

Tesis de Posgrado

Estudio de la constitución del ficocoloide de Iridea Cordata

Barón, Máximo

1954

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Química de la Universidad de Buenos Aires

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

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

Cita tipo APA:

Barón, Máximo. (1954). Estudio de la constitución del ficocoloide de Iridea Cordata. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_0812_Baron.pdf

Cita tipo Chicago:

Barón, Máximo. "Estudio de la constitución del ficocoloide de Iridea Cordata". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1954.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_0812_Baron.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

REPUBLICA ARGENTINA, DE BUENOS AIRES
MINISTERIO DE JUSTICIA Y NEGOCIOS EXTRANJEROS

TRATADO DE LA UNIÓN
ENTRE LA CONSTITUCIÓN DEL
ESTADO DE LA UNIÓN ARGENTINA

CONSTITUCIÓN DEL
ESTADO DE LA UNIÓN
ARGENTINA
ARTICULO 14
DEL
TRATADO DE LA UNIÓN

Revisión 312

312

Frente al problema de arajar alguna luz sobre la constitución del ficolóide de la *Irida cordata*, alga roja patagónica (*Rhodopycea*) de la familia de las Gigartinales, se revisó la mayor cantidad posible de la bibliografía existente relacionada con estudios hechos sobre dos algas de la misma familia; el *Chondrus crispus* y la *Irida laminaroides*. Todo este material se reunió en una monografía que constituye la primera parte de la tesis, quedando la segunda destinada a la descripción de experiencias, discusión de resultados y conclusiones.

Continuando el trabajo de tesis de Lazzari (1), que elaboró en 1953 un método para extraer el ficolóide del alga, se hicieron ante todo algunas determinaciones analíticas sobre el material a emplear con el fin de compararlo con el utilizado hace un año. Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

Humedad variable por ser el alga muy higroscópica. En consecuencia los demás datos se refieren siempre a sustancia seca.

- Humidad: 12,0%
- Nitrógeno: 1,5%
- Carbhidratos: 62,2% (como galactosa)
- Ficolóide: 71,5%
- Sulfato total: 12,0% y 69,3% sobre cenizas.
- Insolubles: no hay.

Inmediatamente se extraje el ficolóide necesario por el mencionado método, ajustándose algunos detalles, y se efectuaron: un análisis químico, un estudio de propiedades físicas y químicas y ensayos para aclarar la estructura.

ANÁLISIS QUÍMICO

Humedad el ficolóide es aún más higroscópica que el alga por lo que también aquí los resultados se expresan siempre sobre sustancia seca.

- Humidad: 21,5% análisis de las cenizas
 - Nitrógeno: 0,20%
 - Galactosa: 40,3%
 - Sulfato total: 22,5%
- | | |
|-----------------|-----------------------|
| SO ₄ | 62,0% (sobre cenizas) |
| Na | 21,0% |
| K | 7,5% |

PROPIEDADES FÍSICAS Y QUÍMICAS

Índice refringente $\alpha_D^{20} = 1,32$ en agua (a g 0,42%)

Viscosidad

Concentración g	Temperatura °C	Densidad gr/cm ³	Viscosidad centipoises
0,000	22,7	1,0000	21,5
0,400	22,7	0,9970	22,5
0,800	22	1,0010	22,5

Se efectuó además un ensayo sobre una solución de concentración 0,0025 previamente tratada con carbón activo al 15 durante 1 hora.

Temperatura: 22,0°C
 Densidad: 0,9970 gr/cm³
 Viscosidad: 22,1 centipoises

22

Concentración g	Temperatura °C	η _{sp}
0,000	22,5	0,00
0,000 (teor.)	22,5	0,0
0,400	22,5	0,15
0,800	22	0,30
1,200	22,5	0,45
0,500	22,5	0,20
0,000	22,5	0,40
0,000	22	0,40

Resistencia de suspensión

- a) Con electrolito de bencidina; se encontró que significa una técnica descrita para carboximida 1 ml. de HCl 1/10 y 0,0572 gr. de floculante seco.
- b) Con surfactante; se encontró un límite de sensibilidad de 0,001 mg. de floculante.

Resistencia con iones negativos

Resistencia con surfactante positivo

Exposición del ácido libre

se intentó por difusión del fluorocloro por bombas de vacío, obteniéndose en solución de colodión y secada al aire, concentrándose luego de 24 horas una reducción en las curvas del 21,5% al 14,5%. No se tuvo el mismo resultado disolviendo por bombas de colodión.

Fluorización simultánea

Experimento	Temperatura °C	Tiempo hr.	Sulfato presente %	Fluorización %
		0	20,5	24,0
	100	10	14,0	27,0
		15	14,0	29,7
		21	11,7	32,0
		26	12,0	32,0
		30	20,1	32,0
	100	110	22,1	29,1
		115	22,1	29,1
		124	24,0	29,0
		130	24,0	24,0

Fluorización simultánea a bombas a vacío se pudo hacer un 20,5%.

INDICIOS PARA APLICAR LA ESTRUCTURA

oxidación con H_2O_2 se hizo en forma comparativa sobre el fluorocloro de, carragenina, agar-agar y papel de filtro; ya que para los últimos tres existen datos experimentales en la literatura. La reacción consiste en tratar poliacrílicos con H_2O_2 0,07 N a temperatura ambiente durante un tiempo largo e ir controlando la desaparición de H_2O_2 por desaje con tiosulfato del iodo liberado al agregar SO_2 a 0,5 ml. de muestra. Los resultados obtenidos se dan en la página siguiente.

RESUMEN

Tiempo hs.	Ficocoloide ml. $S_2O_3Na_2$ N/100	Papel de filtro ml. $S_2O_3Na_2$ N/100	Agar-agar ml. $S_2O_3Na_2$ N/100	Carragenina ml. $S_2O_3Na_2$ N/100
24	14,55	13,32	13,55	14,45
48	14,26	12,61	13,60	13,02
72	14,26	12,51	13,12	13,14
96	14,26	12,45	13,14	13,02
118	14,26	12,43	13,16	12,95
166	14,03	12,42	12,87	12,75
190	13,40	12,04	12,11	12,47

Notese la estabilidad del ficocoloide de la *Iridaea Cordata*.

Finalmente, con la técnica establecida por Luzzati en 1953 se aisló de la *Iridaea Cordata* un ficocoloide que parece tratarse de un sulfato etéreo de un polímero de la galactosa, parcialmente salificado con Na y K y que contiene un 0,26% de N_2 , siendo por ello cualitativamente semejante a la carragenina y a la iridoficina de Hassid (2).

En cuanto a su estructura puede decirse que: a) el resultado de la oxidación con IO_4H indicaría la existencia de uniones entre las moléculas de anhídrido-galactosa del tipo 1-3 similares a las de la carragenina y el agar-agar y b) en razón de la extremada lentitud de la hidrólisis alcalina se puede suponer, como lo hacen Buchanan, Percival y Percival (3) para la carragenina, que el grupo sulfato se encuentra en el C4.

BIBLIOGRAFIA MENCIONADA EN ESTE RESUMEN

- 1) LUZZATI. Extracción del ficocoloide de la *Iridaea Cordata*. Tesis 1953.
- 2) HASSID. Extracción de un éster sulfúrico de galactano. (I) *J. Am. Chem. Soc.* **55** 4163 (1933). Extracción de un éster sódico sulfúrico de galactano de la *Iridaea Laminaroides*. *J. Am. Chem. Soc.* (II) **55** 4163 (1933).
- 3) PERCIVAL, PERCIVAL y BUCHANAN. El polisacárido del *Chondrus Crispus* Primera Parte. *J. Chem. Soc.* **1943** 51



UNIVERSIDAD NACIONAL DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

FCEN-BA

TESIS

presentada por
MAXIMO BARON
para optar al título
de
DOCTOR EN QUIMICA
"1954"

TESIS: 812

Tesis 812

NOTA

ESTUDIO DE LA CONSTITUCION
DEL FICCOLOIDE
DE LA IRIDEA CORDATA

Dedico esta Tesis a mi madre
a quien debo cuanto tengo y
cuanto soy

Agradecemos al Doctor Pedro Cattaneo el haber patrocinado este trabajo y los valiosos consejos que me diere en varias oportunidades. Asimismo hago presente al Doctor Andrés D. Fortunato mi más sincero agradecimiento por haberme orientado en esta tarea que constituyó la culminación de mis estudios universitarios y mi reconocimiento a todo el personal del Instituto Tecnológico del Ministerio de Industria de la Nación, donde fue realizado el trabajo experimental, por su amable colaboración, y al Doctor Bunkichi Uno, médico japonés radicado en la Argentina, que tuvo la gentileza de traducir las memorias que componen el apéndice sobre bibliografía japonesa.

INTRODUCCION

Los trabajos realizados sobre floculoides en general son muy numerosos pero, a pesar de su importancia y de haber sido publicados en general en revistas bastante difundidas, la mayoría de los autores que se han ocupado de estos temas parecen ignorar la existencia de los restantes trabajos; no sólo porque no aprovechan sus conclusiones sino también porque muchas veces ni siquiera indican haberlos consultado.

Ya que los estudios de esta naturaleza son día a día más numerosos e importantes en el país he reunido toda la bibliografía consultada en una monografía que constituye la primera parte de esta tesis. No pretendo haber realizado un trabajo exhaustivo ni mucho menos; pero sí, reunir buena parte del material accesible y distribuirlo por temas en cuatro capítulos, de manera de ofrecer a quién pudiese necesitarlo una idea de que es lo que ya se ha hecho; dando las indicaciones, en general, en la forma más completa posible especialmente en lo que se refiere a métodos y conclusiones y, transcribiendo a veces directamente los pasajes originales.

Si de esta manera he conseguido efectuar un trabajo útil, que sirva de base a futuros estudios, me daré por ampliamente satisfecho.

INDICE

Pag.

PRIMERA PARTE

Capítulo I: DOS PALABRAS SOBRE ALGAS EN GENERAL. Ubicación en el reino vegetal y clasificación de las Rhodophyceas. Función de las algas en la naturaleza	2
Capítulo II: CARRAGENINA.	
<u>Morfología y ubicación geográfica del alga</u>	5
<u>Historia</u>	6
1844-1920	
1920-1954	
<u>Extracción</u>	10
Métodos de extracción directa: Haas y Hill, Young y Rice y Rose.	
Métodos de extracción con precipitación: Butler y Pfister.	
<u>Análisis químico</u>	14
Humedad	
Contenido en cenizas	
Aniones y cationes en los hidrolizados de carragenina: dosaje de sulfato total, dosaje de amonio.	
Determinaciones de nitrógeno	
Arsénico en el Chondrus Crispus	
Materia orgánica de la carragenina	
<u>Propiedades físicas</u>	27
Rotación específica	
Poder de gelatinización y viscosidad	
Poder de estabilización	
Equilibrio Dorman	
<u>Propiedades químicas</u>	34
Precipitación: sales, colorantes y clorhidrate de benzidina	
Hidrólisis: ácida y alcalina	
Poder reductor	
<u>Naturaleza química de la carragenina</u>	41
Elevado porcentaje de cenizas	
Relación SO_4^- total/ SO_4^- cenizas	
Existencia de un electrolito coloidal	
La carragenina como sal de un ácido	
Peso molecular	
Tipo de unión entre unidades galactosa; procesos de acetilación y metilación, oxidación con ácido periódico	
Posición del resto sulfato	
<u>Aplicaciones</u>	54
Alimentación	
Medicina	
Cosmética	
Industria textil	
Curtiembre	
Preparación de medios de cultivo	

Capítulo III: IRIDOFICINA.	
<u>Morfología y ubicación geográfica</u>	57
Descripción	
Datos analíticos sobre el alga	
<u>Extracción</u>	59
<u>Análisis química</u>	60
Presencia de dulcitol	
Cenizas	
Hidrolizados	
Ácidos urónicos	
Determinación de nitrógeno	
Determinación de galactosa	
<u>Propiedades físicas</u>	62
Preparación del ácido libre	
<u>Propiedades químicas</u>	63
Poder reductor	
Hidrólisis ácida	
Hidrólisis alcalina	
<u>Naturaleza química de la iridoficina</u>	64
Existencia de un sulfato estero	
Peso molecular	
Acetilación	
Metilación; hidrólisis del compuesto metilado y preparación del dimetilmetilgalactósido, preparación de trimetilgalactano, preparación de trimetilgalactosa del galactano metilado, oxidación y esterificación de la trimetilgalactosa.	
<u>Aplicaciones</u>	71
<u>Función de los componentes del alga</u>	71
Capítulo IV: EL FICOCOLOIDE DE LA IRIDEA CORDATA.	
<u>Descripción del alga</u>	73
Preparación previa del material	
Ensayos analíticos sobre el alga; humedad, nitrógeno, cenizas, azúcares reductores, sulfato total, sacarificables, iridoficina.	
<u>Extracción</u>	75
Técnica	
Justificaciones: lavado previo con isopropílico al 80%, extracción con solución de ClNa al 0,2%, filtración, precipitación, lavado y secado.	
<u>Propiedades físicas</u>	78
Gelificación	
Viscosidad	
<u>Propiedades químicas</u>	79
Propiedades frente a varios reactivos	
Análisis químico comparativo	
Examen microscópico	
Apéndice I: <u>Experiencias correspondientes al trabajo de Buchanan, Percival y Percival</u>	81
Apéndice II: <u>La bibliografía japonesa</u>	85
Extracción del mucilago de algunas Rhodophyceae	
Identificación de glúcidos	

SEGUNDA PARTE

Capítulo I: DETERMINACIONES ANALITICAS SOBRE EL ALGA UTILIZADA	90
<u>Humedad</u>	
<u>Cenizas</u>	
<u>Nitrógeno</u>	
<u>Sacarificables</u>	
<u>Ficocoloide</u>	
<u>Sulfato total</u>	
<u>Sulfato en cenizas</u>	
<u>Pentosanes</u>	
Capítulo II: EXTRACCION DEL FICOCOLOIDE	92
<u>Lavado con isopropílico</u>	
<u>Filtrado por algodón</u>	
<u>Primera precipitación con isopropílico</u>	
<u>Lavado en licuadora</u>	
<u>Secado</u>	
Capítulo III: ANALISIS QUIMICO DEL FICOCOLOIDE	93
<u>Humedad</u>	
<u>Cenizas: análisis de las cenizas</u>	
<u>Dosaje de nitrógeno</u>	
<u>Determinación y dosaje de glúcidos</u>	
<u>Dosaje del sulfato total</u>	
<u>Relación SO_4^{2-} total/SO_4^{2-} cenizas</u>	
Capítulo IV: PROPIEDADES FISICAS	98
<u>Poder rotatorio</u>	
<u>Viscosidad</u>	
<u>pH</u>	
Capítulo V: PROPIEDADES QUIMICAS	100
<u>Reacciones de precipitación: con safranina, con clorhidrato de benzidina.</u>	
<u>Reacción con Iodo</u>	
<u>Reacción con carbazol</u>	
<u>Preparación del ácido libre</u>	
<u>Hidrólisis alcalina</u>	
Capítulo VI: NATURALEZA QUIMICA DEL FICOCOLOIDE	104
<u>Oxidación con ácido periódico</u>	
Capítulo VII: DISCUSION	106
<u>Conclusiones</u>	
Bibliografía	108

PRIMERA PARTE

Los ficcoloides del Chondrus Crispus
la Iridea Laminaroides y la Iridea Cordata

CAPITULO I

DOS PALABRAS SOBRE ALGAS EN GENERAL

UBICACION EN EL REINO VEGETAL Y CLASIFICACION DE LAS RHODOPHYCEAE:

Se llaman algas (1) a ciertos vegetales inferiores de organización sencilla, que poseen clorófila y son capaces de sintetizar sus alimentos. El nombre de algas proviene del Latín ALGOR: frío.

Dentro de las algas se incluyen desde las marinas de gran tamaño (llamadas en inglés seaweeds) hasta las uni o pluricelulares que carecen de las características de los vegetales superiores. Por presentarse en colores muy típicos es posible clasificarlas según ellos con bastante facilidad. Botánicamente se las ubica en el reino vegetal dentro de las Talófitas y comprenden:

Cyanophyceae (o algas azules): son en general microscópicas y se las encuentra en los mares.

Chlorophyceae (o algas verdes): pueden ser marinas o de agua dulce y generalmente se encuentran a poca profundidad.

Pheophyceae (o algas pardas): abundan mucho entre las marcas máxima y mínima de la marea, de manera que forman casi un cinturón a lo largo de las costas. A ellas pertenecen las grandes algas como los Macrocytis.

Rhodophyceae (o algas rojas): son algas de profundidad, crecen en las partes más oscuras y su color se hace más intenso cuanto mayor sea la distancia a la superficie. Son junto con las pheophyceae las que ocupan un lugar destacado en la economía de muchos países marítimos.

La característica económicamente más valiosa es que los constituyentes de la pared celular son sustancias hidrocarbonadas complejas, generalmente galactanos, que dan soluciones coloidales al ser calentadas con agua, capaces algunas de gelificar por enfriamiento. A este grupo de sustancias pertenecen: el agar-agar, la carragenina y la iridoficina. Siendo de estas dos últimas de las que nos ocuparemos en las páginas siguientes. Pero antes veremos como han sido clasificadas las Rhodophyceae (2):

Euthora
 Rhodoglossum
 Turnerella
 El Chondrus Crispus que lleva en la bibliografía indistintamente con este nombre y con el de musgo de Irlanda o el de Carrageen es la especie más importante ya que de él se extrae la Carragenina.

Chondrus
 Gigartinales
 Laminaroides (o Iridophycus flaccidum); de esta especie extrafo Massid (?) un picocolofo que llamó Iridoficina.

Cordatae es el tema del presente trabajo

Rhodophyceae
 Bangiales
 Nemalionales
 Crintonemiales
 Ceramiales
 Rhodiminales
 Gelidiales (Son las aarofitas)

Rhodophyceae
 Gigartinales
 Chondrus

Iridaceae
 Trideae

Función de las algas en la naturaleza (1):

Se ha demostrado que las algas son los únicos vegetales de las aguas saladas capaces de transformar elementos minerales en alimentos, por lo que un gran número de animales acuáticos dependen de ellas. Así, por ejemplo, la grasa verde de la tortuga y el material verde del cangrejo indican claramente la fuente de alimentación (algas). Por otra parte estudios hechos revisando estómagos de numerosos peces han permitido hallar en ellos una gran variedad de algas; lo que hace suponer que la riqueza animal de las aguas (en peces) se deba en su mayor parte a la abundancia y variedad de algas. -

CAPITULO II

CARRAGENINA

Como ya se indicara anteriormente la carragenina es el ficocoloide que se extrae de una alga roja: el *Chondrus Crispus* que también suele designarse con el nombre de Irish moss (musgo de Irlanda) y Carrageen, encontrándose los tres nombres indistintamente en la literatura. Esta es abundante ya que la sustancia ha sido muy estudiada, haciéndose necesario sistematizar la exposición reuniendo bajo unos pocos títulos todo el material bibliográfico. El plan a seguir será:

Morfología y ubicación geográfica del alga.

Historia.

Extracción.

Análisis químico.

Propiedades físicas.

Propiedades químicas.

Naturaleza química.

Aplicaciones.

MORFOLOGIA Y UBICACION GEOGRAFICA:

El *Chondrus Crispus* es para los occidentales lo que las agarófitas para Oriente debido a las excelentes propiedades gelificantes de su extracto. Ya se indicó más atrás su ubicación botánica, restando solamente indicar su forma que es la que se puede apreciar en las figuras adjuntas que representan los casos extremos de crecimiento en aguas muy tranquilas y en aguas borrascosas, pudiendo observarse en las primeras:

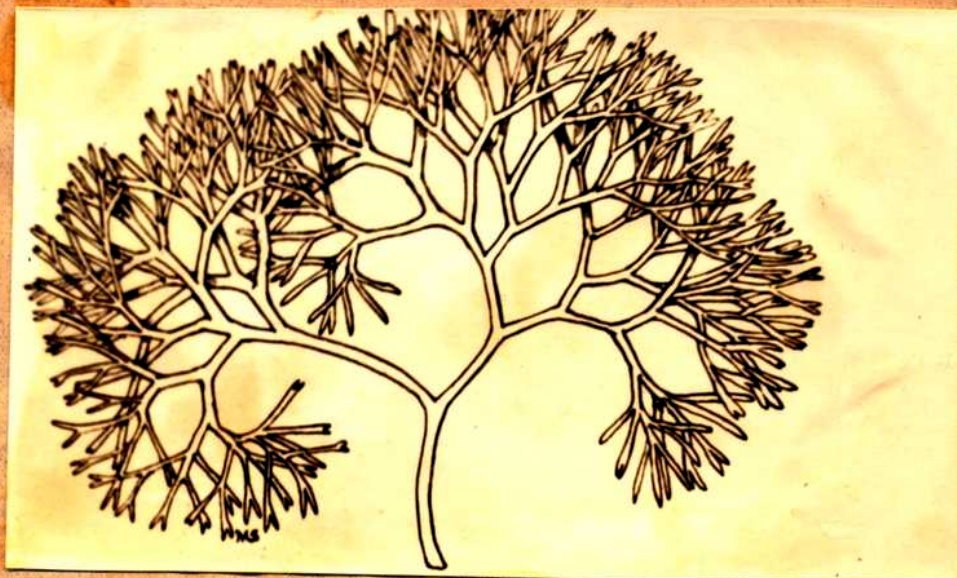


Fig 1. *Chondrus Crispus*. Formas delgadas de aguas borrascosas (Tamaño natural).

ramificaciones mucho más anchas y menos abundantes que en las segundas:

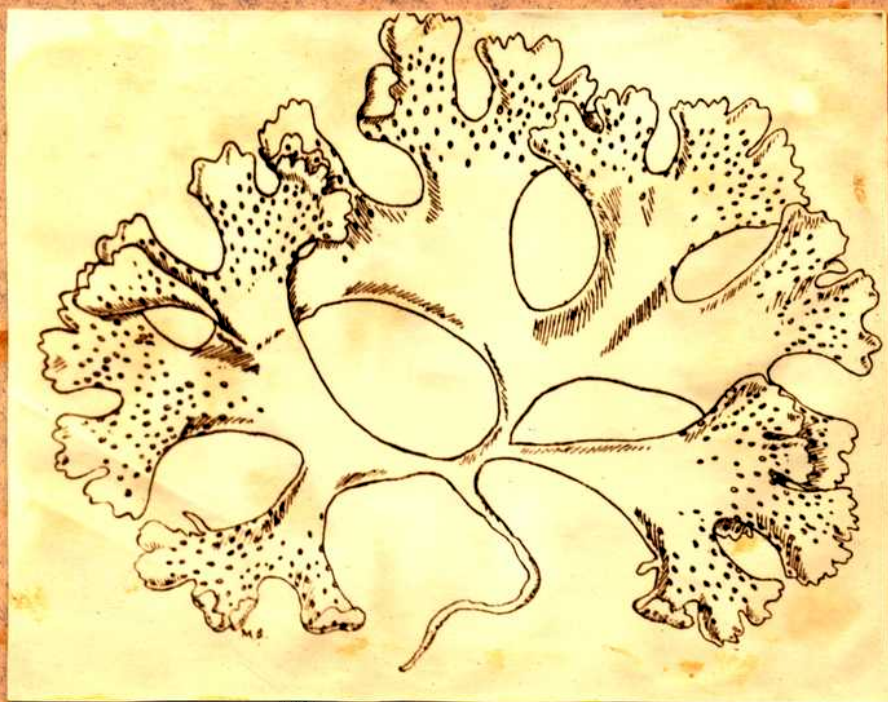


Fig. 2. *Chondrus Crispus*. Formas anchas de aguas tranquilas (tamaño natural).

esto no excluye todas las formas intermedias que son numerosas (5).

El *Chondrus Crispus* abunda en las costas occidentales de Irlanda y Escocia, en las noroccidentales de Gales y prácticamente en todas las costas de Inglaterra (Dorset, Devonshire, Cornwall, Yorkshire y Northumberland) y en el norte de Francia. (5). Mientras que en América existe en las costas del Noreste de América del Norte (Nova Scotia, Isla Príncipe Eduardo y Maine) (14) en grandes cantidades.

HISTORIA:

Es posible reconocer dos etapas en lo que se refiere a la historia de este ficocoloide y más aún es posible fijar un límite bien neto entre ambas ya que se trata de un año: 1920. Se considerará entonces cada una de estas etapas por separado.

1844-1920: La primera cifra (1844) (4) corresponde a la primera cita que sobre el tema está registrada en la bibliografía. En esa fecha Schmidt informa haber aislado un mucilago del *Chondrus Crispus* [Ann. Chem. und Pharm. 51 29 (1844)]. En 1851 John Davy aisló del alga dos sustancias: a) un producto semejante a una goma (28,5%) soluble en agua fría y "con todas las propiedades de un mucilago" y b) una sustancia "gelatinosa"

semejante a la gelatina (49,0%) soluble en agua caliente. Esta es la primera noticia de un extracto frío y un extracto caliente [Cold Extract (C.E.) y Hot Extract (H.E.)] 7 a partir del alga; hecho que parece haber quedado olvidado ya que además de no ser mencionado en la bibliografía posterior Haas y Hill en 1921 (5) lo dan como un descubrimiento propio (según se verá más adelante).

También en 1851 Flückiger y Obermayer dieron las primeras indicaciones sobre la estructura al obtener ácido múcico por oxidación, lo que indica la existencia de galactosa.

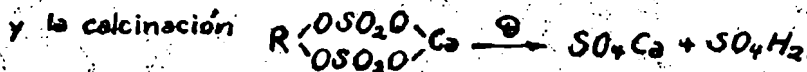
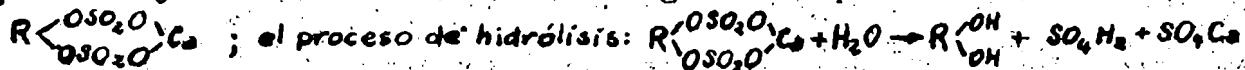
Hasta ese momento se hablaba de un mucílago sin haberlo bautizado; en 1862 Stanford [J. Soc. Arts 10 185 (1862)] 7 lo extrae y lo llama carragenina. En 1876 Bente indica la presencia de ácido levulínico y en 1887 Haedicke, Bauer y Tollens confirman la existencia de galactosa y hablan de una riqueza del 28% de este azúcar en el coloide (4). A todo esto ya en 1871 se había concedido a Bourgade en los E.E.U.U. una patente sobre un método de extracción que se basaba en la precipitación con alcohol etílico (6).

En 1903 aparece en el Biochemisches Handlexikon de Abderhalden la primera indicación sobre una posible fórmula para la carragenina (7) : $(C_6 H_{10} O_5)_n$ no se dan razones y en general no se la acepta debido al elevado porcentaje en cenizas que siempre se había observado y que esta fórmula no explicaría; por otra parte tampoco se menciona la existencia de N_2 . Poco después en 1904, Müther y Tollens dicen haber encontrado glucosa estimando la cantidad de sal de Ag existente en un producto de oxidación, resultado de poco valor porque podría provenir de ácido sacárico o ácido múcico (8). Finalmente en 1914 Tollens nuevamente, y esta vez en el Handbuch der Kohlenhydrate, menciona la existencia de fructosa en base a reacciones coloreadas, pero esto no fue confirmado (4).

En lo que antecede puede observarse que todas las investigaciones que se hicieron sobre la carragenina a lo largo de 70 años, fueron bastante esporádicas y aisladas no consiguiéndose adelantar gran cosa en el conocimiento de esta sustancia. Al estallar la Primera Guerra Mundial el Irish Moss (nombre que recibe en Inglaterra) adquiere una gran importancia, comienzan las investigaciones sistemáticas y pocos años más tarde, en 1920 aparece la primera memoria de la así llamada segunda etapa.

1920-1954: En 1920 aparece pues la primera memoria que informa sobre las investigaciones efectuadas durante la guerra; en ella Haas y Hill (5) mencionan el descubrimiento de un extracto frío (C.E.) y un extracto caliente (H.E.), lo que según se ha visto ya había indicado Davy en 1851, y, lo que es más importante, señalan el elevado porcentaje en cenizas que hasta ese momento parece inexplicable. En 1921 Haas intenta reducir el valor de cenizas por diálisis sin éxito y concluye de esto que el SO_4

(que prácticamente constituye toda la ceniza) está unido a la molécula, lo que confirma al dosar $\text{SO}_4^{=}$ previa hidrólisis de la carragenina. Además señala la constancia de la relación $\text{SO}_4^{=}$ por hidrólisis/ $\text{SO}_4^{=}$ en cenizas, y en vista del elevado porcentaje de Ca en las cenizas sugiere la primera fórmula:

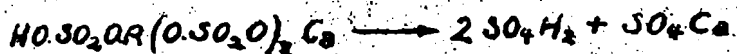


lo que indica la existencia de un sulfato etéreo, el primero hallado en los vegetales. También encontró un 1% de N_2 .

Poco después, en 1922, Russell-Wells (8) analiza las cenizas tanto del C.E. como del H.E. encontrando $\text{SO}_4^{=}$, Ca, Mg, Na y K y en los extractos encontró NH_4^+ . En cuanto a la materia orgánica, además de confirmar la existencia de galactosa, establece la ausencia de pentosas y la presencia de un 1,3% de celulosa.

Si bien hasta este momento se habían aclarado muchos puntos recién en 1923 se efectúa una serie de experiencias de gran importancia teórica; Harwood (9) comprueba que la carragenina es un electrólito coloidal ya que puede alcanzarse con ella un equilibrio Donnan; situando a un lado de la membrana una solución de carragenina y al otro una solución de Cl_2Ca .

En 1934 M.R. Butler (7) luego de confirmar la existencia de Ca^{++} , K^+ y NH_4^+ prepara por diálisis las sales puras de la carragenina, lo que confirma porque las respectivas cenizas indican los porcentajes de $\text{SO}_4^{=}$ y cationes correspondientes a SO_4Ca , SO_4K_2 y $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$. Demuestra además que ninguna de estas sales es igual a la carragenina por lo cual ésta sería una mezcla de las tres y que la pérdida de sulfato por calcinación que Haas había supuesto dando un valor 2:1 para la relación $\text{SO}_4^{=}$ total/ $\text{SO}_4^{=}$ cenizas era algo superior llegando a 3:1 explicable mediante la existencia de una sal ácida:



y la

presencia de una sal de NH_4^+ que se elimina totalmente.

Un año más tarde en 1935 aparece el único trabajo en el que se estudia con bastante detalle el problema del N_2 , lo hace M.R. Butler (10) y encuentra un 1% en la planta y un 0,30% en los extractos; no llega a ninguna conclusión definitiva pero sugiere que el N_2 estaría adsorbido en las partículas coloidales.

Así como 1920 y 1923 marcan jalones fundamentales en el estudio de la carragenina ya que en esos momentos se introduce un nuevo criterio para el estudio de este ficocoloide, puede considerarse el año de 1940 igualmente importante porque se registran en la bibliografía las primeras experiencias de acetila-

ción y metilación. Dillon y O'Colla publican en Nature 145 749 (1940) una carta en la que indican haber preparado el polisacárido libre de S acetilando, y sugieren la fórmula $(C_6H_{10}O_5)_n$ con un 0,1% de cenizas.

Pero recién en 1943 aparece un trabajo serio y sistemático, original de Percival, Percival y Buchanan (11). Estos autores luego de confirmar que el C.E. es principalmente una sal de K y Na con muy poco Ca y vestigios de NH₄ y el H.E. una sal de Ca con muy poco K y Na, estudian el polisacárido por acetilación y metilación encontrando: que el polisacárido está formado por unidades galactosa posiblemente con uniones 1-3 iguales al agar-agar, con un grupo sulfato etéreo en C₄ y el anillo piranósico propio de la galactosa. También indican la existencia en la molécula de una fracción desconocida pero que no estudian.

En 1946 Young y Rice (12) encuentran que no tiene mucho sentido la diferenciación entre C.E. y H.E. ya que es posible agotar completamente el alga sometiéndola a una prolongada extracción con agua fría; además establecen la presencia de ácido 2-ceto-d-glucónico (llamado fructurónico por los ingleses y levulínico por Tollens) que indican como proveniente de la glucosa presente en la carragenina y que comprobaron ser el responsable de la reacción de pentosas. Por otra parte consiguieron aislar carragenina metilada cristalina que caracterizaron mediante el P.F. =130-140°C, la rotación específica $\alpha_D^{20} + 48,0$, el número de metoxilos 15,2% y el porcentaje de cenizas 18,2%.

Continuando estas investigaciones Dillon y O'Colla (4) en 1951 confirmaron la existencia de las uniones 1-3 empleando además de la metilación la oxidación con periodato, que tiene la propiedad de atacar solamente los grupos α glicol. Observaron estos autores que después del tratamiento con IO₄Na desaparece la capacidad de dar color azul con iodo y no es posible observar la presencia de glucosa; en base a esto y sin mucho asidero dicen que el constituyente desconocido de la carragenina tiene un P.M. que no difiere mucho del anhídrido de hexosa en el que cada unidad está esterificada con SO₃H₂. Para decirlo con las palabras de los autores: "El mucilago tiene una estructura muy ramificada que contiene en la parte interna de la molécula una sustancia X que no es azúcar reductor y que es oxidable con ácido periódico y en la parte externa una sustancia Y que da reacciones de cetonas y es fácilmente transformable en un ácido cetónico. Ambas X y Y están esterificadas con SO₃H₂ y el peso molecular de cada una es aproximadamente 160."

Finalmente en 1953 aparece un trabajo sobre el tema que se refiere precisamente a la existencia de dos sustancias que los autores Smith y Cook (13) llaman sencillamente X y Y carragenina; separando la primera por agregado de sales de K y centrifugación. Nada dicen sobre la constitución de cada una de las fracciones.

EXTRACCION:

En todos los procedimientos se empieza por extraer el coloide con agua, pero a partir de aquí se presentan dos variantes; por un lado se evapora directamente (con la consiguiente impurificación por parte de las sales que se arrastran al extraer) hasta sequedad y por la otra se evapora hasta pequeño volumen y luego se precipita el coloide por adición de un exceso de un alcohol, que puede ser etílico (7) o isopropílico. (6).

Como la primera parte es la misma para todos los procedimientos es posible obtener distintos extractos con solo variar la temperatura así:

a 40-50°C se obtiene el extracto frío C.E.
a 80-100°C se obtiene el extracto caliente H.E.

calentando directamente a baño maría sin regular la temperatura se obtiene un extracto que se puede llamar standard, E.St.

Este nombre de EXTRACTO STANDARD (E.St.) Luzzati (16) lo usó para designar el producto obtenido calentando directamente a baño maría sin vigilar la temperatura. En este trabajo se usará esta notación por la simplificación que representa.

A continuación, en lugar de seguir un orden cronológico estricto se considerarán conjuntamente por una parte los métodos en los que se extraen y evaporan a sequedad y por la otra en los que se evapora a pequeño volumen y se precipita el coloide con un alcohol; a los efectos de establecer una diferencia entre ambos se designarán los primeros como métodos de extracción directa y a los segundos como métodos de extracción con precipitación.

MÉTODOS DE EXTRACCION DIRECTA:

Método de Haas y Hill: es el primero que se registra en detalle en la literatura. El alga cosechada y despojada de cuerpos extraños grandes se lavó dos veces rápidamente con agua destilada para eliminar el polvo adherido y las sales provenientes del agua de mar. Es necesario proceder con gran rapidez porque las "hojas" comienzan en seguida a hincharse y a perder coloide por disolución. El alga lavada se escurrió por compresión, dejando secar sobre papel al aire y a la temperatura ambiente primero y en estufa después. El material así obtenido se molió a polvo fino y se sometió a cada uno de los siguientes métodos:

1) Extracción con agua fría: Se echó alga molida en agua destilada fría, en cantidad suficiente como para obtener una solución al 1%, agitando constantemente y agregando luego un poco de tolueno. Se dejó en reposo durante 12 horas agitando de tanto en tanto. El líquido sobrenadante fué filtrado y evaporado; agregándose más agua destilada al residuo que se sometió al mismo proceso una vez más. Con el objeto de comparar el resultado de las sucesivas extracciones cada porción fué evaporada por separado hasta sequedad en un recipiente playo de cobre estañado.

Una extracción exhaustiva durante 36 días sobre 40 gr. de alga molida con agua fría dió solamente 18,85 gr. de coloide, que

se obtiene en tiras.

ii) Extracción con agua caliente: el alga molida se echó en un vaso con agua destilada caliente colocado sobre un baño maría hirviente y se agitó para evitar la formación de grumos (siempre en la proporción necesaria para obtener una solución al 1%. Luego de calentar durante media hora se filtró el contenido del vaso, con presión, a través de un filtro de tela y luego por papel colocado en un Buchner. El residuo fue luego extraído varias veces de esta manera y los filtrados reunidos se vertieron en un recipiente playo de cobre estañado calentándose a baño maría. Una vez seco se quitó la carragenina en forma de tiras. Por este método puede obtenerse un 70-75% de extracto hidrosoluble.

Tanto el G.E. como el H.E. (en adelante se usarán directamente las iniciales para designar los extractos: frío, caliente y Standard) se presentan en forma de hojuelas semejantes a la gelatina, transparentes, de un amarillo pálido, quebradizas cuando están muy secas y que parecen conservarse bien por tiempo indeterminado. Como se ha visto en este caso el H.E. coincide con el E.St.

Desde la época de este trabajo hasta 1934 no se registra ninguna modificación apreciable en los métodos de preparar el coloide y recién en ese momento, 14 años después de los primeros estudios de tiempos de la guerra se introduce la pptación con alcohol (por lo menos es lo que se desprende de la búsqueda en la bibliografía a mi alcance).

Método de Young y Rice (12): El método es en líneas generales igual que el anterior con la variante de que el producto de la precipitación con etanol fue rediseuelto y dializado 6 días en un dializador de Sørensen con control de vacío. Luego se concentró la solución "casi" hasta sequedad al vacío y a 30°-40°C, secándose luego a 60°C en desecador a pistola con P₂O₅.

Es evidente que el proceso de diálisis permite eliminar sales provenientes del agua de mar.

Método de R.C. Rose (14): Más que poner a punto un método hizo un estudio de los procedimientos existentes poniendo especial atención en la influencia de la temperatura, la presión y la presencia de sales en la extracción de la carragenina.

El material fue preparado de la siguiente manera: el alga cosechada se blanqueó al sol, molió hasta pasar por un tamiz de 2mm. y lavó finalmente con agua a 20°C.

i) Influencia de la temperatura y la presión: Se hizo un ensayo preliminar sobre 10 gr. de carragenina extraídos 1/2 hora, 1 hora y 2 horas a 100°C obteniéndose concentraciones de 0,258, 0,266 y 0,271% (igualando los pesos de las mezclas). Como consecuencia de estos resultados se tomó 1 hora como

tiempo de extracción y se trató el *Chondrus crispus* con agua en la proporción de 100 gr. de agua por cada gramo de sustancia original. Se pesaron luego los filtrados determinando la cantidad de material extraído en base a la concentración y peso de cada extracto (se usó la reacción de precipitación con clorhidrato de benzidina (15)).

Las extracciones se hicieron luego a temperaturas crecientes; empleando una simple olla a presión con dispositivo de agitación magnética para trabajar a temperatura superior a 100°C.

Rose reúne sus resultados en el siguiente cuadro:

Tabla I; EFFECTOS DE LA TEMPERATURA

Temp. °C	Carragenina sol. luego de la lera. extracción %	Extracciones			
		1a.	2a.	3a.	Total
20	3,1	2,9	2,0	1,1	6,0
40	10,9	9,3	3,6	3,9	16,8
60	24,1	20,9	5,9	1,8	28,6
80	34,6	27,6	6,4	2,6	36,6
100	46,7	38,6	8,4	5,3	50,3
	47,4	37,7	11,3	1,8	50,8
110	54,6	45,2	7,2	2,2	54,6
	54,0	46,8	6,1	1,0	53,9
120	56,0	48,1	6,5	1,4	56,0
125	54,7	-----	-----	-----	-----

Donde se ve que trabajando a 100°C se obtuvieron resultados suficientemente buenos como para que no tenga mucho sentido extremar las condiciones y extraer a presión.

ii) Efecto de cationes, sales y calentamiento en la extracción de la carragenina: se ha comprobado (y se indicará más adelante al hablar de propiedades físicas) que la presencia de cationes afecta la gelificación y por lo tanto la solubilidad de la carragenina. Como el C.E. es principalmente la sal de Na y K (según ya se ha visto (8)); Rose pensó que sustituyendo el Ca presente por Na en el alga misma sería posible extraer la carragenina a menor temperatura. Para ello dializó cantidades pesadas de carragenina contra soluciones de ClNa, ClK, y Cl₂Ca cambiando frecuentemente las soluciones; dializó luego contra agua destilada a 50°C para eliminar el exceso de sales y extrajo recién entonces en 3 períodos de 1 hora. Las cantidades fueron (a 40°C):

Luego de diálisis contra ClNa	32%
" " " " ClK	10,7%
" " " " Cl ₂ Ca	8,3%

mientras que por extracción directa se obtenía un 16,8% (ver tabla I).

Aumentando la temperatura a 60°C la cantidad extraída se vuelve independiente de los cationes presentes.

A pesar de todo estas experiencias son de la mayor importancia porque permitieron elaborar un buen método de extracción de iridoficina ya que el empleo de una solución diluida de $ClNa$ para la extracción facilita mucho las operaciones de filtrado.

MÉTODOS DE EXTRACCIÓN CON PRECIPITACIÓN: En la sección de historia se había mencionado una patente otorgada a Bourgade en 1871, este es el primer método registrado en la literatura que emplea un pptante alcohólico, el empleo de este recurso se debe a la imposibilidad de purificar de otra manera y en forma rápida la carragenina obtenida por extracción directa: ya que la diálisis no es accesible en gran escala y por ser el coloide parcialmente soluble en agua fría no es posible aplicar el método de congelar y descongelar que tan buenos resultados da con el agar-agar.

La misión del alcohol es doble: por una parte es deshidratante (elimina el agua) y por otra arrastra las impurezas hidrosolubles; quedando la carragenina en condiciones de filtrar y secar.

Se mencionarán aquí solamente dos métodos uno de Butler que usa etanol y el otro de Pfister que usa isopropanol y que fue patentado en 1941.

Método de M.R. Butler: (obtiene un E.St.) (7): Se lavaron 20 gr. de alga (no indica si se molió previamente el material) con agua destilada hasta ausencia de Cl^- (alcanzan 3 o 4 lavados); se suspendió el sólido en 1 litro de agua destilada que se calentó 5-6 horas a baño maría. El líquido viscoso resultante se filtró por Buchner calentado usando papel chardín, (fue necesario cambiar el filtro bastante seguido). El filtrado se evaporó con agitación hasta un volumen de 300 ml. que se vertieron lentamente y agitando sobre 1 lt. de etanol al 95%, se obtuvo un pp. fibroso que se escurrió por estopilla de algodón, y suspendió en 250 ml. de etanol al 95% dejando en reposo una noche. En días sucesivos se transfiere el ppdo a: 1er día: 200ml. de etanol absoluto; 2º día: 200 ml. de etanol absoluto; 3er día: 150 ml. de eter etílico anhidro y el 4º día: 150 ml. de eter etílico anhidro. Se filtró y dejó secar un día en desecador al vacío moléndolo después hasta un polvo fino. La autora recomienda secar el material al aire y a no más de $80^{\circ}C$ durante seis horas antes de usarlo. No se dan rendimientos.

Método de Pfister (6): La carragenina se extrae con agua caliente y clarifica por filtración con codyuvante; luego se evapora hasta tener una solución al 10% (para ahorrar alcohol) y el líquido concentrado se vierte lentamente sobre alcohol isopropílico del 91% vigorosamente agitado. La proporción de alcohol a usar depende del volumen final de la solución de coloide, siendo conveniente que en la mezcla de ambos haya un 50% de alcohol en peso; por ejemplo, si se usa una solución al 2% de carragenina serán necesarios 50 volúmenes de alcohol por cada 36 volúmenes de licor. Pfister introdujo además un dispositivo para

introducir las soluciones finamente divididas, lo que permite obtener un producto muy esponjoso.

A la carragenina así obtenida se le eliminan mecánicamente (por centrifugación, en la industria) todas las impurezas pudiéndose repetir el tratamiento con alcohol para obtener una sustancia de mayor pureza. El material obtenido, que contiene todavía un 10-15% de alcohol y un 5-8% de humedad, se pasa por un molino a martillos y se extiende sobre telas metálicas donde se lo seca por soplado con aire a 49-66 °C durante 2 a 6 horas.

Este método es prácticamente la base de todas las demás técnicas industriales que en general introducen solamente modificaciones de forma. Una de estas variantes, el método de Bihovde ver (6) pag. 688, sirvió de punto de partida a Luzzati para elaborar el método que usó en la extracción del sicocoloide de la *Iridia Cordata* (16).

ANÁLISIS QUÍMICO:

HUMEDAD: Tanto el alga como la carragenina misma son muy higroscópicos a tal punto que carece de sentido dar un valor para la humedad, lo único que puede hacerse es mencionar los límites máximo y mínimo que se citan en la literatura: 2,54 a 18,2% (5) para el alga y 0,1 a 23% para la carragenina (5).

Las determinaciones de humedad requieren en estas sustancias un cuidado extremo porque en la estufa ordinaria las temperaturas son en general suficientes como para alterar la composición del coloide.

Más adelante, en el informe sobre la parte experimental de esta Tesis, se darán los detalles de un método que asegura un secado completo sin peligro de alteración del material.

CONTENIDO EN CENIZAS: El elevado porcentaje de cenizas que dejaba la calcinación tanto del *Chondrus* como de la carragenina fué uno de los primeros problemas que intentaron resolver los investigadores.

En un principio solamente se intentó encontrar un valor bien definido ya que casi cada investigador encontraba una cifra distinta.

Flickiger y Obermayer (5) 16% (Schwercz. *Wochens Pharm* XIII 1868)
Flickiger y Handbury 15% (*Pharmacopeia Londres* 1874)
Czapek 20% (*Biochemie der Pflanzen* II 818)

Cenizas en carragenina obtenida por métodos de extracción directa Haas y Hill (5):

A. Alga entera 14,6%

B. Carragenina

- (5a. fracción: 27,07 %
- 1) C.E. (10a. fracción: 24,32 %
- (30a. fracción: 21,50 %
- 2) H.E. del residuo de 1) 16,3%
- 3) E.St. 22,7%
- 4) Residuo del E.St. 5,19%

Estos autores intentaron reducir el porcentaje de cenizas por diálisis contra agua corriente, pero al cabo de un mes el valor descendió solamente del 22,79% al 20,55%. Comprobaron también que para eliminar sales retenidas bastaban dos días de diálisis.

Uno de los autores del trabajo anterior, Haas (17), publica un poco más tarde el resultado de una serie de observaciones sobre las cenizas que le permiten llegar a una conclusión muy importante, la de que se estaría en presencia de un sulfato etéreo.

Sus determinaciones son:

Cenizas del C.E.	14,6 %
" " H.E.	21,8 %
" " residuo	5,19 %

Efectúa después la sustitución de Ca por Na mediante diálisis contra ClNa y al determinar cenizas encuentra en lugar del 21,8% un 22,7% justifica esto diciendo que un ion Ca (40,08) fue sustituido por dos iones Na (45,99), más adelante al tratar sobre la naturaleza del ficocoloide se verá la importancia de estas experiencias. Además a partir de este momento todos los análisis químicos de la carragenina están directamente relacionados con algún estudio sobre la naturaleza química de la misma.

Muy poco después (en 1922) y basándose en los dos trabajos antes mencionados Russell-Wells (8) estudia la composición de las cenizas aunque no da valores cuantitativos. Encuentra para el C.E. un 32,0% de cenizas que se reducen a un 21,86% por diálisis.

Analizando las cenizas contenían SO_4 , Ca, K, Mg, Na y rastros de Fe. Encontró que el Ca estaba completamente ionizado y que tanto en cenizas como en carragenina hidrolizada presentaba casi el mismo valor.

Ca en cenizas	3,98%
Ca per hidrólisis	4,03%

Después de hacer lo mismo con el SO_4 , es decir, determinar en cenizas y en el hidrolizado llegó a los valores siguientes:

	I	II	media
SO_4 en cenizas	13,75%	14,16%	13,95%
" por hidrólisis	30,14%	30,32%	30,23%

La hidrólisis se hizo sobre 0,5 gr. de C.E. con 200 ml. de H_2O y 5 ml. de $Cl H$ conc. (practicamente solución al 1%) hirviendo 5 hs. a fuego directo.

Sin sacar ninguna conclusión Buchanan, Percival y Percival indican en 1943 (11) los siguientes resultados:

Cenizas del C.E. 22,4% luego de diálisis prolongada que contenían	SO_4 = 63,8%	K = 24,5%
	Ca = 5,5%	Na = 13,7%

Cenizas del H.E. 18,7% luego de diálisis prolongada que contenían	SO_4 = 66,6%	K = 2,5%
	Ca = 29,9%	Na = 1,0%

Cenizas en carragenina obtenida por métodos de extracción con precipitación: M.R. Butler (7) hace un estudio bastante completo sobre cenizas tanto del *Chondrus Crispus* como de la carragenina dando especial atención a las variaciones estacionales (que en general no se habían tomado en cuenta).

Analizó primeramente ocho muestras provenientes de cosechas efectuadas en distintas épocas y determinó el valor de cenizas en los respectivos extractos.

Tabla II: % DE CENIZAS EN EXTRACTOS DE CHONDRUS CRISPUS

Epoca de la cosecha	% de ceniza (sobre peso seco)
Agosto	17,30
Junio	19,32
Agosto	19,46
Agosto	19,74
Agosto	19,11
Agosto	18,43
Febrero	16,36
Agosto	19,44

Hizo una primera investigación cualitativa de estas cenizas y encontró: SO_4 , Ca, K, Na, Mg y rastros de Fe confirmando así los resultados de otros autores. También encontró un poco de IO_4 no precipitable al principio lo que le hizo suponer su existencia en una combinación orgánica.

En previsión de la existencia de azufre en forma no oxidada en cantidades apreciables la autora determina SO_4 en cenizas

oxidando previamente con NO_3H , siendo los resultados los siguientes:

Tabla III: % DE SO_4 EN CENIZAS

Método	% de cenizas (sobre sust.seca)	% de SO_4 sobre carrag. original
Incineración simple:	19,44	11,54
Incineración con NO_3H	19,43	11,67

la coincidencia entre los valores de la incineración simple y de la incineración con ácido nítrico indica claramente la ausencia de azufre no oxidado en cantidades dignas de tener en cuenta, la pequeña diferencia puede provenir perfectamente de una reducción del SO_4 por el C al calcinar.

Como la autora concede especial importancia a la presencia de Ca y K en las cenizas efectuó un análisis cuidadoso en ese sentido indicando:

Tabla IV: RIQUEZA DE LAS CENIZAS EN SO_4 , Ca Y K

Cenizas		SO_4 en carragenina calculado sobre cenizas.	Ca en cenizas	Ca en carragenina calculado sobre cenizas.	K en cenizas	K en carragenina calculado sobre cenizas.
%	%	%	%	%	%	%
18,67	58,44	10,91	2,88	0,52	11,99	2,22
E.St. 19,14	58,74	11,54	3,68	0,68	---	---

Para completar esta serie de resultados se incluye el obtenido por Luzzati (16) que es para cenizas de E.St. 21,05%.

Resumiendo: no quedan ya dudas sobre la composición cualitativa de las cenizas de la carragenina pero su composición cuantitativa esta sujeta definitivamente al método de extracción y por esta razón se reunieron también aquí los trabajos de acuerdo a las técnicas que usaron los autores para obtener el coloide.

ANIONES Y CATIONES EN LOS HIDROLIZADOS DE CARRAGENINA:

Así como se ha dedicado una cuidadosa atención al análisis inorgánico de las cenizas muy poco se ha hecho en este sentido sobre la carragenina en sí o sobre sus hidrolizados. Esto tiene un importante justificativo en el hecho de que casi todos los elementos inorgánicos del ficololoide se encuentran en las cenizas; por lo tanto salvo las cuidadosas determinaciones de SO_4 total y de NH_4^+ los restantes constituyentes inorgánicos se estudian solamente en cenizas.

Dosaje de SO_4 total: Como ya se dijo el primero en observar que para la determinación de SO_4 en soluciones de carra-

genina es necesario someter el material a una hidrólisis fue Haas en 1921 (17), encontrando:

SO ₄	Calcínación	I 12,15%	II 11,8%	Ca	Porac. directa	5,47%
	Hidrólisis	24,55%	23,81%		Calcínación	5,66%

Al año siguiente (1922) Russell-Wells (8) repite las experiencias sobre una muestra de carragenina obtenida en iguales condiciones y encuentra SO₄ por hidrólisis 30,14%
30,32%) 30,23%

Dosa además N₂ por destilación de la muestra con OMg y obtiene 0,24%) 0,23%) 0,22%.

Es decir que pone de manifiesto la presencia de NH₄⁺ en una cantidad que corresponde a un 0,8% de SO₄.

Pero sin lugar a dudas el trabajo más importante a este respecto es el de Butler (7) en 1934 porque al igual que para cenizas estudia varios métodos de hidrólisis y compara los resultados obtenidos de diversas muestras. Observó que el SO₄ es más resistente a la hidrólisis alcalina que a la acción de ácidos (hecho que según se verá intentan explicar casi 10 años más tarde Buchanan, Percival y Percival (11)), lo que justifica en el siguiente cuadro:

Tabla V: SULFATO EN EXTRACTOS HIDROLIZADOS

Métodos de hidrólisis	Tiempo hs.	% sulfato (SO ₄)
<u>Muestra C</u>		
Ebullición directa con ClH 5%	5	27,66
" " " " " "	6	27,53
" " " " " "	13	27,44
A baño maria con ClH 5%	6	21,62
" " " " " "	13	25,62
Ebullición directa con HONa 5%	6	13,32
<u>Muestra H</u>		
Ebullición directa con ClH 5%	6	25,18
" en baño de arena con ClH 5%	6	25,38

Ante la sospecha de que parte del azufre pudiese estar en forma no oxidada Butler efectúa el dosaje oxidando previamente la muestra con una mezcla hidróxido-nitrato (8:1), disolviendo después, acidificando con ClH y precipitando con Cl₂Ba.

Tabla VI: AZUFRE LUEGO DE OXIDACION

Muestra	% de sulfato (SO ₄)	Promedio
I	29,04	28,38%
II	28,08	
III	27,60	
IV	29,07	
V	28,56	
VI	28,95	
VII	28,02	
VIII	27,96	
IX	28,95	
X	29,31	
XI	26,70	
XII	27,72	
XIII	28,20	
XIV	29,28	
XV	30,20	
XVI	30,09	
XVII	28,53	

Como se ve la diferencia entre el valor promedio así obtenido y el que se logra por hidrólisis ácida es muy pequeña (28,38% y 27,66% respectivamente), pudiéndose considerar que todo el azufre presente en la carragenina está en forma de sulfato (recuérdese que Butler obtiene la carragenina empleando un método de extracción con precipitación).

Posteriormente Buchanan, Percival y Percival (12) (extrayendo el coloide por un método directo) indican:

C.E. sulfato 35,1% (Por hidrólisis con ClH).
 H.E. " 23,8% (Por fusión con O₂Na₂).

Finalmente Dillon y O'Colla encuentran un 25,17% pero hay que tener en cuenta que obtienen la carragenina por un método semejante al que se usa para el agar-agar; extraen primero con agua (E.St.) luego congelan y descongelan sobre tela y el residuo lo someten a precipitación con alcohol etílico. El inconveniente de este procedimiento es el ya señalado páginas atrás, es decir: por ser una parte de la carragenina soluble en agua fría se la pierde al descongelar, lo que queda comprobado con el valor de sulfato que es menor al correspondiente a un C.E. y mayor al del H.E. Se perdería de esta manera parte del extracto frío.

Dosaje de NH₄⁺: los únicos datos al respecto encontrados en la literatura consultada son los de Russell-Wells que por destilación del G.E. con OMg indica:

N₂ por OMg: 0,24%)
 0,22%) 0,23%

lo que indicaría una cantidad muy pequeña de sal de amonio presente. Se verá algo más sobre esta en la sección siguiente.

DETERMINACIONES DE N₂: En general casi todos los investigadores que trabajaron sobre carragénina efectuaron dosajes de N₂ por el método de Kjeldahl o alguna de sus modificaciones pero se limitan siempre a dar los resultados sin sacar ninguna conclusión con excepción de Russell-Weils como se verá enseguida, pero antes se darán rápidamente los resultados obtenidos por varios autores.

Hass y Hill indican:

A. Planta seca	1,91%
B. Carragénina	
1. C.E.	0,99%
2. H.E. del residuo de (1)	1,09%
3. H.E. directo	0,82%
4. Residuo de (3)	4,82%

Haciendo notar que tanto el alga como el extracto daban reacción positiva con el reactivo de Millon pero negativa con el del triptófano (ácido glicólico).

Russell-Weils como ya se dijo indica un 0,21% de N₂ amoniacal y además un 0,55% (0,57%) de N₂ total en el C.E. por lo que parecería que la mitad de N₂ total del C.E. sería liberable como NH₃ y el resto proteico. También indica reacción positiva con el reactivo de Millon.

Butler entre las cifras de un análisis de extracto de N₂

C.E.	0,32	-	0,30
H.E.	0,15	-	0,15
H.St.	0,24	-	0,24

Se llega así al trabajo de Butler (10) (1935) que hace una serie de dosajes sistemáticos de N₂ en: muestras provenientes de distintas plantas, distintas fracciones de Chondrus, extractos provenientes de estas plantas y distintas fracciones de los extractos.

Los resultados fueron:

Tabla VII: N₂ EN PLANTAS Y EXTRACTOS

Muestra	% en plantas sobre sustancia seca	% en extracto sobre sustancia seca
S	0,75	0,26
N	1,75	0,39
H	1,05	2,75
C	0,99	0,24
B	0,53	0,29

Las muestras difieren en el lugar en que fueron recolectadas.

Todas provienen de coqueas estivales salvo la muestra H que fue recolectada en invierno.

Se hizo otra serie de determinaciones sobre extractos de otras muestras y sobre los mismos purificados por recristalización.

Tabla VIII: % EN N₂ EN EXTRACTOS REPRECIPITADOS

Muestra	% en extracto	% en extracto reppdo.
T	0,85	0,86
P	1,21	1,10
D	1,43	1,18
S	0,26	0,30
F	3,85	2,25
M	0,81	0,62
B	0,23	0,29
C	0,24	0,24
C*	0,27	0,27

* Reppdo. dos veces

Se puede apreciar la notable diferencia que hay entre las diversas muestras, diferencia que según la autora no existe entre las sucesivas determinaciones sobre una misma muestra.

Tabla IX: % DE N₂ EN DISTINTAS FRACCIONES DE CHONDRUS CRISPUS

Muestra	% en peso sobre sustancia seca
Planta entera	0,03
Extracto acuoso (no ppdo.)	0,64
Residuo de extracto acuoso*	2,06
Precipitado crudo	0,28
Frac. sol. en etanol del extracto acuoso	1,13
Precipitado purificado (E. St.)	0,29
Residuo de plantas libres de material hidrosoluble*	3,85
Extracto alcohólico	0,71
Residuo del extracto alcohólico	0,82

* Es evidente que estas determinaciones deben dar resultados elevados, porque los levados extraen una parte apreciable de material.

Tabla X: FRACCIONAMIENTO DE LAS PLANTAS

Fracción	% de la planta
Extracto acuoso	65-67
Residuo del anterior	33-35
Precipitación alcohólica del extracto acuoso	50-54
Fracción soluble en alcohol del extracto acuoso	13-15

El fraccionamiento es solo aproximado a virtud de la elevada viscosidad de las soluciones y del estado coloidal de los componentes.

Tabla III: % N₂ EN LAS FRACCIONES DE LA TABLA I

Fracciones	% total de N ₂
Planta entera	100
Extracto acuoso	37
Residuo del anterior	63
Precipitado alcohólico	13
Fracción soluble en alcohol	15

Además, y este es el detalle más importante del trabajo que se comenta, la autora hace una discusión de los resultados que por juzgarse de interés se transcribe a continuación;

Discusión:

- El N₂ asociado al polisacárido parece representar el 1% del N₂ total de la planta.
- El N₂ no es impureza, ya que no desaparece por reprecipitación. Tampoco se puede lograr un valor constante lo que indicaría que no está unido químicamente al polisacárido.
- Si bien se supone la existencia de proteínas, la reacción del Biuret es en general negativa y no hay N₂ dosable por el método de van Slyke.
- Aunque Haas (1921), Russell-Wells (1922) y Haas-Hill (1933) indican la presencia de proteínas y Russell-Wells (1922) da un 0.56% de N₂ amoniacal. Ninguna de estas cifras pudo ser confirmada.
- La única sugerencia que puede hacerse es que el N₂ está adsorbido en las partículas coloidales.

ARSENICO EN EL ONCHDRUS CRISPUS: Antes de pasar a considerar la parte orgánica de la resina se mencionará brevemente el resultado de una investigación realizada por Lawall y Harrison [J. Am. Pharm. Soc. 23 308 (1934)] sobre el contenido en arsénico del Onchdrus Crispus comparando los resultados entre muestras previamente sometidas a blanqueado con SO₂ y en muestras sin blanquear; ya que el As. puede provenir del SO₂.

Los resultados fueron los siguientes:

Muestra (origen)	SO ₂ ppm.	As ₂ O ₃ ppm.
Wholesale Drug House	1260	6
" " "	920	7
" " "	1040	11
Importing House (Técnico)	4080	3
" " (Medicinal)	2520	1.5
Natural antes de secar	--	12
" luego del 1er. secado	--	10

Natural listo para embarque	---	8
" luego de 4 hs. de secado	---	9
" " " 2 días de blanqueado al sol	---	10
" " " 6 días de blanqueado al sol	---	2
" listo	---	5

De los cuales los autores sacan las siguientes conclusiones:

- 1) El contenido en As no corre paralelo con el SO₂ presente.
- 2) El As contenido en el Chondrus natural es en promedio (7,5 ppm.) mayor que en el blanqueado (6,1 ppm.)
- 3) Tanto el Chondrus natural como el blanqueado tiene As₂O₃ en exceso del valor permitido para As en alimentos (1,4 ppm.)
- 4) El contenido en As no es constante variando con el lugar.

En una palabra, tanto el Chondrus tratado con SO₂ como el blanqueado al sol contienen bastante más As que el permitido por la legislación.

MATERIA ORGANICA DE LA CARRAGENINA: Salvo las escasas consideraciones que se han hecho sobre el nitrógeno presente todas las investigaciones en lo que a materia orgánica respecta, se refieren a la investigación y dosaje de hidratos de carbono. También aquí los estudios se hicieron sobre cada uno de los distintos extractos obtenidos (C.E. H.E. y E.St.) y en lo que sigue se hará referencia a los distintos trabajos siguiendo un orden cronológico.

Al considerar lo que se llamó la "Historia" de la Carragenina se mencionaron los distintos descubrimientos que fueron apareciendo hasta 1920 y que, a pesar de todo, contribuyeron muy poco a aclarar la situación. Recién con el trabajo de Russell-Wells (8) se tienen resultados de alguna importancia. Esta autora observa:

- 1) Ausencia de poder reductor tanto en el C.E. como en el H.E. frente al licor de Fehling.
- 2) Obtención de un 21,12% de ácido mucico a partir del H.E. y de un 24,82% para el C.E., usando el método de Kent-Tollens modificado por Creydt. Estas cifras corresponden a un 29,47% y un 33,72% de galactosa respectivamente.

En las aguas madres de la precipitación de ácido mucico no observó la presencia de ácido sacárico, pero sí encontró ácidos tartárico y oxálico.

- 3) Presencia de pentosanos | H.E. = 1,89%
| C.E. = 1,38%
por el método de Kröber-Tollens.

- 4) Ausencia de sustancias pécticas por aplicación del método de Fellenberg [Chem.Zentr. 2 942 (1914)]: que consiste en destilar la sustancia en solución alcalina con vapor e investigar CH₃OH y CH₃-CO-CH₃ en el destilado [Tutin (1921) Biochem.J.

15. 4927.

La técnica es aproximadamente:

Se hierven 2 gr. de extracto con 100 ml. de HONa 0,1N durante 6,45 hs. a reflujo, en el destilado se determinan:

CH₃OH con ácido y dicromato de K

CH₃-CO-CH₃ con la reacción del iodoforme y la del nitroprusiato.

- 5) La presencia, en el residuo de la extracción, de una sustancia que hervida 2 días con HONa al 3%, filtrada, lavada, enjuagada con ClH (para eliminar el CO₂Na₂ que se pueda formar) y lavada nuevamente para eliminar el ácido: no contiene proteínas ni cenizas y es soluble en cuproaménio; se indica como celulosa (existe en un 2,3%).

Sin ninguna conexión con este trabajo, por lo menos los autores no lo mencionan (a pesar de ser uno de ellos el que lo realizó), Haas y Russell-Wells (18) intentan preparar "el hidrato de carbono complejo libre de SO₄" por medio de la hidrólisis ácida (propiedad que se comentará más adelante). Luego de hidrolizar una solución al 2% de H.E. con SO₄H₂ 0,15 N (calentando 45 min. a 80°C sobre baño maría), evaporan la solución a pequeño volumen "al vacío" y dializan:

2 días contra agua destilada.
 2 " " " corriente.
 24 hs. " " destilada.

Obtuvieron así dos fracciones: lo que queda en el dializador, que llaman residuo, y los líquidos dializados, que llaman secillamente dializado. Evaporan ambos a pequeño volumen al vacío y efectúan sobre cada uno una serie de determinaciones cuyos resultados se dan a continuación:

En el residuo se observa:

- a) Reducción del Licor de Fehling.
- b) Reacción positiva con el reactivo de Seliwanoff (Supone la existencia de fructosa).
- c) Reacción de Bial positiva y producción de un 12% de furfural por tratamiento con ClH.
- d) Formación de cristales de ácido múico por oxidación con NO₃H.

En el dializado se observa:

- a) Que no reduce el Licor de Fehling.
- b) Reacción positiva de pentosas.
- c) Reacción positiva de fructosa.
- d) Reacción positiva de galactosa.

En resumen:

	Dializado	Residuo	H.E.
Pentosas (React. de Bial)	+	+	+
Galactosa (ac. múico)	-	+	+
Fructosa (Seliwanoff)	+	+	+
Poder reductor (Fehling)	-	+	-

Estos resultados parecerían indicar que por hidrólisis se ha obtenido un compuesto reductor no dializable.

Finalmente en cuanto al discutido problema de la existencia de glucosa se la considera presente en virtud de haberse obtenido sacarato ácido de K por oxidación con ácido nítrico del hidrolizado.

Con los dos trabajos anteriores puede considerarse bastante estudiado el aspecto cualitativo de la cuestión, aunque como se verá más adelante varios de estos resultados fueron rectificadas, lo que fue posible gracias a que se aplicaron las reacciones de acetilación y metilación al estudio de la carragenina. Sin perjuicio de considerar este tema en detalle al tratar los problemas de estructura se darán aquí los resultados cuali y cuantitativos que se obtuvieron.

En el ya mencionado trabajo de Buchanan, Percival y Percival (11) de 1943 se consignan los siguientes resultados y conclusiones: (Estos autores trabajaron sobre un G.E. y un H.E. según se mencionara en su oportunidad).

Estudio del C.E.: Tanto por hidrólisis con SO_4H_2 al 2,5% como con oxálico 0,5 N se encontró un 35% de galactosa, como galactofenilmetilhidrazona. Resultado que se confirma hidrolizando Carragenina metilada con ácido oxálico, acetilando el producto destilando a $175-220^\circ\text{C}/0,02$ mm. y desacetilando el destilado. La sustancia así obtenida se sometió a dos metilaciones con ICH_3 y OAg_2 (reactivo de Purdie) obteniéndose luego de tratar con anilina la tetra-metil-d-galactopiranos-anilida de P.F. = 196°C ; porque mezclada con una muestra pura de esta sustancia no se observó variaciones en el P.F.

Estudio del H.E.: Por hidrólisis con ácido oxálico 0,5 N fue posible encontrar un 36,9% de galactosa que se identifica igual que antes como galactofenilhidrazona. Sobre el jarabe que queda como residuo de la eliminación de galactosa se encontró una osazona que por no sufrir alteraciones su P.F. por agregado de glucosazona; se lo considera como indicio de glucosa (P.F. = $206-208^\circ\text{C}$).

Sobre otra muestra del mismo jarabe (sin galactosa) se confirma este resultado por acetilación ya que la suposición de obtener tetraacetato de β metilglucósido se confirma al no haber variaciones en el P.F. (104°C) por mezcla con sustancia pura.

Es decir que según estos autores la Carragenina contiene galactosa y glucosa. Además indican al pasar, sin justificar ni confirmar, la presencia de;

a) Cetosas 20% (por colorimetría) en C.E. (no indican métodos).

b) Cetosas 1,7%
Pentosas 2,4%
Metilpentosas 1,2% | en H.E. (también sin indicar métodos).

Como se puede ver en lo que se lleva dicho se puede aceptar como confirmadas la presencia de galactosa y glucosa; no así lo referente a pentosas ya que las reacciones coloreadas solamente, no pueden considerarse como terminantes. A este respecto, en 1946, Young y Rice (12) efectúan una interesante investigación:

a) Hidrolizan una muestra de 10 gr. de Carragenina con una solución acuosa 0,05 N de $C_2O_4H_2$ y $C_2O_4K_2$ durante 30 hs. en atmósfera de N_2 , en estas condiciones la solución amarillea ligeramente por lo que la decoloraron con carbón (norit A) y después de filtrar dejaron en congelación una noche a $4^\circ C$ (de esta manera separan todo el material capaz de gelificar). El líquido resultante lo neutralizaron con $NaOH$ y evaporaron hasta sequedad al vacío y a $30-40^\circ C$. Obtuvieron así un residuo siruposo marrón que extrajeron con alcohol etílico del 95%, combinaron luego los extractos que evaporaron a sequedad (al vacío y a $30-40^\circ C$). El residuo, 1,9 gr., (soluble en alcohol etílico absoluto) lo suspendieron en 500ml. de acetona absoluta con 4 gr. de SO_2Ca , agitando luego el recipiente durante 5 días a $20^\circ C$. Obtuvieron un líquido que filtraron y concentraron al vacío (10 mm.) hasta obtener un aceite amarillo que cristalizó; este producto lo suspendieron en 150 ml. de éter con 10 ml. de SO_2H_2 0,01 N, deshidrataron luego la capa etérea con SO_2Na_2 anhidro y evaporaron. El aceite así obtenido lo sometieron a una destilación fraccionada a 0,1 mm. de todas las porciones resultantes aquella separada a $175^\circ C$ cristaliza, purificando luego por recristalización de una mezcla de éter y éter de petróleo.

El producto tenía las siguientes propiedades
P.F. = $95^\circ C$ $\alpha_D^{22} = -48,8$

C = 52,99% H = 6,81%

que coinciden bastante con las del ácido diisopropiliden-2-cetoglucónico

P.F. = $96-97^\circ C$ $\alpha_D^{22} = -49,38$

C = 52,72% H = 6,57%

Las consecuencias de esta coincidencia son muy importantes ya que los mismos autores prepararon el ácido 2-ceto-D-glucónico a partir de glucosa y fructosa por oxidación con MnO_4K [Ohle y Wolter Ber. 63 843 (1943)] y, mezclándolo luego con una muestra obtenida de Carragenina no observaron variaciones en el P.F. = $95^\circ C$.

Por otra parte prepararon también el derivado diisopropilideno que como se ha visto resultó igual al proveniente de la Carragenina. Es decir que de esta manera se confirma definitivamente la existencia de glucosa en la llamada fracción desconocida de la Carragenina, pero además el ácido 2-ceto-D-glucónico da todas las reacciones de fructosa y principalmente de furfural por ebullición con ClH al 12% (preparando el floroglucido resulta un 7,26% de ácido) con lo que pueden considerarse ausentes las pentosas a menos que pueda demostrarse su presencia de alguna otra manera concluyente.

b) Por hidrólisis ácida con 200 ml. de ClH al 2% durante 14 hs. por ebullición a reflujo (aparece un color marrón), agregaron CO_2Ag_2 para eliminar el exceso de Cl^- y luego SH_2 para eliminar la Ag . Acidificaron luego con ácido acético y concentraron a 50 ml. agregando entonces 60 ml. de alcohol etílico del 95%; observaron la

formación de un ppde. que no identificaron. Filtraron y evaporaron a sequedad, teniendo al final hojuelas marrones que dan un P.F. indefinido y que tratadas con fenilhidrazina dieron un producto cristalino de P.F. = 164°C y que calentado con piridina y cloruro de bencilo dió unos cristales de P.F. = 121°C. El primer compuesto sería di-arabinosazona P.F. = 166-168°C y al segundo el éster tribenzóico de la arabolactona P.F. = 120°C.

Esta determinación permitiría suponer la presencia de arabinosa, pero ésta puede provenir (habiéndose confirmado con productos puros) del ácido 2-ceto-d-glucónico por decarboxilación; luego para llegar a la arabolactona basta una oxidación.

c) En cuanto a la fracción conocida de la Carragenina (el residuo siruposo insoluble en alcohol etílico de la hidrólisis con $C_2O_4H_2$), la metilaron, extrajeron el residuo con Cl_3CH y después de eliminar el disolvente destilaron observando que a 0,1 mm. de Hg la temperatura se mantenía a 150-155°C, comportamiento propio de la trimetilgalactosa (indicio cierto de la presencia de Galactosa).

En resumen: de las dos sustancias, químicamente distintas, que aparentemente constituyen la Carragenina, una está formada exclusivamente de galactosa (la que se suele dar como conocida) mientras que la otra contiene por lo menos glucosa (la desconocida).

Además quedan prácticamente aclaradas las reacciones de cetosas y pentosas de la Carragenina hidrolizada en virtud de la existencia del ácido 2-ceto-d-glucónico.

Conclusiones del análisis químico de la carragenina:

- 1) Los dosajes de SO_4^{2-} en cenizas y SO_4^{2-} total (por hidrólisis ácida) permiten suponer la existencia de sulfatos etéreos.
- 2) La presencia de Ca, Na y K en las cenizas y NH_4^+ en los hidrolizados indicaría la existencia de sales de cada uno de estos cationes.
- 3) El polisacárido que lleva el SO_4^{2-} unido está formado por unidades de galactosa.
- 4) La glucosa presente se la supone formando parte de una fracción aún desconocida del ficocoloide.
- 5) No existe una explicación clara del H_2 presente.

PROPIEDADES FISICAS

Como se verá enseguida muy poco se adelantó en este terreno en lo que a Carragenina se refiere, limitándose a veces a determinaciones aisladas casi como complemento del análisis químico.

ROTACION ESPECIFICA: Nada se dice acerca de métodos ni condiciones de trabajo, los autores se limitan a consignar sus resultados indicando solamente la concentración de la solución en que se efectuó la determinación.

Buchanan, Percival y Percival (11):

C.E.: $\alpha_D^{18} + 50$ en H_2O (c=95)

H.E.: $\alpha_D^{18} + 63$ en H_2O (c=95)

Dillon y O'Colla (4): Trabajan sobre un F.St. obtenido por un método que emplea la precipitación pero con algunas modificaciones (ver extracción pág. 10)

$\alpha_D^{18} + 60^\circ$ en H_2O (c=92)

PODER DE GELATINIZACION Y VISCOSIDAD: Ambos temas se tratan conjuntamente debido a la relación que hay entre ellos. Antes de 1946 sólo Haas y Hill (5) se ocuparon del problema en 1920 estudiando la acción de la sal de Rochelle y el poder gelatinizante.

Acción de la sal de Rochelle: observaron estos autores que hirviendo 5 ml. de una solución al 1% de H.E. con 5 gotas de una solución al 20% de sal de Rochelle se obtiene gelificación por enfriamiento; esto no sucede con una solución al 1% de C.E.

Poder gelatinizante: se da ante todo (5) un método para obtener geles de Carragenina. Se empaqueta primero el material en agua hasta observar un hinchamiento apreciable, entonces se coloca el recipiente en agua a 60°C y se mantiene hasta disolución total.

Comparada con la gelatina y el agar la Carragenina ocupa un lugar intermedio, ya que tanto ella como la gelatina se disuelven en agua con relativa facilidad a temperaturas bastante bajas, el agar por su parte requiere un prolongado calentamiento a 90°C.

En cuanto a lo que podría llamarse P.F., el del agar es bastante elevado contrastando con el de la gelatina y el de la Carragenina que son bajos, por otra parte hay una importante diferencia entre estas dos últimas y es que mientras la gelatina pasa del estado sólido al líquido en el espacio de pocos grados, la Carragenina da en caliente un líquido viscoso que hace muy difícil definir exactamente una temperatura de fusión.

Concentración	Gelatina	Carragenina
3%	27,7 °C	27-30 °C
5%	29,5 °C	40-41 °C

Estos datos se obtuvieron por el método de Hatschek y son solamente aproximados. Nótese la diferencia de las temperaturas con la concentración, haciéndose evidente que

el elevado P.F. de la solución de carragenina al 5% la hace especialmente apta para la confección de caldos de cultivo utilizables a temperaturas similares a las del organismo (de la sangre por ejemplo).

Anteriormente los únicos datos eran los de Stanford (Pharm. Journal 1884, XIV 1010):

Carragenina	3,2%	21 °C
Gelatina	3,2%	15,5 °C

Valores, como se ve, bastante distintos de los anteriores pero que no tienen gran utilidad porque no se dice nada acerca del método empleado.

El poder gelificante no es destruido por la ebullición ya que una solución al 3% de Carragenina hervida 3,5 hs. gelificó en pocos minutos al enfriar; mientras que una solución de gelatina sometida al mismo tratamiento tardó varias horas.

Es necesario dar ahora un salto de un cuarto de siglo para llegar al trabajo siguiente publicado sobre el tema; que es original de F.A.H. Rice (19) y en el que se presentan los resultados de un estudio bastante cuidadoso sobre los efectos de algunos disolventes y de la temperatura en la viscosidad de la carragenina. Un resumen siquiera aproximado está fuera de los límites de esta monografía por lo que se transcribe a continuación el abstract que encabeza la memoria y que da una buena idea de lo que ella contiene.

*Se ha encontrado que la viscosidad de soluciones de carragenina depende principalmente de la concentración de sales neutras, sin embargo muestras dializadas presentan considerables variaciones. La relación entre la viscosidad específica (η_{sp}) y la concentración (C_v) en soluciones acuosas diluidas y formamida es tal que $\eta_{sp} = aC_v + bC_v^2$ donde a y b son constantes. En soluciones diluidas estas constantes decrecen por adición de sales neutras. Un aumento en la temperatura produce una disminución en la viscosidad; disminución que es menos rápida para soluciones en formamida y soluciones acuosas con sales neutras. La efectividad de las soluciones salinas individuales en facilitar la disminución de la viscosidad coincide con su capacidad de ocasionar la pptación del polisacárido siendo el orden decreciente de efectividad; ClK , Cl_2Ca , $ClNa$. Las mediciones de viscosidad no tienen valor y no son reproducibles cuando las soluciones de carragenina gelifican al ser dejadas en reposo.

*La concentración a la que se efectúan las mediciones corrientes de viscosidad disminuye al aumentar la concentración de sales neutras. También disminuye así la rigidez de los gels formados y parece ser que la "firmeza"

"de un gel depende de la concentración y tipo de sal
"neutra tanto como de la "viscosidad intrínseca" del
"polisacárido.

"Se define como viscosidad intrínseca como: el límite
"de la viscosidad específica cuando la concentración
"se aproxima a cero.

A partir de este momento (1946) comienzan a aparecer numerosas memorias sobre estudios de la viscosidad de las soluciones de Carragenina que se mencionan en la bibliografía de los trabajos comentados, especialmente los de autores canadienses que parecen bastante completos.

PODER DE ESTABILIZACION: Es una propiedad de la Carragenina conocida desde hace mucho aunque no figuran métodos para medirla hasta 1946 en que F.A.H. Rice pone a punto una técnica (20). Esta se basa en la cantidad de C_2O_4Ca (expresada en gramos por gramo de extracto seco) que se mantiene en solución en determinadas condiciones, que fueron: Temp. $< 60^{\circ}C$
pH = 5,5-8,5
Conc. de sales neutras = pequeña.

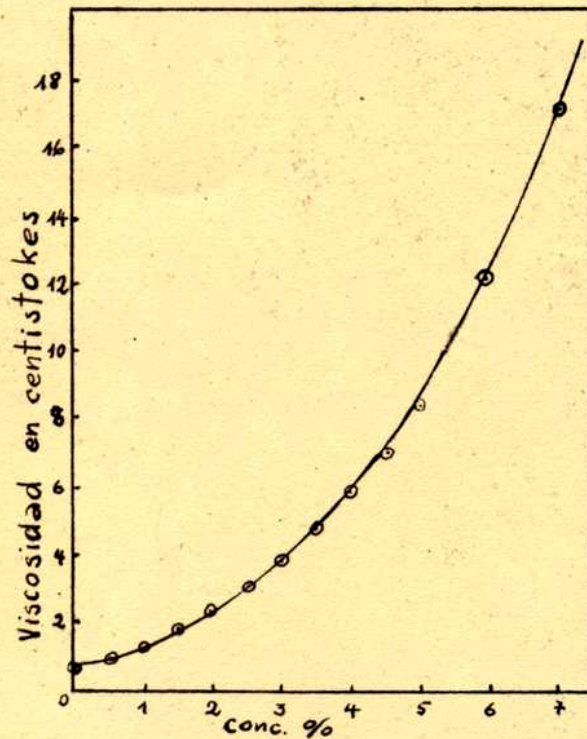
Representando el logaritmo de la mencionada cantidad de C_2O_4Ca en función de la concentración se obtuvo una recta (relación lineal), con resultados de una aproximación del 1%. Se compararon éstos con los obtenidos en una solución estabilizada de polvo de chocolate en leche, desarrollando y verificando la siguiente ecuación $M = \frac{K}{t^p c^n}$; donde K es una constante que

constituye numericamente un índice del poder estabilizante, M es número de granos de C_2O_4Ca mantenidos en suspensión por un gramo de extracto en una concentración de c gramos de extracto por 100 ml. luego de centrifugar un tiempo t; p y n son constantes que representan las tangentes a las líneas trazadas para los logaritmos de M respecto de t y c respectivamente.

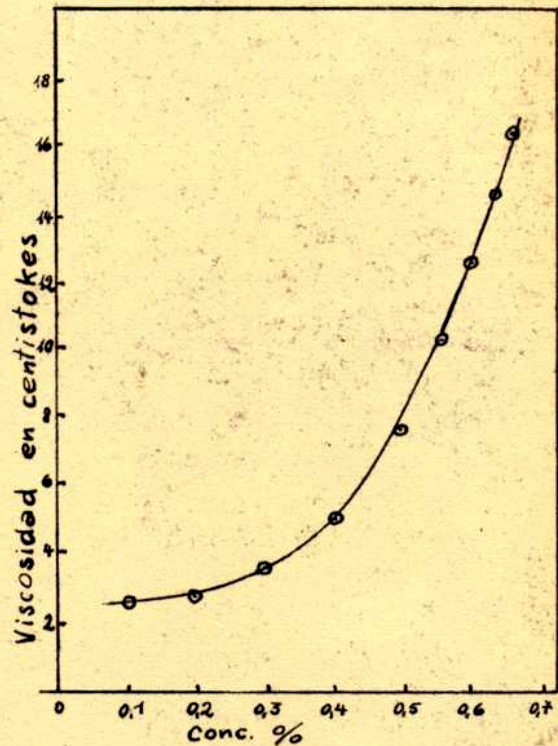
Finalmente entrando de lleno en la aplicación de la Carragenina como estabilizante Rose y Cook en 1949 (21) estudian esta propiedad, aunque de manera algo empírica, en las suspensiones de cocoa en leche, llegando a establecer la menor cantidad de Carragenina necesaria para suspender cocoa en leche en forma satisfactoria. Este mínimo varía entre el 0,04 y el 0,03% en peso de leche, pero la viscosidad que origina es demasiado pequeña para suponer la estabilización de cocoa en leche como consecuencia de la ley de Stokes.

El elevado poder de suspensión debe suponerse entonces como resultado de la formación de un compuesto entre la Carragenina y alguno o algunos de los restantes componentes del sistema que se desea estabilizar.

Algunos años después y mediante un viscosímetro de Ostwald modificado por Fenske, Rose (14) compara las viscosidades entre dos soluciones de Carragenina, una en ClNa 0,05 N y otra en leche cuyos resultados se dan en los gráficos siguientes:



Viscosidad de carragenina a 40°C en ClNa 0,05 N



Viscosidad de carragenina a 10°C en leche.

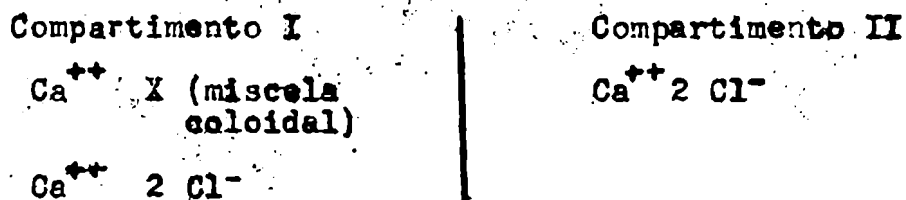
en base a estos datos Rose demuestra que la concentración de Carragenina necesaria para aumentar la viscosidad de la leche en 15 centistokes a 10 °C es una buena medida para estudiar la suspensión de cocoa al 20% en leche.

EQUILIBRIO DONNAN: Es una de las propiedades más importantes de la Carragenina, ya que gracias a ella se ha podido establecer el verdadero carácter del ficocoloide. En la bibliografía consultada apareció un único trabajo sobre el tema que, dada su trascendencia, se transcribe en su mayor parte; se trata de la mencionada memoria de Harwood (9).

Este autor parte de la supuesta fórmula $R \begin{matrix} 0,5O_2O \\ 0,5O_2O \end{matrix} Ca$ ya propuesta por Haas (17) y según la que, como se verá más adelante, se puede suponer un P.M. = 1000 calculado sobre el Ca presente, pero mayor si se considera el comportamiento coloidal de la Carragenina. Por otra parte esta fórmula hace pensar en una fuerte ionización de compuesto, que en solución daría

miscelas más sencillas que las proteicas. Medidas de conductividad en soluciones al 1,5% indican una ionización del 59%, muy elevada para líquidos tan viscosos, y una Λ_{∞} semejante a la del SO_4Ca , es decir que las movilidades deben ser similares (las del ión negativo de la carragenina y del SO_4).

A pesar de todo podría suponerse que el SO_4Ca está adsorbido en la miscela coloidal siendo así responsable de la conductividad. Y aquí es donde interviene el equilibrio de membrana, porque colocando una solución al 1,5% de carragenina en una célula de ósmosis (membrana de pergamino) rodeada por una solución de Cl_2Ca se observó que entre los iones Ca a ambos lados de la membrana se llegó a un equilibrio al cabo de cierto tiempo, lo que solamente puede justificarse considerando el SO_4 unido al complejo. Esto no sucedería en caso en que el SO_4Ca estuviese solamente adsorbido porque se produciría un intercambio del mismo hasta alcanzar un equilibrio. El fundamento de la experiencia se puede resumir en el esquema siguiente:



Para que exista un equilibrio Donnan debe cumplirse que:

$$\frac{[\text{Ca}^{++}]_I}{[\text{Ca}^{++}]_{II}} = \frac{[\text{Cl}^-]_{II}^2}{[\text{Cl}^-]_I^2}$$

Las experiencias hechas por Harwood son las siguientes:

Medidas de conductividad: Trabajó con soluciones al 1,5 de carragenina (que obtuvo por un método que no indica) divididas en dos grupos:

- a) soluciones usadas el mismo día de preparadas.
- b) soluciones dejadas en reposo una noche después de preparadas.

La conductividad en agua resultó ser de $3-3,5 \times 10^{-6}$ mohs considerando un P.M. de 1000 (el indicado por Haas (17)).

Dice Harwood que por accidente (sin especificar más) no determinó la humedad de la muestra y consideró el valor obtenido por Haas y Russell-Wells de 4,6% (lo cual es francamente arbitrario dadas las enormes variaciones que sufre la humedad de la carragenina con el tiempo) haciendo que los valores de Λ no sean estrictamente ciertos. Efectuó las medidas

en un vaso de vidrio de Jena, con un conmutador Whetham como fuente de la corriente alternada.

Tabla XII CONDUCTIVIDAD DE CARRAGENINA A 25 °C

Normalidad (N)	$\kappa \times 10^3$	Λ
0,03	1,953	65,1
0,015	1,001	66,73
0,0075	0,5365	71,53
0,00375	0,2825	75,33
0,00185	0,1506	80,32
0,0009375	0,07968	84,99
0,000469	0,0414	88,32
0,000235	0,02179	92,97

Graficamente (Λ en función de $\sqrt[3]{V}$) se obtiene $\Lambda_{\infty} = 110$ mohs.

El α calculado resulta para una solución 0,01 N del 63,4% mientras que para una solución de SO_4Ca también 0,01 N a 18°C $\alpha = 64,7\%$; pudiéndose aceptar esta ligera variación debido a la diferencia entre las temperaturas en que se obtuvieron ambos valores.

Como consecuencia resulta evidente que la Carragenina se ioniza como una sal de anión bivalente y catión bivalente y que, a semejanza con el SO_4Ca , se trata de una sal de Ca de un ácido bibásico.

Medidas osmóticas: Trabajó Harwood con una solución 0,03 N de Carragenina y otra equivalente de Cl_2Ca . La presión osmótica subió a un máximo de 3,9 cm. en 46,5 hs. y cayó a 1,7 cm. en 161 hs. En este momento no había SO_4^{2-} en el compartimento exterior pero, al no haberse llegado a un equilibrio de Cl^- (se hacen dosajes constantemente para seguir la marcha del proceso) se preparó un dispositivo para evitar fermentaciones y evaporación que permitió mantener la solución hasta llegar al equilibrio (no se dan detalles al respecto). La osmosis alcanzó a 1,5 ml. en 28 ml. y el pH varió de 6,5 a 7,0.

Los cálculos de α se hicieron en base a la suposición de Arrhenius, confirmada por Mac Gregor, Mc Intosh, Archibald y Mc Kay (Trans. N.S. Inst. Sci. 1895-1899), según la cual en soluciones acuosas con un ión común α está determinado por la concentración de dicho ión común.

Resultados:

CaX	0,0296 N	
CaCl ₂	0,0266 N	0,0314 N
Ca ⁺⁺	0,03828 N	0,02595 N
2 Cl ⁻	0,04336 N	0,0519 N

Luego: $\frac{[Ca^{++}]_I}{[Ca^{++}]_{II}} = 1,475$

y $\frac{[Cl^-]_{II}^2}{[Cl^-]_I^2} = 1,483$

Donde se ve que la coincidencia es bastante grande. Si se considera además el 4% de humedad en la carragenina la primera relación (de los Ca^{++}) será menor en un 2%.

PROPIEDADES QUIMICAS:

PRECIPITACION: La carragenina presenta en este sentido un comportamiento muy interesante ya que es capaz de reaccionar con las sustancias más distintas dando precipitados voluminosos que pueden ser fácilmente separados por filtración.

Se comentará esta propiedad considerando por separado los agentes precipitantes.

Sales: en 1921 Haas (17) indicó que el C.E. y el H.E. del Chondrus Crispus precipitan con $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ a media saturación y, con ClNa o SO_4Mg también a media saturación precipita solamente el H.E. ya que el C.E. no resulta afectado. En su informe no dan mayores detalles sobre las experiencias en sí.

Los siguientes datos sobre esta cuestión son de Rice (19) que considera la gelificación como una consecuencia de la precipitación y ordenación de las largas moléculas en una solución, en este sentido indica:

Tabla XIII CONCENTRACIONES DE SALES NEUTRAS NECESARIAS PARA PRECIPITAR CARRAGENINA DE UNA SOLUCION

Conc. de Carragenina gr/l	Conc. de sales necesarias %		
	ClN %	ClNa %	Cl_2Ca %
5,0	0,39	1,86	0,42
3,0	0,46	1,84	0,34

Como se ve, y ya se mencionó anteriormente, la efectividad en la precipitación es del mismo orden que la capacidad de disminuir la viscosidad de la solución.

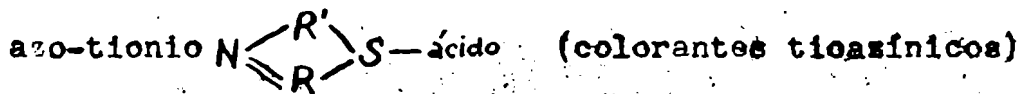
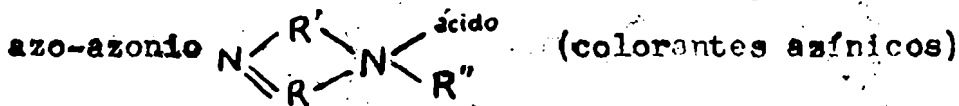
Colorantes: Si bien son numerosos los trabajos publicados sobre esta propiedad, uno de ellos (el más importante sin lugar a dudas) que data de 1924 y prácticamente no figura en la bibliografía, puede considerarse como base fundamental en el estudio de esta propiedad; se trata de la memoria de E. Justin-Mueller (22), en que se observa el comportamiento de soluciones de carragenina frente a soluciones de diversos precipitantes.

El hecho de que algunos colorantes sintéticos (los básicos) son capaces de precipitar carragenina es conocido desde mucho antes de 1924, ya que así lo da a entender Justin-Mueller, aunque desgraciadamente no da ninguna información al respecto. Este autor decidió ver si todos los colorantes básicos gozaban de esta propiedad o si ella era exclusiva solamente de algunos. Con tal motivo utilizó: colorantes del trifenilmetano y sus análogos, azinas

tioasinas y oxazinas; pudiendo comprobar que solamente los colorantes azínicos y tioazínicos son capaces de producir la floculación de la carragenina.

Esta especificidad resultó por demás sorprendente ya que la capacidad de formar lacas por parte de los colorantes básicos es muy semejante en todos ellos. En general se ve que precipitan por acción de: tanino, acetato de sodio, sales de antimonio, resinato de sodio, sales de aluminio o zinc, ferrocianuro alcalino, etc.

Resultaría entonces que la carragenina es un reactivo que no actúa sobre todos los colorantes sino solamente sobre ciertos grupos. En efecto, la carragenina precipita con aquellos colorantes que poseen los grupos cromóforos.



Las experiencias se efectuaron sobre una solución de carragenina obtenida por ebullición durante 2 hs. de 10 gr. de Chondrus Crispus suspendidos en 1 litro de agua, llevando a volumen (1 litro) filtrando por tela y dejando decantar. Con esta solución llenaba un tubo de ensayos hasta $\frac{3}{4}$ y agregaba luego el producto en estudio (no se dan más detalles). Los resultados se resumen en el siguiente cuadro:

Tabla: XIV ACCION DE COLORANTES SOBRE SOLUCIONES DE CARRAGENINA

Soluciones de productos examinados	Aspecto	Viscosidad
Azul de metileno medicinal (puro) 1/1000	pp. caseoso que no varía con ácido acético.	El líquido separa casi incoloro
Azul de metileno clorazínico 1/1000 (Tiazina)	Id. Id.	El líquido está menos coloreado que antes.
Safranina 1/1000 (Azina)	Id. Id.	El líquido separa poco coloreado.
Azul de maldola 1/1000 (Oxazina)	Inalterado con o sin agregado de acético.	0
Frune Puro 1/100 (oxazina)		

Violeta de metilo 1/1000 (Trifenilmetano)	0	0
Fucsina 1/1000 (Trifenil- metano)	0	0
Verde Cristal brillante (Malaquita) 1/1000 (Tri- fenilmetano)	0	0
Azul victoria B 1/1000 (Difenilmetano)	0	0
Auramina 1/1000 (Difenil- metano)	0	0

Posteriormente aparece en 1930 el trabajo de George Ewa (23) que trabaja solamente con el azul de metileno encontrando que sus soluciones son capaces de precipitar extractos de Irish Moss, independientemente de que el producto haya sido lavado previamente con agua fría, o que las soluciones sean frías o calientes. El ppdo. es un coágulo azul oscuro, insoluble en agua, tanto caliente como fría. La reacción es cuantitativa si el material está en exceso haciendo posible una titulación aproximada. Gomas comunes y de acacia y gelatina no dan esta reacción. Se intentó verificar, sin éxito, si otros 15 colorantes presentan un comportamiento similar. Supone que la reacción se trata de un fenómeno de adsorción.

Clorhidrato de benzidina: Si bien en 1950 Rose (14) lo empleó como precipitante, no da ningún detalle al respecto quedando el trabajo de Haas y Russell-Wells (15) como única fuente de información. La memoria es bastante completa y como sus conclusiones fueron utilizadas en la presente tesis se la transcribe y comenta en su mayor parte.

Los autores observaron que de cualquier extracto acuoso de Chondrus Crispus era posible eliminar todo el sulfato (libre y etéreo) dejando el líquido sobrenadante libre de hidratos de carbono; indican esta propiedad como específica de la carragenina ya que ensayos con agar, gelatina, goma arábiga y pectinas dieron resultados negativos. (En la segunda parte de este trabajo se verá que el ficocoloide de la Iridea Cordata también posee esta propiedad).

Ensayos previos demostraron que tanto el C.E. como el H.E. precipitan cuantitativamente con una solución de ClH de benzidina y, calentando el ppdo. suspendido en H₂O a 80°C, el obtenido del C.E. se redissuelve, no así el proveniente del H.E. que sólo lo hace en parte.

Una vez obtenido el ppdo. lo lavaron con solución saturada de sulfato de benzidina hasta ausencia de Cl⁻, suspendieron

el papel de filtro en agua que calentaron a 80°C y titularon con HONa 0,1 N con fenolftaleína como indicador:

El opdo. de 1 gr. de H.E. requirió 29,1 ml. de HONa 0,1 N
 " " " " " C.E. " 32,6 " " " " "

Ante el hecho de precipitar tanto el C.E. como el H.E. con este reactivo y que del opdo. obtenido no puede separarse los compuestos de distinta procedencia debido a lo dicho acerca de la solubilidad de los mismos; se prepararon mezclas de C.E. y H.E. efectuando ensayos sobre 1 gr. de cada una, con los siguientes resultados:

	H.E. gr.	C.E. gr.	HONa 0,1N requeridos ml.
1 gr. de mezcla con	0,1	0,9	22,26
" " " " "	0,2	0,8	31,92
" " " " "	0,3	0,7	31,56
" " " " "	0,4	0,6	31,24
" " " " "	0,5	0,5	30,90
" " " " "	0,6	0,4	30,56
" " " " "	0,7	0,3	30,22
" " " " "	0,8	0,2	29,88
" " " " "	0,9	0,1	29,54

En vista de la relativamente escasa influencia de la proporción de C.E. y H.E. presentes los autores tomaron como promedio para 1 gr. de mezcla 30,9 ml. HONa 0,1 N o bien 1 ml. de HONa 0,1 N = 0,0324 gr. de extracto.

La validez de este resultado se confirmó por un camino inverso, es decir trabajando sobre cantidades conocidas:

Mezcla pesada gr.	Titulación ml. HONa 0,1 N	Mezcla calculada gr.
0,20	6,55	0,212
0,17	6,15	0,199

Valores que pueden aceptarse como buenos especialmente considerando la tendencia de la carragenina a carbonizar.

Método de determinación: en vista de las dificultades mencionadas los autores recomiendan la siguiente técnica (sin dar explicaciones):

Se pesan 0,2 gramos de carragenina o se mide un volumen cualesquiera de solución de carragenina que contenga 0,2 gr. de extracto seco, se disuelve o diluye (según el caso) hasta 100 ml., se acidifica con ClH 4 N (4 gotas) y se precipita con 150 ml. de solución de ClH de benzidina (se preparan disolviendo 4 gr. de benzidina y 5 ml. de ClH conc. en 2 l. de agua). Se mezcla suavemente y se deja en reposo 20 min. por lo menos, el opdo. floculento se

filtra por papel de filtro plegado y se lava con solución concentrada de sulfato de benzidina hasta ausencia de Cl^- .

El ppdo. junto con el filtro se pasa a un vaso con 250 ml. de agua, se calienta a B.M. hasta 30°C y se titula con HONa 0,1 N usando fenolftaleína como indicador. La cantidad de mucílago presente se calcula en base al factor ya mencionado: 1 ml. HONa 0,1 N = 0,0324 gr. de extracto seco. La operación puede completarse en unas 2 hs.

Con ligeras modificaciones puede aplicarse este método en la solución de diversos problemas: a) Determinación de mucílago en emulsiones de aceite de hígado de bacalao, precipitando en presencia de Cl_3CH (en cantidad suficiente para disolver todo el aceite); b) Dosaje de carragenina en presencia de sulfato libre eliminando previamente el SO_4^- con Cl_2Ba .

HIDROLISIS: Originalmente el único fin de esta operación era el de deshacer la molécula compleja poniendo en libertad sus componentes orgánicos e inorgánicos. Como es natural se intentó tanto la vía ácida como la alcalina, pero al ver que en medio ácido la hidrólisis era mucho más rápida se la adoptó dejando la otra a un lado; sólo muy recientemente (11) se demostró el importante significado teórico de esta resistencia a la hidrólisis alcalina por parte de la molécula del ficocoloide. En esta sección se darán solamente los resultados experimentales dejando las conclusiones correspondientes para cuando se trate la naturaleza química de la carragenina.

Hidrólisis ácida: Ya que todos los ensayos en este sentido tendieron a buscar condiciones óptimas sea para la identificación de componentes orgánicos o minerales se seguirá un orden cronológico y, aunque antes de 1920 casi todos los investigadores sometieron al ficocoloide a este tratamiento, como sus resultados sufrieron ratificaciones y rectificaciones (las más de las veces), se considerarán únicamente los trabajos posteriores a esa fecha.

Haas y Hill (5): quisieron comprobar el comportamiento de la carragenina frente a distintos agentes hidrolíticos en vista de la extensa utilización del producto como alimento; para ello lo sometieron a la acción de diversas sustancias comprobando su sensibilidad según diese reacción positiva o negativa de azúcares (poder reductor) al cabo de cierto tiempo.

Acido Clorhídrico: usaron soluciones al 0,2% (semejantes al jugo gástrico) y obtuvieron un resultado ligeramente positivo luego de mantener 3 hs. a 37°C y netamente positivo en el mismo tiempo a 50°C . Esta resistencia de la carragenina al jugo gástrico hace que sean las propiedades físicas y no las químicas las que le confieran valor alimenticio, aunque la gran dilución de las gelatinas (5% apenas) indica por sobre todo que su utilidad es como vehículo para los verdaderos alimentos: azúcares, leche, huevos, etc.

Acido cítrico: con una solución al 5% durante 2 hs. a 37°C obtuvieron el mismo resultado que con el ClH al 0,2% a 50°C. Por otra parte calentando carragenina con solución de ácido cítrico al 5% sobre baño maría hirviente, aquella pierde su capacidad de gelatinizar y presenta una fuerte actividad reductora (licor de Fehling). Todo esto justifica las dificultades encontradas en preparar postres envasados con carragenina y azúcar.

Ptialina: obtenida directamente de la boca: diluida y sin diluir dió resultados positivos incubando varias horas a 50°C en medio alcalino fuerte. A 37°C y luego de 12 hs. los resultados eran negativos o debilmente positivos.

Extracto de pancreas: negativo, tanto a 37°C como a 50°C.

Haas (17) encuentra que a pesar de ser teóricamente suficientes unos minutos solamente observa una hidrólisis completa con ClH al cabo de 5 hs. Sin embargo hay que hacer notar que Haas sostiene que la hidrólisis es total cuando todo el sulfato de la molécula es precipitable con Cl_2Ba .

Haas y Russell-Wells (18) estudiando más a fondo el fenómeno de hidrólisis llegan a la conclusión de que la carragenina es extremadamente sensible a la acción de los ácidos, bastando hervir con jugo de limón o vinagre para observar propiedades reductoras. Indican, sin mencionar las experiencias que los condujeron a ello, que tratando 250 ml. de una solución al 2% de H.E. con 250 ml. de SO_4H_2 0,15 N durante 45 min. a 80°C (calentando a baño maría) se obtiene un compuesto no dializable de propiedades reductoras (pag.24)

Butler (7) estudia bien el proceso de hidrólisis ácida con el objeto de encontrar las condiciones óptimas para liberar rápidamente el sulfato de la molécula compleja. Todos los resultados y métodos ya se dieron en la sección de análisis químico al hablar de sulfatos totales: se repetirá solamente que las condiciones óptimas encontradas eran: ebullición directa 5 hs. con ClH 5%.

Buchanan, Percival y Percival: usan la hidrólisis clorhídrica ya indicada para dosar sulfatos, pero para identificar azúcares usan:

- a) Sobre 2 gr. de C.E. con 100 ml. SO_4H_2 2,5% a 100°C durante 5 hs.
- b) Sobre 2,46 gr. de C.E. y 3,093 gr. de H.E. con ácido oxálico N/2 durante 20 hs. a 100°C.

Finalmente Young y Rice (12) también para dosar azúcares, hidrolizan 4,25 gr. de carragenina con 200 ml. de ClH 2% hirviendo a reflujo 14 hs. y en un procedimiento especial para identificar ácido 2-ceto-d-glucónico, tratan 2 gr. de carragenina a reflujo 30 hs. con 200 ml. de $\text{C}_2\text{O}_4\text{H}_2$ y $\text{C}_2\text{O}_4\text{K}_2$ 0,05 M (solución acuosa) en atmósfera inerte de N_2 .

En resumen: la hidrólisis ácida resulta muy útil para confirmar la existencia de un buen número de constituyentes;

- 1) Obtención del polisacárido libre de S: hidrólisis con SO_4H_2 0,15 N.

2) Identificación de azúcares: hidrólisis con SO_4H_2 2,5% ácido oxálico N/2, ClH 2% y aún $\text{C}_2\text{O}_4\text{H}_2$ y $\text{C}_2\text{O}_4\text{K}_2$ 0,05 M en atmósfera inerte de N_2 .

3) Dosaje de sulfato total: hidrólisis con ClH 5%.

HIDROLISIS ALCALINA: Al estudiar Haas y Russell-Wells (18) en 1929 el comportamiento de la carragenina frente a la hidrólisis observaron que con los álcalis el proceso marcha rápidamente al principio pero luego se hace muy lento sugiriendo la existencia de una fracción más firmemente unida. La marcha del proceso se sigue como siempre por el dosaje de SO_4 , los resultados que obtuvieron tratando 0,7 gr. de C.E. con 40 ml. de HONa al 3% calentando a 110°C en autoclave fueron:

Tiempo hs.	SO_4 obtenido %
1	10,42
2	12,16
3	14,78
7	17,00
9	18,28
11	18,18
16	(19,86
	(20,00

La única conclusión de los autores es textualmente: "La hidrólisis alcalina del C.E. conduce a la destrucción de la molécula siendo imposible obtener una separación cuantitativa del sulfato."

Butler (7) solamente hace notar que luego de una hidrólisis con HONa 5% por ebullición directa sólo es posible eliminar un 13,32% de sulfato.

Como ya se mencionara al principio de esta sección Buchanan, Percival y Percival (11) dieron en 1943 una primera explicación de la resistencia de la carragenina a la hidrólisis en medio alcalino: pero ante todo se consignarán a continuación los resultados que obtuvieron: trabajaron sobre 1,771 gr. de extracto seco (con un 25,1% de SO_4 según la hidrólisis ácida) y 200 ml. de HONa N, el SO_4 liberado lo determinaron naturalmente con Cl_2Ba .

Tabla XV MARCHA DE LA HIDROLISIS ALCALINA DEL C.E.

Tiempo hs.	SO_4Ba mg.	% de hidrólisis %
1	9	14,5
10	12,5	20
23	21,1	34
27,7	22,9	37
73	49,8	80

No sometieron el H.E. a la misma experiencia.

Las conclusiones que pueden extraerse de este hecho quedan para la sección siguiente ya que están directamente relacionados con aspectos de la estructura del coloide. Por ahora se recalca solamente la diferencia en la acción hidrolítica de ácidos y álcalis, pues mientras los primeros permiten reconocer todo el SO_4^{2-} presente en pocas horas, los segundos requieren tratamientos bastante largos.

PODER REDUCTOR: En forma indirecta, al considerar el análisis de los componentes orgánicos, ya se dieron prácticamente todos los detalles al respecto es decir:

- a) Que el polisacárido del Chondrus Crispus carece de poder reductor.
- b) Que los hidrolizados ácidos de carragenina reducen el Licor de Fehling.
- c) Que el poder reductor puede usarse para el dosaje de azúcares en la carragenina (previa hidrólisis).

NATURALEZA QUÍMICA DE LA CARRAGENINA:

A los efectos de presentar un cuadro lo más claro posible (ya que no completo) sobre lo que puede concluirse de la bibliografía consultada se encarará este comentario considerando los siguientes aspectos:

Elevado porcentaje de cenizas.
Relación SO_4 total/ SO_4 cenizas.
Existencia de un electrolito coloidal.
La carragenina como sal de un ácido.
Peso Molecular.
Tipo de unión entre unidades galactosa.
Posición del resto sulfato.

En general ya se dieron en otras secciones la mayor parte de los resultados que se utilizarán aquí, por lo tanto, únicamente se comentarán las conclusiones a que se llega en cada caso.

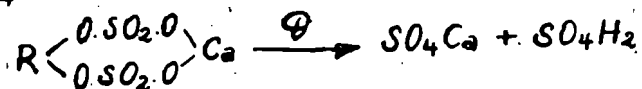
ELEVADO PORCENTAJE DE CENIZAS: (Ya se dieron todas las cifras correspondientes en la pag. 14 y s.s.).

El hecho de obtener una apreciable cantidad de cenizas por calcinación, que no se podían reducir por diálisis o por lavados con disolventes no acuosos, era indicio claro de que los componentes de las cenizas debían formar parte de la molécula de la carragenina. Como también se ha visto las cenizas de este micocoloide están constituidas en su casi totalidad por SO_4^{2-} , Ca, Na y K.

RELACION SO_4 TOTAL/ SO_4 EN CENIZAS: También se vio oportunamente en la pag. 17 y s.s. que el

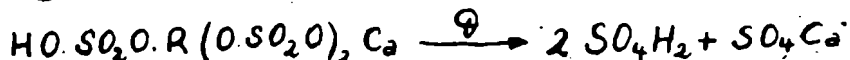
porcentaje de $SO_4^{=}$ en la carragenina variaba fundamentalmente según se lo dosase en cenizas o por hidrólisis: esto hizo pensar a Haas (17) que la relación $SO_4^{=}$ total (por hidrólisis)/ $SO_4^{=}$ en cenizas (por calcinación), cuyo valor numérico era de 2:1, indicaba la presencia de lo que denominó un sulfato etéreo y cuya fórmula general sería $R \begin{matrix} \text{O} \cdot SO_2 \cdot O \\ \text{O} \cdot SO_2 \cdot O \end{matrix} \cdot Ca$ que ya fuera mencionada.

Esta expresión justificaría la pérdida de $SO_4^{=}$ por calcinación pues:



En el momento de hacer esta afirmación (1921), Haas considera que se trata de la primera sustancia de esta naturaleza aislada de vegetales.

Este problema fué retomado por Butler (7) basándose en los trabajos que se acabaron de mencionar. Ante todo sostiene que la relación $SO_4^{=}$ total/ $SO_4^{=}$ en cenizas no es 2:1 sino 3:1 lo que explica mediante la existencia de una sal amónica (que se elimina totalmente por calcinación) y de una sal ácida de Ca, en lugar de la sal neutra propuesta por Haas:



EXISTENCIA DE UN ELECTROLITO COLOIDAL: Con las experiencias de Haas y de Butler se llegó a la conclusión de que la carragenina era un sulfato etéreo pues mientras el sulfato parecía formar parte de la molécula (solo podía ser dosado previa hidrólisis) los cationes eran determinables directamente. A pesar de todo la prueba concluyente la suministraron los resultados de las experiencias de Herwood (9) que ya se mencionaron en detalle (pag. 31 y s.s.) y que indican sin lugar a dudas que la carragenina es un electrolito coloidal con la estructura de un sulfato etéreo y aparentemente sal de Ca de un ácido bibásico.

LA CARRAGENINA COMO SAL DE UN ACIDO: Establecido lo anterior se trata ahora de ver que papel tienen los cationes presentes [al mencionar los resultados del análisis químico se indicaron todos los datos conocidos (ver pags. 14 y s.s.) al respecto]; que es precisamente lo que intenta Butler (7) dializando soluciones de carragenina contra soluciones de sales de Ca, K y NH_4 y estudiando los productos obtenidos. De esta manera encontró que era posible sustituir todos los iones por uno sólo y que la sustancia resultante podía ser considerada perfectamente como una sal de un ácido bibásico. Sus experiencias fueron las siguientes:

Preparación de la sal de potasio: Dializó una solución al 1% de extracto contra solución de ClK al 5% primero y 2,5% después, reemplazando hasta observar ausencia de Ca. El exceso de K lo eliminó dializando contra agua destilada y el residuo lo concentró a baño maría, precipitando y deshidratando por el método que usó en la preparación del extracto que

llamó standard (pag. 13). Obtuvo de esta manera un polvo blanco que era la sal potásica, porque sus cenizas (blancas) (25,56% sobre sustancia seca) estaban constituidas por $SO_4 = 55,14\%$ y $K = 45,18\%$. Comparando estas cifras con las del SO_4K_2 puro $SO_4 = 55,11$ $K = 44,89$ puede verse que la coincidencia es grande. Además no se encontraron casi impurezas, salvo rastros de Ca (0,069%).

Preparación de la sal de amonio: Fue preparada igual que la sal de potasio sólo que en lugar de precipitar se evaporó a sequedad. La diálisis completa puede llevar hasta 2 o 3 semanas, dejando el material apenas un 1% de cenizas (por calcinación).

Preparación de la sal de calcio: Como la sal de potasio obtenida era mucho más pura que el material original se prefirió intentar la preparación de la sal de calcio a partir de aquella dializándola contra solución de Cl_2Ca al 2,5% hasta ausencia de K en el dializado. Alcanzado esto al cabo de 48 hs. se eliminó el exceso de Cl_2Ca dializando contra agua destilada. La sal así "regenerada" se aisló con la técnica ya mencionada resultando diferente tanto al extracto original como a la sal de K. Lo más interesante es que si bien el valor de cenizas en la sal de Ca es casi igual al del extracto St. las proporciones de SO_4 y Ca son muy diferentes. Todos los valores numéricos se reúnen en la siguiente tabla, de la que algo ya se adelantara anteriormente:

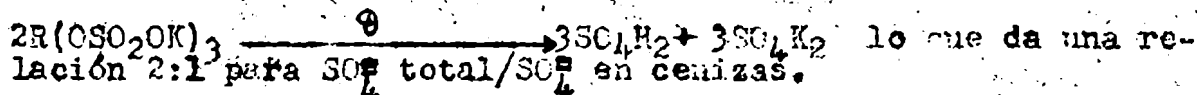
Tabla: XVI COMPARACION DE LAS CENIZAS Y SUS COMPOSICIONES ENTRE EL E. St. Y LAS SALAS PREPARADAS

	Cenizas %	SO_4 en cenizas %	SO_4 en cenizas calculado sobre original %	SO_4 en muestra original por hidrólisis %	Ca en cenizas %	Ca en original calculado de cenizas %	K en cenizas %	K en original calculado de cenizas %
Extracto original	18,67 19,14	58,44 58,74	10,91 11,54	26,82 27,51	2,48 3,68	0,52 0,68	11,99 ---	2,22 --
Sal de Ca regener.	20,96	68,72	14,40	29,06	32,22	6,75*	0,76	0,16
Sal de Potasio	25,73 25,26	54,47 55,14	14,05 13,94	27,32 28,00	0,28 --	0,07 --	45,42 ---	11,70 ---
Sal de Amonio	0,60	---	---	28,49	--	--	---	---

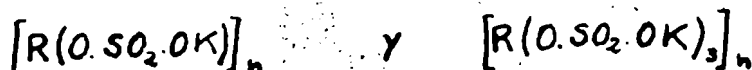
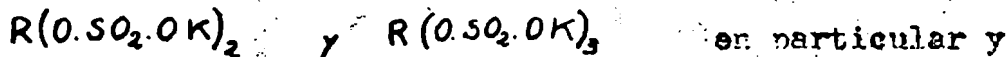
* En esta muestra el Ca por hidrólisis fue del 6,56%.

La observación del cuadro sugirieron a Butler las siguientes conclusiones:

- El material que denomina carragenina o sea el que se extrae del Chondrus Crispus no es una sal de Ca solamente, en vista de la abundante cantidad de K.
- En la sal de Ca "regenerada" la proporción de SO_4 y Ca es la correspondiente a la del SO_4Ca ($SO_4 = 70,31\%$, $Ca = 29,66\%$).
- La pérdida de SO_4 por calcinación de la sal de K puede justificarse de la siguiente manera:



Finalmente: se puede considerar la carragenina (según Butler naturalmente) como una mezcla de sales de Ca, K y NH_4 . De estas estudió algo más en detalle solamente la de K encontrando que lejos de responder a un tipo único podría indicarse como:



en general, teniendo en cuenta la complejidad molecular.

Preparación del ácido libre: Si bien no fue hecha por Butler es un dato de desahogado interés como para ser desaprovechado. Lo obtuvieron Dillon y O'Colla (4) (casi 20 años después de los trabajos de Butler) disolviendo 2 gr. de carragenina oxidada previamente con IO_4Na (proceso que se tratará más adelante) en 200 ml. de agua adicionada de ClH (no se indica en que cantidad) dializaron la solución contra ClH al 2% hasta ausencia de Ca^{++} y luego contra agua destilada hasta ausencia de Cl^- (6 días en total). Continuando la diálisis contra etanol no precipitó el ácido libre pero por adición de éter a la solución alcohólica se obtuvo un opdo. que fue posible filtrar, secar y moler hasta un polvo fino.

El ácido libre así obtenido fue disuelto en agua y neutralizado con $(HO)_2Ba$ obteniéndose la sal de Ba que precipitada con etanol y separada acusó las siguientes propiedades:

$$\alpha_D^{20} = +64,0^\circ \quad (c=0,1) \text{ en agua}$$

Cenizas (como SO_4Ba) = 36,8% lo que representa un 5,05% de S.

Calculado para $(C_6H_9O_5SO_3)_2Ba$, $SO_4Ba = 36,8\%$

S (como SO_4Ba) luego de hidrólisis = 9,7%.

El S calculado según la fórmula es del 10,3%.

La presencia de sodio: Antes de terminar con lo referente a las sales es necesario recordar los resultados de Percival, Percival y Buchanan (11) (que ya se mencionaron anteriormente, pag.16), ya que indican la presencia de una apreciable cantidad de Na en las cenizas tanto del C.E. como del H.E. Por lo tanto sería hasta cierto punto lógico suponer también la existencia de una sal de Na semejante a las ya mencionadas.

Queda de esta manera definitivamente confirmada la suposición de que la carragenina es una mezcla de diversas sales (Ca, K, NH₄ y eventualmente Na) de un ácido con estructura química de sulfato etéreo y propiedades físicas de electrolito coloidal.

PESO MOLECULAR: Es éste otro de los aspectos de la carragenina que han sido muy poco estudiados, lo que es lógico en razón de las dificultades que presenta por la naturaleza de su molécula.

Solamente son dos las noticias que aparecen al respecto en la literatura consultada. La primera es de Hoas (17) que en base al calcio presente indica un P.M. = 1000; este valor es luego utilizado por Harwood (9) en sus medidas de conductividad (ver pag.32). La segunda es de Butler (7) que hizo algunos cálculos aproximados en base a las fórmulas que sugiere (ver pag.46), así:

$R(OSO_2OK)_2 \dots P.M. = 685$ y el radical...P.M. = 415.
 $R(OSO_2OK)_3 \dots P.M. = 1030$ y el radical...P.M. = 625.

pero agrega esta autora que las propiedades del ficocoloide indican un P.M. mayor.

TIPO DE UNION ENTRE UNIDADES GALACTOSA: Este problema fué atacado por dos caminos: a) Por acetilación y metilación y b) Por oxidación con IO₄H. Sirviendo el segundo de confirmación del primero.

a) Procesos de acetilación y metilación: La primera noticia encontrada al respecto es de Dillon y O'Colla (ver Historia pag.9) que intentan separar el polisacárido de la carragenina, libre de azufre. Para ello acetilan el mucílago con ácido acético y anhídrido acético bajo la acción catalítica de SO₂ y Cl₂; eliminaron luego los acetilos y obtuvieron dos polisacáridos con cenizas del 0,1% cuyas fórmulas podrían ser (C₆H₁₀O₅)_n. Uno de éstos era soluble sólo en agua caliente y dió con I₂ un color rojo vino (semejante al obtenido con el glucógeno), mientras que el otro era soluble en agua fría y no dió coloración con I₂.

Ambos polímeros dieron α-metil-fenil-hidrazona y ácido múscico (por oxidación con NO₃H, lo que confirma en ellos la existencia de galactosa.

Pero el primer trabajo serio sobre el tema apareció más tarde (1943) y es original de Buchanan, Percival y Percival. Se darán a continuación las conclusiones, solamente dejando para un apéndice final la descripción completa de las experiencias.

Estos autores trabajaron por separado sobre el C.E. y el H.E. sometiéndolos a metilación, hidrólisis y acetilación, sometiendo luego los productos acetilados a una destilación fraccionada. De esta manera obtuvieron:

Del C.E.: 2-metil- β -metilgalactósidos triacetato de trimetilgalactosa (que dió: 6 metil-galactosazona y tetracetato de monometilgalactosa).

Del H.E.: La galactosazona del tetracetato de mono-metil-hexosa. La 6 metil-galactosazona de un triacetato de mono-metil-hexosa. La anilida de la tetrametil d-galactopiranososa.

Y suponen en base a todo esto la existencia de restos de d-galactosa unidas entre sí por los carbonos 1 y 3.

En el ya mencionado trabajo de Young y Rice (ver pag. 26) sobre la formación de ácido 2-ceto-d-glucónico se agregan una serie de interesantes experiencias de metilación que si bien no aportan ningún dato que ayude en el esclarecimiento de la estructura molecular de la carragenina, sus resultados son demasiado interesantes como para dejarlos a un lado.

En la pag. 26 se indicó el proceso de hidrólisis con ácido oxálico que emplearon estos autores: ahora bien, el residuo que queda luego de haber extraído con alcohol etílico (unos 13,2 gr.) fué disuelto en un poco de agua y se eliminó el C_2O_4 con un exceso de Cl_2Ca . Se filtró y el filtrado se sometió a metilación con sulfato de dimetilo e $HONa$ 8N según el procedimiento de Haworth (J. Chem. Soc. 107 8 (1915)); el material obtenido se extrajo con Cl_3CH , se evaporó el disolvente y el tarabe residual destiló a 150-155°C a 0,1 mm. de Hg, comportamiento que corresponde al de la trimetilgalactosa. Esto es un indicio evidente de la existencia de galactosa en la molécula de carragenina, confirmándose así los resultados de autores anteriores.

Ade más de esto Young y Rice sometieron la carragenina a otros procesos de metilación: un primero para estudiar los productos que se obtienen por hidrólisis del producto metilado y un segundo para preparar carragenina metilada que consiguen aislar. Las experiencias fueron las siguientes:

Metilación de la carragenina: Se metilaron 20 gr. de polisacárido purificado por el método de Haworth, disolviendo la muestra en 200 ml. de agua y tratando con soluciones de $SO_4(CH_3)_2$ e $HONa$ durante 24 hs. a 60-80°C. Los reactivos fueron agregados en pequeñas porciones durante 2 hs. con fuerte agitación. La solución resultante se dializó contra agua corriente hasta ausencia de SO_7 concentrándose la solución resultante al vacío a 40-50°C. Se repitió el proceso de metilación. Luego se procedió a la hidrólisis en 100 ml. de $C_2O_4H_2$ 0,05 M y $C_2O_4K_2$ en ambiente de N_2 . Al enfriar la solución hasta 0° la mayor parte del oxalato cristalizó.

El licor madre se concentró hasta 50 ml. al vacío a 30-40°C, se eliminó así más oxalato y finalmente se llevó a sequedad.

Se disolvió el residuo en etanol y concentró. Se agregó agua a la solución y se la pasó a un recipiente especial de 1 litro equipado con un dispositivo de agitación y uniones de vidrio esmerilado. Se repitió la metilación de la manera indicada anteriormente. La solución fue extraída con Cl_3CH que disuelve los productos metilados y facilita la eliminación del SO_4Na_2 . Este procedimiento de metilación se repitió dos veces más. Finalmente el residuo, extraído una vez más con Cl_3CH , fue metilado nuevamente con ICH_3 y OAg_2 según el método de Purdie e Irving. El Cl_3CH se eliminó por destilación al vacío a 40°C y 16-20 mm. de presión, obteniéndose las siguientes cuatro fracciones a 0,05 mm. de presión:

1era. Fracción: 1,2 gr. de líq. incoloro destiló entre 40-60°C. Esta fracción reduce el licor de Fehling luego de una hidrólisis con ClH al 0,5% durante 6 hs. a 20°C. Se obtuvo una semicarbazona P.F. = 166-167°C y una oxima P.F. = 102-104°C. El producto fue considerado (en primera aproximación) ω -metoxi-5-metilfurfural que da una semicarbazona de P.F. = 166-167°C y una oxima de P.F. = 103-104°C.

2a. Fracción: eran 2,2 gr. de un aceite obtenido entre 160-140°C que cristaliza en forma de agujas incoloras P.F. = 94-95°C. El producto es soluble en éter, éter de petróleo, acetona y etanol. No fue identificado.

3a. Fracción: 5,3 gr. de un aceite marrón claro destilaron entre 110-140°C. Esta fracción es soluble en éter pero no cristaliza, no reduce el licor de Fehling hasta después de hidrolizar con SO_4H_2 al 2% durante 12 hs. a 20°C. Evaporando el hidrolizado neutro al vacío a 40-50°C y extrayendo con Cl_3CH se obtuvo un jarabe que cristalizó con un P.F. de 70-73°C, su contenido en metoxilo era del 56,5% y $\alpha/\beta = +1145$. La anilida funde a 193°C. Todos estos valores corresponden a la 2-3-4-6 tetrametil galactosa y una determinación del P.F. de la mezcla confirmó esta suposición.

4a. Fracción: entre 140-165°C se obtuvo 1,1 gr. de aceite, que no tiene propiedades reductoras hasta después de hidrólisis. El contenido en metoxilos era del 56,4%. Tratando con amoníaco en metanol se obtuvo una amida P.F. 96-98°C. Lo que corresponde a la amida del ácido tetrametil 2-ceto-glucónico, confirmándose esto por el P.F.

5a. Fracción: ya no se obtuvo destilado hasta 250°C y el residuo del balón era oscuro y de aspecto vítreo.

Aislación de la carragenina metilada cristalina: Se metilan como antes 15 gr. de carragenina en 200 ml. de agua con cinco tratamientos sucesivos empleando 100 gr. de $\text{SO}_4(\text{CH}_3)_2$. Entre cada tratamiento se neutraliza la solución con SO_4H_2 y se elimina SO_4Na_2 por diálisis durante 6 hs. Luego del tratamiento final la solución fue dializada 6 días contra agua corriente a pH = 6 y 4°C. La solución residual fue centrifugada y concentrada al vacío hasta 50 ml. a 40-50°C. Fue luego

vertida en 2 lt. de etanol del 95%, se separó el precipitado y la solución fué nuevamente concentrada hasta 50 ml. al vacío a 20-30°C. Ahora se la vertió en 50 ml. de etanol absoluto y se agregaron 150 ml. de eter. Se formó un copioso precipitado blanco que se dejó reposar 5 días a 4°C. El líquido se llenó entonces de rosetas formadas por agujas microscópicas que filtradas y analizadas dieron P.F. = 130-140° con carbonización ($\alpha_D^{20} = +48,0^\circ$, metoxilos 15,2%, cenizas 18,2%). Los valores correspondientes para carragenina metilada amorfa son :

P.F. = 130-140°C con carbonización.
= 47,6°
Metoxilos 14,8%
Cenizas 17,9%



Fig. 3 Carragenina metilada.
Cristales aumentados 70 veces
(Joung y Rice).

Completando el trabajo de Buchanan, Percival y Percival en 1950 Johnston y Percival (24) confirman la existencia de una unión 1-3 en la carragenina; lo hacen hidrolizando parcialmente con ácido oxálico (en la forma indicada en la pag. 39 con $C_2O_4H_2$ 0,1 N y $C_2O_4K_2$ 0,05 M), lo que permitió obtener un polisacárido degradado del que se había eliminado un 25% de los grupos sulfatos iniciales.

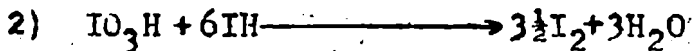
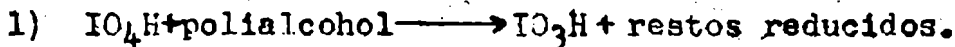
Sometiendo el hidrolizado a una nueva metilación por la técnica de Haworth y Leitch (J. Chem. Soc. 1919 804) se pudo observar, por hidrólisis de los productos de metilación, la presencia de 2-4-6 trimetil galactosa, de tetrametilgalactopiranososa y 2-6 dimetilgalactosa que son indicios ciertos de la existencia de un unión 1-3 y de la presencia de un resto sulfato en C_4 como se verá más adelante.

Aparte de esto Johnston y Percival indican la presencia de 1-galactosa, para ello tratan carragenina con ClH disuelto en alcohol metílico a temperatura ambiente y obtienen dos fracciones; una soluble (85%) constituida por metilgalactosidos, metilsulfato de sodio, etc. y una insoluble (15%) con bajo contenido en sulfato (apenas el 1,5%).

La fracción resistente, de $\alpha)_o$ -5°, dió un acetato que desacetilado y metilado dió un derivado que por hidrólisis permitió identificar 2-3-4-6 tetrametil l-galactosa, 2-4-6-1-galactosa, 2-4 dimetil-d-galactosa y trimetil-d-xilopiranos.

Todo esto indica la posibilidad de que en el mismo polisacárido existan unidades d y l-galactosa; lo que en realidad no sería nada nuevo porque ya fué observado: por Bell y Baldwin (J.Chem.Soc. 1941 125) en el mucílago del caracol, por Tollens (Ber. 1901 34 1422) en la Porphyra laciniata y por Jones y Peat (J.Chem.Soc. 1942 225) en el agar-agar.

b) Oxidación con ácido periódico: Como se dijo al principio de esta sección este proceso constituye un eficaz auxiliar en la investigación de la presencia o ausencia de uniones 1-3 en ciertos polisacáridos. Se basa en la reacción de Malaprade, que aprovecha la capacidad que tienen ciertos polialcoholes de reducir en frío el IO_4H a IO_3H . El proceso total es el siguiente:



Titulándose el I_2 liberado con tiosulfato.

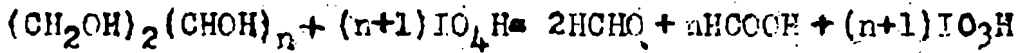
Malaprade realizó las experiencias tomando un determinado volumen de solución de IO_4H al que agregaba una cantidad de polialcohol insuficiente para reducir todo el ácido y unos ml. de una solución al 10% de SO_4H_2 . Sus resultados fueron los siguientes:

1 molécula de glicol	reduce	IO_4H
1 " " glicerina	"	$2IO_4H$
1 " " eritrita	"	$3IO_4H$
1 " " adonita	"	$4IO_4H$
1 " " manita	"	$5IO_4H$

Lo que le indujo a afirmar que la reducción se efectúa con la liberación de 1 átomo de oxígeno. Los coeficientes de reacción así obtenidos permiten dosar polialcoholes en solución, ya que se pueden establecer relaciones entre ml. de $S_2O_3Na_2$ N/5 y mg de polialcohol; por ejemplo:

1 ml. de $S_2O_3Na_2$ N/5 corresponde a	6 mg. de glicol.
	3,6 mg. de manita.

El proceso parece ser:

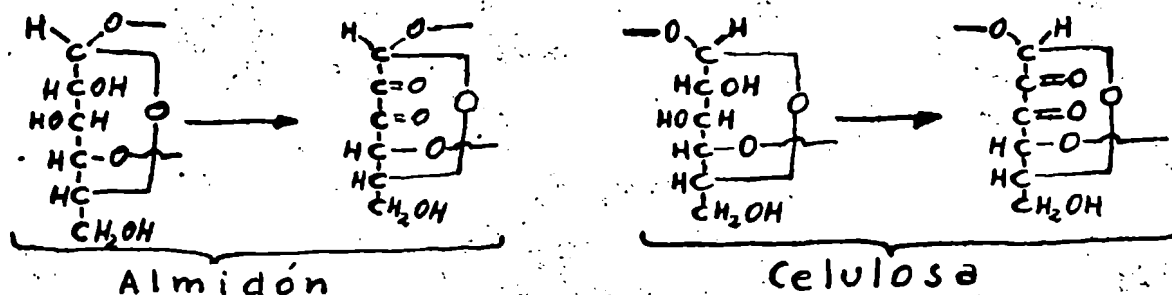


Habiéndose confirmado la presencia del formol.

En 1937 Jackson y Hudson (26) extienden la aplica-

bilidad de esta reacción a polisacáridos (almidón y celulosa), ya que observan que son oxidados por el ácido periódico de la misma manera que los metilaldohexosidos y metilaldopentósidos [Jackson y Hudson J. Am. Chem. Soc. 59 994 (1937)].

El almidón (se lo usó de maíz) es rápidamente oxidado a temperatura ordinaria por una solución acuosa de ácido periódico consumiendo en 24 hs. un equivalente molecular, que es muy aproximadamente la cantidad teórica necesaria para el siguiente proceso de oxidación:



Es decir que la obtención de almidón oxidado es cuantitativa; éste es insoluble en agua fría, disolviéndose solamente después de un calentamiento prolongado y no da el clásico color azul con iodo que desaparece después de haberse consumido 0,8 moles de ácido periódico.

El almidón oxidado tiene en solución acuosa $\alpha/^{20} = +9^{\circ}$ reduce el licor de Fehling, da con fenilhidrazina, a 25°C, un precipitado amorfo y deja por evaporación espontánea un film transparente y flexible pero frágil.

La celulosa también es oxidada por el ácido periódico aunque mucho más lentamente que el almidón. Observando los resultados que permiten seguir la marcha de la reacción se observa la desaparición de oxidante en cantidades que sobrepasan mucho al valor teórico. se explica este hecho suponiendo que el prolongado contacto del material con la solución ácida produce siempre una degradación apreciable.

La celulosa oxidada se puede recuperar con rendimiento cuantitativo y presenta las siguientes propiedades: es insoluble en agua fría, es muy lentamente soluble en agua hirviendo, reduce el licor de Fehling, no da reacción con iodo, da un producto amorfo con fenilhidrazina y evaporando la solución deja un film semejante al obtenido en el caso del almidón.

A pesar de estas y otras investigaciones sobre la reacción con ácido periódico recién en 1942 se la aplica al estudio de la estructura de polisacáridos.

Barry, Dillon y McGettrick (27) frente al descubrimiento de polisacáridos que por metilación e hidrólisis dieron 2-4-ó trimetilhexosas (sus uniones no serían entonces 1-4 como en almidón o la celulosa sino 1-3) sugieren el ensayo con ácido periódico como un sencillo medio de confirmación, ya que reacciona con

el grupo $\text{>COH-COH}<$ rompiendo la unión C-C y oxidando los >CHOH a >C=O (véase también Clutterbuck y Reuter, J. Chem. Soc. 1935 1467).

Es decir que en un polisacárido con uniones 1-4 el par de >CHOH adyacentes necesarios los dan los carbonos 2 y 3, cosa que evidentemente no sucede en los casos de uniones 1-3. Entonces los polisacáridos con este tipo de uniones no serán atacados por el ácido periódico (laminarina y agar-agar).

Los autores del trabajo que se comenta encontraron que en lugar del costoso ácido periódico podía utilizarse con éxito para-periodato de sodio que sugieren preparar según Partington (Text-book of Inorganic Chemistry) oxidando una solución caliente de I_2 en HONa con Cl_2 . El producto obtenido se disuelve fácilmente en SO_4H_2 . A los efectos de este trabajo no molestan ni el sodio ni el sulfato.

Las experiencias realizadas fueron las siguientes:

Prepararon una solución 0,47 N de IO_4H disolviendo para-periodato en la correspondiente cantidad de SO_4H_2 y trataron 1 gr. de material (algodón, papel de filtro, agar-agar y laminarina) con 40 ml. de solución ácida. Dejaron en reposo a temperatura ambiente retirando de tiempo en tiempo 0,25 ml. de líquido que adicionaron de SO_4H_2 y IK titulando el I_2 liberado con $\text{S}_2\text{O}_3\text{Na}$ N/10; observaron una disminución en el número de ml. de tiosulfato gastados lo que constituye un buen índice de la oxidación. Los resultados fueron:

Tabla XVII ENSAYO DE OXIDACION CON ACIDO PERIODICO

Tiempo hs.	Algodón absorben- te. $\text{S}_2\text{O}_3\text{Na}_2$ N/10 gastado		Papel de filtro $\text{S}_2\text{O}_3\text{Na}_2$ N/10 gastado		Agar-Agar $\text{S}_2\text{O}_3\text{Na}_2$ N/10 gastado *		Laminarina $\text{S}_2\text{O}_3\text{Na}_2$ N/10 gastado +	
	ml.	+	ml.	+	ml.	*	ml.	+
24	4,08		4,08		8,02		4,08	
48	3,90		3,90		7,88		4,04	
72	3,74		3,80		7,86		4,00	
120	3,58		3,60		7,96		3,96	
168	3,50		3,40		7,96		3,94	
240	3,46		3,38		8,00		3,92	
312	3,38		3,30		8,00		3,88	
648	3,20		3,13		----		3,73	

* 1 gr. de agar-agar con 40 ml. de IO_4H 0,47 N.

† 1 gr. de polisacárido con 40 ml. de IO_4H 0,235 N.

La observación de la tabla sugiere tomar como límite del tratamiento 240 hs. ya que después parecen iniciarse las acciones sobre grupos terminales. En los productos de hidrólisis de los materiales oxidados sólo fué posible identificar galactosa (con fenilhidrazina) en la laminarina y no en algodón ni en papel de filtro.

Un hecho que llamó mucho la atención en esta serie de experiencias es la notable estabilidad del agar-agar frente al

ácido periódico que se interpreta como originado por la existencia de anhidrogalactosa en la molécula. Los autores invocan en apoyo de este criterio los trabajos de Forbes y Percival (J. Chem. Soc. 1939 1844) y de Pirie (Biochem. J. 30 369.1936).

Barry, uno de los autores de la memoria recién comentada, publica un poco más tarde una corta noticia (28) sobre la posibilidad de degradar en forma regulada los polisacáridos con el tipo de unión insensible al ácido periódico (1-3), que si bien no aporta nuevos elementos de juicio para el estudio de la estructura de la carragenina, suministra en cambio interesantes informaciones sobre las propiedades de este importante reactivo.

Se había demostrado (y así se lo indicó páginas atrás) que hidrolizando los productos obtenidos por oxidación de polisacáridos con uniones 1-4 mediante IO_4H , se obtienen soluciones con glioxal y eritrosa que, al ser tratadas con acetato de fenilhidrazina, dan un precipitado amorfo del que se puede obtener rápidamente glioxalosazona calentando la mezcla a baño maría.

Evidentemente la unión glicosídica resistente a los ácidos se destruye al ser tratada con fenilhidrazina en condiciones suaves.

La importancia de esta reacción está en el hecho de que permite efectuar una hidrólisis regulada de polisacáridos con uniones 1-3 (laminarina p.eg.). Se ha demostrado (desgraciadamente Barry no menciona donde) que la oxidación con IO_4H de estos polisacáridos afecta únicamente a los grupos no reductores terminales, eliminando el C_2 y oxidando los $-\text{CHOH}$ de C_2 y C_4 a $-\text{CH}=\text{O}$. Tratando el polisacárido oxidado con acetato de fenilhidrazina se obtiene una rápida separación de glioxalosazona que eliminada permite aislar el polisacárido con una unidad de glucosa menos. Se puede continuar este tratamiento e ir eliminando grupos terminales.

La marcha de este proceso puede seguirse fácilmente oxidando los $-\text{CH}=\text{O}$ terminales que se van obteniendo a $-\text{COOH}$ y valorar éstos por neutralización. A pesar de lo que puede parecer a primera vista esta reacción no marcha indefinidamente, deteniéndose (sin que se conozca una explicación) luego de haber eliminado una docena de unidades.

Barry indica como una aplicación importante de la oxidación con IO_4H la posibilidad de determinar la existencia de uniones distintas de 1-3 en polisacáridos en que esta existiese. Para ello basta tratar la sustancia en estudio con este reactivo y tratar el residuo con acetato de fenilhidrazina, si existen uniones 1-4 se obtienen los resultados ya indicados.

Dillon y O'Colla (4) son precisamente los que aplican las recomendaciones de Barry al estudio de la carragenina, para ello agitaron 6 gr. de sustancia seca durante 5 días con 500 ml. de periodato de sodio $\text{m}/4$. Observaron que el material se hinchó y disolvió en parte dejando un precipitado que se desapareció agregando más agua. El periodato en exceso fué reducido con etilenglicol y la solución dializada hasta ausencia de iodato (no dicen como lo determinan).

El contenido del dializador se neutralizó, dializó contra etanol, para disminuir el contenido en agua y se precipitó finalmente con etanol.

5 gr. de este material oxidado se disolvieron en agua y se calentaron con fenilhidrazina hasta obtener un precipitado que, después de filtrar y recristalizar de etanol acuoso, dió 0.031 gr. de los cristales característicos de la glioxal-difenilhidrazina. La carragenina aislada después de la oxidación no presentó variantes en sus propiedades físicas pero no dió coloración azul con iodo.

Como resultado de estas experiencias Dillon y O'Colla consideran que el tratamiento con metaperiodato de sodio oxida toda sustancia con grupos α -glicol y, como de esta manera desaparece la propiedad de dar coloración con iodo, suponen que la carragenina está acompañada de pequeñas cantidades de almidón que sería responsable de la glucosa encontrada por diversos investigadores.

La cantidad relativa de periodato consumida indica la presencia de un 4% de almidón, lo que a juzgar por la intensidad del color obtenido con I_2 indica un exceso respecto de polisacárido realmente presente.

Por otra parte al no perder la carragenina su poder gelatinizante se supone que la macromolécula no fué afectada por el tratamiento oxidativo, que solamente atacó almidón y alguna otra sustancia considerable como impureza (celulosa o.eg.).

POSICION DEL RESTO SULFATO: Los únicos autores que se ocuparon de este problema fueron Buchanan, Percival y Percival (11) cuyos resultados ya se dieron en otras partes de esta monografía. La posición del grupo sulfato no es una cuestión fácil de resolver; utilizando los autores mencionados datos de la hidrólisis alcalina y de los procesos de metilación.

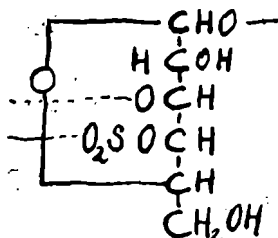
Como ya se indicó en la pag. 40 la velocidad de eliminación del SO_3^- por una solución de HONa al 4% a $10^\circ C$ es muy pequeña, requiriendo 73 hs. la remoción de apenas el 80%. Además en la misma página se dan también los resultados de Haas y Russell-Wells que con una solución de HONa al 3% a $110^\circ C$ solo pudieron separar un 20% del sulfato en 16 hs.

Estos dos resultados recuerdan (según Buchanan, Percival y Percival) dos ejemplos anteriores en que se notó la dificultad de la hidrólisis alcalina: a) El 3-p-toluensulfonil 2-4-6 trimetil α -metilgalactósido (Percival y Percival J.Chem.Soc. 1938 1587) y b) El 6 sulfato de bario de la diacetongalactosa que resistió la hidrólisis durante 8 hs. a $100^\circ C$ con soluciones de HONa al 8% (Percival y Santar J.Chem.Soc. 1940 1475).

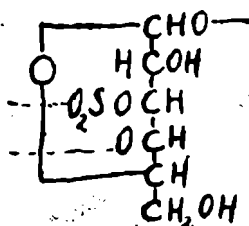
Por otra parte los autores de la memoria que se comenta (11) demostraron que el sulfato de α -metilgalactósido que, según Duff y Percival (J. Chem. Soc. 1941 830), dió 3-6 anhidro

β -metilgalactósido se hidroliza en menos de 2 hs. en las condiciones indicadas para el C.E. Parecería entonces que en todos los casos en que la hidrólisis alcalina presenta dificultades no existe la posibilidad de formarse otro anillo por interacción con un grupo hidroxilo, es decir que el grupo sulfato está en posición tal que no puede formarse un anillo 3-6.

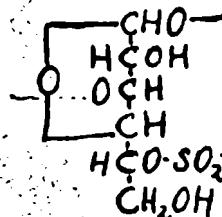
Por lo tanto, si se aceptan los resultados de las experiencias de metilación, los grupos hidroxilo en C₂ y C₃ estarían libres presentándose las siguientes posibilidades:



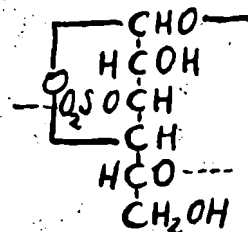
I.



II



III



IV

que analizadas arrojan las siguientes conclusiones:

II y IV deberían hidrolizarse con facilidad dando un resto de 3-6-anhidrogalactosa y por analogía toluensulfonatos de azúcares.

III y IV por su parte deben dar óxidos de etileno.

I solamente podría dar 2-4 o 4-6-anhidrogalactosa, productos que nunca fueron aislados de sulfatos de azúcares o toluensulfonatos.

Es dable entonces suponer, (según Buchanan, Percival y Percival), la existencia de uniones 1-3 entre los restos galactósidos de la carragenina y la presencia de un grupo ester sulfúrico en C₄.

Resumiendo todo lo dicho acerca de la carragenina podría decirse que este ficocoloide está formado por dos fracciones: una desconocida, constituida posiblemente por un polisacárido de unidades glucosa y una conocida, de molécula grande (PM > 1000), con las propiedades físicas de un electrolito coloidal, con las características de un sulfato etéreo (posiblemente sal de Ca, K, Na y NH₄⁺ de varias formas de un ácido bibásico), formada por unidades d-galactosa (y aún pequeñas cantidades de l-galactosa) unidas entre sí por los carbonos 1 y 3 y con el grupo sulfato en C₄.

APLICACIONES:

En el trabajo de Chase (1) mencionado al comienzo de esta monografía (Cap.I) se mencionan numerosas aplicaciones de las algas en general; por ser bastante reciente y amplio se reseña a continuación lo que se refiere al Chondrus Crispus y a la carragenina.

ALIMENTACION: El ficocoloide del musgo de Irlanda tiene en este campo

muchas aplicaciones así:

- 1) Como relleno y para dar cuerpo a caramelos.
- 2) Como estabilizante de helados, ya que evita una fusión prematura al no hacerla depender solamente de las bajas temperaturas.
- 3) En la clarificación de cerveza ya que simplifica mucho la antes tediosa operación de separar las proteínas insolubles. Basta agregar Chondrus al líquido en fermentación mientras está hirviendo, el ficocoloide se separa y se une al tanino del lúpulo para dar una masa floculenta que engloba y arrastra partículas suspendidas e impurezas. Este es un procedimiento muy económico porque basta medio canasto para clarificar 500 barriles de cerveza.
- 4) Puede sustituir ventajosamente al huevo en la clarificación del café.

MEDICINA: Es quizás su aplicación más antigua porque ya en 1835 se lo usó, estaba de "moda" en el tratamiento de la tuberculosis. Actualmente se emplea la carragenina en:

- 1) La preparación de alimentos para enfermos con úlceras estomacales.
- 2) La preparación de laxantes, por sus buenas propiedades como emulsionante de aceites.
- 3) Remedios contra la tos, sustituyendo al azúcar en la misión de mantener el calmante en contacto con la mucosa, tanto por evitar los efectos irritantes de aquel como por su propia acción calmante.

COSMÉTICA: Sus empleos más conocidos son:

- 1) Preparación de excelentes pastas para suavizar las manos que protegen aún en el tiempo más frío y presentan la gran ventaja de no ser absolutamente nada grasosas.
- 2) Elaboración de lociones lava-manos; p.ej: jugo de ananá y un 35% de una solución al 3% de carragenina.
- 3) Preparación de líquidos para fijadores.
- 4) Preparación de pastas dentífricas.
- 5) Preparación de pastas desodorantes.

INDUSTRIA TEXTIL: Se emplea la carragenina con éxito (en soluciones al 3%) para dar consistencia y tacto suave a los tejidos).

CURTIEMBRE: Se emplea el ficocoloide en la elaboración de ciertos tipos de cueros, p.ej.: en el terminado del cuero para suelas; la carragenina se introduce en el cuero frotando con cepillos, se le da así cuerpo y rigidez, además de permitir luego un buen lustrado.

También se preparan buenas pómadas para calzado

ya que al adherir bien a la superficie las pequeñas proyecciones del cuero produce el efecto de pulido que se busca.

PREPARACION DE MEDIOS DE CULTIVO: La escasez de agar-agar durante la Segunda Guerra Mundial indujo a algunos investigadores a tratar de usar carragenina en la preparación de los medios de cultivo. Walker y Day (29) estudian esta posibilidad y sugieren un método para preparar los medios, cuya característica fundamental es que nunca se calientan sin haber neutralizado antes cuidadosamente. Es ya conocida la extraordinaria sensibilidad de la carragenina a los ácidos en caliente. Los medios obtenidos son buenos pero resulta conveniente mejorarlos con un 0,5-0,75% de agar-agar. Fuera de esto y de que su P.F. es algo bajo (45° C) los nuevos medios no presentan mayores dificultades.

CAPITULO III

TRIDOFICINA

De la *Iridea Laminaroides* llamada también *Iridoficum Flaccidum* extrajo Hassid (3) un ficocoloide que llamó iridoficina. Los trabajos de este autor datan apenas de 1933 no encontrándose en la literatura citas anteriores al respecto, de manera que no puede hablarse de una historia como en el caso de la carragenina.

Por otra parte como en la bibliografía consultada solamente se encontraron cuatro trabajos por ser estos bastante completos se dará en lo que sigue una síntesis de los mismos. A tal efecto se mantendrá el mismo plan utilizado para la carragenina.

MORFOLOGIA Y UBICACION GEOGRAFICA:

Cuando Hassid ya había completado sus trabajos aparece en 1939 una memoria de Ellegwood (30) con un estudio fito-químico de la *Iridea Laminaroides*, llamando la atención el hecho de que el autor parece no tener noticias de las importantes investigaciones de Hassid.

La *Iridea Laminaroides* es (como se vió en el Capítulo I) un alga roja, pertenece a la familia de las Gigartinales y según Kylin sería idéntica a la *Iridea Heteroscarpa*.

Se la encuentra a lo largo de casi todo el litoral Pacífico del continente Americano, desde Santa Bárbara en los Estados Unidos hasta el sur de Chile. Crece unida a las rocas de la zona sublitoral superior quedando expuesta solamente cuando la marea baja considerablemente.

Descripción: El tallo de esta alga es corto, ancho y en general de borde ondulado; su color varía entre el marrón oscuro y el rojo púrpureo. En plantas viejas y en aquellas sometidas a la acción de la luz y un secado largo, aparecen zonas blanqueadas que son frágiles y se rompen fácilmente al manejarlas. La *Iridea Laminaroides* es iridiacente no perdiendo esta propiedad por desecación, blanqueado e inmersión subsiguiente.

NOTA: Al no encontrar en la literatura fotografías de *Iridea Laminaroides* se ha preferido reproducir un ejemplar obtenido en la Estación Algológica de Pto. Deseado, Territorio Nacional de Santa Cruz, que como puede verse encuadra perfectamente dentro de las características dadas (su color es marrón oscuro con un ligero tinte verdoso).

Para obtener la fotografía adjunta se sumergió el ejemplar en agua fría hasta que se detuvo el hinchamiento, la escala da una idea de su tamaño.

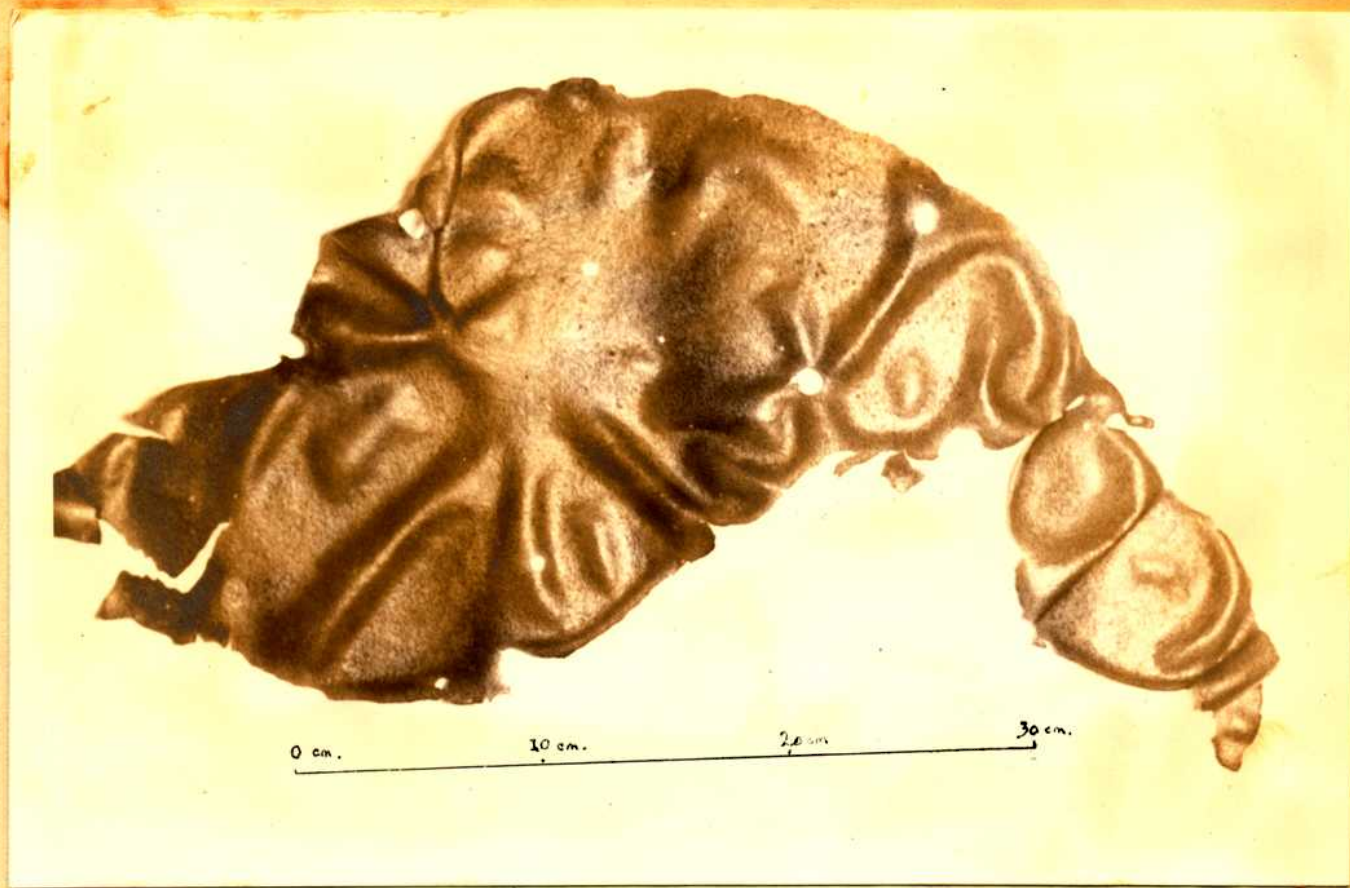


Fig. 4. Hoja de *Iridea laminaroides* proveniente de la costa patagónica argentina (Pto. Deseado).

Datos analíticos sobre el alga (30):

Humedad: se hizo secando a 100°C hasta constancia de peso obteniéndose un 89,74%.

Cenizas: por los métodos AOAC utilizando material secado a 100°C

Ceniza total	16,08%
Insoluble	3,27%
Soluble	12,81%
Ca	0,391%
Na	0,53%
K	2,34%
SO ₄	3,52%
Cl ⁺	1,54%
P ₂ O ₅	0,73%

Todo: fué necesario poner a punto un método que permitiese recuperar todo el I_2 presente porque la mayoría de las técnicas conocidas no eran suficientemente sensibles.

El procedimiento es el siguiente: se calcina el material al rojo sombra con CO_2Na_2 anhidro, cuando está bien carbonizado se lava cuidadosamente con agua destilada (unos 150 ml.) caliente y se agrega MnO_4K (solución) hasta obtener un colar ligeramente rosado. Se agrega alcohol etílico para reducir el exceso de MnO_4K y se lleva la solución a 2000 ml., se filtra descartando los primeros 25-50 ml. y se separa una parte alícuota de 100 ml. para titulación.

A la muestra se agregó IK y SO_2H_2 diluido titulado con $S_2O_3Na_2$ 0,001 N. Para standarizar el método se hicieron blancos con agar-agar sólo y agar-agar adicionado de IK en cantidad conocida; para ello se disolvió 1 gr. de IK en 100 ml. de agua y 1 ml. de esta solución (con 0,01 gr. de I^-) se adicionó a 2 gr. de agar-agar. Deduciendo los blancos, de 0,00764 gr. de I^- agregado (como IK) se recuperaron 0,007354 gr. Es decir que por este método se puede recuperar un 96,25% de I_2 (como IK) de agar-agar.

Aplicado a la *Iridea Laminaroides* este procedimiento indicó la presencia de 24,32 ppm. de I_2 .

Fibra cruda: según la técnica del AOAC se obtuvo un 0,705%.

EXTRACCION:

Prácticamente existe un sólo método empleado en la extracción de iridoficina y es el que emplea Hassid (3).

Las plantas recién recogidas se lavaron con agua destilada y se sumergieron en alcohol etílico hirviendo (del 95%) durante diez minutos. Luego se llevaron en etanol al laboratorio donde se las sometió a una extracción en Soxhlet con alcohol metílico y alcohol etílico hasta ausencia de clorofila, a continuación se las secó a 50°C en estufa de vacío.

El alga se extrajo entonces varias veces con agua, calentando a baño maría varias horas. Se filtró el líquido y se lo virtió en alcohol etílico del 90% (no se especifican proporciones) la solución coloidal lechosa se dejó reposar varias horas y se concentró al vacío. Se echó entonces en alcohol etílico del 95%, se dejó decantar, se filtró y lavó con etanol del 95% primero y absoluto después, secando finalmente a 50°C al vacío. Se obtuvo así una sustancia blanca (nivea) de consistencia fibrosa.

Posteriormente Ellegwood (30) empleó este mismo método pero efectuó previamente algunas extracciones con diversos disolventes. Trabajó en Soxhlet durante 8 hs. obteniendo en todos los casos residuos en forma de película grasosa sobre el fondo del recipiente de extracción, pero en cantidades insuficientes como para intentar un análisis.

Los resultados fueron:

Eter etílico	0,24%
Cloroformo	0,21%
Eter de petróleo	0,19%
Alcohol etílico	0,70%

Efectuó luego una extracción fraccionada con los siguientes resultados:

Eter de petróleo	0,1968%
Cloroformo	0,1937%
Eter etílico	0,2050%
Alcohol etílico	0,4530%
Agua	86,34 %

Es decir que puede considerarse que el material hidrosoluble es casi el único extraíble de la *Iridea Laminaeoides* puesto que el resto no llega al 1%.

ANÁLISIS QUÍMICO:

A pesar de ser posteriores corresponde dar primero los resultados de los ensayos cualitativos que hizo Ellegwood (30) y que son:

Presencia de dulcitol: El líquido que se obtuvo al filtrar el precipitado de iridoficina obtenido por tratamiento con etanol, se concentró hasta consistencia siruposa y se dejó en reposo varios días, al cabo de los cuales aparecieron algunos cristales que recristalizados de alcohol etílico presentaron un P.F. a 183°C. Tratados después con ácido nítrico dieron ácido múscico. Estos dos resultados prueban la existencia de dulcitol.

Ensayos sobre el extracto acuoso y el extracto alcohólico: en ambos se encontraron las mismas reacciones para:

Reactivo de Molisch(+) Indica la presencia de hidratos de carbono.

" " Benedict(-) Indica azúcares reductores.

" " Fehling(-) Indica azúcares reductores.

Clorhidrato de fieroglucinol(-) Indica ausencia de pentosanos.

Ácido múscico(+) Indica la existencia de un galactano.

Como se ve nada hizo Ellegwood en lo que se refiere a la parte inorgánica.

ENSAYOS CUANTITATIVOS: corresponden exclusivamente a los dos trabajos de Hassid, el ya mencionado en el Cap. I (3), y uno publicado dos años más tarde en 1935 (31).

Análisis inorgánico: consiste como siempre en los ensayos sobre cenizas y sobre el material hidrolizado.

Cenizas: calcinando la iridoficina en mufia al rojo se obtuvo un 25,4% de cenizas que analizadas contenían:

SO ₄	69,6%
Na ⁺	13,5%
Ca	2,0%
Mg	2,0%

Hidrolizados: tratando con ClH 1:4 en condiciones no indicadas encuentra Hassid un 12,4% de azufre (que corresponde a un 38,7% de SO₄).

Otra determinación de azufre: la hizo Hassid en la bomba de Parr con O₂Na₂ y ClO₄K encontrando un 11,5% de azufre.

Análisis orgánico:

Ensayo de ácidos urónicos: dió negativo empleando una modificación de Dore del método de Lefèvre.

Ensayo de pentosas: empleó tres caminos:

- 1) Por el método de Tollens del floro-glucinol sobre material hidrolizado y no hidrolizado encontró un 0,5% de furfural que posiblemente se debe a hidroximetilfurfural proveniente de la galactosa.
- 2) Por el método del ácido tiobarbitúrico de Dore y Plaisance (J. An. Chem. Soc. 38 2156 (1916) no obtuvo precipitación de furfural malonil-tioureas.
- 3) Obtuvo resultado negativo en un ensayo con fenilhidrazina.

Determinación de N₂: sin mencionar el método empleado Hassid (32) indica la ausencia de nitrógeno en la iridoficina.

Ensayo de galactosa: lo hizo Hassid por tres caminos distintos:

- 1) Hidrolizó 10 gr. de sustancia seca con 500 ml. de SO₂H₂ al 2% a reflujo durante 7 hs. a 105-110°C, enfrió un poco, llevó casi a neutralidad con (HO)₂Ba caliente y neutralizó con CO₂Ba. Calentó luego la mezcla a 80°C, dejó una noche en reposo, filtró, lavó y llevó el filtrado hasta 1 litro.

Concentrando partes alicuotas de 10 ml. determinó el poder reductor en términos de glucosa con licor de Fehling usando las tablas de Munsen y Walker. El valor medio, calculando arbitrariamente para galactosa aplicando el factor de Browne 0,898 al valor de glucosa, dió una hidrólisis del 54% (ver C.A. Browne Handbook of sugar Analysis p.421, 1921).

Es evidente que se efectuó este dosaje suponiendo la existencia de galactosa en el hidrolizado.

- 2) La identificación de galactosa se hizo sobre una parte alícuota del hidrolizado anterior con unos 2 gr. de ester, que se evapora a presión reducida hasta un jarabe fino, éste fue adicionado de metanol y 1 ml. de ácido acético e inoculado con un cristal de galactosa. Luego de dejar en reposo varios días se separaron los cristales acumulados y se preparó una fenilosazona que tenía un color amarillo naranja y un P.F. 194-196, correspondiente al dado por Mulliken (Determination of pure organic compounds Vol. 1 pag.30) para la galactofenilosazona (P.F. 196°C). Un ensayo confirmatorio demostró que es posible obtener la fenilosazona directamente del hidrolizado sin necesidad de pasar por los cristales de galactosa como paso intermedio.
- 3) La determinación cuantitativa de galactosa se hizo empleando la modificación de Van der Haar del método de Kent-Tollens-Creydt. Se hizo por triplicado y teniendo en cuenta las indicaciones que dan Wise y Peterson [Ind. Eng. Chem. 22 362 (1930)] se encontró de esta manera un 53,2% de anhidrogalactosa.

Como se ve hay concordancia entre el valor obtenido por reducción y el obtenido por aislación del azúcar.

PROPIEDADES FISICAS:

Si pocos son los datos que hay sobre la carragenina mucho menos es lo que se conoce en este sentido respecto de la iridoficina, solamente Hassid (3) consigna algunos valores:

$$\alpha_D^{20} = +69,2^\circ \quad \text{pH} = 6,8$$

Preparación del ácido libre (3): sometiendo 2 gr. de sustancia disueltas en 200 ml. de agua a una electrodiálisis durante 72 hs. en el aparato de Greenberg y Greenberg [J. Biol. Chem. 99 1 (1932)] y concentrando la solución residual se obtiene por precipitación con alcohol etílico del 95% un polvo amorfo granular que disuelto en agua presentó un pH 3,6.

Por otra parte otros 2 gr. de sustancia disueltos también en 200 ml. de agua se colocaron en una bolsa de colodio de 200 ml. de capacidad y se dializaron contra agua corriente (fluyendo continuamente) a 55°C durante 72 hs. Concentrada la solución residual y tratada con alcohol etílico igual que antes se obtuvo la misma sustancia.

Si en lugar de interrumpir la electrodiálisis a las 72 hs. se la continúa (no indica cuanto), el pH de una solución al 1% baja de 3,6 a 2,86.

Se hicieron determinaciones de título sobre una solución al 1% (31) de sal neutra (pH=6,8) con ácido 0,1 N y álcali 0,1 N obteniéndose una curva típica de neutralización

de ácido fuerte. Luego se determinaron las conductividades de diversas soluciones a 25°C.

Solución	Conductividad específica a 25°C
2,0	2,53 x 10 ⁻³ mhos
1,0	1,43 x 10 ⁻³
0,5	6,88 x 10 ⁻⁴
0,25	3,68 x 10 ⁻⁴
0,125	1,84 x 10 ⁻⁴

y, comparando la conductividad de una solución al 2% (0,076 N) con una de una solución 0,076N de ClK ($\kappa = 2,77 \times 10^{-3}$ mhos.) se observa que aquella es mayor en un 25%, lo que puede deberse al tamaño del ión negativo, su gran hidratación y en consecuencia su escasa movilidad.

Finalmente las formas de ambas curvas: la de titulación y la de conductometría indican que la iridoficina es una sal de ácido y base fuerte.

PROPIEDADES QUIMICAS:

Poder reductor: ya se indicó que la iridoficina no es capaz de reducir el Licor de Fehling directamente, pero sí luego de hidrólisis. Este hecho se ha empleado en el dosaje de azúcares.

Hidrólisis ácida: este polisacárido, que Hassid llama a menude galactano (31), es tan sensible como la ca-rragenina a la acción de los ácidos. Parecer ser posible preparar el polisacárido libre de S, para ello 30 gr. de sustancia seca se calentaron a reflujo con 600 ml. de SO₄H₂ 0,5 N durante 5 hs. a 65-70°C; se neutralizó luego con (HO)₂Ba, filtró y lavó reuniendo todos los líquidos.

El filtrado así obtenido se concentró a presión reducida, vertiendo el jarabe en alcohol etílico del 95%; el galactano precipita como una masa blanca amorfa y se lo seca en estufa de vacío a 50°C. Sus propiedades ensayadas fueron:

Rotación específica: $\alpha_D = +82,2^\circ$

Poder reductor: se ensayó luego de tratar con SO₄H₂ al 2% a 105-110°C durante 7 hs. y neutralizar con (HO)₂Ba; resultó ser del 95,8%.

Hidrólisis alcalina: 5 gr. de sustancia se adicionan de 5 gr. de (HO)₂Ba y se suspenden en 100 ml. de agua. La mezcla se calienta a 70°C a reflujo y se observa que se va depositando un precipitado de SO₄Ba a medida que avanza la reacción. Al cabo de un tiempo (no se indica cuanto) se retira el precipitado, se lo lava y se agrega más (HO)₂Ba, continuando el tratamiento en las mismas condiciones. Se siguió

de esta manera hasta no observar formación de más precipitado de SO_4Ba : entonces se enfrió la solución y se eliminó el exceso de Ba con SO_4H_2 diluido. Del filtrado, después de concentrar se precipitó el galactano con alcohol etílico del 95% que se secó en estufa de vacío a 50°C . Las propiedades ensayadas fueron:

Poder rotatorio: $\alpha_D^{20} = +78^\circ$ (C=0,4 en agua)

Poder reductor: Se lo determinó igual que antes, después de hidrolizar con SO_4H_2 al 2% a $105-110^\circ\text{C}$ durante 7 hs. y neutralizar; resultó ser del 86,3%.

La disminución podría deberse a la separación incompleta de algún grupo sulfato o a la destrucción de alguna unidad de Hidrato de Carbono por el álcali.

De la observación de los procesos de hidrólisis descriptos parecería que en medio ácido o alcalino diluido y a baja temperatura es posible eliminar los grupos sulfato sin afectar la molécula del polisacárido (por lo menos esto es lo que Hassid parece querer decir), mientras que en un medio ácido diluido a temperatura mucho mayor se logra la liberación de las unidades de monosacárido. Lamentablemente no se dan detalles sobre la hidrólisis alcalina no pudiéndose, en consecuencia, comparar estos resultados con los obtenidos en el caso de la carragenina.

NATURALEZA QUÍMICA DE LA IRIDOFICINA:

Ya que la única bibliografía al respecto son los dos trabajos de Hassid (3) (31) se ordenarán las observaciones bajo los siguientes títulos:

Existencia de un sulfato etéreo.

Preparación del ácido libre.

Peso Molecular.

Acetilación y metilación.

Discusión de los resultados.

EXISTENCIA DE UN SULFATO ETÉREO: Se la comprobaba fácilmente mediante la relación $\text{SO}_4^- \text{ total} / \text{SO}_4^- \text{ cenizas}$ que resulta, con los datos consignados en la sección de análisis químico, igual a 2:1 (en realidad es 2,08:1). Con todo lo dicho al respecto al estudiar la carragenina puede considerarse este resultado como prueba suficiente.

Es posible, por lo tanto, calcular cuántos grupos sulfato corresponden a cada unidad de galactosa, según los valores correspondientes ya señalados resulta un grupo sulfato para cada unidad galactosa. Con esto sugirió Hassid en 1933 una primera fórmula: $[(\text{C}_6\text{H}_9\text{O}_4)\text{OSO}_2\text{O}]_n$.

PREPARACION DEL ACIDO LIBRE: Ya se dieron todos los detalles al respecto en la sección de propiedades físicas.

PESO MOLECULAR: Hassid hizo una determinación por el método de Rieche en escala semi-micro [vease Rieche Ber. 59 2186]

(1926)] Para ello disolvió 30 gr. de iridoficina en 5 ml. de agua y observó un ascenso de $0,004^{\circ}\text{C}$; empleando la fórmula $M = \frac{1000(C \times S)}{S' \times \Delta}$ donde:

- M = Peso molecular
- C = Punto de ebullición del agua pura.
- S = Peso de sustancia.
- S' = Peso del disolvente.
- Δ = Variación de la temperatura.

resultando $M = 780$, pero por tratarse de una sal de Na se multiplica por dos y queda $M = 1560$. Dividiendo esta cifra por el peso de una unidad $[(\text{C}_6\text{H}_9\text{O}_4)\text{OSO}_2\text{ONa}]_n$ que es de 264 resulta $n = 5,91$ es decir aproximadamente $n = 6$ con lo que la fórmula empírica queda: $[(\text{C}_6\text{H}_9\text{O}_4)\text{OSO}_2\text{ONa}]_6$.

ACETILACION: Permite conocer el número de HO libres que hay en cada unidad de galactosa. Hassid empleó el método usado por Haworth [véase Helv. Chim. Acta 15 609 (1932)] para inulina, introduciendo algunas modificaciones.

Agitó 3 gr. de material durante 30 min. con 5 ml. de piridina a 80°C , enfrió hasta temperatura ambiente y sin interrumpir la agitación, agregó lentamente 30 ml. de anhídrido acético, y luego de varias horas 15 ml. de ácido acético. Observó que la sustancia no se disolvía como en el caso de la inulina. El aumento de acetilos lo fué controlando cada 3-4 días viendo que aumentó hasta alcanzar un valor constante al cabo de 2 semanas, que correspondía a dos HO por molécula de galactosa.

La determinación de los acetilos se hizo de la siguiente manera: se trataron 0,1 gr. de sustancia acetilada con 20 ml. de HONa 0,1 N, titulando al cabo de varias horas con ácido hipocloroso 0,1 N. Ensayos por duplicado dieron para 0,1 gr. de material 5,5 ml. de ácido hipocloroso 0,1 N, lo que corresponde a un valor de acetilos del 23,6%. Si se considera la existencia de dos grupos acetilos por molécula de galactosa a $\text{C}_{10}\text{H}_{18}\text{O}_{10}\text{SNa}$ le corresponde un 24,7%. Es decir que los sustituyentes acetilos fueron eliminados por el HONa y que el sulfato etéreo no fué saponificado.

METILACION: Se metilaron 17 gr. de sustancia según el procedimiento de Haworth y Learner [J. Chem. Soc. 619 (1928)] para metilación de la inulina.

El jarabe metilado se adicionó de 30 ml. de alcohol etílico absoluto y se dejó reposar observando la deposición de un precipitado blanco amorfo que se separó por filtración, lavó con etanol absoluto y secó en estufa de vacío a 50°C .

El contenido en metoxilos se determinó por el método de Dore [J. Ind. Eng. Chem. 12 472 (1920)] en el aparato que se indica en la figura:

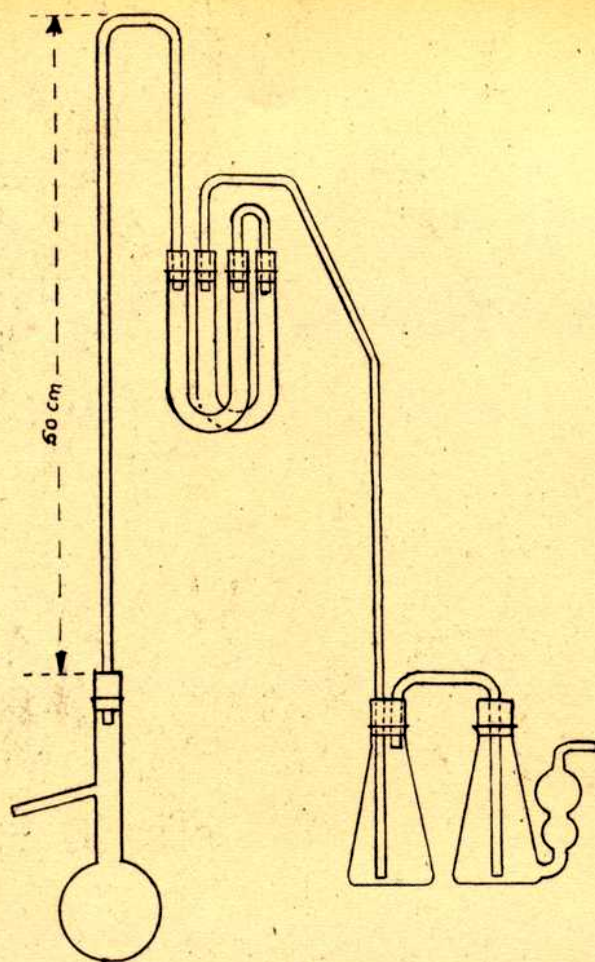


Fig. 5. Aparato usado por Dore para dosar metoxilos.

con una modificación; el agua de uno de los tubos en U del aparato fué sustituido por una solución al 5% de SO_2 Cd.: lo que tenía por objeto eliminar el S que el HI pondría en libertad como SH_2 y que ppararía como SAg_2 ; de esta manera se lo detiene como SCd .

La determinación de metoxilos dió un 14,8%.

Esta sustancia parcialmente metilada fué sometida a ulteriores metilaciones con el reactivo de Purdié (dos veces) elevándose de esta manera el contenido en metoxilos al 20,0%.

Una tercera metilación con el reactivo de Purdie no indicó aumento, aparentemente se llegó a la saturación.

Los resultados obtenidos están de acuerdo con los valores calculados para dos metoxilos en $\text{C}_8\text{H}_{13}\text{O}_8\text{SNa}$, 21,23%. Determinado el poder rotatorio, resultó ser $\alpha_D^{20} = +12,2$ (c:0,8) en Cl_3CH .

Hidrólisis del compuesto metilado y preparación del dimetilmetilgalactósido: Seis gramos de sustancia metilada se hidrolizaron con 300 ml. de SO_4H_2 al 2% a reflujo durante 7 hs. y a 105-110°C. La solución se enfrió, casi neutralizó con $(\text{HO})_2\text{Ba}$ y neutralizó com-

pletamente con CO_3Ag_2 . Se filtró el precipitado y se lo extrajo cuatro veces con porciones de 100 ml. de Cl_3CH . Los extractos clorofórmicos se secaron con SO_4Na_2 anhidro. El SO_4Na_2 se elimina por filtración y se evapora el Cl_3CH obteniéndose un jarabe que no cristaliza, aún luego de un reposo de varios días. Este jarabe reduce el Licor de Fehling y no da precipitado de SO_4Ba con Cl_2Ba luego de someter a hidrólisis clorhídrica.

Esto demuestra que: El polisacárido metilado es hidrolizado a un monosacárido metilado y que el grupo SO_4H_2 es eliminado. El monosacárido metilado fué transformado en su glucósido hirviendo con 75 ml. de metanol conteniendo 2 gr. de ClH , a reflujo durante 8 hs. El ácido fué entonces neutralizado con CO_3Ag_2 y la solución filtrada evaporada hasta consistencia siruposa que se extrajo con benceno y evaporó nuevamente. El jarabe destiló a 90°C y 0,1 mm. que se tomó con un poco de éter de petróleo y se dejó en reposo en ambiente frío con agitación ocasional.

En el curso de pocos días el jarabe dió una sustancia cristalina que no reducía el licor de Fehling y parecía ser dimetilmetilgalactósido.

Su contenido en metoxilos era del 39,0% mientras que el CH_3O -calculado para $\text{C}_6\text{H}_{18}\text{O}_6$ es del 41,8% y $\alpha_{\text{D}} = +97,2^\circ$ ($c=0,8$) en agua.

Preparación de trimetilgalactano: 25 gr. de galactano preparados por hidrólisis ácida, se metilaron por el método de West y Holden. Se obtuvo un jarabe metilado que por adición de un poco de éter de petróleo y de una corta agitación, depositó una masa de cristales. Los cristales se filtraron y secaron a 40°C . La rotación específica de esta sustancia ($C=0,8$) en agua $\alpha_{\text{D}} = +32,4$. Su contenido en metoxilos era del 44,5% mientras que el valor calculado para el trimetilgalactano ($\text{C}_9\text{H}_{16}\text{O}_5$) era del 45,6%.

Preparación de trimetilgalactosa del galactano metilado: 18 gr. de galactano metilado se hidrolizan con 400 ml. de ClH 2N en un balón de destilación con refrigerante a reflujo, calentando con B.M. durante una hora.

La solución se enfrió, saturó con SO_4Na_2 y extrajo cuatro veces con porciones de 150 ml. de Cl_3CH . Los extractos clorofórmicos combinados se secaron con SO_4Na_2 . Se agregaron cinco gramos de carboraffin y se filtró por un filtro seco de talco preparado en un embudo Büchner. Se pasó entonces la solución a un balón de destilación y se destiló el Cl_3CH a presión reducida. El jarabe restante se destiló a presión reducida (0,1 mm.): unos 12 gr. destilaron a 94°C . No se tuvo éxito al intentar la cristalización.

El jarabe reduce el licor de Fehling y su rotación específica ($C=0,8$) en H_2O es $\alpha_{\text{D}} = +129,0^\circ$. Su contenido en metoxilos es del 40,9% con un calculado para $\text{C}_6\text{H}_{18}\text{O}_6$ del 41,8%.

No se tuvo éxito al intentar preparar una osazona, lo que demuestra que el segundo átomo de C debe estar ocupado por un grupo metoxilo.

Oxidación y esterificación de la trimetilgalactosa: La degradación oxidativa de esta sustancia se efectuó en dos etapas:

- 1) Oxidación a lactona con agua de Br.
- 2) Conversión en ácido dibásico.

Esta forma de proceder tiene la ventaja de que el producto final es homogéneo; lo que no ocurre si el azúcar metilado se oxida directamente con ácido nítrico.

10 gr. de jarabe se colocan en un recipiente con tapón de vidrio, al que se agregan 8 ml. de Br₂ y 50 ml. de H₂O. Se calentó el material a 30°C durante siete horas con agitación frecuente, encontrándose que al final de este lapso la oxidación no era completa ya que se obtenía reacción positiva con el licor de Fehling; pero manteniendo el recipiente en esas condiciones durante setenta y dos horas con agitación ocasional desaparece la reacción con el licor de Fehling.

El exceso de Br₂ se elimina por aereación, tratamiento que se continuó con una solución de litargirio y finalmente con óxido de plata hasta neutralidad al tornasol. El filtrado fué saturado con SH₂, filtrado nuevamente y la solución evaporada hasta un jarabe; que se extrajo varias veces con éter anhidro que a su vez se evapora y se obtiene un nuevo jarabe.

El jarabe obtenido de la oxidación con Br₂ (7 gr) se trató con 56 ml. de NO₃H (conc.) y calentó durante 30 min. a 50-60°C en que se inició la oxidación. La temperatura fué aumentada gradualmente hasta 90°C y se mantuvo así durante 5 hs. Entonces la reacción había cesado transfiriéndose la solución a un balón de destilación diluyendo con agua. El NO₃H se eliminó por destilación a presión reducida con frecuentes adiciones de agua. El residuo se secó durante la noche en estufa de vacío a 80°C.

Este jarabe fué esterificado por ebullición con 100 ml. de metanol, conteniendo 3 g. de ClH, a reflujo durante 8 horas. El ácido se neutralizó con CO₃Ag₂ y la solución filtrada fué evaporada hasta un jarabe.

La pequeña cantidad de materia mineral se eliminó extrayendo el jarabe con benceno y luego evaporando la solución. El jarabe destilado a 0,1 mm. y 95°C tiene:

Rotación específica (C_d 0,8) en agua $\alpha_D^{20} = +41,4^\circ$
Contenido en CH₃O - 51,1%; calculado para CaH₁₆O₇ dimetilarabodimetoxiglutarico 52,5%.

Aislación del ácido dimetoxihidroxiglutarico de la sustancia esterificada: Unos 4 gr. del jarabe, dimetiljarabodimetoxiglutarato, se hidrolizaron con 50 ml. de ClH al 2% a 90°C durante 2 hs. El ácido fué neutralizado con CO_3Ag_2 , la solución filtrada, evaporada a presión reducida, y extraída con Cl_3CH y eliminado el Cl_3CH por destilación.

El jarabe se destiló a 0,1 mm. reemplazándose el baño maria por baño de aceite ya que el jarabe no destila a 100°C . Una pequeña cantidad (insuficiente para analizar) destila por encima de 115°C . Aumentando la temperatura no se logró que destilara más jarabe. El contenido en metoxilos resultó del 31,1%.

0,0921 gr. de jarabe, calentados con HONa N/10 y se titularon con ClH N/10 requiriendo 9,3 ml de HONa N/10 para su neutralización. El residuo no destilado es aparentemente ácido dimetoxihidroxiglutarico.

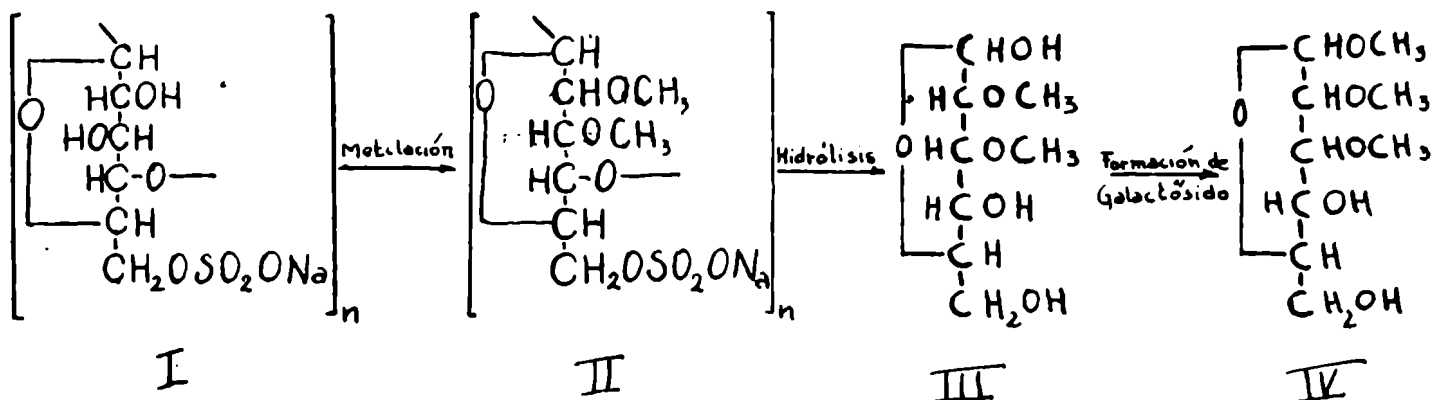
El valor calculado para CH_3O -del ácido dimetoxihidroxiglutarico, $\text{C}_7\text{H}_{12}\text{O}_7$ era 29,8% y por titulación para 0,0921 es de 8,8 ml. de HONa N/10. Esto sugiere que parte del ácido está en forma de su lactona lo que justifica el valor elevado que se encontró.

Las conclusiones a que llega Hassid en base a sus investigaciones sobre la iridoficina son:

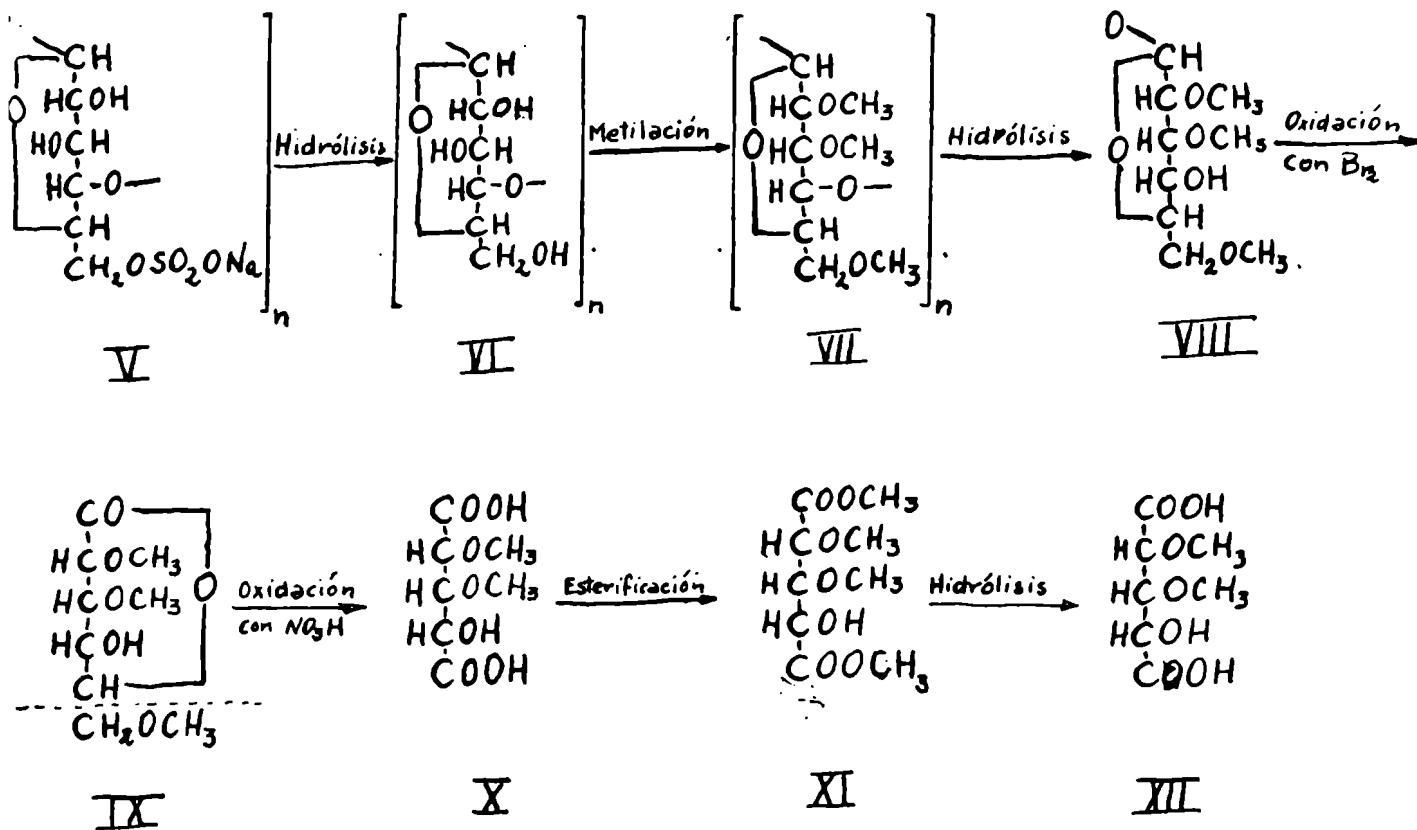
- 1) La ausencia de poder reductor en el galactano indica la inexistencia de una unidad galactosa terminal libre.
- 2) La presencia de dos grupos HO libres está indicada por la capacidad de adicionar dos acetilos.
- 3) La hidrólisis del compuesto metilado dió dimetilgalactosa reductora rompiéndose, aparentemente, tanto las uniones entre galactosa y galactosa y entre galactos y grupos sulfato estereo.

Por ebullición de la dimetilgalactosa con metanol conteniendo un 3% de ClH se obtuvo dimetildimetilgalactósido.

Toda esta serie de transformaciones puede esquematizarse de la siguiente manera:



4) Al hidrolizar el grupo sulfato etéreo del compuesto original (V) se obtuvo el galactano (VI) que por metilación e hidrólisis subsiguiente del (VII) (trimetilgalactano) se obtuvo la trimetilgalactosa. Esta última oxidada con Br_2 , luego con ácido nítrico y finalmente esterificando dió un dimetilara-bodimetoxiglutarato, que por hidrólisis llevó al ácido dimetoxihidroxiglutarico.



Es evidente la presencia de un $-\text{OCH}_3$ en el alcohol primario de C_6 porque la oxidación con NO_2H al eliminar un carbono deja solamente dos $-\text{OCH}_3$ por unidad de galactosa, obteniéndose ácido dimetoxihidroxiglutarico.

Esto demuestra que la unión entre los restos de galactosa no es 1-6, pues en ese caso el resto sulfato etéreo debería ocupar otra posición que la del C_6 caso en que por hidrólisis y metilación se obtendría un trimetilgalactano que por hidrólisis y oxidación con NO_2H daría ácido trimetoxiglutarico y no dimetoxihidroxiglutarico (XII) como se obtiene en realidad.

Si la unión fuese entre los carbonos 1-1 se obtendría por metilación un trimetilgalactano y no el dimetilgalactano (II) obtenido, y un tetrametilgalactano (en lugar del trimetilgalactano (VII) obtenido).

La unión 1-2 se descarta por la imposibilidad de dar una osazona de la trimetilgalactosa (VIII) imposibilidad

que desahafa si hay una unióñ 1-2 porque por hidrólisis hay una HO- libre que permite la formación de osazonas.

También puede descartarse la unióñ 1-5 en virtud del anillo de óxido de amileno que predomina en la galactosa.

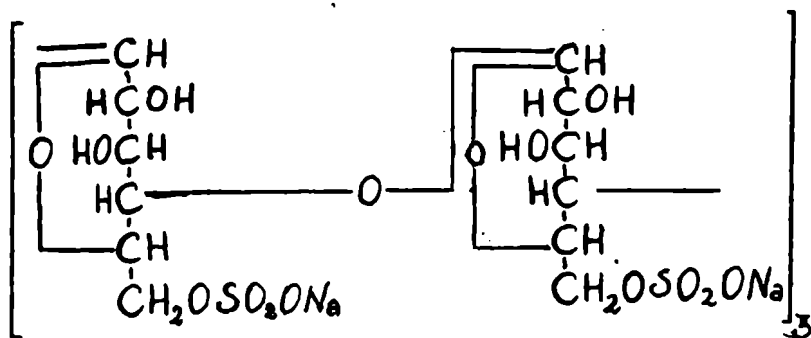
Se descartan así | 1-1
1-2 y 1-6
1-5

Quedan 1-3 y 1-4. Como 1-3 nunca se encontró y 1-4 es común en di y polisacáridos Hassid se pronuncia por 1-4.

NOTA: Aquí es muy importante recordar que este trabajo es de 1935 época en la que era prácticamente desconocida la existencia de uniones del tipo 1-3 (agar-agar, carragenina, etc.).

5) El sulfato etéreo es presumiblemente una cadena lateral y parece estar en C6 (así opina este autor).

En resumen: Hassid sugiere la siguiente configuración:



en base a los resultados obtenidos, llamando a este compuesto éster sulfúrico de galactano.

APLICACIONES:

Lo único encontrado al respecto en la literatura es una indicación de Ellegwood sobre un intento de sustituir geles por iridoficina (30); para ello comparó soluciones de goma tragacanto con soluciones de ficocoloide a distintas concentraciones, usó el método de Nicholls [Jour. Am. Pharm. Assoc. 26 823 (1937)] y encontró que para alcanzar las propiedades de una solución de goma 1:100 se requiere una solución de iridoficina 1:40, es decir casi dos veces más concentrada. Además las emulsiones tienden a separar con más facilidad.

FUNCION DE LOS COMPONENTES DEL ALGA (32): Más que de química propiamente dicha,

éste es un tema de fitoquímica que si bien hasta ahora no fué casi tenido en cuenta no deja por ello de ser de la mayor importancia ya que el metabolismo de las algas es bastante desconocido todavía.

La digestión de hojas de Iridea Laminaroides

con agua caliente dió un líquido con el que se obtuvo reacción positiva de almidón con I_2 . La existencia de almidón fué confirmada porque sometiendo las hojas a la acción de diastasa pudo prepararse maltosazona con los productos de hidrólisis.

La existencia de almidón y dulcitol (ver pag. 60) sugiere un metabolismo de hidratos de carbono anómalo y difícil de explicar, principalmente por la ausencia de azúcares libres; no sería imposible que estos últimos existan pero podría ser que su formación estuviese condicionada a su utilización y por ello no sean detectables. Pero volviendo al dulcitol, también su papel es oscuro, habiéndose supuesto dos explicaciones igualmente lógicas:

- a) El dulcitol sería el primer producto de la fotosíntesis que luego se transformaría en galactosa y ésta en el galactano.
- b) El primer producto de la fotosíntesis sería como siempre la glucosa (así lo justificaría el almidón presente) y esta se transformaría luego en galactosa.

Por otra parte, la ausencia de celulosa y el elevado contenido de galactano en el alga (llega al 40% de peso seco) que constituye la parte principal de la planta parecería tener en el alga el mismo papel que tiene la celulosa en los vegetales superiores.

Del azufre, cuyo porcentaje en el alga es elevado (llega al 6%), sólo se sabe que está totalmente como sulfato etéreo, desconociéndose totalmente su misión.

CAPITULO IV

EL FIGOCOLOIDE DE LA IRIDEA CORDATA

Esta sustancia que Luzzati (16) llamó iridoficina a semejanza de la obtenida por Hassid de la *Iridea Laminaroides* fue extraída (16) de la *Iridea Cordata*, que es un alga muy abundante en el litoral submarino del sur de la Patagonia siendo el mencionado trabajo de Luzzati el primero que existe sobre el tema.

DESCRIPCION DEL ALGA:

La *Iridea Cordata* es una Rhodophyceas (ver cap. I y el cuadro de la pág. 3) que crece adherida a las rocas mediante un pedúnculo extremadamente corto que sostiene una hoja muy ancha de bordes ondulados y de color rojo intenso, a menudo con granulaciones en relieve en tono más oscuro. Su cosecha es dificultosa por tratarse de un alga de profundidad; pero esta operación se ve facilitada por ser arrojada a la playa en grandes cantidades. La muestra estudiada fue cosechada precisamente en las playas de la zona de Puerto Deseado (Territorio Nacional de Santa Cruz).

— x —

NOTA: El ejemplar cuya fotografía se inserta a continuación tiene el mismo origen que el de *I. Laminaroides* cuya fotografía figura en la pág. 58. El tratamiento previo fue exactamente el mismo agregándose una escala que permite tener una idea del tamaño natural del alga.



Fig. 6 Hoja de *Iridea Cordata* proveniente de la costa patagónica argentina (Pto. Deseado).

El aspecto de las algas había variado cuando se las recibí pues habían sufrido procesos de lavado por lluvia y blanqueado por el sol, notándose por lo tanto, la presencia de muchas hojas de color amarillo.

Para obtener una muestra representativa se seleccionaron las hojas más rojas y con mayor depósito de sales, considerando que dicho material había sufrido menos la acción de la intemperie cuya magnitud es incontrolable.

PREPARACION PREVIA DEL MATERIAL:

Con el fin de obtener el ficocoloide se tomaron cuatro kilos de alga, que se lavaron con agua corriente, limpiaron de sales, depósitos calcáreos y otros materiales extraños. Se dejaron entonces secar al aire varios días y se pasaron a estufa a una temperatura no mayor de 60°C (para evitar la descomposición de los componentes sensibles). El secado se finalizó cuando las algas pudieron desmenuzarse fácilmente con las manos, llevándolas inmediatamente a un molino a martillo del que se obtuvieron partículas de unos 0,5 cm. de ancho; a este material bien mezclado se le llamó "muestra representativa".

Moliendo una pequeña parte de la muestra así obtenida en un molino a bolas se obtuvo lo que se denominó "muestra representativa molida" y sobre ella efectuó Luzzati todas las determinaciones analíticas y luego la extracción.

ENSAYOS ANALITICOS SOBRE EL ALGA:

Las técnicas empleadas son las establecidas de manera que se indicarán directamente las fuentes salvo en aquellos casos en que se hayan introducido modificaciones.

Humedad: se determinó secando en estufa de vacío a no más de 70°C ya que experiencias previas con lámparas de infrarrojo y estufas a 100°C habían producido algunas veces carbonización parcial. Se observó un 4,41%.

Nitrógeno: por el método de Kjeldahl dió un 1,41%.

Cenizas: por calcinación en crisol de platino, en mufla a 600°C durante 2 horas (ver AOAC. 6ª Edición 1945, pág. 405) se encontró un 20,7%.

Se repitió este ensayo luego de lavar el alga con alcohol isopropílico del 80% para eliminar sales extrañas obteniéndose un 20,1%.

Azúcares reductores: al efecto se preparó una solución, de acuerdo con la técnica del AOAC 6ª Edición (1945) pág. 132, que consiste en extraer la muestra con etanol del 80% y clarificar. La titulación se hizo por el método de Fehling-Cause-Bonous obteniéndose resultados negativos.

Sulfato total: se determinó sobre muestra hidrolizada con ClH 5% hirviendo a reflujo durante 3 horas por la técnica de precipitación con Cl_2Ba . Los fundamentos del método de hidrólisis se darán más adelante. Se encontró un 24,35%.

Sacarificables: (expresados como galactosa) se desaron sobre mues

tra hidratizada 2,5 horas con CLH 2,5% por ebullición a reflujo (se justificará más adelante), por el método de Fehling-Cause-Bonauz (AOAC 6ª Edición (1945) pág. 410). Se encontró un 38,5%.

Iridoficina: se usó un método que difiere ligeramente del elaborado para extraer la "iridoficina" extracto standard" debiéndose este exclusivamente al deseo de obtener un rendimiento cuantitativo. A 5 g. de "muestra representativa" se le agregó 150 ml. de alcohol isopropílico al 80% manteniéndose en ebullición durante 20 min. y dejándose en remojo hasta el día siguiente. Se escurrió el alcohol, se hicieron dos lavados rápidos con agua destilada y se extrajo con un litro de agua, calentando a baño maría durante una hora. Se filtró por bolsa de tela manteniendo la solución caliente mediante lámpara de infrarrojo; la solución filtró bastante bien, pero quedó en la bolsa una pequeña cantidad de una sustancia mucilagínea imposible de filtrar. La solución se volvió a filtrar con la ayuda del vacío a través de papel de filtro "Whatman 40", previo agregado de pulpa de papel como adyuvante. En este segundo caso la solución filtró perfectamente, lavándose el residuo con agua caliente, no quedando la pulpa mayormente pegajosa. Se evaporó a baño maría con agitación constante precipitándose el floculoide con alcohol isopropílico (a 200 ml. de solución se le agregó 350 ml. de isopropílico 84%). La iridoficina precipitada fue decantada, filtrada y lavada con alcohol etílico primariamente y con éter luego. El secado final se llevó a cabo en estufa de vacío a 60°C, obteniéndose un 64,2%.

EXTRACCION:

Con el objeto de aprovechar las ventajas de los métodos empleados por los diversos autores que trabajaron en la extracción de floculoideos, generalmente sin tener en cuenta los trabajos precedentes, Luzzati elaboró una técnica utilizando todos los datos de la literatura a su alcance obteniendo lo que decidió llamar "iridoficina extracto standard" (I.E.S.). En lo sucesivo se usarán directamente estas iniciales por la simplificación que introducen.

TECNICA:

Se trabajó sobre 50 g. de "muestra representativa". Se hirvió con alcohol isopropílico al 80% se escurrió y lavó rápidamente con agua destilada. Al agua lavada se agregó 4 lt. de una solución caliente al 0,2% de CLH en un vaso de ppdo. de 5 lt que fue colocado luego en un baño de agua hirviendo. Se agitó durante una hora manteniéndose el vaso tapado. Se agregó luego pulpa de papel como adyuvante y se filtró con ayuda del vacío, a través de una gruesa capa de algodón contenida en un buñner, manteniendo la solución caliente mediante la lámpara de infrarrojo, lavando repetidamente el residuo con agua hirviendo. Se volvió a filtrar en caliente la solución turbia a través de papel de filtro, previo agregado de adyuvante, lavando nuevamente el residuo. Se obtuvieron 5,5 lt. de solución que se evaporaron a baño maría con agitación constante hasta obtener unos 400 ml., a los cuales se les agregó 2,5 veces su volumen de isopropílico puro, agitando vivamente la mezcla durante la operación, decantándose la iridoficina precipitada. Se filtró y se hizo un primer lavado

con etanol en una licuadora tipo Turmix; se volvió a filtrar siempre con ayuda de vacío, secando todo lo posible la iridoficina sobre el buchner mediante el pasaje de aire. El floculoide obtenido se redisolvió en 1,5 lt. de agua destilada caliente, evaporándose, precipitándose con isopropílico y lavándose con etanol de la misma manera anterior. Luego se lavó con éter etílico también en la licuadora, filtrando y secando al aire. El secado final se hizo en estufa de vacío a 60°C obteniéndose 16 g. de un producto fibroso y blanco, es decir que el rendimiento fué del 32%.

JUSTIFICACIONES:

Lavado previo con isopropílico al 80%: El calentamiento del carragen en presencia de sales y otras impurezas, produce, según Lund (6) la hidrólisis parcial de la carragenina, para formar ácidos carragenínicos. Si las sales, pigmentos y otras impurezas solubles en alcohol y agua se eliminan antes, el producto final es de mejor calidad. También encontré que soluciones de alcohol al 30% son mejores en separar las sales que las soluciones concentradas. Partiendo de esta base se intentó aplicar la técnica recomendada a la Iridea, pero se vió que soluciones al 30% de isopropílico extraen parcialmente la iridoficina, con lo cual se decidió usar soluciones al 80%. Una disminución de un 3% en el contenido de cenizas, según datos consignados en páginas anteriores, justifica este lavado.

Extracción con solución de ClNa al 0,2% según Rose (14) una extracción del carragen con una solución de ClNa al 0,2% no hace variar el rendimiento, pero reduce el hinchamiento del alga y aumenta la proporción del filtrado obtenido; además la solución conteniendo sal filtra mucho más rápidamente, probablemente debido a su menor viscosidad. Para ver si esta técnica era efectiva en el caso de la Iridea, se hizo una serie de tres extracciones con agua pura, solución de ClNa y solución de ClONa, esta última debido a que en un ensayo previo se había obtenido una iridoficina extraordinariamente blanca. La comparación se hizo por determinaciones de velocidad de escurrimiento en las mismas condiciones, comparadas con el agua destilada. Evidentemente la solución obtenida de la extracción con ClONa fué la que dió menor viscosidad. Se precipitó el floculoide en los tres casos y se volvió a determinar velocidades de escurrimiento en soluciones al 0,5%. La viscosidad de la solución de iridoficina obtenida en la extracción con ClONa era apenas un poco superior a la del agua destilada mientras que la de la solución de iridoficina obtenida en la extracción con ClNa era muy superior e igual a la obtenida en la extracción con agua pura. Esto evidencia que el hipoclorito disminuye más la viscosidad que el ClNa, pero destruye las propiedades espesantes del producto.

También se hizo un ensayo comparativo de extracción entre el método de Hassid (3), Marini-Pettole [Ann. Chim. Applicata 33323 (1943)] y Rose (14) determinando los rendimientos por cen

trifugación, en forma aproximada, obteniéndose los mejores resultados con el método de Rose. Esta diferencia es debida probablemente a que los dos primeros no usan la agitación, calentando, en cambio, durante más tiempo. Para asegurar que una hora de extracción era suficiente, se repitió el proceso sobre el residuo obtenido de la filtración durante otra hora., resultando una solución que no precipitó con alcohol isopropílico.

Filtración: Esta etapa fué siempre la más dificultosa en escala de laboratorio, pues contribuyen dos factores: La viscosidad de la solución y las partículas del residuo que obstruyen los poros de los filtros. De la primera ya se habló en el párrafo anterior, y de la segunda se puede aclarar que fué la razón por la cual la "muestra representativa" se molió en molino a martillo en lugar de molino a bolas. Los métodos industriales especifican el agregado de adyuvante previo al uso de filtros prensa (6). Se intentó repetir este método en escala de laboratorio, comparando al mismo tiempo dos telas filtrantes; la usada en la industria azucarera, y la usada en la industria del cemento, comprobándose que la primera era más efectiva que la segunda. Si bien los resultados fueron prometedores, para poder usar el filtro prensa es necesario trabajar con mucho mayor volumen de solución. Así la filtración por algodón da muy buenos resultados para eliminar las partículas gruesas, pues se puede aplicar el vacío. Además la solución turbia resultante, filtra perfectamente a través de papel, si se tiene la previsión de colocar en el buchner tres papeles superpuestos.

Precipitación: hay dos métodos fundamentales descritos en la literatura para obtener el ficocoloide a partir de sus soluciones acuosas: el secado (5,41) y la precipitación con alcohol etílico (22,40) e isopropílico (6).

El primero tiene el inconveniente de que no elimina las sales que existen en la solución, que tendrán luego una marcada influencia en la viscosidad del producto final (Kruyt, H.R. "Colloid Science" N.Y. Elsevier Publ. Co. 1949). En cuanto a los dos métodos de precipitación consignados se hicieron ensayos comparativos obteniendo con el alcohol etílico un precipitado muy fino, casi coloidal, muy difícil de filtrar.

Se siguió por lo tanto el método industrial con la modificación de Blizovés (6) que agrega el alcohol isopropílico a la solución de carragenina, obteniendo así un precipitado mucho más fino que no necesita ser molido. La evaporación previa se hace únicamente para ahorrar alcohol. Igualmente la segunda precipitación se recomienda para eliminar restos de sales y otras impurezas.

Lavado y secado: los lavados en licuadora dieron excelentes resultados pues se rompen las partículas fibrosas del ficocoloide al mismo tiempo que se lavan.

En cuanto al secado es de suma importancia evitar el aumento de temperatura, pues en la suposición de que la iridoficina es un éster de ácido sulfúrico, al calentar en horno de vapor hay una fuerte tendencia a la carbonización debida al desprendimiento de SO_4H_2 (17), luego de hidrólisis, según la ecuación;

PROPIEDADES:

Luzzati (16) hizo un estudio comparativo entre I.E.S. y una muestra de carragenina obtenida por el mismo método por lo que la llamó "carragenina extracto standard" (C.E.S.).

PROPIEDADES FISICAS:

Gelificación: mientras que una solución al 5% de C.E.S. gelifica perfectamente, una solución de I.E.S. de la misma concentración no lo hace.

Otros ensayos indicaron que tampoco gelifican soluciones más concentradas de I.E.S.

Viscosidad: se determinó con un viscosímetro de Ostwald (32) calibrado con una solución de glicerina al 80%, cuya viscosidad es de 60 centipoises (34) tomándose los tiempos con la precisión de 1/5 de segundo.

COMPARACION DE LAS VISCOSIDADES DE SOLUCIONES DE I.E.S. Y C.E.S.:

Substancia	Concentración %	Temperatura °C	Densidad g/cm ³	Viscosidad centipoises
Iridoficina E.S.	0,8	20,3	1,002	190,5
Carragenina E.S.	0,8	20,5	1,002	77
Carragenina (según tablas) (6)	0,30	25	-	26,0

PROPIEDADES QUIMICAS:

Los resultados se consignan en la tabla adjunta (ver página siguiente).

PROPIEDADES FRENTE A VARIOS REACTIVOS:

Reactivo	Iridoficina E.S. sol. al 0,8%	Carragenina E.S. sol. al 0,8%	Carragenina, sol. 0,8 al 1%, segun tablas (35)
Stokes	leve espesamiento	leve espesamiento	espesamiento
Acetate de plomo neutro 20%	espesamiento pero no ppdo	espesamiento pero no ppdo	ppdo. flocculento, gelifica
Acetate bá sico de Pb	Ppdo. flocculento voluminoso.	Ppdo. flocculento voluminoso.	Ppdo. flocculento voluminoso.
Millon	Opalescencia con espesamiento.	Opalescencia con espesamiento.	Fine ppdo.
Cl3Fe 5%	Ppta. en frio, e hirviendo, ppdo. rojo voluminoso	Ppta. en frio, e hirviendo, ppdo. rojo voluminoso	Ppdo. voluminoso, fibroso, gelifica
KOH 10%	Gelifica, no muy buena consistencia	Gelifica	Gelifica
2 vol. de acético	Espesamiento	Espesamiento muy leve	Negative
Ppdo. alcohólico	Ppdo. muy fine, coagula en forma de gel al centri fugar. 88 ml. de etanol.	Ppdo. fine, coa gula fibroso al centrifugar, con tendencia a ge lificar. 74 ml. de etanol	Coagula, transluce do, fibroso, adhe rente, 20 ml. de etanol

ANALISIS QUIMICO COMPARATIVO:

Se hizo sobre I.E.S. y C.E.S. con los resultados si
guientes;

	Humedad	Cenizas	Sulfato en cenizas	Sulfato total	Sacarificables (como galactosa)
Iridoficina E. S.	1,16%	21,3%	13,11%	30,9%	42,2%
Carragenina	0,1%	21,05%	-	29,05%	46,4%

Para el dosaje de sulfato se encontró que de los tres caminos: CLIGN durante 6 horas, con CLM 5% durante 5 horas (7) y con CLM 2,5% durante 2,5 horas (AOAC pág. 410); el segundo es el que da un valor mayor. Mientras que para galactosa el que da mejores resultados es el tercero de los tres métodos

EXAMEN MICROSCOPICO:

Se siguieron estrictamente las indicaciones para la tinción de precipitados alcohólicos de ficecoleides que da Morris Jacobs (35) obteniéndose los siguientes resultados:

Observación	Irideleina E.S.	Carragenina E.S.	Carragenina (Según tablas)
A simple vista	Casi no se nota coloración	Coloración marrón	Marrón con pequeñas partículas azules
Con microscopio	Muy poco teñido - pardo oscuro.	Marrón	Nótese una estructura nodular característica.

APENDICE I

EXPERIENCIAS CORRESPONDIENTES AL TRABAJO DE BUCHANAN, PERCIVAL Y PERCIVAL (Pag. 45 y s.s.)

METILACION DEL C.E.:

Estos autores trabajaron sobre 5 gr. de sustancia siguiendo las indicaciones de Bell (J.Chem.Soc. 1938 1461), repitiendo la operación cuatro veces obtuvieron un producto con $\alpha_D^{20} = +22^\circ$ en agua (C=0,8).

OMe = 14,5%; cenizas = 17,1%; SO₄ en cenizas = 51,6% y SO₄ total = 24,2%.

Hidrólisis de la carragenina metilada: 3 gr. del producto así obtenido (metilación) fueron hidrolizados con ácido oxálico N/2 durante 24 horas a 100°C; acetilados, y el producto destilado (1,15 gr.) P.E. 175-220°C/0,02 mm. (se encontró OMe = 14,7%).

Una porción de 0,3 gr. fué desacetilada por el método de Zemplen, el producto (0,17 gr.) sometido a 2 metilaciones con ICH₃ y OAg₂, se hidrolizó el metoxilo glicosídico y se trató el azúcar metilado con anilina, obteniéndose así la tetrametil-d-galactopiranosano-anilida (P.F. = 196°C) que no disminuye por mezcla con una muestra pura.

Aislación del 2-metil-β-metilgalactósido: El jarabe acetilado (0,5 gr.) fué calentado según Munro y Percival (J.Chem.Soc. 1935 873) y desacetilado con dimetilamina en metanol (20%) eliminando la acetodimetilamida a 0,01 mm. se obtuvieron agujas de 2-metil-β-metilgalactósido P.F. 130°C $\alpha_D^{15} = +1,5^\circ$ en agua (C=1,0) (Se encontraron: C = 45,9% H = 7,7 y OMe = 28,9% Calculado para C₈H₁₆O₁₆: C=46,1% H=7,75% OMe=29,8%

6-metil-β-metilgalactósido: Se lo preparó a partir de la 6-metilgalactosa por un método similar, ya que la identificación de la sustancia arriba mencionada depende fundamentalmente del P.F. registrado por Oldham y Bell (J.Amer.Chem.Soc. 1938 60 324).

El 6-metil-β-metilgalactósido tenía P.F. 114-115°C $\alpha_D^{13} \pm 0^\circ$ en agua (C=0,7) (Encontrado: C= 46,4%; H= 7,8% y OMe=28,5%) correspondiendo esto a C₈H₁₆O₆.

1) El C.E. metilado (6 g. con OMe=14,5%) fué sometido a una primera hidrólisis con SO₄H₂ N/75 durante 2,5 hs. El producto (A) (2,5 gr.) fué entonces sometido a hidrólisis con C₂O₄H₂ N/2 como antes y el jarabe reductor transformado en glucósidos. El jarabe (0,9 g; OMe= 38,2%) fué destilado para dar: (1) 0,33 g. P.E. = 160-180°C/0,05 mm.; $\eta_D^{15} = 1,4700$; $\alpha_D^{15} = +73^\circ$ en agua (C=1,1) y OMe = 43%

2) 0,27 gr. P.E. = 180-220°C;

(1) [0,15 gr.] fué sometido dos veces a metilación con óxido de plata y yoduro de metilo eliminándose el metoxilo

glucosídico; la formación de la anilida dió entonces la anilida de la tetrametil-d-galactospiranosa (0,05 g.) P.F.=196°C que no disminuyó al mezclarla con sustancia pura. Lo mismo para (2).

El residuo de (1) se trató como antes obteniéndose 2-metil- β -metilgalactósido de P.F.=130°C que no disminuye por adición de compuesto puro.

La metilación completa de (2) seguida de una hidrólisis y formación de anilida dió la anilida de la tetrametil-galactopiranosa como antes.

Una segunda cantidad de (A) fué hidrolizado con $C_2O_4H_2$ dando un jarabe (4,5 g.) que fué acetilado; el jarabe resultante (6,0 g.) fraccionado dió:

- 1) 0,23 g. P.E. = 154-165°C/0,05 mm; $\eta_{10}^{15} = 1,4760$
- 2) 2,88 g. P.E. = 175-185°C/0,02 mm.
- 3) 2,33 g. P.E. = 185-200°C/0,02 mm.
- 4) 0,52 g. residuo.

Las fracciones 2 y 3 se combinaron (5,2 g.) y se redestilaron dando:

- 2b) 4,1 g. P.E. 165-175°C/0,03 mm; $\eta_{10}^{15} = 1,4580$; OMe = 13,0%
- 3b) 0,8 g. P.E. 175-200°C/0,03 mm; $\eta_{10}^{15} = 1,4601$; OMe = 7,9%

La fracción 2b fué redestilada dos veces sin que mejorara la separación y finalmente fué acetilada; el producto (3,1 g.) dió por destilación:

- 1e) 2,35 g. P.E. = 180-190°C/0,1 mm; $\eta_{10}^{16} = 1,4580$ (OMe = 15,4 ; $\frac{H_2}{CO} = 46,2\%$)
- 2e) 0,5 g. P.E. = 195-230°C; $\eta_{10}^{16} = 1,4559$

Investigación de la fracción 1e: La fracción (0,974 g.) fué desacetilada por el método de Zemplén dando un jarabe (0,5 g.) del cual (0,16 g.) puede obtenerse lentamente una osazona por un método adecuado (0,04 g.); P.F.= 195-196°C. Otra porción del jarabe desacetilado (0,78 g.) dió una osazona en forma de cristales largos P.F. 201-204°C no disminuido por agregado de 6-metilgalactosazona pura P.F.= 206°C.

Encontrado: C=60,0; H=6,4; OMe=8,6; N=15,2.

Calculado para $C_{19}H_{24}O_4N_4$; C =61,3; H=6,45; OMe=8,3; N=15,0%.

Estudio de la fracción (3b): El jarabe (0,8g.) fué desacetilado y oxidado con Br_2 como se indicó más arriba. Se aisló una lactona siruposa (0,18 g.) $\alpha_{10}^{18} = -17^\circ$ en agua (C=2,0) (inicial); -15,4 (4 días, constante). Esta fué transformada en ester y luego en amida $\alpha_{10}^{15} + 8^\circ$ que dió resultado negativo con el ensayo de Weerman, demostrando tener un metoxilo en el C₂.

Aislación de glucosazona y metilglucósido tetracetato: El jarabe libre de galactosa dió glucosazona por un tratamiento adecuado (0,3 g.) P.F.=206-208°C (n.d.p.a.s.p.)*. Un jarabe obtenido de igual manera

* no disminuido por adición de sustancia pura

en otra experiencia (2,5 g.) fué acetilado y el acetato tratado de acuerdo con Munro y Percival (obra citada); el tetracetato de β metilglucósido (0,16 g.) obtenido tenía un P.F.=104°C (n.d.p.a.s.p.) $\alpha_D^{19} = -19^\circ$ en cloroformo (C=0,7). El jarabe del que se obtuvo esto por cristalización tenía $\alpha_D^{19} = +7^\circ$ en Cl_3CH y fué metilado obteniéndose un aceite $\eta_D^{20} = 1,4495$; OMe=60,2% que por hidrólisis dió tetrametil glucopiranososa (0,05 g.) P.F.= 85°C.

Metilación: 10 g. de H.E. se metilaron como antes obteniéndose 7 g. de un vidrio. Se encontraron: OMe=14,2 cenizas 17,7% $\left\{ \begin{array}{l} Ca = 19,9\% \\ SO_4 = 27,0\% \end{array} \right.$

Hidrólisis del H.E. metilado y fraccionamiento: Se hidrolizaron 7 g. de H.E. con ácido oxálico, obteniéndose 5 g. de un jarabe $\left\{ \begin{array}{l} OMe = 16,8\% \\ \alpha_D^{19} = +32^\circ \text{ en agua (C=0,3)} \end{array} \right.$ Acetilando se obtuvo un jarabe 5,6 g. que dió:

- 1) 0,4 g. P.F.= 132-140°C/0,03 mm. ; OMe=13,0%.
- 2) 3,5 g. P.F.= 165-180°C/0,03 mm. ; OMe=15,2%
- 3) 1 g. P.F.= 190-200°C/0,03 mm. ; OMe= 9,3%

Redestilando la fracción (2) se obtuvieron:

- 2a) 2,75 g. P.F.= 165-170°C/0,03 mm. $\eta_D^{22} = 1,4598$ $\left\{ \begin{array}{l} OMe = 18,5\% \text{ calculado para } C_{14}H_{22}O_9 \\ OMe = 18,6\% \end{array} \right.$
- 2b) 0,5 g. P.F.= 185-195°C/0,03 mm.; OMe=9,6%.

Sometiendo la fracción (3) a metilación total, hidrólisis y formación de anilida se obtuvo la anilida de la tetrametilgalactopiranososa con buen rendimiento P.F.=196°C n.d.p.a.s.p. Lo mismo para 2a.

Desacetilando la fracción (3) (0,4 g.) y preparando una osazona se obtuvo una (0,1 g.) de P.F.= 170-175°C (sin OMe) que por recristalización subió a 189-191°C n.d.p.a.s.p. (galactosazona).

No fué posible aislar ácido múcico tratando (3) desacetilado con NO_2H en las mismas condiciones en que con galactosa se obtendría un buen rendimiento.

Por lo tanto la galactosazona se ha formado a partir de 2-metil-galactosa.

Aislación de 6-metil-galactosazona de (2a): 0,5 g. de fracción 2a fueron desacetilados y tratados con fenilhidrazina y ácido acético. Se obtuvieron 4 cosechas de osazona 0,11 g. OMe= 7,6%.

Esta osazona recristalizada de alcohol tenía un P.F. = 201°C n.d.p.a.s.p. (6 metilgalactosazona) Encontrado: OMe= 8,0 Calculado para $C_{19}H_{24}O_4N_4$ OMe= 8,3% Este resultado fué confirmado dos veces.

La lenta deposición de esta osazona y las propiedades de 2a confirman la presencia triacetato de 2-6 dimetilgalactosa en esta fracción.

El hecho de que el C₄ no está ocupado por un metoxilo lo afirma la observación de que los glucósidos formados en la fracción 2a desacetilada a 16°C en ClH 1% en MetOH lo hacían con inversión del signo de rotación. $\alpha_D^{25} = -27^\circ$ en ClH al 1% en MetOh, valor de equilibrio.

APENDICE II

LA BIBLIOGRAFIA JAPONESA

Una rápida ojeada a las páginas en que figura la bibliografía consultada indica claramente que solamente se tomaron en cuenta las publicaciones que podrían calificarse como occidentales mientras que, salvo alguna mención aislada, nada se dice acerca de lo que sobre este tema se ha hecho en Oriente.

Dos son las razones que condujeron a esta situación, siendo la primera la insalvable barrera del idioma (casi todos los trabajos que pueden interesar están en japonés) y la segunda la escasez de literatura japonesa. Lo poco que pudo ser consultado indicó, sin dejar lugar a dudas, la importancia de las investigaciones efectuadas en Oriente, máxime teniendo en cuenta lo que las algas significan desde hace siglos en la alimentación de los países del Lejano Oriente.

Por considerar que sus resultados son de interés para el presente trabajo se comentarán brevemente dos memorias.

EXTRACCION DEL MUCILAGO DE ALGUNAS RHODOPHYCEAE:

Mori y Tutiya (36) trabajan sobre varias algas aplicando el método de Hassid de extracción (3) a dos de ellas: *Chondrus Ocellatus* Holmes e *Iridea Laminaroides* Bory. Uno de los datos más interesantes de esta memoria es la gran cantidad de nitrógeno que parecen contener las algas japonesas y que pasa en buena parte al ficocoloide extraído con el procedimiento mencionado. Por este motivo los autores consideran el método de Hassid como inadecuado y elaboran otro.

Pero ante todo se indicarán resultados de análisis efectuados sobre las algas.

Tabla XVIII ANÁLISIS DE LAS ALGAS ESTUDIADAS

	Chondrus Ocellatus Holmes	Iridea Laminaroides Bory
Humedad %	12,45	10,60
Sustancia seca %	87,55	89,40
Mezcla de proteínas %	15,82	16,28
Proteínas puras %	11,64	9,99
Grasas %	0,51	0,66

Fibra cruda %	1,96	0,36
Sustancia sol. sin N ₂ %	62,70	69,20
Cenizas %	19,01	15,50

Tabla XIX

ANALISIS DE LAS CENIZAS

Valores % de cenizas	Chondrus Ocellatus Holmes	Iridea Laminaroides Bory
SiO ₂	2,23	3,78
SO ₃	42,92	46,98
P ₂ O ₅	6,06	6,41
OMn		----
Fe ₂ O ₃		----
Al ₂ O ₃		----
OMg	6,55	6,01
OCa	11,45	9,07
ClNa + ClK	15,26	----

Método de extracción: Unos 100 gr. de algas secados al aire molidos en un molino de discos, se introdujeron en un bolón con 5 litros de agua; se agregó Cl₂Ba (sin especificar cuanto) y se hirvió a reflujo durante 40 min. dejando luego en reposo toda una noche.

Se filtró por Buchner a través de tres papeles de filtro retirando el superior cuando la velocidad de pasaje de líquido se hacía muy pequeña. El residuo del filtro fué deshechado y la solución obtenida (unos 4,5 litros), cuya viscosidad determinada con un viscosímetro de Ostwald era de 27 centipoises, se llevó a ebullición y neutralizó con agua de barita. Se filtró nuevamente, concentró hasta 300-400 ml. y se agregó solución de acetato de Pb al 10% hasta que dejó de aparecer un precipitado marrón; se filtra y en el filtrado se precipitó el mucilago con solución saturada de acetato básico de Pb y pulpa de papel. Se filtró, lavó en el filtro con un poco de agua fría, molió en mortero y finalmente se suspendió en una

pequeña cantidad de agua. De esta solución se eliminó el Pb con SH_2 y luego éste y el SPb por la vía común.

Se filtró entonces por pulpa de papel mediante vacío y se agregó a los 300-400 ml. (no fué necesario concentrar) la misma cantidad de alcohol etílico logrando precipitar así casi toda la sal de Ba del ficocoloide. La sustancia obtenida se redisolvió en agua, decoloró con carbón activo, concentró y reprecipitó con etanol. Esta reprecipitación se repitió tres veces obteniéndose una sustancia no nitrogenada que lavada con etanol y éter se secó en estufa de vacío. Es un polvo blanco muy higroscópico.

Para confirmar la diferencia entre este método y el de Hassid, Mori trató dos muestras de 10 gr. con ambos encontrando que su método le permitía obtener 3,3 gr. de sustancia libre de N_2 (33%) mientras que el método de Hassid daba 0,8 gr. (un 8%) de una sustancia que aún tenía N_2 .

IDENTIFICACION DE GLUCIDOS: Es un interesante estudio realizado por Egami (37) que estudia la reacción de numerosos hidratos de carbono con carbazol. La técnica empleada fué:

0,05-0,4 mg. de hidrato de carbono más 10 ml. de $\text{SO}_4\text{H}_2\text{N}$ se adicionaron de 0,3 ml. de solución de carbazol al 0,5% mientras se enfriaba con hielo; luego se calentó a baño maría y se observó la aparición de un color violeta oscuro.

Dieron reacción positiva:

Glucosa	Xilosa
Arabinosa	Ramnosa
Mánosa	Glucuronato de Ba.
Galactosa	Manuronato de Ba.
Fructosa	Acido algínico neutralizado con HONa
Sorbosa	Condroitínsulfato de Ca.
Levoglucosano	

SEGUNDA PARTE

Estudio de la Constitución del ficocoloide
de la Iridea Cordata.-

MOTIVO DEL TRABAJO

Según se ha visto en el capítulo IV de la primera parte Luzzati (16) elaboró un método que permitió extraer de la *Iridaea Cordata* un ficocoloide que presentó algunas semejanzas con un extracto de *Chondrus Crispus* (carragenina) obtenido en las mismas condiciones. Por lo tanto se está en la posibilidad de dejar las determinaciones de tipo comparativo (como las hechas por Luzzati) e intentar un estudio un poco más profundo sobre dicha sustancia, especialmente en el sentido de arrojar alguna luz sobre la naturaleza química de la misma.

Con el objeto de facilitar la comparación de los resultados obtenidos con los consignados en la primera parte se adoptará para la exposición un esquema similar al utilizado en ella.

CAPITULO I

DETERMINACIONES ANALITICAS SOBRE EL ALGA UTILIZADA:

Se utilizó el mismo material que empleara Luzzati en 1953, más aún, se trabajó sobre la misma "muestra representativa"; de ésta se tomaron unos 400 gr., se los secó en estufa de vacío a no más de 60°C y se molió en molino a bolas hasta que pasó por tamiz de malla 50.

El análisis de esta muestra molida se hizo de la siguiente manera.

Humedad: tal como se mencionara en la pág. 14, el secado del alga requiere cuidados especiales ya que no debe pasarse nunca de los 70°C, en estas condiciones las determinaciones deben efectuarse en estufa de vacío con el fin de acelerar la tarea. El material es demasiado higroscópico como para que una determinación tenga valor permanente, por lo tanto, y con el fin de evitar el tener que secar cada muestra antes de analizarla, se determinó humedad en el material cada tres semanas, contando de esta manera con cifras de sustancia seca utilizables.

Se usaron dos técnicas con igualmente buenos resultados:

- 1) Secar 2 hs. a 60°C y luego llevar a constancia de peso con secados de 20 minutos también a 60°C.
- 2) Secar 7 hs. a 50°C llevando luego a constancia de peso con secados de 3 hs. a la misma temperatura.

Los distintos resultados obtenidos sobre unos 5 gr. de alga molida fueron (con los intervalos indicados):

4,97%, 5,28%, 5,57%

Cenizas: se determinaron calcinando 5 gr. de alga molida en crisol de platino 2 hs. 30 minutos a 500 - 600°C llevando luego a constancia en tratamientos sucesivos de 20 minutos.

Nitrógeno: por el conocido método de Kjeldahl se trabajó sobre 4-5 gr. de sustancia seca

Sacarificables: debido a los inconvenientes que tuviera Luzzati con el método de Fehling-Cause-Bonard se prefirió utilizar el de Shaffer-Somogy que se detallará más adelante.

Picocoloide: no se hizo ninguna extracción especialmente destinada a establecer la cantidad de polisacárido presente en el alga, pero una de las extracciones hechas para obtener la sustancia necesaria para el trabajo dió un rendimiento del 76,8%. (Las condiciones de trabajo se darán en el capítulo siguiente).

Sulfato total: hirviendo unos 7,2 gr. de alga seca a reflujo durante 6 horas con 50 ml. de ClH al 5%. Se dejó enfriar, filtró, lavó el filtro y llevó a 1 X., efectuándose el desaje por precipi-

pitación con Cl_2Ba sobre partes alícuotas de 200 ml. El filtro calcinado no acusó residuos apreciables.

Sulfato en cenizas: se tomaron unos 0,75 gr. de cenizas que se disolvieron en 75 ml. de ClH 1:5, se calentó hasta ebullición agregando entonces 100 ml. de agua hirviendo; se continuó la ebullición 5 minutos y se filtró enseguida, lavando con un poco de agua caliente. Se volvió a hervir agregando 20 ml. de solución al 10% de Cl_2Ba , continuándose luego con la técnica común para sulfatos. (38)

Pentosanos: se hizo la determinación por el método clásico de destilación con ClH al 12% y dosaje de furfural en el destilado por precipitación con floroglucina. La técnica utilizada fue la recomendada por el AOAC y el U.S. Forest Products Laboratory tal como lo indica Wise. (39)

Resumiendo: (todos los resultados se expresan sobre sustancia seca):

Cenizas: 22,02%

Nitrógeno: 1,24%

Sacarificables: 40,22%

Picogoleído: 76,8%

Sulfato total: 25,63%

Sulfato en cenizas: 13,01% y, 59,1% sobre cenizas.

Pentosanos: no hay

CAPÍTULO II

EXTRACCIÓN DEL FICOCOLOIDE:

Se siguió exactamente el método elaborado por Lustati (ver pág. 75) ajustando los siguientes detalles:

- a) Lavado con isopropílico: se usaron 600 ml. de alcohol, dejando hervir 5 minutos.
- b) Filtrado por algodón: se usó una capa de 2 cm. de algodón seco. Cuando la velocidad de filtración disminuía mucho se revolvió el material en el filtro con una varilla provista de hélice.

Los lavados con agua hirviendo se continuaron hasta que la masa en el filtro no tenía consistencia de mucilago al tacto. (A esto se debe el rendimiento elevado).

- c) Primera precipitación con isopropílico: se hizo de dos maneras: dejando enfriar el concentrado y directamente en caliente. En el primer caso la cantidad de isopropílico que indica la técnica es suficiente pero como el concentrado es una masa de consistencia gelatinosa se forman grumos bastante grandes que hicieron necesaria una energética agitación mecánica de 20 minutos.

En el segundo caso se obtuvo una emulsión de ficocoloide en alcohol siendo necesario agregar 1 litro más de isopropílico para obtener un precipitado filtrable.

Ahora bien: aunque en este último caso se obtiene una sustancia más pura, el gasto de precipitante es demasiado elevado y, como los lavados en licuadora son muy eficaces, es suficiente utilizar el primer procedimiento (precipitar en frío).

- d) Lavados en licuadora: se hicieron durante cinco minutos.
- e) Secado: no debe dejarse de un día para otro en la estufa de vacío porque el material puede quedar en forma de trozos compactos, regularmente duros, que son bastante difíciles de moler. Por su parte el ficocoloide obtenido en forma fibrosa está lo suficientemente dividido como para no requerir molienda ulterior.

Los 86 gr. de sustancia empleados en los ensayos correspondientes a este trabajo se obtuvieron en tres extracciones. Observándose que los ensayos efectuados sobre las dos primeras coincidían perfectamente.

CAPITULO III

ANALISIS QUIMICO DEL FICOCOLOIDE

HUMEDAD: ya se indicaron, al tratar del alga, (pág. 90) las dificultades que presenta esta determinación. Los ensayos se hicieron siempre según cualquiera de los métodos indicados, obteniéndose los siguientes valores:

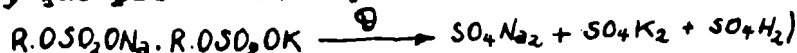
1er. Extracto: 7,64%

2º Extracto: 8,56% - 9,56%

3er. Extracto: 7,3%

Un dosaje efectuado sobre una muestra del material extraído y utilizado por Luzzati hace un año, guardado dentro de un pesafiltro con tapa, indicó un 18,65%.

CENIZAS: se trabajó sobre unos 5 gr. de ficocoloide seco, que se colocaron en una cápsula de platino y se carbonizaron a baja temperatura (200-300°C), porque el material aumenta mucho de tamaño durante este proceso y se corre peligro de perderlo; una vez completada esta etapa (no se perciben más gases picantes que se desprenden de la masa y que provienen de:



se continúa calcinando en las condiciones dadas para el alga.

Análisis de las cenizas: primeramente se efectuó una serie de ensayos cualitativos que fueron:

a) Aspecto: polvo blanco algo sucio, muy fino, casi impalpable.

b) Solubilidad: son completamente solubles en agua y ClH 1:5.

c) Reacción: neutra.

d) Aniones: $SO_4^{\bar{2}}$ = gran cantidad

$PO_4^{\bar{3}}$ = (ausentes) Reac. del fosfomolibdato.

Cl^- = (ausentes)

e) Cationes: se hizo una marcha sistemática para la 4ª y 3ª división de cationes en razón de que los análisis del alga efectuados en el Instituto Tecnológico no indicaron la presencia de ningún otro elemento, salvo vestigios de Fe. Se siguió la técnica de Trendwell-Hall con los siguientes resultados:

Ca^{++} = - Na^+ = +

Mg^{++} = - K^+ = +

Se decidió entonces preparar una solución de cenizas y sobre ella determinar SO_4^{2-} , N_2 y K^+ . Para ello se disolvieron 1,021 gr. de cenizas en CHN 1:5 con la técnica ya indicada (38), preparándose 500 ml. de solución, efectuándose las determinaciones sobre partes alícuotas de la misma.

f) Dosaje de SO_4^{2-} : se efectuó sobre 100 ml. de solución encontrándose en Cl_2Ba sobre cenizas o bien un 13,36% sobre sustancia seca expresado como SO_4^{2-} y 4,46% expresado como azufre.

Con el objeto de determinar si todo el azufre presente en cenizas está o no en forma oxidada se trató aproximadamente 1,0 gr. de material calcinado con agua de bromo, hirviendo hasta expulsión completa del halógeno, se agregaron después 100 ml. de CHN 1:5 y se llevó a 500 ml. La precipitación se hizo sobre 100 ml. obteniendo un 62,0% sobre cenizas o bien un 13,53% sobre muestra original seca o bien un 4,52% sobre muestra original seca pero expresado como azufre. Y aunque la diferencia es pequeña corresponde tomar estos últimos valores y no los primeros. La pequeña cantidad de azufre no oxidado puede provenir perfectamente de una reducción en la malla durante la calcinación.

g) Dosaje de N_2 : se tomaron 50 ml. de la solución de cenizas no oxidada, se eliminó SO_4^{2-} precipitando con Cl_2Ba , se dejó enfriar y se llevó a 250 ml. con agua destilada; sobre 50 ml. de esta nueva solución se hizo la determinación concentrando primero hasta 1 ml. y siguiendo luego estrictamente la técnica de Scott (38) pág. 879.

h) Dosaje de K^+ se hizo directamente sobre la solución de cenizas tomando 25 ml. y precipitando como cobaltinitrito de N_2 y K ; según Treadwell-Hall (40) (pág. 50), pero para evitar los errores que puede introducir la pesada del $C_6(KO_3)_6Na_2O$ (de composición no muy constante), se utilizó la siguiente modificación:

El precipitado que permaneció en reposo una noche, se filtró por un cristal de Geoch con amianto y se lavó con ácido acético al 10% hasta que el líquido pasaba incoloro. Se transfirió entonces el precipitado con 100 ml. de HONa al 1% a un vaso de 250 ml se llevó a ebullición manteniendo así 5 minutos, se filtró en caliente por papel de poro grueso y se lavó el filtro con agua. El líquido así obtenido se adicionó de 50 ml. de M_2O_4K 0,1N (controlado) y de 15 ml. de SO_4H_2 1:5, se dejó con reposo 15 minutos y después de agregar 2 gr. de IK sólido se tituló al I_2 formado con $S_2O_3Na_2$ 0,1N (controlado).

DOSAJE DE NITROGENIO: se hizo en primer lugar un ensayo cualitativo de Lebesaigne (con la técnica habitual) y como dió ligeramente positivo se efectuó una determinación por el método de Kjeldahl, encontrándose un 0,26% es decir algo más de un quinto del N_2 total hallado en el alga.

DETERMINACION Y DOSAJE DE GLUCIDOS: para tener una idea de los azúcares a determinar se hizo primeramente una marcha con la técnica y reactivos indicados por Militzer (41). La solución necesaria se preparó hidrolizando alrededor de 1 gr. de ficosleide con 100 ml. de CHN al 2,5% por ebullición a refluje durante 2,5 hs.

Para cada ensayo se utilizaron 3-5 ml. de esta solución, neutralizando o no según los casos; de esta manera se encontró que en el hidrolizado solamente había galactosa, porque tratando finalmente con reactivo de fenilhidrazina se obtuvieron cristales típicos de galactosazona (se compararon con otros obtenidos a partir de galactosa pura). Este reactivo se preparó como lo indican Wattiez y Sternon (42) de la siguiente manera:

- 10 gr. de fenilhidrazina
- 10 gr. de ácido acético glacial
- 20 gr. de acetato de sodio
- 1 ml. de solución al 30% de SO_2Na
- Agua para llevar a 100 ml.

Se entibió a baño maría y filtró por filtro de pliegues, usándose 20 ml. de reactivo con 50 ml. de solución neutra de hidrolizado calentando luego 1 hora en baño maría hirviendo.

DOSAJE DE GALACTOSA: determinada su presencia se decidió hacer el dosaje de galactosa por el método de Shaffer-Somogy para azúcares reductores (43). A tal efecto se hidrolizaron 0,7379 gr. de ficecoleide con 250 ml. de ClH al 2,5% hirviendo a reflujó durante 2,5 hs., se dejó enfriar, neutralizó con KOH y llevó a 500 ml. adicionándose luego de 1 ml. de fenol lo que permitió conservar esta solución en buen estado durante bastante tiempo.

Se prepararon también cinco soluciones de galactosa con 0,098 gr/l, 0,198 gr/l, 0,296 gr/l, 0,396 gr/l y 0,496 gr/l respectivamente, adicionadas de unas gotas de fenol.

La técnica seguida fué la siguiente:

En un tubo de ensayos de Pyrex, (de 25 x 200 mm.), se vertieron 5 ml. de la solución de hidrolizado y 5 ml. de reactivo de cobre lavando con ella la solución de azúcar de las paredes del tubo de ensayos. Se agitó el tubo suavemente para mezclar bien el contenido y se le tapó con un tapón de goma provisto de un bulbo de vidrio sellado para evitar el acceso de aire. Se prepararon de esta manera cinco tubos más, cada uno con 5 ml. de una de las soluciones de galactosa y 5 ml. de reactivo y, finalmente, un último tubo como blanco con 5 ml. de agua y 5 ml. de reactivo (los volúmenes medidos exactamente). Todos los tubos se sumergieron en un baño maría en franca ebullición manteniéndolos durante quince minutos, se los retiró al cabo de este lapso colocándolos en agua fría hasta que alcanzaron la temperatura de 30°C. A cada uno de los tubos se agregaron entonces 2 ml. de solución de IK al 2,5%, 2 ml. de solución de Cu_2O al 2,5% y 5 ml. de SO_4H_2 N y, después de taparlos nuevamente, se los agitó para disolver el Cu_2O e I_2 formado dejándolos luego durante 5 - 10 minutos. Se lavaron los bulbos y las paredes de los tubos con agua destilada, titulándose entonces el exceso de I_2 con solución 0,005 N de $\text{S}_2\text{O}_3\text{Na}_2$ usando 1 ml. de solución al 1% de almidón soluble hacia el final.

Los resultados obtenidos fueron:

Solución de galactosa %	Vol. ml.	Galactosa mg.	S ₂ O ₇ Na ₂ 0,005 N gastado ml.	S ₂ O ₇ Na ₂ 0,005 N correspondiente a galactosa ml.
0,098	5,02	0,492	21,73	2,69
0,198	5,02	0,992	18,56	5,86
0,298	5,02	1,486	15,14	9,28
0,396	5,02	1,975	12,28	12,18
0,496	5,02	2,490	9,47	14,95
Muestra I	5,02	?	4,48	19,92
Muestra II	5,02	?	4,52	19,92
Centigo	--	--	24,42	--

de los que resulta:

Muestra I 49,4%
 Muestra II 49,2% Promedio 49,3% de galactosa.

DONAJE DEL SULFATO TOTAL: se hizo hidrolizando unos 3,0 gr. de floculoide con 100 ml. de HCl al 5% por ebullición a reflujo durante 8 horas; se dejó enfriar, filtró, lavó el filtro y licó el líquido a 500 ml. con agua destilada. Se precipitó el SO₄²⁻ con Cl₂Ba sobre los ml. de la solución obtenida.

RELACION SO₄²⁻ TOTAL/SO₄²⁻ CENIZAS: tomando los valores hallados 13,36% y 29,55% se tendrá:

$$SO_4^{2-} \text{ total} / SO_4^{2-} \text{ cenizas} = \frac{29,55}{13,36} = \frac{2,21}{1}$$

es decir que muy aproximadamente esta relación sería 2:1.

En resumen: las características químicas determinadas del floculoide de la Irdea Jordana son las siguientes:

Cenizas: 1,83%. Análisis de las cenizas		SO ₄ ²⁻ : 62,0% sobre cenizas
		Na ⁺ : 26,0%
		K ⁺ : 7,5%

Nitrógeno: 0,26%

Galactosa: 49,3%

Sulfate total: 29,55%

DAIRY III

PROPIEDADES FISICAS:

Poder rotatorio: se lo determinó sobre una solución al 0,432% a 25°C con luz amarilla de sodio. Obteniéndose:

$$\alpha_D^{25} = +63,5 \text{ en agua. (C = 0,432).}$$

Se trabajó con un aparato de Bellingier & Stanley.

Viscosidad: se la determinó con un viscosímetro de Ostwald calibrado con solución de glicerina al 80% cuya viscosidad es de 60 centipoises (34), tomándose los tiempos con precisión de 1/5 de segundo. Se trabajó sobre tres soluciones de ficocoloide:

Concentración %	Temperatura °C	Densidad g/cm ³	Viscosidad centipoises
0,693	22,7	1,0064	36,6
0,432	22,7	0,9993	25,6
0,865	30	1,0018	82,8

También se determinó la viscosidad de la solución al 0,693% tratada previamente con un 1% de carbón activo durante 1 hora (se la llamó "decolorada"; el objeto de esta operación era el de obtener una solución suficientemente limpia como para determinar el poder rotatorio; efectuándose la determinación de la viscosidad antes y después del tratamiento con carbón;

Concentración:	0,693%
Temperatura:	22,7°C
Densidad:	0,9970 gr/cm ³
Viscosidad:	25,1 centipoises

Es evidente que el carbón arrastra parte de la sustancia contenida en la solución.

pH: se hicieron medidas sobre varias soluciones con un potenciómetro Leeds-Northrup cuyo punto de pH = 7 se ajustó con una solución preparada según Clark y Lubbs (44) con 29,63 ml. de HCl a N/10.

50 ml. de solución de PO_4H_2K

Agua para completara 100 ml.

Pero los resultados obtenidos son muy irregulares variando de un día a otro salvo en una solución. Las cifras que se dan a continuación se obtuvieron en días sucesivos:

	Soluciones %	Temperatura °C	pH
1	0,853	28,5	5,05
	0,693	27	5,9
	0,432	25	6,15
2	0,865	25	6,35
3	1,177	20,5	5,71
	0,865	20,5	6,80
	0,847	20,5	6,40
4	0,847	25	6,42

Como se ve solamente la solución de ficocoloide al 0,847% da valores utilizables.

PROPIEDADES QUIMICAS

REACCIONES DE PRECIPITACION: se estudiaron unicamente dos, una de valor cualitativo solamente y la otra útil para el dosaje.

Precipitación con safranina: en base al trabajo de Justin-Mueller (22) (ver pag. 34 y s.s.) se decidió estudiar el comportamiento del ficeocoloide de la *Iridia Cordata* frente a la safranina. En un ensayo previo se observó la formación de un precipitado rojo flocofrente al agregar unas gotas de solución de safranina a una solución de ficeocoloide, por esto se prepararon soluciones de dilución crecientes con las que se determinó en forma aproximada la sensibilidad de la reacción.

Técnica: a 2 ml. de solución de ficeocoloide se agregó una gota de solución de safranina al 1% (en agua), luego de 5 minutos de agitación suave se observó con iluminación transversal.

Resultados:

	Solución 1,65 %	+++
•	0,165 %	++
" "	0,3165 %	+
•	0,00165 %	⊕
" "	0,000165 %	-
" "	0,0008 ≈ 0,001 %	⊕

+++	•	precipitado	claramente	visible
++	" "	" "	" "	visible sobre fondo blanco
+	" "	" "	" "	" " " " con iluminación fuerte
⊕	" "	" "	" "	rojo " " "

Es decir que con la safranina es posible indicar la presencia de 0,002 mg. de ficeocoloide.

Precipitación con clorhidrato de benzidina: como ensayos cualitativo indicaban que el clorhidrato de benzidina era capaz de eliminar en forma completa el ficeocoloide presente en una solución, se adaptó el método descripto en la bibliografía (15) para la carragenina por considerarle de utilidad para dosajes.

La técnica seguida es la misma que la indicada en la pag. 37, sólo que se preparó una solución de ficeocoloide con un peso de 2 gr/l. de la que se usaban 100 ml. para cada precipitación. Respecto de la técnica se comprobó que en medio ácido indicado es el mejor, que la filtración es mucho más rápida por filtro de pliegues que por filtro común o por buchner y succión y, que bastaban tres lavados

con solución saturada de sulfato de benzidina para así lavar completamente el Cl⁻ del precipitado. Una detección por duplicado no insu-
ría más de dos horas.

En primer lugar se determinó un factor para convertir ml. de HONa N/10 en mg. de ficocoloide, para ello se promediaron 3 determinaciones obteniendo:

- I 4,93 ml. HONa N/10
- II 4,89 ml. HONa N/10 Promedio 4,93 ml. HONa N/10
- III 4,92 ml. HONa N/10

$$\frac{0,18346 \text{ gr.}}{4,93 \text{ ml.}} = 0,0372 \text{ gr/ml.}$$

Ensayando el filtrado con safranina (un ensayo con safranina sobre so-
lución de clorhidrato de benzidina no indicó formación de precipita-
do) se observa un precipitado que correspondería a una concentración
superior al 0,02 % es decir que en los 250 ml. obtenidos habría más
de 0,005 gr. y como se partió de 0,18 gr. aproximadamente la pérdida
debe estar alrededor del 5%.

La utilidad del factor encontrado se confirmó pesando
cantidades conocidas de ficocoloide, disolviéndolas en agua y precipi-
tando. De esta manera se obtuvieron los siguientes resultados:

Ficocoloide pesado gr.	Titulación HONa N/10 ml.	Ficocoloide calculado gr.	Recuperación %
0,2695	7,07	0,2627	97,5
0,1853	5,23	0,1941	96,4
0,2336	6,31	0,2347	99,63

Es decir que se está dentro de lo indicado por el ensayo con safranina.
Por otra parte evaporando los filtrados de estas operaciones a pe-
queño volumen y agregando un exceso de alcohol isopropílico no se ob-
servó formación de un precipitado apreciable.

Finalmente, si bien una recuperación del 95 % no es el desideratum, el
hecho de poder trabajar con soluciones muy diluidas (2 gr/l) unido
a la sencillez y rapidez de las operaciones, hacen que sea útil tener
en cuenta este método para resolver problemas que requieran el dosaje
de este ficocoloide.

El precipitado obtenido es completamente soluble en
agua a 80° C .

Reacción con yodo: Agregando unas gotas de solución de yodo iodurada
no se observó la aparición de color azul.

Reacción con carbazol: Por considerarlo de interés general se efectuó
un ensayo con carbazol con resultado positivo, es decir que a la lista

de hidratos de carbono que según Egami Huzio (37) reaccionan con el carbazol hay que agregar al del ficocoloide de la Iridea Cordata.

Preparación del ácido libre: Se hicieron en dos experiencias basadas en los datos de dos trabajos de la bibliografía (3) y (4), por diálisis de soluciones de ficocoloide de concentración conocida.

Experiencia I: 1,760 gr. de ficocoloide seco se disolvieron en 150 ml. de agua destilada y se colocaron en una bolsa de tela avión, previamente embebida en solución de colodio y dejaba secar al aire, que se sumergió en un recipiente por el que circulaba agua de cañilla. Se mantuvo la diálisis durante 30 horas, se retiró luego la bolsa y el líquido residual se lo concentró hasta 50 - 60 ml. calentado a baño maría.

Sobre el concentrado se vertieron 300 ml. de alcohol isopropílico obteniéndose un precipitado flocoulento (semejante al que da el ficocoloide) que se filtró y lavó con etanol y éter etílico en la forma ya conocida. Se obtuvieron de esta manera (después de secar en estufa a 50°C) 0,8260 gr. de una sustancia algo distinta al ficocoloide (no es una masa fibrosa como éste). Desafortunadamente la pequeña cantidad de sustancia obtenida no permitió efectuar más de un ensayo de los dos que se habían planeado (pH y cenizas), por lo tanto se calculó la muestra en óxcula de platino en las condiciones ya establecidas (pág. 98). Se obtuvieron así 0,1158 gr. de cenizas a partir de 0,7422 gr. de diálisis; es decir que la sustancia obtenida por diálisis pesa un 16,3% de cenizas, evidentemente menor al 21,83% obtenido por el ficocoloide.

Experiencia II: se efectuó sobre 1,270 gr. de ficocoloide en las mismas condiciones que I pero en lugar de usar una bolsa de tela se usó una bolsa de papel celofán.

Se obtuvieron esta vez 1,1682 gr. de una sustancia también semejante al ficocoloide y cuyas cenizas resultaron ser 0,1519 gr. a partir de 0,7422 gr. o sea un 20,5%.

Aparentemente la bolsa de tela avión impregnada en colodio es más eficaz como dializador que el papel celofán.

Hidrólisis alcalina: aquí se darán solamente las técnicas y los resultados obtenidos dejándose para el último capítulo su interpretación.

Se efectuaron dos series de experiencias:

I) En un frasco de Erlenmeyer se colocaron 1,8346 gr. de ficocoloide seco y 350 ml. de HONa N calentado a baño María a 114°C. A las 6 hrs. se separaron 100 ml. (medidos exactamente) determinándose en el SO_4^{2-} por precipitación con Cl_2Ba (en las condiciones habituales) y a las doce horas se hizo lo mismo sobre el resto.

Al mismo tiempo se trataron en otro recipiente 1,945 gr. de ficocoloide seco con 150 ml. de HONa N en las condiciones mencionadas durante 12 horas determinando luego el SO_4^{2-} libre presente.

II) En un frasco de Erlenmeyer de 2 litros de capacidad se colocaron

4,9202 gr. de ficolloide seco y 1 litro de H₂O l., se lo introdujo entonces en un baño de aceite que se mantuvo a 96 - 98°C durante todo el tiempo que duró la experiencia, cada 24 horas se retiraron 100 ml. del líquido (previa agitación) determinándose en ellos el SO₄²⁻ libre presente. Los resultados obtenidos fueron:

Experiencia	Temper. °C	Tiempo hs.	Sulfato presente %	Hidrólisis %
I	104	6	10,2	34,5
		12	15,9	57,4
		18	20,9	70,7
II	96-98	24	15,7	53,2
		48	18,7	62,6
		68	20,1	68,2
		110	23,1	78,1
		118	23,1	78,1
		134	24,2	82,0
		158	24,2	84,2

Es evidente que la temperatura debe haber influido en la rapidez de la hidrólisis. Por otra parte estos resultados coinciden con los que obtuvieron Duchesne, Mercival y Perival (11) para la carragenina, ver pág. 40.

Además se hizo una determinación de SO₄²⁻ directamente sobre una muestra de ficolloide por la técnica habitual ya que al exigir ésta una digestión más o menos prolongada a cierta temperatura y en medio ácido, puede producirse una hidrólisis apreciable. Efectivamente, sobre 0,642 gr. de sustancia se encontró un 7,95% de SO₄²⁻, es decir que todas las determinaciones anteriores están afectadas de un error práctico incontrolable (por este método) porque las concentraciones de las soluciones no son las mismas a lo largo de la experiencia. De todas maneras se deduce de los resultados obtenidos que en medio alcalino la hidrólisis es mucho más lenta que en medio ácido y progresa regularmente con el tiempo.

CAPITULO VI

NATURALEZA QUIMICA DEL FIGOCOLOIDE

La única forma de llegar a conclusiones definitivas en este aspecto del problema es mediante experiencias de acetilación y metilación, semejantes a las que se indicaron en la primera parte para la carragenina y la iridoficina de Hassid. Por falta del instrumental necesario no fué posible intentar estos ensayos, por lo tanto se decidió efectuar todas las determinaciones que diesen una idea acerca de la estructura molecular del ficocoloide de la *Iridaea Cordata* para, de esta manera, preparar el camino a un futuro estudio en que mediante las experiencias indicadas se den las respuestas definitivas.

Las determinaciones hechas fueron:

Dosaje de SO_4^- total y SO_4^- en cenizas. (Ver pag. 97)

Dosaje de Na^+ y K^+ en cenizas (Ver pag. 96).

Preparación del ácido libre (Ver pag. 102).

Hidrólisis alcalina (Ver pag. 103).

Oxidación con IO_4H .

Salvo la última, las restantes experiencias ya fueron descritas, se pasará entonces directamente a describir la oxidación con IO_4H ; como ya se vió en la bibliografía (4), (27), y (28) esta reacción es útil para determinar el tipo de unión entre las unidades hexosa de un polisacárido. En el caso presente se preparó una solución 0,47M de IO_4H disolviendo IO_4Na en la cantidad necesaria de SO_4Na , que titulada con $\text{S}_2\text{O}_3\text{Na}_2$ N/10 según las indicaciones de Scott (45) dió la siguiente equivalencia 1 ml. $\text{S}_2\text{O}_3\text{Na}_2$ N/10 0,00285 gr. de ácido periódico lo que es igual a la indicación de Scott correspondiente a $\text{IO}_4\text{H} \cdot \text{H}_2\text{O}$. De la solución así obtenida se tomaron 4 porciones de 50 ml. (exactos) que se vertieron en sendos frascos con tapón esmerilado, a los que se agregó 1 gr. de carragenina (preparada por Luzzati, papel de filtro (S.S. 589), agar-agar y ficocoloide de *Iridaea Cordata* respectivamente. Se mezclaron bien y se dejaron en reposo a temperatura ambiente; cada 24 hs. se retiraron 0,5 ml. (previa agitación) que luego de ser adicionados de 10 ml. de SO_4Na N y 1 gr. de IK sólido se tituló el I_2 formado con $\text{S}_2\text{O}_3\text{Na}_2$ N/100 (siempre al mismo y con la misma bureta ya que los datos tienen valor comparativo agregándose 1 ml. de solución al 1% de ongrudo de almidón hacia el final.

Los resultados se dan en la página siguiente.

Tiempo hs.	Ficocoloide ml. $S_2O_3Na_2$ N/100	Papel de filtro ml. $S_2O_3Na_2$ N/100	Agar-agar ml. $S_2O_3Na_2$ N/100	Carragenina I. ml. $S_2O_3Na_2$ N/100
24	14,55	13,32	13,55	14,45
48	14,26	12,61	13,60	13,02
72	14,26	12,51	13,12	12,14
96	14,26	12,45	13,14	13,02
118	14,26	12,43	13,16	12,95
156	14,03	12,42	12,87	12,75
190	13,40	12,04	12,11	12,47

Es evidente de estas cifras la estabilidad del ficocoloide de la *Iridia Cordata* frente al IO.H durante practicamente 160 hs ya que luego de este lapso parece iniciarse la degradación de los grupos terminales.

DISCUSION

Los resultados obtenidos sugieren las siguientes consideraciones:

a) La ausencia de SO_4^{2-} libre en una solución de ficocoloide unida al elevado porcentaje de cenizas y a la relación de SO_4^{2-} total/ SO_4^{2-} cenizas aproximadamente igual a 2:1, indican que el ficocoloide de la *Iridea Cordata* sería un sulfato étereo semejante a la carragenina y a la iridoficina de Hassid.

b) La disminución de cenizas por diálisis y la presencia de Na^+ y K^+ como únicos cationes en las cenizas indican que dicho sulfato étereo sería una sal de Na^+ y K^+ .

c) La molécula del polisacárido está formada por unidades de galactosa que según lo que parece indicar la oxidación con ácido periódico estarían ligadas entre sí por uniones 1-3 semejantes a las de la carragenina y el agar-agar.

d) La lentitud de eliminación del SO_4^{2-} por hidrólisis en medio alcalino parecería indicar que el grupo sulfato estaría situado en el C4 a semejanza con la carragenina (11).

e) El ficocoloide de la *Iridea Cordata* presenta con respecto al extraído por Hassid de la *Iridea Laminaroides*, diferencias tanto en la composición cuantitativa como en la probable posición de los grupos sulfatos y en el tipo de unión entre las unidades galactosa.

f) Los resultados obtenidos indican que; mientras el ficocoloide de la *Iridea Laminaroides* tiene como catión preponderante el sodio y sólo pequeñas cantidades de calcio y magnesio (ver pág. 61), el de la *Iridea Cordata* contiene Na^+ y K^+ en una relación atómica Na^+/K^+ de 5:1, estando ausentes los metales alcalino-térreos; el contenido en galactosa es superior en el ficocoloide aislado por Hassid (54,3% contra 49,95%) y, el contenido en nitrógeno es del 0,26% en el ficocoloide de la *Iridea Cordata* y nulo en el ficocoloide de la *Iridea Laminaroides*.

g) Un detalle interesante lo constituye el hecho de que el azufre encontrado en el ficocoloide estudiado (que se expresó como SO_4^{2-} total) es inferior al que correspondería a una molécula de polisacárido que contuviese un grupo sulfato por cada unidad de arhidro-galactosa.

En definitiva; todo parece indicar que el ficocoloide aislado de la *Iridea Cordata* es diferente al de la *Iridea Laminaroides* y al del *Chondrus Crispus*.

Pero, no se lo ha querido identificar con un nombre determinado hasta tanto no quede establecido en forma definitiva si se trata verdaderamente de una sustancia nueva. Para ello será necesario reali-

zar investigaciones más profundas sobre la estructura molecular y sobre las características fisicoquímicas de estos tres electrolitos coloidales, como los denominara Harwood (9).

CONCLUSIONES

1º) Siguiendo la técnica que estableciera Luzzati en su trabajo de tesis, se ha extraído el floculoide de la *Iridea Cordata*, se han determinado algunas características físicas y químicas y se efectuaron ensayos tendientes a dilucidar su estructura.

2º) De las determinaciones efectuadas se deduce que se trata de un sulfato étereo de un polímero de la galactosa, parcialmente salificado con sodio y potasio, que contiene además un 0,26% de nitrógeno.

3º) Dicha estructura es semejante a la de la carragenina y a la iridoficina de Hassid, pero sólo en su aspecto cualitativo.

4º) El ensayo de oxidación con ácido periódico, indica que las uniones entre las moléculas de anhidro-galactosa se establecen entre los carbonos 1 y 3 de igual forma que en el agar-agar y la carragenina.

5º) El grupo sulfato se encuentra muy probablemente unido al O_4 como parece indicarlo la hidrólisis alcalina.

6º) De todo lo expresado se deduce que muy probablemente el floculoide de la *Iridea Cordata* es diferente al de la *Iridea Laminaroides* y a la carragenina, siendo necesario insistir con nuevos estudios sobre la estructura para poder decidirlo en definitiva.

7º) Finalmente, se ha comprobado que el método de ensaje de carragenina por precipitación con clorhidrato de benzidina es aplicable al floculoide de la *Iridea Cordata*, estableciéndose que 1 ml. de $HONa$ N/10 = 0,0372 gr. de sustancia seca, y también que este floculoide reacciona con la safranina precipitando de igual manera que la carragenina, siendo su límite de sensibilidad 0,002 mg.

BIBLIOGRAFIA

En cada caso se indica la biblioteca en que se encontró la publicación correspondiente.

- 1) T.M. CHASE. Algas útiles. Annual Report of the Smithsonian Institute. (1941). 401. (Soc. Cientif. Arg.).
- 2) DANGEARD. Traité d'algologie 1937. F.C.E.N.
- 3) HASSID. Extracción de un éster sulfúrico de galactano. (I) J. Am. Chem. Soc. 55 4163 (1933) AQA.
- 4) T. DILLON y P. O'COLLA. Constitución de la carragenina Proc. Roy. Irish Acad. 54 B. Nº4 51-64 (1951) F.C.E.N.
- 5) P. HAAS y T.G. HILL. Acerca del Carrageen. Ann. Applied Biol. 7 352 (1920) (Min. Agric. y Ganad.).
- 6) J. ALEXANDER. Colloid Chemistry. New York. Reinhold Publ. Co. Tom VI 660 (1946).
- 7) M.R. BUTLER. Algunas propiedades del polisacárido complejo extraído del Chondrus Crispus. Biochemical J. 28 759 (1934) AQA.
- 8) B. RUSSELL-WELLS. Constitución de la pared celular del Chondrus Crispus Biochemical J. 16 578 (1922). Bibl. de la Fac. de Med.
- 9) HARWOOD. El electrolito coloidal extraído del carrageen (Chondrus Crispus) J. Chem. Soc. 123 2254 (1923) AQA.
- 10) BUTLER. Acerca del N₂ de la carragenina. Biochemical J. 29 1025 (1935) AQA.
- 11) PERCIVAL, PERCIVAL y BUCHANAN. El polisacárido del Chondrus Crispus. Primera Parte. J. Chem. Soc. 1943 51 AQA.
- 12) YOUNG y RICE. El ácido 2-ceto-d-glucónico en el polisacárido del Irish Moss. J. Biol. Chem. 164 35 (1946) AQA.
- 13) SMITH y COOK. Fraccionamiento de la carragenina Arch. of Biochem and Bioph. 45 232 (1953) Fac. Med.
- 14) R.C. ROSE. Extracción, Fraccionamiento y valoración de la carragenina. Canadian J. of Research 28 E 202 (1950) Fac. de Agron. Vet.
- 15) HAAS y RUSSELL-WELLS. El mucilago del Irish Moss y un método para su determinación. The Analyst 52 265-269 (1927). AQA.

- 16) LUZZATI. Extracción del floculoide de la *Iridaea Cordata*. Tesis 1953. F.C.E.N.
- 17) HAAS. Los sulfatos estéreos del *Chondrus Crispus*. *Biochemical J.* 15 459 (1921).
- 18) HAAS. P. y RUSSELL-WILLS, B. Acerca del carrageen (Hidrólisis del mucílago del carrageen) *Biochim. J.* 23 426 (1929)AQA.
- 19) RICE, F.A.H. Efectos de disolventes y temperaturas en la viscosidad de la carragenina y efectos de los disolventes en su gelificación inicial. *Can. J. Research* 24 B 15 (1946) AQA.
- 20) RICE, F.A.H. Un método para medir el poder de estabilización de la carragenina *Can. J. Research* 24 B 20 (1946) AQA.
- 21) ROSE y COOK. El poder de suspensión y la viscosidad de la carragenina. *Can. J. Research* 27 F 323 (1949). Fac. agron. y vet
- 22) JUSTIN-MUELLER. Reacción de los colorantes azínicos y tioazínicos con el mucílago del *Chondrus Crispus* *Bull. Soc. Chim. de France* 35 390 (1924). Fac. de Med.
- 23) EWE, George. El azul de metileno como precipitante del Irish Moss *J. Am. Pharm. Assoc.* 19 569-70 (1930). Fac. de Med.
- 24) JOHNSTON y PERCIVAL. Los polisacáridos del Carragen III. Confirmación de la unión 1-3 en la carragenina y a la unión del-galactosa de un fragmento resistente. *J. Chem. Soc.* 1950 1994. AQA.
- 25) MALAPADE. Oxidación de polialcoholes con ácido periódico. *Comptes Rendus Acad. des Sciences* 186 382 (1928) AQA.
- 26) JACKSON y HUDSON. Aplicación de la rotura de cadenas glucosídicas por oxidación con ácido periódico al almidón y a la celulosa. *J. Am. Chem. Soc.* 59 2049 (1937) AQA.
- 27) BARRY, DILLON y Mc. GETTRICK. El ensayo con ácido periódico en el estudio de la estructura de polisacáridos. *J. Chem. Soc.* 1942 183. AQA.
- 28) BARRY. Degradación regulada de polisacáridos con uniones 1-3. *Nature* 132 537 (1943).AQA.
- 29) WALKER y DAY. Extractos de Irish Moss como sustitutos del agar en los medios de cultivo bacteriológicos. *Food Research* 8 435 (1943) *Bibl. de la Fac. de Agr.*
- 30) ELLEGWOOD. Un estudio fitoquímico de la *Iridaea Laminaroides*. *J. Am. Pharm. Assoc.* 28 294 (1939). Fac. de Med.
- 31) HASSID. Extracción de un ester sódico sulfúrico de galactano de

- Iridea Laminaroides. J. Am. Chem. Soc (II) 55 4163 (1933) F.C.E.N.
- 32) HASSID. Carbohydrates in Iridea Laminaroides. Plant Physiology 11 461 (1936). Inst. Fitot. Sta. Catalina.
- 33) FERNANDEZ y GALLONI. Trabajos Prácticos de Física (1947) pág. 149.
- 34) HODGMAN. Handbook of Chemistry and Physics 30ed. (1947) pág. 1742.
- 35) JACOBS, MORRIS. "The Chemical analysis of food and food products N.Y., Van Nostrand, Co. 1951 p. 486. AQA.
- 36) MORI y TUTIYA. Estudio de mucilagos de Rhodophyceas. J. of the Agric. Chem. Soc. Japan. 14 164 (1938).AQA.
- 37) EGAMI, HUZIO. Identificación y determinación de glúcidos con carbasol J. Jap. Chem. Soc. 62 277-80 (1941). AQA.
- 38) SCOTT. Standard methods of Chemical Analysis pág. 215. Determinación de SO_4^{2-} en cenizas 5ª Ed. N.Y. 1939.
- 39) WISS. Wood Chemistry. Ed. 1946, Pág. 611-24. (véase Determinación de Pentosanes).F.C.E.N.
- 40) TREADWELL-HALL. Analytical Chemistry. Primera Parte. Wiley & Sons. N.Y. 1937 AQA.
- 41) MILITZER. Algunos métodos de análisis cualitativo de Hidratos de Carbono. Marcha sistemática. J. Chem. Ed. 18 25 (1941). AQA.
- 42) WATTIEZ y STERNON. Elements de Chimie Vegetale. Paris 1942, pág. 332. Inst. Tecnol.
- 43) BROWNE y ZIEFRAN. Physical and Chemical methods of sugar analysis. N.Y. 1939. Págs. 827, 836 y 846-49. Inst. Tecnol.
- 44) KOLTHOFF y LAITMEN. p H and electrolitrations. Wiley and Sons N.Y. 1948.
- 45) SCOTT. (op. cit.) pág. 244.

----- X -----

Soc. Cientif. Arg.: Sociedad Científica Argentina.

F.C.E.N.: Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires.

AQA.: Asociación Química Argentina.

Min. Agric. y Ganad.: Ministerio de Agricultura y Ganadería de la Nación.

Fae. de Med.: Facultad de Medicina de la Universidad de Buenos Aires.

Fac. de Agron. Vet.: Facultad de Agronomía y Veterinaria de la Universidad de Buenos Aires.

Inst. Fitot. Sta. Catalina: Instituto Fitotécnico Santa Catalina de la Universidad de Eva Perón. Lavallol Prov de Buenos Aires.

Instit. Tecnol.: Instituto tecnológico del Ministerio de Industria de la Nación.

[Handwritten signature]

[Handwritten signature]