

# Tratamiento ácido de cetohechosas

POR

A. SOLER, A. TARRAGA y P. A. GARCIA

## ABSTRACT

Acid treatment of cetohechoses (D-fructose and L-sorbose) was made. By spectroscopic and chromatographic methods, 3-deoxy-D-erythrohexosulose, disaccharide with 1-2'-glycosidic bond, di-cetopyranose 1,2' : 2,1'-dianhydride and cetopyranose-cetofuranose 1,2' : 2,1'-dianhydride, have been identified.

## INTRODUCCION

Se estudia el comportamiento de D-fructosa y L-sorbosa frente a medios ácidos, empleando como disolventes agua y NN-dimetilformamida.

Las cetohechosas fueron sometidas a idénticas condiciones de acidez, concentración, temperatura y tiempo de reacción que las aldohexosas estudiadas en trabajos anteriores (1), con objeto de comparar los resultados, no sólo en cuanto a posibles reacciones de glicosidación, con formación de disacáridos, sino también frente a posibles reacciones secundarias (2) (3).

## PARTE EXPERIMENTAL

### I.—*Condiciones de reacción:*

a.—En medio acuoso:



Se realizaron tratamientos de D-fructosa y L-sorbosa al 10 % y 30 % en disoluciones acuosas de los ácidos ClH y  $\text{SO}_4\text{H}_2$  con las siguientes concentraciones:  $10^{-2}$  N,  $10^{-1}$  N y 2N.

Todas las muestras se sometieron a reflujo durante 10, 15 y 30 minutos, y 1, 2, 24, 48, 72 y 96 horas.

b.—En NN-dimetil formamida (NN-DMF).

Se realizaron tratamientos de D-fructosa y L-sorbosa al 10 % en NN-DMF - ClH 0,003 N, 0,01 N, 0,03 N, 0,1 N y 0,3 N.

Las muestras se sometieron a reflujo durante 9, 18 y 36 horas.

## II.—Toma de muestras:

Transcurridas las reacciones fueron neutralizadas con carbonato de plomo, filtradas a través de papel Wathman n.º 1 y concentradas en rotavapor hasta siruposos a  $40^\circ\text{C}$ .

Las muestras se conservan en desecador de  $\text{P}_2\text{O}_5$ .

## III.—Obtención de patrones:

a.—Obtención de inulobiosa:

Se realizó la hidrólisis de inulina con ClH 0,1 N a temperatura de reflujo durante 2 h., y la inulobiosa formada se aisló en bandas.

b.—Obtención de hexosulosas y 2,4 dinitro fenil osazona de 3-deoxi-D-eritro-hexosulosa.—Se realizó por los procedimientos descritos en la bibliografía (4) (5).

c.—Obtención de los dihidridos de las ceto-hexosas:

Se trató D-fructosa con cuatro partes de ClH concentrado a  $-5^\circ\text{C}$  durante 72 horas, formándose, con un rendimiento del 30 %, el diheterolevulosano I (di-D-fructopiranososa 1,2' : 2,1' dihidrido) y el diheterolevulosano II (D-fructopiranososa-D-fructofuranosa 1,2' : 2,1' dihidrido) (6).

Se hizo un tratamiento idéntico sobre L-sorbosa, resultando dos compuestos en iguales proporciones que los obtenidos en el tratamiento de D-fructosa, comprobándose, por cromatografía en papel y de gases, que se comportan como los correspondientes dihidridos de L-sorbosa.

## IV.—Métodos analíticos.

a.—Cromatografía en papel.

Se utilizó el método de cromatografía descendente con navicillas de alimentación continua, y se usó papel Wathman n.º 1.

Como disolventes de desarrollo cromatográfico se emplearon:

- A) n-butanol:piridina:agua (3:2:1,5).
- B) acetona:n-butanol:agua (7:2:1).
- C) acetato de etilo:piridina:agua (2,5:0,8:0,7).

Los reactivos empleados como reveladores fueron:

- como reactivo general: ftalato ácido de anilina (7)
- para cetohechosas: orcina-tricloroacético (8), antrona (9), orcina-ClH y resorcina-ClH (10).
- para los dihidridos: resorcina-etanol-fosfórico (6)

El aislamiento en bandas se realizó con papel Wathman n.º 1 siguiendo la técnica de Flood, Hirts y Jones (11).

b.—Cromatografía de gases.

Para el estudio de los productos resultantes, se obtuvieron sus trimetilsilil derivados (12) y se analizaron en un cromatógrafo Perkin-Elmer Mod. F-30 con doble detector de llama, empleándose columnas rellenas de la fase estacionaria SE-30 de 2 m. de longitud y 1/8".

Las condiciones de cromatografía fueron: temperatura de detector e inyector: 250° C; temperatura del horno: A) 90-160° C, B) 125-250° C; velocidad de calentamiento: 2° C/min., velocidad de registro: 5 mm/mín.; flujos de gas portador 30 cc/min.

c.—Espectroscopia:

— los espectros de I.R. se realizaron en un aparato Perkin-Elmer, mod. 297. Los espectros se hicieron en pastillas de BrK.

— los espectros U.V. se realizaron en un espectrofotómetro Beckman DB-GT con registro automático incorporado, y cubetas prismáticas de cuarzo, de 1 cm.

d.—Espectrometría de masas:

Se realizaron los espectros de masas a los trimetilsilil derivados correspondientes, en un espectrómetro Hewlett-Packard mod. 5980 A., con cromatógrafo Hewlett-Packard mod. 5710 A acoplado.

## RESULTADOS

### I.—Cromatografía en papel.

A.—Estudio de los compuestos de  $R_{\text{cetohechosa}} > 1$ .

Al cromatografiar la disolución acuosa de los productos resultantes en los distintos tratamientos de cetohechosas con ácidos se observan los siguientes resultados:

1.—No hay transformación en los ensayos de cetosa al 10 % en

ClH  $10^{-2}$  N durante 10, 15, 30, 60 y 120 minutos, detectándose una única mancha correspondiente a la cetosa inicial.

2.—No se observa ninguna mancha en los ensayos de cetohehexosa al 30 % en ClH y  $\text{SO}_4\text{H}_2$  2N durante 96 horas.

3.—En los ensayos de cetohehexosa al 10 % en ClH 0,01 N y 0,1 N y de cetohehexosa al 30 % en ClH 2N y  $\text{SO}_4\text{H}_2$  2N durante 24 y 72 h., se detecta además de la mancha correspondiente a la cetohehexosa inicial, otra mancha de carácter cetósico cuyo  $R_{\text{cetohehexosa}} = 3,1$  en el disolvente de desarrollo B).

4.—En los ensayos de cetohehexosa al 30 % en ClH y  $\text{SO}_4\text{H}_2$  0,1 N durante 24 h. los resultados son idénticos a los del apartado anterior, pero la mancha de  $R_{\text{cetohehexosa}} = 3,1$  aparece en mucha mayor proporción.

En todos los tratamientos realizados con las cetohehexosas, usando como medio de reacción NN-DMF, aparece la mancha de  $R_{\text{cetohehexosa}} = 3,1$  en el disolvente B).

Esta mancha da reacción de color con reveladores generales de monosacáridos y con reveladores específicos de cetosas.

B.—Estudio de los compuestos de  $R_{\text{cetohehexosa}} < 1$ .

Al cromatografiar los compuestos resultantes en los tratamientos de cetohehexosa al 30 % en ClH 0,1 N durante 24 h. y cetohehexosa al 10 % en NN-DMF-ClH 0,03 N, durante 18 h. se observa lo siguiente:

1.—D-fructosa: en ambos medios de reacción aparecen dos manchas cuyos valores de  $R_{\text{fructosa}}$  son 0,39 y 0,77 en el disolvente de desarrollo B) y 0,57 y 0,82 en el C), valores que coinciden con los  $R_{\text{fructosa}}$  de los diheterolevulosanos I y II obtenidos por Wolfrom (16).

2.—L-sorbosa.—En ambos medios de reacción aparecen también dos manchas con valores de  $R_{\text{sorbosa}}$  0,36 y 0,78 en el disolvente de desarrollo B) y 0,40 y 0,80 en el C).

## II.—Cromatografía de gases:

A.—Estudio del compuesto de  $R_{\text{cetohehexosa}} > 1$ .

Con el programa A) se realizaron los siguientes cromatogramas:

— a los trimetilsilil derivados de la mancha de  $R_{\text{cetohehexosa}} = 3,1$  aislada en bandas, resultando un pico único a un tiempo de retención de 12,2 min., que se repetía cuando en la preparación del trimetilsilil no se adicionaba ácido trifluoroacético.

— al trimetilsilil del 5-hidroximetil-2-furaldehído, resultando un solo pico a un tiempo de retención de 12,2 min.

— a la mezcla de los trimetilsilil del 5-hidroximetil-2-furaldehído y de

nuestra mancha problema, dando pico único a un tiempo de retención de 12,2 min.

Con el programa B) se realizaron los cromatogramas:

— al 5-hidroximetil-2-furaldehído, resultando un pico a tiempo de retención de 7,4 min.

— a la mancha aislada en bandas, no resultando pico alguno.

B.—Estudio de los compuestos de  $R_{\text{cetoH}} < 1$ .

Utilizando el programa B), se cromatografiaron los trimetilsilil derivados de los productos resultantes en los tratamientos: cetohecosa al 30 % en CIH 0,1 N a reflujo durante 24 h., y cetohecosa al 10 % en NN-DMF CIH 0,03 N a reflujo durante 18 h., obteniendo los siguientes resultados:

1.—D-fructosa: aparecen tres picos a distancia de retención, respecto de D-fructosa de 2,25, 2,5, y 2,56. Usando como patrones los trimetilsilil de la inulobiosa y de los diheterolevulosanos I y II, obtenidos como se ha descrito anteriormente, se ha comprobado mediante la técnica de crecimiento de picos, que el de distancia de retención de 2,25, corresponde a inulobiosa, mientras que los de distancia de retención 2,5 y 2,56 corresponden a los dianhídridos di-D-fructopiranosas 1,2' : 2,1' y D-fructopiranosas-D-fructofuranosas 1,2' : 2,1', respectivamente.

2.—L-sorbosa: tanto en disolución acuosa como en NN-DMF aparecen dos picos a distancias de retención, respecto de L-sorbosa, de 2,41 y 2,48, comprobándose, por la técnica de crecimiento de picos, que coinciden con los correspondientes dianhídridos de L-sorbosa obtenidos por el procedimiento descrito anteriormente. Además, en NN-DMF aparece un tercer pico a distancia de retención, respecto de L-sorbosa, de 2,13 que, por paralelismo con los resultados obtenidos en D-fructosa, podría tratarse de la L-sorbofuranosil-1,2' L-sorbofuranosa.

Los porcentajes relativos de los dianhídridos y disacáridos obtenidos, calculados respecto al contenido total en mono y disacáridos de la mezcla final, es el siguiente:

	CIH 72 h. -5°C	NN-DMF CIH 0,03 N	CIH 0,1 N
D-fructosa	51,77	3,59	94,58
Inulobiosa	—	10,79	0,57
Diheterolev. I	8,41	38,38	0,86
Diheterolev. II	39,80	47,22	3,79
L-sorbosa	72,84	11,71	97,75
L-sorbofuranosil 1,2' -L-sorbofuranosa	—	18,60	—
Diheterosob. I	8,90	28,27	0,63
Diheterosob. II	18,28	41,29	1,37

### III.—Espectrometría de masas.

El trimetilsilil de la mancha de  $R_{\text{cetoH.}} = 3,1$ , aislada en bandas, dió un espectro de masas coincidente con el del trimetilsilil del 5-hidroximetil-2-furaldehído, apareciendo fragmentos de  $m/e$  característicos, tales como: 109, 111, 139, 155, 169, 183 y 198. La coincidencia de estos dos espectros de masas, y el hecho de que ambos trimetilsilil derivados den un pico único y coincidente en cromatografía de gases, nos lleva a pensar que en el proceso de formación del trimetilsilil derivado de nuestro compuesto problema, éste se deshidrata, con lo que en realidad lo que se obtiene es el trimetilsilil del 5-hidroximetil-2-furaldehído.

### IV.—Espectroscopía U.V.

El espectro U.V. de la disolución acuosa de la mancha  $R_{\text{cetoH.}} = 3,1$  aislada en bandas, posee dos máximos de absorción a 230 y 285 nm., coincidentes con el espectro U.V. del 5-hidroximetil-2-furaldehído, siendo el de 230 nm. mucho más intenso que en el caso del 5-hidroximetil-2-furaldehído.

Los U.V. de las 2,4 dinitro-fenil-osazonas de D-glucosona y de este compuesto, presentan bandas a 220, 233 y 252 nm., mientras en el de la 2,4 dinitro-fenil-hidrazona del 5-hidroximetil-2-furaldehído los da a 225 y 260 nm., lo que indica que el compuesto problema tiene estructura de hexosulosa y no de 5-(hidroximetil)-2-furaldehído.

### V.—Espectroscopía I.R.

El espectro de I.R. del compuesto de  $R_{\text{cetoH.}} = 3,1$  da picos presentes en los I.R. de otras hexosulosas, como la D-glucosona a 3600-3000, 2925, 2850, 1725, 1660, 1522, 1405, 1200, 1070, 1020, 815 y 780  $\text{cm}^{-1}$ .

Los espectros de I.R. de las 2,4 dinitrofenil osazonas del compuesto problema y de la D-glucosona, presentan picos comunes a 1630, 1570, 1515, 1500, 1440, 1340, 1322, 1140, 1090, 835 y 742  $\text{cm}^{-1}$ , lo que demuestra la analogía entre sus estructuras.

Estos resultados, junto a los anteriores, nos permiten confirmar que el compuesto problema es la 3-deoxi-D-eritro-hexosulosa.

## DISCUSION

Los resultados obtenidos muestran que los productos de glicosidación formados son distintos para aldohexosas y ceto-hexosas, pues mientras las

primeras conducen preferentemente a disacáridos con uniones glicosídicas 1-4 y 1-6 (1), las cetohechosas forman los diahídridos antes citados y el correspondiente disacárido con unión glicosídica 1-2', en pequeña proporción.

De los porcentajes relativos calculados, se deduce que en NN-DMF la transformación de la cetohechosa en productos de glicosidación es muy superior que en disolución acuosa, y para un mismo disolvente esta transformación es mayor para D-fructosa que para L-sorbosa. No se han observado isomerizaciones ni epimerizaciones, propias en el tratamiento de aldohexosas, y sin embargo, debido a la mayor facilidad de las cetohechosas para sufrir reacciones de deshidratación, se ha aislado 3-dexosi-D-eritro-hexosulosa, no detectable en el caso de aldohexosas. La estabilidad de este compuesto en la formación de 5-hidroximetil-2-furaldehído (2) (3) resulta ser muy sensible a pequeñas variaciones en las condiciones de reacción, observándose que las condiciones idóneas para su obtención son: cetohechosa al 30 % en ClH 0,1 N a reflujo durante 24 horas.

## BIBLIOGRAFIA

- (1) Soler, A., García Ruiz, P. A., y Martínez Sánchez, M. C.; *An. Quím.* 72, 957 (1976).
- (2) Anet, E. F. L. J.; *Chem. Ind. (London)*, 262 (1962).
- (3) Anet, E. F. L. J.; *J. Chromatogr.* 9, 291 (1962).
- (4) Bayne, S.; *Methods in Carbohydr. Chem. II*, 421 (1963).
- (5) Kato, H.; *Bull. Agr. Chem. Soc. Japan*, 24, 1 (1960).
- (6) Wolfrom, M. L., Binkley, W. W., Shilling, W. L., y Hilton, H. W.; *J. Am. Chem. Soc.* 73, 3553 (1951).
- (7) Partridge, S. M.; *Nature*, 164, 433 (1949).
- (8) Block, R. J., Durrum, E. L., y Zweig, G.; "A Manual of Paper Chromatography and Paper Electrophoresis", Acad. Press, pág. 154 (1955).
- (9) Bevenue, A., Williams, E. T.; *Arch. Biochem. Biophys.* 34, 225 (1951).
- (10) Joanson, R.; *Nature*, 172, 956 (1953).
- (11) Flood, A. E., Hirst, E. L., y Jones, J. K. N.; *J. Chem. Soc.* 1679 (1948).
- (12) Sweeley, C. C., Bentley, R., Makita, M., y Wells, W. W.; *J. Am. Chem. Soc.*, 85, 2497 (1963).