

Contribución al estudio de las isomerizaciones e interconversiones de azúcares en medios neutros y alcalinos

POR

MAGDALENA CONSUELO PEREZ SANCHEZ

Profesor Adjunto de la Facultad de Ciencias

INTRODUCCION

Con el título de «Contribución al estudio de las isomerizaciones e interconversiones de azúcares en medios neutros y alcalinos» nos honramos en presentar una parte de un estudio más amplio que hemos realizado sobre las distintas transformaciones que sufren los azúcares sencillos y algunos derivados poliméricos de éstos al estar en contacto con distintos medios, incluídos los de carácter ácido, a los que en este trabajo no nos referimos.

El objetivo del estudio era hacer una revisión objetiva de una serie de opiniones dispares que se han sucedido históricamente en la construcción de la ya consolidada Química de los Hidratos de Carbono. No se nos ocultaba la dificultad del tema puesto que grandes autoridades científicas, de rango internacional, lo han tocado, pero creíamos, y creemos, que modestamente podíamos aportar algunos datos de interés al mejor conocimiento del asunto. Prueba de que el tema es de interés palpitante es el hecho de que otros investigadores lo están abordando, simultáneamente a nosotros, aunque con la diferencia clara de que, por haberse apegado aquellos, a aspectos parciales y sobre todo a condiciones de trabajo muy específicas, casi siempre a temperatura ambiente y a un par de agentes químicos, han obtenido visiones y deducciones muy limitadas.



Cuando se nos propuso este tema no era una pura circunstancia la culpable sino que encajaba en la marcha general de los trabajos que se desarrollan en los Laboratorio de Química Orgánica de la Facultad de Ciencias y del Centro de Investigación de Frutos y Conservas del Patronato «Juan de la Cierva», a los que pertenecemos, ya que en ellos se abordan cuestiones eminentemente prácticas sin descuidar los aspectos científicos de éstas; entre tales cuestiones se han sucedido las que entraña el conocimiento de diversas celulosas naturales y modificadas, gomas de frutales, pectinas de frutos, hemicelulosas de fibras, polisacáridos de algas, etc., y mucho juegan para este conocimiento los métodos químicos de degradación alcalina, los de hidrólisis, los de desionización, etc., en los que se plantea la necesidad de saber qué cambios deben ser atribuidos a estas acciones intermedias y por tanto cuáles podrían enmascarar los resultados. Nuestro estudio nos ha obligado a comprobar el comportamiento de los azúcares individuales, ello ha dado lugar a un número muy elevado de experiencias directas y de control. En la exposición de tales experiencias seguimos un orden también individual, pero, para evitar una reiteración excesiva hemos procurado condensar en lo posible aquellas descripciones que abundan en puntos o detalles expuestos con anterioridad, así como tampoco nos detenemos en hacerlo respecto a técnicas de trabajo que ya se juzgan como conocidas, este es el caso de las cromatográficas en sus diversos aspectos, que nos han sido de utilidad incalculable y que hemos cultivado, con este motivo, con bastante esmero. A cambio de la reducción que hemos logrado al exponer la parte experimental nos hemos permitido recoger en esta Memoria a manera de capítulos de revisión casi exhaustiva los temas de *Mutarrotación*, *Transformación de Lobry de Bruyn* y *Alberda van Ekenstein* y *Formación de ácidos sacarínicos*, ya que el esfuerzo que hemos realizado para reunir e interpretar las diversas opiniones puede ser útil para otros.

Es de especial justicia reconocer el aliento y guía con que nos han conducido durante su realización los codirectores de este trabajo, Prof. ANTONIO SOLER y Dr. GINÉS GUZMÁN, Catedrático de Química Orgánica e Investigador Científico del C. S. I. C. respectivamente, a los que expreso mi más sincera gratitud. Por otro lado reconozco públicamente la ayuda moral recibida del Ilmo. Sr. Decano de la Facultad de Ciencias Prof. LOUSTAU y GÓMEZ DE MEMBRILLERA al que nunca han faltado sus frases paternas de estímulo desde que se inició la redacción definitiva. Naturalmente sin las ayudas recibidas simultánea o sucesivamente de la Facultad de Ciencias y Patronato «Juan de la Cierva» tampoco podría haberse realizado este trabajo, por lo que mi gratitud se extiende a los organismos y a las personas que los rigen.



I

MUTARROTACION

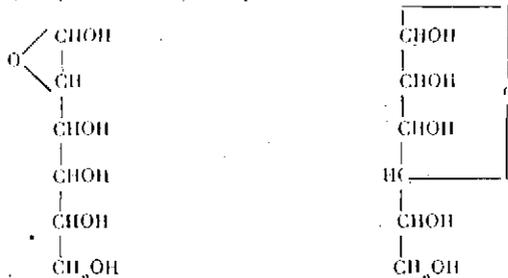
Es sobradamente conocida la gran estabilidad de los diversos azúcares cuando están en estado cristalino y también es conocido que, al hallarse disueltos, comienzan a sufrir transformaciones de diversa índole, que se complican cuando en la disolución existen iones H_3O^+ u OH^- aún cuando se encuentren en pequeña concentración. La complejidad de las transformaciones crece aún más al superponerse varios agentes.

El fenómeno que se observa como más inmediato es el de la mutarrotación, descrito por primera vez, para las hexosas, por DUBRUNFAUT, en 1846.

En cuanto al mecanismo de interpretación del fenómeno ha pasado por muchas vicisitudes. Así, en 1903, surgieron dos hipótesis, una debida a LOWRY (1) que supone la escisión del anillo del azúcar (*) por la adición

(1) T. M. Lowry, *J. Chem. Soc.*, 83, 1316 (1903).

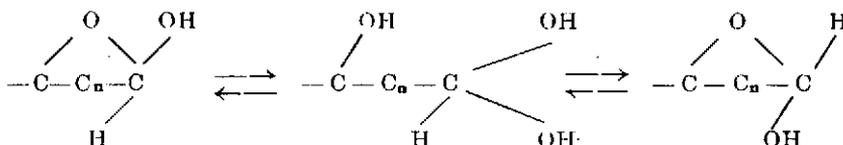
(*) Las primeras fórmulas cíclicas para la glucosa fue on dadas por COLLEY en 1870 y por TOLLENS en 1883 y son, respectivamente, las que se indican:



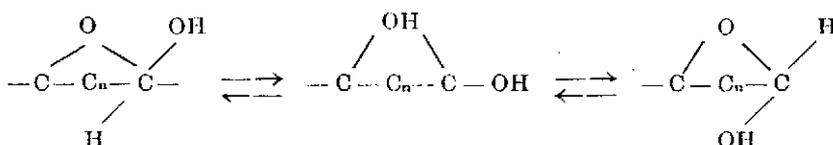
La de TOLLENS tuvo especial aceptación, pero hasta la década 1920-30 no ha podido demostrarse la existencia real del anillo y sobre qué carbonos se establecería el mismo en cada caso.



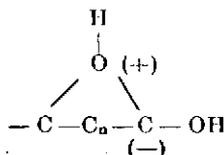
de agua admitiendo la formación intermedia de un *gem*-diol, a partir del cual se reorganizará el anillo primitivo con intervención de uno u otro de los hidróxilos, con la consiguiente formación del azúcar de estructura primitiva o de un anómero. Este mecanismo se representa así:



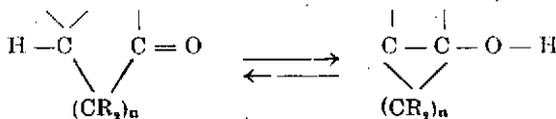
La otra, debida a ARMSTRONG (2), suponía la adición de una molécula de agua y separación posterior de un grupo hidroxilo junto a un átomo de hidrógeno de la aldosa. Se esquematizaba de esta forma:



El doble enlace entonces se tendría que sustituir en la nomenclatura de hoy, por un enlace dipolar quedando la estructura.



En 1913, JACOBSON y STELZNER (3) suponen una tautomería ceto-lactónica que en nuestra nomenclatura se denomina tautomería «semiacetal cíclica», como base fundamental de la mutarrotación e interpretan que el hecho de que los azúcares tengan propiedades típicas de aldehidos y cetonas, mientras que su isomería y sus relaciones a los glicósidos les confirman como lactoles, hace pensar en la existencia de un equilibrio tautomero del tipo ciclo-lineal:



(2) E. F. ARMSTRONG, *J. Chem. Soc.*, 83, 1309 (1903) [C. K. Ingold, «Structure and Mechanism in Organic Chemistry», Ed. Cornell University Press, Ithaca (N. Y.), 1953, pág. 541].

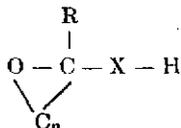
(3) P. JACOBSON y R. STELZNER [Ref.: V. MEYER y P. JACOBSON, «Lehrbuch der Organischen Chemie», Veit, Leipzig, 2.^a Ed., 1913, 1, 2, 886, 915, 927].

A su vez, el hecho de que la transformación de una forma lactólica estereoisómera en otra no pueda hacerse directamente exige también la existencia de la forma abierta como intermedia. Sin embargo, siguieron imperando los conceptos de LOWRY y hubo resistencia a admitir los de JACOBSON.

En 1924, THORPE (4) y colaboradores demostraron la invalidez de las teorías de LOWRY y ARMSTRONG, en defensa de las de JACOBSON. En efecto, el mecanismo de LOWRY requiere un azúcar oxigenado de tal modo que al sustituir el grupo funcional OH del lactol por un SH o por un NHR no debía tener lugar mutarrotación y, en cambio, sí sucedía y además en la misma proporción que en un azúcar normal.

Para la hipótesis de ARMSTRONG, la mutarrotación requiere la intervención de una aldosa y no debía suceder con cetosas. Sin embargo, la práctica demuestra que estas últimas mutarrotan similarmente a las aldosas.

Los hechos experimentales están a favor de la teoría de JACOBSON y STERLZNER (3) en cuanto a las condiciones constitucionales que se requieren, que son la existencia de un sistema en el cual debe existir un grupo electronegativo X que además sea de rotación no restringida, y otro R en el que lo esencial es la falta de cualquier clase de restricción, es decir, que tenga simetría circular alrededor del correspondiente eje internuclear (5).



La mutarrotación, por otro lado, ha sido objeto de variados estudios de tipo cinético. En principio, en los casos más sencillos el fenómeno podría representarse por el equilibrio $\alpha \xrightleftharpoons[K_2]{K_1} \beta$ que vendría regido por la ecuación

$$\frac{d\alpha}{dt} = K_1 [\alpha] - K_2 [\beta]$$

la cual mediría la velocidad de transformación de una a otra forma, y

(4) J. W. BAKER, C. K. INGOLD y J. F. THORPE, *J. Chem. Soc.*, 268 (1924); R. GILMOUR, *J. Chem. Soc.*, 705 (1924).

(5) INGOLD, op. cit., pág. 542.

que HUDSON modifica, expresándola en términos de rotaciones ópticas, e integrándola hasta darla así:

$$K_1 + K_2 = 1/t \log \frac{r_0 - r_\infty}{r_t - r_\infty}$$

siendo $K_1 + K_2$ el coeficiente de mutarrotación. Dicho coeficiente sería el mismo para los anómeros α y β , de cada azúcar. HUDSON (6) demostró que en varios azúcares la mutarrotación está regida por la citada ecuación de primer orden; como ejemplos, PIGMAN y GOEPP (7) recogen una tabla de coeficientes de mutarrotación y energías de activación para diversos anómeros, así como la composición del equilibrio que se establece, que toman de un trabajo de ISBELL y PIGMAN (8).

En los casos en que la mutarrotación se aparta de dichas condiciones, es necesario admitir la intervención de otras estructuras, pudiendo representarse el equilibrio por $\alpha \rightleftharpoons \mu \rightleftharpoons \beta$ habiéndose propuesto diversas ecuaciones como representativas del proceso, siendo las del tipo de la ecuación de SMITH y LOWRY (9).

$$[\alpha] = A \times 10^{-m_1 t} + B \times 10^{-m_2 t}$$

las más sencillas y aceptables. En ellas C es la rotación en el momento de equilibrio, A el cambio total en la rotación por causa del mutarrotante más lento y B es $[(r_0 - r) - A]$; los términos m_1 y m_2 son dos constantes relacionadas entre sí por las constantes de velocidad de las varias reacciones que integran el equilibrio, en el que deben intervenir tres o más componentes.

Así, por ejemplo, en el caso de la galactosa, dada la facilidad de conversión de su forma piranosa a furanosa y aún a su estructura abierta, cabe admitir que en el equilibrio participarán, por un lado, la pareja de anómeros de cada una de las formas cíclicas y, por otro, la estructura abierta. Esto está de acuerdo con la complejidad relativa de los cromatogramas que resultan en nuestros experimentos a partir de una muestra de galactosa hervida simplemente con agua, durante un cierto tiempo, a

(6) C. S. HUDSON, *Z. physik. Chem.*, **44**, 487 (1903).

(7) W. W. PIGMAN y R. M. GOEPP, JR. [«Chemistry of the Carbohydrates», Ed. Academic Press Inc., New York, 1948, pág. 64].

(8) H. S. ISBELL y W. W. PIGMAN, *J. Research Nat. Bur. Standards*, **18**, 141 (1937).

(9) G. F. SMITH y T. M. LOWRY, *J. Chem. Soc.*, 666 (1928).

diferencia de lo que observamos en otras hexosas. A primera vista, en la mutarrotación deben tener lugar por lo menos dos reacciones, simultáneas o consecutivas, de la que una será bastante más lenta que la otra. Para este caso de la galactosa, el valor que toma m_1 en la ecuación de SMITH y LOWRY, es muy parecido al del coeficiente de mutarrotación de la glucosa ($K_1 + K_2$ a 20° es para la α -D-glucosa igual a 0,00632) (9), en cambio m_2 toma valores que son 5-10 veces mayores que dicho coeficiente pareciéndose al de mutarrotación de la fructofuranosa, que es causada principalmente por un cambio de piranosa-furanosa (10); por ello, es muy probable que las mutarrotaciones de aquellos azúcares que no siguen ecuaciones lineales y que supongan también cambios de estructura se hagan por intermedio de una forma cetosa o una aldosa. Por lo que se refiere a la existencia de estructuras abiertas, como pasos intermedios, hay bastantes hechos a su favor. Así cuando se prepara el derivado acetilado de un azúcar en mutarrotación, se obtiene una mezcla de acetilderivados, siendo uno de ellos el que corresponde a una estructura no cíclica. Igualmente, mediante el uso de la polarografía ha podido medirse la evolución de un anómero a otro y se ha determinado la proporción de forma reducible en el electrodo de gota de mercurio para cada azúcar. En efecto, las aldosas y cetosas (11) dan ondas que dependen de la velocidad de transformación, en el electrodo, de la forma semiacetálica cíclica, no reducible, a las formas abiertas aldehído o cetona. La concentración de forma reducible es francamente pequeña. CANTOR y PENISTON (12) dan los «porcentajes aparentes» de forma reducible, los cuales se deducen de la relación porcentual, entre el valor de la corriente cinética (corriente de difusión aparente) y la corriente total que se observaría si todo el azúcar se redujese en forma equivalente a como lo hace el 5-hidroximetilfurfural, aldehído de aproximadamente el mismo peso molecular. Tales porcentajes aparentes, de forma reducible varían con el pH y en general son muy pequeños; así a pH 7 dan los valores que se recogen en la Tabla I, en la que se aprecia un especial comportamiento de la ribosa, puesto que llegan a detectarse 8'5 moles por cien de forma abierta (aldehído anhidro o hidratado).

(10) H. S. ISBELL y W. W. PIGMAN, *J. Research Nat. Bur. Standars.*, **20**, 773 (1938).

(11) WIRSNER, *Collection Czechoslov. Chem. Commun.*, **12**, 64 (1947) [I. M. KOLTHOFF y J. J. LINGANE, op. cit., pág. 675].

(12) S. M. CANTOR y D. P. PENISTON, *J. Am. Chem. Soc.*, **62**, 2113 (1940) [Ref.: KOLTHOFF y LINGANE, op. cit., pág. 675].

TABLA I

Azúcar	Porcentaje aparente de forma reducible (pH 7)
D-glucosa	0,024
D-galactosa	0,082
D-manosa	0,064
D-alosa	(1,4)
D-silosa	0,40
D-xilosa	0,17
L-arabinosa	0,28
D-ribosa	8,15

En favor de la intervención de formas abiertas en el proceso de isomerización está la correspondencia experimental de una actividad mutarrotatoria más manifiesta en los casos de «porcentaje aparente» mayor.

Las reacciones de mutarrotación son catalizadas por los iones H_3O^+ y OH^- , lo cual podría estar relacionado con la actividad catalítica que los ácidos y bases son capaces de ejercer sobre el equilibrio reversible establecido entre una forma aldehído hidratada, en general, y su correspondiente forma anhidra. Por ejemplo, en el caso del formaldehído VESELY y BRDICKA (13) consideran que precisamente las corrientes polarográficas límite que se observan para dicho aldehído, son gobernadas por la velocidad de deshidratación del correspondiente hidrato de formaldehído; con este criterio tales autores observan como los iones OH^- catalizan grandemente la deshidratación



observando que el valor máximo de la corriente límite se presenta para una concentración alcalina 0,1 N y que por encima de esta concentración la corriente límite cae a causa de la transformación del metilén glicol en el anión correspondiente. Otros aldehídos, como el etanal (14) y propional (15), dan ondas que son menos dependientes de factores externos, puesto que estos aldehídos son menos hidratables que el metanal. En el caso de glucosa y galactosa el mínimo se produce entre los pH 3,0 y 7,0;

(13) K. VESELY, y R. BRDICKA, *Collection Czechoslov. Chem. Commun.*, **12**, 313 (1947) [KOLTHOFF y LENGANE, op. cit., pág. 652].

(14) R. BIEBER y G. TRÜMPLE, *Helv. Chim. Acta.*, **30**, 2.000 (1947).

(15) R. BIEBER y G. TRÜMPLE, *Helv. Chim. Acta.*, **31**, 5 (1948).



fuera de este intervalo las velocidades de mutarrotación son muy elevadas.

Para la influencia de los iones H_3O^+ y OH^- , HUDSON (6), como ya se refirió, propuso ecuaciones del tipo

$$k_1 + k_2 = A + B [\text{H}^+] + C [\text{OH}^-]$$

donde A , B y C son constantes; admitiendo que para la glucosa a 20° rige la ecuación

$$k_1 + k_2 = 0,0060 + 0,18 [\text{H}^+] + 16.000 [\text{OH}^-]$$

de la que se calcula que el mínimo de velocidad de mutarrotación se dará a pH 4,61. Según esta expresión los iones OH^- deben tener mayor influencia que los iones H_3O^+ . En un sentido amplio, el agua al ser capaz de producir iones H_3O^+ y OH^- actuará como catalizador excelente.

Según LOWRY y FAULKNER (16) es indispensable que el disolvente sea anfiprótico para que tenga lugar la mutarrotación de un azúcar en su seno. Así para la 2, 3, 4, 6-tetrametil-O-glucosa observan que la mutarrotación es lentísima en piridina o en cresol anhidros, mientras que en una mezcla de estos dos disolventes, en la relación 1:2, es veinte veces más veloz que en el agua. Por ello, propusieron que se necesitaba para que se produzca la mutarrotación tanto una base (N) como un ácido (E) en el sentido de BRÖNSTED y LOWRY (*) (17), lo que supone la existencia de un mecanismo concertado, conocido también como de empuje y arrastre («push-pull» de los anglosajones). El reactivo nucleófilo puede estar sin carga o cargado negativamente y el electrófilo sin carga o con carga positiva (**). El resultado intermedio de este ataque concertado es en general

(16) T. M. LOWRY y H. J. FAULKNER, *J. Chem. Soc.*, 127, 2883 (1945); T. M. LOWRY, *Z. physik. Chem.*, 130, 125 (1927).

(*) Para estos autores, un ácido tiene que ser forzosamente un compuesto hidrogenado mientras que una base puede ser, en principio, una sustancia cualquiera. Lo más característico de esta teoría es la validez de sus definiciones para el caso de cualquier disolvente anfiprótico, es decir, que pueda fijar un protón para formar un ión *Henio* o perder un protón para formar un ión *liato*. V. IRANZO, *Anales Univ. de Murcia*, 751 (1945-46).

(17) J. N. BRÖNSTED, *Rec. trav. chim.*, 42, 718 (1923); T. M. LOWRY, *J. Chem. Soc.*, 42, 43 (1923).

(**) Los reactivos nucleofílicos o nucleófilos actúan cediendo electrones a otro átomo o bien compartiéndolos con él. Todas las bases son reactivos nucleofílicos ya que la basicidad, que es una afinidad para un núcleo de hidrógeno es un caso particular de nucleofilia (afinidad para núcleos atómicos en general). La nucleofilia en cualquiera de sus formas es profundamente constitucional e independiente de las diferencias en carga eléctrica.

Son reactivos electrófilos aquellos que actúan adquiriendo o compartiendo electrones, que previamente pertenecían a otra molécula. Si el reactivo tiene sus capas electrónicas completas se requerirá una escisión del mismo, pudiendo el fragmento molecular menor aceptar alguna nueva pareja electrónica; si este fragmento es un protón el reactivo nucleófilo se comportará

un anión enolato solvatado o un enol o derivado de enol que dependerá de la estructura del reactivo electrófilo (E), ya que éste último o un fragmento del mismo, como puede ser un simple protón, podrá enlazarse o no covalentemente al átomo de oxígeno. Naturalmente el tipo más fuerte de ataque concertado es aquel que lleva consigo la formación de un enlace covalente entre el oxígeno y el reactivo electrófilo, si bien, en principio, bastará con una solvatación electrostática. En disolventes como el etanol y el dioxano anhidro continúa habiendo mutarrotación, pero ésta es muy lenta.

SWAIN y BROWN (18) estudian la mutarrotación de la α -tetrametil-O-glucosa en benceno, catalizada por fenol-piridina y otras mezclas ácido-base, para llegar a la conclusión de que dicha reacción es de primer orden en cada uno de los reactivos [nucleófilo (N), substrato (S), electrófilo (E)] y en conjunto la reacción es de tercer orden. Esta cinética exige la regencia de un mecanismo concertado, concepto que supone la intervención simultánea de tres o más reactivos antes de que pueda suceder cualquier cambio de covalencia; ello no excluye la posibilidad de que el azúcar pueda formar puentes de hidrógeno en mayor o menor extensión con el reactivo ácido o básico, o con ambos, previamente a la reacción principal. Lo que sí es cierto es que la transferencia de un protón desde una a otra posición ha de hacerse de manera que ni el ácido conjugado ni la base conjugada del azúcar tengan que aparecer como intermedios, lo que es equivalente a indicar que no se requiere ninguna estructura transitoria de azúcar que haya ganado o perdido un protón. En la misma etapa debe ocurrir la transferencia de un protón desde el ácido E a la base N, con aparición directa de la forma aldehído (L) según el esquema de la página siguiente. Sin embargo el hecho de que no participen los intermedios iónicos, ácido conjugado o base conjugada, en las reacciones catalizadas por ácidos o bases débiles, como son el fenol y la piridina en el caso que estamos refiriendo, ni tampoco con otros reactivos de los que se utilizan para la demostración de la catálisis general ácido o básica, no quiere decir que no puedan intervenir tales restos conjugados, ácido o base, en otras condiciones como podría ser el caso de la utilización de medios fuertemente

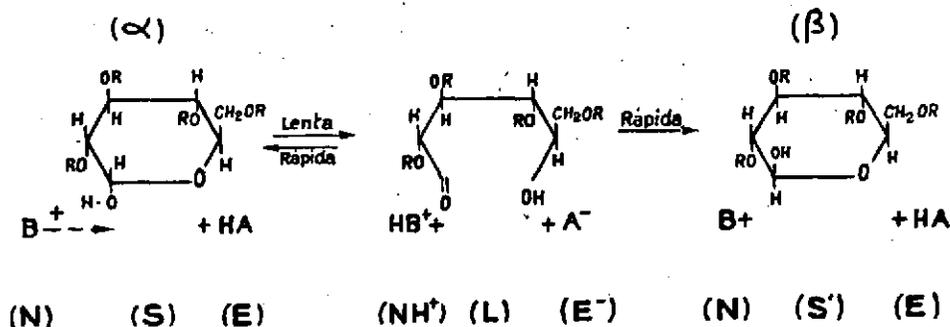
como un ácido, quedando así convertida la acidez (según BRÖNSTED y LOWRY) en un caso particular de electrofilia (afinidad para electrones externos).

LEWIS (G. N. LEWIS, «Valence and the Structure of Atoms and Molecules», Chemical Catalog Co., New York, 1923, pág. 141; FRANKLIN, *Inst.*, 226, 293 (1938) abandona la restricción que hacen BRÖNSTED y LOWRY a reacciones protónicas y considera como sustancias básicas aquellas capaces de ceder parejas de electrones para un enlace químico, y sustancias ácidas aquellas capaces de aceptar las parejas. Según este concepto, bases sería sinónimo de nucleofílicas y ácido de electrofílico.

(18) C. G. SWAIN y J. F. BROWN (Jr.), *J. Am. Chem. Soc.*, 74, 2534 (1952).



ácidos (glucosa en sulfúrico acuoso) o fuertemente básicos (hidróxido sódico en agua) (*).



Diversos autores; tales como PEDERSEN, HAMMETT, WHELAND y otros (19) consideran que la mutarrotación sucede según un mecanismo de empuje y arrastre sólo en el caso de disolventes no acuosos, prefiriendo, en cambio, para el caso del agua, admitir dos mecanismos bimoleculares diferentes, uno catalizado por álcalis y otros por ácidos, a semejanza de lo que se admitía frecuentemente para la enolización de cetonas. El fundamento aparente, de esta enolización de cetonas en dos etapas está basado en los experimentos de DAWSON y SPIVEY (20) que les llevaron a encontrar una ecuación experimental que tenía un término de tercer orden cuyo valor era considerado por PEDERSEN como demasiado pequeño, según éste unas 200 veces menor que el que se predecía de la admisión del mecanismo de empuje y arrastre de LOWRY. La opinión de PEDERSEN fue compartida por otros autores, como antes se ha indicado, deduciendo que el mecanismo concertado sólo era de aplicación a disolventes no acuosos. Sin embargo, SWAIN (21), en estudios más recientes, ha podido defender la aplicación bastante general del mecanismo de LOWRY. Así, ha estudiado con detalle la posibilidad de interpretar con este mecanismo concertado de acción simultánea de los reactivos nucleófilo y electrófilo, los resultados experimentales obtenidos por DAWSON y SPIVEY (20) en la enolización de la cetona y los de PEDERSEN (22) de enolización del acetato de

(*) Cambiamos la posición del hexágono correspondiente a la fórmula cíclica de la glucosa para conseguir una representación más clara.

(19) K. J. PEDERSEN, *P. Phys. Chem.*, **38**, 590 (1934); L. P. HAMMETT, *Physical Organic Chemistry*, McGraw-Hill, Book Co., New-York, N. Y. 1940, págs. 236-237; BELL, *Acid-Base Catalysis*, Oxford, 1941, pág. 133; WHELAND, *Advanced Organic Chemistry*, Ed. John Wiley & Sons, New York, N. Y., 1949, pág. 255.

(20) DAWSON y SPIVEY, *J. Chem. Soc.*, 2180 (1930).

(21) C. G. SWAIN, *J. Am. Chem. Soc.*, **72**, 4578 (1950).

(22) J. K. PEDERSEN, *Acta. Chem. Scand.*, **2**, 252 (1948).

etilo. Otros casos, como el de racemización de la piperitona, una cetona terpénica, estudiado por READ y SMITH (23), que sucede lentamente en agua y rápidamente en medios alcalinos o ácidos diluidos, o el de formación de semicarbazonas en medio ácido (24) y el de la reorganización de la metilenzometina (25), son también ejemplos de mecanismos concertados. Y, de una manera general, es posible que las etapas determinantes de velocidad (etapa más lenta) de la mayoría de las reacciones polares de compuestos orgánicos sin carga, en disolución, sean procesos concertados de este tipo (26).

Según SWAIN (21), el hecho de que PEDERSEN admitiera dos mecanismos bimoleculares (uno catalizado por bases y otro por ácidos) en la mutarrotación de azúcares en medios acuosos se debe a que la ecuación cinética encontrada por éste carece de término de tercer orden. De la misma manera BRÖNSTED y GUGGENHEIM (27) encontraron, experimentalmente, para la mutarrotación de α -D-glucosa en agua, en presencia de ácidos o bases fuertes, una expresión que carece también de término de tercer orden. SWAIN deduce teóricamente qué ecuaciones podrían regir el proceso de mutarrotación admitiendo el mecanismo concertado de empuje y arrastre de LOWRY y, sobre todo, calcula qué magnitud debería tener el término de tercer orden para cada una de las ecuaciones deducidas de las nueve combinaciones cruzadas posibles al atribuir a cada reactivo carácter nucleófilo o electrófilo y sustituir tales circunstancias en la expresión general para la constante de primer orden.

$$k_1 = v[C] = k_0 \underbrace{(\sum r_N [N])}_N \underbrace{(\sum r_E [E])}_E \quad (*)$$

Una de las expresiones teóricas a las que llega SWAIN para la mutarrotación catalizada por acético es la siguiente.

$$k_1 = 8,8 \times 10^{-5} + 4,4 \times 10^{-4} [\text{AcO}^-] + 1 \times 10^2 [\text{HO}^-] + \\ + 4 \times 10^{-5} [\text{HOAc}] + 2,4 \times 10^{-3} [\text{H}_3\text{O}^+] + \\ + 0,2 \times 10^{-3} [\text{AcO}^-] [\text{HOAc}]$$

(23) READ y SMITH, *J. Chem. Soc.*, 123, 2267 (1923).

(24) CONANT y BARTLETT, *J. Am. Chem. Soc.*, 54, 2881 (1932).

(25) ROLFE y HINSHELWOOD, *Trans. Faraday Soc.*, 30, 935 (1934).

(26) S. K. HSÜ, C. K. INGOLD, C. G. RAISIN, F. DE SALAS y C. L. WILSON; *J. Chim. phys.*, 45, 233-241 (1948)

(27) J. N. BRÖNSTED y E. A. GUGGENHEIM, *J. Am. Chem. Soc.*, 49, 2554 (1927).

(*) v = Velocidad de reacción.

C = Compuesto sufriendo desplazamiento concertado.

N = Cualquier especie que pueda actuar como reactivo nucleófilo.

E = Cualquier especie que puede actuar como electrófilo.

r_N y r_E son las reactividades relativas para cualquier N o E con respecto a una especie tipo. Considerada el agua como tal especie tipo r_N y r_E serán iguales a 1,00.

la cual concuerda con la encontrada experimentalmente por BRÖNSTED y GUGGENHEIM

$$k_1 = 8,8 \times 10^{-5} + 4,4 \times 10^{-4} [\text{AcO}^-] + 1 \times 10^2 [\text{OH}^-] + 4 \times 10^{-5} [\text{HOAc}] + 2,4 \times 10^{-3} [\text{H}_3\text{O}^+]$$

salvo en que falta el término final de tercer orden (influencia de la pareja acetato-acético), si bien la contribución de este término a la velocidad total es como máximo de un 1,4 %; el agua se encuentra en tan elevada concentración (55 M) con respecto a los otros reactivos (0,1 M) en los experimentos concertados que su contribución está siempre implicada y enmascara a los términos de contribución escasa.

Un intento para evitar esta desproporción de concentraciones entre agua y soluto podría encontrarse en el trabajo de HILL y THUMM (28) sobre la mutarrotación de glucosa disuelta en mezclas metanol-agua de constantes dieléctricas comprendidas entre 40 y 75, utilizando el ión acetato como catalizador. Con anterioridad, HILL y otros (29) habían estudiado el efecto de varias proporciones de metanol y agua sobre la velocidad de mutarrotación de este azúcar con otros catalizadores. Comprueban, que los catalizadores no iónicos se afectan poco con el cambio de disolvente mientras que al bajar la constante dieléctrica, los de carácter iónico incrementan su actividad; esto último concuerda con la teoría de que ácidos y bases atacan los extremos de signo opuesto del dipolo del azúcar y confirma la idea de BRÖNSTED y GUGGENHEIM (26) y de LOWRY y RICHARDS (30), actualmente generalizada, de que para la mutarrotación se requiere la presencia simultánea de un ácido y una base, ambos en el concepto de BRÖNSTED y LOWRY.

Según HILL y THUMM (28) al representar gráficamente (fig. 1) la dependencia lineal entre constantes de velocidad y las inversas de las constantes dieléctricas se obtienen rectas de poca pendiente. El que sea positiva en los casos considerados está de acuerdo con la ecuación de LAIDLER-EYRING (31) y debe significar que los términos correspondientes a las influencias del dipolo y fuerza iónica son despreciables; el que la pendiente que corresponde a la catálisis por ión hidrógeno sea la mayor, es consecuencia del menor tamaño del ión hidronio. El incremento observado para los K_{H^+} al crecer $\frac{1}{D}$ concuerda con el deducido de la ecuación de AMIS-JAFFE (32); el que la recta que corresponde a la catálisis por acetato

(28) D. G. HILL y B. A. THUMM, *J. Am. Chem. Soc.*, **74**, 1380 (1952).

(29) H. DIAS y D. G. HILL, *J. Am. Chem. Soc.*, **64**, 236 (1942); J. J. GIULIANO y D. G. HILL, *J. Am. Chem. Soc.*, **68**, 2359 (1946).

(30) T. M. LOWRY y E. M. RICHARDS, *J. Chem. Soc.*, 127, 1385 (1952).

(31) K. J. LAIDLER y H. EYRING, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **39**, 303 (1940).

muestra pendiente también positiva, es consecuencia de que el ión negativo acetato ataca al extremo de signo opuesto de la glucosa en su forma dipolar.

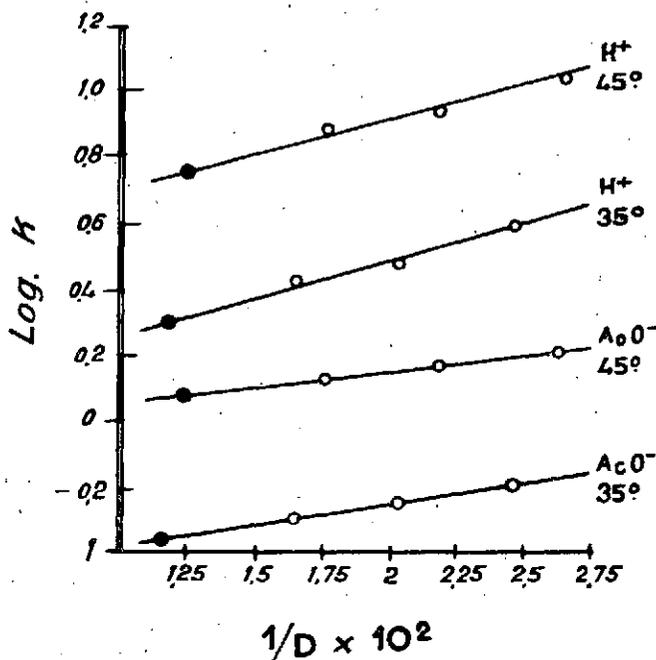


Fig 1

HILL y THUM (28) suponiendo para la mutarrotación un mecanismo bimolecular en el cual el valor experimental de la constante de primer orden coincidiría con el obtenido de la expresión:

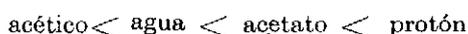
$$K = K_{\text{MeOH}} \times C_{\text{MeOH}} + K_{\text{H}_2\text{O}} \times C_{\text{H}_2\text{O}} + K_{\text{H}^+} \times C_{\text{H}^+} \\ + K_{\text{AcOH}} \times C_{\text{AcOH}} + K_{\text{AcO}^-} \times C_{\text{AcO}^-}$$

han determinado la contribución de cada uno de estos términos, llegando a la conclusión de que el ión hidronio es el catalizador más efectivo por operar con la más baja entropía; también establecen la premisa de que el efecto catalítico del metanol es tan pequeño que K_0 puede suponerse igual a $K_{\text{H}_2\text{O}} C_{\text{H}_2\text{O}}$. En el trabajo comentado se han determinado las constantes dieléctricas de las mezclas metanol-agua por interpolación de los valores

(32) E. S. AMIS y G. JAFFE, *J. Chem. Phys.*, 10, 598 (1942).

dados por ALBRIGHT y GOSTING (33). Los datos de K_0 y K_{AcOH} en agua los han calculado por medio de la ecuación de Arrhenius sustituyendo en ella los valores aportados por KENDREW y MOELWYN-HUGHES (34) y por SMITH y SMITH (35), puesto que en el rango de temperaturas en el que se han hecho unos y otros experimentos tal aplicación es perfectamente válida.

Por otro lado HILL y THUMM (28) han calculado los valores de las energías libres de activación (Kcal/mol) utilizando la ecuación de EYRING, los calores de activación (Kcal/mol) a partir de la ecuación de Arrhenius, y las entropías (cal/mol/grado) por combinación de los datos anteriores. Atendiendo a los calores de activación el orden entre catalizadores sería:



si bien tales calores son compensados por las entropías de activación que se van haciendo menos negativas en el orden en que se incrementa la fortaleza catalítica, es decir,



lo que coincide con un orden decreciente en las energías libres de activación.

De pasada dichos autores demostraron que al añadir un electrolito concretamente, una disolución acuosa de ácido clorhídrico con o sin adición de cloruro sódico, hasta una concentración 0,14 M, a glucosa en metanol del 40%, a 35° C, se incrementaba la constante de velocidad desde 0,470 a 0,481, por lo que teniendo en cuenta que en general las concentraciones usuales de electrolitos son menores de 0,1 M, el efecto salino previsible es poco importante. Esto en cierto modo concuerda con el punto de vista de SWAIN al indicar que, como acelerantes de la mutarrotación, pocos solutos son suficientemente más reactivos que el agua para compensar las diferencias de concentración existentes, ya que la concentración de estos solutos es en cualquier experimento ordinario 100 veces inferior o aún más a la del agua; por ello, será normal que ésta, en virtud de su concentración haga los papeles de reactivo nucleófilo o electrófilo o de ambos y sólo en casos de extremada ineficacia en tales papeles es cuando aparecerían términos de tercer orden en la ecuación experimental del proceso. En el trabajo ya referido de HILL y THUMM los autores han ensayado mezclas de metanol-agua que contienen desde una cantidad dis-

(33) P. A. ALBRIGHT y L. J. COSTING, *J. Am. Chem. Soc.*, 68, 1061 (1946).

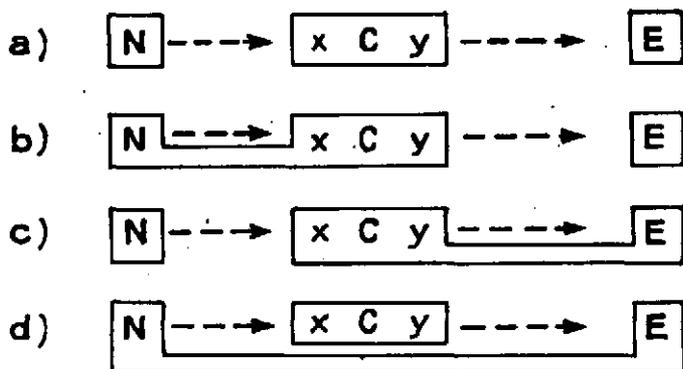
(34) J. C. KENDREW y E. A. MOELWYN-HUGHES, *Proc. Roy. Soc. (London)*, A176, 352 (1940).

(35) G. F. SMITH y M. C. SMITH, *J. Chem. Soc.*, 1413 (1937).

creta de ésta, hasta concentraciones cuatro veces superiores, lo que ha servido para confirmar el mecanismo trimolecular propuesto por SWAIN y de prueba para la correspondiente cinética de tercer orden; sin embargo, los valores calculados para las constantes, a partir de los datos de WORLEY y ANDREWS (36) concuerdan con los que se deducen del supuesto de que el proceso esté regido por un mecanismo de segundo orden, aunque en realidad lo que sucede es, que pese a que el mecanismo sea de tercer orden, la etapa determinante de velocidad es de segundo.

Después de lo dicho se comprende que aún en el caso de la mutarrota-ción calificable de no catalizada, ésta puede ser consecuencia de la actuación simultánea de una molécula de agua como agente nucleófilo (N) y de otra, también de agua, como agente electrófilo (E); también es fácil admitir la intervención de los propios iones H_3O^+ y OH^- del agua de disolución, uno como (N) y otro como (E), o bien combinaciones de estos iones con moléculas no disociadas, de forma que siempre haya una de cada carácter en actuación concertada. Por lo tanto, el mecanismo concertado es compatible con los casos de mutarrota-ción catalizada y no catalizada.

Dentro de las reacciones concertadas pueden considerarse cuatro modalidades que se esquematizan a continuación y que corresponden respectivamente a los siguientes casos:



a) Actuación de un reactivo nucleófilo (N) y otro electrófilo (E) sobre dos puntos x e y del sustrato; éste es el caso más corriente y el de aplicación a la mutarrota-ción de los azúcares en disolución.

b) Intervención de un grupo del propio sustrato como nucleófilo y de un reactivo electrófilo externo extraño al mismo.

(36) F. P. WORLEY y J. G. ANDREWS, *J. Phys. Chem.*, 32 307 (1928).

c) Intervención de un grupo del propio sustrato como grupo electrófilo y un reactivo extraño, en calidad de nucleófilo.

d) Participación de dos grupos pertenecientes a la misma molécula, uno en calidad de nucleófilo y otro de electrófilo.

En la última forma actúan probablemente los enzimas, suponiéndose que la gran actividad de éstos se debe a que tales grupos se encuentran a la distancia apropiada para la interacción óptima con el sustrato. En favor de la existencia de este cuarto tipo de catálisis polifuncional, SWAIN y BROWN (37) han preparado sustancias portadoras de dos grupos activos para el caso concreto de la mutarrotación de la tetrametilglucosa en disolución bencénica. Han comparado las actividades de la 2-hidroxipiridina respecto a la actividad de las mezclas de piridina y fenol, que, como ya hemos referido con anterioridad, mostraban un poder catalítico muy superior al de uno u otro componente por separado. Teniendo en cuenta que la 2-hidroxipiridina es como base 10.000 veces más débil que la piridina, y su carácter ácido 100 veces menor que el del fenol, debía actuar la 2-hidroxipiridina con una intensidad 1.000 veces menor que la de la mezcla, a no ser que se admita el concepto de la polifuncionabilidad a que estamos aludiendo. De la misma manera, si su actuación es como la de un catalizador polifuncional su actividad disminuiría con la concentración; los resultados están a favor de este carácter y así la velocidad de mutarrotación de la tetrametilglucosa observada para una concentración de 2-hidroxipiridina 0,05 M es unas 50 veces superior a la provocada por una mezcla de piridina y de fenol 0,05 M en cada componente. Para una dilución más concentrada en catalizador la diferencia se hace mayor y así la 2-hidroxipiridina en concentración 0,001 M (para una concentración de azúcar 0,1 M) tiene una acción mutarrotatoria sobre el azúcar 1.000 veces superior a la calculada para la mezcla piridina-fenol en concentración 0,001 M en cada componente.

La 2-hidroxipiridina es 10 veces más potente en su acción, en disolución bencénica, que el ión H_3O^+ en disolución acuosa. La adición de piridina o fenol a una disolución en la que está actuando la 2-hidroxipiridina, aún cuando se haga en una proporción que suponga 1.000 veces la concentración de esta última, no provocará efecto alguno, al menos en cuantía medible, sobre la velocidad de mutarrotación, lo que supone que el catalizador polifuncional es en sí altamente concentrado y autosuficiente. En los catalizadores polifuncionales es importantísima la disposición de los grupos N y E, como se deduce del hecho de que mientras en las reacciones químicas ordinarias la 4-hidroxipiridina y sus derivados son

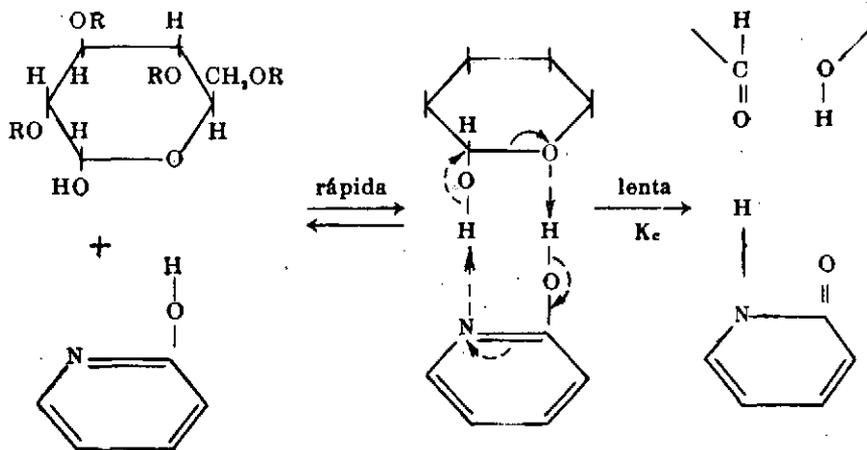
(37) C. G. SWAIN y J. F. BROWN, Jr., *J. Am. Chem. Soc.*, 74, 2538 (1952).



muy semejantes, o sólo ligeramente más reactivos que la 2-hidroxipiridina, en cambio al considerar los modelos moleculares de la 3 ó 4-hidroxipiridina, el nitrógeno y el hidrógeno quedan demasiado lejos estéricamente para formar el complejo deseado con el azúcar mutarrotante, observándose, en efecto, que la velocidad de catálisis por estas otras hidroxipiridinas es hasta 1.000 veces más baja que la de la 2-hidroxipiridina, siguiendo una cinética de tercer orden, lo que supone la intervención de las moléculas del catalizador.

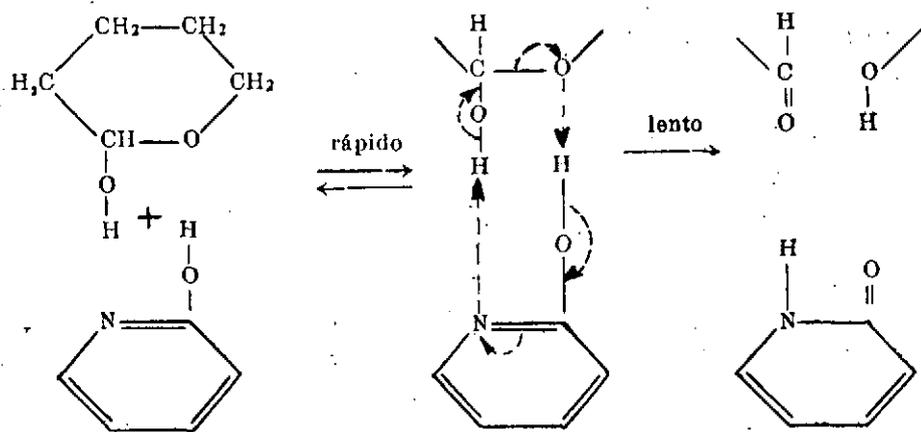
Es previsible la importancia del espaciado de las funciones o grupos *N* y *E* en un catalizador polifuncional, puesto que se admite la formación de un complejo con el sustrato como etapa previa.

Así, en el caso de la actuación de la 2-hidroxipiridina respecto a la mutarrotación de la tetrametilglucosa, las etapas que tienen lugar se esquematizan así:



La 2-hidroxipiridina en medio acuoso aparece usualmente en su forma α -piridona. En este caso el acoplamiento debería hacerse de modo que uno de los puentes de hidrógeno se establezca entre el oxígeno piranósico del azúcar y el nitrógeno de la piridona en vez del puente $O \rightarrow H - O$ que se ha representado en el esquema anterior, por haber supuesto que intervenía la estructura fenólica; no obstante seguirá existiendo un puente entre oxígenos pero a base de intervenir el hidróxilo del carbono 1 de azúcar y el oxígeno carbonílico de la piridona. En definitiva, al suponer la actuación de la forma hidroxipiridina se recuperará piridona y si actuara con piridona se recuperaría 2-hidroxipiridina. Teniendo en cuenta la dinamicidad de los procesos, ambas circunstancias conducirían prácticamente a un mismo efecto.

A favor de la formación de un complejo en cualquiera de sus formas, cuya estructura recuerda a un quelato con doble puente de hidrógeno, establecido sobre el azúcar en su forma cíclica, está el hecho de que realizando la reacción en presencia del semiacetal 2-tetrahidropiranol, cuya estructura se asemeja a la del azúcar, en su forma piranosa, se produce una competición originándose preferentemente el complejo entre dicho compuesto y la 2-hidroxipiridina,



con inhibición parcial de la mutarrotación del azúcar. El fenol o la piridina por separado no pueden formar el citado quelato.

El que la mutarrotación en algunos disolventes aparezca más lenta para un determinado catalizador, como sucede cuando la 2-hidroxipiridina actúa en clorobenceno, acetona, agua y otros disolventes polares, se debe más a un entorpecimiento de la formación del complejo azúcar-catalizador, por asociaciones disolvente-catalizador, que a una inhibición de la mutarrotación en sí, puesto que ésta sucedería en realidad sobre la estructura abierta del azúcar cuya concentración será pequeña al entorpecerse la formación del complejo previo a la apertura del ciclo; el disolvente, por otro lado, no afecta en sí desfavorablemente a la etapa de reciclación anomérica.

Según SWAIN y BROWN (37) actúan también como catalizadores polifuncionales para la mutarrotación de la tetrametilglucosa en benceno los siguientes: 2-hidroxi-4-metilquinoleína, ácido benzoico, ácido pícrico y 2-aminopiridina. En cambio son monofuncionales los nucleófilos piridina, 2-metoxipiridina y N-metil- α -piridona y los electrófilos fenol y p-nitrofenol. La 3-hidroxi-quinoleína es un caso de catalizador monofuncional pero que puede actuar como reactivo nucleófilo o electrófilo.

Ante todo es fundamental para que se dé la polifuncionalidad que las acciones acídicas y básicas se hallen adecuadamente espaciadas en la molécula del catalizador, esto justifica el que los ácidos carboxílicos (*) demuestran una actividad catalítica casi 10 veces superior a la de un fenol sustituido en *meta* o *para*, pero no respecto a un fenol *orto*-sustituido, aun cuando en agua éstos fuesen de acidez comparable. Y en general, el catalizador polifuncional ideal para cualquier reacción de desplazamiento polar es aquel que puede complejarse con el substrato sin claro impedimento estérico y que tenga los grupos funcionales polares dispuestos de tal manera que, cuando se polaricen, queden justamente acoplables a los centros de polarización de signo opuesto del substrato en su forma excitada de transición. Los catalizadores de este tipo son poderosos y específicos aún cuando sus grupos activos sean relativamente débiles (amino, carbonilo, hidroxilo), destacándose más su actividad al actuar en unas condiciones que para los catalizadores monofuncionales son desfavorables, por ejemplo, en medios neutros a baja temperatura, alta dilución, etc. Pero su carácter más importante es el de su alta especificidad que les hace comparables a los enzimas; éstos, en efecto, también tienen grupos *N* y *E* pero ninguno de alta reactividad, son excelentes en medio neutro, a baja temperatura y a alta dilución, muestran elevadísima especificidad catalizador-substrato, su reactividad es de naturaleza polar más que de radical libre y forman complejos catalizador-substrato antes de la reacción propiamente dicha.

De las consideraciones hechas hasta ahora, queda claro que en la mutarrotación influye en general una pareja de reactivos, uno nucleófilo y otro electrófilo equivalentes a un reactivo de carácter básico y a otro de carácter ácido en el sentido de LOWRY; con este criterio queda justificada la mutarrotación, incluso en medios neutros, sobre todo, al tratarse de medios acuosos en los que una molécula de agua puede actuar como nucleófila. Al comparar ácidos y bases, en su concepto clásico, los segundos tienen acción más manifiesta y además no sólo provocan mutarrotación, sino que pueden ocasionar otras transformaciones más profundas o al menos catalizarlas si existen otras causas primeras.

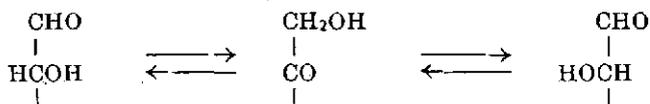
(*) Los ácidos carboxílicos son capaces de formar también complejos reactivos con los azúcares, semejantes a los que forma la 2-hidroxipiridina, actuando el grupo carbonílico como porción nucleófila. Tales complejos recuerdan a los dímeros de ácidos carboxílicos.



II

TRANSFORMACION DE LOBRY DE BRUYN Y ALBERDA
VAN EKENSTEIN (*)

La isomería más típica y en cierto modo más simple, aparte de la mutarrotación es la conocida transformación de LOBRY DE BRUYN y ALBERDA VAN EKENSTEIN (38). En su primitivo concepto, cuando una aldosa se trata con álcalis diluidos, a temperatura ambiente, se establece un equilibrio entre el producto de partida, su epímero (sobre el carbono contiguo al portador de la función reductora) y la cetosa que corresponda; si se parte de una cetosa aparecerán en el equilibrio junto a ésta las dos aldosas correspondientes epímeras entre sí. El equilibrio general será:

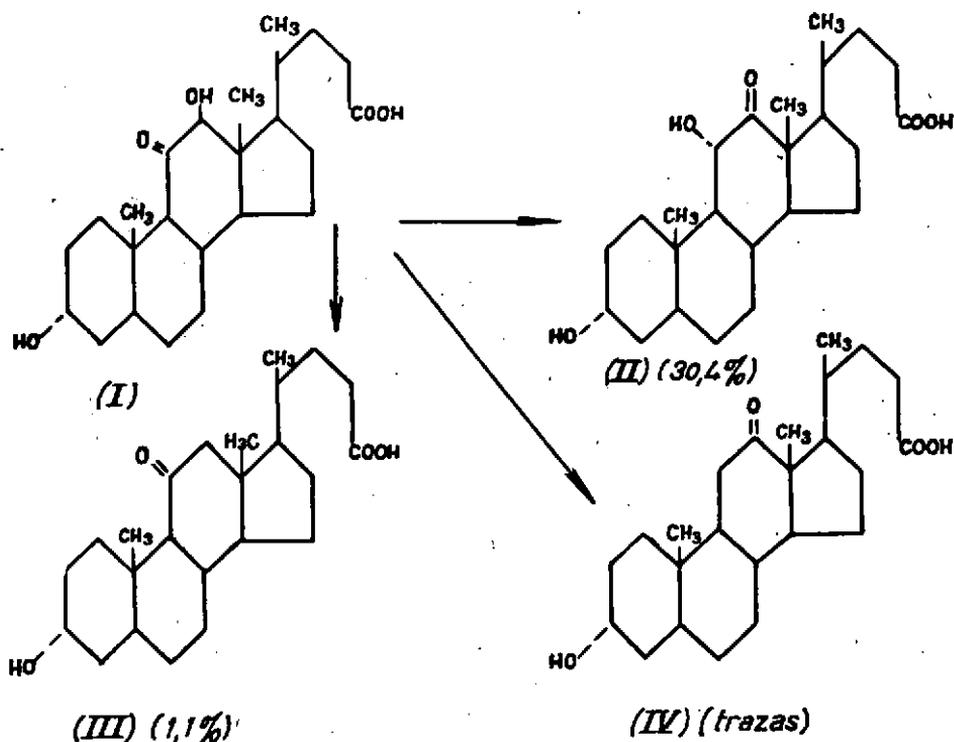


Sin embargo, en el concepto actual quedan también incluidos los casos de simple isomerización aldosa \rightleftharpoons cetosa, independientemente de que haya o no epimerización; esta epimerización, cuando se manifiesta, puede tener lugar sobre otros carbonos distintos del contiguo al de la función carbonilo, tanto sobre la estructura de aldosa como sobre la de cetosa y, además, ya no se limita a condiciones alcalinas, sino que se consideran también las transformaciones en medios neutro y ácido, y las de naturaleza enzimática que tanta importancia tienen en los procesos vitales, por ejemplo, las isomerizaciones de los azúcares fosforilados o no fosforilados. Por otro lado, no sólo han sido localizados casos de esta isomerización en casi todos los azúcares reductores conocidos, sino también en otras sustancias que, sin tener naturaleza de hidrato de carbono, cuentan, por lo menos, con el agrupamiento imprescindible para que la transformación

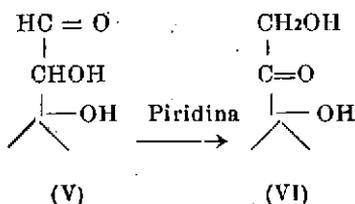
(*) CORNELIS ADRIAAN LOBRY VAN TROOSTERBURG DE BRUYN (1857-1904); WILLEN ALBERDA VAN EKENSTEIN (1858-1937).—En lo sucesivo usaremos indistintamente el nombre completo de esta transformación o el abreviado «Transformación de LOBRY».

(38) C. A. LOBRY DE BRUYN y W. ALBERDA VAN EKENSTEIN, *Rec. trav. chim.*, 14, 203 (1895); C. A. LOBRY DE BRUYN y W. ALBERDA VAN EKENSTEIN, *Rec. trav. chim.*, 16, 262 (1897).

de Lobry pueda suceder, este es el caso de la isomerización de algunos esteroides. Así, análoga a la transformación de una cetosa en aldosa y en los epímeros de ambos, es la observada por BORGSTROM y GALLAGHER (39) al comprobar la formación de los ácidos 3- α , 11- α -dihidroxi-12-cetocolánico (I); 3- α , 12- α -dihidroxi-11-cetocolánico (II) y 3- α , 11- β -dihidroxi-12-cetocolánico (III) a partir del 3- α , 12- β -dihidroxi-11-cetocolánico (IV).



Y como caso particular, en el que sólo sucede isomerización aldosa \rightleftharpoons cetosa, cabe citar el paso del Δ^4 -pregneno-17, 20-diol-3-ona-21-al (V) a Δ^4 pregneno-17, 21-diol-3, 20-diona (VI) en piridina (40).



(39) E. BORGSTROM y T. F. GALLAGHER, *J. Biol. Chem.*, **177**, 951 (1949).

(40) T. REICHSTEIN y J. VON EUN, *Helv. Chim. Acta*, **23**, 1528 (1940).

Es explicable que la transformación de Lobry pueda darse en medios ácidos o básicos, si se admite que dicha transformación sucede a través de enoles intermedios. Así, aunque los experimentos clásicos se referían a álcalis, ya en 1905 OST (41) dió cuenta de la isomerización de D-glucosa en SO_3H_2 diluido a temperatura ambiente, resultando una mezcla de isomaltosa y D-fructosa junto con D-glucosa no transformada después de 4 meses. En 1924 SPOEHR y STRAIN (42) observan la conversión de D-fructosa en D-glucosa y D-manosa a 37°C en tampón de fosfato a pH 6,69; en experimentos parecidos con tampones ácidos, de fosfato, a presión, ENGLIS y HANAHAN (43) obtienen una gran proporción de cetosas a partir de glucosa. ASHMARIN y colaboradores (44) (45), que defienden una catálisis general ácido-base, isomerizan D-glucosa a D-fructosa y viceversa en tampones de formiato, acetato y succinato a pH 4,2 formándose a la vez 5-hidroximetilfurfural. PETUELY (46) observa que el tartárico y cítrico producen la conversión de D-fructosa a D-glucosa y 5-hidroximetilfurfural; defiende un mecanismo de enolización catalizada por ácidos y bases. También es de interés la isomerización, en medio ácido D-L-glicerosa \rightleftharpoons \rightleftharpoons dihidroxipropanona (47), ya que permite estudiar los efectos catalíticos de los iones acético y acetato, confirmando la naturaleza catalítica de la reacción de Lobry por ácidos y bases en el concepto de BRÖNSTEND. Han sido realizados otros muchos experimentos con ácidos.

En lo que respecta a álcalis, aparte de los primitivos experimentos de LOBRY de BRUYN y ALBERDA VAN EKENSTEIN en los que la acción catalítica se atribuyó principalmente al ión OH^- , sin descartar la influencia del catión (en sus experimentos comprobaron que el KOH era más activo que el hidróxido de plomo frente a D-manosa, D-glucosa, D-fructosa y D-galactosa), se han realizado otros con diversos hidróxidos y carbonatos alcalinos y alcalinotérreos. En los experimentos de SPECK (47) sobre la isomerización de la D-L-glicerosa también se pudo contrastar la diferencia de efectos catalíticos de los iones Ca^{+2} y Ba^{+2} . SOWDEN y SCHAFER (48) muestran el efecto decreciente de los hidróxidos de calcio, bario y sodio sobre D-manosa; también muestran que mientras con NaOH la mezcla resultante tiene un poder rotatorio positivo cada vez más pequeño cuando actúa el $\text{Ca}(\text{OH})_2$ el valor de la rotación crece y pasa de negativa

(41) H. OST, *Angew. Chem.*, 18, 1170 (1905).

(42) H. A. SPOEHR y H. H. STRAIN, *J. Biol. Chem.*, 85, 365 (1929).

(43) D. T. ENGLIS y D. J. HANAHAN, *J. Am. Chem. Soc.*, 67, 51 (1945).

(44) P. A. ASHMARIN y Y. S. BELOVA, *Arch. Sci. biol.* (URSS), 42, 53 (1936).

(45) P. A. ASHMARIN y A. D. BRAUN, *Arch. sci. biol.* (URSS), 42, 61 (1936).

(46) F. PETUELY, *Monatsh.*, 84, 298 (1953).

(47) J. C. SPECK, Jr., A. A. FORIST y D. S. MIYADA, *Abstracts Papers, Am. Chem. Soc.*, 127 6D (1955).

(48) J. C. SOWDEN y R. SCHAFER, *J. Am. Chem. Soc.*, 74, 499 (1952).



a positiva durante las primeras 11 horas. Para KUSIN (49) la naturaleza de los iones alcalinotérreos que intervienen puede modificar el curso de la transformación, puesto que se encuentra que mientras la D-glucosa con Ca(OH)_2 a 25° no da D-fructosa, sí aparece esta cetosa cuando se utiliza NaOH. Como quiera que esta opinión no está de acuerdo con los resultados ya clásicos de LOBRY, ni con los de SOWDEN y SCHAFFER (50) y TOPPER y STETTEN (51) los cuales aislaron D-fructosa al hacer actuar el Ca(OH)_2 sobre D-glucosa en condiciones comparables a las de KUSIN, queda justificado el que nosotros incluyamos entre nuestros experimentos una serie encaminada a aclarar los referidos trabajos.

También aparecen descritos en la bibliografía estudios en los que se han usado amoníaco (52) y otras bases nitrogenadas tales como quinoleína y quinaldina (53). Asimismo la piridina se ha empleado como catalizador en la transformación de Lobry, sobre todo para la síntesis de cetosas; la base ha sido usada como catalizador y disolvente (en forma anhidra), y en estas condiciones actúa lentamente, concluyéndose que para la transformación, además de la base, se necesita un ácido, y a este propósito, se recuerda, por su analogía, la discusión amplia que hicimos de la mutarrotación de azúcares en piridina-fenol.

En estos últimos años (54) (55) (56) se ha estudiado la reacción de LOBRY provocada por resinas de cambio iónico de carácter básico fuerte.

Por otro lado, ante el creciente uso de la cromatografía de partición sobre papel, en escala analítica y preparativa, ha llegado a preverse que las impurezas alcalinas del papel de filtro pudieran en algún caso producir alteraciones, bien durante el desarrollo de los cromatogramas, con los consiguientes errores de localización, bien en la operación de secado por calor, aunque sea suave, si se pretende recuperar sustancias por elución de manchas o bandas. Bajo el concepto de catálisis ácido-base el agua actúa también como isomerizante, si bien se trata de un catalizador extremadamente pobre. Así, WOLFROM y CHILLING (57) han observado que cuando una disolución acuosa de D-fructosa al 80 % se calienta a 113°C durante 16 horas sólo llega a producirse un 0,1 % de D-glucosa y aún, en este

(49) A. KUSIN, *Ber.*, 69, 1041 (1936).

(50) J. C. SOWDEN y R. SCHAFFER, *J. Am. Chem. Soc.*, 74, 505 (1952).

(51) Y. J. TOPPER y D. STETTEN, Jr., *J. Biol. Chem.*, 189, 191 (1951).

(52) L. HOUGH, J. K. N. JONES y E. I. RICHARDS, *J. Chem. Soc.*, 2005 (1953).

(53) H. MIDORIKAWA, *Kagaku Kenkyusho Hokoku*, 25, n.º 2/3, *Chem. Sect.*, 33, 105 (1949); 77, 481 (1955).

(54) J. C. SOWDEN, *J. Am. Chem. Soc.*, 76, 4487 (1954).

(55) D. B. BUHLER, R. C. THOMAS, B. E. CHRISTENSEN y C. H. WANG, *J. Am. Chem. Soc.*,

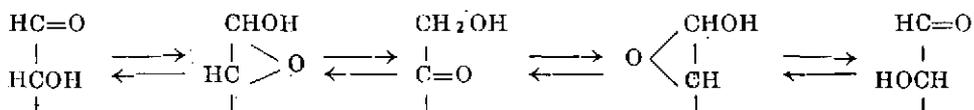
(56) C. N. TURTON y E. PACSU, *J. Am. Chem. Soc.*, 77, 1059 (1955).

(57) M. L. WOLFROM y W. L. SHILLING, *J. Am. Chem. Soc.*, 73, 3557 (1951).

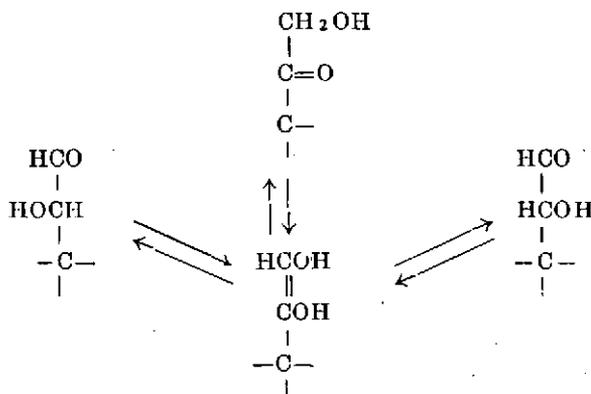


caso, surge la duda de si la acción habrá sido consecuencia del aumento de iones oxonio, puesto que el pH de la disolución pasa desde 6,9 a 2,7.

En cuanto al mecanismo de la transformación de LOBRY, éste ha sido interpretado desde varios puntos de vista. Durante muchos años se admitió que la transformación sucedía por transferencia intramolecular de H sobre compuestos intermedios, semiacetálicos, que se formarían de las aldosas por adición y eliminación sucesiva de agua:



Se ha especulado más sobre la posibilidad de este mecanismo que intentado su comprobación experimental. Posteriormente, FISCHER (58) por un lado, y WOHL y NEUBERG (59), por otro, sugieren la formación de un compuesto enodiolico intermedio para explicar la isomerización aldosa \rightleftharpoons cetosa.



UNIVERSIDAD DE MURCIA
FACULTAD DE VETERINARIA
BIBLIOTECA

Es el mecanismo que más adeptos ha conservado, si bien, hasta los últimos años, no se ha intentado esclarecer su intervención en los simples casos de isomerización de azúcares, sino que las experiencias realizadas se referían preferentemente a los problemas de formación de ácidos sacarínicos, sobre todo a partir de los trabajos de NEF (60).

Hasta los últimos 30 años en los que predominaron los trabajos sobre

(58) E. FISCHER, *Ber.*, 28, 1145 (1895); *Ber.*, 33, 3095 (1900).

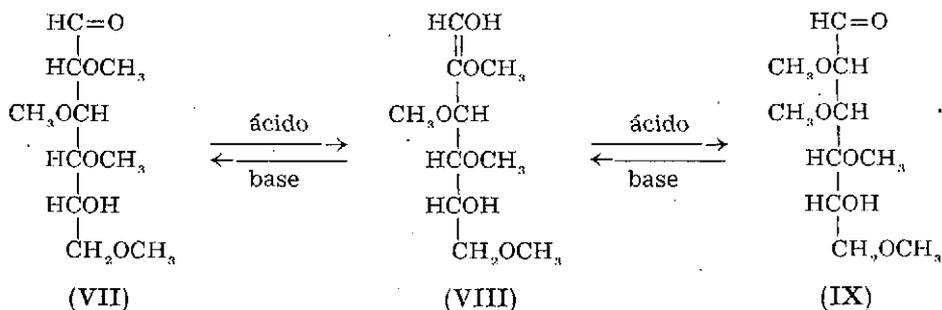
(59) A. WOHL y C. NEUBERG, *Ber.*, 33, 3099 (1900).

(60) J. U. NEF, *Ann.*, 357, 214 (1907); *Ann.*, 376, 1 (1910).



metilazúcares quizá el más destacado, posterior a NEF, sea el de MICHAELIS y RONA (61) en el que se miden el efecto catalítico de los iones OH^- y el de ionización de la D-glucosa para deducir como mecanismo imperante el de epimerización y enolización a través de la separación de un α -hidrógeno en forma de protón.

WOLFROM y LEWIS (62) comprueban la transformación de 2,3,4,6-tetra-O-metil-D-glucosa en 2,3,4,6-tetra-O-metil-D-manosa por acción del agua del cal, no detectando la presencia de la correspondiente cetosa y sí la de una sustancia capaz de consumir iodo en medios alcalinos como se demuestra por el consumo de un 40 % más del calculable por efecto de las aldosas existentes; tal exceso de consumo de iodo sólo es detectable a pH superiores a 7, hasta el punto de que en medio ácido se llega a retrogradar el equilibrio, de forma que aparecen índices de iodo normales, como si sólo existieran aldosas. Dicho comportamiento no se observa al actuar el agua de cal sobre la glucosa, por lo que WOLFROM y LEWIS proponen el siguiente esquema para el tránsito de la tetrametilglucosa (VII) a la tetrametilmanosa (IX) en el cual se admite una 2-epimerización a través de un enediol (VIII).



Sin embargo, las pentosas metiladas 2,3,4-tri-O-metil-D-xilosa (63) y 2,3,4-tri-O-metil-L-arabinosa (64) tenían un comportamiento que, si bien en algún signo externo (elevado índice de iodo en medio alcalino) podrían considerarse semejantes a la de las metilhexosas, difieren en otros puntos. Así, en la acción alcalina aparece metanol a razón de un mol por mol; en medio ácido seguían teniendo elevado índice de iodo a causa de la formación de furfural, por pérdida adicional de otras dos moléculas de metanol, etc. Por ello, aún cuando se admita también la existencia de un enediol, es necesario suponer que la desenolización en medio ácido sigue

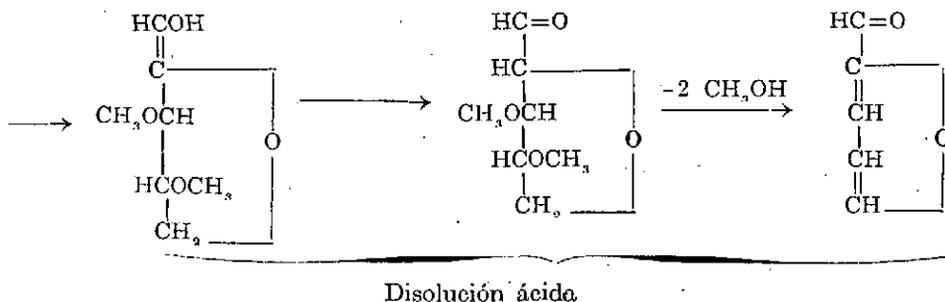
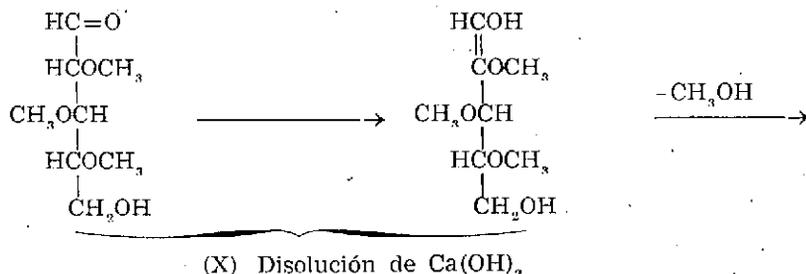
(61) L. MICHAELIS y P. RONA, *Biochem. Z.*, **47**, 447 (1942).

(62) M. L. WOLFROM y W. L. LEWIS, *J. Am. Chem. Soc.*, **50**, 837 (1928).

(63) C. E. GROSS y W. L. LEWIS, *J. Am. Chem. Soc.*, **53**, 2772 (1931).

(64) H. T. NEHR y W. L. LEWIS, *J. A. Chem. Soc.*, **53**, 4411 (1931).

otros derroteros. Teniendo en cuenta estos hechos el esquema que proponen LEWIS y colaboradores (63) para el caso de la 2, 3, 4-tri-O-metil-D-xilosa (X) es el que sigue:



También son de interés los experimentos de la escuela de LEWIS acerca de la acción del agua de cal a 35° C sobre la 3-O-metil-D-fructosa en los que se forma un 29 % de 3-O-metil-D-fructosa y sólo un 3,5 % de ácido sacarínico. Como en los otros casos, aparece metanol, aunque en estas condiciones suaves su proporción sea pequeña, pero suficiente para justificar el índice de iodo mostrado por la mezcla resultante. LEWIS considera que este índice de iodo es consecuencia de la pérdida de un grupo metoxilo en C2 y que a la vez ello demuestra que en el caso de la 3-O-metil-D-glucosa no se forma el correspondiente éter 2,3-enodiolmonometílico.

Sin embargo, LEWIS y colaboradores no tratan de aclarar la naturaleza de los derivados intermedios que dan los metil-azúcares en las transformaciones con álcalis. WOLFROM para intentarlo (65) ha sintetizado el 2,3,4,6-tetra O-metil-D-glucoseno-1,2 (XI) y ha examinado las propiedades (66) de este derivado que él suponía, al igual que RAYMOND (67), el

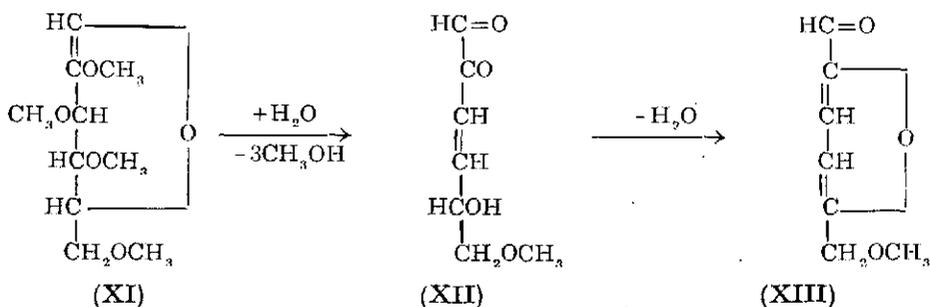
(65) M. L. WOLFROM y D. L. HUSTED, *J. Am. Chem. Soc.*, 59, 2559 (1937).

(66) M. L. WOLFROM, E. G. WALLACE y E. A. METCALF, *J. Am. Chem. Soc.*, 64, 265 (1942).

(67) A. L. RAYMOND, H. GILMAN, «Organic Chemistry», Ed., John Wiley & Sons, New York, 1938, pág. 1512.

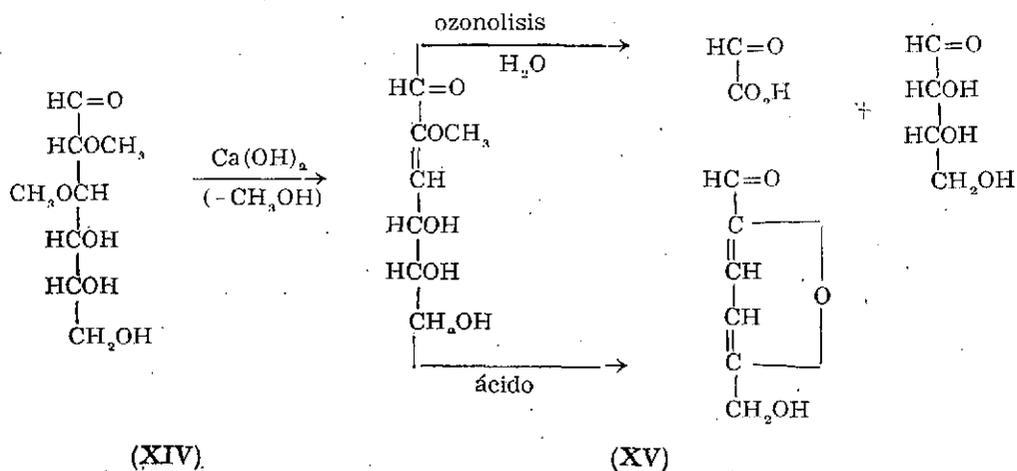


posible intermedio en la interconversión de 2,3,4,6-tetra-O-metil-D-glucosa, en 2,3,4,6-tetra-O-metil-D-manosa. No obstante, el hecho de que este compuesto en medio ácido se transforma en 5-metoximetilfurfural (XIII) pasando por una osona (XII) en vez de producir el tetra-O-metilderivado



de origen y su epímero, obliga a descartar la intervención del 2-3-4,6-tetra-O-metil-D-glucoseno-1,2, ya no sólo como intermedio en la transformación de LOBRY, sino también como un mayor contribuyente a la elevada absorción de iodo que tiene lugar, puesto que el índice de iodo residual en la acidificación de la mezcla de LOBRY (el consumo de iodo que en medio alcalino es 4 átomos/mol pasa a ser de 1,4 átomos/mol en medio ácido) no está en concordancia con la elevada proporción de 2,3,4,6-tetra-O-metil-D-glucosa y 2,3,4,6-tetra-O-metil-D-manosa que aparecen en el equilibrio final (el índice de iodo al final es más de un 1,85 % superior que el calculado para el derivado de partida).

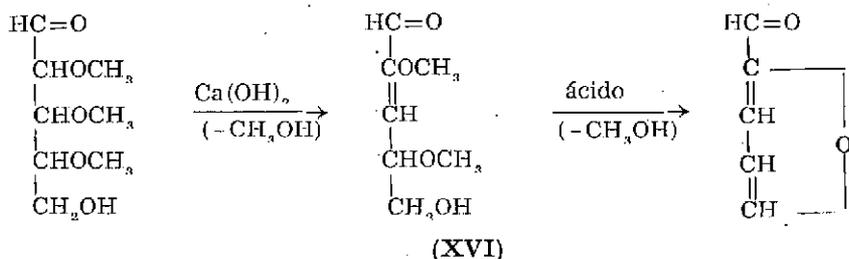
Experimentos más recientes tales como los KENNER y RICHARDS (68)



(68) J. KENNER y G. N. RICHARDS, *J. Chem. Soc.*; 2921 (1956).

realizados sobre la 2,3-di-O-metil-D-glucosa, en ausencia de oxígeno, en agua de cal a 15-20°, confirman la fácil desmetilación e incluso la desglucosidación en β al grupo carbonilo; en estas condiciones no se forman sacarínicos y sí una sustancia intermedia que es lábil a los ácidos y que produce 5-hidroximetilfurfural. Aunque no aislaron el producto puro, hicieron un estudio sobre un concentrado siruposo del mismo, especialmente por ozonólisis, concluyendo que se trataba del éter metílico del enol de la 3-dexosi-D-glucosona (XIV).

Análogamente, en el caso de la 2,3,4-tri-O-metil-D-xilosa y 2,3,4-tri-O-metil-L-arabinosa podía suponerse una transformación semejante en la que se formaría el compuesto (XVI).

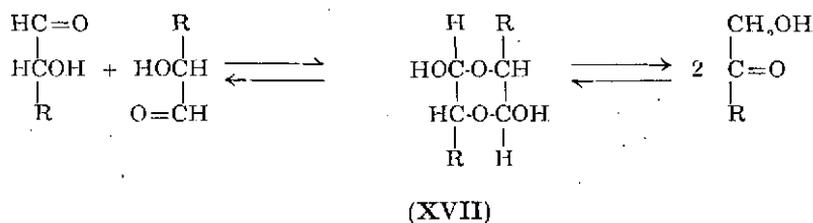


Compuestos de estos tipos tendrían una elevadísima absorción de iodo, casi del orden de 10 átomos/mol, lo que queda demasiado por encima de los índices de iodo experimentales. Quedan pues, todavía dudas sobre la cuestión ya que algunos experimentos descritos en la bibliografía, y realizados sobre la 2,3,4,6-tetra-O-metil-D-glucosa desde un punto de vista fisico-químico no pudieron aclarar tampoco muchos detalles.

FREDENHAGEN y BONHOEFFER (69) intentaron estudiar el mecanismo de la transformación de LOBRY por realización de las isomerizaciones en agua pesada, basándose en el hecho de que en este medio si existen enlaciones o reacciones relacionadas pueden suceder cambios de enlaces C-H por C-D. Trabajaron sobre D-glucosa y 2,3,4,6-tetra-O-metil-D-glucosa en disolución en agua pesada saturada de hidróxidos cálcico y potásico, especialmente cálcico. Para el caso de la glucosa a unos 90° C detectan, en la mezcla resultante, una deuteración de hasta 0,26-1,73 átomos de deuterio/mol de glucosa original, y para la tetra-O-metil-glucosa se introducen en los productos finales de la isomerización hasta 1,08 átomos de deuterio/mol. Ahora bien, se observa esta clara introducción de deuterio, cuando la isomerización se hace a unos 40-42° C, pero no en

(69) H. FREDENHAGEN y K. F. BONHOEFFER, *Z. physik. Chem. Leipzig*, **A181**, 392 (1938).

experimentos realizados sobre glucosa a 25° C, pese a que en ellos tiene lugar una conversión de 1,27 % de D-glucosa en cetosas; pero sin embargo, al usarse hidróxido sódico en exceso, en lugar de la simple disolución saturada, llegan a introducirse hasta 1,57 átomos de deuterio/mol de glucosa inicial. De acuerdo con los resultados obtenidos, FREDENHAGEN y BONHOEFFER admiten un mecanismo enólico al realizar la isomerización a elevada temperatura o en presencia de mucho hidróxido cálcico, y, por el contrario, a baja temperatura y con cantidades discretas de dicho hidróxido no suponen la formación de un dímero intermedio (XVII) que permitiría la emigración intramolecular de hidrógeno sin participación del disolvente.



GOTO (70) confirma las observaciones de FREDENHAGEN y BONHOEFFER, pero en cambio no está de acuerdo con el mecanismo del dímero intermedio propuesto por aquellos.

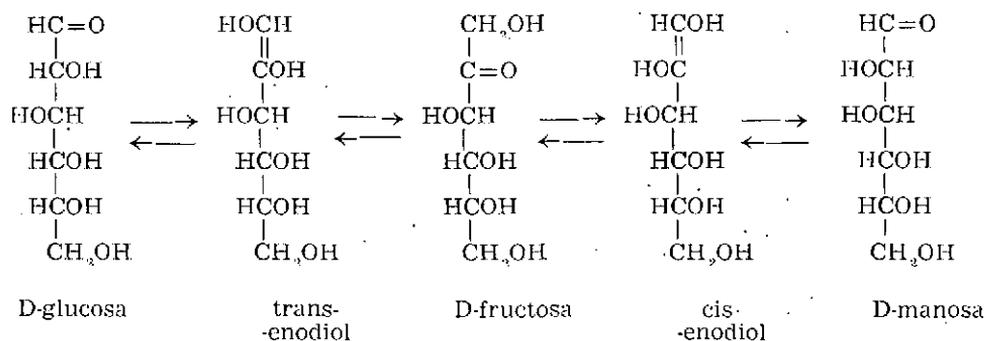
En definitiva, después de los primeros experimentos con cambio de deuterio quedaron dudas sobre la vigencia de un mecanismo de enolización obligado para la transformación de LOBRY.

Los trabajos de TOPPER y STETTEN (51) por un lado y los de SOWDEN y SCHAFFER (50) por otro, parecen haber dado al mecanismo enólico su justa dimensión. TOPPER y STETTEN isomerizan en hidróxido cálcico a 25 y 35° C D-glucosa deuterada en C-1 y, por otro lado, a la misma temperatura hacen actuar sobre D-glucosa normal una disolución saturada de Ca(OH)₂ en agua pesada.

En el primer caso separan D-manosa en forma de su fenilhidrazona que contiene el 44 % del deuterio que debería tener si la transformación glucosa → manosa fuese directa, aunque a través de un mecanismo enediol, y sin pérdida de deuterio, que estará localizado en C-1; a su vez cuando se forma fructosa que se encuentra deuterada en un 94 % cuando los experimentos se hacen a 35° C y, en un 100 % cuando se realizan

(70) K. Goto, *Nippon Kagaku Zasshi*, 63, 217 (1942); *Bull. Chem. Soc. Japan*, 18, 174 (1943).

a 25° C por lo que dichos autores admiten que el cambio glucosa → fructosa es directo y que la cetosa interviene en el tránsito glucosa → manosa admitiendo la existencia de un intermedio *trans*-enodiol para la segunda.

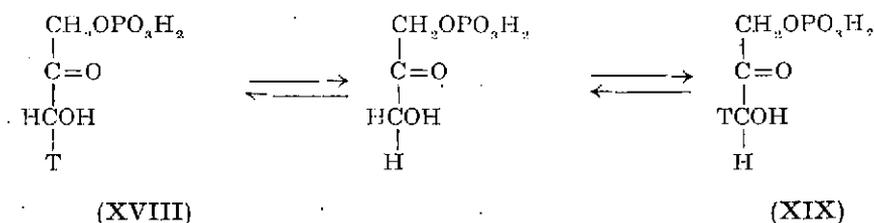


En los experimentos sobre D-glucosa en agua pesada, llegan a encontrar en los productos finales de la mezcla de isomerización de 1,55 a 1,66 átomos de deuterio/mol (según se haga la reacción da 25 ó 35°), lo que exige la deuteración de algún otro enlace, además del que corresponde al C-1, considerando que el fenómeno sucede en C-3.

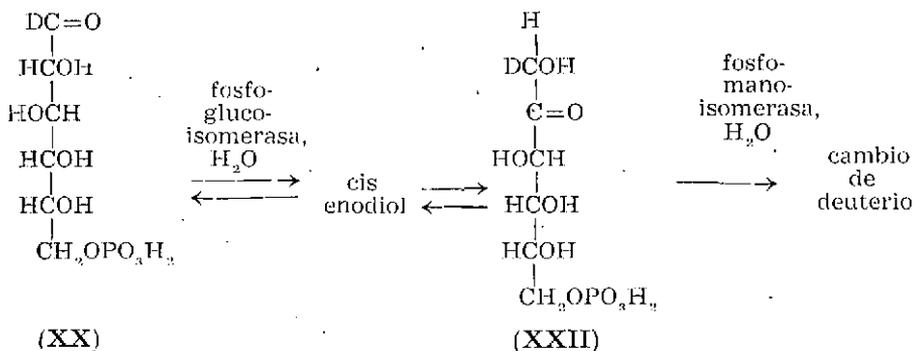
SOWDEN y SCHAFFER (50) en sus experimentos ya referidos, por nosotros, estudian la acción del $\text{Ca}(\text{OH})_2$ en agua pesada a 25° C y determinan el deuterio en los principales productos resultantes (D-glucosa, D-manosa, D-fructosa) así como su distribución a lo largo de la cadena. Sus resultados concuerdan con los de TOPPER y STETTEN y sin embargo, no comparten la opinión o supuesto de STETTEN y TOPPER de que existen cambios de un sólo H en C-1, ni tampoco admiten el mecanismo de aquellos que asignan a la D-fructosa el papel de un intermedio obligado, máxime al haber podido demostrar que casi todo el deuterio de la D-fructosa de la mezcla está en el C-1. Por otro lado, si la D-manosa se formase de la D-fructosa se requeriría que los contenidos en deuterio de ambos compuestos fuesen prácticamente análogos. Realmente, tanto los experimentos de GOTO como los de FREDENHAGEN y BONHOEFFER tenían ciertos defectos de origen, puesto que por la forma de realización del análisis del deuterio y por la escala en que trabajaron sus datos son poco reproducibles. Hoy por hoy es preciso desechar aquellas opiniones que no admiten la existencia de cambios del enlace C-H con el disolvente.

Recientemente ha podido demostrarse que en transformaciones de LOBRY de tipo enzimático, tales como las que provocan la triosafosfato-

isomerasa, en la isomerización de aldosas a cetosas y viceversa, tienen lugar en los enlaces C-H cambios con el disolvente. Así RIEDER y ROSE (71) demuestran la incorporación estereoespecífica del tritio al isomerizar enzimáticamente fosfatodihidroxiopropanona en agua rica en dicho isótopo a la vez que, por causa de esta misma estereoespecificidad, no hay acción del tritio cuando actúan la aldolasa muscular y la triosafosfoisomerasa sobre los productos del primer intercambio enzimático (XVIII) y (XIX) respectivamente.



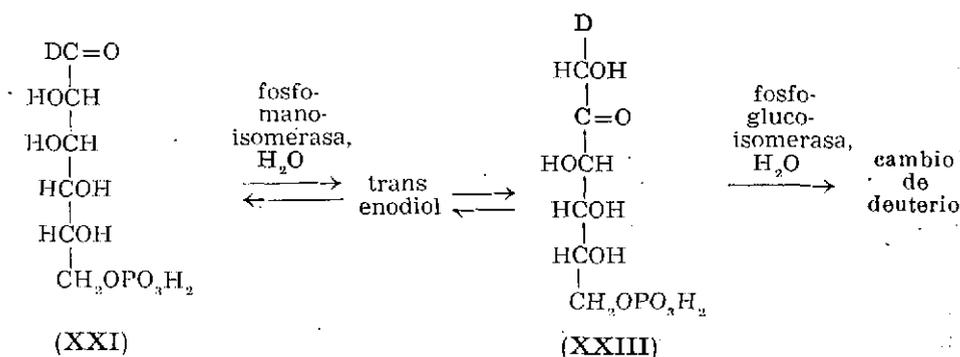
TOPPER (72) (73) observa que cuando se hacen actuar los enzimas fosfoglucoisomerasa y fosfomanoisomerasa, respectivamente, sobre 6-fosfato-D-glucosa (XX) y 6-fosfato-D-manosa (XXI) deuteradas en C-1, se obtiene en ambos casos 6-fosfato-D-fructosa también deuterada en C-1, pero debe existir una diferencia en la posición ocupada por el deuterio como se señala en las fórmulas (XXII) y (XXIII) puesto que la que procede de la 6-fosfato-D-glucosa no llega a sufrir intercambio de deuterio con el disolvente si actúa la fosfoglucoisomerasa; mientras que este intercambio sí se produce al actuar la fosfomanoisomerasa. De la misma manera, la fosfomanoisomerasa no es suficiente para actuar sobre el derivado de la fructosa que procede de la 6-fosfato-D-manosa, pero sí es activa la fosfogluco-



(71) S. V. RIEDER y I. A. ROSE, *Federation Proc.*, 15, 337 (1956)

(72) Y. J. TOPPER, *Federation Proc.*, 15, 371 (1956).

(73) Y. J. TOPPER, *J. Biol. Chem.*, 225, 419 (1957).



isomerasa. Cabe pensar que esta acción isomerizante con intercambio del disolvente está muy ligada a la existencia de los probables esteroisómeros *cis* y *trans*.

La interpretación química del proceso ofrece sus dificultades y el estudio desde un punto de vista cinético sufre las consecuencias de tales dificultades que aún se aumentan por las reacciones simultáneas que tienen lugar. Recientemente (74) se ha estudiado el caso de la isomerización de la DL-glicerosa \rightleftharpoons dihidroxipropanona en tampones de acetato, de formiato y de trimetilacetato, deduciendo que influyen los aniones del tampón pero no el disolvente ni los iones oxonio. En cambio, parecían tener efecto los iones Ba^{+2} y Ca^{+2} en tampones de acetato de fuerza iónica constante. Tanto en el caso sencillo de los iones acetato, como en el de los alcalinotérreos citados, el efecto era de primer orden. Una expresión general, semejante a la que se recoge a continuación, que es la típica

$$-d[G]/dt = (k_1 [\text{HOAc}] + k_2 [\text{OAc}^-] + k_3 [\text{HOAc}] \cdot [\text{OAc}^-] + k_4 [\text{Ca}^{++}] [\text{OAc}^-]) G \quad (*)$$

de la catálisis por tampones de acetato de calcio-acético, es la que regiría prácticamente estos procesos. Junto a la dihidroxipropanona se forma también aldehído pirúvico conservándose casi prácticamente constante la relación entre ambos productos, lo que está de acuerdo con la existencia de un compuesto intermedio común a los dos. Puede seguirse la mar-

(74) J. C. SPECK, JR., A. A. FORIST y D. S. MIYADA, *Abstracts Papers Am. Chem. Soc.*, 127, 6D (1955).

(*) G = a la conc. de DL-glicerosa.
 $k_1 = 1,0 \times 10^{-5} \text{ mol}^{-1} \text{ minutos}^{-1}$.
 $k_2 = 40 \times 10^{-5} \text{ mol}^{-1} \text{ minutos}^{-1}$.
 $k_3 = 1,0 \times 10^{-4} \text{ mol}^{-2} \text{ minutos}^{-1}$.
 $k_4 = 57 \times 10^{-4} \text{ mol}^{-2} \text{ minutos}^{-1}$.



cha de la reacción por oxidación periódica, al comprobar la diferencia de consumo de periodato por una aldosa y su cetosa correspondiente. Así, para el caso del sistema D-glucosa \rightleftharpoons D-fructosa \rightleftharpoons D-manosa se podría determinar el contenido de cada una en el equilibrio teniendo en cuenta que mientras glucosa y manosa consumen 5 moles de periodato/mol, la fructosa sólo utiliza 4,7 moles; estos datos recibirán eficaz complemento haciendo medidas sucesivas de poder rotatorio. El método no resulta adecuado para las isomerizaciones en medio alcalino muy diluído y en ausencia de oxígeno. Mejor resultado da para el caso de los metilazúcares (75), en los que una molécula de 3,4,6-tri-O-metil-D-fructosa disminuye en un 40 % de su concentración inicial si ello se hace en hidróxido sódico, y se observa aun mayor variación en presencia de hidróxido cálcico o hidróxido bórico, por lo que si se tiene en cuenta que este incremento debe atribuirse a la desmetilación, resulta que los iones calcio y bario catalizan esta reacción secundaria.

La opinión reinante en la actualidad sigue siendo la de intervención de enoles, lo que está de acuerdo con los resultados de los experimentos de cambio de hidrógeno por deuterio y tritio. Para el caso de las aldosas se ha venido postulando la formación de un enodiol intermedio, en el que en una primera etapa se perdería la asimetría del carbono contiguo al reductor y éste, a su vez, podría isomerizarse a las dos aldosas posibles que entre sí serían epímeras. Sin embargo, no ha podido demostrarse aun de manera manifiesta, la presencia de estos enodios intermedios ni siquiera la intervención imprescindible de tales formas enólicas. Algunos hechos parecen estar a favor de la real existencia de estos enodios, tales como la decoloración de una disolución de iodo y la del 2,4-diclorofenolindofenol; por otro lado, la facilidad relativa para la oxidación con ruptura del enlace 1-2 parece defender la posición del doble enlace entre los dos primeros carbonos. Entre los defensores de este mecanismo pueden citarse a KUSTIN (49), que creyó haber demostrado de manera evidente la presencia de enodios en mezclas de D-glucosa y álcalis y a KÜNSSBERG (76), si bien este último, en trabajo publicado posteriormente con PETUELY (77) sobre la base teórica de la acción alcalina, estima que lo que se forma son probablemente reductonas (*) del estilo del ácido ascórbico, por ejemplo el 2,3-dihidroxi-2-propenal, puesto que estas conservan el carácter reductor

(75) J. C. SPECK, JR., A. A. FORIST y D. S. MIVADA, *Abstracts Papers Am. Chem. Soc.*, 128 6D (1955)

(76) U. KÜNSSBERG [*C. A.*, 30, 4822 (1951)].

(77) F. PETUELY y U. KÜNSSBERG, *Monatsh.*, 84, 116 (1953).

(*) Sustancia de fórmula general
$$\begin{array}{c} \text{R} - \text{C} = \text{C} - \text{C} - \text{R}' \\ | \quad | \quad || \\ \text{HO} \quad \text{OH} \quad \text{O} \end{array}$$

frente al reactivo de TILMAN, 2,6-diclorofenolindofenol, aun en un medio ácido, lo que supone que el doble enlace no debe estar situado entre los carbonos 1 y 2 como se preveía, sino entre el 2 y el 3.

También parecen estar a favor de la existencia de la estructura enol los ya citados experimentos de WOLFROM y LEWIS (62), sobre la isomerización 2,3,4,6-tetra-O-metil-D-glucosa \rightleftharpoons 2,3,4,6-tetra-O-metil-D-manosa, ya que no puede producirse la epimerización a través de la formación de cetosa, puesto que en este caso no existe hidrógeno ionizable sobre el C-2.

El mecanismo de TOPPER y STETTEN (51) sobre la epimerización en el C-2 de la D-glucosa a través del esquema *cis*-enodiol-D-fructosa \rightleftharpoons *trans*-enodiol no está suficientemente justificado. Tampoco lo está para las isomerizaciones en C-2 vía enzimática, puesto que si bien en este caso todas las epimerizaciones en C-2 de aldosas lo hacen por intermedio de cetosas y requieren la intervención de dos enzimas, exigidas por condiciones de esteroisomería, es también verdad que se conocen epimerizaciones en C-3 directas para el caso de la 5-fosfato-D-treopentulosa y de la 5-fosfato-D-eritropentulosa, lo que permite prever la existencia de una aldosa-epimerasa. En estos últimos años ha podido comprobarse por PRENDICE, CUENDET y SMITH (78) que la epimerización de 2,4,6-tri-O-metil-D-glucosa a 2,4,6-tri-O-metil-D-manosa sucede también de manera directa sin pasar por la cetosa correspondiente.

Los trabajos ya referidos de ASHMARIN y colaboradores (44), (45) y también los de PETUELY y colaboradores (46) sobre la intervención de una catálisis general ácido-base en la formación de furaldehidos a partir de azúcares, y dado que aquellos también pueden formarse a partir de las desoxiosonas (por ejemplo 5-hidroximetil-2-furaldehido a partir de las 3-desoxiosonas de hexosas), son hechos a favor de la intervención de un compuesto intermedio común en las isomerizaciones aldosa-cetosa y en la formación de las 3-desoxiosonas.

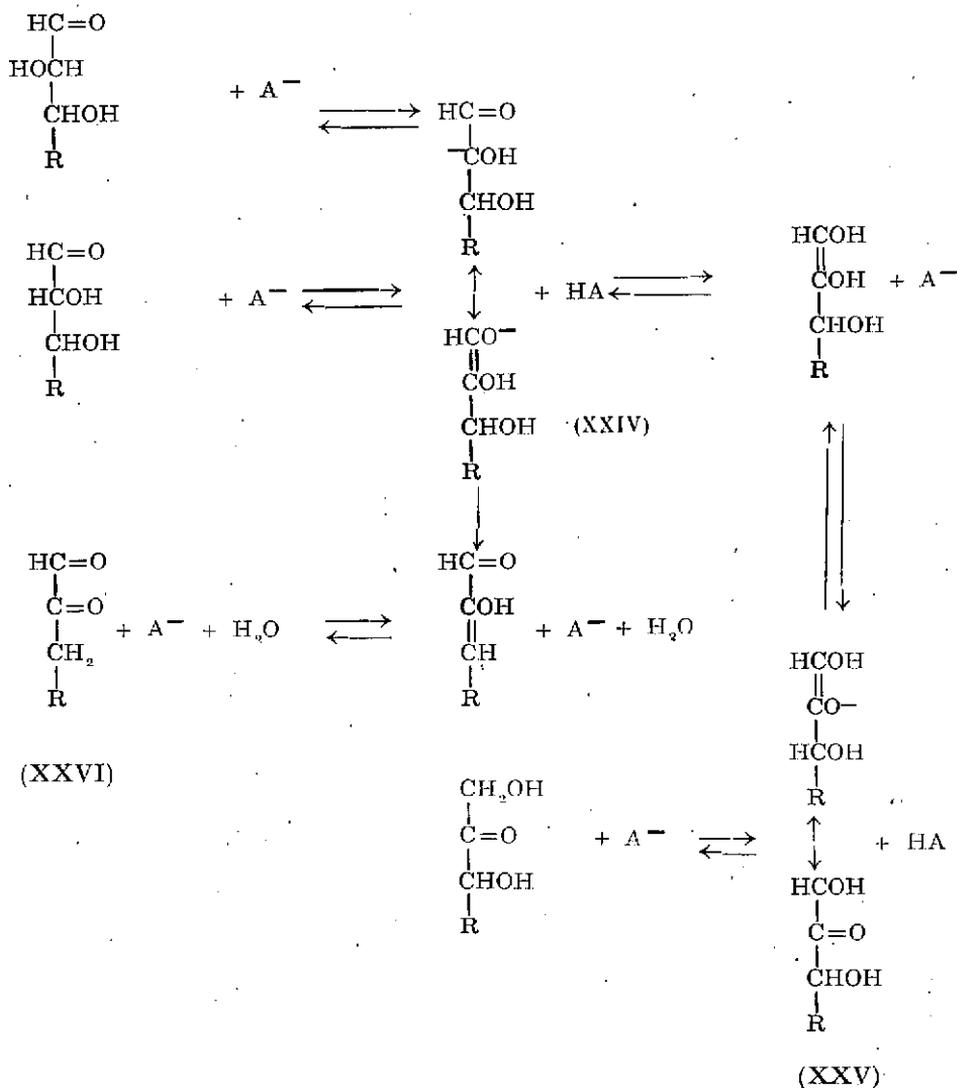
De acuerdo con los criterios anteriores, una transformación aldosa \rightleftharpoons cetosa podrían representarse en la forma que se esquematiza a continuación, en la que A^- sería una base de BRÖNSTED y HA su ácido conjugado. La isomerización de aldosa a cetosa progresa a través de los aniones híbridos (XXIV) y (XXV) del enodiol, siendo (XXIV) el intermedio para la formación de la desoxiosona (XXVI).

BERL y FEAZEL (79) sugieren una variante de este mecanismo, en el que no estaría favorecida la formación de enodiales y en el cual los anio-

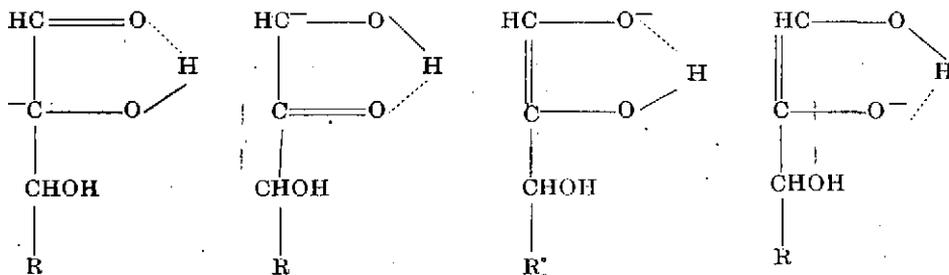
(78) N. PRENDICE, L. S. CUENDET y F. SMITH, *J. Am. Chem. Soc.*, 78, 4439 (1956).

(79) W. BERL y C. E. FEAZEL, *J. Am. Chem. Soc.*, 73, 2054, (1951).

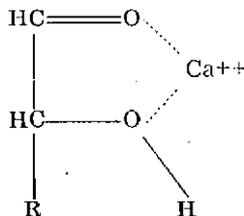
nes híbridos (XIV) y XXV) se resolverían en un simple híbrido de resonancia (XXVII) cuyo puente de hidrógeno facilitaría el cambio de dicho elemento entre los átomos de oxígeno en C-1 y C-2. Probablemente la ac-



ción catalítica de los iones metálicos podría ser atribuída a la aparición de un protón de una aldosa o de una cetosa por formación de un complejo (XXVIII).



(XXVII)



(XXVIII)

REACCIONES ANEJAS A LA DE LOBRY DE BRUYN Y ALBERDA VAN EKENSTEIN

De la misma manera que se ha dado a la reacción de LOBRY una amplitud mayor en cuanto a las condiciones en que puede tener lugar, también aparecen en la bibliografía una serie de hechos que demuestran que aun en las condiciones en las que la transformación de LOBRY debe suceder existen otras reacciones secundarias que a veces han llegado a enmascarar la explicación del camino en que ocurren las transformaciones. Entre estas reacciones secundarias, tienen más significado las de deshidratación y de ellas la de formación de desoxiosonas; esta última reacción estaría de acuerdo con la explicación de NEF (80) para la formación de sacarínicos en medio alcalino y también podría explicar como se ha indicado la producción de furfural y derivados en medio ácido.

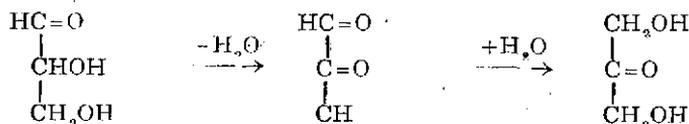
SPECK (81) ha estudiado la isomerización del sistema D-L-glicerosa/

(80) J. U. NEF, *Ann.*, 357, 214 (1907).

(81) J. C. SPECK, JR., A. A. FORIST y D. S. MIYADA, *Abstracts Papers Am. Chem. Soc.*, 127, 6D (1955)

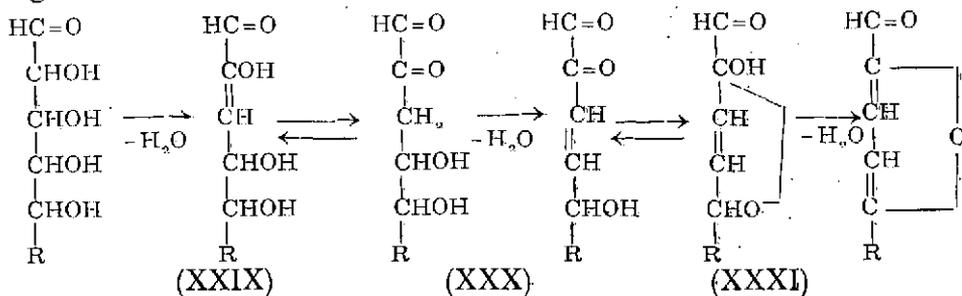


dihidroxiopropanona, en varios tampones, comprobando la aparición del aldehído pirúvico (es decir, la desoxiosona correspondiente), formación que ya había sido observada en condiciones ácidas por PINKUS (82) sobre la 1,3 dihidroxi-2-propanona y por NEUBERG y KANSKI (83) sobre la D-L-glicerosa. La formación de aldehído pirúvico que tiene lugar según la reacción



es indudable por haberse separado incluso su osazona por WOHL (84) y por EVANS y HASS (85) sobre los productos de acción alcalina. En definitiva se trata de una reacción catalizable por ácidos y bases.

Una deshidratación primaria semejante admiten WOLFROM y colaboradores (86) (87) para explicar el comportamiento de la D-glucosa y D-xilosa en agua acidulada con ClH a ebullición; su estudio espectrofotométrico denota la aparición rápida de un máximo en 230 m μ , imputable a un dieno conjugado o a un enal y posteriormente surge un máximo en los 280 m μ motivado por la formación de furfural o 5-dihidroximetilfurfural respectivamente. Las velocidades relativas de aparición de los dos máximos son independientes del pH inicial de la mezcla. Los intermedios responsables de la aparición de ambos máximos serían las 3-desoxiosonas que se estabilizarían en el primer caso al adoptar la forma de dieno conjugado mientras que por una nueva deshidratación producirían furfural y derivados, como HURD e ISENHOUR (88) ya habían supuesto para este último caso. Esta serie de posibilidades podría esquematizarse como sigue.



(82) G. PINKUS, *Ber.*, **31**, 31 (1898).

(83) C. NEUBERG y E. KANSKY, *Biochem. Z.*, **20**, 450 (1909).

(84) A. WOHL, *Biochem. Z.*, **5**, 45 (1907).

(85) W. L. EVANS y H. B. HASS, *J. Am. Chem. Soc.*, **48**, 2703 (1926).

(86) M. L. WOLFROM, R. D. SCHUETZ y L. F. CAVALIERI, *J. Am. Chem. Soc.*, **70**, 514 (1948).

(87) M. L. WOLFROM, R. D. SCHUETZ y L. F. CAVALIERI, *J. Am. Chem. Soc.*, **71**, 2518 (1949).

(88) C. D. HURD y L. L. ISENHOUR, *J. Am. Chem. Soc.*, **54**, 317 (1932).

Las fórmulas XXIX y XXXI podrían aparecer en principio como responsables fundamentales del máximo en los 230 m

También, a través de una desoxiosona formada por deshidratación, cabe explicar las reacciones a pH 7, de los éteres de azúcares, en especial si el alcoxilo se encontrara en β respecto al carbonilo; un caso particular es el de los disacáridos que también son más lábiles si el glicoxilo está en β (89). En la bibliografía abundan casos en los que los productos finales son ácidos sacarínicos, dadas las condiciones de trabajo, pero en todos ellos cabe admitir como intermedio la formación de desoxiosonas aunque no haya podido demostrarse su presencia. Concretamente KENNER y RICHARDS (90) haciendo actuar agua de cal en ausencia de oxígeno sobre 3-O-metil-D-glucosa obtienen hasta el 96 % de metasacarínico. Más adelante dedicamos un capítulo a la formación de sacarínicos.

Las aldosas con grupos metoxilo en C-2 y C-3, independientemente de que en el resto estén más o menos metiladas, no sufren degradación por álcalis hasta ácidos sacarínicos, sino que en vez de ello, tiene lugar una pérdida de metanol a la vez que se forman éteres metílicos de enoles de las 3-desoxiosanas, productos estables en medio alcalino y que en medio ácido se transforman en furfural y derivados.

Unos y otros hechos aclaran la forma en que sucede la deshidratación intermedia de la transformación de LOBRY y explican las reacciones secundarias más importantes a que ésta conduce, así como otras, generalmente menos significativas, tales como las de reconversión y formación de anhídridos que, en ciertos casos, complican grandemente los resultados, sobre todo en las transformaciones de LOBRY en medio ácido.

En medio alcalino adquieren importancia las reacciones de aldolización y desaldolización. Así, se ha investigado sobre la formación de hexosas a partir de triosas (91), (92). Concretamente BERL y FEAZEL (92) al estudiar cinéticamente el equilibrio D,L-glicerosa \rightleftharpoons dihidroxipropanona en presencia de hidróxido sódico, como una variante de los experimentos de MEYERHOF (93) realizados en presencia de fosfato trisódico y en los que se obtenía hasta un 92 % de hexosa, no pudieron detectar la presencia de triosas al final de las reacciones y sí la formación de algo de aldehído pirúvico que podría justificar la diferencia hasta el 100 %.

Por lo que se refiere a la desaldolización, los experimentos descritos en

(89) R. L. WHISTLER y J. N. McMILLER, *Advances in Carbohydrate Chem.*, 13, 280 (1958).

(90) J. KENNER y G. N. RICHARDS, *J. Chem. Soc.*, 278 (1954).

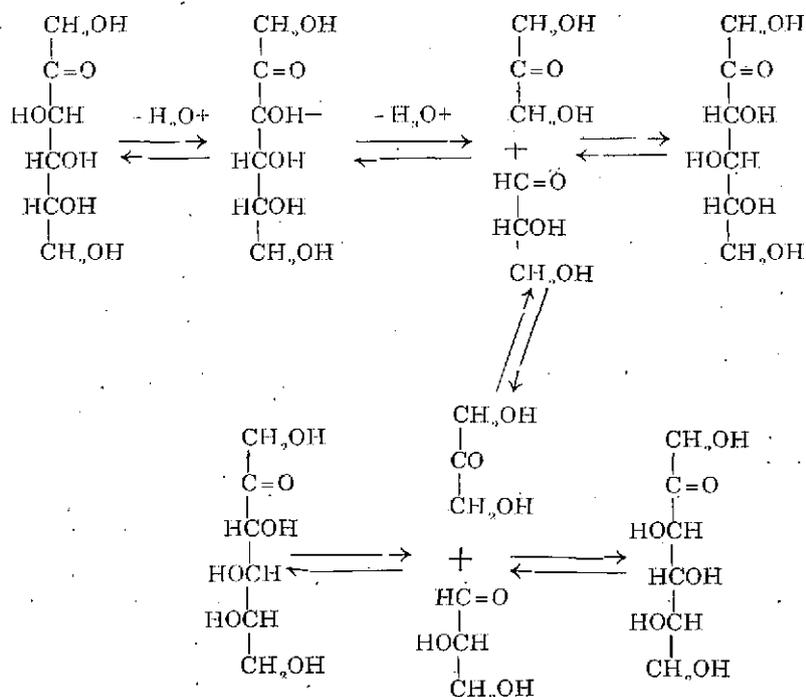
(91) A. WOHL y C. NEUBERG, *Ber.*, 33, 3095 (1900).

(92) W. BERL y C. E. FEAZEL, *J. Am. Chem. Soc.*, 73, 2054 (1951)

(93) O. MEYERHOF y W. SCHULZ, *Biochem. Z.*, 289, 87 (1957).



la bibliografía suelen confirmar dicho proceso por el hecho de que aparezcan azúcares que son producto de recombinación de fragmentos de cadena más corta formados por intermedios. Así, explican WOLFROM y SCHUMACHER (94) la aparición de D-sorbose, D- y L-tagatosa, D- y L-psicosa así como D- y L-alosa (que resultarían por intercambio de estos últimos) entre los productos de acción de los álcalis sobre la D-fructosa, en presencia de iones aconitato, al intentar interpretar la naturaleza de los procesos de defecación alcalina en las azucareras. Bastaría admitir una previa desaldolización hasta dihidroxiacetona y D-gliceraldehido (esta última convertible a L-gliceraldehido) y luego la correspondiente recombinación. Las posibilidades teóricas de aldolización-desaldolización para el sistema fructosa \rightleftharpoons sorbose podrían esquematizarse suponiendo que sólo la glicerosa fuese epimerizable.



(94) M. L. WOLFROM y J. N. SCHUMACHER, *J. Am. Chem. Soc.*, 77, 3318 (1955).

También en los trabajos de BLAIR y SOWDEN (95) sobre la isomerización de D-glucosa hasta D- y L-sorbose (con predominio de la D-) por acción de una resina de base fuerte (*) y separación de los isómeros, se considera la recombinación de fragmentos como fundamental.

GIBBS (96) al estudiar la degradación hasta ácido láctico de D-glucosa marcada con C¹⁴ en el C-1 ó C-3 y C-4 defiende también el proceso de desaldolización.

Sin embargo, en general no se ha llegado a tener evidencia de la localización de los fragmentos sin recombinación y recientemente SOWDEN y THOMPSON (97) ponen en duda la existencia de estos fragmentos al demostrar que en experimentos de degradación de la D-glucosa marcada en C-1 por acción de una resina de base fuerte [Amberlita IRA-400 (OH)], que equivale en su acción al hidróxido potásico, tiene lugar la emigración del grupo carbonilo del azúcar estudiado desde C-1 hasta C-5.

Como otro ejemplo de reacción secundaria aneja a la transposición de LOBRY podría citarse el caso, ya referido, de la formación de reductonas, aun cuando ella tenga lugar en pequeña proporción y sólo en medio alcalino.

También cabe citar algunas transposiciones de carbono que pueden suceder en los procesos de aldolización \rightleftharpoons desaldolización y de formación de sacarínicos, pero no durante la transposición de LOBRY propiamente dicha.

(95) M. G. BLAIR y J. C. SOWDEN, *J. Am. Chem. Soc.*, 77, 3323 (1955).

(*) Utilización Amberlita XE-98 de la casa ROHN & HASS Co. Philadelphia, Pa.

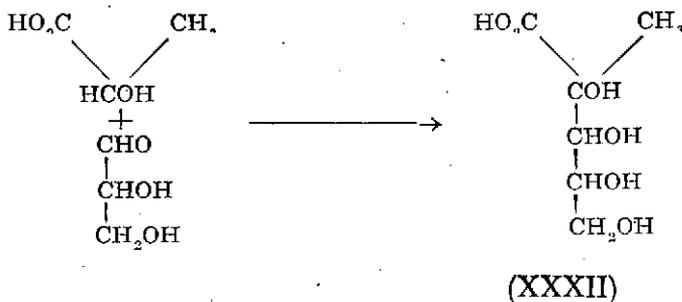
(96) M. GIBBS, *J. Am. Chem. Soc.*, 72, 3964 (1950).

(97) J. C. SOWDEN y R. R. THOMPSON, *J. Am. Chem. Soc.*, 80, 1435 (1958).

III

FORMACION DE ACIDOS SACARINICOS

La acción alcalina sobre azúcares en condiciones controladas (ausencia de oxígeno) y aún en otras circunstancias puede conducir a la formación de unos productos de oxidación interna de los azúcares, denominados ácidos sacarínicos (*). Sobre el mecanismo de formación de estos productos se han sucedido muchas teorías. Para KILIANI (98) el ácido D-glucosacarínico (XXXII) podría considerarse formado por recombinación del ácido láctico (que en definitiva es un ácido metasacarínico corto) con el aldehído glicérico identificado como producto de degradación por NENCKI y SIEBER (99) ambos resultantes de la acción alcalina sobre azúcares.

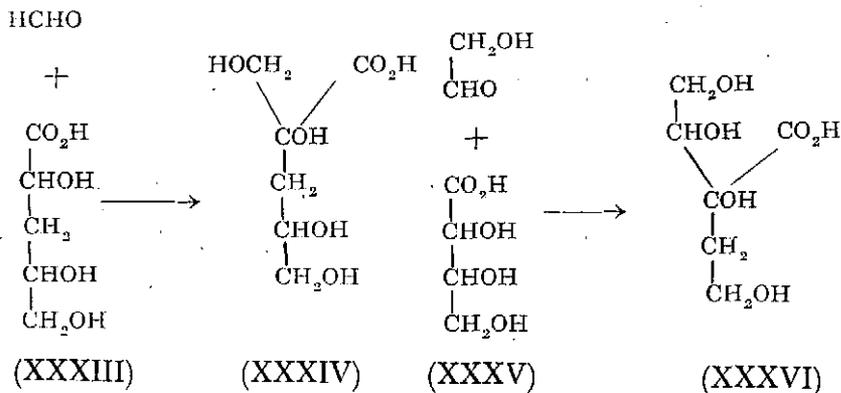


(*) Los ácidos sacarínicos fueron descritos por primera vez por EUGENE PELICOT en 1838 en una comunicación a la Academia francesa de Ciencias [E. PELICOT, *Comp. rend.*, 7, 106 (1840)]. Sucesivamente se conocieron tres formas estructuralmente isómeras de los ácidos sacarínicos de seis carbonos que se denominaron ácidos sacarínicos o 2-C-metil pentónicos, isosacarínicos o 2-dexosi-2-C-(hidroximetil) pentónicos, y melasacarínicos o 3-dexosi-hexónicos. No se conocen las formas cristalinas de los de seis carbonos pero sí sus lactonas (sacarinas). Para PELICOT [E. PELICOT, *Compt. rend.*, 89, 918 (1879)] por error de análisis, la «sacarina» era un isómero de la sacarosa y de ahí su nombre. SCHEIBLER [F. SCHEIBLER, *Ber.*, 13, 2212 (1880)] reconoció el carácter lactónico de la sacarina de PELICOT, pero mantuvo el nombre y de él derivó el de los ácidos.

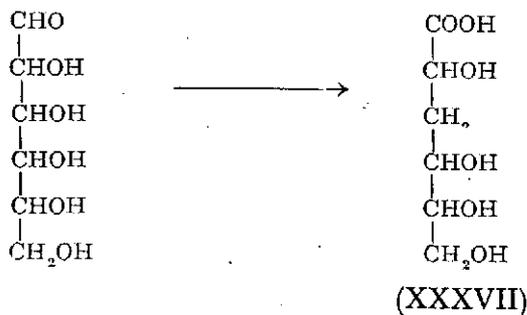
(98) H. KILIANI y S. KLEMMANN, *Ber.*, 17, 1302 (1884).

(99) M. NENCKI y N. SIEBER, *J. prakt. Chem.*, 26, 1 (1882).

WINDAUS (100) opina que también se pueden formar otros ácidos sacarínicos por condensación de fragmentos apropiados de otros ácidos metasacarínicos (XXXIII) (XXXV) con aldehidos. Así explica la formación de los ácidos D-isosacarínicos (XXXIV) y parasacarínicos (XXXVI) por las reacciones.



WINDAUS opina que los metasacarínicos (XXXVII) no ramificados se forman por dismutación interna de los correspondientes azúcares.



En la actualidad, algunos experimentos con azúcares marcados muestran que la recombinación de fragmentos puede ser significativa en algunos casos, pero sin que intervengan los fragmentos concretos supuestos por KILIANI.

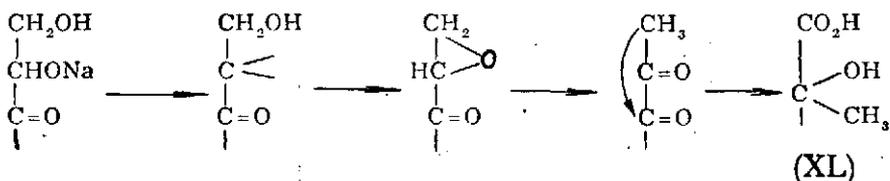
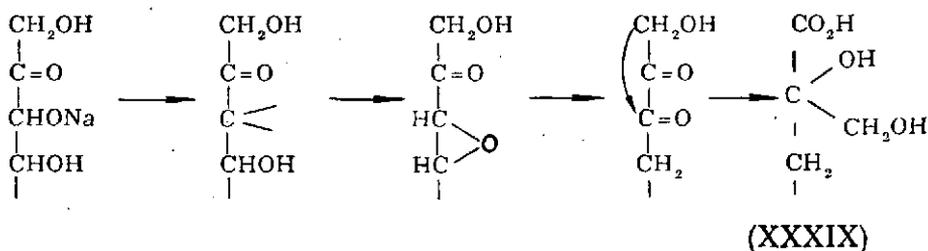
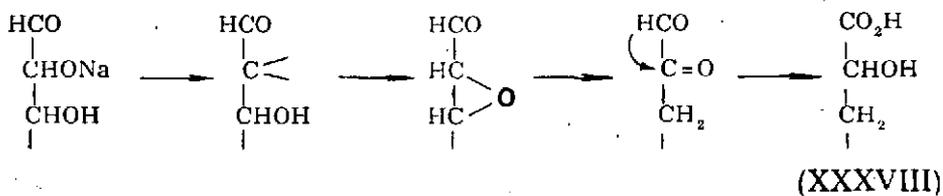
Históricamente constituyó una interesante aportación el mecanismo de isomerización de NEF (101) para el cual la formación de sacarínicos sucede en dos etapas: a) isomerización del azúcar con deshidratación hasta formarse un compuesto α -dicarbonílico; b) transposición tipo ácido bencílico con hidratación hasta sacarínico; con reajuste de cadena para la

(100) A. WINDAUS, *Chem. Ztg.*, **29**, 564 (1905).

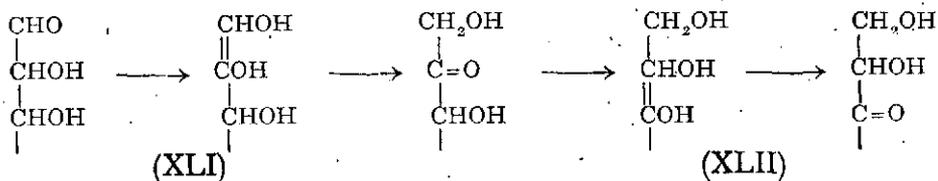
(101) J. U. NEF, *Ann.*, **357**, 214 (1907); **376**, 1 (1910).



formación de sacarínico, isosacarínico y parasacarínico de KILIANI y sin reajuste para la formación de metasacarínico. Para los tres principales ácidos formados metasacarínico (XXXVIII), isosacarínico (XXXIX) y sacarínico (XL), los esquemas de reacción serían:

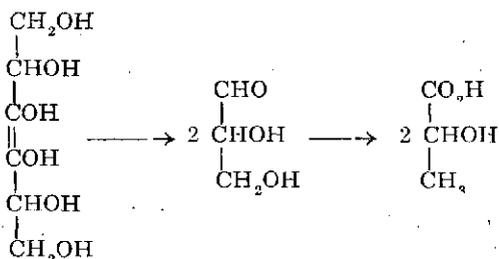


Como, por otro lado, ya se admitía que de una aldosa podrían pasarse a 2-cetosa y de ésta a 3-cetosa por acción alcalina, lo que se justificaba por intervención de 1,2 y 2,3-enodiolos (XLI) y (XLII) respectivamente (102) según la reacción

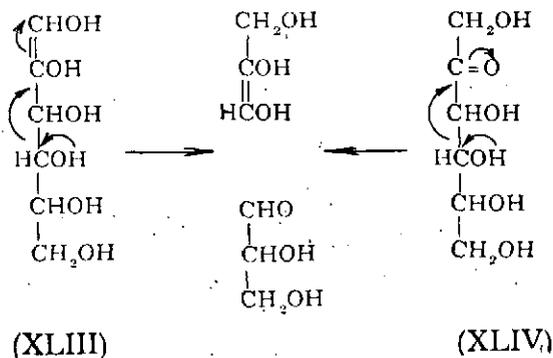


(102) E. FISCHER, *Ber.*, 28, 1145 (1895); A. WOHL y C. NEUBERG, *Ber.*, 33, 3095 (1900).

era fácilmente justificado el que de un azúcar sencillo pudieran producirse los tres sacarínicos distintos, como si se escindiera el enodiol para dar fragmentos de glicerosa que luego producirían ácido láctico.



Esta escisión puede suceder según SCHMIDT (103) por una desaldolización sobre el enlace C-C situado en posición β al doble enlace enodiolico, lo que transforma en intermedio fundamental al enodiol en 1,2 (XLIII) en vez de al enodiol en 3,4. ISBELL (104) prefiere considerar como sustancia escindible a la cetosa (XLIV), que siempre es más vulnerable que la aldosa. Ambos supuestos conducen al mismo resultado:

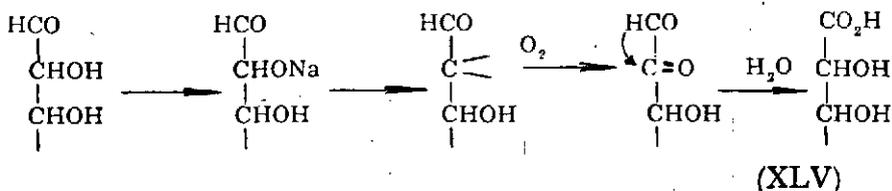


En el mecanismo de NEF es fundamental que la formación del alcóside suceda en α y no en β , como se creyó en un principio, con lo que se justifica fácilmente el porqué en presencia de aire u otros oxidantes a par-

(103) O. SCHMIDT, *Chem. Revs.*, 17, 137 (1935).

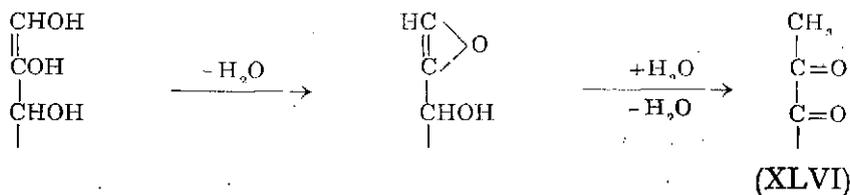
(104) H. S. ISBELL, Comunicación privada.

tir de aldosa se originan ácidos aldónicos (XLV) y no sacarínicos, lo que tendría lugar según el esquema:



La fase que supone una transposición bencílica es perfectamente admisible, pero en cambio requiere revisión la forma con que realmente se hace el tránsito de reductores a la estructura α -dicarbonílica propuesta por NEF; sobre todo resulta difícil admitir los intermedios metilénicos formulados por éste.

En 1926 EVANS y BENOY (105) supusieron que el compuesto α -dicarbonílico (XLVI) de NEF podría formarse a partir de los enodiolos por deshidratación y rehidratación sucesivas:



si bien tampoco es probable la intervención del epóxido no saturado formulado por éste.

En 1930 SHAFFER y FRIEDEMANN (106) suponían que los sacarínicos se forman por reorganización espontánea de los aniones de los azúcares, ya que éstos se comportan como ácidos mono, di, o polibásicos en presencia de álcalis.

Una teoría más acabada también basada en reacciones de desplazamiento electrónico es la desarrollada por ISBELL en 1944, la cual da una aceptable interpretación para la isomerización inicial de azúcares.

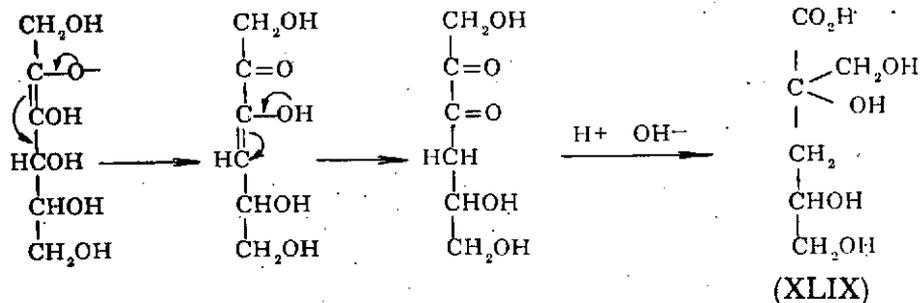
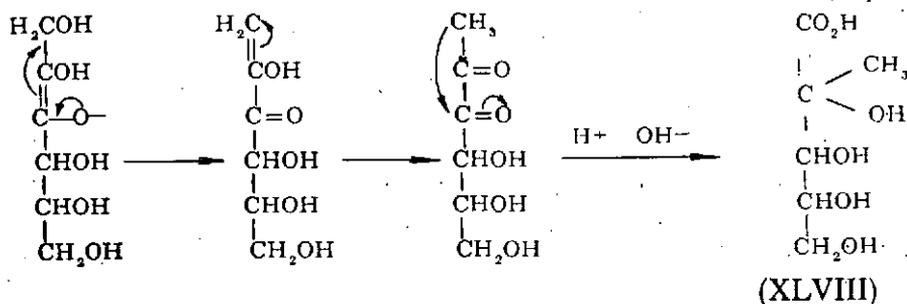
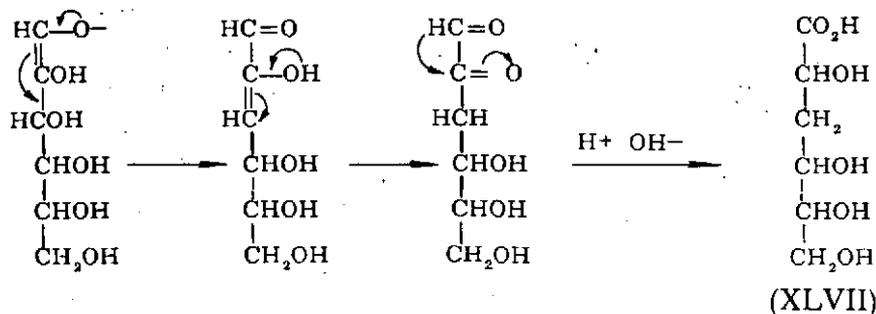
El paso de un azúcar a los diversos tipos de sacarínicos sucede según las siguientes etapas: a) formación y ionización de un enodiol, b) eliminación de un grupo OH o alcoxilo, lo que está de acuerdo con los traba-

(105) W. L. EVANS y M. P. BENOY, citado en W. L. EVANS, Rachel, H. EDGAR y G. P. HOEF, *J. Am. Chem. Soc.*, **48**, 2665 (1926).

(106) P. A. SHAFFER y T. E. FRIEDEMANN, *J. Biol. Chem.*, **86**, 345 (1930).

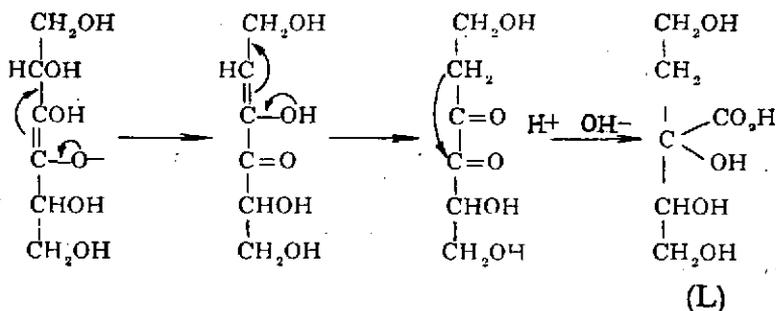
jos de NICOLET (107) y en desacuerdo con los de NEF, c) transposición hasta un compuesto α -dicarbonílico, d) transposición bencílica para dar sacarínicos.

A continuación se dan los esquemas correspondientes a metasacarínicos (XLVII), sacarínicos (XLVIII), e isosacarínicos (XLIX):



(107) B. H. NICOLET. *J. Am. Chem. Soc.*, 53, 4458 (1931).

Aún cabría considerar un 3,4-enodiol como precursor del ácido parasacarínico de KILIANI (L).



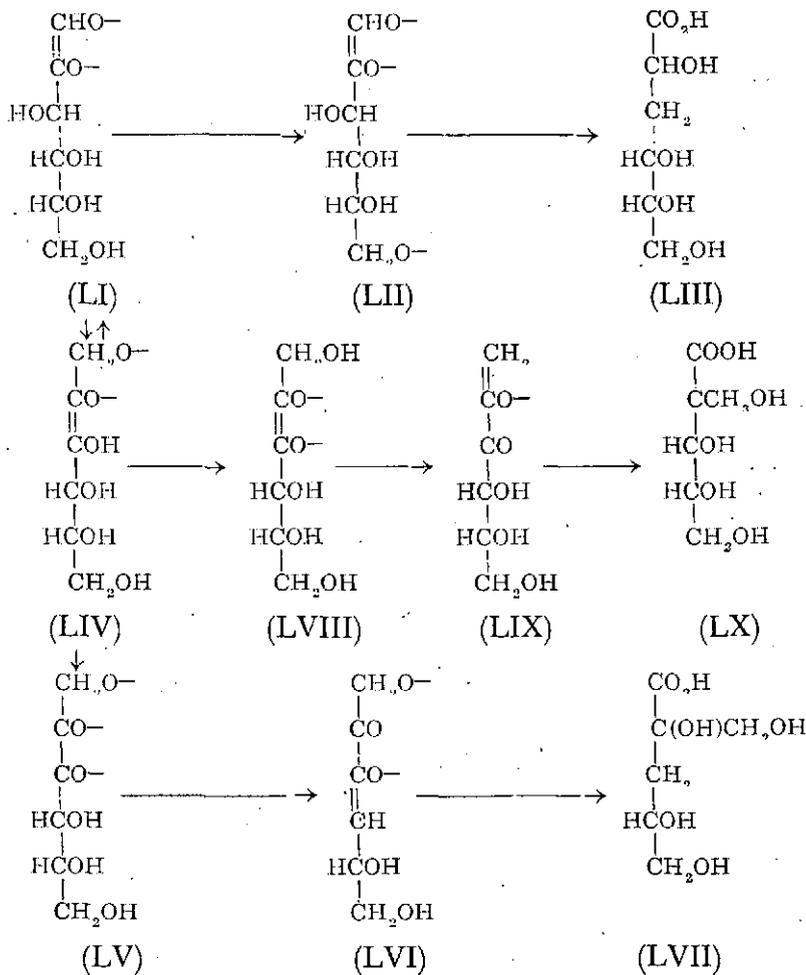
si bien no ha podido demostrarse su presencia. Cabe en cambio, admitir el desdoblamiento de éste en formaldehído y en el 1-2-enodiol de una pentosa, lo que explicaría la aparición de ácidos 3-desoxipentónicos, detectados por GREEN (108) entre los productos resultantes de la acción de los álcalis sobre glucosa.

KENNER y colaboradores en una serie de trabajos publicados sobre degradación de hidratos de carbono por álcalis, algunos de los cuales comentaremos, toman también como base para interpretar el mecanismo de formación de los diversos ácidos sacarínicos, la existencia inicial de estructuras dienol que además se encuentran disociados. Concretamente sobre la glucosa (*) CORBETT y KENNER, al hacer la discusión sobre las degradaciones de ésta, refieren la existencia de una forma dienol disociada (LI) (que sería común también para la fructosa si se considerase ésta como sustrato) en los carbonos 1 y 2, la cual podría conducir a los tres principales sacarínicos del esquema que éstos propugnan; según el orden de actuación de los álcalis concentrados o diluidos. En efecto, si se supone la actuación primera de álcalis concentrados se originaría la forma triiónica (LII) capaz de reorganizarse hasta dar el ácido glucosacarínico (LIII). En cambio, en medio básico débil cabe admitir una tautomerización protontrópica que conduce al compuesto hidroxienólico (LIV) que podría, a su vez, seguir dos caminos diferentes, según se suponga la actuación sobre el mismo de álcalis concentrados o diluidos. En el primer caso se obtendría una forma triiónica (LV), que a través de una estructura oxoxienólica bidisociada (LVI) conduciría hasta glucoisosacarínico (LVII); por otro lado, la acción de álcalis diluidos sobre la forma (LIV) puede con-

(108) J. W. GREEN, *J. Am. Chem. Soc.*, 78, 1894 (1956).

(*) La glucosa ha sido el sustrato más utilizado por los diversos investigadores que se han ocupado de la acción alcalina sobre hidratos de carbono, siguiéndole en importancia la xilosa.

siderarse que provoca una forma enodiólica (LVIII) disociada en 2-3 que, a través de un compuesto de deshidratación oxoenólico disociado (LIX), conduce al metasacarínico (LX).



En la bibliografía aparecen con anterioridad otros diversos estudios sobre la existencia de estas estructuras iónicas, habiéndose llegado a determinar el valor de las constantes de 1.^a y 2.^a disociación (109) e incluso a comprobar la 3.^a disociación para un pH 13,6 (110). En las condiciones de

(109) HIRSCH y SCHLAGO, *Z. physikal. Chem.*, **41**, 387 (1929); STREIN, *J. Phys. Chem.*, **35**, 2226 (1931); SHAFER y HARNED, *J. Biol. Chem.*, **93**, 211 (1931); URBAN y SHAFER, *id.*, **94**, 697 (1932); URBAN y WILLIAMS, *id.*, **100**, 237 (1933) [W. M. CORBETT y J. KENNER, *J. Chem. Soc.*, 3274 (1954)].

(110) W. M. CORBETT, J. KENNER y G. N. RICHARDS, *J. Chem. Soc.*, 1709 (1955).

trabajo de CORBETT y KENNER (agua de cal libre de oxígeno, 0,0383 N y temperatura de 25°) sólo habría un 4 % de glucosa en forma biónica frente a un 70 % con simple carga, siendo la primera forma la más propensa para ceder un anión, por lo que; cuando existe, es la que principalmente rige el proceso.

De acuerdo con NEF (111), que obtiene metasacárico con pequeña proporción de iso por acción de NaOH 8N, la formación de metasacárico sucede en general por acción de álcalis muy fuertes o por uso de disoluciones altamente concentradas. Según CORBETT y KENNER, esto se explica admitiendo que el dienol en 1-6, resultante del dienol en 1-2 no puede estabilizarse suficientemente por los álcalis débiles, del tipo del $\text{Ca}(\text{OH})_2$, mientras que los álcalis más fuertes sí son capaces de ello, puesto que al ser sus cationes monovalentes pueden salificar a dichos iones independientemente de la distancia. En los casos en que el OH del C-6 está sustituido no existe casi influencia por parte del sustituyente y es la forma dienólica disociada en 1-2 la imperante y por tanto, aún cuando se forman mezclas de sacáricos, se halla favorecida la formación de metasacáricos.

En un trabajo de KENNER y RICHARDS (112) con la 6-O-metil-D-glucosa preparan metasacárico por la acción del agua de cal con transformación posterior a un ácido láctico con rendimiento hasta del 80% mientras que la glucosa no sustituida no rinde nunca más del 67% (*). Al estar sustituido el OH del C-6 el rendimiento en ácido se ha igualado prácticamente al que dá la melibiosa por lo que hay que atribuir el efecto a dicha sustitución. En realidad el ácido láctico puede considerarse a su vez como el sacárico correspondiente al aldehído glicérico, que se formaría a causa de que el enlace C-3-C4 queda debilitado. Para SCHMIDT (103) es el doble enlace del enodiol 1-2 el que debilita el enlace en 3-4, pudiendo producirse entonces más «descondensación aldólica» con la consiguiente formación de fragmentos. Concretamente, en el caso de las hexosas se formaría triosas que, a su vez, son capaces de sufrir nuevas transformaciones. Así, por la acción de piridina o álcalis diluidos pueden sufrir la transformación de LOBRY que en este caso supone el tránsito de aldehído glicérico a dihidroxiacetona y viceversa; una acción alcalina algo más enérgica, por ejemplo con KOH 0,2-6 N, a 25 - 50° C convierte el aldehído glicérico en fórmico, acético y láctico (113).

(111) J. U. NEF, *Annalen*, 376, 89 (1910)

(112) J. KENNER y G. N. RICHARDS, *J. Chem. Soc.*, 2916 (1956).

(*) EVANS [W. L. EVANS, *Chem. Revs.*, 6, 281 (1929); 31, 537 (1942)]; obtuvo directamente de la glucosa 1-2 moles de láctico por mol de aquella al usar como agente alcalino hidróxido de benciltrimetilamonio a 25°.

(113) W. L. EVANS y H. B. HASS, *J. Am. Chem. Soc.*, 48, 2703 (1926).



Con los ejemplos referidos, de derivados sustituidos en C-6, se ha esbozado la influencia que en la velocidad de descomposición de los azúcares pueden tener las sustituciones y pensando que estas observaciones son de alto interés para prever o justificar el comportamiento de los diferentes oligosacáridos, en función de los carbonos entre los que esté establecido el enlace, haremos un comentario sobre el efecto de otras de las principales sustituciones.

Se conocen datos en la bibliografía según los cuales los disacáridos sustituidos en C-4 producían sacarínicos (concretamente isosacarínicos) más fácilmente que los monosacáridos correspondientes. Como KENNER y RICHARDS (114), indican, ésto es natural puesto que es más fácil expulsar un O-glicosilo o un O-alquilo que un hidroxilo. Por otro lado ciertas sustituciones pueden inhibir algunas reacciones secundarias como, por ejemplo, sucede con las de escisión sobre los azúcares sustituidos en C-4, por lo que, naturalmente, se interrumpirán además aquellas otras reacciones que sucederían sobre tales productos secundarios. Entre los trabajos existentes sobre azúcares sustituidos en C-4 pueden referirse los realizados sobre lactosa (115) (116), lactulosa (117), maltosa (117), maltulosa (117), celobiosa (118-119), celotetrosa (119), 4-O-metil-D-glucosa (120), 4-O-metil-D-fructosa (120), y 4-6-O-bencilidén-D-glucosa (110), entre otros.

De los azúcares citados como 4-O-sustituidos, las cetosas sufren una transformación en sacarínicos más fácil que las aldosas correspondientes, lo cual estará de acuerdo con la intervención de un 2-3-enodiol como precursor inmediato.

Las hexosas 3-O-sustituidas sufren en cambio la desalquilación o la desglicosilación en la etapa de 1,2-enodiol, produciéndose metasacarínicos, lo que se desprende de la bibliografía referente a la acción del agua de cal sobre 3-O-metil-D-glucosa y 3-O-metil-D-fructosa (115), 3-O- β -D-glucosil-D-glucosa (laminaribiosa) y 3-O- α -D-glucosil-D-fructosa (turancosa) (121), 6-O-bencil-3-O-metil-D-glucosa (122) y 2,3,5,6-di-O-isopropilidén-D-manosa (110). Como es natural, en estos compuestos 3-O sustituidos apenas hay diferencia en la velocidad de reacción entre aldosas y cetosas, puesto que tienen casi la misma facilidad para formar el 1,2 enodiol.

(114) J. KENNER y G. N. RICHARDS, *J. Chem. Soc.*, 278 (1954).

(115) L. CUISINIER, *Monit. sci. Docteur, Quesneville*, 12, 521 (1882); *Bull. soc chim. (France)*, 38, 512 (1882).

(116) W. M. CORBETT y J. KENNER, *J. Chem. Soc.*, 2245 (1953).

(117) W. M. CORBETT y J. KENNER, *J. Chem. Soc.*, 1789 (1954).

(118) S. V. HINTIKKA, *Ann. Acad. Sci. Fennicae, Ser. A. II*, n.º 9 (1922); [*Chem. Abstracts*, 17, 3486 (1923)].

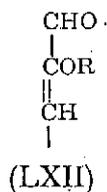
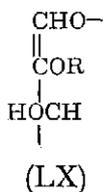
(119) W. M. CORBETT y J. KENNER, *J. Chem. Soc.*, 1431 (1955).

(120) J. KENNER y G. N. RICHARDS, *J. Chem. Soc.*, 1810 (1955).

(121) W. M. CORBETT y J. KENNER, *J. Chem. Soc.*, 3274 (1954).

(122) J. KENNER y G. N. RICHARDS, *J. Chem. Soc.*, 3277 (1954).

Las aldosas 2-O-sustituídas, como han podido demostrar WHISTLER y CORBETT (123) en el caso de la 2-O-(D-xilopiranosil)-L-arabinosa no forman sacarínicos en condiciones alcalinas suaves, quizá por la lentitud con que se elimina el OH situado en el C-3 del monoión intermedio (LXI) y por la estabilidad de la estructura (LXII) en la que es difícil se pierda el radical R y en consecuencia no es fácil la ionización. Sólo en el caso de las pentosas 2-O-sustituídas se forman productos ácidos por la acción del agua de cal a alta temperatura, pero tal formación debe atribuirse a la recombinación de fragmentos.



Las 2-cetosas sustituidas en C-1 producen enodiolos en 1-2 (con un radical en C-1) que son muy estables a los álcalis y a su vez enodiolos en 2,3 cuyos aniones pueden llegar por eliminación del radical en C-1 hasta sacarínicos, de modo que el rendimiento sea mayor que el de la correspondiente cetosa no sustituida; experimentos en este sentido se han realizado por KENNER y RICHARDS (124) sobre la 1-O-metilfructosa que por tratamiento con agua de cal forma principalmente α -glucosacarínico y en pequeña escala iso- y metaglusosacarínico, generalizándose así las deducciones hechas para la influencia de los sustituyentes. Los autores consideran que tienen pruebas de la existencia de los aniones intermedios correspondientes no sólo a la 1-O-metilfructosa sino también a la psicosa (quizá también a su 1-O-metil derivado), glucosa, fructosa y manosa.

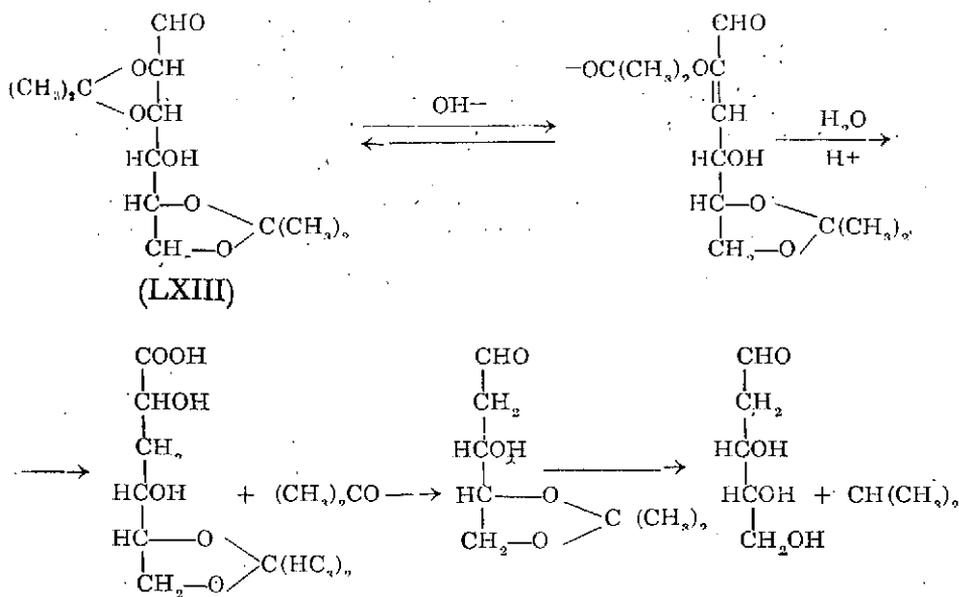
KENNER y colaboradores han ido evolucionando en sus opiniones y así inicialmente aceptaron el mecanismo íntegro de ISBELL en el que la forma moniónica de un enodiol es la activa; después consideraron la necesidad de admitir una forma diiónica y en otros trabajos han vuelto a admitir que un diión enodiólico no es absolutamente esencial para que se inicie la transposición a sacarínico. Así concretamente CORBETT, KENNER, y RICHARDS (110) al estudiar la descomposición por álcalis del diacetal 2,3-5,6-di-O-isopropilidén-D-manosa (LXIII), dan el esquema que se ad-

(123) R. L. WHISTLER y W. M. CORBETT, *J. Am. Chem. Soc.*, 77, 3822 (1955).

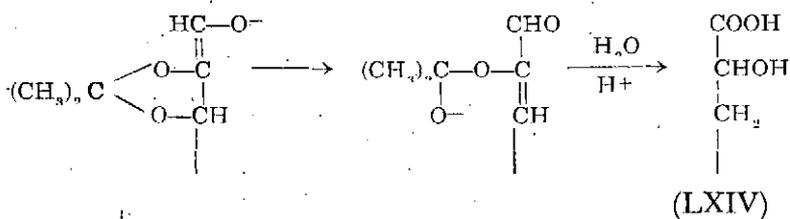
(124) J. KENNER y G. N. RICHARDS, *J. Chem. Soc.*, 1784 (1954).



junta en el cual la formación de 5,6-O-isopropilidén-glucometasarínico (LXIV) tiene lugar sin formarse el intermedio diiónico.



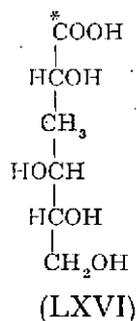
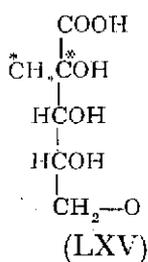
La primera fase de esta transformación, que afecta al grupo isopropilidén en 2-3 y que conduce al 5-6-O-isopropilidén-D-manónico (LXIV) SOWDEN (125) la esquematiza así:



En la opinión de SOWDEN este hecho y el comportamiento de las aldosas 2-O-sustituídas confirman que aunque los diiones enodiólicos existen en medio alcalino e intervengan en la formación de sacarínicos, puede seguir admitiéndose en su integridad el mecanismo de ISBELL, sin necesidad de nuevas reformas.

(125) J. G. SOWDEN [«Advances in Carbohydrate Chemistry», Academic Press Inc., Publishers New York, N. Y. 1957, Vol. 12, pág. 72].

Naturalmente, no puede olvidarse que en la acción alcalina sobre azúcares tiene también lugar la escisión en aldosas y cetosas que, a su vez, por condensación aldólica dan cetohexosas de cadena recta o ramificada cuyos derivados sacarínicos pueden aparecer, en principio, junto a los productos de reacción primaria. Sin embargo, existen pruebas por experiencias con átomos marcados, de que en la mayoría de los casos la formación de sacarínicos sucede sobre todo por el mecanismo iónico, tipo ISBELL, y sólo en proporción muy pequeña tiene lugar la fragmentación y recombinación. Así, SOWDEN y KUENNER (126) muestran que, al preparar el metasacarínico correspondiente a la D-galactosa (LXVI) marcada con C^{14} en

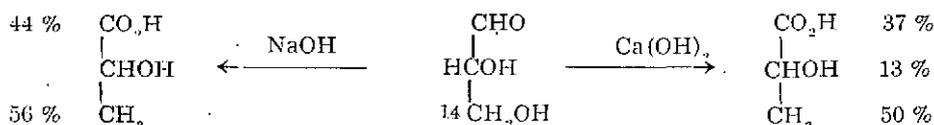


C 1, el isótopo sigue apareciendo casi en un 95 % en el C-1 del sacarínico, mientras el otro 5 % de radioactividad aparece distribuido en otros lugares de la cadena; sólo esta última distribución es atribuible a fragmentaciones previas de la galactosa. No obstante, los mismos autores demuestran que en algunos casos como en el de la formación de α -D-glucosacarínico (LXV) a partir de D-manosa la radioactividad que originalmente estaba en el C-1 del azúcar aparece acumulada en el carbono metílico y en el terciario, más en el segundo que en primero (39 y 57 % respectivamente), lo que lleva a concluir que en este caso particular predomina la recombinación de fragmentos. Sin embargo, no es fácil interpretar exactamente cual es la clase de los supuestos fragmentos para poder dar explicación del predominio de radioactividad en el carbono terciario ya que admitiendo la opinión de KENNER y RICHARDS (113) que supone la formación intermedia de D-glicerosa (a partir de los carbonos 4,5 y 6) y glicerulosa (a partir de los carbonos 1,2 y 3), y recombinación de éstos hasta una hexosa precursora de α -D-glucosacarínico debía aparecer la radioactividad equidistribuida entre los carbonos metílico y terciario o, en todo caso, si se superpusiera una formación sin fragmentación previa, sería previsible un predominio de C^{14} en el metílico, pero nunca en el terciario.

(126) J. C. SOWDEN y J. KUENNER, *J. Am. Chem. Soc.*, 75, 2788 (1953).

Respecto a la influencia de los distintos álcalis en la isomerización de azúcares, incluida la formación de sacarínicos, se conocen datos históricos (127) que ya hemos comentado en páginas anteriores, sobre diferencias en los productos resultantes, pero quedan aún dudas respecto a si tales diferencias son consecuencia del pH de las bases o si se trata de un efecto catiónico. En favor de la primera opinión se encuentran CORBETT y KENNER (112) que estiman, como ya se refirió, que el hecho de que D-glucosa dé dos diferentes sacarínicos según sea tratada por agua de cal o por hidróxido sódico concentrado (α -D-glucosacarínico o metasacarínico respectivamente) se debe a que a pH más bajos se forma el di-ión del 2,3-enodiol, que pierde fácilmente el OH de su C-1 dando glucosacarínico, mientras que a pH superiores hay más facilidad para que la ionización suceda en el C-1 del 2,3 enodiol, llegando a formarse el tri-ión correspondiente en el cual la eliminación del OH sólo sucede sobre C-4 produciéndose α -D-glucoisosacarínico.

Se han obtenido algunos resultados interesantes con el empleo de trazadores. Así, GIBBS (128) obtiene a partir de D-glucosa marcada en C-1 ácido láctico con radioactividad equidistribuida en los carbonos 1 y 3 por acción del hidróxido potásico 3N a 50°. POHLEN (129) utiliza como sustrato D glicerosa marcada en el C-3 realizando la isomerización en unos experimentos con hidróxido sódico 1,68 N a 25° C y en otros con agua saturada de cal a la misma temperatura y obteniendo una localización de radioactividad en los carbonos 1 y 3 en el primer caso y una distribución sobre los tres carbonos del láctico en el segundo; los porcentajes de radioactividad se dan en el esquema siguiente:



Debe interpretarse la aparición de láctico, en el caso de la glucosa, por una desaldolización previa a glicerosa en equilibrio con glicerosa en competencia ventajosa respecto a la formación de sacarínicos directos. El responsable de la formación de láctico a partir de la glucosa o de la glicerosa es en ambos casos el enodiol de esta última. Al partir de una he-

(127) C. A. LOBBY de BRUY y W. ALBERDA VAN EKENSTEIN, *Rec. trav. chim.*, **14**, 203 (1895); **15**, 92 (1896); **16**, 275, 262, 282 (1897); **18**, 147 (1899); **19**, 1 (1900); A. KUSIN, *Ber.*, **68**, 619 (1894); **69**, 1041 (1936); J. C. SOWDEN y R. SCHAEFFER, *J. Am. Chem. Soc.*, **74**, 499, 505 (1952); Y. J. TOPPER y D. STETTEN, Jr., *Biol. Chem.*, **189**, 191 (1951); L. HOUGH J. K. N. JONES y E. L. RICHARDS, *J. Chem. Soc.*, 2005 (1953).

(128) M. GIBBS, *J. Am. Chem. Soc.*, **72**, 3964 (1950).

(129) EVA K. POHLEN, M. A. Thesis, Washington University, St. Louis (1954).

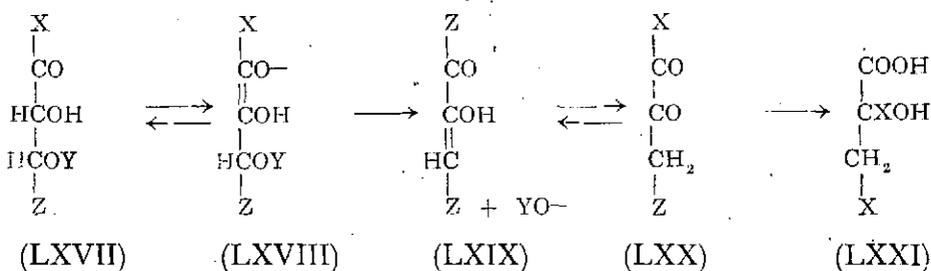


xcosa marcada en C-1 o de una triosa marcada en C-3 y como consecuencia del equilibrio *aldosa* \rightleftharpoons *cetosa*, aparte de la escisión requerida en el primer caso, resulta natural que aparezca equidistribuida la radioactividad entre los carbonos 1 y 3.

Pueden interpretarse los datos de POHLEN como una consecuencia de la emigración del grupo metílico o de un átomo de hidrógeno (mecanismo sacarínico y metasacarínico respectivamente) en el compuesto α -dicarbonílico intermedio (mecanismo de ISBELL) la emigración de hidrógeno es exclusiva en el caso del hidróxido sódico, lo que supone una distribución aparente de radioactividad sólo en los carbonos 1 y 3. Al usar agua de cal puede considerarse que se simultanean los dos mecanismos de emigración, aunque sigue predominando el correspondiente al hidrógeno; un 74 % de emigración de hidrógeno y un 26 % de emigración de metilo, justificarían, exactamente, la distribución de radioactividad observada sobre los tres carbonos del láctico.

A lo largo de las sucesivas hipótesis sobre formación de sacarínicos, que hemos ido comentando, se ha hablado de la probable existencia de un compuesto α -dicarbonílico que ya postuló NEF; que sostuvo ISBELL en su mecanismo y que está de acuerdo con los sucesivos trabajos de KENNER y RICHARDS hasta 1957. Ahora bien, es en otra serie de trabajos de MACHELL y RICHARDS (130) y en una nota de O'MEARA y RICHARDS (131) donde definitivamente se ha dado cuenta de la identificación de compuestos dicarbonílicos concretos.

En líneas generales el mecanismo de formación de sacarínicos sobre derivados 3-O- y 4-O sustituidos (LXVII) una vez confirmada la existencia de compuestos dicarbonílicos (LXX) puede formularse así:

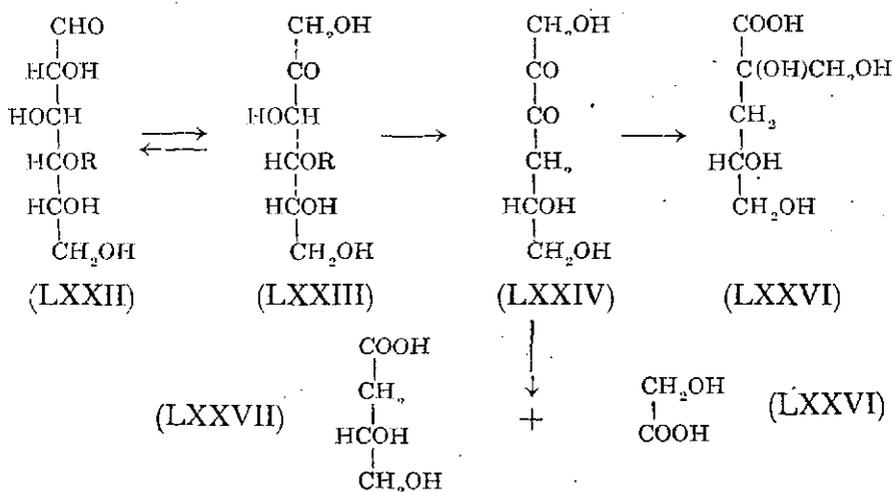


En este esquema tienen gran significado tanto la etapa de eliminación del grupo YO^- [(LXVIII) \longrightarrow (LXIX)] favorecida a la vez por efecto inductivo y por ley de acción de masas, como las reacciones a las que el

(130) G. MACHELL y G. N. RICHARDS, *J. Chem. Soc.*, 1524 (1960); 1932 (1960); 1938 (1960).

(131) D. O'MEARA y G. N. RICHARDS, *J. Chem. Soc.*, 1944 (1960).

compuesto dicarbonílico ha de dar lugar puesto que éste, muy reactivo, puede evolucionar bien sufriendo la simple transposición bencílica [→(LXXI)] o fragmentándose. En esta fase es en la que pueden suceder diversas reacciones de competición que determinarán la naturaleza de los productos resultantes y en la cual pueden jugar especial papel los reactivos utilizados. Así, un caso concreto es el de la diferencia de actuación entre el $\text{Ca}(\text{OH})_2$ y NaOH sobre maltosa y otros derivados 4-O sustituidos de la glucosa (LXXII) o de sus isómeros cetósicos (LXXIII) ya que mientras el hidróxido cálcico cataliza la simple transposición bencílica del compuesto dicarbonílico 4-desoxi-3-exo-D-fructosa (LXXIV) que en este caso conduce al ácido isosacarínico (LXXV), el hidróxido sódico al no catalizar en tan alto grado dicha transposición favorece la fragmentación llegando a formarse en proporción bien manifiesta los ácidos glicólico (LXXVI) y β - γ -dihidroxibutírico (LXXVII). En consecuencia la identificación del compuesto dicarbonílico intermedio (LXXIV) resulta más fácil de conseguir en el segundo caso. He aquí el esquema:



R representa cualquier grupo unido por enlace glicosídico.

El poder catalítico de la cal en los primeros estudios que se habían hecho exclusivamente sobre derivados 4-O-sustituidos, se atribuía a su actuación en forma de iones $(\text{CaOH})^+$, en la etapa de eliminación del grupo glicosídico. Después, al estudiar la acción directa sobre el intermedio dicarbonílico 4-desoxi-3-oxo-D-fructosa aislado previamente (*) a partir de

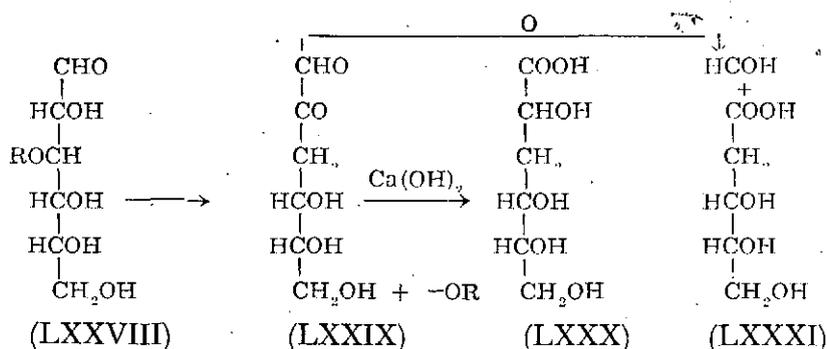
(*) Separado por cromatografía a partir de la mezcla resultante de tratar maltosa con NaOH 0,05 N a 25° durante 5 horas.

4-O-derivados es cuando de manera indudable queda demostrado el gran poder catalítico (rendimiento 90 %) respecto a la etapa de tránsito a isosacarínico que compite con la fragmentación, favorecida en cambio por otros álcalis.

Se ha obtenido mayor generalización al lograrse por MACHELL y RICHARDS (132) separar también un α -cetoaldehído (concretamente la 3-desoxi-D-glucosona) a partir de la mezcla resultante de 3-O-bencil-D-glucosa e hidróxido sódico (**).

En este caso se repite la acción catalítica positiva del agua de cal respecto a la formación de glucometasacarínico, si bien el hidróxido sódico no favorece demasiado la fragmentación oxidativa.

Con todo, los rendimientos en el compuesto dicarbonílico [3-desoxi-D-glucosana (LXXIX)] son menores que para el caso análogo de los 4-O-derivados ya que entre otras cosas queda una gran parte de compuesto original sin alterar. He aquí el esquema:



Hay que añadir aquí que la velocidad de formación de glucosacarínico (LXXX) es muy superior si se parte del compuesto dicarbonílico previamente aislado que si se usa el agua de cal directamente sobre 3-O-bencil-D-glucosa lo que denota que la etapa más lenta es la de eliminación del grupo glicosídico R y por tanto la que determina la velocidad del sistema. También debe destacarse la clara diferencia entre las cantidades relativas de α - y β -D-glucometasacarínico formado según se catalice con hidróxido sódico o hidróxido cálcico independientemente de que

(132) G. MACHELL y G. N. RICHARDS, *J. Chem. Soc.*, 1938 (1960).

(**) En principio para la búsqueda de los sospechados compuestos intermedios dicarbonílicos les resultó a los autores más fácil partir de los derivados 4-O-sustituídos dada su menor facilidad para la formación de sacarínicos. Los 3-O-sustituídos por naturaleza producen con mayor rapidez los correspondientes metesacarínicos. No obstante cabe seleccionar aquellos derivados en los que se catalice, aunque sólo sea de manera relativa la etapa de formación del compuesto dicarbonílico respecto a la velocidad de transposición. Estas últimas circunstancias se dan en la 3-O-bencil-glucosa y no en la 3-O-metil-D-glucosa.

se parta del azúcar original o del dicarbonílico intermedio. Debe admitirse en consecuencia una catálisis catiónica de manifiesta estereoespecificidad en la transposición bencílica que es predominante frente a las fragmentaciones [—(LXXXI)] que de ninguna manera llegan a adquirir la importancia que tenían en el caso del compuesto dicarbonílico procedente de los derivados 4-O-sustituídos. El predominio de la transposición bencílica y no de la fragmentación recuerda al comportamiento del glioxal que sería la sustancia modelo, más simple, representativa de los precursores de ácidos sacarínicos. O'MEARA y RICHARDS (131) estudiando la importancia de diversas sales metálicas (NO_3Li ; Cl_2Ba ; SO_4Tl ; Cl_2Ca) en la velocidad de formación de glicólico en medio alcalino (glioxal 0,05 M en NaOH 0,005 N a 25° C) observan que el orden de efectividad es precisamente el marcado y que prácticamente no había casi diferencia entre la acción del cloruro cálcico y la del agua de cal.

APENDICE A LOS CAPITULOS I, II y III

El comportamiento de las hexosas en general puede extenderse a las pentosas, puesto que en la mayoría de las propiedades, aún en la capacidad para formar anillos piranósicos y furanósicos, son similares. También las tetrasas, sufren mutarrotación en el tránsito desde su estructura cerrada (furanósica) hasta la abierta. (133) (134). Igualmente las triosas son capaces de sufrir la epimerización de LOBRY de BRUYN y ALBERDA van EKENSTEIN en presencia de piridina o álcalis muy diluïdos (135), pasando fácilmente del aldehido glicérico a dihidroxiacetona y viceversa; una acción alcalina algo más enérgica, por ejemplo, hidróxido potásico (0,2-6 N) a 25-50° C convierte el aldehido glicérico en fórmico, acético y láctico (113).

(133) W. FRENDAUËU, *Ber.*, 65, 168 (1932).

(134) V. DENDOFEN, *J. Chem. Soc.*, 2973 (1932).

(135) H. O. L. FISCHER, C. TAUBE y E. BAER, *Ber.*, 60, 480 (1927).



IV

LAS ACCIONES ALCALINAS EN PROBLEMAS PRACTICOS

Hasta ahora hemos hecho una revisión y hemos comentado las alteraciones más significativas que pueden sufrir los azúcares por una acción alcalina (mutarrotaación, transposición de LOBRY, formación de sacarínicos, fragmentación). El comentario a los fenómenos señalados es en general consecuencia de experimentos hechos sobre azúcares particulares y con un objetivo teórico previsto. Pero conviene destacar que las acciones alcalinas en el laboratorio y en la industria se utilizan extensamente con los más variados fines. Desde este punto de vista hemos considerado interesante el realizar diversas experiencias, algunas de ellas relacionadas con otras descritas en la bibliografía, pero procurando elegir unas condiciones de realización más próximas a las que se siguen en los procesos alcalinos prácticos desde el punto de vista analítico o industrial. Es de destacar que casi todos los experimentos que hasta ahora figuraban en la bibliografía están hechos en condiciones demasiado suaves.

A grandes rasgos podrían enumerarse algunos de los casos en los que por ser fundamental la acción alcalina pueden presentarse problemas en relación con los fenómenos referidos.

Uno típico es la identificación de componentes estructurales por hidrólisis escalonada en la que intervienen fundamentalmente medios ácidos, pero también entran en juego neutralizaciones con álcalis o con resinas catiónicas, pudiendo, sin duda, suceder fenómenos superpuestos que interfieren en algunos de los resultados si no se tienen en cuenta, aún suponiendo que se prescinda del caso extremo de la acción alcalina directa, que en un principio constituyó etapa fundamental para la extracción de componentes hemicelulósicos; este método aún sigue usándose, por ejemplo para la separación entre celulosa y lignina en vegetales.

Sin embargo, bien administrados los fenómenos referidos, la acción de



álcalis puede ser un procedimiento auxiliar en la determinación de estructuras. Según KENNER (136) al defender la utilidad del método no sólo para la preparación de oxixelulosas, como método clásico, sino también para la de otros grupos de hidratos de carbono, destaca que el procedimiento que empezó con tan buenos auspicios con los trabajos de CUISNIER, PELICOT, SCHEIBLER, LIEBERMAN y KILIANI (137), determinando este último varias estructuras por uso de degradación alcalina, formación de ácidos sacarínicos e identificación de los mismos fue prácticamente olvidado quedando durante muchos años únicamente KILIANI en esta línea de trabajos; hasta 1907 en que se incorporó NEF (138). Ultimamente han vuelto a ocuparse varios investigadores de esta cuestión, ya que el procedimiento puede ser de mayor utilidad al contar con la técnica de metilación de PURDIE e IRVINE y poder coordinar resultados.

El método se funda en la separación y detección de los ácidos sacarínicos. Estos se originan por eliminación de hidróxilos, alcoholóilos o grupos análogos que lo hacen en forma aniónica, por lo cual estará favorecida la eliminación por acción de los álcalis y partiendo del supuesto de que la etapa intermedia es la de un enol común a una aldosa y a una cetosa correspondiente, los sacarínicos resultantes de aldosa o de sus respectivas cetosas serán los mismos. La utilidad del método se mantiene tanto para los monosacáridos como para los oligosacáridos más complejos (*). Como el mecanismo de formación de sacarínicos supone la intervención de probables estructuras enólicas y éstas, a su vez, están ligadas a la existencia de otras reductoras, es natural que en algunos casos como el de las sacarolactonas (por ejemplo, lactonas de los sacarínicos de glucosa y manosa) que son reductoras también se forman sacarínicos. En la mayoría de los casos la degradación alcalina se lleva a cabo en álcalis suaves, sobre todo con agua de cal. En el caso de las lactonas de ácidos aldónicos, que no muestran propiedades reductoras, pueden usarse igualmente las condiciones típicas de su epimerización, el calentamiento con quinoleína a 140° C [(método de epimerización de FISCHER (139))].

Aun cuando se usan condiciones alcalinas suaves, como en los casos anteriores, es necesario tener previstos los cambios que dichas condiciones ocasionan, para comprobar qué sustancias deben considerarse como nor-

(136) J. KENNER, *Chemistry & Industry*, 727 (1955).

(137) CUISNIER, *Monit. sci.*, 521 (1882); PELICOT, C. R., *Acad. Sci.*, 89, 918 (1879); SCHEIBLER, *Chem. Ber.*, 13, 2212 (1880); LIEBERMAN y SCHEIBLER, *ibid.*, 16, 1821 (1883); y KILIANI, *Liebig Ann.*, 218, 63 (1883); *Chem. Ber.*, 16, 631-642 (1883); *Liebig Ann.*, 44, 113 (1911).

(138) J. U. NEF, *Liebig Ann.*, 357, 249 (1907).

(*) En nuestros laboratorios se tiene iniciado un trabajo de degradación alcalina sucesiva de polisacáridos, concretamente sobre celulosa de diversos manantiales.

(139) H. O. L. FISCHER, *Chem. Ber.*, 33, 799 (1890).

males y cuáles son previamente inexistentes en relación con los procesos de identificación.

Otras veces las condiciones son más enérgicas, éste es el caso de la valoración de azúcares con reactivos cúpricos alcalinos (FEHLING, BENDERIT, etc.), en las que deben ocurrir interesantes fenómenos de transformación de azúcares aparte de los puramente oxidativos. Por otro lado, la utilización de reactivos cúpricos alcalinos está extendida para la determinación de los llamados índices de cobre en polisacáridos y para el fraccionamiento de algunos polímeros, como el típico caso de las xilanas.

También es interesante un caso de acción alcalina que por su amplia utilización en nuestro laboratorio para la determinación de celulosa o para la cotonización de fibras debíamos conocer en sus posibles efectos isomerizantes. Nos referimos al uso de disolución de NaOH al 17'5 % en frío en actuación prolongada (unos 20 minutos en el caso de la celulosa). La obtención de celulosa mediante NaOH al 1 % (celulosa a la sosa) se nos ofrece también como un caso en el que puede suceder varias transformaciones a algunos de los monosacáridos integrantes y que pasará a las lejías residuales como una mezcla más o menos complicada.

Otro caso por el que teníamos interés es el conocimiento de la mezcla de azúcares resultantes en las vasijas de pelado de frutos con lejía de sosa, proceso que en la región murciana tiene una especial importancia por la gran cantidad de melocotón que se elabora por la industria conservera, produciéndose en consecuencia una buena cantidad de lejías residuales, con posibilidad aunque sólo sea remota de aprovechamiento; los azúcares libres que integran el melocotón y que sufren en principio la acción alcalina son la glucosa, fructosa, manosa, sacarosa y algo de xilosa, pero también sufren transformaciones otros azúcares integrantes de estructuras más complejas (hemicelulosas, pectinas, etc.), a las que principalmente afecta el proceso de pelado, sobre todo a las hemicelulosas. En relación con este problema también ofrece interés el resultado del ataque alcalino de las pieles de otros frutos como las del tomate y las de losajos de pomelos y naranjas.

V

PARTE EXPERIMENTAL: GENERALIDADES

La mayor parte de nuestro trabajo de laboratorio se ha centrado en el estudio de la acción alcalina sobre mono y oligosacáridos concretos. A estos trabajos vamos a referirnos a continuación.

Se utilizaron los monosacáridos glucosa, manosa, fructosa, sorbosa, galactosa, arabinosa, xilosa y ribosa y los oligosacáridos sacarosa, maltosa, celobiosa, lactosa, melibiosa y rafinosa.

Como agentes alcalinos se ensayaron los hidróxidos de calcio, bario, amonio, sodio y potasio. Así como las bases orgánicas piridina, quinoleína y lutidinas 2-4 / 2-5 y 2-6, resultando en todos los casos como excelente para el control la técnica cromatográfica. El bloqueo de la acción alcalina inmediatamente después de transcurrido el tiempo del experimento y la desecación de la muestra situada en el papel impiden alteraciones secundarias del equilibrio, permitiendo en cada caso conocer lo que había ocurrido.

Aparte de variar los agentes alcalinos, se han realizado los experimentos en condiciones diversas, en especial de tiempo y temperatura, haciendo algunos de ellos a sobrepresión lo que en realidad supone sólo una temperatura más alta sobre todo en los casos de polisacáridos en los que era previsible alguna acción específica en estas condiciones, que en la práctica no se observó; la descripción de estos experimentos no se hace en esta Memoria. Del conjunto de ensayos realizados hemos podido deducir, por un lado, el grado de resistencia relativa exhibido por cada uno de los azúcares, respecto a cada agente, desde el momento que no todos sufrían las mismas transformaciones, e igualmente la actividad relativa de los reactivos alcalinos al comparar el efecto de los varios usados frente a un mismo sustrato. Este último aspecto es el que vamos a considerar especialmente, aunque el primero es consecuencia de él y prácticamente



quedará también expuesto a lo largo de lo que sigue. Los fenómenos observados sólo en algunos casos son fundamentalmente epimerizantes, lo cual sucede en especial en los monosacáridos y en aquellos oligosacáridos que tienen carácter reductor con lo que parecería confirmarse en principio, que el origen de las epimerizaciones debe buscarse en la formación de enodíoles intermedios, ya que esto explicaría bien las interconversiones aldosa-cetosa que, aunque ya conocidas hemos podido detectar cromatográficamente y aun apreciar en su relativa cuantía. En algunos casos, las epimerizaciones tienen lugar a una velocidad enorme, lo que hace que a los 30 segundos de iniciada la acción alcalina a baño de maría, se observen ya en los cromatogramas las correspondientes manchas de los isómeros formados, especialmente los que resultan en la llamada 2-epimerización o α -epimerización; en realidad, antes sólo se consideraban como epímeros los que diferían en este carbono 2 y que entre sí eran intercambiables pero, en la actualidad, se admite, y nosotros lo hemos confirmado, que la existencia de enodíoles intermedios y la formación en la mayoría de los casos de cetocompuestos, que a su vez pueden dienolizarse, permite la formación de toda una serie de isómeros, que llegan a complicar grandemente la identificación de componentes en una mezcla resultante por una acción alcalina en cuanto ésta sea un poco enérgica. Aún en estos casos era de suponer, y por eso elegimos esta técnica, que la cromatografía podía dar mucha más luz que los procedimientos clásicos de cristalización fraccionada o los de formación de algunos derivados cuya separación requeriría una cristalización complementaria o incluso una destilación, pues cabría la posibilidad, y de hecho debió suceder así a los primeros investigadores, que algunos componentes de estas complejas mezclas, aun incluso lo más característico, por estar en pequeñísima proporción pasaron desapercibidos en aquellas técnicas; también puede ocurrir en cromatografía en papel y se evita en parte al recurrir a diversos disolventes y a variados reveladores, técnica que tiene además a su favor la sencillez de realización.

VI

PARTE EXPERIMENTAL

ACCIONES ALCALINAS SOBRE AZUCARES INDIVIDUALES

Pasemos a exponer la acción de los diversos agentes ensayados en las condiciones que también se indican sobre diversos azúcares. Para simplificar la exposición no repetimos las descripciones que son reiterativas, ni tampoco aquellas otras condiciones que por su sencillez de reproducción basta con enumerarlas.

El orden de exposición que seguiremos será el de comentar los resultados obtenidos al considerar la acción de varios reactivos sobre cada uno de los azúcares elegidos, tratando en primer lugar de los monosacáridos y a continuación de los oligosacáridos más representativos. En todos ellos se hablará de la acción del agua en primer lugar y después de la ejercida por los hidróxidos de calcio, bario, amonio, sodio y potasio que en cierto modo es el orden de previsible acción creciente. En algunos casos se describirá además el efecto de las bases orgánicas y de algunas resinas básicas intercambiadoras de iones.

GLUCOSA

A) *Acción del agua:*

Una disolución de glucosa en agua mantenida a temperatura ambiente durante un período de doce meses, con cloroformo para evitar el crecimiento de gérmenes, seguía conteniendo exclusivamente glucosa al cabo de dicho tiempo. Una vez al mes tomábamos una muestra y cromatografábamos por si se había iniciado la aparición de otro azúcar.

Por otro lado se estudió el comportamiento de la glucosa en disolución en caliente. Para ello preparamos disoluciones al 2 y al 10 % en tubos de ensayo de 20 cc a los que acoplamos refrigerantes de aire y mantuvimos a baño de maría durante 24, 48, 72 y 90 horas. De las muestras tomadas a dichos intervalos se desarrollaron 5 cromatogramas usando como disolvente, butanol : acético : agua (4 : 1 : 5) (140) (*) y como reactivos de revelado ftalato ácido de anilina (141), clorhidrato de p-anisidina (142), resorcina en clorhídrico (143), antrona (modificación de JOHANSON) (144) y orcina (145). En ocasiones se desarrolló un sexto cromatograma para la detección de ácidos sacarínicos con reactivo de ABDEL-AKHER (146).

En las diversas condiciones no observamos apenas diferencia alguna respecto a la muestra tipo que en cada caso es una porción segregada de la disolución de glucosa problema antes del tratamiento. Sin duda sólo ha tenido lugar el proceso de mútarrotación que cromatográficamente no es detectable.

B) Acción del hidróxido cálcico

En la bibliografía sólo existen datos sobre lo que ocurre en frío por tratamiento prolongado, pero hay disparidad en los resultados de los distintos investigadores. Así KUSIN (147) señala un comportamiento para la glucosa que difiere del observado por WOLFROM y LEWIS (62), de ahí el interés de nuestra reinvestigación. En nuestros experimentos se ha utilizado disolución de glucosa al 10% en agua saturada de cal (0.005N) haciendo unos ensayos a temperatura ambiente y otros a baño de maría. En los experimentos en frío se hace el control del producto de cuarto en cuarto de hora y después a intervalos de media y una hora. Se aprecia que al primer cuarto de hora ya se ha iniciado la aparición de fructosa y manosa, mientras que la presencia de psicosa (3 epímero de la fructosa) sólo se observa después de 7 horas. Al prolongar la acción alcalina se complican los cro-

(*) Aunque este disolvente fue el que mejor resultado daba, en experimentos aislados se utilizaron también los siguientes: A) butanol : etanol : agua (10:1:2 v/v [K. T. WILLIAMS y A. BEVENUE, *Science*, **113**, 582 (1951)]; B) acetato de etilo : piridina : agua (2:1:2 v/v [M. A. HORNBY y P. A. ISHERWOOD, *Biochem. J.*, **48**, 515 (1951)]; C) acetato de etilo : ácido acético : ácido fórmico : agua (18:3:1:4 v/v).

(140) S. M. PARTRIDGE y R. G. WESTALL, *Biochem. J.*, **42**, 268 (1948).

(141) S. M. PARTRIDGE, *Nature*, **164**, 443 (1949).

(142) L. HOUGH, *Nature*, **165**, 400 (1950).

(143) V. V. RACHINSKII y E. I. KUYAZYKOVA, *Doklady Akad. Nauk S.S.S.R.*, **85**, 119 (1952) [C. A., **47**, 448 (1953)].

(144) R. JOHANSON, *Nature*, **172**, 956 (1953).

(145) A. BEVENUE y K. T. WILLIAMS, *Arch. Biochem. y Biophys.*, **34**, 225 (1951).

(146) M. ABDEL-AKHER y F. SMITH, *J. Am. Chem. Soc.*, **73**, 5859 (1951).

(147) A. KUSIN, *Ber.*, **69**, 1041 (1936).

matogramas con un azúcar que avanza más que los anteriores y con p-anisidina dá una mancha poco intensa.

Realizando un cromatograma en escala preparativa a base de extender la muestra de glucosa tratada sobre la línea de partida, y tras su desarrollo se extrajo con agua la banda correspondiente a la mancha citada después de localizarla, y se concentró el extracto; se hicieron varios cromatogramas en los que se habían puesto muestras de gliceraldehido y dihidroxiacetona, se utilizaron los varios disolventes y reveladores ya referidos, y se observó en todos ellos la correspondencia del R_f y demás características de la substancia problema con la que mostraba la dihidroxiacetona tipo.

Según WOLFROM y LEWIS (62) era previsible que la glucosa sufriera a temperatura ambiente muchas reacciones secundarias y, de hecho, ellos encontraron que en sus experimentos a 35° C, a los 5 días se había formado una mezcla de glucosa (63,5 %), fructosa (31 %), manosa (2,5 %) y un 3 % de otra substancia, probablemente ácido sacarínico.

En nuestros experimentos a baño de maría los cromatogramas correspondientes son algo más complejos a partir de un cierto tiempo. Las tomas de muestras se hicieron al cabo de 1, 10, 45 y 90 minutos bloqueándose inmediatamente el pH de la muestra tomada con ácido oxálico que a la vez precipitaba iones calcio, separando a continuación el precipitado por simple filtración (*). Se observa que los cromatogramas que corresponden a las muestras tomadas después de 1/2 y 1 minuto no difieren prácticamente del patrón correspondiente a la glucosa sin tratar. En cambio, son muy distintos de ésta, aunque análogos entre sí, los cromatogramas correspondientes a 10, 45 y 90 minutos. En ellos se detectan claramente glucosa, fructosa, manosa y psicosa, más una zona rojiza que parcialmente se superpone a la psicosa, y fructosa. En cromatogramas repetidos puede considerarse como segura la presencia de xilosa y lixosa aunque no se descarta la de trazas de arabinosa y ribosa. A estas pentosas les sigue una mancha parda debida a una cetopentosa (con resorcina en clorhídrico da color azul) y aislada y recromatografiada paralelamente a un epimerizado de xilosa en su primera etapa se corresponde con la xilulosa. Todavía se aprecian dos manchas amarillas que se mueven a la misma velocidad que el gliceraldehido y la dihidroxiacetona respectivamente en los sucesivos disolventes ensayados, coincidiendo también sus tonalidades al revelar los

(* En los primeros ensayos se procedió a desionizar la disolución antes de concentrarla y cromatografiarla, recurriendo a las resinas de cambio de ión Amberlita IR-4B (OH) y Amberlita IR-120 (H+) pero como quiera que puede surgir la duda de epimerizaciones por causa de éstas y puesto que, aún sin desionizar, resultaban cromatogramas bastante claros se prescindió de su utilización.

cromatogramas con p-anisidina y ftalato ácido de anilina. No encontramos ninguna otra mancha más veloz, que pudiera atribuirse a 4-desoxi-3-oxo-D-fructosa (148), a metilgliosol o a acetol; sobre todo esta última substancia esperábamos que apareciera puesto que SATTLER y ZERBAN (149) se esforzaron en demostrar que cuando la fructosa se trata con agua de cal se forma una fuerte proporción de acetol y escasa de metilglioxal y al fin y al cabo fructosa sí que se forma en nuestro caso y queda, por tanto, sometida a la acción alcalina.

En los primeros cromatogramas nos habían pasado desapercibidos, por quedar un poco enmascarados, por lo menos dos manchas de heptulosas, una de ellas es sin duda la sedoheptulosa (150) (151) que fue detectada en procesos de fotosíntesis normal y que ahora nosotros mostramos como una consecuencia explicable por las fragmentaciones y recombinaciones que se superponen a la transposición de Lobry que en otro tiempo se suponía como único fenómeno en el tratamiento alcalino de azúcares. En realidad, ni aun siquiera en las condiciones suaves en que casi todos los investigadores habían trabajado hasta ahora el fenómeno era puro. Pero en la forma en que nosotros hemos realizado nuestras experiencias la superposición de fenómenos se hace manifiesta sin llegar a ser tan compleja, que tuvieran lugar tantas interconversiones como teóricamente pueden suceder. En esto consideramos haber alcanzado unas condiciones muy ventajosas de trabajo, puesto que en tiempo muy breve (10 minutos han bastado generalmente) sucedían las interconversiones más representativas, precisamente muchas de las mismas que por vía bioquímica producen la síntesis de los eslabones básicos en la formación de material hidrocarbonado de animales y plantas.

En cromatogramas aparte se comprobó la presencia, en escasa proporción, de las lactonas de los ácidos sacarínicos al revelarlas con hidroxilamina y cloruro férrico por sucesiva formación «in situ» de los ácidos hidroxámicos. La formación de estos ácidos en caliente no aparece incrementada respecto a lo ocurrido en frío al cabo de diez horas, más bien aparece disminuída.

La identificación por uso sucesivo de hidroxilamina y cloruro férrico, según el método de Abdel-Akher (146) tiene varias dificultades: una se presenta en los ácidos en forma libre, ya que requieren la previa esterificación y otra cuando simultáneamente hay aldehidos y cetonas de bajo peso molecular, concretamente gliceraldehido y dihidroxiacetona tan fre-

(148) G. MACHELL y G. N. RICHARDS, *J. Chem. Soc.*, 193E (1960).

(149) L. SATTLER y F. W. ZERBAN, *Ind. Eng. Chem.*, 41, 1401 (1949).

(150) A. A. BRNSON, J. A. BASSEAN y M. CALVIN, *J. Am. Chem. Soc.*, 73, 2970 (1951).

(151) B. L. HORECKER y P. Z. SMYRNIOTIS, *J. Am. Chem. Soc.*, 74, 2123 (1952).

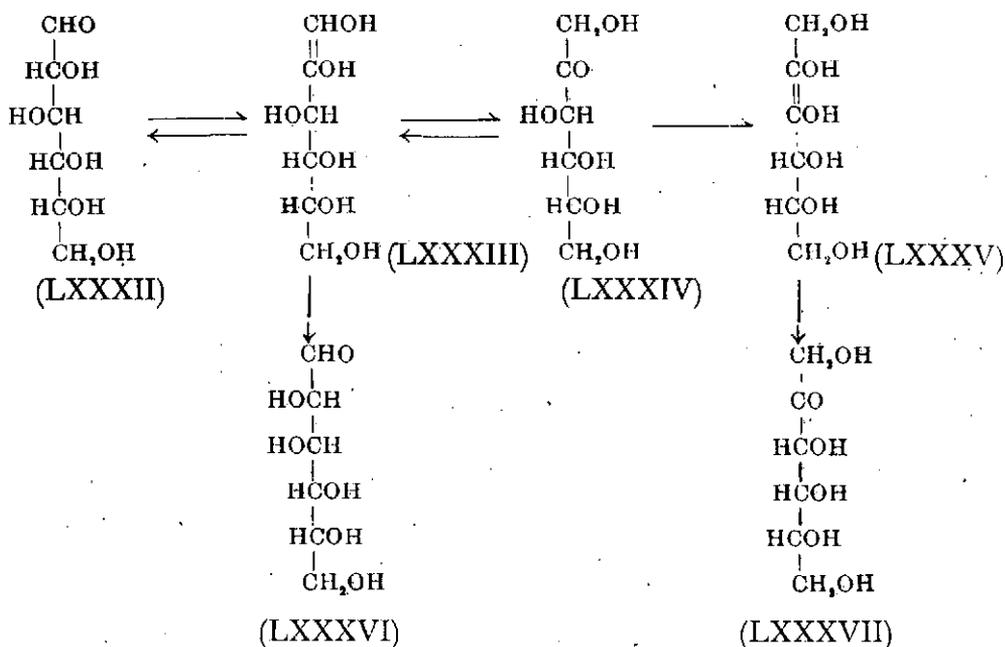


cuentes, que dan los característicos tonos rojizos de los ácidos, lo que puede conducir a errores (*).

Pasemos a comentar o justificar los diversos productos considerados como existentes, refiriéndonos en primer lugar a las etapas de formación de isómeros y demás productos secundarios de la glucosa:

a) *Formación de manosa, fructosa y psicosa.*

Siguiendo el supuesto de la formación intermedia de enodiolés la marcha de estas transposiciones sería:

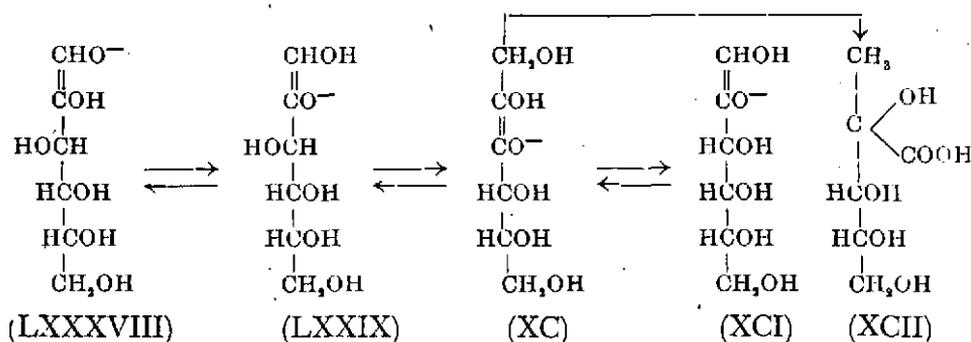


En él queda clara la transposición de glucosa (LXXXII) a manosa (LXXXVI) y fructosa (LXXXIV) a través de un enodiol en 1-2 (LXXXIII). Con todo, el dato más interesante es el de formación de psicosa (LXXXVII) ya que su presencia supone a su vez una confirmación de la etapa intermedia del enodiol en 2-3 (LXXXV). Este mismo esquema es comparable al que proponen KENNER y RICHARDS (124) para justificar la formación de glucosarínicos (CI) a partir de 1-O-metilfructosa, glucosa

(*) Hacemos constar que no hemos pretendido identificar los sacarínicos formados puesto que su estudio está realizado con bastante detalle por KENNER y colaboradores.



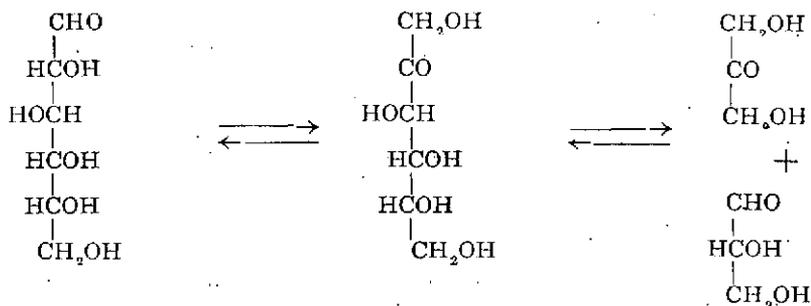
y fructosa; estos autores adoptan la forma iónica para la representación de cada etapa en su esquema que adjuntamos



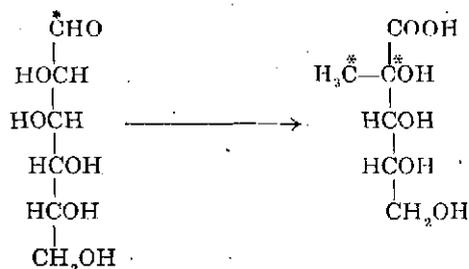
las formas iónicas (LXXXVIII) y (LXXXIX) se corresponderían con la enodiol (LXXXIII) del esquema anterior disociado en uno u otro de los OH, que es tanto como considerarlas como formas monoiónicas de glucosa y fructosa respectivamente. El anión (XC) se correspondería con una de las formas de disociación del supuesto enodiol (LXXXV) del primer esquema, forma que es fundamental, tanto para la posibilidad de epimerización en C-3 que conduciría a la psicosa (XCI), como para explicar la formación de glucosarínico (XCII); aún cabría teóricamente otra forma monoiónica que tuviese la carga sobre el C-2 lo cual podría justificar también la formación de psicosa. Sin embargo la estructura (XC) es la que mejor explica la formación de sacarínicos puesto que en ella resulta más fácil la expulsión del ión OH por su mayor grado de hidrogenación en carbono 1 hacia el cual hay menos impedimento del flujo electrónico.

b) Formación de gliceraldehído y dihidroxiacetona

La aparición de gliceraldehído y dihidroxiacetona debe atribuirse a un simple fenómeno de desaldolización previo tránsito a cetosa según el esquema clásico:

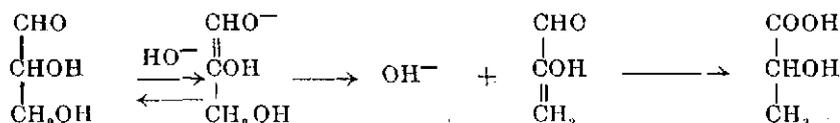


Esta reacción de desaldolización es en realidad reversible, como pudo demostrar SOWDEN (126), que partiendo de manosa originalmente marcada con C¹⁴ en el carbono 1 aparecían marcados los carbonos 3, tanto de la forma cetosa como de la aldosa, de las triosas resultantes también pueden aparecer glucosacarínicos parcialmente marcados en el carbono metílico, o incluso en el carbono cuaternario, moléculas que resultarían según el siguiente esquema:



La existencia de una escisión previa y de una recombinación posterior por el carbono terminal justificaría el tránsito desde glucosa a galactosa sin necesidad de etapas intermedias de epimerización sucesiva. Sin embargo, en nuestros cromatogramas la galactosa no llega a hacerse manifiesta pero tampoco llega a descartarse su presencia en forma de trazas.

La aparición en nuestros cromatogramas de las triosas en abundante proporción justifica el predominio de ácido láctico sobre glucosacarina encontrados por KENNER y RICHARDS (124) cuando someten la glucosa a la acción del hidróxido cálcico a temperatura ambiente en ausencia de oxígeno, pese a que en dichas condiciones las triosas se manifiestan sólo durante el intervalo comprendido entre las 25 y 72 horas, lo que podríamos explicar considerando que, en sus condiciones de trabajo, antes de este intervalo, no llegan a formarse triosas y que después se transforman en láctico o se recombinan a más velocidad que a la que se forman. En todo caso el hecho de que predomine el láctico sobre el glucosacarínico en esas condiciones es debido, probablemente, a la mayor simplicidad del proceso de desaldolización respecto al de eliminación de un anión que se precisa para el paso a glucosacarínico. He aquí el esquema que se admite para la formación de láctico a partir del gliceraldehido:

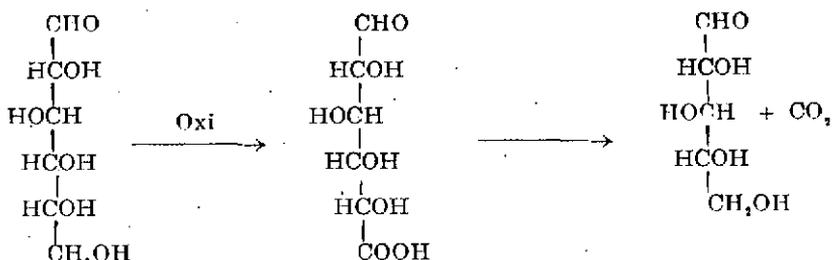


Nuestros experimentos muestran la aparición simultánea y, casi con seguridad, en cantidades equimoleculares, de aldehído glicérico y de dihidroxiacetona, lo que es una justificación de que la forma molecular que sufre la escisión en triosas no es en realidad la glucosa original sino la fructosa formada de aquella. Esta observación concuerda igualmente con la más rápida aparición de láctico, cuando se usa como sustrato la fructosa en frío y ausencia de oxígeno, que cuando se utiliza la glucosa, ya que entonces aparece adelantada la primera etapa del equilibrio tautómero fundamental. Este criterio contradice a la opinión de WOHL (152), que suponía que la fisión de la glucosa tenía lugar sobre una estructura 3-desoxiglucosona, mientras que para nosotros la escisión sucede sobre la estructura cetosa, lo que justifica el retraso notado para la glucosa con respecto a lo que ocurre en la fructosa.

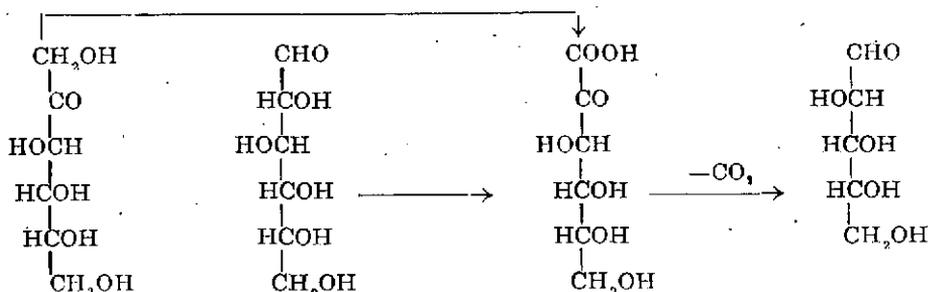
c) *Formación de aldo y cetopentosas.*

Existen en principio las siguientes posibilidades:

c₁) Oxidación hasta ácido en el carbono 6 de la glucosa o de los restantes azúcares producidos, y descarboxilación posterior. En este sentido la D-glucosa produciría D-xilosa que, a su vez, podría sufrir distintas isomerizaciones a causa del medio alcalino.

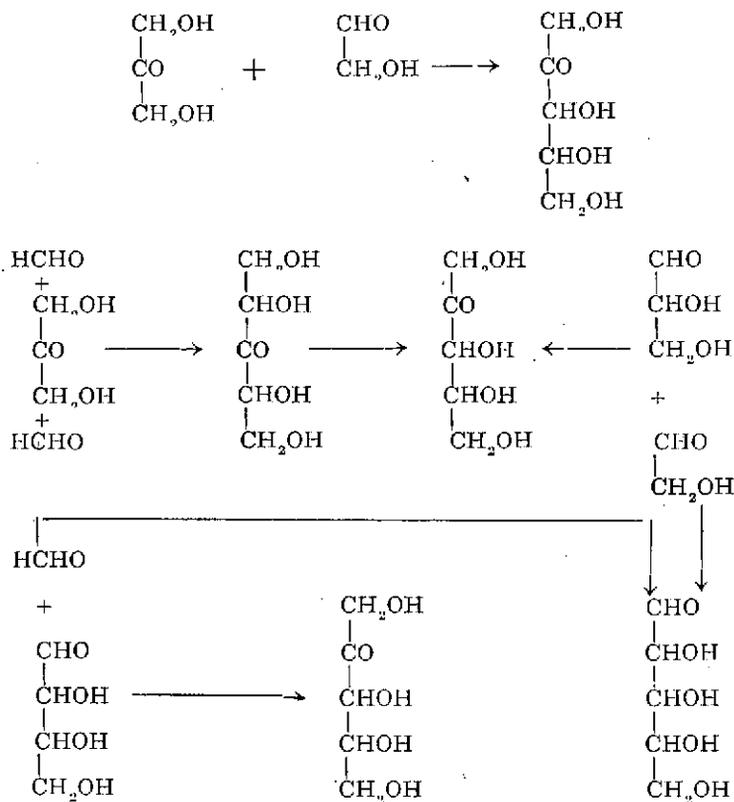


c₂) oxidación hasta el grado máximo de los carbonos 1 y 2 de las aldosas o del 1 de las cetosas y posterior descarboxilación de los ácidos 2-cetohexónicos resultantes.



(152) WOHL, *Z. angew. Chem.*, 20, 1169 (1907).

β) un esquema de recombinaciones no exhaustivo es el que sigue:



Nuestro punto de vista es que suceden simultáneamente las reacciones de copulación de dihidroxiacetona y de aldehído glicérico con gliceraldehído ya que en cuanto empiezan a aparecer en los cromatogramas gliceraldehído y dihidroxiacetona es cuando también aparecen una cetopentosa fundamental y dos aldopentosas predominantes, no produciéndose desequilibrio, al menos en apariencia, en las cantidades relativas de ellas al avanzar el tiempo de acción alcalina, aunque las manchas de las pentosas respectivas sí que son cada vez más intensas. De ser el cetocompuesto camino obligado para las aldopentosas debería apreciarse un predominio de cetopentosas en los primeros minutos en cuanto se hace manifiesta la presencia de triosa. Por otro lado el hecho de que no haya prelación en el orden de aparición de las ceto y aldopentosas respecto a las triosas hace pensar que su formación no es más rápida que la escisión de hexosas y, por supuesto, se descarta en nuestras condiciones la posibilidad de que se formen a través de la previa oxidación de hexosas a ácidos urónicos u óni-

cos puesto que en dicho caso las pentosas resultantes se formarían probablemente antes de la aparición de las triosas.

d) Formación de heptulosas

Después del comentario realizado al explicar la formación de pentosas es perfectamente justificable el que se formen heptulosas. En efecto, una vez confirmada la formación de triosas y la posibilidad de hacerse la fragmentación de las hexosas en moléculas de 4 y 2 carbonos o en tres porciones de dos, es natural que estos fragmentos puedan recombinarse. Es más, dada la gran reactividad de las tetrasas y biosas a causa de su estructura abierta se explica bien el porqué no se detectan tetrasas ni biosas; puesto que las segundas se sustraerán continuamente de la mezcla de reacción para combinarse con las triosas y dar pentosas y las primeras se combinarán igualmente con las triosas para dar heptulosas, abundando de manera particularísima la aparición de sedoheptulosa.

Es interesante destacar que en la zona de las heptulosas el aspecto del cromatograma obtenido es idéntico para la glucosa (y otros azúcares) y para un extracto de la planta «*Sedum spectabile*, Bor.» (planta callera) obtenido por nosotros de manera semejante a como lo hicieron LA FORGE y HUDSON (153). En ambos casos se apreciaba una mancha azul muy característica que se corresponde con sedoheptulosa y otra amarillo-verdosa que a primera vista podría considerarse como resultante de la composición cromática de una mancha amarilla y otra azul. En efecto, repetimos varios cromatogramas y observando la evolución de colores durante el proceso de revelado, queda claro que dicha segunda mancha debe corresponderse a una mezcla con predominio de una cetohexosa, probablemente sorbosa; en ésta y otras cetohexosas era característica una evolución de colores en el orden, anaranjado → verde intenso → verde parduzco, que también se nota para la mezcla en estudio. En cromatogramas de repetición utilizando como disolventes fenol saturado de agua (pH 5,5) y acetato de etilo : ácido acético : agua (3:1:3 v/v), según recomendaciones de NOGGLE (154), la mancha más pura se confirma como de sedoheptulosa (altroheptulosa) y la que está impurificada, por una cetohexosa, se debe a manoheptulosa.

La síntesis de heptulosa puede explicarse de varias maneras:

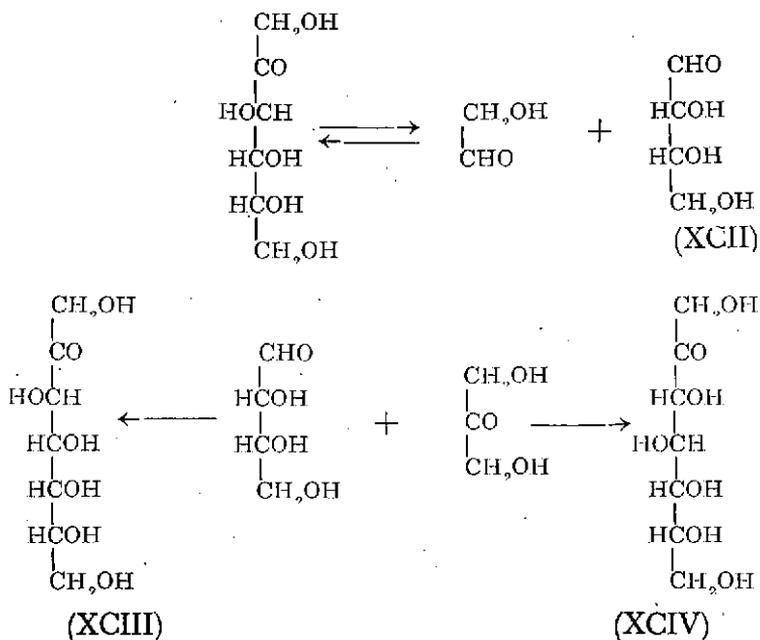
d₁) por reacción de tetrasas con dihidroxiacetona, materiales ambos que resultan de una fragmentación inicial de la glucosa, más bien de la

(153) F. B. LA FORGE y C. S. HUDSON, *J. Biol. Chem.*, **30**, 61 (1917).

(154) G. R. NOGGLE, *Arch. Biochem. y Biophys.*, **43**, 23f (1953).

fructosa al igual que en las fragmentaciones bioquímicas. La fragmentación en triosas no ofrece duda, puesto que en los cromatogramas quedan manifiestas la aldosa y cetosa correspondiente. Sin embargo, la fragmentación en tetrosa y biosa quedaría siempre incontrolada si no fuera por la aparición de heptulosas a las que ahora hacemos alusión; no obstante, no es de extrañar que pasen desapercibidas las tetrosas, aun con reactivos apropiados para éstas, puesto que es conocida la extraordinaria reactividad de estos azúcares de cadena abierta en estado naciente, en los que no existe posibilidad de ciclación estabilizante.

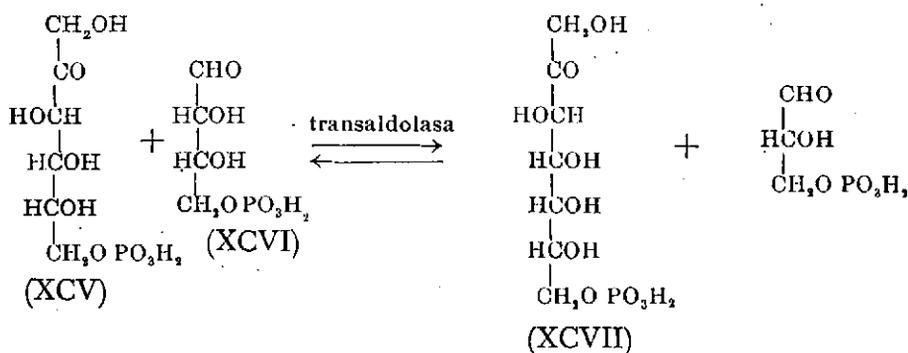
En principio, la tetrosa que fundamentalmente debe formarse es la eritrosa (XCII) la cual se soldaría con la dihidroxiacetona de modo que los dos OH asentados sobre los carbonos del nuevo enlace queden en posición *trans*, pudiendo surgir en consecuencia la sedoheptulosa (XCIII) (*) o la glucoheptulosa (XCIV), pero por razones de impedimento estérico parece más probable la segunda que la primera. He aquí los esquemas de fragmentación de la fructosa y los de recombinación de fragmentos hasta heptulosas:



(*) La configuración de la sedoheptulosa como D-alloheptulosa fue establecida en 1932 por ERTLER (V. ERTLER, *Collection Czechoslov. Chem. Commun.*, 4, 513 (1932) y confirmada más tarde por RICHTMYER (N. K. RICHTMYER, R. M. HANN y C. S. HUDSON, *J. Am. Chem. Soc.*, 61, 343 (1939).

Como quiera que aparece abundancia de sedoheptulosa, pero no de glucoheptulosa, es de suponer que no es este mecanismo el que prepondera.

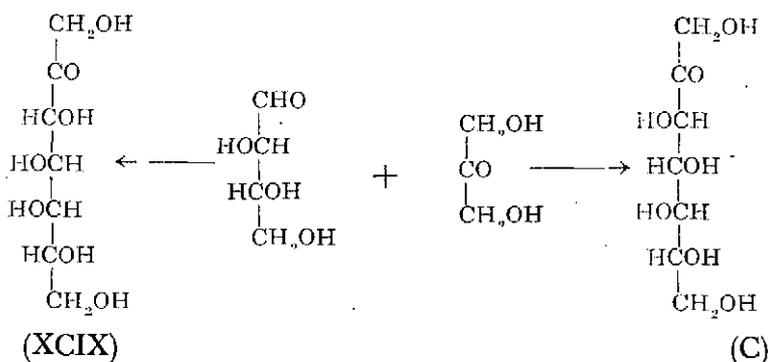
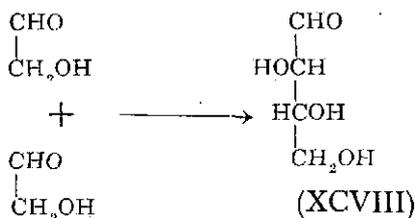
Sin embargo, si se tiene en cuenta la manera en que se forma 7-fosfato de sedoheptulosa (XCVII) en la Naturaleza, a partir del 6 fosfato de fructosa (XCV), como precursor del 4-fosfato de eritrosa (XCVI) y como donador del fragmento triosa-cetósico, cabe pensar que hay preferencia para la formación de sedoheptulosa, de modo que la estructura de la heptulosa resultante tenga la mitad superior de la fructosa. Claro es que en la síntesis bioquímica siempre cabe asignar la misión orientadora a la especificidad del enzima, en este caso la transaldolasa: He aquí el esquema de la Naturaleza.



d₂) cabe la posibilidad de que estas tetrasas sean incluso un intermedio de la unión de dos moléculas de glicolaldehído, ya que este último material resulta de imprescindible presencia para justificar la aparición de pentosas, una vez que los caminos de oxidación y de descarboxilación de hexosas no parecen que sean los seguidos en nuestro caso, como dijimos en el comentario sobre formación de pentosas. No obstante, este camino no justificaría la estructura de altroheptulosa, ni aún la de manoheptulosa, que muestran las dos cetoheptulosas más abundantes entre las encontradas, puesto que la tetrasa básica sería la treosa (XCVIII) que conduciría a la idoheptulosa (C) o a la galactoheptulosa (XCIX). He aquí

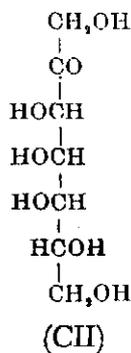
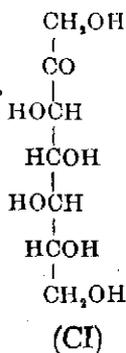
Ni el azúcar natural ni el obtenido por síntesis por WOLFROM y colegas [M. L. WOLFROM, J. M. BERKBILE y A. THOMPSON, *J. Am. Chem. Soc.*, 74, 2197 (1952)] se han podido cristalizar, pero en cambio el anhidroazúcar resultante de ellos, la sedoheptulosa, da cristales con facilidad sobre los que se han realizado los estudios estructurales necesarios, por un lado por WOLFROM y colaboradores, y por otro HUDSON y colaboradores [W. T. HASKING, B. M. HANN y C. S. HUDSON, *J. Am. Chem. Soc.*, 74, 2198 (1952); J. W. PRATT, N. K. RICHMEYER y C. S. HUDSON, *J. Am. Chem. Soc.*, 74, 2200 (1952)].

los esquemas que representarían la formación de treosa y de las heptulosas citadas:

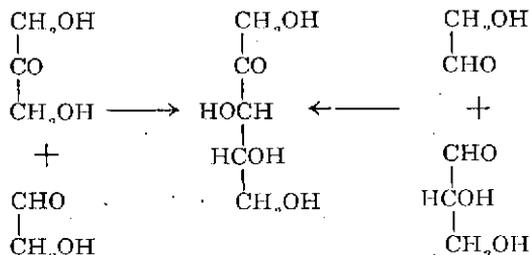


y si encontramos prevista la posición del OH α carbonílico (a la izquierda) por la propia naturaleza de la síntesis transcetolásica las heptulosas probables serán la glucoheptulosa (CI) y la taloheptulosa (CII) con predominio de la primera. Aunque no puede descartarse del todo la presencia de alguna de estas heptulosas, sí que puede asegurarse que de existir, no están en cantidad significativa, podrían ir incluidas en el ligero rastro que acompaña a las dos principales, sedoheptulosa y manoheptulosa.

He aquí las fórmulas de las dos heptulosas de referencia:

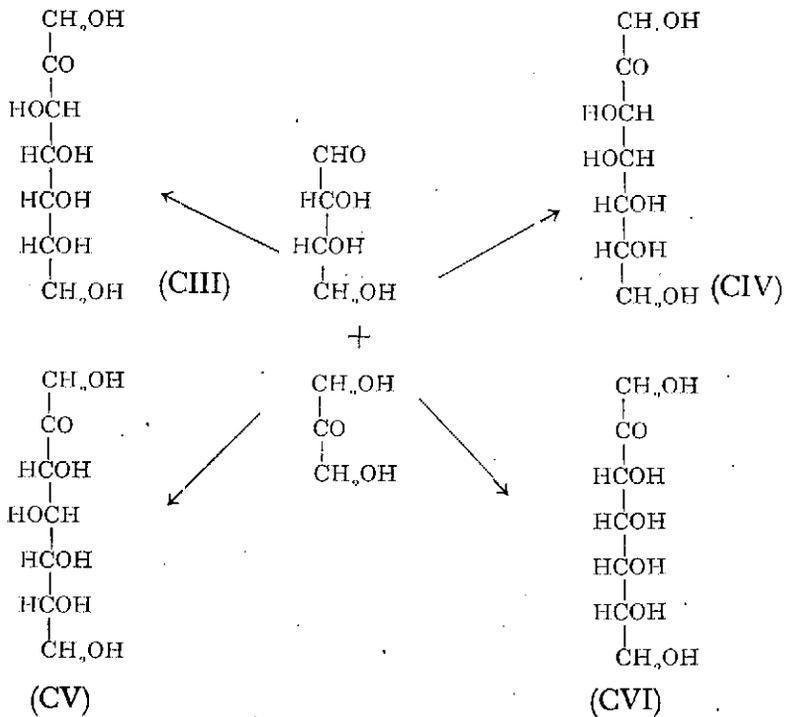


d₃) Hay un hecho interesante a considerar, que es la aparición de pentosas y más concretamente de cetopentosas. Así, entre los productos formados ya se ha citado por ejemplo la formación de xilulosa que puede surgir, tanto a partir de dihidroxiacetona y aldehído glicólico por síntesis aldólica, como desde aldehídos glicólicos y glicérico por síntesis acilónica,



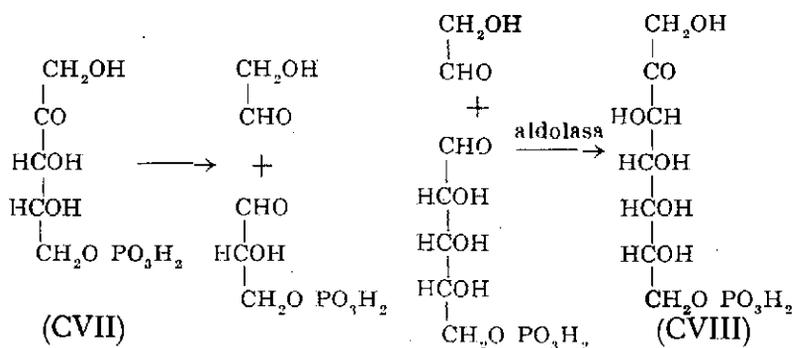
Uno u otro mecanismo exigen la presencia de aldehído glicólico activo, que debe proceder de la escisión de la fructosa para dar a la vez eritrosa. Esta última, combinándose con dihidroxiacetona daría sedoheptulosa o glucoheptulosa si se prevé una combinación en *trans* sin restricciones y sedoheptulosa o manoheptulosa si se considera predeterminada la posición del OH α -carbonílico y variable la del OH en β . Esta última posibilidad justificaría muy bien el porqué estas dos heptulosas son las más abundantes. Existe una tercera posibilidad que es suponer falta absoluta de restricción y en consecuencia podrán quedar todos los OH a un lado, estructura típica de la aloheptulosa (CVI). Por ello, además de las dos manchas fundamentales debidas a sedoheptulosa (CIII) y manoheptulosa (CIV) no se descarta la posibilidad de rastros de glucoheptulosa (CV) y aloheptulosa (CVI).

He aquí las cuatro posibilidades a partir de eritrosa:



Sin embargo, las pentosas pueden seguir también por otro camino que es el que defienden HORECKER y SMYRNIOTIS (151) para justificar la aparición de fosfato de sedoheptulosa entre los primeros productos de la fotosíntesis, considerando que surgen de la ribulosa cuya síntesis debe tener lugar con anterioridad; dichos autores han identificado fosfato de sedoheptulosa como un producto del metabolismo del fosfato de pentosas con enzimas purificadas de origen animal, concretamente con aldolasa muscular, comprobando que tales enzimas tienen mayor actividad frente al 5 fosfato de la ribulosa (CVII) que cuando se utiliza el de la ribosa. Por otro lado, los referidos autores indican que el fosfato de heptulosa se forma también por acción del mismo enzima cuando se incubaba D-eritrosa con difosfato de hexosa (esta última como fuente de dihidroxiacetona), lo que les lleva a creer que la transformación de pentosas en heptulosas se hace vía tetrosa. No obstante, nosotros, basándonos en la referencia de los mismos autores de que de dos moléculas de fosfato de pentosa se obtiene aproximadamente una molécula de fosfato de sedoheptulosa y

media de fosfato de triosa, creemos debe pensarse en que existe la fisión de pentosa en triosa y biosa como fuente de triosa, pero que una parte de esta última se consume en reacciones secundarias; el aldehído glicólico activo resultante es el que fundamentalmente se habrá consumido en reaccionar con una molécula, de aldopentosa, concretamente de ribosa para producir la sedoheptulosa (CVIII). Debe considerarse, por tanto, como donador del glicólico activo a la cetopentosa y como aceptor a la aldopentosa correspondiente. He aquí el esquema que suponemos:



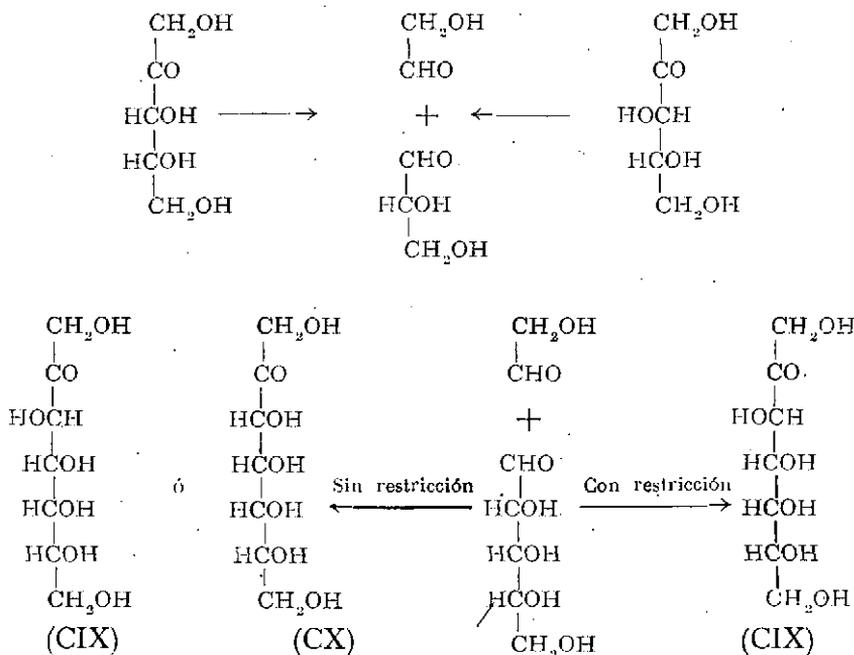
De la misma manera HOUGH y JONES (155) sintetizan sedoheptulosa a partir de los mismos substratos.

Recogemos de KARLSON (156) que en la naturaleza el aldehído glicólico activo, que queda unido al coenzima pirofosfato de tiamina (TPP), es el que reacciona con otro aldehído (aldopentosa en este caso) para dar una cetosa (síntesis aciloínica o reacción transcetolásica); como se origina por vía enzimática ha de proceder de una cetosa cuya ordenación estérica en el carbono 3 sea la de la fructosa, debido a la especificidad del enzima correspondiente. Por ello, no puede ser el fosfato de ribulosa el que interviene sino el de xilulosa. En nuestro caso, aunque existen las dos cetopentosas, predomina una la xilulosa; lo mismo ocurre con las aldopentosas que aunque están las cuatro predominan la pareja lioxo-xilosa y en menor proporción arabinosa. Por lo tanto, quizá la xilulosa esté actuando como manantial de glicólico en adición a la fructosa, que pronto se forma como intermedio de la isomerización de Lobry y pronto sufre escisiones. Este glicólico se adicionará sobre pentosas para dar heptulosas, y cuando concretamente se hace sobre la ribosa surgirán como posibles la sedoheptulosa (CIX) y aloheptulosa (CX), pero funda-

(155) L. HOUGH y J. K. N. JONES, *J. Chem. Soc.*, 4052 (1952).

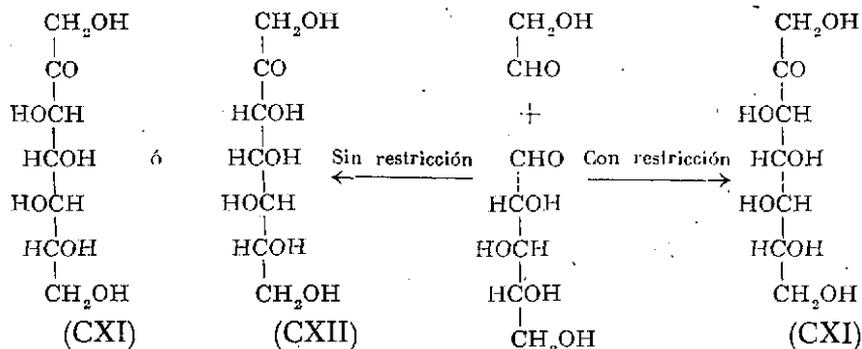
(156) P. KARLSON (traducción de F. POLINO), «Manual de Bioquímica», Ed. MAJUN, S. A. Barcelona (1962), p. 248.

mentalmente la primera, prevista la restricción posicional del OH α -carbonílico sobre el carbono 3.

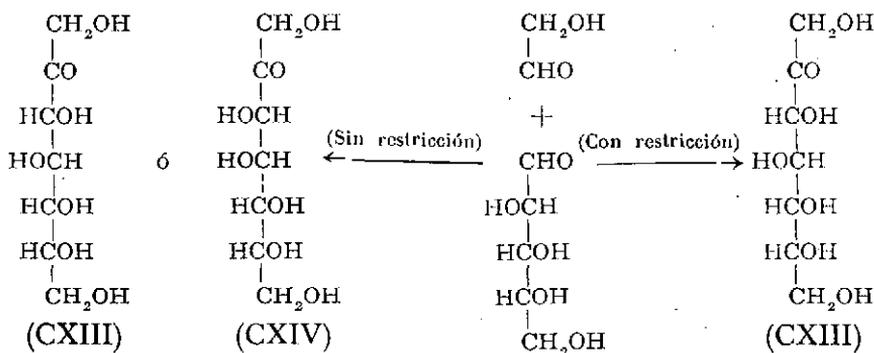


A primera vista esta substracción de ribosa que pasa a heptulosa podría justificar la escasez de su presencia. También tendría sentido el admitir que la causa de que la xilocetona predomine sobre la ribulosa está en la intervención continuada de esta última como donadora de glicólico, ya que las reacciones en medio alcalino no suceden con la marcada especificidad de las reacciones enzimáticas.

Precisamente por esta falta de especificidad es previsible que surgieran las heptulosas correspondientes a las otras aldopentosas que pueden sufrir también la reacción transcetolásica, por lo menos las que corresponden a xilosa, es decir, guloheptulosa (CXII) e idoheptulosa (CXI), si no se admite restricción, y sólo la segunda si el OH del carbono 3 lo consideramos preorientado.



Por último, se aprecia que la arabinosa se encuentra en proporción menor que la xilosa y esto hace pensar que una parte de este azúcar interviene también fácilmente en la síntesis acilónica de manoheptulosa (CXIV) y glucoheptulosa (CXIII) si no se prevé restricción y sólo de la primera si se admite la predicción.



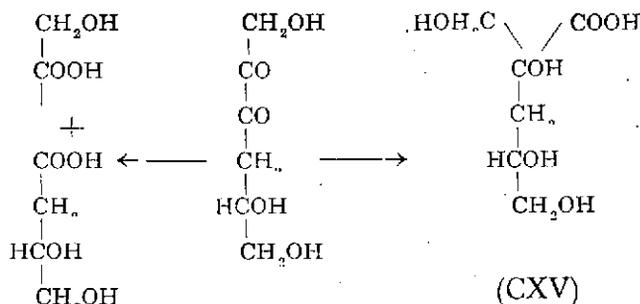
Esta observación es de interés puesto que nos encontramos con que las dos pentosas más escasas, ribosa y arabinosa, están compensadas por la presencia de sedoheptulosa y manoheptulosa que abundan en orden inverso al de estas pentosas precursoras.

En resumen, en el presente caso puede ser explicada la formación de heptulosas tanto por vía tetrosa como por vía pentosa, pero lo probable es que se simultaneen los mecanismos aunque con predominio del segundo. En el de vía tetrosa debe considerarse que el substrato es un fragmento íntegro con la estructura de los cuatro carbonos finales de la fructosa. más que una tetrosa de resíntesis intermedia.



e) *Formación de lactonas de sacarínicos*

Realmente, según las opiniones reinantes, sería fácil justificar la formación de sacarínicos si se confirmara la formación de compuestos dicarbonílicos. No obstante, como la formación de dichos compuestos no ha podido demostrarse en nuestro caso de manera tan fácil como en el caso de azúcares sustituidos en sus posiciones 3 ó 4, queda explicado el porqué la proporción de sacarínicos formados no es abundante. El compuesto dicarbonílico posible sería precursor, bien de ácido isosacarínico (CXV) por reorganización, o bien de una mezcla de ácidos glicólico y dihidroxibutírico por fragmentación:



En la práctica se presentan sus lactonas en vez de los ácidos libres; hay que admitir que en nuestro caso existen tales compuestos carbonílicos aunque en pequeña proporción.

C) *Acción del hidróxido bórico*

Se utilizó hidróxido bórico en disolución saturada (0,033 N). Los cromatogramas a temperatura ambiente recuerdan bastante a los del hidróxido cálcico no apreciándose diferencias cualitativas.

En cambio en cuanto a los cromatogramas de isomerizados a baño de maría es de destacar la mayor complejidad de éstos a partir de los 10 minutos, pudiendo referir que además de detectarse azúcares ya encontrados en el caso del hidróxido cálcico se aprecian las siguientes peculiaridades:

a) el rastro de azúcares es casi continuo desde la línea de partida hasta cerca del frente de disolvente, aunque se distinguen relativamente bien las cinturas separadoras de las manchas individuales más características. Es de destacar la continua presencia de manchas desde la línea de partida hasta la glucosa las cuales se deben a polímeros de dicho

azúcar e incluso a otros monosacáridos resultantes de la acción alcalina, principalmente heptulosas; estas últimas se detectaron en cromatogramas aparte revelados con orcina predominando dos de ellas, sedoheptulosa y manoheptulosa, con mayor abundancia de sedoheptulosa.

b) entre las manchas debidas a gliceraldehido y dihidroxiacetona se detecta una elongada, probablemente doble, aunque no hemos podido comprobarlo, de color pardo-amarillento con ftalato ácido de anilina y clorhidrato de p-anisidina, y rojiza con resorcina en clorhidrato identificable con una 6-desoxicetona (*).

c) probablemente existen también las aldosas epímeras correspondientes a estas 6-desoxicetosas pero en proporción tan pequeña que no pudieron detectarse con claridad.

d) se detecta la presencia de lactaldehido. compuesto que justifica la formación de 6-desoxicetosas.

e) clara presencia de acetol que será en realidad la substancia primaria de la que surge el lactaldehido.

f) metilglioxal resultante por oxidación de acetol.

La presencia de acetol reafirma las opiniones de SATTLER y ZERBAN (149) que se esforzaron en demostrar que este compuesto y no el metilglioxal es el que se origina primeramente en una de las frecuentes degradaciones de las hexosas. En realidad, una clara confirmación de su existencia nos la da tanto su aparición como tal en el cromatograma como la simultánea presencia de lactaldehido, que es de suponer surge de aquel por epimerización de Lobry; más adelante explicaremos la posible marcha para la formación de uno y otro.

Seguidamente se esquematizan las reacciones por las que habrá tenido lugar la formación de los compuestos últimamente referidos ya que la producción de pentosas y la de gliceraldehido y dihidroxiacetona sucederá por los mismos caminos que se indicaron para la acción del hidróxido cálcico, sobre el sustrato que ahora nos ocupa. He aquí dichas reacciones:

(* Habiéndose sospechado que se trataba probablemente de un compuesto comparable a los que HOUCH y JONES (155) obtienen por tratamiento alcalino o por acción enzimática sobre lactaldehido y dihidroxiacetona, tanto añadida como tal, como cuando ésta se forma «in situ» a partir de fructosa o de su fosfato, se repitieron los experimentos de los citados autores y compararon los cromatogramas obtenidos para ambos casos. En cromatogramas muy largos y de prolongado desarrollo se confirmaron las dos 6-desoxicetosas probables: 6-desoxifruktosa y 6-desoxisorbitosa.

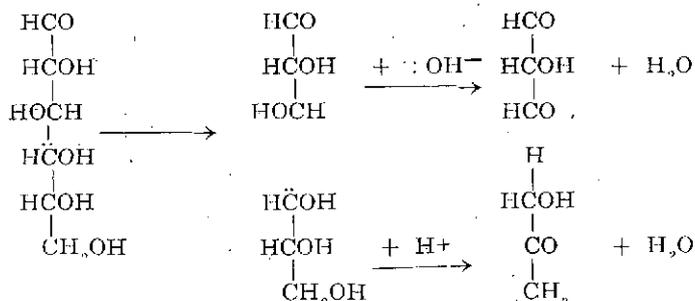
a) *Formación de polímeros*

Sin duda se trata de una eterificación ordinaria que es catalizada por iones OH^- . En efecto, se forman disacáridos y trisacáridos, no descartándose la posibilidad de otros polímeros de mayor grado. En realidad, no se ha pretendido identificarlos estructuralmente, aunque su presencia puede confirmarse al comprobar el R_f de los extractos de algunas bandas y los R_f de los productos de hidrólisis. Es de destacar que son fundamentalmente polímeros de glucosa, pero uno de ellos, que daba una zona amarillenta, corresponde a un polímero de la fructosa.

b) *Formación de metilglioxal, acetol y lactaldehído*

Los tres componentes son detectados con bastante seguridad, pero de ellos es el acetol el que predomina. Sin embargo, a lo largo de la bibliografía, desde los tiempos de PINKUS (82) hasta los trabajos relativamente recientes de NEUBERG y STRAUSS (157), se venía admitiendo la formación fundamental de metilglioxal, pese a que en el año 1932 BAUDISCH y DEUEL (158) demostraron que cuando se destila una disolución de glucosa en bicarbonato sódico al 5 % el material volátil era acetol y no metilglioxal. En un trabajo de 1949, SATTLER y ZERBAN (149) encuentran que las disoluciones acuosas de glucosa, fructosa y maltosa destiladas a volumen constante daban fuerte reacción positiva de acetol. En nuestro caso se trata de un medio mucho más alcalino que el utilizado por ellos confirmando la presencia de acetol, pero apreciándose también la de metilglioxal.

SATTLER y ZERBAN proponen el siguiente esquema:

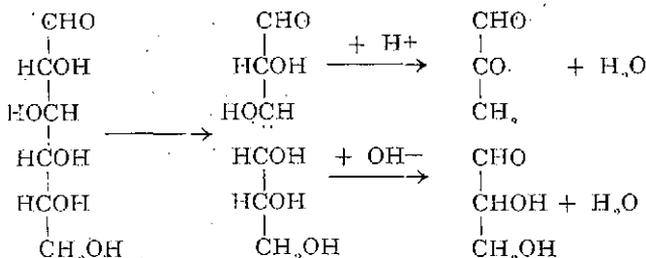


(157) G. NEUBERG y E. STRAUSS, *Archiv. Biochem.*, 7, 226 (1945).

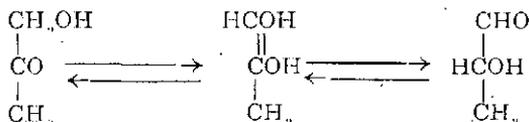
(158) O. BAUDISCH y H. J. DEUEL, *J. Am. Chem. Soc.*, 44, 1581 (1922).

En él se aprecia la formación de una molécula de «ácido glúcido» (*) y de otra de acetol. Aunque, por otro lado, el acetol podría formarse también a partir de metilglioxal por reacción de Cannizzaro es esto menos probable después de los trabajos citados de BAUDISCH y DEUEL en que demuestran que cuando se destila 1 gramo de metilglioxal se obtienen sólo trazas de acetol mientras que partiendo de 5 mg de glucosa en las mismas condiciones obtienen un destilado con clara reacción de dicho compuesto.

Como en nuestro caso observamos la presencia de metilglioxal es necesario admitir también la formación de éste en reacción directa, sólo que en menor cuantía. Podría proponerse la formación de fragmentos a partir de la glucosa en la que hubiera otra ordenación electrónica y, en efecto, la pareja de electrones que forman el enlace quedaría retenida por el fragmento aldehído y en consecuencia es éste el aceptor de hidrógeno, de tal manera que por un posterior intercambio de H y OH se produciría la estructura de metilglioxal. El otro fragmento aceptando un OH pasaría a gliceraldehído.



En lo que se refiere a la formación de lactaldehído no constituye dificultad el explicar su presencia una vez demostrada la de acetol. En realidad, es consecuencia de una simple isomerización del tipo cetosa-aldosa por acción alcalina en la que cabría admitir las mismas etapas para la transformación glucosa-fructosa aunque más simplificadas por la restricción de posibilidades:

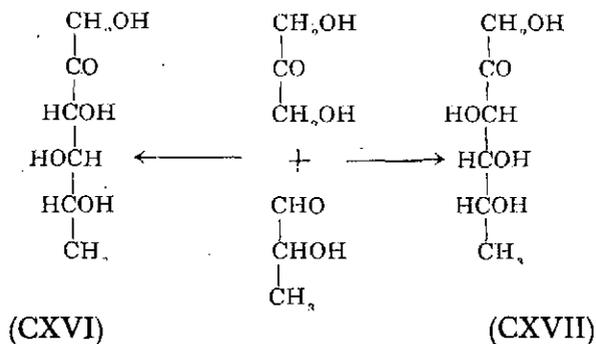


(*) El «ácido glúcido» avanzaba extraordinariamente, marchando casi en el frente del disolvente, por lo que, salvo en cromatogramas especiales, se dejaba salir fuera del papel.



c) *Formación de 6-desoxicetósas*

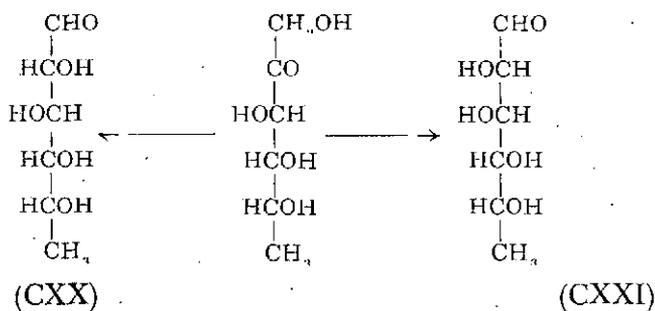
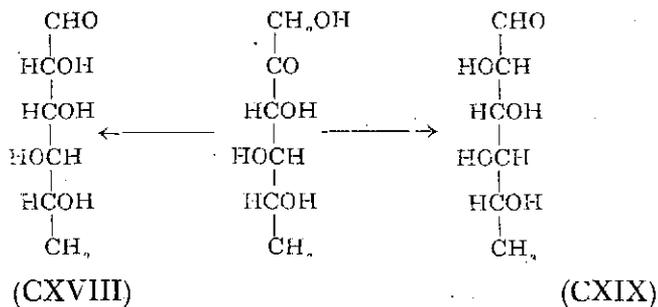
Aunque al principio exista la duda de si se trataba de una o de dos manchas se concluyó que eran dos y que se debían a la 6-desoxifruktosa (CXVII) y a la 6-desoxisorbosa (CXVI) que se formarán a partir del lactaldehído y dihidroxiacetona según el esquema:



Esta reacción, que sucede fácilmente «in vitro», es probable que no presente el camino que se sigue en la Naturaleza para la síntesis de la 6-desoxialdohexosas, ya que por ejemplo, con síntesis de este tipo no se han podido lograr la *L*-ramnosa y *L*-fucosa que con bastante frecuencia aparecen en la Naturaleza. Por supuesto que no puede descartarse la posibilidad de una isomerización en carbono-3 que sería necesaria para el paso de la 6-desoxi-*L*-sorbosa. Tampoco pueden descartarse sistemas como el de transmetilación, tal como el que propone CANTONI (159) al considerar algunos compuestos como la metionina como posibles donadores de metilo previa formación de complejos del estilo de la *S*-adenosil-metionina a expensas del adenosintrifosfato considerado por este autor como material fundamental para estas reacciones «in vivo».

e) caso de existir las sospechadas aldosas correspondientes a las 6-desoxicetósas referidas en el apartado anterior éstas serían: gulometilosa (CXVIII) e idometilosa (CXIX) las correspondientes a 6-desoxisorbosa, y quinovosa (CXX) y ramnosa (CXXI) los correspondientes a 6-desoxifruktosa

(159) G. L. CANTONI, *J. Am. Chem. Soc.*, 74, 2942 (1952).



f) la formación de heptulosa ya ha sido indicada. La más abundante es la sedoheptulosa y la otra su 4-epímero manohéptulosa, cuya presencia simultánea a la de la sedoheptulosa podría explicarse por las diversas teorías apuntadas al hablar de la acción del hidróxido de calcio siendo lo más fácil el suponer que se producen de eritrosa y de dihidroxiacetona por síntesis aldólica. Debe destacarse que el predominio de la sedoheptulosa es justificable porque en la soldadura de los fragmentos bases se favorece la creación de una disposición *trans* aunque no queda impedida totalmente la disposición *cis* que corresponde a la manohéptulosa.

D) Acción del hidróxido amónico

Son conocidos por la bibliografía los trabajos de HOUGH, JONES y RICHARDS (52) (160) de la acción del amoníaco sobre la glucosa en los que se investigan por un lado la formación de glioxalinas y por otro se identifican los azúcares resultantes por epimerización de la glucosa. En dicho trabajo se llega a la conclusión fundamental de que al cabo de 100 horas se alcanza el patrón definitivo en los cromatogramas, aun cuando la epimerización se inicia muy pronto. Se destaca que los cromatogramas son muy sencillos en los que respecta a azúcares de modo que prácticamente

(160) L. HOUGH, J. K. N. JONES y E. L. RICHARDS, *J. Chem. Soc.*, 3854 (1952).



sólo se detectan el 2-epímero manosa, la cetosa común fructosa, y, el 3-epímero de ésta, psicosa. Nosotros hemos repetido los experimentos con exacto resultado, trabajando a la temperatura ambiente.

Los experimentos en caliente a base de utilizar una disolución al 10 % de azúcar y al 1 % de amoníaco (*) en baño de maría durante 1, 10, 45 y 90 minutos se observa lo siguiente:

Al cabo de 1 minuto sólo puede detectarse el alargamiento de la mancha correspondiente a glucosa, sin embargo, nos aparece un polímero que se mueve a la misma velocidad que la maltosa y que probablemente es en efecto ésta pues por hidrólisis con ClH en las condiciones de Clerget dá exclusivamente glucosa.

A los 10 minutos es evidente la presencia de fructosa y la de manosa detectándose igualmente el polímero anteriormente citado; se nota una mancha tenue situada en la misma línea de partida correspondiente a un polímero de grado mayor.

A los 45 minutos, el patrón resultante es completo, detectándose, además de las manchas debidas a glucosa, manosa y glucobiosa las que siguen:

a) una debida indudablemente a psicosa la cual resultará a partir de un enodiol con el doble enlace en 2-3 (**).

A los 90 minutos no se aprecia diferencia alguna con el cromatograma correspondiente a los 45 minutos.

La identificación de psicosa en las porciones correspondientes a los tratamientos de 45 y 90 minutos se hizo por aislamiento previo de la banda que la contenía, extracción con butanol y recromatografía en varios disolventes, haciéndose el revelado con los distintos reactivos siempre en comparación con una muestra auténtica.

No repetimos los esquemas de formación de las distintas substancias aquí referidas puesto que ya se han dado en apartados anteriores.

E) Tratamiento con hidróxido sódico

Simultáneamente se prepararon una muestra a temperatura ambiente y otra a baño de maría, en ambos casos se disolvió glucosa a razón del

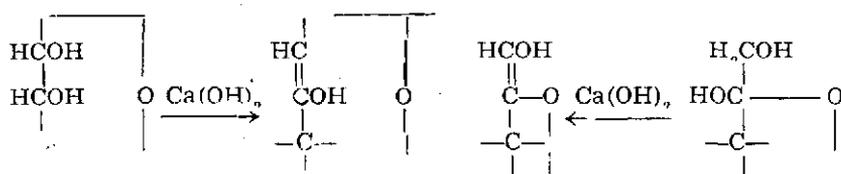
(*) La disolución amoniacal (aproximadamente 0,18 N) se preparó diluyendo 1,00 cc. de hidróxido amónico de $d=0,910$ en 100 cc con agua desilada.

(**) Realmente ya LOBBY DE BUIJN y ALBERA VAN ERENSTEIN dieron cuenta de la presencia de una segunda cetosa (entre los productos de isomerización de la glucosa) a la que llamaron pseudofructosa que sólo recientemente ha podido demostrarse que coincide con la D-psicosa pues, en efecto, durante mucho tiempo no podría compaginarse la afirmación de LOBBY [Rec. trav. chim., 16, 257, 274 (1897)] de que la tal pseudofructosa no era fermentable por levaduras con la fermentabilidad que corresponde a la D-psicosa sintética; como demostraron STRICER y REICHSSTEIN (STRICER y REICHSSTEIN, *Hel. Chim. Acta*, 19, 184 (1936) en realidad, lo que debió ocurrir es que se trataba de un compuesto impuro.

10%, en hidróxido sódico del 1% \approx 0,25 N. Para la observación a temperatura ambiente se tomaron porciones de la disolución cada cuarto de hora, durante las tres primeras horas, la siguiente a las 6 y después a las 12, 24, 47 y 72 horas. Cada muestra tomada se lleva a pH 7 con clorhídrico diluido con lo que queda bloqueada la acción alcalina en espera de realizar el cromatograma general. En los cromatogramas correspondientes a las tres primeras horas sólo aparece fructosa por lo que es como si en estas condiciones quedase muy estabilizada la estructura de esta cetosa. En cambio desde las seis horas en adelante se aprecia también la manosa. Sin embargo, según los experimentos de KUSIN (49) al cabo de 24 horas a temperatura ambiente existe un predominio absoluto de la fructosa y sólo trazas de manosa lo que no está de acuerdo con nuestros resultados.

Para KUSIN las diferencias de acción entre NaOH y Ca(OH)₂ estaría en la existencia de una estructura en anillo que adquiriría el enol o enoles que se admiten como intermedios por efecto de una acción deshidratante del Ca(OH)₂ en un caso, mientras que cuando se utiliza el NaOH y otros álcalis monovalentes no hay formación de tales anillos.

Al poderse crear anillos no hay duda que serán distintos el que se origine sobre la estructura de la glucosa y el que corresponda a la fructosa. En consecuencia, tendrán distinta capacidad de reacción y se comportarán de distinta manera, produciéndose predominio de una de las dos estructuras; no existiría en cambio esta diferencia de comportamiento tan ostensible al tratarse de un simple 2-epímero, esto es lo que justificaría el que con hidróxido cálcico predomine la manosa sobre la fructosa, mientras que con hidróxido sódico es más abundante la proporción de fructosa relativa a la de manosa, lo que puede explicarse admitiendo una escasa estabilización de los grupos cetósicos en beneficio de la manosa. Los esquemas de formación de la estructura en anillo de los supuestos enodioses derivados de glucosa y fructosa son, según KUSIN, los que siguen



Pero insistimos en que esta diferencia de resultados no es fácil compartirla después de los nuestros. Los cromatogramas a las 24, 48 y 72 horas son prácticamente idénticos a los de 6 horas.

En los experimentos a baño de maría realizados en las mismas con-



centraciones es de destacar que después del calentamiento durante $\frac{1}{2}$ y 1 minuto se aprecia sólo una mancha debida a fructosa y ninguna atribuible a manosa, lo que recordaría los resultados de KUSIN, sólo que obtenidos en un tiempo brevísimo. Otras muestras se tomaron a los 10, 60 y 90 minutos observando que a los 10 minutos existe ya manosa aunque en menor proporción que las otras y en el conjunto sigue predominando la glucosa.

Además se aprecia de manera clara la aparición de varias pentosas probablemente las cuatro aldosas y las dos cetopentosas, aunque, a primera vista, no se distinguen bien estas dos últimas entre sí en cromatogramas ordinarios, pero se separaron en cromatogramas de desarrollo prologado. También es indudable la presencia de gliceraldehído, dihidroxiacetona y una mancha debida a acetol por lo que respecta a fragmentos, y de dos 6-desoxicetosos entre los productos de indudable síntesis.

A los 40 y 60 minutos los cromatogramas son prácticamente idénticos al de 10 minutos, salvo en lo que respecta a la zona intermedia entre glucosa y fructosa en la que se aprecian con toda seguridad dos azúcares, uno de ellos de carácter cetónico y que debe ser la sorbosa, siendo el otro la manosa que queda bien diferenciada. Delante de estas dos manchas aparece una muy tenue, como un rastro, la cual revelada con orcina correspondían a las dos heptulosas, sedo y manoheptulosa que vienen apareciendo hasta ahora.

El cromatograma correspondiente a la muestra tomada a los 90 minutos es prácticamente idéntico al anterior.

Debe destacarse que los cromatogramas correspondientes al hidróxido sódico son, en general sencillos, apareciendo las manchas bien separadas, sin los rastros continuos de otros casos, como el del hidróxido cálcico, resaltado sobre todo la falta de polímeros que allí abundaban. Por tanto cabe pensar que existen sólo las reacciones fundamentales de transposición de Lobry y las de fragmentación y recombinación de pentosas, hexosas y heptulosa, pero no están favorecidas las de oligosíntesis.

Se hicieron unos ensayos durante 20 minutos, a una temperatura de 50°C con termostato, utilizándose concentraciones de hidróxido sódico 0,25 N, 3 N y 6 N frente a una disolución de glucosa del 10 %, referido a peso de glucosa en 100 gramos de disolución alcalina. Los resultados son los siguientes:

a) en la disolución correspondiente a la sosa 0,25 N tiene lugar la formación de fructosa y manosa principalmente, y luego una ráfaga poco definida que llega hasta la altura de la dihidroxiacetona.

b) con disolución 3 N desaparecen las manchas correspondientes al substrato glucosa y no se nota tampoco la presencia de fructosa ni de manosa; en cromatogramas en los que la muestra se puso muy concentrada se aprecia un insignificante viso a la altura de unas y otras, notándose además una ráfaga análoga a la que aparece en el caso de la disolución 0,25 N.

c) con hidróxido sódico 6 N los resultados son los mismos a los obtenidos con sosa 3 N y su significado es que para estas concentraciones de hidróxido sódico apenas si tienen lugar procesos de epimerización predominando del todo los de fragmentación y recombinación pero estos últimos en muy poca cuantía.

Para confirmar si esta última podría ser la explicación se trataron de la misma manera gliceraldehido, dihidroxiacetona, treosa y xilosa y en estas condiciones ninguno de ellos daba lugar a azúcares de mayor tamaño y sí a una ráfaga debida a mezclas de pentosas, tetrosas y triosas.

F) *Acción del hidróxido potásico*

Se utilizan las mismas condiciones y concentraciones (sol. al 1 % \approx 0,18 N) de trabajo que en los casos anteriores. Los resultados en frío son prácticamente una reproducción de lo que ocurre en hidróxido sódico.

A baño de maría hay que hacer notar bastantes diferencias. He aquí una descripción breve de ellas:

a) al cabo de 1 minuto no se observa aparición de fructosa ni del epímero manosa a diferencia de lo que antes ocurría. En cambio a los 10, 45 y 90 minutos los cromatogramas son algo más complejos que los de hidróxido sódico pudiendo considerar como principales diferencias la presencia de algunas manchas muy móviles debidas a metilglucosil, acetol y lactaldehido y la de manchas muy lentas debidas a una serie de polímeros que se extienden desde la línea de partida hasta la posición de la glucosa, que no se habían notado en el hidróxido sódico. Ha habido por tanto, oligosíntesis. La presencia de pentosas es también indudable, no notándose, en cambio, la de psicosa, pese a haber utilizado reactivos de localización de cetosas, porque suponíamos que estaría esta cetosa enmascarada por las pentosas.

A 50° C, en termostato durante 20 minutos, se observa que con una disolución 0,25 N sólo se detectan claramente glucosa y fructosa-manosa más una ráfaga, que debe corresponder a un conjunto de compuestos de fragmentación que llegan hasta la altura de la dihidroxiacetona. Con disoluciones 3 N y 6 N, también durante 20 minutos, se observa la desaparición de la mancha debida a la glucosa original y no se detectan ni

fructosa ni manosa, manteniéndose en cambio, el rastro debido a fragmentos de 3 y 5 carbonos. Esto nos prueba que para estas concentraciones, a temperaturas relativamente suaves, juegan poco los procesos de isomerización y en cambio sí los de fragmentación.

MANOSA

A) Acción del agua

En frío no se observó cambio alguno aún después de doce meses. Las disoluciones se mantuvieron a temperatura ambiente, sin control de temperatura, en frascos tapados a los que se agregó unas gotas de cloroformo.

En baño maría ni a las 24 ni a las 48 horas se observaba cambio alguno. Por el contrario, a las 72 horas es de destacar la aparición clarísima de tres polímeros en R_{manosa} 0,41; 0,3 y 0,15 que se corresponden, el primero y tercero con los oligosacáridos de dos y tres eslabones de manosa, y el de $R_{\text{manosa}} = 0,3$ con uno de grado dos de la glucosa, ya que este monosacárido también se ha formado y antecede a la manosa en los cromatogramas. El color de las manchas de los oligosacáridos de manosa es claramente distinto del mostrado por la glucobiosa.

Representando la función $R_m = \log \left(\frac{1}{R_f} - 1 \right)$ en ordenadas y el grado de polimerización en abscisas se obtuvo una línea recta para el caso de la manosa y sus dos polímeros. Por otro lado se separaron por el método de FLOOD, HIRST y JONES (161) bandas que contenían cada uno de los polímeros formados. Hidrolizados con ClH (en las condiciones de costumbre) se observó que la supuesta manobiosa daba manosa y algo de manobiosa residual. La manotriosa daba manchas de manosa, manobiosa y restos de manotriosa; no aparecían rastros que pudiesen confundirse con el otro oligosacárido formado de la manosa original y que identificado por hidrólisis separada se correspondía con una glucobiosa, no habiéndose intentado su identificación estructural.

(161) A. E. Flood, E. L. Hirst y J. K. N. Jones, *Nature*, 158, 270 (1946).

B) Acción del hidróxido cálcico

No hemos encontrado referencias a resultados de la manosa en frío con hidróxido cálcico, salvo las generales de los primeros trabajos de Lobry. Observamos una mayor resistencia a los cambios que la mostrada por la glucosa. En efecto, a las 24 horas en frío no notamos prácticamente ningún cambio que merezca ser calificado como tal. A las 48 horas sólo se observan indicios de glucosa y fructosa.

En caliente se hicieron ensayos en baño de maría con manosa en las mismas condiciones en que se estudió la glucosa. Al cabo de 1 minuto no hay cambio apreciable.

A los 10 minutos es clara la presencia de glucosa y de muy poca fructosa; también aparecen las manchas amarillas debidas a gliceraldehído y dihidroxiacetona pero ninguna otra mancha más, es decir, que ni se muestra la psicosa ni las pentosas ni demás manchas que aparecían como típicas en el tratamiento de la glucosa.

Los cromatogramas correspondientes a los 45 y 90 minutos de tratamiento son prácticamente idénticos a los de 10 minutos. En principio, se deduce que la manosa ofrece mayor resistencia a la epimerización que la mostrada por la glucosa y que la velocidad de formación de glucosa a partir de fructosa es superior a la del tránsito de manosa a fructosa, lo que justifica la escasa proporción de fructosa que aparece en los cromatogramas y, también la desproporción entre la concentración existente al final de los 90 minutos de fructosa, glucosa y manosa (*). La no aparición de psicosa resulta un poco extraña, pero concuerda con la no aparición de 4-desoxi-3-cetofructosa que es otra de las sustancias que podrían formarse en el equilibrio general de transformaciones.

C) Acción del hidróxido bórico

A temperatura ambiente los resultados son semejantes a los obtenidos con el hidróxido cálcico.

En baño de maría la diferencia es sumamente clara. Durante el primer minuto se conserva la mancha inicial inalterada.

A los 10 minutos, por el contrario, se observan las siguientes peculiaridades:

- a) tres polímeros por lo menos de R_{manosa} 0,15, 0,21 y 0,41.
- b) clarísima presencia de glucosa y escasa de fructosa,

(*) Como quiera, que manosa y fructosa tienen poca diferencia de R_f se procedió a desarrollo de varios cromatogramas revelando con flato ácido de anilina, p-anisidina, resorcina y antrona, los dos últimos selectivos para la cetosa.

c) zona de manchas rojas que deben corresponderse con las cuatro aldopentosas apareciendo la de arabinosa montada sobre la cola de la de fructosa.

d) aparece también una mancha parda que corresponde a una mezcla de cetopentosas (ribulosa y xilulosa).

e) una mancha amarilla que por movilidad e intensidad de color amarillo debe corresponderse con la 6-desoxifruktosa; a éste sigue una pequeña cola que se debe probablemente a la 6-desoxisorbosa.

f) a continuación vienen las características manchas de gliceraldehído y dihidroxiaetona seguidas de otras dos identificables como lactaldehído y acetol.

g) superpuesta a la zona de hexosas pudieron detectarse trazas de heptulosa al revelar con orcina en cromatogramas aparte.

A los 45 y 90 minutos los cromatogramas son idénticos a los de 10 minutos, salvo en la última mancha que, debida al acetol, apenas si se notaba en el epimerizado de los 10 minutos.

D) *Tratamiento con hidróxido amónico*

Las disoluciones van oscureciéndose pero los cromatogramas revelados con reactivos de azúcares apenas si prosperan en complicación, a las 48, 72 y 90 horas. En todos ellos se aprecia la presencia de glucosa, fructosa y manosa como corresponde a una simple transformación de Lobry, sin embargo no se notan las manchas atribuibles a psicosa ni a 4-desoxi-3-cetofruktosa, ni tampoco las causadas por polímeros. Sí se nota una tenue mancha debida a dihidroxiaetona, y más débil aún la que corresponde a gliceraldehído.

A baño de maría al cabo de 1 minuto no se observa alteración. En cambio a los 10 minutos aparece ya de una manera clara la presencia de glucosa y la de fructosa más dos oligosacáridos que se corresponden con la manobiosa y manotriosa.

A los 45 minutos aparecen además dos muestras amarillas debidas a gliceraldehído y dihidroxiaetona.

A los 90 minutos no se observa diferencia con el de 45 minutos. Estos dos últimos difieren del de los 10 minutos en la presencia de las manchas amarillas.

E) *Acción del hidróxido sódico*

Preparadas disoluciones de manosa al 10 % en hidróxido sódico al 1 % (0,25 N) se hizo un examen en frío a las 6, 12, 24, 48 y 72 horas, no se aprecian cambios de importancia aparte del que corresponde a la

transformación de Lobry y los cromatogramas son prácticamente idénticos desde las 12 horas. El correspondiente a las 6 horas es cualitativamente idéntico aunque la presencia de glucosa y fructosa es escasa.

A baño de maría se hicieron tomas de muestra como de costumbre a los 1, 10, 60 y 90 minutos. En el cromatograma correspondiente a 1 minuto no aparecen nada más que manosa y trazas de fructosa.

A los 10 minutos el patrón es prácticamente completo pues no hay diferencia cuali ni cuantitativa respecto a los de 60 y 90 minutos. Puede destacarse que además de ser iguales entre sí, lo son con los cromatogramas de glucosa, por lo que hay que pensar que la fase previa de la transformación de Lobry se da en ambos casos y de ahí que las fragmentaciones y recombinaciones supuestas deben ser análogas. Nos remitimos a lo dicho en la glucosa.

F) *Acción del hidróxido potásico*

En frío podemos decir que sucede lo mismo que con hidróxido sódico al hacerse los experimentos en igualdad de condiciones.

En baño de maría notamos ciertas diferencias que comentamos a continuación. En primer lugar, aunque al cabo de 1 minuto sólo se inicia la formación de fructosa y glucosa, es a los 10 minutos cuando el cromatograma ha adquirido su aspecto definitivo, puesto que a los 45 y 90 minutos se obtienen cromatogramas totalmente análogos a los correspondientes a aquel tiempo. Así, a partir de los 10 minutos se observa la presencia de una mancha casi continua desde la línea de partida hasta la glucosa, pero en ella pueden destacarse como bien definidas por lo menos dos manchas pardas que se corresponderán con los dos oligosacáridos de la manosa, sin descartar que en el rastro continuo se encuentren también los polímeros correspondientes a la glucosa y los de otros de los azúcares formados primeramente.

Por debajo de las manchas de glucosa, fructosa y manosa destacan tres rojas que deben representar a las cuatro pentosas, puesto que en realidad la lixosa y xilosa casi superponen sus manchas. También aparecen, además de las manchas ya típicas gliceraldehido, dihidroxiacetona y 6 desoxicetosas, otras manchas pardas que avanzan mucho y que se corresponden con lactaldehido, metilglioxal, acetol y otra no identificada.

Ya que en experimentos repetidos se obtienen cromatogramas análogos es preciso admitir una cierta efectividad potencial mayor que la del hidróxido sódico, por lo menos en este caso, que hace que los cromatogramas sean más completos que los obtenidos al utilizar hidróxido sódico.

FRUCTOSA

A) Acción del agua

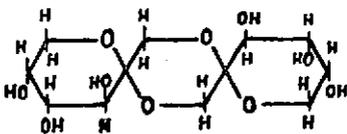
A temperatura ambiente no se observa cambio alguno en una muestra mantenida más de un año, al tener seguridad de que en las disoluciones no se han desarrollado hongos para, lo que como en otros azúcares, poníamos unas gotas de cloroformo.

En caliente, a baño de maría, no se observa cambio alguno a las 24 horas. Lo mismo puede decirse después de 48 horas. En cambio a las 72 se observa presencia de manosa, glucosa y psicosa. La manosa aparece prácticamente superpuesta a la fructosa, aun cuando llega a distinguirse una cierta cintura en la mancha elongada.

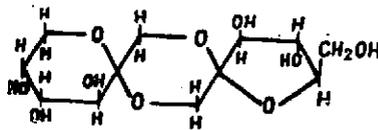
Según los trabajos de SATTLER, ZERBAN y colaboradores (162) cuando una disolución acuosa de fructosa se hierve bajo reflujo durante varias horas, este azúcar sufre deshidrataciones y fragmentaciones que conducen por un lado a anhidroazúcares, por otro a dímeros de éstos (diheterolevulosanas) (*) y por otro a fragmentos carbonílicos de menor tamaño

(162) I. SATTLER, F. W. ZERBAN, G. L. CLARK, CHIA-CHEN CHU, N. ALBON, D. GROSS y H. C. S. de WHALLEY, *Ind. Eng. Chem.*, **44**, 1127 (1952).

(*) La llamada diheterolevulosana es según WOLFROM y BLAIR [M. D. WOLFROM y M. G. BLAIR, *J. Am. Chem. Soc.*, **70**, 2406 (1948)] una mezcla de dos dianhidridos de la fructosa. Uno en el que intervienen dos anillos piranósicos y se corresponde con la fórmula única que proponían SCHLUBACH y BEHRÉ [H. H. SCHLUBACH y C. BEHRÉ, *Ann.*, **508**, 16 (1933)]. La otra diheterolevulosana debe considerarse como formada por un anillo piranosa y otro fu. anosa, las respectivas estructuras han sido comprobadas por WOLFROM y colaboradores [M. L. WOLFROM, W. W. BINKLEY, W. L. SHILLING y H. W. HULTON, *J. Am. Chem. Soc.*, **73**, 3553 (1951)].



(di-D-fructopiranososa 1,2' : 2,1'dianhidrido)



D-fructopiranososa-D-fructofu. anosa
1,2' : 2,1' dianhidrido.

(3-hidroxi-L-butanona, hidroxi-2-butanona, metilglioxal, etc.) compuestos que no detectamos en ninguno de nuestros ensayos; cabría pensar o en una ausencia de estas reacciones, como consecuencia de que nuestras condiciones eran más suaves, o incluso en una formación incipiente de cualquiera de estos compuestos y que por no hacerse nuestras observaciones antes de las 24 horas pasaban desapercibidas ya que sufrían descomposición posterior. Para salvar las dudas se repitió el tratamiento de la fructosa hasta 24 horas pero tomando muestras de dos en dos horas, no observándose nada de particular hasta el cromatograma de 10 horas.

Sin embargo, los de 10, 12 y 14 horas muestran un rastro que aunque suave va desde la línea de partida hasta la mancha correspondiente a fructosa y en el que aparecen además de los dos anhídridos de ZERBAN, azúcares y compuestos relacionados; por debajo existe igualmente un pequeño rastro que es ligeramente más manifiesto en la muestra correspondiente a 14 horas; pero dicho rastro sólo alcanza hasta la altura de la ramnosa y por tanto no puede corresponder a los fragmentos carbonílicos de 3 y 4 carbonos supuestos por aquellos autores. A las 16 y 18 horas disminuye la intensidad del rastro superior y desaparece el rastro inferior. No existe evidencia de que aparezca la 3 cetosa que resultaba en los cromatogramas correspondientes a 72 horas.

Por otro lado, se repitieron los experimentos en condiciones energéticas (matraz a reflujo a fuego directo) y se tomaron muestras a partir de las dos horas, de dos en dos. Hasta las 8 horas no se aprecian rastros de nuevas manchas. A las 10 horas se inicia la aparición de unos tenues rastros, a las 12 horas se alcanza la máxima intensidad de estos rastros, superior e inferior, y a las 14, 16 y hasta 20 horas se observa la exclusiva presencia de fructosa con manchas muy bien delimitadas. Esto hace pensar que la formación de estos dianhidridos tiene un tiempo crítico relativamente corto; lo que no llegamos a observar es la presencia de los pequeños fragmentos señalados por SATTLER, ZERBAN y colaboradores (162).

Hay bastante probabilidad para admitir que en el rastro superior predominan los dianhidridos pues, en efecto, la zona de concentración más fuerte se halla a la misma altura que la mancha que resulta al mantener fructosa con clorhídrico concentrado a 0° C durante 11 días, condiciones análogas a las de PICTET y CHAVAN (163).

(163) A. PICTET y J. CHAVAN, *Hel. Chim. Acta.*, 9, 809 (1926).



B) *Acción del hidróxido cálcico*

A temperatura ambiente durante los primeros días no hay ningún cambio digno de mención. En cambio, después de 30 días aparecen las dos aldosas fundamentales más la fructosa residual como consecuencia de una transposición de Lobry.

A baño de maría los cambios son más rápidos y más manifiestos, de tal manera que después de 1 minuto, tiempo en que hasta ahora en otros azúcares no se notaba alteración, ya habían aparecido la glucosa y manosa, quedando aproximadamente en partes iguales los tres azúcares; por otro lado empieza a hacerse incipiente la presencia de otros azúcares de mayor peso molecular que se mueven a la velocidad del gliceraldehído y dihidroxiactona. No aparecen, en cambio rastros ni manchas que puedan atribuirse a algún tipo de polímero derivado de la fructosa o de sus anhidridos.

A los 10 minutos el cromatograma es más amplio, destacándose fundamentalmente las manchas de glucosa, fructosa y manosa, la de psicosa y probablemente altrosa, otra parte atribuible a la alosa y a continuación otras tres que manifiestamente corresponden a gliceraldehído, dihidroxiacetona y acetol.

Los cromatogramas correspondientes a 45 y 90 minutos son sensiblemente idénticos a los de 10 minutos salvo en lo que respecta a fructosa que aparece disminuída a favor del incremento de las proporciones de glucosa y manosa.

Es de destacar la mayor sensibilidad de la fructosa a la acción alcalina respecto a la mostrada por las correspondientes aldosas glucosa y manosa, lo que parece está de acuerdo con la necesidad de que en la reacción de Lobry sea intermedio obligado la fructosa que es, en definitiva, la determinante de velocidad.

En cromatogramas aparte se detectaron dos heptulosas que se corresponden con sedo y manohéptulosa; no se descartan otras, pero estarían en menor proporción. En conjunto la concentración de unas y otras es pequeña.

C) *Acción del hidróxido bórico*

A temperatura ambiente no hay diferencia sensible entre la acción del hidróxido bórico y la del cálcico.

A baño de maría sí que se observa una diferencia en la acción del agua de cal respecto a la barita. Sucede como si en esta última los pro-

cesos de isomerización y fragmentación se aceleraran. En efecto, ya al minuto se aprecia un número de manchas crecido, detectándose además de glucosa, fructosa y manosa una debida a psicosa, tres rojas que probablemente representan a las cuatro aldopentosas, otra pardo-amarillenta que representa a las cetopentosas, las debidas a gliceraldehido, dihidroxiacetona y una parda intermedia entre las últimas atribuibles a 6-desoxicetohexosas. Entre la línea de partida y la glucosa existe un rastro casi continuo que corresponde sin duda a polímeros de diversos grados, apareciendo una mancha redondeada en el punto de partida que es debida a polímeros de peso molecular elevado que no llegan a iniciar el desarrollo.

Los cromatogramas correspondientes a tiempos de calentamiento de 10, 45 y 90 minutos son sensiblemente idénticos entre sí pero difieren del de 1 minuto en las manchas que aparecen por debajo de la dihidroxiacetona que se deben a fragmentos de 3 carbonos. Por comparación, en cromatogramas aparte, con sustancias tipo se identificaron sucesivamente como lactaldehido, acetol y metilglioxal.

Pasados varios días, destaca otra mancha, casi un rastro parduzco, situada debajo del metilglioxal que es atribuible a glicolaldehido.

En cromatogramas especiales también se detectaron las mismas heptulosas que con el hidróxido cálcico.

D) *Acción del hidróxido amónico.*

Las alteraciones están atenuadas y, en efecto, a temperatura ambiente tiene lugar una Lobry. de Bruyn suave, ya que la proporción de fructosa sigue manteniéndose alta aun cuando se detectan las correspondientes aldosas. Como manosa y fructosa quedan casi superpuestas, su presencia se confirma por revelado con reactivos específicos, para aldosas y cetosas en distintos cromatogramas obtenidos por duplicado.

A baño de maría, se comprueba también la menor actividad isomerizante del amoníaco. Así, después de 1 minuto no se nota más que el efecto de la reacción de Lobry y a los 10 minutos además sólo trazas de un azúcar que se mueve a la velocidad de la dihidroxiacetona.

A los 45 minutos se observa que, aparte de los anteriores, aparecen psicosa, gliceraldehido, acetol y un rastro debido a otros fragmentos. Por encima de la glucosa se encuentran por lo menos dos polímeros definidos y aún más alto un rastro desde la línea de partida.

Los cromatogramas de 90 minutos puede decirse que son una reproducción intensificada del de 45. Todas las manchas son más extensas por lo

que se tocan unas con otras, si bien se observa la correspondencia con el anterior.

En cromatogramas revelados para heptulosas sólo se observan trazas de éstas.

E) *Acción del hidróxido sódico*

A temperatura ambiente siguen apareciendo los resultados de Lobry previstos.

A baño de maría, a los 30 segundos, predomina la fructosa pero se inicia la aparición de manosa y glucosa, algo más de la primera que de la segunda. Después del primer minuto se encuentran manchas debidas a fructosa y a sus dos aldosas, más las debidas a los fragmentos gliceraldehído, dihidroxiacetona y acetol.

A los 10 minutos se incrementa el cromatograma anterior en unas manchas que se involucran entre sí, y que por su color y situación se corresponden con pentosas y sus respectivas cetosas; verdaderamente, destacan dos concordantes con la pareja ribosa-ribulosa.

Los cromatogramas de 60 y 90 minutos tienen además de las manchas indicadas a los 10 minutos, otras dos de polímeros, una a la altura de sacarosa y la otra algo más baja, que daba amarillo más típico en el revelado. Aislados ambos compuestos e hidrolizados daban el primero glucosa y fructosa y el segundo sólo fructosa, por lo que es una fructobiosa (*). Aparecen otras dos manchas debidas a 6-desoxicetosas, comprendidas entre gliceraldehído y dihidroxiacetona y por encima y debajo de acetol una debida a lactaldehído y otra metilgloxal respectivamente.

Cromatogramas revelados con orcina muestran la presencia de las dos heptulosas fundamentales y rastros de otras.

F) *Acción del hidróxido potásico*

Para el hidróxido potásico a temperatura ambiente bastaría repetir lo indicado en los casos anteriores.

En baño de maría es de destacar la presencia de un número mayor de manchas en la zona comprendida entre glucosa y gliceraldehído y una mayor concentración en las que se mueven a más velocidad que el acetol. En la primera zona se nota más claramente la presencia de pentosas e incluso la aparición de algunas otras aldohexosas distintas de las

(*) Se correspondía con el polímero de grado 2 de un hidrolizado preparado por nosotros a partir de inulina.

principales y en la última se detectan claramente lactaldehído, acetol y metilglioxal.

Aunque no muy definidos aparecen rastros de polímeros en los cromatogramas de 10, 60 y 90 minutos.

En cromatogramas aparte revelados con orcina se observa la presencia de heptulosa en concentración y calidad parecidas a las de hidróxido sódico.

SORBOSA

A) *Tratamiento con agua*

A temperatura ambiente la disolución acuosa de sorbosa no sufre cambio ni aún después de un año.

En caliente, a baño de maría, no se aprecia cambio alguno a las 24, a las 48, ni a las 72 horas. Recuérdese que la fructosa a las 72 horas, sí que experimentaba cambios y también en tiempos más cortos en los que había formación de anhídridos y polímeros de éstos.

B) *Acción del hidróxido cálcico*

A temperatura ambiente se observa, a las dos horas la iniciación de la transposición de Lobry, detectándose ya la gulosa, pero sin notarse la idosa. Después de 24 horas no se observa prácticamente ninguna otra particularidad salvo la clara presencia de idosa.

A baño de maría, al cabo de 1 minuto, sólo se notan gulosa y sorbosa.

A los 10 minutos se manifiestan glucosa, sorbosa, tagatosa e idosa y por otro lado las manchas debidas a los fragmentos de gliceraldehído y dihidroxiacetona.

A los 45 y 90 minutos se intensifican las cuatro manchas principales no descartándose la posibilidad de que en la gulosa vaya incluida galactosa y en la idosa algo de talosa. Por otro lado, las manchas de idosa e incluso, en parte, la de tagatosa se enrojecen por superposición de las cuatro aldopentosas. Como manchas nuevas características de este mayor tiempo, existen dos, entre idosa y gliceraldehído, que quedan, una a la altura aproximada de una cetopentosa (quizás de las dos casi superpuestas) y la otra como si correspondiese a la ramnosa cuya formación sería explicable teniendo en cuenta la presencia de una mancha amarilla

entre gliceraldehido y dihidroxiacetona que aunque doble se deberá preferentemente a 6-desoxifruktosa (habrá también 6-desoxisorbosa) la cual por Lobry de Bruyn justificará la aparición de ramnosa. A su vez, la presencia de 6-desoxicompuestos quedaría explicada por la presencia de lactaldehido que aparece como una mancha amarilla manifiesta por debajo de la dihidroxiacetona. El rastro final se debe a acetol y metilglioxal, pues se corresponden en todo con muestras tipo de éstos. Sólo con carácter de curiosidad se detectó la presencia de heptulosas.

C) *Acción del hidróxido bórico*

Prácticamente debe repetirse lo indicado para el hidróxido cálcico a temperatura ambiente y a baño de maría. Si acaso podría hacerse la observación de que a los 10 minutos la intensidad de transformación es mayor, de tal modo que prácticamente es ya idéntico el cromatograma de este tiempo a los que se obtienen con el tratamiento de 45 y 90 minutos. Los componentes detectados son los mismos desde la sorbosa hacia abajo, pero debe destacarse que entre la línea de partida y este azúcar aparece un arrastre continuo, de color pardo, a la vez que existe una mancha inmóvil en la línea de partida que se deberá a polímeros de alto grado.

D) *Acción del hidróxido amónico*

A temperatura ambiente después de un tiempo prolongado sólo se observa la aparición de las aldosas gulosa e idosa, como corresponde a la intervención de una isomerización de Lobry.

En cambio a baño de maría se observa lo que sigue:

a) después de 1 minuto sólo aparece la sorbosa y sus correspondientes aldosas.

b) a los 10 minutos aparecen principalmente, tagatosa, gliceraldehido y dihidroxiacetona, y además una muy clara, más rápida que el gliceraldehido y más lenta que la dihidroxiacetona que se corresponde con la 6-desoxicetosa a las que acompañan inmediatamente delante y después dos rastros tenues.

c) por último aparece una mancha relativamente tenue y muy veloz que debe atribuirse al lactaldehido.

El cromatograma correspondiente a 45 minutos es prácticamente idéntico, salvo en la intensificación de la mancha debida a tagatosa y a la aparición de una mancha en la línea de partida que debe atribuirse a un polímero de elevado peso molecular. En realidad esta mancha se pro-

longa por un rastro tenue hasta el encuentro con la gulosa; reexaminados los cromatogramas de 1 y 10 minutos denotan también una ligera presencia de este rastro pero sin duda mucho más tenue.

El cromatograma correspondiente a 90 minutos ofrece como particularidad el que las manchas de dihidroxiacetona y lactaldehído quedan tan sumamente tenues que en unos primeros cromatogramas se dieron como inexistentes; se sospecha que estas dos últimas pueden haberse recombinado a mayor ritmo que el de su formación para dar origen a las 6-desoxicetosas que aquí aparecen, aparte de que la dihidroxiacetona que en las etapas de 10 y 45 minutos eran más abundantes que el lactaldehído intervienen también en otras reorganizaciones como las de formación probable de fructosa y aún de regeneración de la propia sorbosa.

E) *Acción del hidróxido sódico*

A temperatura ambiente a las 24 horas sólo se nota la aparición de gulosa e idosa, más de la primera que de la última, quedando una buena proporción de sorbosa como tal.

A baño de maría se observa un sensible crecimiento de la velocidad de isomerizaciones, degradaciones y recombinaciones. En efecto, desde el primer minuto se obtiene prácticamente el resultado definitivo, pues los cromatogramas son indistinguibles al cabo de 10, 45 y 90 minutos. El comentario que requieren los datos correspondientes a los cuatro tiempos de acción, que resultan iguales entre sí, es el que sigue:

a) además de los compuestos ya referidos con otros álcalis aparecen superpuestas pentosas (aldosas y cetosas).

b) hay más abundancia en las dos 6-desoxicetosas fundamentales.

c) por debajo de la dihidroxiacetona quedan fragmentos, variados y abundantes que se corresponden con lactaldehído, acetol y metilglioxal.

d) también es más manifiesta la presencia de polímeros aunque no puede descartarse el que éstos tengan naturaleza de polianhidridos.

e) siguen detectándose heptulosas, predominando la sedoheptulosa.

F) *Acción del hidróxido potásico*

Prácticamente puede repetirse lo dicho para el hidróxido sódico. Sólo cabe la salvedad de que en la zona de polímeros se delimitan por lo menos dos y que entre sorbosa e idosa queda algo desapercibida la tagatosa, que en cambio en hidróxido sódico se observaba bien. Entre la zona de pentosas y las consideradas como 6-desoxicetosas hay otras dos manchas poco definidas que deben atribuirse a dos de las aldosas correspondien-

tes a estos compuestos, siendo una de ellas indudablemente debida a ramnosa y la otra, con bastante probabilidad a quinovosa, en cuyo caso resultarían ambas por isomerización de Lobry a partir de la 6-desoxi-fructosa formada por síntesis.

Deben encontrarse también las aldosas correpondientes a 6-desoxisor-bosa pero no aparecen manifiestas, salvo que vayan incluídas en los ras-tros anterior y posterior a las 6-desoxicetosas que se notan después de descartar las manchas más definidas atribuidas a las otras desoxialdosas. Sigue siendo positiva la presencia de heptulosas.

GALACTOSA

A) *Tratamiento con agua*

En agua a temperatura ambiente no sufre cambio alguno detectable por cromatografía.

En caliente, este azúcar parece muy vulnerable, pues en agua a simple baño de maría, durante 24 horas, ocasionaba la aparición de una mancha que se movía a la misma velocidad que la tagatosa y de color amarillento con el ftalato ácido de anilina y de otras dos que por su R_m en relación lineal con los grados de polimerización 2 y 3 relativos a galactosa, debían ser la galactobiosa y galactotriosa. Se separaron, cortando bandas, y daban por hidrólisis nada más que galactosa y galactobiosa el primero, y una mancha de galactosa, galactobiosa y galactotriosa el segundo. Existe todavía una mancha de dihidroxiacetona.

A las 48 horas se observa que están manifiestas las dos manchas de polímeros, se separan muy bien las de tagatosa y talosa, y aparecen claras dos amarillentas identificables como gliceraldehído y dihidroxiacetona.

A las 72 horas resulta curioso destacar que sólo aparecen los polímeros y no las manchas de más abajo. Ante la duda se repitieron los cromatogramas confirmándose los resultados anteriores. Puede que hubiese retroversión de la isomerización de Lobry por un lado y recombinación de los fragmentos que aparecieron en las primeras etapas.

B) *Acción del hidróxido cálcico*

En frío con hidróxido cálcico sólo se observa la aparición de tagatosa en un plazo de 10 á 12 horas y la talosa empieza a aparecer algo después.

En caliente se observa que a baño de maría durante 1 minuto se produce tagatosa y un oligosacárido que se mueve a una velocidad más pequeña que la de la lactosa con un $R_{\text{sol}} = 0,20$ y que se corresponde con galactobiosa.

A los 10 minutos se mantiene ese oligosacárido aunque se prolonga su rastro hacia abajo y aparecen ya además de tagatosa, talosa y sorbosa una serie de aldopentosas superpuestas, una cetopentosa, que probablemente serán dos, y las esperadas de gliceraldehído y dihidroxiacetona.

A los 45 y 90 minutos los cromatogramas ofrecen idéntico aspecto. Es interesante destacar que no se detectan fragmentos de mayor velocidad que la dihidroxiacetona y en consecuencia no aparecen compuestos que se sistetizan a base de aquellos, en especial 6-desoxicetosas, que se forman a partir del lactaldehído.

C) *Acción del hidróxido bórico*

Este ofrece algunas particularidades interesantes en caliente, pues en frío se comporta como el hidróxido cálcico.

Así, al cabo de 1 minuto se observa exclusivamente la aparición de galactobiosa y ningún monosacárido distinto de la galactosa.

A los 10 minutos aparecen ya los siguientes azúcares:

a) galactobiosa más galactobiulosa, es decir, la cetosa correspondiente a la primera (*).

b) tagatosa y talosa como azúcares esperados por la transposición de Lobry.

c) sorbosa que podemos considerar originada o por una 3-epimerización de la tagatosa o por síntesis a partir de los fragmentos.

d) xilulosa como producto de síntesis a partir de algunas primeras moléculas de dihidroxiacetona y de gliceraldehído, resultando curioso el caso de que aparezca ésta y no los componentes de que deriva.

A los 45 minutos es de destacar la aparición de nuevos polímeros por encima de la galactobiosa y galactobiulosa así como la de dos manchas más móviles que la galactobiosa y menos que galactosa y que se identificaron con orcina como heptulosas. Debe destacarse también la aparición de ribulosa y ribosa, e incluso por el viso rojizo de las manchas de tagatosa y talosa es de sopear que contienen superpuestas las otras aldopentosas. Por otro lado, aparecen ya las manchas de gliceraldehído, 6-desoxicetosas, dihidroxiacetona, lactaldehído, acetol y algo de metilglioxal.

(*) Se aislaron pequeñas porciones de los dos oligosacáridos por el método de Flood, Hill y Jones, confirmandose por hidrólisis lo sospechado (galactosa y tagatosa en el segundo).

A los 90 minutos se puede repetir lo mismo que anteriormente.

D) *Acción del hidróxido amónico*

A temperatura ambiente apenas si hay una incipiente reacción de Lobry después de 24 horas.

A baño de maría se observa que al cabo de 1 minuto aun no se han formado isómeros y en cambio ya hay formada galactobiosa.

A los 10 minutos, sí hay formación de tagatosa e incluso signos de presencia del 3-epímero de ésta, sorbosa. En cambio no se nota aparición de talosa, de donde se deduce que es indudable que la fase de producción de cetosas es previa a la de nueva epimerización y también es prueba que la 3-epimerización de cetosas es relativamente fácil.

A los 45 y 90 minutos los cromatogramas son idénticos. En ambos, aparece galactosa, sorbosa, tagatosa, talosa, gliceraldehído y dihidroxiacetona. No los fragmentos más veloces, ni las desoxicetohexosas.

E) *Acción del hidróxido sódico*

A temperatura ambiente sólo se notan los productos previsibles por reacción de Lobry.

A baño de maría al cabo de 1 minuto ya aparecen galactobiosa, galactobiulosa y galactotriosa e incluso por encima algunos polímeros que apenas si se mueven de la línea de partida. Se observa también sorbosa, tagatosa y talosa, una mancha rosa muy tenue que casi hace pensar en una cetopentosa. Luego las dos manchas debidas a gliceraldehído y dihidroxiacetona.

Los cromatogramas correspondientes a 10, 60 y 90 minutos son entre sí iguales y tienen además de las manchas antes indicadas para los de 1 minuto las siguientes:

a) dos, por encima de galactosa y debajo de la galactobiosa, que dan reacción de heptulosas.

b) otra mancha rosa por encima de la que antes se indicó como rosa tenue y que se atribuyó a una cetopentosa. En realidad, hay bastante evidencia de que a partir de la tagatosa están superpuestas las diferentes pentosas e igualmente aparecen superpuestas la idosa y por encima de ella la dendrocetosa (*) que se dejan distinguir un poco por la parte baja ya casi a la cola de la talosa-xilosa. Por encima del gliceraldehído tam-

(*) Una pequeña muestra de dendrocetosa de garantía se desarrolló en el mismo cromatograma de tres formas:

a) solo, b) junto a pentosas y galactosa y c) añadida a la muestra de epimerizado en estudio.

bién aparecen unas pequeñas manchas que se corresponden con quinovosa y ramnosa y después del gliceraldehído y antes de la dihidroxiacetona existe una mancha de bastante superficie, con algo de cintura, pero no intensa que corresponde a la 6-desoxifruetosa y 6-desoxisorbosa, y por debajo de la dihidroxiacetona se detectan por lo menos dos manchas bien claras, unas que se mueven a la misma velocidad que el lactaldehído y otra más veloz que se corresponde con el acetol. El rastro que las sigue debe ser de metilglioxal, pero es escaso.

F) *Acción del hidróxido potásico*

A temperatura ambiente no se observa ninguna particularidad salvo la previsible isomerización de Lobry después de 24 horas.

A baño de maría se observa lo que sigue: al cabo de 1 minuto hay un alargamiento de la mancha de galactosa hacia arriba sin poderse distinguir el número de polímeros que existen. Inmediatamente después de galactosa aparecen la sorbosa (casi oculta), tagatosa y talosa y después gliceraldehído y dihidroxiacetona.

A los 10, 45 y 90 minutos los cromatogramas ya son idénticos entre sí y más ricos en componentes que los de 1 minuto. Además de las manchas ya indicadas se aprecia:

a) dos oligosacáridos bien definidos que se corresponden con galactobiosa y galactotriosa.

b) entre talosa y gliceraldehído se aprecian hasta cuatro manchas. La primera rojiza, visto que también tienen las anteriores tagatosa y talosa como consecuencia de contener pentosas, la última mancha de referencia debe estar formada de ribosa, dendrocetosa, e idosa, más de la primera que de las otras.

c) una cetopentosa que probablemente corresponde a las dos posibles.

d) quinovosa y ramnosa.

e) entre gliceraldehído y dihidroxiacetona aparece una mancha doble debida a 6-desoxicetohexosas.

g) por debajo de dihidroxiacetona tres manchas que se corresponden con aldehído láctico, acetol y aldehído pirúvico (metilglioxal).

ARABINOSA

A) *Acción del agua*

A temperatura ambiente no se observa nada después de 6 meses.

En caliente, a las 24 horas a baño de maría no se aprecia isomerización alguna ni aparición de mancha alguna distinta de la propia de arabinosa. A las 48 horas ocurre exactamente lo mismo.

En cambio, a las 72 horas se observa en primer lugar la aparición de una mancha intensa de $R_{r,ob} = 0,39$ que se corresponde con un polímero de ésta. Luego existen dos manchas más tenues, una de $R_{r,cb} = 0,65$ y otra de $R_{r,rb} = 1,45$ que se corresponden respectivamente con la arabobiulosa y la ribocetosa (arabulosa). En efecto, la primera se separó mediante el método de Hough, Flood y Jones e hidrolizó en las condiciones de Clerget tal como se aplica a la sacarosa, dando dos manchas, una que se movió a la velocidad de la arabinosa y la otra a la misma que la supuesta ribocetosa, también aislada a la vez de los mismos cromatogramas que la arabobiulosa. Por otro lado, un poco de esta última tratada con hidróxido cálcico daba al cabo de 1 minuto arabinosa y ribosa mas una mancha residual que seguía moviéndose como la primitiva, lo que constituye una prueba de que en efecto se trataba de la ribocetosa.

B) *Acción del hidróxido cálcico*

A temperatura ambiente a las 24 horas hay ya transposición de Lobry. A las 48 horas la transposición está algo más avanzada no observándose otras manchas extrañas, lo mismo que a las 72 y 90 horas.

A baño de maría se observa que al cabo de 1 minuto sólo ha tenido lugar la transposición de Lobry más una cierta fragmentación que motiva la aparición de dihidroxiacetona.

A los 45 y 90 minutos los cromatogramas ya son análogos entre sí y difieren del de 1 minuto en lo siguiente:

- a) en la presencia de un oligosacárido, arabobiosa,
- b) en la de una mancha rojiza intermedia entre la de arabinosa y ribosa y que corresponde a xilosa y lixosa, o tal vez más bien sólo a la primera puesto, que la cetosa intermedia de estas dos últimas se encuentra presente sólo en trazas (inmediatamente debajo de la ribulosa) y puede pensarse que el tránsito xilosa \rightarrow lixosa no ha sido completo o que la formación de xilosa y xilocetosa se haga por recombinación de fragmentos de 3 y 2 carbonos, cuya soldadura está más favorecida por ser *trans*, en cambio la lixosa es producto secundario de éstas por isomerización de Lobry.
- c) aparece una mancha amarilla que se corresponde con el gliceraldehído,
- d) sigue apareciendo la dihidroxiacetona. No se detectan manchas más veloces que estas últimas. Tampoco hemos podido demostrar la presencia de heptulosas.

C) Acción del hidróxido bórico

A temperatura ambiente ocurre lo mismo que con el hidróxido cálcico.

Sin embargo a baño de maría, existe una acción mucho más enérgica que la observada con aquel. Así, al cabo de 1 minuto se observa la transposición de Lobry mas la aparición de una mancha amarilla de dihidroxiacetona a la vez que la mancha propia de arabinosa está claramente elongada y con un rastro casi continuo hasta la línea de partida, como si se tratase de una gran masa de polímeros variados (más algunas hexosas y azúcares superiores) que, por su menor solubilidad en la fase móvil, se muestra como si hubiese tenido lugar un fenómeno de saturación de fase. De los elementos de la transposición de Lobry hay un predominio claro de ribulosa y una casi incipiente formación de ribosa. En proporción han predominado los fenómenos de oligosíntesis y de primera fragmentación, sin descartarse la recombinación de éstos hasta hexosas, respecto al tránsito ribulosa \rightarrow ribosa.

A los 10, 45 y 90 minutos los cromatogramas resultan idénticos. En ellos se distingue:

- a) una serie por lo menos de 6 azúcares que se mueven más lentamente que la arabinosa de partida entre los que predomina la arabobiosa y arabotriosa que se presentan como manchas rojas características. Inmediatamente después de la arabobiosa, aunque en forma de mancha

más débil, aparece la arabobiulosa cuya naturaleza se ha demostrado de la misma manera que se indicó al tratar la arabinosa durante 72 horas con agua a baño de maría. Entre la arabotriosa y arabobiosa existe igualmente una mancha tenue que es debida a arbotriulosa. Por encima de la arabotriosa existe una nueva mancha que cabe atribuir a una arabotretosa, ya que en este caso sólo se demostró que por hidrólisis escalonada daba arabotriosa, arabobiosa y arabinosa. Todavía se observa en la línea de partida una clara mancha rojiza que puede corresponder a polímeros de mayor grado,

b) por debajo de la arabinosa aparecen ahora casi con la misma intensidad ribosa y ribulosa y no parece muy destacada la presencia de xilosa,

c) Inmediatamente después de ribulosa aparece una mancha pardo-amarillenta que es debida a xilocetosa, aunque se une a las de ramnosa y quinovosa,

d) destacan ahora dos manchas amarillas, una de ellas de carácter más intenso que se mueve a velocidad un poco mayor que la de ramnosa y que se debe a gliceraldehído, a la que sigue otra también amarillo-parduzca que es debida a las dos 6-desoxicetosas más típicas (la de la sorbosa y fructosa),

e) continúa la dihidroxiacetona,

f) a la anterior sigue una más típicamente amarilla que se corresponde con el lactaldehído,

g) dos manchas, una definida que se debe a acetol y otra más elongada que corresponde a metilglioxal.

En cromatograma aparte se confirmó la presencia de heptulosas, bien manifiestas por su reacción de color con orcina y por la altura a que aparecían; las ceto pentosas daban color púrpura y las ceto hexosas pardo-anaranjado. Las cetoheptulosas quedaban prácticamente a la altura de arabobiosa y rastros próximos.

D) *Acción del hidróxido amónico*

A temperatura ambiente nada digno de especial mención, salvo la ligera presencia de transposición.

A baño de maría, al cabo de 1 minuto no hay síntomas de transposición de Lobry.

A los 10 minutos ya se observa la presencia de ribosa y ribocetosa de manera clara; también aparece gliceraldehído y por encima de la arabinosa se nota una mancha típica de un polisacárido de movilidad pequeña, que sigue apareciendo en los tiempos sucesivos, mas una algo más

baja y otra casi inmediatamente antes de la arabinosa de partida y que en este caso nos pronunciamos por considerarla como una hexosa sintetizada a partir de dos moléculas de gliceraldehído.

A los 45 minutos el cromatograma es casi análogo al de antes salvo en la presencia de otro oligosacárido de $R_{f} = 0,36$ que se corresponde con la arabinosa de otros cromatogramas. La otra particularidad es que debajo de la arabinosa empieza a aparecer la mancha debida a xilosa. Su formación ha de atribuirse a una recombinación de fragmentos (gliceraldehído más glicolaldehído) orientada por el hecho de que se combinan estos en *trans* por tratarse de una reacción menos impedida estéricamente.

En el cromatograma correspondiente a 90 minutos no se reconoce ninguna peculiaridad respecto al de 45 minutos salvo en la mancha atribuida a xilosa que se ha intensificado.

Otros cromatogramas se revelaron con orcina no detectándose en ninguno la presencia de heptulosa.

E) Acción del hidróxido sódico

A temperatura ambiente tiene lugar una reacción de Lobry sin fragmentaciones secundarias.

A baño de maría y al cabo de 1 minuto se obtienen los siguientes resultados:

a) se observa la aparición de arabinosa, de su epímero ribosa y de ribocetosa,

b) abundan también la xilosa y lixosa más la cetosa correspondiente a estas últimas pentosas, es decir, que prácticamente se ha producido la isomerización de pentosas y la cetoformación en un tiempo brevísimo,

c) a continuación, casi confundida con la xilocetosa, aparece ramnosa,

d) se nota claramente la presencia de dihidroxiacetona como fragmento único,

e) en la zona de polímeros solo uno que se corresponde con la arabinosa.

A los 10 minutos el cromatograma es más completo y análogo a los que corresponden a un tratamiento de 45 y 90 minutos. En los tres cromatogramas se observa lo siguiente:

a) aparición de seis manchas que se mueven a menos velocidad que la propia arabinosa y que a partir de la más lenta se corresponden con arabotriosa, xilotriosa, ribotriosa, arabobiosa, xilobiosa más lixobiosa y ribobiosa,

- b) heptulosas que aparecen superpuestas sobre las dos últimas y, por último, sorbosa,
- c) las cuatro aldo- y las dos cetopentosas, predominando la ribulosa,
- d) ramnosa y quinovosa,
- e) gliceraldehido,
- f) 6-desoxifruktosa y 6-desoxisorbosa,
- g) dihidroxiacetona,
- h) lactaldehido y acetol.

En cromatogramas preparativos desarrollados en n-butanol-etanol:agua (10:1:2 v/v) se obtuvieron pequeñas muestras de los polímeros referidos, comprobándose que correspondían a fracciones únicas y, cuando no, se recromatografiaron. Hidrolizados con SO_4H_2 1 N, a reflujo durante 6 horas, se obtenían en cada caso el azúcar unidad y restos del polímero de partida si se trataba de biosas, detectándose manchas de triosas, biosa y monosa cuando se hidrolizan triosas, es decir, que estas condiciones eran adecuadas para una hidrólisis escalonada, aunque siempre predominando la manosa. Se confirmó que la xilobiosa estaba impurificada con lixobiosa.

F) *Acción del hidróxido potásico*

Con hidróxido potásico a temperatura ambiente no se observa ninguna particularidad distinta de las previsibles, es decir, sólo los productos de Lobry.

A baño de maría al cabo de 1 minuto se reproduce el mismo resultado que se obtuvo con el hidróxido sódico.

Lo mismo puede decirse de los resultados al cabo de 10, 45 y 90 minutos que son iguales entre sí pero distintos de los de 1 minuto. Por no haber diferencias con los de hidróxido sódico no repetimos lo allí dicho.

XILOSA

A) *Comportamiento en agua*

A temperatura ambiente, no se observa ninguna alteración cromatográfica puesto que la mutarrotaación que sin duda ha sufrido no llega a producir cambios en los cromatogramas. En efecto, como simple curiosidad se comprobó para este azúcar la existencia de mutarrotaación y así una disolución reciente de la D-xilosa empleada tenía un $[\alpha]_D^{20} = +93^\circ$ (usando una disolución del 10 %) y a las 24 horas era de $+18^\circ$.

A baño de maría a las 24 horas (solución al 10 % en agua) daba tres manchas que se movían a menor velocidad que la muestra de partida y otras dos de movimiento más rápido. De las tres más lentas las dos primeras tienen color rojo y las hemos identificado con la xilobiosa y xilotriosa lo que se confirmó no sólo por el movimiento paralelo con dos muestras tipo sino que estos dos oligosacáridos se aislaron y estudiaron con cierto detalle.

Para disponer de muestras algo más abundantes se hizo una previa separación de oligosacáridos del resto de azúcares, utilizando el método de WHISTLER y DURSO (164). Para ello una muestra de la disolución acuosa se concentró a vacío hasta tener consistencia de jarabe, entonces se añadió mediante una pipeta a la parte alta de una columna rellena con carbón y celita en la relación 1:1. Se hizo la elución con porciones de 20 cc de mezclas agua : etanol de creciente riqueza alcohólica variando ésta desde 0 a 90 %, en saltos de 10 en 10 %. Cada efluente se controló cromatográficamente. La xilobiosa predominaba en los de riqueza alcohólica, del 40 y 50 % y la xilotriosa en el de 70 % que son los extractos que se aprovecharon evaporándolos a vacío. La xilobiosa tenía un punto de fusión de 108°C y la xilotriosa de 213°C y cromatográficamente eran bastante puras. Por hidrólisis de pequeñas porciones con SO_4H_2 1 N

(164) R. L. WHISTLER y D. F. DURSO, *J. Am. Chem. Soc.*, 72, 667 (1950).



a reflujo durante 6 horas daban, la primera un poco de xilobiosa y mucha xilosa, y la segunda tres manchas, una escasa de xilotriosa, otra algo más abundante de xilobiosa y una preponderante de xilosa.

Cuando la hidrólisis se hizo también con SO_4H_2 1 N, pero en tubo cerrado, los rastros de oligosacáridos eran casi insignificantes.

A una muestra de 0,2 grs de xilobiosa y a otra de 0,1 grs de xilotriosa que estaban a pH 7 situadas en 7 matraces esmerilados de 10 cc se les añadió 0,6 y 0,3 cc respectivamente de sulfato de metilo y a continuación 1,5 y 0,75 cc también respectivamente, de disolución de NaOH al 30 % haciendo la adición gota a gota, agitando vigorosamente y enfriando. Al cabo de 12 horas de reposo se repite la metilación en idénticas condiciones, y otra vez después de pasar otras 12 horas. Para asegurarnos de la total metilación se extrae con cloroformo cada conjunto, después de hervido y acidificado. Los extractos, después de evaporado el disolvente, se vuelven a metilar, ahora con reactivo de Purdie (0,6 gr de $\text{Ag}_2\text{O} + 2$ cc de CH_3I). Destruído el exceso de ioduro de metilo por simple destilación se procede a extraer nuevamente con cloroformo, separándose productos totalmente metilados, desde el punto de vista práctico, pues en efecto, el correspondiente al disacárido (xilobiosa) contenía un 49,2 % de metoxilo (97,4 % del teórico) y el derivado de xilotriosa tenía 46,2 % de metoxilo que supone casi el 98,2 % del teórico. Por hidrólisis, con clorhídrico metanólico y con clorhídrico acuoso se obtienen de la biosa metilada fragmentos que se correspondían indudablemente con 2-3-4 tri-O-metil-D-xilosa y 2-3-di-O-metil-D-xilosa, lo que permite asignar a aquella biosa una unión en 1-4. La hidrólisis en idénticas condiciones de la triosa metilada daba también ambos metilazúcares y sólo ellos por lo que lógicamente se trata de un trisacárido lineal con la misma unión en 1-4. El derivado trimetilado, que tenía un punto de fusión de 90°C reaccionaba con la anilina para dar una base de Schiff de punto de fusión 102°C , y se movía en los cromatogramas a la misma velocidad que una muestra tipo de la que disponíamos en el laboratorio (*). El derivado dimetilado se comparó con 2-3, 3-4 y 2-4 dimetil-xilosa tipo del mismo origen, en los disolventes acetato de etilo : ácido acético : ácido fórmico : agua (18:3:1:4 v/v), n-butanol : benceno : agua (47:169:15 v/v), n-butanol : etanol : agua (40:11:19 v/v) y n-butanol : piridina : agua (10:3:3 v/v) comportándose como la primera de las 3 muestras tipo, citadas, es decir, a la 2-3-di-O-metilxilosa.

La mancha más próxima a xilosa de las tres más lentas, amarillenta con ftalato ácido de anilina se debe a una heptulosa como pudo confir-

(*) Obsequio procedente del Departamento de Química Orgánica de Bristol, del grupo de trabajo que dirige J. K. N. JONES.



marse con orcina. De las dos manchas de mayor velocidad, la primera es consecuencia de una isomerización de Lobry en su primera fase, ya que no hay trazas de xilosa pues no se aprecia aún la elongación de la xilosa que sería de esperar si esta última existiera. Por último había una mancha debida a dihidroxiacetona que ha surgido por fragmentación mientras el aldehído glicólico debe haberse combinado inmediatamente para la formación de heptulosa o de una tetrosa intermedia.

A las 48 horas la diferencia está en que aparece un nuevo polímero probablemente el debido a la xilotetosa. También hay ya una elongación manifiesta de la xilosa por efecto de la aparición de xilosa. A las 72 horas se puede decir que hay una reproducción absoluta de lo que ocurre a las 48 horas, incluida la aparición de las cuatro manchas más lentas que la xilosa y de las dos más rápidas que aquellas.

B) *Acción del hidróxido cálcico*

A temperatura ambiente sucede la transposición de Lobry aunque no con demasiada intensidad.

A baño de maría al cabo de 1 minuto se observa la presencia de polímeros (tres destacados sobre un fondo continuo, todos ellos con tonalidad rosa) que se corresponden con los R de los polímeros de 2, 3 y 4 eslabones. Entre las manchas más veloces que la xilosa, es de destacar que de las referidas para el caso del agua, sólo aparece la xilocetosa pero no gliceraldehído detectándose en lugar de éste la dihidroxiacetona. Además se inicia la aparición de manchas extendidas entre xilosa y xilocetosa debidas a ribocetosa.

Los cromatogramas correspondientes a la actuación de hidróxido cálcico durante 10, 45 y 90 minutos son semejantes entre sí, salvo en esa última mancha debida a ribocetosa que es más intensa en función del tiempo; también es clara la presencia de algo de ribosa y arabinosa.

C) *Acción del hidróxido bórico*

A temperatura ambiente no hay diferencias con el calcio.

En cambio a baño de maría pueden destacarse detalles de interés. Así, el cromatograma de 1 minuto es casi más simple que el de hidróxido cálcico, no aparece xilocetosa pero sí los polímeros, aunque no muy definidos.

A los 10, 45 y 90 minutos los cromatogramas son iguales y más complejos que los de hidróxido cálcico. Además de gliceraldehído y dihidroxiacetona hay un azúcar intermedio que se corresponde con las 6-desoxi-

cetosas de fructosa y sorbosa. También aparecen tres manchas pardas por debajo de la dihidroxiacetona, y que se debían a lactaldehído, acetol y metilglioxal.

D) *Acción del hidróxido amónico*

A temperatura ambiente a las 48 horas se observa la aparición de la xilocetosa y de la lixosa, esta última en realidad no llega a separarse bien de la xilosa.

A baño de maría aparecen al cabo de 1 minuto dos polímeros bien definidos y una cola desde la línea de partida hasta el menos veloz; después se nota la presencia de xilosa, lixosa y xilocetosa pero no aparece ninguna otra mancha.

A los 10, 45 y 90 minutos los cromatogramas son sensiblemente idénticos entre sí pero difieren del de 1 minuto en la aparición de cuatro polímeros en vez de dos, en la presencia de una mancha algo más lenta que la xilocetosa y que es atribuible a una ribocetosa, signo de que se ha iniciado la epimerización en C-3, y por último en que ya se detectan tres manchas amarillentas atribuibles a gliceraldehído, 6-desoxicetosas y dihidroxiacetona. Estas últimas manchas son de intensidad algo mayor al crecer los tiempos apareciendo muy tenues en el cromatograma de 10 minutos.

E) *Acción del hidróxido sódico*

A temperatura ambiente sólo tiene lugar la transposición de Lobry en observaciones hechas a las 24 y 48 horas.

A baño de maría, al minuto se observa la aparición de un rastro casi continuo de polímeros, desde la línea de partida, que no llega a permitir la diferenciación entre ellos y pentosa. Después aparecen las diversas pentosas y cetopentosas si bien la más claramente diferenciada es la xilulosa. Por debajo de esta última sólo se detecta una mancha debida a dihidroxiacetona que se muestra muy tenue.

A los 10, 45 y 90 minutos, tiempos entre los que no se observan diferencias hay dos manchas más, situadas a continuación de xilulosa debidas a gliceraldehído y a 6-desoxicetosas. A continuación de la correspondiente a dihidroxiacetona se aprecian dos debidas a lactaldehído y acetol más metilglioxal. La mancha debida a dihidroxiacetona es la más manifiesta, después de la correspondiente a xilulosa.

F) *Acción del hidróxido potásico*

En hidróxido potásico a temperatura ambiente se repite lo dicho para el hidróxido sódico.

A baño de maría parece como si el efecto fuese ligeramente más retardado que en hidróxido sódico. Al primer minuto aparece claramente la xilocetosa y sin duda la lixosa así como dos polímeros rojizos identificados como xilobiosa y xilotriosa, más el rastro casi continuo que aparecía en el caso del hidróxido sódico. No se nota la presencia de dihidroxiacetona.

A los 10 minutos es de destacar la presencia de una mancha parda por encima de las pentosas y que es atribuible a una hexosa y a heptulosas superpuestas. Por debajo de la xilocetosa sólo se observa la presencia de dihidroxiacetona que en los cromatogramas con hidróxido sódico se notaba al cabo de 1 minuto.

A los 45 y 90 minutos es cuando realmente los cromatogramas son completos, recordando a los de 10 minutos de hidróxido sódico, es decir, se incluyen también gliceraldehído, 6-desoxicetosas y 3 fragmentos de 3 carbonos.

En realidad, tras unas observaciones más cuidadas y repitiendo cromatogramas con mayor concentración de isomerizados, se observa que a los 10 minutos ya se encuentra el cromatograma definido, pero la concentración de los productos de mayor velocidad que la xilocetosa es muy pequeña, salvo la correspondiente a dihidroxiacetona.

RIBOSA

A) *Acción del agua*

A temperatura ambiente no hay alteraciones después de un año. Por otro lado, la mutarrotación (se partió de D-ribosa) era aparentemente nula a las 24 horas ya que el cambio de su $[\alpha]$ iba sólo desde 23° a $23,75^\circ$, valor que se mantenía al cabo de un año. Sin embargo, midiendo poderes rotatorios y calculando los específicos de 20 en 20 minutos, se obtienen los valores sucesivos $18,5^\circ$; 19° ; $20,5^\circ$; $20,75^\circ$; $21,5^\circ$; $22,5^\circ$; $23,75^\circ$; $23,75^\circ$; $23,75^\circ$ (estabilización a las 2 h. 20 m. por lo que se tiene seguridad de que había existido mutarrotación).

A baño de maría a las 24 horas hay presencia de arabinosa y heptulosa pero no de ribulosa. A las 48 horas se observa el mismo comportamiento.

A las 72 horas hay más manchas y así, por encima de la heptulosa y arabinosa aparecen hasta cuatro, la más intensa corresponde a una ribobiosa, que es la más próxima a la heptulosa. Otras tres manchas muy tenues quedan por encima de éstas y se corresponden con otros polímeros de mayor grado. Hecha la representación de la función R_m de estos polímeros, corresponden alternados con los de grado 2 y 3 de ribosa y arabinosa. La hidrólisis de muestras aisladas por la técnica de Flood confirman lo supuesto.

B) *Acción del hidróxido cálcico*

A temperatura ambiente se observa el resultado previsible por una simple reacción de Lobry.

A baño de maría, después de 1 minuto sólo se observan por un lado, los productos de isomerización de Lobry, arabinosa, ribosa y ribulosa (ésta poco manifiesta), por otro las dos manchas debidas a heptulosas y

por encima de éstas tres polímeros que se atribuyeron a ribobiosa, arabo-biosa y ribotriosa y por último, ya abajo, se encuentra una mancha amarilla bien separada debida a dihidroxiacetona.

A los 10, 45 y 90 minutos los cromatogramas son completos y en ellos se distingue una primera parte hasta arabinosa, idéntica a la del cromatograma de 1 minuto. Después es ya manifiesta la presencia de xilosa y xilocetosa, además de encontrarse muy clara la presencia de ribulosa que no se notaba en el de 1 minuto. Entre xilocetosa y dihidroxiacetona se encuentran dos manchas amarillas, la segunda doble, atribuyéndose la sencilla a gliceraldehido y la doble, que es muy tenue, se debe a las 6-desoxicetosas correspondientes a fructosa y sorbosa; por último, debajo de la dihidroxiacetona aparece un rastro pardo en el que no llegan a distinguirse las dos o tres manchas previsibles, pero que es muestra de que se han formado fragmentos y entre ellos está el lactaldehido procedente del acetol, al que puede atribuirse la aparición de 6-desoxicetohexosas.

C) *Acción del hidróxido bórico*

A temperatura ambiente se comprueban los resultados del hidróxido cálcico.

A baño de maría después de 1 minuto no se observa efecto alguno sobre la ribosa.

En cambio a los 10, 45 y 90 minutos los cromatogramas son prácticamente análogos a los obtenidos con hidróxido cálcico.

D) *Acción del hidróxido amónico*

A temperatura ambiente se aprecia una sencilla pero retardada reacción de Lobry.

A baño de maría al cabo de 1 minuto se observan los mismos polímeros que en el tratamiento con otros álcalis y otro tanto puede decirse en cuanto a la presencia de heptulosas. En este tiempo ya ha tenido lugar parte de la isomerización en carbono 3 además de la típica de Lobry, pues en efecto, se nota ya xilosa, la lixosa dudosa, y en escasa proporción las cetopentosas. No hay manchas intermedias hasta la de dihidroxiacetona. Por debajo de ésta tampoco queda ningún rastro.

A los 10 minutos puede destacarse como diferencia de la anterior la presencia de una ligera ráfaga que precede a la ribosa como prueba de formación incipiente de xilocetosa; en realidad es que a la vez que se formó esta cetosa se isomerizó a las aldosas 3-epímeras (xilosa, lixosa)

puesto que ya al minuto se nota la presencia de xilosa. Por debajo de la dihidroxiacetona aparecen dos manchas que se corresponden con el lactaldehído y acetol, no apreciándose presencia de metilgloxal ni de 6-desoxicetosa.

Los cromatogramas correspondientes a 45 y 90 minutos son análogos al anterior salvo en la mayor proporción de arabinosa y xilocetosas formadas.

E) *Acción del hidróxido sódico*

A temperatura ambiente tiene lugar la reacción de Lobry prevista.

A baño de maría después de 1 minuto es de destacar la abundante presencia de las 4 aldopentosas isómeras y de sus correspondientes cetosas, también las de gliceraldehído y dihidroxiacetona; hay otras más móviles que la de dihidroxiacetona, si bien estas últimas apenas si se notan. Debe mencionarse que no aparecen polímeros, ni siquiera trazas de heptulosas.

A los 10, 45 y 90 minutos los cromatogramas se enriquecen por un lado en los citados polímeros y heptulosas y por otro con las 6-desoxicetosas y con los tres fragmentos de mayor movilidad que la dihidroxiacetona.

F) *Acción de hidróxido potásico*

Tanto a temperatura ambiente como en los ensayos a baño de maría hay un total paralelismo con lo que sucede con el hidróxido sódico.

SACAROSA

A) *Acción del agua*

A temperatura ambiente hay una pequeña inversión.

A baño de María, a las 24 horas es de destacar que tiene lugar la total inversión, de tal manera que no queda sacarosa residual, pero debe hacerse también la observación de que, atendiendo a la intensidad relativa de las manchas, está claro que prepondera la glucosa. La menor proporción relativa de fructosa puede atribuirse a su intervención en diversos procesos de interconversión, siendo fundamental el del tránsito a manosa y glucosa, de modo que esta última incrementa la concentración de glucosa resultante en el proceso hidrolítico.

A las 48 horas sigue notándose el predominio de glucosa frente a fructosa, apareciendo otra nueva cetosa con todas las características de la psicosa, lo que también estaría a favor de una cierta facilidad de la fructosa recién liberada para sufrir isomerización, ya que cuando se partía de fructosa (recuérdense los resultados expuestos al referirnos a ésta) a las 72 horas sólo aparecía psicosa; también en aquel caso sólo se notaba la presencia de glucosa después de un tratamiento de 72 horas.

A las 72 horas de baño de maría no hay diferencias con los resultados obtenidos por un tratamiento de 48 horas.

B) *Acción del hidróxido cálcico*

A temperatura ambiente no sufre alteración alguna después de prolongado almacenamiento (2 meses).

A baño de maría no se observa cambio alguno después de 1, 10, 45 y 90 minutos, habiéndose usado como de costumbre soluciones del 10 % de azúcar en agua saturada de cal; estos resultados contrastan grandemente con los obtenidos por simple ebullición en agua.

C) *Acción del hidróxido bórico*

Los resultados iguales a los anteriores.

D) *Acción del hidróxido amónico*

A temperatura ambiente se observa una ligera inversión, pero con manifiesta superioridad de sacarosa residual.

A baño de maría, después de 1 minuto se encuentra sacarosa, glucosa y fructosa en concentraciones muy parecidas entre sí aunque predominando la sacarosa.

A los 10 y 45 minutos la inversión prosigue de modo que la proporción glucosa : fructosa es aproximadamente 1 : 1; hay claro predominio de los azúcares resultantes respecto a sacarosa residual.

Es de destacar que a los 90 minutos la mancha debida a fructosa se hace muy tenue, algo así como si una gran parte de ésta se hubiese transformado en glucosa y otra parte recombinado con aquella para regenerar sacarosa; en consecuencia en este momento la presencia de fructosa es muy pobre.

E) *Acción del hidróxido sódico*

No se observa alteración de la sacarosa ni a temperatura ambiente ni a baño de maría.

F) *Acción del hidróxido potásico*

Repetimos lo dicho para el hidróxido sódico. No obstante puede hacerse la observación de que a la mancha debida a sacarosa le sigue un pequeño rastro que podría atribuirse a algún producto de síntesis incipiente.

MALTOSA

A) *Acción del agua*

A temperatura ambiente no hay alteración. La maltosa utilizada estaba impurificada por glucosa y dos polímeros pero la intensidad de las manchas se mantenían a lo largo del tiempo no formándose ningún otro compuesto.

A baño de maría puede repetirse lo mismo tanto a las 24 horas como a las 47 y 72.

B) *Acción del hidróxido cálcico*

A temperatura ambiente observamos que durante las tres primeras horas no existe aumento en la proporción de glucosa que habíamos observado inicialmente como impureza en la maltosa utilizada. A partir de las 6 horas se inicia la presencia de maltulosa y ácidos sacarínicos (según pudo comprobarse en cromatogramas duplicados que se revelaron con reactivo de ABDEL AKHER). A las 24 horas se observa una clara disminución en la concentración de maltosa en beneficio de la de glucosa y de la presencia de fructosa y manosa. Al principio se observa claramente una cierta hidrólisis que es responsable de la aparición de glucosa; a continuación, la transposición de Lobry que afecta a la propia maltosa para producir maltulosa, incluso con clara preferencia a la que podría suceder a glucosa. Esta sensibilidad de los oligosacáridos reductores para sufrir la transposición de Lobry fue estudiada para el tránsito lactosa \rightarrow lactulosa por MONTGOMERY y HUDSON (165). Por otro lado la maltulosa puede comportarse como un oligosacárido muy vulnerable a juzgar por la aceleración que se nota en la descomposición del oligosacárido, en be-

(165) E. MONTGOMERY y C. S. HUDSON, *J. Am. Chem. Soc.*, 52, 2101 (1930).

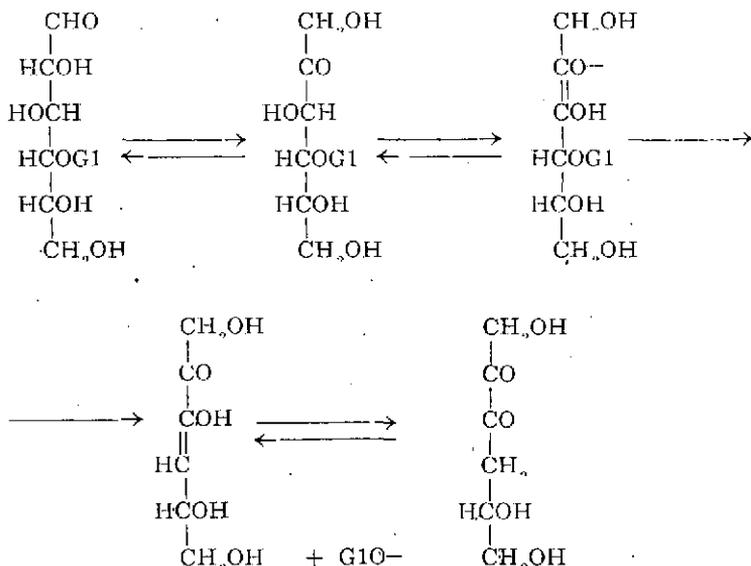
neficio de la formación de oligosacáridos por un lado, y de fructosa y glucosa por otro (por hidrólisis). Conforme fueron estimulándose las reacciones de descomposición se extrema la velocidad de destrucción de la maltosa de tal modo que a los 5 días ya no existe prácticamente como tal ni como maltulosa.

Debe destacarse el hecho de que en realidad a las 48 horas es cuando se observa el valor máximo de glucosa. A partir de los cinco días no parece traducirse la pérdida de maltosa en aumento de monosacáridos, puesto que aquella desaparece sin producirse incremento de las manchas debidas a éstos.

A baño de maría se observa que pasado el primer minuto se inicia la formación de maltulosa y simultáneamente aparece un incremento en glucosa y presencia de fructosa, así como de las manchas debidas a un compuesto que se separó e identificó con la 4-desoxi-3-oxo-D-fructosa.

Por ello, se reprodujo el experimento de MACHELL y RICHARDS (130), de degradación alcalina de maltosa, en agua de cal a 25° C, reproduciendo igualmente las condiciones de caracterización de aquellos investigadores para el compuesto dicarbonílico, que para ellos era innegable, y se comparó con el comportamiento del compuesto dicarbonílico formado en estas otras condiciones.

El esquema de su formación a partir de maltosa sería:



Se hicieron cromatogramas en varios disolventes y en todos había coincidencia entre la mancha problema y la mancha considerada como tipo.

A los 10 minutos el cromatograma muestra un grado más avanzado tanto en la formación de maltulosa como en la de glucosa, fructosa y 4-desoxi-3-oxo-D-fructosa apareciendo además una mancha menos veloz que esta última y que se corresponde a un compuesto que separado e identificado era dihidroxiacetona. Por otro lado, aunque la maltosa original ya daba unas manchas, debidas a polímeros de la glucosa de mayor grado, se observa que a partir de los 10 minutos hay un incremento suave en la proporción de éstos, aunque no se nota clara diferencia entre los resultados de 10, 45 y 90 minutos, pero sí entre éstos y el resultado de 1 minuto. Prácticamente no hay diferencias en la naturaleza y cuantía de los compuestos de las manchas resultantes en tiempos comprendidos entre 10 y 90 minutos.

C) *Acción del hidróxido bórico*

A temperatura ambiente no hay diferencias con lo que ocurre con el de calcio.

A baño de maría resultan cromatogramas algo más complejos que con el agua de cal. Después de 1 minuto se nota glucosa, muy poca fructosa y bastante 4-desoxi-3-oxo-D-fructosa. Los polímeros están casi en la misma proporción que en la maltosa de partida.

A los 10 minutos ya existe un rastro casi continuo desde maltosa hasta desoxicompuestos. Inmediatamente, encima de estos últimos, moviéndose a velocidad sólo ligeramente inferior hay una mancha amarilla que coincide en todo con el lactaldehído. Hay manifiesta evidencia de que además de la dihidroxiacetona está también el gliceraldehído y de que entre gliceraldehído y dihidroxiacetona existe una mancha parda que coincide en sus características con las 6-desoxicetosos, cuya formación queda justificada por la segura aparición del lactaldehído. También es de destacar la presencia de una zona rojiza a modo de cola de la fructosa y que se debe a la presencia de pentosas.

D) *Acción del hidróxido amónico*

A temperatura ambiente se observa que a las 24 horas aparecían fundamentalmente maltosa y maltulosa.

A las 48 y 72 horas se notaban además trazas de glucosa y fructosa.

A baño de maría se observa que al primer minuto no hay práctica-

mente alteración, mientras que a los 10 minutos se nota la presencia de maltulosa. Sin embargo en el ensayo de 45 minutos aparece glucosa (la maltosa utilizada contenía glucosa como impureza pero en la fase de 45 minutos se determina un incremento en la concentración de la mancha debida a éste) y fructosa. Además se detecta una mancha que avanza más que el gliceraldehido y dihidroxiacetona que corresponde al compuesto dicarbonílico ya referido, que se habrá originado por desproporción interna de la fructosa, o más bien, simultáneamente a la epimerización e hidrólisis del oligosacárido inicial.

El comportamiento de la maltosa en frío y en caliente demuestra que la etapa de isomerizaciones de Lobry del disacárido, que afecta a su parte reductora es relativamente rápida y desde luego precede a la etapa de hidrólisis. Igualmente se observa que la de hidrólisis propiamente dicha tiene lugar sobre la glucosilcetosa primeramente formada.

En los experimentos a baño de maría queda también de manifiesto que el tránsito de la aldosa a cetosa y la formación del compuesto dicarbonílico son en cambio casi simultáneos; ésto hace pensar que este último compuesto se origina a gran velocidad a partir de glucosa o fructosa indistintamente.

No notamos la mancha debida a manosa referida por HOUGH, JONES y RICHARDS (52), ni la de pentosa (arabinosa) a la que estos autores aluden. Tampoco aparece psicosa al hidrolizar la banda de polímeros, la cual aparecería en el caso de haberse formado al cabo de los tiempos usados, un oligosacárido en el que ésta se encontrase.

Al comparar los cromatogramas de maltosa y glucosa destaca un paralelismo, entre los de 10 minutos de glucosa y 45 de maltosa, que nos permite reconocer un retraso en el comportamiento del disacárido.

E) Acción del hidróxido sódico

A temperatura ambiente, durante 24 horas sólo se observa la aparición de maltosa, glucosa y de un compuesto que se movía con un $R_{f, \text{muc.}} = 2,12$, el que se aisló y por sus características resultó ser también la 4-desoxi-3-oxo-D-fructosa después de volver a hacer toda la serie de comprobaciones descritas por MACHELL y RICHARDS (130). No aparecían en cambio, manchas intermedias en la zona de pentosas ni tampoco a la altura de gliceraldehido o de dihidroxiacetona.

Prácticamente se obtuvo idéntico resultado cuando el tratamiento se hizo en ausencia de oxígeno (atmósfera de nitrógeno usada por los citados autores).

A las 48 y 72 horas los cromatogramas son idénticos entre sí, pero

más complejos que el correspondiente a 24 horas, apareciendo en los mismos clara presencia de maltulosa, fructosa, gliceraldehido y dihidroxiacetona, además de las ya descritas.

A baño de maría los cromatogramas de 1 minuto son una reproducción de los de 48 horas a temperatura ambiente.

En cambio a los de 10, 45 y 90 minutos, prácticamente iguales entre sí, son claramente complejos detectándose en los mismos lo siguiente:

- a) por lo menos un polímero de glucosa de grado tres (maltotriosa) que a los 45 y 90 minutos ha dado lugar a la maltotriulosa.
- b) maltosa y sus cetoisómeros maltulosa y glucopsicosa,
- c) glucosa, fructosa y manosa, esta última en menor proporción,
- d) probables trazas de psicosa.
- e) aldopentosas, cetopentosas y gliceraldehido,
- f) 6-desoxicompuestos (derivados de fructosa y sorbosa),
- g) dihidroxiacetona,
- h) una pardo-rojiza no identificada,
- i) 4-desoxi-3-oxo-D-fructosa,
- j) tres manchas debidas a lactaldehido, acetol y metilglioxal.

F) *Acción del hidróxido potásico*

A temperatura ambiente ocurre prácticamente lo mismo que con hidróxido sódico.

A baño de maría se observa que al primer minuto sólo ha tenido lugar el paso de maltosa a maltulosa y la aparición de abundante glucosa y fructosa, así como de una zona rojiza, un poco elongada, que se corresponde con la zona de pentosas.

A los 10, 45 y 90 minutos los cromatogramas son análogos entre sí y se detectan los mismos azúcares fundamentales que en la acción del hidróxido sódico. Pasan en cambio desapercibidos los 6-desoxicompuestos y la mancha amarillenta existente entre dihidroxiacetona y el compuesto dicarbonílico que correspondería al ácido láctico.

CELOBIOSA

A) *Acción del agua*

A temperatura ambiente no se observa ninguna mancha distinta a la correspondiente a dicho disacárido después de 4 horas ni aún después de 1, 2 y 3 meses.

A baño de maría se observa que a las 24 horas hay por un lado presencia de glucosa y por otro se detectan dos manchas tenues, una antes y otra después de celobiosa. La más baja da color amarillo, con ftalato ácido de anilina, y por hidrólisis con ácido sulfúrico 1 N da glucosa y fructosa en partes iguales; se atribuye dicha mancha a una celobiulosa en etapa de formación, por lo que no es extraño que no aparezca en cambio fructosa en el cromatograma de 24 horas. La mancha más lenta que la celobiosa se corresponde con un trisacárido, que con seguridad será la celotriosa, puesto que no produce por hidrólisis nada más que glucosa y celobiosa y en cambio tiene un R_f tal que representada la función R_m en un sistema de coordenadas junto a celobiosa y glucosa se obtiene una línea recta; no es extraña esta oligosíntesis que recuerda a la de la Naturaleza en la que siempre hay acciones dirigidas.

A las 48 horas se observa que aparecen además de las manchas antes dichas otras debidas a fructosa disminuyendo en cambio casi la intensidad de la celulosa lo que hace pensar que la formación de fructosa se ha hecho en parte a costa de la última, ya que a la vez se aprecia un aumento en la proporción relativa de glucosa.

En el cromatograma de 72 horas se mantienen los mismos resultados que en el de 48 horas.

B) *Acción del hidróxido cálcico*

A temperatura ambiente se aprecia sólo después de 24 horas un poco de la cetosa, celobiulosa y algo más de glucosa; era de esperar la aparición de fructosa, que no aparece como tampoco ningún otro azúcar.

A baño de maría, después de 1 minuto sólo se aprecia una zona de polímeros no apreciables en su número y que va desde la línea de partida. En realidad tampoco se dió un tiempo mayor de desarrollo para evitar que se marchen los componentes de menor peso molecular.

A los 10 minutos se detecta claramente la presencia de celobiulosa así como la de glucosa (muy abundante), y en menor escala dihidroxiacetona y acetol.

A los 45 minutos se observan las mismas más otras dos manchas, una parda que se mueve a la misma velocidad que la psicosa y otra a la del gliceraldehído. Es de destacar la falta de fructosa pese a prever su presencia, si se admite el tránsito a glucosa y fructosa a través de la celobiulosa.

A los 90 minutos se reproduce lo dicho para los 45 minutos.

C) *Acción del hidróxido bórico*

A temperatura ambiente tiene un comportamiento análogo al observado frente a hidróxido cálcico.

A baño de maría aparecen después de 1 minuto trazas de celobiulosa y glucosa. No se nota ningún otro azúcar extraño.

La aparición de celobiulosa a los 10, 45 y 90 minutos es prácticamente análoga. En estas condiciones aparecen fructosa seguida de una zona roja debida a pentosas, amarilla debida a 6-desoxicetosas, y además el gliceraldehído, dihidroxiacetona, acetol y metilglioxal.

D) *Acción del hidróxido amónico*

A temperatura ambiente se observan algunas pequeñas alteraciones relacionadas con la transposición de Lobry para disacáridos.

A baño de maría, después de 1 minuto sólo se observa un rastro de polímeros que va desde la línea de partida hasta celobiosa, más una marrón-tenue de glucosa.

A los 10 minutos se observa por un lado la celobiulosa que llega a representar casi una cantidad equivalente a la de celobiosa existente. Casi otro tanto hay de glucosa y por último en sólo trazas encontramos glice-

raldehido, dihidroxiacetona y parte en forma de acetol y lactaldehido.

E) *Acción del hidróxido sódico*

A temperatura ambiente sufre la transposición de Lobry.

A baño de maría se obtienen unos cromatogramas magníficos y representativos. Así, al cabo de 1 minuto se observa:

- a) celobiulosa,
- b) glucosa y fructosa,
- c) las cuatro aldopentosas mas la cola debida a cetopentosas,
- d) gliceraldehido y una de gran intensidad que se corresponde con la 6-desoxifruktosa o sorbosa.
- e) dihidroxiacetona,
- f) de los componentes menores sólo aparece una mancha amarilla anaranjada que se corresponde con la 4-desoxi-3-oxo-fructosa.

A los 10, 45 y 90 minutos se observa como diferencia respecto a los de 1 minuto la aparición de unas manchas desde la dihidroxiacetona hacia abajo.

F) *Acción del hidróxido potásico*

A temperatura ambiente no hay diferencia sensible con el de hidróxido sódico.

A baño de maría puede decirse que a los 10, 45 y 90 minutos no hay diferencias entre sí y prácticamente son una reproducción de los de hidróxido sódico.

En el cromatograma correspondiente a 1 minuto sí que hay diferencias, ya que el hidróxido potásico después de dicho tratamiento sólo ha provocado la formación de la celobiulosa y de glucosa así como una mancha en la parte inferior debida a la 4-desoxi-3-oxo-fructosa. Este caso, en el que no aparecen fragmentos y sí el compuesto dicarbonílico permite admitir el mecanismo de formación de Machell y Richards ya referido en otro lugar.

LACTOSA

A) *Acción del agua*

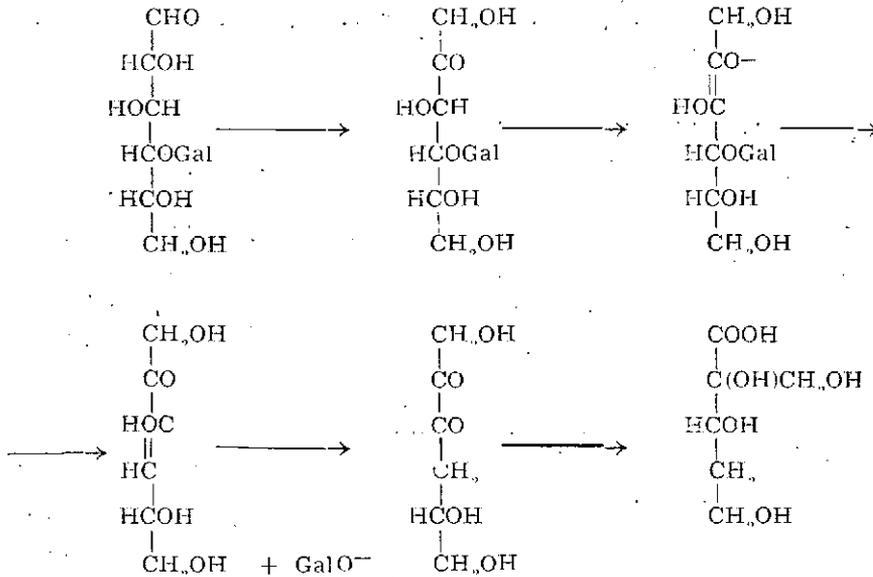
A temperatura ambiente no sufre ninguna alteración aún después de tiempos muy largos.

A baño de maría en las primeras 24 horas sufre un proceso suave de hidrólisis en sus componentes glucosa y galactosa, a la vez que se detecta una mancha próxima a la lactosa que por su color; su movilidad y sus productos de hidrólisis se identifica como lactulosa.

A las 48 horas se obtiene el mismo resultado. Otro tanto ocurre a las 72 horas.

B) *Acción del hidróxido cálcico*

A temperatura ambiente observamos que después de 24 horas sólo se detectaban lactosa, lactulosa y galactosa. En nuestros experimentos se observa el mismo comportamiento a las 48 y 72 horas. Sin embargo, en los trabajos de CORBETT y KENNER (116) sobre la descomposición de la lactosa, por agua saturada de cal libre de oxígeno a 25°, además de lactosa, lactulosa y galactosa se detectan tagatosa, ácidos sacarínicos y talosa. En su trabajo presentan el esquema de formación de sacarínicos y otros compuestos de la siguiente manera:



En dicho esquema no se señalan velocidades relativas de intercambio pero podemos indicar que la primera etapa de lactosa \rightarrow lactulosa es relativamente lenta, como ya demostraron en su día MONTGOMERY y HUDSON (165), en tanto la cetobiosa resultante se degrada rápidamente en ácidos α y β sacarínicos y en galactosa, si bien la última se desintegra también gradualmente en productos ácidos.

A baño de maría al cabo de 1 minuto no hay alteración.

A los 10 minutos aparecen lactulosa, galactosa y glucosa así como trazas de fructosa y por último dihidroxiacetona en mancha muy tenue.

A los 45 y 90 minutos se nota además la presencia de gliceraldehído. Como se ve, se trata de cromatogramas sumamente simples. No se detecta en ninguno el compuesto dicarbonílico esperado.

C) Acción del hidróxido bórico

A temperatura ambiente viene a ocurrir lo mismo que en los experimentos con hidróxido cálcico.

Al primer minuto en baño de maría no hay ninguna alteración.

A los 10 minutos hay abundancia de glucosa, fructosa y otras tres manchas atribuibles a dihidroxiacetona 4-desoxi-3-oxo-fructosa y aceto.

A los 45 y 90 minutos se obtienen cromatogramas análogos entre sí y prácticamente están integrados por un espectro continuado de azúca-

res, siendo de destacar la zona ocupada por las pentosas, éstas se han formado a partir de tri y biosas que se formaron a su vez por escisión del azúcar de partida.

D) *Acción del hidróxido amónico*

A temperatura ambiente nosotros no notamos, después de un tiempo prolongado, cambios específicos. Solamente la aparición de galactosa y algo de lactulosa.

A baño de maría observamos que al primer minuto hay además de la lactosa original una mancha tenue de galactosa.

A los 45 y 90 minutos los cromatogramas son iguales entre sí y en ellos aparecen lactulosa, glucosa, galactosa y dos manchas de menor intensidad debidas a gliceraldehído y dihidroxiacetona.

E) *Acción del hidróxido sódico*

A temperatura ambiente tiene lugar una transposición de Lobry simple.

A baño de maría, después de 1 minuto de tratamiento a reflujo, sólo se nota la presencia de lactosa, lactulosa y dihidroxiacetona.

En cambio a los 10, 45 y 90 minutos los cromatogramas son más complejos, siendo de destacar la presencia de fructosa y aldopentosas además de los azúcares que ya aparecían en el tratamiento durante 1 minuto; por debajo de la dihidroxiacetona también se detectan los otros fragmentos lactaldehído, acetol y metilglioxal, no muy abundantes, y el compuesto dicarbonílico ya referido varias veces, éste en mayor proporción relativa que los anteriores.

F) *Acción del hidróxido potásico*

A temperatura ambiente se repite el resultado obtenido para el hidróxido sódico.

A baño de maría y en el primer minuto se produce únicamente el fragmento dihidroxiacetona.

A los 10, 45 y 90 minutos se obtienen cromatogramas análogos entre sí y completos constituidos por lactosa, lactulosa, galactosa y glucosa, fructosa, tagatosa, talosa las cuatro aldopentosas, gliceraldehído, 6-desoxicetosas, dihidroxiacetona, lactaldehído, acetol, metilglioxal y el característico compuesto dicarbonílico.

MELIBIOSA

Se hizo sólo el tratamiento con hidróxido sódico por ser muy escasa la muestra de que disponíamos.

A temperatura ambiente se detecta a las 24 horas un poco de melibiulosa no descartándose la presencia de galactomanosa; además aparecen tagatosa y galactosa.

A baño de maría observamos que al cabo de 1 minuto no se ha producido un cambio claro, aunque se inicia la transposición hasta melibiulosa.

A los 10, 45 y 90 minutos esta transposición ya es clara, apareciendo además galactosa, glucosa, fructosa y tagatosa, talosa, 6-desoxicetosas, gliceraldehído, dihidroxiacetona, lactaldehído, acetol y metilglioxal. No aparece el compuesto dicarbonílico que cabía esperar.

RAFINOSA

A) *Acción del agua*

No se observa la aparición de ningún azúcar extraño a la rafinosa, ni en frío, ni en caliente.

B) *Acción del hidróxido cálcico*

Ni a temperatura ambiente ni a baño de maría se produce alteración alguna en las moléculas de rafinosa con el agua saturada de cal. Sólo hay duda sobre la formación de otros polímeros isómeros de avance parecido.

C) *Tratamiento con hidróxido bórico*

Se repite tanto a temperatura ambiente como a baño de maría lo que sucede con el hidróxido cálcico.

D) *Tratamiento con hidróxido amónico*

A temperatura ambiente no se observa cambio.

A baño de maría por el contrario tiene lugar desde el primer minuto una hidrólisis parcial hasta melibiosa y fructosa. El aspecto de los cromatogramas se mantiene a los 10, 45 y 90 minutos.

E) *Tratamiento con hidróxido sódico*

Vuelve a comportarse como en los casos de tratamiento con hidróxido cálcico y bórico.

F) *Tratamiento con el hidróxido potásico*

Se repite el mismo resultado.

EXPERIMENTOS CON BASES ORGANICAS

Se prepararon disoluciones al 1 % de las bases piridina, quinoleína y de las lutidinas disponibles. A continuación se prepararon disoluciones de azúcares al 10 % en tales medios básicos. Los experimentos se hicieron con los mismos azúcares que se han empleado para los álcalis ordinarios, salvo melibiosa de la que no pudo disponerse en cantidad suficiente ya que mucha había sido empleada en los estudios de degradación e isomerización ácida y el resto se usó para comprobar la acción de hidróxido sódico. Las muestras se prepararon por duplicado, controlando después de 1, 6, 12, 24, 48 y 72 horas cada una de las muestras que se dejan a temperatura ambiente y al cabo de 1, 10, 45 y 90 minutos las muestras sometidas a baño de maría; para la comprobación se neutraliza la porción sacada, en cada caso, mediante ácido clorhídrico. Se hicieron los cromatogramas en los disolventes de desarrollo usuales y los resultados se resumen así:

A) *Glucosa*: a₁) Piridina a temperatura ambiente: Se inicia la transposición de Lobry a las 12 horas. Nada nuevo en tiempos más prolongados salvo en la intensidad de la isomerización.

a₂) Piridina a baño de maría: Desde el minuto 1 hay polímeros y manosa más fructosa, lo que se repite a los 10 minutos. El cromatograma de 45 minutos muestra además presencia de psicosa y de triosas. Siguen los polímeros de grados 2 y 3. A los 90 minutos el cromatograma es análogo.

b₁) Quinoleína a temperatura ambiente. Comportamiento idéntico al de piridina.

b₂) Quinoleína a baño de maría: También comportamiento paralelo al de piridina.

c₁) Lutidinas 2-4/2-5 y 2-6 a temperatura ambiente. Lo mismo que en piridina.

c₂) Lutidinas 2-4/2-5 y 2-6 a baño de maría. Lo mismo que en piridina.

B) *Manosa*: a₁) Piridina a temperatura ambiente. Sólo sucede la transposición de Lobry, desde las 6 horas, pero desde las 12 horas hay además trazas de dihidroxiacetona.

a₂) Piridina a baño de maría: Desde los 10 minutos además de los isómeros de Lobry hay manobiosa y manotriosa que se incrementa a los 45 minutos, habiendo también triosas.

b₁) y b₂) Quinoleína a baño de maría y a temperatura ambiente se comporta como piridina.

c₁) y c₂) Lutidinas a baño de maría y a temperatura ambiente: Como piridina.

C) *Fructosa*: a₁) y a₂) En piridina a temperatura ambiente y baño de maría se aprecian comportamientos paralelos a los que sucedían en amoníaco.

b₁) y b₂) En quinoleína no hay diferencia con piridina.

c₁) y c₂) En lutidinas tampoco hay diferencias.

D) *Sorbosa*: a₁), a₂); b₁), b₂); c₁) y c₂) A temperatura ambiente, las mismas particularidades que en amoníaco, por lo que no se describen.

E) *Galactosa*: a₁), a₂); b₁), b₂); c₁), c₂). A temperatura ambiente, se nota la transposición de Lobry a las 48 horas por lo que aún parece más retardada que en amoníaco a temperatura ambiente. Pero a baño de maría desde los 10 minutos aparece la tagatosa, su 3-epímero sorbosa y también hay trazas de talosa, que en amoníaco no se detectaba. Triosas se detectan desde los 45 minutos.

F) *Xilosa*: G) *Ribosa* y H) *Arabinosa*. a₁), a₂); b₁), b₂); c₁) y c₂). Las tres pentosas estudiadas se comportan análogamente en las diversas bases utilizadas y además la descripción de lo que ocurre constituiría una reproducción de lo que pasa en amoníaco.

I) *Maltosa*: J) *Celobiosa* y K) *Lactosa*. a₁), a₂); b₁), b₂); c₁) y c₂). En las varias bases se comportan como en amoníaco, sólo puede destacarse como particularidad una mayor intensidad relativa en las manchas de las diversas cetobiosas, es decir, como si se acelerara la primera fase de la transposición de Lobry en todos los casos.

L) *Sacarosa*: a₁), a₂); b₁), b₂); c₁) y c₂). No hay ninguna diferencia ostensible con lo que ocurría en amoníaco a temperatura ambiente y a baño de maría.

M) *Rafinosa*: a₁), a₂); b₁), b₂); c₁) y c₂). También se comportaba con la misma inercia que lo hacía frente a amoníaco, a temperatura ambiente y a baño de maría.

En definitiva, las bases orgánicas no daban lugar a resultados distintos a los de las bases minerales pese a que en la bibliografía se hacen algunas alusiones a esta diferencia. El comportamiento frente a las diversas bases es análogo al que manifiestan ante el amoníaco.

EXPERIMENTOS CON RESINAS DE CAMBIO DE ION

Se seleccionaron tres resinas usadas frecuentemente con el objeto de quitar aniones a disoluciones salinas y en no pocas ocasiones para el caso concreto de desionizar extractos naturales en los que hay azúcares y en los que cabe prever algún efecto isomerizante o de algún otro tipo que entorpecería el estudio posterior. Estas resinas han sido *Amberlita IR-4B* (OH), *Amberlita IR-400* y *Dowex 2*. Los experimentos realizados son de tres tipos.

A) Contacto de una disolución de cada azúcar con las diversas resinas agregadas en su seno en la proporción del 1 %, manteniendo cada conjunto a temperatura ambiente y tomando muestras después de 1, 3, 6, 12 y 24 horas.

Puede decirse que en esas condiciones no se observaba cambio alguno en los controles tomados a 1 y 3 horas. En el de 6, en cambio, empezaban a notarse síntomas de isomerización de Lobry en todos salvo sacarosa y rafinosa, pero la intensidad era poca. En ningún caso se aprecia aparición de fragmentos.

B) Repetición del experimento anterior pero a baño de maría. Se empezaron a controlar los resultados al cabo de 1, 10, 45 y 90 minutos prosiguiendo este control hasta las 6 horas de una en una.

Se aprecia isomerización de Lobry en todos salvo en sacarosa y rafinosa desde el primer minuto. Desde los 10 minutos se detectan manchas en la zona de polímeros de todos los azúcares, inversión en el caso de la sacarosa y parcial desdoblamiento de la rafinosa. A los 45 minutos hay fragmentación clara de todos los azúcares pues se detectan triosas y en casi todos acetol, destacando la presencia en la disolución de maltosa del compuesto dicarbonílico que se detectaba al tratar con bases ordinarias. Es también conveniente destacar que en casi todos los casos aparecen pentosas y desoxiazúcares. Hay poca diferencia entre estos resultados;

recogidos aquí muy esquemáticamente, y los que se obtenían con hidróxido de sodio y potasio.

C) Ensayos sobre columnas rellenas con las sucesivas resinas. Ordinariamente las disoluciones tardaban en pasar por las columnas tiempos cortos, siempre mucho menores de 6 horas, naturalmente depende del grado de empaquetamiento de la columna. En consecuencia, como era de suponer, no se observaban alteraciones dignas de tenerse en cuenta en problemas de identificación de azúcares. Por tanto sigue siendo correcto el uso de resinas de cambio de ión utilizadas como relleno de columnas, pero si la desionización se hace por adición de la resina al medio, deberán tenerse en cuenta los problemas que podrían surgir si el contacto es prolongado por más de 6 horas en frío y si la acción se intenta acelerar mediante calor.

D) Comparación de la forma en que se encuentre la resina. Normalmente las resinas básicas se utilizan en forma de hidróxidos, es decir, se han regenerado mediante hidróxido amónico, por ejemplo. De esa forma es como se han ensayado en los anteriores experimentos en los que se sucedían las transformaciones descritas. Se hizo entonces un cuarto ensayo para cada azúcar con resinas en forma de carbonato, es decir, en forma de sal, en la que el intercambio de aniones puede también suceder, sólo que en estos casos hay cesión de ión carbonato en vez de hidróxidos.

Los resultados que se tienen son totalmente distintos a los que ocurren con las resinas en su forma oxhidrilo, pues en efecto ni aún con tiempos largos de contacto en frío o en caliente hay alteraciones de los azúcares de partida, que sean significativos, es decir, que las transformaciones que en algún caso se notan son las mismas que tienen lugar en agua y aún siempre suceden en menor intensidad que en aquella. En resumen la actividad isomerizante, degradante y sintetizante manifestada por las resinas catiónicas se debe a su carácter básico cuando se encuentran en forma de hidróxidos, pero no a su naturaleza como tal puesto que cuando se saturan con iones carbonato, aún conservando la capacidad de cambio no mantienen aquella otra actividad.

CONCLUSIONES

1.º) Se hace una revisión o puesta al día del fenómeno de *mutarrotación* de azúcares como caso más simple de isomerización de éstos. Se han comentado las sucesivas teorías que imperaron (LOBRY, ARMSTRONG, JACOBSON y STEZNER, THORPE, etc.) discutiéndose a continuación los estudios que aparecen en la bibliografía desde el punto de vista cinético (HUDSON, ISBELL y PIGMAN, SMITH y LOWRY, CANTOR y PENISTON, WESNER, LOWRY y FAULKNER, BRÖNSTED y GUGGENHEIM, DAWSON y SPIVEY, PEDERSON, SWAIN, HILL y OTROS, SWAIN y BROWN); deteniéndose en el estudio de la catálisis polifuncional para justificar la mutarrotación en los distintos medios, incluida el agua, como un buen ejemplo en el que tiene lugar estas catálisis.

2.º) Se han referido y comentado las opiniones científicas que se han sucedido para interpretar la *transformación de Lobry de Bruyn y Albredda van Ekenstein* (KUSIN, FISCHER, WOHL y NEUBERG, NEF, MICHAELIS y RONA, WOLFROM y LEWIS y trabajos posteriores de uno y otro con sus equipos; KENNER y RICHARDS y trabajos posteriores de uno y otro; FREDENHAGEN y BONHOEFFER, GOTO, TOPPER y STETTEN, SOWDEN y SCHAFFER, RIEDER y ROSE, TOPPER, SPECK y OTROS, KUNSSBERG y trabajo posterior de éste con PETUELY, PRENTICE, CUENDET y SMITH, BERL y FEAZEL, etc.).

3.º) Se dedica un tercer capítulo al estudio de la formación posible de *ácidos sacarínicos*, considerando que constituye una buena aportación el poner de acuerdo las opiniones que se han sucedido históricamente (PELICOT, KILIANI, WINDAUS, NEF, SCHMIDT, ISBELL, EVANS y BENOY, SCHAFFER y FREDEMANN, NICOLET; trabajos varios de CORBETT, KENNER y RICHARDS con diferentes colaboradores; SOWDEN, GIBBS, etc.), para interpretar esta formación.

4.º) Se plantea la justificación de nuestro estudio como una exigencia de los numerosos problemas prácticos en los que intervienen fenó-

menos de isomerización o interconversión, con fragmentaciones circunstanciales y con síntesis también ocasionales. Este estudio ha abarcado casi exhaustivamente al comportamiento de los monosacáridos glucosa, manosa, fructosa, sorbosa, lactosa, arabinosa, xilosa y ribosa y de los oligosacáridos sacarosa, maltosa, celobiosa, lactosa, melibiosa y rafinosa frente a varios agentes alcalinos.

5.º) Como agentes alcalinos fundamentales se estudiaron los hidróxidos de calcio, bario, amonio, sodio y potasio en experimentos paralelos a temperatura ambiente y a la de baño de maría, observando los resultados a distintos intervalos de tiempo. Sobre cada azúcar se estudió además el comportamiento en agua con objeto de ver qué parte de las transformaciones podrían atribuirse a efecto del agua de disolución. Se hizo además un estudio del comportamiento de los mismos azúcares frente a las bases orgánicas piridina, quinoleína y lutidinas 2-4/2-5 y 2-6; otro frente a algunas resinas de intercambio iónico de naturaleza básica, concretamente se utilizaron Amberlita IR-4B (OH), Amberlita IRB-400 y Dowex-2.

6.º) Para la identificación de compuestos resultantes de unas y otras acciones se recurrió a la técnica cromatográfica sobre papel, auxiliada cuando procedía, del fraccionamiento en columna de carbón-celita. A lo largo del trabajo ha sido preciso perfeccionar ambas técnicas de cromatografía en papel y en columna tanto con fines analíticos como preparativos. Igualmente hemos ensayado los reactivos de revelado más diversos, teniendo ocasión de observar algunas diferencias con lo comúnmente admitido, tales como positividad del ftalato ácido de anilina frente a cetosas, cambios de color distintos de los previstos en los casos de aldopentosas frente a resorcina, reacción positiva en los casos de cetopentosas frente a resorcina, reacción positiva de las cetosas frente a orcina y cambios de color por calentamiento, evolución en la tonalidad azul de las heptulosas con orcina, etc., etc.

La descripción de resultados se hace por azúcares individuales para el caso del agua e hidróxidos y mediante comentarios globales en lo que respecta a las acciones de las bases orgánicas y de las resinas de cambios de ión.

7.º) En disolución acuosa se han realizado experimentos tanto a temperatura ambiente como a baño de maría siendo de destacar las siguientes particularidades para las aldohexosas:

a) la glucosa no sufre más cambios que los propios de la mutarrotación;

b) la manosa no experimenta isomerización en frío ni aún después de doce meses, pero a baño de maría no se alteraba a las 24 horas y sí a

las 72, en que surgían por un lado glucosa y por otro manobiosa y manotriosa.

c) la galactosa en frío no sufre cambio alguno pero en caliente aparece como muy vulnerable y así a las 24 horas a baño de maría aparece tagatosa, galactobiosa y galactotriosa y dihidroxiacetona; a las 48 horas hay además talosa y gliceraldehido; a las 72 horas aparecen sólo dos polímeros faltando en cromatogramas repetidos los productos de isomerización de Lobry y de fragmentación, debiendo haber sucedido la retroversión de isómeros y la recombinación de fragmentos.

8.º) En agua las cetohechosas ensayadas se comportaron de la siguiente forma:

a) la fructosa no experimenta cambios en agua a temperatura ambiente y a baño de maría sólo a las 72 horas en que se observa manosa, glucosa y psicosa, no apreciándose, en cambio, alguno de los anhidroazúcares o dímeros de fructosa (diheterolevulosanas), ni los fragmentos carbonílicos detectados por SATTLER, ZERBAN y colaboradores [*J. Am. Chem. Soc.*, 70, 2406 (1948)], con cuyo motivo se ha realizado una revisión experimental de diversos trabajos relacionados con ese tema. Se determinan las condiciones críticas en las que tales dianhídridos pueden detectarse, pero no pudo comprobarse presencia en ninguna de las condiciones, de fragmentos carbonílicos de pequeño peso molecular. Se estudió también la síntesis de heterolevulosanas con fines comparativos, en presencia de clorhídrico concentrado a baja temperatura.

b) la sorbosa en agua no sufre cambios a temperatura ambiente después de un año ni a baño de maría después de 72 horas por lo que muestra una resistencia a la isomerización y otras transformaciones mucho mayor que la fructosa.

9.º) El comportamiento en agua de las aldopentosas es el que sigue:

a) en agua la arabinosa a temperatura ambiente no manifiesta cambio, ni tampoco a las 24 ó 48 horas, a baño de maría; a las 72 horas se detectan además de arabinosa, arabobiosa y arabobiulosa como oligosacáridos de síntesis, y ribocetosa como fase importante en la isomerización de Lobry,

b) la xilosa a temperatura ambiente no sufre más cambio que la mutarrotación, que en el presente caso se comprobó polarimétricamente; a baño de maría a las 24 horas se detectan xilobiosa y xilotriosa y una heptulosa.

c) las disoluciones de ribosa (D-ribosa) en agua, a temperatura ambiente no producían nuevos azúcares y aparentemente sufrían escasa mutarrotación, puesto que, el poder rotatorio sólo variaba en 0,75°, en determinaciones hechas a las 24 y 48 h. y al cabo de 1 año. Sin embargo, en

este último aspecto, al hacer el estudio de 20 en 20' se comprueba que el poder rotatorio se distancia del original en los primeros períodos de 20' para ir acercándose luego al poder rotatorio de partida, valor $[\alpha]_D^{25} = -3,75^\circ$ que se alcanza a las 2 h. 20'. A baño de maría a las 24 y 48 h. se detecta la presencia de arabinosa y heptulosa pero no de ribulosa; a las 72 h. se aprecian además dos polímeros de ribosa y dos de arabinosa.

10^o) La sacarosa a temperatura ambiente sufre una pequeña inversión. A baño de maría a las 24 h. inversión total, pero cromatográficamente se detecta una concentración de glucosa mucho mayor que la de fructosa y algo de manosa, por lo que la fructosa naciente habrá sufrido la isomerización de Lobry, aparte de otros procesos. A las 48 h., y no hay nuevo cambio a las 72 h., además del predominio de glucosa y de la presencia de manosa aparece psicosa; esta última debe ser consecuencia de una mayor vulnerabilidad de la fructosa naciente (cuando se parte de fructosa el fenómeno no se manifiesta hasta después de las 72 horas).

11.^o) Las glucobiosas maltosa y celobiosa difieren entre sí en el comportamiento:

a) la maltosa en agua no mostraba alteración alguna ni a temperatura ambiente ni a baño de maría, después de 1 año y 90 h., respectivamente.

b) la celobiosa, aunque en disolución acuosa a temperatura ambiente no sufría ningún cambio detectable, en los controles cromatográficos que se hicieron a las 24 h. ni en los correspondientes a 1, 2 y 3 meses, en cambio a baño de maría a las 24 h. se ha formado glucosa, celobiulosa y celotriosa, es decir, han habido fenómenos de hidrólisis, de isomerización de Lobry y de oligosíntesis. A las 48 y 72 horas se detectan además fructosa y un incremento en la concentración de glucosa, ambas deben haber surgido de la maltobiulosa.

12.^o) La lactosa no sufre cambios a temperatura ambiente, en almacenaje prolongado; a baño de maría a las 23, 47 y 72 h. se nota un ligero proceso de hidrólisis en glucosa y galactosa y la aparición de lactulosa. El trisacárido rafinosa en agua no sufre cambios en las condiciones de trabajo adoptadas.

13.^o) La glucosa en hidróxido cálcico (disolución saturada) y a temperatura ambiente a los 15 minutos se isomeriza parcialmente a fructosa y manosa mientras la psicosa (3-epímero de la fructosa sólo se aprecia a las 7 horas. En tratamiento prolongado aparece además dihidroxiacetona. En caliente, a baño de maría no sufre alteración al cabo de 1/2 ó 1 minuto, obteniéndose cromatogramas complejos idénticos entre sí a los 10, 45 y 90 minutos, en los que se detectan glucosa, fructosa, manosa, psicosa, xilosa-lixosa, trazas de arabinosa y ribosa, xilulosa, glicer-

aldehído y dihidroxiacetona. No aparecen componentes carbonílicos más veloces que la dihidroxiacetona. En cromatogramas aparte se detectan sedoheptulosa y manoheptulosa y en otros revelados según la técnica de ABDEL-AKHER se comprueba la presencia de escasa proporción de sacarínicos y lactonas, menos que lo que se observaba en frío a las 10 horas. Se exponen con detalle las hipótesis que podrían justificar la aparición de los diversos azúcares y compuestos análogos detectados.

En hidróxido bórico 0,033 N (disolución saturada) a temperatura ambiente no hay diferencia práctica con lo que ocurre en agua de cal. En los experimentos a baño de maría desde los 10 minutos la complejidad es mayor que en el experimento análogo con cal, notándose, además de los componentes de entonces, una serie de polímeros de glucosa, en forma de rastro continuo desde la línea de partida, 6-desoxifruktosa y 6-desoxisorbosa, lactaldehído, acetol y metilglioxal. Se hace una exposición de los probables caminos seguidos para la formación de estos componentes nuevos, comentando con mayor detalle la formación de acetol.

14.º) Al tratar la glucosa con amoníaco al 1 % en frío se confirman los resultados, muy sencillos, de la bibliografía. En caliente, sobre lo que no existen datos, es de destacar la formación de un polímero de grado 2 al cabo de 1 minuto y de otro de mayor grado a los 10 minutos, además de fructosa y manosa. A los 45 minutos es cuando la complejidad puede considerarse definitiva, surgiendo como nuevos además de los anteriores, la psicosa, el polímero que se mostraba como incipiente a los 10 minutos y la pareja de triosas gliceraldehído y dihidroxiacetona.

En hidróxido sódico 0,25 N en frío a las 3 horas hay formación de fructosa y no de manosa, que verdaderamente se manifiesta a las 6 h., lo que difiere de lo encontrado por KUSIN para el que aún después de 24 h., el predominio de fructosa era absoluto; cromatogramas análogos se obtienen con muestras tratadas durante 24, 48 y 72 horas. A baño de maría a 1/2 y 1 minuto se forma fructosa y no manosa, pero desde los 10 minutos sí que aparece esta última. Desde ese tiempo se detectan ya las cuatro aldopentosas y las dos cetopentosas, las dos 6-desoxicetosas ya citadas y los fragmentos gliceraldehído, dihidroxiacetona y acetol. En los de 40 y 60 minutos hay además sedoheptulosa y manoheptulosa. En ninguno de los cromatogramas se detectan oligosacáridos. Se hizo un estudio especial con NaOH 0,24 N, 3 N y 6 N a 50° C en termostato, obteniéndose con la más diluída resultados análogos a los de baño de maría, pero con las más concentradas llega a desaparecer la glucosa y a no notarse ni fructosa ni manosa, salvo cuando se partía de una disolución muy concentrada de glucosa, en que se apreciaban trazas de unos y otros azúcares. En cambio sigue apreciándose la ráfaga de la zona baja y fal-

tan los polímeros; en definitiva a estas concentraciones hay poca isomerización de Lobry y predominan las fragmentaciones. Se trataron de la misma manera gliceraldehido, dihidroxiacetona, treosa y xilosa y en estas condiciones ninguno de ellos daba lugar a azúcares de gran tamaño y sí a fragmentos y a escasa proporción de pentosas.

e) En hidróxido potásico al 10 % a temperatura ambiente se reproduce lo del hidróxido sódico. A baño de maría hay como un retraso en el primer minuto y luego mayor efecto que entonces después de 10 minutos, destacando los fragmentos metilglioxal y lactaldehido además del acetol y triosas, así como la presencia de abundantes polímeros y la aparición clara de pentosas, faltando la de psicosa. En los experimentos realizados con hidróxido sódico 0,25 N, 3 N y 6 N a 50° C se reproduce lo observado con sosa, es decir, predominio de fenómenos de fragmentación.

15.º) La acción alcalina sobre manosa puede resumirse así:

a) En hidróxido cálcico a temperatura ambiente sólo después de 48 horas hay indicios de glucosa y fructosa. A baño de maría nada al minuto, pero después de 10, 45 y 90 minutos hay glucosa y fructosa, con predominio de la primera, más gliceraldehido y dihidroxiacetona, pero no psicosa ni pentosas.

b) En hidróxido bórico no hay diferencia a t. a. con lo que ocurre en agua de cal, pero a b. de m. es de destacar la formación de 3 polímeros, el predominio de glucosa sobre fructosa, la aparición de aldo y cetopentosas, la de 6-desoxicetosas, la de las dos triosas, la de lactaldehido y acetol y la de heptulosas. Todas estas substancias, salvo acetol que era todavía escaso, se detectaban bien a partir de los 10 minutos.

c) En hidróxido amónico a t. a: sólo se detectan los isómeros previsibles por la transformación de Lobry y dihidroxiacetona. A b. de m. no hay diferencia al minuto, pero a los 10 aparecen claras glucosa y fructosa más manobiosa y manotriosa, notándose a partir de los 45 minutos la presencia de gliceraldehido y dihidroxiacetona; a los 90 minutos no hay cambio detectable.

d) En hidróxido sódico a t. a. no se observa más fenómeno que el de Lobry y este es escaso a las 6 horas y algo más intenso desde las 12 horas, manteniéndose prácticamente idénticos los cromatogramas hasta los que correspondían a tratamientos de 72 horas. A b. de m. existe análogo comportamiento que el mostrado por la glucosa como prueba de la existencia de un compuesto común.

e) En hidróxido potásico a t. a. no hay diferencia con el sódico. En baño de maría debe destacarse como nota distintiva respecto a los de hidróxido sódico la aparición de una gran cantidad de polímeros,

dándose como seguros los de grado 2 y 3 de la manosa, independientemente de una mezcla de los de glucosa y hasta de los de pentosas, de ahí el rastro casi continuo hasta la línea de partida:

16.º) El comportamiento de la fructosa se resume así:

a) En hidróxido cálcico a temperatura ambiente no sufre cambios hasta los 30 días, en que sólo ha tenido lugar la transformación de Lobry. Parece como, si por no ser fructosa naciente, hubiese mayor resistencia a la acción. En cambio a b. de m. hay una manifiesta aceleración y así al minuto hay ya glucosa, fructosa y manosa casi en partes iguales. En ese primer minuto hay trazas de triosas pero ningún tipo de polímero. A los 10 minutos aparecen además psicosa, algo de alosa y menos de altrosa y entre los fragmentos hay acetol además de las triosas. A los 45 y 90 minutos se incrementa la proporción de glucosa y manosa. En cromatogramas aparte se detectan heptulosas, debiendo destacarse que no se han detectado pentosas.

b) En hidróxido bórico a t. a. no hay diferencias con lo notado con el de calcio. A b. de m. hay un efecto más manifiesto desde el primer minuto, notándose como novedad la aparición de pentosas y la de 6-desoxicetohexosas, así como la de una gran cantidad de polímeros, pasados los 10 minutos se encuentran también los fragmentos lactaldehído, acetol y metilglioxal, e incluso en cromatogramas viejos se aprecia una mancha atribuible a glicolaldehído. Siguen apreciándose las heptulosas de siempre.

c) En hidróxido amónico a temperatura ambiente sólo una transformación de Lobry suave. A b. de m. la acción también está suavizada al minuto sólo síntomas de Lobry, a los 10 minutos aparece dihidroxiacetona. A los 45 y 90 minutos se detectan también psicosa, gliceraldehído, acetol y rastro de los otros fragmentos. Las heptulosas sólo aparecen en trazas.

d) En hidróxido sódico a t. a. sólo la reacción de Lobry. A b. de m. se observan ya glucosa y manosa a los 30 segundos y al minuto aparecen además triosas y acetol. A los 10 minutos se notan también pentosas y desde los 60 minutos dos polímeros, uno que era sacarosa y otro fructobiosa, 6-desoxicetohexosas, lactaldehído y metilglioxal. Hay clara formación de heptulosas:

c) En hidróxido potásico a t. a. nada de particular. A b. de m. incremento en la concentración de pentosas y fragmentos de 3 carbonos, aumentando el número de azúcares secundarios (alosa, altrosa).

17.º) Las particularidades del tratamiento alcalino de la sorbosa son:

a) En hidróxido cálcico a t. m. se aprecia la transposición de Lobry a las dos horas no observándose ningún otro fenómeno después de 24

horas. A b. de m. al minuto sólo el cambio de Lobry y a los 10 minutos surgen además tagatosa y las dos triosas. A los 45 y 90 minutos incremento en la proporción de los azúcares formados, apreciando como nuevos pentosas y ramnosa, 6-desoxifruktosa y 6-desoxisorbosa y fragmentos de 3 carbonos. También heptulosas.

b) En hidróxido bórico debe repetirse lo del cálcico con incremento en cuantía, debiendo destacar la presencia de polímeros.

c) En hidróxido amónico a t. a. sólo gulosa e idosa (Lobry). A b. de m., al cabo de 1 minuto lo mismo que a t. a.; a los 10 minutos aparecen además tagatosa, gliceraldehido, dihidroxiacetona, 6-desoxicetosas y lactaldehido. A los 45 minutos incremento general y a los 90 minutos disminuye la proporción de dihidroxiacetona y lactaldehido, sin duda por haberse recombinado para dar lugar a las 6-desoxicetohexasas.

d) En hidróxido sódico a temperatura ambiente se forman gulosa e idosa, más de la primera que de la segunda; puede decirse, que hay una reproducción de lo que ocurre en hidróxido cálcico pero todo con mayor intensidad. Destaca la aparición de polímeros como en hidróxido bórico.

e) En hidróxido potásico se notan como peculiaridades respecto a lo que ocurre en el sódico la mayor claridad con que se notan los polímeros y la aparición de ramnosa y quinovosa.

18.º) La galactosa frente a los álcalis ofrece las siguientes particularidades:

a) Con agua de cal a temperatura ambiente aparece tagatosa a las 10-12 horas y talosa poco después. En baño de maría en el primer minuto se forma tagatosa y galactobiosa. A los 10 minutos hay además probable galactobiulosa (a manera de rastro de galactobiosa) y talosa, sorbosa, aldo y cetopentosas y las dos triosas. A los 45 y 90 minutos no aparecen nuevos azúcares ni otros fragmentos.

b) En agua de barita a t. a. lo mismo que en cal y a b. de m. un cierto retraso para la transposición de Lobry, ya que en el primer minuto no hay nuevos monosacáridos, pero sí galactobiosa. A los 10 minutos aparecen además galactobiulosa, tagatosa y talosa, sorbosa y xilulosa, pero no triosas, por lo que cabe pensar que estas últimas se consumen rápidamente en su forma naciente. A los 45 minutos aparecen polímeros de mayor grado, heptulosas, ribulosa y ribosa y en menor proporción las otras aldo y cetopentosas, gliceraldehido, 6-desoxicetohexasas, dihidroxiacetona, lactaldehido, acetol y algo de metilglioxal. A los 90 minutos ninguna otra novedad.

c) En hidróxido amónico al 1 % en frío sólo una incipiente Lobry a las 24 horas. Al minuto en baño de maría no hay isómeros y sí galactobiosa. A los 10 minutos se forman tagatosa y el 3-epímero sorbosa, pero

no talosa, lo que defiende a la fase cetosa como previa a las isomerizaciones. A los 45 y 90 minutos sí que hay talosa y triosas pero no otros fragmentos ni desoxicetosos.

d) En hidróxido sódico a t. a. sólo la transposición de Lobry A b. de m. hay intensa oligosíntesis en el primer minuto, apareciendo galactobiosa, galactobiulosa y galactotriosa, que se aislaron, y otros polímeros de mayor grado, además sorbosa, tagatosa y talosa, trazas de una cetopentosa y las dos triosas. Desde los 10 minutos los cromatogramas correspondientes son análogos y en ellos destaca la presencia de heptulosas, pentosas, idosa, dendrocetosa, quinovosa, ramnosa, gliceraldehído, 6-desoxifruktosa, 6-desoxisorbosa, dihidroxiacetona, lactaldehído, acetol y metilglioxal (escaso)

e) En hidróxido potásico a t. m. y a b. de m. sufre cambios análogos a los citados antes. De los oligosacáridos sólo están muy claros galactobiosa y galactotriosa.

19.º) La arabinosa se comporta como sigue:

a) En agua de cal a t. a., empieza la transposición de Lobry a las 24 horas y no hay nada nuevo después de 90 horas. A b. de m., al minuto aparecen ya los isómeros de Lobry y el fragmento dihidroxiacetona. Desde los 10 minutos se encuentran además arabobiosa, xilosa, y xilocetosa, algo de lixosa, y gliceraldehído, pero no otros fragmentos, ni desoxicetosos ni heptulosas.

b) Con barita los efectos son algo más enérgicos a b. de m., que los de cal, destacando que ya en el primer minuto hay síntesis de una masa de azúcares superiores y de polímeros poco definida, y aparecen fragmentos, mientras las isomerizaciones a otras pentosas o la síntesis de éstas es incipiente. Desde los 10 minutos los cromatogramas son idénticos, caracterizándose como nuevos arabobiosa, arabobiulosa, arabotriosa, arabotriulosa, arabotetrosa, ribosa y ribulosa más manifiestas, xilosa sigue escasa, xilocetosa, ramnosa y quinovosa (escasas), gliceraldehído, 6-desoxicetosos, dihidroxiacetona, lactaldehído, acetol y metilglioxal. Habían también heptulosas.

c) Con hidróxido amónico a t. a. una escasa transposición de Lobry. A b. de m. no hay alteración al primer minuto pero a los 10 existe un polímero, una hexosa (sorbosa), ribosa y ribocetosa y algo de gliceraldehído. A los 45 minutos aparecen arabobiosa y xilosa; el correspondiente a 90 minutos sólo muestra más xilosa.

d) En hidróxido sódico a t. a. sólo los isómeros de Lobry pero además al primer minuto están las cuatro pentosas y sus 2 cetosas, dihidroxiacetona como fragmento único y arabobiosa como polímero exclusivo. A los 10, 45 y 90 minutos muchos polímeros (arabotriosa, xilotri-

sa, ribotriosa, arabobiosa, xilobiosa más lixobiosa, ribobiosa), heptulosas, sorbosa, ramnosa y quinovosa, gliceraldehido, 6-desoxicetosas, dihidroxiacetona y lactaldehido y acetol.

e) en hidróxido potásico ninguna particularidad ni a t. a. ni a b. de m. respecto a lo que sucede en sosa.

20.º) El comportamiento de la xilosa puede resumirse así:

a) en hidróxido cálcico a t. a. sólo transposición de Lobry y no intensa. A b. de m., al minuto los polímeros de grados 2, 3 y 4, xilosa, trazas de ribocetosa, xilocetosa y dihidroxiacetona. En los cromatogramas correspondientes a tiempos mayores de 10 minutos es ya abundante la ribocetosa e incipientes las manchas de arabinosa y ribosa.

b) en hidróxido bórico a t. a. no hay diferencias con el de calcio. A b. de m., los cromatogramas que corresponden a 1 minuto son muy simples, sólo están los polímeros, pero falta la xilocetosa. A los 10, 45 y 90 minutos son en cambio más complejos que entonces. Así se detectan las dos triosas, las 6-desoxicetosas (de fructosa y sorbosa) y los fragmentos lactaldehido, acetol y metilglioxal.

c) en amoníaco a las 48 horas xilocetosa y algo de lixosa. A baño de maría al primer minuto dos polímeros y cola, así como xilosa, xilocetosa y lixosa, pero ninguna otra. En los de más de 10 minutos aparecen además cuatro polímeros y ribocetosa, gliceraldehido, 6-desoxicetosas y dihidroxiacetona.

d) en hidróxido sódico a t. a. sólo se nota la transposición de Lobry desde 24 horas en adelante. A b. de m. al minuto abundan los polímeros, todas las pentosas, sobre todo xilulosa, y dihidroxiacetona. Después de 10 minutos se encuentran además gliceraldehido, las dos 6-desoxicetosas usuales, dihidroxiacetona y los tres fragmentos de siempre.

e) en hidróxido potásico a temperatura ambiente lo mismo que con sódico. A b. de m. durante el primer minuto hay como un retardo respecto a aquel. Así, aparecen los polímeros xilobiosa y xilotriosa, también la ribocetosa y lixosa pero no la dihidroxiacetona. A los 10 minutos hay hexosa y heptulosa y también dihidroxiacetona. A los 45 y 90 minutos el aspecto es análogo al de los de hidróxido sódico de 10 minutos en adelante.

21.º) La ribosa se comporta frente a los álcalis de la siguiente manera:

a) En agua de cal a temperatura ambiente sólo los isómeros de Lobry. A b. de m. al minuto aparecen estos mismos isómeros (con poca ribulosa), heptulosas, dihidroxiacetona siendo característicos los polímeros ribobiosa, arabobiosa y ribotriosa. Desde los 10 minutos en adelante es más abundante la ribocetosa, se nota muy bien la de xilocetosa y xilo-

sa, apareciendo gliceraldehido, 6-desoxicetosas y los fragmentos de tres carbonos lactaldehido, acetol y metilglioxal aunque estos último son muy definidos.

b) En hidróxido bórico a t. a. lo mismo que en cálcico. A b. de m. al cabo de 1 minuto no se observa acción alguna, pero a los 10, 45 y 90 minutos se reproduce lo que ocurría con el agua de cál.

c) En hidróxido amónico a temperatura ambiente sólo sucede una sencilla pero retardada transposición de Lobry. A baño de maría al minuto ya están los polímeros de antes e incluso la xilosa y algo de lixosa junto a cetopentosas en pequeña proporción y dihidroxiacetona. A los 10 minutos y tiempos más largos hay cada vez más xilocetosa y aldopentosas correspondientes; existen los fragmentos menores pero no llégan a detectarse 6-desoxicetosas.

d) En hidróxido sódico a t. a. sólo la reacción de Lobry y a b. de m. desde el primer minuto todas las aldo y cetopentosas además de gliceraldehido, dihidroxiacetona y trazas de otros fragmentos, sin detectarse heptulosas, En cambio desde los 10 minutos aparecen además, 6-desoxicetohexosas, fragmentos menores y polímeros.

e) En hidróxido potásico el comportamiento general es análogo.

22.º) En álcalis la sacarosa tiene un comportamiento que se resume así:

a) En hidróxido cálcico no sufre alteración ni a t. a. ni a b. de m. en contraste con lo que ocurre en agua.

b) En hidróxido bórico se repite lo mismo.

c) En hidróxido amónico a t. a. sufre ligera inversión y a b. de m. después del primer minuto ya se detecta dicha inversión, que es predominante a los 10 y 45 minutos, observando una desaparición casi completa de fructosa a los 90 minutos, en beneficio de la regeneración de sacarosa e incremento de glucosa.

d) En hidróxido sódico no se observa cambio alguno.

e) Tampoco en hidróxido potásico.

23.º) La maltosa se comporta como sigue:

a) En hidróxido cálcico, a temperatura ambiente, desde las 6 horas da matulosa y ácidos sacarínicos. A las 24 horas hay clara disminución de maltosa y abundancia de glucosa, fructosa y manosa, obteniéndose el máximo de glucosa a las 48 horas, a partir de cuyo momento va disminuyendo en concentración de maltosa sin aumento de monosacáridos (se van formando sacarínicos) de modo que a los 5 días no hay ni maltosa ni maltulosa.

A baño de maría se inicia la formación de maltulosa en el primer m., y simultáneamente se detectan glucosa, fructosa y un compuesto identi-

ficado como 4-desoxi-3-oxo-fructosa (compuesto descrito por MACHELL y RICHARDS). A los 10 minutos se incrementan las concentraciones de todos y aparece dihidroxiacetona y también crece la proporción de polímeros (en forma de trazas algunos ya existían en la muestra original).

b) En hidróxido bórico a temperatura ambiente sin diferencia con el de cal, pero a b. de m. hay una mayor complejidad en los resultados. En el primer minuto sólo glucosa, fructosa y 4-desoxi-3-oxo-D-fructosa. Desde los 10 minutos, en los cromatogramas, hay prácticamente un rastro continuo desde maltosa hasta el 4-desoxi-3-oxo compuesto, habiéndose formado pentosas, 6-desoxifrufructosa, dihidroxiacetona y lactaldehído como más representativos.

c) En hidróxido amónico a temperatura ambiente sólo aparecen maltosa y maltulosa. A las 48 y 72 horas hay además trazas de glucosa y fructosa. A b. de m. a los 10 minutos sólo hay maltulosa y desde los 45 glucosa, fructosa y el compuesto dicarbonílico referido. Todo demuestra que la transformación de Lobry en su primera etapa es rápida y precede a las otras transformaciones.

d) En hidróxido sódico a t. a. a las 24 horas aparecen maltosa, glucosa y 4-desoxi-3-oxo-fructosa, no notándose ni pentosas ni triosas. A las 48 y 72 horas se detectan además maltulosa, fructosa y las dos triosas. A b. de m. el cromatograma de 1 minuto equivale al de 48 horas a temperatura ambiente. Los de 10, 45 y 90 minutos, idénticos entre sí, son complejos, destacando como novedad la aparición de una glucopsicosa, trazas de psicosa 6-desoxicompuestos, pentosas y los fragmentos lactaldehído, acetol y metilglioxal, además de los que ya aparecían al minuto.

e) En hidróxido potásico se observa en general una acción algo más lenta salvo en la formación de pentosas (ya detectables al minuto), siendo característica la formación de 6-desoxicetohexosas y de láctico.

24.º) La celobiosa frente a álcalis se comporta así:

a) En hidróxido cálcico a temperatura ambiente sólo se forma, a las 24 horas, algo de celobiulosa y más glucosa, pero ningún otro azúcar. A b. de m. una gran cantidad de polímeros. A los 10 minutos hay abundancia de celobiulosa y de glucosa más dihidroxiacetona y acetol. A los 45 y 90 minutos están las anteriores y además psicosa y gliceraldehído. Sigue faltando la fructosa.

b) En hidróxido bórico a t. a. y al cabo de 1 minuto a b. de m. tiene el mismo comportamiento que en agua de cal. Para tiempos superiores a 10 minutos aparecen fructosa, pentosas, 6-desoxicetosas, dihidroxiacetona, acetol y metilglioxal.

c) En hidróxido amónico a t. a. sólo isómeros de Lobry. A b. de m. al minuto sólo polímeros y glucosa. A los 10 minutos celobiulosa que

llega a igualar en concentración a la celobiosa, apareciendo además glucosa y trazas de gliceraldehído, dihidroxiacetona, lactaldehído y acetol.

d) En hidróxido sódico a t. a. sólo la esperada Lobry, detectable a las 24 horas. En baño de maría al minuto hay: celobiulosa, glucosa y fructosa, pentosas, gliceraldehído, 6-desoxicetosas, dihidroxiacetona y 4-desoxi-3-oxo-fructosa. En los de 10, 45 y 90 minutos la diferencia está en la presencia de lactaldehído, acetol y metilglioxal.

e) En hidróxido potásico se obtienen cromatogramas análogos a los correspondientes a la isomerización con sosa, a t. a. y a b. de m., salvo en las condiciones de baño de maría y 1 minuto en las que con potasa sólo se forman celobiulosa, glucosa y 4-desoxi-3-oxo-fructosa, faltando los restantes azúcares y fragmentos que resultaban en hidróxido sódico.

25.º) El comportamiento resumido de la lactosa es el que sigue:

a) En hidróxido cálcico a temperatura ambiente se identifican a las 24, 48 y 72 horas lactosa, lactulosa y galactosa, pero no tagatosa y talosa de las que se dan cuenta algunos autores. A b. de m., después de 1 minuto, no hay alteraciones pero a los 10 se identifican lactulosa, galactosa y glucosa más trazas de fructosa y de dihidroxiacetona. A los 45 y 90 minutos sólo aparece como nuevo el gliceraldehído, pero no el compuesto dicarbonílico esperado.

b) En hidróxido bórico a t. a. sucede lo mismo que en el de calcio; a b. de m., al minuto nada, pero a los 10 minutos hay glucosa, fructosa, dihidroxiacetona, 4-desoxi-3-oxo-fructosa y acetol. Los cromatogramas de 45 y 90 minutos contienen además pentosas.

c) En hidróxido amónico a t. a. nada de particular y a b. de m. sólo algo de galactosa y glucosa, además de lactosa y lactulosa y de las dos triosas en pequeña proporción.

d) En hidróxido sódico a t. a. sólo Lobry y a b. de m. al minuto sólo lactosa, lactulosa y dihidroxiacetona. Desde los 10 minutos hay además pentosas y los fragmentos de 3 carbonos usuales; es clara la presencia del compuesto dicarbonílico ya referido.

e) En hidróxido potásico a t. a. y después de 1 minuto a b. de m. se obtienen cromatogramas muy sencillos. Pero desde los 10 minutos aparecen los isómeros previsibles más las 6 desoxicetosas, y el dicarbonílico y fragmentos.

26.º) La melibiosa sólo pudo ensayarse en su comportamiento frente a hidróxido sódico ya que se había usado la mayor parte de la disponible en experimentos de hidrólisis escalonada, y en el tratamiento con agua. En sosa a temperatura ambiente, después de 24 horas, sólo se obtiene melibiulosa, probable galactomanosa, tagatosa y galactosa. A baño de maría, al minuto se inicia el tránsito a melibiulosa. Desde los 10 minu-

tos además de melibiulosa aparecen galactosa, glucosa, fructosa y tagatosa, talosa, 6-desoxicetosas, gliceraldehido, dihidroxiacetona, lactaldehido, acetol y metilglioxal, pero falta el compuesto dicarbonílico que cabía esperar.

27.º) La rafinosa en hidróxido cálcico a t. a. y a b. de m. no sufre alteración alguna, salvo la dudosa de algún polímero relacionado con la rafinosa, en tamaño y características. En hidróxido amónico aparece a b. de m., en cambio a t. a. nada, una cierta hidrólisis desde el primer minuto hasta melibiosa y fructosa. El aspecto de los cromatogramas se mantiene a los 10, 45 y 90 minutos.

28.º) Los resultados obtenidos con los distintos azúcares frente a piridina, quinoleína y lutidinas en agua al 1 % pueden resumirse así:

A) A t. a. sucede lo que sigue: a) todas las hexosas y pentosas ensayadas sufrían sólo la transposición de Lobry, b) la sacarosa apenas si era alterada, c) la maltosa, celobiosa y lactosa sólo daban las cetobiosas correspondientes y en proporción escasa, d) la rafinosa no sufría alteración.

B) A baño de maría sufren todos los azúcares ensayados la transposición de Lobry en el primer minuto, apreciándose fragmentaciones que recuerdan casi siempre a las que suceden con amoníaco.

29.º) Las resinas de cambio de ión Amberlitas IR-4B (OH), IR-400 y Dowex-2 a t. a. no producen en realidad cambios sobre ninguno de los azúcares ensayados después de un contacto prolongado de 6 horas, iniciándose epimerización a las 12-14 horas. En consecuencia, tampoco provocaban alteraciones al usarlas para el llenado de columnas. Sin embargo, en los ensayos a baño de maría llegaban a producirse fragmentaciones y recombinaciones, siendo comparables los resultados a los obtenidos con hidróxido sódico y potásico.

