

UNIVERSIDAD DE VALENCIA
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS
DEPARTAMENTO DE QUIMICA ORGANICA

"ESTUDIO DE LOS POLISACARIDOS DEL QUERCUS SUBER"

Memoria presentada para optar
al Grado de Doctor en Ciencias
químicas por



Fdo: Amparo Asensio Martínez

UMI Number: U603116

All rights reserved

INFORMATION TO ALL USERS

The quality of this reproduction is dependent upon the quality of the copy submitted.

In the unlikely event that the author did not send a complete manuscript and there are missing pages, these will be noted. Also, if material had to be removed, a note will indicate the deletion.



UMI U603116

Published by ProQuest LLC 2014. Copyright in the Dissertation held by the Author.
Microform Edition © ProQuest LLC.

All rights reserved. This work is protected against
unauthorized copying under Title 17, United States Code.



ProQuest LLC
789 East Eisenhower Parkway
P.O. Box 1346
Ann Arbor, MI 48106-1346

**FACULTAD QUIMICA
BIBLIOTECA**

Cat.

Encuad.

Ent. 2670

Mat. 547(043)

Sell.

Test.

Top.

231



Ri. 18690804

R. 2670

D. ELISEO SEOANE BARDANCA, Catedrático Numerario de Química Orgánica de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad de Valencia.

CERTIFICA:

Que Amparo Asensio Martínez ha realizado en los laboratorio del Departamento de Química Orgánica de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad de Valencia y bajo mi dirección, el trabajo que para optar al Grado de Doctor en Ciencias Químicas presenta con el título de "Estudio de los polisacáridos del Quercus Suber".

Y para que de ello quede constancia, firmo la presente en Burjassot a 21 de Mayo de 1985.

Fdo: Eliseo Seoane Bardanca

A mis padres

Al término de este trabajo quiero expresar mi agradecimiento:

Al Dr.D. Eliseo Seoane Bardanca, Catedrático de este Departamento de Química Orgánica por la dirección de este trabajo.

Al Dr.D.Manuel Gómez Guillén, Catedrático de Química Orgánica de la Universidad de Sevilla en cuyo Departamento se ha realizado parte de este trabajo.

A los Drs.D.Antonio Gil Serrano y Dña.Pilar Tejero Mateo del Departamento de Química Orgánica de la Universidad de Sevilla por su ayuda y estímulo para finalizar este trabajo, así como por la realización de análisis cromatográficos.

Al Dr.D.Manuel Menéndez Gallego del Instituto Nacional de Toxicología de Sevilla por la realización de espectros de masas.

Al Dr.D.Francisco Gaviña Ribelles, Profesor Titular del Colegio Universitario de Castellón por su generosa ayuda.

A Vicenta García Marín por su eficiente labor mecanográfica.

A todos los compañeros del Departamento que de un modo u otro han contribuido al desarrollo de este trabajo y especialmente a Concha Collar Esteve por su ayuda y desinteresada colaboración.

INDICE

I. INTRODUCCION

I.1. Estructura y propiedades físicas del corcho.....	1
I.2. Composición del corcho	3
I.3. Polímeros estructurales de las paredes celulares	5
I.3.1. Las hemicelulosas	7
I.3.2. La celulosa	8

PARTE TEORICA

II. AISLAMIENTO DE LA HOLOCELULOSA DEL CORCHO

II.1. Extracciones previas	12
II.2. Despolimerización del corcho. Eliminación de la suberina	12
II.3. Métodos de deslignificación	14
II.3.1. Deslignificación del corcho	17

III. ESTUDIO DE LA HOLOCELULOSA

III.1. Caracterización de la holocelulosa. Datos es- pectroscópicos	19
III.2. Hidrólisis de la holocelulosa	20
III.2.1. Hidrólisis ácida	20
III.2.1.1. Datos espectroscópicos de los monosacáridos	21
III.2.1.2. Identificación de los monosacá- ridos por cromatografía gaseosa.	23
III.2.1.3. Determinación cuantitativa de los monosacáridos	29
III.2.1.3.1. Formación de los acetatos de alditoles	29
III.2.1.3.2. Datos espectroscópicos .	31
III.2.1.3.3. Identificación de los mo- nosacáridos	33
III.2.2. Hidrólisis enzimática (I)	44
III.2.2.1. Identificación de los monosa- cáridos	44
III.2.2.2. Determinación cuantitativa de los monosacáridos	46

III.2.2.3. Hidrólisis ácida de los oligosacáridos	48
III.2.2.3.1. Determinación cuantitativa de los monosacáridos	48
III.2.2.4. Hidrólisis ácida del residuo no hidrolizado enzimáticamente	48
III.2.2.4.1. Determinación cuantitativa de los monosacáridos	50
III.2.3. Hidrólisis enzimática (II)	50
III.2.3.1. Determinación cuantitativa de los monosacáridos	50
III.3. Metilación de la holocelulosa	53
III.3.1. Caracterización de la holocelulosa metilada	55
III.3.2. Hidrólisis ácida	57
III.3.2.1. Identificación de los monosacáridos parcialmente metilados..	57
III.2.3. Reducción de la holocelulosa metilada.....	57
III.3.3.1. Datos espectroscópicos	60
III.3.3.2. Hidrólisis ácida. Obtención de los monosacáridos parcialmente metilados	62
III.3.3.2.1. Identificación de los monosacáridos parcialmente metilados	63

IV. ESTUDIO DE LA CELULOSA

IV.1. Aislamiento de la celulosa	80
IV.2. Datos espectroscópicos	82
IV.3. Hidrólisis ácida	83
IV.3.1. Datos espectroscópicos de los monosacáridos	83
IV.3.2. Identificación de los monosacáridos ..	85

IV.3.3. Determinación cuantitativa de los monosacáridos	85
IV.3.3.1. Formación de los acetatos de alditoles	85
IV.3.3.2. Identificación de los monosacáridos por cromatografía gas-líquido	87
IV.4. Acetólisis de la celulosa	87
IV.4.1. Datos espectroscópicos	89
IV.4.2. Desacetilación.....	89
IV.4.2.1. Estudio de los oligosacáridos por cromatografía sobre papel	91
IV.5. Metilación de la celulosa	92
IV.5.1. Datos espectroscópicos	93
IV.5.2. Hidrólisis ácida	93
IV.5.2.1. Identificación de los monosacáridos parcialmente metilados	95

V. ESTUDIO DE LA HEMICELULOSA

V.1. Aislamiento de la hemicelulosa	99
V.1.1. Datos espectroscópicos	100
V.2. Hidrólisis ácida total	101
V.2.1. Identificación de los monosacáridos por cromatografía gaseosa	101
V.2.2. Determinación cuantitativa de los monosacáridos	103
V.2.3. Determinación de los ácidos urónicos ...	104
V.3. Hidrólisis ácida parcial	109
V.3.1. Identificación de los monosacáridos por cromatografía gaseosa	109
V.4. Metilación de la hemicelulosa	113
V.4.1. Datos espectroscópicos	114
V.4.2. Hidrólisis ácida	120
V.4.2.1. Identificación de los monosacáridos parcialmente metilados	121
V.4.3. Reducción de la hemicelulosa metilada ..	126

V.4.3.1.	Datos espectroscópicos	126
V.4.3.2.	Hidrólisis ácida	127
V.4.3.2.1.	Identificación de los monosacá- ridos parcialmente metilados ...	129
V.5.	Caracterización del ácido 4-O-metil-D-glucuró- nico	142
VI.	HEMICELULOSAS A y B	
VI.1.	Extracción alcalina de la hemicelulosa. Hemi- celulosas A y B	144
VI.2.	Aislamiento de la hemicelulosa A	144
VI.2.1.	Hidrólisis ácida	144
VI.2.1.1.	Determinación cuantitativa de los monosacáridos	146
VI.2.2.	Purificación de la hemicelulosa A. Ob- tención de las fracciones A-I y A-II.	146
VI.3.	ESTUDIO DE LA FRACCION A-I	
VI.3.1.	Datos espectroscópicos	149
VI.3.2.	Hidrólisis ácida total	149
VI.3.2.1.	Determinación cuantitativa de los monosacáridos	150
VI.3.3.	Hidrólisis ácida parcial	154
VI.3.3.1.	Análisis de los oligosacáridos por cromatografía sobre papel ..	155
VI.3.3.2.	Análisis de los oligosacáridos por cromatografía líquida de al- ta resolución	162
VI.3.4.	Metilación de la fracción A-I	165
VI.3.4.1.	Datos espectroscópicos	165
VI.3.4.2.	Hidrólisis ácida	170
VI.3.4.2.1.	Identificación de los mono- sacáridos parcialmente meti- lados	170
VI.4.	ESTUDIO DE LA FRACCION A-II	
VI.4.1.	Datos espectroscópicos	180
VI.4.2.	Hidrólisis ácida	181

VI.4.2.1.	Determinación cuantitativa de los monosacáridos	181
VI.5.	Aislamiento de la hemicelulosa B	183
VI.5.1.	Datos espectroscópicos	183
VI.5.2.	Hidrólisis ácida	184
VI.5.2.1.	Determinación cuantitativa de los monosacáridos	184
VI.5.3.	Purificación de la hemicelulosa B.Obtención de las fracciones B-I y B-II	184
VI.6.	ESTUDIO DE LA FRACCION B-I	
VI.6.1.	Datos espectroscópicos	187
VI.6.2.	Estudio de la homogeneidad de la fracción B-I	187
VI.6.3.	Hidrólisis ácida	189
VI.6.3.1.	Determinación cuantitativa de los monosacáridos	189
VI.6.3.2.	Determinación cuantitativa de ácidos urónicos	195
VI.6.4.	Hidrólisis ácida parcial	196
VI.6.4.1.	Análisis de los oligosacáridos por cromatografía sobre papel ..	196
VI.6.5.	Metilación de la fracción B-I	205
VI.6.5.1.	Datos espectroscópicos	205
VI.6.5.2.	Hidrólisis ácida	207
VI.6.5.2.1.	Identificación de los monosacáridos parcialmente metilados	207
VI.6.6.	Caracterización del ácido 4-O-metil-D-glucurónico	221
VI.7.	ESTUDIO DE LA FRACCIÓN B-II	
VI.7.1.	Datos espectroscópicos	223
VI.7.2.	Estudio de la homogeneidad de la fracción B-II	224
VI.7.3.	Hidrólisis ácida	224

VI.7.3.1. Determinación cuantitativa de los monosacáridos	224
VI.7.4. Hidrólisis ácida parcial. Identificación de los monosacáridos	224
VI.7.4.1. Análisis de los oligosacáridos por cromatografía sobre papel ...	228
VI.7.4.2. Análisis de los oligosacáridos por cromatografía líquida de alta resolución	231
VI.7.5. Metilación	231
VI.7.5.1. Datos espectroscópicos	232
VI.7.5.2. Hidrólisis ácida	232
VI.7.5.2.1. Identificación de los monosacáridos parcialmente metilados	234

VII. ESTUDIO DE UNA XILANA PATRON

VII.1. Datos espectroscópicos	246
VII.2. Metilación	247
VII.2.1. Datos espectroscópicos	247
VII.2.2. Hidrólisis ácida	252
VII.2.2.1. Identificación de los monosacáridos parcialmente metilados	252

PARTE EXPERIMENTAL

I. TECNICAS GENERALES

I.1. Punto de fusión	255
I.2. Poder rotatorio	255
I.3. Técnicas cromatográficas	255
I.3.1. Preparación de los acetatos de alditoles	259
I.3.1.1. Determinación cuantitativa de los monosacáridos	260
I.4. Técnicas espectroscópicas	260

II. AISLAMIENTO DE LA HOLOCELULOSA

II.1. Extracciones previas	262
II.2. Despolimerización del corcho. Eliminación de la suberina	262
II.3. Deslignificación del corcho	263

III. ESTUDIO DE LA HOLOCELULOSA

III.1. Caracterización de la holocelulosa	264
III.2. Hidrólisis ácida	264
III.2.1. Identificación de los monosacáridos	265
III.2.2. Determinación cuantitativa de los monosacáridos	265
III.3. Hidrólisis enzimática (I)	266
III.3.1. Identificación de los monosacáridos	266
III.3.2. Hidrólisis ácida de los oligosacáridos. Determinación cuantitativa de los monosacáridos	267
III.3.3. Hidrólisis ácida del residuo no hidrolizado enzimáticamente. Determinación cuantitativa de los monosacáridos	267
III.4. Hidrólisis enzimática (II)	268
III.5. Metilación de la holocelulosa	268
III.5.1. Hidrólisis ácida. Identificación de los monosacáridos parcialmente metilados	269
III.5.2. Reducción de la holocelulosa metilada	270
III.5.2.1. Hidrólisis ácida. Identificación de los monosacáridos parcialmente metilados	270

IV. ESTUDIO DE LA CELULOSA

IV.1. Aislamiento	271
IV.2. Hidrólisis ácida	271
IV.2.1. Identificación de los monosacáridos	272

IV.3.	Acetólisis de la celulosa	272
IV.3.1.	Análisis de los oligosacáridos por cromatografía sobre papel	273
IV.4.	Metilación de la celulosa	273
IV.4.1.	Hidrólisis ácida. Identificación de los monosacáridos parcialmente metila- dos	275
V. ESTUDIO DE LA HEMICELULOSA		
V.1.	Aislamiento	276
V.2.	Hidrólisis ácida	277
V.2.1.	Identificación de los monosacáridos	277
V.2.2.	Determinación cuantitativa de ácidos urónicos	278
V.3.	Hidrólisis ácida parcial. Identificación de los monosacáridos	278
V.4.	Metilación de la hemicelulosa	279
V.4.1.	Hidrólisis ácida. Identificación de los monosacáridos parcialmente metilados ..	280
V.4.2.	Reducción de la hemicelulosa metilada .	280
V.4.2.1.	Hidrólisis ácida. Identificación de los monosacáridos parcialmente meti- lados	281
V.5.	Caracterización del ácido 4-O-metil-D-glucuró- nico	282
VI. HEMICELULOSAS A y B		
VI.1.	Aislamiento de la hemicelulosa A.....	283
VI.1.1.	Hidrólisis ácida. Identificación de los monosacáridos	283
VI.1.2.	Purificación de la hemicelulosa A. Obtención de las fracciones A-I y A-II	284
VI.2.	ESTUDIO DE LA FRACCION A-I	
VI.2.1.	Hidrólisis ácida. Identificación de los monosacáridos	285

VI.2.2.	Hidrólisis parcial	285
VI.2.2.1.	Análisis de los oligosacáridos..	285
VI.2.3.	Metilación de la fracción A-I	286
VI.2.3.1.	Hidrólisis ácida. Identificación de los monosacáridos parcialmente metilados	287
VI.3.	ESTUDIO DE LA FRACCION A-II	
VI.3.1.	Hidrólisis ácida. Identificación de los monosacáridos	288
VI.4.	Aislamiento de la hemicelulosa B	288
VI.4.1.	Hidrólisis ácida. Identificación de los monosacáridos	289
VI.4.2.	Purificación de la hemicelulosa B. Ob- tención de las fracciones B-I y B-II..	289
VI.5.	ESTUDIO DE LA FRACCION B-I.	
VI.5.1.	Hidrólisis ácida. Identificación de los monosacáridos	290
VI.5.1.1.	Determinación cuantitativa de áci- dos urónicos	291
VI.5.2.	Hidrólisis parcial	291
VI.5.2.1.	Análisis de los oligosacáridos...	292
VI.5.3.	Metilación de la fracción B-I	292
VI.5.3.1.	Hidrólisis ácida. Identificación de los monosacáridos parcialmente metilados	293
VI.5.4.	Caracterización del ácido 4-O-metil-D- glucurónico	294
VI.6.	ESTUDIO DE LA FRACCION B-II	
VI.6.1.	Hidrólisis ácida. Identificación de los monosacáridos	295
VI.6.2.	Hidrólisis ácida parcial	295
VI.6.2.1.	Análisis de los oligosacáridos por cromatografía sobre papel ...	296
VI.6.3.	Metilación de la fracción B-II.....	296
VI.6.3.1.	Hidrólisis ácida. Identificación de los monosacáridos parcialmente metilados	297

VII. ESTUDIO DE UNA XILANA PATRON	
VII.1. Metilación de la xilana	298
VII.1.1. Hidrólisis ácida. Identificación de los monosacáridos parcialmente meti- lados	298
VIII. RESUMEN Y CONCLUSIONES	299
IX. BIBLIOGRAFIA	304



I. INTRODUCCION

I.1. Estructura y propiedades físicas del corcho

El corcho, como se sabe, constituye la corteza del alcornoque "Quercus Suber", y es genuino de los países del mediterráneo. El alcornoque pertenece a la familia del roble y éstos son árboles de hoja perenne que alcanzan grandes proporciones, de 12 a 18 m. de altura y de 1 a 1,3 m. de diámetro. El alcornoque tiene dos capas protectoras, la corteza exterior que es el corcho, y una corteza mas interna. El cambium se produce en la corteza mas interna, y por tanto, el corcho se puede quitar sin dañar al árbol. Cuando el alcornoque tiene de 15 a 20 años ó su corteza tiene un espesor de 12 a 15 mm se recoge el corcho del árbol. Esta primera corteza recibe el nombre de corcho macho y tiene poco interés comercial. El corcho crece otra vez, pero mas rápidamente que en el corcho original y estos procesos se repiten a intervalos de ocho a diez años. Estas nuevas capas de corcho se denominan corcho hembra y su calidad mejora en cada cosecha. El cultivo del corcho tiene lugar en los países del mediterráneo. Portugal, España, Francia e Italia en Europa y Argelia, Marruecos y Túnez en Africa son los países productores de corcho.

El corcho es un parénquima muy homogéneo, formado casi exclusivamente por membranas celulares sin meato. Las células del corcho en cortes longitudinales aparecen al microscopio como hexágonos siendo el espesor de sus paredes de 1,5 a 2 micras, como se observa en la Fig.I.1. El corcho contiene, encerrado en sus células, un 90% de aire, lo que es la causa principal de su baja densidad de 0,1 a 0,2 (Kirk, 1965). En un centímetro cúbico hay de 30 a 40 millones de células llenas de aire que están unidas por una sustancia natural resinosa, que son las líneas oscuras que se ven en la Fig.I.1.



Robert Hooke, en 1665, dió una descripción del corcho, que observó bajo el microscopio, e introdujo el

término de célula. Lewis mostró que las células del corcho normalmente tienen 14 caras, ocho de ellas son hexagonales y seis cuadriláteras (Lewis, 1928). Esta formación da a las células el mayor volumen posible con la mínima cantidad de superficie, y permite a las células estar juntas de forma

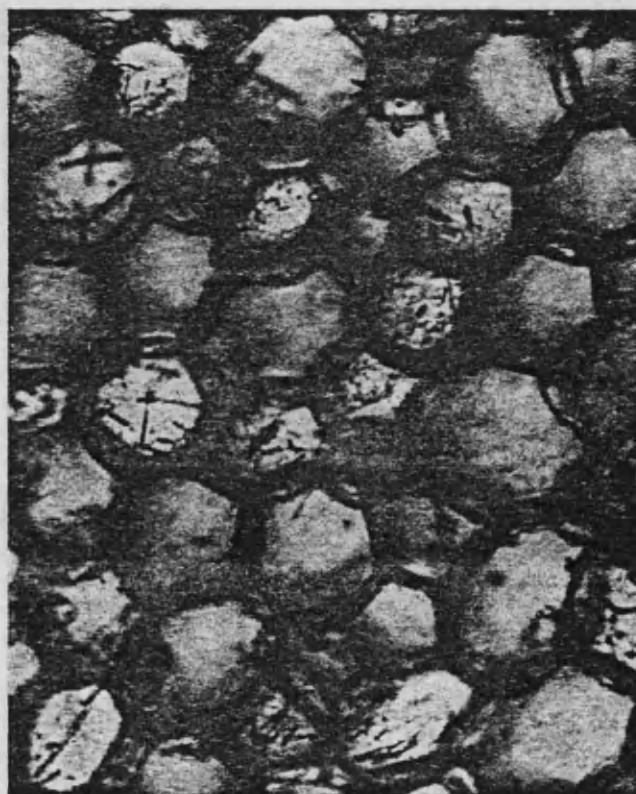


Fig. I.1. Células del corcho

compacta. Cuando las células del corcho se aíslan por la acción química adecuada y se observan al microscopio, aparecen como cuerpos de cuatro ó seis caras, dependiendo de la cara de la célula que predomine.

Esta estructura es de extraordinaria importancia para explicar de forma satisfactoria la mayoría de las propiedades típicas del corcho. Las células del corcho componen mas de cuatro quintos del volumen del corcho. Tanto la

naturaleza química de las paredes de las células, que contienen suberina, como el hecho de que estén rellenas de aire hace que el corcho sea impermeable al agua, elástico e imputrescible. El corcho es también resistente al aceite, a causa de su no capilaridad, resultado de su estructura unicelular. La penetración del corcho por líquidos, en general, es extremadamente difícil (Ribas, 1952).

La gran eficacia del corcho como aislante térmico ó acústico y como amortiguador de vibraciones es debida al hecho de que en una capa de un centímetro de espesor hay de 300 a 350 filas de células que se comportan como compartimentos estancos. La naturaleza química de las paredes de dichas células contribuye a ello, igualmente, ya que son elásticas, resistentes, de pequeño paso específico imputrescibles y no higroscópicas etc...

1.2. Componentes del corcho

El corcho se compone de los grupos de sustancias siguientes: 1°. Sustancias que se pueden extraer por la acción de disolventes y sin que el corcho sufra alteración ninguna. Pertenecen a este grupo a) los taninos y sustancias análogas, hidrosolubles, que se extraen en agua; b) los ceroides, entre los que se hallan la cerina y la friedelina, compuestos policíclicos que pertenecen al grupo de los terpenos, que se extraen con disolventes orgánicos, alcohol-benceno. 2°. Sustancias poliméricas de alto peso molecular. Dentro de este grupo están: a) la suberina, alto polímero formado por epoxi- e hidroxiaácidos, esterificados entre sí. Este es el componente químico típico del corcho, que forma parte de las paredes de las células y a las que el corcho debe sus aplicaciones técnicas; b) la lignina, polímero que todavía no se ha estudiado en su totalidad. La lignina, junto con la celulosa y compuestos

análogos, queda como residuo tras la despolimerización del corcho y se elimina aquella por medio de una oxidación con dióxido de cloro; c) el residuo dejado por los tratamientos anteriores y que, tal como se observó por su estudio, consta de una mezcla de polisacáridos, que denominamos "holocelulosa", siendo la celulosa el componente mayoritario.

De todos estos componentes el mas ampliamente estudiado ha sido la suberina. Concretamente en este Departamento se ocuparon de su estudio abarcando tanto su composición monomérica como su estructura. La despolimerización del corcho se realizó por transesterificación en metanol con la cantidad precisa de metóxido sódico, convirtiendo todos sus monosacáridos en ésteres metílicos que se separaron posteriormente en nueve tipos y que se identificaron como ésteres metílicos de: ácidos grasos monocarboxílicos saturados e insaturados; ácidos grasos dicarboxílicos saturados e insaturados; epoxiácidos; hidroxiepoxiácidos y ácidos e hidroxiaácidos glicólicos (Arnó, 1981). En cuanto a la determinación de la estructura de dicho polímero se realizó un marcaje de los hidroxilos libres del mismo con posterior despolimerización por metanolisis, averiguando que monómeros contenían grupos OH libres y que monómeros los tenían esterificados; con ello se dedujo: que la estructura de la suberina era lineal estando implicadas las uniones ésteres exclusivamente entre grupos carboxilo e hidroxilos primarios (Agulló, 1981 y 1982).

El componente del corcho menos estudiado es la lignina. Este polímero, formado por unidades de fenilpropano, posiblemente funciona como trabadura para mantener unidas las células del corcho, ya que cuando ésta se elimina, la estructura del corcho se rompe y las células se separan.

Después de haberse eliminado del corcho los taninos, la ceras, los ácidos grasos, la glicerina y la lig-

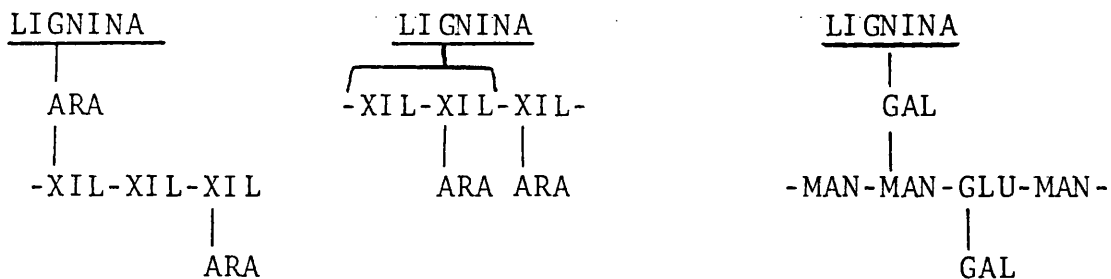
nina, las paredes de las células del corcho permanecen. Las paredes celulares son resistentes a la acción química y están compuestas de celulosa y sustancias muy semejantes a la celulosa, es decir de hemicelulosas (Cote, 1965). Las paredes celulares son la barrera estructural de algunas moléculas contra agentes patógenos (McNeil, 1978) y también son una fuente de alimento y energía.

El éxito en el estudio estructural de las paredes celulares depende ampliamente de la fuerza y de la homogeneidad de la preparación de la pared celular examinada. Un problema importante y que se plantea frecuentemente es la purificación de las paredes celulares. Generalmente, las paredes celulares se purifican por ser insolubles en soluciones salinas tamponadas y en disolventes orgánicos. La insolubilidad de los componentes estructurales de las paredes celulares es la causa de otro problema técnico. Para estudiar la estructura de los componentes individuales de la pared, estos componentes deben ser solubilizados y purificados. En esencia, esto es imposible de hacer, sin alterar las estructuras de los componentes de la pared.

1.3. Polímeros estructurales de las paredes celulares

En las paredes celulares de las plantas la sustancia fundamental del esqueleto consiste principalmente de α -celulosa, largas cadenas de macromoléculas en forma de hilo que están ordenadas en racimos. Dentro de esos racimos los grupos hidroxilo libres del resto de β -glucopiranosas con enlaces glicosídicos 1:4 sirve para alinear las moléculas de celulosa por enlaces de hidrógeno en una estructura organizada que en algunas partes está tan bien ordenada que exhibe cristalinidad, mientras que en otras se encuentra una estructura menos ordenada y más amorfa (Hirst, 1955). Sin embargo, pocas células poseen una pared celular consistente casi enteramente de celulosa. En la mayoría de los casos, más específicamente con material lignificado, los

racimos de celulosa están incrustados en una masa amorfa de materia de lignina y de polisacáridos, dando un elemento estructural fuerte y rígido, para el que se puede encontrar una analogía con el hormigón armado (Cote, 1967; Frey-Wyssling, 1965). La naturaleza exacta de la asociación en la pared celular entre la lignina, la masa amorfa de la materia de carbohidrato no celulósico, y la verdadera celulosa no se conoce bien pero se han desarrollado métodos para la eliminación de la lignina de los carbohidratos que se detallan mas adelante. Una vez eliminada la lignina nos queda la llamada "holocelulosa" a partir de la cual los constituyentes no celulósicos se pueden extraer por álcalis acuosos. A estos constituyentes se les llama "hemicelulosas" (Hirst, 1955). Probablemente no existe ningún enlace químico entre las celulosa y las hemicelulosas pero hay suficiente adhesión mutua por enlaces de hidrógeno y por fuerzas de Van der Waals (Bauer, 1973). Sin embargo, la mayoría de los estudios indican que debe existir uniones covalentes entre la hemicelulosa y la lignina (Sjöström, 1981, p.79). La separación y el análisis de los complejos lignina-carbohidrato han conducido a la conclusión de que los componentes de las hemicelulosas están unidos a la lignina principalmente a través de arabinosa, xilosa y galactosa.



I.3.1. Las hemicelulosas

Antiguamente se definían como sustancias insolubles en agua, solubles en álcalis, que estaban íntimamente asociadas a la celulosa. También se creía que eran intermedios en la biosíntesis de la celulosa. En época más reciente se han vuelto a definir como polisacáridos no celulósicos y no pectínicos presentes en las paredes celulares de plantas terrestres superiores. Al igual que la celulosa, la mayoría de las hemicelulosas funcionan como material de soporte en las paredes celulares. Constituyen hasta el 15-20% de las maderas y de 25 a 40 por cien de los residuos de cosechas agrícolas como paja, tallos de maíz, mazorcas, etc. Las clases principales se clasifican en tres grupos, Xilanas, Mananas y Galactanas, según la principal unidad monosa que las constituyen. Los tamaños moleculares varían desde 50 a 200 unidades de azúcar (Noller, 1968).

Las xilanas son las más abundantes y más ampliamente distribuidas. La xilana del esparto parece ser un homopolisacárido lineal constituido por unidades de D-xilopiranosas con enlaces $\beta(1,4)$. Muchas otras xilanas tienen la misma estructura básica, pero tienen otros azúcares como grupos terminales o unidos como cadenas laterales. En este aspecto es común la L-arabinosa y suele estar presente como la forma furanosa no reductora. En las cadenas laterales también están presentes con frecuencia el ácido D-glucurónico y el 4-O-metil-D-glucurónico.

Las glucomananas consisten en D-glucosa y D-manosa unidas 1,4 por enlaces β formando la mitad de la fracción hemicelulosa de la madera de coníferas y también se encuentran en maderas duras. La razón de glucosa a manosa es variable y no se sabe si una y otra están unidas de modo regular o al azar. La mayoría son de estructura esencialmente lineal, pero algunas podrían ser ramificadas. Las galactanas y arabino-

galactanas abundan especialmente en los alerces. Todas ellas son muy ramificadas, con unidades galactosa enlazadas predominantemente en posiciones 1,6 y 1,3. El principal heteroazúcar en ellas es la L-arabinosa, que se encuentra mayormente como cadenas laterales de furanosa no reductora unidas 1,6; pero también puede haber unidades de L-arabinopiranososa con enlaces β .

I.3.2. La celulosa

La presencia de la celulosa en el corcho ha sido negada en varias ocasiones por diversos autores. Otros han dado números muy diferentes para representar la cantidad encontrada de esta sustancia; otros, finalmente, indicaron que no existe mas que una pequeña cantidad conjuntamente con la hemicelulosa en cantidad mayor (Ribas, 1952).

Kügler, en 1884, es el primero que estudió esta cuestión por un método de determinación cuantitativa sobre madera de alcornoque, y obtuvo una cantidad correspondiente al 64% de celulosa.

En 1913, Zemplen aplicó al corcho los procedimientos convenidos para aislar la celulosa y obtuvo una sustancia que tenía apariencia de celulosa, pero por acetólisis, dedujo que el corcho no contiene celulosa, y lo que se había tomado por celulosa, era otro polisacárido, análogo a la celulosa, pero diferente de ésta y presente en la proporción de 4,17%.

En 1923, Karrer, Peyer y Zega siguieron con el estudio de la celulosa en el corcho. Concluyeron que existe, probablemente, en el corcho, una pequeña cantidad de celulosa acompañada de algún otro polisacárido parecido a esta última, en total, una cantidad representando sólo el 1,6% del corcho seco al aire.

En 1927, Zetzsche y Rosenthaler consiguieron preparar el octaacetato de celobiosa cristalizado de P.F. 121-122°. Evaluaron también la celulosa por diferentes procedimientos. Los resultados conducen a admitir la presencia de 3,3% a 4% de celulosa en el "oxi-corcho" y 2-2,5% en el corcho bruto.

TABLA 1.1

Resultados obtenidos en la determinación de la celulosa en el corcho por Zetzsche y Rosenthaler (1927).

	Celulosa determinada como:		
	acetilcelulosa	celulosa	octaacetilcelobiosa
Encontrada en el oxicorcho.	3,8 a 3,9%		3,3 y 4,0%
Encontrada en el corcho puro.		2,65%	
Calculada para el corcho bruto.	2,5 y 2,6%	2,2;1,8; y 2,2%	2,2 y 2,7%
Calculada para el corcho natural.	1,7%	1,5;1,2; y 1,5%	1,5 y 1,8%

Si se comparan los resultados obtenidos en las determinaciones de celulosa realizadas sobre corcho puro y sobre corcho purificado por el procedimiento del agua oxigenada acética, es decir sobre el "oxicorcho", se ve que el primero contenía mas o menos la mitad de su celulosa bajo una forma distintas de la evaluada por medio del acetato, y que no daba la octaacetil celobiosa, lo que se atribuyó a la presencia de sustancias adheridas, que una vez eliminadas por el agua oxigenada, conducen a una determinación correcta como en el "oxi-corcho". La deter-

minación bajo forma de celulosa libre, por el procedimiento del ácido nítrico, proporciona igualmente buenos resultados. Los resultados obtenidos se resumen en la tabla I.1 y como puede verse concuerdan bien.

En 1928, Zetzsche, Cholatnikow y Sohuz demostraron que la celulosa del corcho se encuentra en forma libre y que como consecuencia, no forma parte de la molécula de suberina.

Madinaveitia, Clay y Catalán se ocuparon también, en 1935, del problema de la celulosa del corcho. Empezaron sus investigaciones determinándola por dos procedimientos distintos: disolviendo todo lo que no es celulosa y recogiendo ésta, o bien disolviendo la celulosa en ácido clorhídrico concentrado y evaluando la glucosa formada. En el corcho de la primera extracción se encontró un 8% y en el corcho hembra un 10% en número redondos. Madinaveitia y sus colaboradores estiman que en el corcho la celulosa existe en forma libre y que, por consiguiente, el complejo de los ácidos grasos no la esterifica.

En 1942, Guillemonat afirmaba que la naturaleza de la celulosa en el corcho era algo incierta.

Fierz-David y Ulrich declaran, en 1945, no saber con certeza si el corcho contiene celulosa y lignina, dando sus investigaciones un resultado positivo.

En 1948, Stockar estudió de nuevo el problema de la celulosa del corcho. La caracterizó por disolución en el reactivo de Schweitzer y precipitación, por hidrólisis y obtención de la oxazona de la glucosa formada, y finalmente por obtención y análisis del triacetato y del trinitrato. Encontró, para el corcho exento de ceroides (extraído con metanol), de 4,8 a 5,6% de celulosa pura, determinada en el residuo insaponificable después de extracción con alcohol y agua a ebullición y sometido a la acción de diversos oxidantes para eliminar la lignina y sustancias análogas. El residuo que resulta de la oxidación está formado por celulosa y otras sustancias de naturaleza análoga; no

se obtiene la celulosa pura mas que si se hace hervir al residuo con una solución acuosa de SO_3Na_2 . Si no se procede a esta purificación se obtienen cantidades aproximadamente dobles de las que son indicadas.

Con estos antecedentes sobre la composición del corcho del *Quercus Suber*, creímos interesante abordar el estudio de los polisacáridos, celulosa y hemicelulosas, y de esta forma ampliar los estudios anteriormente realizados sobre el corcho; a la vez que confirmar la presencia de la celulosa en el mismo.

Este será el tema principal del presente trabajo y, concretamente, se ha estudiado el aislamiento, purificación y determinación estructural de la celulosa y de los polisacáridos solubles en álcali del corcho.

Este trabajo se ha estructurado de la siguiente forma: primeramente se realizó el aislamiento y determinación estructural de la holocelulosa; a continuación se fraccionó ésta en celulosa y hemicelulosa, realizándose el estudio y determinación estructural de ambas por separado.

Finalmente se aislaron las hemicelulosas A y B de la holocelulosa, estudiándose su composición monomérica antes de proceder a su fraccionamiento. Realizado éste, se separaron cuatro polisacáridos que denominamos como fracción A-I, A-II, B-I y B-II y se estudió la composición monomérica de todas y cada una de ellas y la determinación estructural de las fracciones A-I, B-I y B-II.

También se realizó una comprobación de la estructura de una xilana conocida y que nos ha servido para realizar estudios comparativos con nuestros polisacáridos.

PARTE TEORICA

II. AISLAMIENTO DE LA HOLOCELULOSA

II.1. Extracciones previas

El Quercus Suber, al igual que otras plantas, contiene ceras, colorantes, taninos, polifenoles, suberina, etc. que no forman parte del polímero de la holocelulosa, pero que se entremezclan con él. La eliminación de estos componentes que la impurifican se realizó por extracción.

Se sometió, pues, el Quercus Suber a un procedimiento de extracción exhaustiva con disolventes en un soxhlet. Por extracción con benceno hasta agotamiento se separaron las ceras; por extracción con agua se separaron los colorantes y polifenoles, y por último se extrajo con metanol para arrastrar el agua.

El residuo que se obtuvo se dejó secar en una estufa a 50-60°C durante una semana.

II.2. Despolimerización del corcho. Eliminación de la suberina.

La despolimerización del corcho se realizó por transesterificación con metóxido sódico en metanol anhidro 0,1M. Por filtración se separaron los correspondientes ésteres metílicos de los ácidos, quedando un residuo no despolimerizable.

Este residuo se extrajo sucesivamente con éter etílico y con metanol en un soxhlet. Se obtuvo un nuevo residuo, libre de suberina, que después de secarse al aire, representó un 63% respecto al corcho extraído.

En la Fig.II.1. se muestra un esquema de la despolimerización y subsiguientes tratamientos del corcho extraído.

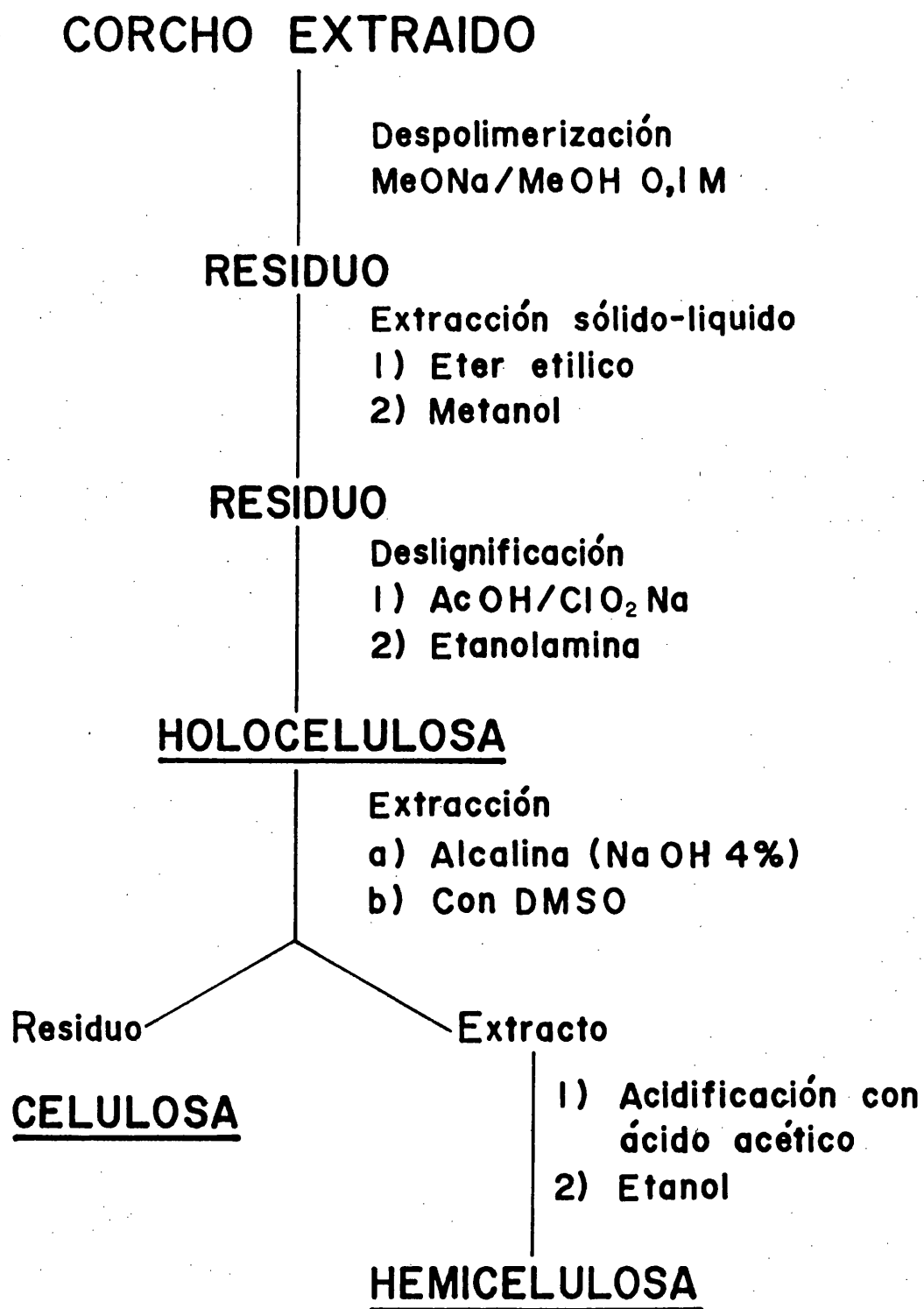


Fig. II.1. Esquema del aislamiento de la holocelulosa, celulosa y hemicelulosa.

II.3. Métodos de deslignificación

No se conoce con detalle el mecanismo responsable de la eliminación de la lignina por los agentes blanqueantes y la mayoría de las explicaciones que se ofrecen son sólo especulativas (Sjöstrom, 1981, p.153). Esto se puede entender en vista de la estructura compleja de los restos de lignina, que también varía dependiendo del método utilizado. Se han descrito varios métodos que resumimos a continuación.

a) Método del cloro

El cloro reacciona con la lignina primeramente por sustitución y por oxidación. Pequeñas cantidades de cloro se introducen también por adición a los dobles enlaces presentes en la lignina.

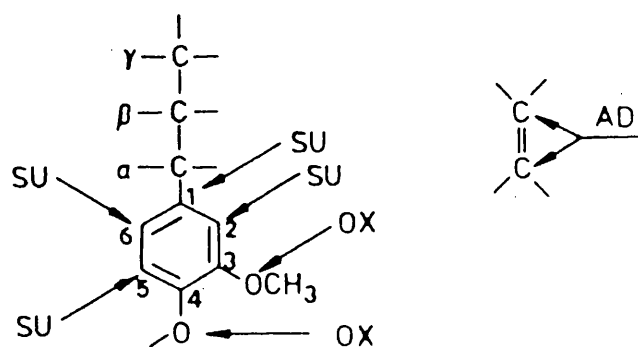


Fig.II.2. Reacciones laterales del cloro.

La despolimerización de la lignina puede originarse a partir de dos tipos de reacciones, es decir, 1) desplazamiento de la cadena lateral electrofílica y 2) ruptura oxidativa de los enlaces ariléter y descomposición del núcleo aromático (Fig.II.2 y II.3).

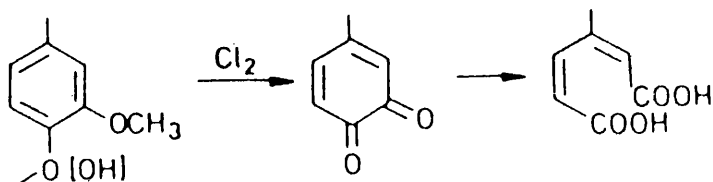
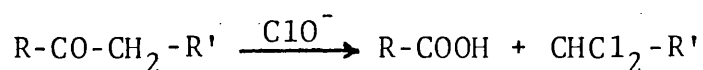


Fig.II.3. Oxidación de la lignina por el cloro.

En la Fig.II.2 se observa que la sustitución (SU) que ocurre principalmente en las posiciones C-6 y C-5 conduce a los productos de la lignina clorados y a cloruro de hidrógeno. Después de la sustitución en el carbono 1, la cadena lateral se desplaza dando origen a la fragmentación de la lignina. La oxidación (OX) da origen a la ruptura de los grupos metoxilo ó a la ruptura de enlaces entre unidades adyacentes. La adición (AD) también conduce al aumento del contenido en cloro, pero a causa de la baja frecuencia de dobles enlaces en las cadenas laterales no es una reacción significativa.

b) Método del hipoclorito

El ión hipoclorito (ClO^-) es un nucleófilo, en contraste con el cloro (Cl_2) que es electrófilo, por tanto ataca primeramente las posiciones que llevan carga positiva, especialmente a los átomos de carbono carbonílico y a dobles enlaces β - y γ - conjugados con grupos carbonilo ó carboxilo:



R y R' denotan grupos alquilo o arilo. R' también puede ser cloro.

Como resultado de estas reacciones la lignina se fragmenta a ácidos carboxílicos de bajo peso molecular y se disuelven. A causa de la destrucción de los grupos cromóforos y a la disolución de la lignina, aumenta la claridad de la pulpa.

c) Método del dióxido de cloro

Aunque las estructuras fenólicas libres se oxidan más rápidamente, el dióxido de cloro también destruye las unidades no fenólicas de fenilpropano y los dobles enlaces presentes en los cromóforos de la pulpa. Después de la ruptura del anillo de benceno se forman varios ácidos dicarboxílicos, tales como el ácido oxálico, mucónico, maleico y fumárico junto con los productos substituidos con cloro (Fig.II.4). Como resultado de la despolimerización y formación de los grupos carboxilos, la lignina modificada se disuelve durante el tratamiento con dióxido de cloro y en la etapa de extracción con hidróxido de sodio que normalmente le sigue (Vidal, 1978).

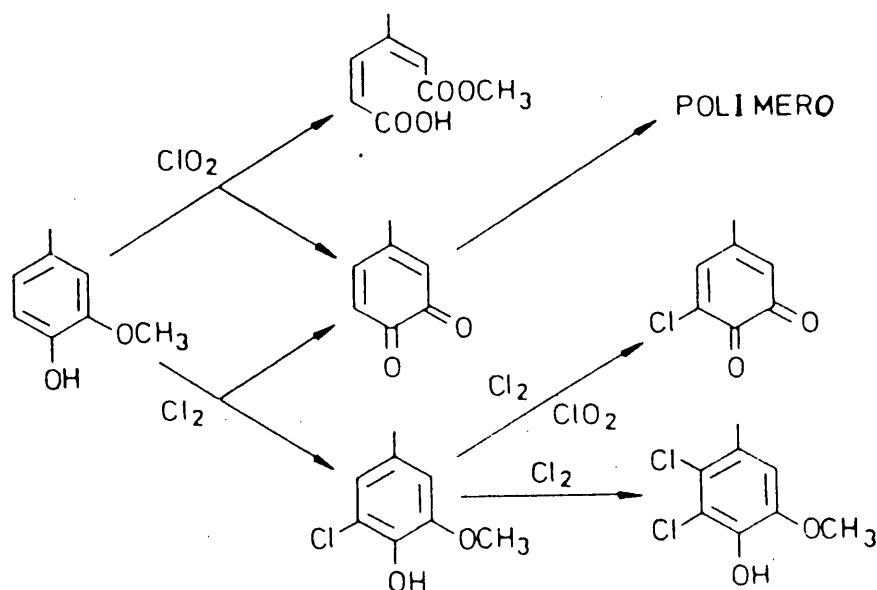


Fig.II.4. Reacciones del cloro y del dióxido de cloro.

d) Método del oxígeno-álcali

Se puede eliminar aproximadamente la mitad de la lignina aplicando un blanqueamiento con oxígeno como etapa inicial. Una deslignificación más completa con oxígeno conduce a una extensa degradación de los polisacáridos afectando a la calidad de la pulpa.

El oxígeno y el peróxido tienen características comunes ya que en ambos casos el medio es alcalino, y están

presentes las mismas especies reactivas (oxígeno y peróxidos), aunque en proporciones diferentes.

Por acción del oxígeno la lignina se degrada y se forman estructuras cromóforas, mientras que el peróxido de hidrógeno elimina los cromóforos sin ninguna descomposición y disolución de la lignina.

Otros métodos de deslignificación se han realizado utilizando bien el etilenglicol (Konkin, 1953) ó bien el dimetilsulfóxido (Bogomolov, 1962; Alekseeva, 1965).

La holocelulosa también se puede obtener por solubilización y extracción de la lignina del corcho por tratamiento con ácido cloroso a 70-75°C (Whistler, 1963).

II.3.1. Deslignificación del corcho

Aunque la reacción del cloro y del hipoclorito es rápida, los carbohidratos no permanecen totalmente inalterados. Los polisacáridos se oxidan en cierto grado con introducción de grupos carbonilo estando por tanto estas cadenas de polisacáridos sujetas a degradación en la etapa siguiente de extracción alcalina vía una β -alcoxi eliminación. Los enlaces glicosídicos también se pueden romper después de la oxidación del C-1 por radicales libres de cloro para dar grupos terminales de ácido aldónico (Fig. II.5). También se pueden formar grupos carboxilo no terminales sin originar ninguna despolimerización. (Por ej. la oxidación en el C-6 da por resultado la formación de grupos de ácido urónico).

El dióxido de cloro es el oxidante mas selectivo de la lignina entre los blanqueadores químicos basados en el cloro y reacciona sólo muy lentamente con los polisacáridos. Además la estabilidad de los polisacáridos durante la etapa de cloración está marcadamente mejorada por la presencia de dióxido de cloro. El dióxido de cloro actúa, como un radical scavenger, inhibiendo la reacción en cade-



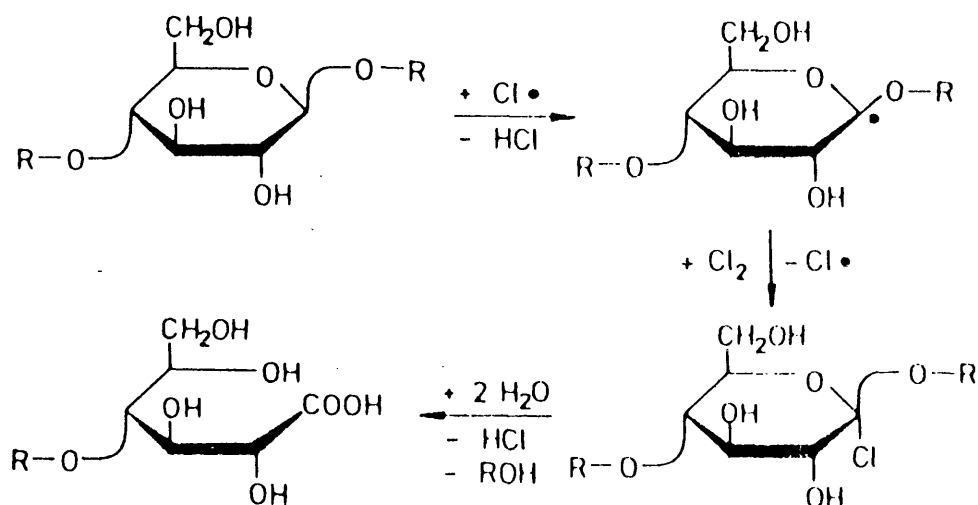


Fig.II.5. Oxidación de la celulosa por radicales cloro.

na de radicales entre el cloro y los polisacáridos sin afectar a la cloración de la lignina, que no es una reacción por radicales.

Por todo esto se eligió, pues, el método del dióxido de cloro (Whistler, 1963), siendo uno de los más comúnmente utilizados debido también a su simplicidad (Manning, 1967; Thompson, 1964; Kocher, 1952; Zaitseva, 1954; Maekawa, 1980 y Wise, 1946).

El corcho, tras metanolisis, se suspendió en agua caliente a $70-75^\circ C$ y se le adicionó ácido acético glacial y clorito de sodio con agitación constante.

Tres tratamientos con clorito son suficientes para reducir el contenido de lignina a un nivel constante. Ulteriores tratamiento causan pérdidas apreciables de holocelulosa sin ninguna reducción significativa en el contenido de lignina.

Por filtración de la mezcla se obtuvo un residuo que se trató con hidróxido de sodio a distintas concentraciones (Ikan, 1969). Esta etapa de la extracción alcalina fue muy larga y tediosa, por lo que se sustituyó por el tratamiento de Doreé (Doreé, 1947, p.417) que utiliza el etanol que contiene un 3% de etanolamina para eliminar los cloruros de lignina. Se obtuvo un sólido blanco fibroso que representó un 17,64% en peso respecto al corcho extraído.

III. ESTUDIO DE LA HOLOCELULOSA

III.1. Caracterización de la holocelulosa. Datos espectroscópicos

Su espectro de IR (Fig. III.1) presentó las siguientes bandas características: entre 3.600 y 3.100 cm^{-1} banda ancha de tensión de O-H asociado intermolecularmente; banda a 2.900 cm^{-1} de tensión de C-H alifático; bandas a 1.430 , 1.380 y 1.320 cm^{-1} de deformación de flexión de grupos CH_3 -, $-\text{CH}_2$ - y CH - respectivamente; banda a 1.050 cm^{-1} de tensión C-O de alcohol y bandas a 1.110 y 890 cm^{-1} que indican la presencia de éteres cíclicos.

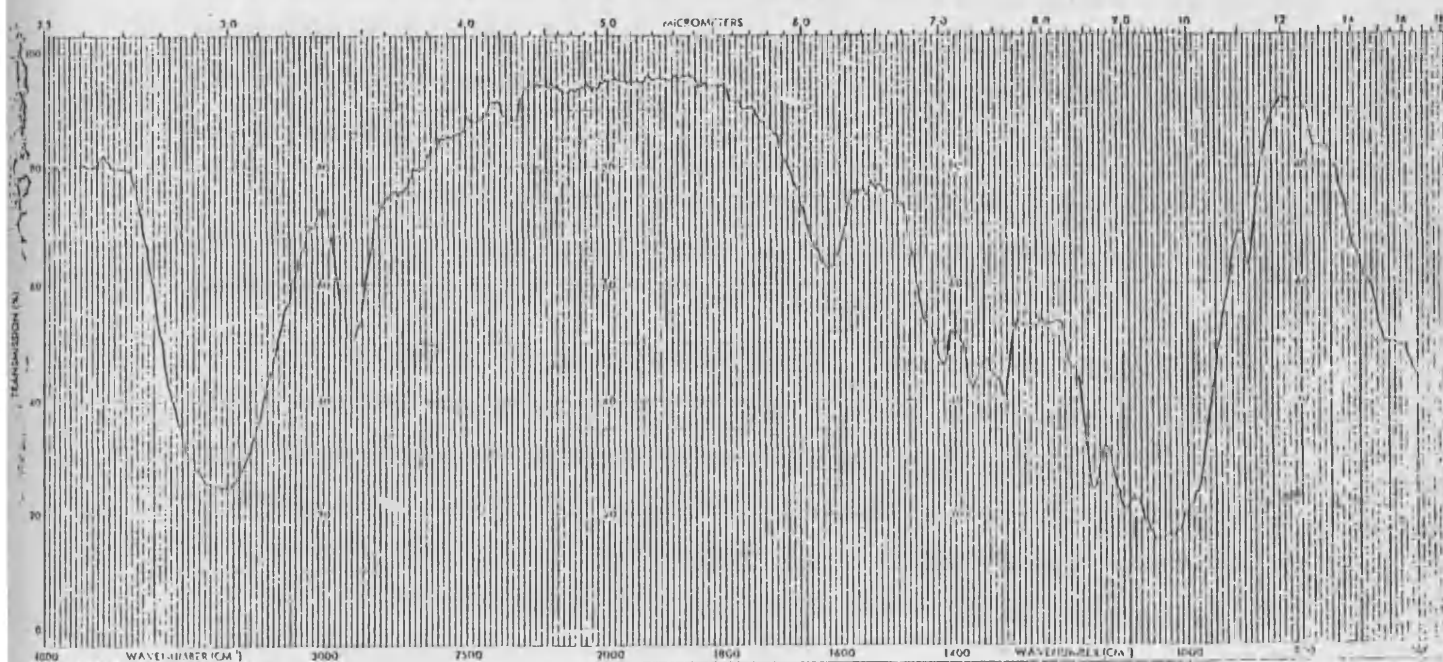


Fig. III.1. Espectro de IR de la holocelulosa.

III.2. Hidrólisis de la holocelulosa

Dada la insolubilidad de la holocelulosa, tanto en disolventes orgánicos como inorgánicos, para deducir la estructura monomérica de los polisacáridos implica una degradación de los mismos por procedimientos químicos. El más utilizado es la hidrólisis tanto ácida como enzimática.

III.2.1. Hidrólisis ácida

Este método de hidrólisis permite separar los hidratos de carbono de la holocelulosa, en forma de monosacáridos solubles, de la lignina, que queda insoluble y se puede eliminar posteriormente por filtración.

Para la neutralización se eligió el carbonato de bario en polvo dado que el borboteo que se produce en el desprendimiento de CO_2 es un medio auxiliar para seguir la reacción. Después de la neutralización se elimina el bario restante pasando la solución por una resina cambiadora de iones, Amberlita IR-120(H^+).

Se utilizaron dos procedimientos ligeramente distintos. Ambos utilizan ácido sulfúrico del 72%, que luego se diluye y se neutraliza con carbonato de bario.

Con el tratamiento de G.W. Monier-Williams (Doreé, 1947, p.197) se añadió SO_4H_2 del 72% a la holocelulosa y se tuvo la mezcla de reacción 4 días en agitación a temperatura ambiente. Luego se diluyó el ácido y se tuvo la mezcla 15 horas a reflujo. Se terminó el tratamiento y después de concentrar a sequedad la solución resultante se obtuvo un sólido amarillo.

Este proceso fue largo y tedioso por lo que se pasó a aplicar el tratamiento de A. Navas (Navas, 1980). Se tuvo la mezcla de reacción con SO_4H_2 del 72% 4 horas con agitación a temperatura ambiente. Luego se diluyó hasta hacer el SO_4H_2 1N, y se calentó a reflujo 4 horas. Se neu-

tralizó con carbonato de bario, se filtró y el filtrado se paso a través de la resina Amberlita IR-120(H⁺) y se concentró a sequedad. Se obtuvo un sólido amarillo correspondiente a la mezcla de azúcares y se caracterizó por métodos espectroscópicos y cromatográficos.

III.2.1.1. Datos espectroscópicos de los monosacáridos

a) Interpretación del espectro de IR

El espectro de IR (Fig. III.2) presentó las siguientes bandas: entre 3.600 y 3.100 cm⁻¹ una banda ancha de tensión de OH asociado intermolecularmente; banda a 2.940 cm⁻¹ de tensión de C-H alifático; bandas a 1.600 y 1.400 cm⁻¹ de tensiones asimétricas y simétricas del anión carboxilato; bandas a 1.100 y a 1.035 cm⁻¹ de tensión de C-O de alcohol primario y secundario respectivamente.

b) Interpretación del espectro de RMN

La espectroscopía de RMN tiene ciertas características que hacen que esta técnica sea especialmente ventajosa para el estudio de los polisacáridos (Aspinall, 1982, p.135). Los espectros de RMN pueden dar información respecto al ángulo diedro entre protones en átomos de carbono adyacentes en los compuestos alicíclicos (Tedder, 1971). Dicho ángulo se puede interpretar en términos de las conformaciones de los sustituyentes en el anillo. Los espectros de los azúcares son complicados, y los de los azúcares libres como mejor se miden es en disolución de óxido de deuterio para eliminar la absorción del protón OH. Sin embargo se obtiene una señal ancha debida al agua residual (señal HOD en la figura III.3). El desplazamiento químico de esta señal a temperatura ambiente ($\delta=4,8$) es tal que puede interferir con la importante región anomérica.

El protón mas fácil de identificar es el del car-

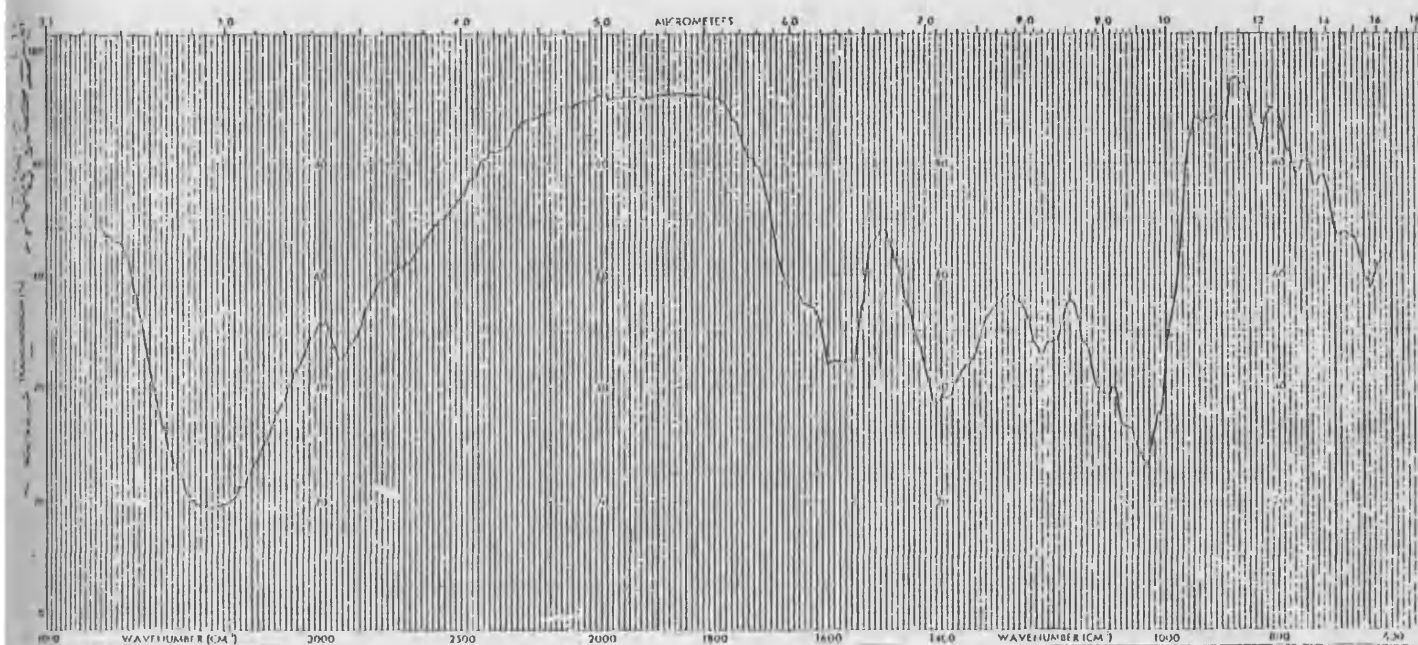


Fig.III.2. Espectro de IR del hidrolizado de la holocelulosa.

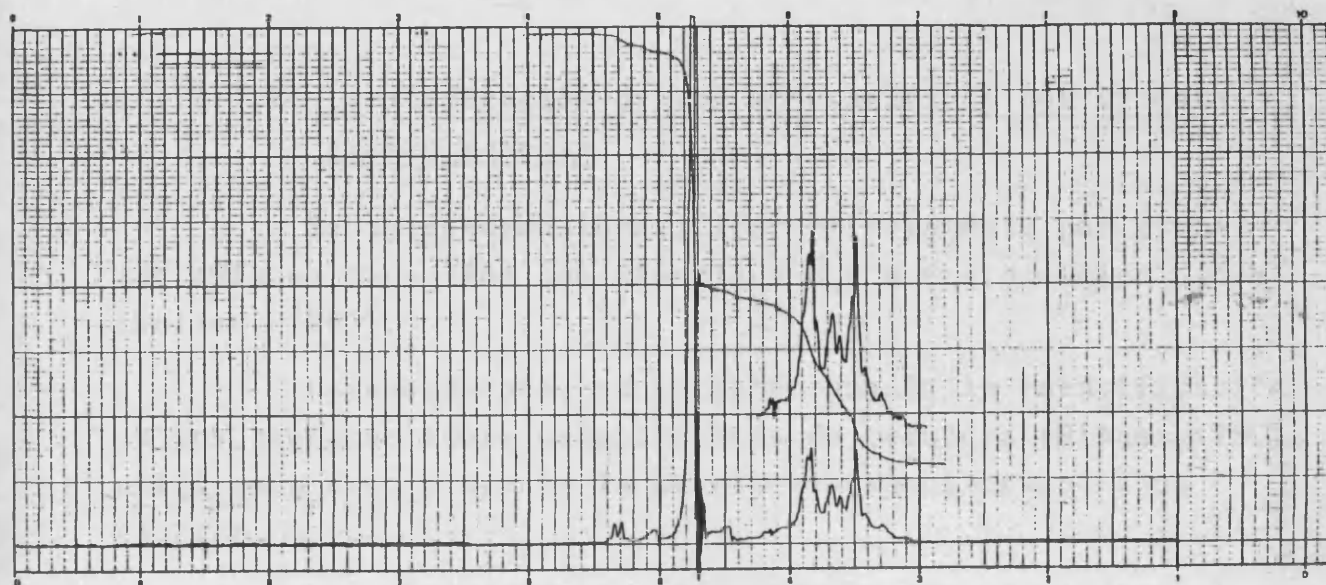


Fig.III.3. Espectro de RMN del hidrolizado de la holocelulosa.

bono anomérico que aparece a un campo inferior al de los demás hidrógenos del anillo. Este protón se presenta como un doblete en el caso de las aldosas, como es nuestro caso. Los protones axiales suelen absorber en un campo mas alto que los protones ecuatoriales.

No es apropiado utilizar la espectroscopía RMN para determinar las proporciones de los constituyentes. Sin embargo si es adecuada para la identificación y determinación de los azúcares que componen el hidrolizado químico o enzimático de un polisacárido.

El espectro de RMN (Fig.III.3.) (D_2O) presentó las señales características de una mezcla de azúcares libres, pero ningún desoxi-azúcar en disolución. Se comprobó por comparación con el espectro de RMN correspondiente a una mezcla de azúcares patrones (glucosa, xilosa, arabinosa y manosa) y ambos dieron señales similares. Las señales mas características son: un doblete a 5,3 δ asignable al protón anomérico en posición α ; y las señales entre 3,9 y 3,3 δ asignables a los \underline{CH} -OH y a los $-\underline{CH}_2$ -OH.

III.2.1.2. Identificación de los monosacáridos por cromatografía gaseosa

Se intentaron identificar primeramente por cromatografía en capa fina con Kieselgur G y acetato sódico 0,02M (Wollen, 1967).

Paralelamente, se intentó también la identificación de los azúcares sobre cromatoplasmas de celulosa (Miñana, 1980), utilizando como eluyente la mezcla n-butanol-etanol-agua (3:2:2).

En ambos casos se visualizaron las placas con el revelador anisaldehído-ácido sulfúrico. Las coloraciones no fueron lo suficientemente diferentes ni tampoco los R_F de los monosacáridos de la mezcla, como para hacer una identificación segura.

Una identificación mas precisa se llevó a cabo por cromatografía gas-líquido previa transformación de los monosacáridos de la mezcla en los correspondientes derivados trimetilsililéteres.

Según Sweeley y colaboradores (Sweeley, 1963) los productos que se obtienen de anómeros puros de pentosas y hexosas presentan un sólo pico en cromatografía gaseosa aunque, en algunos casos, pueden aparecer pequeñas cantidades de otra forma anomérica. En general las anomerizaciones que ocurren en piridina durante la preparación de los TMS derivados son mínimas.

Las soluciones acuosas en equilibrio de los azúcares libres constan casi enteramente de dos componentes, los anómeros α y β .

Se realizó un análisis comparativo de los azúcares del hidrolizado de la holocelulosa con azúcares libres patrones. Se cromatografiaron primeramente por separado los azúcares patrones glucosa, xilosa, arabinosa, galactosa, ramnosa y manosa en solución acuosa. En los cromatogramas correspondientes aparecieron los anómeros α y β como mayoritarios junto con una pequeña cantidad de la forma γ de los azúcares debida probablemente a aldehidos libres ó formas furanósicas. En la tabla III.1. se indican los tiempos de retención de estos azúcares relativos a la α -glucosa.

De igual forma se cromatografiaron los azúcares procedentes de la hidrólisis ácida de la holocelulosa. En la tabla III.2. se indican los tiempos de retención de los azúcares de la hidrólisis según Monier-Williams relativos a la α -glucosa y en la Fig. III.4. se muestra el cromatograma obtenido.

TABLA III.1.

Cromatografía gaseosa de los TMS derivados de los azúcares patrones.

t_R^a	Forma del azúcar	Azúcar
0,34	α	Arabinosa
0,38	β	
0,36	α	Xilosa
0,48	β	
0,58	γ	
0,35	α	Ramnosa
0,47	β	
0,75	α	Galactosa
0,89	β	
1,05	γ	
1,00	α	Glucosa
1,44	β	
0,72	α	Manosa
1,06	β	

^aTiempos de retención relativos a la α -glucosa con una columna OV-1 a 195°C.

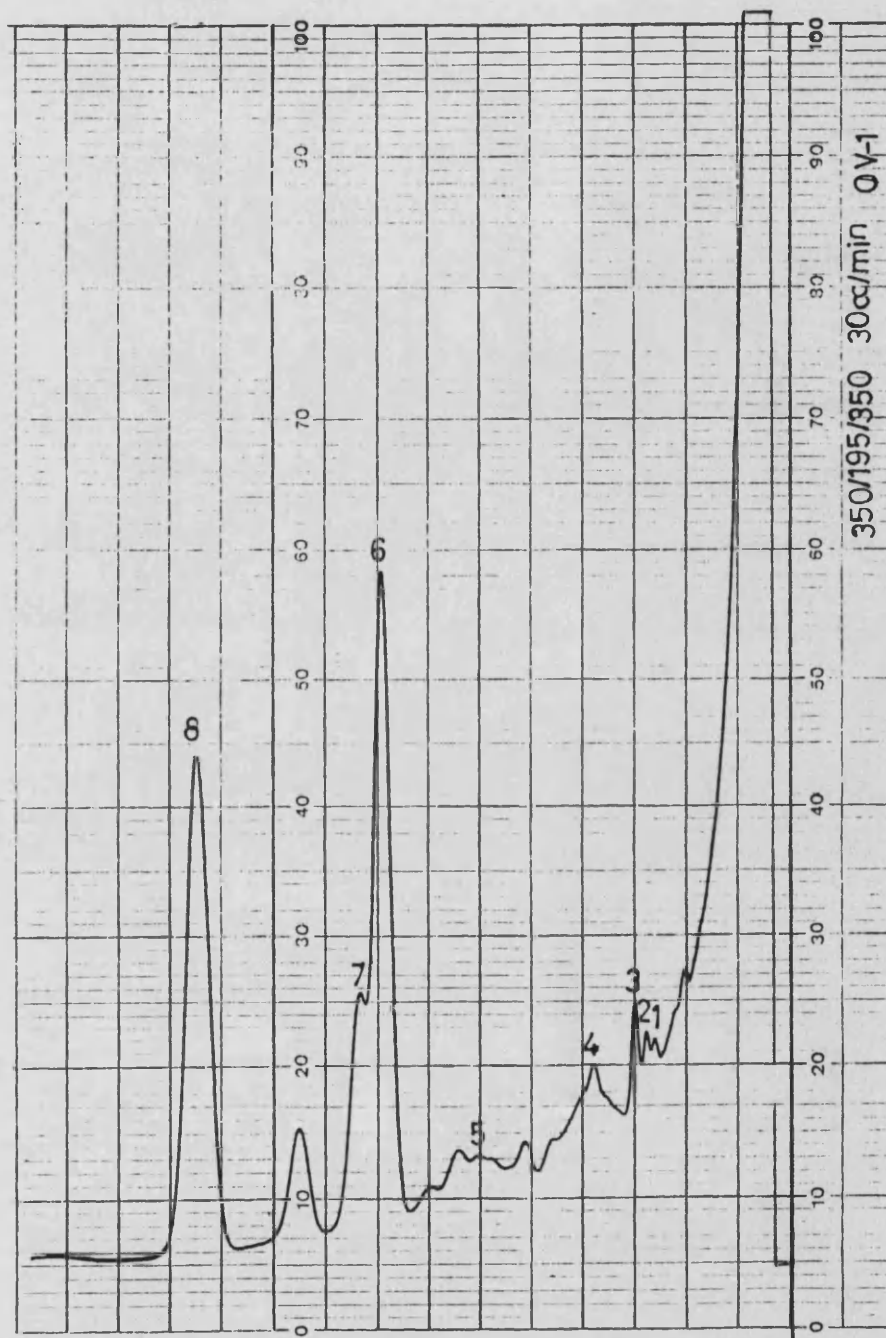


Figura III.4 . Cromatografía gaseosa de los TMS derivados de los azúcares procedentes del hidrolizado de la holocelulosa. Temperatura de la columna 195°.

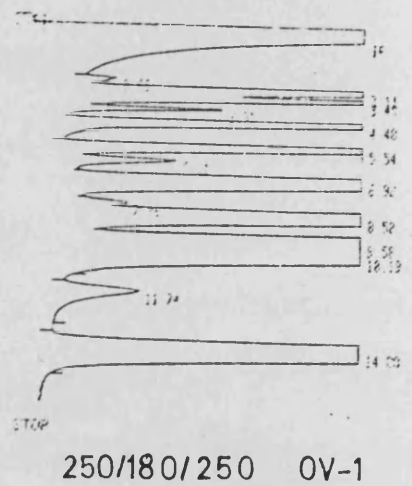
TABLA III.2.

Cromatografía gaseosa de los derivados sililados de los monosacáridos de la holocelulosa (Doreé, 1947).

t_R^a	Pico n°	Forma del azúcar	Azúcar
0,33	1	α	Arabinosa
0,38	3	β	
0,35	2	α	Xilosa
0,48	4	β	
0,72	5	α	Manosa
1,00	6	α	Glucosa
1,45	8	β	
1,05	7	γ	Galactosa

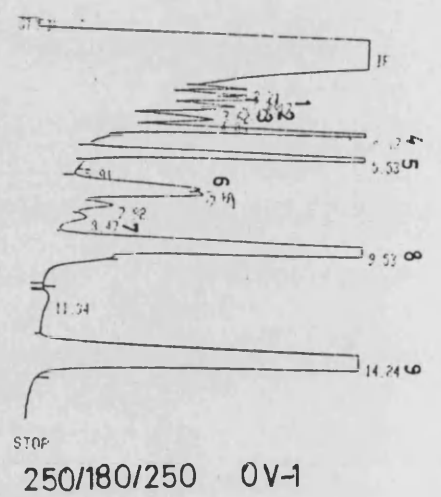
^aTiempos de retención relativos a la α -glucosa en una columna OV-1 a 195°.

Los azúcares procedentes de la hidrólisis según Navas se analizaron igualmente por cromatografía gaseosa de sus trimetilsililéteres y se compararon con una muestra de la mezcla de los seis azúcares patrones igualmente sililados y en las mismas condiciones. En la Tabla III.3. se dan los tiempos de retención de los azúcares obtenidos relativos a la α -glucosa y en la Fig.III.5. se muestran los cromatogramas obtenidos.



RT	AREA	TYPE	NP/HT	SP/RT
1.55	19502	SP	0.226	0.144
1.11	28006	VP	0.152	0.504
3.43	45254	VP	0.152	7.784
1.51	72572	VP	0.112	0.527
4.48	29544	PP	0.179	5.286
1.44	92352	PP	0.219	5.581
2.11	12233	PP	0.243	0.572
1.52	12742	VP	0.335	0.741
3.32	4784	VP	0.268	0.941
5.32	26114	VP	0.347	18.957
5.32	25542	VP	0.372	19.271
12.13	14216	V8	0.421	10.754
11.24	12182	V8	0.542	0.586
14.28	27328	V8	0.535	12.531

TOT PL AREA= 1.370E+07
MUL FACTOR= 1.000E+04



RT	AREA	TYPE	NP/HT	SP/RT
2.71	10888	SP	0.116	0.423
2.90	2304	VP	0.128	0.568
3.17	44682	VP	0.153	1.886
3.47	33061	VP	0.153	0.874
3.62	25922	VP	0.132	0.529
4.06	65136	PP	0.272	1.433
4.47	26326	VP	0.129	5.945
4.47	20952	VP	0.129	0.512
5.53	6252	PP	0.121	0.141
5.91	12954	V7	0.334	2.865
7.10	11671	VP	0.384	2.641
7.31	49857	VP	0.365	1.115
8.42	25522	VP	0.372	0.522
9.57	17219	VP	0.364	0.583
11.94	13917	VP	0.252	0.211
14.24	19442	PP	0.535	43.510

TOT PL AREA= 447.000
MUL FACTOR= 1.000E+00

Fig. 111.5.a. Chromatografía gaseosa de los TMS derivados de los azúcares procedentes del hidrolizado de la hemicelulosa.
b. Chromatografía gaseosa de los TMS derivados de una mezcla de seis azúcares patrones.

TABLA III.3.

Cromatografía gaseosa de los TMS derivados de los monosacáridos de la holocelulosa (Navas, 1980).

t_R^a	Pico n°	Forma del azúcar	Azúcar
0,33	1	α	Arabinosa
0,38	3	β	
0,36	2	α	Xilosa
0,47	4	β	
0,58	5	γ	
0,74	6	α	Galactosa
0,88	7	β	
1,00	8	α	Glucosa
1,49	9	β	

^aTiempos de retención relativos a la α -glucosa (9,53 min.) en una columna OV-1 a 180°C.

De estos análisis se pudo deducir que los monosacáridos que componen los polisacáridos de la holocelulosa son glucosa, xilosa, arabinosa, manosa y galactosa, siendo los dos primeros los mayoritarios.

III.2.1.3. Determinación cuantitativa de los monosacáridos

III.2.1.3.1. Formación de los acetatos de alditoles

La trimetilsilil derivatización es sencilla y rápida pero tiene sus limitaciones (Crowell, 1967). Como el agua reacciona con los reactivos es necesario emplear procedimientos de secado muy eficientes. El cromatograma es difícil de interpretar ya que cada azúcar produce varios anómeros y en el cromatograma aparece una multiplicidad de picos difíciles de resolver.

Gunner y colaboradores mostraron que se obtenían picos sencillos para los acetatos de los alditoles de los azúcares que nos interesan.

Sawardeker y colaboradores ampliaron esta observación y dieron una aplicabilidad general de este procedimiento para el análisis cuantitativo de mezclas de monosacáridos. La reducción de los monosacáridos a sus alditoles y la separación de los derivados de alditoles ofrece posibilidades de cuantificación puesto que este procedimiento elimina el problema de los picos múltiples, ya que los alditoles no pueden anomerizarse.

Este método sin embargo no fué enteramente afortunado -ya que la resolución de sustancias isoméricas era a menudo insatisfactoria, como en el caso del D-glucitol y D-galactitol-, hasta que Sawardeker (1965) introdujo un copolímero de succinato de etilenglicol y cianoetil silicona como fase estacionaria. Este procedimiento fue capaz de resolver todos los acetatos de alditoles comunes en 70 minutos con una temperatura programada desde 155 a 190°C.

Se formaron los acetatos de alditoles de los azúcares patrones ramnosa, arabinosa, xilosa, manosa, galactosa y glucosa. Paralelamente se formaron también los acetatos de alditoles del hidrolizado de la holocelulosa. Los azúcares en disolución acuosa se redujeron con borohidruro de sodio, que es una reducción sencilla y cuantitativa, para formar los alditoles que luego se acetilaron con la mezcla anhídrido-acético/piridina (1:1), como se detalla en los métodos generales.

Las etapas de que consta la conversión de un polisacárido en sus acetatos de alditoles constituyentes se sumarizan en la Fig. III.6.

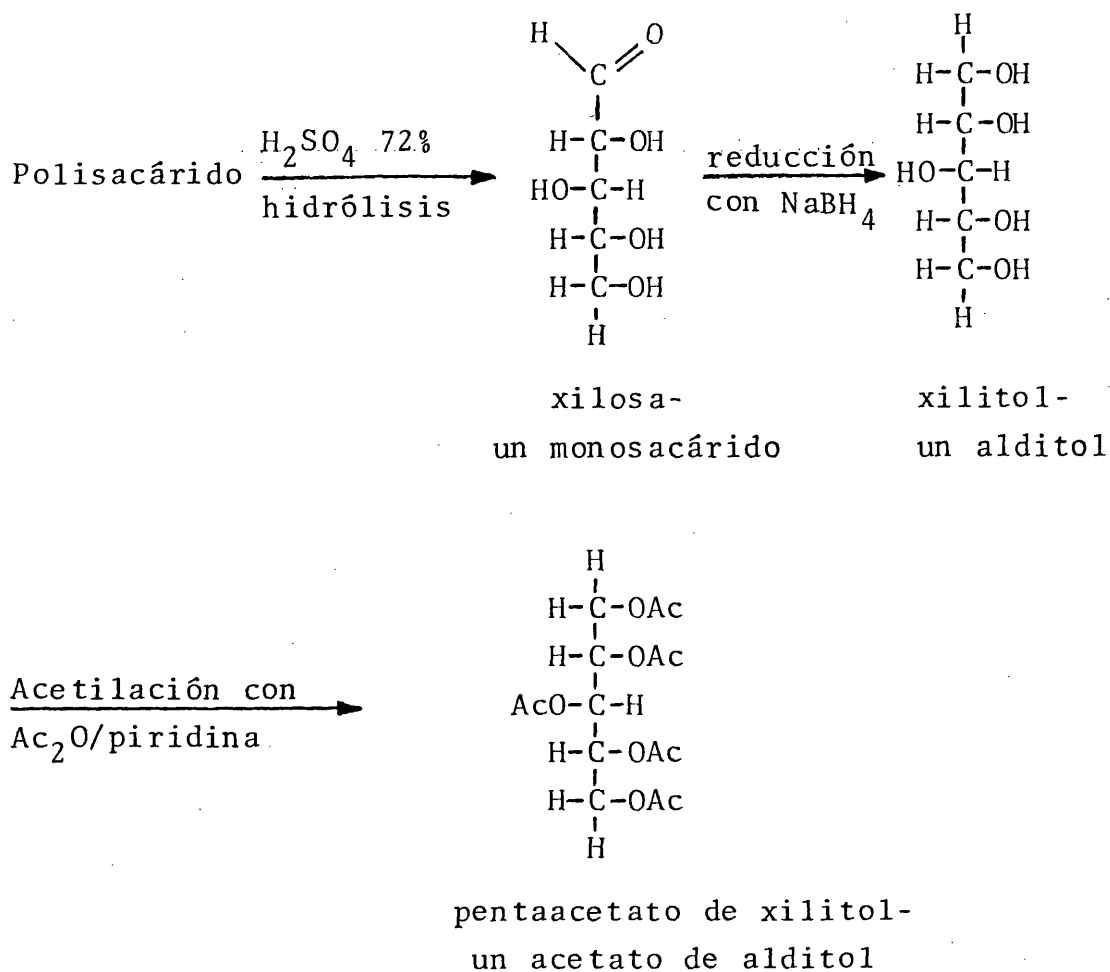


Fig. III.6. El análisis y composición de glicosilos se verifica por conversión de los restos de glicosilo de los oligo- y polisacáridos en los derivados volátiles acetatos de alditoles.

Los acetatos de alditoles, procedentes del hidrolizado de la holocelulosa, se caracterizaron primeramente por datos espectroscópicos.

III.2.1.3.2. Datos espectroscópicos

a) Interpretación del espectro de IR

El espectro de IR (Fig. III.7a) presentó las bandas características de compuestos acetilados: a 2960 y 2850 cm^{-1} bandas de tensión de C-H alifático; banda a 1740 cm^{-1}

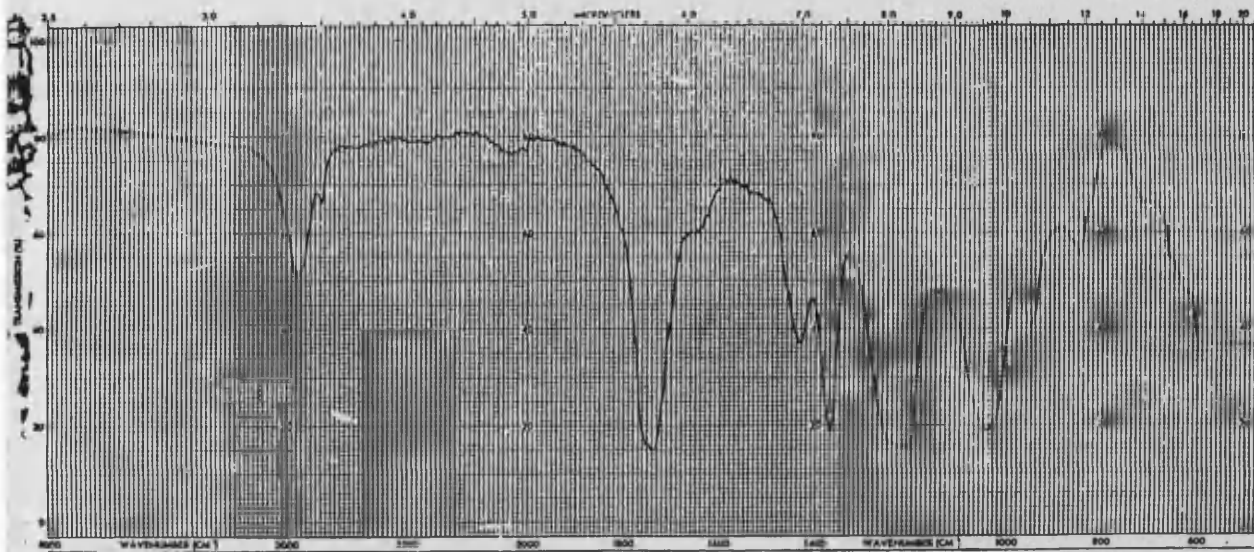


Fig. III.7a. Espectro de IR de los acetatos de alditoles de la holocelulosa.

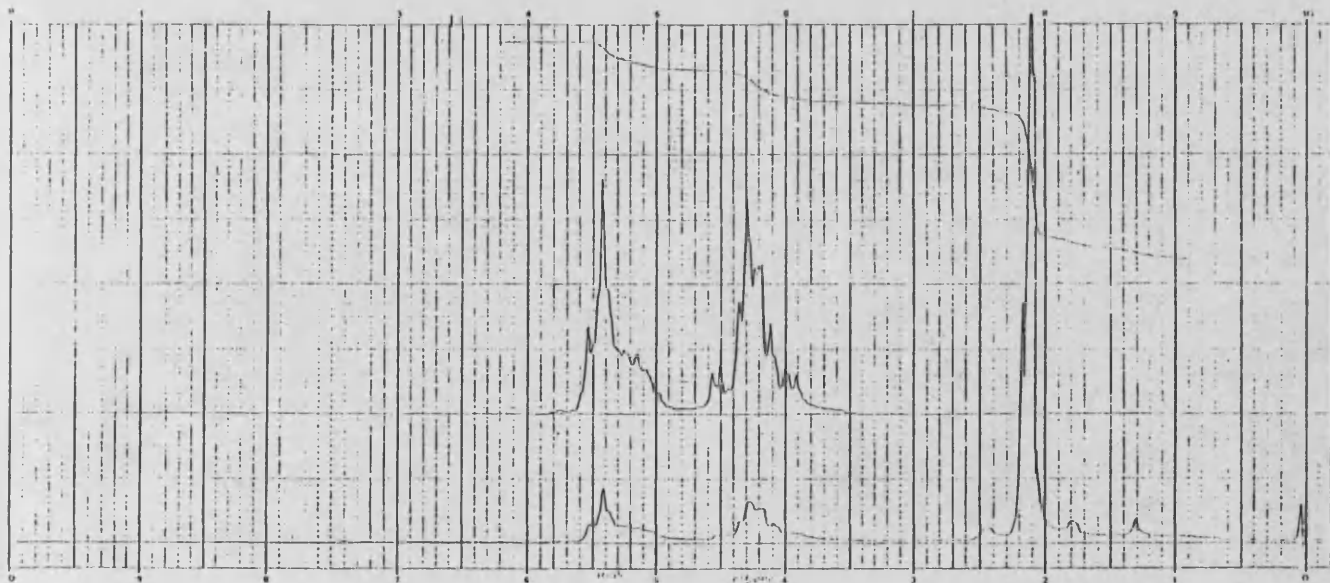


Fig. III.7b. Espectro de RMN de los acetatos de alditoles de la holocelulosa.

de tensión de C=O de ester (acetato); bandas a 1440 y 1370 cm^{-1} de deformación de flexión de grupos $-\text{CH}_2-$ y CH_3- ; y bandas a 1240 y 1040 cm^{-1} de tensión C-O de acetato.

b) Interpretación del espectro de RMN

El espectro de RMN (Fig. III.7.b) se registró en DCCl_3 y presentó las siguientes señales: a 2,06 y 2,12 δ aparecen las señales correspondientes a grupos acetatos; entre 3,7 y 4,5 δ aparecen las señales asignables a los protones $\text{CH}_2\text{-OAc}$; y entre 4,9 y 5,6 δ las señales asignables a los $-\text{CH}\text{-OAc}$. Se comparó este espectro con el espectro de RMN del glucitol cristalizado y se vió que era muy semejante como cabía esperar siendo la glucosa el azúcar mayoritario de la mezcla.

III.2.1.3.3. Identificación de los monosacáridos

a) Cromatografía gas-líquido

La determinación cuantitativa de los monosacáridos del hidrolizado de la holocelulosa se realizó por cromatografía gas-líquido de los correspondientes acetatos de alditoles. El método utilizado fué el del patrón interno. Se eligió el inositol como patrón interno cuyo pico no coincide con el de ninguno de los azúcares del hidrolizado de la holocelulosa.

Blake y colaboradores estudiaron la precisión del método y encontraron que los errores eran inferiores al 5%.

La columna ECNSS-M, una fase de poliéster de organosilicona consistente de succinato de etilén glicol químicamente combinado con una silicona de tipo cianoetil, tuvo la polaridad ideal para la separación de estos derivados.

En la tabla III.4. se detallan los resultados obtenidos en el análisis cuantitativo del hidrolizado de la

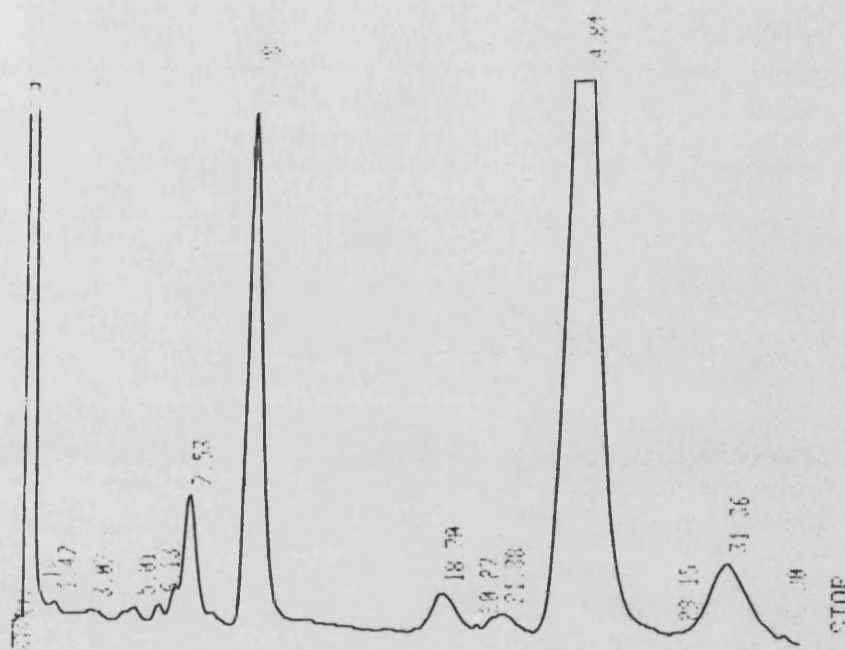


Fig. III. 8. Cromatografía gaseosa de los acetatos de alditoles procedentes de la hidrólisis de la holo-celulosa. Temperatura de la columna 190°.

TABLA III. 4

Monosacáridos de la holocelulosa determinados a través de los acetatos de alditoles

Azúcares	Pico n°	%Azúcares
Arabinosa	1	5,52
Xilosa	2	20,67
Manosa	3	3,52
Galactosa	4	1,83
Glucosa	5	68,45

holocelulosa, se expresan en tanto por ciento del total de azúcares. En la Fig. III.8 se muestra el cromatograma obtenido.

b) Cromatografía gaseosa-espectrometría de masas (Chizhov, 1966).

La identidad de los acetatos de alditoles se confirma por el análisis combinado de cromatografía gaseosa-espectrometría de masas. En la Fig. III.9 se muestra el cromatograma obtenido.

Interpretación del espectro de masas (Chizhov, 1966, Mitsuo, 1975).

En el espectro de masas de los acetatos de alditoles no aparece el pico del ión molecular M^+ .

El espectro de masas de los acetatos de alditoles isoméricos (pentaacetato de xilitol y arabitol, hexaacetatos de manitol, galactitol y glucitol) son extremadamente parecidos. Así, pues, las diferencias estereoquímicas no se reflejan en el espectro de masas de estos compuestos.

La descomposición de los acetatos de alcoholes ocurre a través de dos caminos básicos: 1) Ruptura de la cadena de carbono en el ión molecular con la formación de fragmentos primarios; 2) Expulsión del acetilo en forma de cetena y del acetoxilo en forma de ácido acético en el ión molecular y en los fragmentos primarios, formándose los fragmentos secundarios.

Los iones formados a partir de los acetatos de alditoles se clasifican convenientemente por series de acuerdo con el número de átomos de carbono del azúcar. En el esquema que se da a continuación se indican los esquemas de formación de los iones de los acetatos de hexitoles. El esquema a seguir en el caso de los acetatos de pentitoles sería similar.

Serie VI. En el espectro de los acetatos de hexitol (Fig. III.12) (M^+ , m/e 434), los iones de mayor masa, y con baja intensidad, son los de m/e 375 y 374 procedentes de la ruptura de un radical acetoxilo ó de una molécula de ácido acético a partir del ión molecular, respectivamente.

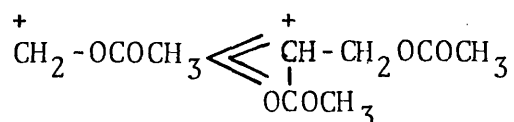
Serie V. En el caso de los acetatos de hexitales esta serie empieza con el m/e 361 procedente de la ruptura de los enlaces C_1-C_2 (ó C_5-C_6). Los iones de mayor intensidad son m/e 157, m/e 139 y m/e 115. En el caso de acetatos de pentitales (Fig. III.10 y 11) (M^+ , m/e 362), la serie empieza con el ión 303. Los siguientes miembros de la serie tienen una unidad de masa mayor en comparación con el de los acetatos de hexitales. Son m/e 260, m/e 200, m/e 158, m/e 140 y m/e 98.

Serie IV. El modelo de esta serie posee m/e 289. En el espectro de los hexitales los iones de esta serie de baja intensidad están a m/e 247 y 229 mientras que en el espectro de pentitales el pico 247 está ausente. Los otros iones de esta serie m/e 145, m/e 103 y m/e 85 son isoméricos con los iones de la serie II.

Serie III. El modelo de esta serie posee m/e 217. Por ruptura de una molécula de ácido acético ó de cetena dan los iones m/e 157 y m/e 175 respectivamente. A esta misma serie pertenecen los iones m/e 115, m/e 97, m/e 73 y m/e 55.

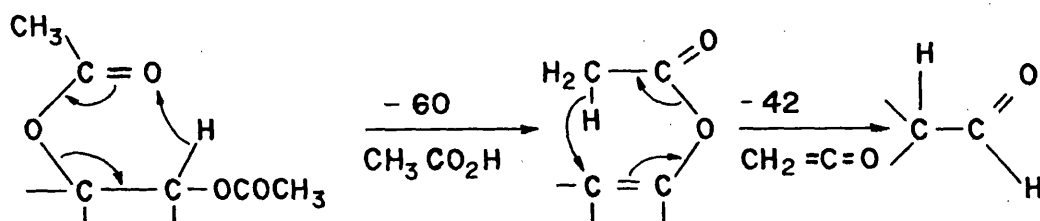
Serie II. El modelo posee m/e 145. Los otros iones son m/e 103, 85 y 43.

El ión de la Serie I con m/e 73 se puede formar por la ruptura de los enlaces C_1-C_2 o bien proceder de la Serie III. La intensidad de los picos de los iones que se forman disminuyen al aumentar m/e. El orden es: la Serie II>III>IV>V>I. La baja intensidad del pico I se debe a que el ión carbonio primario es menos estable que el secundario:



El pico m/e a 43 es el ión acetilo, $\text{CH}_3\text{C}=\text{O}^+$, y es el pico mas intenso en el espectro de masas (De Jongh, 1964).

Este método general de fragmentación de los poliacetatos perdiendo una molécula de ácido acético y una de cetena sugiere el mecanismo (Biemann, 1963):



más que el de una simple eliminación 1,2; ya que la pérdida de cetena está favorecida por el doble enlace resultante de la pérdida de ácido acético que ocurre por la transposición de McLafferty.

Tanto las series de picos obtenidos como las intensidades de los mismos están de acuerdo en el caso del espectro Fig. III.12 con los acetatos de hexitoles y en el caso de los espectros Fig.III.10 y Fig.III.11 con acetatos de pentitoles.

Estos datos se corresponden con los obtenidos en gases pero faltan componentes. Esto es posiblemente debido a que la columna capilar utilizada en la cromatografía de gases acoplada con la espectrometría de masas, no consigue una separación completa de esta mezcla de acetatos de alditoles (Holzer, 1980). Los tiempos de retención correspondientes a los acetatos de D-galactitol y D-glucitol son muy similares, siendo probable que el primero quede incluido en el pico del segundo.

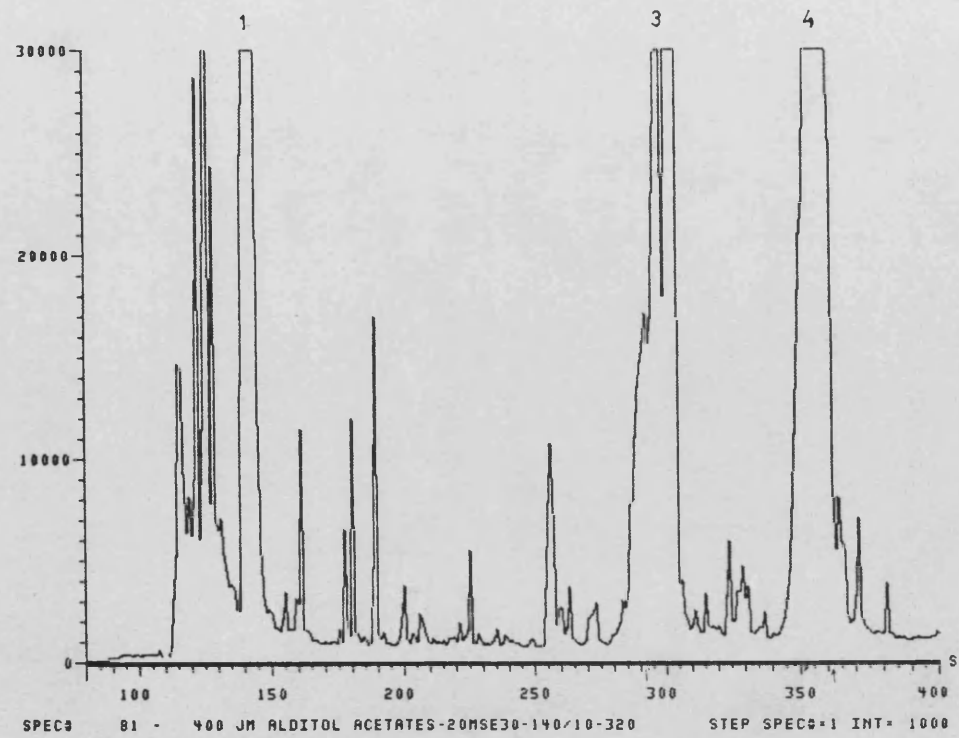


Fig. III.9. Cromatografía gaseosa de los acetatos de alditoles procedentes de la hidrólisis de la holocelulosa.

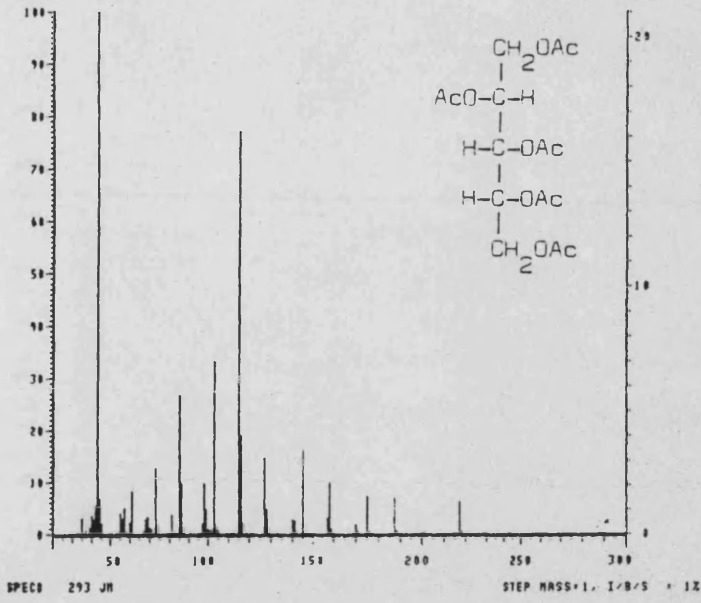


Figura III.10. Espectro de masas del penta-O-acetato del L-arabinitol.

PEAK	INT	I/BASE	MASS	Z-BASE	HAZB
1	140	0.42X	35.0	0.18X	44.0
2	100	0.05X	35.0	0.23X	45.1
3	46	0.82X	36.3	0.43X	46.1
4	42	0.12X	36.3	0.63X	47.0
5	269	0.02X	37.6	0.33X	48.0
6	445	1.35X	38.9	0.25X	49.0
7	1227	3.74X	39.2	0.45X	100.0
8	107	0.32X	39.2	0.30X	101.0
9	89	0.25X	40.4	0.28X	102.0
10	1735	5.00X	41.4	0.40X	103.0
11	50	0.15X	41.4	0.37X	104.0
12	45	0.13X	42.6	0.27X	105.0
13	32760	100.00X	43.0	0.10X	106.0
14	171	0.52X	43.1	0.07X	107.0
15	34	0.10X	43.4	0.08X	108.0
16	35	0.10X	43.7	0.08X	109.0
17	249	6.96X	44.0	0.22X	110.0
18	716	2.13X	44.4	0.33X	111.0
19	40	0.12X	44.4	0.30X	112.0
20	35	0.10X	44.4	0.28X	113.1
21	46	0.14X	44.4	0.26X	114.4
22	194	0.55X	44.4	0.24X	115.0
23	137	0.41X	44.4	0.22X	116.0
24	50	0.15X	44.4	0.20X	117.0
25	122	0.37X	44.4	0.18X	118.0
26	225	0.65X	44.4	0.16X	119.0
27	1311	4.00X	44.4	0.14X	120.0
28	1951	7.80X	44.4	0.12X	121.0
29	1430	0.00X	44.4	0.10X	122.0
30	171	0.52X	44.4	0.08X	123.0
31	327	0.98X	44.4	0.06X	124.0
32	797	2.40X	44.4	0.05X	125.0
33	33	0.10X	44.4	0.04X	126.1
34	33	0.10X	44.4	0.03X	127.0
35	2726	8.72X	44.4	0.02X	128.0
36	40	0.12X	44.4	0.01X	129.0
37	69	0.21X	44.4	0.01X	130.0
38	51	0.15X	44.4	0.01X	131.0
39	45	0.13X	44.4	0.01X	132.0
40	71	0.21X	44.4	0.01X	133.0
41	323	0.93X	44.4	0.01X	134.0
42	221	0.64X	44.4	0.01X	135.0
43	462	1.40X	44.4	0.01X	136.0
44	444	1.41X	44.4	0.01X	137.0
45	381	1.10X	44.4	0.01X	138.0
46	155	0.47X	44.4	0.01X	139.0
47	4235	12.92X	44.4	0.01X	140.0
48	61	0.18X	44.4	0.01X	141.0
49	607	1.85X	44.4	0.01X	142.0
50	55	0.16X	44.4	0.01X	143.0
51	102	0.31X	44.4	0.01X	144.0
52	159	0.48X	44.4	0.01X	145.0
53	55	0.17X	44.4	0.01X	146.0
54	139	0.42X	44.4	0.01X	147.0
55	141	0.43X	44.4	0.01X	148.0
56	1279	3.80X	44.4	0.01X	149.0
57	240	0.73X	44.4	0.01X	150.0
58	224	0.69X	44.4	0.01X	151.0
59	161	0.49X	44.4	0.01X	152.0
60	49	0.14X	44.4	0.01X	153.0
61	8768	26.76X	44.4	0.01X	154.0
62	40	0.12X	44.4	0.01X	155.0
63	3254	9.73X	44.4	0.01X	156.0
64	40	0.12X	44.4	0.01X	157.0
65	427	1.28X	44.4	0.01X	158.0
66	43	0.13X	44.4	0.01X	159.0
67	330	0.98X	44.4	0.01X	160.0
68	330	0.98X	44.4	0.01X	161.0
69	197	0.60X	44.4	0.01X	162.0
70	116	0.35X	44.4	0.01X	163.0
71	116	0.35X	44.4	0.01X	164.0

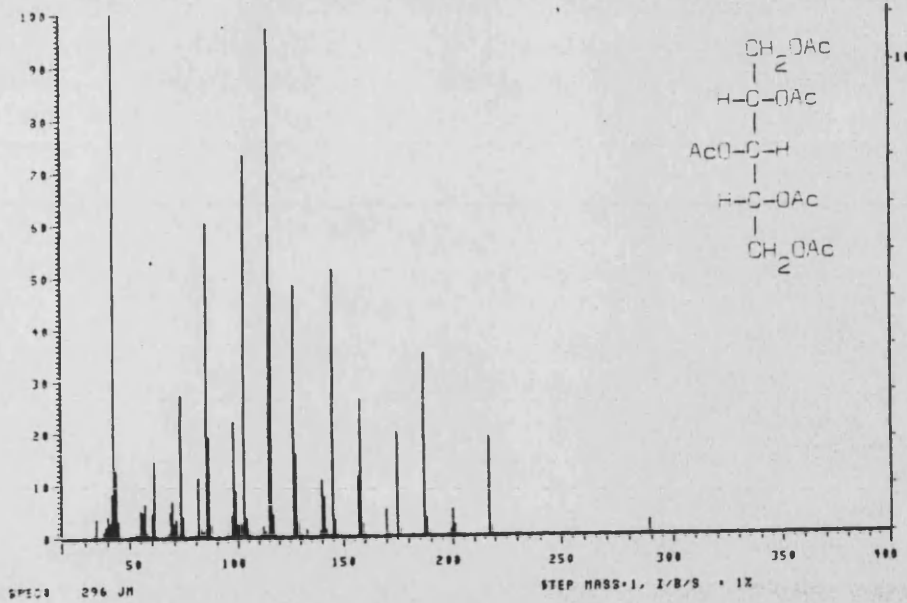


Figura III.11. Espectro de masas del penta-O-acetato del xilitol.

>>DATE<</SPEC4 296/JM<

BASE SUM
32760 243375

PEAK	INT	I/BASE	MASS	PEAK	INT	I/BASE	MASS
1	242	0.73%	45	150	54	0.16%	144
2	1224	3.73%	73	151	49	0.15%	145
3	68	0.20%	35	152	1701	5.13%	146
4	55	0.16%	36	153	220	0.67%	147
5	389	1.18%	37	154	44	0.13%	148
6	1377	4.20%	38	155	6485	19.74%	149
7	205	0.62%	39	156	463	1.41%	150
8	146	0.44%	40	157	73	0.22%	151
9	359	1.09%	41	158	31	0.09%	152
10	275	0.83%	42	159	214	0.64%	153
11	32760	100.00%	43	160	56	0.17%	154
12	437	1.33%	44	161	55	0.16%	155
13	103	0.31%	45	162	31	0.09%	156
14	4214	12.83%	46	163	11514	35.14%	157
15	37	0.11%	47	164	1071	3.24%	158
16	1061	3.23%	48	165	207	0.63%	159
17	65	0.19%	49	166	22	0.07%	160
18	43	0.13%	50	167	36	0.10%	161
19	1061	3.23%	51	168	34	0.10%	162
20	107	0.32%	52	169	47	0.14%	163
21	43	0.13%	53	170	359	1.09%	164
22	111	0.33%	54	171	1674	5.10%	165
23	205	0.62%	55	172	733	2.23%	166
24	107	0.32%	56	173	140	0.42%	167
25	316	0.96%	57	174	44	0.13%	168
26	205	0.62%	58	175	41	0.12%	169
27	1689	5.14%	59	176	40	0.12%	170
28	1597	4.85%	60	177	46	0.14%	171
29	2049	6.24%	61	178	35	0.10%	172
30	282	0.86%	62	179	6159	18.79%	173
31	101	0.30%	63	180	639	1.92%	174
32	1499	4.55%	64	181	131	0.39%	175
33	4821	14.71%	65	182	34	0.10%	176
34	94	0.28%	66	183	39	0.11%	177
35	47	0.14%	67	184	163	0.49%	178
36	37	0.11%	68	185	71	0.21%	179
37	62	0.19%	69	186	32	0.09%	180
38	253	0.77%	70	187	43	0.13%	181
39	67	0.20%	71	188	50	0.15%	182
40	1879	5.72%	72	189	53	0.16%	183
41	38	0.11%	73	190	32	0.09%	184
42	288	0.88%	74	191	66	0.20%	185
43	644	1.96%	75	192	81	0.24%	186
44	1084	3.29%	76	193	145	0.44%	187
45	144	0.44%	77	194	74	0.22%	188
46	3453	10.53%	78	195	30	0.09%	189
47	35	0.10%	79	196	125	0.38%	190
48	1874	5.71%	80	197	5	0.01%	191
49	185	0.56%	81	198	5	0.01%	192
50	148	0.45%	82	199	5	0.01%	193
51	110	0.33%	83	200	5	0.01%	194
52	110	0.33%	84	201	5	0.01%	195
53	256	0.78%	85	202	5	0.01%	196
54	3699	11.29%	86	203	5	0.01%	197
55	24	0.07%	87	204	5	0.01%	198
56	51	0.15%	88	205	5	0.01%	199
57	397	1.21%	89	206	5	0.01%	200
58	349	1.06%	90	207	5	0.01%	201
59	23	0.07%	91	208	5	0.01%	202
60	19760	60.31%	92	209	5	0.01%	203
61	210	0.64%	93	210	5	0.01%	204
62	50	0.15%	94	211	5	0.01%	205
63	33	0.10%	95	212	5	0.01%	206
64	625	1.90%	96	213	5	0.01%	207
65	765	2.33%	97	214	5	0.01%	208
66	70	0.21%	98	215	5	0.01%	209
67	57	0.17%	99	216	5	0.01%	210
68	136	0.41%	100	217	5	0.01%	211
69	67	0.20%	101	218	5	0.01%	212
70	67	0.20%	102	219	5	0.01%	213
71	67	0.20%	103	220	5	0.01%	214

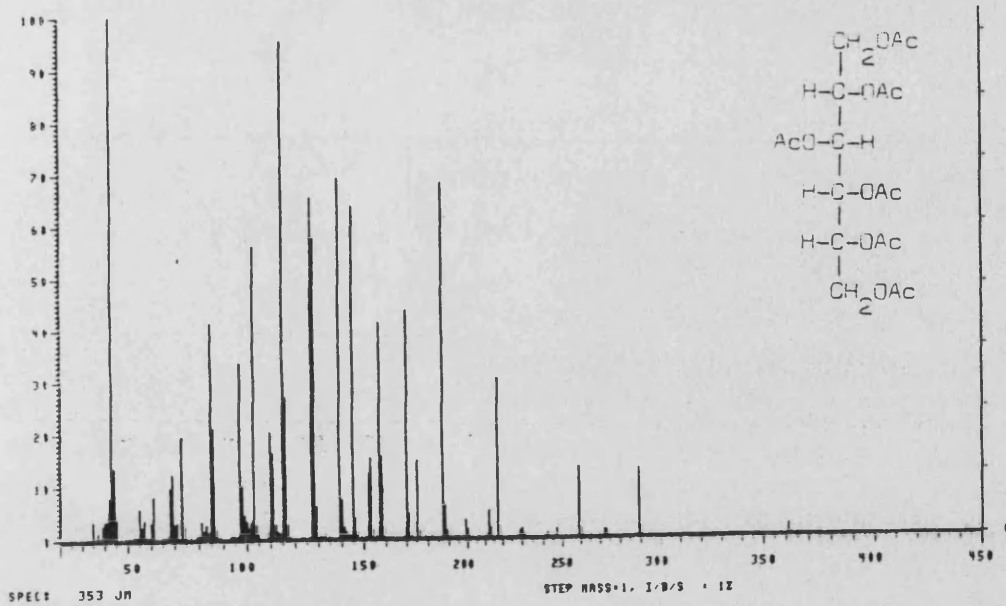


Figura III.12. Espectro de masas del hexa-O-acetato del D-glu-
citol.

>>DATE<<SPECO 353/JM
BASE 32760 SUM 394756

PEAK	INT	I-BASE	HA33	PEAK	INT	I-BASE	HA33
1	151	0.46X	33	22	6444	0.11X	151
2	1141	0.13X	35	23	73	0.15X	151
3	474	0.13X	36	24	642	0.145X	152
4	474	0.13X	37	25	135	0.22X	153
5	225	0.22X	38	26	77	0.41X	154
6	225	0.22X	39	27	77	0.10X	155
7	1122	0.42X	40	28	79	0.19X	156
8	1122	0.42X	41	29	79	0.10X	157
9	1122	0.42X	42	30	241	0.23X	158
10	1122	0.42X	43	31	81	0.022X	159
11	1122	0.42X	44	32	82	0.053X	160
12	2541	0.75X	45	33	82	0.053X	161
13	32760	100.00X	46	34	1043	0.144X	162
14	279	0.085X	47	35	1043	0.144X	163
15	57	0.17X	48	36	85	0.225X	164
16	41	0.12X	49	37	85	0.154X	165
17	47	0.13X	50	38	85	0.19X	166
18	47	0.13X	51	39	85	0.10X	167
19	1257	0.39X	52	40	90	0.045X	168
20	54	0.16X	53	41	91	0.104X	169
21	37	0.11X	54	42	1034	0.15X	170
22	37	0.11X	55	43	47	0.15X	171
23	129	0.39X	56	44	47	0.15X	172
24	126	0.39X	57	45	96	0.49X	173
25	136	0.41X	58	46	97	0.14X	174
26	136	0.41X	59	47	97	0.14X	175
27	201	0.61X	60	48	99	0.14X	176
28	1885	5.75X	61	49	99	0.14X	177
29	36	0.10X	62	50	100	20.42X	178
30	243	0.72X	63	51	101	0.18X	179
31	1163	3.55X	64	52	103	16.36X	180
32	145	0.43X	65	53	104	8.92X	181
33	182	0.55X	66	54	104	1.26X	182
34	147	0.44X	67	55	105	1.00X	183
35	1042	3.24X	68	56	106	45.42X	184
36	2634	8.23X	69	57	107	0.79X	185
37	77	0.23X	70	58	108	2.76X	186
38	72	0.22X	71	59	109	4.0X	187
39	74	0.22X	72	60	110	3.44X	188
40	84	0.24X	73	61	111	0.26X	189
41	84	0.24X	74	62	112	0.23X	190
42	253	0.77X	75	63	113	0.24X	191
43	3219	9.82X	76	64	114	0.24X	192
44	42	0.12X	77	65	115	0.25X	193
45	42	0.12X	78	66	116	0.26X	194
46	31	0.09X	79	67	117	0.36X	195
47	31	0.09X	80	68	118	0.36X	196
48	445	1.34X	81	69	119	0.43X	197
49	445	1.34X	82	70	120	65.57X	198
50	1025	3.18X	83	71	120	57.74X	199
51	114	0.34X	84	72	121	3.33X	200
52	6440	19.65X	85	73	122	0.13X	201
53	30	0.03X	86	74	123	0.13X	202
54	769	2.34X	87	75	124	6.11X	203
55	141	0.43X	88	76	124	0.12X	204
56	33	0.10X	89	77	125	0.42X	205
57	132	0.40X	90	78	125	0.75X	206
58	77	0.23X	91	79	127	0.27X	207
59	144	0.43X	92	80	128	0.27X	208
60	204	0.62X	93	81	129	0.11X	209
61	1080	3.25X	94	82	132	0.15X	210
62	569	1.73X	95	83	133	0.17X	211
63	921	2.80X	96	84	134	6.92X	212
64	555	1.68X	97	85	135	0.15X	213
65	38	0.11X	98	86	135	0.15X	214
66	34	0.10X	99	87	136	7.29X	215
67	13579	41.44X	100	88	137	0.13X	216
68	77	0.23X	101	89	139	4.74X	217
69	39	0.11X	102	90	140	0.86X	218
70	33	0.10X	103	91	140	0.72X	219
71	34	0.10X	104	92	141	0.72X	220
			105	93	142	63.75X	221
			106	94	143	1.06X	222
			107	95	144	3.46X	223
			108	96	145	1.82X	224
			109	97	146	1.49X	225
			110	98	147	0.15X	226
			111	99	148	0.15X	227
			112	100	149	0.25X	228

Los espectros de masas serán, por tanto, los correspondientes a los acetatos de glucitol, xilitol y arabinitol, que son los azúcares mayoritarios que componen la holocelulosa.

III.2.2. Hidrólisis enzimática (I)

Hay enzimas específicos que convierten algunos polisacáridos en oligosacáridos con un alto rendimiento. Parece ser que esos enzimas hidrolizan los fragmentos grandes mas rápidamente que los pequeños, y de esta forma los oligosacáridos mas pequeños se acumulan en la mezcla de reacción. Sin embargo, la mayoría de los enzimas no muestran tal selectividad por los fragmentos grandes.

Para determinar la configuración de la unión intersacarídica de los polisacáridos, se realizó una hidrólisis enzimática. Se llevó a cabo con "celulasa", que hidroliza con especificidad los enlaces β , en una disolución tampón de HOAc/NaAcO a pH 4,5 (Whistler, 1952). Se utilizó como catalizador acetato de fenilmercurio. El producto hidrolizado se separó por filtración, y el filtrado se pasó a través de una columna de carbón activo y se eluyó con agua y finalmente con metanol. Tras eliminar el disolvente en rotavapor se obtuvo un sólido amarillento que se analizó por métodos químicos y cromatográficos.

III.2.2.1. Identificación de los monosacáridos

El análisis de los monosacáridos se realizó por cromatografía gas-líquido. Se tomó una muestra del hidrolizado y se sililó, de la forma habitual, para su análisis comparativo con los azúcares patrones igualmente sililados y se inyectó en el cromatógrafo de gases.

En la tabla III.5 se indican los tiempos de retención de los trimetilsilil derivados del hidrolizado de la holocelulosa relativos a la α -glucosa. En la Fig. III.13 se muestra el cromatograma obtenido.

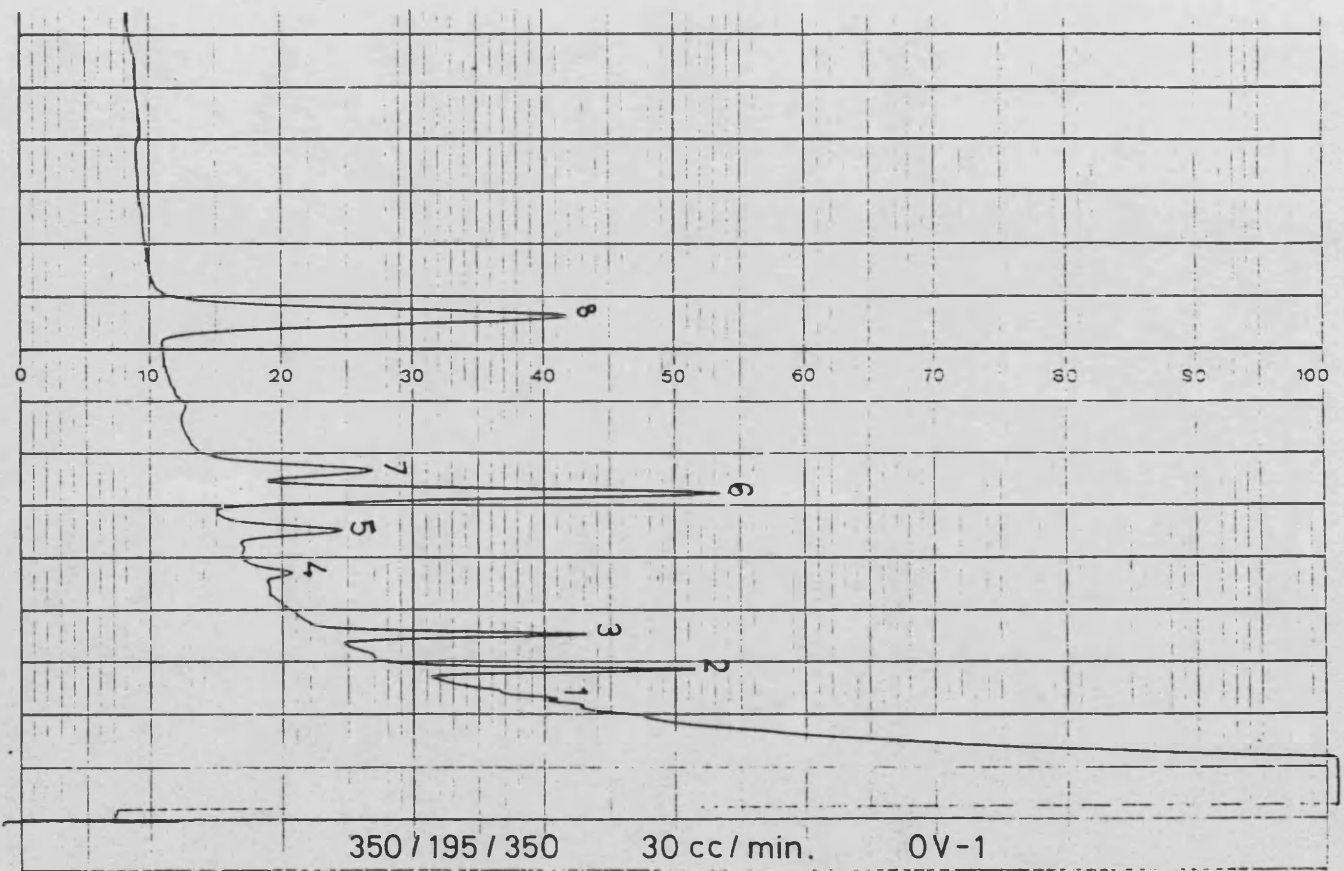


Fig. 111.13. Chromatografía gaseosa de los TMS derivados de los azúcares procedentes del hidrolizado enzimático de la holocelulosa. Temperatura de la columna 195°.

TABLA III.5

Cromatografía gaseosa de los TMS derivados de los monosacáridos procedentes del hidrolizado enzimático de la holocelulosa.

t_R^a	Pico n°	Forma del azúcar	Azúcar
0,37	1	α	Arabinosa y Xilosa
0,45	2	β	Xilosa
0,56	3	γ	
0,75	4	α	Galactosa
0,88	5	β	
1,06	7	γ	
1,00	6	α	Glucosa
1,41	8	β	

^a Tiempos de retención relativos a la α -glucosa en una columna OV-1 a 195°C.

III.2.2.2. Determinación cuantitativa de los monosacáridos

Para un análisis cuantitativo se procedió a la formación de los acetatos de alditoles de los componentes de hidrolizado, tal como se indica en los métodos generales.

Estos nuevos derivados se analizaron por cromatografía gas-líquido, utilizando el método del patrón interno para la determinación cuantitativa de los mismos. En la tabla III.6 se dan los tiempos de retención así como el resultado del análisis cuantitativo expresado en tanto por ciento de los azúcares en la mezcla. En la Fig.III.14 se muestra el cromatograma obtenido.

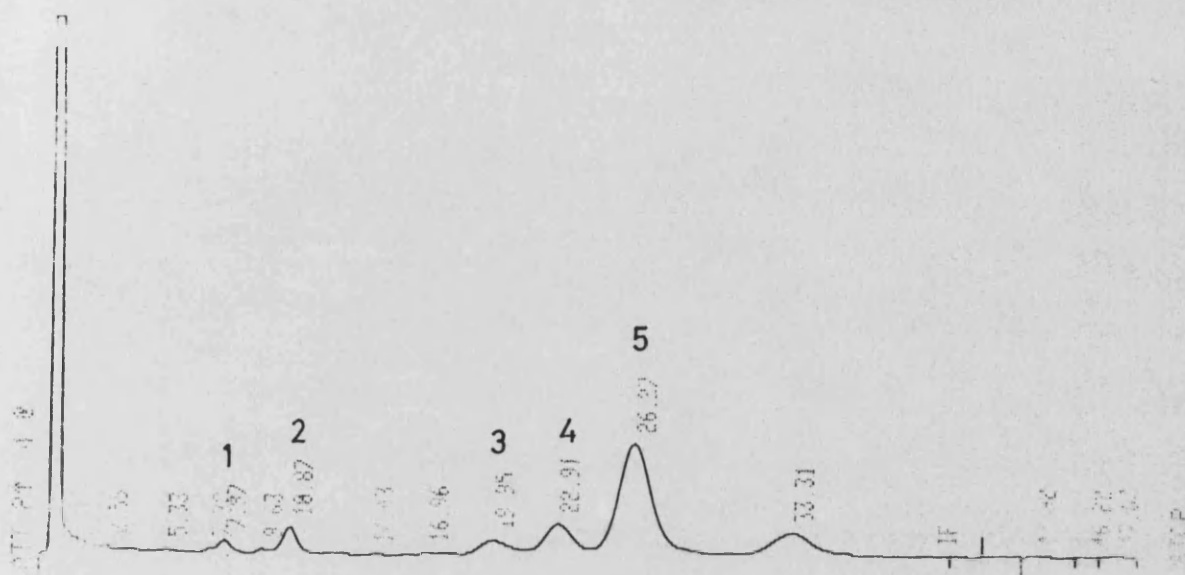


Figura III.14. Cromatografía gaseosa de los acetatos de alditoles procedentes de la hidrólisis enzimática de la holocelulosa. Temperatura de la columna 190°.

TABLA III.6.

Monosacáridos de la holocelulosa determinados a través de los acetatos de alditoles

Azúcares	Pico n°	%Azúcares
Arabinosa	1	3,10
Xilosa	2	7,72
Manosa	3	8,27
Galactosa	4	17,05
Glucosa	5	63,86

III.2.2.3. Hidrólisis ácida de los oligosacáridos

En la hidrólisis enzimática de la holocelulosa se forman, además de los monosacáridos ya mencionados, posibles disacáridos, trisacáridos, etc., que pasarían al hidrolizado.

Se sometió, pues, este hidrolizado a una hidrólisis ácida previa a la identificación de los monosacáridos. Se disolvio el residuo en ácido sulfúrico del 72% con agitación a temperatura ambiente durante 4 horas. A continuación se diluyó el ácido sulfúrico hasta 1 N y se calentó a reflujo 4 horas. Los monosacáridos liberados, tras neutralización con carbonato de bario y desionización a través de Amberlita IR-120 (H⁺), se transformaron en los correspondientes acetatos de alditoles, de la forma acostumbrada.

III.2.2.3.1. Determinación cuantitativa de los monosacáridos

La determinación cuantitativa de los monosacáridos se realizó por cromatografía gas-líquido de los acetatos de alditoles formados. En la tabla III.7 se dan los resultados de estos análisis y se expresan en tanto por ciento del total de azúcares. En la Fig.III.15 se muestran el cromatograma obtenido.

III.2.2.4. Hidrólisis ácida del residuo no hidrolizado enzimáticamente.

El residuo separado por filtración en la hidrólisis enzimática de la holocelulosa, se sometió a una hidrólisis ácida con ácido sulfúrico del 72%. El hidrolizado se neutralizó con carbonato de bario y se desionizó por resina Amberlita IR-120(H⁺). Se eluyeron los productos con agua y se concentraron a un pequeño volumen para su transformación en los correspondientes acetatos de alditoles, de la forma acostumbrada.

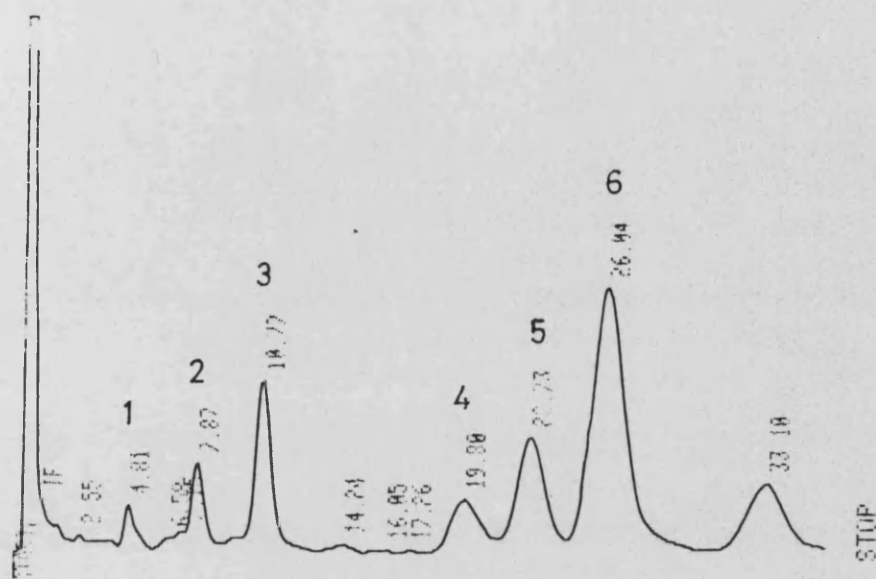


Fig. III.15. Cromatografía gaseosa de los acetatos de alditoles procedentes de la hidrólisis ácida de los oligosacáridos de la holocelulosa. Temperatura de la columna 190° .

TABLA III.7.

Monosacáridos de la holocelulosa determinados a través de los acetatos de alditoles

Azúcares	Pico n°	%Azúcares
Ramnosa	1	3,15
Arabinosa	2	7,61
Xilosa	3	18,95
Manosa	4	12,64
Galactosa	5	25,27
Glucosa	6	32,37

III.2.2.4.1. Determinación de los monosacáridos

Los acetatos de alditoles obtenidos se analizaron de forma cuantitativa por cromatografía gas-líquido.

En la tabla III.8 se indican los resultados obtenidos y se expresan en tanto por ciento del total de azúcares y en la Fig. III.16 se muestra el cromatograma obtenido.

III.2.3. Hidrólisis enzimática (II)

Se realizó otra hidrólisis enzimática de la holocelulosa utilizando el mismo procedimiento que en la anterior y variando el tiempo de reacción. En este caso, se tuvo la mezcla de reacción 20 horas en agitación a 45°C, en lugar de las 4 horas que estuvo en la hidrólisis anterior.

El residuo no hidrolizado de holocelulosa se separó por filtración. Con el filtrado, de color amarillo, una vez terminado el tratamiento, se formaron los correspondientes acetatos de alditoles de la forma acostumbrada, para su posterior análisis cuantitativo.

III.2.3.1. Determinación cuantitativa

La determinación cuantitativa de los monosacáridos se llevó a cabo por cromatografía gas-líquido de los acetatos de alditoles formados. En la tabla III.9 se dan los resultados de análisis cuantitativo expresados en tanto por ciento del total de azúcares y en la Fig. III.17 se muestra el cromatograma obtenido.

De los resultados de la hidrólisis enzimática se puede decir que casi todos los azúcares están implicados en uniones β . No se puede saber la proporción precisa de estos azúcares, ni tampoco si están en su totalidad, puesto que el residuo que queda sin hidrolizar puede deberse a que estos azúcares también formen parte de uniones α , o bien a que el

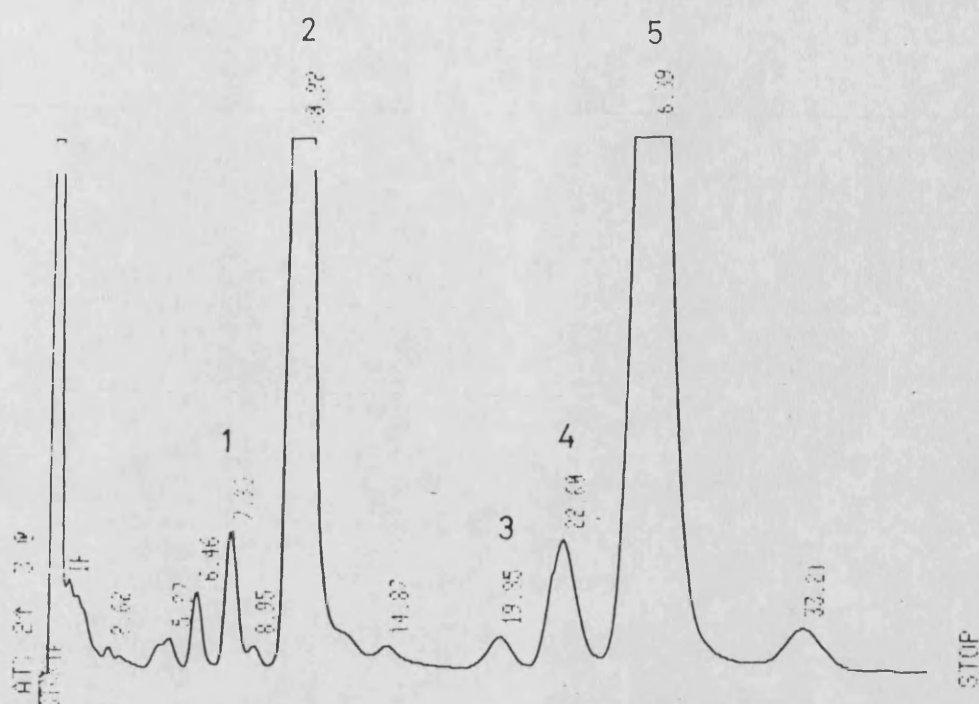


Fig. III.16. Cromatografía gaseosa de los acetatos de alditoles procedentes de la hidrólisis de la holocelulosa no hidrolizada enzimáticamente. Temperatura de la columna 190° .

TABLA III.8

Monosacáridos de la holocelulosa determinados a través de los acetatos de alditoles

Azúcares	Pico n°	%Azúcares
Arabinosa	1	1,97
Xilosa	2	43,79
Manosa	3	1,00
Galactosa	4	2,88
Glucosa	5	50,33

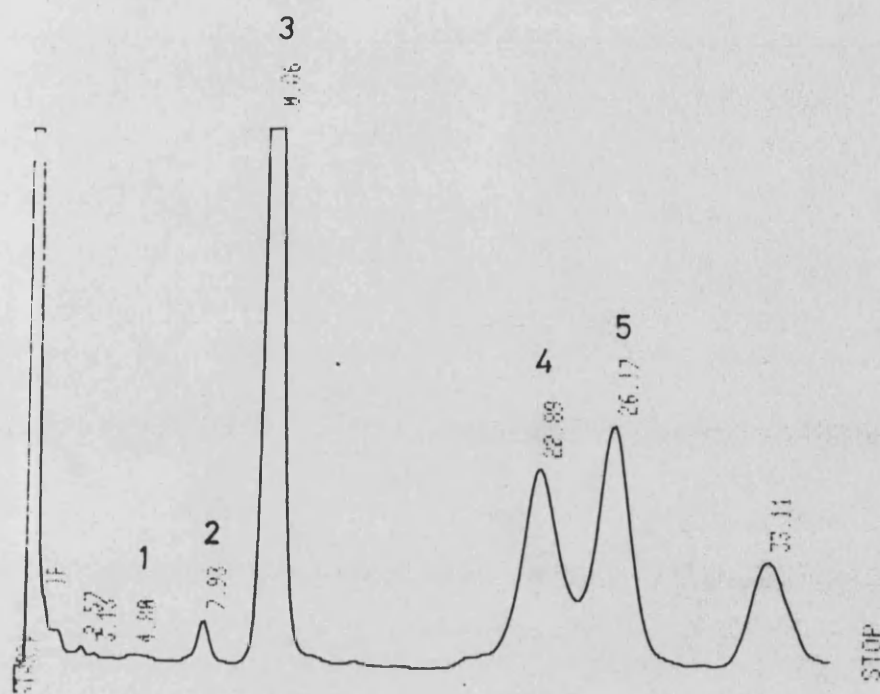


Fig. III.17. Cromatografía gaseosa de los acetatos de alditoles procedentes de la hidrólisis enzimática(2) de la holocelulosa. Temperatura de la columna 190°.

TABLA III.9

Monosacáridos de la holocelulosa determinados a través de los acetatos de alditoles

Azúcares	Pico n°	%Azúcares
Ramnosa	1	0,34
Arabinosa	2	1,61
Xilosa	3	46,49
Galactosa	4	26,47
Glucosa	5	25,08

tratamiento no ha sido completo. Esto último se confirmaría por el hecho de que en la segunda hidrólisis enzimática, que se aumentó el tiempo de reacción, se hidrolizó mayor cantidad de algunos azúcares.

Posteriormente, se comprobará, por análisis espectroscópico de los polisacáridos metilados y por sus poderes rotatorios, que la casi totalidad de los azúcares que constituyen los polisacáridos están unidos por enlaces β y tan sólo una pequeña proporción, están implicados en uniones α .

III.3. Metilación de la holocelulosa

El procedimiento de la metilación, a pesar de los años que han transcurrido desde su primer uso por Purdie e Irvine (Purdie, 1903), permanece como una de las armas más poderosas para determinar el tipo de unión de cada monosacárido en la molécula (Hirst, 1956), es decir, ofrece una buena confirmación de la estructura química (Stoffyn, 1960; Kuhn, 1955 y 1960; Yamakawa, 1963).

La metilación de los polisacáridos se llevó a cabo por el procedimiento de Hakamori. Consiste este proceso en la formación del alcóxido, catalizado por el metilsulfonilcarbanión en dimetilsulfóxido, seguido por la metilación con yoduro de metilo.

a) Formación del carbanión

Según Corey y Chaykovsky (Corey, 1962 y 1965), el sodio metilsulfonil carbanión ($\text{CH}_3\text{-SO-CH}_2\text{Na}^+$) se genera convenientemente calentando el hidruro de sodio finamente pulverizado en un exceso de dimetilsulfóxido seco, bajo atmósfera de nitrógeno, con agitación y a 70-75°C. El final de la reacción se ve por el cese de la evolución de hidrógeno y por la desaparición del hidruro de sodio.

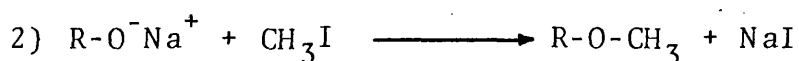
b) Metilación del polisacárido

El polisacárido se trata con la base fuerte anteriormente generada. Con esto se ionizan los grupos hidroxilo que se tratan a continuación con ioduro de metilo.

La ionización de los grupos hidroxilo del polisacárido es una reacción relativamente lenta (Bjorndal, 1970C). Se deja permanecer, pues, el polisacárido varias horas con la base antes de añadir el ioduro de metilo.

Los iones alcoxi y el ioduro de metilo reaccionan mucho más rápidamente. Una parte del ioduro de metilo lo consume la base. El aislamiento de los polisacáridos metilados es sencillo y el método es adecuado tanto para la micro como para la macroescala.

Este método además tiene las ventajas de que la reacción es más rápida y completa cuando se cataliza por el carbanión y se puede controlar por la cantidad de reactivo añadido. Además, la copresencia del ión sodio y del carbanión prohíbe posiblemente varios efectos indeseables del sodio. Las dos etapas de la reacción son:



La metilación de la holocelulosa se llevó a cabo siguiendo este procedimiento. Los polisacáridos metilados se aislaron por extracción con cloroformo, se secaron en estufa de vacío varios días y se purificaron por cromatografía de columna a través de Sephadex LH-20 utilizando como eluyente la mezcla cloroformo-acetona (2:1) (Aspinal, 1978A).

III.3.1. Caracterización de la holocelulosa metilada

Es difícil reconocer si la metilación ha sido completa. Los polisacáridos metilados son higroscópicos, y los últimos restos de dimetilsulfóxido u otro disolvente se eliminan con dificultad. Por análisis de los grupos metoxilo se obtienen a menudo valores muy bajos. El mejor criterio es la ausencia de la banda de absorción del OH entre $3600-3400\text{ cm}^{-1}$, aunque trazas de agua pueden falsear el resultado (Bjorndal, 1970C).

a) Interpretación del espectro de IR

Su espectro de IR (Fig.III.18) presentó las siguientes bandas características: a 2930 y 2850 cm^{-1} bandas de tensión de C-H alifático; banda a 1735 cm^{-1} de tensión de C=O de éster metílico; banda a 1460 cm^{-1} de deformación por flexión asimétrica de grupos $-\text{CH}_2-$ y CH_3- ; banda a 1380 cm^{-1} de deformación por flexión simétrica de los grupos $-\text{CH}_3$; banda a 1320 cm^{-1} de deformación por flexión de grupos $-\text{CH}-$; banda ancha entre 1200 y 1000 cm^{-1} de tensión C-O-C de éter y éster; banda a 950 cm^{-1} que indica la presencia de éteres cíclicos y banda a 890 cm^{-1} debida a las uniones β de los polisacáridos. Se comprueba, pues, que la metilación ha sido completa.

b) Interpretación del espectro de RMN

El espectro de RMN (Fig.III.19) (DCCl_3) muestra las señales características de un polisacárido metilado y con uniones glicosídicas β (Whyte, 1971). Señales a $4,4\delta$, muy poco resuelto el doblete, asignables a los protones anoméricos de polisacáridos lineales; las señales a $3,58$, $3,51$ y $3,4\delta$ asignables a los grupos metoxilo en C-3, C-2 y C-6 respectivamente (Gagnaire, 1969); las señales a $3,05\delta$ y entre $3,7$ y $3,9\delta$, que están muy poco resueltas, asignables a los $-\text{CH}_2-$ y $-\text{CH}-$ adyacentes a grupos metoxilos.

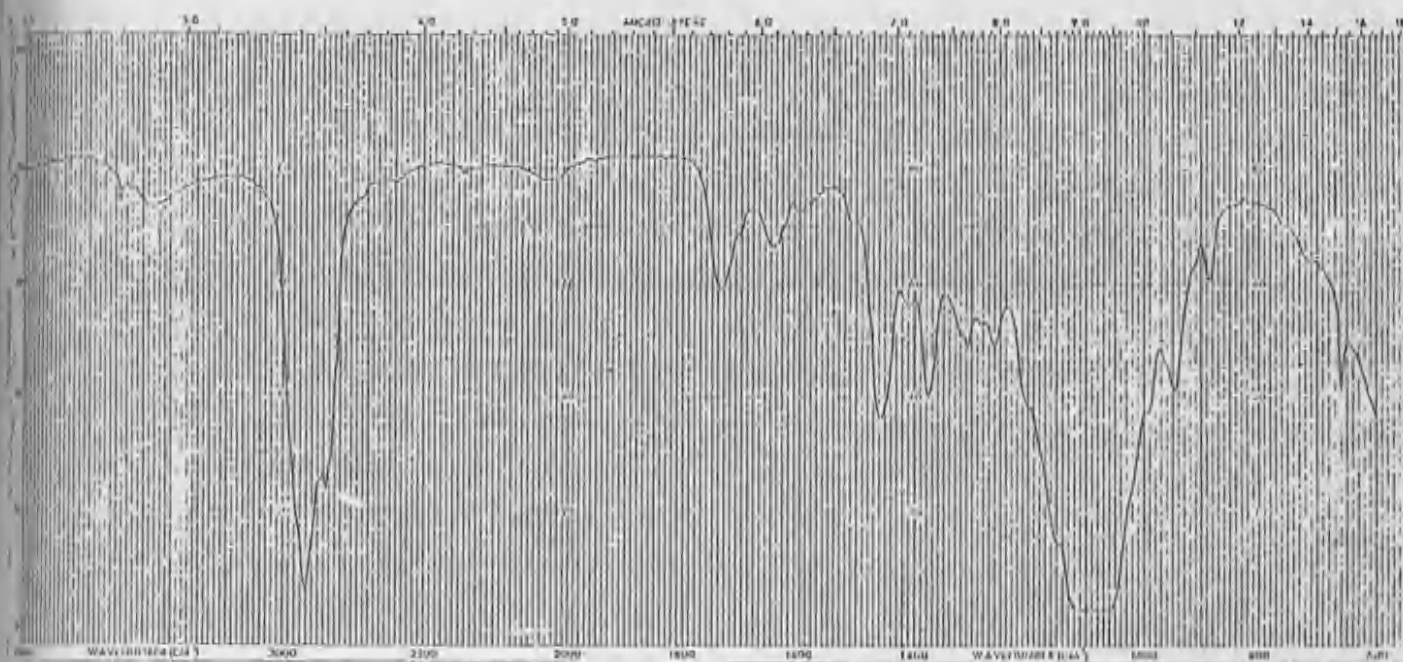


Fig.III.18. Espectro de IR de la holocelulosa metilada.

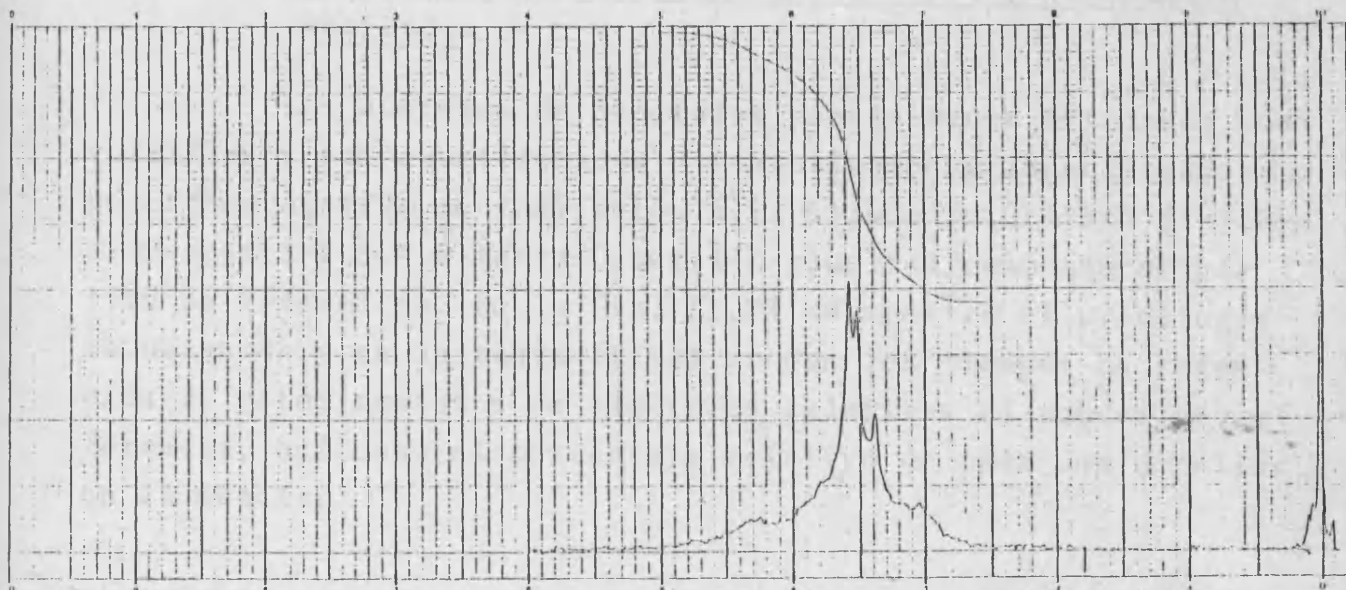


Fig.III.19. Espectro de RMN de la holocelulosa metilada.

III.3.2. Hidrólisis ácida

Una vez que la composición de glicosilo de un polisacárido es conocida, el siguiente paso es determinar la composición de las uniones del glicosilo. Este análisis permite determinar cuantitativamente las cantidades de diferentes restos de glicosilo. El método elegido para el análisis de las uniones de glicosilo envuelve la formación de los acetatos de alditoles parcialmente metilados. Esta técnica sustituye grupos metilo por los átomos de hidrógeno de todos los grupos hidroxilo expuestos en el polisacárido (Sandford, 1966). Después de la permetilación, el polisacárido se hidroliza con ácido sulfúrico del 72% para dar las aldosas parcialmente metiladas, que son reducidas a los correspondiente alditoles y luego acetiladas.

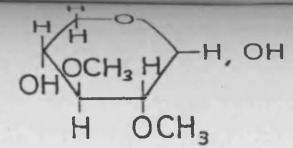
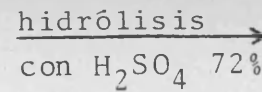
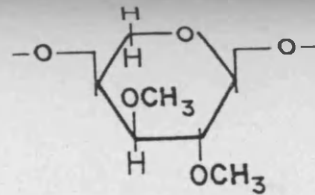
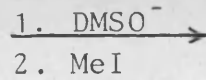
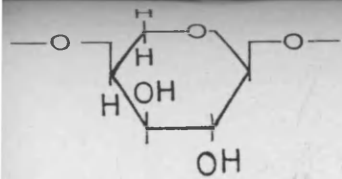
El método de análisis de la unión de los glicosilos por los acetatos de alditoles parcialmente metilados se sumarian en la Fig.III.20.

III.3.2.1. Identificación de los monosacáridos parcialmente metilados

Los acetatos de alditoles parcialmente metilados son volátiles y son cuantificados y tentativamente identificados por cromatografía de ionización a la llama. Se utilizó el 1,5-di-O-acetil-2,3,4,6-tetra-O-metil-D-glucitol como azúcar patrón de referencia. En la Fig.III.21 se muestra el cromatograma obtenido y en la tabla III.13 se dan los tiempos de retención de estos acetatos de alditoles relativos al azúcar de referencia, así como el porcentaje relativo de cada uno de ellos en la mezcla.

III.3.3. Reducción de la holocelulosa metilada

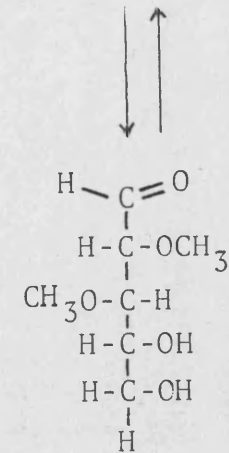
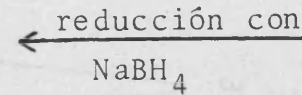
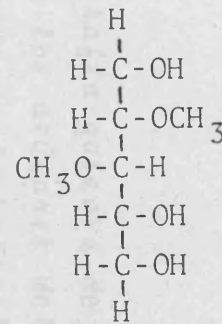
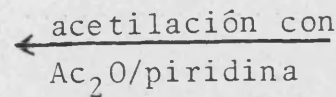
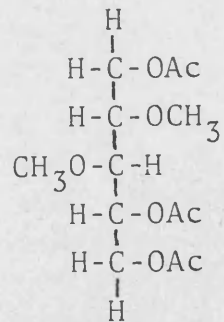
Como se observa en el espectro de IR (Fig.III.18) de la holocelulosa metilada, ha desaparecido la banda de absor-



resto de xilosil
con uniones β(1-4)

resto de 2,3-di-O-metil-
xilosil con enlaces β(1-4);
resto de un glicosilo metilado.

2,3-di-O-metil xilosa;
una aldosa parcialmente
metilada(en forma de anillo)



2,3-di-O-metil; 1,4,5-
tri-O-acetil xilitol;
un acetato de alditol
parcialmente metilado.

2,3-di-O-metil xilitol
un alditol parcialmente
metilado

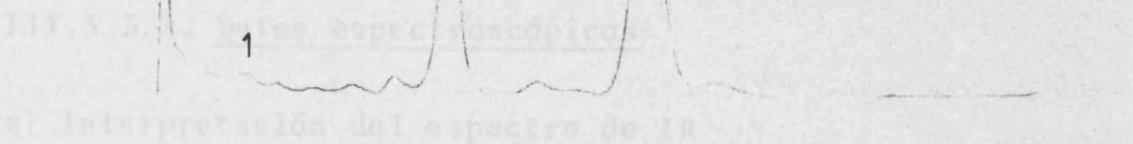
2,3-di-O-metil xilosa
(en forma de cadena
abierta)

Fig.III.20. Análisis de metilación por conversión de los restos de glicosilo de oligo y polisacáridos en los acetatos parcialmente metilados.

ción del $\text{C}=\text{O}$ ($1730-1750 \text{ cm}^{-1}$), lo que significa que el grupo $\text{C}=\text{O}$ está presente en la muestra. Este grupo es característico de los ácidos grasos y los lípidos. Se realizó una reducción de este grupo con el fin de eliminarlo antes de la hidrólisis.

La holocelulosa metilada se calentó a 175°C en un reactor a presión de 10 atm con un catalizador de ácido sulfúrico, agua y glicerol, que contenía hidrato de aluminio. El tiempo de reacción fue de 2 h y el producto se separó por extracción con agua.

En su espectro de IR (Fig. III.21) se observó una banda a 1730 cm^{-1} que corresponde al grupo $\text{C}=\text{O}$ de los ácidos grasos. Este grupo es característico de los lípidos y se eliminó antes de la hidrólisis.



El espectro de IR (Fig. III.21) de los ácidos grasos

Fig. III.21. Cromatografía gaseosa de los acetatos de alditoles de los azúcares metilados obtenidos del hidrolizado de la holocelulosa metilada en una columna ECNSS-M a 175° . Picos: 1) 2,3,4,6-Me₄-Glu; 2) 2,3-Me₂-Xi; 3) 2,3,6-Me₃-Glu.

El espectro de IR (Fig. III.21) de los ácidos grasos

El espectro de IR (Fig. III.21) de los ácidos grasos

El espectro de IR (Fig. III.21) de los ácidos grasos

ción del OH ($3600-3200\text{ cm}^{-1}$), lo que significa que la metilación ha sido completa, pero hay una banda a 1735 cm^{-1} característica de un ester metílico, debido posiblemente a polisacáridos ácidos. Se realizó, por tanto, una reducción de estos polisacáridos ácidos metilados previa a la hidrólisis.

La holocelulosa metilada se calentó a reflujo en tetrahidrofurano, seco y destilado, que contenía hidruro de aluminio y litio (Aspinall, 1978A). El polisacárido metilado y reducido se aisló por extracción con cloroformo.

En su espectro de IR apareció una banda a 3500 cm^{-1} (tensión OH) pero no desapareció totalmente la banda a 1735 cm^{-1} (tensión C=O de ester).

III.3.3.1. Datos espectroscópicos

a) Interpretación del espectro de IR

Su espectro de IR (Fig.III.22a) presentó las siguientes bandas características: a 3500 cm^{-1} de tensión O-H libre; bandas a 2980 y 2860 cm^{-1} de tensión de C-H alifático; banda a 1740 cm^{-1} de tensión de C=O de ester; bandas a 1460 , 1380 y 1320 cm^{-1} de deformación por flexión de grupos $-\text{CH}_2-$, CH_3- , y $-\text{CH}-$ respectivamente; y banda ancha entre 1170 y 1000 cm^{-1} de tensión C-O de éter.

b) Interpretación del espectro de RMN

En su espectro de RMN (Fig.III.22b) (DCCl_3) no se observa ninguna variación con respecto al de la holocelulosa metilada, ni ocurre ningún cambio apreciable en las señales al añadirle agua pesada a la muestra.

Las señales mas características son: a $4,3\delta$ las señales, apenas resultas, de los protones anoméricos de las uniones glicosídicas β ; a $3,6$, $3,52$ y $3,4\delta$ las señales asignables a los grupos metoxilo en C-3, C-2 y C-6 respectivamente; entre $3,05$ y $3,2\delta$ y entre $3,9$ y $3,7\delta$ las señales co-

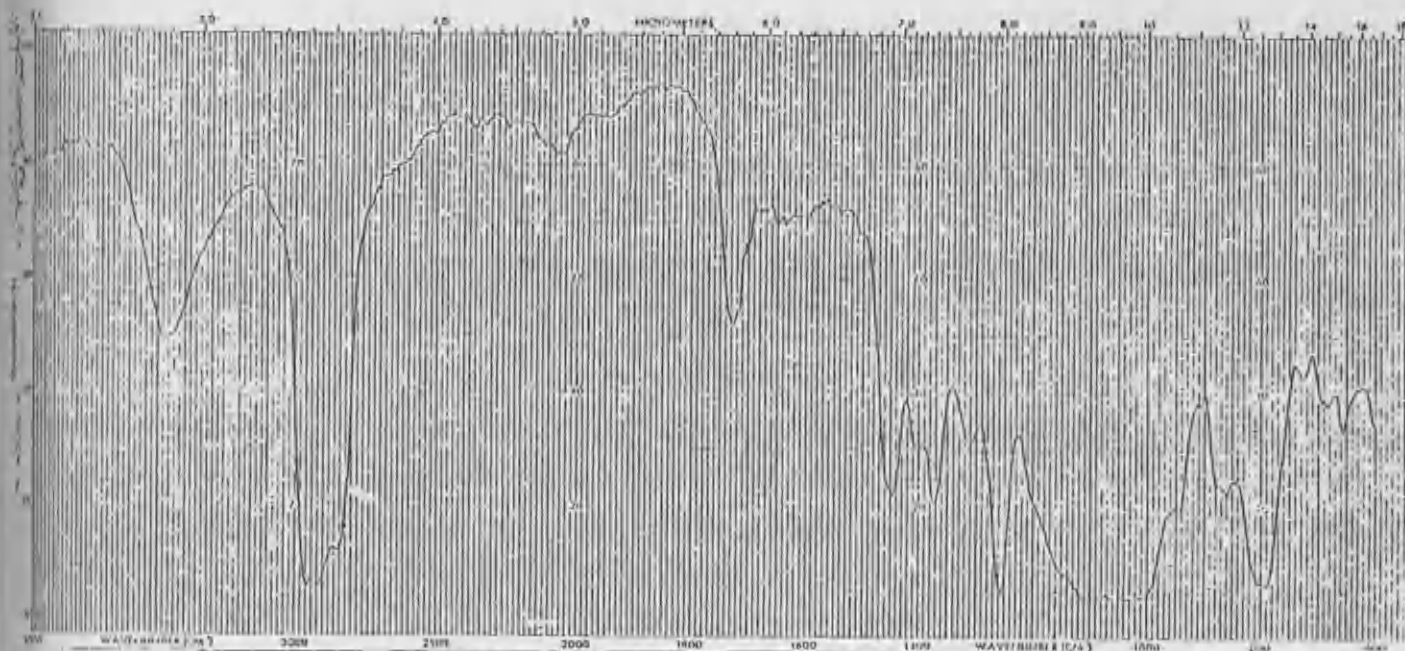


Fig.III.22a. Espectro de IR de la holocelulosa metilada y reducida.

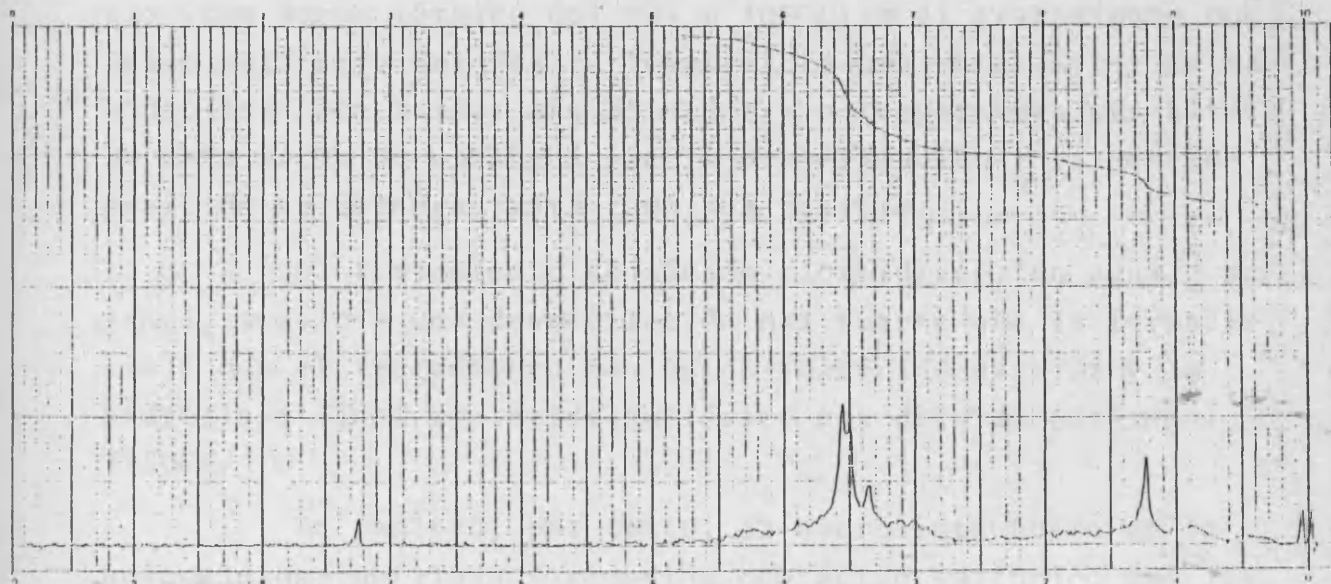


Fig.III.22b. Espectro de RMN de la holocelulosa metilada y reducida.

rrespondientes a los $-CH_2-$ y $-CH-$, respectivamente, adyacentes a grupos metoxilo.

El hecho de que no se aprecie ningún cambio en el RMN puede ser debido a que la resolución de las señales no es lo suficientemente buena o bien que estos grupos ácidos estén en una cantidad tan pequeña que no se detectan.

Esto último parece ser lo mas probable, ya que en el espectro tampoco aparecen las señales correspondientes a los protones anoméricos de uniones glicosídicas α , que es como normalmente se presentan estos ácidos urónicos formando parte de los polisacáridos.

III.3.3.2. Hidrólisis ácida. Obtención de los monosacáridos parcialmente metilados

Los polisacáridos totalmente metilados no se disuelven por lo general, en disoluciones acuosas, aún ni calentando. Por esto, normalmente, se realiza la metanolisis (con ácido clorhídrico metanólico a ebullición), la formolisis (con ácido fórmico del 90% a 100°C) ó el tratamiento con ácido sulfúrico del 72% (a temperatura ambiente) antes de la hidrólisis con ácidos más diluídos y a temperatura mas altas. De esta forma se consigue que la desmetilación y la descomposición se detenga tanto como sea posible.

El tratamiento con ácido clorhídrico, en agua o metanol, ocasiona una desmetilación mas fuerte que la formolisis ó que el tratamiento con ácido sulfúrico del 72% y la hidrólisis final con ácido sulfúrico mas diluído (Björndal, 1970C).

Se realizó, por tanto, la hidrólisis ácida de la holocelulosa metilada y reducida con ácido sulfúrico del 72%.

III.3.3.2.1. Identificación de los monosacáridos parcialmente metilados

Con los monosacáridos parcialmente metilados, obtenidos en la hidrólisis ácida, se formaron los correspondientes acetatos de alditoles de la forma habitual.

a) Análisis por cromatografía gaseosa

Estos derivados volátiles, acetatos de alditoles parcialmente metilados, se analizaron y cuantificaron por cromatografía gaseosa utilizando el 1,5-di-O-acetil-2,3,4,6-tetra-O-metil-D-glucitol como azúcar patrón de referencia. En la Fig.III.23 se muestra el cromatograma obtenido y en la tabla III.13 se dan los tiempos de retención de estos derivados relativos al azúcar patrón de referencia, así como el porcentaje relativo de cada uno de ellos en la mezcla.

b) Análisis por cromatografía gaseosa-espectrometría de masas

La identidad de los acetatos de alditoles parcialmente metilados se confirma por cromatografía gaseosa espectrometría de masas combinadas (Björndal, 1970). En la Fig. III.24 se muestra el cromatograma obtenido.

Interpretación del espectro de masas

La aplicación de la espectrometría de masas acoplada a la cromatografía gas-líquido es una posibilidad para el análisis cualitativo y cuantitativo de la mezcla de azúcares metilados.

Varios autores han estudiado los espectros de masas de los hidratos de carbono (Kochetkov, 1966). Heyns y colaboradores (Heyns, 1963) estudiaron los espectros de masas de glicósidos totalmente metilados, mientras que Kochetkov y colaboradores (Chizhov, 1967), Samuelson y co-

laboradores (Petersson, 1967) se dedicaron a los trimetilsilil derivados de los glicósidos parcialmente metilados.

Los espectros de masas de los acetatos de alditoles parcialmente metilados fueron estudiados por Björndal y colaboradores (Björndal, 1967A). Observando los espectros de masas de los acetatos de alditoles parcialmente metilados se pueden hacer las siguientes generalizaciones:

1. En la mayoría de los espectros de masas el pico base es m/e 43 ($\text{CH}_3-\overset{+}{\text{C}}=\text{O}$).
2. Los derivados con el mismo tipo de sustitución (por ej. los hexitoles de los 2,3,4,6-tetra-O-metilderivados) dan espectros de masas muy semejantes y no permiten, por ello, una diferenciación segura.
3. Con moléculas con dos grupos metoxilo vecinos, por ej. con los acetatos de alditoles del 2,3-di-O-metil-D-xilitol (fig.III.26) y los del 2,3,6-tri-O-metil-D-glucitol (Fig. III.28), se prefiere la ruptura entre esos grupos antes que la ruptura entre un átomo de carbono metoxilado y otro acetoxilado.
4. Los fragmentos primarios formados resultan de la ruptura entre los átomos de carbono de la cadena. La ruptura entre un átomo de carbono metoxilado y uno acetoxilado se prefiere a la ruptura entre dos átomos de carbono acetoxilados. Los fragmentos con el grupo metoxilo llevan la carga positiva. Según esto, el acetato de alditol de la 3-O-metil-D-xilosa (Fig.V.17) se divide primero en un sólo fragmento primario (m/e 189).
5. Los fragmentos secundarios resultan de los fragmentos primarios por una o varias eliminaciones consecutivas de ácido acético (m/e 60), cetena (m/e 42), metanol (m/e 32) ó formaldehído (m/e 30).

Los fragmentos primarios mas importantes de un acetato de alditol parcialmente metilado se dan en la tabla III.11. La intensidad de los fragmentos primarios aumenta con la dis-

TABLA III.11

Fragmentos primarios del espectro de masas de acetatos de alditoles metilados^a.

Posición del CH ₃	m/e												
	45	59	89	117	131	161	175	189	203	205	217	233	261
Pentosas													
3								+					
2,3(3,4)				+				+					
2,3,4				+		+		+					
2,3,5	+			+		+							
Hexosas													
2,3				+									+
2,3,4				+		+		+				+	
2,3,6	+			+								+	
2,4,6	+			+		+						+	+
2,3,4,6	+		+	+		+				+			

a

Se indican solamente los correspondientes a los acetatos de alditoles de los polisacáridos estudiados en este trabajo.

minución del número másico. Las intensidades de estos fragmentos para los acetatos de alditoles son mucho más bajas que las intensidades de los correspondientes picos procedentes de los acetatos de alditoles parcialmente metilados.

En la tabla III.12 se dan los picos más prominentes del espectro de masas de los distintos acetatos de alditoles encontrados en los polisacáridos estudiados en este trabajo. Se incluyen solamente los picos con una intensidad superior al 10% del pico base.

De los espectros de masas de los acetatos de alditoles parcialmente metilados de la holocelulosa metilada y reducida, se identificaron cuatro compuestos correspondientes a los picos que se indican en el cromatograma de la Fig.III.24.

El pico mayoritario, pico n°3 del cromatograma, cuyo espectro de masas se muestra en la Fig.III.29, dió como fragmentos primarios los iones m/e 117 y m/e 233 y como secundarios los iones con m/e 43, 87, 101 y 113 (Fig. III.30). Esto, junto con el análisis por cromatografía gaseosa, nos permitió identificarlo como el 1,4,5-tri-O-acetil-2,3,6-tri-O-metil-D-glucitol.

El siguiente pico en importancia, pico n°2 del cromatograma, cuyo espectro de masas se muestra en la Fig.III.27, tiene como fragmentos más prominentes los iones con m/e 43, 87, 101, 117, 129 y 189 (Fig.III.28), lo que, junto con la cromatografía gaseosa, nos permitió identificarlo como el compuesto 1,4,5-tri-O-acetil-2,3-di-O-metil-D-xilitol.

Para el pico n°1 del cromatograma, pico muy minoritario, cuyo espectro de masas se muestra en la Fig. III.25, se le asignaron como fragmentos más significativos los iones con m/e 43, 45, 71, 87, 101, 117, 129, 145, 161 y 205 (Fig.III.26), que estarían de acuerdo con la cromatografía gaseosa para corresponder al 1,5-di-O-acetil-

TABLA III.12

Picos prominentes (m/e) en el espectro de masas de acetatos de alditoles metilados

Azúcares ^a	m/e																									
	43	45	59	71	85	87	89	99	101	113	115	117	127	129	131	139	143	145	161	175	189	203	205	233	26	
3-Me-Xi	+					+								+												+
2,3-Me ₂ Xi	+					+			+			+		+												+
2,3,4-Me ₃ -Xi	+								+			+							+							
2,3,5-Me ₃ -Ara	+	+		+		+			+			+		+					+							
2,3,4-Me ₃ -Glu	+					+		+	+			+		+					+							+
2,3,6-Me ₃ -Glu	+	+				+		+	+	+		+													+	
2,4,6-Me ₃ -Glu	+	+				+			+			+		+					+							
2,3,4,6-Me ₄ -Glu	+	+		+		+			+			+		+				+	+						+	
2,3-Me ₂ +Glu	+								+			+		+												+

^a 3-Me-Xi=1,2,4,5-tri-O-acetil-3-O-metil-D-xilitol, etc

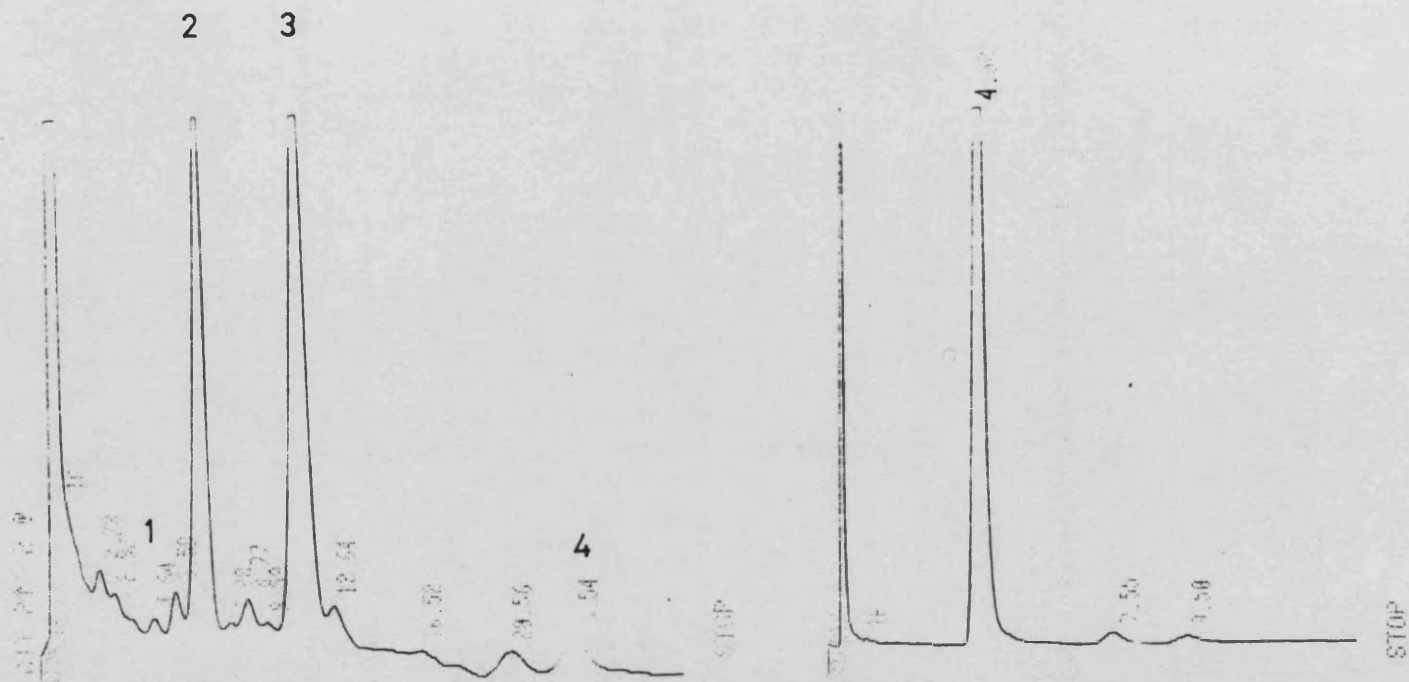


Fig. III.23 a) Cromatografía gaseosa de los acetatos de alditoles de los azúcares metilados obtenidos del hidrolizado de la holo-celulosa metilada y reducida en una columna ECNSS-M a 175° . Picos: 1) 2,3,4,6-Me₄-Glu; 2) 2,3-Me₂Xi; 3) 2,3,6-Me₃-Glu; 4) 2,3-Me₂-Glu.
 b) Cromatografía gaseosa del 2,3,4,6-Me₄-Glu patrón.

TABLA III.13

Eteres metílicos del hidrolizado de los polisacáridos metilados (A) y metilados y reducidos (B).

Azúcares ^a	t_R^b	% Area	
		A	B
2,3,4,6-Me ₄ -Glu	1,00	2,35	1,96
2,3-Me ₂ -Xi	1,47	28,29	28,71
2,3,6-Me ₃ -Glu	2,44	55,58	44,73
2,3-Me ₂ -Glu	5,18	-	4,89

^a 2,3,4,6-Me₄-Glu=1,5-di-O-acetil-2,3,4,6-tetra-O-metil-D-glucitol.

^b Tiempos de retención de los correspondientes acetatos de alditoles parcialmente metilados relativos al del 1,5-di-O-acetil-2,3,4,6-tetra-O-metil-D-glucitol (t_R 4,54) en una columna ECNSS-M a 175°C.

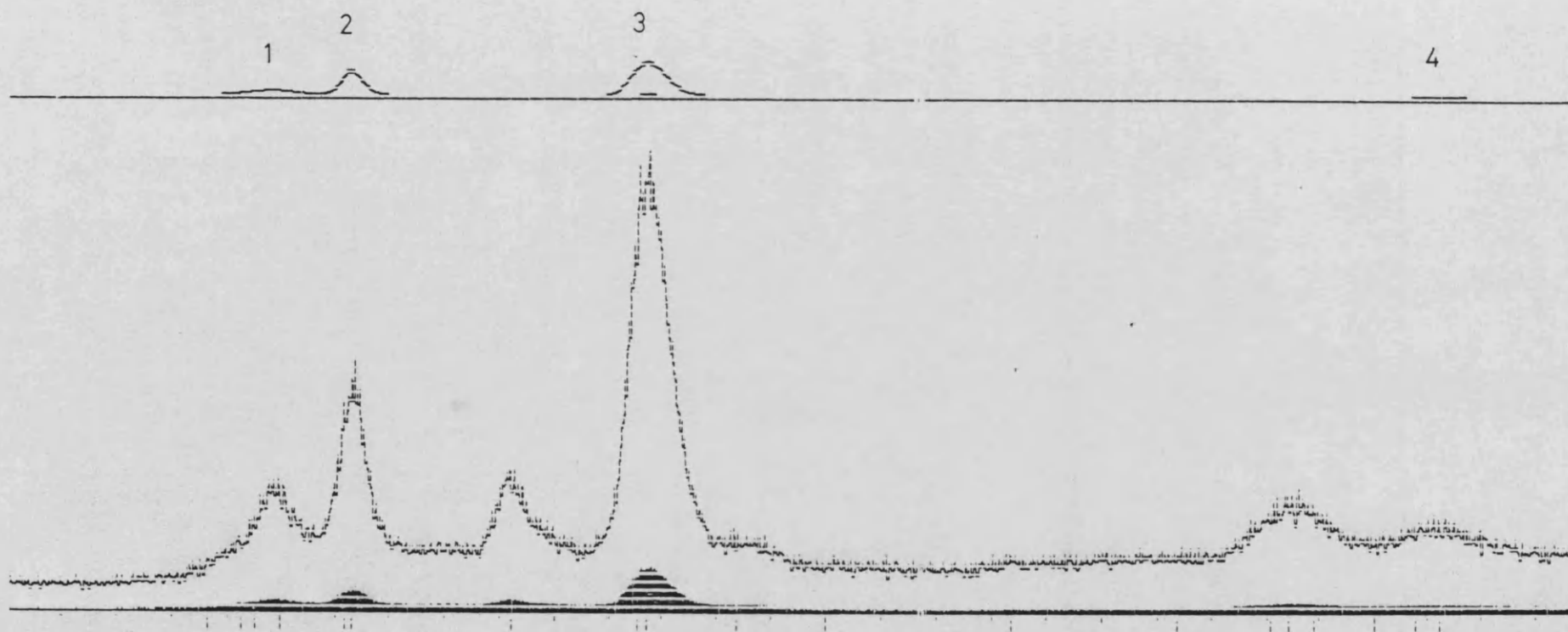
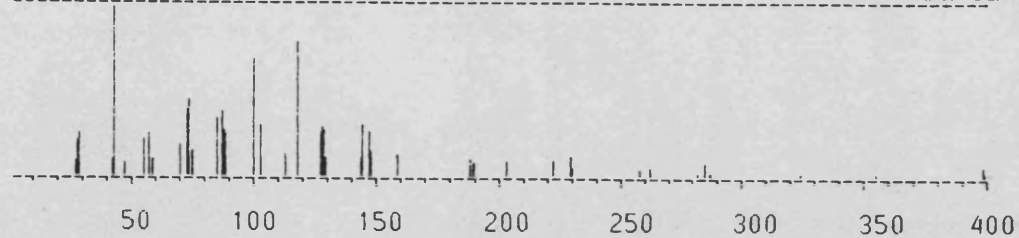


Fig. III.24. Cromatografía gaseosa de los acetatos de alditoles de los azúcares metilados obtenidos del hidrolizado de la holocelulosa metilada y reducida en una columna ECNSS-M a 175° . Píco: 1) 2,3,4,6-Me₄-Glu; 2) 2,3-Me₂Xi; 3) 2,3,6-Me₃-Glu; 4) 2,3-Me₂-Glu.

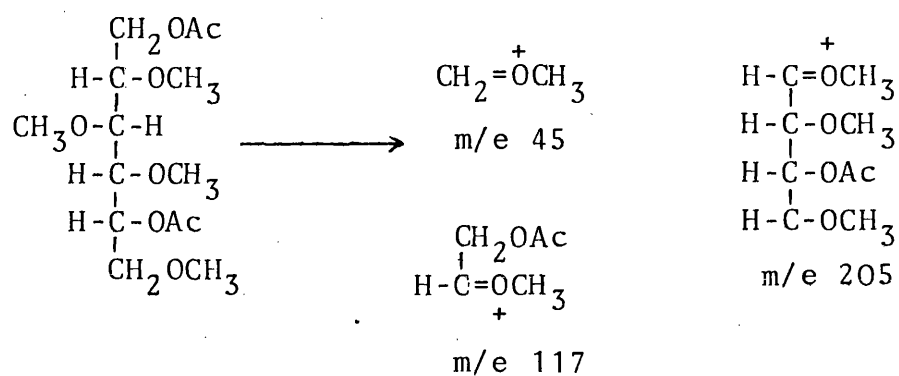
Base Peak = 42.45 Base Peak Abundance = 105 Total Abundance = 990



Lower Abundance Cutoff Level = 1.0%

MASS	ABUNDANCE (%)	MASS	ABUNDANCE (%)	MASS	ABUNDANCE (%)
25.80	8.6	87.90	24.8	201.70	8.6
26.80	21.0	100.10	68.6	221.60	9.5
27.80	24.8	101.95	29.5	229.40	12.4
40.85	9.5	112.15	13.3	230.50	4.8
42.45	100.0	116.75	78.1	257.65	3.8
45.75	7.6	126.35	25.7	261.05	4.8
55.45	21.9	127.15	28.6	281.40	1.9
56.05	24.8	127.95	26.7	285.00	7.6
57.95	10.5	129.15	11.4	285.50	7.6
70.10	19.0	143.00	11.4	286.60	1.9
72.30	39.0	144.60	30.5	324.05	1.9
73.50	44.8	146.10	25.7	355.10	1.9
74.90	15.2	147.20	15.2	355.50	1.9
85.10	34.3	158.60	13.3	398.20	5.7
86.10	38.1	187.65	9.5	399.20	1.9
87.10	26.7	188.85	7.6		

Fig. III.25. Espectro de masas del 1,5-di-O-acetil-2,3,4,6-tetra-O-metil-D-glucitol.



Se observó por marcajes (Björndal, 1970) que este fragmento primario podía existir en dos formas tautoméricas y produce un fragmento secundario m/e 145, por eliminación de ácido acético. No se detectó ningún otro fragmento derivado de m/e 205.

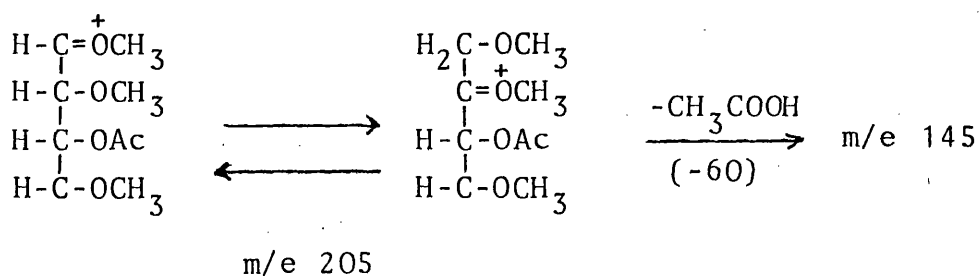
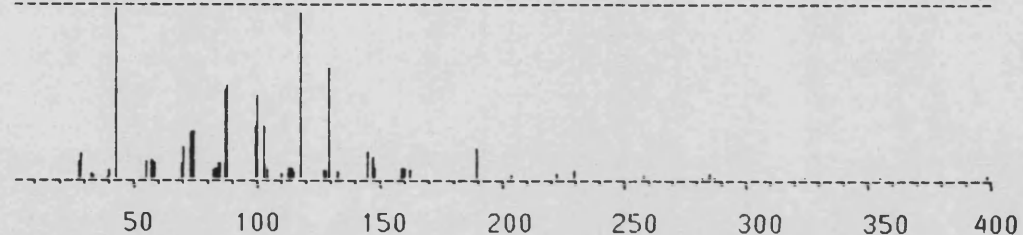


Fig.III.26. Fragmentación del acetato del 2,3,4,6-tetra-O-metil-D-glucitol.

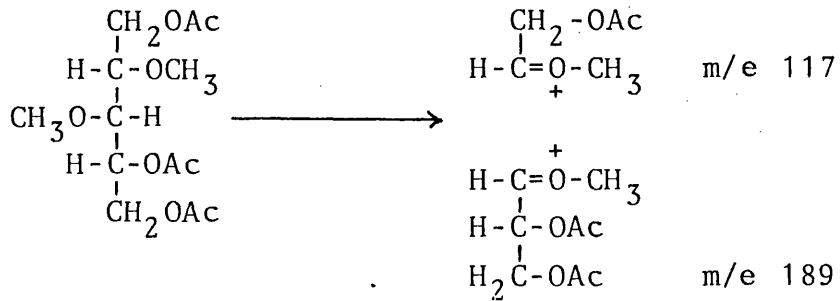
Base Peak = 42.55 Base Peak Abundance = 388 Total Abundance = 3297



Lower Abundance Cutoff Level = 1.0%

MASS	ABUNDANCE (%)	MASS	ABUNDANCE (%)	MASS	ABUNDANCE (%)
26.80	9.5	82.10	5.9	129.15	63.7
27.80	13.7	83.00	5.2	132.05	3.9
28.20	13.4	84.20	8.8	144.80	14.7
31.70	2.8	85.10	8.8	146.00	11.6
32.20	2.8	86.30	51.0	147.20	6.2
33.30	1.5	87.10	53.9	158.30	5.7
38.85	1.3	99.20	29.9	158.70	5.7
39.95	4.9	100.20	48.5	160.30	5.7
42.55	100.0	101.85	30.4	160.90	5.4
54.95	9.8	103.05	6.7	188.75	17.3
55.95	10.6	103.85	5.2	202.70	2.1
56.95	9.5	110.15	3.1	221.40	3.1
57.95	9.0	112.15	6.2	229.50	4.6
69.10	9.3	113.15	6.2	256.85	1.3
70.10	18.0	114.05	6.2	257.45	1.5
72.10	26.0	115.15	4.1	285.00	2.8
73.20	26.5	116.75	95.6	285.60	3.1
73.90	26.8	126.35	4.9	286.60	1.0
81.10	4.6	127.15	5.2	398.20	2.1

Fig. III.27. Espectro de masas del 1,4,5-tri-O-acetil-2,3-di-O-metil-D-xilitol.



Este fragmento primario, m/e 189, característico de los derivados acetilados en las posiciones 1 y 2 y metilados en la 3, puede perder ácido acético (m/e 60) según la transposición de McLafferty para dar el fragmento secundario m/e 129

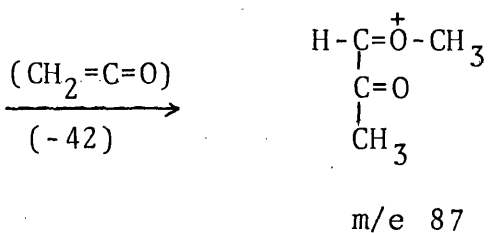
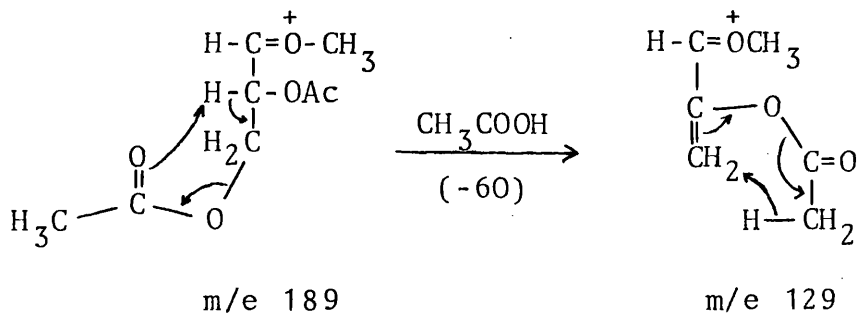
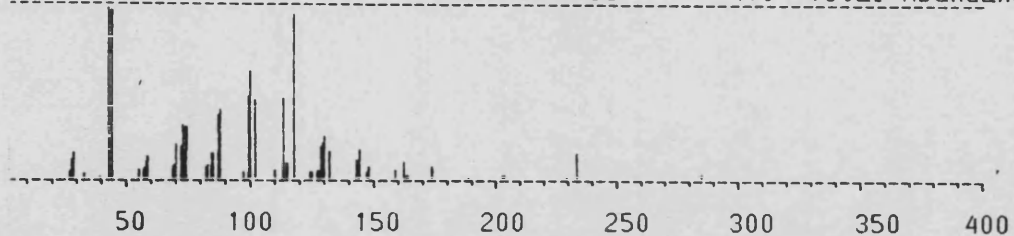


Fig. III.28. Fragmentación del acetato del 2,3-di-O-metil-D-xilitol.

Base Peak = 42.65 Base Peak Abundance = 410 Total Abundance = 4332



Lower Abundance Cutoff Level = 1.0%

MASS	ABUNDANCE (%)	MASS	ABUNDANCE (%)	MASS	ABUNDANCE (%)
25.90	3.9	82.00	8.0	129.25	21.0
26.90	10.7	84.20	14.6	130.15	25.1
27.80	8.3	85.10	15.4	131.15	16.3
28.30	15.4	86.20	37.1	142.30	11.0
31.80	3.4	87.10	40.5	143.10	11.5
38.75	1.5	96.20	4.1	144.30	16.6
42.65	100.0	99.10	47.3	146.10	3.9
43.85	97.3	100.20	62.2	147.40	6.6
54.95	4.6	100.95	45.4	158.30	4.6
55.95	5.9	110.25	4.6	160.70	9.5
57.05	10.0	110.65	4.6	161.10	10.0
58.05	13.2	113.15	45.9	163.20	2.4
68.30	7.3	115.05	9.3	173.25	7.3
69.10	7.8	117.15	94.6	188.55	1.2
70.20	20.2	124.25	3.7	202.50	2.4
71.10	18.5	125.15	3.7	202.90	2.4
72.00	31.0	126.15	5.1	203.60	2.0
73.10	16.1	127.05	4.9	232.90	15.1
74.00	30.0	128.35	18.5	285.00	2.7
81.10	7.1				

Fig. III.29. Espectro de masas del 1,4,5-tri-O-acetil-2,3,6-tri-O-metil-D-glucitol.



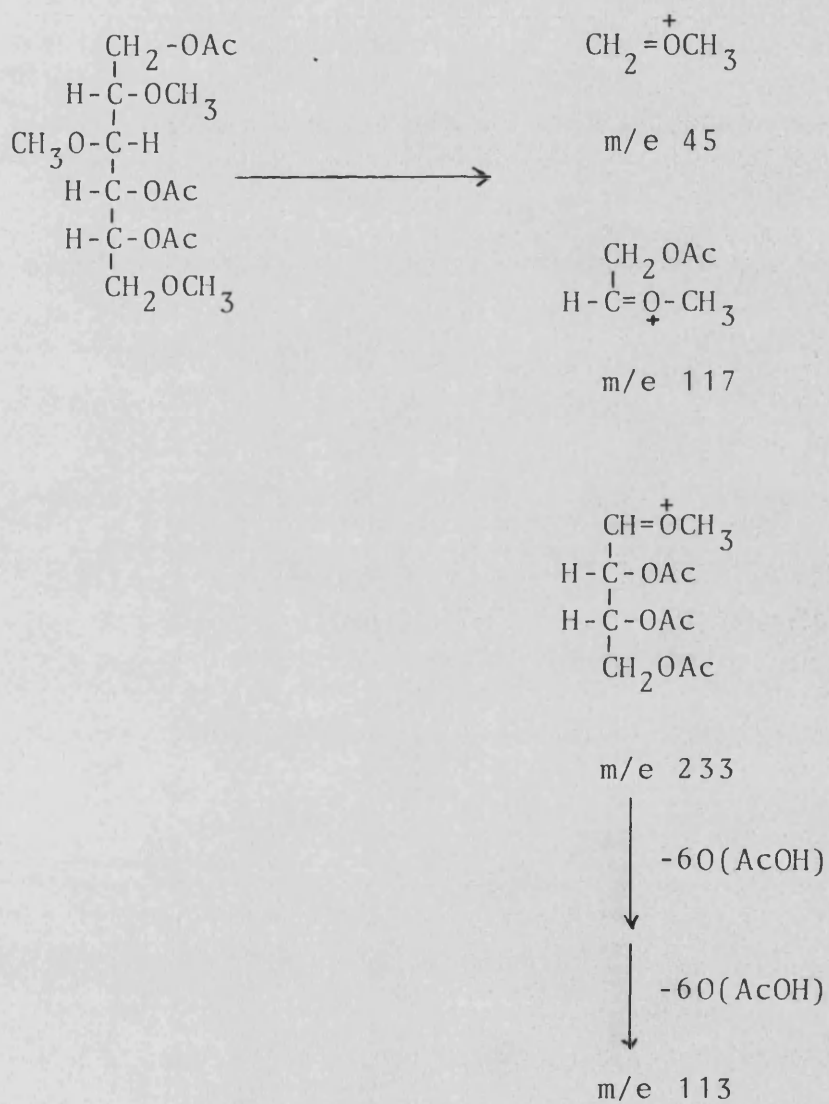
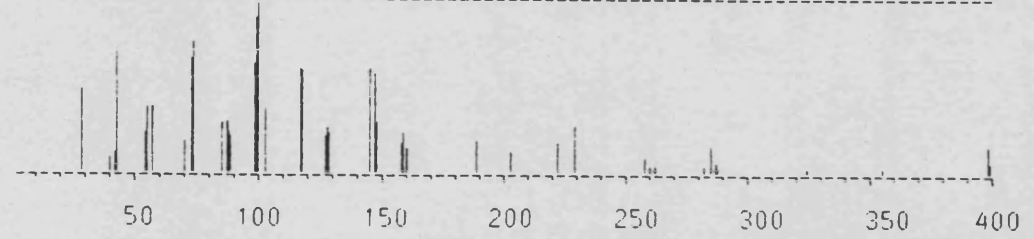


Fig. III. 30. Fragmentación del acetato de 2,3,6-tri-O-metil-D-glucitol.

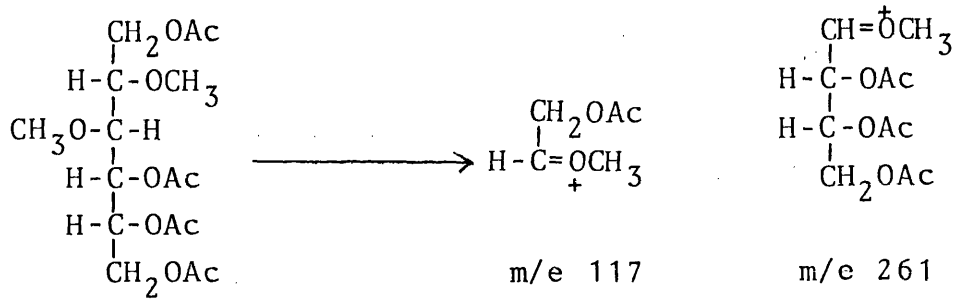
Base Peak = 100.10 Base Peak Abundance = 67 Total Abundance = 959



Lower Abundance Cutoff Level = 1.0%

MASS	ABUNDANCE (%)	MASS	ABUNDANCE (%)	MASS	ABUNDANCE (%)
27.70	49.3	100.10	100.0	202.30	11.9
39.85	9.0	102.05	38.8	221.60	17.9
40.85	11.9	116.55	61.2	228.70	22.4
42.45	71.6	117.45	59.7	229.50	28.4
54.05	23.9	126.45	22.4	257.45	9.0
55.35	38.8	127.15	26.9	260.65	4.5
55.95	38.8	128.15	23.9	261.65	4.5
70.00	19.4	145.10	61.2	281.50	4.5
72.30	67.2	146.10	58.2	285.50	16.4
73.20	76.1	147.00	29.9	286.60	6.0
85.00	29.9	147.60	29.9	287.60	3.0
86.10	31.3	157.40	17.9	324.65	3.0
87.00	25.4	158.50	25.4	355.10	3.0
87.90	22.4	160.30	14.9	355.60	3.0
98.50	64.2	188.05	19.4	398.20	16.4
99.30	89.6	201.70	13.4	399.30	6.0

Fig. III.31. Espectro de masas del 1,4,5,6-tetra-O-acetil-2,3-di-O-metil-D-glucitol.



El fragmento primario m/e 117 se obtiene cuando el C-1 está acetilado y el C-2 metoxilado. El fragmento primario que tiene número másico mas alto, m/e 261, y una intensidad relativamente alta, lo dan los alditoles metilados en la posición 3 y acetilados en las posiciones 4,5 y 6.

Se observó por marcaje isotópico (Björndal, 1970) que las sustancias de este tipo de acetatos dan señales fuertes con m/e 101, pero solamente pequeñas intensidades para m/e 161. Probablemente la ruta principal para m/e 101 de estas sustancias no proceda vía m/e 161 sino la superior.

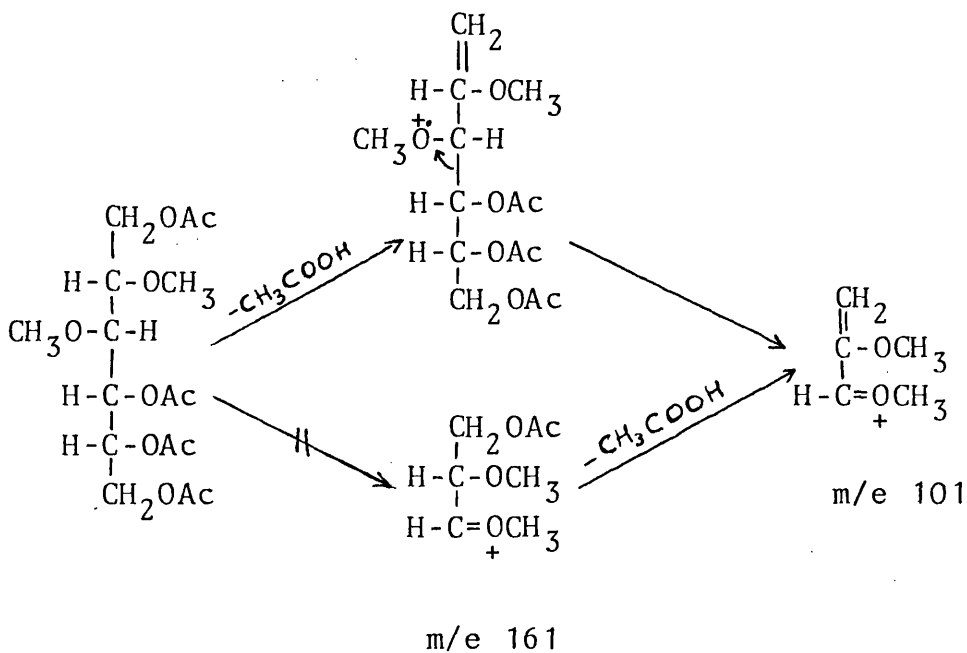


Fig. III.32. Fragmentación del acetato de 2,3-di-O-metil-D-glucitol.

2,3,4,6-tetra-O-metilglucitol.

Para el pico n°4 del cromatograma, también es un pico minoritario, cuyo espectro de masas se muestra en la Fig.III.31, tiene como fragmentos mas prominentes los iones con m/e 43, 101, 117 y 261 (Fig.III.32), lo que junto con la cromatografía gaseosa, nos permitió identificarlo como el compuesto 1,4,5,6-tetra-O-acetil-2,3-di-O-metil-D-glucitol.

La presencia del compuesto 1,4,5-tri-O-acetil-2,3,6-tri-O-metil-D-glucitol indica que hay una cadena lineal de unidades de D-glucopiranososa con enlaces (1→4). La presencia del compuesto 1,5-di-O-acetil-2,3,4,6-tetra-O-metil-D-glucitol indica que éste se encuentra como resto terminal no reductor del polisacárido. La presencia del compuestos 1,4,5-tri-O-acetil-2,3-di-O-metil-D-xilitol indica que hay una cadena lineal formada por unidades de D-xilopiranososa con enlaces (1→4). El tipo de unión glicosídica es β como se dedujo por la hidrólisis enzimática y por espectroscopía de RMN.

La presencia del compuesto 1,4,5,6-tetra-O-acetil-2,3-di-O-metil-D-glucitol indica que se ha producido algo de desmetilación durante la hidrólisis de la holocelulosa metilada.

Se concluye, pues, que la holocelulosa está constituida principalmente por una cadena de unidades de D-glucopiranososa con enlaces β (1→4), que correspondería a la celulosa, y por otra u otras cadenas de unidades de D-xilopiranososa también con enlaces β (1→4) y que correspondería a las hemicelulosas.

IV. ESTUDIO DE LA CELULOSA

La celulosa, una fibra que se presenta de forma natural, se encuentra ampliamente distribuída en la naturaleza. Se encuentra en los tejidos de la madera y en las plantas anuales (Green, 1963). Sin embargo también se ha encontrado en algunos animales, específicamente en bacterias y en ciertos tejidos.

No se debe olvidar que la definición de celulosa, del material que se va a aislar, ha sido un punto de discusión entre los trabajadores en este campo. Hay un acuerdo general de que la celulosa está compuesta predominantemente de unidades de D-glucopiranososa con uniones $\beta(1\rightarrow4)$. Ward definió la celulosa rigurosamente como un polímero que contenía solamente unidades de D-glucopiranososa, como una "glucana $\beta(1\rightarrow4)$ de alto grado de polimerización", los materiales menos puros obtenidos de los tejidos de la madera son referidos como "materiales celulósicos" o "pulpas celulósicas".

La celulosa purificada contiene invariablemente, junto con los preponderantes restos de glucosilo, cantidades de otros restos de glicosilo (Mühlethaler, 1967; Preston, 1974). Se debe considerar la posibilidad de que los restos no-glucosilo sean constituyentes normales de las cadenas de glucana, quizás representando puntos de terminación de estas cadenas. Alternativamente, estos restos no-glucosilo se pueden originar de las hemicelulosas enlazadas fuertemente, aunque no covalentemente, a la celulosa. Los restos n-glucosilo de la celulosa pueden originarse en realidad de la hemicelulosa atrapada entre las fibras agregadas de celulosa.

IV.1. Aislamiento de la celulosa

En 1968, Fremy y Terreil trataron la madera con cloro y luego con hidróxido potásico acuoso para obtener la celulosa cruda. A este trabajo siguió el de Cross y Bevan,

que también utilizaban la cloración como la primera etapa, pero luego extraían la lignina clorada con una solución de sulfito sódico acuoso. Muchos otros métodos para deslignificar la madera y las plantas fueron desarrollados; dos de los cuales son el método de Van Beckum y Ritter y el método de Jame-Wise (Jame, 1942; Wise, 1946). La finalidad de esos métodos es retener la máxima cantidad de carbohidrato en la "holocelulosa" resultante, mientras que la del método de Cross y Bevan no.

La celulosa invariablemente sobrelleva degradación durante la deslignificación, y así parece ser imposible aislar una celulosa que muestre el mismo grado de polimerización que la de la madera o planta original (Ikan, 1969, p.85). Los dos componentes principales que se eliminan son la xilana y la mannana, otros polisacáridos, tales como la galactana y arabana, se eliminan fácilmente.

Al someter a la holocelulosa a las extracciones alcalinas con hidróxido sódico al 4% y al 10%, y a la extracción con dimetilsulfóxido se aisló por filtración un sólido en polvo blanco de celulosa. Este sólido se lavó primero con álcali, excepto en la extracción con dimetilsulfóxido, para evitar la reprecipitación de hemicelulosa por dilución y luego se lavó ampliamente con agua. De esta forma se eliminan los principales contaminantes de la celulosa, en este caso las xilanas.

Este producto tendrá un peso molecular mas bajo que en la celulosa original en el corcho; debido a la degradación durante la deslignificación y puede contener algún grupo carbonilo o carboxilo introducidos en el proceso de blanqueamiento.

Se obtuvo un rendimiento promedio del 60% en peso de la celulosa lo que viene a representar un 10,17% respecto al corcho extraído.

Las caracterización de la celulosa se realizó por métodos espectroscópicos y químicos.

IV.2. Datos espectroscópicos

a) interpretación del espectro de IR

Se realizó el espectro de IR (Fig.IV.1) del producto obtenido en las distintas extracciones, comprobándose que los tres eran concordantes con el correspondiente a la celulosa patrón. Se compararon igualmente con el de la celulosa obtenida del papel (Aspinall, 1982, p.174) y se observaron las mismas bandas características de este polisacárido e incluso se ha obtenido mas purificada de lignina. Las bandas mas características son: entre 3600 y 3200 cm^{-1} banda ancha de tensión de O-H de alcohol asociado intermolecularmente; banda a 2900 cm^{-1} de tensión de C-H alifático; bandas a 1425 y a 1370 cm^{-1} de deformación por flexión de grupos $-\text{CH}_2-$ y CH_3- ; banda a 1160 cm^{-1} de tensión C-O de alcohol secundario; banda a 1050 cm^{-1} de tensión C-O de alcohol primario y banda a 890 cm^{-1} característica de poliglucos con uniones glicosídicas β .

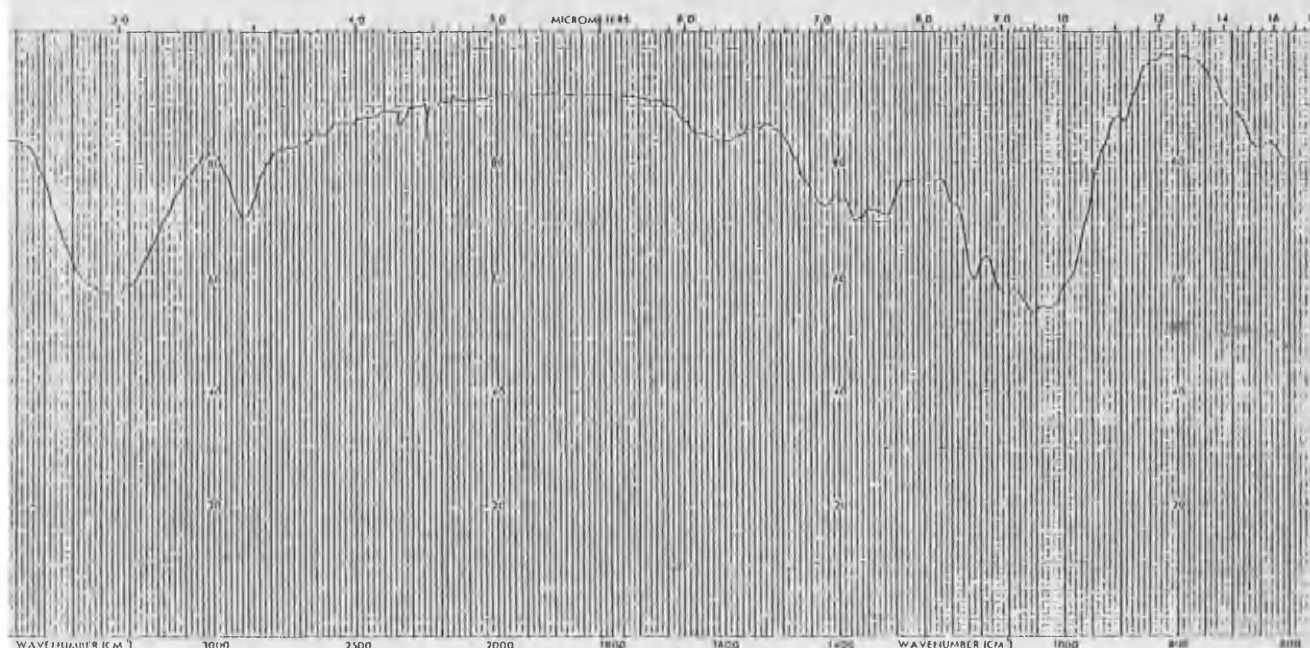


Fig.IV.1. Espectro de infrarrojo de la celulosa.

IV.3. Hidrólisis ácida

La celulosa, que es insoluble en agua y en ácidos diluïdos, se hidrolizó por un procedimiento en dos etapas que incluyen la solubilización con una solución de ácido sulfúrico al 72% seguida de una hidrólisis secundaria con ácido sulfúrico 1N a ebullición.

Los monosacáridos así liberados se caracterizaron por técnicas espectroscópicas y se identificaron por técnicas cromatográficas.

IV.3.1. Datos espectroscópicos de los monosacáridos

a) Interpretación del espectro de IR

El espectro de IR (Fig. IV.2) presentó las siguientes bandas: a 3350 cm^{-1} de tensión de O-H de alcohol; banda a 2920 cm^{-1} de tensión de C-H alifático; bandas a 1580 y 1420 cm^{-1} de tensión simétrica y asimétrica respectivamente del ión carboxilato; banda a 1060 cm^{-1} de tensión C-O de alcohol y banda a 870 cm^{-1} que indica la presencia de éteres cíclicos.

b) Interpretación del espectro de RMN

El espectro de resonancia magnético nuclear (Fig. IV.3) (D_2O) exhibió las señales características de azúcares libres en disolución, como se dedujo por comparación directa con el de la glucosa patrón, con el que fue concordante.

Estas señales fueron: a $5,2\delta$ doblete asignable al protón anomérico en la forma α ; y las señales entre $3,8$ y $3,3\delta$ asignables al resto de los protones, es decir, a los CH-OH y a los $\text{CH}_2\text{-OH}$.

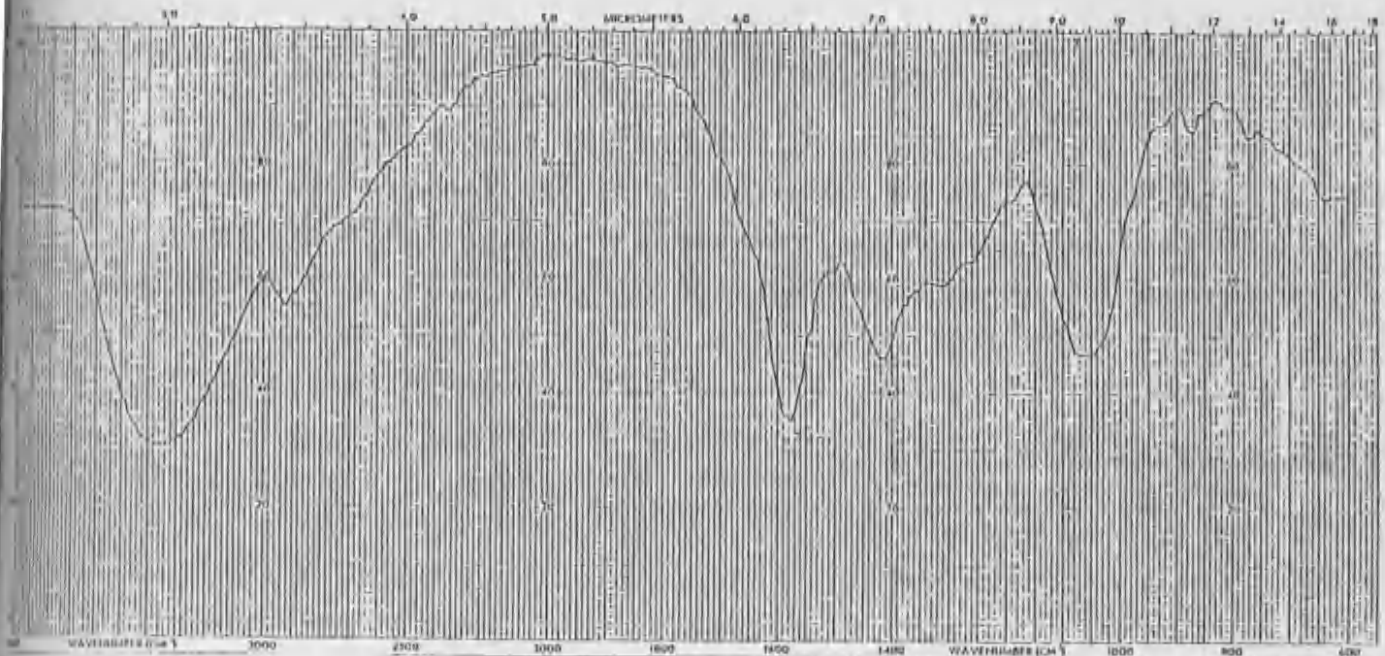


Fig.IV.2. Espectro de IR del hidrolizado de la celulosa.

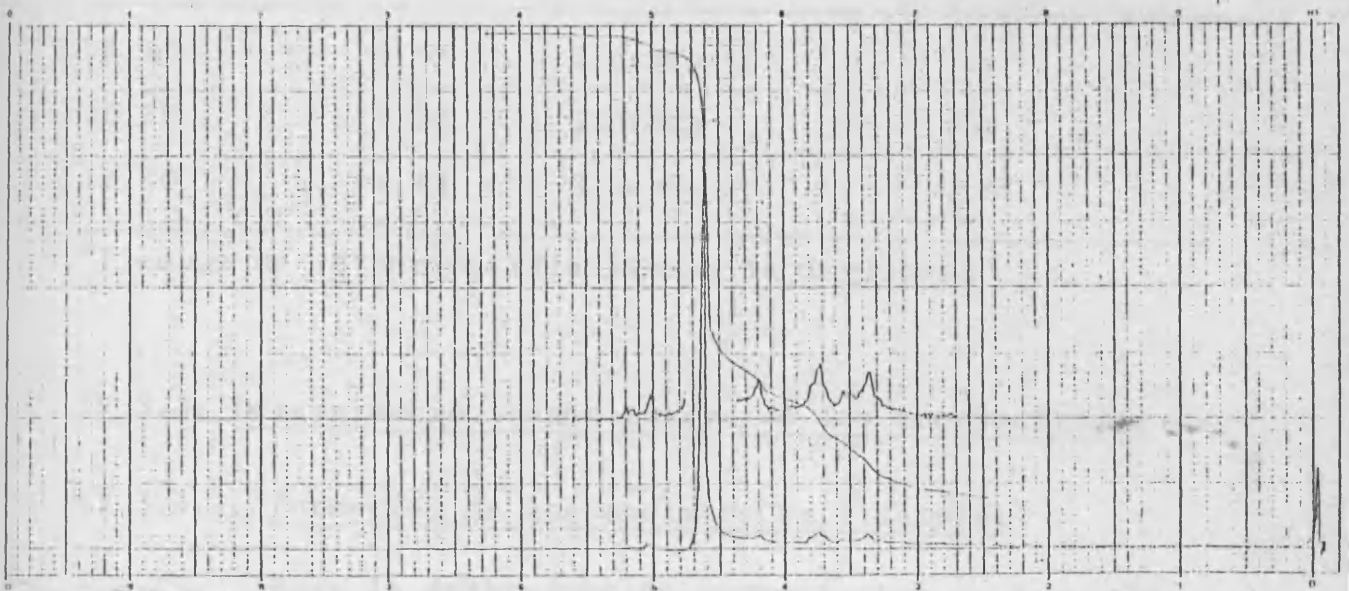


Fig.IV.3. Espectro de RMN del hidrolizado de la celulosa.

IV.3.2. Identificación de los monosacáridos

Una primera identificación cualitativa de los monómeros del hidrolizado de la celulosa se realizó por cromatografía gas-líquido. Una muestra del hidrolizado, previamente siliada, de la forma acostumbrada, se cromatografió comparativamente con glucosa patrón igualmente siliada y en las mismas condiciones. En la Fig.IV.4 se muestran los cromatogramas obtenidos y se puede observar la similitud entre ambos. En la tabla IV.1 se dan los tiempos de retención del monómero, como se observa y era de esperar solo hay un azúcar, del hidrolizado correspondientes a cada forma del azúcar, relativos a la α -glucosa.

TABLA IV.1

Cromatografía gaseosa de los TMS derivados del hidrolizado de la celulosa.

t_R (min)	t_R^a	Azúcar	Forma del azúcar
6,87	0,83	Glucosa	γ
8,29	1,00	Glucosa	α
12,30	1,48	Glucosa	β

^aTiempos de retención relativos a la α -glucosa

IV.3.3. Determinación cuantitativa de los monosacáridos

IV.3.3.1. Formación de los acetatos de alditoles

Para la determinación cuantitativa de los componentes del hidrolizado de la celulosa se formaron los derivados volátiles acetatos de alditoles, tal como se detalla en los métodos generales.

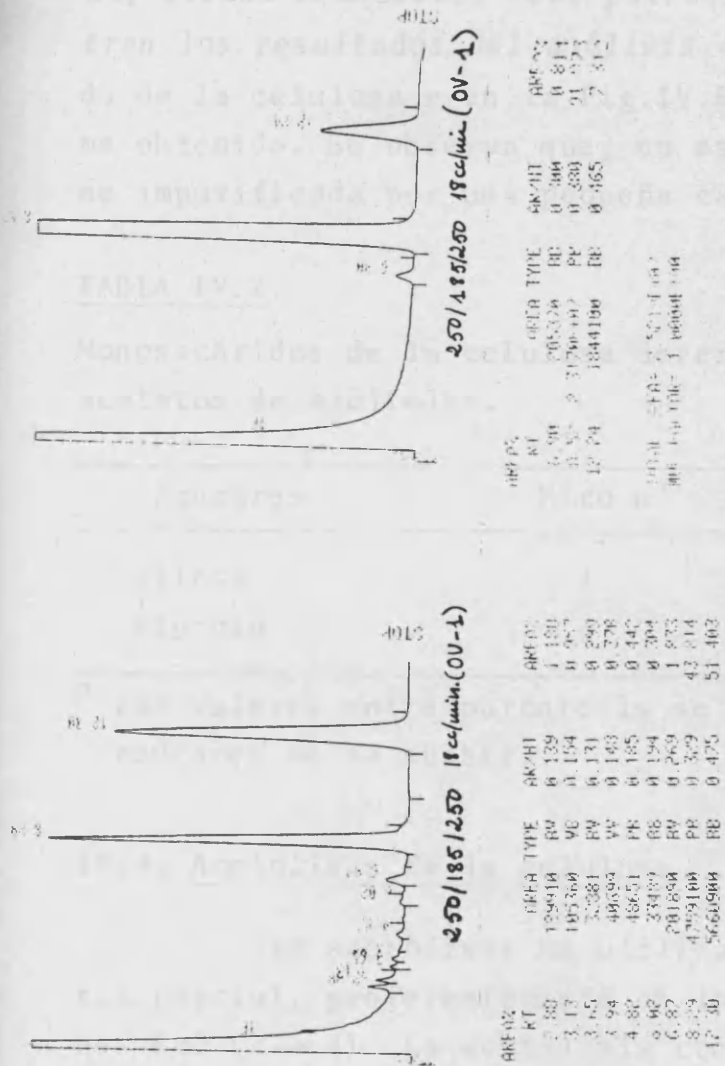


Fig. IV.4. a) Cromatografía gaseosa de los TMS derivados de los azúcares procedentes del hidrolizado de la celulosa.
b) Cromatografía gaseosa de los TMS derivados de la glucosa patrón.

IV.3.3.2. Identificación de los monosacáridos por cromatografía gas-líquido

Para el análisis cuantitativo se utilizó también la cromatografía gas-líquido y el método del patrón interno, siendo el inositol este patrón. En la tabla IV.2 se muestran los resultados del análisis cuantitativo del hidrolizado de la celulosa y en la Fig.IV.5 se muestra el cromatograma obtenido. Se observa que, en este caso, la celulosa viene impurificada por una pequeña cantidad de xilosa.

TABLA IV.2.

Monosacáridos de la celulosa determinados a través de los acetatos de alditoles.

Azúcares	Pico n°	%Area ^a
Xilosa	1	2,32(1,84)
Glucosa	2	97,67(77,55)

^a Los valores entre paréntesis se refieren al porcentaje de azúcares en la muestra.

IV.4. Acetólisis de la celulosa

La acetólisis se utiliza, en lugar de la hidrólisis parcial, preferentemente en los polisacáridos con uniones β -D-(1 \rightarrow 4). La acetólisis controlada de la celulosa da una serie homóloga de α -D-acetatos acetilados del polímero.

Con la celulosa se han utilizado en la acetólisis las condiciones óptimas para obtener octaacetato de α -celobiosa, que son distintas a las requeridas para obtener rendimientos favorables de oligosacáridos superiores (Wolf from, 1964).

CHART SPEED 0.2 CM/MIN
ATTEN: 32 ZERO: 5% 5 MIN/TICK

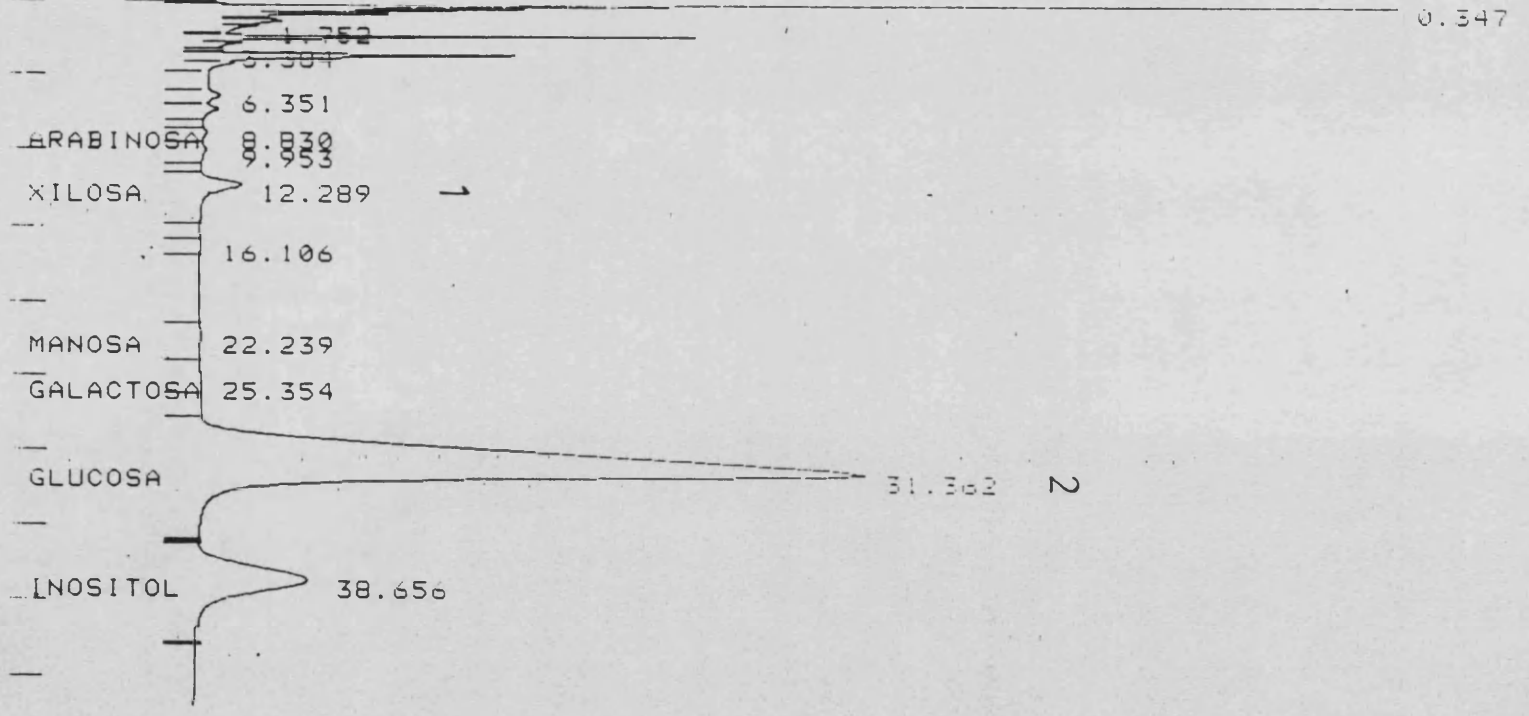


Fig. IV.5. Cromatografía gaseosa de los acetatos de alditoles procedentes de la hidrólisis de la celulosa. Temperatura de la columna 185°.

La celulosa se disolvió, con agitación, en una mezcla de ácido acético glacial, anhídrido acético y ácido sulfúrico concentrado. Por centrifugación de esta mezcla se tuvo una solución transparente de color rojo pardo que se vertió sobre una mezcla de agua y hielo. Los acetatos se recuperaron por centrifugación y se caracterizaron por datos espectroscópicos.

IV.4.1. Datos espectroscópicos

a) Interpretación del espectro de IR

El espectro de IR (Fig. IV.6) presentó las siguientes bandas características: a 2960 cm^{-1} de tensión de C-H alifático; a 1750 cm^{-1} de tensión C=O de ester (acetato); banda a 1435 cm^{-1} de deformación por flexión asimétrica de $-\text{CH}_2-$ y $-\text{CH}_3$; banda a 1375 cm^{-1} de deformación por flexión simétrica de CH_3- , y bandas a 1240 y 1040 cm^{-1} de tensión de C-O de acetato. Se observa en este espectro la desaparición de la banda de absorción O-H ($3600-3200\text{ cm}^{-1}$) y la aparición de las bandas características de los acetatos, lo que indica que la reacción fue completa.

b) Interpretación del espectro de RMN

El espectro de RMN (Fig. IV.7) (DCCl_3) presentó las siguientes señales: entre $2,2$ y $1,9\delta$ ocho singletes correspondientes a ocho grupos acetato diferentes; las señales entre $4,6$ y $3,6\delta$ correspondientes a los protones $\text{CH}_2\text{-OAc}$, y las señales entre $5,6$ y $4,8\delta$ correspondientes a los $-\text{CH}\text{-OAc}$.

IV.4.2. Desacetilación

Los oligosacáridos libres se obtuvieron por trans esterificación con metóxido sódico metanólico. El material

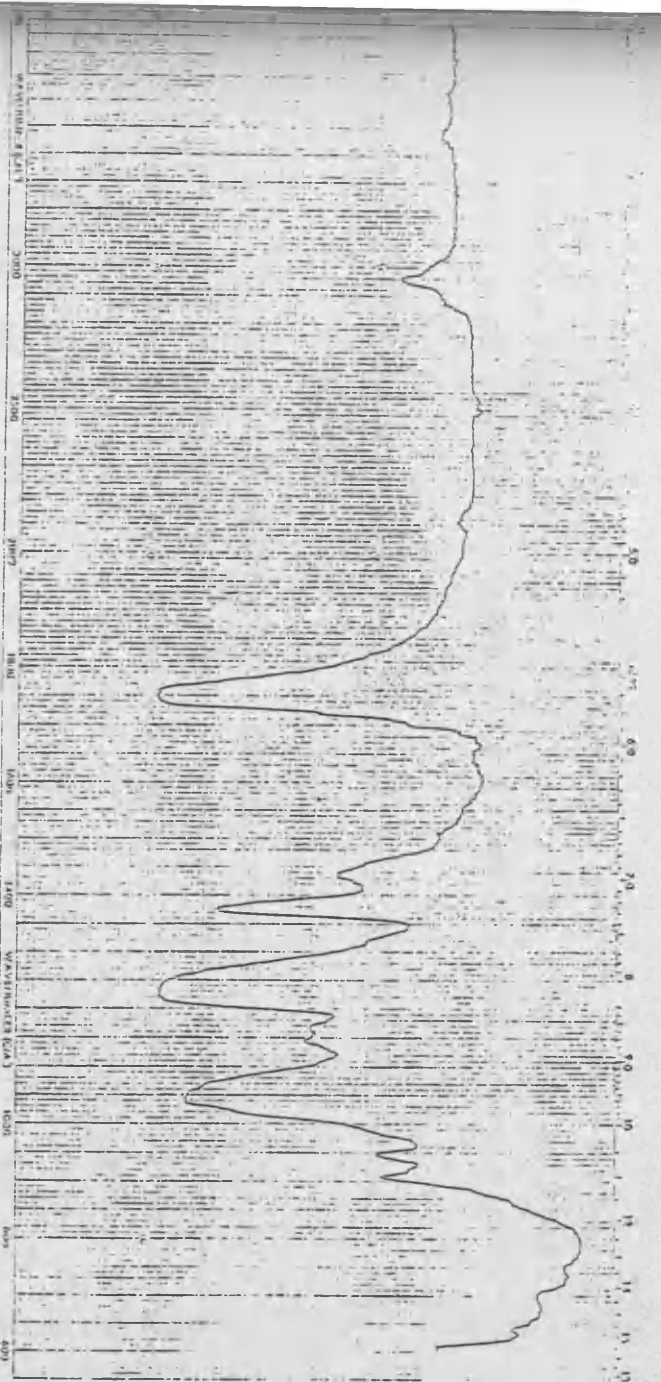


Fig. IV.9. Espectro de IR de la acetólisis de la celulosa.

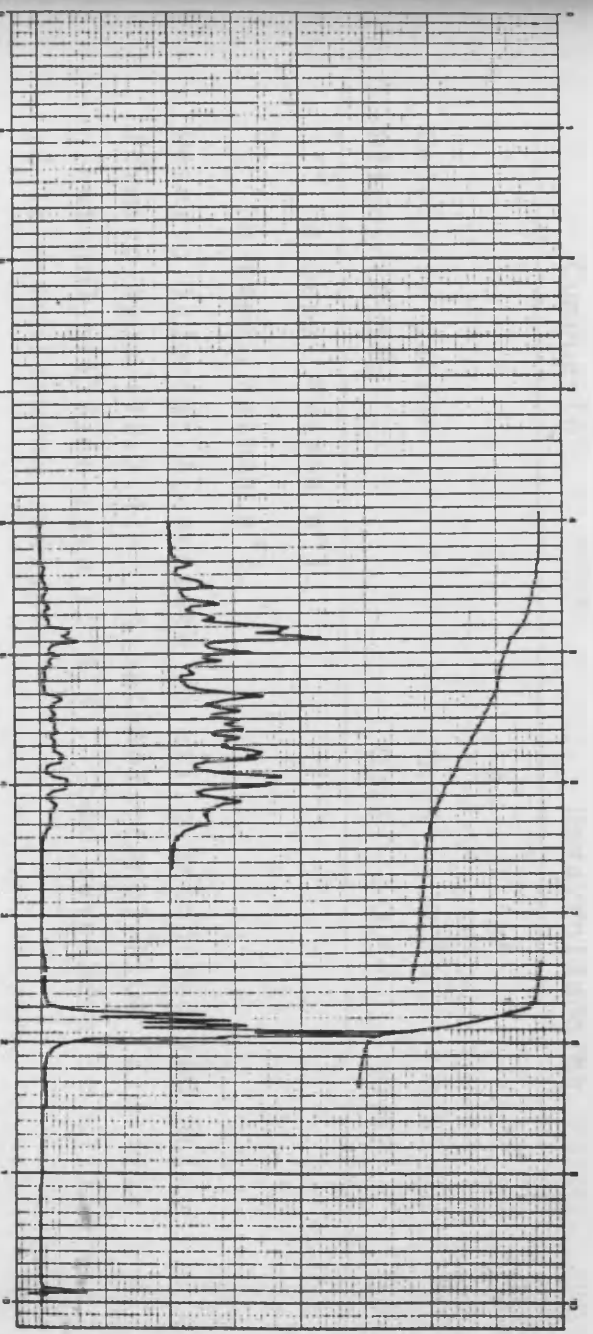


Fig. IV.10. Espectro de RMN de la acetólisis de la celulosa.
Octaacetato de α -celobiosas.

iónico se eliminó pasando la solución por la resina de intercambio iónico Amberlita IR-120(H⁺). El eluyente se concentró a un pequeño volumen y se cromatografió sobre papel.

IV.4.2.1. Estudio de los oligosacáridos por cromatografía sobre papel

En la cromatografía sobre papel se detectó la presencia de celobiosa y glucosa. No se detectó ningún otro oligosacárido. Se comparó con celobiosa patrón. Los valores de R_x del oligosacárido de la celulosa y los de la celobiosa sobre papel Watman n°1 y 3 en los distintos desarrolladores se detallan en la tabla IV.4. Demuestran estos valores que el oligosacárido es celobiosa.

TABLA IV.4.

Valores de R_x del oligosacárido de la celulosa y de la celobiosa patrón en distintos desarrolladores.

Compuesto	Desarrolladores		
	A ¹	B ²	C ³
Celobiosa patrón	0,24	0,56	0,55
Oligosacárido	0,25	0,57	0,55

^{1,3} En papel Watman n°1.

² En papel Watman n°3.

Desarrolladores: A, acetato de etilo-ácido acético-ácido fórmico-agua (18:3:1:4); n-butanol-etanol-agua (2:1:1); n-butanol-piridina-agua (6:4:3). Como revelador se utilizó la difenilamina anilina.

IV.5. Metilación de la celulosa

Para determinar el tipo de unión que existe entre las moléculas de glucosa, se procedió a la metilación del polisacárido. En los primeros métodos de metilación, como los de Denham y Woodhouse (1913) y el de Haworth, ésta se conseguía por varios tratamientos con sulfato de dimetilo e hidróxido de sodio. Pero a menudo se obtenían de esta forma productos parcialmente metilados que era preciso tratar varias veces con óxido de plata y yoduro de metilo, según Purdie e Irvine, para la completa metilación.

La técnica de Purdie fue mejorada por Kuhn y colaboradores (Kuhn, 1955). Estos autores utilizaron para la metilación medios de disolución polares como la N,N-dimetilformamida. Los polisacáridos que se disuelven o hinchan en estas disoluciones se pueden metilar directamente. El óxido de plata produce también una descomposición oxidativa en el polisacárido libre o metilado; por tanto es más ventajoso utilizar las variantes con hidróxido de bario (Kuhn, 1958) o con hidróxido de sodio (Srivastava, 1964). Con estas bases se puede trabajar en dimetilsulfóxido que es mejor medio de disolución para los polisacáridos.

En el caso de la celulosa, los métodos de metilación están limitados por la insolubilidad de este polisacárido en los disolventes que utilizan, tales como el DMSO. Es pues necesario, o por lo menos más conveniente, hacer una metilación preliminar con sulfato de dimetilo e hidróxido de sodio.

Así pues, la celulosa se metiló primeramente con el método de Kuhn (Kuhn, 1963). Se trató la celulosa con hidróxido sódico al 38% y bajo atmósfera de nitrógeno, con agitación y a temperatura ambiente, se adicionó el sulfato de dimetilo. Se recuperó el polisacárido parcialmente metilado y se sometió a una segunda metilación con los reactivos de Hakomori. Este método es más cómodo y sencillo.

La celulosa así metilada se recuperó por extracción con cloroformo. Se purificó por reprecipitación en benceno con éter de petróleo y se caracterizó por sus datos espectroscópicos. En su espectro de IR no apareció la banda de absorción del OH ($3600-3200\text{ cm}^{-1}$) lo que indica que la metilación ha sido completa.

IV.5.1. Datos espectroscópicos

a) Interpretación del espectro de IR

Su espectro de IR (Fig.IV.6) presentó las siguientes bandas características: 2920 y 2850 cm^{-1} de tensión de C-H alifático; banda a 1735 cm^{-1} de tensión C=O de ester metílico; bandas a 1460 y 1380 cm^{-1} de deformación por flexión antisimétrica de $-\text{CH}_2-$ y CH_3 , y de flexión simétrica de $-\text{CH}_3$ respectivamente; banda ancha a 1100 cm^{-1} de tensión C-O de éter y de ester; banda a 950 cm^{-1} que indica la presencia de éteres cíclicos y bandas a 890 cm^{-1} debida a las uniones glicosídicas β del polisacárido.

b) Interpretación del RMN

Su espectro de RMN (Fig.IV.7) (DCCl_3) presentó las siguientes señales: a $5,5\delta$ señal muy poco resuelta asignable a los protones anoméricos de la forma β , señales a $3,55\delta$ correspondiente a los grupos metoxilos en C-2 y en C-3 y señal a $3,37\delta$ correspondiente al grupo metoxilo en C-6.

Este espectro nos informa de que las uniones glicosídicas existentes en el polisacárido de la celulosa son uniones β .

IV.5.2. Hidrólisis ácida

Se realizó la hidrólisis de la celulosa metilada con SO_4H_2 del 72%. Se tuvo la mezcla en agitación durante

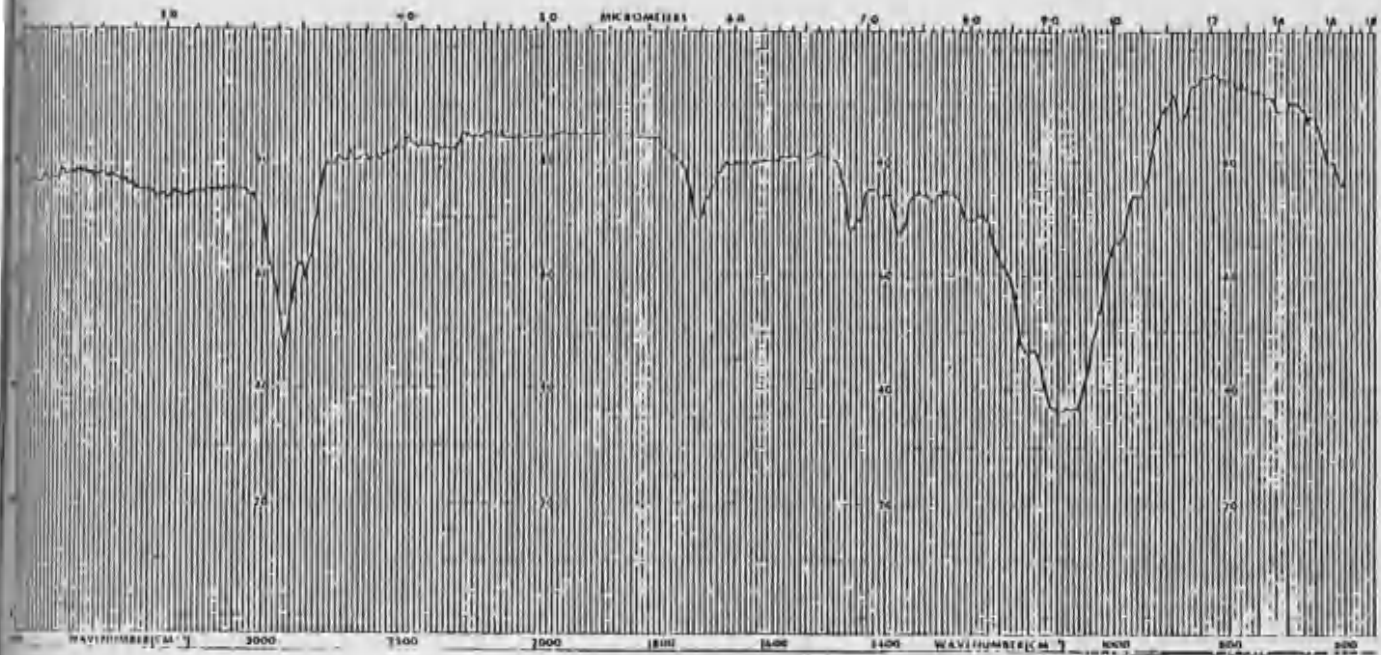


Fig.IV.6. Espectro de IR de la celulosa metilada.

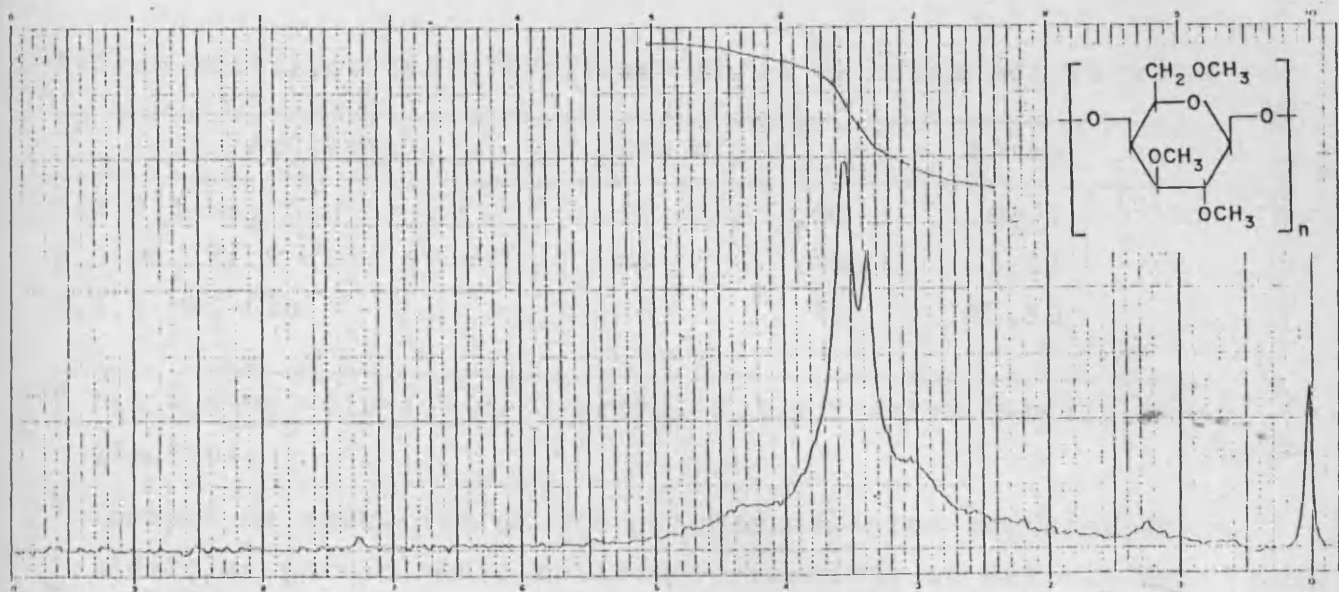


Fig.IV.7. Espectro de RMN de la celulosa metilada.

4 horas y luego se diluyó y se calentó a reflujo otras 4 horas. Con los monosacáridos parcialmente metilados que se obtuvieron, se formaron los acetatos de alditoles para su análisis cuantitativo.

IV.5.2.1. Identificación de los monosacáridos parcialmente metilados

Los acetatos de alditoles del hidrolizado anterior se formaron, como se detalla en los métodos generales, por reducción con borohidruro de sodio y acetilación con la mezcla anhídrido acético/piridina. Se obtuvieron así los acetatos de alditoles parcialmente metilados que se identificaron por cromatografía gas-líquido. En la tabla IV.3. se indican los tiempos de retención de los acetatos de alditoles parcialmente metilados, relativos al 1,5-di-O-acetil-2,3,4,6-tetra-O-metil-D-glucitol (Churms, 1982) y en la Fig.IV.8 se muestra el cromatograma obtenido.

TABLA IV.3

Eteres metílicos del hidrolizado de la celulosa metilada

Azúcares ^a	Pico n°	t _R ^b	%Area
2,3,4,6-Me ₄ -Glu	1	1,00	0,75
2,3-Me ₂ -Xi	2	1,45	1,83
2,3,6-Me ₃ -Glu	3	2,42	85,90

^a 2,3,4,6-Me₄-Glu=1,5-di-O-acetil-2,3,4,6-tetra-O-metil-D-glucitol.

^b Tiempos de retención de los correspondientes acetatos de alditoles parcialmente metilados relativos al del 1,5-di-O-acetil-2,3,4,6-tetra-O-metil-D-glucitol (t_R=4,54) en una columna ECNSS-M a 175°C.

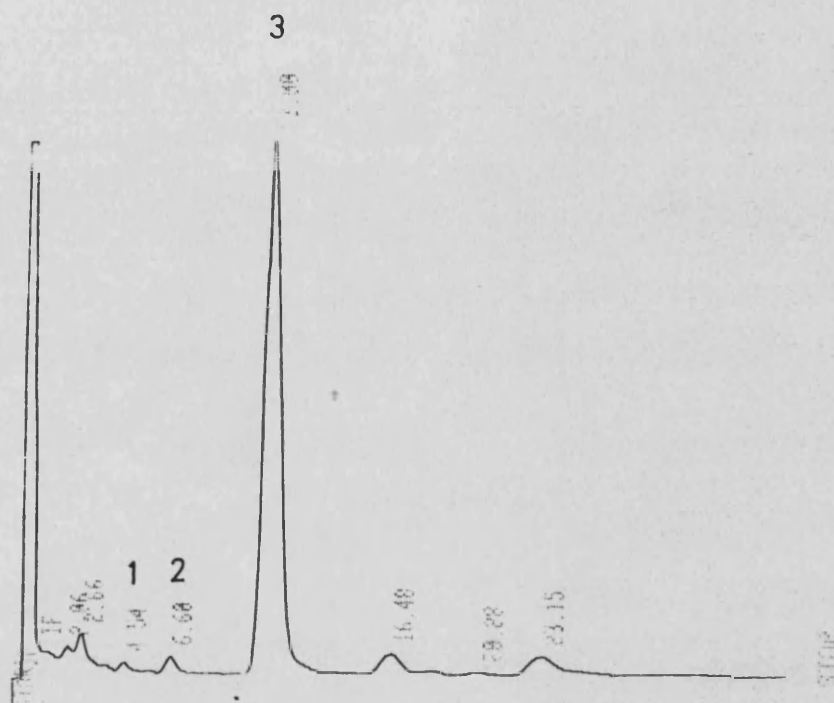


Fig. IV.8. Cromatografía gaseosa de los acetatos de alditoles de los azúcares metilados obtenidos del hidrolizado de la celulosa metilada en una columna ECNSS-M a 175° . Picos: 1) 2,3,4,6- Me_4 -Glu; 2) 2,3- Me_2 -Xi; 3) 2,3,6- Me_3 -Glu.

De este cromatograma se pueden identificar con seguridad tres picos. El pico n°1 se identificó por su tiempo de retención relativo ($t_R=1,00$) como el compuesto 1,5-di-O-acetil-2,3,4,6-tetra-O-metil-D-glucitol, ya que es coincidente con el mismo azúcar utilizado como patrón de referencia.

El pico n°3, que es el mayoritario y principal, se identificó por su tiempo de retención relativo ($t_R=2,42$) y por comparación con el cromatograma correspondiente a la holocelulosa metilada (Fig.III.23) como el compuesto 1,4,5-tri-O-acetil-2,3,6-tri-O-metil-D-glucitol.

El pico n°2, correspondería, por su tiempo de retención y por comparación con el cromatograma similar de la holocelulosa metilada (Fig.III.23) al compuesto 1,4,5-tri-O-acetil-2,3-di-O-metil-D-xilitol. Este derivado procede de la xilosa que aparecía impurificando el hidrolizado de la celulosa (Tabla IV.2) y que es difícil de eliminar (esta celulosa se había purificado ya tres veces).

Con los picos n°4 ($t_R=3,62$) y n°5 ($t_R=5,10$) tan solo se puede hacer un intento de identificación por sus tiempos de retención relativos. En ambos casos, suponiendo que correspondan a acetatos de alditoles parcialmente metilados y no sean impurezas, se corresponderían estos picos con acetatos de hexosas dimetiladas. (El pico n°4 podría corresponder al 1,3,4,5-tetra-O-acetil-2,6-di-O-metil-D-glucitol ($t_R=3,83$ teórico) (4,58%) y el pico n°5 al 1,2,5,6-tetra-O-acetil-3,4-di-O-metil-D-glucitol ($t_R=5,27$, teórico) (6,90%).

La presencia de estos dos picos, siempre suponiendo que fuesen acetatos de hexosas dimetiladas, sería indicativa de que la metilación no fue completa en su totalidad ó bien de que, casi mas probable, se ha producido desmetilación durante la hidrólisis de la celulosa metilada.

La presencia del compuesto 1,4,5-tri-O-acetil-2,3,6-tri-O-metil-D-glucitol indica que el polisacárido está constituido por una cadena de unidades de glucosa unidas entre sí por enlaces (1→4). La presencia del compuesto 1,5-di-O-acetil-2,3,4,6-tetra-O-metil-D-glucitol indica que éste se encuentra como resto terminal no reductor del polisacárido. La presencia del compuesto 1,4,5-tri-O-acetil-2,3-di-O-metil-D-xilitol indica que hay una cadena formada por unidades de xilosa con enlaces (1→4); es decir, hay una pequeña cantidad de xilana que impurifica al polisacárido de glucosa.

Por estos análisis, acetilación y metilación del polisacárido, se deduce, con entera seguridad, que el polisacárido está constituido por unidades de D-glucopiranososa con enlaces $\beta(1\rightarrow4)$. (Fig. IV.9).

Queda confirmada, pues, la presencia de la celulosa en el corcho.

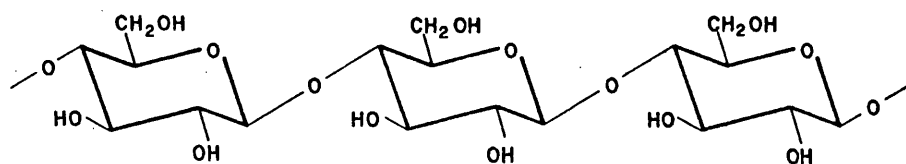


Fig. IV.9. Unidades de D-glucosa unidas por enlaces $\beta(1\rightarrow4)$.
Estructura de la celulosa.

V. ESTUDIO DE LA "HEMICELULOSA"

V.1. Aislamiento de la hemicelulosa

a) Extracción con soluciones alcalinas.

Diversas concentraciones de álcali se utilizan para la extracción de hemicelulosas, variando el rango de las soluciones de carbonato de sodio a las soluciones fuertes de hidróxido de sodio o potasio (Whistler 1965). En general el rendimiento de hemicelulosa depende de la fuerza alcalina del extrayente; con soluciones alcalinas superiores al 10% se obtienen pequeños aumentos en el rendimiento (Wise, 1946). La eliminación de oxígeno durante las extracciones alcalinas minimiza la degradación oxidativa de las hemicelulosas.

Se realizó la extracción de hemicelulosa a partir de la holocelulosa, con hidróxido sódico al 4% y al 10%. Con el álcali menos concentrado no se fraccionaron los polisacáridos y se obtuvo una única fracción, que se le llamó "hemicelulosa", al neutralizar el extracto con ácido acético diluido y añadir un volumen equivalente de etanol del 95% (Doreé, 1947, p.417).

El producto se purificó disolviéndolo en NaOH al 4%, filtrando y adicionando al filtrado ácido acético y alcohol del 95%. Para una ulterior purificación, se disolvió el producto obtenido en NaOH al 2%, calentando un poco, y se filtró a través de lana de vidrio. Se añadió al filtrado solución de Fehling (A+B, volúmenes iguales) en exceso y el precipitado se lavó con alcohol muy diluido. El complejo de cobre se descompuso con ácido acético muy diluido. Se filtró y el sólido se lavó primero con ácido acético muy diluido, luego con alcohol muy diluido y finalmente con etanol del 95%. Se obtuvo un sólido blanco grisáceo que representó un 16,64% en peso respecto a la holocelulosa.

La extracción de la hemicelulosa con NaOH del 10% y posterior fraccionamiento del extracto obtenido se estudia con detalle en el apartado VI.

a) Extracción con dimetilsulfóxido

Entre los pocos disolventes neutros que son efectivos para la extracción de hemicelulosas de la holocelulosa, se encuentra el dimetilsulfóxido (Stjöström, 1981, p.64). Es particularmente útil para la obtención de xilanas y de aquellos polisacáridos que estén parcialmente esterificados, ya que no tienen lugar ningún cambio químico en la extracción con este disolvente.

Así pues, se extrajo la holocelulosa con dimetilsulfóxido y por centrifugación se separó el sólido. Al extracto se le adicionaron cuatro volúmenes de etanol y se acidificó con ácido acético hasta que la precipitación del polisacárido fue completa (Bouveng, 1965). Se obtuvo un sólido blanco que representó un 21,8 respecto a la holocelulosa.

V.1.1. Datos espectroscópicos

Interpretación del espectro de IR

Se caracterizó la hemicelulosa, tanto la procedente de la extracción con NaOH al 4% como la extraída con dimetilsulfóxido, primeramente por espectroscopía de infrarrojo. En ambos casos se obtuvo un espectro concordante (Fig. V.1) que presentó las siguientes bandas: banda ancha entre 3500 y 3200 cm^{-1} de tensión de O-H asociado intermolecularmente; banda a 2920 cm^{-1} de tensión de C-H alifático; banda a 1730 cm^{-1} de tensión de C=O y banda entre 1100 y 950 cm^{-1} de tensión de C-O de alcohol.

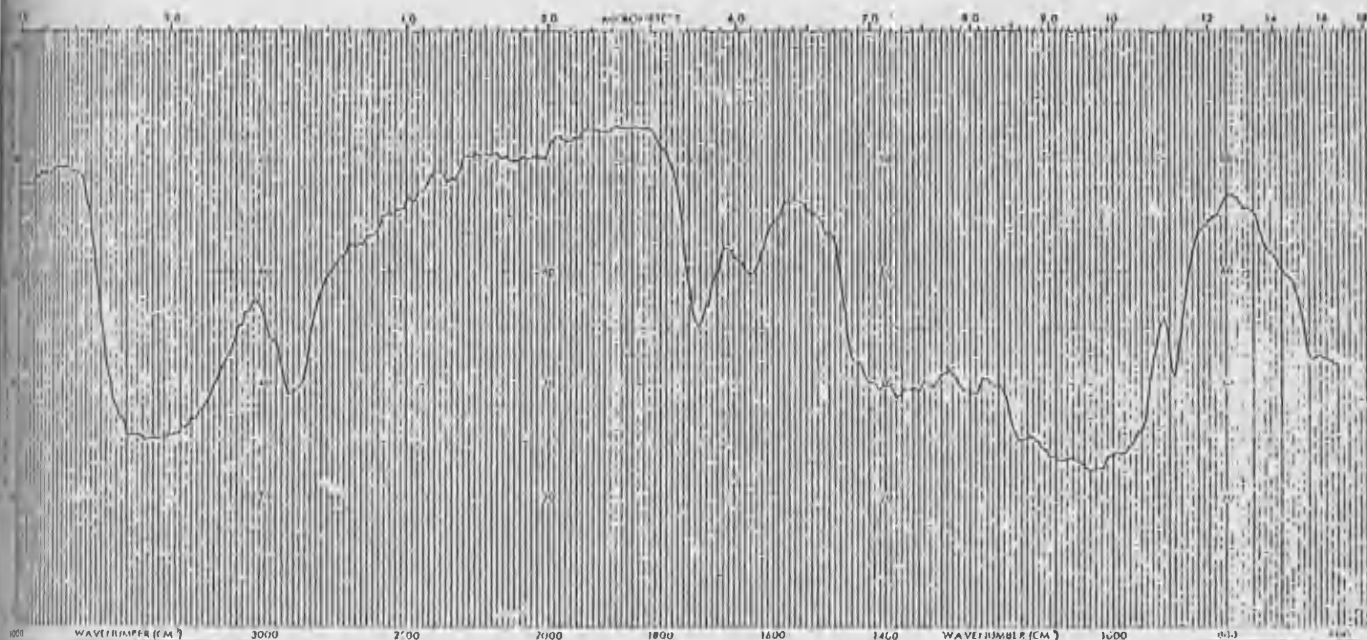


Fig.V.1. Espectro de IR de la hemicelulosa

V.2. Hidrólisis ácida total

La hemicelulosa se hidrolizó con ácido H_2SO_4 del 72% en agitación durante 4 horas y luego se diluyó el ácido y se calentó a reflujo otras 4 horas.

V.2.1. Identificación de los monosacáridos por cromatografía gaseosa

Los monosacáridos liberados en la hidrólisis se caracterizaron por cromatografía gas-líquido. Para un análisis cualitativo se sililó, de la forma acostumbrada, una muestra del hidrolizado y se cromatografió comparativamente con los azúcares patrones xilosa y arabinosa igualmente sililados y en las mismas condiciones. Teniendo en cuenta el cromatograma correspondiente al hidrolizado ácido sililado de la holocelulosa (Fig.III.5) y el cromatograma obtenido en nuestro análisis (Fig.V.3), se deduce que los azúcares con tiempos de retención mas similares son la xilosa y la arabinosa por lo que sólo se inyectaron estos azúcares patrones.

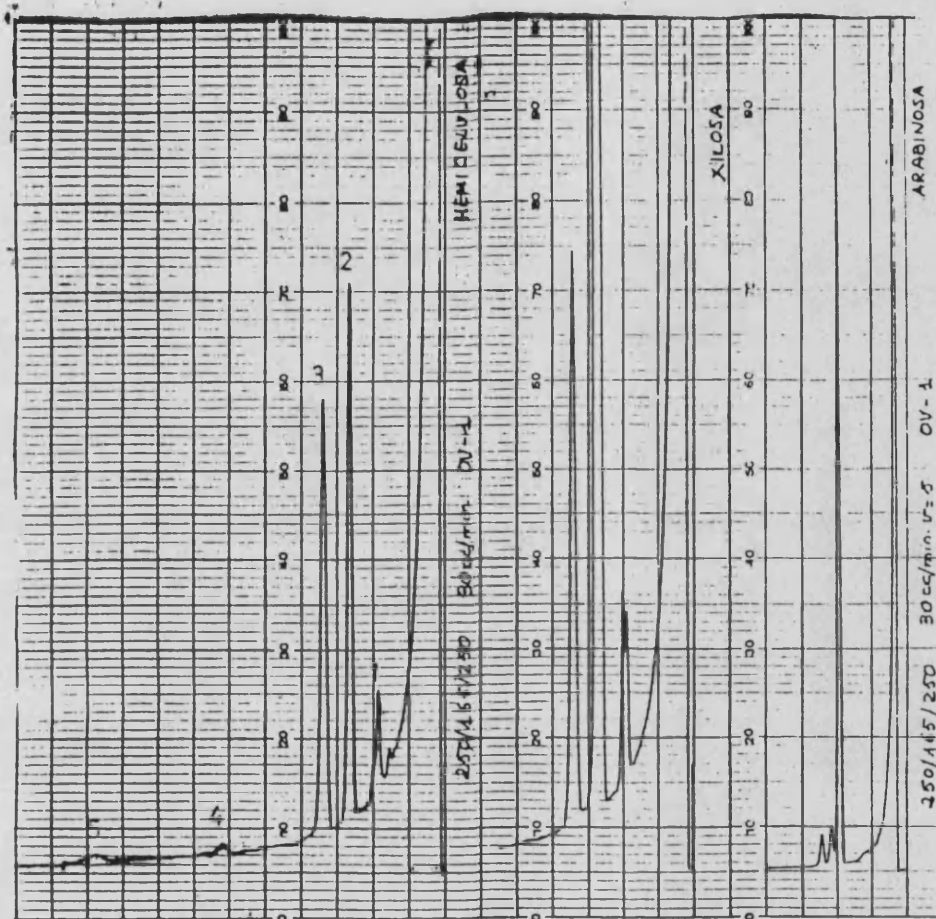


Fig. V.3. Cromatografía gaseosa de los TMS derivados de los azúcares procedentes del hidrolizado de la hemicelulosa. Temperatura de la columna 165°.

Los resultados obtenidos se indican a continuación:

t_R (seg)	Pico	Azucar	%Area
235	1	Arabinosa y Xilosa	7,42
331	2	Xilosa	46,06
417	3	Xilosa	46,52
744	4	Glucosa	trazas
1182	5	Glucosa	trazas

V.2.2. Determinación cuantitativa de los monosacáridos

Se observa en el cromatograma (Fig.V.3) que el pico n°1 puede corresponder a la arabinosa y/o a la xilosa, puesto que tienen el mismo tiempo de retención. Aparecen también trazas de glucosa. Para determinar mas exactamente la cantidad de estos monosacáridos hacemos una determinación cuantitativa de los mismos.

El método mas comunmente utilizado y el de más seguridad para el análisis cuantitativo de los azúcares individuales envuelve la conversión de estos azúcares en sus correspondientes acetatos de alditoles volátiles. Los monosacáridos se convierten en los correspondientes alditoles por reducción con borohidruro de sodio y los alditoles se acetilan con anhídrido acético-piridina. Los acetatos de alditoles se separan y se cuantifican convenientemente por cromatografía de ionización a la llama (Albersheim, 1967).

Este procedimiento es el que se utiliza con mas frecuencia para estudiar la estructura de los polisacáridos, es decir, para determinar la pureza de los polisacáridos y para determinar que polisacáridos están presentes en una fracción cromatográfica particular.

Se realizó un estudio comparativo de los monosacáridos procedentes del hidrolizado de la hemicelulosa extraída con álcali y de la extraída con dimetilsulfóxido. En la tabla V.1 se dan los resultados obtenidos y en las Fig. V.4 y V.5 se muestran los cromatogramas obtenidos.

De la tabla V.1 se deduce que la xilosa es el componente mayoritario, pudiendo considerarse como procedente de una xilana no pura. Las impurezas mas notables son la arabinosa (3,5%), la galactosa (5,12%) y la glucosa (8,9%).

Prueba de que estos monosacáridos son una impureza y no forman parte de la xilana se obtiene al aislar esta xilana por extracción con dimetilsulfóxido y posterior análisis por cromatografía gaseosa de los monosacáridos del hidrolizado, previa transformación en los correspondientes acetatos de alditoles. Ahora la xilosa forma un 94,7% y todas las impurezas se reducen drásticamente como puede verse en la misma tabla. Se concluye pues, con estos análisis, que los polisacáridos de la hemicelulosa constan de los azúcares xilosa, como componente mayoritario y procedente de xilanas, y en pequeña proporción los azúcares glucosa, arabinosa, galactosa, manosa y ramnosa, como posibles impurezas de esos polisacáridos, pero procedentes a su vez de otros u otros polisacáridos.

V.2.3. Determinación de ácidos urónicos

La determinación de ácidos urónicos se realizó por el método del carbazol (Bitter, 1962). El polisacárido se hidrolizó con ácido sulfúrico del 72%. El hidrolizado se llevó a pH 8,5-9 con KOH 0,1 M y se pasó sucesivamente por columnas que contenían Amberlita IR-120(H⁺) e IR-400(AcO⁻). Se eluyeron con agua y la aniónica con ácido acético al 10%. Los ácidos se concentraron a un volumen exacto de 10 mL y mediante diluciones se prepararon las muestras D-1 y D-2.

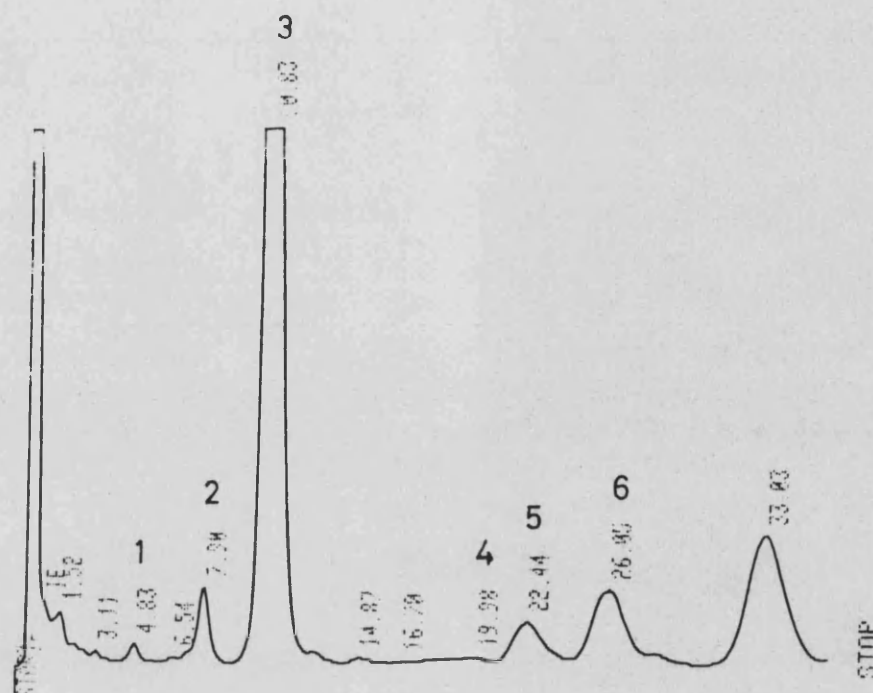


Fig. V. 4. Cromatografía gaseosa de los acetatos de alditoles procedentes de la hidrólisis de la hemicelulosa. Temperatura de la columna 190°.

TABLA V. 1.

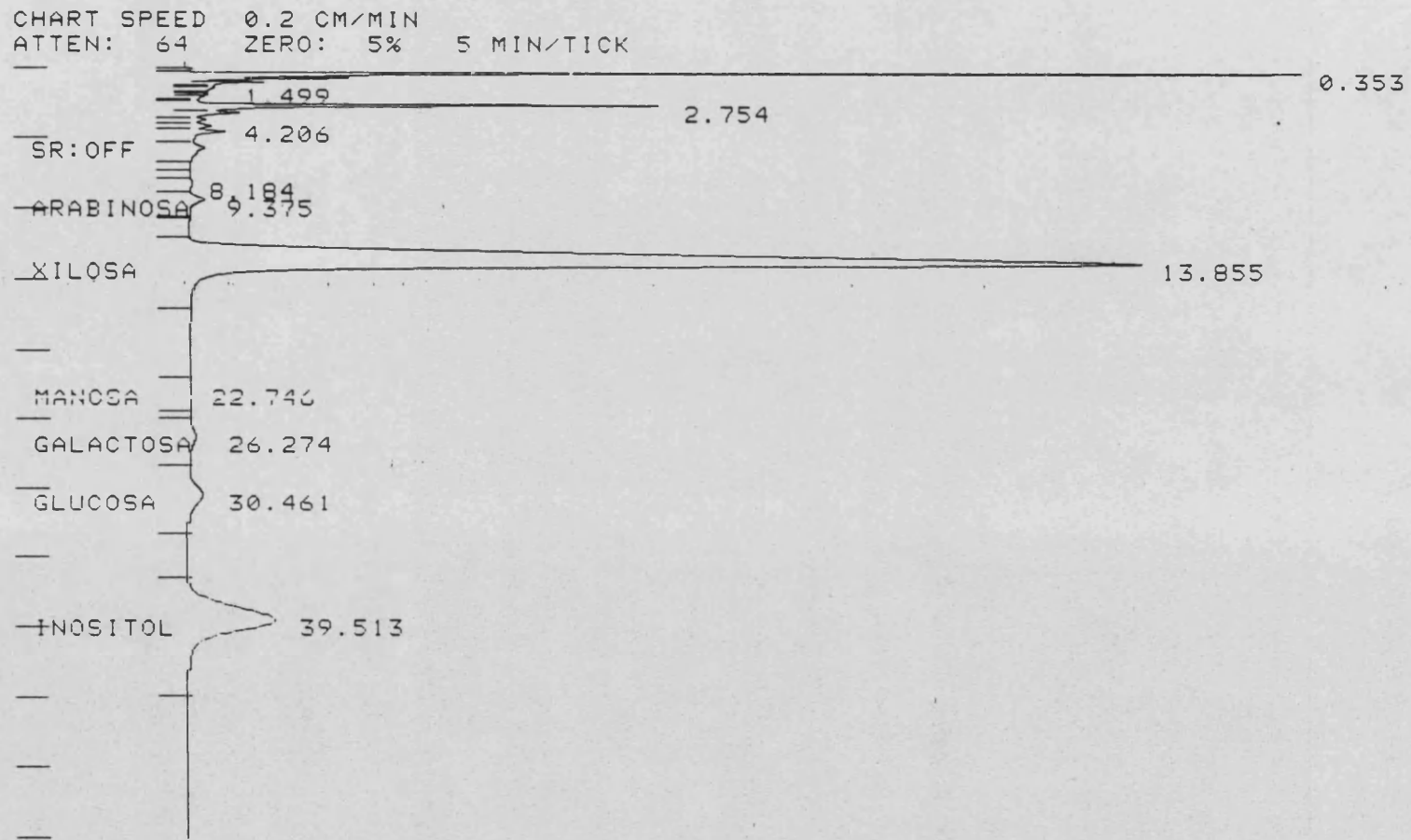
Monosacáridos de la hemicelulosa determinados a través de los acetatos de alditoles

Azúcares	Pico n°	%Azúcares ^a	%Azúcares ^b
Ramnosa	1	0,62	0,65(0,32)
Arabinosa	2	3,5	0,86(0,42)
Xilosa	3	81,01	94,7(46,38)
Manosa	4	0,84	-
Galactosa	5	5,12	0,97(0,47)
Glucosa	6	8,90	2,81(1,37)

^a Hemicelulosa extraída con NaOH al 4%.

^b Hemicelulosa extraída con DMSO. Los valores entre paréntesis se refieren al porcentaje de azúcares.

Fig. V. 5. Cromatografía gaseosa de los acetatos de alditoles procedentes de la hidrólisis de la hemicelulosa extraída con DMSO. Temperatura de la columna 190°.



Para la determinación cuantitativa se construyó una recta de calibrado. Se preparó una disolución de ácido glucurónico y mediante diluciones se prepararon diez soluciones de referencia. Las referencias y las muestras problemas se sometieron simultáneamente a la reacción colorimétrica, de manera que las condiciones fuesen las mismas.

Con los datos de absorbancia y de concentración de ácido glucurónico que se detallan en la tabla V.2 se construyó una recta de calibrado, que se muestra en la Fig.V.6. La ecuación de la recta obtenida, ajustada por mínimos cuadrados, es:

Absorbancia = $0,008C - 0,029$ y el coeficiente de regresión (r) es: 0,994.

TABLA V.2

Concentraciones y absorbancias de las disoluciones de referencia de ácido glucurónico.

Disolución de referencia	Concentración de ácido glucurónico ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Absorbancia
1	6	0,040
2	12	0,048
3	18	0,113
4	24	0,180
5	30	0,210
6	36	0,245
7	42	0,290
8	48	0,380
9	54	0,402
10	60	0,465

Absorbancia

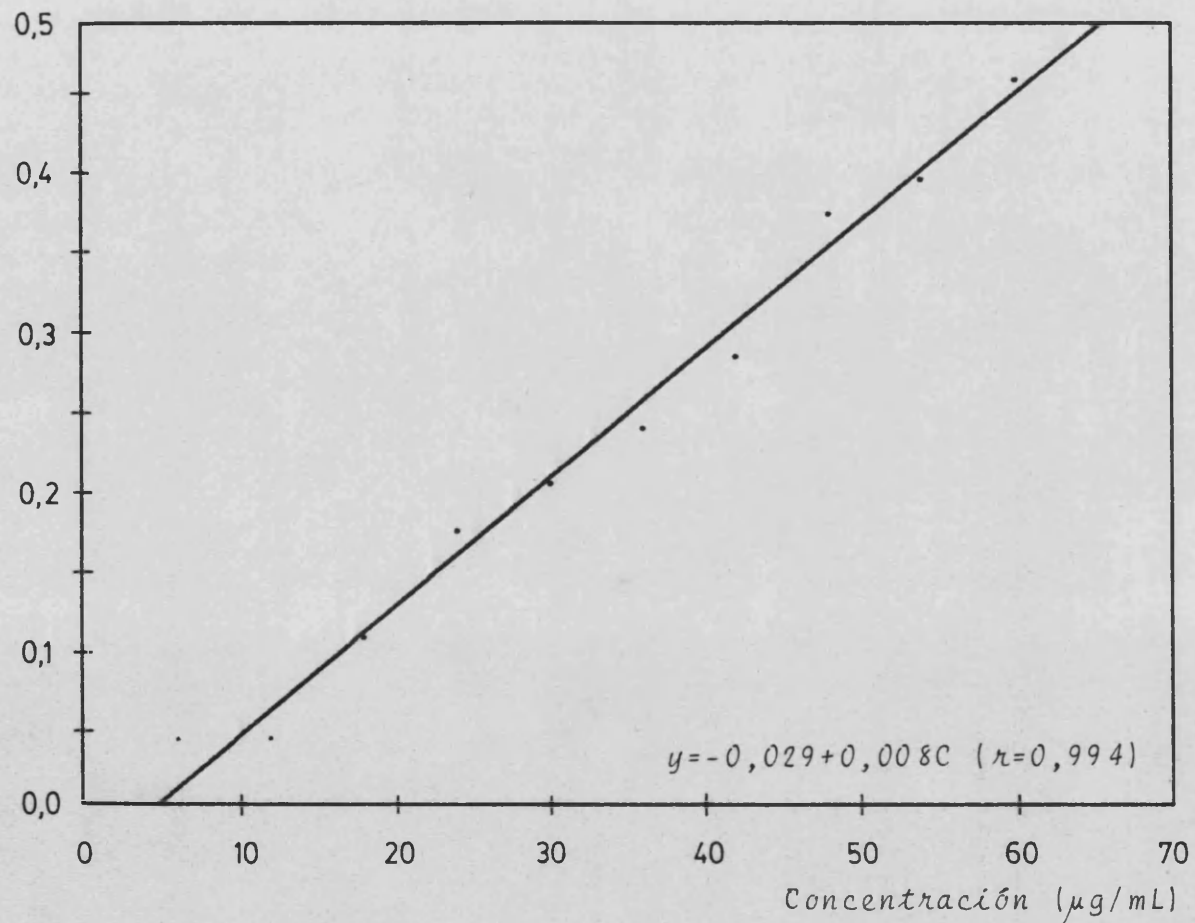


Fig.V.6. Recta de calibrado para la determinación cuantitativa de ácidos urónicos por el método del carbazol.

Sometidas las muestras a la reacción colorimétrica y medidas las absorbancias se obtuvieron los siguientes resultados:

Muestra	Absorbancia	Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	Acid.urónico(%)
D-1	0,047	9,46	2,63
D-2	0,135	20,35	2,28

Se obtuvo un 2,45% de ácido urónico en la hemicelulosa expresado en concentración de ácido glucurónico.

V.3. Hidrólisis ácida parcial

Teniendo en cuenta los datos proporcionados por el análisis cuantitativo de los monosacáridos y sabiendo que las uniones furanósicas son más lábiles que las piranósicas análogas, se procedió a realizar una hidrólisis ácida parcial de la hemicelulosa. Se pretendía, de esta forma, liberar selectivamente los restos de arabinofuranosa, en el caso de que ésta estuviese como ramificación en el polisacárido de xilosa.

La hidrólisis ácida se realizó con ácido sulfúrico 0,05M calentando a reflujo durante hora y media.

V.3.1. Identificación de los monosacáridos por cromatografía gaseosa

Una primera identificación de éstos se realizó por cromatografía gas-líquido de los trimetilsililderivados de los monosacáridos del hidrolizado. Se analizaron comparativamente con azúcares patrones igualmente sililados y en las mismas condiciones. En la tabla V.3. se dan los tiempos de retención de los monosacáridos del hidrolizado y en la Fig. V.7 se muestra el cromatograma obtenido.

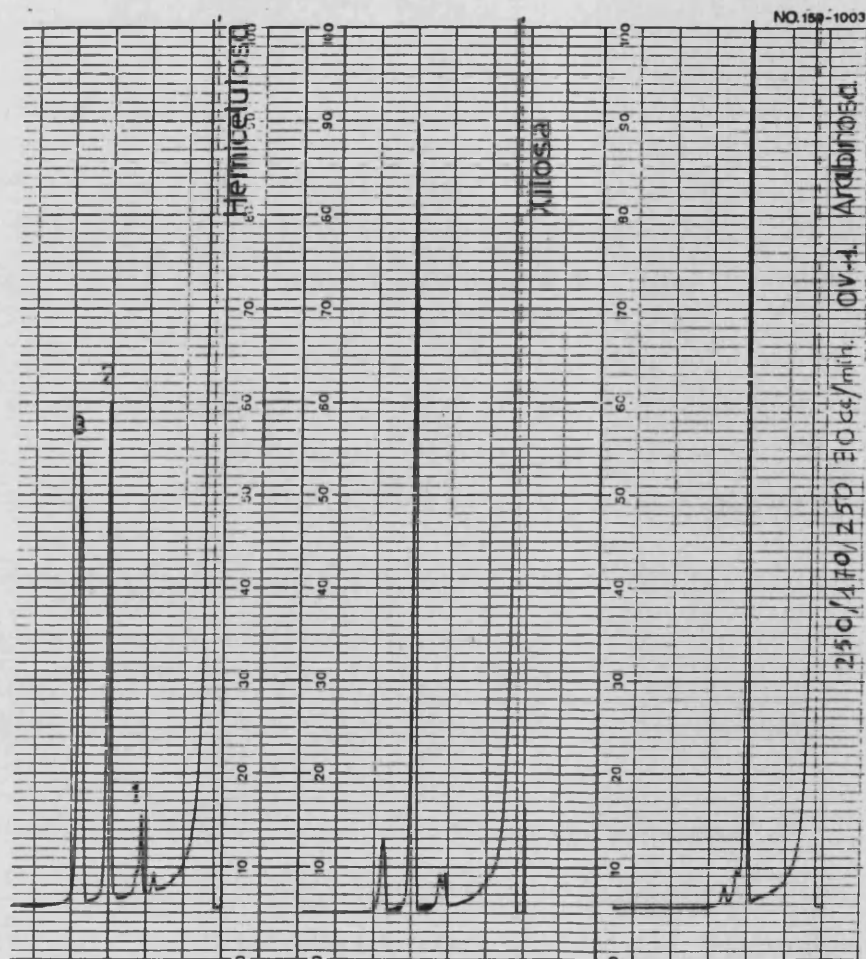


Fig.V.7. Cromatografía gaseosa de los TMS derivados de los azúcares procedentes de la hidrólisis parcial de la hemicelulosa.

TABLA V.3.

Cromatografía gaseosa de los derivados silylados de los monosacáridos procedentes de la hidrólisis parcial de la hemicelulosa.

t_R	Pico	Azúcares	%Area
257	1	Arabinosa y/ Xilosa	4,06
362	2	Xilosa	45,51
453	3	Xilosa	50,43

Para una cuantificación y mejor identificación de estos monosacáridos se formaron sus correspondientes acetatos de alditoles, de la forma acostumbrada.

Se analizaron por cromatografía gas-líquido y se obtuvo el xilitol prácticamente como el único componente (97,83%) (Fig.V.8).

El hecho de obtenerse la xilosa como azúcar mayoritario hizo pensar que esta hidrólisis ácida era todavía fuerte; previamente se había realizado una hidrólisis con ácido H_2SO_4 0,5N obteniéndose el mismo resultado.

Se pasó a realizar una hidrólisis mas suave con ácido sulfúrico 0,005M calentando la mezcla a reflujo una hora. Con el hidrolizado se formaron los correspondientes acetatos de alditoles y se analizaron por cromatografía gas-líquido. Apareció otra vez la xilosa como el componente mayoritario (86,20%).

Estos resultados nos llevan, a confirmar la primera conclusión de que la arabinosa, y concretamente en forma de arabinofuranoza, no forma parte como ramificación de la cadena de xilosa sino que acompaña a ésta como impureza.

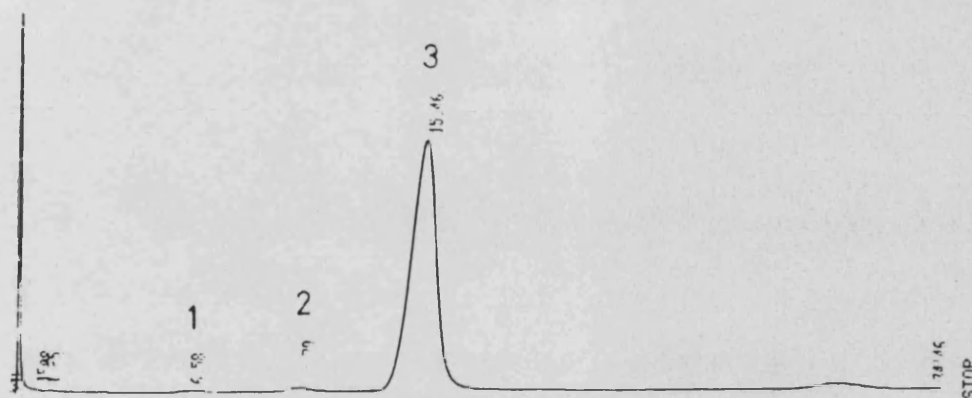


Fig.V.8. Cromatografía gaseosa de los acetatos de alditoles procedentes de la hidrólisis parcial de la hemicelulosa. Temperatura de la columna 190°.

TABLA

Monosacáridos determinados a través de los acetatos de alditoles.

Azucar	Pico	t_R (min)	%Azúcares
Ramnosa	1	6,58	0,77
Arabinosa	2	10,79	1,27
Xilisa	3	15,46	97,83

V.4. Metilación de la hemicelulosa

Para la metilación de la hemicelulosa se utilizaron dos métodos: el de Kuhn, descrito para la metilación de la celulosa (apart. IV.5) y el de Hakomori descrito para la metilación de la holocelulosa (apart. III.3).

Con el primero de ellos se obtuvieron rendimientos muy bajos, un 16% en peso en el caso más favorable. En la metilación según Hakomori, es decir, utilizando como base el metilfulfinilcarbanión, -formado por reacción del HNa con DMSO- y para metilar el ioduro de metilo, se obtuvieron mejores rendimientos, un 50% en el caso más desfavorable, y el aislamiento del polisacárido no presentó problema.

Se trató la hemicelulosa con los reactivos de Hakomori para dar el producto metilado. Los restos de dimetilsulfóxido se eliminaron en estufa de vacío a 40°C durante varios días, y el producto amarillo obtenido se purificó por precipitación en benceno con éter de petróleo y se recuperó como un sólido blanco floculento que representó un 73,96% de rendimiento. Esta forma de purificar el producto metilado fue la más completa y sencilla. Otro tipo de purificaciones que se realizaron fueron: por cromatografía de capa fina preparativa utilizando como eluyente la mezcla benceno-etanol (10:2). Apareció una banda que dio un sólido amarillo. Se hizo una cromatografía en capa fina de este producto y se reveló primero con verde de p-bromocresol. La placa tomó coloración azul, y en las manchas apareció coloración amarilla. Otra purificación de la hemicelulosa metilada se intentó por columna de sílice Kieselgur, utilizando eluyente benceno-etanol (10:2).

En el espectro de infrarrojo del producto metilado no se observó banda de absorción de O-H ($3600-3200\text{ cm}^{-1}$) lo que indicó que la reacción había sido completa.

Por su espectro de RMN se comprobó la purificación del producto metilado.

V.4.1. Datos espectroscópicos

a) Interpretación del espectro de IR

Su espectro de IR (Fig.V.9) presentó las siguientes bandas características: a 2930 y 2860 cm^{-1} de tensión de C-H alifático; banda a 1740 cm^{-1} de tensión de C=O de ester metílico, bandas a 1460, 1380 y 1320 cm^{-1} de deformación de flexión de grupos CH_3- , $-\text{CH}_2-$, y $-\text{CH}$; banda entre 1200 y 1000 cm^{-1} de tensión de C-O de éter y banda a 950 cm^{-1} característica de éteres cíclicos.

b) Interpretación del espectro de RMN- ^1H

El espectro de RMN (Fig.V.10) (DCCl_3) presentó las señales características de un polisacárido metilado y con uniones glicosídicas β : señales a 4,3 δ asignables a los protones anoméricos de un polisacárido lineal formado por uniones β ; señales a 3,5 y a 3,57 δ asignables a los grupos metoxilo en C-2 y C-3 respectivamente; las señales entre 2,9 y 3,2 δ y las comprendidas entre 3,7 y 3,9 δ asignables a los CH_2 -OR y a CH -OR respectivamente.

c) Interpretación del espectro de RMN- ^{13}C .

La espectroscopía de RMN- ^{13}C es de gran valor para la elucidación de la composición, secuencia y conformación de los carbohidratos en disolución (Chizhov, 1967; Gorin, 1973; Allerhand, 1971; Colson, 1974 y 1976; Walker, 1976; Friebolin, 1976; Gagnaire, 1976; Seymour, 1976; Inoue, 1978).

Una de las mas sencillas y generalmente útiles aplicaciones de la espectroscopía de RMN de los polisacáridos es un ensayo del grado de complejidad molecular. Otro tipo de información que se obtiene directamente se refiere a la pureza del polisacárido. Por ej. la detección a campo alto en ^1H ó en ^{13}C de señales atribuibles a grupos alqui-

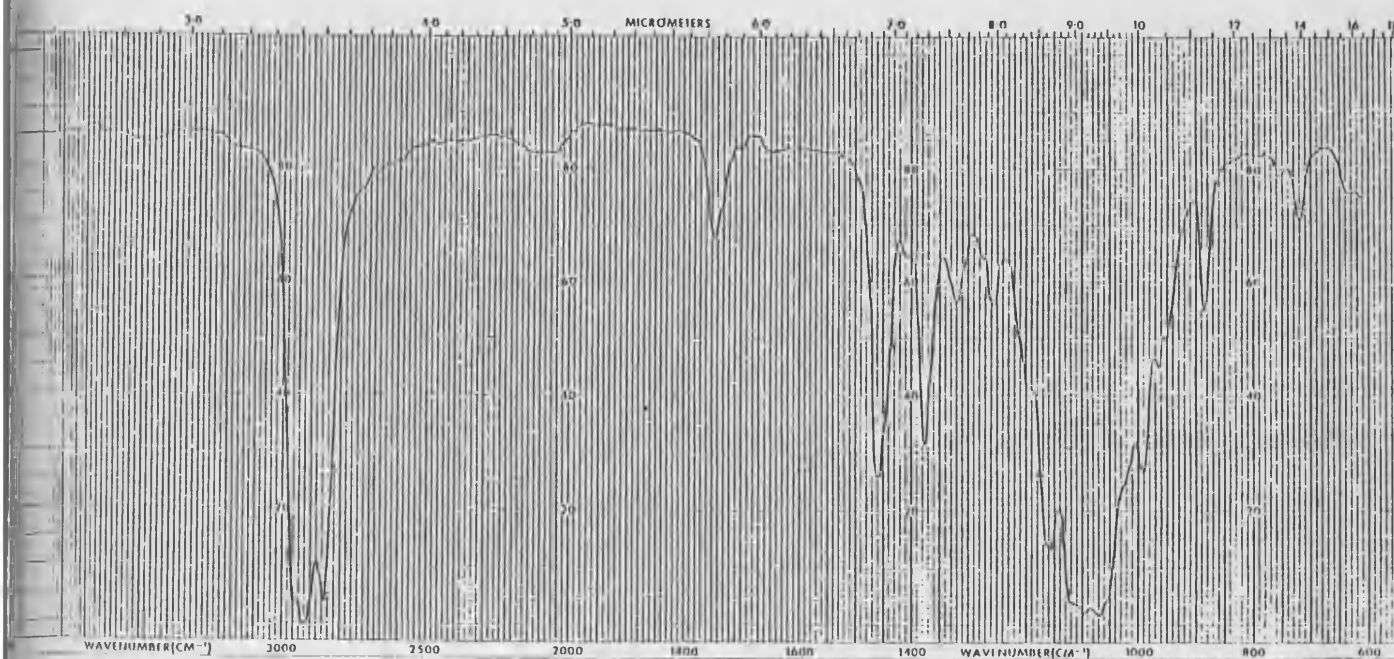


Fig.V.9. Espectro de IR de la hemicelulosa metilada.

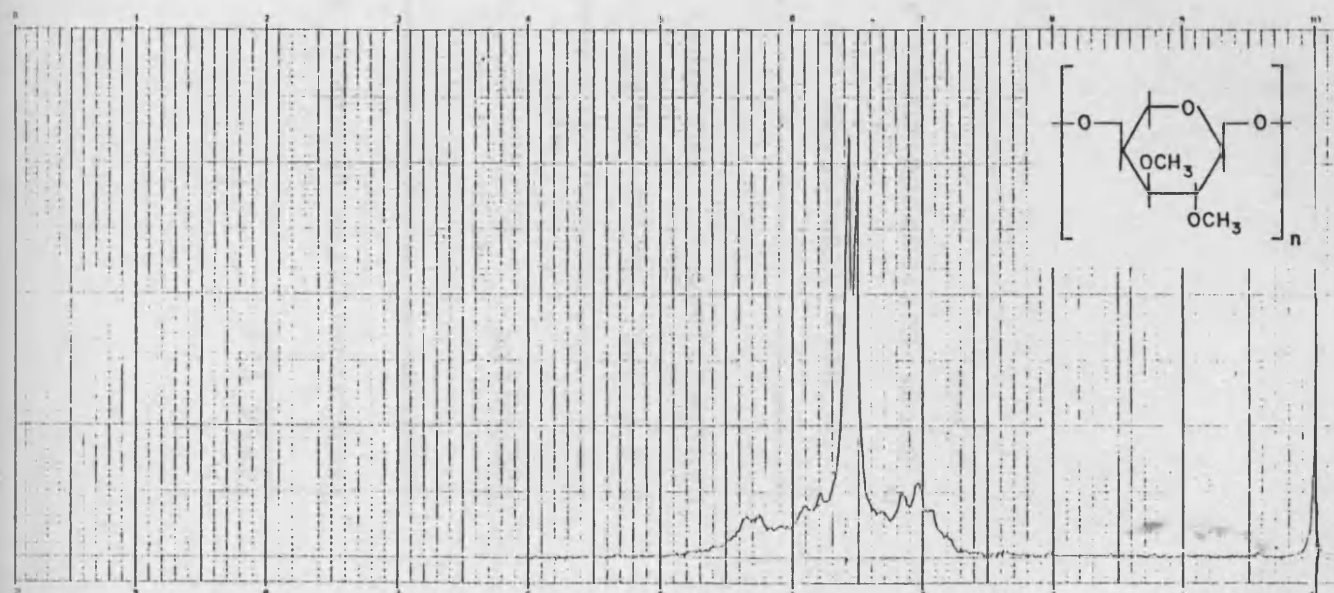


Fig.V.10 Espectro de RMN de la hemicelulosa metilada.

TABLA V.4

Desplazamientos químicos de RMN-¹³C de la hemicelulosa metilada (DCCl₃)

Compuesto	Desplazamientos químicos, ppm ^a					
	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅	OCH ₃
β-D-xilopiranososa	97,49	75,06	76,83	70,21	66,08	
Hemicelulosa ^b	102,67(d)	76,39(d)	83,30(d)	84,22(d)	63,28(t)	60,69(q)

^a Los desplazamientos son relativos al patrón interno.

^b Datos correspondientes al espectro de RMN-¹³C realizado según ¹H-desacoplado.

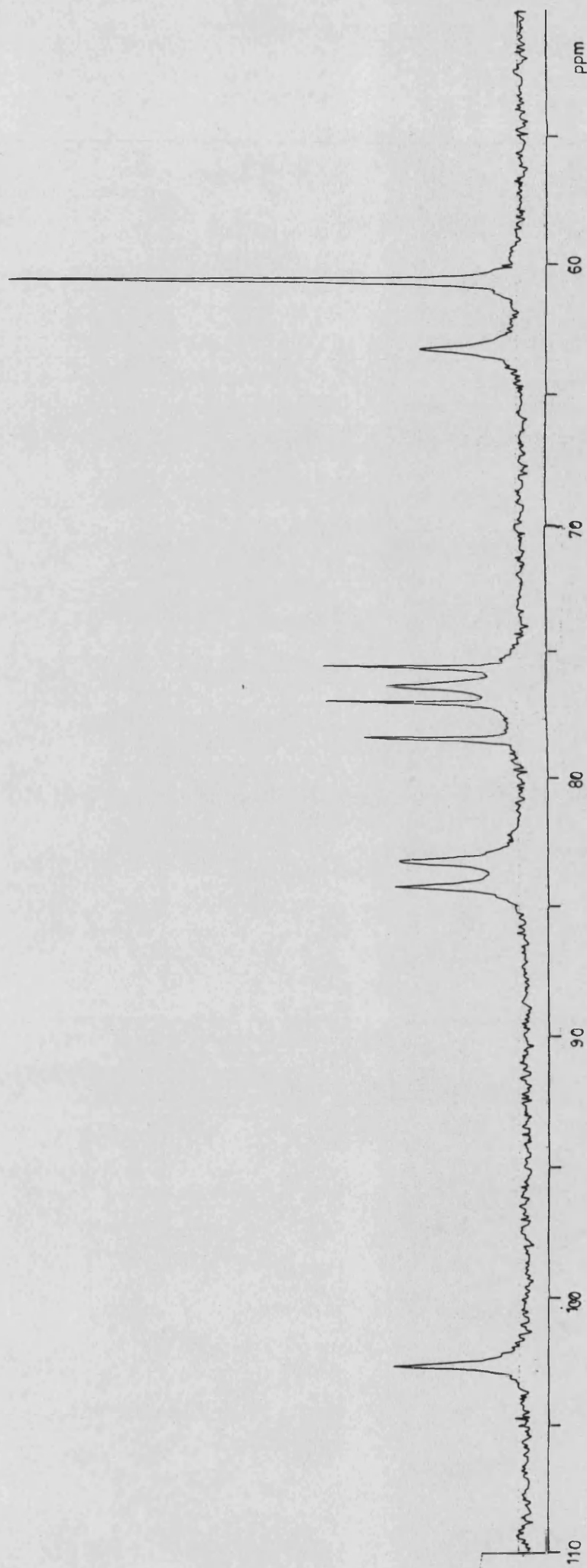
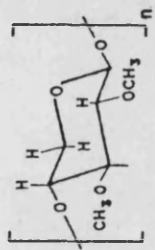


Fig.V.11. Espectro de RMN-¹³C de la hemicelulosa metilada (DCCl₃) según ¹H-desacoplado.

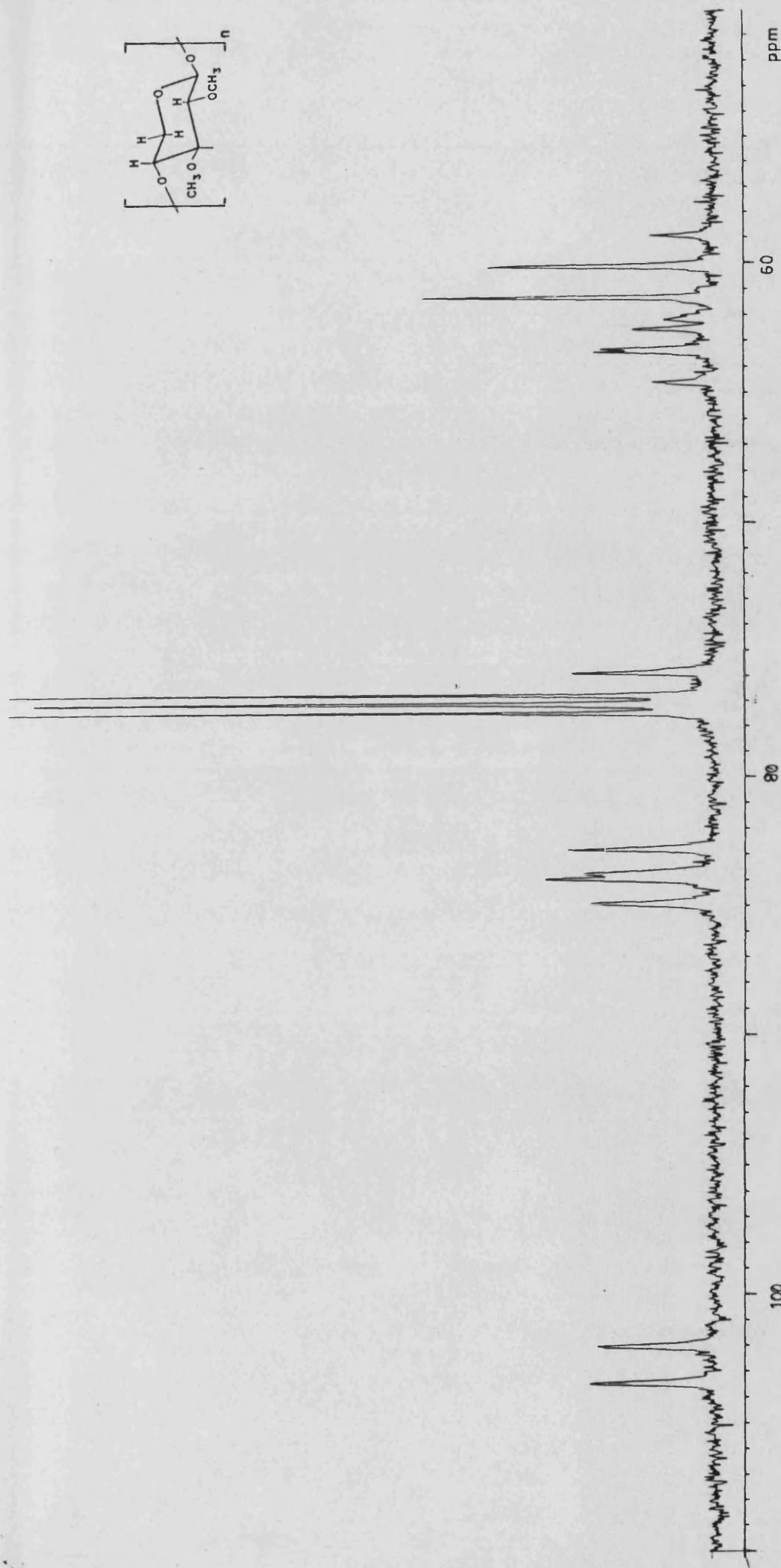


Fig. V.12. Espectro de RMN- ^{13}C de la hemicelulosa metilada (DCCl_3) en off resonance.

lo ó de señales a campo bajo atribuibles a componentes aromáticos muestran la presencia de contaminantes introducidos en la etapa del aislamiento.

Las resonancias anoméricas, en ambos espectros ^1H y ^{13}C , están separadas de las señales producidas por la mayoría de los otros núcleos. Esto ayuda a determinar el número de diferentes clases de restos en un polisacárido y en la estimación de sus proporciones relativas. Una ulterior distinción entre carbonos anoméricos, es la diferencia en el desplazamiento químico entre el C-1 en un resto interno en un polisacárido y el del resto de glicosa reductora (Voss, 1979). El C-1 de este último resuena a unas 5-10 ppm a campo mas alto de los carbonos glicosídicos, en la región de 90-100 δ característica del C-1 de los monosacáridos.

En el espectro de ^{13}C las señales de ambos carbonos unidos por la unión glicosídica (C-1—O—C-X) son fuertemente desplazados a campo mas bajo, normalmente de 6-9 ppm, de las señales de los correspondientes carbonos en monosacáridos relacionados (Aspinall, 1982, pp.145-149). Estos desplazamientos se atribuyen al efecto de desacoplamiento inductivo de los sustituyentes en β . Por tanto, las señales del C-1 de los polisacáridos se localizan en la región de 100-110 δ , bien separadas de las otras señales debidas a los otros carbonos (tabla V.4).

Si C-X es un carbón secundario, como en nuestro caso que es el C-4, dá a menudo la señal mas fuertemente desplazada a campo mas bajo de todos los carbonos secundarios, y en principio, se puede identificar por referencia a los desplazamientos químicos de compuestos adecuados de peso molecular bajo (tabla V.4, datos correspondientes a la β -xilosa) (Pfeffer, 1978).

Se observan menos efectos en las posiciones adyacentes, frecuentemente equivalentes a un desplazamiento a campo mas alto de 2-3 ppm; esto puede ser atribuído al efec

to estérico γ . Sin embargo los valores exactos de los efectos β y γ pueden variar en varias ppm, dependiendo de la posición de la unión glicosídica, su configuración, y posiblemente de los azúcares involucrados.

El desplazamiento químico de un C-1 de un resto glicosídico en un polisacárido está íntimamente relacionado con la configuración y la conformación (Matsuhira, 1982). El desplazamiento químico de un anómero α suele ser de $\delta=100$ y unas 3-4 ppm a campo mas alto para el anómero β .

La confirmación de la composición y configuración de la hemicelulosa metilada se llevó a cabo por el estudio del espectro de RMN- ^{13}C con ^1H -desacoplado y en off resonance.

En el espectro ^1H -desacoplado (Fig.V.11) aparecen seis señales singletes que están de acuerdo con el hecho de que hay seis carbonos no equivalentes magnéticamente en la secuencia de monosacáridos repetida en la hemicelulosa metilada. Las señales obtenidas, así como la asignación y multiplicidad de las mismas, se indican en la tabla V.4.

La señal correspondiente al carbono anomérico (102,67 ppm), indica que éste tiene una configuración β en el polisacárido.

V.4.2. Hidrólisis ácida

Se realizó la hidrólisis de la hemicelulosa metilada con ácido sulfúrico del 72%. Con los azúcares parcialmente metilados liberados, se formaron los acetatos de alditoles de la forma acostumbrada. Se aislaron por extracción con cloroformo.

Se separaron con bicarbonato de sodio los posibles compuestos ácidos. Estos se liberan al acidificar con ácido clorhídrico y se aislaron con cloroformo. Los compuestos neutros, extraídos con cloroformo, se purificaron por

filtración sobre sílicagel utilizando como eluyente la mezcla hexano-éter (1:5).

En su espectro de IR aparecen las bandas típicas de acetatos (1735 , 1460 , 1360 y 1040 cm^{-1}) y su espectro de RMN también muestra las señales correspondientes a los grupos acetatos (singletes entre $2,05$ y $2,16$).

V.4.2.1. Identificación de los monosacáridos parcialmente metilados

Con los monosacáridos parcialmente metilados obtenidos en la hidrólisis ácida, se formaron los correspondientes acetatos de alditoles, de la forma habitual.

a) Análisis por cromatografía gaseosa

Estos derivados volátiles, acetatos de alditoles parcialmente metilados, se analizaron y cuantificaron por cromatografía gaseosa utilizando el 1,5-di-O-acetil-2,3,4,6-tetra-O-metil-D-glucitol como azúcar patrón de referencia. En la Fig.V.13 se muestra el cromatograma obtenido y en la tabla V.5 se dan los tiempos de retención de estos derivados relativos al azúcar patrón de referencia así como el porcentaje relativo de cada uno de ellos en la mezcla.

b) Análisis por cromatografía gaseosa-espectrometría de masas.

La identidad de los acetatos de alditoles parcialmente metilados se confirma por cromatografía gaseosa-espectrometría de masas combinadas. En la Fig.V.14 se muestra el cromatograma obtenido.

Interpretación del espectro de masas

De los espectros de masas de los acetatos de alditoles de la hemicelulosa metilada se identificaron dos com-

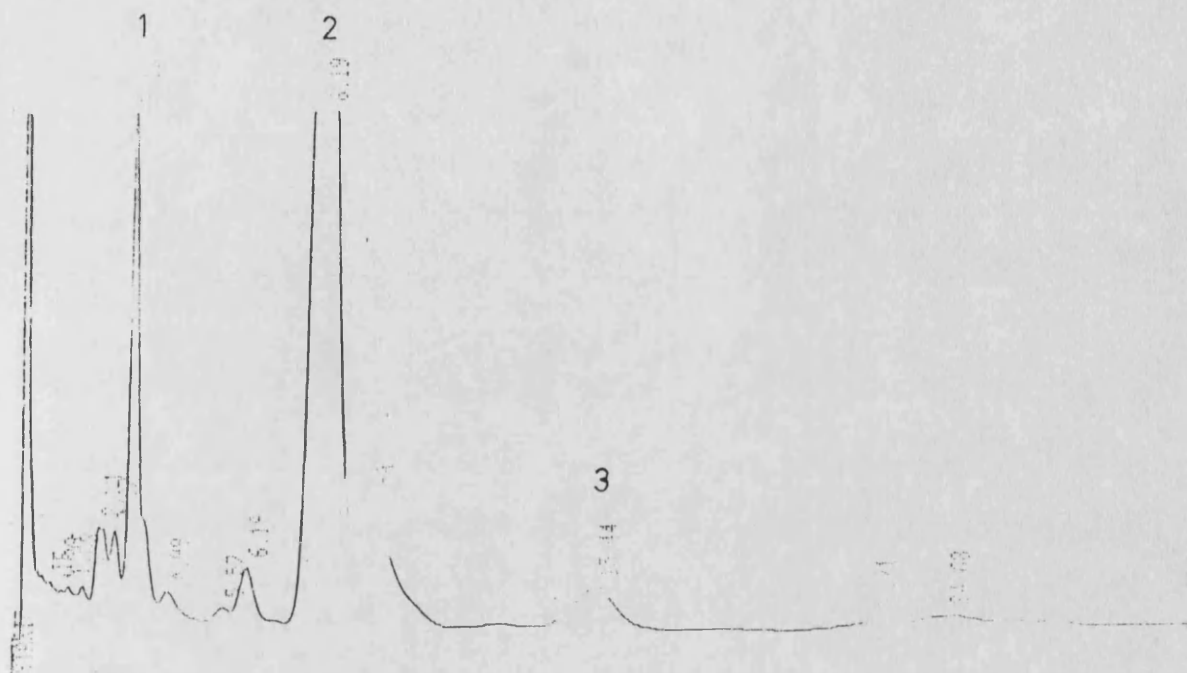


Fig.V.13. Cromatografía gaseosa de los acetatos de alditoles de los azúcares metilados obtenidos del hidrolizado de la hemicelulosa metilada en una columna ECNSS-M a 175°. Pícos: 1) impureza; 2) 2,3-Me₂-Xi; 3) 3-Me-Xi.

RT	AREA	TYPE	AR/HT	AREA%
1.28	17279	BV	0.096	0.024
1.46	72892	VV	0.140	0.100
1.84	109690	VP	0.153	0.151
2.24	650050	PV	0.154	0.894
2.35	768370	VV	0.185	1.056
2.67	944030	VV	0.224	1.293
3.13	7635800	VI	0.277	10.173
4.09	220570	BI	0.311	0.303
5.52	307180	PI	0.31	0.422
6.19	1433600	VB	0.39	1.971
8.19	4.9556E+07	BV	0.538	25.139
9.50	7085600	VB	0.481	4.711
15.44	3002200	BB	1.256	4.127
22.71	35158	BV	0.679	0.040
24.68	898630	VV	1.212	1.235

TOTAL AREA= 2.2737E+07
 MUL FACTOR= 1.0000E+00

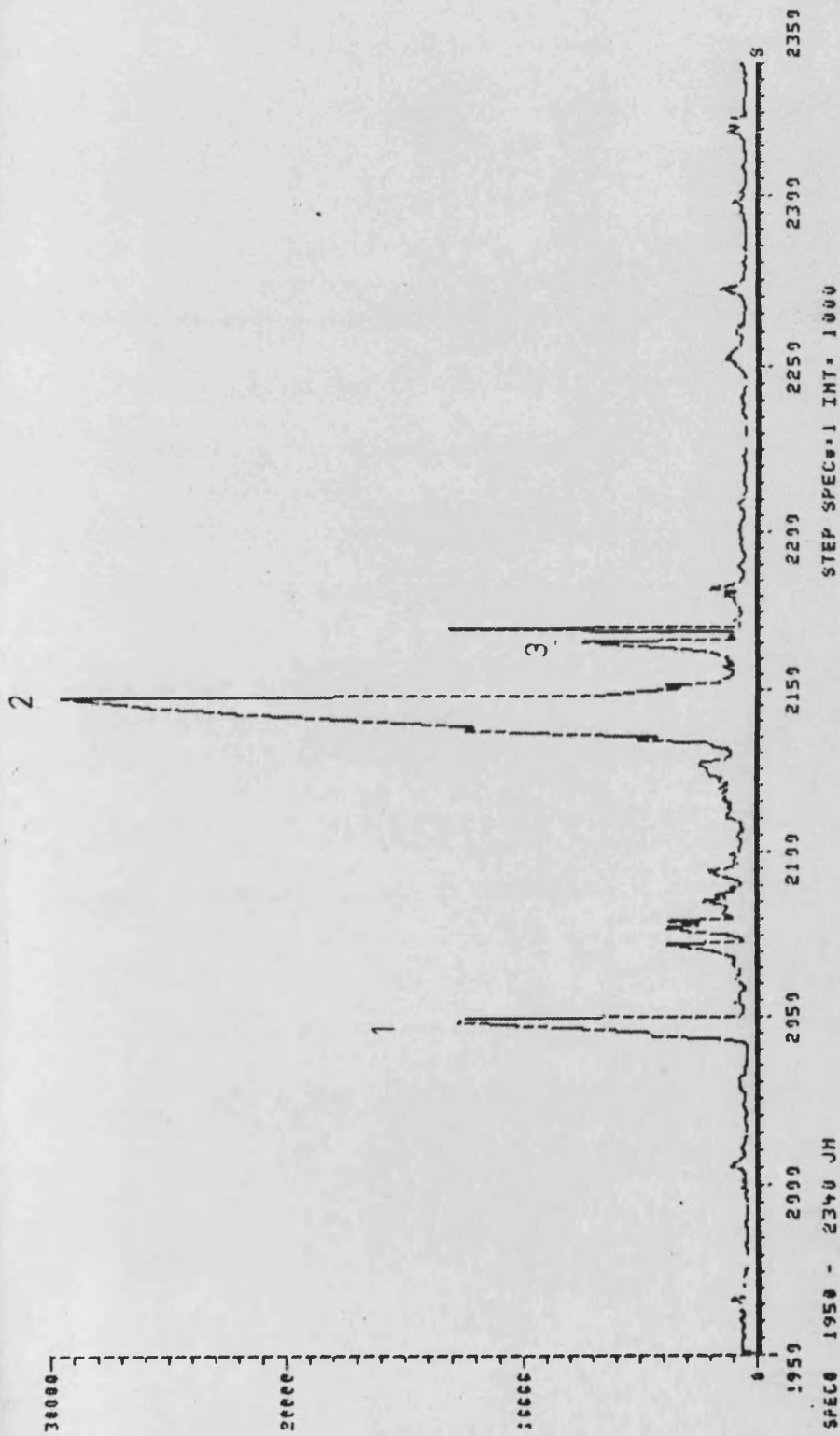


Fig. V.14. Chromatografía gaseosa de los acetatos de alditoles de los azúcares metilados obtenidos del hidrolizado de la hemicelulosa metilada en una columna capilar SE-30 a $110^{\circ}/8^{\circ}-280^{\circ}$. Picos: 1) impureza; 2) 2,3-Me₂-Xí; 3) 3-Me-Xí.

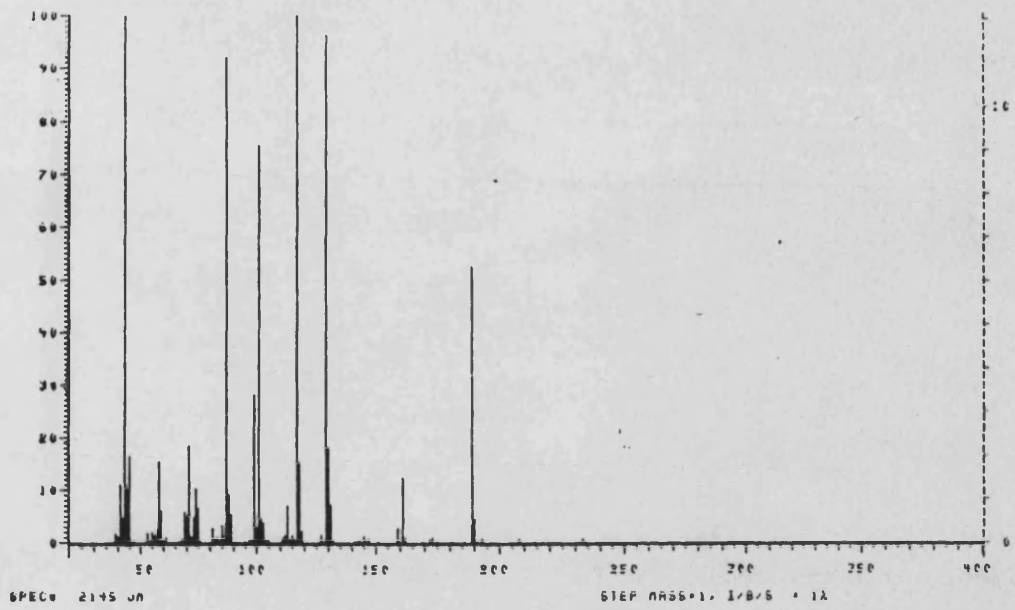


Fig.V. 15. Espectro de masas del 1,4,5-tri-O-acetil-2,3,-
di-O-metil-D-xilitol.

>>DATE<<=SPEC# 2145/JM/
BASE RUN
32760 267902

PEAK	INT	I/BASE	MASS	PEAK	INT	I/BASE	MASS
1	96	0.29%	37.5	72	531	1.62%	112.2
2	427	1.31%	38.7	73	2305	7.03%	113.2
3	465	1.41%	39.8	74	257	0.79%	114.2
4	243	0.74%	39.9	75	567	1.73%	115.2
5	2615	8.03%	41.0	76	271	0.83%	116.2
6	1598	4.87%	42.1	77	32760	100.00%	117.5
7	32760	100.00%	43.2	78	32	0.09%	118.2
8	41	0.12%	43.2	79	5058	15.43%	119.2
9	2429	7.42%	44.1	80	740	2.25%	120.2
10	5430	16.57%	45.0	81	30	0.09%	121.1
11	80	0.24%	46.2	82	28	0.08%	122.3
12	195	0.59%	47.2	83	21	0.06%	124.2
13	53	0.16%	51.2	84	29	0.08%	125.2
14	70	0.21%	52.2	85	28	0.08%	127.1
15	43	0.13%	53.2	86	28	0.08%	127.1
16	155	0.47%	54.1	87	547	1.66%	128.1
17	675	2.06%	55.1	88	84	0.25%	129.1
18	547	1.66%	56.1	89	3168	9.64%	129.1
19	864	2.63%	57.2	90	5930	18.10%	130.1
20	5154	15.73%	58.2	91	2445	7.46%	131.1
21	8000	24.10%	59.2	92	165	0.50%	132.2
22	219	0.66%	60.2	93	21	0.06%	132.2
23	37	0.11%	61.2	94	30	0.09%	133.1
24	30	0.09%	63.2	95	54	0.16%	140.1
25	44	0.13%	64.1	96	151	0.46%	141.2
26	36	0.10%	65.2	97	122	0.37%	142.2
27	30	0.09%	66.2	98	208	0.63%	143.2
28	138	0.42%	67.2	99	130	0.39%	144.2
29	247	0.75%	68.2	100	425	1.29%	145.2
30	1911	5.83%	69.2	101	140	0.42%	146.2
31	1691	5.16%	70.2	102	263	0.80%	147.2
32	4094	12.49%	71.2	103	35	0.10%	148.2
33	464	1.41%	72.2	104	20	0.06%	149.3
34	1634	4.98%	73.1	105	100	0.30%	151.2
35	3385	10.33%	74.1	106	41	0.12%	152.2
36	2165	6.60%	75.2	107	37	0.11%	154.2
37	94	0.28%	76.1	108	56	0.17%	155.2
38	52	0.15%	77.1	109	39	0.11%	156.2
39	29	0.08%	78.1	110	25	0.07%	157.1
40	42	0.12%	79.1	111	978	2.98%	159.1
41	75	0.22%	80.1	112	114	0.34%	160.1
42	905	2.76%	81.1	113	4074	12.43%	161.1
43	308	0.94%	82.1	114	350	1.06%	162.1
44	368	1.12%	83.1	115	49	0.14%	163.2
45	164	0.50%	84.1	116	31	0.09%	164.1
46	1098	3.35%	85.1	117	21	0.06%	165.1
47	447	1.36%	86.1	118	29	0.08%	166.1
48	30154	92.04%	87.1	119	160	0.48%	169.0
49	3026	9.23%	88.1	120	22	0.06%	171.1
50	1767	5.39%	89.1	121	315	0.96%	172.1
51	79	0.23%	90.2	122	401	1.22%	173.1
52	67	0.20%	91.1	123	49	0.14%	174.1
53	21	0.06%	92.1	124	152	0.46%	175.1
54	34	0.10%	93.1	125	101	0.30%	181.0
55	126	0.38%	95.1	126	103	0.31%	186.1
56	65	0.19%	96.1	127	23	0.07%	187.1
57	168	0.51%	97.1	128	1731	52.25%	189.1
58	190	0.57%	98.1	129	1507	4.60%	190.1
59	9185	28.03%	99.1	130	236	0.72%	191.1
60	1032	3.13%	100.1	131	23	0.07%	192.1
61	24705	75.41%	101.1	132	298	0.90%	193.1
62	1511	4.61%	102.1	133	48	0.14%	194.1
63	1234	3.76%	103.1	134	22	0.06%	195.1
64	229	0.69%	104.1	135	57	0.17%	201.2
65	227	0.69%	105.1	136	34	0.10%	203.2
66	45	0.13%	106.1	137	65	0.19%	205.2
67	25	0.07%	107.1	138	251	0.76%	208.3
68	22	0.06%	108.1	139	22	0.06%	209.3
69	51	0.15%	109.1	140	87	0.26%	214.3
70	35	0.10%	110.2	141	17	0.11%	219.1
71	398	1.21%	111.1	142	55	0.16%	231.0
				143	319	0.97%	233.1
				144	28	0.11%	234.1
				145	21	0.06%	243.3
				146	23	0.07%	247.5
				147	30	0.09%	264.1
				148	24	0.10%	272.2
				149	20	0.06%	278.2
				150	34	0.10%	281.2
				151	21	0.06%	293.3

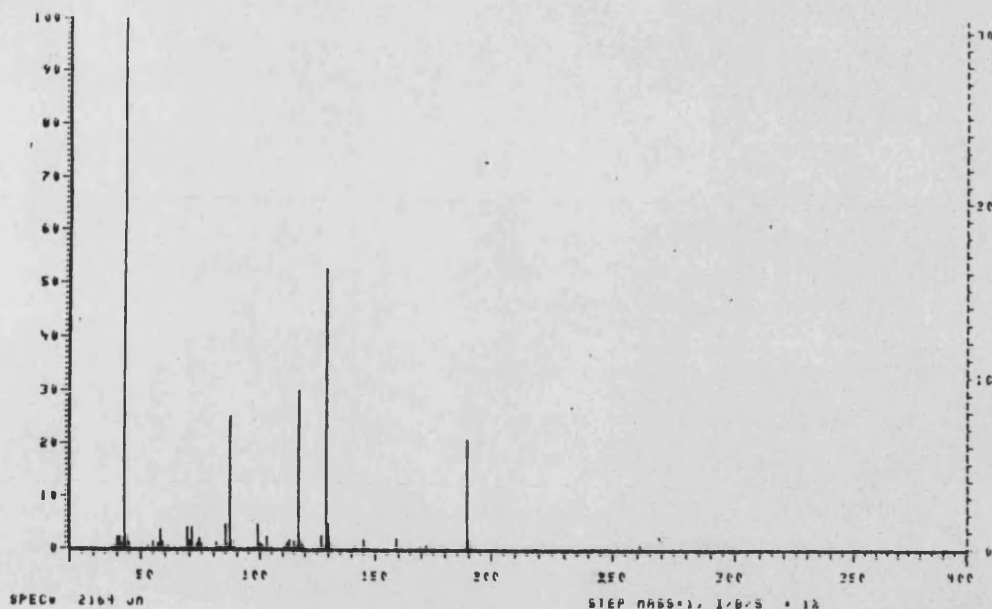


Fig.V.16. Espectro de masas del 1,2,4,6-tetra-O-acetil-3-O-metil-D-xilitol.

BASE	SUM	PEAK	INT	I/BASE	MASS
10201	50664				
1	41	72	23	0.12X	132.1
2	110	73	25	0.19X	133.1
3	489	74	123	0.67X	141.2
4	47	75	86	0.20X	142.2
5	435	76	27	0.14X	143.2
6	200	77	333	1.62X	145.2
7	18881	78	23	0.12X	146.2
8	497	79	74	0.40X	147.2
9	272	80	30	0.16X	151.2
10	20	81	44	0.24X	152.3
11	21	82	25	0.13X	155.3
12	117	83	44	0.24X	157.3
13	37	84	36	0.19X	158.3
14	232	85	394	2.15X	159.3
15	74	86	36	0.19X	160.3
16	195	87	20	0.10X	161.3
17	670	88	21	0.11X	162.2
18	231	89	112	0.61X	164.1
19	58	90	181	0.88X	172.1
20	101	91	42	0.22X	173.1
21	58	92	21	0.11X	175.1
22	60	93	26	0.14X	179.1
23	42	94	73	0.29X	181.0
24	749	95	45	0.24X	187.1
25	303	96	2030	20.99X	189.1
26	754	97	341	1.97X	190.2
27	32	98	40	0.22X	191.2
28	224	99	37	0.20X	193.2
29	307	100	91	0.49X	201.3
30	197	101	58	0.31X	214.2
31	50	102	57	0.31X	219.1
32	243	103	43	0.23X	230.9
33	63	104	151	0.62X	241.1
34	107	105	31	0.16X	242.1
35	45	106	21	0.11X	249.0
36	935	107	28	0.15X	261.1
37	147	108	29	0.15X	293.3
38	4541				
39	303				
40	99				
41	38				
42	33				
43	63				
44	36				
45	65				
46	87				
47	866				
48	186				
49	166				
50	41				
51	435				
52	32				
53	60				
54	23				
55	38				
56	37				
57	115				
58	270				
59	355				
60	305				
61	101				
62	5496				
63	279				
64	179				
65	25				
66	26				
67	463				
68	101				
69	9648				
70	903				
71	229				

puestos correspondientes a los picos del cromatograma de la Fig. V.14.

El pico principal y mayoritario, pico 2 del cromatograma, cuyo espectro de masas se muestra en la Fig.V.15, dió como fragmentos mas prominentes los iones con m/e 43, 87, 101, 117, 129 y 189 (Fig.III.27), lo que junto con el análisis por cromatografía gaseosa, nos permitió identificarlo como el compuesto 1,4,5-tri-O-acetil-2,3-di-O-metil-D-xilitol, como era de esperar.

El pico 3 del cromatograma, pico minoritario, cuyo espectro de masas se muestra en la Fig.V.16, dió como fragmentos mas prominentes los iones con m/e 43, 87, 129, y 189 (Fig. V.17), lo que junto con el análisis cromatográfico permitió identificarlo como el compuesto 1,2,4,6-tetra-O-acetil-3-O-metil-D-xilitol.

V.4.3. Reducción de la hemicelulosa metilada

En el espectro de infrarrojo de la hemicelulosa metilada (Fig.V.9) aparece la banda característica de un ester, en esta caso un posible ester metílico (1735 cm^{-1}). Esto puede ser debido a la esterificación de los ácidos durante el proceso de metilación.

La hemicelulosa metilada se disolvió en THF, seco y destilado, que contenía hidruro de aluminio y litio y se calentó a reflujo (Aspinall, 1978A). El polisacárido metilado y reducido se aisló por extracción con cloroformo.

V.4.3.1. Datos espectroscópicos

a) Interpretación de su espectro de IR

Su espectro de IR (Fig.V.18) presentó las siguientes bandas características: a 3500 cm^{-1} de tensión de O-H; bandas a 2930 y 2840 cm^{-1} de tensión de C-H alifático; bandas

a 1460, 1380 y 1320 cm^{-1} de deformación de flexión de grupos $-\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2-$; y $-\text{CH}-$; banda entre 1150 y 970 cm^{-1} de tensión de C-O de éter y de alcohol primario.

Aparece a 1735 cm^{-1} parte de la banda de ester. Se pensó que la reducción no había sido completa y se repitió el tratamiento en iguales condiciones. En el espectro de IR de este producto nuevamente reducido seguía apareciendo una pequeña banda a 1735 cm^{-1} .

b) Interpretación del espectro de RMN

Su espectro de resonancia magnético nuclear (Fig. V.19) (CDCl_3) presentó las siguientes señales: a 4,3 δ un duplete asignable a los protones anoméricos de un polisacárido lineal formado por uniones β ; los singletes a 3,58 y 3,53 δ asignables a los grupos metoxilo en los C-3 y C-2 respectivamente.

Por agitación de la muestra con agua pesada desapareció parcialmente la señal a 2,95 δ , por lo que se atribuyó esta señal al protón del alcohol primario formado por reducción del ester.

Comparando este espectro con el de la hemicelulosa metilada (Fig.V.10) se observó la desaparición de la señal a 3,8 δ , lo que hizo que esta señal se atribuyese al grupo $-\text{OCH}_3$ del ester metílico.

V.4.3.2. Hidrólisis ácida

La hemicelulosa metilada y reducida se hidrolizó con ácido sulfúrico del 72%. Primeramente se agitó la mezcla a temperatura ambiente y se continuó con una hidrólisis mas suave con H_2SO_4 1N a reflujo.

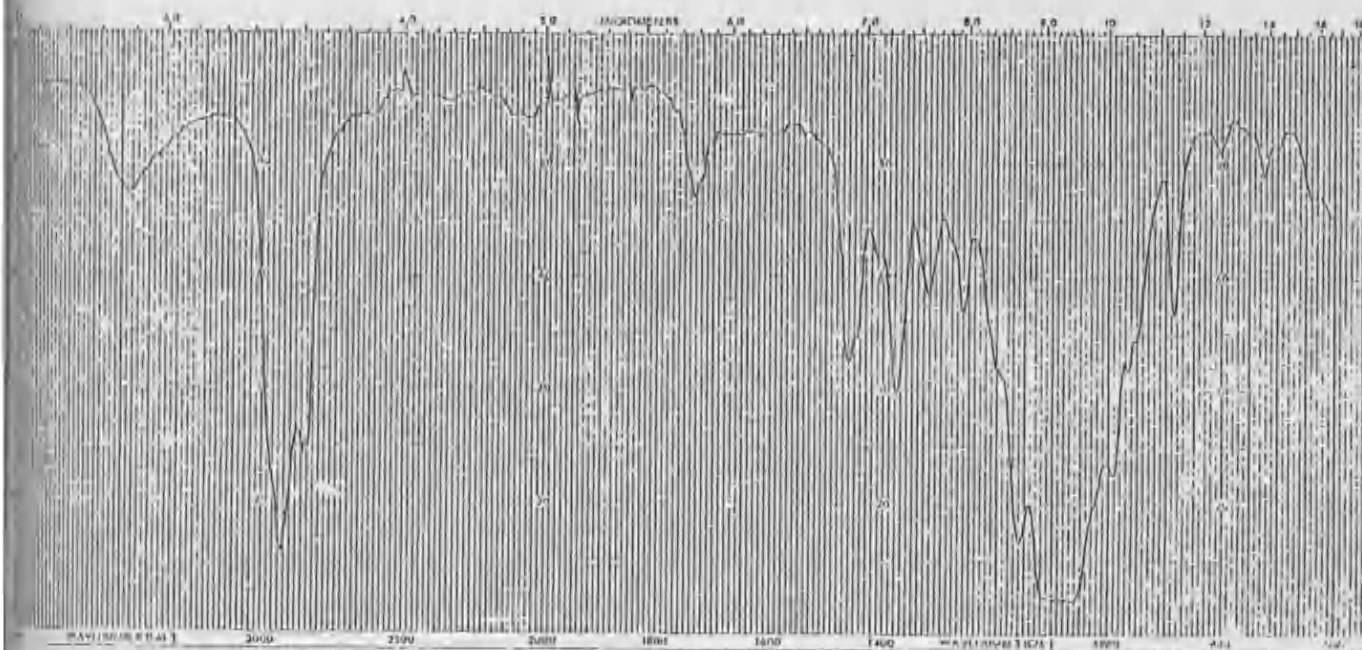


Fig.V.18. Espectro de IR de la hemicelulosa metilada y reducida.

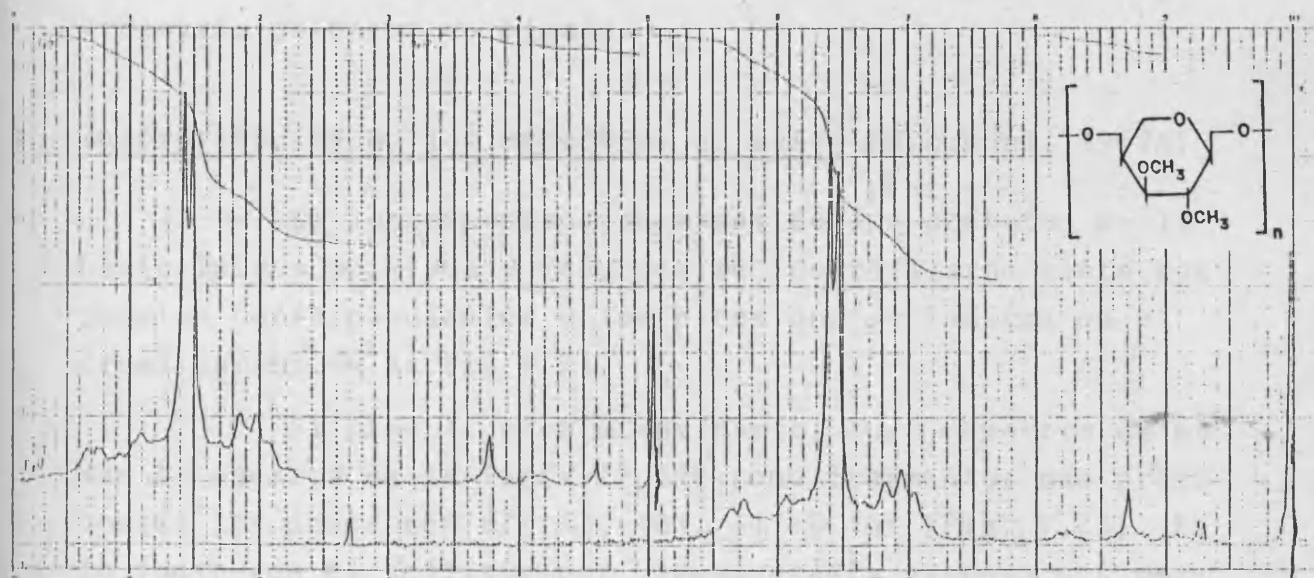


Fig.V.19. Espectro de RMN de la hemicelulosa metilada y reducida.

El pico 3 del cromatograma, pico mayoritario, cuyo espectro de masas se muestra en la Fig. V.24, tiene como

V.4.3.2. Identificación de los monosacáridos parcialmente metilados.

Con los monosacáridos parcialmente metilados, obtenidos en la hidrólisis ácida, se formaron los correspondientes acetatos de alditoles, de la forma acostumbrada.

a) Análisis por cromatografía gaseosa

Estos acetatos de alditoles parcialmente metilados se analizaron y cuantificaron por cromatografía gaseosa utilizando el 1,5-di-O-acetil-2,3,4,6-tetra-O-metil-D-glucitol como azúcar patrón de referencia. En la tabla V.5 se dan los tiempos de retención de estos derivados relativos al azúcar patrón así como el porcentaje relativo de cada uno en la mezcla. En la Fig.V.20 se muestra el cromatograma obtenido.

b) Análisis por cromatografía gaseosa-espectrometría de masas

La identidad de los acetatos de alditoles parcialmente metilados se confirma por cromatografía gaseosa-espectrometría de masas combinada.

Interpretación de los espectros de masas (Björndal, 1967A)

De los espectros de masas de los acetatos de la hemicelulosa metilada y reducida se identificaron cinco compuestos correspondientes a los picos que se indican en el cromatograma de la Fig.V.21.

El pico 1, pico minoritario, cuyo espectro de masas se muestra en la Fig.V.22, dió como fragmentos mas prominentes los iones con m/e 43, 101, 117 y 161 (Fig. V.23). Esto junto con el análisis por cromatografía gaseosa nos permitió identificarlo como el compuesto 1,5-di-O-acetil-2,3,4-tri-O-metil-D-Xilitol.

El pico 2 del cromatograma, pico mayoritario, cuyo espectro de masas se muestra en la Fig. V.24, tiene como

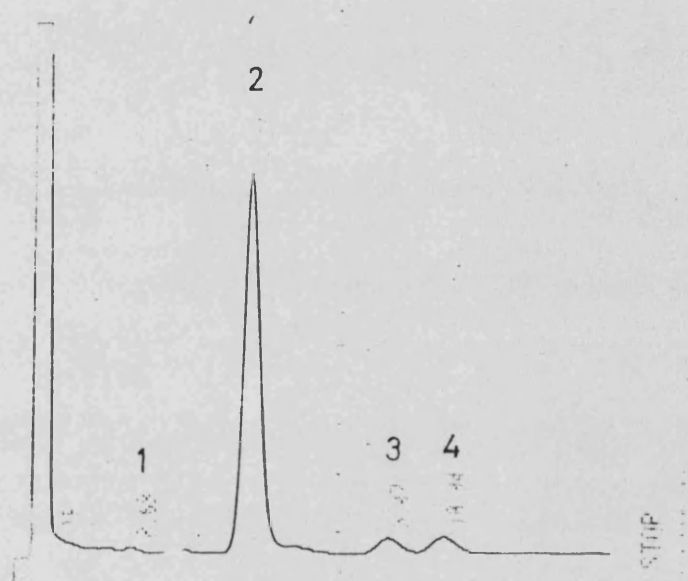


Fig.V.20. Cromatografía gaseosa de los acetatos de alditoles de los azúcares metilados obtenidos del hidrolizado de la hemicelulosa metilada y reducida en una columna ECNSS-M a 175° . Picos: 1) 2,3,4- Me_3 -Xi; 2) 2,3- Me_2 -Xi; 3) 2,3,6- Me_3 -Glu y 2,3,4- Me_3 -Glu y 4) 3-Me-Xi.

TABLA V.5.

Eteres metílicos del hidrolizado de la hemicelulosa metilada (A) y metilada y reducida (B)

Azucar ^a	t _R ^c	t _R ^b	%Area	
			A	B
2,3,4-Me ₃ Xi	0,76	0,66	-	0,43
2,3-Me ₂ Xi	0,93	1,43	68,13	87,16
2,3,6-Me ₃ Glu	1,17	2,35	-	2,34
2,3,4-Me ₃ Glu	1,20	2,35	-	3,31
3-Me-Xi	1,08	2,71	4,13	6,74

^a 2,3,4-Me₃Xi= a 1,5-di-O-acetil-2,3,4-tri-O-metil-D-xilitol.

^b Tiempos de retención de los correspondientes acetatos de alditioles, relativos al del 1,5-di-O-acetil-2,3,4,6-tetra-O-metil-D-glucitol (t_R 4,04) en una columna ECNSS-M a 175°C.

^c Idem en una columna capilar OV-1

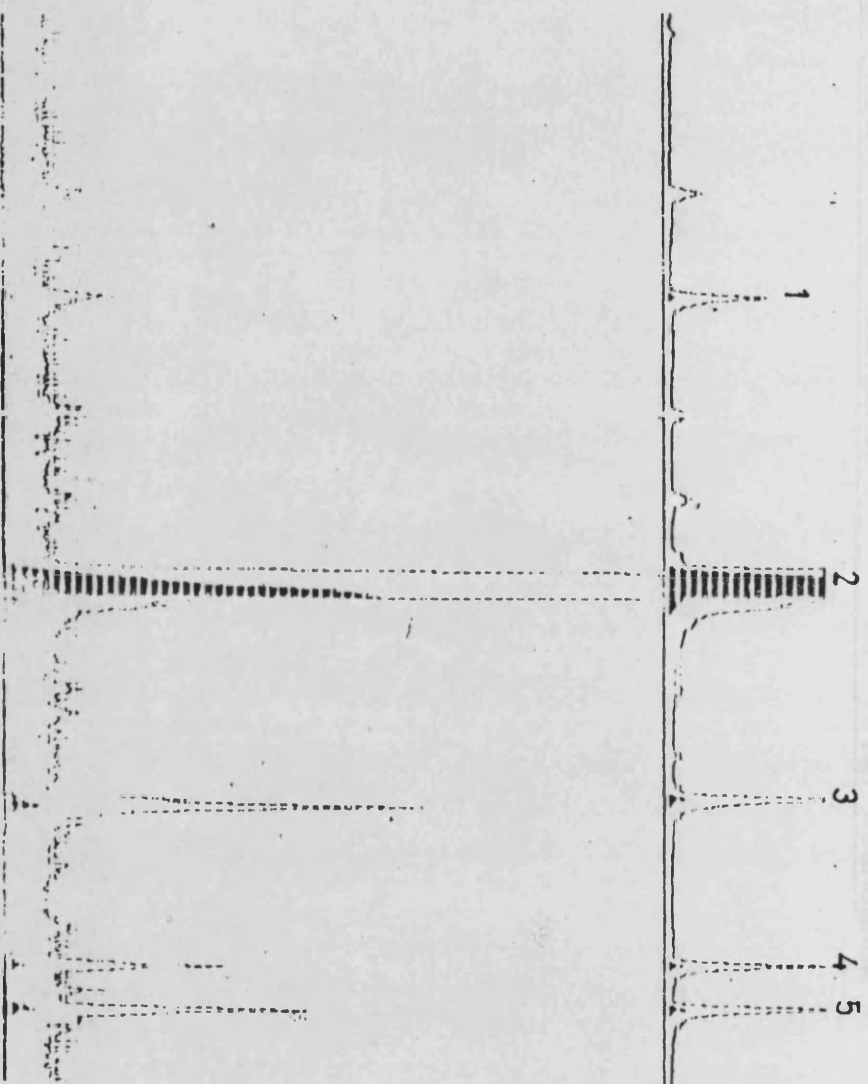
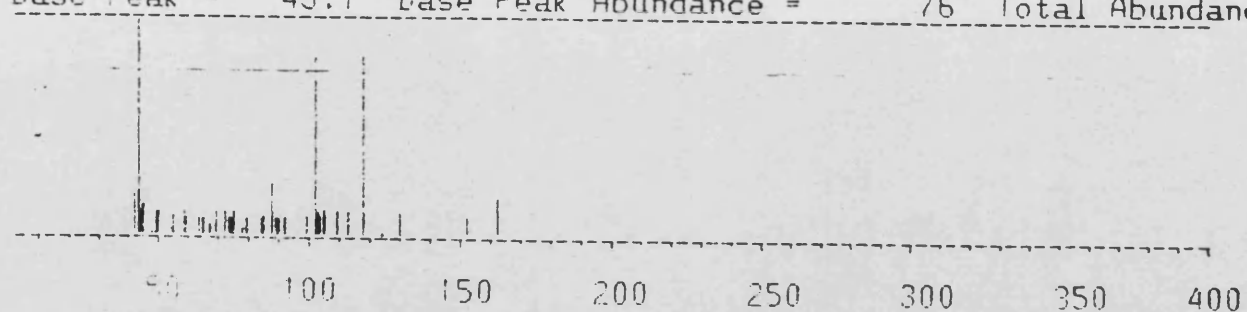


Fig. V. 21. Chromatografía gaseosa de los acetatos de alditoles parcialmente metilados procedentes de la hemicelulosa metilada y reducida, en una columna capilar OV-1 a 120-220° a 8°/mín. Chromatogramma inferior registrado según el ión total y el superior según el ión de m/e 117. Picos: 1) 2,3,4-Me₃-Xí; 2) 2,3-Me₂-Xí; 3) 3-Me-Xí 4) 2,3,6-Me₃Glu y 5) 2,3,4-Me₃-Glu.

Base Peak = 43.1 Base Peak Abundance = 76 Total Abundance = 470

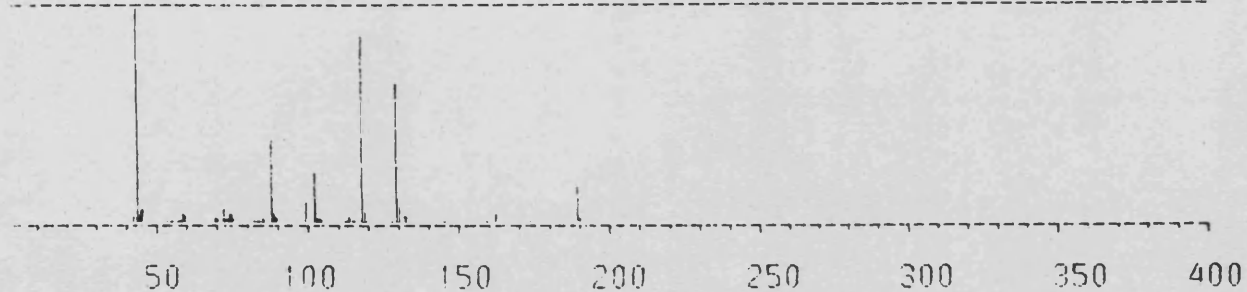


Lower Abundance Cutoff Level = 5.0%

MASS	ABUNDANCE (%)	MASS	ABUNDANCE (%)	MASS	ABUNDANCE (%)
41.1	19.7	66.5	5.3	91.1	9.2
43.1	100.0	68.8	10.5	99.5	9.2
44.0	10.5	71.0	10.5	101.0	82.9
45.2	14.5	72.9	7.9	102.3	10.5
48.9	10.5	73.8	7.9	103.1	9.2
49.9	10.5	75.0	10.5	104.8	11.8
54.8	9.2	79.0	7.9	108.8	11.8
58.0	10.5	84.0	7.9	112.6	10.5
59.0	7.9	84.7	9.2	117.1	82.9
62.8	7.9	87.1	23.7	129.9	10.5
63.3	6.6	89.1	7.9	151.1	9.2
65.1	7.9	89.9	7.9	161.0	18.4

Fig.V.22. Espectro de masas del 1,5-di-O-acetil-2,3,4-tri-O-metil-D-xilitol.

Base Peak = 43.0 Base Peak Abundance = 3821 Total Abundance = 16443

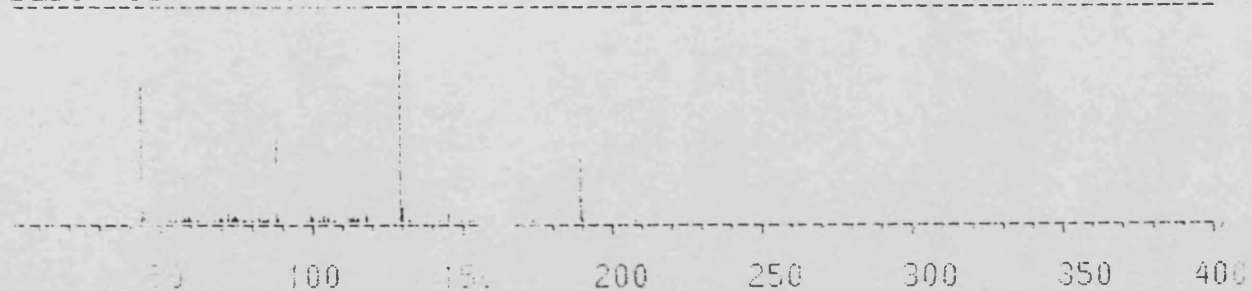


Lower Abundance Cutoff Level = 5.0%

MASS	ABUNDANCE (%)	MASS	ABUNDANCE (%)	MASS	ABUNDANCE (%)
43.0	100.0	99.1	9.5	129.1	64.1
45.1	5.9	101.1	23.3	130.1	7.4
71.0	5.9	117.1	86.1	189.1	16.8
87.0	38.2				

Fig. V.24. Espectro de masas del 1,4,5-tri-O-acetil-2,3-di-O-metil-D-xilitol.

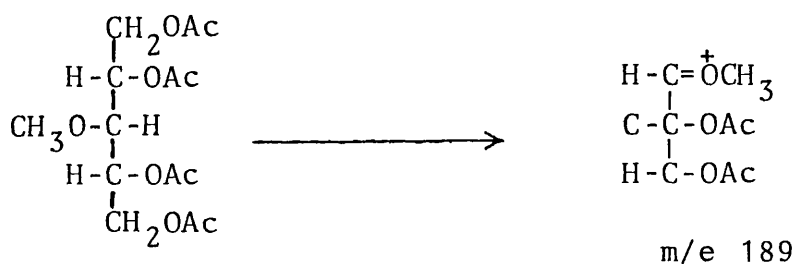
Base Peak = 129.1 Base Peak Abundance = 608 Total Abundance = 2060



Lower Abundance Cutoff Level = 5.0%

MASS	ABUNDANCE (%)	MASS	ABUNDANCE (%)	MASS	ABUNDANCE (%)
43.0	64.8	117.1	5.3	130.1	7.4
44.1	6.1	129.1	100.0	189.1	29.4
87.1	37.7				

Fig.V.25. Espectro de masas del 1,2,4,5-tetra-O-acetil-3-O-metil-D-xilitol.



El fragmento primario m/e 189 lo dan los alditoles acetilados en las posiciones 1 y 2 y metilados en la 3. A partir de este fragmento se origina el fragmento secundario m/e 129 por eliminación de ácido acético según la transposición de McLafferty (Golovkina, 1968), y éste posteriormente puede eliminar una molécula de cetena para dar m/e 87.

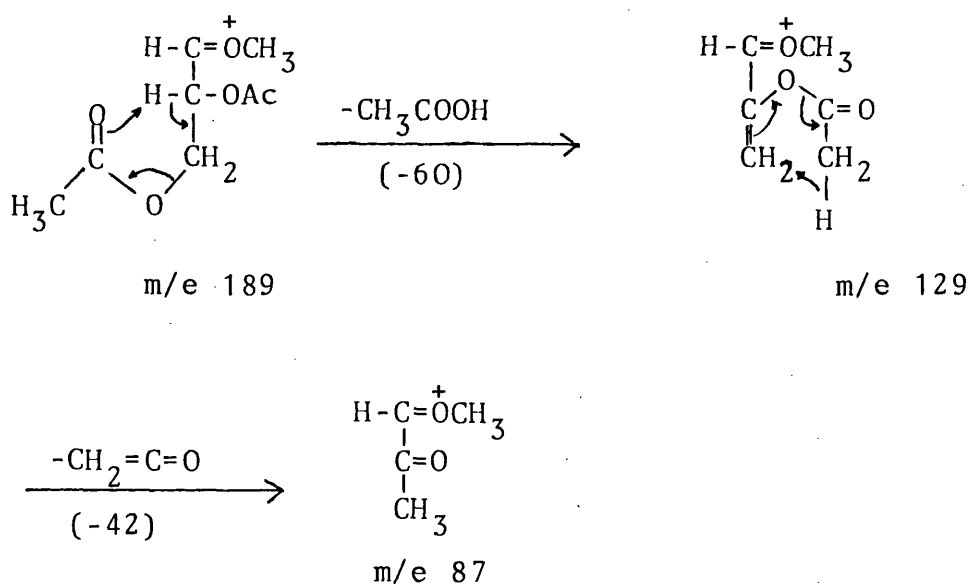
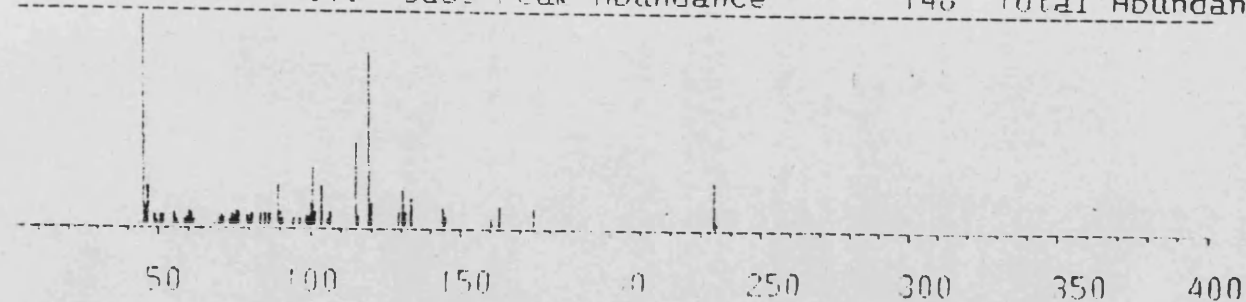


Fig.V.26. Fragmentación del acetato de 3,0-metil-D-xilitol.

Base Peak = 43.0 Base Peak Abundance = 148 Total Abundance = 923

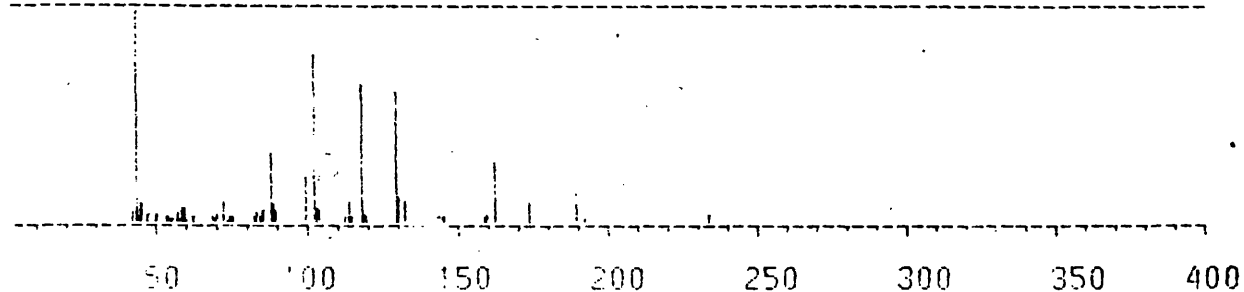


Lower Abundance Cutoff Level = 5.0%

MASS	ABUNDANCE (%)	MASS	ABUNDANCE (%)	MASS	ABUNDANCE (%)
43.0	100.0	79.1	6.1	113.1	38.5
44.0	9.5	80.9	6.1	117.1	81.8
45.1	17.6	82.9	6.1	118.0	10.8
49.7	5.4	85.0	6.1	127.1	6.8
52.9	6.1	87.1	18.9	129.1	16.9
58.5	7.4	88.0	7.4	130.0	7.4
59.1	6.1	95.8	6.1	131.1	12.8
69.0	5.4	97.1	5.4	142.1	8.8
72.0	6.1	98.2	10.8	143.0	5.4
72.9	5.4	99.0	27.0	161.1	10.1
73.9	6.8	100.2	6.8	173.1	8.8
75.6	6.8	101.1	18.9	233.1	22.3
77.0	5.4	105.0	6.8		

Fig.V.27. Espectro de masas del 1,4,5-tri-O-acetil-2,3,6-tri-O-metil-D-glucitol.

Base Peak = 43.0 Base Peak Abundance = 201 Total Abundance = 1310



Lower Abundance Cutoff level = 5.0%

MASS	ABUNDANCE (%)	MASS	ABUNDANCE (%)	MASS	ABUNDANCE (%)
41.0	7.5	87.1	31.8	117.1	64.7
43.0	100.0	88.1	3.0	129.1	60.7
45.0	9.5	89.1	5.0	130.1	11.9
55.1	5.5	99.0	49.8	131.1	10.0
58.0	7.5	101.1	78.1	161.1	28.4
69.0	7.0	102.1	7.0	173.1	10.0
71.0	10.4	103.0	6.5	189.1	18.4
85.0	6.0	113.4	10.0		

Fig.V.28. Espectro de masas del 1,5,6-tri-O-acetil-2,3,4-tri-O-metil-D-glucitol.

fragmentos mas prominentes los iones con m/e 43, 87, 101, 117, 129 y 189 (Fig. III.27), lo que, junto con la cromatografía gaseosa, nos permitió identificarlo como el compuesto 1,4,5-tri-O-acetil-2,3-di-O-metil-D-xilitol.

El pico 3 del cromatograma, cuyo espectro de masas se muestra en la Fig.V.25, dió como fragmentos mas prominentes los iones con m/e 43, 87, 129 y 189 (Fig.V.17), lo que, junto con el análisis por cromatografía gaseosa, nos permitió identificarlo como el compuesto 1,2,4,5-tetra-O-acetil-3-O-metil-D-xilitol.

El pico 4 del cromatograma, pico minoritario, cuyo espectro de masas se muestra en la Fig.V.26 dió como fragmentos primarios los iones con m/e 45, 117 y 233, y como secundarios los iones con m/e 43, 87, 101 y 117 (Fig.III.29), lo que, junto con la cromatografía gaseosa, nos permitió identificarlo como el compuesto 1,4,5-tri-O-acetil-2,3,6-tri-O-metil-D-glucitol.

El pico 5 del cromatogra, cuyo espectro de masas se muestra en la Fig.V.27, dió como fragmentos mas importantes los iones con m/e 43, 87, 99, 101, 117, 129, 161 y 189 (Fig.V.28), lo que, nos permitió identificarlo como el compuesto 1,5,6-tri-O-acetil-2,3,4-tri-O-metil-D-glucitol.

Estos dos últimos compuestos, es decir, el 1,4,5-tri-O-acetil-2,3,6-tri-O-metil-D-glucitol y el 1,5,6-tri-O-acetil-2,3,4-tri-O-metil-D-glucitol dan un único pico en la columna ECNSS-M pero se separan con la columna capilar OV-1.

La presencia del compuesto 1,4,5-tri-O-acetil-2,3-di-O-metil-D-xilitol indica que el polisacárido está formado por una cadena fundamental de xilosa con enlaces (1→4). El compuesto 1,5-di-O-acetil-2,3,4-tri-O-metil-D-xilitol se encontrará como resto terminal no reductor del polisacárido. La presencia del compuesto 1,2,4,5-tetra-O-acetil-3-O-metil-D-xilitol indica que ciertas unidades de la cadena de xilosa portan sustituyentes en el hidroxilo del carbono 2.

La presencia del 1,5,6-tri-O-acetil-2,3,4-tri-O-metil-D-glucitol en la hemicelulosa metilada y reducida y la ausencia del mismo en la solamente metilada, indica que este compuesto procede de la reducción del éster metílico del ácido glucurónico; presente en aquélla y posterior formación del acetato de alditol. Por tanto, el ácido glucurónico estará unido a la cadena principal de xilosa con enlaces $\alpha(1\rightarrow2)$.

La presencia del compuesto 1,4,5-tri-O-acetil-2,3,6-tri-O-metil-D-glucitol indica la presencia de una cadena de unidades de glucosa con uniones $(1\rightarrow4)$, es decir hay una pequeña cantidad de celulosa que impurifica el polisacárido.

V.5. Caracterización del ácido 4-O-metil-D-glucurónico.

El ácido 4-O-metil-D-glucurónico se caracterizó por transformación en el 1,2,3,5,6-penta-O-acetil-4-O-metil-D-glucitol a través de la aldolactona (Tejero, 1984).

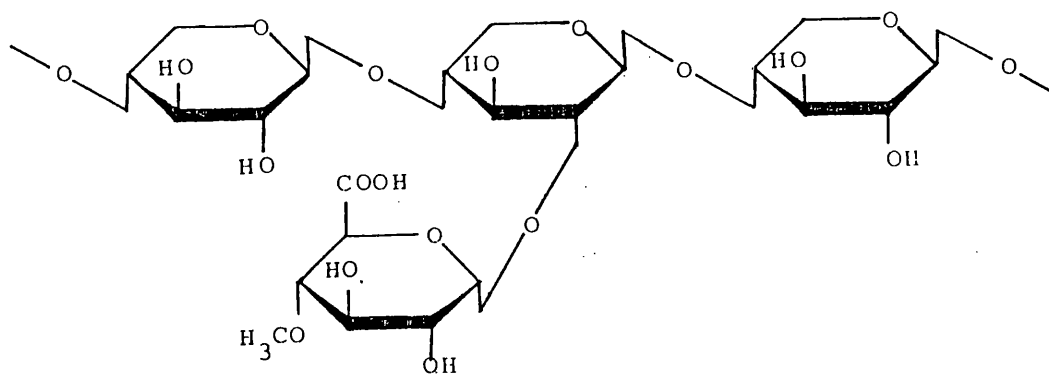
La hemicelulosa se hidrolizó parcialmente con ácido H_2SO_4 0,25N; del hidrolizado se separaron los componentes ácidos por intercambio iónico con las resinas Amberlita IR-120(H^+) e IRA-400(AcO^-). Estos componentes ácidos -ácido urónico, aldobiurónico y superiores-, se hidrolizaron con ácido H_2SO_4 del 72%, se redujeron con borohidruro de sodio a ácidos aldónicos y se formó la aldolactona con ácido HCl 1,2 N. A continuación se formaron los correspondientes acetatos de alditoles para su posterior análisis cromatográfico.

Por cromatografía gaseosa de estos derivados, en una columna ECNSS-M a $185^\circ C$, se identificaron la xilosa y el ácido 4-O-metil-D-glucurónico. El tiempo de retención del pentaacetato de xilitol fué de 31,28 minutos y el del 1,2,3,5,6-penta-O-acetil-4-O-metil-D-glucitol de 71,8 minutos. El tiempo de retención de estos compuestos relativo

al 1,5-di-O-acetil-2,3,4,6-tetra-O-metil-D-glucitol fué de 4,93 y 11,8 respectivamente. El descrito en la bibliografía para este último compuesto es de 11,5 (Churms, 1982).

Luego, en base al análisis de metilación de la hemicelulosa y con la caracterización del ácido 4-O-metil-D-glucurónico se concluye que la hemicelulosa está formada por una cadena lineal de unidades de D-xilopiranosas con uniones $\beta(1\rightarrow4)$ y el ácido 4-O-metil-D-glucurónico se une a esta cadena a través del hidroxilo del carbono 2 de la xilosa, es decir, con uniones $\alpha(1\rightarrow2)$.

Se propone la siguiente estructura para la hemicelulosa:



VI. HEMICELULOSAS A Y B

VI.1. Extracción alcalina de la hemicelulosa. Hemicelulosas A y B.

a) Extracción con NaOH al 10%

Se siguió el procedimiento descrito por Whistler y colaboradores (Whistler, 1965). La holocelulosa se extrajo con una solución de NaOH al 10%, libre de carbonatos, por lo que se desoxigenó pasando nitrógeno. La extracción se realizó con agitación a temperatura ambiente y en atmósfera de nitrógeno. La eliminación del oxígeno durante la extracción alcalina minimiza la degradación oxidativa de la hemicelulosa. El residuo se separó por filtración a través de tela sobre un embudo Büchner. En el filtrado transparente y claro se encuentran las hemicelulosas A y B. En la Fig.VI.1, se ha resumido este proceso de separación.

VI.2. Aislamiento de la hemicelulosa A

El extracto alcalino se acidificó con ácido acético acuoso al 50% y precipitó la hemicelulosa A. Esta se separó por centrifugación y se lavó varias veces con agua. Una vez seca se obtuvo un sólido blanco pulverulento que representó un 25,11% respecto a la holocelulosa.

VI.2.1. Hidrólisis ácida

Para la determinación de los monosacáridos que constituyen la hemicelulosa A se realizó una prehidrólisis ácida con ácido sulfúrico del 72% seguido de una hidrólisis con ácido sulfúrico 1N calentando a reflujo.

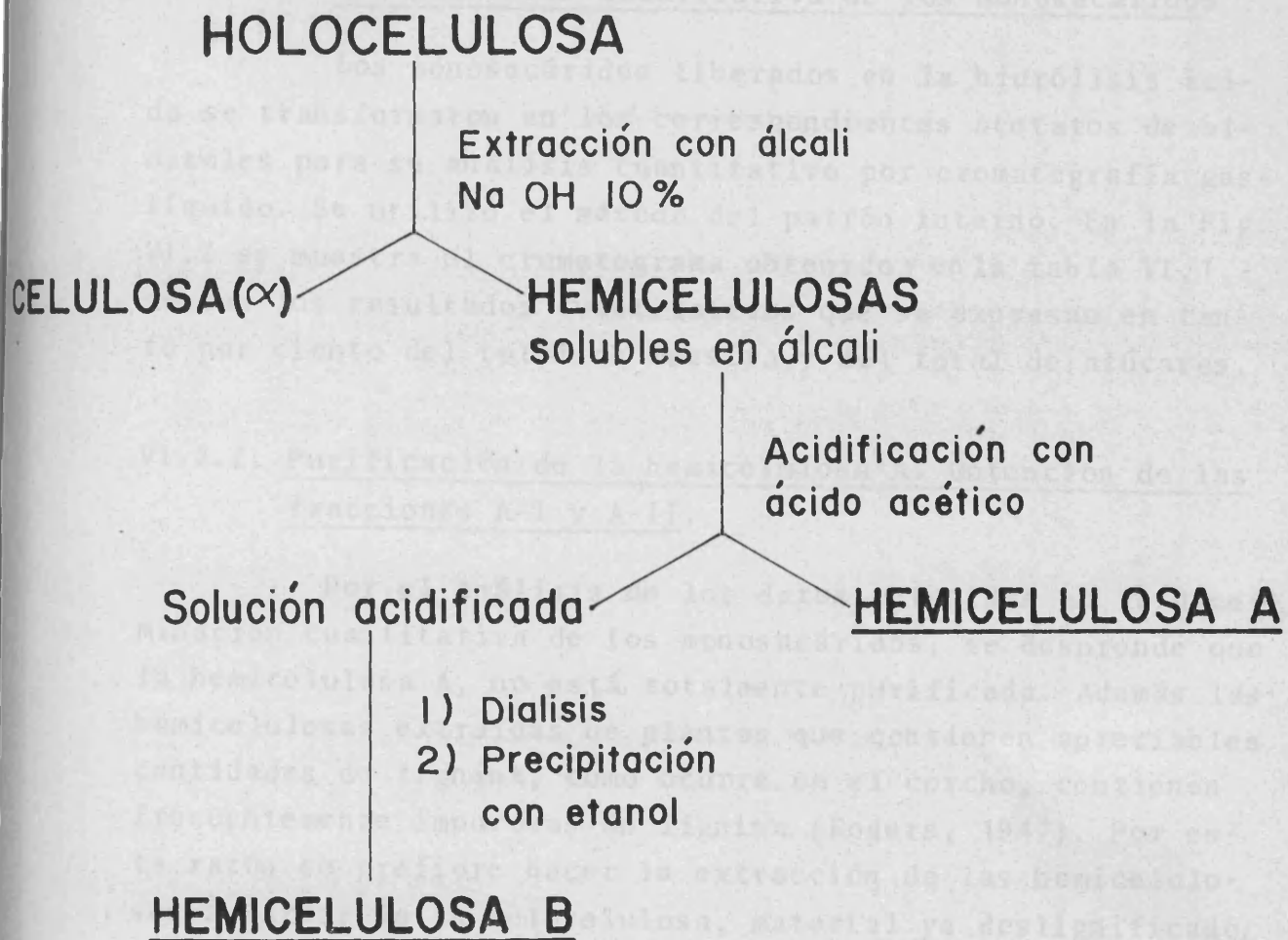


Fig. VI.1. Esquema del Aislamiento de la hemicelulosa A, hemicelulosa B y celulosa.

VI.2.1.1. Determinación cuantitativa de los monosacáridos

Los monosacáridos liberados en la hidrólisis ácida se transformaron en los correspondientes acetatos de alditoles para su análisis cuantitativo por cromatografía gas-líquido. Se utilizó el método del patrón interno. En la Fig. VI.2 se muestra el cromatograma obtenido y en la tabla VI.1 se dan los resultados cuantitativos que se expresan en tanto por ciento del total de muestra y del total de azúcares.

VI.2.2. Purificación de la hemicelulosa A. Obtención de las fracciones A-I y A-II.

Por el análisis de los datos obtenidos en la determinación cuantitativa de los monosacáridos, se desprende que la hemicelulosa A, no está totalmente purificada. Además las hemicelulosas extraídas de plantas que contienen apreciables cantidades de lignina, como ocurre en el corcho, contienen frecuentemente impurezas de lignina (Rogers, 1947). Por esta razón se prefiere hacer la extracción de las hemicelulosas a partir de la holocelulosa, material ya deslignificado, que del producto de partida no tratado (Norman, 1937).

La purificación de la hemicelulosa A se hizo mediante la formación de complejos insolubles de cobre, ya que estos precipitan de forma selectiva con los polisacáridos que contienen xilosa (McDonal, 1952; Hirst, 1955; Aspinall, 1953 y 1954; Ehrenthal, 1954; Salkowski, 1901). Se siguió el método descrito por Jones y Stoodley (Jones, 1965).

La hemicelulosa A se disolvió en hidróxido potásico al 5% y se añadió solución de Fehling hasta que la precipitación del complejo azul de cobre fue completa. Un exceso de solución de Fehling puede redissolver el precipitado. El precipitado, ahora de color blanco, se separó por centrifugación y se lavó con etanol, y luego con acetona hasta que dió negativo el test de los cloruros. Los cloruros de cobre(II) disueltos en acetona dan una intensa solución amarilla. A

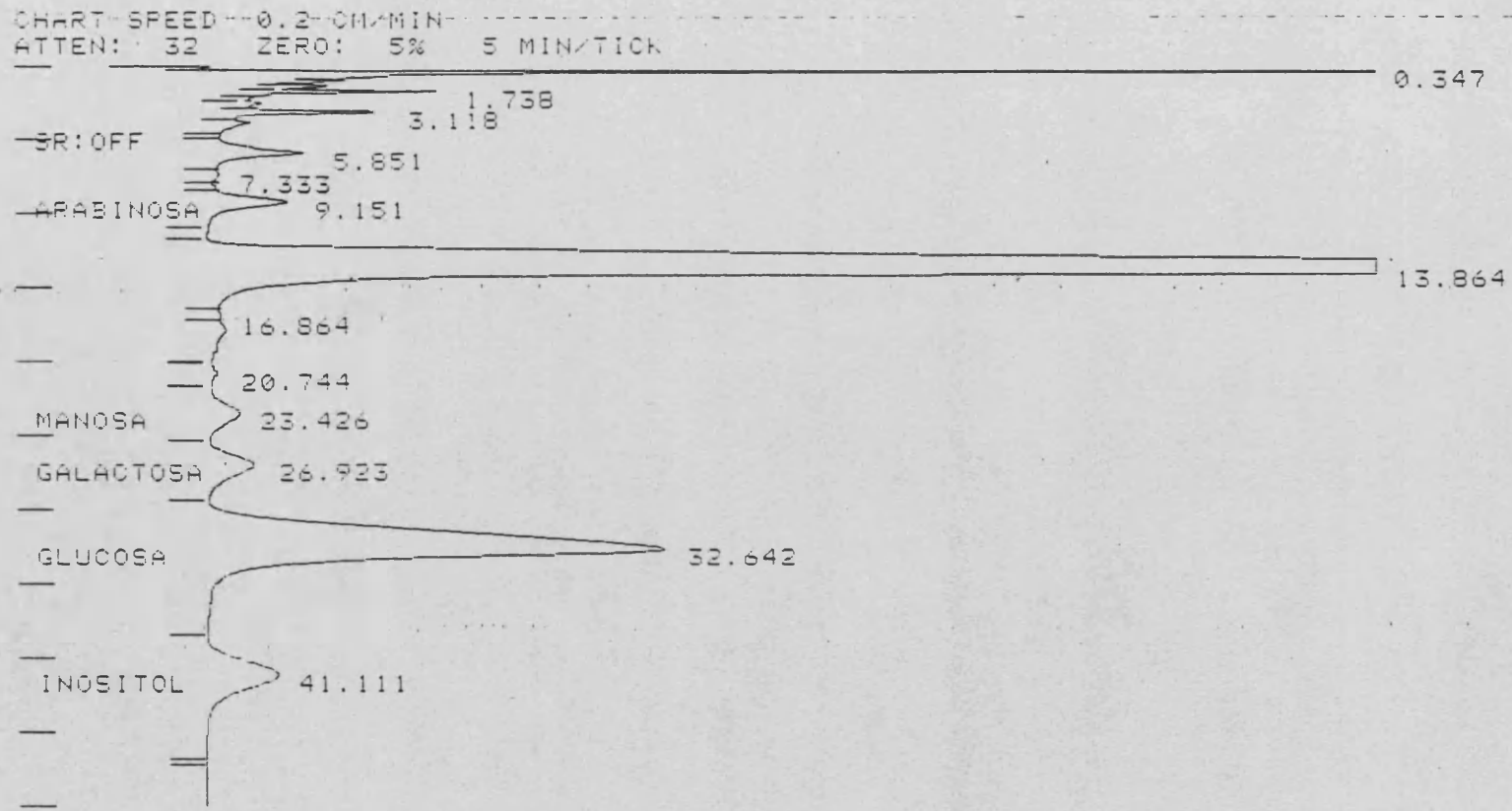


Fig. VI.2. Cromatografía gaseosa de los acetatos de aldito-
 les precedentes de la hidrólisis de la hemicelulosa A. Temperatura de la columna 185°.

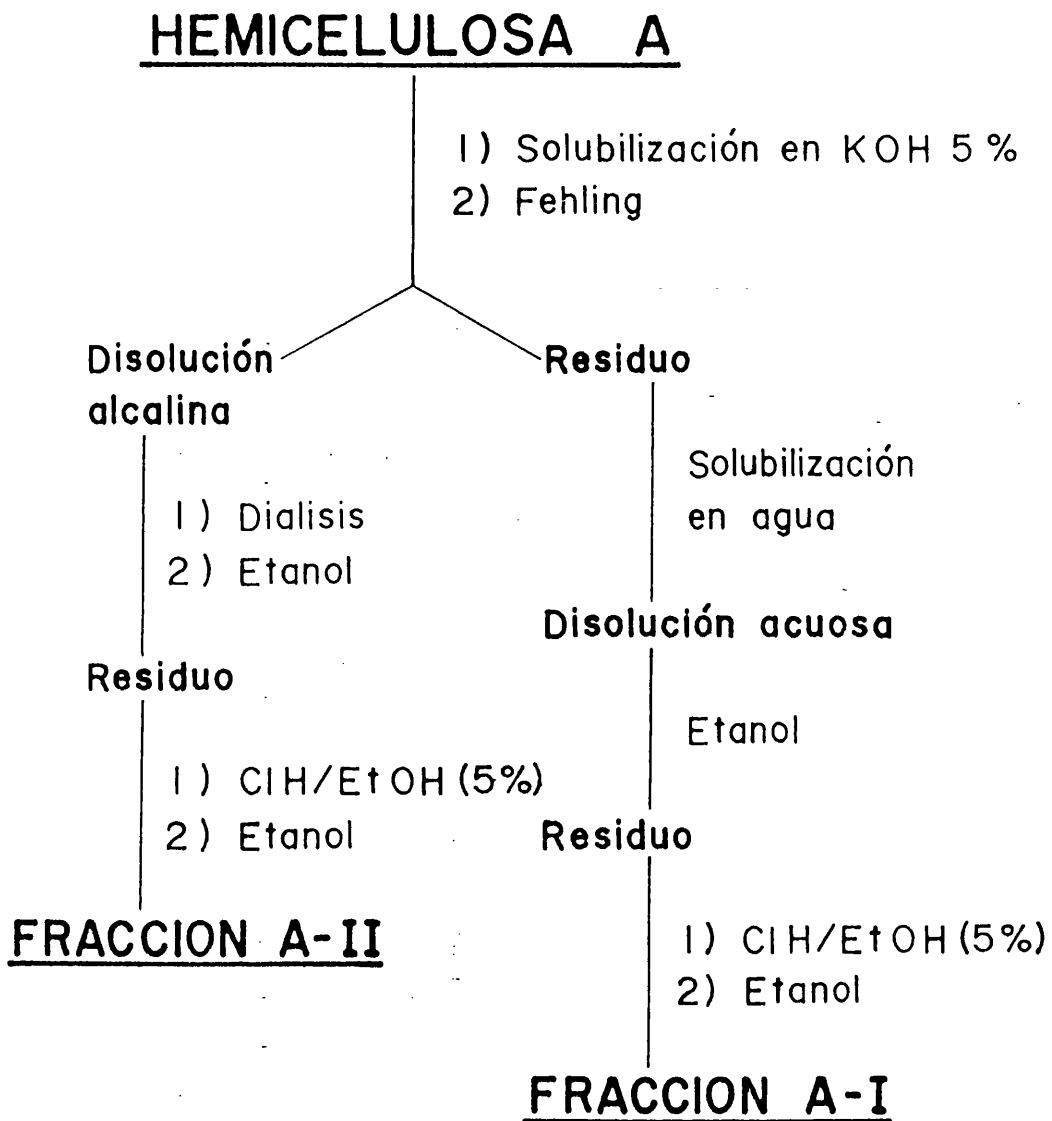


Fig.VI.3. Fraccionamiento de la hemicelulosa A.

este polisacárido purificado se le llamó fracción A-I.

La solución que quedó al centrifugar el complejo de cobre se dializó contra agua destilada. Por adición a esta solución dializada de cuatro volúmenes de etanol se obtuvo un precipitado que se separó por centrifugación; se lavó con etanol y se secó en desecador. Se obtuvo un sólido ligeramente coloreado (verde) que se llamó fracción A-II, que representa un 1,61% respecto a la hemicelulosa A. Estos procesos se resumen en la Fig.VI.3.

VI.6.3. ESTUDIO DE LA FRACCION A-I.

Se caracterizó la fracción A-I primeramente por espectroscopía infrarroja y a continuación por análisis químico.

VI.3.1. Datos espectroscópicos

Su espectro de IR (Fig.VI.4) presentó las siguientes bandas características: banda ancha entre 3600 a 3200 cm^{-1} de tensión de O-H asociado intermolecularmente; banda a 2920 cm^{-1} de tensión de C-H alifático y banda ancha a 1050 cm^{-1} de tensión C-O de alcohol.

VI.3.2. Hidrólisis ácida total

La hidrólisis ácida del polisacárido se realizó con ácido H_2SO_4 del 72% con agitación a 30° durante una hora y luego se diluyó el ácido y se calentó a reflujo cuatro horas. El hidrolizado se neutralizó con carbonato de bario y se desionizó a través de la resina Amberlita IR-120(H^+).

Con los monosacáridos así liberados se formaron los correspondientes acetatos de sus alditoles, de la forma acostumbrada, para proceder a su análisis cuantitativo.

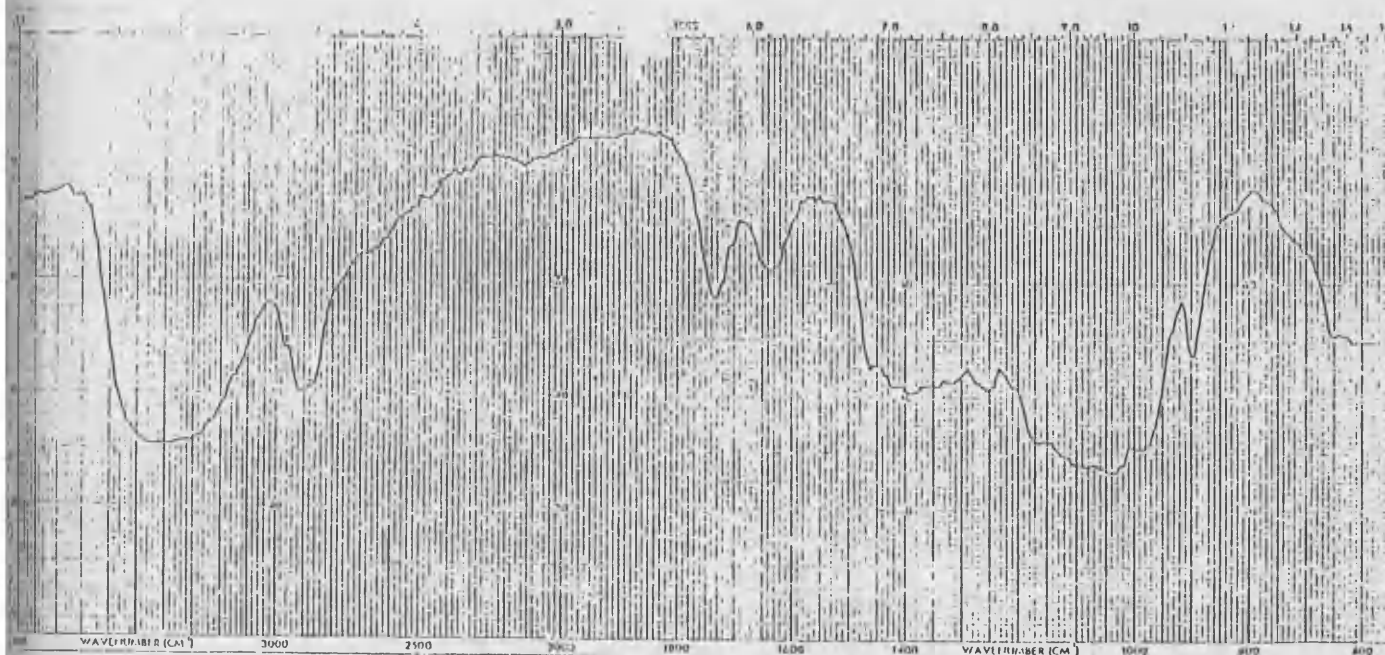


Fig.VI.4. Espectro de IR de la fracción A-I.

VI.3.2.1. Determinación cuantitativa de los monosacáridos

Se realizó el análisis cuantitativo por cromatografía gas-líquido de los correspondientes acetatos de alditoles. Se utilizó el método del patrón interno. En la Fig.VI.5a se muestra el cromatograma obtenido y en la tabla VI.2 se dan los resultados cuantitativos de estos análisis, que se expresan en tanto por ciento del total de muestra y del total de azúcares.

Estos resultados, junto con los obtenidos en la tabla VI.7 y que se explicarán más adelante, fueron indicativos de que los azúcares que acompañan a la xilosa en la fracción A-I no forman parte del polisacárido de xilosa. Para su comprobación se volvió a obtener la fracción A-I, de igual forma que la vez anterior pero repitiendo el proceso de purificación. La composición monomérica de esta fracción A-I purificada se realizó, igualmente, por cromatografía gaseosa de los acetatos de alditoles y los resultados obtenidos se indican en la tabla VI.1 y en la Fig.VI.5b se muestra el

TABLA VI.1.

Datos analíticos de la hemicelulosa A, fracción A-I y fracción A-II.

	Hemicelulosa A	Fracción(A-I) purificada	Fracción(A-II)
Rendimiento(%) ^a	4,43	48,54	1,61
Total de azúcares(%) ^b	44,53	46,89	26
Poder rotatorio ^c		-61,46	
Azúcares(%)			
Ramposa	1,45(0,65)	1,02(0,47)	-
Arabinosa	1,56(0,69)	0,69(0,32)	45,39(11,8)
Xilosa	67,92(30,24)	95,22(44,67)	25,46(6,62)
Manosa	1,12(0,5)	-	-
Galactosa	1,81(0,81)	2,09(0,97)	6,5(1,70)
Glucosa	26,14(11,64)	0,99(0,46)	22,61(5,88)

^aEl rendimiento de la hemicelulosa A está referido al corcho extraído. Los rendimientos de las fracciones A-I y A-II están referidos a la hemicelulosa A.

^bLos valores entre paréntesis se refieren al porcentaje de azúcares en la muestra.

^cEl poder rotatorio se ha realizado en NaOH al 1% (c=0,0048).

CHART SPEED 0.2 CM/MIN
ATTEN: 64 ZERO: 5% 5 MIN/TICK

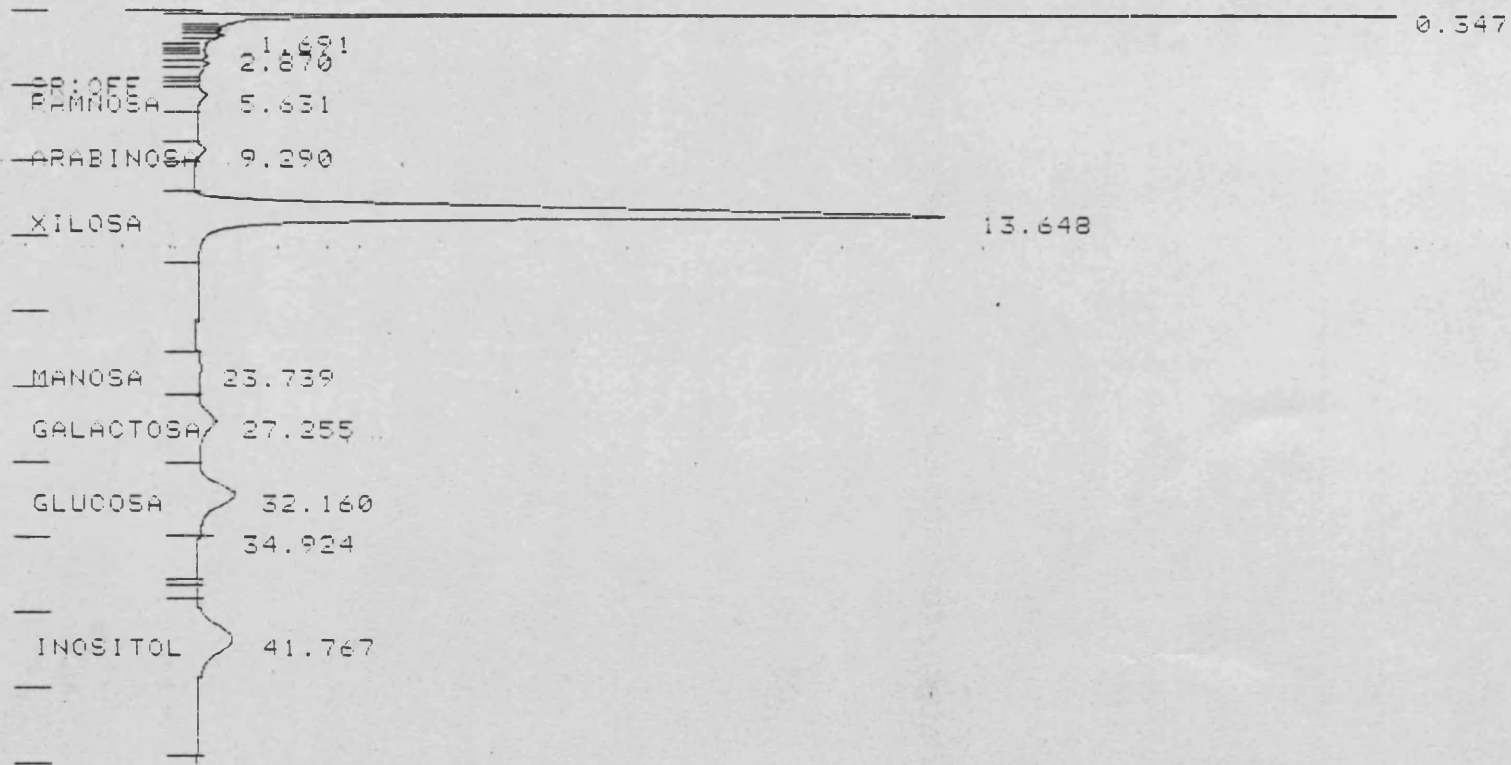


Fig. VI.5a. Cromatografía gaseosa de los acetatos de aldihdoles procedentes de la hidrólisis de la fracción A-1. Temperatura de la columna 185°.

CHART SPEED 0.2 CM/MIN
ATTEN: 64 ZERO: 5% 5 MIN/TICK

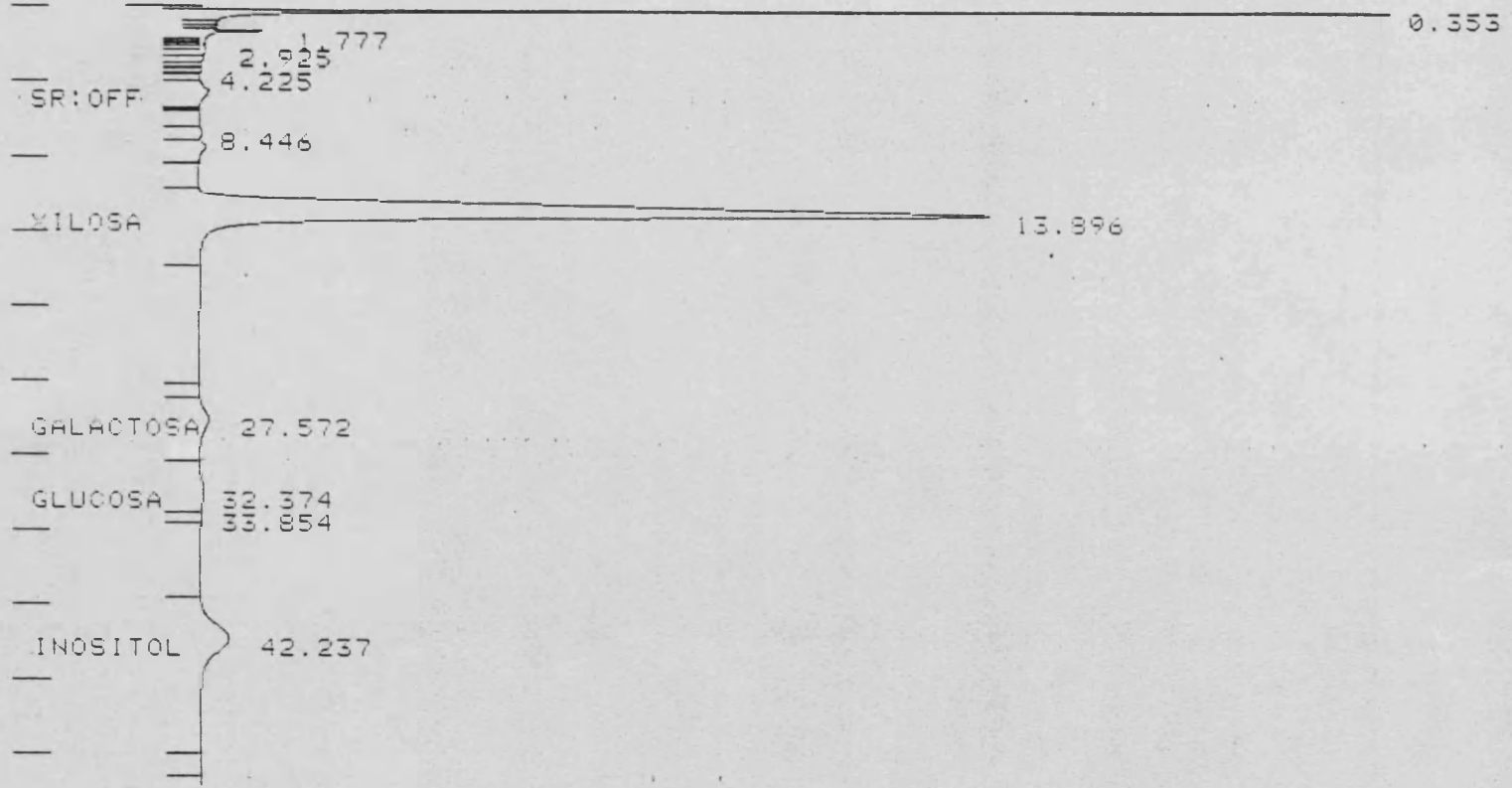


Fig. VI. 5b. Cromatografía gaseosa de los acetatos de
alditoles procedentes de la hidrólisis de
la fracción A-I. Temperatura de la columna
185°.



cromatograma obtenido. Dada la composición de la fracción A-I (95% xilosa) se puede considerar como un polisacárido del grupo de las xilanas, que forman parte de las hemicelulosas presentes en las plantas.

TABLA VI.2

Monosacáridos de la fracción A-I determinados a través de los acetatos de alditoles.

Azúcares	%Azúcares ^a
Ramnosa	0,71 (0,67)
Arabinosa	0,73 (0,69)
Xilosa	84,67 (80,14)
Manosa	0,57 (0,54)
Galactosa	3,63 (3,44)
Glucosa	9,65 (9,14)

^a Los valores entre paréntesis se refieren al porcentaje de azúcares en la muestra.

VI.3.3. Hidrólisis ácida parcial

El polisacárido se sometió a una hidrólisis ácida parcial a fin de obtener información sobre la ordenación de los azúcares. Se realizó con dos concentraciones diferentes del ácido sulfúrico 0,25N y 0,025N, utilizando el mismo procedimiento; es decir se calentó a reflujo durante 90 minutos (Gowda, 1980).

Los oligosacáridos formados se estudiaron por cromatografía de papel y cromatografía líquida de alta resolución.

VI.3.3.1. Análisis de los oligosacáridos por cromatografía sobre papel

Se aplicó la cromatografía sobre papel dada su eficacia para la separación e identificación de mezclas de azúcares (Lederer, 1957; Block, 1964).

Se utilizó la técnica descendente sobre papel Watman n°1 y n°3 usando tres desarrolladores (A,B,C) y como revelador se utilizó la difenilamina anilina.

Los resultados de las cromatografías de los oligosacáridos obtenidos en las hidrólisis parciales son coincidentes y, en ambas, se demostró la presencia de una serie homóloga de oligosacáridos de la xilosa.

Esto se comprobó aplicando la relación de movilidades cromatográficas propuestas por French y Wild. La movilidad en cromatografía sobre papel de una serie homóloga de oligosacáridos depende del número de moléculas de azúcar que contenga, lo que se manifiesta en una relación lineal entre el logaritmo de una función de partición α' ($\alpha' = R_F / 1 - R_F$) y el tamaño molecular, es decir, el grado de polimerización.

En la tabla VI.3 se comparan los valores de R_F , $\lg \alpha'$ y grado de polimerización (G.P.) encontrados para los distintos oligosacáridos originados en las hidrólisis ácidas parciales con el desarrollador A. En la tabla VI.4 se dan los valores de R_F , $\lg \alpha'$ y G.P., correspondientes a la hidrólisis parcial con ácido H_2SO_4 0,25N y utilizando los desarrolladores B y C.

La representación gráfica de los logaritmos de α' frente al grado de polimerización para el desarrollador A en ácido H_2SO_4 0,025N dió una recta de ecuación $\lg \alpha' = 0,487 C + 0,197$ con un coeficiente de regresión $r = -0,998$ y con ácido H_2SO_4 0,25N dió una recta de ecuación $\lg \alpha' = -0,484 C + 0,186$ con un coeficiente de regresión $r = -0,998$ como se muestran en la Fig. VI.6 y VI.7 respectivamente.

TABLA VI.3

Cromatografía sobre papel de la hidrólisis ácida parcial de la fracción A-I

Productos de hidrólisis	Desarrollador A					
	Hidrólisis H ₂ SO ₄ 0,25N			Hidrólisis H ₂ SO ₄ 0,025N		
	<u>R_f^a</u>	<u>log α'</u>	<u>G.P.</u>	<u>R_f^a</u>	<u>log α'</u>	<u>G.P.</u>
	0,005	-2,30	5	0,005	-2,30	5
	0,02	-1,69	4	0,02	-1,70	4
	0,05	-1,22	3	0,06	-1,22	3
	0,14	-0,79	2	0,15	-0,77	2
	0,23	-0,52	-	0,32	-0,33	1
	0,32	-0,33	1			

^a Papel Watman n° 1. Desarrollador A: acetato de etilo-ácido acético-ácido fórmico-agua (18:3:1:4), revelador difenilamina anilina; G.P.=grado de polimerización.

TABLA VI.4

Cromatografía sobre papel del hidrolizado ácido (H₂SO₄ 0,25N) de la fracción A-I

	Desarrollador B			Desarrollador C		
	R_f^a	$\log \alpha'$	G.P.	R_f^b	$\log \alpha'$	G.P.
Productos de hidrólisis	0,02	-1,69	5	0,014	-1,85	5
	0,06	-1,21	4	0,04	-1,39	4
	0,13	-0,82	3	0,12	-0,85	3
	0,22	-0,55	2	0,23	-0,52	2
	0,26	-0,45	-	0,36	-0,25	-
	0,43	-0,12	1	0,515	0,025	1

^a Papel Watman n° 1.

^b Papel Watman n° 3.

Desarrolladores: B, n-butanol-etanol-agua (2:1:1); C, n-butanol-piridina-agua (6:4:3). Revelador: difenilamina anilina; G.P.=Grado de polimerización.

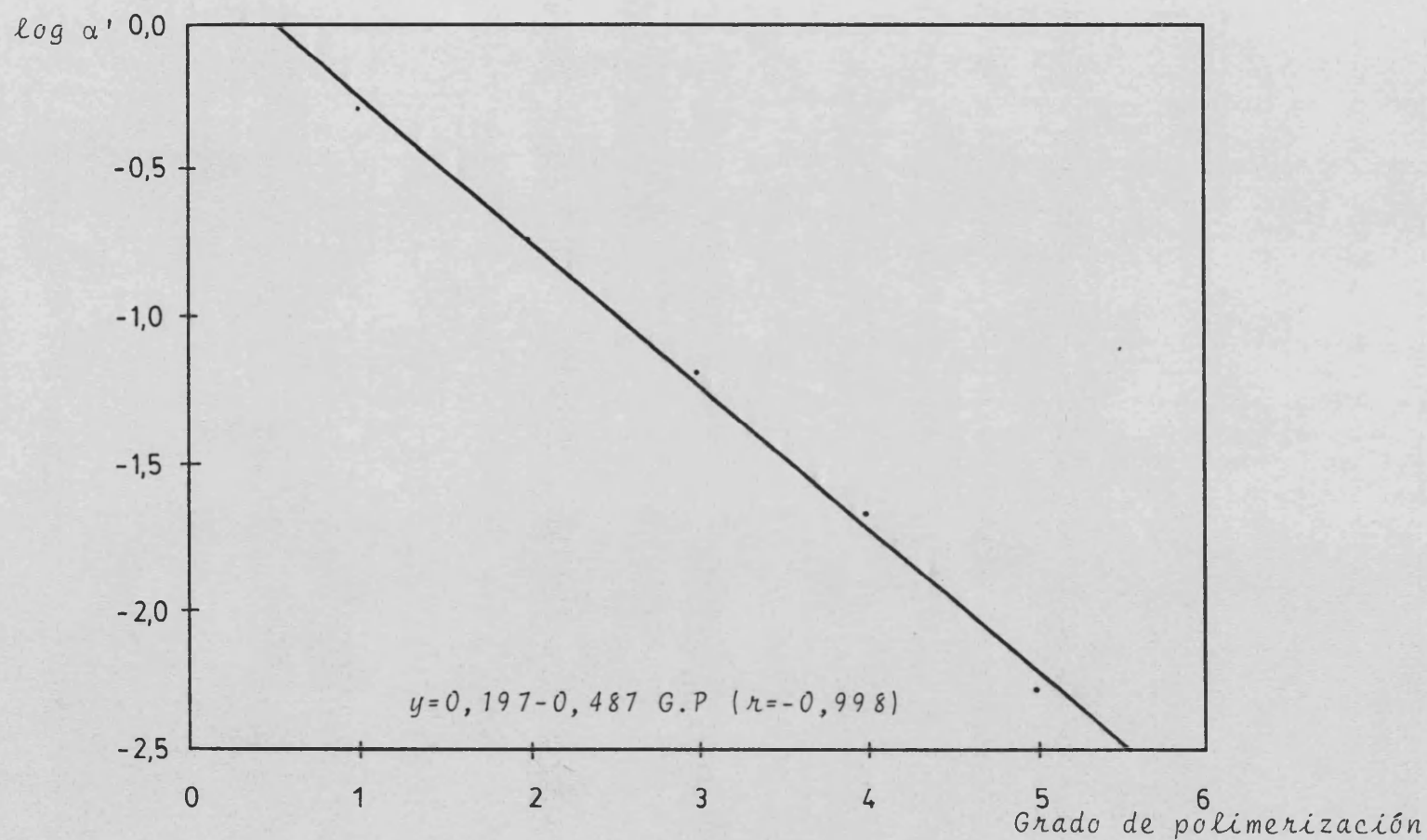


Fig. VI.6. Representación gráfica de la relación entre el $\log \alpha'$ y el grado de polimerización para los oligosacáridos de la serie homóloga de la xilobiosa. Desarrollador A.

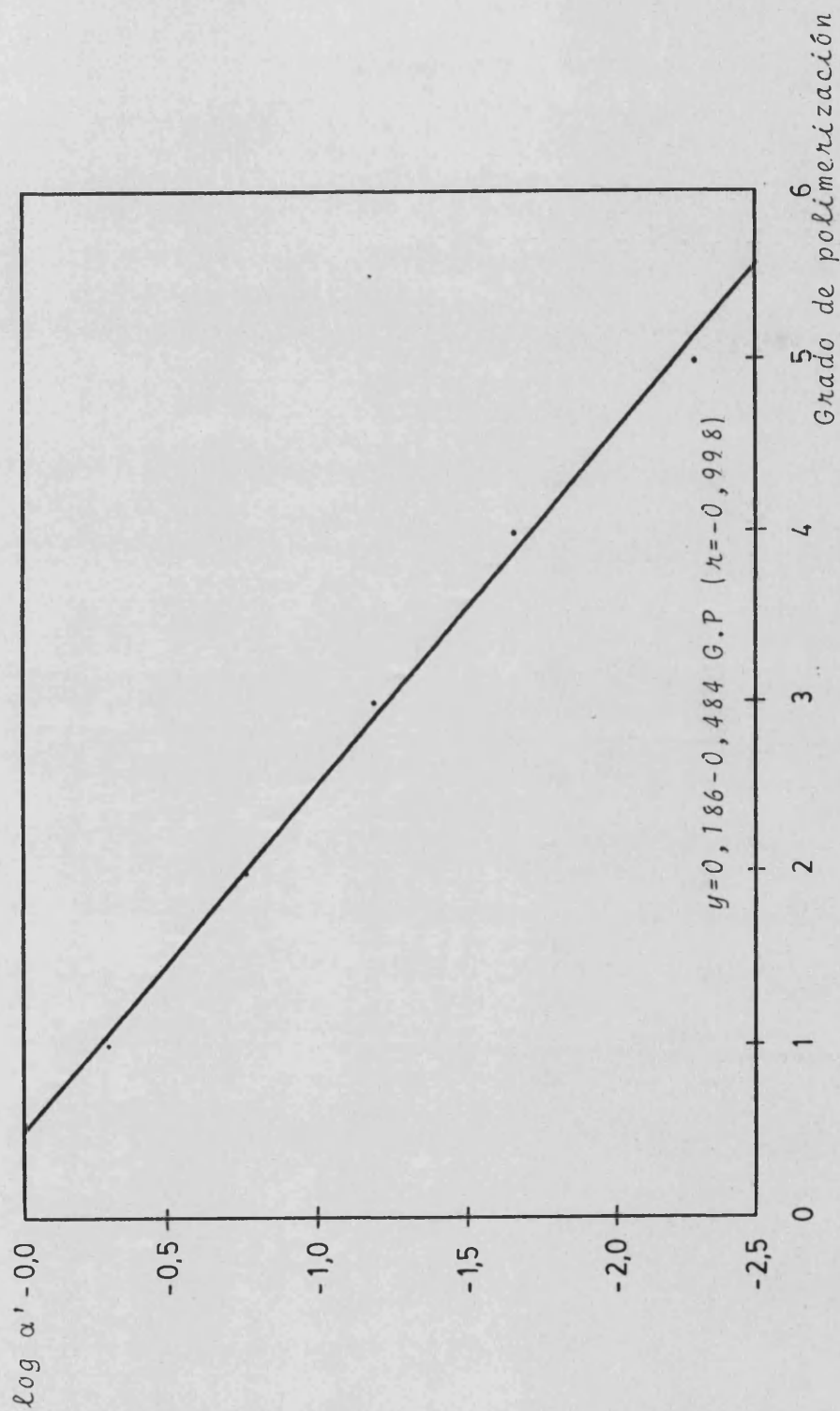


Fig. VI.7. Representación gráfica de la relación entre el log α' y el grado de polimerización para los oligosacáridos de la serie homóloga de la xilobiosa. Desarrollador A.

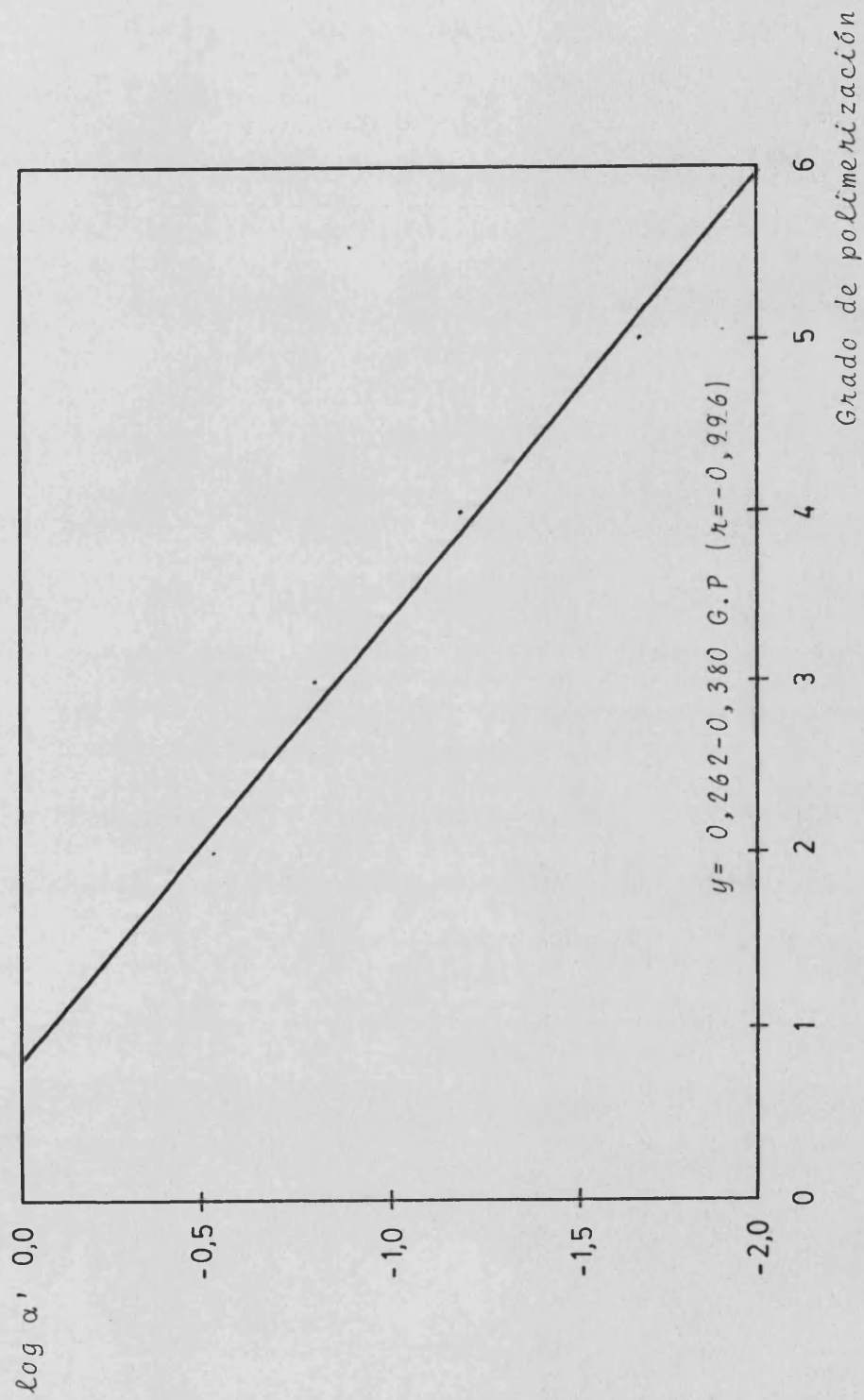


Fig. VI.8. Representación gráfica de la relación entre el $\log \alpha'$ y el grado de polimerización para los oligosacáridos de la serie homóloga de la xilobiosa. Desarrollador B.

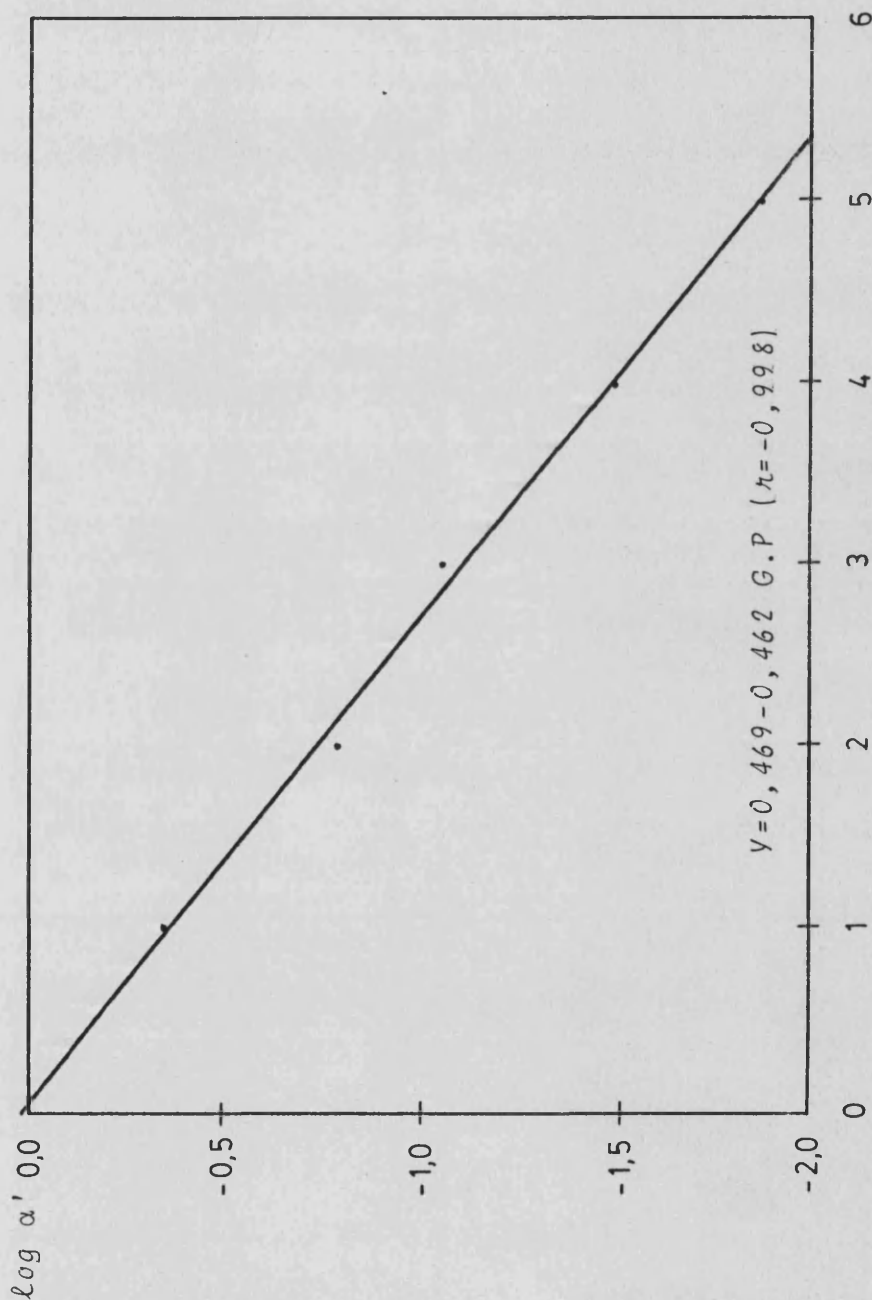


Fig. VI.9. Representación gráfica de la relación entre el $\log \alpha'$ y el grado de polimerización para los oligosacáridos de la serie homóloga de la xilobiosa. Desarrollador C.

Para el desarrollador B se obtuvo una recta de ecuación $\lg \alpha' = -0,380 C + 0,262$ con un coeficiente de regresión $r = -0,996$ como se muestra en la Fig. VI.8 y para el desarrollador C, se obtuvo otra recta de ecuación $\lg \alpha' = -0,462 C + 0,469$ con un coeficiente de regresión $R = -0,998$ y que se dan en la Fig. VI.9.

Estos resultados permitieron admitir que los oligosacáridos procedentes de la hidrólisis parcial de la fracción A-I pertenecen a la serie homóloga de la xilosa hasta un grado de polimerización de cinco.

VI.3.3.2. Análisis de los oligosacáridos por cromatografía líquida de alta resolución

Los oligosacáridos procedentes de la hidrólisis parcial de la xilana se analizaron finalmente por cromatografía líquida de alta resolución.

El estudio de estos productos se basó en el trabajo de Kennedy y colaboradores (White, 1980), que demostraron que los logaritmos de los tiempos de retención de los oligosacáridos obtenidos en la hidrólisis parcial de un polisacárido lineal se relacionan con el grado de polimerización (G.P) de los oligosacáridos según una línea recta cuando pertenecen a una misma serie homóloga. En la Fig. VI.10 se muestra el cromatograma obtenido y la tabla VI.5 se dan los valores correspondientes a los tiempos de retención, logaritmo de los tiempos de retención y el grado de polimerización. En la Fig. VI.11 se muestra la representación gráfica del logaritmo del tiempo de retención frente al grado de polimerización. Se obtuvo una recta de ecuación $\lg t_R = 0,22 + 0,134 G.P$ con un coeficiente de regresión $r = 0,998$ lo que confirmó la existencia de una serie homóloga de oligosacáridos de la xilosa.

Todos estos análisis cromatográficos confirman que la fracción A-I es una xilana. Para conocer el tipo de

CHART SPEED 0.5 CM/MIN
 ATEN: 32 ZERO: 5% 5 MIN/TICK
 0.025

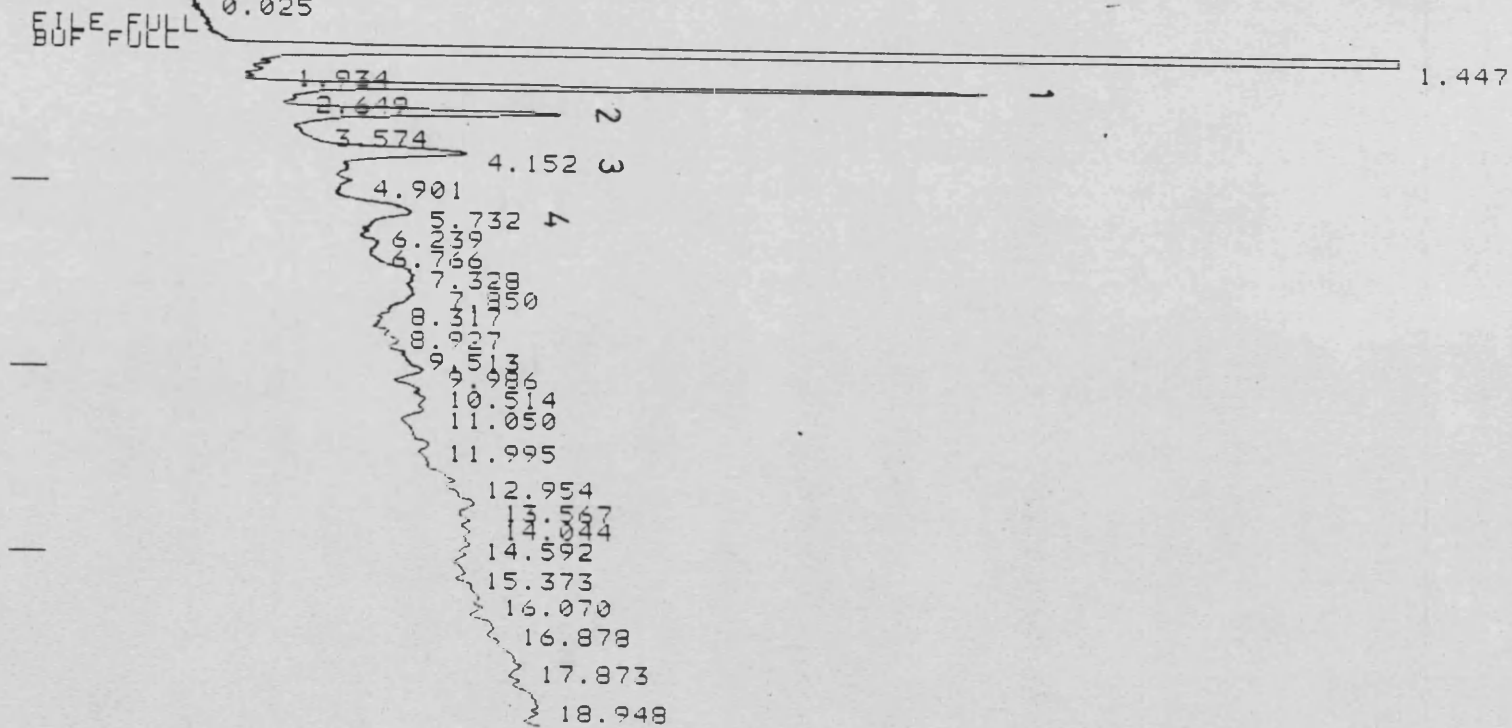


Fig. VI. 10. Hidrólisis parcial de la hacaición A-1,
 c.l.a.r. del hidrolizado. Picos: 1) xilosa;
 2) xilobiosa; 3) xilotriosa y 4) xilote-
 traosa.

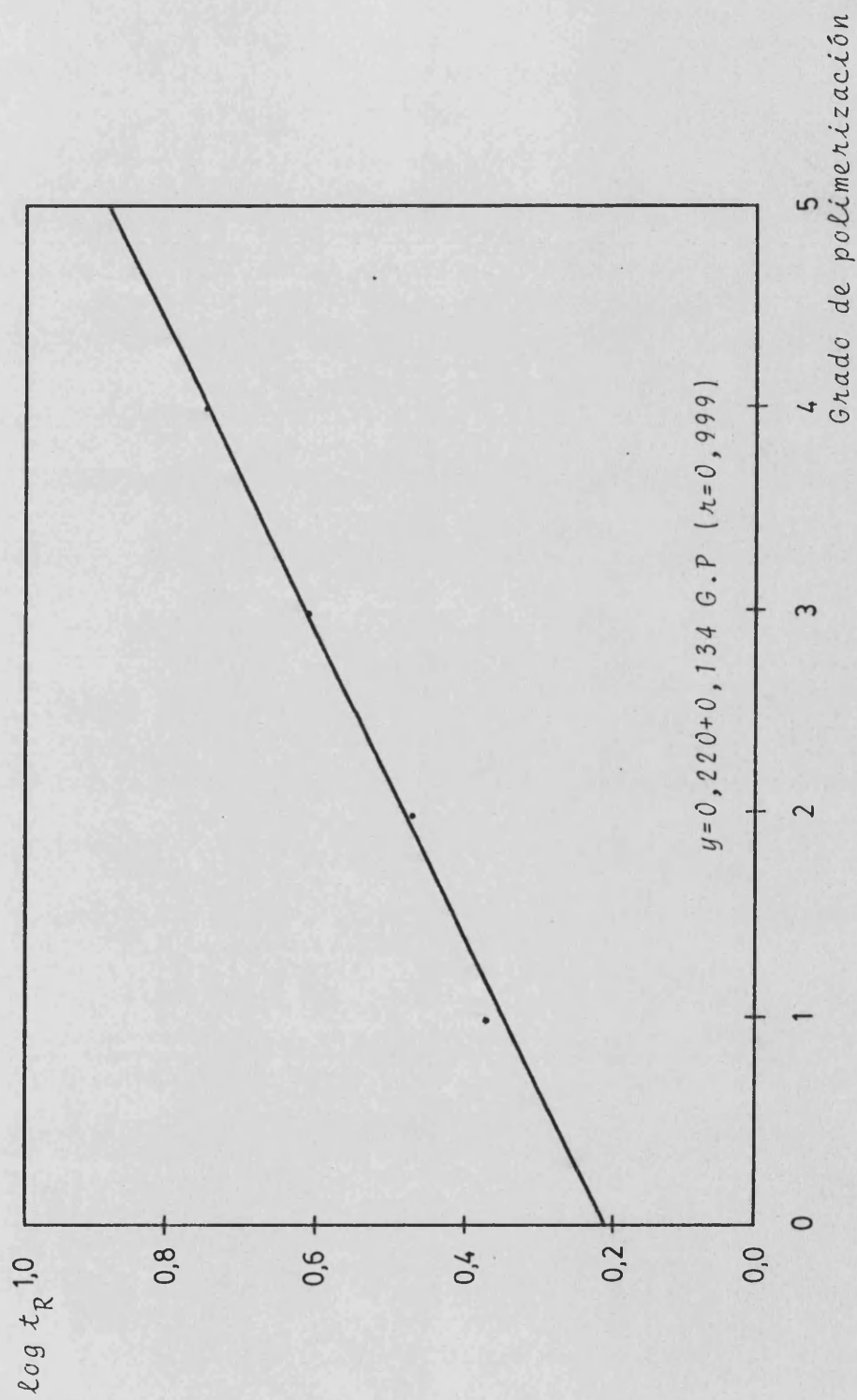


Fig. VI.11. Representación gráfica del $\log t_R$ frente al grado de polimerización, para los oligosacáridos de la serie homóloga de la xilobiosa.

TABLA VI.5

Cromatografía líquida del hidrolizado de la fracción A-I

t_R (min)	$\lg t_R$	Grado de polimerización
2,30	0,36	1
3,06	0,48	2
4,15	0,62	3
5,73	0,76	4

unión y la configuración de los monosacáridos en el polisacárido se procedió a la metilación del mismo.

VI.3.4. Metilación de la fracción A-I

La metilación del polisacárido se realizó por el método de Hakomori. Se preparó la base con dimetilsulfóxido e hidruro de sodio y luego se le hizo reaccionar con el polisacárido. Finalmente se le adicionó el yoduro de metilo. Todo esto se realizó con agitación y bajo atmósfera de nitrógeno. El polisacárido metilado se recuperó por extracción con cloroformo y los restos de DMSO se eliminaron en la estufa de vacío calentando a 40°C varios días. Se purificó por reprecipitación en benceno con éter de petróleo.

VI.3.4.1. Datos espectroscópicos

a) Interpretación del espectro de IR

Su espectro de IR (Fig.VI.12) presentó las siguientes bandas características: a 2925 y 2825 cm^{-1} de tensión de C-H alifático; banda a 1740 cm^{-1} de tensión C=O de ester metílico; banda a 1460 cm^{-1} de deformación por flexión simétrica de grupos $-\text{CH}_2-$ y CH_3- ; bandas a 1380 y 1320 cm^{-1} de de-

formación por flexión de grupos $-\text{CH}_2-$ y $-\text{CH}-$ respectivamente; y banda a 1080 cm^{-1} de tensión C-O de éter.

b) Interpretación del espectro de RMN- ^1H

Su espectro de resonancia magnética nuclear (Fig. VI.13) (CDCl_3) presentó las señales características de un polisacárido con uniones glicosídicas β . A $4,3\delta$ las señales, muy poco resueltas, correspondientes a los protones anoméricos de un polisacárido lineal con uniones glicosídicas en β ; señales a $3,58$ y a $3,5\delta$ asignables a los grupos metoxilo en C-2 y C-3; y finalmente las señales comprendidas entre $3,2$ y $3,9\delta$ y entre $3,7$ y $3,9\delta$, muy poco resueltas, asignables a los $\text{CH}_2\text{-OR}$ y a los CH-OR respectivamente.

c) Interpretación del RMN- ^{13}C

Su espectro de RMN- ^{13}C (Fig. VI.14) muestra seis señales singletes que están de acuerdo con el hecho de que hay seis carbonos no equivalentes magnéticamente en la secuencia repetida de monosacáridos de la fracción A-I metilada. Las señales obtenidas, así como la asignación y multiplicidad de las mismas (Fig. VI.15) se indican en la tabla VI.6.

TABLA VI.6

Desplazamientos químicos de RMN- ^{13}C de la fracción A-I metilada (DCCl_3)

COMPUESTO	Desplazamientos químicos, ppm ^a					
	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅	OCH ₃
FRACCION A-I ^b	102,64 (d)	76,44 (d)	83,26 (d)	84,20 (d)	63,28 (t)	60,62 (q)

^a Los desplazamientos son relativos al patrón interno.

^b Datos correspondientes al espectro de RMN- ^{13}C realizado según ^1H -desacoplado.

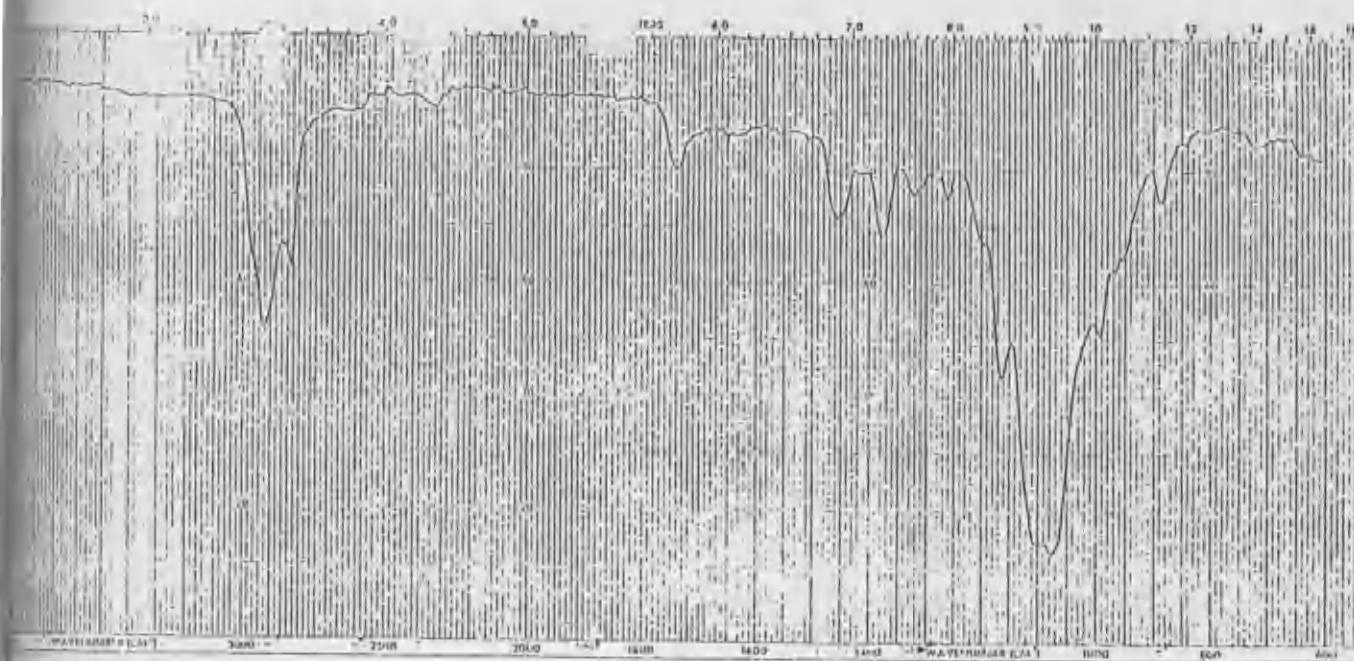


Fig. VI.12. Espectro de IR de la fracción A-I metilada.

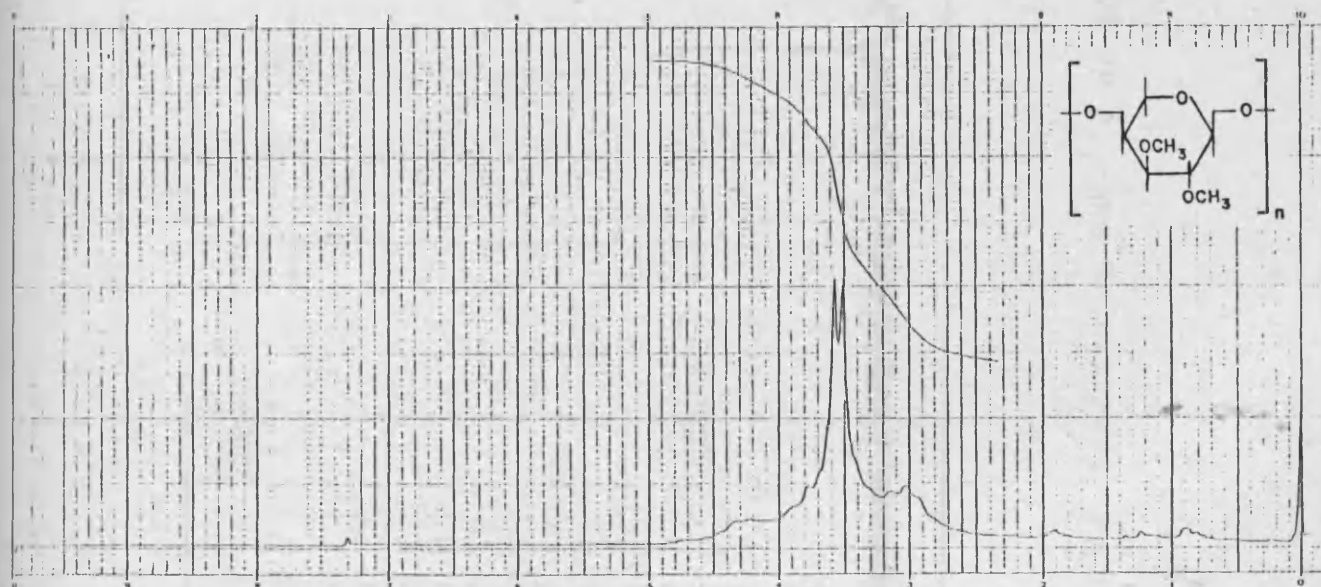


Fig. IV.13. Espectro de RMN de la fracción A-I metilada.

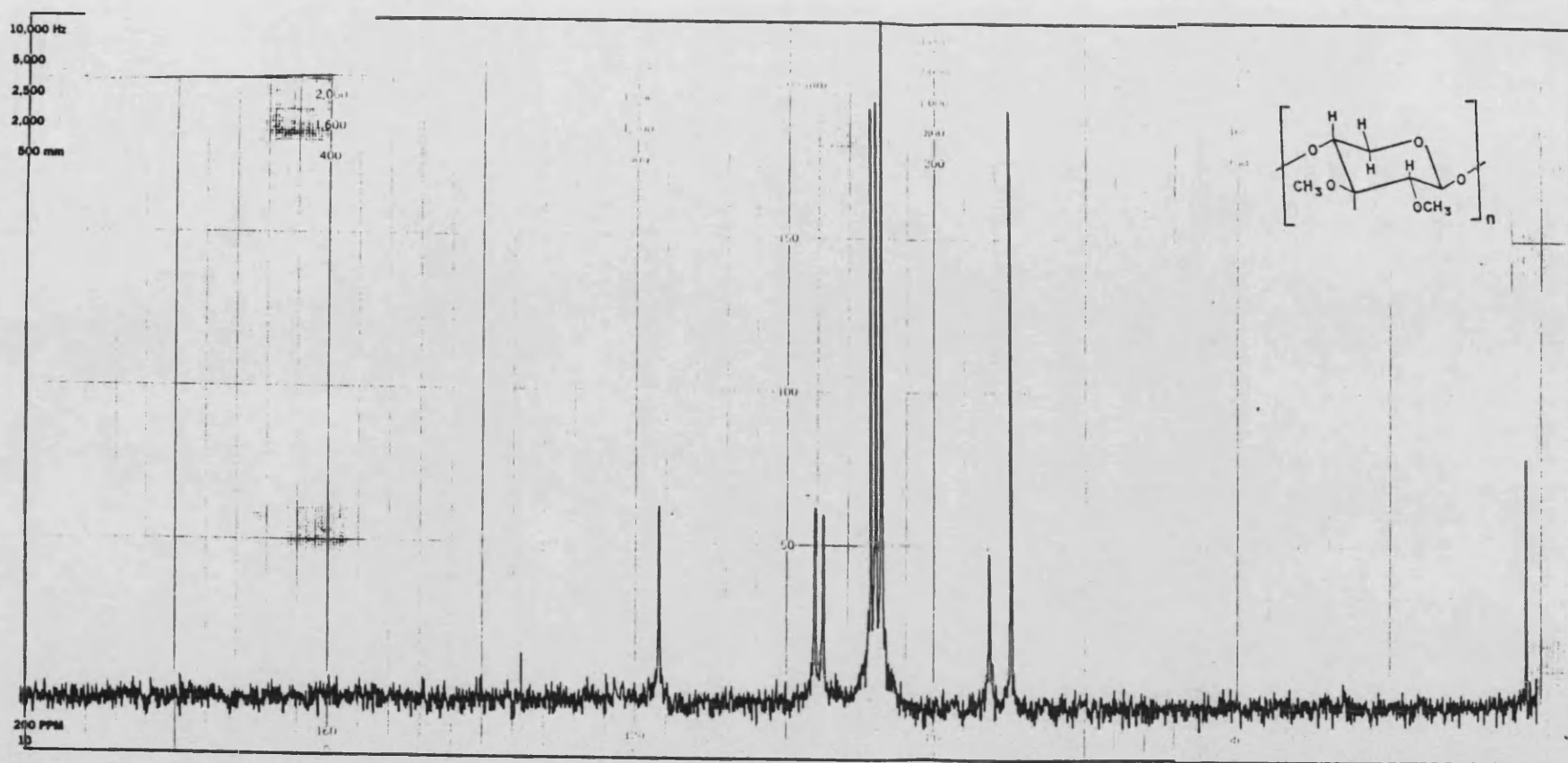


Fig. VI.14. Espectro de RMN- ^{13}C de la fracción A-I metilada (DCCl_3) según ^1H -desacoplado.

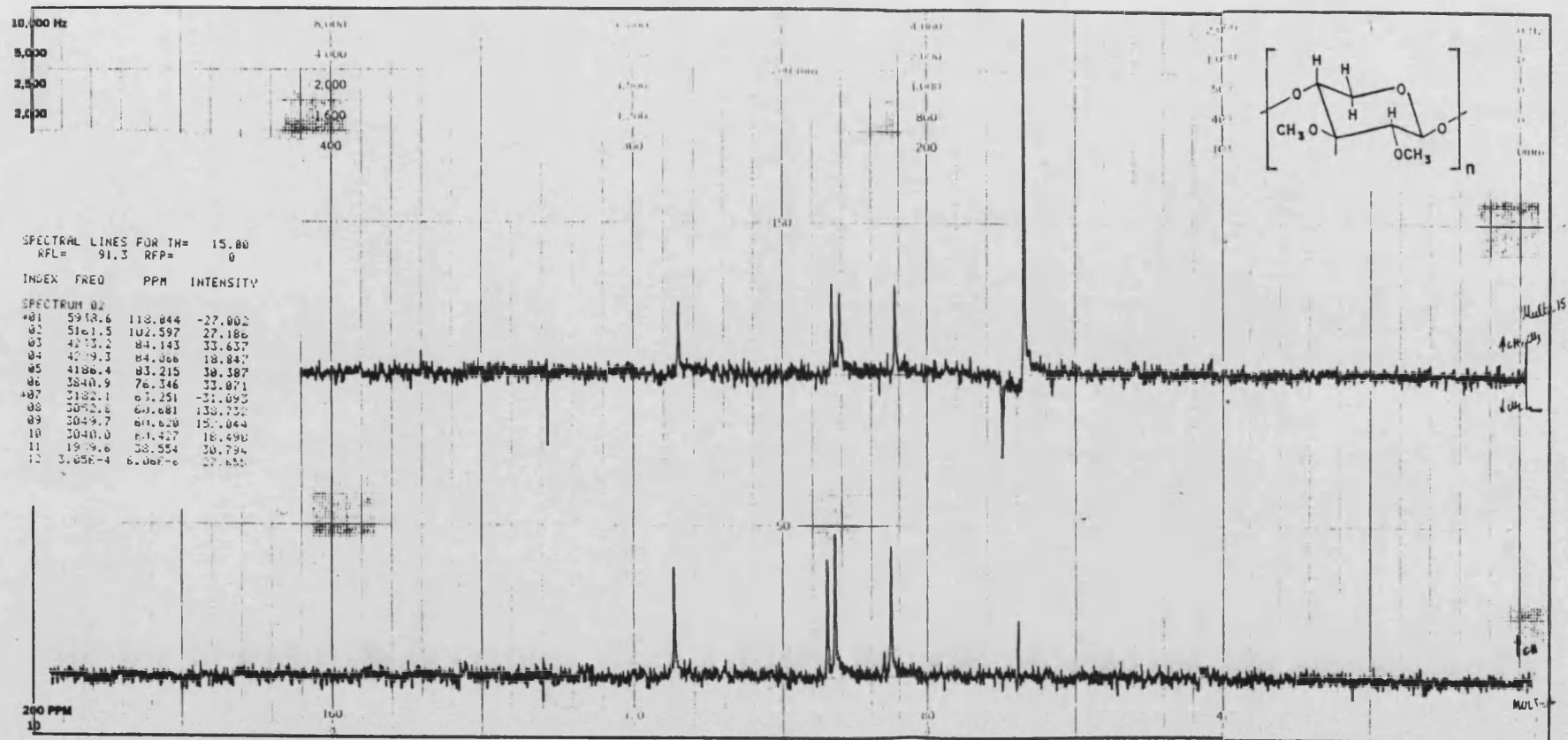


Fig.VI.15. Espectro de RMN-¹³C de la fracción A-I metilada (DCCl₃) mediante secuencia de pulsos DEPT.

La señal correspondiente al carbono anomérico (102,64 ppm), indica que éste tiene una configuración β en el polisacárido.

VI.3.4.2. Hidrólisis ácida

La hidrólisis ácida del polisacárido metilado se realizó con ácido SO_4H_2 del 72% a 30°C durante una hora y luego se diluyó el ácido y se calentó a reflujo 4 horas. El hidrolizado se neutralizó con carbonato de bario y se desionizó a través de la resina de intercambio iónico Amberlita IR-120(H^+).

Con los monosacáridos parcialmente metilados así obtenidos se formaron los derivados acetatos de alditoles para una determinación cuantitativa de los mismos.

VI.3.4.2.1. Identificación de los monosacáridos parcialmente metilados

a) Análisis por cromatografía gaseosa.

Los acetatos de los alditoles parcialmente metilados se analizaron por cromatografía gas-líquido. Se utilizó el 1,5-di-O-acetil-2,3,4,6-tetra-O-metilglucitol como patrón de referencia. En la Fig.VI.16 se muestra el cromatograma obtenido y en la tabla VI.7 se dan los tiempos de retención de los acetatos de alditoles relativos al 1,5-di-O-acetil-2,3,4,6-tetra-O-metil-D-glucitol (Churms, 1982), así como el porcentaje relativo de cada uno en la mezcla.

b) Análisis por cromatografía gaseosa-espectrometría de masas

Para confirmar la identidad de estos derivados parcialmente metilados de la fracción A-I se realizó un análisis combinado de cromatografía gaseosa-espectrometría de masas. En la Fig.VI.17 se muestra el cromatograma obtenido.

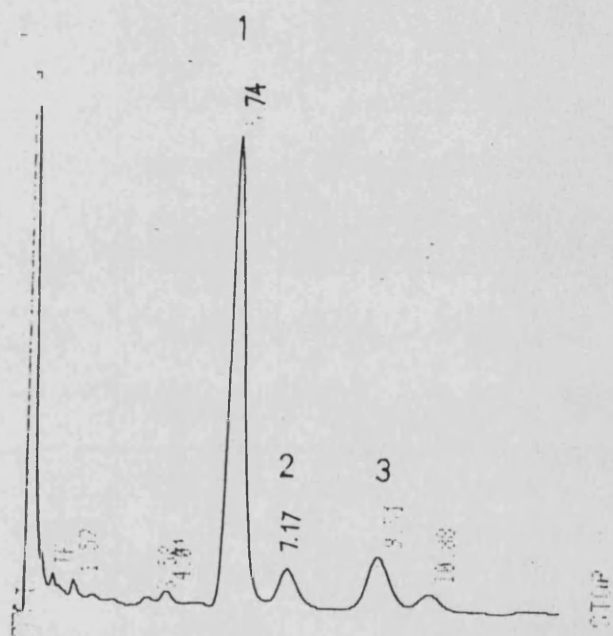


Fig.VI.16. Cromatografía gaseosa de los acetatos de alditoles de los azúcares metilados obtenidos del hidrolizado de la fracción A-I metilada en una columna ECNSS-M a 175°. Picos: 1) 2,3-Me₂-Xi; 2) 2,4,6-Me₃-Glu y 3) 2,3,6-Me₃-Glu.

TABLA VI.7.

Eteres metilicos del hidrolizado de la fracción A-I

Azúcares ^a	t_R^b	t_R^c	%Azúcares
2,3-Me ₂ -Xi	1,42	0,93	79,83
2,3,6-Me ₃ -Glu	2,35	1,14	14,97
2,4,6-Me ₃ -Glu	1,78	1,03	5,18

^a 2,3,-Me₂-Xi= 1,4,5-tri-O-acetil-2,3-di-O-metil-D-xilitol

^b Tiempo de retención relativo al 1,5-di-O-acetil-2,3,4,6-tetra-O-metil-D-glucitol en una columna ECNSS-M.

^c Idem en una columna capilar de OV-1.

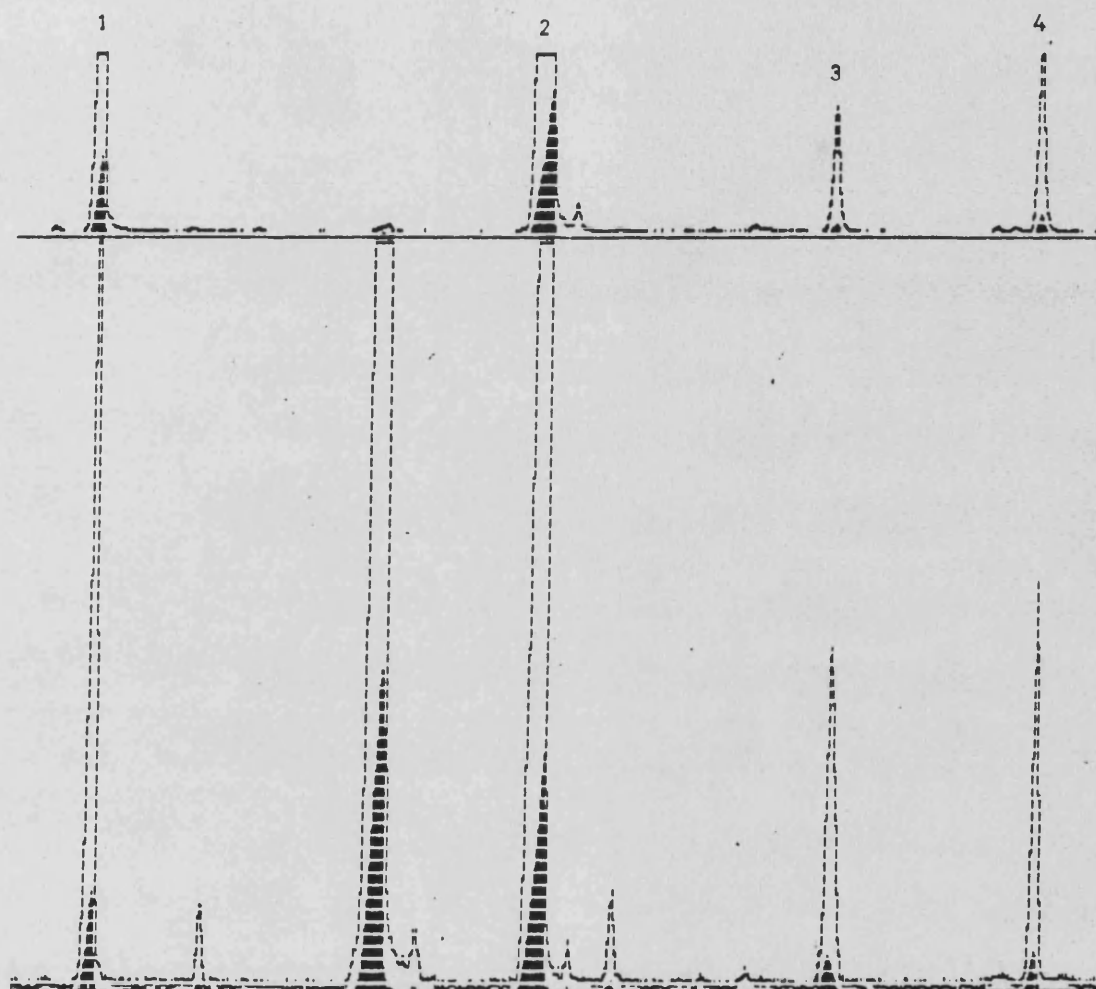


Fig. VI.17. Cromatografía gaseosa de los acetatos de alditoles de los azúcares metilados obtenidos del hidrolizado de la fracción A-I metilada. Columna capilar OV-1. Temperatura de la columna 120-220° a 89 min. Cromatograma inferior según ión total. Cromatograma superior según ión m/e 117. Picos: 1) impurezas; 2) 2,3-Me₂-Xi; 3) 2,4,6-Me₃-Glu y 4) 2,3,6-Me₃-Glu.

Interpretación de los espectros de masas (Björndal, 1967)

De los espectros de masas de los acetatos de alditones parcialmente metilados de la fracción A-I se identificaron tres compuestos correspondientes a los picos que se indican en el cromatograma de la Fig.VI.17.

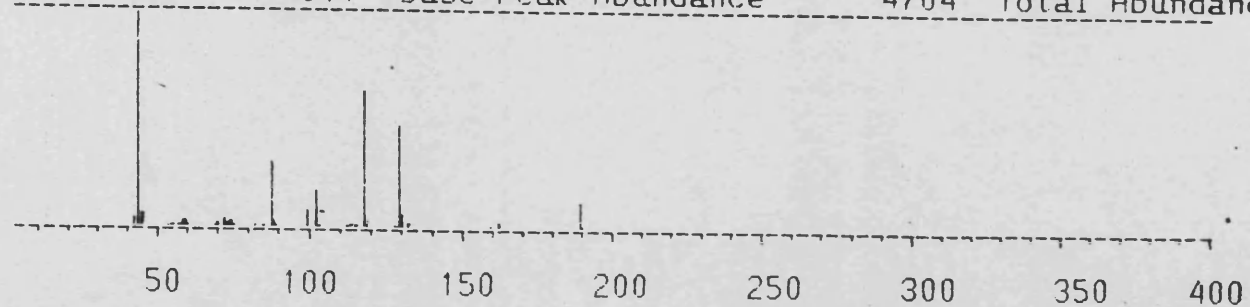
El pico mayoritario y principal, pico n°2 del cromatograma, cuyo espectro de masas se muestra en la Fig. VI.18, dió como fragmentos mas prominentes los iones con m/e 43, 87, 101, 117, 129 y 189 (Fig.III.28), lo que, junto con el análisis por cromatografía gaseosa nos permitió identificarlo como el compuesto 1,4,5-tri-O-acetil-2,3-di-O-metil-D-xilitol.

El pico 3 del cromatograma, cuyo espectro de masas se muestra en la Fig.VI.19a, dió como fragmentos mas prominentes los iones con m/e 43, 45, 87, 101, 117, 129 y 161 (Fig. VI.19b), lo que, junto con el análisis por cromatografía gaseosa se identificó como el compuesto 1,3,5-tri-O-acetil-2,4,6-tri-O-metil-D-glucitol.

El pico 4, cuyo espectro de masas se muestra en la Fig.VI.20, dió como fragmentos mas prominentes los iones con m/e 43, 45, 87, 99, 101, 113, 117 y 233 (Fig.III.30), lo que, junto con el análisis por cromatografía gaseosa nos permitió identificarlo como el compuesto 1,4,5-tri-O-acetil-2,3,6-tri-O-metil-D-glucitol.

Estos dos últimos compuestos aparecen debido a la glucosa que impurifica el hidrolizado de la fracción A-I (tabla VI.2) para que ésta no formaría parte de la cadena del polisacárido de xilosa. Para confirmar este supuesto se realizó una nueva extracción de la fracción A-I como se indicó en el apartado VI.3.2.1., y los resultados obtenidos de la composición monomérica de este polisacárido purificado se indican en la tabla VI.1. Se observa que los monosacáridos que acompañan a la xilosa han disminuído notablemente y en particular la glucosa.

Base Peak = 43.1 Base Peak Abundance = 4704 Total Abundance = 16138

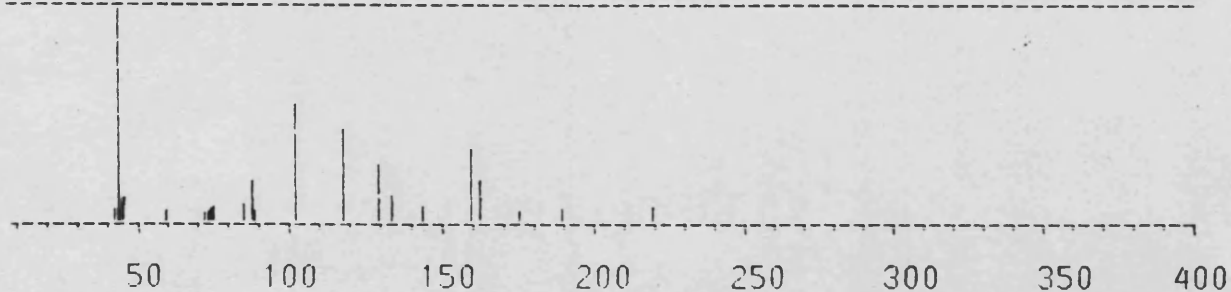


Lower Abundance Cutoff Level = 1.0%

MASS	ABUNDANCE (%)	MASS	ABUNDANCE (%)	MASS	ABUNDANCE (%)
41.2	4.0	74.1	2.9	113.2	2.0
43.1	100.0	75.1	1.3	117.2	52.9
44.2	2.8	85.1	1.3	118.2	3.2
45.1	5.7	87.1	29.9	129.2	47.1
57.2	1.3	88.1	2.9	130.2	5.6
58.2	3.3	89.1	1.1	131.1	1.9
59.1	2.7	99.1	7.7	159.2	1.0
69.1	1.3	101.2	17.3	161.1	3.1
70.2	1.6	102.2	1.0	189.2	12.2
71.1	4.2	103.1	1.2	190.2	1.1
73.2	1.7				

Fig. VI.18. Espectro de masas del 1,4,5-tri-O-acetil-2,3-di-O-metil-D-xilitol.

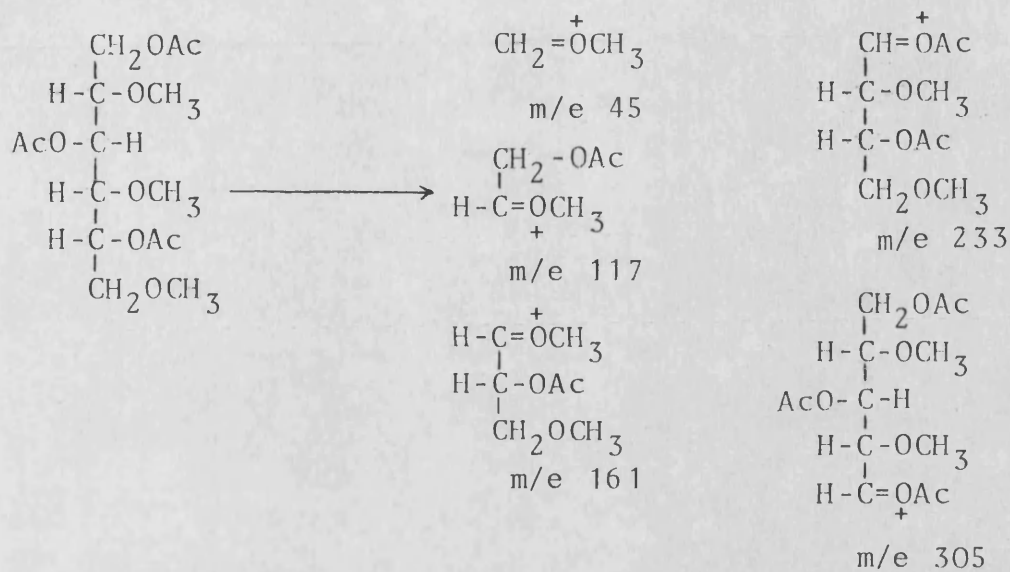
Base Peak = 43.1 Base Peak Abundance = 566 Total Abundance = 2261



Lower Abundance Cutoff Level = 1.0%

MASS	ABUNDANCE (%)	MASS	ABUNDANCE (%)	MASS	ABUNDANCE (%)
41.2	6.4	75.2	6.7	133.1	12.2
43.1	100.0	85.1	8.0	143.1	6.7
44.2	7.2	87.2	19.3	159.1	33.7
45.1	11.5	88.1	4.9	161.1	18.7
59.1	5.1	101.1	55.1	175.1	5.5
71.1	4.2	117.1	43.3	189.1	5.8
73.1	5.3	129.1	26.7	219.1	6.7
74.1	6.4				

Fig. VI. 19a. Espectro de masas del 1,3,5-tri-O-acetil-2,4,6-tri-O-metil-D-glucitol.



La eliminación de ácido acético y de metanol del fragmento primario m/e 161 está facilitada por la acidez del átomo de hidrógeno eliminado.

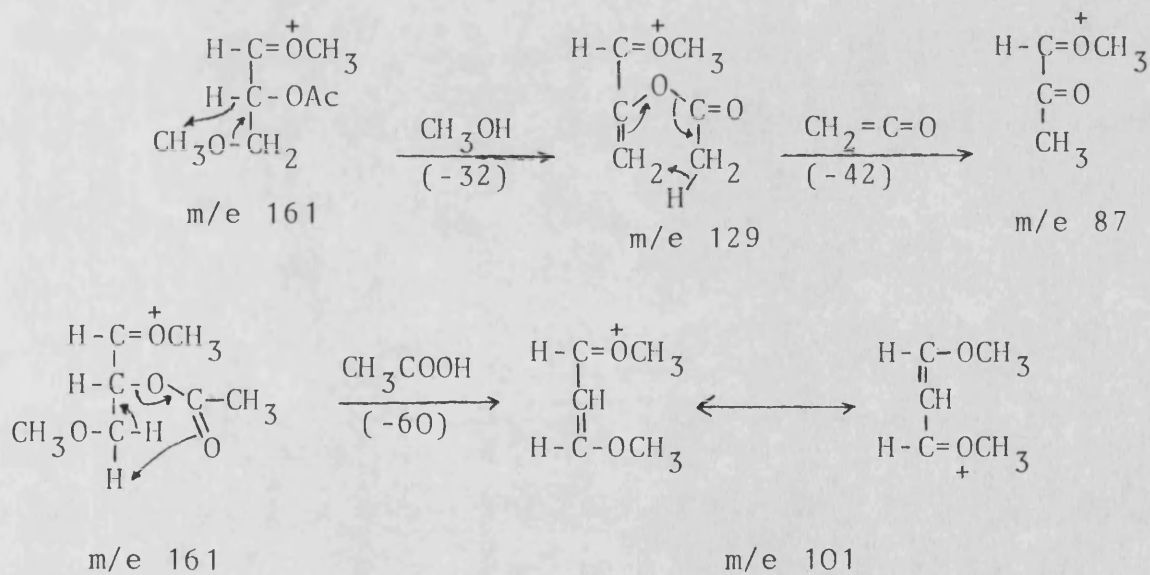
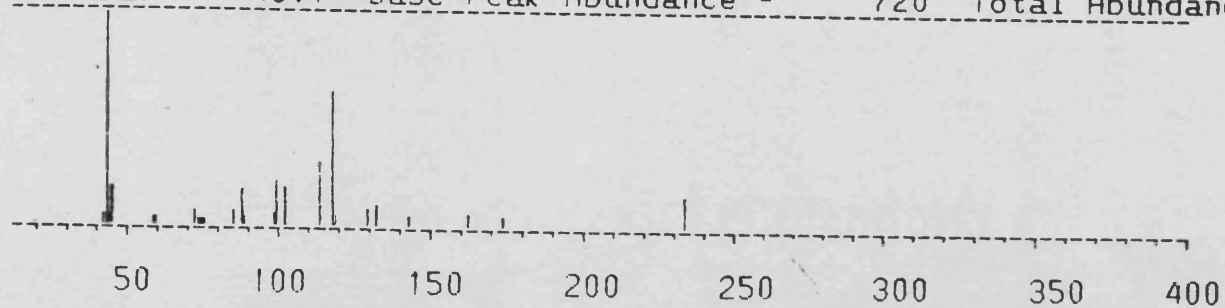


Fig. VI. 19b. Esquema de fragmentación del acetato del 2,4,6-tri-O-metil-D-glucitol.

Use Peak = 43.1 Base Peak Abundance = 720 Total Abundance = 2686



Lower Abundance Cutoff Level = 1.0%

MASS	ABUNDANCE (%)	MASS	ABUNDANCE (%)	MASS	ABUNDANCE (%)
41.0	4.7	75.2	0.5	117.2	59.1
43.1	100.0	85.1	6.7	118.2	4.6
44.1	5.1	87.1	17.1	129.2	8.5
45.1	17.9	88.2	4.2	131.2	10.1
58.0	4.2	98.2	6.1	142.3	5.0
59.0	3.6	99.1	20.6	161.1	6.1
71.1	6.9	101.1	18.5	173.2	5.0
73.1	2.9	113.1	30.4	233.2	15.1
74.2	3.2				

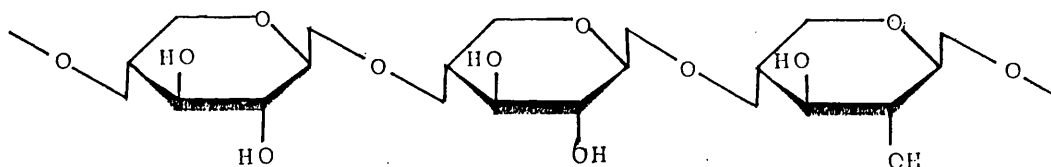
Fig. VI.20...Espectro de masas del 1,4,5-tri-O-acetil-2,3,6-tri-O-metil-D-glucitol.

Por tanto, la presencia del compuesto 1,4,5-tri-O-acetil-2,3,6-tri-O-metil-D-glucitol indica que hay una cadena de unidades de D-glucopiranososa con enlaces (1→4) que impurifica el polisacárido de xilosa.

La presencia del compuesto 1,3,5-tri-O-acetil-2,4,6-tri-O-metil-D-glucitol es debida a que se ha producido desmetilación, durante la hidrólisis ácida, en la cadena de unidades de glucopiranososa.

La presencia del compuesto 1,4,5-tri-O-acetil-2,3-di-O-metil-D-xilitol indica que hay una cadena formada por unidades de D-xilosa con enlaces (1→4).

De todos los análisis se concluye que la fracción A-I es un polisacárido lineal constituido por unidades de D-xilopiranososa con enlaces β (1→4). Es decir, la fracción A-I es una xilana cuya estructura propuesta sería:



VI.4. ESTUDIO DE LA FRACCION A-II

Esta fracción A-II como representa una proporción muy baja en el producto de partida (0,07% respecto al corcho extraído) sólo se ha hecho una determinación cuantitativa de sus monosacáridos.

VI.4.1. Datos espectroscópicos

Su espectro de IR (Fig.VI.21) presentó las siguientes bandas características: una banda ancha entre 3600 a 3100 cm^{-1} de tensión O-H asociado intermolecularmente; banda a 2920 cm^{-1} de tensión de C-H alifático; bandas a 1580 y 1410 cm^{-1} de tensión simétrica y asimétrica respectivamente de C=O de carboxilato, y banda a 1050 cm^{-1} de tensión C-O de alcohol.

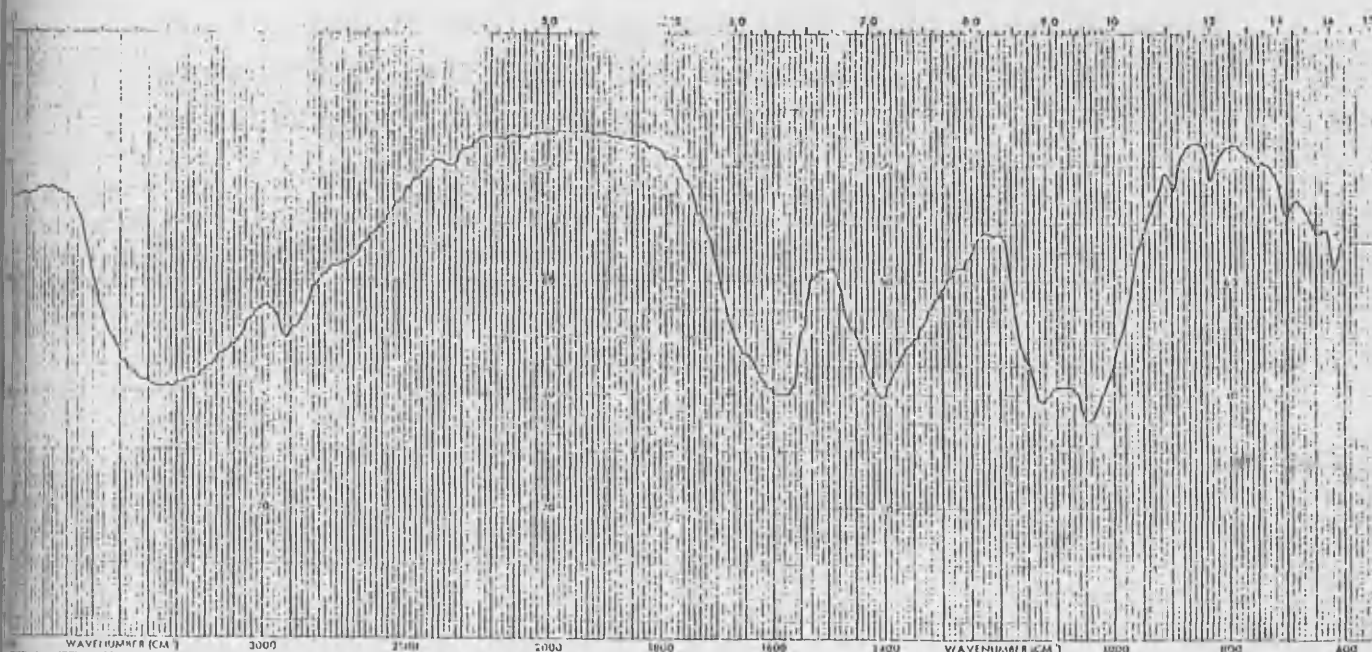


Fig.VI.21. Espectro de IR de la fracción A-II.

VI.4.2. Hidrólisis ácida

La hidrólisis ácida se realizó con ácido H_2SO_4 del 72% en una primera fase para disolver el polisacárido y luego se diluyó el ácido hasta 1N y se calentó la solución a reflujo 4 horas. El hidrolizado se neutralizó con carbonato de bario y se desionizó a través de la resina Amberlita IR-120(H^+).

Con los monosacáridos liberados se formaron sus acetatos de alditoles; se redujeron con borohidruro de sodio y se acetilaron con la mezcla anhídrido acético-piridina. Se recuperaron por extracción con cloroformo.

VI.4.2.1. Determinación cuantitativa de los monosacáridos

Los acetatos de alditoles se analizaron por cromatografía gas-líquido. Para su análisis cuantitativo se utilizó el método del patrón interno. En la Fig.VI.22 se muestra el cromatograma obtenido y en la tabla VI.1 se dan los resultados de este análisis cuantitativo. Se expresan en tanto por ciento del total de muestra y del total de azúcares.

CHART SPEED 0.2 CM/MIN
ATTEN: 32 ZERO: 5% 5 MIN/TICK

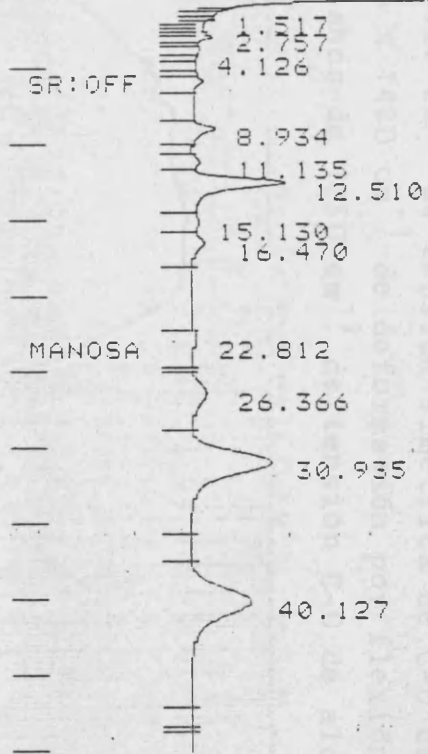


Fig. VI. 22. Cromatografía gaseosa de los acetatos de alditoles procedentes de la hidrólisis de la fracción A-11. Temperatura de la columna 185°.

VI.5. Aislamiento de hemicelulosa B

El centrifugado ácido que quedó tras la separación de la hemicelulosa A (ver apartado VI.2) se dializó con agua desionizada. A esta solución dializada se le adicionaron cuatro volúmenes de etanol del 95% y precipitó la hemicelulosa B que se aisló por centrifugación, se lavó con etanol y se secó en desecador a vacío. Se obtuvo un sólido pulverulento ligeramente coloreado que supone un 12,6% respecto a la holocelulosa.

VI.5.2.1. Determinación cuantitativa de los monosacáridos

VI.5.1. Datos espectroscópicos

Interpretación del espectro de IR

Su espectro de IR (Fig.VI.23) presentó el aspecto general de un polímero: banda ancha entre 3500 a 3200 cm^{-1} de tensión de O-H de alcohol asociado intermolecularmente, banda a 2925 cm^{-1} de tensión C-H alifático; banda a 1580 cm^{-1} y 1505 cm^{-1} de tensión simétrica de C=O de carboxilato, banda a 1420 cm^{-1} de deformación por flexión de grupos CH_2 -, y banda de 1050 cm^{-1} de tensión C-O de alcohol.

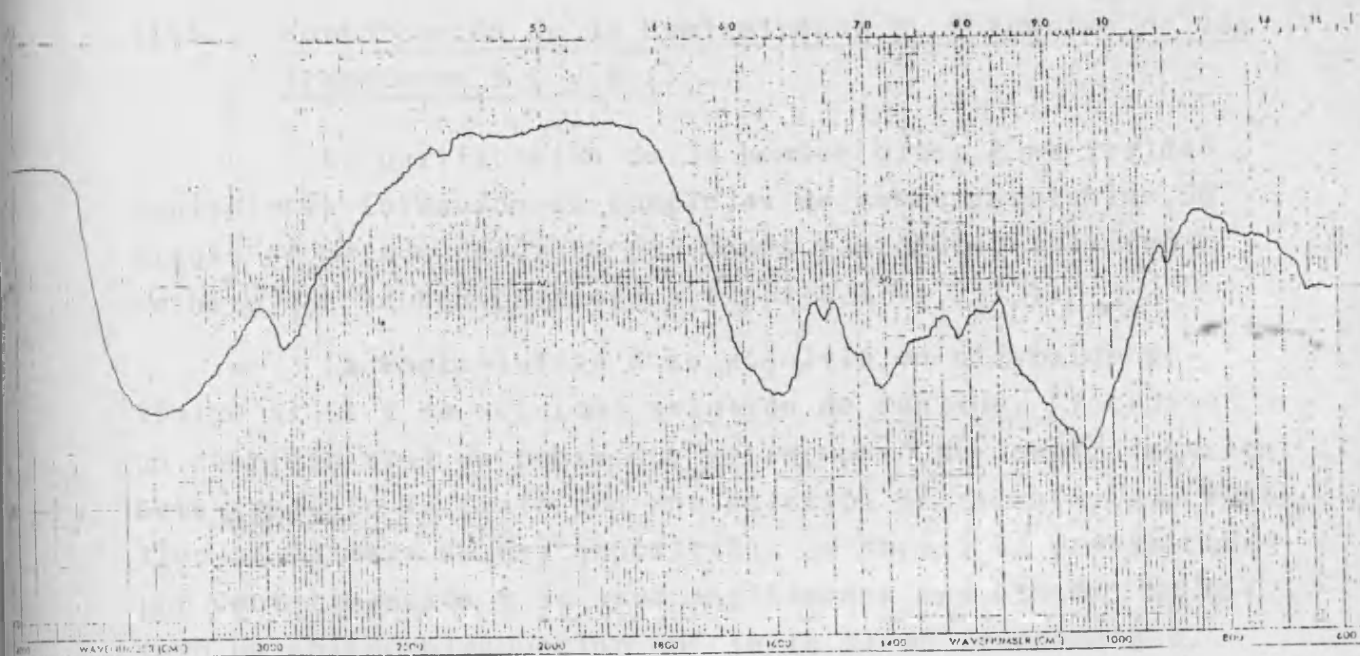


Fig.VI.23. Espectro de IR de la hemicelulosa B.

VI.5.2. Hidrólisis ácida

La hidrólisis ácida de la hemicelulosa B se realizó en dos etapas; primeramente, se disolvió con ácido sulfúrico del 72% y luego se hidrolizó con ácido sulfúrico 1N. A continuación se añadió inositol como patrón interno y el hidrolizado se neutralizó con carbonato de bario y se desionizó a través de resina de intercambio iónico Amberlita IR-120(H⁺).

VI.5.2.1. Determinación cuantitativa de los monosacáridos

Con los monosacáridos del hidrolizado anterior se formaron los correspondientes acetatos de sus aldítoles para una determinación cuantitativa de los monosacáridos por cromatografía gas-líquido. Se realizó el análisis por el método del patrón interno, utilizando como tal el inositol. En la Fig.VI.24 se muestra el cromatograma obtenido y en la tabla VI.8, se dan los resultados cuantitativos que se expresan en tanto por ciento del total de muestra y del total de azúcares.

VI.5.3. Purificación de la hemicelulosa B. Obtención de las fracciones B-I y B-II

La purificación de la hemicelulosa B se realizó mediante la formación de complejos de cobre insolubles. Se siguió el método descrito por Jones y Stoodley tal como se hizo con la hemicelulosa A (apartado VI.2.2.).

La hemicelulosa B se disolvió en hidróxido potásico al 5% y se adicionó solución de Fehling. Precipitó un complejo azul de cobre que se recuperó por centrifugación. Este complejo se trató con una solución de clorhídrico etanólico al 5% para su descomposición. Se separó el precipitado por centrifugación y se lavó ampliamente con etanol. Se obtuvo un sólido blanquecino que se le llamó fracción B-I.

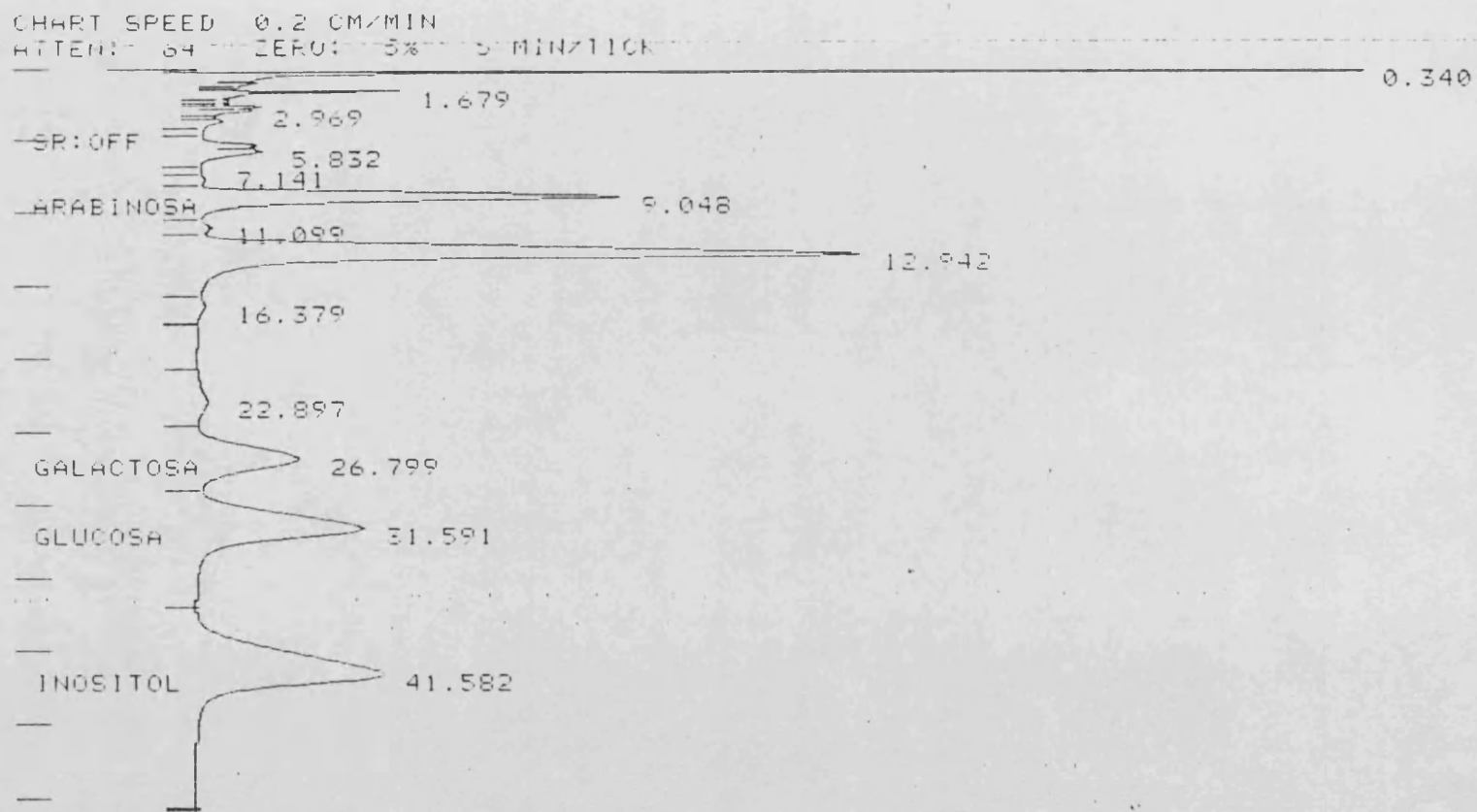


Fig. VI.24. Cromatografía gaseosa de los acetatos de aldihexoses procedentes de la hidrólisis de la hemicelulosa B. Temperatura de la columna 185°.

TABLA VI. 8

Datos analíticos de la hemicelulosa B, fracción B-I y fracción B-II.

	Hemicelulosa B	Fracción(B-I) purificada	Fracción(B-II)
Rendimiento(%) ^a	2,16	47,64	9,86
Total de azúcares(%)	56,85	57,47	59,42
Poder rotatorio ^b		-61,47	3,96
Azúcares(%) ^c			
Ramnosa	1,42(0,81)	-	1,75(1,04)
Arabinosa	21,40(12,17)	1,57(0,82)	23,69(14,08)
Xilosa	40,45(22,99)	90,96(52,37)	34,17(20,31)
Manosa	1,38(0,79)	0,83(0,47)	-
Galactosa	11,83(6,72)	1,43(0,82)	13,36(7,94)
Glucosa	23,51(13,37)	5,20(2,99)	27,01(16,05)

^a El rendimiento de la hemicelulosa B está referido al corcho extraído. Los rendimientos de las fracciones B-I y B-II están referidos a la hemicelulosa B.

^b Los poderes rotatorios se han realizado en NaOH al 1% (c=0,01).

^c Los valores entre paréntesis se refieren al porcentaje de azúcares en la muestra.

La solución alcalina que quedó al centrifugar el complejo de cobre se dializó con agua destilada y posteriormente por adición de etanol precipitó la fracción B-II. Se recuperó el sólido por centrifugación. Se lavó con etanol y se secó en desecador a vacío. Se obtuvo un sólido ligeramente coloreado que representa un 9,86% respecto a la hemicelulosa B.

En la Fig.VI.25 se ha realizado un esquema de estos fraccionamientos.

VI.6. ESTUDIO DE LA FRACCIÓN B-I

El polisacárido B-I se caracterizó por datos espectroscópicos y se analizó por métodos químicos y cromatográficos.

VI.6.1. Datos espectroscópicos

Interpretación del espectro de IR

Su espectro de IR (Fig.VI.26) presentó las siguientes bandas características: entre 3600 y 3200 cm^{-1} . banda ancha de tensión de O-H de alcohol asociado intermoleculamente; banda a 2925 cm^{-1} de tensión C-H alifático; banda a 1735 cm^{-1} de tensión de éster y banda a 1050 cm^{-1} de tensión C-O de alcohol y de ácido.

VI.6.2. Estudio de la homogeneidad de la fracción B-I

Se utilizó la cromatografía de filtración sobre geles porosos para determinar la homogeneidad de la fracción B-I.

La muestra se disolvió en ClNa 0,5 M, que se utilizó también como eluyente, y se cromatografió sobre Sephacryl S-400. Los valores de absorbancia de las fracciones eluidas se dan en la tabla VI.9 y el diagrama obtenido al representar

HEMICELULOSA B

- 1) Solubilización en KOH 5 %
- 2) Fehling

Disolución
alcalina

- 1) Dialisis
- 2) Etanol

Residuo

- 1) ClH/EtOH (5%)
- 2) Etanol

FRACCION B-II

Residuo

Solubilización
con agua

Disolución acuosa

Precipitación
con etanol

Residuo

- 1) ClH/EtOH (5%)
- 2) Etanol

FRACCION B-I

Fig.VI.25 Fraccionamiento de la hemicelulosa B.

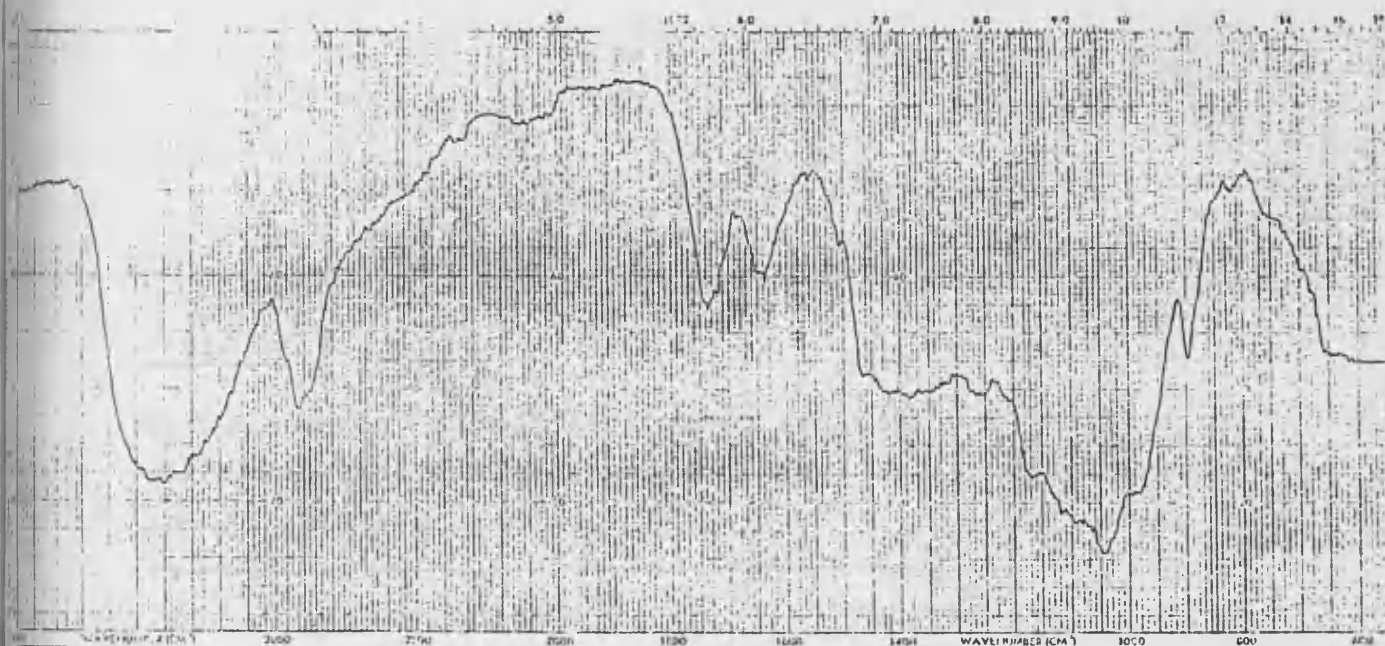


Fig.VI.26. Espectro de IR de la fracción B-1.

estos valores frente a los volúmenes de elución se muestran en la Fig.VI.27.

VI.6.3. Hidrólisis ácida

La hidrólisis ácida del polisacárido se realizó con ácido sulfúrico del 72% con agitación durante una hora a 30° y luego se diluyó el ácido y se calentó la solución a reflujo 4 horas. Se neutralizó con carbonato de bario, se filtró y el filtrado se pasó por una columna que contenía Amberlita-IR-120(H⁺) y se eluyó con agua.

Con los monosacáridos así liberados se formaron los acetatos de alditoles para un análisis cuantitativo.

VI.6.3.1. Determinación cuantitativa de los monosacáridos

La identificación y determinación cuantitativa de los monosacáridos se realizó por cromatografía gas-líquido de sus correspondientes acetatos de alditoles. En la Fig.

TABLA VI.9

Estudio de la homogeneidad de la fracción B-I. Valores de absorbancia de las fracciones eluidas en la cromatografía sobre Sephacryl S-400.

Fracciones ^a	Absorbancia
1-31	0,000
32	0,040
34	0,090
35	0,150
36	0,215
37	0,340
38	0,410
39	0,435
40	0,380
41	0,230
42	0,140
43	0,060
44	0,000

^a Cada fracción eluida es de 2 mL.

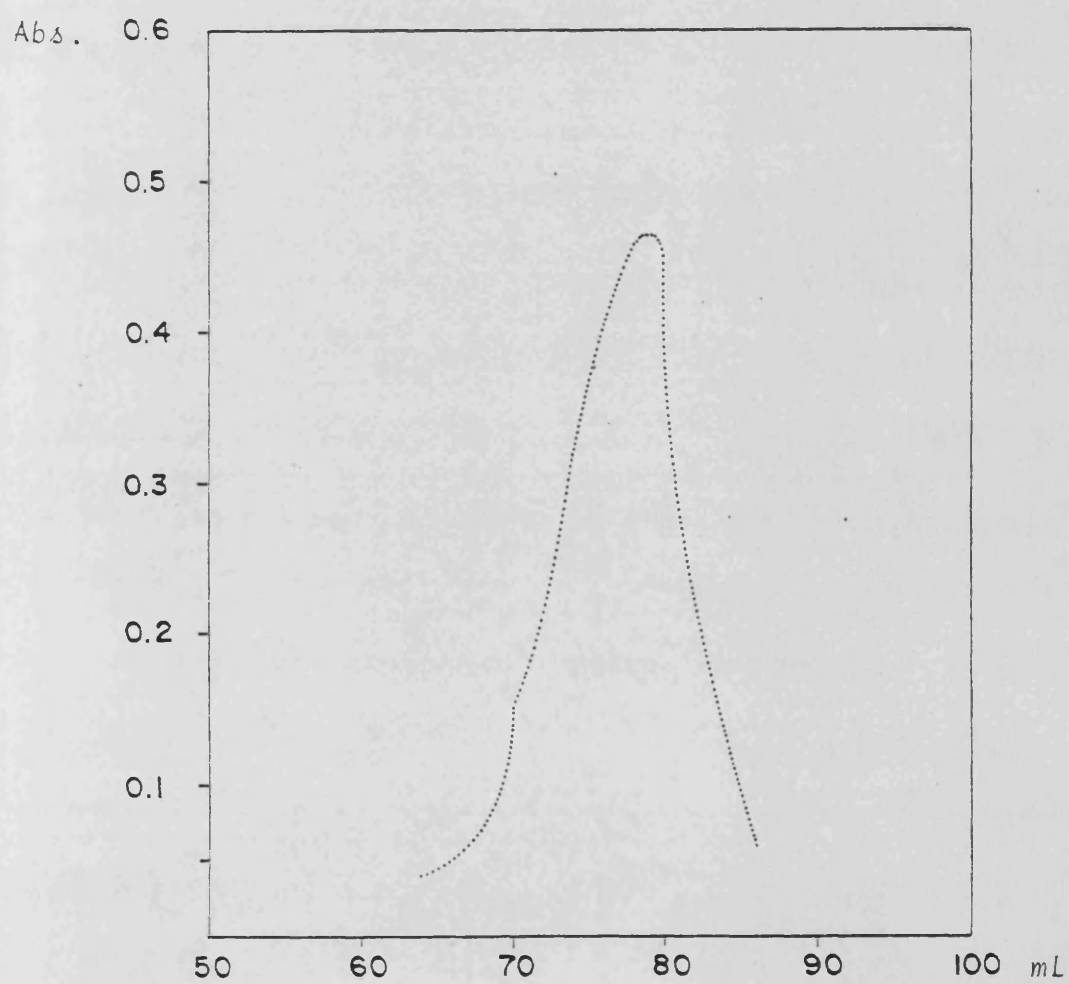


Fig.VI.27. Diagrama de elución de la fracción B-I sobre Sephacryl S-400.

VI.28a se muestra el cromatograma obtenido y en la tabla VI.10 se dan los resultados cuantitativos que se expresan en tanto por ciento del total de azúcar y del total de muestra.

TABLA VI.10

Monosacáridos de la fracción B-I determinados a través de los acetatos de alditoles

Azúcares	% Azúcares ^a
Ramnosa	0,50(0,30)
Arabinosa	3,78(2,22)
Xilosa	72,03(42,25)
Manosa	1,07(0,63)
Galactosa	6,22(3,65)
Glucosa	16,42(9,36)

^a Los valores entre paréntesis se refieren al porcentaje de azúcares en la muestra.

Estos resultados, junto con los obtenidos en la tabla VI.14, -y que se comentarán oportunamente-, fueron indicativos de que esta fracción B-I estaba impurificada en parte por la fracción B-II. Se repitió, pues, el proceso de purificación de la fracción B-I mediante la formación de los complejos insolubles de cobre tal como se explicó en el apartado VI.5.3. La composición monomérica de esta fracción B-I purificada, realizada igualmente por cromatografía gaseosa de los acetatos de alditoles, se indica en la tabla VI.8 y el cromatograma obtenido se muestra en la Fig.VI.28b. Estos resultados nos confirman que los azúcares que acompañan a la xilosa no forman parte del polisacárido de la fracción B-I, constituido por xilosa.

CHART SPEED 0.2 CM/MIN
ATTEN: 64 ZERO: 5% 5 MIN/TICK

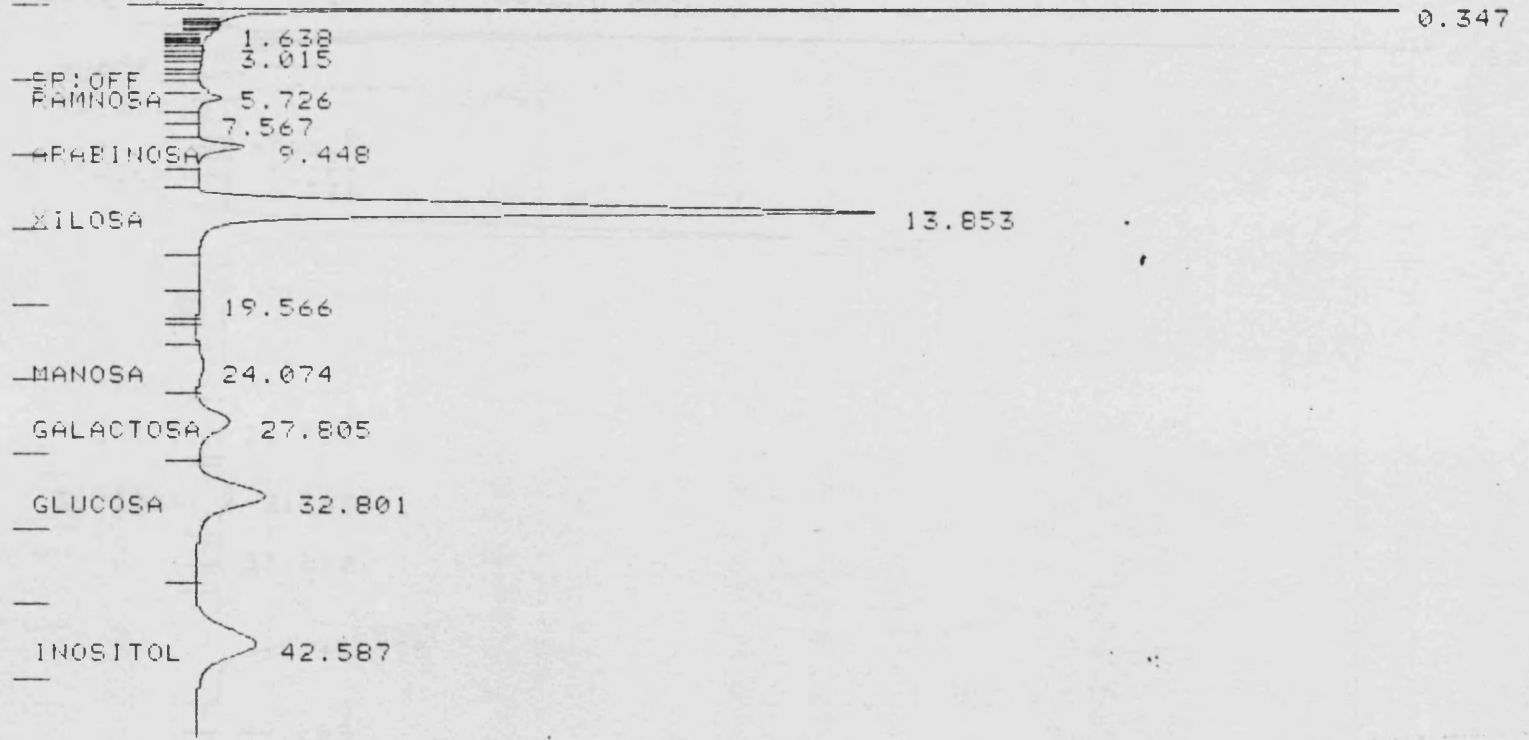


Fig. VI. 28a. Chromatografía gaseosa de los acetatos de alditoles procedentes de la hidrólisis de la fructosa B-1. Temperatura de la columna 185°.

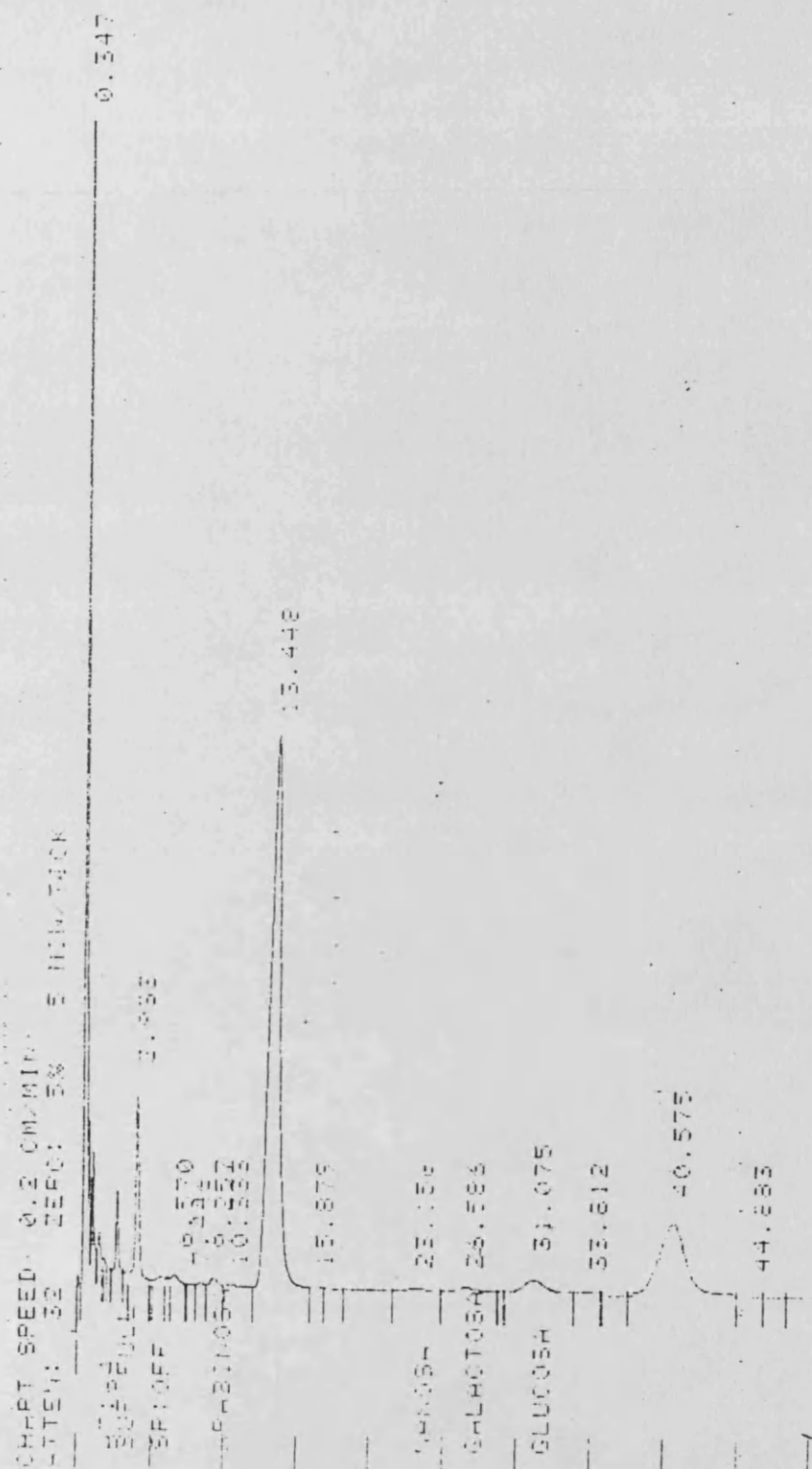


Fig. VI.28b. Cromatografía gaseosa de los acetatos de alditoles procedentes de la hidrólisis de la fracción B-I purificada. Temperatura de la columna 190°.

VI.3.2. Determinación cuantitativa de ácidos urónicos

La determinación de ácidos urónicos en el polisacárido se llevó a cabo por el método del carbazol (Bitter, 1962). Se hidrolizó el polisacárido con ácido H_2SO_4 del 72%. El hidrolizado se llevó a pH 8,5 a 9 con KOH 0,1M y se pasó sucesivamente por las resinas Amberlita IR-120(H^+) e IRA-400(AcO^-). Se eluyeron con agua y la aniónica con ácido acético al 10%. Los ácidos se aforaron a 10 mL y mediante diluciones se prepararon las muestras D-1, D-2 y D-3.

Para la determinación cuantitativa es necesario construir una recta de calibrado. Para ello se preparó una disolución de ácido glucurónico en agua destilada. De esta disolución, mediante diluciones, se prepararon diez soluciones de referencia. Las referencias y las muestras problemas se sometieron simultáneamente a la reacción colorimétrica de manera que las condiciones fuesen las mismas.

Con los datos de absorbancia y de concentración de ácido glucurónico que se detalla en la tabla VI.11 se construyó una recta de calibrado, que se muestra en la Fig.VI.29. La ecuación de la recta obtenida, ajustada por mínimos cuadrados, es: Absorbancia = $0,007 C - 0,029$ y el coeficiente de regresión (r) es: 0,979. Los resultados obtenidos fueron los siguientes.

Muestra	Absorbancia	Concentración ($\mu g/mL$)	Acido urónico(%)
D-1	0,075	13	6,84
D-2	0,156	26,5	6,97
D-3	0,370	62,17	6,54

Se obtuvo, pues, un 6,78% de ácido urónico expresado en concentración de ácido glucurónico.

TABLA VI.11

Concentración y absorbancia de las disoluciones de referencia del ácido glucurónico.

Disolución de referencia	Concentración de ác. glucurónico ($\mu\text{g/mL}$)	Absorbancia
1	6	0,000
2	12	0,075
3	18	0,090
4	24	0,155
5	30	0,180
6	36	0,205
7	42	0,325
8	48	0,285
9	54	0,325
10	60	0,425

VI.6.4. Hidrólisis ácida parcial

El polisacárido se hidrolizó parcialmente con ácido sulfúrico 0,25N y 0,025N calentando a ebullición durante 90 minutos, ambas hidrólisis por separado. Se neutralizaron con carbonato de bario y el filtrado se llevó a pH 8,5 a 9 con potasa 0,1M. Los oligosacáridos formado en ambas hidrólisis se estudiaron comparativamente por cromatografía de papel.

VI.6.4.1. Análisis de los oligosacáridos por cromatografía sobre papel.

Se utilizó la técnica descendente sobre papel Watman n°1 y n°3 usando los desarrolladores A,B y C y como revelador

Absorbancia

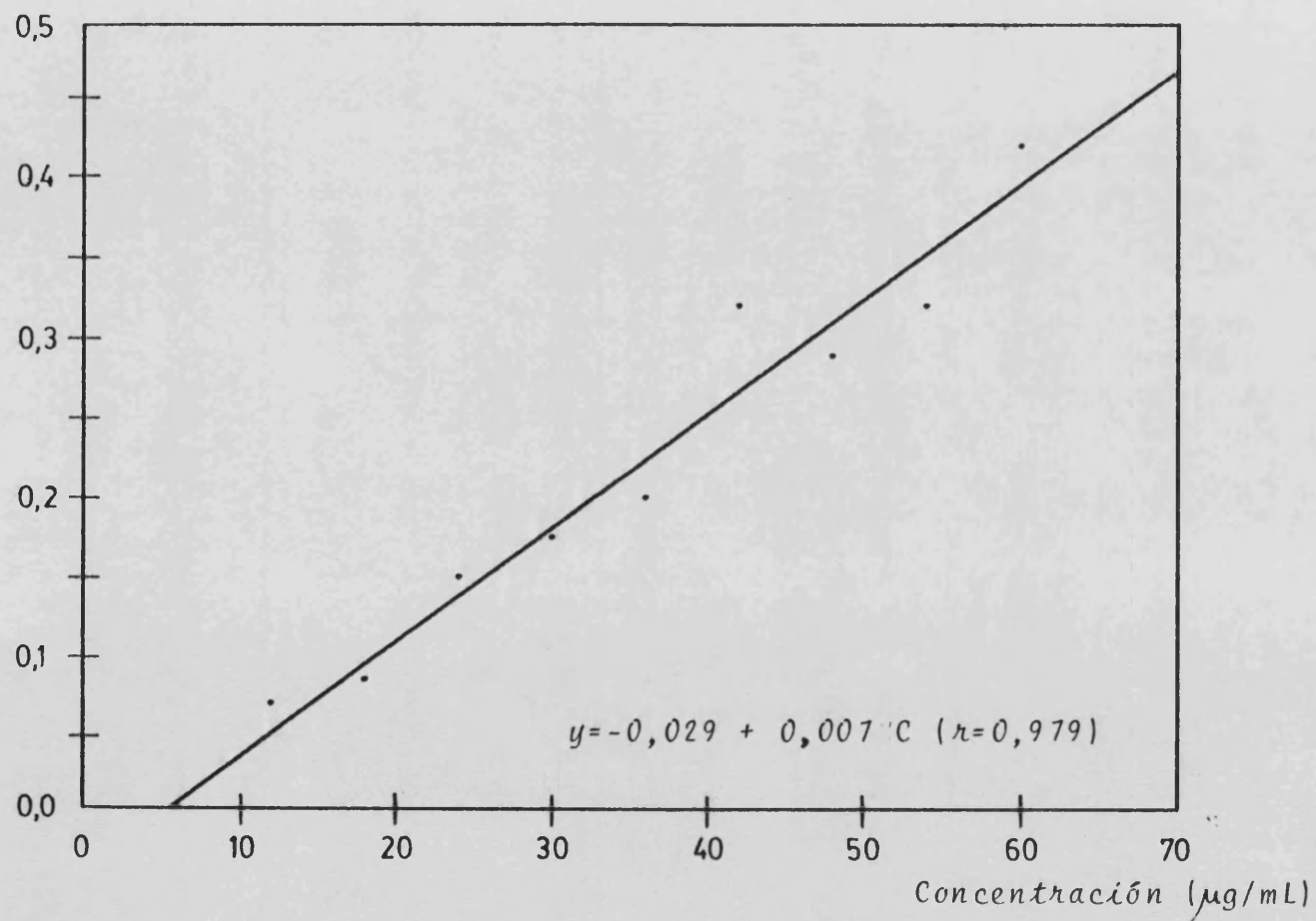


Fig. VI.29. Recta de calibrado para la determinación cuantitativa de ácidos urónicos por el método del carbazol.

se utilizó la difenilamina anilina.

Los resultados de las cromatografías de los oligosacáridos obtenidos en las hidrólisis parciales fueron coincidentes y en ambas se demostró la presencia de una serie homóloga de oligosacáridos de la xilosa. Esto se pudo comprobar aplicando la relación de movilidades cromatográficas propuesta por French y Wild.

En la tabla VI.12 se comparan los valores R_F , $\log \alpha'$ y grado de polimerización de los oligosacáridos procedentes de la hidrólisis parcial con H_2SO_4 0,25N y utilizando los desarrolladores B y C. La representación gráfica de los logaritmos de α' frente al grado de polimerización para el desarrollador A dió una recta de ecuación $\log = -0,465G.P + 0,153$ con un coeficiente de regresión $\bar{r} = -0,999$ en el caso del ácido H_2SO_4 0,025N; y una recta de ecuación $\log = -0,494G.P + 0,180$ y con un coeficiente de regresión $r = -0,999$, en el caso del H_2SO_4 0,25N, como se muestran en la Fig.VI.30 y VI.31.

Con el desarrollador B se obtuvo una recta de ecuación $\log \alpha' = 0,305 - 0,366 G.P$ y un coeficiente de regresión $r = -0,992$ como se muestra en la Fig.VI.32. Para el desarrollador C se obtuvo una recta de ecuación $\log \alpha' = 0,445 - 0,372 G.P$ y un coeficiente de regresión $r = -0,988$ como se muestra en la Fig.VI.33. Los valores obtenidos se dan en la tabla VI.13.

Con estos resultados se admitió que los oligosacáridos procedentes de la hidrólisis parcial de la fracción B-I pertenecen a la serie homóloga de la xilosa hasta un grado de polimerización de cinco.

En la cromatografía sobre papel también se observa la presencia de azúcares ácidos pero no guardan una relación lineal con la serie homóloga de la xilosa.

El oligosacárido ácido se detecta con revelador de tipo indicador que prueban su carácter ácido. La movilidad relativa del oligosacárido ácido respecto a los oligosacáridos neutros (Tabla VI.12 y VI.13) varía según el carácter

TABLA VI.12.

Cromatografía sobre papel del hidrolizado ácido de la fracción B-I

Productos de hidrólisis	Desarrollador A					
	Hidrólisis H ₂ SO ₄ 0,25N			Hidrólisis H ₂ SO ₄ 0,025N		
	R _f ^a	log α'	G.P. ^b	R _f ^a	log α'	G.P. ^b
	0,005	-2,30	5	0,006	-2,19	5
	0,016	-1,79	4	0,02	-1,70	4
	0,05	-1,30	3	0,06	-1,22	3
	0,14	-0,79	2	0,15	-0,77	2
	0,18	-0,66	-	0,3	-0,36	-
	0,24	-0,49	-	0,32	-0,33	1
	0,32	-0,33	1			

^a Papel Watman n°1. Desarrollador A: acetato de etilo-ácido acético-ácido fórmico-agua (18:3:1:4); revelador: difenilamina anilina.

^b G.P.=Grado de polimerización.

TABLA VI.13.

Cromatografía sobre papel de la hidrólisis ácida parcial (H₂SO₄ 0,25N) de la fracción B-I

Producto de hidrólisis	Desarrollador B			Desarrollador C		
	R_f^a	$\log \alpha'$	G.P.	R_f^b	$\log \alpha'$	G.P. ^c
	0,014	-1,84	6	0,03	-1,51	5
	0,028	-1,54	5	0,09	-1,00	4
	0,05	-1,28	4	0,21	-0,57	3
	0,14	-0,78	3	0,36	-0,25	2
	0,33	-0,30	2	0,515	-0,025	1
	0,43	-0,12	1			

^a Papel Watman n°1.

^b Papel Watman n°3. Desarrolladores: B, n-butanol-etanol-agua (2:1:1); C, n-butanol-piridina-agua (6:4:3). Revelador: difenilamina anilina.

^c G.P.=Grado de polimerización.

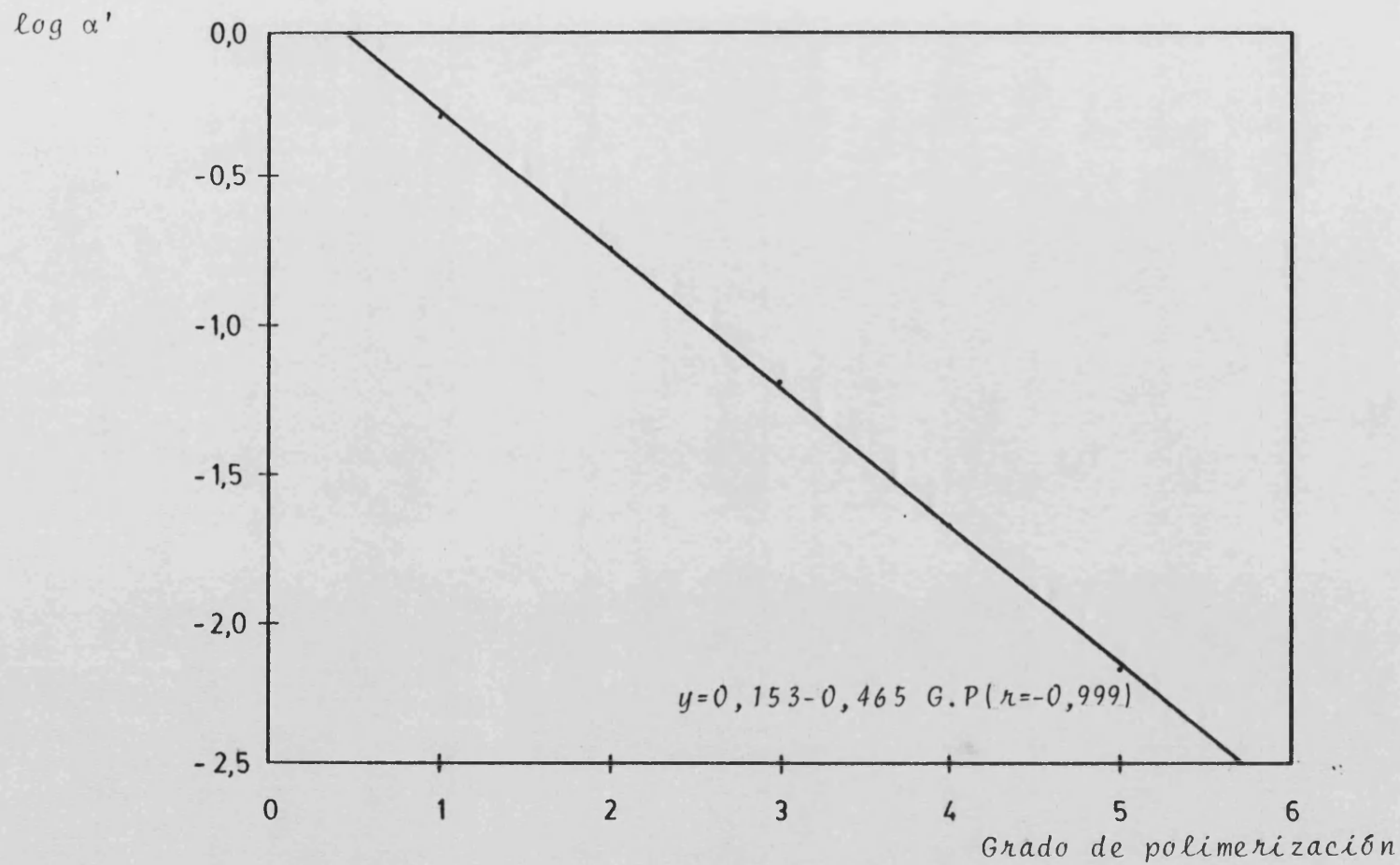


Fig. VI. 30. Representación gráfica de la relación entre el $\log \alpha'$ y el grado de polimerización para los oligosacáridos de la serie homóloga de la xilobiosa. Desarrollador A.

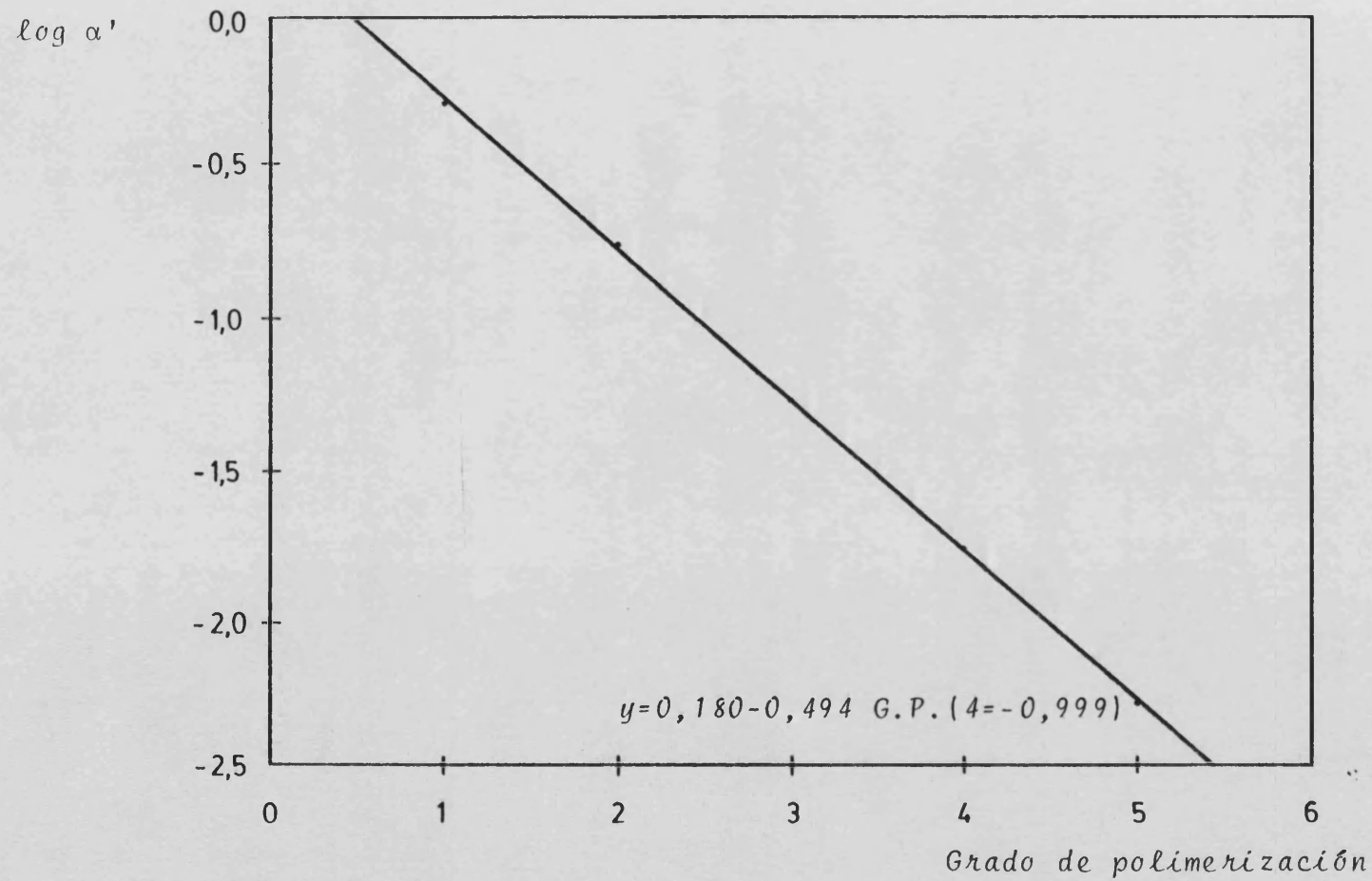


Fig. VI. 31. Representación gráfica de la relación entre el $\log \alpha'$ y el grado de polimerización para los oligosacáridos de la serie homóloga de la xilobiosa. Desarrollador A.

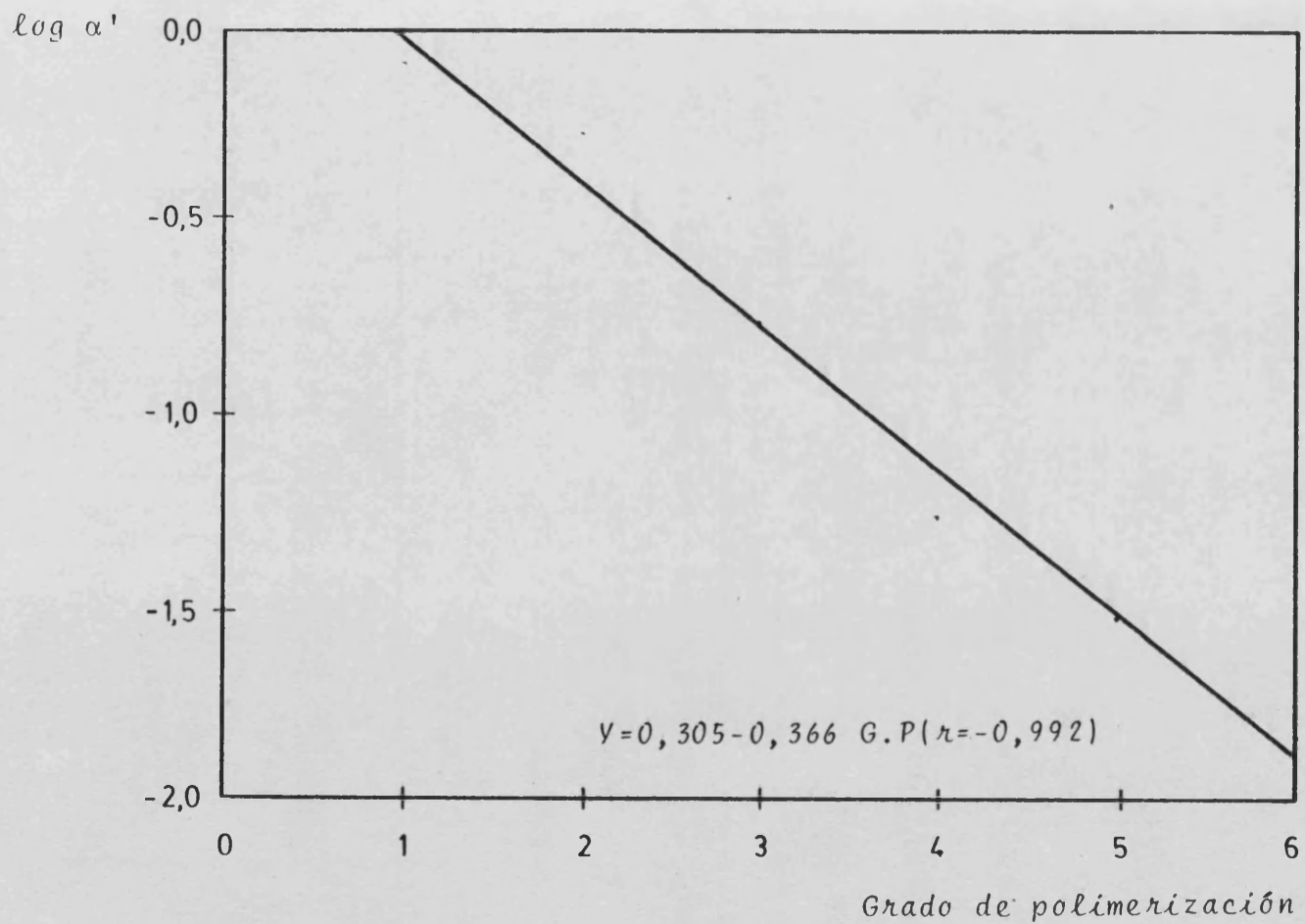


Fig.VI.32. Representación gráfica de la relación entre el $\log \alpha'$ y el grado de polimerización para los oligosacáridos de la serie homóloga de la xilobiosa. Desarrollador B.

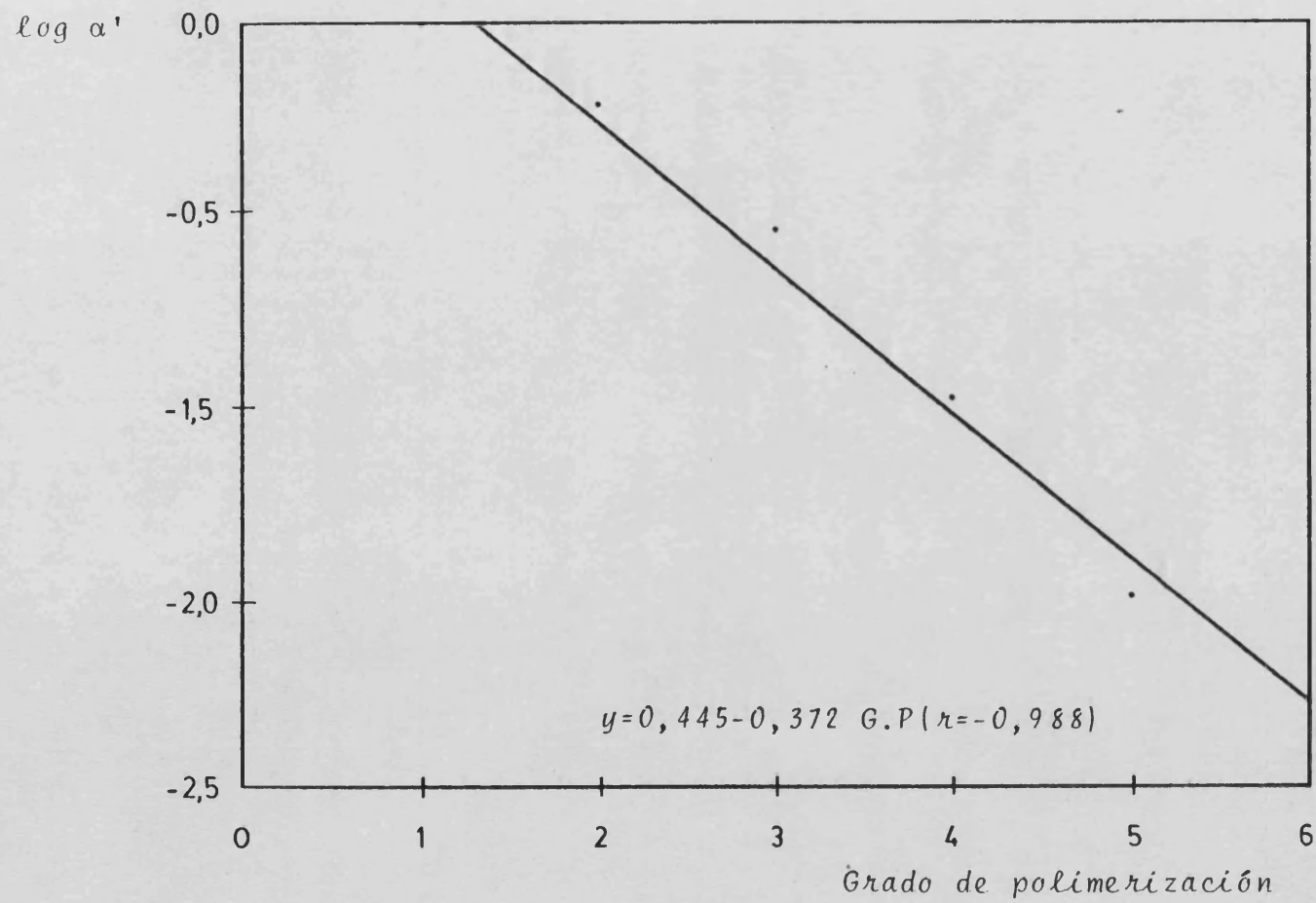


Fig.VI.33. Representación gráfica de la relación entre el $\log \alpha'$ y el grado de polimerización para los oligosacáridos de la serie homóloga de la xilobiosa. Desarrollador C.

ácido-base del desarrollador. (R_X 0,34 para el desarrollador A y 0,27 para el B).

VI.6.5. Metilación de la fracción B-I

El polisacárido se metiló por el método de Hakomori. Primeramente se formó el carbanión por reacción del hidruro de sodio con dimetilsulfóxido y a continuación se le hizo reaccionar con el polisacárido. Después de varias horas se le adicionó el yoduro de metilo. Todas estas operaciones se realizaron bajo atmósfera de nitrógeno y con agitación. El polisacárido metilado se recuperó por extracción con cloroformo. Los restos de dimetilsulfóxido se eliminaron en una estufa de vacío a 40°C.

VI.6.5.1. Datos espectroscópicos

a) Interpretación del espectro de IR

Su espectro de IR (Fig.VI.34) presentó las bandas características de un compuesto totalmente metilado: a 2920 y 2845 cm^{-1} de tensión de C-H alifático; banda a 2830 cm^{-1} de tensión de C-H del grupo $-\text{OCH}_3$; banda a 1740 cm^{-1} de tensión de C=O de ester metílico; banda a 1460 cm^{-1} de deformación por flexión asimétrica de los grupos $-\text{CH}_2-$ y CH_3- ; banda a 1380 cm^{-1} de deformación por flexión simétrica de los grupos $-\text{CH}_3$; y banda entre 1120 y 1050 cm^{-1} de tensión C-O de éter y de ester; banda a 950 cm^{-1} característica de éteres cíclicos y banda a 890 cm^{-1} debida a las uniones β del polisacárido.

b) Interpretación del espectro de RMN

Su espectro de RMN (Fig.VI.35) (DCCl_3) muestra las señales características de un polisacárido metilado con uniones glicosídicas β . Las señales a 4,3 δ corresponden a los

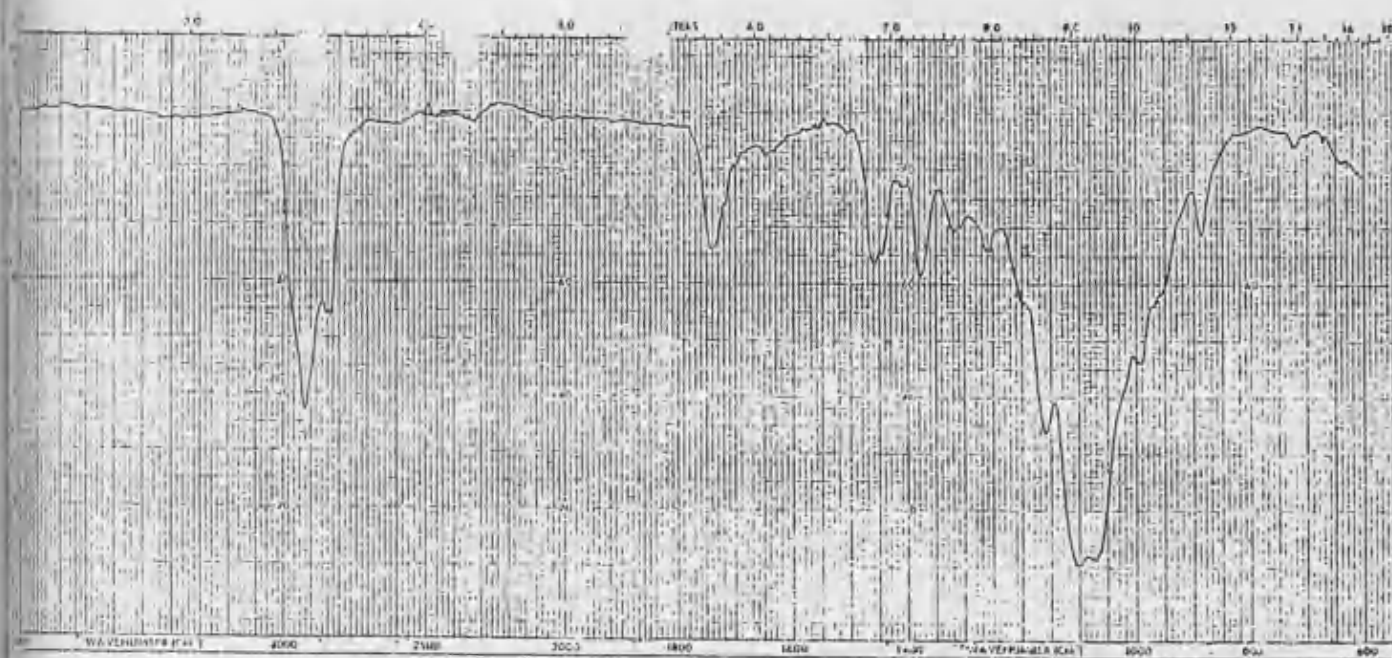


Fig. VI.34. Espectro de IR de la fracción B-I metilada.



Fig. VI.35. Espectro de RMN de la fracción B-I metilada.

protones anoméricos en posición β ; a 3,58 δ y a 3,5 δ singletes asignables a los grupos metoxilo en C-3, y C-2 respectivamente; las señales entre 3,9 y 3,7 δ asignables a los $-\underline{\text{CH}}-\text{OR}$ y las señales entre 3,2 y 2,9 δ muy poco resueltas asignables a los $-\underline{\text{CH}}_2-\text{OR}$.

VI.6.5.2. Hidrólisis ácida

El polisacárido metilado se hidrolizó con ácido sulfúrico del 72% en dos etapas. Primero se disolvió el polisacárido a 30°C y luego se hidrolizó con ácido sulfúrico 1N calentando a 100°C durante 4 horas.

Los monosacáridos parcialmente metilados que se obtuvieron se transformaron en los correspondientes acetatos de alditoles por reducción con borohidruro de sodio y acetilación con anhídrido acético-piridina.

VI.6.5.2.1. Identificación de los monosacáridos parcialmente metilados

a) Análisis por cromatografía gaseosa.

Los acetatos de alditoles parcialmente metilados se identificaron por cromatografía gas-líquido utilizando el 1,5-di-O-acetil-2,3,4,6-tetra-O-metil-D-glucitol como patrón de referencia. En la Fig.VI.36 se muestra el cromatograma típico de estos compuestos y en la tabla VI.14 se dan sus tiempos de retención relativos al azúcar patrón de referencia así como los porcentajes relativos de cada azúcar en la mezcla.

b) Análisis por cromatografía gaseosa-espectrometría de masas

Se confirmó la identidad de estos derivados parcialmente metilados por cromatografía gaseosa -espectrometría de masas combinada. En la Fig. VI.37 se muestra el cromatograma obtenido.

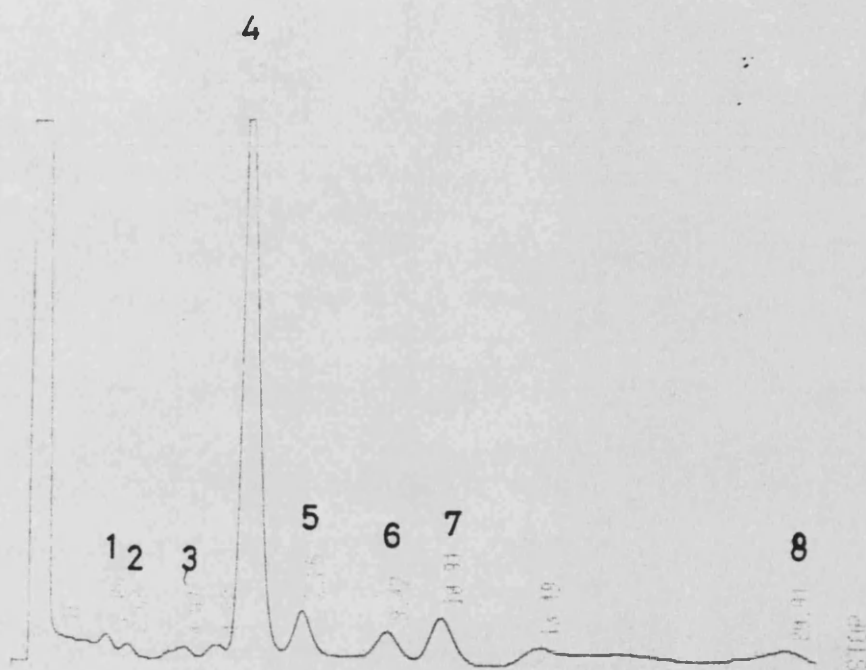


Fig. VI. 36. Cromatografía gaseosa de los acetatos de alditoles de los azúcares metilados obtenidos del hidrolizado de la fracción B-I metilada en una columna ECNSS-M a 175°. Picos: 1) 2,3,5-Me₃-Ara; 2) 2,3,4-Me₃-Xi; 3) 2,3,4,6-Me₄-Glu; 4) 2,3-Me₂-Xi; 5) 2,4,6-Me₃-Glu; 6) 2,3,6-Me₃-Glu; 7) 3-Me-Xi y 8) 2,3-Me₂-Glu.

TABLA VI.14

Eteres metílicos del hidrolizado de la fracción B-I

Azúcares ^a	t _R ^b	t _R ^c	%Azúcares	%Molar ^d
2,3,5-Me ₃ -Ara	0,51	0,69	0,95	
2,3,4-Me ₃ -Xi	0,63	0,75	0,55	0,08
2,3,4,6-Me ₄ -Glu	1,00	1,00	1,98	
2,3-Me ₂ -Xi	1,42	0,91	72,53	10
2,4,6-Me ₃ -Glu	1,78	1,029	7,28	
2,3,6-Me ₃ -Glu	2,35	1,14	4,82	
3-Me-Xi	2,70	1,034	7,36	1,10
2,3-Me ₂ -Glu	4,88	1,26	4,51	

^a 2,3,5-Me₃-Ara=1,5-di-O-acetil-2,3,5-tri-O-metil-L-arabinitol.

^b Tiempos de retención de los acetatos de alditoles parcialmente metilados relativos al 1,5-di-O-acetil-2,3,4,6-tetra-O-metil-D-glucitol (t_R 4,06 min) en una columna ECNSS-M.

^c Idem en una columna capilar OV-1

^d Razón molar calculada aplicando los factores de respuesta según la teoría de e.c.r. (Sweet, 1974).

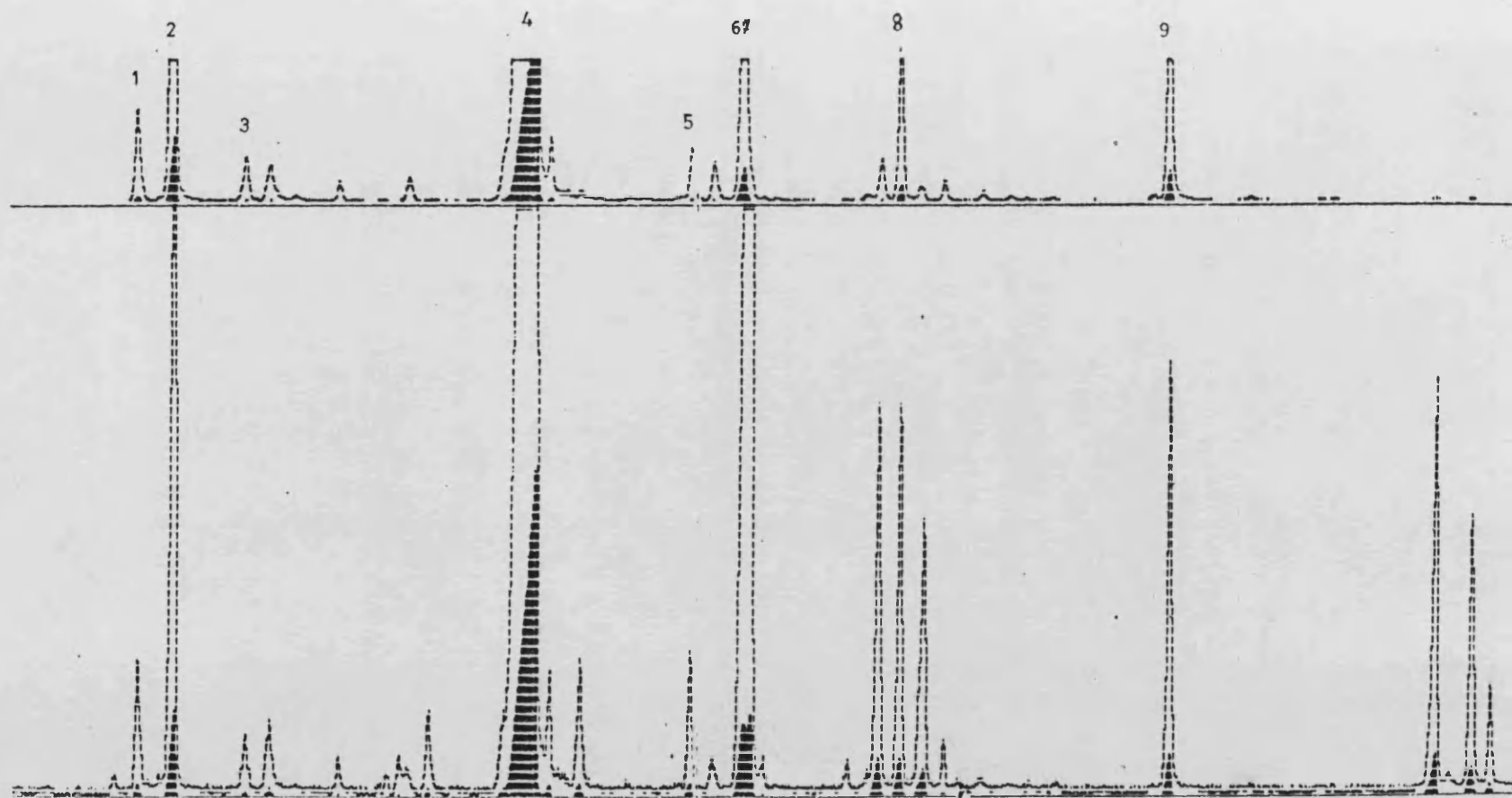


Fig. VI. 37. Cromatografía gaseosa de los acetatos de alditoles de azúcares metilados obtenidos del hidrolizado de la fracción B-I metilada en una columna capilar a 120-220° a 89 min. Cromatograma inferior según ión total. Cromatograma superior según ión m/e 117. Picos: 1) impureza; 2) 2,3,5-Me₃-Ara; 3) 2,3,4-Me₃-Xi; 4) 2,3-Me₂-Xi; 5) 2,3,4,6-Me₄-Glu; 6) 2,4,6-Me₃-Glu y 3-Me-Xi; 7) 2,3,6-Me₃-Glu y 8) 2,3-Me₂-Glu.

Interpretación de los espectros de masas

De los espectros de masas de los acetatos de alditoles parcialmente metilados de la fracción B-I se identificaron ocho compuestos, que se indican en la tabla VI.14, correspondientes a los picos del cromatograma de la Fig.VI.37.

Los acetatos de alditoles que acompañan al pico principal 4 se observa que aparecen igualmente, pero en mayor proporción, en los derivados parcialmente metilados de la fracción B-II (tabla VI.16). Esto hizo suponer que la fracción B-I estaba impurificada en parte por la fracción B-II. Para comprobarlo se volvió a purificar la fracción B-I, tal como se indicó en el apartado VI.5.3 y los resultados obtenidos de la composición monomérica de esta fracción B-I purificada se indican en la tabla VI.6.

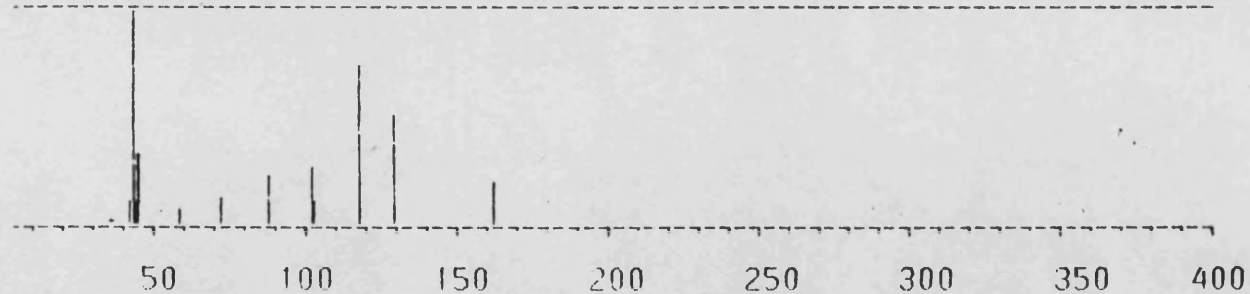
El pico 1 del cromatograma, cuyo espectro de masas se muestra en la Fig.VI.38 dió como fragmentos mas prominentes los iones con m/e 43, 45, 71, 87, 101, 117, 129 y 161 (Fig.VI.55), lo que junto con el análisis cromatográfico, se identificó como el compuesto 1,4-di-O-acetil-2,3,5-tri-O-metil-L-arabinitol.

El pico 3 del cromatograma, cuyo espectro de masas se muestra en la Fig.VI.39, dió como fragmentos mas prominentes los iones con m/e 43, 101, 117 y 161 (Fig.VI.23), lo que junto con el análisis cromatográfico nos permitió identificarlo como el compuesto 1,5-di-O-acetil-2,3,4-tri-O-metil-D-xilitol.

El pico 4, cuyo espectro de masas se muestra en la Fig.V.40, dió como fragmentos mas prominentes los iones con m/e 43, 87, 101, 117, 129 y 189 (Fig.III.28), lo que, junto con el análisis por cromatografía gaseosa nos permitio identificarlo como el compuesto 1,4,5-tri-O-acetil-2,3-di-O-metil-D-xilitol.

El pico 5, cuyo espectro de masas se muestra en la Fig.VI.41, dió como fragmentos mas prominentes los iones con

Base Peak = 43.2 Base Peak Abundance = 314 Total Abundance = 1176

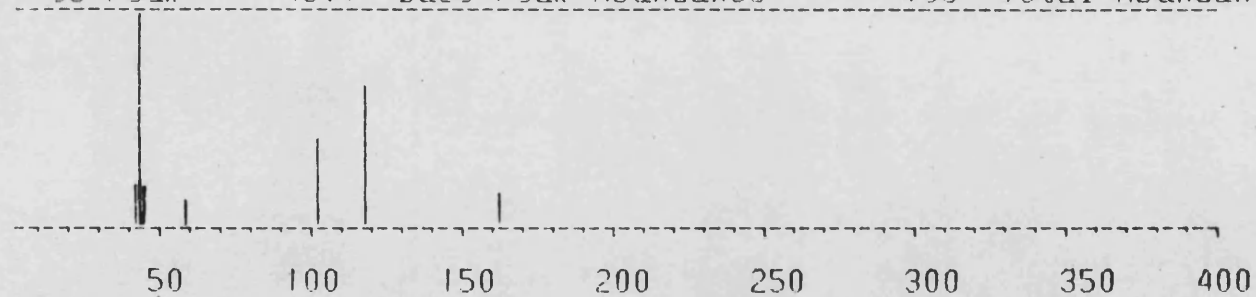


Lower Abundance Cutoff Level = 1.0%

MASS	ABUNDANCE (%)	MASS	ABUNDANCE (%)	MASS	ABUNDANCE (%)
41.1	10.5	58.1	7.0	102.1	11.1
43.2	100.0	71.1	12.4	117.1	73.2
44.1	10.2	87.1	22.3	129.1	50.3
45.1	31.5	101.1	26.4	161.1	19.4

Fig. VI.38. Espectro de masas del 1,4-di-O-acetil-2,3,5-tri-O-metil-L-arabinitol.

Base Peak = 43.1 Base Peak Abundance = 188 Total Abundance = 521

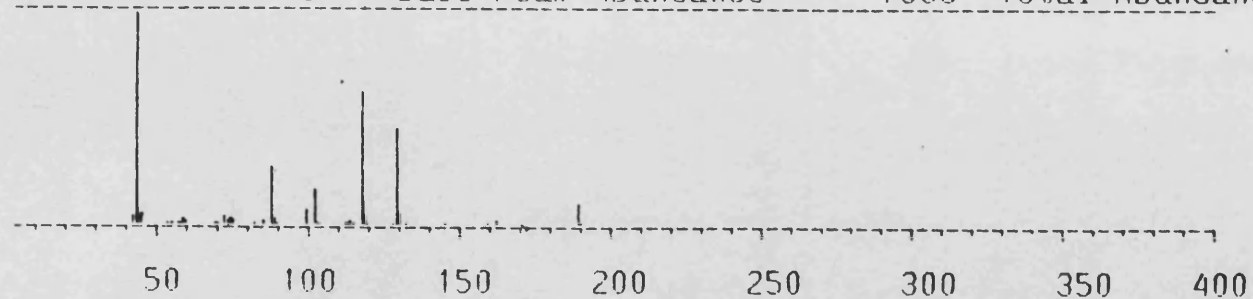


Lower Abundance Cutoff Level = 1.0%

MASS	ABUNDANCE (%)	MASS	ABUNDANCE (%)	MASS	ABUNDANCE (%)
41.3	19.1	45.2	18.1	117.1	64.9
43.1	100.0	58.1	11.7	161.1	15.4
44.1	6.4	101.1	41.5		

Fig. VI.39. Espectro de masas del 1,5-di-O-acetil-2,3,4-tri-O-metil-D-xilitol.

Base Peak = 43.1 Base Peak Abundance = 7536 Total Abundance = 25298

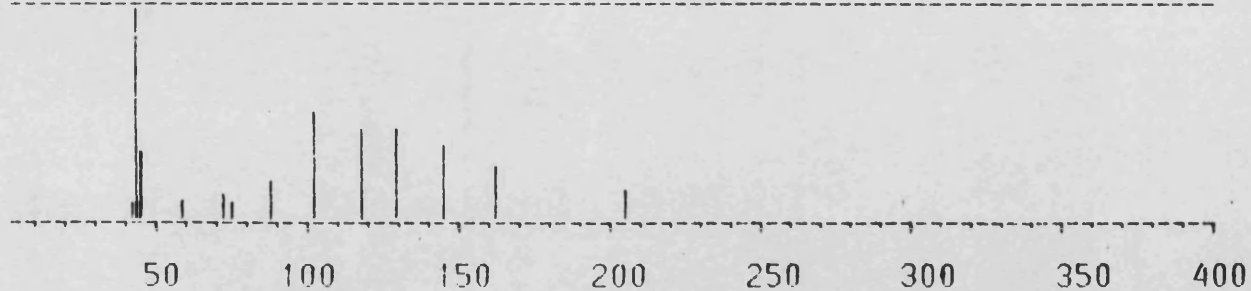


Lower Abundance Cutoff Level = 1.0%

MASS	ABUNDANCE (%)	MASS	ABUNDANCE (%)	MASS	ABUNDANCE (%)
41.2	3.6	71.1	4.2	102.2	1.5
43.1	100.0	73.1	2.0	103.2	1.1
44.1	2.9	74.1	3.1	113.1	1.7
45.1	5.0	75.1	1.8	117.2	61.6
55.2	1.1	81.1	1.2	118.2	3.5
57.1	1.4	85.1	1.7	129.2	44.7
58.2	3.3	87.1	27.4	130.2	4.8
59.1	2.4	88.1	3.1	131.2	1.0
69.1	1.3	99.2	6.8	161.2	2.4
70.2	1.3	101.2	16.9	189.2	10.3

Fig. VI.40. Espectro de masas del 1,4,5-tri-O-acetil-2,3-di-O-metil-D-xilitol.

Base Peak = 43.1 Base Peak Abundance = 305 Total Abundance = 1211

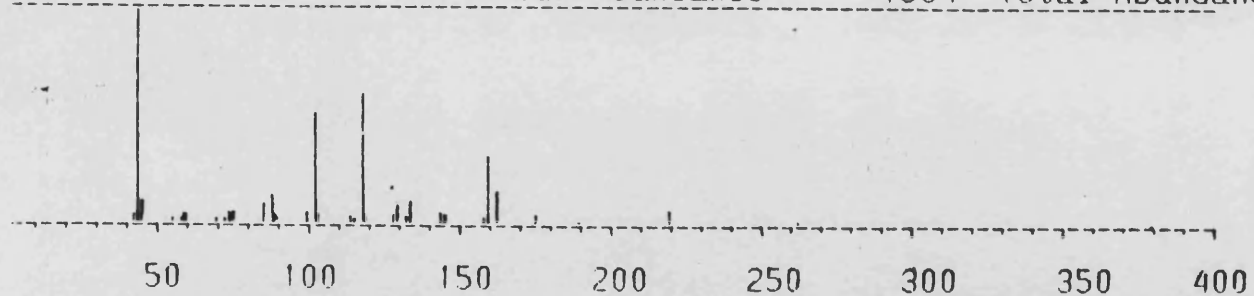


Lower Abundance Cutoff Level = 1.0%

MASS	ABUNDANCE (%)	MASS	ABUNDANCE (%)	MASS	ABUNDANCE (%)
41.2	7.9	71.1	11.8	129.2	42.0
43.1	100.0	75.1	8.2	145.2	34.4
44.2	3.3	87.1	18.4	161.2	25.2
45.1	30.8	101.1	49.5	205.2	14.4
57.9	8.9	117.1	42.3		

Fig. VI.4l. Espectro de masas del 1,5-di-O-acetil-2,3,4,6-tetra-O-metil-D-glucitol.

Base Peak = 43.1 Base Peak Abundance = 1584 Total Abundance = 6322

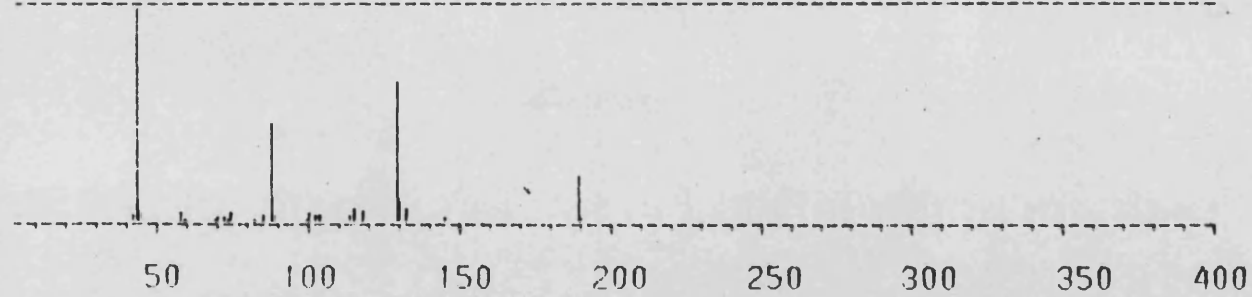


Lower Abundance Cutoff Level = 1.0%

MASS	ABUNDANCE (%)	MASS	ABUNDANCE (%)	MASS	ABUNDANCE (%)
41.2	4.5	75.1	5.4	127.1	3.8
43.1	100.0	85.1	8.8	129.1	8.1
44.2	4.4	87.1	12.6	131.2	3.0
45.1	9.8	88.0	4.2	133.1	10.4
55.1	1.9	89.2	3.4	143.1	4.8
57.1	2.1	99.1	5.0	145.1	3.7
58.1	3.5	101.2	51.5	157.1	2.6
59.1	3.9	102.1	3.7	159.1	30.9
69.2	1.5	113.1	3.3	161.1	15.3
71.1	2.4	115.1	1.8	175.1	3.7
73.1	4.5	117.2	60.4	189.2	1.3
74.2	3.7	118.1	2.9	219.2	5.7

Fig. VI. 42. Espectro de masas del 1,3,5-tri-O-acetil-2,4,6-tri-Ometil-D-glucitol.

Base Peak = 43.1 Base Peak Abundance = 548 Total Abundance = 1679

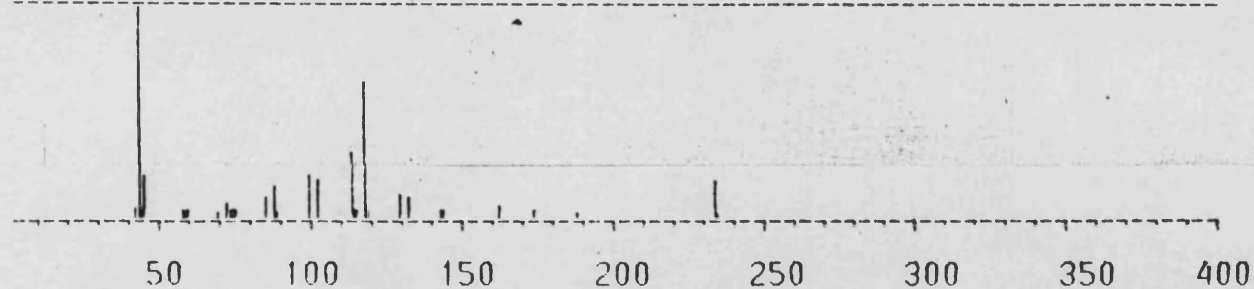


Lower Abundance Cutoff Level = 1.0%

MASS	ABUNDANCE (%)	MASS	ABUNDANCE (%)	MASS	ABUNDANCE (%)
41.2	3.5	74.1	3.6	115.1	5.7
43.1	100.0	81.1	1.5	117.2	5.1
44.1	3.6	85.1	2.9	129.1	65.0
57.0	4.4	87.1	46.0	130.2	9.3
59.0	1.3	88.1	3.1	131.0	6.2
69.1	1.3	100.3	4.2	145.1	2.0
70.3	2.0	101.1	2.9	189.2	21.2
71.1	2.2	103.0	3.3	190.1	1.8
73.1	1.1	113.1	2.6		

Fig.VI.43. Espectro de masas del 1,2,4,5-tetra-O-acetil-3-O-metil-D-xilitol.

Base Peak = 43.1 Base Peak Abundance = 796 Total Abundance = 3151

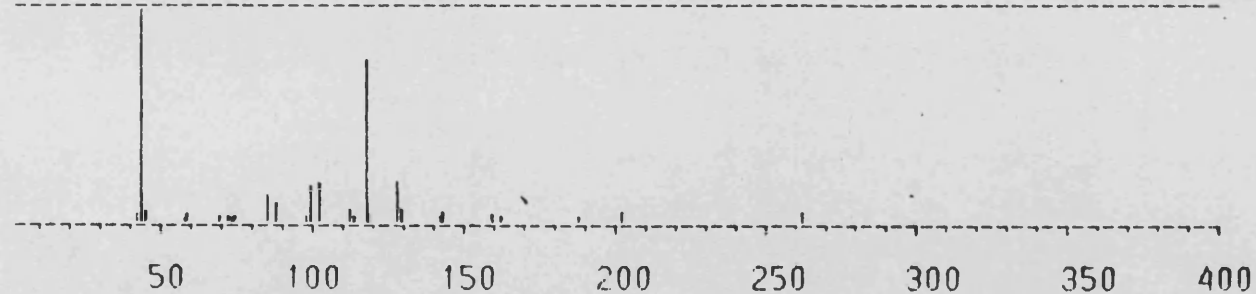


Lower Abundance Cutoff Level = 1.0%

MASS	ABUNDANCE (%)	MASS	ABUNDANCE (%)	MASS	ABUNDANCE (%)
41.2	5.4	75.1	4.4	118.2	4.3
43.1	100.0	85.1	10.4	129.1	11.1
44.2	4.1	87.1	15.1	131.2	10.3
45.1	19.8	88.0	3.3	142.1	4.3
57.2	3.8	99.1	19.8	143.2	4.3
58.4	2.8	101.1	18.0	161.1	5.9
59.1	3.6	113.1	30.4	173.1	3.9
69.1	2.9	114.3	3.5	187.0	2.8
71.1	7.4	115.1	4.1	233.2	16.6
73.2	4.1	117.2	64.1	234.2	1.8
74.5	3.6				

Fig. VI.44. Espectro de masas del 1,4,5-tri-O-acetil-2,3,6-tri-O-metil-D-glucitol.

Base Peak = 43.1 Base Peak Abundance = 1104 Total Abundance = 3648



Lower Abundance Cutoff Level = 1.0%

MASS	ABUNDANCE (%)	MASS	ABUNDANCE (%)	MASS	ABUNDANCE (%)
41.2	3.8	85.1	13.4	127.1	18.7
43.1	100.0	87.1	9.0	129.1	5.7
44.1	4.5	97.1	2.7	141.2	3.2
45.1	4.8	99.2	16.7	142.2	5.4
57.2	2.4	101.1	17.8	159.1	3.7
58.1	3.6	111.1	5.9	161.1	3.4
69.1	3.1	113.1	3.0	187.1	2.7
71.0	3.3	117.2	75.0	201.1	4.6
73.1	2.4	118.1	3.8	261.1	5.1
74.1	2.6				

Fig. VI. 45. Espectro de masas del 1,4,5,6-tetra-O-acetil-2,3-di-O-metil-D-glucitol.

m/e 43, 45, 71, 87, 101, 117, 129, 145, 161 y 205 (Fig.III.26), lo que junto con el análisis por cromatografía gaseosa nos permitió identificarlo como el compuesto 1,5,di-O-acetil-2,3,4,6-tetra-O-metil-D-glucitol.

El pico 6, cuyo espectro de masas se muestra en la Fig.VI.42, dió como fragmentos mas prominentes los iones con m/e 43, 45, 87, 101, 117, 129 y 161. (Fig. VI.20), lo que nos permitió identificarlo como el compuesto 1,3,5-tri-O-acetil-2,4,6-tri-O-metil-D-glucitol.

El pico 7, cuyo espectro de masas se muestra en la Fig. VI.43, dió los iones con m/e 43, 87, 129 y 189 (Fig.V.17), lo que, junto con el análisis por cromatografía gaseosa, nos permitió identificarlo como el compuesto 1,2,4,5-tetra-O-acetil-3-O-metil-D-xilitol.

El pico 8, cuyo espectro de masas se muestra en la Fig.VI.44, dió como fragmentos mas prominentes los iones con m/e 43, 45, 87, 99, 101, 113, 117 y 233 (Fig.III,30), lo que, junto con el análisis cromatográfico, se identificó como el compuesto 1,4,5-tri-O-acetil-2,3,6-tri-O-metil-D-glucitol.

El pico 9, cuyo espectro de masas se muestra en la Fig.VI.45, dió los iones 43, 101, 117 y 261 (Fig.III.32), lo que , junto con el análisis cromatográfico nos permitió identificarlo como el compuesto 1,4,5,6-tetra-O-acetil-2,3-di-O-metil-D-glucitol.

VI.6.6. Caracterización del ácido 4-O-metil-D-glucurónico

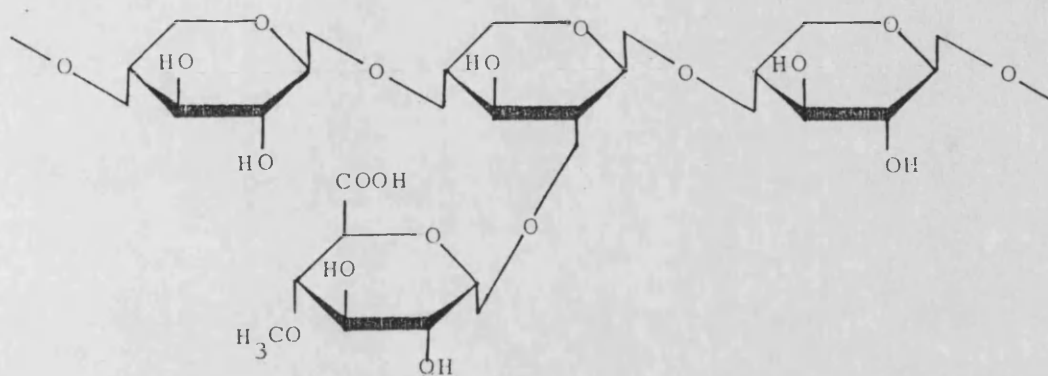
El ácido 4-O-metil-D-glucurónico se caracterizó por transformación en el 1,2,3,5,6-penta-O-acetil-4-O-metil-D-glucitol a través de la aldolactona (Tejero, 1984).

La fracción B-I se hidrolizó parcialmente con ácido sulfúrico 0,25 N (apartado VI.6.4.); del hidrolizado se separaron los componentes ácidos por intercambio iónico con las resinas Amberlita IR-120(H⁺) e IRA-400(AcO⁻). Estos componentes ácidos -ácido urónico, aldobiurónico y superiores-, se hidrolizaron con ácido sulfúrico del 72%, se redujeron con borohidruro de sodio y se formó la aldolactona con ácido HCl 1,2N. A continuación se formaron los correspondientes acetatos de alditoles para su posterior análisis cromatográfico.

Por cromatografía gaseosa de estos derivados, acetatos de alditoles, en una columna ECNSS-M a 185°C, se identificaron la xilosa y el ácido 4-O-metil-D-glucurónico. El tiempo de retención del pentaacetato de xilitol fué de 31,83 minutos y el del 1,2,3,5,6-penta-O-acetil-4-O-metil-D-glucitol de 75,72 minutos. El tiempo de retención de estos compuestos relativo al 1,5-di-O-acetil-2,3,4,6-tetra-O-metil-D-glucitol, utilizado como patrón de referencia, fué de 4,94 y 11,75 respectivamente. El descrito en la bibliografía para el 1,2,3,5,6-penta-O-acetil-4-O-metil-D-glucitol es de 11,5 (Churms, 1982).

Luego, en base al análisis de metilación de la fracción B-I y con la caracterización del ácido 4-O-metil-D-glucurónico se concluye que la fracción B-I está formada por una cadena lineal de unidades de D-xilopiranososa con uniones $\beta(1\rightarrow4)$ y el ácido 4-O-metil-D-glucurónico se une a esta cadena a través del hidroxilo del carbono 2 de la xilosa, es decir, con uniones $\alpha(1\rightarrow2)$.

Se propone la siguiente estructura para la fracción B-I:



VI.7. ESTUDIO DE LA FRACCION B-II

La fracción (BII) se caracterizó primeramente por sus datos espectroscópicos y se analizó por métodos químicos y cromatográficos.

VI.7.1. Datos espectroscópicos

Interpretación del espectro de IR

Su espectro de IR (Fig.VI.46) presentó las siguientes bandas características: entre 3600 y 3200 cm^{-1} banda ancha de tensión de O-H de alcohol asociado intermolecularmente; banda a 2925 cm^{-1} de tensión de C-H alifático; bandas a 1740 y 1650 cm^{-1} de tensión de C=O; y banda ancha a 1050 cm^{-1} de tensión de C-O de alcohol.

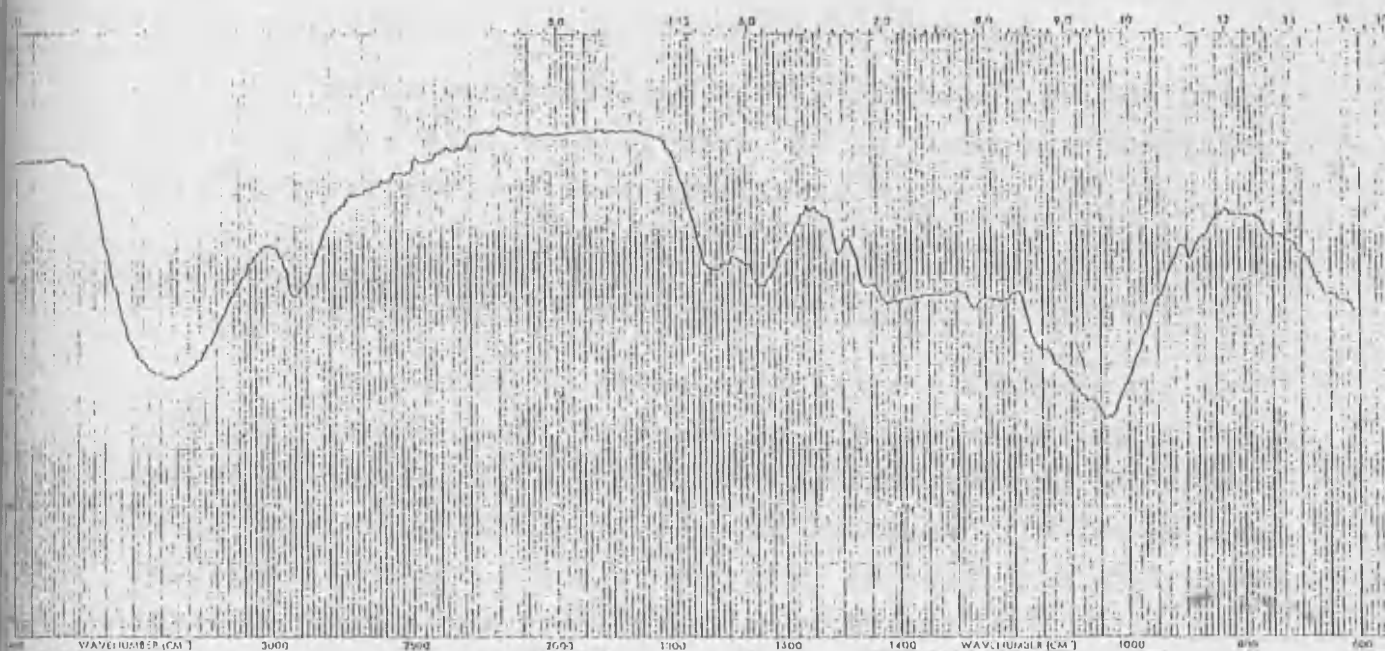


Fig.VI.46. Espectro de infrarrojo de la fracción (B-II).

VI.7.2. Estudio de la homogeneidad de la fracción B-II

Se utilizó la cromatografía de filtración sobre geles porosos para determinar la homogeneidad de la fracción B-II. La muestra se disolvió en NaCl 0,5M, que se utilizó también como eluyente, y se cromatografió sobre Sephacryl S-400. Los valores de absorbancia de las fracciones eluidas se dan en la tabla VI.15 y el diagrama obtenido al representar estos valores frente a los volúmenes de elución se muestran en la Fig. VI.47.

VI.7.3. Hidrólisis ácida

El polisacárido se disolvió en ácido sulfúrico al 72% a 30°C y se hidrolizó con ácido sulfúrico 1N calentando a reflujo. El hidrolizado, tras neutralización con carbonato de bario, se desionizó a través de la resina Amberlita IR-120 (H^+), y se eluyeron los productos con agua.

Estos monosacáridos se transformaron en los correspondientes acetatos de alditoles, de la forma acostumbrada, para su posterior análisis cuantitativo.

VI.7.3.1. Determinación cuantitativa de los monosacáridos

Se utilizó la cromatografía gas-líquido para la identificación y cuantificación de los monosacáridos a través de sus acetatos de alditoles. El cromatograma resultante se muestra en la Fig. VI.48 y en la tabla VI.8 se dan los resultados obtenidos que se expresan en tanto por ciento del total de la muestra y del total de azúcares.

VI.7.4. Hidrólisis ácida parcial

a) Con H_2SO_4 0,005M.

Se realizó una hidrólisis parcial de la fracción B-II con ácido sulfúrico 0,005M. Los oligosacáridos del hi-

TABLA VI.15

Estudio de la homogeneidad de la fracción B-II. Valores de absorbancia de las fracciones eluidas en la cromatografía sobre Sephacryl S-400.

Fracciones ^a	Absorbancia
1-25	0,000
26	0,015
28	0,075
30	0,235
31	0,340
32	0,490
33	0,700
34	0,740
35	0,860
36	0,890
37	0,800
38	0,620
39	0,390
40	0,230
41	0,145
44	0,075

^a Cada fracción eluida es de 2 mL.

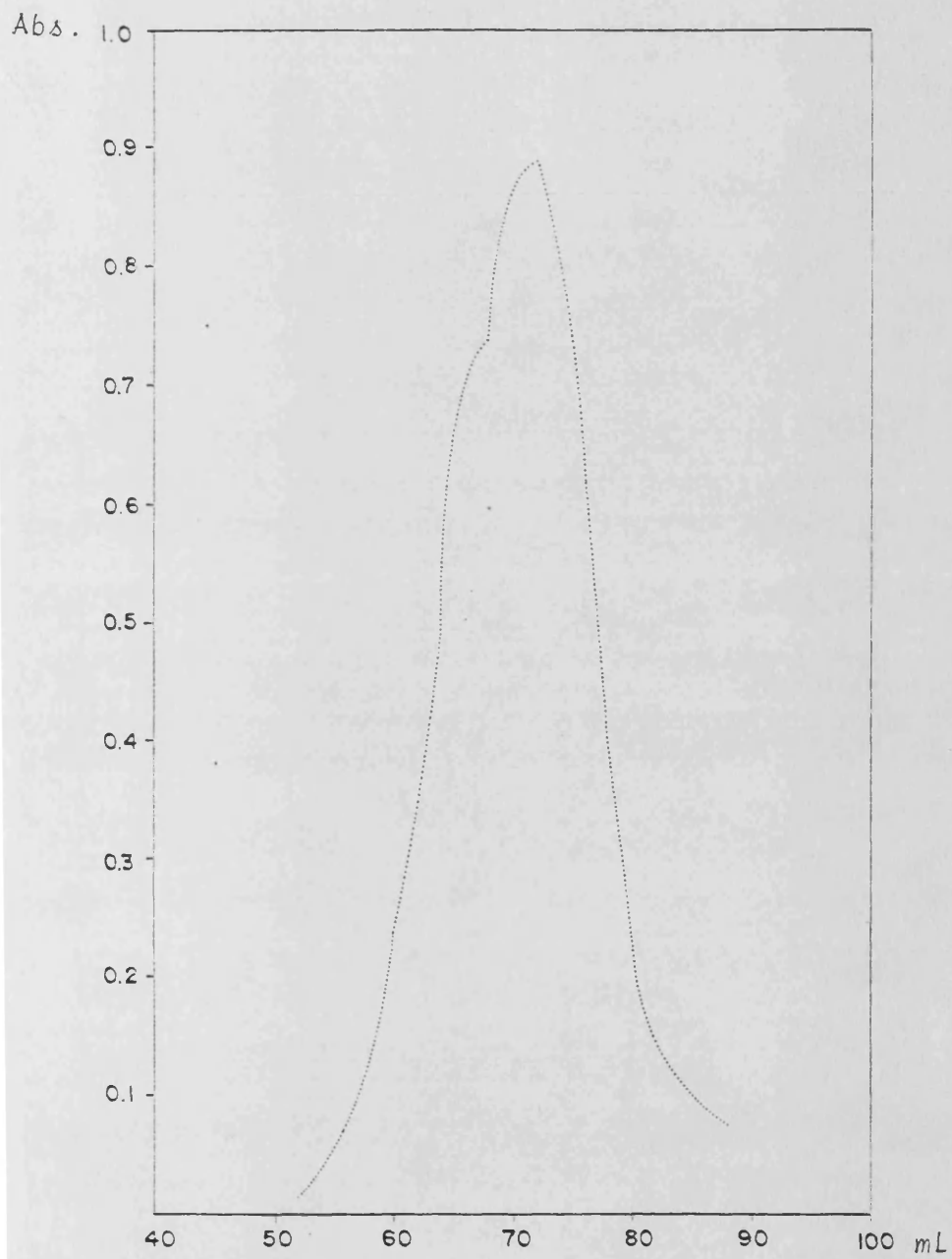


Fig. VI.47. Diagrama de elución de la fracción B-II sobre Sephacryl S-400.

CHART SPEED 0.2 CM/MIN
ATTEN: 32 ZERO: 5% 5 MIN/TICK

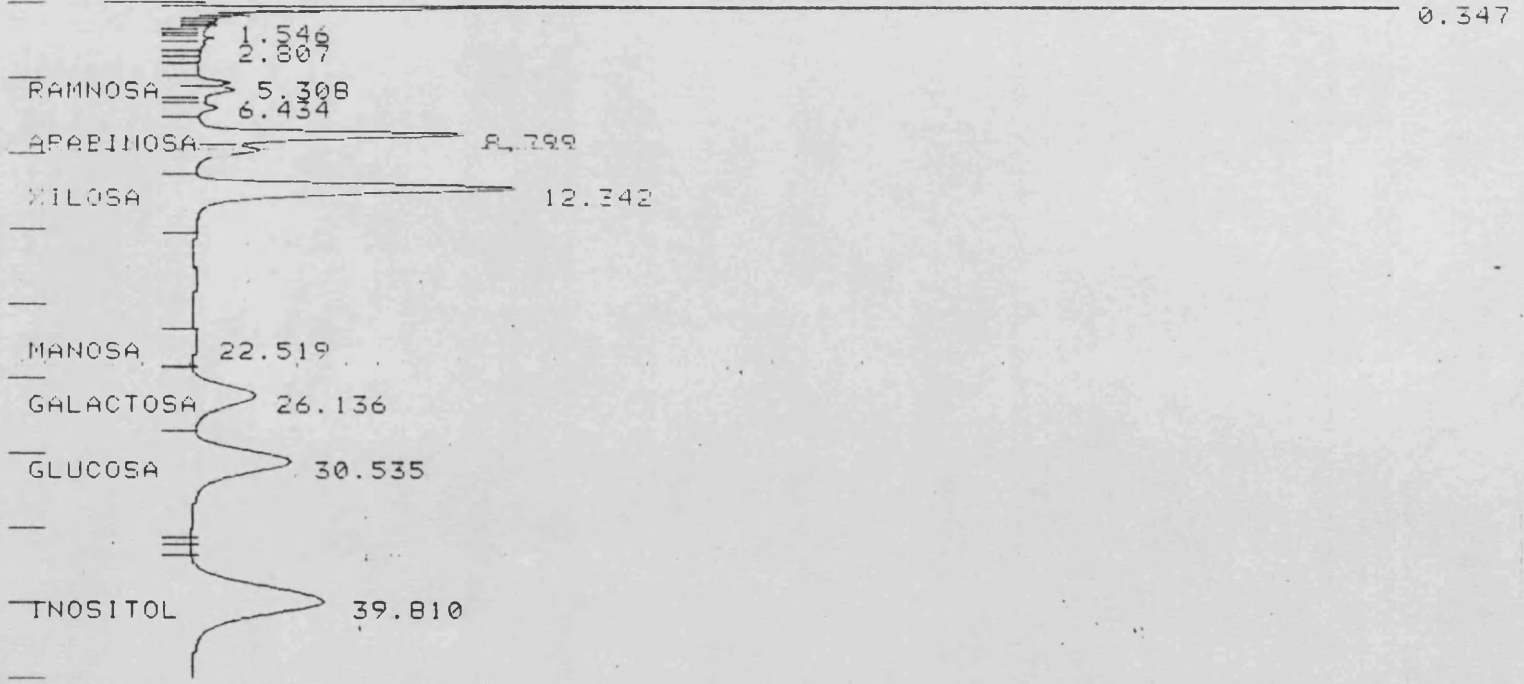


Fig. VI.48. Cromatografía gaseosa de los acetatos de
alditoles procedentes de la hidrólisis de
la fracción B-11. Temperatura de la columna
185°.

drolizado se separaron por adición de etanol y posterior centrifugación. Con los azúcares libres del centrifugado se formaron los acetatos de alditoles, de la forma acostumbrada, y se analizaron por cromatografía gaseosa. En la Fig.VI.49 se muestra el cromatograma obtenido. Los azúcares hallados son la arabinosa y, en menor cantidad, la xilosa como se indica en la tabla VI.16.

b) Con H_2SO_4 0,025 N

El polisacárido se hidrolizó parcialmente con ácido sulfúrico 0,025 N. Se neutralizó la solución con carbonato de bario y el filtrado se llevó a pH 8,5-9 con potasa 0,1M.

VI.7.4.1. Análisis de los oligosacáridos por cromatografía sobre papel.

Los oligosacáridos formados se estudiaron por cromatografía sobre papel. Se utilizó la técnica descendente sobre papel Watman n°1 y n°3, utilizando los desarrolladores A, B y C y como revelador se utilizó la difenilamina-anilina.

Con el desarrollador A, acetato de etilo-ácido acético-ácido fórmico-agua (18:3:1:4) y en papel Watman n°1, se detectó arabinosa (R_G 1,37) al igual que con el desarrollador B, butanol-etanol-agua (2:1:1) y en papel Watman n°3 (R_G 1,13). En ambos casos la muestra estaba muy diluída. Con el desarrollador C, Butanol-piridina-agua (6:4:3) y en papel Watman n°3, se detectó xilosa (R_G 1,28); arabinosa (R_G 1,14); galactosa (R_G 0,86) y tres oligosacáridos (R_G 0,15; 0,08 y 0,04) que no guardaron relación lineal con la serie homóloga de la xilosa ni con la de la glucosa. No se detectó glucosa ni celobiosa.

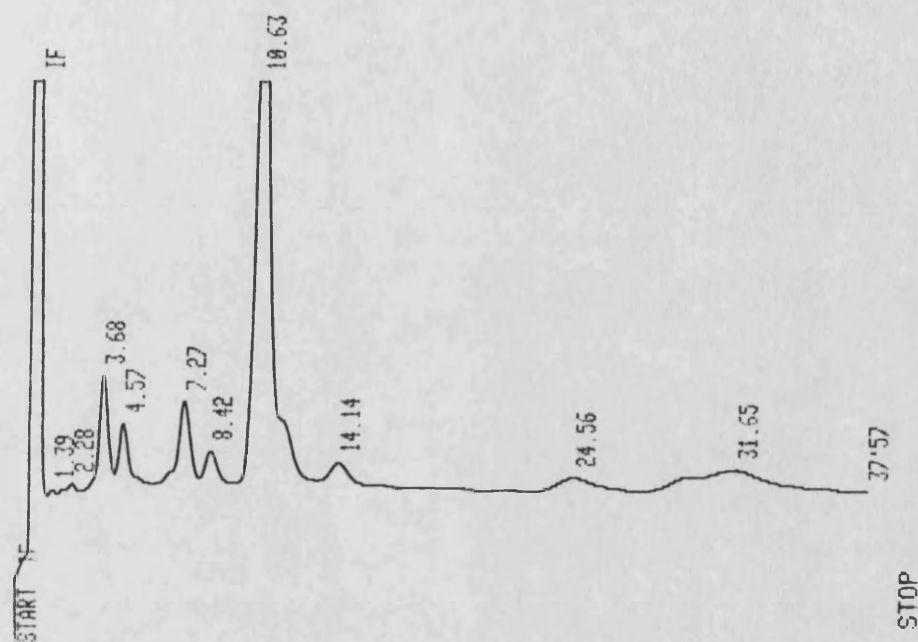


Fig.VI.49. Cromatografía gaseosa de los acetatos de alditoles procedentes de la hidrólisis parcial de la fracción B-II. Temperatura de la columna 190°.

TABLA VI.16

Monosacáridos de la fracción B-II determinados a través de los acetatos de alditoles.

Azucar	Pico	t_R (min)	%Azúcares
Arabinosa	1	10,63	56,55
Xilosa	2	14,14	2,70

Fig. VI.49. Hidrólisis parcial de la fracción (B-11),
c.l.a.n. del hidrolizado.

CHART SPEED 0.5 CM/MIN
ATTEN: 32 ZERO: 5% 5 MIN/TICK

FILE FULL
BUF FULL
DISC FULL

0.007
0.453

1.944

3.112

80
100
110
120
130
140
150
160
170
180
190
200
210
220
230
240
250
260
270
280
290
300
310
320
330
340
350
360
370
380
390
400
410
420
430
440
450
460
470
480
490
500
510
520
530
540
550
560
570
580
590
600
610
620
630
640
650
660
670
680
690
700
710
720
730
740
750
760
770
780
790
800
810
820
830
840
850
860
870
880
890
900
910
920
930
940
950
960
970
980
990
1000

VI.7.4.2. Análisis de los oligosacáridos por cromatografía líquida de alta resolución

El estudio de los oligosacáridos por cromatografía líquida de alta resolución se basó en el trabajo de Kennedy y colaboradores. No se obtiene una línea recta al representar los logaritmos de los tiempos de retención de los oligosacáridos frente al grado de polimerización lo que demuestra que no pertenecen a una misma serie homóloga. El cromatograma obtenido se muestra en la Fig.VI.50.

VI.7.5. Metilación de la fracción B-II

El polisacárido se metiló siguiendo el procedimiento de Hakomori. Primeramente se formó el carbanión por reacción del hidruro de sodio con dimetilsulfóxido. A continuación se le hizo reaccionar con el polisacárido, disuelto en dimetilsulfóxido, durante unas horas y, finalmente, se le adicionó el yoduro de metilo. Todas las operaciones se realizaron bajo atmósfera de argón y los restos de dimetilsulfóxido que acompañan al polisacárido metilado se eliminaron en estufa de vacío a 40°C durante dos días. Se obtuvo un sólido amarillo que se purificó por precipitación en benceno con éter de petróleo.

VI.7.5.1. Datos espectroscópicos

a) Interpretación del espectro de IR

Su espectro de IR (Fig.VI.51a) presentó las siguientes bandas características: a 2950, 2920 y 2850 cm^{-1} de tensión de C-H alifático; banda a 1740 cm^{-1} de tensión de C=O de éster; banda a 1460 cm^{-1} de deformación por flexión asimétrica de los grupos $-\text{CH}_2-$ y CH_3- ; banda a 1380 cm^{-1} de deformación simétrica de los grupos $-\text{CH}_3$; y bandas a 1110 y 1050 cm^{-1} de tensión de C-O de éter.

b) Interpretación del espectro de RMN

Su espectro de RMN- ^1H (Fig. VI.51b)(CDCl_3) presentó las siguientes señales: a 5,1 δ señal poco resuelta correspondiente a los protones anoméricos de uniones glicosídicas α ; señal a 4,2 δ correspondiente a los protones anoméricos de uniones glicosídicas β ; señales a 3,55 y 3,48 δ asignables a los grupos metoxilo en C-3 y C-2 respectivamente; señal a 3,35 δ asignable a los grupos metoxilos en carbonos primarios.

En su espectro de RMN- ^{13}C apareció una señal a 102,59 ppm característica de los carbonos anoméricos con uniones glicosídicas β .

VI.7.5.2. Hidrólisis ácida

El polisacárido metilado se hidrolizó con ácido sulfúrico del 72% en dos etapas. El hidrolizado, tras neutralización con carbonato de bario, se desionizó a través de la resina Amberlita IR-120(H^+).

Estos monosacáridos parcialmente metilados se transformaron en los correspondientes acetatos de alditoles, según se indica en los métodos generales.

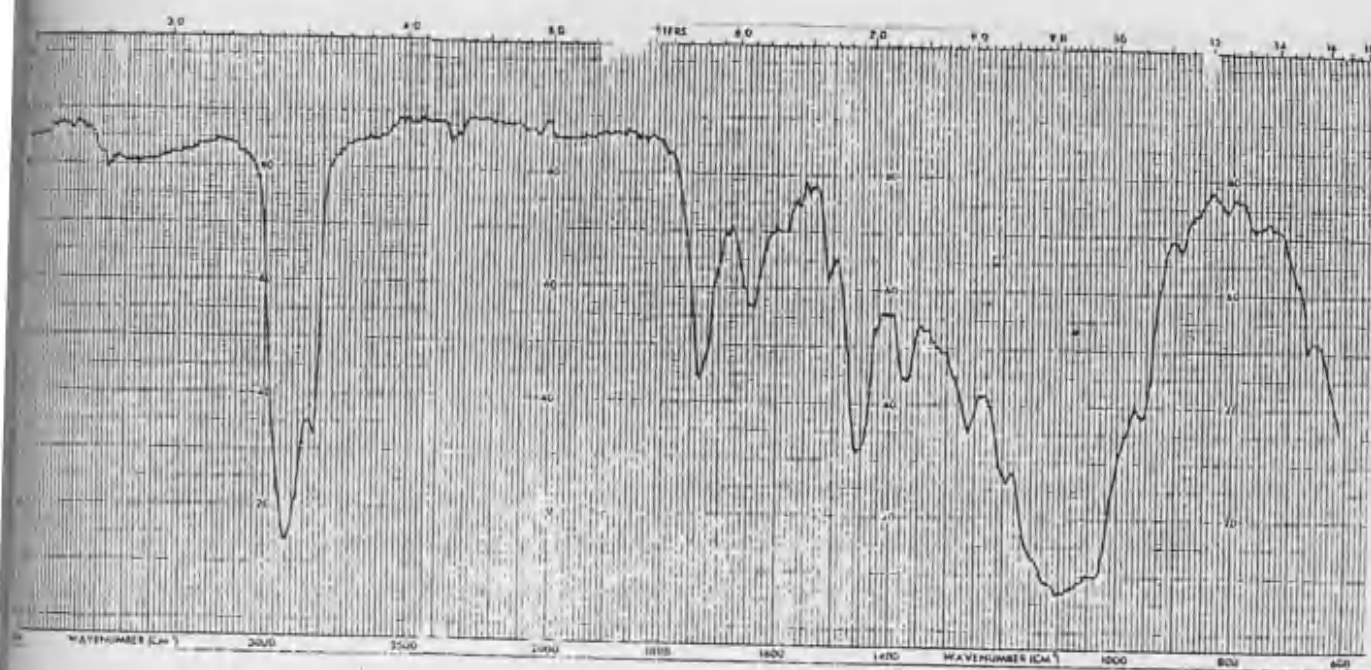


Fig.VI.50. Espectro de IR de la fracción (B-II) metilada.

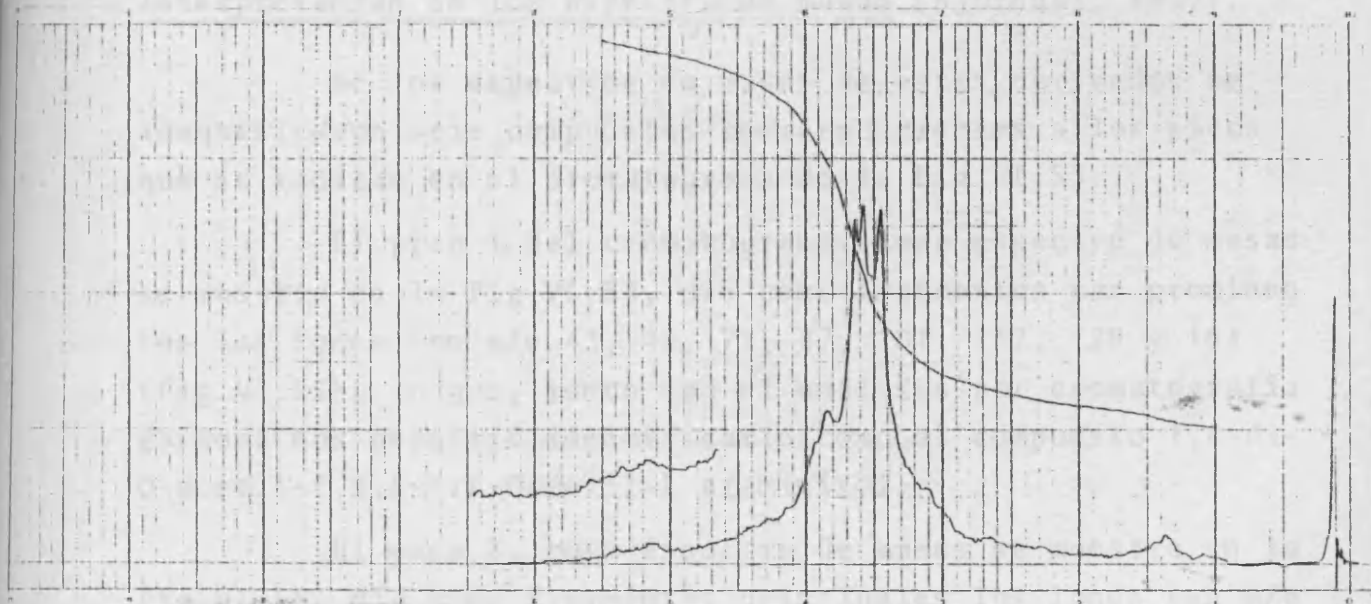


Fig.VI.51. Espectro de RMN de la fracción (B-II) metilada.

VI.7.5.2.1. Identificación de los monosacáridos parcialmente metilados

a) Análisis por cromatografía gaseosa

Los acetatos de alditoles parcialmente metilados se identificaron por cromatografía gas-líquido. Se utilizó el 1,5-di-O-acetil-2,3,4,6-tetra-O-metil-D-glucitol como patrón de referencia (Churms, 1982). En la Fig.VI.52 se muestra el cromatograma obtenido y en la tabla VI.17 se dan los tiempos de retención de los acetatos relativos al azúcar patrón, así como las proporciones molares de cada componente en la mezcla.

b) Análisis por cromatografía gaseosa-espectrometría de masas

Para confirmar la identidad de los acetatos parcialmente metilados se realizó un análisis de cromatografía gaseosa-espectrometría de masas combinada. En la Fig.VI.53 se muestra el cromatograma obtenido.

Interpretación de los espectros de masas (Björndal, 1967).

De los espectros de masas de estos derivados se identificaron seis compuestos correspondientes a los picos que se indican en el cromatograma de la Fig.VI.53.

El pico 1 del cromatograma, cuyo espectro de masas se muestra en la Fig.VI.54, dió como fragmentos mas prominentes los iones con m/e 43, 45, 71, 87, 101, 117, 129 y 161 (Fig.VI.55), lo que, junto con el análisis por cromatografía gaseosa nos permitió identificarlo como el compuesto 1,4-di-O-acetil-2,3,5-tri-O-metil-L-arabinitol.

El pico 2, cuyo espectro de masas se muestra en la Fig.VI.56, dió como fragmentos principales los iones con m/e 43, 101, 117 y 161 (Fig.VI.23), lo que, junto con el análisis por cromatografía gaseosa nos permitió identificarlo como el compuesto 1,5-di-O-acetil-2,3,4-tri-O-metil-D-xilitol.

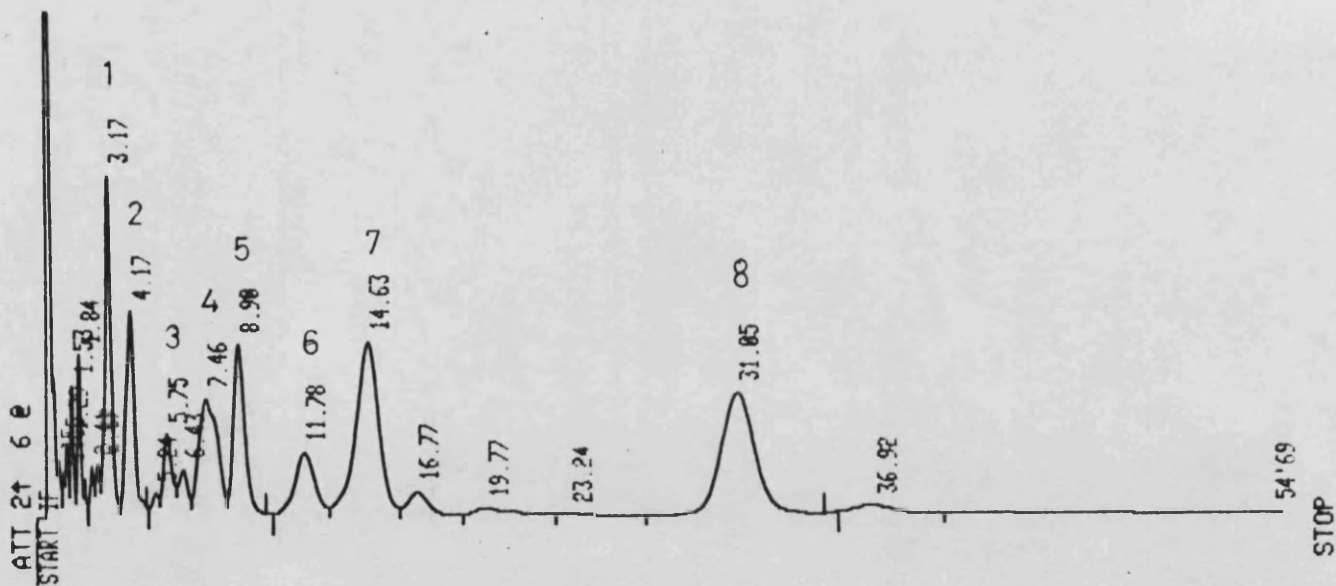


Fig.VI.52. Cromatografía gaseosa de los acetatos de alditoles de los azúcares metilados obtenidos del hidrolizado de la fracción B-II metilada en una columna ECNSS-M a 175°. Picos: 1) 2,3,5-Me₃-Ara; 2) 2,3,4-Me₃-Xi; 3) impurezas; 4) 2,3,4,6-Me₄-Gal; 5) 2,3-Me₂-Xi; 6) impurezas; 7) 2,3,6-Me₃-Glu y 8) 2,3-Me₂-Glu.

TABLA VI.1.7

Eteres metilicos del hidrolizado del polisacárido B-II metilado

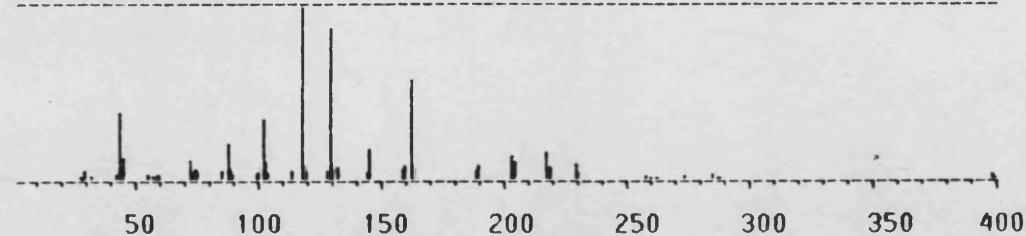
Azúcares	t_R^b	%Molar ^c
2,3,5-Me ₃ -Ara ^a	0,51	1,06
2,3,4-Me ₃ -Xi	0,67	0,86
2,3,4,6-Me ₄ -Gal	1,20	1,00
2,3-Me ₂ -Xi	1,43	0,96
2,3,6-Me ₃ -Glu	2,35	1,87
2,3-Me ₂ -Glu	4,99	1,78

^a 2,3,5-Me₃-Ara=1,4-di-O-acetil-2,3,5-tri-O-metil-L-arabinitol, etc.

^b Tiempos de retención de los acetatos de alditoles parcialmente metilados relativos al 1,5-di-O-acetil-2,3,4,6-tetra-O-metil-D-glucitol (t_R 6,22 min) en una columna ECNSS-M a 175°C.

^c Razón molar calculada aplicando los factores de respuesta según la teoría e.c.r. (Sweet, 1974).

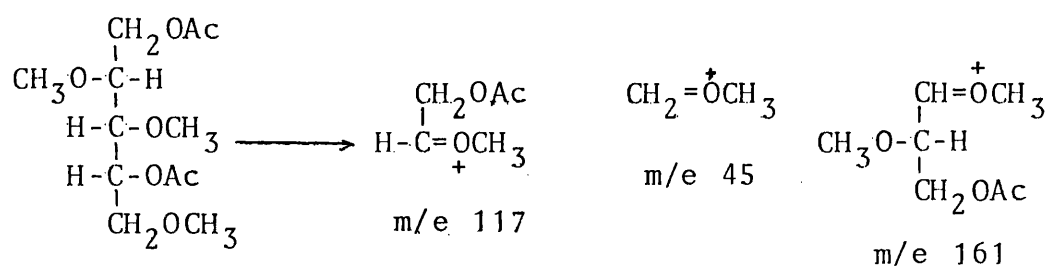
Base Peak = 117.05 Base Peak Abundance = 127 Total Abundance = 773



Lower Abundance Cutoff Level = 1.0%

MASS	ABUNDANCE (%)	MASS	ABUNDANCE (%)	MASS	ABUNDANCE (%)
27.05	1.6	87.05	20.5	158.05	6.3
28.95	4.7	88.05	4.7	158.95	7.9
30.95	1.6	89.05	3.1	161.15	50.7
41.05	3.1	99.05	3.1	162.05	6.3
42.05	1.6	100.05	3.9	188.05	4.7
43.05	37.8	101.05	33.9	189.05	7.9
43.95	1.6	102.05	10.2	201.95	13.4
45.05	11.8	103.05	3.9	202.95	9.4
55.05	3.1	113.05	4.7	204.05	10.2
55.95	1.6	117.05	100.0	215.95	15.0
58.05	2.4	118.05	7.9	218.05	7.1
59.05	3.1	119.05	4.7	229.05	9.4
71.05	11.0	127.15	4.7	230.05	3.9
72.05	2.4	129.05	86.6	257.05	1.6
72.95	4.7	130.15	8.7	273.05	1.6
74.05	5.5	131.05	7.1	285.15	3.1
74.95	3.9	144.35	3.9	398.30	3.1
85.05	4.7	145.05	17.3		

Fig. VI.54. Espectro de masas del 1,4-di-O-acetil-2,3,5-tri-O-metil-L-arabinitol.



El fragmento primario m/e 117 se obtiene cuando el C-1 está acetilado y el C-2 metoxilado. El fragmento primario mas pequeño, m/e 45, lo dán los compuestos que tienen un grupo metoxilo primario.

La eliminación de ácido acético del fragmento primario A, m/e 161, así como la eliminación de metanol en B está facilitada por la acidez del átomo de hidrógeno eliminado.

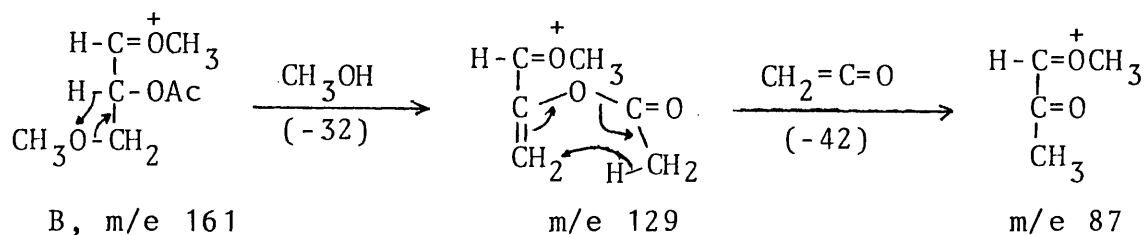
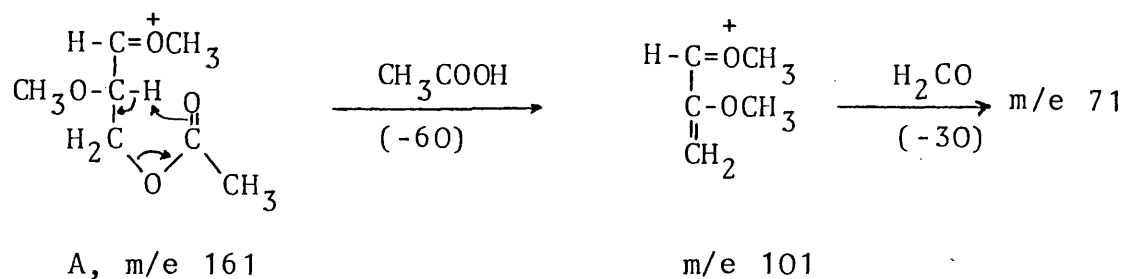
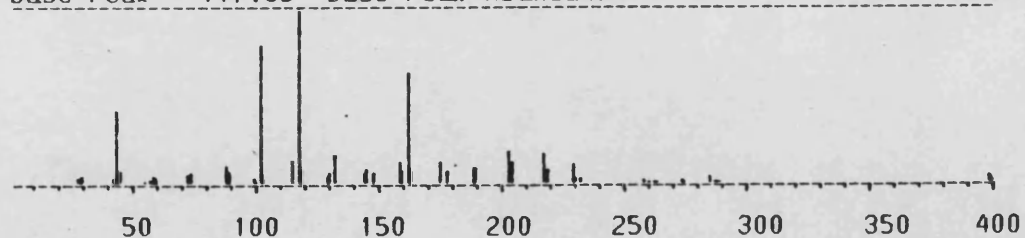


Fig. VI.55. Fragmentación del 2,3,5-tri-O-metil-L-arabinitol.

Base Peak = 117.05 Base Peak Abundance = 113 Total Abundance = 663

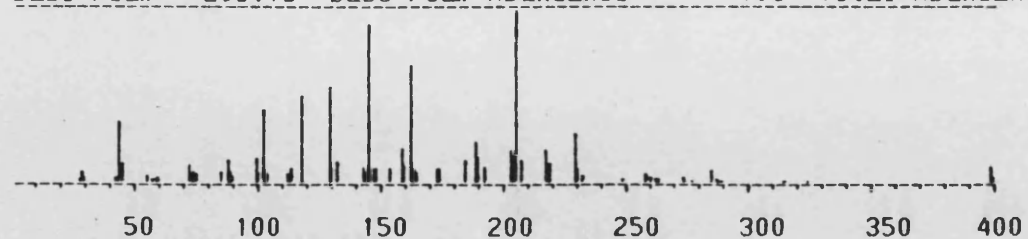


Lower Abundance Cutoff Level = 1.0%

MASS	ABUNDANCE (%)	MASS	ABUNDANCE (%)	MASS	ABUNDANCE (%)
27.05	2.7	101.05	78.8	177.05	7.1
29.05	3.5	102.05	5.3	188.05	8.8
41.05	2.7	115.05	13.3	189.05	8.8
41.95	1.8	117.05	100.0	202.05	17.7
43.05	40.7	118.05	8.0	203.05	12.4
43.95	1.8	129.05	4.4	204.05	11.5
45.05	7.1	130.15	6.2	216.05	16.8
55.95	1.8	131.15	15.9	218.05	8.0
58.05	3.5	144.35	6.2	229.05	10.6
59.05	2.7	145.05	8.0	230.05	2.7
71.05	5.3	146.95	6.2	231.05	2.7
73.05	6.2	158.15	11.5	257.05	1.8
87.05	9.7	158.95	7.1	273.05	1.8
88.05	7.1	161.15	62.8	285.15	3.5
89.05	6.2	162.05	7.1	398.30	3.5
99.05	2.7	175.15	12.4	399.30	1.8

Fig.VI.56. Espectro de masas del 1,5-di-O-acetil-2,3,4-tri-O-metil-D-xilitol.

Base Peak = 205.15 Base Peak Abundance = 108 Total Abundance = 1021

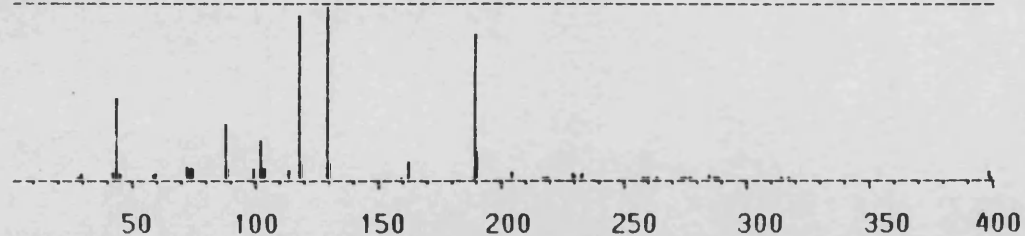


Lower Abundance Cutoff Level = 1.0%

MASS	ABUNDANCE (%)	MASS	ABUNDANCE (%)	MASS	ABUNDANCE (%)
27.05	1.9	110.95	4.6	189.05	14.8
28.05	5.6	113.15	8.3	191.15	9.3
29.05	2.8	117.05	50.9	202.05	19.4
41.05	2.8	129.05	55.6	203.05	14.8
43.05	36.1	130.25	8.3	204.05	15.7
45.05	11.1	131.05	12.0	205.15	100.0
55.05	3.7	142.05	9.3	206.15	13.0
55.95	1.9	143.25	6.5	216.05	18.5
58.05	1.9	145.15	90.7	218.05	11.1
58.95	2.8	146.15	8.3	229.05	28.7
71.05	10.2	146.95	8.3	230.05	8.3
73.05	5.6	153.15	8.3	231.05	3.7
73.95	3.7	158.05	20.4	248.05	1.9
75.05	4.6	158.95	10.2	257.05	4.6
85.05	5.6	161.05	67.6	260.05	2.8
87.05	13.0	162.05	8.3	261.05	1.9
88.05	6.5	163.05	7.4	262.05	1.9
89.05	3.7	164.05	6.5	273.05	2.8
99.05	13.9	172.05	8.3	285.15	7.4
100.05	6.5	173.05	8.3	296.15	1.9
101.05	42.6	184.05	13.0	398.30	9.3
102.05	6.5	187.95	24.1	399.30	2.8
103.05	4.6				

Fig.VI.57. Espectro de masas del 1,5-di-O-acetil-2,3,4,6-tetra-O-metil-D-galactitol.

Base Peak = 129.05 Base Peak Abundance = 99 Total Abundance = 512

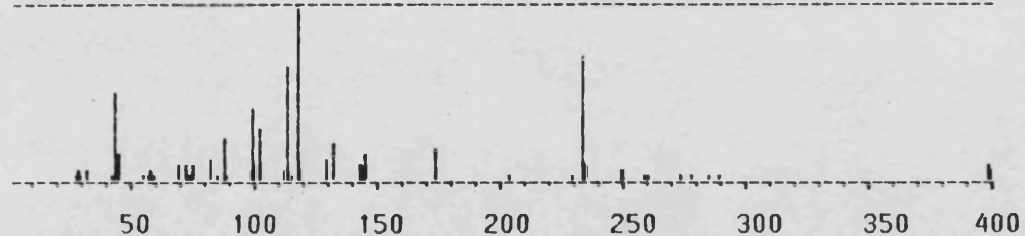


Lower Abundance Cutoff Level = 1.0%

MASS	ABUNDANCE (%)	MASS	ABUNDANCE (%)	MASS	ABUNDANCE (%)
27.05	1.0	102.95	6.1	232.05	3.0
29.05	3.0	113.05	5.1	257.05	1.0
40.95	4.0	117.05	93.9	258.05	1.0
42.05	3.0	118.05	9.1	260.05	1.0
43.05	46.5	129.05	100.0	263.05	1.0
43.95	1.0	130.15	9.1	273.05	1.0
45.05	3.0	158.95	1.0	275.05	1.0
58.05	2.0	161.05	10.1	276.05	1.0
59.05	3.0	187.95	1.0	285.15	2.0
71.05	7.1	189.15	82.8	286.15	1.0
72.95	6.1	190.05	15.2	288.05	1.0
74.05	6.1	203.95	4.0	314.05	1.0
87.05	31.3	216.05	1.0	316.15	1.0
88.05	6.1	218.05	1.0	398.30	4.0
99.05	6.1	229.05	3.0	399.30	1.0
101.05	22.2	230.05	2.0		

Fig.VI.58. Espectro de masas del 1,4,5-tri-O-acetil-2,3-di-O-metil-D-xilitol.

Base Peak = 117.05 Base Peak Abundance = 34 Total Abundance = 226



Lower Abundance Cutoff Level = 1.0%

MASS	ABUNDANCE (%)	MASS	ABUNDANCE (%)	MASS	ABUNDANCE (%)
27.05	2.9	85.05	2.9	145.05	14.7
28.05	5.9	87.05	23.5	173.15	17.6
29.05	2.9	88.05	2.9	203.05	2.9
31.05	5.9	98.05	5.9	229.05	2.9
41.05	2.9	99.05	41.2	233.15	70.6
43.05	50.0	100.05	8.8	234.15	8.8
45.05	14.7	101.05	29.4	235.15	8.8
55.05	2.9	111.05	5.9	249.05	5.9
55.95	2.9	113.05	64.7	250.05	5.9
57.05	5.9	114.05	2.9	258.05	2.9
58.05	2.9	115.05	2.9	260.05	2.9
59.05	2.9	117.05	100.0	273.05	2.9
68.95	8.8	118.05	5.9	277.15	2.9
71.05	8.8	129.05	11.8	285.15	2.9
73.05	2.9	131.05	20.6	289.15	2.9
74.05	2.9	142.15	8.8	398.30	8.8
74.95	8.8	143.05	8.8	399.30	5.9
80.95	11.8				

Fig.VI.59. Espectros de masas del 1,4,5-tri-O-acetil-2,3,6-tri-O-metil-D-glucitol.

El pico 3, cuyo espectro de masas se muestra en la Fig.VI.57, dió como fragmentos mas prominentes los iones con m/e 43, 45, 71, 87, 101, 117, 129, 145, 161 y 205 (Fig.III.26), lo que, junto con el análisis por cromatografía gaseosa nos permitió identificarlo como el compuesto 1,5-di-O-acetil-2,3,4,6-tetra-O-metil-D-galactitol.

El pico 4, cuyo espectro de masas se muestra en la Fig.VI.58, dió como fragmentos mas importantes los iones con m/e 43, 87, 101, 117, 129 y 189 (Fig.III.28), lo que, junto con el análisis por cromatografía gaseosa nos permitió identificarlo como el compuesto 1,4,5-tri-O-acetil-2,3-di-O-metil-D-xilitol.

El pico 5, cuyo espectro de masas se muestra en la Fig.VI.59, dió como fragmentos mas importantes los iones con m/e 43, 45, 87, 99, 101, 113, 117 y 233 (Fig.III.30), lo que, junto con el análisis por cromatografía gaseosa se identificó como el compuesto 1,4,5-tri-O-acetil-2,3,6-tri-O-metil-D-glucitol.

El pico 6 del cromatograma se identificó por cromatografía gaseosa como el compuesto 1,4,5,6-tetra-O-acetil-2,3-di-O-metil-D-glucitol.

La presencia del 1,4,5-tri-O-acetil-2,3,6-tri-O-metil-D-glucitol indica que las unidades de glucosa están unidas por enlaces (1→4). La presencia del compuesto 1,4,5,6-tetra-O-acetil-2,3-di-O-metil-D-glucitol indica que algunas unidades de glucosa llevan ramificaciones unidas a través del C-6.

La presencia del 1,4,5-tri-O-acetil-2,3-di-O-metil-D-xilitol indica que las unidades de xilosa están unidas por enlaces (1→4). La presencia del compuesto 1,5-di-O-acetil-2,3,4-tri-O-metil-D-xilitol indica que la xilosa se encuentra formando ramificaciones laterales en forma de xilopiranosas.

La presencia del compuesto 1,4-di-O-acetil-2,3,5-tri-O-metil-L-arabinitol indica que la arabinosa se encuentra en forma de arabinofuranosa formando ramificaciones laterales.



La presencia del compuesto 1,5-di-O-acetil-2,3,4,6-tetra-O-metil-D-galactitol indica que la galactosa también se encuentra formando ramificaciones laterales.

A la conclusión que se llega es que el polisacárido está formado por una cadena principal constituida por unidades de glucopiranososa y de xilopiranososa, en una proporción molar (2:1), unidas entre sí por enlaces (1→4). La arabinosa, xilosa y galactosa en forma de arabinofuranosa, xilopiranososa y galactopiranososa respectivamente forman ramificaciones de algunas unidades de glucopiranososa unidas por enlaces (1→6).

VII. ESTUDIO DE UNA XILANA PATRON

Se procedió al estudio de una xilana patrón formada por unidades de D-xilosa con uniones $\beta(1\rightarrow4)$. Contiene ramificaciones de ácido D-glucurónico unido al C-2 de la xilosa, es decir, con uniones $\alpha(1\rightarrow2)$.

Se realizó la metilación de la xilana, posterior hidrólisis ácida y formación de los correspondientes acetatos de alditoles de los monosacáridos parcialmente metilados.

De esta forma, se pudo realizar, en los casos apropiados, un análisis comparativo con los polisacáridos similares por datos espectroscópicos y del hidrolizado por datos cromatográficos.

VII.1. Datos espectroscópicos

Interpretación del espectro de IR

Su espectro de IR (Fig.VII.1) presentó las siguientes bandas características: entre 3.600 y 3.200 cm^{-1} banda ancha de tensión de O-H asociado intermolecularmente; banda

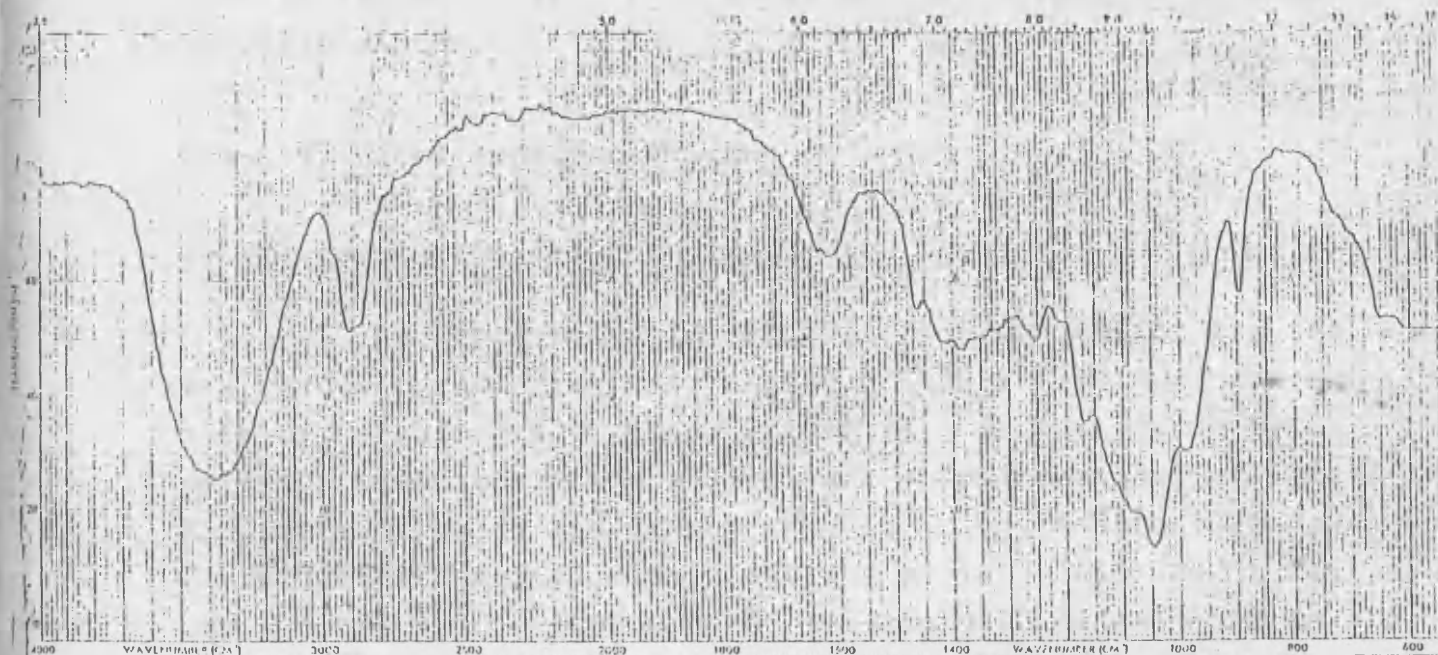


Fig.VII.1. Espectro de IR de la xilana.

a 2900 cm^{-1} de tensión de C-H alifático; banda a 1630 de tensión de C=O; banda 1050 cm^{-1} de tensión C-O de alcohol.

VII.2. Metilación de la xilana

La metilación se llevó a cabo utilizando los reactivos de Hakomori. Se formó la base metilsulfinilcarbanión con hidruro de sodio y dimetilsulfóxido y se le hizo reaccionar con el polisacárido, previamente disuelto en dimetilsulfóxido. Finalmente se le adicionó, tras varias horas de reacción, el yoduro de metilo. Todo el proceso se realizó bajo atmósfera de argón y con agitación.

El polisacárido metilado se recuperó por extracción con cloroformo, se secó en estufa de vacío y se purificó por precipitación en benceno con éter de petróleo. Se recuperó como un sólido blanco, cuyo espectro de IR no presentó banda de absorción de O-H ($3600\text{-}3200\text{ cm}^{-1}$) lo que indicó que la reacción fue completa. Sin embargo apareció una banda a 1735 cm^{-1} de carbonilo de éster debido a la presencia de ácidos urónicos esterificados. Esto se confirma en el espectro de RMN que aparecen señales a $5,35\delta$ debidas a los protones anoméricos de uniones glicosídicas α y la señal a $3,35\delta$ asignable al grupo metoxilo en C-6.

VII.2.1. Datos espectroscópicos

a) Interpretación del espectro de IR

Su espectro de IR (Fig.VII.2) presentó las siguientes bandas características: bandas a 2930 y 2830 cm^{-1} de tensión de C-H alifático; banda a 1740 cm^{-1} de tensión de C=O de éster metílico; banda a 1460 cm^{-1} de deformación por flexión asimétrica de los grupos $-\text{CH}_2-$ y CH_3- ; banda a 1380 cm^{-1} de deformación por flexión simétrica de los grupos CH_3- ; bandas a 1160 , 1070 y 1000 cm^{-1} de tensión de C-O de éter y de éster, banda a 970 cm^{-1} debida a éteres cíclicos.

b) Interpretación del espectro de RMN

Su espectro de RMN (Fig.VII.3) (CDCl_3) presentó las señales siguientes: a 5,35 δ señal poco resuelta correspondiente a los protones anoméricos de uniones glicosídicas α ; a 4,3 δ duplete, poco resuelto, debido a los protones anoméricos de uniones glicosídicas β ; señales entre 3,2 y 3 δ asignables a los $-\text{CH}_2-\text{OR}$; y las señales entre 3,9 y 3,7 δ muy poco resueltas, correspondientes a los $-\text{CH}-\text{OR}$; a 3,58 , 3,5 y 3,35 δ singletes asignables a los grupos metoxilo en los C-3, C-2 y C-6 respectivamente.

c) Interpretación del espectro de RMN- ^{13}C

Su espectro de RMN- ^{13}C (Fig.VII.4 y VII.5) presentó las señales cuyos desplazamientos y multiplicidad se indican en la tabla VII.1.

TABLA VII.1

Desplazamientos químicos de RMN- ^{13}C de la xilana patrón metilada (DCCl_3)

Compuesto	Desplazamientos químicos, ppm ^a					
	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅	OCH ₃
Xilana ^b	102,64(d)	76,39(d)	83,27(d)	84,20(d)	63,28(t)	60,63(q)

^a Los desplazamientos son relativos al patrón interno.

^b Datos correspondientes al espectro de RMN- ^{13}C realizado según ^1H -desacoplado.

La señal correspondiente al carbono anomérico (102,64 ppm), indica que éste tiene una configuración β en el polisacárido formado por unidades de D-xilosa. No aparecen las señales correspondientes al ácido glucurónico debido a que éste se encuentra en una proporción baja.

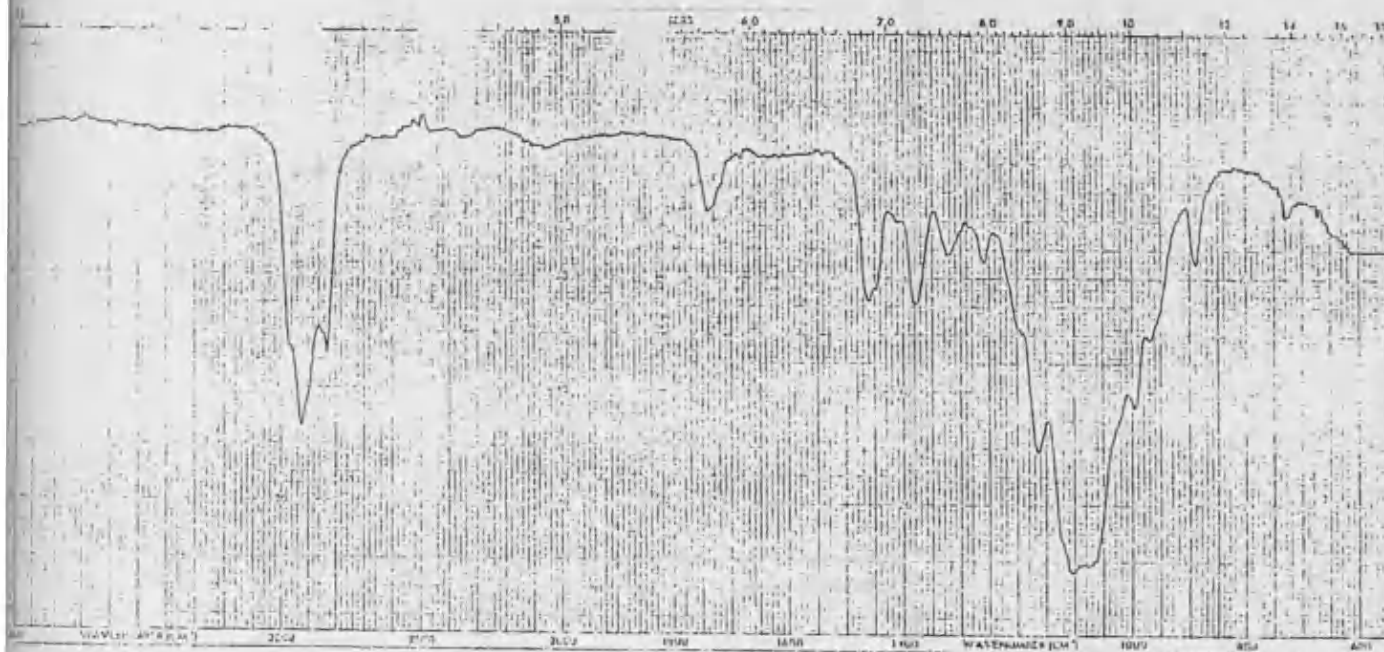


Fig.VII.2. Espectro de IR de la xilana metilada.

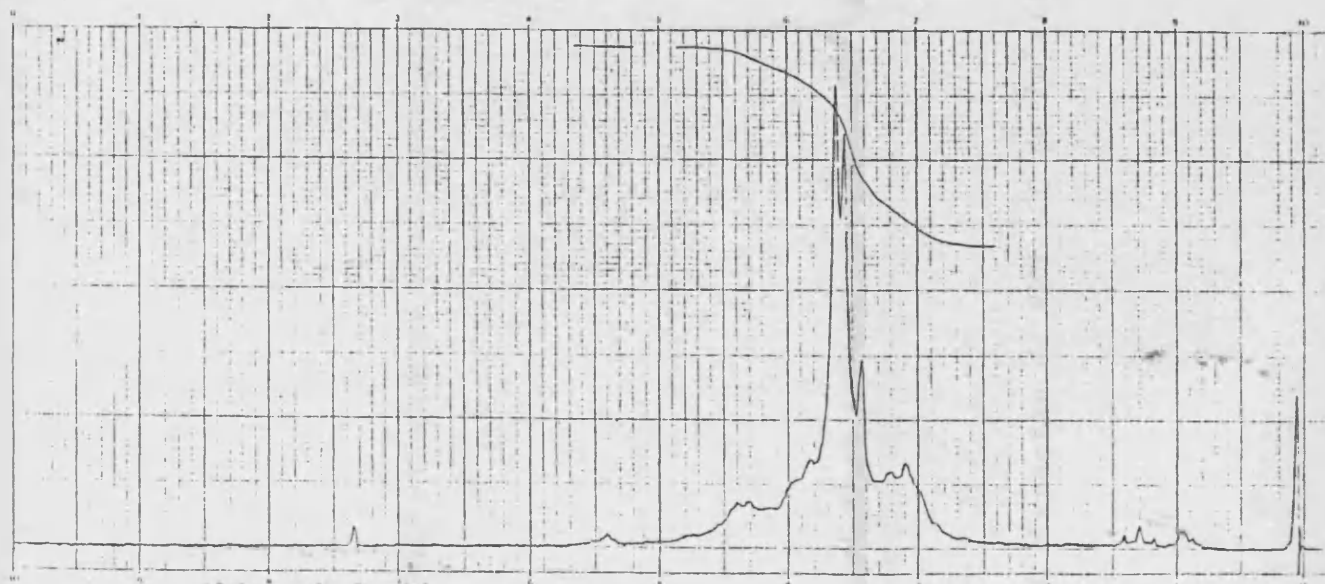


Fig.VII.3. Espectro de RMN de la xilana metilada.

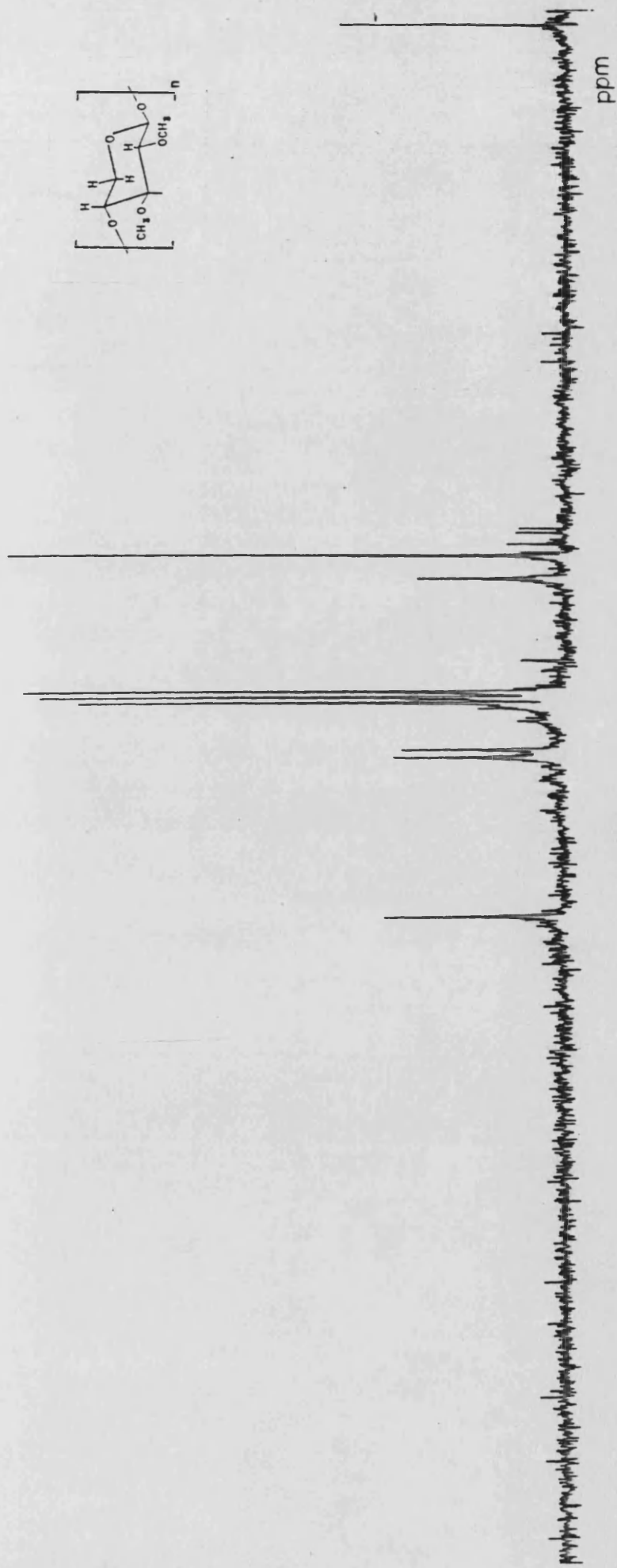


Fig. VII. 4. Espectro de RMN- ^{13}C de la xilana patrón metilada (DCCl_3) realizado según ^1H -desacoplado.

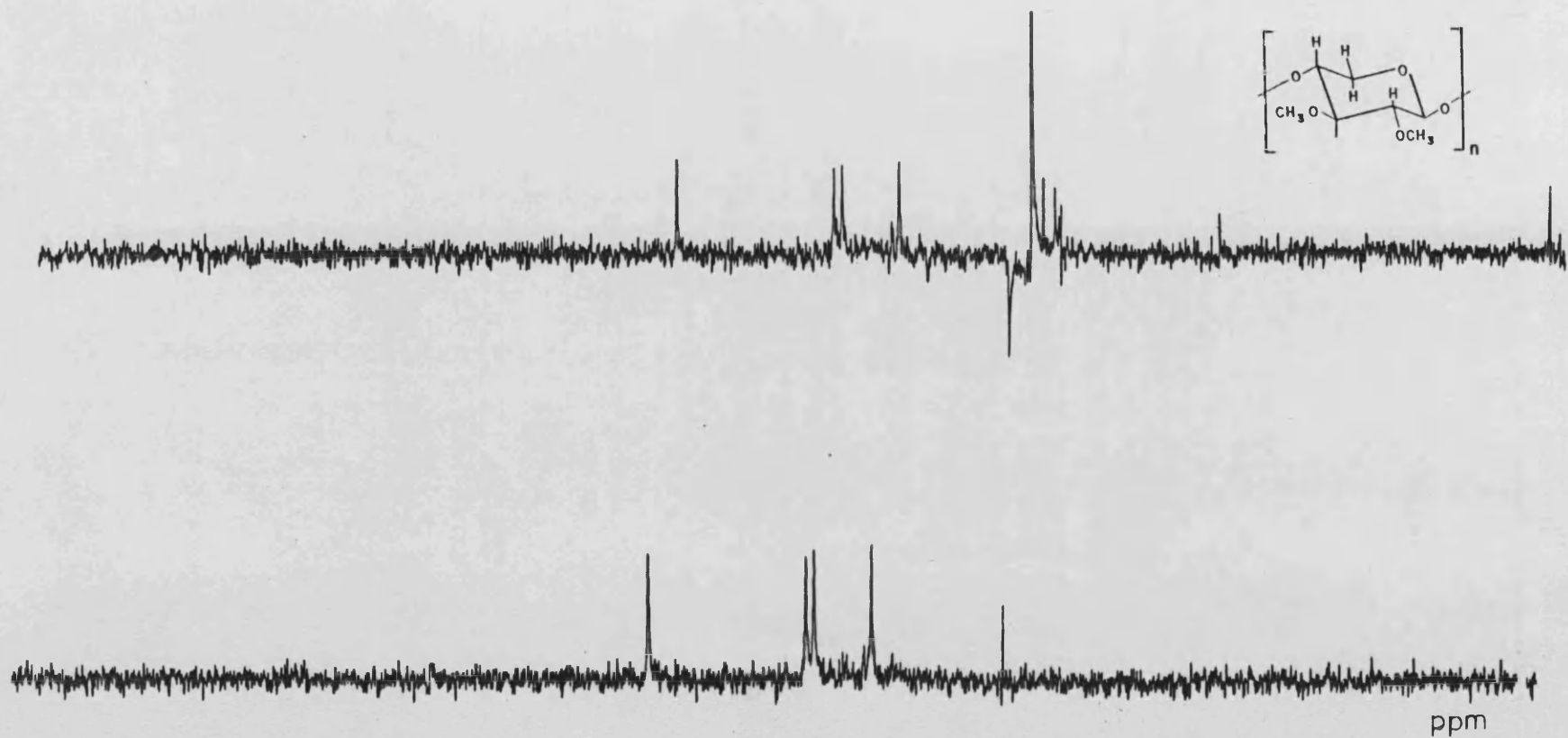


Fig.VII.5. Espectro de RMN- ^{13}C de la xilana patrón metilada (DCCl_3) realizado mediante una secuencia de pulsos DEPT.

VII.2.2. Hidrólisis ácida

La xilana metilada se hidrolizó con ácido sulfúrico del 72% en dos etapas. Primero se disolvió el polisacárido a 30°C, y luego se hidrolizó con ácido sulfúrico más diluido, 1N, calentando a 100°C durante 4 horas.

Los monosacáridos parcialmente metilados obtenidos se transformaron en los derivados volátiles, acetatos de alditoles, por reducción con borohidruro de sodio y acetilación con anhídrido acético-piridina.

VII.2.2.1. Identificación de los monosacáridos parcialmente metilados

Los acetatos de alditoles parcialmente metilados procedentes de la xilana se identificaron por cromatografía gaseosa utilizando el 1,5-di-O-acetil-2,3,4,6-tetra-O-metil-D-glucitol como azúcar patrón de referencia (Churms, 1982). En la Fig.VII.6 se muestra el cromatograma obtenido y en la tabla VII.2 se dan los tiempos de retención relativos al azúcar patrón así como los porcentajes relativos de cada azúcar en la mezcla. Se observa que la xilosa viene acompañada por otros azúcares que la impurifican.

La presencia del compuesto 1,4,5-tri-O-acetil-2,3-di-O-metil-D-xilitol indica que el polisacárido está formado por una cadena fundamental de unidades de xilosa con enlaces (1→4). El compuesto 1,5-di-O-acetil-2,3,4-tri-O-metil-D-xilitol se encontrará como resto terminal no reductor del polisacárido. La presencia del compuesto 1,2,4,5-tetra-O-acetil-3-O-metil-D-xilitol indica que ciertas unidades de la cadena de xilosa portan ramificaciones en el hidroxilo del carbono 2.

Luego esto confirma que el polisacárido está constituido por una cadena de unidades de D-xilopiranososa con unio-

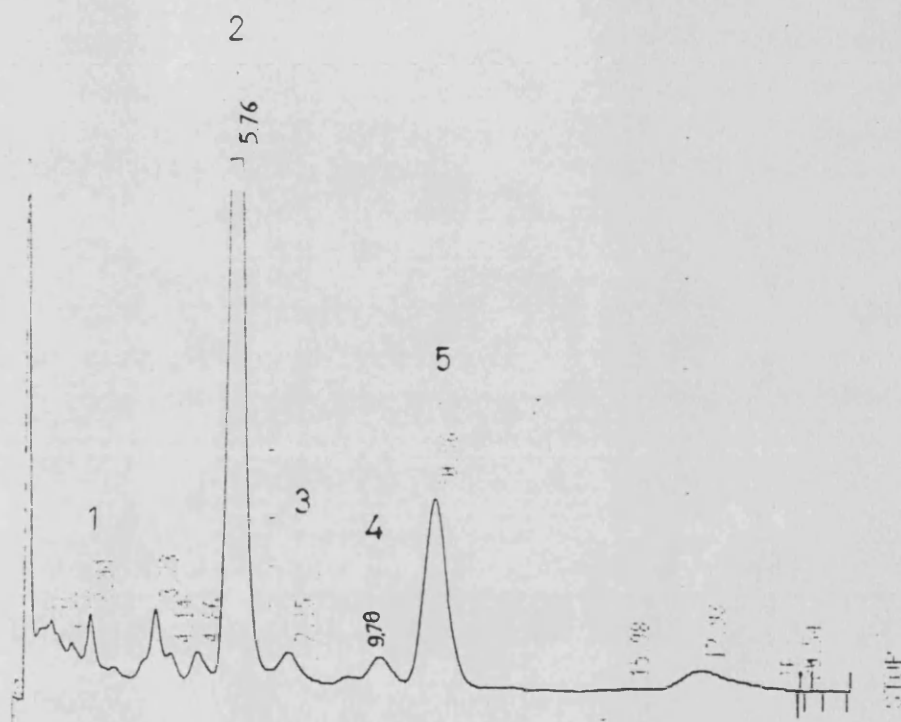


Fig. VII. 3. Cromatografía gaseosa de los acetatos de alditoles de los azúcares metilados obtenidos del hidrolizado de una xilana patrón metilada en una columna ECNSS-M a 175°.

Picos: 1) 2,3,5-Me₃-Ara; 2) 2,3-Me₂-Xi; 3) 2,4,6-Me₃-Glu; 4) 2,3,6-Me₃-Glu y 5) 3-Me-Xi.

TABLA VII.2

Eteres metílicos del hidrolizado de la xilana patrón metilada

Azúcares	t_R^b	%Area	%Molar ^c
2,3,5-Me ₃ -Ara ^a	0,50	1,42	
2,3-Me ₂ -Xi	1,43	65,65	10
2,4,6-Me ₃ -Glu	1,77	1,26	
2,3,6-Me ₃ -Glu	2,42	1,40	
3-Me-Xi	2,70	20,29	3,4

^a 2,3,5-Me₃-Ara=1,4-di-O-acetil-2,3,5-tri-O-metil-L-arabinitol.

^b Tiempos de retención de los acetatos de alditoles parcialmente metilados relativos al 1,5-di-O-acetil-2,3,4,6-tetra-O-metil-D-glucitol (t_R 4,04 min) en una columna ECNSS-M a 175°.

^c Razón molar calculada aplicando los factores de respuesta según la teoría e.c.r. (Sweet, 1974).

nes $\beta(1\rightarrow4)$. Algunas de estas unidades de xilosa llevan como ramificación un ácido urónico, en este caso como ya sabíamos es el ácido 4-O-metil-D-glucurónico, con enlaces $\alpha(1\rightarrow2)$.

PARTE EXPERIMENTAL



I. TECNICAS GENERALES

I.1. Punto de fusión

Los puntos de fusión se determinaron en un microscopio de platina calefactora tipo Koplér, de la casa Reichert, y un aparato según el Dr. Tottoli de la casa Büchi.

I.2. Poder rotatorio

Los poderes rotatorios han sido determinados en un polarímetro Perkin-Elmer modelo 141.

I.3. Técnicas cromatográficas

a) Cromatografía sobre papel

Se han utilizado tiras de papel Watman n°1 y 3 de 58 cm de longitud. Las muestras se colocaron dejando intervalos de 2 cm entre cada mancha y a una distancia de 2 cm del borde del papel. Las disoluciones de referencia se prepararon con azúcares comerciales a una concentración del 2% para los monosacáridos y del 5% para los oligosacáridos.

Se utilizaron los siguientes solventes de desarrollo:

- A) Acetato de etilo-ácido acético-ácido fórmico-agua (18:3:1:4) (Jones, 1953).
- B) n-Butanol-etanol-agua (2:1:1) (Schaffer, 1972).
- C) n-Butanol-piridina-agua (Jeanes, 1951).

Como revelador se utilizó la difenilamina anilina y ácido fosfórico (Bailey, 1960; Buchan, 1952). Se disolvieron 4 g de difenilamina en 4 mL de anilina y 200 mL de acetona y luego se añadieron 20 mL de ácido fosfórico (80-85%).

Una vez sumergido el cromatograma, se dejó secar y

se calentó a 60°C durante cuatro minutos para el revelado de pentosas y a 80°C durante 5 minutos para el revelado de hexosas.

b) Cromatografía en capa fina

Para cromatografía analítica en capa fina se utilizaron placas de sílica gel HF₂₅₄ (ref. 7739 Merck) con un espesor de 0,3 mm. También se han utilizado cromatoplasmas de sílica gel SiF₂₅₄ de 0,25 mm de espesor de la casa Scharlau (ref. 530) F.E.R.O.S.A.

Las placas de acetato sódico se prepararon de la siguiente forma: se suspendieron 30 g de Kieselguhr G en 60 mL de acetato sódico 0,02 M. Una vez extendidas las placas, con un espesor aproximado de 0,2 mm se dejan secar a temperatura ambiente.

También se han utilizado cromatoplasmas de celulosa F(20x20 cm) de 0,1 mm de espesor (ref. 5718 Merck).

Para las cromatografías preparativas se utilizó sílica gel PF₂₅₄₋₃₆₆ (ref. 7748 Merck), con un espesor de placa de aproximadamente 0,5 mm.

Las placas una vez desarrolladas se pulverizaron, según los casos, con alguno de los siguientes reactivos:

- Anisaldehído-ácido sulfúrico : se añadió 1 mL de ácido sulfúrico concentrado a una solución de 0,5 mL de anisaldehído en 50 mL de ácido acético. Una vez pulverizadas, se calentaron las placas a 100-105°C, hasta que el color de las manchas tenga una intensidad máxima sobre un fondo de color rosa.
- Acido sulfúrico 50%: una vez pulverizadas las placas se calentaron a 110°C.
- Verde de bromocresol: se disolvieron 0,04 g de verde de bromocresol en 100 mL de etanol y se añadió hidróxido de sodio 0,1M hasta la aparición del color azul.

- Nitrato de plata: se disolvieron 3 mg de AgNO_3 en 12 mL de agua y se añadieron 500 mL de acetona. La cromatoplaca seca se sumerge en esta solución durante un minuto y 75 segundos, y se deja a secar a temperatura ambiente.

- Hidróxido sódico: se preparó una solución de 50 mL de NaOH 10N en 450 mL de etanol.

Se pulveriza la placa con esta solución hasta que se visualizan las manchas que aparecen de color marrón oscuro sobre fondo marrón claro.

c) Cromatografía de columna

Se utilizó sílica gel 60 de 0,063-0,200 mm (ref.7734).

- Cromatografía de filtración sobre geles porosos

Para el estudio de la homogeneidad de la fracción B-I y B-II se utilizó una columna de la firma Pharmacia Fine Chemicals modelo K 16/70, con un diámetro de 1,6 cm y una altura de lecho de 46 cm rellena de Sephacryl S-400. El Sephacryl S-400 (Pharmacia Fine Chemical) tiene un tamaño de partícula de 40-105 μm y un rango de fraccionamiento de 10.000- $2 \cdot 10^6$.

Se utilizó una bomba peristáltica modelo P-3 de la casa Pharmacia Fine Chemicals. El eluyente utilizado fué el NaCl 0,5 M con una velocidad de flujo de 0,5 mL/min. Las muestras se prepararon al 0,5% en el mismo eluyente y se tomaron cantidades de 0,5 mL para la cromatografía. Se recogen fracciones de 2 mL con un colector de fracciones automático.

Para la purificación de productos metilados se utilizó una columna similar a la anterior y rellena de Sephadex LH-20 (Pharmacia Fine Chemical). Se utilizó como eluyente la mezcla cloroformo-acetona 2:1 (Aspinall 1978 B). El flujo se controló con una bomba peristáltica. La velocidad de flujo fue de 1,75 mL/min, la amplitud de bombeo de cero, y la frecuencia de bombeo 15. Se recogieron las fracciones con un colector de fracciones automático.

d) Cromatografía líquida de alta resolución.

Se utilizó un cromatógrafo isocrático Hewlett-Packard modelo 1081 B, equipado con un inyector de volumen fijo de 20 μl y un detector de índice de refracción.

La muestra se preparó filtrándola a través de un filtro de jeringa Millipore de 0,45 μm de tamaño de poro.

Se utilizó para el estudio de los productos de hidrólisis parcial la columna Lichrosorb-NH₂ (Merck) de 250 mm de longitud y 4,6 mm de diámetro interno con un tamaño de partículas de 5 μm . Como eluyente se utilizó acetoni-trilo-agua (75-25) a 2 mL por minuto.

e) Cromatografía gas-líquido

Los cromatogramas de gases se realizaron en un cromatógrafo Perkin Elmer modelo 3920B y en un Hewlett-Packard modelo 5710A, ambos con detectores de ionización de llama y utilizando helio como gas portador.

En algunos casos se utilizó este último cromatógrafo equipado, el registrador, con una estación de tratamiento de datos Varian modelo Vista 401 y utilizando nitrógeno como gas portador. Se utilizaron las siguientes columnas:

- a) SE-30 al 3% sobre Chromosorb W-AW, DMCS (2m x 1/8")
- b) OV-1 al 5% sobre Chromosorb W-AW, DMCS (2m x 1/8")

Las condiciones de temperatura de columna, inyector, detector y flujo del gas portador, se indican en cada caso concreto.

- Preparación de trimetilsililéteres

Aproximadamente 5 mg de producto disuelto en 0,2 mL de piridina seca se trataron con 6 gotas de hexametildisilazano y 3 gotas de trimetilclorosilano. Se agitó y se dejó reaccionar durante unos minutos en un desecador; se centrifugó e inmediatamente se inyectó en el cromatógrafo.

I.3.1. Preparación de los acetatos de alditoles

Los azúcares (20 mg) y el patrón interno inositol se redujeron en agua (5 mL) con borohidruro sódico en exceso (60 mg) durante 3 horas a temperatura ambiente (Blake, 1970; Björndal, 1967; Sawardeker, 1965). El exceso de borohidruro se neutralizó con ácido acético y la disolución se desionizó utilizando Amberlita IR-120(H⁺) (1 mL de resina por miliequivalente de sodio).

Se concentró el líquido eluído y el ácido bórico se eliminó por codestilación con metanol. El producto se trató con anhídrido acético/piridina (1:1), y se dejó toda la noche a temperatura ambiente. Se adicionaron 30 mL de disolución de ácido clorhídrico al 5% en baño de hielo, y se extrajeron los acetatos con cloroformo. Se secaron sobre sulfato sódico anhidro. La solución se concentró a sequedad en rotavapor, y los acetatos se disolvieron en cloroformo y se inyectaron en el cromatógrafo.

Las condiciones cromatográficas para los acetatos de alditoles fueron las siguientes:

Columna: ECNSS-M (3%) sobre Gas Chromosorb Q (100-200 mesh, (2 m x 1/4").

Temperatura Inyector: 250°C

" Detector: 250°C

" Columna: 190°C

Los acetatos de alditoles de los monosacáridos parcialmente metilados, formados según el procedimiento descrito, también se identificaron por cromatografía gas-líquido utilizando el 1,5-di-O-acetil-2,3,4,6-tetra-O-metil-D-glucitol como patrón de referencia (Churms, 1982). Las condiciones cromatográficas fueron:

Columna: ECNSS-M 3%

Temperatura Inyector: 250°C

" Detector: 250°C

" Columna: 175°C

Flujo Helio: 60 mL/min.

I.3.1.1. Determinación cuantitativa de los monosacáridos

La determinación cuantitativa de los azúcares que constituyen los polisacáridos se realizó por cromatografía gas-líquido de los correspondientes acetatos de alditoles (Blake, 1970). Se utilizó el método del patrón interno utilizando como tal el inositol ya que éste, por su tiempo de retención, no coincide con ninguno de los azúcares presentes en los polisacáridos.

f) Cromatografía gaseosa-espectrometría de masas

Se utilizó, para los acetatos de alditoles parcialmente metilados de la hemicelulosa (metilada y reducida); para los de la fracción (A-I) y para los de la fracción (B-I), un sistema Hewlett-Packard modelo 5995 B equipado con una columna capilar de sílice fundida de 12 m de longitud y 0,2 mm de diámetro interno, de OV-1 "cross linked" con un espesor de película de la fase estacionaria de 0,33 μm . Temperatura de la columna: 120-220°C a 8° por minuto. En el caso de la hemicelulosa metilada y de la fracción B-II, se utilizó un sistema Hewlett-Packard modelo 5995 provisto de una computadora Hewlett-Packard 9825 B acoplada a un módulo 2671 G. Se utilizó la columna ECNSS-M a una temperatura de 175°C.

En el caso de la holocelulosa sin metilar y de la hemicelulosa metilada se realizaron en un aparato Varian 160 del Organisch Chemischen Institut der Universiten Wien.

En todos los casos la energía de ionización fue de 70 eV.

I.4. Técnicas espectroscópicas

a) Espectroscopía infrarroja

Los espectros de infrarrojo se realizaron en un espectrofotómetro Perkin-Elmer 281 que abarca la región 4000-600 cm^{-1} . Los espectros se realizaron en pastilla de bromuro

potásico para las sustancias sólida y en película de líquido puro entre cristales de cloruro sódico para los líquidos.

En el caso de los productos metilados se hizo el espectro directamente de película de líquido, semejante al celofán, sin ningún tipo de soporte.

b) Resonancia magnética nuclear

Se realizaron los espectros de RMN-¹H en un espectrómetro Perkin-Elmer R-12 B (60 MHz). Se usaron disolventes deuterados y tetrametilsilano como referencia interna. Los valores de los desplazamientos se indican en valores δ (ppm).

Los espectros de RMN-¹³C se registraron en un Varian 200. Los desplazamientos químicos fueron referidos al tetrametilsilano, y como disolvente se utilizó el deuterio-cloroformo.

II. AISLAMIENTO DE LA HOLOCELULOSA

II.1. Extracciones previas

Se tomaron 216,69 g de corcho en polvo, finalmente dividido, y se extrajo sucesivamente y hasta agotamiento con benceno (noventa horas); con agua, hasta que no arrastró color, y finalmente con metanol (veinte horas).

El corcho extraído se secó a temperatura ambiente y pesó 45,69 g lo que supone una disminución en peso del 22% respecto al corcho de partida.

II.2. Despolimerización del corcho. Eliminación de la suberina

100 g de corcho extraído y seco se sometieron a transesterificación por metanolisis con 1700 mL de metóxido sódico en metanol anhidro 0,1M.

El secado previo del metanol se realizó de la siguiente manera: En un matraz de fondo redondo de cinco litros provisto de entrada de nitrógeno y refrigerante de serpentín, se introdujeron 10 g de magnesio metálico, 2 g de yodo resublimado y 150 mL de metanol.

Se calentó a reflujo la mezcla hasta la desaparición del color anaranjado del yodo; se añadieron 1800 mL de metanol y se continuó el reflujo una hora más. Finalmente se destiló el metanol (p.eb. 65°C).

En un matraz de 5 litros se introdujeron, bajo atmósfera de nitrógeno, 100 g de corcho extraído y seco en 1,5 litros de metanol seco. Al mismo tiempo se preparó una disolución de metóxido sódico, disolviendo 2,47 g de sodio metálico en 200 mL de metanol seco. Esta disolución se añadió al matraz de reacción y la mezcla se calentó a reflujo bajo atmósfera de nitrógeno durante 5 horas. Finalizado este tiempo se filtró el corcho, se lavó varias veces con metanol, hasta que no arrastró color, y luego con diclorometano.

El residuo obtenido tras metanolisis del corcho y eliminación del metanol, se extrajo con éter (secado y destilado sobre sodio) una semana en soxhlet hasta que éste no arrastró color. Se obtuvo un residuo que se sometió a una extracción con metanol. Tras estas dos extracciones sucesivas se obtuvo un residuo que pesó 63,89 g.

II.3. Deslignificación del corcho

5 g de residuo de corcho se suspendieron en 160 mL de agua caliente en un frasco erlenmeyer de 500 mL que contenía 0,6 mL de ácido acético glacial y a continuación se añadieron 1,5 g de clorito de sodio. Estas operaciones, incluyendo los lavados, deben hacerse en vitrina. La suspensión así preparada se calentó en un baño de agua a 70° con agitación durante una hora. Luego se filtró en un embudo Büchner y el residuo se lavó con agua varias veces.

Idéntico tratamiento se repitió tres veces. El residuo, se secó con etanol y se le añadieron 100 mL de una solución de etanolamina al 3% en etanol (95%) y se calentó a ebullición durante 5 minutos. La mezcla se filtró sobre un Büchner y se lavó primeramente con etanol y luego con agua. Se obtuvo un producto con un color ligeramente amarillo. Se repitieron las cloraciones y extracciones con etanolamina hasta que se obtuvo un producto blanco. Finalmente, se lavó con agua, luego con etanol y se secó en un desecador.

El residuo así obtenido (1,51 g) polvo blanco amorfo de holocelulosa, representó un 28,00% (promedio) en peso respecto al residuo de corcho extraído, lo que supone en el corcho natural del Quercus Suber un 15% en peso.

III. ESTUDIO DE LA HOLOCELULOSA

III.1. Caracterización de la holocelulosa

La holocelulosa resultó ser un sólido blanco amorfo, insoluble en su totalidad en todos los disolventes ensayados, tanto orgánicos como inorgánicos. Sin embargo, se disolvió parcialmente en disoluciones acuosas alcalinas (de KOH y NaOH), así como en dimetilsulfóxido.

Para su caracterización se empleó la espectroscopía de infrarrojo en pastillas de bromuro potásico.

III.2. Hidrólisis ácida

a) Procedimiento de G.W. Monier-Williams

1 g de holocelulosa se suspendió en 5 mL de ácido sulfúrico del 72% y esta mezcla se dejó en agitación a temperatura ambiente durante cuatro días. Se formó una disolución oscura, se diluyó con 500 mL de agua y se calentó a reflujo durante 15 horas. Terminado el reflujo se dejó enfriar y se filtró en un embudo Büchner. El líquido se neutralizó con carbonato de bario y el sulfato de bario se eliminó por filtración. La disolución se concentró a sequedad por evaporación en un rotavapor, con lo que se obtuvo un residuo sólido ligeramente amarillento que pesó 0,516 g.

b) Procedimiento según A. Navas

A 0,5 g de holocelulosa se añadieron 10 mL de una solución de ácido sulfúrico del 72% y la mezcla se tuvo en agitación a temperatura ambiente 4 horas. A continuación se diluyó la mezcla con agua hasta obtener una disolución de ácido sulfúrico 1N y se calentó a 100°C durante 4 horas. Se dejó enfriar la disolución y se adicionaron 2 mg de inositol. Se filtró con succión y el filtrado se pasó por una columna que contenía la resina de intercambio iónico Amberlita IR-120 (H⁺) y se eluyó con agua. La disolución resultante se concen-

tró a sequedad con vacío, obteniéndose un sólido de color amarillo $[\alpha]_D^{20} + 8$ (c=2, en agua).

Su espectro de IR se registró en pastillas de bromuro potásico. Su espectro de RMN se registró disolviendo la muestra en agua pesada.

III.2.1. Identificación de los monosacáridos

Se realizó por cromatografía gas-líquido en forma de derivados trimetilsililados comparando con patrones auténticos igualmente sililados. Las condiciones cromatográficas fueron las siguientes:

Columna OV-1 3%

Temperatura Inyector: 350°C

" Detector: 350°C

" Columna: 195°C

Flujo Helio: 30 mL/min.

Para el caso b) la temperatura de la columna fue de 180°.

Para la cromatografía en capa fina se utilizó un soporte de Kieselgur G y como eluyente acetato de etilo-isopropanol al 65% (65:35).

Con el soporte de celulosa se utilizó como eluyente n-butanol-etanol-agua (3:2:2) y se eluyeron las placas tres veces.

III.2.2. Determinación cuantitativa de los monosacáridos

Para la determinación cuantitativa de estos azúcares en la mezcla se formaron los acetatos de alditoles. Se purificaron por filtración sobre columna de sílica gel eluyendo con éter. Se obtuvo un sólido amarillento que, disuelto en cloroformo, se analizó por cromatografía gas-líquido comparando con los siguientes patrones.

De forma similar, se formaron los acetatos de alditoles de azúcares patrones: xilitol, arabinitol, ramnitol, manitol, galactitol y glucitol. Se purificaron igualmente por columna y en el caso del glucitol y galactitol se cristalizaron en etanol.

De los acetatos de alditoles de la holocelulosa se registró su espectro de IR en pastillas de cloruro sódico.

Su espectro de RMN, se realizó disolviendo la muestra en deuterocloroformo y usando el tetrametilsilano como referencia interna.

La cromatografía gaseosa-espectrometría de masas combinadas de los acetatos de alditoles se realizó en las siguientes condiciones:

Columna: SE-30 (20 m)

Temperatura Columna: 140°/10°-320°.

III.3. Hidrólisis enzimática (I)

A 2 g de holocelulosa se añadieron 100 mL de una disolución tampón AcOH/NaOAc a pH 4,5 que contenía 0,2 g de celulasa y 1 mg de acetato de fenilmercurio. Esta mezcla se termostató a 45°C y se dejó con agitación durante 4 horas. Finalizado este periodo de reacción se filtró y se recuperó la holocelulosa que no se había hidrolizado. El filtrado transparente se calentó a ebullición durante cinco minutos. Se filtró, para que volviese a quedar transparente, y el filtrado se concentró a sequedad y se obtuvo un sólido amarillento cuyo peso fué de 0,862 g.

III.3.1. Identificación de los monosacáridos

Se realizó por cromatografía gas-líquido. Los monosacáridos se sililaron de la forma habitual y se compararon

con patrones auténticos igualmente sililados y en las siguientes condiciones:

Columna OV-1 3%

Temperatura Inyector: 350°C

" Detector: 350°C

" Columna: 195°C

Flujo Helio: 30 mL/min.

Para la determinación cuantitativa de los monosacáridos se formaron los acetatos de alditoles de los componentes del hidrolizado enzimático y se analizaron por cromatografía gaseosa en las condiciones que se indican en los métodos generales.

III.3.2. Hidrólisis ácida de los oligosacáridos. Determinación cuantitativa de los monosacáridos

100 mg del producto de la hidrólisis enzimática de la holocelulosa se disolvieron en 2 mL de H_2SO_4 del 72%, con agitación durante 4 horas. A continuación se añadieron 51 mL de agua destilada y se calentó la mezcla a reflujo durante 4 horas. A esta disolución se añadieron 2 mg de inositol; se neutralizó con carbonato de bario, se filtró y el filtrado se desionizó a través de la resina Amberlita IR-120(H^+). Los monosacáridos se eluyeron con agua y se concentraron a un pequeño volumen para formar los correspondientes acetatos de alditoles, de la forma acostumbrada. Se obtuvieron 30 mg de estos derivados y se analizaron por cromatografía gas-líquido en las condiciones que se indican en los métodos generales.

III.3.3. Hidrólisis ácida del residuo no hidrolizado enzimáticamente. Determinación cuantitativa de los monosacáridos

A 400 mg del residuo de la holocelulosa no hidrolizada enzimáticamente se añadieron 8 mL de H_2SO_4 del 72% y se tuvo en agitación durante 6 horas, porque no se disolvía

totalmente. Se añadieron 204 mL de agua y se calentó la mezcla a reflujo durante 4 horas. Seguidamente se adicionaron 2 mg de inositol, se neutralizó la disolución con carbonato de bario, se filtró y el filtrado se desionizó a través de la resina Amberlita IR-120(H⁺) eluyendo los productos con agua. Con estos monosacáridos se formaron los correspondientes acetatos de alditoles (264 mg), y se analizaron por cromatografía gas-líquido en las condiciones que se indican en las técnicas generales.

III.4. Hidrólisis enzimática (II)

A 100 mg de holocelulosa se añadieron 5 mL de una disolución tampón de AcH/AcONa a pH 4,5; 10 mg de celulasa y 0,1 mg de acetato de fenilmercurio y se realizó la hidrólisis tal como se describió en el apartado III.3. siendo en este caso el tiempo de reacción de 20 horas.

Finalizado el tratamiento, con el hidrolizado obtenido (56 mg) se formaron los acetatos de alditoles (36 mg), para su análisis por cromatografía gas-líquido, utilizando el inositol como patrón interno.

III.5. Metilación de la holocelulosa

14,8 g de HNa (dispersión en aceite mineral al 50%) se colocaron en un matraz redondo de tres bocas y se lavaron cinco veces con hexano seco y destilado, moviéndolo, dejando que se deposite el hidruro y decantando el líquido para eliminar el aceite mineral. Inmediatamente se acopló el matraz un agitador mecánico, un embudo de presión compensada a través del que se adicionaron los reactivos, y la tercera boca fue para la entrada de argón. Se hizo pasar argón varias veces hasta eliminar el hexano. Luego se introdujeron 300 mL de dimetilsulfóxido (destilado sobre hidruro cálcico, b.p. 64° a 4 mm, y secado sobre tamiz molecular de 4Å) a través del embudo gota a gota, con agitación magnética y la mezcla

se calentó a 70°C durante 2 horas. La solución tomó una coloración gris-amarillo oscuro de la sal de sodio. Luego se añadieron 2 g de holocelulosa en 40 mL de DMSO, que había estado tres días con agitación y se dejó reaccionar tres horas. A continuación, y sin calentar, se adicionaron 30 mL de ICH_3 gota a gota y se dejó toda la noche con agitación a temperatura ambiente.

El polisacárido metilado se recuperó por extracción con cloroformo. Las fases orgánicas reunidas se lavaron con agua y se dejaron secar sobre sulfato sódico anhidro. Tras filtración y eliminación del disolvente dió un líquido amarillo viscoso que se secó en estufa de vacío a 40° durante dos días.

Se obtuvo un sólido amarillo (2,325 g) que se purificó por cromatografía de columna sobre Sephadex LH-20 utilizando como eluyente la mezcla cloroformo-acetona (2:1).

Su espectro de IR se registró como película capilar de líquido puro.

Su espectro de RMN se registró disolviendo la muestra en deuterocloroformo y utilizando el tetrametilsilano como referencia interna.

III.5.1. Hidrólisis ácida. Identificación de los monosacáridos parcialmente metilados

60 mg de holocelulosa metilada se disolvieron en 1,1 mL de H_2SO_4 del 72% con agitación durante 4 horas. Se añadieron luego 28 mL de agua destilada y se calentó la mezcla a reflujo otras 4 horas. Se neutralizó la solución con carbonato de bario, se filtró y el filtrado se pasó a través de la resina Amberlita IR-120(H^+) y se eluyó con agua. Con los productos eluidos se formaron los correspondientes acetatos de alditoles.

Estos acetatos de alditoles parcialmente metilados (63 mg) se identificaron por cromatografía gas-líquido en las condiciones que se indican en las técnicas generales.

III.5.2. Reducción de la holocelulosa metilada

A 20 mL de tetrahidrofurano, seco y recién destilado, en un matraz de fondo redondo que contenía 70 mg de hidruro de aluminio y litio se adicionaron 20 mg de holocelulosa metilada y se calentó la mezcla a reflujo durante 4 horas bajo atmósfera de argón. El exceso de reactivo se destruyó por adición de una disolución de HCl al 5% fría, y el producto metilado y reducido se aisló por extracción con cloroformo. El extracto se lavó con agua hasta pH neutro y se secó sobre sulfato sódico anhidro. Se concentró a sequedad y se obtuvo un sólido (15 mg) que se caracterizó por sus datos espectroscópicos.

Su espectro de IR se realizó entre pastillas de cloruro sódico previa disolución en cloroformo. Su espectro de RMN se registró disolviendo la muestra en deutero-cloroformo y se utilizó el tetrametilsilano como referencia interna.

III.5.2.1. Hidrólisis ácida. Identificación de los monosacáridos parcialmente metilados

Los 15 mg de la holocelulosa metilada y reducida se disolvieron en 0,5 mL de H_2SO_4 al 72% con agitación durante 4 horas. Luego se añadieron 13 mL de agua y se calentó a reflujo 4 h. Se neutralizó la solución con carbonato de bario, se filtró y el filtrado se pasó por la resina Amberlita IR-120(H^+) y se eluyó con agua. Con los productos eluidos se formaron los acetatos de alditoles de la forma acostumbrada.

Los acetatos de alditoles parcialmente metilados, se identificaron por cromatografía gas-líquido y por cromatografía gaseosa espectrometría de masas combinada, en las siguientes condiciones:

Columna: ECNSS-M 3%

Temperatura de Columna: 175°C; Detector: 250°C e Inyector: 250°C.

IV. ESTUDIO DE LA CELULOSA

IV.1. Aislamiento

Se obtuvo por tres métodos diferentes:

- a) 1 g de holocelulosa se extrajo con NaOH al 4% con agitación durante 2 días. Se filtró y el residuo se lavó con agua hasta neutralidad, y finalmente, con etanol. Se secó en desecador y se obtuvieron 0,621 g, un polvo blanco de celulosa, que supone un 61,24% respecto a la holocelulosa.
- b) 34 g de holocelulosa, se extrajeron con NaOH al 10% bajo atmósfera de argón y con agitación magnética durante 2 h. Se filtró la mezcla a través de filtros de tela sobre un embudo Büchner. El sólido se lavó con agua y luego con etanol. Una vez seco pesó 2,56 g, lo que supone un 42,16% respecto a la holocelulosa.
- c) 1 g de holocelulosa se extrajo con dimetilsulfóxido, recién destilado, con agitación a temperatura ambiente 4 días. La mezcla se filtró sobre embudo Büchner se lavó con agua y luego con etanol. Se secó en desecador a vacío y el sólido una vez seco pesó 69,70g que presenta un 69,7% respecto a la holocelulosa.

El espectro de IR de la celulosa se realizó en pastillas de bromuro potásico.

IV.2. Hidrólisis ácida

14,4 mg de celulosa se disolvieron en 0,28 mL de H_2SO_4 del 72% con agitación (4 horas). Se añadieron 8 mL de agua destilada y se calentó la mezcla a reflujo 4 horas. Se añadieron 2 mg de inositol (1 mL de una disolución al 2%). Se neutralizó con carbonato de bario y se desionizó a través de la resina Amberlita IR-120(H^+). Se eluyeron los productos con agua y se concentraron a sequedad.

Su espectro de IR se realizó en pastillas de bromuro potásico. Su espectro de RMN se realizó en agua pesada.

IV.2.1. Identificación de los monosacáridos

Una muestra de los monosacáridos obtenidos se sililó de la forma habitual, y se identificaron por cromatografía gas-líquido. Se compararon con azúcares patrones. Las condiciones fueron:

Columna: OV-1 5%

Temperatura Detector: 250°C

" Inyector: 250°C

" Columna: 185°C ; Flujo: 30 mL/min.

Para la determinación cuantitativa se transformaron los monosacáridos en acetatos de alditoles, de la forma acostumbrada. Se analizaron por cromatografía gas-líquido en las condiciones que se indican en las técnicas generales.

IV.3. Acetólisis de la celulosa

1 g de celulosa se disolvió con agitación magnética en 20 mL de la mezcla formada por (17 mL de ácido acético glacial, 17 mL de anhídrido acético y 18 mL de ácido sulfúrico concentrado) (Wolfrom, 1963). La mezcla se dejó reaccionar 80 horas para conseguir el máximo rendimiento de octaacetato de α -celobiosa. La solución tomó un color marrón rojizo. Transcurrido ese tiempo, se centrifugó y el filtrado se virtió lentamente y con agitación magnética sobre una mezcla de hielo y agua y se formó un sólido blanco. Esta mezcla se neutralizó con bicarbonato de sodio y se dejó en reposo 19 horas a 0°. El precipitado blanco se recuperó por filtración, se lavó varias veces con agua hasta que el filtrado fue neutro y se secó en un desecador a vacío sobre hidróxido sódico. Se obtuvo un polvo blanco amorfo que pesó 1,094 g. De este sólido se cristalizaron 0,452 g en metanol. Se obtuvieron unos cristales blancos (0,119 g) cuyo punto de fusión (p.f.=227°C) y poder rotatorio $\{\alpha\}_D^{20} +37,46$, $c=23,86$ en Cl_3CH fueron coincidentes con el del octaacetato de α -celobiosa (p.f. teórico 229°C; $\{\alpha\}_D^{20} +41$, $c=6$ en Cl_3CH).

Su espectro de IR se registró en pastilla de bromuro potásico. Su espectro de RMN se registró, disolviendo la muestra en Cl_3CH y utilizando el tetrametilsilano como referencia interna.

Para la desacetilación se tomaron 0,452 g y se disolvieron en 6 mL de metanol absoluto y se enfrió a 0° . Se añadió una disolución de metóxido sódico para neutralizar y se dejó la solución a 0° durante 48 horas. Se añadió a continuación suficiente agua fría para disolver el precipitado pero no se disolvió totalmente y se separó por centrifugación. El centrifugado se pasó a través de la resina de cambio iónico Amberlita IR-120(H^+) y se concentró el eluido a un pequeño volumen para su análisis por cromatografía sobre papel.

IV.3.1. Análisis de los oligosacáridos por cromatografía sobre papel

Se utilizó la técnica descendente sobre papel Watman n°3, usando tres desarrolladores: desarrollador A, acetato de etilo-ácido acético-ácido fórmico-agua (18:3:1:4) (19 h); desarrollador B, n-butanol-etanol-agua (2:1:1) (46 h); desarrollador C, n-butanol-piridina-agua (6:4:3) (19 h). Como revelador se utilizó la difenilamina anilina, que dió una coloración azul con las hexosas al calentar el cromatograma a 80°C . Se detectó la presencia de celobiosa (R_X 0,25 desarrollador A; R_X 0,57 desarrollador B y R_X 0,55 desarrollador C).

IV.4. Metilación de la celulosa

En un matraz redondo de tres bocas se introdujeron 2 g de celulosa en 20 mL de agua y 67 mL de hidróxido de sodio al 38%. Se acopló al matraz un agitador mecánico, un embudo de presión compensada a través del cual se adicionaron los reactivos y la otra boca fue para la entrada del argón. Se adicionaron 30 mL de sulfato de dimetilo gota a gota a

20°C con agitación y bajo atmósfera de argón. La adición se completó en 5 horas. Se calentó la mezcla a 40°C durante 8 horas y luego 20 min. a 100°C, y finalmente se enfrió y se dejó un día más reaccionando. Luego se añadió dos veces su volumen de agua y se extrajo con cloroformo (5 veces con porciones de 60 mL). El extracto orgánico se lavó con agua, se secó sobre sulfato sódico y el cloroformo se eliminó en rotavapor. Se obtuvieron 54 mg.

El residuo no metilado se recuperó por filtración, se lavó con agua, se secó y se volvió a metilar según Hakomori junto con el producto obtenido.

5,42 g de HNa se colocaron en un matraz de fondo redondo de tres bocas. Se lavó varias veces con hexano y éste se eliminó por decantación. Los últimos restos se eliminaron pasando corriente de argón. Se acopló al matraz un agitador mecánico y un embudo de presión compensada por el que se adicionaron 113 mL de DMSO, seco y destilado, y se calentó la mezcla a 70°C durante 2 horas con agitación mecánica y bajo atmósfera de argón. Se añadió la celulosa no metilada (733 mg), se dejó reaccionar 2 horas y se quitó la calefacción. A continuación se añadieron 15 mL de ICH_3 , gota a gota en 3 horas. Al adicionar el yoduro de metilo, la mezcla pasó de tener un color gris-verdoso, a un amarillo transparente. Se dejó reaccionar durante 24 horas. A la mezcla de reacción se añadió de dos a tres veces su volumen de agua y se extrajo con cloroformo (5x70 mL), se lavó con agua el extracto orgánico, se secó sobre sulfato sódico y se concentró a sequedad. Se obtuvo un producto viscoso (1,072 g) que se dejó en estufa de vacío a 40° durante cuatro días. Seco pesó 0,733 g (67,66% en peso). Se disolvió el residuo en una pequeña cantidad de cloroformo y esta solución resultante se añadió gota a gota a éter de petróleo en un baño de hielo. Se obtuvo un precipitado blanco fibroso, que pesó 124 mg y se caracterizó primeramente por sus datos espectroscópicos.

Su espectro de IR se registró como película de líquido puro.

Su espectro de RMN se registró disolviendo la muestra en deuterocloroformo y utilizando el tetrametilsilano como referencia interna.

IV.4.1. Hidrólisis ácida. Identificación de los monosacáridos parcialmente metilados

100 mg de la celulosa metilada se disolvieron en 2 ml de H_2SO_4 del 72% y se tuvo durante 4 horas con agitación. A continuación añadieron 51 mL de agua y se calentó a reflujo 4 horas. Se neutralizó con carbonato de bario, se filtró, se eluyó el filtrado por resina Amberlita IR-120 (H^+) y se concentró la solución a un pequeño volumen.

Para un análisis cuantitativo se formaron los derivados acetatos de alditoles de los monosacáridos parcialmente metilados, de la forma habitual y se analizaron por cromatografía gas-líquido en las condiciones que se indican en las técnicas generales.

V. ESTUDIO DE LA HEMICELULOSA

V.1. Aislamiento

a) Extracción con NaOH al 4%

A 1 g de holocelulosa se le añadieron 10 mL de una solución de NaOH al 4% y se tuvo en agitación a temperatura ambiente 2 días. Se filtró a través de un embudo Büchner y el filtrado se acidificó con ácido acético. Apareció un precipitado flocculento que se separó por filtración. Al filtrado se le añadió un volumen equivalente de etanol del 95% y el nuevo precipitado se filtró sobre el anterior y se lavó con etanol al 50%. El sólido así obtenido se disolvió en 10 mL de NaOH al 4%, se neutralizó con ácido acético y se le añadió un volumen equivalente de etanol al 95%. El precipitado formado se separó por filtración, se lavó con etanol, y se secó con éter. Se volvió a purificar este sólido disolviéndolo en una disolución de NaOH al 2%. Se le añadió solución de Fehling A y Fehling B (volúmenes iguales) hasta que la precipitación del complejo de cobre fue completa. Se separó el precipitado por filtración. Para destruir el complejo de cobre se añadió ácido acético glacial diluido (3%). El complejo azul de cobre pasó a ser incoloro y la disolución azul. Se filtró, se lavó con ácido acético diluido, luego con etanol diluido y finalmente con etanol del 95%. Se secó la hemicelulosa a temperatura ambiente y peso 0,175 g $\{\alpha\}_D^{20} -100,574^\circ (c = 2, \text{ en solución de hidróxido sódico } 1\%)$.

b) Extracción con dimetilsulfóxido

1 g de holocelulosa se agitó en 12 mL de dimetilsulfóxido, recién destilado, durante 4 días a temperatura ambiente. Se filtró la mezcla sobre un embudo Büchner y al filtrado se le adicionaron 4 volúmenes de etanol y 4 mL de ácido acético, para que la precipitación del polisacárido extraído sea completa. El precipitado se recuperó por cen-

trifugación. Se lavó a fondo con etanol y se secó a vacío en un desecador. Se obtuvieron 0,218 g de un sólido blanquecino.

El espectro de IR, de la hemicelulosa, se registró en pastilla de bromuro potásico.

V.2. Hidrólisis ácida

A 18 mg de hemicelulosa (extraída con NaOH 4%) se adicionaron 0,35 mL de H_2SO_4 del 72% y se tuvo en agitación 4 horas. Se añadieron 13 mL de agua y se calentó a reflujo otras 4 horas. Se adicionaron 2 mg de inositol. La mezcla se neutralizó con carbonato de bario y se desionizó por resina Amberlita IR-120(H^+). Se eluyeron con agua los monosacáridos y se concentraron a sequedad.

En las mismas condiciones, se hidrolizaron 22 mg de hemicelulosa extraída con DMSO.

V.2.1. Identificación de los monosacáridos

Se sililó, de la forma habitual, una muestra de los monosacáridos para su análisis por cromatografía gas-líquido. Se compararon con patrones auténticos. Las condiciones fueron las siguientes:

Columna: OV-1

Temperatura Columna: 165°C

" Detector: 250°C

" Inyector: 250°C

Flujo: 30 mL/min.

Para la determinación cuantitativa se formaron los acetatos de los alditoles de los monosacáridos de la forma habitual y se realizó un análisis comparativo, de la hemicelulosa extraída con NaOH 4% y de la extraída con DMSO, por cromatografía gas-líquido en las condiciones detalladas en las técnicas generales.

V.2.2. Determinación cuantitativa de ácidos urónicos

18 mg de hemicelulosa se disolvieron en ácido sulfúrico del 72% a 30°C, con agitación, durante 1 hora. A continuación se añadieron 13 mL de agua y se calentó a 100°C durante tres horas. El hidrolizado se neutralizó con carbonato de bario, se filtró, se ajustó a pH 8,5-9 con hidróxido potásico 0,1 M y se pasó sucesivamente a través de dos columnas que contenían Amberlita IR-120(H⁺) e IRA-400(AcO⁻). Se eluyeron ambas con agua y la aniónica con ácido acético al 10%. Los ácidos eluidos se concentraron a un volumen exacto de 10 mL. De esta solución se tomaron dos fracciones de 1 y 5 mL respectivamente y se aforaron cada una de ellas a 10 mL. De estas dos disoluciones se tomó un mililitro de cada una de ellas, y se llamaron D-1 y D-2 respectivamente, para hacer la reacción colorimétrica.

V.3. Hidrólisis ácida parcial de la hemicelulosa. Identificación de los monosacáridos.

a) Hidrólisis con H₂SO₄ 0,05 M

A 200 mg de hemicelulosa se le adicionaron 20 mL de H₂SO₄ 0,05 M y se tuvo a reflujo durante hora y media. Se centrifugó la mezcla y se obtuvo 20 mg de residuo no hidrolizado. El hidrolizado se neutralizó con carbonato de bario, se filtró, se eluyó por resina Amberlita IR-120(H⁺) y se concentró a sequedad. Se sililó una muestra de este hidrolizado y se inyectó en el cromatógrafo de gases junto con azúcares patrones igualmente sililados, en las siguientes condiciones:

Columna: OV-1

Temperatura Columna: 170°C

" Detector: 250°C

" Inyector: 250°C

Flujo: 30 mL/min.

Para una determinación cuantitativa se formaron los acetatos de alditoles de los monosacáridos del hidrolizado y se analizaron igualmente por cromatografía gas-líquido en las condiciones habituales.

b) Hidrólisis con H_2SO_4 0,005 M

100 mg de hemicelulosa se agitaron en 10 mL de H_2SO_4 0,005 M durante 1 hora. El hidrolizado, separado por centrifugación, se neutralizó, se desionizó por resina Amberlita IR-120 (H^+) y se concentró a sequedad. Con el residuo obtenido (29 mg, $\{\alpha\}_D^{20} -29,83$ (c = 5,8 en agua), se formaron los correspondientes acetatos de alditoles y se identificaron por cromatografía gas-líquido. El residuo no hidrolizado pesó 56 mg.

V.4. Metilación de la hemicelulosa

7,40 g de HNa (dispersión en aceite mineral al 50%) se colocaron en un matraz redondo de tres bocas y se lavó varias veces con hexano para eliminar el aceite mineral. Luego se acopló al matraz un agitador mecánico y un embudo de presión compensada. Se adicionaron 300 mL de dimetilsulfóxido, seco y destilado, gota a gota, bajo atmósfera de argón y con agitación a 70°C . Al cabo de 3 horas, se adicionaron 2,42 g de hemicelulosa en 40 mL de dimetilsulfóxido y se dejó reaccionar 1 hora. Transcurrido ese tiempo se adicionaron a temperatura ambiente 35 mL de ICH_3 gota a gota, durante hora y media. Después de dos horas, la disolución había pasado de ser de color gris-verdoso a amarillo transparente. Se dejó reaccionar toda la noche. Se le adicionaron 800 mL de agua y se extrajo con cloroformo cuatro veces. Se lavó con agua la fase orgánica hasta neutralidad, se secó sobre sulfato de sodio y se concentró a sequedad. Se obtuvo un líquido viscoso amarillo que se secó en la estufa de vacío durante tres días. El sólido amarillo que se obtuvo se purificó por precipitación en benceno con éter de petróleo. Se recuperó como un sólido blanco flocculento que pesó 1,79 g (73,96% en peso);

$\{\alpha\}_D^{20} - 74 (c = 2 \text{ en } \text{Cl}_3\text{CH})$.

Su espectro de IR se registró como película capilar de líquido puro.

Su espectro de RMN- ^1H y RMN- ^{13}C , se registraron disolviendo la muestra en deuterocloroformo y utilizando el tetrametilsilano como referencia interna.

V.4.1. Hidrólisis ácida. Identificación de los monosacáridos parcialmente metilados

0,212 g de polisacárido metilado se hidrolizaron en 4,2 mL de H_2SO_4 del 72% con agitación durante 4 horas. Luego se añadieron 105 mL de agua y se calentó a reflujo 4 horas. El hidrolizado se neutralizó con carbonato de bario y se desionizó a través de la resina Amberlita IR-120(H^+). Se eluyeron con agua los productos y se concentraron a un pequeño volumen. Estos monosacáridos se transformaron en los acetatos de alditos de la forma habitual y se purificaron por filtración a través de sílica gel utilizando como eluyente la mezcla hexano-éter (1:5).

La identificación de los monosacáridos parcialmente metilados se realizó por cromatografía gas-líquido en las condiciones indicadas en las técnicas generales.

Las condiciones de la cromatografía gaseosa-espectrometría de masas combinadas fueron las siguientes:

Columna: S-30(20 m)

Temperatura Columna: $110^\circ/8^\circ - 280^\circ$

Flujo Helio: 4 mL.

V.4.2. Reducción de la hemicelulosa metilada

En un matraz de fondo redondo de 50 mL, provisto de refrigerante y tubo de sílica gel, que contenía 100 mg de hidruro de litio y aluminio en 30 mL de tetrahidrofurano seco y

destilado, se redujeron 93 mg de hemicelulosa metilada calentando la mezcla a reflujo durante 4 horas y bajo atmósfera de nitrógeno. Terminada la reacción se adicionó al matraz de reacción, con enfriamiento externo, agua clorhídrica hasta pH 4. El polisacárido metilado y reducido se recuperó por extracción con cloroformo. Se lavó la fase orgánica con agua hasta neutralidad de las aguas de lavado, se secó sobre sulfato sódico y se concentró a sequedad. Se obtuvieron 80 mg de un sólido amarillento. Su espectro de IR se registró entre pastillas de cloruro sódico, disuelto en cloroformo.

Su espectro RMN se registró disolviendo la muestra en deuterocloroformo y se utilizó el tetrametilsilano como referencia interna.

V.4.2.1. Hidrólisis ácida. Identificación de los monosacáridos parcialmente metilados.

27 mg de hemicelulosa metilada y reducida se disolvieron en 0,6 mL de H_2SO_4 del 72% con agitación a temperatura ambiente durante 4 horas. Luego se adicionaron 15 mL de agua y se calentó a reflujo otras 4 horas. Se neutralizó el hidrolizado con carbonato de bario y se filtró. El filtrado se pasó por una columna que contenía resina Amberlita IR-120(H^+) y se eluyó con agua. Los productos eluidos se concentraron a un pequeño volumen y se formaron los acetatos de los alditoles de estos monosacáridos, según se indica en las técnicas generales.

Los acetatos de alditoles parcialmente metilados se identificaron por cromatografía gas-líquido, comparando los resultados con los obtenidos del polisacárido metilado sin reducir, en las condiciones cromatográficas habituales.

Las condiciones cromatográficas de la cromatografía gaseosa-espectrometría de masas fueron las siguientes:

Columna: OV-1(12 m)

Temperatura Columna: $120^\circ/8^\circ-220^\circ$.

V.5. Caracterización del ácido 4-O-metil-D-glucurónico

40 mg de hemicelulosa se hidrolizaron parcialmente con ácido H_2SO_4 0,25N a $100^\circ C$ durante 90 minutos. El hidrolizado se neutralizó con carbonato de bario, se filtró y se llevó a pH 8,5-9 con potasa 0,1M. La solución alcalina se pasó a través de las columnas que contenían las resinas Amberlita IR-120(H^+) e IRA-400(AcO^-). Los azúcares neutros se eluyeron con agua y los azúcares ácidos se eluyeron de la columna aniónica con ácido acético al 10% y se concentraron a sequedad.

Estos componentes ácidos (7 mg) se hidrolizaron con ácido H_2SO_4 del 72%, de la forma acostumbrada. El hidrolizado se neutralizó con carbonato de bario, se filtró y se desionizó a través de Amberlita IR-120(H^+). Los productos eluidos se concentraron a un pequeño volumen y se redujeron con $NaBH_4$, 4 horas a temperatura ambiente. El exceso de borohidruro se destruyó con ácido acético, se desionizó la solución con la resina Amberlita IR-120(H^+) y el ácido bórico se eliminó por codestilación con metanol. El residuo obtenido se disolvió en HCl 1,2N y se evaporó a sequedad obteniéndose la aldolactona. A continuación se le añadió ácido bórico 0,4M (1,5 mL) y borohidruro sódico 0,3M (3 mL) gota a gota y enfriando con hielo. Se dejó 30 minutos a $0^\circ C$, se ajustó a pH 9 y se dejó 12 horas a $5^\circ C$. Transcurrido ese tiempo, se añadió un exceso de la disolución de $NaBH_4$ (2 mL) y se dejó reaccionar durante 4 horas. Finalmente se destruyó el exceso de borohidruro de la forma habitual y se prepararon los correspondientes acetatos tal como se detalla en las técnicas generales.

VI. HEMICELULOSA A Y B

VI.1. Aislamiento de hemicelulosa A

Extracción con NaOH al 10%

En un matraz de 1 litro de fondo redondo de tres bocas, que contenía 800 mL de una solución de NaOH al 10% se hizo pasar nitrógeno durante 5 horas a través de la solución para desoxigenarla. Luego se introdujeron 34 g de holocelulosa, secados en estufa de vacío, y se agitó la mezcla mecánicamente bajo atmósfera de nitrógeno y a temperatura ambiente durante 20 horas.

La mezcla se filtró a través de filtros de tela sobre un embudo Büchner. El filtrado, ligeramente amarillo y transparente, se acidificó con ácido acético del 50%. Apareció un precipitado blanco flocculento y se dejó reposar en la nevera durante 3 horas. Luego se separó el precipitado por centrifugación a 14.000 r.p.m. y a 5°C durante media hora. Se lavó con agua y luego con etanol absoluto. Se secó en desecador y se obtuvo un sólido blanco de hemicelulosa A que pesó 11,78 g.

VI.1.1. Hidrólisis ácida. Identificación de los monosacáridos

88 mg de hemicelulosa A se agitaron en 1,6 mL de ácido sulfúrico del 72% durante 1 hora a 30°C. A continuación se añadieron 41 mL de agua y se calentó la mezcla a reflujo durante 4 horas. Se dejó enfriar a temperatura ambiente y se añadieron 2 mg de inositol al hidrolizado antes de neutralizarlo con carbonato de bario. Se separó el sólido por filtración y el filtrado se pasó por una columna que contenía la resina Amberlita IR-120(H⁺). Los productos se eluyeron con agua y se concentraron a un pequeño volumen.

Con los monosacáridos, se formaron sus derivados acetatos de alditoles, de la forma habitual, para un análisis cuantitativo de los mismos por cromatografía gas-líquido. Las con-

condiciones cromatográficas se indican en las técnicas generales.

VI.1.2. Purificación de la hemicelulosa A. Obtención de las fracciones A-I y A-II

7,83 g de hemicelulosa A se disolvieron en 7,83 mL de una solución de hidróxido potásico al 5% con agitación magnética. Después de 3 horas, se adicionaron lentamente y con agitación magnética 38 mL de una solución de Fehling (volúmenes iguales de las soluciones A y B). Se formó un complejo gelatinoso de color azul que se separó por centrifugación. Se lavó primero el complejo con la solución de KOH al 5% y las aguas de lavado se juntaron con el centrifugado anterior y se dializaron contra agua destilada.

El complejo de cobre se lavó a continuación con agua hasta su prácticamente total disolución. A esta solución se le adicionaron cuatro volúmenes de etanol absoluto y apareció un precipitado blanco flocculento. Se tuvo varias horas a 0°C y se centrifugó. El precipitado separado se trató con una solución de clorhídrico etanólico al 5% a 0° durante un minuto, y se lavó con etanol hasta que dió negativo el test de los cloruros. Este sólido blanco se secó en desecador a vacío. Se obtuvieron 3,48 g, de polisacárido purificado que se le llamó fracción A-I.

La solución alcalina, una vez dializada, se concentró a un pequeño volumen y se le adicionaron 4 volúmenes de etanol. Apareció un precipitado azul que se dejó reposar unas horas a 0°C antes de centrifugarlo. Una vez separado se trató con clorhídrico etanólico al 5% (V/V) durante 1 minuto y se lavó ampliamente con etanol. Se obtuvo un sólido blanco que, después de secarse en un desecador a vacío, pesó 0,35 g y se le llamó fracción A-II. En la figura VI.3 (Pag.148) se indica un esquema de este fraccionamiento.

El espectro de infrarrojo, tanto de la fracción A-I como de la A-II se registró en pastilla de bromuro potásico.

VI.2. Estudio de la fracción A-I

VI.2.1. Hidrólisis ácida. Identificación de los monosacáridos

37 mg del polisacárido se disolvieron en 0,4 mL de H_2SO_4 del 72% con agitación a $30^\circ C$ durante 1 hora. Transcurrido ese tiempo se adicionaron 20 mL de agua destilada y se calentó a reflujo durante 3 horas. Se dejó enfriar la mezcla a temperatura ambiente y se añadieron 2 mg de inositol antes de neutralizar con carbonato de bario. La mezcla se filtró y el filtrado se desionizó a través de la resina Amberlita IR-120(H^+). Los productos se eluyeron con agua destilada y se concentraron a un pequeño volúmen.

Con los monosacáridos se formaron los acetatos de alditoles de la forma habitual y se identificaron cuantitativamente por cromatografía gas-líquido en las condiciones que se indican en las técnicas generales.

VI.2.2. Hidrólisis parcial

60 mg de polisacárido se disolvieron en 6 mL de ácido H_2SO_4 0,25N a $100^\circ C$ durante 90 minutos. A continuación se neutralizó la mezcla con carbonato de bario y se filtró. El filtrado se llevó a pH 8,5-9 con una disolución de KOH 0,1M y se pasó sucesivamente por columnas que contenían las resinas Amberlita IR-120(H^+) e IRA-400(AcO^-). Se eluyeron ambas con agua y la aniónica con ácido acético al 10%. Los posible oligosacáridos se concentraron a un pequeño volumen. De forma similar, 40 mg de polisacárido se hidrolizaron en 4 mL de ácido H_2SO_4 0,025N a $100^\circ C$ durante 90 minutos.

VI.2.2.1. Análisis de los oligosacáridos

a) Cromatografía sobre papel

Por cromatografía sobre papel Watman n°1 y 3, los hidrolizados de ambas hidrólisis parciales dieron cinco manchas por cuyos R_f se demostró que eran oligosacáridos perte-

necientes a una serie homóloga de la xilosa (Fig.VI.6 a VI.9).

Los desarrolladores fueron: sistema(A) acetato de etilo-ácido acético-ácido fórmico-agua (18:3:1:4) (24 horas); sistema(B) n-butanol-etanol-agua (2:1:1) (46 horas) y sistema(C) n-butanol-piridina-agua (6:4:3) (18 horas). Como revelador se utilizó la difenilamina anilina.

b) Cromatografía líquida de alta resolución.

Los oligosacáridos se analizaron en disolución acuosa, por cromatografía líquida de alta resolución en una columna Lichrosorb-NH₂ utilizando como eluyente la mezcla acetonitrilo-agua (75:25) con un flujo de 2 mL/min.

VI.2.3. Metilación de la fracción A-I

1 g de HNa (50% de dispersión en aceite mineral) se introdujo en un matraz redondo de dos bocas y se lavó con hexano cinco veces, agitando, dejando reposar el sólido y eliminando el hexano por decantación. Los últimos restos se eliminaron con corriente de argón. Inmediatamente se acopló un embudo de presión compensada a través del que se adicionaron los reactivos, y se cerró el sistema bajo atmósfera de argón. Con agitación magnética y a 70°C, se adicionaron 23 mL de DMSO (destilado y secado sobre tamiz de 4 Å) gota a gota.

Al cabo de 1 hora se añadieron 148 mg del polisacárido disuelto en 5 mL de DMSO. Después de 4 horas, se dejó enfriar la mezcla de reacción a temperatura ambiente y se adicionaron 4 mL de ICH₃ gota a gota con agitación. En estas condiciones se dejó reaccionar toda la noche.

Se añadió agua a la mezcla de reacción y se recuperó el polisacárido metilado por extracción con cloroformo. Los extractos orgánicos se lavaron con agua y se secaron sobre sulfato sódico. Se dejó secar en la estufa de vacío un día a 40°C, y se obtuvo un sólido amarillo, 132 mg (89,19% en peso), sin apenas impurezas, como se comprobó por su

RMN. Se purificó el sólido por precipitación en benceno con éter de petróleo y el sólido blanco flocculento de polisacárido metilado pesó 129 mg (87,16% en peso) $[\alpha]_D^{20} -39,446$ ($c = 26,87$ en Cl_3CH).

Su espectro de IR se realizó en forma de película de líquido puro; se disolvió en cloroformo, se extendió sobre un porta y una vez evaporado el cloroformo se obtuvo el producto en forma de película transparente. No presentó banda de absorción de O-H ($3600-3200\text{ cm}^{-1}$).

Sus espectros de RMN- 1H y RMN- ^{13}C se realizaron disolviendo la muestra en deuterocloroformo y se utilizó el tetrametilsilano como referencia interna.

VI.2.3.1. Hidrólisis ácida. Identificación de los monosacáridos parcialmente metilados

23 mg de la hemicelulosa metilada se disolvieron en 0,5 mL de ácido H_2SO_4 del 72% durante 1 hora a $30^\circ C$. Luego se añadieron 13 mL de agua destilada y se calentó la mezcla a reflujo 4 horas. Al cabo de ese tiempo, el hidrolizado se neutralizó con carbonato de bario y se filtró. El filtrado se desionizó a través de la resina Amberlita IR-120(H^+) y se concentró a un pequeño volumen.

Los monosacáridos se redujeron con borohidruro de sodio y se acetilaron con anhídrido acético-piridina (1:1), como se detalla en las técnicas generales, para transformarlos en sus correspondientes acetatos de alditoles. Estos se analizaron por cromatografía gas-líquido en las condiciones cromatográficas habituales.



VI.3. Estudio de la fracción A-II

VI.3.1. Hidrólisis ácida. Identificación de los monosacáridos

16 mg del polisacárido se disolvieron en 0,32 mL de H_2SO_4 del 72% a 30°C. Al cabo de 1 hora se añadieron 8 mL de agua destilada y se calentó la mezcla a reflujo durante 4 horas.

Se dejó enfriar la mezcla a temperatura ambiente. Se le adicionaron 2 mg de inositol y se neutralizó con carbonato de bario. Se filtró y el filtrado se pasó por resina Amberlita IR-120(H^+). Se eluyó con agua y se concentró la solución a un pequeño volumen.

Se transformaron los monosacáridos en sus correspondientes acetatos de alditoles, de la forma acostumbrada, para su análisis cuantitativo. Se disolvieron en cloroformo y se inyectaron en el cromatógrafo en las condiciones que se indican en las técnicas generales.

VI.4. Aislamiento de la hemicelulosa B

El centrifugado alcalino que quedó al precipitar la hemicelulosa A (ver apartado VI.1.2) se dializó contra agua destilada durante 24 horas.

La solución resultante se concentró a un pequeño volumen y se le adicionaron 4 volúmenes de etanol de 95%. De esta forma precipitó la hemicelulosa B. Este precipitado se dejó reposar a 0°C. Al cabo de una hora se centrifugó a 14000 r.p.m. y a 5°C. El sólido ligeramente coloreado (verdoso) se lavó con etanol y se secó en desecador a vacío sobre pentóxido de fósforo. Se obtuvieron 4,27 g de hemicelulosa B. Su espectro de IR se registró en pastillas de bromuro potásico.

VI.4.1. Hidrólisis ácida. Identificación de los monosacáridos

9,5 mg de hemicelulosa A se agitaron en 0,32 mL de ácido sulfúrico del 72% durante 1 hora a 30°C. A continuación se añadieron 8 mL de agua y se calentó la mezcla a reflujo durante 4 horas. Se dejó enfriar a temperatura ambiente y se añadieron 2 mg de inositol al hidrolizado antes de neutralizarlo con carbonato de bario. Se separó el sólido por filtración y el filtrado se pasó por una columna que contenía la resina Amberlita IR-120(H⁺). Los productos se eluyeron con agua y se concentraron a un pequeño volumen. Con los monosacáridos, se formaron sus derivados acetatos de alditoles (10 mg) y se determinaron cuantitativamente por cromatografía gas-líquido de sus derivados en condiciones cromatográficas habituales.

VI.4.2. Purificación de la hemicelulosa B. Obtención de las fracciones B-I y B-II

2,72 g de hemicelulosa B se disolvieron, de forma instantánea, en 272 mL de una solución de KOH al 5%. A esta solución se adicionaron 40 mL de una solución de Fehling (A + B, volúmenes iguales) y precipitó un complejo de cobre insoluble de color azul intenso que se separó por centrifugación. Este sólido se lavó primero con disolución de KOH al 5% y estas aguas de lavado se unieron al centrifugado alcalino anterior y se dializaron con agua destilada durante 24 horas.

El complejo de cobre se lavó, a continuación, con agua hasta su completa disolución. Por adición de 4 volúmenes de etanol apareció un precipitado que, tras dejarlo reposar a 0°C durante 1 hora, se separó por centrifugación. Este complejo se tuvo en maceración a 0°C con una solución de clorhídrico etanólico al 5% durante un minuto y se centrifugó. El sólido se lavó con etanol extensamente y se secó en un desecador a vacío. Se obtuvieron 0,897 g de la fracción B-I.

La solución alcalina dializada se concentró a un pequeño volumen, se adicionaron 4 volúmenes de etanol y el precipitado que se formó se dejó reposar a 0°C durante varias horas. Se separó el sólido por centrifugación. Se destruyó el complejo por adición de clorhídrico metanólico al 5% a 0°C y se lavó extensamente con etanol. Se secó en un desecador a vacío y se obtuvieron 1,25 g de un sólido ligeramente coloreado (verde) que se llamó fracción B-II. En la Fig. VI.25 (pág.188) se muestra un esquema de este fraccionamiento.

El espectro de IR tanto de la fracción B-I como de la B-II, se realizó en pastilla de bromuro potásico.

VI.5. Estudio de la fracción B-I

VI.5.1. Hidrólisis ácida. Identificación de los monosacáridos.

9,7 mg del polisacárido (B-I) se disolvieron en 0,3 mL de ácido sulfúrico del 72% a 30°C. Al cabo de 1 hora se añadieron 7,6 mL de agua destilada y se calentó a reflujo durante 4 horas.

Se dejó enfriar la mezcla de reacción, se añadieron 2 mg de inositol (1 mL de una disolución al 0,2%) y se neutralizó con carbonato de bario. Se filtró sobre papel Watman n°1 y el filtrado se desionizó a través de la resina Amberlita IR-120(H⁺). Se eluyó con agua y la solución se concentró a un pequeño volumen.

Los monosacáridos, en disolución acuosa, se transformaron en los correspondientes acetatos de alditoles, según se indica en las técnicas generales. Se analizaron por cromatografía gas-líquido por el método del patrón interno en las condiciones habituales.

VI.5.1.1 Determinación cuantitativa de ácidos urónicos

19 mg del polisacárido se disolvieron en 0,4 mL de ácido H_2SO_4 al 72% a $30^\circ C$ y al cabo de 1 hora se añadieron 12 mL de agua y se calentó a $100^\circ C$ durante 3 horas.

El hidrolizado, tras enfriamiento a temperatura ambiente, se neutralizó con carbonato de bario, se filtró y el filtrado se llevó a pH 8,5-9 con una disolución de KOH 0,1M. A continuación se pasó sucesivamente por columnas que contenían las resinas Amberlita IR-120(H^+) e IRA-400 (AcO^-).

Se eluyeron ambas con agua y la aniónica con ácido acético al 10%. La solución ácida se concentró y se aforó a 10 mL. De esta disolución se tomaron 1, 2 y 5 mL por separado y cada fracción se aforó a 10 mL. Finalmente se tomó 1 mL de cada una de estas tres disoluciones, que se les llamó D-1, D-2 y D-3 respectivamente, para hacer la determinación colorimétrica. Se obtuvo un 6,78% de ácido urónico expresado en concentración de ácido glucurónico.

VI.5.2. Hidrólisis parcial

60 mg de polisacárido se disolvieron en 6 mL de ácido H_2SO_4 0,25N a $100^\circ C$ durante 90 minutos. Se dejó enfriar el hidrolizado a temperatura ambiente, y se neutralizó con carbonato de bario. Se filtró y el filtrado se llevó a pH 8,5-9 por adición de disolución KOH 0,1M. Se pasó el filtrado sucesivamente por las resinas Amberlita IR-120(H^+) e IRA-400(AcO^-). Se eluyeron ambas con agua y la aniónica además con ácido acético al 10%. Los posibles oligosacáridos eluidos se concentraron a un pequeño volumen.

De forma similar y en las mismas condiciones, 41,5 mg del polisacárido se hidrolizaron en 4 mL de ácido H_2SO_4 0,025N a $100^\circ C$ durante 90 minutos y los oligosacáridos obtenidos se concentraron también a un pequeño volumen.

VI.5.2.1. Análisis de los oligosacáridos

a) Cromatografía sobre papel

Los hidrolizados, de ambas hidrólisis parciales, dieron por cromatografía sobre papel Watman n°1 y 3, cinco manchas cada uno, por cuyos R_F se demostró que eran oligosacáridos pertenecientes a la serie homóloga de la xilosa (Fig.VI.30 a VI.33).

Los desarrolladores fueron: sistema (A) acetato de etilo-ácido acético-ácido fórmico-agua (18:3:1:4) (24 horas); sistema (B) n-butanol-etanol-agua (2:1:1) (46 horas) y sistema (C) n-butanol-piridina-agua (6:4:3) (18 horas). Como revelador se utilizó la difenilamina anilina.

b) Cromatografía líquida de alta resolución

Los oligosacáridos, en disolución acuosa, se analizaron por cromatografía líquida de alta resolución en la columna Lichrosorb-NH₂ utilizando como eluyente la mezcla acetonitrilo-agua (75:25) con un flujo de 2 mL/min.

VI.5.3. Metilación de la fracción B-I

403 mg de HNa (una dispersión al 50% en aceite mineral) se introdujeron en un matraz redondo de 2 bocas y se lavaron con hexano. Se agitó, se dejó reposar y se decantó el hexano. Así cinco veces, y los últimos restos se eliminaron con corriente de argón. Se acopló un embudo de presión compensada, a través del que se adicionaron los reactivos y se pasó corriente de argón. Con agitación magnética y a 70°C, se adicionaron 9 mL de DMSO gota a gota y bajo atmósfera de argón. Al cabo de 1 hora se añadieron 50 mg del polisacárido disuelto en DMSO. Después de 3 horas se adicionaron, previo enfriamiento a temperatura ambiente de la mezcla de reacción, 1,3 mL de ICH₃ gota a gota y se dejó reaccionar 4 horas más.

El polisacárido metilado se recuperó por extracción con cloroformo. Las fases orgánicas se juntaron, se lavaron con agua y se secaron sobre sulfato de sodio. Se eliminó el disolvente en rotavapor a vacío y el producto se dejó secar en la estufa de vacío a 40°C durante 3 días. Se obtuvo un sólido amarillo, 25 mg (50% en peso) cuyo infrarrojo no mostró banda de absorción O-H ($3600-3200\text{ cm}^{-1}$).

Su espectro de IR se registró en forma de película de líquido puro disolviendo el producto en HCCl_3 .

Su espectro de RMN se registró disolviendo el producto en deuterocloroformo y se utilizó el tetrametilsilano como referencia interna.

VI.5.3.1. Hidrólisis ácida. Identificación de los monosacáridos parcialmente metilados.

25 mg de polisacárido metilado se disolvieron en 0,5 mL de ácido sulfúrico del 72% a 30°C. Al cabo de 1 hora se añadieron 13 mL de agua y se calentó la solución a 100°C durante 4 horas. El hidrolizado se neutralizó con carbonato de bario, se filtró y el filtrado se desionizó por resina Amberlita IR-120(H^+) y se concentró a un pequeño volumen.

Los monosacáridos obtenidos se transformaron en los correspondientes acetatos de alditoles parcialmente metilados, de la forma habitual. Se analizaron por cromatografía gas-líquido. Se disolvieron en cloroformo y se inyectaron en el cromatógrafo, en las condiciones dadas en las técnicas generales.

VI.5.4. Caracterización del ácido 4-O-metil-D-glucurónico

Los oligosacáridos ácidos (9 mg) procedentes de la hidrólisis parcial de la fracción B-II con ácido H_2SO_4 0,25N (ver apartado VI.5.2.), se hidrolizaron con ácido H_2SO_4 del 72% (0,2 mL) de la forma habitual. Después se neutralizó la solución con carbonato de bario, se filtró y el filtrado se desionizó a través de la resina Amberlita IR-120(H^+). Estos monosacáridos eluidos se redujeron con borohidruro de sodio a temperatura ambiente durante cuatro horas. El exceso de borohidruro se destruye con ácido acético y la solución se pasa a través de la resina Amberlita IR-120(H^+); el ácido bórico se elimina por codestilación con metanol. El residuo se disuelve en HCl 1,2 N y se evapora a sequedad obteniéndose la aldolactona. A continuación se añadió ácido bórico 0,4 M (1,5 mL) y borohidruro de sodio 0,4 M (3 mL) gota a gota y enfriando con hielo. Se dejó 30 minutos a $0^\circ C$, se ajustó el pH a 9 y se dejó a $5^\circ C$ durante 12 horas. Pasado este tiempo, se añadió un exceso de disolución de borohidruro sódico (2 mL) y se dejó 3 horas a temperatura ambiente. Finalmente, se destruyó el exceso de borohidruro de la forma habitual y se prepararon los acetatos correspondientes con anhídrido acético/piridina(1:1) tal como se detalla en las técnicas generales.

VI.6. Estudio de la fracción B-II

VI.6.1. Hidrólisis ácida. Identificación de los monosacáridos

7 mg de polisacárido se disolvieron en 0,2 mL de H_2SO_4 del 72% a $30^\circ C$. Al cabo de 1 hora se añadieron al matraz de reacción 5 mL de agua y se calentó la mezcla a $100^\circ C$ durante 4 horas.

Se dejó enfriar un poco la mezcla y se añadieron 2 mg de inositol (1 mL de una solución al 0,2%). Se neutralizó con carbonato de bario; se filtró, se pasó por resina Amberlita IR-120(H^+) y se concentró a un pequeño volumen.

Los monosacáridos, en disolución acuosa, se redujeron con borohidruro de sodio y se acetilaron con anhídrido acético-piridina (1:1) para formar sus correspondientes acetatos de los alditoles. Estos derivados volátiles se analizaron por cromatografía gas-líquido en las condiciones cromatográficas indicadas en las técnicas generales.

VI.6.2. Hidrólisis ácida parcial

a) Con SO_4H_2 0,005M

100 mg se disolvieron en 10 mL de ácido sulfúrico 0,005M a reflujo 1 hora. Al cabo de ese tiempo se dejó enfriar la solución y se centrifugó. El sólido se lavó varias veces con agua y finalmente con etanol. Seco pesó 10 mg. Al filtrado se adicionó etanol y apareció un precipitado flocculento que se separó por centrifugación. En el filtrado quedaron los monosacáridos libres que se transformaron en acetatos de alditoles para su identificación por cromatografía gas-líquido en las condiciones cromatográficas habituales.

b) Con H_2SO_4 0,025N

125,4 mg del polisacárido disolvieron en 12,5 mL de H_2SO_4 0,025N a $100^\circ C$ durante 60 minutos. El hidrolizado se

neutralizó con carbonato de bario y se filtró. El filtrado se llevó a pH 8,5-9 con KOH 0,1M y se pasó sucesivamente por las resinas Amberlita IR-120(H⁺) e IRA-400(AcO⁻). Se eluyeron ambas con agua y la aniónica además con ácido acético al 10%. Los posibles oligosacáridos eluidos se concentraron a un pequeño volumen.

VI.6.2.1. Análisis de los oligosacáridos por cromatografía sobre papel

La cromatografía se representó sobre papel Wtaman n°1 y 3. En papel Watman n°1 y utilizando los desarrolladores A y C, se observó sólo una mancha, en cada caso, correspondiente a la xilosa o arabinosa. Desarrollador(A) acetato de etilo-ácido acético-ácido fórmico-agua (18:3:1:4)(19 horas)(R_G=1,37); desarrollador (B) n-butanol-etanol-agua (2:1:1)(46 horas) (R_G=1,13).

Sobre papel Watman n°3 y utilizando como desarrollador el sistema (C) butanol-piridina-agua (6:4:3)(19 horas)se observaron seis manchas cuyos R_G son: 1,28 (xilosa); 1,14 (arabinosa); 0,86(galactosa); 0,15; 0,082 y 0,038 (de posibles oligosacáridos). Como revelador se utilizó la difenilamina anilina (Bailey, 1960).

VI.6.3. Metilación de la fracción B-II

177,6 mg de HNa se introdujeron en un matraz de fondo redondo de dos bocas, se lavaron con hexano seco varias veces y se eliminaron por decantación los lavados. Se cierra el sistema y se pasa atmósfera de argón. Con agitación magnética y a 70°C se adicionaron 3,7 mL de DMSO gota a gota, a través de un septum.

A continuación se adicionaron 22 mg de polisacárido disuelto en DMSO y se dejó reaccionar 4 horas. Pasado ese tiempo, se dejó alcanzar la temperatura ambiente y se adicionaron con una jeringa 0,6 mL de ICH₃ gota a gota y se dejó la reacción toda la noche.

Posteriormente se añadieron 100 mL de agua a la mezcla de la reacción y se extrajo con cloroformo. La fase orgánica se lavó con agua, se secó sobre sulfato sódico anhidro y se concentró a sequedad. Se secó en estufa de vacío dando 16 mg (72,7% en peso) de producto metilado $\{\alpha\}_D^{20} + 9,61$ ($c=8,32$ en Cl_3CH).

Su espectro de IR se registro en forma de película de líquido puro y no presentó banda de absorción O-H ($3600-3200\text{ cm}^{-1}$).

Su espectro de RMN- 1H y RMN- ^{13}C se registró disolviendo el producto en deuterocloroformo y utilizando el tetrametilsilano como referencia interna.

VI.6.3.1. Hidrólisis ácida. Identificación de los monosacáridos parcialmente metilados

14 mg de producto metilado se disolvieron en 0,28 mL de H_2SO_4 del 72% a $30^\circ C$. Al cabo de 1 hora se añadieron 7,1 mL de agua y se calentó a $100^\circ C$ durante 4 horas.

El hidrolizado se neutralizó con carbonato de bario, se filtró el $BaSO_4$ y el filtrado se desionizó a través de la resina Amberlita IR-120(H^+) y se concentró a un pequeño volumen.

Se formaron los acetatos de alditoles de los monosacáridos de la forma habitual y se analizaron por cromatografía gas-líquido. Se disolvieron en cloroformo y se inyectaron en el cromatógrafo junto con el patrón. Las condiciones cromatográficas se indican en las técnicas generales.

RESUMEN Y CONCLUSIONES

1. Se eliminaron los taninos, ceras, colorantes, polifenoles y sustancias análogas que acompañan a los polisacáridos del *Quercus Suber* por extracción sólido-líquido hasta agotamiento con disolventes orgánicos.
2. La despolimerización del corcho se realizó por transesterificación con metóxido sódico en metanol. De esta forma se eliminó la suberina y quedó un residuo no despolimerizable formado por lignina y holocelulosa.
3. Se aisló la holocelulosa (17,64% en peso) por deslignificación del corcho con clorito de sodio y anhídrido acético glacial.
4. La holocelulosa se caracterizó por espectroscopía IR y el estudio de la estructura de los polisacáridos se realizó por hidrólisis total y por la metilación de los mismos. Se estableció por cromatografía gaseosa de los monosacáridos, que la holocelulosa está constituida por: glucosa (68,45%), xilosa (20,67%), manosa (3,52%), arabinosa (5,52%), galactosa (1,83%) y ramnosa (trazas).

Por análisis de metilación se estableció que los polisacáridos principales están constituidos por una cadena lineal de unidades de D-glucopiranososa con uniones (1→4) y otra cadena lineal de unidades de D-xilopiranososa también con uniones (1→4). Por hidrólisis enzimática, espectroscopía de RMN y por el poder rotatorio de la holocelulosa metilada se estableció que el tipo de unión glicosídica en los polisacáridos era β .

5. Se obtuvo la celulosa (60% promedio en peso) como residuo insoluble al extraer la holocelulosa con sosa al 4%; con sosa al 10% y con dimetilsulfóxido.
6. El estudio de la estructura de la celulosa se realizó por hidrólisis total, acetólisis y metilación del polisacárido.

Se aisló y cristalizó el octaacetato de α -celobiosa, cuyo p.f. y poder rotatorio se corresponden con los datos en la bibliografía.



Se estableció que el polisacárido está constituido por una cadena lineal de unidades de D-glucopiranosa unidas por enlaces $\beta(1\rightarrow4)$

7. Se obtuvo la fracción llamada hemicelulosa (19% en peso) por extracción de la holocelulosa bien con NaOH al 4% bien con dimetilsulfóxido, y precipitación de la misma por acidificación del extracto con ácido acético y adición de etanol. La hemicelulosa se purificó mediante la formación de complejos de cobre (II).
8. Se realizó el estudio de la estructura de la hemicelulosa por hidrólisis total, parcial y por metilación de la misma.

Por hidrólisis total se obtuvo la xilosa como azúcar predominante.

Una parte de la hemicelulosa metilada se redujo, con hidruro de litio y aluminio, antes de proceder a la hidrólisis y formación de los acetatos de alditoles. Los acetatos de alditoles parcialmente metilados procedentes de la xilana metilada y de la xilana metilada y reducida se identificaron y compararon por cromatografía gaseosa y por cromatografía gaseosa-espectrometría de masas combinada.

Se estableció que la hemicelulosa es una xilana constituida por una cadena lineal de unidades de D-xilopiranosas con enlaces $\beta(1\rightarrow4)$ y restos de ácido 4-O-metil-D-glucurónico unidos a la cadena por enlaces $\alpha(1\rightarrow2)$. Por su poder rotatorio y por los datos de espectroscopía de RMN- ^1H y RMN- ^{13}C de la hemicelulosa metilada se establece que las uniones glicosídicas son del tipo β en la cadena lineal.

9. Se obtuvo la hemicelulosa A (25,11% en peso) por extracción de la holocelulosa con NaOH al 10% y precipitación de la misma por acidificación con ácido acético del extracto. La hemicelulosa B (12,6% en peso) se obtuvo de las aguas madres por precipitación con etanol previa diálisis y concentración.

10. Ambas hemicelulosas, A y B, se purificaron y fraccionaron mediante la formación de complejos de cobre insolubles. Se aislaron cuatro fracciones, A-I (48,54%), A-II (1,61%), B-I (47,64%) y B-II (9,86%), que se caracterizaron por su composición en azúcares. Este fraccionamiento ha conducido a dos xilanas (fracción A-I y fracción B-I) y a una posible araboglucoxilana (fracción B-II).
11. El estudio de la estructura de la fracción A-I se realizó por hidrólisis total, parcial y por metilación del polisacárido.

Por hidrólisis total se obtuvo la xilosa como azúcar predominante. Por hidrólisis parcial se obtuvo la xilosa y la serie homóloga de la xilobiosa que se identificaron por cromatografía de papel y por cromatografía líquida de alta resolución.

De la fracción A-I metilada, caracterizada por sus datos espectroscópicos, IR, RMN-¹H; RMN-¹³C y por su poder rotatorio se obtuvieron los acetatos de alditoles parcialmente metilados que se identificaron por cromatografía gaseosa y por cromatografía gaseosa-espectrometría de masas combinada .

Se estableció que la fracción A-I es una xilana constituida por una cadena lineal de unidades de D-xilopiranosas con enlaces $\beta(1\rightarrow4)$.

12. La fracción A-II dió la siguiente composición en azúcares: arabinosa (45,39%), xilosa (25,46%), glucosa (22,61) y galactosa (6,5%).
13. El estudio de la estructura de la fracción B-I se realizó mediante hidrólisis parcial, total y por metilación del polisacárido.

De la hidrólisis total se obtuvo la xilosa como el componente mayoritario. De la hidrólisis parcial se obtuvo la xilosa y la serie homóloga de la xilobiosa que se identificaron por cromatografía de papel.

Del polisacárido metilado, caracterizado por espectroscopía de IR y RMN-¹H, se obtuvieron los acetatos de alditoles parcialmente metilados que se identificaron por cromatografía gaseosa y por cromatografía gaseosa-espectrometría de masas combinadas.

Como resultado de estos análisis, se estableció que la fracción B-I es una xilana constituida por una cadena lineal de unidades de D-xilopiranosas con enlaces $\beta(1\rightarrow4)$ y restos de ácido 4-O-metil-D-glucurónico unido a la cadena lineal por enlaces $\alpha(1\rightarrow2)$.

14. El estudio de la estructura del polisacárido denominado fracción B-II se realizó por hidrólisis total, parcial y por metilación del mismo.

La hidrólisis total dió la siguiente composición molar: xilosa (34,17%), glucosa (27,01%), arabinosa (23,69%), galactosa (13,36%) y ramnosa (1,75%).

Del polisacárido metilado, caracterizado por espectroscopía de IR, RMN-¹H y RMN-¹³C, se obtuvieron los acetatos de alditoles parcialmente metilados y se identificaron por cromatografía gaseosa y por cromatografía gaseosa-espectrometría de masas combinada.

Se propone para la fracción B-II una estructura formada por una cadena principal de unidades de D-xilopiranosas y de D-glucopiranosas con enlaces $(1\rightarrow4)$ alternadas. A las unidades de D-glucopiranosas se unen restos de galactosa, xilosa y arabinosa en forma de galactopiranosas xilopiranosas y arabinofuranosas mediante enlaces $(1\rightarrow6)$.

15. Se realizó la comprobación de la estructura de una xilana patrón mediante la metilación de la misma para un posterior análisis comparativo con las xilanas obtenidas en el corcho. Se formaron los acetatos de alditoles de la xilana metilada y se analizaron por cromatografía gaseosa. La xilana metilada se caracterizó por sus datos espectroscópicos, IR, RMN-¹H, RMN-¹³C y por su poder rotatorio.

Se comprueba que la xilana está constituida por una cadena lineal de unidades de D-xilopiranososa con enlaces $\beta(1\rightarrow4)$ y restos de ácido 4-O-metil-D-glucurónico unidos a la cadena por enlaces $\alpha(1\rightarrow2)$.

BIBLIOGRAFIA

- ADAMS, G.A.; *Methods Carbohydrate Chem.*, 5, 171 (1965).
- AGULLO, C. y SEOANE, E.; *Chem.Ind.*, 6, 8 (1981).
- AGULLO, C. y SEOANE, E.; *An.Quím.*, 78C, 389 (1982).
- ALBERSHEIM, P.; NEVINS, J.; ENGLISH, P.D. y KARR, A.; *Carbohyd.Chem.*, 5, 340 (1967).
- ALEKSEEVA, O.P. y BOGOMOLOV, B.D.; *Izv. Vysshikh.Uchebn. Zavadenii, Lesn.Zn.* 8(4), 135 (1965).
- ALLERHAND, A. y DODDREL, D.E.; *J.Am.Chem.Soc.*, 93, 2777 (1971).
- ARNO, M.; SERRA, MC. y SEOANE, E.; *An.Quím.*, 77, 82 (1981).
- ASPINALL, G.O.; HIRST, E.L.; WOODY, R.W. y PERCIVAL, E.G.V.; *J.Chem.Soc.*, 1631 (1953).
- ASPINALL G.O. y MAHOMED, R.S.; *J.Chem.Soc.*, 1731 (1954).
- ASPINALL, G.O. y ROSELL, K-G.; *Can.J.Chem.*, 56, 680 (1978A).
- ASPINALL, G.O. y ROSELL, K-G.; *Can.J.Chem.*, 56, 684 (1978B).
- ASPINALL, G.O.; "The polysacharides" vol. 1, Academic Press. (1982).
- BAILEY, R.W. y BOURNE, E.J.; *J.Chromatog.*, 4, 206 (1960).
- BAUER, W.D.; TALDMADGE, K.W.; KEEGSTRA, K. y ALBERSHEIM, P.; *Plant.Physiol.*, 51, 174 (1973).
- BIEMANN, K.; DeJONGH, D.C. y SCHONES, H.K.; *J.Am.Chem.Soc.*, 85, 1763 (1963).
- BITTER, T. y MUIR, H.M.; *Anal.Biochem.*, 4, 330 (1962).
- BJORNDAL, H.; LINDBERG, B. y SVENSSON, S.; *Carbohyd.Res.*, 5, 443 (1967A).
- BJORNDAL, H.; LINDBERG, B.; y SVENSSON, S.; *Acta.Chem.Scand.*, 21, 1801 (1967B).
- BJORNDAL, H.; LINDBERG, B.; PILOTTI, A. y SVENSSON, S.; *Carbohyd.Res.*, 15, 339 (1970A).

- BJORNDAL, H.; HELLERQVIST, C.G.; LINDBERG, B. y SVENSSON, S.; *Angew.Chem.Internat.Ed.*, 9, 610 (1970B).
- BJORNDAL, H.; HELLERQVIST, C.G.; LINDBERG, B. y SVENSSON, S.; *Ange.Chem.*, 82, 643 (1970C).
- BLAKE, J.D. y RICHARDS, G.N.; *Carbohydr.Res.*, 14, 375 (1970).
- BLOCK, R.J.; DURRUM, E.L. y ZWEIG, G.; "A Manual of Paper Chromatography and Paper Electrophoresis". Academic Press. Inc., New York (1964).
- BOGOMOLOV, B.D. y ALEKSEEVA, O.P.; *Izv.Vysshikh.Uchebn. Zavedenii, Lesn.Zh.* 5(5), 1955 (1962).
- BOUVENG, H.O. y LINDBERG, B.; *Methods Carbohydrate Chem.*, 5, 147 (1965).
- BUCHAN, J.L. y SAVAGE, R.I.; *Analyst.* 77, 401 (1952).
- COLSON, P.; JENNINGS, H. y SMITH, I.C.P.; *J.Am.Chem.Soc.*, 96, 8081 (1974).
- COLSON, P. y KING, R.R.; *Carbohydr.Res.*, 47, 1 (1976).
- COREY, E.J. y CHAYKOVSKY, M.; *J.Am.Chem.Soc.*, 84, 866 (1962).
- COREY, E.J. y CHAYKOVSKY, M.; *J.Am.Chem.Soc.*, 87, 1345 (1965).
- COTE, W.A.; Jr.; "Cellular Ultrastructure of Woody Plants". Syracuse.Univ.Press, New York (1965).
- COTE, W.A.; Jr.; "Wood Ultrastructure". Univ. of Washington Press, Seattle (1967).
- CROSS, C.F.; BEVAN, E.J. y BEADLE, C.; "Cellulose and Outline of the Chemistry of the Structural Elements of Plants", Longmans, Green and Co; London (1895) p. 95.
- CROWELL, E.P. y BURNETT, B.B.; *Anal.Chem.*, 39, 121 (1967).
- CHIZHOV, O.S.; GOLOVKINA, L.S. y WOLFSON, N.S.; *Izv.Akad. Nauk.SSSR.Ser.Khim.* 1915 (1966).
- CHIZHOV, O.S.; MOLDOTSOV, N.V. y KOCHETKOV, N.K.; *Carbohydr. Res.*, 4, 273 (1967).

- CHURMS, S.C.; "Handbook of Chromatography". C.R.C. Press, Florida (1982).
- DENHAM, W.S. y WOODHOUSE, H.; *J.Chem.Soc.*, 103, 1735 (1913).
- DeJONGH, D.C. y BIEMANN, K.; *J.Am.Chem.Soc.*, 85, 2289 (1963).
- DeJONGH, D.C.; *J.Am.Chem.Soc.*, 86, 4027 (1964).
- DOREE, C.; "The Methods of Cellulose Chemistry" 2nd. edit. Chapman and Hall Ltd. London (1947).
- DORMAN, D.E. y ROBERTS, J.D.; *J.Am.Chem.Soc.*, 93, 4463 (1971).
- EHRENTHAL, G.O.; MONTGOMERY, R. y SMITH, F.; *J.Am.Chem.Soc.*, 76, 5509 (1954).
- ERIKSSON, O. y LINDGREN, B.O.; *Sven.Papperstidn.*, 80, 59 (1977).
- FREMY, E. y TERREIL, A.; *Bull.Soc.Chim.France*, 9, 437 (1968).
- FRENCH, D. y WILD, G.M.; *J.Am.Chem.Soc.*, 75, 2612 (1952).
- FREY-WYSSLING, A., y MÜHLETHALER, K.; "Ultrastructural Plant Cytology", Elsevier, Amsterdam (1965).
- FRIEBOLIN, H.; FRANK N.; KEILICH, G. y SIEFERT, E.; *Makromol. Chem.*, 177, 845 (1976).
- GAGNAIRE, D. y ODIER, L.; *Carbohyd.Res.*, 11, 33 (1969).
- GAGNAIRE, D.Y.; TARAVEL, F.R. y VIGNON, M.R.; *Carbohyd. Res.*, 51, 157 (1976).
- GOLOVKINA, L.S.; WULFSON, N.S. y CHIZHOV, O.S.; *Zh.Org.Khim.*, 4, 738 (1963).
- GORIN, P.A.J.; *Can.J.Chem.*, 51, 2375 (1973).
- GOWDA, J.P.; GOWDA, D.C. y ANJANEYALU, Y.V.; *Carbohyd.Res.*, 87, 241 (1980).
- GREEN, J.W.; *Methods Carbohydrate Chem.*, 3, 9 (1963).
- GUNNER, S.W., JONES, J.K.N. y PERRY, M.B.; *Can.J.Chem.*, 39, 1892 (1961).

- HAKOMORI, S.; *J. Biochem.*, 55, 205 (1964).
- HAWORTH, W.N.; *J. Chem. Soc.*, 107, 8 (1915).
- HEYNS, W. y SCHARMANN, H.; *Liebigs Ann. Chem.*, 667, 183 (1963).
- HIRST, E.L.; *J. Chem. Soc.*, 2974 (1955).
- HOLZER, G.; ORO, J.; SMITH, S.J. y DOCTOR, V.M.; *J. Chromatog.*, 194, 410 (1980).
- IKAN, R., "Natural Products", Israel Universities Press, Jerusalem (1969), p. 85.
- INOUE, Y. CHÛJÔ, R.; *Carbohydr. Res.*, 60, 367 (1978).
- JAME, G.; *Cellulose Chemie*, 20, 43 (1942).
- JEANES, A.; WISE, C.S. y DIMLER, R.J.; *Anal. Chem.*, 25, 415 (1951).
- JONES, J.K.N.; *J. Chem. Soc.*, 1672 (1953).
- JONES, J.K.N. y STOODLEY, R.J.; *Methods Carbohydrate Chem.*, 5, 37 (1965).
- KIRK, E.R. y OTMER, D.F.; "Encyclopedia of Chemical Technology", 2 nd. edit. vol.6, Interscience Publishers (1965) p. 281.
- KOCHER, F.; *Bull. Inst. Textile France*, 32, 9 (1952).
- KOCHETKOV, N.K. y CHIZHOV, O.S.; *Advances Carbohydrate Chem.*, 21, 39 (1966).
- KONKIN, A.A. y ROGOKIN, Z.A.; *Bumazh. Prom.*, 28, n°9, 15 (1953).
- KUHN, R.; TRISCHMANN, M. y LÖW, I.; *Angew. Chem.*, 67, 32 (1955).
- KUHN, R., BAER, H.H., y SEELIGER, A.; *Liebigs Ann. Chem.*, 611, 236 (1958).
- KUHN, R.; EGGE, H.; BROSSMER, R.; GAUHE, R.; KLESSE, W.; BOHM, H.; TRISCHMANN, M. y TSCHAMPEL, D.; *Angew. Chem.*, 72, 805 (1960).
- KUHN, R.; TRISCHMANN, M. y EGGE, H.; *Angew. Chem. Internat.*, 2, 515 (1963).
- LEDERER, E. y LEDERER, M.; "Chromatography". Elsevier Publishing Co. New York (1957).

- LEWIS, F.T.; *Science*, 68, 625 (1928).
- LEWIS, B.A.; SMITH, F. y STEPHEN, A.M.; *Methods Carbohydrate Chem.*, 75, 265 (1979).
- MAEKAWA, E., KOSHIJIMA, T.; *Mokuzai Gakkaishi* 26(9), 614 (1980).
- MANNING, J.H. y GREEN, J.W.; *J.Chem.Soc. (C)*, 2357 (1967).
- MATSUHIRO, B.; ZANLUNGO, A.B. y DUTTON, G.G.S.; *Carbohydr. Res.*; 97, 11 (1982).
- MCDONALD, I.R.C.; *J.Chem.Soc.*, 3183 (1952).
- MCNEIL, M.; DARVILL, A.G. y ALBERSHEIM, P.; *Fortschritte d. Chem.Org.Naturst.* 37, 193 (1978).
- MIÑANA, M.D.; Tesis de Licenciatura, Facultad de Químicas. Universidad de Valencia (1980).
- MITSUO, D. y YASUO, H.; *Kanzei Chuo Bunsekishoho* 15, 115 (1975).
- MÜHLETHALER, K.; *Ann.Review Plant.Physiol*, 18, 1 (1967).
- NAVAS, A. y COLOM, J.F.; *A.T.I.P.*, 34, n°2, 67 (1980).
- NOLLER, C.R.; "Química Orgánica", Interamericana, Mexico, (1968) p. 282.
- NORMAN, A.G.; *Biochem.J.*, 31, 1579 (1937).
- PETERSSON, G.; SAMUELSON, O.; ANJOU, K. y VON SYDOW, E.; *Acta Chem.Scand.*, 21, 1251 (1967).
- PFEFFER, P.E.; VALENTINE, K.M. y PARRISH, F.W.; *J.Am.Chem. Soc.*; 101, 1265 (1978).
- PRESTON, R.D., "The Physical Biology of Plant Cell Walls", Chapman and Hall, London (1974).
- PURDIE, T., e IRVINE, J.C.; *J.Chem.Soc.*, 83, 1021 (1903).
- RANBY, "Inaugural Disertation", Inst.Phys.Chem.Uppsala, 1952.
- RIBAS, I.; *Chim.Ind.*, 68, 333 (1952).

- ROGERS, S.C.; MITCHELL, R.L. y RITTER, G.J.; *Anal.Chem.*, 19, 1029 (1947).
- SALKOWSKI, E.; *Z.Physiol.Chem.*, 34, 162 (1901).
- SANDFORD, P.A. y CONRAD, H.E.; *Biochem.*, 5, 1508 (1966).
- SAWARDEKER, J.S.; SLONEKER, J.H. y JEANES, A.; *Anal.Chem.*, 37, 1602 (1965A).
- SAYMOUR, F.R.; KNAPP, R.D. y BISHOP, S.H.; *Carbohydr.Res.*, 51, 179 (1976).
- SCHAFFER, K.J. y MAREL DU BOIL, P.G.; *J.Chromatog.*, 72, 212 (1972).
- SRIVASTAVA, H.C., SINGH, P.P., HARSHE, S.N. y VIRK, K.; *Tetrahedron Lett.*, 493 (1964).
- STAHL, E. "Thin Layer Chromatography" 2a ed. Springer Verlag New York (1969) p. 814.
- STOFFYN, P.J. y JEANLOZ, R.W.; *J.Biol.Chem.*, 235, 2507 (1960).
- SJÖSTRÖM, E.; "Wood Chemistry", Fundamentals and Applications. Academic Press, New York (1981) p. 64.
- SWEELEY, C.C.; BENTLEY, R.; MAKITA, M. y WELLS, W.W.; *J.Am. Chem.Soc.*, 85, 2497 (1963).
- SWEET, D.P.; SHAPIRO, R.H.; y ALBERSHEIM, P.; *Carbohydr.Res.*, 40, 217 (1975).
- TALDMADGE, K.W.; KEEGSTRA, K.; BAUER, W.D. y ALBERSHEIM, P.; *Plant.Physiol.*, 51, 158 (1973).
- TEDDER, J.M.; NECHVATAL, A.; MURRAY, A.W. y CARNDUFF, J.; "Química Orgánica", Ed. Urmo, parte 4, (1971), p.64.
- TEJERO, M.P.; Tesis Doctoral, Facultad de Químicas, Universidad de Sevilla (1984).
- TIMELL, T.E.; *Adv.Carbohydr.Chem.Biochem.*, 19, 247 (1964).
- TIMELL, T.E.; "Wood and bark polysaccharides". (W.A. Coté, Jr. ed.), Syracuse Univ. Press, Syracuse, New York (1965A), pp. 127-156.

- TIMELL, T.E.; *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, 20, 409 (1965B).
- THOMPSON, N.S. y KAUSTINEN, O.A.; *Tappi*, 47, 157 (1964).
- VAN BECKUM, W.G. y RITTER, G.J.; *Paper Trade J.*, 105(18), 127 (1937).
- VIDAL, T. y COLOM, J.F.; *A.T.I.P.*, 34(4), 149 (1978).
- VOSS, P.; *Starch/Stärke*, 31, 404 (1979).
- WALKER, T.E.; LONDON, R.E., WHALEY, T.W., BARKER, R. y MATWIYOFF, N.A.; *J. Am. Chem. Soc.*, 98, 5807 (1976).
- WARD, K., Jr.; *Tappi*, 41(9), 132A (1958).
- WHISTLER, R.L. y SMART, C.L.; *J. Am. Chem. Soc.*, 75, 1916 (1952).
- WHISTLER, R.L. y BeMILLER, J.N.; *Methods Carbohydrate Chem.*, 3, 21 (1963).
- WHISTLER, R.L. y FEATHER, M.S.; *Methods Carbohydrate Chem.*, 5, 144 (1965).
- WHITE, C.A., CORRAN, P.H. y KENNEDY, J.F.; *Carbohydr. Res.*, 87, 165 (1980).
- WHYTE, J.N.C. y ENGLAR, J.R.; *Can. J. Chem.*, 49, 1302 (1971).
- WISE, L.E., MURPHY, M. y D'ADDICCO, A.A.; *Paper Trade J.*, 122(2), 35 (1946).
- WOLFROM, M.L. y THOMPSON, A.; *Methods Carbohydrate Chem.*, 3, 143 (1963).
- WOLFROM, M.L. y FRANKS, N.E.; *Methods Carbohydrate Chem.*, 4, 269 (1964).
- YAMAKAWA, T.; YOKOYAMA, S. y HANDA, N.; *J. Biochem.*, 53, 28 (1963).
- ZAITSEVA, A.F. y NIKITIN, N.I.; *Zhur. Priklad. Khim.*, 27, 965 (1954).

Reunido el Tribunal que suscribe, en el día de la fecha acordó otorgar, por unanimidad, a esta Tesis doctoral de D.º Amparo Asencio Martinez la calificación de APTO COM LAUDE

Valencia, a 21 de junio de 1985

El Secretario,

El Presidente

[Signature]

[Signature]

