

Modificación química de los ácidos urónicos internos en el polisacárido de la goma de *Cercidium praecox*

María Isabel Bozo de González¹, Maritza Martínez¹, Gladys León de Pinto^{1*}
y Adriana Bravo²

¹ Centro de Investigaciones en Química de los Productos naturales, Facultad de Humanidades y Educación, La Universidad del Zulia. Apartado 526, Maracaibo, Venezuela. ² Gerencia de Soporte Científico, Empresas Polar, Caracas, 1071, Venezuela.

Recibido: 26-09-06 Aceptado: 20-09-07

Resumen

La ruptura selectiva de los enlaces uronosil, por el método de decarboxilación-acetoxilación, se aplicó al polisacárido de la goma de *Cercidium praecox* con la finalidad de recabar información acerca de los residuos de ácidos urónicos internos. La secuencia de reacciones (saponificación, acetoxilación y ruptura reductiva) aplicada a la goma del polisacárido permetilado, permitió obtener oligómeros con residuos de xilitol internos (2,3-di-O-metilxilitol) los cuales corresponden a los residuos de ácido urónico modificados. El análisis de los acetatos de alditol, por cromatografía gas-líquido, permitió confirmar la presencia de L-arabinofuranosa (3-O-enlazada y terminal) y D-xilopiranososa (4-O- y 2,4-di-O-substituida) en la estructura del polisacárido. Los resultados obtenidos indican que los residuos de ácido glucurónico internos están 4-O-enlazados.

Palabras clave: Decarboxilación-acetoxilación; gomas; polisacáridos; ruptura selectiva.

Chemical modification of the internal uronic acids in the polysaccharide from *Cercidium praecox* gum

Abstract

A selective cleavage of glycosyluronic acid linkages, by decarboxylation-acetoxylation, has been applied to the polysaccharide from *Cercidium praecox* gum in order to obtain information about the internal uronic acid residues. The reaction sequence (saponification, acetoxylation and reductive cleavage) applied to the permethylated polysaccharide gum led to obtain oligomers with internal 2,3-di-O-methylxylitol which correspond to the modified uronic acid residues. On the other hand, analysis of alditol acetates, by gas-liquid chromatography, led to confirm the presence of L-arabinofuranose (3-O-and terminal) and 4-O-and 2,4-di-O-substituted xylose residues in the polysaccharide structure. It was demonstrated that the internal glucuronic acid residues are 4-O-substituted.

Key words: Decarboxylation-acetoxylation; gums; polysaccharides; selective cleavage.

* Autor para la correspondencia. E-mail: gleon@luz.edu.ve

Introducción

Las gomas aisladas de plantas que crecen en regiones tropicales, son sistemas heterogéneos de gran complejidad estructural. Se ha demostrado que estos sistemas están constituidos, principalmente por una fracción glucídica tipo arabinogalactán (AG) y un material proteináceo, representado por el complejo arabinogalactán-proteína, glicoproteínas y péptidos (1). La fracción glucídica de muchas gomas de especies localizadas en regiones tropicales se han estudiado con rigurosidad, por la aplicación de métodos tradicionales y estudios de 1D y 2D RMN, en especial, las investigaciones relativas a la goma de *Acacia senegal* (2). El interés específico de estas investigaciones se relaciona con el amplio uso de la goma arábiga como aditivo en la industria alimentaria y farmacéutica (3).

Se han reportado datos analíticos y rasgos estructurales de varias gomas, de especies localizadas en Venezuela (4-6). Los estudios estructurales se han apoyado en una combinación de métodos químicos, específicos para carbohidratos, con la espectroscopia 1D y 2D RMN. La proposición inequívoca del modelo estructural de un heteropolisacárido ácido es muy difícil. Se ha recomendado, el aislamiento y la caracterización de oligosacáridos, lo cual facilita una mejor aproximación al modelo estructural propuesto (7).

El aislamiento de los oligosacáridos, por hidrólisis ácida ó enzimática del polisacárido, proviene generalmente de las ramificaciones del polímero. De esta forma se han aislado oligosacáridos que involucran residuos de ácidos urónicos internos, de los exudados gomosos provenientes de diferentes especies, actuando como glicones (5,6). Sin embargo los enlaces uronosil donde los residuos ácidos actúan como aglicones, sí son vulnerables a las condiciones de hidrólisis. Se ha reportado, como una alternativa, la aplicación de métodos específicos endógenos, tales como, la reacción de la 5-hexeno-

sa, el método de decarboxilación-acetoxilación y el rearrreglo de Hofmann-Curtius (8-10). Esta metodología se ha aplicado con éxito en las gomas de *Anogeissus leiocarpus* (*leiocarpán A*) (9), *Acacia senegal* (10), *Anadenanthera colubrina* (*angico blanco*) (11) y *Cedrela odorata* (12). Mediante estos métodos de ruptura selectiva de los enlaces uronosil, se modifica el residuo ácido involucrado en el enlace, para hacerlo resistente a la ruptura y así poder aislar oligosacáridos, donde se retiene la información relativa al carbono secundario involucrado en el enlace, el tipo y secuencia de azúcares unidos a este residuo ácido.

La goma de *Cercidium praecox* involucra un heteropolisacárido atípico, constituido por residuos de xilosa y ácidos urónicos, como esqueleto central de la estructura.

Este trabajo se refiere a la ruptura selectiva de los enlaces uronosil, presentes en la goma de *Cercidium praecox*, por el método de decarboxilación-acetoxilación.

Materiales y Métodos

Origen y purificación de la muestra

Se seleccionaron los especímenes de *Cercidium praecox* (R&H) Harms (yabo, palo verde), ubicados en los jardines de la Facultad de Humanidades y Educación de La Universidad del Zulia. La estimulación para producción de la goma, por práctica de heridas, a nivel del tallo, se hizo en época no lluviosa (Enero-Marzo, 2004) y se colectó en períodos variables (8-15 días).

La goma colectada (3g), se limpió manualmente, y se disolvió en agua destilada (100 mL). La solución se filtró, por papel Whatman Nº 41 y se dializó, contra agua de chorro circulante (48 h), para la remoción de productos de bajo peso molecular. La goma purificada se obtuvo por liofilización (Liofilizador Labconco Freeze-Dryer 8), a presión y temperatura controladas, previa congelación mediante una mezcla frigorífica acetona-hielo seco.

Metilación de las gomas

La goma de *C. praecox* (300 mg), se metiló aplicando sucesivamente los Métodos de Haworth (14) e Irving-Purdie (15), para garantizar la eterificación total de los grupos hidroxilos primarios y secundarios de los diferentes residuos de azúcares. La goma permitilada (50-70 mg), se obtuvo como un precipitado blanco amorfo. Este proceso se llevó a cabo varias veces, con la finalidad de acumular suficiente goma permitilada para las reacciones sucesivas.

Saponificación de los productos permitilados

El polisacárido permitilado esterificado (200 mg) se saponificó siguiendo la metodología descrita por Aspinall y Puvanesarajav (9). La muestra saponificada se obtuvo como un precipitado blanco amarillento amorfo (180 mg).

Preparación de 5-acetoxipentapiranosidos a partir del polisacárido permitilado ácido

El polisacárido permitilado ácido (180 mg) se colocó en una mezcla de benceno (10 mL) con piridina (0,2 mL); se agregó tetraacetato de plomo (1 g) y se reflujo (24 h) (9). La mezcla de reacción se filtró y el precipitado se lavó con benceno; la combinación de filtrados y lavados se mezcló varias veces con agua, se secó sobre sulfato de sodio anhidro y se redujo en volumen para obtener los polisacáridos acetoxilados (100mg).

Fragmentación reductiva del polisacárido acetoxilado

El polisacárido acetoxilado (150 mg) se disolvió en una mezcla de tetrahidrofurano-agua (1:1,3) y se trató con borohidruro de sodio (100 mg, 25°C, 15 h). El exceso de borohidruro se eliminó con ácido acético y se añadió la resina intercambiadora Amberlite IR-H⁺ (pH 5). La solución se trató varias veces con metanol, el cual se eliminó en un rotavapor BUCHI RE-110, conectado a un sistema de vacío, a temperatura adecuada

(40°C), para obtener la mezcla de oligosacáridos con un residuo pentitol terminal (9).

Aislamiento de los oligómeros obtenidos

a) Benzoilación de la mezcla de oligómeros

La mezcla de oligómeros obtenidos en la etapa anterior, se obtuvo en pesos variables. Se disolvió la mezcla de oligómeros (50 mg) en piridina (2 mL), se agregó cloruro de benzoilo (0.25 mL, 0°C) y se mantuvo a temperatura adecuada (25°C, 24 h). Se adicionó hielo a la mezcla de reacción y colocó en un recipiente con agua. Se extrajo con diclorometano (100 mL). La capa orgánica se lavó varias veces con bicarbonato de sodio y se redujo a sequedad en rotavapor (9).

b) Cromatografía de gel filtración

La mezcla de oligómeros benzoilados obtenidos en la etapa anterior, se cromatografió en una columna de vidrio (27 x 1,3 cm), empacada con Fractogel TSK HM-65 (S), usando diclorometano como eluyente. El perfil de elución a 230 nm, mostró diferentes fracciones (oligómeros), las cuales se aislaron y caracterizaron.

c) De-O-benzoilación de los oligómeros aislados

Los oligómeros benzoilados aislados, se trataron con metóxido de sodio recién preparado (disolución de sodio metálico, 43 mg en metanol grado HPLC, 1 mL). Se añadió la resina intercambiadora Amberlite IR-H⁺, se filtró la mezcla de reacción y se redujo en volumen para obtener los oligómeros de-O-benzoilados.

Caracterización de los oligosacáridos aislados por cromatografía gas-líquido (C.G.L.)

Los acetatos de alditol de los oligómeros aislados se prepararon como se ha reportado para otras gomas (12). La mezcla de los acetatos de alditol, obtenida para cada oligómero, se inyectó en el cromatógrafo de gases Perkin-Elmer Autosystem, provisto de una

columna de vidrio (152,4 x 2 mm) empacada con OV-225 y ECNSS-M al 3%, como fase estacionaria. Se empleó un programa isotérmico (170°C, 20 min.) y luego una rampa de temperatura (5°C) hasta alcanzar la temperatura máxima (200°C). Las temperaturas del inyector y detector se ajustaron (250°C). Los tiempos de retención se refirieron al valor correspondiente del 1,5-di-O-acetil-2, 3, 4, 6-tetra-O-metil-D-glucitol (10).

Espectroscopia de Infrarrojo (I.R.)

La culminación satisfactoria de cada una de las etapas en la secuencia de reacciones, se comprobó por i.r. en un espectrofotómetro infrarrojo con Transformada de Fourier, modelo FTIR-8300, marca SHIMADZU.

Resultados y Discusión

La goma original de *Cercidium praecox* está constituida por xilosa, arabinosa y ácidos urónicos (13,16). La ausencia de galactosa, componente predominante en la mayoría de las gomas investigadas (4-6), constituye un rasgo atípico. Los ácidos urónicos están representados por el ácido glucurónico y su 4-O-metil éter; estos últimos existen parcialmente neutralizados en concordancia con el alto contenido de ceniza (6%) (17).

El espectro de i.r. de la goma de *Cercidium praecox* (Figura 1) muestra las vibraciones de alargamiento y de flexión (cm^{-1}), características de los grupos funcionales OH- (3500), C-H (1375), C=O (1645) y C-O (1080), presentes en las estructuras de estos polisacáridos ácidos. El proceso de metilación de la goma tiene por objeto eterificar los grupos -OH secundarios y primarios libres; este proceso puede estar acompañado de la esterificación de los grupos -COOH, presentes en la molécula del polisacárido (Figura 2).

El espectro de i.r. de la goma permetilada (Figura 3) confirmó que se llevó a cabo con éxito, el proceso de eterificación; desapareció la banda de -OH (3000) característica de los grupos hidroxílicos primarios y secundarios del anillo. La banda correspondiente al C=O de éster (1720) tiene poca intensidad. Se ha descrito que las moléculas de ésteres tienden a adoptar una conformación en el equilibrio, en la cual el momento dipolar del enlace C=O, se encuentra disminuido (18); además, dada la complejidad del polímero, efectos estéricos podrían contribuir con este hecho. Esta banda de baja intensidad se observó también en el espectro de la goma permetilada de *Cedrela odorata* (12).

Durante el proceso de saponificación los grupos -COOH esterificados se regeneran por tratamiento con una base fuerte (NaOH), y posterior acidificación (pH 4) (Fi-

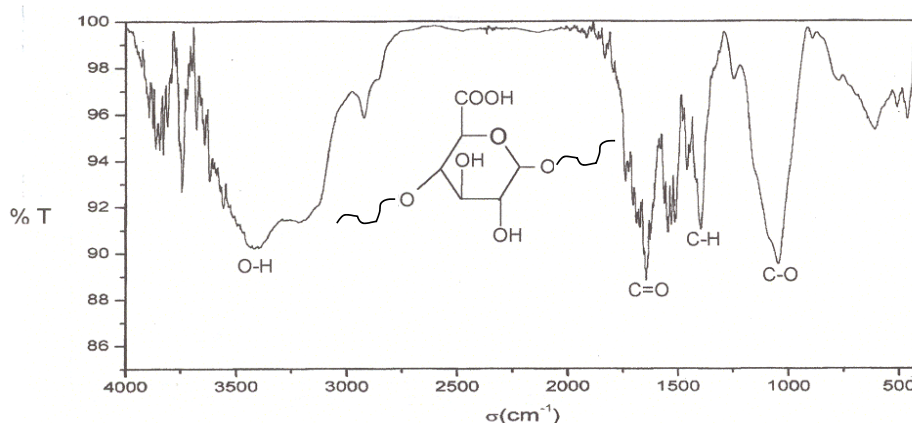
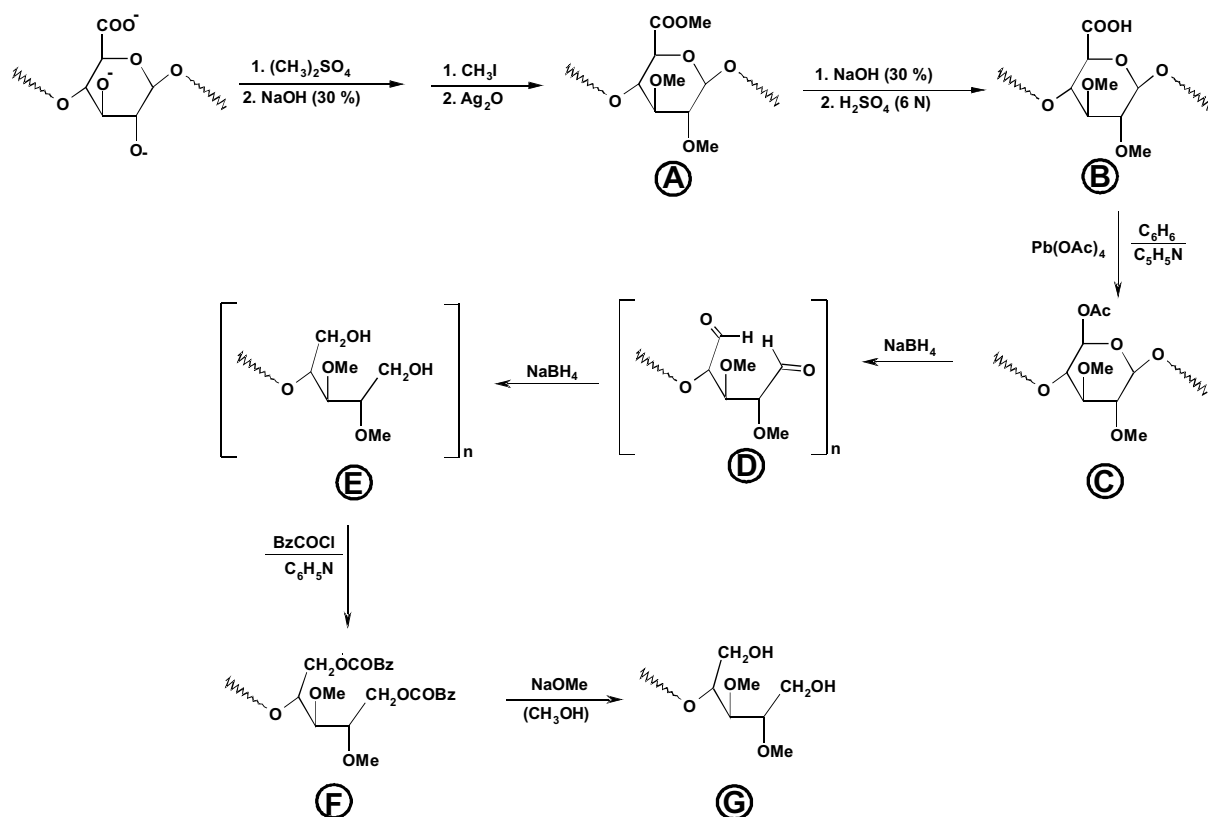


Figura 1. Espectro de I.R. de la goma original de *Cercidium praecox*.



A) Goma permetilada esterificada, B) Goma saponificada, C) Goma acetoxilada, D) Oligómeros con pentodialdosa intermediaria, E) Oligómeros con pentitol terminal, F) Oligómero benzoilado, G) Oligómero de-O-benzoilado.

Figura 2. Secuencia de reacciones del Método de Decarboxilación-Acetoxilación.

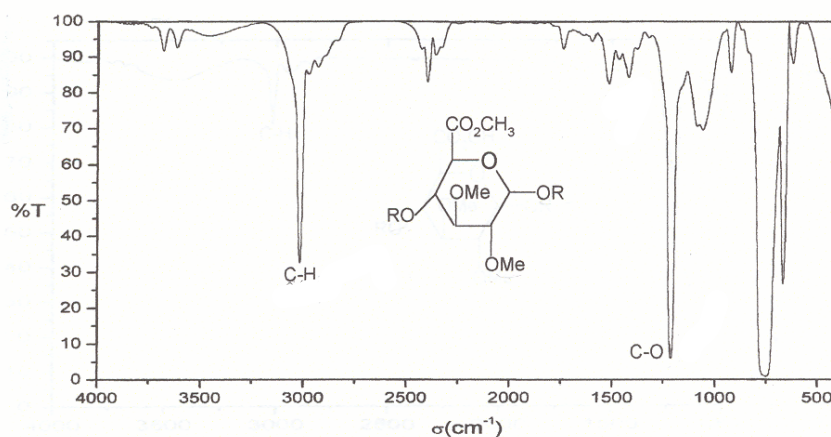


Figura 3. Espectro de I.R. de la goma permetilada de *Cercidium praecox*.

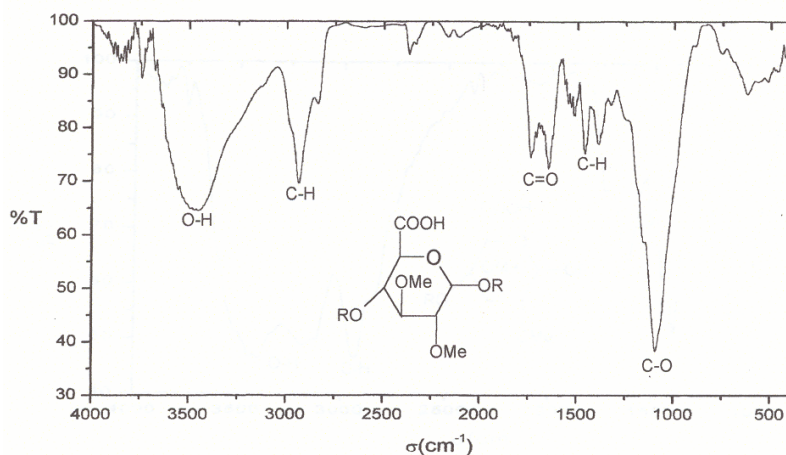


Figura 4. Espectro de I.R. de la goma saponificada de *Cercidium praecox*.

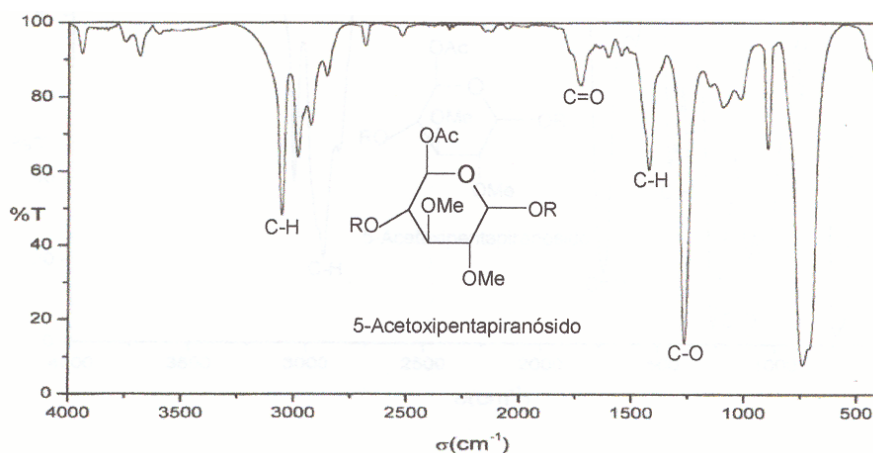


Figura 5. Espectro de I.R. de la goma acetoxilada de *Cercidium praecox*.

gura 2). La reaparición de las bandas de alargamiento de -OH (3500) y de C=O (1645) de ácido en el espectro de i.r., demostró que el proceso de saponificación se llevó a cabo completamente (Figura 4).

La reacción de acetoxilación, (Figura 2) acompañada de un proceso de decarboxilación oxidativa, produce derivados tipo 5-acetoxipentapiranosidos. El espectro de i.r. (Figura 5) muestra la desaparición simultánea de las bandas de alargamiento del -OH (3500) y -C=O de los grupos ácidos -COOH (1645). La baja intensidad de la banda del carbonilo -C=O del grupo acetoxi (1722) po-

dría estar relacionada con efectos estéricos y/o con la disminución de la polaridad del enlace C=O , como se describió para la goma permetilada esterificada (Figura 5) (18).

El polisacárido acetoxilado se redujo con borohidruro de sodio. La pentodialdosa intermedia terminal, bajo las condiciones experimentales usadas (NaBH_4 , 100 mg, 25°C , 15h), no se transformó totalmente en el residuo pentitol. Las bandas debidas al alargamiento del C-H (2780, Resonancia de Fermi) y del C=O de aldehído (1692), son indicadores de este hecho. Sin embargo, la aparición de la banda ancha e intensa de

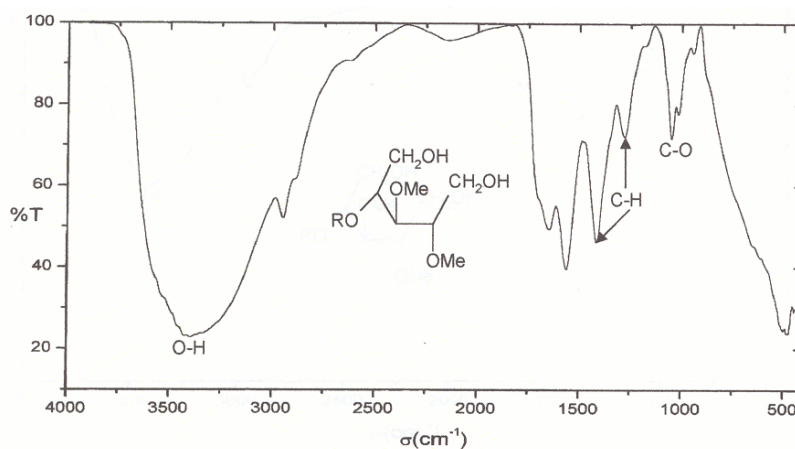


Figura 6. Espectro de I.R. de la mezcla de oligómeros con residuos xilitol terminal.

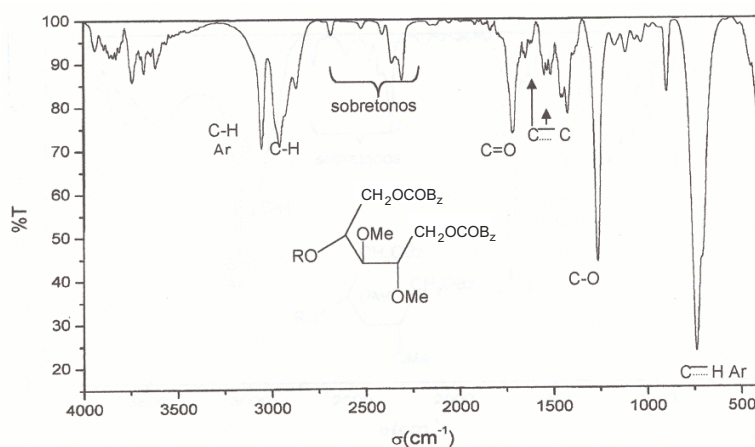


Figura 7. Espectro de I.R. de la mezcla de oligómeros benzoilados.

(-OH) (3500) de los nuevos grupos (-CH₂OH) sugiere la formación de los oligómeros pentitales (Figura 6).

Los oligómeros se aislaron de la mezcla obtenida, previa preparación de los derivados benzoilados. El espectro de i.r. evidencia la formación de estos derivados (Figura 7). El perfil de elución de la mezcla de oligómeros benzoilados de la goma investigada, se obtuvo por cromatografía de exclusión (Figura 8). La absorbancia de las diferentes alícuotas se midió por espectroscopia de U.V. ($\lambda_{\text{máx}}$ 230 nm). Se observó la presencia de tres oligómeros principales para la goma de *Cer-*

cidium praecox, a volúmenes determinados (5, 12 y 19 mL). Las fracciones de mayor volumen de elución (25-80 mL), no se resolvieron bajo las condiciones experimentales empleadas.

Los oligómeros aislados se de-O-benzoilaron, por acción del metóxido de sodio (Figura 2), se hidrolizaron y transformaron en los correspondientes acetatos de alditol y se identificaron mediante cromatografía gas-líquido. Los tiempos de retención se relacionaron con el 1,5-di-acetil-2, 3, 4, 6-tetra-O-metil-D-glucitol (Tabla 1) (10).

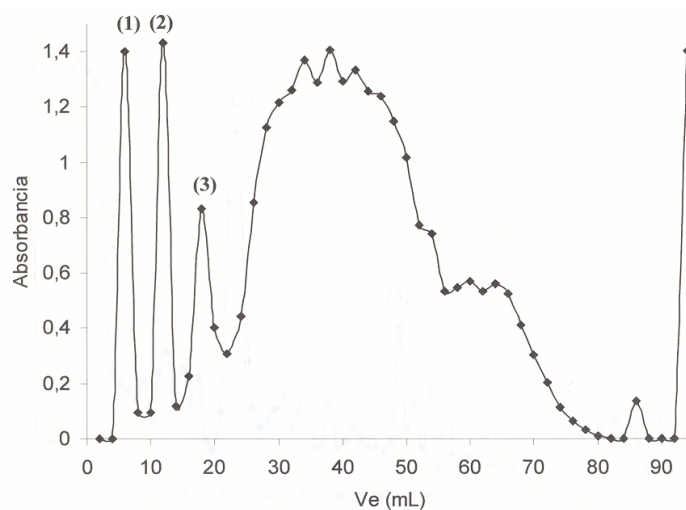


Figura 8. Perfil de elución de la mezcla de oligómeros benzoilados de la goma de *Cercidium praecox*.

Tabla 1
Análisis de metilación de los oligómeros aislado de la goma de *Cercidium praecox*.

O-Metil Azúcares	Tra (min)	Tipo de Enlace
2,3,5-Me ₃ -Araf	0,45	Araf (1
2,3,4-Me ₃ -Xilp	0,60	Xilp (1
2,5-Me ₂ -Araf	0,78	3) Araf (1
2,3-Me ₂ -Xil	1,45 ^b	4) Xilp (1
3-Xil	2,07 ^c	4) Xilp (1
		2

^aTr relativos al 1,5-diacetil-2,3,4,6-tetrametil-D-glucitol, empleando una columna OV-225, 3%.

^bFase estacionaria ECNSS-M, 3%.

^cReferencia 19.

El análisis de metilación de los oligómeros aislados de la goma de *C. praecox* (Tabla 1), confirmó la presencia de α -L-arabinofuranosa (terminal y 3-O-enlazada), lo cual se corresponde con las evidencias químicas y espectroscópicas reportadas (13). La presencia de xilosa 2,4-di-O-sustituida sugiere que las cadenas laterales o residuos terminales se unen al C-2 de los residuos 4-O-D-xilopiranosos internos constituyentes de la estructura (13). El análisis por cromatografía

gas-líquido permitió detectar un solo tipo de xilitol di-O-sustituido, el 2,3-di-O-metilxilitol, obtenido por modificación de los grupos COOH, lo cual sugiere que el carbono 4, de los residuos de ácido glucurónico internos, se encuentra involucrado en el enlace glicosídico. Este resultado se ha reportado para la goma de *Cedrela odorata* (12). La ausencia de 2,4-di-O-metilxilitol evidencia que los residuos de ácidos urónicos internos no se encuentran 3-O-enlazados.

Conclusiones

Los resultados discutidos anteriormente confirman los rasgos estructurales relevantes del polisacárido de la goma de *Cercidium praecox* (14). Se demostró que los residuos de ácido glucurónico internos están 4-O-enlazados y se confirmó la presencia de residuos L-arabinofuranosos en las ramificaciones, unidos probablemente al C-2 de los residuos 4-O-D-xilopiranosos internos constituyentes de la estructura.

Agradecimiento

Los autores expresan su agradecimiento al Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico (CONDES), Universidad del Zulia, Maracaibo, Venezuela, por el soporte financiero que permitió el desarrollo de esta investigación.

Referencias Bibliográficas

- GAMMON D.W., CHURMS S.C., STEPHEN A. *Carbohydrate Research* 151:135-146, 1986.
- OSMAN M.E., MENZIES A.R., WILLIAMS P.A., PHILLIPS G.O., BALDWIN T.C. *Carbohydrate Research* 8: 303-318, 1993.
- VERBEKEN D., DIERCKX S., DEWWETTINCK K. *Appl Microbial Biotechnol* 63: 10-21, 2004.
- LEÓN DE PINTO G., SANABRIA L., MARTÍNEZ M., BELTRÁN O., IGARTUBURU J.M. *Food Hydrocolloids* 16: 599-603, 2002.
- LEÓN DE PINTO G., MARTÍN RZ M., SANABRIA L. *Food Hydrocolloids* 15: 461-467, 2001.
- MARTÍNEZ M., LEÓN DE PINTO G., RIVAS C., OCANDO E. *Carbohydrate Polymer* 29: 247-252, 1998.
- AGRAWAL P.K. *Phytochemistry* 31(10): 3307-3330, 1992.
- KITAGAWA I., YOSHIKAWA M., KADOTA A. *Chemical Pharm Bull* 26: 484-487, 1978.
- ASPINALL G.O., PUVANESARAJAH V. *Canadian Journal of Chemistry* 61:1864-1869, 1983.
- ASPINALL G.O., KNEBL M.C. *Carbohydrate Research* 157: 261-268, 1986.
- DELGOBO C.L., PHILIP A.J., GORÍN CÉSARA. TISCHER MARCELLO IACOMINI *Carbohydrate Research* 320:167-175, 1999.
- BOZO DE GONZÁLEZ M.I., LEÓN DE PINTO G., MARTÍNEZ M., MICHELENA DE BÁEZ E., ÁNGEL GHÍO J. *Ciencia* 12(3): 215-220, 2004.
- LEÓN DE PINTO G., MARTÍNEZ M., RIVAS C. *Carbohydrate Research* 260: 17-25, 1994.
- HAWORTH H.N. *Journal of the Chemical Society* 107: 8-16, 1915.
- PURDIE T., IRVINE J.C. *Journal of the Chemical Society* 83: 1021-1037, 1903.
- LEÓN DE PINTO G., RODRÍGUEZ M., MARTÍNEZ M., RIVAS C. *Biochemical Systematic and Ecology* 21: 297-300, 1993.
- ANDERSON D.M.W., McDOUGALL F. *Phytochemistry* 24(6): 1237-1240, 1985.
- MARCANO D., CORTÉS L. *Química Orgánica*. Editorial Reverté Venezolana, Tomo 2. Caracas (Venezuela), p. 629, 1982.
- SELVENDRAN R.R., STEVENS BJH. *New Series* Vol 3 (H:F: Linskens and J:F: Jackson, eds) Springer-Verlag. Berlin, 1986.