Biblioteca Digital
F C E N - U B A

BIBLIOTECA CENTRAL LUIS F LELOIR
BIBLIOTECA CENTRAL LELOIR
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES UBA

Tesis Doctoral

Galactanos de Hypnea musciformis. Estructura, propiedades y modificaciones

Cosenza, Vanina Andrea

2015

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:
Cosenza, Vanina Andrea. (2015). Galactanos de Hypnea musciformis. Estructura, propiedades y modificaciones. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n5814_Cosenza

Cita tipo Chicago:
Cosenza, Vanina Andrea. "Galactanos de Hypnea musciformis. Estructura, propiedades y modificaciones". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2015.
http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n5814_Cosenza

EXACTAS UBA
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

UBA
Universidad de Buenos Aires

Dirección: Biblioteca Central Dr. Luis F. Leloir, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Intendente Güiraldes 2160 - C1428EGA - Tel. (++54 +11) 4789-9293

Contacto: digital@bl.fcen.uba.ar

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Química Orgánica

Galactanos de *Hypnea musciformis*. Estructura, propiedades y modificaciones.

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

VANINA ANDREA COSENZA

Director de Tesis: DR. CARLOS ARTURO STORTZ

Director Asistente: DR. DIEGO ALBERTO NAVARRO

Consejero de Estudios: DR. CARLOS ARTURO STORTZ

Lugar de Trabajo: Departamento de Química Orgánica-CIHIDECAR, FCEyN-UBA.

Buenos Aires, 4 de Septiembre de 2015

Galactanos de *Hypnea musciformis*. Estructura, propiedades y modificaciones.

Hypnea musciformis es un alga carragenofita industrialmente utilizada como fuente de κ-carragenano. En este trabajo de Tesis se han realizado diversos estudios asociados con el sistema de galactanos que biosintetiza esta alga, sus propiedades reológicas y biológicas, sus modificaciones químicas, y algunos intentos de explicar sus reacciones por modelado molecular.

En primer término se efectuó un estudio detallado de la estructura de los polisacáridos aislados de *H. musciformis*. El κ-carragenano resultó ser el componente más abundante del alga seca, aunque aparecieron otras estructuras de carragenanos. También se encontraron mezclas de galactanos compuestas por agaranos, carragenanos e híbridos DL, con diferentes proporciones de D- y L-galactosa. A su vez, se estudiaron las propiedades reológicas de los carragenanos y de las mezclas de galactanos con presencia de D- y L-galactosa. En presencia de KCl, sólo los carragenanos formaban geles verdaderos. Se observaron variaciones en las propiedades de gelificación en función del peso molecular y de la proporción de estructuras tipo ι-carragenano.

Por otro lado, se realizó la oxidación selectiva del C-6 de la β-galactosa del κ-carragenano aislado de *H. musciformis* con el radical 2,2,6,6-tetrametilpiperidinil-1-oxilo (TEMPO). Se hallaron las condiciones óptimas de reacción para revertir y disminuir la proporción de oxidación no selectiva que ocurría en el C-2 de la 3,6-anhidrogalactosa. Estas condiciones se aplicaron a otros galactanos de algas rojas. A su vez, se estudió la actividad frente al virus del herpes simplex de los productos de oxidación total y parcial del κ- y ι-carragenano. Para los derivados del κ-carragenano, se observó que existe una relación óptima cercana a 1:2 entre la galactosa y el ácido galacturónico para mejorar la actividad.

Por último, se efectuó un estudio teórico por modelado molecular de la reacción de tratamiento alcalino para distintos derivados del metil α-D-galactopiranósido 6-sulfato. Se analizaron los efectos de los sustituyentes presentes en C-2 y C-4. El paso limitante de la reacción resultó ser el de sustitución. Sin embargo, se observó un efecto menor de los sustituyentes en el camino de interconversión de sillas.

Palabras clave: Algas rojas, *Hypnea musciformis*, galactanos sulfatados, reología, modificación química, actividad antiviral, modelado molecular

Galactans from *Hypnea musciformis*. Structure, properties and modifications.

Hypnea musciformis is a carragenophyte industrially used as a source of κ-carrageenan. In this work, we have carried out several studies related to the galactan system of this seaweed, their rheological and biological properties, modifications, and attempts to explain their reactions by molecular modeling.

First, a detailed structural study of the polysaccharides isolated from *H. musciformis* was carried out. κ-Carrageenan was the main component of this seaweed, but other carrageenan structures were present. In addition, mixtures containing agarans, carrageenans and DL hybrids with different proportions of D- and L-galactose, were isolated. Besides, the rheological properties of the carrageenans and the mixtures of galactans with D- and L-galactose were studied. In presence of KCl, only the carrageenans form true gels. It was observed that variations in the gelling properties were related with the variation in the molecular weight and with the proportion of ι-carrageenans diads in the polysaccharide.

On the other hand, a selective oxidation of the C-6 of κ-carrageenans from *H. musciformis* was carried out with (2,2,6,6-tetramethylpiperidinyl)oxy or TEMPO. The optimal conditions to revert the non-selective oxidation at C-2 of 3,6-anhydrogalactose were found. These conditions were applied to other red seaweed galactans. In addition, the antiviral activity against the herpes simplex virus was studied for the products of full and partial oxidation of κ- and ι-carrageenan. For κ-carrageenan derivatives, an optimal ratio ca. 1:2 between galactose and galacturonic acid was found to enhance most the antiviral activity.

Finally, a theoretical study of the reaction of alkaline treatment was carried out on different methyl α-D-galactopyranoside 6-sulfate derivatives. The effect of the substituents in C-2 and C-4 were analyzed. The rate-determing step of the reaction was the substitution step, however, an effect of the substituents was mainly observed in the chair interconvertion pathway.

Keywords: Red seaweeds, *Hypnea musciformis*, sulfated galactans, rheology, chemical modifications, antiviral activity, molecular modeling

A mis padres
Osvaldo y Alicia

Agradezco al Dr. Carlos A. Stortz y al Dr. Diego A. Navarro por haberme dado la oportunidad de realizar esta Tesis. Por la guía recibida durante esta etapa, cada uno aportando sus conocimientos, experiencia y consejos. Por la paciencia que me tuvieron así como por la libertad de trabajo. Gracias por el apoyo, la comprensión y el afecto brindado todos estos años.

Agradecimientos:

A mis padres, mi hermano, mis abuelos y tíos, por haber estado, siempre que fuera posible, presentes en mi vida; apoyándome, aconsejándome y brindándome su amor.

A mis amigos Ake, Charlie, Iña, Lu, Martín, Romi y Walter quienes me acompañaron casi desde el principio de la carrera. Gracias por haber hecho este camino conmigo, compartiendo conmigo los distintos momentos, tanto buenos como malos, escuchándome, apoyándome y alentándome.

A Andrea Ponce, gracias por su amistad. Por toda la ayuda, los consejos, y la compañía que me prestaste durante esta Tesis, y en particular, por todas las veces que alentaste a seguir adelante cuando se presentaban problemas. Gracias por haberme convencido de hacer el doctorado.

A Florencia Basanta, por su compañía y amistad durante estos años de doctorado. Por los momentos de trabajo compartidos y la ayuda y consejos brindados.

A Cecilia Rodríguez, por todo el cariño brindado estos años. También por sus consejos y palabras de aliento.

A la Dra. Cristina Matulewicz, por la ayuda prestada así como por la generosidad y el cariño brindado.

A la Dra. Marina Ciancia, por sus charlas y consejos a lo largo de estos años.

Al Dr. Alberto Cerezo, por su experiencia, sus consejos y su ayuda.

A todos aquellos con los que compartí en el laboratorio durante estos años de Tesis: Dolores Raffo, Gloria Salato, Melissa Rabanal, Mercedes Pérez Recalde, Tamara Barahoma, Virginia Fernández, Yasmín Daglio, por compartir el día a día de trabajo y por la ayuda brindada.

A los chicos que están dando sus primeros pasos en el laboratorio: Andrés del Vigo, Frank Sznaider, Matías Villareal y Tomás Benech por la compañía durante este último período de la Tesis.

A todas las personas del Departamento de Química Orgánica (Profesores, JTP, ayudantes de 1º y 2º, investigadores o tesistas), con quienes compartí clases, congresos o simples charlas de pasillo, por el trato cordial y el apoyo brindado.

A los no docentes y técnicos que trabajan en el Departamento de Química Orgánica, por estar siempre dispuestos a resolver los problemas, y facilitar las cosas.

A la Dra. Ana María Rojas y a la Dra. Eliana Fissore por las mediciones reológicas.

A la Dra. Elsa Damonte y al Dr. Carlos Pujol por los ensayos biológicos.

Al Dr. Oscar Varela y a la Dra. Norma D'Accorso por la cesión de las pentonolactonas comerciales.

Al consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICET) y a la Universidad de Buenos Aires por las becas de Postgrado que me otorgaron para realizar esta Tesis.

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 colaboraron de alguna manera para realizar esta Tesis.

Índice

LISTA DE ABREVIATURAS UTILIZADAS xxi

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN GENERAL

Introducción 3
1.1 Algas rojas: datos taxonómicos y biológicos 3
1.1.1 Pared celular 4
1.1.2 Ciclo reproductivo 5
1.2 Galactanos de algas rojas 6
1.2.1 Carragenanos 8
1.2.2 Agaranos 12
1.2.3 Híbridos DL 14
1.2.4 Modelo del prisma 16
1.3 Gelificación de los galactanos de algas rojas 18
1.3.1 Conformación de galactanos 19
1.3.1.1 Efecto de los iones en la conformación 21
1.3.2 Mecanismo de gelificación 21
1.3.3 Propiedades de los geles 22
1.4 Usos y comercialización de los galactanos de algas rojas 23
1.4.1 Obtención de los galactanos 25
1.4.2 Producción de algas en Sudamérica 26
1.5 Actividad biológica de los polisacáridos sulfatados 26
1.5.1 Actividad antiviral 27
1.5.1.1 Actividad antiviral de los galactanos de algas rojas 29
1.6 Modificaciones químicas de los galactanos de algas rojas 31
Bibliografía 33

CAPÍTULO 2

CARRAGENANOS DE *HYPNEA MUSCIFORMIS*: ESTUDIO QUÍMICO Y REOLÓGICO

2.1 Introducción 43

2.1.1 *Hypnea musciformis* 43
2.1.1.1 Descripción, hábitat y distribución 44
2.1.1.2 Antecedentes sobre carragenanos de *Hypnea musciformis* 45
2.1.2 Reología de materiales viscoelásticos 47
2.1.2.1 Modelo de Maxwell 47
2.1.2.2 Ensayos dinámicos oscilatorios 47
2.1.2.3 Modos de operación para ensayos dinámicos oscilatorios 49
2.2 Objetivos 50
2.3 Resultados y discusión 50
2.3.1 Extracción y fraccionamiento de los polisacáridos 50
2.3.2 Análisis de las fracciones 52
2.3.2.1 Caracterización química del extracto **F** y de sus productos de fraccionamiento 52
2.3.2.2 Azúcares componentes del extracto **F** y de sus productos de fraccionamiento 54
2.3.2.3 Caracterización química del extracto **C** y de sus productos de fraccionamiento 55
2.3.2.2 Azúcares componentes del extracto **C** y de sus productos de fraccionamiento 57
2.3.3 Caracterización estructural de las fracciones 59
2.3.3.1 Análisis estructural de **F-0,125**, **F-0,8-1**, **C-0,125** y **C-1-1,25** 59
2.3.3.1.1 Análisis por metilación 59
2.3.3.1.2 Análisis por espectroscopía de resonancia magnética nuclear 61
2.3.3.2 Análisis estructural de las fracciones solubles en KCl 2M 64
2.3.4 Caracterización reológica de los galactanos aislados de *Hypnea musciformis* 65
2.3.4.1 Análisis reológico del extracto **F** y de las fracciones **F-0,125** y **F-0,8-1** 66
2.3.4.2 Análisis reológico del extracto **C** y de las fracciones **C-0,125** y **C-1-1,25** 68
2.3.4.3 Análisis reológico de las fracciones solubles en KCl 2M 71
2.3.5 Relación estructura-propiedades reológicas 72
2.4 Conclusiones 74
Bibliografía 75

CAPÍTULO 3

FRACCIONAMIENTO Y DETERMINACIÓN ESTRUCTURAL DE LOS PRODUCTOS SOLUBLES EN KCl 2M PRESENTES EN *HYPNEA MUSCIFORMIS*

3.1 Introducción 81

3.2 Objetivos 83

3.3 Resultados y discusión 84

3.3.1 Fraccionamiento y estructura de los polisacáridos que componen **F-2S** 84

3.3.1.1 Fraccionamiento de **F-2S** 84

3.3.1.2 Composición de las subfracciones de **F-2S** 85

3.3.1.3 Análisis por metilación 88

3.3.1.4 Análisis por desulfatación-metilación 92

3.3.1.5 Análisis por espectroscopía de resonancia magnética nuclear 95

3.3.2 Fraccionamiento y estructura de los polisacáridos que componen **C-2S** 102

3.3.2.1 Fraccionamiento de **C-2S** 102

3.3.2.2 Composición de las subfracciones de **C-2S** 104

3.3.2.3 Experimentos para identificar el compuesto incógnita (X) 108

3.3.2.4 Análisis por metilación 112

3.3.2.5 Análisis por desulfatación-metilación 115

3.3.2.6 Análisis por metilación de la subfracción **C-2S-0,8s/X** 118

3.3.2.7 Análisis por espectroscopía de resonancia magnética nuclear 120

3.4 Conclusiones 126

Bibliografía 128

CAPÍTULO 4

OXIDACIÓN DE GALACTANOS BIOSINTETIZADOS POR ALGAS ROJAS Y EVALUACIÓN DE SU ACTIVIDAD ANTIVIRAL

SECCIÓN 4A Obtención de los galactanos oxidados

4.A.1 Introducción 133

4.A.1.1 Oxidación de polisacáridos: formación de ácidos urónicos 133

4.A.1.1.1 Oxidación con TEMPO 134

4.A.1.1.1.1 Condiciones de oxidación: oxidantes primarios 136

4.A.1.1.2 Antecedentes de polisacáridos oxidados con TEMPO 138
4.A.1.1.2.1 Usos y propiedades de los polisacáridos oxidados 141
4.A.2 Objetivos 143
4.A.3 Resultados y discusión 143
4.A.3.1 Introducción del grupo carboxilato por carboximetilación 143
4.A.3.2 Oxidación de κ-carragenano con TEMPO 144
4.A.3.3 Análisis de la reacción de oxidación secundaria 149
4.A.3.3.1 Estudio del producto sobreoxidado 152
4.A.3.3.2 Estudio por modelado molecular de la reacción de oxidación secundaria 155
4.A.3.3.3 Determinación del grado de sobreoxidación 158
4.A.3.4 Caracterización de los productos **KO_H** y **IO_E-d** 158
4.A.3.5 Optimización de las condiciones de reacción 162
4.A.3.5.1 Variación de la base y del pH 162
4.A.3.5.2 Variación del tiempo de reacción 164
4.A.3.5.3 Variación de la cantidad de NaClO utilizada 165
4.A.3.6 Oxidación del ι-carragenano y la agarosa con TEMPO 167
4.A.3.6.1 Caracterización por RMN de los productos **IO_H** y **$AgaO_H$** 168
4.A.3.7 Estudio por microscopía de barrido electrónico (SEM) de los carragenanos y sus derivados oxidados 171
4.A.4 Conclusión 174

SECCIÓN 4B Actividad antiviral de los galactanos oxidados

4.B.1 Introducción 175
4.B.1.1 Virus del herpes simplex 175
4.B.2 Objetivos 176
4.B.3 Resultados y discusión 176
4.B.3.1 Evaluación de la actividad anti-HSV de los carragenanos oxidados 176
4.B.3.1.1 Actividad inhibitoria 177
4.B.3.1.2 Actividad citotóxica 178
4.B.3.1.3 Efecto del grado de sobreoxidación y del peso molecular 178
4.B.4 Conclusión 181
Bibliografía 182

CAPÍTULO 5

ESTUDIO DE LA REACCIÓN DE TRATAMIENTO ALCALINO DE CARRAGENANOS POR MODELADO MOLECULAR

5.1 Introducción 189

5.1.1 Cinética de la reacción de tratamiento alcalino 189

5.1.2 Modelado molecular y los hidratos de carbono 191

5.1.2.1 Métodos *ab initio* y DFT 191

5.1.2.2 Métodos semiempíricos 193

5.1.2.3 Métodos de mecánica molecular 193

5.1.2.4 Simulación computacional 194

5.1.3 Análisis conformacional de los monosacáridos 194

5.2 Objetivos 201

5.3 Resultados y discusión 201

5.3.1 Metodología de trabajo 201

5.3.2 Análisis del modelo sin sustituyentes en C-2 y C-4 203

5.3.2.1 Optimización de las condiciones de trabajo 203

5.3.2.2 Camino de reacción para el compuesto **1** 205

5.3.2.2.1 Análisis de los caminos conformacionales de interconversión 210

5.3.3 Análisis de la sustitución en la posición C-4 211

5.3.3.1 Camino de reacción para el compuesto **2** 211

5.3.3.1.1 Análisis del camino conformacional de interconversión con χ_3 = G/T 217

5.3.3.1.2 Análisis del camino conformacional de interconversión con χ_3 = g y O-3 desprotonado) 219

5.3.4 Análisis de la sustitución en la posición C-2 219

5.3.4.1 Camino de reacción para el compuesto **3** 219

5.3.4.1.1 Análisis del camino conformacional de interconversión con χ_2 = g 226

5.3.4.1.2 Análisis del camino conformacional de interconversión con χ_2 = G/T 228

5.3.4.2 Camino de reacción para el compuesto **4** 230

5.3.4.2.1 Análisis del camino conformacional de interconversión con χ_3 = g 234

5.3.4.2.2 Análisis del camino conformacional de interconversión para el compuesto **4** desprotonado 235

5.3.5 Análisis de la sustitución en las posiciones C-2 y C-4 236

5.3.5.1 Camino de reacción para el compuesto **5** 236
5.3.5.1.1 Análisis del camino conformacional de interconversión con χ_2 = g 243
5.3.5.1.2 Análisis del camino conformacional de interconversión con χ_2 = G/T y χ_3 g u O-3 desprotonado) 245
5.3.5.1.3 Análisis del camino conformacional de interconversión con χ_2 = χ_3 = G y/o T 246
5.3.5.2 Camino de reacción para el compuesto **6** 248
5.3.5.2.1 Análisis del camino conformacional de interconversión 251
5.3.6 Comparación de las energías de activación y reacción del paso de sustitución 253
5.4 Conclusiones 255
Bibliografía 257

CAPÍTULO 6

MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Consideraciones generales 263
6.2 Extracción y fraccionamiento de los polisacáridos de *Hypnea musciformis* 264
6.2.1 Obtención del alga 264
6.2.2 Extracción de los polisacáridos de *Hypnea musciformis* 264
6.2.3 Fraccionamiento de los extractos de *Hypnea musciformis* 265
6.2.4 Fraccionamiento de **C-2S** y **F-2S** 265
6.3 Métodos generales 266
6.3.1 Determinación de los hidratos de carbono totales 266
6.3.2 Determinación de ácidos urónicos 267
6.3.3 Determinación de proteínas totales 267
6.3.4 Determinación colorimétrica de 3,6-anhidrogalactosa 268
6.3.5 Determinación de sulfato 269
6.3.6 Determinación del peso molecular 270
6.4 Determinación de los azúcares componentes 270
6.4.1 Hidrólisis ácida total 270
6.4.2 Preparación de los alditoles peracetilados 271
6.4.3 Hidrólisis reductiva para la generación de alditoles peracetilados 271
6.4.4 Preparación de 1-amino-1-desoxialditoles 272
6.5 Estudios de alquilación 274

6.5.1 Metilación 274
6.5.2 Etilación 275
6.6 Desulfatación y metilación *in situ* 275
6.7 Tratamiento alcalino de polisacáridos 276
6.8 Cromatografía gas-líquido 276
6.8.1 Análisis de alditoles acetilados 276
6.8.2 Análisis de los 1-amino-1-desoxialditoles 277
6.9 Métodos espectroscópicos 278
6.9.1 Cromatografía gas-líquido acoplada a espectrometría de masa 278
6.9.2 Resonancia magéntica nuclear 278
6.9.3 Espectroscopía de IR 279
6.10 Análisis reológicos 279
6.10.1 Ensayos dinámicos oscilatorios 279
6.10.2 Análisis estadístico 280
6.11 Análisis del compuesto X 280
6.11.1 Hidrólisis parcial, reducción y purificación de **C-2S** 280
6.11.2 Síntesis de las γ-pentonolactonas 280
6.11.3 Reducción de lactonas 281
6.11.4 Hidrólisis de furanosas 281
6.12 Modificación química de galactanos 281
6.12.1 Obtención del carboximetil κ-carragenano 281
6.12.2 Oxidación de galactanos con TEMPO 282
6.12.2.1 Adaptación de las condiciones utilizadas por Elboutachfaiti *et al.* 282
6.12.2.1.1 Valoración de la solución de lavandina 283
6.12.2.2 Estudio de las condiciones de reacción 283
6.12.2.2.1 Variación de las condiciones de finalización de la reacción 283
6.12.2.2.2 Variación del oxidante 283
6.12.2.2.3 Variación de la base 284
6.12.2.2.4 Variación del pH de la reacción 284
6.12.2.2.5 Variación del tiempo de reacción 284
6.12.2.2.6 Variación de la proporción del oxidante primario 284
6.12.2.3 Condiciones óptimas para la oxidación de κ-carragenanos con TEMPO 285
6.12.2.4 Oxidación parcial y total del ι-carragenano y de la agarosa 285

6.12.2.5 Caracterización de los galactanos oxidados 285
6.12.2.6 Microscopía de barrido electrónico (SEM) 285
6.12.2.7 Actividad antiviral de los carragenanos oxidados 286
6.12.2.7.1 Determinación de la actividad antiviral 286
6.12.2.7.2 Determinación de la citotoxicidad 286
6.13 Modelado molecular 287
6.13.1 Métodos de cálculo 287
6.13.2 Obtención de energías ΔE_1 y ΔE_2 287
6.13.3 Estudio de la reacción de tratamiento alcalino 288
6.13.3.1 Nomenclatura de conformaciones y rotámeros 290
6.13.3.2 Parámetros de *puckering* 290
Bibliografía 291

RESUMEN FINAL 297

Lista de abreviaturas utilizadas

ADN	Ácido desoxirribonucleico
CC_{50}	Concentración citotóxica 50%
CG/EM	Cromatografía gaseosa acoplada a espectroscopía de masa
CGL	Cromatografía gas líquido
CI_{50}	Concentración inhibitoria 50%
COSY	*Correlation spectroscopy* (Espectroscopía de correlación)
DENV	Virus del dengue
DEPT	*Distortionless enhancement by polarization transfer* (Incremento no distorsivo por transferencia de polarización).
DFT	Teoría de funcionales de la densidad
DMSO	Dimetilsulfóxido
FID	Detector de ionización de llama
GAGs	Glicosaminoglicanos
GPC	Cromatografía de permeación en geles
HCMV	Citomegalovirus humano
HF	Hartree-Fock
HIV	Virus de inmunodeficiencia humana
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
HPV	Virus de papiloma humano
HS	Heparán sulfato
HSQC	Correlación heteronuclear cuántica simple
HSV	Virus del herpes simplex
IE	Impacto electrónico
IQ	Ionización química
IR	Infrarrojo
IRC	Coordenada intrínseca de reacción
IS	Índice de selectividad
PCM	Modelo del continuo polarizable
PM	Peso molecular
TCA	Ácido tricloroacético
TFA	Ácido trifluoroacético
RMN	Resonancia magnética nuclear

SEM	Microscopía de barrido electrónico
S_N2	Sustitución nucleofílica bimolecular
TEMPO	Radical 2,2,6,6-tetrametilpiperidinil-1-oxilo
T_{fus}	Temperatura de fusión
T_{gel}	Temperatura de gelificación
T_m	Temperatura de transición *random coil* (arrollamiento al azar)-hélice

CAPÍTULO 1

Introducción General

1. Introducción

Las algas marinas producen una gran variedad de polisacáridos que poseen estructuras muy diversas. Esta variedad hace que el estudio de estos compuestos haya sido y siga siendo del interés de los científicos. Dentro de los distintos polisacáridos de origen marino hay tres grupos que se destacan, principalmente por su gran utilidad a nivel industrial. Estos son:

1. Alginatos: estos polisacáridos se encuentran presentes principalmente en las algas pardas (Phaeophyta) y están compuestos por ácido manurónico y ácido gulurónico. Sus usos principales son en la industria alimenticia y textil, aunque recientemente también se los empezó a utilizar en la industria farmacéutica para la liberación controlada de drogas.[1]

2. Agaranos: se extraen de las algas rojas (Rhodophyta) y poseen una estructura repetitiva de D-galactosa y L-galactosa o su derivado 3,6-anhidro, pudiendo estar sustituidos por grupos ésteres sulfato. Estos polisacáridos poseen varios usos en la industria alimenticia (el llamado ágar o agar-agar), así como en microbiología como medio de cultivo y para geles en electroforesis, en el caso de la llamada agarosa.[1]

3. Carragenanos: se obtienen de las algas rojas, y están compuestos por D-galactosa y su 3,6-anhidro-D-galactosa, y sus derivados sulfatados. Se los utiliza en la industria alimenticia, cosmética y farmacológica.[1]

De acuerdo a lo expuesto, las rodofitas producen dos de los tres grupos de polisacáridos más importantes a nivel industrial provenientes de las algas.

1.1 Algas rojas: datos taxonómicos y biológicos

Las algas rojas comprenden más de 6.500 especies[2] y se ha demostrado que ya existían hace 1.200 millones de años.[3] Estas algas conforman el phylum (división) Rhodophyta. Tradicionalmente, la clasificación taxonómica dividía a este phylum en dos clases: Bangiophyceae, que comprende las algas estructural y reproductivamente más simples del phylum, y Florideophyceae, que incluye aquellas algas rojas con estructuras y formas reproductivas más complejas. Aunque no está firmemente establecido, a partir de la evidencia obtenida por estudios de biología molecular, se decidió dividir a las bangiofíceas en cinco clases distintas,[3] de manera que el phylum Rhodophyta queda dividido en seis clases (Fig.

1.1). De ellas, la Florideophyceae es la que incluye a la gran mayoría de las algas rojas modernas, aproximadamente 6.200 especies.[2]

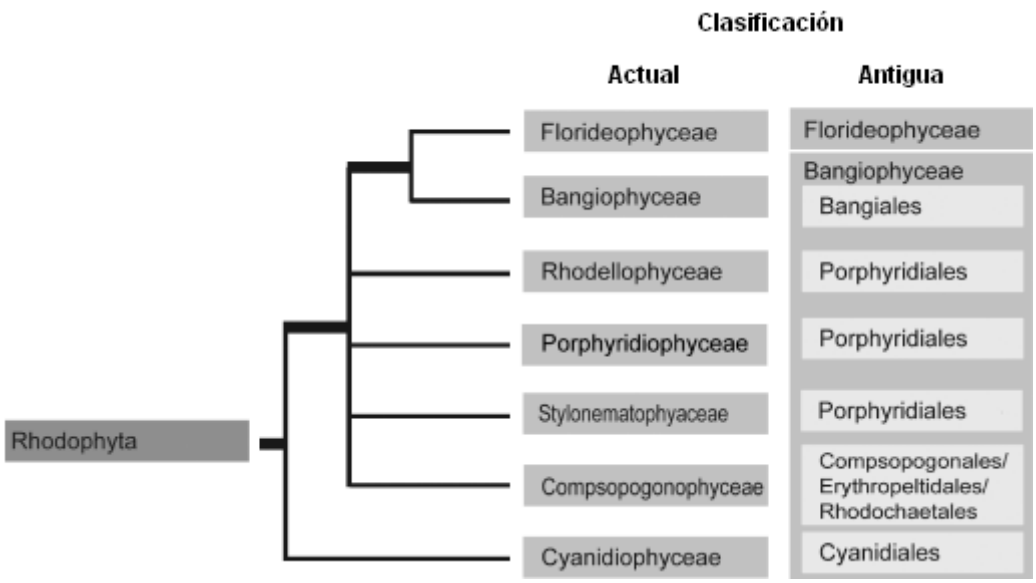


Figura 1.1 Clasificación antigua y actual del phylum Rhodophyta.

A su vez, de acuerdo a la clasificación utilizada, se pueden encontrar cuatro o cinco subclases dentro de las florideoficeas,[3] siendo la más importante la Rhodymeniophycidae, que incluye cerca de 4.700 de las 6.200 especies presentes en la clase. Esta subclase se divide en doce órdenes, dentro de los que se encuentran las Gigartinales, el cual como se verá más adelante, incluye a la mayoría de las especies de algas rojas productoras de carragenanos.

1.1.1 Pared celular

En las algas rojas, la pared celular representa entre un 30 y un 50% del peso seco del alga.[4] Esta consiste de tres dominios: una pared fibrilar, una matriz amorfa y un dominio glicoproteico.[5] La matriz amorfa es el componente más abundante y la responsable de la flexibilidad de la pared.[3] Existen algunas algas rojas, como las del orden Corallinales, que poseen una pared rígida debido a la abundante presencia de carbonato de calcio.[3]

La pared fibrilar está compuesta de microfibrillas de celulosa en bajas proporciones (no mayores al 10%).[3] En algunas especies del orden Bangiales la pared fibrilar está compuesta por fibrillas de mananos con uniones β-(1→4), mientras que en especies de los órdenes Nemaliales y Palmariales se han encontrado xilanos con uniones β-(1→4) ó β-(1→3).[4] En general, los polisacáridos fibrilares se encuentran formando un reticulado con el dominio glicoproteico. El entrecruzamiento se debe a un complejo formado entre determinadas

secuencias de aminoácidos y las fibrillas de celulosa, conocido como "*cellulose binding domain*".[5]

La matriz amorfa está compuesta por mezclas de polisacáridos que generalmente tienen capacidad gelificante o viscosante. Esta matriz no sólo está "embebiendo" el reticulado formado por los otros dos dominios, sino que también interacciona con ellos.[5] En general, este dominio está compuesto mayoritariamente por galactanos sulfatados como los carragenanos y agaranos. Sin embargo, en algunos órdenes se encuentran otros polisacáridos como mananos, xilomananos sulfatados o xilanos neutros.[6] En la Tabla 1.1 se pueden observar los polisacáridos que se encuentran en la matriz amorfa para distintos órdenes. Se destaca que el orden Gigartinales contiene las principales algas productoras de carragenanos, mientras que los órdenes Gelidiales y Gracilariales comprenden a aquellas que generan el ágar. Por otro lado, los órdenes Nemaliales y Palmariales no producen galactanos como componente de su matriz amorfa, mientras que el orden Corallinales produce agaranos y ácido algínico. Este último, tal como se vio al principio de esta introducción, es un polisacárido más común en las algas pardas aunque ha sido encontrado en varias especies de dicho orden de algas rojas.[6]

Tabla 1.1 Polisacáridos solubles en agua representativos de algunos de los diversos ordenes de las algas rojas (adaptación de Usov[6]).

Orden	Polisacáridos solubles en agua
Bangiales	Agaranos parcialmente metilados e híbridos agarano-agarosa (porfiranos)
Nemaliales	Xilomananos sulfatados y xilanos neutros
Gelidiales	Ágar típico
Corallinales	Xilogalactanos sulfatados y metilados (agaranos) y ácido algínico
Halymeniales	Galactanos sulfatados complejos
Gracilariales	Ágar, incluyendo híbridos agarano-agarosa con alta sustitución
Gigartinales	Carragenanos típicos y otros galactanos sulfatados complejos
Rhodymeniales	Galactanos sulfatados complejos
Palmariales	Xilanos neutros y galactanos sulfatados (agaranos)
Ceramiales	Agaranos altamente modificados

1.1.2 Ciclo reproductivo

Las algas rojas pertenecientes a la clase Florideophyceae poseen reproducción asexual por fragmentación vegetativa o por un complejo sistema de reproducción sexual que incluye

un ciclo de vida trifásico.[3] Este último comprende una planta gametofítica haploide y dos plantas diploides, el tetrasporofito y el carposporofito. Los gametofitos forman, por división mitótica, gametas masculinas o femeninas. La fusión de ambas gametas resulta en la formación de la cigota 2N. La cigota da origen al carposporofito. Este individuo diploide se desarrolla en forma totalmente dependiente del gametofito femenino y puede estar encerrado dentro de una capa de células denominada pericarpio. El conjunto de carposporofito y pericarpio constituye el cistocarpio, fácilmente distinguible ya sea a ojo desnudo, o con lupa. De allí que sea frecuente el uso del término "plantas cistocárpicas".

Los carposporofitos maduros producen numerosas esporas diploides, las carposporas.[3] La germinación de las carposporas origina una planta de vida independiente, el tetrasporofito, que producirá esporas haploides (tetrasporas) como producto de división meiótica. La germinación de las tetrasporas produce nuevas plantas gametofíticas cerrando así el ciclo de vida del alga.

1.2 Galactanos de algas rojas

Los galactanos sulfatados son los constituyentes principales de la matriz amorfa de la mayoría de las especies de las algas rojas. Su estructura consiste en una cadena lineal formada por díadas repetitivas de unidades de β-galactopiranosa enlazadas por C-3 y unidades de α-galactopiranosa enlazadas por C-4. Mientras que la unidad de galactosa con configuración β siempre pertenece a la serie D-, la α-galactosa puede pertenecer a cualquiera de las dos series. Cuando ambas unidades de la díada pertenecen a la serie D-, a los galactanos se los conoce como carragenanos, mientras que cuando la unidad α- pertenece a la serie L- se los denomina agaranos (Fig. 1.2). Un tercer grupo, denominado híbridos DL o híbridos carragenano-agarano, comprende a polisacáridos o mezclas no separables de polisacáridos cuyas estructuras poseen unidades de α-galactosa pertenecientes a ambas series.[7]

Tanto en los carragenanos como en los agaranos la unidad de α-galactopiranosa puede estar reemplazada por su derivado bicíclico: la 3,6-anhidrogalactosa (Fig. 1.2). La presencia de este anhidroazúcar en estos polisacáridos es muy importante ya que es la que le confiere las características gelificantes. La formación de dicho azúcar ocurre por una reacción del tipo S_N2 intramolecular a partir del precursor α-galactopiranosa 6-sulfato,[8] tanto *in vivo* por acción enzimática como en el laboratorio por reacción en medio básico acuoso. Debido a la

tensión anular en el anhidroazúcar, el enlace glicosídico de la 3,6-anhidrogalactosa es considerablemente más lábil que el de la β-galactosa. Esto permite que en condiciones suaves de hidrólisis ácida se pueda aislar el disacárido β-D-galactopiranosil-(1→4)-3,6-anhidrogalactosa, al cual se lo conoce como carrabiosa para los carragenanos y agarobiosa para los agaranos. Asimismo, se llama neocarrabiosa al disacárido 3,6-anhidro-α-D-galactopiranosil-(1→3)-β-D-galactosa y neoagarobiosa cuando el anhidroazúcar pertenece a la serie L-. Dada la labilidad diferencial de las uniones en medio ácido, estos disacáridos sólo pueden ser obtenidos por hidrólisis enzimática específica.

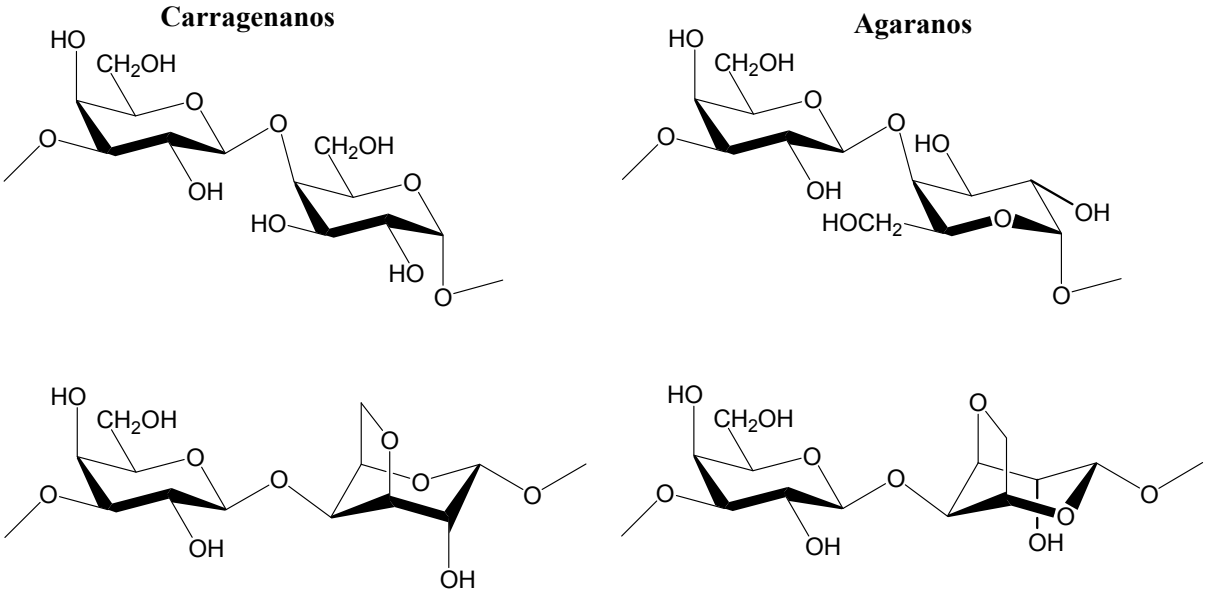


Figura 1.2 Unidades repetitivas que conforman la estructura de los distintos galactanos de algas rojas.

A partir de los esqueletos formados por las cuatro estructuras base que se observan en la Figura 1.2, se ha podido encontrar una amplia variedad de carragenanos y agaranos por sustitución en distintas posiciones. El grupo éster sulfato es el sustituyente más común presente en estos polisacáridos y no sólo en el C-6 de la unidad de α-galactosa, como ya se mencionó previamente. También se han encontrado oxhidrilos sustituidos con éteres metílicos, ácido pirúvico formando cetales entre la posición 4 y 6 de la unidad β- y ramificaciones con unidades de xilosa y 4-*O*-metilgalactopiranosa, entre otros.[6]

La combinación de sustituyentes da lugar a una gran variedad de estructuras. Knutsen *et al.*[9] propusieron un sistema de nomenclatura para simplificar la escritura de la estructura del polisacárido (Tabla 1.2). Por ejemplo, para una estructura de la unidad repetitiva del tipo →3)-β-D-galactosa 4-sulfato-(1→4)-2-*O*-metil-α-L-galactosa 6-sulfato, su nomenclatura sería G4S-L2M,6S.

Tabla 1.2 Nomenclatura de monosacáridos constituyentes de galactanos de algas rojas propuesta por Knutsen *et al.*[9]

Código	Identidad
D	→4)-α-D-galactosa-(1→
DA	→4)-3,6-anhidro-α-D-galactosa-(1→
G	→3)-β-D-galactosa-(1→
L	→4)-α-L-galactosa-(1→
LA	→4)-3,6-anhidro-α-L-galactosa-(1→
M	*O*-metilo
S	éster sulfato

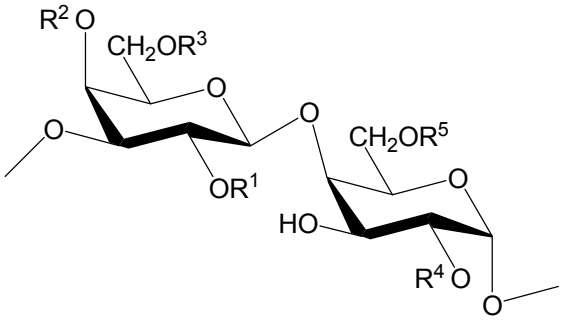
1.2.1 Carragenanos

El término carragenanos deriva del nombre del distrito irlandés donde se cosechaba el alga *Chondrus crispus* (conocida en la zona como *Irish moss* o *Carragheen moss*), a partir de la cual se obtenían estos polisacáridos.[6] Los carragenanos se biosintetizan en las algas rojas pertenecientes al orden Gigartinales (Tabla 1.1), aunque algunas especies del orden producen agaranos o híbridos DL como principal componente de la matriz.

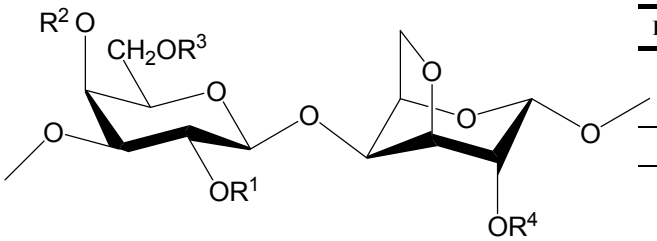
Los carragenanos, como ya se ha mencionado, se caracterizan por poseer las dos galactosas que componen la díada repetitiva con configuración D-. Están sustituidos principalmente por grupos sulfato y, a diferencia de los agaranos, rara vez presentan ácido pirúvico, metoxilos o cadenas laterales como sustituyentes. La clasificación se basa en la ubicación de los grupos sulfatos en la díada y en la presencia o ausencia de 3,6-anhidrogalactosa. De esta manera, se agrupan los distintos carragenanos en cuatro familias (Fig. 1.3). Es importante aclarar que la clasificación está hecha en función de estructuras ideales compuestas únicamente por un tipo de díada, pero en la práctica es común hallar modificaciones de las estructuras tipo, así como más de un tipo de díada presente en el polisacárido.

1- **Familia κ-**: En esta familia se encuentran incluidos todos los carragenanos que poseen un grupo éster sulfato en la posición 4 de la unidad β- (Fig. 1.3). Se han podido definir cinco estructuras que corresponden a esta familia. El κ- y el ι-carragenano se caracterizan por la presencia de 3,6-anhidrogalactosa y son los únicos miembros de la familia con propiedades gelificantes. El ι-carragenano posee un grupo sulfato más en su estructura, ubicado en la posición 2 del anhidroazúcar. Los μ- y ν-carragenanos no

poseen 3,6-anhidrogalactosa pero sí α-D-galactosa 6-sulfato, lo que hace que sean los precursores (químicos o enzimáticos) del κ- y del ι-carragenano respectivamente. Una variante del ν-carragenano es el o-carragenano, el cual no posee sulfato en posición 6 de la unidad α- y por lo tanto ésta no puede ciclar. Sin embargo, este carragenano no es muy común y sólo fue encontrado en algunas pocas especies de las familias Phyllophoraceae y Solieriaceae.[4]



Familia	Carr.	R^1	R^2	R^3	R^4	R^5
κ –	μ –	H	SO_3^-	H	H	SO_3^-
	ν –	H	SO_3^-	H	SO_3^-	SO_3^-
	o –	H	SO_3^-	H	SO_3^-	H
λ –	λ –	SO_3^-	H	H	SO_3^-	SO_3^-
	ξ –	SO_3^-	H	H	SO_3^-	H
	π –	SO_3^-	1-carboxietilidén		SO_3^-	H
β –	γ –	H	H	H	H	SO_3^-
	δ –	H	H	H	SO_3^-	SO_3^-
ω –	ψ –	H	H	SO_3^-	H	SO_3^-



Familia	Carr.	R^1	R^2	R^3	R^4
κ –	κ –	H	SO_3^-	H	H
	ι –	H	SO_3^-	H	SO_3^-
λ –	θ –	SO_3^-	H	H	SO_3^-
β –	β –	H	H	H	H
	α –	H	H	H	SO_3^-
ω –	ω –	H	H	SO_3^-	H

Figura 1.3 Estructura ideal de las distintas díadas de carragenanos.

Los carragenanos más conocidos de la familia son el κ- y el ι-carragenano dado su uso comercial.[10] A estos carragenanos se los puede encontrar en la naturaleza con una estructura casi ideal, aunque muchas veces se presentan mezclados con sus precursores.[6] Las primeras muestras de κ-carragenano se obtuvieron de *Chondrus crispus* mientras que las de ι-carragenano provinieron de *Euchema denticulatum*, aunque en la actualidad ambos han sido hallados en un gran número de especies del orden Gigartinales (Fig. 1.4). En las familias Gigartinaceae y Phyllophoraceae, sólo las algas en fase reproductiva gametofítica producen estos carragenanos, mientras que los de la fase esporofítica producen λ-carragenanos (ver luego) como producto principal.[7]

Como se observa en la Figura 1.4, aunque hay especies que producen κ- y ι-carragenanos con estructuras casi ideales, hay muchas que producen polisacáridos que contienen ambos tipos de díadas y se los conoce como híbridos κ/ι- o kappa-2

carragenanos. Este último grupo, en realidad, incluye a los polisacáridos que poseen entre un 45% y un 80% de unidades de κ-carragenano.[11] Existen dos hipótesis sobre la estructura de estos polímeros híbridos. Una indica que son mezclas inseparables de cadenas homopoliméricas de cada tipo de carragenano, mientras que la otra señala que son heteropolímeros en los cuales conviven los dos tipos de díadas (en bloques o al azar). Aunque para algunas especies fue posible obtener cadenas separadas de homopolímeros,[11] en general se ha observado que los híbridos κ/ι- son copolímeros de ambas díadas. Esto pudo ser corroborado al comparar distintas propiedades físicas y químicas de los híbridos con las de mezclas de ambos carragenanos.[11,12] La estructura de estos copolímeros continua en estudio. Van de Velde *et al.*[11] propuso una estructura de bloques tipo AA-BB ordenados al azar en función de datos experimentales de transición entálpica. Por otro lado, Guibet *et al.*[13] realizaron un análisis por hidrólisis enzimática de híbridos κ/ι- de distintas especies y aunque no pudieron determinar la distribución exacta de las díadas, consiguieron discriminar tres tipos de bloques: regiones con díadas κ- únicamente, regiones ricas en díadas κ- con baja proporción de díadas ι- y regiones con díadas ι- únicamente.

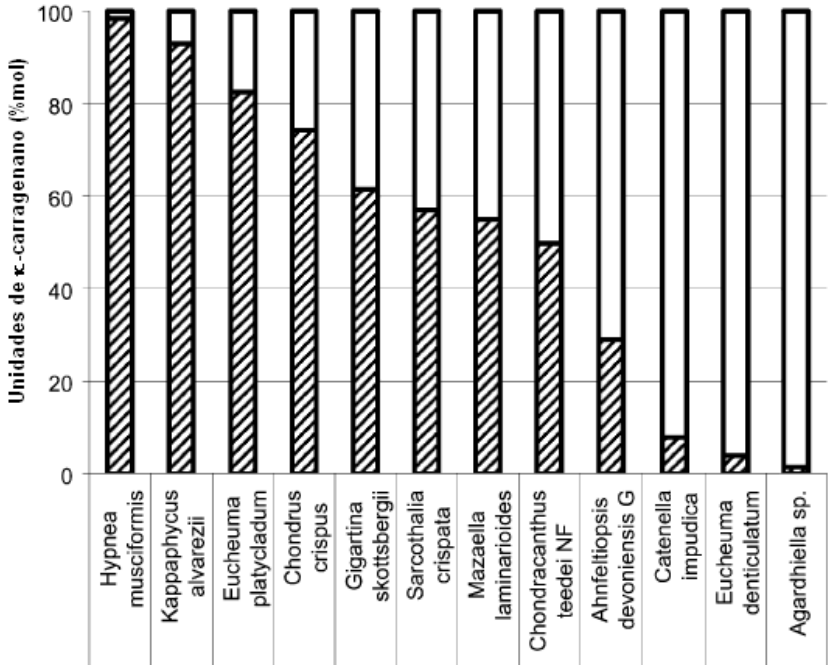


Figura 1.4 Contenido de κ-carragenano en híbridos κ/ι- de distintas especies del orden Gigartinales (adaptación de van de Velde *et al.*[11]).

2- **Familia λ-**: Se caracteriza por poseer un grupo éster sulfato en el C-2 de la unidad β-. Se han encontrado tres estructuras idealizadas en la naturaleza: el λ-, el ξ- y el π-carragenano (Fig. 1.3). Estos tres polisacáridos también presentan sulfato en C-2 de la

unidad α- y ausencia de 3,6-anhidrogalactosa. El λ-carragenano es el único que posee unidades de α-galactosa 6-sulfato, que al ciclar a 3,6-anhidrogalactosa da como producto el θ-carragenano. Este último, en general, se puede obtener únicamente por tratamiento alcalino del λ-carragenano, aunque en el año 2005 Falshaw *et al*.[14] aislaron por primera vez en forma natural dicho carragenano de la matriz amorfa del alga *Callophyllis hombroniana*. El ξ-carragenano fue hallado en plantas tetraspóricas de *Stenogramme interrupta* junto con λ-carragenano.[15] El π-carragenano posee una estructura análoga al ξ-carragenano, pero con una molécula de ácido pirúvico formando un cetal con los carbonos 4 y 6 de la β-galactosa. Este polisacárido fue hallado por primera vez como componente principal del alga *Petrocelis middendorfii*.[16] En general, los carragenanos de esta familia son principalmente producidos por algas en la fase esporofítica de las familias Phyllophoraceae, Petrocelidaceae y Gigartinaceae.[7]

El miembro más importante de esta familia es el λ-carragenano y es utilizado industrialmente como agente espesante.[10] A diferencia del κ- y del ι-carragenano, la estructura de los λ-carragenanos naturales se suele desviar más de la idealidad. Por ejemplo, el primer λ-carragenano extraído (el de *C. crispus*) se encuentra parcialmente desulfatado, ya que sólo el 70% de las díadas contienen sulfato en el C-2 de la unidad β-.[6] En general es difícil encontrar carragenanos de este tipo conteniendo 3 unidades de sulfato por cada unidad disacarídica.

3- **Familia β-**: Esta familia no posee grupos éster sulfato en la β-galactosa. Está compuesta por el β- y el α-carragenano (con estructuras análogas al κ- y al ι-carragenano, respectivamente, pero sin sulfato en C-4) y sus precursores biológicos, el γ- y el δ-carragenano (Fig. 1.3).

En general, los miembros de esta familia no pudieron ser aislados puros. El β-carragenano se ha encontrado junto con el κ-carragenano. El furcellarano, extraído del alga *Furcellaria lumbricalis*, es el híbrido κ/β- más estudiado con una proporción de ambas díadas de 3:2 respectivamente.[17] Si bien se comprobó que el furcellarano mantiene la capacidad de gelificar, las propiedades del gel obtenido son diferentes a las de un gel de κ-carragenano.[18] El α-carragenano, por otro lado, fue hallado junto con estructuras tipo ι- en *Catenella nipae*[19] y en *Stenogramme interrupta*[15] en su fase cistocárpica.

4- **Familia ω-**: Los polisacáridos pertenecientes a esta familia poseen un grupo sulfato en el C-6 de la unidad β-. Se han caracterizado sólo dos miembros de esta familia: el ω-carragenano y su precursor el ψ-carragenano. El primero fue hallado en *Rissoella verruculosa*[20] junto con un κ-carragenano, mientras que el segundo fue aislado del alga *Stenogramme interrupta* en la fase tetraspórica.[21,22]

1.2.2 Agaranos

El término "ágar" o "agar-agar" se conoce desde tiempos antiguos. En un principio, este término se asociaba a un galactano que poseía uniones (1→3) y (1→4).[23] Araki[24] fue el primero en fraccionar el "ágar" en dos tipos diferentes de polisacáridos: uno neutro al que llamó agarosa y otro cargado al que llamó agaropectina. La fracción neutra (agarosa) poseía una estructura repetitiva casi ideal de →3)-β-D-Gal*p*-(1→4)-3,6-An-α-L-Gal*p*-(1→. La fracción cargada resultó ser más compleja, dada la presencia de residuos de galactosa sulfatados sustituidos con ácido pirúvico, ácidos urónicos y xilosa.[24]

Posteriormente, Duckworth y Yaphe[23] concluyeron que la clasificación realizada por Araki era demasiado simplificada. Ellos estudiaron el ágar comercial y luego de fraccionarlo, llegaron a la conclusión que el ágar era una mezcla de polisacáridos con tres estructuras extremas diferentes: la agarosa neutra en la que se incluyó a los galactanos con bajo contenido de sulfato; la agarosa piruvilada con baja sulfatación, donde la unidad β- se encontraba sustituida con ácido pirúvico mientras que algunas unidades de L-galactosa 6-sulfato sustituían a las de 3,6-anhidro-L-galactosa; y un galactano sulfatado que poseía muy bajo contenido de 3,6-anhidrogalactosa y ácido pirúvico y que no tenía propiedades gelificantes. En este último extremo se encontraría incluido el precursor biológico de la agarosa y se lo conoce como "tercer extremo de Yaphe".

Esta clasificación tampoco es completa ya que se han encontrado estructuras con esqueletos similares a la agarosa o al tercer extremo de Yaphe, pero con otros sustituyentes, como por ejemplo grupos metoxilo y cadenas laterales de xilosa y 4-*O*-metilgalactosa (Fig. 1.5).[6] Por esta razón se decidió utilizar al término **agarano** para designar a los polisacáridos constituidos alternativamente por β-D-galactosa unida en 3 y α-L-galactosa (o su derivado 3,6-anhidro) unida en 4.[25]

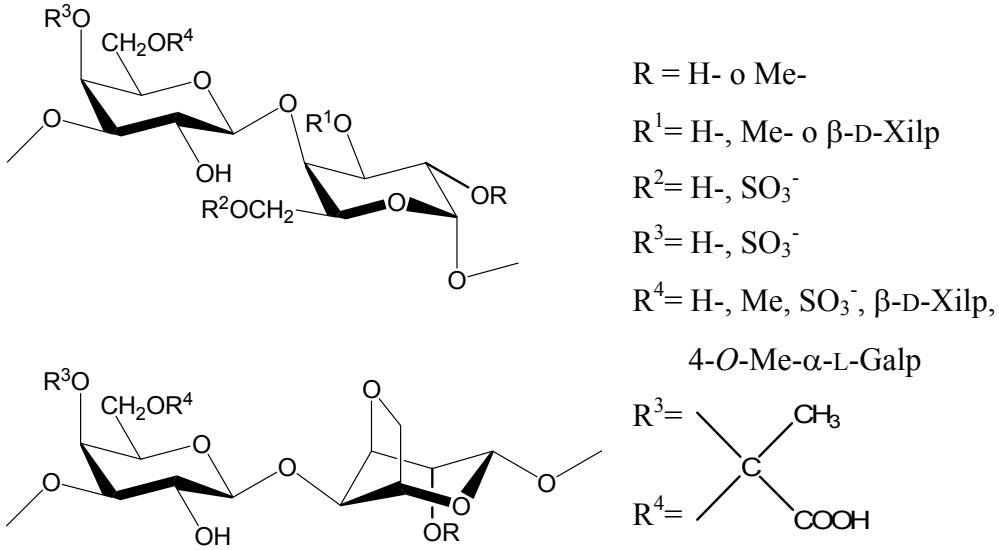


Figura 1.5 Agarosa, tercer extremo de Yaphe y posibles estructura de los agaranos.

Al no ser posible realizar una clasificación tan clara como en los carragenanos, Craigie[4] propuso utilizar el término ágar para los agaranos que poseen propiedades gelificantes, mientras que reservó el término agaroides para aquellos que no gelifican. Dentro del llamado ágar, se denomina agarosa al polisacárido con mayor poder gelificante, que está compuesto idealmente, por unidades de agarobiosa sin grupos sulfatos.[26]

A diferencia de los carragenanos, hay varios órdenes que producen agaranos como componentes de la matriz amorfa (Tabla 1.1). La agarosa se obtiene principalmente a partir de los extractos producidos por algas pertenecientes a los órdenes Gelidiales (géneros *Gelidium*, *Gelidiella* y *Pterocladia*) y Ahnfeltiales (género *Ahnfeltia*).[6] Es común observar en las agarosas obtenidas la presencia de grupos metoxilo en el C-6 de la unidad β- y/o en el C-2 del anhidroazúcar. Estas sustituciones, que proveen hidrofobicidad al producto, afectan sus propiedades gelificantes.

El ágar se obtiene principalmente de algas del género *Gracilaria* (orden Gracilariales) dada la abundancia que existe de las mismas en la naturaleza.[6] Los polímeros biosintetizados por las especies de este género constituyen una mezcla compleja de agaranos, que pueden poseer varios tipos de sustituyentes. En comparación con los ágares extraídos de otros géneros mencionados previamente, los polisacáridos de *Gracilaria* suelen poseer mayor grado de sulfatación, metilación y piruvilación.[27] Generalmente, es la presencia de sulfato y ramificaciones lo que hace que el ágar posea menor capacidad gelificante que la agarosa. El tratamiento alcalino mejora la capacidad gelificante de los agaranos de este género.[27]

Los demás órdenes producen agaranos cuyas estructuras son aún más complejas por la variedad de sustituyentes que poseen. Muchas veces, especies de un mismo orden o género producen agaranos con estructuras similares, por lo que ha sido usual identificarlos con un nombre asociado al género que pertenecen. Por ejemplo, los porfiranos son agaranos aislados de algas pertenecientes al género *Porphyra* y se caracterizan por poseer una estructura donde se alternan residuos de β-D-galactosa o 6-*O*-metil-β-D-galactosa y residuos de 3,6-anhidro-α-L-galactosa o α-L-galactosa 6-sulfato.[28] En general estos polisacáridos no poseen propiedades gelificantes, pero el producto del tratamiento alcalino es una agarosa metilada que forma geles fuertes.[29]

Los coralinanos son agaranos producidos por especies del orden Corallinales. Se caracterizan por no poseer 3,6-anhidrogalactosa (si bien se ha hallado una excepción) y por estar abundantemente sustituidos con residuos de D-xilopiranosa, en general en la posición 6 de la unidad β-, por lo que se los clasifica como xilogalactanos. A su vez suelen estar sulfatados y metilados en distintas posiciones, principalmente en C-2 y C-3 de la unidad α-.[6]

El orden Ceramiales es uno de los más numerosos y sus especies producen distintos tipos de agaranos. Si bien se han encontrado estructuras muy diversas en los agaranos de algas pertenecientes al orden, se ha observado una cierta similitud estructural en especies de una misma familia o un mismo género.[30] Entre los distintos galactanos, cabe destacar a aquellos producidos por miembros del género *Polysiphonia*, que producen un polisacárido similar a la agarosa, pero que posee un grupo sulfato en posición 6 de la unidad β-.[30] Las especies del género *Laurencia* no poseen grupos sulfatos en el C-6 de las unidades α- y bajo contenido de 3,6-anhidrogalactosa.[31] La familia de las Ceramiaceae presenta agarosa metilada en C-6 [→3)-6-*O*-metil-β-D-Gal*p*-(1→4)-3,6-An-α-L-Gal*p*-(1→] con una importante presencia de precursores y de α-L-galactosa, mientras que la familia Delesseriaceae posee agaranos altamente sulfatados, incluso algunos completamente sulfatados.[6,7]

1.2.3 Híbridos DL

En un principio se creía que las algas rojas producían un único tipo de galactano como componente de su matriz amorfa, por lo cual se clasificaba a las algas como carragenofitas o agarofitas. Sin embargo desde hace algún tiempo se ha encontrado que distintas especies producían polisacáridos donde la α-galactosa podía poseer ambas configuraciones[32] (Tabla 1.3), es decir, que son estructuras híbridas entre los agaranos y los carragenanos. La mayor

parte de las algas con estas características pertenecían al antiguo orden Cryptonemiales y ahora se encuentran incluidas dentro del orden Halymeniales o bien pertenecen a algunas de las familias del orden Gigartinales.

Tabla 1.3 Algunos ejemplos de algas rojas productoras de híbridos DL (adaptación de Takano *et al.*[33]).

Orden	Familia	Especie	Tipo de galactano
Bonnemaisoniales	Bonnemaisoniaceae	*Asparagopsis armata*[34]	Híbrido DL
Ceramiales	Rhodomelaceae	*Digenea simplex*[33]	Ágar + híbr. DL
		Rhodomela larix[35]	Ágar + híbr. DL
Gigartinales	Cystocloniaceae	*Rhodophyllis divaricata*[36]	λ-carr. + híbr. DL
	Dumontiaceae[a]	*Constantinea rosa-marina*[36]	Ágar + híbr. DL
		Crystosiphonia woodii[36]	Híbrido DL
		Neodisea borealis[36]	Híbrido DL
	Endocladiaceae[a]	*Endocladia muricata*[37]	κ/β-carr. + híbr. DL
		Gliopeltis furcata[38]	Ágar + híbr. DL
	Gigartinaceae[b]	*Chondrus crispus*[39]	κ/ι-carr. + híbr. DL[c]
		Gigartina skottsbergii[40]	κ/ι-carr. + híbr. DL[c]
		Iridaea undulosa[41,42]	λ-carr. + híbr. DL[d]
	Kallymeniaceae[a]	*Callophyllis cristata*[7]	Híbridos DL
		Cirrulicarpus gmelini[7]	Híbridos DL
	Phyllophoreaceae[b]	*Gymnogongrus griffithsiae*[43]	κ/ι-carr. + híbr. DL[c]
		Gymnogongrus torulosus[44]	κ/ι-carr. + híbr. DL[c]
		Mastocarpus stellatus[39]	κ/ι-carr. + híbr. DL[c]
	Sarcodiaceae	*Sarcodia montagneana*[36]	λ-carr. + híbr. DL
	Solieriaceae	*Anatheca dentata*[45]	Híbridos DL
		Kappaphycus alvarezii[46]	κ/ι-carr. + híbr. DL
		Meristiella gelidium[47]	κ/ι-carr. + híbr. DL
Halymeniales[a]	Halymeniaceae	*Aodes nitidissima*[48]	Híbridos DL
		Cryptonemia crenulata[43]	Híbridos DL
		Grateloupia indicata[7]	Híbridos DL
		Halymenia durvillei[49]	Híbridos DL
Plocamiales	Plocamiaceae	*Plocamium costatum*[7]	Híbridos DL
Rhodymeniales	Champiaceae	*Champia novae-zelandiae*[7]	Híbridos DL
	Lomentariaceae	*Lomentaria catenata*[50]	Híbridos DL
	Rhodymeniaceae	*Hymenocladia sanguínea*[51]	Híbridos DL

[a] Orden o familia pertenecientes al antiguo orden Cryptonemiales.
[b] Familias que producen distintos tipo de carragenanos dependiendo de su fase reproductiva.
[c] Sólo se observaron híbridos DL en la fase cistocárpica.
[d] Sólo se observaron híbridos DL en la fase tetraspórica.

En las últimas dos décadas se han encontrado varias especies consideradas carragenofitas o agarofitas, que producen, más allá del galactano mayoritario, pequeñas cantidades de polisacáridos pertenecientes a la otra familia y/o con estructuras híbridas entre ambas familias, o sea híbridos DL. Por esta razón, se están volviendo a estudiar las estructuras de los galactanos de algas ya conocidas, en particular la configuración de las unidades α- en las fracciones minoritarias. De esta manera se ha encontrado que varios miembros de los órdenes Gigartinales y Ceramiales, previamente considerados productores de un único tipo de galactano, también producen un galactano híbrido (Tabla 1.3).

Hasta el momento, se desconoce si estos híbridos son una única estructura polimérica que posee unidades α- pertenecientes tanto a la serie D- como a la L-, o una mezcla de cadenas de carragenanos y agaranos. En algunos casos se ha conseguido purificar cadenas de agaranos y de carragenanos de fracciones que originalmente poseían una estructura que aparentaba ser híbrida, aunque no ha sido posible comprobar que toda la fracción se trate de una mezcla.[46] Inversamente, tampoco se pudo probar la existencia de un polímero único con ambos tipos de estructuras. Se han realizado varios intentos en esa cuestión, principalmente mediante hidrólisis parciales de híbridos DL aislados de distintas especies.[6,38,52] Hasta el momento sólo se han hallado oligosacáridos (di-, tri- o tetrasacáridos) con secuencias correspondientes a carragenanos o a agaranos, pero nunca híbridos verdaderos. Esto no implica que no existan los híbridos DL, ya que en el caso que la estructura del híbrido sea en bloque, la zona donde se podrían obtener los oligosacáridos con unidades α- pertenecientes a ambas series (o sea la zona de unión entre los bloques) estaría en mucha menor proporción que las zonas ricas en estructuras tipo carragenanos o tipo agaranos.

1.2.4 Modelo del prisma

Teniendo en cuenta que la separación entre algas agarofitas y carragenofitas no es tan clara y marcada como parecía, Stortz y Cerezo[7] propusieron un modelo tipo prisma triangular para ubicar a los distintos tipos de galactanos producidos por las algas rojas (Fig. 1.6). Cada una de las caras triangulares del prisma representa todas las combinaciones posibles de carragenanos (la cara frontal) y agaranos (la cara trasera). Los tres vértices de los triángulos marcan las distintas estructuras extremas posibles de ambas familias con respecto a la unidad α-: 3,6-anhidrogalactosa, galactosa 6-sulfato o galactosa. En los lados y en las superficies de las caras triangulares estarían las posibles variantes estructurales. Así, en los carragenanos, el κ- y el ι- ideal se ubican en el vértice superior, y el μ- y el υ- en el vértice inferior izquierdo. Las distintas combinaciones de estos carragenanos (como por ejemplo las fracciones aisladas

de *Gigartina skottsbergii*[40] e *Iridaea undulosa*[41]) se ubicarían en algún punto de la línea que une los dos vértices. De manera análoga se puede considerar que los porfiranos se ubicarían en algún punto de la línea que une los vértices donde se encuentran la agarosa ideal y el tercer extremo de Yaphe (Fig. 1.6). Los autores basaron esta parte del modelo en uno previamente propuesto por Stortz *et al.*[53] en el cual representaban los agaranos y carragenanos en un hexágono, donde tres vértices del mismo representaban las estructuras extremas de los carragenanos, y los otros tres las de los agaranos.

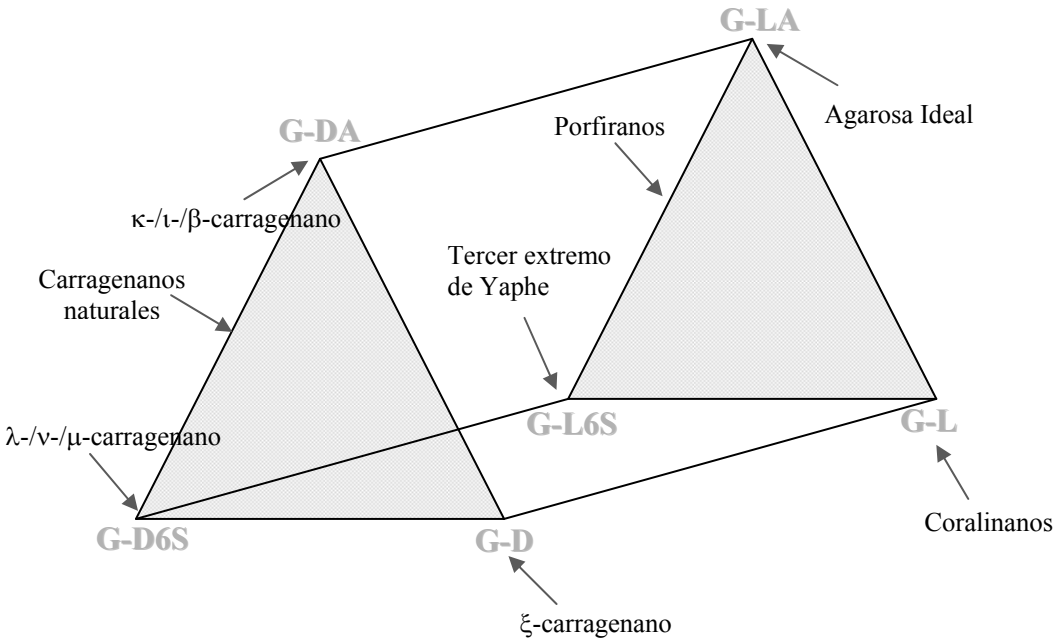


Figura 1.6 Prisma triangular de los galactanos (adaptado de Stortz y Cerezo[7]).

El modelo de Stortz y Cerezo[7] se diferencia en que incluye los híbridos DL. Estos están representados en las caras rectangulares y el cuerpo del prisma. La ubicación exacta de cada galactano híbrido no sólo depende de la proporción de estructuras tipo carragenano o agarano que posea, sino también de la proporción de 3,6-anhidrogalactosa, α-galactosa y α-galactosa 6-sulfato. Entonces, los híbridos DL que sean ricos en estructuras tipo agarano, como los de *Anatheca dentata,*[45] *Champia novae-zelandiae*[7] y *Lomentaria catenata*[50] se van a encontrar ubicados cerca de la cara triangular trasera del prisma, los híbridos ricos en estructuras tipo carragenanos como los de *Asparagopsis armata*[34] y *Grateloupia indica*[7] se encuentran cerca de la cara frontal, y aquellos con proporciones semejantes entre ambos tipos de estructuras, como los de *Digenea simplex,*[33] se ubicarían en la franja central del prisma.

1.3 Gelificación de los galactanos de algas rojas

Las propiedades reológicas de los galactanos de algas rojas en solución están relacionadas con la concentración, la estructura del galactano, la temperatura, la presencia de otros solutos (en general sales) y el peso molecular. Dependiendo de estos factores se pueden encontrar dos posibles comportamientos reológicos: la interacción entre cadenas lineales con un descenso del espacio libre o el incremento del volumen excluido y la formación de geles causada por el entrecruzamiento de cadenas.[10] En el primer caso, un aumento de la concentración produce una mayor interacción entre las macromoléculas, produciendo un aumento en la viscosidad de la solución. Esto ocurre, por ejemplo, con el λ-carragenano.[10] En el segundo caso, las interacciones entre moléculas conllevan a la formación de una red que termina generando un gel. Esta puede considerarse como una forma especial de precipitación o cristalización en solución, donde una macromolécula puede separarse de la solución formando una red extendida que atrapa al solvente produciendo un sistema aparentemente homogéneo.[54] En general, este fenómeno se ve favorecido por las bajas temperaturas y para algunos galactanos por la presencia de ciertos contraiones. La agarosa, el κ- y el ι-carragenano son algunos de los galactanos que pueden gelificar.

La razón por la que galactanos como el κ-carragenano pueden gelificar mientras que otros como el λ-carragenano no, se debe a la presencia o ausencia de la 3,6-anhidrogalactosa. Como se puede ver en la Figura 1.2, el anillo de seis miembros de dicho azúcar se presenta en conformación $^{1}C_{4}$ mientras que la α-D-galactosa 6-sulfato se presenta la silla $^{4}C_{1}$. La diferente conformación del anhidroazúcar permite la formación de estructuras secundarias en forma de hélice que son esenciales para la formación del gel.[10] Es por ello que sólo los galactanos que poseen 3,6-anhidrogalactosa pueden formar geles y la presencia de precursores (es decir unidades de α-galactosa 6-sulfato) en la cadena disminuye su capacidad de gelificación.[55] Sin embargo, la presencia de dicho anhidroazúcar en el galactano no asegura la capacidad de gelificar del mismo. El θ-carragenano, producto de tratamiento alcalino del λ-carragenano y rico en 3,6-anhidrogalactosa, no posee prácticamente propiedades gelificantes, debido probablemente a la presencia de grupo sulfato en el C-2 de la unidad β- que afecta a la estabilidad de las posibles estructuras secundarias.[6]

La formación de las hélices y la consecuente gelificación de los galactanos es un proceso complejo que depende de muchos factores y no se conoce completamente. A su vez,

es diferente para cada tipo de galactano, por lo que se va analizar con más detalle dichos procesos para la agarosa, el κ- y el ι-carragenano.

1.3.1 Conformación de galactanos

En 1970, Rees y colaboradores[56] comprobaron que los cambios conformacionales afectan al poder rotatorio de los polisacáridos. Para el ι-carragenano ellos determinaron que la diferencia en el poder rotatorio se debía al pasaje de una conformación desordenada tipo *random coil* (arrollamiento al azar) a una más ordenada del tipo doble hélice. Desde ese momento, han existido numerosos trabajos que analizaron este tipo de cambios conformacionales para los distintos galactanos gelificantes.[55]

Cada uno de los carragenanos y agaranos gelificantes poseen una temperatura T_m característica en la cual la mitad de las moléculas sufrieron una transición de *random coil* a hélice.[57] Las estructuras de las hélices pudieron estudiarse utilizando técnicas como la difracción de rayos X. Para las fibras del ι-carragenano, se determinó una estructura de doble hélice dextrógira donde el disacárido se repite tres veces por vuelta. Está hélice se encuentra alternada a la mitad, formando un surco o hendidura entre las dos hebras de 2,6 nm.[25] Los dos sulfatos están orientados hacia afuera y los residuos de la galactosa 4-sulfato están conectados entre sí por seis enlaces de hidrógenos entre los O-6 y O-2 por cada vuelta de hélice (Fig. 1.7). Para la sal de potasio del κ-carragenano se obtuvieron fibras menos cristalinas por lo que los datos no fueron tan categóricos. Sin embargo, Millane *et al.*[58] concluyeron que la mejor explicación posible era la de una doble hélice dextrógira con una simetría en la que el disacárido se repetía tres veces por vuelta. A diferencia de la del ι-carragenano, hay un corrimiento de 0,11 nm de la alternación a la mitad y una rotación de 28° respecto del eje de la hélice (Fig. 1.7). Asimismo, la hendidura formada por las hebras es de 2,5 nm. En este modelo, sólo hay tres enlaces de hidrógeno entre los residuos de galactosa 4-sulfato por cada vuelta de hélice.

A partir de estudios de difracción de rayos X también se pudo proponer una estructura de doble hélice para la agarosa. Esta resultó ser levógira con una simetría donde el disacárido se repite tres veces por vuelta de hélice y una hendidura de 1,9 nm.[54] La cavidad interna posee 0,45 nm y alberga moléculas de agua que estarían involucradas en la estabilización de las hélices por formación de enlaces de hidrógeno con los O-2 de la galactosa y O-5 de la 3,6-anhidrogalactosa.[25]

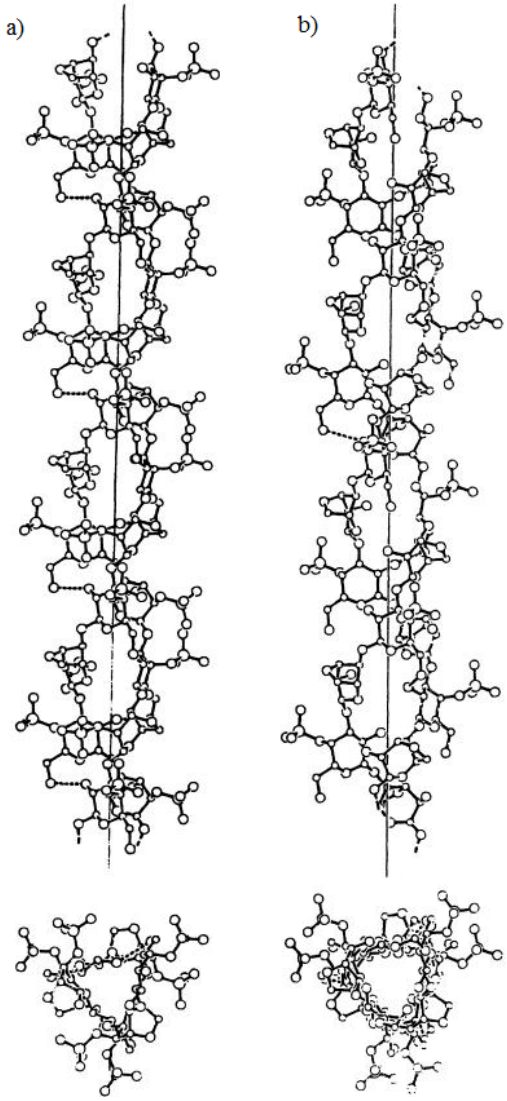


Figura 1.7 Dobles hélices propuestas para a) ι-carragenano, b) κ-carragenano (adaptado de Piculell[55]).

Aunque el modelo de doble hélice es el más conocido, hay otro modelo que ha postulado que la conformación ordenada es una hélice simple que en ciertas condiciones puede asociarse en dímeros sin entrelazarse.[55] Para los carragenanos, se postuló que las características de estas hélices simples son iguales a las de las dobles hélices.[59] Para la agarosa, Foord *et al.*[60] dedujeron hélices simples extendidas con un hueco de 0,89 a 0,97 nm a partir del difractograma de rayos X de una película de dicho agarano. La controversia sobre el mecanismo de gelificación de los galactanos de algas rojas persiste aún hoy en día, con trabajos que intentan demostrar que la doble hélice es el mecanismo real,[56,61,62] y otros que postulan la simple hélice como la posibilidad más certera.[60,63,64]

1.3.1.1 Efecto de los iones en la conformación

Un hecho muy interesante relacionado con los galactanos gelificantes de algas rojas es la sensibilidad de sus propiedades reológicas a las sales. Estas se ven afectadas no sólo por la concentración, sino también por la identidad del catión y del anión.[55] En general, la presencia de sales favorece el orden conformacional y la gelificación, aunque hay casos en los que ocurre el efecto contrario.[55]

De los tres galactanos regulares que se han estudiado en detalle, el κ-carragenano es el que se ve más afectado por la presencia de sales. Rochas y Rinaudo[65] determinaron que existe una relación lineal entre la inversa de la temperatura T_m, o sea la temperatura en la que la mitad de las moléculas sufrieron la transición conformacional, y el logaritmo de la concentración total de cationes c_T, la cual incluye los contraiones de los grupos sulfato más los cationes de las sales agregadas. Al aumentar la concentración de cationes, la temperatura T_m también se hace mayor. A una determinada concentración crítica (c_T*), la transición *random coil* a hélice y la transición hélice a *random coil* dejan de ocurrir a la misma T_m, produciéndose una histéresis. Los autores también observaron que este comportamiento no sólo depende de la concentración sino también de la naturaleza del catión. De esta manera se pueden distinguir tres grupos en función de su tendencia a promover la formación de hélices: cationes monovalentes no específicos (R_4N^+, Li^+, Na^+), cationes divalentes no específicos (Mg^{2+}, Ca^{2+}, Sr^{2+}, Ba^{2+}, Co^{2+}, Zn^{2+}) y cationes monovalentes específicos (NH_4^+, Cs^+, K^+, Rb^+).[55] Los cationes no específicos (mono o divalentes) son menos efectivos para estabilizar las hélices que los específicos. Estos últimos, en cambio, pueden incluso promover la agregación y gelificación en el κ-carragenano. En cuanto a los aniones no se observa selectividad, salvo el I^- que estabiliza la formación de hélices pero impide la agregación.[17]

Para el ι-carragenano se observa que los cationes divalentes, en particular el Ca^{2+}, tienen un gran efecto estabilizador de las hélices. La alta densidad de carga de este polisacárido amplifica la sensibilidad a la valencia del contraión con respecto al κ-carragenano.[55] La agarosa no presenta selectividad a cationes, pero se observó que los aniones afectan la gelificación: el NaCl estabiliza ligeramente el gel formado, mientras que el NaBr, $NaNO_3$, y NaSCN lo desestabilizan.[54]

1.3.2 Mecanismo de gelificación

El primer modelo de gelificación de galactanos fue propuesto por Rees y colaboradores a fines de la década del 60.[66] En ese modelo proponían que la gelificación se debía al

entrecruzamiento de dos o más cadenas formando una red y que el punto de entrecruzamiento estaba dado por las dobles hélices, que a su vez podían formar agregados. Las zonas sin 3,6-anhidrogalactosa (o sea una galactosa 6-sulfato con conformación $^4C_1$), o *kinks*, impedirían la continuación indefinida de la hélice y por lo tanto serían la zona de entrecruce. A partir de ese hito marcado por el grupo británico, se han propuesto diferentes modelos. Todos han tenido en común que el primer paso es el pasaje de *random coil* a hélice (simple o doble) y en muchos modelos se supone la formación de agregados entre las hélices para favorecer el entrecruzamiento.

Un modelo muy interesante es el propuesto por Chronakis *et al.*[67] Los autores realizaron un estudio de las propiedades gelificantes del κ-carragenano en mezclas de NaI y CsI (siempre a una concentración final de 0,1M). A bajas concentraciones de Cs^+ se observaron geles débiles parecidos a los que se obtienen a partir del ι-carragenano, mientras que a altas concentraciones de Cs^+ los geles fueron similares a los geles "convencionales" del κ-carragenano.[67] A partir de estos resultados, los autores propusieron dos posibles esquemas de gelificación:

(1) *random coil* → doble hélice → gel

(2) *random coil* → doble hélice → varillas helicoidales → gel

A bajas concentraciones de Cs^+ (catión monovalente específico), gana el efecto del I^- de estabilizar las hélices e impedir la formación de agregados. En este caso el gel (1) se formaría por asociaciones débiles y reversibles entre las hélices cuya generación podría deberse a una red de dobles hélices ramificadas.[67] A una determinada concentración de Cs^+, el efecto estabilizante y agregante de dicho catión supera al del I^-, formándose un gel de κ-carragenano mucho más firme que el anterior y con propiedades que se asemejan a los geles convencionales de κ-carragenano con K^+. Chronakis *et al.*[67] atribuyeron esta diferencia a la formación de agregados de las hélices, del tipo de varillas helicoidales.

Asimismo, en base a la similitud de las propiedades de los geles y a los estudios realizados, se puede esperar que el ι-carragenano posea un modelo de gelificación similar a (1)[55], y la agarosa a (2).[54]

1.3.3 Propiedades de los geles

Como ya se mencionó en el principio de esta Sección, las propiedades reológicas dependen de diversos factores. De acuerdo a lo explicado en la Sección 1.3.2 se puede

deducir que la firmeza de los geles obtenidos aumenta en el siguiente orden: ι-carragenano < κ-carragenano (con iones específicos) < agarosa.[57]

Otra propiedad de estos geles es la termorreversibilidad. Para los geles dados en las condiciones (1) la temperatura de transición sol-gel y gel-sol es T_m, o sea la temperatura de transición *random coil*-hélice, pero para los geles obtenidos en condiciones (2), la aparición de los agregados de las dobles hélices hace que ocurra una histéresis térmica, o sea que la curva de enfriamiento es distinta a la de calentamiento.[67] Esta se caracteriza por dos temperaturas: T_{fus}, la temperatura en la que se funde el gel y T_{gel}, la temperatura en la que se forma el gel. Es importante destacar que para los geles de tipo (1) $T_m=T_{fus}=T_{gel}$, pero para los geles de tipo (2), $T_m= T_{gel}<T_{fus}$, lo que implica que la formación de hélices ocurre al mismo tiempo que la formación del gel al enfriarse. La diferencia de temperatura observada en la histéresis está directamente relacionada con el grado de agregación de las dobles hélices y la densidad de carga de los polímeros, y por ello el ancho de histéresis sigue el orden: ι-carragenano < κ-carragenano < agarosa.[57]

Para los geles de agarosa, en particular, la presencia de grupos metoxilos afecta a la temperatura de gelificación. La presencia de metoxilo en C-6 de la unidad β- y en C-2 de la unidad α- aumenta el valor de dicha temperatura, mientras que la metilación del O-2 en la unidad β- disminuye dicho valor.[26]

1.4 Usos y comercialización de los galactanos de algas rojas

Como ya se mencionó al principio de este Capítulo, los carragenanos y ágares extraídos de las algas rojas poseen una amplia utilidad a nivel industrial debido principalmente a sus propiedades reológicas. Los galactanos utilizados en la industria son el κ-carragenano, el ι-carragenano, el ágar y la agarosa por sus propiedades gelificantes, y el λ-carragenano por su capacidad viscosante y espesante.

El ágar posee una temperatura de fusión y gelificación superior a la de los carragenanos, por lo que se lo utiliza para rellenos en pastelería y glaseados.[1] También se lo usa para los alimentos con altos contenidos de azúcar, como los caramelos frutales, ya que la presencia de sacarosa aumenta la fuerza del gel. Por otro lado, la gran histéresis entre la temperatura de fusión y de gelificación que posee la agarosa la hace adecuada para uso bacteriológico al poder generar geles esterilizados sin que se fundan. La agarosa también tiene uso de laboratorio, principalmente como medio para electroforesis.[1]

Los carragenanos son muy utilizados en la industria láctea. Se utilizan principalmente el κ- y el λ-carragenano ya que a bajas concentraciones estos polisacáridos interaccionan con las cargas positivas de las proteínas de la leche.[68] El κ-carragenano es usado para impedir la separación del suero de la leche al retener las partículas en la red generada por interacción con la caseína. El λ-carragenano mejora la estabilidad y la textura de dichos productos.

A su vez, estos polisacáridos poseen la capacidad de retener agua, lo que es aprovechado en la industria de la carne procesada para prevenir la pérdida de humedad durante el cocinado de las mismas. Los carragenanos también se utilizan en otras industrias además de la alimenticia. El ι-carragenano es usado como ligante en dentífricos debido a sus propiedades tixotrópicas ya que si bien forma un gel, al aplicar presión este puede fluir.[68] El gel de κ-carragenano generado con K^+ y mezclado con perfume es utilizado en los geles hogareños aromatizados. También son utilizados en comida para mascotas como carne enlatada y alimento balanceado.[68] En esta industria se usa un carragenano semirrefinado que al estar menos procesado requiere menor inversión de capital para obtenerlo y por lo tanto puede ser comercializado a menor precio.

Uno de los usos en común que tienen estos galactanos es como sustituto de la gelatina, aunque por sus distintas propiedades gelificantes, los carragenanos se utilizan para postres y jaleas mientras que el ágar se utiliza para generar gelatinas de carne tipo terrina.

La producción de estos galactanos proviene mayoritariamente de los países asiáticos que poseen costas en el Océano Pacífico. Además, un bajo porcentaje se produce en Europa y América. En la Tabla 1.4 se pueden observar los distintos valores de comercialización de estos galactanos durante el año 2009. De estos datos se puede concluir que la producción y comercialización de carragenanos es más importante que para el ágar, aún cuando este último posee un mayor precio.

Tabla 1.4 Volumen de venta, precio y valor total de ventas de carragenanos y ágar para el año 2009.[1]

Polisacárido	Vol. de ventas (10^6kg)	Precio (US$/kg)[a]	Valor de ventas (10^6 US$)
Carragenanos	50	10,5	527
Ágar	9,6	18	173

[a] Precio promedio entre los distintos tipos y grados de purificación de los polisacáridos.

1.4.1 Obtención de los galactanos

Las especies productoras de carragenanos para la industria son *Kappaphycus alvarezii*, *Eucheuma denticulatum*, *Gigartina skottsbergii* y *Chondrus crispus* (Tabla 1.5). En menor medida se utilizan *Sarcothalia crispata* para producir κ- y λ-carragenano e *Hypnea musciformis* para producir κ-carragenano.

Tabla 1.5 Principales algas productoras de carragenanos y de ágar.[1]

Alga	País	Polisacárido
Kappaphycus alvarezii	Filipinas, Indonesia, Tanzania	κ-carr.
Eucheuma denticulatum	Filipinas, Indonesia, Tanzania	ι-carr.
Gigartina skottsbergii	Chile, Argentina, México, Perú	κ/ι- o λ-carr.
Chondrus crispus	Canadá, Francia, Estados Unidos	κ-/ι- o λ-carr.
Gelidium sp.	Japón, España, Marruecos, México	Ágar
Gracilaria sp.	Chile, Argentina, China, Indonesia	Ágar

Las algas de aguas templadas (*K. alvarezii* y *E. denticulatum*) pueden obtenerse tanto por cosecha natural como por cultivo de las mismas, mientras que las de aguas más frías (*G. skottsbergii* y *C. crispus*) sólo se obtienen por cosecha. Para obtener el carragenano más refinado se realiza una extracción del alga molida en medio acuoso (generalmente básico). Los carragenanos solubilizados en dicho medio son luego purificados por precipitación con isopropanol o, en el caso particular del κ-carragenano, por precipitación con KCl.[68] El ágar se extrae principalmente de los géneros *Gelidium* y *Gracilaria*, y en menor medida de los géneros *Ahnfeltia* y *Pterocladia*. El ágar obtenido de *Gelidium* y *Pterocladia* es de mejor calidad (más gelificante) que los de *Gracilaria* debido a su mayor proporción de 3,6-anhidrogalactosa. La obtención de especies del género *Gelidium* se produce principalmente por cosecha ya que su lento crecimiento hace que el cultivo sea antieconómico. Las especies del género *Gracilaria* se pueden cosechar naturalmente o por cultivo. La obtención del ágar se realiza por extracción acuosa a altas temperaturas.[68] Las especies del género *Gracilaria* requieren un pretratamiento en medio básico para aumentar la proporción de 3,6-anhidrogalactosa y así dar ágares de mejor calidad.

1.4.2 Producción de algas en Sudamérica

En Sudamérica se producen carragenanos y agaranos, siendo Chile el mayor productor de algas de la región.[1] Este país es un gran proveedor de ágar de alta calidad extraído de *Gracilaria chilensis*,[68] y en menor medida también el ágar de otras especies de *Gracilaria* y *Gelidium*.[68] Chile también produce carragenanos, por explotación de las algas *Gigartina skottsbergii* y *Sarcothalia crispata.*[1] Ambas especies en fase cistocárpica producen híbridos κ/ι/μ/ν- ricos en precursores que los hacen útiles como sustitutos del λ-carragenano. Asimismo, el producto de tratamiento alcalino genera un híbrido κ/ι- que tiene propiedades específicas requeridas para la industria láctea y los dentífricos.[1] De la fase tetraspórica también se obtiene λ-carragenano. Todo lo mencionado previamente hace que Chile tenga una gran industria asociada al cultivo de algas rojas y producción de los galactanos de las mismas, teniendo tanto empresas nacionales como extranjeras que asientan sus plantas en las costas del país.[1]

Si bien Chile es el mayor productor del área, Argentina y Brasil también son productores de galactanos de algas rojas. En Argentina, se ha explotado principalmente *Gracilaria sp*. para la producción de ágar y *Gigartina skottsbergii* para la producción de carragenanos, ambas presentes en la región sur del país.[68] En la provincia de Chubut se encuentra Soriano S.A., una empresa de origen nacional que es la mayor productora y exportadora de polisacáridos de algas del país.[1] Por otro lado, Brasil produce ágar proveniente de *Gracilaria sp*., aunque su calidad es menor al proveniente de Chile.[68] Sin embargo, la producción de κ-carragenano está empezando a crecer con el uso de *Hypnea musciformis* como fuente del mismo.[68]

1.5 Actividad biológica de los polisacáridos sulfatados

Los polisacáridos de origen natural constituyen un grupo de productos con baja toxicidad para los mamíferos y poseen una amplia variedad de propiedades biológicas como anticoagulantes, antitrombóticos, antiinflamatorios, antitumorales, antivirales, etc.[69] Los polisacáridos sulfatados, entre los que se encuentran los carragenanos, agaranos e híbridos DL, poseen un amplio potencial terapéutico en gran medida por la presencia de los grupos cargados negativamente y por su similitud estructural con los glicosaminoglicanos (GAGs) presentes en la membranas de las células de mamíferos.[69]

Se postula que la actividad antiviral de estos polisacáridos está relacionada con la capacidad de interferir en la interacción del virus con los GAGs impidiendo la adhesión y/o penetración del virus a la célula.[70] La actividad antitumoral, menos estudiada, podría estar relacionada con una desestabilización de la interacción entre los glicosaminoglicanos de los proteoglicanos y las proteínas extracelulares de la matriz, impidiendo la adhesión de las células tumorales a la matriz.[71] La actividad anticoagulante de los mismos probablemente esté asociada a la similitud de los galactanos con la heparina, un glicosaminoglicano producido por varios tejidos de animales que es muy utilizado como anticoagulante.[72]

1.5.1 Actividad antiviral

Los polisacáridos sulfatados, principalmente los carragenanos, agaranos, híbridos DL y fucoidanos, han probado ser efectivos para inhibir una amplia variedad de virus envueltos, entre los que se encuentran los virus de la familia del herpes, como los virus HSV-1 y HSV-2 o el citomegalovirus humano (HCMV), los retrovirus como el de inmunodeficiencia humana (HIV), los flavivirus como el virus del dengue (DENV-1 a DENV-4), el virus de la influenza A, el virus Junín, el virus de papiloma (HPV), etc.[73] El grado de inhibición depende no sólo del polisacárido, sino también del virus, siendo los virus del herpes y el del HIV los más susceptibles frente a estos compuestos. La actividad antiviral de los polisacáridos sulfatados frente a los virus no envueltos no resulta tan eficiente.[69]

Como ya se mencionó previamente, el mecanismo de inhibición de estos polisacáridos está relacionado con su similitud con los glicosaminoglicanos.[70] Estos últimos se encuentran expuestos en la superficie de la célula permitiendo un acceso fácil al receptor viral de adhesión. Son los responsables de la primera interacción entre el virus envuelto y la célula huésped debido a las interacciones iónicas entre las regiones cargadas positivamente de glicoproteínas externas del virus y las regiones cargadas negativamente de los GAGs. Entre los más importantes se destacan el heparán sulfato (HS), el condroitín sulfato y el dermatán sulfato. De estos GAGs, es el HS el punto de adhesión más común de los virus envueltos. Este polisacárido presenta una estructura lineal con estructura repetitiva disacarídica [→4)-α-Glc*p*A-(1→4)-α-Glc*p*NAc-(1→] la cual sufre biomodificaciones como N-desacetilación, N- y O-sulfatación y epimerización del C-5 del ácido glucurónico (a ácido idurónico). Las cargas negativas aportadas por el ácido urónico y el grupo éster sulfato son las que permiten la interacción con las glicoproteínas virales de adhesión que poseen tanto clústeres como exposición en zonas discretas de aminoácidos básicos.[70]

En general, se ha demostrado que la actividad antiviral de los polisacáridos sulfatados está asociada a una interacción de estos con las glicoproteínas virales, interfiriendo así en el paso de adhesión y/o penetración.[69] Dada la temprana acción de estos compuestos, la actividad antiviral se observa si se incuban simultáneamente las células con los virus y el polisacárido. En este sistema se establece una competencia entre el polisacárido sulfatado y el HS presente en la célula huésped por interacción con las glicoproteínas virales cargadas positivamente. A mayor afinidad entre dichas proteínas y el polisacárido, un mayor porcentaje de virus no se va a poder adherir a las células causando así la inefectividad del mismo.[73]

Si bien la interacción proteína-polisacárido sulfatado va a depender de la estructura de ambos compuestos, se ha hallado que la presencia de ciertos parámetros favorecen la capacidad antiviral de dichos polisacáridos.[69] Entre éstos se pueden mencionar:

- Peso molecular: Si bien se han observado excepciones, la actividad aumenta con el peso molecular nivelándose en aproximadamente 100 kDa.
- Grupos aniónicos: Se requiere un porcentaje de éster sulfato superior al 20 %, salvo algunos casos en los que la disposición de los mismos compensa la deficiencia.
- Cadena de carbohidratos: Deben poder adaptarse a la estructura de la glicoproteína. Se requiere flexibilidad y linealidad de los polisacáridos.
- Sitios hidrofóbicos: Presencia de grupos metilo en posiciones capaces de interaccionar con los sitios hidrofóbicos de la proteína.

A pesar de su alta potencialidad como antivirales, los polisacáridos sulfatados tienen ciertas desventajas para su uso clínico:[73]

- Baja biodisponibilidad y alta degradación: Estos polisacáridos tienen una vida media en plasma de 1,5 a 2 h y son fácilmente degradados tanto en el sistema digestivo como en el plasma sanguíneo.
- Baja penetración en células infectadas: el alto peso molecular y la naturaleza iónica de los mismos hace que estos polisacáridos se unan inespecíficamente a proteínas del plasma siendo su concentración en dicho medio mayor que en las células.
- Propiedades anticoagulantes: otra actividad biológica que presentan estos polisacáridos es la actividad anticoagulante, que si bien es útil en determinadas

condiciones, resulta un efecto adverso en el uso clínico de los polisacáridos sulfatados como antivirales.

Tomando en cuenta estas desventajas, las pruebas de uso clínico realizadas con estos polisacáridos como microbicidas o virucidas son de uso tópico sobre piel o mucosas.

1.5.1.1 Actividad antiviral de los galactanos de algas rojas

Como ya se mencionó previamente, los galactanos sulfatados presentes en algas rojas pertenecen al grupo de polisacáridos sulfatados con potencial actividad antiviral para virus envueltos. Se han realizado varios estudios relacionados a la actividad antitiviral de estos compuestos (Tabla 1.6), comprobándose que tanto los carragenanos, como los agaranos y los híbridos DL pueden ser activos.

Se pudieron determinar algunas características estructurales que favorecen la actividad antiviral de los diferentes galactanos. Para los carragenanos se observó que el λ-carragenano es el más activo, principalmente frente a HSV-1 y HSV-2, seguido por el ι-carragenano y finalmente el κ-carragenano.[73] La mayor actividad del λ-carragenano puede estar asociada a su mayor grado de sulfatación. Además, la presencia de sulfato en el C-2 de la unidad β- y en el C-6 de la unidad α- se asemeja a la forma de sulfatación del heparán sulfato, lo que justificaría su alta actividad.[69]

Los agaranos son activos sólo si poseen altos porcentajes de grupos éster sulfato (superiores al 20 % como se indicó en la Sección 1.5.1), lo cual es menos común que en los carragenanos. Un caso interesante es la actividad antiherpética del agarano extraído de *Cryptopleura ramosa*. Este polisacárido posee una cantidad importante de sulfato (≈ 30 %), pero su peso molecular es bastante bajo (2.8 kDa).[74] Los agaranos, a diferencia de los carragenanos, suelen estar sustituidos por grupos metoxilos. Si bien la presencia de grupos hidrofóbicos en fucoidanos (metilo de la fucosa) favorece a la actividad antiviral de los mismos, ésto no ocurre en los agaranos.[73]

La actividad antiviral de los híbridos DL puede justificarse si se piensa a estos polisacáridos como copolímeros de bloques con zonas tipo carragenano, zonas tipo agarano y zonas de unión híbridas (ver Sección 1.2.3).

Teniendo en cuenta que los galactanos también pueden poseer actividades anticoagulantes, en muchos casos se han estudiado ambas en paralelo. Se ha determinado que un μ/ν-carragenano aislado de *G. skottsbergii*, agaranos obtenidos de *G. corticata*, e híbridos

DL de *G. torulosus* poseían gran poder antiviral frente a los virus estudiados y además poseían baja actividad anticoagulante. Estas características hacen que resulten mejores candidatos a agentes antivirales.

Tabla 1.6 Algunos ejemplos de galactanos con actividad antiviral.

	Especie	Polisacárido	Virus
Carragenanos			
	Gigartina skottsbergii[75]	κ/ι-, μ/ν- y λ-carr.	HSV-1, HSV-2
	Gymnogongrus griffithsiae[43]	κ/ι-carr.	HSV1, HSV-2
	Meristiella gelidium[47]	κ/ι-carr.	HSV-2, DENV
	Schizymenia pacifica[76]	Familia λ-carr.	HIV-1
	Stenogramme interrupta[15]	ι/α-, ξ/λ-carr.	HSV-1, HSV-2
Agaranos			
	Acanthophora spicifera[77]	Agaranos sulf.	HSV-1, HSV-2
	Bostrychia montagnei[78]	Agaranos sulf.	HSV-1, HSV-2
	Cryptopleura ramosa[74]	Agaranos sulf.	HSV-1, HSV-2
	Gracilaria corticata[79]	Agaranos sulf.	HSV-1, HSV-2
	Pterocladiella capillacea[80]	Agaranos sulf.	HSV-1, HSV-2, HCMV
	Schizymenia dubyi[81]	Agaranos sulf.	HIV-1, HSV-1, HSV-2
Híbridos DL			
	Cryptonemia crenulata[76]	Híbridos DL	HSV-1, HSV-2
	Digenea simplex[82]	Ágar + híbr. DL	HIV-1
	Grateloupia indicata[83]	Híbridos DL	HSV-1, HSV-2
	Gymnogongrus griffithsiae[43]	Híbridos DL	HSV1, HSV-2
	Gymnogongrus torulosus[84]	Híbridos DL	HSV-1, HSV-2, DENV
	Schizymenia binderi[85]	Híbridos DL	HSV-1, HSV-2

Dentro de las aplicaciones de uso clínico, la más conocida fue el Carraguard®, un gel microbicida contra HIV, HSV, HPV, entre otros virus de transmisión sexual. Este gel tópico está compuesto por una mezcla de λ- y κ-carragenano.[86] Si bien en un principio parecía efectivo llegando incluso a la fase III en pruebas clínicas realizadas en África, finalmente no pudo demostrarse su eficacia para evitar el contagio del HIV.[87] En la actualidad se sigue estudiando su eficacia en combinación con otros compuestos antivirales ya que sí se demostró que su uso es seguro para el ser humano.[86]

1.6 Modificaciones químicas de los galactanos de algas rojas

Existe una variedad de modificaciones químicas realizadas a los galactanos de algas rojas, generalmente con el objetivo de modular las propiedades fisicoquímicas o biológicas de los mismos.

La modificación más conocida y utilizada, incluso a nivel industrial, es el tratamiento alcalino, donde las unidades de α-galactosa 6-sulfato sufren un ataque nucleofílico intramolecular tipo S_N2 para dar 3,6-anhidro-α-galactosa (Fig. 1.8).[8] En esta reacción el O-3 polarizado o con carga negativa ataca al sulfato en posición 6, previa inversión conformacional de la silla (de $^4C_1$ a $^1C_4$). La reacción se utiliza para mejorar las propiedades reológicas de los galactanos ya que, como se explicó anteriormente, la presencia del anhidroazúcar aumenta la capacidad gelificante de los mismos. Esta es una reacción sencilla donde el tiempo de reacción es altamente dependiente del tipo de galactano. Por ejemplo, los carragenanos de la familia del λ- tardan entre 20 y 60 veces más en ciclar que los de la familia del κ-.[10]

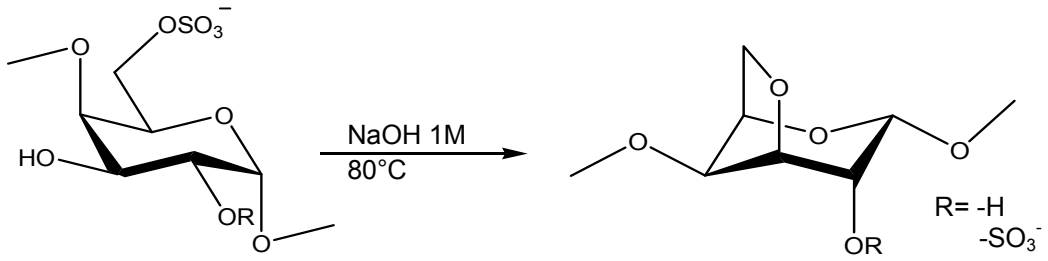


Figura 1.8 Reacción de tratamiento alcalino en galactanos de algas rojas.

La despolimerización por hidrólisis parcial es otra reacción muy común que se aplica en estos galactanos. Esta modificación es utilizada para obtener poli- u oligosacáridos de menor peso molecular pero mayor homogeneidad estructural. Asimismo, también se usa la reacción para disminuir las propiedades anticoagulantes de los mismos y, en algunos casos, para potenciar otras de sus actividades biológicas como la antitumoral.[88] Existen varios métodos de hidrólisis, tanto químicos como enzimáticos. Dentro de los químicos el más común es el uso de hidrólisis ácida en condiciones suaves que permiten la ruptura selectiva del enlace glicosídico de la 3,6-anhidrogalactosa, más lábil, sin afectar al enlace de la β-galactosa. Otras técnicas de despolimerización son la metanólisis, la despolimerización radicalaria por H_2O_2, la acción de especies activas de oxígeno y ultrasonido, entre otras.[88] Por otro lado existen enzimas de origen bacteriano (carragenasas o agarasas), que permiten

romper selectivamente los enlaces α-, así como otras que cortan selectivamente los enlaces β- de estos galactanos.

Otro grupo de modificaciones es el relacionado con alterar la carga aniónica de los galactanos de algas rojas. Al aumentar la presencia de grupos con carga negativa se pueden modificar las propiedades de los polisacáridos y su interacción con los receptores biológicos. Entre estas modificaciones, la más frecuente es la sobresulfatación para obtener productos con mayor carácter aniónico. La sobresulfatación demostró aumentar las actividades antivirales,[73] antitumorales[71] y antioxidantes[89] en varios galactanos. Sin embargo, es importante aclarar que esto no siempre es así, ya que hay una relación óptima entre la actividad biológica y la cantidad y posición de los grupos sulfatos.[73]

Más allá de la sulfatación, se han realizado otras reacciones con el fin de insertar cargas negativas a estos polisacáridos. La fosforilación del κ-carragenano y posterior hidrólisis dieron un producto con mayor actividad antioxidante que el polisacárido original.[89] Por otro lado, el reemplazo de los grupos sulfato por seleniatos en el κ-carragenano generó un producto que podría inhibir la proliferación de células de cáncer mamario.[10] La adición de cargas negativas también se realizó por introducción de espaciadores con grupos carboxilos en los extremos como la *O*-maleoilación,[90] la *O*-succinilación[91] y la formación de carboximetil galactanos.[92,93] Esta inserción de cargas negativas no sólo puede modificar las propiedades biológicas sino también las reológicas ya que para el carboximetil ágar se observó una disminución del poder gelificante del mismo frente al producto sin sustituir.[93]

Por último, dentro de las modificaciones para insertar cargas negativas, se encuentran la oxidación del alcohol primario para generar ácidos carboxílicos, la cual no había sido muy estudiada hasta el comienzo de este trabajo de Tesis. Para los carragenanos se estudió la oxidación con metales (MnO_4^- y Ce^{4+}), centrándose más en la cinética de la reacción que en la estructura final del producto, aún cuando se informó que la reacción no es selectiva.[94] Para los agaranos se han publicado trabajos de oxidación de ágar con H_2O_2[95] y de agarosa con TEMPO,[96] donde si bien la estructura final ha sido más estudiada, no se pudo confirmar la selectividad de la oxidación. Las modificaciones detalladas son sólo algunos ejemplos. Se han realizado también reacciones de entrecruzamiento con otros polímeros para obtener nuevos hidrogeles, *grafting* con distintas moléculas de distinta importancia química o biológica, entre otras.[10]

Bibliografía

1. Bixler, H. J. & Porse, H. (2011). *Journal of Applied Phycology, 23*, 321–335.

2. www.algaebase.org

3. Graham, J. E., Wilcox, L. W. & Graham, L. E. (2008). *Algae* (2º Ed.). Benjamin-Cummings Publishing Company, Nueva Jersey, Estados Unidos. 720 pp.

4. Craigie, J. S. (1990). Eds. Cole, K. M & Sheath, R. G. *Biology of red algae*, Capítulo 10. Cambridge University Press, Nueva York, Estados Unidos.

5. Estévez, J. M., Ciancia, M., Rodríguez, M. C. & Cerezo, A. S. (2003). *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica*, *38*, 13–28.

6. Usov, A. I. (2011). *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, *65*, 115–218 y referencias allí citadas.

7. Stortz, C. A. & Cerezo, A. S. (2000). *Current Topics in Phytochemistry*, *4*, 121–134 y referencias allí citadas.

8. Ciancia, M., Noseda, M. D., Matulewicz, M. C. & Cerezo, A. S. (1993). *Carbohydrate Polymers*, *20*, 95–98.

9. Knutsen, S. H., Myslabodski, D. E., Larsen, B. & Usov, A. I. (1994). *Botanica Marina*, *37*, 163–170.

10. Campos, V. L., Kawano, D. F., da Silva Jr., D. B. & Carvalho, I. (2009). *Carbohydrate Polymers*, *77*, 167–180.

11. van de Velde, F., Antipova, A. S., Rollema, H. S., Burova, T. V., Grinberg, N. V., Pereira, L., Gilsenan, P. M., Tromp, R. H., Rudolf, B. & Grinberg, V. Y. (2005). *Carbohydrate Research*, *340*, 1113–1129.

12. Bixler, H. J., Johndro, K. & Falshaw, R. (2001). *Food Hydrocolloids*, *15*, 619–630.

13. Guibet, M., Boulenguer, P., Mazoyer, J., Kervarec, N., Antonopoulos, A., Lafosse, M. & Helbert, W. (2008). *Biomacromolecules*, *9*, 408–415.

14. Falshaw, R., Furneaux, R. H. & Stevenson, D. E. (2005). *Carbohydrate Research*, *340*, 1149–1158.

15. Cáceres, P. J., Carlucci, M. J., Damonte, E. B., Matsuhiro, B. & Zúñiga, E. A. (2000). *Phytochemistry*, *53*, 81–86.

16. DiNinno, V., McCandless, E. L. & Bell, R. A. (1979). *Carbohydrate Research*, *71*, C1–C4.

17. Rinaudo, M. (2008). Eds. Belgacem, M. N. & Gandini, A. *Monomers, Polymers and Composite of Renewable Resources*, Capítulo 24. Elsevier, Oxford, Reino Unido.

18. Tuvikene, R., Truus, K., Robal, M., Volobujeva, O., Mellikov, E., Pehk, T., Kollist, A., Kailas, T. & Vaher, M. (2010). *Journal of Applied Phycology*, *22*, 51–63.

19. Falshaw, R., Furneaux, R. H., Wong, H., Liao, M.-L., Bacic, A. & Chandrkrachang, S. (1996). *Carbohydrate Research*, *285*, 81–98.

20. Mollion, J., Morvan, H., Bellanger, F. & Moreau, S. (1988). *Phytochemistry*, *27*, 2023–2026.

21. Usov, A. I., Yarotsky, S. V. & Shashkov, A. S. (1980). *Biopolymers*, *19*, 977–990.

22. Miller, I. J. (2001). *Botanica Marina*, *44*, 583–587.

23. Duckworth M. & Yaphe, W. (1971). *Carbohydrate Research*, *16*, 189–197.

24. Araki, C., Arai, K. & Hirase, S. (1967). *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, *40*, 959–962.

25. Lahaye, M. (2001). *Journal of Applied Phycology*, *13*, 173–184.

26. Lahaye, M. (2001). *Cahier de Biologie Marine*, *42*, 137–157.

27. Murano, E. (1995). *Journal of Applied Phycology*, *7*, 245–254.

28. Anderson, N. S. & Rees, D. A. (1965). *Journal of the Chemical Society*, 5880–5887.

29. Brasch, D. J., Chang, H. M., Chuah, C. T. & Melton, L. D. (1981). *Carbohydrate Research*, *97,* 113–125.

30. Miller, I. J. (2003). *Botanica Marina*, *46*, 386–391.

31. Usov, A. I. & Elashvili, M. Y. (1991). *Botanica Marina*, *34*, 553–560.

32. Sen Sr., A. K., Das, A. K., Sarkar, K. K., Siddhanta, A. K., Takano, R., Kamei, K. & Hara, S. (2002). *Botanica Marina*, *45*, 331–338.

33. Takano, R., Shiomoto, K. Kamei, K., Hara, S. & Hirase, S. (2003). *Botanica Marina*, *46*, 142–150.

34. Haslin, C., Lahaye, M. & Pellegrini, M. (2000). *Botanica Marina*, *43*, 475–482.

35. Takano, R., Yokoi, T., Kamei, K., Hara, S. & Hirase, S. (1999). *Botanica Marina*, *42*, 183–188.

36. Chopin, T. Kerin, B. F. & Mazerolle, R. (1999). *Phycological Research*, *47*, 167–188.

37. Whyte, J. N. C., Hosford, S. P. C. & Englar, J. R. (1985). *Carbohydrate Research*, *140*, 336–341.

38. Takano, R., Iwane-Sakata, H., Hayashi, K., Hara, S. & Hirase, S. (1998). *Carbohydrate Polymers*, *35*, 81–87.

39. Craigie, J. S. & Rivero-Carro, H. (1992). *Proceedings of the International Seaweed Symposium*, *14*, 71.

40. Ciancia, M., Matulewicz, M. C. & Cerezo, A. S. (1993). *Phytochemistry*, *34*, 1541–1543.

41. Stortz, C. A. & Cerezo, A. S. (1993). *Carbohydrate Research*, *242*, 217–227.

42. Stortz, C. A., Cases, M. R. & Cerezo, A. S. (1997). *Carbohydrate Polymers*, *34*, 61–65.

43. Talarico, L. B., Zibetti, R. G. M., Faria, P. C. S., Scolaro, L. A., Duarte, M. E. R., Noseda, M. D., Pujol, C. A. & Damonte, E. B. (2004). *International Journal of Biological Macromolecules*, *43*, 63–71.

44. Estévez, J. M., Ciancia, M. & Cerezo, A. S. (2001). *Carbohydrate Research*, *331*, 27–41.

45. Nunn, J. R., Parolis, H. & Russell, I. (1981). *Carbohydrate Research, 95,* 219–226.

46. Estévez, J. M., Ciancia, M. & Cerezo, A. S. (2004). *Carbohydrate Research*, *339*, 2575–2592.

47. de S.F-Tischer, P. C., Talarico, L. B., Noseda, N. D., Guimarães, S. M. P. B., Damonte, E. B. & Duarte, M. E. R. (2006). *Carbohydrate Polymers*, *63*, 459–465.

48. Miller, I. J. & Blunt, J. W. (2005). *Botanica Marina, 48,* 137–142.

49. Fenoradosoa, T. A., Delattre, C., Laroche, C., Wadouachi, A., Dulong, V., Picton, L., Andriamadio, P. & Michaud, P. (2009). *International Journal of Biological Macromolecules*, *45*, 140–145.

50. Takano, R., Nose, Y., Hayashi, K., Hara, S. & Hirase, S. (1994). *Phytochemistry*, *37* 1615–1619.

51. Miller, I. J. (2001). *Botanica Marina, 44*, 245–251.

52. Takano, R., Nose, Y., Hayashi, K., Hara, S. & Hirase, S. (1994). *Phytochemistry, 37*, 1615–1619.

53. Stortz, C. A., Cases, M. R. & Cerezo, A. S. (1997). Eds. Townsend, R. R. & Hotchkiss, A. T. J. *Techniques in Glycobiology.* Capítulo 35. Marcel Dekker, Inc. Nueva York, Estados Unidos.

54. Stanley, N. F. (2006). Eds. Stephen, A. M., Phillips, G. O. & Williams, P. A. *Food Polysaccharides and Their Applications*, (2º Ed.) Capítulo 7. CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, Estados Unidos.

55. Piculell, L. (2006). Eds. Stephen, A. M., Phillips, G. O. & Williams, P. A. *Food Polysaccharides and Their Applications*, (2º Ed.) Capítulo 8. CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, Estados Unidos.

56. Rees, D. A., Scott, W. E. & Williamson, F. B. (1970). *Nature*, 227, 390–392.

57. Rinaudo, M. (2007). Ed. Kamerling, J. P. *Comprehensive Glycobiology*, vol 2, Capitulo 2.21. Elsevier, Ámsterdam, Holanda.

58. Millane, R. P., Chandrasekaran, R., Arnott, S. & Dea, I. C. M. (1988). *Carbohydrate Research, 182,* 1–5.

59. Bongaerts, K., Reynaers, H., Zanetti, F. & Paoletti, S. (1999). *Macromolecules, 32*, 675–682.

60. Foord, S. A. & Atkins, E. D. Y. (1989). *Biopolymers, 28*, 1345–1365.

61. Hjerde, T., Smidsrød, O., Stokke, B. T. & Christensen, B. E. (1998). *Macromolecules, 31*, 1842–1851.

62. Lee, I., Atkins, E. D. T. & Miles, M. J. (1992). *Ultramicroscopy*, *42–44*, 1107–1112.

63. Arndt, E. R. & Stevens, E. S. (1994). *Biopolymers, 34,* 1527–1534.

64. Paoletti, S., Delben, F., Cesaro, A. & Grasdalen, H. (1985). *Macromolecules, 18*, 1834–1841.

65. Rochas, C. & Rinaudo, M. (1980). *Biopolymers, 19*, 1675–1687.

66. Rees, D. A. (1977). *Polysaccharide Shapes*, Chapman and Hall, Londres, Reino Unido. 80 pp.

67. Chronakis, I. S., Piculell, L. & Borgström, J. (1996). *Carbohydrate Polymers, 31*, 215–225.

68. McHugh, D. J. (2003). A guide to the seaweed industry. *FAO Fisheries Technical Paper*, *441*, 105 pp.

69. Pujol, C. A., Carlucci, M. J., Matulewicz, M. C. & Damonte, E. B. (2007). *Topics in Heterocyclic Chemistry, 11*, 259–281.

70. Spillmann, D. (2001). *Biochimie, 83*, 811–817.

71. Haijin, M., Xiaolu, J. & Huashi, G. (2003). *Journal of Applied Phycology, 15,* 297–303.

72. Mestechkina, N. M. & Shcherbukhin, V. D. (2010). *Applied Biochemistry and Microbiology, 46*, 267–273.

73. Damonte, E. B., Matulewicz, M. C. & Cerezo, A. S. (2004). *Current Medicinal Chemistry, 11*, 2399–2419.

74. Carlucci, M. J.; Scolaro, L. A.; Errea, M. I.; Matulewicz, M. C. & Damonte, E. B. (1997). *Planta Medica*, *63*, 429–432.

75. Carlucci, M. J., Pujol, C. A., Ciancia, M.; Noseda, M. D., Matulewicz, M. C., Damonte, E. B. & Cerezo, A. S. (1997). *International Journal of Biological Macromolecules*, *20*, 97–105.

76. Nakashima, H., Kido, Y., Kobayashi, N., Motoki, Y., Neushul, M. & Yamamoto, N. (1987). *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *31*, 1524–1528.

77. Duarte, M. E. R., Cauduro, J. P., Noseda, D. G., Noseda, M. D., Gonçalves, A. G., Pujol, C. A., Damonte, E. B. & Cerezo, A. S. (2004). *Carbohydrate Research*, *339*, 335–347.

78. Duarte, M. E. R., Noseda, D. G., Noseda, M. D., Tulio, S., Pujol, C. A. & Damonte, E. B. (2001). *Phytomedicine*, *8*, 53–61.

79. Mazumder, S., Ghosal, P. K., Pujol, C. A., Carlucci, M. J., Damonte, E. B. & Ray, B. (2002). *International Journal of Biological Macromolecules*, *31*, 87–95.

80. Pujol, C. A., Errea, M. I., Matulewicz, M. C. & Damonte, E. B. (1996). *Phytotherapy Research*, *10*, 410–413.

81. Bourgougnon, N., Lahaye, M., Chermann, J. C. & Kornprobst, J. M. (1993). *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, *3*, 1141–1146.

82. Sekine, H., Ohonuki, N., Sadamasu, K., Monma, K., Kudoh, Y., Nakamura, H., Okada, Y. & Okuyama, T. (1995). *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, *43*, 1580–1584.

83. Chattopadhyay, K., Mateu, C. G., Mandal, P., Pujol, C. A., Damonte, E. B. & Ray, B. (2007). *Phytochemistry, 8,* 1428–1435.

84. Pujol, C. A., Estévez, J. M., Carlucci, M. J., Ciancia, M., Cerezo, A. S. & Damonte, E. B. (2002). *Antiviral Chemistry & Chemotherapy*, 13, 83–89.

85. Matsuhiro, B., Conte, A. F., Damonte, E. B., Kolender, A. A., Matulewicz, M. C., Mejías, E. G., Pujol, C. A. & Zúñiga, E. A. (2005). *Carbohydrate Research*, *340*, 2392–2402.

86. The Carraguard Phase II South Africa Study Team (2010). *Contraconception, 82*, 563–571.

87. Skoler-Karpoff, S., Ramjee, G., Ahmed, K., Altini, L., Plagianos, M. G., Friedland, B., Govender, S., De Kock, A., Cassim, N., Palanee, T., Dozier, G. Maguire, R. & Lahteenmaki, P. (2008). *Lancet*, *327*, 1977–1987.

88. Bondu, S., Deslandes, E., Fabre, M. S., Berthou, C. & Guangli, Y. (2010). *Carbohydrate Polymers, 81*, 448–460.

89. Yuan, H., Zhang, W., Li, X., Lue, X., Li, N., Gao, X. & Song, J. (2005). *Carbohydrate Research, 340*, 685–692.

90. Jiang, Y. & Guo, X. (2005). *Carbohydrate Polymers, 61*, 441–445.

91. Jiang, Y., Guo, X. & Chen, Y. (2007). *Carbohydrate Polymers, 68*, 457–464.

92. Tranquilan-Aranilla, C., Nagasawa, N., Bayquen, A. & Dela Rosa, A. (2012). *Carbohydrate Polymers, 87*, 1810–1816.

93. Cao, M., Liu, X., Luan, J. & Zhang, X. (2014). *Carbohydrate Polymers, 111*, 449–455.

94. Hassan, R. M., Alaraifi, A., Fawzy, A., Zaafarany, I. A., Khairou, K. S., Ikeda, Y. & Takagi, H. D. (2010). *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, *332,* 138–144.

95. Zhang, X., Liu, X., Xia, K. & Luan, J. (2014). *Carbohydrate Polymers, 112*, 583–586.

96. Su, Y., Chu, B., Gao, Y., Wu, C., Zhang, L., Chen, P., Wang, X. & Tang, S. (2013). *Carbohydrate Polymers*, *92*, 2245–2251.

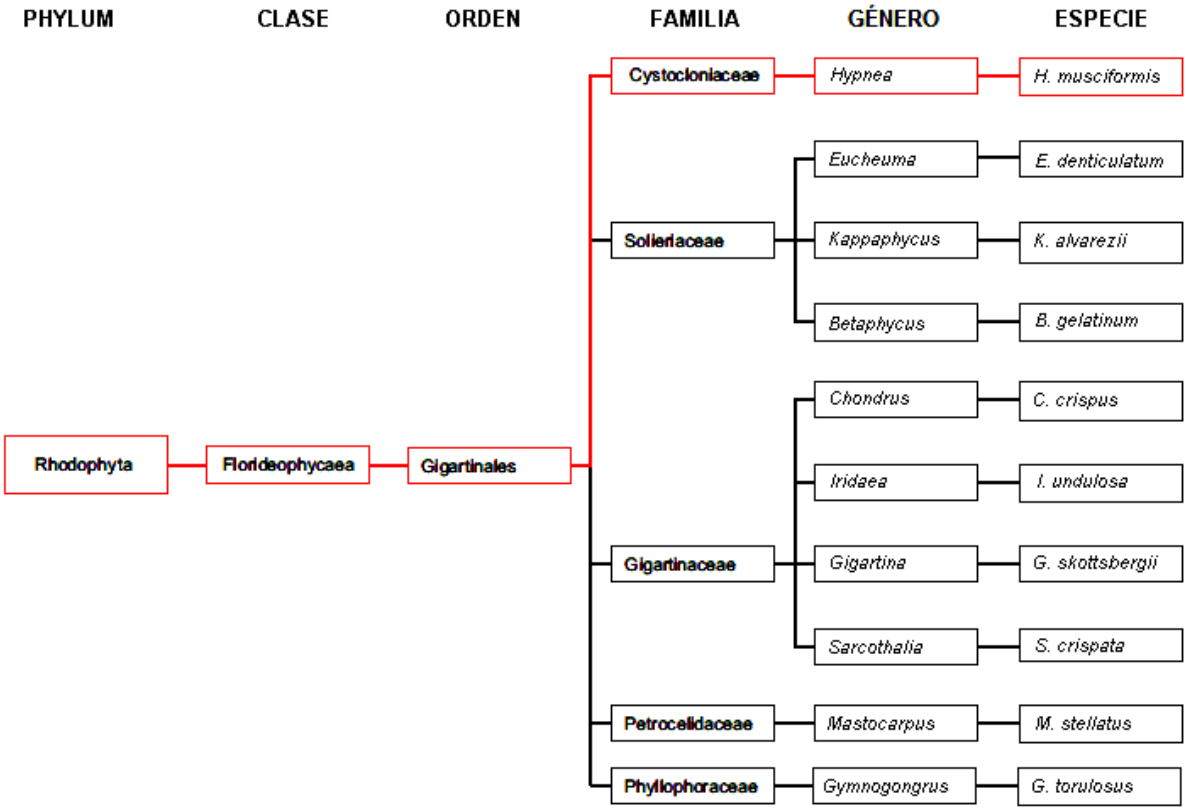
CAPÍTULO 2

Carragenanos de *Hypnea musciformis:* estudio químico y reológico

2.1 Introducción

2.1.1 *Hypnea musciformis*

Hypnea musciformis (Wulfen) Lamouroux es un alga roja perteneciente al orden Gigartinales (Esquema 2.1). Este orden posee el mayor número de algas productoras de carragenanos. Algunas de ellas, como *Kappaphycus alvarezii*, *Eucheuma denticulatum*, *Gigartina sp.*, *Sarcothalia sp.*, y *Chondrus crispus* se utilizan para la producción comercial de los carragenanos κ-, ι-, κ/ι- y λ-.[1]



Esquema 2.1 Árbol taxonómico de las familias y algunos de los géneros y especies más conocidos del orden Gigartinales. En rojo se marca la taxonomía para *H. musciformis*.

El alga *H. musciformis* es en particular productora de κ-carragenano y se encuentra en diversas regiones del mundo.[2] Su uso comercial se desarrolla casi exclusivamente en Brasil,[3] aunque se considera que a nivel mundial posee un buen potencial económico. La rentabilidad no sólo se debe a su gran contenido de carragenano, sino también a su rápido crecimiento y tolerancia a distintas condiciones ambientales.[1] Es importante destacar que la cantidad de carragenano que produce el alga varía considerablemente con los cambios de estación y las condiciones ambientales.[4]

2.1.1.1 Descripción, hábitat y distribución

H. musciformis es un alga roja formada por ramas principales cilíndricas de 0,5 a 1 cm de diámetro, que se interconectan entre sí (Fig 1a). Estas pueden llegar a medir hasta 20 cm, aunque generalmente se fragmentan antes de llegar a dicha altura. Cada rama principal presenta nuevas ramificaciones que terminan en una forma tipo gancho como se observa en la Figura 1.b.[5] El color del alga es rojo-amarronado, pero si crece en aguas con pocos nutrientes toma un color amarillento. Esta alga, en general, posee un rizoide muy chico o directamente no lo tiene; por ello, para anclarse, usa otras especies (generalmente del género *Sargassum*) como soporte, lo que implica que es un alga epífita.[6]

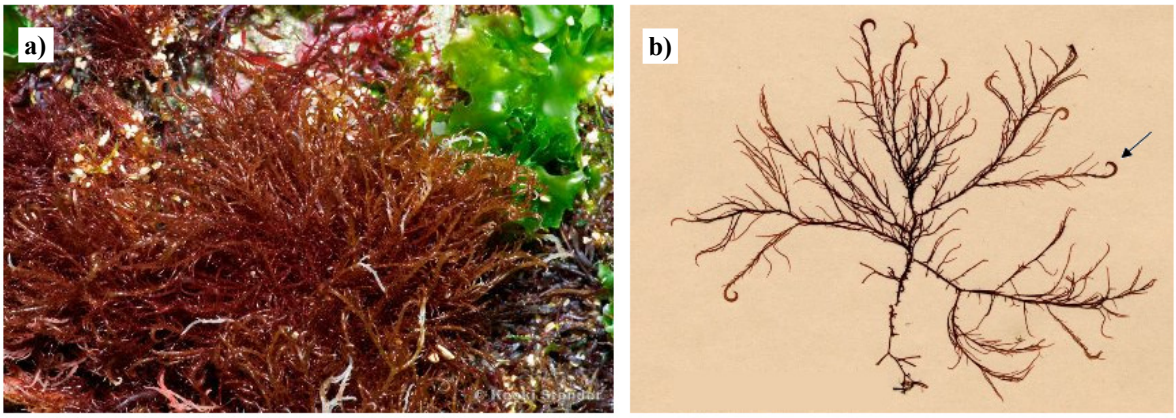


Figura 2.1 Imágenes de *Hypnea musciformis* (a y b). La flecha en la figura b muestra la forma tipo gancho de las terminaciones de las ramas.

El alga se caracteriza por poseer generaciones gametofíticas y tetrasporofíticas isomórficas presentes durante todo el año. En general, estas últimas son mucho más abundantes que las primeras, lo cual conlleva a que los gametofitos no siempre son observados. Se cree que el principal modo de reproducción del alga es por fragmentación vegetativa, principalmente de las plantas tetraspóricas.[7]

Como se puede ver en el Esquema 2.1, esta alga pertenece a la familia Cystocloniaceae. Hasta el 2004, al género *Hypnea* se lo ubicaba en la familia Hypneaceae, en aquel momento separada de la Cystocloniaceae por sus diferencias anatómicas. Ese año, Saunder *et al.*[8] realizaron un estudio del ADN ribosomal de varias familias del orden Gigartinales y llegaron a la conclusión que las especies de la familia Hypneaceae deben ser incluidas dentro de la Cystocloniaceae.

El alga *Hypnea musciformis* crece en la zona intermareal media donde recibe agua de manera irregular (zona eulitoral).[3] En general, se la puede encontrar en la parte superficial de

arrecifes, zonas rocosas o pozos de marea. En épocas de gran proliferación, también es común hallarla flotando libre con la marea.

Como ya se mencionó previamente, el alga *Hypnea musciformis* se encuentra distribuida en varias regiones del mundo, principalmente en áreas de temperaturas cálidas[7] como el océano Índico, el Mar Mediterráneo, costas de Filipinas y el océano Atlántico desde el sur de Estados Unidos hasta las costas de Uruguay. Es un alga invasiva y por lo tanto fácil de introducir en nuevos hábitats, como pasó en Hawaii donde se la llevó en 1974 con fines de comercialización.[9]

2.1.12 Antecedentes sobre carragenanos de *Hypnea musciformis*

El alga *Hypnea musciformis* produce grandes cantidades de carragenanos,[2] los cuales han sido aislados con el fin de analizar sus propiedades reológicas,[10-12] y descubrir actividades biológicas diversas como inductores de mecanismos de defensa de las plantas,[13-21] antioxidantes,[2] antiinflamatorias[22,23] y citotóxicas.[2,24] También se encontraron otras dos publicaciones donde se realizó un análisis estructural de los carragenanos producidos por alga.[25,26] Sin embargo, estas publicaciones son de vieja data, por lo que no contaban con los conocimientos ni las metodologías actuales para este tipo de tareas.

El primero de los trabajos fue publicado por el grupo de Yaphe[25] en la década del 80. Ellos realizaron una extracción en medio básico a 90 ºC para extraer los carragenanos (30 % de la masa total) del alga *H. musciformis* recolectada en la bahía de St. Lawrence en Barbados. Al realizar el fraccionamiento del extracto por precipitación selectiva con KCl, observaron que cerca del 90 % del total de carragenanos extraídos precipitaba a una concentración de 0,3M. Los autores realizaron también un tratamiento con una κ-carragenasa sobre el extracto y sobre la fracción insoluble en 0,3M de KCl. En ambos casos el tratamiento produjo los mismos resultados: un descenso en la viscosidad de la solución y un aumento del número de extremos reductores de los mismos. Cuando los autores repitieron el estudio con ι-carragenasa el resultado fue similar pero no tan marcado como al tratar con κ-carragenasa. Los espectros de RMN-^{13}C del extracto y de la fracción insoluble en 0,3M de KCl fueron consistentes con el de un κ-carragenano. Al realizar el espectro de RMN-^{13}C sobre las muestras tratadas con κ-carragenasa se observaron algunas señales correspondientes al ι-carragenano. Al realizar el tratamiento enzimático sobre la fracción soluble en 0,3M de KCl no se observó modificación alguna del polisacárido. Esto llevó a los autores a suponer que la fracción estaba compuesta por polisacáridos distintos al κ- y al ι-carragenano.

Cerca de una década después, Knutsen *et al.*[26] realizaron un nuevo análisis sobre los polisacáridos del alga, recolectada, en este caso, en el golfo de Trieste (Italia). Ellos comenzaron con un pretratamiento del alga molida con HCl 0,1M a 4 °C y luego realizaron extracciones exhaustivas consecutivas con agua a 25 °C, 90 °C y a 120 °C (en autoclave). Los carragenanos se obtuvieron en las extracciones a temperatura ambiente y a 90 °C, con rendimientos del 25 % y 7 % respectivamente. Los dos extractos conteniendo carragenanos fueron tratados con proteasas y amilasas y posteriormente fraccionados con KCl, separándose la fracción que precipitaba a 0,1M del remanente soluble. Para ambos extractos, la fracción precipitada fue la de mayor rendimiento. Para el análisis estructural, los autores utilizaron degradación con enzimas (κ- y ι-carragenasa), espectroscopía de IR y RMN y encontraron resultados semejantes a los informados previamente por el grupo de Yaphe.[25] Los extractos y las fracciones insolubles en KCl estaban compuestos por κ-carragenano y una pequeña proporción de ι-carragenano. También observaron la presencia de precursores, en particular señales espectroscópicas características del μ- y ν-carragenano. Del análisis de la fracción soluble en KCl, los autores también llegaron a la conclusión que ésta no poseía una estructura de un carragenano. Ellos incluso sugirieron la presencia de xilosa en esta fracción pero no lo confirmaron.

En las restantes publicaciones mencionadas, se trabajó sobre el extracto crudo realizando pocos estudios estructurales. Estas caracterizaciones generalmente se realizaron mediante las técnicas de IR y/o RMN. Sólo en tres de las investigaciones se realizaron fraccionamientos de los extractos.[14,23,24] En todos los casos se centraron únicamente en el estudio estructural de la fracción correspondiente al κ-carragenano.

También hay tres trabajos en los que se analizaron las propiedades reológicas de los galactanos del alga. Dos de los trabajos pertenecen a un grupo paquistaní[11,12] y se centraron únicamente en el estudio de la viscosidad y parámetros termodinámicos asociados. En el tercer trabajo, realizado por Andrade *et al.*,[10] se estudiaron las propiedades gelificantes para los carragenanos de *H. musciformis* extraídos en medio básico y a temperatura ambiente, y se compararon los datos con los obtenidos por mezclas del carragenano con galactomananos extraídos de *Cassia javanica* y con goma de algarroba. Los autores observaron que ambas mezclas poseían valores de temperatura de fusión y gelificación más altos y formaban geles más elásticos que el carragenano solo.

2.1.2 Reología de materiales viscoelásticos

2.1.2.1 Modelo de Maxwell

Las soluciones de los polisacáridos, entre ellos los carragenanos, son viscoelásticas, es decir que poseen comportamientos intermedios entre sólidos y líquidos.[27] Un modelo sencillo para describir este comportamiento es el propuesto por Maxwell. En este se supone un sistema donde el comportamiento sólido se representa como un resorte elástico, y el comportamiento líquido como un elemento de amortiguación viscoso, ambos conectados en serie, o sea que supone una deformación en una dimensión.[27]

Se considera que la contribución de ambas componentes a la deformación es aditiva ante la aplicación de un esfuerzo.[27] Entonces, teniendo en cuenta que la componente elástica puede ser descripta por la ley de Hooke y la componente viscosa por la ley de Newton, la ecuación obtenida para este modelo es la siguiente

$$\frac{d\gamma}{dt} = \frac{1}{E} \cdot \frac{d\sigma}{dt} + \frac{\sigma}{\lambda_{rel}.E} \qquad \text{(ec. 2.1)}$$

donde σ es el estrés o esfuerzo aplicado, γ es la deformación resultante, E es el módulo de Young o módulo elástico proveniente de la ley de Hooke y λ_{rel} es el tiempo de relajación, el cual da idea del tiempo que le toma a la macromolécula recuperar su forma inicial luego de la deformación.[28] Cuando el tiempo de relajación del material viscoelástico es largo, el comportamiento del mismo va a ser más similar a un sólido, mientras que si es corto, va a exhibir una conducta más cercana a la de un líquido. De esta manera, el primer término de la ecuación 2.1 representa la componente elástica y el segundo la componente viscosa.

Cuando en lugar de una deformación unidimensional, el sistema sufre una deformación tridimensional, el modelo sigue siendo válido, pero se plantea una deformación en tres dimensiones y en lugar del modulo de Young, se utiliza el módulo de cizallamiento G.[27]

2.1.2.2 Ensayos dinámicos oscilatorios

Los ensayos dinámicos oscilatorios son utilizados para caracterizar los materiales viscoelásticos.[27] La muestra se somete a una deformación oscilante sinusoidal para obtener un esfuerzo también sinusoidal pero desfasado de la deformación.[27] Como se puede ver en la Figura 2.2, en un sólido ideal el esfuerzo está en fase con la deformación mientras que en un líquido newtoniano hay un desfasaje de 90º.[29] Los materiales viscoelásticos poseen un desfasaje intermedio entre estos ángulos.

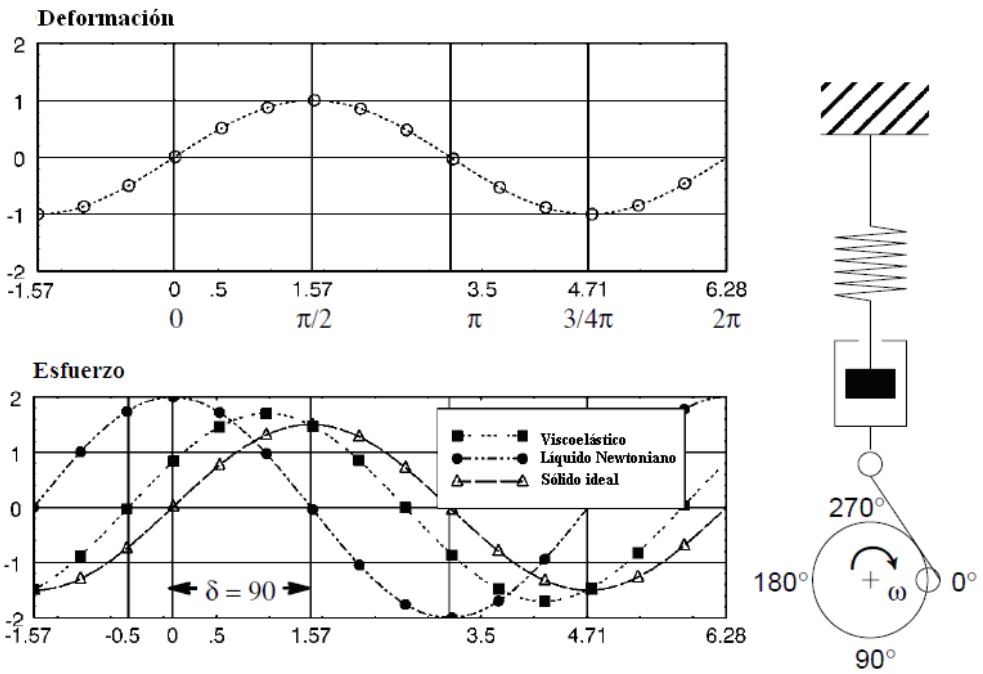


Figura 2.2 Ensayo dinámico oscilatorio para un material viscoelástico, un líquido newtoniano y un sólido ideal (adaptado de Schramm[29]).

De esta manera, si la deformación aplicada a un material viscoelástico sigue la función:

$$\gamma(t) = \gamma_0 \cdot sen(\omega t) \qquad \text{(ec. 2.2)}$$

donde γ_0 es la amplitud de la deformación y ω la frecuencia, la ecuación para el esfuerzo en función del tiempo sería:

$$\sigma(t) = \sigma_0 \cdot sen(\omega t + \delta) = \gamma_0 \cdot \left(\frac{\sigma_0}{\gamma_0} \cdot sen\,\omega t \cdot \cos\delta + \frac{\sigma_0}{\gamma_0} \cdot \cos\omega t \cdot sen\,\delta \right) \qquad \text{(ec .2.3)}$$

siendo σ_0 la amplitud del esfuerzo y δ el ángulo de desfasaje. A partir de esta ecuación se pueden definir dos nuevos parámetros:

$$G' = \frac{\sigma_0}{\gamma_0} \cdot \cos\delta \qquad \text{(ec. 2.4)}$$

$$G'' = \frac{\sigma_0}{\gamma_0} \cdot sen\,\delta \qquad \text{(ec. 2.5)}$$

donde a G' se lo denomina módulo elástico o de almacenamiento, mientras que G'' es el módulo viscoso o de pérdida. De esta manera se puede reescribir la ecuación 2.3 como

$$\sigma(t) = \gamma_0 \cdot (G' \cdot sen\,\omega t + G'' \cdot \cos\omega t) \qquad \text{(ec. 2.6)}$$

Esta ecuación permite observar que G' está asociado al término en fase con la deformación, o sea con la componente sólida, mientras que G'' lo está con el termino desfasado en 90°, y por lo tanto con la componente viscosa. En particular, G' está relacionado con el almacenamiento y recuperación de la energía durante la aplicación del estímulo, y G'' está asociado a la disipación de la energía.[29] Entonces, cuanto mayor sea el valor de G', mayor carácter sólido va a poseer el gel formado por el material viscoelástico, lo cual implica que va a ser más fuerte y resistente a la deformación.

Hay otro parámetro relacionado con los módulos G´ y G'': el módulo complejo o G* que se define como:

$$G^* = \left|G' + iG''\right| = \sqrt{G'^2 + G''^2} = \frac{\sigma_0}{\gamma_0} \qquad \text{(ec. 2.7)}$$

y representa la resistencia total de un material viscoelástico a la deformación aplicada.[29]

El modelo de Maxwell es muy utilizado para interpretar la información obtenida a partir de los ensayos dinámicos oscilatorios de soluciones poliméricas.[28] A partir de las ecuaciones 2.1, 2.2 y 2.6 se pueden deducir las siguientes ecuaciones:

$$G' = \frac{G \cdot \omega^2 \lambda_{rel}^2}{1 + \omega^2 \lambda_{rel}^2} \qquad \text{(ec. 2.8)}$$

$$G'' = \frac{G \cdot \omega \lambda_{rel}}{1 + \omega^2 \lambda_{rel}^2} \qquad \text{(ec. 2.9)}$$

donde aparece G (módulo de cizalladura) en lugar del módulo de Young (E) ya que se está ante una deformación tridimensional. A partir de estas ecuaciones, se puede ver que tanto G' como G'' dependen de la frecuencia del experimento y del tiempo de relajación característico del material viscoelástico.

2.1.2.3 Modos de operación para ensayos dinámicos oscilatorios

Cuando se realizan ensayos dinámicos oscilatorios, los reómetros permiten trabajar en distintos modos, dejando algunas variables fijas y modificando otras, como amplitud, frecuencia, etc. de manera de poder obtener distintos tipos de experimentos que arrojan resultados diferentes:

a) Barrido de deformación

En este modo, se varía la amplitud de la deformación a frecuencia constante. Se usa para determinar el límite de viscoelasticidad lineal, o sea el rango en el cual G* es

constante.[29] Ese valor indica la máxima amplitud de deformación o esfuerzo a la que se puede trabajar.

b) Barrido de frecuencia

Este es uno de los modos más utilizados. En este caso, se deja la amplitud de la deformación constante y se varía la frecuencia. Como ya se vio en la Sección anterior, G' y G'' son dependientes de ω. Se considera que la contribución de ambas componentes a la deformación ante la aplicación de un esfuerzo es aditiva.[29] De acuerdo a los valores de G' y G'' obtenidos en este experimento se pueden distinguir tres tipos de sistemas: soluciones (G''>G'), geles débiles (G''>G' a bajos ω y G'>G'' a altos ω) y geles verdaderos (G'>G'').[27]

c) Barrido de tiempo

Este modo es utilizado para determinar cambios estructurales del material viscoelástico que dependen del tiempo. Se trabaja a frecuencia, deformación y temperatura constante.

d) Barrido de temperatura

En este modo también se trabaja a frecuencia y deformación constante y se varía la temperatura. Se utiliza para estudiar los efectos de la temperatura en el comportamiento reológico del material viscoelástico, como por ejemplo en el proceso de gelificación y fusión, entre otros.[28]

2.2 Objetivos

El objetivo de esta parte del trabajo de Tesis fue realizar el análisis estructural y reológico de los polisacáridos extraídos y purificados del alga *Hypnea musciformis* con agua a temperatura ambiente y a 90ºC.

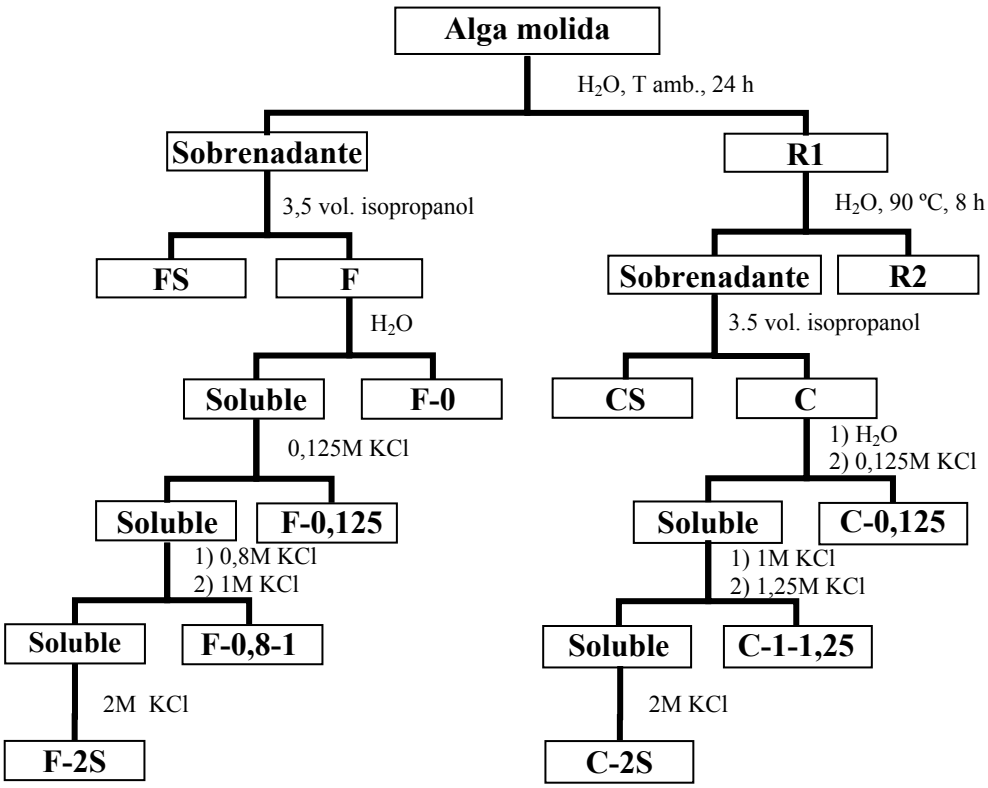
2.3 Resultados y discusión

2.3.1 Extracción y fraccionamiento de los polisacáridos

Se utilizó el alga *Hypnea musciformis*, proveniente de las costas de Brasil (Fig. 2.3). Los ejemplares se encontraban en fase tetraspórica y no poseían epífitos.

Figura 2.3 Mapa de Brasil y ubicación de las playas donde se recolectó el alga *H. musciformis.*

Para la extracción de los carragenanos, siguiendo las metodologías habituales para la extracción del κ-carragenano[25,26,30-32] (Esquema 2.2), se realizaron dos extracciones con agua, una a temperatura ambiente y otra a 90 °C. En cada caso los polisacáridos solubilizados se precipitaron con isopropanol, obteniéndose los extractos **F** y **C** respectivamente. Los remanentes solubles en isopropanol (**FS** y **CS**) no poseían cantidades importantes de hidratos de carbono, por lo que su estudio no se profundizó (Sección 2.3.2).



Esquema 2.2 Extracción y fraccionamiento de los polisacáridos de *Hypnea musciformis.*

Los extractos **F** y **C** se fraccionaron utilizando la técnica de precipitación selectiva con KCl, que aprovecha la capacidad del κ-carragenano de gelificar a bajas concentraciones de K^+. De esa manera, se obtuvieron para **F** las siguientes fracciones: **F-0** (es decir, insoluble en agua), **F-0,125**, **F-0,8-1** (el número indica la concentración de KCl, o rango de concentraciones, a la que precipita el producto) y **F-2S** (el remanente soluble en 2M). Al realizar lo mismo con el extracto **C,** se obtuvieron las fracciones: **C-0,125**, **C-1-1,25** y **C-2S**, siguiendo un sistema de nomenclatura equivalente al utilizado para **F**.

2.3.2 Análisis de las fracciones

2.3.2.1 Caracterización química del extracto F y de sus productos de fraccionamiento

El producto obtenido mediante extracción con agua a temperatura ambiente y sus fracciones fueron analizados con el fin de determinar sus composiciones. Para ello se cuantificaron hidratos de carbono, proteínas y éster sulfato. También se determinó el peso molecular de los mismos. Los resultados se observan en la Tabla 2.1.

Tabla 2.1 Composición de los extractos **F** y **FS** de *Hypnea musciformis* y de las fracciones obtenidas a partir de **F**.

	F	**FS**	**F-0**	**F-0,125**	**F-0,8-1**	**F-2S**
Rendimiento[a]	5,5 ± 0,7	3,9 ± 0,4	2,9 ± 0,4	45,8 ± 4,2	7,3 ± 1,5	18,9 ± 2,8
Azúcares totales (%)	60,3	11,2	7,3	48,9	45,8	45,6
Sulfato (% SO_3Na)	22,1	ND[b]	4,0	20,5	29,0	21,6
Proteínas (%)	8,8	ND	4,5	2,7	2,4	17,9
PM (kDa)[c]	287[d]	<6	ND	88	186	A[e]

[a] Los rendimientos para **F** y **FS** están expresados en g/100 g alga seca. Los rendimientos de las fracciones están expresados en g/100 g **F**. Se informa promedio y desvío estándar (n=2).
[b] ND = no determinado
[c] Medido por GPC considerando el máximo del pico.
[d] Hay presencia también de un pico de bajo peso molecular.
[e] A = pico muy ancho con más de un máximo

Los datos expresados en la tabla para **F** y **FS** confirmaron que en el primero se encuentran los compuestos de alto peso molecular, mientras que en la parte soluble en el alcohol (**FS)** se hallaron los productos de bajo peso molecular. Asimismo, se puede observar que **F** está compuesta mayoritariamente por hidratos de carbono. Los productos surgidos del fraccionamiento de **F** también muestran altos pesos moleculares y cantidades de azúcares totales similares a los del producto de partida. La fracción **F-0** no posee prácticamente

hidratos de carbono y resultó ser insoluble en agua por lo que no se prosiguió su estudio (Tabla 2.1).

En los perfiles cromatográficos (Fig. 2.4) obtenidos por GPC, se puede ver la diferencia de pesos moleculares entre **F** y **FS**, y que **F** está ligeramente contaminado con los productos presentes en **FS**. También se puede observar que la forma del pico principal de **F** no es una gaussiana perfecta sino que posee una deriva hacia la derecha, indicando la presencia de más moléculas con menor peso molecular que el máximo. Los productos de fraccionamiento **F-0,125** y **F-0,8-1** generan un solo pico, de menor peso molecular que el producto de partida, mientras que **F-2S** forma una banda muy ancha con varios máximos, lo que alienta la hipótesis que las dos primeras fracciones son homogéneas, mientras que **F-2S** es una mezcla de compuestos con distinto peso molecular. La gran disminución del segundo pico presente en **F** (~33 min) en los productos de fraccionamiento probablemente se debe a que ese material se perdió durante la diálisis de los mismos.

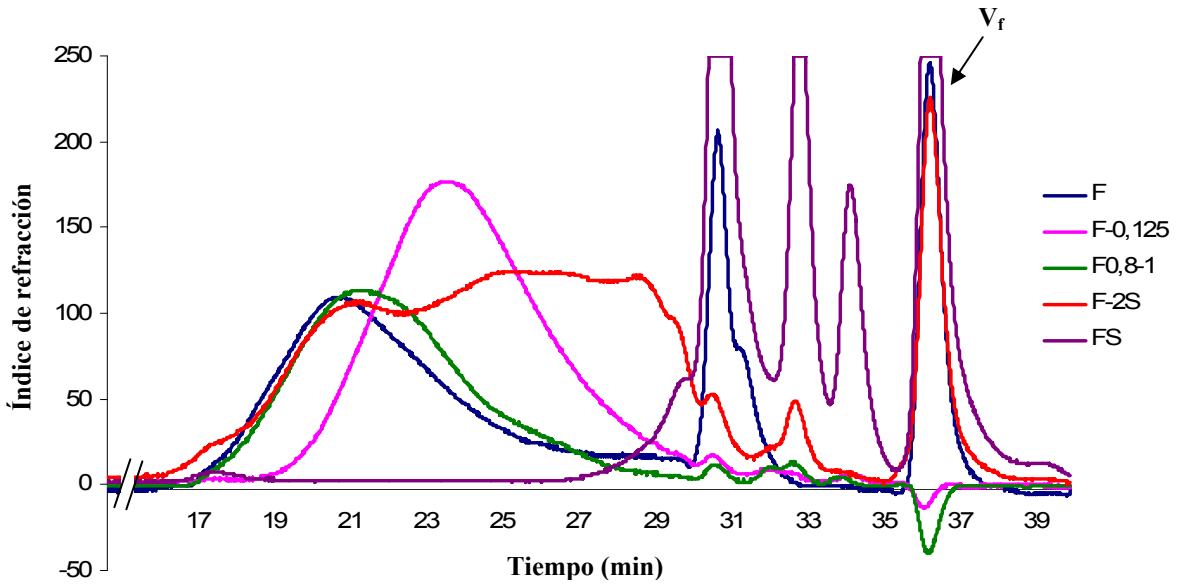


Figura 2.4 Perfiles cromatográficos de **F**, **FS**, **F-0,125, F-0,8-1** y **F-2S** obtenidos por GPC.

Por fraccionamiento se determinó que el extracto **F** estaba compuesto en aproximadamente un 50 % por los polisacáridos que precipitaron en la solución de 0,125M de KCl (**F-0,125**). El material soluble **F-2S** representó cerca de un 20 % de la muestra original, mientras que las dos fracciones restantes tuvieron rendimientos más bajos.

Como se puede observar en la Tabla 2.1, en todas las fracciones el porcentaje de proteínas es bajo, salvo en el remanente soluble en 2M (**F-2S**) donde se produce un enriquecimiento de las mismas.

La determinación del porcentaje de sulfato arrojó que **F** contiene un 22 % del mismo. Al fraccionar el extracto, se observa que la cantidad de sulfato aumenta con la concentración de KCl a la que precipitan.

2.3.2.2 Azúcares componentes del extracto F y de sus productos de fraccionamiento

Los azúcares componentes de las fracciones se determinaron por cromatografía gaseosa analizando los alditoles peracetilados, utilizando una hidrólisis reductiva[33] para poder identificar también la 3,6-anhidrogalactosa. La determinación de la configuración de los azúcares se realizó generando aminoalditoles peracetilados por aminación reductiva con aminas quirales.[34,35]

Tabla 2.2 Azúcares componentes del extracto **F** y de sus fracciones (expresados en moles/100 moles), relación Gal: 3,6-AnGal:SO_3Na y relación Gal:Gal 6-sulfato.

Azúcar	**F**	**F-0,125**	**F-0,8-1**	**F-2S**
D-Gal	51	52	57	39
L-Gal	-	-	-	16
3,6-An-D-Gal	41	46	41	6
3,6-An-L-Gal	-	-	-	3
D-Xil	3	1	1	12
D-Glc	3	1	1	14
D-Man	-	-	-	2
L-Ara	1	-	-	1
L-Ram	1	-	-	1
L-Fuc	-	-	-	2
2-*O*-Me-D-Gal	-	-	-	2
3-*O*-Me-D-Gal	-	-	-	2
Relación molar				
Gal:3,6-AnGal:SO_3Na	1:0,82:1,03	1:0,89:1,21	1:0,72:1,67	1:0,16:1,31
Gal:Gal 6-sulfato	1:0.04	1:0,00	1:0,05	1:0,00

[a] No se determinó la configuración de los azúcares.

El análisis de los azúcares componentes muestra que en **F**, **F-0,125** y **F-0,8-1** el azúcar mayoritario es la galactosa y en segundo lugar aparece la 3,6-anhidrogalactosa. Las composiciones de las tres son similares. Los demás azúcares presentes, principalmente glucosa y xilosa, representan menos de un 10 % de la composición. La galactosa y la 3,6-

anhidrogalactosa pertenecen a la serie D-, lo cual permite inferir que son carragenanos. Al comparar la relación Gal:3,6-AnGal:SO_3Na se observa que **F-0,125** es la que posee una relación más parecida a la esperada para una estructura tipo κ-carragenano (1:1:1). Es sabido que dicho carragenano precipita principalmente a la concentración de 0,125M de KCl.[32] Para **F-0,8-1** se determinó que posee un porcentaje mayor de sulfato que **F-0,125** y posee menos 3,6-anhidrogalactosa, lo que indicaría la presencia del precursor y/o otros carragenanos más sulfatados.

El análisis de la fracción **F-2S** denota la existencia de una mezcla más compleja. Es destacable que esta fracción es la única en la que se encuentran los dos enantiómeros de la galactosa y de la 3,6-anhidrogalactosa. Además contiene mayores proporciones de xilosa y glucosa, y pequeñas cantidades de otros azúcares y galactosas monometiladas. Esto podría llevar a suponer la presencia no sólo de carragenanos sino también de otros polisacáridos como ser híbridos DL, glucanos, xilanos o xilogalactanos.

Con el fin de poder confirmar la presencia de precursores en las fracciones, se determinó la proporción de galactosa 6-sulfato. Para ello se realizó la reacción de tratamiento alcalino a nivel analítico, con el fin de realizar una S_N2 intramolecular y obtener la 3,6-anhidrogalactosa.[36] Una vez ocurrida la reacción, se generaron los alditoles peracetilados y se cuantificaron por cromatografía gaseosa de manera de obtener la proporción de galactosa que cicló (Tabla 2.2). Las fracciones **F** y **F-0,8-1** poseen una pequeña cantidad de galactosa 6-sulfato mientras que en **F-0,125**, donde se espera que esté el κ-carragenano puro, no se apreció la presencia de precursores.

2.3.2.3 Caracterización química del extracto C y de sus productos de fraccionamiento

Se analizaron los productos obtenidos del proceso de extracción en caliente y aquellos obtenidos a partir de su fraccionamiento. Los resultados se muestran en la Tabla 2.3.

La proporción de hidratos de carbono totales en los productos obtenidos en la extracción con agua caliente (**C** y **CS**) es semejante a la observada en las fracciones análogas obtenidas de la extracción en frío. Los productos de fraccionamiento poseen valores de azúcares totales parecidos al producto de partida.

Tabla 2.3 Composición de los extractos **C** y **CS** de *Hypnea musciformis* y de las fracciones obtenidas a partir de **C**.

	C	**CS**	**C-0,125**	**C-1-1,25**	**C-2S**
Rendimiento (%)[a]	39,4 ± 2.3	1,9 ± 0,3	69,0 ± 1,5	2,9 ± 0,3	15,9 ± 1,3
Azúcares totales (%)	60,5	2,1	56,3	46,1	52,2
Sulfato (% SO_3Na)	26,7	ND[b]	25,1	20,6	13,3
Proteína (%)	6,4	ND	2,8	2,5	13,9
PM (kDa)[c]	197	<6	215	248	A[d]

[a] Los rendimientos para **C** y **CS** están expresados en g/100 g alga seca. Los rendimientos de las fracciones están expresados en g/100 g **C**. Se informa promedio y desvío estándar (n=2).
[b] ND = no determinado
[c] Medido por GPC considerando el máximo del pico.
[d] A = pico muy ancho con más de un máximo

En el perfil cromátográfico obtenido por GPC (Fig 2.5) se observa que **C** no se encuentra contaminada con productos de bajo peso molecular (ya que los mismos se eliminaron con el extracto **F**) y que ese perfil se ajusta mejor a una curva gaussiana. El peso molecular es ligeramente menor que el de sus productos de fraccionamiento. Las fracciones **C-0,125** y **C-1-1,25** poseen un peso molecular mayor que el de sus análogos de la extracción en frío y presentan un único máximo. La fracción soluble en solución 2M de KCl (**C-2S**) da una banda ancha con varios máximos, tal como ocurría con su equivalente obtenido a temperatura ambiente.

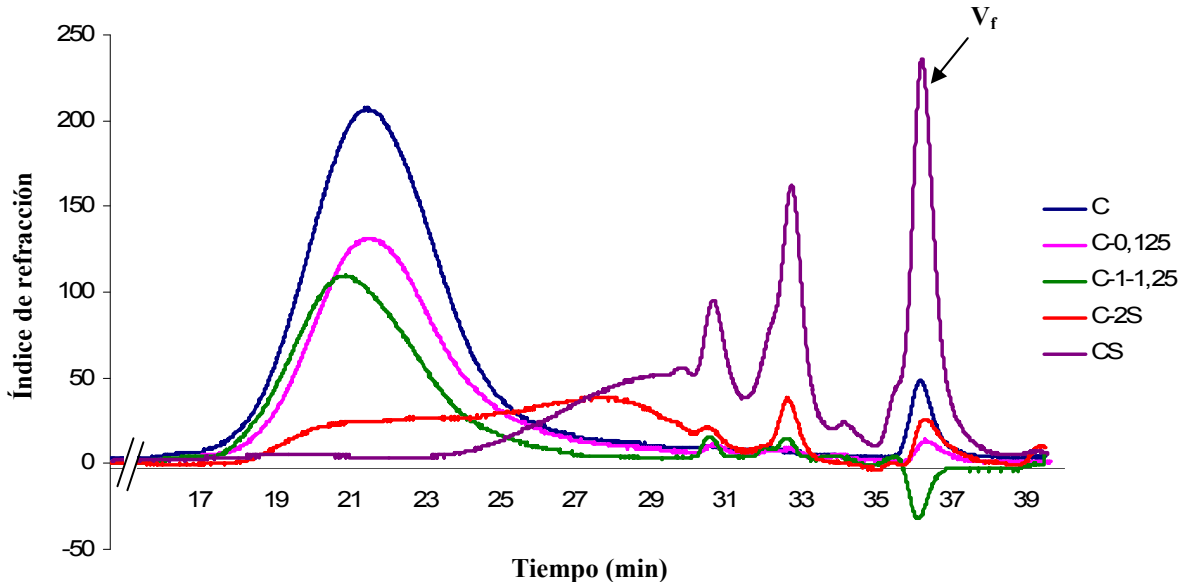


Figura 2.5 Perfiles cromatográficos de **C**, **CS**, **C-0,125**, **C-1-1,25** y **C-2S** obtenidos por GPC.

Al comparar los rendimientos de **F** y **C** se puede ver que la extracción en caliente fue más eficiente para extraer los polisacáridos. Esto se opone a lo que encontraron Knutsen *et*

al.[26] quienes obtuvieron el mayor rendimiento a temperatura ambiente. Los autores atribuyeron el mayor rendimiento en el extracto a temperatura ambiente al pretratamiento realizado con HCl 0,1M a 4 ºC.

El fraccionamiento con KCl de **C** presentó un perfil parecido al de **F**, siendo nuevamente la fracción mayoritaria la que precipitó a 0,125M. Los contenidos de grupos sulfato y de proteínas de las fracciones provenientes del extracto en caliente son similares a los encontrados en las fracciones del extracto en frío. La proporción de proteínas es baja en todos los casos, encontrándose principalmente en **C-2S**. Los valores de sulfato rondan los 15-25 %. Cabe destacar que las fracciones **C-1-1,25** y **C-2S** poseen una menor proporción que sus análogos del extracto en frío.

2.3.2.4 Azúcares componentes del extracto C y de sus productos de fraccionamiento

De acuerdo a lo explicado en la Sección 2.3.1.2, la determinación de los azúcares componentes y la configuración de los mismos se determinaron por CGL. Con estos datos se obtuvo la Tabla 2.4.

El extracto y las primeras fracciones poseen una composición similar donde la D-galactosa y su derivado, la 3,6-anhidro-D-galactosa, representan más de un 90 % del total de los azúcares presentes. En **C**, la proporción de galactosa es sólo ligeramente superior a la de 3,6-anhidrogalactosa. La fracción **C-0,125** posee una relación 1:1 entre ambos mientras que **C-1-1,25** presenta una mayor proporción de galactosa que de su derivado bicíclico.

La relación Gal:3,6-AnGal:SO_3Na indica que **C-0,125** es la fracción que posee una composición más parecida a un κ-carragenano. **C-1-1,25** posee una mayor proporción de sulfato, lo que podría sugerir la presencia de mezclas de κ-carragenano con otros carragenanos más sulfatados y con precursores. Asimismo, **C** posee una menor proporción de sulfato, probablemente debido a que incluye a **C-2S**.

La fracción **C-2S** posee una composición marcadamente distinta a las demás. Si bien la galactosa sigue siendo el azúcar mayoritario, ésta se encuentra presente en ambas configuraciones. La 3,6-anhidrogalactosa, que también se encuentra con ambas configuraciones, representa un muy bajo porcentaje del total. La xilosa y la glucosa resultan más abundantes que dicho anhidroazúcar aunque su proporción tampoco es muy elevada (Tabla 2.4). También se observa una mayor variedad de otros azúcares en bajas proporciones. Entre ellos se observa un compuesto que representa cerca del 10 % de su composición y que

no se corresponde con ninguno de los azúcares habitualmente presentes en estas algas. Por el momento se lo denominará X y los intentos realizados para elucidar su identidad se mostrarán en el Capítulo 3. Todos estos resultados indican que las fracciones solubles en 2M, **F-2S** y **C-2S** resultan más complejas que las demás fracciones aisladas de *H. musciformis*. Sin embargo, es importante destacar que **F-2S** presenta una mayor proporción de 3,6-anhidrogalatosa y sulfato y no posee el compuesto X.

Tabla 2.4 Azúcares componentes del extracto en caliente y de sus fracciones (expresados en moles/100 moles), relación Gal:3,6-AnGal:SO_3Na y relación Gal:Gal 6-sulfato.

Azúcar	**C**	**C-0,125**	**C-1-1,25**	**C-2S**
D-Gal	53	50	58	41
L-Gal	-	-	-	18
3,6-An-D-Gal	42	49	40	4
3,6-An-L-Gal	-	-	-	1
D-Xil	1	-	1	10
D-Glc	3	1	1	13
D-Man	1	-	-	1
L-Fuc	-	-	-	1
2-*O*-Me-D-Gal	-	-	-	2
3-*O*-Me-D-Gal	-	-	-	1
X [a]	-	-	-	8
Relación molar				
Gal:3,6-AnGal:SO_3Na	1:0.80:1.14	1:0.96:1.31	1:0.67:1.39	1:0.09:0.61
Gal:Gal 6-sulfato	1:0,08	1:0,00	1:0,10	1:0,12[b]

[a] Compuesto que no pudo ser identificado (ver Capítulo 3).
[b] Cantidades similares de ambos enantiómeros.

Para poder determinar la presencia de galactosa 6-sulfato, se realizó la técnica de tratamiento alcalino[36] mencionada en la Sección 2.3.1.2. Se observa (Tabla 2.4) que salvo **C-0,125** todas las fracciones poseen galactosa 6-sulfato, representando aproximadamente un 10 % de la galactosa presente. Esto es una diferencia importante con las fracciones provenientes del extracto en frío, donde la proporción de galactosa 6-sulfato era menor. En particular se destaca que si bien en **C-2S** la α-galactosa 6-sulfato representa cerca del 10 % de la galactosa presente, **F-2S** no poseía dicha unidad estructural.

2.3.3 Caracterización estructural de las fracciones

2.3.3.1 Análisis estructural de F-0,125, F-0,8-1, C-0,125 y C-1-1,25

2.3.3.1.1 Análisis por metilación

De acuerdo con los primeros análisis realizados en las Secciones anteriores, las fracciones **F-0,125**, **F-0,8-1**, **C-0,125** y **C-1-1,25** poseen una composición consistente con la de un κ-carragenano con una casi perfecta alternancia de unidades de galactosa y 3,6-anhidrogalactosa. Para analizar la estructura de las mismas, se realizó un estudio por metilación de manera de determinar las sustituciones presentes en cada azúcar. La metilación se efectuó utilizando en las condiciones descriptas por Ciucanu y Kerek.[37] A partir del polisacárido metilado, se realizó una hidrólisis reductiva seguida de acetilación[33] para analizar los derivados por cromatografía gaseosa. Los resultados de dicho análisis se observan en la Tabla 2.5.

Tabla 2.5 Análisis por metilación de las fracciones **F-0,125**, **F-0,8-1**, **C-0,125** y **C-1-1,25** (expresados en moles/100 moles).

Azúcar	Unidad	F-0,125	F-0,8-1	C-0,125	C-1-1,25
2,3,6-Gal[a]	→4)-Gal	1	1	2	-
2,4,6-Gal	→3)-Gal	-	3	6	-
2,3-Gal	→4,6)-Gal	-	1	-	-
2,4-Gal	→3,6)-Gal	1	2	1	1
2,6-Gal	→3,4)-Gal	51	47	45	52
2-Gal	→3,4,6)-Gal + →4,3,6)-Gal	1	2	3	3
4-Gal	→3,2,6)-Gal	-	1	-	-
6-Gal	→3,2,4)-Gal+→4,2,3)-Gal	-	1	-	1
3,6-An-2-Gal[b]	→4)-3,6-AnGal	40	31	42	34
3,6-AnGal	→4,2)- 3,6-AnGal	6	11	1	9

[a] 2,3,6-Gal = 2,3,6-tri-*O*-metilgalactosa, etc.
[b] 3,6-An-2-Gal = 3,6-anhidro-2-*O*-metilgalactosa

En las cuatro fracciones estudiadas en esta Sección, se observa que la 2,6-di-*O*-metilgalactosa y la 3,6-anhidro-2-*O*-metilgalactosa son los azúcares mayoritarios provenientes de la hidrólisis de los polisacáridos metilados. Este dato es importante ya que dichos metilazúcares son los que se obtienen luego de hidrolizar un κ-carragenano ideal permetilado, en el que las unidades β- están unidas en 3 y sulfatadas en 4, dejando libres las

posiciones 2 y 6 para metilarse, y las 3,6-anhidro-α-galactosas están unidas por posición 4, dejando libre únicamente la 2.

Un análisis más detallado de la Tabla 2.5 muestra que todas las fracciones presentan una pequeña desviación de la estructura ideal. Como se esperaba, aquellas que precipitaron en KCl 0,125M son las que poseen la estructura más semejante a un κ-carragenano. Al metilar **F-0,125** se observa, además de la 2,6-di-*O*-metilgalactosa y 3,6-anhidro-2-*O*-metilgalactosa, un 6 % de 3,6-anhidrogalactosa no metilada. Esto último podría explicarse por presencia de una pequeña proporción de estructuras del tipo ι-carragenano, donde la unidad α- está sulfatada en C-2, o por una submetilación. Por otro lado, **C-0,125** no posee prácticamente 3,6-anhidrogalactosa sin metilar, aunque hay cerca de un 10 % de galactosas metiladas en otras posiciones (6 % de unidades β- desulfatadas y 3 % de unidades α-sulfatadas en 3 y 6 y/o de unidades β- sulfatadas en 4 y 6).

Las fracciones que precipitan a mayor concentración de KCl también están representadas principalmente por la estructura del κ-carragenano, pero poseen una mayor desviación de esa estructura ideal. Al metilar el polisacárido presente en **F-0,8-1** se observa un 47 % de 2,6-di-*O*-metilgalactosa y un 31 % de 3,6-anhidro-2-*O*-metilgalactosa. El resto es principalmente 3,6-anhidrogalactosa sin metilar (11 % del total), por lo que si se descarta la submetilación, esta fracción posee una importante proporción de ι-carragenano. También se observan pequeñas cantidades de galactosas monometiladas y trimetiladas. Por otro lado, **C-1-1,25** resulta análoga estructuralmente a **F-0,8-1**, si bien la primera posee una mayor proporción de 3,6-anhidrogalactosa metilada en C-2, por lo que la proporción de estructuras tipo ι-carragenano sería menor. A su vez, también posee una menor proporción de galactosas metiladas en otras posiciones. Es importante destacar que si bien ambas fracciones poseen un porcentaje de galactosa 6-sulfato estas no se ven reflejadas al metilar ya que no se observan la 2,3-di-*O*-metilgalactosa ni la 3-*O*-metilgalactosa. Stortz y Cerezo[30] también observaron una menor proporción que la esperada de estos metilazúcares al metilar los polisacáridos provenientes de *Iridaea undulosa* en fase tetraspórica y lo atribuyeron al medio alcalino utilizado para la metilación, el cual generó la consecuente ciclación de los azúcares.

Por último, en las Tablas 2.2 y 2.4 se observa que las cuatro fracciones poseen bajas proporciones de glucosa y xilosa, cuyas unidades metiladas no se observaron en la Tabla 2.5, probablemente por pérdida en el proceso de metilación y diálisis.

2.3.3.1.2 Análisis por espectroscopía de resonancia magnética nuclear

En esta Sección se puede observar el estudio realizado sobre las fracciones por RMN-^{1}H y por técnicas bidimensionales (HSQC y COSY). Esta últimas se utilizaron para la asignación de todas las señales del carragenano mayoritario y para confirmar de esta manera su estructura. La técnica de RMN-^{1}H se utilizó fundamentalmente para identificar y cuantificar las estructuras minoritarias.

Los espectros HSQC de las cuatro fracciones dieron las mismas 13 señales (correspondientes a 12 carbonos y 14 hidrógenos), mostrando que todas ellas están compuestas mayoritariamente por estructuras tipo κ-carragenano. El espectro correspondiente a la fracción **C-0,125** se observa en la Figura 2.6 a.

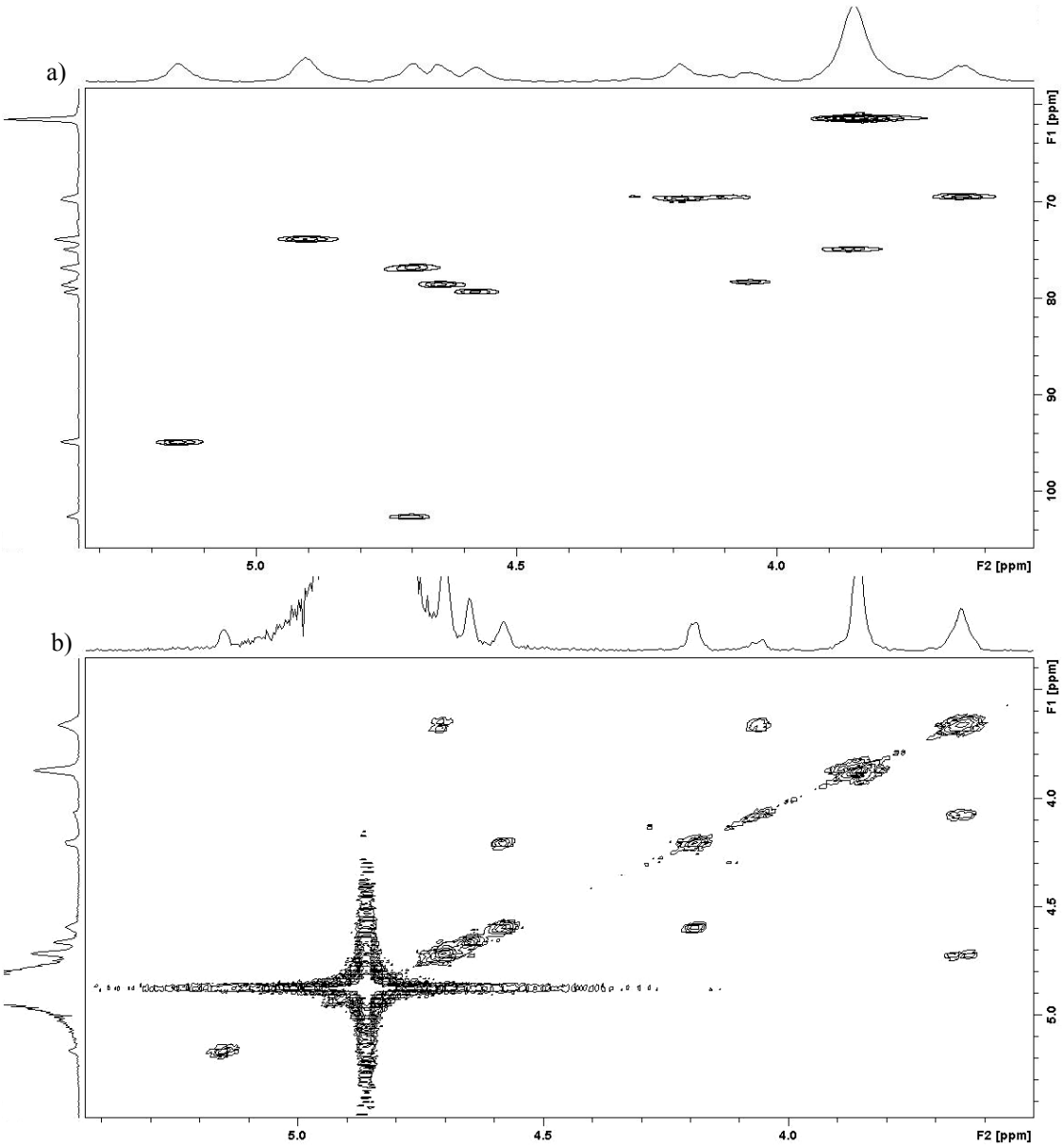


Figura 2.6 Espectros a) HSQC y b) COSY de **C-0,125** en D_2O a temperatura ambiente.

Para realizar una asignación satisfactoria de las señales, se complementaron los datos obtenidos por el HSQC con los obtenidos del COSY (Fig. 2.6 b) de manera de poder confirmar los hidrógenos vecinos. En la Tabla 2.6 se observa la asignación de señales y su comparación con los datos bibliográficos.

Tabla 2.6 Asignación de señales del HSQC para la fracción **C-0,125** y comparación con datos bibliográficos para un κ-carragenano.

Posición	δ (ppm)			
	C-0,125		**κ-carragenano**[a]	
	^{1}H	^{13}C	^{1}H	^{13}C
	G4S[b]		G4S[b]	
H/C-1	4,70	102,5	4,70	102,5
H/C-2	3,65	69,4	3,68	69,6
H/C-3	4,06	78,2	4,15	78,9
H/C-4	4,91	73,7	4,94	74,1
H/C-5	3,87	74,8	3,89	74,8
H/C-6[c]	3,86	61,2	3,89	61,3
	DA[b]		DA[b]	
H/C-1	5,15	94,7	5,17	95,3
H/C-2	4,19	69,7	4,22	69,9
H/C-3	4,58	79,2	4,61	79,2
H/C-4	4,65	78,4	4,73	78,3
H/C-5	4,70	76,7	4,68	76,8
H/C-6	4,27	69,4	4,30	69,5
H-6’	4,10		4,16	

[a] Datos bibliográficos (Tojo y Prado[39] y van de Velde *et al.*[38]).
[b] Según nomenclatura propuesta por Knutsen *et al.*[40]
[c] Los protones 6 y 6’ no pueden ser diferenciados.

En la asignación se puede ver que los dos H-6 de la galactosa no se resuelven, dando lugar a una única señal. Esto justifica que se observen 13 desplazamientos químicos de carbonos diferenciados en vez de 14. Al comparar estos datos con los encontrados en bibliografía para el κ-carragenano (Tabla 2.6), se pudo confirmar que la muestra está compuesta mayoritariamente por dicho polisacárido. Dado que las restantes fracciones (**F-0,125**, **F-0,8-1** y **C-1-1,25**) presentan el mismo espectro y la misma asignación, se puede

concluir que éstas también están compuestas principalmente por las díadas que componen un κ-carragenano.

En la Sección 2.3.3.1.1 se observó que al metilar las fracciones, estas presentaban un pequeño porcentaje de 3,6-anhidrogalactosa no metilada. Se había justificado este hecho en base a una submetilación o a la presencia de unidades sulfatadas en C-2 compatibles con estructuras de ι-carragenano. El RMN-^{1}H (Fig. 2.7) permitió confirmar la presencia de dichas díadas. Para ello se analizaron las señales correspondientes a los hidrógenos anoméricos de las unidades en la región de 5,1 a 5,6 ppm (Fig. 2.7).[38] Como se observa en la Tabla 2.7, dependiendo de la identidad y posición de sulfatación de la unidad α-, se van a tener distintas señales anoméricas diferenciables entre sí.

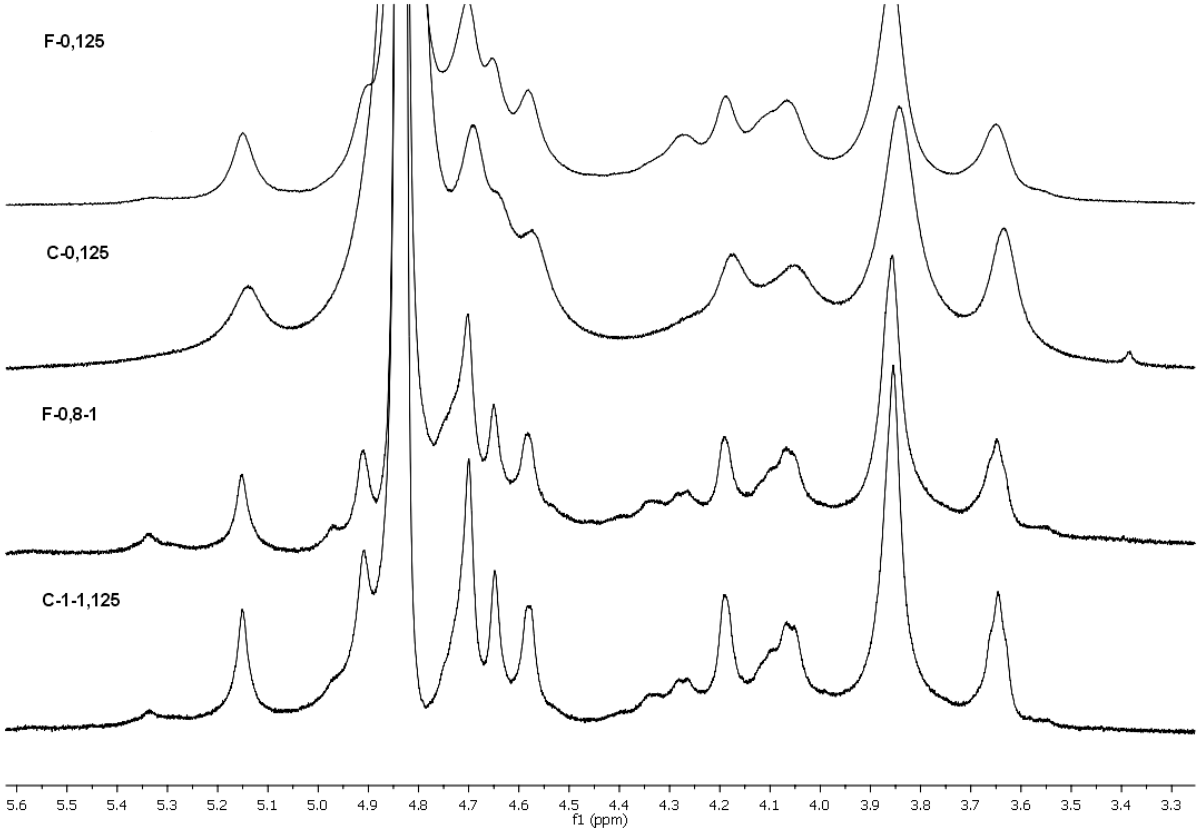


Figura 2.7 Espectros de RMN-^{1}H (500 MHz) de **F-0,125**, **F-0,8-1**, **C-0,125** y **C-1-1,25** en D_2O a temperatura ambiente.

Tabla 2.7 Desplazamientos químicos (en ppm) de los protones anoméricos de las unidades α- para distintos carragenanos (adaptado de van de Velde *et al.*[38]).

Carragenano	Unidad α-[a]	δ (ppm)
κ–	DA	5,11
ι–	DA2S	5,32
μ–	D2S	5,26
ν–	D2S,6S	5,52
λ–	D2S,6S	5,59

[a] Según nomenclatura propuesta por Knutsen *et al.*[40]

La Figura 2.7 muestra los espectros de RMN-^{1}H para las cuatro fracciones aisladas. Al observar la región correspondiente a los hidrógenos anoméricos α-, se puede ver que la señal más importante es la de 5,15 ppm, la cual corresponde al H-1 de la 3,6-anhidrogalactosa presente en el κ-carragenano (Tabla 2.7). Los espectros de RMN-^{1}H de **F-0,125**, **F-0,8-1** y **C-1-1,25** muestran también una señal a 5,34 ppm que se puede atribuir al H-1 de la 3,6-anhidrogalactosa 2-sulfato, por lo que es razonable afirmar que las tres fracciones en cuestión poseen proporciones menores de las unidades que componen un ι-carragenano ideal. Al comparar la relación de áreas se puede ver que en **F-0,125** un 7 % de la 3,6-anhidrogalactosa está sulfatada en posición 2, en **F-0,8-1** este valor aumenta a un 30 % y en **C-1-1,25** representa aproximadamente un 20 %. Estos valores concuerdan aproximadamente con la proporción de 3,6-anhidrogalactosa sin metilar hallada en el proceso de metilación (Tabla 2.5). De esta manera se puede concluir que **C-0,125** es un κ-carragenano mucho más puro que su análogo obtenido en frío, mientras que **F-0,8-1** y **C-1-1,25** poseen mayores proporciones de estructuras tipo ι-carragenano lo que justifica que precipiten a concentraciones mayores. Por otro lado, estas dos últimas fracciones, de acuerdo a las Tablas 2.2 y 2.4, poseen un porcentaje de galactosa 6-sulfato, la cual no se observaba al metilar. En los espectros RMN-^{1}H de dichas fracciones se puede ver un pequeño pico sobre la línea de base en 5,57 ppm que, teniendo en cuenta el corrimiento previamente visto para la 3,6-anhidrogalactosa, se puede atribuir a la galactosa 2,6-disulfato perteneciente a las díadas de un ν-carragenano (Tabla 2.7).

2.3.3.2 Análisis estructural de las fracciones solubles en KCl 2M

Como se observó en la Sección 2.3.2, las fracciones solubles en 2M son química y estructuralmente distintas de las demás fracciones aisladas de *Hypnea musciformis*. Es

razonable que una fracción soluble combine todos los polisacáridos y otros componentes (por ejemplo proteínas) que no interaccionan con el catión potasio. Si bien son mayormente galactanos, poseen baja proporción de 3,6-anhidrogalactosa y más alta de glucosa y xilosa. A su vez, un tercio de la galactosa presente posee configuración L-, por lo que no pueden clasificarse como carragenanos. También poseen una variedad de otros azúcares en bajas proporciones, incluyendo pentosas, desoxiazúcares, galactosas metiladas y en particular para **C-2S** un componente no identificado. El perfil cromatográfico de ambas fracciones indicaría que éstas no son homogéneas ya que se observa una banda ancha con muchos máximos.

La presencia de polisacáridos con estructuras distintas a las de los carragenanos ya había sido observada por Greer *et al.*[25] y Knutsen *et al.*[26] Al analizar las fracciones solubles en KCl, ambos grupos observaron que estas no eran consistentes con las estructuras de κ- o ι-carragenanos. Incluso, el último grupo destacó que no se trataba de un carragenano común ya que poseía xilosa.

Estos sistemas complejos también se observaron en las fracciones solubles en KCl 2M de otras algas rojas tanto tetraspóricas como cistocárpicas,[30,31,41-43] incluso en aquellas productoras de κ-carragenano a nivel comercial.[32,44] El fraccionamiento y posterior análisis de dichas fracciones mostró que éstas estaban compuestas por mezclas de carragenanos, agaranos e híbridos DL.

Es por todo lo expuesto en los párrafos anteriores que se decidió estudiar en más detalle las fracciones solubles en KCl 2M. El análisis de estas se encuentra en el Capítulo 3 de esta Tesis.

2.3.4 Caracterización reológica de los galactanos aislados de *Hypnea musciformis*

Como se mencionó en el Capítulo 1, los carragenanos son muy utilizados industrialmente por sus propiedades reológicas: el κ- y el ι-carragenano por sus propiedades gelificantes ya sea en frío o en presencia de iones como el K^+ o el Ca^{2+} y el λ-carragenano por sus propiedades viscosantes.[30,45] La mayoría de las fracciones estudiades en este Capítulo están constituidas por κ-carragenanos, con sutiles variaciones estructurales, por lo que el estudio del comportamiento reológico de las mismas puede arrojar datos interesantes para su posible aplicación comercial. Para realizar esta parte de la Tesis se trabajó en colaboración con el grupo de la Dra. Ana M. Rojas del Departamento de Industrias de esta Facultad.

En todos los casos se utilizaron soluciones al 2,00 % p/v del polisacárido en 45mM de KCl a un pH de 6,05-6,12. Es importante definir el pH con el que se trabaja ya que Carneiro-

da-Cunha *et al.*[46] demostraron que tanto este factor como la fuerza iónica afectan el diámetro hidrodinámico de los polisacáridos en solución. Para todas las fracciones se realizaron distintos ensayos dinámicos oscilatorios donde se midieron las variables G' (módulo elástico o de almacenamiento) y G'' (módulo viscoso o de pérdida) en función de la temperatura, el tiempo y la frecuencia. Se trabajó a una deformación constante de 0,02 % y, salvo en el barrido de frecuencia, ω se mantuvo constante a 1 Hz. En todos los casos se trabajó dentro del límite lineal de viscoelasticidad.

Es importante aclarar que dado que la concentración de la solución de carragenano y de KCl es distinta a las utilizadas por Andrade *et al.*[10] en su trabajo, no es posible realizar una comparación de resultados.

2.3.4.1 Análisis reológico del extracto F y de las fracciones F-0,125 y F-0,8-1

En la Figura 2.8 a se observa la variación de G' y G'' al disminuir la temperatura para el producto **F** y las fracciones homogéneas de ese extracto, a frecuencia y deformación relativa constante. Las tres fracciones presentan una zona a altas temperaturas donde G'' es ligeramente mayor que G', luego cerca de los 40 ºC ambas curvas se cruzan y en la zona de bajas temperaturas G' pasa a ser cerca de un orden de magnitud superior que G''. El punto de cruce entre ambas curvas para cada fracción representa la temperatura de gelificación del sistema. Esto indica que a partir de dicha temperatura se favorece la formación de enlaces hidrógeno intramoleculares que permiten el pasaje de una conformación tipo *random coil* a hélice.[45] Conjuntamente, la presencia de cationes específicos como el potasio, promueven la agregación de las hélices permitiendo la formación del gel.[47]

Un análisis más detallado de la Figura 2.8 a muestra que el proceso de gelificación ocurre en un rango muy chico de temperatura y luego el valor de G' aumenta lentamente al ir disminuyendo la temperatura. Esto indica que, a pesar de la rampa de enfriamiento utilizada, la formación de la red ocurre en un rango pequeño de temperatura y tiempo, y luego, aunque pueden ocurrir reordenamientos, éstos no se reflejan en grandes cambios del valor de G'.[48]

A partir de la Figura 2.8 b se puede observar la curva de calentamiento del sistema. Inversamente a la curva de enfriamiento, primero se observa una zona donde G' es mayor a G'' (a bajas temperaturas), luego una zona, entre 50 ºC y 70 ºC, donde se produce el cruce de las curvas y por último, otra sección donde G'' es mayor que G'. Análogamente a la temperatura de gelificación, la temperatura de fusión se definió como la temperatura donde se cruzan G' y G'' en la curva de calentamiento. Durante el proceso de fusión, se rompen los

enlaces hidrógeno formados al gelificar, desfavoreciendo así la formación de hélices y agregados que resulta en la pérdida de la red del gel.[49] Se puede observar que las curvas de enfriamiento y calentamiento (Fig. 2.8 a y 2.8 b) no siguen el mismo camino, por lo que los geles formados presentan histéresis. Este fenómeno es común en los geles de κ-carragenanos obtenidos en presencia de K^+.[47] Asimismo, se demostró que los geles obtenidos son termorreversibles.

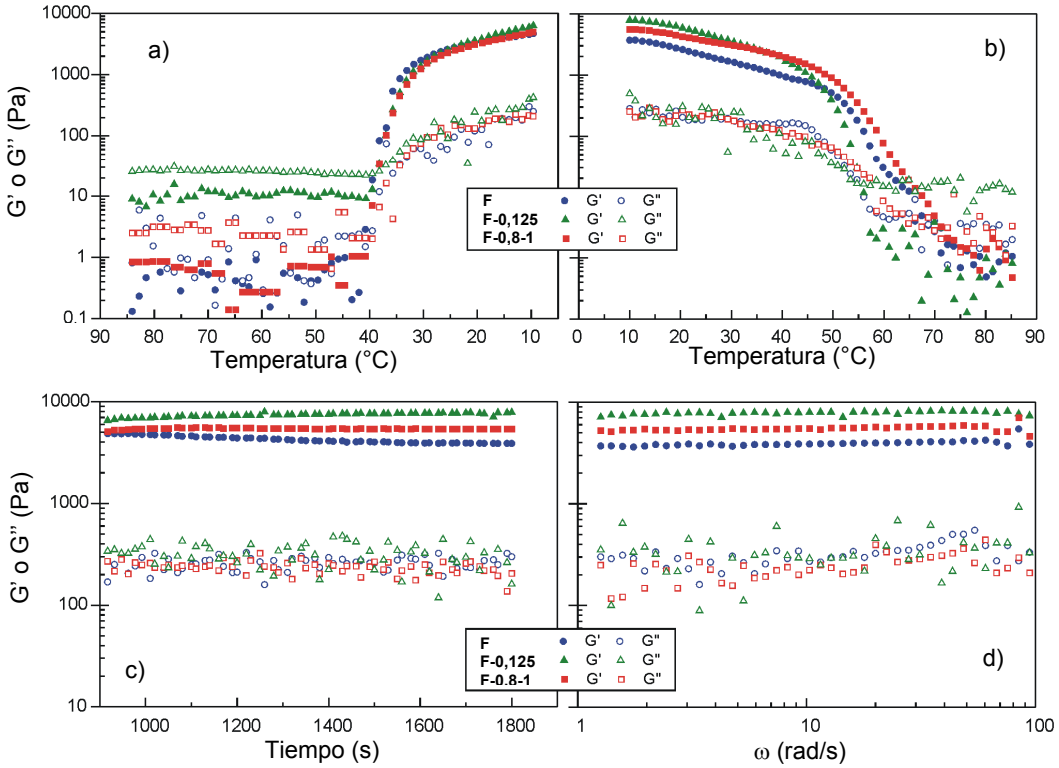


Figura 2.8 Espectros dinámicos oscilatorios para **F**, **F-0,125** y **F-0,8-1** a) rampa de enfriamiento de 5 ºC/min, b) rampa de calentamiento de 5 ºC/min, c) período isotérmico a 10 ºC y d) barrido de frecuencia a 10 ºC.

Finalmente, de las Figuras 2.8 c y 2.8 d se puede deducir que los tres geles formados no presentan dependencia con el tiempo y que son geles verdaderos al no mostrar dependencia con la frecuencia angular, como se mencionó en la Sección 2.1.2.3.

Los datos obtenidos en la Figura 2.8 permitieron obtener la Tabla 2.8 donde se observan los valores de G', G'' (medidos a 10 ºC) y las temperaturas de gelificación y de fusión, medidas como el punto de cruce de las curvas de G' y G'' para la curva de enfriamiento y de calentamiento, respectivamente.

Al comparar la temperatura de gelificación para el crudo y las fracciones del extracto en frío, se puede ver que es el extracto **F** el que posee el mayor valor, mientras que la fracción **F-0,125** tiene el menor. Es sabido que la presencia de otros estructuras, en particular

del tipo ι-carragenano, aumentan la temperatura de gelificación de un κ-carragenano.[47,50] Dado que **F-0,125** está compuesta principalmente por κ-carragenano, mientras que **F** y **F-0,8-1** tienen presencia de otros carragenanos y/o proteínas u otros polisacáridos (el primero por ser un producto no fraccionado y segundo por ser un híbrido κ/ι-), los resultados encontrados coinciden con lo esperado. En general, una menor temperatura de gelificación está asociada con retrasos en la agregación o una mayor dependencia de los cambios conformacionales con la temperatura.

Tabla 2.8 Temperatura de gelificación y fusión, módulo elástico (G') y viscoso (G'') obtenidos para **F**, **F-0,125** y **F-0,8-1** en solución al 2,00 % p/v en 45mM de KCl.[a]

Fracción	T_{gel} (ºC)	G' (Pa)	G'' (Pa)	T_{fus} (ºC)
F	$40,8 \pm 0,2^{D}$	3860 ± 25^{C}	272 ± 13^{A}	$64,9 \pm 0,4^{B}$
F-0,125	$38,2 \pm 0,3^{F}$	7860 ± 37^{A}	294 ± 7^{A}	$56,0 \pm 0,1^{C}$
F-0,8-1	$39,5 \pm 0,2^{E}$	5470 ± 30^{B}	201 ± 18^{B}	$72,5 \pm 0,3^{A}$

[a] Se muestra promedio y desvío estándar (n=3). La misma letra dentro de cada columna indica diferencias no significativas. A estos fines, la temperatura de fusión y gelificación se consideran como una única columna.

Los valores de temperatura de fusión, por otro lado, no son tan semejantes entre sí como los de la temperatura de gelificación. La fracción **F-0,125** es la que posee el menor valor, pero en este caso **F-0,8-1** presenta el mayor. Esto indica que las fracciones con mayor proporción de κ-carragenanos son menos estables térmicamente, lo cual ya había sido observado por Souza *et al.*[50]

Los valores de G' y G'' medidos a 10 ºC muestran que, como ya se había mencionado previamente, a esta temperatura el sistema forma un gel. Si se comparan los valores de G', se observa que, aunque todos se encuentran en el mismo orden, **F-0,125** poseen el mayor valor implicando que es el que forma el gel más elástico. Esto probablemente se deba nuevamente a que la fracción posee una mayor proporción de κ-carragenano y este forma geles más fuertes en presencia de K^+ que el ι-carragenano.[47]

2.3.4.2 Análisis reológico del extracto C y de las fracciones C-0,125 y C-1-1,25

Se repitió la secuencia de experimentos previamente descripta para **C**, **C-0,125** y **C-1-1,25**. Los resultados de la misma se pueden observar en la Figura 2.9. El perfil de la curva de calentamiento para las fracciones provenientes del extracto en caliente (Fig. 2.9 a) es similar al que se observó para sus análogas en frío, con tres zonas: una donde G'' es

superior a G' (a altas temperaturas), otra donde G' y G'' se cruzan y la tercera donde G' es mayor que G'' (a bajas temperaturas). La región donde se cruzan las curvas así como la forma de las curvas es similar a lo observado en la Figura 2.8 a. Un hecho interesante es que al comparar ambas figuras se ve que el valor de G' alcanzado luego de gelificar en las fracciones provenientes del extracto en caliente (≈ 50000 Pa, Fig. 2.9 a) es un orden de magnitud superior que para las fracciones del extracto frío (≈ 5000 Pa, Fig 2.8 a), lo cual implica que las primeras forman geles más elásticos que las segundas.

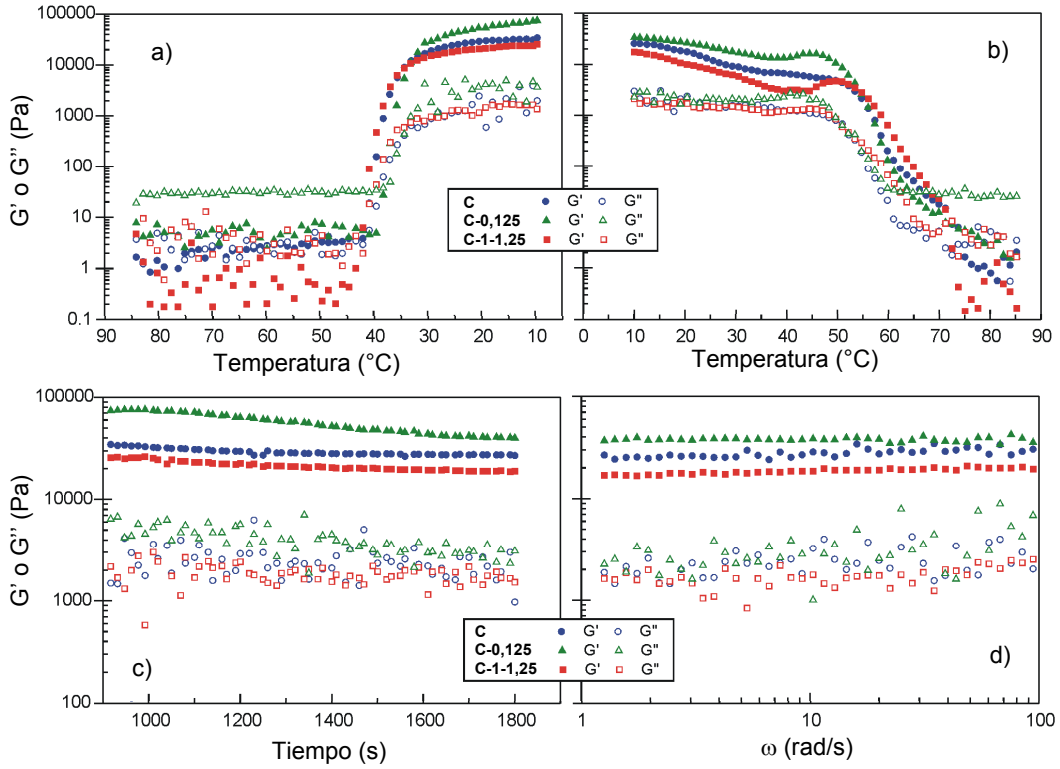


Figura 2.9 Espectros dinámicos oscilatorios para **C**, **C-0,125** y **C-1-1,25** a) rampa de enfriamiento de 5 ºC/min, b) rampa de calentamiento de 5 ºC/min, c) período isotérmico a 10 ºC y d) barrido de frecuencia a 10 ºC.

La Figura 2.9 b muestra la curva de calentamiento de las fracciones del extracto en caliente. Al igual que ocurre con las fracciones provenientes del extracto en frío, estas presentan las tres regiones mencionadas previamente y los valores de entrecruce de G' y G'' son más variables que para la curva de enfriamiento. Asimismo, se puede comprobar que los geles formados son termorreversibles y que presentan histéresis entre el enfriamiento y el calentamiento. Sin embargo, hay una diferencia en la curva de enfriamiento de **C-0,125** y en menor medida de **C-1-1,25**. Poco antes del cambio de pendiente de G', donde ocurre el proceso de fusión, se observa un pico a ≈ 45ºC para el primer caso y a ≈ 52ºC para el segundo. Este comportamiento ya fue observado previamente para un κ-carragenano comercial y se lo atribuye a la sinéresis, o sea a la contracción del gel con exudación del

líquido.[48] La sinéresis puede generarse por la continua agregación de las hélices del κ-carragenano. Las varillas superhelicoidales generadas al gelificar (ver Capítulo 1) resultan insolubles en las condiciones salinas necesarias para su formación, pero aún así se agregan para formar la red. Esta lenta reorganización de las hélices produce la separación de las fases con el tiempo.[51] El efecto de sinéresis y el consecuente deslizamiento en geles de κ-carragenanos es común y aunque hay algunas medidas que se pueden tomar para evitarlo, en este caso no son aplicables y/o no afectan al resultado final.

La presencia de los picos en la Figura 2.9 b se debe a una reducción en el efecto de deslizamiento al volverse más débil la red durante el calentamiento. Se observa que la fracción más rica en estructuras tipo κ-carragenano posee un mayor efecto de sinéresis y deslizamiento. Esto estaría indicando que la presencia de estructuras tipo ι-carragenano reducen la posibilidad de sinéresis.

El análisis de la Figura 2.9 c muestra que **C-0,125** y en menor medida **C-1-1,25** presentan una dependencia del valor de G' en función del tiempo a diferencia de **C**. Esto también se lo puede atribuir al proceso de sinéresis observado en el gráfico 2.9 b. Por último, se puede comprobar que todos los geles formados son verdaderos ya que la Figura 2.9 d no muestra dependencia alguna de los valores de G' y G'' con ω.

En la Tabla 2.9 se observan los valores de G' y G'' medidos a 10 ºC y el valor de temperatura de gelificación y de fusión para el extracto C y sus fracciones.

Tabla 2.9 Temperatura de gelificación y fusión, módulo elástico (G') y viscoso (G'') obtenidos para **C**, **C-0,125** y **C-1-1,25** en solución al 2,00 % p/v en 45mM de KCl.[a]

Fracción	T_{gel} (ºC)	**G'** (Pa)	**G''** (Pa)	T_{fus}(ºC)
C	$42,0 \pm 0,3^{D}$	28100 ± 82^{B}	2530 ± 11^{B}	$73,7 \pm 0,2^{A}$
C-0,125	$38,2 \pm 0,3^{E}$	37700 ± 46^{A}	2850 ± 15^{A}	$63,6 \pm 0,2^{C}$
C-1-1,25	$42,6 \pm 0,1^{D}$	18600 ± 51^{C}	1620 ± 9^{C}	$72,5 \pm 0,2^{B}$

[a] Se muestra promedio y desvío estándar (n=3). La misma letra dentro de cada columna indica diferencias no significativas. A estos fines, la temperatura de fusión y gelificación se consideran como una única columna.

Los resultados indican que, al igual que sucede para las muestras del extracto en frío, la fracción más pura (**C-0,125** en este caso) presenta la menor temperatura de gelificación. Un hecho interesante es que posee el mismo valor que su análoga en frío (Tabla 2.8). Las temperaturas de fusión son mayores que las de gelificación, siendo nuevamente **C-0,125** la menos estable térmicamente de las tres fracciones. **C** y **C-1-1,25** poseen temperaturas de

fusión y gelificación parecidas. La comparación entre estas y sus análogas del extracto en frío muestra que **C** y **C-0,125** son más estables térmicamente que **F** y **F-0,125**, mientras que las fracciones **F-0,8-1** y **C-1-1,25** poseen temperaturas de fusión similares.

Los valores de G' y G'' medidos a 10 ºC muestran que a dicha temperatura se formó un gel, ya que el primero es un orden de magnitud mayor al segundo. Asimismo, el gel más elástico es aquel obtenido de **C-0,125**, o sea la fracción con el κ-carragenano más puro. También se vuelve a observar que los valores de G' y G'' son un orden mayor que los de sus análogos del extracto en frío (Tabla 2.8).

2.3.4.3 Análisis reológico de las fracciones solubles en KCl 2M

Los ensayos dinámicos oscilatorios de **F-2S** y **C-2S** se muestran en la Figura 2.10.

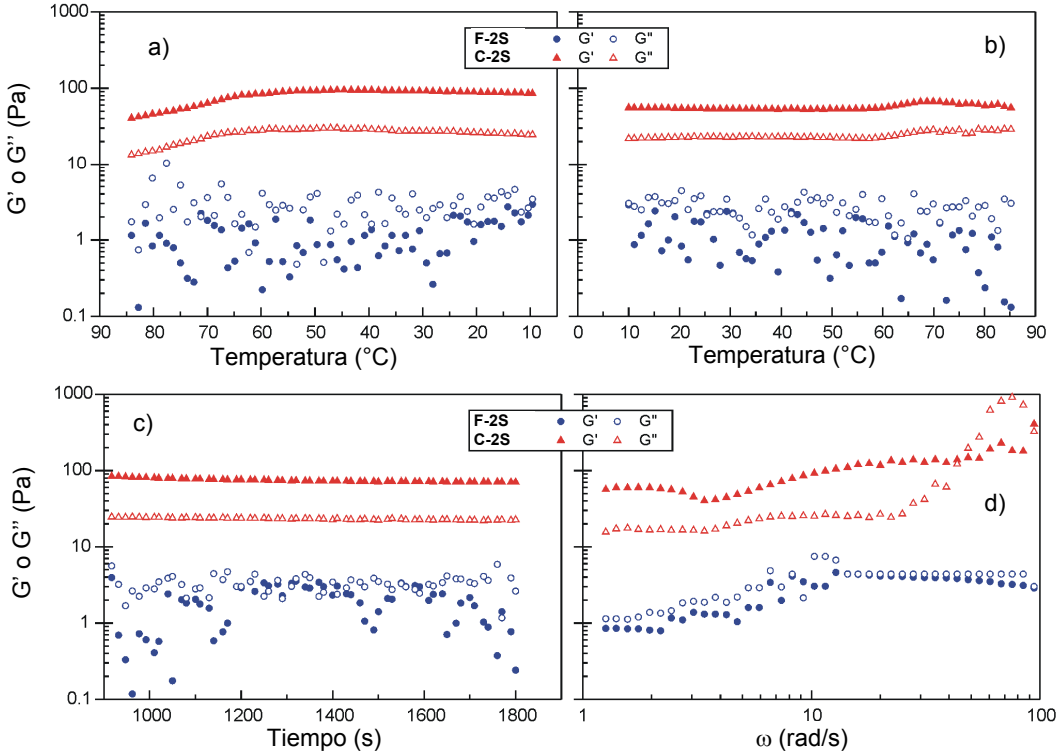


Figura 2.10 Espectros dinámicos oscilatorios para **F-2S** y **C-2S** a) rampa de enfriamiento de 5 ºC/min, b) rampa de calentamiento de 5 ºC/min, c) período isotérmico a 10 ºC y d) barrido de frecuencia a 10 ºC.

Ambos sistemas tienen un comportamiento reológico completamente distinto que las otras fracciones aisladas de *Hypnea musciformis*. Esta situación es lógica ya que la composición de estas fracciones representa una mezcla de distintos polisacáridos e incluso una pequeña cantidad de proteínas. La fracción **F-2S** no gelifica en frío ni siquiera después de reposar por 900 segundos (Fig 2.10 c), mientras que **C-2S** constituye un gel incluso a los 85 °C, siendo siempre G' superior a G'' (Fig. 2.10 a).

El análisis de los espectros mecánicos de estas fracciones (Fig. 2.10 d) indica que la fracción proveniente del extracto frío es un sistema desestructurado y **C-2S** un gel débil que no llega a ser un verdadero gel ya que se observa una dependencia del valor de los módulos con la frecuencia, llegando a cruzarse a los 43,8 rad/seg.

Como se puede ver en las Figuras 2.10 a y 2.10 b, ninguno de los dos sistemas posee punto de gelificación o fusión. Por ello, en la Tabla 2.10 sólo se pueden observar los valores de G' y G'' medidos a 10 °C que muestran las propiedades no gelificantes de **F-2S** y gelificantes de **C-2S**. Es interesante destacar para este último que el valor de ambos módulos es mucho más bajo que para las demás fracciones gelificantes de esta alga y que si bien G' es mayor que G'', ambos módulos se encuentra en el mismo orden de magnitud.

Tabla 2.10 Módulo elástico (G') y viscoso (G'') obtenidos para **F-2S** y **C-2S** en solución al 2,00 % p/v en 45mM de KCl.[a]

Fracción	**G'** (Pa)	**G''** (Pa)
F-2S	3^{B}	3^{B}
C-2S	85 ± 3^{A}	26 ± 2^{A}

[a] Se muestra promedio y desvío estándar (n=3). La misma letra dentro de cada columna indica diferencias no significativas).

2.3.5 Relación estructura-propiedades reológicas

En el Capítulo 1 se mencionó que las distintas características estructurales de los carragenanos, es decir la presencia de 3,6-anhidrogalactosa, el porcentaje y posición del grupo éster sulfato y el peso molecular, afectan de diversas maneras sus propiedades de gelificación. Las diferencias observadas en las propiedades reológicas de los carragenanos de *Hypnea musciformis* están asociadas a la variación del peso molecular y el porcentaje de estructuras del tipo ι-carragenano presentes en los mismos.

Rochas *et al.*[52] ya habían determinado una dependencia creciente entre el peso molecular y la fuerza de los geles generados para κ-carragenanos de hasta Mr ≈ 2-3 $\times 10^5$ Da. Los pesos moleculares de las fracciones de *Hypnea musciformis* se encuentran dentro de este rango, por lo que éste es un factor a considerar. Al comparar las fracciones gelificantes, las que provienen del extracto en caliente resultan más elásticas que las obtenidas en frío (Tablas 2.8 y 2.9). Las Tablas 2.1 y 2.3 muestran que las fracciones **C-0,125** y **C-1-1,25** poseen pesos moleculares más altos que sus análogas, por lo que se justifica la mayor elasticidad de las primeras. Sin embargo, esto no ocurre con **C** y **F** ya que el primero posee menor peso

molecular que el segundo (Tablas 2.1 y 2.3). En este caso, se debe tener en cuenta que ambos extractos son en realidad mezclas compuestas por las distintas fracciones obtenidas luego de precipitar con KCl, más el material soluble y el que podría perderse por diálisis en todas las precipitaciones o en la diálisis final. Si se analizan las Tablas 2.1 y 2.3 se puede observar que la proporción de fracciones gelificantes en **C** representa un 71 % del total mientras que en **F** 53 %, por lo que es de esperar que **C** dé lugar a geles más firmes.

Por otro lado, es importante analizar el efecto de la presencia o ausencia de estructuras del tipo ι-carragenano en las fracciones y su efecto en el gel obtenido. Esto ya fue brevemente mencionado en la Sección 2.3.4. En general se vio que aquellas fracciones que eran más ricas en κ-carragenano (**C-0,125** y **F-0,125**), dieron geles más elásticos en presencia de KCl (Tablas 2.8 y 2.9). Asimismo, un aumento de la proporción de estructuras tipo ι-carragenano aumenta la temperatura de gelificación y de fusión haciendo que los geles formados sean más estables térmicamente. Una posible explicación puede estar relacionada con el mecanismo de gelificación de dichos carragenanos. Como ya fue discutido en el Capítulo 1, este mecanismo comienza con la formación de dobles hélices, las cuales son ligeramente distintas para ι- y κ-carragenanos. En particular, este último carragenano forma hélices que están estabilizadas por una menor cantidad de enlaces hidrógeno por lo que son más dependientes de la concentración de K^+ y de la temperatura que las del ι-carragenano.[45] Estas diferencias hacen que la presencia de uno afecte al otro, y dada la baja concentración de K^+ utilizado para este estudio (45mM) es razonable que la presencia de pequeñas proporciones de ι-carragenano pueda afectar la gelificación de fracciones que son mayoritariamente κ-carragenano. De esta manera, el aumento de la temperatura de gelificación y, principalmente, de fusión observado para las fracciones **F-0,8-1** y **C-1-1,25** podría estar relacionado con la formación de dobles hélices de ι-carragenano, que poseen más enlaces hidrógeno, lo que implicaría que estas estructuras deben encontrarse en bloque. Esto último sería consistente con lo observado y propuesto por van de Velde *et al.*[53] y Guibet *et al.*[54] (Capítulo 1, Sección 1.2.1). Por otro lado, la disminución del valor de G' está relacionada con el hecho de que el κ-carragenano forma geles más fuertes con K^+ que el ι-carragenano y por lo tanto su presencia está afectando la elasticidad del gel.[55] Por otro lado, el hecho de que algunas fracciones obtenidas en caliente posean mayor punto de fusión que sus análogas obtenidas en frío probablemente esté relacionado con el mayor peso molecular de las primeras.

2.4 Conclusiones

En este Capítulo de Tesis se presentó el análisis químico de los carragenanos y otros galactanos extraídos del alga *Hypnea musciformis* y las características reológicas de los mismos.

Los resultados demostraron que los polisacáridos extraídos del alga, tanto con agua a temperatura ambiente como en caliente, están compuestos por tres fracciones principales:

a) las que precipitaron a 0,125M de KCl cuya estructura es consistente con un κ-carragenano casi ideal. Se determinó que la fracción proveniente del extracto en frío (**F-0,125**) posee un mayor porcentaje de estructuras tipo ι-carragenano y menor peso molecular que aquella proveniente del extracto en caliente (**C-0,125**).

b) las que precipitaron a concentraciones mayores de 0,125M de KCl están compuestas mayoritariamente por estructuras de κ-carragenano y una proporción menor de estructuras de ι-carragenano y su precursor ν-carragenano. Para la fracción **F-0,8-1** se determinó que poseía mayor proporción de estos últimos.

c) las solubles en 2M de KCl son una mezcla de carragenanos y otros galactanos, así como también de otros polisacáridos menores y proteínas. Su alta complejidad estructural, así como su inhomogeneidad conllevaron a un subfraccionamiento y un estudio estructural más detallado que se describirá en el Capítulo 3.

El estudio de las propiedades reológicas de estas fracciones mostró que sólo aquéllas compuestas por carragenanos forman geles verdaderos. Las fracciones provenientes del extracto obtenido en caliente forman geles más elásticos que aquéllas del extracto a temperatura ambiente, principalmente debido a su mayor peso molecular. En cada uno de los extractos, la elasticidad de los geles aumenta con la proporción de κ-carragenano presente, mientras que la temperatura de gelificación y fusión disminuyen. A su vez, los carragenanos purificados presentan mejores características gelificantes que los extractos sin fraccionar, destacándose así la importancia de purificar los extractos al realizar estudio reológico.

Los resultados aquí obtenidos demuestran que los carragenanos aislados de *H. musciformis* son valiosos biopolímeros que debido a sus propiedades reológicas pueden ser utilizados en la industria farmacéutica, química y alimenticia.

Bibliografía

1. Vázquez-Delfin, E., Robledo, D. & Freile-Pelegrin, Y. (2014). *Journal of Applied Phycology, 26*, 901–907.

2. Alves, M. G. C. F, Dore, C. M. P. G., Castro, A. J. G, do Nascimento, M. S., Cruz, A. K. M., Soriano, E. M., Barros Benevides, N. M. & Lisboa Leite, E. (2012). *Journal of Applied Phycology*, *24*, 1217–1227.

3. McHugh, D. J. (2003). A guide to the seaweed industry. *FAO Fisheries Technical Paper*, *441*, 105 pp.

4. Craigie, J. S. (1990). Eds. Cole, K. M. & Sheath, R. G. *Biology of red algae.* Capítulo 10, Cambridge University Press, Nueva York, Estados Unidos.

5. Stengenga, H., Bolton, J. J. & Anderson, R. J. (1997). *Seaweeds of the South African west coast.* Bolus Herbarium, Universidad de Ciudad del Cabo, Ciudad del Cabo, Sudáfrica, 665 pp.

6. Caires, T. A., Oliveira Costa, I., Barreto de Jesús, P., Barros de Matos, M. R., Pereira-Filho, G. H. & de Castro Nunes, J. M. (2013). *Brazilian Journal of Oceanography*, *61*, 65–71.

7. Graham, L. E. & Wilcox, L. W. (2000). *Algae*, Prentice Hall, Nueva Jersey, Estados Unidos, 604pp.

8. Saunders, G. W., Chiovitti, A. & Kraft, G. T. (2004). *Canadian Journal of Botany, 82*, 43–74.

9. http://www.hawaii.edu/reefalgae/invasive_algae/rhodo/hypnea_musciformis.htm

10. Andrade, C. T., Azero, E. G., Luciano, L. & Gonçalves, M. P. (2000). *International Journal of Biological Macromolecules*, *27*, 349–353.

11. Bi, F., Hassan, M., Arman, M., Iqbal, S. & Mahmood, S. J. (2007). *Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry*, *6*, 2385–2396.

12. Mahmood, S. J., Bi, F., Taj, N. Seema, Farhan, M., Shahid, M., Azmat, R. & Udini, F. (2007). *Journal of Applied Sciences*, *7*, 3506–3511.

13. Arman, M. (2011). *Natural Product Research*, *25*, 1352–1360.

14. Arman, M. & Ul Qader, S. A. (2012). *Carbohydrate Polymers*, *88*, 1264–1271.

15. Bi, F. & Iqbal, S. (1999). *Pakistan Journal of Scientific and Industrial Research*, *46*, 223–226.

16. Bi, F. & Iqbal, S. (2000). *Bangladesh Journal of Scientific and Industrial Research*, *35*, 130–135.

17. Bi, F. & Iqbal, S. (2002). *Pakistan Journal of Scientific and Industrial Research*, *45*, 172–173.

18. Bi, F. & Iqbal, S. (2005). *Pakistan Journal of Scientific and Industrial Research*, *48*, 216–219.

19. Bi, F., Iqbal, S., Ali, A., Arman, M. & Hassan, M. (2008). *Indian Journal of Plant Physiology*, *13*, 101–106.

20. Bi, F., Arman, M., Ali, A. & Iqbal, S. (2009). *Indian Journal of Plant Physiology*, *14*, 1–6.

21. Bi, F., Iqbal, S., Arman, M., Ali, A. & Hassan, M. (2011). *Journal of Saudi Chemical Society*, *15*, 269–273.

22. De Brito, T. V., da Silva Prudêncio, R., Sales, A. B., das Chagas Vieira Júnior, F., Candeira, S. J. N., Franco, A. X., Sabóia Aragão, K., de Alburquerque Ribeiro, R., Ponte de Souza, M. H. L., de Sousa Chaves, L. Ponte Freitas, A. L. Medeiros, J. V. R. & dos Reis Barbosa, A. L. (2013). *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, *65*, 724–733.

23. Rodrigues, J. A. G., de Araújo, I. W. F., de Paula, G. A., Vanderlei, E. S. O., de Queiroz, I. N. L., Gomes Quinderé, A. L., Oliveria Coura, C., Bessa, E. F., de Brito Lima, T. & Barros Benevides, N. M. (2011). *Ciencia Rural*, *41*, 1211–1217.

24. Rodrigues, J. A. G., de Araújo, I. W. F., de Paula, G. A., Lima, T. B., Bessa, E. F. & Benevides, N. M. B. (2011). *Acta Scientiarum – Technology*, *33*, 137–144.

25. Greer, C. W., Shomer, I., Goldstein, M. E. & Yaphe, W. (1984). *Carbohydrate Research*, *129*, 189–196.

26. Knutsen, S. H., Murano, E., D'Amato, M., Toffanin, R., Rizzo, R. & Paoletti, S. (1995). *Journal of Applied Phycology*, *7*, 565–576.

27. Wang, Q. & Cui, S. W. (2005). Ed. Cui, S. W. *Food Carbohydrates*. Capítulo 4, CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, Estados Unidos.

28. Steffe, J. F., (1996). *Rheological Methods in Food Process Engineering*, Freeman Press, East Lansing, Estados Unidos, 418pp.

29. Schramm, G. (1994). *A Practical Approach to Rheology and Rheometry* (2º Ed). Gebrueder HAAKE Gmbc, Karlsruhe, Alemania, 291pp.

30. Stortz, C. A. & Cerezo, A. S. (1993). *Carbohydrate Research*, *242*, 217–227.

31. Ciancia, M., Matulewicz, M. C. & Cerezo, A. S. (1993). *Phytochemistry*, *34*, 1541–1543.

32. Estévez, J. M., Ciancia, M. & Cerezo, A. S. (2004). *Carbohydrate Research*, *339*, 2575–2592.

33. Stevenson, T. T. & Furneaux, R. H. (1991). *Carbohydrate Research, 210*, 277–298.

34. Cases, M. R., Cerezo, A. S. & Stortz, C. A. (1995). *Carbohydrate Research, 269*, 333–341.

35. Navarro, D. A. & Stortz, C. A. (2003). *Carbohydrate Research, 338*, 2111–2118.

36. Ciancia, M., Noseda, M. D., Matulewicz, M. C. & Cerezo, M. C. (1993). *Carbohydrate Polymers, 20*, 95–98.

37. Ciucanu, I. & Kerek, F. (1984). *Carbohydrate Research, 131*, 209–217.

38. van de Velde, F., Knutsen, S. H., Usov, A. I., Rollema, H. S. & Cerezo, A. S. (2002). *Trends in Food Science & Technology, 13*, 73–92.

39. Tojo, E. & Prado, J. (2003). *Carbohydrate Polymers, 53*, 325–329.

40. Knutsen, S. H., Myslabodski, D. E., Larsen, B. & Usov, A. I. (1994). *Botanica Marina*, *37*, 163–169.

41. Stortz, C. A., Cases, M. R. & Cerezo, A. S. (1997). *Carbohydrate Polymers*, *34*, 61–65.

42. Craigie, J. S. & Rivero-Carro, H. (1992). *Proceedings of the International Seaweed Symposium*, *14*, 71.

43. Ciancia, M., Matulewicz, M. C. & Cerezo, A. S. (1997). *Phytochemistry*, *45*, 1009–1013.

44. Estévez, J. M., Ciancia, M. & Cerezo, A. S. (2000). *Carbohydrate Research*, *325*, 287–299.

45. Lahaye, M. (2001). *Journal of Applied Phycology*, *13,* 173–184.

46. Caneiro-da-Cunha, M. G., Cerqueira, M. A., Souza, B. W. S., Teixeira, J. A. & Vicente, A. A. (2011). *Carbohydrate Polymers*, *85*, 522–528.

47. Piculell, L. (2006). Eds. Stephen, A. M. Phillips, G. O. & Williams, P. A. *Food Polysaccharides and Their Applications*, (2º Ed.) Capítulo 8. CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, Estados Unidos.

48. Richardson, R. K. & Goycoolea, F. M. (1994). *Carbohydrate Polymers*, *24*, 223–225.

49. Núñez-Santiago, M. C. & Tecante, A. (2007). *Carbohydrate Polymers*, *69*, 763–773.

50. Souza, H. K. S., Holliou, L., Bastos, M. & Gonçalves, M. P. (2011). *Carbohydrate Polymers*, *85*, 429–438.

51. Rinaudo, M. (2007). Ed. Kamerling, J. P. *Comprehensive Glycobiology*, vol 2, Capitulo 2.21. Elsevier, Amsterdam, Holanda.

52. Rochas, C., Rinaudo, M. & Landry, S. (1990). *Carbohydrate. Polymers, 12*, 255–266.

53. van de Velde, F., Antipova, A. S., Rollema, H. S., Burova, T. V., Grinberg, N. V., Pereira, L., Gilsenan, P. M., Tromp, R. H., Rudolf, B. & Grinberg, V. Y. (2005). *Carbohydrate Research*, *340*, 1113–1129.

54. Guibet, M., Boulenguer, P., Mazoyer, J., Kervarec, N., Antonopoulos, A., Lafosse, M. & Helbert, W. (2008). *Biomacromolecules*, *9*, 408–415.

55. Imeson, A. P. (2000). Eds. Phillips, G. O. & Williams, P. A. *Handbook of Food Hydrocolloids*. Capítulo 5, CRC Press, Woodhead Publishing Limited, Cambridge, Inglaterra.

CAPÍTULO 3

Fraccionamiento y determinación estructural de los productos solubles en KCl 2M presentes en *Hypnea musciformis*

3.1 Introducción

En el Capítulo 2 se presentaron los resultados del sistema de galactanos aislados del alga *Hypnea musciformis*. Además de los carragenanos, se aislaron dos fracciones minoritarias (**C-2S** y **F-2S**) cuya composición no era consistente con la de los carragenanos (Capítulo 2, Sección 2.3.3.2). Estas fracciones se caracterizaban por poseer D- y L-galactosa, importantes proporciones de xilosa y glucosa y baja cantidad de 3,6-anhidrogalactosa. En función de estos resultados, se dedujo que estas fracciones estaban compuestas por mezclas de polisacáridos, que podrían contener unidades de agaranos y/o híbridos DL.

El aislamiento de fracciones con D- y L-galactosa en algas carragenofitas, ya se había observado en otras algas del orden Gigartinales (Capítulo 1, Tabla 1.3). Craigie y Rivero,[1] en una presentación a un congreso, fueron los primeros en informar la presencia de estos galactanos híbridos DL en algas carragenofitas. Ellos estudiaron los polisacáridos extraídos de los gametofitos de las especies *Chondrus crispus*, *Gigartina canaliculata*, *Gigartina leptorinchos* y *Mastocarpus stellata.* En cada alga estudiada hallaron, además de carragenanos, galactanos sulfatados minoritarios que poseían bajos niveles de 3,6-anhidrogalactosa y relaciones D- a L-galactosa cercanas a uno. Estos polisacáridos también poseían xilosa terminal, principalmente el galactano extraído de *M. stellata*.

Posteriormente al mencionado trabajo, se han hallado otras algas carragenofitas que también producían cantidades minoritarias de polisacáridos compuestos por D- y L-galactosa. Stortz *et al.*[2,3] encontraron estos híbridos DL en plantas de *Iridaea undulosa* que se encontraban en la fase tetraspórica. Luego de precipitar selectivamente a altas concentraciones de KCl el λ-carragenano, los autores hallaron una fracción que no precipitaba en presencia de la sal. Esta última se caracterizaba por poseer un bajo porcentaje de grupos sulfato, una relación D- a L-galactosa 7:3 y ramificaciones de unidades de xilosa y galactosa. Al realizar un nuevo fraccionamiento a dicha fracción por cromatografía de intercambio iónico,[3] los autores aislaron un λ-carragenano y polisacáridos con estructuras diversas. Dichos polisacáridos se caracterizaban por poseer D- y L-galactosa, en proporciones variables según la fracción. Las unidades β- de estos galactanos se encontraban principalmente sulfatados en posición C-2, como en los λ-carragenanos, o sustituidos en C-6 como en los coralinanos.[4] Al aumentar la proporción de α-L-galactosa en las fracciones, aumentaba también la proporción de β-galactosas sustituidas en C-6 de las mismas. Las

unidades α- se encontraban principalmente sustituidas en C-3, aunque también se observaban sustituciones en C-2 y/o C-6. También se observaron ramificaciones de galactosa. Una de las fracciones aisladas resultó ser atípica debido a la alta proporción de D-glucosa; se sugirió que dicho monosacárido podría estar reemplazando a la D-galactosa en la estructura.

Por otro lado, Ciancia *et al.*[5,6] estudiaron el sistema de polisacáridos aislados del alga *Gigartina skottbergii* en su fase cistocárpica. Este estaba compuesto por dos fracciones, una gelificante, compuesta principalmente por polisacáridos con estructura tipo κ/ι-carragenano y otra no gelificante, compuesta mayoritariamente por polisacáridos del tipo μ/ν-carragenano. Ambas fracciones poseían también pequeñas proporciones de L-galactosa. Luego de realizar la reacción de tratamiento alcalino a ambas fracciones y posteriormente fraccionarlas por precipitación con KCl, los autores pudieron separar polisacáridos híbridos DL (o bien una mezcla de polisacáridos) enriquecidos en L-galactosa. El polisacárido proveniente de la fracción no gelificante estaba compuesto por D- y L-galactosa (relación 2:1), 3,6-anhidro-D-galactosa y 3,6-anhidro-L-galactosa (relación 1:2), y pequeñas cantidades de glucosa, xilosa y manosa, entre otras.[5] El híbrido DL obtenido de la fracción gelificante poseía muy baja cantidad de L-galactosa, y una estructura semejante a la de un carragenano, aunque con ramificaciones de galactosa terminal. El análisis estructural mostró que la cadena principal de los polisacáridos de esta subfracción estaba compuesta por una mezcla de díadas tipo κ-, ι- y λ-carragenano.

Unos años después, Chopin *et al.*[7] realizaron un trabajo donde se revisaron las estructuras que habían sido estudiadas de los distintos polisacáridos aislados de algas del orden Gigartinales, e incluyeron en el trabajo a algunas algas que no se habían estudiado hasta ese momento. Entre estas últimas, se encontraban dos algas carragenofitas: *Rhodophyllis divaricata* y *Sarcodia montagneana*. Si bien ambas algas producen mayoritariamente λ-carragenanos, los autores también observaron otros galactanos que poseían D- y L-galactosa. Este dato resulta interesante ya que *R. divaricata* es la única alga, hasta el momento, perteneciente a la familia de las Cystocloniaceae de la que se haya informado la presencia de híbridos DL.

En el alga *Kappaphycus alvarezii*, muy utilizada comercialmente por producir κ-carragenanos, también se halló la presencia de polisacáridos con unidades de L-galactosa. Estévez *et al.* realizaron un análisis estructural de los polisacáridos aislados luego de la extracción acuosa en frío[8] y en caliente[9] del alga. Los galactanos extraídos a temperatura ambiente[8] estaban compuestos mayoritariamente por híbridos κ/ι-, pero se observaban

también sus precursores (μ/ν-). El fraccionamiento de éstos con KCl permitió aislar polisacáridos solubles en solución 2M de KCl. Estos resultaron ser estructuralmente más complejos ya que se encontró la presencia de D- y L-galactosa (relación 9:1). Estos polisacáridos poseían β-galactosas sulfatadas en C-4 (también en parte metiladas en C-6), y en menor proporción sulfatadas en C-2 y C-4 o en C-4 y C-6. Las unidades α- halladas fueron la 3,6-anhidro-D-galactosa, la D-galactosa sin sustituir y la L-galactosa sin sustituir o sustituida en C-3. El extracto obtenido en caliente[9] estaba constituido principalmente por un galactano con estructura similar al κ-carragenano, aunque poseía pequeñas cantidades de L-galactosa y 3,6-anhidro-L-galactosa. El extracto en caliente también poseía una fracción que no gelificaba con KCl, la cual se hallaba compuesta por κ/μ-carragenanos, agaranos e híbridos DL. La mezcla de polisacáridos híbridos DL fue subfraccionada por intercambio aniónico y se pudieron aislar distintas fracciones de galactanos con la presencia de los dos enantiómeros, aunque la relación entre ambos fue variable. Aquellas fracciones con mayor proporción de estructuras tipo carragenano resultaron más sulfatadas que las más ricas en L-galactosa.

Otra alga carragenofita en la que se encontraron híbridos DL es *Gymnogongrus torulosus*. Estévez *et al.*[10] observaron que las fracciones gelificantes del alga no eran un κ/ι-carragenano puro, sino que poseían importantes proporciones de 3,6-anhidro-L-galactosa. La relación entre estructuras tipo carragenano y estructuras tipo agarano eran de aproximadamente 3,5:1, y los autores postularon que la disposición de las distintas estructuras no era al azar sino que debían estar en bloques. Los galactanos no gelificantes estaban compuestos por μ/ν-carragenanos junto con estructuras tipo agarano en relación 2 a 3, y una fracción rica en agaranos con estructura similar a los coralinanos.[4]

3.2 Objetivos

Este Capítulo del trabajo de Tesis tuvo como objetivo estudiar la estructura de las fracciones minoritarias **C-2S** y **F-2S** aisladas de *Hypnea musciformis* a partir de un subfraccionamiento de las mismas por cromatografía de intercambio aniónico.

3.3 Resultados y discusión

3.3.1 Fraccionamiento y estructura de los polisacáridos que componen F-2S

3.3.1.1 Fraccionamiento de F-2S

La fracción **F-2S** proviene del fraccionamiento de los polisacáridos aislados en el extracto en frío (**F**), el cual fue caracterizado en el Capítulo 2. Debido a su heterogeneidad, **F-2S** se volvió a fraccionar mediante una cromatografía de intercambio aniónico. Se utilizó una mezcla de DEAE-Sephadex A-50 y Sephadex G-100 en relación 1,2 a 1 como fase estacionaria, de manera análoga a lo realizado por Stortz *et al.*[3] Como eluyente se utilizaron soluciones acuosas de NaCl de concentraciones crecientes. La proporción de geles se eligió en función de aquella que se encontró óptima para fraccionar **C-2S** (ver Sección 3.3.2.1) la cual también resultó adecuada para **F-2S**. El perfil cromatográfico de la columna analítica se muestra en la Figura 3.1. No se observó elución de carbohidratos a concentraciones superiores a 2M de NaCl.

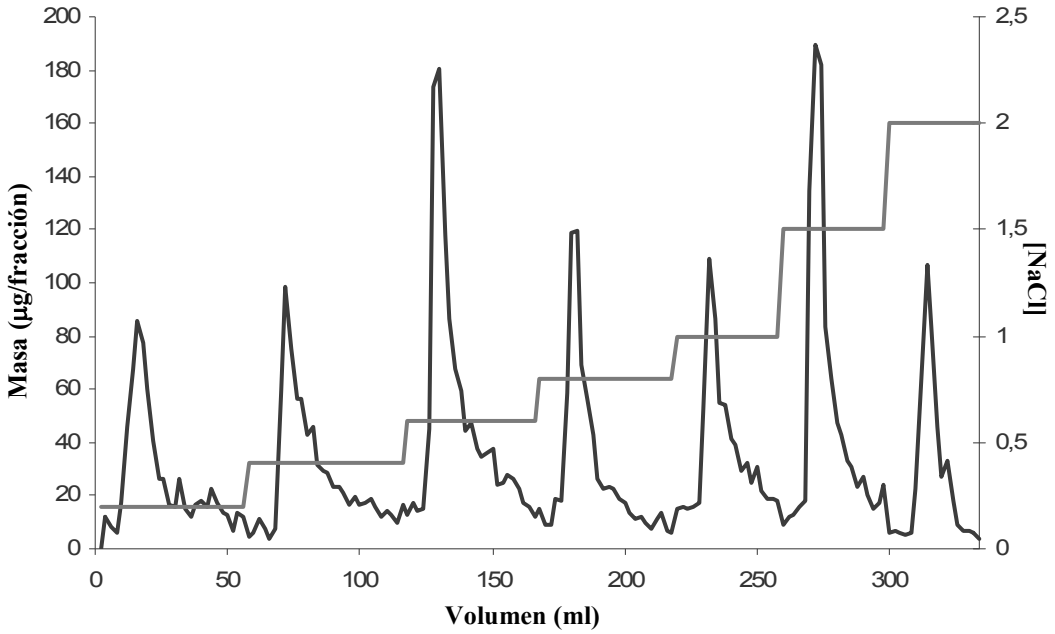


Figura 3.1 Cromatografía de intercambio iónico a escala analítica de **F-2S** sobre una mezcla de DEAE-Sephadex A-50 y Sephadex G-100 1,2:1.

De la columna de intercambio aniónico analítica se recuperó aproximadamente un 70 % de la masa inicial (determinado colorimétricamente por cuantificación de azúcares totales). Las fracciones mayoritarias fueron aquellas que eluyeron a 0,6M y a 1,5M de NaCl. Cabe aclarar que en cada concentración eluida sólo se observa un pico (Fig. 3.1).

En función de estos resultados se realizó una columna a escala preparativa con el fin de fraccionar a **F-2S**. El perfil cromatográfico se muestra en la Figura 3.2. Al igual que sucedió en la columna analítica, no se observó elución de compuestos a concentraciones de NaCl superiores a 2M. Dicho perfil muestra que las fracciones mayoritarias son nuevamente las que eluyen a 0,6M y 1,5M de NaCl.

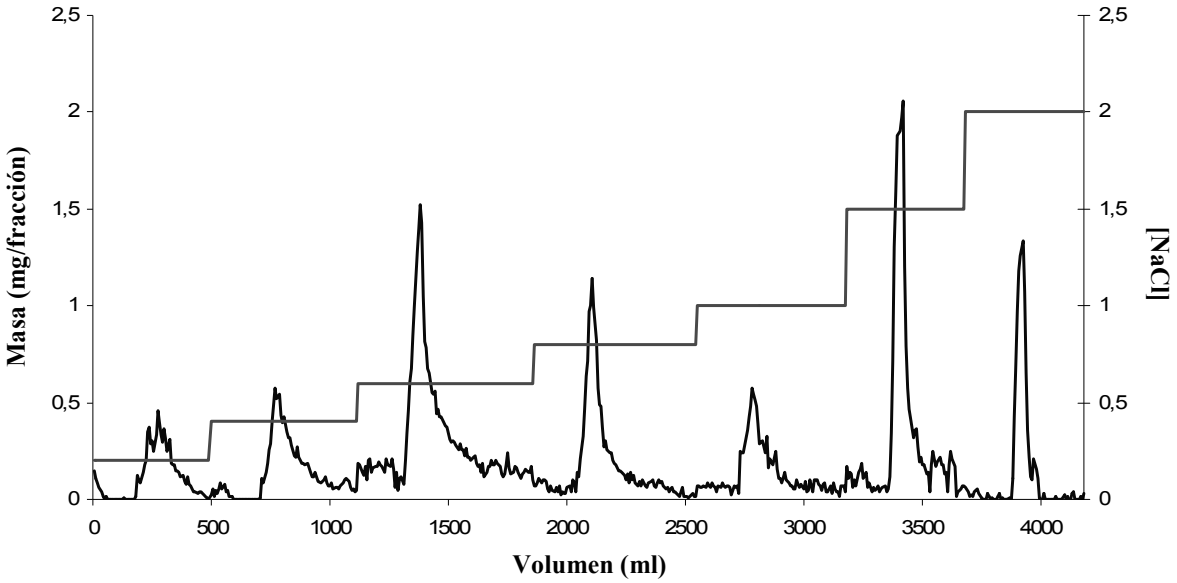


Figura 3.2 Cromatografía de intercambio iónico a escala preparativa sobre una mezcla de DEAE-Sephadex A-50 y Sephadex G-100 de **F-2S.**

Para identificar a las fracciones, se optó por nombrarlas como **F-2S-[NaCl]**, donde [NaCl] indica la concentración de cloruro de sodio a la que eluyeron. De esta manera la fracción eluida a 0,6M de NaCl se denominará **F-2S-0,6**. Se incluye al principio el nombre de la fracción de la que provino para que el sistema de nomenclatura también pueda aplicarse al fraccionamiento de **C-2S** y ambas puedan ser diferenciadas.

Se pudieron eluir siete fracciones: **F-2S-0,2**; **F-2S-0,4**; **F-2S-0,6**; **F-2S-0,8**; **F-2S-1**; **F-2S-1,5** y **F-2S-2**. El rendimiento total final del fraccionamiento fue del 51,6 % (determinado por pesada).

3.3.1.2 Composición de las subfracciones de F-2S

Las fracciones obtenidas fueron caracterizadas (Tabla 3.1). Como se puede observar, los rendimientos obtenidos por pesada no son equivalentes a los que provienen de la cuantificación colorimétrica de azúcares en el perfil cromatográfico. La fracción **F-2S-1,5** no resultó ser la mayoritaria, ya que su rendimiento total fue casi la mitad del de **F-2S-0,6**. Esto probablemente se deba a que la fracción eluida a 1,5M de NaCl posee una mayor proporción

de azúcares totales que las demás fracciones y el perfil cromatográfico se realizó cuantificando únicamente ese componente.

Tabla 3.1 Composición de las subfracciones obtenidas a partir de **F-2S**.

	F-2S	**F-2S-**						
		0,2	**0,4**	**0,6**	**0,8**	**1**	**1,5**	**2**
Rendimiento (g/100g **F-2S**)		4,5	8,6	13,5	9,5	4,8	6,3	4,4
Azúcares totales (%)[a]	45,6	30,7	25,0	28,7	29,2	25,6	38,8	26,3
Sulfato (% SO_3Na)	21,6	6,1	5,7	8,3	12,4	18,5	31,4	23,4
Proteínas (%)	17,9	14,2	20,8	9,7	ND[b]	ND[b]	ND[b]	ND[b]
PM (kDa)[c]	A[d]	9	14	35	65	55	93	151

[a] Usando galactosa como estándar.
[b] ND = no determinado
[c] Medido por GPC considerando el máximo del pico.
[d] A = Pico muy ancho con más de un máximo

El porcentaje de hidratos de carbono para las distintas fracciones se ubica entre el 25 % y el 39 %. La proporción de sulfato aumenta al incrementarse la fuerza iónica con la que se eluyó la fracción, lo cual es esperable en este tipo de cromatografía. El valor de proteínas totales solo se midió para las fracciones que eluyeron a bajas concentraciones dado que no se contaba con suficiente masa de las demás fracciones. A su vez, durante el estudio de las fracciones de **C-2S** no se observó presencia de dichas macromoléculas a concentraciones de eluyente superiores a 0,6M, por lo que es probable que las fracciones para las que no se pudo realizar la determinación posean baja proporción de proteínas (ver Sección 3.3.2.2). De las fracciones estudiadas, **F-2S-0,4** es la que posee la mayor proporción de dicho componente (20,8 %).

El peso molecular de las fracciones (Fig. 3.3) se incrementa al aumentar la concentración del solvente de elución. La fracción **F-2S-0,2** posee un peso molecular menor a los 9 kDa y las demás se encuentran el rango entre los 10-100 kDa, a excepción de **F-2S-2** que supera dicho valor.

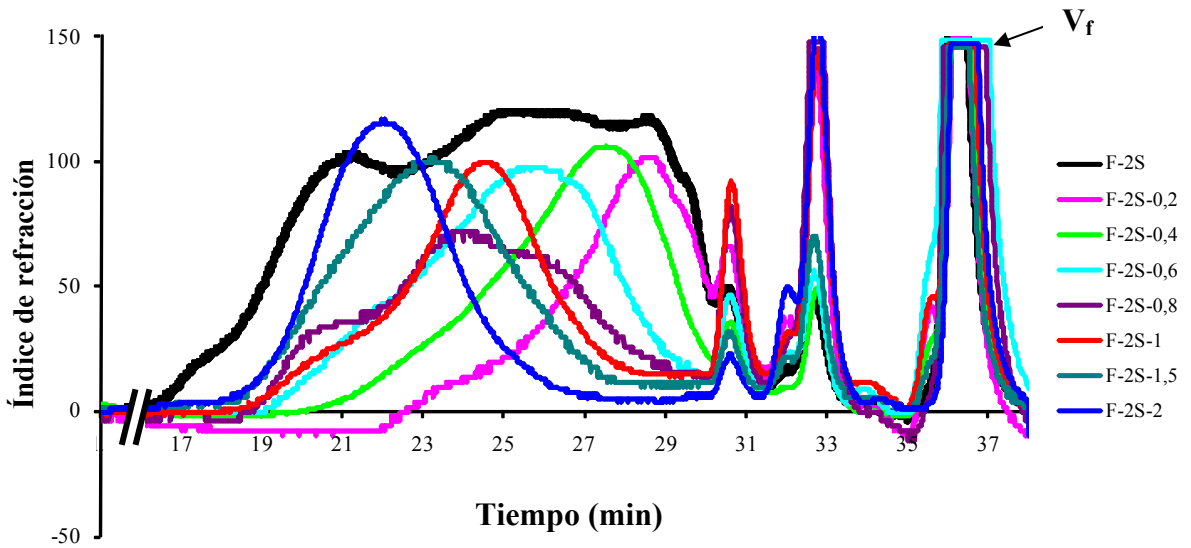


Figura 3.3 Perfiles cromatográficos de **F-2S** y de sus productos de subfraccionamiento realizados por GPC.

Por otro lado, se realizó la determinación de azúcares componentes por cromatografía gaseosa tras hidrólisis. De manera análoga a lo realizado en el Capítulo 2, el análisis se realizó generando alditoles peracetilados por hidrólisis reductiva[11] y los 1-amino-1-desoxialditoles formados con aminas quirales.[12,13] A partir de estos resultados se obtuvo la Tabla 3.2.

El análisis de los azúcares componentes muestra que la "galactosa total" (es decir, incluyendo a la 3,6-anhidrogalactosa y las galactosas metiladas), es mayoritaria en todas las fracciones. Sin embargo, la proporción de cada uno de estos derivados es variable. Las primeras fracciones poseen una mayor proporción de galactosas metiladas que de 3,6-anhidrogalactosa, mientras que las últimas únicamente poseen el anhidroazúcar. La relación D- a L- para las galactosas totales permite generar 4 grupos: **F-2S-0,2** tiene una relación D a L cercana a 1, por lo que poseería una estructura tipo agarano; **F-2S-0,4** a **F-2S-1** muestran preminencia de la D-galactosa, y corresponderían a híbridos DL ricos en estructuras tipo agarano, **F-2S-1,5,** que tiene aún mayor preminencia de la D-galactosa sería un híbrido DL rico en estructuras tipo carragenano y finalmente **F-2S-2** con muy poca L-galactosa, sería un carragenano rico en 3,6-anhidro-D-galactosa.

La relación entre la galactosa total y los grupos sulfato disminuye al aumentar la fuerza iónica en la que se eluyó la fracción, pasando de 0,5 a 1,5 sulfatos por cada galactosa. Asimismo, las primeras fracciones son ricas en glucosa y xilosa; sus proporciones disminuyen al aumentar la concentración de NaCl con la que se eluyó la fracción.

Tabla 3.2 Azúcares componentes de las subfracciones obtenidas a partir de **F-2S** (expresados en moles/100 moles de azúcares), relación D a L-Gal, relación Gal:3,6-AnGal:SO_3Na y relación Gal:Gal 6-sulfato.

Azúcar	**F-2S**	**F-2S-**						
		0,2	**0,4**	**0,6**	**0,8**	**1**	**1,5**	**2**
D-Gal	39	16	24	26	30	42	52	62
L-Gal	16	18	17	21	21	25	17	5
3,6- An-D-Gal	6	-	6	5	3	6	16	29
3,6- An-L-Gal	3	4	2	2	1	1	-	-
D-Xil	12	11	12	13	13	5	4	-
D-Glc	14	32	23	20	21	13	4	-
D-Man	2	5	3	2	1	2	3	1
L-Ara	1	2	1	1	1	1	2	2
L-Ram	1	1	1	1	-	1	1	1
L-Fuc	2	-	1	1	-	3	1	-
2-*O*-Me-D-Gal	2	5	5	3	3	-	-	-
2-*O*-Me-L-Gal	2	-	-	-	1	-	-	-
3-*O*-Me-D-Gal	-	4	5	4	4	-	-	-
6-*O*-Me-Gal[a]	-	2	-	1	1	1	-	-
Relación molar								
D- : L-[b]	1:0,45	1:0,96	1:0,47	1:0,64	1:0,59	1:0,56	1:0,25	1:0,05
Gal[b]:SO_3Na	1:1,13	1:0,63	1:0,59	1:0,74	1:1,06	1:1,50	1:1,46	1:1,42
Gal:Gal 6-sulfato	1:0,00	1:0,00	1:0,00	1:0,00	1:0,07	1:0,04	1:0,09	1:0,26

[a] No se determinó la configuración.
[b] Incluye la proporción de galactosa, 3,6-anhidrogalactosa y galactosas metiladas.

También se realizó la reacción de tratamiento alcalino[14] para determinar la presencia de α-galactosa 6-sulfato en las fracciones (Tabla 3.2). Los resultados muestran que no existe α-galactosa 6-sulfato en las primeras fracciones, consistente con la ausencia del mismo en **F-2S**. A partir de **F-2S-0,8**, se observa baja presencia de dicho azúcar sulfatado. Únicamente **F-2S-2** posee cantidades apreciables de esos precursores.

3.3.1.3 Análisis por metilación

Con el fin de poder determinar la estructura de las fracciones obtenidas a partir de **F-2S**, se realizó un estudio de metilación.[15] Los polímeros metilados se hidrolizaron y los monosacáridos se derivatizaron como alditoles peracetilados por hidrólisis reductiva[11] y

como aminoalditoles peracetilados,[12,16] y se analizaron por cromatografía gaseosa (Tabla 3.3).

Los resultados de metilación indican que las estructuras de las fracciones son diferentes entre sí. En las primeras fracciones, además de los galactanos, se observa la presencia de un glucano. Este último estaría compuesto por glucosas unidas en 3 y en 4, las cuales podrían estar sustituidas en 6 por ramificaciones del mismo azúcar. Se sabe que las algas rojas producen un material de reserva denominado glicógeno de florídeas o almidón de florídeas, formado por una cadena lineal de glucosas enlazadas por C-4 y ramificadas en C-6.[17] Sin embargo, en el almidón de florídeas del alga roja *Dilsea edulis* se encontró evidencia de uniones tipo 1→3 además de las 1→4.[18] En función de estos resultados, es razonable pensar que la glucosa presente en las fracciones proviene principalmente de un almidón de florídeas producido por *H. musciformis*, que presenta algunas uniones 1→3.

La xilosa también aparece en la mayoría de las fracciones. La Tabla 3.3 muestra que dicho azúcar es mayoritariamente terminal, aunque se observan pequeñas cantidades de xilosa dimetilada. Esto podría deberse a submetilación ya que la xilosa suele encontrarse como sustituyente de la cadena principal en los galactanos de algas rojas,[17] aunque no puede descartarse la presencia de ramificaciones dobles o múltiples.

El análisis por metilación de las unidades de galactosa (Tabla 3.3) muestra que estos azúcares se encuentran principalmente dimetilados, si bien en las primeras fracciones se observa una importante proporción de galactosas trimetiladas y terminales. En la mayoría de los casos, las galactosas no se encuentran metiladas en O-3 u O-4. Esto es lo esperado ya que la cadena lineal de los galactanos de algas rojas (ya sea agaranos, carragenanos o híbridos DL) generalmente está formada por β-galactosas enlazadas en C-3 a α-galactosas enlazadas en C-4 (Capítulo 1). Por lo tanto, en las distintas fracciones debería haber igual proporción de unidades enlazadas en 3 y en 4. En algunos casos, como en la 2,6-di-*O*-metilgalactosa no se puede determinar si proviene de la β-galactosa unida por C-3 y sustituida en C-4 o de la α-galactosa enlazada por C-4 y sustituida en C-3. Para los agaranos, esto se puede saber fácilmente determinando la configuración del azúcar metilado: la 2,6-di-*O*-metil-L-galactosa sólo puede estar enlazada por C-4 mientras que su enantiómero estará enlazado por C-3. Sin embargo en los híbridos DL, así como en los carragenanos, la 2,6-di-*O*-D-metilgalactosa podría provenir de la β-galactosa sustituida en C-4 o de la α-galactosa sustituida en C-3, sin que pueda determinarse a ciencia cierta cuál de las dos es.

Tabla 3.3 Análisis por metilación de las subfracciones obtenidas de **F-2S** (expresado en moles/100 moles de galactosas).

Azúcar	Unidad	F-2S-						
		0,2	0,4	0,6	0,8	1	1,5	2
2,3,4,6-Glc[a]	Glc_t	4	-	2	-	-	-	-
2,3,6-Glc	→4)-Glc	4	2	-	-	-	-	-
2,4,6-Glc	→3)-Glc	7	12	14	6	4	-	-
2,3-Glc	→4,6)-Glc	1	8	8	8	-	-	-
2,4-Glc	→3,6)-Glc	-	7	-	-	-	-	-
Glc	→2,3,4,6)-Glc	3	4	1	3	1	-	1
2,3,4,6-Gal	Gal_t	10	7	9	5	4	3	-
2,3,4-Gal	→6)-Gal	-	2	3	-	-	-	-
2,3,6-Gal	→4)-Gal	16	13	9	7	4	2	-
2,4,6-Gal	→3)-Gal	20	17	9	10	11	12	4
3,4,6-Gal	→2)-Gal	4	3	6	3	2	2	1
2,3-Gal	→4,6)-Gal	-	2	3	2	2	2	2
2,4-Gal	→3,6)-Gal	3	6	10	12	8	4	1
2,6-D-Gal	→3,4)-Gal + →4,3)-Gal	3	11	8	13	18	29	47
2,6-L-Gal	→4,3)-Gal	19	17	17	19	26	13	-
4,6-D-Gal	→3,2)-Gal	-	2	6	5	5	2	-
2-Gal	→3,4,6)-Gal + →4,3,6)-Gal	1	4	4	4	5	6	5
3-Gal	→4,2,6)-Gal	-	-	-	-	-	2	-
4-Gal	→3,2,6)-Gal	-	-	2	3	3	-	4
6-Gal	→3,4,2)-Gal + →4,3,2)-Gal	12[b]	-	5	6	5	5	1
Gal	→3,2,4,6)-Gal + →4,2,3,6)-Gal	1	-	-	2	2	1	1
3,6-An-2-Gal[c]	→4)-3,6-AnGal	7	12	8	8	5	9	13
3,6-AnGal	→4,2)-3,6-AnGal	4	4	1	1	-	8	21
2,3,4-Xil	Xil_t	8	10	9	7	4	2	1
2,3- + 3,4-Xil	→4)-Xil + →2)-Xil	2	5	5	3	2	-	-
2,4-Xil	→3)-Xil	1	-	-	-	-	-	-
Xil	→2,3,4)-Xil	2	-	-	-	-	-	-

[a] 2,3,4,6-Glc = 2,3,4,6-tetra-*O*-metilglucosa, etc.
[b] Únicamente enantiómero D.
[c] 3,6-An-2-Gal = 3,6-anhidro-2-*O*-metilgalactosa.

La presencia de galactosas naturalmente metiladas genera una complicación en el análisis estructural por metilación. Esta técnica no logra diferenciar las posiciones naturalmente metiladas de aquellas metiladas artificialmente para identificar las posiciones de unión. Por ello se recurre a la técnica de etilación para identificar la sustitución en los azúcares naturalmente metilados.[19] Para la fracción **F-2S-0,4** esta técnica permitió observar que la 3-*O*-metilgalactosa se encontraba en posición terminal. Este resultado fue consistente con datos de literatura que muestran a la 3- y la 4-*O*-metilgalactosa como sustituyentes de la cadena principal.[17] También explica la importante proporción de galactosa terminal presente en las primeras fracciones. Por ello, se ha asumido que en las primeras fracciones la galactosa terminal proviene principalmente de la 3-*O*-metilgalactosa presente en los polisacáridos.

La variación estructural entre las distintas fracciones está dada tanto por la proporción de D- y L-galactosa como por el perfil de sustitución de las mismas. El primer grupo definido en la Sección 3.3.1.2 incluye únicamente a **F-2S-0,2**, que sería un agarano puro con las unidades α- de configuración L- y las β- de configuración D-. En esta fracción, las galactosas enlazadas en C-4 están representadas por la 2,3,6-tri-*O*-metilgalactosa, la 2,6-di-*O*-metil-L-galactosa, la 3,6-anhidro-2-*O*-metilgalactosa y la 3,6-anhidrogalactosa. Esto indica que las α-L-galactosas se encuentran sin sustituir o sustituidas en C-4 y la 3,6-anhidrogalactosa se encuentra mayoritariamente sin sustituir. Las β-D-galactosas están representadas principalmente por la 2,4,6-tri-*O*-metilgalactosa y la 6-*O*-metil-D-galactosa y por pequeñas cantidades de 2,4-di-*O*-metilgalactosa y 2,6-di-*O*-metil-D-galactosa. Por lo tanto, estas unidades se pueden encontrar sin sustituyentes, sustituidas en C-2 y C-4 y, en menor medida, en C-4 o en C-6. Los sustituyentes principales de la fracción son el éster sulfato, la xilosa y posiblemente la 3-*O*-metilgalactosa terminal.

El siguiente grupo es el formado por las fracciones **F-2S-0,4** a **F-2S-1**. Todas estas fracciones están compuestas por híbridos DL ricos en estructuras tipo agarano. En estos galactanos se observa que las unidades α- son principalmente galactosas sin sustituir (2,3,6-tri-*O*-metilgalactosa), galactosas sustituidas en C-3 (2,6-di-*O*-metil-L-galactosa) y 3,6-anhidrogalactosa sin sustituir (3,6-anhidro-2-*O*-metilgalactosa). Las unidades β- están compuestas por galactosas sin sustituir (2,4,6-tri-*O*-metilgalactosa) y galactosas sustituidas en C-6 (2,4-di-*O*-metilgalactosa). La 2,6-di-*O*-metil-D-galactosa puede estar enlazada tanto por C-3 como por C-4. Para que se cumpla una similar proporción entre ambas unidades en las distintas fracciones del grupo, dicho azúcar debe provenir principalmente de unidades β-sustituidas en C-4.

Un análisis más fino muestra que la proporción de galactosas sustituidas aumenta con la fuerza iónica con la que se eluyó la muestra. Esto es consistente con el aumento de los grupos sulfato que pasan de 1 cada 2 galactosas en **F-2S-0,4** a 3 por cada 2 galactosas en **F-2S-1**. El aumento en el grado de sustitución se observa principalmente en las unidades α- ya que disminuye la 2,3,6-tri-*O*-metilgalactosa y aumenta la 2,6-di-*O*-metil-D-galactosa.

El tercer grupo está compuesto por **F-2S-1,5**. Esta fracción es un híbrido DL rico en estructuras tipo carragenano. Las unidades α- se encuentran como α-L-galactosas sustituidas en C-3 o como 3,6-anhidro-D-galactosa, tanto sustituida en C-2 como sin sustituir. Las unidades β-, por otro lado, están compuestas por galactosas sin sustituir (2,4,6-tri-*O*-metilgalactosa) y en menor medida por galactosas sustituidas en C-6 y C-2 (2,4-di-*O*-metilgalactosa y 4,6-di-*O*-metilgalactosa). Estos azúcares metilados sólo representan 18 unidades cada 100 galactosas, mientras que las unidades α- representan 36 unidades por cada 100 galactosas. La 2,6-di-*O*-metil-D-galactosa, la 6-*O*-metilgalactosa y la 2-*O*-metilgalactosa pueden provenir de ambas unidades y representan el 40 % de las galactosas. Por lo tanto, dos tercios de estas metilgalactosas deben corresponder a unidades β- y un tercio a unidades α-. Esto implica que hay unidades enlazadas en C-3 sustituidas en 4, 2,4 ó 4,6 y unidades enlazadas en C-4 sustituidas en 3, 2,3 ó 3,6.

El último grupo corresponde a la fracción **F-2S-2**. De acuerdo a lo observado en la Tabla 3.3, este galactano es un carragenano casi perfecto, consistente con un híbrido κ/ι-. Sin embargo, en la Tabla 3.2 se observa una importante cantidad de α-galactosa 6-sulfato en la fracción, lo cual no se refleja al metilar ya que no se observa presencia de 2,3-di-*O*-metil-galactosa o 3-*O*-metilgalactosa atribuibles a la presencia de precursores. Esto se puede deber al medio alcalino en el que es llevada a cabo la metilación, que podría generar la reacción de tratamiento alcalino.[2] Por lo tanto la fracción tiene una estructura tipo κ/ι-carragenano junto con unidades precursoras, que podrían ser estructuras tipo μ y/o ν-carragenano.

3.3.1.4 Análisis por desulfatación-metilación

Los resultados obtenidos hasta aquí muestran que **F-2S** está compuesto principalmente por agaranos, híbridos DL y carragenanos, los cuales se encuentran sustituidos con xilosa, metilgalactosas y/o grupos sulfato. Dado que este último sustituyente es el más abundante, es importante determinar cuáles son los sitios de sulfatación en las distintas unidades. Para ello

se utilizó la técnica de desulfatación asistida por microondas y posterior metilación descripta por Navarro *et al.*[20]

Ante la escasa cantidad de material, se seleccionaron algunas fracciones para desulfatar: **F-2S-0,6** en representación del segundo grupo y **F-2S-1,5** del tercero. Del primer y del último grupo no se contaba con suficiente masa de las fracciones para realizar este estudio. La Tabla 3.4 muestra el rendimiento y grado de desulfatación de las fracciones estudiadas.

Tabla 3.4 Proporción de sulfato y rendimiento de la reacción de los polisacáridos desulfatados.

	F-2S-			
	0,6	**0,6d**	**1,5**	**1,5d**
SO_3Na (%)	8,3	2,9	31,4	6,0
Diferencia	5,4 (-65 %)		25,4 (-81 %)	
Rendimiento (%)	54		74	

Como se observa, la desulfatación fue satisfactoria. Los rendimientos fueron de aceptables a muy buenos (54-74 %) dependiendo de la muestra. Las fracciones desulfatadas fueron metiladas. Los resultados se muestran en la Tabla 3.5.

Al desulfatar **F-2S-0,6** se observó un aumento en la proporción de galactosas trimetiladas (2,3,6- y 2,4,6-tri-*O*-metilgalactosa) y una pequeña disminución en los distintos azúcares mono y dimetilados. De acuerdo a estos resultados, la sustitución en C-3 de la α-L-galactosa no corresponde a sulfato ya que la proporción de la 2,6-di-*O*-metil-L-galactosa no varió. Los azúcares metilados que sí disminuyeron luego de desulfatar fueron la 2,6-di-*O*-metil-D-galactosa, la 2,4-di-*O*-metil-galactosa, la 2,3-di-*O*-metil-galactosa y la 6-*O*-metilgalactosa. Esto indicaría que hay sulfatos en las posiciones C-6, C-4 y en C-2 y C-4 de la β-galactosa, mientras que en las unidades α- están en las posiciones C-6, C-3 (de unidades D-) y en C-2 y C-3. Es importante destacar que si bien no se detectó α-galactosa 6-sulfato por tratamiento alcalino, sí se observó una pequeña proporción al metilar y desulfatar.

La desulfatación de **F-2S-1,5** mostró que los grupos sulfato se encuentran principalmente en la unidad β-, dado que la 2,4,6-tri-*O*-metilgalactosa pasó de 12 a 40 unidades cada 100 galactosas. Esto es consistente con la disminución de la 2,6-di-*O*-metil-D-galactosa, la 4,6-di-*O*-metil-D-galactosa y la 6-*O*-D-metilgalactosa. Por lo tanto, las unidades de β-galactosa poseen sulfato principalmente en C-4 y en menor proporción en C-2 o están

disulfatadas en C-2 y C-4. También se observa una disminución de la 2-*O*-metilgalactosa y un aumento de la 2,4-di-*O*-metilgalactosa por lo que habría unidades β- sulfatadas en C-4 y sustituidas en C-6, probablemente con la xilosa. Las unidades α-, por otro lado, poseen grupos sulfato en el C-2 de la 3,6-anhidrogalactosa y en el C-3 de la galactosa, ya que disminuyó la 2,6-di-*O*-metil-L-galactosa y aumentó la 2,3,6-tri-*O*-metilgalactosa.

Tabla 3.5 Análisis por metilación de las subfracciones **F-2S-0,6** y **F-2S-1,5** y de sus productos desulfatados (expresados en moles/100 moles de galactosas).

Azúcar	**Unidad**	**F-2S-**			
		0,6	**0,6d**	**1,5**	**1,5d**
2,3,4,6-Glc[a]	Glc_t	2	-	-	-
2,4,6-Glc	→3)-Glc	14	12	-	-
2,3-Glc	→4,6)-Glc	8	7	-	-
Glc	→2,3,4,6)-Glc	1	6	-	-
2,3,4,6-Gal	Gal_t	9	11	3	5
2,3,4-Gal	→6)-Gal	3	-	-	-
2,3,6-Gal	→4)-Gal	9	17	2	15
2,4,6-Gal	→3)-Gal	9	20	12	40
3,4,6-Gal	→2)-Gal	6	6	2	-
2,3-Gal	→4,6)-Gal	3	-	2	-
2,4-Gal	→3,6)-Gal	10	7	4	10
2,6-D-Gal	→3,4)-Gal + →4,3)-Gal	8	4	29	6
2,6-L-Gal	→4,3)-Gal	17	16	13	4
4,6-D-Gal	→3,2)-Gal	6	3	2	-
2-Gal	→3,4,6)-Gal + →4,3,6)-Gal	4	3	6	4
3-Gal	→4,2,6)-Gal	-	-	2	-
4-Gal	→3,2,6)-Gal	2	1	-	-
6-Gal	→3,4,2)-Gal + →4,3,2)-Gal	5	-	5	-
Gal	→3,2,4,6)-Gal + →4,2,3,6)-Gal	-	1	1	-
3,6-An-2-Gal[b]	→4)-3,6-AnGal	8	9	9	15
3,6-AnGal	→4,2)-3,6-AnGal	1	2	8	-
2,3,4-Xil	Xil_t	9	10	2	-
2,3- + 3,4-Xil	→4)-Xil + →2)-Xil	5	7	-	2

[a] 2,3,4,6-Glc= 2,3,4,6-tetra-*O*-metilglucosa, etc.
[b] 3,6-An-2-Gal = 3,6-anhidro-2-*O*-metilgalactosa.

3.3.1.5 Análisis por espectroscopía de resonancia magnética nuclear

Los estudios por espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN) de galactanos de algas rojas han aportado información valiosa para su determinación estructural.[17] En este trabajo se realizaron espectros de RMN-^{1}H y espectros de correlación ^{13}C-^{1}H (HSQC) a las distintas muestras. Los espectros de RMN-^{13}C requieren más masa por lo que sólo fue posible realizarlos para la fracción mayoritaria **F-2S-0,6** (Fig. 3.4 a). El análisis de este espectro no aportó resultados nuevos con respecto a aquellos obtenidos por el espectro HSQC de la muestra. Los espectros de RMN-^{1}H (Fig. 3.4 b) dieron señales muy anchas y difusas, haciendo complicada la obtención de información estructural a partir de los mismos. Por esta razón, estos espectros sólo se utilizaron en algunos casos como complemento de la información aportada por los espectros HSQC.

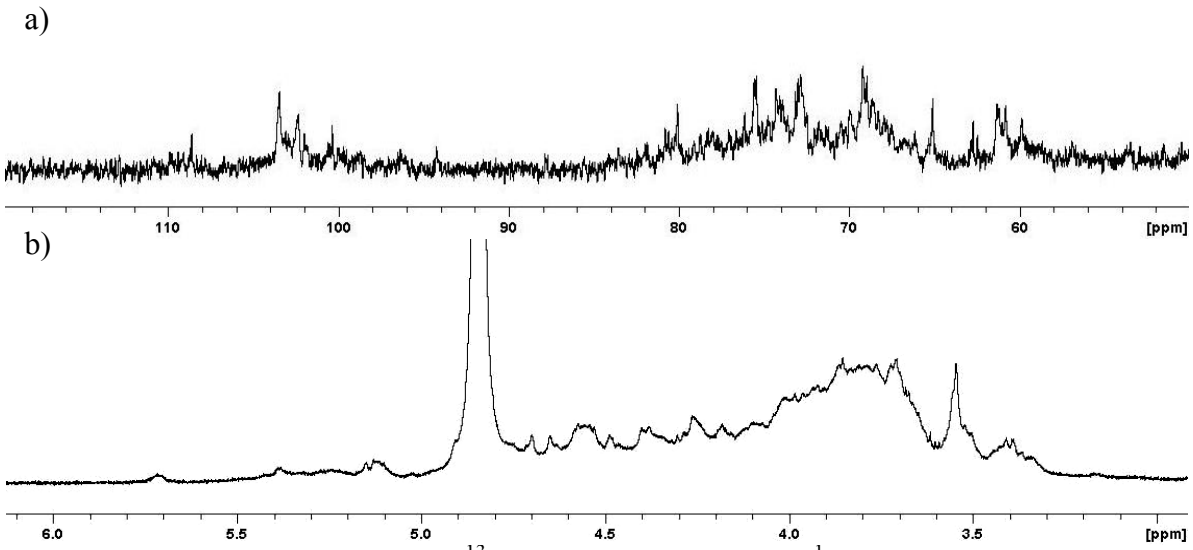


Figura 3.4 Espectros de a) RMN-^{13}C (125 MHz) y b) RMN-^{1}H (500 MHz) de **F-2S-0,6** en D_2O a temperatura ambiente.

En la Figura 3.5 se observa el espectro HSQC completo para la fracción **F-2S-0,6**. En este caso se puede observar que a diferencia de los carragenanos estudiados en el Capítulo 2, la asignación completa del espectro no es tan sencilla. Es por ello que se decidió centrar el análisis en la región anomérica que resulta más fácil de estudiar debido al menor número de señales superpuestas.

En el espectro HSQC de un galactano se pueden observar dos grupos de señales anoméricas. Aquellas correspondientes a las unidades α- se observan en la región comprendida entre 90 y 102 ppm en F2 (^{13}C) y entre 5 y 5,6 ppm en F1 (^{1}H) mientras que las correspondientes a las unidades β- aparecen entre 102,5 y 104,3 ppm en F2 y entre 4,45 y 4,7 ppm en F1.

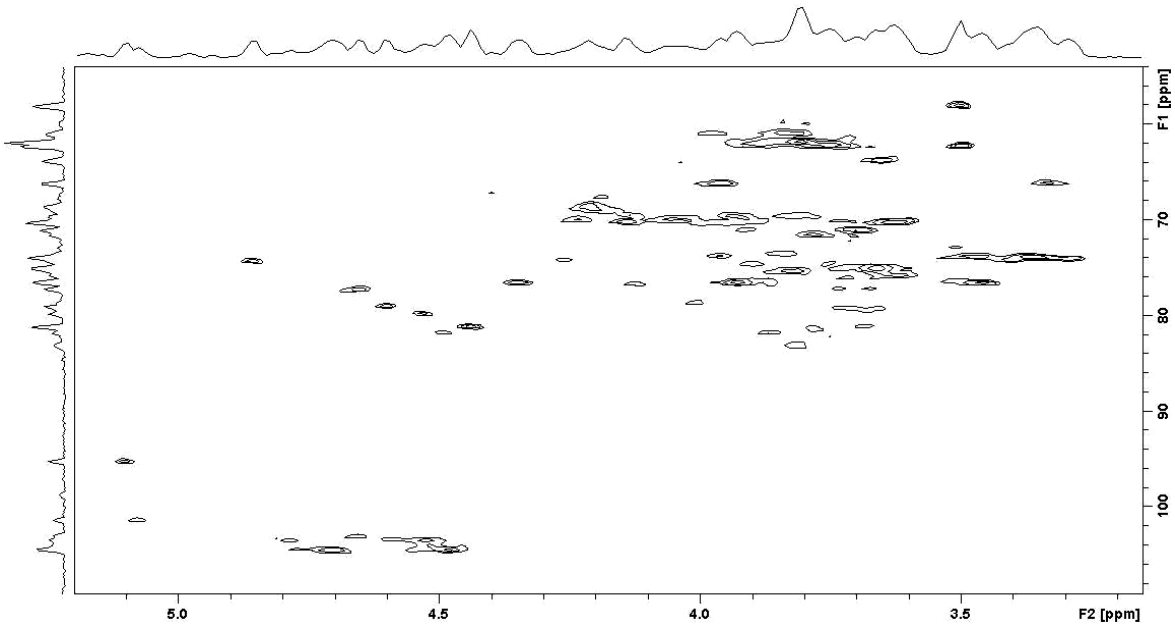


Figura 3.5 Espectro HSQC de **F-2S-0,6** en D_2O a temperatura ambiente.

Las Figuras 3.6 a 3.10 muestran las ampliaciones de la región anomérica de los espectros HSQC (en D_2O a temperatura ambiente) de las fracciones obtenidas de **F-2S.** Los espectros HSQC obtenidos para las fracciones **F-2S-0,8** y **F-2S-1** poseen una baja relación señal-ruido dificultando la correcta asignación de las señales y por ello no se analizaron.

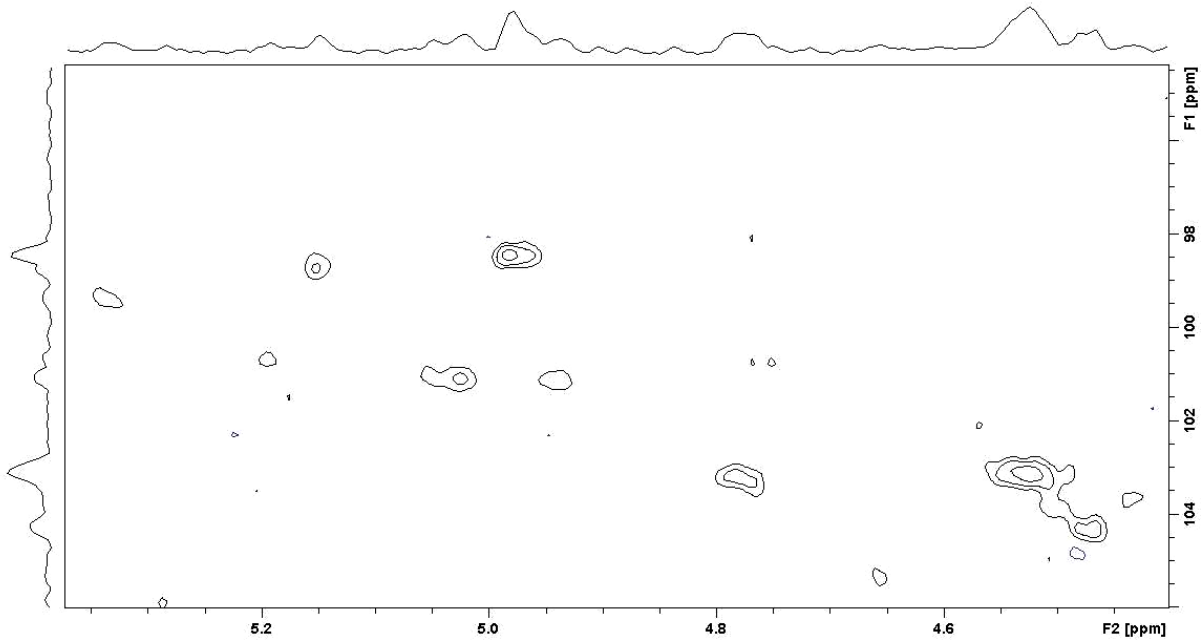


Figura 3.6 Ampliación de la región anomérica del espectro HSQC de **F-2S-0,2.**

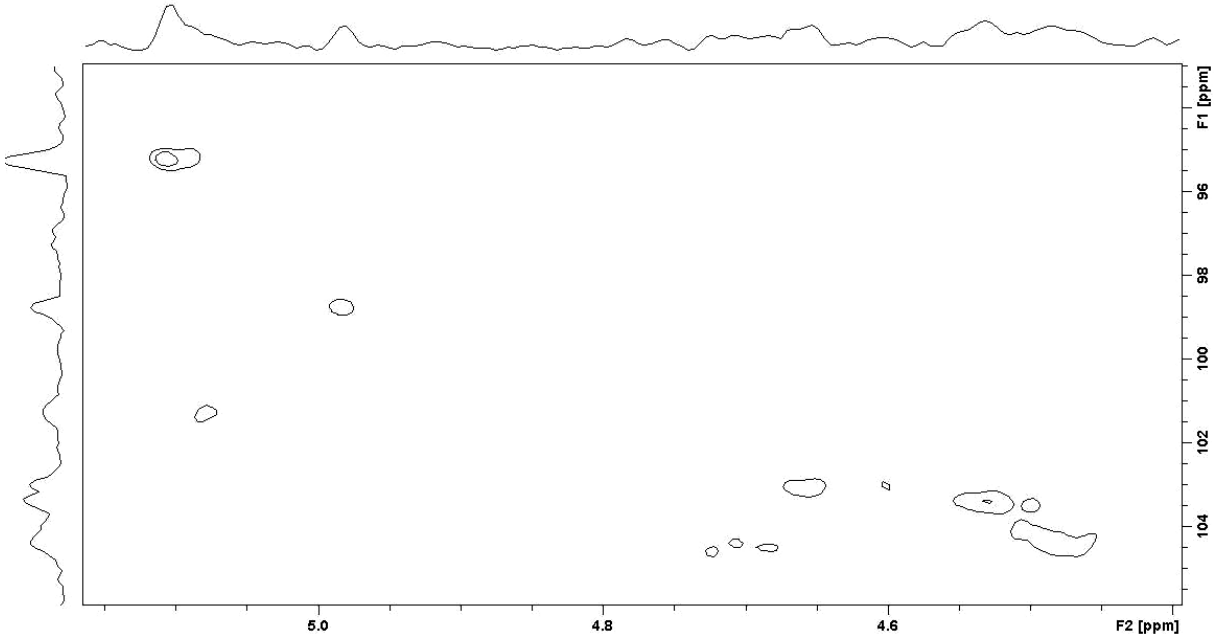


Figura 3.7 Ampliación de la región anomérica del espectro HSQC de **F-2S-0,4.**

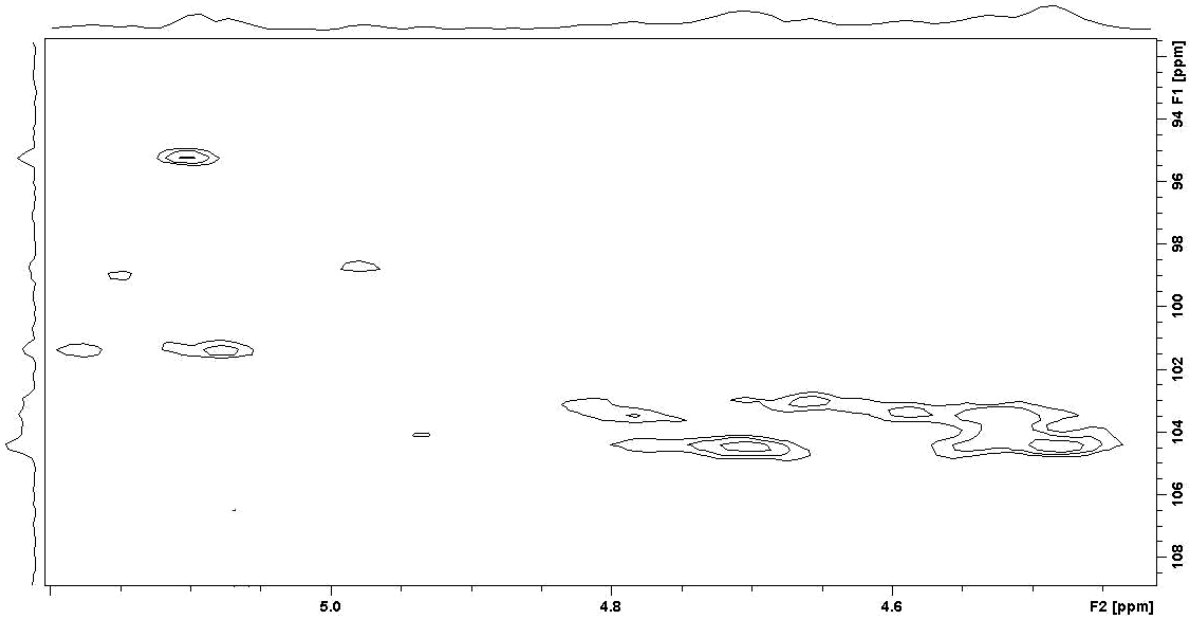


Figura 3.8 Ampliación de la región anomérica del espectro HSQC de **F-2S-0,6.**

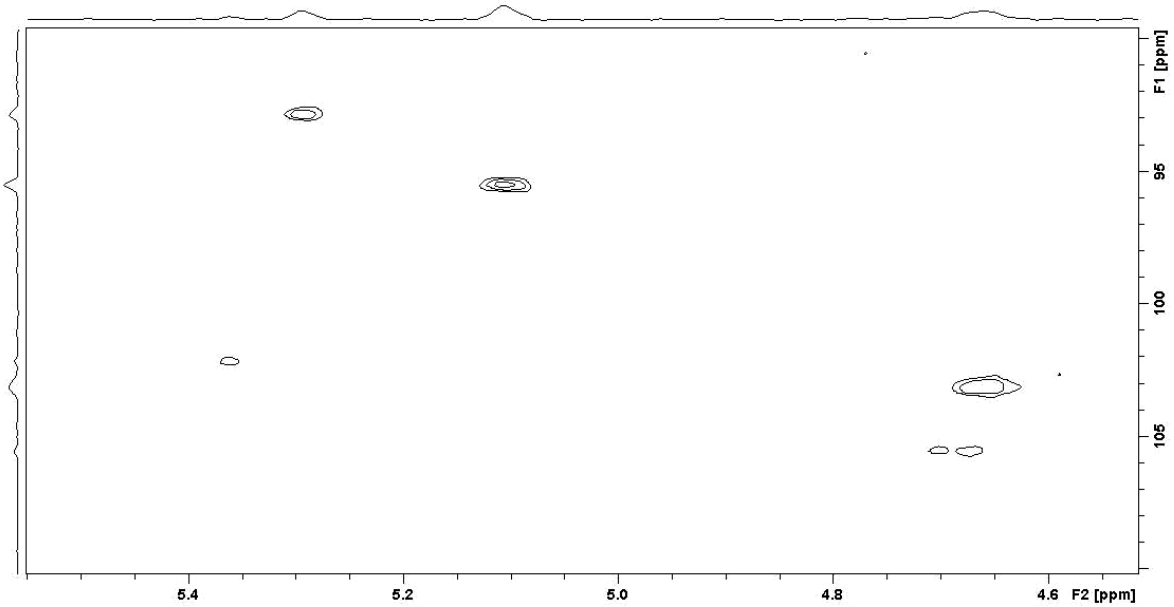


Figura 3.9 Ampliación de la región anomérica del espectro HSQC de **F-2S-1,5.**

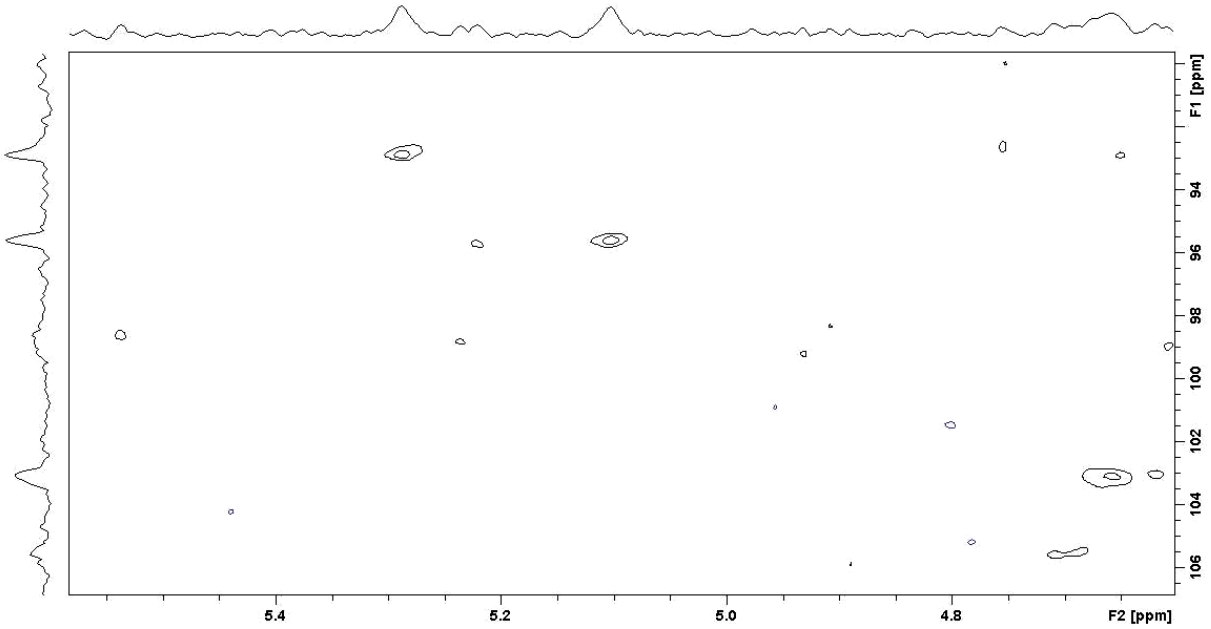


Figura 3.10 Ampliación de la región anomérica del espectro HSQC de **F-2S-2.**

Para la asignación se tuvo en cuenta lo descripto en la bibliografía. La Tabla 3.6 muestra una compilación de los datos bibliográficos conocidos. Estos se combinaron con la información estructural obtenida al metilar y desulfatar.

En los espectros de RMN de las fracciones **F-2S-0,2** a **F-2S-0,6** se observa una señal a 104,4 ppm y 4,48 ppm que se puede asignar a la β-D-xilosa según lo determinado por Usov *et al.*[21] para los xilogalactanos de *Corallina pilulifera* y por Navarro y Stortz[22] para aquellos provenintes de *Jania rubens*.

Tabla 3.6 Compilación bibliográfica de los desplazamientos químicos (en ppm) de los átomos de C y H anoméricos en los espectros de RMN de las unidades habitualmente halladas en galactanos de algas rojas.

Unidad[a]	**unido a**	**δ ^{13}C**	**δ ^{1}H**	**Ref.**
Agaranos				
G o G6R [b,c]	L	104,3	4,43	21, 22
G4S o G4Y[b, d]	L, L2M	103,9	-	9
G2S[e]	L	103,5	-	23
G o G6R [b]	LA	102,7	4,43	24
L o L3M [b]	G o G6Y[d]	101,6	5,28	24
L6S[f]	G	101,7	-	24
L3Y[b, d]	G o G6M	101,3	5,07	22
L3S[g]	G o G6M	101,1	-	25
L2S [b]	G	99,5	5,54	21, 22
LA o LA2M [b]	G	98,9	5,14	22
Carragenano				
G4S[h]	D2,6S o D6S	105,3	-	26
G2S[h]	D2,6S	103,4	-	26
G4S[h]	DA	102,9	-	26
G[e]	DA o DA2S	102,7	-	27
D2,6S[h]	G4S	98,8	5,51	26
D6S[h]	G4S	98,2	5,24	26
DA[h]	G4S	95,7	5,10	26
DA2S[h]	G4S	92,6	5,30	26
Otros				
α-Glc (Alm. florídeas)[b]	α-Glc	99,4	5,41	21, 22
β-Xil$_t$[b]	G	104,3	4,49	21, 22

[a] Según nomenclatura propuesta por Knutsen *et al.*[28]
[b] Espectros realizados a temperatura ambiente. Referencia: Acetona δ= 31,1 ppm / 2,22 ppm.
[c] R representa un sustituyente cualquiera: metilo, sulfato, xilosa o residuo glicosídico.
[d] Y representa un residuo glicosídico.
[e] Espectros realizados a temperatura ambiente. Referencia: DMSO δ= 39,6 ppm.
[f] Espectros realizados a 90 °C. Referencia: DMSO δ= 39,4 ppm.
[g] Espectros realizados a 80 °C. Referencia: DMSO δ= 39,6 ppm.
[h] Espectros realizados a 70 °C. Referencia: Acetona δ= 30,4 ppm / 2,20ppm.

Por otro lado, en las fracciones **F2S-0,2** y **F2S-0,4** se destaca la señal a 99,6 ppm en ^{13}C y a 5,35 ppm en ^{1}H correspondiente al almidón de florídeas (Tabla 3.6).[21,22] En el análisis por

metilación se había observado no sólo glucosa unida 1→4 sino también unida 1→3. Estas últimas no son muy comunes en polisacáridos. Sin embargo, los desplazamientos químicos del C-1 y H-1 de glucosa en el extremo no reductor de la nigerosa (3-*O*-α-D-glucopiranosil-D-glucosa) y de la maltosa (4-*O*-α-D-glucopiranosil-D-glucosa) son muy similares (100,1 ppm / 5,35 ppm y 100,8 ppm / 5,38 ppm, respectivamente).[29] Por lo tanto, la señal ancha de 99,6 ppm / 5,35 ppm en el espectro HSQC podría corresponder a la asignación de la α-glucosa unida tanto en C-4 como en C-3.

La ampliación de la región anomérica del espectro HSQC de **F-2S-0,2** (Fig. 3.6) mostró dos señales a 103,4 ppm con distinto corrimiento en el desplazamiento del H. Se podrían asignar al C-1 de dos unidades de β-D-galactosa 2-sulfato con distinto entorno químico.[23] Sin embargo, el análisis por metilación no presenta unidades β- sustituidas únicamente en C-2, sino sustituidas en C-2 y C-4, por lo que estas señales podrían corresponder a unidades de β-galactosa disustituidas en dichas posiciones. Asimismo, según lo discutido en la Sección 3.3.1.3, **F-2S-0,2** posee una importante proporción de β-D-galactosa sin sustituir. La señal correspondiente al C-1 de este residuo debería aparecer aproximadamente a 104,3 ppm / 4,43 ppm según lo asignado en la Tabla 3.6, coincidente con la señal ya observada para la xilosa como sustituyente.[21,22] Ambos picos podrían estar superpuestos.

Las señales correspondientes a los carbonos anoméricos de las unidades α- que se encuentran en 98-99 ppm corresponden a las unidades de 3,6-anhidro-α-L-galactosa presentes en distintos entornos químicos.[22] La señal a 101,3 ppm en ^{13}C y 5,04 ppm en ^{1}H se puede asignar a C-1/H-1 de la α-L-galactosa sustituida con un residuo glicosídico en C-3 (Tabla 3.6).[22] Esta señal es consistente con la 2,6-di-*O*-metil-L-galactosa hallada al metilar. Por último se observa una señal a 101,4 ppm y 4,95 ppm que no pudo ser asignada.

Del segundo grupo definido en la Sección 3.3.1.2, sólo se pudieron analizar las ampliaciones de la región anomérica de los espectros HSQC de las fracciones **F-2S-0,4** y **F-2S-0,6** (Figs. 3.7 y 3.8), las cuales resultaron similares entre sí. Las señales en la región de los anómeros β- incluyen a la β-xilosa, así como señales las señales a 103,4 ppm que pueden corresponder a la β-D-galactosa sustituida en C-2 ó en C-2 y C-4, según lo discutido en el párrafo anterior. La presencia de la 4,6-di-*O*-metilgalactosa y la 6-*O*-metilgalactosa, principalmente al metilar **F-2S-0,6**, parecen confirmar este hecho. El análisis de desulfatación y metilación de **F-2S-0,6** confirmó la presencia de sulfato en las posiciones 2 y 4. También se observa un grupo de señales a 104,4 ppm que corresponden a los C-1 de la β-D-galactosa y

sus derivados sustituidos en C-6 cuando están unidos a α-L-galactosa. La presencia de estas señales es consistente con la alta proporción de 2,4,6-tri-*O*-metilgalactosa y 2,4-di-*O*-metilgalactosa en la metilación. Por otro lado las señales que aparecen entre 102,7 y 102,9 ppm en ^{13}C pueden corresponder tanto al carbono anomérico de las unidades de β-D-galactosa y sus derivados sustituidos en C-6 cuando están unidos a 3,6-anhidro-α-L-galactosa[22] como a β-D-galactosa 4-sulfato cuando está unida a 3,6-anhidro-α-D-galactosa[26] (Tabla 3.6). Según el análisis de metilación, es de esperar que estas fracciones del grupo sean ricas en β-D-galactosa y sus derivados sustituidos en C-6.

Las señales atribuibles a los anómeros α- corresponden a la 3,6-anhidro-α-L-galactosa, tanto unida a β-D-galactosa como a la 6-*O*-metil-β-D-galactosa, y a la α-L-galactosa sustituida con un residuo glicosídico en C-3. Por otro lado, también fue posible hallar las señales anoméricas de la α-L-galactosa (101,3 ppm / 5,30 ppm), la α-L-galactosa 3-sulfato (101,3 ppm / 5,18 ppm) y la 3,6-anhidro-α-D-galactosa (95,2 ppm / 5,15 ppm), las cuales fueron asignadas según los datos expuestos en la Tabla 3.6.[21,22,25,26] La presencia de α-L-galactosa sustituida en C-3 es consistente con la alta proporción de 2,6-di-*O*-metil-L-galactosa obtenida al metilar estas fracciones. Por otro lado, es llamativo que la única señal correspondiente a un azúcar α- con configuración D- es la asignada al C-1 de la 3,6-anhidro-α-D-galactosa.

En el espectro de HSQC de **F-2S-1,5** se observan principalmente señales asociadas a carragenanos. En la región anomérica β- (Fig. 3.9) se observan las señales de la β-D-galactosa 4-sulfato tanto unida a una 3,6-anhidro-α-D-galactosa[26] (102,9 ppm / 4,65 ppm) como unida a α-D-galactosa 6-sulfato[26] con entornos distintos (105,4 ppm / 4,67 ppm y 105,3 ppm / 4,69 ppm). Estas señales son consistentes con la alta proporción de 2,6-di-*O*-metil-D-galactosa observada al metilar. Al aumentar el nivel de corte del espectro se observan señales menos intensas a 104,4 ppm correspondientes a β-D-galactosa y sus derivados sustituidos en C-6 cuando están unidos a una a α-L-galactosa, lo que explicaría las demás unidades β- observadas al metilar. La región anomérica α- presentó fundamentalmente las señales correspondientes a la 3,6-anhidro-α-D-galactosa sulfatada en C-2 y sin sulfatar. Un análisis de la región de los anómeros α- del espectro RMN-^{1}H de la fracción (Fig. 3.11) muestra, además de las señales de H-1 observadas en el espectro HSQC, otras señales de menor intensidad. En la Figura 3.11 se observa una señal ancha a 5,15 ppm por lo que la señal correspondiente al H-1 de la α-L-galactosa 3-sulfato (asignada a 5,18 ppm en el

espectro de HSQC de **F-2S-0,6**) podría estar solapada con la del H-1 de la 3,6-anhidrogalactosa. Esto mismo ocurre con la señal de 5,32 ppm lo que podría implicar un solapamiento entre la señal correspondiente al H-1 de la α-L-galactosa (5,28 ppm[22]) y al H-1 de la 3,6-anhidro-D-galactosa 2-sulfato (5,30 ppm[26]). También se observa una señal minoritaria y ancha por encima de las 5,5 ppm que podría corresponder a α-D-galactosa 2,6-disulfato (Tabla 3.6).[26]

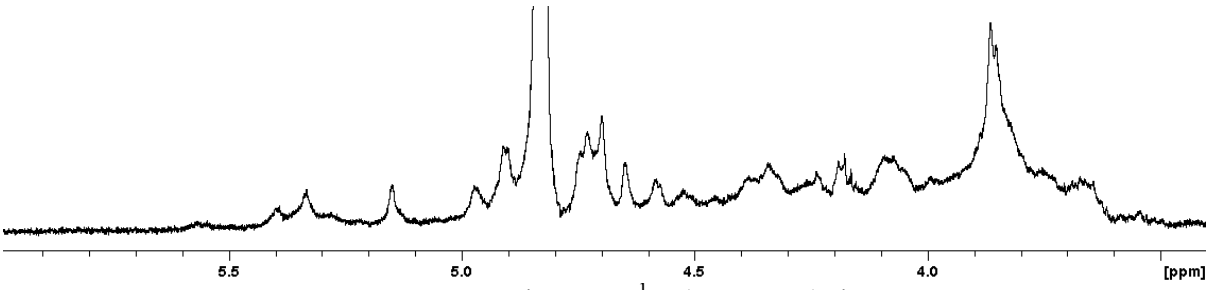


Figura 3.11 Espectro de RMN-^{1}H (500 MHz) de **F-2S-1,5**.

Finalmente, el espectro HSQC de **F-2S-2** (Fig. 3.10) es consistente con un carragenano κ/ι/ν- ya que se observan las señales correspondientes a la β-D-galactosa 4-sulfato, a la 3,6-anhidro-α-D-galactosa y a la 3,6-anhidro-α-D-galactosa 2-sulfato. Se destaca que si bien se observa la señal para la β-D-galactosa 4-sulfato unida a una α-D-galactosa sulfatada en C-6 (105,4 ppm/ 4,70 ppm), no se observan señales de las correspondientes unidades α-. Sin embargo, la señal de la α-D-galactosa 2,6-disulfato (5,56 ppm) se puede apreciar en el espectro RMN-^{1}H de la fracción (Fig. 3.12).

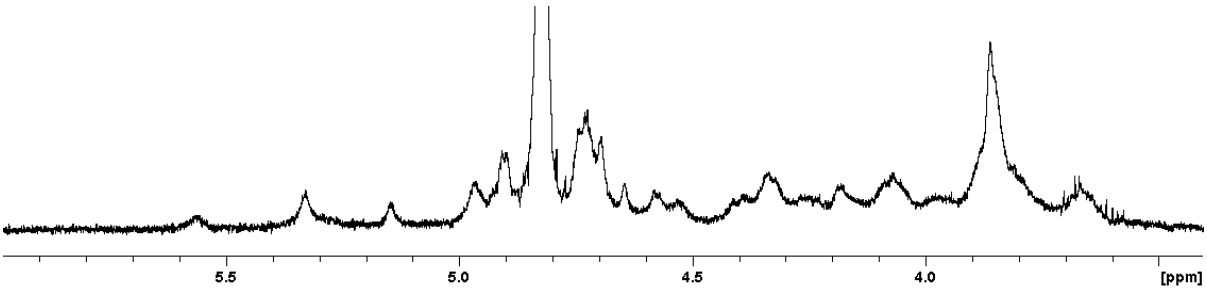


Figura 3.12 Espectro de RMN-^{1}H (500 MHz) de **F-2S-2**.

3.3.2 Fraccionamiento y estructura de los polisacáridos que componen C-2S

3.3.2.1 Fraccionamiento de C-2S

La obtención de **C-2S** por fraccionamiento de los polisacáridos aislados del extracto en caliente (**C**), su estudio y caracterización fueron descriptos en el Capítulo 2. **C-2S** fue fraccionada por cromatografía de intercambio aniónico utilizando una mezcla de DEAE-Sephadex A-50 y Sephadex G-100 como fase estacionaria. Se utilizó esta fracción

para buscar la proporción óptima de la mezcla de geles para la fase estacionaria. Se realizó una serie de cromatografías de intercambio aniónico a escala analítica sobre **C-2S**, variando la proporción de los geles y eluyendo con concentraciones crecientes de NaCl (Fig. 3.13).

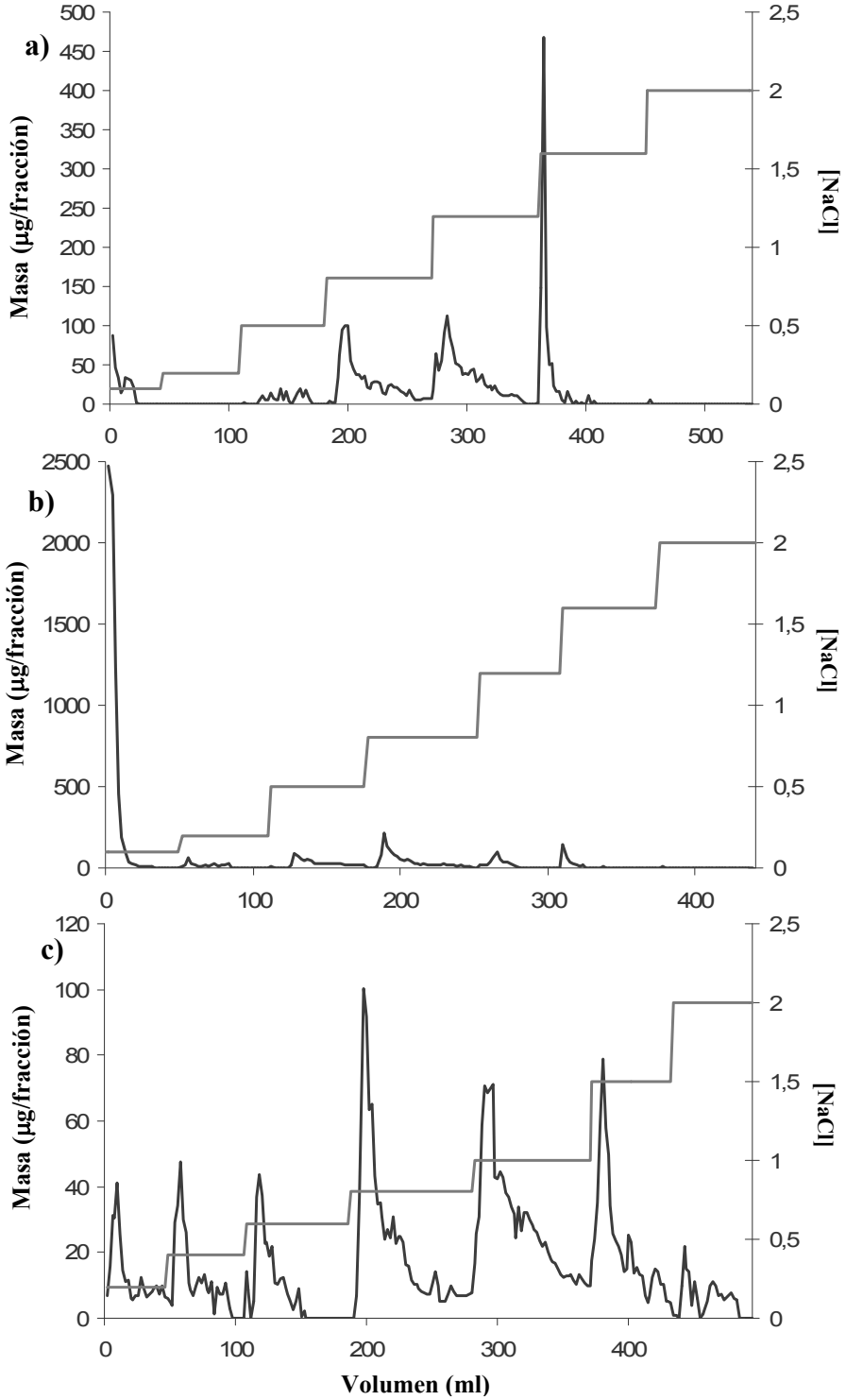


Figura 3.13 Cromatografía de intercambio iónico analítica de **C-2S** sobre una mezcla de DEAE-Sephadex A-50 y Sephadex G-100 con relación en masa de a) 2:1, b) 1:2 y c) 1,2:1.

De las tres proporciones de DEAE-Sephadex A-50 y Sephadex G-100 utilizadas (2:1, 1:2 y 1,2:1) sólo la última de ellas fue eficiente para fraccionar los polisacáridos presentes en **C-2S** (Fig. 3.13). En estas condiciones, la muestra eluyó principalmente a concentraciones intermedias, entre 0,6 y 1,5M de NaCl, y dejó de eluir en la concentración de 2M de NaCl. A su vez, para cada fuerza iónica sólo se observa un pico al igual que sucedió durante el fraccionamiento de **F-2S**. El rendimiento final estimado fue superior al 50 % (determinado colorimétricamente por cuantificación de azúcares totales).

A partir de estos resultados, se realizó una columna preparativa cuyo perfil cromatográfico se observa en la Figura 3.14. En él nuevamente se destaca que las fracciones mayoritarias se encuentran entre 0,6M y 1,5M, siendo la más importante aquella que eluyó con una solución 0,8M de NaCl. Siempre se aisló una sola fracción a cada concentración.

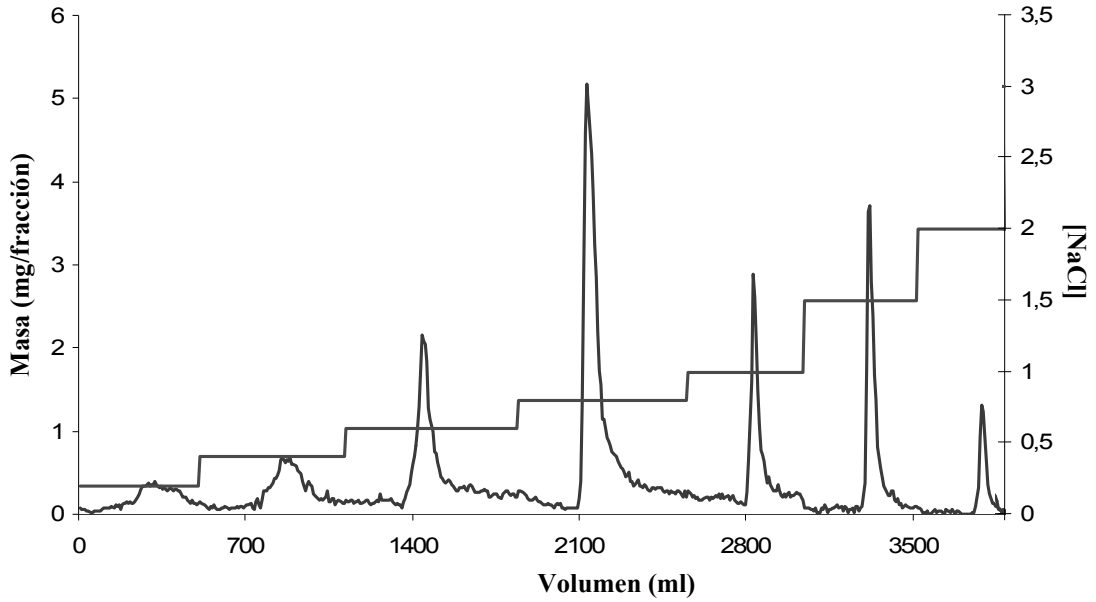


Figura 3.14 Cromatografía de intercambio iónico preparativa sobre una mezcla de DEAE-Sephadex A-50 y Sephadex G-100 (relación 1,2:1) de **C-2S.**

En total se eluyeron siete fracciones: **C-2S-0,2**; **C-2S-0,4**; **C-2S-0,6**; **C-2S-0,8**; **C-2S-1**; **C-2S-1,5** y **C-2S-2**. La nomenclatura se designó siguiendo lo detallado en la Sección 3.3.1.1. El rendimiento final total determinado por pesada fue del 49,8 %.

3.3.2.2 Composición de las subfracciones de C-2S

De manera análoga a lo realizado en la Sección 3.3.1.2, se caracterizaron las fracciones cuantificando la proporción total de hidratos de carbono, proteínas y sulfato, así como el peso molecular. En la Tabla 3.7 se muestran los valores obtenidos junto con los rendimientos de las fracciones. Como se puede observar, los rendimientos obtenidos gravimétricamente

coinciden con los determinados por el ensayo colorimétrico de fenol-ácido sulfúrico al construir el perfil cromatográfico. Las dos fracciones más abundantes resultaron ser aquellas que eluyeron a concentraciones de 0,6M y 0,8M.

Tabla 3.7 Composición de las subfracciones obtenidas a partir de **C-2S**.

	C-2S	**C-2S-**						
		0,2	**0,4**	**0,6**	**0,8**	**1**	**1,5**	**2**
Rendimiento (g/100g **C-2S**)		1,7	5,5	10,6	18,3	5,8	6,1	1,7
Azúcares totales (%)[a]	52,2	38,5	35,0	48,8	31,2	28,3	42,9	34,2
Sulfato (%SO_3Na)	13,3	6,7	2,7	5,9	9,1	11,3	23,4	42,5
Proteínas (%)	13,9	16,1	21,6	14,0	<2	<2	<2	ND[b]
PM (kDa)[c]	A[d]	6[e]	16	68	225	230	272	315

[a] Se usó galactosa como estándar.
[b] ND= no determinado
[c] Medido por GPC considerando el máximo del pico.
[d] A = Pico muy ancho con más de un máximo
[e] Hay un segundo pico de muy bajo peso molecular.

El porcentaje de hidratos de carbono de las fracciones oscila entre el 28 % y el 49 %, siendo **C-2S-0,6** y **C-2S-1,5** aquellas con mayor proporción. Se observa que la proporción de grupos sulfato aumenta al incrementar la fuerza iónica con la que se eluyó la fracción. La excepción a esta secuencia es la fracción **C-2S-0,2**, la cual posee un porcentaje de sulfato incluso mayor que el de la fracción que eluye a 0,6M. Este mismo hecho ya había sido observado por Stortz *et al.*[3] Las proteínas se encuentran presentes en las primeras fracciones y a partir de **C-2S-0,8** su proporción es casi nula.

El peso molecular de las fracciones (Tabla 3.7, Fig. 3.15) aumenta al incrementarse la concentración del solvente de elución. La fracción **C-2S-0,2** posee un peso molecular menor a los 10 kDa, **C-2S-0,4** y **C-2S-0,6** están en el rango entre los 10 y los 100 kDa, mientras que las restantes fracciones de la columna superan los 200 kDa. Esto estaría indicando que, en promedio, las fracciones provenientes de **C-2S** poseen un peso molecular superior a aquellas obtenidas de **F-2S**.

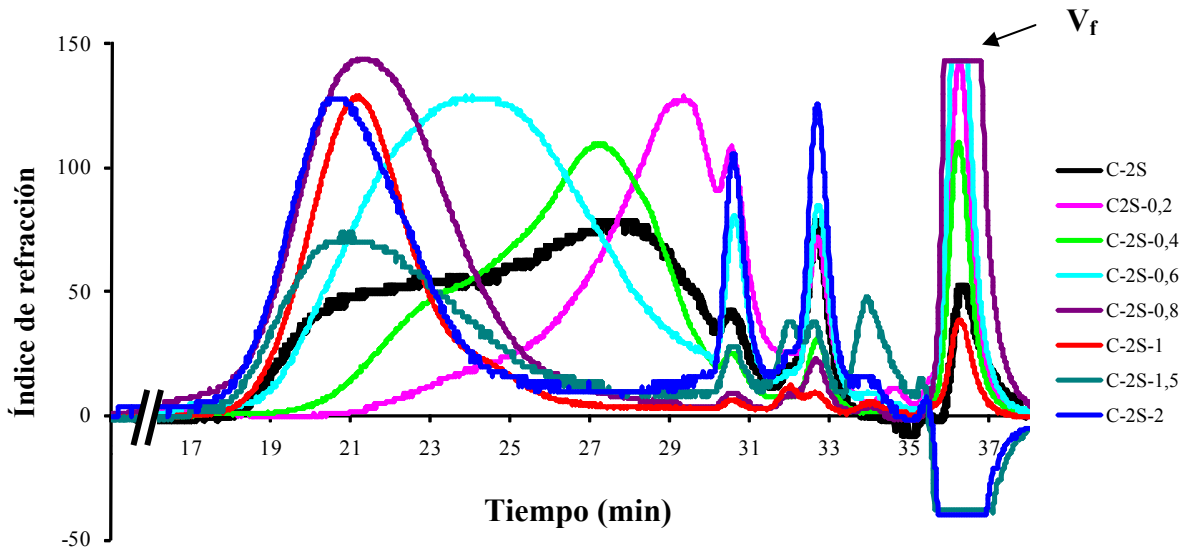


Figura 3.15 Perfiles cromatográficos de **C-2S** y de sus productos de subfraccionamiento realizados por GPC.

La determinación de azúcares componentes se realizó de igual manera que en la Sección 3.3.1.2. Se generaron los alditoles por hidrólisis reductiva[11] y los 1-amino-1-desoxialditoles por aminación reductiva con aminas quirales.[12,13] A partir de estos datos se obtuvo la Tabla 3.8.

La composición de azúcares demuestra que las fracciones son bastante diferentes entre sí. Se destaca que la proporción de L-galactosa disminuye con la fuerza iónica del solvente de elución, a excepción de **C-2S-1,5** que presenta una proporción mayor a la de todas las demás fracciones.

De manera análoga a lo realizado con las fracciones provenientes de **F-2S**, se pueden agrupar a las fracciones de la Tabla 3.8 según la relación de D- y L-galactosa total. El primer grupo está compuesto exclusivamente por **C-2S-0,2**, el cual posee una relación cercana a 1 de ambos enantiómeros, por lo que sería un agarano casi puro. Además posee una abundante proporción de glucosa, la cual se encuentra en mayor proporción que la galactosa total. Esto podría implicar la presencia de almidón de florídeas, tal como se observó en su análoga del extracto en frío.

El segundo grupo incluye a las fracciones **C-2S-0,4** y **C-2S-0,6,** las cuales poseen una importante proporción de glucosa y galactosa. Ambas cuentan con una muy baja proporción de grupos sulfato, y poseen una apreciable cantidad de xilosa y metilgalactosas. La relación D- a L-galactosa es consistente con la de un híbrido DL con un exceso de estructuras tipo agarano. También se observa una baja proporción de un compuesto incógnita (denominado X). Este compuesto fue detectado por primera vez al generar los alditoles peracetilados de **C-**

2S (ver Capítulo 2). Su tiempo de retención en la corrida cromatográfica y su espectro de masa no se corresponde con ninguno de los azúcares más conocidos. Los estudios realizados para identificar este compuesto se presentarán en la Sección 3.3.2.3.

Tabla 3.8 Azúcares componentes de las subfracciones obtenidas a partir de **C-2S** (expresados en moles/100 moles), relación D a L-Gal, relación Gal:3,6-AnGal:SO_3Na y relación Gal:Gal 6-sulfato.

Azúcar	**C-2S**	**C-2S-**						
		0,2	**0,4**	**0,6**	**0,8**	**1**	**1,5**	**2**
D-Gal	41	9	12	22	33	47	48	60
L-Gal	18	7	12	25	20	16	34	4
3,6- An-D-Gal	4	-	-	-	-	1	-	27
3,6- An-L-Gal	1	5	4	-	-	-	-	-
D-Xil	10	9	9	10	13	10	5	1
D-Glc	13	66	51	22	15	1	2	4
D-Man	1	-	2	-	-	1	-	3
L-Ram	-	1	-	-	-	1	1	1
L-Fuc	1	-	-	-	-	2	-	-
2-*O*-Me-D-Gal	2	1	3	5	-	-	-	-
2-*O*-Me-L-Gal	-	-	-	1	1	-	-	-
3-*O* Me-D-Gal	1	2	4	6	2	-	-	-
X[a]	8	-	3	9	16	21	10	-
Relación molar								
D- : L-[b]	1:0,40	1:0,97	1:0,83	1:0,79	1:0,60	1:0,33	1:0,71	1:0,05
Gal[b]:SO_3Na	1:0,56	1:1,16	1:0,34	1:0,34	1:0,79	1:1,08	1:0,97	1:1,92
Gal:Gal 6-sulfato	1:0,12	ND[c]	1:0,00	1:0,11	1:0,16	1:0,05	1:0,18	ND[c]

[a] Ver texto, Sección 3.3.2.3.
[b] Incluye la proporción de galactosa, 3,6-anhidrogalactosa y metilgalactosas.
[c] ND = No determinado

La fracción mayoritaria, **C-2S-0,8**, junto con **C-2S-1,5** forman el tercer grupo. La relación entre D- y L-galactosa es similar a la del grupo anterior (consistente con un híbrido DL con un exceso de estructuras tipo agarano sobre las tipo carragenano). Sin embargo, a diferencia del grupo anterior, las fracciones del tercer grupo poseen mayoritariamente galactosa, con una relación casi 1:1 entre galactosa total y grupos sulfato, y un bajo porcentaje de glucosa y xilosa. Se destaca que estas fracciones cuentan con una mayor proporción de compuesto X que el grupo anterior.

La fracción **C-2S-1** compone el cuarto grupo. Esta fracción posee una relación entre D- y L-galactosa tal que la proporción entre estructuras tipo carragenano y tipo agarano es 1. La relación entre galactosa total y grupos sulfato también es cercana a la unidad. Asimismo, se caracteriza por poseer poca cantidad de glucosa y la mayor proporción de compuesto X.

Por último, el quinto grupo está compuesto exclusivamente por **C-2S-2**. Al igual que su análoga del extracto en frío, esta fracción es prácticamente un carragenano perfecto donde aquellos monosacáridos distintos de la galactosa representan menos de un 10 %. A su vez, esta fracción es la única con una alta proporción de 3,6-anhidrogalactosa.

Teniendo en cuenta que la fracción original había demostrado poseer galactosa 6-sulfato, se decidió realizar la técnica de tratamiento alcalino.[14] Se trabajó con las fracciones que eluyeron entre 0,4M y 1,5M ya que de **C-2S-0,2** y **C-2S-2** se contaba con poca masa (Tabla 3.8). Los resultados indican que **C-2S-0,4** no posee galactosas que puedan ciclar, pero las demás fracciones sí. Las fracciones **C-2S-0,8** y **C-2S-1,5** son las que poseen mayor cantidad de precursores.

3.3.2.3 Experimentos para identificar el compuesto incógnita (X)

Como ya se mencionó previamente, **C-2S** y varias de sus fracciones poseen en su estructura un compuesto (X), que se detectó al generar los alditoles peracetilados por hidrólisis reductiva.[11] Los cromatogramas de estas fracciones presentaban un pico con un tiempo de retención muy similar al del xilitol peracetilado, aunque ambos se resolvían. Cuando se utilizó la columna Ultra 2, en lugar de utilizar la columna SP-2330, más polar y tradicionalmente usada para alditoles, el compuesto X eluía a un tiempo de retención mucho menor que el resto de los alditoles (incluido el xilitol), sugiriendo una considerable diferencia de polaridad. En la Figura 3.16 se muestra el espectro de masa de impacto electrónico (70eV) para el compuesto X luego de someterlo a una hidrólisis reductiva y peracetilarlo.

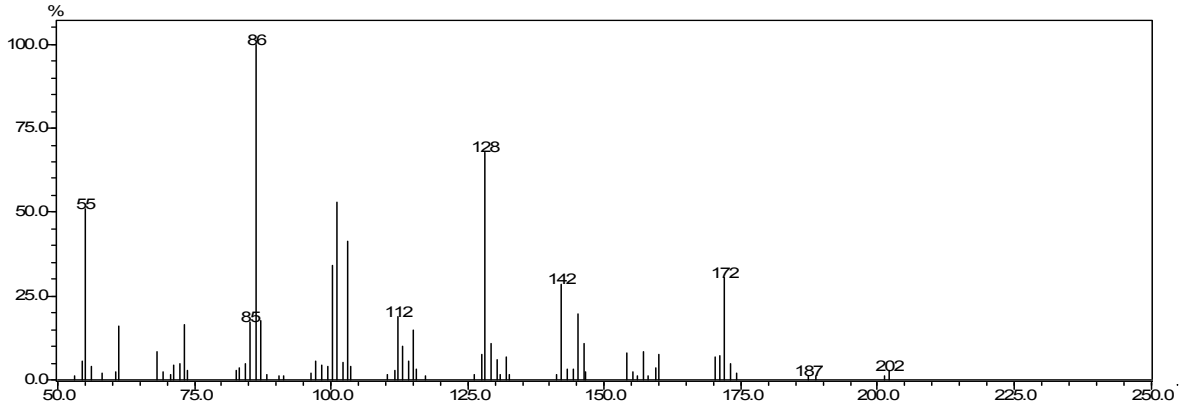


Figura 3.16 Espectro de masa (IE, 70eV) del compuesto X reducido y acetilado.

Este espectro no es consistente con el de ninguno de los alditoles más conocidos. Una búsqueda bibliográfica detectó cierta similitud con el espectro de masa de la γ-ribonolactona peracetilada (Fig. 3.17). Al comparar los espectros se observa que ambos poseen los picos de *m/z* 86 y 128 como los más abundantes. También ambos cuentan con los picos de *m/z* 100, 101, 115, 142, 172, entre otros.

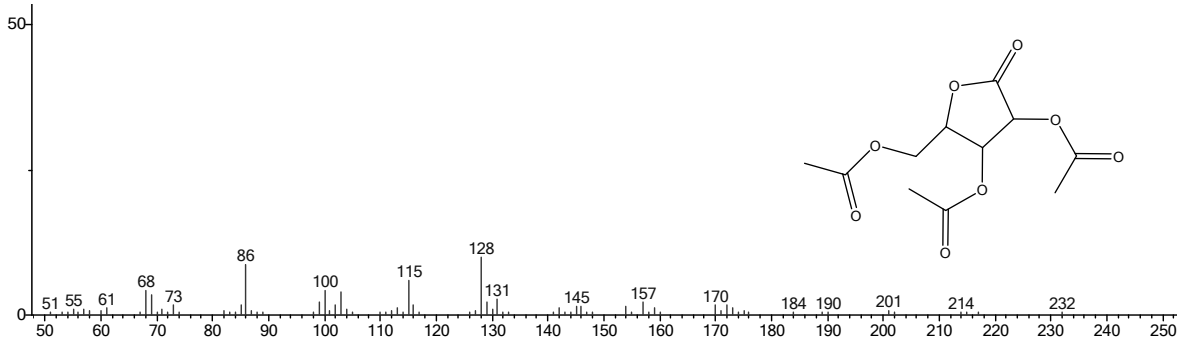


Figura 3.17 Espectro de masa (IE, 70eV) de la γ-ribonolactona peracetilada.[30]

Esta similitud entre los espectros podría indicar para el compuesto X reducido una estructura como la de la γ-ribonolactona o alguno de sus diastereómeros. El compuesto X podría ser entonces un ácido aldopenturónico que al reducirle el carbono aldehídico genera el aldonato y luego la lactona. Es importante destacar que si bien la γ-ribonolactona se puede obtener por reducción del ácido riburónico y la γ-xilonolactona del ácido xilurónico por sus estructuras simétricas, esto no ocurre con los otros dos diastereómeros. La γ-arabinolactona se obtendría por reducción del ácido lixurónico mientras que la γ-lixonolactona a partir del ácido arabinurónico.

Varios experimentos sustentaron la hipótesis del ácido aldopenturónico como componente X. Por un lado, al utilizar un espectrómetro de masa con ionización química (con metano en modo positivo) como detector de la cromatografía gaseosa se pudo observar un pico de *m/z* 275 que podría corresponder al M+1 del compuesto X reducido y peracetilado (Fig. 3.18). Esto indicaría un peso molecular de 274, idéntico al de la γ-ribonolactona peracetilada.

Por otro lado, se observó que si se realizaba la hidrólisis y acetilación de la muestra sin reducir no se veía el pico cromatográfico correspondiente al compuesto X, ni ninguna señal adicional. Es razonable que un compuesto con el grupo ácido libre no pueda ser eluido en un tiempo razonable y sin degradación en las condiciones utilizadas en la cromatografía gaseosa.

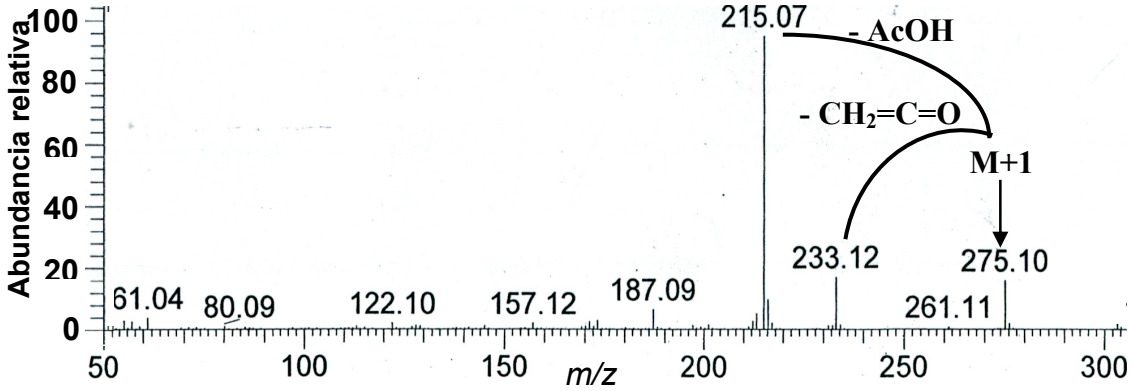


Figura 3.18 Espectro de masa (IQ) del compuesto X derivatizado como alditol peracetilado (gas ionizante: CH_4).

Por último, los espectros HSQC de todas las fracciones que poseen el compuesto X presentaron una señal en 109,5 ppm en ^{13}C consistente con una señal anomérica furanósica (ver luego). Los ácidos aldopenturónicos sólo pueden ciclar en forma furanósica ya que el C-5 corresponde al grupo carboxilo. Es importante aclarar que si bien el ensayo colorimétrico de ácidos urónicos[31] dio resultado negativo para esta muestra, este se lo utiliza normalmente para cuantificar ácidos aldohexurónicos que rinden un derivado del furfural. Puede esperarse que el producto de los ácidos aldopenturónicos no genere color en esas condiciones.

Teniendo en cuenta esta posibilidad, se decidió realizar un RMN-^{13}C a fin de comprobar si se observa una señal asignable a un carboxilo. Como **C-2S** y sus fracciones son muy poco solubles, se realizó una hidrólisis parcial selectiva a la 3,6-anhidrogalactosa para disminuir el peso molecular. Luego de purificar por cromatografía de permeación de geles, se obtuvo una fracción enriquecida en el compuesto X cuyo RMN-^{13}C se muestra en la Figura 3.19. Se observó una señal a aproximadamente 175 ppm consistente con la presencia de un grupo carboxilo en el polisacárido, compatible con la hipótesis de un ácido penturónico.

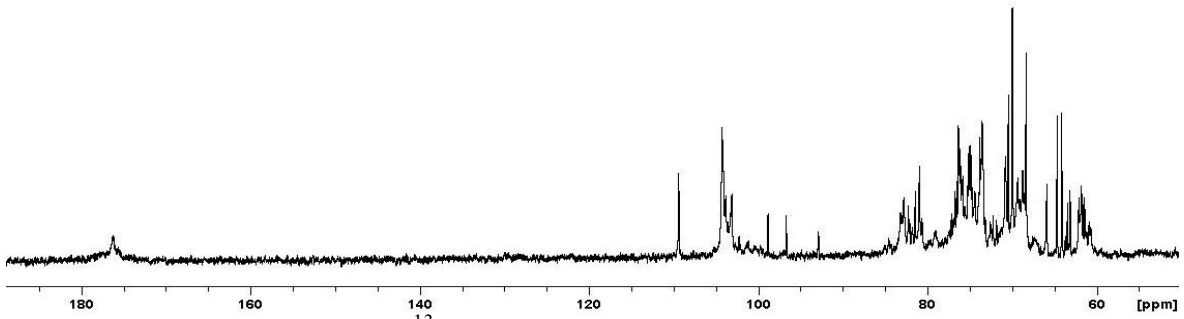


Figura 3.19 Espectro de RMN-^{13}C (125 MHz) de **C-2S** hidrolizado parcilamente en D_2O a temperatura ambiente.

Tomando en cuenta los resultados anteriores, se decidió generar el derivado acetilado de la γ-ribonolactona y de sus tres diastereómeros. La γ-ribonolactona y la γ-xilonolactona son comerciales pero para obtener la γ-arabinolactona y la γ-lixonolactona se oxidaron la

arabinosa y lixosa utilizando I_2 en NaOH como fue descripto por Sassaki *et al.*[32] Luego los distintos estándares generados se analizaron por cromatografía gaseosa y se compararon sus tiempos de retención con los del compuesto X derivatizado (Tabla 3.9).

Tabla 3.9 Tiempos de retención (t_r) del compuesto X derivatizado y las cuatro pentonolactonas peracetiladas.

Compuesto	**t_r[a] (min)**
X	12,2
γ-xilonolactona	13,1
γ-arabinolactona	13,4
γ-ribonolactona	14,4
γ-lixonolactona	15,7

[a] Realizado con el Programa C (Sección 6.8.1, Capítulo 6).

Como se puede observar, ninguno de los tiempos de retención de esas lactonas coincide con el del compuesto X, aún cuando son cercanos. La observación detallada del espectro de masa de X derivatizado (Fig. 3.16) indica que, más allá de las coincidencias, no aparecen los picos con *m/z* 131, 170, 184 y 190 que sí aparecen en el espectro de la Figura 3.17. Esto lleva a pensar que X probablemente sea algún otro isómero de la γ-ribonolactona. Una posibilidad es que sea un azúcar ramificado, donde el compuesto X pueda seguir estando en forma furanósica y al reducirlo pueda generar una lactona.

Ante esta posibilidad se realizó una búsqueda bibliográfica sobre azúcares ramificados naturales que posean grupos carboxilo en su estructura. Se halló un trabajo de Albersheim y colaboradores[33] en el cual aislaron del sicomoro e identificaron la 3-*C*-carboxi-5-desoxi-L-xilosa o ácido acérico. Este trabajo resultó interesante ya que el espectro de masa por impacto electrónico que obtuvieron los autores del ácido acérico reducido y peracetilado (Fig. 3.20) resultó muy similar al del compuesto X pero con los fragmentos desplazados en 14 unidades de masa. Esto podría implicar que X posee una estructura similar al ácido acérico pero sin el metilo en C-4, lo cual sería consistente con toda la información obtenida de X incluyendo su peso molecular. A su vez, los autores observaron que la lactona formada al tratar al ácido acérico con $NaBH_4$ en medio amoniacal también se podía reducir en condiciones suaves. Al tratar a dicha lactona con $NaBH_4$ pero a pH 7,5 en vez de las condiciones básicas utilizadas tradicionalmente, los autores obtuvieron el correspondiente poliol, el cual fue acetilado y analizado por espectrometría de masa (Fig. 3.20).

En función de esto último se ha intentado reducir a X utilizando las condiciones propuestas por el grupo de Albersheim[33] a fin de comparar el espectro de masa del compuesto X doblemente reducido con el publicado en el trabajo. Al momento de presentación de esta Tesis no se pudo llevar a cabo la mencionada reducción de manera satisfactoria.

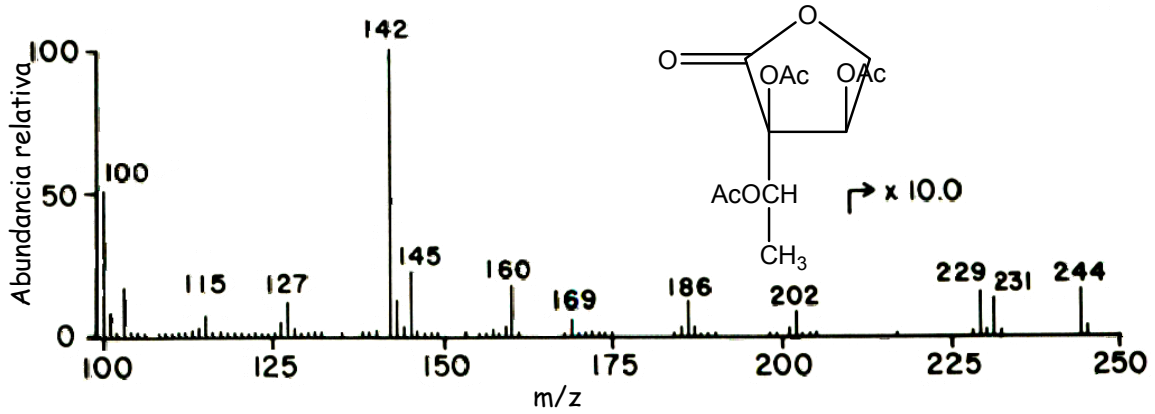


Figura 3.20 Espectro de masa (EI, 70eV) de la 2,3,4-tri-*O*-acetil-3-C-carboxi-5-desoxi-L-xilitol-3[1],l-lactona.[33]

En paralelo, se empezaron a realizar algunos intentos para aislar el compuesto X por hidrólisis parcial y purificación por HPLC o cromatografía de intercambio aniónico pero nuevamente sin resultados satisfactorios al momento de la presentación de Tesis.

Queda pendiente la determinación de este compuesto para completar definitivamente esta determinación estructural. Cabe acotar que esta estructura sería totalmente novedosa en polisacáridos de algas, aunque es importante destacar que Estévez *et al.*[9] también hallaron una señal a 109,6 ppm en el RMN-^{13}C de algunas de las fracciones obtenidas a partir del polisacárido soluble en KCl 2M del extracto en caliente de *Kappaphycus alvarezii*. Si bien los autores asignaron esta señal al C-1 de un residuo de β-D-galactofuranosa, no detectaron la presencia de este azúcar al metilar las fracciones. Esto podría sugerir que en realidad el compuesto X también se hallaba presente en dicha alga.

3.3.2.4 Análisis por metilación

De manera análoga a lo realizado en la Sección 3.3.1.3, se realizó un estudio de metilación de las fracciones provenientes de **C-2S**. En función de estos resultados, se construyó la Tabla 3.10. Es importante destacar que no se pudo identificar en el cromatograma ningún pico que corresponda al compuesto X metilado.

Tabla 3.10 Análisis por metilación de las subfracciones obtenidas de **C-2S** (expresados en moles/100 moles de galactosa).

Azúcar	Unidad	C-2S-						
		0,2	**0,4**	**0,6**	**0,8**	**1**	**1,5**	**2**
2,3,6-Glc[a]	→4)-Glc	14	23	6	4	4	-	1
2,4,6-Glc	→3)-Glc	45	-	-	-	-	-	-
2,3-Glc	→4,6)-Glc	12	6	6	7	-	-	-
2,4-Glc	→3,6)-Glc	15	27	6	3	-	-	-
3-Glc	→4, 2,6)-Glc	-	6	2	2	-	-	-
Glc	→2,3,4,6)-Glc	-	4	3	2	5	1	-
2,3,4,6-Gal	Gal_t	4	2	6	-	2	2	-
2,3,4-Gal	→6)-Gal	-	-	1	9	-	1	-
2,3,6-Gal	→4)-Gal	13	16	9	5	6	6	2
2,4,6-Gal	→3)-Gal	30	18	10	7	-	9	5
3,4,6-Gal	→2)-Gal	-	5	6	2	-	1	-
2,3-Gal	→4,6)-Gal	-	-	-	-	7	1	2
2,4-Gal	→3,6)-Gal	1	8	16	45	23	10	2
2,6-D-Gal	→3,4)-Gal + →4,3)-Gal	4	9	3	1	6	9	49
2,6-L-Gal	→4,3)-Gal	19	21	19	1	18	38	-
4,6-D-Gal	→3,2)-Gal	-	-	9	11	4	2	-
2-Gal	→3,4,6)-Gal + →4,3,6)-Gal	3	3	4	2	4	4	4
3-Gal	→4,2,6)-Gal	-	-	-	15	-	-	-
4-Gal	→3,2,6)-Gal	-	-	3	-	3	5	2
6-Gal	→3,4,2)-Gal + →4,3,2)-Gal	-	-	-	-	-	5	2
Gal	→3,2,4,6)-Gal + →4,2,3,6)-Gal	-	-	4	-	21	2	-
3,6-An-2-Gal[b]	→4)-3,6-AnGal	21	12	7	2	6	3	14
3,6-AnGal	→4,2)-3,6-AnGal	4	6	3	-	-	2	18
2,3,4-Xil	Xil_t	9	7	14	10	4	2	-
2,3- + 3,4-Xil	→4)-Xil + →2)-Xil	3	-	4	2	-	-	-
2,4-Xil	→3)-Xil	-	4	3	3	5	-	-
Xil	→2,3,4)-Xil	5	-	3	-	5	1	-

[a] 2,3,6-Glc= 2,3,6-tri-*O*-metilglucosa,etc.
[b] 3,6-An-2-Gal = 3,6-anhidro-2-*O*-metilgalactosa.

Los resultados de metilación sugieren que las estructuras de las fracciones son diferentes entre sí. Las fracciones ricas en glucosa presentan dicho azúcar tanto enlazado en C-4 como en C-3 y sustituido en C-6. Esto lleva a suponer una estructura similar al almidón de florídeas como la que presentan las primeras fracciones provenientes de **F-2S**. La xilosa es principalmente terminal, aunque se observan cantidades menores de xilosa dimetilada.

En la primera fracción (**C-2S-0,2**) el galactano representa una proporción muy baja del total. Este aparenta ser un xilogalactano con aproximadamente una xilosa por cada dos galactosas totales. Las unidades β- se encuentran principalmente sin sustituir (2,4,6-tri-*O*-metilgalactosa), y una pequeña proporción sustituida en C-4 (2,6-di-*O*-metil-D-galactosa). Las unidades α-, por otro lado, están representadas por la 3,6-anhidro-L-galactosa y por la L-galactosa sustituida en C-3 y sin sustituir.

Las fracciones pertenecientes al segundo grupo (**C-2S-0,4** y **C-2S-0,6**) presentan un perfil de metilación similar entre sí. Las unidades enlazadas en C-3 se encuentran sustituidas en C-2 (4,6-di-*O*-metilgalactosa), C-4 (2,6-di-*O*-metil-D-galactosa) y C-6 (2,4-di-*O*-metilgalactosa), así como sin sustituir (2,4,6-tri-*O*-metilgalactosa). Por otro lado, aquellas enlazadas en C-4, principalmente de configuración L-, se encuentran como galactosa sustituida en C-3 y sin sustituir y como 3,6-anhidrogalactosa, sustituida en C-2 y sin sustituir. La presencia del anhidroazúcar en **C-2S-0,6** se debe a las condiciones básicas en las que se llevó a cabo la metilación, ya que la fracción original no contaba con dicho anhidroazúcar.

Al comparar ambas fracciones del grupo, se observa que **C-2S-0,6** se encuentra más sustituida que **C-2S-0,4**. Si bien ambas fracciones poseen igual proporción de grupos sulfato, **C-2S-0,6** posee una mayor proporción de xilosa y de galactosas naturalmente metiladas, que podrían representar ramificaciones. Por otro lado, **C-2S-0,4** posee menos cantidad de 2,4-di-*O*-metilgalactosa y más de 2,6-di-*O*-metil-D-galactosa indicando que las unidades β- poseen más sustituyentes en C-4 y menos en C-6 que **C-2S-0,6.**

El siguiente grupo resultó ser bastante heterogéneo en cuanto a las estructuras de las fracciones. La fracción **C-2S-0,8** posee una gran proporción de 2,4-di-*O*-metilgalactosa, por lo que las unidades β- están sustituidas principalmente en C-6. Asimismo, se observa una importante proporción de 4,6-di-*O*-metilgalactosa y 2,4,6-tri-*O*-metilgalactosa, por lo que también hay β-galactosas sustituidas en C-2 y sin sustituir. Las unidades α- se encuentran principalmente sustituidas en C-2 y C-6 y en menor medida sin sustituir. Sin embargo, cuando se compara la proporción de galactosas enlazadas en C-3 y C-4, las primeras (β-) son

más abundantes que las segundas (α-). Una posible explicación es que la glucosa presente en la fracción no provenga del almidón de florídeas sino que en realidad forme parte de la cadena del galactano reemplazando a la α-galactosa. Esto ya había sido sugerido por Stortz *et al.*[3] al estudiar los polisacáridos de la fracción soluble en KCl de la fase tetraspórica de *Iridaea undulosa*. Distintivamente, una de las fracciones poseía una alta proporción de glucosa por lo cual los autores sugirieron que la glucosa podía estar reemplazando en parte a la galactosa en una estructura atípica. En la fracción **C-2S-0,8,** la glucosa se encuentra mayoritariamente enlazada en C-4, a diferencia de las demás fracciones, por lo que podría estar sucediendo algo similar a lo sugerido para *I. undulosa.* Por otro lado, la fracción **C-2S-1,5** posee unidades α- compuestas principalmente por L-galactosa sustituida en C-3 y en menor medida por 3,6-anhidrogalactosa y galactosa sin sustituir. Para que la proporción D- a L-galactosa sea consistente con lo observado en la Tabla 3.8, estas últimas deben pertenecer a la serie D-. Las β-galactosas no tienen un patrón de sustitución definido. Dada la alta proporción de 2,6-di-*O*-metil-L-galactosa, todos aquellos azúcares metilados que no se hayan asignado previamente deben corresponder a las unidades β-D. Esto implica que hay pequeñas cantidades de β-galactosa sin sustituir, mono y disustituida en C-2, C-4 y/o C-6.

La fracción **C-2S-1**, que conforma el cuarto grupo, posee una importante cantidad de galactosa sin metilar. Se intentó metilar la muestra hasta tres veces consecutivas, sin embargo, no disminuyó la proporción de dicho azúcar. El análisis de los azúcares metilados indica que las unidades α- se encuentran como L-galactosas sustituidas en C-3. También hay una baja proporción sin sustituir y sustituidas en C-3 y/o C-6. Dado que esta fracción posee igual proporción de estructuras tipo carragenano y agarano, estas galactosas deben poseer configuración D-. Las unidades β- están representadas por la 2,4-di-*O*-metilgalactosa y en menor medida por la 2,6-di-*O*-metil-D-galactosa y la 2-*O*-metilgalactosa. Esto implica que dicha unidad se encuentra sustituida en C-6 y en menor medida en C-4 y/o C-6.

El último grupo constituido exclusivamente por **C-2S-2** presenta una estructura de κ/ι-carragenano al igual que la fracción análoga de **F-2S**. También se observan algunas unidades α- sin sustituir así como precursores.

3.3.2.5 Análisis por desulfatación-metilación

Se pudieron desulfatar únicamente aquellas fracciones obtenidas con mayor rendimiento. La Tabla 3.11 muestra el grado de desulfatación y el rendimiento de las fracciones desulfatadas.

Tabla 3.11 Proporción de sulfato y rendimiento de reacción de los polisacáridos desulfatados.

	C-2S-							
	0,6	**0,6d**	**0,8**	**0,8d**	**1**	**1d**	**1,5**	**1,5d**
SO_3Na (%)	5,9	3,5	9,1	1,9	11,3	6,9	23,4	4,0
Diferencia	2,4 (-41 %)		7,2 (-79 %)		4,4 (-40 %)		19,4 (-83 %)	
Rendimiento (%)	71		90		100		87	

Los rendimientos de reacción fueron altos, pero el grado de desulfatación fue dispar. Las fracciones **C-2S-0,6** y **C-2S-1** se lograron desulfatar en menos del 50 %. En particular, **C-2S-1** parece ser una muestra atípicamente compleja, ya que la metilación tampoco fue satisfactoria. Se estudió la composición de las cuatro fracciones desulfatadas y posteriormente metiladas. Los resultados se observan en la Tabla 3.12.

El análisis de desulfatación de **C-2S-0,6** indicó una disminución de los azúcares monometilados y la galactosa sin metilar y un aumento de la 2,6-di-*O*-metil-L-galactosa y la 2,4-di-*O*-metilgalactosa. Asimismo, la 4,6-di-*O*-metilgalactosa disminuye y aumenta la 2,4,6-tri-*O*-metilgalactosa. Esto estaría indicando que tanto las unidades α- como las β- se encuentran sulfatadas en C-2. Es importante destacar que esta fracción no posee 3,6-anhidrogalactosa, aunque dicho azúcar se observa al desulfatar y metilar. Esto se puede atribuir a que las unidades de α-galactosa 6-sulfato en la fracción no fueron desulfatadas convenientemente pudiéndose ciclar por el medio alcalino de la metilación.

La metilación de **C-2S-0,8d** lleva, respecto de la de **C-2S-0,8**, a una disminución de la 3-*O*-metilgalactosa y un aumento de la 2,3,6-tri-*O*-metilgalactosa. Esto indica que la α-galactosa se encuentra sulfatada en C-2 y C-6. Las β-galactosas se encuentran parcialmente sulfatadas en C-2 ó en C-6 ya que se observa una disminución de la mitad de la 4,6-di-*O*-metilgalactosa y de la 2,4-di-*O*-metilgalactosa y un aumento de la 2,4,6-tri-*O*-metilgalactosa.

Al desulfatar y metilar **C-2S-1** no se observó galactosa sin metilar. Este hecho probablemente se deba a que la desulfatación, al disminuir la carga, facilitó su completa metilación. Aún considerando el bajo porcentaje de desulfatación (Tabla 3.11) se pueden obtener algunos datos. Por un lado se observa que las unidades α- sustituidas poseen grupos sulfatos en C-3 (representadas por la 2,6-di-*O*-metil-L-galactosa). Por otro lado, la galactosa sin metilar y las galactosas monometiladas tienen que corresponder principalmente a unidades β- ya que la disminución de éstas produjo un gran aumento en la 2,4,6-tri-*O*-metilgalactosa.

Tabla 3.12 Análisis por metilación de las subfracciones **C-2S-0,6, C-2S-0,8, C-2S-1** y **C-2S-1,5** y de sus productos desulfatados (moles/100 moles de galactosas).

Azúcar	Unidad	C-2S-							
		0,6	**0,6d**	**0,8**	**0,8d**	**1**	**1d**	**1,5**	**1,5d**
2,3,6-Glc[a]	→4)-Glc	6	5	4	13	4	3	-	-
2,3-Glc	→4,6)-Glc	6	-	7	-	-	-	-	-
2,4-Glc	→3,6)-Glc	6	5	3	-	-	-	-	-
3-Glc	→2,4,6)-Glc	2	-	2	-	-	-	-	-
Glc	→2,3,4,6)-Glc	3	-	2	12	5	-	1	3
2,3,4,6-Gal	Gal_t	6	3	-	9	2	2	2	4
2,3,4-Gal	→6)-Gal	1	3	9	3	-	-	1	1
2,3,6-Gal	→4)-Gal	9	7	5	9	6	21	6	36
2,4,6-Gal	→3)-Gal	10	15	7	24	-	30	9	30
3,4,6-Gal	→2)-Gal	6	5	2	-	-	-	1	-
2,3-Gal	→4,6)-Gal	-	-	-	-	7	1	1	2
2,4-Gal	→3,6)-Gal	16	19	45	30	23	29	10	13
2,6-D-Gal	→3,4)-Gal + →4,3)-Gal	3	4	1	2	6	6	9	4
2,6-L-Gal	→4,3)-Gal	19	29	1	5	18	2	38	2
4,6-D-Gal	→3,2)-Gal	9	3	11	4	4	-	2	-
2-Gal	→3,4,6)-Gal + →4,3,6)-Gal	4	-	2	-	4	3	4	2
3-Gal	→4,2,6)-Gal	-	-	15	10	-	-	-	-
4-Gal	→3,2,6)-Gal	3	-	-	-	3	1	5	-
6-Gal	→3,4,2)-Gal + →4,3,2)-Gal	-	-	-	-	-	2	5	-
Gal	→3,2,4,6)-Gal + →4,2,3,6)-Gal	4	-	-	4	21	-	2	-
3,6-An-2-Gal[b]	→4)-3,6-AnGal	7	7	2	-	6	2	3	5
3,6-AnGal	→4,2)-3,6-AnGal	3	5	-	-	-	-	2	1
2,3,4-Xil	Xil_t	14	20	10	7	4	4	2	2
2,3- + 3,4-Xil	→4)-Xil + →2)-Xil	4	2	2	-	-	-	-	-
2,4-Xil	→3)-Xil	3	2	3	-	5	-	-	2
Xil	→2,3,4)-Xil	3	2	-	4	5	1	1	1

[a] 2,3,6-Glc= 2,3,6-tri-*O*-metilglucosa, etc.
[b] 3,6-An-2-Gal = 3,6-anhidro-2-*O*-metilgalactosa.

Por último, **C-2S-1,5** posee grupos sulfato en C-3 de la unidad enlazada en C-4 ya que luego de desulfatar disminuyó casi completamente la 2,6-di-*O*-metil-L-galactosa y aumentó la 2,3,6-tri-*O*-metilgalactosa. Por otro lado el gran aumento de la 2,4,6-tri-*O*-metilgalactosa implica que todas los demás azúcares metilados que disminuyeron deben pertenecer a la unidad enlazada en C-3, como se había supuesto en la Sección anterior. Esto significa que las galactosas sin metilar y monometiladas, así como parte de la 2,6-di-*O*-metil-D-galactosa poseen sulfatos como sustituyentes. Los sustituyentes minoritarios, xilosa y el compuesto X, se deben encontrar principalmente en posición 6 ya que la proporción de 2,4-di-*O*-metigalactosa no varió luego de desulfatar.

3.3.2.6 Análisis por metilación de la subfracción C-2S-0,8s/X

Teniendo en cuenta que el compuesto X parece encontrarse en forma furanósica en el polisacárido y que estas uniones glicosídicas son más fáciles de hidrolizar que las piranósicas, se trató a **C-2S-0,8** en condiciones de hidrólisis suave.[34] Luego de dializar, se obtuvo la fracción **C-2S-0,8s/X**, la cual se encontraba prácticamente desprovista del compuesto X (Tabla 3.13). Este resultado estaría indicando que dicho compuesto aparece como ramificación de la cadena principal ya que al hidrolizarlo no variaron mayormente las proporciones de los demás componentes. Los intentos para aislar el compuesto X de las aguas de diálisis resultaron infructuosos debido a la abundancia de las sales formadas al neutralizar.

Tabla 3.13 Azúcares componentes derivatizados como alditoles de las fracciones **C-2S-0,8** y **C-2S-0,8s/X** (expresados en moles/100 moles).

Azúcar	**C-2S-**	
	0,8	**0,8s/X**
Gal	53	65
Xil	13	16
Glc	15	13
2-*O*-Me-Gal	1	2
3-*O*-Me-Gal	2	1
X	16	3

Se metiló **C-2S-0,8s/X** para determinar en qué posición se encontraba X unido a la cadena lineal del galactano. Los resultados se observan en la Tabla 3.14 junto con los datos obtenidos para la fracción original y la desulfatada.

Tabla 3.14 Análisis por metilación de la fracción **C-2S-0,8** hidrolizada selectivamente, desulfatada y nativa (moles/100 moles de galactosas).

Azúcar	Unidad	C-2S-		
		0,8	**0,8d**	**0,8s/X**
2,3,6-Glc[a]	→4)-Glc	4	13	6
2,3-Glc	→4,6)-Glc	7	-	-
2,4-Glc	→3,6)-Glc	3	-	6
3-Glc	→2,4,6)-Glc	2	-	2
Glc	→2,3,4,6)-Glc	2	12	2
2,3,4,6-Gal	Gal_t	-	9	4
2,3,4-Gal	→6)-Gal	9	3	8
2,3,6-Gal	→4)-Gal	5	9	9
2,4,6-Gal	→3)-Gal	7	24	27
3,4,6-Gal	→2)-Gal	2	-	2
2,4-Gal	→3,6)-Gal	45	30	17
2,6-D-Gal	→3,4)-Gal + →4,3)-Gal	1	2	-
2,6-L-Gal	→4,3)-Gal	1	5	5
4,6-D-Gal	→3,2)-Gal	11	4	13
2-Gal	→3,4,6)-Gal + →4,3,6)-Gal	2	-	1
3-Gal	→4,2,6)-Gal	15	10	4
6-Gal	→3,4,2)-Gal + →4,3,2)-Gal	-	-	2
Gal	→3,2,4,6)-Gal + →4,2,3,6)-Gal	-	4	6
3,6-An-2-Gal[b]	→4)-3,6-AnGal	2	-	2
2,3,4-Xil	Xil_t	10	7	11
2,3- + 3,4-Xil	→4)-Xil + →2)-Xil	2	-	-
2,4-Xil	→3)-Xil	3	-	-
Xil	→2,3,4)-Xil	-	4	2

[a] 2,3,6-Glc= 2,3,6-tri-*O*-metilglucosa,etc.
[b] 3,6-An-2-Gal = 3,6-anhidro-2-*O*-metilgalactosa.

El análisis de **C-2S-0,8s/X** indica claramente que el compuesto X se encontraba unido a la posición 6 de la unidad β- en **C-2S-0,8**, ya que su hidrólisis disminuyó la proporción de 2,4-di-*O*-metilgalactosa y aumentó concomitantemente la de 2,4,6-tri-*O*-metilgalactosa. Esto indica que la unidad β- se encuentra sustituida en C-6 tanto por grupos sulfato como por el

compuesto X. Asimismo, también se observa una disminución menor en la 3-*O*-metilgalactosa y un consecuente aumento en la 2,3,6-tri-*O*-metilgalactosa. Esto indicaría que las unidades α- pueden encontrase sustituidas en C-2 y C-6 por el compuesto X o por sulfato.

3.3.2.7 Análisis por espectroscopía de resonancia magnética nuclear

Para complementar el estudio estructural de las fracciones se realizaron espectros de RMN a las mismas de manera análoga a lo realizado con las fracciones provenientes de **F-2S**. El análisis se centró sobre la región anomérica de los espectros HSQC complementándose, cuando fue necesario, con los espectros RMN-^{1}H.

Para el estudio de la región anomérica del espectro HSQC de las distintas fracciones, se utilizó la Tabla 3.6 como referencia. Las Figuras 3.21 a 3.26 muestran la ampliación de la región anomérica para los espectros HSQC de las distintas fracciones. La solubilidad de éstas conspiró contra la obtención de buenos espectros. En particular, la ampliación del espectro HSQC de **C-2S-1** (cuarto grupo) presenta únicamente una señal a 109,5 ppm y por ello no se muestra.

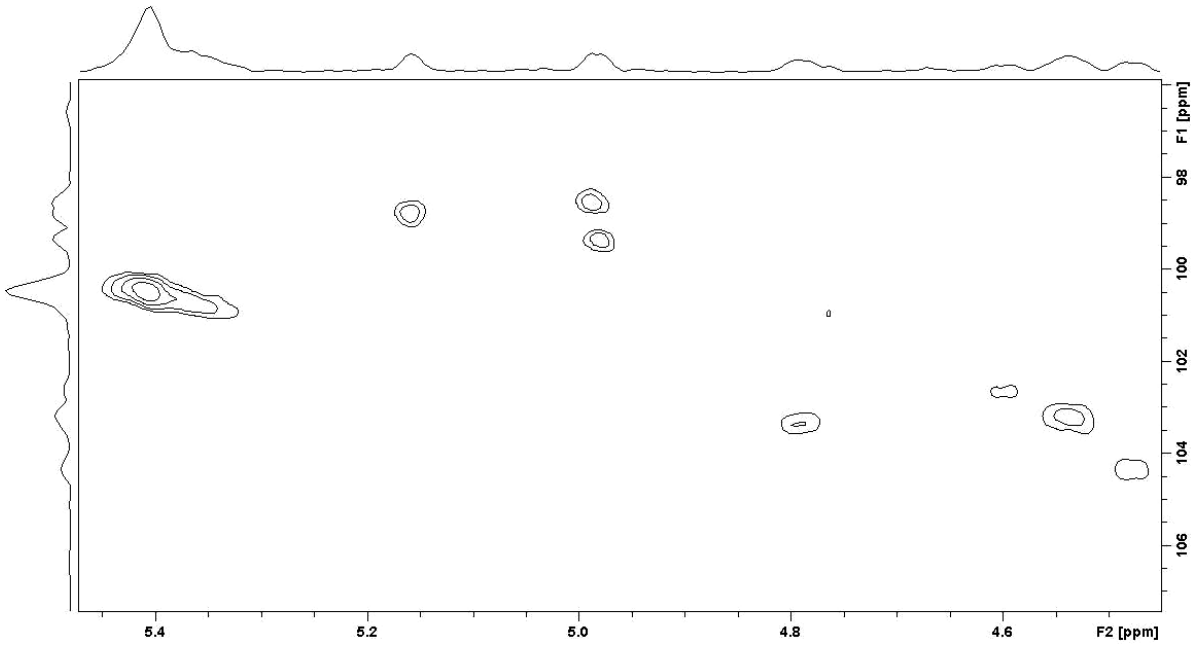


Figura 3.21 Ampliación de la región anomérica del espectro HSQC de **C-2S-0,2.**

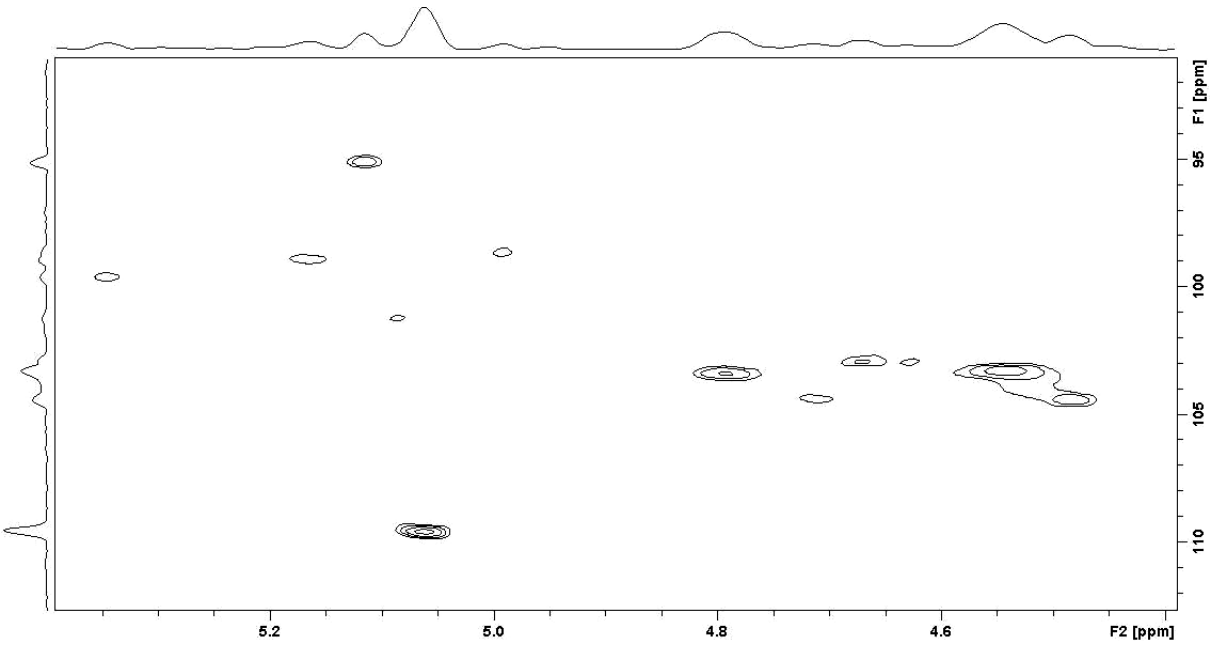


Figura 3.22 Ampliación de la región anomérica del espectro HSQC de **C-2S-0,4.**

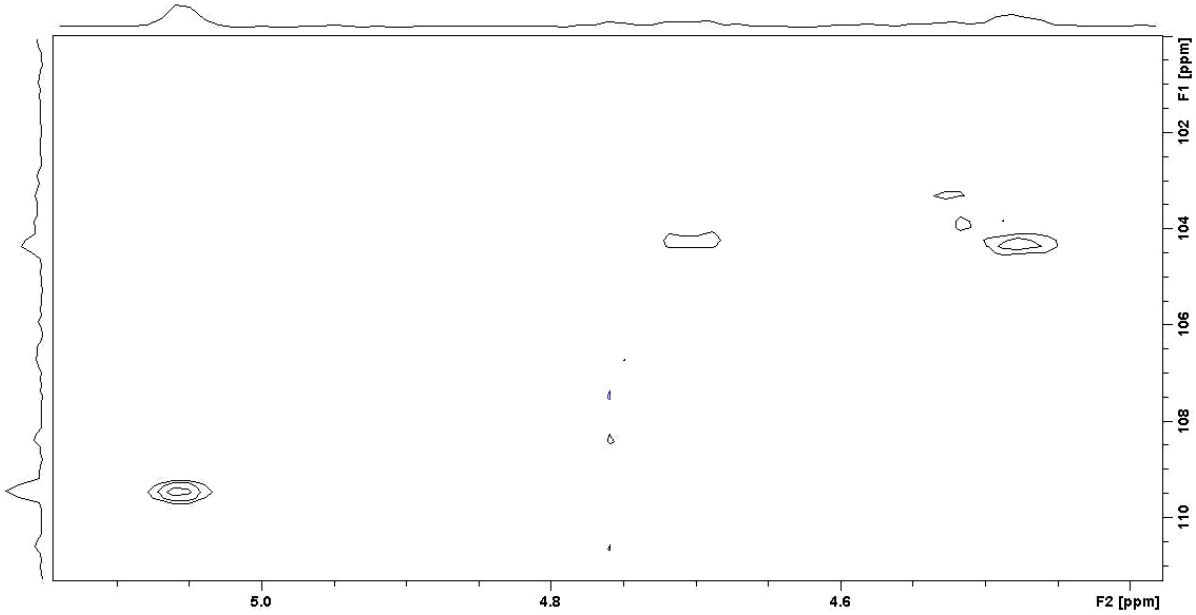


Figura 3.23 Ampliación de la región anomérica del espectro HSQC de **C-2S-0,6.**

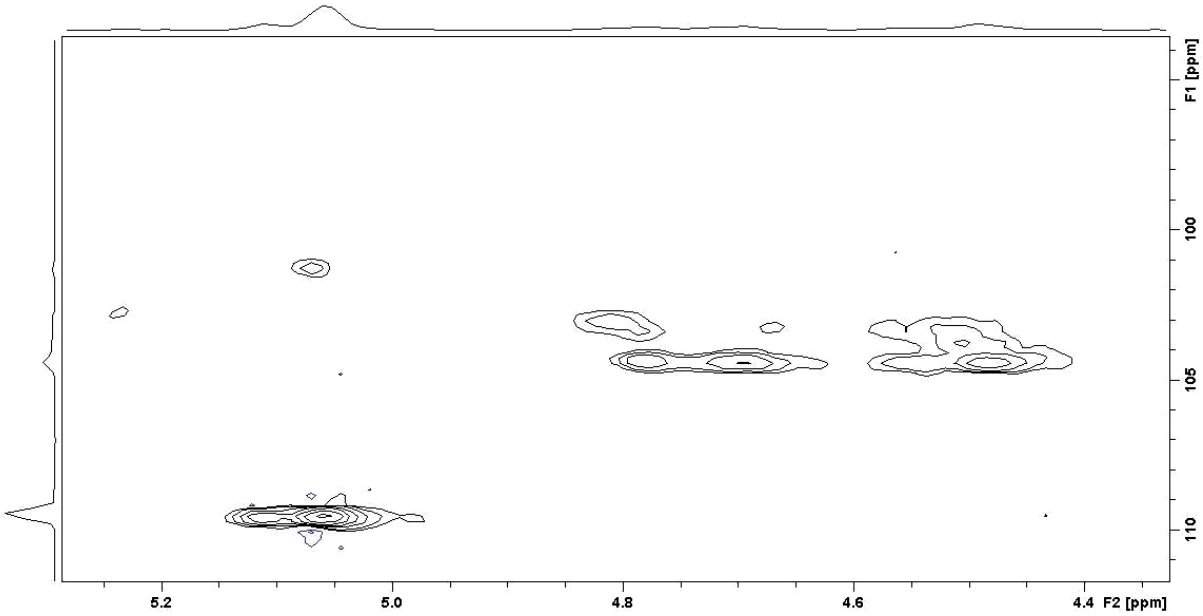


Figura 3.24 Ampliación de la región anomérica del espectro HSQC de **C-2S-0,8.**

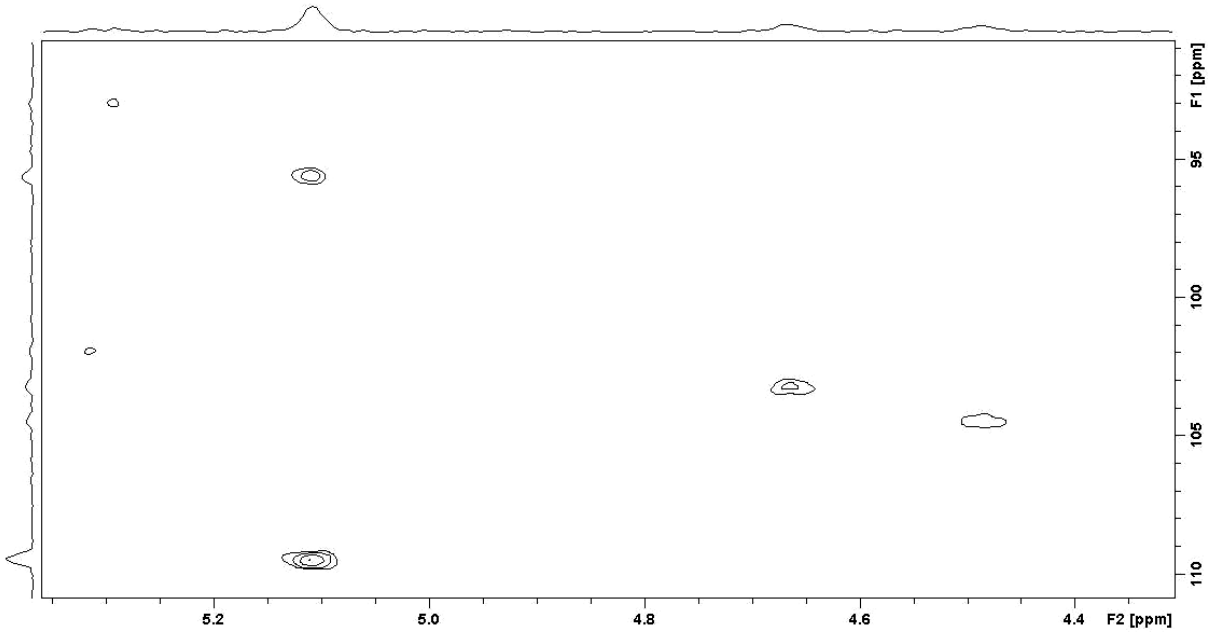


Figura 3.25 Ampliación de la región anomérica del espectro HSQC de **C-2S-1,5.**

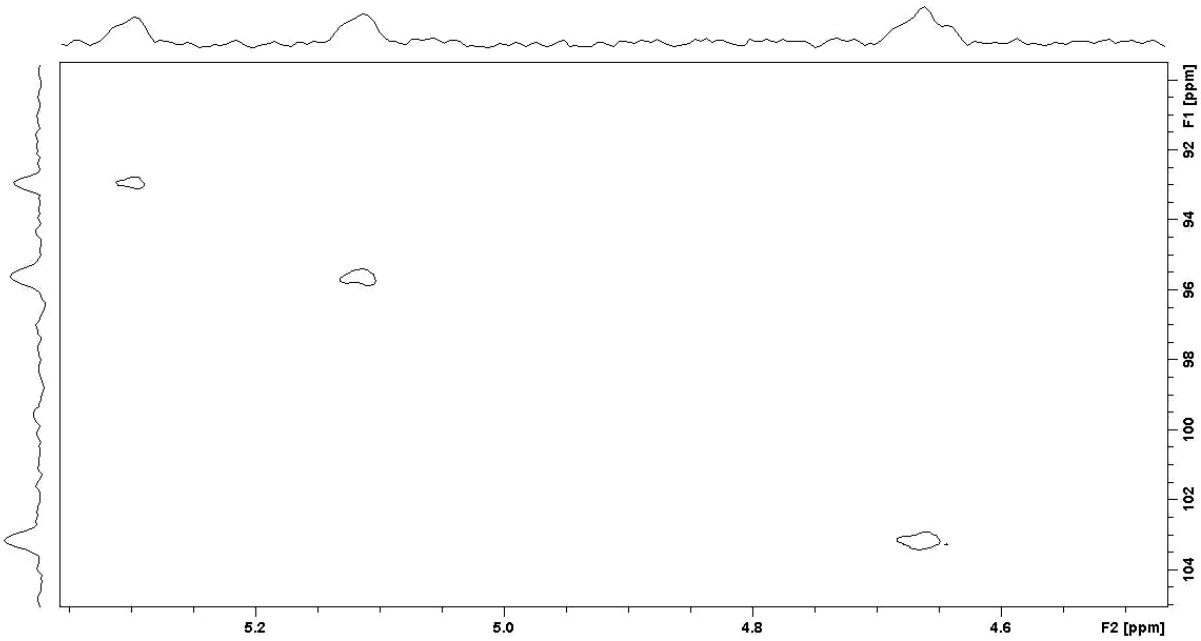


Figura 3.26 Ampliación de la región anomérica del espectro HSQC de la fracción **C-2S-2.**

Los espectros HSQC de las fracciones **C-2S-0,2** y **C-2S-0,4** muestran la señal anomérica característica del almidón de florídeas.[21,22] El espectro de **C-2S-0,2**, en particular, presenta tres señales de ^{1}H a 5,4 ppm, 5,36 ppm y 5,34 ppm, siendo la primera la más intensa. Esto indicaría C-1/H-1 de glucosas con distintos entornos, ya sea por encontrarse enlazada en C-3, además de C-4 o por las ramificaciones que posee en C-6. En los demás casos, al ser menor la proporción del azúcar no se observa esta distinción. Por otro lado para las fracciones **C-2S-0,2** a **C-2S-0,8** aparece la señal característica de la β-xilosa terminal a 104,3 ppm / 4,48 ppm, confirmando lo observado al metilar.

Otra señal intensa que aparece en los espectros de varias fracciones (**C-2S-0,4** a **C-2S-1,5**) es aquella que aparece a 109,5 ppm y 5,06 ppm. El desplazamiento químico en ^{13}C es compatible con la presencia de un azúcar en forma furanósica. Es sabido que las α-L-arabinofuranosas en arabinanos[35] y arabinanogalactanos[36] exhiben las señales de los carbonos anoméricos de aparecen entre 107,2 ppm y 108,3 en el primer caso y entre 109,5 y 110,5 ppm en el segundo. Asimismo, en los polisacáridos de origen fúngico ricos en β-D-galactofuranosa, la señal del C-1 de este azúcar sale entre 107,0 y 108,0 ppm.[37] Dado que estas fracciones poseen el compuesto X es probable que la señal a 109,5 ppm corresponda al C-1 de dicho compuesto. Para confirmarlo, se realizó el espectro HSQC de **C-2S-0,8-s/X**, donde la proporción de compuesto X es muy baja (Fig. 3.27). Al observar este espectro y compararlo con el de **C-2S-0,8** se aprecia una clara disminución de la señal a 109,5 ppm, confirmando su asignación.

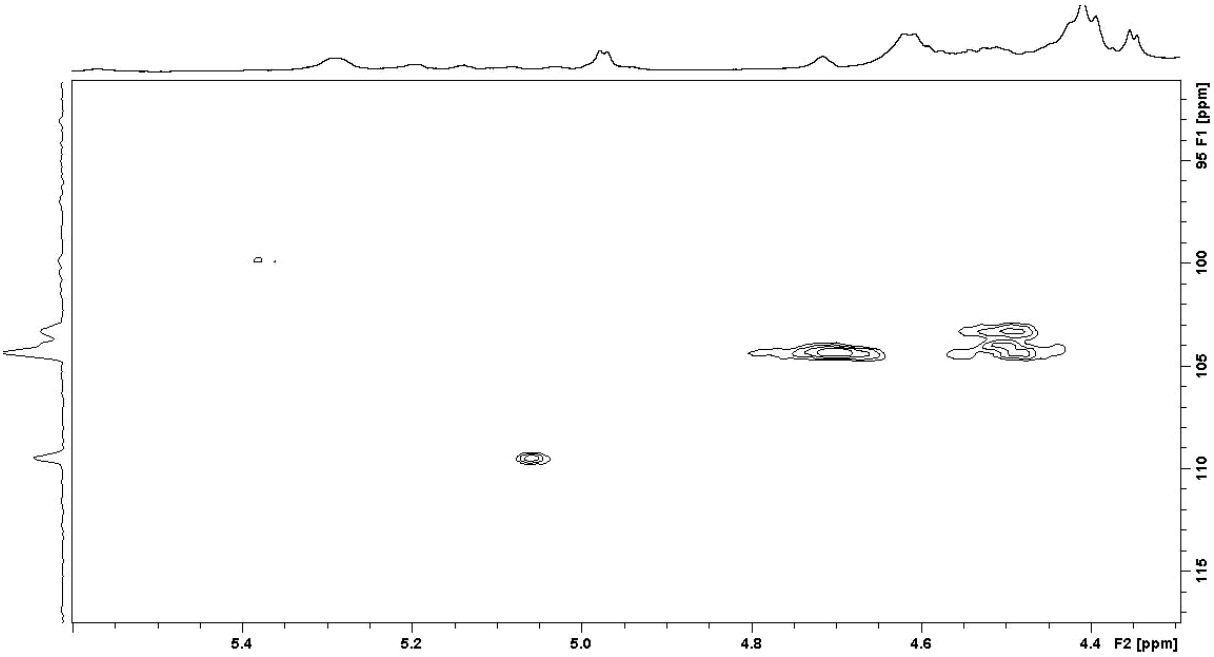


Figura 3.27 Ampliación de la región anomérica del espectro HSQC de **C-2S-0,8s/X.**

El análisis espectroscópico de cada una de las fracciones permitió confirmar parte de la estructura definida por el estudio por metilación. Para **C-2S-0,2** se observan las señales anoméricas correspondientes a la 3,6-anhidro-α-L-galactosa en distintos entornos químicos[22] (señales entre 98-99 ppm) y para las β-galactosas sustituidas en C-6 y/o sin sustituir[21,22] (102,6 ppm y 4,6 ppm) y aquellas sustituidas en C-2[23] o C-2 y C-4 (señales a ca. 103 ppm). No se observa la señal de la α-L-galactosa sustituida en C-3 esperada según la Tabla 3.6, por lo que podría encontrarse con otro entorno químico que el observado por Navarro y Stortz.[22].

Del segundo grupo, el espectro de la fracción **C-2S-0,4** presenta las señales correspondientes a la 3,6-anhidrogalactosa con ambas configuraciones (95,1 ppm / 5,11 ppm para el azúcar perteneciente a la serie D-; 98,9 ppm / 5,17 ppm y 98,6 ppm / 4,99 ppm para aquel perteneciente a la serie L-). También se observa una señal a 101,2 ppm en ^{13}C y 5,08 ppm en ^{1}H correspondiente a la α-galactosa sustituida en C-3 por un azúcar.[22] Las señales correspondientes a las unidades β- agrupan a las galactosas sin sustituir y sustituidas en C-6 (señal a 104,3 ppm y a 102,9 ppm). También se observan en el espectro β-galactosas sustituidas en C-2 y/o C-4 (103,4 ppm / 4,79 ppm y 103,3 ppm / 4,54 ppm).

El espectro de **C-2S-0,6** no aporta mucha información. Dentro de la región donde aparecen los C-1 de las α-galactosas, no se observaron señales correspondientes a estas unidades. Por otro lado, la señal que aparece a 109,5 ppm se puede asignar al compuesto X. Las señales correspondientes a carbonos anoméricos β- incluyen a la galactosa sin sustituir o

sustituida en C-6 (aproximadamente a 104 ppm) y la galactosa sustituida en C-2 o C-2 y C-4 (señal a 103,3 ppm).

Los espectros de las fracciones que componen el tercer grupo (Fig. 3.24 y 3.25) resultan bastante diferentes entre sí. Para **C-2S-0,8** se observa una señal anomérica de unidades α- a 101,2 ppm y 5,07 ppm la cual podría corresponder a la α-L-galactosa 3-sulfato,[25] aún cuando ésta se encuentra en muy baja proporción en la muestra. Esta fracción posee una gran cantidad de α-galactosas sustituidas en C-2 y C-6, sin embargo, no se observan las correspondientes señales. Por otro lado, se observan dos señales que pertenecen al C-1 del compuesto X (109,5 y 109,6 ppm), lo que indicaría que en esta fracción el compuesto se encuentra en dos entornos químicos distintos. Las señales asignables a unidades β-, que aparecen a *ca.*104,4 ppm en ^{13}C, incluyen a la galactosa y su derivado sustituido en C-6, cuando están unidas a una α-galactosa.[21,22] El número y la intensidad de dichas señales son consistentes con lo observado al metilar, donde la sustitución en 6 de la β-galactosa es mayoritaria. También se observa la señal anomérica de β-galactosas sustituidas en C-2 y/o C-4 (señales entre 103 y 104 ppm).

En el HSQC obtenido para **C-2S-1,5** se observan las señales correspondientes a la 3,6-anhidro-D-galactosa sin sulfatar y sulfatada en C-2[26] (95,6 ppm / 5,11 ppm y 93,0 ppm / 5,29 ppm, respectivamente), así como la señal correspondiente a la L-galactosa 3-sulfato[25] (101,9 ppm / 5,3 ppm). Para los anómeros β- se observa la señal de la xilosa y/o β-galactosa sustituida en C-6 o sin sustituir (104,4 ppm / 4,49 ppm) y la de la galactosa 4-sulfato (103,2 ppm / 4,67 ppm).

El último grupo compuesto por **C-2S-2** presenta el espectro de un híbrido κ/ι/ν-carragenano con las señales características de la 3,6-anhidro-α-D-galactosa sulfatada y sin sulfatar en C-2 y de la β-galactosa 4-sulfato. En el espectro RMN-^{1}H de la fracción también se observan las señales de la α-D-galactosa 2,6-disulfato a 5,57 ppm (Fig. 3.28).

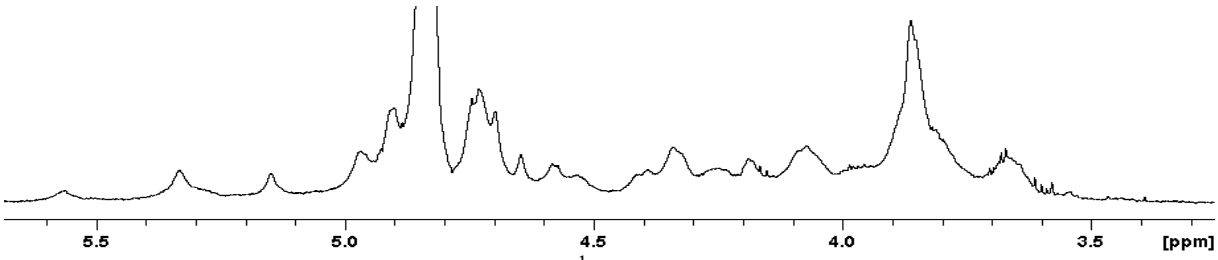


Figura 3.28 Espectro de RMN-^{1}H (500 MHz) de la fracción **C-2S-2.**

3.4 Conclusión

En este Capítulo de Tesis se presentan las estructuras de los polisacáridos hallados en las fracciones solubles en 2M de KCl (**F-2S** y **C-2S**) provenientes de *Hypnea musciformis*. El subfraccionamiento mediante columna de intercambio aniónico de **F-2S** y **C-2S** permitió separar distintos galactanos, o mezclas de ellos, que se pudieron agrupar en tres grupos según la proporción de D y L-galactosas totales presentes:

a) Agaranos: las fracciones eluidas con soluciones 0,2M de NaCl poseían una relación entre D- y L-galactosas cercana a la unidad. Tenían una baja proporción de 3,6-anhidro-L-galactosa y se caracterizaban por estar poco sustituidos. Aún así, se observó sustitución en el C-3 de la α-L-galactosa, principalmente por grupos sulfato y por xilosa terminal. El almidón de florídeas eluyó junto con estos agaranos.

b) Híbridos DL: las fracciones eluidas a concentraciones intermedias poseían un exceso de D-galactosa frente a la L-galactosa, por lo que estas fracciones resultarían ser híbridos DL o bien mezclas de agaranos y carragenanos. En general, se observó que al aumentar la fuerza iónica del solvente de elución, aumentaba la proporción de D-galactosa, aún cuando la mayoría de las fracciones aisladas poseían un exceso de estructuras tipo agaranos. También se observó un aumentó en la proporción de sulfato y una disminución en las proporciones de xilosa terminal y metilgalactosas con la fuerza iónica del solvente de elución. Las fracciones poseían baja (o nula) proporción de 3,6-anhidrogalactosa, mayoritariamente de configuración D-. La sustitución en estas fracciones fue variada pero se observó una importante proporción de α-L-galactosa sustituida en C-3, tanto por grupos sulfatos como por monosacáridos terminales. Las unidades β- se encontraron sustituidas en C-6, C-4 o C-2. Las fracciones provenientes de **C-2S** poseían un compuesto X, cuya identidad no se pudo determinar, actuando principalmente como sustituyente en el C-6 de las unidades β-.

c) Carragenanos: las fracciones que eluyeron en 2M de NaCl poseían principalmente D-galactosa, o su derivado la 3,6-anhidro-D-galactosa. Estos polisacáridos tenían una estructura consistente con la de un híbrido κ/ι/ν-carragenano.

De acuerdo a los resultados obtenidos en los Capítulos 2 y 3, las distintas fracciones provenientes de *Hypnea musciformis* estudiadas se ubicarían en el modelo del prisma propuesto por Stortz y Cerezo[38] (Capítulo 1) como se muestra en la Figura 3.29.

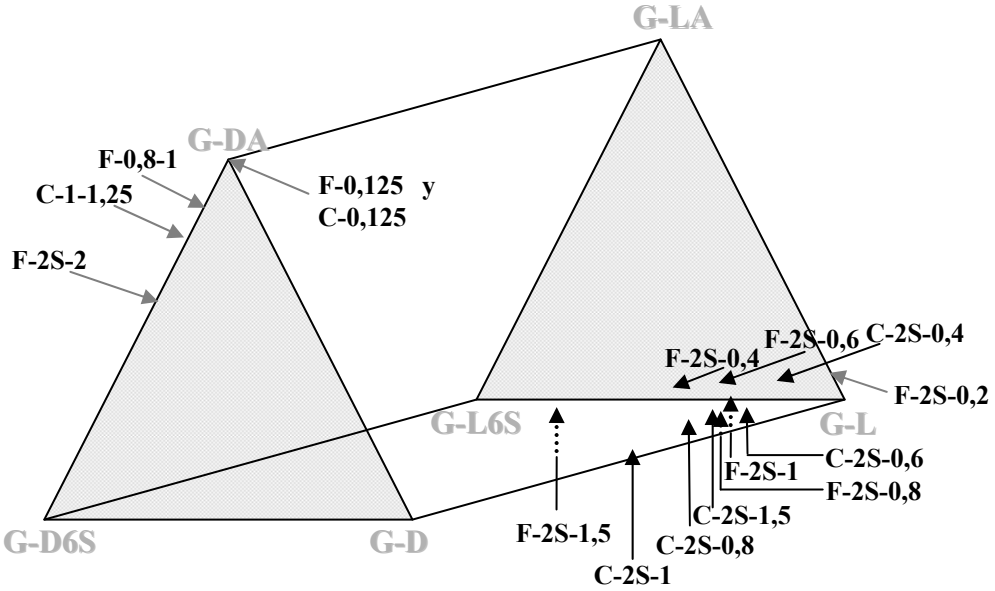


Figura 3.29 Ubicación de las fracciones de *H. musciformis* en el modelo del prisma propuesto por Stortz y Cerezo.[38] Las fracciones **C-2S-0,2** y **C-2S-2** no se muestran en la figura ya que no se realizó la determinación de galactosa 6-sulfato.

Los resultados obtenidos en este Capítulo muestran la necesidad de estudiar más en detalle los polisacáridos presentes en algas productoras de carragenanos ya que también pueden producir cantidades menores, pero relevantes, de otros galactanos.

Bibliografía

1. Craigie, J. S. & Rivero-Carro, H. (1992). *Proceedings of the International Seaweed Symposium*, *14*, 71.
2. Stortz, C. A. & Cerezo, A. S. (1993). *Carbohydrate Research*, *242*, 217–227.
3. Stortz, C. A., Cases, M. R. & Cerezo, A. S. (1997). *Carbohydrate Polymers*, *34*, 61–65.
4. Cases, M. R., Stortz, C. A. & Cerezo, A. S. (1994). *International Journal of Biological Macromolecules*, *16*, 93–97.
5. Ciancia, M., Matulewicz, M. C. & Cerezo, A. S. (1993). *Phytochemistry*, *34*, 1541–1543.
6. Ciancia, M., Matulewicz, M. C. & Cerezo, A. S. (1997). *Phytochemistry*, *45*, 1009–1013.
7. Chopin, T., Kerin, B. F. & Mazerolle, R. (1999). *Phycological Research*, *47*, 167–188.
8. Estévez, J. M., Ciancia, M. & Cerezo, A. S. (2000). *Carbohydrate Research*, *325*, 287–299.
9. Estévez, J. M., Ciancia, M. & Cerezo, A. S. (2004). *Carbohydrate Research*, *339*, 2575–2592.
10. Estévez, J. M., Ciancia, M. & Cerezo, A. S. (2001). *Carbohydrate Research*, *331*, 27–41.
11. Stevenson, T. T. & Furneaux, R. H. (1991). *Carbohydrate Research, 210*, 277–298.
12. Cases, M. R., Cerezo, A. S. & Stortz, C. A. (1995). *Carbohydrate Research, 269*, 333–341.
13. Navarro, D. A. & Stortz, C. A. (2003). *Carbohydrate Research, 338*, 2111–2118.
14. Ciancia, M., Noseda, M. D., Matulewicz, M. C. & Cerezo, A. S. (1993). *Carbohydrate Polymers, 20*, 95–98.
15. Ciucanu, I. & Kerek, F. (1984). *Carbohydrate Research, 131*, 209–217.
16. Errea, M. I., Kolender, A. A. & Matulewicz, M. C. (2001). *Botanica Marina*, *44*, 133–138.
17. Usov, A. I. (2011). *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, *65*, 115–217.
18. Peat, S., Turvey, J. R. & Evans, J. M. (1959). *Journal of the Chemical Society*, 3223–3227.

19. Cases, M. R., Stortz, C. A. & Cerezo, A. S. (1994). *Journal of Chromatography A*, *2*, 293–299.

20. Navarro, D. A., Flores, M. L. & Stortz, C. A. (2007). *Carbohydrate Polymers*, *69,* 742–747.

21. Usov, A. I., Bilan, M. I. & Shashkov, A. S. (1997). *Carbohydrate Research, 303*, 93–102.

22. Navarro, D. A. & Stortz, C. A. (2008). *Carbohydrate Research, 343*, 2613–2622.

23. Miller, I. J., Falshaw, R., Furneaux R. H. & Hemmingson, J. H. (1997). *Botanica Marina, 40,* 119–127.

24. Lahaye, M., Yaphe, W., Viet, M. P. T. & Rochas, C. (1989). *Carbohydrate Research, 190*, 249–265.

25. Kolender, A. A. & Matulewicz, M. C. (2002). *Carbohydrate Research, 337*, 57–68.

26. Stortz, C. A., Bacon, B. E., Cherniak, R. & Cerezo, A. S. (1994). *Carbohydrate Research, 261*, 317–326.

27. van de Velde, F., Knutsen, S. H., Usov, A. I., Rollema, H. S. & Cerezo, A. S. (2002) *Trends in Food Science & Technology, 13*, 73–92.

28. Knutsen, S. H., Myslabodski, D. E., Larsen, B. & Usov, A. I. (1994). *Botanica Marina*, *37*, 163–169.

29. Goffin, D., Bystricky, P., Shashkov, A. S., Lynch, M., Hanon, E., Paquot, M. & Savage, A. V. (2009). *Bulletin of the Korean Chemical Society, 30*, 2535–2541.

30. NIST/EPA/ NIH Mass Spectral Library. Versión 2.0g

31. Filisetti-Cozzi, T. M. C. C. & Carpita, N. C. (1991). *Analytical Biochemistry*, *197*, 157–162.

32. Sassaki, G. L., Souza, L. M., Serrato, R. V., Cipriani, T. R., Gorin, P. A. J. & Iacomini, M. (2008). *Journal of Chromatography A, 1208*, 215–222.

33. Spellman, M. W., McNeil, M., Darvill, A. G., Albersheim, P. & Hendrick, K. (1983). *Carbohydrate Research*, *122*, 115–129.

34. Mariño, K., Marino, C., Lima, C., Baldoni, L. & de Lederkremer, R. M. (2005). *European Journal of Organic Chemistry, 14*, 2958–2964.

35. Navarro, D. A., Cerezo, A. S. & Stortz, C. A. (2002). *Carbohydrate Research, 337*, 255–263.

36. Odonmažig, P., Ebringerová, A., Machová, E. & Alföjldi, J. (1994). *Carbohydrate Research, 252*, 317-324.

37. Cordeiro, L. M. C., Carbonero, E. R., Sassaki, G. L., Reis, R. A., Stocker-Wörgötter, E, Gorin, P. A. J. & Iacomini, M. (2005). *FEMS Microbiology Letters, 244*, 93–198.

38. Stortz, C. A. & Cerezo, A. S. (2000). *Current Topics in Phytochemistry*, *4*, 121–134.

CAPÍTULO 4

Oxidación de galactanos biosintetizados por algas rojas y evaluación de su actividad antiviral

Este Capítulo de Tesis se dividió en dos Secciones. En la primera se presenta la generación y caracterización de los galactanos oxidados y en la segunda Sección se muestra el estudio de las propiedades antivirales de los mismos.

SECCIÓN 4A

Obtención de los galactanos oxidados

4.A.1 Introducción

4.A.1.1 Oxidación de polisacáridos: formación de ácidos urónicos

En 1942, Yackel y Kenyon[1] publicaron el primer trabajo sobre oxidación selectiva de los alcoholes primarios presentes en los azúcares de los polisacáridos utilizando NO_2 gaseoso. Desde entonces, los distintos óxidos de nitrógeno han sido los reactivos más utilizados para generar ácidos urónicos en polisacáridos. En 1977, Painter[2] modificó la técnica original generando el óxido de nitrógeno *in situ* por agregado de ácido ortofosfórico al nitrito de sodio. De esta manera, el autor consiguió oxidar el C-6 de la glucosa de la celulosa con menor despolimerización que si hubiera usado directamente NO_2. Sin embargo, la oxidación no fue completamente selectiva. En un trabajo posterior, Painter *et al.*[3] utilizaron las mismas condiciones para oxidar la amilosa. En este caso, los autores observaron una mayor proporción de producto sobreoxidado, al mismo tiempo que se producía una disminución en el peso molecular. Se confirmó la vinculación de ambos procesos al volver a tratar con nitrito de sodio y ácido ortofosfórico el producto sobreoxidado y observar que se perdía completamente al dializar.

A fines del siglo XX, se comenzó a utilizar el radical orgánico 2,2,6,6-tetrametilpiperidinil-1-oxilo (TEMPO) y sus derivados, para la oxidación selectiva de los alcoholes primarios de los hidratos de carbono. Si bien los primeros trabajos realizados se aplicaron a carbohidratos de bajo peso molecular,[4] posteriormente de Nooy *et al.*[5] incursionaron en la oxidación de polisacáridos con estos reactivos. El TEMPO posee las ventajas de ser soluble en agua, de poder utilizase en cantidades catalíticas y de dar reacciones rápidas, con alto rendimiento y selectividad, y baja degradación.[6]

Existen otros reactivos para la oxidación selectiva de alcoholes primarios de hidratos de carbono, como Pt/C y oxígeno[7] y OsO_4 en combinación con $NaIO_4$, K_2FeO_4, $HCrO_4$ y $KMnO_4$ en ácido acético;[6] también puede hacerse por oxidación enzimática[6]. Sin embargo,

todas estas técnicas cuentan con diferentes desventajas. La oxidación con OsO_4 utiliza reactivos tóxicos. Si bien la oxidación con Pt/C o enzimas es ambientalmente más amigable, en el primer caso sólo sirve para oxidar hidratos de carbono de bajo peso molecular[6] y en el segundo, las enzimas son selectivas para un único tipo de azúcar.

4.A.1.1.1 Oxidación con TEMPO

El TEMPO (Fig. 4.1) pertenece al grupo de los radicales nitroxilos, los cuales se obtienen por oxidación de aminas secundarias. Estos radicales se caracterizan por ser altamente estables ya que poseen muy baja tendencia a dimerizar o descomponerse por efecto de la humedad, la temperatura o la atmósfera en la que se encuentran.[8, 9] Asimismo, aquéllos que poseen carbonos cuaternarios vecinos al radical nitroxilo son más estables al estar desfavorecida la dismutación.[8,9] Dentro de este grupo de radicales, los que más se han utilizado en los últimos tiempos son los radicales nitroxilo provenientes de aminas cíclicas que están impedidos estéricamente, entre éstos se encuentra el TEMPO.[6] Este último oxidante también es utilizado como marcador de espín para sistemas biológicos por ser paramagnético, como trampa de espín para la detección de radicales de vida corta, como antioxidante de materiales poliméricos y monómeros al evitar la oxidación térmica y fotoxidación y como inhibidor de polimerizaciones en cadena.[6]

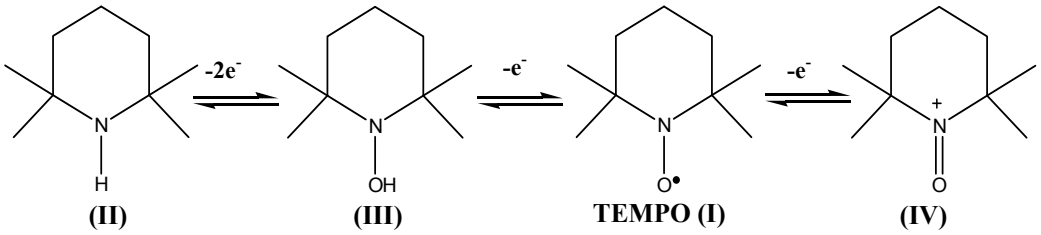


Figura 4.1 Estructura del radical TEMPO (I), y los miembros correspondientes a la serie redox: amina (II), hidroxilamina (III) y ion nitrosonio (IV) (adaptación de Bragd *et al.*[6]).

El uso del TEMPO y sus derivados sustituidos en posición 4 como oxidantes está asociado a la capacidad del grupo nitroxilo de reducirse y oxidarse. En la Figura 4.1 se muestra la serie redox completa para el radical. El agente oxidante en las reacciones con TEMPO es, en realidad, su ion nitrosonio (IV), el cual se reduce en presencia de un alcohol hasta llegar a la hidroxilamina (III).[10] Para generar el ion nitrosonio hace falta agregar oxidantes apropiados como cloro o bromo. Asimismo, para obtener la amina se utilizan reductores más fuertes como H_2/Ni Raney o $NaBH_4$.[6] Si bien el radical TEMPO es estable en medio levemente ácido, a pH muy bajo dismuta dando el ion nitrosonio y la hidroxilamina.[11]

Esto se debe a que en dichas condiciones la hidroxilamina generada se protona desplazando la reacción hacia los productos.

El mecanismo de la oxidación de alcoholes con TEMPO implica primero una oxidación a aldehído, el cual posteriormente en agua genera el *gem*-diol que se oxida finalmente al ácido (Fig. 4.2). Esta oxidación puede realizarse utilizando cantidades estequiométricas de TEMPO, donde el ion nitrosonio se obtiene por dismutación del radical. Sin embargo, es más habitual utilizarlo en proporciones catalíticas, agregando un oxidante externo (denominado oxidante primario) en cantidades estequiométricas. Este último es el encargado de transformar al TEMPO en su correspondiente catión oxoamonio y a su vez oxidar la hidroxilamina resultante al radical TEMPO para así cerrar el ciclo (Fig. 4.2). Si bien el TEMPO es siempre el oxidante que transforma los alcoholes a aldehídos, el segundo paso de oxidación puede suceder tanto por oxidación del ion nitrosonio como por acción del oxidante primario directamente.[11]

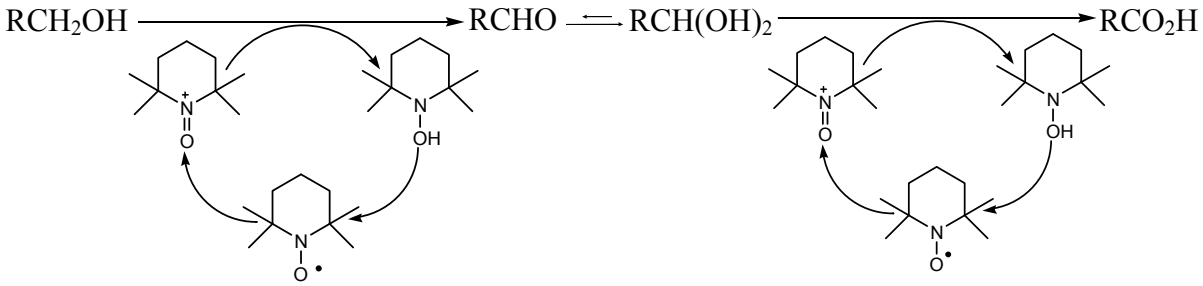


Figura 4.2 Mecanismo de oxidación de alcoholes primarios con TEMPO en cantidades catalíticas.

Un estudio más detallado de la reacción demostró que la oxidación empieza con un ataque nucleofílico del oxígeno del alcohol al nitrógeno del ion nitrosonio formando un intermediario o aducto (Fig. 4.3).[12] La formación de este intermediario es la razón de la habitual selectividad de la reacción hacia alcoholes primarios. Al estar el nitrógeno del TEMPO (y por ende de su ion nitrosonio) altamente impedido, el ataque nucleofílico se ve más favorecido cuando ocurre sobre un alcohol menos impedido.[11]

El segundo paso de la reacción consiste en la sustracción del hidrógeno del carbono del alcohol para generar el aldehído. Se postula que el estado de transición para este paso depende del pH en el que transcurra la reacción. En medio básico se genera un estado de transición intramolecular compacto de cinco miembros donde el oxígeno unido al nitrógeno es el que sustrae al protón. En cambio, en medio ácido el estado de transición es lineal ya

que, al estar protonado dicho oxígeno, una base externa sustrae el protón del carbono a oxidar (Fig. 4.3).[11]

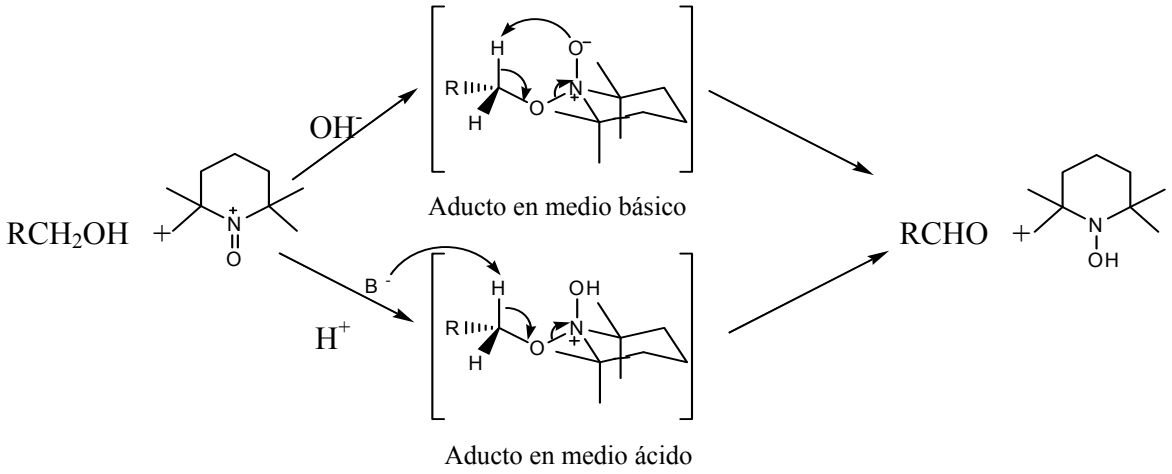


Figura 4.3 Estado de transición en medio básico y en medio ácido para la oxidación de alcoholes primarios con TEMPO (adaptado de Tojo y Fernández[11]).

4.A.1.1.1.1 Condiciones de oxidación: oxidantes primarios

La primera oxidación utilizando radicales orgánicos de tipo nitroxilo fue realizada en 1965[11] al oxidar etanol a acetaldehído utilizando el radical 4-hidroxi-2,2,6,6-tetrametilpiperidinil-1-oxilo (4-OH-TEMPO). Diez años después, Cella *et al.*[13] oxidaron varios alcoholes primarios a sus correspondientes ácidos carboxílicos utilizando ácido *m*-cloroperbenzoico y proporciones catalíticas de 2,2,6,6-tetrametilpiperidina. Este trabajo demostró por primera vez que se podían utilizar cantidades catalíticas del ion nitrosonio para la oxidación. En 1983, Semmelhack *et al.*[14] realizaron la oxidación de alcoholes con TEMPO regenerando electroquímicamente la sal de nitrosonio por la aplicación de un potencial adecuado.

En 1987, Anelli *et al.*[15] publicaron un trabajo en el que oxidaron alcoholes primarios con alta eficiencia utilizando lavandina comercial (NaClO), KBr, $NaHCO_3$ y cantidades catalíticas del radical 2,2,6,6-tetrametil-4-metoxipiperidinil-1-oxilo (4-MeO-TEMPO) en una mezcla bifásica de H_2O-CH_2Cl_2 a 0°C (Fig. 4.4). Cuando los autores realizaban la reacción por corto tiempo obtenían el aldehído, mientras que con tiempos mayores y la adición de un catalizador de transferencia de fase se generaban los ácidos carboxílicos. La realización de la reacción en estas condiciones se la conoce como "oxidación de Anelli". Si bien Anelli utilizaba 4-MeO-TEMPO, es posible utilizar TEMPO o sus otros derivados. Otro hecho importante es que utilizó lavandina,[15] un reactivo fácil de conseguir y económico.

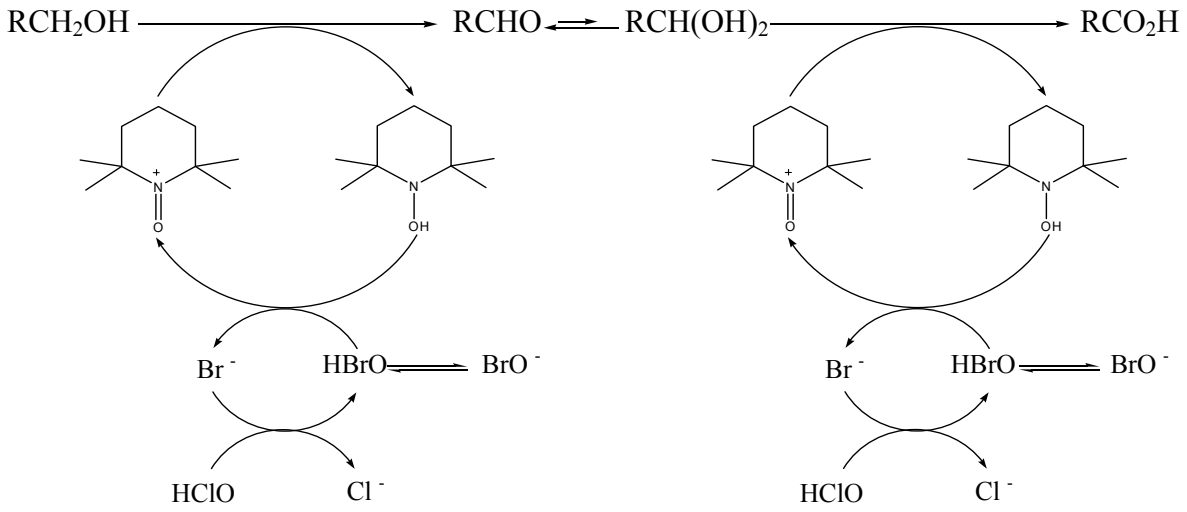


Figura 4.4 Oxidación de alcoholes primarios con las condiciones propuestas por Anelli (adaptado de Tojo y Fernández[11]).

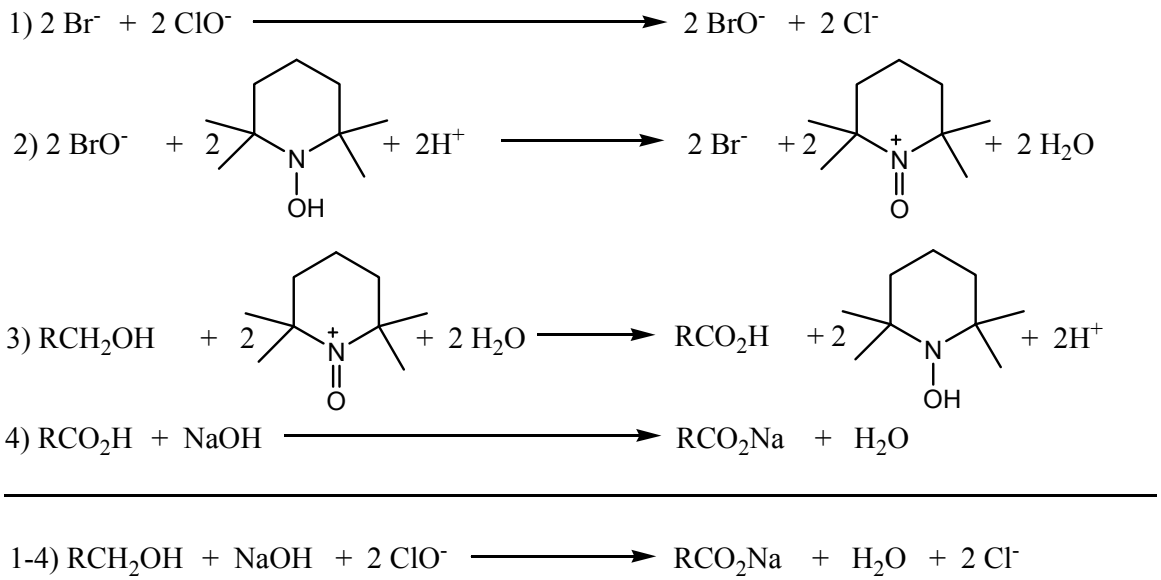
Según el mecanismo propuesto por Anelli,[15] el HClO proveniente de la lavandina es el oxidante estequiométrico y primario. Su función es oxidar al bromuro aportado por el KBr de manera de generar HBrO, un mejor oxidante encargado de regenerar el ion nitrosonio a partir de la hidroxilamina. Sin embargo, al pH que se encuentra la lavandina adicionada (12,7), la proporción de HClO y HBrO presentes en solución sería muy baja, enlenteciendo la reacción. Por ello, los autores decidieron disminuir el pH a la solución de NaClO hasta 8,6 por medio de un buffer.[15] Realizaron la reacción a baja temperatura para evitar que el ion nitrosonio produzca H_2O_2 en medio básico.[15] Como solvente de reacción, los autores optaron por usar la mezcla bifásica H_2O-CH_2Cl_2 debido a las diferentes solubilidades de los reactivos. Sin embargo, para alcoholes hidrofílicos, como ocurre con los polisacáridos, la reacción se debe llevar a cabo utilizando únicamente agua como solvente.[11]

Se han probado otros oxidantes primarios. Por un lado, Zhao *et al.*[16] realizaron modificaciones sobre la técnica descripta por Anelli sustituyendo al hipoclorito de sodio por clorito de sodio. Los autores indicaron que el oxidante estequiométrico era el clorito de sodio y que el hipoclorito presente en la reacción se encontraba en cantidades catalíticas. En estas condiciones, el TEMPO oxidaba el alcohol a aldehído y luego directamente el $NaClO_2$ oxidaba el aldehído a ácido. Esta reacción fue realizada a temperatura ambiente y a un pH de 6,7. Por otro lado, Epp y Widlanski[17] demostraron que se podía utilizar bis(acetoxi)iodobenceno (BAIB) como oxidante primario para oxidar nucléosidos a los correspondientes derivados ácidos. El BAIB oxida la hidroxilamina generada a TEMPO el cual, por dismutación, da el ion nitrosonio.[11]

4.A.1.1.2 Antecedentes de polisacáridos oxidados con TEMPO

Al principio de este Capítulo se mencionó que el primer trabajo de oxidación de polisacáridos con TEMPO para generar ácidos urónicos fue realizado por de Nooy *et al.*[5] Los autores consiguieron oxidar almidón soluble de papa e inulina de dalia para dar los correspondientes productos de oxidación en el C-6 de la glucosa y de la fructosa respectivamente.[5] Para ello, utilizaron las condiciones propuestas por Anelli para oxidar con TEMPO, pero con ligeras modificaciones. El solvente utilizado fue agua en lugar de utilizar la mezcla bifásica y los autores usaron una solución de NaOH 0,5M para mantener un pH en un rango entre 10,5 y 11 en vez de un buffer.

Como se muestra en el Esquema 4.1, por cada mol de carboxilato generado, se consume un mol de NaOH, por lo que en estas condiciones el pH debe ser controlado en todo momento para mantenerlo constante. Sin embargo, al alcalinizar de esta manera es importante llevar previamente la solución de NaClO al mismo pH que se va a llevar a cabo la reacción, para que el pH final no se modifique. La reacción se finalizó por agregado de etanol y neutralización con HCl.



Esquema 4.1 Reacciones involucradas en el proceso de oxidación con TEMPO de alcoholes primarios al usar NaOH como base.

Si bien los autores pudieron llevar a cabo la oxidación del almidón sin mayores problemas, al oxidar la inulina observaron que el consumo de NaOH era superior al calculado para la oxidación exclusiva de los alcoholes primarios.[5] Habiendo descartado una oxidación no selectiva de los alcoholes producida por el hipobromito, los autores supusieron que la oxidación de los alcoholes secundarios con TEMPO en las furanosas podía ser más rápida

que en las piranosas. Esto demostraría que la oxidación con TEMPO es más selectiva en piranosas que en furanosas. Sin embargo, se han observado algunos ejemplos en literatura de oxidación inespecífica en polisacáridos con azúcares piranósicos (ver luego).

A partir del primer trabajo realizado por de Nooy *et al.*[5], el TEMPO ha sido más utilizado para la oxidación selectiva de polisacáridos. Asimismo, diversos trabajos han investigado las condiciones de reacción a fin de hallar las óptimas para obtener un polisacárido oxidado selectivamente y con baja despolimerización. Esta última es una consecuencia desfavorable de este tipo de reacciones y en literatura se han hallado distintas razones por la que ocurre. De Nooy *et al.*[18] atribuyeron la degradación a un fenómeno de β-eliminación desde el aldehído generado en C-6 durante la reacción. En cuanto éste se oxida a carboxilato, la degradación ya no ocurriría.

El primer estudio de optimización de la reacción de oxidación también fue realizado por de Nooy *et al.*[10] Este grupo realizó un estudio sistemático de la reacción de oxidación del metil α-glucopiranósido, del metil β-glucopiranósido y de diferentes glucanos (almidón, oligo-α-(1→4)-glucósidos, y pululano) a fin de observar el efecto del pH, de la concentración de NaBr y de la temperatura.[10]

Al evaluar el efecto del pH, de Nooy *et al.*[10] observaron que la velocidad de la reacción con el metil α-glucopiranósido era máxima a pH 10 aún cuando el grupo de Anelli trabajaba a pH 8,6. Los autores atribuyeron este hecho a que al aumentar el pH era más fácil formar el intermediario de la reacción (Fig. 4.3) debido a la desprotonación del alcohol. Sin embargo, a altos valores de pH la conversión de hipoclorito y bromuro a cloruro e hipobromito era menor, enlenteciendo la reacción.[10] Al repetir el estudio con el almidón de papa en lugar de hacerlo con el metil α-glucopiranósido, los autores llegaron a la conclusión que el pH óptimo estaba entre 10,5 y 11. Independientemente del pH, los autores observaron siempre una gran selectividad en la oxidación de los alcoholes primarios frente a los secundarios. A su vez, comprobaron que la oxidación no selectiva de los hipohalitos presentes ocurría a una velocidad mucho menor, siendo máxima a pH 6-8.

Al estudiar el efecto de la concentración de NaBr, de Nooy *et al.*[10] comprobaron que la ausencia de éste disminuía la velocidad de reacción, tal como había sido observado por Anelli *et al.*[15] A esta misma conclusión llegaron Jiang *et al.*[19] al estudiar la cinética de oxidación con TEMPO del ácido hialurónico en las condiciones de Anelli modificadas por de Nooy *et al.*[5] Jiang *et al.*[19] notaron que el efecto de la concentración de dicha sal dependía de la

concentración de NaClO. Esto se debe a que a altas fuerzas iónicas, la atracción del catión nitrosonio al polisacárido cargado negativamente es menor, enlenteciendo la reacción.

Por otro lado, de Nooy *et al.*[10] investigaron el efecto de la temperatura. Los resultados fueron opuestos a los de Anelli *et al.*[15] ya que a mayor temperatura, ellos encontraron que la velocidad de reacción aumentaba. Sin embargo, los autores aclararon que al aumentar la temperatura, también aumentaba la oxidación no selectiva de los hipohalitos.

Además de las variables mencionadas previamente, de Nooy *et al.*[10] detectaron, al tratar con TEMPO una amilodextrina (α-(1→4)-glucósidos) de bajo peso molecular, la oxidación del extremo reductor, el cual posteriormente siguió oxidándose, generando fragmentos más pequeños.[10] Este hecho fue estudiado en más detalle por Thaburet *et al.*[20] Los autores observaron, al oxidar con TEMPO maltodextrinas de bajo peso molecular en las condiciones de Anelli modificadas, la formación de oxalato, el cual se generaba por descarboxilación y/o ruptura de dioles en el extremo reductor. Este fenómeno causa la despolimerización de los oligosacáridos. Los autores comprobaron que la generación de oxalato disminuía al trabajar a pH altos y que no se observaba al trabajar con polisacáridos de alto peso molecular.

En otro trabajo realizado por de Nooy *et al.*[18] se analizó la variación del peso molecular y el efecto del pH al oxidar pululanos. Los autores determinaron que la degradación disminuía al bajar el pH aunque el tiempo de reacción era mayor, siendo el pH óptimo entre 9,2 y 9,7. Resultados similares fueron hallados por Thaburet *et al.*[20] al determinar que el almidón oxidado de mayor peso molecular se obtenía a pH 9,5.

Un hecho interesante de la reacción de oxidación de pululanos realizada por de Nooy *et al.*[18] es que se observó la oxidación de las posiciones C-2 y C-3, además de la del C-6. Esto demuestra que los azúcares piranósicos también pueden sufrir oxidaciones inespecíficas. Para revertirlo, los autores adicionaron $NaBH_4$ al pululano sobreoxidado, generando un producto oxidado únicamente en el C-6 de la glucosa, por lo que la reducción de las cetonas mostró una estereoselectividad en favor de la configuración tipo *gluco.* Este no es el único caso de oxidación inespecífica en azúcares piranósicos. Su *et al.*[21] también detectaron productos de sobreoxidación en la agarosa, al tratar el galactano en las condiciones de Anelli modificadas.

La adaptación de las condiciones de Anelli descriptas por de Nooy *et al.*[5] es la más utilizada para la oxidación de polisacáridos con TEMPO. Con dicha metodología, se han oxidado glucanos como el almidón[5,10,20,22-24], la celulosa,[25,26] el pululano,[10,18,22,27] el curdlano,[28,29] el paramilon,[28] glucanos de origen fúngico,[30,31] etc. También se utilizaron estas condiciones para oxidar quitina[32] y su derivado desacetilado (quitosano[33]),

glucoglucuronanos bacterianos,[34] xantano,[35] agarosa,[21] galactomananos,[36,37] galactoxilanos,[37] galactoglucomananos,[37] ácido hialurónico,[19,38] gelano,[39,40] etc. En cada caso se adaptaron las condiciones de pH, temperatura y proporción de reactivo. En particular, Xu *et al*.[41] realizaron una modificación interesante a las condiciones propuestas por de Nooy *et al*.[5] Ellos utilizaron buffers (Na_2CO_3/$NaHCO_3$ o bórax) a pH 10,5 en vez de la solución de NaOH para oxidar la celulosa, de manera de independizarse el control del pH. Siguiendo estas condiciones los autores observaron una menor despolimerización del producto oxidado. El uso de bórax permitió mayor capacidad de penetración del oxidante en las fibras de celulosa que el buffer de Na_2CO_3/$NaHCO_3$. A su vez, este último reguló mejor el pH durante la reacción.

Las condiciones de Zhao también fueron adaptadas para la oxidación de polisacáridos. Isogai y colaboradores consiguieron oxidar celulosa[42,43] y curdlano,[44,45] utilizando el radical 4-acetamido-2,2,6,6-tetrametilpiperidinil-1-oxilo (4-acetamido-TEMPO), $NaClO_2$ y NaClO a pH 4,7 y 35°C. Al realizarse la oxidación a pH ligeramente ácido, no ocurría β-eliminación, ni degradación alcalina, obteniéndose productos de peso molecular aproximadamente diez veces mayor al del producto oxidado en las condiciones de Anelli. Si bien la oxidación fue completa y efectiva para estos glucanos, al realizarla sobre almidón, amilosa y pululano, los autores sólo consiguieron oxidarlos parcialmente.[44]

Por otro lado, con el fin de buscar condiciones más amigables con el medio ambiente, se han realizado reacciones de oxidación en sistemas que no incluyan haluros. Isogai *et al.*[46] realizaron oxidaciones de curdlano, amilodextrina y celulosa con 4-acetamido-TEMPO con regeneración electroquímica del oxidante. Los autores obtuvieron productos oxidados con alto grado de selectividad sobre C-6 y bajo grado de despolimerización al realizar la reacción a pH casi neutro. Otro enfoque ha sido la utilización de enzimas como oxidantes primarios para la oxidación con TEMPO,[6] siendo el más usado el sistema lacasa/O_2. Esta enzima oxida compuestos fenólicos y aminas sustituidas pero no alcoholes alifáticos. Por lo tanto, esta enzima puede regenerar al TEMPO sin afectar a los alcoholes alifáticos presentes en el polisacárido. De esta manera, se consiguió oxidar celulosa,[6] almidón,[6] pululano[6] y goma guar.[47]

4.A.1.1.2.1 Usos y propiedades de los polisacáridos oxidados

Una de las primeras características que se destacaron sobre los polisacáridos oxidados selectivamente en el C-6 de sus unidades monosacarídicas es el aumento de su solubilidad, especialmente en medio básico. Ya en 1942 Yackel y Kenyon[1] observaron este fenómeno en la celulosa oxidada frente a aquella sin oxidar. Más recientemente, Chang y Robyt[48]

realizaron un estudio de las propiedades de solubilidad, viscosidad y de formación de geles con Ca^{2+} de distintos polisacáridos oxidados selectivamente con TEMPO (Tabla 4.1). En todos los casos se observó que los productos oxidados eran más solubles en agua (a pH neutro) que sus precursores sin oxidar. La viscosidad sólo variaba marcadamente para el quitosano. La formación de geles con Ca^{2+} sólo pudo observarse para el almidón, sus derivados y la celulosa, aunque los autores destacaron que en ninguno de los casos los geles obtenidos resultaban tan fuertes como aquel generado por el alginato natural. Es importante destacar que los resultados expuestos por Chang y Robyt no pueden ser extrapolados a todos los polisacáridos oxidados. Lavazza *et al.*[47] observaron un aumento en la viscosidad al oxidar la goma guar. La solución del polisacárido oxidado poseía características de gel aún en ausencia de Ca^{2+}, mientras que la del nativo es una solución viscosa.

Tabla 4.1 Solubilidad, viscosidad intrínseca y formación de geles con Ca^{2+} para los glucanos oxidados (adaptado de Chang y Robyt[48]).

Polisacárido oxidado	Solubilidad (% p/v)[a]	Viscosidad (mP)[a,b]	Geles con Ca^{2+}
Almidón	11,1 (0,2)	9,95 (10,02)	Si
Amilosa	10,9 (0,1)	9,42 (9,59)	Si
Amilodextrina	41,9 (14,8)	10,62 (10,72)	Si
Quitina	7,9 (0)	10,52 (ND[c])	No
Quitosano	33,4 (29,7)	9,32 (67,58)	No
Pululano	34,2 (12,6)	9,95 (9,82)	No
Celulosa	9,4 (0)	10,59 (ND)	Si

[a] Entre paréntesis se expresa el valor para el polisacárido sin oxidar.
[b] Viscosidad intrínseca determinada para soluciones de 2 mg de polisacárido/ml.
[c] ND = no determinada por insolubilidad de la muestra

La reacción de oxidación en el C-6 de los azúcares presentes en los polisacáridos también ha servido para aumentar la actividad biológica con respecto a los polisacáridos nativos. Los productos de oxidación de un glucano extraído de *Portia cocos*,[30] del xantano,[35] del curdlano[49] y del gelano desacetilado[40] han demostrado poseer una mayor actividad antioxidante que el producto sin oxidar. También se observó un aumento en la actividad antitumoral al oxidar el glucano extraído de *Grifola frondosa*.[31]

Otra aplicación de los polisacáridos oxidados está dada por su capacidad de capturar cationes. La quitina oxidada formó complejos solubles con Cu^{2+} y Ni^{2+} e insolubles con Pb^{2+} y Fe^{3+}.[32] A su vez, Saito y Isogai[25] determinaron que la capacidad de captura de cationes de la

celulosa oxidada con TEMPO es mayor que la de la carboximetilcelulosa. Asimismo observaron un orden de selectividad de iones siendo el Pb^{2+} el más retenido.

Los polisacáridos oxidados con TEMPO también han sido utilizados como punto de partida para realizar otras modificaciones químicas. A partir del producto completamente oxidado, se han realizado reacciones de amidación[21,26] y de esterificación.[32] También se han realizado reacciones a partir del aldehído generado, el cual se obtiene a tiempos cortos de reacción. Sierakowski *et al.*[36] y Huerta-Angeles *et al.*[38] realizaron reacciones de aminación reductiva sobre los productos de oxidación parcial de un galactomanano y de ácido hialurónico. En ambos casos la reacción de aminación se realizó a continuación de la de oxidación (*one-pot*), siendo muy importante para esta última controlar del grado de oxidación. En ambos casos, además de la presencia del producto aminado, se observaron grupos carboxilato.

4.A.2 Objetivos

En esta Sección se oxidó con TEMPO el κ-carragenano con el objetivo de generar un nuevo polisacárido con estructura [→3)-β-D-Gal*p*A 4-sulfato-(1→4)-3,6-An-α-D-Gal*p*-(1→]. Además se evaluaron distintas condiciones de reacción para obtener polisacáridos con distintos grados de oxidación, maximizar los rendimientos y minimizar las reacciones secundarias. Con el fin de obtener nuevos productos también se oxidaron el ι-carragenano y la agarosa.

4.A.3 Resultados y discusión

4.A.3.1 Introducción del grupo carboxilato por carboximetilación

Cuando se inició este trabajo de Tesis, se buscaron alternativas para generar grupos carboxilo en el κ-carragenano aislado de *Hypnea musciformis*, de preferencia de manera selectiva, a fin de evaluar cómo se modificaban sus propiedades reológicas y su actividad biológica. Tranquilan-Aranilla *et al.*[50] habían observado cambios en las propiedades gelificantes al modificar el κ-carragenano con ácido monocloroacético para obtener el correspondiente carboximetil derivado. A su vez, Leong *et al.*[51] habían obtenido distintos derivados de carboximetil κ-carragenanos con diferentes posiciones preferenciales de sustitución al variar las proporciones de los reactivos. Tomando en cuenta estos antecedentes, se decidió insertar el grupo carboxilo mediante la reacción con ácido monocloroacético para

generar el carboximetil κ-carragenano. En primer lugar se ensayaron las condiciones de Leong *et al.*,[51] es decir, una suspensión del polisacárido en isopropanol, a la que se agregó una solución acuosa de NaOH y el ácido. Si bien se probaron distintas condiciones donde se variaron las proporciones de base y ácido, y la temperatura, en ningún caso se obtuvo una sustitución significativa. Esto se confirmó mediante el uso de espectroscopía de RMN bidimensional (espectros HSQC, en particular) ya que en todos los casos las señales observadas eran las del κ-carragenano sin sustituir. El problema principal parecía ser la insolubilidad del polisacárido liofilizado en isopropanol. Es por ello que se decidió probar con las condiciones utilizadas para la metilación[52] o sea, generación de la sal de trietilamonio, disolución en DMSO, agregado de NaOH sólido y luego el ácido monocloroacético como alquilante. En esta ocasión sí se obtuvo reacción ya que se observó un espectro HSQC más complejo y con mayor número de señales. Un análisis del mismo mostró que si bien el producto final se encontraba mayoritariamente carboximetilado, no se podía obtener ninguna selectividad como se pretendía originalmente.

En función de estos resultados poco satisfactorios, se decidió buscar un método alternativo para la inserción selectiva de grupos carboxilo.

4.A.3.2 Oxidación del κ-carragenano con TEMPO

Se optó por introducir grupos carboxilo en los carragenanos por oxidación selectiva con TEMPO del C-6 de las galactosas. Este método nunca había sido probado con carragenanos anteriormente. Cabe destacar que la reacción de oxidación de la agarosa con TEMPO fue publicada durante el desarrollo de este trabajo de Tesis.[21]

Para generar el κ-carragenano oxidado [→3)-β-D-Gal*p*A 4-sulfato-(1→4)-α-3,6-An-D-Gal*p*-(1→] (Figura 4.6) se partió de la fracción **C-0,125** aislada de *Hypnea musciformis*, la cual estaba compuesta por un κ-carragenano con estructura prácticamente ideal (ver Capítulo 2). La oxidación se realizó utilizando el sistema NaClO/NaBr/TEMPO, el cual ha demostrado dar muy buenos resultados para oxidar selectivamente el C-6 de los azúcares en polisacáridos.[10]

De los distintos trabajos que usaron las condiciones de Anelli adaptadas por de Nooy *et al.,*[5] se utilizaron las proporciones empleadas por Elboutachfaiti *et al.*[39] para oxidar gelanos, aunque se realizaron algunas modificaciones.

Una de las variaciones efectuadas fue el modo en el que se controló la reacción. Esto se realizó midiendo la cantidad de NaClO agregado en lugar del volumen de solución de NaOH

consumido. Al trabajar de esta manera la reacción se independiza del control exacto del pH de la solución, aún cuando este no debería variar en demasía. Sin embargo, se debe determinar la proporción exacta de NaClO agregado, la cual debe ser ligeramente superior a la estequiométrica ya que se toma en cuenta, entre otros factores, la oxidación del C-1 de extremo reductor. Elboutachfaiti *et al.*[39] agregaron un exceso del 35 % sobre la cantidad estequiométrica. Sin embargo en otros trabajos[10,20] utilizaron un exceso de sólo el 10 %. Se optó por usar un exceso del 25 % por encima de la relación estequiométrica.

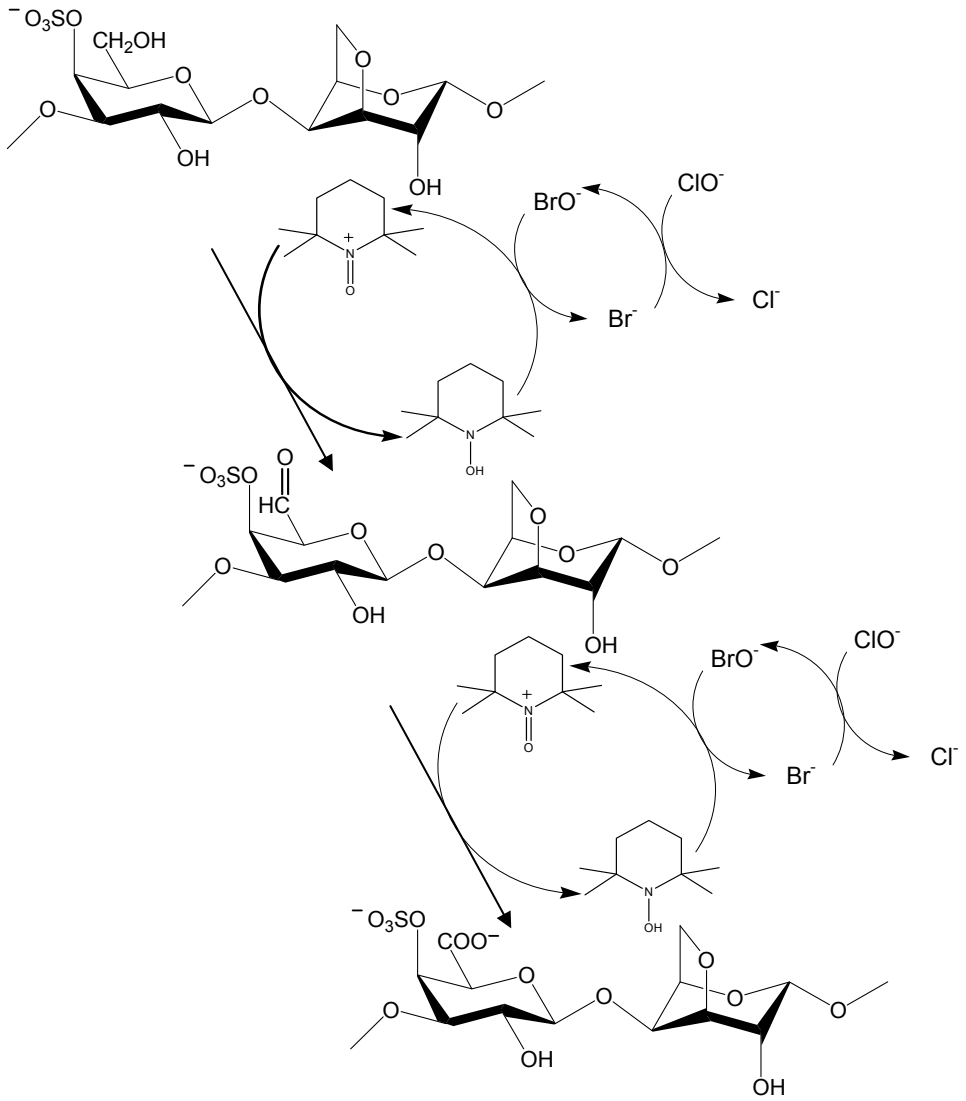


Figura 4.6 Reacción de oxidación del κ-carragenano con TEMPO.

El pH utilizado para la reacción se modificó con respecto al descripto por Elboutachfaiti *et al.*[39] Este grupo trabajó a pH 10; sin embargo, de acuerdo al estudio realizado por de Nooy *et al.*,[10] la oxidación del almidón de papa ocurría a mayor velocidad y con menor grado de oxidación de los hipohalitos a pH 10,5-11. Por ello se decidió, como un primer ensayo trabajar con un pH de 10,5.

De esta manera, las condiciones utilizadas para el κ-carragenano fueron: al polisacárido disuelto en agua se le agregó el TEMPO y el NaBr. La reacción se realizó a 0 °C. Se llevó la solución a pH 10,5 con una solución de NaOH y se adicionaron 1,25 equivalentes de NaClO. Se utilizó una solución de lavandina comercial, la cual fue valorada con una solución de $Na_2S_2O_3$. La reacción se continuó hasta observar que el pH se mantuvo constante (lo cual ocurrió a las 2 h); el exceso de oxidante se destruyó agregando etanol y se llevó a pH 5 con HCl 1M. Luego el producto se dializó para eliminar los compuestos de bajo peso molecular y se liofilizó.

De esta manera se obtuvo un producto **KO_E** con un rendimiento del 80,1 %. Su caracterización (Tabla 4.2) se efectuó por cuantificación de la proporción de galactosa por CGL, el ácido galacturónico y la 3,6-anhidrogalactosa por métodos colorimétricos y el éster sulfato por conductimetría (ver Sección 6.12.2.5). A diferencia de lo realizado en Capítulos anteriores, la 3,6-anhidrogalactosa no se pudo cuantificar por CGL ya que se encuentra unida al ácido galacturónico cuyo enlace glicosídico es más resistente a la hidrólisis ácida y en consecuencia no es liberada tan fácilmente. Los datos analíticos indican que las unidades de galactosa del polisacárido se oxidaron en el C-6. Sin embargo, se observa que la proporción de 3,6-anhidrogalactosa también disminuyó sensiblemente, lo cual no debería ocurrir en una reacción selectiva. El peso molecular resultó ser cerca de una tercera parte de su valor original, lo cual es consistente con la despolimerización observada al oxidar otros polisacáridos.[18,19]

Tabla 4.2 Composición de **KO_E** y **C-0,125**.

	Rend. (% molar)	Gal:GalA:3,6-AnGal:SO_3Na[a]	PM[b] (kDa)
C-0,125		1,00:0,00:1,02:1,17	215
KO_E	83,3	0,03:0,97:0,30:0,88	65

[a] Relación molar. Se considera 1=Gal+GalA
[b] Peso molecular determinado por GPC considerando el máximo del pico.

Al analizar el espectro de HSQC (Figura 4.7) se observó un espectro mucho más complejo que el esperado. Al ser el κ-carragenano un polisacárido compuesto por una díada repetitiva (ver Capítulo 1), el producto totalmente oxidado debería generar un espectro HSQC relativamente simple con no más de 12 señales para los 11 carbonos observables. Obviamente, si el polisacárido no se oxidara completamente se podrían esperar más señales.

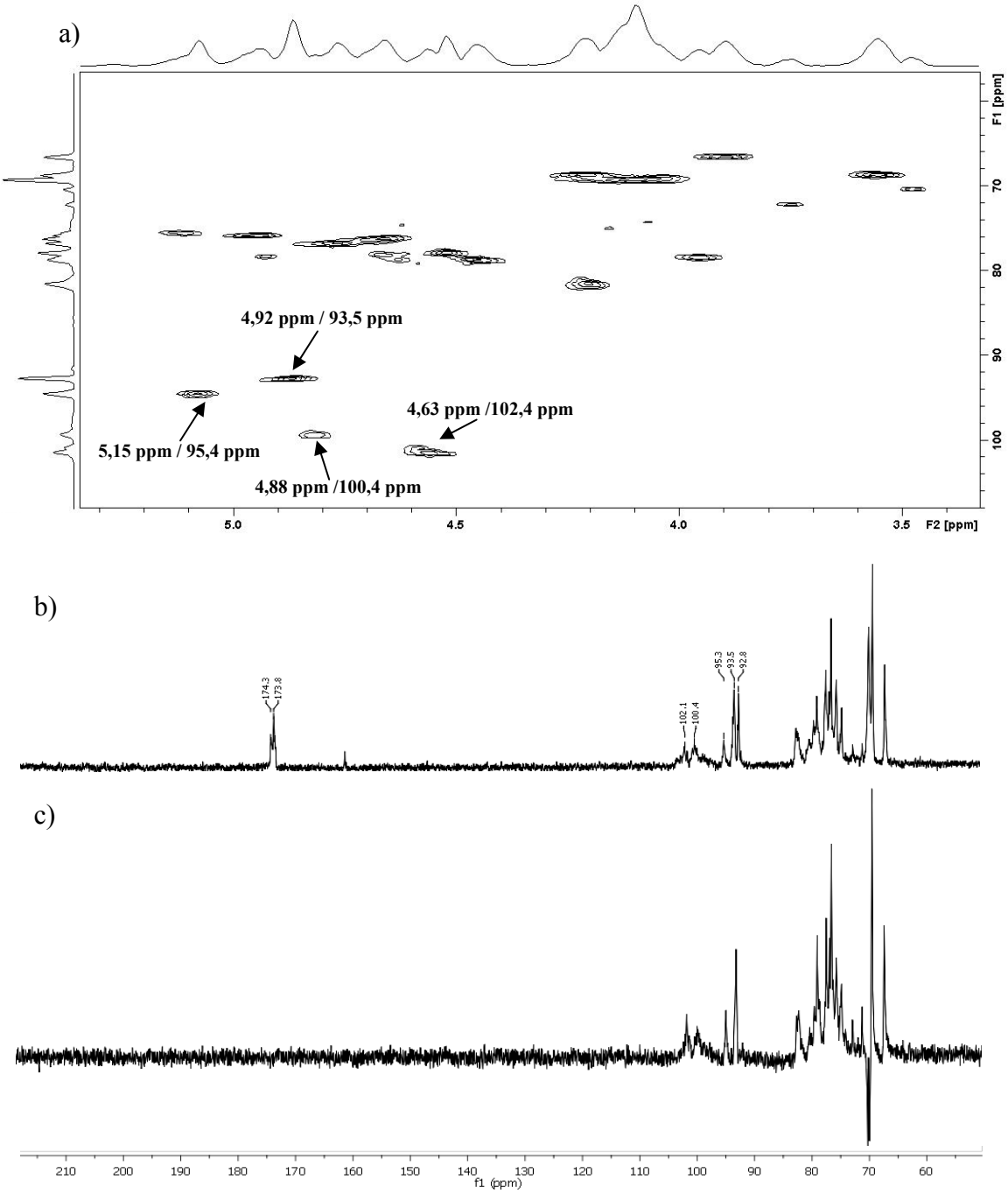


Figura 4.7 Espectros a) HSQC, b) RMN-^{13}C (125 MHz) y c) RMN-^{13}C DEPT (125 MHz) de **KO$_E$** en D_2O a temperatura ambiente.

En el espectro HSQC la señal correspondiente al C-6 de la β-D-galactosa 4-sulfato (3,86 ppm en ^{1}H y 61,2 ppm en ^{13}C, Capítulo 2, Tabla 2.6) no se observa, lo que indicaría que el alcohol primario fue completamente oxidado. La región anomérica presenta cuatro señales en lugar de las dos esperadas: 5,15 ppm / 95,4 ppm, 4,95 ppm / 93,5 ppm, 4,88 ppm / 100,4 ppm y 4,63 ppm / 102,4 ppm. Dos de dichas señales poseen desplazamientos químicos muy similares a los de los átomos anoméricos de la β-D-galactosa 4-sulfato (4,70 ppm / 102,5 ppm, Tabla 2.6) y a los de la 3,6-anhidro-α-D-galactosa (5,15 ppm / 94,7 ppm, Tabla 2.6).

El espectro de RMN-^{13}C (Figura 4.7b) confirmó la oxidación del C-6 a ácido ya que la presencia de señales entre 170 y 175 ppm corresponden al carbono carboxílico. Sin embargo, la existencia de dos señales en esa región estaría indicando la presencia de dos grupos carboxilo con entornos químicos distintos, lo cual nuevamente no se condice con el producto buscado. Al analizar la región del espectro correspondiente a los carbonos anoméricos se observan 5 señales, una más que las observadas en el HSQC. Esto indicaría la presencia de un carbono cuaternario posiblemente vecino a dos oxígenos. El espectro de RMN-^{13}C DEPT (Figura 4.7c) presenta dos señales asignables a metilenos en la misma región donde aparece la del C-6 de la 3,6-anhidrogalactosa (69,7 ppm, Tabla 2.6), lo que indicaría dos unidades de dicho azúcar con entornos químicos distintos. A su vez, sólo se observan cuatro señales en la región anomérica, lo cual confirmaría que la aquella a 92,8 ppm corresponde a un carbono cuaternario y por ello no se observa en el RMN-^{13}C DEPT ni en el HSQC.

En el espectro de FT-IR de **KO$_E$** (Figura 4.8) se observan las señales características del κ-carragenano[53] originadas en la tensión de los grupos: O=S=O (1230-1250 cm^{-1}), C-4–O–S (840-850 cm^{-1}) y O–C–O (930 cm^{-1}). Además, se observa una señal adicional a 1621cm^{-1} consistente con una frecuencia característica de la tensión C=O en el carboxilato.

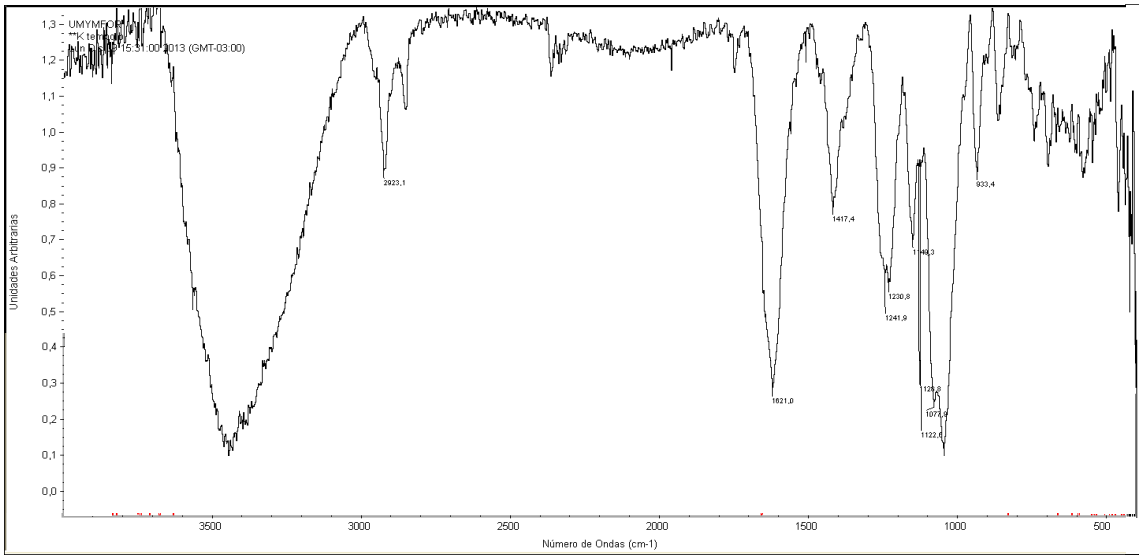


Figura 4.8 Espectro FT-IR de **KO$_E$**.

A fin de constatar si las condiciones de reacción eran adecuadas, se decidió realizar la misma con almidón, cuyo producto de oxidación ya había sido informado[10]. Al utilizar las mismas condiciones utilizadas para generar **KO$_E$**, se obtuvo un producto (**AlmO$_E$**) cuyo espectro de HSQC (no se muestra) fue consistente con el previamente informado (Tabla 4.3). Se confirmó la oxidación completa del C-6 de la glucosa ya que no se observó la señal correspondiente en el espectro HSQC.

Tabla 4.3 Asignación de las señales del espectro HSQC del [→4)-α-Glc*p*A-(1→]$_n$ modificado (**AlmO$_E$**) y comparación con datos bibliográficos.

		δ (ppm)			
		AlmO$_E$		de Nooy *et al.*[10]	
		^{1}H	^{13}C	^{1}H	^{13}C
	C/H-1	5,55	97,8	5,56	98,0
	C/H-2	3,54	72,2	3,49	72,8
GlcA	C/H-3	3,96	73,4	3,94	73,9
	C/H-4	3,69	76,4	3,66	77,0
	C/H-5	4,08	72,5	4,02	73,2
	C-6		ND[a]		177,0

[a] ND = no determinado

De esta manera se pudo confirmar que el problema no estaba relacionado con las condiciones de reacción, sino con el polisacárido. Si bien en **KO$_E$** se observaba la oxidación del C-6 de la galactosa, las numerosas señales observadas en el HSQC y RMN-^{13}C sugerían que al mismo tiempo estaban ocurriendo reacciones secundarias.

4.A.3.3 Análisis de la reacción de oxidación secundaria

Se han descripto en bibliografía diversas reacciones secundarias para la oxidación con TEMPO.[11,18] La posibilidad de halogenación debido a la presencia de hipoclorito e hipobromito se descartó, ya que sólo ocurre para alquenos y compuestos aromáticos. Tampoco era posible la formación de una lactona intramolecular al acidificar, ya que el oxhidrilo en C-3 de la β-galactosa, el único con el que podría lactonizar, forma parte del enlace glicosídico. La oxidación de alcoholes secundarios a cetonas sería la reacción secundaria más probable. Sin embargo, no se observaron en el RMN-^{13}C (Fig. 4.7) ni en el IR (Fig. 4.8) señales compatibles con una cetona que confirmen esta suposición. Cabe destacar que Su *et al.*,[21] al oxidar la agarosa en condiciones similares a las utilizadas, observaron también más señales de las esperadas en el RMN-^{13}C que atribuyeron a oxidación de los oxhidrilos secundarios, aún cuando no observaron carbonilos en el RMN-^{13}C. La posible explicación a estas observaciones se verá más adelante.

Con el fin de poder confirmar que la sobreoxidación es la reacción secundaria que estaba ocurriendo se repitió la reacción modificando las condiciones de finalización de la misma agregando $NaBH_4$ en lugar de etanol. Este reactivo no sólo destruiría el exceso de oxidante, sino que también reduciría los posibles carbonilos de cetona generados por

sobreoxidación sin afectar a los grupos carboxilato. De esta manera se obtuvo el producto **KO_H**. En el espectro HSQC de **KO_H** se observaron 12 señales importantes (que corresponden a 11 carbonos y 12 hidrógenos) y tres de muy baja intensidad (Figura 4.9). El análisis del espectro permitió observar la desaparición de la señal del C-6 de la galactosa, lo cual demostraba que ocurría la oxidación en dicha posición. En la región anomérica se observaron sólo dos señales, a diferencia de las cuatro observadas para **KO_E**. Las 3 señales de menor intensidad también aparecen en el espectro de **KO_E**, lo que estaría indicando que la reducción no fue completa.

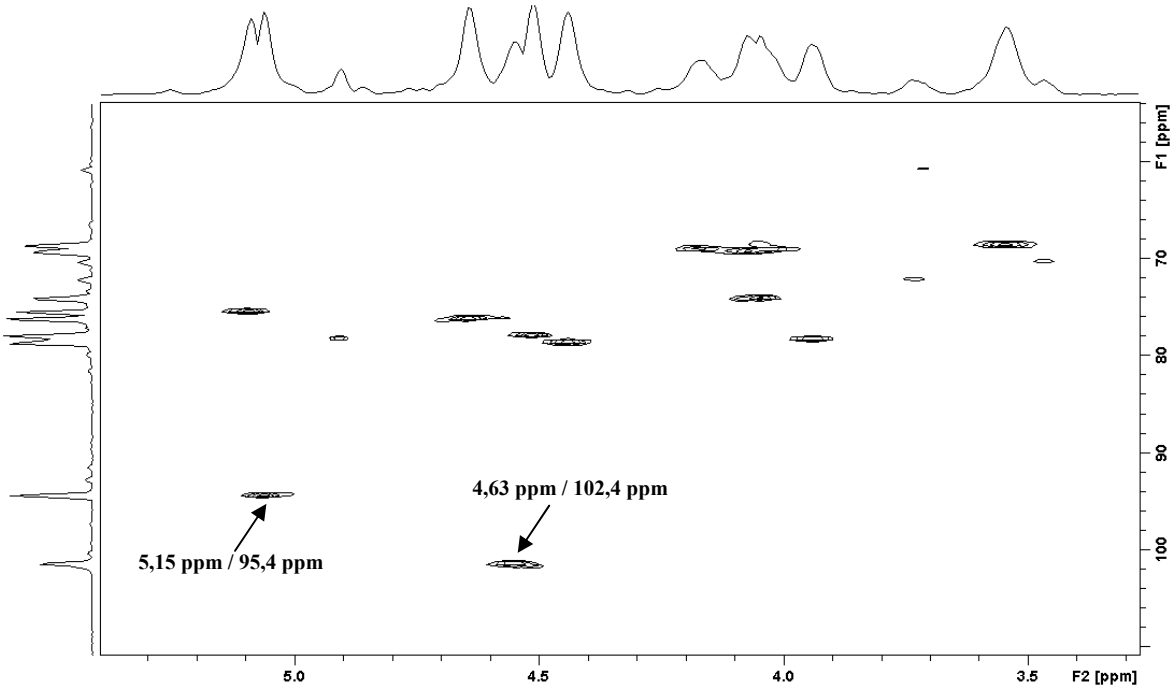


Figura 4.9 Espectro HSQC de **KO_H** en D_2O a temperatura ambiente.

Como es sabido, la reducción de cetonas con $NaBH_4$ no es estereoselectiva, por lo que al reducirse los carbonilos generados en las posiciones oxidadas, se debería observar la aparición de los diferentes epímeros. El κ-carragenano posee solo dos alcoholes secundarios que se podrían oxidar, sobre las posiciones 2 de la galactosa y de la 3,6-anhidrogalactosa. Esto implicaría que el producto obtenido podría contener 3,6-anhidrogalactosa, 3,6-anhidrotalosa, ácido galacturónico 4-sulfato y/o ácido talurónico 4-sulfato. Sin embargo, en el espectro de RMN (HSQC) obtenido para **KO_H** se observaron sólo dos señales anoméricas y 10 señales más importantes por debajo de los 90 ppm. Esto estaría indicando que si bien la sobreoxidación ocurría, la reducción de las cetonas generaba únicamente un producto. El análisis cromatográfico de los azúcares neutros mostró la presencia de 3,6-anhidrogalactosa, una pequeña proporción de galactosa (aquella que no llegó a oxidarse) y la ausencia de otros epímeros. Esto indicaría que el producto tratado con $NaBH_4$ sería el producto buscado (ver

asignación en Sección 4.A.3.4). Tanto Painter[2] como de Nooy *et al.*[18] habían observado que al tratar con $NaBH_4$ glucanos sobreoxidados en los C-2 y C-3 de la glucosa, la reducción resultaba estereoselectiva a favor de una configuración tipo *gluco*. Teniendo en cuenta que la configuración de la glucosa y de la galactosa para el C-2 es la misma, es razonable suponer que dicha selectividad también estaría ocurriendo en este caso.

De esta manera, se pueden asignar las cuatro señales anoméricas observadas en **KO_E**. Las señales de 5,15 ppm / 95,4 ppm y 4,60 ppm / 102,4 ppm corresponden a los dos carbonos e hidrógenos anoméricos de la 3,6-anhidrogalactosa y ácido galacturónico, respectivamente, en el producto buscado, mientras que las señales a 4,92 ppm / 93,5 ppm y 4,88 ppm / 100,4 ppm corresponden al producto sobreoxidado. La obtención del producto deseado al cortar la reacción con $NaBH_4$ estaría indicando que la reacción secundaria que estaba ocurriendo era la sobreoxidación de uno o ambos alcoholes secundarios.

Habiendo determinado la reacción secundaria que ocurría, se repitió la reacción cortando con etanol, pero sin el agregado de TEMPO, a fin de comprobar si el hipoclorito era el responsable de la sobreoxidación. De esta manera se obtuvo el producto **KO_E-ST**. El espectro HSQC de dicho producto se observa en la Figura 4.10.

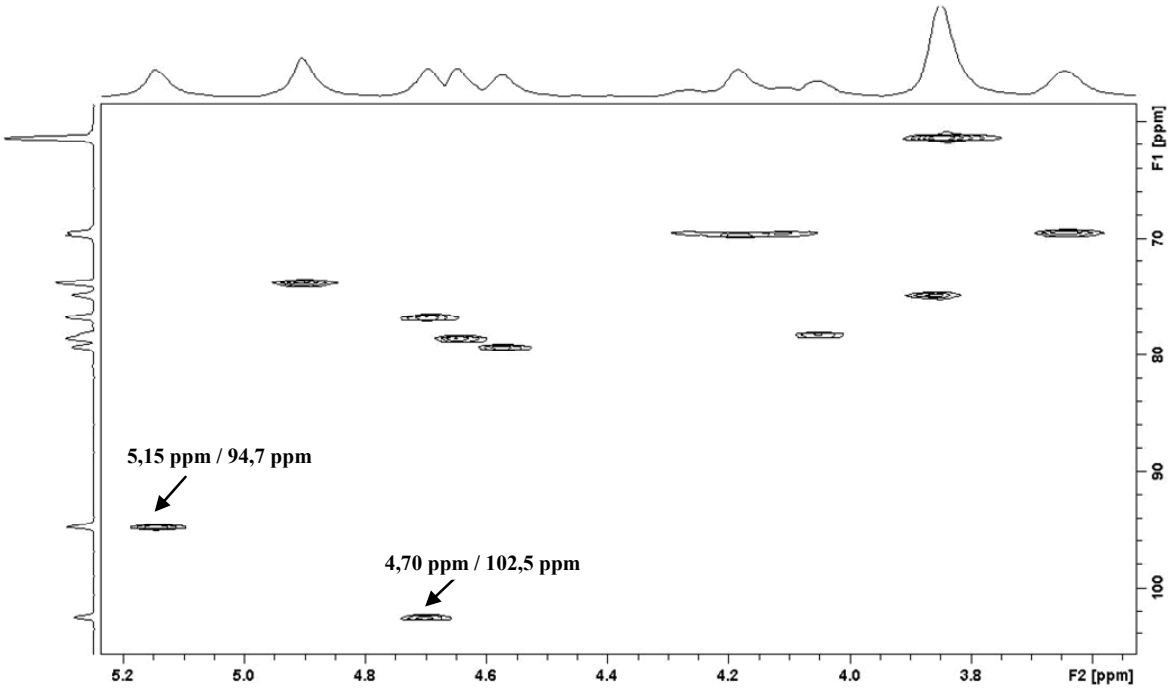


Figura 4.10 Espectro HSQC de **KO_E-ST** en D_2O a temperatura ambiente.

El espectro HSQC confirma que el producto obtenido luego de realizar la reacción sin TEMPO prácticamente no se oxidó ya que las señales que se observan son las 13 (12 carbonos y 14 hidrógenos) correspondientes al κ-carragenano (Tabla 2.6, Capítulo 2). Esto

indicaría que la oxidación no selectiva es causada por el TEMPO y no por los hipohalitos. De Nooy y Besemer[54] habían observado al oxidar distintos alcoholes secundarios con TEMPO e hipobromito que la reacción era más lenta si no se agregaba el TEMPO; en cambio, en este caso no se observó reacción.

4.A.3.3.1 Estudio del producto sobreoxidado

Si bien la reducción con $NaBH_4$ del producto tratado con TEMPO confirmó que ocurría también la oxidación de algunos alcoholes secundarios, no se podía justificar por qué no se observaban los carbonilos de las cetonas en los espectros de RMN-^{13}C y de IR. Tampoco se explicaba la presencia de sólo cuatro señales anoméricas, cuando se esperarían encontrar más señales según las distintas posibilidades de sobreoxidación. Por último, restaba explicar la quinta señal en la región anomérica del RMN-^{13}C correspondiente a un carbono cuaternario.

Se ha observado en reacciones de galactanos de algas rojas en las que el oxhidrilo actúa como nucleófilo que no siempre la posición C-6 es la preferencial. Prado *et al.*[55] observaron al cationizar la agarosa con cloruro de 3-cloro-2-hidroxipropiltrimetilamonio que la sustitución ocurría principalmente en el C-2 de la 3,6-anhidrogalactosa y no en el C-6 de la galactosa como hubiera sido esperado para una reacción de este tipo. En un trabajo posterior, Barahoma *et al.*[56] confirmaron estos resultados al realizar la reacción con el ι-carragenano, que posee el O-2 de la 3,6-anhidrogalactosa sulfatado, y observar que prácticamente no ocurría reacción. Esto estaría indicando que en algunos casos el oxhidrilo en el C-2 de la 3,6-anhidrogalactosa está favorecido para las reacciones vía ataque nucleofílico en comparación con el alcohol primario. Teniendo en cuenta que el primer paso de la reacción con TEMPO implica un ataque nucleofílico del oxhidrilo al nitrógeno del oxidante (Fig. 4.3), lo que podría estar ocurriendo no sería una sobreoxidación al azar sino una específica sobre la mencionada posición de la 3,6-anhidrogalactosa. Este derivado de la galactosa es un biciclo tensionado, por lo que la presencia del carbono sp^2 del carbonilo agregaría tensión al anillo, mientras que la formación del *gem*-diol implicaría un carbono sp^3 menos tensionado. Este hecho permite explicar la ausencia del grupo carbonilo de una cetona y la presencia de la quinta señal en la región anomérica del espectro de RMN, adjudicable a la señal de un *gem*-diol. Al tratarse de un carbono cuaternario no se observa en el RMN-^{13}C DEPT ni en el HSQC.

A fin de confirmar esta hipótesis, se realizaron dos pruebas. Por un lado se realizó la oxidación del ι-carragenano comercial, que posee un grupo éster sulfato en el C-2 del anhidroazúcar, finalizando la reacción con etanol para observar el posible producto de

sobreoxidación. Por otro lado, se trató al producto **KO_E** con $NaBD_4$ a fin de marcar las posiciones que se reducían. Luego el producto se hidrolizó y los azúcares se derivatizaron como alditoles peracetilados para analizar por CG-EM.

Al tratar al ι-carragenano en las mismas condiciones que **KO_E** se obtuvo el producto **IO_E**. En el espectro HSQC (Fig. 4.11) se pueden apreciar señales para los once carbonos esperados y la ausencia del C-6 de la galactosa. No se observó ninguna otra señal como ya había ocurrido con el producto de oxidación del almidón **$AlmO_E$**, donde sólo se observaron las señales del producto oxidado. La asignación completa de las señales del producto **IO_E** se realizará más adelante.

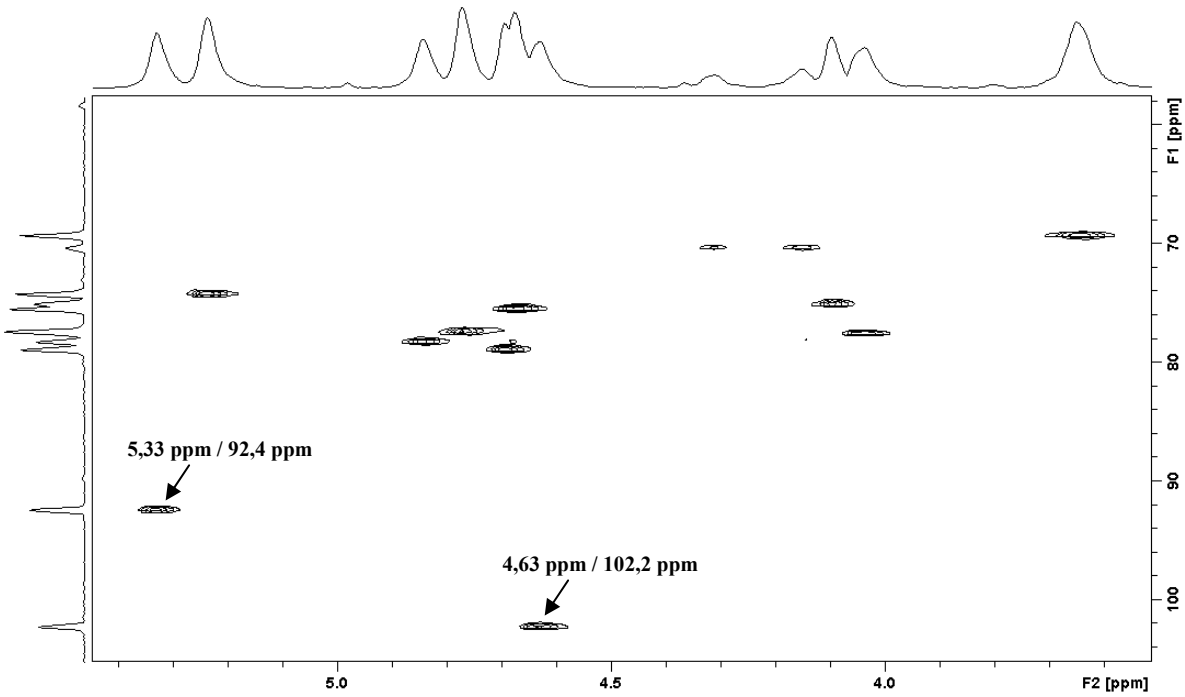


Figura 4.11 Espectro HSQC de **IO_E** en D_2O a temperatura ambiente.

El análisis de la composición de **IO_E** confirmó la oxidación del C-6 (Tabla 4.4). La oxidación fue prácticamente completa, si bien el producto poseía menor proporción de sulfato y menor peso molecular.

Tabla 4.4 Composición de **IO_E** y ι-carragenano.

	Rend. (% molar)	Gal:GalA:3,6-AnGal:SO_3Na[a]	PM[b] (kDa)
ι–carr		0,97:0,03:1,02:2,02	460
IO_E	90,5	0,05:0,95:0,85:1,73	167

[a] Relación molar. Se considera 1=Gal+GalA
[b] Peso molecular determinado por GPC considerando el máximo del pico.

El tratamiento del κ-carragenano oxidado **KO$_E$** con $NaBD_4$ también mostró que la posición donde ocurre la sobreoxidación corresponde al C-2 de la 3,6-anhidrogalactosa ya que al derivatizar el producto y realizar el CG/EM sólo se observan en el espectro de masa fragmentos desplazados en una unidad en el alditol del anhidroazúcar y no así en las trazas del derivado de la galactosa. En la Figura 4.12 se puede observar el espectro de masa obtenido para el 3,6-anhidrogalactitol acetilado proveniente del producto **KO$_E$** tratado con $NaBD_4$ (Fig. 4.12b) y su comparación con el espectro del alditol sin marcar (Fig. 4.12a).

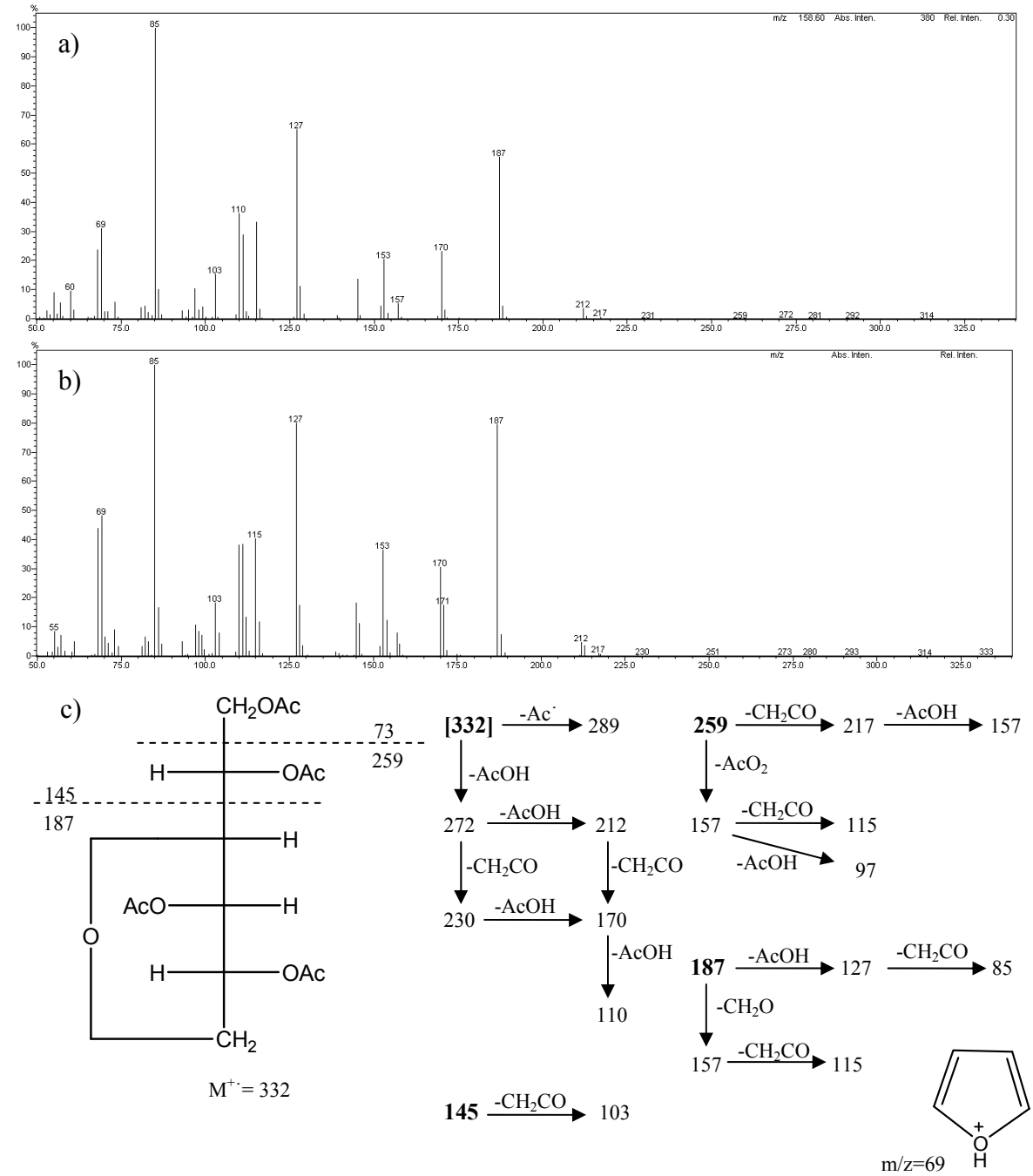


Figura 4.12 Espectro de masa de a) 3,6-anhidrogalactitol acetilado y b) 3,6-anhidrogalactitol-2^{2}H acetilado; c) fragmentaciones principales del espectro de masa del 3,6-anhidrogalactitol acetilado.[59]

En el espectro de la Figura 4.12 b, para las señales correspondiente a los fragmentos que incluyen el C-2 del azúcar (*m/z* 332, 217, 212, 170 y 103, Fig. 4.12c) se observa también los picos correspondiente a los mismos con valores de *m/z* incrementados en una unidad. Esto no ocurre con aquellos fragmentos que no incluyen dicho carbono (*m/z* 187, 127 y 85). Los picos a *m/z* 157 y 115 se obtienen por fragmentos que pueden o no incluir al C-2, por lo que no se los puede utilizar para comparar.

4.A.3.3.2 Estudio por modelado molecular de la reacción de oxidación secundaria

Con el fin de comprender la razón por la que la reacción ocurre principalmente sobre C-6, pero la sobreoxidación concomitante se produce específicamente sobre la posición 2 de la 3,6-anhidrogalactosa, se realizó un estudio teórico utilizando herramientas de modelado molecular. De acuerdo a lo descripto en la introducción, el gran impedimento estérico que presenta el nitrógeno del TEMPO hace que la reacción se vea favorecida para alcoholes poco impedidos (como los alcoholes primarios). Según lo informado en bibliografía,[11] el primer paso es el de la formación del aducto el cual es el más afectado por el impedimento estérico que presenta el alcohol. De Nooy y Besemer[54] ya habían observado que si bien la oxidación del 3-metilciclohexanol (mezcla *cis*/*trans*) ocurría a igual velocidad que la oxidación del ciclohexanol, esto no sucedía con la oxidación del 2-metilciclohexanol (mezcla *cis*/*trans*). En este último, al encontrarse el oxhidrilo más impedido estéricamente, la reacción ocurría a menor velocidad. Esto demuestra que si bien los alcoholes primarios, menos impedidos, van a estar más favorecidos para la oxidación con TEMPO que los secundarios, la selectividad de la reacción en polioles va a depender de cuan impedido esté el alcohol secundario.

Por lo tanto, se decidió analizar el valor de ΔE de esta reacción (ΔE_1, Fig. 4.13 a) para los intermediarios generados para la 3,6-An-4-*O*-Me-α-D-Gal*p*-(1→OMe) sustituida con TEMPO en O-2 y para la 3-*O*-Me-β-D-Gal*p*-(1→OMe) sustituida con TEMPO en O-2, O-4, y O-6. Utilizando MM3, se buscaron las estructuras de menor energía entre las distintas combinaciones de ángulos exocíclicos. Para cada caso, se eligieron aquellas de menor energía y se minimizaron en vacío utilizando M06-2X con la base 6-31+G(d,p). Luego, se les realizó un cálculo puntual de energía con M06-2X/6-311+G(d,p) utilizando el modelo del continuo polarizable (PCM) para simular la presencia de agua. El valor de ΔE_1 (Fig. 4.13 a, Tabla 4.5) se obtuvo usando para cada estructura aquella de menor energía luego del cálculo puntual.

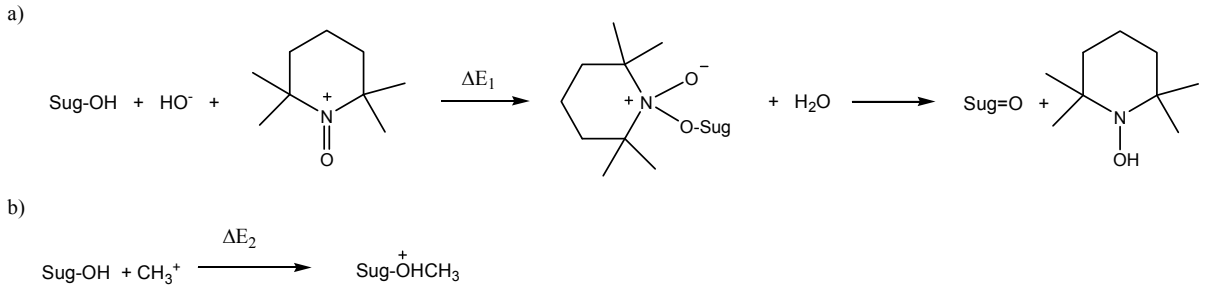


Figura 4.13 a) Pasos característicos de la reacción entre el –OH de un azúcar (Sug) y el TEMPO. El primer paso implica una energía llamada ΔE_1 b) Simplificación de la reacción para estimar la nucleofilia. Este paso implica una diferencia de energía ΔE_2.

Por otro lado, se decidió estudiar la capacidad nucleofílica de cada uno de los distintos grupos OH, ya que la que ocurre en el primer paso de la reacción es una reacción de sustitución nucleofílica. Para ello se calculó el ΔE para la reacción entre la galactosa o la 3,6-anhidrogalactosa y el catión metilo (ΔE_2, Fig. 4,13 b). Este método resultó ser exitoso para determinar la regioselectividad en la reacción de glicosilación de algunos derivados de azúcares.[60] Para la determinación de esta diferencia de energía (Tabla 4.5) se procedió de manera similar al cálculo de ΔE_1, pero en este caso también para las minimizaciones se simuló la presencia de agua con el modelo PCM.

Tabla 4.5 Valores de las energías de reacción ΔE_1 y ΔE_2 determinadas por DFT para la sustitución/oxidación en diferentes posiciones para un metil glicósido que actúa como modelo de un carragenano.

Posición	**ΔE_1[a] (kcal/mol)**	**ΔE_2[b] (kcal/mol)**
O-2 3,6-AnGal	–37,36	–66,48
O-2 Gal	–33,82	–66,35
O-4 Gal	–34,69	–72,82
O-6 Gal	–37,79	–74,88

[a] Determinado a nivel M06-2X/6-311+G(d,p) con el modelo PCM para simular el agua sobre geometrías determinadas sobre cálculos en vacío en nivel M06-2X/6-31+G(d,p).
[b] Determinado a nivel M06-2X/6-311+G(d,p) con el modelo PCM para simular el agua sobre geometrías determinadas sobre cálculos en nivel M06-2X/6-31+G(d,p) con el modelo PCM para simular el agua.

El análisis de ΔE_1 (que contiene tanto factores estéricos como electrónicos) muestra que los intermediarios sustituidos en el O-6 de la galactosa y en el O-2 de la 3,6-anhidrogalactosa son los de menor energía. Esto sugiere un menor impedimento estérico en

esas posiciones, lo que se condice con el comportamiento observado en la oxidación. Para la posición 6 de la galactosa este resultado era esperado al ser el único alcohol primario (Fig. 4.14 c). El OH en el C-2 de la 3,6-anhidrogalactosa está en una posición axial y no tiene ningún sustituyente vecino cercano: el O-3 también es axial y forma parte del biciclo, mientras que si bien el O-1 es ecuatorial, el efecto *exo*-anomérico lleva su sustituyente lejos del O-2 (Fig. 4.14 d). Los derivados sustituidos en O-2 y O-4 de la galactosa se encuentran mucho más impedidos (Fig. 4.14 a y b).

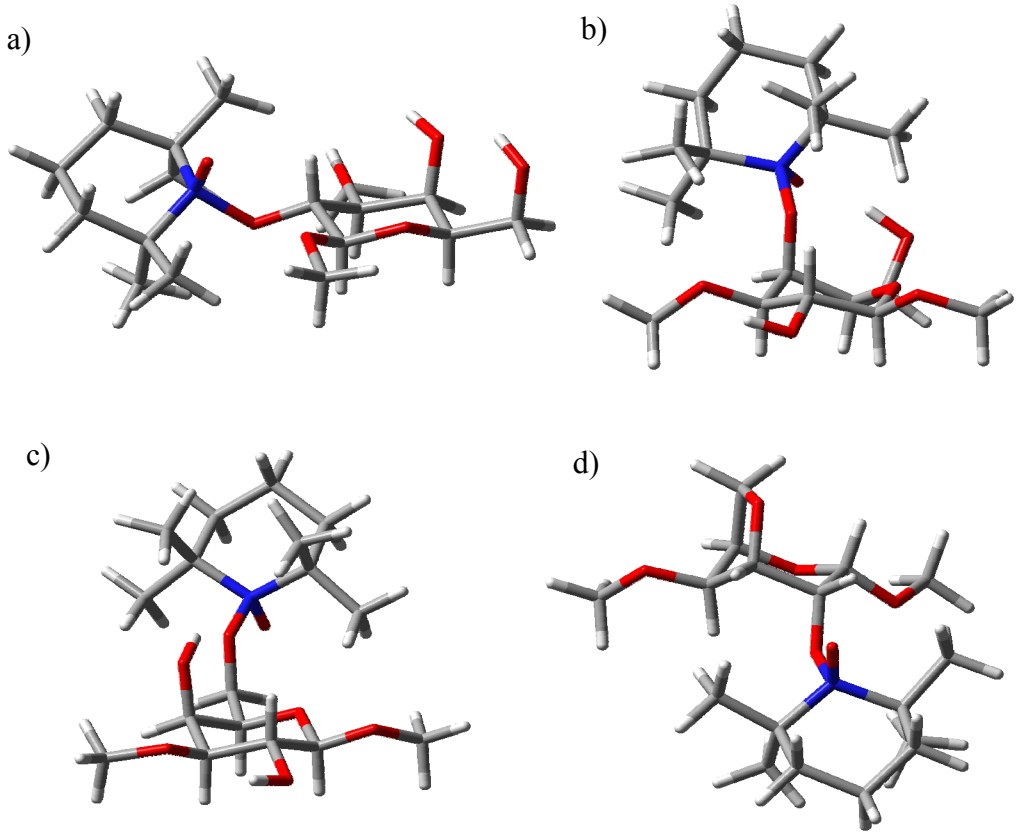


Figura 4.14 Estructuras optimizadas para el metil 3-*O*-metil-β-D-galactopiranósido sustituido con TEMPO en O-2 (a), O-4 (b) y O-6 (c) y para el metil 3,6-anhidro-4-*O*-metil-α-D-galactopiranósido sustituido con TEMPO en O-2 (d). Los confórmeros fueron optimizados con M06-2X/6-31+G(d,p) en vacío.

Los datos obtenidos del cálculo de ΔE_1 permiten explicar porque el O-2 de la 3,6-anhidrogalactosa posee mayor tendencia a oxidarse con TEMPO que los demás alcoholes secundarios. Sin embargo, no explica porque el alcohol primario sigue siendo el sitio preferido para la reacción en estos galactanos. Como se verá más adelante, cuando son utilizadas bajas cantidades de NaClO, no se observa sobreoxidación. Esto indica que el TEMPO oxida en primer lugar el alcohol primario y luego la posición 2 de la 3,6-anhidrogalactosa. Esta selectividad se puede explicar viendo los factores nucleofílicos "puros" expresados en ΔE_2. Como se observa en la Tabla 4.5, el O-6 de la galactosa es la

posición más nucleofílica por lo que explicaría su preferencia como sitio de oxidación por el TEMPO.

4.A.3.3.3 Determinación del grado de sobreoxidación

Habiendo ya determinado cual es la reacción secundaria que ocurría, fue necesario encontrar una manera de cuantificarla. En primer lugar, se consideró utilizar la espectroscopía RMN-^{1}H, sin embargo la superposición de señales en dichos espectros no lo permitió. Sin embargo, en el espectro HSQC, la región anomérica aparece bien resuelta para estos productos. Considerando que el experimento HSQC utiliza parámetros en su secuencia de pulsos que afectan de manera diferente a los distintos núcleos,[61] hay que ser cuidadoso para utilizarlo de manera cuantitativa. Un factor influyente en la cuantificación es la constante de acoplamiento $^1J_{C\text{-}H}$, que se aplica en la secuencia de pulsos. Se utiliza un único valor de la constante que define la duración de la demora de la transferencia de polarización ($\Delta=1/(2^1J_{C\text{-}H\ aplicado})$, por lo que la intensidad de las distintas señales va a depender en parte de la diferencia entre el $^1J_{C\text{-}H\ real}$ y $^1J_{C\text{-}H\ aplicado}$.

De acuerdo a lo explicado en el párrafo anterior, la cuantificación en un espectro de HSQC presenta error, salvo que los $^1J_{C\text{-}H}$ sean similares. Es de esperarse que esto ocurra en un determinado grupo de átomos con entorno químico y conformacional similar. Se sabe que la constante de acoplamiento $^1J_{C\text{-}H}$ es ≈170 Hz en el carbono anomérico de azúcares con configuración α-D-, en los que el –H está ecuatorial, diferente al de los β-D-, en los que el H está axial, y tienen un $^1J_{C\text{-}H}$ de ≈160 Hz.[62] De esta manera, se puede esperar que el efecto del $^1J_{C\text{-}H\ aplicado}$ sobre los H α- sea muy similar para todos los azúcares. Es por ello que a partir de la integración de las señales correspondientes a la 3,6-anhidrogalactosa (94,5 ppm / 5,15 ppm) y de la 3,6-anhidrogalactosa oxidada en C-2 (93,5 ppm / 4,92 ppm) se puede estimar el grado de sobreoxidación. Este se ha calculado como el porcentaje del área de 3,6-anhidrogalactosa oxidada en función del área total del anhidroazúcar presente. De esta manera, se determinó que el grado de sobreoxidación para **KO$_H$** e **IO$_E$** era nulo mientras que para **KO$_E$** tiene un valor considerable (71%). Si bien los valores no se pueden tomar como exactos, ya que en el espectro de **KO$_H$** se observan en baja proporción otras señales, permiten tener una idea comparativa de cuánto se sobreoxidó el producto en las condiciones utilizadas.

4.A.3.4 Caracterización los productos KO$_H$ y IO$_E$-d

A fin de realizar una caracterización completa al producto de oxidación del κ-carragenano **KO$_H$** [→3)-β-D-Gal*p*A 4-sulfato-(1→4)-α-3,6-An-D-Gal*p*-(1→] se realizó la

caracterización por RMN-^{13}C y RMN-^{13}C DEPT y COSY (Figura 4.15). Asimismo, para complementar, se realizó el estudio por RMN de un carragenano desulfatado y oxidado. Teniendo en cuenta que, en teoría, el producto de desulfatación completa de **IO$_E$** y **KO$_H$** deberían ser los mismos, y que **IO$_E$** posee mayor peso molecular y no está sobreoxidado, se decidió realizar la desulfatación sobre este último. Para la misma se utilizó la técnica propuesta por Navarro *et al.*[57] obteniéndose **IO$_E$-d** [→3)-β-D-Gal*p*A-(1→4)-α-3,6-An-D-Gal*p*-(1→] con un grado de desulfatación del 79 %.

En el espectro de RMN-^{13}C de **KO$_H$** se pudieron observar las doce señales correspondientes a los carbonos del polisacárido incluyendo la señal carbonílica del ácido y la correspondiente al metileno del C-6 de la 3,6-anhidrogalactosa (confirmado por RMN-^{13}C DEPT). También se detectó una pequeña señal a 61 ppm correspondiente al C-6 de la galactosa que no se oxidó.

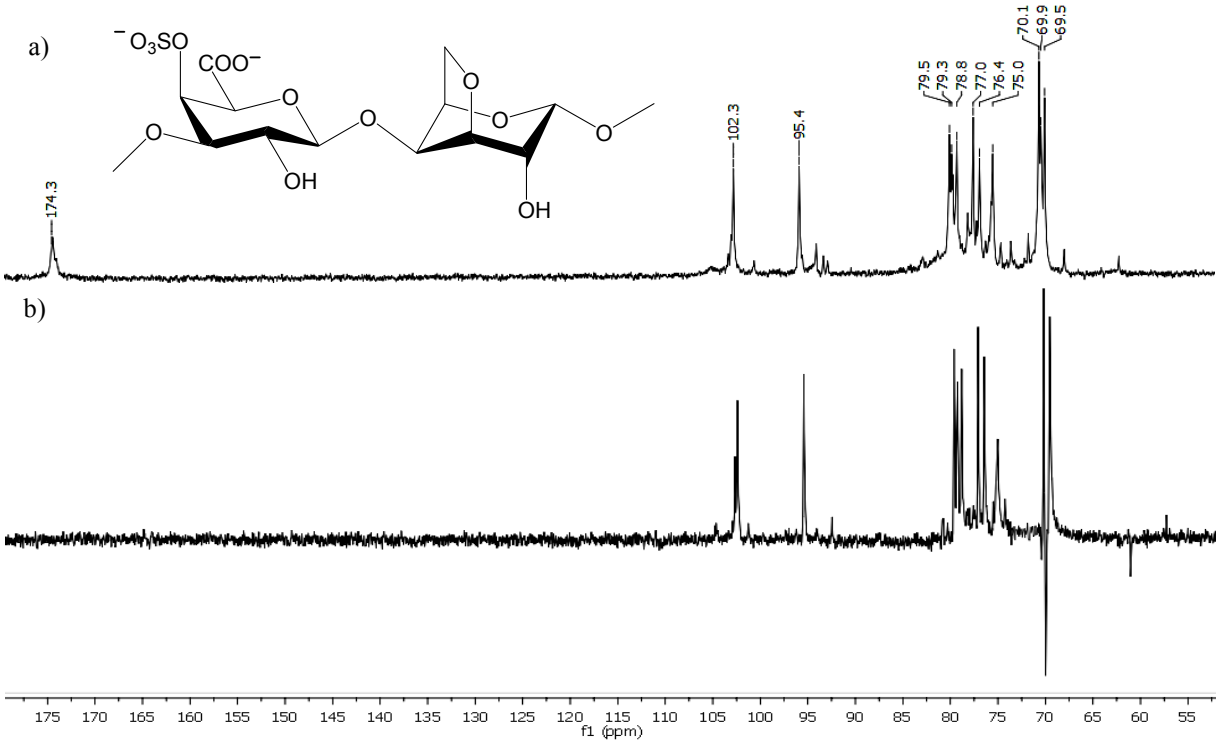


Figura 4.15 Espectros a 125 MHz de a) RMN-^{13}C y b) RMN-^{13}C DEPT del **KO$_H$** en D_2O a temperatura ambiente.

La comparación de los espectros de RMN del producto **KO$_H$** con el de κ-carragenano (**C-0,125**) permitió realizar una asignación completa de las señales observadas (Tabla 4.6). Se puede destacar que a excepción de las señales correspondientes a los C-3, C-4 y C-5 del ácido galacturónico, los demás desplazamientos químicos sólo se vieron ligeramente modificados con respecto a los de **C-0,125**. La señal correspondiente al C-4 es la que más se ve afectada por la presencia del carboxilato, desprotegiéndose 0,28 ppm en la señal del

protón y 2,5 ppm en la señal del carbono. Para confirmar la asignación de **KO_H**, se realizó un espectro COSY (Fig. 4.16 a).

Tabla 4.6 Asignación de las señales del HSQC de **KO_H** y **IO_E-d** y comparación con **C-0,125**.

	δ (ppm)					
	C-0,125		**KO_H**		**IO_H-d**	
	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C
	G[a]		GA4S[b]		GA[c]	
C/H-1	4,70	102,5	4,63	102,3	4,64	102,4
C/H-2	3,65	69,4	3,60	69,5	3,66	69,7
C/H-3	4,06	78,2	4,02	79,3	3,96	80,8
C/H-4	4,91	73,7	5,17	76,4	4,46	68,3
C/H-5	3,87	74,8	4,16	75,0	4,14	76,1
C/H-6	3,86 [d]	61,2		174,3		ND[e]
	DA[a]		DA[a]		DA[a]	
C/H-1	5,15	94,7	5,15	95,4	5,17	95,1
C/H-2	4,19	69,7	4,16	70,1	4,14	70,6
C/H-3	4,58	79,2	4,52	79,5	4,58	79,8
C/H-4	4,65	78,4	4,57	78,8	4,64	78,6
C/H-5	4,70	76,7	4,72	77,0	4,79	77,3
C/H-6	4,19	69,7	4,26	69,9	4,30	70,0
H-6'	4,10		4,11		4,16	

[a] Según nomenclatura propuesta por Knutsen *et al.*[58]
[b] GA4S= ácido galacturónico 4-sulfato
[c] GA= ácido galacturónico
[d] Los protones 6 y 6' no pueden ser diferenciados.
[e] ND = no determinado

El análisis de los espectros de HSQC de **IO_E-d** (Fig. 4.16) mostró el corrimiento de la señal del C-4 del ácido galacturónico por la ausencia del grupo sulfato en dicha posición (de 5,17 ppm / 76,2 ppm en **KO_H** a 4,46 ppm / 68,3 ppm, en **IO_E-d**) mientras que las señales asignadas a los restantes carbonos e hidrógenos sólo varían levemente con respecto a los valores asignados para **KO_H**.

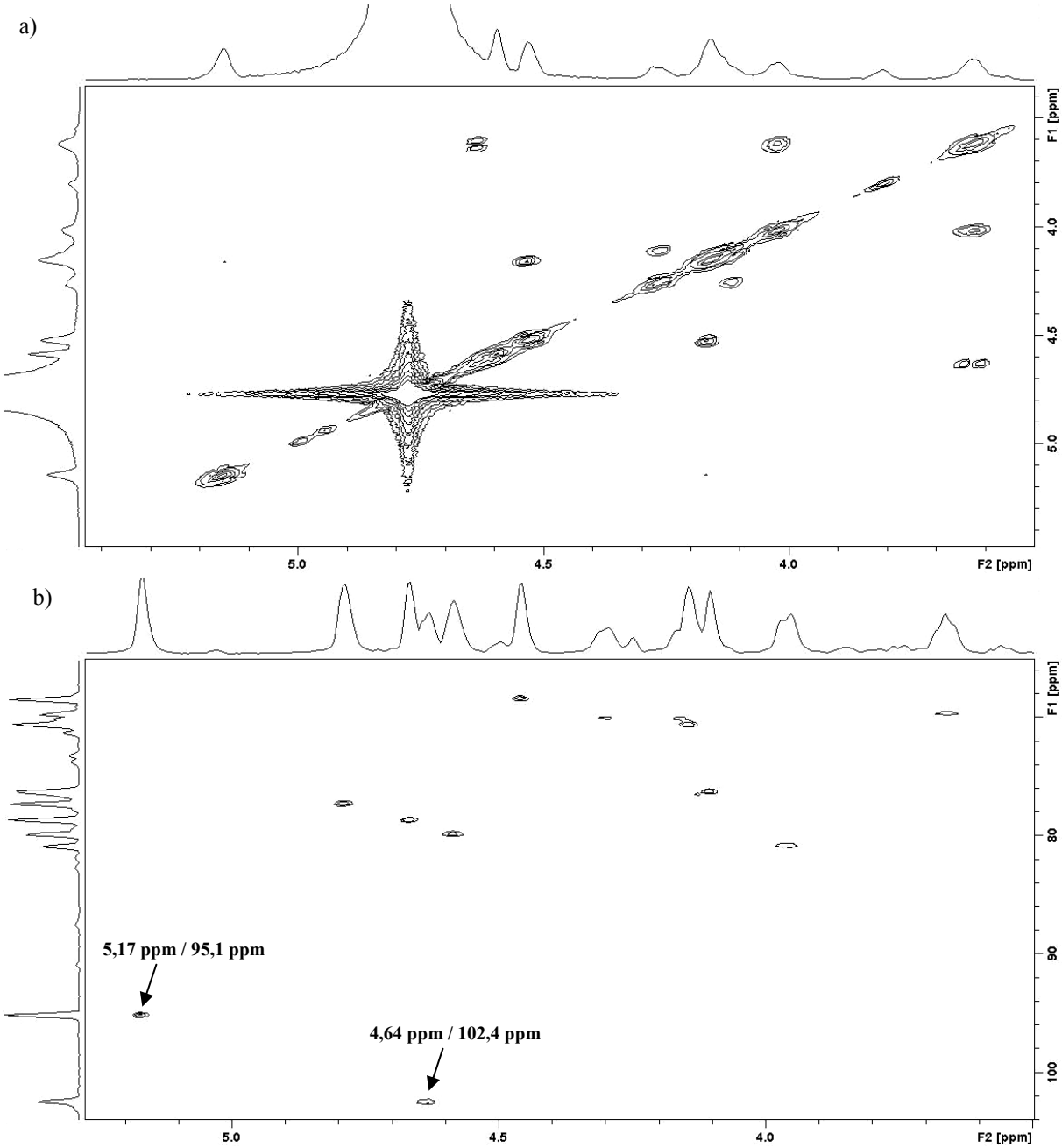


Figura 4.16 Espectros a) COSY de **KO_H** y b) HSQC de **IO_E-d** en D_2O a temperatura ambiente.

Se compararon las composiciones de los productos generados al cortar la reacción con $NaBH_4$ y con etanol (producto sobreoxidado, Tabla 4.7). El rendimiento de reacción para **KO_H** fue levemente menor que para **KO_E**, pero su peso molecular mayor. La proporción de ácidos urónicos y sulfato es semejante en ambos productos oxidados, pero **KO_H** mantuvo la cantidad de 3,6-anhidrogalactosa presente en el carragenano original. Para el producto desulfatado **IO_E-d**, se destaca la marcada disminución del peso molecular luego de la desulfatación.

Tabla 4.7 Composición de **KO_E**, **KO_H**, **IO_E-d** y **C-0,125**.

	Rend. (% molar)	Gal:GalA:3,6-AnGal:SO_3Na[a]	PM[b] (kDa)
C-0,125		1,00:0,00:1,02:1,17	215
KO_E	83,3	0,03:0,97:0,30:0,88	65
KO_H	74,0	0,07:0,93:1,04:0,87	93
IO_E-d		0,03:0,97:0,76:0,22	16

[a] Relación molar. Se considera Gal+GalA=1
[b] Peso molecular determinado por GPC considerando el máximo del pico.

4.A.3.5 Optimización de las condiciones de reacción

Se evaluaron las condiciones de reacción para la oxidación de **C-0,125** con TEMPO de manera de disminuir la proporción de producto sobreoxidado y de mantener el peso molecular del polisacárido obtenido lo más alto posible. Se tomaron como base las condiciones utilizadas para **KO_H** y en todas las reacciones ensayadas se tomó una alícuota para finalizar con etanol y así poder calcular el grado de sobreoxidación con el método explicitado en la Sección 4.A.3.3.2

4.A.3.5.1 Variación de la base y del pH

Teniendo en cuenta que esta reacción es sensible al pH y que al mantener el pH constante agregando NaOH en realidad ocurren pequeñas fluctuaciones en el mismo, se examinó una adaptación de las condiciones utilizadas por Xu *et al.*[41] Los autores usaron las condiciones de Anelli pero utilizando un buffer $Na_2CO_3/NaHCO_3$ a pH 10,5 para mantener el pH de la reacción constante en vez de compensar con NaOH como de Nooy *et al.*[10]

De esta manera se reemplazó la base directamente disolviendo el polisacárido en el buffer HCO_3^-/CO_3^{2-} 0,1M, pH 10,4 a 25 °C (pH 10,6 a 0 ºC), mientras que el resto de las condiciones se mantuvieron constantes. Se midió el pH durante toda la reacción confirmándose que éste no se modificaba significativamente tal como habían descrito Xu *et al.*[41] Una vez finalizada la reacción, se obtuvo el producto de oxidación **KO_H-B10,4**, cuya composición se observa en la Tabla 4.8. La cantidad de ácido galacturónico es ligeramente menor que en **KO_H** pero la proporción de sulfato es mayor. También disminuyó ligeramente el grado de sobreoxidación. Por otro lado, se puede destacar que el peso molecular del polisacárido obtenido utilizando buffer es cerca de la mitad del obtenido con NaOH, resultado opuesto al que obtuvieron Xu *et al.*[41] al oxidar celulosa en estas condiciones.

Tabla 4.8 Composición de **KO_H-B10**, **KO_H-B9,4** y **KO_H-10**, **KO_H-B10,4** y **KO_H**.

	Rend. (% molar)	Gal:GalA:3,6-AnGal:SO_3Na[a]	PM[b] (kDa)	3,6-AnGal oxidada[c] (%)
KO_H-B10,4	73,6	0,13:0,87:0,75:1,03	52	58
KO_H-B10	69,5	0,07:0,93:0,86:1,11	35	28
KO_H-B9,4	83,5	0,16:0,84:0,71:0,82	55	11
KO_H	74,0	0,07:0,93:1,04:0,87	93	71
KO_H-10	67,4	0,13:0,87:0,91:0,95	91	28

[a] Relación molar. Se considera Gal+GalA=1
[b] Peso molecular determinado por GPC considerando el máximo del pico.
[c] Calculado por RMN de una alícuota cortada con etanol.

Es sabido que los polisacáridos en medio básico sufren una reacción de degradación (*peeling*) que causa la disminución del peso molecular. Esto no ocurre si el extremo reductor se encuentra reducido.[63] Es por ello que se repitió la reacción con buffer pero sobre la fracción **C-0,125** prerreducida con $NaBH_4$. Al observar el peso molecular del producto oxidado obtenido en estas condiciones no se observó modificación alguna con respecto a **KO_H-B10,4**, de manera que se descartó la degradación alcalina desde el extremo reductor como causa de la despolimerización.

Habiendo confirmado que la fluctuación del pH al realizar la reacción con NaOH no era la razón principal por la que ocurría la sobreoxidación, se decidió observar que sucedía con la variación del pH. Como se mencionó en la introducción de este Capítulo, el TEMPO requiere un pH básico para que ocurra la reacción. Si éste es demasiado alto (> 10,5-11), la reacción se vuelve muy lenta, mientras que a pH casi neutro (< 8) se favorece la oxidación directa por el oxidante primario. Se había elegido un pH de 10,5 para la reacción ya que de Nooy *et al.*[10] habían demostrado que éste era el pH donde la velocidad de reacción era máxima para la oxidación del almidón de papa. Sin embargo, posteriormente los autores encontraron que el pH óptimo para obtener el producto menos degradado era aproximadamente 9,5.[18] En base a esto se repitió la reacción utilizando un buffer de pH 10 y 9,4 a 25 °C (pH 10,2 y 9,6, respectivamente, a 0 ºC), de manera tal de seguir dentro del rango de pH entre 10,5 y 8,5. De esta manera se obtuvieron los productos **KO_H-B10** y **KO_H-B9,4**. Si bien el peso molecular de los productos oxidados usando buffer es menor que el de los obtenidos utilizando NaOH (Tabla 4.8), el resto de los parámetros de la Tabla 4.9 son similares. Por ello se probó primero realizar la reacción usando el buffer para asegurar que el pH se mantuviera constante.

Los productos **KO_H-B10** y **KO_H-B-9,4** se encuentran oxidados y no presentan una diferencia significativa del peso molecular al disminuir el pH, a diferencia de lo observado por de Nooy *et al.*[18] Esto indicaría que si bien la despolimerización puede estar asociada al medio alcalino de la reacción, el trabajar a pH ligeramente menores no parece disminuir el grado de despolimerización. Sin embargo, se observó que al trabajar a pH menores el grado de sobreoxidación es marcadamente menor, sugiriendo que el aumento de pH favorece dicha reacción secundaria y por lo tanto el pH óptimo de trabajo estaría entre 9,5 y 10.

Al realizar la reacción con NaOH en dicho rango de pH se observó que el producto obtenido (**KO_H-10**) también poseía un menor grado de sobreoxidación que **KO_H**, sin variar significativamente el peso molecular, tal como se había observado al utilizar el buffer.

De acuerdo a lo observado hasta el momento, las condiciones óptimas de trabajo serían la utilización de NaOH como base y un pH entre 9,5 y 10. Por lo tanto, los siguientes experimentos se realizaron en estas condiciones.

4.A.3.5.2 Variación del tiempo de reacción

Habiéndose encontrado las condiciones óptimas de pH para disminuir la sobreoxidación, se realizó un estudio para optimizar el tiempo de reacción. El producto **KO_H-10** se obtuvo al finalizar la reacción a las 2 h. Luego se ensayaron distintos tiempos obteniéndose los productos **KO_H-1h** y **KO_H-3h** al utilizar 1 h y 3 h de reacción respectivamente. La composición de los mismos se puede observar en la Tabla 4.9. La proporción de ácidos urónicos y el grado de sobreoxidación para **KO_H-1h** son ligeramente menores que para **KO_H-10**. Se observa que el rendimiento disminuye con el tiempo de reacción. Como el producto **KO_H-3h** posee el menor peso molecular y mayor grado de sobreoxidación se concluye que el tiempo óptimo de reacción es entre 1 y 2 horas.

Tabla 4.9 Composición de **KO_H-1h** y **KO_H-3h** y comparación con **KO_H-10**.

	Tiempo (h)	Rend. (% molar)	Gal:GalA:3,6-AnGal:SO_3Na[a]	PM[b] (kDa)	3,6-AnGal oxidada[c] (%)
KO_H-1h	1	78,4	0,15:0,85:1,02:0,92	92	17
KO_H-10	2	67,4	0,13:0,87:0,91:0,95	91	28
KO_H-3h	3	57,6	0,09:0,91:0,87:0,97	60	36

[a] Relación molar. Se considera Gal+GalA=1
[b] Peso molecular determinado por GPC considerando el máximo del pico.
[c] Calculado por RMN de una alícuota cortada con etanol.

4.A.3.5.3 Variación de la cantidad de NaClO utilizada

Con el fin de generar polisacáridos con distinto grado de oxidación se utilizaron cantidades variables de NaClO. Dado que inicialmente se agrega un exceso del 25 % de la proporción estequiométrica (1,25 eq_{NaClO}/mol_{gal}) de dicho oxidante y que no se puede saber qué proporción de este se consume en la sobreoxidación del producto, no es fácil predecir el grado de oxidación en función de la proporción del oxidante agregado. Es por ello que se repitió la reacción agregando 0,625, 0,3125 y 0,125 eq_{NaClO}/mol_{gal}. De esta manera se obtuvieron los productos **KO_H-1/2**, **KO_H-1/4** y **KO_H-1/10**, respectivamente.

Tal como se esperaba, ninguno de los tres nuevos productos generados está completamente oxidado. De acuerdo a lo que se observa en la Tabla 4.10, **KO_H-1/2** presenta aproximadamente 2/3 de la galactosa oxidada, **KO_H-1/4** cerca de 1/5 y **KO_H-1/10** directamente no se encuentra oxidado. Es llamativo que si bien **KO_H-1/2** se oxidó aproximadamente lo que se esperaba de acuerdo a los equivalentes agregados de NaClO, en los otros dos productos el grado de oxidación fue menor. Un análisis detallado de los espectros de HSQC de los productos generados al cortar la reacción con etanol mostró la presencia de dos señales anoméricas que no se observaban en el espectro de **C-0,125** ni en el de **KO_E**. Estas señales no se observaron para los productos generados cuando se finalizó la reacción con $NaBH_4$. Esto llevó a pensar que debido a la baja proporción de oxidante primario, no todos los C-6 oxidados pudieron llegar hasta el ácido carboxílico, quedando algunos como aldehídos. Al igual que las cetonas, los aldehídos se reducen con $NaBH_4$ por lo que no se los puede observar en el producto finalizado con dicho reductor, aunque sí podrían observarse cuando se utiliza etanol. Huerta-Angeles *et al.*[38] ya habían observado que con bajas concentraciones de oxidante primario era posible obtener el aldehído, incluso como producto mayoritario.

Al observar la Tabla 4.10 se puede destacar un descenso en el peso molecular al aumentar la proporción de oxidante primario agregado. Esto estaría confirmando que la despolimerización es una consecuencia del proceso de oxidación en medio básico tal como lo habían afirmado Jiang *et al.*[19] También Su *et al.*[21] observaron una reducción del peso molecular al aumentar la proporción del oxidante primario para oxidación de la agarosa. Por otro lado, se observa que el porcentaje de sobreoxidación aumenta con la proporción del oxidante primario. Esto estaría confirmando experimentalmente que la posición 6 de la galactosa es el sitio preferido para la oxidación con TEMPO, seguido por la posición 2 de la 3,6-anhidrogalactosa.

Tabla 4.10 Composición de **KO_H-1/10**, **KO_H-1/4** y **KO_H-1/2** y comparación con **KO_H-10** y **C-0,125**.

	Rend. (% molar)	Gal:GalA:3,6-AnGal:SO_3Na[a]	PM[b] (kDa)	3,6-AnGal oxidada[c] (%)
KO_H-10	67,4	0,13:0,87:0,91:0,95	91	28
KO_H-1/2	96,2	0,33:0,67:0,81:1,08	163	4
KO_H-1/4	75,5	0,82:0,18:0,92:1,14	141	0
KO_H-1/10	77,4	1,00:0,00:0,76:0,78	207	0
C-0,125		1,00:0,00:1,02:1,17	215	

[a] Relación molar. Se considera 1=Gal+GalA
[b] Peso molecular determinado por GPC considerando el máximo del pico.
[c] Calculado por RMN de una alícuota cortada con etanol.

Los espectros de RMN-^{13}C de **C-0,125** y sus derivados con distinto grado de oxidación se observan en la Figura 4.17.

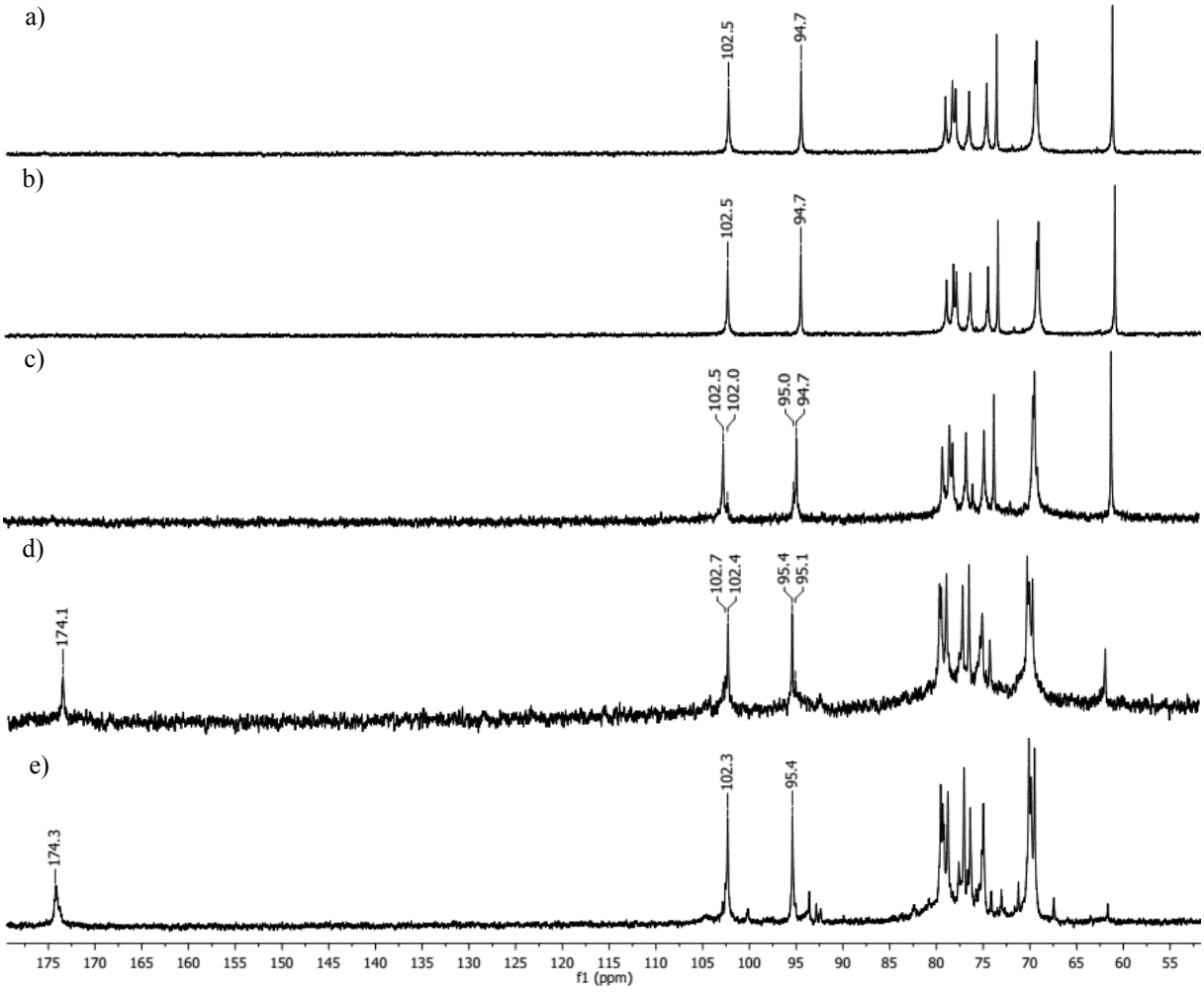


Figura 4.17 Espectros de RMN-^{13}C (125 MHz) de a) **C-0,125,** b) **KO_H-1/10**, c) **KO_H-1/4**, d) **KO_H-1/2** y e) **KO_H-10** en D_2O a temperatura ambiente.

Al analizar la Figura 4.17, se puede ver claramente que la fracción **KO_H-1/10** no se encuentra oxidada ya que su espectro es idéntico al del κ-carragenano. En el espectro de **KO_H-1/4** se observan pequeñas señales en la región anomérica que indican la presencia de producto oxidado, aún cuando no se observa la señal de grupo carboxilo. **KO_H-1/2** posee un espectro donde las señales correspondientes al producto oxidado son más notorias. En este no sólo se puede observar la señal del grupo carboxilo, sino que las señales de los carbonos anoméricos del producto oxidado son de mayor intensidad que las del producto sin oxidar.

4.A.3.6 Oxidación del ι-carragenano y la agarosa con TEMPO

La oxidación de la agarosa y del ι-carragenano se llevó a cabo utilizando las mejores condiciones encontradas para el κ-carragenano, o sea NaOH a pH 10, entre 1 y 2 h de reacción, 1,25 equivalentes de oxidante primario y $NaBH_4$ para cortar la reacción. Se respetaron las masas de TEMPO y de NaBr usadas y se ajustó la masa de los polisacáridos de manera que los moles de alcohol primario sean los mismos que los utilizados para el κ-carragenano. Es importante destacar que estos polisacáridos poseían mucha mayor tendencia a formar soluciones viscosas y/o a gelificar a 0 °C (temperatura en la que se llevó a cabo la reacción) que el κ-carragenano, complicando la agitación de la muestra. Sin embargo en cuanto se agregaron los reactivos y la reacción se inició, la mezcla se volvía mucho más fluida, indicando que una pequeña proporción de producto oxidado alteraba las propiedades reológicas de la muestra.

Se obtuvieron los productos de oxidación total de ambos galactanos (**IO_H** y **$AgaO_H$**), así como aquellos de oxidación parcial por adición de la mitad (**IO_H-1/2** y **$AgaO_H$-1/2**) y un cuarto (**IO_H-1/4** y **$AgaO_H$-1/4**) de la cantidad inicial de hipoclorito. La composición de estos productos se observa en la Tabla 4.11. Al igual que con el κ-carragenano los rendimientos fueron buenos y se pudieron obtener productos oxidados en forma prácticamente total.

De los dos galactanos modificados, la agarosa demostró un comportamiento más similar al del κ-carragenano. **$AgaO_H$-1/2** se oxidó según lo esperado a los equivalentes adicionados, mientras que **$AgaO_H$-1/4** lo hizo en defecto. Asimismo, se observan signos de sobreoxidación al aumentar la proporción de hipoclorito utilizada. Esto indica que la posición 2 de la 3,6-anhidrogalactosa tiene la misma tendencia a oxidarse con TEMPO independientemente de su configuración.

Para el ι-carragenano, ambos productos de oxidación parcial se oxidaron en defecto en función de los equivalentes agregados en cada caso. A su vez, y como ya se había

demostrado previamente, no se observa sobreoxidación en ninguno de sus productos ya que la posición 2 del anhidroazúcar se encuentra sustituida con el grupo sulfato. Asimismo, se puede observar que el producto **IO_H** tiene una composición muy similar a **IO_E** (Tabla 4.4). Sin embargo, se observan diferencias en el peso molecular de los productos y en rendimiento de la reacción atribuibles a las diferentes condiciones de reacción.

Tabla 4.11 Composición del ι-carragenano, agarosa y sus productos de oxidación parcial y total.

	Rend. (% molar)	Gal:GalA:3,6-AnGal:SO_3Na[a]	PM[b] (kDa)	3,6-AnGal oxidada[c] (%)
IO_H	80,5	0,07:0,93: 1,00:1,76	216	0
IO_H-1/2	76,6	0,52:0,48:1,00:1,62	324	0
IO_H-1/4	96,9	0,87:0,13:0,81:1,62	445	0
ι-carr		0,97:0,03:1,02:2,02	460	
$AgaO_H$	84,1	0,15:0,85:0,75:0,06	23	48
$AgaO_H$-1/2	83,6	0,38:0,62:0,90:0,04	32	7
$AgaO_H$-1/4	87,1	0,83:0,17:0,78:0,03	38	2
Agarosa		0,99:0,01:0,88:0,02	35	

[a] Relación molar. Se considera Gal+GalA=1
[b] Peso molecular determinado por GPC considerando el máximo del pico.
[c] Calculado por RMN de una alícuota cortada con etanol.

Al observar el peso molecular de estos compuestos, se ve una disminución del mismo al aumentar la proporción de oxidante primario, tal como ocurría con los derivados del κ-carragenano. Esto nuevamente estaría confirmando que la despolimerización de los productos oxidados es consecuencia de la oxidación.

4.A.3.6.1 Caracterización por RMN de los productos IO_H y $AgaO_H$

Los espectros de RMN permitieron confirmar las estructuras de los compuestos modificados, así como indicar la presencia de producto sobreoxidado.

La Figura 4.18 muestra los espectros de HSQC para la agarosa oxidada cuya reacción fue terminada tanto con etanol (**$AgaO_E$**) como con $NaBH_4$ (**$AgaO_H$**). En el primer espectro se puede ver claramente la presencia de las cuatro señales anoméricas y más de 12 señales en total, consistente con el producto sobreoxidado. El agregado de $NaBH_4$ genera un producto cuyo espectro de HSQC (Fig. 4.18b) cuenta con 12 señales mayoritarias (pertenecientes a 11 carbonos y 12 hidrógenos) consistentes con [→3)-β-D-Gal*p*A-(1→4)-α-3,6-An-L-Gal*p* (1→].

La presencia de algunas otras señales menores indica que la oxidación inicial o la reducción ulterior no fueron completas.

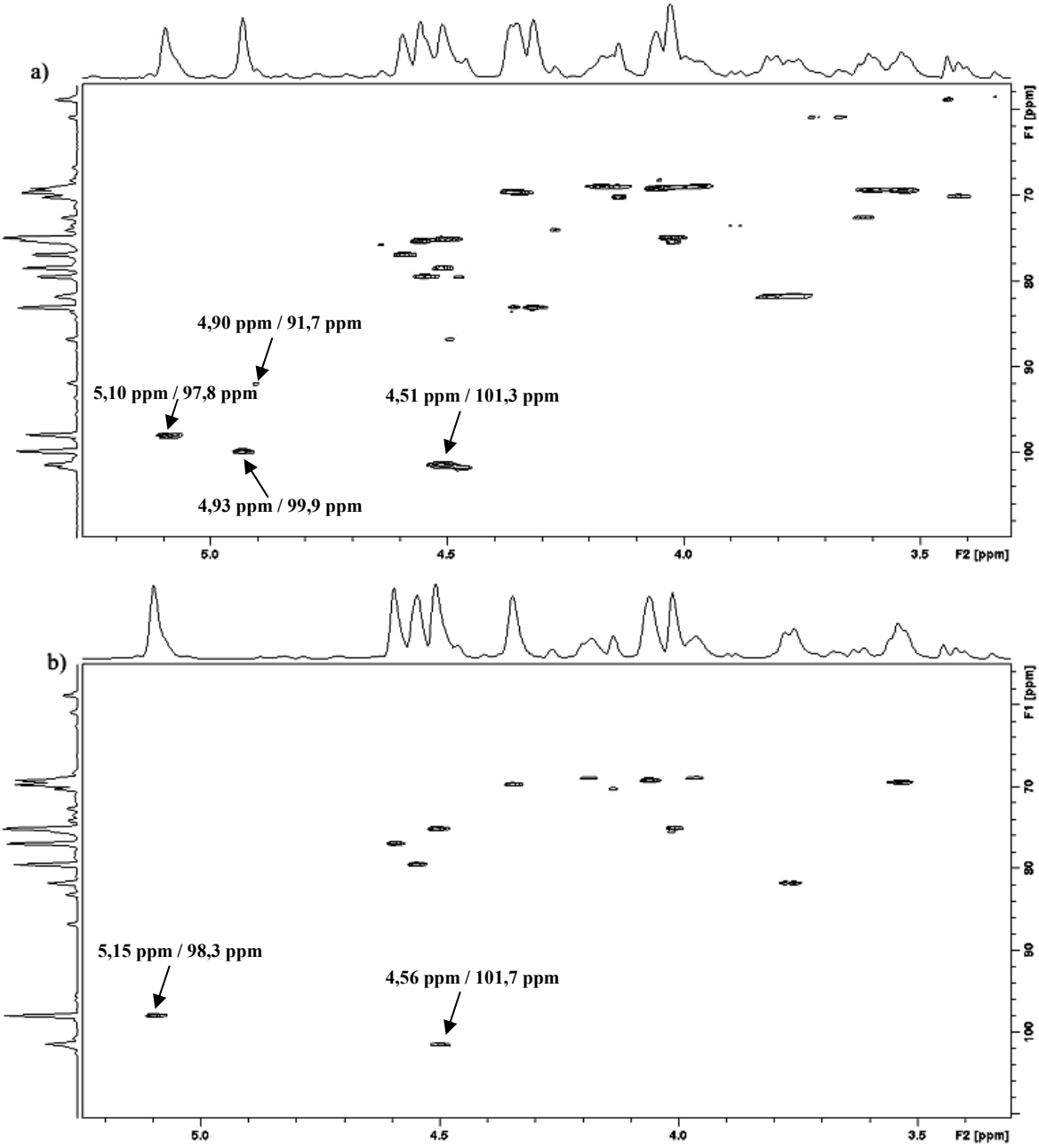


Figura 4.18 Espectros HSQC de a) **AgaO$_E$** y b) **AgaO$_H$** en D_2O a temperatura ambiente.

Para el derivado oxidado del ι-carragenano, ya se había observado en la Figura 4.11 que el espectro de HSQC del producto cuya reacción fue terminada con etanol (**IO$_E$**) sólo poseía las 12 señales (11 carbonos y 12 hidrógenos) correspondientes al producto deseado, idéntico al de **IO$_H$**, por lo que su espectro no se analizó.

Los espectros de RMN-^{13}C de **IO$_H$** y **AgaO$_H$** (Fig. 4.19) confirman la oxidación de los mismos al observarse la señal del grupo carboxilo a aproximadamente 175 ppm. El espectro

del derivado de la agarosa (Fig. 4.19 b) presenta varias señales menores que corresponden a la presencia de un pequeño porcentaje de producto sobreoxidado y de agarano sin oxidar. Este espectro es similar al que presentaron Su *et al.*[21] al oxidar la agarosa con TEMPO. Sin embargo, en el espectro de aquel trabajo las señales de sobreoxidación eran de mayor intensidad, probablemente debido a que terminaron la reacción con etanol. Es importante destacar que los autores no realizaron ninguna asignación del espectro.

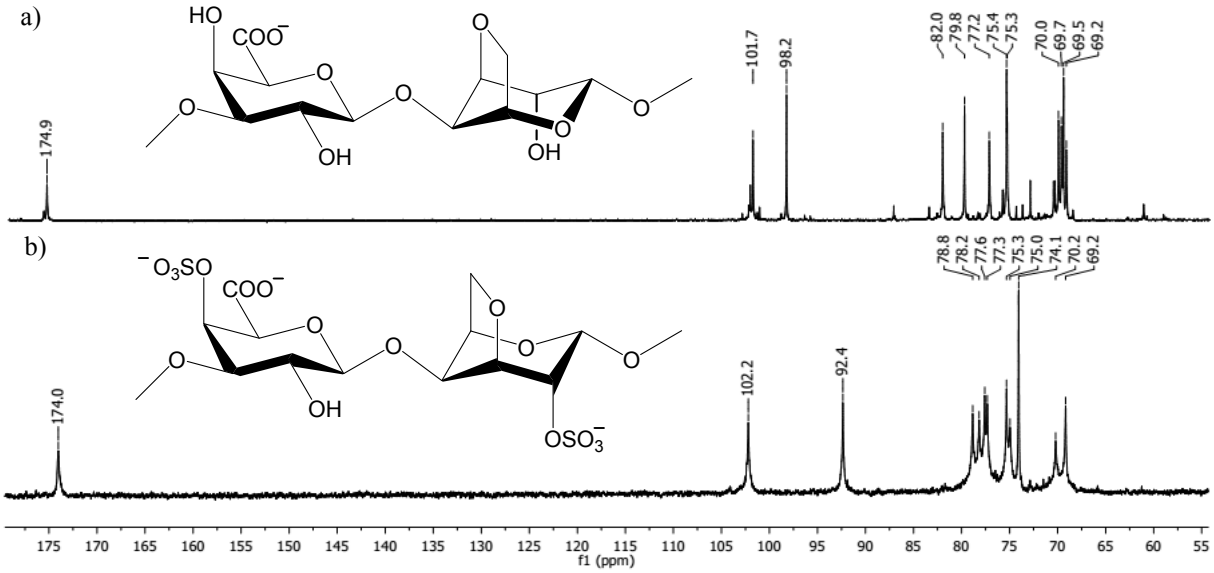


Figura 4.19 Espectros de RMN-^{13}C (125 MHz) de a) **IO$_H$** y b) **AgaO$_H$** en D_2O a

Con los datos del HSQC y del RMN-^{13}C se pudieron asignar los carbonos e hidrógenos de las moléculas modificadas. Al igual que sucedió con el producto de oxidación del κ-carragenano, la mayoría de los carbonos e hidrógenos mantuvieron sus desplazamientos frente a los productos sin oxidar. Dentro de los que se vieron afectados, el C-6 de la galactosa, obviamente, es el más desplazado ya que pasó de ser un alcohol primario a un carboxilo. En menor medida, se vieron afectados el C-5, el C-4 y el C-3 de dicho azúcar. La asignación completa se observa en la Tabla 4.12.

Tabla 4.12 Asignación de las señales de RMN de **$AgaO_H$** y **IO_H.**

	δ (ppm)			
	$AgaOx_H$		**IO_H**	
	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C
	GA[a]		GA4S[b]	
H/C-1	4,56	101,7	4,63	102,2
H/C-2	3,60	69,7	3,64	69,2
H/C-3	3,72	82,0	4,03	77,6
H/C-4	4,45	70,0	5,24	74,1
H/C-5	4,08[c]	75,3	4,10	75,0
C-6		174,9		174,0
	LA[d]		DA2S[d]	
H/C-1	5,15	98,3	5,33	92,4
H/C-2	4,12	69,5	4,68	75,3
H/C-3	4,61	79,8	4,84	78,2
H/C-4	4,65	77,2	4,70	78,8
H/C-5	4,57	75,4	4,77	77,3
H/C-6	4,31	69,2	4,31	70,2
H-6'	4,03		4,15	

[a] GA= ácido galacturónico
[b] GA4S= ácido galacturónico 4-sulfato
[c] Los protones 6 y 6' no pueden ser diferenciados.
[d] Según nomenclatura propuesta por Knutsen *et al.*[58]

4.A.3.7 Estudio por microscopía de barrido electrónico (SEM) de los carragenanos y sus derivados oxidados

Los productos de oxidación total y parcial de los carragenanos fueron analizados por microscopía de barrido electrónico (SEM) con el fin de observar su morfología y compararlos con los polisacáridos nativos (Fig. 4.20). El análisis se hizo sobre las muestras liofilizadas que fueron recubiertas con una capa de oro. **KO_H-1/10** no fue estudiada ya que no mostró signos de oxidación.

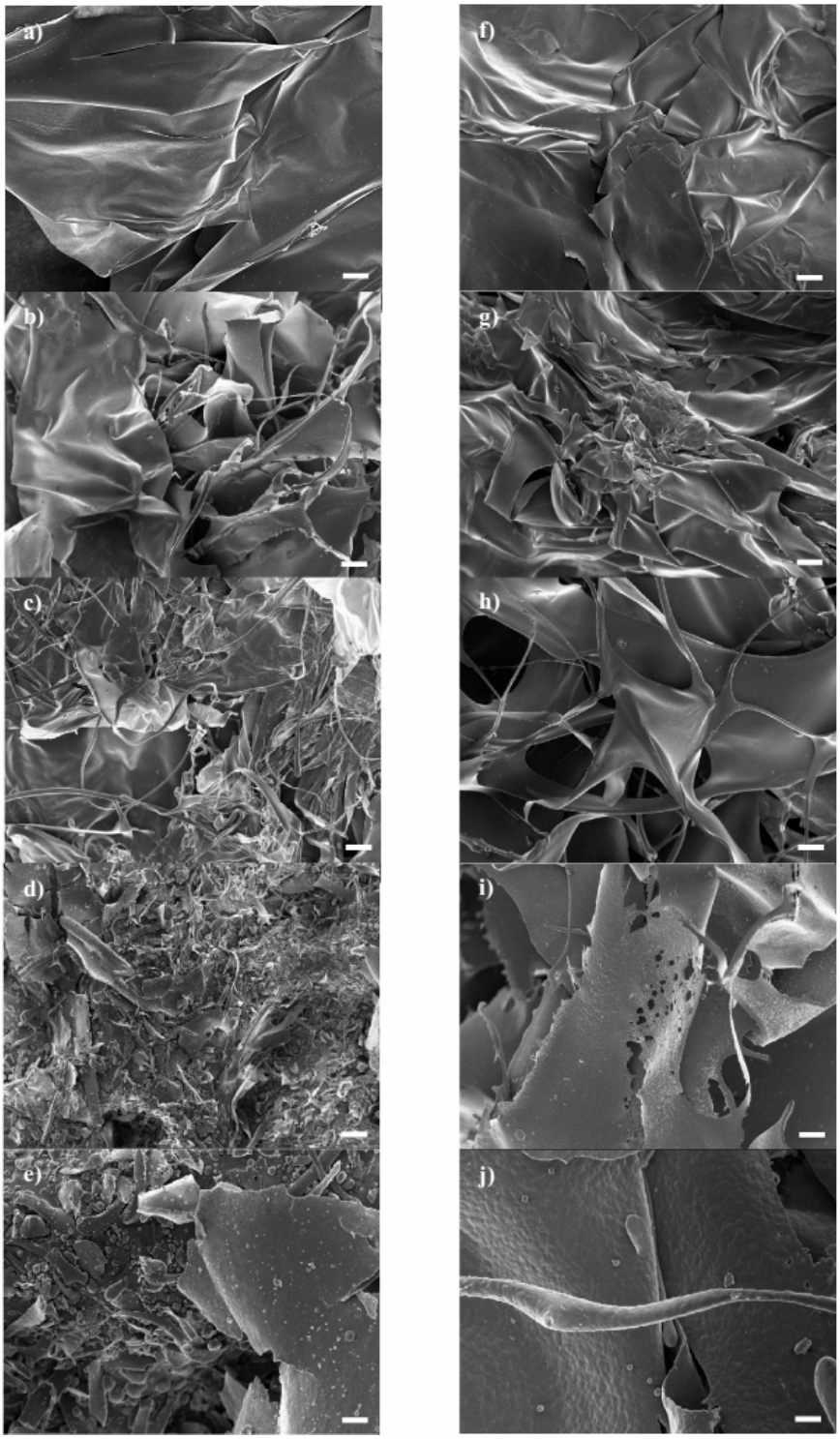


Figura 4.20 Imágenes obtenidas por microscopía de barrido electrónico de a) **C-0,125**; b) **KO_H-1/4**; c) **KO_H-1/2**; d) y e) **KO_H-10**; f) ι-carragenano; g) **IO_H-1/4**; h) **IO_H-1/2**; i) y j) **IO_H**. Imágenes a, b, d y f-i tienen un aumento 500× (escala = 40μm), c 1000× (escala = 20μm), e y j, 2000× (escala = 10μm).

Los carragenanos nativos (κ- e ι-carragenano) poseen características similares (Fig. 4.20 a y f). Ambos poseen una morfología tipo laminar. Las hojas poseen una superficie lisa incluso al magnificar hasta los 10000×. También se observa que las diferentes hojas no se

encuentran apiladas, sino que hay poros entre ellas cuyo tamaño varía entre los 15 y 40 μm. Medina-Torres *et al.*[64] ya habían observado este tipo de morfología al realizar experimentos de SEM sobre carragenanos liofilizados.

La morfología de los productos de oxidación del κ-carragenano (Fig. 4.20 b-e) cambia marcadamente respecto del polisacárido original. Las hojas empiezan a fracturarse y a desaparecer, aún cuando en **KO_H-10** quedan algunas. Las imágenes también revelan la presencia de estructuras tipo varilla, principalmente para **KO_H-1/2** (Fig. 4.20 c). Estas poseen diferentes longitudes y su ancho es menor a los 10 μm. Varias de estas estructuras tipo varilla terminan en pequeñas esferas cuyo diámetro varía entre los 5 y 10 μm. El producto oxidado completamente posee una estructura distinta a la de aquellos oxidados parcialmente. Si bien existen algunas estructuras foliares y tipo varilla, lo que principalmente se observa son pequeñas esferas semiamorfas de entre 1 y 7 μm de diámetro. A diferencia de lo que ocurre con las hojas, estas esferas poseen una superficie rugosa.

Los productos de oxidación del ι-carragenano (Fig. 4.20 g-j) también poseen una morfología distinta a la del polisacárido nativo. En los productos parcialmente oxidados las estructuras foliares también desaparecen, pero son reemplazadas por estructuras con forma de lazo. Estas probablemente se generen por la ruptura de las hojas (Fig. 4.20 h). En el producto completamente oxidado, las estructuras tipo lazo son menos frecuentes. En este caso vuelven a ser predominantes las foliares, pero la superficie de las mismas es rugosa a diferencia de la del polisacárido nativo. También se observan agujeros en éstas, con diámetros que varían entre 1 y 10 μm.

4.A.4 Conclusiones

En esta Sección del trabajo de Tesis se modificaron carragenanos (κ- y ι-) y agaranos (agarosa) por oxidación de la β-D-galactosa a ácido β-D-galacturónico, utilizando el sistema TEMPO/NaBr/NaClO como oxidante. Se buscaron las condiciones óptimas para la oxidación selectiva del C-6 de la galactosa del κ-carragenano y para minimizar la despolimerización de producto final. Estas consistieron en trabajar con NaOH como base, pH entre 9,5 y 10, entre 1 y 2 h de reacción y usar $NaBH_4$ para finalizar la reacción. Dicha metodología se aplicó para la oxidación de otros galactanos.

Para el κ-carragenano y la agarosa, la reacción de oxidación no fue selectiva sobre el C-6 de la galactosa, ya que también ocurría oxidación en la posición 2 de la 3,6-anhidrogalactosa. El estudio por modelado molecular de la reacción determinó que el O-2 del anhidroazúcar está menos impedido estéricamente que los demás oxhidrilos secundarios, lo que favorece el ataque nucleofílico del ion nitrosonio del TEMPO y por ende, su oxidación. El mismo estudio justificó la preferencia experimental por el ataque sobre el alcohol primario.

La reacción de sobreoxidación se revirtió usando $NaBH_4$ para finalizar la reacción. La reacción de reducción resultó ser estereoselectiva ya que se demostró la presencia de la 3,6-anhidrogalactosa en el producto final y no la de su epímero en C-2. Esta selectividad ya había sido observada en la glucosa sobreoxidada.[2,3,18]

Además de los galactanos completamente oxidados se obtuvieron productos parcialmente oxidados. En aquellos con alto grado de oxidación, la proporción de ácido galacturónico es prácticamente estequiométrica, considerando los equivalentes de hipoclorito agregados. Esto no ocurre con aquellos productos de bajo grado de oxidación, probablemente por la generación de aldehídos en vez de carboxilatos, que luego se reducen con el $NaBH_4$.

El estudio de la morfología de los carragenanos oxidados y parcialmente oxidados mostró cambios respecto de los carragenanos nativos. Las estructuras fueron menos homogéneas y más fragmentadas que la estructura laminar característica de los carragenanos liofilizados[64].

SECCIÓN 4B

Actividad antiviral de los galactanos oxidados

4.B.1 Introducción

4.B.1 Virus del herpes simplex

El virus del herpes simplex (HSV) pertenece a la familia Herpesvirideae, la cual está compuesta por 8 herpesvirus distintos. Entre los HSV se conocen dos tipos: el tipo 1 (HSV-1) y el tipo 2 (HSV-2). Los HSV se caracterizan por permanecer latente en las células neuronales y replicarse en las células epiteliales durante la infección y la reactivación, causando lesiones monocutáneas.[65] El virus se trasmite por contacto físico entre un individuo sano y uno infectado. El virus HSV-1 está asociado a lesiones orales y oculares, mientras que el virus HSV-2 a lesiones genitales. Estos virus pueden llegar a causar enfermedades neurológicas como meningitis y encefalitis, así como también ceguera.

El virus HSV presenta cuatro componentes (Fig. 4.21): un *core* que contiene dobles hélices de ADN, una cápside que contiene al genoma, una capa proteica llamada tegumento y una envoltura externa que contiene las glicoproteínas que interaccionan con las células huéspedes para permitir su fusión. Este proceso es llevado a cabo por cinco glicoproteínas de la envoltura (gB, gC, gD, gH y gL).[66] El paso inicial implica la unión de las proteínas gC con los glicosaminoglicanos presentes en la superficie celular, principalmente el heparán sulfato (Fig. 4.21). Después de la adhesión del virus a la célula, gD se une a otro set de receptores celulares conocidos como "mediadores del virus herpes" e incluyen una amplia variedad de receptores presentes en la superficie celular. Esta interacción desencadena la fusión de la envoltura con la membrana celular permitiendo la entrada del virus al citoplasma. Este paso requiere de la acción de las proteínas gB, gH y gL.

Como ya se había mencionado en el Capítulo 1 (Sección 1.5.1), los polisacáridos sulfatados actúan al inicio de la infección impidiendo la fusión y/o penetración del virus. En el caso del HSV los polisacáridos interactúan con gC impidiendo de esta manera la adhesión del virus a las células.[66]

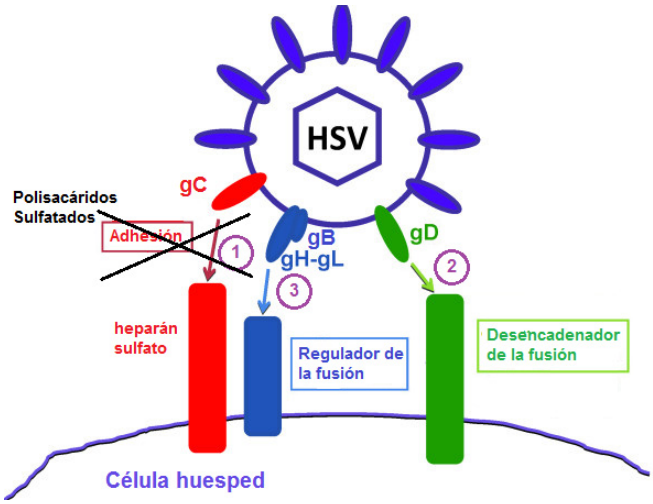


Figura 4.21 Glicoproteínas del HSV para la fusión viral y mecanismo de acción de los polisacáridos sulfatados (adaptado de Karasneh y Shukla[65]).

4.B.2 Objetivos

El objetivo de esta Sección fue estudiar la actividad antiviral de los carragenanos oxidados frente al HSV-1 y al HSV-2, a fin de observar el efecto de la inserción del grupo carboxilo en la misma.

4.B.3 Resultados y discusión

4.B.3.1 Evaluación de la actividad anti-HSV de los carragenanos oxidados.

Los carragenanos y agaranos son agentes antivirales potentes y selectivos para impedir la replicación del virus del herpes en cultivos celulares, incluso a concentraciones bajas (0,1-1 μg/ml).[67] A su vez cuentan con la ventaja de poseer altos índices de selectividad al no ser tóxicos para las células incluso a concentraciones de hasta 5 mg/ml. Como ya fue mencionado en el Capítulo 1 (Sección 1.5) la actividad antiviral de estos galactanos está asociada a su carga negativa, provista principalmente por los grupos éster sulfato. Es por ello que se decidió evaluar la actividad contra el virus del herpes de los carragenanos oxidados, a los cuales se les insertó una carga negativa extra en forma de carboxilato a pH fisiológico. Estos estudios fueron realizados en colaboración con los Dres. E. B. Damonte y C. A. Pujol del Departamento de Química Biológica, FCEyN-UBA.

4.B.3.1.1 Actividad inhibitoria

Se estudió la actividad antiviral de los carragenanos oxidados frente a los virus herpes simplex tipo 1 cepa F (HSV-1(F)) y tipo 2 cepa G (HSV-2 (G)). Los ensayos se realizaron sobre células Vero (células de riñón de mono verde africano) utilizando el método de reducción del número de placas. Se estudiaron principalmente los carragenanos oxidados ya que los derivados de agarosa, al no poseer grupos sulfato, no poseen una actividad significativa. El κ- y el ι-carragenano se utilizaron como referencias, mientras que **IO_E-d** se utilizó para verificar si los productos oxidados sin sulfato no eran activos. Se analizaron las variables de grado de oxidación y peso molecular para ambos carragenanos. Para cada producto y virus, se evaluaron las curvas dosis-respuesta (Fig. 4.22). A partir de estas, se pudieron calcular los valores de CI_{50}, es decir el coeficiente que indica la concentración de polisacáridos para la cual el número de placas virales se reduce al 50 % (Sección 4.B.3.1.3, Tabla 4.13).

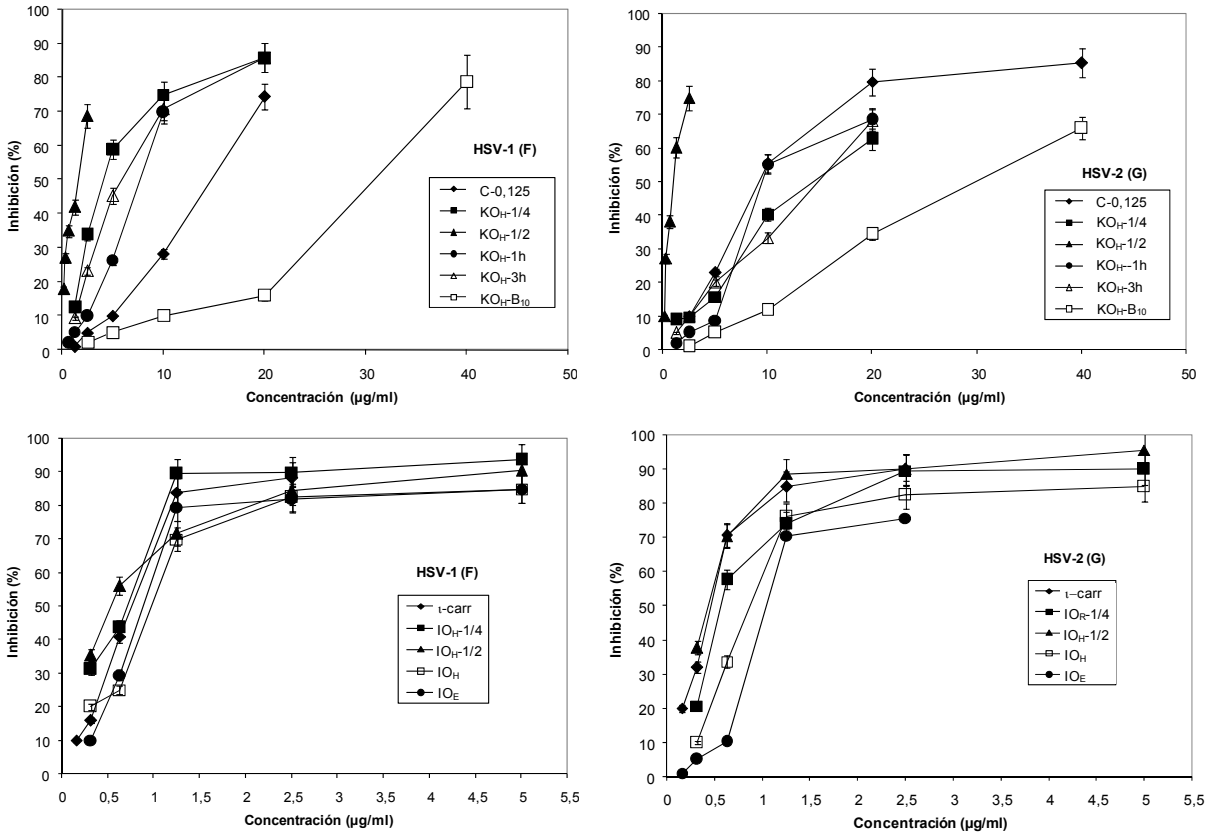


Figura 4.22 Curvas dosis-respuesta de la actividad antiviral contra HSV-1 y HSV-2 del κ- y ι-carragenano y sus productos de oxidación. Los valores se expresan como promedio de ensayos duplicados ± desvío estándar.

Se puede observar que todos los compuestos analizados graficados en la Figura 4.22 resultaron activos frente a ambos virus. **IO_E-d** no resultó activo ni siquiera a altas

concentraciones por lo que no se graficó su curva de dosis-respuesta. Se puede observar que el ι-carragenano y sus derivados resultan un orden de concentración más activos que los derivados del κ-carragenano. Esto era de esperarse ya que, como se mencionó en el Capítulo 1, el κ-carragenano es menos activo que el ι-carragenano.[66] También se destaca que mientras que todos los derivados de este último poseen similares perfiles en las curvas de dosis-respuesta, esto no ocurre para los derivados de **C-0,125**. Esto estaría indicando que los efectos de la oxidación y el peso molecular en la actividad antiviral son más notorios para el κ-carragenano.

4.B.3.1.2 Actividad citotóxica

Se estudió la citotoxicidad de los compuestos analizados para la actividad antiviral. Para ello se evaluó la viabilidad de las células Vero en presencia de concentraciones variables de polisacáridos por 48 h. Se midió la concentración citotóxica 50 (CC_{50}) definida como la concentración del compuesto a la cual disminuye la viabilidad celular un 50 %. En todos los compuestos ésta fue superior a 1000 μg/ml, lo que estaría indicando que los polisacáridos modificados no mostraron actividad citotóxica contra las células Vero a las concentraciones utilizadas tal como sucede para los carragenanos nativos. Esto se puede medir mediante el índice de selectividad (IS) que se define como el cociente entre CI_{50} y CC_{50} (Sección 4.B.3.1.3, Tabla 4.13).

4.B.3.1.3 Efecto del grado de oxidación y del peso molecular

Los distintos carragenanos así como sus productos de oxidación resultaron activos frente a los virus HSV-1 y HSV-2 sin resultar citotóxicos (Tabla 4.13). Sin embargo, se observan diferencias en la actividad de cada uno de ellos y ésta depende en gran medida del peso molecular y del grado de oxidación, principalmente para el κ-carragenano. Como ya se mencionó en la Sección 4.B.3.1.1, los derivados del ι-carragenano no presentan cambios significativos en su CI_{50} al oxidarse o al variar su peso molecular. Este hecho probablemente esté asociado a que el compuesto ya es muy activo en su estado natural y a su vez todas las fracciones ensayadas poseen un alto peso molecular.

Los productos de oxidación total del κ-carragenano mantienen un nivel similar de actividad antiviral al del polisacárido nativo. Sólo cuando el peso molecular del producto oxidado disminuye marcadamente (**KO_H-B10**), se observa una disminución en la actividad antiviral. Esto estaría indicando que un descenso marcado en el peso molecular es un factor que desfavorece la actividad de los carragenanos oxidados. La Figura 4.23 a muestra la

tendencia decreciente con el peso molecular para la actividad inhibitoria, principalmente para HSV-2. Por otro lado, los productos de oxidación parcial de este carragenano muestran una tendencia a aumentar la actividad contra los virus herpes simplex tipo 1 y tipo 2. **KO_H-1/2** resultó diez veces más activo que el polisacárido nativo mientras que **KO_H-1/4** sólo tres veces (Fig. 4.23 b). Esto estaría sugiriendo que existe una relación óptima entre la proporción de galactosa y ácido galacturónico presente en el carragenano modificado.

Tabla 4.13 Actividad anti HSV-1 y HSV-2 e índices de selectividad (IS) para los carragenanos y sus productos de oxidación.

	HSV-1		HSV-2	
	CI_{50} (μg/ml)	IS	CI_{50} (μg/ml)	IS
C-0,125	13,8 ± 1,3	> 72,5	11,0 ± 0,7	> 90,9
KO_H-1/4	4,2 ± 1,1	> 238,1	13,5 ± 1,8	> 74,1
KO_H-1/2	1,7 ± 0,6	> 588,2	0,98 ± 0,4	> 1020,4
KO_H-1h	7,9 ± 1,2	> 126,6	9,0 ± 0,6	> 111,1
KO_H -3h	5,5 ± 0,3	> 181,8	13,9 ± 1,4	> 71,9
KO_H -B10	30,2 ± 7,3	> 33,1	34,3 ± 6,8	> 29,1
ι-carr	0,67 ± 0,07	> 1492,5	0,43 ± 0,03	> 2325,6
IO_H-1/4	0,66 ± 0,04	> 1515,1	0,54 ± 0,01	> 1851,8
IO_H-1/2	0,4 ± 0,1	> 2500	0,40 ± 0,01	> 2500,0
IO_H	0,9 ± 0,2	> 1111,1	0,8 ± 0,2	> 1250,0
IO_E	0,83 ± 0,01	> 1240,8	1,1 ± 0,2	> 909,1
IO_E-d	> 200	Inactivo	> 200	Inactivo

Estos resultados confirman que la densidad de carga negativa no es el único factor a tener en cuenta para la actividad antiviral. Se sabe que la inserción de cargas negativas, generalmente por sobresulfatación, no siempre conlleva a productos más activos.[66] La sulfatación completa del κ-carragenano en el C-6 de la unidad β- mostró un descenso de la actividad inhibitoria frente al HSV, aunque en ese caso el producto poseía un menor peso molecular que el carragenano original.[68] La oxidación completa de dicha posición y consecuente inserción de grupos carboxilo produce un ligero aumento en la actividad antiherpética. Cuando la oxidación no es completa, o sea, hay carboxilatos e hidroximetilos unidos al C-5 de la β-galactosa, se observa que el incremento de la actividad frente al HSV es mucho más marcado. Este aumento depende, en gran medida, del peso molecular y del carragenano utilizado, siendo más notorio para los derivados del κ-carragenano. Una posible

explicación a estas diferencias observadas puede estar relacionada con los factores conformacionales originados por las interacciones no covalentes (tanto iónicas, dipolares o de van der Waals) que facilitan o interrumpen las interacciones de los polisacáridos con el virus.

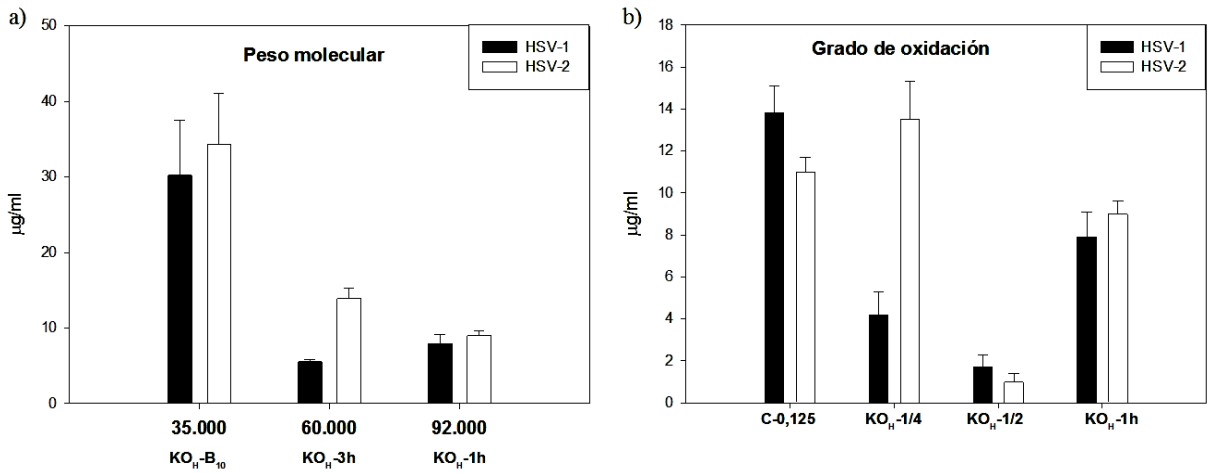


Figura 4.23 a) Relación del CI_{50} para HSV-1 y HSV-2 con el peso molecular para los derivados completamente oxidados del κ–carragenano. b) Relación entre el CI_{50} para HSV-1 y HSV-2 y el grado de oxidación del κ-carragenano.

4.B.4 Conclusiones

Los resultados obtenidos en esta Sección mostraron el efecto de la oxidación con TEMPO de los carragenanos sobre la actividad frente al HSV.

La generación de grupos carboxilato adicionó carga negativa a los carragenanos, lo cual afectó de manera apreciable la actividad antiherpética del κ-carragenano. El polisacárido más activo resultó aquel con proporciones similares de galactosa y ácido galacturónico en su estructura. La actividad también se vio afectada por la naturaleza del carragenano y el peso molecular. La presencia de carboxilatos en el carragenano sin coexistir con grupos sulfato resulta en compuestos inactivos.

Bibliografía

1. Yackel, E. C. & Kenyon, W. O. (1942). *Journal of the American Chemical Society*, *64*, 121–127.

2. Painter, T. J. (1977). *Carbohydrate Research*, *55*, 95–103.

3. Painter, T. J., Cesàro, A., Delben, F. & Paoletti, S. (1985). *Carbohydrate Research*, *140*, 61–68.

4. Davis, N. J. & Flitsch, S. L. (1993). *Tetrahedron Letters, 34*, 1181–1184.

5. de Nooy, A .E. J., Besemer, A. C. & van Bekkum, H. (1994). *Receuil des Travaux Chimiques des Pays-Bas*, *113*, 165–166.

6. Bragd, P. L., van Bekkum, H. & Besemer, A. C. (2004). *Topics in Catalysis, 27*, 49–66.

7. Edye, L. A., Meehan, G. V. & Richards, G. N. (1994). *Journal of Carbohydrate Chemistry*, *13*, 273–283.

8. Bowman, D. F., Brokenshire, J. L., Gillan, T. & Ingold, K. U. (1971). *Journal of the American Chemical Society*, *93*, 6551–6555.

9. Bowman, D. F., Gillan, T. & Ingold, K. U. (1971). *Journal of the American Chemical Society*, *93*, 6555–6561.

10. de Nooy, A .E. J., Besemer, A. C. & van Bekkum, H. (1995). *Carbohydrate Research*, *269*, 89–98.

11. Tojo, G. & Fernandez, M. (2007). Ed. Tojo, G. *Oxidation of primary alcohols to carboxylic acids*. Capítulo 6. Springer, Berlin, Alemania.

12. Semmelhack, M. F., Schmid, C. R. & Cortés, D. A. (1986). *Tetrahedron Letters*, *27*, 1119–1122.

13. Cella, J. A., Kelley, J. A. & Kenehan, E. F. (1975). *Journal of Organic Chemistry, 40*, 1860–1862.

14. Semmelhack, M. F., Chou, C. S. & Cortés, D. A. (1983). *Journal of the American Chemical Society*, *105*, 4492–4494.

15. Anelli, P. L., Biffi, C., Montanari, F. & Quici, S. (1987). *Journal of Organic Chemistry*, *52*, 2559–2562.

16. Zhao, M., Li, J., Mano, E., Song, Z. Tschaen, D. M., Grabowski, E. J. J. & Reidor, R. J. (1999). *Journal of Organic Chemistry*, *64*, 2564–2566.

17. Epp, J. B. & Widlanski, T. S. (1999). *Journal of Organic Chemistry*, *64*, 293–295.

18. de Nooy, A. E. J., Besemer, A. C., van Bekkum, H., van Dijk, J. A. P. P. & Smit, J. A. M. (1996). *Macromolecules*, *29*, 6541–6547.

19. Jiang, B., Drouet, E., Milas, M. & Rinaudo, M. (2000). *Carbohydrate Research*, *327*, 455–461.

20. Thaburet, J-F., Merbouh, N., Ibert, M., Marsais, F. & Queguiner, G. (2001). *Carbohydrate Research*, *330*, 21–29.

21. Su, Y., Chu, B., Gao, Y., Wu, C., Zhang, L., Chen, P., Wang, X. & Tang, S. (2013). *Carbohydrate Polymers*, *92*, 2245–2251.

22. Bragd, P. L., Besemer, A. C. & van Bekkum, H. (2001). *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, *170*, 35–42.

23. Kato, Y., Matsuo, R. & Isogai, A. (2003). *Carbohydrate Polymers*, *51*, 69–75.

24. ter Haar, R., Timmermans, J. W., Slaghek, T. M., van Dongen, F. E. M., Schols, H. A. & Gruppen, H. (2010). *Carbohydrate Polymers*, *81*, 830–838.

25. Saito, T. & Isogai, A. (2005). *Carbohydrate Polymers*, *61*, 183–190.

26. Follain, N., Montanari, S., Jeacomine, I., Gambarelli, S. & Vignon, M. R. (2008). *Carbohydrate Polymers*, *74*, 333–343.

27. Pereira, J. M., Mahoney, M. & Edgar, K. J. (2014). *Carbohydrate Polymers, 100*, 65–73.

28. Tamura, N., Wada, M. & Isogai, A. (2009). *Carbohydrate Polymers*, *77*, 300–305.

29. Lien, L. T. N., Shiraki, T., Dawn, A., Tsuchiya, Y., Tokunaga, D., Tamaru, S-i., Enomoto, N., Hojo, J. & Shinkai, S. (2011). *Organic & Biomolecular Chemistry*, *9*, 4266–4275.

30. Wang, W., Liu, S., Yang, Z., Zhu, Y., Wu, Y., Huang, J. & Mao, J. (2011). *Carbohydrate Polymers*, *85*, 798–802.

31. Bae, I. Y., Kim, H. Y., Lee, S. & Lee, H. G. (2011). *Carbohydrate Polymers*, *83*, 1298–1302.

32. Muzzarelli, R. A. A., Muzzarelli, C., Cosani, A. & Terbojevich, M. (1999). *Carbohydrate Polymers, 39*, 361–367.

33. Bordenave, N., Grelier, S. & Coma, V. (2008). *Biomacromolecules, 9*, 2377–2382.

34. Elboutachfaiti, R., Petit, E., Michaud, P., Courtois, B., Courtois, J. & Delattre, C. (2012). *Carbohydrate Polymers*, *89*, 1261–1267.

35. Delattre, C., Pierre, G., Gardarina, C., Traikia, M., Elboutachfaiti, R., Isogai, A. & Michaud, P. (2015). *Carbohydrate Polymers*, *116*, 34–41.

36. Sierakowski, M. R., Milas, M., Desbrières, J. & Rinaudo, M. (2000). *Carbohydrate Polymers, 42*, 51–57.

37. Parikka, K., Leppänen, A-S., Xu, C., Pitkänen, L., Eronen, P., Österberg, M., Brumer, H., Willför, S. & Tenkanen, M. (2012). *Biomacromolecules*, *13*, 2418−2428.

38. Huerta-Angeles, G., Němcová, M., Příkopová, E., Šmejkalová, D., Pravda, M., Kučcera, L. & Velebý, V. (2012). *Carbohydrate Polymers*, *90*, 1704–1711.

39. Elboutachfaiti, R., Petit, E., Beuvain, C., Courtois, B., Courtois, J. & Delattre, C. (2010). *Carbohydrate Polymers*, *80*, 485–490.

40. Elboutachfaiti, R., Petit, E., Pillon, M., Courtois, B., Courtois, J. & Delattre, C. (2011). *Food Chemistry, 127,* 976–983.

41. Xu, M., Dai, H., Sun, X., Wang, S. & Wu, W. (2012). *Bioresources*, *7*, 1633–1642.

42. Hirota, M., Tamura, N., Saito, T. & Isogai, A. (2009). *Carbohydrate Polymers, 78*, 330–335.

43. Saito, T., Hirota, M., Tamura, N., Kimura, S., Fukuzumi, H., Heux, L. & Isogai, A. (2009). *Biomacromolecules*, *10*, 1992–1996.

44. Tamura, N., Hirota, M., Saito, T. & Isogai, A. (2010). *Carbohydrate Polymers, 81*, 592–598.

45. Watanabe, E., Tamura, N., Saito, T., Habu, N. & Isogai, A. (2014). *Carbohydrate Polymers, 100*, 74–79.

46. Isogai, T., Saito, T. & Isogai, A. (2010). *Biomacromolecules*, *11*, 1593–1599.

47. Lavazza, M., Formantici, C., Langella, V., Montic, D., Pfeiffer, U. & Galantea, Y. M. (2011). *Journal of Biotechnology, 156*, 108–116.

48. Chang, P. S. & Robyt, J. F. (1996). *Journal of Carbohydrate Chemistry, 15*, 819–830.

49. Yan, J. K., Ma, H-L., Cai, P-F., Zhang, H-N., Zhang, Q., Hu, N.Z., Feng, X-B. & Wu, J-Y. (2014). *Food Chemistry, 143*, 530–535.

50. Tranquilan-Aranilla, C., Nagasawa, N., Bayquen, A. & Dela Rosa, A. (2012). *Carbohydrate Polymers, 87*, 1810–1816.

51. Leong, K. H., Chung, L. Y., Noordin, M. I., Mohamad, K., Nishikawa, M., Onuki, Y., Morishita, M. & Takayama, K. (2011). *Carbohydrate Polymers, 83*, 1507–1515.

52. Ciucanu, I. & Kerek, F. (1984). *Carbohydrate Research, 131*, 209–217.

53. Prado-Fernández, J., Rodríguez-Vázquez, J. A., Tojo, E. & Andrade, J. M. (2003). *Analytica Chimica Acta, 480*, 23–37.

54. de Nooy, A. E. J. & Besemer, A. C. (1995). *Tetrahedron, 51*, 8023-8032.

55. Prado, H. J., Matulewicz, M. C., Bonelli, P. R. & Cukierman, A. L. (2011). *Carbohydrate Research, 346*, 311–321.

56. Barahona, T., Prado, H. J., Bonelli, P. R., Cukierman, A. L., Fissore, E. L., Gerschenson, L. N. & Matulewicz, M. C. (2015). *Carbohydrate Polymers*, *126*, 70-77.

57. Navarro, D. A., Flores, M. L. & Stortz, C. A. (2007). *Carbohydrate Polymers*, *69,* 742–747.

58. Knutsen, S. H., Myslabodski, D. E., Larsen, B. & Usov, A. I. (1994). *Botanica Marina*, *37*, 163–169.

59. Chizhov, O. S., Zolotarev, B. M., Usov, A. I., Rechter, M. A. & Kochetkov, N. K. (1971). *Carbohydrate Research, 16*, 29–38.

60. Colombo, M. I., Rúveda, E. A. & Stortz, C. A. (2011). *Organic & Biomolecular Chemistry, 9*, 3020–3025.

61. Heikkinen, S., Merja, T. M., Karhunen, P. T. & Kilpaläinen, L. A. (2003). *Journal of the American Chemical Society*, *125*, 4362–4367.

62. Bock, K., Lundt, I. & Pedersen, C. (1974). *Tetrahedron Letters*, *13*, 1037–1040.

63. Rees, D. A. (1961). *Journal of the Chemical Society*, 5168–5171.

64. Medina-Torres, L., Brito-De La Fuente, E., Gómez-Aldapa, C. A., Aragon-Piña, A. & Toro-Vázquez, J. F. (2006). *Carbohydrate Polymers*, *63*, 299–309.

65. Karasneh, G. A. & Shukla, D. (2011) *Virology Journal*, *8*, 481-492.

66. Damonte, E. B., Matulewicz, M. C. & Cerezo, A. S. (2004). *Current Medicinal Chemistry, 11*, 2399–2419.

67. Pujol, C. A., Carlucci, M. J., Matulewicz, M. C. & Damonte, E. B. (2007). *Topics in Heterocyclic Chemistry, 11*, 259-281.

68. Kolender, A. A., Pujol, C. A., Damonte, E. B., Cerezo, A. S. & Matulewicz, M. C. (1998). *Anales de la Asociación Química Argentina*, *86*, 304–311.

CAPÍTULO 5

Estudio de la reacción de tratamiento alcalino de carragenanos por modelado molecular

5.1 Introducción

La reacción de tratamiento alcalino de los galactanos de algas rojas es muy utilizada tanto a nivel analítico como industrial. Como se explicó en el Capítulo 1, ésta consiste en una reacción del tipo S_N2 intramolecular que sufren las unidades de α-galactosa 6-sulfato de los galactanos de algas rojas para dar, por pérdida de sulfato y ciclación, la correspondiente 3,6-anhidrogalactosa. Esta reacción es bastante atípica ya que los grupos hemiéster sulfato suelen ser estables en medio básico. Asimismo, la carga negativa de los mismos hace que no sean buenos grupos salientes ya que su presencia disminuye la polarización del enlace C-O.[1]

La importancia y utilidad de la reacción hizo que haya sido ampliamente estudiada, observándose una cinética dependiente de la estructura. Se decidió estudiar la reacción por modelado molecular como una posible herramienta que permita justificar los datos observados experimentalmente.

5.1.1 Cinética de la reacción de tratamiento alcalino

La reacción de tratamiento alcalino consiste de tres pasos: la desprotonación del O-3 de la galactosa, la interconversión de sillas de $^4C_1$ a $^1C_4$ y la propia reacción de sustitución nucleofílica (Fig. 5.1). Uno de los interrogantes a resolver de este mecanismo es cuál de los pasos ocurre primero: la desprotonación o la inversión. Ciancia *et al.*[2] postularon que la desprotonación del O-3 es la fuerza impulsora para la interconversión. Los autores consideraron que en las condiciones de reacción es factible encontrar una carga negativa cercana al C-2, ya sea por presencia de un grupo éster sulfato sobre el mismo, o por desprotonación del alcohol en dicha posición (más acídico que el de O-3). Por lo tanto, al desprotonar O-3 quedarían dos cargas negativas vecinas en posición ecuatorial, lo que desestabilizaría la conformación $^4C_1$, e impulsaría su interconversión a la $^1C_4$.

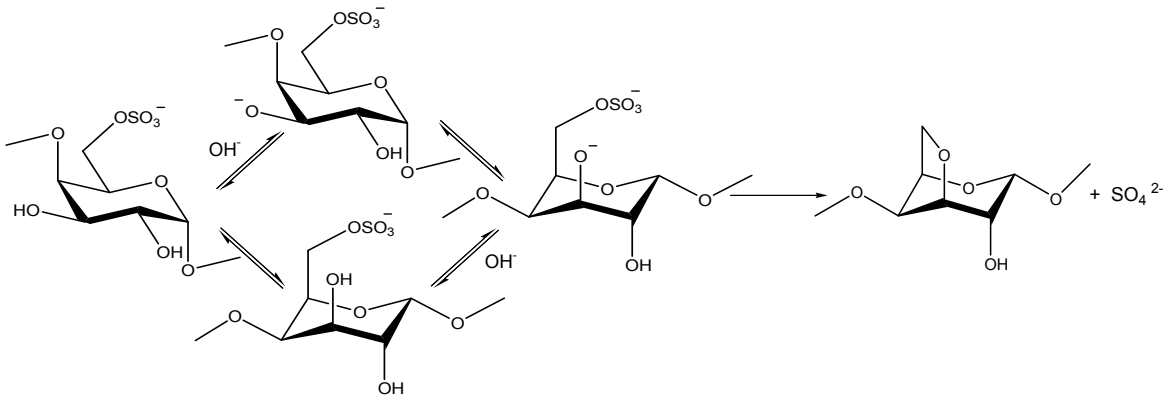


Figura 5.1 Reacción de tratamiento alcalino en galactanos de algas rojas

En los estudios de cinética de reacción se comprobó que la misma era de segundo orden. Sin embargo, como la concentración de NaOH es alta y se mantiene prácticamente constante, puede considerarse de pseudo primer orden y dependiente exclusivamente de la concentración de galactosa 6-sulfato.[2] Los estudios permitieron establecer una relación entre la velocidad de reacción y la posición de los grupos sulfato tanto en las unidades α- como en las β-. La Tabla 5.1 muestra los parámetros cinéticos de la reacción de tratamiento alcalino en distintos galactanos de algas rojas informados en bibliografía.

Tabla 5.1 Valores de la constante de reacción y vida media en NaOH 1M a 80 °C para distintos galactanos de algas rojas.

Polisacárido	Unidad disacarídica[a]	k_1 (10^4 s^{-1})	$t_{1/2}$ (min)	Ref.
ν-carragenano	G4S-D2,6S[b]	77,0 [c]	1,5	3
ν+μ-carragenano	G4S-D2,6S+G4S-D6S [d]	26,0	4,5	2
λ-carragenano degradado	G-D2,6S	5,0	25,5	4
Porfirano	G6M-L6S+G-L6S[e]	5,0	23,0	5
λ-carragenano	G2S-D2,6S	0,7	172,0	2

[a] Según nomenclatura propuesta por Knutsen *et al.*[6]
[b] 71 % de unidades ι-carragenano, 21 % de unidades ν-carragenano, 7 % de unidades no sulfatadas.
[c] Determinada a 70 °C
[d] 43 % de unidades ν-carragenano, 17 % de unidades μ-carragenano y 39 % de unidades κ-/ι-carragenano
[e] 70% de la unidad β- se encuentra metilada en C-6

De acuerdo a estos resultados, los galactanos que poseen la unidad de β-galactosa sulfatada en C-4 (μ- y ν-carragenanos) son los que reaccionan más rápidamente. Noseda y Cerezo[4] observaron al construir modelos moleculares que dicho sulfato podría interaccionar con la posición 6 de la unidad α- que se encuentra sulfatada, desestabilizando la conformación $^4C_1$ de la misma.

Ya que el ν-carragenano cicla más rápido que el híbrido μ/ν se puede inferir que la presencia del grupo sulfato en el C-2 de la unidad α- acelera la reacción. Viana *et al.*[3] justificaron este hecho en base a la presencia de la carga negativa concentrada en C-2, y vecina al O-3 desprotonado. Los autores supusieron que al estar la carga negativa del sulfato más alejada que en el O-2 desprotonado del μ-carragenano, va a ser más fácil desprotonar el O-3 en el ν-carragenano.

El λ-carragenano es el galactano en el cual la reacción ocurre más lentamente. Esto estaría indicando que la presencia de grupos éster sulfato en C-2 de la unidad β- desfavorece

la reacción. Ciancia *et al.*[2] infirieron que este fenómeno se debe a que el sulfato en dicha posición interacciona por enlace de hidrógeno con el H(O)-3 de la unidad α- por lo que desprotonar dicha posición es desfavorable.

Un hecho interesante es que un λ-carragenano parcialmente desulfatado y el porfirano presentan velocidades de reacción de tratamiento alcalino similares. Dado que ambos poseen diferente configuración de la unidad α-, este resultado permite inferir que tanto la L- como la D-galactosa 6-sulfato en ambientes diastereoméricos poseen velocidades de reacción similares.

5.1.2 Modelado molecular y los hidratos de carbono

La química computacional es una disciplina que estudia el modelado y simulación computacional de un enorme variedad de moléculas orgánicas e inorgánicas.[7] Esta rama de la química se ha visto muy beneficiada por el crecimiento exponencial de la capacidad computacional, acompañada del desarrollo de software y hardware. Esta disciplina se puede utilizar para un gran número de tareas como calcular energías de estructuras, optimizar geometrías, hallar estructuras de transición, medir propiedades termodinámicas, simular espectros (Raman, IR, RMN, dicroísmo circular), etc.

Existen distintos tipos de métodos para realizar el modelado de las moléculas. Su elección depende del grado de exactitud buscada, del tamaño de la molécula o de los grupos de moléculas a estudiar y de las propiedades que se buscan calcular. Generalmente los métodos con mayor nivel de teoría son los más exactos, pero a su vez requieren una mayor demanda computacional.

5.1.2.1 Métodos *ab initio* y DFT

Los métodos cuánticos son los que mayor rigor teórico presentan, pero tienen más requerimientos computacionales y por ello se los suele utilizar para moléculas de tamaño chico o mediano. Entre ellos se encuentran los métodos *ab initio* que resuelven la ecuación de Schrödinger con algunas aproximaciones.[7] El método *ab initio* más conocido es el de Hartree-Fock (HF) donde la función de onda es aproximada por un determinante de Slater. Sin embargo, este método no incluye la correlación coulómbica de los electrones por lo que siempre va a haber una diferencia entre la energía calculada y la exacta, que proviene de la ecuación de Schrödinger. La teoría de la perturbación de Möller-Plesset (MP) permite corregir esta deficiencia del método al agregar a la energía calculada por HF un término de corrección por correlación electrónica. Se necesita al menos una perturbación de segundo

orden (MP2) para que los cálculos se aproximen más al resultado exacto. Este método no es útil cuando se usan bases mínimas, por lo cual los cálculos demandan mucho tiempo.

Otros métodos cuánticos muy utilizados en la actualidad son aquellos que utilizan la teoría de funcionales de densidad (conocida por su abreviatura en inglés DFT: "*density functional theory*"). Estos métodos expresan la energía como una función de la densidad electrónica, es decir como un funcional.[7] Si bien no se conoce la forma exacta de este funcional, se utilizan aproximaciones que toman en cuenta la energía cinética y las energías de intercambio y correlación del sistema de electrones. Existen métodos de DFT puros y métodos híbridos donde una parte del cálculo de energía se realiza por HF. Los métodos DFT son muy útiles para calcular diferencias de energía con una exactitud similar a los método *ab initio* combinados con MP, pero con mucha menor demanda computacional.

Con el avance en la capacidad computacional, tanto los métodos *ab initio* como los DFT se están utilizando desde hace más de una década para realizar cálculos con hidratos de carbono de bajo peso molecular, ya que permiten describir mejor el fenómeno estereoelectrónico que determina la estructura de estos compuestos.[8] Sus usos son variados, desde estudios teóricos de reacción que involucran azúcares[9,10] al análisis de las conformaciones tanto de monosacáridos[11,12] como de disacáridos.[13,14] En particular, los caminos conformacionales de los monosacáridos (es decir los pasajes entre las distintas sillas, botes, botes torcidos, etc.) están siendo muy estudiados ya que hay evidencias que enzimas como las glicosil hidrolasas operan sobre conformaciones más flexibles como el bote o el bote torcido en vez de hacerlo sobre la conformación silla, más estable.[15]

Se han realizado diversos estudios para determinar cuáles son los métodos cuánticos, tanto *ab initio* como DFT, más convenientes a utilizar con hidratos de carbono. [8,16] Dentro de los métodos *ab initio*, el método MP2 con bases de alto nivel como aug-cc-pVTZ ha demostrado dar resultados bastante exactos al calcular las energías relativas.[16] Sin embargo, el largo tiempo requerido para los cálculos hace que no sea un método muy utilizado. En general, la mayoría de los estudios conformacionales de carbohidratos (y de muchos otros compuestos) se realizaron por DFT, utilizando, en particular, el funcional híbrido B3LYP. Este método requiere una demanda computacional moderada y ha demostrado su utilidad en los cálculos de moléculas orgánicas en general, sin necesidad de una base excesivamente grande. Hace algunos años Csonka[17] demostró que al modelar hidratos de carbono con B3LYP era suficiente trabajar con bases a nivel 6-31+G(d,p). Sin embargo, trabajos más recientes han evidenciado algunas fallas en la aplicación de este funcional.[18] Esto llevó a

Csonka *et al.*[16] a estudiar una amplia variedad de métodos cuánticos para calcular energías relativas de distintos sets de confórmeros de monosacáridos usando MP2/aug-cc-pVTZ como valor de referencia. Los autores llegaron a la conclusión que B3LYP no es el mejor funcional para el estudio de energías relativas en el análisis conformacional de monosacáridos. Asimismo, en aquel momento el funcional de creación reciente M05-2X fue el que mejor resultado dio. Tres años después, Sameera y Pantazis[8] realizaron un estudio similar sobre conformaciones de monosacáridos, pero ampliando tanto los confórmeros como los métodos utilizados. Estos autores observaron que, dentro de los métodos de DFT, los que dieron mejor resultado fueron *m*PW2PLYP-D y M06-2X.

Los funcionales híbridos M05-2X y M06-2X son dos funcionales relativamente nuevos que pertenecen a la misma familia, siendo el último una mejora y actualización del primero.[19] Ambos funcionales están parametrizados para los átomos de los tres primeros períodos de la tabla periódica y sus usos están asociados con la termodinámica, la cinética y las interacciones no covalentes. M06-2X también ha sido recomendado para estudiar las energías de excitación electrónica.[19]

5.1.2.2 Métodos semiempíricos

Los métodos semiempíricos (AM1, PM3, etc.) son más simples ya que reemplazan algunos de los términos de los cálculos de HF por parámetros empíricos. En estos métodos se elimina el cálculo del *core* de electrones, se usa el mínimo número de bases y se reduce el número de integrales de dos electrones.[7] De esta manera la demanda computacional es mucho menor. Sin embargo, la desventaja de este método es que si la molécula a estudiar no se asemeja a ninguna de las moléculas utilizadas como base para parametrizar el método, los resultados no son satisfactorios. Estos métodos generalmente fallan para los cálculos con hidratos de carbono.[16]

5.1.2.3 Métodos de mecánica molecular

En los métodos de mecánica molecular, la expresión de la energía está asociada a los distintos movimientos nucleares como la vibración y rotación de enlaces y las diferentes interacciones a distancia. La combinación de funciones sencillas asociadas a la posición de los núcleos con parámetros experimentales determina la energía potencial de la molécula. Esta expresión matemática del potencial se conoce como campo de fuerza.[7] Como se puede observar, el electrón no se considera explícitamente, ya que se lo considera asociado a la posición del núcleo. Estos métodos claramente requieren mucha menor demanda

computacional y son muy útiles para moléculas medianas y grandes como los oligosacáridos. Métodos como MM3,[20,21] CHARMM,[22] AMBER, o su variante para hidratos de carbono GLYCAM[23] y GROMOS en su variante $A56_{CARBO}$[24,25] han sido muy utilizados para el estudio conformacional de hidratos de carbono. Los métodos de mecánica molecular cuentan con la ventaja que al incorporar parámetros que incluyen las interacciones de van der Waals, permiten una buena descripción de los carbohidratos. Sin embargo, estos métodos no toman en cuenta la reactividad química ni los efectos electrónicos en la estructuras, si bien en algunos casos tienen en cuenta el efecto anomérico.[8]

5.1.2.4 Simulación computacional

Cuando el objetivo es estudiar una macromolécula o un sistema grande de moléculas, es más habitual utilizar campos de fuerza, pero no generar optimizaciones de energía, sino recurrir a métodos de simulación computacional.[26] Estos métodos permiten el estudio y predicción de las propiedades de un sistema mediante el uso de técnicas que consideran pequeñas réplicas del sistema macroscópico con un número manejable de átomos o moléculas. La simulación genera configuraciones representativas de estas réplicas de manera de obtener los valores de las propiedades, estructuras y parámetros termodinámicos con un requerimiento computacional factible. La simulación computacional se puede llevar a cabo por dos métodos: los determinísticos como la dinámica molecular y los probabilísticos, como los métodos Metrópolis-Monte Carlo. En el primer método, configuraciones sucesivas de un sistema son generadas al integrar las leyes de movimiento de Newton.[26] El resultado es una trayectoria que muestra la variación de la posición y de la velocidad de las partículas con el tiempo. Por otro lado, una simulación de Monte Carlo genera configuraciones de un sistema al realizar cambios al azar a las posiciones de los átomos, lo que también origina cambios en las conformaciones. En estos métodos se puede calcular la energía potencial de cada configuración del sistema junto con otras propiedades dependientes de la posición de los átomos.[26]

5.1.3 Análisis conformacional de los monosacáridos

Como es ampliamente sabido, los monosacáridos no suelen encontrarse en su forma abierta, sino como hemiacetales intramoleculares formando anillos de cinco o seis miembros, conocidos como furanosas y piranosas, respectivamente.

La mayoría de las pentosas y hexosas en solución prefieren la forma piranósica ya que su formación implica la formación de un anillo de seis miembros estable, formado por cinco

átomos de carbono y un oxígeno. Esto hace que el estudio conformacional de dicha estructura esté relacionado con el del ciclohexano y sus derivados. En la Figura 5.2 se observan las distintas conformaciones de mínima (silla y bote torcido) y de máxima energía (bote y semisilla) para el ciclohexano. El sobre es también un posible estado de transición entre la silla y el bote torcido. Si bien para el ciclohexano dicho máximo es una semisilla, se ha encontrado que para sus derivados un estado de transición puede tener una conformación tipo sobre.[27] Cada una de las conformaciones se identifica con una letra que proviene de su inicial en inglés.

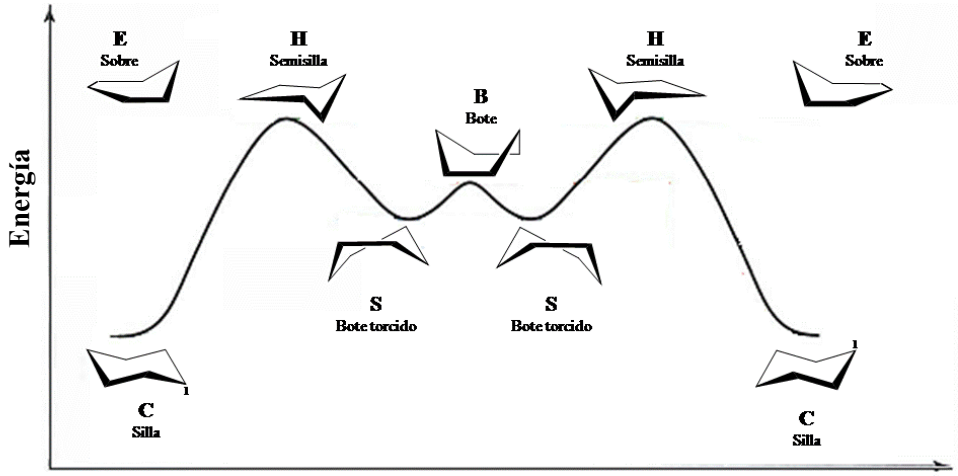


Figura 5.2 Diagrama de energía para el camino conformacional del ciclohexano marcando las estructuras de mínima y máxima energía

En los ciclohexanos sustituidos, así como en estructuras análogas, como las formas piranósicas de los azúcares, el camino de interconversión de sillas puede ser notablemente más complejo. No sólo la interconversión de la silla al bote torcido puede ocurrir a través de una estructura tipo sobre, sino que también puede haber varios mínimos y máximos locales (generalmente estructuras cercanas a botes torcidos y botes) entre ambas semisillas o sobres.

Para sistematizar el estudio conformacional de los derivados de ciclohexanos, Cremer y Pople[28] propusieron un sistema de coordenadas esféricas para describir el *puckering*, o sea la desviación de la planaridad en los anillos. Este sistema define tres parámetros de *puckering*: *Q* es una medida de la amplitud promedio de la desviación del anillo respecto al plano y se expresa en Å, mientras que los ángulos ϕ y θ indican la desviación de la planaridad de los distintos ángulos del anillo (Fig. 5.3). Puede definirse así una esfera conformacional a partir de estos parámetros, por analogía a la esfera terrestre, en la que el ángulo θ indica la latitud, mientras el ángulo ϕ indica la longitud. De esta manera, las sillas se ubican en los polos (θ = 0° y 180°), los botes y botes torcidos en el ecuador (θ = 90°) y las semisillas y los sobres en los trópicos (θ = 50,8 y 129,1º; θ = 54,7 y 125,3°, respectivamente).[29] El ángulo ϕ, que sólo

tiene importancia lejos de los polos, indica cuáles son los átomos por encima y debajo del plano para el mismo tipo de conformación (igual latitud), permitiendo así describir a los distintos botes y botes torcidos en el ecuador, y a los diferentes sobres y semisillas en los trópicos. Para poder nombrar a los distintos conformeros, se agrega a los costados de las letras números que señalan los átomos que se encuentran arriba o abajo del plano que generan los restantes átomos del anillo. De esta manera, el bote $B_{2,5}$ es aquel donde los átomos 2 y 5 se encuentran por debajo de un plano definido por los carbonos 1, 3, 4 y 6. Estos parámetros también se utilizan para representar las distintas conformaciones de la forma piranósica de los monosacáridos, como se observa en Figura 5.3. En este caso, la numeración es del 1 al 5 para los átomos de carbono y la letra O simboliza al oxigeno que es el sexto átomo del anillo.

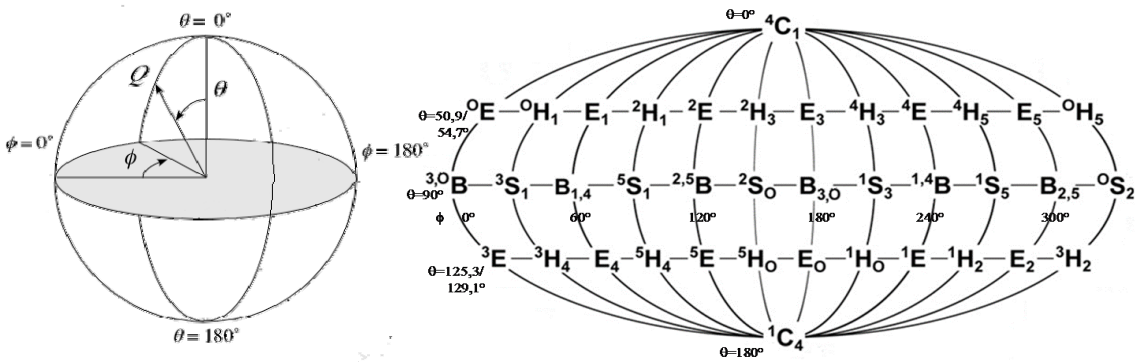


Figura 5.3 Localización de los distintos confórmeros de una aldopiranosa en la esfera conformacional en función de los parámetros de *puckering* de Cremer y Pople (adaptado de Mayes *et al.*[15]).

El modelado molecular es una herramienta muy útil para estudiar caminos conformacionales. No sólo permite obtener la diferencia de energía entre las distintas estructuras sino que al obtener una dada geometría se puede determinar con precisión sus parámetros de *puckering*. Los primeros estudios conformacionales de azúcares se realizaron utilizando mecánica molecular dada la menor demanda computacional de esos métodos. Se determinó la energía en función de los diferentes parámetros de *puckering*, y los datos obtenidos se representaron en mapas de contorno donde los ejes cartesianos indicaban los distintos valores de ϕ y θ (el parámetro Q no es considerado en estos cálculos, ya que se grafica el óptimo). Si bien el primer estudio de este tipo en monosacáridos lo realizaron Joshi y Rao en 1979[30] para la α- y β-glucopiranosa, recién en la década del 90 con los trabajos de French y colaboradores tomaron real importancia. Dowd *et al.*[20] realizaron este análisis para las ocho aldohexopiranosas de la serie D- en sus formas α- y β- utilizando MM3 para realizar los cálculos. Los estudios mostraron que la forma $^4C_1$ es la preferencial para la mayoría de

los monosacáridos estudiados, aunque algunos de ellos, como la α-idopiranosa y la α-altropiranosa se encontraban mayoritariamente como los confórmeros $^{O}S_2$ y/o $^{1}C_4$. En la Figura 5.4, se observan los mapas de isoenergía para la α- y β-D-galactopiranosa y la α- y β-D-glucopiranosa. En ellos se puede ver, tal como era esperado, zonas de baja energía cerca de los polos (θ = 0° y 180º) donde se encuentran las dos sillas, zonas de alta energía a θ = 60° y 120° correspondientes a los sobres y semisillas. Estas últimas no forman una cresta continua de alta energía sino que a distintos valores de ϕ hay zonas de mayor energía que otras. La zona del ecuador (θ = 90°) es variable ya que se encuentran los botes torcidos (mínimos) y los botes (máximos). Se puede observar que no se encuentran todos los mínimos locales teóricamente posibles. En particular, para la α-galactopiranosa los autores determinaron dos mínimos en esa zona (de los seis posibles) correspondientes a los botes torcidos $^{1}S_3$ y $^{O}S_2$. Se destaca que en la Figura 5.4 se observa un tercer mínimo para la α-galactopiranosa con ϕ cercano a 90° que los autores no destacaron.

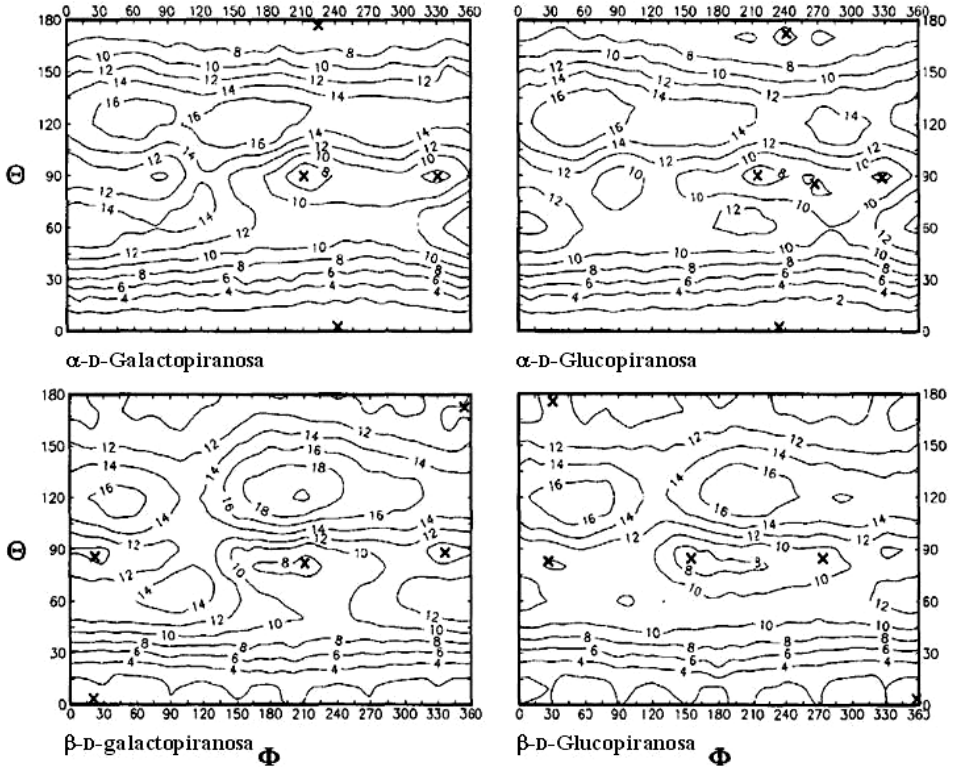


Figura 5.4 Mapas adiabáticos de *puckering* utilizando MM3 con contornos de energía graduados cada 2 kcal/mol (adaptado de Dowd *et al.*[20]).

Si bien los estudios por mecánica molecular permitieron profundizar el estudio conformacional de los monosacáridos, no pueden olvidarse las limitaciones que presentan para calcular geometrías y energías relativas. Los métodos cuánticos mejoran notablemente este aspecto, como se vio en la Sección anterior. Sin embargo, debido al requerimiento

computacional de estos métodos, sólo recientemente han empezado a realizarse estudios conformacionales con mayor grado de teoría. Al utilizar métodos cuánticos es más difícil realizar un barrido completo de los ángulos ϕ y θ como en aquellos estudios de Dowd *et al.*[20] con mecánica molecular. Es más sencillo buscar directamente los mínimos y máximos a partir de las 38 conformaciones "ideales" definidas en la Figura 5.3. Un estudio utilizando métodos cuánticos (DFT y HF) realizado por Stortz,[27] mostró los distintos caminos conformacionales para ciclohexanos monosutituidos, ciclohexanona y ciclohexanos sustituidos con heteroátomos en el anillo. El ejemplo más pertinente es el del 2-hidroxitetrahidropirano (Fig. 5.5) por su similitud con las formas piranósicas de los azúcares al presentar efecto anomérico. El autor sólo pudo encontrar cuatro de los seis botes torcidos teóricamente posibles. La estructura $^{O}S_2$ resultó la más estable, probablemente debido a que el grupo OH se encuentra antiperiplanar a un orbital del átomo de O del anillo. Asimismo este bote torcido es el intermediario para el camino de intercorvención de sillas más directo y de menor energía.

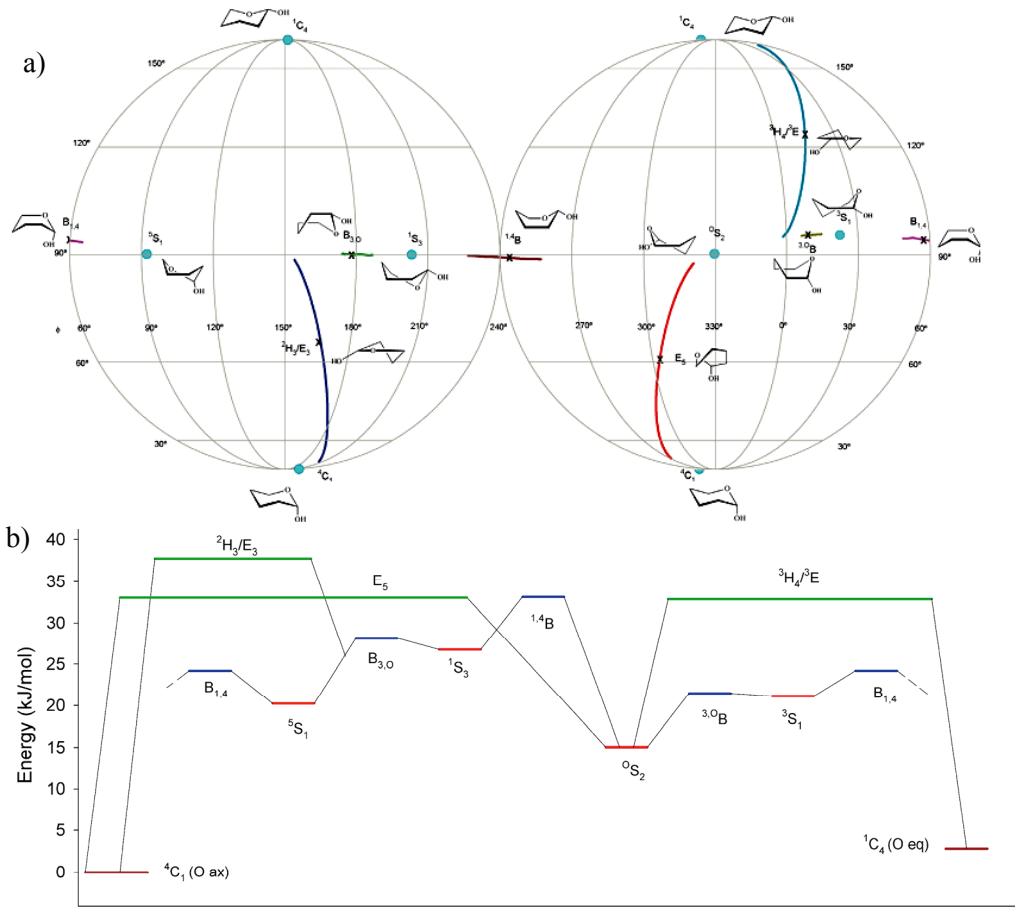


Figura 5.5 a) Representación geométrica de los parámetros de *puckering* de Cremer y Pople de las estructuras obtenidas por B3LYP/6-31+G(d,p) y b) diagrama de energía obtenido a nivel B3LYP/6-311+G(d,p) del camino conformacional del 2-hidroxitetrahidropirano (adaptado de Stortz[27]).

Un intento de extender el mismo análisis a monosacáridos resultaría mucho más complejo debido la gran cantidad de rotámeros que puede haber para cada estructura por los grupos exocíclicos presentes en un monosacárido. Si bien se han realizado estudios por métodos cuánticos de algunas de las conformaciones de los monosacáridos,[11,12] recién en el año 2013 se realizó un estudio completo del *puckering* para monosacáridos.[15] En dicho trabajo se estudiaron cinco azúcares: β-D-xilosa, α-D-glucosa (Fig. 5.6 a), β-D-glucosa (Fig. 5.6 b), β-D-manosa y N-acetil-β-D-glucosamina, todos en su forma piranósica. Para simplificar el análisis, los autores realizaron un barrido utilizando mecánica molecular (CHARMM) para hallar los distintos rotámeros y luego utilizaron DFT con niveles crecientes de teoría para ir calculando los rotámeros según su energía. Los autores utilizaron M06-2X para las primeras optimizaciones ya que había demostrado ser eficiente para azúcares (ver Sección anterior) y la optimización final la realizaron con B3LYP/6-311+G(2df,p).

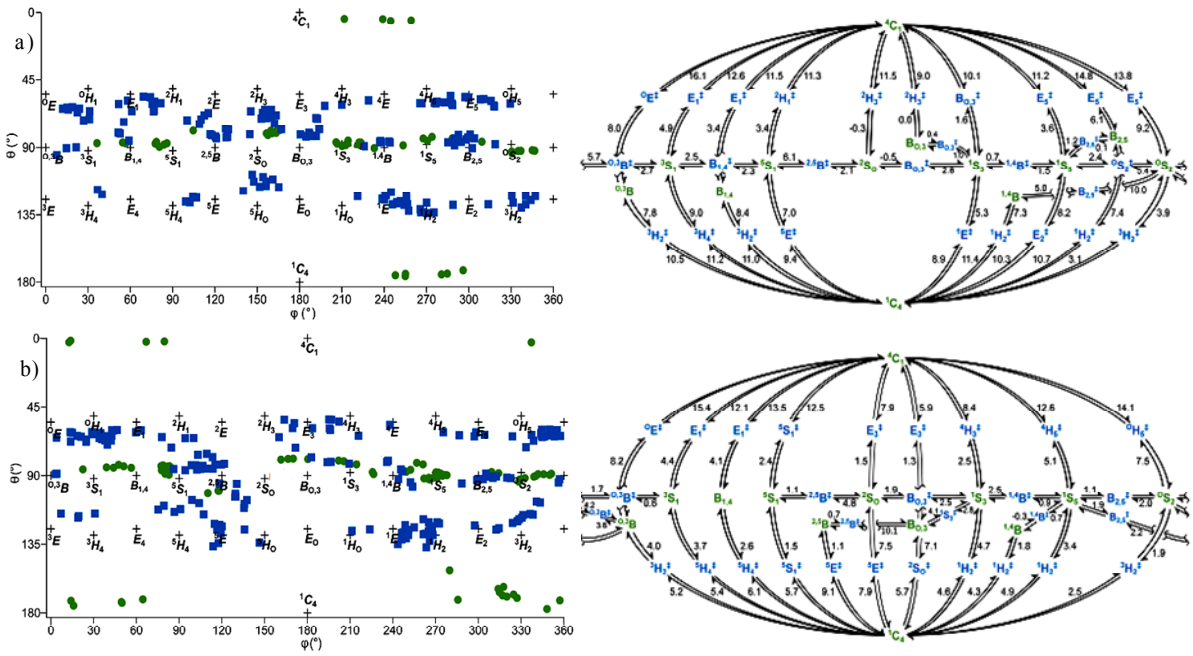


Figura 5.6 Diagrama de las distintas conformaciones y entalpías (kcal/mol) halladas para la a) α-D-glucopiranosa y b) β-D-glucopiranosa determinadas por Mayes *et al.*[15] Los círculos verdes representan los mínimos y los cuadrados celestes los máximos.

Al comparar los resultados obtenidos por Dowd *et al.*[20] por MM3 (Fig 5.4) y por Mayes *et al.*[15] utilizando DFT (Fig. 5.6) para la α- y β-D-glucopiranosa, se concluye que los datos obtenidos por métodos cuánticos resultan mucho más complejos. Se destaca el mayor número de mínimos hallados en la zona del ecuador. Un análisis más detallado de los resultados obtenidos por Mayes *et al.*,[15] mostró que algunas estructuras con parámetros de *puckering* correspondientes a un bote son mínimos y las estructuras cercanas a un bote torcido son en

realidad máximos, mostrando la complejidad del camino conformacional de las aldopiranosas. El análisis de las barreras entálpicas para el pasaje de la silla $^4C_1$ a las conformaciones del ecuador en ambos anómeros muestra que el paso de menor energía ocurre entre dicha silla y la región del ecuador delimitada entre ^2S_O y $^1S_3$. Esta barrera de energía es menor para la β-glucosa. Otro hecho interesante de este estudio es que el anómero α- presenta una región de energía prácticamente plana entre las conformaciones ^2S_O y $B_{3,O}$.

Otro método utilizado para estudiar el camino conformacional de los azúcares piranósicos es la dinámica molecular. Biarnès *et al.*[31] utilizaron este método combinado con métodos *ab initio* y con la técnica de metadinámica para estudiar el camino conformacional de la β-D-glucopiranosa. La metadinámica es una técnica que mejora la toma de muestra en simulaciones y a su vez permite la reconstrucción de la superficie de energía libre como función de unos pocos grados de libertad elegidos, generalmente llamados variables colectivas.[32] En este caso, Biarnès *et al.*[31] eligieron las coordenadas de los parámetros de Cremer y Pople como las variables colectivas. Se analizó principalmente el camino de la silla $^4C_1$ al ecuador (es decir, uno solo de los hemisferios de la esfera conformacional). Los autores observaron que el paso de menor energía entre la silla $^4C_1$ y el ecuador ocurre hacia la zona de los botes torcidos $^1S_3$ y ^2S_O. Esto se condice con lo informado por Mayes *et al.*[15] al realizar el estudio por DFT para la β-glucosa.

Plazinski y Drach[25] también realizaron un estudio del camino conformacional para la α- y β-D-glucopiranosa por dinámica molecular pero utilizando el campo de fuerza GROMOS. Al analizar el pasaje de la silla $^4C_1$ al ecuador para ambos anómeros de glucosa, los autores hallaron dos posibles caminos. Uno de ellos pasaba entre la silla y el bote torcido $^1S_3$, similar al observado por Mayes *et al.*[15] y por Biarnès *et al.*[31] Sin embargo, la menor barrera energética que encontraron estaba ubicada entre la silla y la región delimitada por $^OS_2$ y $^{3,O}B$.

Según lo expuesto en esta Sección, el uso de DFT o de dinámica molecular aportan los resultados más completos para el análisis conformacional de hidratos de carbono. Aún así, los resultados obtenidos por estas técnicas no siempre son comparables. Si bien la optimización por DFT sólo permite estudiar mínimos y máximos conformacionales, tiene sus ventajas frente a los métodos de dinámica molecular. El uso de campos de fuerza o métodos semiempíricos en las simulaciones no permite resolver características importantes de las superficies de energía potencial, resultando en la incorrecta identificación de estructuras y/o en energías relativas inexactas.[15] A su vez, técnicas como la metadinámica no aseguran el

muestreo completo de la superficie de energía potencial de las moléculas al centrar el análisis en los parámetros de Cremer y Pople.[15]

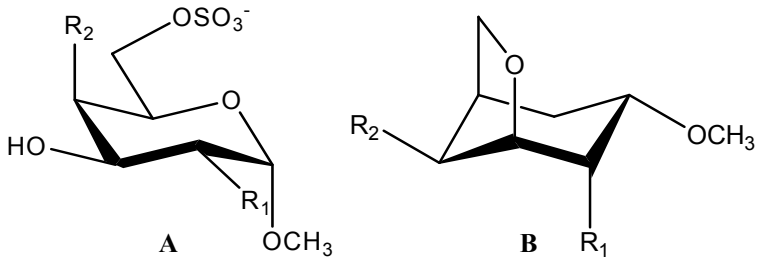
5.2 Objetivos

El objetivo de este Capítulo del trabajo de Tesis es realizar un estudio teórico, mediante métodos cuánticos, de la cinética de la reacción de tratamiento alcalino y del efecto de los sustituyentes presentes en la metil α-D-galactopiranósido 6-sulfato sobre las superficies de energía potencial.

5.3 Resultados y discusión

5.3.1 Metodología de trabajo

La reacción de ciclación a 3,6-anhidrogalactosa ocurre en las unidades α- de los galactanos de algas rojas cuando se encuentran sustituidas por un grupo sulfato en C-6. En consecuencia, los modelos más sencillos a estudiar por modelado molecular son los derivados **1** a **6** del metil α-D-galactopiranósido 6-sulfato, a partir de los cuales se obtienen los correspondientes anhidroazúcares derivados **7** a **12** (Fig. 5.7). Se variaron y/o eliminaron, los sustituyentes en C-2 y C-4 del mencionado azúcar, a fin de comprender el efecto de estos en la cinética de reacción: la presencia de un metoxilo en C-4 simula el enlace glicosídico que ocurre en los galactanos y la sustitución en C-2 está asociada a los diferentes grupos encontrados en dicha posición en las unidades α- de los galactanos.



A	B	R_1	R_2
1	**7**	H	H
2	**8**	H	OMe
3	**9**	OH	H
4	**10**	OSO_3^-	H
5	**11**	OH	OMe
6	**12**	OSO_3^-	OMe

Figura 5.7 Derivados del metil α-D-galactopiranósido 6-sulfato y sus productos de tratamiento alcalino

La reacción de sustitución nucleofílica requiere dos pasos previos: la interconversión de sillas (de $^4C_1$ a $^1C_4$) y la desprotonación del O-3. El orden de estos dos pasos es aún desconocido (Fig. 5.1). Esto implica que para determinar cuál es el paso inicial más viable se debe realizar un análisis completo del camino conformacional tanto para cada compuesto

protonado como desprotonado en O-3, y finalmente buscar el estado de transición para la reacción de sustitución.

Como se puede observar en la Figura 5.7 cada uno de los compuestos posee varios sustituyentes exocíclicos, lo que define un gran número de rotámeros para cada estructura. En particular, existen seis ángulos diedros exocíclicos en los derivados del metil α-D-galactopiranósido 6-sulfato de importancia para este estudio, que se denominaron χ_1 a χ_4 (H–C-n–O-n–X), ω (O-5–C-5–C-6–O-6) y χ_6 (C-5–C-6–O-6–S). Es importante aclarar que el cálculo puede simplificarse cuando los derivados no poseen los seis ángulos exocíclicos, por ejemplo si R_1 y/o R_2 es H.

Para poder diferenciar los distintos rotámeros de cada estructura modelada de cada compuesto, se ha utilizado un código de letras para identificar los distintos ángulos:[21] S para ángulos entre -30 y 30°, g para 30-100°, e para 100-130°, T para 130-230°, E para 230-260° y G para 260°-330° (o sea entre –100º y –30º). Para las estructuras desprotonadas en O-3 se utilizó la letra d a fin de indicar dicha situación. Esta nomenclatura se ha usado únicamente para aquellos ángulos diedros que presentan variaciones en los distintos rotámeros de un compuesto. De esta manera, si para el compuesto **5** sólo varían los ángulos χ_2 a χ_4, la silla $^4C_1$ que posea un valor igual cercano a 60° para los tres ángulos se la va a denominar $^4C_{1\text{-}2g,3g,4g}$.

El análisis para cada uno de los compuestos **1-6** se planteó de la siguiente manera: utilizando mecánica molecular (MM3) se variaron los distintos ángulos exocíclicos χ_n y ω de las sillas $^4C_1$ y $^1C_4$ (protonadas y desprotonadas en O-3) en una búsqueda sistemática exhaustiva. Se eligieron aquellos rotámeros con una diferencia de hasta 2 kcal/mol respecto al de mínima energía (MM3). Se descartaron aquellas estructuras que tuvieran un χ_1 muy alejado de –60º ya que se sabe que los métodos cuánticos favorecen las estructuras determinadas por el efecto *exo*-anomérico ($\chi_1 \approx -60$º).[29] También se descartaron aquellos rotámeros en los que el sustituyente quedó hacia adentro del anillo. Todas estas estructuras seleccionadas fueron optimizadas por métodos de DFT, nuevamente aislando los rotámeros más estables. En este caso también se verificó que dentro de este grupo estén las sillas $^4C_1$ y $^1C_4$ con ángulos exocíclicos similares. De esta manera, se buscaron las distintas estructuras del camino conformacional manteniendo los ángulos diedros hallados para las sillas. Como se verá en las Secciones siguientes, esto no siempre fue posible, observándose la variación de los ángulos durante el camino conformacional así como el entrecruzamiento de caminos entre dos rotámeros distintos. Se compararon las energías relativas de las estructuras considerando la silla $^4C_1$ con el O-3 protonado más estable como el cero de energía para cada compuesto.

Es importante tener en cuenta que en algún punto del camino de reacción ocurre una desprotonación dada por la siguiente reacción:

$$R{-}OH + HO^- \longrightarrow R{-}O^- + H_2O$$

Es por ello que para comparar las energías de los distintos reactivos y productos del camino de reacción, se ha sumado a las estructuras protonadas la energía del HO^- y a las desprotonadas la del H_2O.

5.3.2 Análisis del modelo sin sustituyentes en C-2 y C-4

5.3.2.1 Optimización de las condiciones de trabajo

Habiendo determinado el protocolo de trabajo, fue importante analizar la metodología con la que se iba a realizar la optimización por DFT de las estructuras de mínima energía obtenidas por MM3. La idea original era utilizar B3LYP a nivel 6-31+G(d,p) ya que este método presenta una demanda computacional moderada y había demostrado su utilidad en cálculos de moléculas orgánicas en general y en particular para de hidratos de carbono.[17,33] Sin embargo, al intentar modelar el camino de reacción para **1**, se observaron dificultades para hallar ciertos estados de transición, aún probando distintas técnicas como utilizar una grilla ultrafina, "congelar" los distintos ángulos exocíclicos o el anillo, entre otras, sin dar el resultado esperado.

En función de estos aspectos se decidió utilizar otro funcional para hallar los estados de transición buscados. El funcional M06-2X había dado buenos resultados para calcular energías relativas de monosacáridos,[8] así como para optimizar estructuras al trabajar a nivel 6-31+G(d,p).[15] En estas condiciones se optimizaron correctamente todas las estructuras con el nuevo funcional, y se observó que el tiempo requerido para los cálculos era apenas mayor que al utilizar B3LYP. Por lo tanto, se decidió utilizar M06-2X como funcional para realizar todos los cálculos.

Otro punto a considerar es que la reacción de tratamiento alcalino ocurre en medio acuoso, por lo que la simulación del solvente parece imprescindible. Sin embargo, este agregado requiere mayor tiempo de cálculo. Por esa razón, la optimización original con B3LYP de las sillas $^4C_1$ y $^1C_4$ obtenidas por el estudio con MM3 para el compuesto **1** se realizó tanto en vacío como simulando el solvente acuoso con el modelo del continuo polarizable (PCM). Si bien B3LYP no fue el funcional utilizado en el resto de los análisis, los

resultados obtenidos (Tabla 5.2) permitieron llegar a conclusiones que luego se mantuvieron para los cálculos realizados con M06-2X.

Tabla 5.2 Rotámeros obtenidos para **1** por MM3 y sus valores de energías relativas luego de optimizar por B3LYP y M06-2X a nivel 6-31+G(d,p) en vacío y/o con PCM en agua. En negrita se marcan los rotámeros elegidos para el presente estudio.

Rotámeros (MM3)[a,b]			ΔE_{MM3}[c] (kcal/mol)	ΔE_{B3LYP}[c] (kcal/mol)	$\Delta E_{B3LYP\text{-}PCM}$[c] (kcal/mol)	$\Delta E_{M06\text{-}2X\text{-}PCM}$[c] (kcal/mol)
χ_3(°)	ω (°)	χ_6 (°)				
$^4C_1$ *C-3 protonado*						
56	**60**	**–179**	0,00	2,17	0,06	**0,06**
–56	**60**	**–179**	0,00	0,03[d]	0,00	**0,00**
56	–58	–180	0,13	3,49	0,44	0,71
–56	–58	–180	0,13	1,58	0,39	0,62
–56	174	179	0,23	0,00	0,65	0,20
56	174	179	0,23	1,71	0,73	0,27
$^1C_4$ *C–3 protonado*						
–56	**51**	**–176**	0,00	5,72	0,01	**0,06**
56	**51**	**–176**	0,04	3,80[d]	0,00	**0,00**
–56	172	176	0,03	0,00[d]	0,70	1,16
56	171	177	0,04	7,29	0,83	1,19
$^4C_1$ *C–3 desprotonado*						
	60	**179**	0,00	0,00	0,00	**0,00**
	–58	179	0,14	4,78	1,14	0,63
	176	179	0,24	2,30	0,86	1,05
$^1C_4$ *C–3 desprotonado*						
	51	**171**	0,00	0,20	0,00	**0,00**
	178	171	0,39	1,30[d]	1,43	1,87
	41	70	1,49	0,00	0,94	0,91

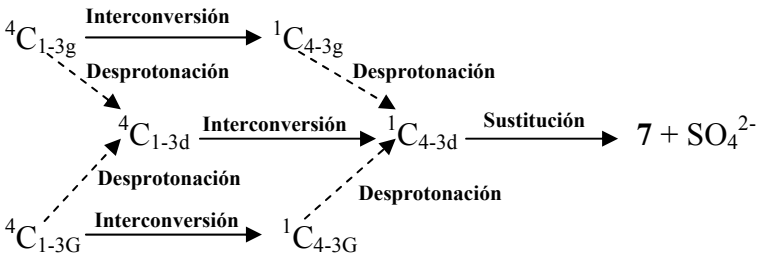
[a] Ordenados por E creciente según MM3.
[b] χ_1 = G en todos los rotámeros.
[c] Se considera como cero para cada confórmero a la estructura de menor energía.
[d] Se cambia sustancialmente algún ángulo diedro con respecto a lo obtenido por MM3.

Al analizar las energías relativas, se observa que las diferencias entre estas son mayores en vacío. Esto se debe a que en dichas condiciones los enlaces de hidrógeno intramoleculares influyen más en la estabilidad de la molécula, pudiendo ocasionar incluso una variación de los ángulos exocíclicos originales con el fin de generar un enlace de hidrógeno. Este fenómeno no se observó en las moléculas calculadas con simulación de solvente donde los

enlaces de hidrógeno intramoleculares no influyen tanto en la estabilidad de la molécula por su interacción con el solvente. Tomando en cuenta que la reacción ocurre en medio acuoso y que los cálculos con solvente requieren sólo aproximadamente 10 % más de tiempo que aquellos en vacío, se decidió realizar todos los cálculos simulando el solvente con el método PCM.

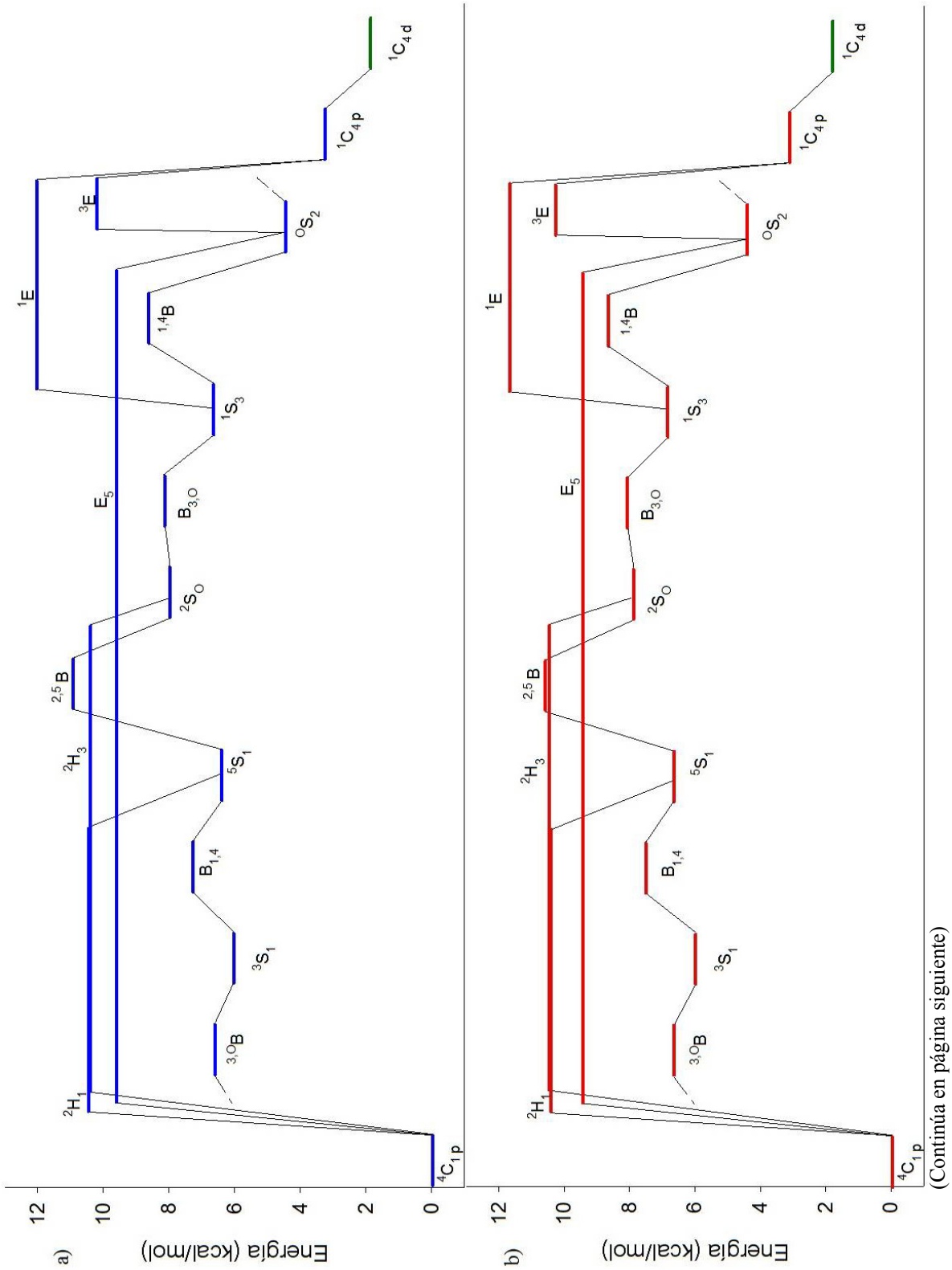
5.3.2.2 Camino de reacción para el compuesto 1

Habiendo definido las condiciones para modelar las estructuras, restaba elegir que rotámeros utilizar. Todas las estructuras modeladas a nivel M06-2X/6-31+G(d,p) con simulación de solvente tienen menos de 2 kcal/mol de diferencia entre sí (Tabla 5.2). Se puede ver que en todos los casos las más estables son las que poseen $\omega \approx 60°$ y $\chi_6 \approx 180°$, lo que permite generar un camino de reacción completo manteniendo esos ángulos constantes. Las sillas con $\omega \approx \chi_6 \approx 180°$ también permiten armar el camino completo. Sin embargo para generar el estado de transición del paso de sustitución nucleofílica (etapa final del tratamiento alcalino), ω debe tener un valor cercano a los 90° (ver luego). Esto implica que en algún paso del camino ese ángulo diedro va a tener que acercarse a dicho valor, que es lo que ocurre en aquellos rotámeros que tienen $\omega \approx 60°$. Por ello, y además considerando que hay una diferencia de cerca de 1 kcal/mol en todos los casos a favor de las estructuras con $\omega \approx 60°$ y $\chi_6 \approx 180°$, se ha modelado únicamente el camino de reacción de estos rotámeros. De esta manera el mecanismo completo a plantear para el compuesto **1** va a ser el siguiente:



Esquema 5.1 Camino de reacción para el tratamiento alcalino de los rotámeros elegidos del compuesto **1**.

De acuerdo al diagrama, hay tres pasos de interconversión y un estado de transición tipo S_N2 para analizar. La energía relativa final se determinó realizando un cálculo puntual de energía a nivel M06-2X/6-311+G(d,p) sobre las estructuras optimizadas. Los datos son presentados en forma de diagramas de energía y para mejorar su visualización, se incluye un gráfico para cada paso de interconversión junto con la correspondiente desprotonación y otro diferente para el paso de sustitución. De esta manera se obtuvieron las Figuras 5.8 y 5.9.



(Continúa en página siguiente)

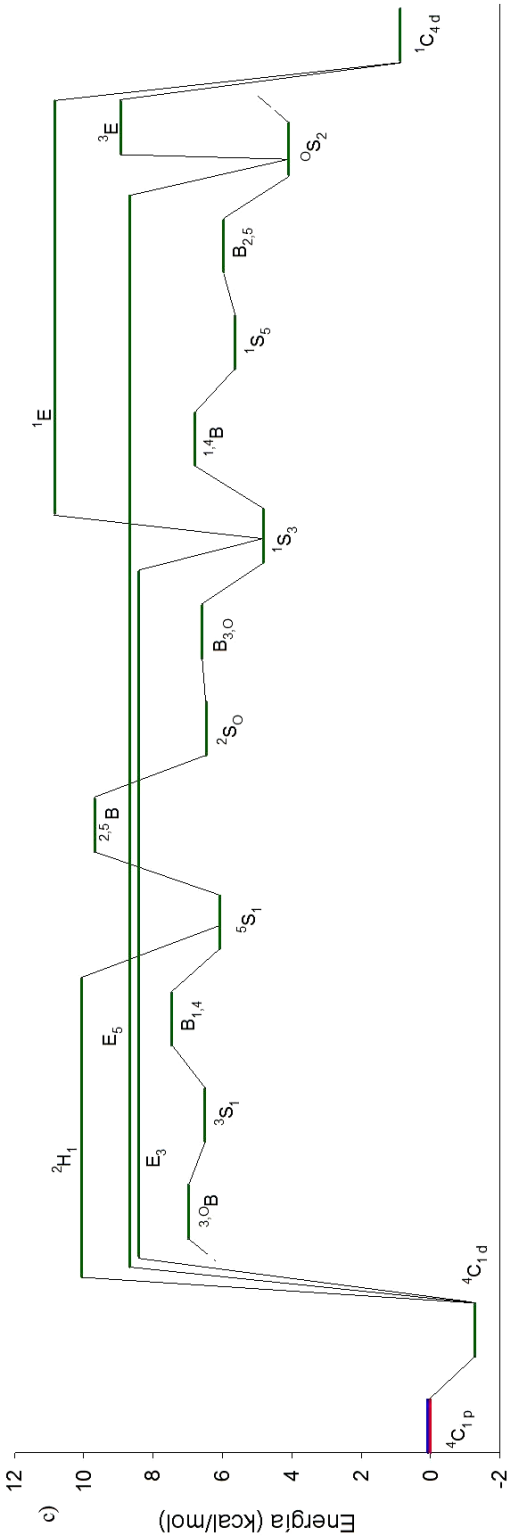


Figura 5.8 Caminos conformacionales de a) $^4C_{1\text{-}3G}\rightarrow\ ^1C_{4\text{-}3G}$, b) $^4C_{1\text{-}3g}\rightarrow\ ^1C_{4\text{-}3g}$ y c) $^4C_{1\text{-}3d}\ \rightarrow\ ^1C_{4\text{-}3d}$ con los respectivos pasos de desprotonación para **1.** Los colores indican los rotámeros analizados: 3G — 3g — 3d

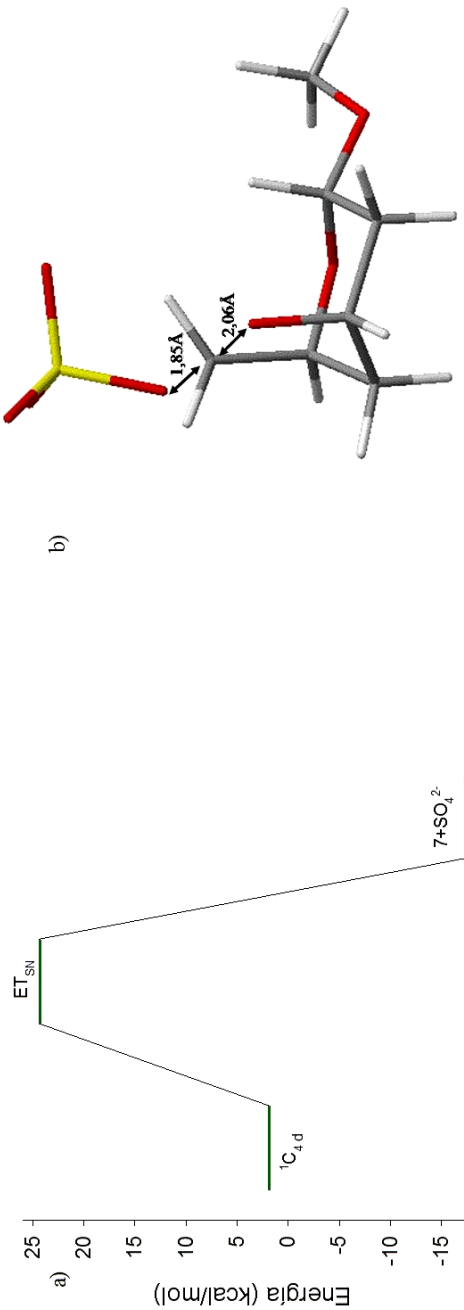
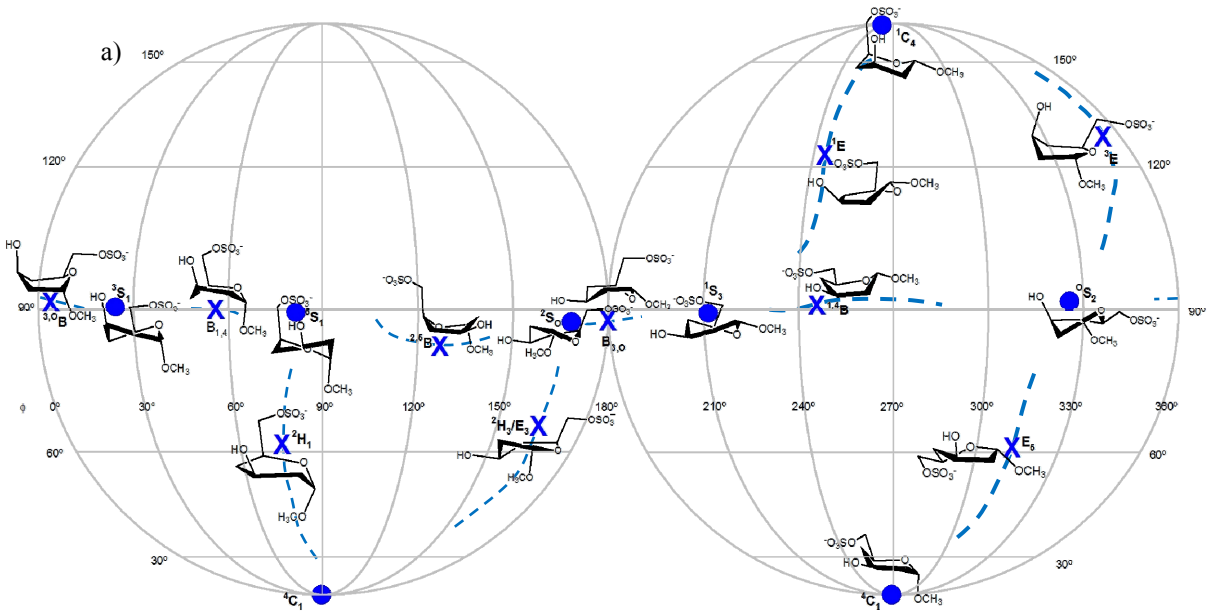


Figura 5.9 a) Diagrama de energía para el paso de sustitución nucleofílica intramolecular de **1** y b) estructura modelada del estado de transición.

Lo primero que se observa del mecanismo general de la reacción de tratamiento alcalino de **1** es que, de acuerdo a nuestros cálculos, el paso limitante de la reacción es el de la sustitución nucleofílica intramolecular (Fig. 5.9 a). La energía de activación de este paso es de 22,4 kcal/mol mientras que en los pasos de interconversión las energías de activación no superan las 11 kcal/mol. La estructura del estado de transición de la sustitución (Fig. 5.9 b) presenta un carbono sp^2 para C-6 con ángulos cercanos a 120° entre los hidrógenos y C-5. El ángulo diedro ω es cercano a los 90° permitiendo que el carbono a reaccionar quede en la misma línea con O-3 y O-6. Este estado de transición es el esperado para una reacción tipo S_N2. Las distancias C-6–O-3 y C-6–O-6 son similares y cercanas a los 2 Å.

El análisis de los pasos de interconversión y desprotonación se complementaron con un estudio de los parámetros de *puckering*, los cuales se representaron de manera análoga a la utilizada por Stortz[27] para los derivados del ciclohexano (Fig. 5.5). De esta manera se obtuvo la Figura 5.10. Dado que no se pudo realizar el cálculo de coordenada intrínseca de reacción (IRC, ver Capítulo 6), las líneas que aparecen en la Figura 5.10 no indican un camino de reacción calculado, sino que son representativas para indicar los mínimos a los que cae cada uno de estos estados de transición. El camino más probable de cada una de las interconversiones planteadas se marcó con líneas más gruesas. Es importante aclarar que dadas las bajas energías de activación observadas en el paso de interconversión de sillas, todos los caminos observados son posibles. Aún así, se determinó como los caminos más probables a aquellos cuyas energías de activación sean al menos 1 kcal/mol más bajas que las demás variantes.



(Continúa en página siguiente)

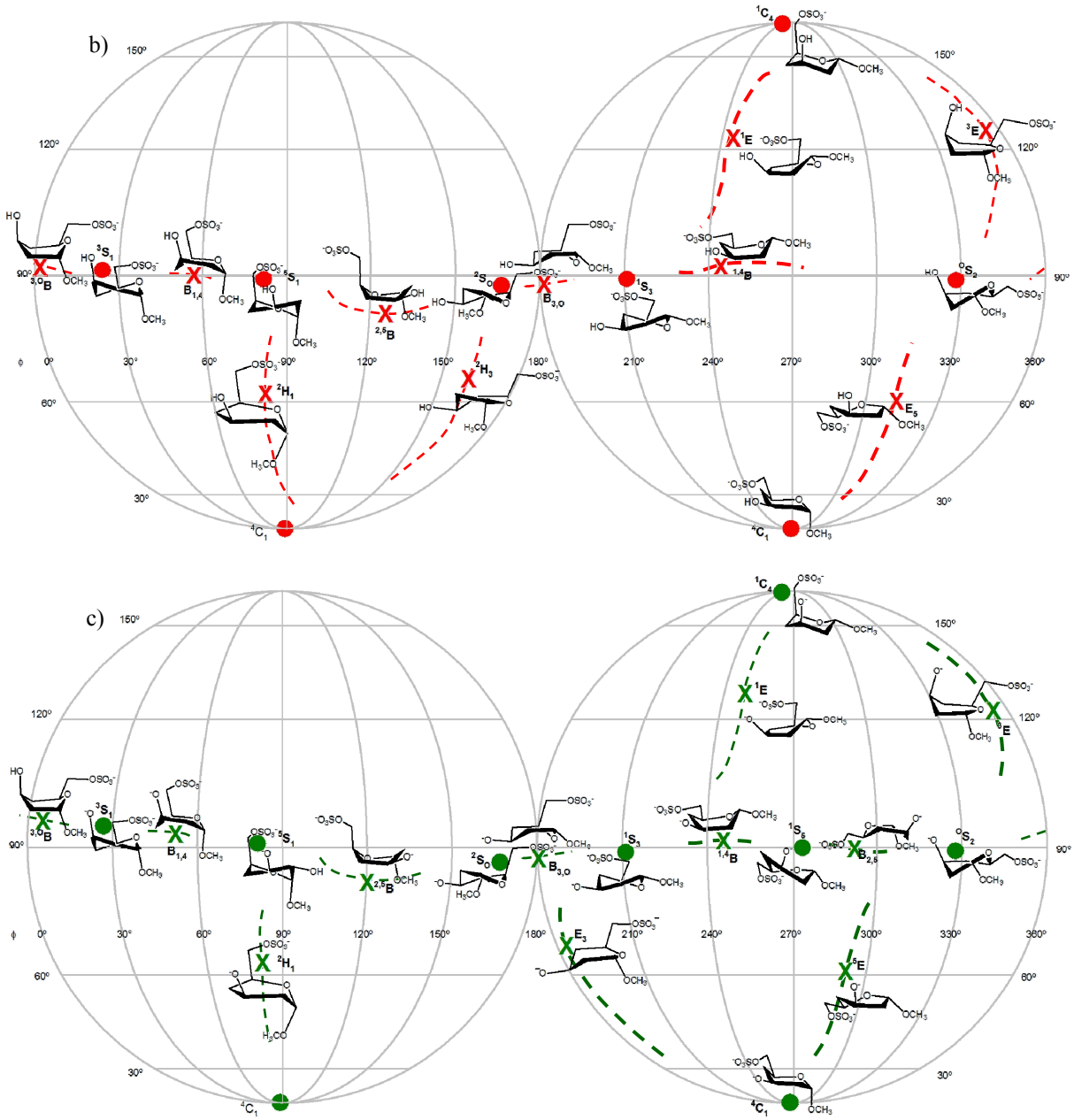


Figura 5.10 Representaciones geométricas de los parámetros de *puckering* de Cremer y Pople para a) $^{4}C_{1\text{-}3G} \rightarrow {}^{1}C_{4\text{-}3G}$, b) $^{4}C_{1\text{-}3g} \rightarrow {}^{1}C_{4\text{-}3g}$ y c) $^{4}C_{1\text{-}3d} \rightarrow {}^{1}C_{4\text{-}3d}$. Los círculos indican los mínimos de energía y las cruces los máximos. Los colores indican los rotámeros analizados: ● 3G ● 3g ● 3d

De esta manera, a partir de las Figuras 5.8 y 5.10, se pudo hacer un análisis de los pasos de interconversión y desprotonación no sólo analizando las diferencias de energías sino también las desviaciones de la idealidad que presentan esas estructuras.

De acuerdo a la Figura 5.8, las sillas $^{4}C_{1}$ son los confórmeros más estables, seguidos de las sillas $^{1}C_{4}$ y en tercer lugar los botes torcidos $^{O}S_{2}$. Este perfil se observa tanto para las estructuras protonadas como para las desprotonadas, siendo análogo a lo observado por Stortz[27] para el 2-hidroxitetrahidrofurano. La mayor estabilidad del $^{O}S_{2}$ frente a los demás

botes torcidos (Fig. 5.8) probablemente se deba a la disposición del grupo OH en C-1 antiperiplanar a un orbital del átomo de O del anillo, lo que magnifica el efecto anomérico. A su vez, se observa que la energía relativa de ambas sillas desprotonadas es menor a la de las protonadas. Esto implica que para el compuesto **1**, el OH de C-3 es más acídico que el agua.

Por último, para analizar al orden de los pasos de reacción entre la interconversión y la desprotonación, se debe comparar el valor del paso con mayor energía de activación en la interconversión: el pasaje de la silla $^4C_1$ al ecuador. Tanto las estructuras de **1** con O-3 protonado como desprotonado requieren de una cantidad de energía similar para que ocurra dicho paso. Esto estaría sugiriendo que desde el punto de vista cinético para **1** la desprotonación es igual de probable que la interconversión como primer paso del camino de reacción.

5.3.2.2.1 Análisis de los caminos conformacionales de interconversión

Al estudiar los tres caminos de interconversión planteados, el pasaje de menor energía de la silla $^4C_1$ a la zona del ecuador ocurre principalmente mediante una estructura de transición E_5 (sobre), la cual deviene en el bote torcido $^OS_2$ (Fig. 5.8 a, b y c). Sin embargo, al desprotonar **1** se halló un estado de transición $E_{3\text{-}3d}$ el cual es 0,35 kcal/mol más estable que el sobre $E_{5\text{-}3d}$. Las estructuras protonadas no poseen un estado de transición E_3. En su lugar, se halló una semisilla $^2H_3$ la cual presenta una energía aproximadamente 1 kcal/mol mayor que el sobre E_5. Por último, los tres caminos estudiados poseen una semilla $^2H_1$ que resultó ser el estado de transición de mayor energía para pasar de la silla $^4C_1$ al ecuador.

El pasaje del ecuador a la silla $^1C_4$ resulta similar para las estructuras protonadas y desprotonadas. En los tres casos puede ocurrir mediante el pasaje $^1S_3 \rightarrow [^1E]^{\ddagger} \rightarrow {}^1C_4$ ó $^OS_2 \rightarrow [^3E]^{\ddagger} \rightarrow {}^1C_4$. En el caso de las estructuras desprotonadas, este último es el de menor energía. Esto implica que el camino más directo es $^4C_{1\text{-}3d} \rightarrow {}^OS_{2\text{-}3d} \rightarrow {}^1C_{4\text{-}3d}$, aunque la silla $^4C_{1\text{-}3d}$ también puede pasar al bote torcido $^1S_{3\text{-}3d}$ dada la similar energía de activación de los estados de transición $E_{3\text{-}3d}$ y $E_{5\text{-}3d}$.

Los caminos conformacionales para los dos rotámeros protonados son distintos. En ambos casos, el camino de menor energía entre la silla $^4C_1$ y el ecuador es el mismo, el sobre E_5. En el rotámero con χ_3 = G la energía de activación de los pasajes $^1S_3 \rightarrow [^1E]^{\ddagger} \rightarrow {}^1C_4$ u $^OS_2 \rightarrow [^3E]^{\ddagger} \rightarrow {}^1C_4$ son muy similares haciendo que el paso del ecuador a la silla $^1C_4$ pueda ocurrir por ambos caminos. Para el rotámero con χ_3 = g, la energía de activación para el

pasaje $^{1}S_{3}\rightarrow[^{1}E]^{\ddagger}\rightarrow{}^{1}C_{4}$ es 1 kcal/mol menor, por ello el camino de menor energía resultante es: $^{4}C_{1\text{-}3g}\rightarrow{}^{O}S_{2\text{-}3g}\rightarrow{}^{1}S_{3\text{-}3g}\rightarrow{}^{1}C_{4\text{-}3g}$.

Por otro lado, al observar las estructuras en la zona del ecuador, se destaca que para las estructuras protonadas no fue posible obtener todas las conformaciones teóricas, ya que no se hallaron el bote $B_{2,5}$ ni el bote torcido $^{1}S_{5}$ en ninguno de los casos. En su lugar, el bote $^{1,4}B$ es el estado de transición que permite pasar del bote torcido $^{1}S_{3}$ al $^{O}S_{2}$. Por otro lado, en todos los casos, la diferencia de energía entre el bote $B_{3,O}$ y el bote torcido $^{2}S_{O}$ resultó ser muy pequeña (entre 0,1 y 0,2 kcal/mol), indicando que la superficie de energía en esta zona es casi plana, lo cual ya había sido observado por Mayes *et al.* para la α-glucopiranosa.[15]

Otra estructura que llama la atención en los tres caminos de interconversión es el bote $^{2,5}B$. Este resulta ser un máximo con alta energía, más cercana a la de los sobres y semisillas que a la del resto de los botes, también coincidente con lo observado por Mayes *et al.*[15] (Fig. 5.6) para la α-glucopiranosa. La Figura 5.10 muestra que las estructuras alrededor del $^{2,5}B$ se alejan de la idealidad. El valor de θ es unos 10° inferior a los 90° esperados, lo cual implica que su geometría se encuentra ligeramente deformada hacia el sobre ^{2}E. Este hecho podría estar asociado con la alta energía de estos botes.

5.3.3 Análisis de la sustitución en la posición C-4

Una vez estudiado el camino de reacción para el análogo más simple del metil α-galactopiranósido 6-sulfato representado por el compuesto **1**, se decidió agregar distintos sustituyentes en las posiciones 2 y 4 para observar cómo afectan estos al camino de reacción. En un galactano de algas rojas, el C-4 de la unidad α- se encuentra enlazado a la unidad β-, pero dado que agregar otra galactosa en esa posición implicaría un aumento muy grande de los tiempos de cálculo, se decidió simplificarla con un grupo metoxilo en C-4. Por ello, el segundo modelo estudiado fue el pasaje del compuesto **2** al **8**.

5.3.3.1 Camino de reacción para el compuesto 2

Se planteó la misma estrategia que para **1**: por MM3 se buscaron los rotámeros de menor energía y luego se los optimizó con DFT con el funcional M06-2X a nivel 6-31+G(d,p) con PCM en agua. Se tomaron en cuenta los mismos criterios y restricciones expuestos en la Sección 5.3.2.1 para elegir los rotámeros de **2** cuyo camino de reacción se va a plantear. Las sillas $^{4}C_{1}$ y $^{1}C_{4}$ seleccionadas se observan en la Tabla 5.3.

Tabla 5.3 Rotámeros seleccionados y sus valores de energía relativa para las sillas $^4C_1$ y $^1C_4$ de **2** luego de optimizar por M06-2X/6-31+G(d,p) con PCM en agua.

	Rotámeros[a]				**ΔE**[b] (kcal/mol)
	χ_3 (°)	χ_4 (°)	ω (°)	χ_6 (°)	
$^4C_1$ C-3 protonado					
$^4C_{1\text{-}3T,4S}$	–170	–16	66	174	0,00
$^4C_{1\text{-}3G,4g}$	–46	33	68	–176	1,69
$^4C_{1\text{-}3g,4g}$	59	34	68	–175	1,73
$^1C_4$ C-3 protonado					
$^1C_{4\text{-}3G,4G}$	–67	–51	59	–157	0,00
$^1C_{4\text{-}3G,4g}$	–75	41	59	–163	0,44
$^1C_{4\text{-}3g,4g}$	56	59	58	–163	1,90
$^4C_1$ C-3 desprotonado					
$^4C_{1\text{-}3d,4g}$		32	69	–173	0,00
$^1C_4$ C-3 desprotonado					
$^1C_{4\text{-}3d,4g}$		64	61	–163	0,00
$^1C_{4\text{-}3d,4G}$		–53	62	–160	0,69

[a] χ_1 = G en todos los rotámeros
[b] Se considera como cero para cada silla la estructura de menor energía.

Al igual que sucedió con el compuesto **1**, todos los rotámeros de menor energía poseen valores de ω y χ_6 cercanos a 60° y 180° respectivamente. Al comparar el ángulo χ_4, se destaca que si bien las sillas $^1C_4$ poseen rotámeros de baja energía con χ_4 tanto en conformación gauche positiva (g) (Fig. 5.11 a) como negativa (G) (Fig. 5.11 c), esta última conformación no se pudo encontrar para las sillas $^4C_1$. Esto se debe a que cuando la conformación del grupo Me(O)-4 es G, los hidrógenos del metilo se acercan a los sustituyentes unidos en C-5, generando impedimento estérico. Esto ocurre independientemente del valor de ω.

El único rotámero $^4C_1$ con χ_4 con valor negativo es la silla $^4C_{1\text{-}3T,4S}$ (Tabla 5.3). Esta es una estructura muy particular (Fig. 5.11 b). El valor de χ_4 es de –16°, con lo cual si bien es negativo, es más cercano a 0° que a –60°. Por otro lado, χ_3 posee un valor cercano a –180°. Esto se debe a que el oxhidrilo en dicha posición está generando un enlace de hidrógeno con el O-4. Este enlace hace más estable la molécula y por ello se acomoda para favorecer su formación. La silla $^4C_{1\text{-}3T,4S}$ no posee un rotámero análogo como silla $^1C_4$. Cuando se trató de modelar el camino conformacional, dicha silla convergió a la silla $^1C_{4\text{-}3G,4G}$.

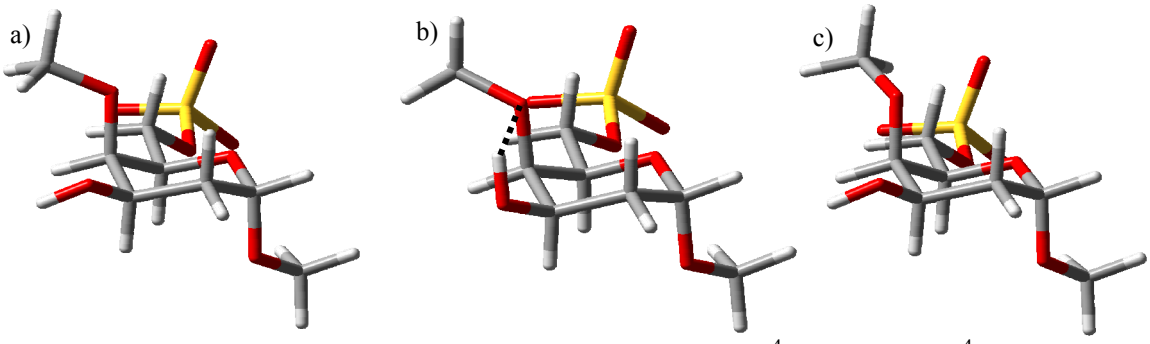
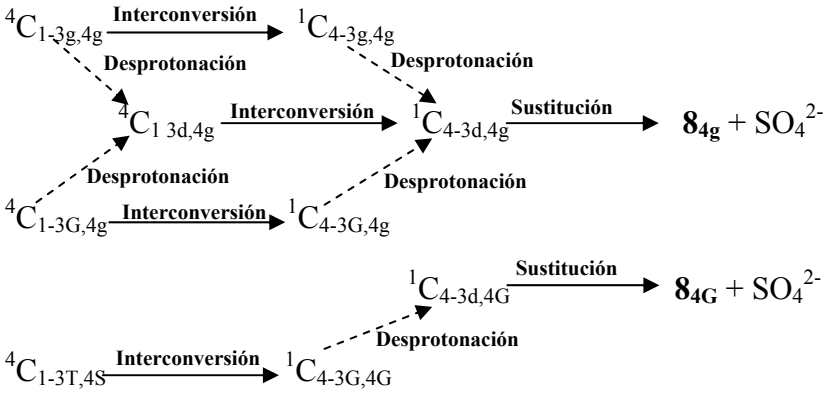


Figura 5.11 Estructuras modeladas para el derivado **2** a) $^{4}C_{1\text{-}3G,4g}$ y b) $^{4}C_{1\text{-}3T,4S}$, y c) hipotética estructura $^{4}C_{1\text{-}3G,4G}$

Por último, en la Tabla 5.3 no se ha listado el confórmero $^{1}C_{4\text{-}3g,4G}$ ya que su energía relativa en comparación con la silla $^{1}C_{4\text{-}3G,4G}$ es mayor a 2 kcal/mol.

De acuerdo a estos resultados, se planteó el Esquema 5.2. Es importante destacar que al no hallarse una silla $^{4}C_{1}$ con O-3 desprotonado y con χ_4 de valor negativo, solo se puedo plantear el camino de interconversión-desprotonación para obtener $\mathbf{8_{4G}}$.

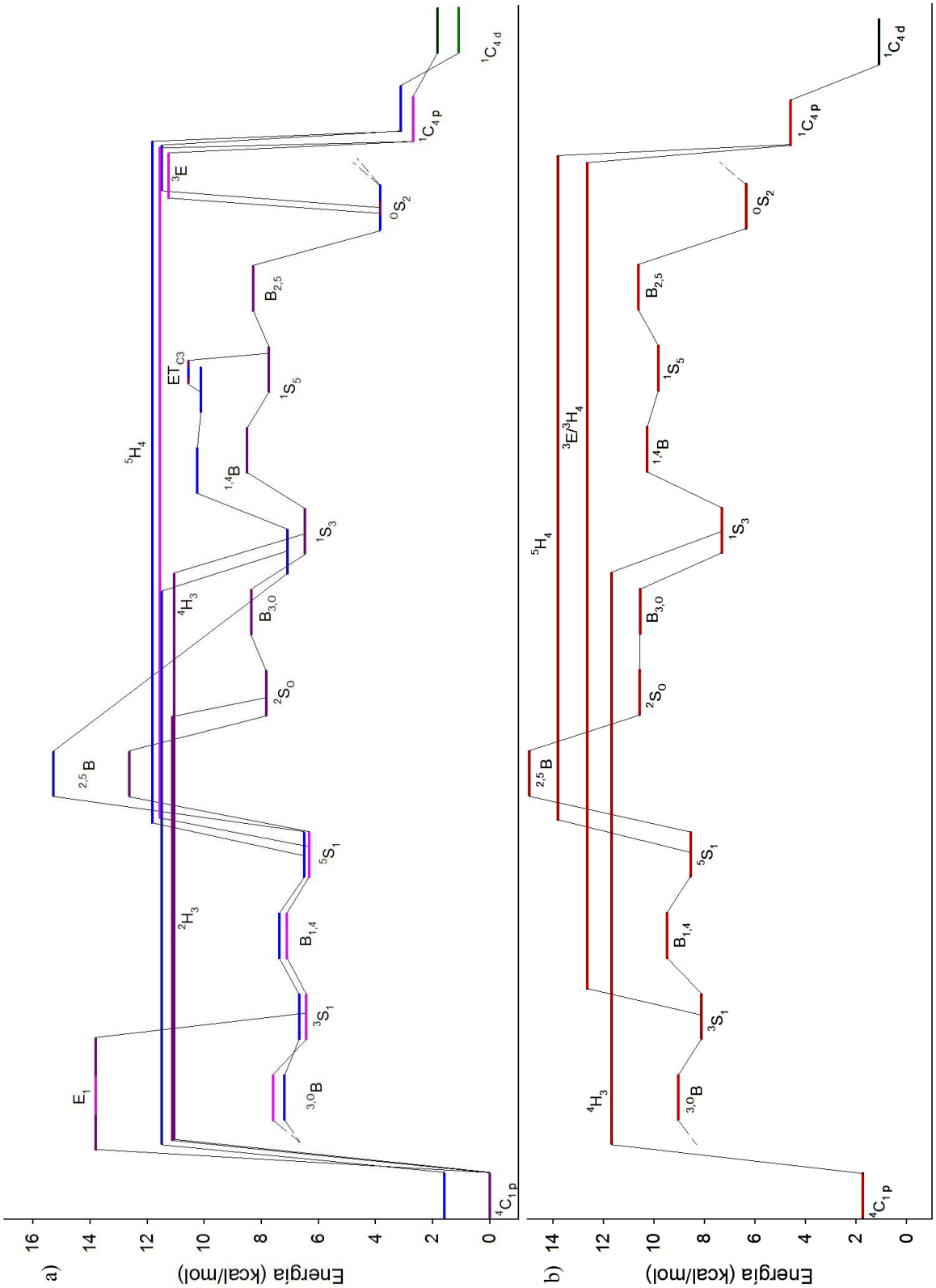


Esquema 5.2 Camino de reacción para el tratamiento alcalino de los rotámeros elegidos del compuesto **2**.

Se puede observar que hay dos posibles rotámeros de **8** a obtener, uno con χ_4 = g y otro con χ_4 = G. Esto implica, que a diferencia de lo observado para el pasaje **1** → **7**, en el camino de reacción de **2** hay dos pasos de sustitución y cuatro caminos de interconversión de sillas para analizar.

La Figura 5.12 muestra los distintos caminos de interconversión y desprotonación construidos, mientras que en la Figura 5.13 se presenta el diagrama de energía para la S_N2 en los dos compuestos. El paso de sustitución (Fig. 5.13) resulta ser nuevamente determinante de la velocidad de reacción. Las energías de activación de dicho paso para ambos rotámeros son similares. La presencia del grupo metoxilo no parece afectar a este paso de reacción ya

que el $\Delta E^{\ddagger}$ es de aproximadamente 22 kcal/mol, tanto en los dos casos en que C-4 se encuentra sustituido (compuesto **2**) como cuando no lo está (compuesto **1**).



(Continúa en página siguiente)

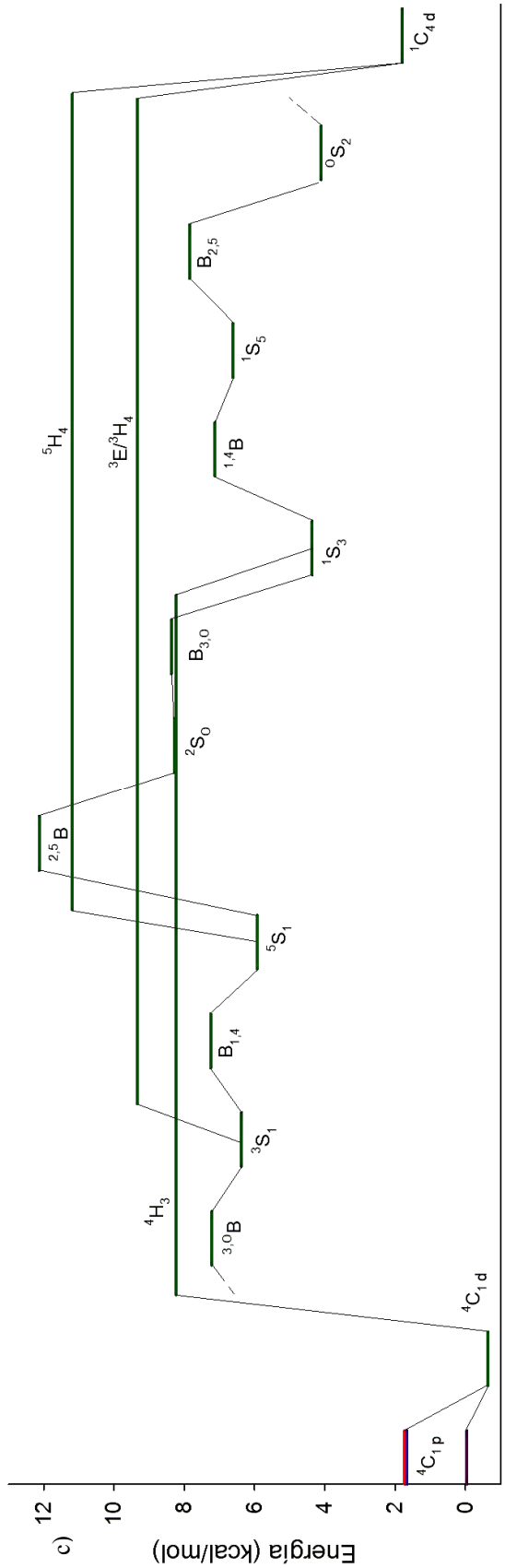


Figura 5.12 Caminos conformacionales de a) $^4C_{1\text{-}3G,4g} \rightarrow {}^1C_{4\text{-}3G,4g}$ y $^4C_{1\text{-}3T,4S} \rightarrow {}^1C_{4\text{-}3G,4G}$, b) $^4C_{1\text{-}3g,4g} \rightarrow {}^1C_{4\,3g,4g}$ y c) $^4C_{1\text{-}3d,4g} \rightarrow {}^1C_{4\text{-}3d,4g}$ con los respectivos pasos de desprotonación para **2**. Los colores indican los rotámeros analizados: 3G4S 3E4S 3E4g 3g4g 3d4g 3d4G 3G4g 3G4G 3T4S

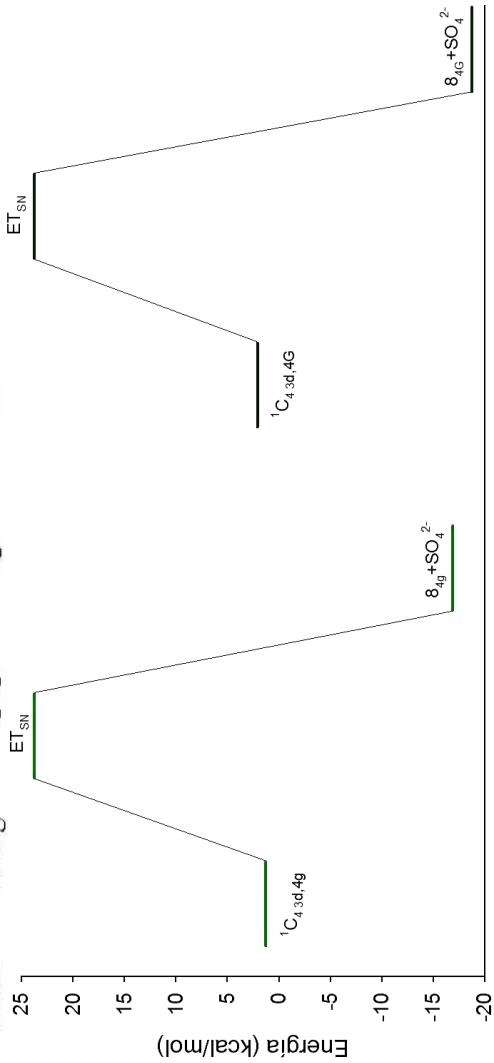
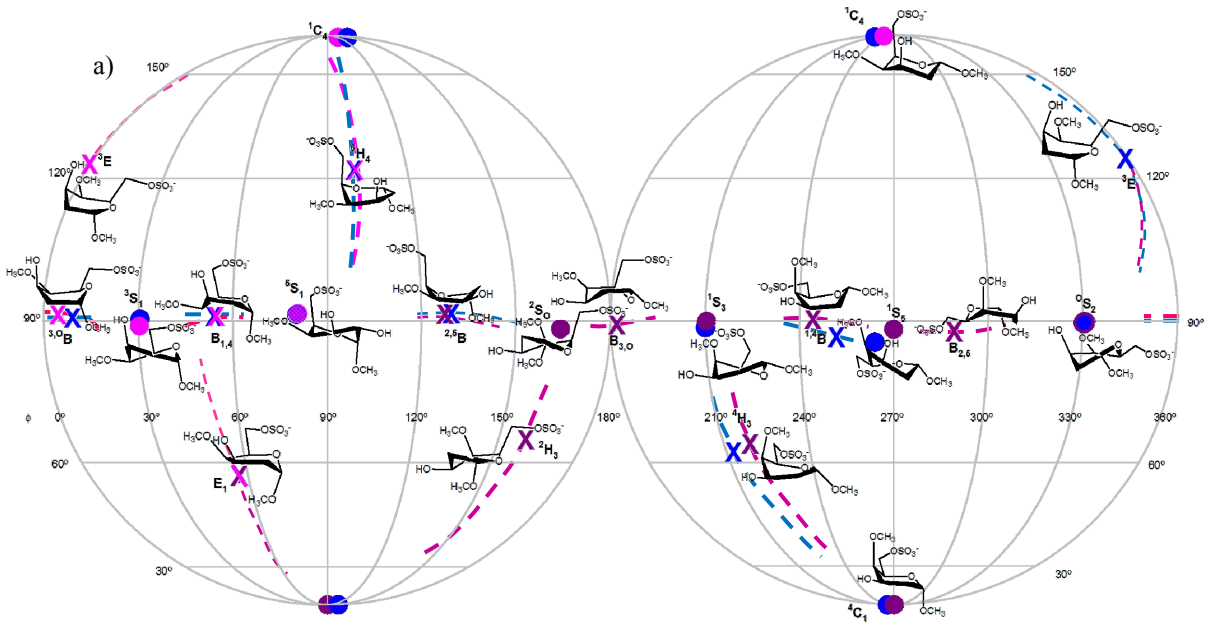


Figura 5.13 Diagrama de energía para los pasos de sustitución nucleofílica intramolecular de **2**.

Al comparar los caminos conformacionales de interconversión de las sillas para las estructuras protonadas y desprotonadas, se observa que el pasaje de la silla $^{4}C_{1}$ al ecuador (paso limitante) ocurre con un $\Delta E^{\ddagger}$ = 8,8 kcal/mol para las estructuras desprotonadas (Fig. 5.12 c), mientras que el valor para las sillas protonadas es superior a 11 kcal/mol en todos los casos (Fig. 5.12 a y b). Esto podría indicar una preferencia a favor de la secuencia desprotonación-interconversión. Se vuelve a observar que el oxhidrilo en C-3 de los distintos rotámeros de la silla $^{4}C_{1}$ resulta más acídico que el agua.

Los diagramas de energía para el camino conformacional de los distintos rotámeros se ven afectados por la presencia del grupo metoxilo en C-4. Al igual que para **1**, se obtuvieron los parámetros de *puckering* de los distintos confórmeros de **2** (Fig. 5.14), a fin de complementar el estudio del camino conformacional.

Los caminos conformacionales para los rotámeros de **2**, tanto protonados como desprotonados muestran que los confórmeros más estables son las sillas $^{4}C_{1}$, seguidas de las sillas $^{1}C_{4}$ y los botes torcidos $^{O}S_{2}$. Asimismo, el bote $^{2,5}B$ es la conformación menos estable. Es importante destacar que si bien los $^{2,5}B$ son estados de transición de alta energía (Fig. 5.12), estas estructuras no se encuentran corridas del ecuador como ocurría con los $^{2,5}B$ del compuesto **1**.



(Continúa en página siguiente)

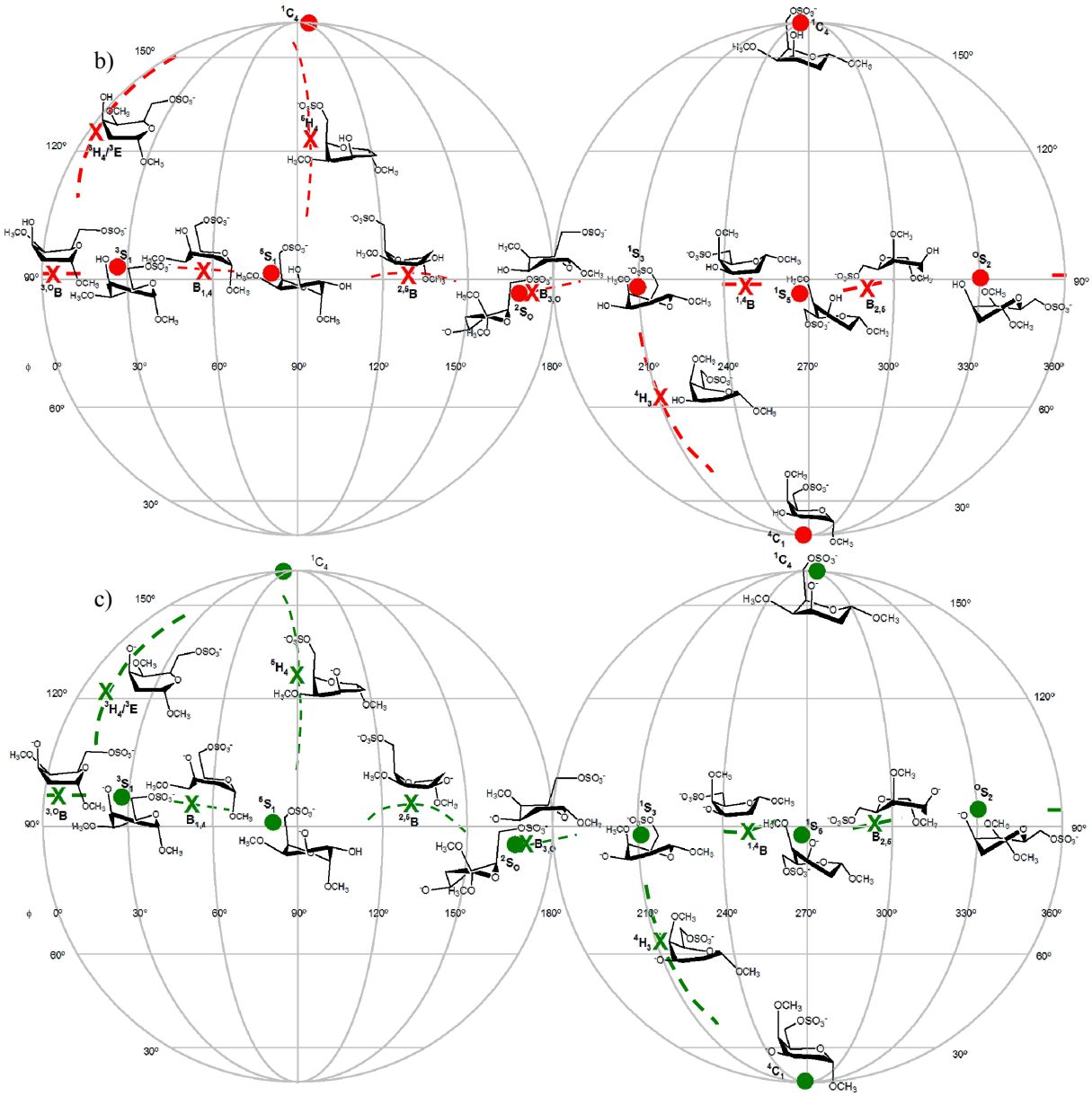


Figura 5.14 Representaciones geométricas de los parámetros de *puckering* de Cremer y Pople para a) $^{4}C_{1\text{-}3G,4g} \rightarrow {}^{1}C_{4\text{-}3G,4g}$ y $^{4}C_{1\text{-}3T,4S} \rightarrow {}^{1}C_{4\text{-}3G,4G}$, b) $^{4}C_{1\text{-}3g,4g} \rightarrow {}^{1}C_{4\text{-}3g,4g}$ y c) $^{4}C_{1\text{-}3d,4g} \rightarrow {}^{1}C_{4\text{-}3d,4g}$. Los círculos indican los mínimos y las cruces los máximos. Los colores indican los rotámeros analizados: ● 3G4g ● 3G4G ● 3G4g + 3G4G ● 3T4S ● 3E4g X 3E4S ● 3g4G ● 3d4g

5.3.3.1.1 Análisis del camino conformacional de interconversión con χ_3 = G/T

En la Figura 5.12 a se distingue el camino de interconversión para las sillas $^{4}C_{1\text{-}3G,4g}$ y $^{4}C_{1\text{-}3T,4S}$. Se pudo comprobar que la silla $^{4}C_{1\text{-}3T,4S}$ se interconvierte a la silla $^{1}C_{4\text{-}3G,4G}$, lo cual implica un giro en los ángulos diedros χ_3 y χ_4 durante la interconversión. Al analizar la figura, se observa que la silla $^{4}C_1$, las semisillas $^{4}H_3$ y $^{2}H_3$ y las formas flexibles $^{2,5}B$, $^{2}S_O$, $B_{3,O}$, $^{1}S_3$, $^{1,4}B$, $^{1}S_5$ y $B_{2,5}$ corresponden a rotámeros con χ_3 = T y χ_4 = S. Las sillas $^{1}C_4$, los sobres y semisillas $^{5}H_4$ y ^{3}E y los botes y botes torcidos $^{3,O}B$, $^{3}S_1$, $^{5}S_1$ y $B_{1,4}$ corresponden al

rotámero con χ_3 = G y χ_4 = G. En cambio, el bote torcido ${}^{O}S_2$ presenta ángulos χ_3 = E y χ_4 = g y el sobre E_1 presenta ángulos χ_3 = E y χ_4 = S.

El bote torcido ${}^{O}S_{2\text{-}3E,4g}$ es una estructura en común para el camino ${}^{4}C_{1\text{-}3G,4g}\rightarrow{}^{1}C_{4\text{-}3G,4g}$ y ${}^{4}C_{1\text{-}3T,4S}\rightarrow{}^{1}C_{4\text{-}3G,4G}$. Por esta razón, ambas trayectorias se graficaron juntas. El valor de los ángulos diedros χ_3 y χ_4 es intermedio entre los esperados para cada uno de los caminos. Este bote se encuentra muy estabilizado por un enlace hidrógeno intramolecular, razón por la cual resulta más estable que los demás botes torcidos (Fig. 5.15)

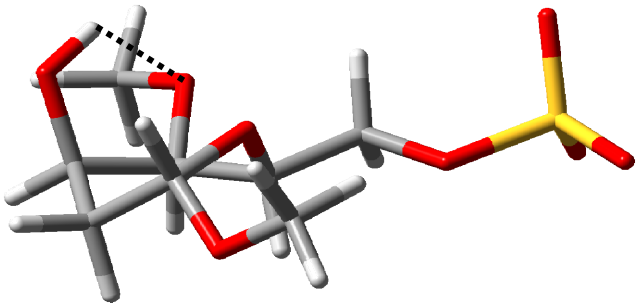


Figura 5.15 Estructura modelada para ${}^{O}S_{2\text{-}3E,4g}$ del compuesto **2**.

Los caminos para generar el ${}^{O}S_{2\text{-}3E,4g}$ también son complejos. Existen dos rotámeros de una conformación tipo sobre que generan este bote torcido: ${}^{3}E_{\text{-}3G,4g}$ y ${}^{3}E_{\text{-}3G,4G}$. Cada una deviene en un rotámero distinto de la silla ${}^{1}C_4$ y ambos máximos poseen energías similares. Por otro lado, si bien existen para ambos rotámeros el camino ecuatorial ${}^{3}S_1\rightarrow[{}^{3,0}B]^{\ddagger}\rightarrow{}^{O}S_2$, no es así para el ${}^{1}S_5\rightarrow[B_{2,5}]^{\ddagger}\rightarrow{}^{O}S_2$. El $B_{2,5\text{-}3G,4g}$ no se halló por lo que el bote ${}^{1}S_{5\text{-}3G,4g}$ debe interconvertirse al ${}^{1}S_{5\text{-}3T,4S}$ mediante un estado de transición $[{}^{1}S_{5\text{-}3G,4S}]^{\ddagger}$ donde son los ángulos χ_3 y χ_4 los que giran dejando el esqueleto del anillo fijo.

Como se puede observar, el camino conformacional de interconversión en este caso no es tan directo. El pasaje de la silla ${}^{4}C_1$ al ecuador ocurre mediante el camino ${}^{4}C_1\rightarrow[{}^{4}H_3]^{\ddagger}\rightarrow{}^{1}S_3$ para ambos rotámeros mientras que para la silla ${}^{4}C_{1\text{-}3T,4S}$ también existen los caminos ${}^{4}C_1\rightarrow[{}^{2}H_3]^{\ddagger}\rightarrow{}^{2}S_O$ y ${}^{4}C_1\rightarrow[E_1]^{\ddagger}\rightarrow{}^{3}S_1$. El sobre E_1, en particular, al ser el estado de transición entre la silla ${}^{4}C_{1\text{-}3T,4S}$ y el bote torcido ${}^{3}S_{1\text{-}3G,4G}$, posee valores de χ_3 y χ_4 que resultan intermedios entre ambos. Este estado de transición posee una energía de activación aproximadamente 2 kcal/mol superior a las de las semisillas ${}^{2}H_{3\text{-}3T,4S}$ y ${}^{4}H_{3\text{-}3T,4S}$ (Fig. 5.12 a).

El pasaje de la zona ecuatorial a la silla ${}^{1}C_4$ ocurre tanto a través de los sobres ${}^{3}E$ previamente mencionados, como por las semisillas ${}^{5}H_4$ (Fig. 5.14 a). Ambas conformaciones poseen energías similares entre sí. Sin embargo dada la gran estabilidad del bote torcido ${}^{O}S_{2\text{-}3E,4g}$, el pasaje global a través de las semisillas ${}^{5}H_4$ resulta de menor energía (Fig. 5.12 a).

Por último, para los rotámeros con χ_3 = G y χ_4 = g, se observa que no existe el bote torcido ^2S_O ni el bote $B_{3,O}$. En lugar de ello, el pasaje entre los intermediarios $^1S_3$ y $^5S_1$ ocurre mediante un estado de transición $^{2,5}B$ de muy alta energía, por lo que seguramente dicho pasaje estaría desfavorecido. En este caso no se observa una gran desviación de la idealidad de la estructura del bote $^{2,5}B$ (Fig. 5.14 a), por lo que su alta energía no siempre está asociada a la deformación de la estructura.

5.3.3.1.2 Análisis del camino conformacional de interconversión con χ_3 = g y O-3 desprotonado

El camino $^4C_{1\text{-}3g,4g} \rightarrow {}^1C_{4\text{-}3g,4g}$ y para las estructuras desprotonadas $^4C_{1\text{-}3d,4g} \rightarrow {}^1C_{4\text{-}3d,4g}$ (Fig. 5.12 b y c) resultaron mucho más simples que los casos planteados en la Sección anterior. En ambos casos, el pasaje de la silla $^4C_1$ al ecuador puede ocurrir únicamente mediante una semisilla $^4H_3$, mientras que el pasaje del ecuador al otro polo puede ser mediante el camino $^3S_1 \rightarrow [^3E / {}^3H_4]^{\ddagger} \rightarrow {}^1C_4$ o a través de $^5S_1 \rightarrow [^5H_4]^{\ddagger} \rightarrow {}^1C_4$, estando el primero más favorecido energéticamente (Fig. 5.12 b y c). También se observa que el bote torcido ^2S_O y el bote $B_{3,O}$ poseen energías muy similares entre sí, generando una región de energía plana.

5.3.4 Análisis de la sustitución en la posición C-2

Habiendo analizado el efecto de la sustitución en C-4 restaba ver el efecto de la sustitución en C-2 de los derivados del metil α-galactopiranósido 6-sulfato. Es sabido que en los carragenanos, esta posición se puede hallar como oxhidrilo libre o sustituido con un grupo éster sulfato. Es por ello que se decidió estudiar el camino de reacción para dos compuestos: el pasaje de **3** a **9** (Fig. 5.7), donde el sustituyente sobre C-2 es oxhidrilo y el pasaje de **4** a **10** (Fig. 5.7) donde dicha posición se encuentra sustituida por un grupo sulfato.

5.3.4.1 Camino de reacción para el compuesto 3

Con el mismo procedimiento antes mencionado, se generaron los confórmeros de menor energía y se optimizaron por DFT con el funcional M06-2X a nivel 6-31+G(d,p) con PCM en agua. El listado de aquellos seleccionados para modelar el camino de reacción se muestra en la Tabla 5.4.

Como se puede observar, el número de rotámeros tanto protonados como desprotonados es mayor que para los compuestos anteriores. Los rotámeros de menor energía

siguen siendo aquellos con ω y χ_6 de valores cercanos a 60° y 180° respectivamente. En cambio, los rotámeros obtenidos por diversas combinaciones de los ángulos χ_2 y χ_3 poseen energías similares. Aún así, se destaca que no todas las estructuras seleccionadas se enmarcan dentro del rango de 2 kcal/mol utilizado como criterio de selección. Las razones por las que se eligieron dichas estructuras de describen a continuación.

Tabla 5.4 Rotámeros seleccionados y sus valores de energías relativas para las sillas $^4C_1$ y $^1C_4$ de **3** luego de optimizar por M06-2X/6-31+G(d,p) con PCM en agua.

	Rotámeros[a]				**ΔE**[b] (kcal/mol)
	χ_2 (°)	χ_3 (°)	ω (°)	χ_6 (°)	
$^4C_1$ C-3 protonado					
$^4C_{1\text{-}2T,3g}$	–165	67	66	–178	0,00
$^4C_{1\text{-}2T,3G}$	–166	–54	66	–177	1,47
$^4C_{1\text{-}2G,3g}$	–41	67	63	–178	1,73
$^4C_{1\text{-}2g,3G}$	70	–45	66	–178	1,83
$^4C_{1\text{-}2G,3G}$	–46	–55	66	–177	3,61
$^1C_4$ C-3 protonado					
$^1C_{4\text{-}2G,3G}$	–79	–58	59	–150	0,00
$^1C_{4\text{-}2G,3g}$	–77	51	56	–163	0,12
$^1C_{4\text{-}2T,3g}$	–151	51	53	–151	0,42
$^1C_{4\text{-}2T,3G}$	–151	–56	53	–151	0,58
$^1C_{4\text{-}2g,3G}$	48	–58	55	–165	2,46
$^4C_1$ C-3 desprotonado					
$^4C_{1\text{-}2g,3d}$	86		66	–179	0,00
$^4C_{1\text{-}2T,3d}$	–176		65	–177	2,97
$^4C_{1\text{-}2G,3d}$	–55		66	–177	5,42
$^1C_4$ C-3 desprotonado					
$^1C_{4\text{-}2G,3d}$	–77		57	–165	0,00
$^1C_{4\text{-}2T,3d}$	–158		55	–152	0,09
$^1C_{4\text{-}2g,3d}$	80		56	–167	1,55

[a] χ_1 = G en todos los rotámeros
[b] Se considera como cero para cada silla al confórmero de menor energía.

El orden de estabilidad entre las sillas $^4C_1$ está asociado a la capacidad de formar enlaces de hidrógeno entre los oxhidrilos presentes en C-3 y/o C-2 (Fig. 5.16 a y b). Por ejemplo, las sillas $^4C_{1\text{-}2T,3g}$ y $^4C_{1\text{-}2G,3g}$ poseen un enlace de hidrógeno entre el H(O)-3 y el O-2.

Las sillas $^4C_{1\text{-}2T,3g}$, $^4C_{1\text{-}2T,3G}$ y $^4C_{1\text{-}2T,3d}$ generan un enlace entre el H(O)-2 y el O-1. Finalmente, en las sillas $^4C_{1\text{-}2g,3G}$ y $^4C_{1\text{-}2g,3d}$ hay un enlace hidrógeno entre el H(O)-2 y el O-3.

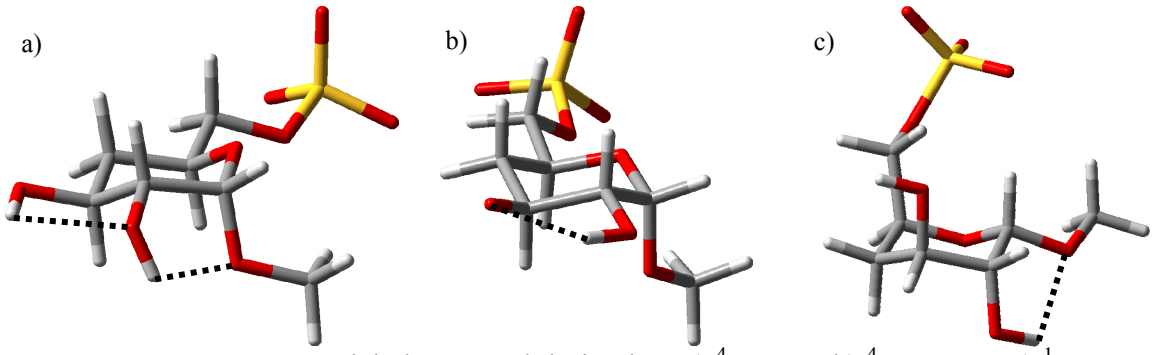
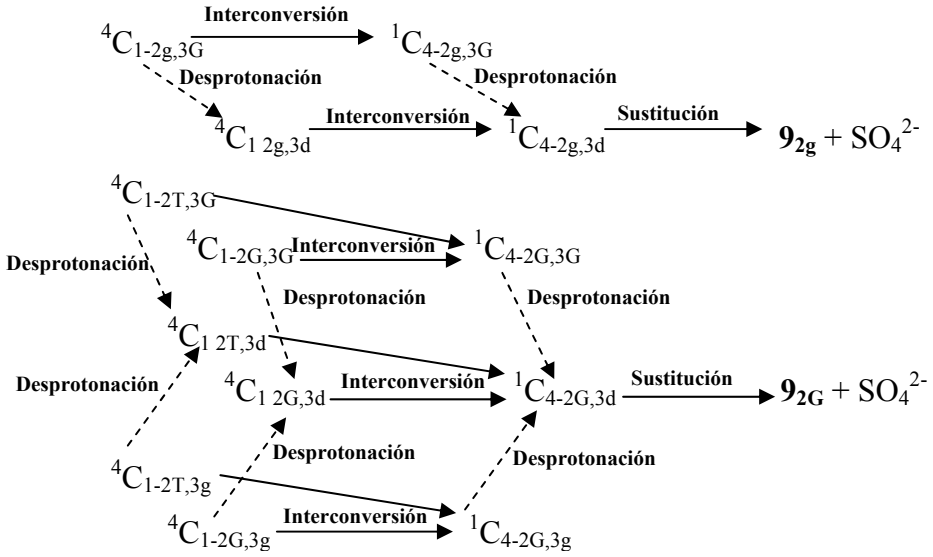


Figura 5.16 Estructuras modeladas para el derivado **3** a) $^4C_{1\text{-}2T,3g}$, b) $^4C_{1\text{-}2g,3d}$, y c) $^1C_{4\text{-}2G,3G}$

Según lo descripto en el párrafo anterior, la silla $^4C_{1\text{-}2G,3G}$ es la única del grupo de rotámeros que no es capaz formar enlace de hidrógeno y por ello su estabilidad es menor. Sin embargo, se la incluyó en el grupo ya que su equivalente $^1C_4$ resulta ser la más estable (Tabla 5.4), dado que las sillas $^1C_4$ con χ_2 = G forman enlaces de hidrógeno entre el H(O)-2 y O-1 (Fig. 5.16 c). Asimismo, si bien $^1C_{4\text{-}2g,3G}$ aparece fuera del rango de las 2 kcal/mol para las $^1C_4$ protonadas, se la incluyó ya que el rotámero equivalente de la $^4C_1$ sí cae en el rango.

Entre las conformaciones $^4C_1$ del compuesto desprotonado se destaca la gran diferencia de energía entre la silla $^4C_{1\text{-}2g,3d}$ y el resto de las seleccionadas. Esto se debe a que al poseer el ángulo χ_2 en conformación g y el O-3 desprotonado, se forma un enlace de hidrógeno que estabiliza la carga negativa del oxígeno. Los demás rotámeros no pueden formar el enlace y por ello presentan mayor energía, aunque se los incluyó en la lista ya que las correspondientes sillas $^1C_4$ son más estables que la silla $^1C_{4\text{-}2g,3d}$.

En función de los resultados de la Tabla 5.4 se plantearon cinco posibles caminos de interconversión para las sillas protonadas y tres para las desprotonadas, los cuales convergerían en tres posibles rotámeros de las sillas $^1C_4$ para el paso de sustitución. Sin embargo, al modelar los distintos intermediarios y estados de transición se observó que estos caminos no eran totalmente independientes. Todos los caminos conformacionales de los rotámeros donde χ_2 es T se combinan con el camino del análogo del rotámero que posee χ_2 = G a través de un giro del ángulo diedro χ_2. Finalmente, no se halló el estado de transición para el paso de sustitución cuando χ_2 es T. De esta manera, los caminos de reacción resultantes serían los representados en el Esquema 5.3.

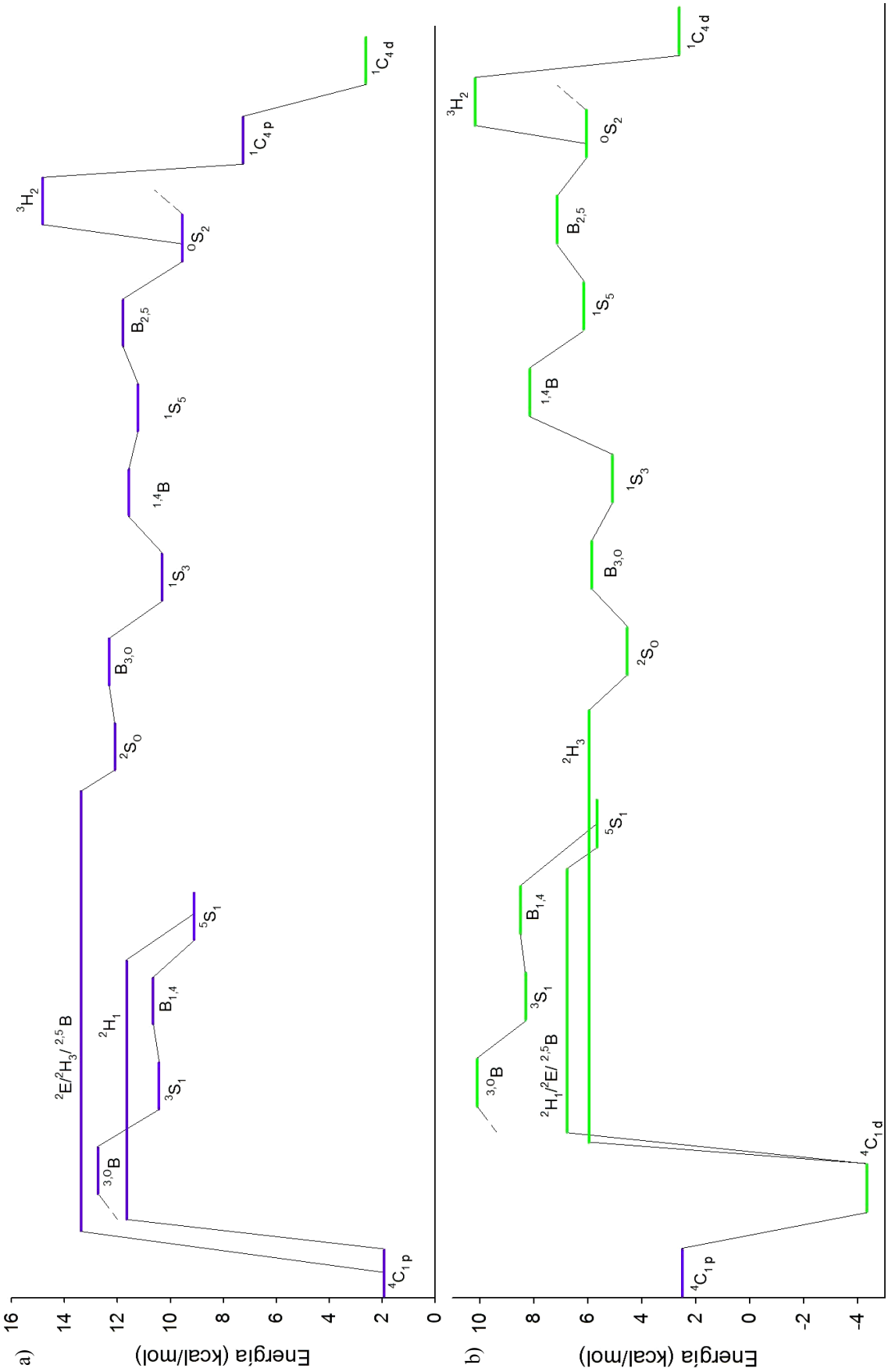


Esquema 5.3 Camino de reacción para el tratamiento alcalino de los rotámeros elegidos del compuesto **3**.

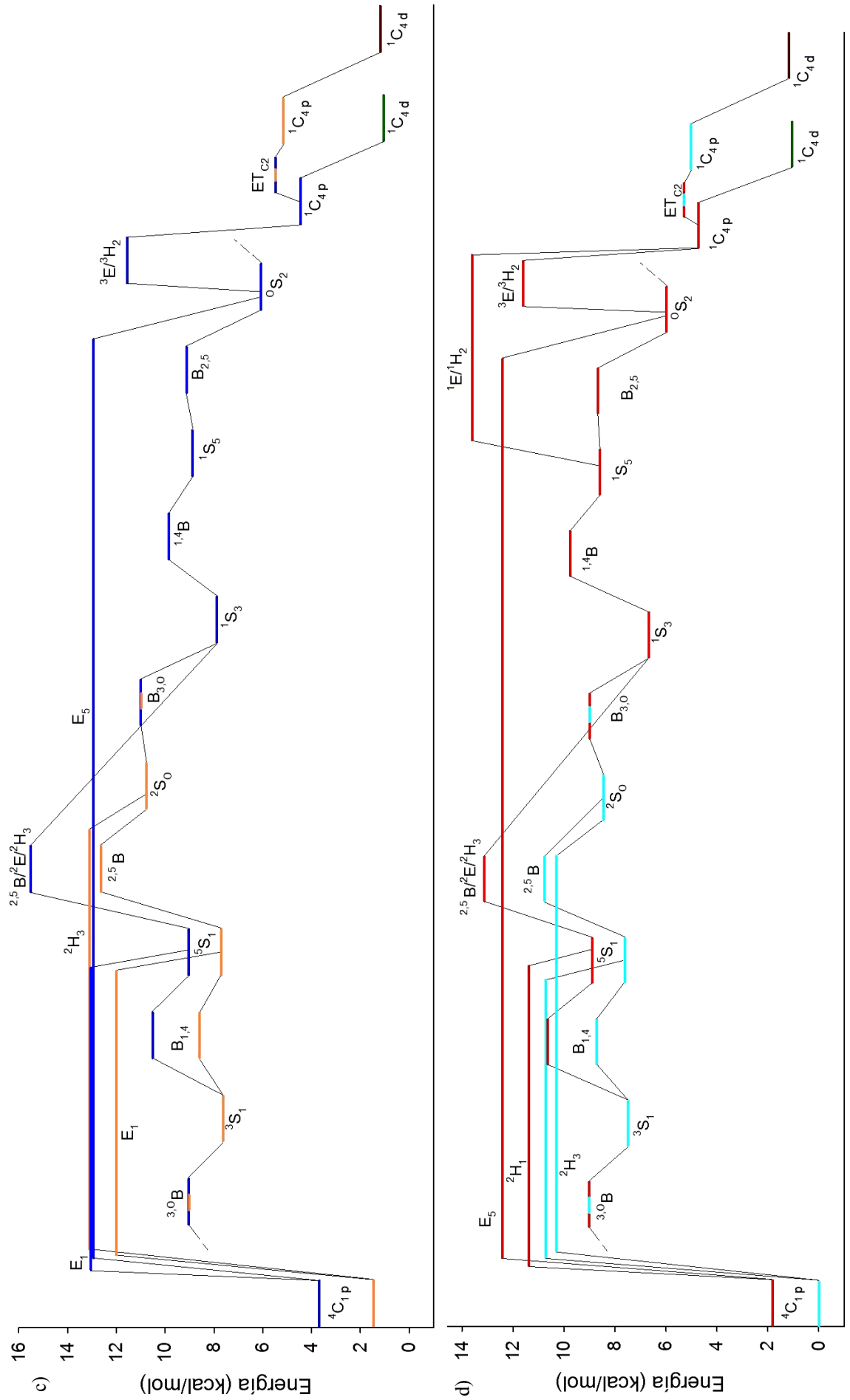
A partir de este esquema, se calcularon los caminos de reacción cuyos gráficos de energía se muestran a continuación. Nuevamente, se separaron los gráficos de energía para el paso de interconversión-desprotonación (Fig. 5.17) del paso de sustitución (Fig. 5.18). Por las razones previamente detalladas se graficaron en conjunto los rotámeros con χ_2 = T y χ_2 = G que posean los demás ángulos diedros iguales. Según los diagramas de energía planteados para los distintos rotámeros de **3**, el paso limitante de la reacción sigue siendo el paso de la sustitución, con una energía de activación de aproximadamente 23 kcal/mol tanto cuando χ_2 es g o G (Fig. 5.18), similar a lo observado para los compuestos **1** y **2**.

El camino de interconversión se ve más afectado por la presencia del sustituyente en posición C-2. Un análisis de la Figura 5.17 muestra una marcada diferencia entre los caminos con χ_2 = g y con χ_2 = G/T. En ambos casos el confórmero más estable resulta ser la silla $^4C_1$ seguida de la $^1C_4$. Sin embargo, se observan diferencias en la estabilidad de los botes torcidos. Asimismo, difieren los estados de transición que permiten el paso entre los polos (sillas) y el ecuador (botes/botes torcidos). Es por ello que se van a analizar por separado ambos grupos.

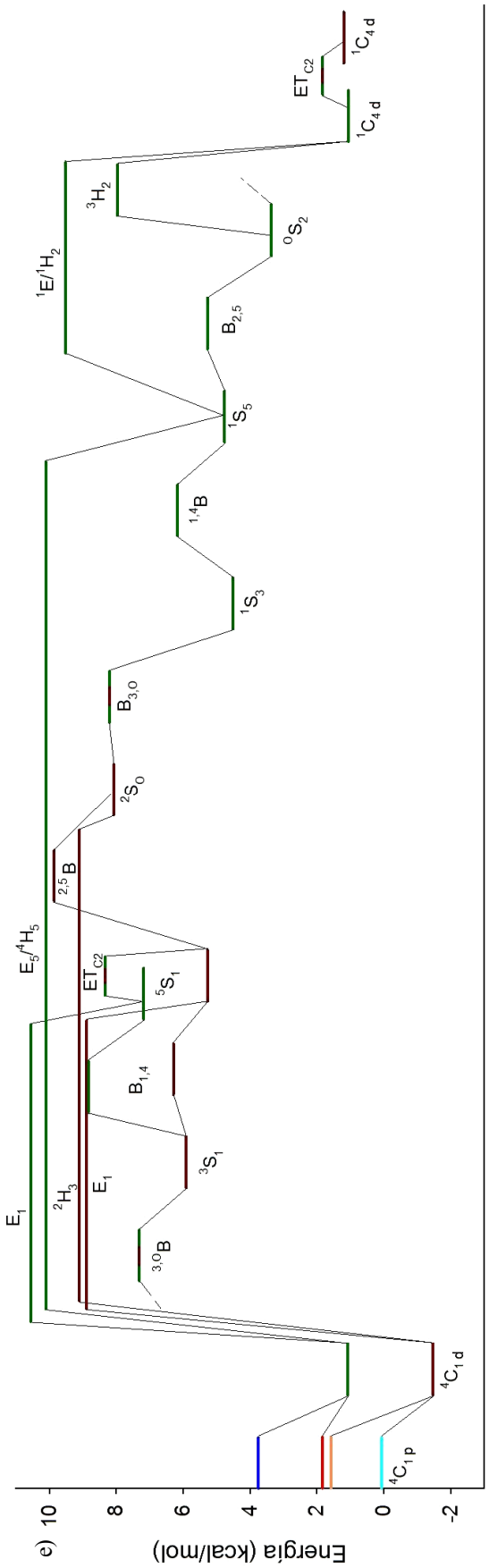
Aún así, es importante destacar que al comparar los caminos conformacionales de las estructuras protonadas y desprotonadas en ninguno de los casos se observa una preferencia en el orden de los pasos de desprotonación e interconversión. Esto estaría indicando que la presencia del oxhidrilo en C-2 tampoco favorece ningún camino en particular. Asimismo, se observa que en todos los rotámeros estudiados el HO-3 de las sillas $^4C_1$ y $^1C_4$ resulta más acídico que el agua.



(Continúa en página siguiente)



(Continúa en página siguiente)



e)

Figura 5.17 Caminos conformacionales de a) $^4C_{1\text{-}2g,3G} \rightarrow {}^1C_{4\text{-}2g,3G}$ b) $^4C_{1\text{-}2g,3d} \rightarrow {}^1C_{4\text{-}2g,3d}$, c) $^4C_{1\text{-}2G,3G} \rightarrow {}^1C_{4\text{-}2G,3G}$ y $^4C_{1\text{-}2T,3G} \rightarrow {}^1C_{4\text{-}2T,3G}$, d) $^4C_{1\text{-}2G,3g} \rightarrow {}^1C_{4\text{-}2G,3g}$ y $^4C_{1\text{-}2T,3g} \rightarrow {}^1C_{4\text{-}2T,3g}$ y e) $^4C_{1\text{-}2G,3d} \rightarrow {}^1C_{4\text{-}2G,3d}$ y $^4C_{1\text{-}2T,3d} \rightarrow {}^1C_{4\text{-}2T,3d}$ con los respectivos pasos de desprotonación para **3.** Los colores indican los rotámeros analizados — 2g3G — 2g3d — 2G3G — 2T3G — 2E3G — 2G3g — 2T3g — 2E3g — 2G3d — 2T3d — 2E3d

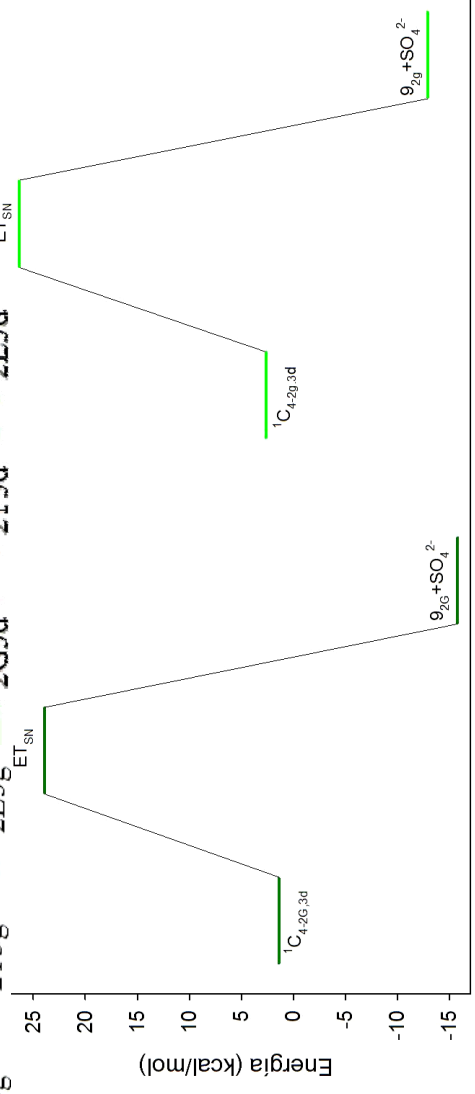


Figura 5.18 Diagrama de energía para los pasos de sustitución nucleofílica intramolecular de **3**.

5.3.4.1.1 Análisis del camino conformacional de interconversión con χ_2 = g

Al analizar el camino conformacional del compuesto **3** con χ_2 = g se puede observar que los botes torcidos $^{O}S_2$ no son los mínimos más estables en la zona del ecuador como sucedía en los demás compuestos estudiados y en las estructuras de **3** con χ_2 = G. El bote torcido $^{5}S_{1\text{-}2g,3G}$ resulta 0,5 kcal/mol más estable que el $^{O}S_{2\text{-}2g,3G}$ para el rotámero protonado. En cambio, para la estructura desprotonada, el $^{2}S_{O\text{-}2g,3d}$ es el más estable de los botes torcidos. Estas variaciones de estabilidad están relacionadas con la posibilidad de generar enlaces de hidrógeno: los botes torcidos $^{O}S_2$ cuyo χ_2 es G poseen un enlace hidrógeno entre el H(O)-2 y el O-1 (Fig 5.19 a), lo cual no ocurre cuando χ_2 es g. Asimismo, el bote torcido $^{2}S_{O\text{-}2g,3d}$ posee un enlace hidrógeno entre el grupo H(O)-2 y el O-3 que estabiliza la carga negativa presente en dicho oxígeno (Fig. 5.19 b).

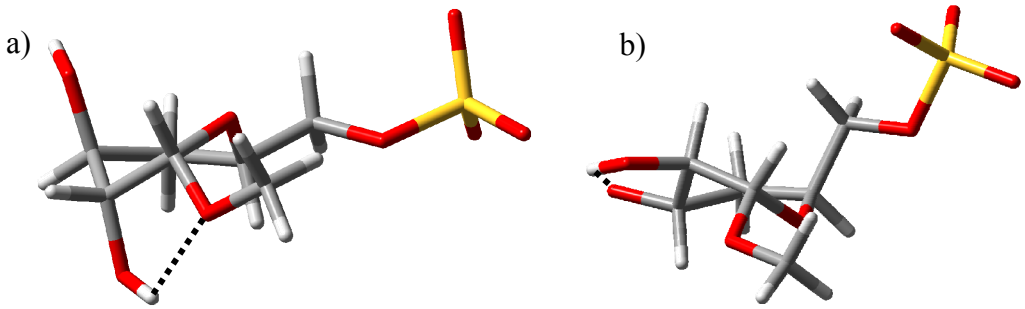


Figura 5.19 Estructuras modeladas para el derivado **3** a) $^{O}S_{2\text{-}2G,3G}$ y b) $^{2}S_{O\text{-}2g,3d}$.

Por otro lado, el pasaje del ecuador a la silla $^{1}C_4$ con χ_2 = g sólo puede ocurrir a través de una semisilla $^{3}H_2$ tanto para el camino con el O-3 protonado como desprotonado (Figs. 5.17 a y b). Sin embargo, el pasaje entre la silla $^{4}C_1$ al ecuador resulta más complejo. Si bien sólo se observan dos posibles estados de transición (las semisillas $^{2}H_3$ y $^{2}H_1$) sus parámetros de *puckering* muestran que las estructuras no siempre poseen los valores ideales. En la Figura 5.20 a se observa que las estructuras protonadas en realidad poseen una conformación híbrida $^{2}H_3/^{2}E/^{2,5}B$. A su vez, de la Figura 5.20 b se puede deducir que la semisilla $^{2}H_{1\text{-}2g,3d}$ no se encuentra como tal sino que es un híbrido $^{2}E/^{2}H_1/^{2,5}B$. Esto se debe a que no existe una estructura tipo bote $^{2,5}B$ que intermedie entre los botes torcidos $^{5}S_1$ y $^{2}S_O$ sino que dicho pasaje ocurre indirectamente a través de la silla $^{4}C_1$. Es interesante notar que en este caso el camino de flexibilidad de la zona del ecuador es reemplazado por otro que implica mayores cambios de energía y conformación.

Al comparar las energías de los estados de transición que permiten el pasaje de las sillas $^{4}C_1$ al ecuador, se puede observar que para las estructuras protonadas, el camino de interconversión prefiere comenzar con el paso $^{4}C_{1\text{-}2g,3G} \rightarrow [^{2}H_{1\text{-}2g,3G}]^{\ddagger} \rightarrow {}^{5}S_{1\text{-}2g,3G}$ (Fig. 5.17 a)

mientras que para las estructuras desprotonadas lo hace por $^{4}C_{1\text{-}2g,3d} \rightarrow [^{2}H_{3\text{-}2g,3d}]^{\ddagger} \rightarrow {}^{2}S_{O\text{-}2g,3d}$. Luego en ambos casos van a ocurrir los correspondientes pasos de interconversión entre botes torcidos hasta llegar al $^{O}S_2$ y pasar a la silla $^{1}C_4$ mediante un estado de transición $^{3}H_2$ (Figs. 5.17 a y b).

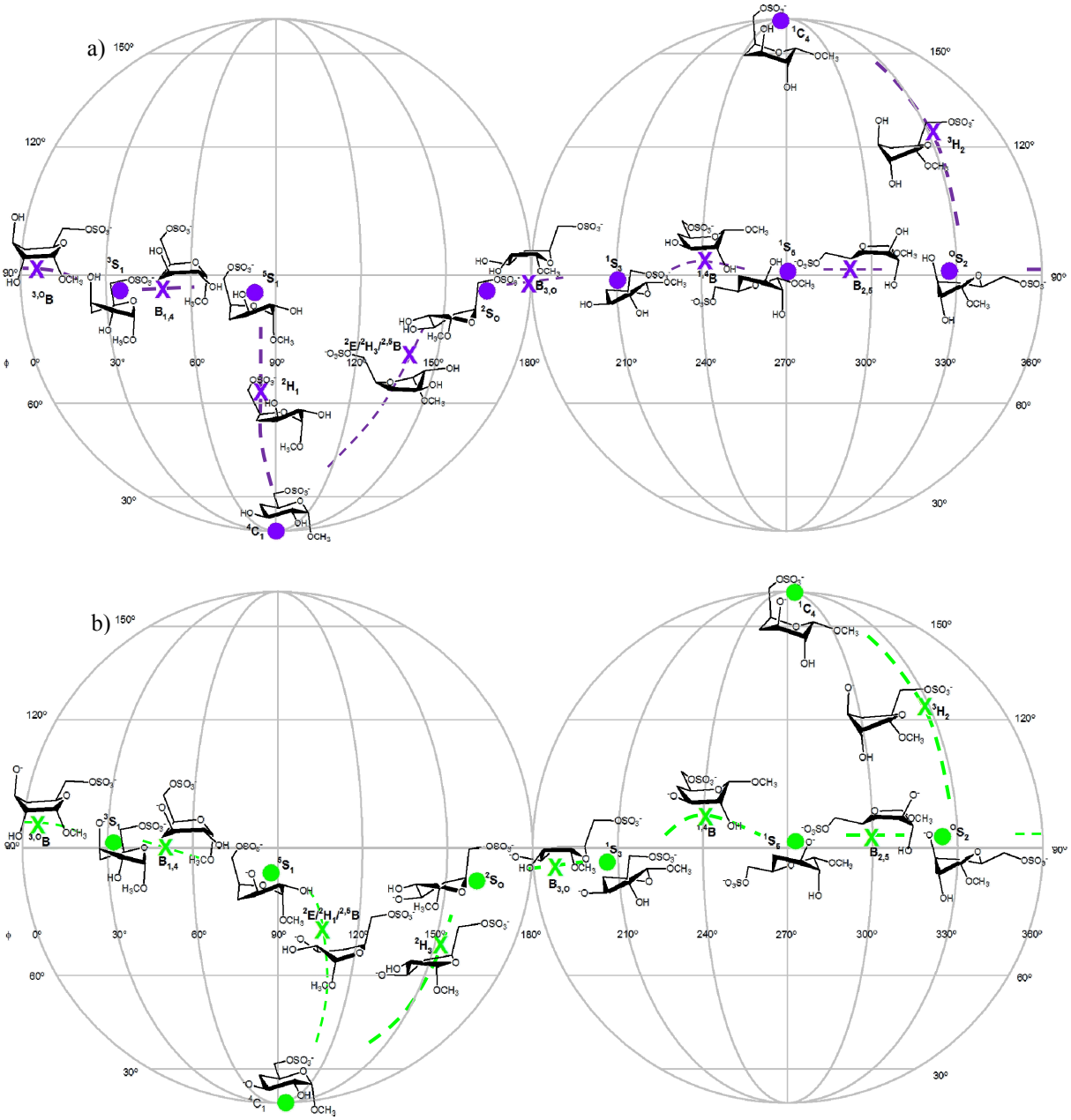
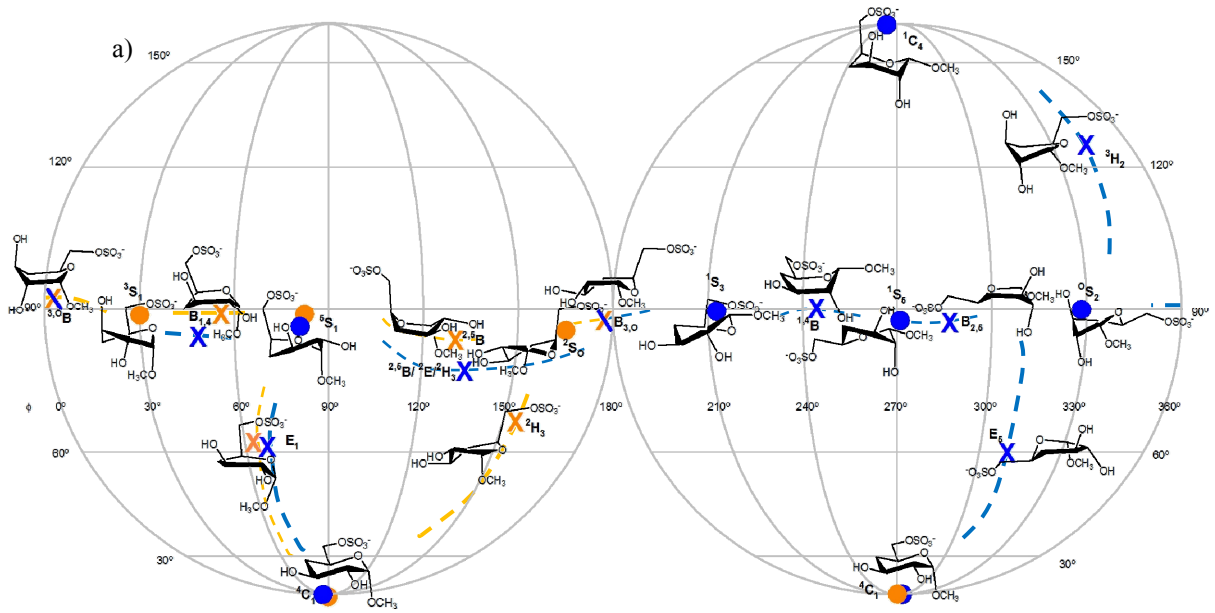


Figura 5.20 Representaciones geométricas de los parámetros de *puckering* de Cremer y Pople para a) $^{4}C_{1\text{-}2g,3G} \rightarrow {}^{1}C_{4\text{-}2g,3G}$ y b) $^{4}C_{1\text{-}2g,3d} \rightarrow {}^{1}C_{4\text{-}2g,3d}$. Los círculos indican los mínimos y las cruces los máximos. Los colores indican los rotámeros analizados: ● 2g3G ● 2g3d

5.3.4.1.2 Análisis del camino conformacional de interconversión con χ_2 = G/T

Como se mencionó previamente, los caminos de **3** a **9** con χ_2 = G se combinan con aquellos donde χ_2 = T. Esto sucede para χ_3 = G o g, así como para las estructuras desprotonadas. Lo primero que llama la atención es que los distintos botes y botes torcidos existen generalmente como uno de los rotámeros. Las conformaciones ${}^{O}S_2$, $B_{2,5}$, ${}^{1}S_5$, ${}^{1,4}B$ y ${}^{1}S_3$ existen únicamente con χ_2 = G, mientras que ${}^{2}S_O$ y ${}^{1}S_3$ ocurren con χ_2 = T. El bote torcido ${}^{5}S_1$ y el bote $B_{1,4}$ existen con ambos valores del ángulo diedro. Los botes $B_{3,O}$ y ${}^{3,O}B$ tienen un valor de χ_2 intermedio (E), probablemente porque implican el pasaje de un intermediario con χ_2 = G a otro con χ_2 = T. El bote ${}^{2,5}B$ siempre existe con χ_2 = T pero cuando el O-3 está protonado existe también con χ_2 = G. Al analizar los parámetros de *puckering* de los rotámeros del bote ${}^{2,5}B$ con χ_2 = G se observa que éste se encuentra desplazado del valor esperado para θ (Figs. 5.21 a, b y c). A su vez, los estados de transición son muy inestables, como se observó para varios rotámeros de **1** y **2**. Esto no ocurre cuando χ_2 es T.

Otro hecho destacable es que no existe pasaje entre el ecuador y la silla ${}^{1}C_4$ para las estructuras con χ_2 = T, en cambio sí existe para los distintos rotámeros con χ_2 = G. Tanto cuando χ_3 es G como si es g (y χ_2 = G), se observa una semisilla ${}^{3}H_2$ (Fig. 5.17 c y d) También existe el híbrido ${}^{1}E/{}^{1}H_2$ tanto para las estructuras protonadas con χ_3 = g como para las desprotonadas en O-3 (Fig. 5.17 d y e). Si bien en ambos casos su energía relativa es superior a la de la semisilla ${}^{3}H_2$, la energía de activación de los pasajes ${}^{1}S_5 \rightarrow [{}^{1}E/{}^{1}H_2]^{\ddagger} \rightarrow {}^{1}C_4$ y ${}^{O}S_2 \rightarrow [{}^{3}H_2]^{\ddagger} \rightarrow {}^{1}C_4$ son similares.



(Continúa en página siguiente)

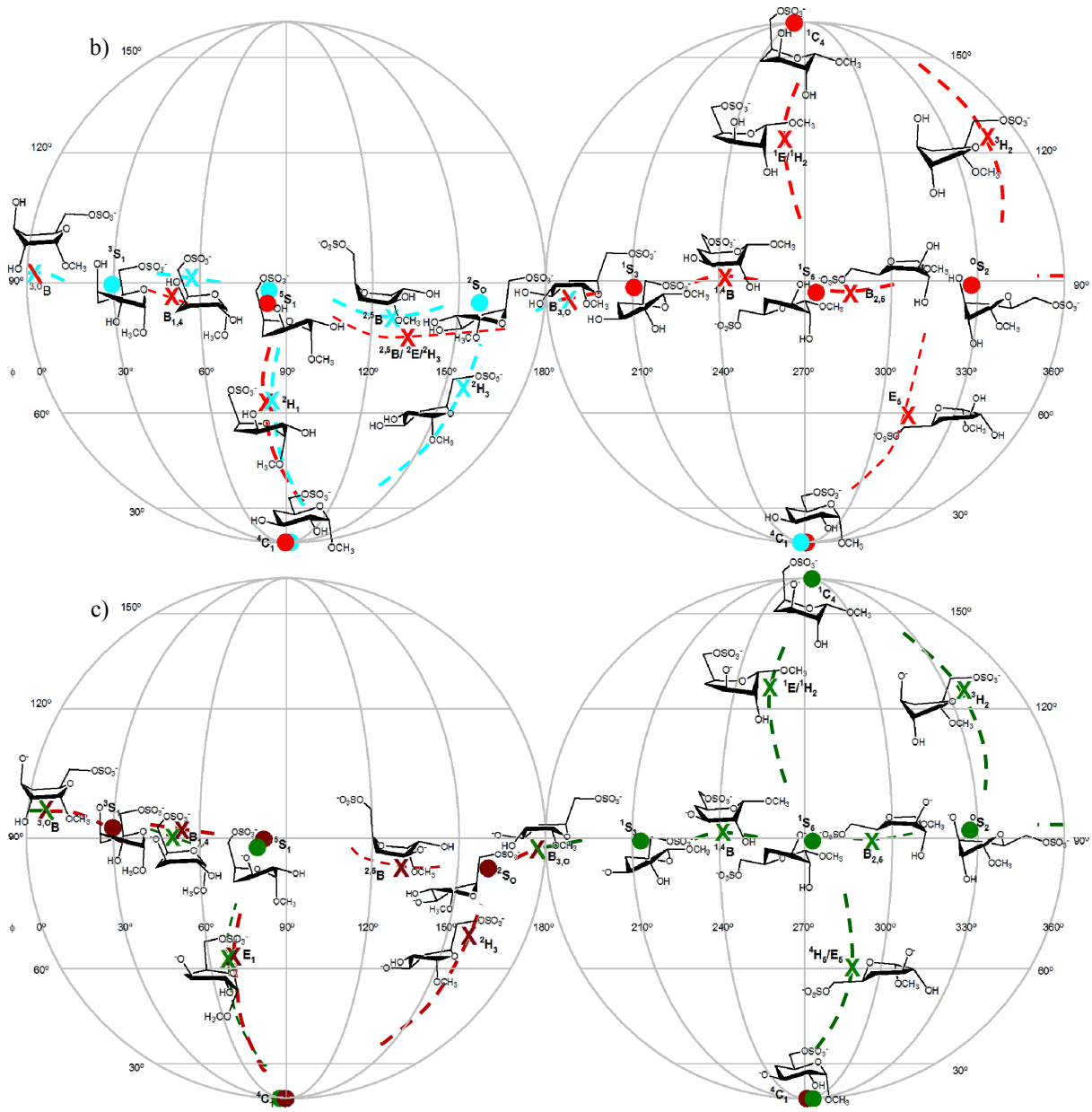


Figura 5.21 Representaciones geométricas de los parámetros de *puckering* de Cremer y Pople para a) $^{4}C_{1\text{-}2G,3G}$ /$^{4}C_{1\text{-}2T,3G}$ → $^{1}C_{4\text{-}2G,3G}$, b) $^{4}C_{1\text{-}2G,3g}$/$^{4}C_{1\text{-}2T,3g}$ → $^{1}C_{4\text{-}2G,3g}$ y c) $^{4}C_{1\text{-}2G,3d}$/$^{4}C_{1\text{-}2T,3d}$ → $^{1}C_{4\text{-}2G,3d}$. Los círculos indican los mínimos y las cruces los máximos. Los colores indican los rotámeros analizados: ● 2G3G ● 2T3G X 2E3G ● 2G3g ● 2T3g X 2E3g ● 2G3d ● 2T3d X 2E3d

El paso de la silla $^{4}C_{1}$ al ecuador sí puede ocurrir para ambos valores del ángulo diedro. Cuando χ_2 es T existen siempre dos posibles caminos: $^{4}C_{1}$→$^{5}S_{1}$ y $^{4}C_{1}$→$^{2}S_{O}$. El primer camino ocurre a través de estado de transición $^{2}H_{1}$ cuando χ_3 es g (y χ_2 es T; Figs. 5.17 d y 5.21 b) y E_{1} para χ_3 = G o para las estructuras con el O-3 desprotonado. El segundo camino pasa a través de un estado de transición $^{2}H_{3}$ en los tres casos (Figs. 5.17 y 5.21). Ambas opciones para el pasaje entre la silla y el ecuador son igualmente factibles para los tres casos

estudiados en esta Sección (Fig. 5.17), a excepción del rotámero con χ_3 = G. En ese caso, el sobre E_1 es 1 kcal/mol más estable (Fig. 5.17 c).

Cuando χ_2 es G también hay dos opciones de pasaje entre la silla $^4C_1$ y el ecuador para cada camino marcado. Independientemente del valor de χ_3 siempre se encuentra una semisilla $^2H_1$ o un sobre E_1 que permite el paso $^4C_1 \rightarrow {}^5S_1$. La segunda posibilidad implica un estado de transición E_5 para las estructuras protonadas en O-3 y $E_5/^4H_5$ para las desprotonadas. En general ambos estados de transición tienen energías similares por lo tanto el camino de reacción puede ir por cualquiera de las dos opciones. Sin embargo cuando χ_3 es g, el pasaje $^4C_1 \rightarrow [^2H_1]^{\ddagger} \rightarrow {}^5S_1$ se encuentra favorecido (Fig. 5.17 d).

5.3.4.2 Camino de reacción para el compuesto 4

Al remplazar el grupo –OH por el grupo $–OSO_3^-$ (compuesto **4**, Fig. 5,7), el estudio del camino conformacional se simplificó marcadamente, debido a la disminución del número de rotámeros de las sillas $^4C_1$ y $^1C_4$ protonadas y desprotonadas en O-3. El análisis por MM3 mostró que, debido a la presencia del grupo sulfato, el ángulo χ_2 siempre presenta valores cercanos a 0° (el azufre está eclipsado con el H-2), por lo que en los rotámeros seleccionados variaban únicamente en los valores de los ángulos χ_3, ω y χ_6. Estos se optimizaron por DFT (M06-2X /6-31+G(d,p) con PCM en agua). En función los resultados obtenidos, se seleccionaron los rotámeros presentes en la Tabla 5.5.

Tabla 5.5 Rotámeros seleccionados y sus valores de energías relativas para las sillas $^4C_1$ y $^1C_4$ de **4** luego de optimizar por M06-2X/6-31+G(d,p) con PCM en agua.

	Rotámeros[a]				**ΔE**[b]
	χ_2 (°)	χ_3 (°)	ω (°)	χ_6 (°)	(kcal/mol)
$^4C_1$ C-3 protonado					
$^4C_{1\text{-}3g}$	12	92	68	–175	0,00
$^1C_4$ C-3 protonado					
$^1C_{4\text{-}3g}$	22	47	55	–164	0,00
$^1C_{4\text{-}3G}$	21	–57	55	–165	0,33
$^4C_1$ C-3 desprotonado					
$^4C_{1\text{-}3d}$	-26		67	–177	0,00
$^1C_4$ C-3 desprotonado					
$^1C_{4\text{-}3d}$	17		57	–161	0,00

[a] χ_1 = G en todos los rotámeros
[b] Se considera como cero para cada silla al confórmero de menor energía.

Al igual que ocurrió con los otros compuestos, los rotámeros de menor energía resultaron aquellos con valores de ω y χ_6 cercanos a 60° y 180° respectivamente. A su vez, el valor de χ_2 siempre es S. Esto implica que el único ángulo diedro que va a variar es χ_3, por lo tanto en la nomenclatura se van a omitir los demás ángulos.

De acuerdo a los resultados obtenidos luego de optimizar por DFT, sólo es posible un rotámero para las estructuras desprotonadas, mientras que para las protonadas hay dos: uno con χ_3 = G y otro con χ_3 = g. En este último caso, ambos rotámeros $^1C_4$ poseen energías similares; sin embargo, el rotámero con χ_3 = g de la silla $^4C_1$ es aproximadamente 4 kcal/mol más estable debido a la formación del enlace hidrógeno entre el H(O)-3 y el O(S)-2, el cual estabiliza la carga negativa de grupo sulfato (Fig. 5.22).

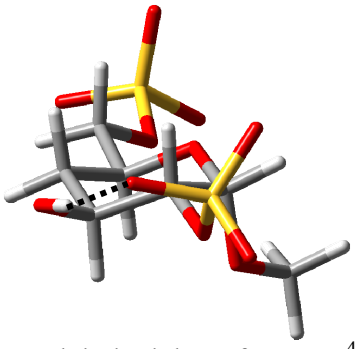
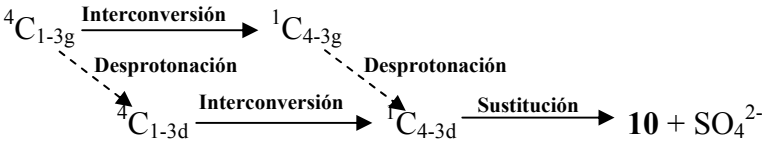


Figura 5.22 Estructura modelada del confórmero $^4C_{1\text{-}3g}$ del derivado **4**.

En función de lo previamente mencionado, las posibilidades de reacción van a ser las que se muestran en el Esquema 5.4. Este resulta más sencillo que los anteriores ya que se parte únicamente de la silla $^4C_{1\text{-}3g}$ y se plantean las dos opciones posibles: interconversión-desprotonación y desprotonación-interconversión.



Esquema 5.4 Camino de reacción para el tratamiento alcalino de los rotámeros elegidos del compuesto **4**.

En Figura 5.23 se muestran los correspondientes pasos de interconversión y en la Figura 5.24 el paso de sustitución. Al igual que sucedió con los otros compuestos, el paso limitante de la reacción **4** →**10** es el de sustitución. La energía de activación también es similar a las observadas para los otros compuestos.

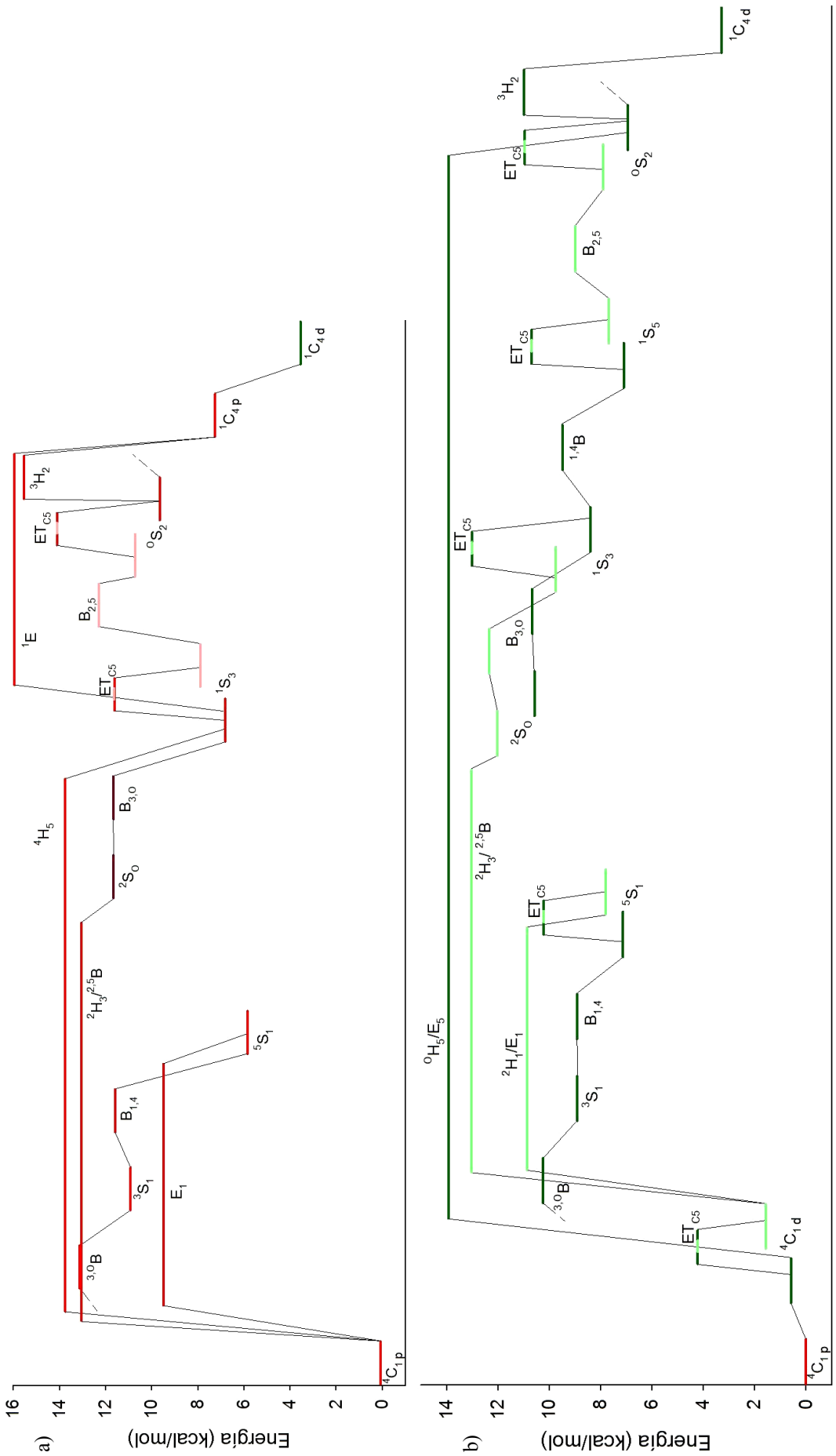


Figura 5.23 Caminos conformacionales de a) $^4C_{1\text{-}3g} \rightarrow {}^1C_{4\text{-}3g}$ y b) $^4C_{1\text{-}3d} \rightarrow {}^1C_{4\text{-}3d}$ con los respectivos pasos de desprotonación para **3.** Los colores indican los rotámeros analizados.

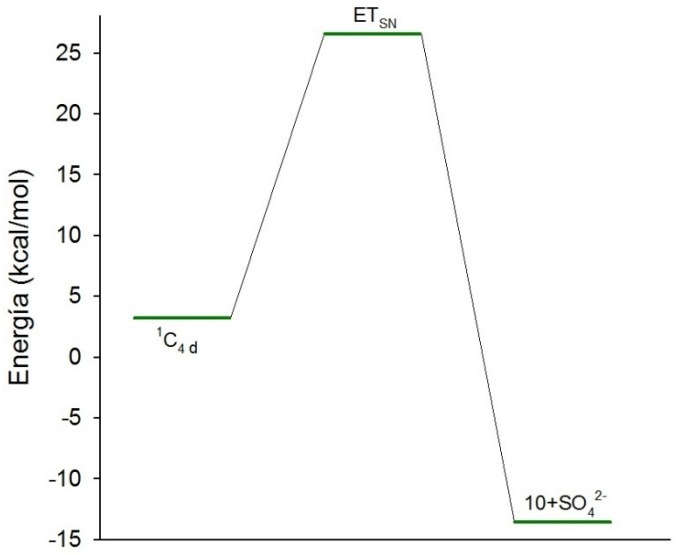


Figura 5.24 Diagrama de energía para el paso de sustitución nucleofílica intramolecular de **4**.

El análisis del paso de interconversión de las sillas, tanto para las estructuras protonadas como desprotonadas, presenta varias características interesantes. Una de las más destacables es que no todas las estructuras planteadas tienen los mismos ángulos diedros exocíclicos que las sillas $^4C_1$ y $^1C_4$. Esto sucede en ambos caminos de interconversión planteados y se debe a que no fue posible hacer converger determinados estados de transición con $\omega \approx 60°$, aún cuando los dos intermediarios que conectan dicho estado de transición sí presentan ese ángulo. Se probaron distintas variantes (realizar cálculos por el método cuasi-Newton guiado por tránsito sincrónico, utilizar grilla ultrafina, cambiar de funcional, etc.) pero no fue posible obtener dichas estructuras. Sin embargo, con ω cercano a 180°, dichos estados de transición convergían sin inconvenientes. Por esta razón se observan algunas conformaciones con ω = T, si bien, como se puede observar en la Figura 5.23, estos son cerca de 1 kcal/mol menos estables que sus análogos con ω = g. En la nomenclatura de las conformaciones, sólo se incluyó el valor de ω cuando era distinto de g. Asimismo, salvo aclaración, las estructuras analizadas en el texto son aquellas con ω = g.

Al comparar ambos gráficos de la Figura 5.23, se observa que el paso limitante de la interconversión de sillas para las estructuras protonadas y desprotonadas es de energía muy similar. Es importante aclarar que cuando el O-3 se encuentra desprotonado, el estado de transición (que permite el pasaje de la silla $^4C_1$ a las conformaciones del ecuador) de menor energía encontrado es aquel con ω = T (ver luego). Aún así, estos resultados llevan a la conclusión que la presencia del grupo sulfato en C-2 tampoco favorece ningún orden en particular entre los dos primeros pasos del camino de reacción (desprotonación e

interconversión). Asimismo, este compuesto se diferencia de los anteriores porque el oxhidrilo en C-3 de la silla $^4C_1$ resulta menos acídico que el agua, probablemente debido a la presencia de una carga negativa vecina y al enlace hidrogeno formado en la silla $^4C_{1\text{-}3g}$ (Fig. 5.22).

5.3.4.2.1 Análisis del camino conformacional de interconversión con χ_3 = g

Un análisis del gráfico presentado en la Figura 5.23 a muestra que la silla $^4C_1$ es el confórmero más estable. Sin embargo, los botes torcidos $^5S_1$ y $^1S_3$ resultan más estables que la silla $^1C_4$. Esto se lo puede atribuir a la formación de enlaces hidrógeno entre el H(O)-3 y el grupo sulfato en posición C-2 (Fig. 5.25 a y b). Como ya fue mencionado previamente, la formación de dicho enlace estabiliza la carga negativa del sulfato y por lo tanto favorece estas conformaciones.

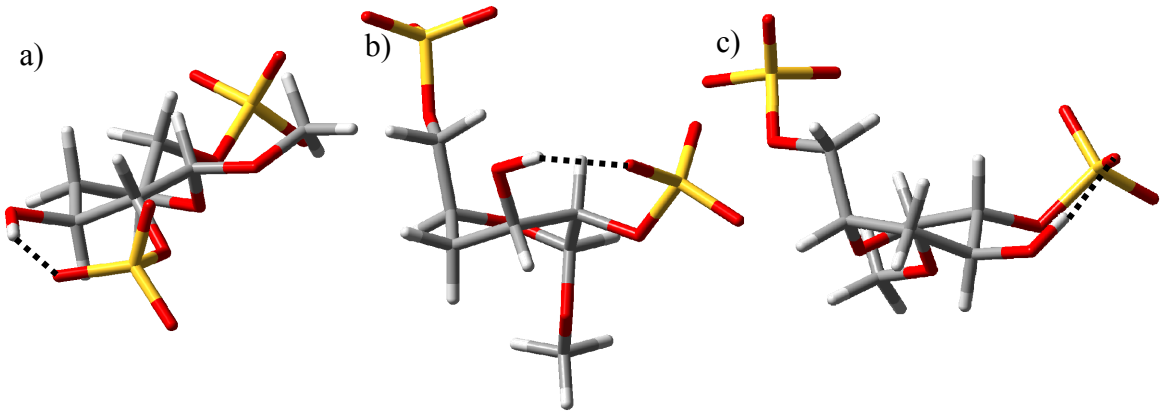


Figura 5.25 Estructuras modeladas para el derivado **4** a) $^5S_{1\text{-}3g}$, b) $^1S_{3\text{-}3g}$ y c) $^2S_{O\text{-}3g}$.

Para las estructuras protonadas, hay tres posibles pasajes entre la silla $^4C_1$ y el ecuador (las semisillas $^2H_3$ y $^4H_5$ y el sobre E_1) y dos entre el ecuador y la silla $^1C_4$ (la semisilla $^3H_2$ y el sobre ^1E, Fig. 5.23 a). Los pasajes a través del sobre E_1 y la semisilla $^3H_2$ resultan los preferenciales, al poseer la menor energía de activación. Asimismo, no existe el bote $^{2,5}B$ sino una conformación híbrida $^2H_3/^{2,5}B$ (Fig. 5.26), como ya había sido observado para las estructuras de **3** con χ_2 = g. Por otro lado, se destaca que el bote torcido $^2S_{O\text{-}3g}$ y el bote $^{3,O}B$ poseen energías similares y un valor de χ_3 de alrededor de los 120°, ya que de ese modo se puede formar un enlace hidrógeno con el grupo sulfato (Fig. 5.25 c).

Por último, no fue posible hallar los botes $^{1,4}B$ y $B_{2,5}$ ni el bote torcido $^1S_5$ con ω = g. Al girar dicho ángulo diedro a 180°, solo se halló el bote $B_{2,5}$. Este estado de transición es la única vía entre los botes torcidos $^1S_3$ y $^OS_2$ (es decir, entre $^1S_{3\text{-}3g,5T}$ y $^OS_{2\text{-}3g,5T}$). Por lo tanto, se

debieron optimizar los mencionados botes torcidos así como los correspondientes estados de transición para permitir el pasaje a los rotámeros con ω = g.

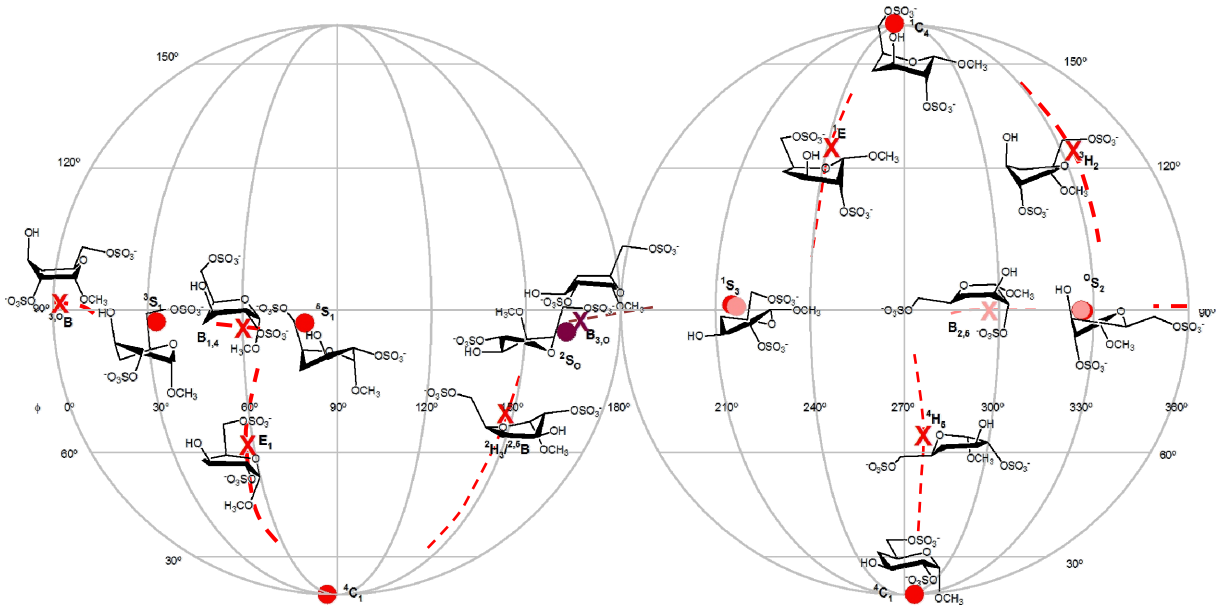


Figura 5.26 Representaciones geométricas de los parámetros de *puckering* de Cremer y Pople para $^{4}C_{1\text{-}3g} \rightarrow {}^{1}C_{4\text{-}3g}$. Los círculos indican los mínimos y las cruces los máximos. Los colores indican los rotámeros analizados: ● 3g ● 3e ● 3g5T

5.3.4.2.2 Análisis del camino conformacional de interconversión para el compuesto 4 desprotonado

El estudio del camino conformacional de la estructura desprotonada muestra que la conformación $^{4}C_{1}$ es la más estable seguida de la $^{1}C_{4}$. Asimismo, los botes torcidos $^{O}S_{2}$, $^{1}S_{5}$ y $^{5}S_{1}$ son las conformaciones más estables en el ecuador siendo aproximadamente 3 kcal/mol menos estables que la silla $^{1}C_{4}$ (Fig. 5.23 b). El pasaje del ecuador a la silla $^{1}C_{4}$ puede ocurrir sólo a través del estado de transición $^{3}H_{2}$. Por otro lado, para pasar de la silla $^{4}C_{1}$ al ecuador existe un estado de transición $^{O}H_{5}/E_{5}$.

Al igual que ocurrió con las estructuras protonadas, no fue posible hallar todas las conformaciones con ω = g. El bote $^{2,5}B$ apareció como un híbrido con la semisilla $^{2}H_{3\text{-}3d,5T}$ (Figura 5.27). Asimismo, se halló un estado de transición E_{1} para las estructuras desprotonadas con ω = T. De esta manera se optimizaron los correspondientes mínimos con ω = T (la silla $^{4}C_{1}$ y los botes torcidos $^{5}S_{1}$ y $^{2}S_{O}$). Al optimizar los estados de transición para la interconversión de los rotámeros con ω = T→g, no se pudo hallar el correspondiente al bote torcido $^{2}S_{O}$, pero se encontró el estado de transición entre el bote torcido $^{1}S_{3\text{-}3d,5T}$ y $^{1}S_{3\text{-}3d}$. El otro máximo de energía que sólo se pudo hallar con ω = T es el bote $B_{2,5}$, por lo que

también se optimizaron los rotámeros de los botes torcidos $^{O}S_2$ y $^{1}S_5$ con dicho valor de ω. Por otro lado, se observa que, en este caso, sí existen las conformaciones $^{1}S_5$ y $^{1,4}B$. Este último, en particular, se encuentra ligeramente desplazado de sus valores de ϕ y θ ideal.

Por último se destaca que el bote torcido $^{3}S_1$ y el bote $B_{1,4}$ poseen la misma energía (Fig. 5.23 b). Este es el primer caso, entre los discutidos en este capítulo, donde se genera una región plana de energía diferente de la zona entre el bote $B_{3,O}$ y el bote torcido $^{2}S_O$.

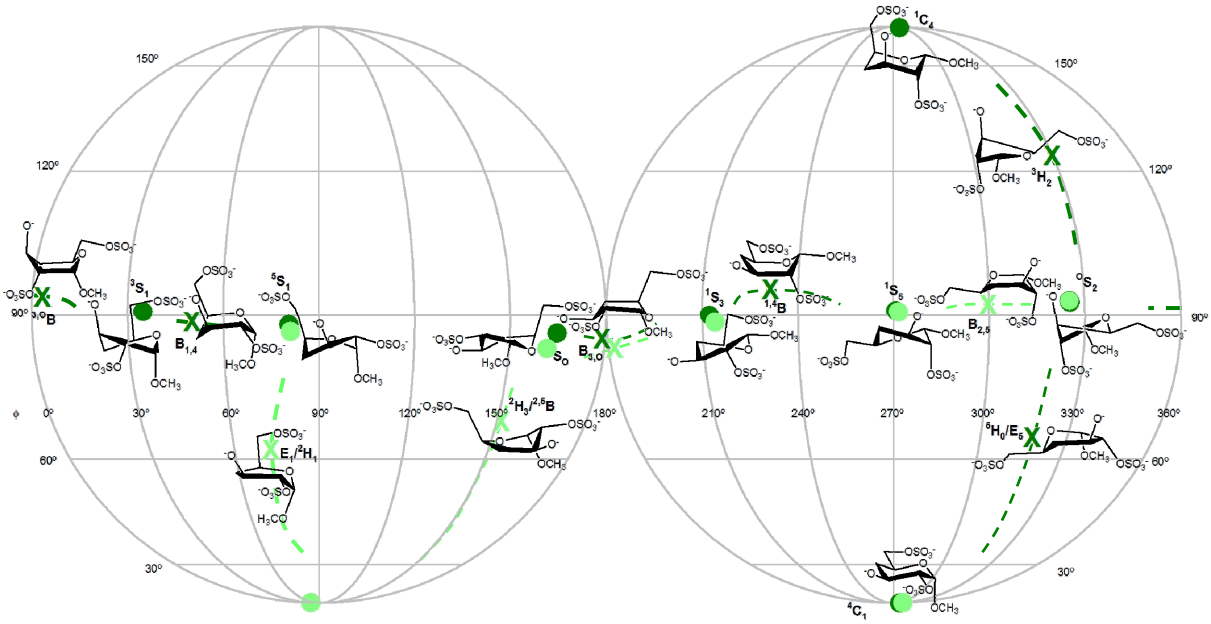


Figura 5.27 Representaciones geométricas de los parámetros de *puckering* de Cremer y Pople para $^{4}C_{1\text{-}3d} \rightarrow {}^{1}C_{4\text{-}3d}$. Los círculos indican los mínimos y las cruces los máximos. Los colores indican los rotámeros analizados: ● 3d ● 3d5T

5.3.5 Análisis de la sustitución en las posiciones C-2 y C-4

Por último, se ha analizado el efecto en conjunto de los sustituyentes en C-2 y en C-4, es decir, el caso del metil 4-*O*-metil-α-D-galactopiranósido 6-sulfato y su derivado sulfatado en 2. Para ello se estudió el camino de reacción para pasar del compuesto **5** al **11** y del compuesto **6** al **12** (Fig. 5.7), donde el sustituyente en C-4 es el grupo metoxilo mientras que en posición C-2 puede haber un grupo –OH o $–OSO_3^-$.

5.3.5.1 Camino de reacción para el compuesto 5

El camino de reacción para el compuesto **5** (Fig. 5.7) resultó ser el más complejo de todos los planteados debido al gran número de rotámeros posibles. Este compuesto registra las influencias de los compuestos **2** y **3** por lo que la formación de enlaces hidrógeno entre H(O)-3 y O-4 u O-2, así como H(O)-2 y O-3 u O-1 van a afectar en gran medida la estabilidad de las distintas estructuras (Tabla 5.6).

Tabla 5.6 Rotámeros seleccionados y sus valores de energías relativas para las sillas $^4C_1$ y $^1C_4$ de **5** luego de optimizar por M06-2X/6-31+G(d,p) con PCM en agua.

	Rotámeros[a]					**ΔE**[b] (kcal/mol)
	χ_2 (°)	χ_3 (°)	χ_4 (°)	ω (°)	χ_6 (°)	
$^4C_1$ C-3 protonado						
$^4C_{1\text{-}2T,3T,4S}$	−168	−169	−16	66	−172	0,00
$^4C_{1\text{-}2T,3g,4g}$	−165	71	34	69	−173	0,13
$^4C_{1\text{-}2g,3T,4S}$	71	−166	−18	66	−172	0,52
$^4C_{1\text{-}2T,3G,4g}$	−166	−42	30	68	−173	1,74
$^4C_{1\text{-}2G,3g,4g}$	−38	72	34	69	−173	1,81
$^4C_{1\text{-}2G,3T,4S}$	−46	−168	−17	66	−171	1,92
$^4C_{1\text{-}2g,3G,4g}$	71	−38	32	69	−174	2,05
$^4C_{1\text{-}2G,3G,4g}$	−46	−41	30	69	−172	3,84
$^1C_4$ C-3 protonado						
$^1C_{4\text{-}2G,3G,4G}$	−78	−69	−51	58	−141	0,00
$^1C_{4\text{-}2G,3G,4g}$	−78	−76	40	61	−138	0,30
$^1C_{4\text{-}2T,3G,4G}$	−147	−68	−49	56	−145	1,03
$^1C_{4\text{-}2T,3G,4g}$	−148	47	58	52	−149	1,39
$^1C_{4\text{-}2G,3g,4g}$	−77	47	51	60	−137	1,92
$^1C_{4\text{-}2g,3G,4G}$	45	−68	−50	58	−145	2,46
$^1C_{4\text{-}2T,3g,4g}$	−149	−76	40	55	−149	2,68
$^1C_{4\text{-}2g,3G,4g}$	44	−75	38	58	−169	2,98
$^4C_1$ C-3 desprotonado						
$^4C_{1\text{-}2g,3d,4g}$	86		35	68	−174	0,00
$^4C_{1\text{-}2T,3d,4g}$	−175		33	68	−172	3,32
$^4C_{1\text{-}2G,3d,4g}$	−54		33	68	−172	5,76
$^1C_4$ C-3 desprotonado						
$^1C_{4\text{-}2G,3d,4g}$	−77		62	62	−155	0,00
$^1C_{4\text{-}2G,3d,4G}$	−76		−51	67	−160	0,39
$^1C_{4\text{-}2T,3d,4g}$	−155		59	58	−168	0,62
$^1C_{4\text{-}2T,3d,4G}$	−153		−51	63	−162	1,11
$^1C_{4\text{-}2g,3d,4g}$	76		59	59	−168	1,66
$^1C_{4\text{-}2g,3d,4G}$	76		−51	65	−161	2,07

[a] χ_1 = G en todos los rotámeros
[b] Se considera como cero para cada silla al confórmero de menor energía.

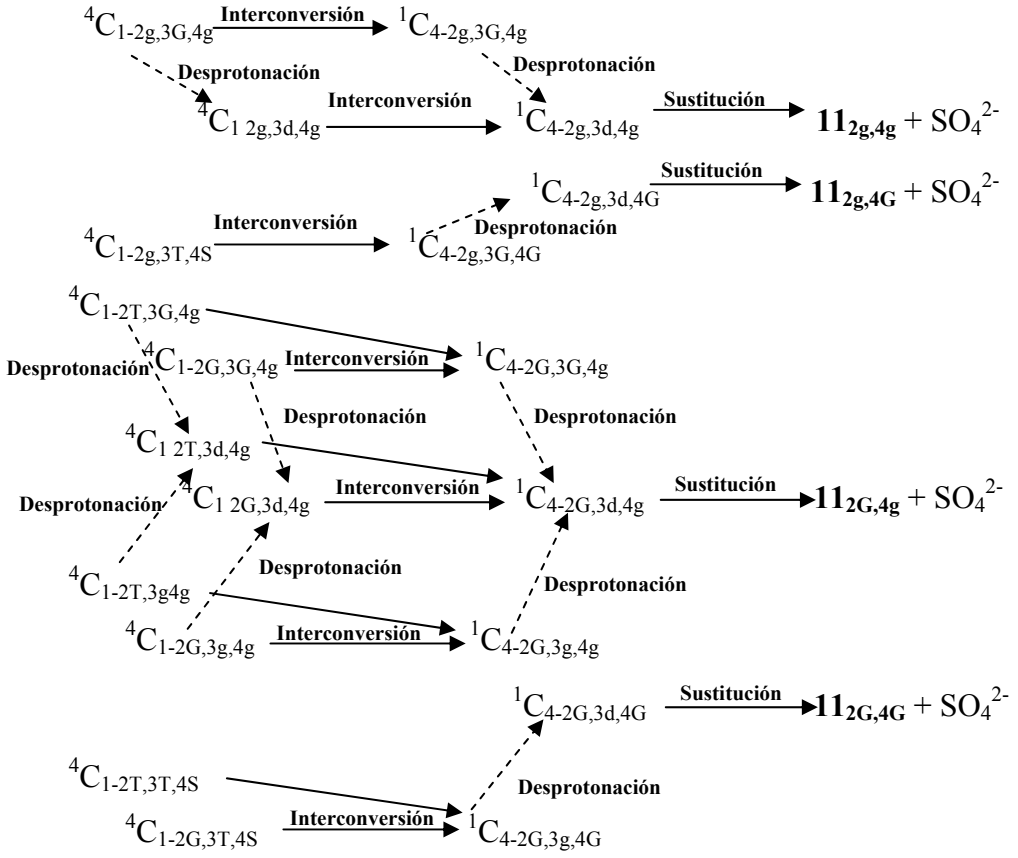
Al igual que ocurrió con los demás compuestos estudiados, los rotámeros con ω = g y χ_6 = T resultaron ser los más estables. Asimismo, de manera análoga a lo observado para el compuesto **2**, las sillas $^4C_1$ no existen con χ_4 = G debido al impedimento estérico entre los hidrógenos del metoxilo y los hidrógenos del C-5.

Se han incluido sillas que superan el límite de 2 kcal/mol dado que, si bien resultan poco estables, su confórmero invertido se encuentra muy estabilizado y por ello resulta necesario plantear el camino conformacional para la inversión.

Como ya se había mencionado previamente, la estabilidad de las sillas se ve afectada por la posibilidad de formar enlaces hidrógeno. Del análisis realizado para el compuesto **3**, se desprende que el ángulo χ_2 = T favorece la estabilidad de las sillas $^4C_1$ al formar un enlace hidrógeno con O-1. Asimismo, si χ_2 = g se puede generar un enlace entre H(O)-2 y O-3, el cual se encuentra muy favorecido cuando O-3 está desprotonado. A su vez, si χ_3 = g se puede formar enlace entre H(O)-3 y O-2. Por otro lado, a partir del análisis realizado para **2**, se observa que si χ_3 = T se genera un enlace de hidrógeno entre H(O)-3 y O-4. Estos resultados explican la tendencia observada para las sillas $^4C_1$. Para las conformaciones $^1C_4$ del compuesto protonado ya se había visto para **3** que χ_2 = G está favorecido al formarse enlace de hidrógeno entre H(O)-2 y O-1.

Estos resultados indican que los caminos de reacción a plantear presentan la influencia conjunta de lo descripto para **2** y **3,** tal como se muestra en el Esquema 5.5.

En la Figura 5.28 se muestran los diagramas de energía para los caminos de interconversión y desprotonación, mientras que la Figura 5.29 muestra el paso de sustitución. Al igual que el compuesto **3**, los caminos con χ_2 = G y χ_2 = T aparecen combinados. Por otro lado, los rotámeros con χ_3 = G y χ_3 = T tienen una conformación en común, al igual que ocurría en el compuesto **2**. Asimismo, las sillas $^4C_1$ con χ_3 = T y χ_4 = S se interconvierten a las sillas $^1C_4$ con χ_3 = G y χ_4 = G.

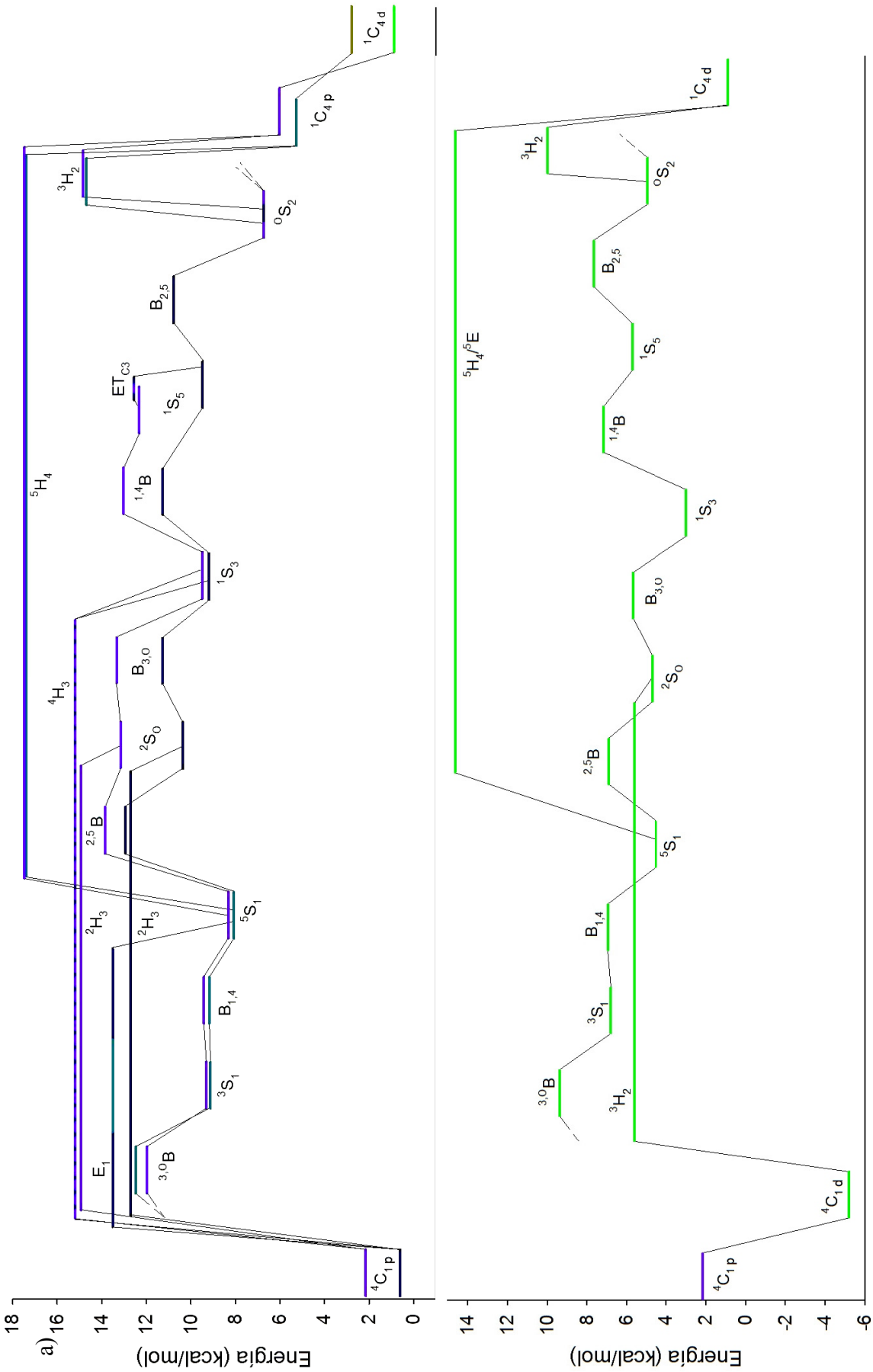


Esquema 5.5 Camino de reacción para el tratamiento alcalino de los rotámeros elegidos del compuesto **5**.

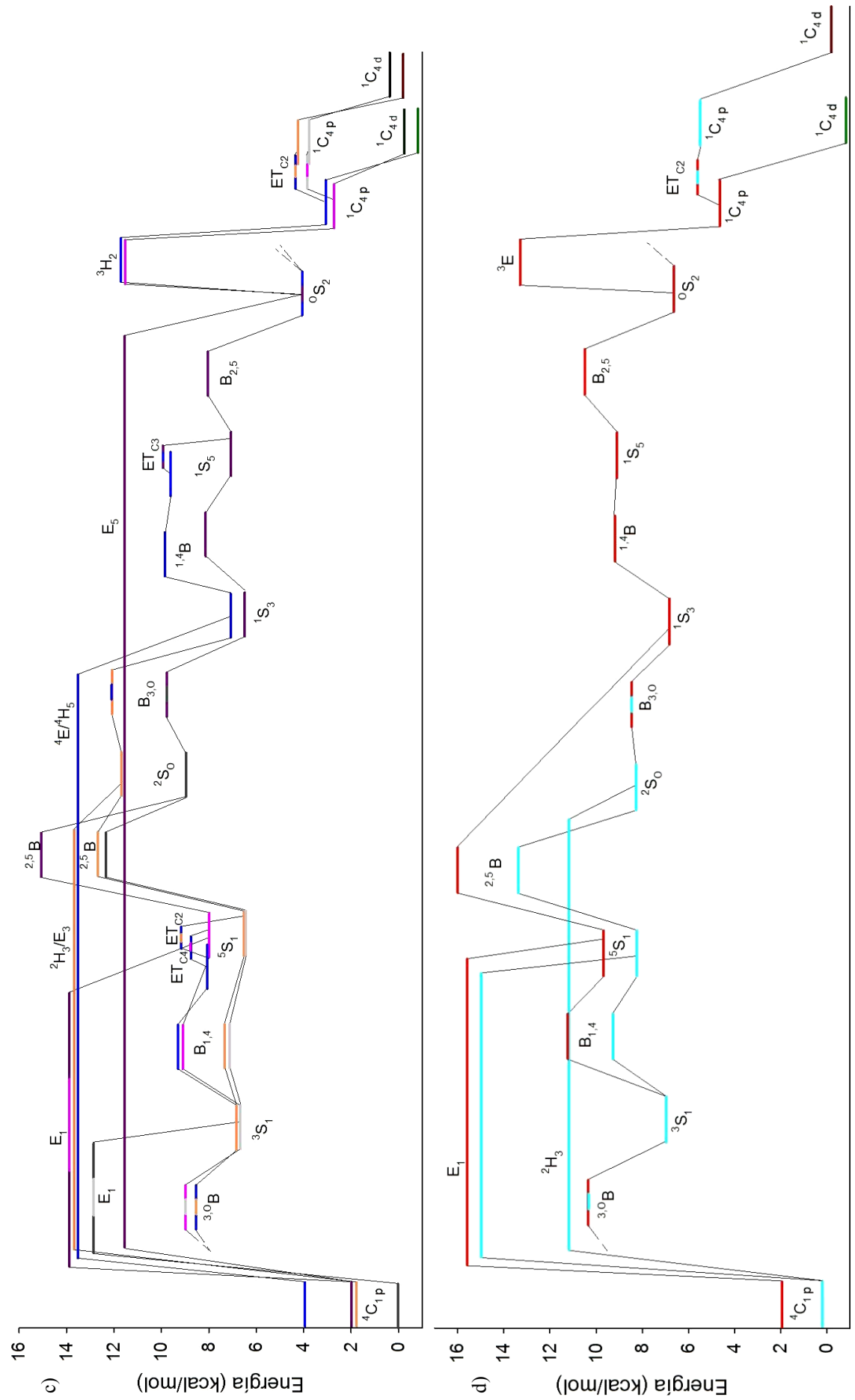
El análisis del camino de reacción mostró nuevamente que el paso limitante de la reacción es el de la sustitución nucleofílica. La energía de activación de dicho paso es similar a la observada para los compuestos ya estudiados.

En cuanto a los otros dos pasos de la reacción (la desprotonación y la interconversión) nuevamente no puede determinarse una preferencia hacia cual ocurre primero. Tanto para las estructuras protonadas como para las desprotonadas, la menor energía de activación para el pasaje de la silla $^4C_1$ al ecuador (el paso limitante de la interconversión de sillas) se da en los rotámeros con χ_2 = G y en ambos casos con un valor aproximado de 9 kcal/mol. Este resultado se asemeja a lo observado para el compuesto **3**. En cambio, en el compuesto **2** se observaba una preferencia por el camino de desprotonación seguido de interconversión. Esto estaría indicando que al estar simultáneamente el grupo oxhidrilo en C-2 y el metoxilo en C-4 prevalece el efecto del primero.

Por otro lado, se observa para las sillas $^4C_1$ que las estructuras desprotonadas son más estables que las protonadas, lo cual indica que OH en C-3 es más acídico que el agua, de manera análoga a lo observado para los compuestos **2** y **3**.



(Continúa en página siguiente)



(Continúa en página siguiente)

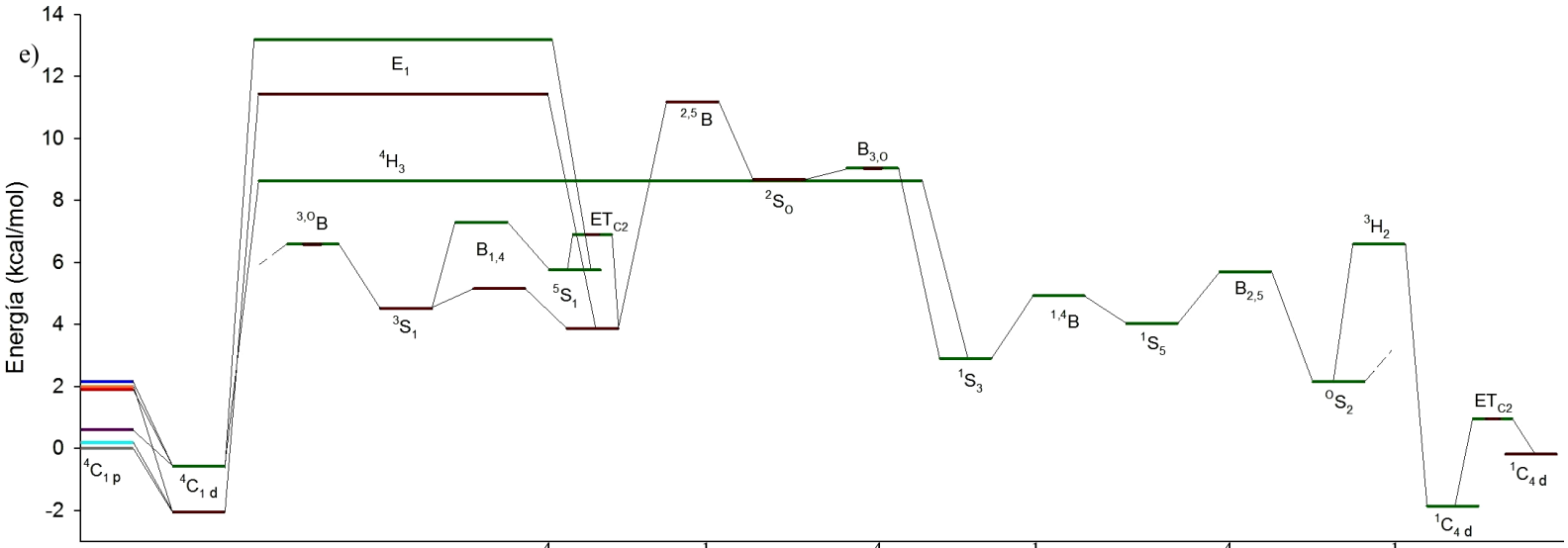


Figura 5.28 Caminos conformacionales de a) $^{4}C_{1\text{-}2g,3G,4g}\rightarrow{}^{1}C_{4\text{-}2g,3G,4g}$ y $^{4}C_{1\text{-}2g,3T,4S}\rightarrow{}^{1}C_{4\text{-}2g,3G,4G}$, b) $^{4}C_{1\text{-}2g,3d\ ,4g}\rightarrow{}^{1}C_{4\text{-}2g,3d,4g}$, c) $^{4}C_{1\text{-}2G,3G,4g}\rightarrow{}^{1}C_{4\text{-}2G,3G,4g}$, $^{4}C_{1\text{-}2T,3G,4g}\rightarrow{}^{1}C_{4\text{-}2T,3G,4g}$ y $^{4}C_{1\text{-}2G,3T,4S}\rightarrow{}^{1}C_{4\text{-}2G,3G,4G}$, $^{4}C_{1\text{-}2T,3T,4S}\rightarrow{}^{1}C_{4\text{-}2T,3G,4G}$, d) $^{4}C_{1\text{-}2G,3g,4g}\rightarrow{}^{1}C_{4\text{-}2G,3g,4g}$ y $^{4}C_{1\text{-}2T,3g,4g}\rightarrow{}^{1}C_{4\text{-}2T,3g,4g}$ y e) $^{4}C_{1\text{-}2G,3d,4g}\rightarrow{}^{1}C_{4\text{-}2G,3d,4g}$ y $^{4}C_{1\text{-}2T,3d,4g}\rightarrow{}^{1}C_{4\text{-}2T,3d,4g}$ con los respectivos pasos de desprotonación para **3.** Los colores indican los rotámeros analizados: 2g3G4g 2g3T4S 2g3G4G 2g3G4S 2g3E4S 2g3G4g + 2g3T4S 2g3d4g 2g3d4G 2G3G4g 2T3G4g 2E3G4S 2E3G4g 2G3G4G 2G3T4S 2G3G4S 2G3E4S 2G3E4g 2T3G4G 2T3T4S 2T3E4S 2E3G4S 2E3G4G 2E3T4S 2G3g4g 2T3g4g 2E3g4g 2G3d4g 2T3d4g 2E3d4g 2G3d4G 2T3d4G

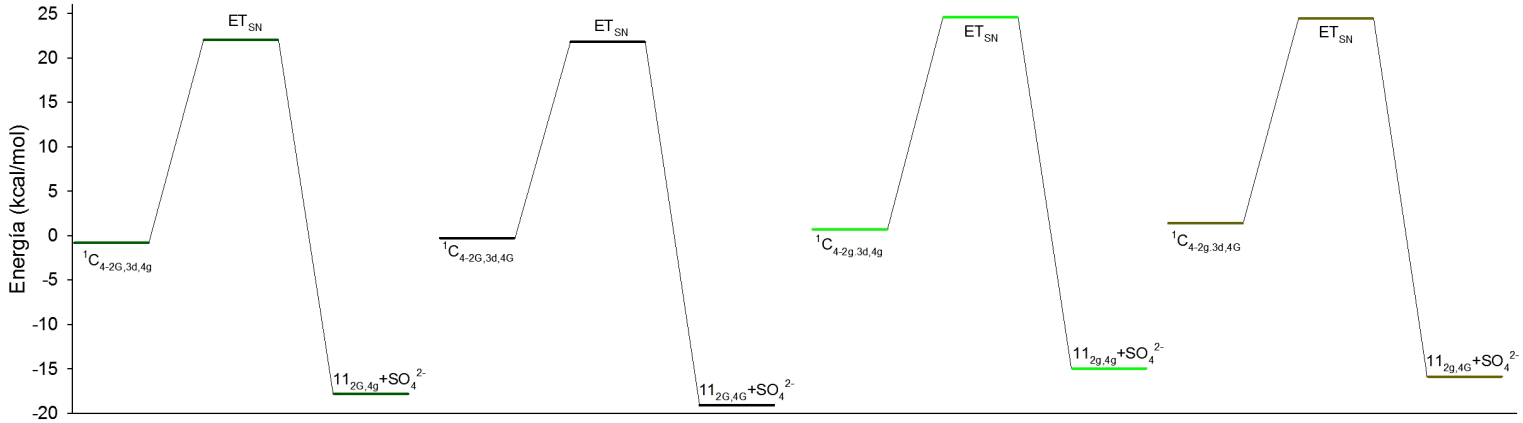


Figura 5.29 Diagrama de energía para los pasos de sustitución nucleofílica intramolecular de **5**.

5.3.5.1.1 Análisis del camino conformacional de interconversión con χ_2 = g

El camino de interconversión de las distintas estructuras con χ_2 = g está muy relacionado con lo observado para los rotámeros análogos de los compuestos **2** y **3**. Para las estructuras protonadas se observa una gran similitud con el camino de interconversión planteado para las sillas $^4C_{1\text{-}3G,4g}$ y $^4C_{1\text{-}3T,4S}$ del compuesto **2** (Sección 5.3.3.1). Las conformaciones más estables resultaron ser ambas sillas y el bote torcido $^OS_2$ (Fig. 5.28 a). Este último es una estructura en común entre los dos rotámeros con χ_2 = g y posee valores intermedios de χ_3 y χ_4. No se pudo hallar el bote $B_{2,5\text{-}2g,3G,4g}$ por lo que debe haber un paso de rotación del bote torcido $^1S_{5\text{-}2g,3G,4g}$ al $^1S_{5\text{-}2g,3T,4S}$ (Fig. 5.28 a), para el cual existe el correspondiente rotámero del bote $B_{2,5}$. Las conformaciones de máxima energía que permiten pasar de los polos al ecuador también son las mismas que las observadas para los mencionados rotámeros del compuesto **2**. Hay cuatro estados de transición para el pasaje de las sillas $^4C_1$ al ecuador: el sobre $E_{1\text{-}2g,3E,4S}$ y las semisillas $^2H_{3\text{-}2g,3G,4g}$, $^2H_{3\text{-}2g,3T,4S}$ y $^4H_{3\text{-}2g,3G,4g}$. Asimismo, hay dos estados de transición de cada rotámero para pasar del ecuador a las sillas $^1C_4$: las semisillas $^5H_4$ y $^3H_2$, esta última más probable (Fig. 5.28, a).

Sin embargo, hay algunas diferencias con respecto a lo observado para el camino de interconversión de las sillas $^4C_{1\text{-}3G,4g}$ y $^4C_{1\text{-}3T,4S}$ del compuesto **2**. Para **5**, se pudo encontrar el bote torcido ^2S_O y el bote $B_{3,O}$ con χ_3 = G y χ_4 = g. Asimismo, los botes $^{2,5}B$ se encuentran mucho más desplazados de sus valores de *puckering* ideal (Fig. 5.30). El análisis del camino conformacional del compuesto **3** con χ_2 = g y χ_3 = G muestra que el bote $^{2,5}B$ no existe como tal sino que es un híbrido $^2E/^2H_3/^{2,5}B$. Esto está sugiriendo que mientras el grupo metoxilo en C-4 favorece la formación de una estructura ideal del bote $^{2,5}B$ (ver Sección 5.3.3.1), el grupo oxhidrilo en C-2 con un valor de χ_2 = g produce la deformación del mismo hacia un sobre o una semisilla. Lo observado en este caso es un intermedio entre ambas tendencias.

En cuanto a los estados de transición que permiten el pasaje de la silla $^4C_1$ al ecuador, se observa para ambos rotámeros que las semisillas $^2H_3$ son las de menor energía, si bien la energía de $^4H_{3\text{-}2g,3G,4g}$ es cercana a la del correspondiente rotámero de la conformación $^2H_3$. Para el paso del ecuador a la silla $^1C_4$, el camino $^OS_2 \rightarrow [^3H_2]^{\ddagger} \rightarrow {}^1C_4$ es el de menor energía de activación en ambos rotámeros.

También el camino de interconversión de las sillas desprotonadas con χ_2 = g se ve influido por ambos sustituyentes. La silla $^4C_1$ resulta ser la conformación más estable seguida

de la silla $^{1}C_{4}$. Al comparar la estabilidad de los botes torcidos, el confórmero $^{1}S_{3}$ resulta el de menor energía (Fig. 5.28 b). Para plantear el camino de interconversión de las sillas del compuesto **5** desprotonado con χ_2 = g, existe un solo estado de transición que permite pasar de la silla $^{4}C_{1}$ al ecuador: la semisilla $^{2}H_{3}$. Sin embargo existen dos posibilidades para pasar del ecuador a la silla $^{1}C_{4}$, la conformación híbrida $^{5}H_{4}/^{5}E$ y la semisilla $^{3}H_{2}$. Esta última posee una energía considerablemente menor.

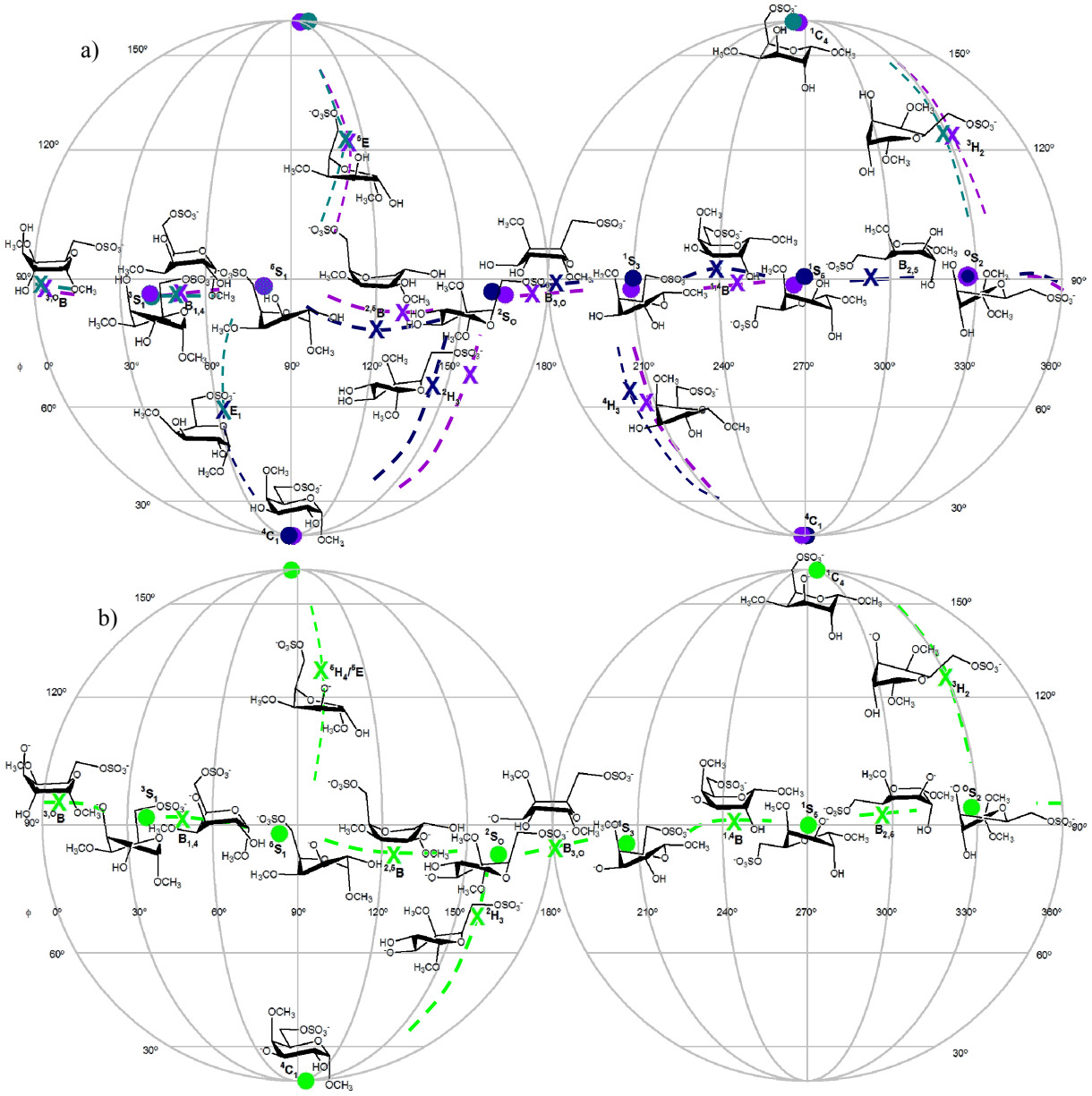


Figura 5.30 Representaciones geométricas de los parámetros de *puckering* de Cremer y Pople para a) $^{4}C_{1\text{-}2g,3G,4g} \rightarrow {}^{1}C_{4\text{-}2g,3G,4g}$ y $^{4}C_{1\text{-}2g,3T,4S} \rightarrow {}^{1}C_{4\text{-}2g,3G,4G}$ y b) $^{4}C_{1\text{-}2g,3d,g} \rightarrow {}^{1}C_{4\text{-}2g,3d,g}$. Los círculos indican los mínimos y las cruces los máximos. Los colores indican los rotámeros analizados: ● 2g3G4g ● 2g3T4S ● 2g3G4G ● 2g3G4g +2g3G4G ● 2g3E4g X 2g3E4S ● 2g3d4g ● 2g3d4G

Por último, se observa que el bote $^{2,5}B$ se desvía de la conformación ideal, principalmente en el valor de θ (Fig. 5.30). Esto también se puede justificar por los efectos

opuestos del grupo OMe en C-4 y del –OH en C-2 con χ_2 = g, como ya fue previamente discutido en esta Sección.

5.3.5.1.2 Análisis del camino conformacional de interconversión con χ_2 = G/T y χ_3 = g u O-3 desprotonado

Como ya se observó en el compuesto **3**, cuando χ_2 es G el camino de interconversión se combina con el de χ_2 = T. Dado que cuando el compuesto **5** tiene χ_3 = g o el O-3 desprotonado no hay interacción entre los sustituyentes en posición C-3 y C-4, los caminos de interconversión de las correspondientes sillas resultan muy similares a los análogos del compuesto **3**. Al igual que en dichos casos, se observa que algunas de las conformaciones del ecuador existen únicamente como uno de los dos posibles rotámeros. Sólo el bote torcido $^5S_1$ y el bote $B_{1,4}$ (y para las estructuras protonadas también el bote $^{2,5}B$) existen como los dos rotámeros de χ_2. Asimismo, los botes $B_{3,O}$ y $^{3,O}B$ poseen un valor intermedio de χ_2 (E). En todos los casos, las sillas resultan las conformaciones más estables. Al comparar los botes torcidos, el $^OS_2$ resulta ser el más estable (Fig. 5.28 d y e) ya que posee un enlace hidrógeno entre H(O)-2 y O-1 (ver Sección 5.3.4.1.1).

Es importante destacar que tanto en las estructuras protonadas como desprotonadas el bote $^{2,5}B$ no se encuentra desplazado en función del ángulo θ (Fig. 5.31). Esto se puede atribuir a que cuando χ_2 es G o T no se deforman tanto como cuando es g y por lo tanto el grupo metoxilo favorece la obtención de una conformación casi ideal.

Por último, en ambos casos se observa que el pasaje del ecuador a la silla $^1C_4$ ocurre únicamente a través un estado de transición ^3E (que para la estructura desprotonada es en realidad un híbrido $^3H_2/^3E$) el cual existe sólo para los rotámeros con χ_2 = G. El pasaje de la otra silla al ecuador es más variable. Para las estructuras protonadas con χ_2 = G hay un sólo el paso: $^4C_1 \rightarrow [E_1]^{\ddagger} \rightarrow {}^5S_1$. Cuando χ_2 es T se encontraron dos posibles estados de transición, el sobre E_1 y la semisilla $^2H_3$. Esta última resulta 4 kcal/mol más estable. Para las estructuras desprotonadas, se halló un sobre E_1 para todos los rotámeros y cuando χ_2 es G también se encontró una semisilla $^3H_4$. Esta última resulta más estable que el sobre $E_{1\text{-}2G,3d,4g}$.

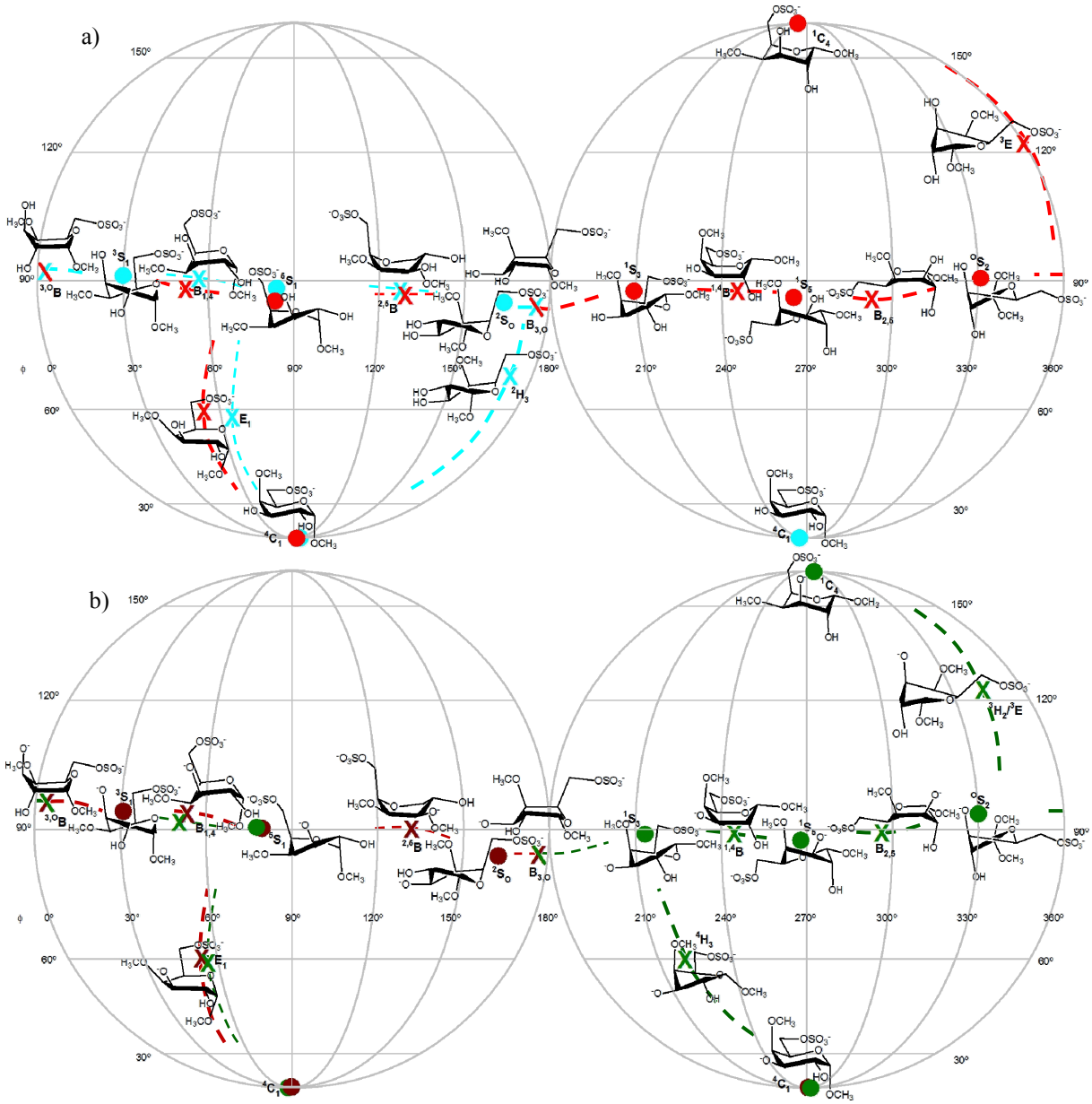


Figura 5.31 Representaciones geométricas de los parámetros de *puckering* de Cremer y Pople para a) $^{4}C_{1\text{-}2G,3g,4g}/^{4}C_{1\text{-}2T,3g,4g}\rightarrow{}^{1}C_{4\text{-}2G,3g,4g}$ y b) $^{4}C_{1\text{-}2G,3d,4g}/^{4}C_{1\text{-}2T,3d,4g}\rightarrow{}^{1}C_{4\text{-}2G,3d,4g}$. Los círculos indican los mínimos y las cruces los máximos. Los colores indican los rotámeros analizados: ● 2G3g4g ● 2T3g4g X 2E3g4g ● 2G3d4g ● 2T3d4g X 2E3d4g

5.3.5.1.3 Análisis del camino conformacional de interconversión con $\chi_2 = \chi_3 =$ G y/o T

El camino conformacional de interconversión de los rotámeros de las estructuras protonadas a estudiar en esta Sección poseen características que lo asemejan a los de las dos Secciones anteriores. Por un lado, las estructuras con χ_2 = G o T (e igual valor de χ_3) convergen en un mismo camino de interconversión como se vio tanto para el compuesto **3** como para el rotámero con χ_3 = g del compuesto **5**. De igual manera, se observa que las

conformaciones del ecuador existen como uno de los dos posibles rotámeros (χ_2 = G o T) salvo las mismas excepciones observadas en la Sección anterior. Por otro lado, los caminos de interconversión de las estructuras con χ_3 = G poseen una conformación única, que actúa de transición con aquellas con χ_3 = T: el bote torcido $^{O}S_{2\text{-}2G,3E,4g}$ (Fig. 5.28 c). Las demás conformaciones de la zona del ecuador pueden aparecer como ambos rotámeros de χ_3 y con el correspondiente valor de χ_2 según lo discutido en el párrafo anterior. La única excepción es el bote $B_{2,5}$ que no existe con χ_3 = G. Todo lo detallado muestra que hay cuatro rotámeros de la estructura protonada del compuesto **5** cuyos caminos de interconversión de sillas se entrecruzan.

En los cuatro rotámeros discutidos en esta Sección, la silla $^{4}C_{1}$ resulta el confórmero de menor energía. A su vez, el bote torcido más estable es el $^{O}S_{2\text{-}2G,3E,4g}$ al estar estabilizado por los enlaces hidrógeno entre H(O)-3 y O-4 y entre H(O)-2 y O-1. En ninguno de los casos se observan grandes desviaciones de las estructuras ideales (Fig. 5.32). Sólo los botes $B_{2,5}$ y $^{2,5}B$ con χ_2 = G, χ_3 = T y χ_4 = S se encuentran ligeramente desplazados en el valor del ángulo θ.

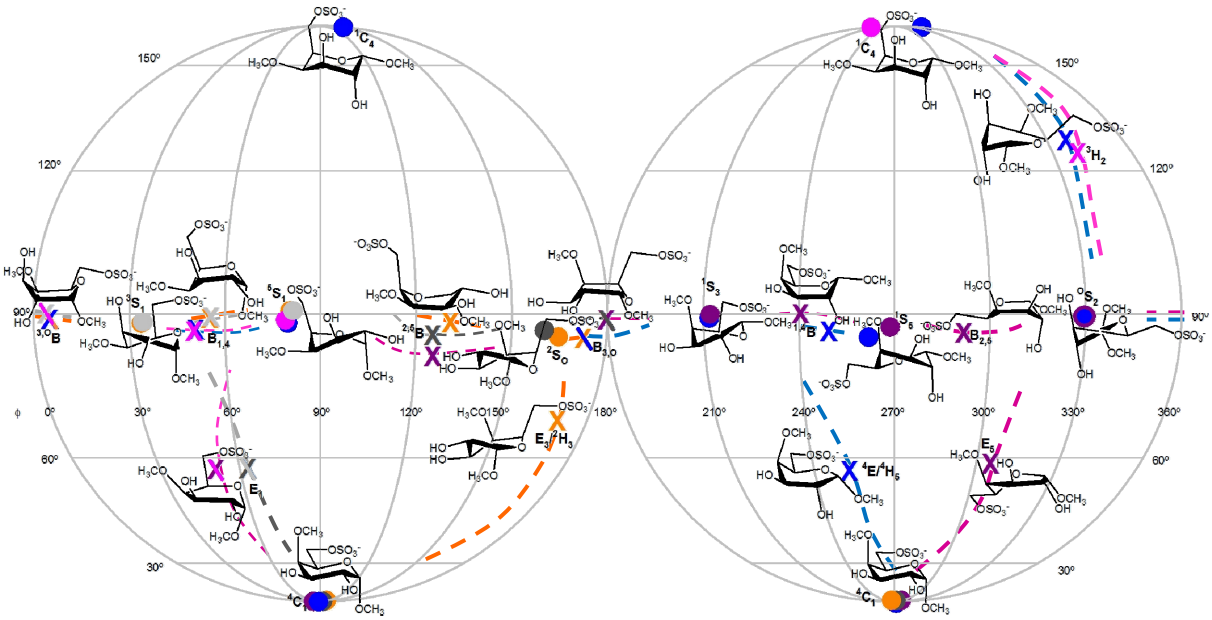


Figura 5.32 Representaciones geométricas de los parámetros de *puckering* de Cremer y Pople para $^{4}C_{1\text{-}2G,3G,4g}/^{4}C_{1\text{-}2T,3G,4g}\rightarrow{}^{1}C_{4\text{-}2G,3G,4g}$ y $^{4}C_{1\text{-}2G,3T,4S}/^{4}C_{1\text{-}2T,3T,4S}\rightarrow{}^{1}C_{4\text{-}2G,3G,4G}$. Los círculos indican los mínimos y las cruces los máximos. Los colores indican los rotámeros analizados: ● 2G3G4g ● 2T3G4g ● 2G3T4S ● 2G3G4G ● 2T3G4G ● 2T3T4S ● 2G3E4g X 2G3E4S X 2E3G4g X 2E3G4S X 2E3G4G X 2E3T4S X 2T3E4S

Como se mencionó anteriormente, el pasaje de la silla $^{1}C_{4}$ al ecuador solo existe para los dos rotámeros con χ_2 = G y ocurre a través de un estado de transición $^{3}H_{2}$ en ambos casos.

En cambio, se encontraron estados de transición que permiten el pasaje de la silla $^4C_1$ al ecuador para todos los rotámeros. Las sillas $^4C_{1\text{-}2T,3T,4S}$ y $^4C_{1\text{-}2G,3T,4S}$ se convierten en el correspondiente bote torcido $^5S_1$ mediante estados de transición E_1 (Fig. 5.28 c). Asimismo, para el último rotámero mencionado también existe un sobre E_5 que permite el paso de la silla $^4C_1$ al bote torcido $^OS_2$ y resulta de menor energía que E_1. Para los rotámeros con χ_3 = G se halló una estructura híbrida $E_3/^2H_3$ cuando χ_2 es T y $^4E/^4H_5$ cuando χ_2 es G.

5.3.5.2 Camino de reacción para el compuesto 6

El último compuesto estudiado es **6** (Fig. 5.7), donde el sustituyente en C-2 es el grupo éster sulfato y en C-4 es el metoxilo. Esto implica que el estudio del camino de reacción de este compuesto debería tener varios puntos en común con los estudiados para **2** y **4**. Se buscaron los rotámeros de menor energía de las sillas $^4C_1$ y $^1C_4$ protonadas y desprotonadas por MM3, los cuales luego se optimizaron por DFT. Aquellas sillas que cumplen con los criterios previamente mencionados se presentan en la Tabla 5.7. En esta se observa que todos los rotámeros de menor energía poseen χ_2 = S, ω = g y χ_6 = T, por lo que estos ángulos diedros se van a omitir del nombre.

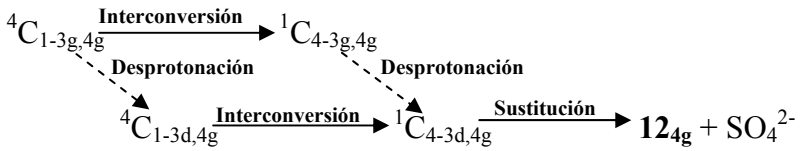
Tabla 5.7 Rotámeros seleccionados y sus valores de energías relativas para las sillas $^4C_1$ y $^1C_4$ de **6** luego de optimizar por M06-2X/6-31+G(d,p) con PCM en agua.

	Rotámeros[a]					**ΔE**[b] (kcal/mol)
	χ_2 (°)	χ_3 (°)	χ_4 (°)	ω (°)	χ_6 (°)	
$^4C_1$ C-3 protonado						
$^4C_{1\text{-}3g,4g}$	10	97	32	70	–173	0,00
$^1C_4$ C-3 protonado						
$^1C_{4\text{-}3G,4G}$	22	–68	–50	59	–144	0,00
$^1C_{4\text{-}3G,4g}$	21	–76	49	61	–165	0,44
$^1C_{4\text{-}3g,4g}$	22	43	56	62	–161	1,69
$^1C_{4\text{-}3g,4G}$	23	42	–51	61	–167	2,00
$^4C_1$ C-3 desprotonado						
$^4C_{1\text{-}3d,4g}$	–25		28	71	–172	0,00
$^1C_4$ C-3 desprotonado						
$^1C_{4\text{-}3d,4g}$	17		60	63	–164	0,00
$^1C_{4\text{-}3d,4G}$	17		–52	62	–168	0,56

[a] χ_1 = G en todos los rotámeros
[b] Se considera como cero para cada silla al confórmero de menor energía.

A su vez, no se observan sillas $^4C_1$ con χ_4 = G debido al impedimento estérico que generan los hidrógenos del OMe en C-4 y los sustituyentes en C-5 (ver Sección 5.3.3.1). Esto implica que solo existe una posible silla $^4C_1$ del compuesto desprotonado mientras que en teoría podría haber tres rotámeros con el O-3 protonado. La silla $^4C_{1\text{-}3g,4g}$ se encuentra muy estabilizada por el enlace hidrógeno generado entre el H(O)-3 y el O(S)-2 (ver Sección 5.3.4.2) mientras que la estructura análoga con χ_3 = G se encuentra muy desfavorecida por ausencia de dicho enlace. La estructura con χ_3 = T debería estar favorecida por el enlace hidrógeno entre el H(O)-3 y el O-4, sin embargo cuando se trató de optimizar el rotámero, no se halló la silla buscada sino que el ángulo χ_3 giró y la estructura se optimizó como la silla $^4C_{1\text{-}3g,4g}$. Es por ello que este rotámero es el único seleccionado. Para las sillas $^1C_4$ sí se puede hallar la estructura con χ_4 = G, así como también con χ_4 = g con energías similares. Esto implica que para las sillas de las estructuras desprotonadas hay dos rotámeros que cumplen con los criterios de selección establecidos. Asimismo, para las estructuras protonadas se observan cuatro rotámeros ya que las energías de las sillas $^1C_4$ con χ_3 = G y χ_3 = g también son similares.

En función de estos resultados, sólo se puede plantear el camino completo de reacción partiendo de la silla $^4C_{1\text{-}3g,4g}$ y obteniendo como producto **12$_{4g}$** (Esquema 5.6). El producto **12$_{4G}$** se podría obtener a partir de la silla $^1C_{4\text{-}3d,4G}$, sin embargo no existe ningún camino de interconversión-desprotonación (o viceversa) que permita obtenerla. De acuerdo a lo observado para el compuesto **2**, dicha silla $^1C_4$ se podría obtener de la silla $^4C_{1\text{-}3T,4S}$, la cual no se halló. Por esta razón se va a plantear que dicha silla $^1C_4$ se puede obtener por giro alrededor del diedro χ_4 partiendo del rotámero con χ_4 = g.



Esquema 5.6 Camino de reacción para el tratamiento alcalino de los rotámeros elegidos del compuesto **6**.

A partir del Esquema 5.6 se graficaron las energías de los pasos de interconversión-desprotonación y desprotonación-interconversión para la silla $^4C_{1\text{-}3g,4g}$ (Fig. 5.33). A su vez, se graficó el diagrama de energía para el paso de sustitución de las sillas $^1C_4$ desprotonadas con χ_4 = g y G (Fig. 5.34). Al comparar ambas figuras, se observa que nuevamente el paso de sustitución es el limitante de la reacción. La energía de activación del mismo no difiere significativamente de los valores obtenidos para los otros compuestos (ver luego).

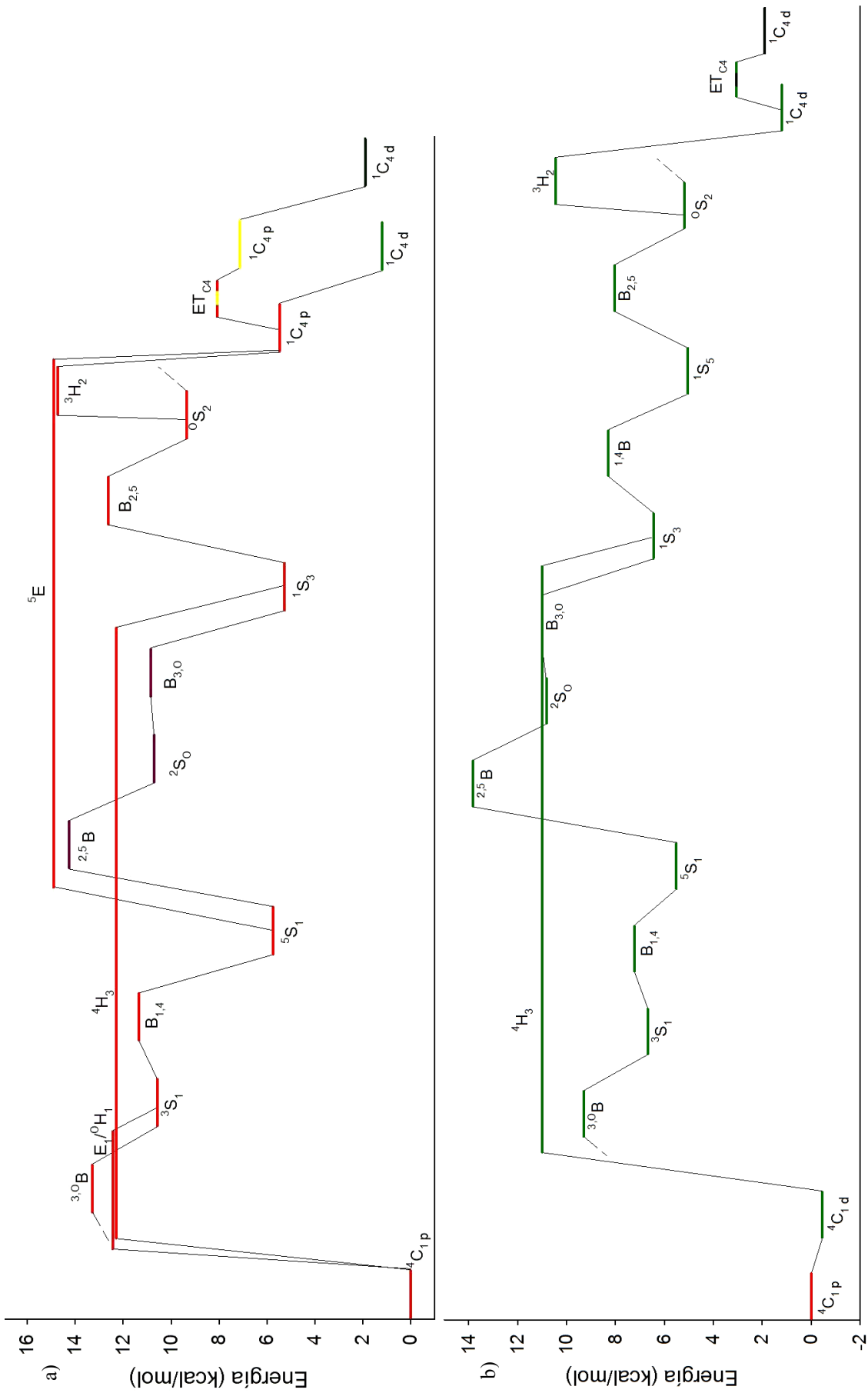


Figura 5.33 Caminos conformacionales de a) $^{4}C_{1\text{-}3g,4g} \rightarrow {}^{1}C_{4\text{-}3g,4g}/{}^{1}C_{4\text{-}3g,4G}$ y b) $^{4}C_{1\text{-}3d,4g} \rightarrow {}^{1}C_{4\text{-}3d,4g}/{}^{1}C_{4\text{-}3g,4G}$ con los respectivos pasos de desprotonación para **6**. Los colores indican los rotámeros analizados: 3g4g, 3e4g, 3g4G, 3d4g, 3d4G

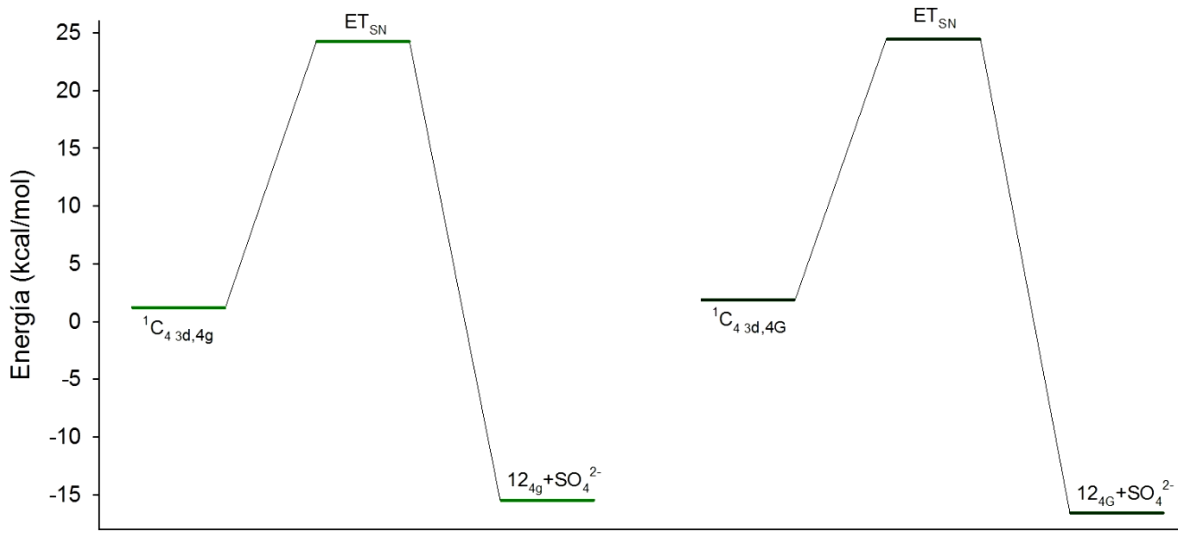


Figura 5.34 Diagrama de energía para los pasos de sustitución nucleofílica intramolecular de **6**.

El análisis de la Figura 5.33 muestra que las energías de activación para el paso limitante del camino de interconversión de las estructuras protonadas y desprotonadas son similares. En ambos casos el pasaje de la silla $^4C_1$ al ecuador ocurre con una energía de activación cercana a las 12 kcal/mol. Esto indica que, contrariamente a lo sugerido por Ciancia *et al.*,[2] la desprotonación del O-3 no parece favorecer la interconversión de sillas al haber un grupo sulfato en C-2. Sin embargo, a diferencia de lo observado para el compuesto **4**, el OH en C-3 de la silla $^4C_1$ protonada sí resulta levemente más acídico que el agua por lo que la desprotonación de la misma estaría favorecida.

5.3.5.2.1 Análisis del camino conformacional de interconversión

Se observa una gran semejanza de ambos caminos de interconversión de sillas con lo observado para el compuesto **4**, con la diferencia de que todas las conformaciones halladas en este caso poseen ω = g.

La silla $^4C_1$ resulta el confórmero más estable tanto para las estructuras protonadas como desprotonadas. Sin embargo, el orden de estabilidad de los demás mínimos no es el mismo. Las estructuras con el O-3 protonado pueden formar enlaces hidrógeno del H(O)-3 con el sulfato, lo cual disminuye la energía del confórmero. Por esta razón los botes torcidos $^1S_3$ y $^5S_1$ resultan muy estables (Fig. 5.33 a), incluso más que la silla $^1C_4$ (ver Sección 5.3.4.2.1). En cambio en las estructuras desprotonadas ambas sillas resultan más estables que los botes torcidos (Fig. 5.33 b).

A diferencia de lo observado para el compuesto **4**, para ambos caminos fue posible hallar un bote $^{2,5}B$ que represente la transición entre los botes torcidos $^5S_1$ y ^2S_O. De manera

análoga a lo discutido para las estructuras del compuesto **5** con χ_2 = g, la presencia del grupo metoxilo en C-4 contrarresta el efecto de alterar la forma ideal de algunos botes que había sido observada a causa del sustituyente en C-2. En particular, para las estructuras protonadas dicho bote posee χ_3 = e en vez de g. Esto mismo ocurre para ^2S_O y $B_{3,O}$ y es atribuible a la formación un enlace hidrógeno entre H(O)-3 y el sulfato en C-2.

El análisis de los parámetros de *puckering* muestra que la mayoría de las estructuras protonadas y desprotonadas poseen valores de ϕ y θ cercanos a los ideales (Fig. 5.35).

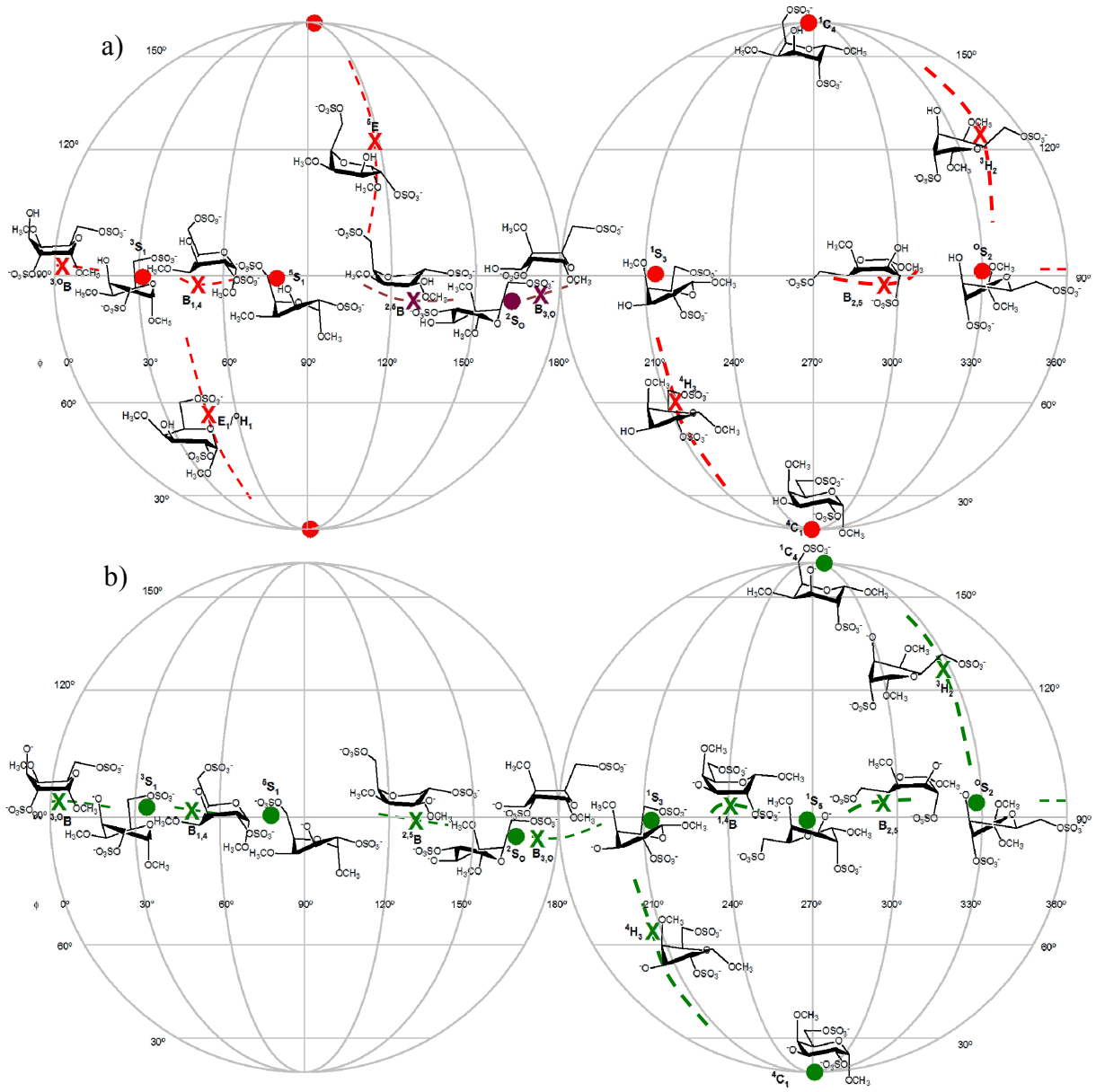


Figura 5.35 Representaciones geométricas de los parámetros de *puckering* de Cremer y Pople para a) $^4C_{1\text{-}3g,4g} \rightarrow {}^1C_{4\text{-}3g,4g}$ y g) $^4C_{1\text{-}3d,4g} \rightarrow {}^1C_{4\text{-}3d,4g}$. Los círculos indican los mínimos y las cruces los máximos. Los colores indican los rotámeros analizados: ● 3g4g ● 3e4g ● 3d4g

Por último, se puede observar que para el compuesto protonado existen dos estados de transición que permiten el pasaje de la silla $^4C_{1\text{-}3g,4g}$ al ecuador: el sobre E_1 y la semisilla $^4H_3$, ambos de energías similares (Fig. 5.33 a). Para la estructura desprotonada dicho pasaje sólo se puede ocurrir a través de la semisilla $^4H_3$ (Fig. 5.33 b). Para pasar del ecuador a la silla $^1C_4$ existe, para ambas estructuras, una semisilla $^3H_2$ y cuando O-3 se encuentra protonado también se halló un sobre ^5E. Este último estado de transición posee una mayor energía de activación que el $^3H_{2\text{-}3g,4g}$.

5.3.6 Comparación de las energías de activación y de reacción del paso de sustitución

Como se observó en las Secciones anteriores, el paso de sustitución nucleofílica es el limitante de la velocidad de reacción de tratamiento alcalino para los seis compuestos estudiados. En la Tabla 5.8 se resumen las energías de activación y de reacción calculadas para los rotámeros estudiados de cada compuesto.

Tabla 5.8 Energías de activación ($\Delta E^{\ddagger}$) y de reacción (ΔE) para el paso de sustitución nucleofílica de los compuestos **1-6** a **7-12** calculados por M06-2X/6-311+G(d,p) con PCM en agua.

	Compuesto	$\Delta E^{\ddagger}$ (kcal/mol)	ΔE^{a} (kcal/mol)
1	$^1C_{4\text{-}3d} \rightarrow$ **7**	22,41	-19,18
2	$^1C_{4\text{-}3d,4g} \rightarrow$ **8_{4g}**	22,45	-17,97
	$^1C_{4\text{-}3d,4G} \rightarrow$ **8_{4G}**	21,85	-20,77
3	$^1C_{4\text{-}2g,3d} \rightarrow$ **9_{2g}**	23,73	-15,64
	$^1C_{4\text{-}2G,3d} \rightarrow$ **9_{2G}**	22,82	-16,98
4	$^1C_{4\text{-}3d} \rightarrow$ **10**	23,29	-16,83
5	$^1C_{4\text{-}2g,3d,4g} \rightarrow$ **$11_{2g,4g}$**	23,70	-15,81
	$^1C_{4\text{-}2g,3d,4G} \rightarrow$ **$11_{2g,4G}$**	23,03	-17,27
	$^1C_{4\text{-}2G,3d,4g} \rightarrow$ **$11_{2G,4g}$**	22,82	-16,98
	$^1C_{4\text{-}2G,3d,4G} \rightarrow$ **$11_{2G,4G}$**	22,23	-18,82
6	$^1C_{4\text{-}3d,4g} \rightarrow$ **12_{4g}**	23,10	-16,67
	$^1C_{4\text{-}3d,4G} \rightarrow$ **12_{4G}**	22,61	-18,45

[a] Se toma en cuenta la energía del anión sulfato como producto para el cálculo.

Se puede observar que todas las energías de activación obtenidas, independientemente del compuesto del que provienen, son superiores a las 20 kcal/mol (22-24 kcal/mol) y al menos 10 kcal/mol superiores que aquellas correspondientes al paso limitante de la interconversión conformacional.

En general, en los compuestos con más de un rotámero posible la menor energía de activación, así como los productos más estables, se obtienen para las estructuras con χ_2 y/o χ_4 = G. La diferencia entre las energías de activación de los distintos compuestos o entre rotámeros es inferior a las 2 kcal/mol.

Estos resultados justifican considerar que no existen diferencias significativas en las energías de activación del paso de sustitución para los distintos compuestos.

Al realizar la comparación con los valores de ΔE para el paso de sustitución, se observa que el compuesto **2** no sólo posee la menor energía de activación para este paso sino que genera el producto más estable. Inversamente, el compuesto **4** posee la mayor energía de activación y genera el producto menos estable. Esto parecería indicar que la presencia de un grupo metoxilo en C-4 favorece cinética y termodinámicamente este paso cuando no hay sustitución en C-2, mientras que un grupo sulfato en C-2 lo desfavorece cuando no hay sustitución en C-4. Sin embargo, es importante aclarar que esta tendencia es muy sutil dado que las diferencia de valores (tanto de $\Delta E^{\ddagger}$ como de ΔE) son muy pequeñas.

5.4 Conclusiones

El estudio por modelado molecular de la reacción de tratamiento alcalino para los derivados **1-6** del metil α-D-galactopiranósido 6-sulfato resultó ser complejo. Esto se debe a la gran cantidad de rotámeros de energías similares posibles para las sillas $^4C_1$ de cada derivado, así como el hecho de que la desprotonación del O-3 puede ocurrir antes o después de la interconversión de sillas, aunque todas estas variantes después convergen en un número menor de secuencias posibles de sustitución nucleofílica intramolecular.

La cinética de este paso de sustitución resultó ser la determinante de la reacción. El paso no parece verse afectado por la sustitución en C-2 y C-4 del azúcar ya que la energía de activación del mismo no varía significativamente entre los distintos compuestos estudiados.

Los caminos de los distintos pasos de desprotonación e interconversión de sillas también aportaron resultados interesantes al estudio, en particular por las diferencias observadas entre los distintos rotámeros. Los casos más complejos resultaron los compuestos **5** y **6** por el mayor número de sustituyentes y por ser los que más asemejan a las moléculas reales presentes en los carragenanos. En la mayoría de los casos, se observó que la estabilidad de los distintos rotámeros de una misma conformación está asociada con la posibilidad de formar enlaces hidrógeno. Es por ello que los compuestos con –OH en C-2 y –OMe en C-4 poseen la mayor cantidad de rotámeros para la silla $^4C_1$ ya que H(O)-2 puede formar enlaces de hidrógeno con O-1 u O-3 y H(O)-3 con O-2 u O-4 obteniéndose así una mayor variedad de rotámeros estables. Por otro lado, la presencia del éster sulfato en C-2 disminuye la cantidad de rotámeros ya que el azufre del sulfato toma una conformación eclipsada con el H-2 y a su vez favorece la conformación gauche positiva para χ_3 (cuando O-3 está protonado) por formación de enlace de hidrógeno.

En general, los distintos caminos conformacionales planteados para cada compuesto y entre ellos poseen diferencias y similitudes asociadas en gran medida a los valores de los ángulos χ_2, χ_3 y χ_4 (si existen) y a la posibilidad de generarse enlaces de hidrógeno para cada conformación. Se encontraron estados de transición que permiten el pasaje de los polos (sillas) al ecuador (botes torcidos y botes) para todos los compuestos y rotámeros salvo para aquellos con el OH en C-2 anti al H-2. Por otro lado, se pudieron hallar todas las conformaciones de la zona de botes/botes torcidos en la mayoría de los casos estudiados. Para las estructuras protonadas de los compuestos **1**, **4** y **6** no se pudo hallar el bote torcido $^1S_5$ y uno de los dos botes vecinos. Asimismo, todos aquellos compuestos con un ángulo χ_2 T

o G no poseen todas las conformaciones posibles, pero como ambos caminos se entremezclan, la combinación de ambos las tiene. Los compuestos con OMe en C-4, χ_3 = G y χ_4 = g no poseen el $B_{2,5}$ con esos valores de ángulos diedros y poseen un bote torcido $^{O}S_2$ que es una estructura en común con los rotámeros con χ_3 = T y χ_4 = S.

Las distintas conformaciones obtenidas para cada compuesto poseen valores de *puckering* cercanos a la idealidad. La excepción es el $^{2,5}B$, el cual suele poseer un valor de θ marcadamente inferior a los 90°. Asimismo esta estructura suele ser el máximo absoluto para muchos caminos conformacionales. Del estudio realizado para los distintos compuestos se vio que la presencia de metoxilo en C-4 favorece la estructura ideal del bote. Al contrario, cuando en C-2 hay grupo OH con χ_2 = g o un grupo sulfato, el bote se deforma al punto de ser más asimilable a una semisilla o a un sobre que a un bote. En estos casos incluso se observa que el estado de transición no une más a dos puntos del ecuador sino a la silla $^4C_1$ y uno de los botes torcidos.

Por último, se observó que la energía de activación del paso limitante de la interconversión para las estructuras protonadas y desprotonadas es similar. En general, se encontraron energías similares para cualquiera de las dos secuencias (inversión-desprotonación y desprotonación-inversión). Sin embargo, el H(O)-3 de las sillas $^4C_1$ fue más acídico que el agua, lo que sugiere que la desprotonación del mismo se encuentra termodinámicamente favorecida. Estos resultados estarían sugiriendo que si bien el camino de desprotonación-inversión podría estar favorecido, esto no se debe a que la desprotonación del O-3 sea la fuerza impulsora para la interconversión como fue sugerido por Ciancia *et al.*[2] ya que la presencia de carga negativa en C-2 (como ocurre en **6**) no aparenta favorecer la interconversión de las estructuras desprotonadas.

Bibliografía

1. Hegedüs, C., Madarás, J., Guyás, H., Szöllösy, A. & Bakos, J. (2001). *Tetrahedron: Asymmetry, 12*, 2867–2873.

2. Ciancia, M., Noseda, M. D., Matulewicz, M. C. & Cerezo, A. S. (1993). *Carbohydrate Polymers*, *20*, 95–98.

3. Viana, A. G., Noseda, M. D., Duarte, M. E. R. & Cerezo, A. S. (2004). *Carbohydrate Polymers*, *58*, 455–460.

4. Noseda, M. D. & Cerezo, A. S. (1995). *Carbohydrate Polymers*, *26*, 1–3.

5. Noseda, M. D., Viana, A. G., Duarte, M. E. R. & Cerezo, A. S. (2000). *Carbohydrate Research*, 42, 301–305.

6. Knutsen, S. H., Myslabodski, D. E., Larsen, B. & Usov, A. I. (1994). *Botanica Marina*, *37*, 163–169.

7. Ramachandran, K. I., Deepa, G. & Namboori, K. (2010). *Computational Chemistry and Molecular Modeling*, Springer, Berlin, Alemania. 341pp.

8. Sameera, W. M. C. & Pantazis, D. A. (2012). *Journal of Chemical Theory and Computation,* 8, 2630–2645.

9. Colombo, M. I., Rúveda, E. A. & Stortz, C. A. (2011). *Organic & Biomolecular Chemistry, 9*, 3020–3025.

10. Seshadri, V. & Westmoreland, P. R. (2012). *Journal of Physical Chemistry A, 116*, 11997−12013.

11. Appell, M., Strati, G. L., Willett, J. L. & Momany, F. A. (2004). *Carbohydrate Research, 339*, 537–551.

12. Momany, F. A., Appell, M., Willett, J. L., Schnupf, U. & Bosma, W. B. (2006). *Carbohydrate Research*, *341*, 525–537.

13. Schnupf, U., Willett, J. L., Bosma, W. B. & Momany, F. A. (2007). *Carbohydrate Research*, *342*, 2270–2285.

14. French, A. D., Johnson, G. P, Cramer, C. J. & Csonka, G. I. (2012). *Carbohydrate Research*, *350*, 68–76.

15. Mayes, H. B., Broadbelt, L. J. & Beckham, G. T. (2013). *Journal of the American Chemical Society, 136*, 1008−1022.

16. Csonka, G., French, A. D., Johnson, G. P. & Stortz, C. A. (2009). *Journal of Chemical Theory and Computation,* 5, 679–692.

17. Csonka, G. I. (2002). *Journal of Molecular Structure (THEOCHEM), 584*, 1–4.

18. Grimme, S. (2006). *Angewandte Chemie, International Edition, 45*, 4460–4464.

19. Zhao, Y. & Truhlar, D. G (2008). *Theorical Chemistry Accounts, 120*, 215–241.

20. Dowd, M. K., French, A. D. & Reilly, P. J. (1994). *Carbohydrate Research, 264*, 1–19.

21. Stortz, C. A. & Cerezo, A. S. (2000). *Journal of Carbohydrate Chemistry, 19*, 1115–1130.

22. Guvench, O., Mallajosyula, S. S., Raman, E. P., Hatcher, E., Vanommeslaeghe, K., Foster, T. J., Jamison, F. W. & MacKerell, A. D. (2011). *Journal of Chemical Theory and Computation*, *7*, 3162−3180.

23. Spiwok, V., Králová, B. & Tvaroška, I. (2010). *Carbohydrate Research*, *345*, 530–537.

24. Hansen, H. S. & Hunenberger, P. H. (2011). *Journal of Computional Chemistry*, *32*, 998–1032.

25. Plazinski, W. & Drach, M. (2014). *RSC Advances*, *4*, 25028–25039.

26. Leach, A. R. (1996). *Molecular Modelling. Principles and Applications.* Addison Wesley Longman Limited, Harlow, England. 595pp.

27. Stortz, C. A. (2010). *Journal of Physical Organic Chemistry, 23*, 1173–1186.

28. Cremer, J. A. & Pople, J. (1975). *Journal of the American Chemical Society, 97*, 1354–1358.

29. French, A. D. & Brady, J. W. (1989). *ACS Symposium Series, 430*, 1–19.

30. Joshi, N. V. & Rao, V. S. R. (1979). *Biopolymers, 18*, 2993–3000.

31. Biarnés, X., Ardèvol, A., Planas, A., Rovira, C., Laio, A. & Parrinello, M. (2007). *Journal of the American Chemical Society*, *129*, 10686–10693.

32. Barducci, A., Bonomi, M. & Parrinello, M. (2011). *WIREs Computational Molecular Science*, *1*, 826–843.

33. Navarro, D. A. & Stortz, C. A. (2005). *Carbohydrate Research, 34*, 2030–2038.

CAPÍTULO 6

Materiales y métodos

6.1 Consideraciones generales

Las algas fueron molidas en un molinillo de paletas General Electric 5KH38PG 16 5E.

Las extracciones fueron realizadas con agitadores mecánicos modelo Glas-Col (Terre Haute, Estados Unidos) con paletas de acero inoxidable y sobre una manta calefactora Barnstead Electrothermal modelo EM 5000/C. Los fraccionamientos con KCl se realizaron con agitadores magnéticos FAC AM20, Thermolyne Nuova II, Velp scientifica ARE y Cole-Parmer modelo 4658.

Para las centrifugaciones se utilizaron las centrífugas Sargent S-15700 trabajando a 3400 rpm para volúmenes pequeños, International Centrifuge A7213X-1 y P7115 a 2000 rpm y Sigma Laboratory Centrifuge 4K15C a 9000-10000 rpm para volúmenes intermedios y grandes.

Las evaporaciones se realizaron en un evaporador rotatorio Büchi RE 111 a presión reducida, con temperaturas del baño de agua inferiores a 40 ºC.

Las muestras en solución acuosa se llevaron a sequedad en liofolizadores Virtis 10-324 y Rificor L-T12, 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 bolsas 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. Las diálisis se efectuaron 48 h en sistema abierto contra agua corriente y 24-48 h más en sistema cerrado contra agua destilada, salvo que se aclare de otro modo.

Las determinaciones colorimétricas se llevaron a cabo en un espectrofotómetro Spectronic 20D (Milton Roy Company) empleando celdas cilíndricas de 1 cm de recorrido óptico.

En este trabajo de Tesis se utilizaron los siguientes polisacáridos comerciales: ι-carragenano (Sigma, Tipo V), agarosa (Britania) y almidón (BDH). Todos los reactivos y solventes utilizados fueron de calidad analítica.

6.2 Extracción y fraccionamiento de los polisacáridos de *Hypnea musciformis*

6.2.1 Obtención del alga

Las muestras del alga *Hypnea musciformis* (Wulfen) Lamoroux Foslie (donadas por Soriano S.A., Gaiman, Argentina) fueron recolectadas cerca de la ciudad de Natal, en el estado de Rio Grande do Norte, Brasil (coordenadas: 5°37'52'' S, 35°13'03'' W).

6.2.2 Extracción de los polisacáridos de *Hypnea musciformis*

En forma previa a la extracción, las algas se observaron al microscopio para confirmar que no estaban contaminadas con otras especies y luego se molieron de modo que atravesaran una malla 40.

EXTRACCIÓN EN FRÍO

Se suspendieron 50 g del alga molida en 2,6 l de agua destilada y se realizó la extracción a temperatura ambiente por 24 h utilizando agitación mecánica. Se separó el residuo sólido **R1** por centrifugación. A éste se lo lavó con 200 ml de agua y se volvió a centrifugar. El residuo **R1** se liofilizó y el agua de lavado se juntó con el sobrenadante separado. El extracto obtenido se concentró hasta un volumen final de 1,5 l y luego fue tratado con 3,5 volúmenes de isopropanol a fin de precipitar los polisacáridos. Luego de dejar reposar una noche en la heladera, se separó el precipitado del líquido hidroalcohólico por centrifugación. Se lavó el precipitado con 100 ml de una mezcla 1:3,5 agua / isopropanol y se volvió a centrifugar. Se disolvió el precipitado en agua, se eliminaron los restos de isopropanol por evaporación a presión reducida y se lo liofilizó obteniéndose el extracto **F**. A la fracción soluble también se le eliminó el isopropanol a presión reducida y luego se liofilizó a fin de obtener la fracción **FS**.

EXTRACCIÓN EN CALIENTE

Se extrajeron 38 g de residuo liofilizado **R1** con 2,6 l de agua destilada a 90 °C por 8 h. Análogamente a lo realizado en la extracción en frío, se separó el nuevo residuo **R2** por centrifugación y se lo lavó con 200 ml de agua, para luego liofilizarlo. El sobrenadante junto con las aguas de lavado se evaporaron a presión reducida hasta un volumen final de 1,3 l. Luego se le agregaron 3,5 volúmenes de isopropanol y se dejó reposar una noche. A continuación, se separó el precipitado del sobrenadante por centrifugación y se lavó el precipitado con 100 ml de una mezcla de agua / isopropanol 1:3,5. El precipitado fue disuelto

en agua. La solución obtenida se sometió a evaporación rotatoria a fin de eliminar los restos de isopropanol y luego se liofilizó a fin de dar lugar al extracto **C**. De igual manera al sobrenadante se le eliminó el exceso de isopropanol por evaporación a presión reducida y luego se lo liofilizó dando así la fracción **CS**.

6.2.3 Fraccionamiento de los extractos de *Hypnea musciformis*

Los extractos fueron sometidos a un fraccionamiento por precipitación selectiva con KCl. Para ello se disolvieron 2,44 g del extracto **F** en 1 l de agua destilada y se agitaron por al menos 6 h con agitación magnética. Luego se separó el insoluble por centrifugación. Se le agregó KCl sólido al sobrenadante de manera de obtener una solución de concentración final de 0,125M. Se dejó la solución durante al menos 6 h con agitación magnética y posteriormente se aisló el precipitado por centrifugación. Se repitió el mismo procedimiento pasando por concentraciones de KCl iguales a 0,25M, 0,5M, 0,8M, 1M, 1,25M y 2M. Cada vez que apareció un precipitado luego de la centrifugación, éste se disolvió en agua, se dializó utilizando bolsas con corte de PM 12000 y se liofilizó. El mismo procedimiento se llevó a cabo con el remanente soluble en 2M. De esta manera se obtuvieron las fracciones: **F-0**, **F-0,125**, **F-0,8-1** y **F-2S**, donde los números indican la concentración o el rango de concentraciones en las que precipitó el polisacárido y **F-2S** es el remanente soluble en 2M de KCl.

Se realizó el mismo procedimiento para **C**, obteniéndose las fracciones **C-0,125**, **C-1-1,25** y **C-2S**.

6.2.4 Fraccionamiento de C-2S y F-2S

El subfraccionamiento de las fracciones solubles en 2M de KCl se realizó por cromatografía de intercambio iónico sobre mezclas de DEAE-Sephadex A-50 y Sephadex G-100, de manera análoga a la descripta por Stortz *et al.*[1] La cromatografía en columna se realizó a escala analítica, con el fin de encontrar la proporción adecuada de geles, y posteriormente a escala preparativa con 1,2 g DEAE-Sephadex A-50 y 1 g de Sephadex G-100. Para generar la mezcla de geles, ambos sólidos secos se suspendieron en el primer solvente de corrida (NaCl 0,1 ó 0,2M) y se dejaron hinchar 3 h a 90 °C. Luego se decantó y se eliminó el exceso de solvente. A continuación se desgasificó el gel y se rellenó la columna cuidando que no se introduzcan burbujas de aire. Se lavó la columna con abundante solvente hasta que 0,5 ml del solvente eluido den resultado negativo frente a la reacción de fenol-ácido sulfúrico (sección 6.3.1).

Para la columna analítica se utilizaron 15 mg de muestra en una columna de 12 × 0,9 cm. Para el fraccionamiento a escala preparativa se utilizaron entre 300 y 500 mg en una columna de 45 × 2,5 cm.

Una vez sembrada la muestra, se eluyó con soluciones de NaCl de concentraciones crecientes desde 0,1 hasta 4M en escala analítica y de 0,2 hasta 3M en la columna preparativa. En este último caso se recogieron alícuotas de 7 ml mientras que en la columna analítica las alícuotas fueron de 2,2 ml. Para cada una de éstas se determinó la cantidad de hidratos de carbono por el método de fenol-ácido sulfúrico.[2] Las fracciones obtenidas de la columna fueron dializadas utilizando bolsas con corte de PM 6000-8000 y luego liofilizadas.

6.3 Métodos generales

6.3.1 Determinación de los hidratos de carbono totales

Se empleó el método colorimétrico del fenol-ácido sulfúrico según la técnica descripta por Dubois *et al*.[2]

Reactivos

- Solución de fenol al 5 % p/v. Esta solución es estable durante varios meses conservándola a temperatura ambiente.
- Acido 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 (× 162/180).

6.3.2 Determinación de ácidos urónicos

Se realizó aplicando la modificación de Filisetti-Cozzi y Carpita[3] al método originalmente desarrollado por Blumenkrantz y Asboe-Hansen.[4]

Reactivos

- Solución A: ácido sulfámico / sulfamato de potasio 4M (pH 1,6).
- Solución B: tetraborato de sodio 0,0125M 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 ºC durante 30 min. Luego se colocaron sobre hielo 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 como estándar una solución de ácido galacturónico 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 galacturónico.[5]

6.3.3 Determinación de proteínas totales

Se llevó a cabo siguiendo la técnica descripta por Lowry *et al*.[6]

Reactivos

- Solución A: solución de carbonato de sodio al 2 % en hidróxido de sodio 0,1M.
- Solución B: sulfato cúprico pentahidratado al 0,5 % en solución de tartrato de sodio y potasio al 1 %. Se preparan las soluciones de sulfato cúprico y tartrato de sodio y potasio por separado al doble de la concentración indicada y luego se mezcla igual volumen de ambas.

- Solución C: se mezclan 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: se diluye al medio el reactivo comercial de Folin-Ciocalteu. 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.

6.3.4 Determinación colorimétrica de 3,6-anhidrogalactosa

Se llevó a cabo por el método colorimétrico de resorcinol-ácido clorhídrico según la técnica descripta por Yaphe y Arsenault.[7]

Reactivos

- Solución A: 1,1-dietoxietano (acetal) 0,37 mg/ml. Esta se preparó a partir de una dilución 1:25 de una solución madre de 918 mg (1,1 ml) de acetal en 100 ml de agua destilada. La solución A es estable por un mes.
- Solución B: resorcinol 1,5 mg/ml. Se preparó por disolución de 15 mg de resorcinol en 10 ml de agua destilada. La solución es estable por una semana.
- Solución C: reactivo resorcinol-ácido clorhídrico. Se obtiene mezclando 1 ml de solución A y 9 ml de solución B en 100 ml de HCl concentrado.

Procedimiento

En un tubo de ensayo contenido en un baño de hielo se colocaron 0,6 ml de una solución que contenga entre 0,5 y 40 µg/ml de 3,6-anhidrogalactosa o su equivalente en el polisacárido. Luego se agregaron 3 ml de solución C y se mezcló. Se taparon los tubos con una bolita de vidrio y se mantuvo en baño de hielo entre 3 y 30 min. Se colocó en un baño de agua a 20 °C por 4 min y luego se calentó a 80 °C durante 10 min. Se enfrió por 90 s en baño

de hielo y se midió la absorción del color desarrollada a 555 nm dentro de los primeros 15 min.

La cantidad de 3,6-anhidrogalactosa se determinó por referencia a una curva de D-fructosa.[8] La conversión de la curva de calibración expresada en masa de fructosa a masa de 3,6-anhidrogalactosa se hizo considerando la siguiente ecuación: $m_{3,6-AnGal} = m_{Fru} \times 0{,}92$.[9]

6.3.5 Determinación de sulfato

Se utilizó el método turbidimétrico de Dodgson y Price[10] 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 ºC. Esta mantuvo en heladera durante al menos 6 h, luego se disolvieron en la misma 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 ºC.
- Solución de ácido tricloroacético (TCA) 3 % p/v. Esta solución es estable a 4 ºC.

Procedimiento

Los polisacáridos se disolvieron en HCl 1M y se hidrolizaron a 110 ºC durante 4,5 h. Las cantidades disueltas se eligieron en función de obtener una solución 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 1M. A cada una de estas soluciones 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. El blanco se realizó en idénticas condiciones utilizando 400 µl de HCl 1M. Como solución patrón se utilizó una solución de sulfato de sodio anhidro en HCl 1M 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, pesado exactamente) se disolvieron en ácido trifluoroacético (TFA) 2M (1 ml) y luego se hidrolizaron en vial cerrado a 120 ºC durante 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 Na_2CO_3 1,8mM y $NaHCO_3$ 1,7mM, con un flujo de 2 ml/min. Este trabajo fue realizado por personal del INQUIMAE.

6.3.6 Determinación del peso molecular

La determinación del peso molecular de los polisacáridos se realizó por cromatografía de permeación en geles en un sistema de cromatografía líquida de alta resolución (GPC-HPLC). Se utilizó una bomba Shimadzu LC-20AT y un detector de índice de refracción Shimadzu RID-10A. El análisis se realizó utilizando dos columnas conectadas en serie: una Progel-TKS G4000 y una Waters Ultrahydrogel 250 (ambas de 300 × 7.8 mm) y como solvente de elución una solución de nitrato de sodio 0,05M conteniendo 0,02 % de NaN_3 preparada con agua de calidad HPLC (Sigma-Aldrich). Se trabajó a flujo constante de 0,6 ml/min. Se inyectaron 100 µl de una solución de 5 mg/ml del polisacárido disuelto en el solvente de corrida y filtrado a través de una membrana fluoruro de polivinilideno (PVDF) de 0,22 µm (GV, Millipore). La columna se calibró usando dextranos de peso molecular conocido como estándares. El rango de peso molecular utilizado para la calibración estuvo en un rango de los 6 kDa a los 500 kDa.

6.4 Determinación de los azúcares componentes

Se realizó analizando por cromatografía gaseosa los derivados de los polisacáridos hidrolizados.

6.4.1 Hidrólisis ácida total [11]

De 1 a 2 mg de muestra se colocaron en viales provistos con cierre de teflón, se les adicionaron 1 ml de TFA 2 M, y se colocaron en estufa a 121 ºC durante 90 min. Luego se evaporó el solvente bajo corriente de aire. Los hidrolizados fueron redisueltos en agua y

posteriormente ésta se evaporó nuevamente; este tratamiento se realizó las veces necesarias para eliminar totalmente el ácido.

6.4.2 Preparación de los alditoles peracetilados[12,13]

A las muestras secas provenientes de las hidrólisis contenidas en los viales se les agregaron 0,5 ml de hidróxido de amonio 1M y se redujeron con borohidruro de sodio (ca. 10 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 descationizaron las soluciones 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 consecutivos de 0,5 ml de metanol y evaporación a sequedad en cada oportunidad. Una vez secas, se dejaron en desecador al vacío durante una noche y la mezcla de alditoles obtenida se acetiló con 1 ml de una mezcla anhídrido acético-piridina (1:1) a 100 ºC durante 45 min. Una vez que las soluciones alcanzaron temperatura ambiente, se particionaron en 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.

6.4.3 Hidrólisis reductiva para la generación de alditoles peracetilados

Se utilizó el método de Stevenson y Furneaux[14] 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 3M y 0,1 ml de una solución conteniendo 80 mg/ml de 4-metilmorfolina borano (MMB). Se cerró el vial y se llevó a 80 ºC 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 ºC 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 ºC. En los casos en que el polisacárido provenía de una metilación, la temperatura de evaporación del solvente se mantuvo a menos de 30 ºC. Luego, en ambos casos, se realizó un agregado de 0,5 ml de acetonitrilo y se evaporó a sequedad para eliminar los restos de agua. Los alditoles generados se acetilaron con

anhídrido acético (0,2 ml) y TFA (0,2 ml) a 55-60 ºC. Luego los derivados peracetilados se recuperaron con cloroformo del mismo modo que se explica en la sección 6.4.2.

En los casos en que los polisacáridos pudieran contener 3,6-anhidrogalactosa 2-sulfato, se utilizó la técnica de hidrólisis reductiva modificada por Jol *et al.*[15] En estos casos la hidrólisis a 80 ºC 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 ºC. Al producto seco se le agregaron 0,4 ml de TFA 2M y se dejó en estufa a 120 ºC durante 2 h. El proceso luego continuó como se describió anteriormente para la técnica original.

6.4.4 Preparación de 1-amino-1-desoxialditoles

Se efectuó mediante la técnica descripta por Cases *et al.*[16]

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 6.4.1) 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 ºC durante 1-2 h. Una vez que alcanzaron la temperatura ambiente se les agregó, bajo campana, TFA 3M hasta alcanzar pH 1-2. Tras llevar a seco, se les agregó agua destilada (3 × 0,5 ml) y metanol (5 × 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 ºC 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 3 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 descriptas por Cases *et al.*[16] y Errea *et al*.,[17] respectivamente. La determinación de la configuración de la galactosa dimetilada se realizó sobre los polisacáridos permetilados. Esta misma técnica también se utilizó para diferenciar la 3-*O*-metilgalactosa de la 4-*O*-metilgalactosa y la 2,6-di-*O*-metilgalactosa de la 4,6-di-*O*-metilgalactosa, las cuales no se resuelven por la técnica de alditoles descripta en las secciones 6.4.2 y 6.4.3.

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 los polisacáridos hidrolizados se les 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 ºC durante 2 h. Una vez que alcanzaron la temperatura ambiente se agregó, bajo campana, TFA 3M hasta alcanzar pH 1-2. El resto del procedimiento fue idéntico al indicado anteriormente utilizando 1-amino-2-propanol.

Para determinar la configuración absoluta de la 3,6-anhidrogalactosa también se realizó la aminación reductiva con (*S*)-α-metilbencilamina pero fue necesario realizar un paso más de hidrólisis según la técnica descripta por Navarro y Stortz.[18]

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

Se tomaron entre 1 y 2 mg de los polisacáridos y se le agregaron 0,25 ml de TFA 0,1M. Esta solución, en vial cerrado, se llevó a estufa a 80 °C durante 3 h. Luego del período de calentamiento, 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 total eliminación del ácido.

El residuo resultante fue sometido a una reacción de aminación reductiva con (*S*)-α-metilbencilamina. Para ello al hidrolizado 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 fueron llevados a estufa de 65 °C durante 1-2 h. Una vez que alcanzaron la temperatura ambiente, se cortó la reacción agregando TFA 3M, bajo campana, hasta alcanzar pH 1-2. El contenido del vial se llevó a seco y se le agregó agua destilada (3 × 0,5 ml) y metanol (5 × 0,5 ml), con evaporaciones intermedias. Luego procedió a realizarse una nueva hidrólisis y aminación reductiva tal como fue indicado anteriormente para la 2-*O*-metilgalactosa.

6.5 Estudios de alquilación

La alquilación (metilación y etilación) de los polisacáridos fue realizada sobre sus respectivas sales de trietilamonio según lo descripto por Stevenson y Furneaux,[14] utilizando las condiciones y reactivos propuestos por Ciucanu y Kerek.[19] Los productos alquilados fueron posteriormente hidrolizados y derivatizados para cromatografía gaseosa, tal como se describió en 6.4.3.

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. La columna se había equilibrado previamente con clorhidrato de trietilamina al 5 % y lavado con abundante agua hasta reacción negativa de cloruros en los eluidos (con solución de $AgNO_3$).

Las sales de trietilamonio de los polisacáridos se recuperaron por elución con agua y posterior liofilización. Estas luego se sometieron a las reacciones de alquilación.

6.5.1 Metilación

La sal de Et_3NH^+ 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 ioduro 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 se recuperaron por diálisis (bolsa de corte 3500) y liofilización.

6.5.2 Etilación

La sal de Et_3NH^+ del polisacárido (~5 mg) fue tratada de igual manera que al realizar la metilación, pero utilizando en este caso ioduro de etilo como agente alquilante. Como la reacción es más lenta, se realizaron dos agregados de NaOH y dos de ioduro de etilo, separados cada uno por 30 min. El proceso de purificación y obtención fue el mismo que el descripto para los productos de metilación.

6.6 Desulfatación y metilación *in situ*

La desulfatación solvolítica de los polisacáridos se realizó con asistencia de un horno microondas sobre sus sales de piridinio según lo descripto por Navarro *et al.*,[20] y luego, sobre una alícuota, se realizó la metilación *in situ*.

OBTENCIÓN DE LAS SALES DE PIRIDINIO

Entre 20 y 50 mg de las muestras se disolvieron en 1-2 ml de agua y se sembraron en una columna que contenía una resina Amberlite IR-120. La columna se había equilibrado previamente con cloruro de piridinio al 5 % p/v y lavado con abundante agua hasta reacción negativa de cloruros en los eluidos (con solución de $AgNO_3$).

Las sales de piridinio de los polisacáridos se recuperaron por elución con agua y posterior liofilización para someterse luego a la desulfatación.

DESULFATACIÓN

Se disolvió la sal de piridinio en 9,8 ml de DMSO y 0,2 ml de piridina anhidra. La mezcla se colocó en un reactor de teflón de 50 ml con tapa roscada (el tubo tenía un diámetro de 42 mm y paredes de 5 mm de grosor, y fue construido en los Talleres del Departamento de Industrias FCEyN-UBA). La desulfatación se llevó a cabo en un horno de microondas doméstico marca Sharp, modelo R353EA de 1200 W de potencia y 2450 MHz de frecuencia de irradiación. La reacción fue realizada al 100 % de potencia. A la muestra se le aplicaron seis pulsos de 10 s cada uno, enfriando en baño de hielo en cada etapa intermedia hasta una temperatura de 60 °C. Una vez enfriada la muestra luego del último pulso, se midió el volumen final y una alícuota se separó para metilar. El resto se dializó en una bolsa de corte

de PM 3500 y luego se liofilizó. Del polisacárido obtenido se calculó el rendimiento final y el porcentaje de sulfato.

METILACIÓN *IN SITU*

Esta se realizó sobre la porción no dializada del polisacárido disuelto en DMSO-piridina proveniente de la desulfatación asistida por microondas ya descripta y se siguió el procedimiento de Ciucanu y Kerek[19] descripto en la Sección 6.5. Cabe aclarar que durante la metilación la solución toma un color rojo-amarronado, característico del iodo en solución.

6.7 Tratamiento alcalino de polisacáridos[21]

Entre 1 y 2 mg de los polisacáridos se disolvieron en 0,2 ml de agua y se les agregaron 0,1 ml de NaOH 3M, con el objetivo de obtener soluciones de concentración final 1M. Estas se colocaron en una estufa a 80 °C en viales cerrados durante el tiempo necesario:[22] 2 a 3 h para un μ/ν-carragenano, 5 h para un μ-carragenano y 16 h para un λ-carragenano. Luego cada solución se dejo enfriar y se agregaron aproximadamente 0,12 ml de TFA 3M para neutralizarlas. A continuación se les adicionó resina Amberlite IR-120 (H^+) con el fin de descationizar. Después de separar la resina por filtración, se evaporó el solvente y se procedió a realizar la derivatización de los monosacáridos por la técnica descripta en la sección 6.4.3.

6.8 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.

6.8.1 Análisis de alditoles acetilados

Los monosacáridos componentes de los polisacáridos y de sus productos de alquilación derivatizados como alditoles peracetilados fueron analizados utilizando una columna capilar SP-2330 (Supelco) de 30 m de longitud, 0,25 mm de diámetro interno y 0,20 μm de espesor de film. Se empleó un flujo de gas carrier de 1,2-1,3 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 ºC.

Para los azúcares provenientes del polisacárido nativo se empleó el siguiente programa:

Programa **A** para alditoles peracetilados:

200 → 230 ºC a 2 ºC/min, mantener a 230 ºC durante 20 min.

Para los azúcares provenientes del polisacárido metilado se empleó el siguiente programa de temperatura:

Programa **B** para alditoles permetilados:

160 → 210 ºC a 2 ºC/min, 210 → 240 ºC a 5 ºC/min, mantener a 240 ºC durante 20 min.

Para el estudio de la identidad del compuesto X se utilizó, para los alditoles obtenidos del polisacárido, una columna Ultra 2 (Hewlett-Packard) con las siguientes dimensiones: 30 m, 0,32 mm de diámetro interno y 0,17 μm de espesor de film. La presión de cabeza de columna utilizada fue de 7 psi y el flujo de gas carrier de 1 ml/min. La temperatura del inyector y del detector fue de 270 °C. El programa utilizado fue:

Programa **C** para alditoles peracetilados:

160 (5 min) → 220 ºC a 1 ºC/min, 220 → 250 ºC a 2 ºC/min, mantener a 250 ºC durante 20 min.

6.8.2 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, 0,2 mm de diámetro interno y 0,11 μm de espesor de film. Se utilizó una presión de cabeza de columna de 22 psi y un flujo de gas carrier de 0,6 ml/min. La temperatura del inyector y del detector fue de 270 °C

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 ºC a 4 ºC/min, mantener a 220 ºC por 2 min, 220 → 250 ºC a 1 ºC/min, mantener a 250 ºC por 20 min.

Programa **E** para los 1-desoxi-1-(1'-feniletilamino) alditoles peracetilados:

180 → 220 ºC a 4 ºC/min, mantener a 220 ºC por 2 min, 220 → 270 ºC a 1 ºC/min, mantener a 270 ºC por 20 min.

6.9 Métodos espectroscópicos

6.9.1 Cromatografía gas-líquido acoplada a espectrometría de masa

-FRAGMENTACIÓN POR IMPACTO ELECTRÓNICO

Se utilizó un cromatógrafo gaseoso Shimadzu GC17A conectado a un espectrómetro de masa Shimadzu GCMS QP5050 A con potencial de ionización de 70 eV, un analizador de tipo cuadrupolo y helio como gas portador (1 ml/min). Las condiciones cromatográficas utilizadas fueron las mismas que las descriptas en la sección 6.8.

-FRAGMENTACIÓN POR IONIZACIÓN QUÍMICA

Se utilizó un cromatógrafo gaseoso acoplado a un espectrómetro de masa Thermo DSQ II con un analizador de tipo cuadrupolo. Se trabajó con gas metano en modo positivo. Las condiciones cromatográficas utilizadas fueron las mismas que las descriptas en la sección 6.8.

6.9.2 Resonancia magnética nuclear

Los espectros se realizaron en un espectrómetro Bruker Avance II 500 operando a 500,13 (^{1}H) y 125,77 MHz (^{13}C) 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 ^{1}H).

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 H_2O-D_2O (aprox. 1:1). El tiempo de adquisición fue de 1,1 s con un tiempo de espera de 0,1 s y un ángulo de pulso de 45°. Generalmente, se acumularon entre 30000 y 36000 barridos.

Para los espectros de RMN de ^{1}H, 10 mg de muestra se disolvieron en 0,5 ml de agua deuterada. Tras filtrar, se dispusieron en tubos de 5 mm de diámetro. Se añadió acetona como estándar interno. Los espectros se llevaron a cabo con un tiempo de adquisición de 4,36 s, con un ángulo de pulso de 30° y un tiempo de espera de 1 s luego de acumular 16 barridos. Para eliminar el pico de HOD se efectuó la secuencia de pulso 180º-τ-90º.

Los experimentos de tipo 2D se realizaron utilizando los parámetros estándar del software de Bruker. Los espectros HSQC se llevaron a cabo usando 24 barridos, con un tamaño de FID de 512 (F1) x 1024 (F2) y un J_{C-H} de 144,9 Hz. Los espectros COSY se llevaron a cabo utilizando 4 barridos y con un tamaño de FID de 256 (F1) x 2048 (F2).

6.9.3 Espectroscopía de FT-IR

Los espectros de infrarrojo se obtuvieron a partir de películas de los carragenanos oxidados obtenidas por evaporación de una solución acuosa 1 % p/v. Las muestras se analizaron en un espectrofotómetro Nicolet Magna IR-550 (Thermo Fisher Scientific, Inc.) usando 32 barridos y en un rango de 4000-450 cm^{-1}.

6.10 Análisis reológicos

Los análisis reológicos fueron realizados en colaboración con el grupo de la Dra. Ana M. Rojas del departamento de Industrias, FCEN-UBA.

Para realizar los ensayos, se disolvieron 40 mg del polisacárido en KCl 45mM con el fin de obtener una solución al 2,00 % p/v. En general, fue necesario calentar (entre 50 y 60 °C) para obtener disolución total. Se midió el pH de las soluciones siendo esté aproximadamente 6 en todos los casos.

6.10.1 Ensayos dinámicos oscilatorios

Se colocó suficiente volumen de la solución de la muestra a 85 °C en un reómetro MCR300 Paar Physica (Alemania) con un sistema de placas paralelas separadas a 0,5 mm entre sí. El control de temperatura en el reómetro se realizó mediante una unidad peltier (Viscotherm VT2 Physica, Alemania).

Se midieron las funciones viscoelásticas G' (módulo de almacenamiento) y G'' (módulo de perdida) manteniendo una deformación constante del 0,02 % y una frecuencia de 1 Hz, salvo indicación en contrario. Las mediciones se realizaron en las siguientes condiciones de manera consecutiva:

a) 85,0 ºC isotérmico por un período de 60,0 s (sin recolección de datos).

b) enfriamiento de la muestra de 85,0 a 10,0 ºC con una rampa de 5,0 ºC/min.

c) 10 °C isotérmico por un período de 900 s.

d) barrido de frecuencia de 1 a 100 Hz en condiciones de viscoelasticidad lineal.

e) calentamiento de la muestra de 10,0 a 85,0 ºC con una rampa de 5,0 ºC/min.

Las temperaturas de fusión y gelificación se determinaron en los pasos b) y e) respectivamente, definiéndose como aquellas temperaturas donde se cruzan las curvas de G' y G''. Las mediciones se realizaron por triplicado.

6.10.2 Análisis estadístico

Los resultados del análisis reológico se informaron como el promedio y desvío estándar de los tres replicados. Los resultados fueron analizados a través de ANOVA (α: 0,05) seguido de una comparación múltiple evaluado a través de la prueba de mínima diferencia significativa, usando el paquete Statgraphic (Statgraphic Plus para Windows, versión 5.0, 2001, Manugistic Inc., Estados Unidos).

6.11 Análisis del compuesto X

6.11.1 Hidrólisis parcial, reducción y purificación de C-2S

Para la hidrólisis parcial de **C-2S** se utilizó la técnica de hidrólisis selectiva de 3,6-anhidrogalactosa. Para ello, 100 mg de la fracción se hidrolizaron con 25 ml de TFA 0,1M por 3 h a 80 °C. Luego, el solvente se evaporó a presión reducida y se realizaron 3 lavados con 15 ml de agua, evaporando entre cada lavado, para eliminar el exceso de ácido. El producto se disolvió en 25 ml de NH_4OH 1M, se agregó $NaBH_4$ (~25 mg) y se dejó reduciendo una noche. Transcurrido el tiempo, se finalizó la reacción agregando ácido acético glacial hasta pH = 4-5. Luego se evaporó el solvente y se realizaron 2 lavados con 25 ml de agua evaporando entre cada lavado.

Para la eliminar las sales y los productos de bajo peso molecular se realizó una cromatografía de permeación en geles utilizando Bio-Gel P30 y una solución de NaCl 0,1M como solvente de elución. El gel se dejó hinchar 4 h a 100 °C con NaCl 0,1M. Luego se decantó y se eliminó el exceso de solvente. A continuación se desgasificó el gel y se rellenó la columna (28 × 1,5 cm) cuidando que no se introduzcan burbujas de aire. Se sembró el sólido disuelto en 10 ml del solvente de solución y se recogieron alícuotas de 4 ml. Para cada una de éstas se determinó la cantidad de hidratos de carbono por el método de fenol-ácido sulfúrico.[2] Se recolectó la fracción que eluyó junto con el volumen muerto, la cual fue dializada utilizando bolsas con corte de PM 6000-8000 y luego liofilizada.

6.11.2 Síntesis de las γ-pentonolactonas[23]

Las correspondientes pentosas fueron convertidas a los ácidos aldónicos usando hipoiodito de sodio generado por iodo en medio básico. 1 mg del azúcar fue disuelto en 100 μl de agua y se agregó 200 μl de una solución 0,1M de I_2/KI. A continuación, se adicionaron 400 μl de una solución 0,1M de NaOH en el lapso de 2 min y se mantuvo la reacción por 15

min a temperatura ambiente. Luego, la solución fue acidificada con 200 µl de HCl 1M en metanol y evaporada. Se realizaron dos lavados con metanol para eliminar el exceso de iodo generado y se acetiló la muestra en las condiciones descriptas en la sección 6.4.2. Los productos se caracterizaron por cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masa de impacto electrónico como fue descripto en la sección 6.9.1.

6.11.3 Reducción de lactonas[24]

Se hidrolizaron 1-2 mg de fracciones ricas en el compuesto X como fue descripto en la sección 6.4.1. Los monosacáridos obtenidos se redujeron con $NaBH_4$ en medio amoniacal de manera análoga a lo descripto en la sección 6.4.2. Una vez eliminado el borato de la muestra reducida (sección 6.4.2), ésta se disolvió en unas gotas de buffer borato de sodio 10mM a pH 7,5. Luego se adicionó $NaBH_4$ (2,5 mg) disuelto en 0,25 ml del mismo buffer. La mezcla de reacción se dejó reposar por una hora y se finalizó por agregado de ácido acético. Luego se prosiguió como se indica en la sección 6.4.2 para obtener los productos acetilados, y se realizó una cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masa de impacto electrónico como se describió en la sección 6.9.1.

6.11.4 Hidrólisis de furanosas[25]

Se hidrolizaron 30 mg de la fracción rica en el compuesto X en 10 ml de ácido trifluoroacético 0,02M por 2 h a 100 ºC. Luego se neutralizó con solución saturada de $NaHCO_3$ y se dializó con bolsa de corte de PM 1000 contra agua destilada.

6.12 Modificación química de galactanos

6.12.1 Obtención del carboximetil κ-carragenano

-ADAPTACIÓN DE LAS CONDICIONES UTILIZADAS POR LEONG ET AL.[26]

Se suspendieron 50 mg de κ-carragenano en 7 ml de isopropanol y se agitó por 30 minutos a temperatura ambiente. Luego, se agregó lentamente el volumen y concentración adecuados de una solución de NaOH (ver luego) en un período de 5 minutos y se dejó agitando la solución por una hora a temperatura ambiente. A continuación, se agregó la masa adecuada de ácido monocloroacético y luego, se calentó a 50 °C con agitación continua por 4 h. El producto se recuperó por filtración al vacío. Este fue lavado 3 veces con 5 ml de una solución de etanol:agua 4:1 y luego otras 3 veces con etanol. El sólido obtenido fue disuelto en agua, evaporado a presión reducida a fin de eliminar los restos de solvente y liofilizado.

Las condiciones ensayadas fueron: a) 0,16 ml NaOH 40 % p/v y 181 mg de ácido monocloroacético; b) 1 ml NaOH 40 % p/v y 181 mg de ácido monocloroacético y c) 0,04 ml NaOH 16M y 91,5 mg de ácido monocloroacético

-ADAPTACIÓN DE LAS CONDICIONES DE CIUCANU Y KEREK[19]

Se generó la sal de Et_3NH^+ del κ-carragenano (30 mg) tal como fue descripto en la sección 6.5. Esta fue tratada de igual manera que al realizar la metilación según las condiciones de Ciucanu y Kerek,[19] pero utilizando en este caso ácido monocloracético (120 mg) como agente alquilante. Una vez agregado el agente alquilante, la reacción se dejó por 4 h a 50 °C. El proceso de purificación y obtención del producto final fue el mismo que el descripto para los productos de metilación (sección 6.5.1).

6.12.2 Oxidación de galactanos con TEMPO

6.12.2.1 Adaptación de las condiciones utilizadas por Elboutachfaiti *et al.*[27]

Las condiciones de oxidación con TEMPO se adaptaron de las propuestas por Elboutachfaiti *et al.*[27] para gelanos. La oxidación se llevó a cabo sobre 100 mg de κ-carragenano (conteniendo aproximadamente 0,25 mmol de alcohol primario) disueltos en 15 ml de agua destilada. Esta solución se colocó en baño de hielo con agitación constante y se ajustó el pH a 10,5 utilizando una solución 0,1M de NaOH. Paralelamente se preparó una solución diluida al medio de lavandina comercial, la cual se la llevó al pH de la reacción y se valoró por titulación con $Na_2S_2O_3$ (ver sección 6.12.2.1.1) Se adicionaron a la solución de polisacárido 1,6 mg de TEMPO y 20 mg de NaBr, controlando que el pH se mantenga constante agregando NaOH 0,1M en caso que el pH disminuya. A continuación, se incorporó el volumen adecuado de solución de lavandina de manera de adicionar 1,25 eq. de NaClO. Este proceso se realizó en un período de 20 min.

La reacción se llevó a cabo por un total de 2 h. Durante ese período, se mantuvo la temperatura a 0 °C y el pH en 10,5. Para cortar la reacción, se adicionó de 1 ml de etanol, se neutralizó con HCl 1M y se dejó agitando por 10 min. Luego se dializó únicamente contra agua destilada con una bolsa de corte de PM 3500 y se liofilizó.

Esta reacción también se llevó a cabo para el almidón y el ι-carragenano. En ambos casos se adaptaron las masas de los polisacáridos de manera de mantener el mismo número de moles de alcoholes primarios.

6.12.2.1.1 Valoración de la solución de lavandina

La valoración de la solución de lavandina se llevó a cabo mediante una titulación con $Na_2S_2O_3$ usando el sistema I_3^-/almidón como punto final. Para ello, en un erlenmeyer conteniendo 40 ml de agua destilada, se adicionaron 0,5 g de KI, 5 ml de ácido acético y 2 ml de la solución de lavandina a utilizar. La titulación se realizó con una solución 0,15M de $Na_2S_2O_3.5H_2O$ previamente valorada. Poco antes de llegar al punto final de la titulación se agregaron 0,5 ml de una solución al 1 % p/v de almidón, de manera de generar el complejo I_3^-/almidón. La concentración molar de hipoclorito se obtuvo mediante la siguiente ecuación:

$$[NaClO] = \frac{1}{2} \times \frac{V \times 0{,}15M \times f}{2}$$

donde *V* es el volumen de tiosulfato consumido expresado en ml y *f* el factor obtenido luego de valorar la solución de $Na_2S_2O_3$.

Para la valoración se utilizó dicromato de potasio como patrón analítico. Brevemente, se mezclaron en un erlenmeyer 0,100 g de $K_2Cr_2O_7$, 1 g de KI y 20 ml de una solución 1:1 (v/v) de HCl concentrado en agua. Se realizó la titulación con la solución de tiosulfato 0,15M, agregando 0,5 ml de almidón (solución 1 % p/v) poco antes del punto final. El factor *f* se calculó de la siguiente manera:

$$f = 6 \times \frac{n_{Cr_2O_7^-}}{V \times 0{,}15}$$

donde *V* nuevamente es el volumen de tiosulfato consumido pero esta vez expresado en litros.

6.12.2.2 Estudio de las condiciones de reacción

En todos los casos se utilizaron 100 mg de κ-carragenano y 20 mg de NaBr y la reacción se llevó a 0 °C.

6.12.2.2.1 Variación de las condiciones de finalización de la reacción

Se repitió la reacción descripta en la sección 6.12.2.1 pero para finalizar la reacción se utilizaron 50 mg de $NaBH_4$ en lugar del etanol. Se mantuvo la solución por 2 horas a 0°C para luego dializar y liofilizar como fue descripto en la sección 6.12.2.1.

6.12.2.2.2 Variación del oxidante

Se realizó la reacción descripta en la sección 6.12.2.1 sin el agregado de TEMPO para analizar el poder oxidante de los hipohalitos. Se finalizó la reacción con etanol.

6.12.2.2.3 Variación de la base

En lugar de utilizar como base una solución de NaOH según lo descripto en la sección 6.12.2.1, se utilizó un buffer 0,1M $NaHCO_3/Na_2CO_3$ (pH=10,4) adaptando las condiciones de Xu *et al.*[28]. Para ello se utilizó el buffer a pH 10,4 como solvente de reacción y se le adicionaron los reactivos según lo descripto en la sección 6.12.2.1. En estas condiciones no fue necesario mantener el pH constante con NaOH ni llevar la solución de lavandina al pH adecuado. Previo a la finalización de la reacción, el contenido se dividió en dos alícuotas. Uno se terminó con etanol y otro con $NaBH_4$ como fue previamente descripto para ambos casos.

Para generar el carragenano prerreducido, se disolvieron 100 mg de κ-carragenano en 50 ml de agua, se le adicionaron 50 mg de borohidruro de sodio y se dejó reaccionar por 2 h. Luego de dializar con bolsa de corte de PM 3500 y liofilizar se realizó la reacción descripta en el párrafo anterior.

6.12.2.2.4 Variación del pH de la reacción

a) CON BUFFER

Se realizó la reacción utilizando los buffers de pH 10 y 9,4 descriptos en la sección 6.12.2.2.3 como solvente.

b) CON NaOH

La reacción informada en la sección 6.12.2.1 se repitió manteniendo el pH a 10 con una solución de NaOH. Pasado el tiempo de reacción, la solución se dividió en dos alícuotas, en un caso la reacción se finalizó con etanol como fue descripto en la sección 6.12.2.1 y en el otro con $NaBH_4$ (sección 6.12.2.2.1)

6.12.2.2.5 Variación del tiempo de reacción

Se realizó la reacción descripta en la sección 6.12.2.2.4 b) por 1 y 3 horas.

6.12.2.2.6 Variación de la proporción del oxidante primario

La reacción informada en 6.12.2.2.4 b) se repitió utilizando 0,125, 0,313 y 0,625 eq. de NaClO.

6.12.2.3 Condiciones óptimas para la oxidación de κ-carragenano con TEMPO

Se disolvieron 100 mg del carragenano, conteniendo 0,25 mmoles de alcohol primario, en agua destilada. Se lo colocó en baño de hielo y se llevó a pH 10 con una solución acuosa de NaOH 0,1M. Se adicionaron 1,6 mg de TEMPO y 20 mg de NaBr. Se agregó el volumen adecuado de una solución de lavandina (ver sección 6.12.2.1) que contenga 1,25 eq. de NaClO durante 20 min. La reacción se mantuvo con pH constante de 10 por 1 a 2 h a 0 °C. Después de ese período, se agregaron 50 mg de $NaBH_4$ y se dejó por 2 h a 0 °C. Luego se dializó con una bolsa de corte de PM 3500 y se liofilizó.

6.12.2.4 Oxidación parcial y total del ι-carragenano y de la agarosa

La oxidación del ι-carragenano y de la agarosa se realizó utilizando las condiciones óptimas para el κ-carragenano descriptas en la sección 6.12.2.3. Se adaptaron las masas de manera que en todos los casos haya 0,25 mmoles de alcohol primario (125 mg de ι-carragenano y 75 mg de agarosa). Se realizó la reacción con 1,25 eq. de NaClO para el producto completamente oxidado y 0,625 y 0,313 eq. para los productos parcialmente oxidados.

6.12.2.5 Caracterización de los galactanos oxidados

Los galactanos y sus productos de oxidación se caracterizaron midiendo las proporciones de galactosa (sección 6.4.3), ácido galacturónico (sección 6.3.2), 3,6-anhidrogalactosa (sección 6.3.4) y sulfato presentes (sección 6.3.5) en cada uno de ellos. La cuantificación de la galactosa se realizó utilizando *mio*-inositol como estándar interno.[18]

Todos los valores se expresaron en moles de compuesto medido por cada mg de polisacárido. La relación molar Gal:GalA:3,6-AnGal:SO_3Na se obtuvo normalizando a 1 la suma de los moles de galactosa y ácido galacturónico.

6.12.2.6 Microscopía de barrido electrónico (SEM)

La morfología de los carragenanos oxidados se determinó por microscopía de barrido electrónico (SEM). Se empleó un microscopio electrónico de barrido Zeiss DSM 982 Gemini (Carl Zeiss, Alemania) equipado con una pistola de emisión de campo y un detector de electrones secundarios en la lente. Las magnificaciones usadas estuvieron en el rango de 500× a 50000×.

6.12.2.7 Actividad antiviral de los carragenanos oxidados

Los ensayos de actividad antiviral fueron realizados como parte de una colaboración establecida con los Dres. Elsa B. Damonte y Carlos A. Pujol.

Se utilizaron células Vero (riñón del mono verde africano *Cercopithecus aethiops*) cultivadas en un medio esencial mínimo suplementado con 5 % de suero de ternera inactivado. Se midió la actividad de los polisacáridos frente a los virus del herpes simplex tipo 1 (HSV-1) línea F y tipo 2 (HSV-2) línea G, obtenidas del American Type Culture Collection (Estados Unidos) y posteriormente propagados y titulados en células Vero.

6.12.2.7.1 Determinación de la actividad antiviral

La actividad antiviral se evaluó por el método de la reducción del número de placas. Se infectaron las células Vero crecidas en microplacas de 24 pocillos en 50 UFP (unidades formadoras de placas) por pocillo, en ausencia o en presencia de distintas concentraciones de polisacáridos. Se ensayó cada dilución por duplicado. Luego de 1 h de adsorción a 37 °C, se descartó el inóculo y las células se cubrieron con un medio de mantenimiento conteniendo 0,7 % de metilcelulosa. Luego de 2 días de incubación a 37 °C, se procedió a contar las placas previa tinción con cristal violeta. La concentración inhibitoria 50 % (**CI_{50}**) fue definida como la concentración de los polisacáridos para reducir el número de placas al 50 % respecto del control sin el compuesto.

6.12.2.7.2 Determinación de la citotoxicidad

La viabilidad celular se midió por el método de MMT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) sobre monocapas ya formadas de células Vero.[29] Se incubaron células Vero ya crecidas en microplacas de 96 pocillos con diferentes concentraciones de polisacárido por 48 h a 37 °C. Luego se agregaron 10 µl de medio esencial mínimo con MTT (concentración final 5 mg/ml) en cada pocillo y se incubó por 2 h a 37 °C. A continuación, se retiró el medio y se agregaron 200 µl de etanol 96 % en cada pocillo, los cuales se agitaron vigorosamente para asegurar la solubilidad total del 1-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-3,5-difenilformazán (producto azul obtenido como consecuencia de la degradación del MMT por enzimas mitocondriales). Posteriormente, se midió la densidad óptica en cada pocillo con una longitud de onda de referencia a 595 nm. A partir de los datos obtenidos se calculó la concentración citotóxica 50 % (**CC_{50}**) como la concentración de polisacárido capaz de reducir el número de células viables en un 50 % respecto del control.

6.13 Modelado molecular

6.13.1 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, Estados Unidos); modificado de acuerdo a la 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-H.[32] Además se realizó la modificación sugerida para las rutinas de MM3 cambiando el máximo movimiento atómico de 0,25 a 0,10 Å.[33] Se utilizó una constante dieléctrica de 3, que disminuye parcialmente los efectos electrostáticos y de enlace de hidrógeno.

Las optimizaciones se realizaron según el método de Newton-Raphson diagonalizado, y las condiciones de finalización utilizadas son las que trae el programa por defecto.

MECÁNICA CUÁNTICA

Los cálculos por mecánica cuántica fueron realizados utilizando el programa Gaussian 09W (revisión C-01) con conjunto de bases estándar.[34] Salvo indicación en contrario, se realizó la minimización y el cálculo de la energía libre por procedimientos de DFT, utilizando el modelo de solvatación de polarización continua, desarrollado por Tomasi y colaboradores (PCM, con agua como solvente).[35]

6.13.2 Obtención de energías ΔE_1 y ΔE_2 para la reacción con TEMPO

Las diferencias de energía fueron calculadas de la siguiente manera:

$$\Delta E_1 = E_{Gal-TEMPO} + E_{H_2O} - E_{Gal} - E_{TEMPO} - E_{OH^-} \qquad \text{(ec. 6.1)}$$

$$\Delta E_2 = E_{GalMe^+} - E_{Gal} - E_{CH_3^+} \qquad \text{(ec. 6.2)}$$

Cada una de las energías para el cálculo se obtuvo sobre cálculos puntuales con M06-2X/6-311+G(d,p) con PCM en agua sobre geometrías previamente calculadas con M06-2X/6-31+G(d,p). Las minimizaciones para ΔE_1 se realizaron en vacío dado el gran tamaño de las moléculas, mientras que para ΔE_2 se realizaron utilizando PCM en agua.

Dado que los azúcares y los derivados metilados y sustituidos con TEMPO poseen una gran cantidad de rotámeros, se debió previamente determinar cuál es el de menor energía para

poder realizar los cálculos. Para ello se realizó un primer estudio con MM3 sobre la silla $^4C_1$ del metil 3-*O*-metil-α-D-galactopiranósido barriendo los distintos ángulos exocíclicos χ_n = H–C-n–O-n–X, con n = 1 a 4 y X = –H o $–CH_3$, así como ω = O-5–C-5–C-6–O-6 y χ_6 = C-5–C-6–O-6–H. Este mismo estudio se realizó con los derivados metilados o sustituidos con TEMPO en las distintas posiciones. En este último caso hay un ángulo diedro más a tener en cuenta que es el C-n–O-n–N–O-$_{TEMPO}$. Para cada uno de los compuestos, se ordenaron los rotámeros por energía creciente y se eligieron aquellos con menos de 2 kcal/mol de diferencia respecto de aquel de menor energía. Se descartaron las estructuras donde el ángulo diedro que incluye el C-1 fuera distinto de gauche negativo ($\chi_1 \approx -60º$) ya que éste es el esperado por el efecto *exo*-anomérico.[36] Estas estructuras de partida se optimizaron por DFT en las condiciones previamente descriptas y se les realizó el cálculo puntual de energía. Se utilizó para el cálculo de ΔE aquel que resultó de menor energía.

Para la silla $^1C_4$ del metil 3,6-anhidro-4-*O*-metil-α-D-galactopiranósido no se realizó el estudio previo por MM3. Esto se debe a que dada la estructura rígida de la molécula y el efecto *exo*-anomérico son pocos los rotámeros a tener en cuenta. En este caso, directamente se minimizaron por DFT todos los rotámeros y se seleccionó aquel de menor energía luego del cálculo puntual.

6.13.3 Estudio de la reacción de tratamiento alcalino

El estudio teórico de la reacción de tratamiento alcalino se realizó sobre los compuestos **1** a **6** (Capítulo 5). Para el armado del camino de reacción, se empezó realizando una búsqueda de los rotámeros de menor energía de las sillas $^4C_1$ y $^1C_4$ de dichos compuestos. Esto se realizó por MM3 de manera análoga a lo descripto en la sección 6.13.2 para el metil 3-*O*-metil-α-D-galactopiranósido, variando los ángulos χ_1 a χ_4, ω y χ_6. Las estructuras que tuvieron una energía no mayor de 2 kcal/mol por encima de la de mínima, fueron optimizadas con M06-2X/6-31G+(d,p) o B3LYP/6-31G+(d,p) con PCM en agua, según se indica (Capítulo 5), y luego se les realizó un cálculo puntual de energía con igual base y simulador de solvente pero a nivel 6-311G+(d,p). Este mismo estudio se realizó para las sillas a las cuales se les removió el protón del O-3 de las estructuras **1** a **6**. En cada caso, se seleccionaron aquellas de menor energía, dentro de un rango de 2 kcal/mol, luego del cálculo de energía por DFT. Se generaron los caminos de reacción para aquellas estructuras que poseían los dos pares de sillas modeladas (protonadas y desprotonadas en O-3) dentro de dicho rango y valores similares de los ángulos diedros. Para cada grupo de rotámeros, se

buscaron todos los intermediarios y estados de transición existentes para realizar la interconversión (ver más abajo). Asimismo, se buscó el estado de transición del paso de S_N2 y se modeló el correspondiente anhidroazúcar. Estos se minimizaron con M06-2X/6-31G+(d,p) con PCM en agua y luego se les realizó un cálculo puntual de energía con M06-2X/6-311G+(d,p) con PCM en agua.

Para los distintos mínimos y estados de transición modelados, se verificó que tuvieran ninguna o una frecuencia imaginaria según corresponda. Para los estados de transición se verificó que la frecuencia corresponda al camino buscado modificando manualmente las estructuras en la dirección que indicaba la frecuencia negativa de los mismos y luego se los minimizó. Aunque la recomendación habitual es realizar un cálculo de IRC (coordenada intrínseca de reacción), en este caso las frecuencias imaginarias de estos estados de transición eran demasiado bajas en valor absoluto, por lo que el cálculo de IRC fallaba luego de un par de pasos.

Los estados de transición fueron obtenidos por el algoritmo de Berny tradicional, o bien utilizando el método cuasi-Newton guiado por tránsito sincrónico (STQN por su sigla en inglés). Este último método utiliza una aproximación de tránsito sincrónico cuadrático para mantenerse cercano a la región cuadrática del estado de transición y un algoritmo "cuasi-Newton" para completar la optimización, en coordenadas internas redundantes. El método converge de forma eficiente siempre que se proporcione una estimación empírica del Hessiano y estructuras de partida adecuadas. En el programa Gaussian pueden usarse distintas opciones, como QST2 y QST3. En este caso se utilizó la primera opción, la cual requiere dos especificaciones moleculares, para reactivos y productos, en el archivo de entrada, En varias ocasiones a fin de hallar el estado de transición se debió especificar la utilización de una grilla ultrafina, o bien optimizar estructuras con algunos ángulos diedros congelados y luego volverlas a optimizar con éstos ya descongelados, ya que de otro modo el sistema divergía y no podía encontrar los estados de transición buscados.

Las energías obtenidas provienen del cálculo de campo autoconsistente con la simulación de solvente PCM y fueron calculadas a 298 K, de acuerdo a los valores estándar del archivo de salida del programa Gaussian.

Para cada rotámero de la silla $^4C_1$ se generaron dos diagramas de energía separados, uno considerando que primero ocurre la interconversión y otro que ocurre primero la desprotonación. El gráfico de energía para el paso de sustitución se realizó por separado del resto de los pasos ya que los rangos involucrados son diferentes.

6.13.3.1 Nomenclatura de conformaciones y rotámeros

La nomenclatura de los distintos confórmeros sigue la convención usual para hidratos de carbono[36] la cual fue representada en la Figura 5.3.

Para poder diferenciar a los grupos de diferentes rotámeros de cada derivado se implementó un código de letras para identificar los ángulos χ_1 a χ_4, ω y χ_6:[37] **S** para ángulos entre –30 y 30°, **g** para 30-100°, **e** para 100-130°, **T** para 130-230°, **E** para 230-260° y **G** para 260°-330° (o sea entre –100º y –30º). El sentido de giro del cada ángulo diedro A-B-C-D se consideró mirando la proyección de Newman entre B y C y girando A en sentido horario con respecto a D. Es importante aclarar que los derivados pueden simplificarse al no poseer los seis ángulos exocíclicos cuando R_1 y/o R_2 es –H (ver Figura 5.7) Asimismo, al desprotonar O-3 desaparece el ángulo χ_3, en cuyo caso se utilizó la letra **d** para indicar dicha situación. Los ángulos diedros que no presentaron variaciones entre los rotámeros modelados se omitieron de la nomenclatura: χ_1 debe encontrarse en gauche negativo (valor cercano a -60°) por el efecto *exo*-anomérico,[36] mientras que ω y χ_6 generalmente tomaron valores cercanos a 60° (**g**) y 180° (**T**) respectivamente. Las letras se colocaron según el orden de los ángulos a continuación del nombre de la estructura. De esta manera una silla $^4C_1$ del derivado **5**, por ejemplo, que posea los ángulos χ_2 a χ_4 de valor cercano a 60° se denominó $^4C_{1\text{-}2g,3,g,4,g}$.

6.13.3.2 Parámetros de *puckering*

La representación geométrica de los parámetros de *puckering* de Cremer-Pople[38] se realizó sobre aquellas estructuras que se encuentran implicadas en el paso de interconversión de sillas. Los parámetros de *puckering* de cada estructura se obtuvieron utilizando un programa escrito originalmente por el Dr. L. Madsen (Colorado University) en Fortran y readaptado a Quick Basic por el Dr. C. Stortz.

Se graficaron las coordenadas ϕ y θ en dos semiesferas dibujadas como proyecciones acimutales ortogonales centradas en el ecuador, de manera análoga a lo realizado por Stortz.[39] La coordenada *Q* no se graficó debido a que ésta posee poca variación y presenta un único valor de energía mínima, fácilmente encontrado por el proceso de minimización. Por lo tanto, se considera que los confórmeros se encuentran en la capa externa de la esfera. Las líneas en el gráfico representan una estimación de los caminos que llevan de los estados de transición a los distintos mínimos. Aquellas líneas de mayor grosor muestran el camino de menor energía para la interconversión.

Bibliografía

1. Stortz, C. A., Cases, M. R. & Cerezo, A. S. (1997). *Carbohydrate Polymers*, *34*, 61–65.

2. Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A. & Smith, F. (1956). *Analytical Chemistry*, *28*, 350–356.

3. Filisetti-Cozzi, T. M. C. C. & Carpita, N. C. (1991). *Analytical Biochemistry*, *197*, 157–162.

4. Blumenkrantz, N. & Asboe-Hansen, G. (1973). *Analytical Biochemistry*, *54*, 484–489.

5. Ponce, N. M. A. Tesis Doctoral. *"Estudio del sistema de polisacáridos* Adenocystis utricularis*, un alga parda de las costas patagónicas argentinas de posible utilizació farmacológica"*, FCN-UNPSJB, 2006.

6. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. & Randall, R. J. (1951). *Journal of Biological Chemistry, 193*, 265–275.

7. Yaphe, W. & Arsenault, G. P. (1965). *Analytical Biochemistry*, *13*, 143–148.

8. Yaphe, W. (1960). *Analytical Chemistry*, *32*, 1327–1330.

9. Kolender, A. A. Tesis Doctoral. "*Polisacáridos de* Nothogenia fastigiata *y* Georgiella confluens *(Rhodophyta). Nuevos métodos de análisis para polisacáridos de algas.*", FCEyN-UBA, 1995.

10. Dodgson, K. S. & Price, R. G. (1962). *Biochemical Journal, 84*, 106–110.

11. Albersheim, P., Nevins, D. J., English, P. D. & Karr, A. (1967). *Carbohydrate Research*, *5*, 340–345.

12. Shea, E. M. & Carpita, N. C. (1988). *Journal of Chromatography, 445*, 424–428.

13. Turner, S. H. & Cherniak, R. (1981). *Carbohydrate. Research*, *95*, 137–144.

14. Stevenson, T. T. & Furneaux, R. H. (1991). *Carbohydrate Research, 210*, 277–298.

15. Jol, C. N., Neiss, T. G., Penninkhof, B., Rudolph, B. & De Ruiter, G. A. (1999). *Analytical Biochemistry*, *268*, 213–222.

16. Cases, M. R., Cerezo, A. S. & Stortz, C. A. (1995). *Carbohydrate Research, 269*, 333–341.

17. Errea, M. I., Kolender, A. A. & Matulewicz, M. C. (2001). *Botanica Marina*, *44*, 133–138.

18. Navarro, D. A. & Stortz, C. A. (2003). *Carbohydrate Research, 338*, 2111–2118.

19. Ciucanu, I. & Kerek, F. (1984). *Carbohydrate Research, 131*, 209–217.

20. Navarro, D. A., Flores, M. L. & Stortz, C. A. (2007). *Carbohydrate Polymers*, *69,* 742–747.

21. Anderson, N. S., Dolan, T. C. S., Lawson, C. J., Penman, A. & Rees, D. A. (1968). *Carbohydrate Research*, *7*, 468–473.

22. Ciancia, M., Noseda, M. D., Matulewicz, M. C. & Cerezo, M. C. (1993). *Carbohydrate Polymers*, *20*, 95–98.

23. Sassaki, G. L., Souza, L. M., Serrato, R. V., Cipriani, T. R., Gorin, P. A. J. & Iacomini, M. (2008). *Journal of Chromatography A, 1208*, 215–222.

24. Spellman, M. W., McNeil, M., Darvill, A. G., Albersheim, P. & Hendrick, K. (1983). *Carbohydrate Research*, *122*, 115–129.

25. Mariño, K., Marino, C., Lima, C., Baldoni, L. & de Lederkremer, R. M. (2005). *European Journal of Organic Chemistry, 14*, 2958–2964.

26. Leong, K. H., Chung, L. Y., Noordin, M. I., Mohamad, K., Nishikawa, M., Onuki, Y., Morishita, M. & Takayama, K. (2011). *Carbohydrate Polymers, 83*, 1507–1515.

27. Elboutachfaiti, R., Petit, E., Beuvain, C., Courtois, B., Courtois, J. & Delattre, C. (2010). *Carbohydrate Polymers*, *80*, 485–490.

28. Xu, M., Dai, H., Sun, X., Wang, S. & Wu, W. (2012). *Bioresources*, *7*, 1633–1642.

29. Denizot, F. & Lang, R. (1986). *Journal of Inmunological Methods, 89*, 271–277.

30. Allinger, N. L., Yuh, Y. H. & Lii, J-H. (1989). *Journal of the American Chemical Society*, *111*, 8551–8566.

31. Allinger, N. L., Rahman, M. & Lii, J-H. (1990). *Journal of the American Chemical Society*, *112*, 8293–8307.

32. Stortz, C. A. (2005). *Journal of Computational Chemistry*, *26*, 471–483.

33. MM3 (96) (1997). *Quantum Chemistry Program Exchange Bulletin, 17*, 3.

34. Gaussian 09, Revisión C.01, Frisch, M. J., Trucks, G. W., Schlegel, H. B., Scuseria, G. E., Robb, M. A., Cheeseman, J. R., Scalmani, G., Barone, V., Mennucci, B., Petersson, G. A., Nakatsuji, H., Caricato, M., Li, X., Hratchian, H. P., Izmaylov, A. F., Bloino, J., Zheng, G., Sonnenberg, J. L., Hada, M., Ehara, M., Toyota, K., Fukuda, R., Hasegawa, J., Ishida, M., Nakajima, T., Honda, Y., Kitao, O., Nakai, H., Vreven, T., Montgomery, Jr., J. A., Peralta, J. E., Ogliaro, F., Bearpark, M., Heyd, J. J., Brothers, E., Kudin, K. N., Staroverov, V. N., Kobayashi, R., Normand, J., Raghavachari, K., Rendell, A., Burant, J. C., Iyengar, S. S., Tomasi, J., Cossi, M., Rega, N., Millam, J. M., Klene, M., Knox, J. E., Cross, J. B., Bakken, V., Adamo, C., Jaramillo, J., Gomperts, R., Stratmann, R. E., Yazyev, O., Austin, A. J., Cammi, R., Pomelli, C., Ochterski, J. W., Martin, R. L., Morokuma, K., Zakrzewski, V. G., Voth, G. A., Salvador, P., Dannenberg, J. J., Dapprich, S., Daniels, A. D., Farkas, Ö., Foresman, J. B., Ortiz, J. V., Cioslowski, J. & Fox, D. J. Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2009.

35. Barone, V., Cossi, M. & Tomasi, J. (1998). *Journal of Computational Chemistry*, *19*, 404–417.

36. French, A. D. & Brady, J. W. (1989). *ACS Symposium Series, 430*, 1–19.

37. Stortz, C. A. & Cerezo, A. S. (2000). *Journal of Carbohydrate Chemistry, 19*, 1115–1130.

38. Cremer, J. A. & Pople, J. (1975). *Journal of the American Chemical Society, 97*, 1354−1358.

39. Stortz, C. A. (2010). *Journal of Physical Organic Chemistry, 23*, 1173–1186.

RESUMEN FINAL

Este trabajo de Tesis tuvo como objetivo el estudio y modificación de los polisacáridos presentes en *Hypnea musciformis*. Incluye un Capítulo introductorio, cuatro Capítulos de resultados (cada uno de ellos con una introducción específica del tema) y uno que contiene los materiales y métodos utilizados. A continuación, se resume la información detallada en cada Capítulo y los principales resultados obtenidos.

En el **Capítulo 1** se presenta una introducción general sobre los polisacáridos de la pared celular de algas rojas. Se describen las diferentes estructuras presentes, así como sus propiedades reológicas y biológicas. También se presentan los usos y comercialización de dichos polisacáridos y las distintas modificaciones químicas realizadas sobre los mismos.

El **Capítulo 2** contiene los resultados del análisis estructural y reológico de los polisacáridos del alga roja *Hypnea musciformis*. Los mismos fueron extraídos con agua a temperatura ambiente y a 90 °C y luego fraccionados por precipitación por KCl. El fraccionamiento de ambos extractos demostró que éstos estaban compuestos por tres fracciones principales, aunque aquellas provenientes del extracto en frío poseían menor peso molecular. Las fracciones que precipitaron a 0,125M de KCl tenían una estructura consistente con la de un κ-carragenano casi ideal. Aquellas que precipitaron a concentraciones mayores de 0,125M de KCl estaban compuestas mayoritariamente por díadas de κ-carragenano y una proporción menor de estructuras de ι-carragenano y su precursor ν-carragenano. Por último, las fracciones solubles en KCl 2M resultaron ser una mezcla de carragenanos, otros galactanos, y otros polisacáridos menores y proteínas.

El análisis de las propiedades reológicas de estas fracciones mostró que sólo aquellas compuestas por carragenanos forman geles verdaderos. En cada uno de los extractos, la elasticidad de los geles aumentó con la proporción de κ-carragenano presente y el peso molecular. Por otro lado, la temperatura de gelificación y fusión incrementó con la proporción de ι-carragenano presente.

En el **Capítulo 3** se continuó con el estudio de los polisacáridos de *Hypnea musciformis*, centrándose en los resultados del subfraccionamiento por columna de intercambio aniónico de la fracciones solubles en KCl 2M y la determinación estructural. Las fracciones eluidas se pudieron dividir en tres grupos según la proporción de D- y L-galactosa que poseían: agaranos, híbridos DL (o mezclas de galactanos) y carragenanos.

Con la concentración 0,2M de NaCl eluyeron los agaranos conjuntamente con el almidón de florídeas. Los galactanos tenían una baja proporción de 3,6-anhidro-L-galactosa y se caracterizaron por estar poco sustituidos, aún cuando se observó sustitución en el C-3 de la α-L-galactosa, principalmente por sulfato y xilosa terminal.

Los híbridos DL eluyeron a concentraciones intermedias. La relación D-galactosa a L-galactosa en las fracciones se incrementó al aumentar la fuerza iónica del solvente de elución. Esta tendencia también se observó para la proporción de sulfato, mientras que la proporción de xilosa y 3-*O*-metilgalactosa terminales disminuyó con la fuerza iónica del solvente de elución. La sustitución en estas fracciones fue variada pero se observó una importante proporción de α-L-galactosa sustituida en C-3, tanto por grupos sulfato como por monosacáridos terminales. La proporción de 3,6-anhidrogalactosa presente fue baja o incluso nula. Las fracciones provenientes de **C-2S** poseían un componente que no pudo ser identificado como uno de los azúcares conocidos y se encontraba unido principalmente al C-6 de las unidades de β-galactosa.

Por último, los carragenanos eluyeron con soluciones 2M de NaCl. Estos polisacáridos tenían una estructura consistente con un híbrido κ/ι/ν-carragenano.

En el **Capítulo 4**, el cual se dividió en dos secciones, se exponen los resultados obtenidos al oxidar selectivamente galactanos de algas rojas y la actividad antiviral de los nuevos productos generados.

La primera parte de la Sección 4 contiene los resultados de oxidación selectiva del C-6 de la β-galactosa del κ-carragenano con 2,2,6,6-tetrametilpiperidinil-1-oxilo (TEMPO). Se buscaron las condiciones óptimas de reacción y se aplicaron estos resultados para la oxidación del ι-carragenano y de la agarosa.

La oxidación selectiva de polisacáridos con TEMPO ha sido estudiada para una gran variedad de polisacáridos, sin embargo en este trabajo es la primera vez que se realiza con carragenanos. Los resultados demostraron que la oxidación del C-6 de la β-galactosa del κ-carragenano a ácido galacturónico con TEMPO utilizando las condiciones clásicas (NaClO/NaBr en medio básico como oxidante primario) modificadas para polisacáridos fue efectiva pero no selectiva. Un análisis más detallado de la reacción mostró que la posición C-2 de la 3,6-anhidrogalactosa también se podía oxidar en estas condiciones de reacción. Un estudio utilizando modelado molecular permitió explicar estos resultados al demostrar que

dicha posición se encontraba poco impedida estéricamente, a diferencia de los demás alcoholes secundarios presentes, favoreciendo la reacción.

Si bien fue imposible evitar que ocurra la sobreoxidación, se pudo revertir la misma. Al finalizar la reacción utilizando $NaBH_4$ en vez de etanol, no sólo se destruyó el reactivo, sino también se redujo el carbonilo generado en el C-2 de la 3,6-anhidrogalactosa sin que se vea afectado el carboxilato en C-6 del ácido galacturónico. Asimismo, esta reducción resultó diastereoespecífica al rendir únicamente 3,6-anhidrogalactosa como producto.

Una búsqueda de las condiciones óptimas de reacción mostró que trabajar a pH 9,5-10, con NaOH como base y con un tiempo de reacción de 1 a 2 h disminuía la sobreoxidación y la despolimerización de los polisacáridos oxidados.

Utilizando las condiciones óptimas de reacción, se generaron productos de oxidación total y parcial del κ-carragenano, ι-carragenano y agarosa. Estos fueron caracterizados química y espectroscópicamente.

La segunda Sección del Capítulo 4 presenta los resultados de la actividad frente al virus del herpes simplex tipo 1 (HSV-1) y tipo 2 (HSV-2) de los carragenanos oxidados. Se eligieron distintos carragenanos oxidados a fin de observar el efecto de proporción de producto oxidado y de sulfato, así como el efecto del peso molecular. Los resultados mostraron que sólo la actividad de los derivados del κ-carragenano se veía significativamente favorecida por la oxidación. En particular, se observó que existe una relación óptima entre la proporción de galactosa y ácido galacturónico en el polisacárido cercana a 1:2.

En el **Capítulo 5** se realizó el estudio por modelado molecular (DFT: M06-2X/6-31+G(d,p) con PCM) de la reacción de tratamiento alcalino con derivados del metil α-D-galactopiranósido 6-sulfato. Los distintos derivados analizados varían en los sustituyentes que poseen en C-2 (–H, –OH u $–OSO_3^-$) y en C-4 (–H u –OMe) a fin de comprender el efecto de éstos en el camino de reacción. Se analizaron los pasos de interconversión-desprotonación o desprotonación-interconversión así como el de sustitución. También se estudiaron los parámetros de *puckering* de las estructuras modeladas en los pasos de interconversión.

Los resultados mostraron que el paso determinante de la reacción era el de sustitución nucleofílica intramolecular. Este paso no se vio afectado por la presencia de sustituyentes en C-4 y/o en C-2, siendo la energía de activación para todos los compuestos estudiados muy similar.

Asimismo, no se pudo observar una preferencia en el orden de los pasos de desprotonación del O-3 e interconversión de la silla $^4C_1$ a $^1C_4$. En general, la energía de activación del paso limitante del camino conformacional de interconversión de sillas no varió significativamente entre las estructuras protonadas y desprotonadas en O-3. Por otro lado, el HO-3 de las sillas $^4C_1$ de los distintos compuestos resultó ser más acídico que el agua, lo que implica que su desprotonación está favorecida. Estos resultados se cumplieron principalmente para los derivados con sustitución similar a la de los carragenanos reales.

Las distintas conformaciones obtenidas para cada compuesto poseían valores de *puckering* cercanos a la idealidad. La excepción es el $^{2,5}B$ el cual generalmente tenía un valor de θ marcadamente inferior a los 90°. Se observó que la presencia de OMe en C-4 favorecía la estructura ideal del bote mientras que cuando en C-2 hay un oxhidrilo en conformación *gauche* positiva o un grupo sulfato, el bote se deforma al punto de ser más semejante a una semisilla o a un sobre que a un bote.

En el **Capítulo 6** se especifican los materiales utilizados, así como se describen todos los métodos aplicados durante el desarrollo de la Tesis.

Hasta este momento las distintas partes de este trabajo de Tesis dieron lugar a las siguientes publicaciones:

• Cosenza, V. A., Navarro, D. A., Fissore, E. N., Rojas, A. M. & Stortz, C. A.
Chemical and rheological characterization of the carrageenans from *Hypnea musciformis* (Wulfen) Lamoroux
Carbohydrate Polymers, **2014**, 102, 780-789.

• Cosenza, V. A., Navarro, D. A., Pujol, C. A., Damonte, E. B. & Stortz, C. A.
Partial and total C-6 oxidation of gelling carrageenans. Modulation of the antiviral activity with the anionic character
Carbohydrate Polymers, **2015**, 128, 199-206.

Además, en el período de duración de esta Tesis se trabajó en otros temas que generaron la siguiente publicación:

• Cosenza, V. A., Navarro, D. A., & Stortz, C. A.
Usage of α-picoline borane for the reductive amination of carbohydrates
ARKIVOC, **2011**, vii, 182-194.