

Director: R. GARCIA-VILLANOVA

ESTUDIO ESPECTROFOTOMETRICO
Y ESPECTROFLUOROMETRICO DE LA REACCION DE
AZUCARES CON EL ACIDO CROMOTROPICO EN MEDIO
SULFURICO. II.— COMPORTAMIENTO DE LAS
METIL-PENTOSAS”

Por R. GARCIA-VILLANOVA y O. LORENTE

RESUMEN

Se hace un estudio de la reacción de la sal sódica del ácido cromotrópico en medio sulfúrico con el metil-furfurol originado por la ramnosa y la fucosa al ser tratados estos dos azúcares con el ácido sulfúrico. La gráfica espectral de ambos productos de condensación permite la identificación y diferenciación de estas dos 6-deoxi-hesosas, por presentar a todas las concentraciones ensayadas un máximo a 460 nm. superior al originado a 260 nm en el caso de la ramnosa, mientras que el máximo a 460 nm que origina la fucosa es siempre de menor altura que el de 260 nm. Se da la interpretación de acuerdo con los resultados experimentales.

Se han determinado los coeficientes de extinción y las constantes de equilibrio aparentes.

También se ha hecho un estudio espectrofluorométrico de la reacción.

SUMMARY

A study is made of the reaction of the sodium salt of chromotropic acid in a sulphuric acid medium with methylfurfural produced by rhamnose and fucose when these two sugars are treated with sulphuric acid. The spectral graph of both products of condensation allows the identification and differentiation of these two 6-deoxy-hesoses, due to their showing at all the concentrations tested a maximum to 460 nm higher than that originated at 260 nm in the case of rhamnose, while the maximum at 460 nm wh is always less than that of 260 nm. The interpretation has been made in accordance with the experimental results.

The extinction coefficients and the equilibrium conditional constants has been determined.

A spectrofluometric study is made of the reaction also.

INTRODUCCION

La reacción de oligosacáridos con el ácido cromotrópico en medio sulfúrico ha sido estudiada por R. GARCIA-VILLANOVA y col. (1) y (2). La determinación del formaldehído y 1,2 glicoles ha sido motivo de estudio por AFANAS'EV y col. (3), así como la determinación del formaldehído en el aire por ORLOVSKAYA y col. (4).

TAKASHI MITSUI y col. (5) han dado a conocer el comportamiento de la acroleína, metaacroleína, etilacroleína, propaldehído, etc., en medio acuoso con ácido cromotrópico y sulfúrico que originan reacciones coloreadas.

De manera similar SAWICKI y col. (6) hacen un estudio comparativo de las reacciones antes descritas en las cuales el ácido cromotrópico es sustituido por el ácido 7-amino-4-hidronaftalin-2-sulfónico y por el ácido 7-anilin-4-hidroxinaftalin-2-sulfónico.

La determinación de manitol en sangre se debe a TOMPSETT y col. (7) y PAVLOVA (8), los cuales condensan el formaldehído liberado por oxidación peryódica con el ácido cromotrópico seguida de la lectura espectrofotométrica del producto de condensación.

Un procedimiento similar emplean CLEIN y col. (9), los cuales separan el formaldehído del furfurool procedente de hesosas, el cual se condensa con ácido cromotrópico y se mide posteriormente la absorbancia.

La espectrofluorimetría de hidratos de carbono y derivados ha servido para la identificación de los mismos por su reacción con la ortofenilenodiamina que origina formas estables fluorescentes, según TOWNE y col. (10) que han logrado microdeterminaciones de azúcar por estos métodos.

Estudios relacionados con el tema anterior han sido realizados por VECEREK y col. (11) y NATESAN y col. (12).

PARTE EXPERIMENTAL

Material.—

- Espectrofotómetro VU Hitachi-Perkin Elmer, mod. 124 con registro gráfico de igual marca, mod. 165,
- Espectrofluorómetro Hitachi-Perkin Elmer, mod. 204 con registro de la misma marca, mod. 165.

Reactivos.—

- α -L(-) Fucosa, marca Sigma
 α -L Ramnosa, marca Sigma
5-Hidroxi-metil-2-furfurol, marca Fluka
Sal disódica del ácido cromotrópico, marca Merck
Acido sulfúrico (95-97%), marca Merck

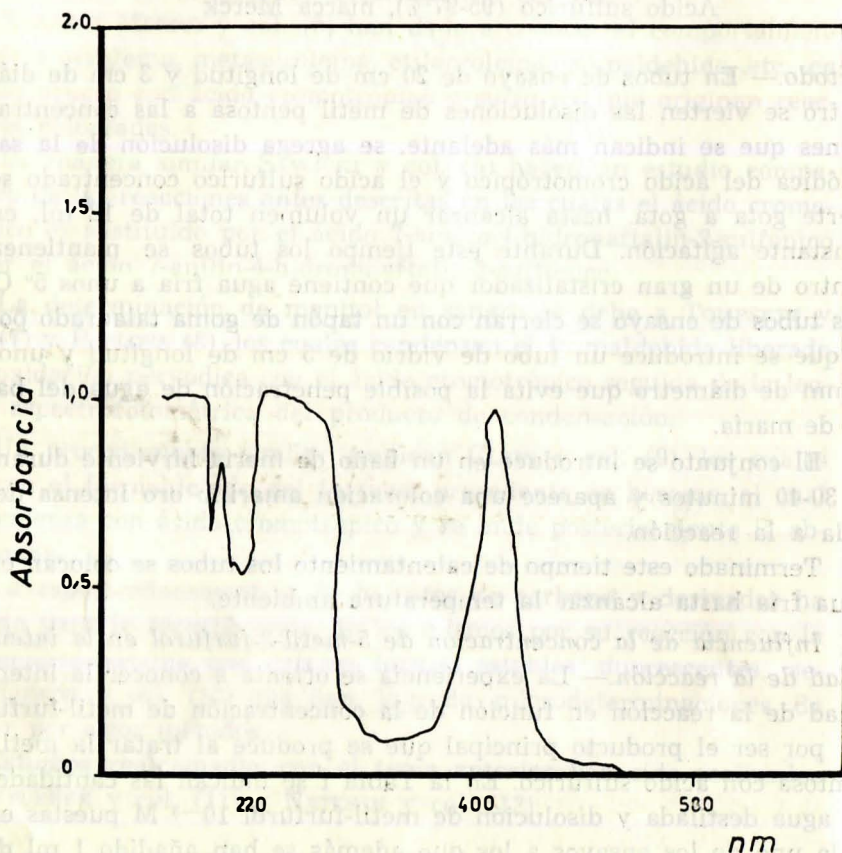
Método.— En tubos de ensayo de 20 cm de longitud y 3 cm de diámetro se vierten las disoluciones de metil pentosa a las concentraciones que se indican más adelante, se agrega disolución de la sal disódica del ácido cromotrópico y el ácido sulfúrico concentrado se vierte gota a gota, hasta alcanzar un volumen total de 12 ml, en constante agitación. Durante este tiempo los tubos se mantienen dentro de un gran cristizador que contiene agua fría a unos 5° C. Los tubos de ensayo se cierran con un tapón de goma taladrado por el que se introduce un tubo de vidrio de 5 cm de longitud y unos 3 mm de diámetro que evita la posible penetración de agua del baño de maría.

El conjunto se introduce en un baño de maría hirviente durante 30-40 minutos y aparece una coloración amarillo oro intensa debida a la reacción.

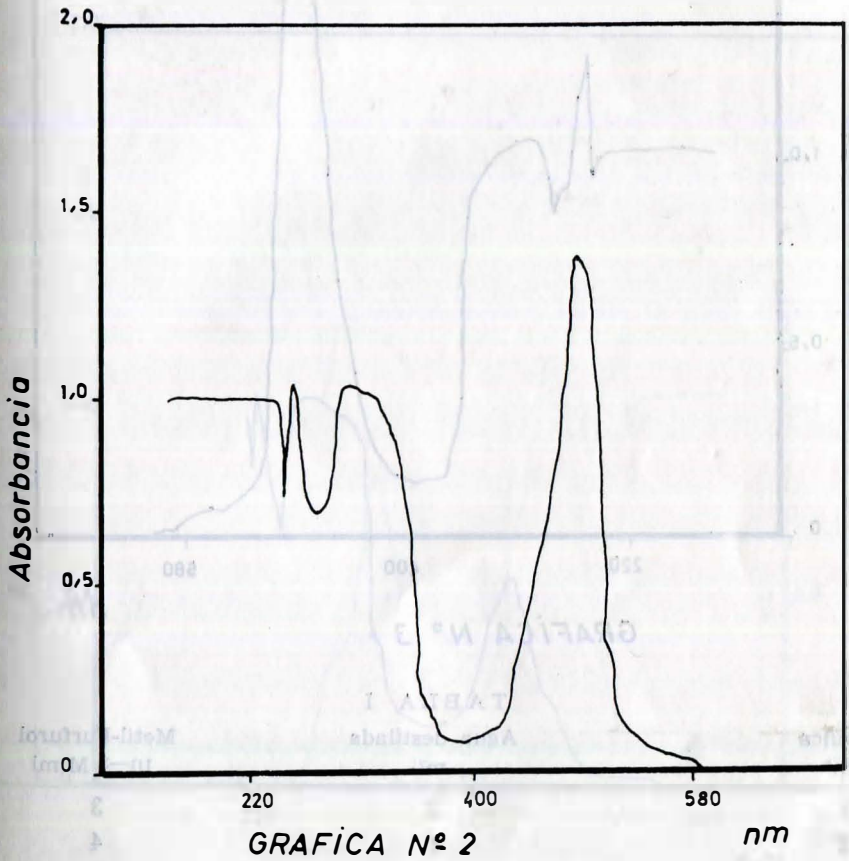
Terminado este tiempo de calentamiento los tubos se colocan en agua fría hasta alcanzar la temperatura ambiente.

Influencia de la concentración de 5-metil-2-furfurol en la intensidad de la reacción.— La experiencia se orienta a conocer la intensidad de la reacción en función de la concentración de metil-furfurol por ser el producto principal que se produce al tratar la metil-pentosa con ácido sulfúrico. En la Tabla I se indican las cantidades de agua destilada y disolución de metil-furfurol 10^{-3} M puestas en cada uno de los ensayos a los que además se han añadido 1 ml de disolución de sal disódica del ácido cromotrópico $2,15 \cdot 10^{-2}$ M y 6 ml de ácido sulfúrico concentrado. Al mismo tiempo se ha preparado un ensayo en blanco de manera idéntica en donde se ha sustituido el volumen de disolución de metil furfurol por otro igual de agua destilada.

Las gráficas 1, 2 y 3 correspondientes a los ensayos de la Tabla I representan los espectros de absorción visible ultravioleta del metil-furfurol en esta reacción.



GRAFICA Nº 1



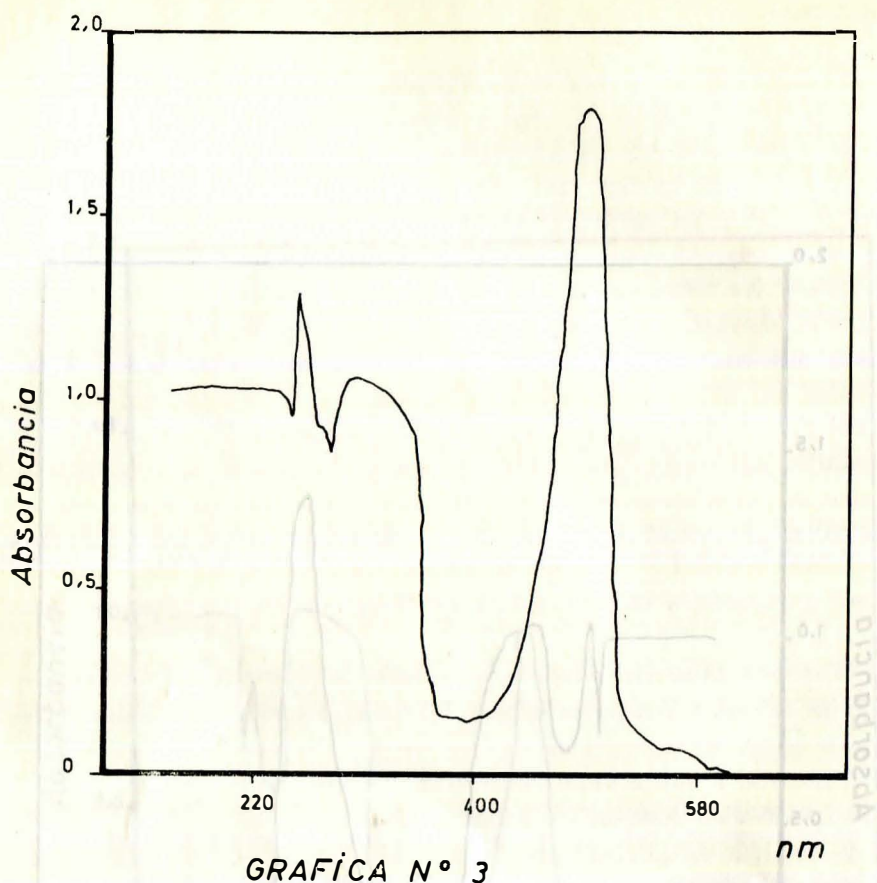
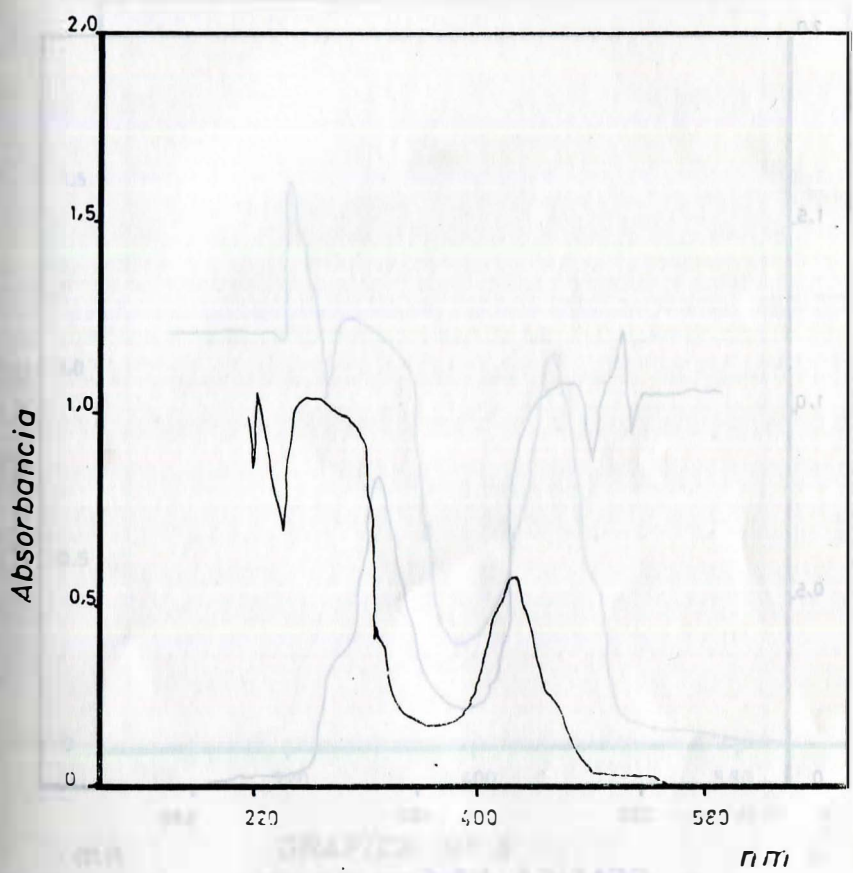
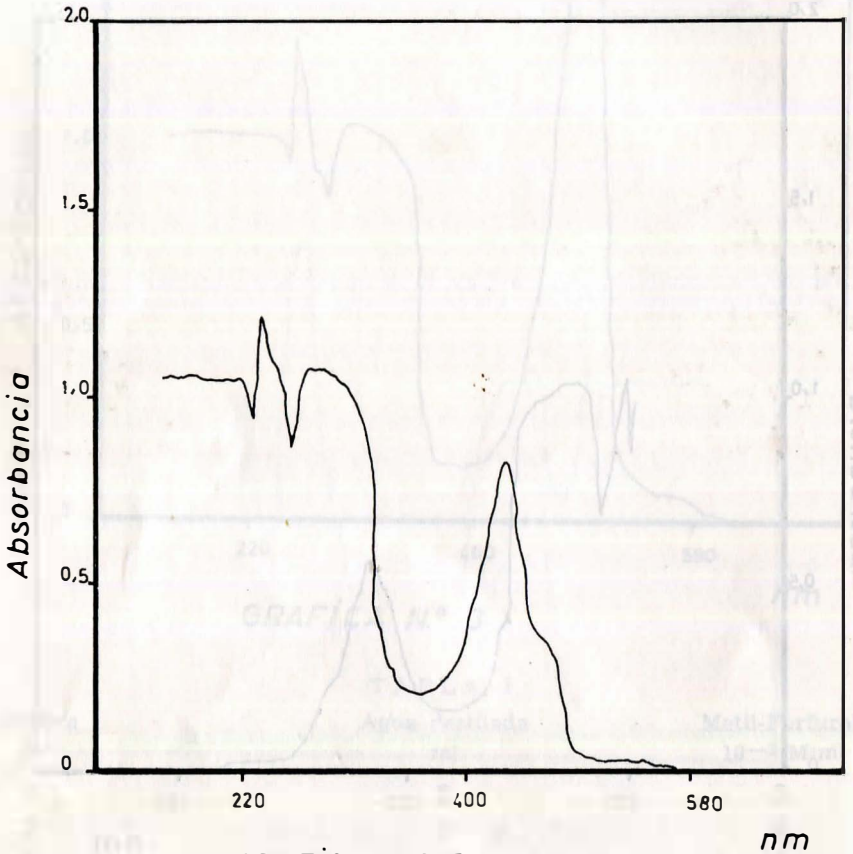


TABLA I

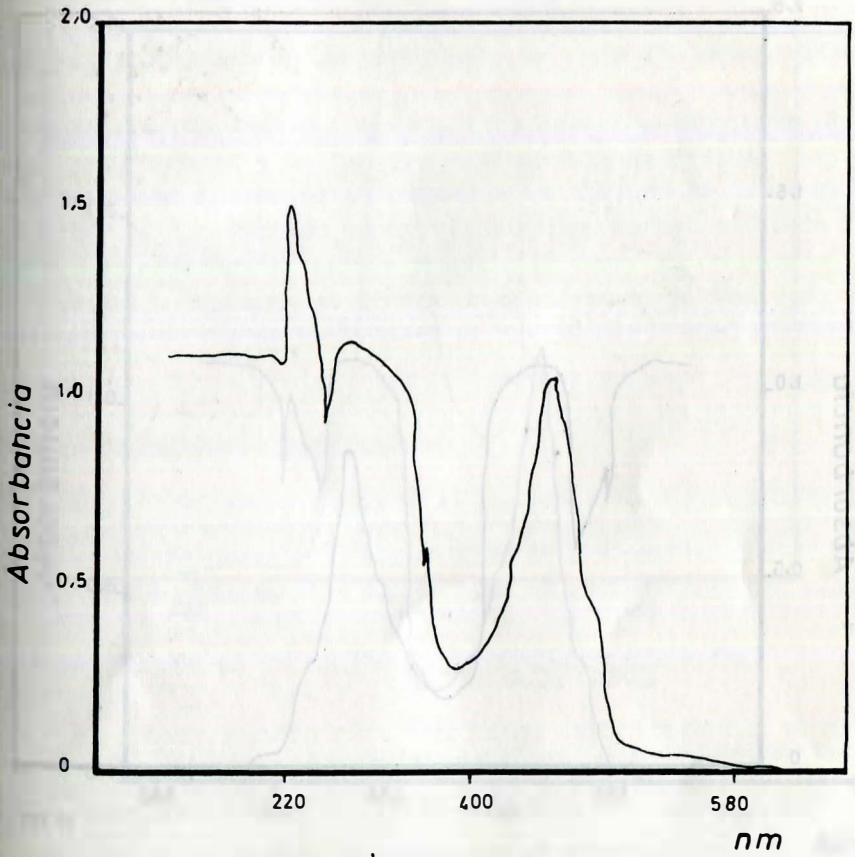
Gráfica N.º	Agua destilada ml	Metil-Furfuroil 10-3 M ml
1	2	3
2	1	4
3	—	5

Influencia de la concentración de metil-pentosa en la intensidad de la reacción.—Operando como se indica en el apartado anterior sustituyendo la disolución de metil-furfuroil por otra de Fucosa de igual concentración molar, se han obtenido los espectros de absorción VU a las concentraciones que se indican en la Tabla II. Las gráficas 4, 5 y 6 corresponden a la Fucosa y la 7, 8 y 9 a la Ramnosa.

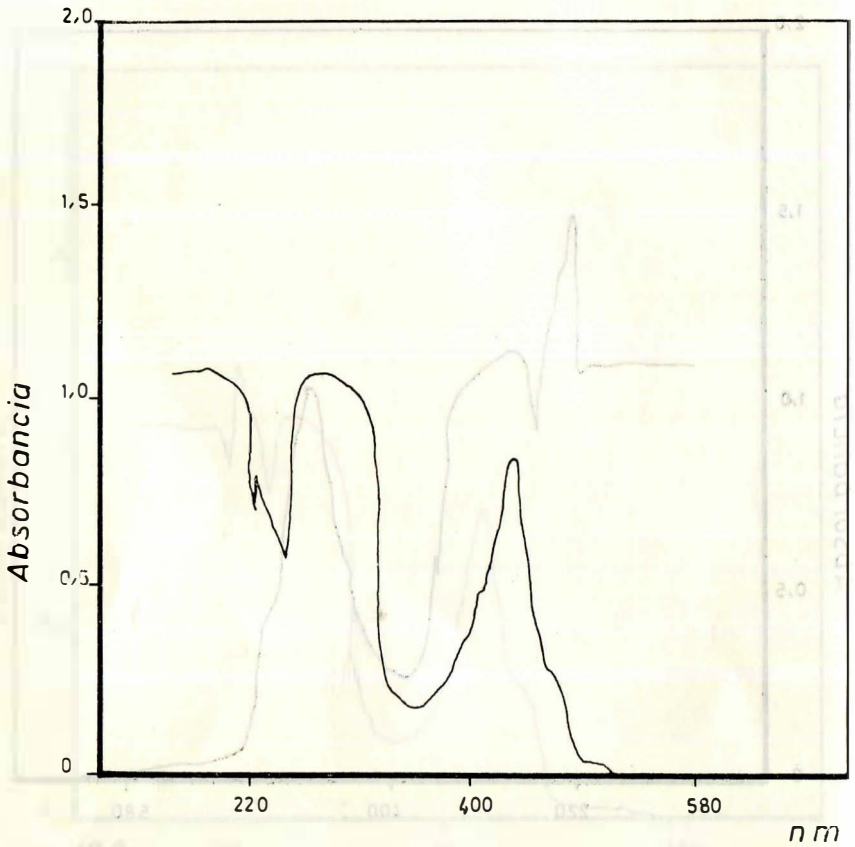




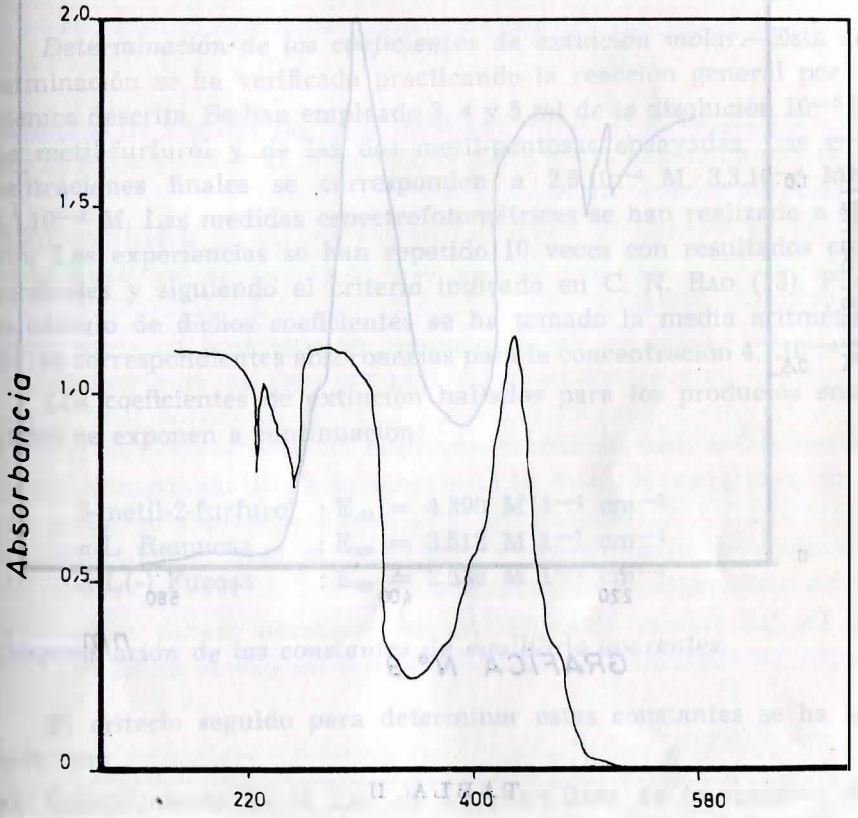
GRAFICA Nº 5



GRAFICA Nº 6



GRAFICA N° 7



GRAFICA Nº 8

nm

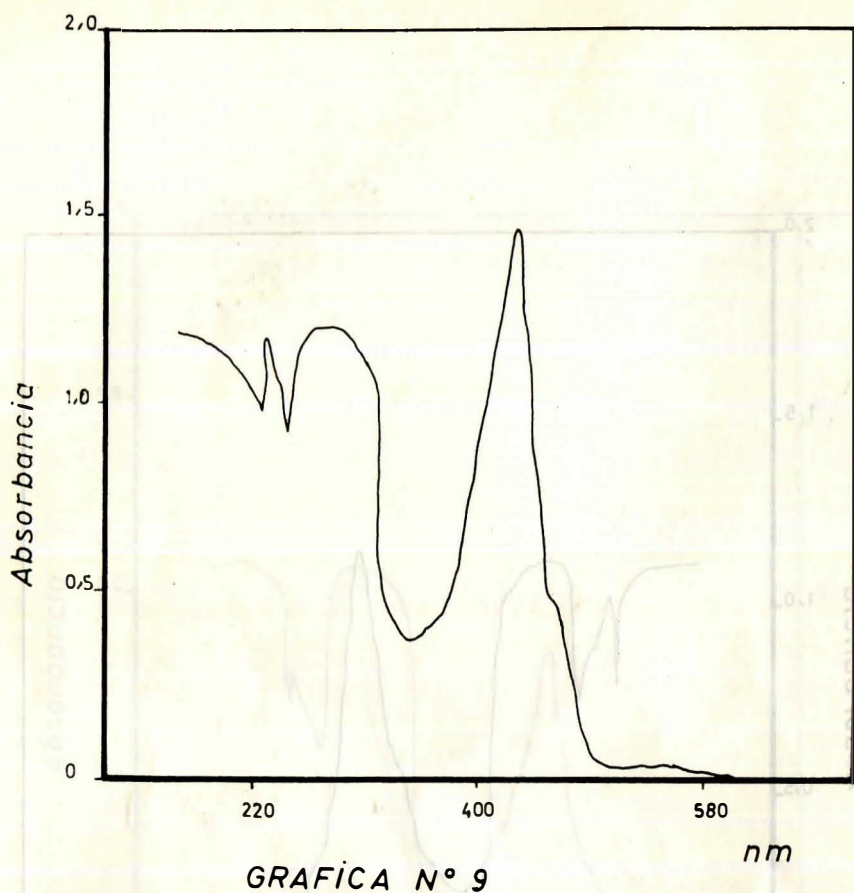


TABLA II

Gráfica N.º	Agua destilada ml	α -L(-) Fucosa ml
4	2	3
5	1	4
6	—	5

TABLA III

Gráfica N.º	Agua destilada ml	α -L Ramnosa ml
7	2	3
8	1	4
9	—	5

Determinación de los coeficientes de extinción molar.—Esta determinación se ha verificado practicando la reacción general por la técnica descrita. Se han empleado 3, 4 y 5 ml de la disolución 10^{-3} M de metil-furfurol y concentraciones finales se corresponden a $2,5 \cdot 10^{-4}$ M, $3,3 \cdot 10^{-4}$ M y $4,1 \cdot 10^{-4}$ M. Las medidas espectrofotométricas se han realizado a 460 nm. Las experiencias se han repetido 10 veces con resultados concordantes y siguiendo el criterio indicado en C. N. RAO (13). Para el cálculo de dichos coeficientes se ha tomado la media aritmética de las correspondientes absorbancias para la concentración 4,1

Los coeficientes de extinción hallados para los productos ensayados se exponen a continuación:

$$5\text{-metil-2-furfurol} : E_{460} = 4.390 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$$

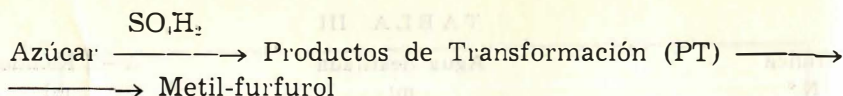
$$\alpha\text{-L Ramnosa} : E_{460} = 3.512 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$$

$$\alpha\text{-L(-) Fucosa} : E_{460} = 2.536 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$$

Determinación de las constantes de equilibrio aparentes.

El criterio seguido para determinar estas constantes se ha basado en:

- Cumplimiento de la Ley de Lambert-Beer de la reacción del metil-furfurol con la sal disódica del ácido cromotrópico en medio sulfúrico.
- Deducción de la concentración de metil-furfurol encontrado en los productos de transformación de las correspondientes metil-pentosas, partiendo de las medidas de absorbancia de la reacción anterior a las concentraciones equivalentes, y
- Deducción de las constantes de equilibrio aparente de acuerdo con la siguiente reacción:



Por consiguiente, la constante de equilibrio aparente puede formularse:

$$\frac{[\text{Metil-Furfurol}]}{[\text{PT}]} = K'$$

Para lograr la cursa del metil-furfurol que aparece en la gráfica 10 se han empleado 3, 4 y 5 ml de disolución 10^{-3} M de acuerdo con la reacción ya descrita.

Se ha tomado la media aritmética de las 10 determinaciones concordantes y que han servido para el cálculo de los coeficientes de extinción molar.

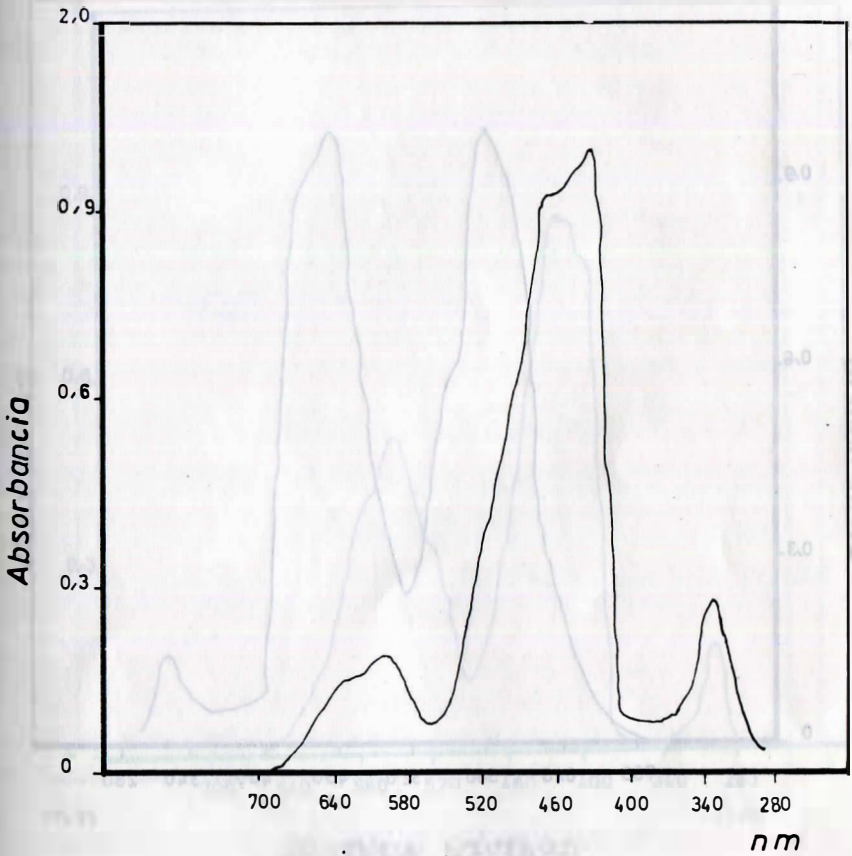
La determinación de la constante de equilibrio aparente se ha practicado para el óptimo de la reacción de las correspondientes metil-pentosas y que corresponde a 5 ml de disolución 10^{-3} M. La concentración final de azúcar empleada, una vez practicada la reacción, resulta ser $4,1 \cdot 10^{-4}$ M. Los valores de la absorbancia igualmente son los correspondientes a la media aritmética de las 10 determinaciones concordantes y que sirvieron para la determinación de los coeficientes de extinción molar.

De los valores obtenidos por interpolación gráfica se han deducido las constantes de equilibrio aparentes que se indican:

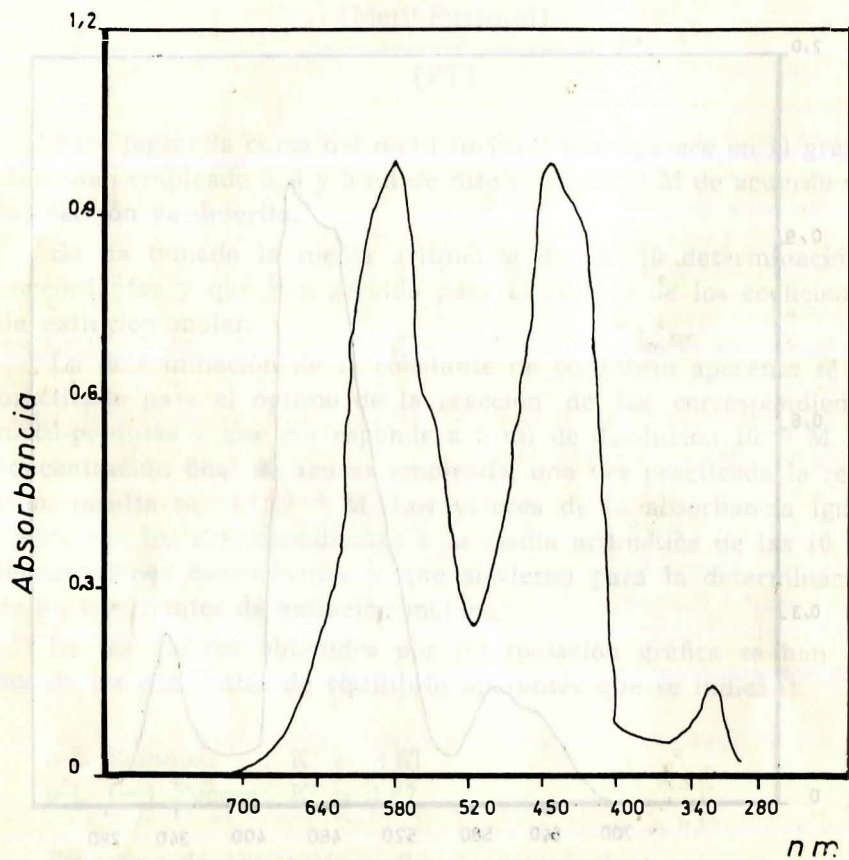
$$\alpha\text{-L Ramnosa} : K' = 4,63$$

$$\alpha\text{-L (—) Fucosa} : K' = 1,67$$

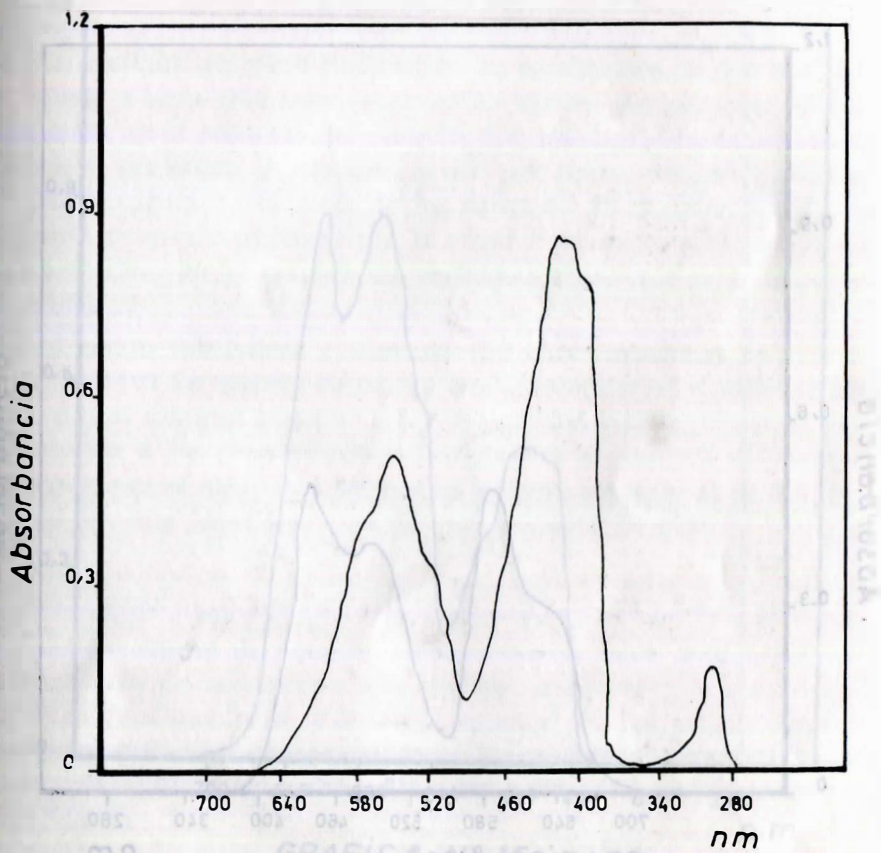
Espectros de excitación y fluorescencia.—En la reacción practicada como se indica en el método se han realizado los espectros de excitación y fluorescencia de las correspondientes metil-pentosas, así como del furfurol. Las gráficas corresponden a las concentraciones $4,1 \cdot 10^{-4}$ M. Las gráficas 11, 12 y 13 representan a los espectros de excitación del metil-furfurol, fucosa y ramnosa, respectivamente, y las gráficas 14, 15 y 16 corresponden a los espectros de fluorescencia y en el mismo orden.



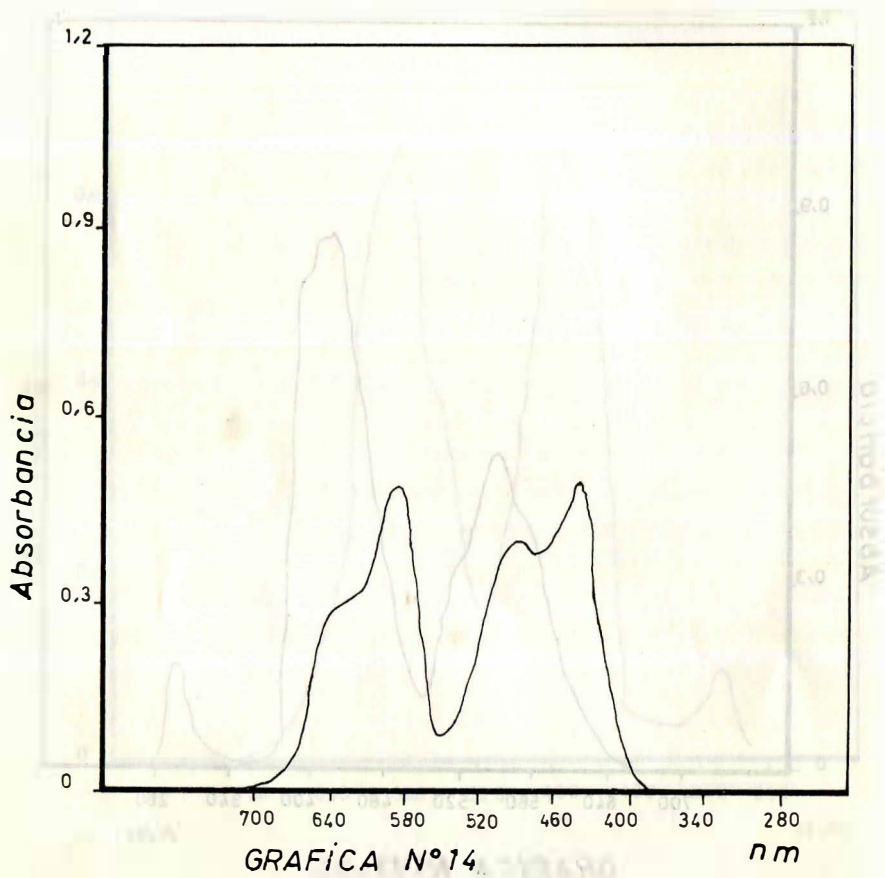
GRAFICA N° 11

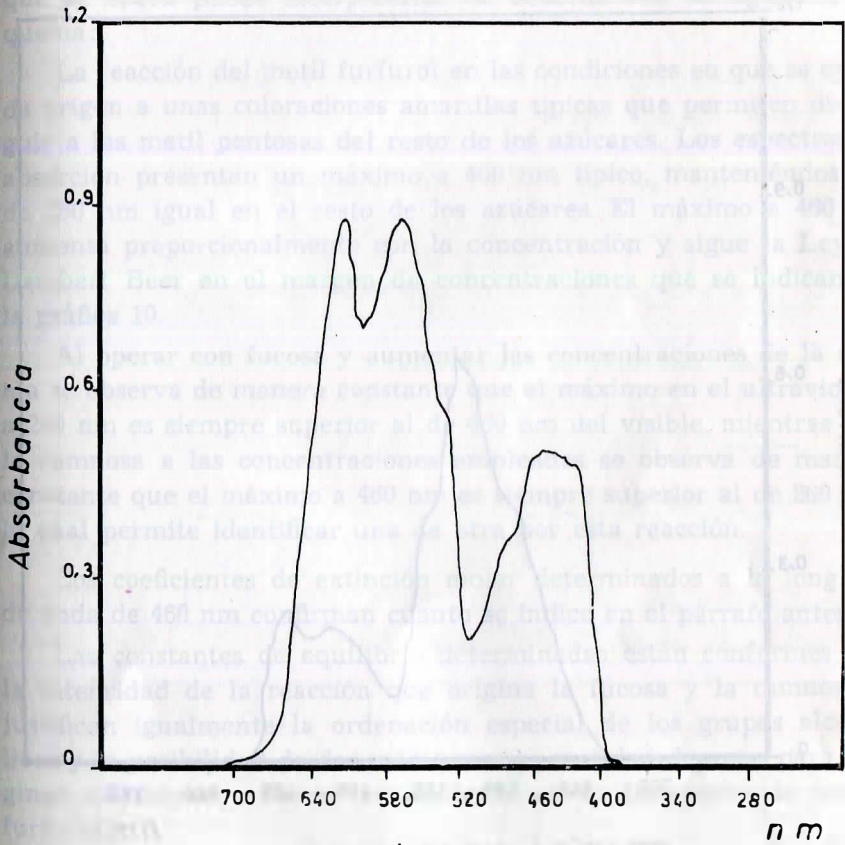


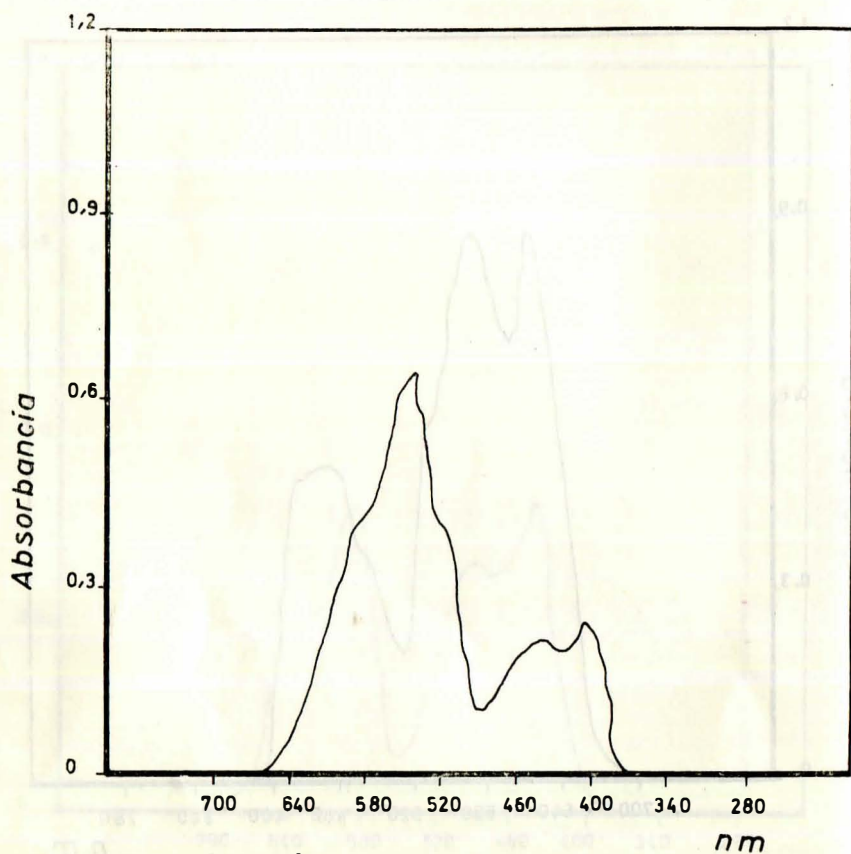
GRAFICA Nº 12



GRAFICA Nº 13



GRAFICA N^o 15



GRAFICA N° 16

DISCUSION DE LOS RESULTADÓS

La reacción de las 6-deoxihesosas con el ácido cromotrópico en medio sulfúrico obedece a la combinación de estas dos últimas sustancias con el metil furfurool resultante de la transformación de dichos azúcares. El mecanismo de la reacción en las condiciones en que se opera puede interpretarse de acuerdo con el siguiente esquema:

La reacción del metil furfurool en las condiciones en que se opera da origen a unas coloraciones amarillas típicas que permiten distinguir a las metil pentosas del resto de los azúcares. Los espectros de absorción presentan un máximo a 400 nm típico, manteniéndose el de 260 nm igual en el resto de los azúcares. El máximo a 460 nm aumenta proporcionalmente con la concentración y sigue la Ley de Lambert Beer en el margen de concentraciones que se indican en la gráfica 10.

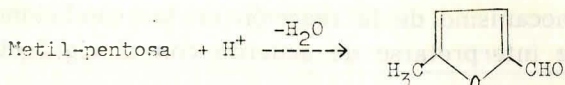
Al operar con fucosa y aumentar las concentraciones de la misma se observa de manera constante que el máximo en el ultravioleta a 260 nm es siempre superior al de 460 nm del visible, mientras que la ramnosa a las concentraciones empleadas se observa de manera constante que el máximo a 460 nm es siempre superior al de 260 nm, lo cual permite identificar una de otra por esta reacción.

Los coeficientes de extinción molar determinados a la longitud de onda de 460 nm confirman cuanto se indica en el párrafo anterior.

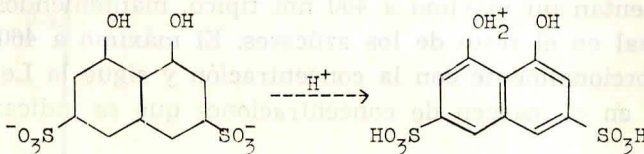
Las constantes de equilibrio determinadas están conformes con la intensidad de la reacción que origina la fucosa y la ramnosa y justifican igualmente la ordenación especial de los grupos alcohólicos y la posibilidad de dar más o menos cantidad de agua para originar un mayor o menor rendimiento en la formación de metil-furfurool.

Los espectros de excitación presentan unos máximos intensos a 400 y 520 nm, pero en la ramnosa el de 400 nm es siempre de mayor altura que el de 520 nm, lo que también permite distinguir ambas metil pentosas por su espectro de excitación.

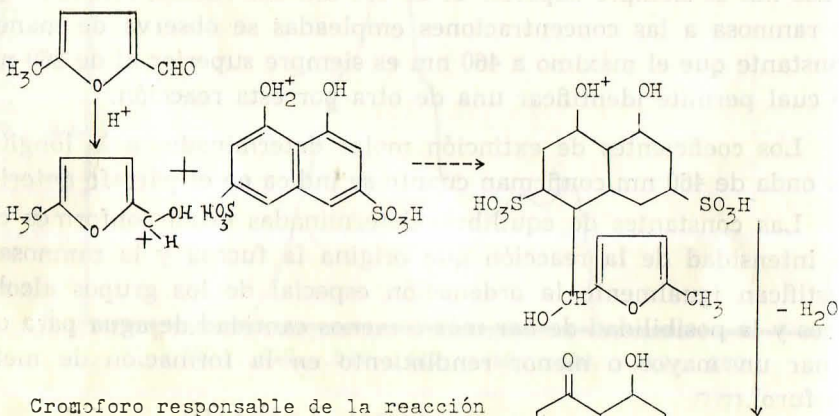
Los espectros de fluorescencia ofrecen dos máximos a 560 nm y 400 nm, siendo el primero dependiente de la concentración empleada de ambas metil-pentosas.



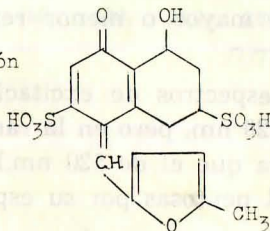
y la sal sódica del ácido cromotrópico, en medio ácido fuerte, daría lugar a:

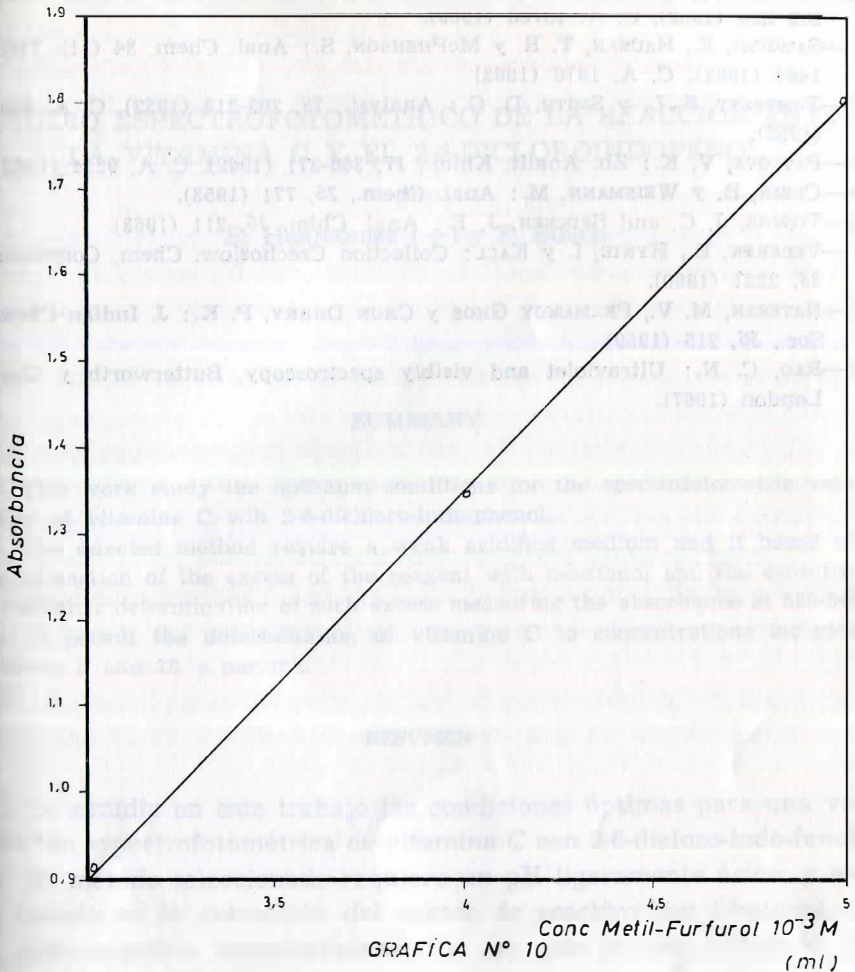


El Metil-furfurol se condensaría:



Cromóforo responsable de la reacción





BIBLIOGRAFIA

- 1.—GARCIA-VILLANOVA, R., THOMAS, J. y BOSCH, F.: Anal. Real Acad. Farm., 33, 439 (1967).
- 2.—GARCIA-VILLANOVA, R., THOMAS, J. y BOSCH, F.: Inf. Quim. Anal., 22, 73 (1968).
- 3.—AFANAS'EV, A. M., KALYAZIN, E. P., PANFEROVA, A. T., STABNIKOVA, T. V.: Zh. Anal. Klin., 26 (1), 189 (1971).
- 4.—ORLOVSKAYA, A. M., OL'KHOVSKAYA, Z. K., NUL'MAN, F. S., SHEIN, E. M.: Gig. Sanit., 36 (E), 90 (1971).

- 5.—TAKASHI MITSUI y YOKO MAYATAKE: *Rika Gaku Kenkyusho Hokoku*, 38, 189 204 (1962). C. A. 13138 (1963).
- 6.—SAWICKI, E., HAUSER, T. R. y McPHERSON, S.: *Anal. Chem.* 34 (11), 1460-1464 (1962). C. A. 1878 (1963)
- 7.—TOMPSETT, S. L. y SMITH, D. G.: *Analyst.*, 78, 209-216 (1953). C. A. 6309 (1953).
- 8.—PAVLOVA, V. K.: *Zh. Analit. Khim.*, 17, 368-371 (1962). C. A. 9214 (1962).
- 9.—CLEIN, B. y WEISMANN, M.: *Anal. Chem.*, 25, 771 (1953).
- 10.—TOWNE, J. C. and SPIKNER, J. E.: *Anal. Chim.*
- 11.—VECEREK, B., HYNIE, I. y KACL: *Collection Czechoslow. Chem. Commun.*, 25, 2221 (1960).
- 12.—NATESAN, M. V., PREMAMOY GHOS y CHON DHURY, P. K.: *J. Indian Chem. Soc.*, 36, 215 (1959).
- 13.—RAO, C. N.: *Ultraviolet and visibly spectroscopy*, Butterworth y Cop., London (1967).