

Contribución al estudio de algunos poliurónidos de interés biológico e industrial

POR

MARIA MAYOL HURTADO

Doctor en Ciencias

INTRODUCCIÓN

Dentro de la orientación general teórico práctica de los trabajos que se realizan en los Laboratorios de Química Orgánica de la Facultad de Ciencias y del Instituto de Química «Alonso Barba» en Murcia, así como en los Departamentos de Frutos y Conservas del Patronato «Juan de la Cierva» del C.S.I.C. y de Conservas e Industrias Agrícolas del Instituto de Orientación y Asistencia Técnica del Sureste (I.O.A.T.S.) con sede en los mismos Laboratorios, se nos asignó un tema que desde su principio consideramos nosotros como muy sugestivo. El interés de dicho tema era indudable, tanto por el significado científico que habrían de tener las conclusiones, como por la trascendencia, incluso económica, que las mismas podrían alcanzar. Se trataba de penetrar en el estudio de la estructura química, significado bioquímico y hasta en las posibilidades industriales de una serie de poliurónidos que, siendo constituyentes normales de frutos y frutales, o bien usarse como aditivos actuales o potenciales en la industria conservera, ofrecían un interés inmediato para una investigación sistemática en el campo de la química de frutas y de sus elaborados.

De hecho, la consistencia de los frutos durante su ciclo normal de desarrollo, y aun durante el período de almacenaje, ya estén frescos o en conserva, está muy ligada a la naturaleza de los poliurónidos que interviene en la textura de los mismos.



Por otro lado, en muchos de los procesos de obtención de elaborados, a partir de frutos, participan también de manera directa el grupo de sustancias que nos ocupa. Piénsese en la formación de jaleas, o en la de carnes, o incluso en el espesamiento de mermeladas. En algún otro caso, el tema nos da pie para pensar en aplicaciones futuras de algunos poliurónidos considerados, especialmente para las gomas de frutales de hueso, que han sido los de nuestra mayor atención. A su vez, del conocimiento íntimo de los poliurónidos que intervienen en la textura de los frutos, cabe sacar deducciones que pueden redundar en beneficio de la calidad de los elaborados al mantener o modificar, según convenga, la cantidad de los mismos en los procesos de fabricación.

Como se verá en el desarrollo de este trabajo, han sido principal objeto de nuestra atención los siguientes puntos:

1.º) Los poliurónidos de carácter hemicelulósico y péctico que integran la porción carnosa del albaricoque, variedad búlida, así como los de carácter mucilaginoso de la semilla.

2.º) Estudio de las gomas de albaricoque y melocotón, procedentes de distintas variedades, en comparación con gomas más conocidas, tales como las de almendro, ciruelo, acacia y limón, de las que se hace simultáneamente una revisión.

3.º) Estudio de poliurónidos de uso frecuente como aditivos para elaborados de frutos.

Entre estos diversos puntos existe una clara conexión, determinada por la naturaleza química de los poliurónidos tratados en cada uno de ellos

Creemos haber puesto un gran entusiasmo en nuestra labor diaria, el cual han sabido inculcárnoslo nuestros superiores, Profesor A. SOLER y Dr. G. GUZMÁN codirectores de este trabajo. A ellos, por su dirección y consejo, y al Patronato «Juan de la Cierva» del C.S.I.C. e Instituto de Orientación y Asistencia Técnica del Sureste, por la ayuda económica prestada, debo expresar públicamente mi agradecimiento más sincero.

I

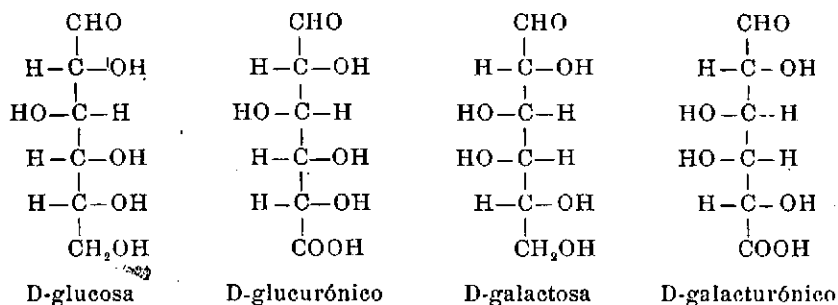
GENERALIDADES SOBRE POLIURONIDOS

Quizá sea conveniente para adentrarnos en el tema, hacer desde un punto de vista general, algunas consideraciones sobre el grupo de los poliurónidos, características y clasificación, que sirvan a su vez para exponer el concepto de ellos que consideramos como más acertado, pues existe una clara disparidad de criterios a lo largo de la bibliografía, por lo que se requiere una cierta revisión.

DEFINICIÓN, ESTRUCTURA Y OTRAS CARACTERÍSTICAS

El término *poliurónidos* fué utilizado primeramente por SMOLENSKI (1), conociéndose como tales, aquellos polímeros de azúcares, de cadena lineal o ramificada, en los que todos o algunos de los eslabones están reemplazados por ácidos urónicos.

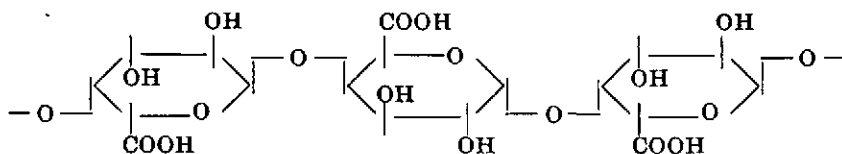
Son ácidos urónicos aquellas sustancias, con el agrupamiento fundamental de azúcares, en las que se mantiene, por lo tanto, el carácter reductor, y en las que el grupo alcohólico primario aparece oxidado a carboxilo. He aquí unas fórmulas comparativas a título de ejemplos:



(1) SMOLENSKI, K., *Roczniki Chemji*, 3, 86 (1923); 4, 72 (1924) [KERTESZ, E. I., *The Pectic Substances*, Interscience Publisher, New York & London (1951), pág. 5].

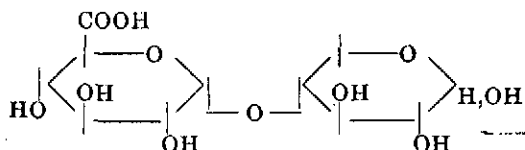


He aquí un ejemplo de un polímero en el que todos los eslabones son de carácter ácido:



Acido poligalacturónico

Un significado especial tienen para nosotros los llamados ácidos aldobiurónicos, triurónicos, etc. en los que junto a 1, 2,... eslabones neutros existe un eslabón ácido urónico que da carácter de tal al oligosacárido correspondiente. Aunque tendremos ocasión en este trabajo de hablar de varios aldobiurónicos caracterizados por nosotros, damos aquí como ejemplo, la fórmula del integrado por un eslabón de D-xilosa y otro de D-glucurónico unidos ambos por un enlace en 4-1:



4 (-D-glucuronosido) D-xilosa

Como es conocido, las estructuras de los azúcares y también las de los ácidos urónicos, responden a cadenas cerradas (como las indicadas para el poligalacturónico esquematizado), más que a cadenas abiertas (como las indicadas para galactosa, glucosa y urónicos correspondiente); las estructuras cerradas de 5 ó 6 eslabones se corresponden con las estructuras de los anillos furano o pirano respectivamente (*). En los poliurónidos, los eslabones mantienen sus correspondientes estructuras, y hoy en día se han conseguido verdaderas fotografías de estas cadenas, con auxilio de los rayos X, utilizándose especialmente la técnica del polvo cristalizado (diagramas de DEBYE-SCHERRER-HULL) (2).

(*) Dentro de estas formas cíclicas, atendiendo a la posición relativa del grupo reductor (semiacetálico), respecto al plano del anillo, pueden presentarse dos formas isómeras (anómeras), la α y la β .

En el sistema de Hudson, que es el más aceptado generalmente, se designa como compuesto α -D al anómero más dextrorrotatorio de los de la familia D y α -L al más levorrotatorio de los dos anómeros de la familia L. Por tanto, las dos formas α de los enantiomorfos son entre sí imágenes especulares e igual puede decirse respecto a las formas β .

(2) DEBYE, P., y SCHERRER, P., *Physik. Z.*, 17, 277 (1916); HULL, A. W., *Physic. Rev.*, 10, 661 (1917) [*Physical Chemistry of High Polymeric Systems*, MARK, H. y TOBOLSKY, A. V., Ed. Interscience Publishers, Inc., pág. 6, New York, N. Y., 1950].

La unión entre eslabones, sean azúcares neutros o ácidos, se realiza por medio de puentes de oxígeno, tipo éter-óxido, originados entre grupos OH de moléculas de azúcares (neutros o ácidos) llamándose a este tipo de enlace entre azúcares, *glicosídico* (3). A su vez cabe distinguir entre enlace α ó β glicosídico, atendiendo a la configuración estérica.

La investigación sobre poliurónidos tiene diversos aspectos: determinación cualitativa y cuantitativa de sus constituyentes, determinación de la forma en que están dispuestos tales constituyentes en la macromolécula (en lo que recuerda a los problemas normales de la Química de Proteínas), estructura cristalina, propiedades técnicas (por ejemplo capacidad gelificante), tamaño molecular, su génesis y misión en los tejidos, etc., etc.

La investigación cualitativa y cuantitativa ha encontrado un poderoso auxilio en las nuevas técnicas cromatográficas, ya que al permitir trabajar en escala micro en unos casos, o por la gran sensibilidad en otros, es grande el número de reinvestigaciones que se han realizado en el campo de los poliurónidos, con no pocas modificaciones sobre estructuras que se consideraban seguras. Pueden recordarse a este respecto los numerosos trabajos que aparecen en la bibliografía a nombre de HIRST, PERCIVAL, JONES, etc., (4), (5), (6), (7)...

Aunque es muy frecuente que los poliurónidos tengan estructura lineal, como sucede al ácido péctico (8), (9) o al ácido algínico (10), no faltan los poliurónidos de estructura ramificada, en cuyo caso los urónicos suelen integrar las cadenas laterales, como en el caso del ácido arábigo (11), o el de la goma de ciruelo (12). Existen también poliurónidos de carácter mixto tales como las hemicelulosas, que, en general, están integradas por una porción de tipo lineal y otra ramificada.

Por tanto, un problema que se plantea es el determinar cuáles son los puntos de soldadura de los distintos eslabones, con lo que a su vez conoceremos si poseen estructura lineal o ramificada. En la marcha que se sigue para la identificación de tales puntos de soldadura, se procede generalmente a una metilación profunda, seguida de una hidrólisis que liberará azúcares metilados en todos los grupos OH alcohólicos, salvo en los

(3) HIRST, E. L. y JONES, J. K. N., *Soc. Dyers Colourist*, 63, 249 (1947).

(4) HIRST, E. L. y JONES, J. K. N., *Discussions Faraday Soc.*, N.º 7, 268-74 (1949), *J. Chem. Soc.*, 1659 (1949); etc.

(5) PERCIVAL, E. G. V. y CHANDA, S. K., *Nature*, 166, 787 (1959).

(6) JONES, J. K. N., *Assoc. tech. ind. papetière*, Bull, 6, 157 (1952).

(7) JONES, J. K. N. y WISE, L. E., *J. Chem. Soc.*, 2750 (1952).

(8) BEAVEN, G. H. y JONES, J. K. N., *Chemistry & Industry*, 363 (1939).

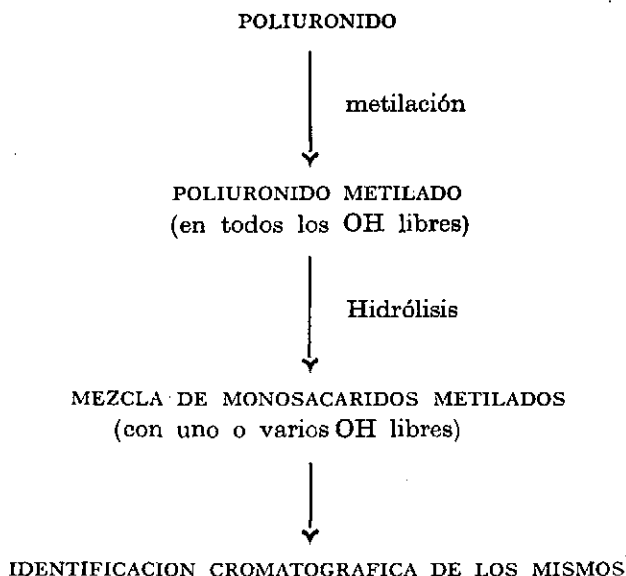
(9) HIRST, E. L., *J. Chem. Soc.*, 70 (1942).

(10) HIRST, E. L., JONES, J. K. N. y JONES, W. O., *J. Chem. Soc.*, 1880 (1939).

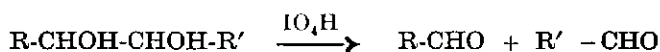
(11) JACKSON, J. y SMITH, F., *J. Chem. Soc.*, 74, (1940); 79 (1940)

(12) HIRST, E. L. y JONES, J. K. N., *J. Chem. Soc.*, 506 (1946).

que antes intervenían en la formación del enlace glicosídico, en la cadena del poliuronido. El esquema de dicho proceso es el siguiente:



La presencia de azúcares con más de un OH libre, significa que éstos proceden de cadenas ramificadas, y la posición de los puntos de enlace se podrán determinar, en el caso de que los dos OH sean contiguos, mediante oxidación con ácido periódico, según la reacción (13):



Por otro lado, provocando hidrólisis controladas, podrán identificarse algunos oligosacáridos, como se describirá a lo largo de este trabajo en varias ocasiones. Así, nosotros hemos podido identificar polímeros de xilosa y de glucosa, diversos ácidos aldobiurónicos, etc., etc.

En la identificación química de la estructura de poliuronidos puede surgir otra complicación debida al hecho de que el Ca y el Mg, que se encuentran normalmente en casi todas las cenizas, como hemos podido comprobar, por ejemplo, en las gomas de frutales, intervengan estableciendo puentes intermoleculares; igualmente, el P_2O_5 que aparece con relativa abundancia en las cenizas de poliuronidos, tendrá probablemente

(13) SMITH, G. F., *Analytical Applications of Periodic and Yodic Acid and their Salts* (Univ. of Illinois, EE. UU., 1950).

una misión similar (parte del P_2O_5 que aparece en las cenizas puede ser que se encuentre en forma inorgánica desde el principio, o bien esterificando OH libres). El caso de los puentes de Ca y Mg está plenamente demostrado, y se manifiesta de una manera especial en el grupo de las pectinas (14).

La determinación del tipo de enlace y, sobre todo, la localización de los puntos de soldadura, puede tener un gran interés desde otros puntos de vista. Así, por ejemplo, HIRST y colegas (15) muestran que las galactanas y ácidos pécticos difieren en el tipo de enlace, por lo cual el paso de galactanas a pécticos, no puede ser consecuencia de una simple oxidación, y, en el caso en que aquéllas sean el origen de las pectinas, el proceso ha de hacerse en varias etapas, siendo probable que el ácido fosfórico inter venga en la interconversión [loc. cit. (14)].

La formación de poliurónidos en los organismos se hace siempre a través de procesos de transglicosidación enzimática, a la manera que ocurre para los restantes polisacáridos naturales.

También es conveniente la determinación del tamaño molecular, que puede realizarse por métodos físicos: presión osmótica, velocidad de sedimentación, ultracentrífuga, dispersión luminosa en suspensión y en disolución (16), etc., o por métodos químicos, sobre todo por el llamado de los grupos finales.

En cuanto a la estructura cristalina, como se refleja claramente en la bibliografía, se ha avanzado mucho al perfeccionarse las técnicas de rayos X y al haber entrado en juego, para la identificación de estructuras, el microscopio electrónico. Interesantes conclusiones se han logrado modernamente para la configuración de poliurónidos, por medida de la periodicidad de los retículos (17). En nuestro propio laboratorio se realizan actualmente trabajos estructurales sobre otros oligosacáridos, muchos de ellos con eslabones urónicos, por lo cual, en un sentido amplio, deben ser incluidos dentro del grupo general de poliurónidos, en especial sobre las formas α , β y γ de la celulosa de esparto y frutos, en los que juega un importante papel el espectro de rayos X de estas fracciones.

La función de los poliurónidos en los vegetales dependerá grandemente de las características físico-químicas y estéricas de las cadenas componentes; así, en la celulosa, caso límite de poliurónidos en el que faltan prácticamente los grupos ácidos, ésta posee una estructura densa y crista-

(14) HENGLEIN, F. A., KRASSIG, H. y STEINNING, A., *Makromol. Chem.*, **4**, 78 (1949).

(15) HIRST, E. L., *J. Chem. Soc.*, **70** (1942).

(16) WEISSBERGER, A., *Physical Methods of Organic Chemistry*, Interscience Publishers, Inc. New York, vol. I, partes 1, 2 y 3 (1954).

(17) PALMER y HARTZOG, *J. Am. Chem. Soc.*, **67**, 2122 (1945).



lina (18), como han podido comprobar PRESTON y colegas (19), en fotografías obtenidas mediante el microscopio electrónico. Debe suponerse que entre las cadenas existen fáciles puentes de hidrógeno y que los grupos -COOH que poseen aquéllos, aunque escasos, sirven como puntos de unión con otros constituyentes de las paredes celulares. En otros poliurónidos más típicos, mucho más carboxilados, puede depender la estructura en mayor grado de los puentes iónicos, haciéndose ésta más o menos variable en relación con la proporción de estos grupos. Insistiremos sobre este punto al tratar algunas protoestructuras, especialmente la de la protopectina.

Dada la importancia que los diversos poliurónidos juegan en la fisiología vegetal, muchos investigadores han estudiado la posible explicación de cómo sucede el metabolismo de los mismos, muy especialmente el de las pectinas, habiéndose realizado investigaciones desde un aspecto puramente químico y enzimático, sucesivamente. Según CLAYSON (20) en la descomposición enzimática de protopoliurónidos intervienen, la pectasa (pectin-estearasa) y pectinasa (poligalacturonasa), aparte de otras enzimas que tal vez separen las arabanos y galactanas.

Otra forma de ruptura posible en los poliurónidos, muy típica en los organismos, es la causada o inducida por el peróxido de hidrógeno, o por el ácido ascórbico y otros enodiolos en presencia de oxígeno, o un adecuado aceptor de hidrógeno, como puede ser el agua oxigenada.

El ácido ascórbico y el peróxido de hidrógeno, cuando se presentan juntos, se refuerzan recíprocamente en esta acción (21).

Por lo que se refiere a propiedades técnicas, se comprende que este aspecto sólo tiene interés para aquellos poliurónidos que por su abundancia o facilidad de aislamiento permitan una utilización amplia. Este es el caso de algunas pectinas (las de manzana o frutos cítricos) en los que su poder gelatinizante es el más manifiesto; el caso de algunos mucílagos, como el de la semilla de algarroba con su gran capacidad de hinchamiento; el de gomás tan conocidas como la arábica; etc., etc.

Dada la índole de nuestro tema nos estamos refiriendo solamente a los poliurónidos en el reino vegetal, pero debemos llamar la atención al hecho de que, también en el reino animal, otros poliurónidos muy semejantes, juegan un importante papel, tanto en la virulencia de ciertos microorganismos como en muchos fenómenos de inmunidad.

(18) HERMANS, P. H., HERMANS, J. J., VERMANS, D. y WEIDINGERS, A., *Rec. trav. chim.*, **63**, 44 (1944).

(19) PRESTON, R. D., NICOLAI, E., RECD, R. y MILLARD, A., *Nature*, **162**, 665 (1948).

(20) CLAYSON, D. H. F., *Chemistry & Industry*, **61**, 516 (1942)

(21) ROBERTSON, W. V. B., ROPES, M. W. y BAUER, W., *Biochem. J.*, **35**, 903 (1941)



CLASIFICACIÓN DE POLIURÓNIDOS

Aunque según la génesis y posible función de los poliurónidos en los organismos, haremos algunas consideraciones posteriores, es frecuente el clasificarlos en: hemicelulosas, pectinas, gomas y mucílagos.

Durante algún tiempo estuvo muy generalizado el reunir a los poliurónidos en dos grupos solamente: poliurónidos ácidos (en el que se reunían los actuales de pectinas, mucílagos y gomas) y neutros (hemicelulosas). Pero cada día se va demostrando que la presencia de urónicos es bastante más general que lo que se preveía en el campo de las hemicelulosas, así por ejemplo, puede recordarse la revisión que sobre las hemicelulosas del esparto, antes consideradas como neutras, iniciaron J. K. N. JONES y G. GUZMÁN (22), demostrando la presencia de varios ácidos urónicos.

Existe una gama amplia en el contenido de $-\text{COOH}$ en los distintos tipos de poliurónidos y, como se ve en la Tabla I adjunta, algunas hemicelulosas llegan a contener una proporción elevada de grupos ácidos (23).

TABLA I

POLIURONIDO	ESLABONES URONICOS %.
Acido algínico	100
Acido péctico degradado	100
Pectinas (término medio)	85
Goma de pomelo	31
» limón	22
» Damson	14
» ciruelo	12
» almendro	10
» cerezo	10
» cerezo silvestre	8
Acido arábigo	15
Hemicelulosas de maderas diversas	11 a 15
» algodón	10 a 12
» paja de trigo	8
Musgo Islandés	5
Mucílagos de trigo de India	6 a 11
» del «Aloe vera»	2,4
Celulosa β de pasta de papel purificada	0,25
» de algodón	0,2
Celulosa, fracción α pura	0,0

(22) JONES, J. K. N. y GUZMÁN, G., *An. R. S. E. Fis. y Quím.*, 50, 505 (1954).(23) HINTON, C. L., *Ann. Review of Biochemistry*, 20, 68 (1951).

CONSIDERACIONES GENERALES SOBRE LOS GRUPOS PRINCIPALES
DE POLIURÓNICOS

Aunque sea sólo de una manera superficial, estimamos como fundamental el tratar aisladamente cada uno de los principales grupos de poliurónidos, insistiendo en aquellos puntos que han sido objeto de nuestra atención especial en el terreno experimental.

Hemicelulosas.—Durante mucho tiempo las hemicelulosas se han considerado algo apartadas del grupo de los poliurónidos, ya que sólo se encontraban en ellas azúcares neutros, y únicamente en muy pocas especies, aparecían pequeñas cantidades de ácidos glucurónico o galacturónico. Sólo a estas últimas, portadoras de azúcares ácidos, se les incluía con propiedad entre los poliurónidos.

Sin embargo, cada día se avanza más en el conocimiento de estos complejos naturales y, como se dijo anteriormente, se está demostrando la presencia de dichos ácidos en la mayoría de las hemicelulosas (24), (25). Por nuestra parte hemos podido llegar a la confirmación de dicha presencia en varias hemicelulosas, como tendremos ocasión de exponer.

El término hemicelulosa fué aplicado por primera vez por SCHULTZE en 1891 (26), al definir un grupo de constituyentes celulares, solubles en álcalis diluïdos e hidrolizables hasta pentosas y hexosas. Posteriormente NORMAN (27) establece un concepto más amplio al considerarlos solubles en álcalis diluïdos, en frío o en caliente, y que además de transformarse en azúcares neutros, pueden hacerlo en azúcares ácidos, e igualmente tipo hexosa o pentosa. si bien para estas hemicelulosas de componentes acídicos se desea reservar el nombre de poliurónidos, concepto usado por primera vez por SMOLENSKI, como ya se indicó. Su función puede ser la de material de reserva, como en el caso de las que integran las médulas y

(24) ASPINALL, G. O., HIRST, E. L. y MAHOMED, I. S., *J. Chem. Soc.*, 17 (1954).

(25) GORROD, A. R. N. y JONES, J. K. N., *J. Chem. Soc.*, 25 (1954).

(26) DORES, CH., *Les méthodes de la chimie de la cellulose*, Ed. Dunod, París, 1949, pág. 428.

(27) NORMAN, A. G., *The Biochemistry of Cellulose, Hemicelluloses, Poliuronides and Lignins*, Oxford Univ. Press, pág. 37 (1937).



semillas, o bien la de constituyentes estructurales, como las que forman las cáscaras de frutos, paja, madera, etc.

En el primer caso, los principales productos de hidrólisis son hexosas y en el segundo dan especialmente pentosas, de las cuales las más comunes son xilosa y arabinosa.

Citaremos algunos tipos: en el tejido leñoso, las hemicelulosas están formadas por xilana con eslabones de ácido glucurónico, pero con una preponderancia de xilosa. Así por ejemplo ANDERSON y colegas (28) consideran que en la madera de mezquita existe un eslabón de ácido urónico por cada 6-12 eslabones de xilosa.

En la corteza de árboles se encuentran hemicelulosas del tipo galactana-galacturónico entre ellas la de la corteza del fresno (*Fraxinus excelsior*) (29) cuyos productos de hidrólisis son esencialmente galactosa y ácido galacturónico.

Pero estos resultados no son definitivos, pues aunque se han separado hemicelulosas de una amplia variedad de vegetales, no se han podido lograr conclusiones generales, ya que la heterogeneidad de éstas, no sólo es notable de unas a otras especies, sino que puede depender de la edad de la planta. Incluso para un mismo vegetal pueden observarse claras diferencias según la localización de aquéllas, como ha podido comprobar O'DWYER (30), al comparar celulosas del duramen y albura del roble.

Siempre hubo dudas de si en los procesos de aislamiento de las hemicelulosas, previos a su estudio, no se producirían modificaciones de estructura, sobre todo en lo que respecta a la presencia de ácidos urónicos. Las posibilidades de modificación han sido confirmadas en el caso de las hemicelulosas de abeto, por WETHERN (31), y en las hemicelulosas de abedul, según trabajos de TIMELL y JAHNS (32) al comparar los resultados obtenidos por hidrólisis de hemicelulosas sin aislamiento, con los conseguidos sobre hemicelulosas separadas tras previa deslignificación con ClO_2 , según WISE (33).

El número de hemicelulosas es muy crecido y varían entre sí, desde las que poseen una estructura integrada por azúcares preponderantemente neutros, como por ejemplo la xilana del esparto y del maíz (antes era ésta un ejemplo típico de hemicelulosas neutras, ahora resulta esto discutible), hasta otras menos frecuentes que responden a una estructura po-

(28) ANDERSON, E. y colaboradores, *J. Biol. Chem.*, 144, 767 (1942).

(29) BUSTON, H. W. y HOPF, N. S., *Biochem. J.*, 32, 44 (1938).

(30) O'DWYER, *Biochem. J.*, 34, 149 (1940).

(31) WETHERN, Tesis, The Institute of Paper Chemistry, Appleton, Wisconsin, U.S.A.

(32) TIMELL y JAHNS, *Svensk Papperstidning*, 54, 831 (1951).

(33) WISE, MURPHY y D'ADDIECO, *Paper Trade J.*, 125, n.º 11, 57 (septiembre 1947).

liurónica total, y que por su función pueden considerarse también como hemicelulosas.

Sin embargo, son más frecuentes las hemicelulosas del tipo intermedio, es decir, aquellas que en la hidrólisis producen más de un monosacárido, y uno o más azúcares ácidos. Algunas supuestas hemicelulosas neutras, por ejemplo las del álamo blanco, o la anteriormente citada xilana del esparto, han resultado estar constituídas por algún eslabón ácido intercalado, como se ha podido demostrar al aislar algunos ácidos urónicos, firmemente ligados a eslabones de azúcares neutros, como por ejemplo los aldobiurónicos detectados por J. K. N. JONES y colaboradores (34) (35), en los estudios sobre estas hemicelulosas.

En la bibliografía abundan trabajos sobre hemicelulosas de los más variados orígenes: marfil vegetal, semilla de dátiles, paja de cereales, maderas duras y blandas en comparación, etc., etc., sin olvidar los estudios sobre lejías sulfúricas y alcalinas de las fábricas de celulosa que siempre tratan de investigar porciones y componentes azucarados que, en definitiva, proceden de hemicelulosas de las materias primas.

Para nosotros constituye tema principal el estudio de las hemicelulosas de frutos sobre los que existen escasas referencias.

Pectinas.—El término pectina se ha derivado del griego «πηκτος» que significa congelable o solidificable (36).

Las frutas, bayas y tubérculos contienen un grupo de polisacáridos sin una solución de continuidad manifiesta. La duda existe en lo referente al tamaño mínimo molecular del ácido péctico, es decir, cuándo un ácido poligalacturónico puede calificarse de péctico. Además, contribuye a esto, la gran heterogeneidad de las pectinas en cuanto a su contenido en otras substancias, tales como D-galactosa y L-arabinosa. EHRLICH también considera la presencia de ácido acético y alcohol metílico. No pasan desapercibidas las confusiones a que pueden dar lugar las variadas nomenclaturas en este campo. En la bibliografía se encuentran aproximadamente 50 términos diferentes para las distintas substancias pécticas, resultando complicado unificar todos los conceptos.

El primer paso para resolver esta cuestión se dió en 1926 por un Comité de la *American Society*. En 1941 se revisó nuevamente la cuestión y en 1943 se presentó un trabajo, *Revised Nomenclature of the Pectic Substances* (37), a dicha Sociedad, que contenía una nomenclatura adoptada

(34) JONES, J. K. N. y WISE, E. L., *J. Chem. Soc.*, 2750 (1952); 338 (1952).

(35) JONES, J. K. N. y GUZMÁN, G., *An. R. S. E. Fis. y Quím.*, 50, 505 (1954).

(36) BIRACONNOT, H., *Ann. Chim. Phys.*, Serie 2, 28, 173 (1825).

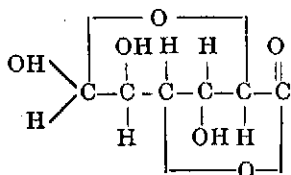
(37) BAKER, G. L., JOSEPH, G. H., KERTESZ, Z. I., MOTTERN, H. H. y OLSEN, A. G., *Chem. Eng. News*, 22, 105 (1944).

oficialmente en 1944, y que es seguida en este trabajo. De acuerdo a ella son *substancias pécticas* un grupo de complejos coloidales, derivados de los hidratos de carbono, que se encuentran, o se obtienen, de las plantas y que contienen una gran proporción de unidades de ácido D-galacturónico, a las cuales se les atribuye una unión en cadena; el grupo $-\text{COOH}$ de los ácidos poligalacturónicos debe estar parcialmente esterificado por grupos metilo, y parcial o totalmente neutralizado por una o más bases.

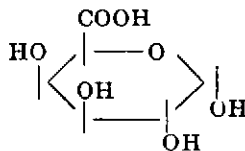
De acuerdo con esta definición, el ácido galacturónico forma el esqueleto de todas las substancias pécticas, de la misma manera que la galactosa lo forma en las gomas generalmente; es natural que las propiedades de dicho ácido reflejen las características pécticas.

Aunque el ácido galacturónico es componente de otras substancias tales como mucílagos y hemicelulosas, la función más importante la realiza en las pectinas, por lo que es conveniente, antes de entrar en el estudio de los complejos, hablar resumidamente del ácido.

WŁOSTOWSKA (38) establece que, en solución acuosa, un 5-6 % del ácido D-galacturónico se encuentra en forma de lactona y el resto en forma piranosa.



Ac. galacturónico (Forma lactona)



Ac. galacturónico (Forma piranosa)

Los procedimientos de obtención de ácido galacturónico son muy variados. Algunos utilizan los hidrolizados de pectinas conseguidos por acción enzimática (39), dando un rendimiento mayor del 85 %; la hidrólisis ácida da menores rendimientos debido probablemente al resultado de la descarboxilación del ácido urónico; otros emplean sales dobles (galacturonatos) y actualmente se han simplificado mucho los métodos que parten de las sales insolubles del ácido y utilizan resinas intercambiadoras de iones.

En cuanto a su síntesis, por ahora, carece de interés. Posee propiedades ácidas y reductoras debidas al $-\text{COOH}$ y $-\text{CHO}$, existiendo gran número de pruebas de color para su reconocimiento, de las cuales la más

(38) WŁOSTOWSKA, W., *Roczniki Chemji*, 10, 342 (1930) [(E. I. KERTESZ, *The Pectic Substances*. Interscience Publisher, New York & London, pág. 15 (1951)].

(39) EERLICH, P., *Biochem. Z.*, 250, 525 (1932); 251, 204 (1932).

antigua y conocida es la del reactivo TOLLENS (40). Posteriormente DISCHE (41) ha descrito la reacción entre ácidos urónicos con carbazol y SO_4H_2 que sirve, tanto para el ácido D-glucurónico, como para el D-galacturónico.

Existen también reacciones específicas. Entre ellas está el tratamiento con solución de acetato de plomo, que da precipitado blanco; éste por ebullición en baño de agua, toma color rosado que acaba por volverse rojo (42). Para su identificación se puede usar la reacción de descarboxilación que sufre al calentarlo con ácido clorhídrico (43). También se ha utilizado con éxito la separación cromatográfica, que es la seguida por nosotros.

SCHNEIDER y colaboradores (44), establecieron que la diferencia entre las distintas sustancias pécticas se debe: a) al tamaño molecular del ácido péctico, b) grado de esterificación de los distintos grupos $-\text{COOH}$ y c) proporción de materiales de lastre que contienen. Eventualmente, también pueden darse diferencias estructurales.

Sin embargo, las sustancias pécticas poseen diversas propiedades, como son el estado coloidal, viscosidad, facilidad de gelación (o geificación), etc., que requieren una constitución molecular más complicada. Se admite la existencia de enlaces entre unidades básicas (formadas por moléculas de ácido galacturónico) de tipo lactona, anhídrido de ácido y, recientemente, se ha demostrado la presencia de enlaces por puentes de hidrógeno entre los $-\text{COOH}$.

En todos los tratados sobre sustancias pécticas, se manejan varios términos sobre los que debemos de insistir, diferenciándolos, para llegar a un concepto más claro sobre aquellas sustancias. Estos son: ácido péctico, ácido pectínico, pectina y protopectina.

Acido péctico.—Con arreglo a lo establecido, la estructura más sencilla de la pectina es la de un ácido poligalacturónico que contienen las unidades componentes justas para ser un ácido coloidal: un ácido péctico. Por tanto el ácido péctico se puede considerar como la estructura mínima, a partir de la cual, se pueden obtener otras sustancias pécticas por adición de otros grupos, o aumento del tamaño molecular.

EHRlich y colegas (45) fueron los primeros en proponer fórmulas desarrolladas para los ácidos poligalacturónicos, un ejemplo de las

(40) TOLLENS, B., *Ber.*, 41, 1788 (1908).

(41) DISCHE, Z., *J. Biol. Chem.*, 167, 189 (1947); *J. Biol. Chem.*, 183, 489 (1950).

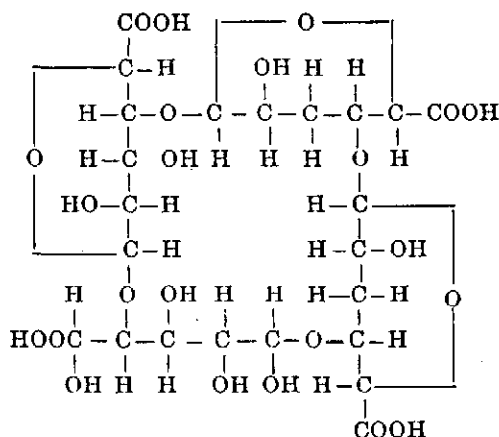
(42) EHRlich, F., *Ber.*, 65, 352 (1932).

(43) DICKSON, A. D., HERSON, H. O. y LINK, K. P., *J. Am. Chem. Soc.*, 52, 775 (1930).

(44) SCHNEIDER, G. y FRITSCHI, U., *Ber.*, 69, 2537 (1936).

(45) EHRlich, F. y SCHEUBERT, F., *Ber.*, 62, 1974 (1929).

cuales es la correspondiente al ácido tetra-galacturónico, de la que damos un esquema a continuación:



MORELL, BAUR y LINK (46) no estuvieron de acuerdo con estas estructuras, demostrando mediante metilación y saponificación subsiguiente, la existencia de una cadena polimérica lineal de por lo menos 8-10 eslabones. Posteriormente se admitieron longitudes mucho mayores, suponiéndose una estructura que es muy similar a la de la celulosa. HENGLEIN y SCHNEIDER (47) prepararon nitropectina encontrando que mostraba propiedades muy similares a las de la nitrocelulosa; al igual que esta última, la nitropectina debe estar compuesta de moléculas filiformes, puesto que las películas formadas por evaporación rápida de este compuesto, muestran una resistencia a la tensión considerablemente mayor en el sentido longitudinal que en el transversal.

Por otro lado, por oxidación del ácido poligalacturónico con IO_4H se produce ácido L-tartárico (48), luego la unión entre los eslabones de D-galacturónico debe ser por los carbonos 1-4 ó 1-5. Posteriormente J. K. JONES (49), demostró que el enlace es 1-4.

La representación espacial más adecuada fué sugerida por HAWORTH

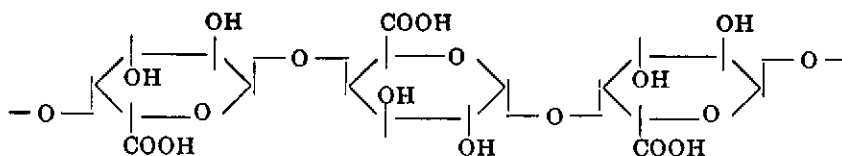
(46) MORELL, S., BAUR, L. y LINK, K. P., *J. Biol. Chem.*, 105, 1 (1934).

(47) HENGLEIN, F. A. y SCHNEIDER, G., *Ber.*, 69, 309 (1936).

(48) LEVENE, P. A. y KREIDER, L. C., *J. Biol. Chem.*, 120, 591 (1937).

(49) BEAVEN, G. H. y JONES, J. K. N., *J. Soc. Chem. Ind.*, 58, 363 (1939).

(50) siendo ésta la que se usa en la actualidad; la configuración propuesta es la que ya se ha dado en páginas anteriores:



Las sales de los ácidos pécticos o pectatos, por ejemplo el pectato cálcico, son insolubles, pudiéndose usar en la determinación cuantitativa de pectinas. La formación de estos pectatos justifica el endurecimiento o aumento de consistencia de frutos elaborados con aguas duras, o las recomendaciones que se hacen de adición de cloruro cálcico a los líquidos de gobierno, en conservas en que interesa mantener una cierta consistencia.

Debemos citar además, la existencia de una serie de ácidos pécticos comerciales a los que es frecuente asignarles algún nombre que denote su origen. Así el ácido «citrus péctico» se obtiene por extracción ácida de la pulpa de frutos del género *Citrus*. El extracto ácido se trata con $\text{Ca}(\text{OH})_2$ y NaOH , los cuales precipitan el pectato cálcico. Por acidificación de esta sal se libera el ácido. Tanto las aplicaciones industriales como la preparación de estas sustancias pécticas, han sido estudiadas ampliamente por BAIER y WILSON (51)

Ácidos pectínicos y pectinas.—Estos dos grupos es preferible considerarlos conjuntamente.

Ácido pectínico es el ácido péctico que contiene una pequeña proporción de grupos metoxilo. Cuando el ácido pectínico es capaz de formar gels con azúcar y ácido se llama pectina.

Es decir «todas las pectinas son ácidos pectínicos, pero no todos los ácidos pectínicos son pectinas».

Las pectinas son extremadamente difíciles de metilar, existiendo algunos métodos para obviar esta dificultad. Así por ejemplo, ha sido posible metilar completamente algunas pectinas de frutas tales como las de fresas y las de cítricos tratándolas, primero con ioduro de metilo en presencia de hidróxido de talio, y después por ioduro de metilo y óxido de plata (52).

(50) HAWORTH, W. N., *Proc. Roy. Soc. (London)*, 186, 1 (1946).

(51) BAIER, W. E. y WILSON, C. W., *Ind. Eng. Chem.*, 33, 287 (1941).

(52) BEAVEN, G. H. y JONES, J. K. N., *Chemistry & Industry*, 58, 363 (1939); LUCKETT, S. y SMITH, F., *J. Chem. Soc.*, 1106, 1114, 1506 (1940).

Igualmente por acilación suave de pectinas comerciales con piridina y anhídridos de ácidos se obtienen ésteres disustituídos (53), lográndose sustancias de diferente flexibilidad según el radical esterificante que contengan, así por ejemplo, las películas de dibutirato y dipropionato de pectina son moderadamente fuertes y flexibles, mientras que las de diacetato son muy débiles.

Las pectinas de diferente origen tienen marcadas diferencias en velocidad o grado de gelación, cenizas, contenido en metoxilo y otras propiedades, como se muestra en la Tabla II, en la que se recogen las variaciones observadas por HINTON (54).

TABLA II

<i>Propiedades</i>	<i>Rango</i>
Poder de gelación	0-29,5
Acidez libre	1,3-10,3 grs. NaOH/100 grs. pectina
pH de disoluciones al 1 %	2,6-4,4
Contenido en metoxilo	9-12 % CH ₃ OH
Índice de saponificación	7,6-15,1 grs. NaOH/100 grs. pectina
Grupos ácidos totales	16,7-29,6 %, grs. NaOH/100 grs. pectina
Poder reductor frente a Iodo	2,7-23,3 % azúcares reductores
Cenizas	0,59-8,90 %.

El contenido en éster de las pectinas puede salirse del rango recogido en la Tabla II, estando claramente justificada la existencia de los conceptos «pectina de bajo contenido en éster» y «pectina de elevado contenido en éster». De estas últimas el ideal sería aquella que contuviese 16,3 % de metoxilo, y que correspondería al ácido péctico totalmente metilado, pero sustancias de este tipo no se han encontrado en la naturaleza (*). Las pectinas conteniendo del 3-7 % de metoxilo (típicas de bajo éster) precipitan muy fácilmente con iones polivalentes (Ca, Mg,...).

Las pectinas de tipo medio, en cuanto a su contenido en éster, en presencia de azúcar y ácido producen un gel. No obstante se ha observado que algunas sufren gelificación por adición de frutos ácidos y sales de calcio, sin necesidad de nuevas adiciones de azúcar, es decir, se comportan como pectinas de bajo contenido en éster. Esto se atribuye a la acción de una enzima, «pectasa», que provoca una desmetilación del ácido pectí-

(*) Debido a la heterogeneidad de las sustancias pectínicas, no puede establecerse un límite riguroso que separe de manera general las de bajo y elevado éster. No obstante, de una forma aproximada se comportan como pectinas de bajo éster aquellas que hayan reducido en un 50 % su contenido normal de MeO.

(53) CARSON, J. F., Jr., y NAILAY, W. D., *J. Am. Chem. Soc.*, 67, 787 (1945).

(54) HINTON, C. L., *Fruit Pectins*, Chemical Publishing Co., N. Y. (1940); HIRST, E. L. y JONES, J. K. N., *Advances in Carbohydrate Chem.*, 2, 235 (1946).

nico correspondiente, permitiendo así la formación de un pectinato de calcio muy insoluble por su bajo contenido en metoxilo, ya que, como es conocido, al disminuir dicho contenido, los ácidos pécticos, y más aún sus sales, se hacen más insolubles en agua.

En resumen, para que tenga lugar la formación del gel se requiere: a) en el caso de las pectinas de elevado contenido en éster, ácido y azúcar y b) para las de bajo contenido en éster, ácido y iones Ca^{++} u otros polivalentes.

Protopectinas.—Nos referimos a la protoestructura que corresponde a las pectinas: la palabra «protoestructura» indica el modo de ordenarse las moléculas de poliuronidos en el tejido celular. La determinación de la protoestructura se ha conseguido al estudiar la protocelulosa y protopectina, conjuntamente.

Este último término corresponde a la substancia péctica original, progenitora, insoluble en agua, tal como se encuentra en las plantas, es decir, antes de sufrir la hidrólisis adecuada para producir el ácido pectínico.

A pesar de su marcada insolubilidad en agua, se ataca fácilmente por un gran número de reactivos y otros tratamientos muy variados (55) (56).

La estructura de la protopectina es uno de los problemas más difíciles de la química de las pectinas; una de las razones de esta dificultad son los inconvenientes que presenta el separarla de otros compuestos insolubles que integran el tejido vegetal.

RIPA (57) sugirió que, en la protopectina, los grupos no esterificados estaban unidos con celulosa. De acuerdo con esto, en una protopectina que contenga ácido poligalacturónico, muy esterificado con grupos metilo, éste se combinaría con una pequeña cantidad de celulosa y viceversa.

Por otra parte se atribuye la insolubilidad de la protopectina a la presencia de una sal de Ca-Mg, así como a la existencia de puentes fosfóricos intermoleculares, como ya indicamos en otro lugar.

Además de los componentes fundamentales, de naturaleza poliurónica (ácidos pectínicos, pectina, etc.), existen en las substancias pécticas otros componentes. Estos son: metil-pentosas, xilosa (sobre todo en la naranja y limón), ácido galacturónico, acetona, ácido acético, arabanos y galactanas.

Estos dos últimos son tan importantes que, actualmente, el término pectina significa tanto la presencia de ácidos poligalacturónicos, como de

(55) BRANFORD, N. H. (CARRE, N. H.), *A Critical and Historical Study of the Pectic Substances of Plants*. Dept. of Sci. and Ind. Res., Special Report N.º 33, H. M. Stationery Office, London (1929).

(56) ENRICH, F., *Cellulosechemie*, 11, 1 (1930).

(57) SUGARIPA, R. (ahora RIPA, J. *Am. Chem. Soc.*, 46, 145 (1924).



arábana y galactana, y muchas veces también la de galactosa y arabinosa libres. La proporción de unos y otros componentes varía de unas a otras pectinas.

También cabe el considerar a las galactanas y arabanas como dos hemicelulosas (del primer tipo) componentes de las sustancias pécticas. Para separarlas de los ácidos pectínicos se precipitan con sales de aluminio.

HIRST y JONES (58) estudiaron las sustancias pécticas de la manzana estableciendo las características que se recogen en la Tabla III.

TABLA III

	Protopectina	Complejo Ac. pectínico- galactana	Ac. péctico
Peso equivalente	364	250	185
Acido galacturónico (%)	49,2	73,0	96,7
Pentosanas (%)	20	0,0	0,0
Galactanas (% medido por diferencia)	25	21	(4)

Hay gran evidencia de que las unidades no urónicas se encuentran en las cadenas laterales, o sea, al contrario que en las gomas. Los trabajos de SPEISER, EDDY y HILLS (59) sobre cinética de separación del material no urónico durante la desesterificación ácida de la pectina de manzanas, sugieren que una parte está unida a la cadena por enlaces primarios covalentes, probablemente tipo éster. El resto está retenido por fuerzas de valencia secundaria, o, simplemente, como una mezcla física.

Por otra parte HENGLEIN (60) admite la posibilidad de que la unión entre los grupos carboxilos se verifique por iones metálicos polivalentes (y no por enlaces lactona, anhídrido o por puentes de H), suponiendo que, entrelazándose tales uniones con los grupos celulósicos y otros, constituyen una estructura tridimensional.

Según dicha estructura, si el contenido en metoxilo es elevado existen pocos $-COOH$ capaces de entrelazarse por medio de cationes, el enmarañamiento es pequeño, y entonces la protopectina posee una gran capacidad de hinchazón con el agua que es característica. Si el contenido en metoxilo es bajo, existe más cantidad de Ca^{++} , con mayor grado de unio-

(58) HIRST, E. I. y JONES, J. K. N., *J. Chem. Soc.*, 454 (1939).

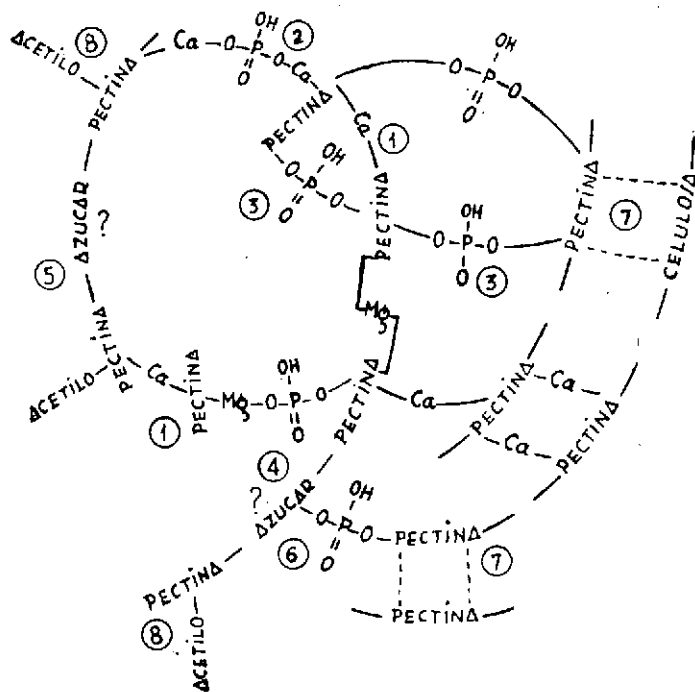
(59) SPEISER, R., EDDY, C. R., y HILLS, C. H., *J. Phys. Chem.*, 49, 563 (1945).

(60) HENGLEIN, F. A., *J. Makromol. Chem.*, 1, 121 (1943).



nes, teniendo como consecuencia una disminución de las propiedades hidrofílicas. Por tanto, cualquier alteración en las propiedades fisiológicas de las protopectinas en su desarrollo «in situ», refleja un cambio gradual entre estas dos condiciones.

La obtención de ácido fosfórico esterificado en la pectina, llevó a HENGLEIN, KRASSIG, H. y STEIMMIG (61) a formular una estructura más compleja, en la que la unión funciona a través de los grupos fosfóricos esterificados, los puentes iónicos de Ca^{++} y las fuerzas de Van der Waals, dando el siguiente esquema, el cual hay que concebirlo como tridimensional.



Modelo de protopectina⁰ propuesto por HENGLEIN, KRASSIG y STEIMMIG

- 1.—Enlace mediante iones metálicos que unen los grupos carboxilos de dos cadenas pectínicas diferentes
- 2.—Enlace mediante iones metálicos que unen una cadena de pectina a un resto fosfórico, que a su vez puede unirse a otras cadenas directamente o por intermedio de iones metálicos.
- 3.—Enlace de dos cadenas pectínicas, a través de un OH por cada una, y una molécula de ácido fosfórico.
- 4.—Enlace mixto, combinación de los tipos 2 y 3.
- 5.—Enlace mixto, combinación de los tipos 3 y 5.
- 6.—Enlace entre las cadenas pectínicas y otras, mediante fuerzas de Van der Waals.
- 7.—Enlace tipo éster, grupos metilo por ejemplo, sobre los grupos de las pectinas.

(61) HENGLEIN, F. A., KRASSIG, H. y STEIMMIG, A., *Makromolekuläre Chem.*, 4, 78 (1949).

Admitida esta estructura, la hinchazón con el agua de las sustancias pécticas, con un 70 % de éster, se atribuye a la hidratación de las cadenas individuales, que son formadas independientemente por las moléculas de agua. La resistencia a esta hinchazón o hinchamiento, se debe, en las pectinas de bajo grado de esterificación, a la asociación de grupos carboxilo o a la formación de puentes iónicos.

Gomas y mucílagos.—Las gomas y mucílagos es conveniente tratarlas en conjunto por sus grandes analogías.

El término goma se usa comercialmente para designar una gran variedad de productos naturales, pero gomas verdaderas son únicamente las de origen vegetal, solubles en agua, para dar disoluciones coloidales viscosas e insolubles en aceites, alcohol, benceno y otros disolventes orgánicos.

Los mucílagos se encuentran muy repartidos en el reino vegetal, pudiendo encontrarse en membranas secundarias, en el material intercelular y en el contenido de las células. Aparecen en la raíz, corteza, hojas, tallos, flores, endosperma, sustancias envolventes de las semillas y en ciertas células especiales de algunos bulbos. Su función es muy variada; en algunos casos son reservas alimenticias y en otros cumplen funciones especiales. Así, es probable, que las propiedades físicas de algunos mucílagos les permitan actuar como depósitos de agua en determinadas plantas que crecen en condiciones de alta sequedad; las envolturas mucilaginosas de las semillas pueden tener una función semejante durante la germinación.

Las gomas y mucílagos atendiendo a su origen pueden dividirse en tres grupos generales:

1.º) Aquellas gomas que son exudaciones secas de ciertos árboles y arbustos, en forma de escamas, nódulos o fragmentos angulares, los cuales se forman espontáneamente en las fisuras naturales, en heridas accidentales o por incisiones provocadas; éste es el caso de las gomas de acacia, almendra, ciruelo, etc., etc.

De acuerdo con la solubilidad podemos dividir estas gomas en tres tipos distintos:

- a) gomas completamente solubles en agua,
- b) gomas que se disuelven muy lentamente formando geles por hinchamiento,
- c) gomas que constan de una parte soluble en agua y otra insoluble que se hincha para producir espesamiento o geles.

2.º) Mucílagos de las plantas, los cuales se pueden extraer de ellas con agua, formando disoluciones viscosas insolubles en alcohol, como

son, por ejemplo, musgo islandés (*Cetraria islándica*), mucílago de la semilla de acacia, etc.

3.º) Las sustancias mucilaginosas conocidas como *coloides hidrofílicos*, que se obtienen a partir de las algas pardas (*Fucofíceas*) y rojas (*Rodofíceas*). Muchas de ellas tienen grandes aplicaciones comerciales tales como el agar y algina, aparte del interés científico de las mismas.

Mientras se sabe con certeza que los mucílago, son productos normales del metabolismo, en cambio, sobre las gomas vegetales hay opiniones diferentes respecto a cuál sea el mecanismo fisiológico exacto de su formación. En principio pueden formarse por supuración de las heridas que se producen accidental o intencionadamente, viniendo a ser en este caso, como medios naturales de protección de tales heridas.

Estas heridas pueden originarse por agentes mecánicos o por acción de insectos, así como por efectos climatológicos o por una invasión de hongos o bacterias. En este caso la aparición de la gomosis tendría tales causas como primarias.

Sin embargo otros investigadores mantienen la opinión de que la gomosis es consecuencia de un proceso patológico más íntimo, ya que suele ir acompañada de una degeneración de las células, degeneración que es más rápida sobre la superficie de la herida que está expuesta a infección por hongos, bacterias y parásitos en general, que actuarían como coadyuvantes al curso de la enfermedad.

NORMAN y otros (62) consideran que todas las gomas exudadas son de origen bacteriano y que las diferencias entre aquéllas son consecuencia de las distintas variedades de bacterias causantes de la gomosis. Los hechos no se pronuncian a favor de la anterior opinión, pues ni todas las gomosis son producidas por bacterias, aun cuando las más típicas sean de este origen (cancro bacteriano o gomosis bacteriana), ni es muy probable que la naturaleza de las bacterias influya en las características de la goma, ya que realmente éstas se originan por transformación del almidón y otras sustancias de reserva por acción de enzimas propias del vegetal, independientemente de cuál haya sido la causa desencadenadora de esta transformación; sobre esta última opinión tampoco existe evidencia absoluta.

El problema biológico de la formación de las gomas, en general ha merecido bastante atención en los últimos 50 años, aun cuando queden puntos por aclarar.

El primer caso de gomosis típicamente bacteriana sobre albaricoques, ciruelos, y cerezos, fué observado en 1902 por BRZEZINSKI en Krakow

(62) NORMAN, A. G., *The Biochemistry of Cellulose the Polyuronides, Lignin, etc.*; Oxford (1937); *Ann. Rev. Biochem.*, 10, 65 (1911); HIRST, E. L., *J. Chem. Soc.*, 70 (1942); MANTILL, C. L., *The Water Soluble Gums*, Reinhold, New York (1947).

(Polonia). En 1905 ADERHOLD y RUELAND, encuentran en Alemania una gomosis en cerezos cuyo organismo causante es el «*Pseudomonas spongiosa*». GRIFFIN demuestra igualmente el origen bacteriano de la gomosis de cerezos, producidos según él por el «*Pseudomonas cerasus*», consideración a la que llega igualmente BARSS que considera a dicha bacteria como productora de esta gomosis aún en otros frutales de hueso. Interesantes contribuciones han hecho posteriormente WILSON en California y WORMALD en Inglaterra, éstos últimos sobre ciruelo y cerezo, que han creído encontrar diversas especies bacterianas causantes de gomosis al igual que los autores antes referidos (63). Sin embargo experimentos más recientes realizados con diversas bacterias de las aisladas, cambiando de huéspedes, no han permitido deducir diferencias patogénicas como para seguir considerándolas como especies diferentes, imperando actualmente el criterio de suponer a la «*Pseudomonas syringae*», Van Hall, como causante del cancro bacteriano o gomosis en frutales de hueso. Esta bacteria se caracteriza por producir o segregar un pigmento verde fluorescente y por ser Gran negativa. Si acaso sólo cabe admitir como otra especie productora de gomosis distinta de la anterior, a la «*Pseudomonas mors-prunorum*», Wormald, ya que esta última se caracteriza por no producir pigmento verde fluorescente y por ser Gran positiva.

La «*Ps. syringae*» parásita, por lo menos a 80 especies, de ellas 11 frutales de hueso del género *Prunus*: «*Prunus persica*», «*P. avium*», «*P. cerasus*», «*P. armeniaca*», «*P. domestica*», «*P. mahaleb*», «*P. pumila*», «*P. salicina + munsoniana*» y «*P. simonii*». De estas especies, el cerezo dulce y el melocotonero son las especies más y menos susceptibles, respectivamente, al ataque de esta bacteria; diversas variedades de ciruelo siguen en orden de susceptibilidad al cerezo.

Como se sabe la gomosis puede manifestarse en diversas modalidades, dependiendo de las condiciones climáticas y aún de las reacciones típicas de cada especie a la invasión bacteriana. Ordinariamente la zona invadida por los gérmenes se muestra de color marrón, gomosa y acre. La gomosis puede manifestarse tanto sobre troncos y ramas como sobre otros puntos del vegetal (yemas, hojas, frutos, etc.) aunque sin duda la alteración más característica es la de troncos y ramas. Dicha alteración puede tener variadas consecuencias; en el caso en que por ejemplo una rama esté totalmente circundada por la alteración, ésta deja de desarrollarse ya en la pri-

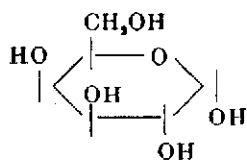
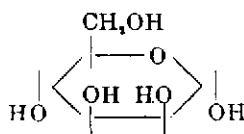
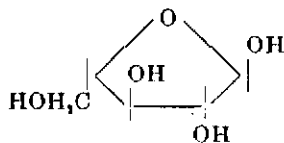
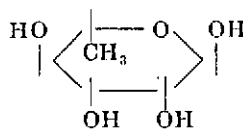
(63) WILSON, F. E., *Hilgardia*, 8, 83-123 (1933). *Idem.*, 12, 250-298 (1938); WORMALD, H., *J. Pomol. Hort. Sci.*, 15, 35-48 (1937); BARSS, H. P., *Ore. Agr. Expt. Sta. Bienn. Crop Pest and Hort. Rep.*, 1913-1914. 2; 224-240 (1915); GRIFFIN, F. L., *Science*, n. s., 34, 615-16 (1911); ADERHOLD, R. y RUELAND, W., *Centra. Bakteriell. Parasitenk.*, 15, 376-77 (1905) y BAZEZINSKI, J., *Acad. Sci. Compt. Rend.*, 134, 1170-73 (1902). [ANDERSON, H. W., *Diseases of Fruit Crops*, McGrawHill Book Company, Inc., New York (1956), pág. 245].

mavera o bien se seca en el verano, aunque haya tenido lugar un temprano desarrollo de hojas. También es muy frecuente observar gomosis que afectan al fruto, llegando la alteración hasta el hueso.

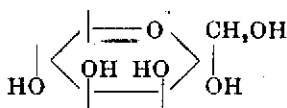
Tanto en su estructura molecular como en la capacidad de producir disoluciones viscosas, las gomas solubles en agua se asemejan mucho a los mucílagos vegetales y es necesario revisar las propiedades de unas y otras, para establecer una diferenciación entre ambos grupos, a pesar de sus respectivas funciones biológicas claramente distintas.

Con relación a su estructura química, ambos grupos son, como se ha dicho anteriormente, polisacáridos formados por residuos de distintos azúcares y ácidos urónicos.

Los azúcares neutros componentes de gomas y mucílagos más frecuentes son: α -D-galactosa, α -D-manosa, α -arabo-furanosa y α -L-ramnosa.

 α -D-galactosa α -D-manosa α -L-áramo-furanosa α -L-ramnosa

En general, el ácido galacturónico es más frecuente en los mucílagos y el D-glucurónico en las gomas, sin que esto sea invariable. A veces se encuentran también azúcares más raros, por ejemplo, la goma del árbol «*Sterculia setigera*» contiene la cetosa D-tagatosa, único caso conocido de su existencia en un producto natural.

 α -D-tagatosa

El estudio de la estructura de numerosas gomas y mucílagos es complicado a causa de la presencia de ciertos azúcares acetilados o metilados, pero contribuye a aclarar algunos de los procesos naturales por los que se originan los distintos azúcares y polímeros, a partir de los productos pri-

marios de la fotosíntesis, que tienen por base la glucosa. Por ejemplo, es ya casi seguro que la transformación de D-galactosa en D-arabinosa no se produce en las moléculas poliméricas, a pesar de la estrecha relación esteoquímica de ambos azúcares; lo mismo puede decirse en cuanto a la transformación D-glucosa en D-xilosa (64). Falta aún por averiguar si se trata de una transformación enzimática directa, a partir de la hexosa monomérica en los ácidos urónicos correspondientes y luego en las pentosas, o si la molécula de hexosa se desintegra primero en triosas, como en la fermentación alcohólica, para reconstruirse después la pentosa.

Hay, pues, muchos motivos para el estudio de estas estructuras complejas, máxime con el aliciente de su semejanza estructural con los polisacáridos bacterianos. Entre los poliurónidos bacterianos que han sido objeto de estudios especiales pueden destacarse los capsulares segregados por los del género *Pneumococcus*, así como los de *Rhizobium radicicola* (65) (66) (67).

Los problemas aquí implicados son, sin embargo, los más difíciles en la rama de la química de los hidratos de carbono; las gomas y mucílagos contienen por lo general eslabones diversos y es necesario descubrir el orden en que éstos se encuentran en la molécula, con lo cual se presentan problemas semejantes a los típicos de la química de las proteínas, como ya dijimos en otro lugar. Por otro lado, los eslabones de hexosa pueden hallarse unidos por enlaces glicosídicos en α o β ; en forma anular piranósica o furanósica; combinarse por sus grupos hidroxilo con uno, dos, tres o cuatro residuos más; etc., etc. Hay por tanto numerosas posibilidades estructurales y el número de residuos pentosánicos y ácidos urónicos es enorme. Afortunadamente se han observado ciertas regularidades que simplifican algo el problema de determinar el lugar de cada eslabón y su estructura.

En la investigación estructural se siguen las normas generales de purificación, así como la hidrólisis ácida a fin de averiguar los azúcares constituyentes y sus proporciones relativas. Por hidrólisis controladas se aíslan oligosacáridos que dan luz para la deducción de agrupamientos de monómeros. Así por ejemplo, de la goma arábiga se han aislado: un ácido aldobiurónico, el 6- β -D-glucuronósido-D-galactosa, la 3- β -D-galactósido-D-galactosa y la 3- β -galactósido-L-arabinosa.

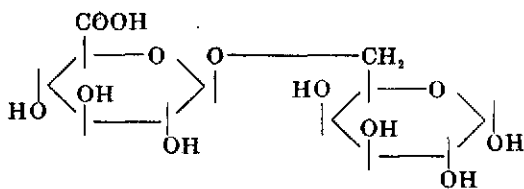
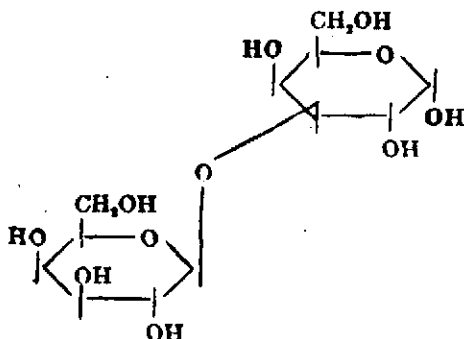
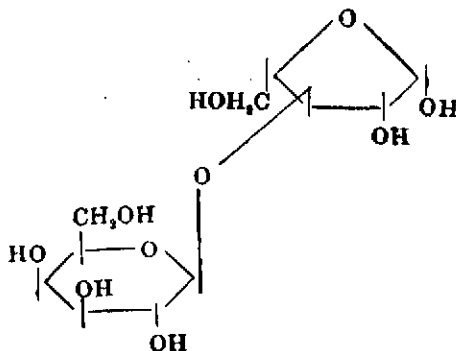
(64) HIRST, E. L., *J. Chem. Soc.*, 522 (1949).

(65) HUTCHIKISS, R. D. y GOBBEL, W. F., *J. Biol. Chem.*, 121, 195 (1937).

(66) HEDELBERGER, M. y HOBBY, G. L., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*, 28, 516 (1942).

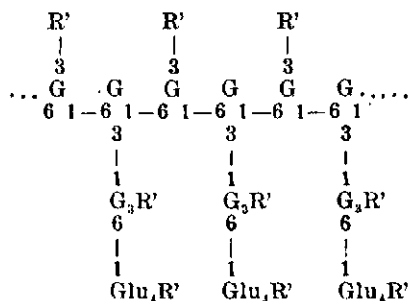
(67) SCHLUCHTERBERG, E. y STACKY, M., *J. Chem. Soc.*, 776 (1945).



6- β -D-glucuronosido-D-galactosa3- β -D-galactosido-D-galactosa3- β -D-galactosido-L-arabofuranosa

Después de una serie de investigaciones SMITH y colegas (68) (69), han propuesto una fórmula para la goma arábiga que consta de un esqueleto lineal de D-galactosa a la que se enlazan otras cadenas de ramnosa, galactosa y glucurónico. El esqueleto galactósico es muy general en las gomas y, como se ha indicado, también la presencia de ácido glucurónico.

(68) SMITH, F., *J. Chem. Soc.*, 1035 (1940).(69) JACKSON, J. y SMITH, F., *J. Chem. Soc.*, 74 (1940).

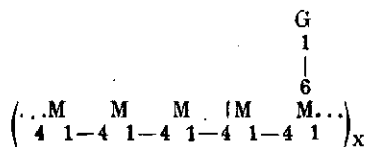


Una de las fórmulas posibles para la goma arábiga.—Eslabones: G = D galactosa; Glu = ácido D-glucurónico; R' = L-ranosa o L-arabofurana, ó 3-β-D-galactósido L-arabofurana.

Tratemos ahora, también ligeramente, los mucílagos vegetales. Estos poseen estructuras moleculares del mismo tipo general. Pueden clasificarse en tres grandes grupos:

- a) Polisacáridos neutros de elevado Pm, que contienen uno o más tipos de azúcar, pero no de ácidos urónicos.
- b) Polisacáridos acídicos o semejantes a las gomas, pero, por lo general, con ácido D-galacturónico.
- c) Polisacáridos de estructura compleja y elevado Pm, con ésteres sulfatados, que se hallan frecuentemente en las algas.

He aquí algunos ejemplos de los distintos tipos: En el primer grupo se encuentra el mucílago de la algarroba (*Ceratonia silicua*) compuesta de restos de manosa (determinada como su hidrazona) y galactosa (determinada por oxidación a ácido múcico) en la proporción 3-4 : 1 (70). HIRST y JONES (71) proponen como una posible estructura para este mucílago la siguiente:



en la que se observa que por cada 5 eslabones de manosa ligados entre sí en 1-4, existe uno de galactosa que se suelda a la posición 6 de un eslabón de manosa.

Entre los del segundo grupo pueden citarse los de las semillas de las distintas especies de *Plantago*. Todos contienen ácido D-galacturónico pero presentan notables diferencias en sus estructuras. Algunos mucíla-

(70) REW, B. W. y GONTNER, R. A., *Arch. Biochem.*, 1, 325 (1943).

(71) HIRST, E. L. y JONES, J. K. N., *J. Chem. Soc.*, 1278 (1948).

gos de este grupo, como el de la semilla de membrillo y mostaza blanca, se dan, en las plantas, combinados con la celulosa.

El estudio de los mucílagos del tercer grupo o «algales» presenta dificultades especiales. Los mejores conocidos son el agar-agar y musgo de Irlanda (*Chondrus crispus*), en los cuales el residuo sulfúrico está sobre la posición 4 de un eslabón galactósico. La estructura del agar la estudiaremos en capítulo aparte con más detenimiento.

Gomosidad.—Es notable que la propiedad de la «gomosidad» se encuentre en muchas sustancias de diversa estructura química; hasta ahora sólo se puede dar una explicación parcial del fenómeno. Probablemente para que una sustancia soluble en agua posea dicha gomosidad debe contener grupos hidróxilos, capaces de permitir puentes de hidrógeno con las moléculas de agua, mientras que, al mismo tiempo, la geometría molecular debe ser tal, que las moléculas no puedan realinearse estrechamente entre sí en un orden regular. Cuando esto sucede, como en el caso de las moléculas filiformes y sin ramificación de la celulosa, el puente de hidrógeno entre moléculas produce una sustancia insoluble que sólo puede ser dispersada por un disolvente con mayor afinidad por los grupos OH.

La mayoría de las gomas y mucílagos contienen estructuras de gran ramificación, cuyos OH están idealmente situados para enlazarse con las moléculas de agua y aún en los casos más simples, no existe la posibilidad de un compacto orden geométrico con enlaces de hidrógeno intermoleculares, como se da en la celulosa. En consecuencia, las gomas permanecen marcadamente hidratadas aunque estén disueltas en concentraciones muy elevadas. No obstante, tienen que haber ciertos enlaces de hidrógeno, intermoleculares, entre las mismas moléculas de la goma (no muy pronunciadas en disoluciones altamente diluidas) que tienden a producir una estructura de creciente rigidez al ir desapareciendo el agua y, es muy probable, que la explicación de las propiedades físicas características de las gomas y mucílagos, se encuentre en la delicada interrelación entre estas reacciones opuestas.

Con esta ligera descripción referente a gomas y mucílagos creemos haber completado el fin que nos habíamos propuesto de presentar una revisión resumida del estado actual del conocimiento sobre los cuatro grandes grupos de poliurónidos que tanta importancia tienen, tanto desde un punto de vista eminentemente científico como práctico. Cumplido esto pasamos a dar cuenta de aquellos de nuestros estudios en el campo de los poliurónidos y que reagruparemos en lo posible, en correspondencia con las clasificaciones a que hemos aludido, en esta parte general introducto-



ria. Como se verá, para nuestros diversos trabajos aunados en esta Memoria, se han utilizado materias primas de fuentes distintas; sin embargo tienen de común el proceder de especies arbóreas taxonómicamente muy relacionadas. Concretamente, nuestros estudios de gomas se han realizado sobre muestras de éstas segregadas por diversas especies y aún variedades de Prunaceas. Debe hacerse la salvedad de otros poliuronidos que también hemos tratado con cierto detenimiento, aunque no sean componentes normales de frutos. Este es el caso del agar-agar o del ácido algínico, mucílagos, que, si bien proceden de las algas, juegan un importante papel en la industria conservera vegetal y por tanto pueden aparecer, en cierto modo, como componentes casi normales en algunos elaborados de frutos, tales como carnes, jaleas y mermeladas.

II

CARACTERIZACION DE ALGUNOS FRAGMENTOS DE LOS POLIURONIDOS QUE INTERVIENEN EN LA TEXTURA DEL ALBARICOQUE «BULIDA» (PORCION CARNOSA Y SEMILLA)

PARTE TEÓRICA

Como es sabido, en los tejidos vegetales en general, y en los que integran los frutos en particular, la textura de los mismos es cambiante con el desarrollo. Sin duda, esto se debe a una serie de variaciones de tipo químico en las substancias responsables de esta textura, lo que nos indujo al estudio de cuáles son tales substancias y, en lo posible, cuáles las variaciones que éstas sufren. Separadamente, hemos estudiado, con este objeto, algunos de los componentes de la porción carnosa y de la semilla del albaricoque «búlida» (que hemos elegido como ejemplo por ser el más típico de los frutos conserveros murcianos).

Como podrá deducirse de la exposición que sigue, nuestro estudio se ha centrado en los componentes de naturaleza poliurónica, pero sobre todo hemicelulosas.

Ya en la parte general se hizo una descripción de la naturaleza de las hemicelulosas y otros poliurónidos en un sentido amplio, aludiendo a la evolución del concepto de éstos, así como a los métodos que se siguen para la identificación y estudio de sus componentes.

Hasta nuestros trabajos no teníamos referencias de que existieran estudios sobre la naturaleza de los compuestos hemicelulósicos en frutos, salvo el de CHANDA, HIRST y PERCIVAL sobre las hemicelulosas de las membranas celulares de la pera (72), pese a que en la bibliografía existen

(72) CHANDA, S. E., HIRST, E. L. y PERCIVAL, E. G. V., *J. Chem. Soc.*, 1240 (1951).

publicaciones sobre las de los más variados orígenes. Si existen algunas referencias a la variación del contenido en hemicelulosas en función del desarrollo, pero sin penetrar en el conocimiento de estructuras. Así por ejemplo, KROTKOV y NELSON (73) estudiando el metabolismo glucídico de la manzanas (variedad *Mc Intosh*) en el árbol y después de recolectadas, establecen seis períodos sucesivos en la vida del fruto, destacando la disminución en el contenido de hemicelulosas, especialmente en el 1.º y 2.º período. En realidad tiene lugar una disminución cuando se consideran porcentajes en peso, mas no así en cuanto a valor absoluto, ya que, como WIDDOWSON (74) tuvo ocasión de demostrar, la cantidad de hemicelulosas por fruto es creciente con el desarrollo.

Por otro lado BARNELL (75) ha estudiado las variaciones en el contenido total de hemicelulosas (considera como tales a la porción extraída por álcalis al 4 %) en el plátano, indicando que el porcentaje de éstas, que en los frutos verdes es del 8-10 %, baja durante la maduración hasta alcanzar del 1-3 %, y destaca a su vez que el almidón y la celulosa sufren igualmente una clara disminución en su porcentaje. Simultáneamente existe un incremento en azúcares sencillos y en ácidos orgánicos, llegando BARNELL (loc. cit. 75) a admitir que el origen de éstos hay que buscarlo en las hemicelulosas, aunque también en la celulosa y almidón. Algunos otros trabajos se ocupan de la variación del contenido en hidratos de carbono, hemicelulosas incluídas, en función de algunos factores externos, sobre todos los que dependen del suelo de cultivo (76) y de las condiciones de temperatura del medio; un número mayor de trabajos puede citarse sobre la influencia que en el contenido hidrocarbonado pueden tener las condiciones de almacenaje en lo que a temperatura se refiere. A título de ejemplo, podemos referir como uno de los más antiguos el de EMMETT sobre peras (77), y entre otros más recientes pueden citarse el de BARNELL (78) comparando el metabolismo de los plátanos a altas y bajas temperaturas, y los numerosos de ULRICH y colegas en Francia, así como los diversos de la *Low Temperature Research Station*, en Inglaterra.

Bastantes más referencias existen sobre pectinas, pero, ordinariamente, los trabajos se han centrado sobre unas cuantas particulares que son las únicas más conocidas (las de manzana, cítricos, etc.). Sobre pectinas de albaricoque sólo hemos encontrado en KERTESZ (79) dos referencias,

(73) KROTKOV, G. y NELSON, V., *Cand. J. Res. C.*, 24, 126 (1946).

(74) WIDDOWSON, E. M., *Ann. Bot.*, 46, 597 (1932).

(75) BARNELL, B. H., *Ann. Bot.*, 7, 1 (1943).

(76) NIGHTINGALE, G. T., ADDONS, R. M. y BLAKE, M. A., *N. Y., Agr. Exp. Sta., Bull.* 494 (1930).

(77) EMMETT, A. M., *Ann. Bot.*, 43, 270 (1929).

(78) BARNELL, H. R., *Ant. Bot.*, 55, 607 (1941).

(79) KERTESZ, Z. I., *The Pectic Substances*, Interscience Publishers, Inc., New York (1951), pág. 292.

una tomada de LAMPITT y HUGHES (80), en la que se fija el contenido péc-tico del albaricoque en 1,03 % (obtienen valores que oscilan entre 0,75 y 1,32 %), expresado en ácido péctico, y otra de MONEY y CHRISTIAN (81) en que se señala un 0,99 %, expresado en pectato cálcico, pero ninguno de ellos se refiere a su naturaleza. Al igual que hemos indicado para hemice-lulosas, la mayoría de los trabajos sobre pectinas han tenido por objeto el determinar la variación del contenido de éstas con el desarrollo, sin adentrarse en cuestiones estructurales. Así por ejemplo, CARRE y HORNE (82) siguieron el curso de las variaciones de los compuestos pécticos sobre manzanas, a lo largo de un año de almacenaje a +1 °C, deducien-do que el contenido en pectinas crece hasta alcanzar un máximo que em-pieza a descender al entrar en la senectud; los restantes componentes pécticos que considera el autor (pectosa, sustancias pécticas de la lamini-lla media y sustancias pécticas totales), descienden todos. FREMY (83) ya opinaba que las frutas verdes contienen principalmente protopectinas, mientras en las maduras éstas se transforman en pectinas, hasta el punto de que es esta transformación una de las características más destacadas del proceso de maduración. Sin embargo, HALLER (84) hizo unas interes-antes observaciones sobre la transformación de sustancias pécticas en las variedades de manzanas *Ben Davis* y *Jonathan*; en efecto, destaca que mientras los frutos se encuentran en el árbol, la protopectina dismi-nuye y el contenido en pectina se mantiene prácticamente constante, y por el contrario, una vez recolectadas, si se almacenan a 0° C, la propor-ción de pectina aumenta, extremándose la disminución en protopectina. ULRICH y colegas (85) hacen un estudio parecido al seguir las variaciones en el contenido en pectina y en protopectina sobre las manzanas de la va-riedad *Calville*, almacenadas a + 10° C, continuando sus observaciones hasta un avanzado grado de senectud, y concluyendo que, en general, durante la maduración la protopectina decrece, mientras que la pectina aumenta, pero que en los frutos «pasados», la pectina se transforma en ácidos pectínicos y continúa hasta ácidos pécticos. La transformación de protopectina en pectina es atribuida por FREMY (loc. cit. 83) y EMMET (loc. cit. 77) a la acción de ácidos orgánicos aunque también se da impor-tancia a la influencia de sistemas enzimáticos; aun existen dudas sobre si el sistema protopectinasa es específico para esta transformación, es más, hay bastantes motivos para admitir que el sistema es exactamente el mis-

(80) LAMPITT, L. H. y HUGHES, E. B., *Analyst*, 53, 32 (1928).

(81) MONEY, R. W. y CHRISTIAN, W. A., *J. Sci. Food. Agr.* 1, 8 (1950).

(82) CARRE, M. H. y HORNE, A. S., *Ann. Bot.*, 41, 193 (1927).

(83) FREMY, E., *Compt. rend. Acad. Sciences*, 24, 784 (1844).

(84) HALLER, N. H., *Journ. agric. Res.*, 39, 739 (1929)

(85) ULRICH, R., RENAC, J. y LAFOND, J., *Rev. gén. Froid*, 445 (1949).

mo que el que motiva la hidrólisis de los ligandos 1-4 de los ácidos pectínicos, o sea, que las enzimas protopectinasa y pectin-poligalacturonasa son una misma cosa. Ciertos cambios en los tejidos vegetales que se atribuían a la acción de la protopectinasa, pueden tener lugar a través de ciertos mecanismos de tipo no enzimático, entre otros, por la acción del peróxido de hidrógeno (86). Concretamente, cuando esta acción es ejercida sobre los ácidos pectínicos, forman productos de degradación que recuerdan en mucho a las hemicelulosas.

Después de lo indicado consideramos que, en general, puede ser de porvenir un estudio de las hemicelulosas de frutales, sobre todo por las continuas discusiones y dudas sobre la intervención de galactanas y arabanos (las clásicas hemicelulosas) en la integración de pectinas, al menos en la estructura conocida como protopectina. Los trabajos de HIRST y JONES (87) mostraron que las arabanos y galactanas que existen en las preparaciones pécticas de manzana, están en mezcla y no en combinación con los poliuronidos pectícos, ahora bien, entre sí se unen, si no por valencias principales, al menos, sí por algún otro tipo de enlace, especialmente por puentes de hidrógeno; calculan incluso la energía de activación necesaria para separar ambas hemicelulosas, concluyendo que, realmente, sólo las arabanos están unidas a las cadenas poligalacturónicas por puentes de hidrógeno, mas no así las galactanas. Hay muchas razones, aunque no enteramente satisfactorias, para admitir que las arabanos y galactanas están adscritas a los materiales pectínicos como impurezas, pero sin formar parte de su estructura; en principio su origen puede buscarse en las pectinas, como antes se ha indicado. No obstante, la cuestión es todavía muy discutible.

A nuestro criterio, es interesante el hecho ya observado en otras hemicelulosas, y que ahora confirmamos también en las hemicelulosas de albaricoque, de que las mismas no son enteramente neutras, sino que en ellas intervienen algunos eslabones de ácidos urónicos, de forma que, aun en la hidrólisis prolongada, forman oligosacáridos ácidos estables, completamente distintos a los trozos identificados por JONES y REID (88) en la escisión enzimática del ácido pectínico en la manzana, y por nosotros mismos ahora en el albaricoque, quedando por tanto descartada la posibilidad de que procedan de las pectinas, e incluso, concretamente, hemos podido comprobar por una escisión más energética, que los urónicos que integran estos oligosacáridos ácidos, de hemicelulosas de frutos, no son ni el ácido galacturónico, como correspondería si se tratara de impurezas

(86) KIRTESZ, Z. I., *Plant. Physiol.*, 18, 308 (1943); DRUHL, H., *Helv. Chim. Acta*, 26, 2002 (1943).

(87) HIRST, E. L. y JONES, J. K. N., *J. Chem. Soc.*, 454 (1939).

(88) JONES, J. K. N., y REID, W., *J. Chem. Soc.*, 1361 (1954); *idem.*, 1800 (1955).

pectínicas, ni ninguno de sus derivados, sino por el contrario derivan del glucurónico.

El hecho de que se hayan podido aislar arabanos a partir de pectinas comerciales por JOSEPH (89) sin pérdida alguna del poder gelificante inicial, aboga igualmente por la afirmación de que las citadas arabanos no pueden llevar en su molécula ningunos de los eslabones que integran el ácido pectínico que, de alguna manera, hubieran podido ser responsables de estos oligosacáridos ácidos.

Nuestros estudios se hicieron sobre albaricoques en diverso grado de desarrollo, pero especialmente sobre frutos maduros y pulpas obtenidas de los mismos. Previamente al estudio de sus poliurónidos, se realizó un análisis completo de la materia prima, consistente en la determinación de: humedad, azúcares (libres y totales), acidez, cenizas y pectocelulosa.

En los primeros experimentos, que son los más repetidos, se partió de pulpa de albaricoques maduros, previamente triturada, sometiéndosela a un tratamiento con etanol hirviendo, de forma que, teniendo en cuenta la humedad propia de la pulpa, la concentración no bajase del 80 %. Después se enfría la mezcla hasta temperatura ambiente, manteniéndose el conjunto en maceración con alcohol de la misma concentración durante unas doce horas. Seguidamente se realizaron dos nuevos tratamientos en forma idéntica, hasta que prácticamente el alcohol queda incoloro. Este tratamiento proporciona una masa esponjosa, blanca, de buen aspecto, que denominamos «pectocelulosa» (*). El alcohol acuoso arrastra una serie de compuestos: azúcares libres, ácidos, aminoácidos, colorantes, etc.; cada uno de estos grupos es objeto de estudios independientes en nuestro Departamento.

La pectocelulosa aislada, se sometió a determinación de pentosanas, según el método de KULLGREN y TYDEN (90); lignina, según RITTER; azúcares por hidrólisis, según BÉNEDIT; cenizas, por incineración hasta peso constante; humedad, por pérdida de peso, y por el método de DEAN STARK; proteínas, según KJELDAHL; urónicos según DICKSON (90 bis) y metoxilo, según VIEBOCK, modificación de A. SOLER (91).

Después de estas determinaciones, se sometió la pectocelulosa a suce-

(*) Más correctamente debíamos llamarle ligno-pectocelulosa, pero como aún este nombre sería inadecuado, ya que junto a estos constituyentes contiene proteínas insolubles, cenizas, etc., utilizaremos en lo sucesivo el nombre de pectocelulosa como expresión para el residuo insoluble en alcohol del 80 % preparado en la fase descrita, sin pararnos en definir su exacta naturaleza

(89) JOSEPH, G. H., *Bull. Natl. Formula y Com.*, 9, 18 (1940).

(90) KULLGREN, C. y TYDEN, *Ingeniörsvetenskaps Akads.*, Haulinger, núm. 94 (1929); SOLER, A. y GUZMÁN, G., *Anales de la R. S. E. de la Fis. y Quím.*, (B) 371 (1951).

(90 bis) DICKSON, A. D. y otros, *J. Amer. Chem. Soc.*, 52, 775 (1930).

(91) SOLER, A. y CARRASCO, A., *Anales R. Soc. Fis. y Quím.*, 50, 99 (1954); VIEBOCK, F. y SCHWAPPACH, Ber., 63, 3207 (1930).

sivos lavados con agua destilada hasta reacción negativa al reactivo de MOLISCH, y a otros ensayos, sobre todo hasta reacción negativa en papel rociado con p-anisidina (91 bis).

Quedaba una porción insoluble con aspecto ligeramente gelatinoso cuando estaba húmeda, que llegó a hacernos pensar pudiese contener todavía algo de pectina. Para salir de dudas, esta porción residual se sometió durante 24 horas, a maceración con SO_4H_2 1N, en frío, no apareciendo nuevas porciones solubles. Por otro lado hicimos un nuevo ensayo invirtiendo el orden de actuación, es decir, primero maceración con SO_4H_2 1N durante 24 horas y a continuación lavados hasta reacción neutra y negativa de azúcares. Después de neutralizar el sulfúrico, filtrar, lavar y llevar a un volumen conocido, evaporamos una parte alícuota, observando, prácticamente, una completa coincidencia de resultados (el mismo peso, el mismo aspecto y los mismos componentes por hidrólisis) al comparar los residuos de evaporación obtenidos con una y otra marcha.

Más definitivas fueron aún las pruebas que se hicieron sobre los hidrolizados de la porción pectocelulósica que era insoluble en la maceración y lavado (holocelulosa + lignina), preparados para su estudio estructural, pues mostraron la ausencia de galacturónico, que es el componente más característico de las sustancias pécticas.

Sin duda, la porción insoluble contenía sobre todo las hemicelulosas, ligadas a celulosa y lignina, ya que estos dos constituyentes no son afectados en la precipitación con alcohol que nos sirvió para la preparación de la pectocelulosa, ni tampoco en los lavados sucesivos (con agua o con ácidos diluidos) que sólo deben arrastrar el material de tipo pectínico soluble y algún otro (proteínas, cenizas...). La ausencia de galacturónico nos prueba además que en la protoestructura de las paredes celulares del albaricoque maduro, no existen ligandos excesivamente rígidos entre pectina y celulosa o entre pectina y lignina, que fuesen invulnerables a la acción del agua, y que, en consecuencia, hubieran reservado por lo menos una ligera parte de grupos galacturónicos para quedar en libertad sólo al actuar un agente hidrolítico más fuerte como el SO_4H_2 1N, en frío o, con más razón, en caliente.

Esto concuerda claramente con el criterio generalizado de que con la madurez disminuye el contenido en protopectina con aumento de la proporción de pectina, propiamente dicha. Como quiera que nuestro trabajo fundamental se realizó sobre las hemicelulosas obtenidas del albaricoque con grado de madurez comercial, es natural que la desintegración de la protoestructura se alcanzara por completo. Prácticamente, obtuvimos los mismos resultados al trabajar sobre pectocelulosas preparadas a partir de

(91 bis) HOUGH, L., JONES, J. K. N. y WADMAN, W. H., *J. Chem. Soc.*, 1702 (1950).

pulpa de albaricoque que habían sido envasadas y sometidas a pasteurización; este hecho nos permitió disponer de materia prima durante todo el año.

Para mayor confirmación del anterior criterio, durante la campaña siguiente sometimos a estudio idéntico las pectocelulosas preparadas de albaricoques en distinto grado de desarrollo; partimos del fruto cuando, ya en su forma bien definida, tenía un diámetro medio de 2,5 cms., e hicimos recolección del mismo árbol de 7 en 7 días durante 5 semanas consecutivas, al cabo de las cuales se completó su desarrollo alcanzando la madurez comercial. Estas pectocelulosas cuando se lavaban para arrastrar la porción pectínica, sufrían una hinchazón menos manifiesta y cedían relativamente menos material que aquéllas de la 5.^a semana. Las aguas de lavado correspondientes a cada una de las pectocelulosas, se reunieron y llevaron a un volumen conocido. Se tomaron porciones iguales de cada una de ellas, evaporaron a sequedad y se hizo una comparación de resultados; el residuo crecía al proceder de frutos de mayor grado de maduración, pero las diferencias no eran excesivamente marcadas.

Las pectocelulosas que sólo habían sido lavadas con agua al someterlas a maceración ácida (SO_4H_2 1N en frío, durante 24 horas) se portaban de manera distinta según el grado de desarrollo de los frutos de que se extrajeron. Así las de albaricoques de la 1.^a y 2.^a semana daban, por la adición de SO_4H_2 , nuevas materias pectínicas, denotando que existía cierta porción de pectinas muy ligadas a las paredes celulares (protoestructura). Las pectocelulosas a partir de la 3.^a semana, prácticamente ceden todo el material pectínico, y otros solubles, en los primeros lavados con agua; en el desarrollo de los frutos la protoestructura va aflojándose sucesivamente, ya sea por acción enzimática o no enzimática, o, lo que es más probable, por una combinación de acciones.

El residuo que quedó en cada caso después de las operaciones de arrastre, como se ha indicado, se sometió a estudio, pero sobre el que hicimos más hincapié fué sobre el procedente de la pectocelulosa de la 5.^a semana, ya que en él no nos interferían con toda seguridad, las pectinas residuales, y puesto que, en definitiva, son los que más nos interesan por sus consecuencias en la industrialización de estos frutos. A este residuo nos referiremos en lo que sigue, ya que la marcha utilizada para los restantes residuos fué análoga en todo. En cuanto a los resultados, la única particularidad observada se debía a la ya citada presencia de pectinas retenidas en las pectocelulosas, correspondientes a la 1.^a y 2.^a semana cuando se lavaron sólo con agua. La pectocelulosa de la 5.^a semana se sometió al siguiente proceso: maceración prolongada seguida de hidrólisis poco forzada (con ácido sulfúrico 1 N a 80° C durante 8 horas); neutralización

parcial del líquido ácido con hidróxido y carbonato de bario, hasta $\text{pH}=3,4$ aproximadamente, en cuyas condiciones la acidez será exclusivamente urónica. En efecto, según el trabajo de HIRSCH (92) a partir de los de PAULI y otros, en el caso del ácido glucurónico, como la constante de disociación es $4,65 \times 10^{-4}$, su pH será 3,33. Igualmente, para el ácido galacturónico, SPEISER, HILLS y EDDY encuentran a 27°C una $K=3,81 \times 10^{-4}$, lo que supone un $\text{pK} = \text{pH} = 3,42$ (93).

El líquido a $\text{pH} = 3,4$ contenía los azúcares ácidos y neutros originados en la hidrólisis, sometiéndosele primero a una suave concentración a vacío y, después, a desionización mediante el paso a través de resinas de cambio iónico: Amberlita IR-120 que retiene los cationes, y Amberlita IR-4B que retendrá aniones y, en consecuencia, también los ácidos urónicos. Una vez desionizada la disolución de azúcares neutros, se concentra hasta siruposo, estando en condiciones de proceder a su estudio cromatográfico. Dicho estudio demostró en la pectocelulosa de la pulpa de albaricoque libre de pectinas, la presencia de xilosa como azúcar más abundante, arabinosa en menor proporción que aquélla, y menores cantidades de galactosa, manosa y glucosa así como dos polímeros de pentosas que por las características comprobadas, resultaron corresponder a xilobiosa y xilotriosa, idénticas a las preparadas primeramente por WHISTLER y DURSO (94) a partir del álamo y confirmadas después por JONES y GUZMÁN en hidrolizados del esparto (loc. cit. 22); también se detecta una leve mancha debida a xilotetraosa.

El fraccionamiento de los distintos oligosacáridos, así como la separación de los monómeros contenidos en los hidrolizados, se consiguió mediante el paso de la mezcla por una columna de carbón-celita según el método de WHISTLER y DURSO (loc. cit. 94) y elución posterior con sucesivas porciones de agua conteniendo concentraciones crecientes de etanol. Los monosacáridos son fácilmente arrastrados por el agua. Los oligosacáridos salen según el orden que corresponde a su grado de polimerización (primeramente los más ligeros), al ir creciendo el grado alcohólico del eluyente. Además de la xilobiosa y xilotriosa logramos separar, aunque en poca proporción, el polímero de grado 4 de la xilosa.

La naturaleza de todos estos oligosacáridos fué comprobada de forma definitiva por a) identificación cromatográfica de éstos como tales y de sus hidrolizados respectivos, b) determinación de algunas características físicas (punto de fusión y forma cristalina) y c) formación de osazonas. En la xilotetraosa sólo pudimos determinar el R_f que guardaba la relación lineal propia de los polímeros homólogos.

(92) HIRSCH, P., *La Revue des Pays Bas*, (1952).

(93) SPEISER, N., HILLS, C. H. y EDDY, C. R., *J. Phys. Chem.*, 49, 328 (1945).

(94) WHISTLER y DURSO, *J. Am. Chem. Soc.*, 72, 667 (1950).

La porción de monosacáridos neutros separados de la columna de carbón por los primeros lavados con agua, constaba de xilosa, arabinosa, manosa, galactosa y glucosa, fraccionándose a continuación en una columna de celulosa y utilizándose, como disolvente de desarrollo, butanol medio saturado de agua (95). Los productos cristalinos se sometieron a varias reacciones de caracterización preparándose incluso las osazonas de todos ellos.

Los azúcares ácidos que quedan retenidos por la columna de Amberlita IR-4B, se eluyen con SO_4H_2 1N. El efluente se lleva a $\text{pH}=3,4$ con hidróxido y carbonato bórico, pasándolo después a través de Amberlita IR-120 para retener los iones bario, quedando así sólo los ácidos urónicos libres, los cuales se sometieron a refraccionamiento en columnas de carbón y de celulosa, según las técnicas de WHISTLER y DURSO y de JONES y otros (96), respectivamente.

Para el fraccionamiento del efluente, tanto en el caso de los azúcares ácidos como en el anteriormente referido, de azúcares neutros, sobre todo al usar columnas de celulosa, nos ha sido esencial la construcción de un colector automático de fracciones que nos dispensará de los enormes precios que tienen los del mercado. Con la colaboración de A. RODRÍGUEZ SUÁREZ construimos uno con fundamento electrónico sobre bases de tiempos para cuatro columnas. Posteriormente hemos construido uno de fundamento mecánico sencillísimo, que podrá estar al alcance del laboratorio más modesto. Dicho colector está basado en el de A. CARRASCO, difiriendo esencialmente de todos los encontrados en la bibliografía; éstos son, unos de base electrónica, en que la cuantía de las fracciones se hace por medida fotoeléctrica de las mismas (97); o por regulación electrónica de tiempos (98); otros de fundamento mecánico, en los que se suele tomar el peso como criterio para el corte de las fracciones (99), (100) a semejanza del nuestro, pero que en ellos gira todo el soporte de colectores, lo que es precisamente evitado en el construido en nuestros laboratorios. En el nuestro sólo gira un distribuidor que, descargando el efluente en cada tubo colector, provoca su progresivo hundimiento hasta un límite crítico en que al bajar de la altura de una lámina tope que lleva dicho distribuidor, éste pasará a situarse sobre el tubo siguiente, que, igualmente, iniciará su hundimiento por el mismo sistema. El conjunto de cuatro series colectoras se halla flotando en un recipiente cilíndrico, construido de cinc,

(95) HOUGH, L., JONES, J. K. N. y WADMAN, W. H., *J. Chem. Soc.*, 1702 (1950).

(96) HOUGH, L., JONES, J. K. N. y WADMAN, W. H., *J. Chem. Soc.*, 2511 (1949).

(97) STEIN, W. H. y MOORE, S., *J. Biol. Chem.*, 176, 337 (1948).

(98) HOUGH, L., JONES, J. K. N. y WADMAN, W. H., *J. Chem. Soc.*, 2511 (1949).

(99) PHILIP, D. M., *Nature*, 164, 544 (1949).

(100) SANDERSON, E. S., *Anal. Chem.*, 944 (1954).



conteniendo agua hasta la altura deseada; tanto esta altura del agua, como la del tope en el distribuidor, se regula a voluntad a fin de lograr fracciones de la cuantía deseada.

Una vez realizado el corte de fracciones se procede a la selección de las mismas, para lo cual se ensayan mediante cromatografía de papel, gotas de tubos a sucesivos intervalos, uniéndose todas aquellas fracciones que contienen el mismo componente.

La fracción correspondiente a los ácidos urónicos se nos mostró por cromatografía en papel como heterogénea, detectándose por lo menos siete componentes. Una vez concentrada hasta consistencia de jarabe, se dispuso sobre las capas superiores de una columna de carbón - celita según la técnica de WISTLER y DURSO, pasando agua, alcohol del 5 % y ácido acético al 50 %, sucesivamente. La 1.^a fracción que resultó la más abundante, estudiada cromatográficamente, estaba formada por cuatro componentes los cuales eran los más veloces de la mezcla, moviéndose el más rápido a la misma velocidad que la ramnosa. La fracción eluída por el alcohol está formada por un urónico que se mueve a la misma velocidad que la glucosa y la última elución realizada con ácido acético dió una mezcla de 3 urónicos distintos que se mueven a pequeñas velocidades, entre los que predomina uno que lo hace a velocidad intermedia entre xilobiosa y xilotriosa.

El siruposo procedente de la fracción eluída con agua, se somete posteriormente a un refraccionamiento en columna de celulosa, haciéndose esta vez la elución con butanol : fórmico : H₂O (50 : 1 : 5), recogándose 350 fracciones por uso del colector automático anteriormente descrito. Tomando muestras de los tubos de 5 en 5, se identificaron por cromatografía las fracciones aisladas, resultando 5 compuestos distintos: uno, ya citado antes, que se movía a la misma velocidad que la ramnosa; otra fracción, formada por un solo compuesto, que se movía a la misma velocidad que la xilosa, pero aislado en tan escasa proporción que no intentamos de momento su estudio; un urónico que se movía a la misma velocidad que la glucosa, idéntico al compuesto aislado por elución con alcohol al 5 %, al que se le unió; y finalmente, dos fracciones pequeñas, una de las cuales, la más rápida, se trataba del compuesto más abundante de los separados en la columna de carbón con ácido acético, reuniéndose ambas fracciones y sometiéndoselas a un tercer fraccionamiento.

Para esta separación, también se utilizó una columna de celulosa, realizándose la elución con el mismo disolvente [butanol : fórmico : H₂O (50 : 1 : 5)], que antes, recogándose 360 fracciones, lográndose localizar tres compuestos distintos; se pudo separar el más abundante, siendo objeto de estudio por nuestra parte, no así los otros dos compuestos los cua-

les aparecen juntos aún después de un número elevado de fracciones, por lo que renunciamos a su separación.

Por tanto los compuestos aislados, objeto de estudio en el presente trabajo fueron: 1) el urónico que se movía a la velocidad de la ramnosa, 2) el urónico eluído con alcohol al 5 % junto con la fracción más abundante de las separadas en la primera columna de celulosa y 3) el urónico separado en el segundo fraccionamiento en columna de celulosa. Estos dos últimos compuestos, como posteriormente se verá, resultaron ser ácidos aldobiurónicos.

Sobre siruposos o fracciones cristalinas, algo higroscópicas del primero y de estos dos últimos aldobiurónicos, procedentes del fraccionamiento en columnas, se hicieron diversas pruebas tendentes a caracterizarlos. Vueltas a cromatografiar en papel cada una de estas fracciones daba una sola mancha de color rojo cereza y forma de corazón, lo que confirmaba que las fracciones separadas eran puras. Una se movía a la velocidad de la ramnosa, otra a la de la glucosa y otra más lentamente, entre las velocidades de la xilobiosa y xilotriosa. A estos tres compuestos les llamaremos en adelante, para hacer más simple su denominación, U_I , U_{II} y U_{III} respectivamente.

Sobre el compuesto U_I se hicieron diversas pruebas tendentes a caracterizarlo. Por cromatografía en papel con distintos disolventes y reveladores, así como por la forma y color de la mancha, velocidad de la misma, etc., se dedujo claramente se trataba de un ácido urónico metilado, ya que la posibilidad de que fuese una lactona quedó eliminada al revelar con reactivo específico de tales sustancias a base de clorhidrato de hidroxilamina y KOH (101). Por disponer de pequeña cantidad de materia, no pudimos hacer determinaciones de tipo químico que nos ayudasen a su identificación, pero con su analogía con los componentes urónicos ya detectados en otras sustancias con cierto parecido (102) sospechamos se trataría de un metil urónico siendo el más probable el 4-metil-D-glucurónico (*). Se repitieron los cromatogramas en condiciones muy bien controladas, comparando con los datos bibliográficos, obteniendo como R_x definitivos en el disolvente acetato de etilo : ácido acético : ácido fórmico : agua (18 : 3 : 1 : 4) el valor 1,37, a 25° C, siendo 1,38 el dato encontrado en la bibliografía, para el 4-metil-D-glucurónico, en el mismo disolvente.

El compuesto U_{II} , cuando se sometía a una hidrólisis más enérgica (SO_4H_2 1N en tubo cerrado a 110° C durante 15 horas) daba xilosa y una

(101) ABDEL-AMER y SMITH, E., *J. Am. Chem. Soc.*, 73, 5859 (1951).

(102) CHANDA, S. K., HIRST, E. L. y PERCIVAL, E. G. V., *J. Chem. Soc.*, 1240 (1951).

(*) En este y otros casos análogos se sobreentiende que nos referimos al 4-O-metil... compuesto; habiendo utilizado indistintamente una u otra nomenclatura.

mancha de color rojo cereza debida a un ácido urónico, que se movía a gran velocidad y que se identificó también como 4-metil-D-glucurónico.

El compuesto U_{III} sometido al mismo tratamiento, daba también xilosa y dos manchas pequeñas, una de color rojo cereza, que se movía a la misma velocidad que el ácido glucurónico y otra de color rojo ladrillo, que lo hace a la velocidad de la glucurona, esta última en menor proporción. Se tuvo la certeza de que esta última substancia se trataba de una lactona al revelar los cromatogramas realizados con tal fin, con revelador específico de tales substancias. Es sumamente probable que en la hidrólisis desaparezcan la mayor parte de los grupos COOH y de ahí la mayor proporción aparente de la xilosa.

Una muestra del aldobiurónico U_{II} y otra del U_{III}, ambas por separado, se trataron con metanol en presencia de ClH (al 2 %) para esterificar los grupos urónicos y formar simultáneamente los metil glicosidos. Es posible que en esta etapa, tenga lugar simultáneamente una metanolisis parcial del enlace glicosídico entre eslabones, lo cual no entorpece nuestra marcha, ya que ése es nuestro propósito final. A continuación se someten a reducción con H₂Al Li (103) en presencia de tetrahidrofurano, con lo cual, los respectivos grupos éster pasan a alcohol, manteniéndose los grupos metilo glicosídicos situados sobre el asiento del grupo reductor.

Las disoluciones de los correspondientes disacáridos se desionizan pasándolas por columnas de resinas intercambiadoras. Amberlita IR-120 y Amberlita IR-4B. Se concentran a baja temperatura hasta consistencia siruposa e hidrolizan con SO₄H₂1N, con lo que se escinde el total de grupos glicosídicos existentes, inter e intramolecularmente, observándose que el disacárido del aldobiurónico U_{II} daba manchas de xilosa y 4-metil glucosa, y el del aldobiurónico U_{III} partes prácticamente iguales de xilosa y de glucosa, todos los cuales fueron identificados de manera muy clara por cromatografía en papel.

Para determinar la posición por la que se une la xilosa a uno y otro ácido se procedió a la metilación total de ambos biurónicos, para lo cual se utilizó SO₄(CH₃)₂ en medio alcalino, renovando el agente de metilación y fortaleciendo la basicidad del medio en cada nueva operación, durante tres veces consecutivas. Para conseguir una metilación más completa, se hicieron todavía otras tres operaciones con reactivo de PURDIE (*). Tanto el producto totalmente metilado procedente del compuesto U_{II} como el correspondiente del compuesto U_{III}, se sometieron a dos procedimientos distintos de hidrólisis. En uno de ellos el U_{II} se somete a hi-

(*) ICH₃ en presencia de Ag₂O.

(103) LYTCHOL, B. y TRIPLET, S., *J. Chem. Soc.*, 1983 (1950); A'DAMS, G. A. y BISHOP, C. T., *J. Am. Chem. Soc.*, 78, 2842 (1956).

drólisis directa, primero con ClH en metanol, durante un tiempo prolongado y después con ClH acuoso, ya que existen antecedentes de que cuando se intenta la hidrólisis con ácidos acuosos, el rendimiento es inferior. Se formaron de esta manera dos monosacáridos, uno de carácter ácido muy metilado a juzgar por su gran velocidad, y otro neutro. El derivado correspondiente al compuesto U_{III} , sometido al mismo tratamiento, daba el mismo urónico que el compuesto anterior y un azúcar neutro distinto. Para la identificación de cada uno de estos compuestos, cada uno de los aldourónicos U_{II} y U_{III} por separado, después de metilados e hidrolizados con ClH metanólico, como ya hemos dicho, se neutralizan con $Ba(OH)_2$ extrayendo con $CHCl_3$ primero en medio neutro y después una segunda extracción en medio ácido con el mismo disolvente. En la 1.ª, el cloroformo arrastra el azúcar neutro y en la 2.ª, la fracción ácida, estudiándose por separado.

La fracción ácida se trata con ClH metanólico, con lo cual se logrará la metilación de los grupos ácido y semiacetalico que deben estar libres. Se neutraliza con CO_3Ag_2 y reducen los filtrados con H_2AlLi , concentrándose hasta siruposo y cromatografiando en papel. Tanto en el derivado del U_{II} como del correspondiente a U_{III} dió el mismo compuesto, el 2-3-4 trimetil D-glucosa, fácilmente identificable por sus R_G en distintos disolventes.

La fracción neutra, estudiada cromatográficamente, resultó estar constituida en el derivado de U_{II} por la 3-4 dimetil-D-xilosa y en el derivado de U_{III} por la 2-4 dimetil-D-xilosa. La 2-4 y 3-4 dimetil-D-xilosa se pueden identificar y diferenciar perfectamente, tanto por la medida absoluta de sus R_G como por comparación con muestras tipo obtenidas por nosotros. En el disolvente etanol : benceno : agua (47 : 169 : 15) se movían ambas muestras con un $R_G = 0,31$ y $0,47$, respectivamente, a $25^\circ C$; en cambio en el disolvente butanol : etanol : agua (40 : 11 : 19) aparentaban ser idénticas, puesto que mostraban prácticamente el mismo R_G (0,73-0,74). Este último disolvente nos sirvió para demostrar claramente que no se trataba de la 2-3 dimetil-D-xilosa, ya que ésta tiene un R_G evidentemente distinto del que muestran la 2-4 y 3-4 dimetil-D-xilosa.

Estos resultados permiten deducir que el enlace entre el urónico y la xilosa se hace, para el compuesto U_{II} a través del C_2 de la xilosa, mientras que en el U_{III} lo hace a través del C_3 . La aparición en uno y otro caso del mismo urónico permiten asegurar que el carbono que intervenía en la unión glicosídica sería el mismo, precisamente el C_1 , ya que en otro caso aparecería un urónico con algún OH libre, aparte del semiacetalico. En cambio, el hecho de que los urónicos trimetilados procediendo de U_{II} y U_{III} sean ahora idénticos no autoriza a admitir que lo fueran



en el oligosacárido original, ya que al haber existido la fase intermedia de metilación, se han igualado los eslabones; en efecto, recuérdese que al hacer la hidrólisis directa de cada uno de los oligosacáridos, se obtienen eslabones ácidos distintos: del U_{II} el 4-metil-D-glucurónico y en el U_{III} el ácido glucurónico.

El otro procedimiento a partir de los productos totalmente metilados de los aldobiurónicos U_{II} y U_{III}, consiste en la reducción con H₂Al Li, con lo cual se pasa el grupo éster carboxílico de cada uno a grupo alcohol, obteniéndose en consecuencia disacáridos totalmente metilados.

A partir de este compuesto hidrogenado se siguen dos caminos diferentes: 1) metilación seguida de hidrólisis y 2) metanolisis seguida de hidrólisis.

En el primer proceso una parte del derivado metilado y reducido, se somete a varias metilaciones sucesivas con reactivo de PURDIE, con lo cual se obtendrá el derivado totalmente metilado; a continuación se hidrolizan con SO₄H₂1N y someten a estudios cromatográficos los productos hidrolíticos formados, resultando ser dos azúcares neutros, identificados cromatográficamente como 3-4 dimetil-D-xilosa y 2-3-4-6 tetrametil-D glucosa para el derivado de U_{II}, y 2-4 dimetil-D-xilosa así como el mismo azúcar tetrametilado para los correspondientes al derivado U_{III}. La 2-3-4-6 tetrametil-D-glucosa se identificó claramente por su R_G en el disolvente butanol saturado de agua.

El resto de los disacáridos neutros resultantes en la reducción con H₂Al Li, separados por extracción con CHCl₃, se refluaron durante un tiempo prolongado (12 horas) con ClH metanólico al 8 %; estas condiciones son las típicas de FISCHER para glicosidación de monosacáridos, en el caso de disacáridos, como en el que nos ocupa, provocarán una escisión previa del enlace eter óxido entre los dos eslabones de monosacáridos, formándose simultáneamente el glicósido correspondiente sobre el grupo semiacetálico que se libera en la escisión. Seguidamente, y también a reflujo, se hidroliza con ClH acuoso, 0,5 N, durante 10 horas, con lo que la hidrólisis queda completa.

Tras desionización con resinas y concentración a vacío se identificaron cromatográficamente los monosacáridos correspondiente. Del disacárido obtenido de U_{II} resultaron los azúcares previsibles 3-4 dimetil-D-xilosa y 2-3-4 trimetil-D-glucosa, que fácilmente se identificaron en papel por sus R_G en distintos disolventes. Ambos compuestos pudieron separarse puros sobre una hoja de papel por distribución uniforme del siruposo a lo largo de la línea de partida, localización posterior de las bandas por revelado de tres tiras longitudinales (dos de los bordes del papel y una del centro) y elución de las zonas correspondientes mediante agua, según

el método de FLOOD, HIRST y JONES (104). De la delicadeza para extender el siruposo depende en gran parte la efectividad de la separación.

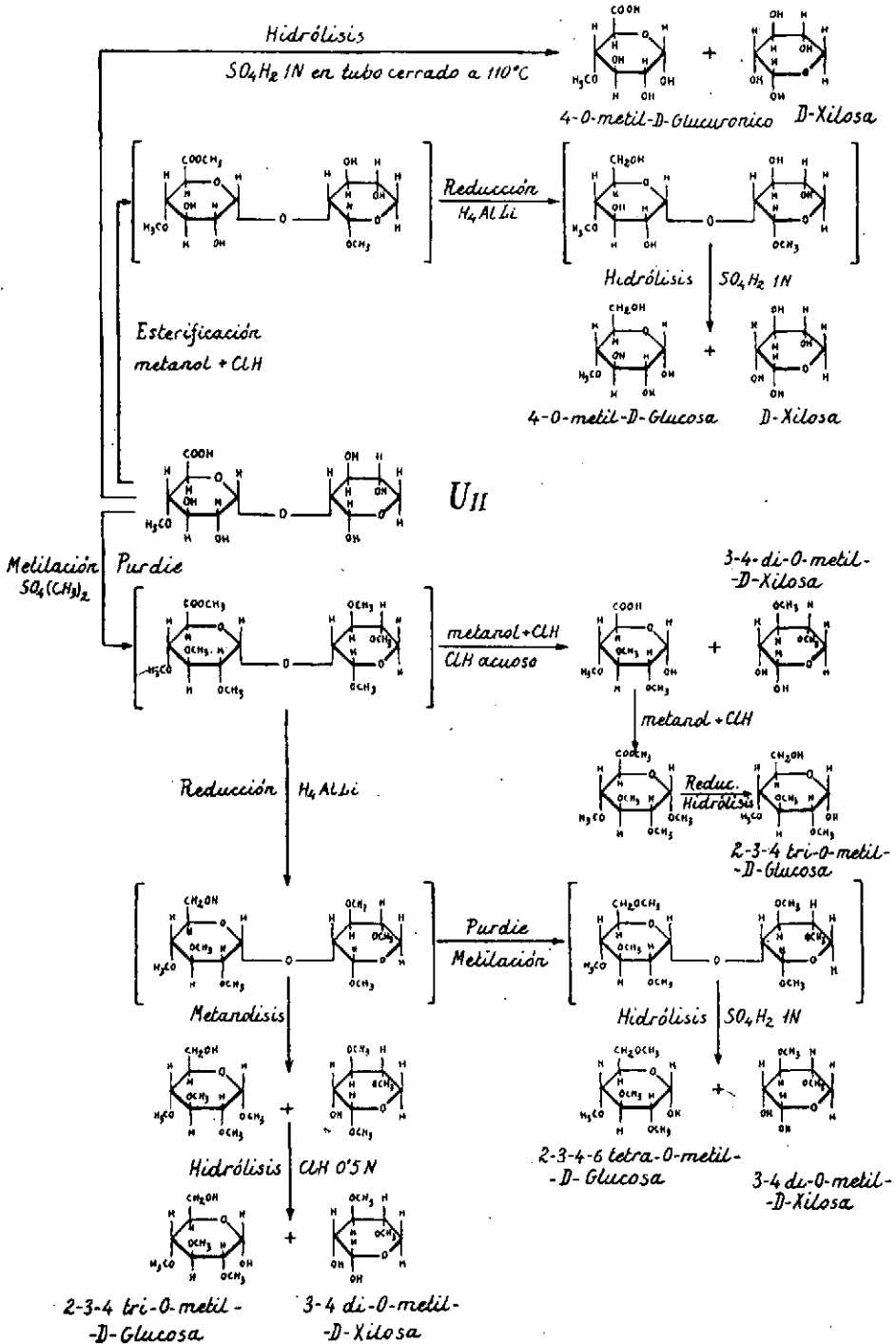
El disacárido totalmente metilado, correspondiente al aldobiurónico U_{III} , sometido a una idéntica hidrólisis da, como era de suponer, dos azúcares metilados: la 2-4 dimetil D-xilosa así como 2-3-4 trimetil D-glucosa, determinando sus respectivos R_G , confirmándose aquí los resultados obtenidos anteriormente.

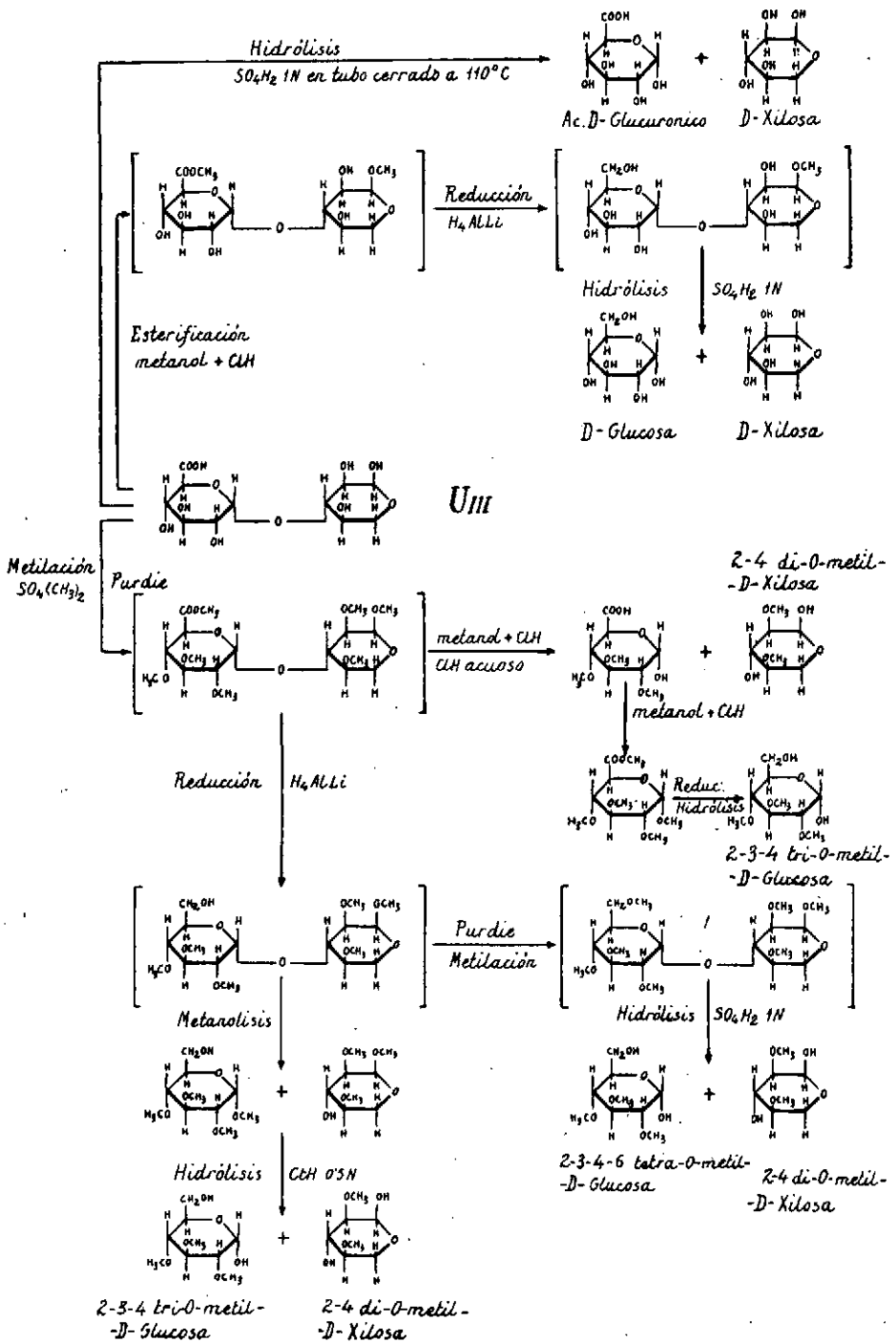
De todos estos experimentos se confirma que en el aldobiurónico U_{II} la unión se hace entre el C_1 del metil glucurónico y el C_2 de la xilosa, en tanto en el aldobiurónico U_{III} la unión se hace entre el C_1 del glucurónico y el C_3 de la xilosa.

En las líneas adjuntas se esquematizan las distintas etapas a que se han sometido los compuestos U_{II} y U_{III} , a los que se asignan las estructuras que responderían a los productos finales obtenidos según las diferentes marchas. Como se verá, al compuesto U_{II} se le atribuye la estructura de 2-(4-O-metil-D-glucuronósido)-D-xilosa y al U_{III} , la de 3-(glucuronósido)-D-xilosa. Se trata de dos ácidos aldobiurónicos relativamente frecuentes entre los productos de hidrólisis de algunas hemicelulosas, pero que sólo han sido identificadas con certeza en estos últimos años, en los que otros varios aldobiurónicos han sido caracterizados. En la bibliografía se observa una cierta regularidad en cuanto a los puntos de enlace entre los eslabones en aldobiurónicos en general; así en los derivados del ácido 4-metil D-glucurónico, que concretamente es uno de los que nosotros tenemos, la unión con la xilosa se hace siempre con el C_2 de ésta, hecho que se sigue cumpliendo en nuestro compuesto U_{II} . Por el contrario, al ser uno de los eslabones el ácido glucurónico, la unión con la xilosa puede hacerse por el C_2 , C_3 ó C_4 , apareciendo en la bibliografía numerosos casos de cada uno de estos enlaces: con el enlace en C_2 (105), (106); en C_3 (107), (108), (109), (110), (111) y C_4 (112). En nuestro caso el compuesto U_{III} resultó tener la unión por el C_3 de la xilosa, hecho que concuerda con la identificación de un aldobiurónico idéntico al nuestro en las hemicelulosas de la pera [loc. cit. (72)], es decir procedentes de un manantial parecido, ya que a su vez es el único caso de estudio estructu-

-
- (104) FLOOD, A. E., HIRST, E. L. y JONES, J. K. N., *J. Chem. Soc.*, 1679 (1948).
 (105) WHITE, E. V., *J. Am. Chem. Soc.*, 76, 4906 (1954).
 (106) ADAMS, G. A. y BISHOP, C. T., *J. Am. Chem. Soc.*, 78, 2842 (1956).
 (107) BISHOP, L. T., *Can. J. Chem.*, 31, 134 (1953).
 (108) ASPINALL, G. D. y MAHOMED, R. S., *J. Chem. Soc.*, 1731 (1954).
 (109) GHANDA, S. K., HIRST, E. L. y PERGIVAL, E. G. V., *J. Chem. Soc.*, 1240 (1951).
 (110) Mc ILROY, R. J., *J. Chem. Soc.*, 121 (1949).
 (111) BISHOP, C. T., *Can. J. Chem.*, 33, 1521 (1955).
 (112) WHISTLER, R. L. y Mc GILVRA, D. I., *J. Am. Chem. Soc.*, 77, 2212 (1955).







ral reciente sobre hemicelulosas de frutas del que hemos encontrado referencia, como ya se dijo.

Lo que en los gráficos adjuntos queda esquematizado es que las estructuras atribuidas responden en todos los casos a los productos finales conseguidos. Como se ha trabajado en escala microanalítica no se han pretendido identificar los productos intermedios de las diversas etapas, los cuales, en los gráficos, han sido cerrados entre corchetes.

Después de la hidrólisis suave, que afectaba solamente al material que hemos considerado como hemicelulósico, queda un residuo que consta especialmente de celulosa y lignina. El mismo se somete a hidrólisis en las condiciones de determinación de lignina, con SO_4H_2 del 72 % primeramente, a fin de conseguir una degradación de la celulosa hasta polímeros de menor grado, tipo dextrinas, y a un reflujo posterior de 6 horas, diluyendo el sulfúrico hasta hacerlo del 3 %. De esta manera se consiguen dos fines: por un lado, se determina la proporción de lignina en la «pectocelulosa despectinada»; por otro, indirectamente, se determina la de celulosa en función de los azúcares liberados.

Como era de prever, se observan principalmente, manchas que corresponden a glucosa y sus polímeros; se identifican hasta el de 4 eslabones (como resultado de la hidrólisis de la celulosa), junto a algunas manchas debidas a componentes de hemicelulosas que no se habían separado de una forma completa en la prehidrólisis; así por ejemplo, aparecía una cierta proporción de xilosa, lo que es natural desde que se sabe que el tratamiento de SO_4H_2 1N no es suficiente para una hidrólisis exhaustiva, mientras ahora las condiciones son más enérgicas.

Igualmente se ha estudiado la fracción separada en los arrastres acuosos a que se sometió la pecto-celulosa antes de hidrolizarla, fracción que podemos llamar pectínica soluble. Sometida a ensayos cromatográficos, tanto en disolventes ácidos como básicos, aparecía siempre una mancha en la línea de partida que correspondía, sin duda, a polímeros de alto peso molecular.

Posteriormente, se concentraron estas aguas a vacío, y sobre una primera porción del siruposo resultante, se agregó un volumen igual de alcohol, precipitando así el material pectínico; nueva concentración y precipitación permitió recuperar más pectinas, de las que se determinó el contenido en metoxilo (*). Otra posición del mismo siruposo (que seguía dando en los cromatogramas una mancha en la línea de partida), se hidrolizó según la misma técnica que se ha descrito para la porción hemicelulósica.

(*) Algunas de estas determinaciones se hicieron por la Sección de Microanálisis del Int. de Química «Alonso Barba» del C.S.I.C., en Madrid, expresando desde aquí nuestro agradecimiento.

ca; seguía manteniéndose en la línea de origen una buena parte del material sin emigrar, si bien otra porción del mismo avanzaba, haciéndolo paralelamente a una muestra tipo de ácido galacturónico, pudiendo descartarse la presencia de azúcares neutros (*), salvo galactosa que aparece en escasa proporción, así como una débiles manchas correspondientes a oligosacáridos. No es extraño el que la hidrólisis no haya afectado a todo el material, puesto que como se sabe, el rendimiento en la hidrólisis ácida es bastante bajo; en cambio hicimos un ensayo con pectinasa dando resultados más satisfactorios, como queda claramente de manifiesto por la mayor intensidad de la mancha de galacturónico y correspondiente disminución en la inmóvil, al estudiarla cromatográficamente. Las primeras aplicaciones de las técnicas cromatográficas al control de hidrolizados de pectinas se debe a REID (113) así como a JERMYN y TOMKINS (114).

La obtención de galacturónico por métodos enzimáticos es realmente ya un proceso industrial. Así por ejemplo la patente norteamericana de PASTERNAK y REGNA (115) se refiere a esta cuestión. Nosotros hemos seguido un procedimiento mixto, basado en los trabajos de ROBOZ y KERTESZ (116) en el que la hidrólisis enzimática sigue a una prehidrólisis ácida.

Para aislar el ácido galacturónico producido utilizamos el procedimiento de FRUSH e ISBELL (117) en el que se aprovecha la insolubilidad de la sal doble del galacturónico con el Sr y Na (también es posible el uso de la sal doble de Ca y Na); la descomposición con SO_3H_2 de la sal doble y el aislamiento del ácido es inmediata. El ácido galacturónico obtenido era idéntico en su comportamiento cromatográfico, a una muestra tipo, en varios disolventes.

Simultáneamente a los estudios cromatográficos, se hicieron otros ensayos más clásicos del ácido galacturónico. Por su simplicidad se ensayaron en primer lugar, el de EHRlich, a base de subacetato de plomo (118), y por su interés histórico el de TOLLENS con nafto-resorcina (119). En este último se tuvieron en cuenta las modificaciones de NEUBERG y SANEYOSHI (120) así como las debidas a NEUBERG y KOBEL (121). En nuestro

(*) La porción que precipitaba con alcohol, daba por hidrólisis exactamente los mismos componentes que cuando dicha hidrólisis se hacía sobre el extracto total.

(113) REID, W. W., *J. Sci. Food. Ag.*, 1, 234 (1950).

(114) JERMYN, M. A. y TOMKINS, R. G., *Biochem. J.*, 47, 437 (1950).

(115) PASTERNAK, R. y REGNA, P. P., *U. S. Pat.* 2, 338-534 (1944).

(116) ROBOZ, E. y KERTESZ, Z. I., no publicado (1948), ref. en KERTESZ, *The pectic substances*, loc. cit., pág. 21.

(117) FRUSH, H. L. y ISBELL, H. S., *J. Research Natl. Bur. Standards*, 33, 401 (1944)

(118) EHRlich, F., *Ber.*, 65, 352 (1932).

(119) TOLLENS, B., *Ber.*, 41, 1788 (1908).

(120) NEUBERG, C. y SANEYOSHI, S., *Biochem. Z.*, 36, 56 (1911).

(121) NEUBERG, C. y KOBEL, M., *Biochem. Z.*, 243, 435 (1931).

caso, como la disolución constaba especialmente de moléculas de ácido galacturónico, el método de la nafto-resorcina resultó satisfactorio, puesto que faltaban los azúcares neutros, los cuales, cuando se encuentran en gran proporción, pueden enmascarar la reacción.

ESTUDIO DE LA SEMILLA

Un estudio paralelo al realizado con la porción carnosa del albaricoque «búlida» hicimos con sus semillas.

A las semillas en bruto se les determinó humedad, cenizas, proteínas, lignina, azúcares totales por hidrólisis, pentosanas, carbónico y metoxilo. Antes de proceder a la preparación de pectocelulosas de estas semillas se les separó la grasa, parcialmente por expresión y el resto por extracción con disolventes en un aparato de SOXHLET. La porción de aceite suponía un 42,1 %, como valor medio.

El aceite de albaricoque es objeto de estudios especiales en nuestro Departamento, habiéndose hecho ya algunas publicaciones sobre el mismo (121 bis). Por otro lado, la torta residual es un material valioso en todos los órdenes (contiene 6,2% de nitrógeno, 2% de P_2O_5 , 1% de K_2O , etc., según el citado trabajo de A. SOLER y F. COSTA).

En los primeros experimentos se trituraron las almendras, incluido el tegumento, pero en lo sucesivo se separó éste fácilmente por maceración con agua durante un cierto tiempo. De esta manera se evitaba, por un lado, el teñido del aceite y, por otro, la torta residual quedaba con un aspecto más agradable, lo que luego repercutía también en la pectocelulosa obtenida. Igualmente pensamos que, de esta manera, se evitarían interferencias en los resultados, ya que, era probable que esta película tegumentosa tuviera una composición distinta a la de la almendra propiamente dicha.

La torta residual de extracción, correspondiente a las semillas sin tegumentos, se sometió a un proceso de desamigdalización enzimática, favoreciendo la acción de la propia emulsina de la semilla y arrastrando los volátiles con vapor de agua. Desamigdalizada la torta se procedió a la preparación de «pectocelulosa» en la forma en que describimos para el caso de la pulpa. Prácticamente quedó insoluble en alcohol toda la semilla, como demuestra el rendimiento obtenido del 99,67 %, es decir, que la pectocelulosa obtenida está integrada por una serie heterogénea de com-

(121 bis) SOLER, A. y COSTA, F., *Bol. Inf. Centro Invest. Frutos y Conservas*, n.º 2, pág. 17 (1956).

ponentes (proteínas, lignina, polisacáridos neutros, etc.) todos ellos precipitables por el alcohol.

Un estudio de la emulsina de albaricoque en comparación con tres emulsinas de almendra de diferente pureza fué hecho en el año 1932 por HELFERICH, y colegas (122), resultando ser prácticamente idénticas, en cuanto a su actividad de β -glucosidasa.

Las cuatro principales glicosidasas de la emulsina de almendra (β -glucosidasa, β -galactosidasa, α -galactosidasa y α -manosidasa) son probablemente también responsables de la hidrólisis de los pentósidos y de algunos otros glicósidos. De los pentósidos, los L-arabinósidos, los β -D-xilósidos y los α -D-lixósidos se hidrolizan por la propia emulsina. Los D-arabinósidos y β -L-xilósidos no se afectan y los D- y L-ribósidos y L-lixósidos no han sido ensayados. Una característica muy importante de la emulsina, es la de contener enzimas que hidrolizan los ácidos nucleicos a nucleósidos, hasta el punto de que puede usarse para la preparación de éstos (122 bis); como se sabe, los nucleósidos están integrados por purinas o pirimidinas en combinación con D ribosa o con la 2-dexosi-D-ribosa. Igualmente se aprovecha la actividad de la emulsina para la preparación de ribosa de manantiales naturales; así por ejemplo, emulsinas preparadas de almendras, semillas de alfalfa y muchas semillas germinadas, sirven para obtener nucleósidos, los cuales a su vez por hidrólisis ácida dan ribosa. Esta actividad nucleotidasa de la emulsina es otro caso de coincidencia de localización de enzimas y sustratos, ya que, aunque los ácidos nucleicos estén ampliamente distribuidos, es un hecho que en las semillas se encuentran más abundantes, como por ejemplo, FISHER y JOHNSON (123), demostraron para la semilla de arveja. Precisamente, suponemos que la ribosa que detectamos entre los productos de hidrólisis de la pectocelulosa de tegumento y almendra de semilla de albaricoque, procede de estos ácidos nucleicos, aun cuando la ribosa también es componente fundamental de vitaminas y coenzimas, así por ejemplo la coenzima I o *codehidrogenasa I*, que es una difosforidín nucleótido, produce por hidrólisis con emulsina, un N-ribósido de la nicotinamida (123 bis).

Posteriormente se estudiaron los tegumentos separados de las semillas en los que se determinó humedad, lignina, azúcares por hidrólisis, pentosanas y cenizas. De estos tegumentos se preparó pectocelulosa en la for-

(122) HELFERICH, B., GOOTZ, R. y SPARNBERG, G., *Z. Physiol. Chem.*, 205, 201 (1932) [Ref. PIGMAN, W. M. y GOEPP, R. M. Jr., *Chemistry of the Carbohydrates*, Academic Press Inc., Publishers New York, N. Y., pág. 491 (1948)].

(122 bis) BREDERECK, H., MARTINI, A. y RICHTER, F., *Ber.*, 74, 694 (1941).

(123) FISHER, H. J. y JOHNSON, T. B., *J. Amer. Chem. Soc.*, 54, 2038 (1932).

(123 bis) SCBLENK, F., *Arch. Biochem.*, 3, 93 (1943).

ma usual, determinándose el rendimiento en ésta que se fija en 89,3 %.

Tanto sobre la pectocelulosa procedente de los tegumentos como sobre la preparada a partir de las semillas libres de piel que correspondían a semillas de frutos totalmente formados, en grado de madurez óptima, se determinaron humedad, cenizas, proteínas, lignina, pentosanas, azúcares totales, carbónico y metoxilo. Al igual que sobre las pectocelulosas de las pulpas, sobre ambas pectocelulosas se hicieron las operaciones de despectinación, hidrólisis, fraccionamiento e identificación de componentes.

Cuando la pectocelulosa obtenida del tegumento se desposee de la porción soluble en agua (pectinas, mucílagos, etc.) se nos manifiesta como especialmente leñosa, conteniendo, como es normal en materiales de este tipo, una proporción muy grande de xilana unida a la lignina, lo que en cierto modo da flexibilidad a la película dentro de su tacto áspero. De los hidrolizados, que se desmineralizaron por uso de Amberlitas IR-4B e IR-120, pudimos separar sobre papel, por el método de FLOOD, HIRST y JONES (loc. cit. 104), xilobiosa y xilotriosa idénticas cromatográficamente a las obtenidas en los hidrolizados de la pectocelulosa despectinada de pulpa, y a su vez idénticas en todo a unas muestras tipo preparadas por JONES y WISE (124) a partir del álamo, cedidas por el primero de los autores al Dr. GUZMÁN y las preparadas por JONES y GUZMÁN a partir del esparto (loc. cit. 35), lo que nos hace opinar que la xilana aquí existente estará integrada también por eslabones de xilosa unidos en 1-4, agrupamiento que está muy extendido en todo el reino vegetal. Aparte de la *xilosa*, que era sin duda el componente fundamental, aparecen manchas debidas a *arabinosa* y *galactosa*, pero éstas se encuentran en pequeñísima proporción, mientras que en las pulpas, como ya indicamos en su momento, dichos azúcares se encuentran en proporción mayor; también aparecen indicios de *ribosa* que probablemente se encuentren integrando nucleótidos o enzimas.

Por lo que respecta a los ácidos urónicos, que separamos del hidrolizado total en la columna de Amberlita IR-4B (OH), pudimos detectar también cromatográficamente la presencia de, por lo menos, dos ácidos aldobiurónicos derivados sin duda de la xilosa. Uno de ellos se comporta en todo como el 3-(4-O-metil-D-glucuronósido)-D-xilosa, el U_{II} detectado en las pulpas, que a su vez es el mismo que JONES y colegas (125) identificaron en los hidrolizados de hemicelulosas de la madera de álamo. Dicho ácido aldobiurónico pudimos separarlo también por la citada técnica de FLOOD, HIRST y JONES, sobre papel, con ánimo de estudiarlo con detalle. Por hidrólisis forzada (SO_3H_2 1N en tubo cerrado a 110° C) daban xilosa

(124) JONES, J. K. N. y WISE, L. E., *J. Chem. Soc.*, 2750 (1952).

(125) JONES, J. K. N. y WISE, L. E., *J. Chem. Soc.*, 3389 (1952).



y un urónico que se movía a la misma velocidad que el 4-O-metil D-glucurónico en el disolvente acetato de etilo : ácido acético : ácido fórmico : agua (18 : 3 : 1 : 4). A pesar de estos resultados es natural que queden todavía dudas para asignar una estructura definitiva a este oligosacárido ácido, ya que ha sido imposible de momento aislarlo en cantidad suficiente para un estudio estructural a fondo.

El otro ácido urónico que daba una mancha muy pequeña aunque característica y de movimiento bastante lento, $R_x = 0,1$, en el disolvente butanol : etanol : agua (40 : 11 : 19), no pudo aislarse de momento por no haber podido realizarse un fraccionamiento metódico. Sin embargo consideramos muy interesante hacer un estudio completo de la película de la semilla, que nos proponemos llevar a cabo en un futuro próximo.

Los resultados anteriores se refieren a la porción de pectocelulosa de tegumentos que queda como residuo después de arrastrar exhaustivamente el material soluble en agua. Aunque en principio este material soluble no era objeto fundamental de nuestra atención, quisimos, no obstante, estudiar algo su naturaleza. Para ello concentramos a vacío las aguas de lavado que arrastraban estos materiales y los sometidos a hidrólisis ácida con SO_4H_2 1N, primero suave y luego forzada, observando que la proporción pectínica debía ser insignificante a juzgar por el escasísimo galacturónico detectable. En cambio en los hidrolizados existía abundancia de arabinosa y galactosa que corresponderían a arabanas y galactanas. Por otro lado, hicimos experimentos de hidrólisis enzimática, ensayando, para este fin, *pectinasa*, observando igualmente que la proporción de galacturónico en los hidrolizados era prácticamente despreciable, aunque desde luego habían indicios de su presencia.

La pectocelulosa correspondiente a las semillas peladas se sometió también en primer lugar a maceración durante 24 horas con SO_4H_2 1N y a continuación a sucesivos arrastres con agua hasta reacción negativa al reactivo MOLISCH. El extracto resultante junto con las aguas de lavado, se concentró a vacío hasta consistencia siruposa y sin hidrolizar se cromatografió en papel, mostrando una mancha rojiza (al revelar con p-anisidina) que quedaba en la línea de partida en los varios disolventes ensayados; cabía pensar que se trataba de material urónico o pentosánico de un cierto grado de polimerización, por lo que no avanzaba al desarrollar el cromatograma.

Cuando sometimos dicho siruposo a hidrólisis suave, corrección del pH y desmineralizaciones convenientes, detectamos por lo menos cinco manchas, de las cuales sólo una quedaba inmóvil al cromatografiar usando un disolvente básico de desarrollo [(*n*-butanol : piridina : H_2O) (9 : 2 : 2)] lo que se sabe correspondería a un ácido urónico y que poste-

riormente se identificó como galacturónico. Las otras cuatro manchas correspondían a galactosa, arabinosa, galactobiosa y arabobiosa, confirmando la presencia de estas últimas al provocar la hidrólisis forzada, pues desaparecieron las debidas a arabobiosa y galactobiosa, con el correspondiente incremento de las manchas debidas a arabinosa y galactosa. Se destaca la mayor proporción de azúcares neutros respecto al contenido ácido, lo que estaría de acuerdo con una naturaleza de mucílago para los polisacáridos aquí existentes, mejor que el suponerles con constitución de pectina.

La porción de pectocelulosa que quedó insoluble en el arrastré con agua, tendrá también en parte naturaleza hidrocarbonada a causa de la celulosa y hemicelulosas que integran su estructura, junto a lignina y otros constituyentes que de momento no han sido estudiados.

Al hidrolizar la porción insoluble ahora referida y tras las operaciones de purificación tantas veces descritas, se identificaron por cromatografía hasta por lo menos 10 componentes. Siendo de interés, por la índole de nuestro tema, el estudio de ellos, se procedió al fraccionamiento del hidrolizado por combinación del uso de resinas de cambio de ión, carbón y celulosa, separándose como azúcares neutros arabinosa, galactosa, xilosa y ribosa, así como los polímeros de grado dos de los tres primeros. En la fracción ácida se localizan por lo menos tres ácidos aldooligourónicos, realmente aldobiurónicos. Cuando la fracción ácida en su conjunto se sometía a hidrólisis forzada, y el resultado, después de llevar hasta $\text{pH}=3,4$ se cromatografía en *n*-butanol : piridina : H_2O (9 : 2 : 2) se detectan como azúcares neutros la arabinosa y xilosa, por lo que cabía pensar que estos dos azúcares y sólo éstos, se hallaban integrando tales aldobiurónicos. Cuando otro cromatograma, desarrollado también en *n*-butanol : piridina : agua (9 : 2 : 2) durante 72 horas (para dar tiempo a que los azúcares neutros salgan del papel), sin revelar, se desarrolla ahora en acetato de etilo : ácido acético : ácido fórmico : agua (18 : 3 : 1 : 4) observándose la presencia de dos manchas debidas a ácidos urónicos. Una de ellas, es identificable con el ácido glucurónico (la más abundante) y otra, más móvil y más escasa, avanzaba a la misma velocidad y tenía las mismas características que el 4-O-metil glucurónico, que detectamos e identificamos suficientemente en las pulpas. Al encontrar sólo dos ácidos urónicos, cabe pensar que alguno de ellos se combina con la arabinosa y xilosa para dar dos aldobiurónicos o que en el caso de que alguno de ellos se combine con uno sólo de los azúcares lo hará por diferentes posiciones, quedando así justificada la presencia de los tres aldobiurónicos.

Azúcares libres de pulpa y semilla

Finalmente, estudiamos la naturaleza de los azúcares libres existentes en la pulpa y en la semilla. Para ello aprovechamos los extractos acuo-alcohólicos resultantes de la preparación de pectocelulosas. Se concentraron a vacío hasta consistencia siruposa y se identificaron los componentes por cromatografía en papel.

Azúcares de pulpas.—Al hacer el estudio de los extractos acuo-alcohólicos obtenidos al preparar pectocelulosas de sucesivas semanas, se observa que mientras en los de la primera semana es prácticamente nula la presencia de sacarosa, existiendo sólo *glucosa* y *fructosa*, al estudiar los de las sucesivas semanas se encuentra un incremento de sacarosa, apreciándose que el salto es más brusco, en cuanto a este incremento, se nota entre la 1.^a y 2.^a semana de desarrollo, lo que está de acuerdo con el análisis químico. Los cambios posteriores a esta 2.^a semana son de poca importancia, por lo que se centró el estudio de una manera especial en los extractos acuo-alcohólicos procedentes de pulpas de la 5.^a semana, que podrían considerarse como de madurez óptima. En el caso de estas últimas pulpas (prácticamente sucede lo mismo en las restantes semanas a partir de la 2.^a) pudieron separarse *glucosa*, *fructosa*, *sacarosa* y una pequeña proporción de *xilosa*.

En estudios aparte que se han seguido en campañas anteriores, se observó en los extractos procedentes de la preparación de pectocelulosa, la presencia de un azúcar que daba color amarillo en el revelado con p-anisidina, y que en sucesivas observaciones pudo comprobarse que, realmente, no se encontraba en extractos frescos, sino que aparecía en dichos extractos al cabo de cierto tiempo. Por su R_f no podía identificarse con ningún monosacárido, ni tampoco con la sacarosa, moviéndose más lentamente que ellos; en cambio, su R_f era algo superior al de la rafinosa, un oligosacárido fácil de formarse por acción enzimática y que no sería difícil en el caso de líquidos azucarados a base de sacarosa, glucosa y fructosa, como el que nos ocupa, donde fácilmente se desarrollan levaduras segregadoras de las enzimas correspondientes.

Pusimos toda nuestra atención en la identificación de dicho oligosacárido. Para ello procedimos a separarlo por la técnica de FLOOD, HIRST y JONES, recuperando así, en varias operaciones, una pequeña porción. A continuación se hicieron cromatogramas, comprobando que daba una sola mancha y por tanto que la separación había sido eficaz; paralelamente se desarrollaron muestras de rafinosa y melibiosa, observándose que en el disolvente *n*-butanol : ácido acético : agua (4 : 1 : 5), el oligosacárido

problema tenía un R_f análogo al de la melibiosa e inferior al de la rafinosa.

Por otro lado, cinco cromatogramas desarrollados simultáneamente, conteniendo muestras del oligosacárido en cuestión y de los dos de comparación, se revelaron: uno con p-anisidina, otro con α -naftol (126), un tercero con antrona, otro con NO_3Ag amoniacal (127) y el quinto, es dividido en dos partes reveladas respectivamente con FEHLING y BENEDICT, desecando en todos los casos a calor suave y observándose cuidadosamente el momento de aparición de las manchas. Los resultados obtenidos fueron: a) con la p-anisidina, el problema daba color amarillento, mientras la melibiosa da color marrón y la rafinosa muestra un tono intermedio, b) con α -naftol da el color de las cetosas, violeta; color que también da la rafinosa, pero que, en cambio, no aparece en la melibiosa, por lo que se descarta la posibilidad de que se trate de ésta, c) con antrona se confirman los resultados anteriores; d) en el cromatograma revelado con NO_3Ag amoniacal (Tollens), en condiciones muy suaves, se observa que pronto aparece la mancha debida a melibiosa (carácter reductor), mientras que el oligosacárido problema y la rafinosa sólo dan la mancha al calentar muy forzosamente, de donde se deduce que el oligosacárido problema, a semejanza de la rafinosa, no tiene carácter reductor, y e) un comportamiento idéntico al caso anterior, es decir que sólo aparece como reductor la melibiosa, muestran los tres oligosacáridos comparados al revelar con FEHLING y BENEDICT. Como consecuencia de estas observaciones cabe pensar que se trataba de un oligosacárido, rico en cetosas, de carácter no reductor, distinto de la rafinosa y por supuesto de la melibiosa. Por hidrólisis progresiva, tanto ácida como enzimática, se observa un desdoblamiento en sacarosa y fructosa, aun cuando pronto se alcanza el desdoblamiento total en glucosa y fructosa, siendo aproximadamente el doble la proporción de esta última.

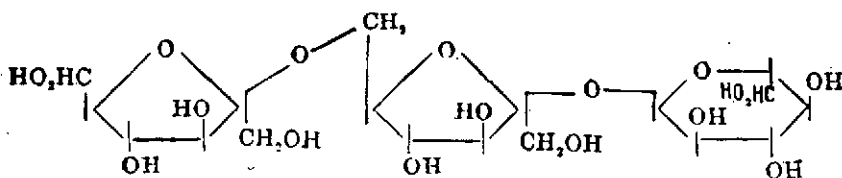
Después de estos datos había motivos para sospechar que se trataría de la *kestosa* o algún otro oligosacárido muy relacionado con éste. Se hicieron entonces cromatogramas utilizando el disolvente *n*-propanol : acetato de etilo : agua (7 : 1 : 2) desarrollándose durante 48 horas a la temperatura ambiente (aproximadamente 22° C) obteniéndose un R_f igual a 0,12, que coincide con el que aparece en la bibliografía para el azúcar supuesto, en tanto que para la rafinosa se calculó en los mismos experimentos un $R_f = 0,09$; también está a favor de ello el valor del punto de fusión (PF = 145-146° C) que nos daba la muestra aislada.

(126) RACHINSKI, V. V. y KNYAZATOVA, E. I., *Doklady Akad. Nauk., S.S.S.R.*, 85, 1119, (1952). [*Chem. Abstr.*, 47, 11082 (1953)].

(127) PARTURGE, S. N., *Biochem. J.*, 42, 238 (1948); HOUGH, L., *Nature (London)*, 165, 400 (1950).

La *kestosa* ha sido identificada en estos últimos años (128) como un O- α -D-glucopiranosil (1-2) O- β -D-fructofuranosil (6-2) β -D-fructofuranósido, es decir, integrado por dos eslabones de fructosa y uno de glucosa. GROSS y otros (29) estiman que a la *kestosa* debe nombrársele como *6-kestosa* para distinguirla de la *1-kestosa* (O- α -D-glucopiranosil (1-2) β -D-fructofuranosil (1-2) β -D-fructofuranósido) cuya estructura fué establecida por BACON y BELL (130). Se conoce un tercer trisacárido integrado por dos eslabones de fructosa y uno de glucosa, por lo que en el citado trabajo (129) proponen el nombre de *neo-kestosa* y al que atribuyen la estructura de O- β -D-fructofuranosil (2-6) α -D-glucopiranosil (1-2) β -D-fructofuranósido.

La fórmula que se admite actualmente para la *6-kestosa*, que es la que coincide, por todas las características, con el azúcar que a nosotros nos aparece es la siguiente:



Azúcares de semillas.—En el caso de las semillas estudiamos los azúcares libres de los líquidos acuo-alcohólicos tanto de la preparación de pectocelulosas de tegumentos, como las que procedían de la almendra. Unos y otros resultaron tener la misma composición, teniendo de común con los que procedían de las pulpas los azúcares sacarosa y glucosa como más abundantes, siguiéndoles en importancia la fructosa, con una concentración aproximadamente la mitad que la glucosa, siendo casi despreciable la presencia de xilosa. En cambio era muy característica la presencia de «*kestosa*» azúcar que en el caso de las pulpas procedía de la alteración del extracto, como hemos visto en el apartado anterior, mientras que en las semillas aparece como un componente normal de ella, puesto que los cromatogramas se hicieron sobre extractos recién preparados, en los que no era previsible alteración alguna. La naturaleza de este oligosacárido se comprobó de la misma manera que en el caso de las pulpas.

(128) BACON, J. S. D. y EDELMAN, J., *Arch. Biochem.*, 28, 467 (1950); BLANCHARD, P. H. y ALBON, N., *Arch. Biochem.*, 29, 220 (1950); FISCHER, E. H., KOETES, L. y FELLIG, J., *Helv. Chim. Acta*, 34, 1132 (1951); PAZUR, J. H., *J. Biol. Chem.*, 199, 217 (1952); ALBON, N., BELL, D. J., BLANCHARD, P. H., GROSS, D. y RUNDRELL, J. T., *J. Chem. Soc.*, 24 (1953); etc., etc.

(129) GROSS, D., BLANCHARD, P. H. y BELL, D. J., *J. Chem. Soc.* 1727 (1954).

(130) BACON, J. S. D. y BELL, D. J., *J. Chem. Soc.*, 2528 (1953).

Posibilidad de recuperación de azúcares.—Una vez identificados los azúcares en uno y otro caso, se hizo un fraccionamiento de los mismos sobre columna de celulosa, eluyendo con butanol normal medio saturado de agua. Esta operación tenía a su vez otro fin, el de ver las posibilidades del procedimiento para la recuperación de azúcares libres a partir de subproductos. En primer lugar podrían someterse a extracción acuo-alcohólica las enormes masas de frutos blandos o ligeramente averiados que no se pueden utilizar en los elaborados de conservas, con lo que el resto pectocelulósico podría dedicarse a su vez a extracción de pectinas para mejoras de mermeladas.

Igualmente podría hacerse la extracción total de los frutos con agua, en cuyo caso el extracto llevaría simultáneamente los azúcares libres antes citados, más las pectinas, con lo cual, el tal extracto, rico en aromas naturales, una vez concentrado hasta consistencia conveniente, podría dedicarse a diversidad de usos, sobre todo en la industria conservera de la que proceden la mayor parte de estos subproductos actualmente sin aplicación. Esto permitiría reforzar o más bien restaurar parte del aroma y sabor natural que en las manipulaciones propias de la elaboración, se pierden.

El caso de las semillas nos ofrece un marcado interés, ya que, por ejemplo, de la torta residual de extraer aceite, podrían recuperarse una gran cantidad de azúcares útiles, siendo de destacar la posibilidad de que este subproducto fuese manantial para la obtención de kestosa, azúcar para el que cabe esperar una utilización con algún fin más concreto; como mínimo ha de ser base de investigaciones posteriores para lo que interesa obtener esta especie química comercialmente.

APENDICE EXPERIMENTAL AL CAPITULO II

(Se refieren sólo los detalles que pueden ser de interés para la reproducción de experimentos).

Métodos de identificación

Se ha hecho repetido uso de técnicas cromatográficas de partición sobre papel y sobre columnas de celulosa, carbón y resinas de cambio de ión. Los disolventes de desarrollo utilizados para cromatografía (*) a lo largo de este trabajo son:

- (A) *n*-butanol : ácido acético : agua (4 : 1 : 5).
- (B) Acetato de etilo : ácido acético : agua (4 : 1 : 5).
- (C) *n*-butanol : piridina : agua (9 : 2 : 2).
- (D) Acetato de etilo : ácido acético : ácido fórmico : agua (18 : 3 : 1 : 4).
- (E) *n*-butanol : ácido fórmico : agua (50 : 1 : 5).
- (F) *n*-butanol : etanol : agua (40 : 11 : 19).
- (G) Etanol : benceno : agua (47 : 169 : 15).
- (H) Acetato de etilo : ácido acético : agua (10 : 3 : 3).
- (I) *n*-propanol : acetato de etilo : agua (7 : 1 : 2).
- (J) Butanol : agua (2 : 1).
- (K) Butanol : etanol : agua : hidróxido amónico (100 : 25 : 122,5 : 2,5).
- (L) *n*-butanol : piridina : agua (10 : 3 : 3).
- (M) *n*-butanol semisaturado de agua.
- (N) Acetato de etilo : ácido acético : agua (10 : 3 : 3).

(*) Aunque en alguna ocasión se cite su composición en el texto, en general, se referirán mediante las letras mayúsculas que precede a cada uno de ellos en la lista adjunta.

PULPAS

Materia prima.—Albaricoques frescos, variedad «búlida», en distinto grado de maduración, así como pulpas industriales de 80/85, para cuya preparación se someten los frutos, partidos por la mitad, a un proceso de preesterilización a bote abierto, seguido de otro de esterilización, más concretamente de pasteurización, a bote cerrado. Estos estudios se han realizado durante las campañas de 1955-58, ambos inclusive, procediendo, tanto los frutos como las pulpas, de la zona de Alcantarilla (Murcia).

A fin de homogeneizar las pulpas, antes de iniciar el trabajo, se trituraron en una batidora modelo «Turmix».

1.º) *Características de las pulpas*

De todas ellas se hicieron las siguientes determinaciones:

- a) Humedad.
- b) Azúcares (libres y totales).
- c) Acidez.
- d) Cenizas.
- e) Pectocelulosa.

A fin de no repetir demasiado, se dará cuenta de la marcha seguida con los albaricoques en grado de desarrollo óptimo (madurez comercial). Respecto a las muestras en otros grados de desarrollo, solamente se darán resultados resumidos.

a) *Determinación de humedad*

Se siguió el método de DEAN-STARK, usando como líquido de arrastre benceno saturado de agua. Los resultados obtenidos son los siguientes:

<i>Peso muestra</i>	<i>Humedad %</i>	<i>% medio</i>
10	85,27	
10	85,35	85,3
10	85,30	

El contenido en humedad calculado por diferencia entre la medida refractométrica (% de sólidos solubles) y el resto hasta 100 resultó ser:

$n_{28^{\circ}\text{C}}$		% Sólidos	% Humedad	% Medio
1.ª medida	1,3546	14,3	85,7	
2.ª medida	1,3543	14,1	85,9	85,78
3.ª medida	1,3545	14,25	85,75	

Igualmente se determinó la humedad por calentamiento a 100°C , de muestras de pectocelulosa en cápsula tarada, hasta peso prácticamente constante. Los resultados obtenidos son:

Peso muestra	Humedad	Humedad %	% Medio
0,8012	0,6838	85,34	
1,0234	0,8725	85,26	85,40
0,3251	0,2783	85,61	

Como valor proximado puede tomarse el de 85,5 % para el contenido en humedad.

b) Determinación de azúcares

La valoración de azúcares libres presentes en el fruto se realizó según el método de BENEDICT, basado, como se sabe, en la reducción del $(\text{SCN})_2\text{Cu}$ complejado, azul, hasta SCNCu , precipitado blanco, dejando la solución incolora. Para ello se toman muestras de aproximadamente 10 grs. y se lavan con sucesivas porciones de agua en un mortero, pasando las soluciones de cada una a un matraz aforado que se enrasa a 250 c.c. Para la valoración se sitúan en un Erlenmeyer 5 c.c. de BENEDICT que equivalen a 0,0101246 grs. de glucosa. En la tabla adjunta se esquematizan los resultados obtenidos:

Peso muestra llevada a 250 cc	Peso azúcares en 250 cc	% azúcares	% medio
9,6	0,1056	1,1	
9,85	0,1103	1,12	1,11
10,2	0,1142	1,12	

Para la valoración de azúcares totales por el mismo método, se hizo previamente la inversión según CLERGET. A 50 c.c. de la solución azuca-

rada obtenida anteriormente se le añaden 5 c.c. de ClH concentrado, calentándose a 68° C durante 15 minutos. A continuación se enfría rápidamente hasta temperatura ambiente y enrasa hasta 200 c.c. Los resultados obtenidos son los siguientes:

Peso muestra llevada a 200 cc	Peso azúcares en 200 cc	% azúcares
9,6	0,4838	5,04
9,85	0,4754	5,03
10,2	0,5140	5,04

c) Acidez

Se valoran con NaOH N/10 $f = 0,924$, utilizando como indicador fenolftaleína en alcohol al 1 %.

Peso muestra en 250 cc	Peso de málico	% Acidez en málico
1,9674	0,0281	1,42
2,7801	0,0392	1,41
2,5200	0,0357	1,42

d) Cenizas

El contenido en cenizas se determinó por calcinación en un horno de mufla hasta peso constante en crisol de platino. Se partió de muestras de pulpa conteniendo, como acabamos de ver, 85 % de humedad. Los resultados obtenidos se esquematizan a continuación:

Peso muestra	Peso cenizas	Cenizas %	% medio
0,7424	0,0036	0,48	
2,1407	0,0105	0,49	0,48
1,7350	0,0084	0,48	

El valor 0,48 % se entiende respecto a albaricoque con el 85 % de humedad, lo que equivale a 3,20 % si se refiere a material seco.

e) *Preparación de pectocelulosa*

Se hizo la preparación de la pectocelulosa partiendo de 1.500 grs. de pulpa de albaricoque.

Triturada en un «Turmix» se trató con 5.100 c.c. de alcohol etílico del 100 % caliente. La concentración alcohólica resultante viene a ser del 80 %, teniendo en cuenta la humedad propia de la pulpa.

Se dejó macerar durante 24 horas en alcohol, pasadas las cuales se filtró; la masa fibrosa residual se sometió a cinco tratamientos sucesivos con alcohol caliente del 85 % hasta que, por filtración, dió un líquido transparente e incoloro.

La masa residual recuerda en su aspecto a la celulosa bruta, dando los siguientes rendimientos:

Rendimiento referido a materia húmeda	2,43 %
» » » » seca	16,2 %

(La pectocelulosa se entiende desecada al aire; contiene 13,15 % de humedad).

He aquí el resumen de los resultados obtenidos con albaricoques en distinto grado de desarrollo:

ALBARICOQUES

	1. ^a semana	2. ^a semana
Humedad	78 %	80,5 %
Azúcares libres	1,3 %	1,35 %
Id. totales	1,3 %	2,95 %
Cenizas	0,74 %	0,68 %
Pectocelulosa	4,30 %	3,92 %

ALBARICOQUES

	3. ^a semana	4. ^a semana
Humedad	83,0 %	84,5 %
Azúcares libres	1,36 %	1,36 %
Id. totales	3,9 %	5,01 %
Acidez	1,82 %	1,68 %
Cenizas	0,60 %	0,54 %
Pectocelulosa	3,24 %	2,69 %

ALBARICOQUE 5.^a SEMANA

	frescos	envasados
Humedad	85,3 %	87,0 %
Azúcares libres	1,1 %	0,9 %
Id. totales	5,04%	5,0 %
Acidez	1,42%	1,36%
Cenizas	0,48%	0,43%
Pectocelulosas	2,43%	2,30%

2.º) Características de la pectocelulosa preparada

De la pectocelulosa preparada se hicieron las siguientes determinaciones:

- a) Humedad.
- b) Lignina.
- c) Azúcares reductores por hidrólisis.
- d) Pentosanas.
- e) Hexosanas.
- f) Cenizas.
- g) Proteínas.
- h) Urónicos.
- i) Metoxilo.

a) Determinación de humedad.

Se siguió el método de DEAN-STARK en las condiciones ya indicadas. Los resultados obtenidos son:

Peso muestra	% Humedad	% Medio
10	13,15	
10	13,12	13,13
10	13,12	

Los resultados de la determinación de humedad por calentamiento y diferencia de peso, son los siguientes:

Peso muestra	Humedad	Humedad %	% Medio
0,3275	0,0431	13,15	
0,5102	0,0671	13,15	13,15
0,7114	0,0937	13,17	



b) *Determinación de lignina*

Se siguió una adaptación de la técnica de RITTER. Muestras de aproximadamente 0,4 gramos, se dejan en maceración con SO_4H_2 del 72 % a temperatura ambiente durante dos horas, después de las cuales se diluye el conjunto hasta que la concentración del SO_4H_2 sea del 3 %. Seguidamente se hierve a reflujo durante cuatro horas, filtrándose a continuación en un crisol Gooch con placa de vidrio fritado, tarado previamente. El residuo de filtración se lava con agua destilada hasta neutralidad, se deseca y pesa sucesivas veces hasta alcanzar constancia de peso. Los resultados son los siguientes:

Peso muestra	Peso residuo seco por diferencia	Lignina %.	% medio
0,6212	0,0827	13,3	
0,8104	0,1075	13,26	13,29
0,4102	0,0546	13,31	

c) *Determinación de azúcares reductores por hidrólisis (líquidos de lavados de determinar ligninas)*

La valoración de reductores producidos en la determinación de lignina, procedentes de la hidrólisis de los hidratos de carbono, se realizó según el método de BENEDICT, tras neutralización de las aguas ácidas con CO_3Na_2 y cerca del punto final con CO_3Ca . 5 c.c. de la solución de Benedict = 0,0081804 grs. de glucosa.

Los resultados obtenidos son:

Peso muestra llevada a 250 cc	Peso azúcares en 250 cc	% azúcares
0,6212	0,4044	65,1
0,8104	0,4862	65,0
0,4102	0,2729	65,55

Aunque los reductores se expresan en grs. de glucosa por ciento, realmente se trata de una mezcla de pentosas y hexosas, e incluso de ácidos urónicos y furfural y homólogos.

d) *Determinación de pentosanas*

Se siguió el método volumétrico de KULLGREN y TYDEN. El proceso está basado esencialmente en la transformación de las pentosas en furfural, mediante tratamiento con ClH del 12 %, reacción de este aldehído con el Br₂ procedente de una mezcla de Br⁻ + BrO₃⁻ y valoración del residual con tiosulfato sódico por retroceso.

Se parte de muestras de pectocelulosa de aproximadamente 0,2 grs. atacándose con 100 c.c. de ClH del 13,15 % en un adecuado aparato de destilación en presencia de 19-20 grs. de ClNa y calentando en un baño de aire (Babor). Se destila a pequeña velocidad (aproximadamente 25 c.c. en 10 minutos; a cada 25 c.c. de destilado se reponen otros 25 c.c. de ClH del 13,15 % en el matraz, a fin de mantener el nivel y concentración prácticamente inalterados). Se procura no calentar el matraz por encima del nivel del líquido. El destilado total (furfural + ClH), era, en todos los ensayos realizados, inferior a 250 c.c., comprobándose el agotamiento de furfural mediante papel de filtro impregnado de acetato de anilina (*) que con el furfural de coloración roja, debido a la formación de una base de SCHIFF.

Reactivos utilizados:

NaOH 1,58 N.

Solución bromuro-bromato conteniendo 1,392 grs. de BrO₃K y 10 grs. de BrK por litro (0,05 N en bromato).

Solución de tiosulfato sódico 0,1 N, f = 1,0253.

Solución de molibdato amónico (25 grs./l).

ClH del 13,15 % (D = 1,065).

ClNa y IK sólidos.

El destilado procedente de cada muestra se llevó a un volumen conocido (250 c.c.) con ClH del 13,15 %. A continuación se procedió al análisis volumétrico del furfural siguiendo la siguiente marcha: A una porción de 100 c.c. de destilado, se añaden 200 c.c. de NaOH 1,58 N y deja a temperatura ambiente durante 2 minutos. A continuación se añaden 10 c.c. de MoO₄(NH₄)₂ y 25 c.c. de Br⁻ + BrO₃⁻. Se deja el matracito sobre fondo blanco y observa hasta aparición de un color amarillo; se deja entonces el conjunto en reposo 3 minutos y añade ahora 1 gr. de IK sólido agitando inmediatamente la solución. Se deja en reposo durante 5 minutos y después se valora con tiosulfato el I₂ liberado (en presencia de en-

(*) A 100 c.c. de anilina recién destilada, se le agregan 10 c.c. de ácido acético glacial, gota a gota, cantidad suficiente para la redisolución del precipitado primeramente formado. A continuación se impregnan unas tiras de papel Whatman n.º 1, se desecan y dejan dispuestas para la detección de furfural.

grudo de almidón). Se repitió el ensayo con otras fracciones de 100 c.c. y de 25 c.c. respectivamente.

Los resultados obtenidos son los siguientes:

Peso muestra	% furfural	% pentosanas	% medio
0,1752	22,63	38,61	
0,2011	22,68	38,6	38,6
0,1632	22,68	38,6	

e) *Hexosanas*

El porcentaje en hexosanas puede obtenerse por combinación entre el dato de azúcares totales y el debido a pentosanas. Podemos partir del supuesto de que todos los azúcares fuesen glucosa; teniendo en cuenta que el método seguido es análogo al de MONIER-WILLIAMS para el que se preconiza un rendimiento del 94,41 %, deberá corregirse el % de glucosa, con lo que se transformará en 68,9 % el valor de azúcares totales, y que corresponde a $69,9 \times 0,9 = 62,01$ % de hexosanas.

Por otro lado, el 38,61 % de pentosanas son equivalentes a $38,61 \times 1,2271 = 47,3783$ % de hexosanas. Si restamos del contenido total supuesto de hexosanas (62,01 %) la porción que no está en dicha forma sino como pentosanas, quedará $62,01 - 47,38 = 14,63$ % de hexosanas reales.

f) *Cenizas*

Se partió de muestras de aproximadamente 0,3-0,4 grs. de pectocelulosa desecada al aire (conteniendo 13,15 % de humedad), determinándose el contenido en cenizas por calcinación en las condiciones ya indicadas, siendo los resultados los siguientes:

Peso de muestra	Peso cenizas	% cenizas	% medio
0,3379	0,0142	4,20	
0,3520	0,0146	4,14	4,20
0,4105	0,0173	4,26	

g) *Proteínas*

La determinación se hace por el método de KJELDAHL. Para ello las muestras se someten a digestión con SO_4H_2 concentrado en presencia de ácido selenioso (*). Cuando el líquido se pone negro y comienza a des-

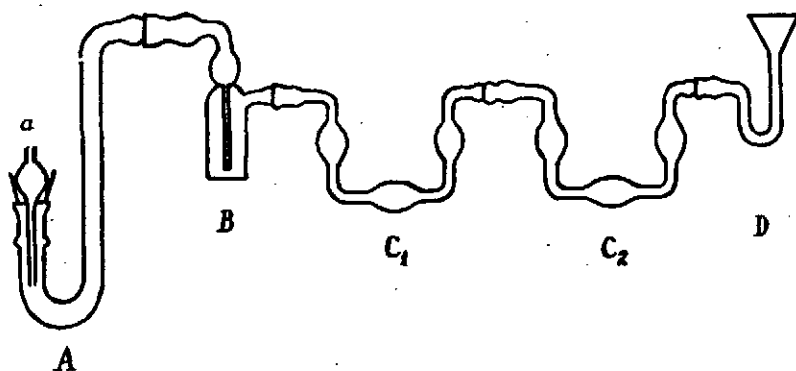
(*) Previamente a los ensayos con selenioso, se hicieron otros utilizando el selenio metal directamente como catalizador, con resultados insatisfactorios; por el contrario, en la práctica,

prender gases se le añaden lentamente unas gotas de ácido perclórico ($D = 1,61$), como catalizador complementario, y se sigue la ebullición hasta llegar a un líquido transparente y desaparición de restos carbonosos. Para la destilación se trata el líquido con gotas al 30 % en presencia de sulfuro potásico y un poco de cinc en polvo.—El amoníaco desprendido se recoge en sulfúrico N/2, situado en dos colectores, valorando luego el exceso con NaOH N/2, en presencia de rojo de metilo.—Los resultados son:

Peso muestra	Proteínas encontradas	Proteínas %	% Medio
1,1595	0,0800	6,89	
0,2106	0,0140	6,64	6,89
0,8522	0,0609	7,15	

h) Valoración de ácidos urónicos

Se realiza la descarboxilación mediante CIH de acuerdo con el método de LEFEVRE, aunque con las modificaciones de DICKSON. Como dispositivo experimental se utiliza el recomendado por A. SOLER y A. CARRASCO para metoxilo y que se representa en la figura adjunta.



En el tubo de digestión A se colocan muestras de unos 0,030 grs. agregándole CIH del 12 % (10 c.c.). En el frasco lavador B se colocan 6 c.c. de NO_3Ag al 10 % al objeto de retener el CIH y aún el furfural desprendido en la reacción. En cada uno de los colectores C_1 y C_2 se ponen 6 y 4 c.c. respectivamente de agua de barita. Por último se conecta con el co-

agregando éste ya al estado de ácido selenioso acelera la digestión de una manera evidente y clara. El ácido selenioso se preparó según la receta siguiente: 5 grs. de selenio se calientan con 50 c.c. de SO_4H_2 conc. hasta decoloración, pasándosele una vez frío a un matraz forado de 100 c.c. completándosele con SO_4H_2 concentrado.

lector C_2 , un tubo de seguridad, en cuyo extremo libre contiene sal sodada para evitar la entrada de CO_2 . Por el conducto (a) penetra una corriente de N_2 , libre de oxígeno, CO_2 y humedad, por paso del mismo a través de un tren de purificación constituido por frascos conteniendo pirogalol en medio alcalino, una disolución al 20 % de KOH y SO_2H_2 conc. respectivamente, separados por correspondientes frascos de seguridad.

La operación de digestión y recogida de CO_2 se realizó en 4,30 horas, aproximadamente, manteniendo la temperatura del baño de glicerina, durante ese tiempo a $120^\circ C$. La valoración del agua de barita utilizada se realiza con ClH 0,1N, $f = 0,990$, y como indicador rojo de metilo, azul de metileno y fenolftaleína (20 : 1 : 100).

El contenido en anhídrido urónico se obtiene multiplicando por 4 el valor de CO_2 .

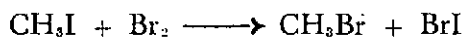
Peso muestra	Peso CO_2 encontrado	% CO_2	% CO_2 corregido (*)	urónico
0,0352	0,0020	5,68	5,74	22,96
0,0360	0,0020	5,55	5,61	22,44
0,0373	0,0021	5,65	5,70	22,80

i) Determinación de metoxilo

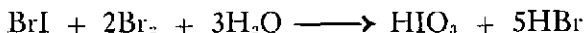
Se utiliza el método de VIEBOCK, adoptando el dispositivo de A. SOLER y A. CARRASCO antes referido para ácidos urónicos. En el tubo de digestión se introducen 5 c.c. de IH , recientemente destilado, junto a la substancia, aparte de 0,2 grs. de P rojo seco, 0,5 c.c. de ácido acético glacial y unos cristallitos de fenol. El tubo de digestión se halla unido a un lavador que contiene unas gotas de Br_2 y acetato sódico al 10 % en ácido acético del 96 %. Los colectores contienen agua saturada de Br_2 .

El tubo de digestión se calienta en un baño de glicerina (en otras operaciones se usó *Rhodorsil*) a una temperatura mantenida constantemente en el intervalo de $140-150^\circ C$. Una placa de amianto situada sobre el baño, con dos hendiduras para los dos tubos de digestión, facilitaba el reflujo de la rama larga. Con el fin de favorecer el arrastre del ICH_3 que se produce en la digestión, se hace pasar una corriente de CO_2 , libre de O_2 , para lo que el carbónico producido mediante un Kipp (mármol + ClH) se lava previamente haciéndolo pasar por una disolución diluida de acetato de plomo. El ICH_3 arrastrado al ponerse en contacto con el bromo, sufre la reacción primaria:

(*) En un ensayo en blanco con ácido galacturónico se obtienen recuperaciones de CO_2 del 98,9%, por tanto, utilizamos como factor experimental de corrección para el CO_2 el valor $100/98,9 = 1,0111$.



si bien al haber exceso de Br_2 tiene lugar la oxidación del BrI hasta ácido iódico:



Acabada la operación (4 horas), se vierte el contenido de los colectores, más las aguas de lavado, en frascos con tapón esmerilado. Se destruye el exceso de bromo reducido a BrH con fórmico y se agrega IK , que deja iodo en libertad por la acción del IO_3H , el es valorado por $\text{S}_2\text{O}_3\text{Na}_2$ 0,001N, $f = 1,002$.

En definitiva, por cada equivalente de metoxilo se producen 6 equivalentes de iodo (*)

Del contenido en CH_3O —, de la pectocelulosa en conjunto y del contenido en lignina, puede deducirse el valor de metoxilo que interesa recoger para la determinación de la composición centesimal de cada una de las pectocelulosas, ya que, correspondiendo éste a sustancias de tipo pectínico, que estarán incluidas en los porcentajes de pentosanas y hexosanas, pasaría desapercibido. Tanto para la pectocelulosa de la 1.ª semana, como para las subsiguientes, se dan por tanto estos valores corregidos por ser los únicos que tienen interés. El porcentaje de la lignina, se mantiene prácticamente invariable a lo largo del desarrollo, fijándose en 4,12 %.

Se tabulan a continuación los datos y resultados en la determinación de metoxilo de pectocelulosa y lignina de la 5.ª semana. En los otros casos se recogen sólo los datos deducidos.

Peso muestra de lignina	Peso metoxilo encontrado	% metoxilo	% medio
0,0205	0,00085	4,14	
0,0180	0,00079	4,11	4,12
0,0234	0,00097	4,11	

Peso muestra de pectocelulosa	Peso metoxilo encontrado	% metoxilo	% medio
0,0162	0,00052	3,20	
0,0204	0,00065	3,19	3,19
0,0150	0,00048	3,19	

(*) Se hicieron ensayos en blanco sobre vainillina pura, carbonato de guayacol y o-nitro anisol, obteniéndose siempre resultados con error inferior al 0,5 % que es el admitido.

He aquí los resultados obtenidos con pectocelulosa de albaricque de distintas semanas, para el metoxilo y demás componentes característicos:

PECTOCELULOSA

	1. ^a semana	2. ^a semana
Humedad.	13,2 %	13,05 %
Cenizas.	4,51 %	4,52 %
Proteínas	6,58 %	6,45 %
Lignina.	16,98 %	16,02 %
Pentosanas	12,82 %	13,24 %
Hexosanas	36,47 %	37,10 %
CO ₂	5,49 %	5,51 %
CH ₃ O	2,46 %	2,48 %

PECTOCELULOSA

	3. ^a semana	4. ^a semana
Humedad.	13,10 %	12,90 %
Cenizas.	4,40 %	4,32 %
Proteínas	6,51 %	6,68 %
Lignina	15,93 %	15,85 %
Pentosanas	13,85 %	13,98 %
Hexosanas	36,43 %	36,51 %
CO ₂	5,59 %	5,60 %
CH ₃ O	2,54 %	2,60 %

PECTOCELULOSA 5.^a SEMANA

	<u>Procedente de frutos frescos</u>	<u>Procedente de frutos envasados</u>
Humedad.	13,15 %	13,32 %
Cenizas.	4,20 %	4,05 %
Proteínas	6,89 %	6,85 %
Lignina.	13,29 %	13,62 %
Pentosanas	38,61 %	38,20 %
Hexosanas	14,63 %	14,85 %
CO ₂	5,68 %	5,48 %
CH ₃ O	2,64 %	2,56 %

3.ª) Estudio de los azúcares componentes de la pectocelulosa

Sobre pectocelulosa procedente de albaricoques maduros se hicieron las siguientes determinaciones:

- A) Aislamiento y determinación de pectinas solubles.
- B) Hidrólisis de la pectocelulosa desprovista de pectinas.
- C) Separación y purificación de los productos de hidrólisis mediante resinas de cambio iónico, carbón y celulosa.
- D) Identificación de constituyentes.
- E) Determinación de lignina en el residuo de hidrólisis de la pulpa.
- F) Determinación de azúcares reductores por hidrólisis.

A) Aislamiento y determinación de pectinas solubles

Se ponen en maceración con agua destilada 10 grs. de pectocelulosa, procedentes de albaricoques de la 5.ª semana de desarrollo, durante 50 horas, formándose una masa gelatinosa que filtra con cierta dificultad por un Büchner con papel de filtro de grano grueso, pasando un líquido de aspecto siruposo. Seguidamente se lava varias veces con agua destilada y filtrada, comprobando la presencia de azúcares en las aguas de lavado hasta que éstas dieron reacción negativa con el reactivo MOLISCH (*). En presencia de dicho reactivo la disolución problema, transparente, no debe formar un anillo verde por la acción del SO_4H_2 puro ($D = 1,84$), localizado en la interfase.

Simultáneamente, porciones alícuotas de cada una de las aguas de lavado (previamente ensayadas con el reactivo MOLISCH) se evaporan hasta casi sequedad y cromatografían en papel para la detección de azúcares. Los disolventes de desarrollo utilizados fueron el A y el B (véase primera página de este Apéndice experimental), revelándose con p-anisidina (*).

(*) Para la preparación de dicho reactivo, se disuelven 15 grs. de α -naftol en 10 c.c. de alcohol libre de aldehidos. Este reactivo sólo debe prepararse en cantidad para el uso inmediato, dado que se altera con el tiempo.

(*) Para la preparación de dicho reactivo se añaden 12 grs. de p-anisidina a 400 c.c. de *n*-butanol, juntamente con 2,32 c.c. de Cl_4Sn ($D=1,88$). Después se le añaden unos gramos de Cl_2Sn .

Los resultados cromatográficos fueron los siguientes:

<i>Azúcares</i>	<i>Resultados</i>	<i>Color de las manchas</i>
Rafinosa	(-)	
Galactosa	(+)	marrón
Xilosa	(-)	
Ramnosa	(-)	
Glucosa	(-)	
Fructosa	(-)	
Sacarosa	(-)	
Acidos urónicos	(+)	rojo
Oligosacáridos	(+)	marrón

las aguas de lavado negativas al Molisch, no daban manchas de azúcar alguno como era de esperar.

El volumen total de las aguas de lavado resultó ser de 210 c.c. y el de la masa gelatinosa de hemicelulosas de aproximadamente 18 c.c. De esta manera se separan las pectinas y otros materiales solubles que interferirían la identificación de constituyentes de las hemicelulosas.

Para comprobar si el rendimiento aparente en pectina de cada una de las pectocelulosas varía con la forma de extracción se someten tres muestras de cada una de ellas a tres marchas distintas de extracción:

- maceración y lavado exhaustivo con agua,
- maceración con agua durante 24 horas; maceración con SO_4H_2 1N durante 24 horas, y lavado exhaustivo con agua,
- maceración con SO_4H_2 1N durante 24 horas; maceración con agua durante 24 horas y lavados exhaustivos con agua.

Los resultados se resumen en las tablas adjuntas:

SOLUBILIDAD EN H_2O

<i>Pectocelulosas</i>	<i>Peso muestra</i>	<i>Peso sólidos solubles</i>	<i>% sólidos solubles</i>
1. ^a semana	0,5000	0,1460	29,2
2. ^a semana	0,3812	0,1160	30,43
3. ^a semana	0,4201	0,1299	30,92
4. ^a semana	0,5024	0,1613	32,12
5. ^a semana	0,4317	0,1391	32,22

SOLUBILIDAD EN $\text{SO}_4\text{H}_2 + \text{H}_2\text{O}$

Pectocelulosas	Peso muestra	Peso sólidos solubles	% sólidos solubles
1. ^a semana	0,5203	0,1567	30,12
2. ^a semana	0,3712	0,1149	30,97
3. ^a semana	0,6320	0,1961	31,04
4. ^a semana	0,7101	0,2273	32,00
5. ^a semana	0,4768	0,1532	32,13

SOLUBILIDAD EN $\text{H}_2\text{O} + \text{SO}_4\text{H}_2$

Pectocelulosas	Peso muestra	Peso sólidos solubles	% sólidos solubles
1. ^a semana	0,6013	0,1805	30,01
2. ^a semana	0,8257	0,2535	30,70
3. ^a semana	0,6100	0,1891	31,00
4. ^a semana	0,5107	0,1604	31,40
5. ^a semana	0,9500	0,3050	32,10

Como se observa, en las pectocelulosas de la 1.^a y 2.^a semana al hacer una maceración previa con SO_4H_2 se facilita el posterior arrastre con agua, es decir, que el rendimiento en pectinas es superior al obtenido cuando sólo se hace el lavado con agua. En cambio prácticamente se tiene el mismo resultado cuando se invierte la actuación del SO_4H_2 respecto al agua.

Con el fin de determinar la naturaleza de las pectinas solubles aisladas de la pectocelulosa de la 5.^a semana, descritas anteriormente, las aguas de lavado se sometieron a las siguientes operaciones:

- A₁) Precipitación de pectinas.
- A₂) Hidrólisis ácida de la disolución pectínica
- A₃) Hidrólisis enzimática de la disolución pectínica.

A₁) *Precipitación de pectinas.*—Una parte de 50 c.c. se concentra a vacío hasta 1/5 de su volumen. Se agregan entonces 20 c.c. de etanol del 100 % y precipita una porción identificada como pectina. Después de lavada con etanol del 100% y éter, se seca y pesa, obteniéndose 0,695 grs., lo que representa un contenido de 29,19% de pectinas en la pectocelulosa. A una parte de dicha pectina se le determinó metoxilo, según ZEISEL, obteniéndose un valor medio de 6,2 %. A otra parte de la misma se le deter-

minó contenido en urónicos por el método de LEFÈVRE descrito anteriormente, obteniéndose un valor medio de 14,30 %. Este carbónico equivaldría a una riqueza en anhídrido urónico del $14,3 \times 1,0111 \times 4 = 57,83\%$. y aplicando el factor de NANJI, PATON y LING (131) el contenido en materiales pectínicos propiamente dichos será de $14,3 \times 5,66 = 80,93\%$. Simultáneamente, una pequeña porción de dicha pectina se hidroliza con SO_3H_2 1N paralelamente a la hidrólisis de líquidos de lavado en bruto, y que se describe en el apartado siguiente, observándose por cromatografía los mismos resultados, por lo que en los experimentos siguientes se prescinde de precipitar pectinas previamente, actuando siempre sobre las disoluciones de éstas tal como se obtienen en los lavados o todo lo más concentrándolas hasta mayor consistencia.

A₂) *Hidrólisis ácida de la pectina*.—50 c.c. de las aguas de lavado procedentes de la pectocelulosa de albaricoques maduros, se hidrolizan con 50 c.c. de SO_3H_2 1N. Tras reflujó de cuatro horas, la disolución se neutraliza con una suspensión de $\text{Ba}(\text{OH})_2$ hasta pH = 3,4. Se filtra (*) y concentra a vacío, sin pasar de 40° C, hasta reducir su volumen aproximadamente a la octava parte del primitivo (6,2 c.c.). A continuación se pasa el líquido por dos columnas (**), primeramente por una rellena con Amberlita IR-120, capaz de retener los cationes, en este caso los iones Ba^{++} , así como los procedentes de las sustancias minerales del vegetal, y la 2.ª con Amberlita IR-4B (***) que retiene el material de carácter ácido, en este caso los ácidos urónicos. El efluente, contiene sólo los posibles azúcares neutros, entre los que sólo pudo detectarse galactosa en pequeña proporción así como una masa indefinida de oligosacáridos que no avanzan en los cromatogramas.

Seguidamente se eluyen, mediante 200 c.c. de SO_3H_2 1N los ácidos urónicos retenidos en la columna IR-4B, con lo que el efluente alcanza manifiesta reacción ácida. De nuevo se lleva el conjunto hasta pH = 3,4 con $\text{Ba}(\text{OH})_2$ y CO_2Ba , se separa el precipitado y el filtrado se descationiza pasándolo por la columna conteniendo Amberlita IR-120, previamente

(131) NANJI, PATON y LING (1925) [DORÉE, Ch., *Les Méthodes de la Chimie de la Cellulose*, Dunod, París, pág. 548 (1949)].

(*) La filtración sólo conseguimos realizarla bien con papel Whatman N.º 1, ya que, con papel de grano grueso pasa a través de él SO_3H_2 coloide, al no poderlo coagular por calor ante peligro de descomposición de los ácidos urónicos.

(**) Las columnas son de vidrio neutro, de 57 cms. de altura por 3 cms. de diámetro, alanzando en ellos el lecho de resinas 30 cms. de altura, lo que supone un volumen de éstas de 212 cms³, y que expresado en peso, teniendo en cuenta las correspondientes densidades, será $212 \times 0,77 = 163,24$ grs. para la Amberlita IR-120 y $212 \times 0,515 = 109,18$ grs. para la IR-4B.

(***) Las Amberlitas utilizadas proceden de «The Resinous Products and Chemical Company», Estados Unidos.

regenerada (*). El efluente, de carácter ácido, se concentra a vacío hasta consistencia siruposa, sometiendo a identificación cromatográfica los urónicos que la integran. En diversos disolventes (A, B, D) sólo pudo detectarse una mancha móvil que corresponde al ácido galacturónico, quedando la mayor parte inmóvil en la línea de partida por tratarse, sin duda, de una porción ácida de tamaño molecular relativamente alto. En cromatogramas dejados en desarrollo durante 74 horas, avanzan muy poco. En el disolvente C (a base de piridina) no avanzaba ningún azúcar, lo que prueba ausencia de azúcares neutros, a la vez que se confirma que la mancha móvil era un ácido.

A₃) *Hidrólisis enzimática de las pectinas.*—Se toman 50 c.c. de los 210 c.c. del extracto pectínico obtenido a partir de 10 grs. de pectocelulosa; se calientan a 70° C y pH = 0,8-1,2 (acidez sulfúrica) durante 90 minutos. Seguidamente se enfría el conjunto y lleva al pH hasta 10,5 con CO₂Ba y filtra manteniéndolo en estas condiciones durante 30 minutos. A continuación se lleva el conjunto hasta pH = 3,5, iniciando la digestión enzimática, para lo cual se le añaden, 0,2 grs. de pectinasa (**).

Por otro lado, se sometieron simultáneamente a idéntico proceso, otros 50 c.c. del extracto pectínico, pero realizando la digestión enzimática esta vez con pectinasa (0,2 grs.) y clarasa (0,1 grs.) (***) conjuntamente.

El pretratamiento químico anterior, reduce considerablemente la cantidad de enzima requerida para completar la hidrólisis.

Para separar el galacturónico producido del resto del material, se hicieron las siguientes operaciones: a) filtración con ayuda de carbón-celita (2 grs.); b) valoración con NaOH N/10, f = 0,9240, consumiendo cada 1 c.c. de muestra 0,78 c.c. de NaOH, lo que supone un contenido en galacturónico de 0,0014 grs./c.c. Para realizar tales valoraciones se consumieron 5 c.c.; c) concentración a presión reducida de los 45 c.c. residuales hasta unos 6 c.c.; d) con el fin de neutralizar los 2/3 de la acidez valorable (0,0630 grs. de galacturónico en 45 c.c.) se agregaron 0,0158 grs. de CO₂Sr y el 1/3 restante se neutraliza con 0,0053 grs. de CO₂Na. Al agregarle este último, la sal doble galacturonato sódico-estróncico cristaliza rápidamente. Se deja reposar y a continuación se filtra, lava con agua

(*) Después de usar cada columna y antes de utilizarla de nuevo, hay que proceder a su correspondiente regeneración. Esta se realiza, en nuestro caso, mediante el paso a través de las mismas de 3.930 c.c. de CO₂Na₂ al 2% para la Amberlita IR-4B y 658,3 c.c. de ClH al 10% para la Amberlita IR-120. Las cantidades de carbonato y ácido utilizadas son variables, calculándose con relación al volumen de resina y teniendo en cuenta la velocidad aproximada de cambio. Se aconsejan 48 grs. de ClH del 36% para 100 grs. de Amberlita IR-120 (en disolución diluida al 10%) y 22 grs. de CO₂Na₂, que se aplica disuelto al 2%.

(**) Pectinasa, F-7661, «Takamine Laboratory»; Clifton, New Jersey, U.S.A.

(***) Clarasa, F-7427, «Takamine Laboratory», Clifton, New Jersey, U.S.A.

y seca en un micro-büchner, obteniéndose 0,065 grs. de la sal doble, lo que supone un 88 % de recuperación (cantidad esperada 0,0736 grs. de galacturonato de Sr y Na).

Preparación del ácido galacturónico a partir del galacturonato de Sr y Na.—A partir de este galacturonato se obtiene galacturónico. Para ello, 0,062 grs. del mismo se añaden agitando a 0,1 c.c. de SO_4H_2 2N. Se separa el SO_4Sr y el filtrado (unas gotas) se deja cristalizar. Por cromatografía en papel resultó ser exclusivamente galacturónico.

Los otros 50 c.c. de extracto pectínico hidrolizados con pectinasá y clarasa conjuntamente, se sometieron a los mismos tratamientos obteniéndose una disolución que contenía 0,016 grs./c.c. de galacturónico, según los resultados de valoración con NaOH , lo que supone indudablemente un rendimiento mayor en la hidrólisis. Equivale a un contenido en galacturónico de 0,0720 grs. en 45 c.c.

Para obtener la sal doble se siguió una marcha análoga a la descrita anteriormente, lográndose 0,0838 grs. de ésta, lo que supone una recuperación del 86,8 % del galacturónico valorable.

B) Hidrólisis de la pectocelulosa desprovista de pectinas.

La pectocelulosa residual desprovista de pectinas y demás sustancias solubles en agua, aproximadamente 10 c.c. en volumen, procedentes de los 10 gramos de pectocelulosa, se puso en maceración con 36 c.c. de SO_4H_2 2N durante 24 horas a temperatura ambiente y se lavó de una manera exhaustiva con agua. Se somete ahora a reflujo durante 8 horas seguidas, con SO_4H_2 1N, cuidando que la temperatura no pase de 80°C . Después se filtra el contenido del matraz en un Büchner, lavándose con agua destilada hasta neutralidad y reacción negativa al Molisch (volumen total de las aguas de lavado 190 c.c.).

C) Separación y purificación de los productos de hidrólisis mediante resinas de cambio iónico, carbón y celulosa.

Seguidamente se procede a la neutralización del volumen acuoso total hasta $\text{pH} = 3,4$ concentrándose a vacío hasta 48 c.c. pasándosele a través de columnas con resinas intercambiadoras de iones Amberlita IR-120 y Amberlita IR-4B, siguiendo un proceso idéntico al indicado anteriormente. Se separan así dos grandes fracciones: la ácida que queda retenida en la Amberlita IR-4B y la neutra que pasa a través de ambas sin afectarse.

La elución de los ácidos urónicos retenidos se realiza mediante el paso a través de la columna de 250 c.c. de SO_4H_2 1N.

La disolución ácida se pone a pH = 3,4 y filtra para separar el SO_4Ba formado, pasándola de nuevo a través de Amberlita IR-120. A continuación se concentra a vacío hasta siruposo (8,2 grs.) procediendo a su estudio cromatográfico.

En un primer cromatograma de tanteo con el disolvente D, se aprecian por lo menos 7 manchas de color rojo cereza, típicas de ácidos urónicos, algunas moviéndose a gran velocidad. Sobre otra muestra de pectocelulosa de 10 grs. se siguió una marcha idéntica, desde el lavado exhaustivo para separar pectinas, hasta la recuperación de una nueva porción de ácidos urónicos, que se unió a la 1.^a a fin de contar con mayor cantidad de materia prima para su estudio.

Para un primer fraccionamiento, se pusieron 3,1 grs. de siruposo sobre una columna de carbón y celita (50 grs. de carbón y 50 grs. de celita) según la técnica de WISTLER y DURSO, haciendo una primera elución con 50 c.c. de agua, a continuación otra con 50 c.c. de alcohol al 5 % y por último otra con 50 c.c. de ácido acético al 50 %. La fracción más abundante fué la primera, que permitió recuperar 2,0 grs. de siruposo; en éste, por cromatografía en papel, se identificaron hasta cuatro manchas, precisamente las de mayor velocidad del cromatograma general, moviéndose *la más ligera a la misma velocidad que la ramnosa en el disolvente D*. La porción eluída por el alcohol (0,52 grs. de siruposo) sólo daba una mancha, debida a un urónico, *que se mueve a la velocidad de la glucosa*. Por último, la fracción recogida en la elución ácida (0,45 grs. de siruposo), estaba integrada, por lo menos, por tres urónicos de lento movimiento, entre los que predominaba *uno que se movía a una velocidad intermedia entre xilobiosa y xilotriosa*.

Refraccionamiento en columna de celulosa de la 1.^a fracción.—Una porción de 1,5 grs. del siruposo procedente de la elución acuosa (por lo menos 4 componentes), se dispone sobre una columna de 60 cms. de largo por 3 cms. de diámetro interior, conteniendo celulosa de alto grado de pureza, la misma con que se fabrica el papel Whatman, lavada por tanto a los ácidos y libre de extractos (*).

La elución se realizó con el disolvente E [butanol : ácido fórmico : agua (50 : 1 : 5)], manteniéndose el flujo constante (**), recogándose 350 fracciones mediante el uso del colector automático mencionado en la parte teórica.

(*) Preparada por N. Y. R., Bulston, Ltd.

(**) Se mantiene el flujo uniforme, logrando nivel constante, gracias al artificio siguiente: un matraz, de cuello largo, invertido sobre la columna, al que se le practica un orificio a unos 4 ó 5 cms. de la boca, dejará entrar disolvente en la columna solamente cuando queda libre el orificio, el cual va perfectamente acompasado con la velocidad del flujo, que queda así regularizado, por su nivel constante.

Por caracterización mediante cromatografía en papel de porciones correspondientes de los tubos tomados de 5 en 5, se localizaron en cuáles se hallaban los distintos componentes, dividiéndose el conjunto de tubos en cinco grupos. Entre los tubos 5-35 se encontraba el urónico de mayor movilidad; después de reunir el contenido de todos y evaporar hasta siruposo, se recuperan 0,05 grs. de material que, como se indicará posteriormente, resultó ser inconfundiblemente, el ácido 4-O-metil glucurónico. Otra fracción se recogió entre los tubos 45-60 tratándose de un solo compuesto que se movía a igual velocidad que la xilosa, pero del que sólo se pudo reunir una porción tan pequeña que no intentamos, de momento, su estudio (aproximadamente 0,020 grs. de siruposo). Entre los tubos 65-155, se separa un tercer componente, el más abundante (0,45 grs. de siruposo), cuya velocidad era análoga a la de la glucosa, idéntico al compuesto que se extrajo como único en la elución con alcohol al 5 %, por lo que se unió al siruposo de aquél, totalizando así 0,97 grs. de este compuesto. Todavía pudieron recuperarse otras dos fracciones, una al concentrar el contenido de los tubos 165-205 y otra entre 215-240, que dieron respectivamente 0,2 y 0,15 grs. de siruposo. Los tubos posteriores daban reacción negativa de azúcares. La fracción comprendida entre los tubos 165-205 tenía las mismas características que el componente más abundante de los separados en la columna de carbón, por elución con ácido acético al 50%, uniéndose a dicha fracción (siruposo total 0,65 grs.), para un refraccionamiento posterior.

Para realizar este tercer fraccionamiento, utilizamos una columna de celulosa de menor tamaño que la anterior (30 cms. de larga por 2 cms. de diámetro interior), con un grado de empaquetamiento superior a fin de que el fraccionamiento sea más lento, y utilizando el mismo disolvente E antes indicado. Se recogieron 360 fracciones, observando que no aparecían azúcares en el efluente hasta después del tubo 110.

Cromatografiando muestras de los tubos de 5 en 5, se localizaron 3 componentes distintos; uno, el más abundante, del que se recuperaron 0,30 grs. de siruposo, entre el 110-140. Los otros dos componentes aparecían siempre juntos desde el tubo número 155 aún cuando en los primeros tubos de esta nueva fracción, abundaba el de menor velocidad. Continuaron apareciendo ambos hasta el tubo 360 por lo que renunciamos de momento a su separación.

D) Identificación de constituyentes.

Después de lo indicado, tomamos como materia de trabajo los siguientes compuestos entre todos los separados: 1.º) el urónico que se movía

a la velocidad de la ramnosa en el disolvente D y que llamaremos U_I (0,05 grs.), 2.º) el urónico separado por el alcohol al 5 % junto con la porción más abundante de las recuperadas en la primera columna de celulosa, urónico U_{II} (0,97 grs.) y 3.º) el urónico separado en el refraccionamiento logrado con la segunda columna de celulosa, urónico U_{III} (0,65 gramos).

Identificación del urónico U_I

Por su reacción de color con el revelador p-anisidina (típico color rojo cereza); por su forma de corazón en los cromatogramas (también típica de urónicos); por permanecer fijo en el origen cuando se usa un disolvente básico de desarrollo (disolvente C), mientras que en los disolventes ácidos y neutros avanza normalmente, era seguro que se trataba de un ácido urónico que por su gran movilidad debía estar metilado. Igualmente se había desechado la posibilidad de que se tratara de una lactona, ya que no daba la reacción típica de estos compuestos al tratarle con el revelador a base de clorhidrato de hidroxilamina y KOH (loc. cit., 101). Por su $R_x = 1,37$ en disolvente D, se identificó como el ácido 4-O-metil glucurónico. No pudimos hacer determinaciones de tipo químico por disponer de muy pequeña cantidad de substancia.

Identificación del U_{II} y U_{III}

Como quiera que existía bastante evidencia de que ambos compuestos eran disacáridos de carácter ácido (aldobiurónicos) (*), se siguió una marcha paralela sobre los mismos, a fin de determinar sus estructuras.

d.) Hidrólisis directa de los aldobiurónicos U_{II} y U_{III} .—Se parte de 0,075 grs. del compuesto U_{II} se hidrolizan con 5 cc. de SO_4H_2 1N en tubo cerrado durante 15 horas seguidas (después de las cuales se neutraliza con CO_2Ba , filtra y cromatografía en papel. En el disolvente de desarrollo D aparecen dos manchas que por sus R_x y comparación con mezclas tipo se identificaron con la xilosa y un urónico que se movía a gran velocidad en varios disolventes de desarrollo; en el disolvente D este último tiene un $R_x = 1,37$, valor prácticamente coincidente con el que aparece en la bibliografía para el 4-O-metil glucurónico (en la bibliografía 1,38).

(*) a) por el color y forma de las manchas eran urónicos, b) por el R_f quedaban descartados los urónicos sencillos, c) por la detección, en estudios recientes, de aldobiurónicos en diversos hidrolizados de hemicelulosas, d) por las condiciones de hidrólisis aquí utilizadas, etc..

Sometidos 0,050 grs. del compuesto U_{III} al mismo procedimiento con 1 c.c. de SO_4H_2 1N, mostraban por cromatografía en papel, la presencia igualmente de xilosa y un ácido urónico, identificado en el disolvente D como el ácido glucurónico por su $R_x = 0,62$.

d₂) Hidrólisis tras esterificación, metil glicosidación y reducción previa.—Se trataba 0,12 grs. de U_{II} con 7,5 c.c. de metanol conteniendo aproximadamente el 2 % de ClH disuelto, se reflujan durante 8 horas a b. m. Seguidamente se evapora el disolvente recuperándose 0,065 grs. del residuo.

Por otro lado, 0,05 grs. del compuesto U_{III} se someten a una marcha análoga con clorhídrico metanólico (3 c.c.) obteniéndose 0,03 grs. de residuo.

Uno y otro residuo por separado, se disuelven en 2,5 c.c. de disolución de $H_4Al Li$ en tetrahidrofurano (al 1,6%) (*). Se reflujan ambas mezclas durante 30 minutos y dejan enfriar, descomponiéndose el exceso de hidruro por adición cuidadosa de acetato de etilo y agua (1 : 1). Se agregan unos gránulos de Amberlita IR-4B, filtra y se agregan de nuevo otros gránulos de de Amberlita IR-120, filtrando y concentrando hasta siruposo, recuperándose 0,060 y 0,027 grs. de los derivados de U_{II} y U_{III} respectivamente.

Los 0,060 grs. del derivado de U_{II} por hidrólisis con SO_4H_2 1N (2 c.c.) durante 10 horas en b.m. produjeron dos azúcares cuyos R_x en el disolvente E eran 0,15 y 0,26, correspondiendo a la xilosa y 4-metil glucosa respectivamente, al tomar como referencia el 2-3-4-6 tetrametil glucosa.

Por otro lado, los 0,027 grs. del siruposo obtenido al concentrar el material resultante de la metilación y reducción del compuesto U_{III} , obtenido en forma idéntica al anterior, permitió identificar como productos de hidrólisis final, dos manchas cuyos R_G en el disolvente E eran 0,09 y 0,015, correspondiendo a la glucosa y xilosa respectivamente.

d₃) Hidrólisis tras metilación total.

0,75 grs. del compuesto U_{II} , se neutralizan con $Ba(OH)_2$ hasta $pH=7$ y agregan 2,5 c.c. de agua, añadiendo después 2 c.c. de $SO_4(CH_3)_2$ y 5 c.c. de NaOH al 30 %, gota a gota con vigorosa agitación y enfriamiento. A las 12 horas se agregan un exceso de NaOH (10 c.c.) y 5 c.c. de $SO_4(CH_3)_2$ añadido gota a gota igualmente. Se repite la operación otras dos veces más. Después se calienta el conjunto a b.m. durante 30 minutos, se enfría y acidifica con SO_4H_2 diluído, haciéndose a continuación una extrac-

(*) El tetrahidrofurano se destiló en presencia de hilo de Na, recogiendo en un matraz seco conteniendo Na recién hilado.

ción continua con CHCl_3 . Se evapora el disolvente recogiendo un siruposo que se somete a una nueva metilación al agregarle 3 c.c. de reactivo de PURDIE (6 gramos de Ag_2O + 20 c.c. de CH_3I). Seguidamente se destruye el exceso de CH_3I por destilación. El derivado metilado se extrae con CHCl_3 , concentrando hasta siruposo y obteniéndose 0,64 grs.

Sobre 0,5 grs. del compuesto U_{III} se siguió idéntica marcha, obteniéndose 0,4 grs. de siruposo.

Los compuestos totalmente metilados se sometieron a dos marchas distintas:

- a) metanólisis e hidrólisis.
- β) ídem. tras reducción previa.

a) *Metanólisis e hidrólisis de los compuestos totalmente metilados.*— 0,10 grs. del compuesto totalmente metilado derivado de U_{II} , se trata con 15 c.c. de ClH metanólico al 5 % durante 48 horas. A continuación se concentra a vacío hasta 2 c.c. añadiéndosele 7 cc. de ClH acuoso, hirviendo durante 24 horas. Después se enfría la solución, se neutraliza con $\text{Ba}(\text{OH})_2$ concentrando el total hasta 3 c.c. y extrae con CHCl_3 ; la disolución acuosa se acidifica con SO_3H_2 y vuelve a extraer con CHCl_3 . En la primera extracción en medio neutro, el cloroformo arrastra la 3-4 dimetil D-xilosa, mientras que en la extracción en medio ácido, la porción urónica metilada que se arrastra; posteriormente se demostró era el 2-3-4 trimetil D-glucurónico, recuperándose ambos por evaporación del disolvente y obteniéndose 0,062 grs. de 3-4 dimetil-D-xilosa y 0,064 grs. del ácido.

Para el compuesto totalmente metilado derivado de U_{III} se parte de 0,1 grs. siguiendo en todo una marcha idéntica, obteniéndose 0,04 grs. de 3-4 dimetil-D-xilosa y 0,035 grs. del mismo ácido, 2-3-4-trimetil-D-glucurónico.

La 2-4 dimetil-D-xilosa procedente de U_{II} y la 3-4 dimetil-D-xilosa procedente de U_{III} se identificaron en los disolvente F, L, D y G, resultando ser sus respectivos R_G los siguientes:

DISOLVENTES

	F	L	D	G
3-4 dimetil-D-xilosa	0,74	0,85	0,87	0,47
2-4 dimetil-D-xilosa	0,73	0,84	0,75	0,31

Las funciones ácidas procedentes del U_{II} y U_{III} (0,064 y 0,035 grs. respectivamente), se trataron por separado con 16 y 8 c.c., respectivamente, de ClH metanólico al 1 %, durante 2 horas. Se neutraliza a continuación el ClH libre con CO_2Ag_2 y los filtrados se concentran, recuperán-

dose así 0,06 grs. y 0,03 grs. respectivamente, de cada uno de los correspondientes ésteres. Estos se disuelven, también por separado, en éter y tratan con 0,50 y 0,25 grs. cada uno de $H_4Al Li$ reflujiéndose durante 30 minutos. A continuación se destruye el exceso de reactivo por adición de acetato de etilo y los filtrados y aguas de lavado correspondientes se desionizan con Amberlita IR-4B y Amberlita IR-120. Se concentran hasta siruposos y cromatografían en papel, resultando en ambos casos el compuesto 2-3-4 trimetil-D-glucosa, identificado por su $R_G = 0,79$ en el disolvente J, 0,53 en el disolvente G y 0,87 en el disolvente K.

β) *Metanólisis e hidrólisis tras reducción previa.*—0,45 grs. del derivado totalmente metilado procedente del compuesto U_{II} , se disuelven en 50 c.c. de $H_4Al Li$ en tetrahidrofurano (al 1,6 %). Se refluja durante 6 horas y deja enfriar, descomponiendo el exceso de hidruro por adición cuidadosa de acetato de etilo y agua. La disolución se desioniza mediante las mismas resinas intercambiadoras repetidamente mencionadas, concentrándose a vacío hasta siruposo, con un peso de 0,32 grs.

0,3 grs. del derivado totalmente metilado procedente del compuesto U_{III} , sometido al mismo proceso, dió 0,23 grs. de siruposo.

Cada uno de estos siruposos a su vez, por separado, se someten a dos tratamientos distintos:

- β_1) metilación seguida de hidrólisis
- β_2) metanólisis seguida de hidrólisis.

β_1) *Metilación seguida de hidrólisis.*—0,16 grs. del siruposo (derivado del compuesto U_{II} reducido) y 0,16 grs. del correspondiente al compuesto U_{III} se tratan por separado con 2 cc. de reactivo PURDIE, repitiendo la adición de este reactivo otras dos veces a intervalos de una hora. A continuación se hidrolizan con 2 c.c. de SO_4H_2 1N durante 20 minutos, se neutralizan con $Ba(OH)_2$, filtran y desionizan mediante resinas, concentrándose hasta siruposo.

Por cromatografía en papel sobre siruposos, el derivado del compuesto U_{II} daba dos manchas, una rojiza y otra marrón; avanza mucho en los cromatogramas, suponiendo se trata de un azúcar muy metilado, identificándose en el disolvente M por su $R_f =$ como la 2-3-4-6 tetrametil-D-glucosa. La mancha rojiza se identificó a su vez, por su R_G en distintos disolventes, como la 3-4 dimetil-D-xilosa:

disolvente	F	0,74
»	L	0,85
»	D	0,78
»	G	0,47

El siruposo que procede originalmente del compuesto U_{III} daba por cromatografía en papel, igualmente dos manchas, una identificada también como la 2-3-4-6 tetrametil-D-glucosa y la otra, rojiza, por su R_G en distintos disolventes se identificó como la 2-4 dimetil-D-xilosa:

disolvente	F	0,73
»	L	0,84
»	D	0,75
»	G	0,31

β_2) Metanólisis seguida de hidrólisis ácida.—0,15 grs. del compuesto U_{II} después de metilado y reducido, se tratan con 9 c.c. de metanol conteniendo aproximadamente el 2 % de ClH , se refluja durante 8 horas a b. m. concentrando a vacío hasta siruposo.

0,05 grs. del correspondiente al compuesto U_{III} se sometieron al mismo proceso.

Ambos siruposos por separado, se tratan con 9 c.c. el primero y con 3 c.c. el segundo, de ClH 0,5 N durante 6 horas a b.m., neutralizan hasta $pH = 3,4$ con $Ba(OH)_2$, separa el filtrado y descationiza agregándole unos gránulos de Amberlita IR-4B, después de haberle agregado otros gránulos de Amberlita IR-4B y separados los mismos por filtración.

Los productos formados en esta nueva hidrólisis se detectaron e identificaron por cromatografía en papel, resultando ser, para el derivado del compuesto U_{II} , la 3-4 dimetil-D-xilosa y 2-3-4 trimetil-D-glucosa; para el derivado del compuesto U_{III} resultaron la 2-4 dimetil-D-xilosa y 2-3-4 trimetil-D-glucosa.

Para la separación de la 3-4 dimetil-D-xilosa y 2-3-4 trimetil-D-glucosa utilizamos el método de FLOOD, HIRST y JONES (loc. cit. 104), poniendo a lo largo de la línea de partida de un pliego de papel Whatman n.º 1, muestras sucesivas de siruposo mediante un capilar, teniendo sumo cuidado de que el trazo siga fielmente la línea señalada como origen. Se utilizó el disolvente de desarrollo F, revelándose tiras de papel cortadas de los extremos y del centro, localizándose así la porción de las bandas correspondientes, que se cortaron y extrajeron separadamente con agua en un micro SOXHLET. Por evaporación del disolvente se obtuvieron 0,058 grs. de 3-4 dimetil D-xilosa y 0,06 grs. de 2-3-4 trimetil-D-glucosa, que presentaban características idénticas a dos muestras tipos.

Fraccionamiento de azúcares neutros.—La fracción conteniendo los azúcares neutros está integrada por monosacáridos así como por algunos oligosacáridos, como por ejemplo xilobiosa. Para separar mono y oligosa-

cáridos se siguió la técnica de WHISTLER y DURSO. El siruposo (0,6 gr.) se pone en la parte superior de la columna, distribuyéndolo uniformemente y pasando a través de la misma sucesivos volúmenes (20 c.c. cada vez) de alcohol del 10, 20, 30; 40, 50, 60, 70, 80, 90 y 100 % por el mismo orden, recogién dose cada una de estas fracciones separadamente. Las disoluciones de cada una de las fracciones de los azúcares neutros se concentran para su estudio cromatográfico. Las fracciones eluidas con agua y con alcohol del 10 % estaban integradas exclusivamente por monosacáridos (*xilosa, arabinosa, glucosa, manosa y galactosa*); la fracción eluida con alcohol del 20 % contenía junto a estos monosacáridos una parte de oligosacáridos; en la del 30 % todavía quedaban monosacáridos, pero ya había aumentado el contenido en el disacárido aparecido en la fracción anterior, cuya mancha revelada con p-anisidina, era de color rojo y por su $R_f = 0,098$ en el disolvente C, 0,109 en el disolvente E y 0,111 en el F se trataba de xilobiosa. En la del 40 y 50 %, prácticamente, sólo se encuentra este oligosacárido, en tanto que en la del 60 % aparece una proporción más pequeña del trisacárido homólogo, caracterizado por su $R_f = 0,036$ en el disolvente C, 0,034 en el H y 0,039 en el F. Por último, en los del 70 y 80 % aparece una proporción pequeñísima de un oligosacárido que se mueve a menor velocidad que los anteriores y cuyo $R_f = 0,0015$ en el disolvente C, 0,0013 en el N y 0,0011 en el F, corresponde según cálculo gráfico del mismo, a la xilotetrosa.

Representando en ordenadas el logaritmo del desplazamiento de cada polímero respecto a xilosa, en vez de respecto al frente de disolvente, se obtiene la representación que se adjunta, en el disolvente AcOEt :
: AcOH : H₂O (10 : 3 : 3):

xilosa, 0,316

xilobiosa, 0,109

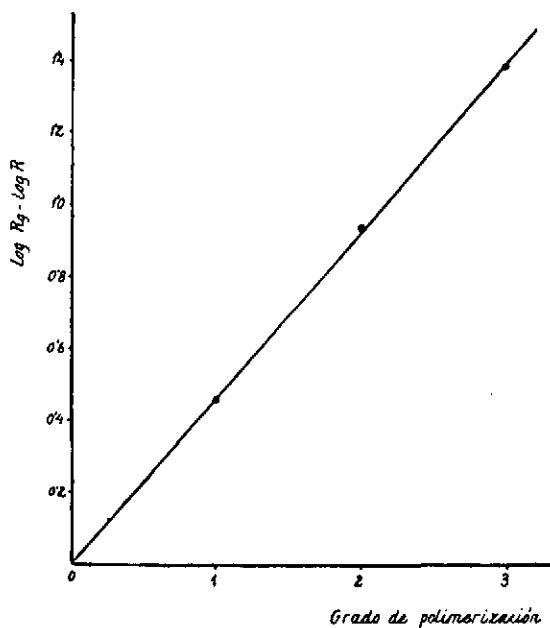
xilotriosa, 0,034

xilotetrosa, 0,0013

Para otro disolvente se obtiene la misma representación variando la pendiente de la recta al cambiar aquél.

Las cantidades recuperadas de estos oligosacáridos fueron 0,02 grs. de xilobiosa, 0,018 grs. de xilotriosa y menos de 0,008 grs. de xilotetrosa. De la xilobiosa sólo pudo medirse su R_f así como su $PF = 108^\circ C$ (descompone) e igualmente en la xilotriosa, $PF = 214^\circ C$ (descompone). De la xilotetrosa sólo pudimos determinar su R_f así como identificar los pro-

ductos resultantes de su hidrólisis con SO_4H_2 1N en tubo cerrado, los cuales eran xilosa, xilobiosa y xilotriosa.



E) Determinación de lignina en el residuo de hidrólisis de la pulpa

Tras eliminación previa de las hemicelulosas por hidrólisis, se somete una parte del residuo resultante a una determinación de lignina. Se siguió en todo un proceso idéntico al descrito anteriormente.

Muestra de partida en grs.	Lignina en grs.	Lignina %	% Medio
2,5	0,95	38 %	38,4
2,5	0,97	38,8	

F) Determinación de azúcares reductores por hidrólisis.

Los azúcares liberados en la determinación de lignina se estudiaron cromatográficamente, apareciendo dos manchas correspondientes a monosacáridos que se caracterizaron claramente como glucosa y xilosa, esta última en pequeña proporción, así como una serie de manchas, tres, que

resultaron corresponder a otros tantos polímeros de la glucosa por sus R_f en el disolvente R:

Glucosa $R_f = 9,5$

Celobiosa $R_f = 3,6$

Celotriosa $R_f = 1,6$

Celotrosa $R_f = 0,8$

La valoración total de ellos, según BENEDICT, dió los siguientes resultados:

5 c.c. de Benedict = 0,0062107 grs. de glucosa.

Peso muestra llevado a 250 cc	grs. azúcares en 250 cc	% azúcares
2,5	1,0708	42,83
2,5	1,0634	42,53

4.º) Estudio de los azúcares libres procedentes de la pulpa

Se hicieron estudios de los azúcares procedentes de 1.700 grs. de pulpa de albaricoques de la 5.ª semana, que eran arrastrados en la mezcla agua-alcohol utilizado en la preparación de pectocelulosa.

Volumen total de agua-alcohol = 11000 c.c.

Dicho volumen se concentró a vacío hasta siruposo (175 grs.) realizándose a continuación análisis cromatográficos del mismo, resultando contener varios azúcares, los cuales por sus R_x en diversos disolventes (A, E, L, etc.) se caracterizaron como xilosa, fructosa, glucosa y sacarosa.

El fraccionamiento de los mismos, contenidos en 2 grs. de siruposo, se realizó en forma preparativa en una columna de 60 cms: de largo por 3 cms. de diámetro interior, conteniendo celulosa pura, lavada a los ácidos y libre de extractos.

Antes de iniciar el fraccionamiento se acondicionó convenientemente la columna por paso de agua, y seguidamente se inició el fraccionamiento. La elución se realizó con butanol normal semisaturado de agua. Se recogieron 410 fracciones cromatografiando muestras de los tubos de 5 en 5. Entre los tubos 35-60 aparece una mancha correspondiente a la xilosa; entre el 80-165 la fructosa; 175-260, correspondiente a glucosa y desde el 290-385, la fracción más abundante, correspondiente a sacarosa. Cada una de estas fracciones, reunidas separadamente y concentradas hasta siruposo dieron 1,13 grs. de sacarosa, 0,64 grs. de glucosa, 0,32 grs. de fructosa y 0,02 grs. de xilosa.

En los extractos acuo-alcohólicos obtenidos en la preparación de pectocelulosa de campañas anteriores, es decir que tenían un cierto tiempo, se observa, por cromatografía, la presencia de un nuevo azúcar que no aparecía en extractos recientemente preparados. Dicho azúcar se caracterizó como una cetosa al revelarse los cromatogramas con reactivos específicos de tales substancias, en especial los de α -naftol y antrona (*). Su R_f en el disolvente I igual a 0,12 corresponde a la kestosa. Por la técnica de FLOOD, HIRST y JONES se separaron, en varias operaciones, 0,06 grs. de este oligosacárido cuyo PF = 145° C; no tenía carácter reductor frente a los reactivos de TOLLENS, FEHLING y BENEDICT. Se trataba de una cetosa al observar los resultados con los reveladores específicos de estas substancias, α -naftol y antrona. Por hidrólisis con invertasa (**) daba fructosa y glucosa, el primer azúcar en doble proporción que el segundo, al mismo resultado se llega en la hidrólisis ácida suave (SO_4H_2 1N en b.m. durante 24 horas), de modo que queda parte de la kestosa sin hidrolizar, como se manifestaba por cromatografía. Parelamente se hicieron ensayos análogos con rafinosa y melibiosa, confirmándose una y otra vez que se trataba de un azúcar distinto de aquéllos.

Aunque los datos indicados se refieren a pulpas de albaricoques en grado óptimo de desarrollo (5.ª semana), los extractos correspondientes a las semanas anteriores mostraban análoga composición cualitativa, a excepción de la 1.ª semana, en que apenas si aparecía sacarosa en los cromatogramas. Esto concuerda con los datos obtenidos por valoración con Benedict:

1.ª semana	
Reductores libres (expresado en glucosa)	1,3 %
Idem. tras inversión	1,3 %
2.ª semana	
Reductores libres (expresados en glucosa).	1,3 %
Idem. tras inversión	4,74 %
3.ª semana	
Reductores libres (expresados en glucosa)	1,3 %
Idem. tras inversión	5,0 %

(*) Reactivo α -naftol.—Está formado por una mezcla de α -naftol al 2% en alcohol y PO_4H_3 (10 : 1)

Reactivo antrona.—Se disuelven 200 mgrs. de antrona en 10 c.c. de ácido acético glacial, calentando y añadiendo 20 c.c. de etanol, 3 c.c. de PO_4H_3 de D = 1,60 y 1 c.c. de agua. Guardar en sitio frío. Para la preparación de este revelador tuvimos que obtener previamente la antrona, hirviendo a reflujo antraquinona con ClH y Sn en ácido acético glacial, lográndose buen rendimiento de dicha substancia.

(**) La invertasa utilizada procede de «The Sugar Manufacturers Supply Co., Ltd.», Londres, Inglaterra.



La aparición de kestosa era general al cabo de bastante tiempo, independientemente del contenido inicial de sacarosa.

SEMILLAS

(En esta parte se restringirá aún más la descripción de experimentos, ya que se omiten la de aquellos referidos al tratar de las pulpas).

Materia prima.—Se utilizaron semillas de albaricoque, variedad «búli-da», desecadas al aire, conteniendo un 8,7 % de humedad.

1) Características de semillas

Siguiendo las técnicas descritas en la primera parte, se determinó sobre las semillas en bruto, contenido en humedad, cenizas, proteína, lignina, pentosanas, hexosanas, carbónico y metoxilo. El dato de metoxilo recogido en la tabla que se dará seguidamente, se ha obtenido descontando al que resulte en la determinación, el porcentaje que corresponde a lignina (en determinación paralela se comprobó que, la lignina de tegumentos, tenía un contenido en metoxilo de 4,16 %). En las tablas sucesivas se ha seguido el mismo criterio.

Igualmente se determinó sobre semillas en bruto el contenido en grasa, operación que por otro lado era fundamental antes de iniciar el estudio de los hidratos de carbono. Para ello, una muestra de 300 grs. se sometió aproximadamente a 200 atmósferas mediante una prensa hidráulica, extrayendo una parte de aceite que suponía un rendimiento del 29,6 %. Posteriormente porciones de 30, 40 y 45 grs. de estas semillas parcialmente extraídas, se sometieron a extracción continua con éter anhidro en un aparato tipo Soxhlet. A continuación se resumen los resultados obtenidos:

Peso muestra parcialmente desengrasada	Peso extracto graso	Rendimiento %	Rendimiento medio
30	4,719	15,73	
35	5,523	15,78	15,74
40	6,284	15,71	

Teniendo en cuenta que la semilla original perdió en la expresión el 29,6 % de su peso, el rendimiento por extracción con disolvente respecto a dicha semilla original será de $\frac{15,74 \times 100}{129,6} = 12,15$ %, luego el rendimiento total en materia grasa puede fijarse en 41,75 %. Este rendimiento

fué confirmado por extracción, completa, de semilla sin desengrasar.

Se resumen a continuación los valores medios obtenidos en cada una de las determinaciones.

	%
Humedad	8,70
Cenizas	3,50
Proteínas	19,41
Lignina	5,88
Pentosanas.	4,58
Hexosanas	15,16
CO ₂	0,26
CH ₃ O	0,51
Grasas	41,75

2) Separación de tegumentos de las semillas

100 grs. de semillas íntegras, se dejan en maceración durante 24 horas a temperatura ambiente, con lo que éstas hinchan y la piel queda fácilmente desprendible. Para el cálculo de rendimiento, se desecaron éstos muy suavemente y se determinó el contenido en humedad. Se obtuvieron 14,60 grs. de tegumentos que contenían el 44 % de humedad, lo que equivale a 8,17 grs. de tegumentos anhidros y 8,95 grs. con 8,7 % de humedad, que es la misma que tenía la semilla en bruto. En definitiva, el contenido de tegumentos de la semilla en bruto es del 8,95 %.

Este rendimiento se comprobó en otras separaciones de tegumentos, realizadas siempre sobre muestras de semillas de alrededor de 100 grs. cada una.

3) Características de tegumentos

Los tegumentos separados se desecaron posteriormente (humedad 8,9 %) haciéndose las siguientes determinaciones:

	%
Humedad	8,90
Cenizas	4,85
Proteínas	8,18
Lignina.	30,24
Pentosanas	23,13
Hexosanas.	23,43
CO ₂	0,24
CH ₃ O	0,48



4) *Preparación de pectocelulosa de tegumentos*

30 grs. de tegumentos, previamente desengrasados, se tratan con 100 c.c. de alcohol del 100 %, con lo cual la concentración alcohólica resultante viene a ser del 80 %, teniendo en cuenta la humedad propia de los tegumentos (8,9 %).

Se agregaron además 100 c.c. de alcohol del 80 %, caliente, siguiendo en todo una marcha análoga a la descrita para el caso de las pulpas.

Los resultados obtenidos fueron los siguientes: Rendimiento en pectocelulosa del 6,34 % de humedad respecto a tegumentos del 8,9 % de humedad: 89,3. Rendimiento en materia seca respecto a tegumentos secos: 92,57 %.

(La pectocelulosa contiene 6,34 % de humedad desecada al aire).

5) *Características de la pectocelulosa de tegumentos*

Sobre la pectocelulosa preparada a partir de tegumentos se hicieron las siguientes determinaciones:

	%
Humedad	6,34
Cenizas	4,95
Proteínas	8,40
Lignina.	31,59
Pentosanas	23,85
Hexosanas.	24,14
CO ₂	0,23
CH ₃ O	0,46

6) *Identificación de componentes hidrocarbonados*

Sobre la pectocelulosa procedente de los tegumentos, se hicieron las siguientes determinaciones:

- A) Separación de la porción hidrocarbonada soluble.
- B) Hidrólisis de dicha porción soluble e identificación de componentes en lo que a glúcidos concierne.
- C) Hidrólisis de la pectocelulosa desprovista de la porción soluble e identificación de los azúcares resultantes.

A) Despectinación de la pectocelulosa procedente de tegumentos

(Aislamiento y determinación de la porción hidrocarbonada insoluble)

Se siguió un proceso idéntico al descrito para las pectocelulosas de pulpa, haciendo la extracción primero con SO_4H_2 1N y luego con agua.

Los volúmenes de aguas de lavado procedentes de cuatro muestras de 2 grs. aproximadamente, se llevaron en todos y cada uno de los casos a 150 c.c.

El rendimiento medio obtenido por evaporación de dos porciones alícuotas de 10 c.c. por cada una de las muestras fué de 24,14 % (como valor medio se separan 0,0321 grs./10 c.c. de disolución); ello supone un rendimiento en porción insoluble de 75 86 %.

Posteriormente se somete a estudio dicha porción soluble, como se describirá.

B) Hidrólisis de la pectocelulosa de tegumentos desprovista de pectinas

2 grs. aproximadamente de la pectocelulosa residual desprovista de pectinas (aun húmeda), se hidroliza con 15 c.c. de SO_4H_2 1N durante 8 horas. El hidrolizado se lleva hasta $\text{pH} = 3,4$ con $\text{Ba}(\text{OH})_2$ y CO_2Ba , desmineralizándose mediante el paso del mismo a través de dos columnas de vidrio neutro de 40×3 cms. conteniendo una Amberlita IR-120 (H) y la otra Amberlita IR-4B (OH).

Los ácidos urónicos retenidos en la columna conteniendo la resina IR-4B se eluyeron con SO_4H_2 1N; y el conjunto, tras corrección del pH y descationización, se concentró a vacío hasta siruposo (0,35 grs.).

En papel cromatográfico aparecen dos manchas, una mucho más abundante que la otra, correspondientes ambas a ácidos aldobiurónicos. Uno de ellos se mueve muy lentamente, siendo su $R_x = 0,1$, en el disolvente *n*-butanol : etanol : agua (40 : 11 : 19); el otro se mueve a la misma velocidad que la glucosa en el mismo disolvente ($R_x = 0,63$).

Sobre hojas de papel Whatman n.º 1, de 30×45 cms., siguiendo la técnica de FLOOD, HIRST y JONES y reuniendo los eluidos con agua de las bandas de los diversos papeles que se corresponden entre sí, se separaron, después de concentrar muestras cristalinas del ácido urónico más abundante, que es el más móvil de los dos anteriormente citados (0,018 grs.), procediendo a su identificación.

Para ello, 0,015 grs. de dicho ácido se hidrolizan con 2 c.c. de SO_4H_2 1N en tubo cerrado durante 15 horas seguidas durante las cuales se neutraliza hasta $\text{pH} = 3,4$ con CO_2Ba , filtra y cromatografía en papel. Aparecen

dos manchas, una debida indudablemente a xilosa y otra que por su R_x y demás características ($R_x = 1,38$, en el disolvente D, reacciones de color, por no tratarse de ninguna lactona, etc.) se identificó como el 4-O-metil-glucurónico. Por otro lado en el disolvente C a base de piridina, sólo avanzaba en los cromatogramas la mancha debida a xilosa, confirmando la naturaleza ácida de la otra. Cambiando de disolvente, en un cromatograma duplicado, el urónico antes retenido, volvía ahora a avanzar.

En cuanto a los azúcares neutros, mono y oligosacáridos, se sometieron a un refraccionamiento usando igualmente la técnica de FLOOD, HIRST y JONES, permitiéndonos conseguir mediante el uso repetido de dicho procedimiento, hasta 0,020 grs. de xilobiosa y 0,015 grs. de xilotriosa, que resultaron ser idénticos al cromatografiar en todos los disolventes, a las muestras tipo de que disponíamos.

Sin un interés marcado en obtener resultados cuantitativos, se recuperaron de los mismos papeles 0,087 grs. de xilosa, 0,018 grs. de arabinosa y 0,020 grs. de galactosa.

C) Hidrólisis de la porción soluble separada de pectocelulosa de tegumentos en lo que a glúcidos concierne.

Una muestra de 50 c.c. de las aguas de lavado anteriores, ya reunidas, se concentró a vacío hasta pequeño volumen [5 c.c. e hidroliza con SO_4H_2 2N (5 c.c.)]: se refluja durante 8 horas, se neutraliza hasta $\text{pH} = 3,4$ y tras desmineralización del conjunto con resinas de cambio de ión, se procede a identificación cromatográfica. Se aprecia una pequeña proporción de material urónico el cual se identifica como ácido galacturónico, apareciendo en cambio una proporción mayor de galactosa y arabinosa, estas últimas procedentes de arabanos y galactanos, observándose en los cromatogramas indicios de oligosacáridos de dichos azúcares.

Otros 50 c.c., concentrados igualmente (6 c.c.), y con las misma proporción de ácidos (6 c.c. de SO_4H_2 2N), se calientan en tubo cerrado durante 15 horas, observándose los mismos componentes, excepto los oligosacáridos que no aparecen ni aún como vestigios.

Por último, otros 50 c.c. se tratan con 0,2 grs. de pectinasa, siguiendo en lo demás la misma marcha que en las pulpas. Dada la pequeña proporción de galacturónico sólo intentamos su reconocimiento cualitativo, prescindiendo de su valoración cuantitativa.

7) *Desengrasado de las semillas sin tegumentos.*

Siguiendo la técnica antes descrita para la semilla en bruto, se procedió a desengrasar la semilla sin tegumentos, con un rendimiento en grasa del 42 %.

8) *Desamigdalización enzimática de semillas sin tegumentos.*

200 grs. de semillas sin tegumentos y molidas, tras la extracción de su aceite por expresión y agotamiento por éter, se calientan con 2.400 c.c. de agua, a 50° C durante 50 minutos. A continuación se deja la mezcla en reposo, a temperatura ambiente, durante 12 horas, procediendo luego a la filtración y secado al aire de la torta residual (*).

9) *Características de las semillas sin tegumentos*

Sobre las semillas sin tegumentos previamente desengrasadas y desamigdalizadas, se hicieron las siguientes determinaciones:

	%
Humedad	8,53
Cenizas	6,60
Proteínas	39,26
Lignina	8,69
Hexosanas	28,14
Pentosanas	7,03
CO ₂	0,63
CH ₂ O	0,97

10) *Preparación de pectocelulosa de semillas libres de tegumento*

100 grs. de semillas libres de tegumento, desengrasadas, desamigdalizadas y secadas al aire, se tratan con 35 c.c. de alcohol del 100%, con lo que éste se hace del 80 %, al tener en cuenta la humedad de la semilla (un 8,55 % según determinaciones realizadas momentos antes de su utilización), añadiendo otros 100 c.c. del alcohol del 80 % repitiendo el tratamiento 5 veces con alcohol caliente de esta última concentración.

(*) En unos primeros experimentos en los que la separación previa del tegumento se hizo por calentamiento en h.m. de la torta desengrasada, no fué posible la desamigdalización enzimática, ya que la emulsina original se había destruido e inactivado; al agregarle una porción (aproximadamente un 10 %) de semillas desengrasadas que habían sido desprovistas de su piel en frío, la actividad enzimática de ésta era suficiente para desamigdalizar todo el conjunto.

Se siguió por tanto idéntica marcha que la descrita para el caso de las pulpas. Se obtuvieron 93,92 grs. de pectocelulosa que después de perder el alcohol y dejada secar al aire, contenía un 6,6 % de humedad, lo que representa un rendimiento en bruto del 93,92 %; si lo referimos a pectocelulosa anhidra respecto a semilla anhidra, el rendimiento es del 99,67 %.

11) Características de la pectocelulosa de semillas sin tegumento

Sobre dicha pectocelulosa se hicieron las siguientes determinaciones, cuyos valores medios obtenidos en cada una de ellas, se tabulan a continuación.

Humedad	6,60 %
Cenizas	6,30 %
Proteínas	39,75 %
Lignina	9,76 %
Hexosanas	28,65 %
Pentosanas	7,07 %
CO ₂	0,60 %
CH ₃ O	0,97 %

12) Identificación de componentes hidrocarbonados en la pectocelulosa de semillas sin tegumentos.

Siguiendo la misma marcha descrita para las pectocelulosas de pulpa y de tegumento, se realizaron las siguientes etapas:

- A) Separación de la porción soluble.
- B) Hidrólisis e identificación de componentes hidrocarbonados de dicha porción.
- C) Hidrólisis e identificación de componentes hidrocarbonados de la porción insoluble.

A) Separación de la porción soluble

10 grs. de pectocelulosa, macerados durante 24 horas con SO₄H₂ 1N y por arrastre exhaustivo con agua, sufrieron una pérdida de peso de 27,95 grs., por tanto el rendimiento en porción insoluble fué de 72,05 %.

El volumen total de las aguas de lavado (cuando las últimas porciones resultaron negativas al reactivo Molisch) fué de 150 c.c. si bien se concentran a vacío hasta 6 c.c., teniendo consistencia de jarabe. Muestras de este jarabe se cromatografían en los disolventes A, B y D. Al revelar con

p-anisidina se observa en todos ellos una mancha rojiza que queda sin desarrollar en la línea de partida.

B) Hidrólisis e identificación de componentes hidrocarbonados de la porción soluble

Posteriormente una muestra de 0,20 grs. del siruposo anterior se hidroliza con 3 c.c. de SO_3H_2 1N durante 8 horas a reflujo, después de las cuales se pone a $\text{pH} = 3,4$ con CO_3Ba y $\text{Ba}(\text{OH})_2$; se separa el precipitado por filtración y desmineralización mediante resinas de cambio, en la forma indicada repetidamente.

Por cromatografía sobre papel se detectan cuatro manchas que por sus respectivos $R_{\text{galactosa}}$ en el disolvente D (1; 1,50, 0,35 y 0,53) se identificaron posteriormente como galactosa, arabinosa, galactobiosa y arabobiosa, sometiéndose a otras pruebas confirmatorias. En menor proporción aparece otra mancha correspondiente a una ácido urónico identificado igualmente como el ácido galacturónico ($R_{\text{galactosa}} = 0,97$ en el mismo disolvente).

Por el método de FLOOD, HIRST y JONES se separan muestras correspondientes a las supuestas arabobiosa y galactobiosa (0,013 y 0,016 grs.) hidrolizándose con SO_3H_2 1N en tubo cerrado durante 8 horas. Después de llevar a $\text{pH} = 3,4$ y desmineralizar mediante unos gránulos de Amberlitas catiónica y aniónica, sucesivamente, se detectan por cromatografía, en el primer caso exclusivamente arabinosa y en el segundo exclusivamente galactosa.

C) Hidrólisis e identificación de componentes de la porción insoluble.

La porción de pectocelulosa no arrastrable en la maceración y lavado (4 c.c.) se somete a hidrólisis con 4 c.c. de SO_3H_2 2N durante 6 horas a b.m. Un cromatograma directo del hidrolizado daba una gran cantidad de manchas, destacándose la presencia de varias debidas a ácidos urónicos. Por ello, se procedió a obtener del conjunto dos fracciones, la ácida y la neutra, a la vez que se lograba la desmineralización correspondiente. De esta manera, por desarrollo cromatográfico en el disolvente D y revelado con p-anisidina, se detectan en la fracción neutra, los siguientes componentes:

Azúcares	Color de la mancha	$R_{\text{galactosa}}$
Arabinosa	roja	1,50
Galactosa	marrón	1,00
Xilosa	roja	1,69
Ribosa	roja	1,98
Arabobiosa	roja	0,53
Galactobiosa	marrón	0,35
Xilobiosa	roja	0,59

Para comprobarlos se separaron primero oligo y monosacáridos en columna de carbón y posteriormente se fraccionaron ambos grupos sobre dos columnas de celulosa de $20 \times 1 \frac{1}{2}$ cms. y 25×2 cms., respectivamente, utilizando como disolvente en ambos casos butanol medio saturado de agua. Para lograr estas separaciones se recogieron 450 fracciones para los monosacáridos y 310 para los oligosacáridos. Se recuperaron 0,075 grs. de arabinosa, 0,060 grs. de galactosa, 0,6 grs. de xilosa y 0,027 grs. de ribosa así como 0,018 grs. de arabobiosa, 0,012 de galactobiosa y 0,020 grs. de xilobiosa.

La fracción ácida se concentra hasta consistencia siruposa (aproximadamente 1 c.c.). Una gota de la misma, desarrollada en varios disolventes neutros o ácidos, daba siempre tres manchas, que por su velocidad relativa (concretamente en el disolvente D tenían un R_x igual a 0,28; 0,35; y 0,68 respectivamente) supusimos se tratarían de ácidos aldobiurónicos.

Una parte de la fracción ácida (0,5 grs.) se hidroliza con 2 c.c. de SO_3H_2 2N en tubo cerrado durante 15 horas, después de las cuales se lleva la disolución a $\text{pH} = 3,4$; se agregan unos gránulos de resinas intercambiadoras (Amberlitas IR-4B e IR-120), se filtra y cromatografía. En el mismo disolvente D aparecen sólo cuatro manchas de R_x 0,89; 1; 0,09 y 1,38 que se corresponden con arabinosa, xilosa, ácido glucurónico y ácido 4-O-metil-glucurónico, respectivamente. En cromatogramas desarrollados paralelamente en *n*-butanol : piridina : agua (9 : 2 : 2) [disolvente C], durante 24 horas y revelados con p-anisidina, se detectan por lo menos dos manchas correspondientes a dos azúcares neutros, arabinosa y xilosa, quedando los otros dos componentes ácidos retenidos en el origen, como era de esperar.

Se desarrolló durante un tiempo más largo (72 horas) un cromatograma en el mismo disolvente C, con las muestras duplicadas. Se corta éste longitudinalmente y se revela sólo una de las mitades para comprobar que los azúcares neutros han desaparecido por haberse salido fuera del papel; los ácidos quedan retenidos en la línea de partida. La otra mitad

se seca suavemente y se cromatografía en acetato de etilo : ácido acético : ácido fórmico : agua (18 : 3 : 1 : 4) observándose al revelar, después de 48 horas de desarrollo, la aparición de sólo dos manchas, características de urónicos, y que correspondían a glucurónico y 4-O-metilglucurónico.

13) Estudio de los azúcares libres procedentes de las semillas

Los extractos acuo-alcohólicos de la preparación de 28 grs. de pectocelulosa de tegumentos (380 c.c.) se concentraron a vacío (25 c.c. aproximadamente). Muestras de este concentrado se cromatografiaron en los disolventes A, C, D, ... apareciendo en todos ellos, de una manera claramente manifiesta, sacarosa, glucosa, fructosa y trazas de xilosa, así como un azúcar, de $R_x = 0,12$ en el disolvente I, que se sospechó se trataría de kestosa. Por la técnica de FLOOD, HIRST y JONES se separaron 0,045 grs. de este último azúcar, en cuatro operaciones, sometiéndosele a los mismos ensayos (punto de fusión, examen de su poder reductor, hidrólisis, etc.) que en el caso de las pulpas, resultando ser completamente idéntico a la kestosa aislada de los extractos de pulpas, hasta el punto que no existían diferencias en el comportamiento cromatográfico entre ellas, y tampoco se observaba depresión alguna en el punto de fusión de la mezcla de kestosa procedente de ambos orígenes; el punto de fusión bien definido es de 145°C . Paralelamente se hizo un estudio similar con el extracto acuo-alcohólico de la preparación de pectocelulosa de semilla sin tegumentos, obteniéndose un resultado idéntico, sobre todo en lo que respecta a la presencia y proporción del azúcar kestosa, que era el que ocupaba mayormente nuestra atención. Por ello, en lo sucesivo se usó como materia prima para la separación de kestosa, los extractos de semilla sin piel.

Se intentó la separación cromatográfica de constituyentes en columna de celulosa, por arrastre con butanol medio saturado de agua, así como en columna de carbón-celita, arrastrando de una manera discontinua, con etanol acuoso de creciente grado alcohólico; se usaron porciones de 80 c.c. cada una y de grado alcohólico de 0-60 %, de 10 en 10 grados.

En unos últimos experimentos se adoptó la técnica de elución continua con gradiente, para lo cual, sobre una columna de 6×20 conteniendo 300 grs. de una mezcla de carbón-celita (1 : 1), se suministraba líquido de dos depósitos, uno conteniendo agua y otro etanol del 45 %, de modo que el grado alcohólico del eluyente, que iba creciendo, al cabo de 33 horas aproximadamente, era de un 30 %. Se separan así los monosacáridos

(1,3 grs. en conjunto), del trisacárido kestosa, que fué el último azúcar en salir (recuperándose 0,14 grs. de dicho azúcar) y que se obtuvo en un grado de pureza idéntico al logrado en microescala por la técnica de FLOOD, HIRST y JONES.

III

LAS GOMAS DE FRUTALES: CARACTERISTICAS FISICAS Y QUIMICAS E IDENTIFICACION DE ALGUNOS FRAGMENTOS OBTENIDOS POR HIDROLISIS DE AQUELLAS

PARTE TEÓRICA

En la parte general ya aludimos a las dificultades que entraña la determinación de estructuras de las gomas, grupo de sustancias que, por otro lado, aun no está suficientemente definido. Estas dificultades son comunes, en realidad, a los otros grupos de poliurónidos y muy especialmente a hemicelulosas y mucílagos. Sin duda muchas de estas dificultades son consecuencia de que todavía no se ha hecho una profundización de manera extensiva en este campo; con todo, después del desarrollo de las técnicas cromatográficas, se ha dado un buen avance, tanto en éste como en los otros grupos, al permitir aquellas técnicas identificar fragmentos en la hidrólisis escalonada de los poliurónidos, puros o impuros, que posteriormente dan pie para la reorganización razonada de la estructura de donde proceden tales fragmentos. La bibliografía de los últimos años nos muestra que, en general, los estudios de gomas han tenido por objeto el reinvestigar las estructuras de unas cuantas clásicas, tragacanto (132), esterculia (133), etc. No obstante, las escuelas de HIRST y JONES han emprendido también la revisión de otras gomas menos conocidas, entre las que citamos por el interés inmediato que para nosotros tienen, las de melocotonero (134), cerezo (135), limonero (136), ... Estos trabajos han conducido a la identificación de nuevos oligosacáridos, unos neutros

(132) AMER, Z. F., *Proc. Pharm. Soc. Egypt.*, Sci. Ed., 36, N.º 6, 3-20 (1954) [Ref. C. A. 50, 4454 (1946)].

(133) HOUGH, L. y JONES, J. K. N., *J. Chem. Soc.*, 1109 (1950).

(134) JONES, J. K. N., *J. Chem. Soc.* 534 (1950).

(135) JONES, J. K. N., *J. Chem. Soc.*, 3141 (1949).

(136) CONNELL, J. J., HAINSWORTH, R. M., HIRST, E. L. y JONES, J. K. N., *J. Chem. Soc.* 1696 (1950).

como la 3-O- β -L-arabopiranosil -L-arabinosa en el melocotón y otros ácidos como el 4-(D-glucuronósido)-D-galactosa en la goma de limón.

Realmente, nuestro propósito de estudiar las gomas de los frutales, de interés regional, surgió como consecuencia de la índole de los trabajos emprendidos por el *Departamento de Frutos y Conservas del C.S.I.C.*, al que pertenecemos.

En efecto, en los planes de trabajo de este Centro se intenta buscar siempre aplicación idónea a los productos y subproductos vegetales, en especial a los que de alguna manera tienen interés conservero. En este sentido, teniendo en cuenta que el número de plantaciones de frutales suministradoras de la materia prima, para la industria conservera, crece a gran ritmo, podría pensarse que, junto al fin primordial del Centro de conocer y aplicar los productos principales, tiene también importancia el estudio de otros productos secundarios. Este es el caso de algunas gomas de frutales de hueso que por su abundancia merecen, a nuestro criterio, atención industrial aparte de la meramente científica. El principal ejemplo en nuestro caso, es el de la goma de albaricoquero, pues aunque las excrecencias gomosas constituyen una anormalidad fisiológica no deseable, el hecho de que éstas se presenten con tanta frecuencia y dado el auge que está adquiriendo el cultivo de este frutal, aun considerando sólo la región murciana, podría ser de importancia su eventual aprovechamiento.

Sólo hemos encontrado en la bibliografía, una breve e indirecta referencia a un trabajo analítico hecho con goma de albaricoquero del Asia Central, a la que califican de «*gummi armeniaca*». Consideramos que un estudio profundo de la goma de albaricoquero «búlida» y de otras variedades, es fundamental para pensar en sus aplicaciones en España. Teniendo en cuenta que en la práctica arboricultora de la región murciana, son muchas las variedades de albaricoquero que se destinan a la producción de frutos para la conserva, se nos ofrecía la posibilidad de estudiar las gomas producidas por las diversas variedades, sobre todo por las que difieren ya en el injerto, ya en el portainjerto o ya en ambos, con el objeto de comprobar si realmente tenía influencia en la naturaleza de las gomas tal hecho. Si así fuera, podría ayudar a la interpretación de la formación bioquímica de las exudaciones gomosas, aparte de que la cuestión pudiese tener un interés práctico inmediato, bien por la calidad técnica de las gomas producidas por unas u otras variedades, o bien desde un punto de vista analítico, si pudiera demostrarse que la especificidad era tan grande, que el método nos permitiera identificar las variedades por un simple análisis de sus gomas. De hecho parece ser que cada especie arbórea produce una goma distinta de la otra, así por ejemplo

JONES (loc. cit. 136) observa homogeneidad entre las producidas por melocotoneros criados en Italia y otros desarrollados en Inglaterra, en tanto existe una clara diferencia con las gomas de ciruelo o arábica, mucho más complicadas y a su vez diferentes entre sí. HIRST y JONES (137) sugieren precisamente el interés que tendría un estudio de este tipo, puesto que, en principio, es previsible una influencia del historial del árbol (sobre todo por lo que a injertos se refiere) en las características de las gomas. Sin embargo, estos autores no pudieron realizar tal idea, por lo que hemos pretendido nosotros colaborar al esclarecimiento de este punto, tomando como materia prima la goma de albaricoquero de diferentes variedades, en nuestro caso todas cultivadas en la misma zona.

Menos interés económico previsible ofrece la goma de melocotonero, puesto que su proporción en los respectivos frutales es más pequeña; se presenta en nódulos de poco tamaño en tanto la de albaricoquero lo hace en otros más voluminosos. No obstante creemos que un estudio de esta goma ofrece también un gran interés ya que, por un lado, nos permite compararla con las otras gomas que, igualmente, son objeto de nuestra atención y por otro, con las investigaciones de JONES (loc. cit. 134) realizadas también sobre goma de melocotón, aunque, en su caso, se hizo especialmente sobre las de procedencia italiana.

Para mayor eficacia extendimos nuestros estudios comparativos a otras gomas de frutales que pertenecen a especies del mismo género que albaricoquero y melocotonero; éstas fueron ciruelo japonés y almendro, ambos del género *Prunus*. Además, como más distintas, en principio, al menos por proceder de especies de otros géneros, se estudian la arábica (del género *Acacia*), la de limonero (*Citrus lemon*) y, en algunos aspectos, también la goma tragacanto (*Astragalus sp.*).

Sobre la goma de limonero existen ya en la bibliografía varios trabajos (138), (139), (140), pero entre sí se observan diferencias de resultados y si a ello se agrega el que ninguno fué hecho con gomas procedentes de árboles españoles, queda justificado el que también hayamos revisado la composición de tal goma con el fin de aportar algún nuevo dato al conocimiento general de este campo de trabajo.

Nuestros estudios han abarcado aspectos muy diferentes, desde los de interés sólo técnico hasta los de exclusivo interés científico. Por ello,

(136 bis) ULANSKI, Z. N., OL'SHANSKI, M. I. y FIRMESMAN, M. L., *Farmakol i Toksikol*, 9, 63 (1946) [Ref. C. A., 41, 3584 (1947)].

(137) HIRST, E. L. y JONES, J. K. N., *The Analysis of Plant Gums and Mucilages* [PARCH, K. y TRACEY, M. V., *Modern Methods of Plant Analysis*, vol. II, Springer-Verlag, Berlín-Göttingen-Heidelberg, pág. 280 (1955)].

(138) PARISI, E., *Ann. chim. applicata*, 25, 230 (1935).

(139) ANDERSON, E., RUSSELL, F. H. y SIEGLE, L. W., *J. Biol. Chem.*, 113, 683 (1936).

(140) CORRAO, A., *Industria Conserve*, 32, 294 (1957).

en las diversas gomas se han determinado por un lado características tales como densidad, solubilidad, viscosidad de disoluciones..., suministrando datos prácticos, a la vez que, por otro lado, se determinaron componentes globales, como humedad, lignina, cenizas, azúcares totales, proteínas..., cuyos resultados interesan más desde otros puntos de vista. Por último se han hecho determinaciones de constituyentes y de grupos funcionales específicos tales como la valoración de metoxilo, la de cationes en cenizas o la concreta determinación de los azúcares individuales que constituyen el polisacárido fundamental de cada una de las gomas, aportando así algunos datos para dilucidar la estructura de cada uno de estos polisacáridos. Debe destacarse igualmente el estudio estructural comparativo que se ha intentado, desde un punto de vista físico, por medio de la medición de espaciados, a partir de los datos de los correspondientes rontgenogramas.

Indicadas, a grandes rasgos, cuáles han sido las facetas estudiadas, quizá convenga comentar con más detalle las diferentes técnicas utilizadas y deducciones conseguidas, sin menoscabo que los datos concretos se reserven para la parte experimental de este capítulo.

Desde el momento de recogida de las diversas muestras de gomas utilizadas se aprecia una consistencia variable, ya sean éstas diferentes o aun tratándose de gomas del mismo árbol. Esta consistencia era debida principalmente al grado de hidratación, el que a su vez dependía sin duda del grado de actividad de los tejidos inmediatos a la goma del vegetal en que se halla localizada la gomosis. No nos referimos aquí a las diferencias de consistencia motivadas por la inclusión de partículas extrañas a la goma propiamente dicha, como puedan ser algunas esquirlas leñosas o el propio polvillo del ambiente que quedó ocluido por la secreción antes de su semisolidificación; sobre todo en lo que respecta a las porciones leñosas y a las de partículas de suelo groseras, se separaron en todos los casos de una manera mecánica, por lo que en general no entorpecían los experimentos fundamentales.

Tanto para confirmar que la consistencia estaba bastante ligada a la hidratación, como para disponer del dato de humedad que necesitaríamos en la mayoría de los experimentos posteriores (densidad verdadera, viscosidad, características químicas diversas, etc., etc.) para el cálculo de porcentajes reales, se procedió a determinar el agua contenida en cada una de las gomas, determinándose la pérdida de peso a 100-105° C, resultando valores distintos para cada una y coincidiendo, en general, las de consistencia más blanda, con las más ricas en agua, pero sin que exista proporcionalidad al tratarse de gomas distintas.

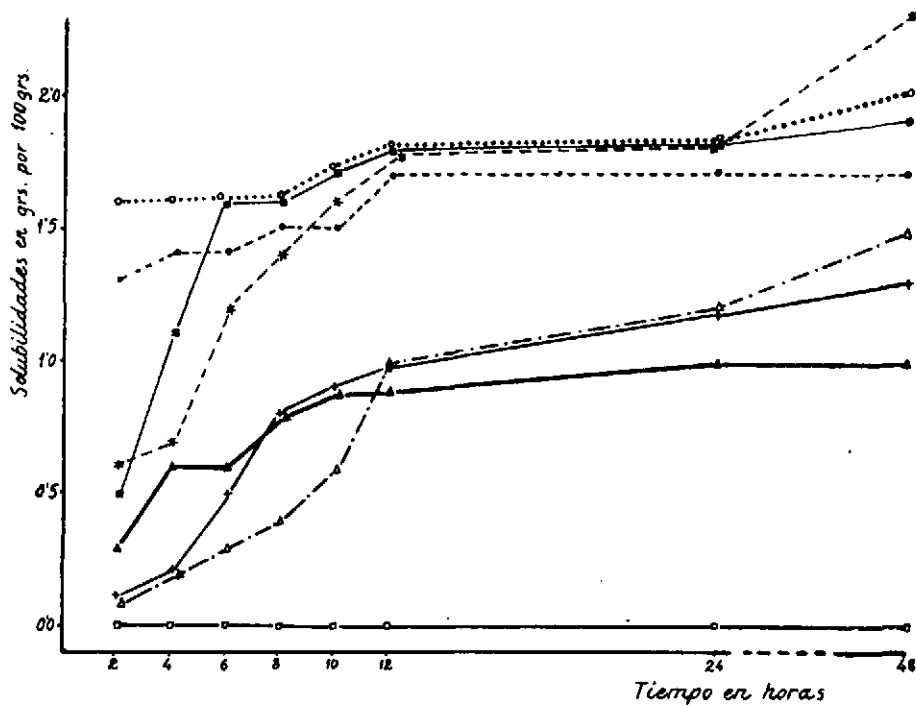
Los datos que se recogen en la parte experimental se refieren a las

determinaciones hechas al iniciar los experimentos, no recogándose en cambio las posteriores determinaciones que tuvieron que hacerse antes de la valoración de cada componente, dado que, después de la recogida, proseguía la desecación.

A continuación comentaremos nuestros experimentos sobre solubilidades. Dada la gran diversidad de comportamiento, ya a primera vista, de las distintas gomas objeto de nuestro estudio al ponerlas en contacto con el agua, consideramos que era conveniente el compararlas bajo una observación objetiva. Para ello se adoptó como criterio el preparar muestras de aproximadamente el mismo peso, en contacto con una proporción determinada de agua, agitando todos y cada uno de los conjuntos durante dos minutos, a intervalos de dos horas, siguiendo la solubilidad durante 12 horas, también de dos en dos horas, y controlando de nuevo a las 24 y 48 horas de iniciado el contacto. El control de solubilidad se hizo de una manera convencional por medidas refractométricas, realizadas, en cada caso, inmediatamente después de la última agitación. Paralelamente a estos ensayos de control refractométrico se hicieron otros en que el control de sólidos disueltos se hacía por pesada tras evaporación de una parte alícuota. Con los resultados obtenidos refractométricamente que se tabulan en el apéndice experimental, se han confeccionado los gráficos I y II, en los que, en realidad, se refleja tanto la velocidad de solubilización como la relación que existe entre los valores absolutos de porción disuelta de cada una de las clases de estas gomas. Se observa que la más fácilmente soluble es la arábica, que desde los primeros momentos muestra un elevado índice de refracción, en tanto que la de solubilización más lenta es la del almendro, cuya curva muestra una pendiente prácticamente nula. Las gráficas III y IV son equivalentes a las anteriores, pero se han confeccionado representando en ordenadas las lecturas del refractómetro en porcentaje de solubles (escala que, en realidad, está destinada a disoluciones de sacarosa).

Por otro lado, se ensayó también como criterio posible la determinación por pesada del residuo que dejaban porciones idénticas de disolución al cabo de tiempos crecientes; como un ejemplo, se acompaña la gráfica V obtenida para el caso de la goma de albaricoquero búlida, patrón ciruelo.

En dicha gráfica se confirma, en líneas generales, la curva obtenida por lectura refractométrica, aun cuando los valores correspondientes a tiempos iguales, obtenidos por pesada, sean superiores a los del otro procedimiento.

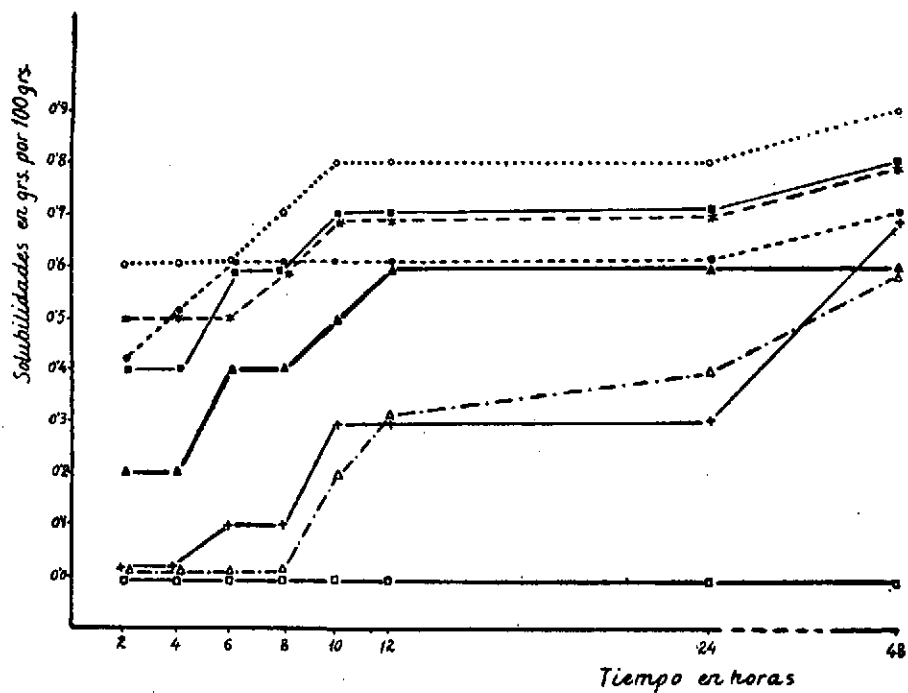


- — Almondo
- △ — Ciruelo japonés
- + — Búfida myrobolán
- ▲ — Melocotonero
- — Búfida ciruelo
- * — Búfida albaricoquero
- Limonero
- Arábica

— Solubilidades de diversas gomas en agua en función del tiempo, partiendo de 2 grs. en 100 c.c. de agua a 28°C. —

Fig. I





- — Almendro
- △ — Ciruelo japonés
- + — Búfida myrobolan
- ▲ — Melocotonero
- — Búfida ciruelo
- * — Búfida albaricoquero
- — Limonero
- — Arábica

— Solubilidades de diversas gomas en agua en función del tiempo, partiendo de 1 grs. en 100 cc. de agua a 28°C. —

Fig. II

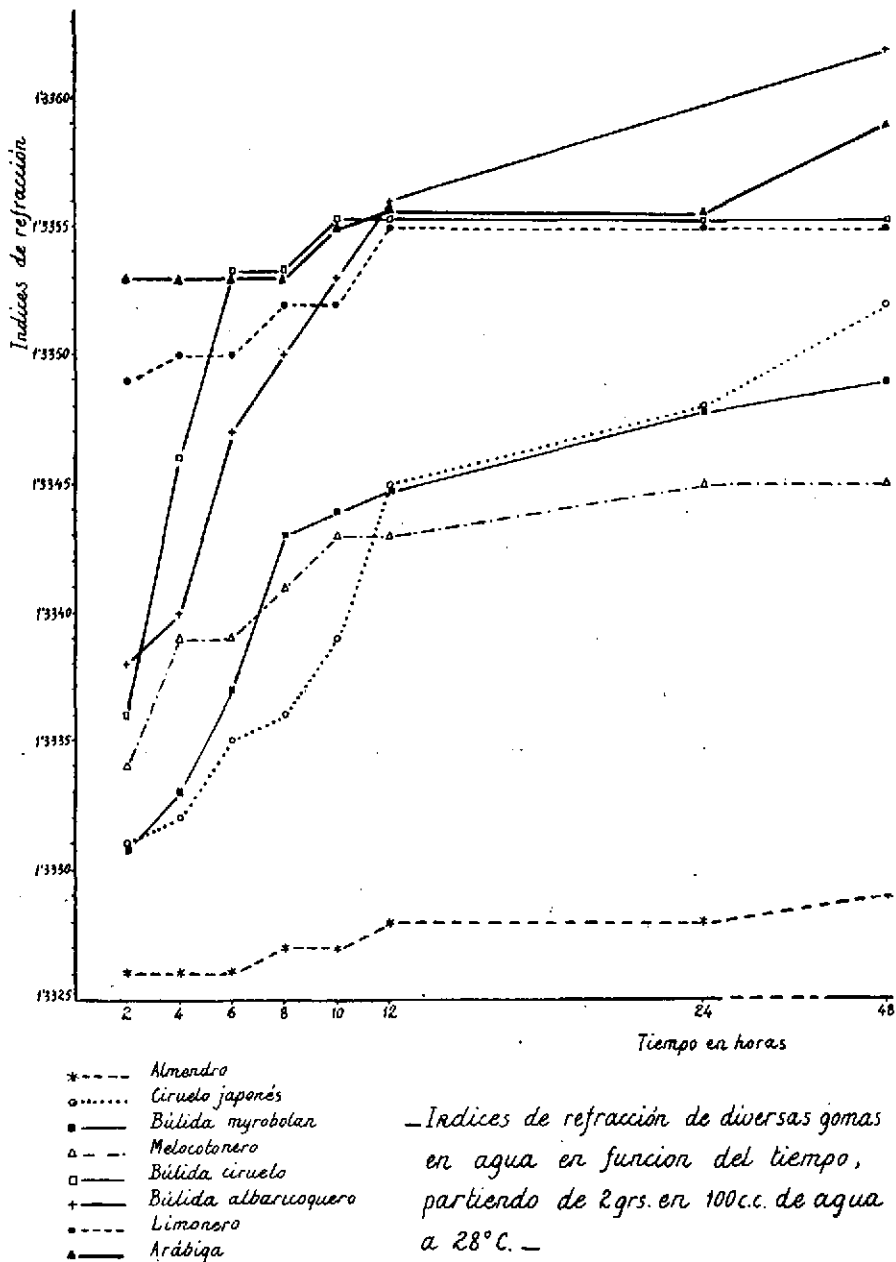
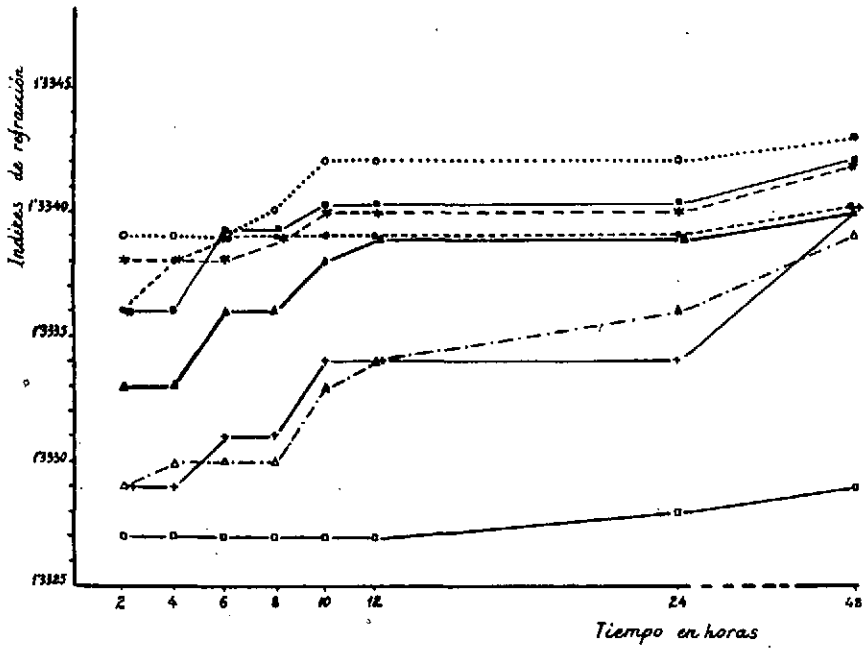


Fig. III



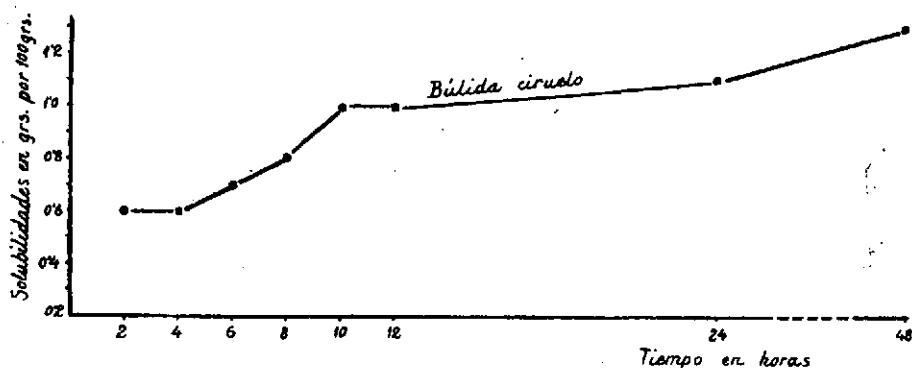


- Almendo
- Ciruelo japonés
- Búlida myrobolán
- Melocotonero
- Búlida ciruelo
- Búlida albaricoquero
- Limonero
- Arábigo

— Índices de refracción de diversas gomas en agua en función del tiempo, partiendo de 1 gr. en 100 c.c. de agua a 28° C. —

Fig. IV





Solubilidad de la goma de bulida ciruelo en función del tiempo, partiendo de 1gr. en 100c.c. de agua a 28° C.

Fig. V

Los experimentos de solubilidad nos permitieron además el observar la forma en que ésta tenía lugar, ya que ello es una característica bastante específica de cada goma, hasta el punto que, en las referencias analíticas de algunas de las más clásicas, se destaca este comportamiento. En el apéndice experimental, en forma de tabla, se recogen los resultados.

Otra característica que se determinó en las gomas, fué la densidad de diversas disoluciones. Se siguió la técnica picnométrica de SPRENGEL y las variaciones observadas de una a otra goma para disoluciones de la misma concentración son relativamente pequeñas, ya que, incluso a concentraciones distintas los valores experimentales extremos, sólo oscilan entre 1,0037, que corresponde a la del almendro y 1,0070 que corresponde a la arábiga. El dato de densidad era necesario para el cálculo de viscosidades específicas.

Los coeficientes de viscosidad se determinaron por medio de un viscosímetro de OSWALD, modelo en U, tomando como líquido de comparación agua destilada. Las determinaciones se hicieron a 28° C, que era la temperatura ambiente en el laboratorio durante los experimentos, consistiendo en la medida del tiempo requerido para que el nivel del líquido problema o del agua, pase por dos enras del capilar del viscosímetro. La viscosidad relativa se determinó por la expresión

$$\frac{\eta}{\eta'} = \frac{D}{D'} \times \frac{t}{t'}$$

que se deduce de la ley general de POISEUILLE. De los valores de viscosidad relativa (η_r) se dedujeron las de viscosidad específica ($\eta_{esp} = \eta_r - 1$

y se quiso comprobar si se cumplía o no la sencilla ley de EINSTEIN (141) cuya expresión matemática es

$$\eta_r = 1 + K \cdot \varphi$$

en la que K es una constante y φ (el volumen de la fase dispersa) = $\frac{c}{d}$ siendo c = concentración en grs./l. y d = densidad del soluto. Se comprobó fácilmente que la citada ley, que corresponde realmente a los esferocoloides, no tenía aquí aplicación, pues de nuestros datos de viscosidad, se dedujeron valores para K ($K = \eta_{\text{esp.}} \cdot \frac{d}{c}$) muy superiores. En efecto, aun el valor más pequeño de K obtenido por nosotros ($K = 0,0704$ para la goma de limonero) es superior al que se admite para los esferocoloides, que es un valor constante (0,0025), independiente según EINSTEIN del tamaño de las partículas. Tampoco se encuentran dentro de los casos observados por STAUDINGER con el glucógeno y derivados esferocoloides, para los cuales, si bien K se mantiene prácticamente constante, toma en cambio valores bastante más elevados que el 0,0025 de EINSTEIN, dependiendo éste, muchas veces, incluso del disolvente; precisamente STAUDINGER explica estas anomalías por la existencia de fenómenos de solvatación.

Nuestro caso se encuentra más relacionado con lo que sucede con los coloides lineales en los que no se cumple la relación de EINSTEIN, sino que, por el contrario, la η_{esp} ya muy alta para concentraciones pequeñas, depende extraordinariamente del grado de polimerización o magnitud de la molécula dispersa (142). STAUDINGER ha estudiado una amplia serie de sustancias de tipo polimérico, deduciendo que en una primera aproximación, se cumple la relación sencilla •

$$\frac{\eta_{\text{esp.}}}{c} = K_m P$$

expresión en la que K_m es una constante, c es la concentración en gramos/l y P representa el grado de polimerización o número de eslabones contenidos en la molécula. STAUDINGER llama a la expresión η_{esp}/c , número o índice de viscosidad, la cual puede corregirse multiplicándola por el peso específico de la sustancia disuelta. Otra expresión parecida es $\eta_{\text{esp.}}/a$, siendo a la concentración en grs. por 100 grs. de disolución;

(141) EINSTEIN, A., *Ann. der Physik.*, 19, 289 (1906) y 34, 591 (1911).

(142) SOLER, A., *Anales de la Universidad de Murcia*, pág. 49 (1945).



a esta relación, para $a \rightarrow 0$, le llaman KRAEMER y LAMSING (143) viscosidad propia η y su valor absoluto es 10 D veces superior al índice de viscosidad de STAUDINGER.

A partir de los datos de viscosidad específica para las diversas gomas, hemos calculado el índice de viscosidad $K_m P$ para cada una de ellas, lo que nos permite establecer la relación existente entre sus grados de polimerización. Aplicando para K_m el valor 12×10^{-1} que STAUDINGER y REINECKE (144) utilizaron para derivados de la celulosa y que CHANDA, HIRST y PERCIVAL (145) usaron para la determinación de pesos moleculares en el caso de la xilana de pera, hemos obtenido en una primera aproximación, el grado de polimerización para las diversas gomas, ya que los eslabones de pentosas, hexosas y urónicos que en los mismos intervienen, aportarán incrementos de viscosidad parecidos a los de los casos referidos.

Por otro lado, teniendo en cuenta que algunas gomas muy conocidas, como son por ejemplo la tragacanto y arábica, se diferencian entre sí en el comportamiento frente a ciertos reactivos de precipitación, se observó si en las experiencias realizadas por nosotros podría apreciarse igualmente alguna diferencia de comportamiento que añadiera así alguna característica con fines analíticos. Sin embargo, al probar las reacciones de precipitación con los distintos reactivos, que se especifican en el apéndice experimental, se comportaban todas de manera prácticamente idéntica, lo que está de acuerdo con las grandes analogías constitucionales que hemos encontrado entre ellas.

Posteriormente se hicieron algunas determinaciones clásicas en el análisis de cualquier material vegetal, así por ejemplo, se determinó en primer lugar el residuo mineral obtenido por calcinación (cenizas), sobre el cual se determinó además la proporción de calcio y magnesio, por intervenir estos cationes muy frecuentemente como constituyentes de las gomas, hasta el punto de que algunas de éstas pueden considerarse como sales de ácidos polibásicos de alto peso molecular. Estas determinaciones ofrecían además otro interés, como era el comparar el contenido en estos cationes de las gomas arábica y de albaricoquero, ya que dada la gran viscosidad de las disoluciones diluídas de esta última, y en vista de no ser previsibles componentes nocivos, cabe su utilización como expansivo de plasma en sustitución de la arábica, sobre todo una vez que se comprobó el inferior contenido en cationes mostrado por la goma de albaricoquero.

(143) KRAEMER y LAUSING, *J. Phys. Chem.*, **39**, 153 (1935).

(144) STAUDINGER y REINECKE, *Annalen*, **535**, 47 (1938).

(145) CHANDA, S. K., HIRST, E. L. y PERCIVAL, E. G. V., *J. Chem. Soc.*, 1240 (1951).

El contenido en pentosanas así como en azúcares totales por hidrólisis se determinó así mismo, ya que uno y otro dato son interesantes para ayudar a conocer la estructura de las diversas gomas. La determinación de pentosanas se realizó por el procedimiento general de valoración del furfuraldehído desprendido por la acción del CIH. Se realizó, como ya se ha descrito repetidamente en los casos anteriores, por el método de KULGREN y TYDEN. Los azúcares totales se determinaron por hidrólisis completa de cada goma por el método de MONIER-WILLIAMS, aunque otras determinaciones se hicieron sobre las aguas de lavado de la determinación de lignina realizada por el método de RITTER, que aunque indirectamente es en esencia análogo a aquél. Todos estos métodos fueron descritos al tratar de las pulpas.

Teniendo en cuenta que las gomas, aun cuando en principio sean hidratos de carbono, suponen en realidad un agregado biológico con todas sus consecuencias, es natural que en las mismas exista una cierta proporción de nitrógeno, ya sea integrando proteínas propiamente dichas, o bien ácidos nucleicos; una parte de nitrógeno pertenecerá a algunas de las enzimas cuya presencia en las gomas se ha demostrado, especialmente a las peroxidases. La determinación de nitrógeno se hizo por el método de KJELDAHL, estando comprendidos los valores obtenidos entre el 2 y el 3 % de proteínas ($N \times 6,25$), aproximadamente.

Una determinación que hemos llevado a cabo por la importancia bioquímica que pudiera presentar, es la de ácido pirúvico, ya que, recientemente, SUSUMU HIRASE (146) ha encontrado su presencia en el agar-agar, e incluso ha podido aislar un disacárido que lleva firmemente unida una molécula de pirúvico y determinar la estructura del citado polisacárido. HIRASE pensó si el pirúvico podría aparecer en otros polisacáridos y examinó con este fin dos mucílagos de algas, goma arábiga, pectina de manzana, una manzana y almidón, obteniendo en todas sus pruebas resultados negativos. Nosotros hemos considerado interesante analizar este componente en todas nuestras gomas, aunque, en principio no sería raro encontrar pirúvico combinado, puesto que no hay duda de que su presencia en estado libre es normal en muchos tejidos. Para la identificación del ácido pirúvico en las diversas gomas objeto de nuestro estudio se siguió la misma técnica de los autores citados, con objeto de que los resultados fuesen más comparativos, haciendo en todos los casos ensayos paralelos con gomas a las que se les había agregado previamente pirúvico. En estos últimos pudimos comprobar que el método de identificación era suficientemente eficaz, siendo negativos los resultados para cada una de las gomas ensayadas. Cabe deducir de ellos que el pirúvico

(146) HIRASE, S., *Bull. Chem. Soc. Japan*, 30, 68 (1957).

encontrado por HIRASE en el agar, y confirmado por nosotros, se presenta en el citado mucílago como componente bastante específico hasta tanto no pueda demostrarse su presencia en cualquier otro polisacárido.

Las determinaciones aquí descritas se hicieron sobre gomas que sólo habían sido purificadas mecánicamente. Sin embargo, se hicieron otras cuantas determinaciones de interés, para las que se requirió el utilizar gomas con un cierto grado de purificación física y química. Estas determinaciones fueron: índice de metoxilo, contenido en CO_2 (por urónicos) y espectrorontgenogramas.

La purificación consistió en líneas generales en disolver la goma en agua, precipitando a continuación con alcohol, repitiendo este proceso alternativo tantas veces como cada caso requirió, hasta obtener un polvo blanco de fácil solubilidad y características constantes.

Para la determinación de índice de metoxilo se utilizaron muestras purificadas y desecadas hasta peso constante en la pistola de ABDEEHALDEN; se siguió el método de VIEBOCK [modificación de A. SOLER y A. CARRASCO (loc. cit. 91)], oscilando los resultados obtenidos entre 1,06 para la goma arábica y 3,89 para la goma de limón.

También sobre gomas purificadas se determinó el contenido urónico recogiendo, en $\text{Ba}(\text{OH})_2$, el CO_2 desprendido por la acción de ClH , es decir, el mismo método que ya seguimos en el caso de las pulpas y semillas.

Sin pretender resultados absolutos, se realizó un estudio por Rayos X de las distintas gomas purificadas, adoptando el método del polvo cristalino de DEBYE, SCHERRER y HULL (loc. cit. 2) en el que, como se sabe, la muestra ha de reducirse a polvo, en forma tal que al pasar los rayos a su través existirá siempre algún cristal microscópico (en el caso de que la estructura sea cristalina), correctamente dispuesto para que la reflexión pueda tener lugar. En realidad de cada plano cristalino no se obtiene un solo rayo reflejado, sino un cono de rayos de ángulo semivertical 2θ , cuyo vértice viene determinado por todas las posibles orientaciones del cristal. Al cortar, por un plano (placa fotográfica), perpendicular al eje de los conos correspondientes a diversos planos cristalinos, se obtendrá una serie de círculos concéntricos cuyas diferencias de radio permitirán la determinación de los espaciados reales. También pueden obtenerse los diagramas cortando dicha serie de conos por una placa fotográfica situada ecuatorialmente a dicho eje central, en cuyo caso, los círculos estarán sustituidos por líneas o arcos paralelos que nos permitirán medir, igualmente, el espaciado entre planos cristalinos. La relación matemática que

liga estos espaciados con la longitud de onda es, como se sabe, la sencilla relación de BRAGG

$$\lambda = 2d \cdot \text{sen } \theta$$

Es muy frecuente, salvo en los casos de cristales complicados de muy baja simetría, el que los rontgenogramas sean característicos para cada estructura cristalina particular, por lo que el método de Rayos X puede ser suficiente para una identificación inequívoca. En este sentido, la «American Society for Testing Materials» (A.S.T.M.), ha llegado a publicar unas tablas en las que quedan recogidas los rontgenogramas obtenidos, según la técnica del polvo cristalino, de muchos miles de compuestos inorgánicos y, en proporción, sólo de un cierto número de compuestos orgánicos, que sirven de standard para la comprobación de materiales. Pensando en la posible utilidad de los Rayos X para nuestro caso, se hicieron los rontgenogramas correspondientes, utilizando para el empastado de las muestras, grasa de vacío, observándose que, en general, todas ellas son sustancias amorfas puesto que los diagramas obtenidos en cada caso son análogos al diagrama fondo de la grasa. Sin embargo, en las gomas correspondientes a moniquí myrabolán y real fino myrabolán, parece que hay algo de materia cristalina, existiendo también indicios en las gomas búlidas myrabolán y ciruelo japonés. Los diagramas de estos cuatro cuerpos son semejantes, siendo 4,06 y 3,64 los espaciados de las rayas, el primer dato de los cuales corresponde a la raya fondo característica de la grasa de empaste. Un mayor grado de cristalinidad muestra la goma de almendro, ya que, además de la línea de la grasa de vacío, ofrece en los cromatogramas otras rayas cuyos espaciados son 2,72 y 2,44. En la parte experimental se recogen las tablas de valores así como reproducciones fotográficas de los diagramas (*) correspondientes a las diversas gomas, así como el de grasa de vacío y un diagrama correspondiente a celulosa de esparto (**) con fines comparativos.

Una vez que hemos dado cuenta de esta serie de experimentos que han tenido por fin el proveernos, en lo posible, de métodos de caracterización, a la vez que sirvieran para deducir bastantes analogías de comportamiento en los diversos aspectos físicos, describimos seguidamente, de una manera también breve, los experimentos de hidrólisis total y escalonada y de identificación.

En primer lugar, para calificar la naturaleza ácida o no de las distintas gomas, se hizo la determinación de pH de cada una de ellas, usando

(*) Obtenidos por el Instituto Alonso de Santa Cruz, del C.S.I.C., a quien agradecemos esta cooperación.

(**) Este último cedido por cortesía de M. PARRA, de nuestro Departamento.

muestras iguales en peso, disueltas en porciones de agua también iguales. El pH variaba entre 4,66 y 6,2 apareciendo como más ácida la goma arábica y como menos la de melocotonero. Dado el carácter ácido, aun cuando no muy pronunciado, se intentó observar si tenía lugar o no autohidrólisis, de las gomas al estar en disolución acuosa a la temperatura ambiente; para ello se tomaron muestras de 2 en 2 horas, al principio, y de 12 en 12 horas después, cromatografiándolas en papel. No encontramos evidencia de que la autohidrólisis tuviese lugar en estas condiciones pese a que se admite que, en general, las gomas ácidas se autohidrolizan fácilmente.

Intentamos entonces una autohidrólisis en condiciones más forzadas, para lo cual, porciones de cada una de las gomas en agua, en la relación 1 : 10, aproximadamente, se calentaron a b.m. durante 3 días, siguiendo, como en el caso anterior, la marcha de la hidrólisis por cromatografía en papel. En estas condiciones pudo apreciarse que, en todas las gomas ensayadas, aparecía arabinosa relativamente pronto; aproximadamente a las 40 horas se distinguían arabinosa y xilosa (salvo en la de limonero y arábica), mas varios oligosacáridos; diez horas más tarde aparecía también galactosa. Al cabo de 3 días de calentamiento a b.m. no se apreciaban variaciones en los correspondientes cromatogramas. Se repitió entonces el experimento para comparar el poder reductor de dos disoluciones de goma de albaricoquero búlida que se tomaron como ejemplo; una fué sometida durante 48 horas al proceso de autohidrólisis y otra durante 72 horas. La determinación del poder reductor, según BENEDICT, nos demostró que el contenido en reductores era idéntico en ambos casos, por lo cual puede asegurarse que, al cabo de las 48 horas, la autohidrólisis en estas condiciones había alcanzado su máximo, afectando aproximadamente a la mitad del total de la goma. En la fig. VI se representan gráficamente los resultados obtenidos.

Posteriormente se intentó la hidrólisis también suave pero en un medio ácido mineral, para seguir la marcha, también por cromatografía, a lo largo de tres semanas. Aunque los resultados más concretos se darán en la parte experimental, puede aquí indicarse que, la hidrólisis, se hizo con ClH 1N a temperatura ambiente y que, aparte de identificar en papel los azúcares resultantes, se hizo también en todos los casos un fraccionamiento en columna de celulosa. Como resultados generales debe fijarse la aparición de L-arabinosa en todas ellas al poco tiempo de iniciada la hidrólisis, en tanto los restantes mono y oligosacáridos requieren mayor tiempo para liberarse, lo cual está de acuerdo con la intervención de la arabinosa con anillo furánico, lo que determina siempre una mayor vulnerabilidad. Realmente se repite lo sucedido en la autohidró-

lisis, sólo que a una velocidad mucho mayor. La hidrólisis en estas condiciones no afectó a todo el material, pues, como posteriormente se vió al comparar los resultados obtenidos por hidrólisis más forzada, la proporción absoluta de azúcares, era bastante superior en este último caso. Los cromatogramas obtenidos con las distintas gomas en la hidrólisis en frío,

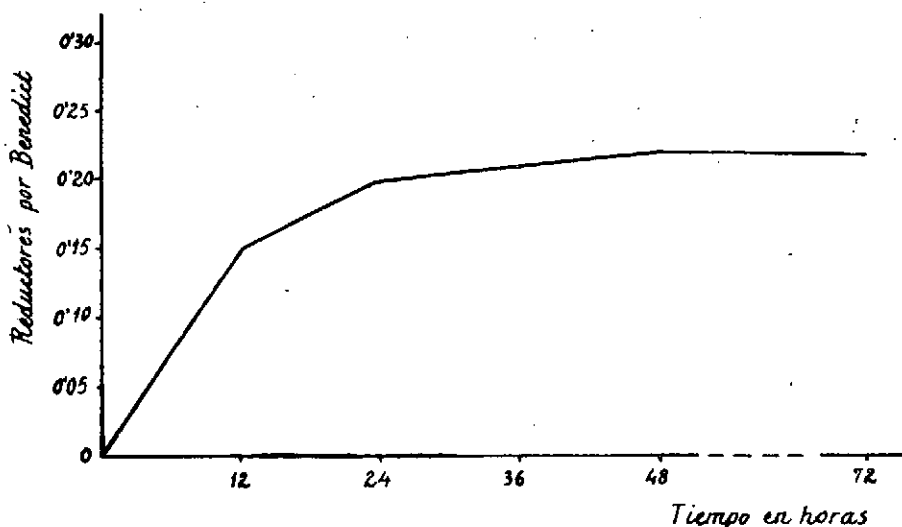


Fig. VI. Autohidrólisis de gomas de frutales

tenían de común, como se ha indicado, la precoz presencia de arabinosa, pero en los que respecta a otros azúcares aunque a la larga llegaban a ser los mismos, se manifestaba una diferencia de complejidad en los cromatogramas a causa de los oligosacáridos intermedios.

Después de tres semanas de hidrólisis a temperatura ambiente y puesto que no se observaban ya cambios en los cromatogramas, se procedió a identificar en lo posible los componentes de cada uno de los hidrolizados de las distintas gomas, así como a fraccionarlos, previa neutralización parcial, como en otros casos hasta $\text{pH} = 3,4$ desionización con resinas, concentración a vacío, etc., lo que permitía un primer fraccionamiento en fracción neutra y ácida. La fracción ácida queda retenida en una de las columnas (Amberlita IR-4B), y se aparta. La fracción neutra se pasa por una columna de celulosa, usando como eluyente *n*-butanol medio saturado de agua, recogiendo las fracciones con colector automático y tomando las demás precauciones que hemos recomendado

para el caso de las pulpas y de las semillas. Las fracciones se controlan por cromatografía en papel, tomando muestras de los tubos del colector para localizar componentes. Se separaron sucesivamente en los primeros 150 tubos, los azúcares ramnosa, xilosa y arabinosa y en los tubos posteriores (se recogieron más de 500 fracciones) se separaron galactosa y varios oligosacáridos.

Sobre otra porción de la fracción neutra se hizo una separación previa de mono y oligosacáridos por utilización de una columna de carbón-celita y elución posterior con mezclas agua-alcohol de riqueza creciente en el segundo componente, observándose concordancia de resultados cuando las porciones de mono y oligosacáridos se refraccionaban por separado sobre columna de celulosa.

Los azúcares ácidos se fraccionaron, en cambio, mediante la técnica de FLOOD y otros, pudiendo aislarse un urónico sencillo (glucurónico), un aldobiurónico, un triurónico y otros de mayor grado de polimerización.

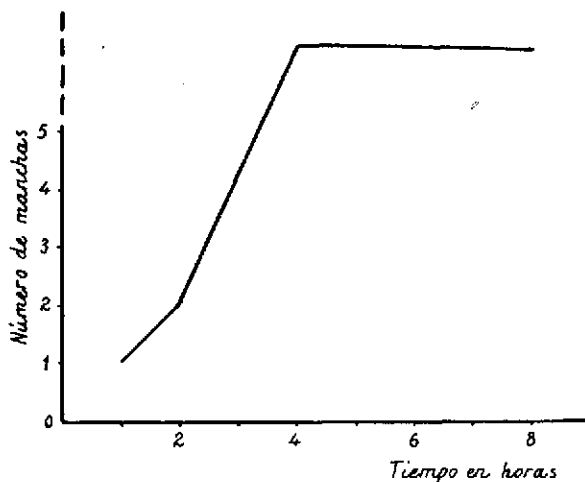
Los monosacáridos separados de una y otra forma no mostraban dificultad alguna de caracterización, sin embargo, aun se prepararon las fenilosazonas correspondientes, confirmándose la familia estereoquímica a la que pertenecía cada una, por medida de su poder rotatorio. Resultaron ser inequívocamente: L-ramnosa, D-xilosa, L-arabinosa, D-galactosa y D-glucurónico; los azúcares producidos en la hidrólisis suave eran comunes e idénticos a todas las gomas de prunáceas. En cambio, en la de limonero no aparece xilosa ni tampoco encontramos ribosa que al parecer detectaron CORRAO y otros (loc. cit., 140), en la goma de limoneros italianos; tampoco aparece xilosa en la goma arábica, pero sí L-ramnosa, azúcar que otros autores (loc. cit. 62) encuentran en ciertas muestras de esta goma. En la goma tragacanto encontramos además de D-galactosa, L-arabinosa y D-xilosa, el ácido D-galacturónico y L-fucosa.

Por lo que respecta a los oligosacáridos sólo nos detuvimos en la identificación de los disacáridos más abundantes de cada una de las gomas. Existían, sin embargo, fragmentos de mayor peso molecular que, en esta primera investigación, no pudimos aislar en estado de pureza y en cantidad suficiente para permitirnos el estudio estructural correspondiente. Se comprobó que, por lo menos dos de los disacáridos neutros aislados de la columna de celulosa y un disacárido ácido (separado por la técnica de FLOOD), eran comunes a todas las muestras hidrolizadas. Los neutros resultaron ser xilo-arabinosa y arabobiosa, el primero especialmente notorio en la goma de melocotonero, conclusión a la que pudo llegarse atendiendo a sus R_f , a los productos de hidrólisis de éstos y a la naturaleza de las correspondientes osazonas. El oligosacárido ácido, también común

a todas las gomas, se caracterizó, después de una serie de experimentos como el 4-(4-O metil-glucuronósido) L-arabinosa, cuya presencia resultaba claramente más manifiesta en el caso de la goma de limonero. Sin menoscabo de que más adelante demos una explicación más amplia de la marcha seguida para identificar los diferentes fragmentos, daremos cuenta que, todavía, se sometieron las gomas a hidrólisis más forzadas. Por un lado, se hidrolizaron en las condiciones que hemos adoptado y descrito repetidamente para hemicelulosa, es decir, a la acción de SO_4H_2 1N en caliente (baño maría), durante un tiempo que osciló entre 1 y 8 horas, para varias muestras de cada goma, con el fin de comprobar la marcha de hidrólisis. Encontramos que, en estas condiciones, al cabo de 1 hora, aparece una sola mancha debida, de manera inequívoca, a L-arabinosa, lo que sigue estando de acuerdo con el supuesto de que ésta se encontrará en forma furanosa; a las dos horas ya son dos las manchas bien típicas que aparecen en los cromatogramas, una debida a L-arabinosa y otra a L-ramnosa. A las cuatro horas aparecen una serie de manchas correspondientes a los dos azúcares citados más galactosa, xilosa y ácido glucurónico así como toda una serie de oligosacáridos. Se observa que al prolongar el tiempo hasta las ocho horas, crece la proporción relativa de monosacáridos pero sin variar el número de manchas debidas a éstos, manteniéndose también el número de oligosacáridos. Disminuye la concentración de oligosacáridos neutros, mas no así la de los fragmentos ácidos que, aproximadamente, dan manchas de la misma intensidad aun cuando se prolongue la hidrólisis, lo que está de acuerdo con su probable naturaleza de aldobiurónicos, desde que se sabe que los disacáridos ácidos son bastante estables, como tuvimos ocasión de demostrar en los casos anteriormente descritos para pulpas y semillas.

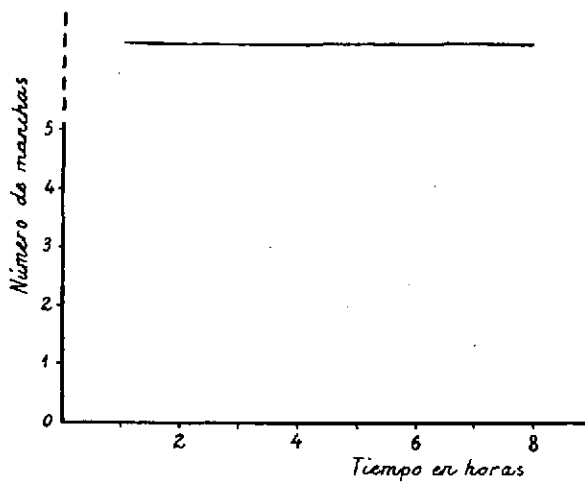
En la fig. VI se ha representado de una manera convencional esta marcha de hidrólisis, indicándose en ordenadas el número de manchas de azúcares que aparecen en los cromatogramas, en tanto en abscisas se da el tiempo en horas desde que se inicia la hidrólisis.

Con el fin de forzar más las condiciones de hidrólisis, se sometieron las varias gomas, a la acción de SO_4H_2 2N, a b.m. y reflujo, como en el caso anterior, siguiendo también cromatográficamente la marcha de hidrólisis. Se observa que al cabo de 1 hora aparecía un cromatograma idéntico al obtenido en cuatro horas de ataque con SO_4H_2 1N. Los polímeros seguían mostrando resistencia a la hidrólisis, siendo ésta más manifiesta en los oligosacáridos ácidos, como sucedía con el SO_4H_2 más diluido. En la figura VII se ha representado el proceso con el mismo criterio que en el caso anterior, y como quiera que el número de manchas no desaparece al prolongar la hidrólisis hasta un período de 8 horas, se pue-



Hidrólisis de diversas gomas de árboles
con SO_4H_2 1N

Fig. VI



Hidrólisis de diversas gomas de árboles

con SO_4H_2 2N

Fig. VII

de considerar que una gráfica paralela al eje de abscisas es la representación gráfica correcta con el criterio convencional adoptado.

Todavía se sometieron las gomas a un nuevo proceso de hidrólisis, más energético. Consistió en hacerlo con SO_4H_2 1N pero en tubo cerrado. En este caso los cromatogramas obtenidos, después de llevar la disolución hasta $\text{pH} = 3,4$ y desionizar con resinas intercambiadoras (*) eran más sencillos ya que, en realidad, sólo aparecían monosacáridos: L-ramnosa, D-xilosa (salvo en la goma de limonero y arábiga), L-arabinosa, D-galactosa, D-glucurónico y 4-O-metil-glucurónico; si acaso todavía puede detectarse una buena parte del oligosacárido ácido.

Para la apreciación semicuantitativa de las cantidades relativas de los distintos azúcares sencillos, así como de oligosacáridos, se compararon siempre las muestras con otras tipos que se usaron como testigo en varias proporciones (por utilización de volúmenes múltiples entre sí de una disolución patrón, agregados al papel mediante una micropipeta). Los datos obtenidos, que para algún caso particular (albaricoquero búlida) se confirmaron mediante la técnica de FLOOD, HIRST y JONES, nos han permitido establecer la Tabla IV en el que se recogen las proporciones relativas de los diversos azúcares en cada una de las gomas.

TABLA IV

Proporción relativa de cada uno de los constituyentes de algunas gomas vegetales, en moles

Goma	A. D-glucurónico	D-Galactosa	L-Arabinosa	D-xilosa	L-Ramnosa	L-Fucosa	Oligosacáridos
A	1,5	3	5	2	1	—	2,5
B	2	4	5	—	1	—	3
C	1,5	3	4	0,5	1	—	2
D	1	5	6	2,5	1	—	2
E	1	3	5	1,5	1	—	2
F	1,5	3	4	1,25	1	—	2,5
G	1,75	3	5	1,25	1	—	2,5
H	1,75	3	4,5	1,5	1	—	3
I	1,5	3	5	1,25	1	—	2,5
J	1,5	3,5	5	1	1	—	2,5
K	1,5	2,75	4	1	1	—	2,5
	A. D-Galacturónico						
L	1	3	4	2	—	1	2

A = Almendro

E = Arábiga

I = Real fino myrobolán

B = Limonero

F = Búlida ciruelo

J = Moniquí myrobolán

C = Ciruelo

G = Búlida myrobolán

K = Damasco

D = Melocotonero

H = " albaricoquero

L = Tragacanto

(*) Aunque en los casos anteriores no se ha indicado, se sobreentiende que estas dos operaciones de ajuste de pH y desionización, son fundamentales antes de cromatografiar.

A la vez recogemos, de la bibliografía (147), la Tabla V, en la que se da la composición de varias gomas, entre ellas la arábica y las de limonero y almendro que han sido revisadas también por nosotros en el presente trabajo. No coincide la composición dada con la nuestra, así por ejemplo, en las de limonero no encuentran ramnosa, ni tampoco coincidimos en cuanto a las proporciones.

TABLA V

Goma	A. D-glucorónico O-metilado	D-galactosa	D-monosa	L-Arabinosa	D-xilosa	L-Ramnosa
A	1	3	nada	2	nada	1
B	1	2	1	3	ca. 3 %	nada
C	1	2	1	6	ca. 3 %	»
D	2	6	nada	7	1	»
E	1	3	»	3	1	»
F	1	3	»	4	2	»
G	+	+	»	+	nada	»
H	+	+	»	+	»	»
I	+	+	»	+	»	»
J	+	+	»	+	»	+
	A. Galacturónico					
K		+	»	+	»	—

A = Arábica
 B = Damson
 C = Cerezo
 D = Ciruelo amarillo
 E = Ciruelo púrpura
 F = Almendro
 G = Limonero
 H = Naranja
 I = Pomelo
 J = Cholla
 K = Mezquita

(147) TSENG, C. K., *Science*, 101, 597 (1945) [Ref. PIGMAN, W. W. y GOEPP, R. M. Jr., *Chemistry of the Carbohydrates*, Academic Press Inc., Publishers, New York, 1948, pág. 631].

A la vista de los diversos experimentos de hidrólisis que hemos descrito, se ha comprobado la identidad de los fragmentos en unas y otras condiciones, aun cuando la proporción de ellos variará según la naturaleza del proceso adoptado. Esto nos permitió, en cada uno de los casos, por la técnica de FLOOD, HIRST y JONES, al separar, a partir de los siruposos correspondientes, diversos mono y oligosacáridos, siendo tres de éstos últimos los que, en definitiva, merecieron nuestra atención. De ellos dos eran de carácter neutro y otro tenía carácter ácido llamándolos en lo sucesivo D_I , D_{II} y D_{III} .

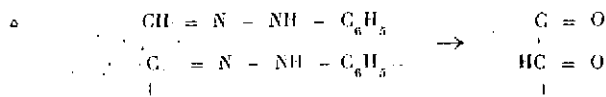
El disacárido que hemos llamado D_I por hidrólisis relativamente suave daba D-xilosa y L-arabinosa. Tenía un $R_{gr.} = 1$ en disolvente acetato de etilo: ácido acético : ácido fórmico : agua (18 : 3 : 1 : 4) y 1,2 en *n*-butanol : piridina : agua (10 : 3 : 3).

Daba una osazona que por hidrólisis con CHI diluido (*) producía xilosa, lo que prueba que la osazona se había formado sobre el eslabón de arabinosa, que a su vez debería tener libre, además de su grupo reductor, el OH de su C_2 (**). Cuando una pequeña porción de D_I se oxidaba con Br_2 e hidrolizaba el producto de oxidación, no se producía arabinosa, lo que estaba también de acuerdo con el anterior hecho de que es la xilosa la que tiene su grupo reductor utilizado en el enlace glicosídico, por lo que el bromo sólo afecta al grupo reductor de la arabinosa.

D_I tenía poder rotatorio negativo lo que puede identificarse con un enlace glicosídico tipo β , por intervención del anómero correspondiente de la xilosa, así como la probable presencia de la arabinosa en su forma furanosa que siempre es más negativa; este último supuesto estaría de acuerdo con la relativa facilidad de hidrólisis de este oligosacárido y justificaría también la abundancia de L-arabinosa lábil en el hidrolizado general de las gomas.

Por metilación exhaustiva se obtenía un hexa-O-metil compuesto que por hidrólisis daba dos azúcares metilados, que pudieron identificarse como 2-3-4 tri-O-metil-D-xilosa y 2-3 di-O-metil-L-arabinosa, separándose estos metil-derivados entre sí por la técnica de FLOOD, HIRST y JONES. El derivado de la xilosa era característico tanto por su punto de fusión (PF = 90°) como por su velocidad en los cromatogramas al compararlo con una muestra tipo; su contenido en metoxilo era de 47,9 %. Con eta-

(*) De usar CHI concentrado, la osazona se descompondría en una osona (celosa-aldosa):



(**) Por el poder rotatorio de la osazona del segundo eslabón se deduce que era L-arabinosa.

nol y anilina daba N-(2-3-4 tri-O-metil-xilopiranosil)- anilina, de PF = 102° C.

El derivado de la arabinosa tenía un contenido en metoxilo de 32,07 % y se distinguía fácilmente por cromatografía de la 2-4, 3-4 y 2-5 di-O-metil-L-arabinosa (así en el disolvente *n*-butanol : etanol : agua (40 : 11 : 19) sus R_G son los siguientes:

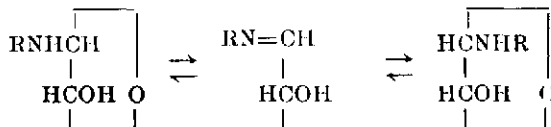
	R _G
3-4 di-O-metil L-arabinosa	0,58
2-3 di-O-metil L-arabinosa	0,70
2-4 di-O-metil L-arabinosa	0,64
2-5 di-O-metil L-arabinosa	0,85

Con etanol y anilina daba N-(2-3 di-O-metil-arabinosil) anilina, de PF = 138° C (*).

La 2-3 di-O metil arabinosa, de aspecto siruposo, por oxidación con Br₂ daba una lactona, cristalina, de punto de fusión = 30° C.

De los hechos aquí indicados cabe asignar al disacárido original la estructura de 4 ó 5 O-(β-D-xilopiranosido)-L-arabinosa, si bien de las consideraciones hechas anteriormente que nos llevaron a asignar estructura

(*) En general, estos N-glicósidos (también llamados anilidas de azúcares), a los que inicialmente se les atribuyó estructura abierta de base de SCHIFF, es más probable que muestren estructura anular, si bien aparecerán en equilibrio dinámico, los N-glicósidos correspondientes a los dos anómeros del azúcar, haciéndose la interconversión a través de una estructura con doble enlace tipo base de SCHIFF:



El nombre de N-glicósidos está basado en la analogía estructural con los O-glicósidos. En algunos casos resulta más sencillo, de acuerdo con la sugerencia de VOTŮČEK y VALENTIN [VOTŮČEK, E. y VALENTIN, F., *Collection Czechoslov. Chem. Commun.*, **6**, 77 (1934)] el denominarlos como aminas sustituidas, nomenclatura adoptada también por nosotros. Aparte del indiscutible interés analítico de estos compuestos, el campo de los N-glicósidos está siendo actualmente reinvestigado, debido a que pertenecen a este grupo muchas sustancias de alto interés biológico tales como los llamados nucleósidos, que son productos hidrolíticos de los ácidos nucleicos e igualmente varias coenzimas. Algunos N-glicósidos derivados de aminas de cadena larga son buenos agentes humectantes; derivados de la glucosa y aminas aromáticas son buenos antioxidantes para el caucho; otras glicosilaminas han sido ensayadas como tuberculostáticos [LEHM, H., BLOCH, H. y EULENBERGER, H., *Helv. Chim. Acta*, **28**, 1415 (1945)], etc., etc.

Aunque en el gráfico hemos asignado a N-(2-3 di-O-metil-arabinosil) anilina la estructura furanoide, no hemos podido demostrarla por no disponer en el momento de los experimentos de cloruro de tritilo, pues está demostrado que en el caso que sea la estructura furanoide la realmente existente, sería posible la formación de un monometil derivado, en tanto si se trata de una estructura piranosica debe ser imposible la formación de estos derivados.

furanósica a la arabinosa, nos pronunciamos por admitir el enlace en 1-5 y no en 1-4.

El otro disacárido, al que llamaremos D_{II} , daba por hidrólisis forzada sólo arabinosa por lo que desde un principio se pensó que era una arabinosa. El disacárido tenía un alto poder rotatorio, lo que permite suponer que las dos moléculas de arabinosa que participan en éste, lo hacen en forma piranosa y que el anómero que interviene con el grupo reductor en la formación de enlace glicosídico, debe ser la L-arabinosa- β , que es la de poder rotatorio más positivo.

D_{II} se movía en los cromatogramas a una velocidad inferior a la galactosa, separándose bastante bien de aquélla en la columna de celulosa. Reducía al FEHLING y al BENEDICT, por lo que, como mínimo, tenía libre uno de los grupos reductores, observándose que el equivalente de reducción era el que correspondía a la mitad del Pm de una dipentosa, por lo que uno de los eslabones integrantes del disacárido tendría bloqueado su grupo aldehído.

Por tratamiento con fenilhidrazina, daba una osazona lo que probaba que el OH del carbono contiguo al grupo reductor, es decir, el OH del C_2 estará libre. Cuando la osazona se hidrolizaba, se producía L-arabinosa, idéntica a la que se liberaba por hidrólisis directa del oligosacárido original D_{II} . lo que prueba que este eslabón tenía el -CHO bloqueado en el momento de formarse la osazona, por lo tanto intervenía por su C_1 .

Por metilación exhaustiva de D_{II} se obtuvo un hexa-O-metil compuesto que por hidrólisis de FLOOD, HIRST y JONES. El primero por su R_G (*) relativamente lento (0,83) en el disolvente *n*-butanol : etanol : agua (40 : 11 : 19) y contenido en metoxilo (48,7 %), se identificó inequívocamente como 2-3-4 tri-O-metil L-arabinosa. El otro derivado metilado mostraba un R_G (0,64 en el mismo disolvente), también característico. Se determinó el contenido en metoxilo (34,5 %) y su punto de fusión (PF = 145° C). Su poder rotatorio era $[\alpha]_D = + 120^\circ$; también se preparó su anilín-derivado de PF = 145° C. Todos estos datos coinciden con los de la 2-4 di-O-metil arabinosa.

De acuerdo con todos estos datos, queda justificado el porqué se ha atribuido a D_{II} la estructura de 3- β -L-arabopiranosido-L-arabinosa.

El tercer disacárido que ha sido objeto de estudio por nuestra parte tiene carácter ácido, al que llamaremos en lo sucesivo D_{III} . Tenía un poder rotatorio fuertemente positivo. Cuando éste se sometía a hidrólisis forzada daba cantidades aproximadamente equimoleculares de L-arabi-

(*) Recuérdese que entendemos por R_G los valores relativos a la 2-3-4-6 tetra-O-metil glucosa.

nosa y 4-O-metil-D-glucurónico, de donde se deduce, en principio, que éstos son los eslabones que lo integran. Al mismo resultado se llega por hidrólisis a 100° C durante 24 horas con SO_3H_2 1N, apreciándose en los cromatogramas que sigue apareciendo como abundante la mancha debida al oligosacárido original, lo que prueba que debe ser muy resistente a la hidrólisis.

Por esterificación con metanol más ClH seguida de reducción con AlH_4Li e hidrólisis se obtiene 4-O-metil-D-glucosa y L-arabinosa, inequívocamente detectables, lo que se confirma que el componente ácido era el 4-O-metil D-glucurónico; éste último componente ha sido identificado en estos últimos años en varios manantiales naturales (recuérdese nuestro propio caso de las pulpas).

Con fenilhidrazina se obtenía una osazona. Por hidrólisis y cromatografía de los productos formados, se observó que ya no aparecía arabinosa, pero sí el 4-O-metil-D-glucurónico, lo cual prueba que era la arabinosa el responsable del poder reductor, a la vez que se deduce que el OH de su C_2 debe estar libre. Cuando se hacía una oxidación con Br_2 dejaba igualmente de aparecer L-arabinosa, confirmándose lo anterior.

Por metilación exhaustiva daba un compuesto siruposo muy difícil de purificar aún cuando lo intentamos varias veces; se hidrolizó con ClH metanólico y a continuación con ClH acuoso, obteniéndose 2-3-4 tri-O-metil-D-glucurónico y 2-3 di-O-metil L-arabinosa. El primero fué fácil de aislar e identificar, al igual que hicimos en el caso de urónicos de las pulpas, mediante esterificación, reducción e hidrólisis que nos conducía hasta 2-3-4 tri-O metil-D-glucosa, fácilmente identificable. La 2-3 di-O-metil-L-arabinosa no ofrecía dificultad de identificación puesto que sus características son bastante definidas.

Por otro lado, el alto poder rotatorio de D_{III} denota la presencia de su enlace glicosídico de estructura α , acción probablemente reforzada por una estructura piranósica para el eslabón no glicosídico; ello nos lleva a suponer que la arabinosa se presenta con estructura piranósica lo que está de acuerdo igualmente con la resistencia ofrecida por el disacárido a la hidrólisis, resistencia que no mostraría de tratarse de un anillo con estructura furanosa.

En virtud de estos hechos debemos considerar como preferible el enlace en 1-4, ya que esto justifica la estructura piranósica, atribuyendo a D_{III} la estructura definitiva de 4-(4-O-metil- α -D-glucuronósido)-L-arabinosa.

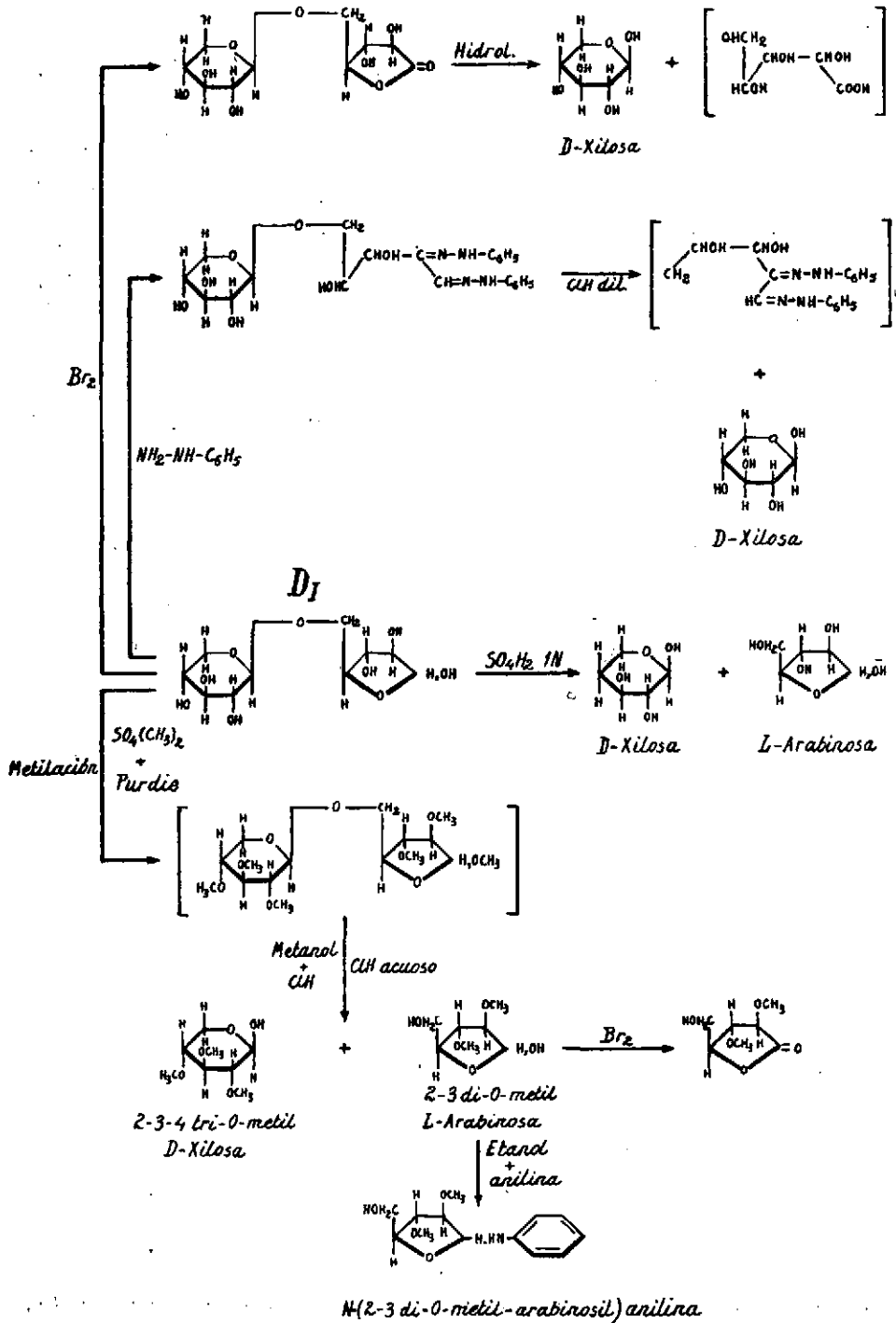
Debemos aquí hacer la advertencia de que los tres disacáridos estudiados estructuralmente eran comunes a todas las gomas, pero sin embargo unos nos resultaron más fáciles separarlos de la goma de albaricoque-

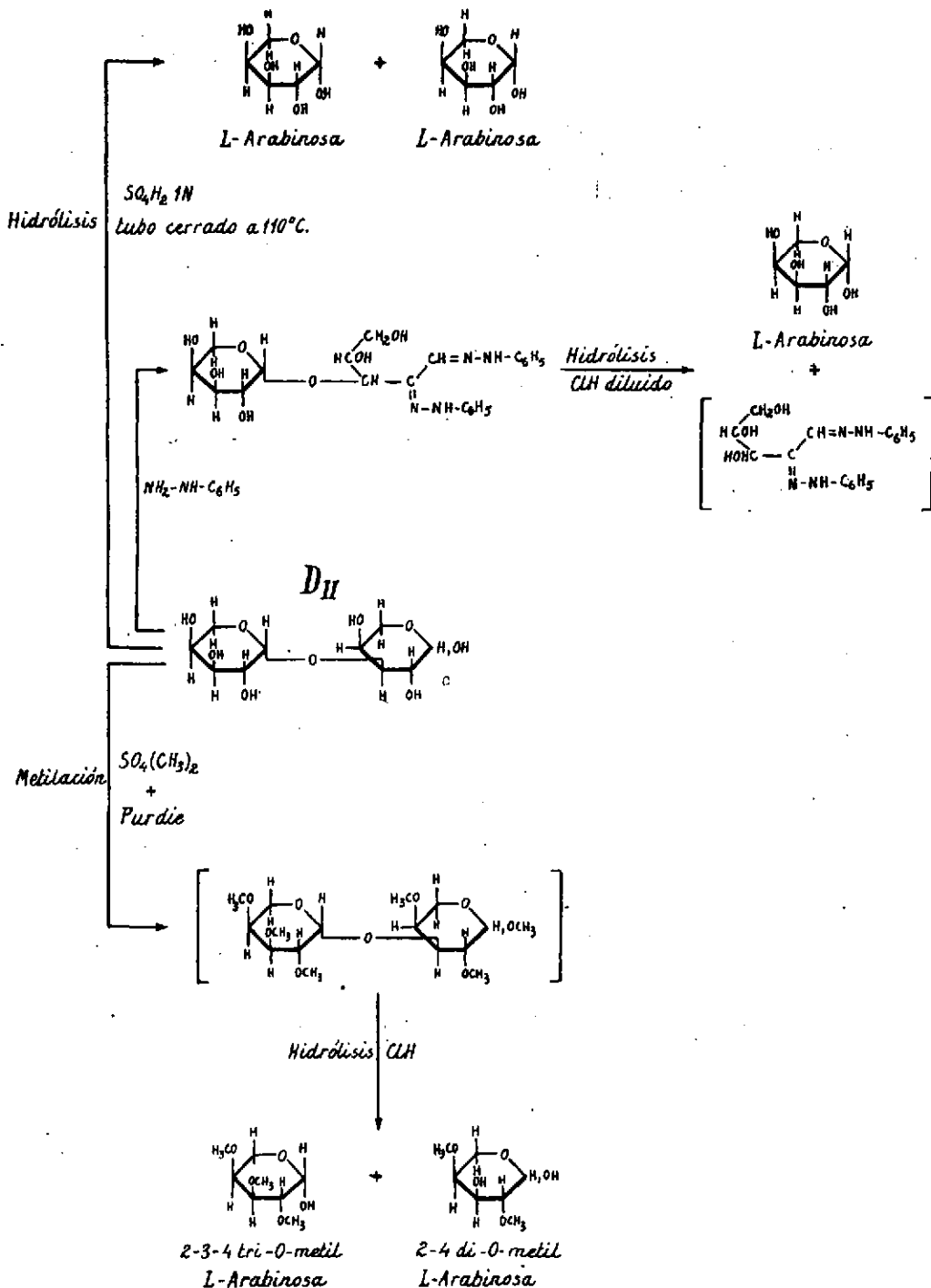
ro, los disacáridos neutros, mientras el glucuronósido de la galactosa quedaba más claramente manifiesto en la de limonero y por esto la tomamos como manantial para separarlo. Igualmente debemos hacer la advertencia de que, en el caso de la goma arábica, al hacer la operación de autohidrólisis se observa un oligosacárido cuyo color era más pardo que los típicos de las otras gomas, e incluso de la propia arábica a la que hemos hecho referencia estructural y que separado por la técnica de FLOOD, HIRST y JONES daba por hidrólisis galactosa y arabinosa. Sin embargo no hemos hecho hincapié en el mismo; probablemente se trate del 3-D-galactopiranosil-D-galactosa, ya que este disacárido ha sido encontrado en algunos productos naturales (148).

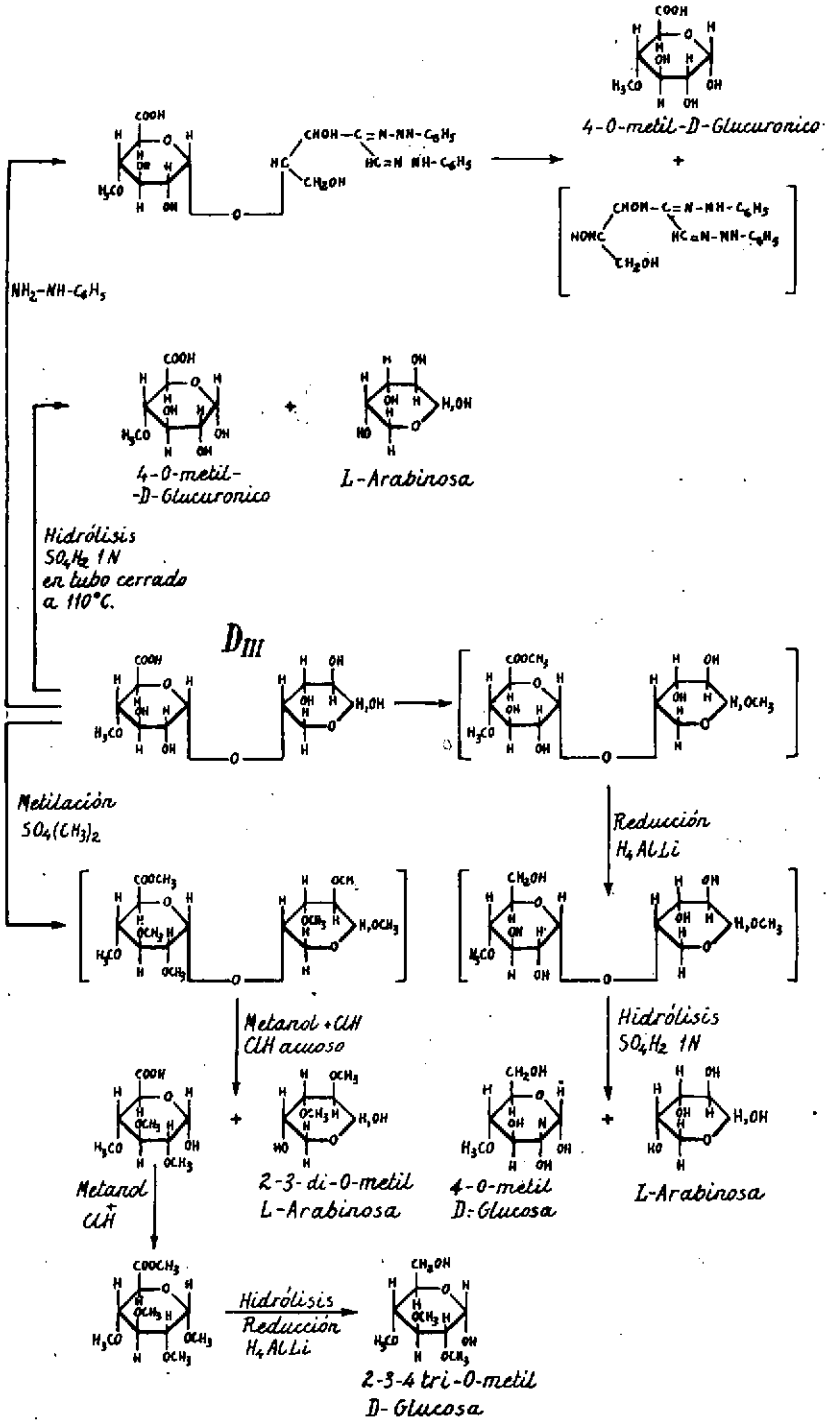
La marcha requerida para la identificación de los 3 disacáridos D_I , D_{II} y D_{III} ha sido esquematizada en los tres cuadros que se insertan a continuación.

(148) WHITE, *J. Amer. Chem. Soc.*, 74, 3966 (1925); HELFERICH y BRENDERECK, *Annalen*, 465, 166 (1928).









APÉNDICE EXPERIMENTAL AL CAPÍTULO III

(Como en los apéndices experimentales anteriores, se recogen en éste sólo aquellos datos que pueden considerarse fundamentales para la reproducción de experimentos).

Materia prima.—Los estudios se han realizado sobre gomas separadas de los árboles y variedades siguientes: ciruelo japonés, melocotonero, patrón ciruelo, albaricoquero búlida, patrón ciruelo myrobolán, albaricoquero búlida, patrón ciruelo japonés, albaricoquero moniquí, patrón ciruelo myrobolán, albaricoquero real fino, patrón ciruelo myrobolán, albaricoquero damasco y albaricoquero búlida, patrón albaricoquero, todos ellos cultivados en la huerta de Murcia. Aparte y con carácter comparativo se estudian la goma de limonero y almendro, también de la cuenca del Segura, así como goma arábica y tragacanto, ambas de procedencia comercial.

Todas las de prunáceas se presentaban en nódulos más o menos blandos, siendo los más voluminosos los de albaricoquero y almendro y los de menor tamaño los de melocotonero. La goma de limonero tenía en cambio formas más esquinosas y, en general, la proporción sobre árboles era pequeña, apareciendo la gomosidad muy adherida a la corteza de aquéllos. La goma tragacanto utilizada, de procedencia comercial, ya la teníamos en polvo.

1) Características de gomas

Sobre las gomas se han hecho las siguientes determinaciones:

- a) Humedad
- b) Solubilidades
- c) Densidad

- d) Coeficiente de viscosidad
- e) Reacciones de precipitación
- f) Cenizas y sales en el residuo
- g) Pentosanas
- h) Lignina
- i) Hexosanas
- j) Proteínas
- k) Acido pirúvico
- l) Índice de metoxilo
- m) Contenido urónico
- n) Espectrorontgenogramas
- ñ) Acidez.

a) *Determinación de humedad*

Se siguió el método de DEAN-STARK en aquellas gomas de las que disponíamos en relativa abundancia, usando como líquido de arrastre benceno saturado de agua, confirmándose los resultados por medida, sobre muestras aparte, de la pérdida de peso en estufa a 100-105° C. Para aquellas gomas de las que teníamos menor cantidad usamos exclusivamente este segundo método. Los resultados obtenidos por el primer procedimiento se recogen en la Tabla VI y los obtenidos por el segundo en la Tabla VII.

TABLA VI

Goma	Peso muestra en gms.	% de humedad
Arábica	10	10,00
Búlida myrobolán	10	9,98
Búlida albaricoquero	10	10,00
Almendro	10	10,20

TABLA VII

Goma	Pese muestra en gms.	Humedad	Humedad %
Búlida ciruelo	0,8737	0,0797	9,1
Búlida myrobolán	0,9358	0,0950	10,0
Búlida albaricoquero	0,9968	0,0997	10,0
Moniquí myrobolán	1,0008	0,0981	9,8
Real fino myrobolán	0,9508	0,0951	10,0
Damasco	0,7256	0,0719	9,9
Arábiga	1,1218	0,1143	10,1
Limonero	0,9652	0,0985	10,2
Ciruelo	1,0260	0,1005	9,8
Melocotonero	1,2002	0,1189	9,9
Almendro	1,3012	0,1341	10,3

b) *Solubilidades*

Se siguieron dos criterios para su determinación: uno consistió en tomar muestras de 0,5 grs. y 1 gr. y dejarlas en maceración con 50 c.c. de agua, agitando siempre el conjunto un momento antes de la toma de muestra; se sigue la variación del índice de refracción del líquido sobrenadante cada 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24 y 48 horas (*). Los resultados obtenidos se tabulan en las tablas VIII, IX, X y XI que corresponden, las dos primeras, a la lectura directa del índice de refracción en las dos concentraciones usadas y, las dos seguidas, a las lecturas, también refractométricas, en la escala de azúcares o sólidos solubles.

Por otro lado se prepararon ocho muestras del 1 % y otras tantas del 2 % de diversas gomas, cada una de las cuales se maceraron durante tiempos diferentes, que variaron desde 2 hasta 48 horas, siguiendo los mismos intervalos que en el caso anterior; transcurridas las 2, 4, 6, 8... etc., horas, se procede a la filtración, midiéndose los correspondientes volúmenes. Tres partes alícuotas de cada fracción se evaporan a sequedad a 100° C hasta peso constante, a la vez que se determina el índice de refracción para comparar de esta manera los valores obtenidos por uno y otro procedimiento. Estos experimentos sirven a la vez de comprobación de los antes citados, en los que se siguió la marcha de la solubilidad sólo por refractometría, observándose que estos últimos coincidían, prácticamente, siendo los datos obtenidos por pesada ligeramente supe-

(*) Refractómetro utilizado «Officine Galileo» núm. 113.138.

TABLA VIII

Indice de refracción de varias gomas en disolución(al 2 % en agua; t.^a 28° C)

<i>Goma</i>	2 h	4 h	6 h	8 h	10 h	12 h	24 h	48 h
A = Arábica	1,3353	1,3353	1,3353	1,3353	1,3355	1,3356	1,3356	1,3359
B = Limonero	1,3349	1,3350	1,3350	1,3352	1,3352	1,3355	1,3355	1,3355
C = Melocotonero	1,3334	1,3339	1,3339	1,3342	1,3343	1,3343	1,3344	1,3344
D = Ciruelo japonés	1,3331	1,3332	1,3335	1,3336	1,3339	1,3345	1,3347	1,3352
E = Almendro	1,3326	1,3326	1,3326	1,3327	1,3327	1,3328	1,3328	1,3329
F = Búlida ciruelo	1,3338	1,3345	1,3353	1,3353	1,3355	1,3355	1,3355	1,3356
G = Búlida myrobolán	1,3331	1,3333	1,3338	1,3342	1,3343	1,3344	1,3347	1,3349
H = Búlida albaricoquero	1,3339	1,3340	1,3347	1,3350	1,3353	1,3356	1,3356	1,3363



TABLA IX

Indice de refracción de varias gomas en disolución(al 1 % en agua; t.^a 28° C)

<i>Goma</i>	2 h	4 h	6 h	8 h	10 h	12 h	24 h	48 h
A = Arábica	1,3339	1,3339	1,3339	1,3340	1,3342	1,3342	1,3342	1,3343
B = Limonero	1,3336	1,3338	1,3339	1,3339	1,3339	1,3339	1,3339	1,3340
C = Melocotonero	1,3333	1,3333	1,3336	1,3336	1,3338	1,3339	1,3339	1,3340
D = Ciruelo japonés	1,3329	1,3330	1,3330	1,3330	1,3333	1,3334	1,3336	1,3339
E = Almendro	1,3327	1,3327	1,3327	1,3327	1,3327	1,3327	1,3328	1,3329
F = Búlida ciruelo	1,3336	1,3336	1,3339	1,3339	1,3340	1,3340	1,3340	1,3342
G = Búlida myrobolán	1,3329	1,3329	1,3331	1,3331	1,3334	1,3334	1,3334	1,3340
H = Búlida albaricoquero	1,3338	1,3338	1,3338	1,3339	1,3340	1,3340	1,3340	1,3342

TABLA X
% Solubilidades por medida refractométrica
(gomas en agua al 2 %, t.^a 28° C)

Goma	2 h	4 h	6 h	8 h	10 h	12 h	24 h	48 h
A)	1,6	1,6	1,6	1,6	1,7	1,8	1,8	2
B)	1,3	1,4	1,4	1,5	1,5	1,7	1,7	1,7
C)	0,3	0,6	0,6	0,8	0,9	0,9	1,0	1,0
D)	0,1	0,15	0,35	0,4	0,6	1,1	1,2	1,5
E)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
F)	0,5	1,1	1,6	1,6	1,7	1,7	1,7	1,8
G)	0,1	0,2	0,5	0,8	0,9	1,0	1,2	1,3
H)	0,6	0,7	1,2	1,4	1,6	1,8	1,8	2,3

A) Arábiga	E) Almendro
B) Limonero	F) Búlida ciruelo
C) Melocotonero	G) Búlida myrobolán
D) Ciruelo japonés	H) Búlida albaricquero

TABLA XI
% Solubilidades por medida refractométrica
(gomas en agua al 1 %, t.^a 28° C)

Goma	2 h	4 h	6 h	8 h	10 h	12 h	24 h	48 h
A)	0,6	0,6	0,6	0,7	0,8	0,8	0,8	0,9
B)	0,4	0,5	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,7
C)	0,2	0,2	0,4	0,4	0,5	0,6	0,6	0,6
D)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,2	0,3	0,4	0,6
E)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
F)	0,4	0,4	0,6	0,6	0,7	0,7	0,7	0,8
G)	0,0	0,0	0,1	0,1	0,3	0,3	0,3	0,7
H)	0,5	0,5	0,5	0,6	0,7	0,7	0,7	0,8

A) Arábiga	E) Almendro
B) Limonero	F) Búlida ciruelo
C) Melocotonero	G) Búlida myrobolán
D) Ciruelo japonés	H) Búlida albaricquero

riores a los obtenidos por lectura refractométrica. Como ejemplo daremos en la Tabla XII los valores obtenidos para una de las gomas estudiadas, la búlida-ciruelo:

TABLA XII
Solubilidad de goma búlida-ciruelo

Tiempos	2 h	4 h	6 h	8 h	10 h	12 h	24 h	48 h
% Solubles	0,6	0,6	0,7	0,8	1,0	1,0	1,1	1,3

Los experimentos de solubilidades se aprovecharon para observar la forma de disolverse las diferentes gomas, ya que, en ocasiones, dicha observación puede servir como criterio diferencial en la caracterización de algunas. Los resultados de estas observaciones se recogen en la Tabla XIII.

TABLA XIII

<i>Goma</i>	<i>Forma de disolverse en agua</i>
Arábiga	Disolución rápida en agua fría para dar soluciones claras, poco viscosas.
Limonero	Disolución rápida en agua fría para formar soluciones claras, ligeramente coloreadas de amarillo, con pequeña viscosidad.
Almendro	Hinchamiento con agua fría y disolución lenta en caliente con viscosidad despreciable.
Ciruelo	Hinchamiento por tratamiento con agua fría disolviéndose muy lentamente para dar soluciones transparentes.
Melocotonero	Hinchamiento en agua fría, disolución lenta y solución débilmente coloreada de amarillo.
B. myrobolán	Grandes geles por hinchamiento con agua fría; solución ligeramente amarilla.
B. albaricoquero	Solución viscosa de color amarillento-ámbar.
B. ciruelo	Disolución lenta con agua fría dando geles por hinchamiento; solución transparente e incolora.

c) *Determinación de densidad de gomas y sus disoluciones.*

α) Densidad de disoluciones.—Para esta determinación se ha utilizado un picnómetro de SPRENGEL. Se determina la densidad del problema respecto al agua a la temperatura de la operación (28° C). Para tener su valor referido al agua a 40° C (lo que designamos simplemente con el

nombre de densidad), se multiplica el resultado obtenido por la densidad del agua a la temperatura de la operación, que es 0,99626 (*).

Los resultados obtenidos para las diversas disoluciones de gomas se resumen en la Tabla XIV, en la que se expresan los datos experimentados m_1 , m_2 y m_3 (taras de equilibrio correspondientes a picnómetro va-

TABLA XIV

Goma	a	m_1	m_2	m_3	D 28° C	D 4° C
A)	0,9	7,3876	10,3699	10,3492	1,0070	1,00331
B)	0,6	7,3876	10,3667	10,3492	1,0059	1,00225
C)	0,6	7,3876	10,3696	10,3492	1,0069	1,00222
D)	0,02	7,3876	10,3602	10,3492	1,0037	1,00006
E)	0,8	7,3876	10,3669	10,3492	1,0066	1,00298
F)	0,8	7,3876	10,3670	10,3492	1,0060	1,00231
G)	0,8	7,3876	10,3659	10,3492	1,0058	1,00219
H)	0,6	7,3876	10,3670	10,3492	1,0060	1,00226

- | | |
|--------------------|-------------------------|
| A) Arábiga | E) Búlida ciruelo |
| B) Limonero | F) Búlida albaricoquero |
| C) Ciruelo japonés | G) Moniquí myrobolán |
| D) Almendro | H) Búlida myrobolán |

cío, picnómetro con problema y picnómetro con agua destilada, respectivamente) y % en sólidos solubles, junto a los datos calculados de densidad a 28° C y 4° C. El dato de sólidos solubles se obtuvo por refractometría y se confirmó por pesada.

β) Densidad de gomas.—A partir de la densidad y concentración de las disoluciones de cada goma, pudo calcularse la densidad de la goma en cuestión dentro de cierto margen de aproximación, suficiente para nuestro objeto. En efecto, al estar expresado el porcentaje de soluble en grs./100 grs., puede aplicarse la ecuación:

$$\frac{\% \text{ sólido}}{d} + \frac{100 - \% \text{ sólidos}}{d_{\text{H}_2\text{O}}} = \frac{100}{D}$$

Como quiera que ya se había expresado en la Tabla XIV el dato de D correspondiente a 40° C, podrá considerarse a $d_{\text{H}_2\text{O}} = 1,000$; los valores calculados para d se recogen en la Tabla XV.

(*) *Handbook of Chemistry and Physics*, Chemical Rubber Publishing Co., Cleveland, 1945, pág. 1652.



En otra columna de la misma Tabla XV, se recogen los datos de densidad obtenidos directamente por picnometría. Se hicieron tres pesadas para cada caso (m_1 = picnómetro con agua destilada; m_2 = picnómetro + agua destilada + goma fuera del frasco; m_3 = picnómetro + agua destilada + goma en el interior del frasco). Los resultados coinciden aproximadamente para los efectos que nos interesan, con los calculados a partir de la densidad de las disoluciones.

TABLA XV

Goma	D calculada	m_1	m_2	m_3	$D_{28^\circ C}$	$D_{4^\circ C}$
A)	1,5826	27,2676	27,6410	27,4052	1,5833	1,5744
B)	1,40481	27,2676	27,5231	27,3617	1,5835	1,5776
C)	1,61111	27,2676	27,6020	27,3904	1,5801	1,5741
D)	1,4285	27,2676	27,5202	27,3516	1,4986	1,4930
E)	1,6068	27,2676	27,6114	27,3940	1,5809	1,5749
F)	1,6021	27,2676	27,6002	27,3898	1,5805	1,5746
G)	1,5908	27,2676	27,6322	27,4017	1,5821	1,5773
H)	1,5979	27,2676	27,5816	27,3820	1,5806	1,5747
I)	1,3743	27,2676	27,6204	27,3975	1,5827	1,5768

- A) Moniquí myrobolán
- B) Búlida albaricoquero
- C) Ciruelo japonés
- D) Almendro
- E) Arábiga
- F) Búlida myrobolán
- G) Búlida ciruelo
- H) Limonero
- I) Real fino myrobolán

d) Determinación de viscosidad

a) Cálculos de viscosidad específica.—La determinación del coeficiente de viscosidad la hacemos por medio de un viscosímetro de OSTWALD.

Se miden los tiempos t y t' de paso del agua y del problema por dos enrasas del viscosímetro; con estos datos, la densidad del agua y la de

cada problema (los datos de densidad están recogidos en la Tabla XIV) se calcula la relación entre coeficientes de viscosidad por la ecuación

$$\frac{\eta}{\eta'} = \frac{D}{D'} \times \frac{t}{t'}$$

y tomando como valor conocido el absoluto del agua, a 28° C (que es igual a 0,8360), se calculan η' para cada una de las disoluciones de goma problema. Estos valores, así como los calculados para las viscosidades específicas $\eta_{\text{esp}} = \frac{t'}{t} - 1$, se recogen en la Tabla XVI.

TABLA XVI

Goma	η	D	D'	t	t'	η'	η_{esp}
A)	0,8360	0,99626	1,0058	5,5	15,0	2,3013	1,72
B)	0,8360	0,99626	1,0060	5,5	13,6	2,0871	1,47
C)	0,8360	0,99626	1,0069	5,5	16,5	2,5341	2,00
D)	0,8360	0,99626	1,0037	5,5	6,0	0,9189	0,09
E)	0,8360	0,99626	1,0070	5,5	10,0	1,5722	0,81
F)	0,8360	0,99626	1,0058	5,5	8,0	1,2275	0,45
G)	0,8360	0,99626	1,0066	5,5	20,8	3,1945	2,78
H)	0,8360	0,99626	1,0059	5,5	7,0	1,0743	0,27
I)	0,8360	0,99626	1,0056	5,5	16,5	2,6962	2,00

- | | |
|-------------------------|------------------------|
| A) Moniquí myrobolán | E) Arábiga |
| B) Búlida albaricoquero | F) Búlida myrobolán |
| C) Ciruelo japonés | G) Búlida ciruelo |
| D) Almendro | H) Limonero |
| | I) Real fino myrobolán |

β) Comprobación de la ley de EINSTEIN.—Para comprobar si esta ley, cuyo expresión matemática es $\eta_r = 1 + K \varphi$, ($\varphi = \frac{c}{d}$), se cumplía en nuestro caso basta comprobar si a partir de los datos de η_r experimentales, se confirmaba la constancia de K . De la expresión general se deduce que $K = \frac{\eta_r - 1}{\varphi} = \frac{\eta_{\text{esp}} d}{c}$ siendo d la densidad de la fase dispersa (goma) y c la concentración en grs./l de ésta. Como los datos de concentración recogidos en la Tabla XIV están expresados en grs./100., habrá que dividir por 10 D, quedando la expresión final:

$$K = \frac{\eta_{\text{esp}} d}{10 a D}$$

siendo a , el % de goma disuelta (peso/peso).

Los valores obtenidos para K se recogen en la Tabla XVII.

TABLA XVII

Goma	K
Arábiga	0,1579
Limonero	0,0704
Ciruelo japonés	0,5211
Almendro	0,6693
Búlida ciruelo	0,5445
Búlida albaricoquero	0,2882
Moniquí myrobolán	0,3365
Real fino myrobolán	0,4480

Se deduce de dicha Tabla el claro incumplimiento de la ley de EINSTEIN, a la vez que se demuestra que aún el valor de K más pequeño (goma de limonero) es muy superior al de 0,0025 utilizado por aquél.

γ) Cálculo del índice de viscosidad (según STAUDINGER) y viscosidad propia (según KRAEMER y LAMSING).—Se aplican los conceptos η_{esp}/c . (siendo $c = \text{conc. en grs./l}$) y η_{esp}/a (siendo $a = \text{grs. de soluto/100 grs. de disolución}$) obteniéndose los valores que se resumen en la Tabla XVIII.

TABLA XVIII

Goma	η_{esp}/c	η_{esp}/a	P
A)	0,8470	0,900	70
B)	0,0447	0,457	37
C)	0,3310	3,333	276
D)	0,4486	4,500	373
E)	0,3450	3,475	288
F)	0,1826	1,837	152
G)	0,2127	2,150	177
H)	0,2841	2,857	237

A) Arábiga	E) Búlida ciruelo
B) Limonero	F) Búlida albaricoquero
C) Ciruelo japonés	G) Moniquí myrobolán
D) Almendro	H) Real fino myrobolán

En la misma se resume igualmente el grado de polimerización P calculado para cada una de las gomas, admitiendo, que se cumple la relación de STAUDINGER $\eta_{\text{esp}}/c = K_m \cdot P$ y tomando para K_m el valor $12 \cdot 10^{-4}$.

e) *Reacciones de precipitación*

Se ensayaron los reactivos de precipitación clásicos (Cl_2Ca , NH_3 aq. NaOH , $\text{Ba}(\text{OH})_2$, acetato básico de plomo...). Para la realización de los experimentos, se tomaron disoluciones de gomas al 1%, agregando, a porciones alícuotas de cada una los reactivos citados en las proporciones que se indican en la Tabla XIX, obteniéndose los resultados recogidos en la misma.

TABLA XIX

Goma	1/10 vol. $\text{Ba}(\text{OH})_2$		1 vol. acetato básico de Pb	1 vol. $\text{Ba}(\text{OH})_2$ saturado	Acetato básico de Pb + 1/5 vol. NH_4OH 3N	Acido tánico
	frío	calor				
Arábigo			ppdo. vol. opaco		ppdo. vol. opaco	
Ciruelo			ppdo. floco-lento-gelati-noso			
Melocoto-nero			enturbia-miento		enturbia-miento	
Limonero		débil color amarillo	ppdo. floco-lento abun-dante	débil colo-ración ama-rillo	ppdo. floco-lento	
Almendro	ppdo débil	color amari-llo	ppdo. floco-lento	ppdo floco-lento	ppdo. floco-lento	ppdo.
Tragacanto			enturbia-miento con débil ppdo.		ppdo. floco-lento	
B. albarico-que-ro			ppdo. floco-lento gelati-noso		ppdo. floco-lento	
B. Myrobo-lán			ppdo floco-lento		ppdo. floco-lento	
B. ciruelo			ppdo. floco-lento		ppdo. floco-lento	
R. F. Myro-bolán			ppdo floco-lento		ppdo. floco-lento	
Moniquí Myrobolán			ppdo floco-lento		ppdo floco-lento	

Muchos de los reactivos aquí utilizados con resultado negativo son, en cambio, útiles frente a ciertos mucílagos y pectinas.

f) Cenizas

Se determinó el contenido en cenizas por calcinación en las condiciones repetidamente indicadas para las pulpas y semillas. Los resultados obtenidos en una de las series de determinaciones se recogen en la Tabla XX.

TABLA XX

Goma	Peso muestra	Peso cenizas	% cenizas
Búlida albaricoquero	0,6618	0,0175	2,64
Búlida myrobolán	0,7283	0,0187	2,56
Búlida ciruelo	0,4536	0,0093	2,05
Moniquí myrobolán	0,2746	0,0058	2,10
Real fino myrobolán	0,3227	0,0069	2,14
Damasco	0,2416	0,0049	2,01
Arábiga	0,8858	0,0251	2,83
Almendra	0,8270	0,0198	2,39
Ciruelo japonés	0,6918	0,0178	2,58
Limonero	0,3672	0,0130	3,54
Melocotonero	0,3741	0,0077	1,98

Las cenizas correspondientes a unas cuantas gomas se llevan separadamente a un volumen conocido (100 c.c.), valorándose a continuación el contenido en Ca^{2+} y Mg^{2+} con complexonas. Los resultados obtenidos se resumen en la Tabla XXI.

TABLA XXI

Goma	Ca^{2+}	Mg^{2+} %
Búlida albaricoquero	1,16	0,079
Búlida myrobolán	1,35	0,073
Arábiga	1,62	0,0901
Limonero	2,12	0,0544
Melocotonero	1,14	0,079

Se usaron gomas sin purificar; cuando se someten a tratamiento previo se reduce extraordinariamente el contenido en cenizas. Cualquiera de las gomas de albaricoquero y aún mejor la de melocotonero, podría tener interés para usarse como expansionante de plasma en sustitución de la arábica, pues requeriría porciones ínfimas de goma, para obtener viscosidades similares (ver Tabla XVI) y, por tanto, el contenido en cenizas aportado al plasma es relativamente pequeño.

g) *Determinación de pentosanas*

Se siguió el método volumétrico de KULLGREN y TYDEN descrito también anteriormente. Los resultados obtenidos en dos de las series de experimentos realizados se recogen en la Tabla XXII.

Tiosulfato sódico utilizado en la valoración 0,1 N, F = 1,1130.

TABLA XXII

Goma	Peso muestra en gramos	c. c. destilado total	c. c. S ₂ O ₃ Na ₂ gastados para destilado total	% medio	% Pento- sanas	% Furfural
A)	0,1586	250	18,9210	28,63	48,8	47,43
A)	0,1536	250	17,2580	26,96	46,07	
B)	0,1695	250	18,921	26,79	45,76	46,13
B)	0,1764	500	20,0470	27,27	46,5	
C)	0,1984	250	21,1470	25,58	43,70	43,18
C)	0,1798	500	17,8030	24,38	42,66	
D)	0,1844	500	18,9210	24,81	44,5	43,55
D)	0,1798	500	18,6984	24,96	42,6	
E)	0,1542	500	16,1385	25,11	42,91	42,70
E)	0,1502	500	15,5820	24,89	42,5	
F)	0,1568	500	16,1386	24,70	42,1	42,34
F)	0,1500	500	15,5820	24,93	42,59	
G)	0,2886	250	28,130	23,39	41,01	41,65
G)	0,1832	500	18,9210	24,78	42,30	
H)	0,1592	500	16,1385	24,32	41,56	41,83
H)	0,1408	500	14,4690	24,66	42,1	

- A) Almendro
- B) Arábica
- C) Círculo
- D) Búlida ciruelo
- E) Real fino myrobolán
- F) Búlida albaricoquero
- G) Búlida myrobolán
- H) Moniquí myrobolán

h) *Lignina*

Se siguió la técnica de RITTER descrita al tratar de las pulpas. Los resultados obtenidos con unas cuantas gomas se resumen en la Tabla XXIII.

TABLA XXIII

<i>Gomas</i>	Peso en grs. de goma	Peso en grs. Lignina	% Lignina	% medio
Almendro	1,0160	0,0003	0,029	0,042
	1,1034	0,0006	0,0543	
	1,1060	0,0005	0,0452	
Arábiga	1,0946	0,0008	0,0730	0,088
	0,9802	0,0010	0,1001	
	1,0950	0,0010	0,0914	
Ciruelo japonés	1,1578	0,0004	0,0345	0,029
	1,1748	0,0003	0,0255	
	1,1316	0,0002	0,0182	
Búlida albaricoquero	1,0904	0,0069	0,0630	0,050
	1,0564	0,0005	0,0473	
	0,9516	0,0004	0,0420	
Búlida myrobolán	1,0200	0,0004	0,0390	0,043
	1,1496	0,0006	0,0520	
	0,9816	0,0004	0,040	

i) *Determinación de azúcares reductores por hidrólisis*

Los líquidos de lavado de lignina, se neutralizan y enrasan en cada caso hasta 250 c.c., haciéndose la valoración con BENEDICT, cuyo factor para 5 c.c. de dicho reactivo, equivalía a 0,00931 grs. de glucosa. Los datos obtenidos en esta valoración se resumen en la Tabla XXIV.

TABLA XXIV

Goma	Peso muestra c. c. consumidas	Solución pro- blema c. c. consumidos	Peso azú- cares en 250 c. c.	% azú- cares	% medio
Almendro	1,0160	3,50	0,6650	65,45	65,95
	1,01034	3,17	0,7338	66,50	
	1,1060	3,19	0,7289	65,90	
Arábigo	1,0950	2,95	0,7923	72,05	72,21
	0,9802	3,29	0,7074	72,16	
	1,0950	2,93	0,7940	72,42	
Ciruelo japonés	1,1578	2,95	0,7889	68,13	68,50
	1,1748	2,91	0,7998	68,08	
	1,1316	2,98	0,7844	69,31	
Búlida albaricoquero	1,0904	3,1	0,7508	68,85	67,84
	1,0564	3,3	0,7053	66,76	
	0,9516	3,6	0,6465	67,93	
Búlida myrobolán	1,0200	3,3	0,7053	69,14	68,50
	1,1496	2,95	0,7889	68,63	
	0,9816	3,5	0,6650	67,74	

j) *Determinación de nitrógeno proteico*

Se siguió el método KJELDAHL, referido con detalle en el Apéndice experimental I. Los resultados obtenidos en 3 series de experimentos se expresan en la Tabla XXV. (El NaOH utilizado en las valoraciones es 0,6N. $F = 1,0414$).

k) *Determinación de ácido pirúvico*

Muestras de 1 gr. de cada goma, así como de agar, se hidrolizaron con 10 c.c. de SO_4H_2 1N a b.m. durante 4 horas. En cada uno de los hidrolizados se separaron las sustancias ácidas formadas, de los productos neutros, por medio de resinas de cambio de ión y posteriormente se aislaron mediante sales de bario. El tratamiento de cada uno de los precipitados formados con p nitro-fenil-hidrazina en ClH diluído dió lugar

a un precipitado rojo de hidrazonas solamente en el caso del agar. Por cromatografía de todos ellos en el disolvente *n*-butanol saturado de NH_4OH al 3 %, daba lugar, en el procedente del agar, a dos zonas distintas diferenciadas por sus propios colores amarillos; la zona más rápida se movía a la misma velocidad que lo hacía la *p*-nitrofenilhidrazona del ácido levulínico y la más lenta a la velocidad de la *p*-nitrofenilhidrazona del ácido pirúvico, demostrándose así la presencia de este componente en el agar, mas no así en las gomas estudiadas paralelamente.

TABLA XXV

Goma	c. c. NaCH gastados con 25 c. c. SO_4H_2	c. c. NaOH gastados con 25 c. c. $\text{SO}_4\text{H}_2 +$ $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$	c. c. NaOH neutraliza- dos por $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$	% N_2	% Pro- teínas
A)	24,1	23,45	0,75	0,55	3,42
A)	24,20	23,50	0,75	0,50	3,12
A)	24,20	23,60	0,60	0,44	2,74
B)	24,20	23,35	0,65	0,49	3,05
B)	24,20	23,50	0,70	0,52	3,18
B)	24,20	23,50	0,70	0,52	3,24
C)	24,20	23,70	0,50	0,38	2,37
C)	24,20	23,8	0,40	0,30	1,87
C)	24,20	23,75	0,45	0,34	2,12
D)	24,20	23,65	0,50	0,42	2,62
D)	24,25	23,75	0,50	0,38	2,37
D)	24,30	23,70	0,60	0,44	2,74
E)	24,35	23,80	0,55	0,42	2,62
E)	24,20	23,68	0,52	0,38	2,37
E)	24,20	23,63	0,57	0,42	2,62

- A = Búlida myrobolán
 B = Búlida albaricoquero
 C = Arábiga
 D = Amendro
 E = Ciruelo japonés

Por otro lado, muestras de 1 gr. de las mismas gomas y agar, se hidrolizaron por separado con 10 c.c. de ClH 0,1 N a b.m. durante 4 horas. A cada uno de los hidrolizados se le añadió la misma cantidad de 2-4-dinitro-fenil-hidrazina, disuelta en ClH diluido, dejándolas en reposo durante 12 horas a temperatura ambiente. A continuación, cada uno de

los hidrolizados se extrae separadamente y varias veces, con acetato de etilo, agitando los extractos con una disolución diluída de CO_3Na_2 . Por acidificación del carbonato extraído precipita en el caso del agar la 2,4-dinitro-fenil-hidrazona del ácido pirúvico en cristales amarillos finos de $\text{PF} = 218^\circ\text{C}$, mas no así en las demás substancias estudiadas, confirmando los resultados obtenidos por cromatografía.

Purificación de las gomas

Muestras de cada una de las gomas, se disuelven en agua destilada caliente, filtrándose a continuación para eliminar las impurezas mecánicas. A continuación se acidifican ligeramente con ClH del 5 % en volumen y se tratan con alcohol etílico hasta obtener una concentración alcohólica del 80 % en volumen. Se obtienen precipitados de consistencia característica (consistencia gomosa) y color oscuro en todas ellas, menos en las gomas arábica y de limonero que desde el principio daban un precipitado blanco. Unos y otros precipitados, lavándolos varias veces por decantación con alcohol del 80 %, y redisolueltos en agua destilada, se precipitan de nuevo con alcohol del 80 %, esta vez en presencia de una mínima cantidad de ClNa con el fin de obtener una buena coagulación. El precipitado se deja reposar unas 10 horas, aproximadamente, separándose del líquido hidroalcohólico claro; se lava con alcohol del 80 % repetidas veces con el fin de eliminar el cloruro, después con alcohol del 100 % y, finalmente, con éter etílico anhidro, secándose a continuación a vacío en una pistola de *ABDERHALDEN*. Se obtienen así substancias blancas fácilmente pulverizables y solubles en agua fría.

l) Determinación del índice de metoxilo

Se siguió el método de *VIEBOCK*, modificación de *A. SOLER* y *A. CARRASCO* descrito anteriormente. Se hicieron paralelamente determinaciones en el laboratorio de Microanálisis del Instituto de Química «Alonso Barba» (*), obteniéndose valores prácticamente coincidentes con los obtenidos por nosotros. Los resultados se resumen en la Tabla XXVI.

m) Valoración de ácidos urónicos

Se siguió la misma marcha descrita con detalle para el caso de las pulpas. Los resultados obtenidos se resumen en la Tabla XXVII.

(*) Agradecemos la amable colaboración del Dr. CALDERÓN, jefe del citado laboratorio

TABLA XXVI

<i>Goma</i>	Peso muestra en mgrs.	c. c de $S_2O_3Na_2$ 50 consumidos	$OCH_3\%$	% medio
Arábiga	3,890	0,388	1,03	1,04
	3,828	0,393	1,06	
Búlida myrobolán	3,641	0,702	1,99	1,50
	3,834	0,748	2,02	
Real fino myrobolán	3,267	0,819	2,59	2,63
	3,722	0,964	2,67	
Búlida albaricoquero	3,246	0,851	2,71	2,72
	3,500	0,926	2,73	
Búlida ciruelo	3,580	0,795	2,30	2,30
	3,251	0,724	2,31	
Ciruelo japonés	3,182	0,430	1,41	1,52
	3,117	0,491	1,62	
Melocotonero	3,673	0,599	1,68	1,56
	3,865	0,542	1,45	
Almendro	3,228	0,570	1,83	1,81
	3,517	0,613	1,80	
Moniquí myrobolán	3,650	1,132	3,20	3,18
	3,475	1,062	3,16	
Limonero	3,758	1,366	3,75	3,89
	3,455	1,347	4,03	

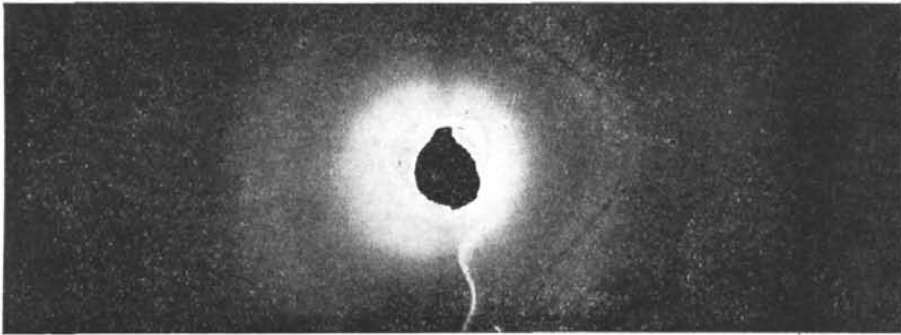
TABLA XXVII

Goma	Peso muestra	% CO ₂	% CO ₂ corregido	% anhídrido urónico
A)	0,0362	4,0055	4,05	16,20
B)	0,0421	4,3516	4,40	17,60
C)	0,0262	4,5495	4,60	18,4
D)	0,0300	4,2616	4,71	18,14
E)	0,0358	4,2033	4,25	17,00
F)	0,0217	4,1341	4,18	16,72
G)	0,0308	4,1637	4,21	16,84
H)	0,0316	4,8669	4,92	19,68
I)	0,0426	4,1637	4,21	16,84
J)	0,0412	4,4110	4,43	17,72
K)	0,0315	4,1538	4,20	16,80

- A) Búlida ciruelo
- B) Búlida albaricoquero
- C) Búlida myrobolán
- D) Moniquí myrobolán
- E) Real fino myrobolán
- F) Damasco
- G) Arábiga
- H) Limonero
- I) Ciruelo japonés
- J) Almendro
- K) Melocotonero

n) *Diagramas de Rayos X*

Sobre muestras de las diversas gomas purificadas, que se empastaron con grasa de vacío, se hicieron los correspondientes röntgenogramas utilizando una cámara Siemens, radiación K y tubo de hierro. Las fotografías de cada una de ellas (números del 1-10), se adjuntan a continuación, indicando las condiciones de obtención y los espaciados que de ellas se deducen. A título comparativo se acompaña el röntgenograma obtenido (fot. 12) para la celulosa de esparto a la sosa, sin atacar, así como el que corresponde a la grasa de vacío fondo (fot. 11).



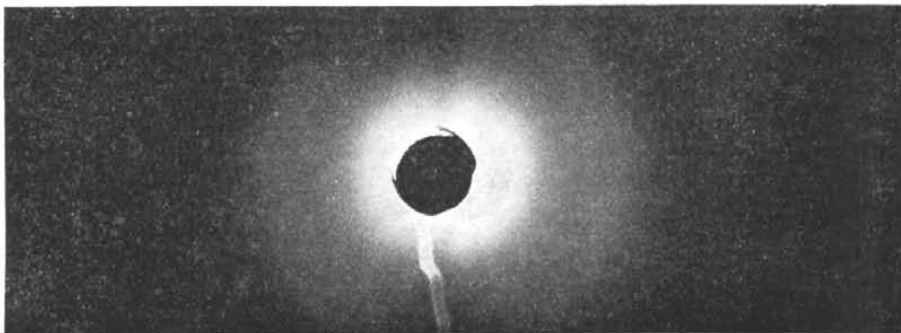
Fot. 1. Almendro

Tensión KV. = 35

Intensidad en mA = 15

Tiempo de exposición = 12 horas. Radio = 57,7 mm.

N.º de línea	l	θ	sen θ	d
1	d	13° 46'	0,2380	4,06
2	ddd	20° 49'	0,3554	2,72
3	dd	23° 19'	0,3958	2,44

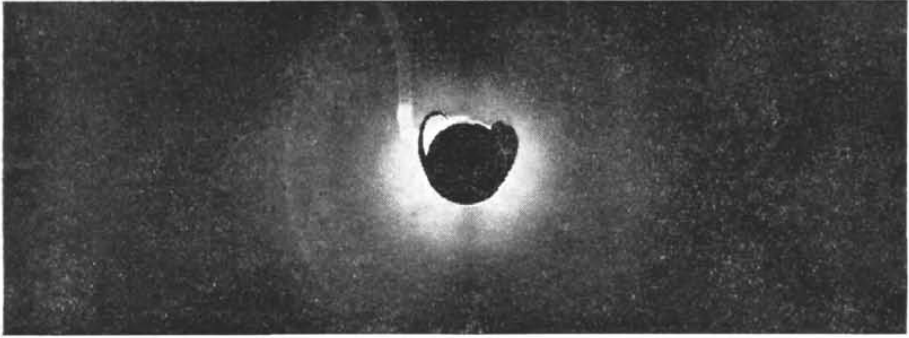


Fot. 2. Búlida ciruelo

Tensión KV = 35

Intensidad en mA = 15

Tiempo de exposición = 12 horas. Radio = 57,5 mm.



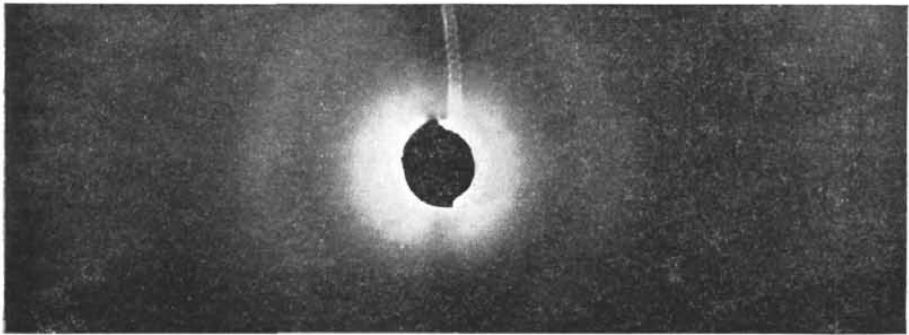
Fot. 3. Real fino myrobolán

Tensión KV = 35

Intensidad en mA = 15

Tiempo de exposición = 12 horas. Radio = 57,5 mm.

N.º de línea	2L	I	θ	sen θ	d
1	55,5		13° 46'	0,2380	4,06
2	62	d	15° 23'	0,2653	3,64

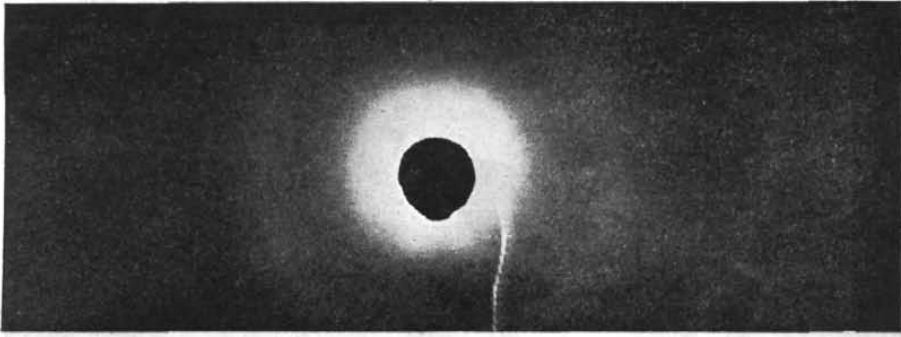


Fot. 4. Melocotonero

Tensión KV. = 35

Intensidad en mA = 15

Tiempo de exposición = 12 horas. Radio = 57,5 mm.

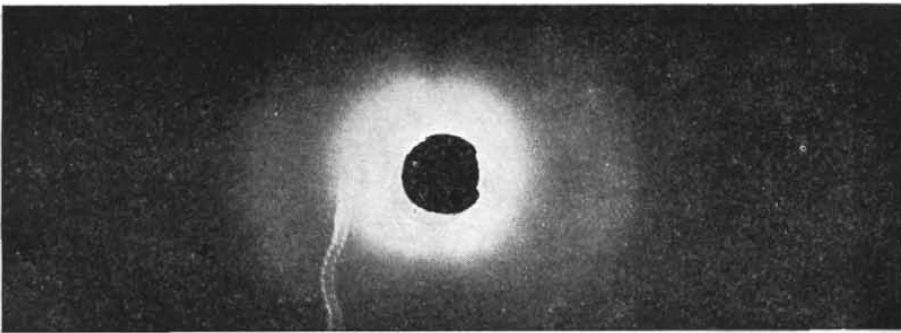


Fot. 5. Búlida albaricoquero

Tensión KV. = 35

Intensidad en mA = 15

Tiempo de exposición = 12 horas. Radio = 57,5 mm.

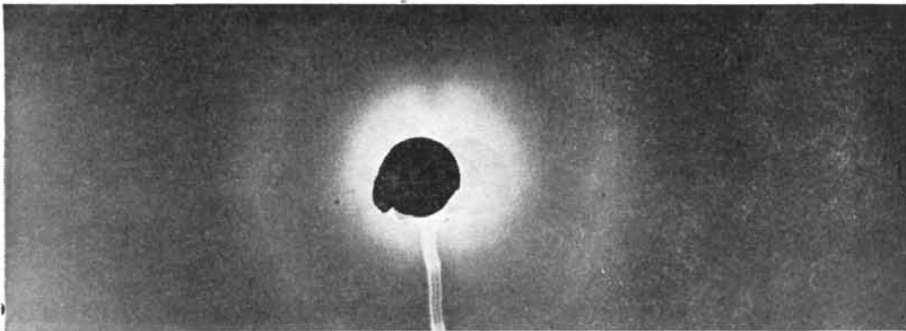


Fot. 6. Búlida myrobolán

Tensión KV. = 35

Intensidad en mA = 15

Tiempo de exposición = 12 horas. Radio = 57,7 mm.

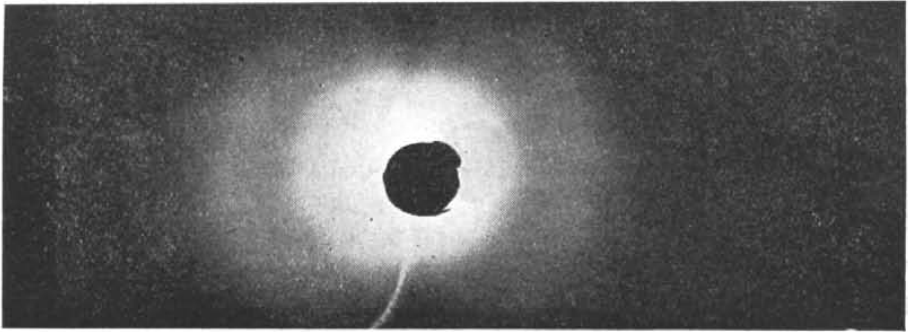


Fot. 7. Círuelo japonés

Tensión KV. = 35

Intensidad en mA = 15

Tiempo de exposición = 12 horas. Radio = 57,7 mm.

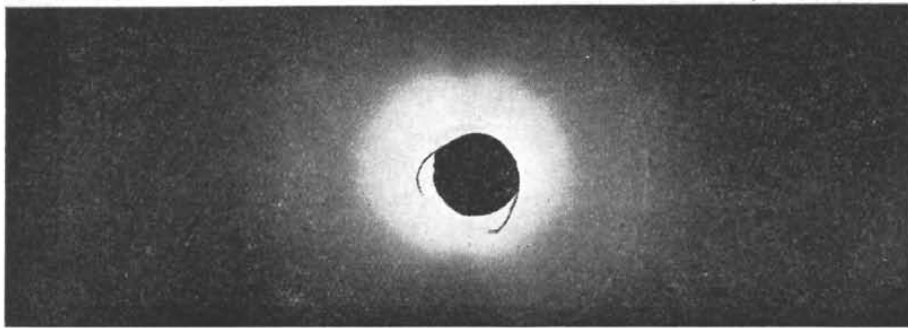


Fot. 8. Arábiga

Tensión KV. = 35

Intensidad en mA = 15

Tiempo de exposición = 12 horas. Radio = 57,7 mm.

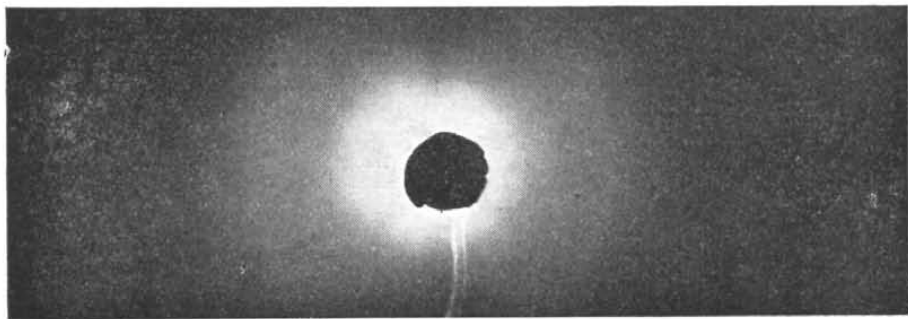


Fot. 9. Moniquí myrobolán

Tensión KV. = 35

Intensidad en mA = 15

Tiempo de exposición = 12 horas. Radio = 57,5 mm.

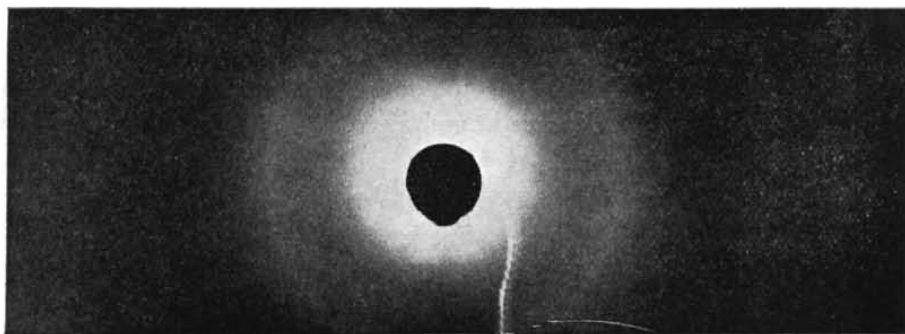


Fot. 10. Limonero

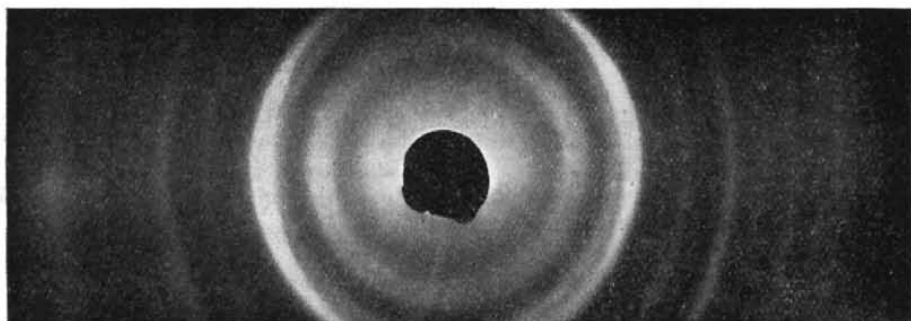
Tensión KV. = 35

Intensidad en mA = 15

Tiempo de exposición = 12 horas. Radio = 57,5 mm.



Fot. 11. Ensayo en blanco (grasa de vacío)
 Tensión KV. = 35 Intensidad en mA = 15
 Tiempo de exposición = 12 horas. Radio = 57,7 mm.



Fot. 12. Celulosa de esparto a la sosa sin atacar.
 Tensión KV. = 35 Intensidad en mA = 15
 Tiempo de exposición = 12 horas. Radio = 57,7 mm.

Interpretación del diagrama

N.º de línea	l	2l	θ	sen θ	d
1	F	37	9º 11'	0,1596	6,06
2	F	41,5	10º 17'	0,1725	5,42
3	d	51,5	12º 46'	0,2210	4,38
4	FFF	57	14º 8'	0,2442	3,96
5	d	74	18º 44'	0,3212	3,01
6	dddd	79	19º 35'	0,3352	2,88
7	d	87	21º 35'	0,3679	2,63
8	dddd	97	24º 4'	0,4078	2,37
9	dd	106	26º 17'	0,4428	2,18
10	dd	115,5	28º 38'	0,4792	2,02
11	d	121	30º 1'	0,5003	1,93
12	ddd	133,3	33º 4'	0,5456	1,77

ñ) *Acidez*

Se mide la acidez sobre las disoluciones resultantes de la maceración, durante 24 horas, de 1 gr. de cada goma en 50 c.c. de agua, con un potenciómetro modelo Philips GM 4494.

Los resultados obtenidos se resumen en la Tabla XXVIII.

TABLA XXVIII

Goma	grs. de goma en 50 c. c. de agua	goma disuelta en % (*)	pH
Arábica	1,0066	1,8	4,66
Limonero	1,0006	1,7	4,80
Búlida albaricoquero	1,0040	0,8	4,80
Búlida myrobolán	1,0000	1,2	5,30
Búlida ciruelo	1,0078	1,7	5,40
Ciruelo	1,0000	1,2	5,50
Almendra	1,0054	0,0	5,85
Melocotonero	1,0002	1,0	6,20

(*) Para estos resultados se han tomado las disoluciones de gomas obtenidas por maceración durante 24 horas de 1 gr. de cada una de ellas en 50 c.c. de agua. Los % se han obtenido refractométricamente.

2) **Hidrólisis de las gomas**a) *Intento de autohidrólisis suave de las gomas*

Muestras de 0,5 grs. de gomas de limonero, ciruelo, melocotonero, almendra, búlida ciruelo, búlida myrobolán, búlida albaricoquero, moniquí myrobolán y real fino myrobolán, se pusieron en maceración a temperatura ambiente, con 5 c.c. de agua agitando como mínimo cada media hora. Se tomaron muestras cada dos horas, al principio, y después a intervalos de 12 horas, haciéndose cromatogramas en los disolventes A, B, C y D (*). El control de la posible autohidrólisis se siguió durante 10 días no apareciendo síntomas de que ésta tuviere lugar, salvo leve indicio en el caso de la goma de limonero en que aparecía algo de L-arabínica.

b) *Intento de autohidrólisis forzada de gomas*

Muestras de 0,5 grs. de las gomas antes referidas, se maceran en agua en la misma proporción que hemos descrito anteriormente, calentando

(*) En el presente Apéndice se ha adoptado el mismo criterio para designar los distintos disolventes descritos al principio del Apéndice experimental I.

a b.m. durante 72 horas, siguiendo la marcha de autohidrólisis de dos en dos horas. A las 40 horas se distinguía claramente arabinosa y xilosa en las gomas de albaricoquero, melocotonero, ciruelo y almendro (en las de limonero y arábica no aparecía xilosa), así como varios oligosacáridos, siendo tres los más característicos, cuyos R_{gal} eran 1, 0,75 y 1,1 respectivamente en el disolvente D. Cuando los cromatogramas se desarrollaban en *n*-butanol : piridina : agua (10 : 3 : 3) (disolvente L) no avanzaba el oligosacárido de $R_G = 1,1$ permaneciendo en la línea de partida; un desarrollo posterior en el disolvente A volvía a moverlo, deduciendo que se trataba de un oligosacárido ácido, observando de pasada que los dos oligosacáridos neutros aparecían en proporción prácticamente idéntica en todas las gomas; el oligosacárido ácido era algo más abundante en la goma de limonero que en las otras. Después de 40 horas se siguió la marcha de 8 en 8 horas, observando que a las 48 horas se había alcanzado prácticamente el máximo de hidrólisis puesto que no se distinguían, ni en la intensidad de color ni en el área, las manchas obtenidas con muestras iguales del autohidrolizado a las 48 horas y a las 72 horas, que fué el tiempo máximo de control seguido. Cualitativamente el hidrolizado de las 48 horas respecto al de las 40, difería en la galactosa, azúcar que no se manifestó hasta entonces.

Comprobación cuantitativa del grado de autohidrólisis.—Se determinó el poder reductor con reactivo de BENEDICT a las 12, 24, 48 y 72 horas, haciendo cada uno de los experimentos sobre una muestra distinta aunque todas en las mismas condiciones salvo en lo que al tiempo se refiere (0,5 grs. de goma búlida albaricoquero en 5 c.c. de agua, a b. m.). Transcurrido cada uno de los tiempos, la correspondiente muestra se llevó con agua a 250 c.c. y se procedió a la valoración; los datos se recogen en la Tabla XXIX deduciendo que a las 48 horas es aproximadamente igual

TABLA XXIX

Peso muestra llevada a 250 c. c.	Tiempo en horas	Sol problema. e. e. consumidos	grs azúcares en 250	% azúcares
0,5	12	40,07	0,00075	0,15
0,5	24	40,05	0,00100	0,20
0,5	48	34,78	0,00115	0,23
0,5	72	34,79	0,00115	0,23

a la que tiene la solución a las 72 horas, considerando que al cabo de este tiempo se había alcanzado el máximo de hidrólisis (5 c.c. de BENEDICT = 0,0001602 grs. de glucosa).

Esta comprobación se hizo sólo con goma búlida ya que se confirmaban plenamente los resultados deducidos de la observación de los cromatogramas, pudiéndose generalizar los resultados en las gomas restantes.

c) *Hidrólisis ácida en frío y fraccionamiento de los hidrolizados*

Muestras de 0,5 grs. de cada una de las gomas antes citadas se dejan en maceración con 20 c.c. de SO_4H_2 1N a temperatura ambiente, siguiendo la marcha de hidrólisis gradual, por cromatografía, durante 8 horas, de media en media hora, observación que se siguió a intervalos durante 3 semanas. En la primera media hora, se aprecia la aparición de arabinosa y sucesivamente aparecen los restantes monosacáridos, manteniéndose prácticamente los mismos oligosacáridos que en la autohidrólisis.

Al cabo de tres semanas el hidrolizado general de cada una de las gomas, se llevó hasta $\text{pH} = 3,4$ por adición de $\text{Ba}(\text{OH})_2$, filtró y pasó sucesivamente por dos columnas conteniendo Amberlita IR-120 y Amberlita IR-4B, quedando retenidas en la 2.ª los de naturaleza ácida. El eluido se concentró a vacío reduciendo en cada uno de los casos hasta unos 2,5 c.c. aproximadamente.

Todos y cada uno de los concentrados desionizados correspondientes a las diversas gomas, se fraccionaron mediante columnas de celulosa (el colector automático de fracciones utilizado, que ha sido construido en nuestros laboratorios, permite la utilización de cuatro columnas simultáneas); la elución se hizo mediante butanol medio saturado de agua. En los primeros 150-160 tubos se recogieron para cada uno de los hidrolizados, sólo los azúcares ramnoso, xilosa y arabinosa, salvo en la de limonero que no aparecía la xilosa. En los 350 tubos posteriores se recogieron, igualmente en todos los casos, galactosa y por lo menos 5 oligosacáridos, si bien sólo dos de ellos lograron separarse puros en unos pocos tubos, pues los otros tres siempre aparecían impurificadas. Se recuperaron entre todas las columnas 0,4 grs. de galactosa, 0,67 grs. de arabinosa, 0,27 de xilosa, y 0,13 grs. de ramnosa así como 0,21 grs. de una mezcla de oligosacáridos.

Un caso aparte constituyó para nosotros la goma tragacanto, puesto que era la que más difería de las anteriores. En efecto, sometida a maceración o hidrólisis en la forma antes indicada, y al fraccionamiento en azúcares neutros y ácidos, pudieron identificarse en sus hidrolizados galactosa, arabinosa, xilosa, galacturónico y fucosa. Porciones de estos dos últimos se separaron por la técnica de Flood y otros, comprobándose su

identidad con muestras tipo. Los oligosacáridos que daba la goma traga-canto, en principio, eran distintos de los que hemos separado en las otras gomas, no habiéndose estudiado detenidamente en el presente trabajo.

Por otro lado, porciones de aproximadamente 0,3 grs. de los siruposos correspondientes a la porción neutra de los hidrolizados de las diversas gomas, se pasaron por columnas de carbón-celita (1 : 1). Se eluyen todas ellas con 80 c.c. de agua, arrastrando así los monosacáridos. A continuación se pasó por cada columna 50 c.c. de agua-alcohol (9 : 1); seguidamente se hizo esta operación con otros 50 c.c. de agua-alcohol 8 : 2, y así sucesivamente fué incrementándose el grado alcohólico del eluyente de 10 en 10 grados. En los efluentes que correspondían a alcohol del 30 % y del 40 %, se recogieron los dos disacáridos que desde los primeros cromatogramas habían merecido nuestra atención y que coincidían con los separados en las columnas de celulosa. Las cantidades recuperadas en todos los casos por uso de columna de carbón, era aproximadamente 0,015 grs. de cada uno de los dos disacáridos, porciones que se unieron a las separadas con columna de celulosa. Esta operación fué repetida con el fin de obtener una cantidad de oligosacáridos mayor, que nos permitiese su estudio.

De los azúcares sencillos aislados anteriormente se prepararon las osazonas correspondientes, para lo cual, 0,02 grs. de cada una de ellas se tratan con 0,04 grs. de cloruro de fenil hidrazina y 0,06 grs. de acetato sódico, así como 2 c.c. de agua destilada, identificándose por sus respectivos puntos de fusión :

	<u>PF</u>
Galacto-osazona	193° C
Arabo-osazona	159° C
Xilo-osazona	166° C
Ramno-osazona	180° C

Se determinó el poder rotatorio de muestras, de los distintos azúcares aislados (*) calculándose los poderes rotatorios específicos de todos ellos resultando ser :

Galactosa :	$\alpha = 24,60$	$[\alpha]_D = 80,2$	(H ₂ O; c = 0,3)
Arabinosa :	$\alpha = 20,90$	$[\alpha]_D = 104,5$	(H ₂ O; c = 0,2)
Xilosa :	$\alpha = + 5,64$	$[\alpha]_D = + 18,8$	(H ₂ O; c = 0,3)
Rammonas :	$\alpha = + 3,36$	$[\alpha]_D = + 8,4$	(H ₂ O; c = 0,4)

(*) Las determinaciones fueron realizadas en un polarímetro «Kern Aarau», N.º 33.823.

valores prácticamente coincidente con D-galactosa, L-arabinosa, D-xilosa y L-ramnosa respectivamente.

En la columna conteniendo Amberlita IR-4B (OH) quedarán retenidos los azúcares de carácter ácido, los cuales se recuperaron por elución con 180 c.c. de SO_4H_2 1N. El efluente, después de neutralizar con $\text{Ba}(\text{OH})_2$ hasta $\text{pH} \approx 3,4$ y separar el precipitado por filtración, se pasa por Amberlita IR-120 concentrando el efluente de esta columna a sequedad. Se recuperaron 0,32 grs. aproximadamente al reunir los de todos los hidrolizados. Por cromatografía se detectaban más de tres manchas, una de las cuales avanzaba a la velocidad que lo hacía el ácido glucurónico, otra se mostraba claramente debida a un aldobiurónico moviéndose a una velocidad parecida a la galactosa ($R_G = 1,1$ en el disolvente D) y una tercera mancha, de movimiento más lento ($R_G = 1,65$ en el disolvente D), pero que quedaba prácticamente unida a una cola que llegaba hasta la línea de partida y que correspondía seguramente a polímeros de carácter ácido de mayor peso molecular que el aldobiurónico indicado.

d) *Hidrólisis ácida en caliente*

Cinco muestras de 0,5 grs. de cada una de las gomas repetidamente citadas; se tratan con 20 c.c. de SO_4H_2 1N, sometiéndose sucesivamente durante 1, 2, 4, 6 y 8 horas a calentamiento en b. m. y reflujo, haciéndose un estudio cromatográfico de los productos resultantes previo ajuste del pH y desionización con las resinas repetidamente citadas. Los resultados obtenidos se esquematizan en la Tabla XXX.

TABLA XXX

Azúcar	1 h	2 h	4 h	6 h	8 h
Ramnosa	—	—	+	+	+
Xilosa	—	—	+	+	+
Arabinosa	+	+	+	+	+
Galactosa	—	—	+	+	+
A. glucurónico	—	—	+	+	+
Oligosacáridos	—	—	+	+	+

Sobre otra serie de muestras se hizo actuar SO_4H_2 2N a b. m. y reflujo y demás condiciones adoptadas en el caso anterior. Los resultados se esquematizan en la Tabla XXXI.

TABLA XXXI

Azúcar	1 h	2 h	4 h	6 h	8 h
Ramnosa	+	+	+	+	+
Xilosa	+	+	+	+	+
Arabinosa	+	+	+	+	+
Galactosa	+	+	+	+	+
A. glucurónico	+	+	+	+	+
Oligosacáridos	+	+	+	+	+

e) *Hidrólisis ácida en condiciones forzadas*

Muestras de 0,5 grs. de las gomas objeto de nuestro estudio se introducen cada una de ellas en un tubo de ensayo, de paredes gruesas, con 15 c.c. de SO_4H_2 1N; se cierra a la llama y calienta a b.m. durante 12 horas. Al cabo de este tiempo, se rompen los tubos y el contenido de cada uno de ellos se lleva a pH = 3,4, filtra y desioniza. Los cromatogramas de estos hidrolizados mostraban la presencia de ramnosa, xilosa, arabinosa, galactosa, ácido glucurónico y ácido 4-O-metil-D-glucurónico, fácilmente identificables. La xilosa faltaba en los productos de hidrólisis de la goma de limonero y arábigo; la tragacanto no mostraba glucurónico y en cambio tenía bastante galacturónico, así como fucosa, azúcar que no aparecía en ninguna de las otras gomas. De los oligosacáridos que se apreciaban en los hidrolizados suaves, sólo quedaba algo del oligosacárido ácido ($R_G = 1,1$ en el disolvente D).

Apreciación semicuantitativa de la relación de azúcares y oligosacáridos.—Se prepararon tres disoluciones patrón, a, b, y c. La a contenía ácido glucurónico y arabinosa, ambas al 1%; la b contenía galactosa, xilosa y ramnosa, todas igualmente al 1% y la disolución c contenía xilobiosa al 1%, oligosacárido que aunque concretamente no se encontraba en las gomas, nos sirvió como elemento de referencia para la comparación cuantitativa.

En cada caso se hicieron cromatogramas, junto a muestras de las fracciones neutra y ácida de cada goma (muestras de 0,001 c.c. a una concentración original del 20 %), muestras de cinco concentraciones distintas de las mezclas standard *a*, *b* y *c*. Estas concentraciones diferentes se obtuvieron poniendo en la línea de partida volúmenes de 0,001; 0,002; 0,003; 0,004 y 0,005 c.c. con una micropipeta, procurando hacer los toques con ella sin que se extienda la muestra, con objeto de que las manchas en el desarrollo no resultaran difusas. En consecuencia, las concentraciones de los diversos azúcares de las muestras standard quedaban en la relación 1 : 2 : 3 : 4 : 5, lo que nos permitía saber por comparación, la relación aproximada en que se encontraban los mono y oligosacáridos en los hidrolizados problema. Los resultados se recogieron en la Tabla IV.

Comprobación del procedimiento anterior mediante la técnica de FLOOD, HIRST y JONES.—Se tomó como ejemplo la goma de albaricocero búlida. A una porción de 0,1181 grs. de siruposo de la fracción neutra; se añadieron 0,012 grs. de ribosa; se agregó 0,9 c.c. de agua y mezcló íntimamente el conjunto para obtener una disolución homogénea. Con una micropipeta se extendió en varias veces, a lo largo de la línea de partida de una hoja de papel Whatman n.º 1 de 60 × 60 cm., el total de la disolución (1 c.c.), desarrollándose en el disolvente A. Al cabo de 24 horas se revelaron tres tiras cortadas longitudinalmente, dos de los bordes y una central, cortándose a continuación las bandas correspondientes a los distintos azúcares y procediendo a la elución con agua; se comprobó que cada uno de los eluidos estaba prácticamente integrado por un solo componente, salvo el de los oligosacáridos que los contenía en bloque. Se concentró cada uno de los eluidos hasta sequedad, recuperándose 0,0011 grs. de ribosa; 0,0062 grs. de ramnosa; 0,0250 grs. de arabinosa; 0,0081 grs. de xilosa; 0,0198 grs. de galactosa; 0,0125 grs. de ácido galacturónico y 0,0364 grs. de oligosacáridos.

Teniendo en cuenta que la ribosa recuperada es aproximadamente el 90 % de la añadida y suponiendo un rendimiento análogo para los restantes azúcares, los valores en peso obtenidos deberá incrementarse en un 10 %. Dividiendo por el peso molecular asignado a cada uno de los componentes se calcula el número de moles que corresponde a cada peso, y si se dividen todos por el menor, que es el valor relativo a ramnosa en el caso del albaricocero búlida, se obtiene el número de moles de cada componente. Los resultados se resumen en la Tabla XXXII.

TABLA XXXII

Azúcar	grs. recuperados	grs. incrementados en 10 %	grs./Pm	Moles respecto a ramnosa
D-Glucurónico.	0,0125	0,0137	0,00007062	1,71 \approx 1,75
D-Galactosa	0,0198	0,0218	0,0001212	2,92 \approx 3
L-Arabinosa	0,0250	0,0275	0,0001833	4,42 \approx 4,5
D-Xilosa	0,0081	0,0089	0,00005933	1,43 \approx 1,5
L-Ramnosa	0,0062	0,0068	0,00004146	1 = 1
Oligosacáridos	0,0364	0,0404	0,0001248	3,07 \approx 3

3) Identificación de componentes hidrolíticos

A) Identificación y estructura de D_I

El disacárido que hemos llamado D_I tenía un R_{glc} = 1 en el disolvente D y 1,2 en el disolvente L.

Una porción de D_I (0,020 grs.) refluja durante 8 horas con SO_4H_2 1N daba xilosa y arabinosa, a partes iguales. Se separaron por la técnica de FLOOD, HIRST y JONES, obteniéndose 0,0095 grs. de xilosa y 0,009 grs. de arabinosa, determinándose a cada una de ellas su punto de fusión solas y en mezcla con especies puras.

Formación de osazona.—0,029 grs. de D_I se calientan a b. m. con 0,05 grs. de acetato de fenil hidrazina, obteniéndose una osazona, (PF = 207° C); después de varias recristalizaciones en etanol, se consiguió con un punto de fusión más alto (PF = 216° C). Es fácilmente soluble en piridina : etanol (3 : 2); una disolución al 0,020 % tenía un $\alpha = + 0,99$ (longitud del tubo 1 dm.), lo que supone un $[\alpha] = + 49^{\circ} 45$.

La disolución piridín-alcohólica se evapora a sequedad recuperando la osazona inalterada. 0,010 grs. de ella se hidrolizan con ClH 1N reconociéndose los productos de hidrólisis por cromatografía, previa corrección del pH con CO_3Ag_2 . Al revelar con p-anisidina se detecta únicamente xilosa, como tal, no apareciendo arabinosa (la mancha amarilla debida a la osazona correspondiente se observaba sin necesidad de revelar).

Oxidación con Br_2 .—A 0,015 grs. de D_I se le añaden unas gotas de agua de Br_2 . Después se calienta el conjunto con SO_4H_2 1N durante 4

horas, observándose por cromatografía que faltaba la arabinosa, debido, sin duda, a que este eslabón ha pasado a ácido arabónico.

Poder rotatorio de D_I .—Una disolución de este compuesto en agua ($c = 0,3$) tenía un $\alpha = -10^\circ$ lo que supone un $[\alpha] = -33,33^\circ$.

Metilación e hidrólisis.—Sobre 0,214 grs. de D_I en presencia de 5 c.c. de NaOH al 30 %, se añaden 2 c.c. de $SO_4(CH_3)_2$ gota a gota, agitando vigorosamente mediante un agitador magnético y manteniéndose el conjunto a la temperatura ambiente. A las 8 horas se agrega una nueva porción de $SO_4(CH_3)_2$ (2 c.c.) y otra de NaOH a 30% (3 c.c.). Cada 8 horas aproximadamente se repite la adición de $SO_4(CH_3)_2$ y NaOH hasta consumir 10 c.c. del primero. Acabada la metilación se acidifica con SO_4H_2 diluído y extrae con Cl_3CH . Por evaporación de este último se recupera un líquido de $n_{25}^\circ = 1,4672$. Una porción de este líquido (derivado metilado), se hidroliza con SO_4H_2 1N a ebullición durante 6 horas; se enfría el conjunto y neutraliza con $Ba(OH)_2$ y el total se evapora a sequedad. En un micro-Soxhlet se hace una extracción de este residuo con acetona, con lo que se separan dos derivados metilados, cuyos R_G en el disolvente P eran 0,96 y 0,70 respectivamente. Por la técnica de FLOOD, HIRST y JONES se consiguieron separar, en varias veces, 0,045 grs. (cristales) y 0,046 grs. (siruposo) de ambos derivados metilados.

El primero, de $R_G = 0,96$ en el disolvente F, era claramente distinto de los derivados dimetilados de la xilosa (por ejemplo la 3-4 di-O-metil D-xilosa $R_G = 0,73$, en el mismo disolvente), coincidiendo en cambio en su velocidad de desplazamiento con una muestra tipo de 2-3-4 tri-O-metil D-xilosa de que disponíamos. Su punto de fusión era igual a $90-91^\circ C$. Sobre una porción de 0,0164 grs. de dicho compuesto, se hizo una determinación de MeO resultando 47,9% (valor calculado para el derivado trimetilado 48,5 %). Una porción de 0,020 grs. del derivado trimetilado se calentó con unas gotas de anilina disuelta en etanol, obteniéndose la N (2-3-4 tri-O-metil xilosil) anilina, de $PF = 102^\circ C$.

El segundo derivado metilado de $R_G = 0,70$ en el disolvente F tenía un contenido en MeO de 32,07 %, lo que corresponde a un derivado dimetilado. Por su velocidad en los cromatogramas debía tratarse de la 2-3 di-O-metil L-arabinosa, es decir, se trataría del dimetil derivado de la arabinosa más veloz (3-4-di-O-metil L-arabinosa $R_G = 0,58$; 2-3 di O-metil L-arabinosa, $R_G = 0,70$; 2-4 di-O-metil L-arabinosa $R_G = 0,64$ y 2-5 di-O-metil L-arabinosa $R_G = 0,85$), lo que podría llevar a confundirlo con alguno de los derivados dimetilados de la xilosa, aun cuando siempre queda por encima de aquéllos. Por la técnica de FLOOD sólo pudo separarse en forma de siruposo; se preparó su N-(2-3 di-O-metil arabino-

sil) anilina, que tenía un $PF = 138^{\circ}C$, que coincide con referencias bibliográficas. Sobre otros 0,020 grs. de siruposo se añadieron unas gotas de agua de Br_2 , consiguiendo separar una lactona que cristalizaba y tenía punto de fusión bien definido a $30^{\circ}C$.

B) Identificación y estructura de D_{II}

Tenía un $R_G \approx 0,75$ en el disolvente D y 0,58 en el L. Sobre una muestra de 0,040 grs. disuelta en agua, se determinó su poder rotatorio resultando ser $\alpha_D = +9,2$, lo que supone un $[\alpha]_D = +230^{\circ}$. Reducía al FEHLING y BENEDICT; con este último reactivo hicimos una valoración de la disolución que nos había servido para determinar el poder rotatorio, obteniendo un valor para el equivalente de reducción de, aproximadamente, 150 grs., lo que representa la mitad del disacárido.

Hidrólisis.—0,030 grs. de D_{II} , hidrolizado con SO_4H_2 1N durante 8 horas daba una gran mancha debida a arabinosa y otra al disacárido sin hidrolizar. Una porción idéntica fué hidrolizada con SO_4H_2 1N en tubo cerrado a b. m. durante 10 horas, dando por cromatografía exclusivamente arabinosa; una parte de este azúcar pudo separarse y cristalizarse (0,023 grs.) obteniéndose la correspondiente osazona de $PF = 163$ así como el sentido de su poder rotatorio, sobre una pequeña porción, observándose que éste era positivo, tratándose por lo tanto de L-arabinosa.

Formación de osazona.—0,018 grs. de D_{II} daba una osazona, con un $PF = 235^{\circ}C$. Dicha osazona hidrolizada con ClH 1N, liberaba arabinosa y otra porción se mantenía en forma de osazona.

Metilación.—0,1 grs. de D_{II} se sometieron a metilación exhaustiva a la manera indicada en el caso de D_I . Por hidrólisis y por la técnica de FLOOD se lograron separar 0,042 grs. y 0,044 grs. aproximadamente de los dos derivados metilados.

El primer derivado tenía un $R_G = 0,83$, en el disolvente F, es decir, es relativamente lento para un derivado trimetilado y es característico de la 2-3-4 tri-O-metil L-arabinosa; su contenido en MeO = 48,7 %, lo que corresponde a un derivado trimetilado.

El otro derivado tenía un $R_G = 0,64$ en el mismo disolvente F [*n*-butanol : etanol : agua (40 : 11 : 19)] y un contenido en metoxilo de 34,5 %, que corresponde a un derivado dimetilado. Su $PF = 145^{\circ}C$ y su poder rotatorio para una concentración = 0,1 era de 12, lo que equivale a $[\alpha]_D = 120^{\circ}$.

1. *Anilín derivado*.—0,030 grs. del derivado dimetilado se tratan con etanol y anilina, dando 0,035 grs. de N (2-4 di-O-metil arabinosil) anilina, de $PF = 145^{\circ}C$. Por todos estos datos se identificó este 2.º compuesto como la 2-4 di-O-metil L-arabinosa.

C) Identificación y estructura de D_{III}

El disacárido que hemos llamado D_{III} , en el disolvente C, a base de piridina, no se movía de la línea de partida en los cromatogramas, haciéndolo al desarrollarlo en un disolvente no básico (por ejemplo en el disolvente D tenía un $R_{gal} = 1,1$).

Una disolución de $c = 0,1$ en agua, tenía un poder rotatorio $\alpha = 13$, con un $[\alpha]_D = 130^{\circ}$.

Hidrólisis.—0,020 grs. de D_{III} por hidrólisis con SO_4H_2 1N a reflujo apenas si se hidroliza por lo que en los cromatogramas, la mancha más importante seguía correspondiendo al urónico inicial, si bien aparecían trazas de arabinosa y 4-O-metil glucurónico. Se repitió la hidrólisis (0,050 grs.) en tubo cerrado durante 12 horas, también con SO_4H_2 1N. Por cromatografía daba partes iguales de los azúcares que antes sólo aparecían en trazas (arabinosa y 4-O-metil glucurónico), quedando todavía bastante oligosacárido sin alterar.

Esterificación, reducción e hidrólisis.—0,1 grs. de D_{III} , se tratan con 3 c.c. de metanol conteniendo aproximadamente el 2 % de ClH disuelto, reflujiendo durante 8 horas a b.m. Seguidamente se evapora el disolvente recuperándose 0,091 grs. del residuo. Dicho residuo se disuelve en H_4AlLi en tetrahidrofurano (al 1,6 %), reflujiéndose el conjunto durante 30 minutos, después de los cuales, y dejado enfriar, se le adicionó cuidadosamente acetato de etilo para descomponer el exceso de hidruro. Después de neutralizar y concentrar hasta siruposo, se hidroliza el conjunto con SO_4H_2 1N (2 c.c.) durante 10 horas a b.m., observándose por cromatografía que los azúcares formados correspondían a 4-O-metil-D-glucosa y L-arabinosa, respectivamente, por sus correspondientes $R_G = 0,26$ y $0,018$ en el disolvente E (*n*-butanol : fórmico : H_2O (50:1:5)).

Osazona.—0,025 grs. de D_{III} con 0,40 grs. de acetato de fenilhidrazina daba una osazona que no pudo recrystalizarse satisfactoriamente; por hidrólisis de dicha osazona con ClH 1N, se observaba por cromatografía, después de neutralizar con CO_3Ag_2 , la aparición de 4-O-metil-D-glucurónico, fácilmente identificable, así como una mancha amarilla correspondiente a la osazona de la arabinosa.

Oxidación con bromo.—0,030 grs. de D_{III} se oxidan con agua de Br_2 (5 gotas) y el resultado se somete a hidrólisis con SO_4H_2 1N durante 4 horas; por cromatografía del hidrolizado no se detectaba arabinosa.

Metilación e hidrólisis.—Sobre 0,080 grs. de D_{III} en presencia de NaOH al 30 % (2 c.c.) se le añaden 2 c.c. de $SO_4(CH_3)_2$ con agitación y enfriamiento, añadiendo porciones de 2 c.c. del reactivo metilante y reforzando la basicidad del medio cada 8 horas, haciendo cuatro adiciones en total. A continuación se refluja el conjunto a b.m. durante 30 minutos, pasados los cuales se acidifica con SO_4H_2 diluído, haciéndose una extracción continua con Cl_3CH . El siruposo resultante se hidrolizó durante 48 horas con ClH metanólico y a continuación con ClH acuoso, hirviendo durante 24 horas. Después de enfriada la solución se neutraliza con $Ba(OH)_2$ concentrando el total (1,5 c.c.) y extrayendo con Cl_3CH ; la disolución acuosa se acidifica seguidamente con SO_4H_2 y vuelve a extraer con Cl_3CH . En la primera extracción en medio neutro, el cloroformo arrastra la 2-3 di-O-metil-L-arabinosa mientras que en la extracción en medio ácido queda el ácido urónico metilado, como se pudo comprobar por cromatografía de sus respectivos concentrados. La fracción ácida se trató con 6 c.c. de ClH metanólico al 1 % durante 2 horas, pasadas las cuales se neutraliza el hidrolizado con CO_3Ag_2 , separa el precipitado por filtración y el filtrado se trata nuevamente con $H_4Al Li$, reflujiéndose durante 30 minutos. Seguidamente se destruye el exceso de reactivo; desmineralizada y después de concentrar se procede a su identificación cromatográfica ($R_G = 0,79$ en el disolvente J; 0,53 en el disolvente G, 0,83 en el disolvente K), resultando ser la 2-3-4-tri-O-metil-D-glucosa.

IV

APENDICE SOBRE ALGUNOS POLIURONIDOS DE FRECUENTE USO EN ELABORADOS DE FRUTOS

Hasta aquí nos hemos venido refiriendo a una serie de poliurónidos de interés, desde el punto de vista biológico, como constituyentes normales de las pulpas y semillas de los frutos, que tanto significado tienen en el desarrollo y en la textura de los mismos. También ha sido objeto de estudio los que integran las excrescencias gomosas que con frecuencia aparecen en los árboles productores de tales frutos. Ahora bien, es conocido que para la confección de ciertos elaborados para los que se requiere una consistencia especial, hay casos en que no son suficientes los poliurónidos aportados por la materia prima y en éstos se recurre a la adición de otros extraños que, en la mayoría de las ocasiones, no han de considerarse como aditivos fraudulentos, sino más bien como coadyuvantes a la consecución de un efecto organoléptico deseado. Sin embargo, es conveniente el contar con procedimientos analíticos que permitan descubrir estos aditivos para aquellos casos en que se desee un control objetivo por cualquier causa, por ejemplo por sospechar de una sustitución o adición excesiva, para la imitación de un elaborado de la competencia, para el desarrollo de algún preparado especial, etc., etc.

En el caso de carnes, jaleas y mermeladas de frutas, suelen usarse pectinas de manzana o de cítricos y también algunos poliurónidos procedentes de las algas, en especial agar-agar y ácido alginico. Sobre las pectinas hay bastantes referencias, si bien sobre los polisacáridos algales existe menos información y por ello pusimos especial interés en recoger datos y aportar otros, sobre estos últimos.

Recientemente HIRST (149), en una conferencia sobre los polisacáridos de las algas, hace unas consideraciones sobre la importancia económica de estas sustancias que en el futuro pueden aliviar la desproporción entre el crecimiento de la población y las reservas alimenticias de origen terrestre. De hecho está probado que estos polisacáridos algales son originados por una forma de actividad fotosintética del mismo tipo que la de las plantas terrestres, aun cuando el proceso metabólico por el que se forman, debe tener también algunas peculiaridades que se traducen luego en las características estructurales de cada uno de ellos.

Existe un creciente interés de los investigadores por este campo, en el que modestamente nos hemos introducido al estudiar algunas propiedades de los hidrolizados del agar y ácido algínico, compuestos ambos para nosotros tienen una importancia práctica enorme por ser aditivos de frecuente uso en elaborados de frutos.

La química de los polisacáridos de algas tiene algunas dificultades características, tales como la propia identificación de las algas productoras e incluso la variación de constituyentes que se observa según la fecha de recolección (150). Otra dificultad es la mayor gama de azúcares que integran estos polisacáridos, así por ejemplo, además de los ya frecuentes en los polisacáridos de algas superiores, aparecen como componentes característicos L-galactosa, 3-6 anhídrido de la D- y de la L-galactosa, L-fucosa y los ácidos manurónico y gulurónico, incluso otros constituyentes como la glicerina, el ácido pirúvico, etc., etc.

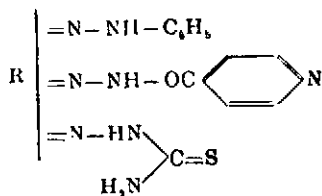
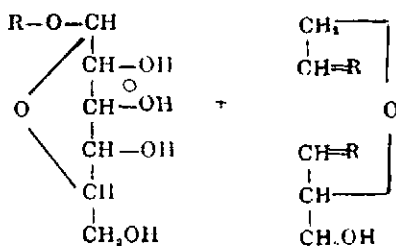
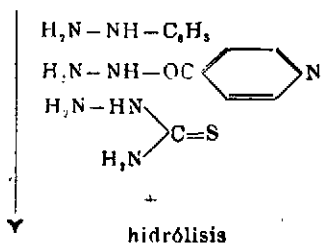
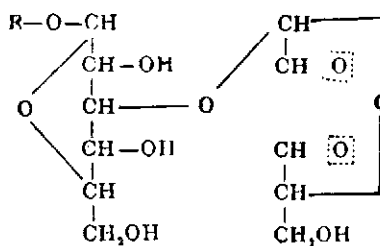
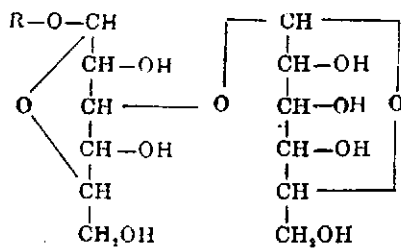
Quizá la mayor dificultad para los estudios estructurales de los polisacáridos de algas, surja de la presencia de ésteres del ácido sulfúrico. En efecto, durante las operaciones de metilación por ejemplo, actúan como inhibidores; si se intenta la hidrólisis ácida tienen lugar degradaciones del polisacárido. En ocasiones, estudiando su estabilidad puede deducirse su posible colocación.

Salvadas estas dificultades, los métodos que se siguen para su estudio estructural, son los mismos que ya hemos referido para polisacáridos de plantas terrestres (metilación, hidrólisis parcial, etc.). Como complemento a estos procedimientos generales han surgido otros más específicos; así, el procedimiento de BARRY (151) permite una degradación escalonada de cadenas con azúcares ligados en 1-3 y que se basa en la acción del ácido periódico y tratamiento con fenil-hidrazina, con lo que se formaron hidrazonas en aquellos fragmentos con funciones aldehído procedentes de la ruptura de α -glicoles, recuperándose los eslabones íntegros de

(149) HIRST, E. L., *Proceedings of The Chemical Society*, julio, 1958, págs. 177-187.

(150) BLACK, J., *Soc. Chem. Ind.*, 165, 355 (1948).

(151) BARRY y McCORMICK, *J. Chem. Soc.*, 2777 (1957).



aquellos azúcares que en el momento de la oxidación periódica no tenían tales grupos α -glicólicos libres, lo que sucede en los enlazados a través del C₃. Otra modificación, también de BARRY (152) condensa los productos de oxidación periódica de los polisacáridos en estudio con otros reactivos tales como la isonicotinoil-hidrazina y la tiosemicarbazida; el análisis de los productos de condensación insolubles, permite una valiosa información sobre el número de grupos α -glicólicos en la molécula original.

En las algas, los polisacáridos más importantes son galactanas, las cuales se encuentran al estado de sulfatos; en ellas, junto a la D-galactosa, el principal componente de las galactanas de plantas superiores, como ya dijimos al tratar de las hemicelulosas en general, aparecen algunos eslabones de L-galactosa. Igualmente suelen intervenir otros eslabones tales como 3,6 anhidro D- (y L-) galactosa, 6-O-metil galactosa (153), D-xilosa y ácido D-glucurónico. La presencia de azúcares ácidos en la constitución de estos polisacáridos de algas, que en otra época se consideraban como eminentemente neutros, es otro caso más que aboga en favor de nuestra opinión de que en el concepto de poliurónidos quedan perfectamente incluidos todos los tipos de polisacáridos naturales, aunque, por el momento, no se pudiese determinar en ellos la presencia de material ácido.

Las tres galactanas algales de mayor importancia son: el llamado *almidón de Florida* (procedente de la *Dilsea edulis*), la *carragenina* o *musgo de Irlanda* (del *Chondrus crispus*) y el agar (de las algas del género *Gelidium* y otros relacionados).

El almidón de Florida, está constituido por D-galactosa, D-glucurónico, D-xilosa, un 11 % de SO₄H₂ y trazas de 3-6 anhidro D-galactosa; los eslabones de D-galactosa que forman la cadena fundamental del polisacárido se unen en 1-3, enlace que está muy extendido en la mayoría de las plantas y mucílagos vegetales, como ya hemos resaltado en otras ocasiones. La carragenina es un polisacárido aún más sulfatado que el anterior (28 %) y sus principales constituyentes son: D-galactosa, L-galactosa y 3-6 anhidro L-galactosa, sin descartar la posibilidad de que intervengan otros aunque en pequeña proporción; en realidad, se trata de una mezcla de polisacáridos que recientemente ha merecido la atención de varios investigadores (154) en la que la presencia simultánea de los isómeros D- y L- de la galactosa dificulta considerablemente la determina-

(152) BARRY y MITCHELL, *J. Chem. Soc.*, 3610 (1953); BARRY, MCCORMICK y MITCHELL, *J. Chem. Soc.*, 3692 (1954).

(153) NUNN y HOLDT, *J. Chem. Soc.*, 1094 (1937).

(154) JOHNSTON y PERCIVAL, *J. Chem. Soc.*, 1994 (1950); ARAKI y HIRASE, *Bull. Chem. Soc. Japan*, 29, 770; etc., etc. (1956)

ción de estructuras. Pero la galactana más interesante para nosotros, es el agar agar, puesto que ha ocupado nuestra atención, no tanto su aspecto estructural como en sus características analíticas, por lo que nos permitiremos exponer un poco más ampliamente el estado actual de conocimientos sobre estos poliurónidos; los avances más importantes sobre la estructura del agar se deben a la escuela japonesa de ARAKI al que debemos agradecer la gentileza de habernos enviado la última serie de sus publicaciones en esta materia, algunas recién salidas de prensa (155).

Las sustancias agáricas se diferencian en composición y propiedades físicas según las especies a partir de las cuales se hace la extracción; el alga *Gelidium amansii*, es la especie más importante de las utilizadas comercialmente para la extracción de agar. De ARAKI recogemos la Tabla XXXIII en la que se comparan las propiedades del agar procedente de varias especies.

TABLA XXXIII

Composiciones químicas		<i>Gelidium</i> <i>Amansii</i> Lax.	<i>Gelidium</i> subconstatum Okan.	<i>Ceramium</i> <i>Nypnacooides</i>	<i>Acenthopeltis</i> japonica Okan.
CH ₃ O	%	3,3	2,3	0,4	2,1
Total azúcares reductores (como galactosa)	%	66,8	48,1	66,2	56,0
D - galactosa (método de TOLLENS)	%	32,2	26,3	46,6	28,1
3 - 6 anhidro L-galac- tosa	%	14,2	20,7	5,2	22,2
L-galactosa		+	+	-	+
D-1-galactosa		-	-	+	-
Lactona de urónicos (método de LEFEVRE)	%	4,6	13,1	13,7	4,5
Lactona de urónicos (método de TOLLENS)	%	5,4	17,2	17,5	10,7

El agar-agar o simplemente agar se extrae de ciertas especies de algas rojas (clase *Rhodophyceas*) principalmente las del género *Gelidium* (*Gelidium amansii*, *Gelidium subcostatum*,...), si bien puede tener otros orí-

(155) ARAKI y ARAI, *Bull. Chem. Soc. Japan*, 29, 339-345 (1956); ARAKI y ARAI, *Bull. Chem. Soc. Japan*, 30, 287-293 (1957); HIRASE, *Science and Technology*, 6 (1957); etc., etc.

genes. Puesto que se trata de una sustancia obtenida por extracción, posiblemente mezcla de polisacáridos, es conveniente considerar este nombre como aplicable a una familia de sustancias de constitución muy similar.

Su propiedad de formar geles le permite tener múltiples aplicaciones, pudiéndose utilizar como agente solidificante en la preparación de medios de cultivo de microorganismos en los laboratorios bacteriológicos; como agente espesante en alimentos (nuestro caso), en adhesivos y cojas; como componentes de emulsiones (incluyendo emulsiones fotográficas); etc., etc. Sus usos como catártico están basados en su indigestibilidad y poder de hinchamiento en presencia del agua.

Para la obtención industrial del agar, se hierven las algas previamente seleccionadas y secadas al sol y el extracto filtrado se concentra a vacío hasta siruposo; éste se mezcla con alcohol o acetona y agita hasta formar un precipitado blanco, el cual se separa por filtración, redisolviéndolo en agua caliente y precipitándolo de nuevo en alcohol. Como resultado de repetir este tratamiento varias veces se obtiene el agar en forma de un polvo blanco. Esta misma técnica fué utilizada por nosotros para la purificación de agar en los casos en que lo pretendimos.

En la Tabla XXXIV se recogen los datos obtenidos también por

TABLA XXXIV

%	Sustancias agarosas del <i>Gelidium</i>		Agar-agar comercial	Agar-agar
	<i>Amansii</i>	<i>Lax.</i>		
Agua	13,0	13,0	13,0	16,2
Cenizas	3,1	3,1	3,2	3,7
C	47,2	47,2	46,3	—
H	6,3	6,3	6,1	—
S	0,64	0,64	1,05	—
N	0,89	0,89	0,51	0,68
SO ₄	—	—	—	3,20
CH ₃ O	—	—	0,70	1,2
CH ₃ CO	3,6	3,6	—	—
Galactosa	32,2	32,2	35,0	—
Azúcares reductores directos	—	—	—	9,2
Azúcares reductores totales	66,8	66,8	—	68,2
Lactona de urónicos (método de LEFEVRE)	4,6	4,6	6,8	—
Lactona de urónicos (método de TOLLENS)	5,4	5,4	4,8	—

ARAKI (156) sobre agar seleccionado y agar comercial, figurando en la última columna los datos obtenidos por nosotros para el agar industrial de más frecuente uso en España. Las variaciones más notables corresponden al dato de viscosidad: en cuanto al contenido en metoxilo así como en la cantidad de S y N hay muy pocas referencias. El S se considera como un componente elemental del agar, el cual está presente en forma de éster del ácido sulfúrico (157), no ocurriendo igual con el N que, parece ser, procede de impurezas que acompañan al agar, tales como proteínas, pudiéndose eliminar fácilmente por tratamiento con ácido acético. La separación simultánea de proteínas en estas precipitaciones globales de poliuronidos, resulta natural, como hemos tenido ocasión de comprobar en el caso de pectocelulosas.

El principal componente azucarado, tanto en el agar comercial como en el de ARAKI, es la galactosa, encontrándose en uno y otro aproximadamente en la misma cantidad. Finalmente se observa en las cenizas la presencia de Ca, Mg y Sr figurando los dos primeros en la molécula como sales de un polisacárido formado por eslabones de galactosa unidos con ésteres del ácido sulfúrico (158).

El agar es estable frente a los álcalis pero muy inestable en medio ácido hidrolizándose fácilmente, como hemos tenido ocasión de comprobar y como más adelante se tratará con detalle.

Los estudios sobre la presencia de L-galactosa en el agar fueron realizados simultáneamente por PIRIE y ARAKI, publicando el primero antes que el investigador japonés, el método de aislamiento (159) el cual fué perfeccionado posteriormente por el segundo (160). PIRIE aisló la D, L-galactosa en forma de heptacetato, como consecuencia de la presencia en la molécula de un aldehído galactósico y, finalmente separó la L-galactosa a partir de la mezcla de los dos isómeros ópticos. Existen otras opiniones en contra de la existencia de dicho aldehído galactósico (161); posteriormente se descubrió (162) que la D-galactosa no la contienen todas las sustancias agarosas observando su presencia en el extracto de la *Ceraninus hypnacoides*, mientras la *Gelidium amansii*, por ejemplo, y otras especies sólo contienen L-galactosa. Con todo, es difícil asegurar si en aquellos casos de aparición de D- y L-galactosa, la sustancia estará libre de contaminación con otras galactanas.

(156) ARAKI, CH., *Science and Technology Japan*, Vol. 2 (B), 1953.

(157) NEUBERG, C. y OBLE, H., *Biochem. Z.*, 125, 311 (1921).

(158) ARAKI, C., *J. Chem. Soc. Japan*, 58, 958 (1937); 59, 424 (1938).

(159) PIRIE, N. W., *Biochem. J.*, 30, 369 (1936).

(160) ARAKI, S., *J. Chem. Soc. Japan*, 58, 958 (1937); 59, 424 (1938).

(161) FRAUKENBERG, K. y SODP, K., *Ber.*, 70, 264 (1937).

(162) ARAKI, C., *J. Chem. Soc. Japan*, 58, 1214 (1937); *Collection of Treatises in Commemoration of the Anniversary of Kyoto Technical College*, 136 (1932).

El estudio de la estructura da lugar a serias dificultades experimentales como se puede deducir fácilmente, ya que junto a restos lábiles, que a veces se comportan como ceto-azúcares, hay ácidos urónicos (que pueden estar presentes en un polisacárido contaminante), ácido pirúvico, los restos sulfúricos, etc., etc.

En los estudios realizados en la Universidad de Edimburgo (163) mediante procesos de metilación, detectaron la presencia de eslabones de β -D galactopiranososa, con enlaces en 1-3 y de 3-6 anhidro L-galactosa, enlazados a otros eslabones a través del C₄. Pero, no les fué posible averiguar si estas unidades de anhidro-azúcares existían como tales en el polisacárido original o si se produjeron durante el proceso de aislamiento, como resultado de la hidrólisis de los ésteres sulfúricos.

Este problema se ha resuelto recientemente, durante los estudios que sobre la estructura del agar realizan ARAKI y colaboradores, los cuales han demostrado que el anhidro-azúcar lábil se puede aislar de una manera relativamente estable en forma de dimetil acetal. ARAKI considera que el agar no es una sustancia simple, sino una mezcla de, a lo menos, dos polisacáridos, denominados agarosa y agarpectina. Dicha heterogeneidad se demuestra por el hecho de que acetilando el agar directamente, da lugar a dos extractos diferentes, uno soluble en cloroformo y otro insoluble en él. El primero es el llamado acetato de agarosa y el segundo acetato de agarpectina, el cual contiene los ácidos urónicos y sulfúrico presentes en el agar. Por saponificación de los respectivos acetatos se obtiene la agarosa y agarpectina nuevamente. Igual ocurre al metilar el agar, se producen dos derivados metilados distintos: éter metílico de la agarosa (soluble en cloroformo) y éter metílico de la agarpectina (insoluble en cloroformo).

La agarpectina está formada por eslabones de D-galactosa enlazados en 1-3 y quizá también ácidos urónicos aunque en pequeña proporción.

La agarosa, según se deduce de la hidrólisis ácida, tiene una estructura formada por unidades repetidas de agarobiosa [4-O- β -(D-galactosil) 3-6-anhidro L-galactosa]; por otro lado, ARAKI y ARAI (loc. cit. 155) observaron que una enzima aislada de la *Pseudomonas kiotensis*, rompía los enlaces β de la agarosa, obteniéndose una mezcla de oligosacáridos, siendo el más abundante el disacárido llamado neo-agarobiosa, cuya estructura se ha probado es la 3-O-(3-6 anhidro- α -L-galactopiranosil) D-galactosa. La agarosa tiene una mayor facilidad para formar gel que la agarpectina; la estructura de la primera es más simple que la de la se-

(163) PERCIVAL, E. G. V., SOMERVILLE, J. C. y FORBES, I. A., *Nature*, 142, 797 (1938); PERCIVAL, E. G. V. y FORBES, I. A., *Nature*, 142, 1076 (1938); *J. Chem. Soc.*, 1844 (1939).



nes. Pero, aparte de esta misión, no era conocido hasta los trabajos de HIRASE, que dicho ácido interviniera constituyendo una parte de la molécula del agar, capaz de romperse fácilmente por hidrólisis ácida, no existiendo tampoco datos suficientes para decir que dicho ácido, como integrante del agar, juegue una función definida en el metabolismo de las algas. El problema, en este caso, está en saber cómo se distribuye el ácido pirúvico en los dos polisacáridos (agarosa y agarpectina) o si está acumulado en uno de ellos, al igual que los eslabones de sulfúrico y los de ácido urónico.

Como no se conocía que el ácido pirúvico formara parte de polisacáridos, HIRASE hizo experimentos posteriores sobre otros polisacáridos distintos del agar, para detectar la presencia de dicho ácido en ellos, siguiendo un camino idéntico al realizado para aquél, pero en ninguno de los casos examinados pudieron detectarlo. Precisamente nosotros hemos ampliado esta identificación de pirúvico a otros muchos polisacáridos, en especial a gomas de frutales, como se indicó en su momento, no acusándose su presencia en ninguno de los casos; en cambio, en el ensayo realizado con agar seguía confirmándose la clara presencia de dicho ácido.

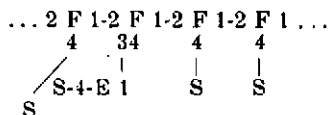
El estudio del investigador japonés sobre la estructura del compuesto (A) constituye una interesante aportación para la determinación de la fórmula estructural real del agar, ya que pese a las diversas fórmulas propuestas para éste (165) todavía existen bastantes puntos por aclarar.

Una característica definida, es la presencia de eslabones de D-galactopiranosos unidos en 1-3. Quizá la fórmula propuesta por ARAKI y colegas a base de la intervención de eslabones de agarobiosa, sea la que tenga más puntos a favor, pero, con todo, resulta prematuro el asignar al agar una constitución definitiva hasta tanto no se descubran todos los compuestos que integran la molécula de este polisacárido complejo.

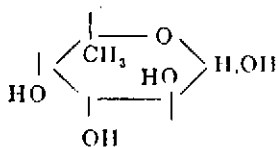
Así como el agar es el polisacárido de las algas rojas que más interés económico ha alcanzado, en el caso de las algas pardas (feofíceas) es el ácido algínico el que tiene mayor importancia. Junto al ácido algínico es también típico de las algas pardas el polisacárido laminarina, así como algunas fucanas. La laminarina es un poliglucósido con enlaces en 1-3, que se extrae especialmente de las algas del género *Laminaria*. Entre las fucanas debe destacarse la fucoidina, que puede proceder de varias algas, en especial de las de los géneros *Fucus* y *Laminaria*. Los eslabones de fucosa se enlazan entre sí por las posiciones 1-3, teniendo unido cada es-

(165) PERCIVAL, E. G. V. y SONERVILLE, J. V., *J. Chem. Soc.*, 1615 (1937); ARAKI, G., *J. Chem. Soc. Japan*, 58, 1362 (1937); JONES, W. G. M. y PRAT, S., *J. Chem. Soc.* 225 (1942) [Ref. C. A., 36, 4097 (1942)]; PERCIVAL, E. G. V. y THOMSON, *J. Chem. Soc.*, 750 (1942); BARRY, V. C., DILLON, J. y McGETTRICK, W., *J. Chem. Soc.*, 183 (1942) [Ref. C. A., 36, 3489 (1942)].

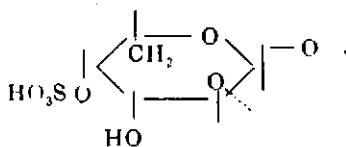
labón de fucosa, un grupo $\text{SO}_4=$ por su posición 4. Para la fucoidina, han propuesto CONCHIE y PERCIVAL (166) la fórmula:



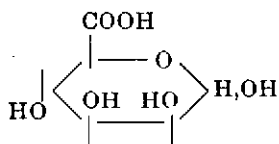
en donde cada F representa un eslabón de fucosa y cada S un grupo sulfato:



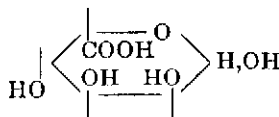
L-fucosa

Eslabón de 4-sulfato L-fucosa
con enlaces en 1-2

El ácido algínico es, en principio, un polímero del ácido manurónico, urónico este último que, junto al gularónico (estereoquímicamente relacionado con el anterior), es el más característico de las feofíceas, en las cuales faltan, sin embargo, polímeros del glucurónico y galacturónico que tan extendidos se encuentran en las plantas superiores; si acaso existen a veces eslabones aislados de estos últimos integrando cadenas mixtas.



Acido D-manurónico

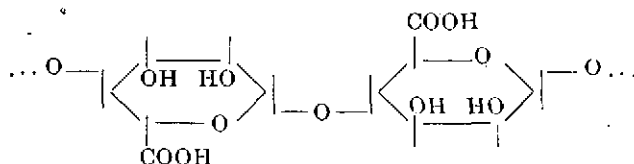


Acido L-gularónico

El ácido algínico que fué descubierto en 1883 por STANFORD, está comercializado desde entonces. Sus características coloidales y elevado peso molecular, así como el gran número de grupos carboxilo, son responsables de sus innumerables aplicaciones, algunas de las cuales poseen interés para nosotros desde el momento de que el ácido algínico se usa con éxito en la preparación de ciertas carnes, mermeladas y jaleas de frutas.

(166) CONCHIE y PERCIVAL, *J. Chem. Soc.*, 827 (1950).

Aun cuando los estudios estructurales fueron de los primeros iniciados en el campo de los polisacáridos, son sin embargo, de los que más dificultades han encontrado, sobre todo como consecuencia de la gran resistencia a la hidrólisis manifestada por el algínico, lo que lleva a la degradación o destrucción de los productos de hidrólisis al tener que recurrir a procedimientos mucho más enérgicos. Por una hidrólisis ácida muy controlada, es posible obtener D-manuro lactona, aun cuando no con rendimiento cuantitativo; por métodos de metilación e hidrólisis posterior, pueden deducirse otras particularidades, sucediendo igual con lo que respecta a oxidaciones graduales y estudio de productos resultantes. En el año 1939 HIRST y colegas (167) propusieron para el ácido algínico la estructura parcial.



en la que como se ve, está formado por eslabones de ácido manurónico enlazados en 1-4, aceptándose ésta con las naturales reservas.

Ensayos posteriores (168) realizados por metilación total, hidrólisis, remetilación y reducción con H_2AlLi , permitieron la identificación de los azúcares resultantes mediante cromatografía, habiéndose encontrado que éstos se distribuyen en la siguiente proporción:

2-3-4 tri-O-metil D-manosa	≈ 1 %
2-3 di-O-metil D-manosa	≈ 88 %
mono-O-metil manosas	≈ 4 %
di-O-metil hexosas	≈ 6 %

la presencia de azúcares monometilados puede deberse, bien a una dimerización incompleta, o bien a la existencia de eslabones de manurónico en cadena ramificada. Aunque no se descarta la posibilidad de ramificaciones, la cadena es principalmente rectilínea, en la que los eslabones de manurónico se enlazan en 1-4, contando estas cadenas con 100 ó más eslabones. Las investigaciones de FISCHER y DÖRFEL (169), con uso de técnicas cromatográficas, han permitido demostrar la presencia de L-gulurono-

(167) HIRST, JONES y JONES, *J. Chem. Soc.*, 1880 (1939).

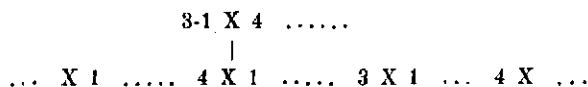
(168) CHANDA, HIRST, PERCIVAL y ROSS, *J. Chem. Soc.*, 1833 (1952).

(169) FISCHER y DÖRFEL, *Z. physiol. Chem.*, 301, 224 (1955); 302, 186 (1955).



lactona, aparte del principal componente D-manuronolactona, existiendo entre ambas lactonas una indudable relación estereoquímica. La proporción de L-gulurónico varía para el ácido algínico obtenido de diferentes manantiales. Queda la duda si los eslabones de gulurónico se unen entre sí o con otros de manurónico, es decir, integrando una molécula uniforme de eslabones idénticos al igual que el ácido manurónico o si formaría un polisacárido único en el que los eslabones de gulurónico estarían repartidos en proporción a su cuantía. Los métodos ionoforéticos ayudarán, sin duda, a comprobar si, en definitiva, el algínico está integrado por un polisacárido único o por una mezcla de dos muy relacionados.

Nos queda por mencionar, aunque sea ligeramente, por la relación que tiene con los nuestros, el caso de las pentosanas algales. Sobre ellas cabe recoger las consideraciones que HIRST (loc. cit. 149) hace sobre las diferencias constitucionales, respecto a las pentosanas de plantas terrestres. En efecto, mientras que estas últimas, como ya hemos visto en distintas ocasiones predomina la L-arabinosa coexistiendo con la D-galactosa (que es la hexosa estereoquímicamente relacionada con aquélla) y el ácido galacturónico, en cambio las pentosanas algales muestran constitución muy distinta. En primer lugar la L-arabinosa falta prácticamente en todas las algas (un caso particular en que se ha encontrado este azúcar es en el alga *Anabaena cylindrica*) (170), tampoco aparecen nunca las galactanas en las algas en asociación con los poliurónidos derivados del glucurónico y galacturónico tan frecuentes en las plantas. En los que respecta a la xilosa, debe indicarse que aparece con mayor frecuencia en las algas, pero no integrando xilanas que formen parte de las paredes celulares, como sucede en las plantas superiores, sino más bien participan como eslabones intercalados en las galactanas. En algún caso particular, por ejemplo en el alga roja *Rhodymenia palmata*, se encuentran verdaderas xilanas que juegan un importante papel en el metabolismo de dichas algas, en vez de participar como elementos plásticos de las paredes. Recientemente han aparecido algunos trabajos sobre estas xilanas algales (171) (172), cuya estructura más probable parece ser:



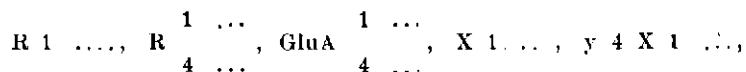
Como se ve nos hemos referido especialmente a los polisacáridos de las algas rojas y pardas que son las que hasta ahora han sido objeto de

(170) PERCIVAL Y CRANDA, *Nature*, 166, 787 (1950).

(171) BARRY, MCGORMICK Y MITCHELL, *J. Chem. Soc.* 3692 (1954)

(172) HOWARD, *Biochem. J.*, 67, 643 (1957).

atención por parte de los investigadores. Sin embargo existen otras muchas variedades de algas y todas cuentan con polisacáridos de interés potencial. Recientemente se han iniciado estudios sobre los de algas verdes, polisacáridos que constitucionalmente son intermedios entre los de las algas rojas y parda y los de plantas superiores. Así por ejemplo, los polisacáridos de la *Ulva lactuca* (173) contienen un porcentaje elevado de grupos sulfato junto a L-ramnosa, D-xilosa y D-glucurónico. Para este polisacárido se ha adelantado la estructura:



pero no está aclarado si se trata de un polisacárido único o si se trata de una mezcla de varios. También es interesante el caso de la *Clodophora rupestris* (174), un alga verde también, de la que se extrae un mucílago contaminado con proteínas, cuya porción hidrocarbonada consta de D-galacturónico, L-arabinosa, D-xilosa y ácido sulfúrico (20 %), junto con pequeñas porciones de L-ramnosa y D-glucosa, aun cuando se supone que la glucosa procede de algo del polisacárido laminarina que se encuentra como contaminante; como en el caso anterior queda la duda de si se trata de un polisacárido único o de una mezcla de varios.

A pesar de que hemos hecho una serie de consideraciones sobre la naturaleza de los diversos polisacáridos de algas, sólo dos de ellos, el agar-agar, de las rodofceas, y el ácido algínico de las feofíceas, tienen interés inmediato para el fin que nos hemos propuesto: detectar la presencia de poliurónidos adicionados a elaborados de frutos. Tampoco son éstos dos poliurónidos los únicos coagulantes utilizados como aditivos, pues, aparte de las pectinas, que constituyen, por así decir, el aditivo más afín a los constituyentes propios de los frutos, está extendiéndose también el uso de derivados de la celulosa obtenidos artificialmente; entre tales derivados podemos citar las diversas tilosas (por ejemplo la *tilosa SL-400* que es una oxietil-metil celulosa y la *tilosa KN-2.000* que es la sal sódica de la carboximetilcelulosa).

La existencia de esta variedad de aditivos que pueden utilizarse por separado, e incluso en mezcla, implica indudablemente la determinación de los mismos en elaborados en que se pretenda descubrirlos o valorarlos. No teníamos conocimiento al iniciar nuestro trabajo, de la existencia de algún método eficaz para detectar tales aditivos, por lo que iniciamos

(173) BRADING, GEORG-PLANT y HARDY, *J. Chem. Soc.* 319 (1954).

(174) FISHER y PERCIVAL, E., *J. Chem. Soc.*, 2666 (1957).

unos experimentos con este fin, y que, de una manera muy resumida, exponeremos en este apéndice.

Nuestros experimentos se enfocaron desde dos aspectos; por un lado se esperaba obtener algún resultado mediante el logro de precipitaciones selectivas e identificación posterior de fragmentos resultantes, determinando cuáles eran los realmente característicos para cada uno de los poliurónidos en ensayo.

El método de precipitación consistió en la misma técnica que seguimos para las gomas, es decir, utilización sucesiva de electrolitos y observación subsiguiente; recogemos los resultados obtenidos en la Tabla XXXV. En dicha tabla se ve claramente que para cada uno de los poliurónidos ensayados, el comportamiento más característico se observa frente a unos determinados reactivos, quedando recuadradas en la misma el grupo de reacciones a aplicar.

Debemos aquí hacer constar que en el curso de nuestros experimentos, conocimos la referencia bibliográfica a un trabajo de KOCH y BRETTHAUER, a través del C. A. (175), en el que los autores se habían planteado el mismo problema que nosotros para el caso de pectinas, tilosas y alginatos en mermeladas; por dicha referencia vimos que los reactivos de precipitación utilizados eran prácticamente iguales a los nuestros, ahora bien, los resultados que según el resumen del C. A., obtenían los autores, nos desconcertaban grandemente, ya que por ejemplo el reactivo indicado para el algínico es $Ba(OH)_2$ y $(NO_3)_2$ (UO_2) y para el caso de la tilosa KN , Cl_2Ca o ClH . Bastante avanzado nuestro trabajo, tuvimos la oportunidad de recibir una separata del original, por gentileza de los autores, miembros del *Instituto para la Investigación y Aprovechamiento de Frutos y Verduras de Geisenheim, Rheingau*, con la satisfacción de comprobar que sus resultados coincidían con los nuestros y por tanto que el error estaba en el resumen.

Posteriormente conocimos el trabajo de EWART y CHAPMAN (176), en el que los autores tratan de la determinación de estabilizantes en alimentos en un sentido amplio y que cronológicamente es anterior al de los autores alemanes, coincidiendo también en líneas generales en la forma y conclusiones a que llegan, que también son coincidentes con las nuestras. También existe un trabajo de NEWBURGER, JONES y CLARK (177) sobre la identificación de tales substancias mediante espectros en el infrarrojo.

(175) KOCH, J. VON y BRETTHAUER, G., *Zeitschrift für Lebensmittelkunde*, 50, 162 (1954) [Ref. C. A. 5719 (1955)].

(176) EWART, M. H. y CHAPMAN, R. A., *Anal. Chem.*, 24, 1460 (1952).

(177) NEWBURGER, S. H., JONES, J. H. y CLARK, G. R., *Proc. Sci. Sect. Toilet Goods Assoc.*, 19, 25 (1953) [Ref. C. A., 47, 9040 (1953)].

TABLA XXXV

Substancia	1/5 Vol. Cl ₂ Ca al 2,5 %	1/5 Vol. Cl ₂ Ca al 2,5 % + 1/5 Vol. NH ₄ OH 3N	1 Vol NaOH 3 N	1/10 Vol. saturado de Ba (OH) ₂		1 Vol. Ba (OH) ₂ saturado	1 Vol de acetato básico de Pb.	Acetato básico de Pb + 1/5 Vol NH ₄ OH 3N
				Frío	caliente			
Pectina de bajo éster	ppdo. gela- tinoso o gel.	—	ppdo. gelatino- so o flocculento color amarillo por Q.	gel. o ppdo. gelatinoso	ppta. y la sol. cambia a amarillo	—	gel	gel
Alginato	ppdo gela- tinoso o gel.	—	sol. amarillo clara por Q.	gel. o ppdo. gelatinoso	ppta. y la sol. cambia a amarillo	—	gel	gel
Pectina	—	Forma len- tamente ppdo. gela- tinoso	ppdo. gelatino- so o flocculento color amarillo por Q.	gel. o ppdo. gelatinoso	ppta. y la sol. cambia a amarillo	—	gel	gel
Agar	—	—	—	—	color amarillo y después obscurece	—	ppdo. flo- culento	gel
Metil-celu- losa	—	—	—	—	turbidez o gel; sol clara por enfriamiento	—	—	gel
Carboxi-me- til celu-	—	—	—	ppdo. sol. por agita- ción	—	ppdo. floccu- lento	gel	gel

Al margen de estas reacciones de precipitación, consideramos como posibles características para ayudar a la identificación de los coagulantes de carácter hidrocarbonado que estábamos ensayando, la forma de disolverse éstos en el agua, después de que los mismos habían sido separados del producto bruto que los contenía (mermelada, jalea, carne...). La separación en bloque de los coagulantes se hace por precipitación con etanol, pasando, después de secados muy suavemente, a observar la forma de disolverse cada uno de ellos en el agua; nuestras observaciones subjetivas fueron confrontadas con las de un panel de prueba que constituimos por deferencia de un grupo de compañeros, por lo que estimamos que el ensayo de solubilidad tiene fuerza de prueba objetiva. En la Tabla XXXV se han resumido los resultados; se desprende de la tabla que el ensayo no tiene carácter determinante pero sí es un buen complemento para otras pruebas.

Con todo, pensamos que quizá el método de más porvenir podría estar ligado a una hidrólisis e identificación de los productos de ésta, identificación en la que indudablemente tendrían papel primordial las técnicas cromatográficas. Nuestros ensayos se hicieron en unas ocasiones sobre la masa bruta de coagulante por precipitación con alcohol, en otros aplicamos la hidrólisis directa sobre los elaborados de frutos que han sido la materia prima fundamental de nuestros experimentos, aparte de mezclas artificiales en que confirmamos la presencia de dos o más aditivos; en estos últimos casos se hizo la observación sobre el constituyente más característico que resulta en la hidrólisis de cada poliurónido.

Para la hidrólisis utilizamos SO_4H_2 de diversas concentraciones (1; 2; 3; 4,5; 9 y 18 N), haciendo actuar el agente hidrolítico entre 1 y 8 horas y haciendo la observación de los productos de hidrólisis al cabo de 1, 2, 4, 6 y 8 horas; transcurrido el tiempo previsto para cada una de las hidrólisis, se provoca el bloqueo del agente hidrolizante para que su acción no prosiguiera y se estudian los productos resultantes por cromatografía.

A continuación se resumen los resultados, primero al dejar fija la concentración y variar los materiales sometidos a hidrólisis (Tabla XXXVI); después se indican también los resultados de actuar sucesivas concentraciones de ácidos frente al mismo sustrato (Tabla XXXVII). También se dan los resultados para las mezclas agar-agar, ácido algínico, pectina y tilosas, deduciéndose que es posible lograr la identificación de una manera bastante inequívoca (Tabla XXXIX). Aunque en la mayoría de los casos no llega a interesar la variación cuantitativa de estos aditivos, debe hacerse constar que puede lograrse mediante la medida densitométrica de las manchas más características para cada uno de

ellos. Así para la pectina era necesario medir la concentración en galacturónico; de la galactosa para el agar (no descartando la posibilidad de hacerlo sobre la marcha de pirúvico y aun sobre una mancha de elevada velocidad, amarilla sin necesidad de revelar cuya presencia en el hidrolizado de agar era específica, comprobándose en los de varias procedencias); la manuronlactona para el ácido alginico y la glucosa y ácido glucurónico, para las *tilosas SL* y *GN* respectivamente.

El procedimiento indicado para la identificación, sobre todo cuantitativa resultó completamente práctico al comprobarlo frente a diversas mermeladas y carnes preparadas por nosotros con mezclas de estos aditivos. Por la sencillez de realización es fácil su uso en los laboratorios de fábrica en los que con frecuencia pueden plantearse y en especial para los Laboratorios del *Centro de Investigación de Frutos y Conservas*, al que pertenecemos, en donde con frecuencia se nos plantea el problema de la identificación de aditivos diversos, permitidos o no, en elaborados de las fábricas conserveras nacionales e incluso de las de la competencia internacional. Por ello, consideramos que esta aportación aunque sencilla es sumamente práctica.

TABLA XXXVI

<i>Substancia</i>	<i>Forma de disolverse en agua</i>
Acido péctico	Insoluble.
Pectato (sal de Na, K...)	Forma soluciones claras o turbias por calentamiento.
Pectato (sal de Ca)	Insoluble
Pectina	Hinchamiento en agua fría y disolución en caliente
Alginato	Disolución lenta en agua fría y rápida por calentamiento para formar soluciones viscosas.
Agar	Hinchamiento en agua fría, disolución por calor, geles por enfriamiento.
Metil celulosa	Disolución lenta en agua fría, pero enturbiamiento o geles por calor.
Carboximetil celulosa	Disolución lenta en agua, rápida por calentamiento dando soluciones viscosas claras.

TABLA XXXVII

<i>Substancia</i>	SO ₄ H ₂ 1N
Agar	Hay hidrólisis desde 1 hora y continúa igual a las 2, 4 y 8 horas.
Algínico	A las 4 horas se inicia la hidrólisis dando dos manchas, correspondientes a ácidos manurónico y su lactona. Continúa igual a las 6 y 8 horas.
Tilosa	Empieza a hidrolizarse a las 6 horas y continúa a las 8 horas.
Pectina	A las 2 horas se inicia, apareciendo ácido galacturónico, y continúa a las 4, 6 y 8 horas.
SO ₄ H ₂ 2N	
Agar	Hay hidrólisis desde 1 hora; continúa igual durante 2, 4, 6 y 8 horas.
Algínico	A las 4 horas se inicia la hidrólisis; continúa igual durante 6 y 8 horas.
Tilosa	Empieza la hidrólisis a las 4 horas (aparece glucosa) y continúa igual a las 6 y 8 horas.
Pectina	A las 6 horas, débiles manchas correspondientes al ácido galacturónico. Manchas en el origen.
SO ₄ H ₂ 3N	
Agar	Igual a la hidrólisis con SO ₄ H ₂ 1N.
Algínico	Desde 1 hora se inicia la hidrólisis.
Tilosa	Empieza a hidrolizarse desde 1 hora.
Pectina	Empieza a hidrolizarse desde 4 horas.

TABLA XXXVII (continuación)

<i>Substancia</i>	SO_4H_2 4,5N
Agar	Igual a la hidrólisis con SO_4H_2 1N
Algínico	Igual a la hidrólisis con SO_4H_2 3N
Tilosa	Desde 1 hora hay hidrólisis.
Pectina	A las 2 horas se inicia la hidrólisis, continuando a las 4, 6 y 8 horas.
SO_4H_2 9N	
Agar	} Igual a la hidrólisis con SO_4H_2 4,5.
Algínico	
Tilosa	
Pectina	
SO_4H_2 18N	
Agar	} En 1 hora se hidrolizan todos, pero en las horas siguientes (2, 4, 6 y 8 horas), debido a la concentración del ácido se carboniza la substancia.
Algínico	
Tilosa	
Pectina	

TABLA XXXVIII

Acción de ácido sulfúrico de varias concentraciones sobre mezclas de agar, algínico, pectina y tilosa

SO ₄ H ₂	Agar
1N	Hidrólisis desde 1 hora dando una mancha correspondiente a galactosa y otra rápida, de color naranja que avanza con el frente de disolvente; mancha en el origen. Continúa igual a las 2, 4, 6 y 8 horas.
2N	Igual a la hidrólisis con SO ₄ H ₂ 1N.
3N	Igual a la hidrólisis con SO ₄ H ₂ 1N
4,5N	Igual a la hidrólisis con SO ₄ H ₂ 1N
9N	Igual a la hidrólisis con SO ₄ H ₂ 1N
18N	A partir de 1 hora se carboniza la substancia.
Algínico	
1N	Durante 1 y 2 horas no hay hidrólisis. A las 4 horas se inicia la hidrólisis dando dos manchas rojas correspondientes al ácido manurónico y su lactona. Continúa igual a las 6 y 8 horas.
2N	Igual a la hidrólisis con SO ₄ H ₂ 1N
3N	Desde 1 hora se inicia la hidrólisis.
4,5N	Igual a la hidrólisis con SO ₄ H ₂ 3N.
9N	Igual a la hidrólisis con SO ₄ H ₂ 3N.
18N	A partir de 1 hora se carboniza la substancia

TABLA XXXVIII (continuación)

SO ₄ H ₂	Pectina
1N	A las 2 horas se inicia dando una mancha correspondiente a ácido galacturónico y continúa a las 4, 6 y 8 horas. Manchas en el origen.
2N	A las 6 horas débiles manchas correspondientes al ácido galacturónico. Manchas en el origen.
3N	A las 4 horas se inicia la hidrólisis, continuando a las 6 y 8 horas.
4,5N	A las 2 horas se inicia la hidrólisis, continuando a las 4, 6 y 8 horas.
9N	Se hidroliza desde 1 hora.
18N	A partir de 1 hora se carboniza la substancia.
Tilosa	
1N	Empieza la hidrólisis a las 6 horas, una mancha de glucosa y continúa a las 8 horas.
2N	Empieza en hidrólisis a las 4 horas (aparece glucosa) y continúa a las 6 y 8 horas.
3N	Desde 1 hora se hidroliza.
4,5N	Desde 1 hora se hidroliza.
9N	Igual a la hidrólisis con SO ₄ H ₂ 4,5 N.
18N	A partir de 1 hora se carboniza.



TABLA XXXIX

Acción de ácido sulfúrico de varias concentraciones sobre mezclas de agar, algínico, pectina y tilosa

<i>Tiempo</i>	(SO ₄ H ₂ 1N)
1 hora	La aparición de galactosa así como otra mancha muy rápida color naranja indica la presencia de agar.
2 horas	La aparición de una débil mancha roja debida a ácido galacturónico indica la presencia de pectina.
4 horas	La aparición de dos manchas, una de ácido manurónico y otra de su lactona, indican la presencia de ácido algínico.
6 horas	La aparición de glucosa indica la presencia de tilosa SL.
	(SO ₄ H ₂ 2N)
1 hora	La aparición de galactosa así como otra mancha muy rápida color naranja, indica la presencia de agar.
4 horas	La aparición de manchas de glucosa indica la presencia de tilosa y la aparición de ácido manurónico y su lactona la presencia de ácido algínico.
6 horas	La presencia de débiles manchas correspondientes al ácido galacturónico, indican la presencia de pectina

NOTA: Con SO₄H₂ de concentraciones 3N, 4,5N y 9N desde 1 hora se empiezan a hidrolizar todas las sustancias y no hay buena diferenciación.—Con SO₄H₂ 18N se carbonizan todas y tampoco hay probabilidades de diferenciación.

CONCLUSIONES

1.^a Se hace una revisión del concepto de poliurónidos, estableciendo varios criterios que permiten extender tal nombre a casi todos los polisacáridos estructurales, insistiendo en la amplia distribución de ácidos urónicos que llegan a integrar polisacáridos en otros tiempos considerados como absolutamente neutros, como sucede con la mayor parte de las hemicelulosas que se han sometido a revisión en los últimos años. En nuestra opinión sólo la celulosa α podría considerarse como un «poliurónido estructural neutro» y esto dentro de ciertas reservas.

2.^a Se hace una puesta al día de los conocimientos actuales, muy dispersos, sobre hemicelulosas, pectinas, gomas y mucílagos, estableciendo las relaciones y diferencias entre los diversos grupos, tanto en su constitución como en su función, destacando también cómo en realidad no existe un límite de continuidad tan rígido como se venía admitiendo hasta ahora. Se apuntan varias teorías imperantes sobre la formación de poliurónidos, así como las explicaciones que se admiten para definir su comportamiento, al menos en las facetas más características (gelificación, gomosidad, hinchamiento, consistencia, integración de protoestructuras, etc.).

3.^a Han sido objeto de estudio experimental detallado, los poliurónidos que intervienen en la porción carnosa y en la semilla de albaricoque «búlida», a la vez que los azúcares libres que se encuentran en estas porciones del fruto, adoptando el criterio actualmente seguido de estudiarlos sin aislamiento previo, con objeto de evitar las transformaciones que pueden suceder en dicho proceso. Se han estudiado las excrecencias gomosas de las diversas variedades de albaricoquero en relación con las de otros frutales también del género *Prunus* y las de otros árboles más

conocidos. Por otro lado, se han verificado estudios sobre algunos poliurónidos de frecuente uso como aditivos en la obtención de algunos elaborados de frutos.

4.^a Sobre albaricoque «búlida» en sucesivo grado de desarrollo, entre la 1.^a y 5.^a semana, de una en una, se siguió la variación en sus constituyentes, entre las que debe destacarse la variación en el complejo lignopectocelulósico, de una manera progresiva, habiéndose hecho también bien la determinación de los constituyentes particulares de dicho complejo, que variaban entre los siguientes límites: humedad 78-87 %; azúcares libres 1,3-0,9 %; azúcares totales 1,3-5; acidez 2,46-1,36 %; cenizas 0,74-0,43 % y rendimiento en pectocelulosa 4,30-2,30 %; límites que corresponden respectivamente a la 1.^a y 5.^a semana de desarrollo. Los azúcares libres que componían el fruto maduro, se separaron y cristalizaron, resultando ser sacarosa, D-glucosa, D-fructosa y D-xilosa, previniéndose su recuperabilidad a partir de frutos blandos y recortes de ellos para usos industriales.

5.^a El estudio sobre las hemicelulosas de albaricoque, va precedido de una exposición resumida, aunque bastante exhaustiva, acerca del estado actual de conocimientos sobre hemicelulosas de frutos que, salvo para el caso de la pera, se reduce al contenido global en función del desarrollo de algunos frutos (no existiendo datos en la bibliografía sobre albaricoques). El aislamiento por nuestra parte de fragmentos de carácter ácido en los que intervenían el ácido glucurónico y derivados de éste, en vez de los fragmentos aislados por JONES y REID en la hidrólisis escalonada de pectina de manzana, nos demuestra la existencia de hemicelulosas de carácter ácido como entidades distintas de las pectinas, que hasta ahora venían considerándose como los componentes primordiales en la textura de los frutos, siendo así que las hemicelulosas juegan un importante papel en la estructura de los mismos.

6.^a A partir de la lignopectocelulosa bruta (porción insoluble en etanol del 80 %), se separó la porción soluble que resultó tener carácter eminentemente pectínico. Se determinaron rendimientos semanalmente en función del método de extracción (maceración neutra o ácida y combinación de ellas) sometiendo a estudio más detallado los correspondientes a albaricoques en su grado de madurez óptima. Se comprobó la presencia de galactosa libre, así como la de algunos polisacáridos de grado medio de polimerización que constituían indudablemente una fracción minoritaria del complejo pectínico propiamente dicho. También aparecían indicios de urónicos libres, demostrándose en cambio la ausencia de

los azúcares arabinosa, xilosa, ramnosa, glucosa, fructosa y sacarosa; la falta de estos tres últimos azúcares demuestra que la separación primera de la lignopectocelulosa había sido eficaz.

7.^a Tanto las pectinas previamente precipitadas de la disolución que las contenía, como las disoluciones directas, se sometieron a hidrólisis ácida y enzimática, comprobando los resultados en uno y otro caso y en la combinación de ambos métodos. En la hidrólisis ácida sólo pudieron detectarse galactosa, oligosacáridos de grado medio de polimerización y galacturónico, no apareciendo ningún otro material que hubiese aportado duda sobre la naturaleza pectínica del problema. La identificación de componentes se hizo por cromatografía en papel usando varios disolventes. Para el fraccionamiento de los hidrolizados en porción ácida y neutra, se hizo uso de las resinas de cambio de ión. Para la hidrólisis enzimática se usaron pectinasas de distinto grado de actividad, obteniendo un claro éxito en la escisión, aumentando grandemente la proporción de galacturónico manifiesto; la hidrólisis enzimática fué más eficiente al hacerla sobre una disolución pectínica pretratada químicamente. Pudo comprobarse el refuerzo de la acción que se conseguía al utilizar mezclas de enzimas.

8.^a La porción hidrocarbonada libre de pectinas (hemicelulosas y celulosas), se sometió a hidrólisis ácida escalonada, para conseguir afectar sólo a las hemicelulosas. Sobre los productos de hidrólisis se siguió una marcha metódica de fraccionamientos y refraccionamientos, mediante el uso combinado de columnas de resinas de cambio de ión, carbón y celulosa que nos llevaron a separar componentes neutros y ácidos, primero en conjunto y después individualmente. La fracción ácida, la más importante para nosotros, constaba de por lo menos siete componentes, de los cuales fueron objeto de estudio los tres más abundantes. La fracción neutra se componía de los monosacáridos D-xilosa, L-arabinosa, D-glucosa, D-manosa y D-galactosa. Igualmente se separaron e identificaron los oligosacáridos xilobiosa, xilotriosa y xilotetrosa, enlazados en 1-4.

9.^a Los componentes de la porción ácida, previamente aislada, se separaron por refraccionamiento, tanto por elución selectiva sobre columnas de carbón como por uso de otras de celulosa de creciente grado de empaquetamiento, seleccionándose tres ácidos urónicos a los que hemos llamado hasta su identificación U_I , U_{II} y U_{III} .

El U_I , por sus especiales características (R_f , color y forma de la mancha, etc., etc.) resultó ser el ácido 4-O-metil glucurónico, descartándose además la posibilidad de que fuese una lactona, único caso a que podría asemejarse, por la reacción negativa ante reactivos específicos.

10.^a El componente U_{II} , que resultó ser un ácido aldobiurónico, daba por hidrólisis forzada 4-O-metil-D-glucurónico y D-xilosa. Por esterificación, reducción con H_4AlLi e hidrólisis, producía D-glucosa y D-xilosa. Por metilación exhaustiva e hidrólisis se obtenían 2-3-4 tri-O-metil-D-glucurónico y 3-4-di-O-metil-D-xilosa, confirmándose además la naturaleza del derivado trimetilado del glucurónico por su transformación en 2-3-4-tri-O-metil-D-glucosa mediante esterificación y reducción selectiva. Por otro lado, el derivado totalmente metilado de U_{II} , daba por reducción metanólisis e hidrólisis, 2-3-4-tri-O-metil-D-glucosa y 3-4 di-O-metil-D-xilosa. Todos estos hechos nos permiten asignar a U_{II} la estructura de 2-(4-O-metil-D-glucuronósido)-D-xilosa.

11.^a El componente U_{III} , que resultó ser otro ácido aldobiurónico, daba por hidrólisis forzada D-glucurónico y D-xilosa. Por esterificación, reducción e hidrólisis daba D-glucosa y D-xilosa. Por metilación exhaustiva seguida de hidrólisis, se producía 2-3-4-tri-O-metil-D-glucurónico y 2-4-di-O-metil-D-xilosa; el derivado trimetilado del urónico pudo transformarse en 2-3-4-tri-O-metil-D-glucosa por esterificación y glicosidación previa, seguida de reducción e hidrólisis. Siguiendo la misma marcha que en el caso de U_{II} , el derivado totalmente metilado de U_{III} , se sometió a reducción, metanólisis e hidrólisis, produciéndose 2-3-4-tri-O-metil-D-glucosa y 2-4-di-O-metil-D-xilosa. Todos estos hechos nos permiten atribuir a U_{III} la estructura de 3 (D-glucuronósido)-D-xilosa.

12.^a Sobre la almendra de albaricoque se determinó en primer lugar su contenido en grasa (41,75 % en total) y se hizo el análisis completo de la torta desengrasada correspondiente. A otra porción de semillas se les separó la película o tegumento, haciendo el análisis de la película así como el de las semillas sin piel. De tegumentos y de semillas se obtuvieron las pectocelulosas correspondientes, si bien para éstas se requirió la desamigdalización previa, operación que realizamos por acción enzimática de la emulsina propia de las semillas. Los resultados de todos estos análisis se han recogido tabulados en la presente Memoria.

13.^a Sobre la lignopectocelulosa de tegumentos se hicieron en primer lugar las determinaciones de cenizas, humedad, proteínas, lignina, pentosanas, hexosanas CO_2 y CH_3O procediendo a la identificación de sus componentes hidrocarbonados. El rendimiento en porción soluble fué de 24,14 %, debiendo tener naturaleza pectínica o mucilagínica. Dicha porción soluble, por hidrólisis e identificación de componentes resultó contener galactosa y arabinosa, algunos polímeros de estos azúcares y una porción ácida que resultó ser galacturónico. La porción hidro-

carbonada insoluble en agua (hemicelulosa) contenía como azúcares neutros, D-xilosa, L-arabinosa y D-galactosa, estos dos últimos en la misma proporción, siendo la xilosa unas cuatro veces más abundante; como oligosacáridos neutros se separaron xilobiosa y xilotriosa por la técnica de FLOOD, HIRST y JONES. Los compuestos acídicos detectados eran dos, uno que se movían a la velocidad de la glucosa en el disolvente *n*-butanol : : etanol : agua (40 : 11 : 19), y otro muy lento en el mismo disolvente; el primero, que era el más abundante, coincidía en todas sus características con el U_{II} identificado en las pulpas.

14.^a La lignopectocelulosa de las semillas sin tegumento, desengrasadas y desamigdalizadas se sometió a estudio hidrolítico, tanto en lo que afecta a su porción hidrocarbonada soluble (pectinas y mucílagos) como a la insoluble (hemicelulosas). La porción soluble, por hidrólisis controlada produjo galactosa, galactobiosa, arabinosa y arabobiosa y una mayor proporción de galacturónico. El polisacárido original debe calificarse de mucílago por la misión que desempeña. Las hemicelulosas por hidrólisis daban arabinosa, galactosa, xilosa, ribosa (aunque en escasa proporción fué demostrada inequívocamente su presencia), arabobiosa, galactobiosa y xilobiosa, consiguiendo por combinación de técnicas de fraccionamiento la separación y obtención de todos estos compuestos cristalizados. La fracción ácida contenía tres ácidos aldobiurónicos, los cuales por hidrólisis forzada daban arabinosa, xilosa, glucurónico y 4-O-metil D-glucurónico, por lo que los oligosacáridos originales serán tres combinaciones de estos cuatro componentes y cuyos resultados definitivos no se recogen en la presente Memoria. En principio parece más heterogénea la composición de las hemicelulosas de la semilla que la del tegumento en lo que a fracción ácida se refiere.

15.^a Por otro lado, se hizo un estudio de los azúcares que acompañan los líquidos acualcohólicos de la separación de lignopectocelulosas tanto de las pulpas como de las semillas peladas e incluso de sus tegumentos. En el caso de las pulpas pudieron separarse los azúcares sacarosa, glucosa, fructosa y xilosa, observándose que en los extractos que tenían algún tiempo, aparecía un oligosacárido que en los últimos años es conocido en la bibliografía por *kestosa*. Se hizo un refraccionamiento en columna de celulosa pudiéndose recuperar todos ellos en forma cristalina. La recuperabilidad de estos azúcares hace concebir la posibilidad de utilización de los subproductos de fábricas conserveras, concretamente de albaricoque, para obtener mezclas de ellas en la misma proporción que se encuentran en la naturaleza y utilizarlas en la corrección de otros frutos deficientes en azúcares o en la preparación de almíbares.

Los extractos acuo-alcohólicos de tegumentos y de semillas peladas, diferían de los de las pulpas sólo en el oligosacárido *kestosa*, ya que estos últimos extractos aparecían desde el primer momento en contra de lo que ocurría en aquéllas. Sobre la supuesta *kestosa* separada, se hicieron una serie de ensayos que permitieron concluir que, en efecto, se trataba de dicho azúcar, observándose identidad absoluta con la *kestosa* obtenida de los extractos acuoalcohólicos de las pulpas al cabo de cierto tiempo.

16.^a Con interés científico y técnico se ha realizado un estudio sobre las gomas siguientes: ciruelo japonés; melocotonero, patrón ciruelo; albaricoquero búlida, patrón ciruelo myrobolán; albaricoquero búlida, patrón ciruelo japonés; albaricoquero moniquí, patrón ciruelo myrobolán; albaricoquero real fino, patrón ciruelo myrobolán; albaricoquero damasco y albaricoquero búlida, patrón albaricoquero, almendro, limonero y arábiga. Sobre la goma de albaricoquero en sus diversas variedades, no hemos encontrado nota alguna en la bibliografía y sobre las restantes se tienen escasa referencia y ninguna sobre gomas de frutales españoles. Se han estudiado una serie de propiedades físicas tales como las solubilidades, densidades y coeficientes de viscosidad y el comportamiento ante una serie de reactivos de precipitación. De los datos de viscosidad pudieron hacerse deducciones respecto a grado de polimerización y aun a la forma de las macromoléculas demostrándose el incumplimiento de la relación de EINSTEIN. La alta viscosidad de la goma de albaricoque, bastante superior a la arábiga, la hace especialmente apta para sustituir a ésta en algunos casos como sucede en su utilización como expansionante de plasma.

17.^a Se determinaron las características químicas de las diversas gomas (humedad, cenizas y sales en el residuo, pentosanas, lignina, hexosanas, proteínas, ácido pirúvico, índice de metoxilo, contenido urónico y acidez). Por una serie de procesos de purificación, se consiguieron obtener todas y cada una de las gomas en forma de un polvo blanco, más fácilmente soluble, aparentemente cristalino.

18.^a Se obtuvieron los diagramas en Rayos X según la técnica del polvo cristalino de DEBYE, SCHERRER y HULL, apareciendo líneas de cristalinidad sólo en las gomas de almendro y de las variedades de albaricoquero moniquí myrobolán y real fino myrobolán, mostrando naturaleza amorfa el resto de las gomas aun cuando aparecen indicios de cristalinidad en las de búlida myrobolán y ciruelo japonés. En la presente Memoria se recogen los diagramas correspondientes, en los que la raya más

pronunciada corresponde a la grasa de vacío utilizada para el empaste. A título comparativo se ofrecen diagramas de la celulosa α de esparto que muestra una elevada cristalinidad.

19.^a Un estudio interesante realizado también sobre las gomas ha sido el identificar los fragmentos resultantes en la hidrólisis realizada en diversas condiciones (autohidrólisis, hidrólisis suave e hidrólisis forzada). Resulta general la aparición temprana de L-arabinosa, lo que está en favor de su existencia en estructura furanosa. Los azúcares producidos en la hidrólisis suave, eran comunes e idénticos estereoquímicamente en todas las gomas de prunáceas (L-aramnosa, D-xilosa, L-arabinosa, D-galactosa y D-glucurónico). En cambio en la goma de limonero no aparecen xilosa ni tampoco la ribosa que otros detectaron. En forma de tabla se da la proporción relativa en moles, en que se encuentran los distintos azúcares en las gomas, según nuestros experimentos. En la hidrólisis suave de todas las gomas, quedaban varios oligosacáridos que no se habían escindido aún después de tres semanas de hidrólisis. De ellos se han identificado, las tres más abundantes que eran comunes a todas las gomas de prunáceas, dos de ellos de carácter neutro y uno de carácter ácido que aparecía también en la goma de limonero y en una mayor proporción que en las otras gomas. A tales compuestos les hemos llamado hasta su identificación D_I , D_{II} y D_{III} .

20.^a El disacárido D_I , de carácter neutro, por hidrólisis forzada daba D-xilosa y L-arabinosa. Si previamente se oxidaba con Br_2 , por hidrólisis sólo producía xilosa. D_I formaba osazona y ésta por hidrólisis sólo daba también xilosa. Por metilación exhaustiva e hidrólisis se obtenían 2-3-4 tri-O-metil-xilosa y 2-3 di-O-metil-L-arabinosa, siendo estos compuestos metilados claramente identificables. Todo esto está de acuerdo en la existencia de enlace en 1-4 ó en 1-5 entre la xilosa y la L-arabinosa. El marcado poder rotatorio negativo de D_I , supone la presencia de un enlace del tipo β -glicosídico (por intervención de la estructura β de la D-xilosa) y con una naturaleza furanósica para la L-arabinosa, por lo que esta última debe intervenir en el enlace glicosídico. En definitiva, la estructura asignada a D_I es 5-(- β -D-xilopiranosido)-L-arabinosa.

21.^a El disacárido D_{II} daba por hidrólisis forzada sólo arabinosa. Tenía carácter reductor, pero su equivalente de reducción era igual a su Pm, lo que prueba tenía sólo un C_1 libre. Formaba osazona que por hidrólisis daba L-arabinosa. Por metilación exhaustiva e hidrólisis se producía 2-3-4 tri-O-metil-L-arabinosa, claramente identificables. D_{II} tenía un elevado poder rotatorio claramente positivo (+230°), lo que es

favorecido si sus eslabones están en forma piranosa (β -L-arabo-piranosas $[\alpha]_D = +190,6$). Por todos estos datos cabe asignar a D_{II} la estructura 3- β -L-arabopiranosido-L-arabinosa.

22.^a El disacárido D_{III} , tenía carácter ácido. Por hidrólisis forzada daba L-arabinosa y 4-O-metil-glucurónico. Por esterificación, reducción e hidrólisis daba L-arabinosa y 4-O-metil-D-glucosa; igualmente por oxidación previa del disacárido con Br_2 no aparecía arabinosa en la hidrólisis. Por metilación exhaustiva e hidrólisis pudo separarse 2-3 di-O-metil-L-arabinosa y 2-3-4 tri-O-metil-D-glucurónico, pudiéndose transformar este último en 2-3-4 tri-O-metil-D-glucosa. Por los hechos expuestos se ha asignado a U_{III} la estructura de 4 (4-O-metil- α -D-glucurónico)-L-arabinosa.

23.^a En un apéndice sobre ácido algínico, agar, tilosas y pectinas como aditivos en elaborados de frutos, se hace una revisión de los escasos datos existentes en la bibliografía dándose métodos sencillos para la identificación de los mismos en el caso complejo en que puedan encontrarse más de dos de ellos en un mismo elaborado. Los métodos se basan en la hidrólisis ácida selectiva e identificación cromatográfica de los mismos así como en reacciones específicas de precipitación.

BIBLIOGRAFIA

P. Salmerón.—FUNDAMENTOS DEL SECADO Y DESHIDRATACION DE FRUTAS Y HORTALIZAS.—Publicaciones del Instituto de Orientación y Asistencia Técnica del Sureste, Murcia, 1960. 121 págs.

El interés del tema es innegable puesto que la producción potencial española de frutos desecados es enorme en tanto que la producción actual es todavía pequeña y no responde a la calidad que las buenas características de las materias primas de nuestro país muestran; esta deficiencia hace que los frutos secos españoles se paguen a precios inferiores a los de la competencia, al menos en lo que a los de hueso se refiere. Tampoco escapa el interés del tema en relación con la industria pimentonera que debe sustituir extensamente los métodos tradicionales de secado del pimiento para proceder a la total elaboración del fruto en el seno de la factoría con mejora sensible de rendimientos y calidades.

El autor da primero una visión general de la distribución de las áreas geográficas mundiales en que tiene importancia la desecación de frutos y hortalizas, para tratar luego en forma sencilla sucesivos puntos, todos del máximo interés. Define la desecación en su acepción amplia y establece sus ventajas e inconvenientes, así como las características diferenciales en pro y en contra de los productos deshidratados en secadero y los obtenidos por desecación al sol, destacando naturalmente el mayor contenido vitamínico en los deshidratados, recogiendo algunos datos concretos. Establece los fundamentos de la desecación y deshidratación lo que da pie para la elección del sistema más conveniente (secado o deshidratación) en cada caso. Se extiende el autor sobre el secado al sol y sobre las condiciones que hay que tener en cuenta para el establecimiento de secaderos naturales, acompañando unas tablas detalladas correspondientes a temperaturas y humedades de Murcia en 1958 para concluir que precisamente esta zona no es de las más adecuadas para la desecación pese a la elevada temperatura predominante. Ampliamente se ocupa de las operaciones preparatorias (lavado, clasificación, lejiado, azufrado, corte y lim-



pieza) para pasar luego a las de secado y exudación, estableciendo los límites de humedad en consonancia con la seguridad de conservación y se refiere a las modificaciones que tienen lugar en el fruto. Se revisan las condiciones de desecación al sol para cada una de las más importantes frutas (albaricoques, melocotones, ciruelas, peras, manzanas, higos, uvas); después se revisan también las condiciones en que se secan al sol las verduras y hortalizas y a pesar de destacar que, en general, este sistema es poco satisfactorio para ellas, se dan normas para el secado en pequeña escala de apio, guisantes, coliflor, cebollas, espinacas, patatas, coles, tomates, zanahorias y pimientos. Como principal objetivo de esta publicación se trata ampliamente el tema de la deshidratación forzada (por vacío, aire caliente, vapor sobrecalentado o calor directo) para destacar el interés de los secadores de aire caliente; estudia la forma en que se produce la eliminación del agua y los factores de que depende (superficie de evaporación, velocidad de renovación de aire, temperatura). Habla sobre la constitución de un buen secadero de aire caliente y sobre las características que debe reunir (temperatura y velocidad de aire regulable, distribución uniforme de aire y temperatura, facilidad para variar y regular humedad en el aire de salida). Hace ahora unas consideraciones básicas para la elección de secadero destacando cuáles son los principales tipos y de ellos cuáles son de aplicación práctica para la deshidratación de frutas y hortalizas (de túnel, de bandejas, continuos de cinta y de cilindros rotativos). Sin embargo el estudio se centra sobre secaderos de bandejas y de cinta para destacar las ventajas y simplicidad de manejo de los del primer tipo estableciendo a la vez en qué casos es recomendable el segundo tipo.

Especial mención debe hacerse del interesante estudio que se incluye sobre un secadero de bandejas para pimiento con destino a pimentón, calculándose la producción diaria en uno de 60 m² así como sus necesidades energéticas en función de la cantidad mínima de aire que ha de circular por el mismo, dándose total de calorías por hora, rendimiento, cálculo del radiador, consumo de combustible, superficie de calefacción de la caldera requerida, potencia consumida en el ventilador. Muy demostrativa es la comparación de costos primarios de secado al sol y en secadero de pimiento así como la nota sobre la influencia porcentual de los distintos elementos que integran el coste.

Con criterio semejante a como se hizo para la desecación al sol de frutas y hortalizas se da cuenta de las peculiaridades de la deshidratación de cada fruta o de cada hortaliza en particular, refiriéndose a las mismas que entonces. Se dedica un interesante apartado a la microbiología de los alimentos deshidratados estableciéndose primero cuáles son las condiciones fundamentales para que los productos sean microbiológicamente satisfactorios, comentando las opiniones de diferentes autores sobre esta importante faceta en relación con la salud pública. Se dan las normas que rigen en EE. UU. respecto a la clasificación por tamaños para melocotones, higos, peras, ciruelas, manzanas y uvas.

El embalado y almacenaje de los productos deshidratados se trata tanto desde el punto de vista de las condiciones que deben reunir los locales destinados a estas operaciones como en lo referente a la forma imperante de embalaje para cada fruta. También son interesantes las consideraciones sobre la influencia del envasado en la conservación de las características de los productos, aludiendo al envasado hermético en presencia de gases inertes y de agen-

tes deshidratantes. Se estudian los materiales de envase y de embalaje y se insiste sobre las condiciones de almacenaje primero de frutas secas y deshidratadas y después de verduras deshidratadas.

Se dedica un apartado al proceso de rehidratación o reconstitución, deteniéndose en explicar el método recomendado por el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos que permite calcular los términos «razón de rehidratación», «coeficiente de rehidratación» y «porcentaje de agua en el producto rehidratado». Por último se describen los métodos analíticos usuales para la determinación de humedad, anhídrido sulfuroso y actividades catalasa y peroxidasa, así como el que se utiliza para el recuento de bacterias en el ambiente de los secaderos.

El libro se completa con una sección bibliográfica que comprende 33 citas de gran interés inmediato.

La presentación es cuidada y el formato muy acertado, conservándose el adoptado para otras anteriores publicaciones del Instituto de Orientación y Asistencia Técnica del Sureste.

G Guzmán

F. J. Clauser.—SYMPOSIUM OF PLASMA DYNAMICS.—Adison-Wesley Pub. Co. inc. 369 pág. Londres (1960).

Durante los últimos años se ha registrado en los medios científicos nucleares de Europa y América un notable interés por la Dinámica de plasmas, ciencia que trata del comportamiento de los materiales conductores deformables frente a los campos electromagnéticos. Una contribución notable de este movimiento científico lo constituye la presente obra, basada en una conferencia internacional que sobre Dinámica de plasmas tuvo lugar durante los días 9-13 de junio de 1958 en Woods Hole, Whitney Estate, al suroeste del Cabo Cod, Massachusetts, bajo el patrocinio de la Academia Nacional de las Ciencias y el Consejo Nacional de Investigación de los Estados Unidos. A ella acudieron las más relevantes figuras de Norteamérica, Inglaterra, Alemania y Suecia, especializadas en el moderno campo de la Dinámica de plasmas, base de los actuales estudios de la Física Termonuclear, Astrofísica, Física de Cohetes, Magneto-aerodinámica, etc.

No olvidemos que el día que la fusión nuclear sea controlada por el hombre, el problema de la escasez de las reservas energéticas mundiales habrá desaparecido por completo, pues sólo el deuterio contenido en el agua del mar será suficiente para los más ambiciosos proyectos de la humanidad. Pero ello requerirá previamente un conocimiento profundo de los campos electromagné-

ticos necesarios para producir el control de plasmas a 100 millones de grados, en los cuales tenga lugar la fusión nuclear y este objetivo ha movilizado centenares de científicos en una tarea común. Los trabajos presentados en las nueve sesiones de la Conferencia de Woods Hole, fruto de las investigaciones realizadas en este campo durante los últimos años, así como el resultado de las fructíferas discusiones que en ella se desarrollaron, constituyen la base del material recopilado en este libro bajo la dirección de F. H. Clauser, de la Universidad de Johns Hopkins, como editor general de la obra.

Los primeros capítulos están destinados a ofrecer una visión general de los modernos dispositivos experimentales existentes para la obtención de elevadas temperaturas y la información que de ellos se deduce respecto a la dinámica del plasma, «talón de Aquiles», como dice el autor de toda la Física de plasmas. Se describen detalladamente diversos ingenios termonucleares tales como Ixión, Columbres, Seylla y Toxon, utilizados en los Laboratorios Científicos de Los Alamos para resolver el problema de la fusión nuclear controlada, así como las últimas experiencias magnetohidrodinámicas realizadas con mercurio y otros metales líquidos.

Las investigaciones teóricas sobre la dinámica de un haz de electrones y su interacción con un plasma, así como el tratamiento estadístico del mismo, están tratadas detalladamente y de sus ecuaciones se deducen aplicaciones importantes en la interpretación de las ondas de choque producidas magnéticamente, la producción de plasmas de elevada densidad y los espectros observados en la corona solar y en las descargas tipo Zeta.

Una de las sesiones de la mencionada Conferencia fué dedicada a la magnetohidrodinámica solar, planetaria e interplanetaria, tema que es recogido en uno de los capítulos de la obra estudiando desde este punto de vista la dinámica de los gases interplanetarios, el viento solar en el campo geomagnético, y los procesos dinámicos en las atmósferas terrestre y solar.

El último capítulo está dedicado a la magnetohidrodinámica cósmica. En él se tratan extensamente los problemas planteados por los campos magnéticos interestelares, causa probable de la radiación cósmica, así como una serie de fenómenos hidromagnéticos astrofísicos y sus posibilidades en el laboratorio.

En resumen, el libro ofrece sin duda la visión más completa presentada hasta la fecha dentro del campo de la Dinámica de plasmas. Más de 1.500 citas bibliográficas recogidas en sus páginas le convierten en una fuente magistral de referencias para el científico o técnico interesado en el campo de la magnetohidrodinámica.

José Aguilar Peris