

UNIVERSIDAD DE VALLADOLID

AREA DE MICROBIOLOGIA. FACULTAD DE MEDICINA.



UTILIDAD DEL ANALISIS TERMICO EN MICROBIOLOGIA.
APLICACION DE LAS TECNICAS TG-DTG, DTA Y DSC EN LA
CARACTERIZACION DE POLISACARIDOS DE PAREDES FUNGICAS

MARIA DEL CARMEN RAMOS SANCHEZ

VALLADOLID, 1990

UNIVERSIDAD DE VALLADOLID

COMISION DE DOCTORADO

FECH. 08 OCT. 1990, N.º 90

**"UTILIDAD DEL ANALISIS TERMICO EN MICROBIOLOGIA. APLICACION
DE LAS TECNICAS TG-DTG, DTA Y DSC EN LA CARACTERIZACION DE
POLISACARIDOS DE PAREDES FUNGICAS"**

**MEMORIA PRESENTADA POR LA LICENCIADA
MARIA DEL CARMEN RAMOS SANCHEZ PARA OPTAR
AL GRADO DE DOCTOR EN MEDICINA Y CIRUGIA**

VALLADOLID, A 24 DE SEPTIEMBRE DE 1990.

María del Carmen Ramos Sánchez



FACULTAD DE MEDICINA
AREA DE MICROBIOLOGIA
UNIVERSIDAD DE VALLADOLID



ESCUELA TECNICA SUPERIOR
DE INGENIEROS INDUSTRIALES
UNIVERSIDAD DE VALLADOLID

ANTONIO RODRIGUEZ TORRES, Catedrático de Microbiología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valladolid, y

JESUS MARTIN GIL, Catedrático de E.U. de Química General y Orgánica y Profesor Titular de Química Inorgánica de la Escuela Técnica Superior de Ingenieros Industriales de la U. de Valladolid,

CERTIFICAN:

Que han dirigido y codirigido la Tesis titulada "Utilidad del Análisis Térmico en Microbiología. Aplicación de las técnicas TG-DTG, DTA y DSC en la caracterización de polisacáridos de paredes fúngicas", de la que es autora Dña. MARIA DEL CARMEN RAMOS SANCHEZ, Licenciada en Medicina y Cirugía.

El trabajo investigador ha sido realizado en el Area de Microbiología de la Facultad de Medicina de Valladolid, en la Sección de Química Inorgánica y Análisis (Laboratorio de Análisis Térmico) de la E.T.S.I.I. de la Universidad de Valladolid, y en la Unidad Estructural de Microbiología Aplicada del Centro de Investigaciones Biológicas del C.S.I.C. en Madrid.

La original aportación del método termolítico en Taxonomía, su exitosa aplicación a la caracterización de polisacáridos fúngicos (con el logro de una secuencia inédita de estabilidades térmicas en química de carbohidratos) y las prometedoras posibilidades de estos resultados en Inmunología, hacen que consideremos la presente Tesis con méritos suficientes para que su autora pueda aspirar al grado de Doctor en Medicina y Cirugía.

Y para que así conste, firmamos la presente en Valladolid a treinta de octubre de mil novecientos noventa.

A Javier, Pablo y Clara.

Agradecimientos:

Al Prof. Antonio Rodríguez Torres, por aceptar la Tutoría de la presente Tesis y dirigir su realización.

Al Prof. Jesús Martín Gil, co-director del trabajo, por su constante asesoramiento en análisis térmico y química de carbohidratos.

Al Prof. Juan Antonio Leal Ojeda, del Centro de Investigaciones Biológicas del C.S.I.C., por la extraordinaria acogida dispensada en su laboratorio, su enseñanza personalizada de los métodos de trabajo en polisacáridos fúngicos y su generosidad en la entrega de muestras.

Al Prof. Jean-Paul Latgé, por las facilidades de estancia en la Unidad de Micología del Instituto Pasteur.

A los Profs. Ricardo Landínez y Cristina Merino, por iniciar mi formación científica.

A los Dres. Begoña Gómez-Miranda, Carmen Guerrero, Alicia Prieto y Francisco J. Martín Gil, por sus orientaciones y consejos.

Al Lcdo. Manuel Sánchez Valiente, por su ayuda técnica.

Al Fondo de Investigaciones Sanitarias de la Seguridad Social por la concesión de una Beca de Intercambio con los países de la CEE y COST (89/2576) y otra de Ampliación de Estudios (90/969).

"UTILIDAD DEL ANALISIS TERMICO EN MICROBIOLOGIA. APLICACION DE LAS TECNICAS TG-DTG, DTA Y DSC EN LA CARACTERIZACION DE POLISACARIDOS DE PAREDES FUNGICAS"

	Pag.
1. INTRODUCCION	
Planteamiento general de la Memoria y proyección práctica de sus objetivos.....	1
2. PARTE TEORICA	
A. Componentes celulares utilizados en Quimiotaxonomía...	3
B. Significación de los polisacáridos en la composición química y en la estructura de las paredes fúngicas	
B.1. Consideraciones generales.....	9
B.2. Composición química de la pared. Su utilidad como marcador taxonómico.....	17
B.3. Organización de los polímeros en la pared.....	28

C. Métodos químicos y técnicas relacionadas para el estudio de la estructura de polisacáridos bacterianos y fúngicos.	
C.1. Métodos químicos para la identificación de los monómeros constituyentes.....	35
Enlace y secuencia.	
C.2. Técnicas cromatográficas, espectroscópicas y citoquímicas para la caracterización de los componentes celulares, especialmente polisacáridos.....	44
D. El Análisis Térmico como método alternativo en la sistematización de bacterias y hongos.	
D.1. Técnicas basadas en la Termogénesis de microorganismos. Utilidad de las curvas microcalorimétricas en la identificación de bacterias....	74
D.2. Técnicas de Termólisis: TG-DTG, DTA y DSC. Sus principios y fundamentos. Precedentes de su aplicación en Microbiología.....	81

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1. Material y métodos.....	109
3.2. Aplicación del Análisis Termogravimétrico, del Análisis Térmico Diferencial y de la Calorimetría Diferencial de Barrido en la caracterización de polisacáridos fúngicos.	

3.2.1. Resultados del estudio por TG-DTG y su valoración.....	142
3.2.2. Resultados del estudio por DTA y su valoración.....	169
3.2.3. Resultados del estudio por DSC y su valoración.....	183
4. ESTUDIOS COMPARATIVOS	
4.1. Comparación de resultados.....	191
4.2. Consideraciones sobre el grado de utilidad de las diversas técnicas disponibles para el análisis de polisacáridos.....	209
5. CONCLUSIONES.....	213
6. BIBLIOGRAFIA.....	217
7. GLOSARIO.....	232

1. INTRODUCCION

Planteamiento general de la Memoria y proyección práctica de sus objetivos.-

La presente Memoria constituye una aportación totalmente novedosa en el campo de la Microbiología y, especialmente, en el área de la Taxonomía, al introducir las curvas de termolisis como un método rápido de caracterización de polisacáridos de paredes celulares (y extracelulares) en muestras purificadas del orden del miligramo.

Se propone el análisis termogravimétrico derivado (DTG), el análisis térmico diferencial (DTA) y la calorimetría de barrido diferencial (DSC) como técnicas alternativas y complementarias a las de la cromatografía en capa fina (TLC), gas líquido (GLC), líquida de alta presión (HPLC), pirólisis espectrometría de masas (Py-MS), espectroscopía de infrarrojo (IR) y espectroscopía de resonancia magnética nuclear (NMR).

La elección de los polisacáridos de pared y extracelulares como marcadores químicos, frente a otros componentes celulares, ha venido determinada por las exigencias de las técnicas empleadas y la capacidad elucidativa de aquéllos, suficiente para una distinción no sólo a nivel de género (Bartnicki-Garcia, 1968) sino, incluso, a nivel de especie (Leal y cols., 1984; Kroppenstedt, 1988).

Por otra parte, en la decisión de centrar nuestra atención en los polisacáridos fúngicos frente a los bacterianos, han influido varios factores: los polisacáridos fúngicos son mejor conocidos, están siendo objeto de estudio por varios grupos de investigación españoles y, recientemente, han despertado un gran interés debido a su acción antivírica (Cacabelos, 1988) y antitumoral (Whistler y cols., 1986; Chasseing y cols., 1988), singularmente efectiva en el caso de los α - y β -glucanos con uniones lineales tipo (1-3).

2. PARTE TEORICA

A. Componentes celulares utilizados en Quimiotaxonomía

En la mayor parte de las bacterias y hongos los principales componentes celulares, por ejemplo DNA, citoplasma, membrana plasmática y pared celular, son a *grosso modo* los mismos. Sin embargo, las estructuras finas de estos componentes muestran diferencias significativas que son de naturaleza química.

Las variaciones de estos componentes no son las mismas a nivel de los diferentes grupos de bacterias u hongos, sino que, dentro de un mismo grupo, se encuentra siempre el mismo tipo de variación. Tal hecho indica que estos tipos químicos son taxón-específicos y que las diferencias químicas en las células bacterianas y fúngicas son idóneas para clasificación e identificación. La sistematización basada sobre marcadores químicos se conoce con el nombre usual de quimiotaxonomía o quimiosistemática.

Durante las dos últimas décadas se ha producido un rápido desarrollo de métodos químico-físicos con el fin de reducir el tiempo empleado en la identificación y, asimismo, se han introducido métodos automáticos e informáticos que permiten una mayor objetividad en la interpretación de resultados. Usando estas técnicas es posible para un microbiólogo separar y/o identificar mezclas de moléculas químicas encontradas en los diferentes componentes de las células bacterianas y fúngicas.

Los siguientes componentes celulares son los utilizados fundamentalmente en quimiotaxonomía:

Peptidoglicano.- Las bacterias Gram positivas muestran diferencias significativas en los peptidoglicanos de sus paredes celulares mientras que en las bacterias Gram negativas sólo un tipo de peptidoglicano ha sido encontrado hasta ahora.

Además, en las bacterias Gram positivas, no sólo existen diferencias en las secuencias de las cadenas laterales peptídicas y unidades interpeptídicas, sino que también se dan en los tipos de uniones entrecruzadas ("*cross linkages*") de estas cadenas laterales. En 1972, Schleifer y Kandler mostraron que tales variaciones en la estructura del peptidoglicano son taxón-específicas. Por consiguiente, el peptidoglicano es un buen marcador para clasificación e identificación de bacterias Gram positivas. Para este propósito, las paredes celulares deben ser purificadas y el peptidoglicano hidrolizado. La mezcla de aminoácidos resultantes se separa por cromatografía en capa fina y los aminoácidos se visualizan con ninhidrina.

Tipo Acilo.- El llamado esqueleto del peptidoglicano es un heteropolisacárido. Su estructura es idéntica en prácticamente todas las bacterias. Este polisacárido es una combinación de N-acetilglucosamina y ácido N-acetilmurámico que son conectados alternativamente por enlaces glicosídicos β -(1-4). En algunos Actinomicetos y taxa relacionados, el grupo acetilo del ácido N-acetilmurámico es sustituido por un grupo glicolilo. Este grupo glicolilo queda en libertad por hidrólisis ácida de células completas como ácidos glicólicos, susceptibles de reacción con 2,7-naftalindol para dar un color púrpura mortecino.

(Los enlaces del tipo β -(1-4), que confieren compacidad y resistencia al peptidoglicano, también se encuentran presentes en la quitina, que es una poli-N-acetilglucosamina constitutiva de la pared de los hongos).

Polisacáridos de paredes celulares y polisacáridos extracelulares.- Se ha postulado que la relación entre química de paredes y taxonomía puede ser extendida de modo efectivo al nivel de género. En la hidrólisis de células completas de muchas bacterias se han encontrado diferentes azúcares. Estos azúcares son, en su mayor parte, componentes de polisacáridos de paredes celulares. Los estudios de Cummins y Harris en 1956 mostraron entre los *Actinomycetales* diferencias significativas con valor taxón-específico en la distribución de azúcares, si bien, sorprendió la incidencia conjunta de los azúcares arabinosa y galactosa en *Corynebacterium*, *Nocardia* y *Mycobacterium*. Posteriores estudios en este campo fueron llevados a cabo por Lechevalier y Lechevalier, 1970, mostrando el valor de otros azúcares en la taxonomía de los *Actinomycetales*. En 1980, Haverkamp, Meuzelaar, Beuveri, Boonekamp y Tiesjema, diferenciaron los polisacáridos capsulares conteniendo ácido siálico de los grupos B, C, W-135 e Y de *Neisseria meningitidis*, utilizando la pirólisis espectrometría de masas.

En hongos, el análisis de los polisacáridos de la pared celular (formada por polímeros de hexosas y hexosaminas) ha tenido y tiene un interés superior al examen de otros componentes celulares, porque ofrece claves sencillas para elucidar la posición taxonómica de los diferentes *taxa*. La significación filogenética de la distribución de la quitina puede ponerse de manifiesto, por

ejemplo, en la distinción entre los Oomicetos y los Zigomicetos: la pared celular de los primeros está constituida principalmente por glucanos no quitinosos, mientras los segundos poseen considerables cantidades de quitina en sus paredes (Bartnicki-Garcia, 1970). Consideración ésta, que motivó a Gerdemann y Trappe, en 1974 y 1975, a clasificar las *Endogonaceae* dentro de los Zigomicetos.

La presencia o ausencia de nigerano en *Aspergillus* y *Penicillium* también tiene utilidad filogenética, sugiriéndose que algunos de estos taxa podían no ser naturales (Bobbitt y Nordin, 1978). El estudio de las fracciones de pared solubles en álcalis en el género *Penicillium* (Leal y cols., 1984) y sus estados teleomórficos, *Eupenicillium* y *Talaromyces* (Gómez-Miranda y cols., 1988), ha permitido clasificar especies diferentes en dos grupos naturales dependiendo que el componente predominante fuera un α -D-glucano (posiblemente un S-glucano) o un polisacárido β -enlazado rico en galactofuranosa y con poder antigénico.

Asimismo, la presencia de α -(1-6)-galactosaminogalactano, característica constitutiva común de polímeros extracelulares en el género *Aspergillus* (Gomez-Miranda, Rupérez y Leal, 1981), conlleva diferentes relaciones de galactosamina a galactosa para sus diversas especies (Gorin y Eveleigh, 1970; Bardalaye y Nordin, 1976; Leal y Rupérez, 1978).

Ácidos Micólicos.- Son ácidos grasos de cadena larga α -ramificados y β -hidroxilados que forman parte de la pared celular. Se encuentran, entre otras, en las familias *Corynebacteriaceae*, *Nocardiaceae* y *Mycobacteriaceae*.

Los ácidos micólicos aislados de distintos taxa difieren en la longitud de la cadena: 80 átomos de C en *Mycobacterium*, 50 en

Nocardia y 30 en *Corynebacterium*. Los ácidos micólicos son separados en forma de sus ésteres metílicos por cromatografía en capa fina en silicagel de acuerdo a su longitud de cadena.

Fosfolípidos.- Son las unidades constituyentes de la membrana citoplasmática. El esqueleto de su molécula es el glicerol, que está esterificado en posiciones 1 y 2 por ácidos grasos de cadena larga. Los fosfolípidos difieren en los grupos que figuran en la posición 3 (azúcares, aminoácidos). Estos grupos están conectados vía enlaces fosfodiéster al glicerol. Los diferentes tipos de fosfolípidos se separan por cromatografía en capa fina, utilizando silicagel como fase estacionaria. Son identificados por su valor Rf y su reacción con reactivos específicos en aerosol. La presencia de algunos fosfolípidos como fosfatidil-etanolamina ó fosfatidil-colina es taxón-específica.

Acidos grasos.- Son uno de los principales componentes en los fosfolípidos de la membrana citoplasmática. Además de estos ácidos grasos, es posible aislar ácidos grasos hidroxilados a partir del lípido A, que es un componente de la membrana externa de las bacterias Gram-negativas. Los ácidos grasos pueden ser clasificados en dos grupos principales: ramificados y no ramificados. Los ácidos grasos ramificados se encuentran preferentemente en bacterias Gram positivas, mientras que en bacterias Gram-negativas se detectan los no ramificados. Los ácidos grasos se liberan usualmente de sus glicerolésteres por trans-esterificación con metanol-HCl seguida de extracción con un disolvente orgánico. Estos metilésteres son identificados por cromatografía gas-líquido (Valero-Guillén y Martín-Luengo, 1983).

El crecimiento de los organismos bajo condiciones estandarizadas permite que la distribución obtenida de ácidos grasos posea un alto valor diagnóstico.

Quinonas.- En muchas reacciones re-dox de células bacterianas, las quinonas desempeñan un importante papel, por ejemplo, en el sistema de transporte electrónico de la cadena respiratoria, y en la fosforilación oxidativa, por enumerar solo otro ejemplo. Las quinonas son parte de la membrana plasmática. Son fácilmente extraídas por cloroformo/metanol y separadas por cromatografía líquida de alta presión (HPLC).

En bacterias se han encontrado dos tipos de quinonas: benzoquinonas (principalmente ubiquinonas, Q) y naftoquinonas (principalmente menaquinonas, MK). En las bacterias Gram-positivas solo se han detectado hasta la fecha MK, mientras las Gram-negativas son capaces de sintetizar Q y/o MK. No solo el tipo de quinona (Q vs MK), sino la longitud de la cadena isoprénica y su grado de saturación, son de valor taxonómico.

La identificación de bacterias y hongos por marcadores químicos puede utilizarse sola o en combinación con otros criterios. Algunos marcadores son muy específicos y pueden ser tomados para identificación de especies. Otros, por el contrario, son sólo diagnósticos a nivel de familia (Kroppenstedt, 1988).

B. Significación de los polisacáridos en la composición química y en la estructura de las paredes fúngicas.

B.1. Consideraciones generales

Los hongos son organismos eucariotas, es decir, se trata de organismos cuyas células contienen su material genético encerrado en núcleos separados del citoplasma por una membrana distinta de la plasmática que recubre a la célula entera. Como en cualquier otro ser vivo, el éxito biológico de los hongos se mide por su capacidad de colonizar nuevos nichos ecológicos, o lo que es lo mismo, por su capacidad de dividirse lo más rápidamente posible utilizando las fuentes nutricionales de su entorno. A partir de propágulos, o extensiones, que absorben material nutritivo del medio, los hongos se diseminan en forma de colonias que avanzan por ambientes distintos (muchos de ellos agresivos) hasta el extremo de terminar, incluso, por alimentarse del propágulo inicial. Para evitar esa contingencia, el protoplasma de las células del hongo se recubre de una capa protectora, la pared celular, que le permitirá resistir las condiciones adversas del medio.

La pared celular de los hongos puede considerarse el producto de evolución del glicocalix, o capa de polisacáridos (solos o asociados a proteínas) que refuerza y confiere resistencia a las membranas plasmáticas de casi todos los tipos de células, hacia un verdadero exoesqueleto.

Hay notables diferencias químicas y de estructura fina entre la pared celular de una célula eucariota y la de otra procariota. Las células eucariotas deben la rigidez de su pared a las microfibrillas de los polisacáridos, de las que carecen los procariotas. Las microfibrillas son estructuras formadas por la asociación lateral de largas cadenas de azúcares, que actúan a modo de varillas rígidas y protegen la integridad de la célula (Fig. 1). Pese a su rigidez, la pared celular de los hongos está creciendo constantemente y cambiando durante el desarrollo. El hongo, a lo largo de su ciclo biológico, debe asumir una serie de características morfológicas para poder realizar diversas funciones (crecimiento vegetativo, colonización de sustratos, reproducción, supervivencia, infección, etc), y esto lo hace cambiando la estructura de su pared. En términos muy sencillos, el desarrollo morfológico de los hongos se reduce, prácticamente, a la morfogénesis de la pared celular (Bartnicki-García, 1968).

El estudio de la pared celular de estos microorganismos presenta varios aspectos atractivos . En primer lugar, constituye un modelo para desentrañar la estructura de la pared celular y los fenómenos de biosíntesis que en ella concurren, generalizables a todas las células eucariotas dotadas de esa protección. En segundo lugar, la pared es la responsable de la forma que adquirirá un hongo, y conocer sus componentes estructurales y vías de síntesis permitirá averiguar la naturaleza de los fenómenos morfogenéticos y diferenciativos de estos organismos. Y, en tercer lugar, resulta de interés estudiar la pared celular de los hongos porque lo que distingue a éstos, de los eucariotas que pueden parasitar, es justamente la presencia o la composición de ese muro.

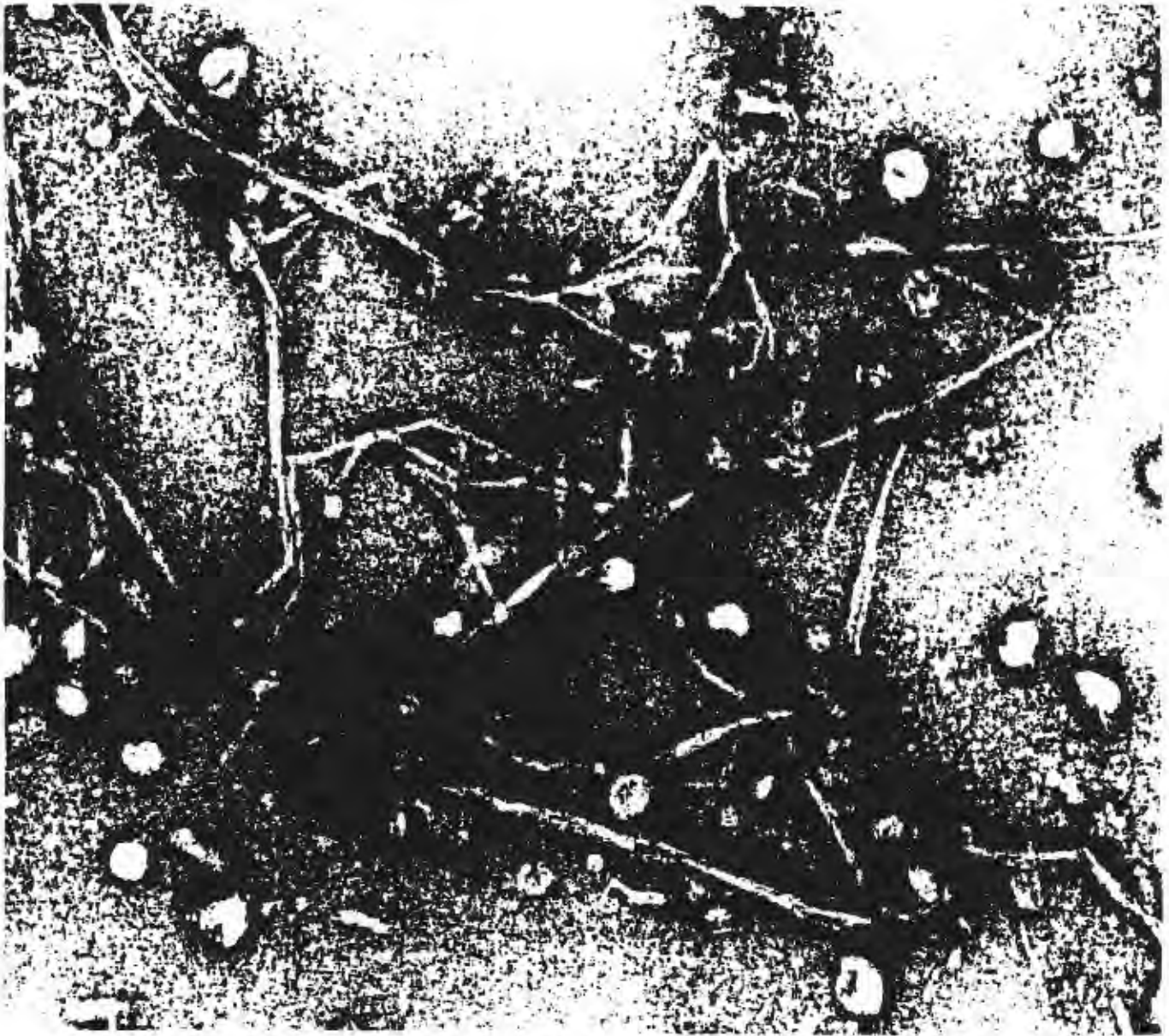


Fig. 1. Microfibrillas de quitina producidas por quitosomas de *Mucor rouxii*.

(Tomado de Sentandreu y cols., 1983)

Existe una cuarta razón, la más importante desde el punto de vista médico: el considerable aumento de las infecciones fúngicas (micosis) en los hospitales se debe, en gran parte, al uso indiscriminado de antibióticos para controlar las enfermedades bacterianas; esos fármacos suelen mostrarse inócuos para las células eucariotas, incluidas las del hombre, por supuesto, pero también las de los hongos. El análisis de la pared celular, el descubrimiento de su estructura y síntesis, servirá, pues, de fundamento para posteriores diseños de estrategias dirigidas a controlar las infecciones fúngicas.

Paso previo al estudio de la composición química de una estructura celular es el de su aislamiento y purificación. En los primeros trabajos realizados sobre la pared celular de los hongos se emplearon métodos químicos para su aislamiento. Estos métodos, que involucran tratamientos energéticos con ácidos y álcalis, preservan exclusivamente los compuestos más resistentes a la hidrólisis. Por esta razón, las primeras investigaciones de valor sobre la composición química de las paredes celulares nos ofrecían una imagen distorsionada, según la cual, predominaban los componentes más resistentes a los drásticos métodos de extracción. Hoy, la visión de las cosas ha cambiado merced a unas mejores técnicas de preparación y análisis de las paredes.

Desde hace dos décadas, el aislamiento o purificación de las paredes celulares puede realizarse por rotura del micelio utilizando una prensa mecánica (Novaes-Ledieu, Jiménez-Martínez y Villanueva, 1967; Wessels y cols., 1972), homogeneizadores

(Hamilton y Knight, 1962; Zonneveld, 1971), ultrasonidos (Bull, 1970; Mahadevan y Mahadkar, 1970), por tratamiento con detergentes (Mahadevan y Tatum, 1965; Bull, 1970) o por rotura balística, por agitación violenta de las células en presencia de pequeñas perlas de vidrio (Sentandreu, Ruíz-Herrera y Elorza, 1983).

Las paredes celulares se separan de los constituyentes solubles y de los restos de citoplasma por centrifugación diferencial, lavándolas con soluciones salinas (Gancedo, Gancedo y Asensio, 1966; Mahadevan y Mahadkar, 1970) o con disolventes de lípidos (Wessels, 1965) para eliminar el material contaminante.

Con estos procesos se obtienen paredes celulares libres de citoplasma y membranas, lo que se comprueba por observación al microscopio electrónico y se constata por hidrólisis, al no aparecer componente alguno típico del citoplasma, como la ribosa (Rosenberger, 1976).

Ya que los polisacáridos suelen formar más de un 75% de las paredes celulares, el fraccionamiento de éstas es fundamentalmente un ejercicio de separación de polisacáridos. Muchos de los polímeros se diferencian por su solubilidad en soluciones ácidas o alcalinas, siendo esta propiedad la más utilizada en el fraccionamiento. Como ilustración de estas técnicas, se muestra en la Fig. 2 el procedimiento diseñado por Mahadevan y Tatum (1965). Dado que este método puede producir una relativa degradación de los polímeros y tiene además poco poder de resolución, resulta más conveniente utilizar hidrolasas específicas de los polisacáridos para la digestión controlada de paredes (Troy y Koffler, 1969).

Figura 2

Fraccionamiento de paredes de acuerdo con Mahadevan y Tatum (1965)

Pared	NaOH 2N 16 h, 25°C	_____	<u>1^{er} sobrenadante</u> α-(1-3) glucano, proteína, galactosamina.
1 ^{er} residuo	H ₂ SO ₄ 1N 16 h, 90°C	_____	<u>2^o sobrenadante</u> Galactosa, glucosamina, manosa, glucosa, proteína
2 ^o residuo	NaOH 2N 30 min, 25°C	_____	<u>3^{er} sobrenadante</u> β-(1-3) glucano
Quitina			

El tipo de monómeros presente en la pared o en sus fracciones puede ser fácilmente determinado mediante hidrólisis y cromatografía. Cuando los polisacáridos se hidrolizan durante largo tiempo a altas temperaturas con ácidos minerales, puede haber destrucción de los azúcares. Esto puede interferir en el momento de hacer determinaciones cuantitativas de los monómeros y en la detección de algunos compuestos lábiles como los ácidos urónicos (Gancedo, Gancedo y Asensio, 1966; Bartnicki-Garcia y Reyes, 1968). Si se consigue obtener un polisacárido en suficiente cantidad y pureza, los métodos clásicos de la química de carbohidratos son suficientes para caracterizarlos completamente.

En mezclas de polisacáridos, algunos de los enlaces presentes se pueden determinar por su susceptibilidad a enzimas purificadas de especificidad conocida, o por la detección de disacáridos después de una hidrólisis parcial (Novaes-Ledieu y cols., 1967).

Entre los métodos físicos, los difractogramas de rayos X han sido muy utilizados para estudiar la quitina y la celulosa, ya que tienden a ser más cristalinos que el resto de los polímeros de la pared (Fuller y Barshad, 1960; Aronson, 1965). También se han utilizado para caracterizar glucanos diferentes de la celulosa, aunque en algunos casos no han dado resultados muy fiables (Kreger, 1954; Mitchell y Sabar, 1966; Aronson y cols., 1967; Bartnicki-García, 1968). La espectroscopía infrarroja ha sido usada por numerosos investigadores para estudiar y evidenciar el tipo de uniones de los monómeros (Aronson y cols., 1967; Mitchell y Scurfield, 1967, 1970; Bull, 1970).

Un método que se ha revelado de gran valor para determinar la arquitectura de la pared celular ha sido el de la microscopía electrónica de paredes nativas o tratadas con solventes y con enzimas específicos (Houwink y Kreger, 1953; Latgé, 1987).

B.2. Composición química de la pared celular.

Entrando de lleno en los aspectos principales sobre la composición química de la pared, podemos afirmar que, en general, las paredes celulares de los hongos poseen glúcidos, proteínas, lípidos, pigmentos y sales minerales, en orden decreciente de abundancia. No hay ácidos nucleicos. Los azúcares o glúcidos constituyen, por si solos, más del 80% del peso seco de la pared. El azúcar más abundante en las paredes celulares y el que encontramos en todos los grupos taxonómicos de hongos es la glucosa, seguida por la galactosa y la manosa, presentes también en la inmensa mayoría de las especies. En el mismo orden de abundancia siguen la glucosamina, el ácido glucurónico, la ramnosa y la xilosa, azúcares que restringen también su ámbito de distribución. Por último, los menos representados en los distintos grupos de hongos, y que además se registran en oligocantidades, son la arabinosa, la fucosa y la ribosa.

Los azúcares se hallan asociados, en la pared, en forma de polisacáridos. Podemos distinguir tres tipos fundamentales: los formados por un solo tipo de azúcar (homopolisacáridos), como la celulosa, constituida por monómeros o unidades de glucosa; los formados por varios azúcares distintos (heteropolisacáridos) y, por último, los polisacáridos en los que los azúcares se hallan unidos a una proteína, que constituye una porción sustancial del producto (glicoproteínas).

De la variedad de polisacáridos presentes en las paredes celulares de los hongos, sólo los más importantes han sido estudiados a fondo (Tabla I). Rosenberger (1976) hace una clasificación de estos polisacáridos:

R-Glucano o β -(1-3) Glucano: Este tipo de polímero es probablemente el que se encuentra más ampliamente distribuido en las paredes celulares fúngicas. No está presente en las paredes de los Zigomicetos (Bartnicki-García y Reyes, 1968; Bartnicki-García, 1968) ni en las de *Agaricus* (Kreger, 1954), pero sí está presente en otros hongos estudiados y en muchas levaduras (Mahadevan y Tatum, 1965, 1967; Wessels, 1965; Novaes-Ledieu y cols., 1967; Bartnicki-García, 1968; Bull, 1970). Cuando aparece en la composición de los polisacáridos de la pared, su contenido supone entre un 15 y un 30% del total.

El R-glucano fúngico no está formado exclusivamente de glucosa enlazada en β -(1-3), sino que también tiene algunos enlaces β -(1-6) (Bull y Chesters, 1966; Wessels, 1969; Novaes-Ledieu y cols., 1967; Bull, 1970; Zonneveld, 1971). Este hecho ha sido claramente demostrado por la detección de gentiobiosa, el disacárido β -(1-6), después de la digestión con β -(1-3) glucanasas purificadas. No se puede hacer afirmación alguna sobre la frecuencia de los enlaces β -(1-6), sobre la distancia entre los puntos de ramificación o si de hecho la fracción que contiene el β -(1-3) glucano es una mezcla de polisacáridos (Rosenberger, 1976). Es interesante observar que algunos hongos producen un mucílago extracelular que es un β -(1-3) glucano con algunos enlaces β -(1-6), que contiene únicamente glucosa (Buck y cols., 1968; Wessels y cols., 1972).

Tabla I.- Polímeros encontrados en paredes fúngicas

Polímero	Monómeros constituyentes	Enlace	Distribución
R-glucano	Glucosa	β -(1-3)+ β -(1-6)	La mayor parte de los grupos excepto Mucorales
S-glucano	Glucosa	α -(1-3)	Ascomicetos y Basidiomicetos
Celulosa	Glucosa	β -(1-4)	Ficomicetos
Quitina	N-acetil glucosamina	β -(1-4)	La mayor parte de los grupos excepto Mucorales y Ficomicetos
Quitosano	Glucosamina	β -(1-4)	Mucorales
Aminopoli-sacáridos	Galactosamina	desconocido	Ascomicetos e Hifomicetos
Poliurónidos	Ac. Glucurónico	desconocido	Mucorales
Heteropolímeros	Manosa, Fucosa, Glucosa, Xilosa, Ac. Glucurónico, Galactosa	desconocido	Zigomicetos, Ascomicetos y Basidiomicetos
Proteína	Amino-ácidos y, a veces, Hidroxiprolina		Todos los grupos En Ficomicetos, Hidroxiprolina

(Tomado de Rosenberger, 1976)

Los R-glucanos normalmente exhiben un difractograma de rayos X difuso, seguramente debido a que las cadenas laterales no permiten la formación de monocristales (Kreger y Meeuse, 1952; Kreger, 1954; Wessels y cols., 1972). Al eliminar las cadenas laterales con hidrólisis ácidas en condiciones poco enérgicas, los difractogramas de rayos X se hacen más nitidos y más parecidos a los de glucanos lineales con enlaces β -(1-3). Sin embargo, toda vez que la extracción del R-glucano de la pared conlleva una hidrólisis ácida suave (Mahadevan y Tatum, 1965) y este tratamiento rompe algunos enlaces (Kreger, 1954; Wessels y cols., 1972), la confirmación de la estructura del polímero nativo se hace inviable.

La naturaleza ramificada del R-glucano y su amplia distribución pueden deberse a que este polímero cumple una función especial en la pared. Si en la construcción de la pared celular de los hongos se precisara de enlaces cruzados ("*cross linkages*") entre cadenas polisacarídicas, enlaces cuya naturaleza todavía no está clara, el R-glucano podría ser el candidato para cumplir esta misión.

Celulosa o β -(1-4) Glucano.- En contraste con su presencia ubícua en paredes de células vegetales, la celulosa se encuentra sólo en un número discreto de hongos, principalmente especies de Oomicetos (Bartnicki-García, 1968). Cuando está presente, lo hace como componente principal de la pared, representando el 30-45% de la misma (Novaes-Ledieu, Jiménez-Martínez y Villanueva, 1967) y en forma de microfibrillas (Hunsley y Burnett, 1970).

La gran insolubilidad y resistencia a la hidrólisis de la celulosa permiten que sea purificada de la mayor parte de los otros componentes de la pared, excepto quitina, facilitando con éllo su identificación. Esta puede hacerse por difracción de rayos-X (Aronson, 1965), susceptibilidad a la digestión por celulasa, por la presencia de celobiosa en hidrolizados parciales y por su solubilidad en el reactivo de Schweitzers (Michell y Scurfield, 1970).

S-Glucano o α -(1-3) Glucano.- Este polisacárido lineal es uno de los componentes más abundantes de la pared celular en los Ascomicetos y los Basidiomicetos (Kreger, 1954; Bacon y cols., 1968; Bull, 1970; Wessels y cols., 1972). Supone un 15-25% de los polisacáridos de la pared, habiéndose constatado que en algunas especies forma una de las capas más externas de la pared (Hunsley y Burnett, 1970; Wessels y cols., 1972). El S-glucano puede extraerse de la pared con álcalis a temperatura ambiente, y en estos extractos es normalmente el componente mayoritario. Precipitado de tales extractos, es posible su caracterización a través de la identificación de los productos de su hidrólisis parcial y por examen de sus difractogramas de rayos-X y espectros IR.

Quitina.- Es una poli-N-acetilglucosamina con sus monómeros unidos por enlaces β -(1-4), en cadenas lineales. Es uno de los polímeros más frecuentes en las paredes de los hongos; sólo los β -(1-3) glucanos tienen una distribución más amplia (Bartnicki-García, 1968). No se ha encontrado quitina en las paredes de los Oomicetos, pero está presente en las paredes de otros grupos de hongos filamentosos en forma de microfibrillas

(Mahadevan y Tatum, 1965; Aronson, 1965; Hunsley y Burnett, 1970). En los Oomicetos las fibrillas son de celulosa, mientras que los Zigomicetos contienen quitosano (Bartnicki-García y Reyes, 1968).

El contenido en quitina de la pared es muy variable, desde un 5% en peso seco de la pared en *Schizophyllum* (Wessels, 1965) a un 60% en *Sclerotium* (Bloomfield y Alexander, 1967). Debido a su gran resistencia a la hidrólisis, la quitina se puede purificar del resto de los componentes de la pared celular calentando ésta con soluciones de ácidos fuertes y/o álcalis. Su cristalinidad la hace muy apropiada para análisis por difracción de rayos X. Esta última característica y su susceptibilidad a la quitinasa ha sido utilizada para su caracterización (Aronson, 1965; Troy y Kroffler, 1969).

Quitosano.- Este es el análogo desacetilado de la quitina, o sea, β -(1-4)-poliglucosamina, con ninguno o muy pocos grupos acetilo. Sólo ha sido descrito como componente importante en *Mucor* y *Phycomyces* (Bartnicki-García, 1968).

Aminopolisacáridos.- En las paredes de varios Ascomicetos se ha identificado galactosamina, generalmente en cantidades muy pequeñas (Mahadevan y Tatum, 1965; Applegarth y Bozoian, 1969; Bull, 1970; Katz y Rosenberger, 1970). Es preciso hacer notar, sin embargo, que la detección de galactosamina es fácil solamente en las fracciones de la pared que no contienen glucosamina. En las fracciones en que hay quitina y/o glucosamina, la galactosamina puede pasar inadvertida o perderse. No obstante, en algunos hongos, se ha visto que la galactosamina es el componente mayoritario de la pared, aunque no se conoce característica alguna sobre el polímero que forma (Applegarth y Bozoian, 1969; Bull, 1970).

Poliurónidos.- Se han encontrado como componentes principales en *Mucor* (Bartnicki-García y Reyes, 1968). En hidrolizados de otros hongos, o se han detectado ácidos urónicos sólo en pequeñas cantidades (Gancedo, Gancedo y Asensio, 1966) o no se han detectado. Es conocido que los ácidos urónicos son muy lábiles a la hidrólisis ácida y, en muchos casos, pueden haber sido fácilmente desestimados o perdidos.

Otros polisacáridos.- En los hidrolizados de las paredes de diferentes especies fúngicas se han encontrado cuatro azúcares en cantidades pequeñas. Son la manosa y galactosa en Ascomicetos; manosa, fucosa y xilosa en Basidiomicetos; y manosa, fucosa y galactosa en Zigomicetos (Bartnicki-García, 1968). Existe muy poca información sobre los polímeros donde se encuentran estos azúcares. En *Mucor rouxii*, manosa, fucosa y galactosa se encuentran en un heteropolímero con ácido glucurónico (Bartnicki-García y Reyes, 1968) y en Ascomicetos se ha sugerido que galactosa y manosa están en un heteropolímero con glucosa (Ruíz-Herrera, 1967; Zonneveld, 1971).

Proteínas y Lípidos.- Como se ha dicho anteriormente, las paredes celulares poseen también proteínas, algunas de las cuales tienen actividad enzimática. Suele tratarse de enzimas hidrolíticos, cuya misión es la de degradar compuestos de peso molecular alto o mediano y que proporcionan, como producto de la acción enzimática, sustancias capaces de difundir hacia el interior de las células. Estas proteínas son glicoproteínas.

Las propiedades hidrofóbicas que distinguen a la pared celular resultan de su contenido en lípidos. Tal es el caso de varias

esporas, que casi quedan impermeables en medio acuoso merced a la capa de grasa y ceras que las rodean. El análisis de los lípidos de la pared celular no ha demostrado característica alguna especial de los mismos. Existen grasas neutras, ácidos grasos y fosfolípidos, como en las membranas celulares, si bien son un componente minoritario de la pared.

Sales minerales.- En algunas especies el contenido en sales minerales de su pared es bastante alto, dentro de una proporción característicamente baja. Hay paredes donde los cationes metálicos, divalentes sobre todo, se encuentran formando sales con otros compuestos orgánicos aniónicos. En otros casos son los aniones inorgánicos (los fosfatos, por ejemplo) los que forman sales con sustancias orgánicas catiónicas.

Pigmentos : Aunque la mayoría de los hongos tienen su pared blanca, encontramos ejemplos que poseen un color que va del gris al negro debido al pigmento que portan, del tipo de las melaninas normalmente.

proponer la existencia de dos grupos de hongos: En el primer grupo acomodó formas heterotróficas cuyas paredes contenían celulosa, lo que es característico de las algas. En el segundo grupo ubicó los hongos caracterizados por paredes quitinosas.

Posteriormente, se demostró la existencia de una tercera categoría (Nabel, 1939) en *Rhizidiomyces bivellatus*: los hongos que poseen celulosa y quitina.

En la década de los 50 se reconocían cuatro tipos de pared:

<u>Componentes característicos</u>	<u>Grupo taxonómico</u>
1. Celulosa	<i>Oomycetes</i>
2. Celulosa y Quitina	<i>Hyphochytridiomycetes</i>
3. Quitina	<i>Ascomycetes,</i> <i>Basidiomycetes</i> <i>Chytridiomycetes</i> <i>Deuteromycetes</i>
4. Mananos	<i>Levaduras</i>

Relativo a la última de estas categorías, las levaduras, y su componente característico, manano, es preciso hacer notar que, si bien había sido descubierto en 1894 por Salkowski, la literatura posterior le ignoró hasta 1940, en que los trabajos de Garzuli-Janke comprobaron su existencia. Dicho manano está reemplazado parcialmente por quitina en algunas levaduras filamentosas y sobre todo en hongos filamentosos.

A partir de 1960 ha habido un progreso espectacular en el estudio de las paredes fúngicas, pero sólo se han realizado un número limitado de estudios desde el punto de vista taxonómico (Slodki y cols., 1961; Crook y Johnston, 1962; O'Brien y Ralph, 1966).

Más recientemente, Bartnicki-García (1968, 1970) propuso la división de los hongos en ocho categorías, basadas en combinaciones de los polisacáridos más abundantes en las paredes celulares:

<u>Componente característico</u>	<u>Grupo taxonómico</u>
1. Celulosa-Glucógeno	<i>Acrasiales</i>
2 Celulosa- β -Glucano	<i>Oomycetes</i>
3. Celulosa- Quitina	<i>Hyphochytridiomycetes</i>
4. Quitina-Quitosano	<i>Zygomycetes</i>
5. Quitina- β -Glucano	<i>Chytridiomycetes, Euscomycetes, Homobasidiomycetes</i>
6. Manano- β -Glucano	<i>Hemiascomycetes</i>
7. Quitina-Manano	<i>Heterobasidiomycetes</i>
8. Polímeros de galactosa y galactosamina	<i>Trichomycetes</i>

Es interesante resaltar que la mayor parte de los hongos se encuentran en el grupo 5.

B.3. Organización de los polímeros en la pared celular de los hongos.

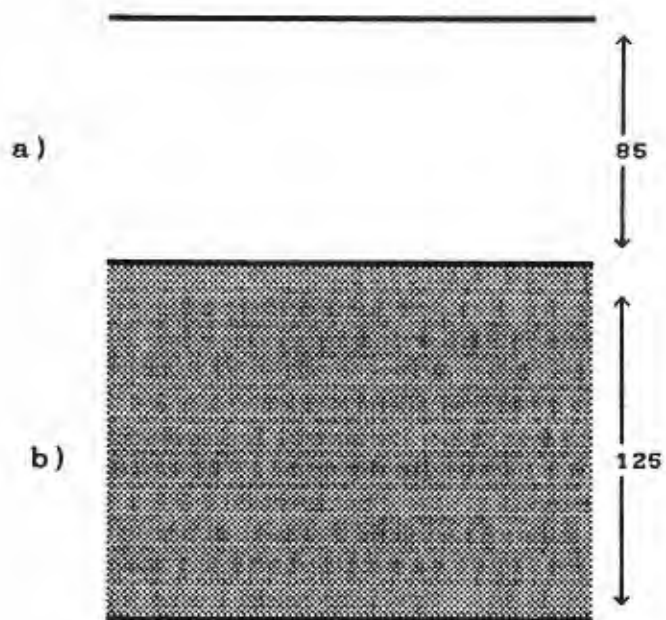
Este es otro de los puntos importantes en el estudio de la pared celular de los hongos.

Las paredes son, sin duda, una mezcla homogénea de los polímeros que la forman, los cuales presentan un ensamblaje estructurado y complejo. Las relaciones espaciales de los polímeros entre sí parecen determinar tanto las propiedades de la pared como la naturaleza de los polímeros en sí mismos. Estas relaciones deben afectar tanto a las características estático-mecánicas como a los cambios dinámicos que las paredes tienen que realizar durante el crecimiento y la morfogénesis (Rosenberger, 1976).

De las investigaciones de Hawker en 1965, Mahadevan y Tatum en 1967 y Hunsley y Burnnet en 1968 y 1970, ha quedado establecido que, por lo menos uno de los polímeros de la pared está presente en forma de microfibrillas (Figs. 3, 4 y 5). Las microfibrillas se entrelazan formando una red y los espacios vacíos se rellenan de una matriz formada por el resto de los polímeros. La red fibrilar se puede ver claramente sólo después de eliminar los polímeros de la matriz por un proceso químico o enzimático apropiado. El tratamiento seguido, sobre todo el tipo de enzima utilizado para poner de manifiesto las microfibrillas, puede servir también para estudiar el tipo de polímeros que forman la matriz e indicar su composición química. Las microfibrillas suelen estar compuestas por quitina o celulosa, según el tipo de polímeros presentes en la pared.

Figura 3

Organización de la pared celular de los hongos
Ficomícetos



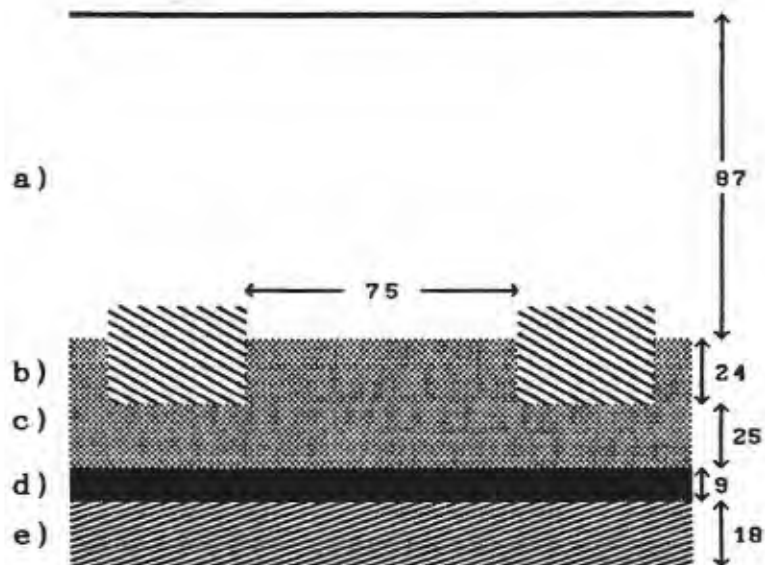
Modelo de la pared celular de *Phytophthora parasitica*, basado en experimentos en los cuales el material de la pared celular fue sometido a tratamiento enzimático. Se distinguen dos capas:

a) Capa externa de los glucanos amorfos con enlaces β -(1-3) y β -(1-6).

b) Capa interna de microfibrillas de celulosa y proteínas.

El espesor de las capas (nm) se indica por el número y flecha.
(Tomado de Hunsley y Burnett, 1970).

Figura 4
Organización de la pared celular de los hongos
Ascomicetos y Deuteromicetos



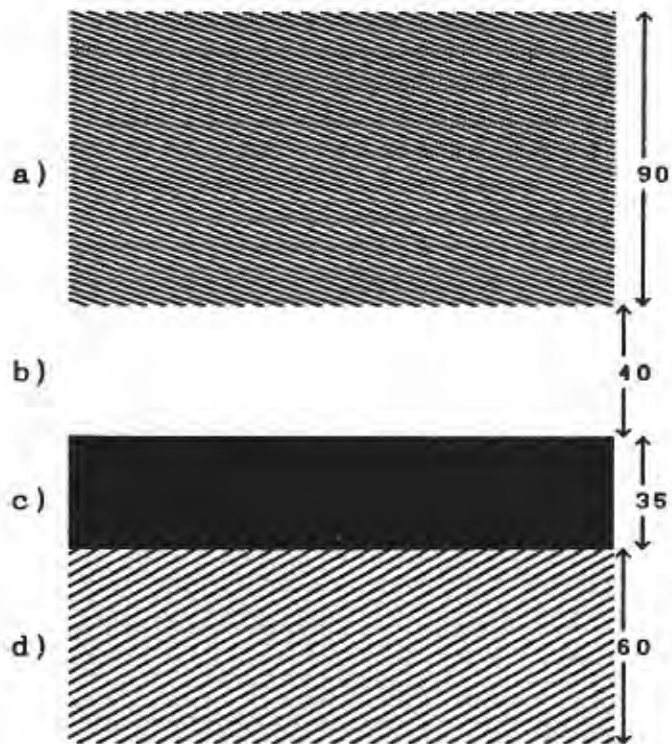
Modelo de pared celular de *Neurospora crassa*, basado en experimentos en los cuales el material de la pared celular fue sometido a tratamiento enzimático. Se distinguen cinco capas:

- a) Capa externa de glucanos amorfos con enlaces β -(1-3) y β -(1-6).
- b) Capa glicoprotéica en forma de red.
- c) Capa de proteínas fácilmente eliminables.
- d) Capa de proteínas más resistentes.
- e) Capa interna de microfibrillas de quitina que contiene probablemente proteínas.

El espesor de las capas (nm) se indica por el número y flecha. (Tomado de Hunsley y Burnett, 1970).

Figura 5

Organización de la pared celular de los hongos
Basidiomicetos



Modelo de la pared celular de *Schizophyllum commune*, basado en experimentos en los cuales el material de la pared celular fue sometido a tratamiento enzimático. Se distinguen cuatro capas:

- a) Capa externa de glucanos amorfos con enlaces α -(1-3) y álcalisolubles.
- b) Capa de glucanos amorfos con enlaces β -(1-3) y β -(1-6).
- c) Capa de proteínas.
- d) Capa interna de microfibrillas de quitina que contiene probablemente proteínas.

El espesor de las capas (nm) se indica por el número y flecha.
(Tomado de Hunsley y Burnett, 1970)

En los Ascomicetos (Fig. 4) hay una segunda red de fibras glicoproteicas, además de las de Quitina (Mahadevan y Tatum, 1967; Hunsley y Burnnett, 1970). Existe, además, un pequeño grupo de transición (Hifoquitridiomycetos) cuyos miembros poseen quitina y celulosa. La diversidad de polímeros fibrilares de la pared celular está de acuerdo con la idea de un origen polifilético de los hongos, ya que hay miembros que poseen quitina, lo que les asocia con los animales, otros poseen celulosa, que les encuadra con las plantas, y hongos que presentan ambos compuestos (loc. cit.).

Los componentes cementantes son polisacáridos distintos de los recién aludidos, proteínas y lípidos. Suelen concurrir en proporción mayoritaria, comparados con los fibrilares o estructurales. Se extraen o degradan fácilmente por acción de la temperatura o presión y por ácidos y álcalis fuertes, a diferencia de los fibrilares.

La mezcla de las fibrillas con la matriz debe dar a las paredes celulares de los hongos alguna de las propiedades que tienen los productos de la tecnología moderna como la fibra de vidrio, el carbofibrol, el cemento armado, etc.: elevada resistencia, rigidez y piroresistencia. Los reforzadores fibrilares confieren resistencia a las tensiones y las bases o matrices amorfas soportan las presiones y mantienen articuladas las fibras.

Quizás más importante que el incremento de la solidez, son las propiedades mecánicas que se pueden adquirir sin cambiar los materiales y teniendo diferentes mezclas de fases. Cambios en la longitud y en el grosor de las fibras, en el área ocupada, en su orientación y en el grado de interacción entre las fibras y la

matriz, producen grandes alteraciones en el comportamiento del compuesto. Estos son precisamente el tipo de parámetros que la célula puede controlar y modificar durante el crecimiento y la diferenciación. Cambios en las cantidades relativas de fibras y matriz deben afectar a la plasticidad de la pared y parece ser que estos cambios ocurren en las hifas. Cuando el apéndice joven madura, tanto el diámetro como la densidad de las fibras aumenta (Hunsley y Burnnett, 1968, 1970) y al mismo tiempo la pared se vuelve más rígida (Robertson, 1959).

Cuando se examinan al microscopio electrónico secciones ultrafinas de hifas y de esporas, la pared se ve formada normalmente por capas que se diferencian por su densidad a los electrones (Hawker, 1965). Se ha obtenido más información sobre estas capas combinando la microscopía electrónica con digestiones controladas de la pared por enzimas específicas o tratamientos químicos (Mahadevan y Tatum, 1967; Hunsley y Burnnett, 1970). Las capas consisten principalmente en polímeros específicos o determinadas mezclas de polímeros. La fase microfibrilar, ya sea de quitina o de celulosa, y su material cementante, la matriz, parecen estar siempre en la superficie interna de la pared, cerca de la membrana plasmática. Las capas superficiales de *Neurospora* y *Phytophthora* contienen β -(1-3) glucano y en *Schizophyllum* α -(1-3) glucano (Fig. 3, 4 y 5). La melanina se deposita como una funda en el exterior (Rowley y Pirt, 1972). La disposición del material de la pared en capas debe conferirle algunas propiedades específicas. Sin embargo, la presencia de las capas puede deberse a la forma en que operan los mecanismos de biosíntesis, particularmente cuando la pared, a partir de un depósito primario, se engrosa. Una vez se ha

formado una capa debe ser muy difícil intercalar material adicional (Hunsley y Burnett, 1970).

Las hifas pueden ser tratadas con enzimas específicos o químicamente de forma que se eliminen sucesivamente los polímeros de la pared, obteniéndose finalmente paredes formadas por un solo compuesto (Mahadevan y Tatum, 1967; Hunsley y Burnett, 1970). Experimentos de este tipo han demostrado que cada uno de los componentes mayoritarios de la pared pueden, por sí solos, mantener la forma característica de la hifa.

El papel de la quitina en las paredes fúngicas ha sido investigado desde diferentes puntos de vista, utilizando un mutante de *Aspergillus nidulans* que tiene bloqueada la síntesis de glucosamina y por lo tanto de la quitina. Cuando crecía en presencia de un estabilizador osmótico, las hifas tenían una forma normal y las paredes tenían muy poca quitina. Estas hifas no eran osmóticamente sensibles y no alteraban su forma, incluso estando en agua destilada. Sin embargo, cuando se transferían a un medio de crecimiento sin estabilizador osmótico, se hinchaban y se lisaban (Katz y Rosenberger, 1970, 1971). Por tanto, parece haber un estado durante la extensión de la pared y el crecimiento, en el que todos los componentes de la pared son necesarios para proporcionar la solidez y la rigidez. Formada la pared, la pérdida de uno o de la mayoría de los componentes no parece afectar su forma.

C. Métodos químicos y técnicas relacionadas para el estudio de la estructura de polisacáridos bacterianos y fúngicos.

C.1. Métodos químicos

La elucidación de la estructura primaria de los polisacáridos requiere el conocimiento de la naturaleza y tamaño de los anillos (piranosa o furanosa) para cada residuo azúcar, la secuencia de las unidades monosacarídicas constituyentes, el tipo de unión para cada enlace glicosídico y su configuración anomérica (α ó β).

C.1.1. Identificación de los monómeros constituyentes

La primera etapa en la determinación de la estructura de un polisacárido purificado es identificar los componentes monosacárido. La composición general de los polisacáridos en términos de azúcares neutros, ácidos hexurónicos y hexosaminas puede ser establecida por ensayos colorimétricos (Dische, 1962; Montreuil y SpiK, 1963, 1981; White y Kennedy, 1981). La determinación de monosacáridos neutros y ácidos hexurónicos se lleva a cabo por tratamiento con ácido sin hidrólisis preliminar del polisacárido, pero las determinaciones colorimétricas de hexosaminas requieren la liberación previa de los aminoazúcares. La hidrólisis cursa hacia la formación de productos que condensan con reactivos específicos para dar especies coloreadas (Dische, 1962; Montreuil y SpiK, 1963, 1981; White y Kennedy, 1981).

C.1.2. Enlace y secuencia.

Cuando se conocen los monosacáridos presentes en los polisacáridos, el siguiente problema es determinar el tipo de enlace glicosídico: 1-2, 1-3, 1-4, ó 1-6.

C.1.2.a Metilación.

El análisis por metilación es uno de los procedimientos más idóneos para el análisis estructural de los polisacáridos y glicoconjugados (Fig. 6). Involucra la permetilación de todos los hidroxilos libres de los azúcares, la liberación de monosacáridos metilados por hidrólisis o metanolisis del polisacárido totalmente metilado, y el análisis cualitativo y cuantitativo de los derivados metilados.

Muchos métodos de metilación han sido descritos desde 1903 en que Purdie e Irvine propusieron el primero, pero la mayor parte de ellos conducen a una metilación incompleta de los sacáridos. A este respecto, el procedimiento de Hakomori (1964) usando hidruro sódico y dimetilsulfóxido representa un progreso real al producir un reactivo nucleofílico más potente que los previamente utilizados. No obstante, al hidruro sódico acompañan impurezas, por lo que han sido propuestos reactivos más limpios para llevar a cabo la metilación de pequeñas cantidades de polisacáridos. Paz Parente, Fournet y cols., en 1985, desarrollaron un procedimiento basado en la asociación de dimetilsulfóxido (DMSO) y n-butil litio que da menos línea base o ruido (background) en GLC y, así, puede usarse para metilar microcantidades de polisacáridos (10 a 50 μ g de azúcares totales). La asociación de CGL y espectrometría de masas (MS) constituye el método más fácil de identificación de los

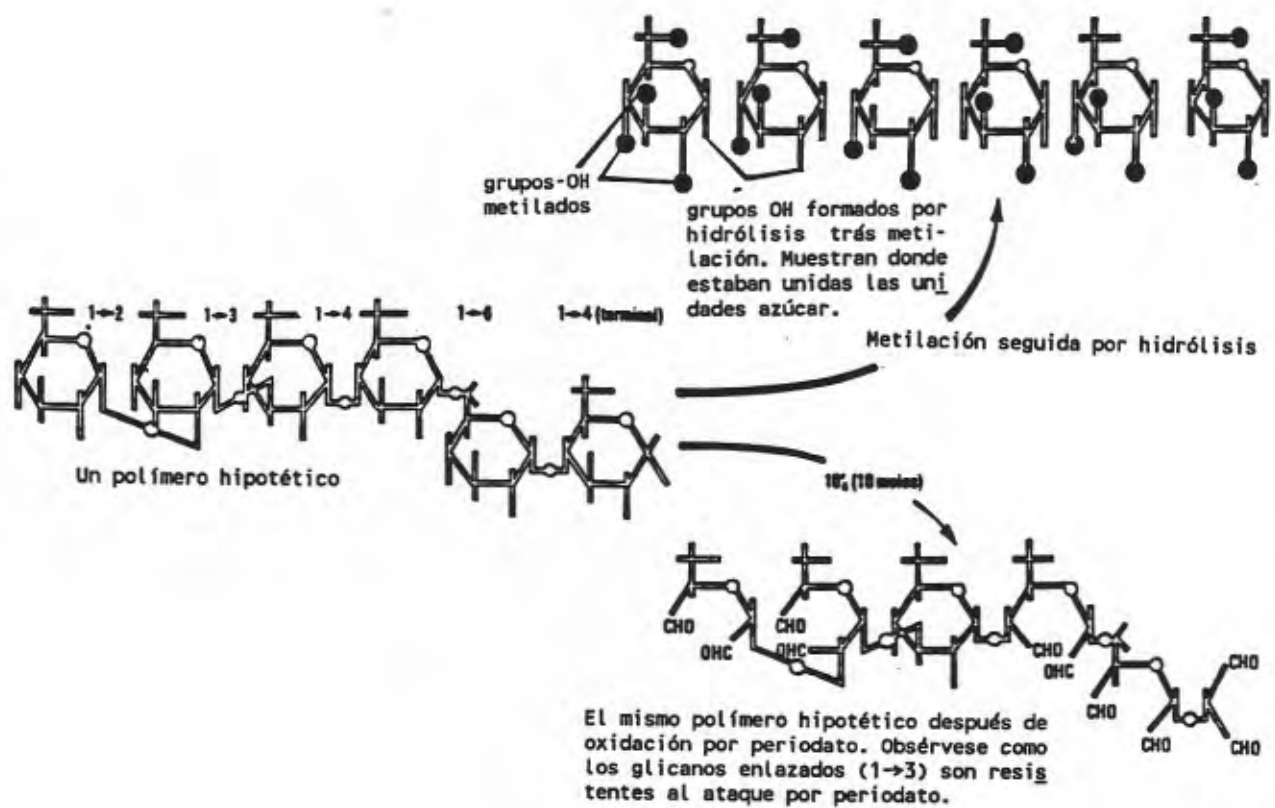


Fig. 6. Uso de la metilación y de la oxidación con periodato en el análisis estructural de los polisacáridos.

monosacáridos metilados obtenidos por hidrólisis o metanolisis de permetil-polisacáridos. Después de la metanolisis de los permetilpolisacáridos y la acetilación de metil-glicósidos parcialmente metilados, todos los azúcares metilados, así como sus formas metilglicosídicas acetiladas, pueden ser identificadas por GLC-MS sobre columnas capilares (Fournet, Strecker, Leroy y Montreuil, 1981).

C.1.2.b Despolimerización parcial.

Los polisacáridos pueden ser despolimerizados por varios procedimientos para romper los enlaces más frágiles. Los oligosacáridos liberados pueden ser separados por cromatografía (filtración sobre gel, cromatografía de partición, cromatografía de adsorción sobre carbón activo, cromatografía de cambio iónico). El análisis de los oligosacáridos también se lleva a cabo por HPLC (McGinnis y Fang, 1980).

Hidrólisis ácida parcial.-

Los enlaces (1-6) son más estables a la hidrólisis suave con ácido mineral que los enlaces (1-4). Los ácidos glicosidurónicos son mucho más resistentes a la hidrólisis a bajo pH que los correspondientes glicósidos neutros. Por ejemplo, la hidrólisis de glucuronoxilomanano conteniendo ácido glucurónico de *Cryptococcus neoformans* conduce al aislamiento de disacáridos ácidos (ácido aldobiurónico), como pusieron de manifiesto Cherniak y cols., en 1980.

Acetolisis.-

La acetolisis parcial involucra el tratamiento de un polisacárido, o preferiblemente su derivado acetilado, con anhídrido acético conteniendo alrededor de un 5% de H_2SO_4 . En

contraste con el método de la hidrólisis parcial, los enlaces que se separan preferentemente durante la acetólisis son los (1-6). Consecuentemente, este método se ha utilizado de modo generalizado para caracterizar, en mananos procedentes de levaduras y hongos, el perfil de las cadenas laterales unidas a un núcleo (core) enlazado (1-6) (Lee y Ballou, 1965).

Oxidación con periodato.-

El periodato reacciona con polisacáridos rompiendo el enlace entre carbonos portadores de grupos hidroxilo vecinos (Fig. 6). Por cada enlace roto, se consume un mol de periodato. Los grupos hidroxilo primarios son oxidados a aldehído y los secundarios a ácido metanoico. Las cantidades de periodato consumidas, y los productos que se forman, dependen de la posición de los átomos de carbono involucrados en los enlaces con los residuos vecinos. La degradación de Smith es una secuencia de reacciones basada sobre la reacción con periodato de los polisacáridos seguida por reducción e hidrólisis ácida controlada (Goldstein y cols., 1965).

Hidrólisis catalizada por enzimas.-

Los enzimas glicosídicos son excelentes herramientas para la despolimerización parcial de los polisacáridos, para la determinación del enlace anomérico de cada monosacárido conjugado y para la determinación de la estructura primaria de los polisacáridos por degradación secuencial. Dos tipos de enzimas son utilizados: las exoglicosidasas que hidrolizan los enlaces glicosídicos de los monosacáridos en una posición no reductora terminal y conducen a una degradación en etapas de los polisacáridos, y las endoglicosidasas, que hidrolizan los enlaces glicosídicos en posiciones internas. Ejemplos de exoglicosidasas

son la β -amilasa, que actúa sobre la amilosa y la amilopectina para formar maltosa, y la fosforilasa, que actúa sobre el glucógeno con liberación de α -D-glucopiranosilfosfato. La exo-(1-3)- β -D glucanasa, procedente de un basidiomiceto (QM 806) y preparado de acuerdo con el procedimiento de Peterson y Kirkwood (1975), digiere el β -D-glucano extracelular de *Botrytis cinerea* dando lugar a una completa degradación de polisacáridos a gentiobiosa y D-glucosa en la razón molar 3 a 2 (Fig. 7) (Dubordieu y cols., 1981). La celulasa de *Streptomyces sp.* (QM B814) es un ejemplo de una endoglicosidasa que rompe el enlace glicosídico entre dos residuos β -D glucopiranososa 4-enlazados, no ramificados, de β -D glucanos procedentes de avenas y cebada.

Despolimerización parcial de polisacáridos permetilados.-

La hidrólisis parcial de polisacáridos permetilados da información válida sobre la estructura primaria de los polisacáridos. De este modo, Valent y col. (1980) han desarrollado un procedimiento basado en la hidrólisis parcial de un permetilpolisacárido (85% de ácido fórmico, 39 min, 80 °C, seguido por reducción con NaBD_4 0,2 M y etilación de los grupos hidroxilo libres). Los productos etilados parcialmente metilados pueden ser analizados por GLC-MS o fraccionados por HPLC sobre columnas de fase invertida.

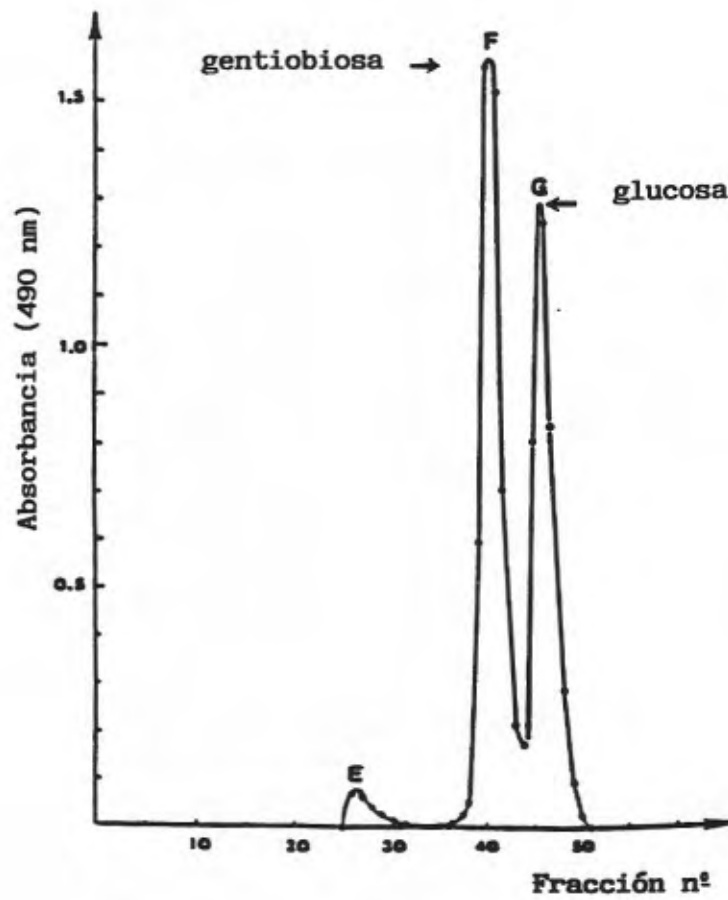


Fig. 7. Separación del producto obtenido después del tratamiento del glucano de *Botrytis cinerea* con exo (1-3)- β -D-glucanasa sobre una columna de Sephadex G-15 (1,6 x 120 cm).

C.1.2.c Naturaleza anomérica de los residuos azúcar.

Angyal y James (1970) han mostrado que aldopiranosidos completamente acetilados con agliconas ecuatorialmente unidas en la disposición más estable (generalmente los β -anómeros, Fig.8, compuesto I) son oxidados por trióxido de cromo en ácido acético a 5-alduloseonatos (Fig.8, compuesto II).

Los anómeros con agliconas axialmente unidas (generalmente los α -anómeros, Fig.8, compuesto III) se oxidan solo lentamente bajo estas mismas condiciones. Este reactivo ha sido utilizado para determinar la naturaleza anomérica de residuos azúcar en oligo y polisacáridos (Hoffman y cols., 1972). Las muestras son completamente acetiladas, siendo los oligosacáridos primeramente reducidos a sus alditoles y después tratados con óxido de cromo(VI) en ácido acético en presencia de un patrón interno. Una comparación de los análisis de azúcares antes y después de la oxidación, revela qué residuos azúcar han sido oxidados (Hoffman y Lindberg, 1980).

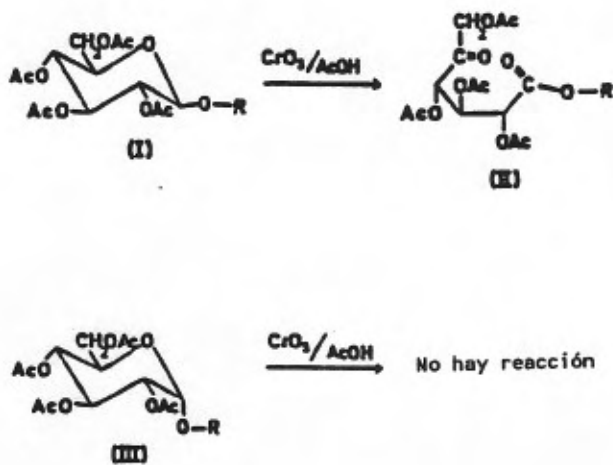


Fig. 8. Oxidación con trióxido de cromo en ácido acético de aldopiranosas completamente acetiladas.

C.2. Técnicas para la caracterización de los componentes celulares especialmente polisacáridos.

Las técnicas utilizadas durante las últimas décadas en la clasificación e identificación de componentes celulares, basadas sobre sus características físico-químicas, pueden ser agrupadas en tres grandes grupos:

- I. Técnicas cromatográficas
- II. Técnicas espectroscópicas
- III. Técnicas citoquímicas asociadas a la microscopía electrónica de transmisión.

Seguidamente pasaremos a considerar su fundamento y aplicaciones:

I.-Técnicas cromatográficas: Fundamentos y aplicaciones.

Por cromatografía se entiende el conjunto de técnicas de separación que permiten analizar mezclas complejas en tiempos relativamente cortos. La principal característica de la cromatografía es la resolución o capacidad de separar dos constituyentes de la mezcla. La resolución es proporcional a tres factores : eficiencia (la capacidad de producir picos estrechos), selectividad y capacidad (retención por el sistema cromatográfico).

El principio común de todas las técnicas cromatográficas es el siguiente: un fluido (fase móvil) circula a través de una fase estacionaria (sólida o líquida). Cuando la mezcla de sustancias se introduce en el sistema, se producen una serie de equilibrios de distribución entre las dos fases, generalmente de distinta magnitud

para cada componente de la mezcla, por lo que cada uno de ellos se desplazará con diferente velocidad a lo largo del sistema.

Cuando la fase móvil es un gas, solamente se utilizan columnas y el proceso se realiza siempre mediante elución. Esta es la cromatografía de gases donde, además, los componentes de la mezcla están en fase vapor. La columna que se utilizó al principio era simplemente un tubo de metal relleno de partículas porosas de un material relativamente inerte (tierra de diatomeas) sobre el cual estaba distribuida la fase estacionaria (líquida) en forma de una película delgada. La forma más usual de hacer cromatografía de gases es utilizando un líquido como fase estacionaria; recibe entonces el nombre de cromatografía gas-líquido (CGL). También se utilizan adsorbentes, dando lugar a la cromatografía gas-sólido (CGS), pero en mucha menor proporción.

Como modalidades de cromatografía más usuales en química de carbohidratos se han utilizado las siguientes:

1.1. Cromatografía en papel.-

En cromatografía de papel ascendente, se mantiene verticalmente en el seno de un disolvente una tira de papel de filtro. El disolvente migra a lo largo del papel por acción capilar, sirviendo el papel como un soporte (o mecha). Una mancha de la sustancia susceptible de fraccionamiento se coloca en el papel justo por encima del nivel donde llegará el disolvente y se deja secar antes de que tenga lugar la inmersión. Sumergida la tira y a medida que el disolvente migra a través del papel, las diversas fracciones de la muestra se moverán con distintas velocidades. Las solubilidades relativas de los componentes de la muestra en el disolvente, la polaridad del disolvente y las polaridades de los

solutos de interés, afectan la velocidad a la que los diversos componentes se mueven. Después que la separación ha tenido lugar, se retira el papel, se seca y se nebuliza con un reactivo para desarrollo de color. Las manchas pueden, entonces, ser cuantificadas midiendo su área, su intensidad, o ambas. En ciertos casos, las manchas pueden hacerse visibles en la zona UV del espectro, examinando el papel bajo dicha luz.

En cromatografía descendente, la tira de papel se introduce en una cubeta y se dobla en posición que permita al disolvente elevarse sobre el borde de la cubeta por capilaridad, percolar a través del papel e ir a caer en la parte inferior del recipiente.

En años pasados, la cromatografía de papel se utilizó para fraccionamiento de azúcares pero, últimamente, ha sido desplazada por la cromatografía en columna.

1.2. *Cromatografía en capa fina (TLC).*-

Los principios de la cromatografía en capa fina (TLC) son similares a los ya descritos para cromatografía en papel ascendente. La principal diferencia entre las dos técnicas es que en TLC se usan como matriz placas de vidrio, aluminio, plástico o fibra de vidrio, recubiertas de una capa fina de gel de sílice, alúmina, gel de poliacrilamida, o gel de almidón, en vez de papel de filtro.

Los bordes de las placas se sumergen casi a ras de la superficie límite de un disolvente que, luego, difunde a través del material por capilaridad, como ocurría en cromatografía de papel. Asimismo, la separación tiene lugar debido a diferencias en solubilidad, polaridad del disolvente, polaridad del carbohidrato (u otra especie química) de interés, y velocidad de difusión.

Una ventaja de la cromatografía en capa fina es que la mancha puede ser eliminada por raspado de la placa, redisuelta fácilmente en un disolvente y, después, analizada en un cromatógrafo o un fluorímetro. Otra ventaja de la TLC es que la separación puede ser completada a menudo entre 30 y 90 minutos, a diferencia de las 12-24 horas para cromatografía en papel.

Las funciones principales de la TLC son la separación e identificación de sustancias conocidas en una etapa o la purificación preliminar de muestras previa a la realización del análisis final por otra técnica. Varias muestras pueden ser analizadas sobre la misma placa junto con un estándar para chequear que el sistema global es propiamente operativo.

I.3 Cromatografía en gel o filtración molecular.-

La filtración molecular sobre gel es una técnica cromatográfica en la cual se utilizan las propiedades de criba de las partículas de un gel poroso para separar moléculas y sobre todo macromoléculas (proteínas, ácidos nucleicos, polisacáridos, etc.) en función de su tamaño molecular. Las partículas del gel consisten en una estructura tridimensional que presenta poros de un tamaño bastante pequeño como para impedir la entrada de moléculas grandes pero, al mismo tiempo, lo bastante grandes como para permitir la entrada de moléculas pequeñas. Sobre una columna de partículas de gel en equilibrio con un solvente adecuado, las moléculas de tamaño superior al de los poros más grandes del gel, pasan a través de la columna con la fase líquida móvil fuera de las partículas del gel y salen en el eluyente con el volumen de exclusión, mientras que las moléculas más pequeñas se distribuyen igualmente dentro y fuera de

estas partículas, siendo eluidas de la columna con un importante retraso en relación con las moléculas grandes. Las moléculas de un tamaño intermedio tienen una capacidad de penetración en el interior de las partículas del gel, en función de su talla. A mayor penetración, corresponde un mayor retraso, de manera que cada clase de moléculas sale de la columna después de un volumen de eluyente, mayor cuanto más pequeña es la molécula.

Para filtración molecular de fracciones polisacarídicas solubles en agua se preparan geles hidrofílicos de Sephadex G-150 y G-200 que retienen en sus mallas las moléculas sacarídicas con un peso molecular inferior a 150.000 y 200.000 D, respectivamente.

I.4.- *Cromatografía gas-líquido (GLC).*-

Este tipo de cromatografía utiliza un gas inerte como fase móvil y generalmente un líquido como fase estacionaria. El factor limitante para la elección de esta técnica es, que los componentes a cuantificar no volátiles puedan ser convertidos en derivados que si lo son. Sin embargo, esta técnica posee dos grandes ventajas: el corto periodo de tiempo necesario para la separación de los componentes y la alta precisión de la cuantificación.

El procedimiento de trabajo en GLC (Fig. 9) comienza inyectando la muestra en un bloque caliente, donde se evapora, y su vapor es arrastrado a través de la columna por el gas portador. Durante este periodo, las moléculas de los componentes de la muestra pasan parte del tiempo en la fase estacionaria y durante el tiempo restante son arrastradas por el gas portador a través de la columna. El retardo relativo de los diferentes componentes de la muestra es distinto y, por lo tanto, emergen de la columna separados en el tiempo.

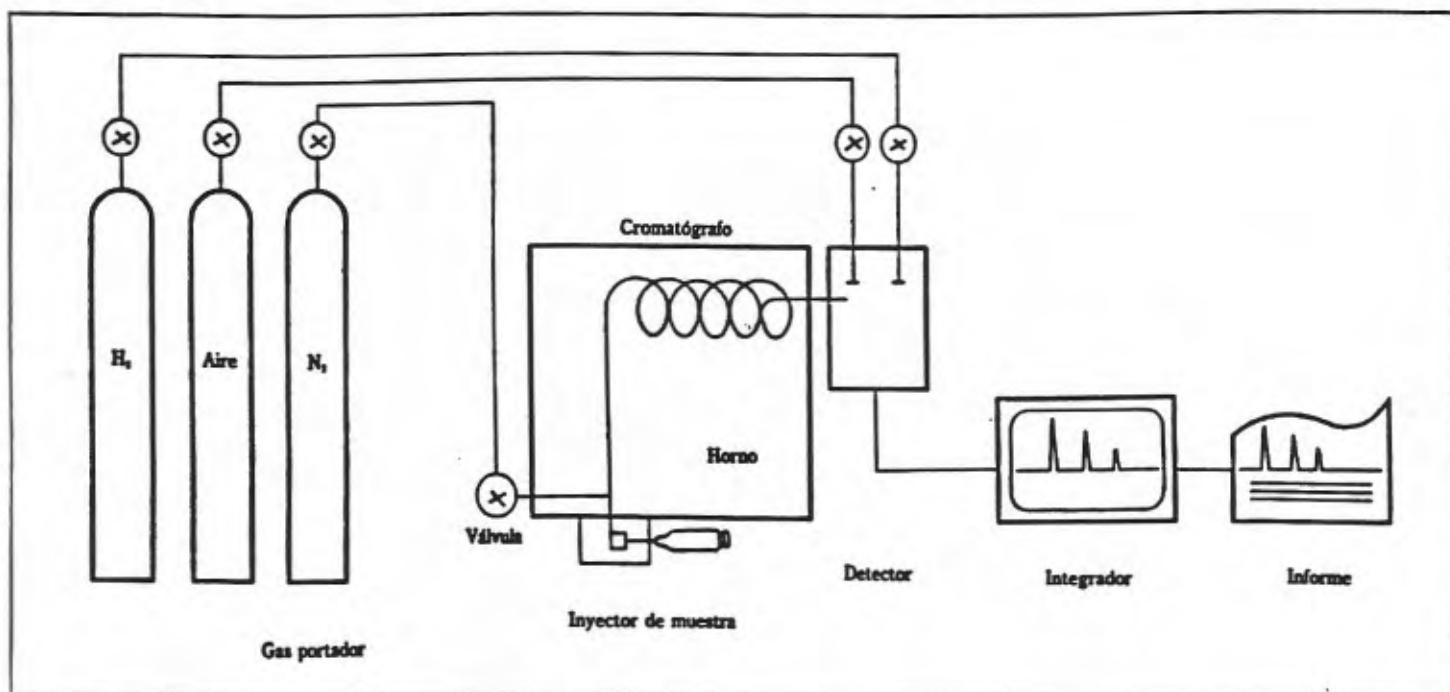


Fig. 9. Esquema de funcionamiento de un cromatógrafo de gases.

Durante todo el proceso, el sistema se lleva a suficiente temperatura como para mantener los componentes de la muestra en fase vapor. Por éello, las muestras deben ser suficientemente volátiles a la temperatura del análisis, y deben ser, también, suficientemente estables a esa temperatura, de manera que no tengan lugar descomposiciones durante el proceso cromatográfico.

Los cromatógrafos de gases contienen esencialmente.

1.- Una fuente de gas comprimido que proporciona la fase móvil (gas portador). Los gases más utilizados son He, N₂ y Ar.

2.- Un regulador de presión o flujo de gas portador.

3.- Un inyector, que es un dispositivo que permite la introducción de la muestra en la corriente del gas portador. Existe cierta variedad de diseño según el tipo de muestra que se trata de analizar: consiste en una cámara situada a la entrada de la columna y calentada independientemente de ésta (generalmente a temperatura superior al punto de ebullición del componente menos volátil de la muestra). El volumen interior ha de ser lo más reducido posible.

4.- Una columna cromatográfica.- Es el módulo donde se realiza la separación de la mezcla, siendo, por tanto, la parte más importante del instrumento.

5.- El horno donde se sitúa la columna, que debe poseer una buena regulación de la temperatura.

6.- Un detector, que es un dispositivo que permite medir de una manera continua una propiedad física del gas portador, la cual se modifica con la presencia de muy pequeñas concentraciones de la sustancia a analizar. Está situado a la salida de la columna.

7.- Sistema electrónico de amplificación y medida de la señal eléctrica enviada por el detector y registrador de la misma.

La GLC es útil en la caracterización de los monosacáridos liberados por hidrólisis de cualquier polisacárido después de la transformación de éstos en derivados volátiles (trimetil silil éteres y acetato o trifluoro acetato ésteres). También es de aplicación a la distinción entre enantiómeros D- y L- operando con columnas capilares sobre glicósidos de alcoholes quirales.

I.5. *Cromatografía líquida de alta presión (HPLC).*-

La HPLC es un método de separación basado en la distribución de los componentes en una mezcla de fases, la estacionaria y la móvil. Las mezclas en solución son conducidas por un solvente hasta el lecho de la columna de separación a un flujo constante, regulado por un sistema de bombeo a presiones altas (Fig.10). La separación vendrá dada por la diferente interacción de los componentes de la mezcla tanto con la fase estacionaria como con el solvente que los arrastra, o fase móvil. Al salir de la columna el eluyente pasa a través de un sistema de absorbancia, refracción, fluorescencia o conductividad eléctrica. Un sistema de registro representa estos cambios frente al tiempo transcurrido, como en la CG.

Existen diferentes modos de HPLC. La cromatografía de intercambio iónico se basa en la atracción que experimentan los constituyentes iónicos de la mezcla por las partículas cargadas del material que constituye la columna en la denominada cromatografía de adsorción en fase normal, siendo el medio de separación altamente polar mientras que la fase móvil es no polar. A partir de 1975 se introdujeron las llamadas invertidas ("reverse"): una fase estacionaria no polar, un compuesto hidrocarbonado hidrofóbico de 8 o 16 residuos, se halla en contacto con una fase móvil polar.

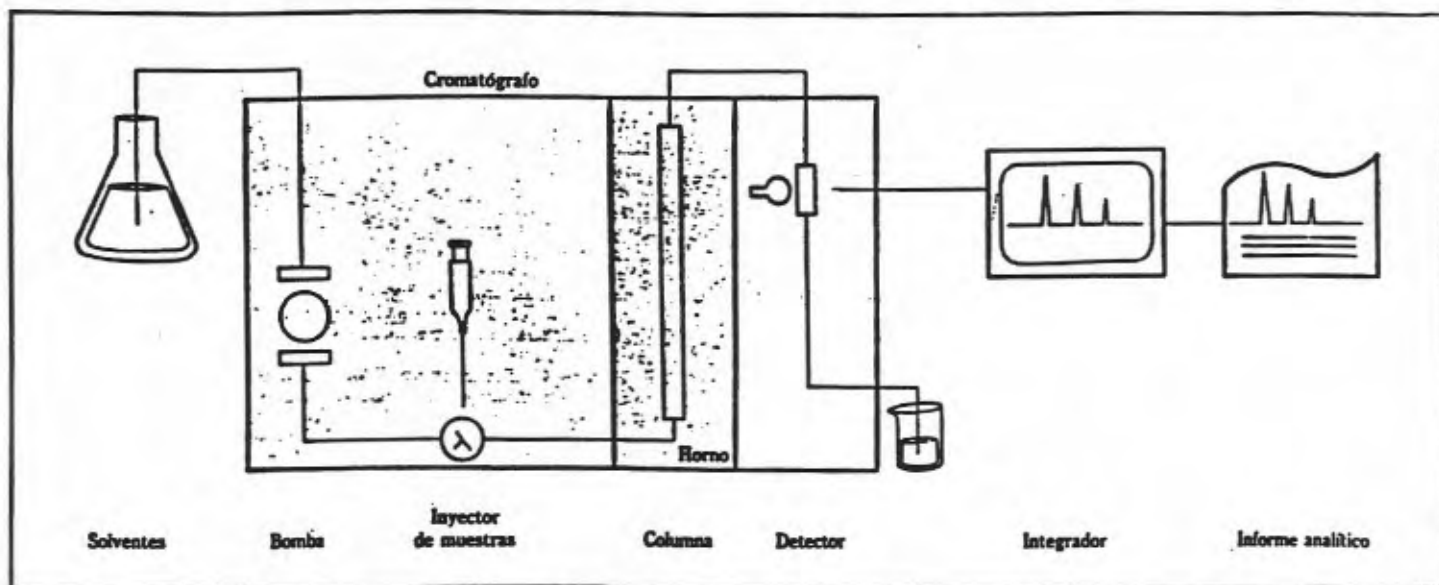


Fig. 10. Esquema de funcionamiento de un cromatógrafo de alta presión

Si el compuesto es fuertemente polar, es retenido pobremente por la columna apolar y pasará rápidamente. Al aumentar el carácter no polar de los analitos, serán retenidos con más fuerza por la columna de fase invertida. Esta forma de HPLC es considerada hoy día como la más versátil y más usada.

El desarrollo de la HPLC se ha dirigido a aumentar la eficacia y la resolución, disponiéndose de partículas empaquetadas uniformemente y cada vez más pequeñas ($3 \mu\text{m}$), pudiéndose reducir la longitud de las columnas y acortar notablemente el tiempo de análisis. La selectividad puede mejorarse utilizando fases estacionarias especiales: etil, fenil, propil, ciano, cambiando la concentración del solvente "fuerte" (el que eluye más rápidamente), o cambiando el pH (*ion-paring*). La utilización de partículas cada vez más pequeñas exige grandes estaciones a los equipos de HPLC. Ya que la identificación se basa en los tiempos de retención, se exige un suministro de solvente muy preciso a presiones entre cero y varias decenas de kilopascales.

Las ventajas de la HPLC no se han asociado tradicionalmente con la selectividad de la detección dado que utiliza como método de detección más común la absorción UV convencional, sino que el valor principal de la HPLC es su capacidad de eliminar interferencias antes de la detección convencional. Con todo, el utilizar una longitud de onda próxima al límite (195 nm) permite determinar sustancias muy diversas con sensibilidad razonable. Al igual que otras formas de cromatografía, la HPLC es una técnica altamente flexible, en la que numerosos analitos diferentes pueden ser determinados con el mismo instrumento y en la misma inyección.

Utilizando cromatografía de partición y cambio iónico, la HPLC permite el análisis directo de los monosacáridos liberados por hidrólisis de los polisacáridos a estudiar.

II. Técnicas espectroscópicas: Fundamentos y aplicaciones.

II.1. *Espectroscopía de Infrarrojo (IR)*

La espectrofotometría de infrarrojo (también llamada espectroscopía de IR) es una de las mejores herramientas para resolver problemas de estructura molecular y de identificación química. La región IR del espectro se extiende desde los 750 nm hasta unos 1000 μm (en longitudes de onda) o sus equivalentes desde 10 cm^{-1} hasta 13300 cm^{-1} (en números de onda), siendo su zona de mayor interés la llamada fundamental ($4000\text{-}400\text{ cm}^{-1}$). A esta región es a la que se hace normalmente referencia cuando no se califica el término infrarrojo y de ella se obtiene una gran cantidad de información cuali y cuantitativa acerca de los grupos funcionales y de la estructura molecular.

Los compuestos con distinta estructura presentan espectros de absorción IR distintos, excepto los isómeros ópticos y ciertos polímeros de alto peso molecular, los cuales pueden no ser diferenciables con los instrumentos habituales.

Existen dos requisitos para la absorción, siendo el primero de ellos que la frecuencia de la radiación IR corresponda exactamente a una frecuencia fundamental de vibración de la molécula considerada y el segundo, que la molécula experimente un cambio en el momento dipolar cuando tiene lugar la vibración fundamental.

Los espectrofotómetros IR clásicos tienen como componentes básicos: una fuente de energía radiante (emisor de Nernst, el Globar y filamentos incandescentes), un monocromador con cristal iónico como componente y un detector (termopares, bolómetros o detectores neumáticos de Golay).

La reciente aparición de espectrómetros infrarrojo con transformada de Fourier (cuyo elemento más importante es un interferómetro de Michelson) ha supuesto una revolucionaria innovación, debido a la facilidad de análisis de datos por uso de tales técnicas.

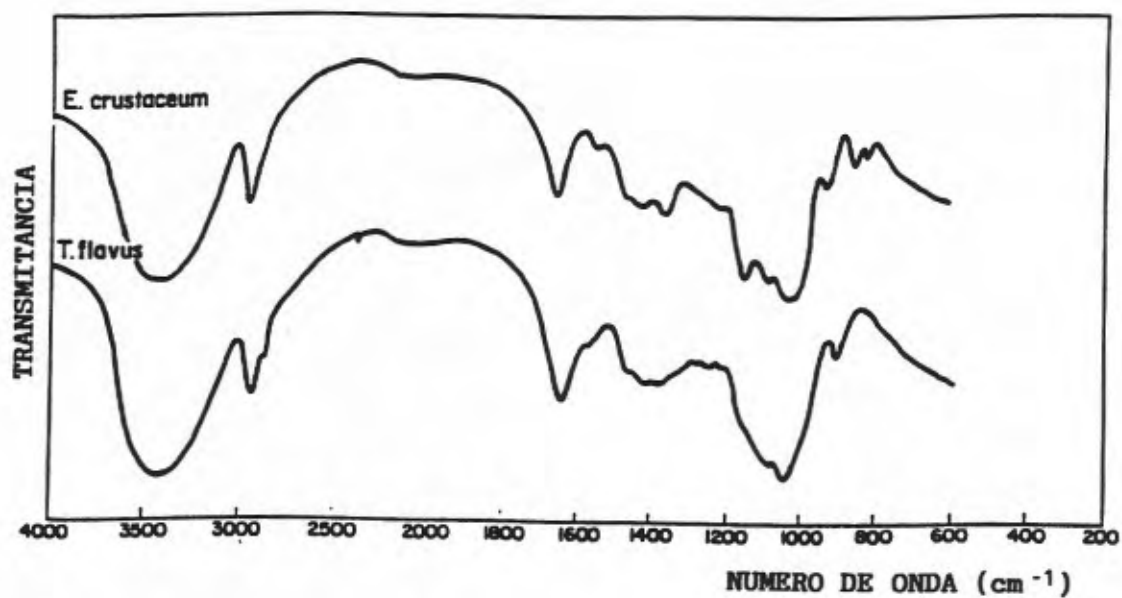


Fig. 11. Espectro IR de la fracción S de *Eupenicillum crustaceum* (CBS 635.70) y *Talaromyces flavus* (CBS 352.72). (Tomado de Gómez-Miranda y cols., 1988)

La revisión bibliográfica de las publicaciones que utilizan la espectroscopía de infrarrojo en la determinación de la estructura de los carbohidratos nos ha permitido sumarizar como información de utilidad la siguiente: Las bandas a 820 y 850 cm^{-1} son características de los espectros de los glucanos que poseen configuración α (Fig. 11), mientras los glucanos β -enlazados muestran absorción a 890 cm^{-1} (Barker, Bourne y Whiffen, 1956)

- Los residuos β -galactofuranosilo presentan frecuencias características a 810 y 870 cm^{-1} .

- La aparición de una banda a 920 cm^{-1} puede ser atribuida a enlaces β -(1-6) (Ebert y Zenk, 1966, 1967).

- Los N-acetil-amino azúcares (quitinas y otras hexosaminas) y proteínas absorben a 1650 y 1550 cm^{-1} , frecuencias características del enlace CO-NH.

- Los registros de ésteres saturados exhiben una banda a 1750 cm^{-1} , característica de su grupo carbonilo.

La aplicación de la espectrometría infrarrojo con transformada de Fourier (FT-IR) en el análisis estructural de carbohidratos se encuentra todavía en una fase inicial, pero su futuro es altamente prometedor en el análisis cuantitativo de mezclas (Mathlouthi y Koenig, 1986).

II.2. Espectroscopía de resonancia magnética nuclear (NMR).-

Esta técnica estudia la absorción molecular en la región de las radiofrecuencias (megahertz). Se utiliza para estudiar núcleos que poseen momento magnético de spin (Fig. 12). Primero se crea un campo magnético y posteriormente la muestra se irradia con la radiación de radiofrecuencia. Si la radiación es de la frecuencia

correcta será absorbida y producirá una transición entre los niveles de energía de spin nuclear. Actualmente, en los espectrofotómetros de NMR se utilizan campos magnéticos del orden de 5 a 23 KG y, en función de los núcleos a estudiar, se utiliza radiación de radiofrecuencia del intervalo de 5 a 100 MHz (60 a 3 m). La NMR es complementaria de la espectroscopía IR.

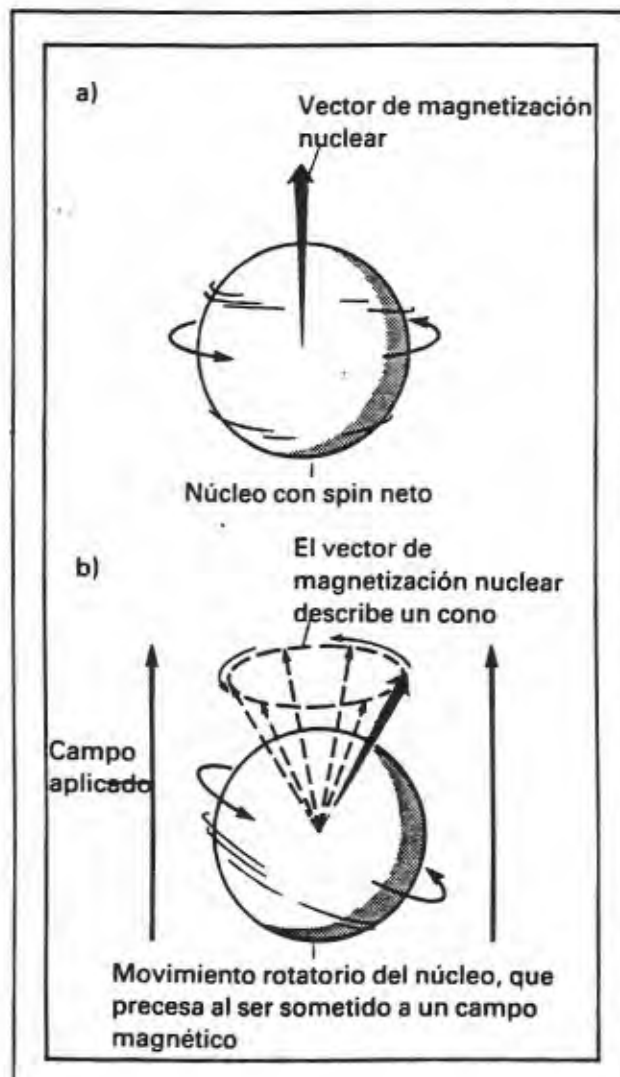


Fig. 12. Bases de la magnetización y spin nucleares.

a) Los núcleos de ciertos elementos tienen un movimiento de rotación o spin neto. Como tienen también carga eléctrica, este spin neto ocasiona un pequeño campo magnético. La magnitud y dirección de este campo magnético pueden ser representadas mediante un vector: El vector de magnetización nuclear. b) Si se sitúa en un campo magnético intenso y uniforme, el vector de magnetización nuclear se alinea formando un ángulo con el campo aplicado. El vector de magnetización nuclear rota alrededor, de la misma forma que lo hace una peonza cuando se desliza de la vertical. Esta forma de movimiento se llama precesión. Cuando el núcleo precesa, el vector de magnetización nuclear describe la superficie de un cono.

Un espectrómetro de NMR consta de una fuente de radiación (monocromática y generada por un oscilador de radiofrecuencia), un dispositivo de dispersión (un imán con un campo intenso y homogéneo) y un detector de radiofrecuencia.

En la interpretación de los espectros de NMR se utilizan tres de sus principales características: (1) la posición de las bandas espectrales (s.c., los desplazamientos químicos), que es importante porque da indicios de la posición estructural de los núcleos magnéticos (protón, ^{13}C , ^{14}N , ...); (2) la intensidad de las bandas (que da una medida del número de núcleos implicados) y (3) la multiplicidad (o desdoblamiento de los picos en bandas) que da información sobre los núcleos no ligados directamente a átomos de hidrógeno.

La espectroscopía de NMR tiene un conjunto de características que hacen que esta técnica sea especialmente ventajosa para el estudio de polisacáridos (Bovey, 1972; James, 1975; Jones, 1976). A diferencia de otros métodos físicos, la espectroscopía NMR no es destructiva. Es posible, por consiguiente, examinar un polímero sin modificarle o degradarle y, de este modo, recuperar el material en forma intacta. Hasta muy recientemente, los estudios de NMR de alta resolución han estado restringidos a soluciones, tal que no ha sido posible aplicarlos directamente a polisacáridos de baja solubilidad más que por técnicas de NMR de línea ancha (*wideline*). Estas limitaciones han sido sustancialmente resueltas (Schaefer y Stejskal, 1979) por nuevos métodos e instrumentación que dan espectros ^{13}C de alta resolución con muestras sólidas. De modo similar, la técnica de impulsos por transformada de Fourier (FT),

al incrementar la relación señal/ruido permite incrementar la sensibilidad. Estas técnicas permiten el examen de la naturaleza anomérica de los residuos azúcar por asignación de desplazamientos químicos y evaluación de constantes de acoplamiento.

Espectros $^1\text{H-NMR}$.- Para simplificar el análisis, se cambian los grupos hidroxilo por grupos deuteroxilo mediante tratamiento con óxido de deuterio. Sin embargo, se suele obtener un pico fuerte debido al agua residual (señal HOD) así como bandas laterales al pico, especialmente si la concentración de polisacárido es menor que 1 mM. Este pico es próximo a la señal H-1 de residuos β -glucopiranosilo y los problemas que origina pueden resolverse elevando la temperatura 70 °C aproximadamente.

La Tabla II da los desplazamientos químicos (δ) y las constantes de acoplamiento $^3J_{\text{H,H}}$ para núcleos de polisacáridos.

Las señales de los protones anoméricos están bien separadas de las señales producidas por la mayor parte de los otros protones. Este hecho simplifica en gran modo la determinación del número de diferentes tipos de residuos en un polisacárido y permite la estimación de sus proporciones relativas. También hace más fácil obtener de estas señales el desplazamiento químico y los parámetros de acoplamiento necesarios para asignar configuraciones anoméricas por espectroscopía NMR.

Espectros $^{13}\text{C-NMR}$.- El uso del modo FT es obligatorio para ^{13}C debido a la baja abundancia natural (1,1%) e intrínsecamente baja sensibilidad del núcleo 13. Los espectros bien definidos de ^{13}C obtenidos bajo condiciones de desacoplamiento protónico han proporcionado información valiosa sobre las propiedades de los polisacáridos (Gorin, 1981).

Tabla II. Desplazamientos químicos $1/3H$ (δ) y constantes de acoplamiento $J_{H,H}$ para núcleos de polisacáridos.

1H	δ (pmm)	$^3J_{H,H}(H_3)$
CH ₃ -C (desoxihexosas)	1.2 - 1.3	
CH ₃ -C (Piruvilo)	1.5 - 1.6	
CH ₃ -CON (Acetilo)	1.8 - 2.1	
CH ₃ -COO (Acetilo)	2.0 - 2.2	
H-2 a H-6	3.5 - 4.5	
H-5	4.5 - 4.6	
H-2 y H-3 de isómeros furánicos	4.2 - 4.5	
H-5 de ácidos urónicos		
H-1 axial (β)	4.5 - 4.8	7
H-1 ecuatorial (α)	5.3 - 5.8	4
OH (Hidroxilo)	5.0 - 5.4	
HCO ₂	5.9	

(Tomado de Latgé y Drouet, 1988)

Por ejemplo, un hexopirano que sea estructuralmente homogéneo o tenga una secuencia de repetición de 2 ó 3 unidades, puede dar 6, 12 ó 18 resonancias respectivamente (Fig. 13). Valores de $J_{C,H}$ pueden indicar configuración glicosídica.

La Tabla III da los desplazamientos químicos ^{13}C para núcleos de polisacáridos. Puede verse que los anómeros C-1 (α y β) dan desplazamientos químicos claramente definidos. Los grupos metilo aparecen bajo condiciones de campo alto (C-6 de 6-deoxihexosa a 16 ppm). Hexosas de la forma furano dan señales características (C-2, C-3, C-4 entre 83 y 87 ppm).

Hace dos décadas, la aplicación de la resonancia magnética nuclear en la caracterización de los componentes celulares, pasaba por el requerimiento de que las moléculas objeto de estudio fueran susceptibles de experimentar un rápido movimiento interno. Los polisacáridos cristalinos, tales como glucano o quitina, constitutivos de la porción esquelética interna de la pared celular de los hongos, no podían ser objeto de estudio por esta técnica al tener estructuras rígidas. Por el contrario, los homo y heteropolisacáridos amorfos componentes de la matriz de la pared externa, poseían estructuras flexibles y eran detectados por NMR. El escaso porcentaje de estos últimos componentes en la pared celular (por ej. los residuos β -galactofuranosilo representan un 6% de la misma), que constituye un inconveniente notable para su detección por otras técnicas, no resultaba serlo para la NMR. Desde 1975 tres equipos de investigación importantes vienen siendo operativos en la caracterización de polisacáridos por ^{13}C -NMR:

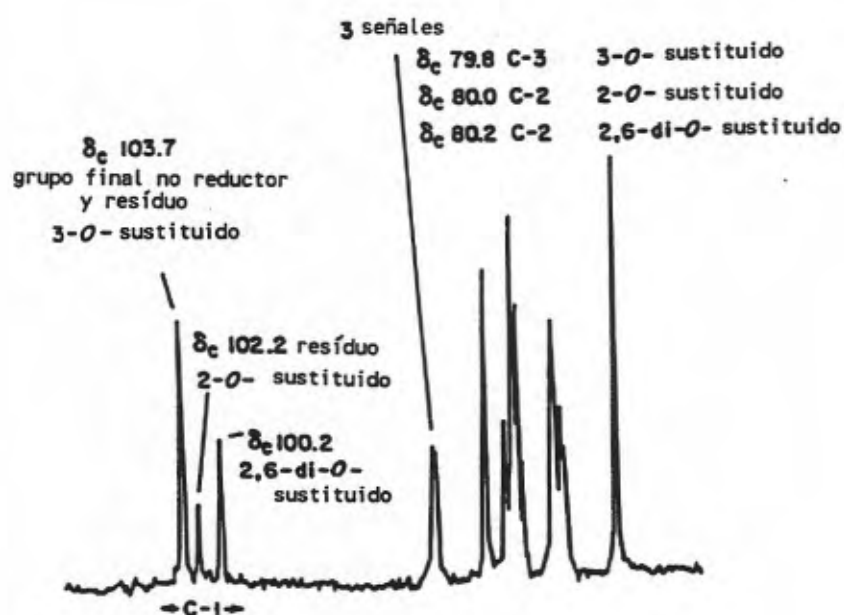


Fig. 13. Espectro ^{13}C -NMR de un α -D-manopirano de cadena ramificada (disolvente, D_2O ; temperatura, 70°C ; desplazamientos (δ) respecto a tetrametilsilano). (Tomado de Gorin, 1981)

Tabla III. Desplazamientos químicos ^{13}C para núcleos de polisacáridos

^{13}C	δ (pmm)
$\text{CH}_3\text{-C}$ (CH_3 de 6 desoxihexosas)	16 - 18
$\text{CH}_3\text{-C}$ (Piruvilo)	22 - 25
CH -CON (Acetilo) } $\text{CH}_3\text{-COO}$ (Acetilo) }	20 - 23
CH_2C	38
CH_3O	55 - 61
CH(NH)	58 - 61
C_6 (CH_2OH)	60 - 65
C-2 a C-5	65 - 75
C-2, C-3, C-4 forma furano	83 - 87
C-1 (axial, libre)	90 - 95
C-1 (ecuatorial, libre)	95 - 98
C-1 (axial, conjugado)	103 - 106
C-1 (ecuatorial, conjugado, furano)	106 - 109
COOH	174 - 175
C=O	175 - 180
C_6 (COOH de ácido urónico)	186

(Tomado de Latgé y Drouet, 1988)

El constituido por H.J. Jennings, A.K. Bhattacharjee, C.P. Kenny, A. Martin y ICP Smith trabajando sobre polisacáridos capsulares de *Neisseria meningitidis*; el formado por T.-Y. Liu, E.C. Gotshlich, W. Egan y J.B. Robbins, con el mismo tema; y el grupo de trabajo del Departamento de Química Agrícola de la Universidad de Tokio (T. Matsunaga, A. Okubo, M. Fukani, S. Yamazaki y S. Toda) interesado en la caracterización de polisacáridos de *Penicillium ochro-chloron*. A nivel individual, las investigaciones más provechosas han resultado ser las de Gorin, trabajando sobre mananos.

Hoy, la espectroscopía NMR de protón y ^{13}C ha superado sus limitaciones con nuevos métodos e instrumentación (loc. cit.) y ha incorporado a sus ventajas la posibilidad de dar información del número y proporciones relativas de los residuos, diferentes configuraciones de enlace y posiciones en homopolímeros, convirtiéndose así en una técnica de elección.

Al menos, la espectroscopía ^{13}C -NMR ha sido reconocida como un método excelente para examinar el grado de regularidad de secuencias en polisacáridos lineales conteniendo diferentes tipos de enlaces y/o residuos azúcar.

II.3. Pirólisis espectrometría de masas (Py-MS).-

El principal proceso en la pirólisis es el desdoblamiento térmico de las macromoléculas en sus bloques constructivos así como en pequeños fragmentos.

En tanto que la pirólisis se realiza en el vacío del espectrómetro de masas y las presiones en el área de reacción permanecen bajas, las reacciones demuestran ser intramoleculares.

Se obtiene una mezcla de productos volátiles cuya composición suministra información químico-estructural del material de partida.

El sistema automatizado de Py-MS se presenta esquemáticamente en la Fig. 14. Brevemente, consiste en un dispositivo de cambio de muestra (placa giratoria con capacidad variable), un reactor de pirólisis de punto de Curie con un generador de alta frecuencia, espectrometro de masas de cuadrupolo con detector de contaje iónico y un microcomputador.

La pirólisis se realiza por calentamiento inductivo de un alambre ferromagnético (Fe/Ni) hasta la temperatura de Curie en 0,1 s. El tiempo total de calentamiento es de 0,8 s. Los productos volátiles de la pirólisis entran en la cámara de ionización vía un volumen de expansión calentado (150°C) y son ionizados por un impacto electrónico de bajo voltaje (electrones 14 eV). Como resultado de la presencia de la cámara de expansión entre el reactor de pirólisis y la cámara de ionización, el pirolizado es aceptable para análisis durante 10 s, en los que la mezcla de iones es repetidamente barrida a una velocidad de 10 barridos/seg. Los barridos son acumulados en la memoria del microcomputador por un procedimiento de señal promedio. El rango de masas barrido suele ser entre 15 y 153 uma. Los espectros pueden almacenarse en discos blandos para, posteriormente, ser transferidos a un computador central mayor que efectúe procesado de datos. La Py-MS fué desarrollada en la segunda mitad de la década de los 70 por H.L.C. Meuzelaar, P.G. Kistemaker y W.Eshuis y puesta a punto por A.K. Bhattacharjee y H.J. Jennings, simultáneamente a otra técnica relacionada, que consideraremos en el epígrafe siguiente.

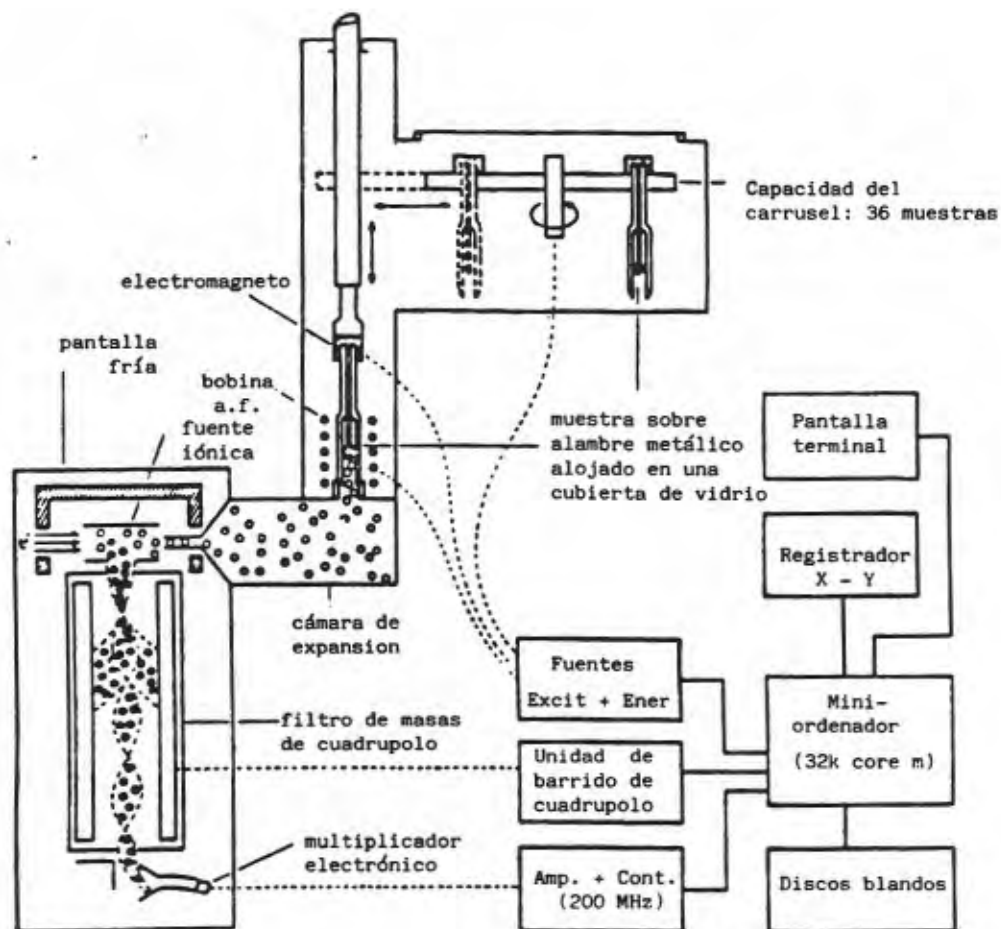


Fig. 14. Esquema de un instrumento Py-MS completamente automatizado. (Tomado de Haverkamp, 1988)

La Py-MS es considerada una técnica universal, aplicada hasta el presente a aspectos muy diversos de diferentes campos de la investigación biológica y médica, como p. ej., clasificación e identificación de microorganismos procarióticos (Meuzelaar y col., 1976), hongos (Weijman, 1976, 1977a, 1977b; de Hoog, 1977; Meuzelaar, 1974), caracterización de tipos de suelo y depósitos geológicos (Maters y col., 1977; Halma y col., 1979), y biopolímeros (Posthumus y col., 1974). En lo que respecta a aminoazúcares poliméricos y polisacáridos neutros, los siguientes picos han sido considerados característicos:

- Aminoazúcares poliméricos m/e 95, 97, 109, 125, 137 y 151
- Polisacáridos neutros m/e 82, 96, 98, 110, 112 y 126

como se ejemplifican, respectivamente, en los espectros de quitina y celulosa de *Saprolegnia ferax* (Fig. 15).

II.4. Cromatografía gas-líquido - espectrometría de masas (GLC-MS)

Esta técnica aprovecha el carácter volátil de los productos cromatografiados para su introducción en la cámara de ionización del espectrómetro.

La asociación de la GLC y la MS supone el modo más fácil de identificación de los monosacáridos metilados obtenidos por hidrólisis o metanolisis de permetil-polisacáridos.

Después de la metanolisis de los permetil-polisacáridos y acetilación de metil-glicósidos parcialmente metilados, todos los azúcares metilados, así como sus formas metilglicosídicas acetiladas, pueden ser identificadas por GLC-MS sobre columnas capilares (loc. cit.).

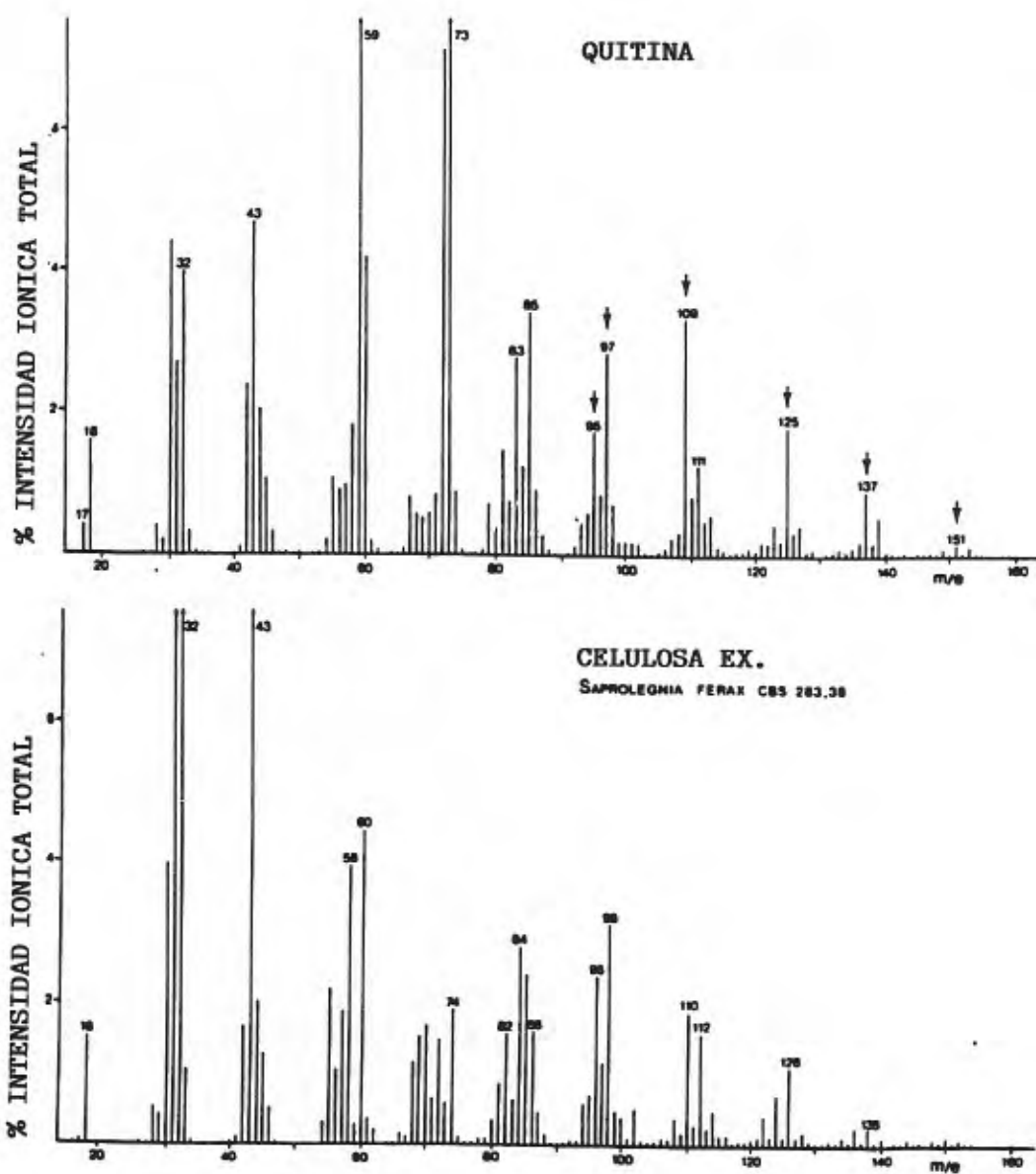


Fig. 15. Espectros Py-MS de quitina y celulosa extraídas de *Saprolegnia ferax* (CBS 283.38). (Tomado de Weijman, 1979)

III. Técnicas citoquímicas y relacionadas

Son aquellas que, desarrolladas hace años por la histología óptica, permiten no solo caracterizar, sino también visualizar los componentes estructurales de interés en las células (Latgé, 1987). Hoy son herramientas adicionales imprescindibles en microscopía electrónica de transmisión. Entre ellas podemos reconocer:

(a) *Los métodos que utilizando sustancias catiónicas permiten detectar los agrupamientos aniónicos (esencialmente SO_4^{2-} y $COOH^-$).* Aunque no específicos de componente celular alguno, estos métodos pueden ser muy útiles para estudiar la modificación de los polisacáridos de la pared de los hongos en el curso de la morfogénesis. Los reactivos más frecuentemente utilizados son el rojo de rutenio, el hierro coloidal y la ferritina cationizada (Schrevel, 1981; Aldrich, 1986).

(b) *La técnica de Schiff empleando el ácido periódico.* La oxidación periódica transforma en aldehídos los azúcares que posean dos agrupamientos hidroxilos vecinos libres (tales como los 1-2, 1-6 (galacto)mananos ó 1-4 glucanos, al contrario de los β -(1-3) glucanos y α -(1-3) mananos). Los aldehídos son visualizados con el complejo tiosemicarbazida o tiocarbohidrazida-proteinato de plata (Paris, Prevost, Latgé y Garrison, 1986).

(c) *Las sondas a base de lectina* permiten obtener una información ventajosa sobre la naturaleza específica de los azúcares que entran en la composición de los polisacáridos fúngicos. Las lectinas más frecuentemente utilizadas en microscopía fúngica son la concavalina A (conA) específica de los radicales

α -manosilo y α -glucosilo; la lectina de *Triticum vulgare* (WGA), específica de los radicales N-acetil-glucosamina y las lectinas aisladas de *Ricinus communis* (RCA), *Glycine max* (SBA) y *Bandeira simplicifolia* (BsI) reconociendo los residuos galactosa (Horisberger y Vonlanthen, 1977; Latgé y col., 1986). Las lectinas son visualizadas directamente por acoplamiento al oro coloidal o a la ferritina, o indirectamente, utilizando el monosacárido específico acoplado a un marcador denso a los electrones. La utilización de lectinas está perfectamente adaptada a la localización de la quitina y de los (galacto) mananos pero no a la de los β -(1-3) glucanos.

(d) La degradación por enzimas específicas y, sobre todo, la utilización de anticuerpos poli- o monoclonales específicos de un polisacárido de estructura química conocida, se muestran también prometedores. El último de estos métodos ha podido ser aplicado a la localización de β -(1-3) glucanos y α -(1-2) mananos tras visualización de los anticuerpos fijados por medio de otro anticuerpo específico o de la proteína A acoplada al oro coloidal.

D. El Análisis Térmico como método alternativo en la sistematización de bacterias y hongos.

D.1. Técnicas basadas en la Termogénesis de Microorganismos. Utilidad de las Curvas Microcalorimétricas en la Identificación de Bacterias.

Los avances en instrumentación analítica han conducido al desarrollo de nuevas metodologías para la detección e identificación de microorganismos patógenos, siendo algunas de ellas lo suficientemente rápidas, sensibles y específicas para resultar de interés en Microbiología Diagnóstica. Uno de estos métodos es la Microcalorimetría.

Un microorganismo en crecimiento en un medio de cultivo definido se caracteriza por una termogénesis específica y reproducible. El registro de la producción de calor durante el crecimiento bacteriano como una función del tiempo (curvas P-t o curvas d-t, obtenidas como derivación de las primeras) depende, debido a la actividad metabólica del cultivo, de las condiciones culturales (composición del medio, temperatura, etc) y del tipo de microorganismo. El crecimiento bacteriano en un medio de cultivo mínimo origina curvas P-t llanas, mientras que en un medio complejo la variedad de etapas metabólicas características de cada especie bacteriana queda reflejada en curvas P-t que permiten diferenciar las mismas utilizando una técnica de análisis adecuada (Rius y cols., 1988).

El desarrollo de una técnica taxonómica basada en la Microcalorimetría puede potenciarse mediante el control de las condiciones iniciales del cultivo, el inóculo y el tratamiento de la información a partir de los datos microcalorimétricos obtenidos.

Para la aplicación de las curvas microcalorimétricas de cultivos bacterianos en la identificación bacteriana, se suele elegir el medio TBS suplementado con KNO_3 y 37°C como temperatura de incubación; el tamaño inicial del inóculo debe ser de aproximadamente 100.000 bacterias por mililitro. Los termogramas (curvas P-t y d-t) se han registrado con un calorímetro tipo Calvet, siendo los parámetros calorimétricos empleados en el análisis la Energía total disipada (E) y el Ritmo máximo de potencia de disipación (R). E se define como la integración numérica de la función Q/dt , y R, como valor máximo de la función derivada $d/dt (Q(t))$.

Para el estudio comparativo de resultados se utiliza el programa de análisis discriminante P7M (Jennrich y Sampson, 1983) del paquete estadístico BMDP. Los cálculos se procesan por ordenador (IBM 3083). El programa selecciona un conjunto reducido de N variables como variables canónicas para llevar a cabo el análisis discriminante de las cepas a partir de la semejanza de sus curvas P-t. Una vez finalizado el análisis, cada caso estudiado se representa por un punto en un espacio N-dimensional. El valor de la distancia entre dos puntos es un reflejo de las semejanzas entre las respectivas curvas P-t de las cepas estudiadas.

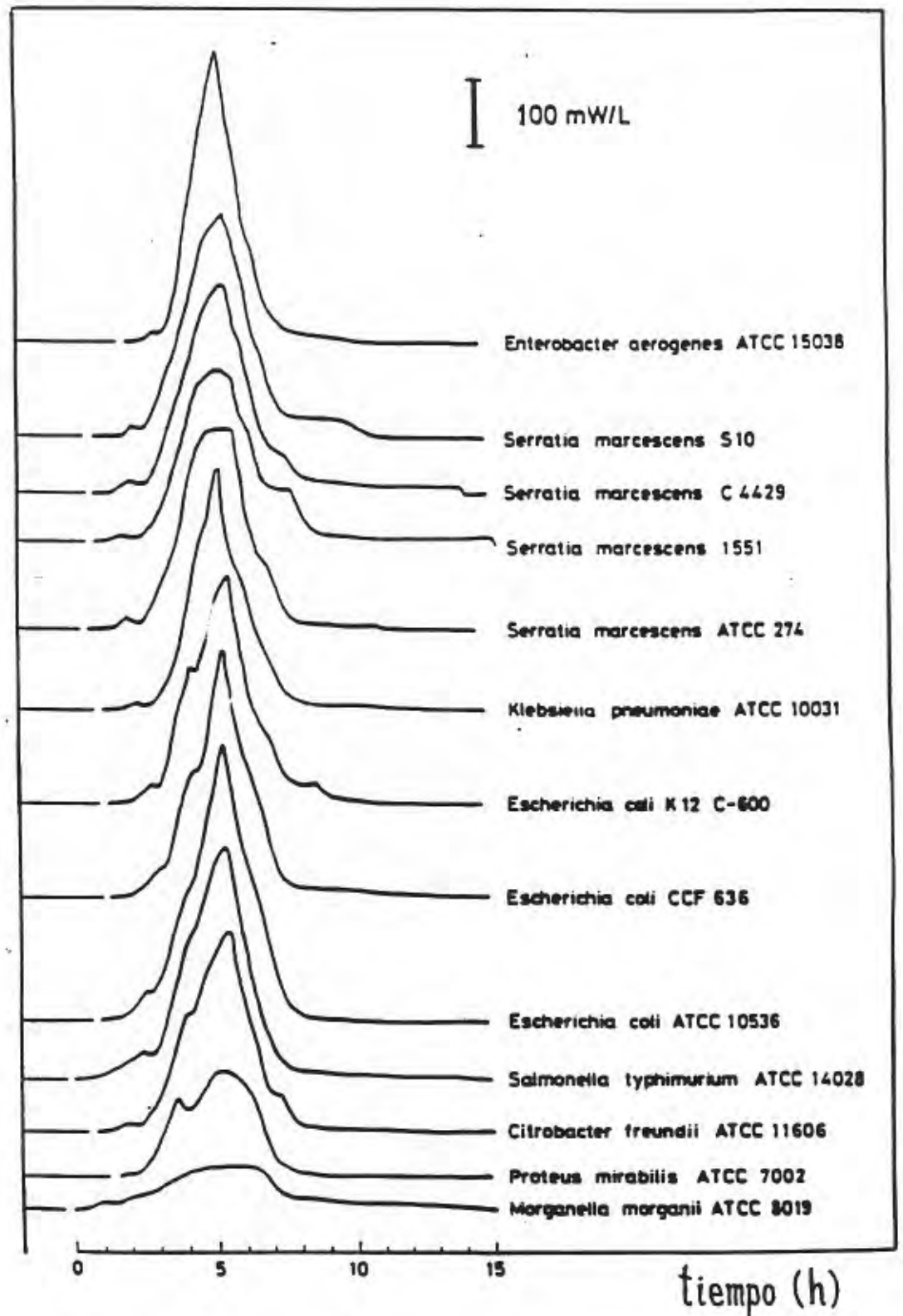


Fig. 16. Termogramas de cepas de la familia *Enterobacteriaceae*.
(Tomado de Rius y cols., 1988)

La Fig. 16 muestra los termogramas de las cepas estudiadas. En la Fig. 17. observamos la posición relativa de las distintas cepas bacterianas analizadas, utilizando la técnica del análisis discriminante. Los mejores resultados se obtienen usando como variables los parámetros E y R y los termogramas, tal como puede observarse en la Fig. 17. La Tabla IV muestra las distancias estadísticas (D^2) entre distintas especies. Los valores bajos corresponden a bacterias que presentan una gran similitud entre los parámetros microcalorimétricos estudiados y, por consiguiente entre sus actividades metabólicas.

Finalmente, aplicando este enfoque experimental a la identificación de distintas cepas de una misma especie bacteriana y en base a los resultados obtenidos para cepas de *Serratia marcescens* (Fig. 18a) y *Escherichia coli* (Fig. 18b), cabe destacar el poder discriminatorio del análisis propuesto al comparar cepas de una misma especie que solo difieren en escasas características morfológicas o bioquímicas.

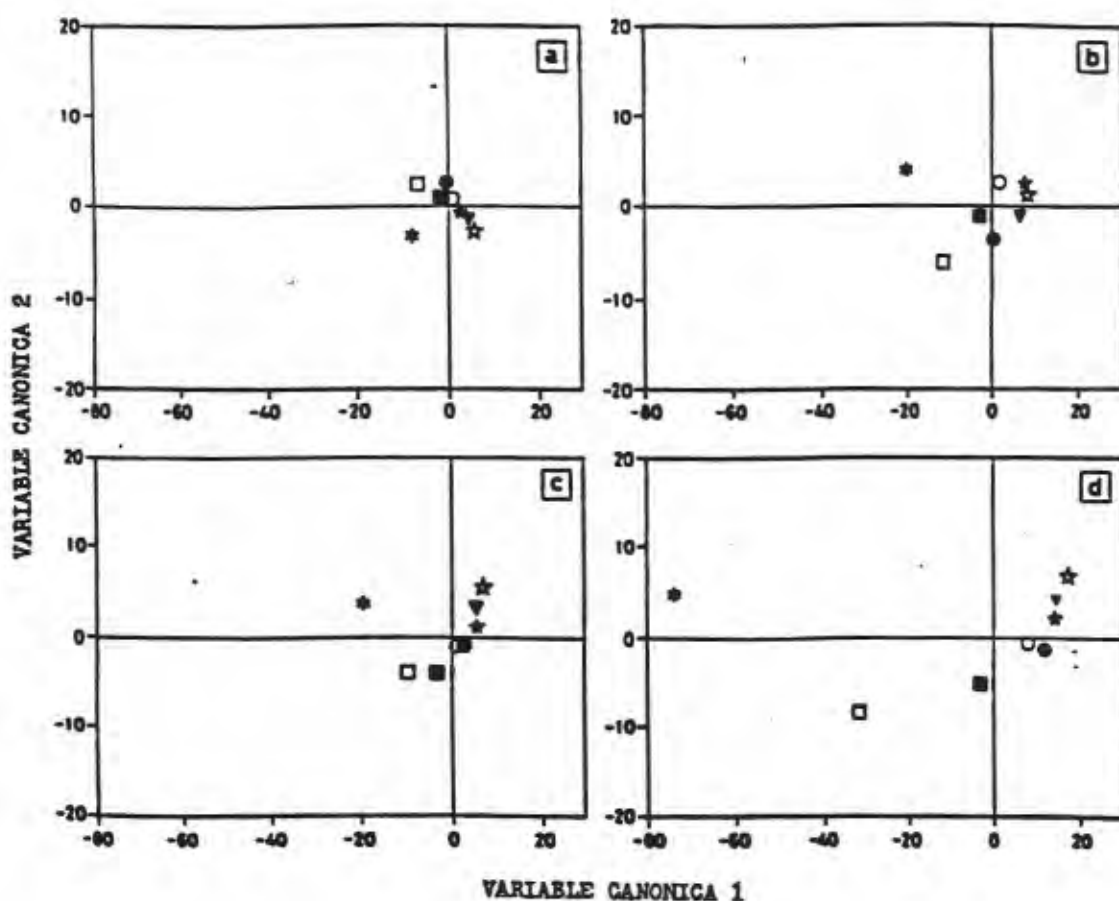


Fig. 17. Posición relativa de cepas bacterianas utilizando distintos parámetros microcalorimétricos como variables en el análisis discriminante. (a) curvas P-t; (b) curvas P-t y d-t; (c) curvas P-t y d-t y parámetro R; (d) curvas P-t y d-t y parámetros E y R. Las variables canónicas 1 y 2 de cada diagrama son, respectivamente, curvas P-t de *E. coli* 636 y *S. typhimurium* ATCC 14028 (a), *S. marcescens* 1551 y *E. coli* 636 (b), *S. marcescens* 1551 y *S. typhimurium* ATCC 14028 (c) y *S. marcescens* 1551 y *C. freundii* ATCC 11606 (d). (Tomado de Rius y cols., 1988).

☆ *E. aerogenes*; ★ *S. marcescens*; ▼ *K. pneumoniae*; ● *E. coli*;
 ○ *S. typhimurium*; ■ *C. freundii*; □ *P. mirabilis*; * *M. morgani*

Tabla IV. Distancias estadísticas (D^2) entre distintas especies de la familia *Enterobacteriaceae*.

	<u>E. aerogenes</u>	<u>S. marcescens</u>	<u>K. pneumoniae</u>	<u>E. coli</u>	<u>S. typhimurium</u>	<u>C. freundii</u>	<u>P. mirabilis</u>
<u>M. morgani</u>	8139	7578	7691	7098	6557	4861	1922
<u>P. mirabilis</u>	2639	2219	2324	1908	1679	819	
<u>C. freundii</u>	621	384	456	287	172		
<u>S. typhimurium</u>	170	57	94	47			
<u>E. coli</u>	149	60	65				
<u>K. pneumoniae</u>	31	18					
<u>S. marcescens</u>	65						

(Tomado de Rius y cols., 1988)

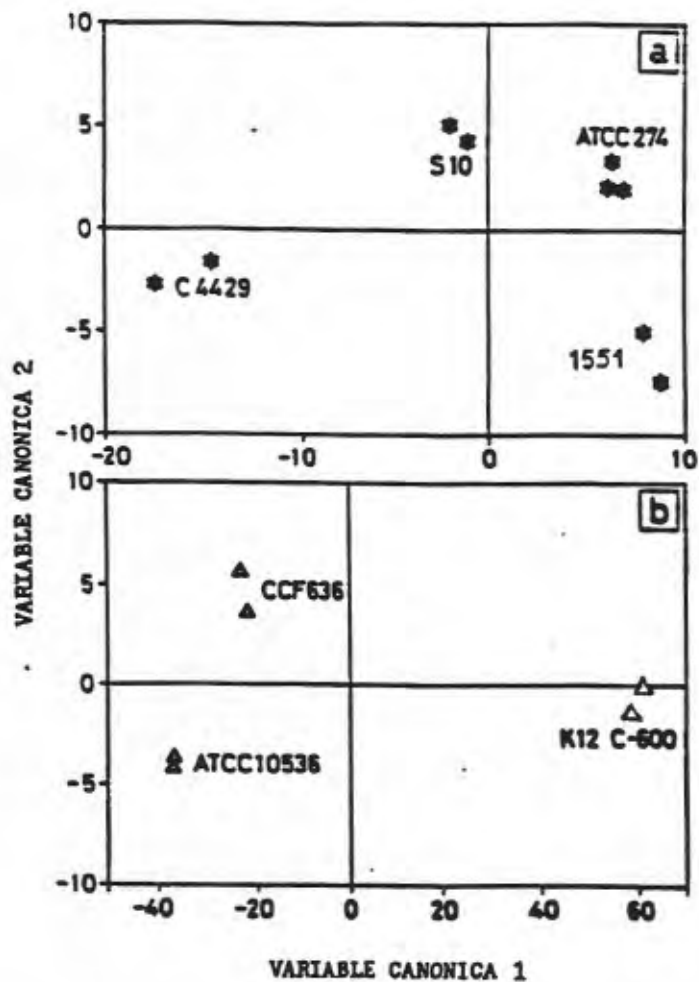


Fig. 18. Posición de las cepas bacterianas de las especies (a) *Serratia marcescens* y (b) *Escherichia coli* una vez efectuado el análisis discriminante. Las variables canónicas 1 y 2 son en (a) las curvas P-t y d-t de *S. marcescens* ATCC 274 y en (b) las curvas d-t de *E. coli* 636 y *E. coli* ATCC 10536, respectivamente. (Tomado de Rius y cols., 1988)

D.2. Técnicas de Termolisis: TG-DTG, DTA y DSC. Sus principios y fundamentos. Precedentes de su aplicación en Microbiología.

D.2.1. Principios fundamentales de los sistemas termogravimétricos y térmico diferenciales.

El calor puede usarse como reactivo. Al someter a un amplio intervalo de temperaturas una sustancia, ésta puede sufrir termolisis, con cambios físicos y químicos evidenciables. Tales cambios implican a veces una ganancia o pérdida de peso, pero de cualquier modo, siempre van acompañados por absorción o liberación de energía en forma de calor. La velocidad y la temperatura a las que los materiales presentan transiciones físicas y químicas a medida que se calientan (y enfrían), así como los cambios de energía y de peso involucrados en dichas transiciones, constituyen el objetivo del Análisis Térmico (TA).

Instrumentos de Análisis Térmico.-

Todos los instrumentos de TA tienen rasgos comunes que se ponen de manifiesto en la Fig. 19. La variedad de las técnicas resulta de la variedad de las propiedades físicas que pueden ser medidas y de la variedad de los transductores que pueden ser utilizados para convertir estas propiedades en señales eléctricas. Las determinaciones son generalmente continuas y normalmente, pero no necesariamente, la velocidad de calentamiento es lineal con el tiempo. El resultado de tales medidas es una curva de análisis térmico, cuyas características se tratarán más adelante.

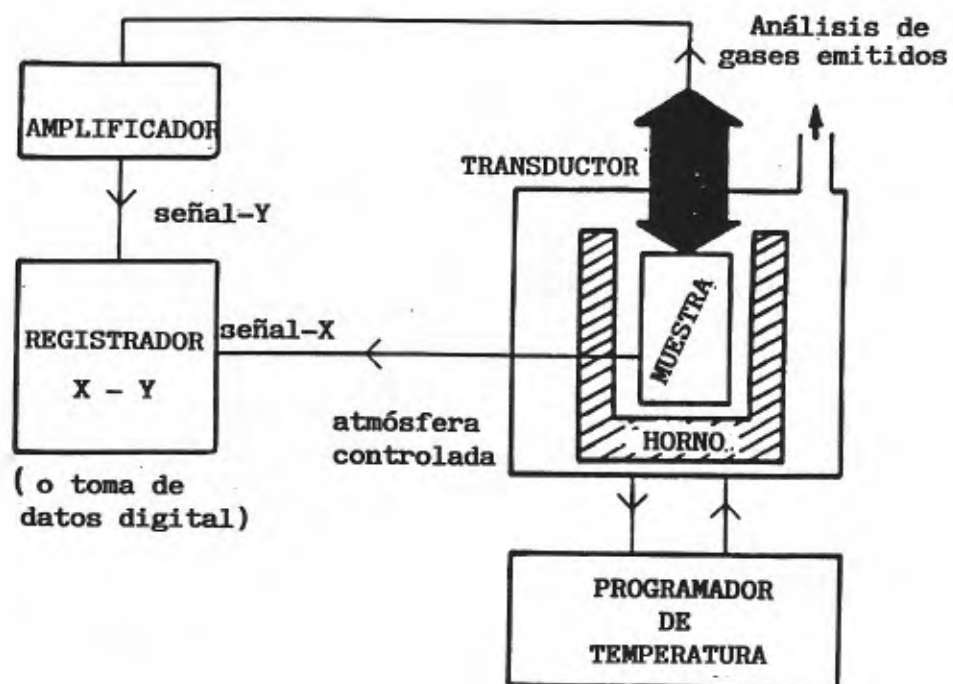


Fig. 19. Esquema general de un instrumento de análisis térmico.

Tipos de medidas.-

Pueden registrarse valores absolutos de una propiedad física de la muestra (masa, cambios dimensionales), o bien la diferencia entre una propiedad de la muestra y la misma propiedad de un material de referencia (ΔT , ΔH). También puede ser de interés medir la velocidad de cambio de una propiedad de la muestra con la temperatura (medidas derivadas).

Técnicas principales.-

Las diferentes técnicas de que consta el TA van asociadas con la propiedad específica que son capaces de medir. La Tabla V recoge su enumeración de acuerdo con el Comité de Nomenclatura de la International Confederation for Thermal Analysis (ICTA).

Tabla V. Técnicas principales en Análisis Térmico

Propiedad	Técnica	Abrev.
Masa	Termogravimetría	TG
	Termogravimetría Derivada	DTG
Temperatura	Análisis Térmico Diferencial	DTA
Entalpía	Calorim.Diferencial de Barrido	DSC
Dimensiones	Termodilatometría	
Prop. mecánicas	Análisis termomecánico	TMA
	Análisis mecánico dinámico	DMA
Prop. magnéticas	Termomagnetometría	TM
Prop. ópticas	Termofotometría o Termomicroscopía	
Prop. eléctricas	Termoelectrometría	

Todas estas técnicas pueden combinarse con el Análisis de gases emitidos (EGA) y, a menudo, es posible obtener medidas simultáneas de más de una propiedad.

Procesos térmicos de sólidos.-

Cuando una sustancia pura, A, en estado sólido, es calentada en una atmósfera inerte, el resultado es un incremento de la movilidad de sus átomos, moléculas o iones. Como consecuencia, puede tener lugar un cambio en la estructura cristalina, una sinterización, una fusión o una sublimación. Si las fuerzas intramoleculares de dicho sólido son más débiles que las fuerzas intermoleculares, la sustancia puede descomponerse formando fragmentos moleculares nuevos, algunos de los cuales, o todos ellos, pueden ser volátiles a mayores temperaturas.

Las reacciones resultan más complicadas cuando el sólido inicial puede reaccionar con la atmósfera circundante (aire, O_2 , CO_2 , ...).

Cuando inicialmente están presentes más de una sustancia sólida, aumenta el número de posibilidades de interacción en el calentamiento, pudiendo aparecer nuevas fases como soluciones sólidas, mezclas eutécticas o nuevos compuestos por reacciones de adición o doble descomposición.

Las transformaciones a las que hemos hecho referencia están casi siempre acompañadas de cambios de entalpía (calor a presión constante), y también, algunas veces, por cambios de masa; por lo tanto, pueden ser estudiadas utilizando una o más de las técnicas de análisis térmico de la Tabla anterior.

Los fenómenos térmicos más importantes se resumen, esquemáticamente, en la Tabla VI.

Tabla VI. Fenómenos térmicos en sólidos

$A(s_1)$	$\left\{ \begin{array}{l} \longrightarrow A(s_2) \\ \longrightarrow A(l) \\ \longrightarrow A(g) \\ \longrightarrow B(s)+gases \\ \longrightarrow gases \end{array} \right\}$	transición de fase fusión sublimación descomposición	$\left\{ \begin{array}{l} \text{t\u00e9rmica} \\ \text{radiol\u00edtica} \end{array} \right\}$
$A(\text{crist.})$	$\longrightarrow A(\text{amorfo})$	transici\u00f3n v\u00edtreas	
$A(s) + B(g)$	$\longrightarrow C(s)$	$\left\{ \begin{array}{l} \text{oxidaci\u00f3n} \\ \text{deslustrado} \end{array} \right\}$	
$A(s) + B(g)$	$\longrightarrow \text{gases}$	$\left\{ \begin{array}{l} \text{combust\u00edon} \\ \text{volatilizaci\u00f3n} \end{array} \right\}$	
$A(s) + \text{gas}_1$	$\longrightarrow A(s) + \text{gas}_2$	cat\u00e1lisis heterog\u00e9nea	
$A(s) + B(s)$	$\longrightarrow AB(s)$	adici\u00f3n	
$AB(s) + CD(s)$	$\longrightarrow AD(s) + CB(s)$	doble descomposici\u00f3n	

D.2.1.a. Sistemas Termogravimétricos.

El Análisis Termogravimétrico proporciona al analista una medición cuantitativa de cualquier cambio de peso asociado con una transición. Por ejemplo, la Termogravimetría, TG, puede registrar directamente la pérdida de peso con respecto al tiempo o la temperatura, debida a deshidrataciones o descomposiciones. Las curvas termogravimétricas son características de cada compuesto o sistema, debido a la secuencia singular de las reacciones físico-químicas que se verifican en determinados intervalos de temperatura y a velocidades que son función de la estructura molecular. Con estas curvas se obtienen datos relativos a la termodinámica y la cinética de diversas reacciones químicas, los mecanismos de reacción y los productos intermedios y finales involucrados.

En la Termogravimetría Derivada, DTG, la señal de medición real aparece como una gráfica derivada de la pérdida o ganancia de peso, la cual ayuda a la asignación precisa de los puntos de iniciación y terminación de reacciones que se presentan superpuestas en TG.

En TG, la muestra se pesa continuamente a medida que se calienta hasta temperaturas elevadas. Las muestras se colocan en un crisol o en un portamuestras de poco fondo, que se conecta a una balanza de registro automático. La balanza de tipo de equilibrio a cero incorpora un elemento sensor que detecta cualquier desviación del fiel de la balanza con respecto a la

posición de equilibrio. Un transductor está formado por un par de fotocélulas, una bandera ranurada conectada al brazo de la balanza y una lámpara (Fig. 20). Una vez que se ha establecido un equilibrio inicial, cualquier cambio de peso hará que la balanza gire. Esto provoca que la bandera se mueva, de tal manera que la luz incidente en ambas fotocélulas ya no es igual. La señal resultante se amplifica y se retroalimenta con una corriente a un motor de torsión de banda tirante (el punto de pivote de la balanza) para restaurar el equilibrio de la balanza.

Esta corriente es proporcional a la variación de peso y se registra en el eje y del registrador. También pueden detectarse los cambios de masa por contracción o dilatación de un resorte helicoidal preciso, cuyo movimiento se detecta por el desplazamiento de un núcleo en un transformador diferencial de variación lineal (Fig 21).

La temperatura del horno se registra continuamente por medio de un termopar cuya señal se aplica al eje x del sistema de tratamiento de datos. Por lo general, se emplean velocidades lineales de calentamiento de 5-20°C por minuto (en nuestro caso, ha sido encontrada óptima la de 10°C/min).

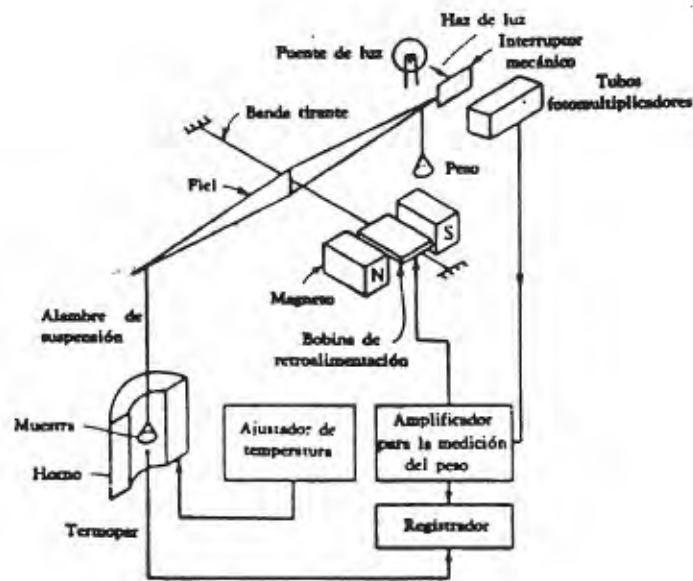


Fig. 20. Diagrama esquemático del equipo de TG con sensor óptico.

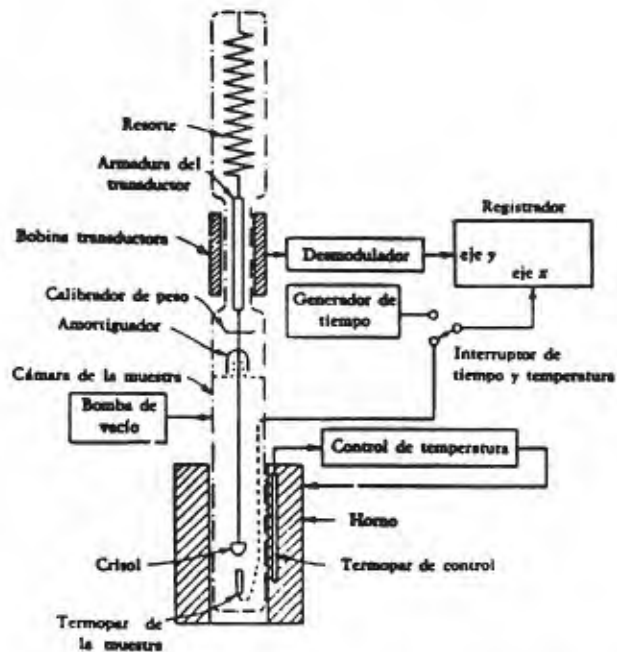


Fig. 21. Diagrama modular de una unidad de TG con resorte y bobina transductora como sensor.

D.2.1.b. Análisis Térmico Diferencial (DTA) y Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC).

La finalidad de los sistemas térmicos diferenciales es registrar la diferencia de temperatura o el cambio de entalpía que tiene lugar entre una muestra y un material inerte de referencia, cuando ambos están sometidos a un programa controlado de temperatura. Estos sistemas pueden clasificarse en tres tipos: (a) DTA clásico; (b) DTA "Boersma"; y (c) DSC.

DTA Clásico y DTA "Boersma"

El DTA es la técnica más simple y más ampliamente utilizada en análisis térmico. Con esta técnica se registra la diferencia de temperatura, ΔT , entre la muestra y un material de referencia, mientras ambas están bajo un mismo programa controlado de temperatura, p.ej., un calentamiento a $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$. En los sistemas de DTA clásico y DTA "Boersma", tanto la muestra como la referencia son calentadas por una sola fuente de calor.

En los instrumentos de DTA clásico las temperaturas son medidas por sensores (termopares) introducidos dentro de los materiales de muestra y de referencia (Fig. 22a).

Actualmente, los calorímetros DTA son tipo "Boersma". En este tipo de instrumentos muestra y referencia, contenidas en crisoles semejantes, son colocadas sobre bases termoconductoras individuales. Las juntas de los termopares están soldadas a estas bases (Fig. 22b). Tal configuración tiene la ventaja de que la señal de salida es independiente de las propiedades térmicas de la muestra.

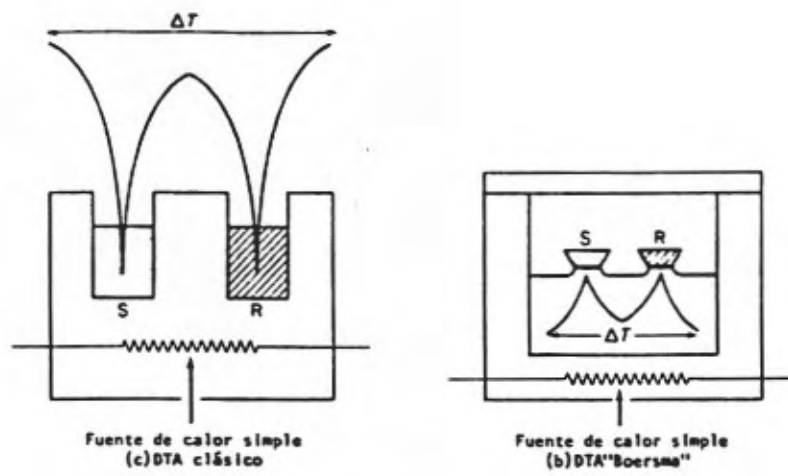


Fig. 22. Fuentes de calor simple en (a) DTA clásico y (b) DTA "Boersma".

En los registros que se obtienen, aparece representada la diferencia de temperatura entre muestra y referencia, $\Delta T = T_s - T_r$, en ordenadas, frente a la temperatura del horno, T_h , en abcisas (Fig. 23).

En un proceso endotérmico ($\Delta H > 0$, p.ej., una fusión), ocurre que la temperatura de la muestra, T_s , se retrasa con respecto a la de la referencia, T_r , cuando ambas son calentadas bajo el mismo programa de flujo de calor. Si la salida de los termopares, $\Delta T = T_s - T_r$, es registrada frente a T_r (o temperatura del horno, T_h , $T_r \approx T_h$) el resultado sería la curva de la Fig. 23. Si el proceso es exotérmico ($\Delta H < 0$, p.ej. una oxidación), el pico saldría en posición contraria a la anterior. Como la definición $\Delta T = T_s - T_r$ es bastante arbitraria, cada curva de DTA debe aparecer con una indicación de la dirección ENDO > o EXO > en el eje de ordenadas. Dentro del registro, la temperatura más apartada de la línea de base es la T_{max} ; esta temperatura de pico depende de la velocidad de calentamiento (o enfriamiento), ϕ , del programa de temperatura, y de factores como las dimensiones de la muestra y posición de los termopares. La temperatura a la cual comienza el proceso térmico, se denomina T_{onset} .

El material de referencia debería reunir como características:

- 1) Una total ausencia de transformaciones térmicas en el rango de temperaturas en que transcurre el análisis.
- 2) Una inercia química que imposibilite cualquier reacción con el portamuestras o con el termopar.
- 3) Una conductividad térmica y una capacidad calorífica similares a las de las muestras.

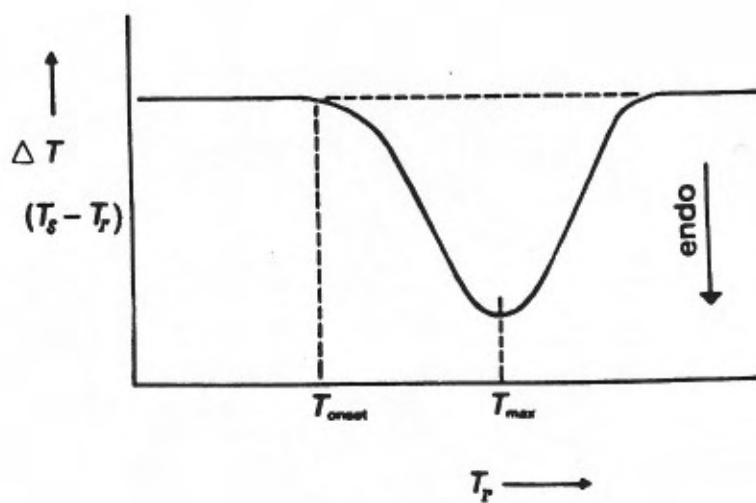


Fig. 23. Termograma de DTA "Boersma". Proceso endotérmico.

La alúmina, Al_2O_3 , y el carborundo, SiC , son las especies químicas más utilizadas como sustancias de referencia. Para compuestos orgánicos y especialmente polímeros, es aconsejable utilizar el octilftalato y el aceite de silicona, si se trabaja a temperaturas bajas.

Tanto la muestra como la referencia se utilizan en forma de polvo. Los resultados se ven influenciados por el tamaño de partícula de la muestra y por su compacidad. Una técnica corriente para igualar las propiedades térmicas de la muestra con las de referencia, consiste en utilizar el material de referencia como diluyente de la muestra; es obvio, que en este caso, no ha de producirse reacción entre la muestra y el material de referencia.

El sistema del horno puede ser purgado por circulación de aire o de un gas inerte. El rango de temperaturas del DTA depende de los materiales con que estén fabricados el horno y los termopares (el DTA de Perkin-Elmer trabaja desde temperatura ambiente hasta más de 1000°C).

DSC.-

A diferencia del DTA, donde muestra y referencia son calentadas por un mismo horno, el sistema DSC utiliza fuentes caloríficas individuales para la muestra y la referencia (Fig. 24a). Esto hace posible que el DSC emplee el principio de "balance nulo de temperatura" por el cual la muestra y la referencia son mantenidas a la misma temperatura durante el análisis ($\Delta T = T_s - T_r = 0 \Rightarrow T_r = T_s$).

Como se esquematiza en la Fig. 24b, el sistema está dividido en dos bucles distintos de control de temperatura: un bucle general que se encarga de mantener la temperatura de calefacción a una velocidad predeterminada (es la temperatura que se registra en el eje de abscisas), y un bucle diferencial encargado de mantener el recipiente de la muestra y el de la referencia siempre a la misma temperatura.

El DSC actúa de la siguiente forma: cuando el calorímetro percibe una diferencia de temperatura entre muestra y referencia (debida a un proceso endotérmico o exotérmico sufrido por la muestra), actúa modificando inmediatamente la potencia de entrada a la muestra con el fin de anular esta diferencia. En esto consiste el principio de "balance nulo" de temperatura. La señal producida, proporcional a la diferencia del calor de entrada a la muestra y a la referencia, dq/dt ($=dH/dt$, pues se trabaja a $P = \text{cte.}$) es registrada en el eje de ordenadas. La Fig. 25 representa una endoterma de DSC. Por convenio se adopta el criterio inverso de dirección de los picos ENDO > y EXO > respecto del DTA.

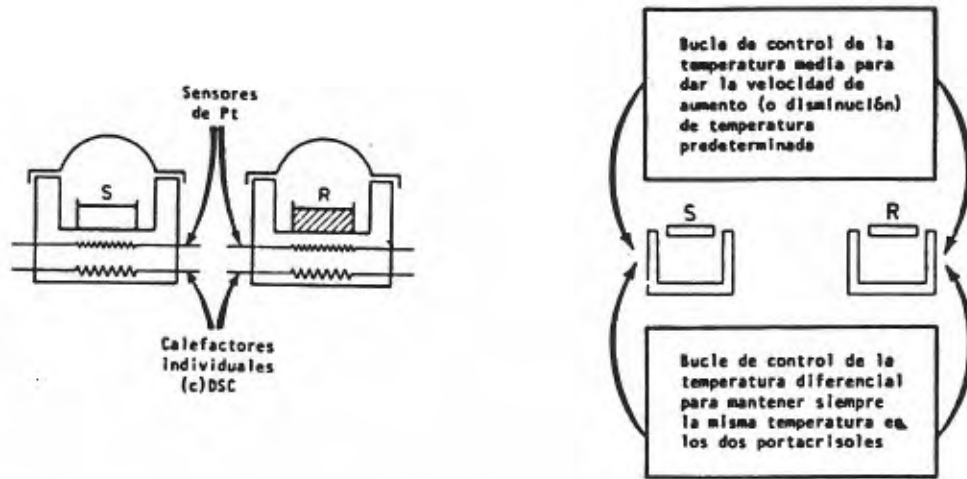


Fig. 24. Representación esquemática del sistema térmico DSC y de sus bucles de control.

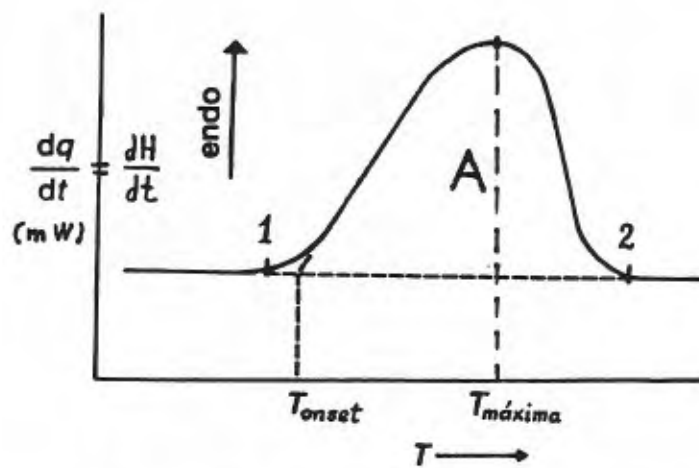


Fig. 25. Termograma ideal de DSC.

El área bajo el pico, A, (Fig. 25) es directamente proporcional a la variación de entalpía puesta en juego en ese proceso o transformación térmica.

$$A = \int_1^2 \frac{dH}{dt} dT$$

Haciendo el cambio de variable: $dT = \phi dt$, siendo ϕ la velocidad o grado de calentamiento, tendremos que:

$$A = \int \frac{dH}{dt} \phi dt = \phi \int_1^2 dH \quad \rightarrow \quad A = \phi \Delta H$$

Esto quiere decir que en un calorímetro DSC se obtiene una conversión directa del área del pico a unidades de energía, y por lo tanto es capaz de medir la variación de entalpía asociada a cualquier transformación térmica (física o química) de la muestra en el rango de temperatura de operación del análisis.

A pesar de las similitudes existentes entre DTA y DSC en el parecido de los termogramas obtenidos, el principio de "balance nulo de temperatura" del DSC hace que éste sea diferente a la calorimetría DTA. Es importante hacer notar que los calorímetros de DTA no son capaces de hacer una conversión simple del área del pico en unidades de energía; esto es debido a que ΔT se relaciona con dH/dt de una forma compleja. En consecuencia, el hecho de que algunos fabricantes de calorímetros DTA denominen a sus instrumentos bajo nombres como "heat-flux DSC" o "DSC indirecto", no debe inducirnos a error. Estos calorímetros son sistemas DTA "Boersma", capaces de medir la entalpía de forma indirecta ya que transforman el eje ΔT en un eje dH/dt . Por lo tanto, se puede

decir que estos aparatos son calorímetros DTA que pueden trabajar en modo "falso DSC", y que las energías que calculan son sólo aproximadas, a diferencia del verdadero DSC, capaz de medir la energía exacta.

Considerando la endoterma de DSC de la Fig. 25, habría dos criterios para determinar la temperatura de la transformación térmica (ej.: punto de fusión). El primero sería tomar la T_{max} o temperatura del pico y el segundo (más exacto) tomar la T_{onset} , o temperatura de comienzo del cambio de pendiente (obtenido como intersección de la tangente a la línea base y la tangente al primer cambio de pendiente).

La máxima temperatura que puede alcanzar un calorímetro DSC es generalmente menor que la de un DTA (aprox. 700°C para los DSC frente a >1000°C para los DTA). El modelo DSC-7 de Perkin-Elmer, permite un rango de operación entre -175°C (con un dispositivo de nitrógeno líquido) y 730°C.

Los calorímetros de DSC se calibran en base a las endotermas de fusión de patrones bien conocidos. La Tabla VII ofrece los materiales estándar de calibración más frecuentemente utilizados, según sea el rango de temperaturas de operación. También se pueden utilizar patrones orgánicos como el ácido benzoico. En la zona de bajas temperaturas se puede utilizar el agua pura o el ciclohexano. Existen normas de la American Society for Testing Materials (ASTM) sobre patrones orgánicos.

Tabla VII. Materiales estándar recomendados para calibración.

(a) Calibración de Temperatura

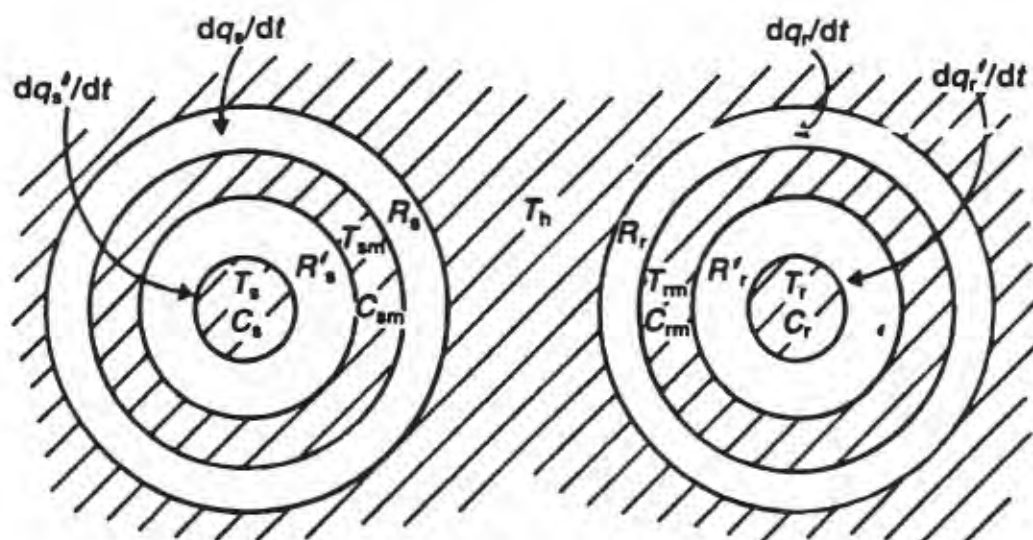
<i>Material</i>	Temperatura de Transición (°C)	<i>Material</i>	Temperatura de Transición (°C)
KNO ₃	127.7	K ₂ SO ₄	583
KClO ₄	299.5	K ₂ CrO ₄	665
Ag ₂ SO ₄	412	BaCO ₃	810
SiO ₂ (cuarzo)	573	SrCO ₃	925

(b) Calibración de Entalpía (y Temperatura)

<i>Material</i>	P.F. (°C)	P.F. (K)	$\Delta H_{\text{fus.}}$ (cal g ⁻¹)	$\Delta H_{\text{fus.}}$ (J g ⁻¹)
Indio	156.4	429.6	6.80	28.5
Estañio	231.9	505.1	14.40 ± 0.01	60.25 ± 0.04
Plomo	327.4	600.6	5.45 ± 0.01	22.80 ± 0.04
Cinc	419.5	692.7	25.9 ± 0.1	108.4 ± 0.4
Aluminio	660.4	933.6	94.9 ± 0.3	397 ± 1

Comparación de los principios de DTA y DSC.-

La Fig. 26 representa de forma esquemática un calorímetro térmico diferencial, junto con las definiciones de los términos necesarios para la comparación del DTA clásico, DTA Boersma y DSC.



T_h = temperatura del horno

$T_s = t^a$. real de la muestra

$T_r = t^a$. real de la referencia

$T_{sm} = t^a$. medida de la muestra

$T_{rm} = t^a$. medida de la referencia

C_s = capacidad calorífica de
la muestra + pocillo

C_r = capacidad calorífica de
la referencia + pocillo

C_{sm} = capacidad calorífica
del regulador

C_{rm} = capacidad calorífica
del regulador

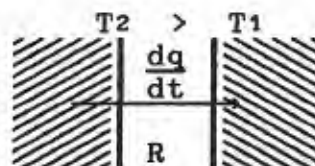
R'_s, R_s, R'_r y R_r son resistencias térmicas

Los términos dq/dt son flujos de calor

Fig. 26. Esquema de calorímetro térmico diferencial.

Para un instrumento ideal, las capacidades caloríficas y las resistencias térmicas deberían ser iguales por parejas: $C_m=C_r$; $R_s=R_r=R$ y $R'_s=R'_r=R'$. No tienen porque ser iguales $C_s \neq C_r$ y $R \neq R'$. Se asume que $C_s > C_r$ y que el flujo de calor está gobernado por la Ley de Newton:

$$\frac{dq}{dt} = \left(\frac{1}{R}\right) \Delta T$$



$$\Delta T = T_2 - T_1$$

El calor suministrado (o cedido) por el lado de la muestra, dq_s , se emplea en: (1) variar la energía del regulador (termopar o resistencia), $C_m dT_m$, y (2) variar la energía de la muestra (muestra+pocillo), $C_s dT_s$. Por lo tanto:

$$dq_s = C_m dT_m + C_s dT_s$$

dividiendo por dt tendremos términos de potencia calorífica,

$$dq_s/dt = C_m(dT_m/dt) + C_s(dT_s/dt)$$

llamando $dq'_s/dt = C_s(dT_s/dt)$ nos queda:

$$dq_s/dt = C_m(dT_m/dt) + dq'_s/dt$$

y aplicando la Ley de Newton,

$$dq_s/dt = (1/R) (T_h - T_m)$$

$$dq'_s/dt = (1/R') (T_m - T_s)$$

En el lado de la referencia se obtendrían expresiones totalmente análogas, sin más que sustituir los subíndices s por r .

DTA clásico

Los termopares están dentro de la muestra y del material de referencia, siendo posible igualar: $T_{em} = T_s$ y $T_{rm} = T_r$, $R' = 0$, que llevado a ecuaciones anteriores, permite obtener la expresión correspondiente a la señal registrada en el eje de ordenadas:

$$\Delta T = (T_s - T_r) = R (dT/dt) (C_r - C_s) = R \phi (C_r - C_s)$$

En consecuencia, ΔT depende de las capacidades caloríficas de la muestra y de la referencia, del grado o velocidad de calentamiento y de la resistencia térmica entre la muestra y el horno. A su vez, R depende de las características de la muestra y del instrumento, siendo prácticamente imposible determinar cuantitativamente esta dependencia. De esta forma, la señal registrada mediante DTA clásico va a depender fuertemente de las características de la muestra y de la referencia.

DTA "Boersma"

Los termopares van soldados a la base de los huecos que contienen la muestra y la referencia (reguladores). La condición es ahora: $T_h \neq T_{em} \neq T_s$ y $R \neq R' \neq R \neq 0$, y la señal:

$$\Delta T = (T_{em} - T_{rm}) = R (dT/dt) (C_r - C_s) = R \phi (C_r - C_s)$$

La señal depende de las mismas variables que el DTA clásico, excepto que ahora R solamente depende del instrumento y no de las características de la muestra (como ocurría antes). R es una función de la temperatura, $R = R(T)$, y puede ser determinada por la calibración del instrumento para varias temperaturas. Como ya comentamos anteriormente, algunos fabricantes de DTA "Boersma" o "heat-flux DSC", han incorporado una compensación electrónica para

esta dependencia de R con la temperatura, de forma que el módulo de control del instrumento convierte la salida del eje de ordenadas en unidades de potencia ("falso DSC").

DSC

Muestra y referencia son calentadas por fuentes caloríficas independientes, y en todo momento se mantienen a la misma temperatura, por tanto, $T_s = T_{sm} = T_r = T_{rm} = T_h$ y $R = R' \approx 0$, es decir, apenas hay resistencia térmica. La señal que se registra es la diferencia de potencia suministrada a la muestra y a la referencia:

$$\Delta \left(\frac{dq}{dt} \right) = \left(\frac{dq_s}{dt} - \frac{dq_r}{dt} \right) = \frac{dT}{dt} (C_s - C_r) = \phi (C_s - C_r)$$

En consecuencia, la variación de flujo de calor entre muestra y referencia es directamente proporcional a la diferencia de capacidades caloríficas, mediante la constante ϕ (velocidad de calentamiento o enfriamiento).

Contenedores de muestra y muestreo.-

En el DTA "Boersma", tanto muestra como referencia (alúmina en polvo), van depositadas en sendos crisoles cerámicos y éstos, a su vez, van emplazados en unos pocillos en cuyas bases están soldados los termopares. La muestra se debe poner en forma de polvo (no más de 10 mg) entre dos capas de alúmina, para que no se adhiera al crisol. Muestra y referencia quedan expuestas al flujo de atmósfera con el que se realice el análisis (aire, oxígeno, nitrógeno, dióxido de carbono, etc.).

En el caso del DSC, las muestras son encapsuladas en contenedores de aluminio. Estos contenedores se cierran con tapaderas del mismo material y el conjunto se lleva a una prensa

para su sellado. Con estas cápsulas de aluminio no se debe sobrepasar la temperatura de 600°C, pues el Al tiene un punto de fusión de 660°C, y se correría el grave riesgo de que el Al se alée con los pocillos de Pt-Ir del calorímetro. En los calorímetros modernos de DSC, el programa de software advierte de dicho peligro en el caso de que se introduzca una temperatura mayor de 600°C. Existen en el mercado contenedores de oro o grafito con los cuales se podría rebasar la temperatura de 600°C y/o utilizar muestras que reaccionan con el aluminio; igualmente se han descrito contenedores de vidrio que aún no están disponibles en el mercado.

El material de referencia, en la mayoría de análisis rutinarios del DSC, es simplemente un contenedor sellado y vacío, si bien, en situaciones excepcionales que requieren gran precisión, puede utilizarse alúmina. El conjunto muestra + referencia, es purgado con un gas inerte o reactivo (la alta conductividad térmica del He lo hace indeseable para medidas térmicas, aunque presenta ventajas para el análisis de gases emitidos). Para rangos de bajas temperaturas, el DSC puede acoplar un equipo de refrigeración con nitrógeno líquido que permite bajar hasta -175°C (loc. cit.).

Las muestras ideales para el DSC deben estar en forma de polvos densos o como discos del espesor de una película. En el caso de muestras líquidas se debe emplear una pequeña jeringa. Ante la posibilidad de que se formen productos volátiles durante el calentamiento de la muestra, se deberán utilizar cápsulas agujereadas, o bien cápsulas de alta presión. Las cápsulas perforadas son muy aconsejables cuando se desee estudiar la

reacción de la muestra con el gas de purga. Es muy recomendable que el total de la masa: muestra + tapadera + contenedor sea anotada antes y después del ensayo, a fin de saber si ha habido pérdida de masa durante el análisis; además, el programa de software del DSC pedirá el peso de la muestra como un dato necesario para poder hacer el cálculo de la entalpía específica de un pico (J/g).

Interpretación de las curvas de DTA y DSC.-

La Termodinámica clasifica a las transiciones de fase en dos grupos bien diferenciados:

- a) *Transiciones de primer orden:* Se caracterizan principalmente porque la temperatura permanece constante durante la transición y, además, tanto el volumen como la entropía presentan una discontinuidad frente a la temperatura, llevando asociada por tanto una variación de energía. Indistintamente en DTA como en DSC, estas transiciones producen un pico. Son la fusión, sublimación, cambio de estructura cristalina, solidificación,...
- b) *Transiciones de segundo orden:* Se realizan sin discontinuidades en el volumen y en la entropía (sólo una inflexión) y, por tanto, no se producen manifestaciones energéticas. En cambio, otras propiedades, como los coeficientes de dilatación y los calores específicos a presión constante, experimentan cambios discontinuos con la temperatura al pasar de una a otra fase. En DSC, estas transiciones aparecen como un salto en la línea de base (cambio en la capacidad calorífica). Como ejemplos de transiciones de segundo orden podemos citar: el cambio de una sustancia ferromagnética en paramagnética en el punto de Curie, la transición del estado superconductor al estado conductor en ausencia de un campo

magnético, y la transición vítrea de polímeros.

En consecuencia, lo fundamental en todos los ensayos efectuados por análisis térmico, es el problema de correlacionar los procesos térmicos que tienen lugar en la muestra con el termograma obtenido. Las técnicas diferenciales de DTA y DSC son complementarias del TG, pues realizados los ensayos en las mismas condiciones de operación (gas, velocidad de calentamiento,...) podremos discernir entre las transformaciones químicas (sólo vistas en el TG como variaciones de masa) y las transformaciones físicas (extraídas del DTA o del DSC por eliminación).

Un procedimiento usual para comprobar si un determinado proceso térmico es reversible o irreversible, es realizar el correspondiente enfriamiento; si en el mismo sale un pico de la misma energía en sentido contrario, el proceso es reversible; si por el contrario, el pico desaparece, el proceso es irreversible. En general, los procesos exotérmicos no suelen ser fácilmente reversibles; en contrapartida, sí lo son todas las fusiones y las transiciones sólido-sólido. La atmósfera circundante puede influir, a veces, en la reversibilidad o no de algunos procesos; así, una deshidratación puede ser encontrada reversible en un enfriamiento con atmósfera húmeda, y la descomposición de los carbonatos es también reversible en enfriamientos donde está presente una atmósfera de dióxido de carbono.

Las sustancias puras presentan picos endotérmicos de fusión mucho más puntiagudos y estrechos que las mismas sustancias conteniendo impurezas. Cuanto mayor es el porcentaje de impurezas, mayor es la anchura de pico y menos puntiagudo es éste.

D.2.2. Precedentes de la aplicación de las técnicas de termolisis en Microbiología.

Los primeros intentos de aplicación de las curvas de Termolisis a la caracterización de hongos y bacterias se realizaron por nosotros a través de sendas comunicaciones al 9th International Congress on Thermal Analysis (Jerusalem, agosto de 1988) y a la III Reunión del Grupo de Taxonomía Bacteriana de la SEM (Madrid, septiembre de 1988).

En dichas comunicaciones se recogía, inicialmente, la puesta a punto metodológica: tras múltiples tentativas sobre células completas (en diferentes grados de pureza) y sus extractos, registrando las curvas TG-DTG y DTA en diferentes condiciones (aire, O₂, Ar, N₂; regímenes estático y dinámico; y velocidades de calentamiento de 5, 10, 20 y 60 °C/min), se llegaba a una optimización operacional, base de la utilizada en la presente Memoria. Establecidas como mejores condiciones de registro las de aire dinámico (60 cm³/min) y velocidad de calentamiento de 10 °C/min (subsidiariamente, también resultan idóneas las de O₂ a 25 cm³/min y velocidad de calentamiento de 10 °C/min) para TG, y aire estático y velocidad de calentamiento de 10 °C/min para DTA, el siguiente paso consistió en examinar las diferencias introducidas por los diferentes métodos de separación y/o purificación de las muestras, concluyéndose que, para garantizar la efectividad de la aplicación de las técnicas termolíticas en Microbiología, era preciso optar por: (a) estandarizar rigurosamente tales métodos,

cuando se trata de células completas o sus paredes, ó (b) fraccionar las paredes celulares hasta sus componentes estructurales, sin mayores requerimientos.

Se ensayaron ambas posibilidades y se decidió que la más idónea era la segunda, aplicada a polisacáridos fúngicos.

No obstante, la opción (a) nos permitió obtener, para bacterias completas, conclusiones tan buenas como las logradas por el grupo catalán que viene trabajando en Termogénesis (Rius y cols., 1988).

Registrando los termogramas tanto de liofilizados preparados por nosotros como de discos comerciales (Eurodiagnostics Microtrol Discs) conteniendo organismos derivados de cultivos ATCC y CDC, ha sido posible:

1.- Establecer secuencias de estabilidad térmica basadas en las temperaturas del segundo de los efectos exotérmicos de las curvas DTA (sensibilizado por un pico en torno a 450 °C). Las bacterias Gram-negativas estudiadas se han mostrado, en general, más estables que las Gram-positivas. Dentro de las primeras, las pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae* parecen exhibir mayor estabilidad que las no *Enterobacteriaceae*. Dentro de las *Enterobacteriaceae*, *Morganella morganii*, *Proteus mirabilis* y *Salmonella enteritidis* sufren la descomposición a temperaturas más altas que *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* ó *Enterobacter cloacae*.

2.- La caracterización de un microorganismo a nivel de especie concreta puede conseguirse en muchos casos completando la información de las temperaturas de pico de los efectos térmicos con la valoración de sus energías y/o con la morfología del pico.

A este último respecto, y a título ilustrativo, reseñamos que en los registros DTA la presencia de un hombro marcado a la derecha o a la izquierda del pico hacia 450 °C servirá para apoyar fuertemente su atribución a *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*, respectivamente (Fig. 27).

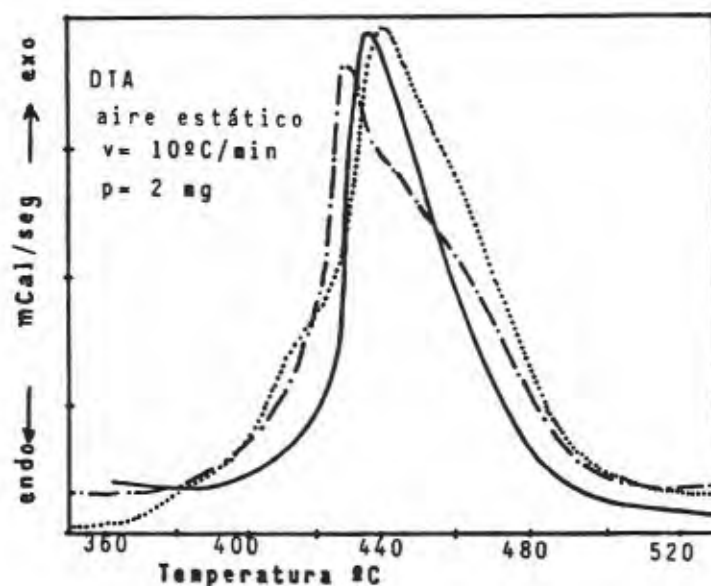


Fig. 27. Registros DTA de liofilizados de *Pseudomonas aeruginosa* (-.-.-), *Neisseria lactamica* (—) y *Escherichia coli* (.....)
(EuroDiagnostic Microtrol Discs).

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1. Materiales y Métodos

3.1.1. Microorganismos y otras fuentes de polisacáridos

Las especies fúngicas utilizadas en el presente trabajo se incluyen en:

Clase	Orden	Familia	Género
<i>Ascomycetes</i>	<i>Eurotiales</i>	<i>Amauroascaceae</i>	<i>Aphanoascus</i>
		<i>Eurotiaceae</i>	<i>Eupenicillium</i>
		<i>Onygenaceae</i>	<i>Talaromyces</i>
<i>Deuteromycetes</i>	<i>Moniliales</i>	<i>Moniliaceae</i>	<i>Aspergillus</i>
			<i>Botrytis</i>
			<i>Candida</i>
			<i>Gliocladium</i>
			<i>Microsporum</i>
			<i>Nomuraea</i>
			<i>Penicillium</i>
	<i>Trichophyton</i>		
	<i>Dematiaceae</i>	<i>Aureobasidium</i>	

Los polisacáridos fúngicos han sido extraídos de cepas procedentes del Centraalbureau von Schimmelcultures (CBS), Baarn, Holanda; del Instituto Jaime Ferrán (IJFM), Madrid; del Centro de Investigaciones Biológicas (CIB), Madrid; y de la Facultad de Medicina de Reus (FMR), Reus, Barcelona.

Todas ellas pertenecen a la colección del Prof. J. A. Leal:

<i>Penicillium allahabadense</i>	(IJFM - 1087)
<i>Aspergillus flavipes</i>	(CBS 129.61)
<i>Eupenicillium crustaceum</i>	(CBS 812.70)
<i>Candida albicans</i>	(CBS 2730)
<i>Aspergillus cremeus</i>	(CBS 477.65)
<i>Aspergillus niger</i>	(CBS 120.49)
<i>Aureobasidium pullulans</i>	(CBS 105.22)
<i>Aphanoascus fulvescens</i>	(FMR 3392)
<i>Aphanoascus reticulisporus</i>	(FMR 2899)
<i>Aphanoascus terreus</i>	(FMR 2239)
<i>Microsporum gypseum</i>	(FMR 3314)
<i>Trichophyton ajelloi</i>	(CBS 58594)
<i>Botrytis cinerea</i> (Pers. ex Fr.)	Aisl. Gómez-Miranda
<i>Nomuraea rileyi</i> (Pers. ex Fr.)	Aisl. Latgé
<i>Gliocladium viride</i>	(CIB A-122)
<i>Talaromyces helicus</i>	(CBS 335.48)
<i>Penicillium digitatum</i>	(CIB A-352)
<i>Talaromyces flavus</i>	(CBS 387.48)
<i>Penicillium spinulosum</i>	(CBS 269.29)
<i>Eupenicillium stolckiae</i>	(CBS 315.67)

Adicionalmente, se han obtenido de Sigma Chemical Co. los siguientes polisacáridos:

Quitina, a partir de caparazones de cangrejos de mar (C 3641), purificada por el método de Skujins, J.J., y col., 1965, Arch. Biochem. Biophys., 111, 358.

Laminarano, procedente del alga *Laminaria digitata* (L 9634), preparado siguiendo el método de Black, W.A.P. y col., (1951). *J. Appl. Chem.*, 1, 505.

Celulosa, extraída de paredes de células vegetales.

Manano, de *Sacharomyces cerevisiae*, M 7504 (ref. Haworth, W.N., y col., 1937, *J. Chem. Soc.*, 784) y M 3640 (preparado por el método del Cetavlon. Ref. Barker, S.A., y cols., 1957, *Chem. Ind.*, 330).

Dextrano, procedente de *Leuconostoc mesenteroides*, cepa B-512(F), D 9260.

Nigerano, de *Aspergillus awamori* (N 8634)

Pululano, de *Aureobasidium pullulans* (P 4516).

Amilopectina, de cereal (A 7780)

Amilosa, de patata (tipo III), libre de amilopectina (A 0512), preparada por el método de Street, H.V. y Close, J.R., 1956, *Clin. Chim. Acta*, 1, 256.

Pustulano, del líquen *Umbilicaria pustulata* (*Pers. ex Fr.*). Aislado por Leal.

Quitosano, de caparazones de cangrejos (C 0792).

Xilano, obtenido de espelta de avena (X 0376).

Goma de xantano, procedente de *Xanthomonas campestris*.

Inulina, de raíces de achicoria (I 2255).

Fucoidano, obtenido del alga *Fucus vesiculosus* (F 5631). Preparado según una modificación del método de Black, W.A.P. y cols., 1952, *J. Sci. Food Agri.*, 3, 122.

Glucosamina.HCl (Quitosamina).- G 4875

Galactosamina.HCl (Condrosamina).- G 0264

Manosamina.HCl.- M 4500.

Acido Glucurónico.- G 5269

3.1.2. Medios de cultivo

3.1.2.1. Medio de mantenimiento

Bacto-patata-dextrosa-agar (Difco)	30 g/l
Extracto de levadura (Difco)	1 g/l
(verificar que el pH final es de 6.5)	

3.1.2.2. Medio base sintético para el cultivo de los hongos con el propósito de obtención de paredes celulares

Glucosa	15	g
Casaminoácidos (Difco)	3	g
KH_2PO_4	0.5	g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.5	g
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.5	mg
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.5	mg
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.02	mg
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.02	mg
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.02	mg
Tiamina	1	mg
Agua destilada	1	l
(pH ajustado a 6.5)		

El medio se distribuye en matraces Erlenmeyer de 2 litros de capacidad, con 1 litro de contenido, que se tapan con algodón graso y se esterilizan en autoclave a 120 °C durante 15 minutos. Como inóculo se utilizaron unas gotas de medio con una suspensión de esporas del microorganismo obtenido del cultivo de mantenimiento. Se incuban a 25 °C y 120 rpm durante 5 días en un incubador Gallenkamp.

3.1.3. Obtención de las paredes celulares

Alcanzado el crecimiento máximo, el micelio se separa del medio de cultivo filtrándolo a través de tela, se lava con agua desionizada y se deseca a 60 °C. Se tritura en un homogeneizador Sorvall a la máxima velocidad, seguido por un tratamiento en molino de bolas Fritsch "pulverisatte 6", hasta que se obtiene un polvo fino.

Se añaden 500 ml de dodecil sulfato sódico al 1% y 0.2 ml de azida sódica al 0,02% y se deja agitando durante 16 horas a temperatura ambiente. A continuación, se lava 3-4 veces con agua desionizada, centrifugando a 8000 rpm durante 10 min. cada vez, hasta eliminar el detergente de la suspensión. El material se divide en 4 porciones que se suspenden en 100 ml. de agua desionizada. Cada una de ellas se somete a 3-4 periodos de sonicación de 3 min en un sonicador MSE mod. MK2, 150 W, a la máxima potencia. Las paredes deben quedar sueltas, sin formar grumos y en trozos de pequeño tamaño. Se someten a centrifugado y se resuspenden, todas las paredes, en 500 ml de etanol del 25%. Se vuelve a centrifugar y se repite el proceso aumentando cada vez la proporción de etanol: 40, 50, 60, 75 y 96%. De esta forma, el contenido del citoplasma sale al medio líquido. Una vez que se ha comprobado con el microscopio de contraste de fase o tiñendo el material con Azul de Coomasie, que las paredes están vacías de contenido, éstas se resuspenden en acetona, se centrifugan y se dejan secar a 80 °C hasta peso constante. Las paredes celulares son después pesadas y, tras trituración y molienda, guardadas en frascos de cristal con tapón de rosca (Guerrero-Benito, 1985).

3.1.4. Fraccionamiento de las paredes celulares

3.1.4.1. *Fraccionamiento con NaOH 1N a diferentes temperaturas* (Leal y cols., 1984. Véase esquema Fig. 28).

Las paredes celulares se suspenden en el mortero con la cantidad suficiente de NaOH 1N para dar una concentración de 10 mg/ml aproximadamente. La suspensión se mantiene en agitación en un matraz Erlenmeyer tapado durante una noche a temperatura ambiente. Se centrifuga a 5000 rpm 10 min. y al sobrenadante se le añade, v/v, etanol al 96%, apareciendo un precipitado blanco (fracción F1(1^a)). El sedimento de la centrifugación se resuspende en NaOH 1N 30 min. y se vuelve a centrifugar, obteniéndose un sobrenadante que, tratado con etanol al 96%, proporciona la fracción F1(2^a). De este modo, se van obteniendo sucesivas fracciones F1, repitiéndose el proceso hasta que no aparece precipitado blanco al añadir etanol. Las fracciones F1(1^a) y F1(2^a) se mezclan y después se llevan a centrifugación. El sedimento resultante será sometido a diálisis (frente a agua corriente hasta eliminación de NaOH) y nueva centrifugación, de la que obtendremos un precipitado insoluble, F1I, y un sobrenadante que nos dará, por concentración en rotavapor, la fracción soluble, F1S. Ambas fracciones, F1I y F1S, serán posteriormente congeladas y liofilizadas.

El sedimento correspondiente a este sobrenadante se somete, entonces, a digestión con NaOH 1N a 70 °C durante 45 min., proporcionándonos tras centrifugación, un nuevo sobrenadante susceptible de precipitación con etanol al 96% para dar la fracción F3(1^a).

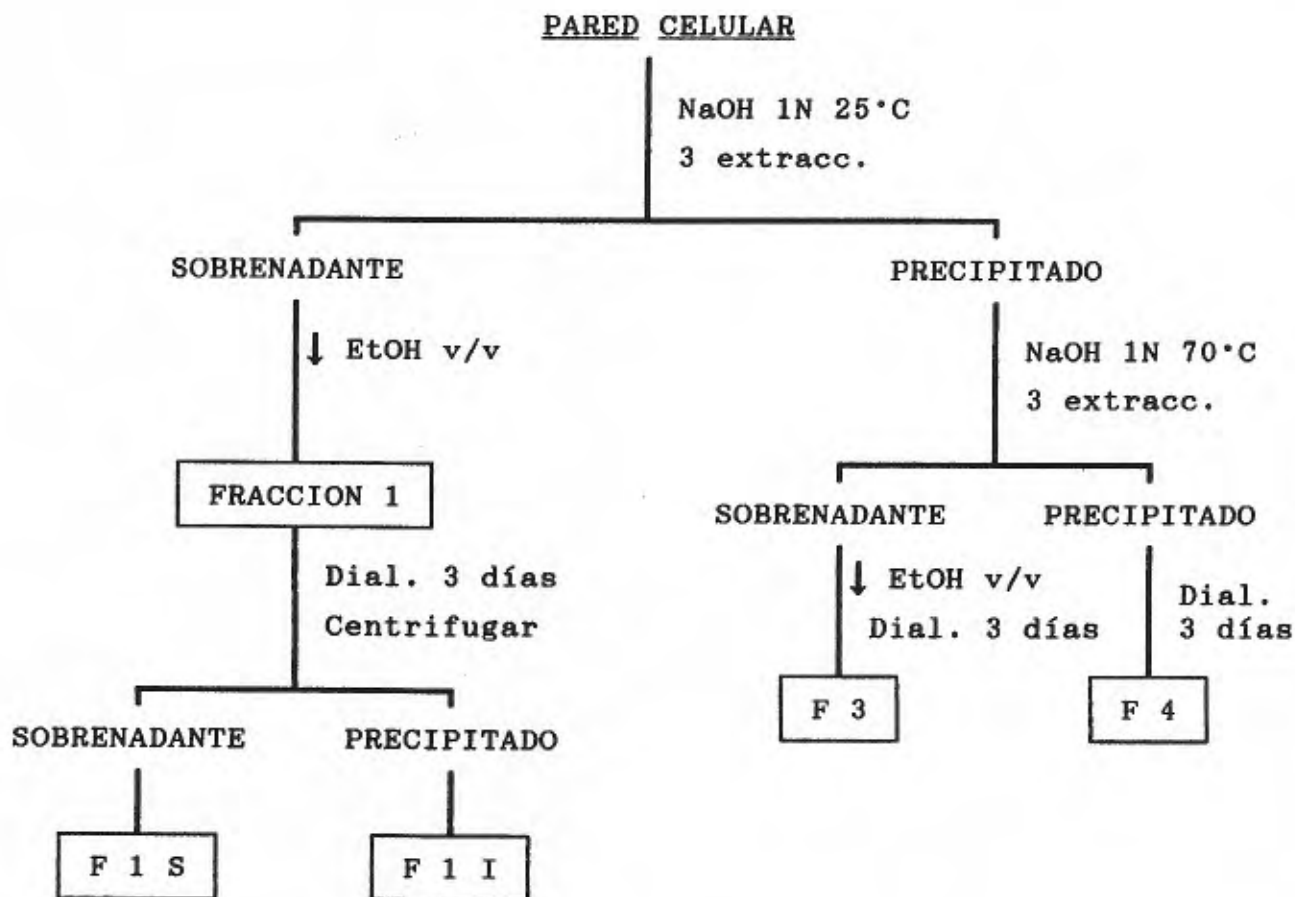


Fig. 28. Fraccionamiento de paredes celulares con NaOH 1N.

El sedimento de la centrifugación cuyo sobrenadante dió lugar a la fracción F3(1^a), sometido a una nueva digestión alcalina en las mismas condiciones que su predecesor y tras centrifugación, proporciona un sobrenadante que, tratado con etanol al 96%, es causa de la formación de la fracción F3(2^a). El proceso se repite hasta que no aparece precipitado al añadir etanol. Las fracciones F3(1^a), F3(2^a), etc., se mezclan, se dializan hasta la eliminación total de NaOH y luego se centrifugan para obtener un precipitado, F3, que se congela y liofiliza.

Finalmente, el precipitado resultante de la última digestión alcalina, tras purificación por diálisis (hasta eliminación de NaOH) y centrifugación, es etiquetado como F4 y congelado, liofilizándose para su almacenamiento óptimo.

3.1.5. Obtención y fraccionamiento del polisacárido extracelular

Para comprobar si un hongo segrega polisacárido al medio de cultivo, una vez separado éste del micelio por filtración a través de tela, se añade un volumen de etanol al 96%. Si aparece un precipitado viscoso, se recoge enrollándolo sobre una espátula y se resuspende en agua. Se agita para homogeneizar la suspensión y se dializa frente a agua corriente durante 3 días a temperatura ambiente. El polisacárido así obtenido se congela y liofiliza, tras lo cual se pesa y se guarda en frasco de cristal herméticamente cerrado.

El polisacárido extracelular se suspende en agua (5 mg/ml), se deja agitando a temperatura ambiente 1 hora, y se centrifuga, repitiéndose este proceso 3 veces. Los sobrenadantes se juntan, se congelan y se liofilizan. De esta forma se obtiene el polisacárido extracelular soluble en agua a temperatura ambiente.

El residuo se extrae con agua desionizada (5 mg/ml aprox.) dejándolo durante 1 hora en baño de agua hirviente. Después se centrifuga. El proceso se repite dos veces más. Los sobrenadantes se mezclan, se congelan y se liofilizan, caracterizándose el producto resultante como polisacárido extracelular soluble en agua a 100 °C.

El residuo insoluble también se congela y se liofiliza, guardándose etiquetado como polisacárido extracelular insoluble en agua a 100 °C

3.1.6. Acetilación de polisacáridos y desacilación

El polisacárido al que se van a introducir grupos acetilo se mantiene durante 1 hora a 100 °C con una mezcla de piridina y anhídrido acético en proporción 1:1. Seguidamente, se evapora a sequedad hasta eliminar la piridina y el anhídrido acético.

De esta forma, se unen grupos acetilo tanto a los grupos hidroxilo libres como a los grupos amino de los aminoazúcares. Como sólo interesa mantener grupos N-acetilo, será preciso eliminar los grupos O-acilo, lo que se consigue tratando el polisacárido con NaOH 0.02 M durante 16 horas a temperatura ambiente (Sutherland, 1970). La disolución polisacarídica resultante se trata con alcohol etílico al 96% , obteniéndose un

precipitado y un sobrenadante. El precipitado se trata con alcohol etílico al 50% y se centrifuga, repitiéndose la operación con el precipitado hasta que el sobrenadante que le acompañe tenga pH neutro. Una vez conseguido este propósito, el precipitado es lavado con acetona, secado en la estufa y guardado.

3.1.7. Purificación de fracciones polisacáridicas por cromatografía en gel o filtración molecular.

3.1.7.1. Preparación de los geles Sephadex.-

Las partículas del gel se hinchan en un exceso del mismo líquido que se usará posteriormente como eluyente en unas condiciones establecidas previamente para cada gel. Esta operación se realiza en un vaso de precipitados, evitando una excesiva agitación que podría romper las partículas y formar burbujas que alterarían la homogeneidad del lecho y la regularidad del flujo.

Cuando las suspensiones de geles tienen que conservarse cierto tiempo sin usarse, se les añade agentes antimicrobianos (como pueden ser el mertiolato o la azida sódica) para evitar el crecimiento bacteriano.

3.1.7.2. Selección de columnas de cromatografía.-

En las operaciones de purificación de la fracción polisacáridica, se han utilizado columnas de 60 cm de largo por 2,5 cm de diámetro interior de la firma Pharmacia Fine Chemical, fabricadas con un material inerte que posee un espacio muerto de salida inferior al 0,1% del volumen de la columna, lo que elimina prácticamente toda la dilución e impide cualquier mezcla entre zonas previamente separadas.

3.1.7.3. *Empaquetamiento del lecho de Sephadex.*-

Para conseguir un empaquetamiento correcto, se procede de la siguiente manera: se coloca verticalmente la columna y se llena con eluyente el espacio muerto situado debajo del filtro así como el capilar de plástico que sirve para la salida del eluyente, eliminando todas las posibles burbujas y se cierra el capilar con la pinza. Las partículas del gel previamente hinchado y equilibrado con el eluyente, se dejan sedimentar en el vaso de precipitados, eliminando el exceso de líquido hasta obtener un gel medianamente espeso. Se introduce de una sola vez la cantidad de gel calculada para llenar la columna hasta la altura que se desee. A continuación, se conecta en la parte superior un reservorio con eluyente, dejando pasar un volumen de líquido correspondiente a dos o tres volúmenes del lecho, con el fin de estabilizar y equilibrar éste. Antes de cargar la sustancia sobre la columna, se comprueba visualmente la homogeneidad del lecho. Para determinar el volumen de exclusión de la columna, se carga con una pipeta un pequeño volumen de una solución (2 mg/ml) de azul dextrano (M=2.000.000 D) sobre la superficie del lecho, una vez eliminado el eluyente y tratando de no remover la superficie del gel. Se deja pasar todo el azul dextrano y se lava la superficie con una pequeña cantidad de eluyente. Después se llena la parte superior de la columna con eluyente y se conecta al reservorio controlando en todo momento la velocidad de la operación. Se mide el volumen de líquido necesario para que salga la sustancia no retenida por el gel.

Una vez conocido el volumen de exclusión de la columna, se carga la muestra a estudiar, actuando de la misma manera que para

el azul dextrano.

Para recoger las fracciones eluidas se utiliza un colector de fracciones automático, valorando posteriormente los azúcares neutros en alícuotas de cada tubo. Paralelamente, se puede medir la absorción a 280 nm. si se desea determinar, en las diferentes fracciones, el contenido en proteínas.

3.1.8. Métodos analíticos

3.1.8.1. *Determinación de azúcares neutros totales.-*

Se ha utilizado el método de la antrona (Loewus, 1952): Trás la hidrólisis de los carbohidratos presentes en la muestra y la posterior deshidratación intermolecular de los monosacáridos formados (debido a la acción del H_2SO_4 concentrado y caliente), las pentosas dan lugar a furfural y las hexosas a 5-hidroximetil-2- furfural, que reaccionan con los grupos fenólicos de la antrona para dar lugar a complejos coloreados, cuya intensidad de color es proporcional a la cantidad de carbohidratos presentes en la muestra

3.1.8.2. *Determinación de azúcares reductores.-*

Los azúcares reductores son susceptibles de reducir, en medio alcalino y en presencia de tartrato, el $Cu(II)$ a $Cu(I)$. Subsiguientemente, se hace reaccionar al $Cu(I)$ con $Mo(VI)$, éste último en forma de arsenomolibdato sódico, para dar lugar a compuestos coloreados verde-azulados ($Mo(V)$?) cuya cantidad de color es proporcional a la concentración de azúcares reductores en la muestra (Somogyi, 1952).

3.1.8.3. *Determinación de aminoazúcares totales.-*

Se ha utilizado el método de Chen y Johnson (1983) para la

determinación de quitina en paredes de hongos. El método se basa en la formación de una o varias especies cromogénicas cuando los amino-azúcares se calientan a 90 °C en solución alcalina de acetilacetona. El cromógeno produce un cromóforo o cromóforos al reaccionar, en solución ácida, con N-N-dimetil-p-aminobenzaldehído etanólico (el reactivo de Ehrlich).

3.1.9. Identificación de monómeros

3.1.9.1. Hidrólisis ácidas.-

Muestras de 10 mg de paredes o polisacáridos se hidrolizan con 1 ml de H_2SO_4 1N, 16 horas a 100 °C o con 0.5 ml de H_2SO_4 al 72%, 3 horas a temperatura ambiente, diluyendo después a 2 M y calentando a 100 °C durante 2 horas (hidrólisis Saeman). Terminada la hidrólisis, el exceso de ácido se elimina con la cantidad suficiente de carbonato bórico para neutralizarlo, calentando a 50-60 °C para acelerar la reacción. Se centrifuga para eliminar el sulfato bórico producido y el carbonato bórico sobrante. El sobrenadante se evapora en cápsula a 60 °C. Al hidrolizado se le añade la cantidad de agua desionizada necesaria para llevarlo a la concentración deseada.

Para determinados fines (valoración de quitina, determinación de aminoderivados, ...) interesa la hidrólisis con HCl en vez de con H_2SO_4 . Muestras de 10 mg de paredes o polisacáridos se hidrolizan con 1 ml de HCl de diferentes concentraciones durante distintos periodos de tiempo, en estufa a 100 °C. Los tubos de hidrólisis se cierran bien para evitar evaporaciones. Terminada la hidrólisis, el exceso de ácido se elimina mediante la evaporación en estufa de aireación a 60 °C, añadiendo agua destilada y

volviendo a evaporar hasta que se obtenga un pH neutro. Los hidrolizados se disuelven en la cantidad de agua necesaria para obtener la concentración deseada.

3.1.9.2. Cromatografía gas-líquido.-

La cromatografía gas-líquido puede ser utilizada rutinariamente para el análisis de carbohidratos transformando los monosacáridos obtenidos de la hidrólisis en derivados volátiles. Mediante esta técnica, podemos identificar y cuantificar dichos constituyentes. La velocidad a la que los análisis pueden ser realizados y la facilidad de preparación de los derivados ofrece unas ventajas definitivas sobre cualquier otro método tradicional de análisis de azúcares (Laine, Esselman y Sweely, 1972).

La selección de los derivados depende del tipo de mezcla que se quiera resolver. Los acetatos de alditol son los derivados volátiles de azúcares más utilizados. Si se trata de una mezcla de azúcares libres, procedentes de una hidrólisis por ejemplo, los acetatos de alditol son los más convenientes ya que en el cromatograma aparecerá un solo pico para cada tipo de molécula.

Otro tipo de derivados son los trimetilsilil derivados, que se usan después de un proceso de metanolisis. En nuestro caso se han utilizado siempre los acetatos de alditol, ya que los análisis se realizaron después de una hidrólisis ácida.

Para hacer el análisis cuantitativo conviene utilizar un estándar interno. Se ha utilizado en nuestro caso inositol, un azúcar que no está presente en muestra alguna. Se debe incluir en la mezcla de azúcares justo después de la hidrólisis, antes de realizar el resto de los procesos preparativos de la cromatografía, para que las pérdidas sean iguales en los azúcares

analizados y en el estándar.

También es preciso incluir el estándar en la mezcla de patrones. El procedimiento operacional comienza disolviendo en 1 ml de agua desionizada los productos de la hidrólisis (una vez eliminado de ellos el exceso de ácido) y añadiendo, para 10 mg de hidrolizado, 12-15 mg de borohidruro sódico. Al día siguiente, se adiciona HCl conc.hasta pH < 5. Se evapora en rotavapor y al residuo se adicionan 2 ml de metanol. Se vuelve a evaporar en rotavapor, repitiendo el proceso 3 veces para eliminar los boratos sobrantes.

Al tubo donde se encuentra la muestra reducida y evaporada se le añade 1 ml de la mezcla de piridina y anhídrido acético (1:1), se deja en estufa a 100 °C durante 1 hora. Al cabo de este tiempo se evapora en rotavapor la mezcla de piridina y anhídrido acético, dejando la muestra acetilada dispuesta para su análisis cromatográfico.

Análisis de la muestra en el cromatógrafo de gases.-

La muestra se disuelve en 0.5 ml de cloroformo. Se inyectan en el aparato 3 µl de la muestra. La columna utilizada tiene un 3% de SP-2340 sobre 100/120 Supelcoport; mide 2 m de longitud y su diámetro interior es de 2 mm. El gas portador utilizado es el N₂ en unas condiciones de flujo de 30 ml/min. La temperatura del inyector y del detector durante el análisis es de 250 °C. La temperatura del horno está programada para que al comienzo del análisis y durante los 3 primeros minutos sea de 200 °C; seguidamente se eleva con una velocidad de 10 °C/min hasta 230 °C, temperatura que, una vez alcanzada, se mantiene durante 14 minutos más (el tiempo total del análisis es de 20 minutos).

Identificación y cálculos.-

El pico de cada azúcar en el cromatograma se identifica por su tiempo de retención, propiedad característica de cada sustancia en unas condiciones determinadas.

Los tiempos de retención de los azúcares problemas se comparan, para identificarlos con los de las carreras de patrones (Fig. 29). Además del área de pico, que es proporcional a la concentración, disponemos de otro parámetro importante para realizar los cálculos de un modo cuantitativo (pues a pesar de que todos los azúcares se encuentran en igual cantidad en la mezcla de patrones, no dan el mismo área en el cromatograma): es el factor de respuesta. Este se obtiene comparando las áreas del pico correspondiente y del estándar y sus respectivas concentraciones en la mezcla, según la siguiente ecuación:

$$f_i = (C_i/A_i)(A_s f_s)/C_s (1/N) + f (N-1)/N$$

donde f_i es el factor de respuesta; f es el factor de respuesta inicial; f_s es el factor de respuesta del estándar (f y f_s se hacen igual a 1); C_i es la concentración del componente i ; C_s es la concentración del estándar; A_i es el área de pico del componente i ; A_s es el área de pico del estándar; y N es el número de carreras de patrones realizados para estos cálculos.

Teniendo en cuenta la cantidad de estándar adicionado y el factor de respuesta de cada azúcar, los cálculos se realizan asignando al estándar interno la concentración de 1 mg por 0.5 ml de cloroformo. De este modo, se evitan las pérdidas que haya podido haber en el proceso y, sobre todo, las pérdidas de volumen en el momento de la inyección.

De esta forma se llega a determinar la relación molar de cada azúcar en la muestra, así como la recuperación conseguida después de todo el proceso.

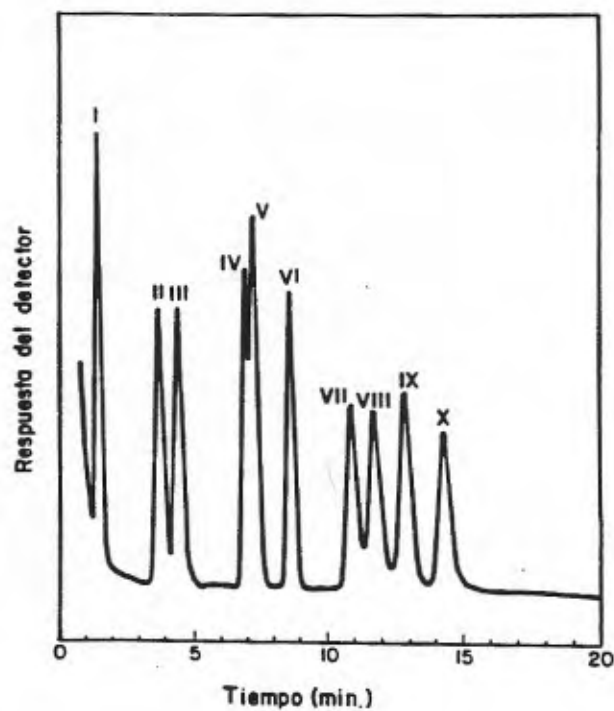


Fig. 29. Cromatograma de gases de patrones de azúcares neutros detectados como acetatos de alditol, I: glicerol; II: eritrosa; III: treosa; IV: ribosa; V: arabinosa; VI: xilosa; VII: manosa; VIII: galactosa; IX: glucosa y X: inositol (estándar interno).

3.1.10. Oxidación de polisacáridos por periodato sódico

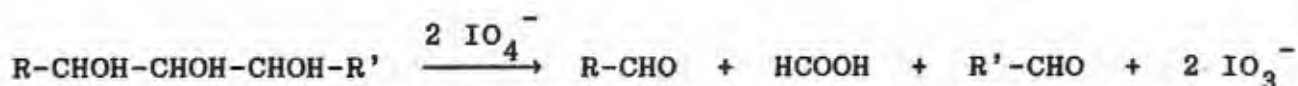
Las fracciones polisacarídicas obtenidas a partir de los extractos acuosos y alcalinos de las paredes celulares, se tratan con periodato sódico con el fin de valorar su porcentaje de enlaces (1-3), (1-4) y (1-6).

(La oxidación periódica de complejos polisacárido-proteína tiene un pequeño margen de error debido a las interferencias de aminoácidos como la treonina y serina, y de la glucosamina, que consumen también periodato. En el caso de que los aminoazúcares estén N-acetilados, los grupos acetilo dificultan la oxidación entre los carbonos 1-2 y 2-3 (Bardalaye y Nordin, 1976)).

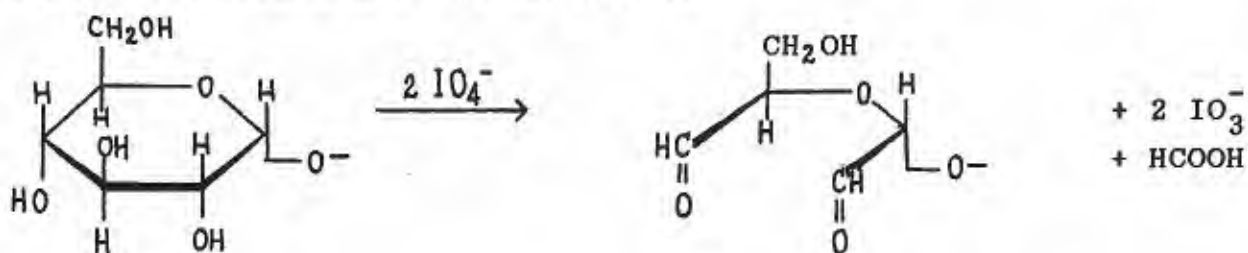
Cuando dos glicoles vecinos se tratan con ácido periódico o sus sales, tiene lugar la ruptura de la cadena carbonada entre los dos grupos hidroxilo, formándose dos grupos aldehído y consumiéndose una molécula de periodato:



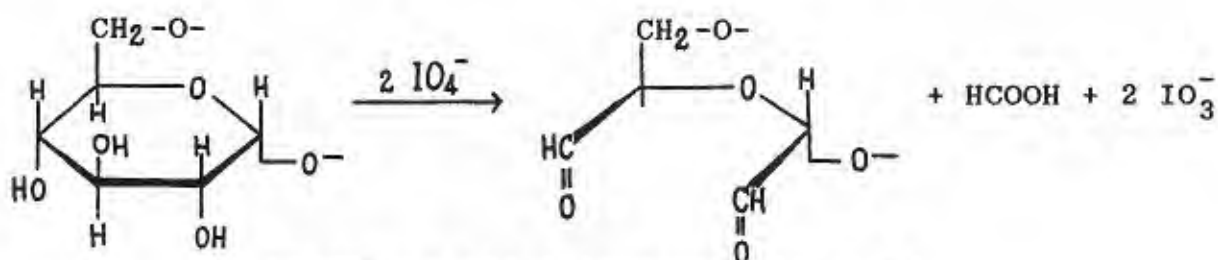
En el caso de α , β y γ trioles ocurre una doble ruptura de la cadena carbonada con la formación de dos grupos aldehído, liberándose una molécula de ácido fórmico y consumiéndose dos moléculas de periodato:



Consecuentemente, en un polisacárido, las unidades de hexosa (o pentosa) terminales no reductoras, o las unidades de hexosa no terminales con uniones (1-6) teniendo tres grupos hidroxilo adyacentes, serán rotas por dos moléculas de periodato, para dar lugar a una molécula de ácido fórmico:

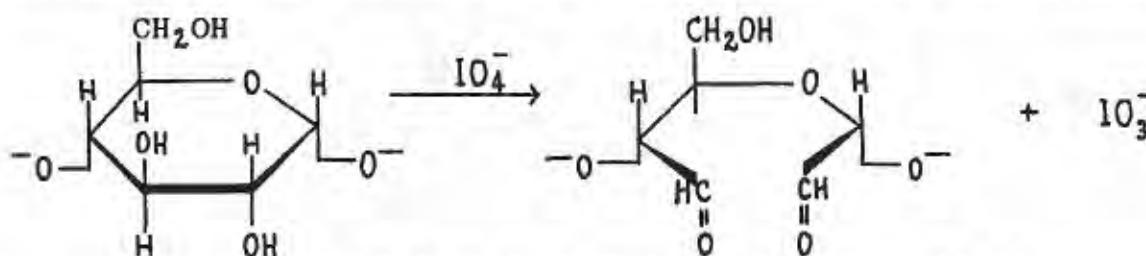


Unidad terminal no reductora



Unidad no terminal con unión (1-6)

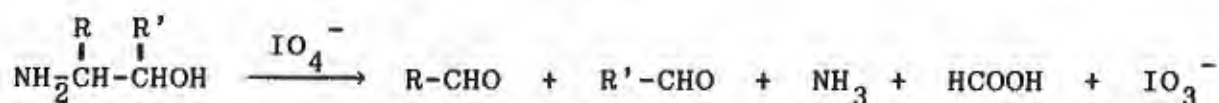
Las unidades de hexosa (o pentosa) no terminales unidas por enlaces (1-2) ó (1-4) que solo tienen dos grupos hidroxilo adyacentes, sufren ruptura de un enlace C-C reduciéndose una sólo molécula de periodato a iodato y no liberándose ácido fórmico:



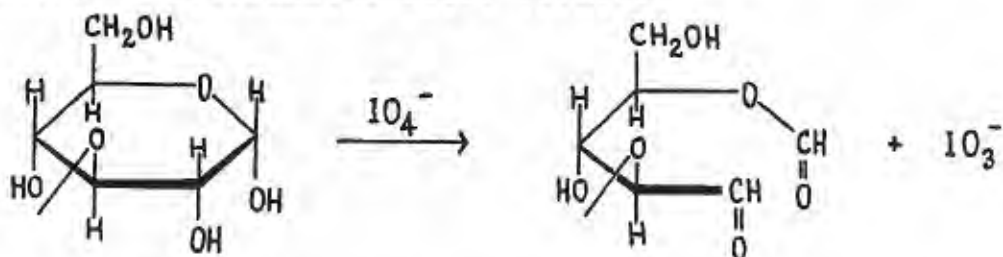
Unidad no terminal con unión en (1-4)

Las unidades de hexosa (o pentosa) que no poseen grupos hidroxilo adyacentes, tales como unidades no terminales unidas por enlaces (1-3), o unidades implicadas en ramificaciones, cualesquiera que sea su enlace, no son afectadas por el periodato.

El periodato oxida los aminoazúcares con la liberación de amoniaco y ruptura del enlace C-C. El amoniaco neutraliza el ácido fórmico producido en la rotura de un azúcar enlazado en 1-6:

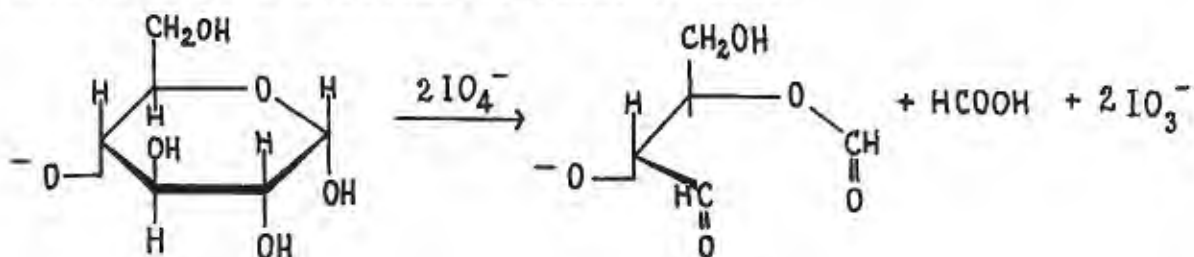


Las unidades de hexosa (o pentosa) terminales reductoras unidas por enlace (1-3) sufren ruptura por una molécula de periodato, no liberándose ácido fórmico



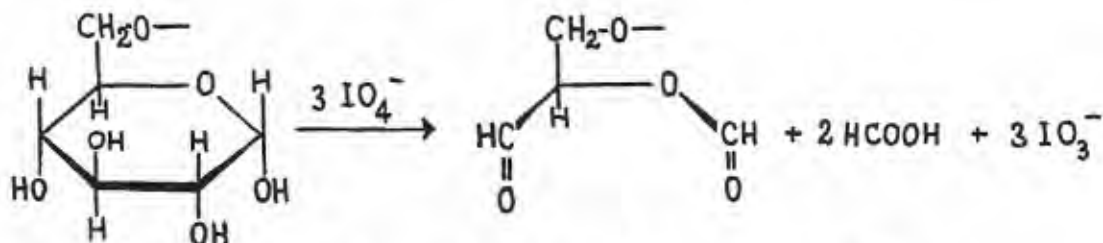
Unidad terminal reductora con unión en C3

Las unidades de hexosa (o pentosa) terminales reductoras unidas por enlaces (1-4) consumen dos moléculas de periodato, produciéndose una molécula de ácido fórmico:



Unidad terminal reductora con unión en C4

Las unidades de hexosa terminales reductoras unidas por enlaces (1-6) consumen tres moléculas de periodato, produciéndose dos moléculas de ácido fórmico:



Unidad terminal reductora con unión en C6

Así, la oxidación de un polisacárido y la determinación cuantitativa de los moles de periodato consumidos, el ácido fórmico y el amoniaco liberados y la proporción de las unidades de azúcar no atacadas, nos dan información sobre la naturaleza y proporción de los enlaces glicosídicos presentes en el polisacárido.

Determinación del periodato consumido.-

La oxidación de un polisacárido y la determinación del periodato consumido se realizan según el método descrito por Aspinall y cols. (1957) con pequeñas modificaciones. El consumo de periodato se determina midiendo, a lo largo de la oxidación, la disminución en la absorbancia a 223 nm, que es proporcional a la disminución de la concentración del ion periodato.

Operacionalmente, se mezclan 25 ml de una solución de polisacárido (2 mg/ml) con 25 ml de la solución 0.03 M de periodato sódico (quedando la concentración final de periodato sódico 0.015 M) dejándose en reposo y en la oscuridad a 4°C. Igual se hace con la solución de glucosa preparada anteriormente.

Para tiempos establecidos y empezando por $t = 0$, se toman 20 μl de cada una de las soluciones y se diluyen a 5 ml, midiéndose a continuación la absorbancia a 223 nm frente a un blanco hecho con solución de periodato 0.015 M.

Al cabo de cierto tiempo, cuando el consumo de periodato permanece estable en ambas soluciones, damos por terminada la oxidación, pudiendo destruir el exceso de periodato añadiendo un exceso de etilenglicol.

Determinación del ácido fórmico liberado en la oxidación con periodato sódico.-

Se realiza por valoración directa con NaOH siguiendo el método de Hay et cols. (1965).

En base al número de moles de ácido fórmico gastados se puede calcular con una cierta aproximación el porcentaje de cada tipo de enlace que existe en la muestra (Jeannes, 1965) según la siguiente fórmula:

$$\text{Enlaces (1-6)} = n^0 \text{ moles de ácido fórmico} \times 100$$

$$\text{Enlaces (1-4)} = n^0 \text{ moles } \text{IO}_4^- \times 100 - (2 \times n^0 \text{ moles } \text{ác. fórmico} \times 100).$$

$$\text{Enlaces (1-3)} = 100 - (\% \text{ enlaces (1-4)} + \% \text{ enlaces (1-6)}).$$

Determinación de amoníaco.-

El amoníaco producido en la oxidación de aminoazúcares se valora destilándole sobre una mezcla indicadora (Leal, Gallegly y Lilly, 1967).

Reducción e hidrólisis del polisacárido oxidado con periodato sódico (degradación de Smith modificada).-

La reducción de los polisacáridos oxidados tiene por objeto convertir los aldehidos resultantes de la oxidación periódica en alcoholes, por ser éstos más estables a la hidrólisis ácida.

La degradación de Smith de la muestra oxidada y posteriormente reducida produce una serie de moléculas características según los tipos de enlaces que éstas tengan en el polisacárido y según los monómeros iniciales que intervengan:

Enlace (1-6).- Todas las hexosas se degradan a glicerol.

Enlace (1-4).- Glucosa y manosa producen eritritol. Galactosa origina treitol.

Enlace (1-3).- No hay degradación. Se detectan los azúcares tal como estaban antes del proceso

En cuanto a las pentosas, los monómeros unidos en (1-4) producen glicerol mientras los unidos en (1-3) no están afectados por el periodato.

Para la degradación de Smith se sigue el método descrito por Sietsma y Wessels (1977). La solución del polisacárido oxidado por periodato se dializa durante una noche a 4°C (ó 48 h a temperatura ambiente) frente a agua destilada para eliminar las sales inorgánicas. Luego se añaden 75 mg de NaBH_4 por cada 100 ml de solución dializada y se deja que tenga lugar la reducción durante 16 horas a temperatura ambiente. A continuación se añade HCl conc. para neutralizar la solución y se dializa de nuevo frente a agua destilada durante 48 horas para eliminar el NaBH_4 sobrante, se congela y se liofiliza.

El residuo obtenido se hidroliza en las distintas condiciones ya descritas para los polisacáridos no oxidados y se sigue el procedimiento ya indicado para analizar las muestras por cromatografía gas-líquido.

3.1.11. Análisis por metilación

El análisis por metilación es el método más fácil para determinar la sustitución de las unidades monosacárido constitutivas de los oligo- y polisacáridos o las mitades carbohidrato de los glicoconjugados. El método proporciona detalles sobre las unidades estructurales presentes en los polímeros, pero no da información sobre su secuencia o la naturaleza anomérica de sus enlaces. El análisis involucra la conversión de todos los hidroxilos libres del material original en grupos metoxilo, seguido de ruptura hidrolítica con ácido de los enlaces glicosídicos y análisis de los monómeros formados. La sustitución hidroxilo-metoxilo se realiza por el procedimiento de Hakomori (1964) y el análisis de los monómeros formados en la hidrólisis se lleva a cabo por cromatografía gas líquido (GLC) y espectrometría de masas de los alditol acetatos derivados. Las etapas involucradas en el análisis de metilación por este método se ilustran en la Fig. 30.

Desde el punto de vista operativo, se ha seguido la modificación introducida por Jansson y col. (1976) al método de Hakomori: Muestras de 10-15 mg, secadas a 50°C en estufa de vacío, se tratan con DMSO (3 ml) en atmósfera de Ar y se fuerza su disolución por sonicación. Trás inyección del metilsulfinil

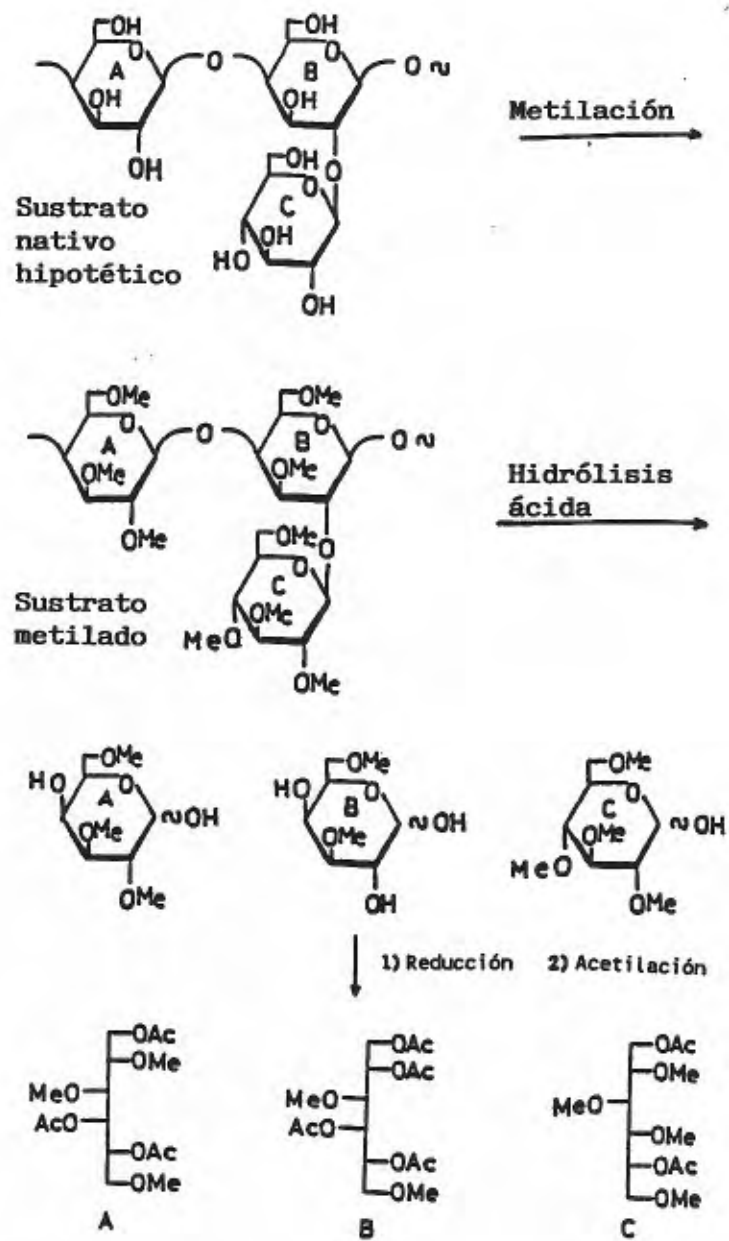


Fig. 30. Acetatos de alditol parcialmente metilados (análisis por GLC y MS).

carbani3n (Dimsyl Na, 3 ml) y nueva sonicaci3n, se adiciona IMe (3 ml) y se deja reaccionar 2 h. Se extrae el material metilado con $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (1:1), se filtra en embudo de vidrio, se dializa frente a H_2O desionizada 24 h y despues en $\text{EtOH}/\text{H}_2\text{O}$ para asegurar la bondad de la diálisis. El material resultante se evapora a sequedad en rotavapor a 50°C y se redisuelve en $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (1:1) varias veces en tubos SVL 15.

En esta fase del proceso se registra un espectro IR para verificar que la metilaci3n ha sido correcta.

A continuaci3n, las fracciones metiladas se hidrolizan secuencialmente a 100°C con ácido fórmico al 90% (2 h) y H_2SO_4 0,25M (16 h), y los productos parcialmente metilados se reducen con NaBD_4 y se convierten en acetatos de alditol parcialmente metilados (PMAA). Los PMAA se separan por GLC sobre columnas 3% OV-225 isotérmicamente a 170°C (para adjudicar los tiempos de retenci3n relativos, RRT) y sobre columnas 3% ECNSS-M a 180°C , con un programa de temperaturas (para áreas de pico).

La GLC-MS ha sido realizada con un espectrómetro de masas automático ITD Perkin-Elmer acoplado a un cromatógrafo de gases Sigma 3 Perkin-Elmer, trabajando en modo partici3n (split) y usando una columna de sílice fundida OV-101 (25 m x 0,22 m) desde 160 a 200°C , a $2^\circ\text{C}/\text{min}$, con 1 min. de mantenimiento inicial.

Los PMAA han sido identificados por (i) tiempos de retenci3n relativos a 1,5-di-O-acetil-2,3,4,6-tetra-O-metil-glucitol y (ii) la presencia de fragmentos i3nicos diagn3sticos en el espectro de masas. Para la determinaci3n cuantitativa de los PMAA se han utilizado los factores de respuesta molar recomendados por Sweet y col. (1975).

3.1.12. Espectros infrarrojo.

Han sido registrados en el rango de 4000 a 200 cm^{-1} con un Perkin Elmer 1420 Ratio Recording Infrared Spectrophotometer, siguiendo la técnica de pastillaje en KBr (mezcla de 2-3 mg de muestra con 300 mg de KBr desecado, pulverización en mortero de ágata y prensado hidráulico a 2 Tm/cm^2 durante 2 min, y 10 Tm/cm^2 otros 10 min).

3.1.13. Análisis Térmico

El Análisis Térmico se ha realizado con equipamiento instrumental Perkin-Elmer, agrupado en tres sistemas fundamentales: el termogravimétrico, modelo TGS-2; el térmico diferencial de alta temperatura, DTA 1700; y el calorímetro de barrido diferencial, DSC 7.

El modelo TGS-2 es un sistema de segunda generación, completo, diseñado para registrar de modo preciso la pérdida o ganancia de peso de una muestra a medida que se la somete a un programa de calentamiento controlado. Consiste en las siguientes unidades independientes: la termobalanza, el control de balanza electrónico, el controlador (del programa) de temperatura, la unidad de control del horno, el microprocesador de primera derivada (FDC) y el registrador (Fig. 31).

El sistema DTA 1700 de análisis térmico diferencial para alta temperatura mide los cambios de temperatura diferencial entre los materiales de muestra y referencia debidos a descomposiciones de

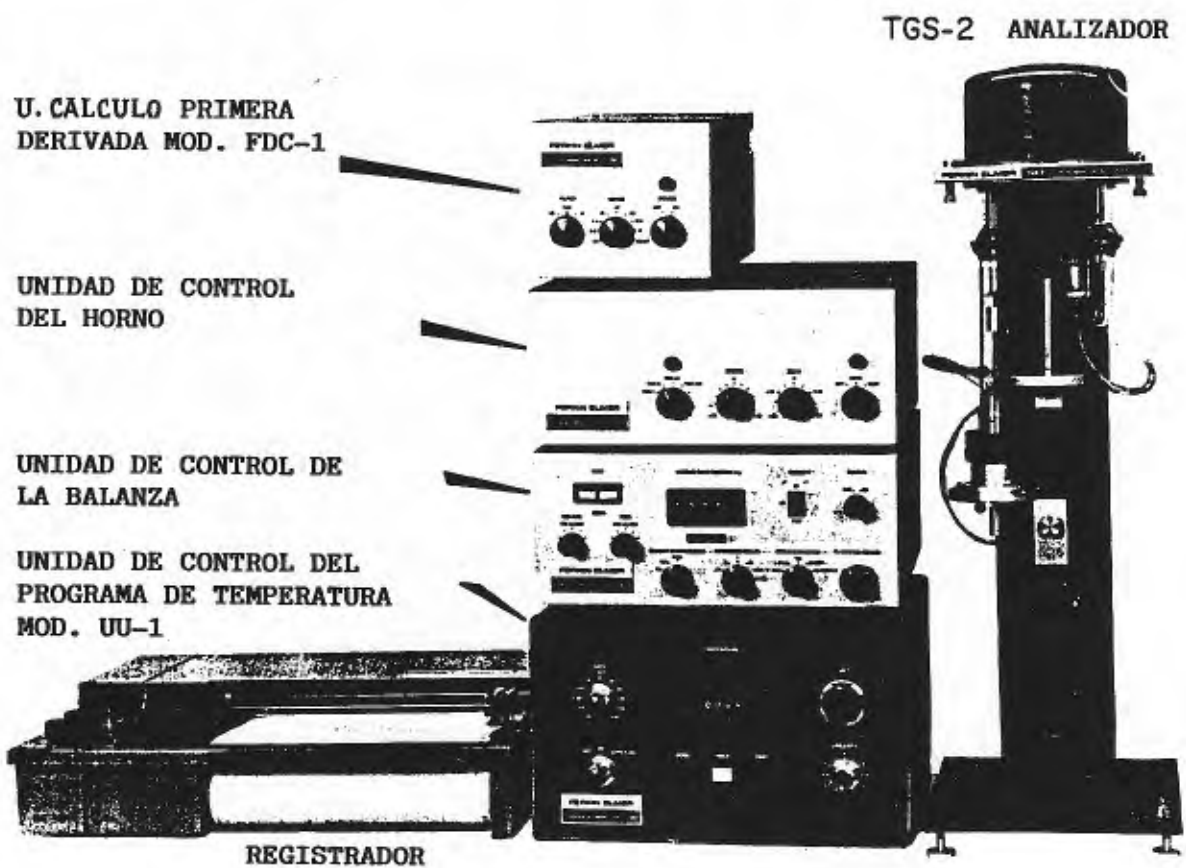


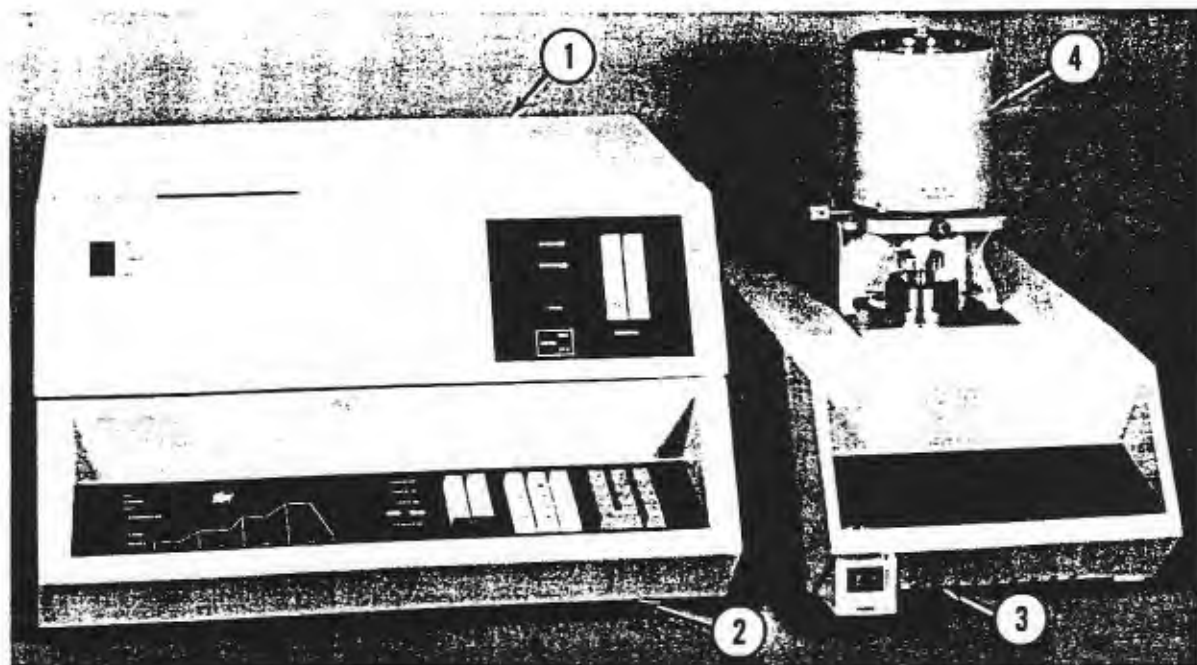
Fig. 31. Componentes de un sistema Perkin-Elmer TGS-2 completo.

la muestra, cambios de fase, etc. Está constituido por un módulo analizador DTA 1700 (que consiste en un horno de alta temperatura y su celda base) y un controlador de análisis térmico System 4. (Fig. 32).

Para monitorizar las temperaturas de *ambos* materiales muestra y referencia, se utilizan termopares contruidos en Pt y Pt-10%Rh. (Fig. 33). La temperatura diferencial de los termopares de muestra y referencia (ΔT) es transmitida del módulo analizador al módulo de control, donde es linealizada y transmitida al registrador. Aquí, ΔT es representada sobre el eje y frente a valores de x que son las temperaturas a lo largo de las cuales la muestra ha sido calentada.

Los datos térmicos para TG y DTA se han recogido en una estación de datos Perkin-Elmer modelo 3700 (Fig. 34).

El calorímetro diferencial de barrido DSC 7 permite, con su PC, la medida calorimétrica directa, caracterización y análisis de propiedades térmicas de materiales (Fig. 35). La teoría de operación está basada en el principio del "balance nulo", en que la energía absorbida o emitida por la muestra se compensa por adición o sustracción de una cantidad equivalente de energía eléctrica a un calentador localizado en el portador de muestra. El ajuste continuo y automático de potencia calorífica (energía por unidad de tiempo) necesario para mantener la temperatura del portador de muestra idéntica a la del portador de referencia, provee una señal eléctrica variable equivalente al comportamiento térmico variable de la muestra. Esta medida se hace directamente en unidades de potencia (miliwatios).



- 1) Controlador del Sistema 7/4
- 2) Sistema 7/4
- 3) Analizador DTA 1700
- 4) Horno

Fig. 32. Sistema Perkin-Elmer DTA 1700 de análisis térmico diferencial de alta temperatura.

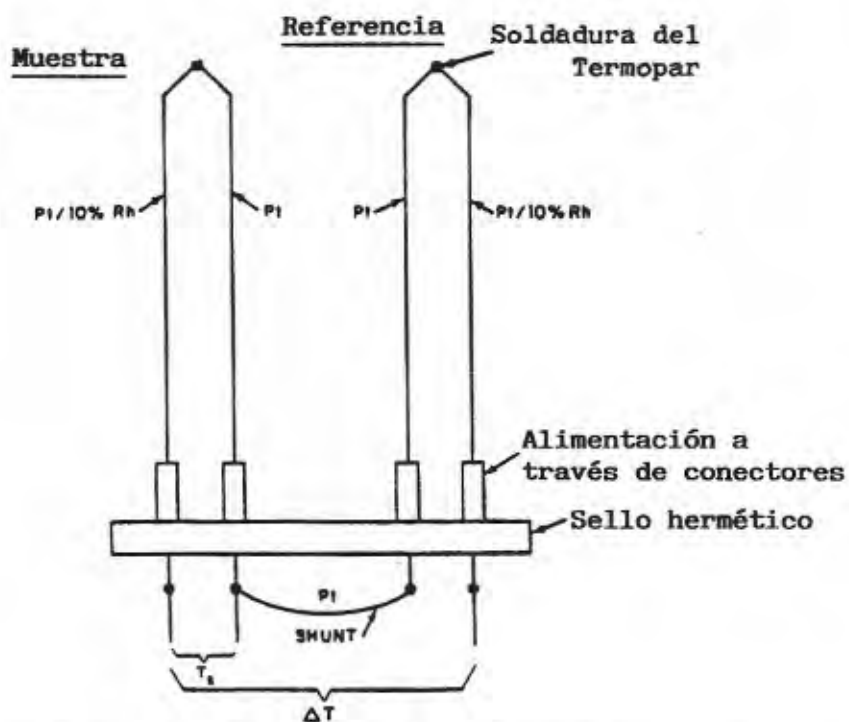


Fig. 33. Construcción de un termopar.



- 1) Pantalla
- 2) Módulo de procesado de datos
- 3) Teclado

Fig. 34. Estación de datos térmicos Perkin-Elmer modelo 3700.

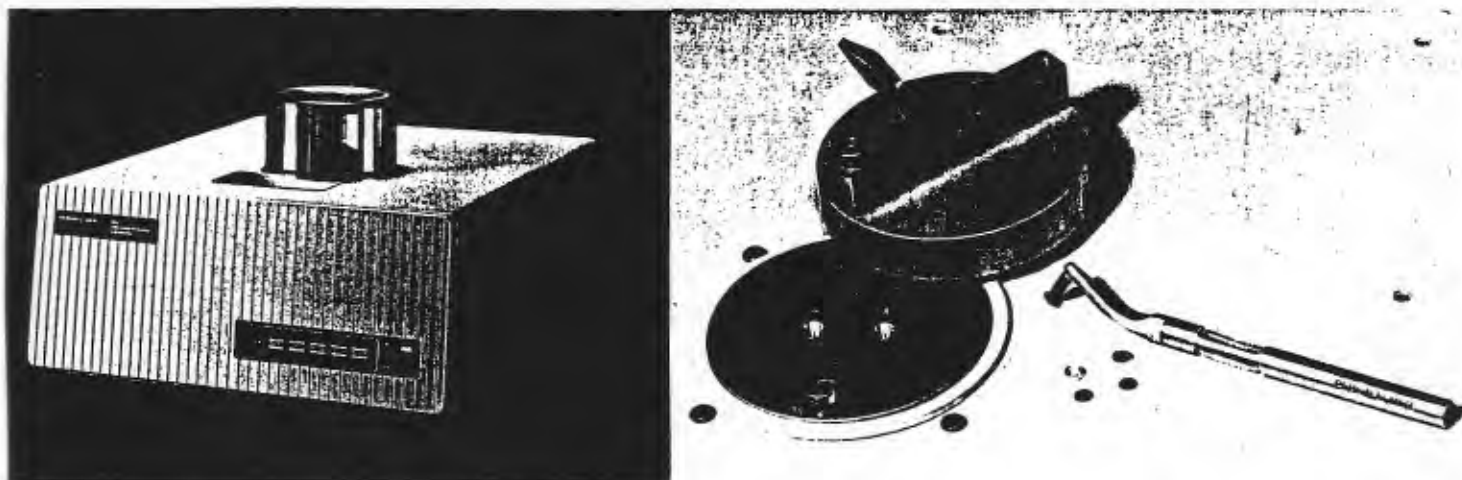


Fig. 35. Calorímetro diferencial de barrido Perkin-Elmer DSC 7.

El calibrado del TGS-2 se realiza con una muestra de oxalato cálcico monohidratado (con etapas de pérdida de masa a 100, 346, y 660°C); y la del DTA 1700 y DSC 7 con indio (temperatura de fusión, 156,6°C; entalpía de fusión, 28,4 J/g).

Las condiciones operativas (ya reseñadas al final de la sección D.2. de la presente Memoria) han sido: 2 mg de muestra; rango de temperatura de 25 a 600°C; velocidad de calentamiento de 10°C/min; aire dinámico (60 cm³/min) en TG, estático y dinámico en DTA, y N₂ dinámico (20 cm³/min) en DSC como atmósferas de análisis; crisoles de Pt en TG, cerámicos en DTA y cápsulas cerradas de Al en DSC, como contenedores de muestra; y Al₂O₃ (en TG y DTA) y un contenedor de Al sellado y vacío (en DSC) como materiales de referencia.

3.2. Aplicación del Análisis Termogravimétrico, del Análisis Térmico Diferencial y de la Calorimetría Diferencial de Barrido en la caracterización de polisacáridos fúngicos. Resultados.

3.2.1. Resultados del estudio por TG-DTG.

Los registros TG-DTG de los polisacáridos fúngicos (y otros no fúngicos, pero utilizados como referencia) presentan, de modo general, velocidades máximas de descomposición a $300 \pm 40^\circ\text{C}$, 450°C y/o 510°C , de acuerdo con los valores de los picos DTG, siendo el primero de ellos de mayor entidad que los restantes y de mayor valor para su caracterización relativa. El efecto DTG hacia 50°C , común a la mayor parte de los registros, corresponde a la pérdida del contenido en agua de las muestras y no será objeto de consideración.

A continuación, entraremos en la descriptiva de las curvas correspondientes a los diversos tipos de polímeros:

Quitina.- Su curva termogravimétrica (TG) muestra una horizontal entre 75 y 235°C a la que sigue la caída correspondiente a la descomposición, que cursa en dos etapas (I y II, con temperatura de transición a 350°C), tras la cual, a partir de 600°C aproximadamente, se registra la horizontal correspondiente a los productos de termólisis. Las dos etapas de la descomposición son sensibilizadas por sendos efectos DTG en torno a 320 y 510°C , respectivamente. El primero de ellos es doble y puede exhibir

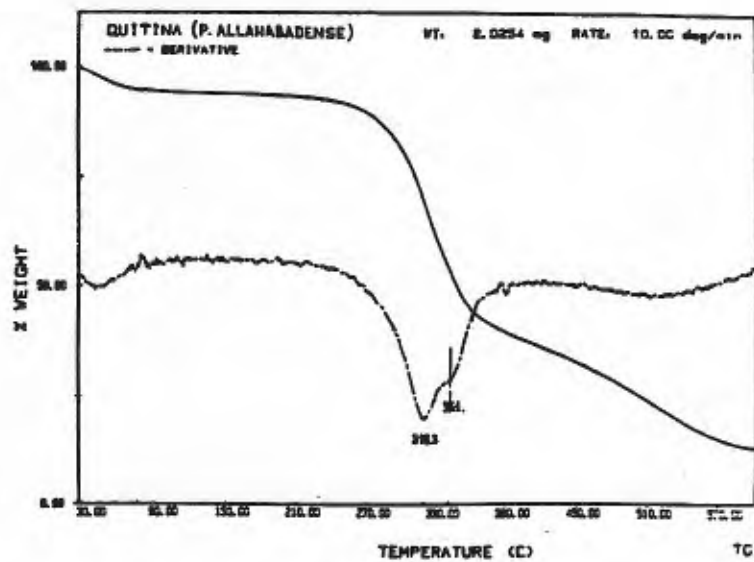
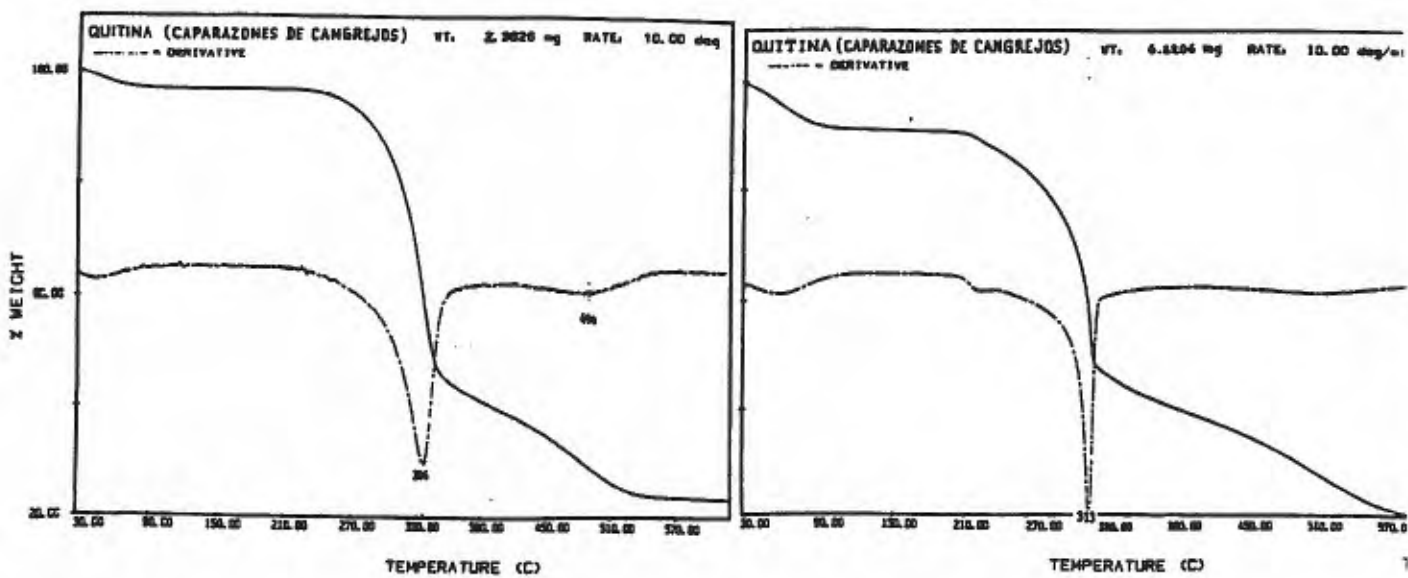


Fig. 36. Curvas DTG de quitina procedente de caparazones de cangrejos (a y b) y de *P. allahabadense* (c)

picos a 318-313°C y 341-336°C, dependiendo del grado de pureza y del peso de muestra utilizado en el AT : Estimamos que el pico a 340 °C corresponde al producto puro; el de 318 °C parece corresponder a quitina acompañada de componentes de bajo grado de polimerización (evidenciables por un pico adicional hacia 210 °C) o impurificada por glucano (caso del extracto de *P. allahabadense*), siendo, en cualquier caso, sensibilizada de modo preferente a la de 340 °C cuando el peso de muestra procesada es mayor del usual (6 mg).

Laminaranos.- Los registros TG de estos β -(1-3) D-glucanos, muestran a través de la meseta entre 100 y 230 °C su estabilidad en ese rango de temperaturas. A partir de 235 °C se produce una brusca descomposición (registrada en DTG como pico agudo entre 267 y 243 °C), seguida de otra más suave (que conlleva un segundo efecto DTG, más ancho, entre 330 y 343 °C) y, finalmente, otra descomposición abrupta, alrededor de 475 °C.

Celulosa.- La degradación térmica de este β -(1-4) D-Glucano recuerda la de quitina, si bien es mucho más sencilla: estable hasta 290 °C, experimenta un proceso único de termólisis con máximo a 330 °C, que puede darse por terminado a 360 °C (si bien no se consume cuantitativamente hasta 550 °C, en que se observa la horizontal final).

S-Glucanos.- Los derivatogramas de α -(1-3) glucanos procedentes de las fracciones F1 de *A. flavipes* y *E. crustaceum*, aisladas por J.A. Leal y cols., presentan un pico característico entre 331 y 327 °C.

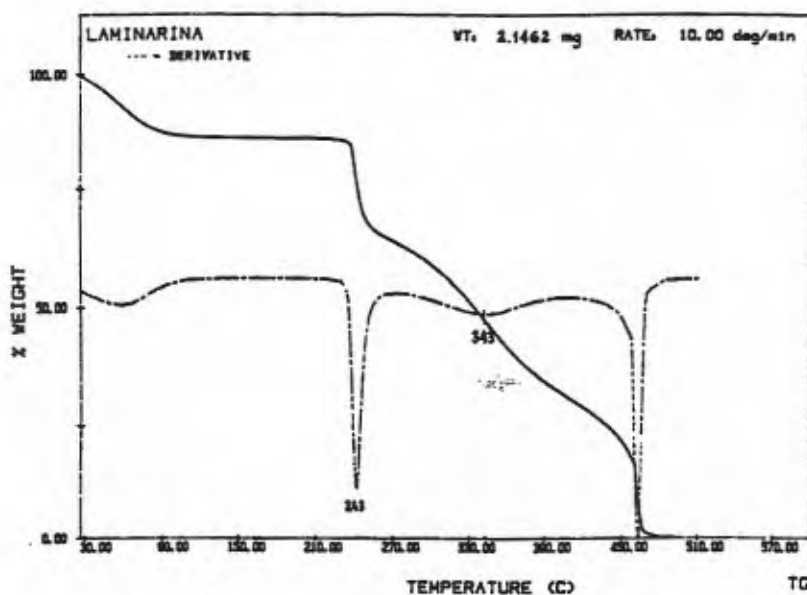


Fig. 37. Curvas de laminarano procedente de *L. digitata*.

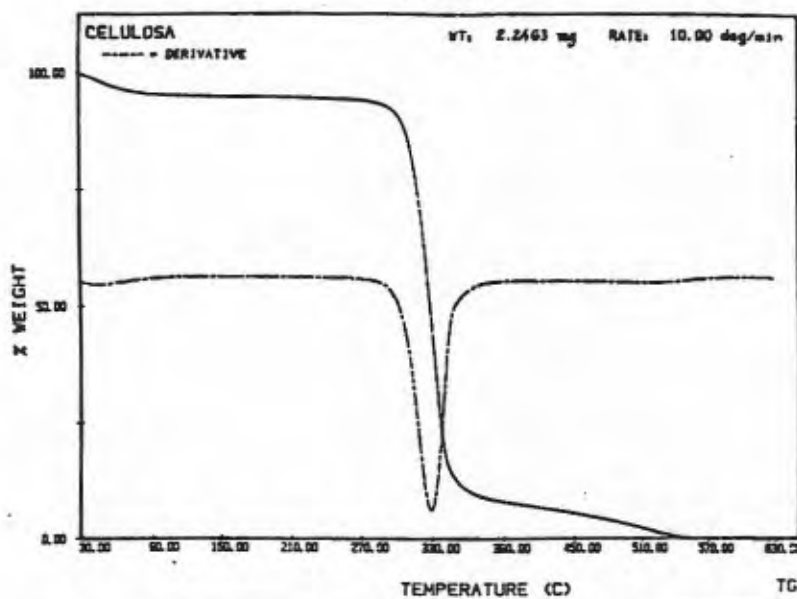


Fig. 38. Curvas TG-DTG de celulosa.

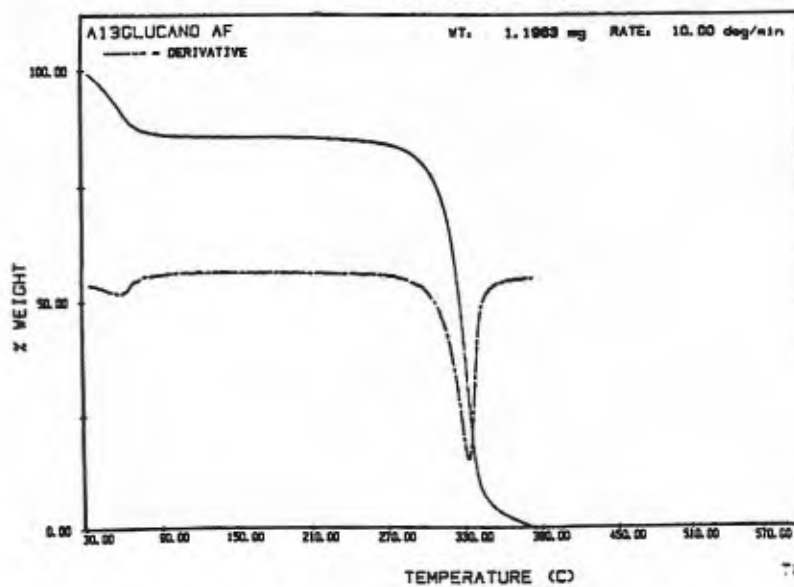


Fig. 39. Curvas TG-DTG de S-glucano (*A. flavipes*).

Mananos.- La degradación térmica de la cadena α -Man-(1-6), a la que están unidas cadenas cortas de unidades manosilo α -(1-3) y α -(1-2), caracterizada como componente de la pared celular de *S. cerevisiae*, ha cursado con efectos DTG a 329-326, 450-437 y 500-470 °C, sin que puedan establecerse diferencias significativas entre productos obtenidos vía Cetavlon o por el método de Haworth (únicamente la intensidad relativa de los dos últimos efectos podría ser tomada como indicador: con productos Cetavlon, el efecto más intenso es el de 470 °C; con productos Haworth, el de 450 °C). Los mananos procedentes de *C. albicans*, con cadenas principales α -(1-6) y ramas sólo α -(1-2), presentan un comportamiento térmico diferente de los anteriores, toda vez que los picos DTG aparecen a temperaturas más bajas: 313-296 °C para el efecto principal y más altas: 510-490 °C, para el secundario.

Dextrano.- El α -D-glucano de *Leuconostoc* B-512(F), cuya hidrólisis enzimática ha mostrado cadenas principales α -(1-6) y ramas α -(1-3) en pequeña proporción (Pulkownik y Walker, 1977), presenta la particularidad de un efecto DTG adicional a los usuales: Previo a los picos a 322 y 444 °C exhibe otro efecto a 206 °C cuya intensidad, aunque relativamente menor, no deja de ser representativa. De la curva TG pueden deducirse, además, las temperaturas inicial y final de la descomposición, 180 y 480 °C, útiles como datos complementarios a la caracterización.

Nigeranos.- De modo similar a lo que ocurre en el caso de la celulosa, las curvas termogravimétricas de estos α -(1-3),(1-4) glucanos son muy sencillas, pues el efecto DTG entre 324.5 y 316 °C (que muestra un hombro a menores temperaturas) es prácticamente único.

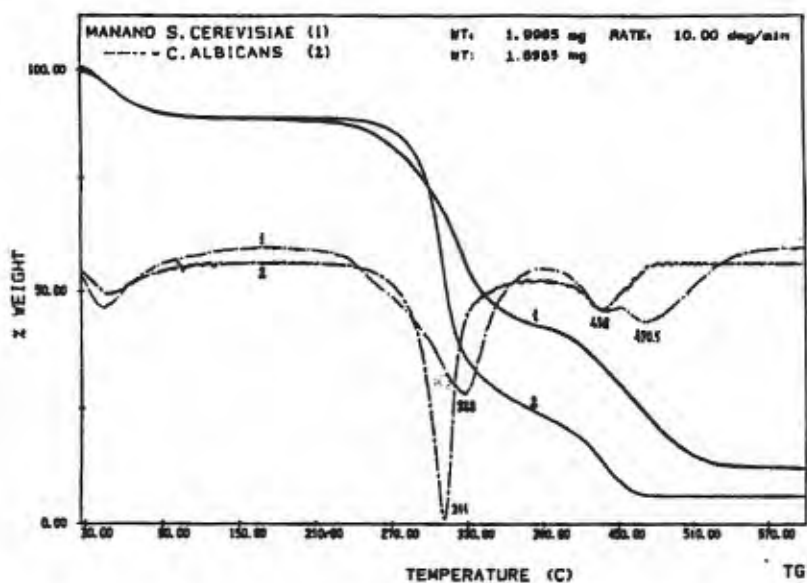


Fig. 40. Curvas TG-DTG de mananos (*S. cerevisiae*).

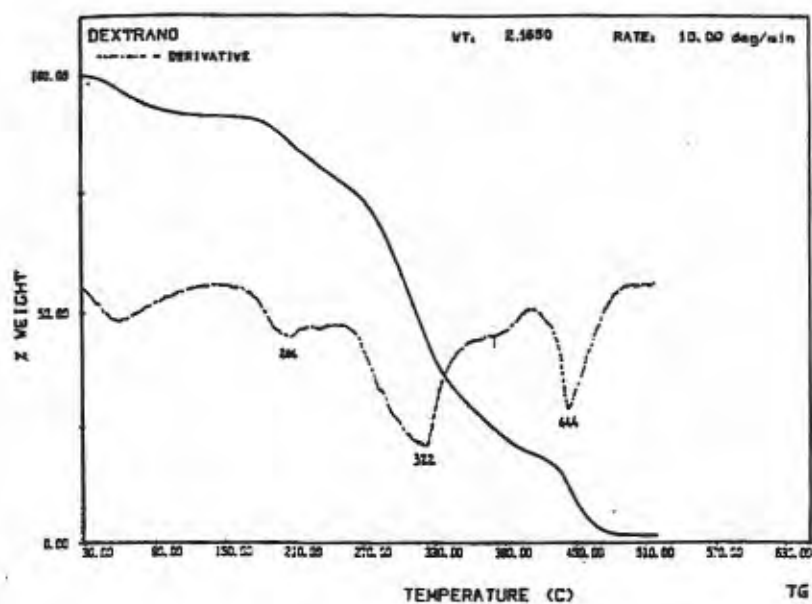


Fig. 41. Curvas TG-DTG de dextrano (*Leuconostoc* spp)

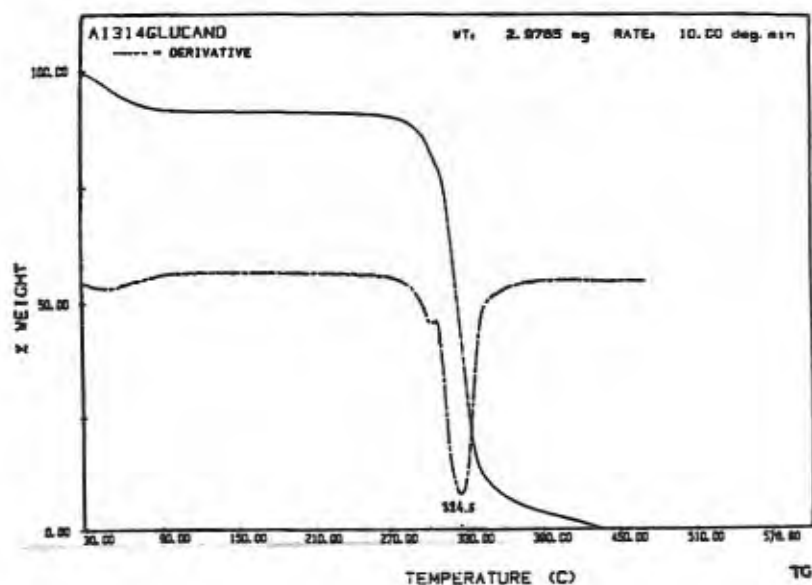


Fig. 42. Curvas TG-DTG de nigerano (*A. cremes*).

Pululanos y Amilopectina.- La similitud de estos polímeros, sólo diferenciables por la disposición adyacente de las unidades α -(1-6) y α -(1-4), en el primer caso, y ramificada, en el segundo, permite justificar su comportamiento térmico, estimado, por otra parte, intermedio entre los nigeranos y la amilosa: los pululanos presentan un pico a 324.5 °C y la amilopectina a 320,5 °C.

Amilosa.- La evolución térmica por TG y DTG de este α -(1-4) D-glucano lineal es muy similar a la de los dos últimos tipos de polisacáridos descritos, difiriendo únicamente en la temperatura de pico, ligeramente inferior para amilosa (319,5 °C).

Glucomananos.- Por su caracter heterogéneo, los registros termoanalíticos de estos polisacáridos mixtos han dado lugar a efectos DTG con temperaturas de pico diferenciables:

- 319 °C para el procedente de *A. fulvescens*, a base de unidades β -(1-4) manosilo y β -(1-6) glucosilo,

- 314-311 °C para los procedentes de *A. reticulisporus* y *A. terreus*, que constan fundamentalmente de unidades α -(1-6) mano y de residuos β -(1-6)(1-4) glucosilo,

- 300 y 503-495 °C para los de *M. gypseum* y *T. ajelloi*, que contienen unidades α -(1-6) mano con residuos β -(1-4) glucosilo.

R-Glucanos ó β -D-Glucanos basados en esqueletos o cadenas β -(1-3) con algunos enlaces β -(1-6). Los más desramificados (*B. cinerea*) presentan un efecto intenso a 267 °C seguido por otro, ancho, de poco desarrollo, a 330-313 °C. Dicho efecto se resuelve en un pico único a 322-313 °C con hombro a 278 °C, para muestras más ricas en β -(1-6), como el polisacárido de *N. rileyi*. El siguiente de los efectos DTG varía entre 441 y 483 °C.

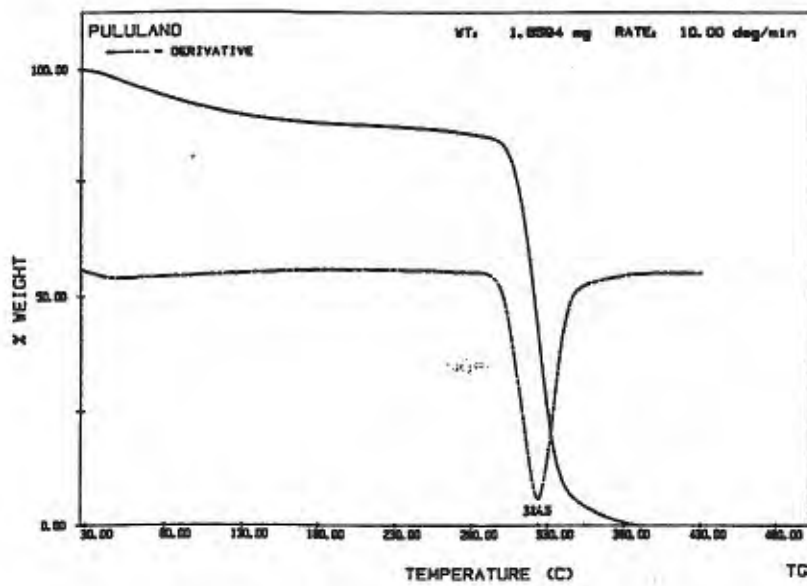


Fig. 43. Curvas TG-DTG de pululano (*A. pullulans*).

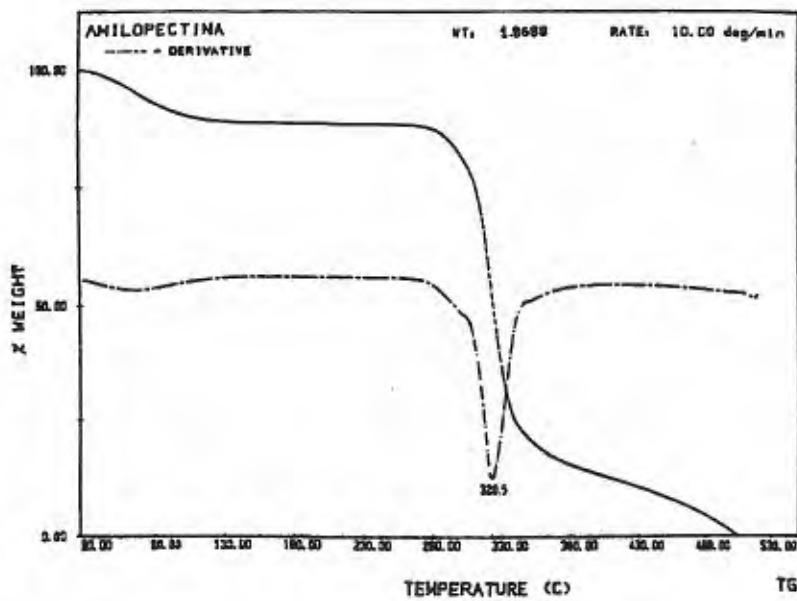


Fig. 44. Curvas TG-DTG de amilopectina de cereal.

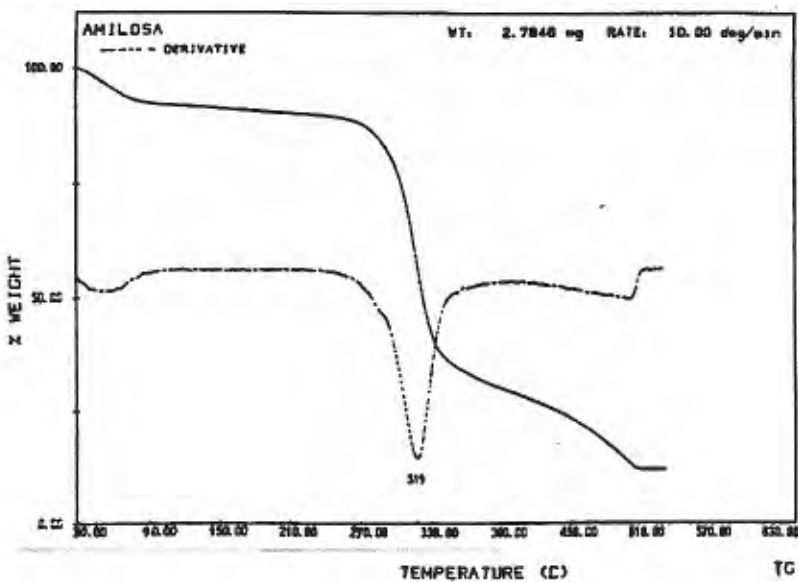


Fig. 45. Curvas TG-DTG de amilosa de patata.

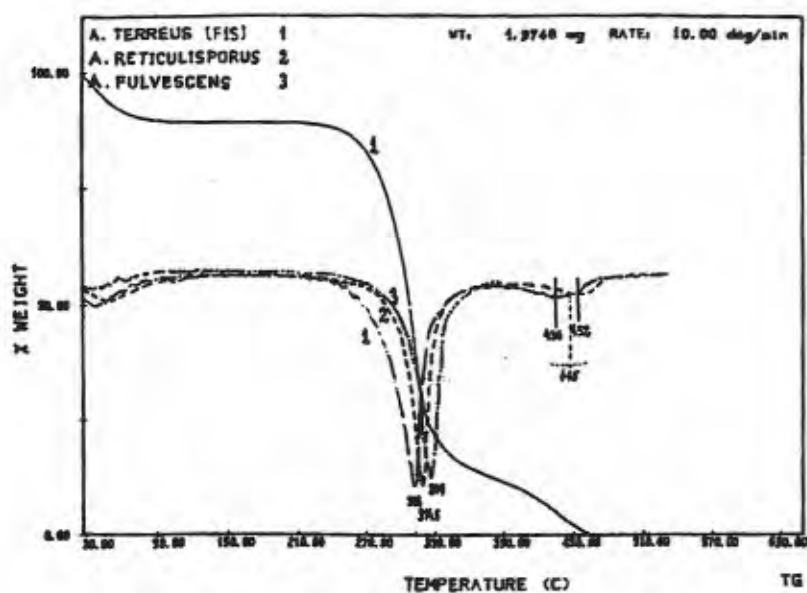


Fig. 46. Curvas TG-DTG de glucomananos β -Glc-(1-6).

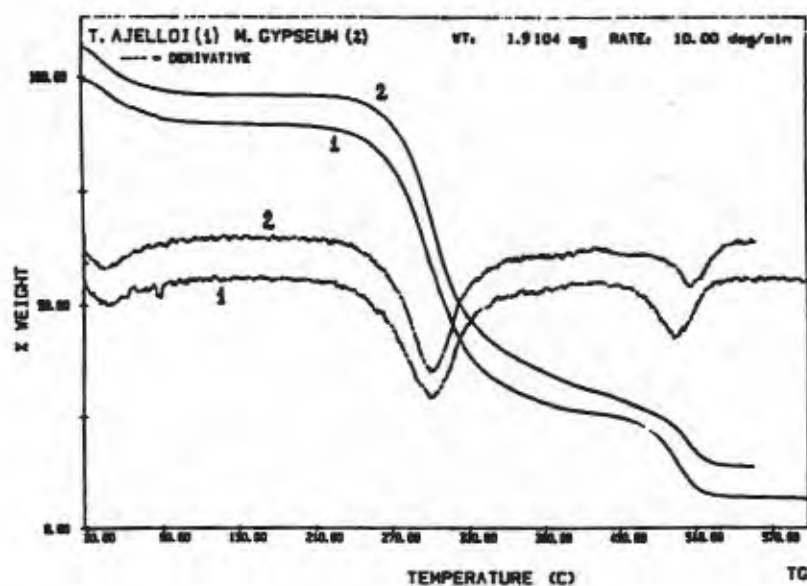


Fig. 47. Curvas TG-DTG de glucomananos β -Glc-(1-4).

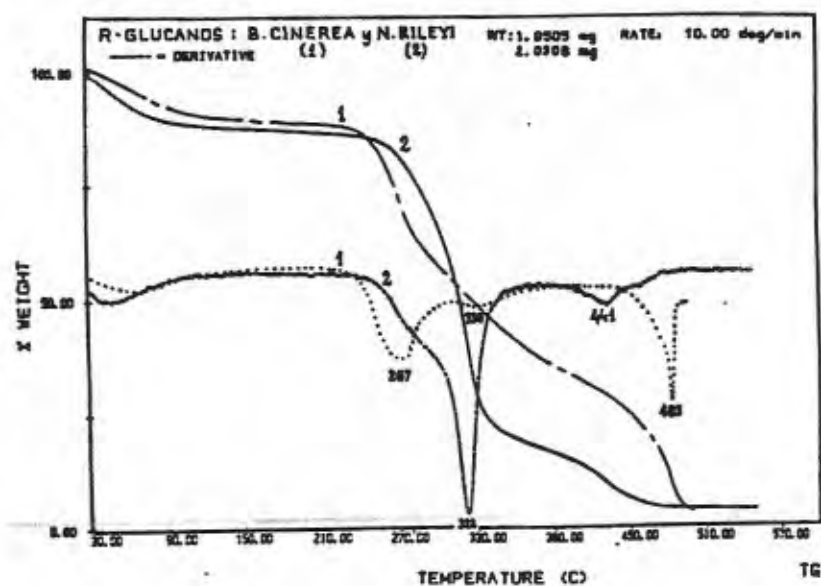


Fig. 48. Curvas TG-DTG de R-gluconos.

Pustulanos y análogos.- Los β -(1-6) glucanos y sus derivados con unidades glucosilo β -(1-3) (que mantienen una proporción relativa β -(1-6): β -(1-3) altamente favorable a β -(1-6)) exhiben registros comunes, con efectos térmicos a 318 y 453 °C que permiten su caracterización como grupo, pero con la particularidad útil para su diferenciación de que los pustulanos propiamente dichos poseen una banda adicional a 212 °C, no presentada por sus análogos.

Otro hecho a reseñar es que el pico a 453 °C puede resultar más intenso que el de 318 °C para pesos de muestra de 1.5 mg.

Glucanoquitina.- La presencia de unidades glucosilo en la estructura de la quitina motiva un decrecimiento de su termoestabilidad, como puede apreciarse en la comparación de las temperaturas de los efectos DTG principales (310 °C en glucanoquitina y 340 °C en quitina).

Quitosano.- Su derivatograma muestra picos a 305 y 603 °C que, comparados con los de quitina, respectivamente a 340 y 500 °C, introducen una cierta ambigüedad en cuanto a sus estabilidades relativas (el desplazamiento hipsotérmico del primer pico está compensado con el desplazamiento batotérmico del segundo).

Galactomanoglucanos.- Sus derivatogramas muestran picos a 266, 297.5 y 421 °C. La proximidad de los dos primeros podría introducir ambigüedades a la hora de establecer correspondencia con los efectos exhibidos por otros polisacáridos, de no ser por la conocida ubicación a 300 °C de los galactoglucanos, que orienta a tomar el de 297,5 °C como característico.

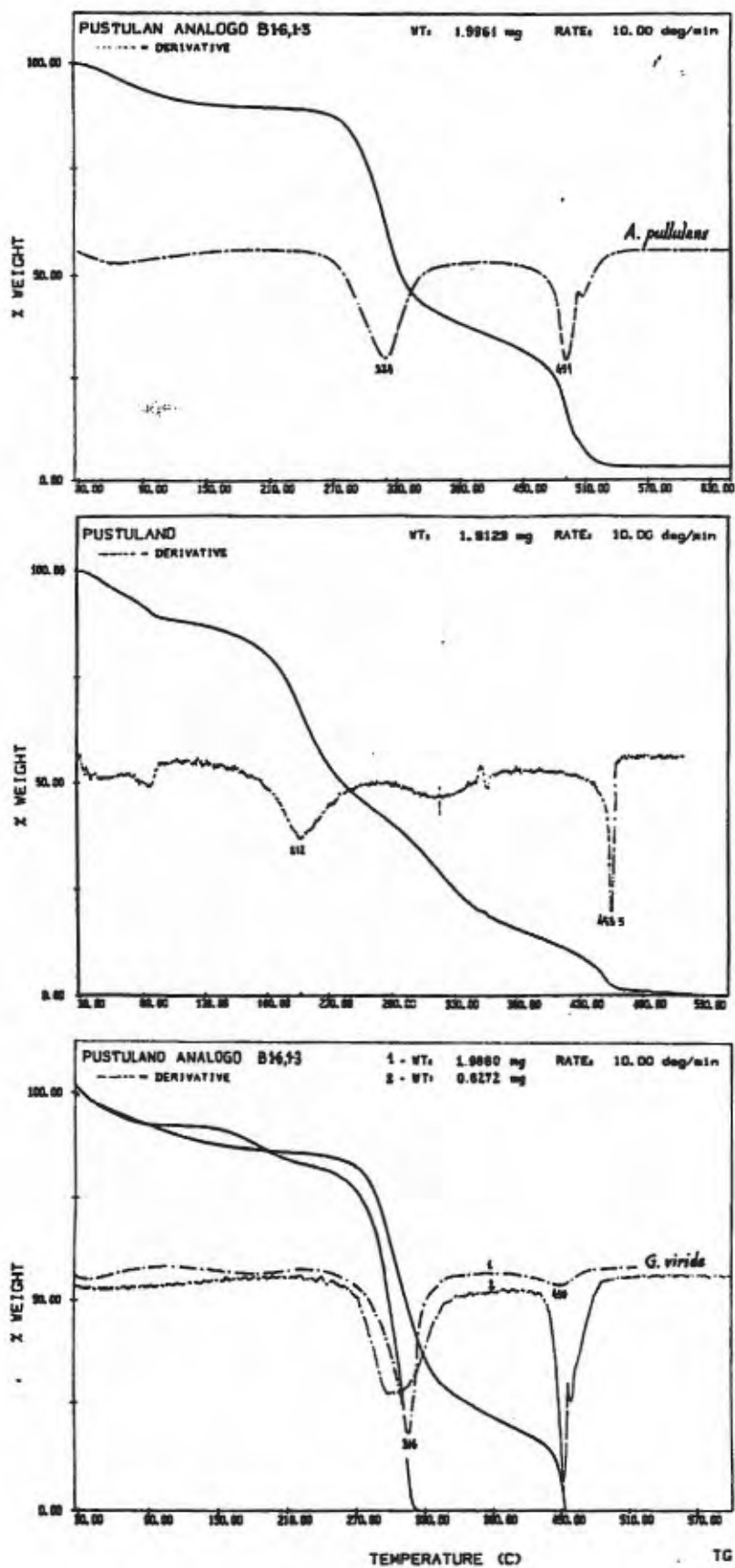


Fig. 49. Registros TG-DTG de pustulano y pustulanoides.

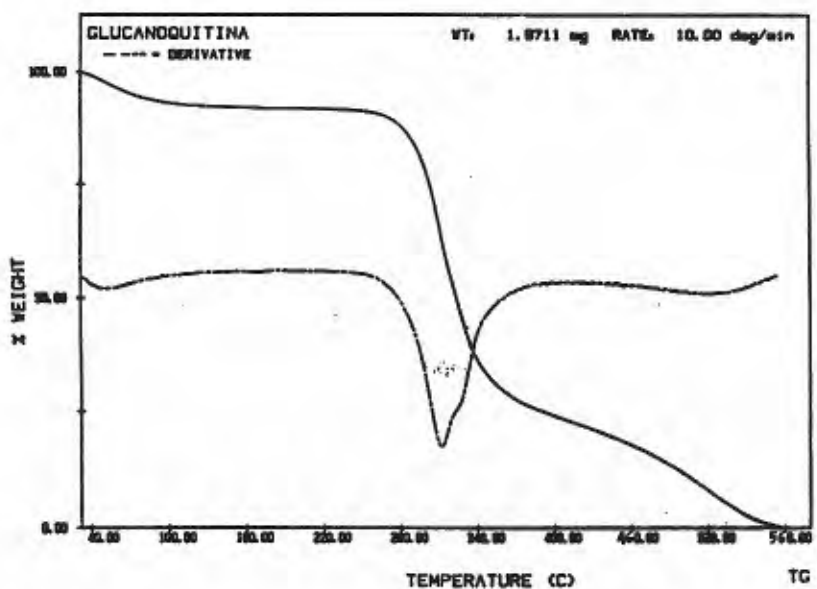


Fig. 50. Curvas TG-DTG de glucanoquitina.

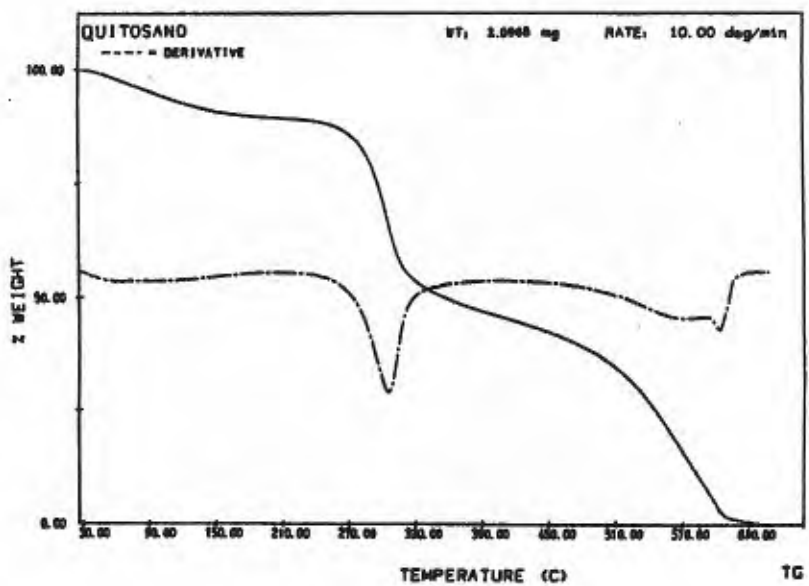


Fig. 51. Curvas TG-DTG de quitosano.

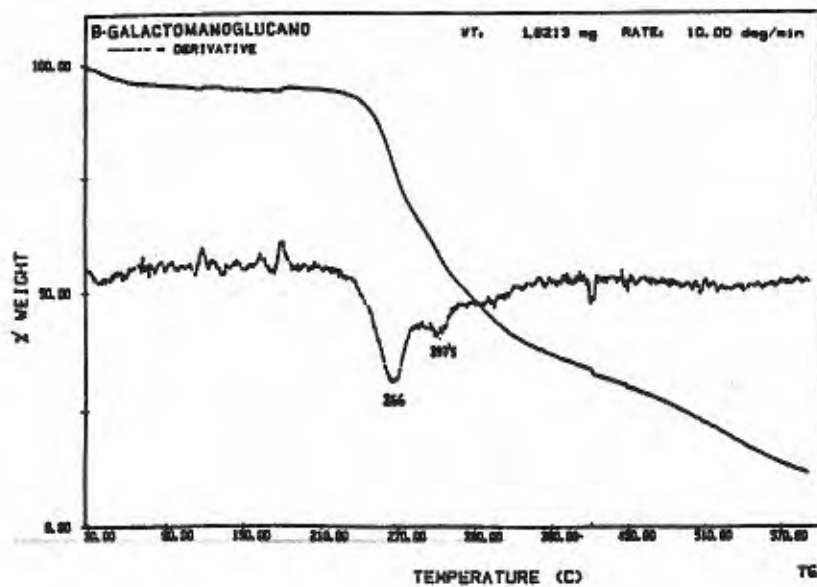


Fig. 52. Curvas TG-DTG de un β -galactomanoglucano.

β -Glucogalactanos y β -Galactoglucanos.- En la primera región de sus registros estos polisacáridos mixtos muestran sendos efectos DTG a 301-298 y a 294-291 °C. En la segunda región, los efectos correspondientes se producen a 508-499 °C y a 474/542.

Galactanos.- Las fracciones FINS de *P. spinulosum* y *E. stolckiae*, tipadas como β -galactanos presentan velocidades máximas de descomposición a 284-278 y 489-481 °C. Creemos que fracciones procedentes de *k*-carrageenans ricas en unidades 4-O-sulfo-neocarrabiosilo β -(1-4) también deberían presentar picos DTG a estas temperaturas, a diferencia de las fracciones de carrageenans con residuos galactosilo enlazados alternativamente β -(1-3) y α -(1-4), que proporcionan picos DTG a 236, 325, (408) y 509 °C.

Xilanos.- Las curvas DTG de esta familia de polisacáridos, basados en un esqueleto β -Xyl-(1-4), al que se unen cadenas cortas de otros residuos azúcar por enlaces α -(1-3) y/o α -(1-2), muestran picos a 283 y 441 °C.

Xantano Goma de.- Las etapas de descomposición de este exopolisacárido, compuesto de una cadena lineal de residuos glucosilo β -D-(1-4) enlazados con una cadena lateral compuesta de β -D-manosil-(1-4)- β -D-ácido glucosilurónico-(1-2)-D-manosa enlazada α -D-(1-3) a cada dos unidades D-glucosilo, quedan sensibilizadas en el registro DTG con picos a 251, 281 y 462 °C.

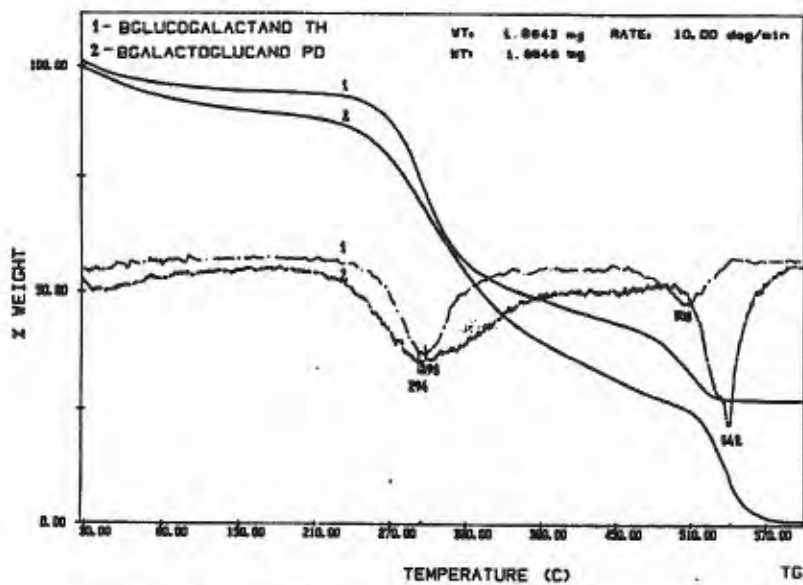


Fig. 53. Curvas TG-DTG de glucogalactano (*T. helicus*) y galactoglucano (*P. digit*)

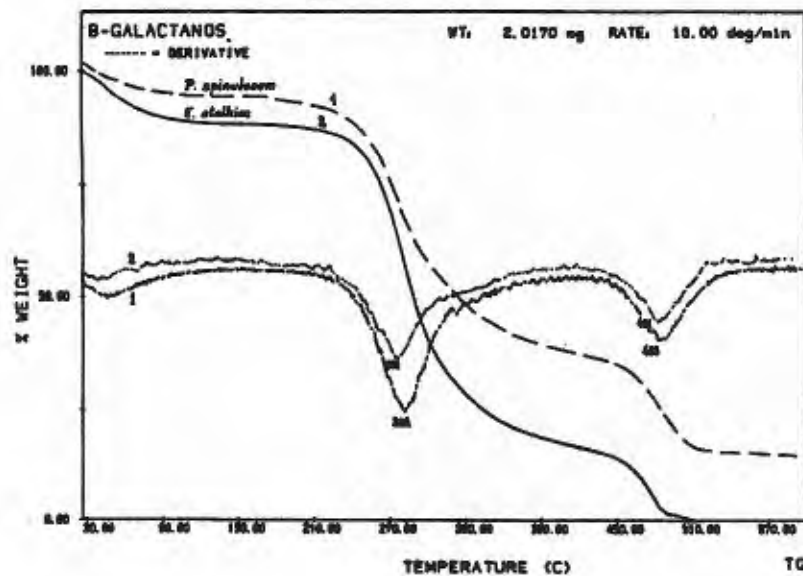


Fig. 54. Curvas TG-DTG de β -galactanos.

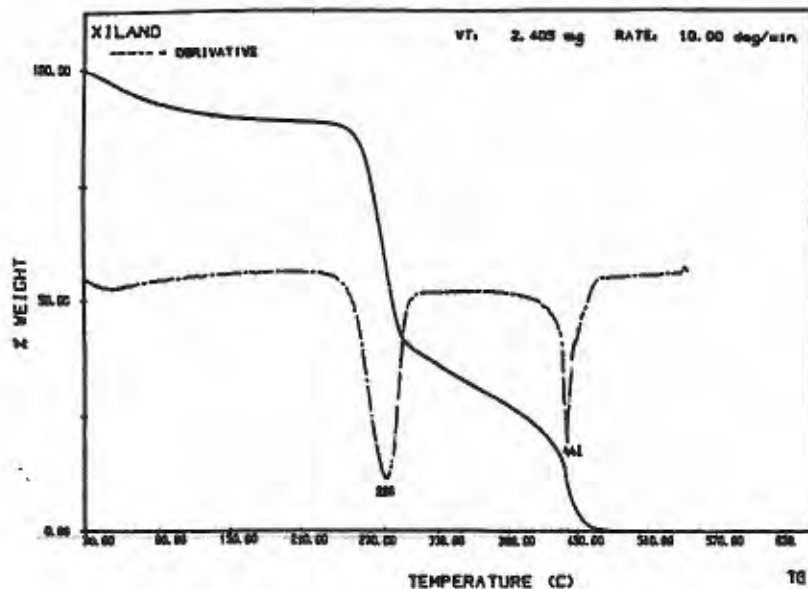


Fig. 55. Curvas TG-DTG de xilano.

Inulina.- La curva TG de los D-fructanos β -(2-1) presenta pérdidas de masa significativas en torno a 242, 278 y 520 °C.

Fucoidano.- Los α -fucanos-(1-2), ram. α -(1-4) proporcionan picos DTG útiles para su caracterización a 221, 245sh, 409 y 486°C.

Hexosaminas.- Los registros TG-DTG correspondientes a glucosamina (en formas HCl y N-acetil), galactosamina.HCl y manosamina.HCl muestran un efecto térmico común en torno a 200 °C que permite la secuencia de estabilidades siguiente:

Glucosamina.HCl	>	Glucosamina.N-Ac	>	Galactosamina.HCl	>	Manosamina.HCl
210 °C		209 °C		196 °C		180 °C

Acido Glucurónico.- Su curva TG muestra una excelente horizontal hasta 143 °C, temperatura a la que la descomposición toma lugar. Esta evoluciona con velocidad creciente hasta alcanzar un máximo a 168 °C, seguido por un segundo proceso a 203 °C. El hecho de que las temperaturas de estos efectos hayan sido las más bajas en la serie de compuestos estudiados, está de acuerdo con la gran labilidad de los ácidos urónicos, no establecidas térmicamente pero sí conocida frente a la hidrólisis ácida (Rosenberger, 1976).

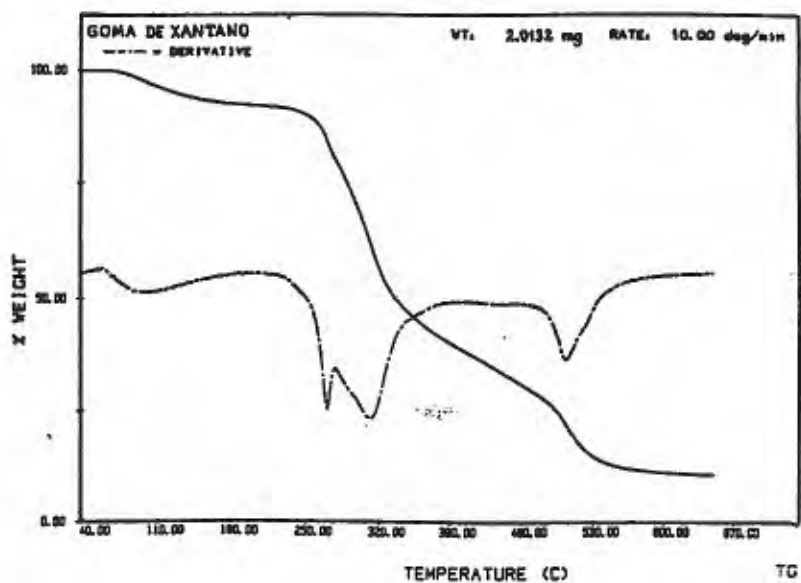


Fig. 56. Curvas TG-DTG de goma de xantano.

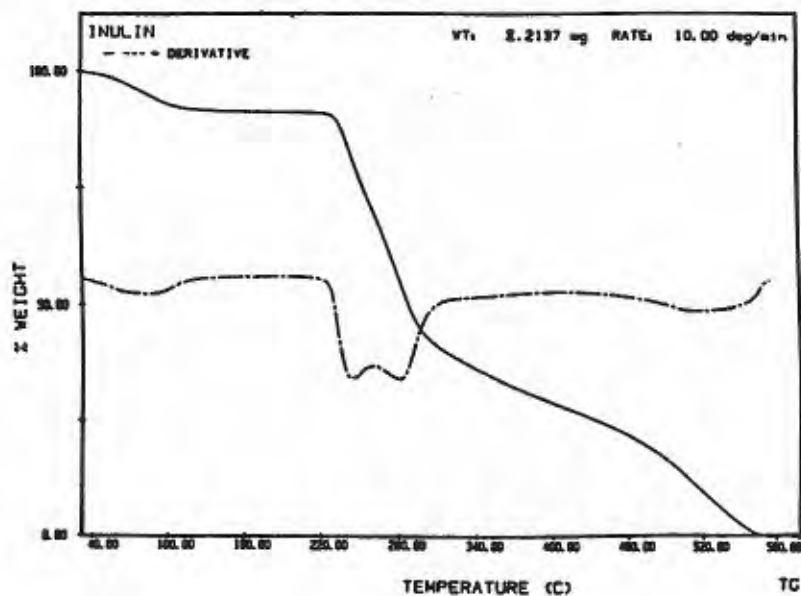


Fig. 57. Curvas TG-DTG de inulina.

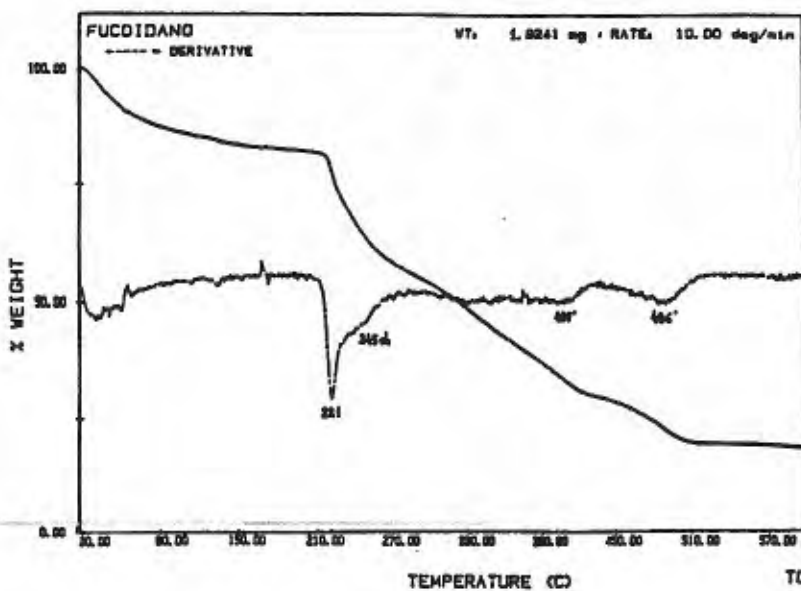


Fig. 58. Curvas TG-DTG de fucoidano.

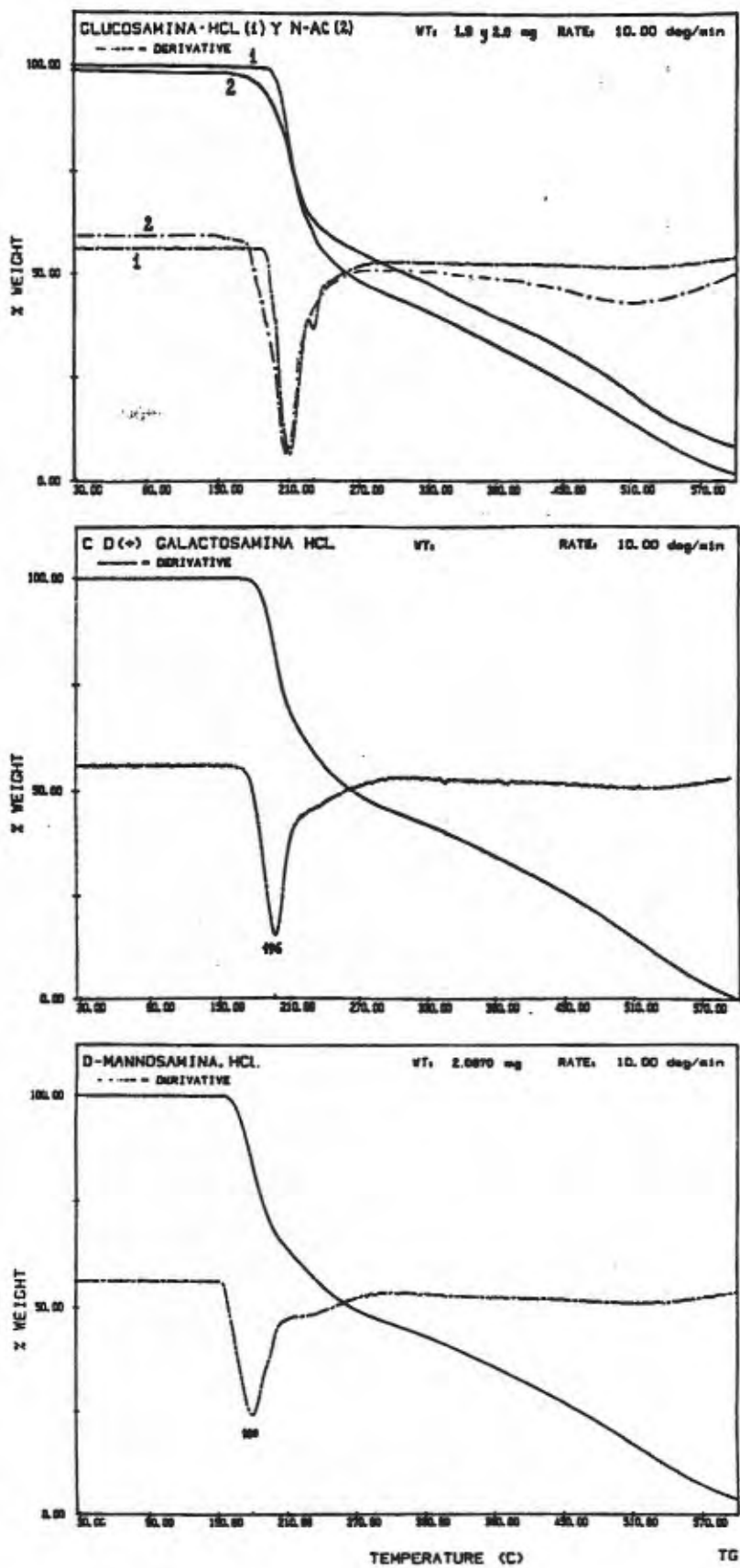


Fig. 59. Curvas TG-DTG de hexosaminas.

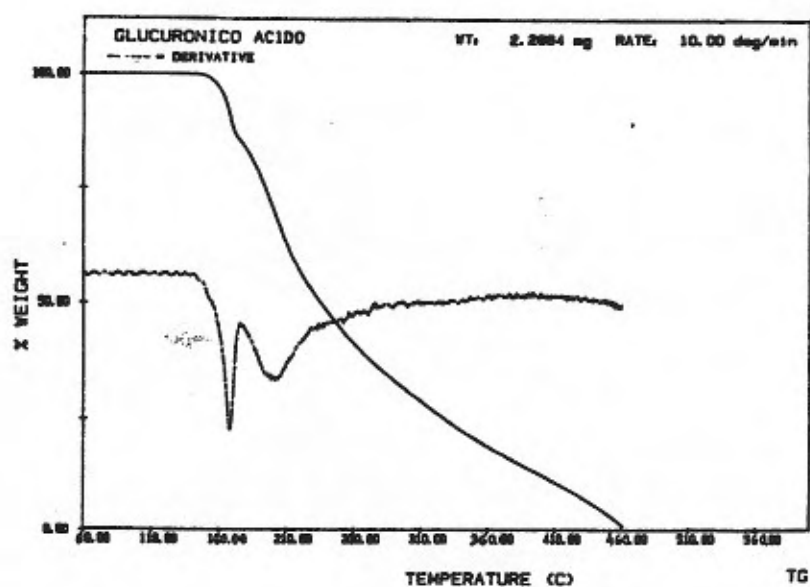


Fig. 60. Curvas TG-DTG de ácido glucurónico

Valoración de resultados

1.- Los registros TG-DTG se han mostrado útiles en la caracterización de 25 tipos de polisacáridos fúngicos, aparte de otros varios de origen no fúngico : En condiciones de registro de alrededor de 2 mg de muestra, aire dinámico (aprox. 60 cm³/min) y velocidad de calentamiento de 10 °C/min, la temperatura de pico del efecto DTG principal (en torno a 300 °C) ha permitido construir una tabla de asignaciones (Tabla VIII) que permitirá orientar sobre la constitución monomérica y tipos de enlace de nuevos polisacáridos y, en la mayor parte de los casos, establecerla.

En situaciones de ambigüedad, la temperatura de otros efectos térmicos DTG, la morfología de las curvas TG y, subsidiariamente, el examen diferencial de las curvas DTA/DSC servirá de ayuda adicional.

Toda vez que se ha trabajado con muestras suficientemente purificadas, la procedencia de los polisacáridos y la metodología empleada en su obtención no han introducido modificaciones sustanciales en las temperaturas de pico.

2.- La posibilidad de utilización del pico central de los registros DTG como marcador de estabilidad ha permitido, por primera vez, secuenciar de modo exhaustivo la termoestabilidad de los polisacáridos y ponerla en relación con otras secuencias de estabilidad (a la hidrólisis y a la acetólisis).

Tabla VIII

Efectos térmicos de las curvas TG-DTG (°C) de polisacáridos fúngicos y de otros orígenes

Polímero	Constituyente y tipo de enlace	Fuente	Picos DTG característicos		
Quitinas	β -Glc-(1-4) lineal	{ <i>P. allahabadense</i> <i>Caparazones de cangrejos de mar</i>	318-313	341-336	520-490
Laminaranos	β -Glc-(1-3) lineal	<i>L. digitata</i>	267-243	343-330bd	483-465
Celulosa	β -Glc-(1-4) lineal	<i>Paredes de células vegetales</i>		330	
S-Glucanos	α -Glc-(1-3)	{ <i>A. flavipes</i> <i>E. crustaceum</i>		331-327	
Mananos	α -Man-(1-6), ram. α -(1-3) y α -(1-2)	<i>S. cerevisiae</i>		329-326	450-437 500-470
Dextrano	α -Glc-(1-6), ram. α -(1-3)	<i>L. mesenteroides</i>	206	326-322	444
Nigeranos	α -Glc-(1-3), (1-4) lineal	{ <i>A. cremeus</i> <i>A. niger</i>	312-302sh	325-316	
Pululanos	α -Glc-(1-6), (1-4) lineal	<i>A. pullulans</i>		324,5	
Amilopectina	α -Glc-(1-4), ram. α -(1-6)	<i>de cereal</i>		320,5	517
Amilosa	α -Glc-(1-4) lineal	<i>tipo III, de patata</i>		319,5	
Glucomananos	?-Man-(1-4)- β -Glc-(1-6)	<i>A. fulvescens</i>		319	
R-Glucanos	β -Glc-(1-3), ram. β -(1-6)	{ <i>N. rileyi</i> <i>B. cinerea</i>	288	322-314	482-441
Pustulanoides	β -Glc-(1-6), (1-3)	{ <i>G. viride</i> <i>P. allahabadense</i>		320-314	491-450
Pustulanos	β -Glc-(1-6) lineal	{ <i>A. pullulans</i> <i>U. pustulata</i>	212	318-314	455,5

(Gluco)mananos	α -Man-(1-6)- β -Glc-(1-6), (1-4)	$\left\{ \begin{array}{l} A. \text{reticulisporus} \\ A. \text{terreus} \end{array} \right.$	314-311	452-436	
Mananos	α -Man-(1-6), ram. α -(1-2)	<i>C. albicans</i>	313-296	438,5	510-490
Glucanoquitina	β -(1-4)	<i>T. helicus</i>	310		525
Quitosano	β -(1-4)	de caparazones de cangrejos	305		603
Glucomananos	α -Man-(1-6)- β -Glc-(1-4)	$\left\{ \begin{array}{l} M. \text{gypseum} \\ T. \text{ajelloi} \end{array} \right.$	300		503-495
Galactomanoglucanos	β -(1-4), (1-6)	<i>G. viride</i>	266	(302)-297,5	421
Glucogalactanos	β -(1-4)	$\left\{ \begin{array}{l} P. \text{allahabadense} \\ T. \text{helicus} \end{array} \right.$	301-298		508-499
Galactoglucanos	β -(1-4), (1-6), (1-3)	$\left\{ \begin{array}{l} P. \text{digitatum} \\ T. \text{flavus} \end{array} \right.$	294-291		542-474
Galactanos	β -Gal-(1-4), (1-3)	$\left\{ \begin{array}{l} P. \text{spinulosum} \\ E. \text{stolkiae} \end{array} \right.$	284-278		489-481
Xilano	β -Xyl-(1-4), ram. α -(1-2)	de espelta de avena	283	441	
Xantano goma de	β -Glc-(1-4)/ β -Man-(1-4)	<i>X. campestris</i>	251	281	462
Inulina	β -Fru-(2-1) lineal	de raices de achicoria	242	278	520
Fucoidano	α -Fuc-(1-2), ram. α -(1-4)	<i>F. vesiculosus</i>	221	245sh	409 486
Glucosamina.HCl			210	230	
Glucosamina.N-acetil			209		512
Galactosamina.HCl			196		477
Manosamina.HCl			180		
Ac. Glucurónico			168	203	

El orden de estabildades encontrado es el siguiente:

Quitina = Laminaranos > Celulosa > S-Glucanos >
 α -Man-(1-6), ram. α -(1-3) y (1-2) Mananos > Dextrano > Nigeranos =
Pululanos > Amilopectina > Amilosa > β -Man-(1-4)- β -Glc-(1-6)-
D-Glucomananos > R-Glucanos > β -(1-6), β -(1-3)-D-Glucanos >
Pustulanos > α -Man-(1-6)- β -Glc-(1-6),(1-4) Glucomananos >
 α -(1-6), ram. α -(1-2) Mananos > Glucanoquitina > Quitosano >
 α -Man-(1-6)- β -Glc-(1-4) Glucomananos > Galactomanoglucanos >
 β -Glucogalactanos > β -Galactoglucanos > β -Galactanos > Xilano >
Xantano Goma de > Inulina > Fucoidanos > Glucosamina.HCl >
Glucosamina.N-Ac > Galactosamina.HCl > Manosamina.HCl > Acido
Glucurónico.

Conscientes de la importancia de las relaciones estructura-actividad y refiriendo la anterior secuencia a otra de tipos de enlace, ha sido posible estimar de modo general un orden para la fuerza de los distintos tipos de unión:

β -(1-4) (Quitina y Celulosa) \geq β -(1-3) > α -(1-3) > α -(1-6) >
 α -(1-4) > β -(1-6) > β -(1-4) > β -(2-1) > α -(1-2).

La cabecera de esta secuencia parece estar de acuerdo con la susceptibilidad a la hidrólisis ácida y alcalina de los polisacáridos tal y como se deriva del proceso clásico de fraccionamiento de paredes diseñado por Mahadevan y Tatum en 1965. Respecto a los otros tipos de enlace, ya en 1948 Swanson y Cori mostraron que los enlaces α -D-(1-6) son más resistentes a la hidrólisis ácida que los enlaces α -D-(1-4), observación que se ha completado con la reciente de Pazur, en 1986, de que los compuestos con enlaces (1-6) se hidrolizan por ácidos menos fácilmente que los

(1-2), en total coincidencia con nuestros resultados.

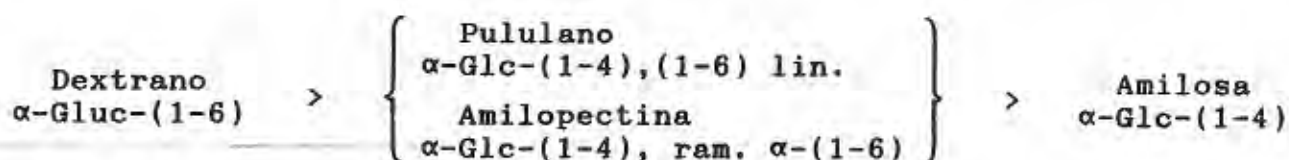
En comparación con la secuencia de estabilidades deducible a través de las velocidades relativas de ruptura en el proceso de acetolisis (Rosenfeld y Ballou, 1974), nuestra secuencia de termoestabilidades no ofrece más analogía que la común observación de una muy diferente estabilidad de los enlaces (1-6), fundamentalmente los β -, respecto a los enlaces (1-3) y (1-4).

Por lo demás, se advierte un cierto comportamiento inverso termolisis-acetolisis (también reseñado entre hidrólisis y acetolisis) que permite asimilar termoestabilidad con resistencia a la hidrólisis y facilidad a la acetolisis.

En otro orden de consideraciones, la generalización que supone la secuencia de enlace arriba mencionada ha de modularse con ciertas puntualizaciones:

Una, es relativa a la coexistencia de dos o más tipos de enlace en un polímero y, a este respecto, han de distinguirse dos situaciones fundamentales derivadas de la homogeneidad o heterogeneidad del polisacárido:

(a) Cuando el polisacárido es homogéneo en cuanto a tipo de monómeros constituyentes (homoglicano), la coexistencia de dos tipos de enlace (tanto sobre cadenas no ramificadas como ramificadas) determina que su estabilidad sea intermedia entre las de polisacáridos que posean un solo tipo de enlace:



(b) Cuando el polisacárido es heterogéneo (heteroglicano) y ramificado, *s.c.*, con residuos y tipos de enlace en las cadenas laterales distintos de los que mantienen el esqueleto fundamental, por ejemplo, goma de xantano, xilanos, etc., su estabilidad es sustancialmente menor que la de un polisacárido homogéneo no ramificado:

Celulosa	>	Goma de Xantano
β -Glc-(1-4)		β -Glc-(1-4), ram.Man-GlcA-Ac-Man-(1-3).

Otra de las puntualizaciones es la relativa a la justificación de la diferente estabilidad de quitina y celulosa frente al abigarrado grupo de xilanos, mananos, glucomanos y galactoglucanos, que también presentan enlaces β -(1-4). La gran rigidez estructural y la superior estabilidad térmica que exhiben quitina y celulosa, ha de buscarse en la agregación de sus cadenas por enlace de hidrógeno (Fig. 61).

La función del sustituyente N-acetilo en quitina es un misterio. Quizás el átomo de nitrógeno conduce a mayores facilidades para el enlace de hidrógeno que las que existen en celulosa y, por consiguiente, da pábulo a la mayor fuerza mecánica (C.F. Phelps, 1972) y termoestabilidad exhibida por quitina.

Adicionalmente a la presencia o no del enlace de hidrógeno, otro argumento puede ser esgrimido para comprender la desigual estabilidad de polisacáridos con esqueletos β -(1-4)-D-glucano comunes: la conformación que presenta la celulosa es de cinta (típica de homopolisacáridos con residuos 4-enlazados muy estables) mientras el xantano cristaliza como una hélice (similar a la de homopolisacáridos a base de unidades 4-enlazadas

moderadamente estables). La adopción de este tipo de conformación de baja energía por el xantano se debe, probablemente, a las interacciones con la cadena lateral presente sobre cualquier residuo alternativo en el esqueleto.

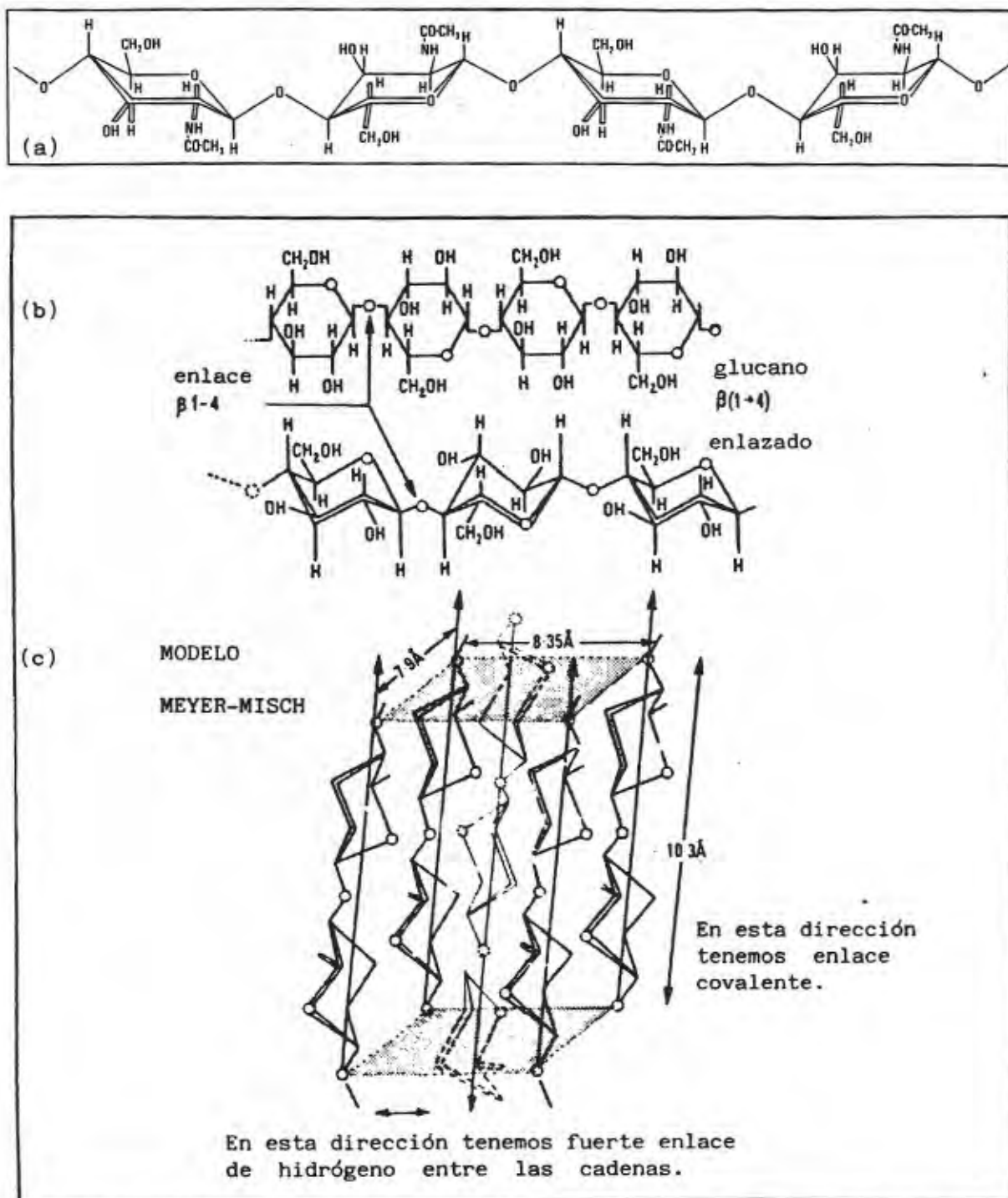


Fig. 61. Quitina (a) y celulosa (b). Representación de la posible agregación de sus cadenas (c). (Tomado de Phelps, 1972)

Como quiera que la comparación de estabilidades térmicas de quitina y quitosano cuenta con un precedente bibliográfico (Bihari-Varga, Sepulchre y Moczár, 1975), su discusión con nuestros resultados merece especial atención:

Los autores citados, trabajando con un derivatógrafo Paulik-Paulik-Erdey MOM y usando cantidades de muestra de 20 mg y velocidades de calentamiento de 2 °C/min., obtuvieron una aparente mayor estabilidad de quitosano frente a quitina (ver Fig.62), cuando, según nuestras observaciones, la termoestabilidad de la quitina es superior a la de su forma N-desacetilada.

El efecto térmico base de la discusión es un pico a 280 °C en quitosano y 275 °C en poli-N-acetil-D-glucosamina, que permitió en el artículo de referencia asignar una mayor estabilidad al primero. El reconocimiento por parte de los autores del mencionado artículo de la existencia de contaminación en la quitina por componentes de bajo grado de polimerización, permite deducir que el producto puro debería haber exhibido el efecto DTG unos grados más arriba, muy probablemente por encima de quitosano. Superando cualquier elucubración al respecto y tras una atenta observación de los registros, se advierte para poli-N-acetil-D-glucosamina un efecto de pirólisis a 700°C, adicional al exhibido en común con quitosano hacia 600°C y que evidencia la superior estabilidad de aquélla.

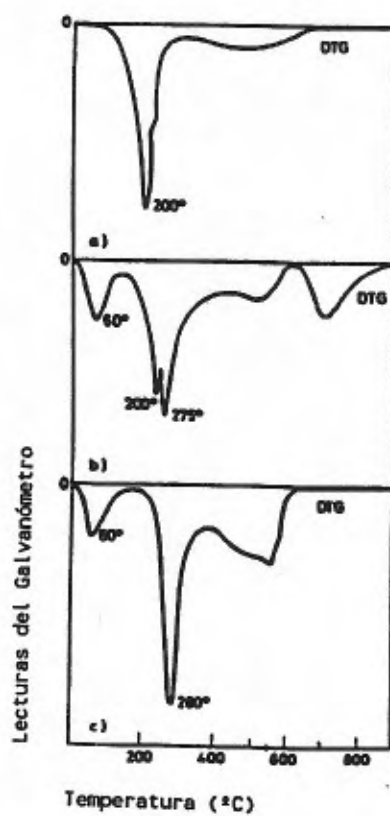


Fig. 62. Curvas DTG de N-acetil-D-glucosamina (a), poli-N-acetil-D-glucosamina (b) y quitosano (c).

3.2.2. Resultados del estudio por DTA y su valoración

Habiéndose realizado el Análisis Térmico Diferencial de las fracciones polisacarídicas objeto de estudio en atmósferas diferentes (aspecto, este último, determinado no por su composición -aire- sino por el régimen de dinamicidad o estaticidad de aquél), y a la vista de la diferente morfología de los registros, parece idóneo examinar sus resultados por separado:

DTA en aire dinámico (60 cm³/min).-

Las curvas DTA (Fig. 63 a 74) muestran tres/cuatro exotérmicos entre 250 y 600 °C, destacando los de temperaturas en torno a 334 y 432 °C, susceptibles de experimentar desplazamientos batotérmicos e hipsotérmicos dependiendo de la naturaleza de cada polisacárido.

Tomando las temperaturas de dichos efectos en los β -Glucogalactanos como referencia, corrimientos a temperaturas mayores o menores del primero de sus exotérmicos, conlleva desplazamientos similares del segundo:

Galactomanoglucanos	443 °C	347 °C
	12 °C	9 °C
Glucogalactanos	431 °C	338 °C
	12 °C	9 °C
Glucomananos	419 °C	329 °C

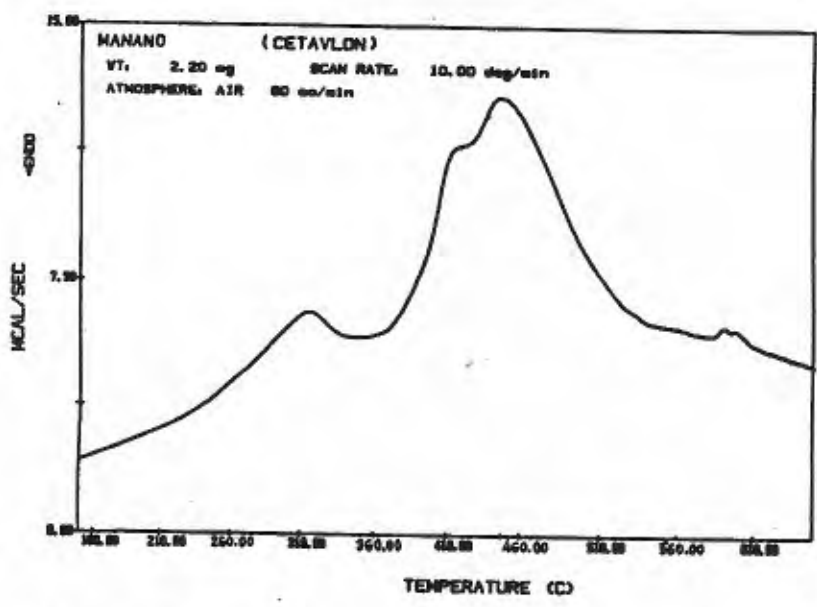


Fig. 63. Curva DTA de manano de *S. cerevisiae* (Cetavlon).

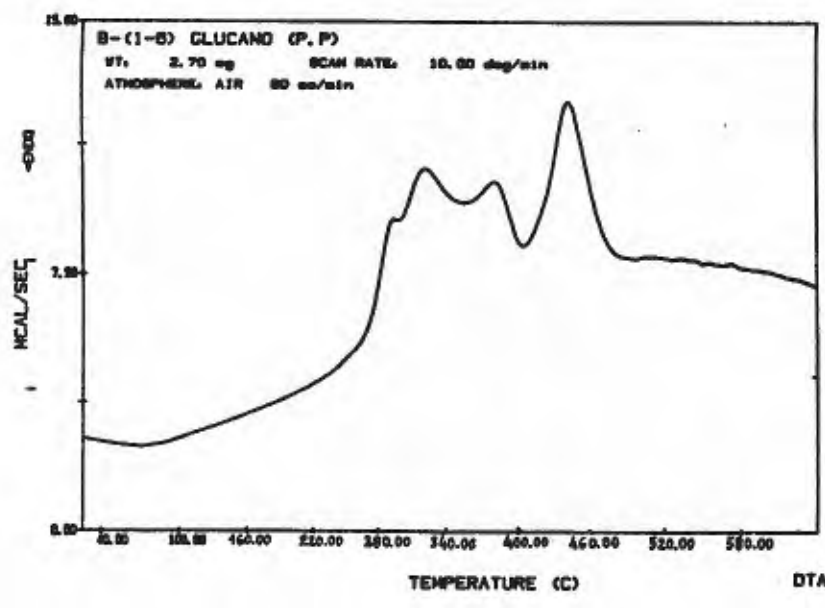


Fig. 64. Curva DTA de pustulano de *P. pullulans*.

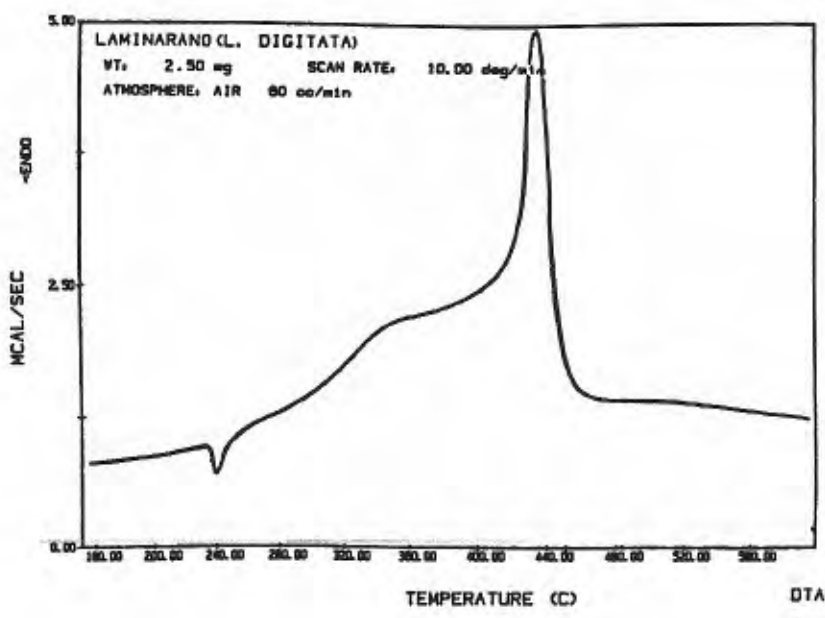


Fig. 65. Curva DTA de laminarano de *L. digitata*.

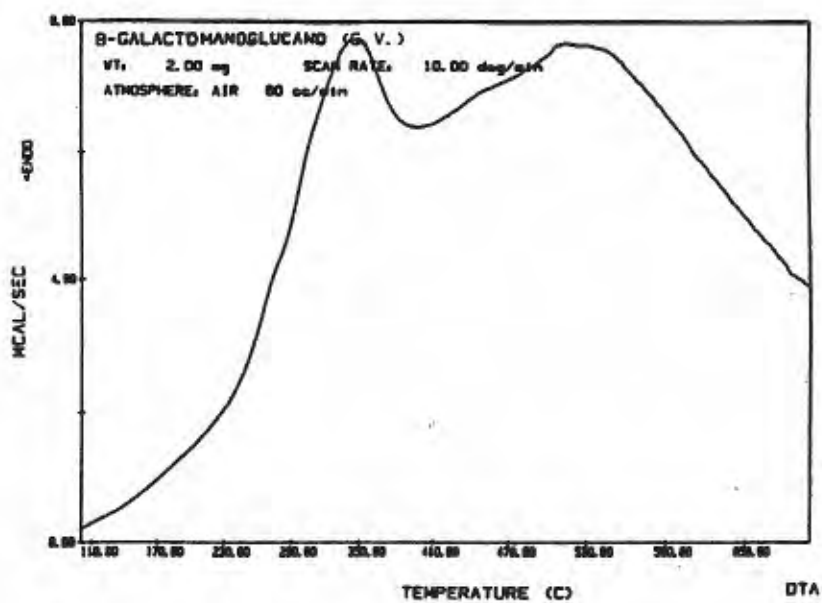


Fig. 66. Curva DTA de un galactomanoglucano.

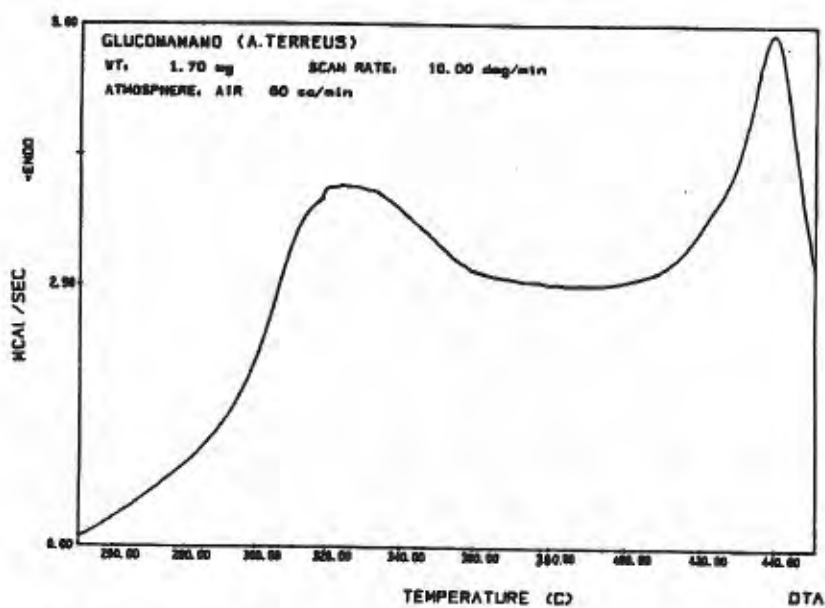


Fig. 67. Curva DTA de glucomanano de *A. terreus*.

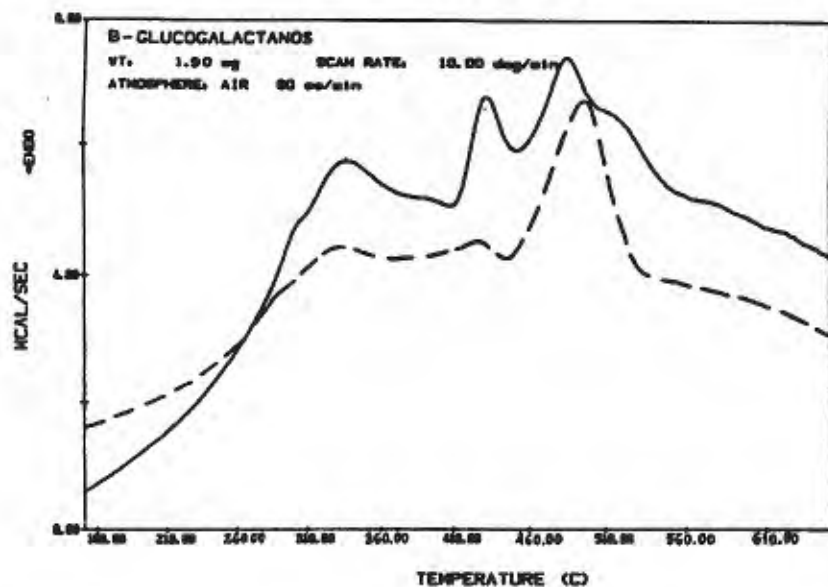


Fig. 68. Curva DTA de β -glucogalactanos.

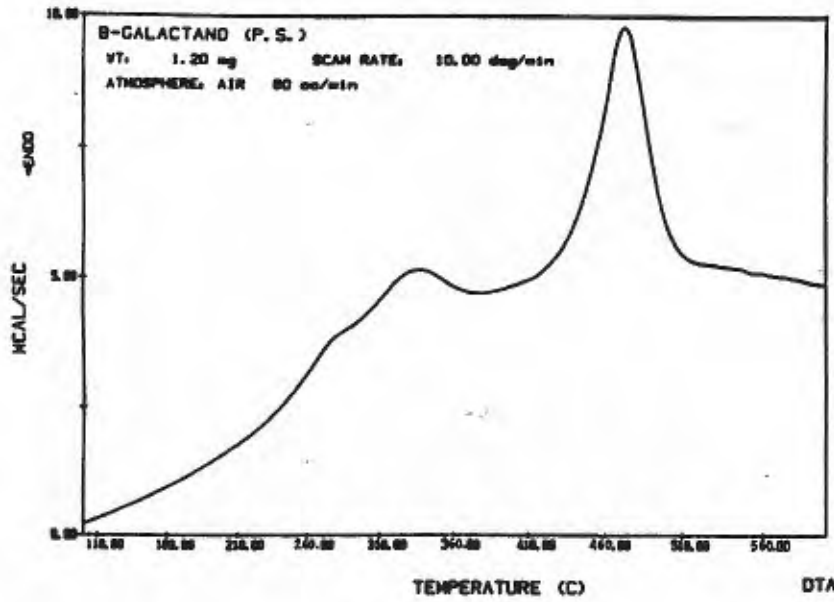


Fig. 69. Curva DTA de un β -galactano.

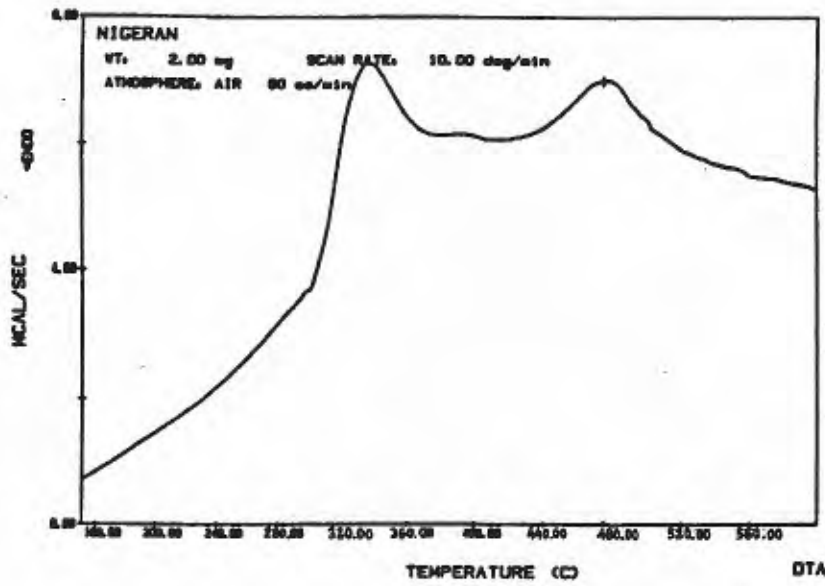


Fig. 70. Curva DTA de nigerano.

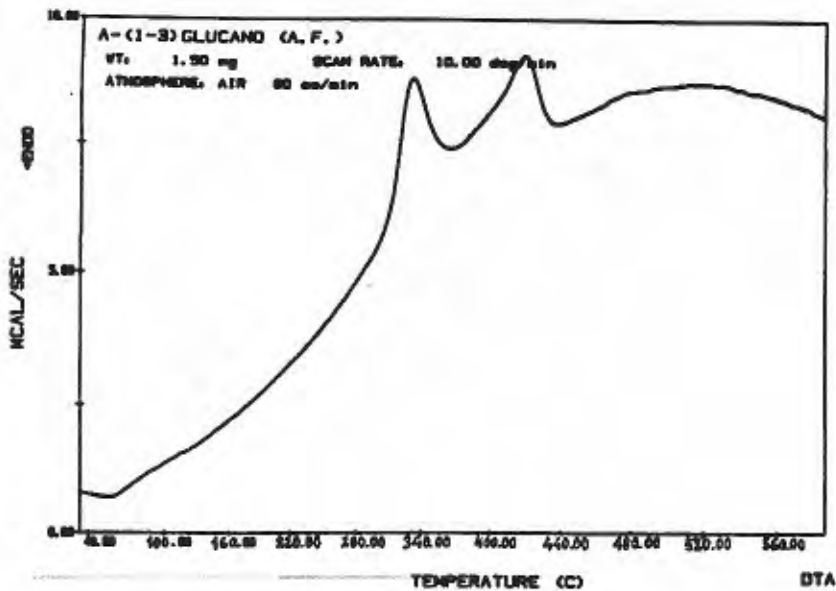


Fig. 71. Curva DTA de S-glucano de *A. flavipes*.

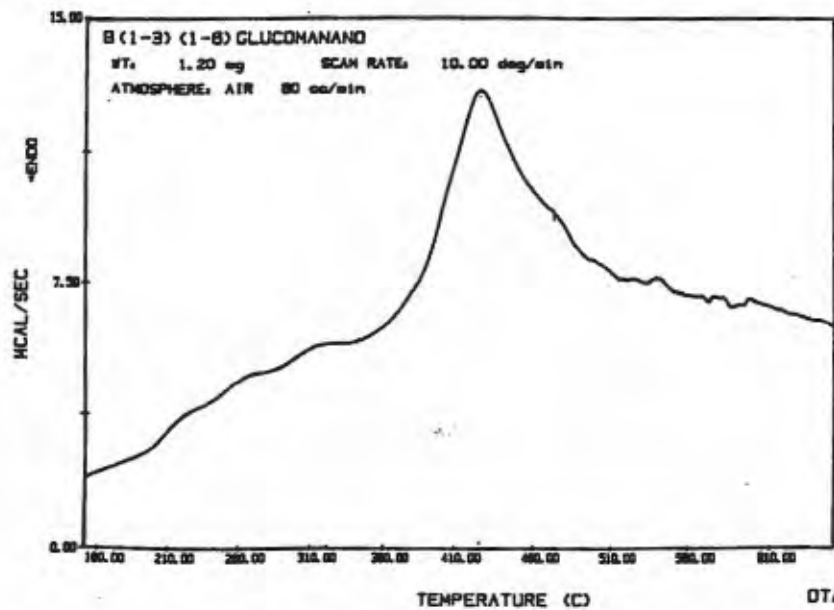


Fig. 72. Curva DTA de R-glucano de *N. rileyi*.

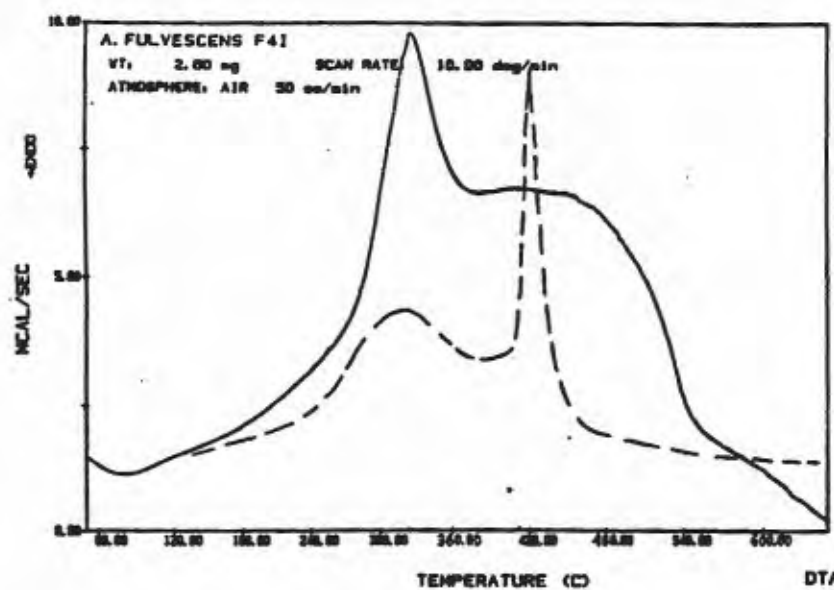


Fig. 73. Curva DTA de glucomanano de *A. fulvescens*.

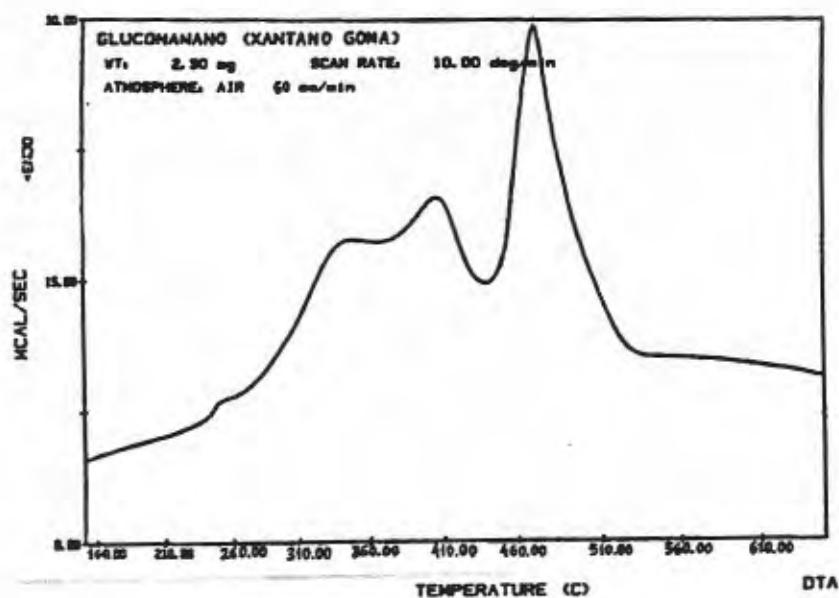


Fig. 74. Curva DTA de goma de xantano (*X. campestris*)

Esto implica que sendos exotérmicos sirven a efectos de caracterización (Tabla IX), si bien el mayor desarrollo del de 432°C puede aconsejar su utilización preferente (Recuérdese que en TG-DTG sólo un pico, el de 320 °C servía a propósitos de caracterización).

Otro resultado importante a reseñar en DTA es la alteración de la secuencia de estabilidades respecto a DTG, si las temperaturas de los exotérmicos que venimos considerando se toman como marcadores de termoestabilidad.

Según la nueva secuencia, el orden de estabilidades sería el siguiente:

α -Man-(1-6) > B-Glc-(1-6) > β -Glc-(1-6)(1-4) > β -Gal-(1-4) >
 β -Gal-(1-4)(1-3) > α -Glc-(1-3)(1-4) > α -Glc-(1-3) >
 β -Glc-(1-3)(1-6) > β -Man-(1-4)- β -Glc-(1-4).

La oportuna comparación de esta secuencia con la deducida de las velocidades relativas de acetólisis de di- y polisacáridos (Rosenfeld y Ballou, 1974; Lindberg, Lonngren y Svenson, 1975):

α -Man-(1-6) > β -Glc-(1-6) > β -Gal-(1-4) > α -Glc-(1-3),

nos lleva a concluir un cierto paralelismo.

Tabla IX.- Efectos térmicos de las curvas DTA (en aire dinámico) de polisacáridos

Polímero	Constituyente(s) y tipo(s) de enlace	Efectos térmicos (°C)	
Mananos	α -Man-(1-6)	447	(416sh)
Pustulanos	β -Glc-(1-6)	444	381
Laminaranos	β -Glc-(1-3)	444	356
Galactomanoglucanos	β -(1-6)(1-4)	443	347
Glucomananos	α -Man-(1-6) β -Glc-(1-6)(1-4)	432-429,5	340
Glucogalactanos	β -(1-4)	431-427	339-337
Galactanos	β -Gal-(1-4)(1-3)	-	337
Nigeranos	α -Glc-(1-3)(1-4)	(394)	336
S-Glucanos	α -Glc-(1-3)	430	332
R-Glucanos	β -Glc-(1-3)(1-6)	425	(318)
Glucomananos	β -Man-(1-4) β -Glc-(1-6)	419-413	329
Goma de xantano	β -Glc-(1-4)	400	-

DTA en aire estático.-

Las curvas DTA de los polisacáridos fúngicos calentados en aire estático (Fig. 75 a 87) muestran un exotérmico en torno a 500°C y otros menores a 430 y 350 °C.

La localización del primero y último de tales picos está determinada por la composición del polisacárido, siendo útiles a efectos de caracterización (Tabla X).

Una ordenación de los polisacáridos según la temperatura del exotérmico hacia 500 °C, postulado como marcador de estabilidad, permite obtener una secuencia de termoresistencia en excelente correspondencia con la deducida del efecto DTG principal: De nuevo, la serie se abre con laminarina, quitina y celulosa; continúa con S-glucanos, nigeranos, pululanos, R-glucanos, pustulanos, mananos y galactoderivados; y se cierra con xilanos, inulina, fucoidano y aminoazúcares.

Una moderada correlación inversa ha sido encontrada con los efectos DTA bajo condiciones dinámicas.

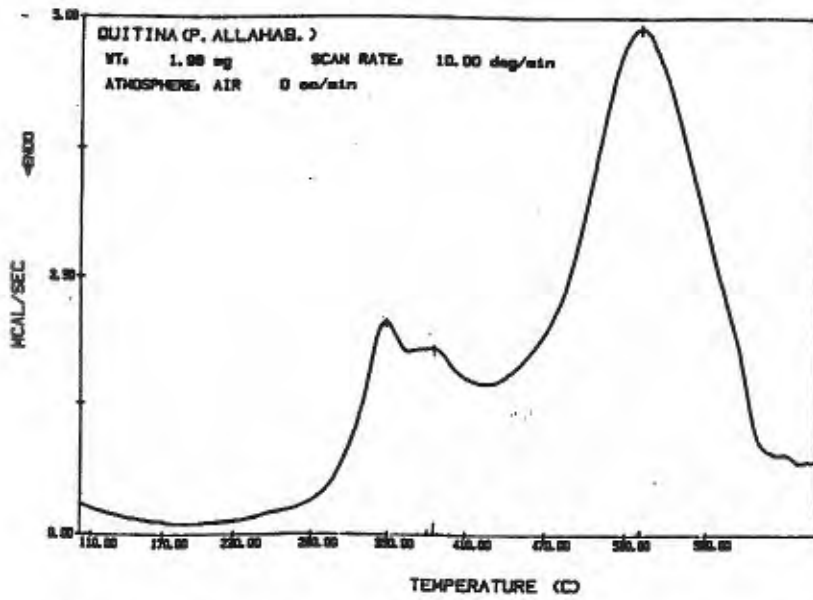


Fig. 75. Curva DTA de quitina (*P. allahabadense*).

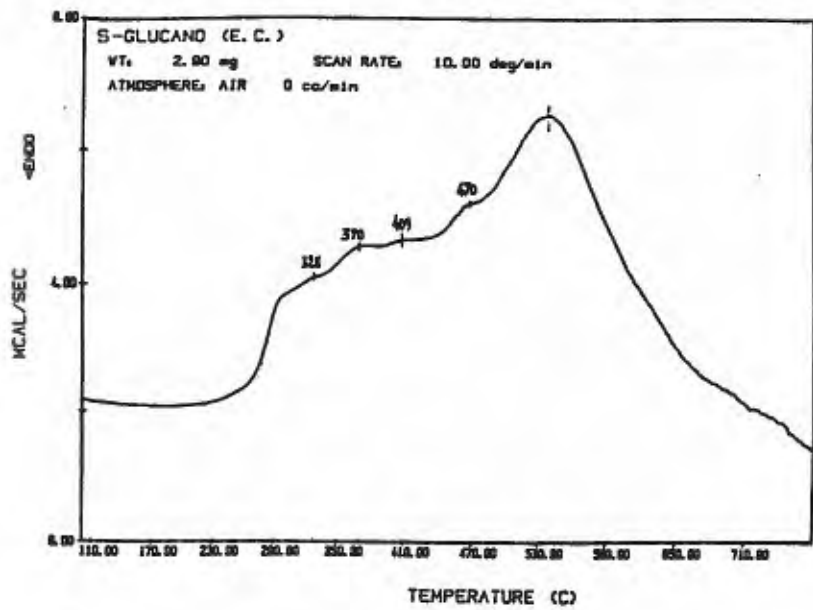


Fig. 76. Curva DTA de S-glucano (*E. crustaceum*).

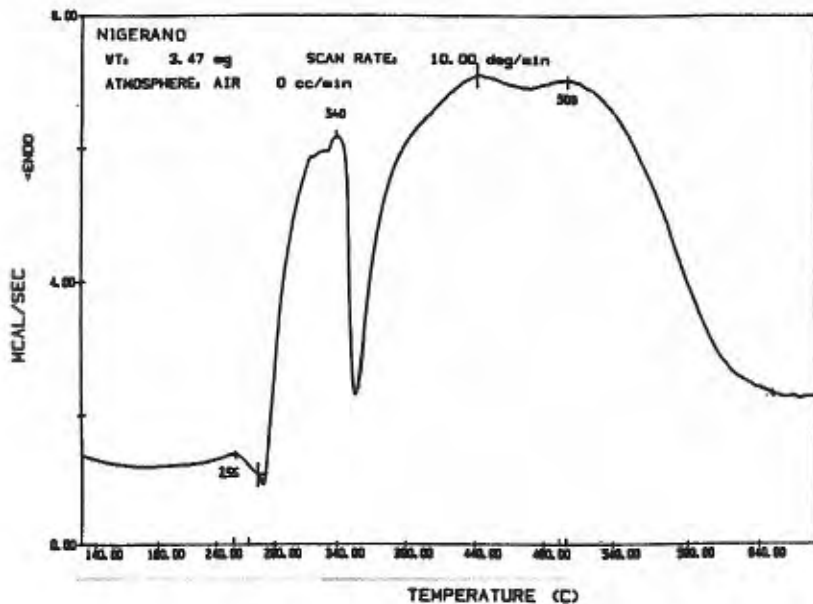


Fig. 77. Curva DTA de nigerano (*A. cremus*).

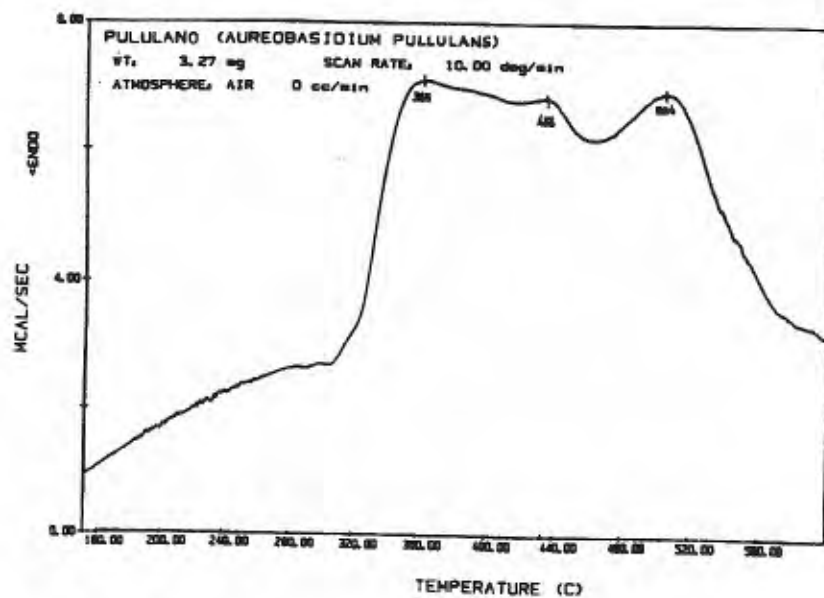


Fig. 78. Curva DTA de pululano (*A. pullulans*).

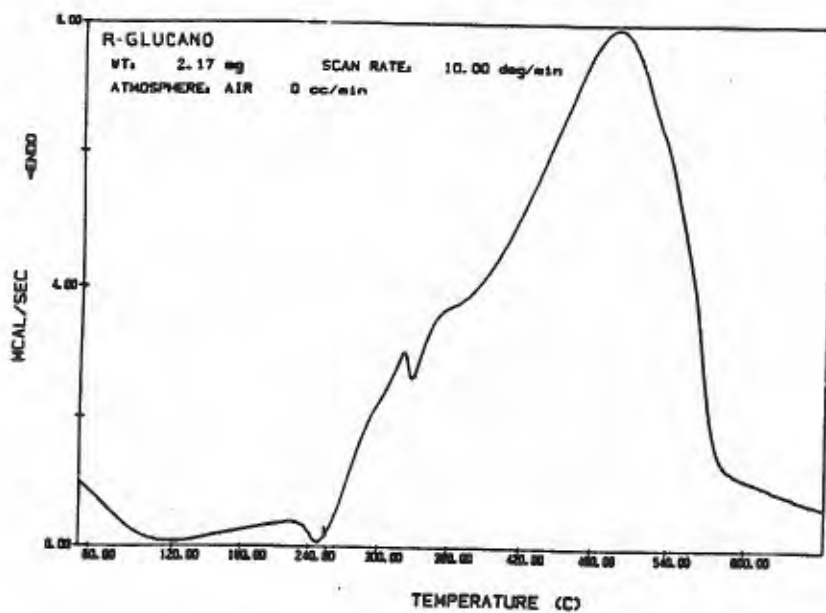


Fig. 79. Curva DTA de R-glucano (*B. cinerea*).

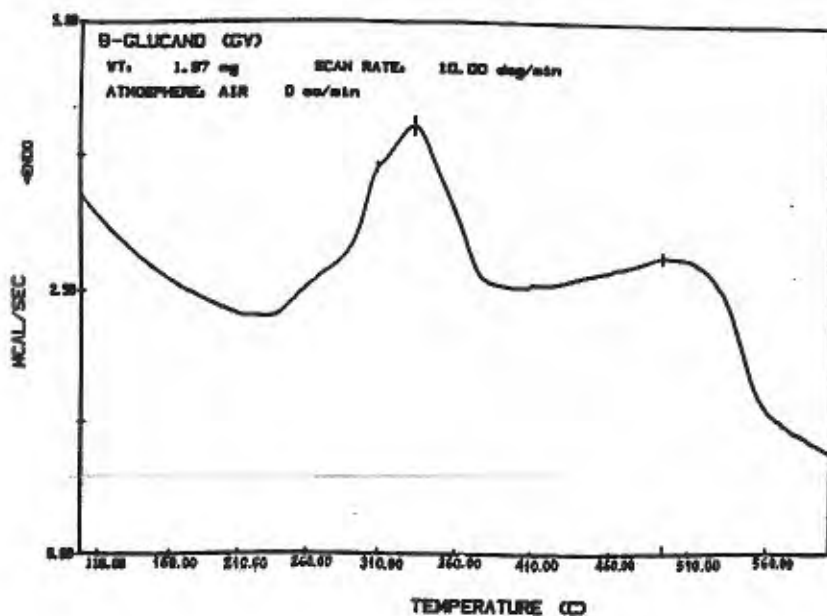


Fig. 80. Curva DTA de un pustulanoide (*G. viride*).

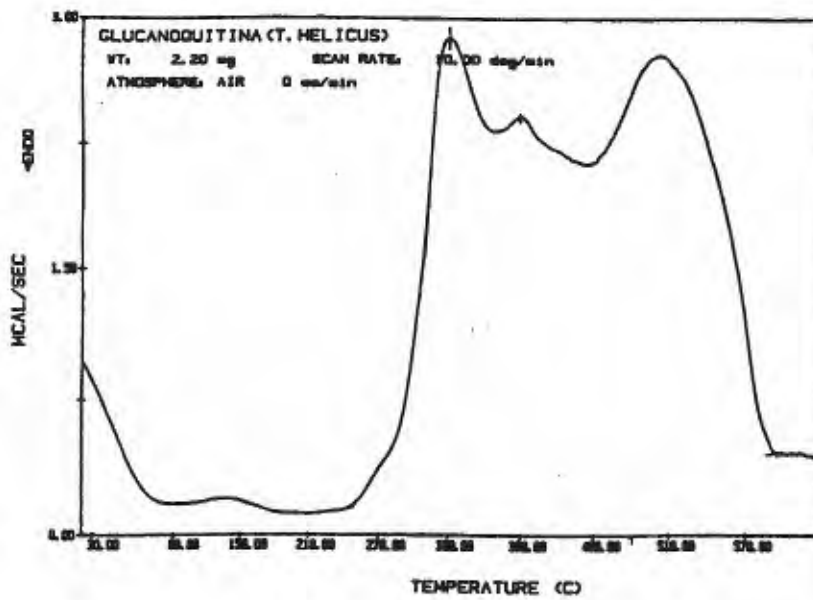


Fig. 81. Curva DTA de glucanoquitina (*T. helicus*).

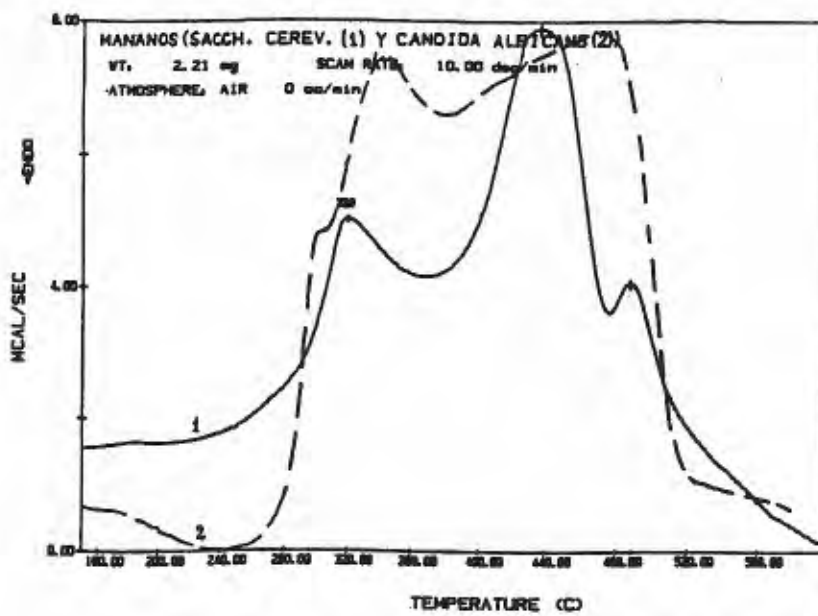


Fig. 82. Curva DTA de manano (*S. cerevisiae*).

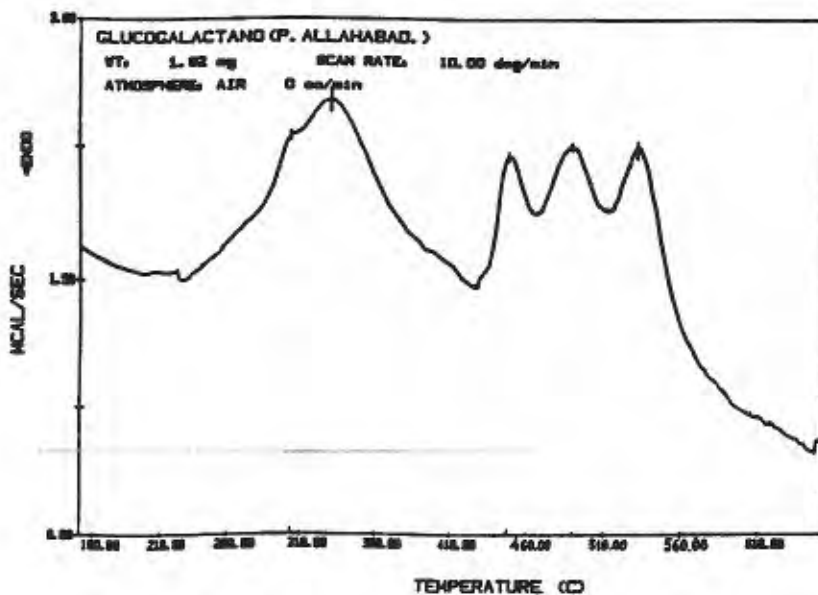


Fig. 83. Curva DTA de glucogalactano (*P. allahabadense*).

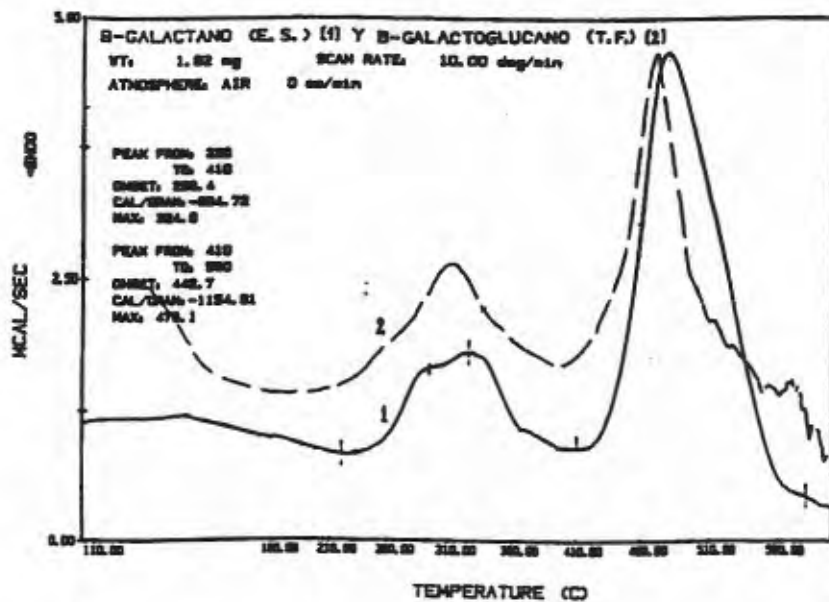


Fig. 84. Curvas DTA de galactoglucano y galactano.

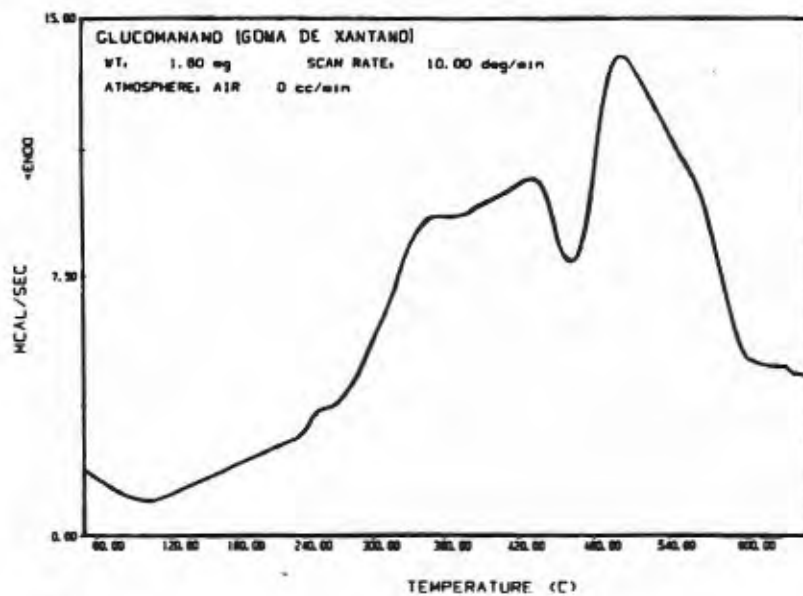


Fig. 85. Curva DTA de goma de xantano.

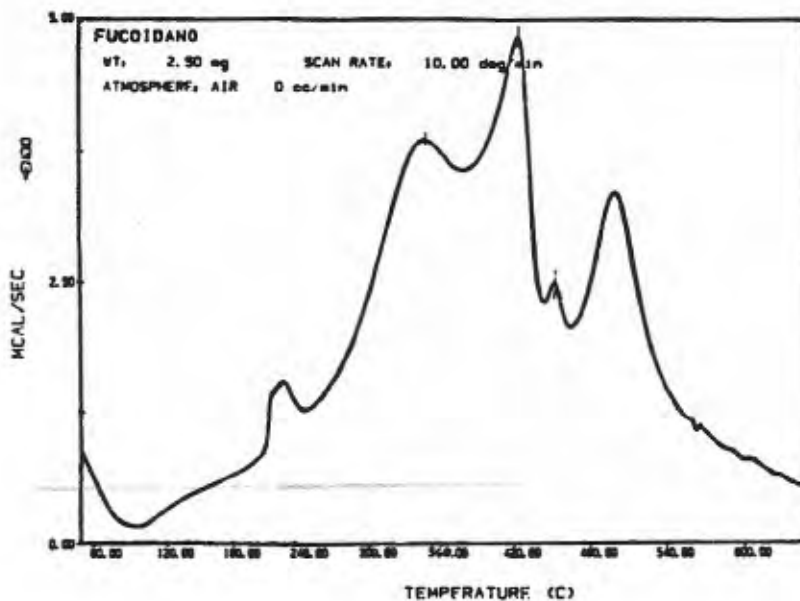


Fig. 86. Curva DTA de fucoidano (*F. vesiculosus*).

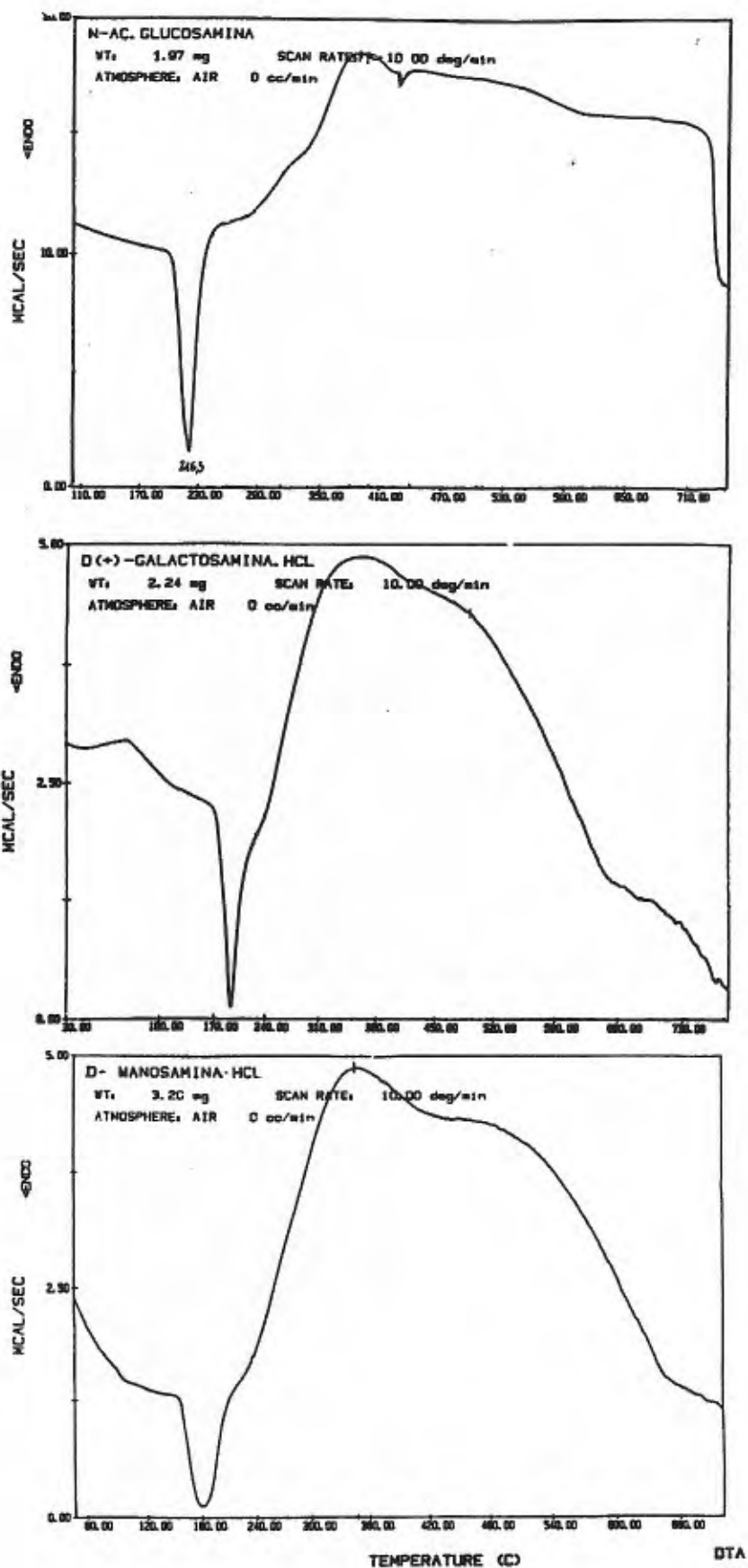


Fig. 87. Curvas DTA de hexosaminas.

Tabla X.- Efectos térmicos de las curvas DTA (en aire estático) de polisacáridos

Polímero	Constituyente(s) y tipo(s) de enlace	Efectos térmicos			
Quitina	β -Glc-(1-4)	540	-	385	350
S-Glucanos	α -Glc-(1-3)	537	433	375 \pm 5	328
Nigeranos	α -Glc-(1-3)(1-4)	506-491	433 \pm 10	-	-
Pululanos	α -Glc-(1-6)(1-4)	504	433	365	-
R-Glucanos	β -Glc-(1-3)(1-6)	500-497	-	352	322
Pustulanoides	β -Glc(1-6)(1-3)	494	-	334	-
Glucanoquitina	β -(1-4)	492	390	331	-
Mananos	α -Man-(1-6)	492-490	432 \pm 5	336-320	-
Glucogalactanos	β -(1-4)	490-489	-	331-326	-
Galactanos	β -(1-4)(1-3)	479-475	-	324-322	-
Galactoglucanos	β -(1-4)	473	-	310	-
Goma de xantano	β -Glc-(1-4) β -Man-(1-4)	454	-	-	-
Fucoidano	α -Fuc-(1-2)	451 425	346	-	-
Glucosamina N-ac		385	-	-	-
Galactosamina.HCl		368	-	-	-
Manosamina.HCl		348	-	-	-

3.2.3. Resultados del estudio por DSC y su valoración.

La curva DSC general de un polisacárido presenta, en su primera parte, un efecto endotérmico con pico a $150\pm 30^{\circ}\text{C}$ y, a temperaturas superiores, un efecto exotérmico con pico a $280\pm 70^{\circ}\text{C}$, siendo ejemplificado este comportamiento térmico por las curvas de celulosa (Fig. 89), manano (Fig. 90), xilano (Fig. 97) y ácido glucurónico (Fig. 102).

Sin embargo, el resto de los polisacáridos muestra curvas DSC menos simplificadas, bien por: (a) el desdoblamiento del primer efecto en varios picos, caso de fucoidano (Fig. 99), nigerano (Fig. 92) ó pustulano (Fig. 100); (b) la secuenciación de la descomposición atribuible al efecto endotérmico en tres etapas, con sendos efectos positivos de la entalpía, tal como ocurre en la termolisis de la inulina (Fig. 98); (c) la pirólisis súbita (sensibilizada por un pico muy fino en la región del exotérmico), que experimentan amilopectina (Fig. 94) y pululano (Fig. 93) ó (d) la pirólisis lenta e indiferenciada de las hexosaminas (Fig. 101).

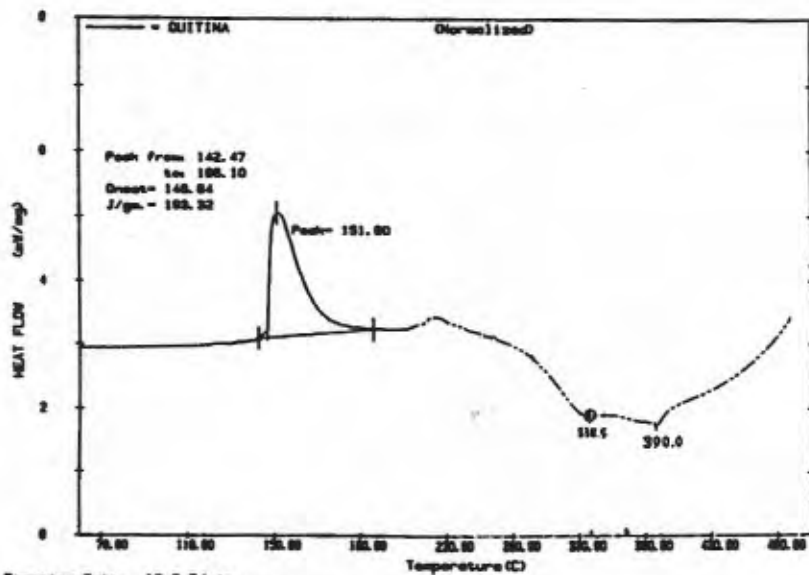
La Tabla XI recoge las temperaturas de los onset y picos de los efectos térmicos exhibidos por las curvas DSC, y las entalpías asociadas a tales efectos. Los datos del efecto endotérmico sólo sirven individualmente, para cada polisacárido, a propósito de su caracterización, no habiéndose podido establecer con ellos secuencia alguna de estabilidades. Los datos del efecto exotérmico, aparte de su valor informativo, permiten construir una secuencia de

estabilidades relativas entre polisacáridos en base a la temperatura del pico exotérmico, utilizado como marcador de la estabilidad:

Quitina > Celulosa > Manano > S-Glucano > Nigerano > Pululano > Amilopectina > Amilosa > Galactano > Xilano > Inulina > Fucoidano

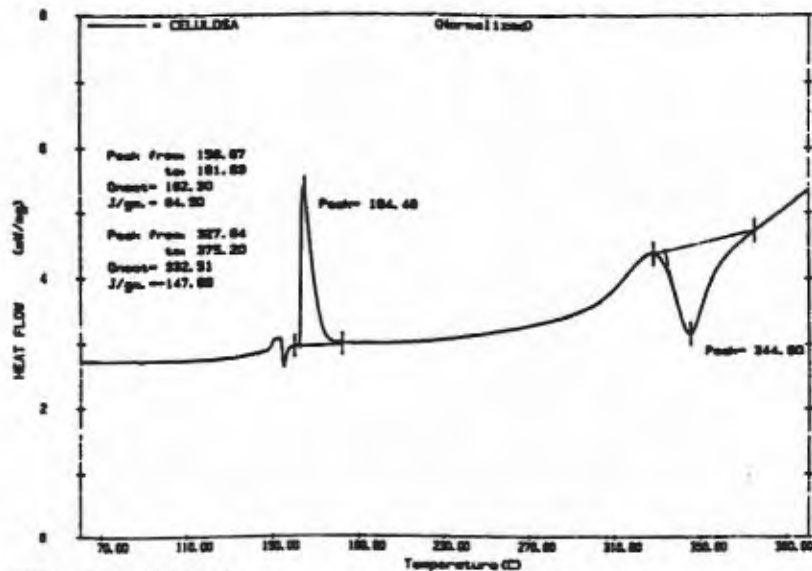
La secuencia anterior corresponde casi exactamente con la obtenida de los registros TG-DTG y DTA en aire estático (pues sólo cambia el orden S-glucano/manano), confirmando así, los resultados ya referidos sobre fuerzas relativas de los distintos tipos de enlace.

En otro orden de observaciones, consideramos que la naturaleza endotérmica del primero de los dos efectos de las curvas DSC puede asociarse a la pérdida termolítica de moléculas de agua a partir de los residuos monosacáridos constituyentes del polímero, mientras el efecto exotérmico a mayores temperaturas ha de referirse al proceso de combustión. A este respecto, se ha evidenciado la presencia cuantitativamente significativa de hidroximetilfurfural como producto intermedio de la termólisis de la celulosa (postulándose su formación a partir de los residuos hexosa por eliminación de dos moléculas de agua), mientras a temperaturas por encima de 290°C e indistintamente del polisacárido pirolizado, es ostensible la formación de CO y CO₂ (que llevan al reventado de las cápsulas de contención de muestra).



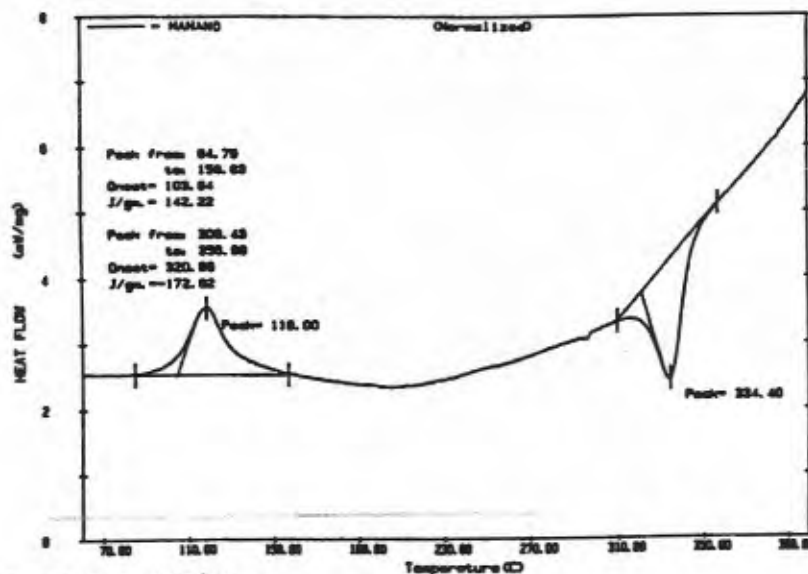
Scanning Rate: 10.0 C/min
Sample Wt: 1.000 mg Path: c:\p\course

Fig. 88. Curva DSC de quitina



Scanning Rate: 10.0 C/min
Sample Wt: 1.000 mg Path: c:\p\course

Fig. 89. Curva DSC de celulosa



Scanning Rate: 10.0 C/min
Sample Wt: 1.000 mg Path: c:\p\course

Fig. 90. Curva DSC de manano.

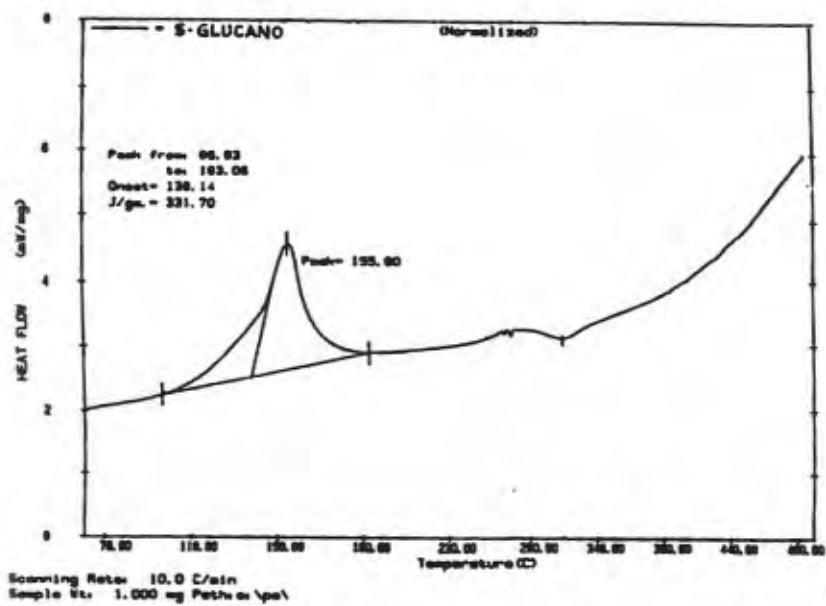


Fig. 91. Curva DSC de S-Glucano

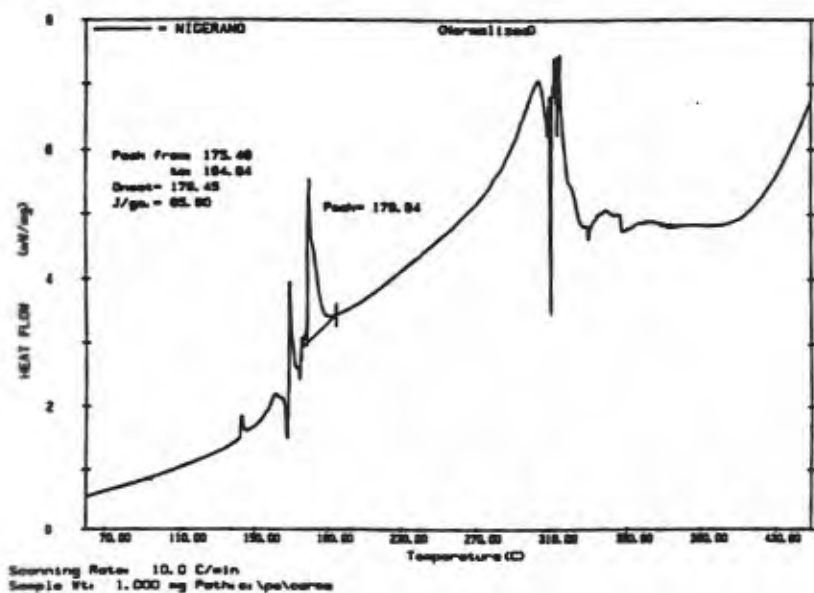


Fig. 92. Curva DSC de nigerano

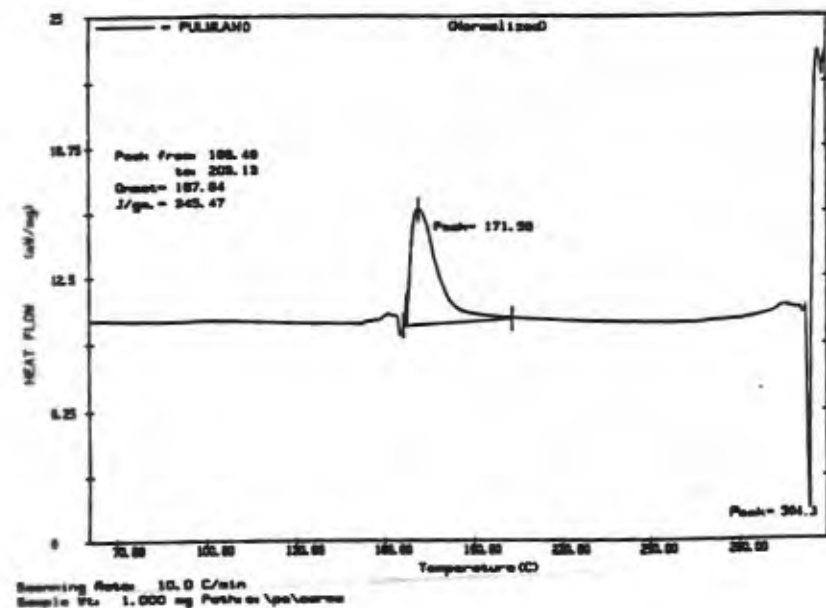


Fig. 93. Curva DSC de pululano

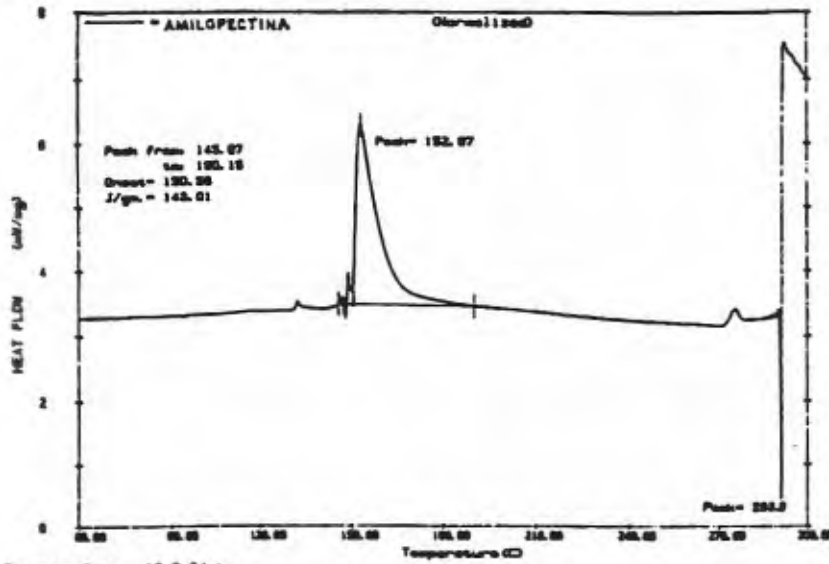


Fig. 94. Curva DSC de amilopectina.

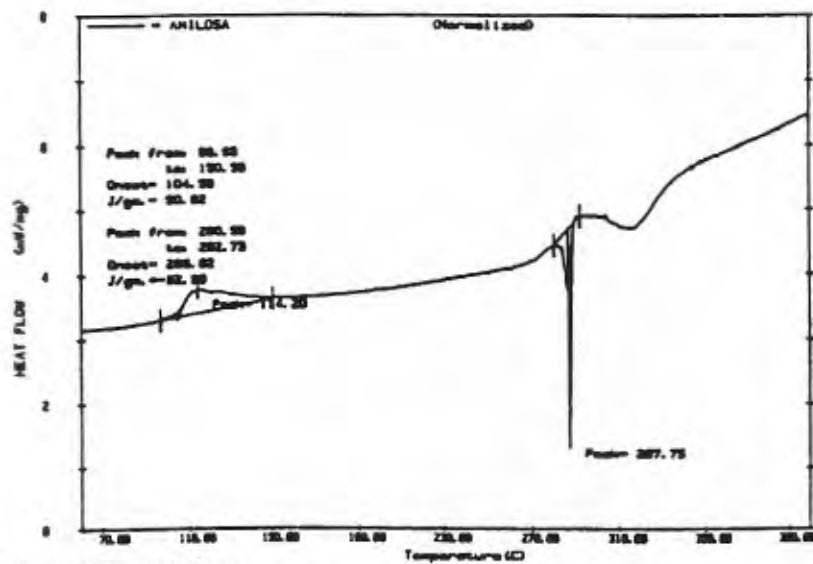


Fig. 95. Curva DSC de amilosa

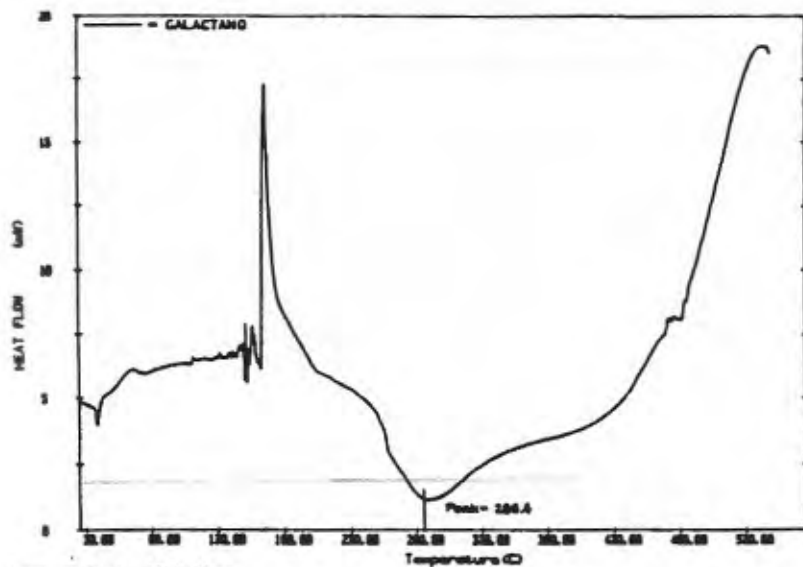


Fig. 96. Curva DSC de galactano.

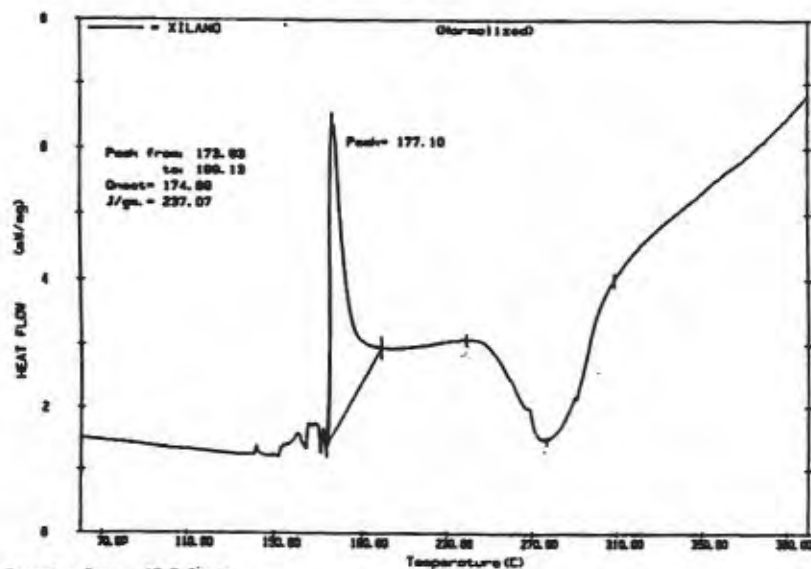


Fig. 97. Curva DSC de xilano.

Scanning Rate: 10.0 C/min
Sample Wt: 1.000 mg Path: c:\pel\carne

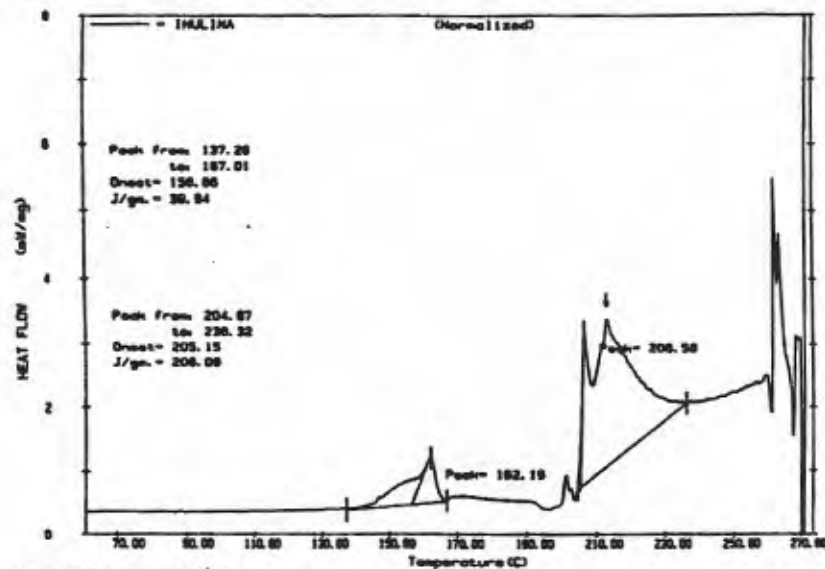


Fig. 98. Curva DSC de inulina.

Scanning Rate: 10.0 C/min
Sample Wt: 1.000 mg Path: c:\pel\carne

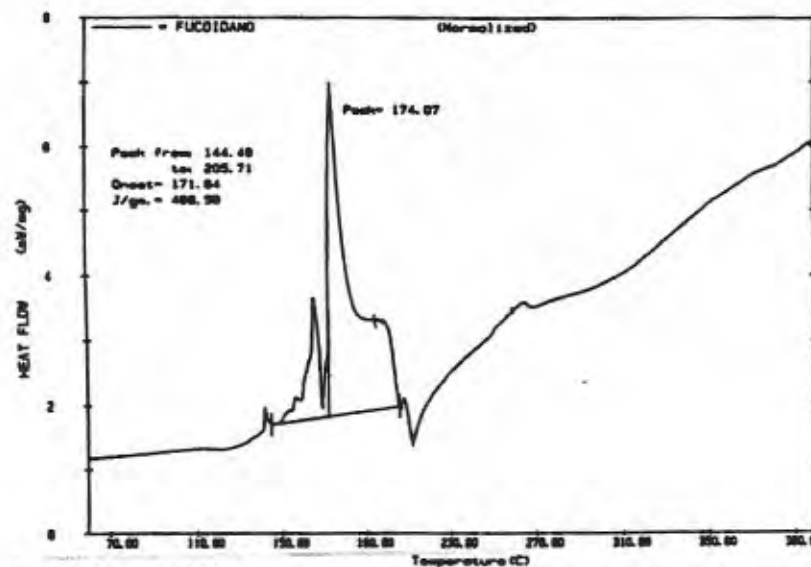
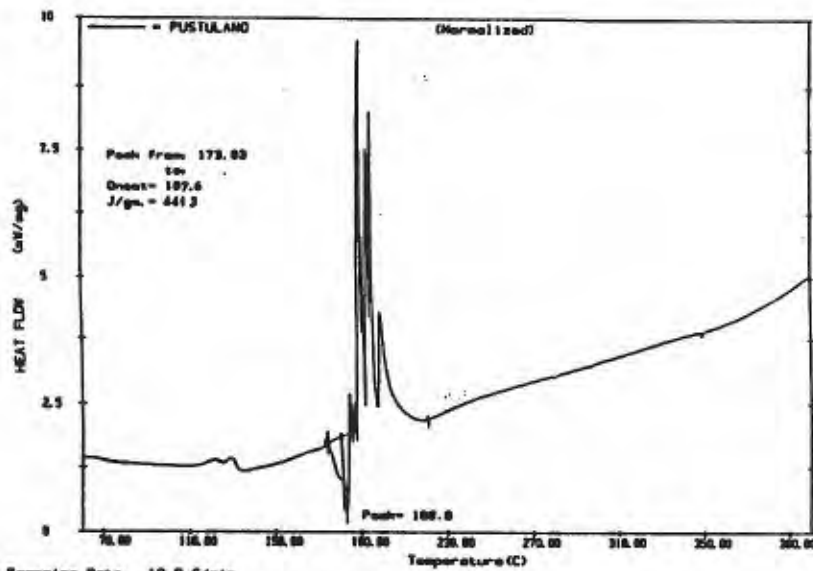


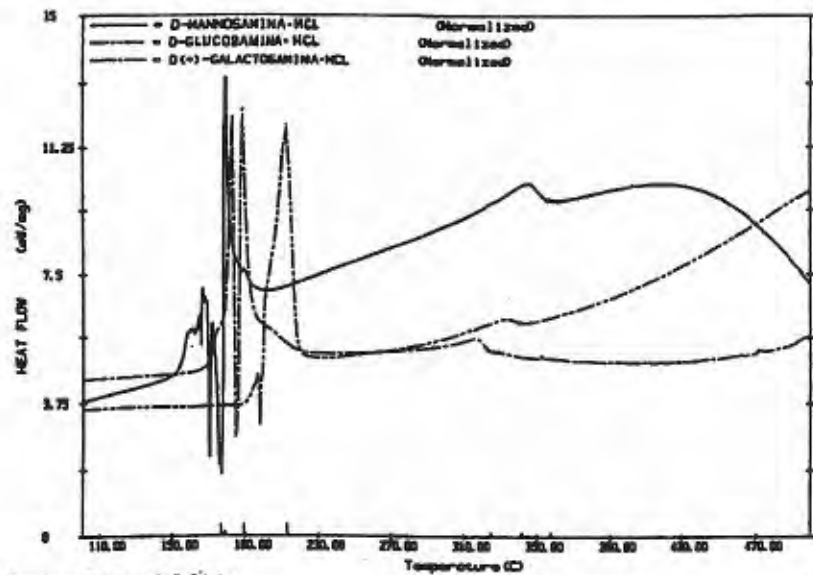
Fig. 99. Curva DSC de fucoidano.

Scanning Rate: 10.0 C/min
Sample Wt: 1.000 mg Path: c:\pel\carne



Scanning Rate: 10.0 C/min
 Sample Wt.: 1.000 mg Path: d:\ps\curves

Fig. 100. Curva DSC de pustulano.



Scanning Rate: 10.0 C/min
 Sample Wt.: 1.000 mg Path: a \

Fig. 101. Curva DSC de hexosaminas.

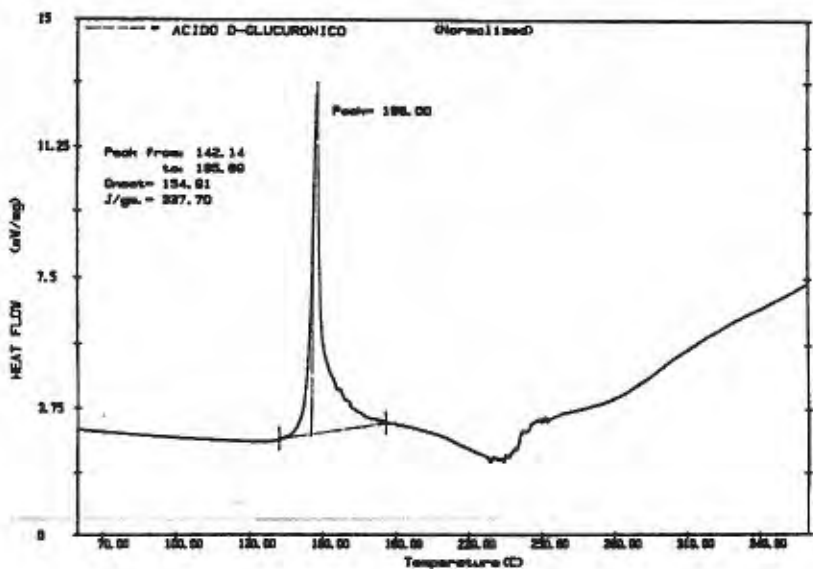


Fig. 102. Curva DSC de ácido glucurónico.

Tabla XI.- Efectos térmicos de las curvas de DSC en polisacáridos.

Polímero	Endotérmico			Exotérmico		
	onset(°C)	pico(°C)	$\Delta H(J/g)$	onset(°C)	pico(°C)	$\Delta H(J/g)$
Quitina	146,6	151,8	193,3	—	390,0 336,5	—
Celulosa	162,3	164,5	84,5	332,5	344,8	-147,7
Manano	103,8	118,0	142,2	320,7	334,4	-172,8
S-Glucano	138,1	155,8	331,7	—	315,6	—
Nigerano	(178,4)	179,9	(65,9)	—	310,0	—
Pululano	167,6	171,6	345,5	—	304,3	—
Amilopectina	150,6	152,9	143,0	—	292,0	—
Amilosa	104,6	114,2	50,9	286,9	287,7	-33,0
Galactano	—	166,0	—	—	286,4	—
Xilano	174,7	177,1	237,1	260,9	278,0	-488,7
Inulina	156,7	162,2	39,9	—	271,8	—
	205,1	206,6	206,1			
	—	263,0	—			
Fucoidano	171,6	174,1	—	201,0	211,7	-283,8
Pustulano	187,6	188,8	441,3	—	—	—
Glucosamina	—	213,0	—	—	—	—
Galactosamina	—	190,0	—	—	—	—
Manosamina	—	177,0	—	—	—	—
Ac. Glucurón.	154,9	158,0	337,7	221,3	234,3	-203,0

4. ESTUDIOS COMPARATIVOS

4.1. Comparación de resultados

En este apartado se sumariza, para un número discreto de polisacáridos de paredes fúngicas, la información estructural obtenida por la metodología tradicional y la derivada de los registros de análisis térmico, a efectos comparativos.

Los materiales objeto de estudio han sido fracciones de paredes celulares de las especies *Gliocladium viride*, *Microsporium gypseum*, *Trichophyton ajelloi*, *Aphanoascus fulvescens*, *Aphanoascus reticulisporus*, *Aphanoascus terreus*, *Talaromyces flavus* y *Penicillium allahabadense*, todas ellas en curso de investigación por el equipo de trabajo del Prof. Leal:

Gliocladium viride.- La extracción de la fracción F1 de su pared celular ha proporcionado dos materiales, uno insoluble (F1P) y otro soluble (F1S) cuya composición, determinada por análisis de azúcares neutros (Tabla XII), corresponde a un glucano y un galactomanoglucano, respectivamente.

Para F1P, la oxidación con IO_4^- ha dado lugar a glicerol y glucosa (Tabla XIII) que denuncian la existencia de enlaces 1-6 (42,5%) y 1-3 (40,0%). Su espectro IR (Fig. 103) muestra absorción a 890 cm^{-1} , característica de los polisacáridos con enlace β .

Para F1S, la degradación de Smith y la GLC han revelado la presencia de glicerol, eritritol, treitol, arabitól, manosa y glucosa (Tabla XIV) que sugieren enlaces 1-6, 1-4 y 1-3. Los datos

GLC-MS para acetatos de alditol metilados de las dos principales fracciones obtenidas tras filtración en gel de F1S (Tabla XV) indican que el esqueleto es un glucano 1-6 sustituido en C2 y C3 por manosa, que hay manopiranososa y galactopiranososa como residuos terminales y que también se encuentra presente galactofuranosa enlazada (1-6) y (1-2).

En análisis térmico, los picos DTG correspondientes a los efectos principales de descomposición de F1P y F1S aparecen a 316°C y 297.5°C, respectivamente.

La temperatura del máximo a 316°C permite la ubicación de F1P en la Tabla VIII entre los pustulanos y los R-glucanos, asegurando con éllo su naturaleza de β -glucano con enlaces 1-6 y 1-3. (En el examen de otros picos de su registro TG-DTG, el de 450°C confirma su situación intermedia entre los que exhiben los polisacáridos de *U. pustulata* (455.5°C) y *N. rileyi* (441°C), siendo este último un R-glucano con alto contenido en enlaces β -(1-6)).

Relativo a la fracción F1S, su pico DTG en torno a 300°C está localizado en la región de temperaturas comprendida entre los glucomananos con enlaces 1-4 y 1-6 y los glucogalactanos con enlaces β -(1-4), denotando con éllo su composición intermedia, o sea, de galactomanoglucano con enlaces 1-4 y 1-6, principalmente.

Tabla XII.- Porcentajes molares de azúcares neutros (como acetatos de alditol) detectados por GLC en los polisacáridos extraídos del material de pared de *G. viride* con NaOH 1M.

La hidrólisis ha sido llevada a cabo con H_2SO_4 4N a 100 °C durante 5 h. Todos los valores son media de tres determinaciones.

Fracción	Xilosa	Manosa	Galactosa	Glucosa
F1	3.0	16.2	12.3	68.5
F1S	0.0	26.1	19.1	54.7
F1P	6.2	2.9	0.7	90.1

Tabla XIII.- Porcentajes molares de azúcares (como acetatos de alditol) detectados por GLC después de degradación de Smith de F1S y F1P de *G. viride*.

La hidrólisis ha sido llevada a cabo con H_2SO_4 4N a 100 °C durante 5 h. Todos los valores son media de tres determinaciones.

	F1S	F1P
Glicerol	18.8	42.5
Eritritol	12.7	7.9
Treitol	12.7	0.0
Ribitol	0.9	1.5
Arabitol	7.0	0.0
Xilosa	0.0	5.7
Manosa	12.2	1.9
Galactosa	3.3	0.0
Glucosa	32.4	40.5

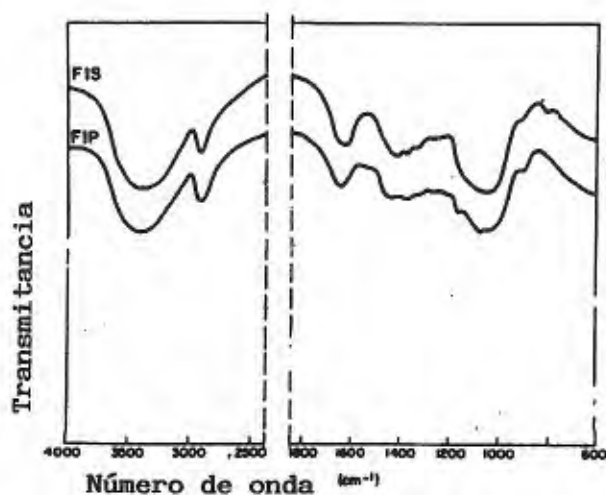


Fig. 103. Espectros IR de polisacáridos de pared de *G. viride*. F1S, solución sobrenadante de F1; F1P, sedimento de F1.

Tabla XIV.- Porcentajes molares de azúcares (como acetatos de alditol) detectados por GLC de las fracciones obtenidas a partir de F1S de *G. viride* por purificación a través de Sefarosa-CL6B.

La hidrólisis ha sido llevada a cabo con H_2SO_4 4N a $100^\circ C$ durante 5 h. Todos los valores son media de tres determinaciones.

Fracción	Recuperación de la columna (%)	Manosa	Galactosa	Glucosa
A	29.3	29.2	18.5	52.3
B	35.6	23.4	14.6	61.9
C	7.9	26.2	16.6	57.2

Tabla XV . - Datos GLC-MS de acetatos de alditol^a metilados procedentes de las fracciones A y B de *G. viride*.

Todas las muestras han sido reducida con NaBD₄

Alditol	T ^b	moles (%)		Fragmentos principales del espectro de masas (m/z)	Enlace deducido
		A	B		
2,3,4,6-Me ₄ -Man ^c	0.99	27.0	25.0	87, 88, 101, 102, 118, 129, 145, 161, 162, 205	Man p-(1-
2,3,4,6-Me ₄ -Gal	1.19	2.8	tr.	87, 88, 101, 102, 118, 129, 145, 161, 162, 205	Gal p-(1-
2,3,4-Me ₃ -Glc	2.22	12.5	12.0	87, 102, 118, 129, 130, 162, 173, 189, 206, 233	-6)-Glc p-(1-
3,5,6-Me ₃ -Gal	1.90	6.6	6.0	45, 59, 88, 89, 130, 190, 205, 306	-2)-Gal f-(1-
2,3,6-Me ₃ -Gal	2.22	3.0	3.0	45, 102, 113, 118, 130, 162, 173, 233	-4)-Gal p-(1-
2,3,4-Me ₃ -Gal	2.89	5.8	7.8	87, 102, 118, 129, 130, 162, 173, 189, 206, 233	-6)Gal p-(1-
2,3,5-Me ₃ -Gal	2.76	6.3	7.2	102, 117, 118, 130, 173, 233	-6)Gal f-(1-
3,4-Me ₂ -Glc	4.26	15.0	19.0	87, 88, 129, 130, 173, 174, 189, 190, 233, 234	-2,6)-Glc p-(1-
2,4-Me ₂ -Glc	4.21	21.0	20.0	87, 118, 129, 174, 189, 234	-3,6)-Glc p-(1-

^a Hidrólisis con H₂SO₄ 0,25 M durante 16 h a 100°C.

^b Tiempo de retención relativo al de 1,5-di-O-acetil-2,3,4,6-tetra-O-metilglucitol en OV-225 a 170°C.

^c 2,3,4,6-Me₄-Man=1,5-di-O-acetil-2,3,4,6-tetra-O-metil-manitol, etc

Microsporium gypseum y *Trichophyton ajelloi*.- Las fracciones F1S de estas dos especies, de géneros diferentes, se han agrupado para su examen debido a su similar composición y tipo de enlace (Tablas XVI y XVII): ambas son glucomananos con predominio de enlaces 1-6 sobre 1-4 e indefinición respecto a la configuración α/β .

El estudio térmico por TG-DTG ha mostrado para ambas fracciones un máximo común a 300°C, ubicado en la zona inferior de descomposición de los mananos de *C. albicans* (313-296 °C), próximo al pico exhibido por quitosano (305 °C) y también cercano a los β -glucogalactanos con enlaces 1-4 de *P. allahabadense* y *T. helicus*. Parece establecida, pues, la presencia de enlaces α -Man-(1-6) y β -Glc-(1-4) en ambas fracciones.

Tabla XVI.- Azúcares neutros (%) liberados de la fracción F1S de *M. gypseum* y *T. ajelloi*, después de hidrólisis con H₂SO₄ a 100 °C, determinados como acetatos de alditol por GLC.

Microorganismo	Xilosa	Manosa	Galactosa	Glucosa
<i>M. gypseum</i>	0.80	67.80	0.38	3.98
<i>T. ajelloi</i>	0.85	64.42	1.05	3.25

Tabla XVII.- Porcentajes molares de azúcares (como acetatos de alditol) detectados por GLC después de degradación de Smith de las fracciones F1S de *M. gypseum* y *T. ajelloi*.

	Gli	Eri	Tre	Rib	Ara	Xil	Man	Gal	Glu
<i>M. gypseum</i>	84.84	4.38	1.01	0.0	0.67	0.0	2.36	0.67	6.06
<i>T. ajelloi</i>	99.26	0.20	0.0	0.0	0.0	0.0	0.14	0.0	0.39

Aphanoascus sp.- Los porcentajes de azúcares neutros de las fracciones de pared FIS de diferentes especies de *Aphanoascus* (Tabla XVIII) permiten diferenciar por sus contenidos en manosa y glucosa *A. fulvescens*, *A. mepitalus*, *A. reticulisporus* y *A. saturnoideus* de *A. terreus* y *A. verrucosus*. El análisis por GLC de los acetatos de alditol subsiguientes a la degradación de Smith (Tabla XIX) ha mostrado para estas especies muy diferentes proporciones de enlaces 1-6 a 1-4: 71,4/11,5 (*A. reticulisporus*), 50,3/34,6 (*A. terreus*) y 34,6/53,2 (*A. fulvescens*). Las bandas de los espectros IR y los valores de rotación óptica se muestran ambíguos respecto al tipo de enlace.

El análisis de las curvas DTG se manifiesta útil para resaltar las diferencias anteriores, toda vez que los máximos para *A. reticulisporus* y *A. terreus* (314°C y 311°C) aparecen en una región diferente de la de *A. fulvescens* (319°C), en la Tabla VIII. Las temperaturas de *A. reticulisporus* y *A. terreus* están comprendidas entre la de los pustulanos y pustulanoides (320-316°C) por una parte, y las de mananos y glucanoquitina (en torno a 310°C) por otra, sugiriendo con éllo la coexistencia de los enlaces β -(1-6) de los primeros con enlaces α -(1-6) y β -(1-4) de los últimos. La mayor proximidad del máximo de *A. reticulisporus* al de los pustulanos sugiere un mayor contenido en β -(1-6), mientras que en el caso de *A. terreus*, aparte de un equilibrio entre el número de enlaces 1-6 y 1-4, se advierte la posibilidad fundada de la presencia de enlaces α en cantidad significativa.

En el caso de *A. fulvescens*, su pico DTG característico a 319°C, muy próximo a los de amilosa (319.5°C) y *U. pustulata* (318°C), sugiere un alto contenido en glucanos con enlaces 1-4 y 1-6, pero sin permitir definición alguna respecto al tipo de enlace de los residuo manosilo (se apunta, a título orientativo, la posibilidad de que estén 1-4 enlazados).

Tabla XVIII.- Azúcares neutros (%) liberados de la fracción F1S de diferentes especies de *Aphanoascus*, después de hidrólisis con diferentes concentraciones de H_2SO_4 a $100^\circ C$ determinados como acetatos de alditol por cromatografía gas-líquido.

Microorganismo	Arabinosa	Xilosa	Manosa	Galactosa	Glucosa	(%)
<i>A. fulvescens</i>	tr	4.5	65.7	4.2	9.1	83.5
<i>A. mephitalus</i>	0.0	1.3	66.3	0.5	4.5	72.6
<i>A. reticulisporus</i>	0.0	0.6	70.6	3.1	8.0	82.3
<i>A. saturnoideus</i>	0.0	1.0	65.6	5.0	4.0	75.6
<i>A. terreus</i>	0.0	tr	54.0	7.8	4.6	96.4
<i>A. verrucosus</i>	0.5	10.1	17.0	1.5	21.7	50.3

Tabla XIX.- Porcentajes molares de azúcares (como acetatos de alditol) detectados por GLC después de degradación de Smith de la fracción F1S de diferentes especies de *Aphanoascus*.

Microorganismo	Gli	Eri	Tre	Ara	Xil	Man	Gal	Glc
<i>A. fulvescens</i>	34.6	53.2	1.1	0.7	0.0	0.7	0.2	9.4
<i>A. reticulisporus</i>	71.4	11.5	0.0	0.0	0.0	7.8	3.0	6.3
<i>A. terreus</i>	50.3	34.6	0.0	3.0	1.7	1.4	0.2	8.1

Talaromyces flavus.- La fracción F1 de la pared celular de esta especie obedece a la composición reseñada en la Tabla XX. Se trata de un galactoglucano con un alto contenido en residuos galactosilo (30%). Los porcentajes molares de azúcares (como acetatos de alditol), detectados por GLC después de la degradación de Smith (modificada) (Tabla XXI) son coherentes con la presencia de varios tipos de enlace: 1-4, 1-6 y 1-3, predominando los dos primeros. El espectro IR (Fig. 11) muestra una banda de absorción a 890 cm^{-1} , típica de polisacáridos β -enlazados.

El registro DTG de la fracción F1 considerada (Fig. 104) permite localizar su máximo de descomposición (291°C) en la región de los galactoderivados, entre los galactomanoglucanos de *G. viride* ($297,5^{\circ}\text{C}$) y los glucogalactanos de *P. allahabadense* y *T. helicus* ($301-298^{\circ}\text{C}$) en un extremo, y los galactanos de *P. spinulosum* y *E. stolckiae* ($284-278^{\circ}\text{C}$) en el otro.

Puesto que los polisacáridos de *G. viride*, *P. allahabadense* y *T. helicus* muestran enlaces β -(1-4), (1-6) y los de *P. spinulosum* y *E. stolckiae*, enlaces β -(1-4), (1-3), parece razonable atribuir al de *T. flavus* la presencia de los tres tipos de enlace, en acuerdo con las deducciones por GLC tras degradación de Smith arriba reseñadas.

Tabla XX.- Porcentajes molares de azúcares neutros liberados de la fracción F1 de *T. flavus* (CBS 387.48) tras hidrólisis con H₂SO₄ 4 N durante 5 h. (Determinados como acetatos de alditol por GLC)

Microorganismo	R	Arabinosa	Xilosa	Manosa	Galactosa	Glucosa
<i>T. flavus</i>	7.1	3.0	17.0	9.0	30.0	41.0

Nota: Todos los valores son media de tres determinaciones.

R: Porcentaje de la fracción F1 obtenida de la pared celular seca.

Tabla XXI.- Porcentajes molares de azúcares (como acetatos de alditol) detectados por GLC después de degradación de Smith de la fracción F1 de *T. flavus*.

Componente	Moles
Glicerol	24.9
Eritritol	7.2
Treitol	12.9
Ribitol	0.9
Arabitol	9.5
Xilosa	18.0
Manosa	1.8
Galactosa	8.8
Glucosa	16.0

Nota: La hidrólisis ha sido llevada a cabo con H_2SO_4 4 N a $100^\circ C$ durante 5h. Todos los valores son media de tres determinaciones.

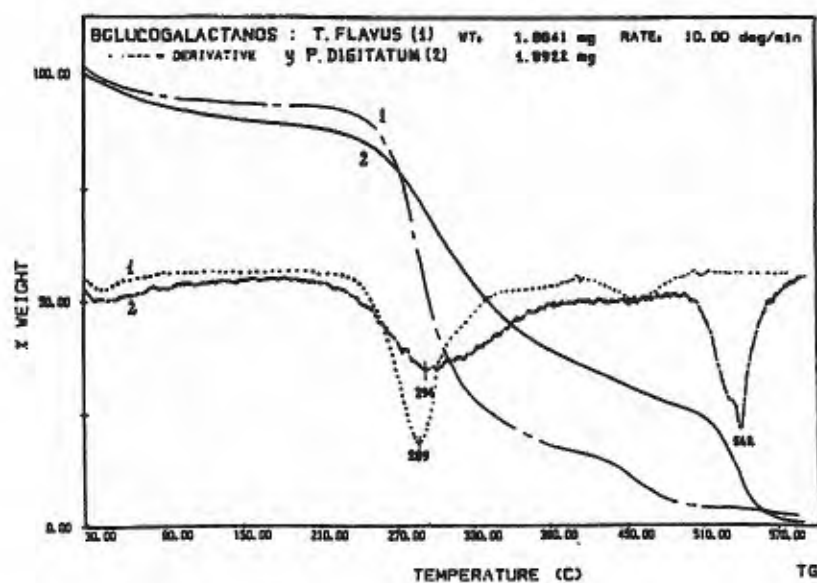


Fig. 104.- Curvas TG-DTG de galactoglucano de la fracción F1 de *T. flavus*

Penicillium allahabadense.- Este hongo, puesto en crecimiento en un medio líquido, sin agitación, forma un polisacárido extracelular que precipita con etanol (fracción A) y cuya composición corresponde a glucosa y ácido malónico. De la fracción A se obtiene por desacilación la fracción D.

Las dos fracciones mostraron en IR (Fig. 105) una banda a 920 cm^{-1} (atribuida a enlaces β -(1-6)) y ausencia de absorción a 850 cm^{-1} . La banda de absorción a 1750 cm^{-1} , característica del grupo CO de ésteres orgánicos, no está presente en la forma desmalonilada.

El consumo de NaIO_4 y producción de ácido fórmico por ambas fracciones (Tabla XXII) y los porcentajes molares de azúcares detectados por GLC tras degradación de Smith (Tabla XXIII) ha llevado a concluir que el principal tipo de enlace entre los residuos de glucosa en D es 1-6. Este resultado ha sido confirmado por el análisis de metilación, toda vez que se ha obtenido como principal producto de la misma el 2,3,4-tri-O-metil-glucitol.

Los derivatogramas de las fracciones consideradas (Fig. 106) han proporcionado picos característicos a $280\text{-}277^\circ\text{C}$ y $604\text{-}594^\circ\text{C}$ para la fracción A, y a $314\text{-}306^\circ\text{C}$ y $482\text{-}466^\circ\text{C}$ para la fracción D. Llevadas estas temperaturas a la Tabla VIII en busca de correspondencias que permitan tentativas de asignación, encontramos para la fracción D un fácil acomodo dentro de los pustulanos o los pustulanoides β -(1-6),(1-3) ricos en β -(1-6). No así para la fracción A, cuyo máximo de descomposición a $280\text{-}278^\circ\text{C}$, relativamente bajo, llevaría a sugerir tanto la existencia de

enlaces β -(1-4), presentes en xilano o la goma de xantano, como la de residuos 1-2 ó 2-1 enlazados, en similitud a la inulina, pero sin proporcionar de modo alguno evidencia del componente mayoritario β -(1-6).

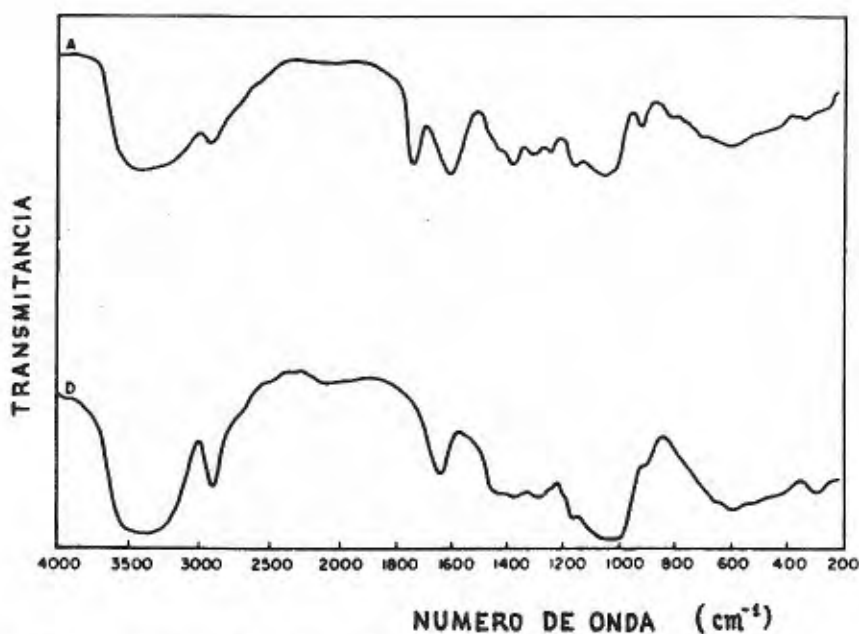


Fig. 105. Espectro IR de fracciones polisacáridicas aisladas de *Penicillium allahabadense*. (A) Precipitada con etanol, y (D) desmalonilada.

Tabla XXII.- Consumo de periodato y producción de ácido fórmico por las fracciones A y D de *P. allahabadense*.

	Periodato		Acido fórmico	
	$\mu\text{mol}/\text{mg}$ polisac.	$\mu\text{mol}/\mu\text{mol}$ res. hexosa	$\mu\text{mol}/\text{mg}$ polisac.	$\mu\text{mol}/\mu\text{mol}$ res. hexosa
Polisacárido A	11.22	--	2.58	--
Polisacárido D	9.78	1.59	3.34	0.55

Tabla XXIII.- Porcentajes molares de azúcares (acetatos de alditol) detectados por GLC después de degradación de Smith de las fracciones A y D de *P. allahabadense*.

Componente	Moles	
	A	D
Glicerol	54	74
Eritritol	2	5
Treitol	3	8
Manosa	2	3
Galactosa	3	0
Glucosa	36	10

Tabla XXIV.- Acetatos de alditol parcialmente metilados obtenidos del polisacárido desmalonilado (fracción D) .

AAPM	TRR	%Mol	Azúcar original	% Molar del azúcar neutro original	
				calculado a partir de MS	por análisis directo
2,4,6-Me ₃ -Man ^b	1.86	0.6	Mannosa	2.6	3.0
4,6-Me ₂ -Man	2.98	2.0			
2,3,5,6-Me ₄ -Gal	1.10	1.7	Galactosa	7.8	8.0
2,3,4,6-Me ₄ -Gal	1.18	0.2			
2,3,6-Me ₃ -Gal	2.22	5.9			
2,3,4,6-Me ₄ -Glc	1.00	12.6	Glucosa	89.3	89.0
3,4,6-Me ₃ -Glc	1.86	10.7			
2,3,4-Me ₃ -Glc	2.22	51.7			
2,3,6-Me ₃ -Glc	2.32	1.6			
2,3-Me ₂ -Glc	4.50	6.3			
Me ₂ -hexitol	5.12	6.4			

^a Tiempo de retención relativo al de 1,5-di-O-acetil-2,3,4,6-tetra-O-metilglucitol en OV-225 a 170 C.

^b 2,3,4,6-Me₄-Man=1-mono-O-acetil-2,3,4,6-tetra-O-metil-manitol, etc

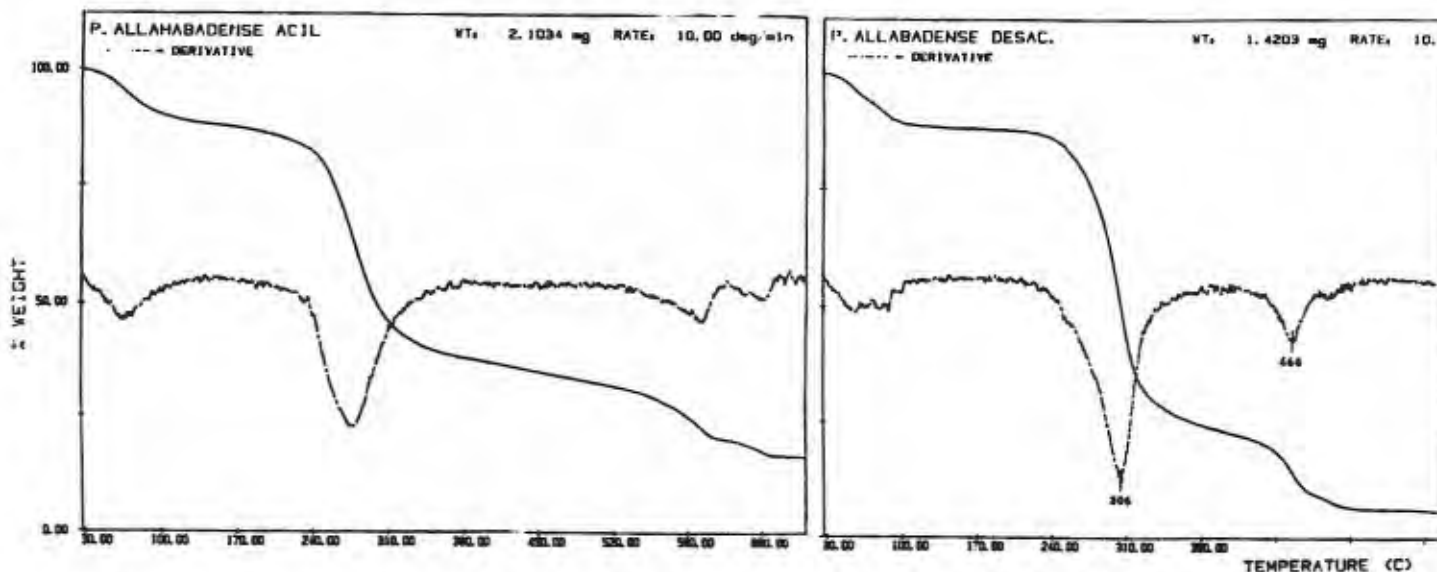


Fig. 106. Curvas TG y DTG de las fracciones A y D de *Penicillium allahabadense*.

4.2. Consideraciones sobre el grado de utilidad de las diversas técnicas disponibles para el análisis de polisacáridos

Clásicamente, el TG ha sido utilizado para estudiar las variaciones de masa y deducir de ellas la naturaleza de los productos de degradación del material de partida. Pese a nuestra experiencia sobre el particular, no ha sido posible aplicarla a estos fines en el caso de polisacáridos, debido, más que a la escasez de horizontales o mesetas en los registros TG, a la heterogeneidad de las especies que se forman en el curso de la termolisis: La uniformidad química que pueda asociarse a la presencia de una horizontal en alguna curva TG de polisacáridos, no es atribuible a una especie intermedia pura, sino a polidispersidad. (Para obtener información sobre la identidad y mecanismo de formación de los productos de termolisis, es más adecuado utilizar la Py-MS).

Sin embargo, si focalizamos nuestra atención sobre las transformaciones químicas en vez de hacerlo sobre sus productos, los derivatogramas de estas curvas de TG resultan ser la *huella dactilar* de cada azúcar examinado, aparte de una herramienta nueva para su elucidación estructural.

Análoga utilidad es mostrada por los picos DTA y los efectos endo y exo DSC asociados a las transformaciones de la termolisis.

Tales posibilidades estructurales nos llevan a cotejar su aplicación frente a otras técnicas establecidas en química de carbohidratos.

Hasta hoy, el análisis estructural de polisacáridos ha discurrido por dos métodos posibles: el del *mordisqueo*, en el que el polímero es *roído* desde un extremo a otro, siendo identificado unidad por unidad, o el más frecuente de *maceo*, en el que el polímero es desmoronado en un número de pequeños fragmentos, que luego se analizan por el primer método. La metodología de *maceo* ha empleado usualmente las técnicas de despolimerización parcial (asociadas a las cromatográficas de separación e identificación de monosacáridos) que sólo proporcionan información sobre la naturaleza y el orden de las unidades monosacarídicas en el polímero, pero que no nos dicen nada sobre las posiciones de sustitución o sobre la configuración del enlace anomérico. Hemos visto que es preciso acudir al recurso de la metilación o a la oxidación por periodato para obtener detalle sobre las posiciones de sustitución, y efectuar oxidación con CrO_3 , realizar registros de IR ó MNR o aplicar el análisis enzimático, para conocer la naturaleza anomérica de sus enlaces.

Las técnicas cromatográficas (a las que hemos aludido en el párrafo anterior) son de gran ayuda en el análisis cuantitativo pero el procedimiento operativo previo es muy laborioso y presentan múltiples inconvenientes para la interpretación. En GLC, la incorporación de la MS ha facilitado mucho la identificación de monosacáridos metilados pero en HPLC, el problema de la eliminación de interferencias aún no ha sido obviado.

La única técnica ventajosa para el estudio de polisacáridos es la ^{13}C -NMR-FT pues, aparte de su carácter no destructivo, provee información sobre la composición y secuencia de los monosacáridos, configuración anomérica y conformación del polisacárido.

Casi las mismas prestaciones estructurales son proporcionadas por los registros DTG, DTA y DSC, toda vez que la disponibilidad de una tabla suficientemente completa de temperaturas de picos para azúcares estándar (de composición, enlace y secuencia conocidas) permite, por asignación, orientar sobre las propiedades desconocidas de nuevos polisacáridos.

Es preciso resaltar que, en polisacáridos, la más idónea de las técnicas térmicas es la de DTG, tanto por su seguridad como por el límite superior de la temperatura de trabajo. DTA y DSC son técnicas complementarias, destacando DSC frente a DTA por su carácter cuantitativo y pese a su rango de operación a temperaturas inferiores.

Esperamos, a estas alturas de la Memoria, haber despertado el interés de cualquier investigador en polisacáridos sobre la utilidad de las técnicas termolíticas como herramienta en estudios estructurales, a pesar, incluso, de que las posibilidades de estas técnicas en la elucidación de azúcares ramificados no hayan sido suficientemente exploradas por nosotros (a falta de suficientes compuestos de referencia). Esperamos también la valoración positiva a nuestra consecución en química de carbohidratos, no por indirecta menos importante, de una secuencia de estabilidades térmicas entre tipos de enlace, de cuya bondad el tiempo y el trabajo nos dirán.

Para terminar, hemos recogido una sugestiva referencia al inquietante diálogo que mantuvieron los Profs. Roden y Ogstrom en un coloquio sobre la capacidad de las nuevas técnicas en *hacer hablar a los polisacáridos*:

RODEN: *"In what language are these substances speaking and to whom?"*

OGSTROM: *"Are we listening and talking in the right language?"*

5. CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos a lo largo del presente estudio extraemos las siguientes conclusiones:

1.- Las técnicas de análisis térmico TG-DTG, DTA y DSC han sido aplicadas por primera vez en Taxonomía, mostrando su máxima utilidad en la caracterización de polisacáridos de paredes fúngicas. (Tal aplicación es de gran ayuda para el conocimiento de la composición de la pared y como auxiliar en quimiotaxonomía a nivel de especie). La aplicación de estas técnicas a muestras enteras de paredes celulares bacterianas y fúngicas, e incluso a células completas, también es posible con auxilio del análisis discriminante de resultados, si bien la información quimiotaxonómica derivada solo puede extenderse con rigor, en estos casos, a nivel de género.

2.- Si las fracciones polisacáridicas de paredes fúngicas se encuentran suficientemente purificadas, la caracterización por la metodología aquí descrita es completa, directa y rápida. Operando con moderna instrumentación Perkin Elmer y en condiciones sistematizadas (peso de muestra en torno a 2 mg, velocidad de calentamiento de 10°C/min y, opcionalmente, aire estático o dinámico a 60 cm³/min) es posible obtener, en un periodo de 1 a 3 horas y tras examen de los registros DTG, DTA y/o DSC, información válida sobre constituyentes monoméricos, posiciones de sustitución (cómo están unidos) y configuración anomérica (α - ó β - del polisacárido analizado).

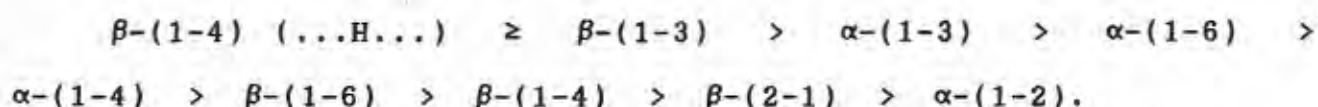
La coexistencia de dos tipos de enlace en un mismo polisacárido se evidencia generalmente sin dificultad. La presencia ocasional de un tercer tipo de enlace puede detectarse en algunos casos (mananos, p. ej.).

3.- Las posibilidades de elucidación estructural anteriormente referidas encuentran una aplicación adicional en Inmunología, toda vez que facilitan el reconocimiento, en antígenos polisacarídicos, de la presencia de enlaces (1-3), valorados por su influencia en la determinación antigénica y de máxima efectividad en inducir la regresión tumoral.

4.- El caracter marcador de estabilidad hallado para determinados efectos térmicos principales de las curvas DTG, DTA y DSC ha permitido, por primera vez, secuenciar de modo exhaustivo la termoestabilidad de los polisacáridos:

Quitina = Laminaranos > Celulosa > S-Glucanos >
 α -Man-(1-6), ram. α -(1-3) y (1-2) Mananos > Dextrano > Nigeranos =
Pululanos > Amilopectina > Amilosa > β -Man-(1-4)- β -Glc-(1-6)-
D-Glucomananos > R-Glucanos > β -(1-6), β -(1-3)-D-Glucanos >
Pustulanos > α -Man-(1-6)- β -Glc-(1-6),(1-4) Glucomananos >
 α -(1-6), ram. α -(1-2) Mananos > Glucanoquitina > Quitosano >
 α -Man-(1-6)- β -Glc-(1-4) Glucomananos > Galactomanoglucanos >
 β -Glucogalactanos > β -Galactoglucanos > β -Galactanos > Xilano >
Xantano Goma de > Inulina > Fucoidanos > Acido Glucurónico.

5.- Conscientes de la importancia de las relaciones estructura-estabilidad y refiriendo la anterior secuencia a otra de tipos de enlace, ha sido posible estimar de modo general un orden para la fuerza de los distintos tipos de unión:



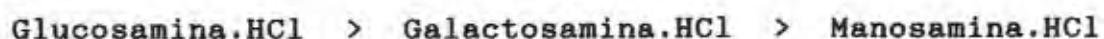
Tal gradación de estabilidades puede ser reducida, prescindiendo del tipo de configuración, a la siguiente:



Ambas secuencias han de ser moduladas por la observación de que la estabilidad anormalmente alta exhibida por la quitina (y que también presenta la celulosa) se debe al efecto de agregación de sus cadenas por enlace de hidrógeno.

6.- Las secuencias de estabilidad térmica han sido puestas en relación con otras secuencias de estabilidad, advirtiéndose una relación directa con la de hidrólisis e inversa con la de acetólisis, que permite asimilar termoestabilidad con resistencia a la hidrólisis y facilidad a la acetólisis.

7.- Relativo a los aminoazúcares (en sus formas HCl) se obtiene la secuencia de estabilidades:



que está en consonancia con la previsión teórica de una mayor estabilidad de glucanos respecto a galactanos y mananos (luego, en la práctica, la mayor fuerza de los enlaces α -(1-4) ó α -(1-6) de la

cadena principal de los mananos respecto de los enlaces β -(1-4) de los galactanos, determina una mayor estabilidad de aquéllos en relación a éstos).

8.- En un estudio comparativo de glucosamina en sus formas poli-N-acetil, acetil, HCl y quitosano, discutido en relación con el único precedente bibliográfico de nuestro trabajo específico (el artículo de Bihari-Varga, Sepulchre y Moczár, 1975), se establece la superior estabilidad de quitina respecto a las restantes formas.

9.- Las variaciones de entalpía asociadas a la degradación térmica de todos los polisacáridos estudiados cursa con un efecto endotérmico a temperaturas en torno a 150°C y otro exotérmico alrededor de 280°C, evidenciables por DSC. El primero de ellos ha sido asignado a la pérdida termolítica de moléculas de agua a partir de los residuos monosacáridos constituyentes del polímero y el segundo, al proceso de combustión.

10.- En una valoración de las técnicas termolíticas frente a otras técnicas utilizadas en la caracterización de polisacáridos fúngicos, sólo la ^{13}C -NMR-FT parece aventajarlas en prestaciones como herramienta estructural.



Valladolid, 23 de Julio de 1990.

6. BIBLIOGRAFIA

ALDRICH, H.C. y TODD, W.J. (1986). Ultrastructure techniques for microorganisms, Plenum Press, New York.

ANGYAL, S.J. y JAMES, K. (1970). Oxidation of carbohydrates with chromium trioxide in acetic acid. Aust. J. Chem., 23: 1209.

APPLEGARTH, D.A. y BOZOIAN, G. (1969). Cel wall of *Helminthosporium salivum*, Archives of Biochemistry and Biophysics, 134 (2): 285-289.

ARONSON, J.M. (1965). The cell wall. En: The fungi, vol. 1. The Fungal cell, pp. 46-76. G.C. Ainsworth y A.D. Sussman (eds). Academic Press Inc.

ARONSON, J.M., COOPER, B.A. y FULLER, M.S. (1967). Glucans of Oomycete cell walls. Science, 155: 332-335.

ASPINALL, G.O. y FERRIER, R.J. (1957). A spectrophotometric method for the determination of periodate consumed during the oxidation of carbohydrates. Chem. Ind., 1216.

BACON, J.S.D., JONES, D., FARMER, V.C. y WEBLEY, D.M. (1968). The occurrence of α -(1-3) glucan in *Eryptococcus*, *Schizosaccharomyces* and *Polyporus* species and its hydrolysis by a *Streptomyces* culture filtrate lysings cell walls of *Eryptococcus*, Biochimica et Biophysica Acta, 158: 313-315.

BARDALAYE, P.C. y NORDIN, J.H. (1976). Galactosaminegalactan from cell walls of *Aspergillus niger*. Journal of Bacteriology, 125 (2): 655-669.

BARKER, S.A., BOURNE, E.J. y WHIFFEN, D.M. (1956). Use of Infrared analysis in the determination of Carbohydrate structure. Methods of Biochemical Analysis, 3: 213-245. Cit. por GOMEZ-MIRANDA, 1988.

BARTNICKI-GARCIA, S. (1968). Cell wall chemistry, Morphogenesis, and Taxonomy of Fungi. Annual Review of Microbiology, 22: 87-108.

BARTNICKI-GARCIA, S. y REYES, E. (1968). Polyuronides in the cell walls of *Mucor rouxii*. Biochimica et Biophysica Acta, 170: 54-62.

BARTNICKI-GARCIA, S. (1970). Cell wall composition and other biochemical markers in fungal phylogeny. En: Phytochemical Phylogeny, pp. 81-103. J.B. Harborne (ed). Academic Press, New York-London.

BHATTACHARJEE, A.K., JENNINGS, H.J., KENNY, C.P., MARTIN, A. y SMITH, I.C.P. (1975). J. Biol. Chem., 250: 1926-1932. Cit por HAVERKAMP, J., 1980.

BHATTACHARJEE, A.K., JENNINGS, H.J., KENNY, C.P., MARTIN, A. y SMITH, I.C.P. (1976). J. Biol. Chem., 54: 1-8. Cit por HAVERKAMP

BHATTACHARJEE, A.K. y JENNINGS H.J. (1976). Carbohyd. Res., 51: 213-261. Cit por HAVERKAMP J., 1980.

BIHARI-VARGA, M., SEPULCHRE, C. y MOCZAR, E. (1975). Thermoanalytical studies on protein-polysaccharide complexes of connective tissues. J. Therm. Anal., 7: 675-683.

BLOOMFIELD, B.J. y ALEXANDER, M. (1967). Melanins and resistance of Fungi to lysis. Journal of Bacteriology, 93: 1276-1280.

BOBBIT, F. y NORDIN J.H. (1978). Hyphal nigeran as a potential phylogenetic marker for *Aspergillus* and *Penicillium* species. Mycología, 70: 1201-1211.

BOVEY, F.A. (1972). High Resolution N.M.R. of macromolecules. Academic Press, New York.

BRACONNOT, M.H. (1811). Recherches analytiques sur la nature des champignons. Annual Chemistry (Paris), 79: 265-304. Cit. por DROUET

- BUCK, K.W., CHEN, A.W., DICKERSON, A.G. y CHAIN, E.B. (1968). Formation and structure of extracellular glucans produced by *Elaviceps* species. *Journal of General Microbiology*, 51: 337-352.
- BULL, A.T. y CHESTERS, C.G.C. (1966). The biochemistry of laminarin and the nature of laminarinase. *Advances in Enzymology*, 28: 325-364.
- BULL, A.T. (1970). Chemical composition of wild-type and mutant *Aspergillus nidulans* cell walls. The Nature of Polysaccharide and Melanin constituents. *Journal of General Microbiology*, 63: 75-94.
- CACABELOS, R. (1988). Farmacología molecular de la terapia anti-SIDA. *Jano*, 35 (835): 24-27.
- CHASSEING, N.A., LEDERKREMER, R.M., COUTO, A., MAYER, A. y RUMI, L.S. (1988). *Inmunología*, 7 (4): 138-142.
- CHEN, G.C. y JOHNSON, B.R. (1983). Improved colorimetric determination of cell wall chitin in wooddecay fungi. *Applied Environmental Microbiology*, 46: 13-16.
- CHERNIAK, R.E., REISS, E., SLODKI, M.E., PLATTNER, R.D. y BLUMER, S.O. (1980). Structure and antigenic activity of the capsular polysaccharide from *Eryptococcus neoformans* serotype A. *Mol. Immunol.*, 17:1025.
- CROOK, E.M. y JOHNSTON, I.R. (1962), The qualitative analysis of the cell walls of selected species of fungi. *Biochem. J.*, 83: 325-331.
- CUMMINS, C.S. y HARRIS, H. (1956). *Cit.* por KROPPESTEDT, R.M.
- de HOOG, G.S. (1977). *Rhinochadiella* and allied genera. *Stud. Mycol.*, 15, 1-140.

DISCHE, Z (1962), Color reactions of carbohydrates. En: "Methods in Carbohydrate Chemistry". Vol. I, p. 477. Whistler, R.L. y Wolfson, M.L. (ed.). Academic Press, New York.

DROUET, E. (1988). Fungal Antigens, pp. 9-14. Latgé, J.P. y Drouet, E. (eds.). Plenum Press.

DUBOURDIEU, D., BIDEREAU-GAYON, P. y FOURNET, B. (1981). Structure of the extracellular β -D-glucan from *Botrytis cinerea*. Carbohydr. Res., 93:294.

EBERT, E. y ZENK, M.H. (1966). Untersuchungen zu Struktur und Biogenese des sauren Polysaccharids von *Penicillium islandicum* (Islandinsäure). Arch. Mikrobiol., 54. 276-296.

EBERT, E. y ZENK, M.H. (1967). Luteic acid and islandic acid, composition and structure. Phytochemistry, 6: 390-312.

FOURNET, B., STRECKER, G., LEROY, Y. y MONTREUIL, J. (1981). Gas-liquid chromatography and mass spectrometry of methylated and acetylated methyl glycosides. Application to the structural analysis of glycoprotein glycans. Anal. Biochem., 116: 489.

FULLER, M.S. y BARSHAD, I. (1960). Chitin and cellulose in the cell walls of *Rhizidiomyces* sp. American Journal of Botany, 47: 105-109.

GANCEDO, J.M., GANCEDO, C. y ASENSIO, C. (1966). Uronic acids in fungal cell walls. Biochemische Zeitschrift, 346: 328-332.

GARZULI-JANKE (1940). Cit. por DROUET, E., En: Fungal Antigens (1988). Plenum Press Ed.

GERDEMANN, J.W. y TRAPPE, J.M. (1974). The Endogonaceae in the Pacific Northwest. Mycol. Mem., 5, 1-76.

GERDEMANN, J.W. y TRAPPE, J.M. (1975). Taxonomy of the Endogonaceae. En: Endomycorrhizas. F.E. Sanders. ed., Academic Press, London, New York y San Francisco. pp. 35-51.

GOLDSTEIN, I.J., HAY, G.W., LEWIS, B.A. y SMITH, F. (1965). Controlled degradation of polysaccharides by periodate oxidation, reduction and hydrolysis, En: "Methods in Carbohydrate Chemistry", 5: 361. Academic Press, New York.

GOMEZ-MIRANDA, B., MOYA, A. y LEAL, J.A. (1988). Differences in the cell wall composition in the type species of *Eupenicillium* and *Talaromyces*. Exp. Mycol., 12: 258-263.

GORIN, P.A.J. y EVELEIGHT, D.E. (1970). Extracelular 2-acetamido-2-deoxy-D-galacto-D-galactan from *Aspergillus nidulans*. Biochem., 9: 5023-5027.

GORIN, P.A.J. (1975). Assignment of signals of carbon-13 magnetic resonance spectrum of a selected polysaccharide: comments on methodology. Carbohydr. Res., 39: 3.

GORIN, P.A.J. (1981). Carbon-13 Nuclear magnetic resonance spectroscopy of polysaccharides, En: "Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry", 38: 13. Academic Press, New York.

GUERRERO-BENITO, M.C. "Polisacáridos de Hongos (*Aspergillus fumigatus*)". Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid. Facultad de Ciencias Biológicas. 1985.

HAKOMORI, S.I. (1964). A rapid permethylation of glycolipid and polysaccharide catalysed by methylsulfinyl carbanion in dimethyl sulfoxide. J.Biochem. (Tokyo), 55: 205.

HALMA, G., POSTHUMUS, M.A., MIEDEMA, R, van der WESTERINCH, W. y MEUZELAAR, H.C.L. (1979). Characterization of soil types by pyrolysis mass spectrometry. Proc. 12th. Int. Symp. Soil Colloids, Piza, Italia, Sept. 1978. Agrochimica Acta.

HAMILTON, P.B., y KNIGHT, S.G. (1962). An analysis of the cell wall of *Penicillium chrysogenum*. Archives of Biochemistry and Biophysics, 99: 282-287.

HAVERKAMP, J., MEUZELAAR, H.L.C., BEUVERI, E.C., BOONEKAMP, P.M. y TIESJEMA, R.H. (1980). Analytical Biochemistry, 104: 407-418.

HAWKER, L.E. (1965). Fine structure of fungi as revealed by electron microscopy. Biological Reviews, 40: 52-92.

HOFFMAN, J., LINDBERG, B., y SVENSSON, S. (1972). Determinations of the anomeric configuration of sugar residues in acetylated oligo- and polysaccharides by oxidation with chromium trioxide in acetic acid. Acta Chem. Scand., 26: 661.

HOFFMAN, J. y LINDBERG, B. (1980). Oxidation of acetylated carbohydrates with chromium trioxide in acetic acid, En: "Methods in Carbohydrate Chemistry", 8: 117. Whistler, R.L. y BeMiller, J.N.. (eds.). Academic Press (New York).

HORISBERGER, M. y VONLANTHEN, M. (1977). Location of mannan and chitin on thin sections of budding yeast with gold markers. Arch. Microbiol., 115: 1-7.

HORTON, D. y LINEBACK, D.R. (1965). N-deacetylation; chitosan from chitin. Methods in Carbohydrate Chemistry, 5: 403-406.

HOUWINK y KREGER, D.R. (1953). Cit. por DROUET, E. En: Fungal Antigens, pp. 9-13.

HUNSLEY, D. y BURNETT, J.H. (1968). Dimensions of microfibrillar elements in fungal walls. Nature (London), 218: 462-463.

HUNSLEY, D. y BURNETT, J.H. (1970). The ultrastructural architecture of the walls of some hyphal fungi. Journal of General Microbiology, 62: 203-218.

JAMES, J.L. (1975), En: "Nuclear magnetic resonance in biochemistry". Academic Press, New York.

JANSSON, P.-E., KENNE, L., LIEDGREN, H., LINDBERG, B. y LONNGREN, J. (1976). Chem. Commun. Univ. Stockholm, 8.

JEANNES, A. (1965). Dextrans. Preparation of dextrans from growing *Leuconostoc* cultures. En: Methods in Carbohydrate Chemistry, 5: 118-127.

JENNINGS, H.J., BHATTACHARJEE, A.K., BUNDLE, D.R., KENNY, C.P., MARTIN, A. y SMITH, I.C.P. (1977). J. Infec. Dis., 136: S78-S83. Cit. por HAVERKAMP, J., 1980.

JENNRICH, R. y SAMPSON, P. (1983). En: BMDP Statistical Software, pp. 519-537. Dixon, W.J. (ed.). Univ. California Press. Berkeley.

JONES, D.W. (1976). Combined applications of spectroscopy and other techniques. En: "Introduction to the Spectroscopy of Biological Polymers", 295. Academic Press, New York.

KATZ, D. y ROSENBERGER, R.F. (1970). A mutation in *Aspergillus nidulans* producing hyphal walls which lack chitin. Biochimica et Biophysica Acta, 208: 452-460.

KATZ, D. y ROSENBERGER, R.F. (1971). Lysis of an *Aspergillus nidulans* mutant blocked in chitin synthesis and its relation to wall assembly and wall metabolism. Archiv. fur Mikrobiologie, 30: 284-292.

KREGER, D.R. y MEEUSE, B.J.D. (1952). X-ray diagrams of *Euglena paramylon*, of the acid insoluble glucan of yeast cell walls and of laminarin. Biochimica et Biophysica Acta, 9: 699-700. Cit. por ROSENBERGER, R.F., 1976.

KREGER, D.R. (1954). Observations on cell wall of yeast and some other fungi by X-ray diffraction and solubility test. *Biochimica et Biophysica Acta*, 13: 1-9. Cit. por ROSENBERGER, R.F., 1976.

KROPPESTEDT R.M. (1988). Chemical methods in the systematic of bacteria. Comunicación a la III Reunión del Grupo de Taxonomía Bacteriana de la SEM. Madrid, 22-23 de septiembre.

LAINE, R.A., ESSELMAN, W.J. y SWEELEY, C.C. (1972). Gasliquid chromatography of carbohydrates. *Methods in Enzymology*, 28: 159-167.

LATGE, J.-P., COLE, G.T., HORISBERGER, M. y PREVOST, M.C. (1986). Ultrastructure and chemical composition of the ballistospore of *Conidiobolus obscurus*. *Exp. Mycol.*, 10: 99-113.

LATGE, J.-P. (1987). La Microscopie electronique a transmission (MET) en Mycologie et son application a la localization cytochimique des polysaccharides fongiques. *Bull. Soc. Fr. Mycol. Méd.*, 16 (1): 229-234.

LATGE, J.-P. y DROUET, E. (1988). Fungal antigens. Plenum Press.

LEAL, J.A., GALLEGHLY, M.E. y LILLY, V.G. (1967). The relation of the Carbon-Nitrogen ratio in the basal medium to sexual reproduction in species of *Phytophthora*. *Mycologia*, LIX (6): 953-964.

LEAL, J.A. y RUPEREZ, P. (1978). Extracellular polysaccharide production by *Aspergillus nidulans*. *Transaction of the British Mycological Society*, 70 (1): 115-120.

LEAL, J.A., MOYA, A. GOMEZ-MIRANDA, B., RUPEREZ, P. y GUERRERO, C. (1984). Differences in cell wall polysaccharides in some species of *Penicillium*. En: *Microbial cell wall synthesis and autolysis*. pp. 149-155. C. Nombela (ed.). Elsevier Science Publishers.

LECHEVALIER, M.P. y LECHEVALIER, H.A. (1970). Chemical composition as a criterion in the classification of aerobic Actinomycetes. *Int. J. Sys. Bacteriol.*, 20: 435-443.

LEE, Y.C. y BALLOU, C.E. (1965). Preparation of mannobiose, mannotriose and a new mannotetraose from *Saccharomyces cerevisiae* Mannan. *Biochemistry*, 4:257.

LINDBERG, B., LONNGREN, J. y SVENSSON, S. (1975). Specific degradation of polysaccharides. *Adv. Carbohydr. Chem. and Biochem.*, 31: 185-240.

LIU, T.-Y., GOTSHLICH, E.C., EGAN, W. y ROBBINS, J.B. (1977). *J. Infec. Dis.*, 136 (Suppl.): S71-S77. *Cit por HAVERKAMP.*

LOEWUS, F.A. (1952). Improvement in the anthrone method for determination of carbohydrates. *Analytical Chemistry.*, 24: 219.

LUDWIG, F. (1892). *Lehrbuch der niederen kryptogamen mit besonderer Berücksichtigung derjenigen Arten, die für den Menschen von Bedeutung sind oder im Haushalte ein hervorragende Rolle spielen.* F. Enke, Stuttgart. *Cit. por DROUET, E.*

MAHADEVAN, P.R. y TATUM, E.L. (1965). Relationship of the major constituents of the *Neurospora crassa* cell wall to wild-type and colonial morphology. *Journal of Bacteriology*, 90: 1073-1081.

MAHADEVAN, P.R. y TATUM, E.L. (1967). Localization of structural polymers in the cell wall of *Neurospora crassa*. *Journal of Cell Biology*, 35: 295-302.

MAHADEVAN, P.R. y MAHADKAR, V.R. (1970). Role of enzymes in growth and morphology of *Neurospora crassa*: cell wall bound enzymes and their possible role in branching. *Journal of Bacteriology*, 101: 941-947.

MATERS, W.L., van der MEENT, D., SCHUYL, P.J.W., de LEEUW, J.W., SCHENCK, P.A. y MEUZELAAR, H.L.C. (1977). Curie-point pyrolysis in organic geochemistry. En: Analytical pyrolysis, pp. 203-216. Jones, C.E.R. y Cramers, C.A. (eds.). Elsevier Scientific Publishing Company. Amsterdam.

MATHLOUTHI, M. y KOENIG, J.L. (1986). Vibrational spectra of carbohydrates. En: Advances in carbohydrate chemistry and biochemistry, 44: 7-85. Tipson, R.S. y Horton, D. (eds.). Academic Press, Inc.

MATSUNAGA, T., OKUBO, A., FUKANI, M., YAMAZAKI, S. y TODA, S. (1980). Preparation, isolation and NMR spectra of polysaccharides from *F. ochro-chlorum*. Agric. Biol. Chem., 44: 2757-2759.

McGINNIS, G.D. y FANG, P. (1980). High-performance liquid chromatography. En: "Methods in Carbohydrate Chemistry", 8: 33. Whistler, R.L. y BeMiller, J.N. (eds.). Academic Press, New York.

MEUZELAAR, H.L.C., KISTEMAKER, P.G. y POSTHUMUS, M.A. (1974). Recent advances in pyrolysis mass spectrometry of complex biological materials. Biomed. Mass Spectrom., 1: 312-319.

MEUZELAAR, H.L.C., KISTEMAKER, P.G., ESHUIS, W. y ENGEL, H.W.B. (1976). Progress in automated and computerized characterization of microorganisms by pyrolysis mass spectrometry. En: Rapid methods and automation in microbiology, pp. 225-230. Johnston, H.H. y Newsom, S.W.B. (eds.). Learned Information (Europe) Ltd., Oxford y New York.

MITCHELL, R. y SABAR, N. (1966). Hyphal cell wall structure of two species of *Phyllum*. Canadian Journal of Microbiology, 12: 471-475.

MICHELL, A.J. y SCURFIELD, G. (1967). Composition of extracted fungal cell wall as indicated by Infrared spectroscopy. Archives of Biochemistry and Biophysics, 120: 628-637.

MICHELL, A.J. y SCURFIELD, G. (1970). An assesment of Infrared spectra as indicators of fungal cell wall composition. Australian Journal of Biological Science, 23: 345-360.

MONTREUIL, J. y SPIK, G. (1963). Methodes colorimetriques de dosage des glucides totaux. Monog. Lab. Chim. Biol. Fac. Sci. Lille.

MONTREUIL, J., SPIK, G., FOURNET B. y TOLLIER, M.T. (1981). Glucides, En: "Techniques d'analyse et de Controle dans les Industries Agro-alimentaires", Vol. 4, p. 85. Deymie, B., Multon, J.L. y Simon, D. (eds.). Technique et Documentation. Paris.

NABEL, K. (1939). Über die Membran niederer Pilze, besonders *Rhizidiomyces livellatus* nov. spez. Arch. Mikrobiol., 10: 515-541. Cit por DROUET, E.

NOVAES-LEDIEU, M. JIMENEZ-MARTINEZ, A. y VILLANUEVA, J.R. (1967). Chemical composition of hyphal walls of Phycomycetes. Journal of General Microbiology, 47: 237-245.

O'BRIEN, R.W. y RALPH, B.J. (1966). The cell wall composition and taxonomy of some Basidiomycetes and Ascomycetes. Ann. Bot., 30: 831-843.

PARIS, S., PREVOST, M.C., LATGE, J.P. y GARRISON, R. (1986). Cytochemical study of the yeast and mycelial cell walls of *Paracoccidioides brasiliensis*. Exp. Mycol., 10: 228-242.

PAZ PARENTE, J., CARDON, P., LEROY, Y., MONTREUIL, J., FOURNET, B. y RICART, G. (1985). A convenient method for methylation of glycoprotein glycans in small amounts by using lithium methyl-sulfinyl carbanion. Carbohydr. Res., 141: 41.

PAZUR, J.H. (1986). Neutral polysaccharides. En: Carbohydrate Chemistry: a practical approach, p. 79. Chaplin, M.F. y Kennedy, J.F. (eds.). IRL Press, Oxford-Washington

PETERSON, D.R., y KIRKWOOD, S. (1975). Studies on the structure and mechanism of an exo-(1-3)- β -D-glucanase from basidiomycete QM 806. Carbohydr. Res., 41: 273.

PHELPS, C.F. (1972). Polisaccharides. En: Oxford Biology Readers, 27. Head, J.J. y Lowenstein, O.E., (eds.). Oxford Univ. Press.

POSTHUMUS, M.A., BOERBOOM, A.J.H. y MEUZELAAR, H.L.C. (1974). Analysis of biopolimers by Curie-point pyrolysis in direct combination with low voltage electron impact ionization mass spectrometry. En: Advances in mass spectrometry. Vol. 6. pp.397-402. West, A.R.(ed.). Applied Science Publishers, Barking, Essex, U.K.

PULKOWNIUK, A. y WALKER, G.J. (1977). Carbohydr. Res., 54: 237-251. Cit. por TIPSON, R.S. y HORTON, D.

PURDIE e IRVINE (1903). St. Andrews University Press. Cit. por PHELPS, C.F.

RIUS, N., LOPEZ, D., SANAHUJA, A., VIÑAS, M., BERMUDEZ, J. y LOREN, J.G. (1988). Análisis de las curvas calorimétricas de cultivos bacterianos y su aplicación a la identificación. III Reunión del Grupo de Taxonomía Bacteriana de la S.E.M.. Madrid, 22-23 septiembre 1988.

ROBERTSON, N.F. (1959). Experimental control of hyphal branching and branch form in hyphomycetous fungi. Journal of the Lineaen Society, 56: 207-211.

ROSENBERGER, R.F. (1976). The cell wall. En: The Filamentous Fungi, vol. II. Biosynthesis and Metabolism. pp. 328-344. Smith J.E.S. y Berry, D.R. (eds.).

ROSENFELD, L. y BALLOU, C. E. (1974). Carbohyd. Res., 32: 287-298

ROWLEY, B.I. y PIRT, S.J. (1972). Melanin production by *Aspergillus nidulans* in batch and chemostat cultures. *Journal of General Microbiology*, 72: 553-563.

RUIZ-HERRERA, J. (1967). Chemical components of the cell wall of *Aspergillus* species. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 122: 118-125.

RUPEREZ, P. y LEAL, J.A. (1981). Extracellular galactosamino galactan from *Aspergillus parasiticus*. *Trans. Br. mycol. Soc.*, 77: 621-625

SALKOWSKI (1894). *Cit. por DROUET E.* En: *Fungal Antigens*, pp. 9-13.

SCHAEFER, J. and STEJSKAL, E.O. (1979). High-resolution carbon-13 N.M.R. of solid polymers. *Top. Carbon-13 N.M.R. Spectrosc.*, 3: 283.

SCHREVEL, J., GROS, D. y MONSIGNY, M. (1981). Cytochemistry of cell glycoconjugates. *Progr. Histochem. Cytochem.*, 14: 1-269

SCHLEIFER y KANDLER (1972). *Cit. por KROPPESTEDT, R.M.*

SENTANDREU, R., RUIZ-HERRERA, J. y ELORZA, M.V. (1983). La pared celular de los hongos. *Investigación y Ciencia*, 76: 92-104.

SIETSMA, J.H. y WESSELS, J.G.H. (1977). Chemical analysis of the hyphal wall of *Schizophyllum commune*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 496: 225-239.

SLODKI, M.E., WICKERHAM, L.J. y CADMUS, M.C. (1961). Phylogeny of phosphomannan-producing yeast. II. Phosphomannan properties and taxonomic relationships. *J. Bact.*, 82: 269-274. *Cit. por DROUET, E*
SOMOGYI, M. (1952). *J. Biol. Chem.*, 195: 19

STOFFYN, P.J. y JEANLOZ, R.W. (1954). Identification of aminosugars by paper chromatography. Archives of Biochemistry and Biophysic, 52: 373-379.

SUTHERLAND, I.W. (1970). Formate, a new component of bacterial exopolysaccharides. Nature, 228, 280.

TIPSON, R.S. y HORTON, D. (1986). Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry, Vol. 44. Academic Press, Inc.

TROY, F.A. y KOFFLER, H. (1969). The chemistry and molecular architecture of the cell walls of *Penicillium chrysogenum*. Journal of Biological Chemistry, 244, 5563-5576.

VALENT, B.S., DARVILL, A.G., McNEIL, M., ROBERTSEN B.K. y ALBERSHEIM, P. (1980). A general and sensitive chemical method for sequencing the glycosyl residues of complex carbohydrates. Carbohydr. Res., 79: 165.

VALERO-GUILLEN, P.L. y MARTIN-LUENGO, F. (1983). Análisis cromatográfico de *Mycobacterium fortuitum*. En: Microbiología 83. I (1), pp. 215 Rodríguez Torres, A., (ed.).

van WISSELINGH, C. (1898). Mikrochemische Untersuchungen über die Zellwände der Fungi. Jb. wiss. Bot., 31: 619-687. Cit. por DROUET

von TABEL, F. (1892). Vergleichende morphologie der Pilze. Gustav Fischer, Jena. Cit. por DROUET, E.

von WETTSTEIN, F. (1921). Das Vorkommen von Chitin und Seine Verwertung als systematischphylogenetisches Merkmal im Pflanzenreich. Sber. Akad. Wiss. Wien, math. naturw. kl., Abt. 1, 130: 3-20. Cit. por DROUET, E.

WEIJMAN, A.C.M. (1976). Cell-wall composition and taxonomy of *Cephalosascus fragrans* and some Ophiostomataceae. Antonie van Leeuwenhoek; J. Microb. Serol., 42: 315-324.

WEIJMAN, A.C.M. (1977a). The application of Curie-point pyrolysis mass spectrometry in fungal taxonomy. En: Analytical pyrolysis, pp. 225-233. Jones, C.E.R. y Cramers, C.A. (eds). Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam.

WEIJMAN, A.C.M. (1977b). Carbohydrate composition and taxonomy of the genus *Dipodascus*. Antonie van Leeuwenhoek; J. Microbiol. Serol., 43: 323-331.

WEIJMAN, A.C.M. y MEUZELAAR, H.L.C. (1979). Biochemical contributions to the taxonomic status of the *Endogonaceae*. Can. J. Bot., 57: 284-291.

WESSELS, J.G.H. (1965). Morphogenesis and biochemical process in *Schizophyllum commune*. Wentia, 13: 1-113.

WESSELS, J.G.H. (1969). Control of cell wall glucan degradation during development in *Schizophyllum commune*. Antonie van Leeuwenhoek, 32: 341-355.

WESSELS, J.G.H., KREGER, D.R., MARCHANT, R., REGENSBURG, B.A. y De VRIES, O.M.H. (1972). Chemical and morphological characterization of the hyphal wall surface of the basidiomycete *Schizophyllum commune*. Biochimica et Biophysica Acta, 273: 346-358.

WHISTLER, R.L., BUSHWAY, A.A., SINGH, P.P., NAKAHARA, W., TOKUZEN, R. (1976). Noncytotoxic, antitumor polysaccharide. Adv. Carbohydr. Chem. Biochem., 32: 235-275.

WHITE, C.A. y KENNEDY, J.F. (1981). Manual and automated spectrophotometric techniques for the detection and assay of carbohydrates and related molecules. En: "Techniques in Carbohydrate Metabolism", Kornberg, H.L., Metcalce, J.C., Northcote, D.H., Poigson, C.I. y Tipson, K.F., (eds). Elsevier, Amsterdam.

ZONNEVELD, B.J.M. (1971). Biochemical analysis of the cell wall of *Aspergillus nidulans*. Biochimica et Biophysica Acta, 249: 506-514.

7. GLOSARIO

Atomo de carbono anomérico.- En un azucar, el carbono carbonílico (C-1, en aldosas y C-2, en cetosas) que se convierte en un centro asimétrico, por paso de la forma abierta a la cerrada.

Agrupamiento Alcohol.- Un alcohol primario tiene el agrupamiento $-\text{CH}_2\text{OH}$; uno secundario, $-\text{CHOH}-$.

Enlace de hidrógeno.- O enlace por puente de hidrógeno, es un tipo de interacción electrostática cuya energía de enlace oscila entre 2 y 10 Kcal/mol. Se produce entre cualquier átomo electronegativo como el oxígeno o el nitrógeno y un átomo de hidrógeno que esté unido de manera covalente a otro átomo electronegativo.

Enlace glicosídico.- El que se produce entre un grupo carbonilo de un monosacárido y un grupo hidroxilo de otro monosacárido, con pérdida de una molécula de agua. Se expresa señalando la posición y configuración anomérica del carbono carbonílico del monosacárido que lo aporta, una flecha, y la posición del carbono que contribuye con el $-\text{OH}$.

Formas anoméricas α y β .- Las dos posibles configuraciones del carbono carbonílico (C-1 en aldosas y C-2 en cetosas) de un monosacárido que resultan de su ciclación y que se distinguen por la ubicación del grupo hidroxilo unido a dicho carbono por debajo y por encima del plano del anillo, respectivamente.

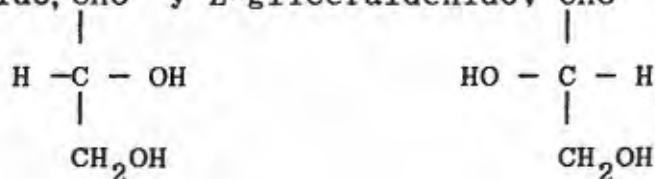
Fuerzas de van der Waals.- Son el resultado de la atracción que ejercen los núcleos cargados positivamente de un átomo sobre la nube electrónica de un átomo adyacente de otra molécula (Fuerzas de London) o de la misma molécula. Estas fuerzas actúan en distancias extremadamente cortas y son muy débiles.

Furanosa.- Un monosacárido con una estructura anular de 5 átomos.

Heteroglicano.- Un polisacárido con unidades monoméricas diferentes.

Homoglicano.- Un polisacárido con unidades monoméricas idénticas.

Isómeros D- y L- Una convención para representar, de acuerdo con la disposición de Fischer, los azúcares derivados del D-gliceraldehido, CHO y L-gliceraldehido, CHO



Piranos.- Un monosacárido con una estructura anular de 6 átomos.

Polisacárido.- Polímero resultante de la condensación (con pérdida de agua) de un número de azúcares monoméricos superior a 10.

Resíduo.- Una unidad azucar en un polímero.

Transformada de Fourier.- Proporciona la relación entre la distancia, λ , y la intensidad $I(\lambda)$ medida en un interferograma y la intensidad espectral deseada $I(\nu)$ a la frecuencia ν . La transformada del interferograma al espectro se lleva a cabo con miniordenador.

Unidad Angström (Å).- 10^{-10} m.

GRADO DE DOCTOR

De orden del Ilmo. Sr. Decano de la Facultad, se presentará el interesado a la lectura de su Memoria doctoral el día de a las de la

Valladolid, de de 19
El Secretario de la Facultad,

Terminada la lectura y contestadas por el alumno las objeciones formuladas por los señores Jueces del Tribunal, éste calificó dicho trabajo con la nota de *Apto "cum laude"*

Valladolid, 4 de Diciembre de 1990
El Secretario del Tribunal,

Repetición del ejercicio.— Reunido nuevamente el Tribunal y verificado el ejercicio sobre la Memorial doctoral, que versaba acerca del siguiente tema:

fue calificado con la nota de

Valladolid, de de 19
El Secretario del Tribunal,



Universidad de Valladolid

Por cuanto D.^a MARIA DEL CARMEN RAMOS SANCHEZ de 35 años de edad, natural de SALAMANCA, provincia de _____, ha obtenido en el curso de 19 91 a 19 92 previos los correspondientes ejercicios de oposición y conforme al Reglamento de estudios vigente, Premio extraordinario de Doctorado en la Facultad de MEDICINA

En virtud de lo que el mismo Reglamento dispone, y para que en todo tiempo conste la buena conducta, aplicación y aprovechamiento de este distinguido alumno, expido el presente, sellado con el de esta Universidad, en Valladolid a DOS de OCTUBRE de mil novecientos NOVENTA Y DOS

El Rector,

El Secretario General,

1 / alomuel

Registrado al fol. AS num. 474 del libro de su razón.

REAL ACADEMIA DE DOCTORES



En el Concurso del año 1991 juzgo digno del premio

Premio Juan Abello Pascual (1991)

Dr. Da. María del Carmen Ramos Sánchez

*en testimonio de lo cual y para honor y satisfacción de su autor se
expide este diploma autorizado con el sello de la Real Academia.*

Madrid, a veintinueve de Enero de 1992

El Presidente,

El Secretario,

H. Des. Rueda

Dr. Juan María

