

FLEXIBILIDAD DE CADENAS NEUTRAS Y CARGADAS DE ÁCIDO POLIGALACTURONICO EN DISTINTOS SOLVENTES

FLEXIBILITY OF NEUTRAL AND CHARGED CHAINS OF POLYGALACTURONIC ACID IN DIFERENT SOLVENT

S. Guidugli^{(1)*}, M. Villegas⁽¹⁾, C. Esteban⁽¹⁾, C. Fernández Gauna⁽¹⁾, S. Pantano⁽²⁾, S. Paoletti⁽³⁾ y J. Benegas⁽¹⁾

(1) Instituto de Matemática Aplicada San Luis (IMASL) – Departamento de Física – Universidad Nacional de San Luis – CONICET, Ejército De Los Andes 950 - (5700) -San Luis – Argentina

(2) Instituto Pasteur de Montevideo – Calle Mataojo 2020, Cp 11400, Montevideo, Uruguay.

(3) Dipartimento di Science Della Vita, Università degli Studi di Trieste, Trieste, Italia

e-mail: sguidu@unsl.edu.ar

El objetivo de este trabajo es estudiar el efecto del solvente y del estado de carga sobre la flexibilidad de cadenas de ácido péctico (poli(1→4)- α -D-galacturónico). Para ello se construyeron cadenas de longitud creciente mediante un algoritmo de Monte Carlo que utiliza los resultados de dinámica molecular (DM) para asignar probabilidades para la orientación de cada monómero agregado a la cadena. Mediante este procedimiento se crearon ensamblajes estadísticos de cadenas no perturbadas de hasta 900 monómeros, para los cuatro casos de interés: cadenas totalmente ionizadas o neutras de ácido péctico en agua o dimetilsulfóxido (DMSO). Las correspondientes longitudes de persistencia y cocientes característicos calculados en estas ensamblajes estadísticas establecen que, en agua, el ácido péctico ionizado es más rígido que el descargado, confirmando algunos resultados de literatura. En DMSO se revierte la situación, señalando la complejidad de la dependencia con el estado de carga y el solvente de las propiedades conformacionales de este biopolímero. Un análisis de los resultados de las respectivas DM muestra que los puentes hidrógenos intramoleculares no se correlacionan con este comportamiento de la longitud de persistencia, pero que sí lo hace la masa de las moléculas de solvente unidas mediante enlaces de hidrógeno al soluto. Se especula que, para este polisacárido extendido y relativamente rígido, la interacción con las moléculas del solvente, manifestada a través del efecto inercial de esta masa "extra", puede ser un factor importante de estabilidad conformacional.

Palabra clave: polisacáridos, ácido péctico, dinámica molecular, efecto de la carga, efecto del solvente.

The aim of this work is to study the effect of different molecular solvents and charge state on the conformational properties of pectic acid (poly(1→4)- α -D-galacturonic). For that purpose statistical ensembles of long polygalacturonic chains have been created using a Monte Carlo approach in which, after an initial monomer is selected, the dihedral angles of the following monomer are assigned through a Metropolis algorithm that uses conformational probabilities obtained from the trajectories of molecular dynamics simulations of the four cases of interest; the fully protonated and charged polymer in molecular water or DMSO solvents. For all these cases characterization of polymer flexibility is obtained by calculating characteristic ratios and persistence lengths on the respective populations. The results show that the charged chains in water are more rigid than the neutral counterpart, while in explicit DMSO the situation is reversed. Analyses of the previous MD show that intramolecular H-bond patterns (both direct and mediated by solvent molecules) do not correlate with this flexibility pattern. An important correlation is found, however, between the variation of the persistence length and the "extra" mass, defined as the mass of solvent molecules H-bonded added to the saccharide. We speculate that, for this type of elongated molecules, whose conformational space is restricted to a single region at large values of both glycosidic angles, the large inertia of this "extra" mass could play an important role in hindering its torsional mobility.

Keywords: polysaccharides, pectic acid, molecular dynamics, charge effect, solvent effect.

I. INTRODUCCIÓN

Las pectinas constituyen una familia de polisacáridos con un esqueleto polimérico de unidades α -D-(1-4)-galacturonano⁽¹⁾. Aunque en general los polisacáridos exhiben una importante riqueza conformacional, las uniones glicosídicas de tipo axial que caracteriza a las pectinas resultan en conformaciones bastante extendidas y relativamente rígidas. Trabajos previos de mecánica molecular⁽²⁻⁴⁾ han mostrado que los ángulos glicosídicos (ϕ, ψ) que unen

dos monómeros consecutivos están restringidos a valores positivos de estos ángulos, distribuidos en regiones caracterizadas por uno o más mínimos de energía, que dependen de las condiciones físico-químicas de la solución. Estos trabajos se han realizado en general modelando el solvente como un medio continuo, relegando aspectos moleculares que determinan las interacciones soluto-solvente. En este trabajo se propone estudiar como las moléculas del solvente y el estado de ionización de las unidades poliméricas incide sobre la flexibilidad de cadenas de

* Autor a quién debe dirigirse la correspondencia

ácido poligalacturónico, caracterizada por medio del cociente característico (una medida de cuanto se aleja el comportamiento del polímero de una cadena totalmente libre) y la longitud de persistencia (proyección de la distancia entre extremos del polímero sobre la dirección de la primera unión) de cadenas de creciente grado de polimerización. Estas cadenas son construidas mediante un algoritmo de Monte Carlo que utiliza para asignar las probabilidades de una dada configuración de ángulos glicosídicos (ϕ, ψ) los resultados de dinámicas moleculares (DM) de dímeros realizadas previamente. Dado que en estas simulaciones de DM se utilizan moléculas explícitas del solvente (agua o DMSO), las probabilidades así obtenidas representan un modelo más real de la solución. Experimentalmente se ha determinado que las pectinas son polisacáridos bastante rígidos, pero que diferentes impurezas modifican fuertemente su flexibilidad⁽⁵⁻¹⁰⁾. Cross et. al.⁽⁵⁾ han determinado la longitud de persistencia (L_p) de distintas pectinas de citrus y manzana mediante dispersión de neutrones a bajo ángulo (SANS) y viscosimetría, obteniendo valores entre 45 y 75 Å mediante SANS y entre 59 y 115 Å por viscosimetría. Otros resultados confirman que este polímero es bastante rígido con longitudes de persistencia de 90 Å⁽⁶⁾ o cocientes característicos para cadenas muy largas, C_∞ , entre 22 y 70 para pectinas parcialmente metiladas⁽⁷⁾, mientras que mediante experimentos de dispersión de la luz se han obtenido valores de C_∞ en el rango de 77 a 156⁽⁸⁾.

El esquema computacional más comúnmente utilizado es el de generar ensamblajes estadísticas de cadenas construidas mediante algoritmos de Monte Carlo similares al aquí utilizado, pero donde las probabilidades se asignan a partir de los mapas no perturbados de energía interna en el espacio (ϕ, ψ), llamados de mapas Ramachandran, obtenidos mediante simulaciones de mecánica molecular realizadas en vacío o en solvente implícito^(3-5,11-16). Mediante este procedimiento Cross et. al.⁽⁵⁾ obtuvieron valores de $C_\infty = 57$ y de $L_p = 135$ Å, independientemente del grado de esterificación de la cadena. Con un procedimiento similar Noto et al.⁽¹⁶⁾ reportan valores de la longitud de persistencia de 121 y 131 Å, para cadenas neutras y completamente ionizadas, respectivamente. Braccini et. al.⁽⁴⁾ reportan para similares cadenas un valor de $C_\infty = 72$ y una longitud de persistencia $L_p = 166$ Å. Ruggiero et. al.^(12,13) también mediante una combinación de mecánica molecular y Monte Carlo, investigaron el efecto de la ionización y el contenido de impurezas de ramnosa sobre la flexibilidad de cadenas de ácido péptico, encontrando que las cadenas totalmente ionizadas y neutras tienen casi igual flexibilidad, pero que cuando solo la mitad de los monómeros está ionizado, la flexibilidad aumenta al doble. Encontraron además que una pequeña fracción (10%) de impurezas de ramnosa disminuye el cociente característico hasta en un factor de 10, calculando longitudes de persistencia entre 50 y más de 350 Å.

Recientemente Noto et. al.⁽⁵⁾, utilizando resultados de DM con solvente explícito para asignar probabilidades

en el algoritmo de Monte Carlo, encuentran una longitud de persistencia $L_p = 120 \pm 20$ Å para el ácido poli(galacturónico) neutro, que se incrementa a $L_p = 300 \pm 50$ Å para cadenas completamente ionizadas. La importante diferencia entre estos valores de L_p y los que estos mismos autores obtienen utilizando mecánica molecular para asignar probabilidades a las orientaciones de los ángulos glicosídicos, resalta la importancia de considerar explícitamente las moléculas del solvente en la simulación. En conclusión, los resultados experimentales y teóricos indican un cierto acuerdo sobre la relativa rigidez de este biopolímero, pero que los efectos de carga polimérica y de distintos solventes sobre la flexibilidad molecular en solución es todavía materia de estudio, tanto experimental como teórica. Nuestro interés en las propiedades conformacionales del ácido péptico también se debe a la necesidad de dar una base molecular a un modelo de campo medio propuesto recientemente⁽¹⁷⁾ para la asociación de cadenas de ácido péptico mediadas por iones Ca^{++} , paso inicial en la formación de geles.

La siguiente sección describe el algoritmo de construcción de cadenas poliméricas. Es seguida por una descripción de los principales resultados y una discusión de los mismos, donde, analizando los resultados de la DM, se encuentra que los enlaces de hidrógeno intramoleculares no correlacionan con el comportamiento de la longitud de persistencia, pero sí lo hace la masa "extra" de las moléculas de solvente unidas por enlaces hidrógeno a cada unidad polimérica.

II. MÉTODOS

El primer paso consiste en obtener un banco de datos representativo de los ángulos glicosídicos (ϕ, ψ) que unen dos monómeros consecutivos. En este trabajo se postula que en una simulación suficientemente larga de dinámica molecular del ácido di(galacturónico) los ángulos (ϕ, ψ) visitados conforman un banco de datos representativo de los valores tomados en una solución polimérica. Se utilizarán entonces los 50.000 conformeros registrados durante los 10 ns de las DM de cada uno de los cuatro casos de interés: polímero neutro y cargado, en agua y DMSO, para calcular la probabilidad $p_j(\phi, \psi)$ de que un evento de la DM caiga en el j -ésimo retículo elemental de área 5×5 del mapa (ϕ, ψ). Estas probabilidades se calculan entonces simplemente contando los eventos con ángulos en ese intervalo de (ϕ, ψ) y normalizando por el número total de eventos.

El presente modelo considera que la cadena polimérica es una sucesión de uniones virtuales independientes entre enlaces glicosídicos, generada de acuerdo al siguiente algoritmo:

- 1- Se ordenan los estados $p_i(\phi, \psi)$ de mayor a menor probabilidad de ocurrencia.
- 2- Para todo i , se calcula la probabilidad acumulada $P_i = \sum p_j$, con $j < i$.
- 3- Se genera un número aleatorio, q , entre 0 y 1.
- 4- Se toma un estado "i" del banco de probabilidades,

- 5- si $P_i > q$, entonces el estado i , caracterizado por el par de ángulos diedros $(\phi, \psi)_i$, se asigna para unir el próximo monómero de la cadena.
- 6- Si $P_i < q$, se rechaza este estado i y el algoritmo retorna al punto 3.
- 7- El proceso termina cuando la cadena así construida alcanza el número n de monómeros deseado.

Se construyen ensamblajes estadísticas de un número adecuado de cadenas, para cada grado de polimerización n . Este número de cadenas debe ser suficientemente grande para asegurar la convergencia y estabilidad de los parámetros estadísticos calculados, en este caso la longitud de persistencia y el cociente característico. En nuestros cálculos se han generado 10.000 cadenas para cada grado de polimerización n , y para cada uno de los cuatro casos de interés. Sobre estas ensamblajes se calcularon propiedades topológicas de cadenas imperturbadas tales como: el cociente característico,

$$C_n = \frac{\langle r^2 \rangle}{nl^2} \quad (1)$$

donde r es el vector distancia extremo-extremo y la longitud de persistencia

$$L_p = \left\langle \frac{\vec{l}_1}{l_1} \cdot \sum_{i=1}^n \vec{l}_i \right\rangle \text{ con } n \rightarrow \infty \quad (2)$$

donde \vec{l} es el vector unión virtual de longitud l .

Resultados.

La Figura 1 muestra las funciones de distribución calculadas por el método descrito arriba para los cuatro casos de interés. La característica general es que existe una sola región permitida del espacio (ϕ, ψ) a valores positivos de ambos ángulos glicosídicos. En esta región cada una de las distribuciones está caracterizada por uno, dos o más máximos relativos de probabilidad de diferente intensidad.

La distribución de probabilidad para la molécula neutra en DMSO muestra un solo máximo importante, a valores mayores de ϕ y ψ , anticipando un importante estiramiento y rigidez de esas cadenas. En los otros tres casos hay más de un pico de probabilidad, cuyas intensidades relativas, posición y extensión dependen del estado de carga y solvente

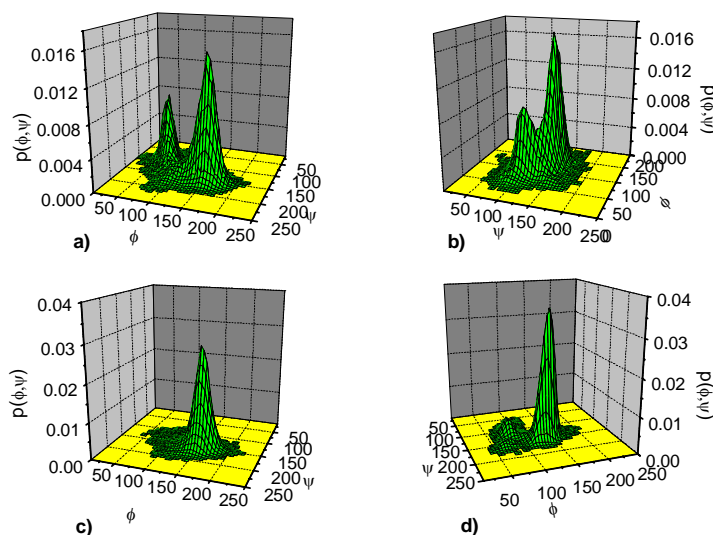


Figura 1. Funciones de probabilidad $p_i(\phi, \psi)$ de que un evento de la DM tenga valores de los ángulos diedros (ϕ, ψ) para el ácido péctico: a) neutro en agua, b) ionizado en agua, c) neutro en DMSO y d) ionizado en DMSO

Con esa información, y siguiendo el algoritmo descrito anteriormente, se calcularon las ensamblajes estadísticas de cadenas de grado de polimerización creciente, hasta $n=900$ monómeros. La Figura 2 muestra la dependencia del cociente característico con el grado de polimerización n . Para los cuatro casos de nuestro estudio estas curvas muestran la clásica dependencia casi lineal a bajo n , para luego nivelarse y determinar,

tanto el valor límite del cociente característico para cadenas muy largas, C_∞ , (no mostrado), como de la longitud de persistencia. La Tabla I muestra estos valores límites, tomados como el valor medio y la dispersión obtenidos para cadenas de $n > 300$. En agua para las cadenas neutras se obtiene así un valor $L_p = 79.5 \text{ \AA}$ que aumenta a 135 \AA para las cadenas totalmente ionizadas, mientras que en DMSO las

cadena son sustancialmente más rígidas. Notablemente, en este solvente se revierte la dependencia con el estado de carga, con la longitud de persistencia de las cadenas neutras aproximadamente el doble que para las cadenas cargadas. La Figura 2 muestra además que los valores límites son muy estables, con una dispersión muy baja (ver Tabla I). Desde el punto de vista computacional esto indica que las dinámicas moleculares que dieron origen a las funciones de probabilidad son suficientemente largas y estables y que las asambleas estadísticas de las cadenas calculadas son suficientemente grandes para garantizar la estabilidad y confiabilidad de los parámetros estadísticos.

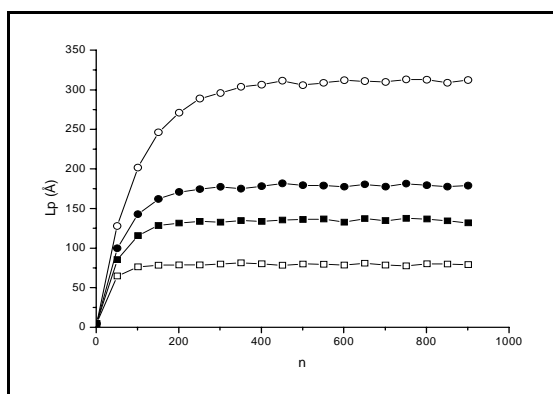


Figura 2: Dependencia de la longitud de persistencia, L_p , con la longitud de la cadena, n , para los cuatro casos de la Figura 1: □ neutro en agua, ■ ionizado en agua, ○ neutro en DMSO y ● ionizado en DMSO

Considerando una distancia entre monómeros a lo largo de la cadena de 4,35 Å, los valores de L_p de la Tabla I implican que, a partir de un dado monómero, estas cadenas mantienen memoria de su dirección por alrededor de 18 y 32 unidades monoméricas para las cadenas neutras e ionizadas en agua, y por alrededor de 42 y 72 monómeros para esos estados de carga pero en DMSO, respectivamente.

Discusión

El objetivo de este trabajo ha sido estudiar la dependencia con el solvente y con el estado de ionización de la flexibilidad de cadenas de ácido poligalacturónico en soluciones diluidas. Para ello se construyeron asambleas estadísticas de cadenas largas (hasta $n=900$) sobre las cuales se calculó la dependencia

con el grado de polimerización de la longitud de persistencia y del cociente característico. Este análisis se realizó para los cuatro casos de interés: cadenas totalmente neutras o ionizadas, en agua o DMSO. En todos ellos las cadenas se construyeron con un algoritmo de Monte Carlo que utiliza resultados de simulaciones previas de dinámica molecular para asignar las probabilidades de los ángulos diedros (ϕ, ψ) que caracterizan a cada monómero agregado a la cadena. Los valores de la longitud de persistencia obtenidos están en excelente acuerdo con los datos experimentales disponibles. Los más apropiados para esta comparación son los obtenidos de Cross et al.⁽⁵⁾ mediante experimentos de SANS para la muestra de pectinas identificada como C28, para la cual reportan una longitud de persistencia de 75 Å en excelente acuerdo con el valor aquí obtenido para cadenas neutras en agua. Esta muestra es elegida debido a que tiene la máxima pureza polimérica (92.7% GalA), la más pequeña fracción de impurezas (ramnosa 0.6%) y a la alta fuerza iónica de la solución, que apantalla fuertemente las interacciones electrostáticas. Cálculos previos reportan valores sustancialmente más grandes: Noto et al.⁽¹⁶⁾, utilizando también resultados de MD para asignar probabilidades en su algoritmo de generación de cadenas, encontraron que la longitud de persistencia aumenta de $L_p = (120 \pm 20)$ Å para cadenas neutras a $L_p = (300 \pm 50)$ Å para las totalmente ionizadas. Es posible que estos altos valores de L_p sean debidos, al menos en parte, a una restricción en el algoritmo de estos autores que limita los valores en que pueden cambiar los ángulos glicosídicos de una unión monomérica a la siguiente. Los mismos autores también utilizan el procedimiento tradicional de calcular probabilidades a partir de los mapas de Ramachandran, obtenidos mediante mecánica molecular, reportando por este procedimiento valores muy similares para la longitud de persistencia de cadenas neutras y cargadas (121 Å y 131 Å, respectivamente). Por una metodología similar Ruggiero et al.⁽¹³⁾ calculan longitudes de persistencia bastante mayores, aunque muy similares para cadenas neutras y cargadas. Respecto del efecto de distintos solventes, solo encontramos en la literatura el trabajo de Boutherein et al.⁽¹⁵⁾, que compara los resultados obtenidos en vacío, agua y DMSO, aunque utilizando la aproximación de solvente implícito, es decir introduciendo el efecto del solvente solo como un cambio en la constante dieléctrica. Estos autores encuentran que las cadenas ionizadas son más rígidas

Tabla I: Valores medios, por monómero de ácido péctico, de enlaces de hidrógeno intramoleculares directos y mediados por solvente, número y masa “extra” de las moléculas de solvente unidas mediante enlaces de hidrógeno, longitud de persistencia y cociente característico para los cuatro casos de la Figura 1.

| Solvente/carga | Enlaces H directos | Enlaces H c/solvente | No. moléculas solvente | Masa “extra” | $L_p \pm \sigma$ (Å) | $C_{n=900}$ |
|----------------|--------------------|----------------------|------------------------|--------------|----------------------|-------------|
| Agua-neutro | 0,04 | 0,09 | 11,06 | 199 | 79.5±1.1 | 35 |
| Agua-cargado | 0.96 | 0,88 | 18,87 | 340 | 135.0±1.9 | 58 |
| DMSO-neutro | 0.01 | 0,02 | 7,32 | 572 | 308.6±4.8 | 115 |
| DMSO-cargado | 1,09 | 0,01 | 5,56 | 434 | 178.7±1.8 | 75 |

que las neutras pero con tendencias opuestas para el efecto del solvente, denotando la complejidad de simular los efectos del solvente y del estado de ionización en este tipo de polímeros. En busca de las fuentes de este comportamiento conformacional se han analizado los resultados de la DM. La Tabla I muestra que los enlaces de hidrógeno intramoleculares, tanto directos como mediados por moléculas de solvente, no se correlacionan con el comportamiento de la longitud de persistencia o el cociente característico. Se observa un cuadro similar en ambos solventes: el único enlace relevante se establece, para la molécula ionizada (y en ambos solventes), entre los O del grupo carboxilo de un monómero con el O en posición 2 del monómero siguiente. En contraposición, tanto en agua como en DMSO, no se observa ningún enlace de hidrógeno relevante para las cadenas neutras. Los enlaces hidrógeno intramoleculares mediados por moléculas de solvente, que en otros polisacáridos parecen aportar a la estabilidad conformacional^(18,19) tienen, en agua, un comportamiento similar a los enlaces hidrógeno directos, mientras que en DMSO son prácticamente irrelevantes, debido que este solvente solo puede actuar como aceptor de hidrógeno. La Tabla I muestra el número de moléculas de solvente que se unen mediante enlaces hidrógeno a distintos O de cada unidad polimérica. Notamos que se ligan a cada unidad polimérica más moléculas de agua que de DMSO. Este patrón es similar para todos los O poliméricos, excepto para los O carboxílicos de los monómeros ionizados que no pueden establecer enlaces de hidrógeno con las moléculas de DMSO. El resultado final es que, en agua, cada monómero de ácido poligalacturónico totalmente ionizado está unido mediante enlaces hidrógeno a cerca de 50% más moléculas de solvente que los monómeros neutros. En DMSO esta situación se revierte y la forma neutra muestra alrededor de 30% más de moléculas de DMSO ligadas que la forma totalmente ionizada. Estos datos se han sintetizado en la columna “Masa extra” de la Tabla I, que presenta la masa de las moléculas de solvente unidas mediante enlaces de hidrógeno a cada unidad monomérica. Para este polisacárido y moléculas de solvente, esta masa extra representa una gran inercia, que incrementa la masa de cada monómero entre 50% para las cadenas neutras en agua, hasta alrededor del 150% para las mismas cadenas neutras, pero en DMSO. La Figura 3 muestra la importante correlación ($c_r=0.97$) que existe entre esa “masa extra” y las longitudes de persistencia calculadas previamente. Nuestra especulación es que, para este tipo de moléculas, relativamente extendidas, y sujetas a un espacio conformacional restringido⁽²⁰⁾, la interacción soluto-solvente, manifestada a través de la inercia extra que implican las moléculas de solvente adheridas a cada monómero, contribuyen de manera importante a la dependencia de la flexibilidad con el tipo de solvente y estado de ionización. Estudios en otros sistemas poliméricos y en distintos solventes y estados de carga son necesarios para evaluar la importancia de este efecto.

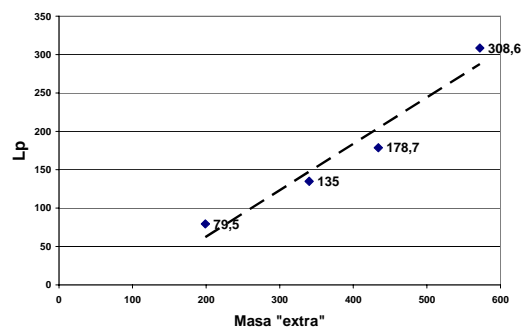


Figura 3: longitud de persistencia vs masa de las moléculas de solvente unidas mediante enlaces de hidrógeno a cada monómero del ácido péctico (“extra”). Rótulo de datos: longitud de persistencia para las cuatro casos de la Figura 1 (ver Tabla I).

Referencias

- 1- Yalpani M, *Polysaccharides, Syntheses, Modifications and Structure / Property Relations*, Elsevier Science, Amsterdam, (1998).
- 2- Morris E.R., Powell D.A. Godley M.J., Rees D.A., *J. Mol. Biol.*, **155**, 507-516, (1992).
- 3- Pérez, S., Mazeau K., du Penhoat, C.H., *Plant Physiol. Biochem.*, **38**, 37-55, (2000).
- 4- Braccini I., Grasso R., Pérez S., *Carbohydrate Research (Elsevier)*, **317**, 119-130, (1999).
- 5- Cross S., Garnier C., Axelos M., Imberty A. and Pérez S., *Biopolymers*, **39**, 339-352, (1996).
- 6- Malovikova A., Rinaudo M. and Milas M., *Carbohydr. Pol.*, **22**, 87-92, (1993).
- 7- Axelos M.A. V. and Thibault J.F., *Int. J. Biol. Macromol.* **13**, 77-82, (1991).
- 8- Plashchina I.G., Semenova M.G., Braudo E.E. and Tolstoguzov V.B, *Carbohydr. Pol.*, **5**, 159-179,(1985).
- 9- Axelos M.A. V., Thibault J.F. and Lefebvre J., *Int. J. Biol. Macromol.* **11**, 186-191, (1989).
- 10- Cross S., Herve du Penhoat, C., Bouchemal N., Ohassan H., Imberty A. and Pérez S., *Int. J. Biol. Macromol.*, **14**, 313-320, (1992).
- 11- Whittington, S.G., *Macromolecules*, **4**, 569-571, (1971).
- 12- Ruggiero J.R., Urbani R., Cesàro A. *J. Biol. Macromol*, **17**, 213-218, (1995).
- 13- Ruggiero J.R., Urbani R., Cesàro A. *J. Biol. Macromol*, **17**, 205-212, (1995).
- 14- Urbani R. and Cesàro A., *Polymer*, **32**, 3013-3020, (1991).
- 15- Bouterin B, Mazeau K and Tvaroska, I., *Carbohydr. Pol.* **32**, 255-266, (1997).
- 16- Noto R., Martorana V., Bulone D. and San Biagio P.L., *Biomacromolecules*, **6**, 2555-2562, (2005).
- 17- Donati I, Benegas J.C., and Paoletti S *Biomacromolecules*; **7**(12); 3439-3447, (2006).
- 18- Ueda K., Saiki M and Brady J., *J.Phys.Chem. B*, **105**, p. 8629-8638, (2001).
- 19- Almond A., *Carbohydrate Research*, **340**, 907-920, (2005).
- 20- Guidugli S., Grigera R., Pantano S. y Benegas J., 90ª Reunión Nacional de Física, Trabajo N° A250, La Plata, (2005).