

Dilucidación estructural de la fracción oligómero-proteína de la goma de *Acacia tortuosa*

*Rosa E. Ferrer **, *Gladys León de Pinto* y *Maritza Martínez*

Centro de Investigaciones en Química de los Productos Naturales, Departamento de Química. Facultad de Humanidades y Educación. Universidad del Zulia.

Recibido: 29-09-00 Aceptado: 12-06-01

Resumen

La hidrólisis básica de la goma de *Acacia tortuosa* facilitó la separación de tres fracciones oligómero-proteína mediante cromatografía de gel permeación (GPC). La comparación de los perfiles de elución de la goma cruda original y de la goma hidrolizada evidenció una estructura polidispersa representada por dos fracciones tipo arabinogalactán-proteína (AGP). La hidrólisis ácida de estas fracciones, aisladas y caracterizadas por técnicas cromatográficas (PC y HPLC), demostró el posible compromiso entre arabinosa e hidroxiprolina como unidades internas, posiblemente involucradas en el enlace carbohidrato-proteína.

Palabras clave: *Acacia tortuosa*; arabinogalactán-proteína; gel filtración; goma.

Structural dilucidation of oligomer-protein fraction from *Acacia tortuosa* gum

Abstract

Basic hidrolisis of *Acacia tortuosa* gum, followed by gel permeation chromatography (GPC), led to separate three oligomer-protein fractions. Comparison of the elution profiles of the original crude gum and the hydrolysed gum evidenced the presence of a polydisperse structure, represented by two arabino-galactan- protein fractions. Acid hidrolisis of these fractions, isolated and characterized by chromatography techniques (PC, HPLC) demonstrated that arabinose and hydroxiprolin, internal units, are possibly involved in the linkage carbohydrate-protein

Key words: *Acacia tortuosa*; arabinogalactan-protein; gel permeation; gum.

Introducción

El estudio de exudados gomosos, productos naturales de gran complejidad, ha sido de gran interés. La creciente aplicación de las gomas en las industrias alimentaria, farmacéutica, cosmética, textil y vitícola (1,2), entre otras, se basa en su capacidad de modificar las propiedades reológicas de los sistemas acuosos en los cuales intervienen. Se han aprovechado tradicionalmente

sus usos como espesantes (3), emulsificantes (4), gelificantes (5) y clarificantes (6). Actualmente, se han descrito implicaciones nutricionales de las gomas, tales como: efectos gastrointestinales, absorción de lípidos y proteínas, agentes hipocolesterolémicos y efectos antitumorgénicos (7).

En Venezuela, se ha evidenciado la existencia de especies productoras de gomas (8). Se han publicado estudios físico-

* Autor para la correspondencia.

químicos y estructurales de las gomas de *Acacia tortuosa* (9), *Cercidium praecox* (10), *Enterolobium cyclocarpum* (11), *Albizia lebbbeck* (12) y *Acacia macracantha* (13), entre otras.

Tradicionalmente se consideró a la goma como un polímero complejo de carácter glucídico; sin embargo, recientemente se ha comprobado la presencia de una porción glucídica y proteica unidas covalentemente. La porción glucídica, componente mayoritario de la goma, corresponde a un heteropolisacárido ácido. Las gomas se denominan arabinogalactán-proteína (AGP) (14-16).

La estructura química de los polisacáridos aislados de gomas, está constituida por hexosas (galactosa, manosa y glucosa), pentosas (arabinosa y xilosa), metilpentosa (ramnosa) y ácidos urónicos (ácido glucurónico, su derivado 4-O-metil y ácido galacturónico). Estos ácidos urónicos existen en la estructura del polímero parcialmente neutralizados por cationes, tales como: calcio, magnesio, potasio, sodio, etc. Los estudios estructurales de muchos polisacáridos aislados de gomas demuestran la presencia de una estructura tipo -1,3 galactán con ramificaciones constituidas por arabinosa, ramnosa y ácidos urónicos (9-13,17,18).

La presencia de nitrógeno como péptido o proteína es un rasgo importante en la estructura de los AGP. Se han efectuado estudios relacionados con la composición de aminoácidos de gomas de *Acacia* (17), *Prosopis* (19), *Astragalus* (20) y *Albizia* (21). Se ha evidenciado que la hidroxiprolina es el aminoácido más abundante en la goma de *Acacia seyal* ("goma talha") (22), mientras que el ácido aspártico existe predominantemente en las gomas Combretaceae (23,24).

Posteriormente, las investigaciones tendientes a determinar la naturaleza del enlace carbohidrato-proteína en *Acacia robusta* (25), *Acacia tortilis* (26) *Acacia erioloba* (27) y *Acacia senegal* (28), demostraron que la hidroxiprolina es el aminoácido unido al carbohidrato.

El objetivo principal de esta investigación consiste en caracterizar fracciones oligómero-proteína de la goma de *Acacia tortuosa*, con el propósito de indagar acerca de la naturaleza del enlace carbohidrato-proteína.

Materiales y Métodos

Origen y colección de la goma

La muestra estudiada se obtuvo mediante la práctica de una herida a nivel del tallo de la especie de *Acacia tortuosa*. La producción del polímero tuvo lugar en períodos variables (8-15 días), posterior a la estimulación de la planta. La goma cruda se secó en una estufa a 110°C.

Hidrólisis alcalina de la goma

Se disolvieron los nódulos de la goma cruda (5g) en solución saturada de $Ba(OH)_2$ (200 mL) a temperatura ambiente por 2 h. Se hidrolizó la mezcla a 100 °C por 8 h. La solución obtenida se neutralizó con H_2SO_4 1M, se filtró y se obtuvo una solución de goma de color característico, la cual se liofilizó posteriormente (Equipo LABCONCO FREEZE ONE).

Obtención de los perfiles de elución de la goma cruda e hidrolizada por cromatografía gel permeación (GPC)

Se empleó una columna de vidrio (30 x 1 cm) empacada con FRACTOGEL TSK-H-W-65 (s). Con la muestra liofilizada se preparó una solución acuosa de la goma hidrolizada (100 mg/ 10 mL), se tomó una alícuota (0,3 mL) y se agregó a la columna, previamente empacada con el material poroso; se usó como eluyente una solución de NaCl 0,1M. Se tomaron alícuotas (2 mL), a una velocidad de elución de 3,5mL/h. Se determinó la presencia de carbohidrato y proteína por métodos espectroscópicos visible y ultravioleta, respectivamente (29). Las curvas de absorción correspondientes se obtuvieron al graficar absorbancia versus volumen

de elución (mL). Este barrido permitió obtener, en las mismas condiciones, los perfiles de elución de la goma cruda original.

Aislamiento de las distintas fracciones observadas en los perfiles de elución de la goma hidrolizada

Se colectaron tres fracciones que eluyeron en los intervalos determinados: 16-30mL (fracción 2), 34-38mL (fracción 3) y 40-44mL (fracción 4), las cuales se seleccionaron según los máximos de absorbancia observados en los perfiles de elución de las fracciones glucídica y proteica de la goma sometida a hidrólisis básica. Las tres fracciones se redujeron en volumen y se desecaron para su posterior estudio.

Caracterización de las distintas fracciones aisladas de la goma hidrolizada

Hidrólisis ácida: La muestra (mg), obtenida por evaporación del solvente de las fracciones, se disolvió en ácido trifluoroacético (TFA 0,1M) hasta obtener una concentración específica (5mg/mL). Seguidamente se calentó por 1h a 100°C. Se extrajo una alícuota (2 mL), la cual se redujo en volumen. El resto de la solución se ajustó a una concentración 2M de TFA; y se calentó por 6h a 100°C. Se extrajo otra alícuota y se redujo en volumen. El calentamiento continuó a 100°C y se repitió el mismo procedimiento con tiempos de hidrólisis de 15 y 24h. Finalmente, se obtuvieron 4 alícuotas de cada fracción aislada por hidrólisis con TFA.

Métodos cromatográficos:

1. *Determinación cualitativa de carbohidratos:* A cada una de las alícuotas obtenidas en la hidrólisis de cada fracción oligómero-proteína con TFA se determinó el contenido de carbohidratos por el método del fenol-sulfúrico (29). Los azúcares hidrolizados se identificaron por cromatografía de

papel, empleando papel Whatman #1 y se uso un sistema de solvente básico formado por: benceno:butanol:piridina:agua (1:5:3:3).

2. Determinación cualitativa de aminoácidos:

2.1. *Cromatografía de papel (PC):* Se determinó cualitativamente aminoácidos empleando la cromatografía de papel unidimensional descendente, utilizando papel Whatman #3 en un sistema de solventes constituido por butanol: ácido acético: agua (120:30:50) a temperatura ambiente. Se empleó una solución de ninhidrina en acetona (0,25 %) como revelador.

2.2. *HPLC:* Las muestras hidrolizadas se ajustaron a un pH de 2,2 con HCl 6N, con el empleo de un potenciómetro (Methrom 620), estandarizado con un buffer de referencia (pH 7). Las muestras se llevaron a un balón de 100mL, filtrándolas previamente con papel Whatman #1. Se aforó con Buffer Citrato (pH 2,2) y se filtró la solución con filtro millipore (0,45µm). Se conservaron en refrigeración para su posterior análisis.

Los aminoácidos se analizaron por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Se empleó un cromatógrafo modelo SHIMADZU (LCGA HPLC), equipado con detector de fluorescencia (FLDGA). Se usó una columna de ALTEX ULTRASPHERE ODS, C18 (15 cm x 4mm). Los sistemas de solventes empleados se describen a continuación: A: Buffer acetato (0.05 M), metanol y tetrahidrofurano (80:19:1); B: Buffer acetato, metanol (80:20).

Se empleó como referencia una solución de aminoácidos (50nmol/mL) Sigma. Se realizó una derivatización pre-columna de los aminoácidos con un reactivo OPT (O-phthalaldehído); las muestras (20µL) se inyectaron en la columna; el flujo correspondió a 1 mL/min. La fluorescencia se leyó a 470 nm con una longitud de onda de excitación de 350nm.

Resultados y Discusión

El conocimiento global de la goma de *Acacia tortuosa* amerita investigar las fracciones glucídica y proteica. El alto contenido de nitrógeno en esta goma (37,8%) facilita el estudio de la fracción proteica (30).

El perfil de elución de la goma original de *Acacia tortuosa* obtenida a 490 nm, Figura 1, muestra un sólo pico de máxima absorbancia a un volumen de elución de 22mL; en contraste con la goma hidrolizada que muestra tres fracciones perfectamente diferenciables (A, B, C) correspondientes a volúmenes de elución definidos (22, 36 y 42mL). Este perfil corrobora que la estructura predominante es la que se separó al menor volumen de elución (Fracción A). Las fracciones B y C presentan un peso molecular relativamente menor, en función de su mayor volumen de elución. Este hecho sugiere que la hidrólisis alcalina permitió la degradación de la fracción de mayor peso molecular, lo cual se ha reportado para las gomas de *Acacia tortilis* (26) y *Acacia senegal* (28). Por otra parte, el resultado obtenido podría indicar que el tiempo de hidrólisis no fue suficiente para romper un mayor número de enlaces, por lo tanto, los dos fragmentos liberados (B y C), poseen un peso molecular relativamente bajo; este hecho explicaría que la fracción mayoritaria (A) no varió significativamente con respecto a la fracción mostrada en el perfil de elución de la goma original, por lo tanto, el volumen de elución de la banda se mantiene constante (22mL). El predominio de la fracción de mayor peso molecular (A) podría indicar que la degradación de la goma original no fue suficiente como se ha reportado en el caso de la goma de *Acacia erioloba* (27).

El perfil de elución de la goma original, obtenida a 220 nm, Figura 2, exhibe 2 máximos a volúmenes de elución definidos (4 y 18mL), los cuales podrían indicar que hay dos tipos de estructuras químicas con predominio de la estructura de menor peso molecular (volumen de elución 18mL). La diver-

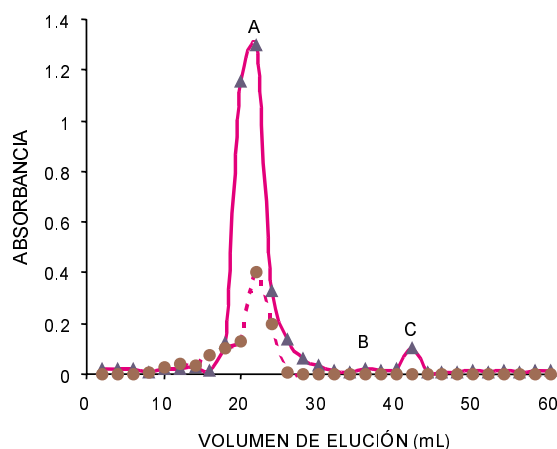


Figura 1. Comparación de los perfiles de elución de la fracción glucídica de la goma original cruda y hidrolizada —▲— de *Acacia tortuosa*.

sidad de estos dos tipos de estructura es un indicador de la presencia de un sistema polidisperso, es decir, un posible comportamiento de un sistema heterogéneo. El sistema polidisperso podría estar relacionado con un complejo tipo AGP presente en la goma investigada. En este perfil de elución de proteínas de la goma cruda se observan otros picos a mayores volúmenes de elución (30, 38 y 46mL), los cuales probablemente corresponden a péptidos susceptibles de degradación; estos picos disminuyen su intensidad en el perfil de elución de la goma hidrolizada y en su lugar aparece otro pico a un volumen de elución mayor, el cual podría corresponder a los aminoácidos liberados.

La comparación de los perfiles de elución para carbohidratos y proteínas de la goma cruda, Figura 3, corrobora lo antes expuesto confirmándose la existencia de un complejo AGP y de péptidos probablemente en la periferia de la molécula, los cuales son susceptibles a hidrólisis básica.

La comparación de los perfiles de elución de la goma hidrolizada de *Acacia tortuosa* obtenidos a 490 y 220nm, Figura 4, evi-

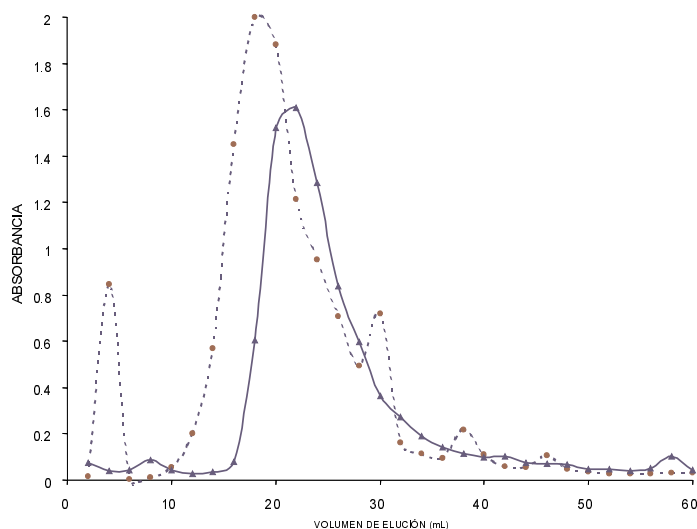


Figura 2. Comparación de los perfiles de elución de la fracción proteica de la goma original cruda e hidrolizada de *Acacia tortuosa*.

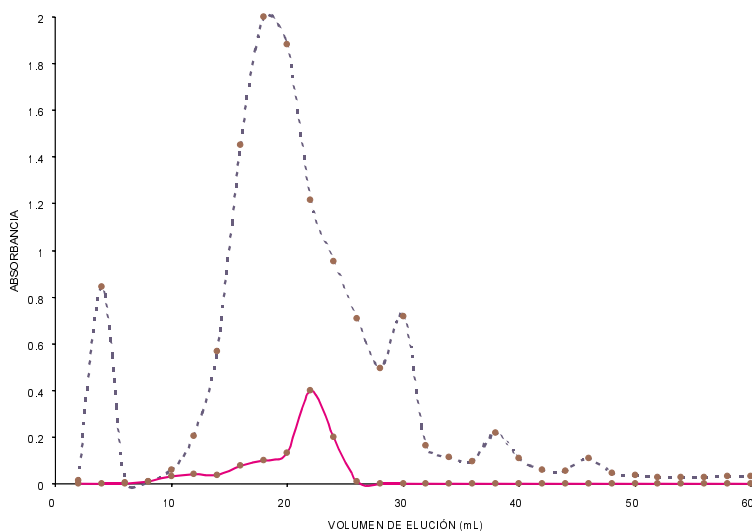


Figura 3. Comparación de los perfiles de elución de la fracción glucídica y proteica de la goma original cruda de *Acacia tortuosa*.

denció 5 máximos. Las fracciones 2, 3 y 4 revelan la presencia tanto de carbohidrato como de proteína y en función de este criterio se aislaron para su posterior análisis. La fracción 2 volumen de elución de 22mL, tal como se discutió anteriormente, corresponde a un AGP. Las distintas fracciones aisladas se sometieron a hidrólisis ácida con áci-

do trifluoroacético (TFA), para posteriormente determinar su composición en carbohidratos y aminoácidos.

El estudio del comportamiento de la porción glucídica, Tabla 1, mostró presencia de ácido glucurónico en las diferentes fracciones analizadas, el cual se removió después de 1 h de hidrólisis. Se observa poste-

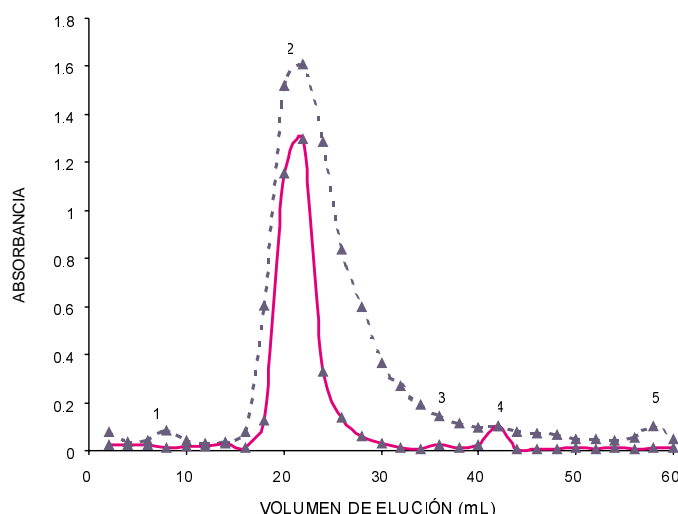


Figura 4. Comparación de los perfiles de elución de la fracción glucídica —▲— y proteica▲..... de la goma hidrolizada de *Acacia tortuosa*.

Tabla 1
Carbohidratos identificados por PC, a partir de las fracciones AGP aisladas por GPC

Tiempo de Hidrólisis (h)	Fracciones		
	2	3	4
1	A. Glc	A. Glc	A. Glc
6	A. Glc, Gal	A. Glc	A. Glc
15	A. Glc, Gal	A. Glc	A. Glc, Gal
24	A. Glc, Gal, Ara	A. Glc, Gal, Ara	A. Glc, Gal, Ara

ácido glucurónico (A.Glc.), arabinosa (Ara), galactosa (Gal).

riormente la remoción de galactosa en tiempos variables (6, 15 y 24 h), en las fracciones 2, 4 y 3, respectivamente. La separación de arabinosa se observó en todos los casos en el mismo tiempo de hidrólisis (24 h). La facilidad relativa de remoción de los distintos azúcares pudiera estar relacionada con la posición de estos monosacáridos dentro del oligómero; el ácido glucurónico podría estar como posible residuo terminal y la arabinosa como residuo interno involucrado en el enlace al péptido en las fracciones oligómero-proteína. Es importante destacar que resultados similares se han publicado para *Acacia tortilis* (26) y *Acacia erioloba* (27), las cuales, al igual que *Acacia tortuosa* pertene-

cen a la serie Gummiferae. Los azúcares periféricos liberados (ácido glucurónico y galactosa), se han descrito en la goma original de *Acacia tortuosa* (30) como integrante del oligosacárido más abundante.

El análisis cromatográfico por HPLC y PC muestra los aminoácidos presentes en las distintas fracciones sometidas a hidrólisis ácida, Tabla 2. Se requirió 24 h en la fracción 2 para observar la presencia de ácido aspártico (Asp), ácido glutámico (Glu), histidina (His), arginina (Arg) y valina (Val); mientras que en la fracción 3 se observa la liberación de His. y Arg. a las 6 h de hidrólisis, a las 15 h comienza a liberarse Val. y finalmente, a las 24 h se muestra la hidrox-

Tabla 2
Aminoácidos identificados por PC y HPLC, a partir de las fracciones AGP aisladas por GPC

Tiempo de Hidrólisis (h)	Fracciones		
	2	3	4
1	-	-	-
6	-	His, Arg	-
15	-	His, Arg, Val	Asp, Glu, His, Arg, Val
24	Asp, Glu, His, Arg, Val	His, Arg, Val, Hyp	Asp, Glu, His, Arg, Val, Hyp

ácido aspártico (Asp), ácido glutámico (Glu), arginina (Arg), hidroxiprolina (Hyp), histidina (His), valina (Val).

prolina (Hyp). Para la fracción 4 se observa liberación de Asp., Glu., His., Arg. y Val a las 15 h, mientras que a las 24 h se muestra la separación de la Hyp. El estudio comparativo de la facilidad relativa para remover los distintos aminoácidos constituyentes de las diferentes fracciones investigadas pareciera que está relacionada con la presencia de la Hyp, el cual probablemente está involucrado en la unión carbohidrato-proteína. Este hecho se ha reportado para: *Acacia robusta* (25), *Acacia tortilis* (26), *Acacia erioloba* (27) y *Acacia senegal* (28).

Por otra parte, los aminoácidos liberados por hidrólisis ácida de la fracción 2 son los mismos que se describen como periféricos para las fracciones 3 y 4. La ausencia de Hyp en las alícuotas obtenidas a partir de la hidrólisis ácida de la fracción 2, podría relacionarse con el hecho de que la hidrólisis ácida no fue suficiente para liberar los aminoácidos más internos debido a la complejidad de dicha fracción.

Los resultados obtenidos en esta investigación evidencian la presencia de un complejo tipo AGP e indica el posible compromiso entre arabinosa e hidroxiprolina como unidades responsables de la unión carbohidrato-proteína.

Agradecimiento

Deseamos expresar nuestro agradecimiento a la Unidad de Investigación de Cien-

cias y Tecnología de Alimentos (UDICTA) de la Facultad de Ciencias Veterinarias de LUZ, y a la Unidad de Genética Médica (UGM-LUZ) del Hospital Universitario de Maracaibo, por el aporte prestado para la culminación de este trabajo.

Referencias Bibliográficas

- ZATZ JL. *Ind Eng Chem Prod Res Dev* 23: 12-16, 1984.
- BAICLÓN S. *Rev Agroquímica y Tecnología de alimentos* 27: 545-555, 1987.
- ANDON A.S. *Food Technology* 41: 74 - 75, 1987.
- TASNEEM R. SUBRAMANIAN N. *J of Agriculture and Food Chemistry* 34: 850-852, 1986.
- REES D.A. *Chemistry and Industry* 19: 630-637, 1972.
- BANNACH W. *Food Gelatin on the Beverage Industries an Important help in juice and Wine Finning* Confrontac. Vol 3:198-206, 1984.
- INK S.L. HURT H.D. *Nutricional Implications of Gum Food Technology* 1: 77-82, 1987.
- CLAMENS C., RINCÓN F., SANABRIA L., VERA A., LEON DE PINTO G. *Food hydrocolloid* 14 (3): 253-257, 2000.
- LEÓN DE PINTO G., MARTÍNEZ M., ORTEGA S., VILLAVICENCIO N., OCANDO E.

- Biochem Syst and Ecol** 21 (8): 795-797, 1993.
10. LEÓN DE PINTO G., MARTÍNEZ M., RIVAS C. **Carbohydr Res** 260: 17-25, 1994.
 11. LEÓN DE PINTO G., MARTÍNEZ M., LUDOVIC DE CORREDOR A., RIVAS C., OCANDO E. **Phytochemistry** 37: 13 11-13 15, 1994.
 12. MARTINEZ M., LEÓN DE PINTO G., ALVAREZ S., GONZÁLEZ DE TROCONIS N., OCANDO E., RIVAS C. **Biochem Sist and Ecol** 23: 843-848, 1995.
 13. MARTINEZ M., LEON DE PINTO G., RIVAS C., OCANDO E. **Carbohydrate Polymers** 29: 247-252, 1996.
 14. FISCHER. **Annu Rev Plant Physiol** 34:47-70, 1983.
 15. ANDERSON D.M.W. **Advancing Frontiers of Plant Sciences** 23:169, 1968.
 16. NOTHNAGEL E.A **International Review of Cytology** 174:195-282, 1997.
 17. ANDERSON DMW., MC DOUGALL F.J. **Food Add Cont** 4:125-132, 1987.
 18. GONZALEZ DE TROPONIS N., LEÓN DE PINTO G. **Ciencia** 6:20-46, 1988.
 19. ANDERSON DMW. **Phytochemistry** 24: 2718-2720, 1985.
 20. ANDERSON DMW. **Food Add Cont** 2: 159-164, 1985.
 21. ANDERSON DMW., MORRISON N.A. **Food Add Cont** 7: 175-180, 1990
 22. ANDERSON DMW., YIN XS. **Food Add Cont** 5: 1 - 8, 1988.
 23. ANDERSON DMW. **Phytochemistry** 26: 237-839, 1987.
 24. ANDERSON DMW. **Food Add Cont** 3: 305-312, 1986.
 25. CHURMS S.C., STEPHEN A.M. **Carbohydr Res** 133: 105-123, 1984.
 26. GAMMON DW., **Carbohydr Res** 151: 135-146, 1986.
 27. GAMMON DW., STEPHEN A. **Carbohydr Res** 154: 289-295, 1986.
 28. OSMAN M.E. **Carbohydr Res** 246: 303-318, 1993.
 29. DUBOIS **Analytical Chemistry** 28: 350-356, 1956.
 30. LEÓN DE PINTO G., MARTÍNEZ M., DE BOLAÑO L., RIVAS C., OCANDO E. **Phytochemistry** 47(4): 53-56, 1998.