

Transformaciones de mono y disacáridos por el ácido sulfúrico 2 N (*)

P O R

A. SOLER, G. GUZMAN Y C. PEREZ SANCHEZ

Hay muchas circunstancias en las que los monosacáridos y oligo- y polisacáridos se someten a una acción ácida (hidrólisis de almidón, inversión química de sacarosa, hidrólisis escalonada de hemicelulosas, extracción ácida de materiales pécticos, transformaciones de pentosas y hexosas en furfural y derivados, etc.). Otro tanto sucede cuando mono y polisacáridos se exponen a acciones alcalinas.

En esta comunicación damos cuenta de una serie de ensayos encaminados a estudiar el comportamiento de algunos mono, di y trisacáridos en disolución sulfúrica 2 N, a la temperatura de baño maría en el transcurso de algunas horas.

En trabajos anteriores (1), hemos podido comprobar la complejidad de las mezclas de reacción resultantes del comportamiento de estos mismos hidratos de carbono frente a disoluciones al 1 % de los hidróxidos sódico, potásico, amónico y disoluciones saturadas de los de calcio y bario, todos ellos realizados en las mismas condiciones de trabajo. Las transformaciones fueron fundamental y simultáneamente epimerizaciones, degradaciones con recombinación de fragmentos, hidrólisis y polimerizaciones.

(*) Comunicación presentada a la XII Reunión Bienal de la Real Sociedad Española de Física y Química. Salamanca, junio 1965.

(1) M. C. PÉREZ SÁNCHEZ, *Anales Univ. Murcia*, 34 (1964); A. SOLER, G. GUZMÁN y C. PÉREZ SÁNCHEZ, *Anales Real Soc. Esp. Fis. y Quím.*, 62, 157 (1966); *ib.*, 62, 737 (1966).



En medio ácido, cambia considerablemente el comportamiento de estos glúcidos y mientras tienen lugar las reacciones de epimerización y polimerización no hemos podido detectar cromatográficamente ningún compuesto que determine la aparición de degradaciones moleculares a dihidroxiacetona, gliceraldehído y metilglioxal, por lo que tampoco aparecen los compuestos de síntesis a partir de estos fragmentos como sería el caso de las heptulosas. Los cromatogramas resultan más sencillos. En todos los monosacáridos se comprueba que queda parte del glúcido sin atacar, con excepción de las cetosas, sorbosa y fructosa que desaparecen a las 96 horas de tratamiento; así como todo otro compuesto detectable cromatográficamente, mientras en di y trisacáridos la hidrólisis es completa a las 24 horas y son los eslabones de que están formados los que se transforman posteriormente y, de acuerdo a los resultados antes indicados, no llegan a desaparecer en el transcurso total del tratamiento. Se observa cierta analogía en las transformaciones sufridas por las aldohexosas y disacáridos. Igualmente ocurre con las cetosas entre sí y entre las aldopentosas. Entre di y trisacáridos no sólo es semejante el comportamiento entre ellos sino también con las aldohexosas en sus últimas transformaciones.

Simultáneamente aunque no tan extensas, se han realizado estos ensayos en disoluciones acuosas. En unos casos, el comportamiento es análogo al que tiene lugar en medio ácido; en otros aunque igual, se produce un retraso en la aparición de los compuestos de reacción que a veces se prolonga hasta las 72 horas, y en los de glucosa, sorbosa, maltosa y rafinosa los azúcares permanecen inalterados, considerándolos por tanto como los más estables.

Desde hace más de un siglo se estudian las degradaciones ácidas de los hidratos de carbono. MULDER (2) aisló en 1840 ácido fórmico y el compuesto conocido actualmente como ácido levulínico. También por la acción del sulfúrico sobre glucosa (3) aparece ácido fórmico y material polimérico coloreado. Investigadores posteriores llegan a la conclusión de que este comportamiento frente a los ácidos es común a todas las hexosas.

En 1895 al tratar los productos de hidrólisis de la inulina con ácido oxálico, obtienen una sustancia que recuerda en sus propiedades al fur-

(2) G. J. MULDER, *J. prakt. Chem.*, 21, 229 (1940) (*Advan. Carbohydrate Chem.*, 6, 84).

(3) A. VON GROTE y B. TOLLENS, *Ann.*, 206, 226 (1881) (*Advan. Carbohydrate Chem.*, 6, 84).



fural (4) y KIERMAYER (5) considera a la fructosa y sacarosa como las principales fuentes de producción de este compuesto al ser tratadas con el mismo ácido. BLANKSMA (6) confirma que se forma este compuesto a partir de hexosas por eliminación de tres moléculas de agua empezando a observar la mayor reactividad de las ceto-hexosas con relación a las aldohexosas (7). EKENSTEIN y BLANKSMA (8) son los primeros autores que señalaron que la degradación de hexosas a ácido levulínico tiene lugar previa formación de hidroximetilfurfural. E igualmente se ha llegado a la conclusión (9) de que no es necesaria la catálisis ácida para la obtención de 5-hidroximetilfurfural ya que se logra igualmente en disolución acuosa de azúcares anhidroazúcares, etc., calentándolos a 100-150° C.

Las disoluciones acuosas de glucosa se colorean cuando se calientan durante varias horas a 100° C haciendo responsable del pardeamiento al hidroximetilfurfural formado, seguido de polimerización a sustancias húmicas.

WOLFROM, SCHUET, LIEVE y CAVALIERI (10) estudian espectrofotométricamente el paso de D-glucosa a 5-hidroximetilfurfural a través de una serie de compuestos ya enunciados por WOLFROM, WALLACE y METCALF (11) y comprobados por ellos.

El paso de fructosa a las correspondientes aldosas epímeras (12) fue estudiado en presencia de varios ácidos orgánicos, lográndose separar e identificar glucosa, fructosa y manosa polarográficamente y cromatográficamente. La glucosa se epimeriza en condiciones similares. El hecho de que el compuesto intermedio en estas reacciones similares sea el mismo enodiol justifica la aparición del hidroximetilfurfural en el tratamiento de ambos azúcares.

Para RICE y FISHBEIN (13) en el tratamiento de las pentosas, con disolución de ácido sulfúrico a varias concentraciones, tiempos de trata-

(4) G. DÜEL, Chem. Ztg., 19, 166, 216 (1895) (Advan. Carbohydrate Chem., 6, 84).

(5) J. KIERMAYER, Chem., Ztg., 19, 1.003 (1895) (Advan. Carbohydrate Chem., 6, 84).

(6) W. ALBERDA VAN EKENSTEIN y J. J. BLANKSMA, Chem. Weekblad, 6, 717 (1909) (Advan. Carbohydrate Chem., 6, 85).

(7) W. N. HAWORTH y W. G. M. JONES, J. Chem. Soc., 667 (1944).

(8) W. ALBERDA VAN EKENSTEIN y J. J. BLANKSMA, Chem. Weekblad, 7, 387 (1910) (Advan. Carbohydrate Chem., 6, 85).

(9) R. MONTGOMERY y J. F. WIGGINS, J. Soc. Chem. Ind. London, 66, 31 (1947); C. TANAKA, Mem. Coll. Sci., Kyoto Ymp. Univ. (A), 13, 265 (1930) (Advan. Carbohydrate Chem., 6, 86).

(10) M. L. WOLFROM, R. D. SCHUET y LIEBE F. CAVALIERI, J. Am. Chem. Soc., 70, 515 (1948).

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

(12) F. PETUELY (UNIV. GRAZ, AUSTRIA), Monatsh. 84, 298 (1953) (C. A. (1954) 4447 e).

(13) F. A. H. RICE y LAWRENCE FISHBEIN, J. Am. Chem. Soc., 78, 1505 (1956).



miento y temperatura, se obtienen los mismos espectros en el ultravioleta, para el furfural y otras sustancias también solubles en éter tales como acetaldehído, formaldehído y crotonaldehído.

Los mismos autores (14) obtuvieron para las hexosas reductoras bajo las mismas condiciones espectros de absorción semejantes. Sin embargo, la velocidad a que el espectro se desarrolla era característico de cada hexosa individual. Los compuestos reconocidos, solubles en éter, fueron acetaldehído, propionaldehído, formaldehído y 5-hidroximetil-2-furfural.

ANET (15) recoge una serie de mecanismos propuestos a lo largo de un siglo para explicar por diferentes caminos las transformaciones de hexosas y pentosas a 5-hidroximetilfurfural y furfural, respectivamente, en medios alcalinos y ácidos.

En un trabajo de FETZER y colaboradores (16) encontramos una discusión interesante sobre el efecto de la concentración de ácido y de la temperatura sobre la glucosa y polímeros de ésta, destacando el efecto preponderante de la concentración del sustrato, ante todo en los fenómenos de reversión en los que obtienen maltosa y gentiobiosa así como otros oligosacáridos.

MENDICK (17) estudió el comportamiento de la glucosa y almidón frente a catalizadores ácidos y básicos proponiendo un camino para la transformación de glucosa a fructosa seguida de deshidratación, y cambiando las condiciones de reacción con ánimo de conseguir mayores rendimientos de 5-hidroximetil-2-furaldehído que posteriormente conduce a ácidos levulínico, fórmico y sustancias húmicas.

Nuestros resultados concuerdan en parte con los recogidos en estas publicaciones; en efecto, tienen lugar reacciones de epimerización a través de compuestos enodiólicos, demostrado por la presencia simultánea de las aldosas epímeras y la cetosa común a ambas en los cromatogramas correspondientes a manosa, glucosa y fructosa.

La mayor parte de los investigadores dedican sus esfuerzos a demostrar la presencia de 5-hidroximetil-2-furfural y 2-furfural a través de una serie de compuestos y por diferentes mecanismos de reacción, compuestos que se forman, y nosotros no detectamos porque avanzan con el frente del disolvente y, para lograr separar los demás componentes de la mezcla de reacción, hemos de desarrollar el cromatograma durante tiempos prolongados y por tanto quedan fuera de nuestro reconocimiento. Por otra parte, también tienen lugar las reacciones de pardeamiento probable-

(14) F. A. H. RICE y LAWRENCE FISHBEIM, *J. Am. Chem. Soc.*, **78**, 3731 (1956).

(15) E. F. L. J. ANET, *Advan. Carbohydrate Chem.*, **19**, 181 (1964).

(16) W. R. FETZER, E. K. CROSBY, C. E. ENGEL y L. C. KIRST, *Ind. Eng. Chem.*, **49**, 1.075 (1953).

(17) M. C. MEDNICK, *J. Org. Chem.*, **27**, 398 (1962).



mente debidas a la polimerización de furfural, y que quedan en origen en el transcurso del desarrollo cromatográfico.

Sin embargo, hay pocas referencias concretas y a veces entre sí contradictorias, respecto a la formación de una serie de compuestos que también se forman y que constituyen fundamentalmente dos grupos, uno el de polímeros de aldosas y otro el de un grupo de polímeros de cetosas que cromatográficamente permanecen superpuestas o intercaladas entre las anteriores y que sólo pueden ser detectadas por medio de reveladores específicos y muy sensibles a la estructura cetosa. Este avance simultáneo, aun en tiempos de desarrollo cromatográfico prolongado, hace casi imposible el aislamiento por métodos cromatográficos de los distintos componentes. Hemos prescindido de momento de su aislamiento.

PARTE EXPERIMENTAL

Estudiamos los mono di y trisacáridos: glucosa, galactosa, manosa, xilosa, arabinosa, ribosa, sorbosa, fructosa, lactosa, maltosa, celobiosa, sacarosa y rafinosa.

Porciones de un gramo de cada azúcar, en 10 ml de disolución de sulfúrico 2 N, se introducen en tubos de ensayo provistos de refrigerante de aire. Se mantiene durante 24, 48, 72 y 96 horas a baño de maría en atmósfera normal. Transcurrido los correspondientes tiempos de tratamiento se enfrían los tubos en baño de agua, a continuación se neutraliza el ácido con hidróxido bórico, se separa el precipitado y la disolución se pasa por columnas de Amberlitas IR-400 e IR-4B.

Se desarrollan 5 cromatogramas para cada uno de los ensayos, en el disolvente butanol-ácido acético-agua (4, 1, 5, fase superior). El tiempo de desarrollo varía desde 4 a 48 horas acorde con la temperatura ambiente, por no tener las cámaras cromatográficas termoestabilizadas.

Cada cromatograma se revela con cada uno de los reactivos: fitalato ácido de anilina (18), orcina-ClH (19), orcina-ácido tricloroacético (20), resorcina-ClH (21), antrona (22).

Se identificaron los distintos componentes de la mezcla de reacción atendiendo a las reacciones de color con estos reactivos, movilidad res-

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

(19) J. HOUGH, J. K. N. JONES y W. H. WADMAN, *J. Chem. Soc.*, 1,702 (1950).

(20) R. KLEVSTRAND y A. NORDAL, *Acta Chem. Scand.*, 4, 1,320 (1950), F. LEDERER y M. LEDERER, *Chromatography*, Ed. Elsevier, Amsterdam, 1953.

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

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

pecto a una sustancia tipo, para polímeros se recurrió a la representación en papel semilogarítmico de la función R_m frente a grado de polimerización, y naturalmente comparación con muestras tipo con todos aquellos compuestos de que disponemos o nos es posible aislar de productos naturales que los contienen (la heptulosa se extrajo de la planta «Sedum spectabile» y la gentiobiosa de la raíz de genciana).

Comportamiento de las aldosas frente al SO_3H_2 2 N

Glucosa.—Desde las 24 a las 96 horas el comportamiento es similar. Quedan restos de glucosa, y se han formado manosa y fructosa y otras tres manchas de R_f fructosa 0,14, 0,29 y 0,54. La primera se corresponde con una glucotriosa, la segunda, de color pardo rojiza, no se identifica ni con maltosa ni con celobiosa, correspondiéndose con la gentiobiosa de un extracto de genciana y, la tercera es otro disacárido no identificado. Todas ellas reveladas con el ftalato ácido de anilina. Con orcina-clorhídrico y antrona detectamos otros tres polímeros de R_f 0,31, 0,59 y 0,70 que juntamente con fructosa dan la reacción de cetosas y que corresponde a los polímeros de grado 4, 3 y 2 respectivamente, se trata por tanto de las mismas polifructosanas obtenidas por hidrólisis de inulina.

Manosa.—Queda también manosa inalterada después de las 96 horas de tratamiento y desde las 24 se observan glucosa y fructosa, las tres manchas de R_f 0,14, 0,29 y 0,54, y con antrona y orcina-clorhídrico se comprueba la presencia de fructosa y la de R_f 0,31 o tetrafructosa.

Galactosa.—Aparecen los polímeros de grado 2 y 3 junto a galactosa residual, al revelar con ftalato ácido de anilina. En los cromatogramas revelados con orcina-clorhídrico, destacan 4 manchas de R_f 0,17, 0,42, 0,66 y 0,85 que cumplen las condiciones necesarias para ser polímeros de tagatosa.

Arabinosa.—Desde las 24 horas hasta las 96 el comportamiento es análogo. Con el ftalato ácido de anilina 3 manchas rojas, una de ellas corresponde a la arabinosa que queda sin reaccionar y las otras dos de R_{f1} 0,20 y 0,38. Calculadas las funciones R_m y representadas en papel semilogarítmico corresponden a los polímeros de grado 2 y 3 de arabinosa. Estas manchas dan color azul-violeta, que pasa a azul permanente, con orcina-clorhídrico. Los cromatogramas no acusan la presencia de ceto-hexosas ni aldohexosas. Con el reactivo resorcina clorhídrico tampoco se detecta la presencia de cetopentosas.

Xilosa.—El comportamiento de la xilosa es análogo al de arabinosa, con ftalato ácido de anilina, todas las manchas cromatográficas dan reac-

ción roja de pentosas; con orcina-clorhídrico dan color azul-violeta. No hay reacción de aldohexosas ni de cetopentosas ó cetoaldosas. Durante todos los períodos de tratamiento el comportamiento es semejante y al cabo de 96 horas queda parte de la xilosa sin atacar.

Las manchas correspondientes a estos cromatogramas son polímeros de la xilosa de grados 2, 3 y 4 ó xilobiosa, xilotriosa y xilotetrosa.

La resorcina-clorhídrico da color azul con las aldopentosas, y no con las correspondientes cetopentosas como era de esperar.

Ribosa.—Con ftalato ácido de anilina reacción roja de tres manchas que se corresponden con un resto de ribosa no alterada y dos polímeros de R_{rib} 0,22 y 0,40 ribobiosa y ribotriosa. Las mismas manchas dan reacción azul-violeta con orcina-clorhídrico.

Comportamiento del ácido sulfúrico 2 N frente a cetosas

Fructosa.—A las 96 horas desaparecen totalmente a la sensibilidad cromatográfica todo compuesto, incluida la fructosa. Mientras para los otros tres períodos de tratamiento son análogos los resultados. Detectamos las dos aldohexosas epímeras correspondientes a fructosa, y además sacarosa. Tanto con antrona como con orcina-clorhídrico no se obtiene más producto reaccionable que la fructosa y sacarosa.

Sorbosa.—Lo mismo que en la fructosa, en los cromatogramas correspondientes al tratamiento sulfúrico de 96 horas no se revela la presencia de ningún compuesto por los métodos cromatográficos. Para los otros tres períodos de tratamiento sorbosa y otras dos manchas en la zona de los polímeros con R_f 0,12, 0,26, todas dan reacción de cetosas con la orcina-clorhídrico y amarillento con ftalato ácido de anilina.

Comportamiento del ácido sulfúrico 2 N frente a di y trisacáridos

Lactosa.—Con ftalato ácido de anilina se detectan 4 manchas en los cuatro tiempos de tratamiento, una elongada que corresponde a glucosa más galactosa, como producto de hidrólisis de lactosa, y 3 en la zona de polímeros, dos de ellas de color pardo que se corresponde con la gluco-triosa y glucobiosa encontradas en los cromatogramas correspondientes de glucosa. La tercera pardo-rojiza corresponde a la gentiobiosa, se encuentra a la misma altura aproximadamente que la lactosa, su color por tanto enmascara cualquier posible resto de lactosa que da reacción amarilla, aunque suponemos que en estas condiciones de trabajo la hidrólisis de lactosa es total. Con orcina-clorhídrico detectamos tres cetosas,

compuestos que se corresponden con los encontrados en las disoluciones de glucosa y que son los polímeros de grado 2 y 3 de fructosa más ésta.

Maltosa.—Desde las 24 a las 96 horas los resultados obtenidos son análogos, la hidrólisis de maltosa es total. En el lugar que debía ocupar ésta aparece de nuevo la mancha, rojiza con ftalato-ácido de anilina, de R_f 0.29, de gentiobiosa, que nos impide comprobar cualquier pequeño resto de maltosa, aunque consideramos que en medio sulfúrico y en tratamiento tan prolongado se ha hidrolizado toda la maltosa. Como era de esperar aparecen glucosa y fructosa y los dos oligosacáridos correspondientes a glucotriosa y glucobiosa. Con antrona y orcina-clorhídrico, fructosa, fructobiosa y fructotriosa.

Celobiosa.—Desde 24 a 96 horas con ftalato ácido de anilina comprobamos la presencia de: fructosa, glucosa, glucobiosa, gentiobiosa y glucotriosa. Con antrona y orcina-clorhídrico fructosa, fructobiosa y fructotriosa.

Sacarosa.—Hidrólisis total a glucosa y fructosa desde las 24 horas, glucobiosa, gentiobiosa y glucotriosa así como fructobiosa y fructotriosa.

Rafinosa.—A las 24 horas de tratamiento en los cromatogramas revelados con ftalato ácido de anilina comprobamos la presencia de restos de rafinosa, melibiosa y fructosa correspondientes a la primera fase de la hidrólisis, galactosa y glucosa. Cuadro que se mantiene a las 48 horas. A partir de las 72 desaparecen rafinosa y melibiosa y no quedan restos de ningún glúcido ni fragmento a las 96 horas.