

Estudio de los principales enlaces glicosídicos presentes en la estructura de la goma de *Sterculia apetala* por degradación y análisis de metilación

Marvelys Larrazábal^{1,*}, Maritza Martínez², Gladys León de Pinto²,
Dina Abed El Kader², Julio Herrera³, Adriana Bravo⁴

¹Programa Ingeniería, Universidad del Zulia, Núcleo Costa Oriental del Lago. Cabimas, Venezuela.

²Centro de Investigaciones en Química de los Productos Naturales, Facultad de Humanidades y Educación, Universidad del Zulia, Apdo. 526. Maracaibo, Venezuela.

³Departamento de Química, Laboratorio de Resonancia Magnética Nuclear, Facultad de Ciencias, Universidad Simón Bolívar. Caracas, Venezuela.

⁴Laboratorio de Soporte Científico, Empresas Polar. Caracas, Venezuela.

Recibido: 12-07-10 Aceptado: 22-03-11

Resumen

Sterculia apetala (Sterculiaceae), exuda una goma clara, viscosa, de estructura muy compleja. La identificación y localización de los principales enlaces glicosídicos presentes en el heteropolisacárido ácido de la goma de *S. apetala*, constituye el objetivo de este trabajo. La goma degradada A, se obtuvo a partir de la goma original, por hidrólisis ácida parcial, mientras que la goma degradada B (núcleo de la estructura), por oxidación drástica, a partir de la goma degradada A. Se prepararon los acetatos de alditol de los azúcares parcialmente metilados, tanto de la goma original como de los productos degradados y se analizaron por CG-MS. Se demostró que existen ramificaciones unidas probablemente al C-3 o C-4 de residuos de 2-O-ramnosa, terminadas en arabinofuranosa y/o xilopiranososa. El núcleo probablemente no es lineal e incluye una unidad repetitiva (Ram: A Gal = 3:1), con un residuo de ácido galacturónico 4-O-enlazado sustituido en posición 3 por ramnosa. El estudio realizado es una contribución al conocimiento de la estructura compleja de la goma de *S. apetala*.

Palabras clave: *Sterculia apetala*, metilación, enlace glicosídico, polisacárido.

Study of the main glycosidic linkages in the structure of *Sterculia apetala* gum by degradation and methylation analysis

Abstract

Sterculia apetala (Sterculiaceae) exudes a clear and viscous gum, of very complex structure. The identification and location of the main present glycosides linkages in the acid heteropolysaccharide one of the gum of *S. apetala* constitute the objective of this work. The gum degraded "A", was obtained from the original gum, by partial acid hydrolysis, whereas degraded gum "B" (nucleus of the structure) was obtained by drastic oxidation, from degraded gum "A". The acetates of alditol of sugars partially methyls were prepared, as much for the original gum

* Autor para la correspondencia: marvelysl@gmail.com

as for the degraded products, and they were analyzed by CG-MS. It was demonstrated that probably exist united ramifications to the C-3 or C-4 from 2-O-ramnose residues, finished in arabinofuranose and/or xylopiranose. The nucleus is not lineal and includes a repetitive unit (Ram: A Gal = 3:1), with a residue of Galacturonic Acid 4-O-linked replaced in 3th position by ramnose. The study made is a contribution to the knowledge of the complex structure of the gum of *S. apetala*.

Key words: *Sterculia apetala*, methylation, glicosidic linkage, polysaccharide.

Introducción

Las especies de la familia Sterculiaceae, son conocidas porque exudan gomas de estructura muy compleja (1). Las gomas de varias especies del género *Sterculia*, localizadas principalmente en India, Sudán y Senegal, son aceptadas como aditivos en la industria alimentaria (2). Los estudios estructurales de la goma de *Sterculia urens* (goma karaya), de amplia aplicación industrial, han demostrado que está constituida por un heteropolisacárido parcialmente acetilado (3). Estas investigaciones corroboran que el esqueleto de esta goma incluye residuos de ácido α -D-galacturónico y α -L-ramnosa (4). Los estudios químicos y estructurales de otras Sterculiaceas, demostraron que poseen rasgos análogos a la goma de *S. urens* (5, 6), excepto la goma de *Sterculia setigera* que contiene D-tagatosa, azúcar atípico en este tipo de polímeros (7).

La familia Sterculiaceae está representada en Venezuela por 10 géneros y 67 especies, el género *Sterculia*, abarca 8 especies (8). La goma de *Sterculia apetala*, es un heteropolisacárido ácido constituido por galactosa, xilosa, arabinosa, ramnosa y ácidos urónicos. La complejidad del polímero se demostró mediante la combinación de estudios químicos y espectroscópicos (9), el esqueleto central es un galacturonoramnán, poco común para las gomas exudadas de plantas, el cual corresponde a una estructura tipo B, según la clasificación propuesta (10). Dada la complejidad de este polímero, se requiere una profundización en el conocimiento de su estructura. El objetivo de este trabajo es, en consecuencia, identificar y lo-

calizar los principales enlaces glicosídicos presentes en la estructura de la goma de *S. apetala*.

Materiales y métodos

Origen y colección de la goma de *Sterculia apetala*

La goma de *Sterculia apetala* (camoruco), se colectó de los especímenes debidamente identificados, en las áreas verdes de la Facultad de Experimental de Ciencias, municipio Maracaibo, estado Zulia. La goma exudada se colectó periódicamente, después de la práctica y remoción de heridas, realizadas a nivel del tallo. La goma colectada, de color claro, se purificó por disolución en agua destilada, diálisis y liofilización.

Composición de azúcares

Los azúcares presentes se identificaron por cromatografía de papel, previa hidrólisis (H_2SO_4 1 M), usando Whatman Nº 1. La cromatografía preparativa de papel (Whatman 3 MM) permitió la separación de los azúcares y se cuantificaron por el método colorimétrico de fenol-sulfúrico (11). La absorbancia se midió, en un Spectronic 21 (BAUSH y LOMB, USA) a una longitud de onda de 490 nm. El análisis se llevó a cabo también por HPLC, en un cromatógrafo Water 410. El contenido de azúcares ácidos se determinó por el método cuantitativo del *metahidroxibifenilo* (12). La presencia del ácido galacturónico, se verificó por cromatografía de papel, previa hidrólisis ácida (H_2SO_4 1 M), usando los siguientes sistemas de solventes: a) acetato de etilo, piridina y

agua (8:2:1) y b) acetato de etilo, piridina, ácido acético y agua (5:5:1:3) (13).

Preparación de los productos degradados

La goma degradada A, se obtuvo a partir de la goma purificada (10 g), la cual se trató con ácido sulfúrico (5 mM, 541 mL 100° C, 96 h). Se neutralizó con carbonato de bario, se filtró y dializó contra agua destilada (2L) y posteriormente contra agua de chorro circulante (48 h). El producto degradado se obtuvo por liofilización (4,5 g). La goma degradada B, se preparó a partir de la goma degradada A (3 g), la cual se disolvió en agua destilada (88 mL) y se añadió una solución de *metaperyodato* de sodio (0,25 M; 88 mL). El polímero oxidado se redujo con borohidruro de sodio (2,9 g, 30 h) y se dializó contra agua de chorro circulante (48 h). La solución se acidificó con ácido sulfúrico (1M) para efectuar la hidrólisis (H₂SO₄ 0,5 M, 25°C, 48 h); La goma degradada B se obtuvo por liofilización (30 mg).

Análisis de metilación de la goma original y sus productos degradados

El análisis de metilación comprende tres etapas: metilación, preparación de acetatos de alditol y análisis por CG-MS de dichos acetatos. Las gomas original y gomas degradada y degradada B, se permetilaron siguiendo la metodología descrita (14, 15). Para la preparación de los acetatos de alditol, las muestras permetiladas se hidrolizaron con ácido trifluoroacético (2 M), redujeron con borohidruro de sodio (0,5 M) en amoníaco (2 M), y acetilaron por la adición

de acetato de etilo y anhídrido acético. Se añadió ácido perclórico (70%), se agitó y colocó en un baño de hielo, se enfrió y añadió agua destilada y 1-metilimidazol. La extracción de los acetatos de alditol se efectuó con diclorometano, para obtener la mezcla de acetatos de alditol. La mezcla obtenida para cada goma metilada, se inyectó en un cromatógrafo de gases Perkin-Elmer Autosystem provisto de una columna de vidrio (152,4 × 2 mm) empacada con OV-225 al 3% y ECNSS-M al 3%, como fase estacionaria. Se empleó un programa isotérmico (170°C, 20 min) y luego una rampa de temperatura (5°/min) hasta alcanzar la temperatura máxima (200°C). Las temperaturas del inyector y del detector fueron iguales (250°C) (16, 17). Los tiempos de retención fueron referidos al valor correspondiente del recién preparado, siguiendo la metodología 1,4-di-O-acetil-2,3,5-tri-O-metil-arabinitol descrita (18). Los derivados obtenidos se analizaron además, por un cromatógrafo de gas acoplado a un espectrómetro de masas.

Resultados y discusión

La goma original, de *S. apetala* está constituida por residuos de galactosa, arabinosa, xilosa, ramnosa y ácidos urónicos (tabla 1), en concordancia con lo reportado para esta goma (9), en su composición se incluyen residuos de ácido galacturónico. El análisis de metilación, de la goma original, permitió inferir que existen cadenas laterales unidas a C-3 y/o C-4 de ramnosa 2-O-enlazada; se detectó la presencia de →2,3) Ram y →2,4) Ram, tabla 2. Estas cadenas probablemente involucran residuos inter-

Tabla 1
Composición de azúcares de la goma de *Sterculia apetala* y de sus productos degradados (%)

	Galactosa	Arabinosa	Xilosa	Ramnosa	Ácidos urónicos ^a
Goma Original	24	5	8	17	46
Goma Degradada A	14	2	5	16	63
Goma Degradada B	-	-	-	77	23

^aLos ácidos urónicos están representados por: ácido galacturónico, ácido glucurónico y su 4-O-metil derivado.

Tabla 2
Análisis de metilación de los acetatos de alditol de la goma original y productos degradados de *Sterculia apetala*

Tr ^a	Patrón de fragmentación (m/z)	Goma original	Goma degradada A	Goma degradada B
0,88	59, 72, 101 (pico base), 145			Ram(1→
1,00	59, 71, 87, 101, 117 (pico base), 129, 145, 161, 173	Araf(1→	Araf(1→	
1,03	58,71,87,101,117 (pico base), 129,145,161,173	→4) Ram	→4) Ram	→4)Ram
1,11	59,72,89,99,115,(131)(pico base), 159,173,189,203,219,233	→2) Ram	→2)Ram	
1,16	58,71,87,101,117,(pico base) 129,145,161,205	Xilp (1→	Xilp (1→	
1,17	57,72,89,131(pico base) 142,159,173,187,201,261	→2,3) Ram		
1,18	87,101,117,129 (pico base), 143,159,189,203,231	→2,4) Ram		
1,19	55,87(pico base) 129,184,231	3,4→) A. gal ^b	3,4→) A. gal ^b	3,4→) A. gal ^b
1,22	58,71,87,101,117(pico base) 129,131,143,161.173,233	→3) Gal	→3) Gal	

^aTr, relativos al 1,4-di-O-acetil-2,3,5-tri-O-metil-arabinitol. ^b Como éster metílico.

nos de 3-O- galactosa y/o 2-O-ramnosa terminadas en arabinofuranosa y xilopiranosas, tabla 2, figura 1. El aislamiento de un oligosacárido, constituido por Ram- Xil, confirma este hecho (19).

Se ha descrito la presencia de 2,3 y 2,4-di-O-ramnosa en el polisacárido de la goma *Cola cordifolia* (Sterculiaceae) (6). La existencia de galactosa 3-O-enlazada, xilosa y arabinosa terminal han sido reportadas para *S. apetala* (9). Los datos de metilación del producto degradado A, indican que durante su preparación, la mayoría de estas cadenas laterales son eliminadas de los puntos de ramificación (C-3 o C-4); no se detectó 2,3- ó 2,4-di-O-ramnosa, tabla 2.

En la goma degradada B, núcleo de la estructura, hay predominio de residuos de ramnosa 4-O-enlazada; la presencia de es-

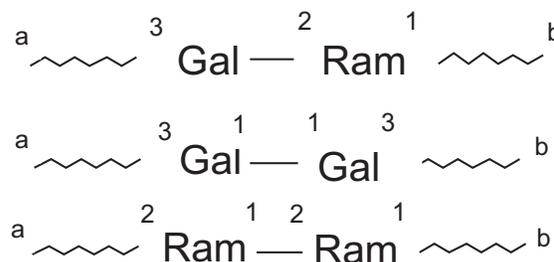


Figura 1. Posibles secuencias de azúcares presentes en las cadenas laterales de goma de *S. apetala*. ^a Enlaces a C-3 y/o C-4 de 2-O-ramnosa, ^b Terminadas en arabinofuranosa y/o xilopiranosas.

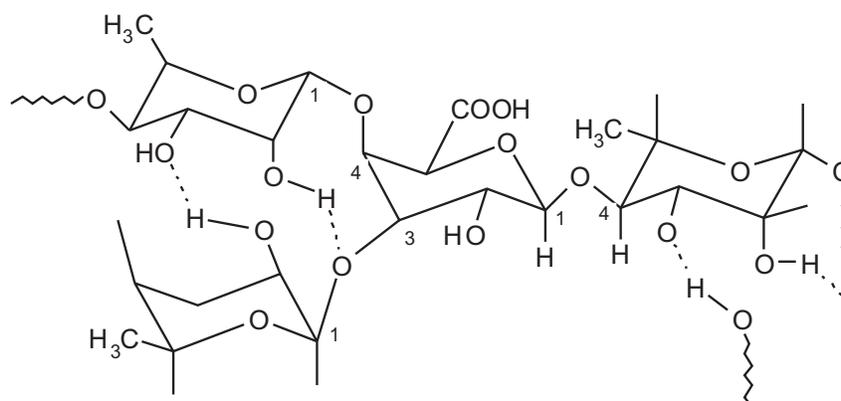


Figura 2. Estructura propuesta para la unidad repetitiva presente el núcleo del polisacárido de *S. apetala*.

tos azúcares fue confirmada por RMN de ^{13}C y ^1H , para la goma de *S. apetala* (9), y contrasta con los datos reportados para el núcleo de la goma de *S. urens*, en el cual hay predominio de residuos de ramnosa 2-*O*-enlazada (1, 4). La presencia del ácido galacturónico 2,4-di-*O*-sustituido (punto de ramificación), tabla 2, sugiere que la estructura del núcleo de *S. apetala* no es lineal y se podría proponer una unidad repetitiva, figura 2, con base en la proporción reportada de Ram: A Gal (3:1) (9).

La estructura propuesta para esta unidad repetitiva, permite inferir que los residuos constituyentes del núcleo, aunque vulnerables al proceso oxidativo, no son liberados por formación de puentes de hidrógeno. Este hecho se ha reportado para gomas de Acacia, diseminadas en Venezuela (20, 21).

Conclusiones

El núcleo del polisacárido de la goma de *S. apetala*, corresponde a un galacturonorannan, probablemente no lineal, con unidades repetitivas en las cuales se destacan residuos de ácido galacturónico 4-*O*-enlazados, sustituidos en posición 3, por residuos de ramnosa. De igual forma existen cadenas laterales terminadas en xilosa y/o arabinofuranosa, unidas a C-3 o C-4 de residuos de 2-*O*-ramnosa en la estructura del polímero.

Agradecimiento

Los autores agradecen al Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico (CONDES), por el soporte financiero el cual permitió el desarrollo de esta investigación.

Referencias bibliográficas

1. VERBEKEN D., SIERCKX, S. DEWETTINCK . *Appl Microbiol Biotechnol* 63: 161-163. 2003.
2. FDA (FOOD AND DRUG ADMINISTRATION) FEDERAL REGISTER, 39 (185), 34209. 1974.
3. LE CERF D., IRINEI F., MULLER G. *Carbohydr Polym* 13: 375-386. 1990.
4. STEPHEN A.M., CHURMS S. C., VOGT D.C. *Biochemistry* 2: 483-522. 1990.
5. BRITO A.C.F., SILVA D.A., DE PAULA R.C.M., FEITOSA J.P.A. *Polym Int* 53: 1025-1032. 2004.
6. TOGOLA A., NAESS K.H., DIALLO D., BARSETT H., MICHAELSE T.E., PAULSEN B.S. *Carbohydr Polym* 73:280-288. 2008.
7. FIGUEIRA A., JANICK J., BEMILLER J. *Carbohydr polym* 24 (2):133-138. 1994.
8. HOKCHE O., BERRY P., HUBER O. *Fundación Instituto Botánico de Venezuela Dr. Tobías Lasser*. 633-634. Caracas (Venezuela). 2008 .

9. LARRAZÁBAL M., MATÍNEZ M., SANABRIA L., LEÓN DE PINTO G. HERRERA J. **Food Hydrocolloid** 20: 908-913. 2006.
10. STEPHEN A.M., PHILLIPS G.O., WILLIAMS P.A. **Food Polysaccharides and Their Applications**. Second Edition. CRC Press. Recuperado 20 de agosto de 2008. www.Casadellibro.com. 2006.
11. DUBOIS M., GILLES K., HAMILTON J., REBERS P., SMITH F. **Anal Chem** 28: 350-356. 1956.
12. BLUMENKRANTZ N., ASBOE-HANSEN G. **Anal Biochem** 54: 484-489. 1973.
13. KINSLEY H. Ph. D. Thesis. Lawrence University, Wisconsin. 1967.
14. HAWORTH W.N. **J Chem Soc** 107: 8-16. 1915.
15. PURDIE T., IRVINE J.C. **J Chem Soc** 83: 102. 1903.
16. ASPINALL G.O., KNEBL M.C. **Carbohydr Res** 157: 261-258. 1986.
17. RAY B., GHOSAL P.K., THAUKUR S., MAJUMDAR S.G. **Carbohydr Res** 185: 105-112. 1986.
18. León de Pinto G., Martínez M., Beltrán O., Rincón F., Igartuburu J., Rodríguez L. **Carbohydr Polym** 43: 105-112. 2000.
19. LARRAZÁBAL, M. Aislamiento y caracterización estructural de oligosacáridos de la goma de *Sterculia apetala*. (Para obtener el título de Doctora en Química). Facultad Experimental de Ciencias. Universidad del Zulia. Maracaibo (Venezuela). 106 pp. 2009.
20. LEON de PINTO, G., MARTÍNEZ M., BOLAÑO L., OCANDO E., RIVAS C. **Phytochemistry** 47: 53-56. 1998.
21. MARTÍNEZ M., LEON DE PINTO G., RIVAS C., OCANDO E. **Carbohydr Polym** 29:247-252. 1996.