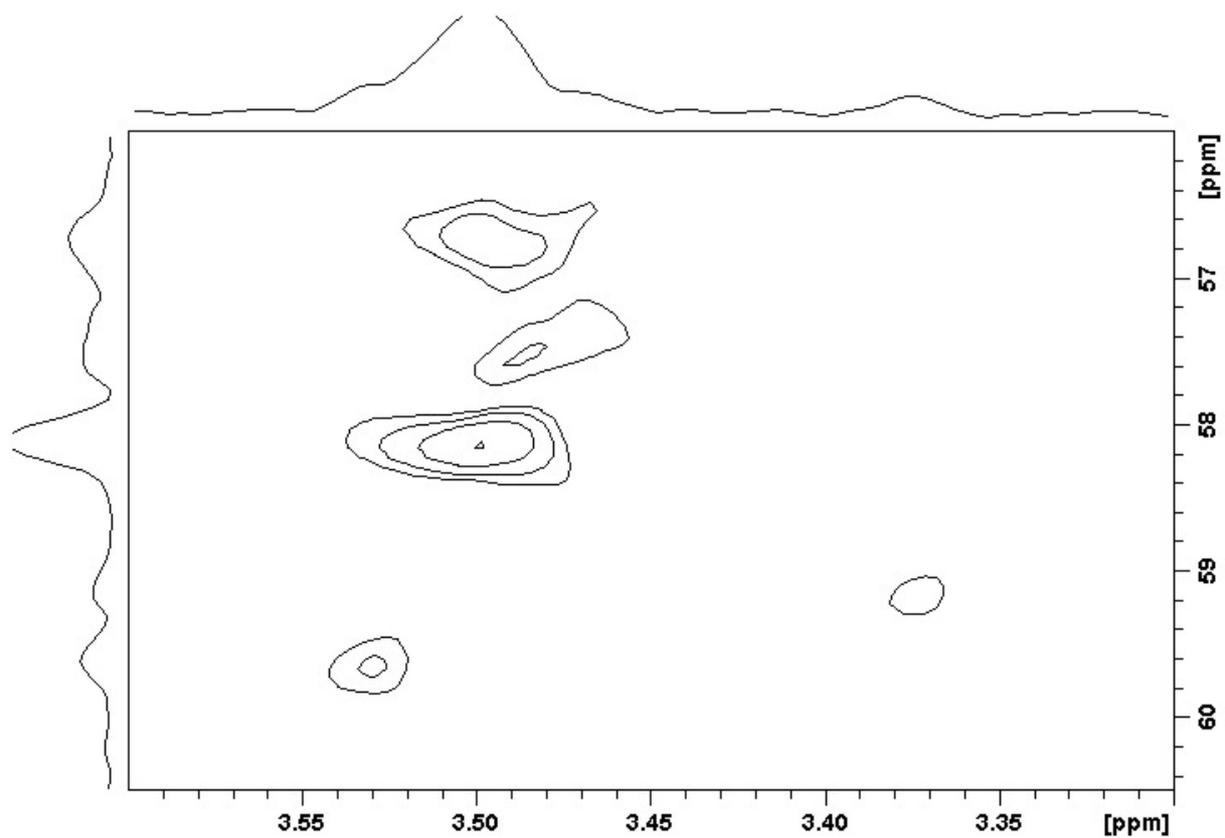


Figura 5.12 Ampliación del espectro espectro HSQC de la fracción 3.2.

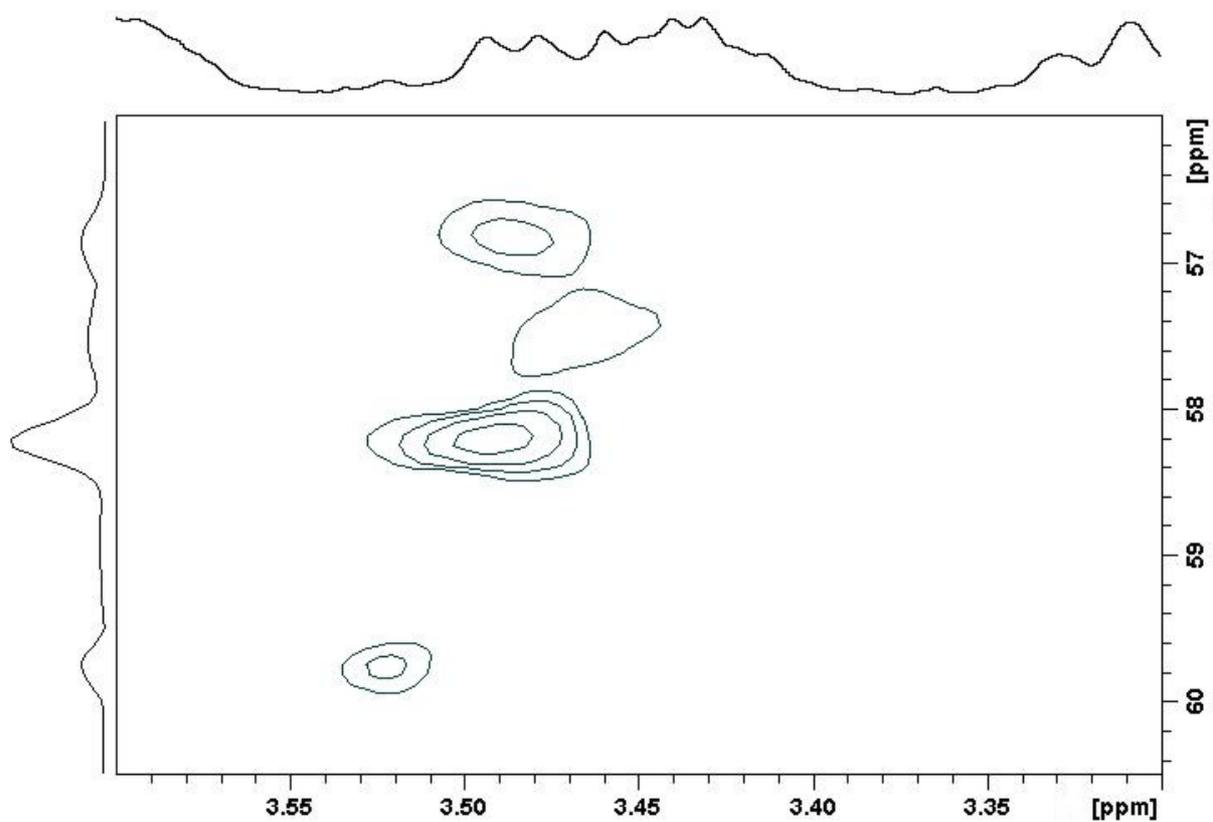


Figura 5.13 Ampliación del espectro espectro HSQC de la fracción 4.1.

En las figuras puede apreciarse que hay cinco señales diferentes para los metoxilos presentes en las galactosas, aunque sólo pueden observarse las cinco al mismo tiempo para la fracción 3.2 (Figura 5.12).

Según el análisis de azúcares componentes, las unidades de galactosas metiladas que pueden generar estas señales son: 2-*O*-Me-L-Gal, 3-*O*-Me-D-Gal, 3-*O*-Me-L-Gal, 6-*O*-Me-D-Gal, 3,6-An-2-*O*-Me-L-Gal y 2,3-di-*O*-Me-D-Gal. Las proporciones de cada una de ellas en los polisacáridos analizados van desde trazas hasta las 10 unidades cada 100 galactosas totales.

La asignación de las señales (realizadas con la ayuda de datos de literatura) pueden observarse en la Tabla 5.20. Si bien la asignación de algunas señales no revistió gran dificultad, otras merecen una breve discusión.

Tabla 5.20 Asignaciones de las señales (ppm) de RMN de ^{13}C y ^1H de los metoxilos presentes en las unidades de galactosa de polisacáridos aislados del alga *Jania rubens*.

	2- <i>O</i> -Me-L-Gal	3- <i>O</i> -Me-D-Gal	3- <i>O</i> -Me-L-Gal	6- <i>O</i> -Me-D-Gal	3,6-An-2- <i>O</i> -Me-L-Gal
C	58,2	56,7	57,5	59,2	59,7
H	3,50	3,49	3,47	3,37	3,53

Usov *et al.* informaron los desplazamientos químicos de los metoxilos unidos a las posiciones C-2 y C-3 de las unidades de L-galactosa presentes en los xilogalactanos del alga *C. pilulifera*¹². Estos valores coinciden aproximadamente (más allá de un desplazamiento sistemático en carbono) con los obtenidos en este trabajo e informados en la Tabla 5.20.

El desplazamiento químico correspondiente al metilo de la 6-*O*-Me-D-Gal en los xilogalactanos también fue ubicado sin inconvenientes en 59,2 ppm para carbono y 3,38 ppm para protón. Sin embargo, hubo que considerar la existencia de pequeñas proporciones de 3,6-anhidro-2-*O*-metil- α -L-galactosa, ya que la señal del carbono del metoxilo está muy próxima a la señal del de la 6-*O*-Me-D-Gal²⁶. La cercanía de las señales es tal que en muchas ocasiones se les asigna el mismo desplazamiento. Sin embargo, los dos monosacáridos metilados pueden diferenciarse perfectamente en los espectros bidimensionales ya que el desplazamiento en protón es bastante diferente. Montañó *et al.*²⁷ informaron (para agaranos aislados de dos especies de *Gracilaria*) que la señal correspondiente a los hidrógenos del

metilo de la 3DG6M estaba desplazada a 3,43 ppm, mientras que la de la 4LAG2M se ubicaba a 3,52 ppm (Tabla 5.20).

La señal correlacionada en los espectros a 56,7 (^{13}C) y 3,49 ppm (^1H) no había sido detectada en experimentos realizados sobre otros coralinanos ni agaranos. La explicación de esta señal se puede resolver con ayuda del análisis de la composición de azúcares componentes por cromatografía gaseosa. Se había determinado que las fracciones **3.1**, **3.2** y **4.1** contenían cantidades importantes de 3-*O*-Me-D-Gal, por lo cual era razonable asignar las señales al metoxilo de este monosacárido. El estudio de etilación mostró que estas unidades estarían como ramificaciones. Cabe destacar que las fracciones **3.1** y **3.2** poseen pequeñas cantidades de 2,3-di-*O*-Me-D-Gal, cuyas señales probablemente se superpongan con las de las otras metilgalactosas.

Una confirmación adicional está dada por la intensidad de la señal, ya que las tres fracciones analizadas poseían diferentes cantidades de 3-*O*-Me-D-Gal, y las mismas se reproducen en forma semicuantitativa en los espectros observados (ver luego).

Además, hay tres antecedentes de literatura que sustentan la asignación del metilo de la 3-*O*-Me-D-Gal. Por un lado Voelter *et al.*²⁸ sintetizaron una serie de metilglicósidos entre los cuales se encontraba el de la 3-*O*-metil- β -D-galactosa. Los compuestos fueron caracterizados por ^{13}C -RMN asignándose la señal a 56,2 ppm al carbono del metilo de la 3-*O*-Me- β -D-Gal y la de 103,9 ppm al carbono anomérico²⁸. En otro trabajo, Fernández *et al.*²⁹ sintetizaron diversos derivados metilados de la lactosa, entre ellos el metilglicósido que poseía la posición 3 de la galactosa metilada. El carbono del metilo en este caso apareció en 57,5 ppm y 3,51 ppm para carbono e hidrógeno respectivamente. El carbono anomérico de la galactosa se encontraba desplazado a 104,1 ppm (+0,2 ppm con respecto al sistema de referencia aquí utilizado)²⁹. En un estudio sobre galactomananos aislados de hongos, Rosado *et al.*³⁰ informaron que la señal del metoxilo de la 3-*O*-metil- α -D-galactosa con unión (1 \rightarrow 6) aparecía a 56,4 ppm en ^{13}C (-0,9 ppm con respecto al sistema de referencia aquí utilizado) y 3,47 ppm en ^1H .

Se sabe que los experimentos de HSQC no pueden ser utilizados de manera cuantitativa porque existen parámetros en la secuencia de pulsos de RMN que influyen de manera diferente en la respuesta de los distintos núcleos. Entre estos parámetros, el más importante³¹ es la constante de acoplamiento C-H ($^1J_{\text{C-H}}$). En los experimentos de HSQC convencionales, el valor de $^1J_{\text{C-H}}$ define la duración de la demora de transferencia de polarización ($\Delta=1/(2J_{\text{C-H}} \text{ aplicado})$). El problema surge en que la secuencia de pulso utiliza un

único valor de $^1J_{CH}$, aún cuando cada núcleo de la molécula analizada puede tener un valor diferente³¹. En consecuencia, las intensidades (volúmenes) de las distintas señales no sólo dependen de su abundancia, sino también de la respuesta en el experimento. Cuanto mayor sea la diferencia ente $^1J_{C-H}$ aplicado y el $^1J_{C-H}$ real, menor será la intensidad de la señal.

En términos generales, puede considerarse que las constantes de acoplamiento C-H en un determinado grupo de átomos con entorno similar son aproximadamente iguales. Por lo tanto, suponiendo que todos los metilos unidos naturalmente a las unidades de galactosas poseen la misma $^1J_{CH}$ (y en consecuencia una respuesta similar), se puede efectuar una cuantificación relativa de las distintas unidades estructurales y compararla con los datos obtenidos por métodos químicos.

Los resultados de la integración de los volúmenes de las señales de los metilos de las galactosas se muestran en la Tabla 5.21 (considerando 2-*O*-Me-L-Gal =10).

Tabla 5.21 Cuantificación relativa de las unidades de galactosa monometiladas por CGL y RMN-HSQC^a.

Unidad/Fracción	Cromatografía gaseosa			RMN-HSQC		
	3.1	3.2	4.1	3.1	3.2	4.1
3- <i>O</i> -Me-D-Gal	9	6	4	10	6	3
6- <i>O</i> -Me-D-Gal	4	1	1	2	1	tr. ^b
2- <i>O</i> -Me-L-Gal	10	10	10	10	10	10
3- <i>O</i> -Me-L-Gal	9	5	4	6	4	3
2- <i>O</i> -Me-3,6-An-L-Gal	1	1	tr.	tr.	2	1

^a No se tuvo en cuenta la 2,3-di-*O*-Me-D-Gal.

^b tr= < 0,5; en RMN estas señales se observaron solamente al disminuir el nivel de corte.

Del análisis de la Tabla 5.21 se desprende que la cuantificación realizada por RMN (HSQC) es muy similar a la obtenida por cromatografía gaseosa. Esto implica que la suposición de la similitud de las $^1J_{C-H}$ es válida.

La principal diferencia (aunque pequeña) entre las cuantificaciones realizadas está en las proporciones de 6-*O*-Me-D-Gal y 3-*O*-Me-L-Gal en la fracción **3.1**. Para ésta última la diferencia podría provenir de distintos modos de unión de este azúcar, que podrían originar su subvaluación en el espectro de RMN. En esta fracción se había sugerido que parte de la 3-*O*-Me-L-Gal estaba en la cadena central, y parte como ramificación terminal (pág. 223).

Los resultados de cuantificación por RMN respaldan la asignación de señales, especialmente la que concierne a la 3-*O*-Me-D-Gal. En este caso la señal a 56,7 ppm disminuye su intensidad desde la fracción **3.1** a la **4.1** de manera prácticamente idéntica a la disminución de la proporción del monosacárido determinada por CGL.

Como la 3-*O*-Me-D-Gal sería terminal no se puede afirmar que su configuración sea β tal como lo son el resto de las D-galactosas que conforman la cadena central del agarano. Sin embargo, todo hace suponer que todas las D-Gal son de configuración β ya que en la región anomérica α no se observan más señales que las justificadas (ver luego).

5.2.5.3.2 Análisis de la región anomérica de los espectros bidimensionales de correlación C-H

En las Figuras 5.14, 5.15, 5.16 y 5.17 se observan las ampliaciones de las regiones anoméricas de los espectros obtenidos para las fracciones **3.1**, **3.2**, **4.1** y **5.1**, respectivamente. Dada la presencia de dos dimensiones en el espectro, la información obtenida es mayor que la obtenida en los espectros de ^{13}C y de ^1H .

Los cuatro espectros presentan en la zona anomérica dos conjuntos de señales. Uno de los conjuntos se ubica en la región comprendida entre 102,5-104,3 ppm en F2 (^{13}C) y 4,45-4,65 ppm en F1 (^1H). Estas se originan en unidades de galactosa y de xilosa con configuración β -D. El segundo conjunto de señales se encuentra en la región del espectro que va de 96 a 102 ppm y de 5 a 5,6 ppm aproximadamente. Las mismas se originan en las diferentes unidades α -L.

La región anomérica del espectro correspondiente a las unidades β -D muestra para todas las fracciones analizadas una considerable superposición de las señales. Junto a la señal de la xilosa a 104,3 ppm, aparece en 104,0 ppm en ^{13}C y 4,43 ppm en ^1H una señal o conjunto de señales que coinciden con los valores informados en literatura para las unidades de 4DG, 4DG6S, 4DG6M y 4DG6X. Usov *et al.*¹² asignaron el C-1 de todas estas unidades a la señal de 104,6 ppm (+0,6 ppm, teniendo en cuenta la referencia diferente) y el H-1 a 4,42 ppm.

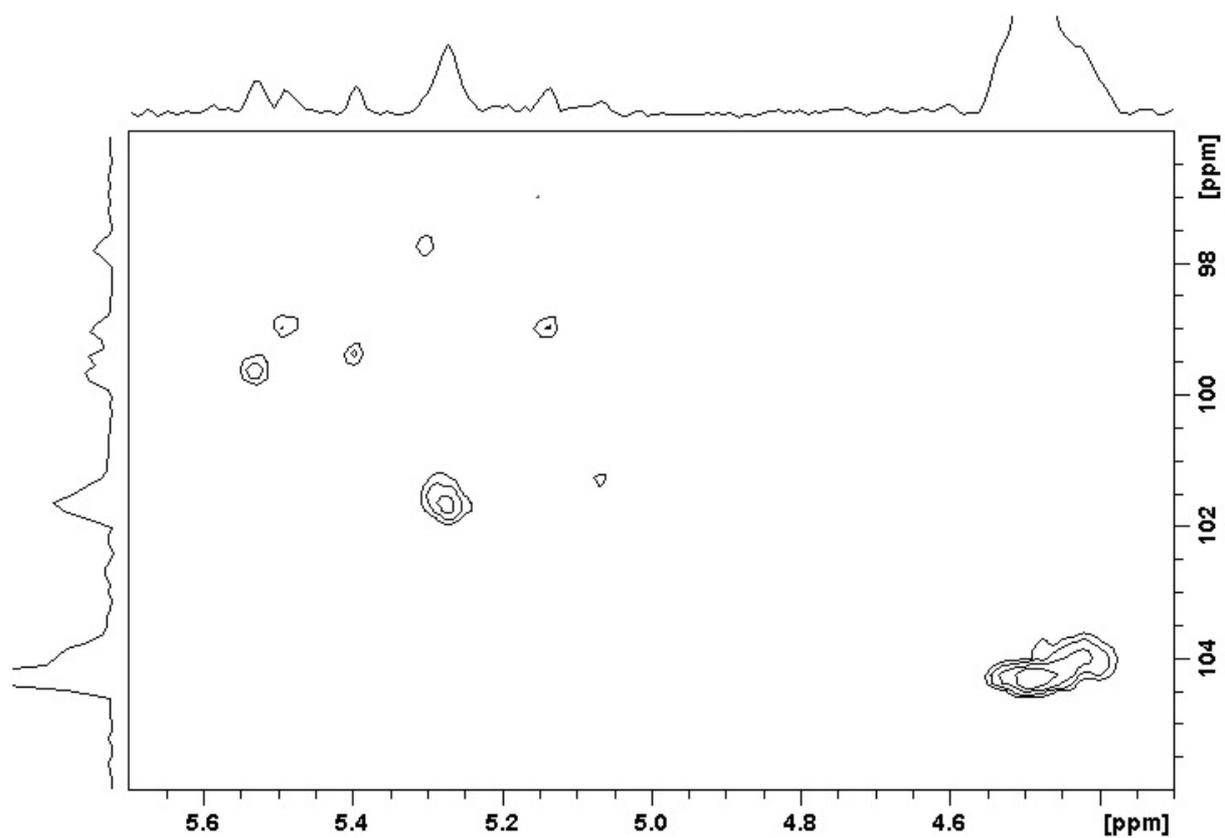


Figura 5.14 Ampliación del espectro HSQC (región anomérica) de la fracción 3.1.

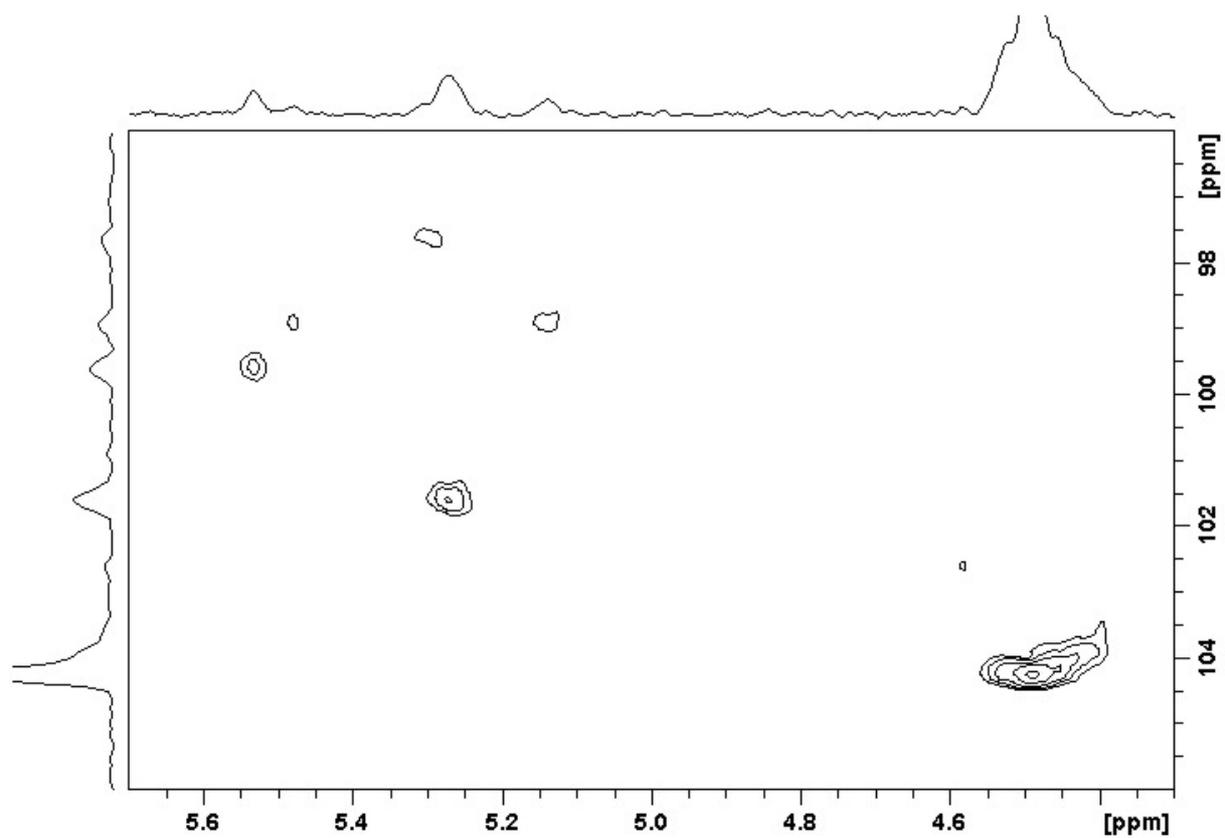


Figura 5.15 Ampliación del espectro HSQC (región anomérica) de la fracción 3.2.

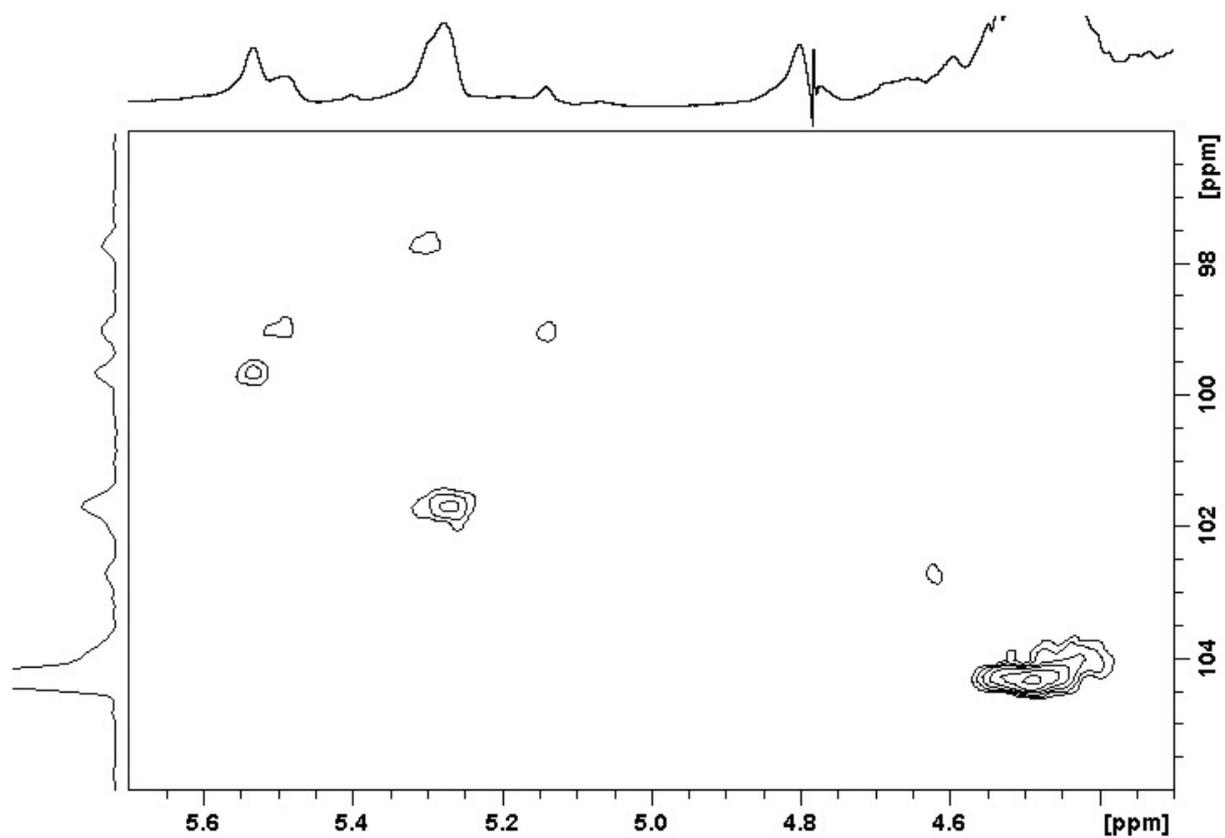


Figura 5.16 Ampliación del espectro HSQC (región anomérica) de la fracción 4.1.

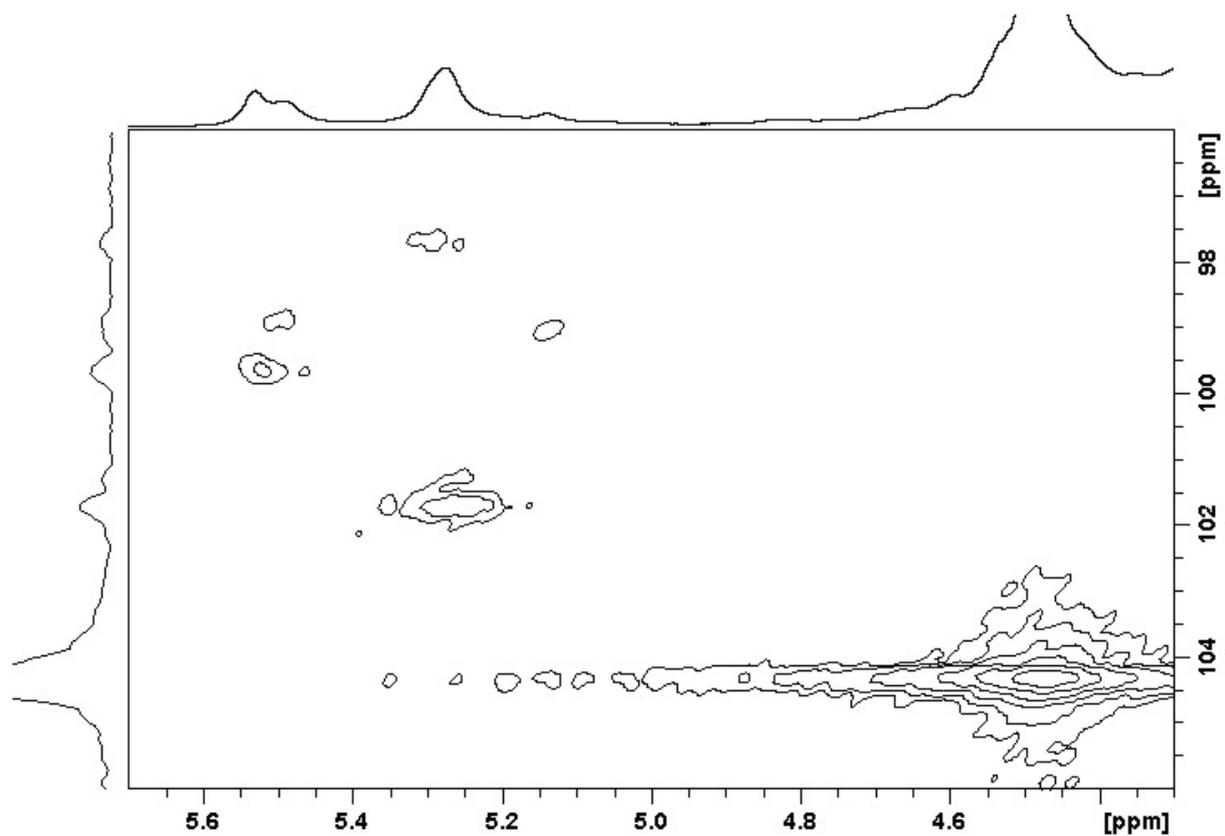


Figura 5.17 Ampliación del espectro HMQC (región anomérica) de la fracción 5.1.

En el espectro obtenido para la fracción **5.1** la señal de la xilosa no permite visualizar aquellas generadas por las unidades de galactosa, ya que la primera es demasiado intensa. Cabe destacar que en este caso la resolución del espectro de RMN-¹³C fue superior a la obtenida en el experimento bidimensional HMQC (Figuras 5.5 y 5.17).

Para las fracciones **3.2** y **4.1** se puede visualizar además otra señal de configuración β-D, como ya se había mencionado (Tabla 5.17). Esta se ubica a 102,7 ppm para carbono y 4,63 ppm en protón. Nuevamente para la fracción **5.1**, esta señal no se observa en el espectro bidimensional, aunque es posible hacerlo en el espectro de RMN de ¹³C. La señal a 102,7 ppm está relacionada con una variación de la estructura del xilogalactano con respecto a las informadas previamente, ya que en ninguno de los espectros publicados aparece. De acuerdo a los antecedentes³² y los datos estructurales obtenidos hasta aquí, la señal de 102,7 ppm podría estar originada en el C-1 de la β-D-galactosa unida a la 3,6-anhidro-α-L-galactosa (ver luego).

La región anomérica correspondiente a las unidades de α-L-galactosa alberga entre 5 y 7 señales dependiendo de la fracción. De éstas, 5 son comunes a todas y 3 ya habían sido asignadas en la Tabla 5.17. En la Tabla 5.22 se las vuelve a presentar junto con el desplazamiento de ¹H asociado. Los valores son coincidentes con los datos de literatura.

Tabla 5.22 Asignaciones de algunas señales de RMN en la región anomérica de xilogalactanos

Unidad	δ (ppm)			
	Usov <i>et al.</i> ¹²		<i>J. rubens</i>	
	C	H	C	H
4LG ^a	101,9	5,28	101,6	5,28
4LG2S	100,1	5,53	99,5	5,54
4LG2M ^a	99,4	5,49	98,9	5,50

^a Podría estar incluida la 4LG3M.

Las señales correspondientes a los C-1 de la unidades α-L que no pudieron ser asignadas y son comunes a los tres espectros son: 97,6/5,30 ppm y 98,9/5,14 ppm. Además, en el espectro correspondiente a la fracción **3.1** aparecen dos señales más a 101,3/5,07 ppm y 99,4/5,41 ppm.

Como puede observarse, la señal que aparece en carbono a 98,9 ppm (Figuras 5.14 a 5.17) además de tener asociado un protón con desplazamiento de 5,50 ppm (4LG2M) tiene otro a 5,14 ppm. En un principio se pensó que podía corresponder a la 4LG3M ya que los antecedentes en bibliografía informaban que la señal del C-1 coincidía con el de la 4LG2M (no se informaba el desplazamiento en ^1H , luego se volverá sobre esta asignación). Sin embargo, también se pensó que las señales a 98,9/5,14 y 97,6/5,30 ppm podían estar asociadas a la presencia de α -L-3,6-AnGal (ver luego). Para intentar la asignación de estas señales se decidió tratar químicamente a los polisacáridos y luego realizar nuevos experimentos de HSQC.

La señal a 101,3 ppm que aparece en el espectro HSQC de la fracción **3.1** está muy cerca de la informada en literatura para la 4LG3S²²; sin embargo, el estudio de desulfatación no permitió detectar la presencia de estas unidades. Los análisis químicos mostraron que esta fracción poseía proporciones considerables de unidades de α -L-galactosa disustituida en las posiciones 3 y 4, de manera que la asignación al C-1/H-1 de la señal a 101,3/5,07 ppm podría corresponder a una unidad del tipo 4LG3Y, donde Y probablemente sea un grupo glicosilo.

La señal a 99.4 ppm en el espectro bidimensional de la fracción **3.1** podría asignarse según datos de literatura³² al C-1 de las unidades de α -D-glucosa enlazadas por 4 que son constituyentes principales del almidón de florídeas. Esta señal fue confirmada al compararla con la obtenida en un experimento de HSQC de la fracción **PC2**, la cual contiene enormes proporciones de almidón.

5.2.5.4 Análisis del espectro HSQC de la fracción 4.1 desulfatada

La fracción **4.1** fue desulfatada con la metodología asistida por microondas descrita en el Capítulo 4.

La ampliación de la región anomérica del espectro HSQC de la fracción **4.1** desulfatada puede observarse en la Figura 5.18.

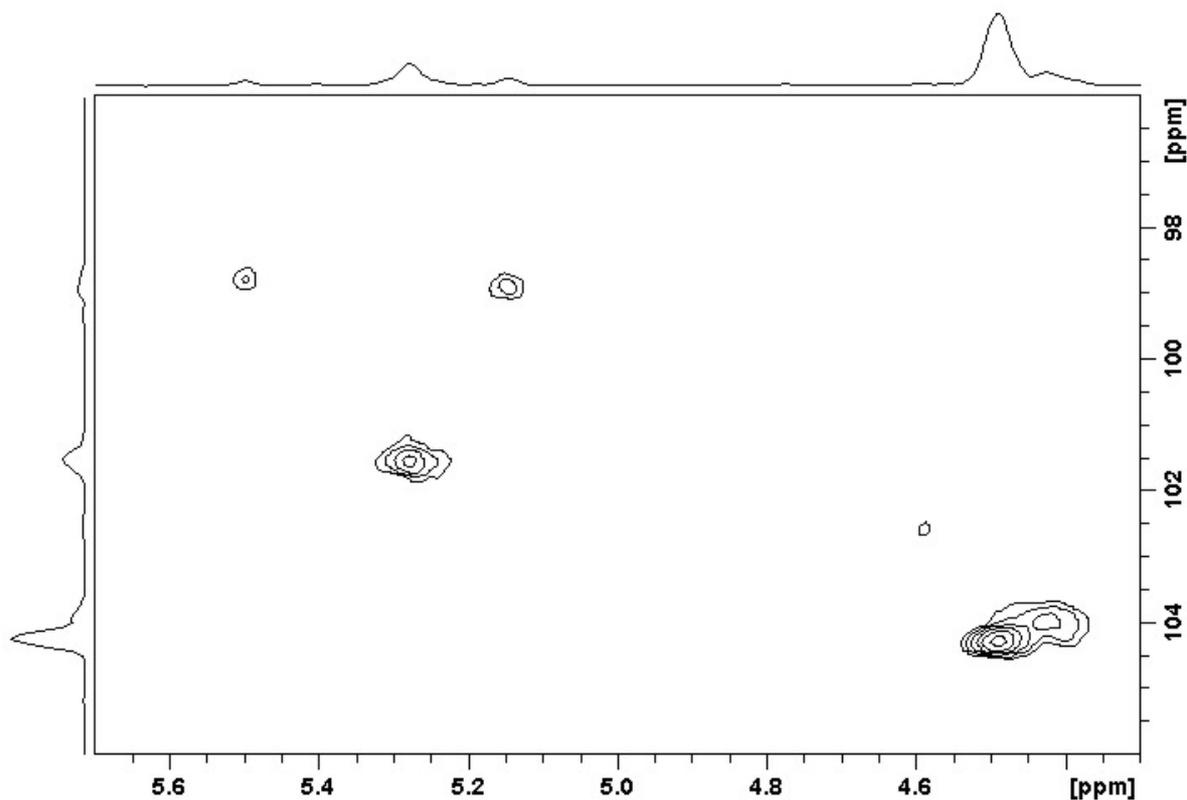


Figura 5.18 Ampliación del espectro HSQC (región anomérica) de la fracción 4.1 desulfatada.

La zona anomérica muestra la completa desaparición de las señales a 99,5 ppm y 97,6 ppm, lo que indica que estas dos señales corresponden a los C-1 de unidades sulfatadas (o C-1 de residuos que a su vez tienen unidades vecinas sulfatadas). La señal a 99,5 ppm había sido asignada por bibliografía¹² a la unidad de α -L-galactosa 2-sulfato. Su desaparición en el producto desulfatado es compatible con la asignación. La ausencia de la señal a 97,6 ppm resultó sorprendente ya que como se mencionó anteriormente, se esperaba que correspondiera al C-1 de la 3,6-AnGal.

De igual manera que se hizo con los metilos naturales presentes en las galactosas, se decidió cuantificar integrando los volúmenes de las señales de los espectros de HSQC obtenidos para la fracción 4.1 y 4.1 desulfatada, nuevamente suponiendo que todas las unidades α -L poseen la misma $^1J_{C-H}$. En la Tabla 5.23 se presentan los resultados.

Al integrar la región anomérica correspondiente a las unidades α -L se ve claramente que al desulfatar el polisacárido la señal correspondiente a la 4LG2S desaparece, y se produce un aumento en la proporción de la señal de la 4LG. Es importante marcar que la cantidad en que aumenta la 4LG es igual a la que desaparece de la unidad sulfatada en C-2 (49 \rightarrow 70%).

Tabla 5.23 Cuantificación relativa de las unidades α -L-galactosa por RMN-HSQC.

Señal	Asignación	4.1	4.1DS
101,6; 5,28	4LG (ζ + 4LG3M?)	49	70
99,5; 5,54	4LG2S	20	-
98,9; 5,50	4LG2M (ζ + 4LG3M?)	9	10
98,9; 5,14	?	9	20
97,6; 5,30	?	13	-

La señal en el espectro de la muestra original que aparecía a 97,6 ppm representaba el 13% de las unidades α . Al desaparecer esta señal en el producto desulfatado, el volumen de la señal que aparece a 98,9 y 5,14 ppm se incrementó en un 11%, que es justamente muy similar a la proporción que había originalmente en la señal de 97,6 ppm.

Anteriormente se mencionó la posibilidad de que las señales de 98,9 y 97,6 ppm estuvieran generadas por el C-1 de la 3,6-anhidro- α -L-galactosa. Ahora se sumaba el hecho de que la segunda correspondía a una unidad sulfatada. En consecuencia, una asignación razonable era que la señal a 97,6 ppm correspondiera al C-1 de la 3,6-anhidro- α -L-galactosa 2-sulfato (único derivado sulfatado posible), mientras que la de 98,7 ppm provendría del anhidrozúcar sin sulfatar. La comprobación de estas dos asignaciones se obtuvo al hidrolizar selectivamente la fracción **4.1** (ver más abajo).

5.2.5.5 Análisis del espectro HSQC de la fracción 4.1 despolimerizada

La fracción **4.1** fue despolimerizada parcialmente utilizando TFA 0,1 M para hidrolizar selectivamente la 3,6-anhidrogalactosa. La hidrólisis selectiva del enlace glicosídico de la 3,6-anhidrogalactosa permite obtener polímeros de menor peso molecular cuyos extremos reductores pertenecen al anhidrozúcar. La reacción de hidrólisis se llevó a cabo con TFA 0,1 M a 80 °C durante 3 h, de manera similar a la utilizada para la determinación configuracional de la 3,6-AnGal⁸ en el Capítulo 3. Luego de la hidrólisis, los nuevos extremos reductores fueron reducidos con NaBH₄, de manera que al realizar los experimentos desaparecerían las señales originadas por el carbono anomérico de la 3,6-

anhidrogalactosa. Este tipo de despolimerización había sido llevada a cabo con anterioridad sobre otros galactanos conteniendo 3,6-anhidrogalactosa^{23,34}, pero en esos casos se había utilizado MMB como reductor.

La región anomérica del espectro bidimensional del biopolímero modificado se presenta en la Figura 5.19. En él se puede observar cómo las señales a 97,6/5,30 y 98,9/5,14 ppm desaparecieron. Estos datos confirman que esas dos señales estaban originadas en diferentes unidades de 3,6-anhidrogalactosa.

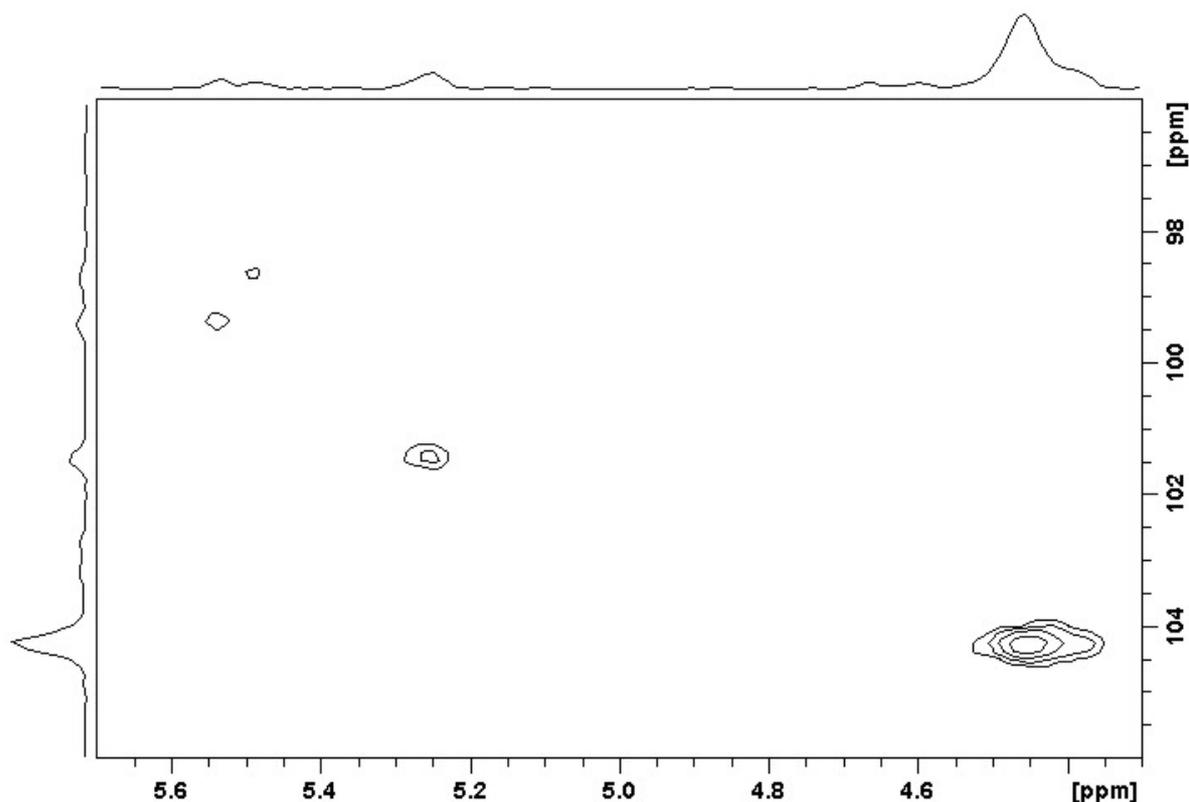


Figura 5.19 Ampliación del espectro HSQC (región anomérica) de la fracción **4.1** despolimerizada con TFA 0,1 M.

La señal a 98,9 y 5,14 ppm se asignó al C-1 de la 3,6-anhidrogalactosa en base a los cambios observados tras modificar químicamente la fracción **4.1**, el análisis de azúcares componentes y los datos bibliográficos³³.

Las señales de ¹³C-RMN correspondientes a la 3,6-anhidrogalactosa en agaranos ha sido asignadas en varias ocasiones. En la Tabla 5.24 se muestran los desplazamientos informados para los carbonos de la 3,6-anhidrogalactosa y su derivado metilado en C-2, junto con las señales de los monosacáridos unido a ésta (en distintas díadas)³¹.

Tabla 5.24 Asignaciones de las señales de RMN de ^{13}C de las díadas de agaranos conteniendo 3,6-anhidrogalactosa³².

Unidad	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	OMe
3DG ^a	102,7	70,5	82,5	69,1	75,7	61,8	
4LAG	98,7	70,1	80,4	77,7	75,9	69,7	
3DG6M ^a	102,7	70,5	82,5	69,4	74,0	72,3	59,5
4LAG	98,9	70,1	80,5	77,8	75,9	69,8	
3DG ^a	102,7	70,2	82,7	68,8	75,3	61,4	
4LAG2M	98,7	78,9	78,5	77,6	75,7	69,5	59,2
3DG6M ^b	102,2	69,6	82,2	68,6	73,1	71,4	58,5
4LAG2M	98,3	78,3	78,0	77,2	75,3	69,0	58,6

^a Espectros realizados a temperatura ambiente y señal de DMSO tomada como referencia a 39,6 ppm.

^b Espectros realizados a 80 °C y señal de DMSO tomada como referencia a 39,6 ppm.

Estos datos muestran como el desplazamiento químico de las señales del anhidrozúcar puede mostrar variaciones en función de diferencias en sus unidades vecinas.

En el caso de la 3,6-anhidrogalactosa encontrada en los polisacáridos de *Jania rubens*, la señal correspondiente al C-1 aparece a 98,9 ppm, lo que es coincidente con la informada para la díada 3DG6M-4LAG. Esto es lógico si se considera que en el coralinano aproximadamente 42 de cada 50 unidades de β -D galactosa están sustituidas en la posición C-6 (en este caso con β -D-xilosa). El desplazamiento de la señal del H-1 a 5,14 ppm coincide perfectamente con los valores informados en literatura para la 4LAG³⁵.

En el espectro de la fracción tratada (Figura 5.19) se aprecia como la señal a 102,7 ppm también desaparece. En función de este resultado y los datos bibliográficos (Tabla 5.24) se confirma que la señal se puede asignar al C-1 de las unidades de β -D galactosa unidas a 3,6-AnGal.

La desaparición de la señal de 97,6 ppm en el espectro HSQC de la fracción **4.1** tratada químicamente, junto con el incremento en un 10% de la señal correspondiente a la 3,6-anhidrogalactosa (98,7 ppm) en el polisacárido desulfatado, hacen suponer que la misma tiene su origen en el C-1 de 4LAG2S.

La asignación de las señales de RMN correspondientes a la 3,6-anhidro- α -L-galactosa 2-sulfato ha sido realizada con anterioridad solamente en dos ocasiones. Miller y Blunt³⁶ informaron los desplazamientos de RMN de ^{13}C para el anhidrozúcar sulfatado en C-2 presente en un agarano aislado del alga *Cladhymenia oblongifolia*. Zibetti *et al.* encontraron desplazamientos similares para la 4LAG2S en un agarano aislado de *Cryptonemia crenulata*³⁷. En la Tabla 5.25 se muestran los valores informados por los autores.

En los polisacáridos de *J. rubens*, el C-1 de la 4LAG2S está desplazado a 97,6 ppm, es decir a campos más bajos que los valores informados en bibliografía (Tabla 5.25). Más allá de poder justificar la diferencia en los desplazamientos por las distintas condiciones en que fueron realizados los espectros, nuevamente debe tenerse en cuenta que el entorno químico no es el mismo, ya que en el caso de los polisacáridos de *J. rubens* la mayor parte de las unidades β -D-galactosa están sustituidas con β -D-xilosa.

En la Tabla 5.25 se presentan los desplazamientos químicos para algunas señales de 4LAG2S informados en literatura. Además se presentan los hallados para el mencionado anhidrozúcar en *J. rubens*. Estas asignaciones se realizaron en base al análisis de los espectros de HSQC de la fracción **4.1** original, **4.1** desulfatada y **4.1** depolimerizada con TFA 0,1 M (Figuras 5.16, 5.18 y 5.19).

Tabla 5.25 Asignaciones de algunas señales de RMN de ^{13}C de la 3,6-anhidro- α -L-galactosa 2-sulfato.

Posición/ δ (ppm)	<i>C. oblongifolia</i> ^a	<i>C. crenulata</i> ^b	<i>J. rubens</i>
C-1	97,1	96,1	97,6
C-2	76,9	75,6	75,5
C-3	78,5 o 78,1	78,3 o 78,1	78,9

^a Espectro determinado en D₂O a 80 °C³⁶.

^b Espectro determinado en D₂O a 70 °C³⁷.

Los valores de las señales originadas en los hidrógenos 1 a 3 para la 4LAG2S fueron 5.30, 4.66 y 4.80 ppm, respectivamente. Cabe destacar que anteriormente no habían sido informado los valores de los desplazamientos químicos correspondientes a los protones de estas unidades.

La existencia de 3,6-anhidro- α -L-galactosa 2-sulfato resultó sorpresiva, ya que el análisis por metilación sugería que la mayor parte del monosacárido no se encontraba sulfatado. En el caso puntual de la fracción **4.1**, la relación 4LAG:4LAG2S por metilación era 7:3, mientras que la integración del HSQC daba 4:6. Las explicaciones a estas diferencias en los resultados podrían ser que las $^1J_{C-H}$ de ambos azúcares sean muy diferentes y en consecuencia la integración de la región anomérica del HSQC no fuese válida, o mucho más probablemente que en el proceso de metilación, la 3,6-anhidrogalactosa 2-sulfato sufra un proceso de desulfatación parcial. Debe destacarse que la señal a 97,6 ppm es intensa en todas las fracciones estudiadas, sugiriendo que la 3,6-AnGal se encuentra sulfatada en alta proporción en todas ellas.

5.2.5.6 Análisis cuantitativo de la región anomérica de los espectros HSQC

Como ya se explicó, la utilización de los espectros HSQC con fines cuantitativos debe ser cuidadoso debido a que la intensidad de cada señal es dependiente de la constante $^1J_{C-H}$ ³¹. Se sabe que la constante $^1J_{C-H}$ es aproximadamente 10 Hz mayor en aquellos casos en que el H anomérico está en forma ecuatorial (anómeros $\alpha \approx 170$ Hz) con respecto a los que están axiales (anómeros $\beta \approx 160$ Hz)³⁸, de modo que no se puede realizar una integración precisa de todas las señales anoméricas. De esta manera, a lo sumo podrían integrarse por separado cada grupo de unidades con diferente configuración. En particular, para las unidades de β -D-xilosa y β -D-galactosa los H-1 y C-1 tienen prácticamente el mismo desplazamiento químico, por lo que no pueden diferenciarse e integrarse.

A partir de la buena resolución de las señales correspondientes a las unidades α , y asumiendo que todas ellas poseen $^1J_{C-H}$ similares, se puede realizar sobre los espectros de HSQC la integración de la región anomérica. Los resultados se observan en la Tabla 5.26 (en la construcción de la tabla no se consideró la señal del almidón de florídeas).

Para comparar los resultados obtenidos por RMN con los previos, se construyó luego la Tabla 5.27 donde se presentan los resultados para las unidades de α -L-galactosa que se obtuvieron de los análisis de azúcares componentes y de metilación.

Tabla 5.26 Asignación y cuantificación relativa de las unidades α -L-galactosa por RMN-HSQC.

Señal (ppm) ^{13}C ; ^1H	Unidad	3.1	3.2	4.1
101,6; 5,28	4LG ^a	48	46	49
101,3; 5,07	4LG3Y	9	–	–
99,5; 5,54	4LG2S	17	17	20
98,9; 5,50	4LG2M ^a	10	10	9
98,9; 5,14	4LAG	9	15	9
97,6; 5,30	4LAG2S	8	12	13

^a Podría contener a la señal de la 4LG3M.

Tabla 5.27 Cuantificación relativa de las unidades de α -L-galactosa por técnicas químicas.

Unidad	3.1	3.2	4.1
4LG	20	38	34
4LG3Y	26	-	-
4LG2S	4	19	20
4LG2M	20	19	22
4LG3M	18	9	9
4LAG	9	9	10
4LAG2S	3	6	5

Al comparar ambas tablas se puede apreciar que existen diferencias considerables en las proporciones de algunas unidades. Las más importantes y sistemáticas son la subvaluación de la 4LG2M y la sobrevaloración de las unidades de 3,6-anhidrogalactosa que ocurren en el HSQC con respecto al análisis químico.

La respuesta diferente de las unidades de 3,6-anhidro- α -L-galactosa con respecto a las otras unidades con la misma configuración puede deberse a las distintas magnitudes de $^1J_{\text{C-H}}$. Mientras que las unidades de 3,6-anhidro- α -L-galactosa toman la conformación $^4\text{C}_1\text{-L}$ (equivalente a $^1\text{C}_4\text{-D}$, ver Capítulo 6) con el H anomérico en posición axial, el resto de las

unidades de α -L-galactosa poseen el H-1 ecuatorial ya que se encuentran como 1C_4 (equivalente a 4C_1 -D). Como se explicó anteriormente, las diferentes orientaciones de los H generan una diferencia de aproximadamente 10 Hz en la ${}^1J_{C-H}$, y en consecuencia diferente respuesta en el HSQC. Además, siguen existiendo diferencias no explicables por este hecho, como la baja respuesta de la 4LG2M en el RMN (o la alta respuesta por métodos químicos). En función de las proporciones determinadas por ambos métodos, se podría afirmar que el carbono anomérico de la 4LG3M se superpondría con el correspondiente al de la 4LG (101,6 ppm).

5.2.6 Estructura de los coralinanos aislados de *Jania rubens*

De acuerdo a los antecedentes sobre el tema y a los resultados obtenidos en este trabajo utilizando métodos químicos y espectroscópicos, se puede afirmar que los polisacáridos aislados del alga *J. rubens* con agua a temperatura ambiente (luego de la destrucción de la capa de carbonato de calcio) están constituidos fundamentalmente por una estructura alternante $[\rightarrow 3)\text{-}\beta\text{-D-Gal-(1}\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-L-Gal-(1}\rightarrow]$ del tipo agarano, modulada con diferentes sustituyentes. La estructura central se encuentra además modificada por el reemplazo de unidades de α -L-galactosa con unidades de 3,6-anhidro- α -L-galactosa.

Se determinaron en la cadena central del xilogalactano las siguientes sustituciones:

- a) La posición 6 de la unidad de β -D-galactosa con cadenas laterales de xilosa, 3-O-metil-galactosa (D y L) y cantidades menores de metoxilo y sulfato .
- b) Las posiciones 2 y 3 de las unidades de α -L-galactosa con grupos metoxilo (pero no con ambas a la vez).
- c) La posición 2 de las unidades de α -L-galactosa y de 3,6-anhidro- α -L-galactosa con grupos sulfato.
- d) Las posiciones 3 y 6 de las unidades de α -L-galactosa con cadenas laterales de xilosa y/o galactosa (o alguno de sus derivados metilados).

Para determinar las proporciones de los sustituyentes en las distintas unidades se decidió transformar la Tabla 5.8 expresando los resultados en base a 100 galactosas de

cadena. Para su construcción se asumió en base a los resultados obtenidos en este capítulo que todas las unidades de D-xilosa, 3-*O*-metil-D-galactosa y 2,3-di-*O*-metil-D-galactosa son unidades terminales. Además, los estudios de etilación permitieron determinar que una parte de las unidades de 3-*O*-metil-L-galactosa también están como unidades terminales. En las fracciones **2** y **3.1** se encontraron pequeñas cantidades de D-galactosa terminal que pueden provenir de extremos no reductores de la cadena central, y así se consideraron en los cálculos (Tabla 5.28).

Tabla 5.28 Azúcares componentes de los coralinanos de *J. rubens* (moles/100 moles de galactosas de cadena)

Azúcar/Fracciones	2	3.1	3.2	4.1	4.2	5.1	5.2	6	7
D-Gal	39	38	48	51	53	50	51	50	51
6- <i>O</i> -Me-D-Gal	6	4	2	1	1	1	1	1	2
L-Gal	31	29	25	27	28	27	29	29	31
2- <i>O</i> -Me-L-Gal	12	12	11	10	10	9	10	11	10
3- <i>O</i> -Me-L-Gal	6	6	4	3	2	1	1	1	2
3,6-An-L-Gal	6	6	8	7	6	10	7	7	3
3,6-An-2- <i>O</i> -Me-L-Gal	1	1	1	-	-	2	1	1	-
Man	5	1	-	-	-	-	-	-	-
Glc	6	3	1	-	-	-	-	-	-
Relación D/L	44/56	46/54	51/49	53/47	54/46	51/49	53/47	52/48	54/46
Unidades terminales									
Xil	42	43	45	44	41	44	42	43	38
3- <i>O</i> -Me-D-Gal	10	10	6	4	2	1	-	-	-
2,3-di- <i>O</i> -Me-D-Gal	4	3	1	-	-	-	-	-	1
3- <i>O</i> -Me-L-Gal	5	5	2	1	1	1	1	1	1

Puede observarse que la relación entre las unidades D y L de las galactosas de cadena es muy similar a 1. La mayor diferencia con este valor se registra en las fracciones **2** y **7**, o sea aquellas eluidas al principio y al final de la columna de intercambio iónico.

En base a estos datos, se establecieron las proporciones para las distintas unidades monosacarídicas (Tabla 5.29).

Tabla 5.29 Estructura de los coralinanos de *J. rubens* (moles/200 moles de galactosas de cadena)

Azúcar/Fracciones	2	3.1	3.2	4.1	4.2	5.1	6	7
3DG	7	11	8	9	7	6	6	6
3DG6M	13	9	4	2	2	2	2	4
3DG6Y + 3DG6S	80	80	88	89	91	92	92	90
4LG	18	19	16	19	16	27	22	28
4LG2S	11	15	22	21	24	20	20	22
4LG2M	22	22	22	21	22	18	24	22
4LG3M	11	11	8	6	4	2	2	2
4LG3Y	18	19	10	9	4	2	2	4
4LG6Y	7	2	2	9	16	6	13	15
4LAG	6	6	8	8	7	10	8	4
4LAG2S	5	5	8	7	6	10	7	3
4LAG2M	2	2	2	-	-	4	2	-
Unidades terminales (Y)								
Xil	83	86	90	88	82	89	86	76
3-O-Me-D-Gal	21	21	12	8	4	1	-	-
3-O-Me-L-Gal	10	9	4	2	2	2	2	2
2,3-di-O-Me-D-Gal	8	6	2	-	1	1	1	2

Los estudios de metilación demostraron que la mayoría de las unidades de β -D-galactosa enlazadas por C-4 están sustituidas además por la posición 6. Mientras que más del 80% de estas unidades posee algún sustituyente adicional en C-6, sólo una pequeña proporción no está sustituida. Las unidades de β -D-xilosa (terminal) son los sustituyentes mayoritarios del C-6 y los grupos metoxilo (sólo importante en el caso de las fracciones 2 y

3.1) y sulfato los minoritarios.

La variedad de posibles sustituyentes unidos al C-6 de las unidades de β -D-galactosa llevaron a definir un grupo **Y** que puede estar formado por xilosa, 3-*O*-metil-D-galactosa, 3-*O*-metil-L-galactosa y 2,3-di-*O*-metil-galactosa, como cadenas laterales simples.

En la desulfatación quedo demostrado que también existen en estos polisacáridos unidades de β -D-galactosa 6-sulfato (3DG6S), aunque dada la escasa cantidad presente y las limitaciones de este tipo de estudios no fue posible discriminar su proporción.

La posible sustitución con 3-*O*-metil-galactosa y 2,3-di-*O*-metil-D-galactosa es importante sólo en las primeras fracciones (**2** y **3**).

En la cadena central de los coralinanos aislados del alga *J. rubens* las unidades α -L pueden ser galactosa o 3,6-anhidrogalactosa, las cuales a su vez pueden estar o no sustituidas.

El análisis de azúcares componentes determinó la sustitución con metoxilos en las posiciones C-2 y C-3 de la galactosa y una muy pequeña cantidad en la C-2 de la 3,6-anhidrogalactosa. Todas estas unidades pertenecen a la serie L.

Se pudo determinar fehacientemente que la sustitución con grupos sulfato ocurría en la posición C-2 de las unidades de α -L-galactosa y 3,6-anhidro- α -L-galactosa. La proporción de 4LG2S es mayor en los polisacáridos eluidos al final de la columna de intercambio iónico. La presencia de 3,6-anhidro- α -L-galactosa 2-sulfato fue comprobada especialmente por técnicas de RMN, ya que no pudo ser cuantificada de manera certera en los estudios de metilación. La relación entre la 3,6-AnGal y su derivado sulfatado es cercana a 1 según se desprende de la integración de los espectros de HSQC.

La desulfatación no evidenció la presencia de grupos sulfato en otras posiciones de las unidades de α -L-galactosa, con lo cual la sustitución en las posiciones 3 y 6 de estas unidades queda restringida a cadenas laterales (**Y**). La identidad de estas ramificaciones es difícil de determinar, aunque es llamativo que los polisacáridos con más 4LG3Y y 4LG6Y (**2** y **3.1**) son a la vez los que tienen más cantidad de 3-*O*-metilgalactosa y 2,3-di-*O*-metilgalactosa terminales, lo que sugiere que ambos podrían estar presentes en esos sitios.

Para las primeras fracciones se pueden observar diferencias considerables en lo que respecta a la cantidad de unidades ramificadas y de unidades terminales, lo que podría denotar una estructura del polisacárido más compleja que la expuesta anteriormente o una carencia de la metodología utilizada en su estudio.

En función de las características estructurales determinadas para las distintas

fracciones, las mismas se agruparon según algunas similitudes.

5.2.6.1 Grupo Principal

Este grupo está formado por las fracciones **4.1**, **4.2**, **5.1** (probablemente **5.2**), **6** y **7**, aunque **4.1** y **7** constituyen los límites del grupo. Este grupo representa el 70% del material eluido de la columna, de manera que define la estructura básica de los coralinanos aislados del alga *J. rubens*. Las fracciones son similares en su composición y peso molecular, más allá de pequeñas diferencias en cuanto a la cantidad de sulfato, peso molecular y proporciones de algunas unidades .

En el grupo principal, más del 90% de las unidades de β -D-galactosa están sustituidas en la posición 6. De ellas, un 90% están sustituidas con β -D-xilosa (Tabla 5.30). La presencia de pequeñas proporciones de unidades de 3-O-metilgalactosa terminal también podría indicar que estas se unen al C-6 de la β -D-galactosa. Sin embargo, como la proporción de 3-O-Me-Gal aumenta con la sustitución en C-3 de las unidades de α -L-galactosa, podría suponerse que las únicas unidades glicosídicas sustituyendo la β -D-Gal son las de xilosa.

Tabla 5.30 Estructura promedio de las fracciones que conforman el grupo principal de los coralinanos de *J. rubens* (moles/200 moles de galactosas de cadena)

Unidades β -D		Unidades α -L	
3DG	7	4LG	22
3DG6M	2	4LG2S	21
3DG6X	84	4LG2M	22
3DG6S	7	4LG3M	3
		4LG3(G3M)	4
		4LG6(G3M)	12
		4LAG	7
		4LAG2S	7
		4LAG2M	1

Las proporciones de grupos metoxilo y sulfato en C-6 de la D-galactosa son muy pequeñas en comparación a lo determinado en otros coralinanos^{7,10}. Mientras que la sustitución con metoxilo ronda el 2%, la proporción de sulfato es de aproximadamente 7%. La sustitución con sulfato en los polisacáridos de este grupo encuentra su mínimo en la fracción 4.1 y su máximo en la 7. La β -D-galactosa no sustituida representa el 7% de la totalidad de las unidades con esa configuración.

Como ya se ha explicado, existen en estos polisacáridos mayores variaciones en las unidades con configuración α -L. La α -L-galactosa no sustituida está presente en aproximadamente un 22%, el resto de las unidades con esta configuración pueden estar sustituidas en C-2 con grupos sulfato y metoxilo, en C-3 con grupos metoxilo y cadenas laterales, y en C-6 con cadenas laterales (Tabla 5.30). Además un 15% promedio corresponde a unidades de 3,6-anhidrogalactosa y/o sus derivados metilados y sulfatados en C-2. Este monosacárido representa un importante desviación de la estructura conocida hasta ahora para los coralinanos.

Además de las importantes cantidades de 3,6-AnGal, otra gran diferencia de los coralinanos aislados de *J. rubens* con los obtenidos de otras algas del mismo orden, es la alta proporción de 4LG3Y. Se demostró que Y en las mencionadas unidades no es un grupo sulfato, sino que sería un monosacárido terminal. Si toda la xilosa está enlazada a las unidades de β -D-galactosa, se puede suponer que Y es fundamentalmente 3-O-metilgalactosa (D y L). Esta asunción es también válida para las unidades 4LG6Y.

La presencia de 3-O-Me-Gal como cadena lateral fue encontrada hasta ahora sólo en algunos polisacáridos aislados del alga carragenofita *Rhabdonia verticulata*^{39,40}.

5.2.6.2 Grupo minoritario

Este grupo está formado por las fracciones 2 y 3.1 (3.2 es el límite intermedio con el grupo principal). Estos polisacáridos comparten entre sí las características de poseer bajo peso molecular y de ser altamente ramificados. Entre las unidades terminales pueden encontrarse la xilosa, la 3-O-metil-D-galactosa, la 3-O-metil-L-galactosa y 2,3-di-O-metil-D-galactosa. En las fracciones 2 y 3.1 las galactosas metiladas terminales son especialmente importantes. Como ya se ha explicado, se observó que las unidades terminales se encuentran en mayor proporción que los puntos de ramificación, lo que impide determinar algunos detalles menores de esta

estructura compleja (Tabla 5.31).

La proporción de unidades de β -D-galactosa sustituidas en C-6 es inferior a la encontrada en los polisacáridos que conforman el grupo principal. En consecuencia al existir un exceso de unidades de xilosa terminales con respecto a las unidades de β -D-galactosa queda abierta la posibilidad que parte de esa pentosa pueda estar también unida a la α -L-galactosa (Tabla 5.31).

En este grupo es importante también la sustitución en C-6 de la β -D-galactosa con grupos metoxilo. Para estas estructuras se determinaron valores de 3DG6M cercanos al 10%. Se encontró una proporción similar de unidades de β -D-galactosa no sustituidas.

La presencia de 3DG6S no pudo ser determinada para las fracciones de este grupo, aunque es probable que existan pequeñas cantidades de la misma.

La mayor diferencia que se encuentra entre la estructura del grupo principal y la del minoritario en las unidades de configuración α -L, es la fuerte presencia de unidades sustituidas en C-3 con cadenas laterales en este último grupo. Se puede suponer que los principales sustituyentes serían 3-O-Me-Gal y 2,3-di-O-Me-D-Gal, aunque es altamente probable que también aparezca algo de xilosa terminal.

Tabla 5.31 Estructura promedio de las fracciones que conforman el grupo minoritario de los coralinanos de *J. rubens* (moles/200 moles de galactosas de cadena)

Unidades β -D		Unidades α -L	
3DG	9	4LG	18
3DG6M	11	4LG2S	13
3DG6X	78	4LG2M	22
3DG6S	ND	4LG3M	11
		4LG3Y	18
		4LG6Y	5
		4LAG	6
		4LAG2S	5
		4LAG2M	2

Y = Xil 15%, 3-O-Me-D-Gal 46%, 3-O-Me-L-Gal 23%, 2,3-di-O-Me-D-Gal 16%.

5.2.6.3 Fracción 3.2. Estructura intermedia

La estructura de la fracción 3.2 es de transición entre el grupo principal y el minoritario.

Tabla 5.32 Estructura de la fracción 3.2 (moles/200 moles de galactosas de cadena).

Unidades β -D		Unidades α -L	
3DG	8	4LG	16
3DG6M	4	4LG2S	22
3DG6X	88	4LG2M	22
3DG6S	ND	4LG3M	8
		4LG3Y	10
		4LG6Y	2
		4LAG	8
		4LAG2S	8
		4LAG2M	2

La estructura de esta fracción está marcada por la alta sustitución con β -D-xilosa del C-6 de la β -D-galactosa, incluso mayor que en los polisacáridos que conforman el grupo mayoritario. La sustitución con sulfato de estas unidades, al igual que en el grupo minoritario, es tan pequeña que no pudo ser determinada. La proporción de unidades de 3LG6M es intermedia a la encontrada en los dos grupos antes descritos.

Mientras que las proporciones de 3,6-anhidro- α -L-galactosa y sus derivados son más próximas a las halladas en el grupo principal, las de 3-O-Me-Gal son similares a las determinadas para las estructuras del grupo minoritario.

La sustitución del C-2 de la unidad de α -L-galactosa con grupos sulfato es considerable. La presencia de unidades glicosídicas unidas al C-3 y C-6 de las α -L-galactosas coincide con la estructura promedio del grupo minoritario: mientras que la cantidad de 4LG3Y es alta, la de 4LG6Y encuentra su mínimo.

5.3 Conclusiones

En este Capítulo se presentan las estructuras de los xilogalactanos sulfatados aislados del alga *Jania rubens*. El estudio fue realizado aplicando tanto metodologías preexistentes, como otras nuevas desarrolladas en este trabajo y presentadas en capítulos anteriores.

Los resultados demostraron que los polisacáridos poseían características similares a otros estudiados previamente, pero también algunas distintivas de mucha importancia. Se determinaron para los xilogalactanos de *J. rubens* las siguientes características:

- a) una cadena central de agarano altamente sustituido con grupos metoxilos.
- b) alta proporción de ramificaciones simples de D-xilosa, 3-*O*-metilgalactosa (D y L) y 2,3-di-*O*-metil-D-galactosa unidas a C-6 de la β -D-galactosa, y los C-3 y C-6 de la α -L-galactosa.
- c) proporciones importantes de 3,6-anhidro- α -L-galactosa (y derivados sulfatados o metoxilados en C-2).
- d) grupos sulfato mayoritariamente en la posición C-2 de la α -L-galactosa y de la 3,6-anhidrogalactosa.

La presencia de 3,6-anhidrogalactosa en los polisacáridos de *J. rubens* es la principal propiedad distintiva con respecto a otros coralinanos. Esta característica permite ubicar a estos polisacáridos en la representación del prisma triangular (Capítulo 1) fuera del vértice donde se los colocaba hasta el momento y sobre la arista que incluye a los agaranos con 3,6-AnGal y sin α -L-galactosa 6 sulfato.

Los resultados aquí obtenidos demuestran claramente la necesidad de un estudio más profundo de nuevos biopolímeros generados por las algas del orden Corallinales para lograr una mayor comprensión sobre el tema y así evitar tomar conclusiones definitivas sobre detalles estructurales.

Bibliografía

1. Stortz, C. A.; Cerezo, A. S. *Curr. Top. Phytochem.*, **2000**, 4, 121-134.
2. Soliman, F. M.; El Tohamy, S. F.; Fathy, M. M.; Ramadan, A.; Afyfy, N. A.; Sanad, O. *A. J. Drug Res. Egypt*, **1994**, 21, 155-165.
3. Soliman, F. M.; El Tohamy, S. F.; Fathy, M. M.; Ramadan, A.; Afyfy, N. A.; Sanad, O. *A. J. Drug Res. Egypt*, **1994**, 21, 165-172.
4. Mendoza, M. L. *Naturalia Patagonica*, **2002**, 1, 51-59.
5. Takano, R.; Hayashi, J.; Hayashi, K.; Hara, S.; Hirase, S. *Bot. Mar.*, **1996**, 39, 95-102.
6. Cases, M. R.; Stortz, C. A.; Cerezo, A. S. *Phytochemistry*, **1992**, 31, 3897-3900.
7. Cases, M. R. Tesis Doctoral. "Estudio del sistema de polisacáridos del alga calcárea *Corallina officinalis*", FCEyN-UBA, **1995**.
8. Stevenson, T. T.; Furneaux, R. H. *Carbohydr. Res.* **1991**, 210, 277-298.
9. Cases, M. R.; Cerezo, A. S.; Stortz, C. A. *Carbohydr. Res.*, **1995**, 269, 333-341.
10. Cases, M. R.; Stortz, C. A.; Cerezo, A. S. *Int. J. Biol. Macromol.*, **1994**, 16, 93-97.
11. Usov, A. I.; Bilan, M. I.; Klotchkova, N. G. *Bot. Mar.* **1995**, 38, 43-51.
12. Usov, A. I.; Bilan, M. I.; Shashkov, A. S. *Carbohydr. Res.*, **1997**, 303, 93-102.
13. Usov, A. I.; Bilan, M. I. *Bioorg. Khim.*, **1998**, 24, 139-146.
14. Turvey, J. R.; Simpson, P.R. *Proc. Int. Seaweed Symp.*, **1965**, 5, 323-327.
15. Navarro, D. A.; Stortz, C. A. *Carbohydr. Polym.*, **2002**, 49, 57-62 .
16. Ricci, A. M.; Navarro, D. A.; Stortz, C. A. Resultados no publicados.
17. Ciucanu, I. ; Kerek, F. *Carbohydr. Res.*, **1984**, 131, 209-217.
18. Dutton, G. G. S. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, **1974**, 30, 10-52.
19. Errea, M. I.; Kolender, A. A.; Matulewicz, M. C. *Bot. Mar.*, **2001**, 44, 133-138.
20. Cases, M. R.; Stortz, C. A.; Cerezo, A. S. *J. Chromatogr. A*, **1994**, 662, 293-299.
21. van de Velde, F.; Knutsen, S. H.; Usov, A.; Rollema, S. H.; Cerezo A. S. *Trends Food Sci. Technol.*, **2002**, 13, 73-92.
22. Kolender, A. A.; Matulewicz, M. C. *Carbohydr. Res.*, **2002**, 337, 57-68.
23. Usov, A. I.; Elashvili, M. Ya. *Bot. Mar.* **1991**, 34, 533-560.
24. Nerinckx, W.; Broberg, A.; Duus, J. Ø.; Ntarima, P.; Parolis, L. A. S.; Parolis, H.; Claeysens, M. *Carbohydr. Res.*, **2004**, 339, 1047-1060.
25. Cardoso, M. A.; Nosedá, M. D.; Fujii, M. T.; Zibetti, R. G. M.; Duarte, M. E. R. *Carbohydr. Res.*, **2007**, 342, 2766-2775.
26. Usov, A. I.; Yarotsky, S. V.; Shashkov, N. D. *Biopolymers*, **1980**, 19, 977-990.
27. Montaña, N. E.; Villanueva, R. D.; Romero, J. B. *J. Appl. Phycol.*, **1999**, 11, 27-34

28. Voelter, W.; Breitmaier, E.; Rathbone, E. B.; Stephen, A. M. *Tetrahedron*, **1973**, 29, 3845-3848.
29. Fernández, P.; Jiménez-Barbero, J.; Martín-Lomas, M. *Carbohydr. Res.*, **1994**, 254, 61-79.
30. Rosado, F. R.; Carbonero, E. R.; Claudino, R. F.; Tischer, C. A.; Kimmelmeier, C.; Iacomini, M. *FEMS Microbiol Lett.*, **2003**, 221, 119-124.
31. Heikkinen, S.; Merja, T. M.; Karhunen, P. T.; Kilpeläinen, L. A. *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, 125, 4362-4367.
32. Lahaye, M. Yaphe, W.; Viet, M. P. T.; Rochas, C. *Carbohydr. Res.* **1989**, 190, 249-265.
33. Knutsen, S. H.; Grasdalen, H. *Bot. Mar.*, **1987**, 30, 497-505.
34. Gonçalves, A. G.; Ducatti, D. R. B.; Paranha, R. G.; Duarte, M. E. R.; Nosedá, M. *Carbohydr. Res.* **2005**, 340, 2123-2134.
35. Welti, D. *J. Chem. Res. (S)*, **1977**, 312-313.
36. Miller, I. A.; Blunt, J. W. *Bot. Mar.*, **2000**, 263-271.
37. Zibetti, R. G. M.; Nosedá, M. D.; Cerezo, A. S.; Duarte, M. E. R. *Carbohydr. Res.* **2005**, 340, 711-722.
38. Bock, K.; Lundt, I.; Pedersen, C. *Tetrahedron Lett.*, **1973**, 13, 1037-1040.
39. Nunn, J. R.; Parolis, H.; Russell, I. *Carbohydr. Res.* **1971**, 20, 205-215.
40. Kochetkov, N. K.; Usov, A. I.; Miroshnikova, L. I. *Zh. Obshch. Khim.* **1970**, 40, 2473-2488 (en ruso).

CAPÍTULO 6

MODELADO MOLECULAR DE 3,6-ANHIDROGLICÓSIDOS

6.1 Introducción

Para comprender las funciones y propiedades de los carbohidratos, es necesario conocer las características tridimensionales que éstos adoptan. Las formas moleculares de los oligosacáridos y de los polisacáridos están determinadas en buena medida por los ángulos de las uniones glicosídicas (Figura 6.1), pero también por la identidad y conformación adoptada por cada monosacárido que constituye el biopolímero¹.

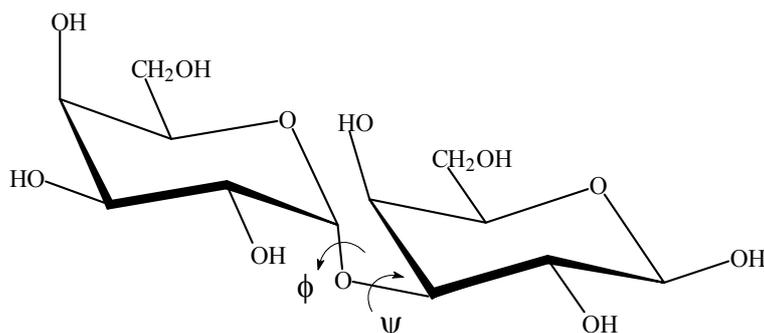


Figura 6.1 Disacárido (α -D-Galp-(1 \rightarrow 4)- β -D-Galp) en el que se muestran los ángulos glicosídicos ϕ y ψ .

Como se ha explicado en los capítulos anteriores, la 3,6-anhidrogalactosa es uno de los constituyentes más importantes de los polisacáridos aislados de algas rojas². La 3,6-anhidrogalactosa o los polímeros que la contienen han sido objeto de estudio en los diferentes capítulos de este trabajo de Tesis. A los fines de ampliar su caracterización, se decidió utilizar las herramientas del modelado molecular para analizar sus conformaciones. Además, el estudio se amplió a otros anhidroglicósidos con el objetivo de comprender cuáles son los factores que influyen en la estabilidad de las conformaciones.

El modelado molecular fue realizado utilizando métodos de mecánica molecular (MM3) y métodos cuánticos (HF/6-31+G** y B3LYP/6-31+G**), con y sin simulación de solvente. Ambos métodos permitieron encontrar las conformaciones más estables de los compuestos estudiados. Además, por MM3 se pudieron construir los mapas energéticos (superficies de “*puckering*”, ver luego). Los métodos cuánticos se utilizaron para optimizar las geometrías más favorables que surgieron de utilizar MM3, e introducir en éstos los modelos de solvente. El método DFT fue elegido por los buenos resultados que había obtenido Csonka³ al modelar distintos hidratos de carbono, y por ser un método que incluye correlación electrónica, la cual no existe en los métodos HF. Además los datos de energía y de conformación fueron comparados con datos experimentales existentes en literatura.

También se presentan los resultados que surgieron de estudiar los confórmeros de tres sistemas del tipo biciclooctano utilizados como compuestos modelo.

6.1.1 Análisis conformacional

El análisis conformacional de los hidratos de carbono se puede realizar utilizando técnicas experimentales tales como rayos X y RMN, indirectamente a través de estudios de reactividad, y también por modelado molecular.

Los estudios cristalográficos por rayos X permiten determinar experimentalmente la conformación molecular, incluyendo las longitudes de enlace y los ángulos. Sin embargo, esta técnica está restringida a aquellas moléculas que pueden ser aisladas en forma cristalina, lo que muchas veces resulta dificultoso⁴. Además de estas complicaciones prácticas, se debe considerar que la estructura tridimensional determinada es en estado sólido, de manera que podría no correlacionarse con sistemas en solución.

Las técnicas de espectroscopía de resonancia magnética nuclear han ayudado a determinar la forma tridimensional de un gran número de moléculas. Los estudios se llevan a cabo normalmente analizando los desplazamientos químicos, las constantes de acoplamiento C-C, C-H y H-H y realizando estudios de NOE. Estos son relativamente sencillos para moléculas pequeñas y no demasiado complejas, aunque resultan dificultosos de realizar para aquellas que poseen gran peso molecular o que presentan superposición de señales.

El equilibrio conformacional existente en solución también puede ser un obstáculo para el análisis ya que, la medición visualiza una conformación promedio que surge de la mezcla de confórmeros. En consecuencia, el análisis podría llevar a una conclusión no real (“conformación virtual”).

Como consecuencia de las limitaciones que existen al emplear las técnicas de RMN y de rayos X, no se conocen completamente las características conformacionales de un gran número de moléculas, entre ellas algunos carbohidratos (monosacáridos, oligosacáridos y especialmente polisacáridos)¹ difíciles de cristalizar o con espectros de RMN complicados.

Una ruta alternativa o complementaria del análisis conformacional es aquella que comprende la utilización de técnicas de modelado molecular (computacionales). Los resultados obtenidos poseen gran valor, especialmente en combinación con los datos que pueden obtenerse en forma experimental. Esta técnica teórica ha permitido en numerosos casos ampliar y comprender mejor los comportamientos conformacionales de las moléculas.

6.1.2 Análisis conformacional por modelado molecular

Del modo más simple, el modelado molecular implica el cálculo de la energía potencial de una dada molécula en un determinado estado conformacional y, eventualmente, la modificación de la posición espacial de sus átomos para generar una estructura en un nuevo mínimo de energía. Luego pueden realizarse tareas más complejas como el graficado de potenciales electrostáticos, la observación de orbitales de frontera, la predicción de los desplazamientos químicos en RMN, etc⁴.

Es habitual que las moléculas posean más de un conformero estable, por lo que suele ser necesario realizar un estudio sistemático completo para encontrar las diversas conformaciones que representan mínimos relativos de energía. De no realizarse, puede incurrirse en el grave error de considerar a una dada conformación molecular como la más estable, cuando en realidad ésta sólo se encuentra en un mínimo energético local y no en el global. Este tipo de sucesos que conllevan a errores de interpretación está vinculado con el llamado “problema de los mínimos múltiples”^{1,5}.

Las búsquedas conformacionales permiten obtener un conjunto de estructuras de diferentes energías relativas, que suelen expresarse en función de las coordenadas de los átomos. Esta función multidimensional se conoce como “superficie de energía potencial” (PES, según su abreviatura en inglés), que es en realidad una hipersuperficie en $3n-6$ dimensiones (donde n es el número de átomos). La expresión gráfica simplificada de estas relaciones permite observar zonas correspondientes a múltiples conformeros con mínima energía y zonas de máximos energéticos (respecto de una variable), que representan barreras de interconversión¹.

La energía potencial en función de las posiciones de los átomos puede calcularse utilizando diferentes métodos: los basados en mecánica cuántica, los semiempíricos y los que utilizan campos de fuerzas empíricos (mecánica molecular).

Dentro de los métodos cuánticos (QM), están los que resuelven la ecuación de Schrödinger con pocas aproximaciones (conocidos como métodos *ab initio*), como por ejemplo Hartree-Fock (HF). Dentro del grupo de los QM también se encuentran aquellos que utilizan la teoría de funcionales de densidad (“density functional theory”, DFT). Estos métodos no intentan resolver la ecuación de Schrödinger, sino que expresan la energía de un sistema en términos de la densidad electrónica^{4,6,7}.

Los métodos cuánticos requieren una gran demanda computacional, ya que calculan un gran número de integrales. Sin embargo, la rigurosidad del cálculo no garantiza por sí

misma que los resultados obtenidos sean mejores que otros logrados con métodos más simples⁴.

El avance permanente de la capacidad de cálculo de las computadoras ha permitido que el número de trabajos que utilizan QM crezca continuamente, y que las bases utilizadas sean más complejas y así los resultados sean más confiables.

En pos de ahorrar tiempo y recursos (especialmente con moléculas más complejas), los procedimientos de mecánica cuántica pueden simplificarse sustituyendo algunos términos de las integrales con valores empíricos. Estos métodos denominados semiempíricos, como el AM1 y PM3, han funcionado bien para un gran número de moléculas, aunque no han dado buenos resultados en el campo de carbohidratos⁴.

Los métodos más utilizados en los carbohidratos han sido tradicionalmente los de naturaleza empírica (mecánica molecular). En ellos, la energía potencial es expresada como la sumatoria de términos relativamente sencillos en los que contribuyen la compresión-estiramiento de los enlaces, la deformación de los ángulos de unión y diferentes interacciones a distancia (electrostáticas, enlace hidrógeno y van der Waals).

Entre los métodos de mecánica molecular, el campo de fuerza MM3 ha sido uno de los más utilizados para los hidratos de carbono. Esto se debe a que éste tiene en cuenta en su parametrización la presencia del enlace hidrógeno con contribución angular, penalizaciones energéticas adecuadas para la deformación de anillos y los efectos anomérico y *exo-anomérico*. Este campo de fuerza fue aplicado para un gran número de carbohidratos, obteniéndose en la mayoría de los casos resultados muy satisfactorios. Fueron especialmente significativos los estudios realizados por Dowd y colaboradores sobre disacáridos con diferentes formas de unión^{8,9}.

La eficacia del MM3 ha sido puesta en duda en algunas ocasiones, aunque el único caso para el cual los resultados se alejaban de la realidad fue cuando se modeló la sacarosa. La justificación para los errores encontrados fue explicada por la probable superposición de efectos anoméricos⁴.

6.1.3 Estudio conformacional computacional de monosacáridos

Los monosacáridos se encuentran normalmente como ciclos de seis miembros (forma piranósica) o de cinco miembros (forma furanósica), aunque la mayoría de las hexosas y de las pentosas se encuentran naturalmente en la primera forma. Estos anillos piranósicos pueden

adoptar distintas conformaciones tal como se observa en la Figura 6.2. Las mismas pueden ser sillas, una serie de botes y botes torcidos con energías similares y baja energía de interconversión entre ellos, y un grupo de semisillas y sobres.

Todas estas conformaciones indicadas son las “ideales”, pero en realidad existe un número infinito de formas intermedias entre ellas¹.

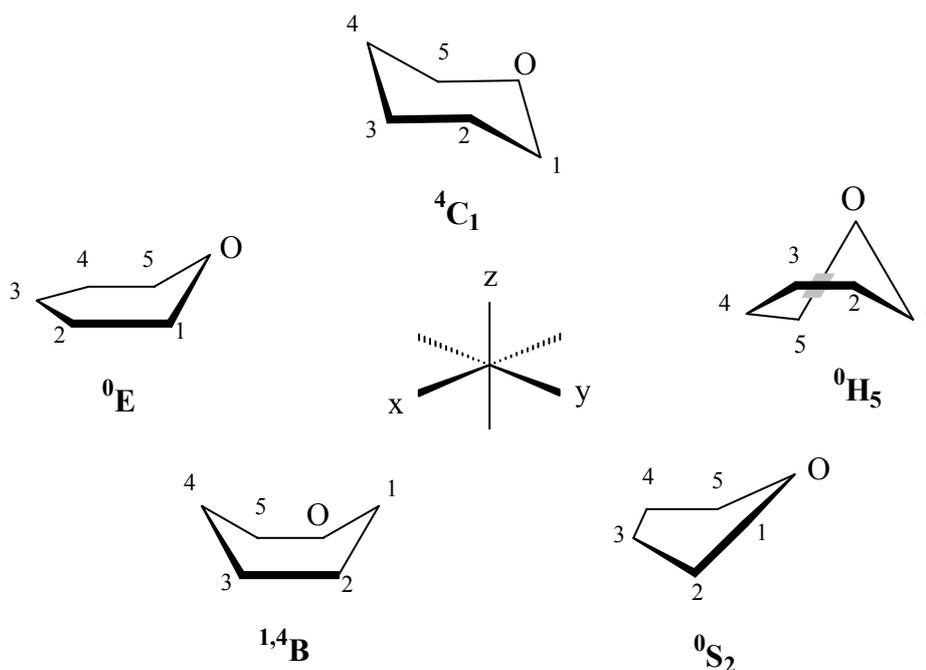


Figura 6.2 Representación de algunos conformeros de aldosas piranósicas: **C** = silla (*chair*), **B** = bote, **S** = bote torcido (*skew*), **H** = semisilla (*half chair*) y **E** = sobre (*envelope*).

Nota: por simplicidad no se indican sustituyentes

Mediante estudios de RMN y de cristalografía, se ha encontrado que la mayoría de las hexosas (D-alosa, D-glucosa, D-galactosa, etc) adopta la conformación 4C_1 (silla) como forma más estable. Para la α -D-altrosa se determinó por RMN, que la otra silla (1C_4) también era estable y estaba en equilibrio con la “normal” (4C_1). La excepción a estas características de las hexosas son la idosa y sus derivados¹⁰, ya que además de estar presentes en las formas silla, también existen como botes torcidos del tipo 0S_2 . Este hecho es especialmente relevante para la química de algunos glicosaminoglicanos que contienen ácido idurónico 2-sulfato¹¹.

En el caso de los monosacáridos y derivados, el interés primario del estudio computacional está en determinar la forma del anillo. Este se puede describir por su *puckering*, es decir por la desviación longitudinal de su forma plana¹. Una forma de

representarlo numéricamente es mediante los parámetros de *puckering* Q , ϕ y θ desarrollados por Cremer y Pople¹².

La magnitud de *puckering* Q es una medida de la desviación del anillo respecto del plano (en Å), mientras que ϕ y θ son ángulos que reflejan los desvíos relativos de los distintos átomos del anillo. La utilización de estos parámetros facilita notablemente la clasificación de los conformeros de los anillos de seis y cinco miembros, permitiendo describirlos tanto en determinaciones experimentales como en las computacionales.

Los tres parámetros de *puckering* pueden ser adaptados a un sistema de coordenadas esféricas, con los cuales se puede generar una representación estereográfica similar a un planeta¹³ (Figura 6.3). En esta esfera las conformaciones sillas de los azúcares se ubican en los polos. Una silla perfecta 4C_1 tiene un $\theta = 0^\circ$ (Polo Norte), mientras la 1C_4 tiene un $\theta = 180^\circ$. La región de botes es aquella que posee un $\theta = 90^\circ$ (zona del ecuador). En estos casos intermedios, el parámetro ϕ es el que define la conformación. Por ejemplo, un $B_{1,4}$ (bote) tiene un $\phi = 60^\circ$ mientras que un 1S_5 posee un $\phi = 270^\circ$ (bote torcido). Los sobres y semisillas se ubican entre los polos y el ecuador ($\phi = 51, 55, 125$ y 129°).

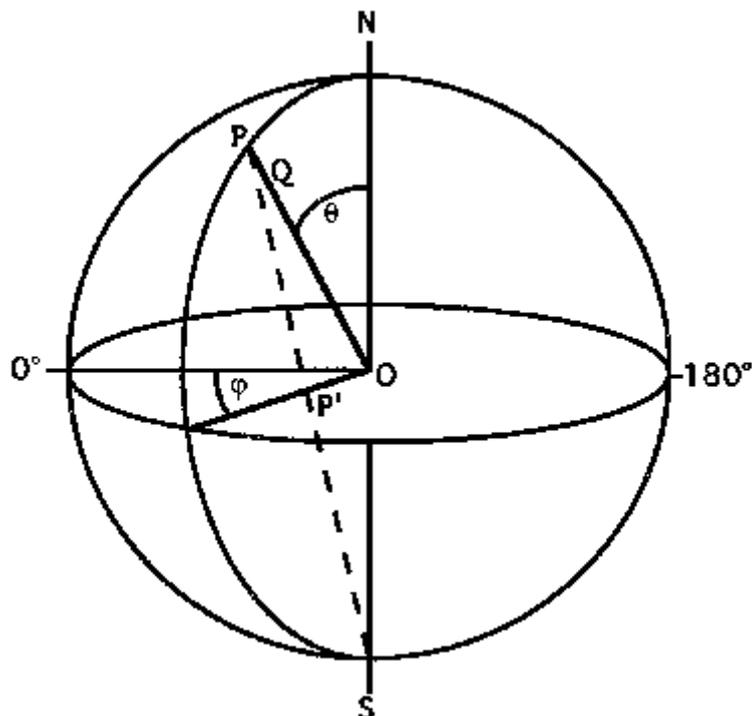


Figura 6.3 Esfera conformacional para anillos de seis miembros en función de los parámetros de *puckering* de Cremer y Pople.

Los estudios por modelado molecular generan los datos de geometría junto con los valores de energía relativas de cada conformero. En consecuencia, se puede realizar un análisis de *puckering* representando cada conformero por 4 variables, ϱ , ϕ , θ y el valor de energía correspondiente. Con este conjunto de datos es posible generar contornos de isoenergía dentro de la esfera, que definen las zonas correspondientes a los conformeros más y menos estables. Sin embargo, estas representaciones en la esfera en muchas ocasiones son difíciles de implementar, y en consecuencia complicadas para visualizar e interpretar.

Dado que en general no se observan grandes variaciones en la magnitud ϱ , se puede considerar que la mayoría de las variaciones del *puckering* se ubican en la superficie de la esfera. Es así que bajo esta suposición, se puede realizar una representación plana rectangular, similar a una proyección del tipo *plateau carrée* de la superficie de la Tierra, tal como lo hicieron Pickett y Strauss¹⁴. La representación y localización de los conformeros representados por los parámetros de *puckering* se pueden observar en la Figura 6.4. Por costumbre, se suele graficar la zona de 0° (4C_1) en la parte inferior, y la de la conformación 1C_4 (180°) en la parte superior del gráfico. Luego los contornos de isoenergía pueden graficarse en esta representación en función de los parámetros ϕ y θ .

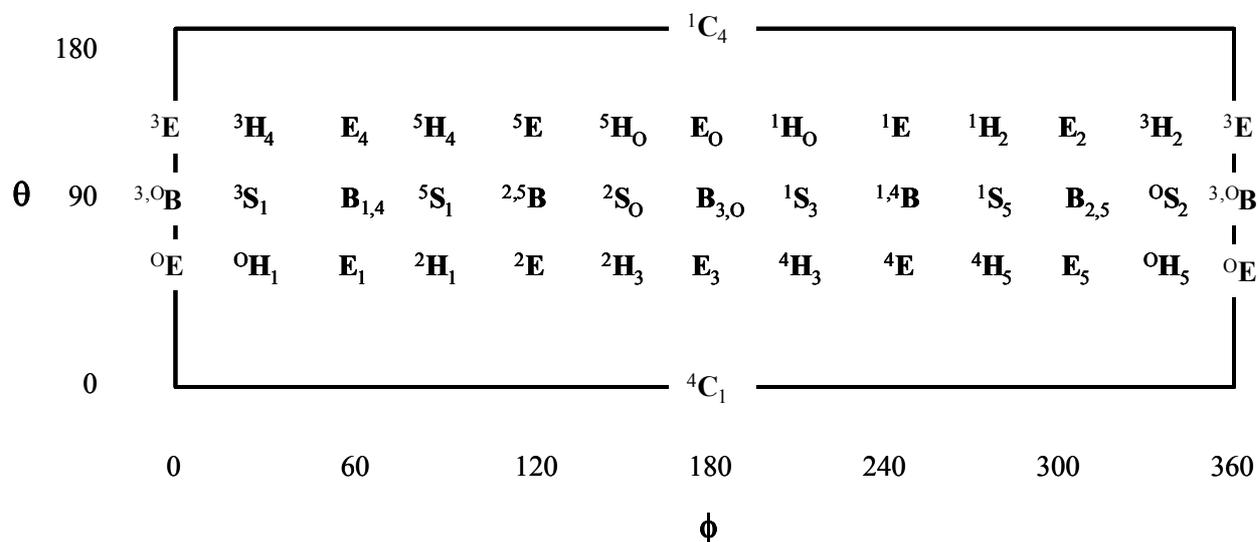


Figura 6.4 Localización de conformeros en función de los parámetros de *puckering* de Cremer y Pople.

Las superficies de energía de los conformeros de las hexosas han sido bastante estudiadas. En 1979 por mecánica molecular se estudió el espacio conformacional de la glucopiranosas¹⁵; siete años más tarde Ragazzi *et al.* dibujaron una proyección de contornos

isoenergéticos obtenidos del estudio del ácido 4-*O*-metil- α -L-idopiranosilurónico 2-sulfato¹⁶. Luego durante los años 90, con la mejora de la capacidad computacional aumentaron notablemente este tipo de estudios. Ferro *et al*¹⁷ y French y Dowd, por diferentes caminos, presentaron utilizando mecánica molecular (MM3) los mapas energéticos completos de una serie de hexosas y pentosas barriendo todo el espacio esférico conformacional^{10,18,19}.

Sin embargo, el estudio conformacional de *puckering* de anillos medianamente tensionados como la 3,6-anhidrogalactosa no habían sido realizados de manera completa hasta el desarrollo de esta Tesis. Sólo se habían realizado estudios parciales sobre el metil glicósido de la 3,6-anhidro- α -D-galactosa utilizando mecánica molecular (MM3-(92))²⁰ y métodos *ab initio*^{21,22}. Los resultados limitados por los métodos computacionales utilizados mostraron que el anillo de seis miembros se encontraba restringido a un área pequeña cercana al sistema 1C_4 . Estos resultados coincidían con los obtenidos por cristalografía^{23,24}, pero al no ser completo el análisis no permitió determinar la presencia de otras conformaciones estables.

Experimentalmente se ha demostrado que si bien los 3,6-anhidro- α -D-glicósidos existen en la conformación silla (1C_4) en solventes polares²⁵, en ocasiones podrían coexistir con una conformación próxima a un bote ($B_{1,4}$) en solventes menos polares como el cloroformo^{26,27}. La conformación 4C_1 está prohibida, debido a la presencia del anillo de 5 miembros formado entre el C-3 y C-6.

Para comprender mejor el comportamiento conformacional de los 3,6-anhidroglicósidos se decidió realizar un estudio computacional más completo.

6.2 Resultados

En la Figura 6.5 pueden observarse las moléculas que fueron estudiadas por modelado molecular en este trabajo. Ellos son tres metilglicósidos de 3,6-anhidrohexosas y tres modelos simplificados. Como ya se explicó, el interés principal estaba en la 3,6-anhidro- α -galactosa dado que es un constituyente importante de los polisacáridos de algas rojas, aunque era necesario ampliar el estudio a otros compuestos relacionados, para lograr comprender mejor los factores que pesan en el comportamiento conformacional de este tipo de moléculas.

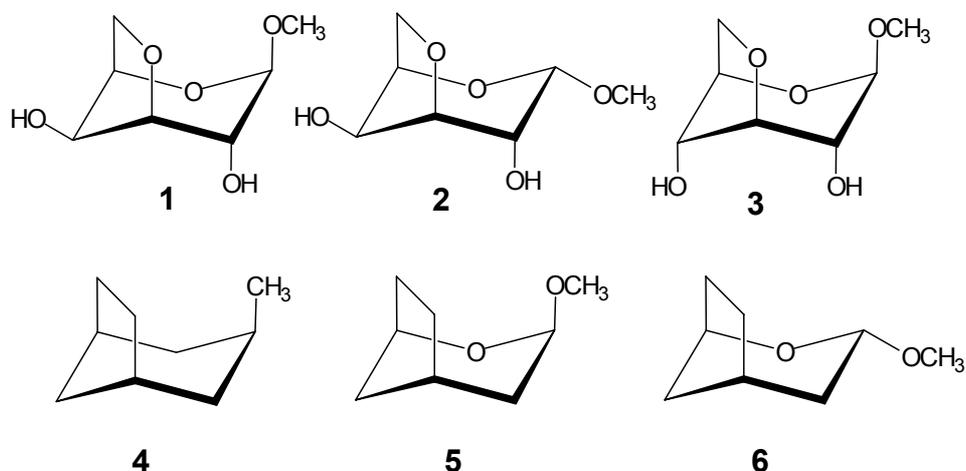


Figura 6.5 Estructuras de los compuestos estudiados, dibujados como conformeros 1C_4 .

6.2.1 Generación de los mapas de *puckering*

Las estructuras de los tres metil glicósidos y la del 3-metilbicyclo[3.2.1]octano (**4**) fueron sometidas a un análisis de superficie de energía potencial (PES) en función de los parámetros de *puckering* ϕ y θ . Para ello se utilizó el programa MM3, con una constante dieléctrica (ϵ) igual a 3. En la Figura 6.6 se pueden observar las mencionadas superficies en función de los parámetros de *puckering* ϕ y θ (mapas adiabáticos) para los compuestos **1-4**. En estos mapas fueron considerados todos aquellos puntos con energía que no exceda en más de 10 kcal/mol a la del mínimo global. Los 4 mapas poseen formas similares, aunque los obtenidos para **1** y **4** están más extendidos en la región de $\theta < 120^\circ$, donde se ubican las conformaciones tipo bote. Como se aprecia, el mapa correspondiente al compuesto **4** es simétrico alrededor de $\phi = 60^\circ$, tal como se esperaría de la simetría molecular (inexistente en **1-3**).

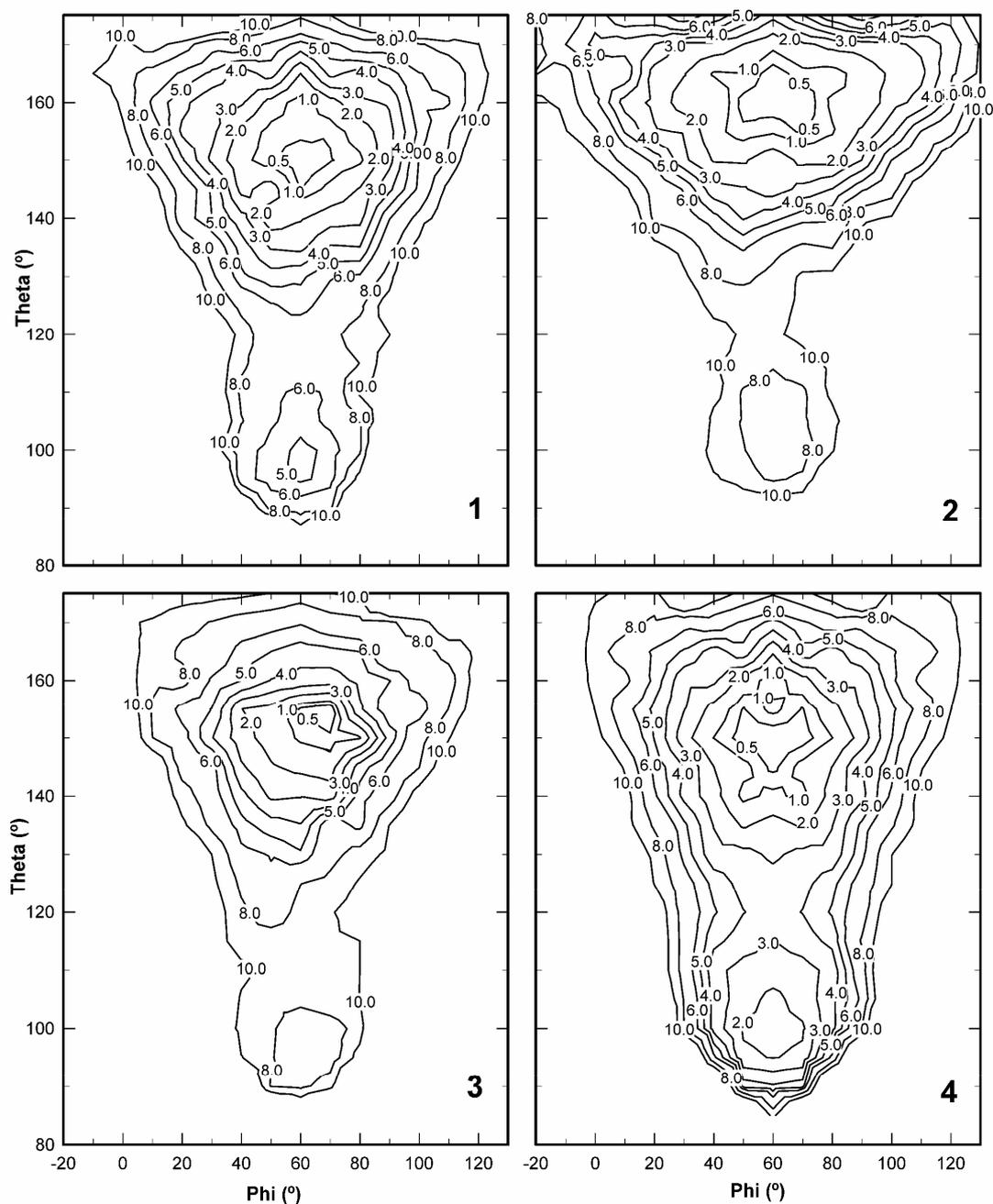


Figura 6.6 Mapas adiabáticos de *puckering* utilizando MM3 ($\epsilon = 3$) con contornos de energía graduados en 0,5, 1, 2, 3, 4, 6, 8 y 10 kcal/mol. (1) metil 3,6-anhidro- β -D-galactopiranosido, (2) metil 3,6-anhidro- α -D-galactopiranosido, (3) metil 3,6-anhidro- β -D-glucopiranosido, (4) 3-metilbiciclo[3.2.1]octano.

En los cuatro mapas puede observarse que los niveles de menor energía relativa se encuentran en dos zonas bien definidas, las correspondientes a $\theta \approx 150-160^\circ$ y a $\theta \approx 100^\circ$.

Los cuatro compuestos poseen mínimos globales que se ubican en la región donde θ es cercana a 150° . Los confórmeros con $\theta \approx 150^\circ$ son del tipo silla 1C_4 , ya que el valor del parámetro θ es cercano al que le corresponde a una silla perfecta ($\theta = 180^\circ$). La diferencia de magnitud del parámetro θ entre la forma ideal y la calculada denota la existencia de una cierta deformación conformacional que se analizará en detalle en las próximas secciones.

La otra región que comprende a confórmeros en regiones de menor energía es la que se halla alrededor de $\theta = 100^\circ$. Esta conformación posee mayor energía que la de los confórmeros tipo silla. La diferencia entre los valores de energía relativa está en el orden de 2 a 8 kcal/mol dependiendo el compuesto analizado. Dada esta diferencia, se puede afirmar que la región $\theta \approx 100^\circ$ representa un mínimo energético local. La conformaciones con $\theta \approx 100^\circ$ se asemejan a la de un bote/bote torcido ya que en estos casos θ es igual a 90° . Nuevamente, la diferencia de valores representa una cierta deformación con respecto a las formas ideales.

Los contornos isoenergéticos de mayor magnitud que se ubican en el resto del gráfico dan cuenta de las conformaciones menos estables que pueden adoptar las moléculas, aunque ninguna representa un mínimo. Estos pueden dar una idea de cual sería la energía de interconversión conformacional.

6.2.2 Conformaciones de menor energía de los 3,6-anhidroglicósidos

Los tres metil 3,6-anhidroglicósidos fueron sometidos a un análisis completo girando las cadenas laterales en las tres posiciones alternadas posibles, con el objetivo de encontrar las estructuras de mínima energía. Se utilizó nuevamente mecánica molecular (MM3) y tres valores de ϵ .

Los resultados mostraron lógicamente que las únicas conformaciones estables que podían adoptar las moléculas modeladas eran 1C_4 , $B_{1,4}$ o alguna variación intermedia entre éstas. Cualquier otra conformación se encuentra prohibida como consecuencia de la restricción producida por el anillo de 5 miembros formado por la unión éter entre los carbonos 3 y 6. En las Tablas 6.1, 6.2 y 6.3 se muestran los valores de energía relativa de las conformaciones más estables. Además se informan los valores de los parámetros de *puckering* y los ángulos de torsión ($\chi_n = H-n-C-n-O-n-H(O)-n$, el último reemplazado por C para χ_1).

Tabla 6.1 Energías relativas, ángulos de torsión y parámetros de *puckering* de los principales conformeros del metil 3,6-anhidro- β -D-galactopiranosido (1).

Método/conformero	E_{rel} (kcal/mol)	Angulo torsional			Parámetros de <i>puckering</i>		
		χ_1	χ_2	χ_4	Q (Å)	θ (°)	ϕ (°)
MM3, $\epsilon = 1,5$							
C1	0,00	46	-31	49	0,64	152	61
C2	0,03	46	24	46	0,64	152	62
C3	0,15	45	36	-37	0,64	152	62
B1	3,10	45	-53	151	0,84	99	62
MM3, $\epsilon = 3$							
C1	0,00	45	-36	49	0,64	152	61
C2	0,03	45	35	47	0,64	152	61
C3	0,08	45	40	-43	0,64	152	61
B2	3,45	46	-50	52	0,85	99	57
B3	3,78	45	-49	-42	0,85	99	57
MM3, $\epsilon = 80$							
C2	0,00	44	44	48	0,64	153	60
C3	0,01	44	44	-47	0,64	153	60
C1	0,05	44	-41	48	0,64	153	60
C4	0,07	44	-41	-47	0,64	153	61
B2	3,76	44	-50	49	0,84	99	58
B3	3,76	44	-50	-49	0,84	99	58
B4	3,89	42	44	-49	0,84	99	58
B5	3,90	42	43	49	0,84	99	58
B3LYP/ 6-31+G**							
C1	0,00 (0,00) ^a	52	-43	66	0,66	147	62
C3	0,42 (0,13) ^a	51	51	-47	0,66	146	64
C2	0,49 (0,66) ^a	52	41	65	0,66	146	64
B1	0,56 (3,45) ^a	52	-58	157	0,81	104	62
B2	1,33 (2,75) ^a	52	-56	70	0,81	105	57
B3	2,14	52	-55	-49	0,81	106	57
HF/ 6-31+G**							
C1	0,00 (0,00) ^a	53	-42	63	0,65	147	61
C2	0,62	52	36	62	0,65	147	62
C3	0,71	51	48	-47	0,65	147	62
B1	1,60 (3,87) ^a	53	-55	153	0,80	104	60
B2	1,67 (2,55) ^a	54	-52	67	0,81	105	56
B3	2,67	54	-51	-48	0,80	105	56

^a Entre paréntesis figuran las energías relativas considerando el modelo del continuo polarizable en agua.

Tabla 6.2 Energías relativas, ángulos de torsión y parámetros de *puckering* de los principales conformeros del metil 3,6-anhidro- α -D-galactopiranosido (2).

Método/conformero	E_{rel} (kcal/mol)	Angulo torsional			Parámetros de <i>puckering</i>		
		χ_1	χ_2	χ_4	Q (Å)	θ (°)	ϕ (°)
MM3, $\epsilon = 1,5$							
C1	0,00	-47	-84	48	0,66	161	61
B1	6,40	-44	-158	152	0,80	102	63
B2	6,56	-44	-154	54	0,80	102	59
MM3, $\epsilon = 3$							
C1	0,00	-46	-75	48	0,66	161	62
C2	0,30	-46	-73	-38	0,66	162	62
B2	6,12	-43	-161	51	0,80	102	60
B3	6,30	-43	-163	-44	0,80	102	60
MM3, $\epsilon = 80$							
C1	0,00	-44	-56	49	0,66	162	63
C2	0,02	-45	-56	-47	0,66	162	63
B4	5,57	-42	-51	-49	0,80	102	60
B5	5,58	-42	-51	49	0,80	102	60
B3LYP/ 6-31+G**							
C1	0,00 (0,87) ^a	-54	-83	59	0,66	156	58
C2	0,46 (0,00) ^a	-53	-81	-40	0,66	156	58
B1	0,91 (2,76) ^a	-47	-149	157	0,79	105	60
B2	1,62 (2,22) ^a	-47	-142	68	0,79	107	54
B3	2,32	-45	-145	-43	0,80	106	55
HF/ 6-31+G**							
C1	0,00 (0,00) ^a	-55	-79	58	0,66	156	57
C2	0,65 (0,03) ^a	-54	-78	-40	0,66	156	57
B1	3,03 (4,37) ^a	-49	-150	153	0,79	105	58
B2	3,13 (3,76) ^a	-49	-143	67	0,79	107	54
B3	3,99	-48	-147	-43	0,79	106	54

^a Entre paréntesis figuran las energías relativas considerando el modelo del continuo polarizable en agua.

Tabla 6.3 Energías relativas, ángulos de torsión y parámetros de *puckering* de los principales conformeros del metil 3,6-anhidro- α -D-glucopiranosido (**3**).

Método/conformero	E_{rel} (kcal/mol)	Angulo torsional			Parámetros de <i>puckering</i>		
		χ_1	χ_2	χ_4	Q (Å)	θ (°)	ϕ (°)
MM3, $\epsilon = 1,5$							
C1	0,00	46	46	-178	0,61	155	67
B1	5,47	45	-52	-78	0,81	99	55
MM3, $\epsilon = 3$							
C1	0,00	45	46	179	0,61	155	65
C2	0,25	44	177	54	0,61	154	66
C3	0,40	45	-173	-44	0,61	155	64
C4	0,41	45	-27	-175	0,61	155	66
B1	4,46	44	-52	-63	0,80	99	56
B2	4,99	44	-52	52	0,80	99	57
MM3, $\epsilon = 80$							
C5	0,00	44	45	-56	0,61	154	62
C6	0,06	44	-42	-58	0,61	154	62
C7	0,09	44	47	54	0,61	154	63
C8	0,18	44	-42	54	0,61	154	63
B1	4,29	43	-50	-55	0,80	99	57
B2	4,33	43	-50	55	0,80	99	57
B3	4,44	43	43	-55	0,80	99	57
B4	4,47	43	44	55	0,80	99	57
B3LYP/ 6-31+G**							
C2	0,00 (0,00) ^a	49	161	134	0,66	148	69
C1	1,36	51	59	-164	0,64	149	66
C4	1,69	52	-50	-154	0,64	149	65
C3	1,99	50	176	-34	0,64	150	64
B1	3,98 (1,76) ^a	53	-56	-117	0,75	111	54
B2	5,66	50	-57	58	0,78	106	63
HF/ 6-31+G**							
C2	0,00 (0,00) ^a	50	169	82	0,63	147	65
C1	0,56 (0,27) ^a	51	57	-168	0,63	150	66
C4	0,78	53	-43	-155	0,63	149	64
C3	1,27	50	178	-34	0,63	149	63
B1	2,79 (1,03) ^a	53	-53	-85	0,77	107	56
B2	4,48	52	-54	56	0,77	105	62

^a Entre paréntesis figuran las energías relativas considerando el modelo del continuo polarizable en agua.

Las estructuras más estables obtenidas por MM3 fueron sometidas a una nueva minimización con los métodos cuánticos HF/6-31+G** y B3LYP/6-31+G**. Los resultados obtenidos también figuran en las Tablas 6.1, 6.2 y 6.3. En las mismas además están los resultados logrados al adicionarle a los métodos cuánticos un sistema de solvente simulado

mediante el método del continuo polarizable (en agua) a los principales conformeros²⁸.

En las tablas puede observarse para los tres anhidroazúcares que, por todos los métodos de cálculo, los conformeros más estables obtenidos son aquellos que tienen una conformación cercana a la silla 1C_4 . Este resultado coincide con lo observado en los mapas adiabáticos.

Para cada azúcar se encontró más de una silla estabilizada, con los mismos parámetros de *puckering* (tipo 1C_4), pero con diferentes arreglos de los oxhidrilos ubicados en las posiciones 2 y 4. Estas diferencias conformacionales se ponen de manifiesto en los valores de los ángulos dihedros χ_n (ver nomenclatura en pág. 275). A modo de ejemplo, en la Figura 6.7 se muestra para el compuesto **2** como las dos sillas más estables tienen el OH-4 orientado de diferente manera. Prácticamente no se observa otra diferencia entre estas dos conformaciones.

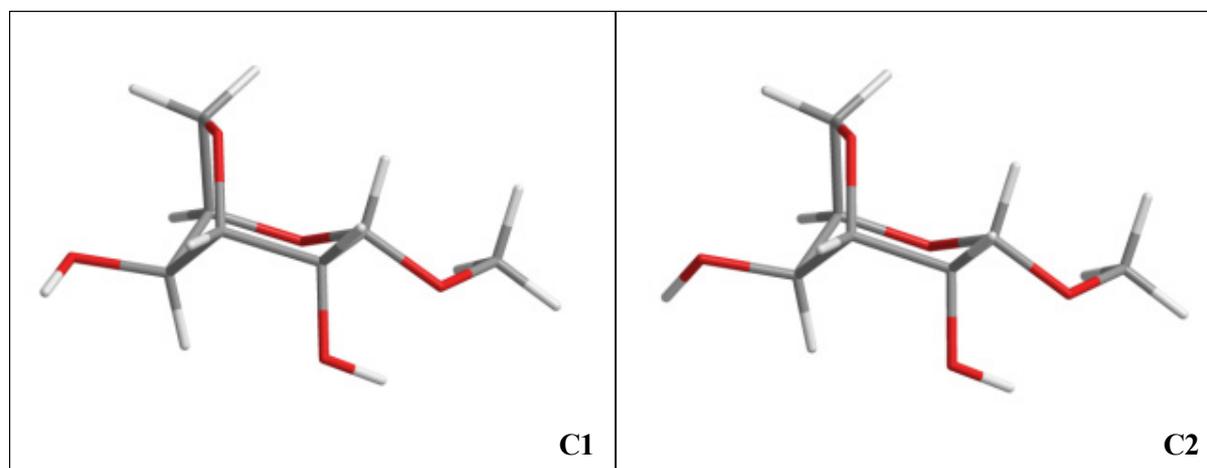


Figura 6.7 Conformeros del metil 3,6-anhidro- α -D-galactósido obtenidos por DFT.

Como se ya se explicó la otra conformación favorecida para estos compuestos es la cercana al bote $B_{1,4}$. Nuevamente la diversidad de conformeros estables de este tipo se origina en los valores de los ángulos dihedros de los grupos exocíclicos.

6.2.3 Búsqueda de las conformaciones de menor energía de los biciclooctanos 4-6

La misma metodología de cálculo utilizada para los anhidroazúcares fue empleada con los compuestos modelo **4**, **5** y **6**, aunque simplificada por la menor cantidad de grupos exocíclicos. Los resultados presentados en la Tabla 6.4 muestran nuevamente que los

parámetros de *puckering* de los conformeros más estables se ubican en la región cercana a $\theta = 150^\circ$ y a $\theta = 100^\circ$, indicando que las formas que adoptan las moléculas son próximas a 1C_4 y $B_{1,4}$.

Para cada uno de los compuestos modelo fueron obtenidas una única silla y un único bote dado que, estos ciclos poseen un solo sustituyente, cuya rotación no origina cambios o uno restringido a una posición por el efecto *exo*-anomérico. Las geometrías obtenidas por MM3 fueron muy similares al utilizar los tres valores de ϵ en **5** y **6** (en **4** fueron idénticas), aún cuando las energías relativas fueron levemente diferentes.

Tabla 6.4 Energías relativas y parámetros de *puckering* de los principales conformeros de los compuestos **4**, **5** y **6**.

Método/conformero-compuesto	E_{rel} (kcal/mol)	Parámetros de <i>puckering</i>		
		Q (Å)	θ (°)	ϕ (°)
MM3, $\epsilon=1,5$				
4-silla	0,00	0,64	150	60
4-bote	1,16	0,83	101	60
5-silla ^a	0,00	0,63	153	58
5-bote ^a	4,71	0,82	100	58
6-silla ^a	0,00	0,65	161	59
6-bote ^a	3,80	0,77	105	56
B3LYP/ 6-31+G**				
4-silla	0,00	0,64	151	60
4-bote	0,51	0,82	101	60
5-silla	0,00 (0,00) ^b	0,64	151	58
5-bote	3,99 (2,97) ^b	0,79	104	56
6-silla	0,00 (0,00) ^b	0,64	159	58
6-bote	1,51 (3,09) ^b	0,78	106	53
HF/ 6-31+G**				
4-silla	0,00	0,64	151	60
4-bote	0,78	0,82	102	60
5-silla	0,00 (0,00) ^b	0,63	151	57
5-bote	4,06 (3,09) ^b	0,79	103	54
6-silla	0,00 (0,00) ^b	0,64	158	56
6-bote	2,18 (3,73) ^b	0,77	106	52

^a Las geometrías a $\epsilon=3$ y 80 son las mismas. Sus energías relativas se presentan en la Tabla 6.5.

^b Entre paréntesis figuran las energías relativas considerando el modelo polarizable continuo en agua.

6.2.4 Discusión de los resultados

6.2.4.1 Análisis de las conformaciones

En la Tabla 6.5 se observan las diferencias de energía encontradas entre las sillas más estables y los botes más estables para cada uno de los seis compuestos modelados, por cada uno de los métodos utilizados.

Todos los cálculos indican que los conformeros bote poseen mayor energía que las sillas, aunque la magnitud de la diferencia depende del compuesto, del método de cálculo, de la constante dieléctrica utilizada en mecánica molecular y de la presencia o no de un modelo de solvente en los métodos cuánticos.

Tabla 6.5 Diferencias de energías $E_{\text{bote}} - E_{\text{silla}}$ (kcal/mol).

Compuesto	Configuración	MM3	MM3	MM3	B3LYP/6-31+G**	HF/6-31+G**
		$\epsilon=1,5$	$\epsilon=3$	$\epsilon=80$	(+PCM en agua)	(+PCM en agua)
1	β	3,10	3,45	3,76	0,56 (2,75)	1,60 (2,55)
2	α	6,40	6,12	5,57	0,91 (0,22)	3,03 (3,76)
3	β	5,47	4,46	4,29	3,98 (1,76)	2,79 (1,03)
4	β	1,16	1,16	1,16	0,51	0,78
5	β	4,71	4,50	4,50	3,99 (2,97)	4,06 (3,09)
6	α	3,80	4,01	4,01	1,51 (3,09)	2,18 (3,73)

La mayor estabilidad relativa de las conformaciones silla encontrada para los compuestos modelados, coincide con lo informado para otros ciclos de 6 miembros¹⁰. La conformación silla de anillos simples como el ciclohexano o el tetrahidropirano es entre 5,6 y 5,8 kcal más estable que el bote torcido (S), tanto por cálculos teóricos como por determinaciones experimentales. La barrera de interconversión para estos compuestos fue estimada en un valor superior a las 10 kcal/mol¹⁰.

Los cálculos por MM3 demostraron que 9 de 16 hexopiranosas (incluyendo los anómeros α y β de la serie D) poseen diferencias de energías similares entre la conformación silla más estable y el bote torcido más estable (0S_2 , 3S_1 , 1S_3 , 2S_0 o 1S_5 dependiendo del azúcar). La magnitud de dicha diferencia se ubica entre 4,2 y 7,9 kcal/mol⁹.

Para la β -Alt, la β -Gul, la β -Ido y α -Tal la estabilidad de los conformeros silla es relativamente menor que en los casos anteriores, ubicándose los valores entre 2,9 y 3,7 kcal¹⁹. Para otros azúcares, se encontró que la diferencia energética relativa entre la silla y el bote eran muy pequeñas o prácticamente nula. Es el caso de la α -Gul y la α -Alt, ya que tanto por cálculo computacional como por determinaciones experimentales se estimó que las sillas estaban estabilizadas en apenas 1,2 a 1,5 kcal/mol. Tal como se mencionó anteriormente, se sabe que la α -Ido coexiste en las dos formas silla y un bote torcido (⁰S₂), de manera que en este caso la diferencia de energías entre las tres conformaciones es muy baja¹⁰. En algunos derivados en vez de un bote torcido, aparece como más estable entre las formas flexibles un bote, por ejemplo en la α -L-Rha (^{3,0}B)¹⁸.

En los cálculos realizados en este trabajo, utilizando MM3 a distintas constantes dieléctricas, se obtuvieron diferencias de energía promedio entre la silla y el bote de 3,43 kcal/mol para el compuesto **1**, 6,03 kcal/mol para el **2** y 4,74 kcal/mol para el **3**. En todos los casos, el valor promedio fue próximo al obtenido al utilizar un $\epsilon=3$. Para los compuestos **2** y **3** la mayor diferencia de energía se obtuvo con $\epsilon=1,5$, mientras que para el **1** fue con $\epsilon=80$.

La utilización del método cuántico HF arrojó como resultado diferencias de estabilidades cercanas a la mitad de las encontradas con MM3 a $\epsilon=3$, siendo similar la tendencia en todos los casos. El cálculo con DFT dio diferencias entre las sillas y los botes de los compuestos **1** y **2** sensiblemente menores a los otros métodos de cálculo. Los desniveles energéticos en estos casos fueron de 0,56 y 0,91 kcal/mol, es decir 6 veces menos que los obtenidos al utilizar MM3 y 3 veces menos que con HF. Estos resultados podrían sugerir que éstos dos últimos métodos pueden estar sobreestimando la energía de los conformeros bote. En contrapartida con esta tendencia, la utilización de DFT con el metil 3,6-anhidro- β -D-glucósido (**3**) mostró una diferencia de energía silla-bote próxima a la conseguida con MM3 y HF.

La aplicación del modelo de solvente desarrollado por Tomasi *et al.*²⁸ en los métodos cuánticos generó conformaciones silla más estabilizadas por la solvatación del agua. Este efecto es notoriamente significativo para los conformeros de los compuestos con configuración *galacto*. Sin embargo, la presencia del solvente para el compuesto **3** (*gluco*) tiene un efecto contrario, ya que la estabilización ocurre sobre la forma bote.

Al realizar los cálculos con MM3 a una constante dieléctrica de 80 y simulando un solvente polar, no cambian demasiado las diferencias de energía entre las sillas y los botes, pero aún así la tendencia es similar a la conseguida por adición del modelo de solvente a los

métodos cuánticos. La excepción a este comportamiento se observó para el compuesto **2**.

Los botes y las sillas obtenidos por cálculos de los 3,6-anhidroglicósidos no son “perfectos”, tal como lo demuestran los parámetros de *puckering* y como se observó en los mapas de la Figura 6.6. Mientras que para las conformaciones bote perfectas se espera que el parámetro de *puckering* θ sea 90° , por mecánica molecular se obtuvo para los compuestos **1**, **2** y **3** valores de entre 99 y 102° . Los cálculos cuánticos mostraron conformeros aún más distorsionados que los obtenidos por MM3, ya que θ se ubicó entre 104 y 107° , con la excepción de un valor de $\theta=111^\circ$ para el compuesto **3**.

La desviación de la conformación bote se produce por la elevación del C-1 con respecto a la posición que ocuparía en un bote perfecto, para disminuir la interacción entre los sustituyentes de C-1 y C-4. El efecto puede observarse claramente en la Figura 6.8 donde se muestran las conformaciones bote más estables obtenidas para los tres anhidroazúcares por DFT.

Los valores de *puckering* de θ de la otra región ($\theta=146-162^\circ$) revelan que también existe una distorsión de la silla. Estas conformaciones se encuentran en un punto intermedio entre una silla perfecta ($\theta=180^\circ$) y un sobre E_4 ($\theta=125^\circ$). La distorsión de las sillas se origina también, como en el caso de la conformación bote, en el movimiento que sufre el carbono 1 con respecto a la posición que ocuparía en una silla 1C_4 perfecta. La posición que adopta el C-1 en los anhidroazúcares es tal, que el anillo de 6 miembros es más plano que una silla típica. Esto se debe a que la conformación busca evitar la interacción entre el sustituyente axial de C-1 y el anillo de 5 miembros (interacción 1,3-diaxial).

Utilizando MM3, la distorsión de los anómeros β (compuestos **1**, **3** y **5**) fue mayor que 25° ($\theta=152-155^\circ$), mientras que para los compuestos α (**2** y **6**) el efecto fue menor ($\theta=161^\circ$). Estos resultados son lógicos, ya que la presencia del grupo metoxilo en posición axial sobre C-1 de los anómeros β intensifica las interacciones del tipo 1,3-diaxiales con el O-3 y C-5 (anillo de 5 miembros).

Los cálculos con mecánica cuántica también generaron estructuras distorsionadas. El parámetro θ en estos casos tuvo valores que se ubicaron entre 146 y 156° . Es decir que en algunos casos la conformación adoptada se encuentra aún más lejos de los valores esperados para una silla y más cercanos a un sobre. Un ejemplo de esto, son las conformaciones obtenidas para los metilglicósidos de la 3,6-anhidro- β -D-galactosa (**1**) y de la 3,6-anhidro- β -D-glucosa (**3**) ya que θ en estos casos tiene valores de 146 a 148° . En la Figura 6.9 se aprecian las conformaciones sillas más estables conseguidas por DFT .

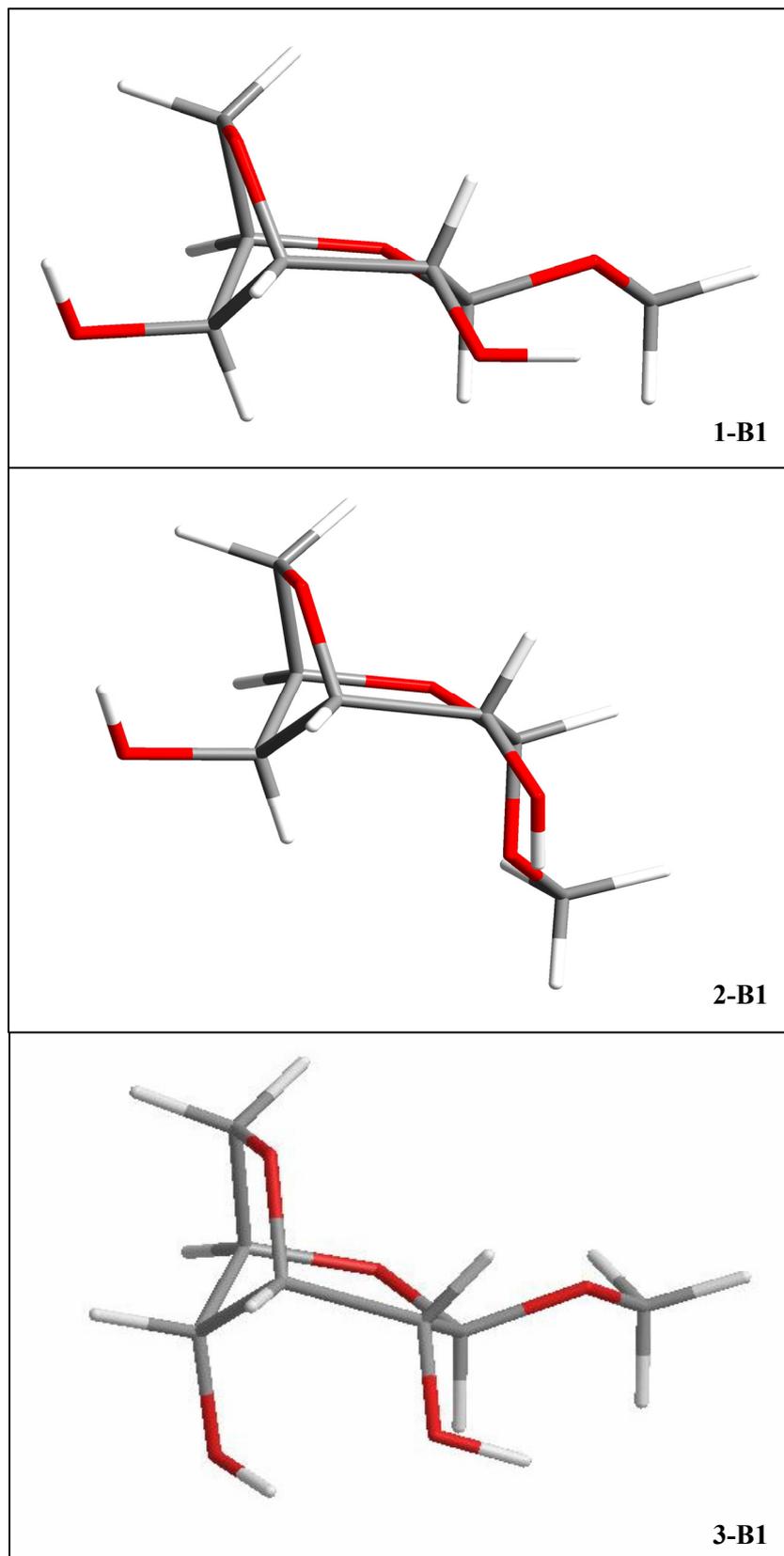


Figura 6.8 Conformaciones tipo bote de menor energía obtenidas por DFT para los compuestos **1**, **2** y **3**.

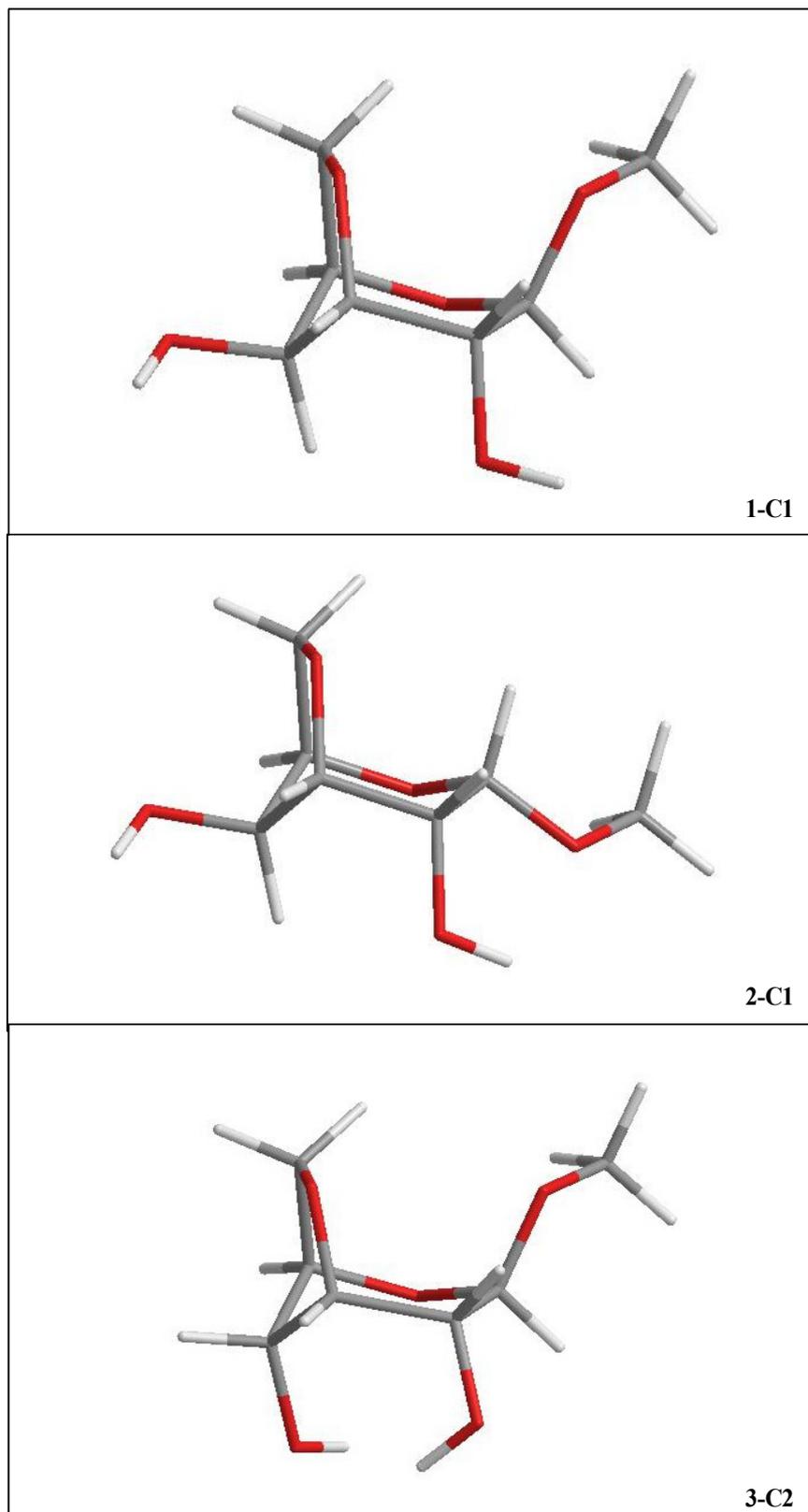


Figura 6.9 Conformaciones tipo silla de menor energía obtenidas por DFT para los compuestos **1**, **2** y **3**.

Las geometrías obtenidas por HF y DFT son esencialmente similares, con sólo alguna excepción como la encontrada para la silla más estable del compuesto **3**. La diferencia se observa en el ángulo χ_4 , para el que existen aproximadamente 50° de diferencia entre ambos casos.

Las conformaciones más estables obtenidas por métodos cuánticos se diferencian de las obtenidas por MM3 tanto en el grado de distorsión como en los arreglos de algunos ángulos dihedros, aunque las tendencias son similares.

Para los tres anhidroglicósidos se encontró que el parámetro ϕ siempre se encontraba cercano a los 60°. Este valor no es exactamente 60 por la asimetría causada por la presencia de dos oxígenos en los anillos. El contraejemplo es el compuesto **4** que posee un plano de simetría y para el cual el parámetro ϕ es exactamente 60°, como era de esperar.

6.2.4.2 Comparación de los resultados con datos experimentales

A continuación se presentan algunos datos conformacionales experimentales de compuestos vinculados con los aquí modelados.

La estructura cristalina del compuesto **2**, determinada por Campbell *et al*²³, mostró ser una silla del tipo ¹C₄ distorsionada, muy similar a las obtenidas aquí por cálculo. Los parámetros de *puckering* correspondientes fueron: $\theta = 158^\circ$, $\phi = 63^\circ$, $Q = 0,67 \text{ \AA}$, mientras que χ_4 tuvo un valor de -47° . La magnitud de θ es intermedia a la encontrada por los métodos cuánticos en fase gaseosa (156°) y MM3 (161°). El valor de ϕ se ajusta más al obtenido con MM3 (61-63), ya que en el caso de los métodos cuánticos este siempre es inferior a los 60°.

También se determinaron los parámetros de *puckering* para la 3,6-anhidro- α -D-galactosa presente en un disacárido²⁹: $\theta = 161^\circ$, $\phi = 58^\circ$, $Q = 0,67 \text{ \AA}$. Estos muestran nuevamente parámetros similares a los obtenidos por modelado. Mientras que el valor de θ es más próximo al valor determinado por MM3, el del parámetro ϕ es cercano al obtenido por QM²⁹.

En los mapas adiabáticos de la Figura 6.10 se pueden apreciar las ubicaciones de los cónformeros de mínima energía calculada y las correspondientes a las estructuras cristalinas.

La determinación conformacional en solución de la 3,6-anhidro- α -D-galactosa fue realizada por Izumi³⁰. El autor postuló, utilizando la ecuación de Karplus con viejos parámetros, que la conformación era una silla muy distorsionada. Sin embargo, recalculando

esos mismos datos con los parámetros de Haasnoot *et al.*³¹, se observa que la conformación es una silla levemente distorsionada compatible con las generadas en este estudio ($\theta \approx 161^\circ$, $\phi \approx 58^\circ$).

Los datos experimentales encontrados sobre los otros compuestos fueron escasos. De los derivados de la 3,6-anhidro- β -D-glucosa se encontró únicamente información para el fenilglicósido³². En cambio, fueron encontrados en bibliografía varios resultados experimentales sobre derivados de la 3,6-anhidro- α -D-glucosa, que no fue estudiada en este trabajo.

Los parámetros de *puckering* del fenilglicósido de la 3,6-anhidro- β -D-glucosa determinados por rayos X fueron: $\theta = 150^\circ$, $\phi = 67^\circ$, $Q = 0,62 \text{ \AA}$. Estos valores coinciden en buena medida con los determinados por DFT, especialmente para la conformación C1 (Tabla 6.3), que curiosamente no es la más estable de las sillas obtenidas. Es importante notar que la distorsión de la silla obtenida por cristalografía para este análogo **3**, es mayor que la correspondiente al compuesto **2**. Este resultado confirma la tendencia encontrada por cálculo en el sentido de que los conformeros de los anómeros β están más distorsionados que los α . En la Figura 6.10 se aprecia que las conformaciones silla más estables obtenidas por modelado molecular y la determinada experimentalmente convergen prácticamente en un punto del mapa.

Para el metil 3,6-anhidro- α -D-glucósido en estado cristalino se determinó por rayos X que poseía los siguientes parámetros de *puckering*: $\theta = 166^\circ$, $\phi = 69^\circ$, $Q = 0,66 \text{ \AA}$ ³³. Estos valores indican una conformación silla menos distorsionada que las encontradas para el compuesto de configuración β -D. De esta manera, se confirma claramente que la distorsión de la silla ocurre en parte para aliviar la interacción espacial entre el sustituyente en C-1 y el anillo de 5 miembros²⁴.

Otros datos de bibliografía sobre la 3,6-anhidro- α -D-glucosa son los encontrados en un par de ciclodextrinas modificadas, una como un octasacárido cíclico y otra como heptasacárido complejado con hidróxido de potasio e incluyendo moléculas de agua y acetona. Se informó que el octasacárido posee los siguiente valores de parámetros $\theta = 161$ - 163° , $\phi = 67$ - 75° , $Q = 0,63$ - $0,64 \text{ \AA}$ ³⁴, mientras que el heptasacárido tiene $\theta = 153$ - 163° , $\phi = 64$ - 86° , $Q = 0,57$ - $0,69 \text{ \AA}$ ³⁵. Los resultados muestran una cierta dispersión de valores, aunque la conformación silla es la que siempre predomina y nunca llega a estar tan distorsionada como la correspondiente al anómero β .

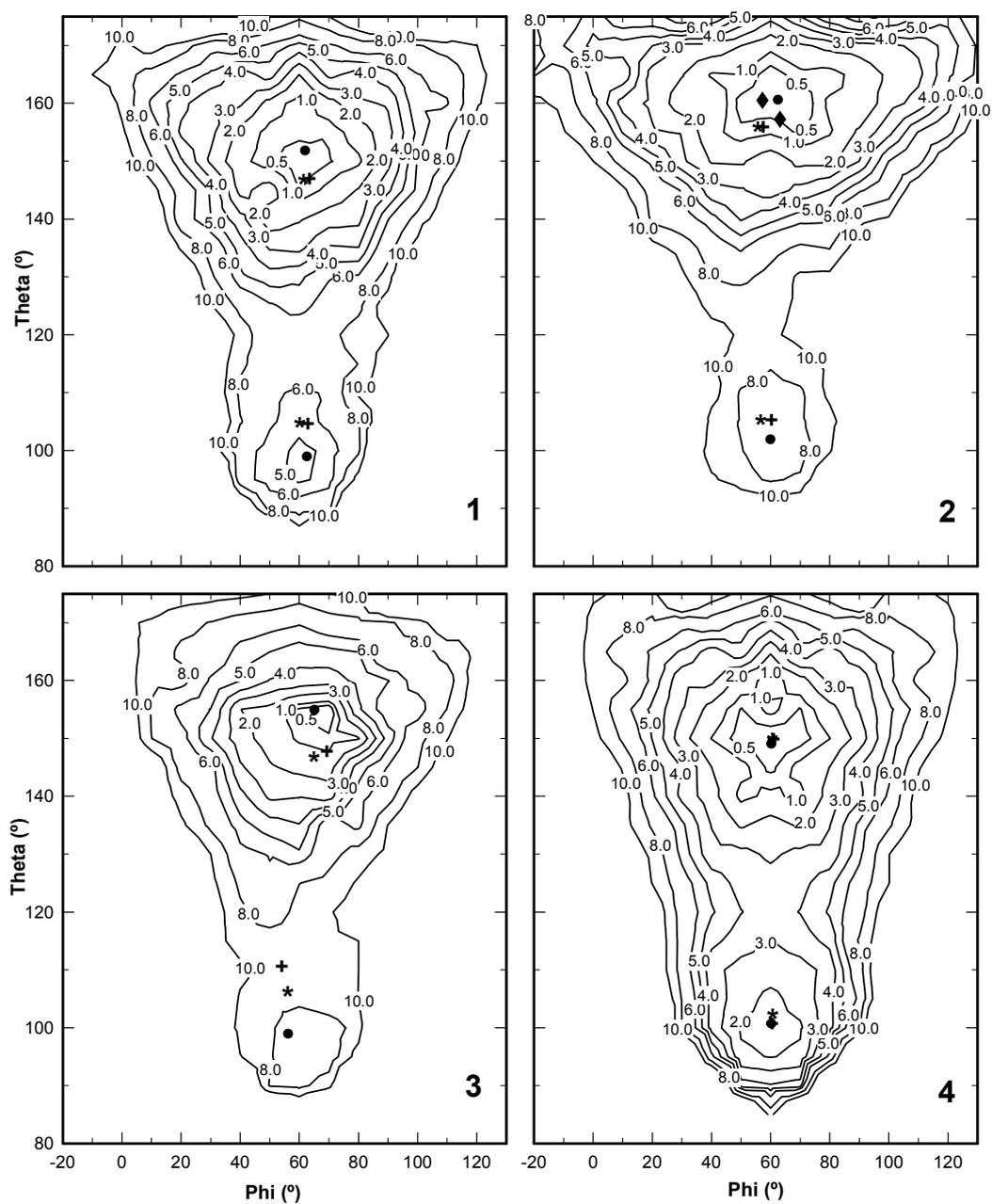


Figura 6.10 Mapas adiabáticos de *puckering* utilizando MM3 ($\epsilon = 3$) para los compuestos 1-4. Confórmeros de mínima energía obtenidos por: MM3 (●), B3LYP (+), HF (*) y estructuras cristalinas (◆).

El análisis por RMN del metil 3,6-anhidro- β -D-galactósido (**1**) realizado en una mezcla metanol-agua, demostró²⁵ que la conformación preferida del compuesto era claramente la silla 1C_4 . Sin embargo, este resultado cambia al realizar el experimento en cloroformo ya que ahí se aprecia que la conformación adoptada es la cercana al bote. Estos resultados han llevado a cometer errores de interpretación sobre la conformación del 3,6-anhidrogalactósido. Por ejemplo, en la determinación de velocidades de hidrólisis ácida de los metilglicósidos de la 3,6-anhidrogalactosa, los autores justificaron la diferencia en la cinética de reacción entre anómeros en el hecho de que el compuesto de configuración α -D adoptaba la conformación silla mientras que la β -D se encontraba en forma de bote²⁷. Esto último podría ser cierto sólo en un solvente de baja polaridad ya que en agua está presente como silla. En consecuencia, la justificación presentada en dicho trabajo sobre la diferencia de velocidades no es válida.

Respecto de los compuestos biciclooctánicos se sabe que los sistemas sustituidos con grupos arilo en C-3 (equivalente al carbono anomérico) y con configuración equivalente a los anómeros β , adoptan la forma bote en solventes de baja polaridad. Esto ocurre aún cuando en el anillo de 5 miembros están presentes un átomo de oxígeno o de nitrógeno (8-oxa- u 8-azabicyclooctanos). Estas últimas estructuras están relacionadas con la cocaína^{36,37}.

6.2.4.3 Influencia de los grupos exocíclicos

El arreglo de los grupos exocíclicos en las conformaciones más estables obtenidas por mecánica molecular y por mecánica cuántica son similares. El ángulo de la unión glicosídica χ_1 (H-1-C-1-O-1-CH₃) está gobernado por el efecto *exo*-anomérico tal como era de esperar. De esta manera, los ángulos dihedros toman valores entre 45 y 54° para los anómeros β y entre -42 y -55° para los α . El valor determinado para el metil 3,6-anhidro- α -D-galactósido (**2**) fue muy similar al que se determinó en la estructura cristalina de este compuesto²³.

Las diferentes orientaciones que adoptan los grupos exocíclicos unidos a los C-2 y C-4 son responsables, como ya se explicó, de la generación de distintos conformeros. Las uniones hidrógeno que éstos pueden formar son responsables de la existencia de diferentes conformeros de energía mínima, ya que esas interacciones son las que aportan muchas veces los efectos estabilizantes.

En los confórmeros bote más estables (B1, Tablas 6.1 y 6.2) de los compuestos **1** y **2** el hidrógeno unido a O-4 se direcciona hacia el O-6 para formar una unión hidrógeno, aunque esto se observa sólo cuando la ϵ utilizada es 1,5. La direccionalidad de H-4 no es de importancia en los casos en que la constante dieléctrica empleada sea mayor que 1,5 tal como se espera que ocurra cuando el solvente es más polar. Cuando el cálculo fue realizado por mecánica cuántica en el estado equivalente de fase gaseosa, también se observó el efecto estabilizante generado por la formación de la unión hidrógeno entre H(O)-4 y el O-6.

En el caso del metilglicósido de la 3,6-anhidro- β -D-galactosa, además de la estabilización de la forma bote por el aporte de las uniones puente hidrógeno, ocurre que también están disminuidas las repulsiones 1,3 y 1,5-diaxiales, que sí son importantes en la silla²⁶. La diferencia de energía obtenida por DFT en fase gaseosa entre ambas conformaciones es de apenas 0,56 kcal/mol, lo que demuestra cuán estabilizado está el bote (Tabla 6.5).

La inclusión del modelo de solvente en los cálculos por mecánica cuántica del compuesto **1** muestra como la diferencia de energía bote-silla aumenta hasta 2,75 kcal/mol. Esto se debe a que el bote pierde estabilidad como consecuencia de la disminución de la energía de las uniones hidrógeno en solventes polares.

Como ya fue explicado, el efecto fue observado experimentalmente por RMN: en cloroformo el compuesto **1** adoptaba la forma bote B_{1,4} como conformación más estable, mientras que en solventes más polares tomaba la forma silla²⁵.

Para el compuesto **2** se aprecia que en la conformación bote más estable el H unido al O-2 puede alcanzar al O-1 (H(O)-2 *anti* con respecto a H-2) para formar una unión hidrógeno, generándose un factor estabilizante adicional al que causan el H(O)-4 y el O-6. Nuevamente, este efecto es de importancia sólo a bajas ϵ (1,5 ó 3). Como se sabe, la unión fuerza de la unión hidrógeno disminuye con el aumento de la constante dieléctrica, y empiezan a gobernar los factores estéricos, que obviamente no producen una estabilización de la conformación bote.

El efecto estabilizante producido por la interacción entre el H(O)-2 y el O-1 se aprecia también en las conformaciones obtenidas por métodos cuánticos en fase gaseosa. En la Figura 6.8 se presentó al confórmero 2-B1 obtenido por DFT con el arreglo de los grupos exocíclicos que estabilizan la conformación bote.

Las diferencias de energía relativas entre las conformaciones bote y silla determinadas por DFT para el compuesto **2** (Tabla 6.5) en fase gaseosa y con modelo de solvente fueron de 0,91 kcal/mol y de 2,22 kcal/mol respectivamente. Nuevamente se puede apreciar cómo la formación de un enlace hidrógeno estabiliza parcialmente a la conformación bote.

Para el compuesto **3** la conformación silla más estable se encontró cuando los sustituyentes axiales en C-2 y C-4 están orientados de forma que pueden formar enlaces hidrógeno entre sí. Esto puede ocurrir con diferentes arreglos, de manera que aumenta la estabilidad entrópica de la silla. En cambio, la silla se vuelve menos estable cuando se pierden estas interacciones por el aumento de la constante dieléctrica con MM3 o al aplicar el modelo de solvente en los QM, con lo que comienzan a tener mayor efecto las repulsiones 1,3-diaxiales presentes en los anómeros β . En la Tabla 6.5 se observan las diferencias de energía que demuestran esta suma de efectos, ratificando para el compuesto **3** una tendencia en las diferencias energéticas inversa a las observadas para **1** y **2**.

La mayor diferencia energética se obtuvo al utilizar DFT, pasando de 3,98 kcal/mol en fase gaseosa con la silla estabilizada por enlace hidrógeno a 1,76 kcal/mol cuando la fuerza de éste disminuye.

En la Figura 6.9 se puede observar la conformación silla obtenida por DFT en fase gaseosa, donde se visualiza la interacción entre los oxhidrilos presentes en C-2 y C-4.

Los cálculos por mecánica cuántica de los compuestos modelos **5** y **6** (anómeros α y β del 3-metoxi-2-oxabicyclo[3.2.1]octano, Figura 6.5) permitieron evaluar la importancia del efecto anomérico sin la influencia de los enlaces hidrógeno.

El efecto anomérico lleva a que existan factores estabilizantes adicionales en la conformación silla de los anómeros β y en la bote de los α . Esta característica se debe a que el grupo metoxilo es más estable en posición *anti* al par electrónico del oxígeno del anillo. La presencia de este efecto se aprecia claramente al analizar los valores de energía obtenidos para los distintos conformeros.

Para el compuesto **5**, los cálculos por DFT muestran que la diferencia de energía entre las conformaciones bote y silla es 2,5 kcal/mol mayor que la observada para el compuesto **6** (Tabla 6.5). Esta diferencia también es observada al utilizar los otros métodos de cálculo (MM3 y HF), aunque las magnitudes en estos casos son menores.

La mayor estabilidad de la conformación silla en el compuesto **5** ocurre a pesar de las interacciones estéricas que existen en los anómeros β entre el sustituyente en C-1 y el anillo de 5 miembros. Como ya se mencionó, la distorsión de la silla alivia en parte esta interacción.

La naturaleza del efecto anomérico también se ve reflejada en la influencia que produce la solvatación con un solvente polar. Este hace disminuir el efecto anomérico, por lo que hace que decrezca marcadamente la diferencia de energía entre **5** y **6**, ya que el compuesto **5** no posee más el efecto estabilizante. Inclusive el resultado obtenido muestra ahora que la diferencia para el compuesto **6** es aún mayor que para **5** (Tabla 6.5).

La Tabla 6.6 permite apreciar las diferencias de energía entre los conformeros silla más estables de los anómeros. La silla del anómero β (**5**) es más estable cuando predomina el efecto anomérico (cálculo en fase gaseosa), mientras que la α del **6** se convierte en más estable cuando los factores estéricos son los que dominan (cálculos con modelo de solvente o alta constante dieléctrica). Esto se observa con todos los métodos de cálculo.

Tabla 6.6 Diferencias de energía de los conformeros más estables de los anómeros β y α (E_{β} - E_{α} , kcal/mol)

Compuesto	MM3 $\epsilon = 1,5$	MM3 $\epsilon = 3$	MM3 $\epsilon = 80$	B3LYP/6-31+G** (+PCM en agua)	HF/6-31+G** (+PCM en agua)
1-2	2,69	1,37	0,35	2,62(-1,32)	2,94(-0,93)
5-6	-0,08	0,13	0,34	-0,45(0,91)	-0,22(1,14)

Una situación diferente es la que se observa al comparar los compuestos **1** y **2** (Tabla 6.6). En estos casos los efectos estéricos, y especialmente las uniones hidrógeno, son más importantes en el cálculo energético que el efecto anomérico.

En fase gaseosa los cálculos demuestran que la silla es relativamente más estable para el compuesto **2** (anómero α) que para el **1** (anómero β) con respecto al bote (Tabla 6.5). debido a los efectos desestabilizantes de interacciones estéricas 1,3-diaxiales en el compuesto **1**, aún cuando la conformación silla se deforma para minimizar estas interacciones. En consecuencia la influencia estabilizadora del efecto anomérico sobre **1** sería menos importante.

La silla del compuesto **2**, como ya fue explicado, posee una estabilidad extra debido a la formación de enlaces hidrógeno. La Tabla 6.6 ratifica esa tendencia: la silla de **2** es bastante más estable que la de **1** en fase gaseosa por esos enlaces hidrógeno, mientras que se observa una inversión (o una disminución de la diferencia) al decrecer la fuerza del enlace hidrógeno.

Es notorio que la utilización de DFT hace disminuir levemente las diferencias de energía entre sillas y botes para los compuestos **1** y **2**. Estos resultados se deben probablemente a la relevancia que este método da a la presencia de la unión hidrógeno entre H(O)-4 y O-6 en la forma bote.

6.3 Conclusiones

El modelado molecular indica que la silla 1C_4 sería la conformación más estable para los tres anhidroglicósidos estudiados, en coincidencia con los datos obtenidos para algunas estructuras cristalinas.

La forma silla se encuentra distorsionada en los tres casos hacia la forma E_4 debido a las interacciones 1,3-diaxiales, las cuales son de mayor importancia en los compuestos de configuración anomérica β .

Para los compuestos se encontraron diferentes arreglos de uniones hidrógeno, que en fase gaseosa estabilizan diferencialmente la forma bote y la forma silla.

Los cálculos para el compuesto **1** mostraron que la diferencia de energía entre las conformaciones silla y bote es prácticamente nula, especialmente al utilizar DFT en fase gaseosa. Este resultado es compatible con el dato experimental, que muestra al bote como la conformación predominante en cloroformo, y a la silla en metanol-agua. Esta última aparece estabilizada a altas constantes dieléctricas, y con la inclusión de modelo de solvente. La conformación se encuentra más distorsionada en comparación a las correspondientes a los compuestos tipo β (**4** y **5**), debido a que busca disminuir las interacciones diaxiales.

Para el epímero en C-4 de **1** (compuesto **3** de configuración *gluco*) la forma silla también aparece como la más estabilizada. Esto se debe a la fuerte interacción desfavorable que existe entre las cabezas del bote, el O-4 y el C-1 y al efecto estabilizante adicional que genera el enlace hidrógeno entre los grupos O-4 y O-2. Estos efectos se ven disminuidos con la inclusión del modelo de solvente (tal como era de esperar).

El metil 3,6-anhidro- α -D-galactósido (**2**) está estabilizado en su conformación silla, aunque ésta se encuentra distorsionada hacia la forma E_4 por las interacciones que existen entre el C-1 y el ciclo de 5 miembros. Este anhidroazúcar es, como ya se explicó, un constituyente importante en la mayoría de los carragenanos (y el de configuración L de los agaranos). Su conformación determinada por diferentes técnicas experimentales también era 1C_4 ^{21,23,30}.

Bibliografía

1. French, A. D.; Brady, J. W. *ACS Symp. Ser.*, **1989**, 430, 1-19.
2. Stortz, C. A.; Cerezo, A. S. *Curr. Top. Phytochem.*, **2000**, 4, 121-134.
3. Csonka, G. I. *J. Mol. Struct. (Theochem)*, **2002**, 584, 1-4.
4. Stortz, C. A. *Handbook of carbohydrate engineering.*, (Ed. Yarema, J.), Francis and Taylor; Boca Raton, **2005**, 211-246. (y referencias allí citadas)
5. Stortz, C. A. *Carbohydr. Res.*, **1999**, 322, 77-86.
6. Levine, I. N. *Fisicoquímica*. McGraw-Hill/Interamericana de España, S. A. U., Madrid, **1996**, Vol.2, 1002 pp.
7. Ziegler, T. *Chem. Rev.*, **1991**, 91, 651-667.
8. Dowd, M. K.; Zeng, J.; French, A. D.; Reilly, P. J. *Carbohydr. Res.*, **1992**, 230, 223-244.
9. Dowd, M. K.; French, A. D.; Reilly, P. J. *Carbohydr. Res.*, **1992**, 233, 15-34
10. Dowd, M. K.; French, A. D.; Reilly, P. J. *Carbohydr. Res.*, **1994**, 264, 1-19.
11. Ferro, D.R.; Provasoli, A.; Ragazzi, M.; Torri, G.; Casu, B.; Gatti, G.; Jacquinet, J.C.; Sinay, P.; Petitou, M.; Choay, J. *J. Am. Chem. Soc.*, **1986**, 108, 6773-6778
12. Cremer, D.; Pople, J. A. *J. Am. Chem. Soc.*, **1975**, 97, 1354-1358.
13. Jeffrey, G. A., Yates, J. H. *Carbohydr. Res.*, **1979**, 74, 319-322.
14. Pickett, H. M.; Strauss, H. L. *J. Am. Chem. Soc.*, **1970**, 92, 7281-7290.
15. Joshi, N. V.; Rao, V. S. R. *Biopolymers*, **1979**, 74, 319-322.
16. Ragazzi, M; Ferro, D. R.; Provasoli, A. *J. Comput. Chem.*, **1986**, 7, 105-112.
17. Ferro, D. R.; Provasoli, A.; Ragazzi, M. *Carbohydr. Res.*, **1992**, 228, 439-443.
18. Rockey, W. N.; Dowd, M. K.; Reilly, P. J.; French, A. D. *Carbohydr. Res.*, **2001**, 335, 261-273.
19. Dowd, M. K.; Rockey, W. N.; French, A. D.; Reilly, P. J. *J. Carbohydr. Chem.*, **2002**, 21, 11-25.
20. Schafer, S. E.; Stevens, E. S.; Dowd, M. K. *Carbohydr. Res.*, **1995**, 270, 217-220.
21. Schafer, S. E.; Stevens ; Mazurek, A. P.; Szeja, W. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2*, **1985**, 57-58.
22. Mazurek, A. P.; Szeja, W. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, **1985**, 57-58.
23. Campbell, J. W.; Harding, M. M.; *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, **1972**, 1721-1723.
24. Lindberg, B.; Lindberg, B.; Svensson, S. *Acta Chem. Scand.*, **1973**, 27, 373-374.
25. Rashid, A.; Mackie, W. *Carbohydr. Res.*, **1992**, 223, 147-155.

26. France, C. J.; McFarlane, I. M.; Newton, C. G.; Pitchen, P.; Barton, D. H. R. *Tetrahedron*, **1991**, 32, 6381-6388.
27. McDonnell, C.; Lopez, O.; Murphy, P.; Fernández Bolaños, J. G.; Hazell, R.; Bols, M. J. *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, 126, 12374-12385.
28. Barone, V.; Cossi, M.; Tomasi, J. *J. Comput. Chem.*, **1998**, 19, 404-417.
29. Lamba, D.; Segré, A. L.; Glover, S.; Mackie, W.; Sheldrick, B.; Pérez, S. *Carbohydr. Res.*, **1990**, 208, 215-230.
30. Izumi, K. *Carbohydr. Res.*, **1973**, 27, 278-281.
31. Haasnoot, C. A.G.; de Leeuw, F. A. A. M.; Altona, C. *Tetrahedron*, **1980**, 36, 2783-2792.
32. Wang, L.; Li, Y-M.; Yip, C-W.; Qiu, L.; Zhou, Z.; Chan, A. S. C. *Adv. Synth. Catal.*, **2004**, 346, 947-953.
33. Isaacs, N. W.; Kennard, C. H. L. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2*, **1972**, 582-585.
34. Yamamura, H.; Nagaoka, H.; Kawai, M.; Butsugan, Y.; Einaga, H. *Chem. Commun.*, **1996**, 1069-1070.
35. Ashton, P. R.; Gattuso, G.; Koninger, R.; Stoddart, J. F.; Williams, D. J. *J. Org. Chem.*, **1996**, 61, 9553-9555.
36. Meltzer, P. C., Blundell, P.; Chen, Z.; Yong, Y. F.; Madras, B. K. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **1999**, 9, 857-862.
37. Meltzer, P. C., Liang, A.; Blundell, P.; Gonzalez, M.; Chen, Z.; George, C.; Madras, B. K. *J. Med. Chem.*, **1997**, 40, 2661-2673.

CAPÍTULO 7

MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Consideraciones generales.

Las algas fueron molidas en un molinillo de paletas General Electric 5KH38PG 16 5E.

Las extracciones fueron realizadas con agitadores magnéticos FAC AM20, Thermolyne Nuova II y Cole-Parmer modelo 4658, o agitadores mecánicos modelo Glas-Col (Terre Haute, IN USA) con paletas de acero inoxidable.

Para las centrifugaciones se utilizaron las centrífugas Sargent S-15700 trabajando a 3400 rpm, International Centrifuge A7213X-1 y P7115 a 2000 rpm y Sigma Laboratory Centrifuge 4K15C a 9000-10000 rpm.

Las evaporaciones se realizaron en un evaporador rotatorio Büchi 10566 a presión reducida, con temperaturas del baño de agua inferiores a 45 °C.

Las muestras en solución acuosa se llevaron a sequedad en liofilizador Virtis 10-324, a presiones inferiores a 0,1 mm Hg (100 mTorr), y a temperaturas del condensador cercanas a -45 °C.

Las diálisis se realizaron a temperatura ambiente utilizando tubos de celulosa (Spectra Por o Sigma) seleccionando el diámetro según el volumen a dializar. El corte de peso molecular empleado fue el que se detalla en cada caso (cuando no se indica, se utilizó un corte de 6000-8000). Las diálisis se efectuaron 48 h en sistema abierto contra agua corriente y 24-48 h más en sistema cerrado contra agua destilada, en este último caso renovando el agua tres o cuatro veces.

Las determinaciones colorimétricas se llevaron a cabo en un espectrofotómetro Spectronic 20D (Milton Roy Company) empleando celdas de 1 cm de recorrido óptico.

Los poderes rotatorios se determinaron a temperatura ambiente en un polarímetro Perkin-Elmer 343, provisto de una lámpara de sodio (589 nm), una celda de 1 dm de camino óptico y aproximadamente 1,0 ml de volumen interno.

Los espectros de masa se efectuaron en un espectrómetro de masa Shimadzu QP-5050A, acoplado a un cromatógrafo gaseoso, a un potencial de ionización de 70 eV.

En este trabajo de Tesis se utilizaron los siguientes polisacáridos comerciales: κ-carragenano (Sigma, Tipo III), ι-carragenano (Sigma, Tipo V), agarosa (K & K Lab.) y condroitin sulfato A (Sigma, de tráquea vacuna, 70% A y 25 % C).

7.2 Aislamiento de los polisacáridos

7.2.1 Obtención de las algas utilizadas

Las muestras de las algas *Corallina officinalis* y *Jania rubens* fueron colectadas en las costas de la ciudad de Miramar (provincia de Buenos Aires), mientras que las de *Bossiella orbigniana* fueron recogidas cerca de la ciudad de Comodoro Rivadavia (provincia de Chubut).

Los ejemplares de *Porphyra columbina* fueron una gentil cesión del Dr. Alberto Cerezo. Estas algas fueron recolectadas en las costas de la ciudad de Comodoro Rivadavia.

En todos los casos las algas fueron secadas al aire, limpiadas manualmente y molidas en un polvo fino (mesh 20).

7.2.2 Métodos extractivos de polisacáridos de Corallinales

Las algas *C. officinalis*, *J. rubens* y *B. orbigniana* fueron extraídas con cada uno de los siguientes métodos. Los resultados de este proceso pueden observarse en el Capítulo 2.

Primera Extracción

Método C. Desarrollado por Cases *et al.*^{1,2}.

Se suspendieron 15 g de alga molida en agua y se agregó HCl 1 M. El agregado del ácido se realizó en pequeñas porciones con vigorosa agitación, manteniendo el pH de la solución siempre por encima de 6. El agregado fue realizado hasta que no se observó más desprendimiento de CO₂ (volumen de ácido añadido cercano a 250 ml). La suspensión se mantuvo con agitación mecánica durante 24 h a temperatura ambiente.

El residuo fue separado del sobrenadante por centrifugación y fue posteriormente lavado con agua (2 x 25 ml). Los sobrenadantes fueron combinados y concentrados a 50 ml, y dializados (corte 6000-8000). Los productos se recuperaron por liofilización, y posteriormente se redisolvió en agua generándose un residuo insoluble que se separó por centrifugación y fue descartado. El sobrenadante fue nuevamente dializado y liofilizado.

Método U. Desarrollado por Usov *et al.*^{3,4}.

Se tomaron 15 g de alga y se suspendieron en 75 ml de agua. Luego se agregaron 27 ml de HCl concentrado y la mezcla se agitó durante 2 h a temperatura ambiente. El residuo y el sobrenadante fueron separados por centrifugación. El primero se extrajo tres veces más con 75 ml de HCl 0,1 M. Al finalizar cada etapa de extracción el residuo se separó por centrifugación y lavó con agua (2 x 25 ml).

Todos los sobrenadantes fueron reunidos y tratados como se indica en el método C.

Método T. Desarrollado por Takano *et al.*⁵.

Se extrajeron 15 g de alga con 120 ml de agua a 100 °C durante 10 h. Este proceso fue realizado dos veces más. En cada etapa se separó el residuo por centrifugación y posteriormente se lavó con agua (2 x 25 ml). Todos los sobrenadantes se combinaron y trataron como se describe en el método C.

Segunda extracción (2)

Cada residuo generado en la primera extracción fue nuevamente extraído con 100 ml de agua a 100 °C durante 20 h. Los extractos se recuperaron por centrifugación, y se trataron como se indica en el método C.

7.2.3 Extracción preparativa de los polisacáridos de *Jania rubens* (Capítulo 5)

Primera extracción

La primera extracción se llevó a cabo sobre 300 g de alga molida con 2,5 l de agua a 100 °C durante 24 horas, con agitación mecánica. El extracto resultante se centrifugó para separar un residuo (**R1**) y una solución acuosa que luego se concentró hasta 350 ml (Esquema 5.1). Esta se volcó lentamente sobre 1225 ml de isopropanol (3,5 vol) y se dejó toda la noche en la heladera. Los polisacáridos precipitados se separaron por centrifugación, y a continuación se secaron por intercambio de solventes (isopropanol y luego acetona) a temperatura ambiente. Tras redisolución en agua, se separaron por centrifugación una fracción insoluble (**RPC1**) y una soluble (**PC1**). Ambas fueron recuperadas por liofilización.

Segunda extracción

El residuo **R1** se sometió a un segundo proceso de extracción. Se suspendió en 900 ml de agua, y en baño de hielo se le agregó HCl 0,1 M lentamente evitando que el pH descendiera por debajo de 6. El agregado se continuó hasta no observar desprendimiento de CO₂; en total se utilizaron 3,5 l de solución ácida. Luego se continuó la extracción con agitación mecánica durante 24 h. El residuo (**R2**) y el sobrenadante fueron separados por centrifugación. El residuo insoluble fue lavado con agua dos veces.

Los sobrenadantes y las aguas de lavado fueron combinados y concentrados por evaporación a presión reducida. La solución resultante fue volcada sobre isopropanol (3,5 vol) para precipitar los polisacáridos, tal como se describió en la primera extracción. Los biopolímeros luego se separaron por centrifugación y se secaron por intercambio de solventes. A continuación se redisolviéron en agua, donde se generó un nuevo residuo insoluble (**RPA1**) y un sobrenadante. Este último fue recuperado por liofilización (**PA1**) (Esquema 5.1).

Posteriormente, la fracción **PA1** fue disuelta nuevamente en agua y la solución generada dializada contra agua corriente y agua destilada. Finalmente se liofilizó para dar lugar a la fracción **PA1d**.

Tercera extracción

El residuo **R2** se extrajo nuevamente con agua caliente siguiendo la metodología descrita en la primera extracción. La fracción obtenida se denominó **PC2**.

7.2.4 Extracción de los polisacáridos de *Porphyra columbina* (Capítulos 3 y 4)

La extracción se llevó a cabo sobre 15 g de alga molida con 2,5 l de agua durante 24 h a temperatura ambiente con agitación mecánica⁶. El extracto resultante se centrifugó y se separó un residuo y un sobrenadante. Este último luego se volcó sobre 3 vol de isopropanol para precipitar los polisacáridos. Los mismos luego fueron aislados por centrifugación y secado. El rendimiento fue del 47% (respecto del peso seco del alga).

7.2.5 Obtención de los polisacáridos de *Iridaea undulosa* (Capítulos 3 y 4)

La fracción **C** (μ/v parcialmente ciclados de la familia de los κ -carragenanos) fue aislada de plantas cistocárpicas por el Dr. Carlos Stortz de la manera informada previamente⁷.

Una nueva fracción **T1** (λ -carragenano) fue obtenida por fraccionamiento de un extracto crudo de polisacáridos aislado de plantas de la fase tetraspórica con agua a temperatura ambiente⁷. El fraccionamiento se realizó por precipitación con KCl. A una solución del carragenano crudo de concentración 2,5g/l (5,2 g de polisacárido) se le agregaron pequeñas porciones de la sal de potasio. Los precipitados generados en los siguientes rangos de concentraciones de sal se separaron por centrifugación: 0-0,5 M; 0,5-0,9 M; 0,9-1,2 M; 1,2-2 M. La fracción **T1**, que precipitó en el rango de concentraciones de KCl 0,9-1,2 M, se aisló con un rendimiento del 70% (respecto del polisacárido tetraspórico total).

7.3 Fraccionamiento del sistema de polisacáridos de *Jania rubens* (Capítulo 5)

El fraccionamiento del sistema de polisacáridos **PA1d** se realizó por cromatografía de intercambio iónico sobre DEAE-Sephadex A-50. La cromatografía en columna se realizó a escala analítica y preparativa. A escala analítica se utilizaron 10 mg de muestra y una columna de 20 x 0,9 cm. El fraccionamiento preparativo se realizó con 820 mg de muestra en una columna de 50 x 3.5 cm.

El gel se preparó suspendiendo la resina de intercambio en un exceso de agua destilada. El mismo se hinchó por calentamiento de la suspensión durante 2 h.

Una vez armada la columna cromatográfica y sembrada la muestra, se eluyó con soluciones de NaCl de concentraciones crecientes desde 0,1 hasta 2,5 M.

A escala preparativa se recogieron alícuotas de 4,6 ml, mientras que en la minicolumna las mismas fueron de 0,5 ml. Para cada una de éstas se determinó la cantidad de hidratos de carbono por el método de fenol-ácido sulfúrico.

Las fracciones obtenidas de la columna fueron dializadas contra agua corriente y agua destilada.

7.4 Métodos generales

7.4.1 Determinación cuantitativa de los hidratos de carbono totales

Se empleó el método colorimétrico del fenol-ácido sulfúrico según la técnica descrita por Dubois *et al.*⁸.

REACTIVOS

- Solución de fenol al 5% (p/v). Esta solución es estable a temperatura ambiente durante varios meses conservada a temperatura ambiente.
- Ácido sulfúrico 98% grado analítico.

PROCEDIMIENTO

A 0,5 ml de solución conteniendo hasta 70 µg/ml de hidratos de carbono se le adicionaron 0,5 ml de fenol al 5% y se mezclaron. Luego se agregaron 2,5 ml de ácido sulfúrico concentrado directamente sobre la superficie de la solución a fin de asegurar un calentamiento máximo y se dejó reposar 10 min. Transcurrido este tiempo, los tubos se agitaron en un vórtex y se mantuvieron 20 min a temperatura ambiente. En forma paralela se preparó un blanco con agua destilada. Finalmente se leyó la absorbancia del color desarrollado a 490 nm (máximo de absorción para galactosa), y el contenido de hidratos de carbono totales se cuantificó por referencia a curvas patrón de galactosa. El resultado se expresó como porcentaje de azúcar anhidro.

7.4.2 Determinación de ácidos urónicos

Se realizó siguiendo la modificación de Filisetti-Cozzi y Carpita del método de Blumenkrantz y Asboe-Hansen^{9,10}.

REACTIVOS

Solución A: ácido sulfámico/ sulfamato de potasio 4 M (pH 1,6).

Solución B: tetraborato de sodio 0,0125 M en ácido sulfúrico concentrado, grado analítico.

Solución C: *m*-hidroxidifenilo (0,15 %) en hidróxido de sodio acuoso al 0,5 %.

PROCEDIMIENTO

Alícuotas de una solución de la muestra conteniendo hasta 200 nmoles de ácido hexurónico se diluyeron con agua hasta 0,5 ml, posteriormente se les agregaron 40 µl de la Solución A y se agitaron en vórtex. Sobre los tubos colocados en baño de hielo se adicionaron 2,5 ml de la Solución B. Nuevamente se agitaron los tubos, y se llevaron a un baño de agua a 100 °C durante 30 min. Luego se colocaron sobre hielo para alcanzar la temperatura ambiente y se les agregaron 80 µl de la Solución C. Finalmente se agitaron los tubos, se dejaron reposar entre 5 y 10 minutos, y a continuación se midieron las absorbancias a 525 nm. El color permanece estable por 1 hora.

Se preparó un blanco con agua destilada y se utilizó D-glucuronolactona de concentración 80 µg/ml como patrón.

En los cálculos se considera que la absorbancia producida por reacción con azúcares neutros es 1/40 de la que produce el ácido glucurónico.

7.4.3 Determinación cuantitativa de proteínas totales

Se llevó a cabo siguiendo la técnica descrita por Lowry *et al.*¹¹.

REACTIVOS

Solución A: solución de carbonato de sodio al 2 % en hidróxido de sodio 0,1 M.

Solución B: sulfato cúprico pentahidratado al 0,5 % en solución de tartrato de sodio y potasio al 1 %.

Solución C: mezclar 50 ml de la Solución A y 1 ml de la Solución B. Esta solución debe ser utilizada dentro de las primeras 24 h luego de su preparación.

Solución D: diluir al medio de un volumen el reactivo comercial de Folin-Ciocalteu (Sigma-Aldrich). Esta solución debe prepararse inmediatamente antes de ser usada.

PROCEDIMIENTO

Se tomaron alícuotas de la solución de la muestra conteniendo hasta 500 µg de proteínas por ml y se llevaron a un volumen final de 0,4 ml con agua destilada. Luego se añadieron a cada tubo 2 ml de la Solución C, se mezclaron y se dejaron a temperatura ambiente durante al menos 10 min. A continuación se agregaron rápidamente 0,2 ml de la Solución D y se agitaron dentro de los 2 s. Las muestras se mantuvieron durante 30 min en reposo, y luego se

midieron las absorbancias a 500 nm. Paralelamente se preparó un blanco con agua destilada y una curva patrón con solución de albúmina de suero bovino de hasta 500 µg/ml.

7.4.4 Determinación de sulfato

Se utilizó el método turbidimétrico de Dodgson y Price^{12,13} y también cromatografía de intercambio iónico con detector conductimétrico.

Método turbidimétrico

REACTIVOS

- Reactivo de cloruro de bario-gelatina: se preparó por disolución de 200 mg de gelatina (Oxoid) en 40 ml de agua destilada a 60-70 °C. Esta mantuvo en heladera durante al menos 6 h, luego en la misma se disolvieron 200 mg de cloruro de bario y se dejó en heladera por 2 h o más. Este reactivo es estable por aproximadamente 7 días si se conserva a menos de 4 °C.
- Solución de ácido tricloroacético (TCA) 3 % (p/v). Esta solución es estable a 4 °C.

PROCEDIMIENTO

Los polisacáridos se disolvieron en HCl 1 M y se hidrolizaron a 110 °C durante 4,5 h. Las cantidades disueltas se eligieron en función de obtener una solución madre que, por dilución adecuada, permitiera obtener soluciones con concentraciones finales de 20-200 µg de SO_4^{2-} /0,5 ml.

Una vez enfriadas las soluciones de hidrólisis, se tomaron alícuotas (100-400 µl) y se llevaron a un volumen final de 400 µl con ácido clorhídrico 1 M. A cada una de estas se le adicionó 2,8 ml de la solución de TCA y se agitaron. Luego se agregaron 800 µl del reactivo de cloruro de bario-gelatina y tras agitar nuevamente se dejaron en reposo por 20 min. Posteriormente se procedió a leer las absorbancias (turbidez) a 360 nm en menos de una hora. El blanco se realizó en idénticas condiciones utilizando 400 µl de HCl 1 M. Como solución patrón se utilizó una solución de sulfato de sodio anhidro en HCl 1 M de concentración equivalente a 400 µg de SO_4^{2-} /ml. La medición debe ser realizada dentro de la primera hora, debido a que luego el sulfato de bario tiende a precipitar.

Cromatografía iónica con detector conductimétrico

PROCEDIMIENTO

Las muestras (aprox. 1 mg) se disolvieron en ácido trifluoroacético 2 M (1 ml) y luego se hidrolizaron en vial cerrado a 110-120 °C durante 2-4 h. Una vez enfriadas, se llevaron a sequedad bajo corriente de aire y se redisolvieron en 5 ml de agua mili-Q. 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 realizó con una solución de Na₂CO₃ 1.8 mM y NaHCO₃ 1.7 mM, con un flujo de 2 ml/min. Este trabajo fue realizado por personal del INQUIMAE.

7.4.5 Determinación del peso molecular promedio

Se efectuó mediante determinación de grupos reductores siguiendo la técnica de Park y Johnson¹⁴.

REACTIVOS

Solución A: ferricianuro de potasio (500 mg/l). Esta solución debe ser conservada en botella de color caramelo.

Solución B: cianuro de potasio (650 mg/l) en solución de carbonato de sodio (5,3 g/l).

Solución C: 1,5 g de sulfato amónico-férrico hidratado y 1 g de dodecilsulfato de sodio (SDS) disueltos en un litro de ácido sulfúrico 0,025 M. Esta solución debe ser filtrada luego de preparada.

PROCEDIMIENTO

Se tomaron alícuotas de las soluciones de las muestras conteniendo hasta 30 nanomoles de azúcar reductor, y se llevaron a un volumen final de 0,5 ml. Luego se agregaron a cada uno de los tubos 0,5 ml de la solución A y 0,5 ml de la solución B y a continuación se agitaron. Los tubos se taparon con bolitas de vidrio y se calentaron en un baño de agua a 100 °C durante 15 min. Luego se enfriaron, y se adicionaron 2,5 ml de la solución C. El blanco utilizado fue preparado de igual forma con agua destilada. Finalmente se leyeron las absorbancias del color desarrollado a 690 nm. La cantidad de grupos reductores se determinó por referencia a curva patrón construida con galactosa (hasta 30 nanomoles de azúcar

reductor/0,5 ml). En el Capítulo 5, para los cálculos de peso molecular (promedio numérico) se utilizó la siguiente ecuación:

$$\overline{\text{PM}} = \frac{m \cdot \%_{H \text{ de } C} \cdot p \cdot V_{\text{alic}} \cdot 10}{A \cdot V_T} \cdot \text{PM}_{\text{anh}} \cdot \frac{180}{162}$$

donde:

m: masa de polisacárido en mg

%_{H de C}: porcentaje de hidratos de carbono totales del polisacárido (determinado por el método del fenol-ácido sulfúrico)

p: pendiente de la curva de absorbancia vs concentración del azúcar

V_{alic}: volumen de la alícuota de la solución del polisacárido

V_T: volumen total de la solución (0,5 ml)

PM_{Anh}: peso molecular anhidro promedio de la unidad monosacáridica

180/162: factor que corrige el hecho de que el peso molecular de la unidad monosacáridica en el polisacárido tiene 18 unidades de masa menos que el azúcar empleado como estándar.

En el Capítulo 2, para los cálculos de peso molecular no se consideraron ni el porcentaje de hidratos de carbono, ni el peso molecular anhidro promedio, dada la complejidad de la misma (ej. altos porcentajes de proteínas).

7.5 Determinación de los azúcares componentes

Se realizó analizando por cromatografía gaseosa los derivados de los polisacáridos hidrolizados.

7.5.1 Hidrólisis ácida total¹⁵

De 1 a 3 mg de muestra se colocaron en viales provistos de cierre de teflón, se les adicionaron 1 ml de TFA 2 M, y colocaron en estufa a 121 °C durante 90 min. Luego se evaporó el solvente bajo corriente de aire. Los hidrolizados fueron redissueltos en agua y posteriormente ésta se evaporó nuevamente; este tratamiento se realizó las veces necesarias para eliminar totalmente el ácido. Las muestras se colocaron en un desecador al vacío durante una noche.

7.5.2 Preparación de los alditoles peracetilados^{16,17}

A las muestras secas provenientes de las hidrólisis contenidas en los viales se les agregaron 0,5 ml de hidróxido de amonio 1 M y se redujeron con borohidruro de sodio (5 mg) durante al menos 2 h a temperatura ambiente. En un paso posterior se adicionaron gotas de ácido acético diluido para destruir el exceso de agente reductor (hasta que cesó la efervescencia). Luego se descationizó la solución por agregado de resina Amberlite IR-120 (H⁺). Las soluciones se filtraron para separar la resina, y se evaporaron hasta sequedad. El ácido bórico generado se eliminó como borato de metilo, mediante 5 agregados de 0,5 ml de metanol y evaporación a sequedad en cada oportunidad. Se dejaron en desecador al vacío durante una noche y la mezcla de alditoles obtenida se acetiló con 1 ml de anhídrido acético-piridina (1:1) a 100 °C durante 45 min. Un vez que las soluciones alcanzaron la temperatura ambiente, se realizó una extracción de la misma con una mezcla cloroformo-agua. La fase acuosa se extrajo nuevamente con cloroformo. Los extractos clorofórmicos recuperados se juntaron y se lavaron tres veces con 1 ml de solución saturada de bicarbonato de sodio y dos veces con 1 ml de agua destilada. Finalmente los extractos se secaron con sulfato de sodio anhidro y llevaron a sequedad. El residuo obtenido se disolvió en cloroformo y se inyectó en el cromatógrafo gaseoso.

7.5.3 Preparación de los aldononitrilos peracetilados¹⁸

A las muestras secas provenientes de las hidrólisis (sección 7.5.1) contenidas en viales se les adicionaron 10 mg de clorhidrato de hidroxilamina y 0,5 ml de piridina. Se calentaron

en estufa a 85 °C durante 30 min. Luego se dejaron enfriar, y se les agregó 0,5 ml de anhídrido acético. Nuevamente se colocaron en estufa a la misma temperatura por 30 min más. Los derivados fueron purificados como se describe en 7.5.2.

7.5.4 Hidrólisis reductiva para la generación de alditoles peracetilados

Se utilizó el método de Stevenson y Furneaux¹⁹ modificando el segundo período de hidrólisis a 2 h.

Típicamente a 1 ó 2 mg de polisacárido contenidos en un vial se les agregaron 0,4 ml de TFA 3 M y 0,1 ml de una solución conteniendo 80 µg/ml de 4-metilmorfolina borano. Se cerró el vial y se llevó a 80 °C durante 10 min. Luego se dejó enfriar y se agregaron nuevamente 0,1 ml de MMB. La solución resultante se llevó a estufa a 121 °C durante 2 h.

Una vez enfriado el vial se volvieron a añadir 0,2 ml de MMB, para luego evaporar el solvente bajo corriente de aire seco a 50 °C. En los casos en que el polisacárido proviniera de una metilación, la temperatura de evaporación del solvente se mantuvo a menos de 30 °C. El producto de hidrólisis se dejó en desecador al vacío durante al menos 2 h.

Los alditoles generados se acetilaron con anhídrido acético (0,2 ml) y TFA (0,2 ml) a 55-60 °C. Luego los derivados peracetilados se recuperaron con cloroformo como se explica en 7.5.2.

En los casos en que los polisacáridos contuvieran 3,6-anhidrogalactosa 2-sulfato, se utilizó la técnica de hidrólisis reductiva modificada por Jol *et al.*²⁰. En estos casos la hidrólisis a 80 °C se realizó durante 30 min. Luego, una vez que la solución alcanzó la temperatura ambiente, se le añadieron nuevamente 0,1 ml de MMB. Seguidamente se evaporó el solvente con corriente de aire seco a 50 °C. Al producto seco se le agregaron 0,4 ml de TFA 2 M y se dejó en estufa a 120 °C durante 2 h. El proceso luego continuó como se describió anteriormente para la técnica original.

7.5.5 Preparación de 1-amino-1-desoxialditoles

Se efectuó mediante la técnica descripta por Cases *et al.*²¹.

REACTIVOS

Solución A: Solución 1:8 (v/v) de (*S*)-1-amino-2-propanol en metanol.

Solución B: Solución 1:4 (v/v) de ácido acético glacial en metanol.

Solución C: Solución de cianoborohidruro de sodio en metanol al 3 % (p/v).

PROCEDIMIENTO

A los polisacáridos hidrolizados (sección 7.5.1) se les agregaron en forma consecutiva, por cada mg de muestra: 20 µl de solución A, 17 µl de solución B y 13 µl de solución C. A continuación los viales se llevaron a estufa a 65 °C durante 1-2 h. Una vez que alcanzaron la temperatura ambiente se les agregó, bajo campana, TFA 3 M hasta alcanzar pH 1-2. Tras evaporación, se les agregó agua destilada (3 x 0,5 ml) y metanol (5 x 0,5 ml), con evaporaciones intermedias. Los residuos se dejaron por una noche en desecador en vacío.

Finalmente se acetilaron con 1 ml de piridina-anhídrido acético (1:1), a 100 °C durante 45 min y se enfriaron. Los aminoalditoles peracetilados se extrajeron con cloroformo. Los extractos clorofórmicos se lavaron 2 veces con solución saturada de bicarbonato de sodio (1 ml) y 2 veces con agua destilada (1 ml). Los mismos se secaron mediante el agregado de sulfato de sodio anhidro y se llevaron a sequedad. Los derivados se tomaron con cloroformo para ser inyectados en el cromatógrafo gaseoso.

Para determinar la configuración absoluta de la 2-*O*-metilgalactosa y de la 2,6-di-*O*-metilgalactosa, la aminación reductiva se efectuó utilizando (*S*)- α -metilbencilamina según las técnicas descritas por Cases *et al.*²¹ y Errea *et al.*²², respectivamente. La determinación de la configuración de la galactosa dimetilada se realizó sobre polisacáridos permetilados.

REACTIVOS

Solución A: Solución 1:8 (v/v) de (*S*)- α -metilbencilamina en metanol.

Solución B: Solución 1:4 (v/v) de ácido acético glacial en metanol.

Solución C: Solución de cianoborohidruro de sodio en metanol al 3 % (p/v).

PROCEDIMIENTO

A las polisacáridos hidrolizados se le agregaron en forma consecutiva 32 µl de solución A, 17 µl de solución B y 13 µl de solución C por cada mg de muestra. A continuación, los viales se llevaron a estufa a 65 °C durante 2 h. Una vez que alcanzaron la temperatura

ambiente se agregó, bajo campana, TFA 3 M hasta alcanzar pH 1-2. El resto del procedimiento fue idéntico al indicado arriba utilizando 1-amino-2-propanol.

7.6 Estudios de alquilación

La alquilación (metilación y etilación) de los polisacáridos fue realizada sobre sus respectivas sales de trietilamonio según lo descrito por Stevenson y Furneaux¹⁹, utilizando las condiciones y reactivos propuestos por Ciucanu y Kerek²³.

OBTENCIÓN DE LAS SALES DE TRIETILAMONIO

Estas se prepararon disolviendo 5 mg de las muestras en 0,5 ml de agua y sembrándolas en una columna que contenía una resina Amberlite IR-120 (H⁺). La columna se había equilibrado previamente con clorhidrato de trietilamonio al 5 % y lavado con abundante agua hasta reacción negativa de cloruros en los eluidos.

Las sales de trietilamonio de los polisacáridos se recuperaron por elución con agua y posterior liofilización. Estas luego se sometieron a reacciones de metilación o etilación.

7.6.1 Metilación

La sal de Et₃NH⁺ de cada polisacárido (~5 mg) se disolvió con agitación en aproximadamente 0,5 ml de DMSO anhidro. Posteriormente se agregaron 100 mg de hidróxido de sodio pulverizado, y se agitó la mezcla durante 30 min. A continuación la solución se colocó en baño de hielo, se le añadieron 0,5 ml de yoduro de metilo y se agitó durante 30 min más. Para finalizar la reacción se agregaron 3 ml de agua. Los productos permetilados se purificaron y recuperaron por diálisis (bolsa de poro 3.500) y liofilización.

7.6.2 Etilación

La sal de Et₃NH⁺ del polisacárido (~5 mg) fue tratada de igual manera que al realizar la metilación, pero utilizando en este caso yoduro de etilo como agente alquilante. Como la reacción es más lenta, se realizaron dos agregados de NaOH y dos de IEt, separados cada uno

por 30 min. El proceso de purificación y obtención fue el mismo que el descrito para los productos de metilación.

Los productos alquilados fueron posteriormente hidrolizados y derivatizados para cromatografía gaseosa, tal como se describió en 7.5.

7.7 Tratamiento alcalino tradicional de polisacáridos²⁴

Aproximadamente 100 mg de polisacárido se disolvieron en 50 ml de agua, y se adicionaron 50 mg de borohidruro de sodio. Al cabo de 24 h se agregaron 90 mg más de NaBH₄ y 25 ml de una solución de NaOH 3 M. De acuerdo a los antecedentes, según el polisacárido tratado se utilizaron diferentes tiempos de calentamiento: de 2 a 3 h para el μ/v -carragenano parcialmente ciclado(C)²⁵, de 3 a 5 h para el porfirano (P)²⁶ y el coralinano Pa1d, y 16 h para el λ -carragenano (T1)²⁵.

7.8 Cromatografía gas-líquido

Las cromatografías gas-líquido se realizaron en un cromatógrafo Hewlett Packard 5890A equipado con un detector de ionización de llama (FID) y un integrador HP3395. Se utilizó nitrógeno como gas portador y las corridas se efectuaron con valores de flujo entre 0,7 y 1,4 ml/min y una relación de split cercana a 80:1.

7.8.1 Análisis de alditoles y aldónitrilos acetilados

Los monosacáridos componentes de los polisacáridos y de sus productos de alquilación derivatizados como alditoles o aldónitrilos fueron analizados utilizando una columna capilar SP-2330 (Supelco) de 30 m de longitud, 0,25 mm de diámetro interno y 0,20 μ m de espesor de film. Se empleó un flujo de gas carrier de 1-1.3 ml/min y una presión de cabeza de columna de 15 psi. En todos los casos la temperatura del inyector y detector fue de 240 °C.

Para los azúcares provenientes del polisacárido nativo se emplearon los siguientes programas:

Programa **A** para alditoles peracetilados: 200 → 230 °C a 2 °C/min, 230 °C durante 20 min.

Programa **B** para aldononitrilos peracetilados: isotérmico a 220 °C durante 40 min.

Para los azúcares provenientes del polisacárido metilado o etilado se empleó el siguiente programa de temperatura:

Programa **C**: 160 → 210 °C a 2 °C/min, 210 → 240 °C a 5 °C/min, 240 °C durante 20 min.

7.8.2 Análisis de los 1-amino-1-desoxialditoles

Los productos provenientes de derivatización por aminación reductiva fueron analizados con una columna Ultra 2 (Hewlett-Packard) con las siguientes dimensiones: 50 m, 0,36 mm de diámetro interno y 0,17 µm de espesor de film. Se utilizó una presión de cabeza de columna de 11 psi y un flujo de gas carrier de 0,8 ml/min.

Los programas utilizados fueron dependientes de la amina quiral con que se realizó la derivatización:

Programa **D** para los 1-desoxi-1-(2'-hidroxipropilamino)alditoles peracetilados: 180 → 220 °C a 2 °C/min, 220 °C durante 2 min, 220 → 250 °C a 1 °C/min, 250 °C durante 20 min. Temperatura del inyector y del detector 270 °C.

Programa **E** para los 1-desoxi-1-(1'-feniletilamino)alditoles peracetilados: 180 → 220 °C a 2 °C/min, 220 °C durante 2 min, 220 → 270 °C a 1 °C/min, 270 °C durante 20 min. Temperatura del inyector y del detector 270 °C.

7.9 Cromatografía gas-líquido acoplada a espectrometría de masa

Para las muestras analizadas por cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masa se utilizó un cromatógrafo Shimadzu GC17A conectado a un espectrómetro de masa Shimadzu GCMS QP5050 A con potencial de ionización de 70 eV y helio como gas carrier (1

ml/min). Las condiciones cromatográficas utilizadas fueron las mismas que las descritas en 7.6.

7.10 Análisis por RMN

Los espectros se realizaron en un espectrómetro Bruker AM 500 y un espectrómetro Bruker Avance II 500 a 500.13 (^1H) y 125.77 (^{13}C) MHz utilizando tubos de 5 mm a temperatura ambiente. Se utilizó acetona como estándar interno (referido a Me_4Si el grupo metilo de la acetona se calibró en 31.1 ppm en ^{13}C y en 2.22 ppm en ^1H).

En el caso de los espectros de RMN de ^{13}C , 30 mg de muestra se disolvieron en agua deuterada y agua destilada hasta lograr 0,5 ml de una mezcla de $\text{H}_2\text{O}-\text{D}_2\text{O}$ (aprox. 1:1). Los parámetros utilizados fueron los siguientes: tiempo de relajación máximo, ángulo de pulso de 90° y unos 40000 pulsos, sin espacio entre pulsos.

Para los espectros de RMN de ^1H , 10 mg de muestra se disolvieron en 0,5 ml de agua deuterada y se liofilizaron, a fin de intercambiar los protones de sus oxhidrilos. Este procedimiento se realizó una vez más. Finalmente se disolvieron en D_2O (0,5 ml) y tras filtrar se dispusieron en tubos de 5 mm de diámetro. Se añadió acetona como estándar interno. Se acumularon 300 pulsos, y para eliminar el pico de HOD se efectuó la secuencia de pulso $180^\circ-\tau-90^\circ$.

Los experimentos en 2D se realizaron utilizando los parámetros estándar del software de Bruker.

7.11 Técnicas desarrolladas en el Capítulo 3, Sección A

7.11.1 Determinación de la α -galactosa 6-sulfato en un sistema “one-pot”

Entre 1 y 2 mg de los polisacáridos se disolvieron en 0,2 ml de agua y se les adicionó 1 mg de NaBH_4 . Luego de 1 h se les agregaron 0,1 ml de NaOH 3 M, con el objetivo de obtener soluciones de concentración final 1 M. Estas se colocaron en estufa a 80°C en viales cerrados, durante el tiempo necesario para realizar la ciclación completa de todas las unidades de α -galactosa 6-sulfato. Luego cada solución se dejó enfriar y se agregaron aproximadamente 0,12 ml de TFA 3 M para neutralizarlas. A continuación se les agregó una

resina de intercambio catiónico (Amberlite IR-120 [H⁺]). Después de separar la resina por filtración, se evaporó el solvente y se procedió a realizar la derivatización de los monosacáridos a alditoles peracetilados por la técnica de hidrólisis reductiva descrita en la sección en 7.5.4. La proporción de α -galactosa 6-sulfato presente en el polisacárido nativo queda determinada por la diferencia entre la 3,6-anhidrogalactosa presente en éste y en el polisacárido tratado con álcali.

7.11.2 Técnica de doble hidrólisis-doble aminación reductiva para la determinación de la configuración de la 3,6-anhidrogalactosa

En un experimento típico se tomaron entre 1 y 2 mg del polisacárido y se le agregaron 1 mg de inositol (estándar interno) y 0,25 ml de TFA 0,1 M. Esta solución, en vial cerrado, se llevó a estufa a 80 °C durante 3 h. Luego del período de calentamiento donde se hidrolizó selectivamente la unión glicosídica de la 3,6-anhidrogalactosa¹⁹, se enfrió la solución y se evaporó el solvente. A continuación se agregaron 0,5 ml de agua y se evaporó con corriente de aire. Este lavado se repitió 3 veces hasta eliminar totalmente el ácido.

El residuo resultante fue sometido a una reacción de aminación reductiva con α -metilbencilamina racémica o de configuración (*S*)- según se indica, utilizando las condiciones descritas en la sección 7.5.5. A los polisacáridos hidrolizados se le agregaron en forma consecutiva 20 μ l de solución A, 17 μ l de solución B y 13 μ l de solución C por cada mg de muestra. A continuación los viales fueron llevados a estufa a 65 °C durante 1-2 h. Una vez que alcanzaron la temperatura ambiente se les agregó, bajo campana, TFA 3 M hasta alcanzar pH 1-2, y el contenido de los viales se evaporó. Luego se les agregó y posteriormente evaporó: agua destilada (3 x 0,5 ml) y metanol (5 x 0,5 ml).

Al residuo resultante se le agregaron 0,5 ml de TFA 2 M y se colocó en estufa 2 h a 120 °C (sección 7.5.1). A continuación la solución se enfrió, se evaporó el solvente y se realizaron lavados con agua para eliminar las trazas de ácido.

Posteriormente el residuo fue sometido a una nueva aminación reductiva con α -metilbencilamina como en la primer etapa.

Los aminodesoxialditoles formados se dejaron en desecador por una noche, y finalmente fueron peracetilados con piridina y anhídrido acético (1:1) a 100 °C por 45 min. Los productos fueron aislados por extracción con cloroformo como se describe en 7.5.5.

La técnica fue aplicada sobre κ -carragenano, ι -carragenano y agarosa de origen comercial, el agarano aislado del alga *P. columbina* y los carragenanos $\mu/\nu/\kappa/\iota$ - y λ - aislados de *I. undulosa*. Finalmente se empleó para determinar la configuración de la 3,6-AnGal en los polisacáridos de *J. rubens* (Capítulo 5). El procedimiento preparativo se realizó del mismo modo, tal como se indica en la página 80.

7.11.3 Técnica de doble hidrólisis-doble aminación reductiva utilizando 1-amino-2-propanol

La técnica utilizada es similar a la descrita en la sección anterior con la diferencia que la aminación reductiva fue realizada con 1-amino-2-propanol racémico o de configuración (*S*), según se indique. Las proporciones de los reactivos fueron las descritas en 7.5.5.

La técnica fue aplicada sobre κ -carragenano, ι -carragenano y agarosa de origen comercial. El método también fue utilizado para determinar la configuración de la 3,6-anhidrogalactosa presente en el agarano aislado del alga *P. columbina* y los carragenanos $\mu/\nu/\kappa/\iota$ - y λ - aislados de *I. undulosa*.

7.11.4 Variaciones en la técnica de doble hidrólisis-doble aminación

7.11.4.1 Reacción de doble hidrólisis-doble aminación sin evaporación de TFA

La técnica descrita en 7.11.1 fue modificada a partir de no realizar el agregado de agua para la evaporación exhaustiva del TFA utilizado para destruir el exceso de NaCNBH₃. El resto de la metodología fue idéntica.

7.11.4.2 Reacción de doble hidrólisis-doble aminación sin segundo agregado de MBA

Se modificó la técnica descrita en 7.11.1 suprimiendo el agregado de α -metilbencilamina en la segunda aminación reductiva de la técnica. En cambio, fueron agregados el NaCNBH₃ y el AcOH en metanol, como se describe en 7.11.1. El resto de la metodología fue idéntica.

7.11.4.3 Reacción de doble hidrólisis-doble aminación combinada con MBA y AP

La técnica fue realizada como se describe en la sección 7.11.1, pero realizando la segunda aminación reductiva con 1-amino-2-propanol. El resto de la metodología fue idéntica.

7.11.4.4 Reacción de doble hidrólisis-doble aminación combinada con MBA y NaBH₄

La técnica fue realizada como se describe en la sección 7.11.1, pero en lugar de realizar la segunda etapa de aminación, se generaron los alditoles con NaBH₄ como se describe en 7.5.2.

7.11.5 Determinación configuracional de la 2-*O*-metil-3,6-anhidrogalactosa

Sobre 1 mg de un κ -carragenano metilado y aislado en las condiciones descritas en 7.6, se aplicó la técnica de doble hidrólisis-doble aminación reductiva con α -metilbencilamina presentada en 7.11.1.

7.11.6 Determinación de la configuración de la α -galactosa 6-sulfato

Entre 1 y 2 mg de polisacárido se disolvieron en 0,2 ml de agua y se adicionaron 1 mg de NaBH₄. Luego de 1 h se adicionaron 0,1 ml de NaOH 3 M para obtener una solución final de concentración 1 M. Las soluciones se colocaron en estufa a 80 °C durante el tiempo necesario para realizar la ciclación completa de todas las unidades de α -galactosa 6-sulfato (sección 7.7). Luego de finalizada la reacción se enfrió la solución, y se agregaron 0,12 ml de TFA 3 M para neutralizar. A continuación se agregó una resina de intercambio catiónico (Amberlite IR 120 (H⁺)). Después de separar la resina por filtración se evaporó el solvente y se procedió a realizar la de doble hidrólisis-doble aminación con (*S*)- α -metilbencilamina (sección 7.11.2).

La 3,6-anhidrogalactosa generada en la reacción tendrá la configuración de la α -galactosa 6-sulfato originalmente presente.

7.11.7 Determinación configuracional de la 2,3,4,6-tetra-*O*-metilgalactosa (Capítulo 5)

Esta determinación fue realizada con el polisacárido de la fracción **3.1** aislado de *J. rubens* (secciones 7.2.3 y 7.3). El mismo fue metilado y aislado en las condiciones descritas en 7.6. Luego, utilizando 1 mg de éste se aplicó la técnica de aminación reductiva con (*S*)- α -metilbencilamina presentada en 7.5.5 para determinar la configuración de la 2,6-di-*O*-metilgalactosa.

El estándar cromatográfico fue preparado formando los 1-aminodesoxialditoles con (\pm)- α -metilbencilamina según 7.5.5, utilizando 2,3,4,6-tetra-*O*-metil-D-galactosa comercial (Sigma).

7.12 Evaluación de la α -picolina borano como reductor (Capítulo 3 Sección B)

7.12.1 Aminación reductiva de galactosa en las condiciones de Sato *et al.*²⁷

En la primera experiencia se realizó la reacción de aminación reductiva entre la D-galactosa y las aminas (\pm)-1-amino-2-propanol y (\pm)- α -metilbencilamina. Las condiciones de reacción utilizadas fueron dos de las descritas por Sato *et al.*³³ y los productos fueron analizados por cromatografía gaseosa como aminoalditoles peracetilados.

CONDICIÓN A

A 5 mg de galactosa y 5 mg de inositol (estándar interno) se le agregaron 150 μ l de una mezcla de agua-ácido acético 10:1. Luego se añadieron 0.027 mmol de amina y 0.027 mmol de α -picolina borano. La mezcla se dejó con agitación 2 h a temperatura ambiente. Luego se acidificó con TFA 3 M. La solución se llevó a seco y se lavó con agua destilada (3 x 0,5 ml) y luego con metanol (5 x 0,5 ml). Los residuos se dejaron por una noche en desecador en vacío. El residuo finalmente se acetiló y los derivados formados se asilaron en las condiciones descritas en 7.5.

CONDICIÓN B

A 5 mg de galactosa y 5 mg de inositol (estándar interno) se le agregaron 150 μ l de una mezcla de metanol-ácido acético 10:1. Luego se continuó de la manera descrita para la condición A.

7.12.2 Aminación reductiva de galactosa en las condiciones de Cases *et al.*²⁹

Se realizó la aminación reductiva de 1 mg de galactosa en las condiciones descriptas en 7.5.5, pero utilizando como agente reductor la α -picolina borano. Como estándar interno se agregó 1 mg de inositol. Los 1-aminodesoxialditoles se formaron con (\pm)-1-amino-2-propanol y (\pm)- α -metilbencilamina.

A la galactosa se le agregaron en forma consecutiva 20 o 32 μ l de solución A dependiendo de la amina utilizada, 17 μ l de solución B y 13 μ l de una solución al 5% de α -picolina borano en metanol (1,2 mol de reductor / mol de galactosa) por cada mg de muestra. A continuación se llevaron a estufa a 65 °C durante 2 h. Una vez que alcanzaron la temperatura ambiente se les agregó, bajo campana, TFA 3 M hasta alcanzar pH 1-2. Las soluciones se llevaron a seco y se lavaron con agua destilada (3 x 0,5 ml) y luego con metanol (5 x 0,5 ml). Los residuos se dejaron por una noche en desecador en vacío. Los productos finalmente se acetilaron y aislaron en las condiciones descriptas en 7.5.

7.12.3 Estudio de las condiciones de reacción utilizando α -picolina borano

En todos los casos se utilizaron galactosa y (\pm)-1-amino-2-propanol.

7.12.3.1 Variación de los tiempos de reacción

Se modificaron sistemáticamente los tiempos de la reacción informados para 7.13.2. Los períodos utilizados, expresados en horas, fueron 0,5; 1; 2 y 3.

7.12.3.2 Variación de las temperaturas de reacción

La reacción informada en 7.13.2 se realizó calentando por 1 h a las siguientes temperaturas: 40, 50 y 65 °C.

7.12.3.3 Variación proporción de agente reductor

La proporción de α -picolina borano (1,2 mmol) utilizada en 7.13.2 se cambió a 0,5 y 2 moles por mol de galactosa en las reacciones realizadas a 65 °C y a 10 moles en las realizadas a 40 °C.

7.12.3.4 Variación de la proporción de ácido acético utilizada

La reacción informada en 7.13.2 se realizó en metanol sin AcOH y con un 7% y 20 % de ácido, con 1 h de calentamiento a 65 °C.

7.12.4 Reacciones de aminación reductiva en metanol sin ácido acético

La reacción entre la galactosa y el (\pm)-1-amino-2-propanol se realizó como se informa en 7.13.2, en metanol sin AcOH con 1 h de calentamiento a 65 °C. El volumen final de metanol por mg de azúcar fue el mismo que se empleó en 7.5.5.

7.12.4.1 Reacciones de aminación reductiva en metanol sin ácido acético variando la proporción de amina utilizada

La proporción de amina (1,2 mmol) utilizada en 7.13.4 se cambió a 3 y 5 moles por mol de galactosa.

7.12.5 Condiciones optimizadas para la aminación reductiva con α -picolina borano

A 0,027 mmoles de azúcar reductor se le agregan en forma consecutiva: 50 μ l de metanol, 0,135 mmoles de amina y 0,03 mmoles de α -picolina borano. A continuación, se lleva a estufa a 65 °C en vial cerrado durante 2 h. Transcurrido el período de calentamiento, se deja alcanzar temperatura ambiente y se agrega TFA 3 M hasta alcanzar pH 1-2. Las soluciones se llevan a seco y se lavan con agua destilada (3 x 0,5 ml) y luego con metanol (5 x

0,5 ml). Los residuos se dejan por una noche en desecador en vacío. Los productos finalmente se acetilan y asilan en las condiciones descriptas en 7.5.

7.12.6 Reducción de fructosa con α -picolina borano

En condiciones de solvente y temperatura similares a las de las reacciones de aminación reductiva utilizadas en la sección 7.5.5 se hizo reaccionar 1-2 mg de D-fructosa (1-2 mg). Luego de la reducción se formó el respectivo alditol peracetilado según 7.5.2.

7.13 Reacciones asistidas por microondas

7.13.1 Generalidades

Se utilizó un horno de microondas doméstico marca Sharp, modelo R353EA de 1200 W de potencia y 2450 MHz de frecuencia de irradiación. Todas las reacciones fueron realizadas al 100% de potencia utilizando períodos de calentamiento de 10 o 15 s según se indique. Cada paso de calentamiento fue seguido por la apertura del recipiente y enfriamiento rápido de la solución en baño de hielo hasta 50-60 °C. Esta metodología se utilizó para minimizar los riesgos de explosión por el aumento de la presión del sistema.

La reacción fue realizada en un reactor de teflón de 50 ml con tapa roscada (42 mm el tubo y 52 mm la rosca) y con paredes de 5 mm de grosor (Figura 4.11, pág. 143). El reactor fue construido en los Talleres del Departamento de Industrias (FCEyN-UBA).

7.13.2 Tratamiento alcalino asistido por microondas

Se utilizaron tres polisacáridos para el estudio de tratamiento alcalino: los carragenanos aislados del alga *Iridaea undulosa* en las fases cistocárpica (μ/v -carragenanos parcialmente ciclados) y en la tetraspórica (λ -carragenano), y el agarano aislado del alga *P. columbina* (Sección 7.2.4). Las reacciones fueron realizadas sobre los polisacáridos nativos y sobre los reducidos en sus extremos reductores.

7.13.2.1 Reducción de los polisacáridos

Se tomaron 100 mg de polisacárido y se disolvieron en 50 ml de agua. Luego se adicionaron 100 mg de NaBH₄ y se dejó reduciendo toda la noche. Los polisacáridos reducidos se recuperaron por liofilización luego de diálisis exhaustiva.

7.13.2.2 Reacción de tratamiento alcalino

Se tomaron 20 mg de polisacárido y se disolvieron en 10 ml de una solución de NaOH de concentración deseada (desde 0,5 hasta 3 M). La solución se calentó en el horno de microondas durante el tiempo de reacción fijado (de 15 s hasta 10 min, ver Capítulo 4) utilizando pulsos de irradiación de 15 s. Luego de cada período de calentamiento se abrió el recipiente y se enfrió rápidamente la solución sobre baño de hielo.

En una variante de la reacción se reemplazo el NaOH por KOH y en otra por Na₂CO₃.

7.13.2.3 Seguimiento de la reacción de tratamiento alcalino

El transcurso de la reacción se siguió midiendo la cantidad de 3,6-anhidrogalactosa formada. Para ello se siguió la técnica descrita en la sección 7.11.1. Luego de cada período de calentamiento se tomaron del recipiente de reacción alícuotas de 100 µl de la solución y se neutralizaron con TFA 3 M para luego generar los alditoles peracetilados.

7.13.3 Desulfatación solvolítica asistida por microondas

Se utilizaron cinco polisacáridos para el estudio de desulfatación: carragenanos aislados de las fases cistocárpica y tetraspórica del alga *Iridaea undulosa*, el coralinano aislado del alga *C. officinalis*, fucoidanos aislados del alga *Adenocystis utricularis* y condroitin sulfato tipo A.

La desulfatación solvolítica se realizó sobre las sales de piridinio y de trietilamonio de los polisacáridos sulfatados.

7.13.3.1 Obtención de la sal de piridinio

Método A

Entre 20 y 50 mg de polisacárido se disolvieron en agua y se pasaron a través de una columna de resina de intercambio catiónico Amberlite IR 120 (H⁺). La elución se realizó con agua. Toda la solución eluida de la columna se recogió sobre una solución acuosa de piridina al 20%^{28,29}. Luego la solución se dializó y la sal se recuperó por liofilización.

Método B

Entre 20 y 50 mg de polisacárido se disolvieron en agua y se pasaron a través de una columna de resina de intercambio catiónico Amberlite IR 120 previamente equilibrada con cloruro de piridinio (10 %) y luego lavada con agua. La sal del polisacárido eluido con agua se recuperó por liofilización.

Este método también fue empleado para formar la sal de trietilamonio de los polisacáridos a desulfatar, reemplazando el cloruro de piridinio por el clorhidrato de trietilamina.

Método C

Entre 20 y 50 mg de polisacárido se trataron de igual manera que en el método B, pero inmediatamente después de eluir la sal de la columna se agregaron unas pocas gotas de piridina para llevar el eluido a pH neutro. Luego, la sal del polisacárido se recuperó por liofilización.

7.13.3.2 Reacción de desulfatación solvolítica asistida por microondas

Entre 20 y 50 mg de la sal de piridinio (o trietilamonio) del polisacárido sulfatado fueron disueltas o suspendidas en 9,8 ml de DMSO y 0,2 ml de piridina anhidra. La mezcla se calentó en el horno de microondas irradiando con pulsos de 10 s y enfriando luego de cada pulso en baño de hielo hasta 60 °C. El tiempo final de calentamiento fue de 0,5 a 1,5 minutos, según se indique. La solución tratada se dividió en dos porciones (7 y 3 ml). La porción mayoritaria se dializó en bolsa de poro 3500 durante 48 h en sistema abierto y 24 h más en sistema cerrado, para luego realizar las determinaciones analíticas. El resto de la solución se utilizó para realizar la metilación *in situ*.

7.13.4 Metilación *in situ*

Fue realizada sobre la solución del polisacárido disuelto en DMSO-piridina proveniente de la desulfatación asistida por microondas por el procedimiento de Ciucanu y Kerek²³ (descrito en la Sección 7.6). Cabe aclarar que durante la metilación la solución toma un color rojo-marrón característico del yodo en solución.

7.14 Modelado molecular

7.14.1 Métodos de cálculo

Mecánica molecular

Los cálculos por mecánica molecular fueron realizados utilizando el programa MM3(92) desarrollado por Allinger y colaboradores^{30,31} (QCPE, Universidad de Indiana, USA); modificado (versión MM3(2000)) en: los parámetros torsionales O-C-C-O y O-C-O-H, el parámetro de enlace hidrógeno O-H y la corrección de electronegatividad de C-H³². Además se realizó la modificación sugerida para las rutinas de MM3 cambiando el máximo movimiento atómico de 0.25 a 0,10Å³³. Se utilizaron las constantes dieléctricas indicadas en el texto (Capítulo 6).

Se utilizaron los métodos de minimización y condiciones de finalización que trae el programa por defecto. Cada mínimo fue sometido a un cálculo de segunda derivada para confirmar que realmente correspondía a un mínimo y no a un punto de ensilladura.

Mecánica cuántica

Los cálculos por mecánica cuántica fueron realizados utilizando el programa Gaussian 98W (versión 5.2, revisión A-7) con conjunto de bases estándar³⁴. Cuando se indica, se determinó la energía libre de solvatación de las geometrías obtenidas en fase gaseosa por procedimientos de HF o DFT, utilizando el modelo de solvatación de polarización continua desarrollado por Tomasi y colaboradores (PCM, con agua como solvente)³⁵.

7.14.2 Generación de las superficies de energía

Se siguió el procedimiento general desarrollado por Dowd y colaboradores³⁷⁻³⁹: para cada molécula, todas las estructuras planares de cada anillo fueron generadas por combinación de las 9 orientaciones posibles prefijadas que pueden adoptar los oxhidrilos exocíclicos presentes en C-2 y C-4. Cada grupo metoxilo fue dispuesto inicialmente en la posición más estable generada por el efecto *exo*-anomérico ($\chi_1 \approx 45^\circ$ para los β -glicósidos y -45° para los α -glicósidos).

El anillo plano fue orientado en el plano *x-y*, y fue distorsionado por el movimiento de C-2, C-4 y O-5, junto a sus sustituyentes en el plano *z*. Luego de pruebas preliminares, se decidió mover los átomos en incrementos de 0.1 Å desde -0.7 a $+0.6$ Å para C-2 y O-5 y desde -0.9 a 0.5 Å para C-4. Para una mejor cobertura de las áreas de menor energía, se generaron nuevas estructuras utilizando incrementos de 0,05 Å.

Las estructuras generadas fueron sometidas a minimización por MM3 (“diagonal block”) manteniendo las coordenadas en el eje *z* de los 6 átomos del anillo y dejando relajar los demás grados de libertad. Para cada conformero generado se obtuvo la energía relativa y las coordenadas cartesianas de los átomos. Luego con estas se generaron los parámetros de *puckering* de Cremer-Pople⁴⁰ utilizando un programa escrito por el Dr L. Madsen (Colorado University) en Fortran, readaptado a Quick Basic por el Dr. C. Stortz.

Para la construcción de la superficie de energía con el tipo de presentación de Pickett-Strauss⁴¹, se graficaron los parámetros de *puckering* juntándolos en regiones de $5^\circ(\theta) \times 10(\phi)$. El valor mínimo de energía en cada región fue graficado en función de estos parámetros. El parámetro *Q* y la orientación de los grupos exocíclicos no son incluidos en este tipo de representación.

Siempre se debe tener en cuenta que la representación de la superficie distorsiona la verdadera superficie esférica, especialmente en la zona de los polos.

7.15 Construcción de la Tabla 5.29

La Tabla 5.29 se contruyó en base a los datos de azúcares componentes (Tabla 5.8), mientras que las proporciones de cada sustituyente se calcularon utilizando los resultados obtenidos por metilación y etilación (aldononitrilos, Tablas 5.10 y 5.11). Los resultados se

recalaron para expresarlos como moles cada 200 unidades de galactosas de totales. A modo de ejemplo:

- a) la xilosa se considero toda terminal y su valor es el dato de composición de la Tabla 5.8.
- b) El valor de la 2-*O*-Me-L-Gal también es el que figura en la Tabla 5.8, pero de acuerdo al análisis por etilación (Tabla 5.11) para la fracción **5.1**, un 90% corresponde a unidades del tipo $\rightarrow 4$ -Gal y un 10% a unidades de $\rightarrow 4,6$ -Gal.
- c) Considerando la unidades metiladas de la Tabla 5.10, y obteniendo la relación entre ellas, se puede resolver que:
$$4LG + 4LG2S + 4LG2M = [2,3,6-Gal] + [3,6-Gal] + [2,6-Gal] + [2,3-Gal]$$
, donde $4LG + 4LG2S$ es la cantidad de α -L-galactosa expresada en la Tabla 5.8.
- d) $4LG2S = [3,6-Gal]$ de la Tabla 5.10.

Bibliografía

1. Cases, M. R.; Stortz, C. A.; Cerezo, A. S. *Phytochemistry*, **1992**, 31, 3897-3900.
2. Cases, M. R. Tesis Doctoral. "*Estudio del sistema de polisacáridos del alga calcárea Corallina officinalis*", FCEyN-UBA, **1995**.
3. Usov, A. I.; Bilan, M. I.; Klochkova, N. G. *Bot. Mar.*, **1995**, 38, 43-51.
4. Usov, A. I.; Bilan, M. I.; Shashkov, A. S. *Carbohydr. Res.*, **1997**, 303, 93-102.
5. Takano, R.; Hayashi, J.; Hayashi, K.; Hara, S.; Hirase, S. *Bot. Mar.*, **1996**, 39, 95-102.
6. Nosedá, M. D.; Viana, A. G.; Duarte, M. E. R.; Cerezo, A. S. *Carbohydr. Res.*, **2000**, 42, 301-305.
7. Stortz, C. A.; Cerezo, A. S. *Carbohydr. Res.*, **1993**, 242, 217-227.
8. Dubois, M.; Gilles, K. A.; Hamilton, J. K.; Rebers, P. A.; Smith, F. *Anal. Chem.*, **1956**, 28, 350-356.
9. Blumenkrantz, N.; Asboe-Hansen, G. *Anal. Biochem.*, **1973**, 54, 484-489.
10. Filisetti-Cozzi, T. M. C. C.; Carpita, N. C. *Anal. Biochem.*, **1991**, 197, 157-162.
11. Lowry, O. H.; Rosebrough, N. J.; Farr, A. L.; Randall, R. J. *J. Biol. Chem.*, **1951**, 193, 265-275.
12. Dodgson, K. S. *Biochem. J.*, **1961**, 78, 312-319
13. Dodgson, K. S.; Price, R. G. *Biochem. J.*, **1962**, 84, 106-110
14. Park, J. T.; Johnson, M. J. *J. Biol. Chem.*, **1949**, 181, 149-151.
15. Albersheim, P.; Nevins, D. J.; English, P. D.; Karr, A. *Carbohydr. Res.*, **1967**, 5, 340-345.
16. Shea, E. M.; Carpita, N. C. *J. Chromatogr.*, **1988**, 445, 424-428.
17. Turner, S. H.; Cherniak, R. *Carbohydr. Res.*, **1981**, 95, 137-144.
18. Seymour, F. R.; Chen, E. C. M.; Bishop, S. H. *Carbohydr. Res.*, **1979**, 73, 19-45.
19. Stevenson, T. T.; Furneaux, R. H. *Carbohydr. Res.*, **1991**, 210, 277-298.
20. Jol, C. N.; Neiss, T. G.; Penninkhof, B.; Rudolph, B.; De Ruiter, G. A. *Anal Biochem*, **1999**, 268, 213-222.
21. Cases, M. R.; Cerezo, A. S.; Stortz, C. A. *Carbohydr. Res.*, **1995**, 269, 333-341.
22. Errea, M. I.; Kolender, A. A.; Matulewicz, M. C., *Bot. Mar.*, **2001**, 44, 133-138.
23. Ciucanu, I.; Kerek, F. *Carbohydr. Res.* **1984**, 131, 209-217.
24. Anderson, N. S.; Dolan, T. C. S.; Lawson, C. J.; Penman, A.; Rees, D. A. *Carbohydr. Res.* **1968**, 7, 468-473.

25. Ciancia, M; Nosedá, M. D.; Matulewicz, M. C.; Cerezo, M. C. *Carbohydr. Polym.*, **1993**, 20, 95-98.
26. Nosedá, M. D.; Viana, A. G.; Duarte, M. E. R.; Cerezo, A. S. *Carbohydr. Res.*, **2000**, 42, 301-305.
27. Sato, S; Sakamoto, T.; Miyazawa, E.; Kikugawa, Y. *Tetrahedron*, **2004**, 60, 7899-7906.
28. Usov, I. A.; Adamyants, K. S.; Miroshnikova, L. I.; Shaposhnikova, A. A.; Kochetkov, N. K. *Carbohydr. Res.*, **1971**, 18, 336-338
29. Usov, I. A.; Miroshnikova, L. I.; Kochetkov, N. K. *Zh. Obshch. Khim*, **1972**, 42, 945-949 (En ruso).
30. Allinger, N. L., Yuh, Y. H.; Lii, J. -H. *J. Am. Chem. Soc.*, **1989**, 111, 8551-8566.
31. Allinger, N. L., Rahman, M.; Lii, J. -H. *J. Am. Chem. Soc.*, **1990**, 112, 8293-8307.
32. Stortz, C. A. *J. Comput. Chem.*, **2005**, 26, 471-483.
33. MM3 (96). *Bull. QCPE*, **1997**, 17 (1), 3.
34. Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Zakrzewski, V. G.; Montgomery Jr., J. A.; Stratmann, R. E.; Burant, J. C.; Dapprich, S.; Millam, J. M.; Daniels, A. D.; Kudin, K. N.; Strain, M. C.; Farkas, O.; Tomasi, J.; Barone, V.; Cossi, M.; Cammi, R.; Mennucci, B.; Pomelli, C.; Adamo, C.; Clifford, S.; Ochterski, J.; Petersson, G. A.; Ayala, P. Y.; Cui, Q.; Morokuma, K.; Malick, D. K.; Rabuck, A. D.; Raghavachari, K.; Foresman, J. B.; Cioslowski, J.; Ortiz, J. V.; Baboul, A. G.; Stefanov, B. B.; Liu, G.; Liashenko, A.; Piskorz, P.; Komaromi, I.; Gomperts, R.; Martin, R. L.; Fox, D. J.; Keith, T.; Al-Laham, M. A.; Peng, C. Y.; Nanayakkara, A.; Gonzalez, C.; Challacombe, M.; Gill, P. M. W.; Johnson, B.; Chen, W.; Wong, M. W.; Andres, J. L.; Gonzalez, C.; Head-Gordon, M.; Replogle, E. S.; Pople, J. A. Gaussian 98, Revision A.7. Gaussian, Inc., Pittsburgh PA, **1998**.
35. Barone, V.; Cossi, M.; Tomasi, J. *J. Comput. Chem.*, **1998**, 19, 404-417.
36. Dowd, M. K.; French, A. D.; Reilly, P. J. *Carbohydr. Res.*, **1994**, 264, 1-19.
37. French, A. D.; Dowd, M. K. *J. Comput. Chem.*, **1994**, 15, 561-570.
38. Dowd, M. K.; Rockey, W. M.; French, A. D.; Reilly, P. J. *J. Carbohydr. Chem.*, **2002**, 21, 11-25.
39. Rockey, W. M.; Dowd, M. K.; Reilly, P. J.; French, A. D. *Carbohydr. Res.*, **2001**, 335, 261-273.
40. Cremer, D.; Pople, J. A. *J. Am. Chem. Soc.*, **1975**, 97, 1354-1358.
41. Pickett, H. M.; Strauss, H. L. *J. Am. Chem. Soc.*, **1970**, 92, 7281-7290.

RESUMEN FINAL

Este trabajo de Tesis incluye un capítulo introductorio general, cinco capítulos de resultados (cada uno de ellos con una introducción particular al tema) y uno que contiene a los materiales y métodos utilizados.

Los resultados presentados en este trabajo se enmarcan dentro del campo de los estudios de los polisacáridos de algas rojas. Los cinco capítulos de resultados pueden dividirse en tres grupos de acuerdo al enfoque y la metodología utilizada:

- a) Dos de los Capítulos (2 y 5) contienen los resultados obtenidos al estudiar los sistemas de polisacáridos de algas calcáreas pertenecientes al orden Corallinales. Estos tuvieron como objetivos determinar nuevas estructuras y comprender mejor las antes descriptas. Además, se hizo especial énfasis en los sistemas de aislamiento y purificación.
- b) En los Capítulos 3 y 4 se presentan nuevas metodologías de análisis de polisacáridos de algas rojas. Estas tuvieron como objetivo primordial acelerar, facilitar y simplificar los estudios, dando lugar además a resultados más confiables. Por otra parte, el desarrollo de éstas técnicas permitió extender los estudios a los polisacáridos aislados de algas rojas no pertenecientes a las Corallinales, los cuales son más extensamente estudiados por su valor comercial.
- c) El Capítulo 6 contiene los resultados que surgieron del estudio teórico por modelado molecular de las conformaciones del metilglicósido de la 3,6-anhidro- α -D-galactosa. También se estudiaron otros 3,6-anhidroglicósidos con el objetivo de comprender mejor los factores que gobiernan a las conformaciones de estos.

A continuación, se resumen las tareas llevadas a cabo y los principales resultados obtenidos.

En el Capítulo 2 se presentan los resultados obtenidos al evaluar diferentes métodos de extracción para polisacáridos de algas pertenecientes al orden Corallinales.

Las algas elegidas, *Corallina officinalis*, *Bossiella orbigniana* y *Jania rubens*, fueron extraídas por tres métodos distintos:

- a) Destrucción de la capa de carbonato de calcio con ácido clorhídrico concentrado y posterior extracción con una solución de concentración 0,1 M del mismo ácido.

- b) Destrucción de la capa de carbonato de calcio con ácido clorhídrico diluido manteniendo siempre el pH encima de 7, y posterior extracción con ésta solución.
- c) Extracción con agua a ebullición.

Mientras que los polisacáridos de *C. officinalis* habían sido estudiados previamente, los aislados de *B. orbigniana* y *J. rubens* fueron analizados por primera vez en este trabajo.

Los tres métodos permitieron extraer cantidades aproximadamente similares de producto. Sin embargo, la composición de éstos fue diferente dependiendo del método de extracción utilizado. Mientras que el agua a 100 °C fue más eficiente para extraer proteínas y almidón de florídeas, los medios de extracción ácidos tuvieron mayor capacidad para aislar los xilogalactanos. El uso de agua a ebullición permitió aislar xilogalactanos con menor contenido de xilosa.

Posteriormente, los residuos de extracción de las tres algas fueron sometidos a un segundo proceso extractivo con agua a ebullición. Los nuevos productos tuvieron una composición y rendimiento similar al observado en la primera extracción con agua a 100 °C.

Las características de los xilogalactanos aislados de las tres algas fueron similares, aunque en cada uno de ellos se encontraron detalles distintivos. El más significativo fue el hallazgo de 3,6-anhidrogalactosa en los xilogalactanos aislados de *J. rubens*. Este anhidroazúcar no había sido encontrado en ningún otro coralinano.

En la primer sección del Capítulo 3 de este trabajo de Tesis se presenta una técnica para determinar la configuración absoluta de las unidades de 3,6-anhidrogalactosa y de su derivado metoxilado en C-2, habitualmente presentes en agaranos y carragenanos. La técnica se basó en la formación de diastereómeros con una amina quiral, para luego separarlos y cuantificarlos por cromatografía gas-líquido.

La secuencia de reacción se inició con una hidrólisis suave que rompe selectivamente la unión glicosídica del anhidroazúcar, y posteriormente sobre el nuevo aldehído generado se efectuó una reacción de aminación reductiva con (*S*)- α -metilbencilamina. A continuación se llevó a cabo una hidrólisis total y un nuevo paso de aminación reductiva con la misma amina. Por último, se procedió a peracetilar los aminodesoxialditoles formados y a analizarlos por CGL.

También se probó la secuencia de reacción con 1-amino-2-propanol, aunque en este caso los diastereómeros de los anhidroazúcares no fueron separables.

Esta técnica, en combinación con una reacción de tratamiento alcalino “one-pot”, sirvió para cuantificar los enantiómeros de la α -galactosa 6-sulfato. La técnica de tratamiento alcalino “one-pot” incluyó la etapa de ciclación de la galactosa sulfatada en NaOH, posterior neutralización del medio y finalmente la derivatización, tanto a aminodesoxialditoles como a alditoles peracetilados.

Estas metodologías se aplicaron a diferentes polisacáridos, lo cual permitió demostrar la aplicación y utilidad de las mismas. Fueron especialmente interesantes los resultados obtenidos al analizar los polisacáridos aislados de *Porphyra columbina*, ya que se demostró la existencia de unidades de α -D-galactosa 6-sulfato, aún cuando toda la 3,6-anhidrogalactosa es de la serie L.

En la Sección B se muestran los resultados obtenidos al emplear α -picolina borano como agente reductor en las reacciones de aminación reductiva utilizadas para determinar la configuración absoluta de los azúcares, a fin de minimizar la toxicidad de los subproductos.

Al emplear α -picolina borano en lugar de NaCNBH₃, se observó una reacción secundaria de epimerización del azúcar utilizado. Aparentemente ésta transcurría por un mecanismo similar al reordenamiento de Amadori.

Para evitar esas reacciones secundarias se evaluaron diferentes condiciones de reacción, utilizando galactosa y 1-amino-2-propanol. Los resultados obtenidos demostraron la necesidad de realizar la aminación reductiva en ausencia de ácido y con un exceso de 5 equivalentes de amina. Las condiciones finales se probaron con éxito en la determinación configuracional de azúcares constituyentes de diferentes polisacáridos.

En el Capítulo 4, el cual se dividió en tres secciones, se presentan los resultados obtenidos al efectuar distintas reacciones con asistencia de microondas.

En la Sección 4A se presenta una serie de experimentos orientados a caracterizar a un horno de microondas hogareño. Estos se diseñaron para evaluar la potencia de irradiación, verificar la linealidad del calentamiento en el tiempo y encontrar la zona de mayor velocidad de absorción de energía.

Los resultados demostraron que el microondas hogareño (multimodo) generaba una irradiación no homogénea en su cubículo, por lo que se utilizó la zona central del plato del horno ya que en ésta región el calentamiento era homogéneo y reproducible. También se verificó el ámbito de linealidad de calentamiento vs tiempo.

La segunda Sección del Capítulo 4 (4B) contiene los resultados obtenidos al realizar la reacción de tratamiento alcalino de agaranos y carragenanos utilizando microondas como fuente de energía. La producción de 3,6-anhidrogalactosa a partir de la ciclación en álcali de unidades de galactosa 6-sulfato presentes en polisacáridos, es una reacción utilizada tanto industrialmente como a nivel de laboratorio.

Los experimentos demostraron que la utilización de microondas aceleraba notablemente la reacción en comparación a las fuentes convencionales de calentamiento. También se observó que el orden relativo de las velocidades de ciclación de las unidades de galactosa 6-sulfato presentes en los diferentes galactanos era similar al encontrado con el calentamiento convencional.

Al realizar la reacción con distintos polisacáridos y concentraciones de álcali, se determinó que la mayor velocidad se alcanzaba a 2 M de NaOH. Esto se debía al hecho que la velocidad de calentamiento disminuía con la concentración de la base, lo que se compensaba parcialmente con la aceleración de la reacción por la mayor concentración de álcali.

En la tercer Sección se presentan los resultados logrados al desulfatar con microondas (irradiando 1 min) las sales de piridinio de diferentes polisacáridos en DMSO. Los polisacáridos utilizados fueron un λ -carragenano, un μ/ν -carragenano parcialmente ciclado, una coralinano, un fucoidano y condroitín sulfato.

Las sales de piridinio fueron obtenidas por tres métodos diferentes, aunque el más efectivo fue aquel que incluye un paso de neutralización final con piridina.

Las desulfataciones removieron entre el 60 y el 93% de los grupos sulfato presentes. En la reacción se observaron algunos signos de degradación, aunque estos se moderaron sensiblemente al generar adecuadamente la sal de piridinio.

Luego se acopló a desulfatación asistida con microondas una técnica de metilación en el mismo medio de reacción. La alquilación, utilizada para las determinaciones estructurales, se pudo realizar perfectamente y permitió un importante ahorro de tiempo.

En el Capítulo 5 se exponen los resultados logrados al analizar en detalle los polisacáridos de *Jania rubens*. Los mismos fueron aislados secuencialmente con agua a 100°C, con agua a temperatura ambiente luego de destruir la capa de carbonato de calcio con HCl 0,1 N, y por último nuevamente con agua a ebullición. Los xilogalactanos aislados con agua caliente estaban fuertemente contaminados con almidón de florídeas, por lo que el estudio detallado fue realizado sobre aquellos aislados a temperatura ambiente (**PA1d**).

El fraccionamiento de **PA1d** por cromatografía de intercambio iónico permitió separar 10 fracciones diferentes. Estas fueron caracterizadas cuantificando hidratos de carbono, proteínas, ácidos urónicos, sulfato y peso molecular promedio. Además, se analizaron los azúcares componentes de los mismos y se determinaron las configuraciones de los monosacáridos. El análisis estructural se llevó a cabo por metilación, etilación, desulfatación-metilación y RMN.

El grupo principal de polisacáridos estaba conformado por la díada repetitiva [$\rightarrow 3$]- β -D-Galp-(1 \rightarrow 4)- α -L-Gal-(1 \rightarrow), aunque ésta se encontraba modulada por la sorpresiva presencia de 3,6-anhidro- α -L-galactosa.

Las unidades de β -D-Gal tenían la mayor parte de los O-6 sustituidos con cadenas simples de β -D-xilosa. Se determinó también que en la misma posición estaban unidas proporciones menores de grupos sulfato y metoxilo. Para las unidades de α -L-galactosa se encontró sustitución de C-2 con grupos sulfato y metoxilo, y la de C-3 con este último. Además, para una parte de las unidades de 3,6-AnGal se determinó que la posición C-2 se encontraba sulfatada.

Para una fracción minoritaria de polisacáridos se determinó, además de las sustituciones ya descritas, la presencia de unidades laterales de 2,3-di- y 3-O-metil-D-galactosa, y de 3-O-metil-L-galactosa. Estas se encontrarían unidas al O-3 y O-6 de unidades de α -L-galactosa y al O-6 de la β -D-Gal.

En el Capítulo 6 se presenta el estudio por modelado molecular de las diferentes conformaciones de los metil 3,6-anhidroglicósidos de configuración β -D-galacto, α -D-galacto y β -D-gluco. Además, se analizaron tres compuestos biciclooctánicos como modelo. Los cálculos se realizaron utilizando mecánica molecular (MM3) y mecánica cuántica (HF/6-31+G** y B3LYP/6-31+G**). Se utilizaron diferentes constantes dieléctricas (en mecánica molecular) y simulación de solvente (en los métodos cuánticos).

Utilizando mecánica molecular se construyeron las superficies de energía graficando las energías calculadas contra los parámetros (ϕ y θ) que describen la forma de los anillos de seis miembros.

Las conformaciones de menor energía encontradas para los 3,6-anhidroglicósidos fueron cercanas a las 1C_4 y $B_{1,4}$. Sin embargo, los resultados mostraron que la silla era la conformación más estable y que se encontraba distorsionada hacia la forma E_4 , debido a la

interacción del C-1 con el anillo de 5 miembros. La distorsión fue lógicamente mayor en aquellos compuestos de configuración β -. Para el compuesto con configuración β -galacto se había determinado que en solventes polares la conformación 1C_4 era la más estable, mientras que en solventes no polares la más estable era la $B_{1,4}$.

Los resultados obtenidos por cálculo teórico coinciden en buena medida con aquellos experimentales informados en literatura.

Las distintas partes de este trabajo de Tesis dieron lugar a las siguientes publicaciones:

- Navarro, D. A.; Stortz, C. A.
Isolation of xylogalactans from the Corallinales: influence of the extraction method on yields and compositions.
Carbohydr. Polym., **2002**, 49, 57-62.
- Navarro, D. A.; Stortz, C. A.
Determination of the configuration of 3,6-anhydrogalactose and cyclizable α -galactose 6-sulfate units in red seaweed galactans.
Carbohydr. Res., **2003**, 338, 2111-2118.
- Navarro, D. A.; Stortz, C. A.
Modeling ring puckering in strained systems: application to 3,6-anhydroglycosides.
Carbohydr. Res., **2005**, 340, 2030-2038.
- Navarro, D. A.; Stortz, C. A.
Microwave-assisted alkaline modification of red seaweed galactans with potential industrial application.
Carbohydr. Polym., **2005**, 62, 187-191.
- Navarro, D. A.; Flores, M. L.; Stortz, C. A.
Microwave-assisted desulfation of sulfated polysaccharides.
Carbohydr. Polym., **2007**, 69, 742-747.
- Navarro, D. A.; Stortz, C. A.
The system of xilogalactans from red seaweed *Jania rubens* (Corallinales, Rhodophyta).
Carbohydr. Res., **2008**, en prensa, doi:10.1016/j.carres.2008.06.015.

Además, en el período de duración de esta Tesis se trabajó en otros temas que generaron las siguientes publicaciones:

- Navarro, D. A.; Cerezo, A. S., Stortz, C. A.
NMR spectroscopy and chemical studies of an arabinan-rich system from the endosperm of seed of *Gleditsia triacanthos*.
Carbohydr. Res., **2002**, 337, 255-263.
- Cappelletti, C. I.; Navarro, D. A.; Manzi, A. E.; Stortz, C. A.; Cerezo, A. S.
Weak bond-linked components of the reserve and fibrillar cell wall of the endosperm of *Gleditsia triacanthos*.
Arkivoc, **2005**, 12, 62-75.
- Navarro, D. A.; Stortz, C. A.
DFT/MM modeling of the five-membered ring in 3,6-anhydrogalactose derivatives and its influence on disaccharide adiabatic maps.
Carbohydr. Res., **2008**, en prensa, doi:10.1016/j.carres.2008.04.037

Además, como parte de un convenio con una compañía farmacéutica local, se optimizaron las condiciones para la obtención de condroitín sulfato de alta pureza, a partir de tráquea vacuna.