

# Caracterización estructural de dos oligosacáridos y del núcleo del polisacárido de la goma de *Cedrela odorata*

María Isabel Bozo de González<sup>a\*</sup>, Maritza Martínez Carrizo<sup>a</sup>, Gladys León de Pinto<sup>a</sup>, Lilian Sanabria<sup>a</sup>, Adriana Bravo<sup>b</sup>, Julio Herrera<sup>c</sup>, José Igartuburu<sup>d</sup>.

<sup>a</sup>Centro de Investigaciones en Química de los Productos Naturales, Facultad de Humanidades y Educación, La Universidad del Zulia. Apartado 526, Maracaibo. <sup>b</sup>Gerencia de Soporte Científico, Empresas Polar, Caracas 1071, Venezuela. <sup>c</sup>Laboratorio de Fitoquímica Biodirigida, Departamento de Química, Universidad Simón Bolívar. <sup>d</sup>Departamento de Química Orgánica, Facultad de Ciencias, Universidad de Cádiz, Apartado 40, 115110 - Puerto Real, Cádiz, España.

*Structural characterization of two oligosaccharides and the backbone of the polysaccharide from Cedrela odorata gum*

*Caracterització estructural de dos oligosacàrids i del nucli del polisacàrid de la goma de Cedrela odorata*

Recibido: 6 de mayo de 2007; revisado: 23 de julio de 2008; aceptado: 4 de agosto de 2008

## RESUMEN

Se caracterizaron dos oligosacáridos y el núcleo del polisacárido de la goma de *Cedrela odorata*. Las gomas degradadas A y B, se prepararon sucesivamente, a partir de la goma original, mediante hidrólisis ácida parcial y degradación de Smith. Los oligosacáridos se aislaron por hidrólisis ácida parcial de la goma degradada A. La caracterización estructural se hizo mediante la combinación de métodos clásicos para carbohidratos y espectroscopia de RMN bidimensional (TNTocsy y HMQC). Los datos obtenidos demostraron la presencia, en los oligosacáridos aislados, de 4-O- y 2,4-di-O- $\alpha$ -L-ramnosa, 2-O- $\beta$ -L-arabinopiranososa y 4-O- $\beta$ -D-galactosa. El núcleo está constituido por 2-O- $\alpha$ -L-ramnosa, sustituida en posición 4, residuos de 3-O- $\beta$ -D-galactosa, algunos de éstos sustituidos en posición 2. La caracterización de fragmentos más simples, proporciona información relevante para proponer un modelo estructural para el polisacárido complejo.

**Palabras clave:** *Cedrela odorata*. Exudado gomoso. Oligosacáridos. Degradaciones de Smith. RMN bidimensional.

## SUMMARY

They were characterized two oligosaccharides and the backbone of the polysaccharide from *Cedrela odorata* gum. Degraded gums A and B were prepared successively, from original gum, by acids hydrolysis and Smith-degradation process. The oligosaccharides were isolated by partial acid hydrolysis of degraded gum A. The structural characterization was done by the combination of the classical method for carbohydrates and two-dimensional NMR spectroscopy (TNTocsy and HMQC). The data support the presence of 4-O- and 2,4-di-O- $\alpha$ -L-rhamnose, 2-O- $\beta$ -L-arabinopyranose and 4-O- $\beta$ -D-galactose in

the isolated oligosaccharides. On the other hand, the nucleus is constituted by 2-O- $\alpha$ -L-rhamnose, substituted on position C-4, and 3-O- $\beta$ -D-galactose residues, some of them substituted on position C-2. The characterization of simple fragments, provided a relevant structural information to propose a structural model of the complex polysaccharide.

**Key words:** *Cedrela odorata*. Gum exudates. Oligosaccharides. Smith-degradation. 2D-NMR techniques.

## RESUM

Es caracteritzen dos oligosacàrids i el nucli del polisacàrid de la goma de *Cedrela odorata*. Les gomes degradades A i B es preparen successivament a partir de la goma original, mitjançant hidròlisi àcida parcial i degradació d'Smith. Els oligosacàrids s'aïllen per hidròlisi àcida parcial de la goma degradada A. La caracterització estructural es realitza mitjançant la combinació de mètodes clàssics per a carbohidrats i espectroscòpia de RMN bidimensional (TNTOCYSY i HMQC). Les dades obtingudes demostren la presència, en els oligosacàrids aïllats, de 4-O- i 2,4-di-O- $\alpha$ -L-ramnosa, 2-O- $\beta$ -L-arabinopiranososa i 4-O- $\beta$ -D-galactosa. El nucli està constituït per 2-O- $\alpha$ -L-ramnosa substituïda en posició 4 i residus de 3-O- $\beta$ -D-galactosa, alguns d'aquests substituïts en posició 2. La caracterització de fragments més senzills proporciona informació rellevant per proposar un model estructural per al polisacàrid complex.

**Mots clau:** *Cedrela odorata*. Exsudat gomós. Oligosacàrids. Degradacions d'Smith. RMN bidimensional.

\* Autor para correspondencia: Tel: +58-261-759-6269. Fax: +58-261-759-6149. mibodegon2003@yahoo.es; mibodegon2003@gmail.com

## INTRODUCCIÓN

Las gomas, hidrocoloides, están constituidos predominantemente por heteropolisacáridos ácidos y un material proteináceo minoritario<sup>(1)</sup>. Las investigaciones realizadas hasta el presente han demostrado la complejidad estructural del polisacárido aislado de gomas de *Acacia*<sup>(2,3)</sup>, *Spondias*<sup>(4,5)</sup> y *Anacardium*<sup>(6)</sup>. El esqueleto central está representado por un  $\beta$ -1,3-galactán; galactosa, arabinosa, ramnosa y ácidos urónicos son constituyentes de las ramificaciones estructurales.

El polisacárido, aislado de *Cedrela odorata* (Meliaceae), tiene ciertos rasgos estructurales atípicos<sup>(7)</sup>. El núcleo es un ramnogalactán ácido. Los ácidos urónicos están presentes tanto en el núcleo como en las ramificaciones de la estructura del polisacárido. Se ha descrito que el ácido  $\beta$ -D-glucurónico interno está 4-O-enlazado<sup>(8)</sup>.

El aislamiento de oligosacáridos constituye una herramienta valiosa para profundizar en el conocimiento de la estructura de estos polímeros complejos<sup>(9,10)</sup>.

El presente trabajo tiene como objetivo profundizar en el conocimiento de los rasgos estructurales primarios de la goma de *C. odorata* mediante el aislamiento y caracterización de dos oligosacáridos y de un producto degradado, núcleo de la estructura, por la combinación de métodos químicos y espectroscopia de RMN bidimensional.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Origen y purificación de la goma

La goma de *Cedrela odorata* (Meliaceae), conocida en Venezuela con el nombre vulgar de cedro, se colectó en época no lluviosa (enero-marzo de 2006), en períodos variables (8-15 días), de árboles ubicados en el Consejo de Ciruma, Municipio Miranda, Estado Zulia, Venezuela. Se estimuló la producción de la goma mediante la práctica de heridas, a nivel del tronco, de los especímenes en estudio. La goma colectada, muy soluble en agua, se purificó por disolución, diálisis y liofilización.

### Preparación de los Productos Degradados

#### Goma Degradada A

La goma pura (13 g) se trató con ácido sulfúrico (5 mM, 526 mL, 96 h, 100 °C). 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 (4,39 g). El dializado en agua destilada se concentró para su posterior estudio por cromatografía de papel.

#### Goma Degradada B

La goma Degradada A (3 g) se disolvió en agua destilada (88 mL), se le añadió una solución de metaperyodato de sodio (0.5 M, 88 mL). La oxidación se llevó a cabo en la oscuridad, a temperatura ambiente (96 h). La reacción redox se detuvo con etilenglicol y se dializó contra agua de chorro circulante (48 h). 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 (0.5M, 48 h, 25 °C); a continuación se dializó contra agua de chorro circulante (48 h). La goma degradada B se obtuvo por liofilización (0,66 g).

### Aislamiento y caracterización de los oligosacáridos

Los oligosacáridos se aislaron por hidrólisis ácida parcial de la goma degradada A ( $H_2SO_4$ , 0.25 M, 1 h, 100 °C) y se caracterizaron por su movilidad cromatográfica, composición de azúcares, análisis de metilación y RMN bidimensional (TNTocsy y HMQC). En el análisis cromatográfico se usó el sistema de solventes: acetato de etilo, anhídrido acético, ácido fórmico y agua (18:3:1:4).

### Análisis de Metilación

La goma colectada y purificada se permetiló siguiendo la metodología descrita<sup>(11,12)</sup>. El polisacárido permetilado se hidrolizó, redujo con borohidruro de sodio y acetiló para obtener la mezcla de acetatos de aldito; ésta se inyectó en un cromatógrafo de gases Perkin-Elmer Autosystem, acoplado a un espectrómetro de masas, provisto de una columna de vidrio (152,4 x 2mm) empacada con OV-225 al 3 %, como fase estacionaria. Se empleó un programa isotérmico (170 °C, 20 min.) y una rampa de temperatura (5 °C/min) hasta alcanzar la temperatura máxima (200 °C). Las temperaturas del inyector y detector fueron iguales (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-galactitol (35,813 min).

### Espectroscopia de RMN

Los espectros bidimensionales se corrieron en un espectrómetro Avance DRX-400 operado a 100572 MHz y 399944 MHz para  $^{13}C$  y  $^1H$ , respectivamente. Los estudios incluyeron una técnica homonuclear, TNTocsy, y otra heteronuclear HMQC. Las muestras (50-100mg) se disolvieron en agua deuterada (0.5-1.0 mL); los datos se acumularon a una temperatura de 25 °C y el cálculo de los desplazamientos químicos se hizo en función de la señal del tetrametilsilano (Me<sub>4</sub>Si).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La goma original de *Cedrela odorata* está constituida por residuos de galactosa, arabinosa, ramnosa y ácidos urónicos<sup>(13)</sup>.

La degradación, mediante hidrólisis ácida parcial de este polímero, permitió el aislamiento de dos oligosacáridos, los cuales se caracterizaron por análisis de metilación y espectroscopia de RMN bidimensional.

El oligosacárido 1, con una movilidad cromatográfica Rgal 0.22 (a), (solvente ácido) está constituido por galactosa, arabinosa y ramnosa. El análisis espectral bidimensional, TNTocsy y HMQC, Figs. 1 y 2, reveló la presencia de residuos de 4-O- y 2,4-di-O- $\alpha$ -L-ramnosa. El espectro TNTocsy, Fig. 1, muestra múltiples señales que relacionan los protones metílicos de  $\alpha$ -L-ramnosa (1.12 ppm) con los protones anoméricos, i.e. 5.1, 5.0 y 4.45 ppm. El protón a 5.1 ppm se une directamente a un carbono reductor (92.3 ppm), Fig. 2, mientras que los H-1 (5.0 y 4.45 ppm) corresponden a carbonos anoméricos, en dos ambientes diferentes, que resuenan a 100.3 y 102.0 ppm, respectivamente. Se observa también en el espectro TNTocsy, Fig. 1, las correlaciones 1.12/4.0 y 1.12/3.86 ppm; los protones a 4.0 y 3.86 ppm se enlazan con carbonos (78.6; 79.6 ppm), Fig. 2, asignables a C-2 de 2-O- $\alpha$ -L-ramnopiranosas<sup>(14)</sup>. La mayoría de los sistemas de spin correspondientes a residuos de  $\alpha$ -L-ramnosa evidencian correlaciones que involucran al protón que resuena a 3.13 ppm. El espectro HMQC, Fig. 2, revela que este protón se une a un carbono (a 82.2 ppm) asignado al C-4 enlazado de  $\alpha$ -L-ramnosa<sup>(14)</sup>. Estos resultados

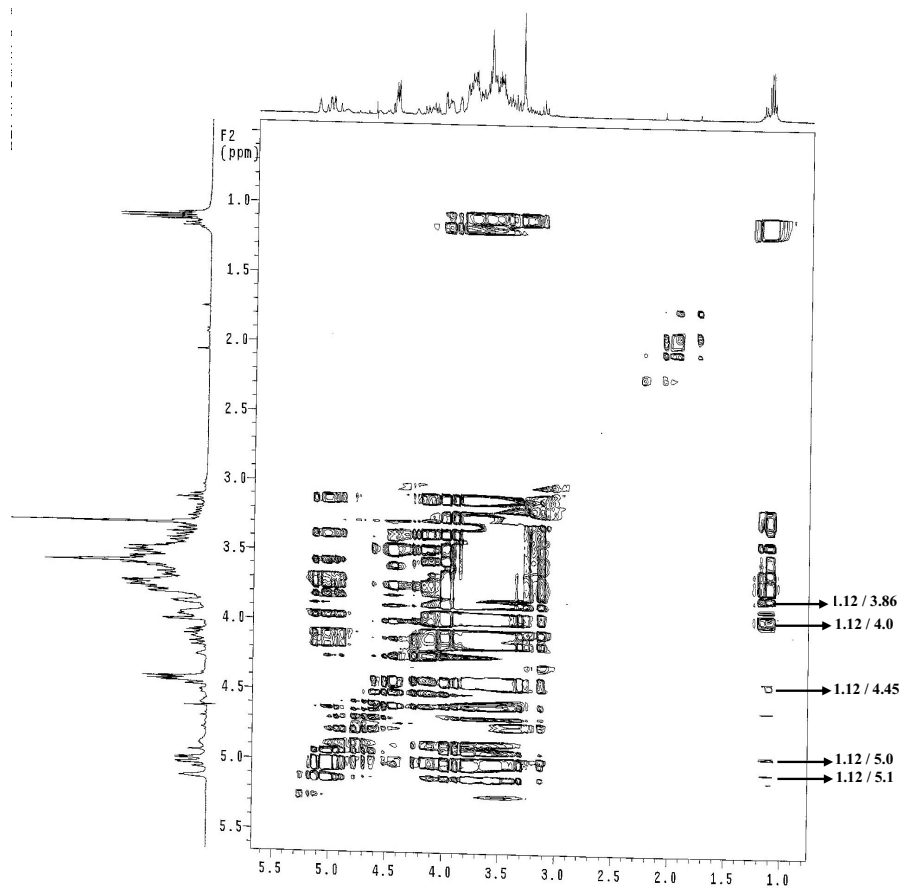


Figura 1. Espectro TNTocsy del oligosacárido 1, Rgal 0,22 (a).

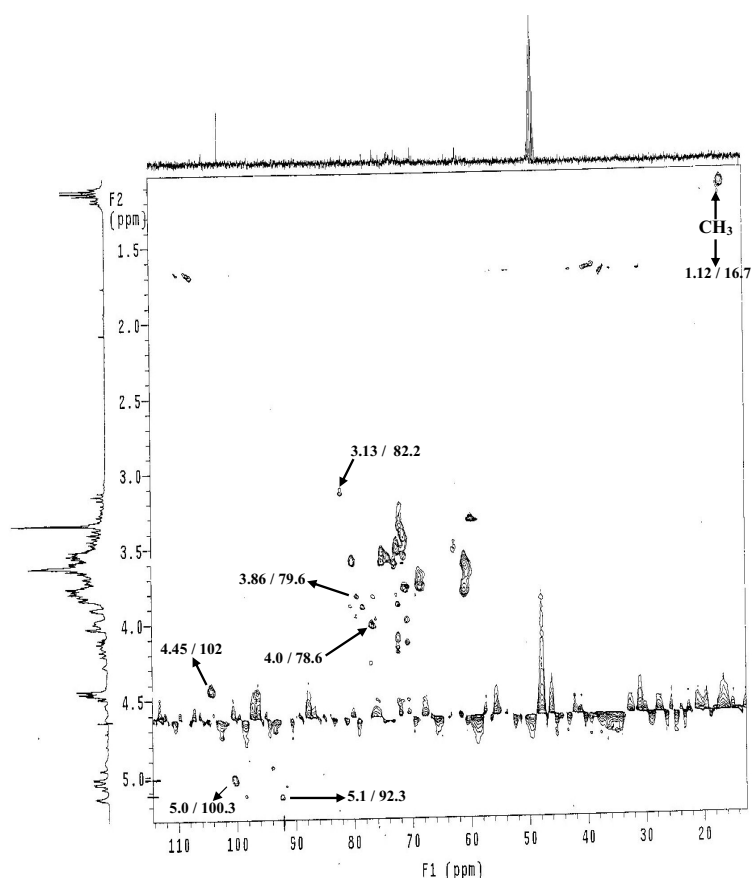


Figura 2. Espectro HMQC del oligosacárido 1, Rgal 0,22 (a).

TABLA I

Datos de metilación de la goma de *Cedrela odorata* y sus productos degradados.

Azúcar metilado	G.O.	Deg. A	Deg. B	Tipo de enlace
2,3,5-Me <sub>3</sub> -Ara <sub>r</sub>	0.868	0.867	0.865	Ara <sub>r</sub> (1→
2,3,4-Me <sub>3</sub> -Ram <sub>p</sub>	-	-	0.585	Ram <sub>p</sub> (1→
2,3,4-Me <sub>3</sub> -Ara <sub>p</sub>	0.896	0.903	-	Ara <sub>p</sub> (1→
3,5-Me <sub>2</sub> -Ara <sub>r</sub>	0.939	-	-	→2) Ara <sub>r</sub> (1→
2,5-Me <sub>2</sub> -Ara <sub>r</sub>	0.948	0.934	-	→3) Ara <sub>r</sub> (1→
3,4-Me <sub>2</sub> -Ram <sub>p</sub>	-	-	0.962	→2) Ram <sub>a</sub> (1→
2,3-Me <sub>2</sub> -Ram <sub>p</sub>	0.965	0.948	-	→4) Ram <sub>p</sub> (1→
3,4-Me <sub>2</sub> -Ara <sub>p</sub>	0.974	0.961	-	→2) Ara <sub>p</sub> (1→
2,3,4,6-Me <sub>4</sub> -Gal	1	1	1	Gal <sub>p</sub> (1→
3-Me-Ram <sub>p</sub>	1.036	1.015	-	2,4) Ram <sub>p</sub> (1→
3-Me-Ara <sub>r</sub>	1.044	1.034	-	2,5) Ara <sub>r</sub> (1→
2,3,6-Me <sub>3</sub> -Gal	1.064	1.048	-	→4) Gal <sub>p</sub> (1→
2,4,6-Me <sub>3</sub> -Gal	-	-	1.062	→3) Gal (1→
3,4,6-Me <sub>3</sub> -Gal	1.069	1.059	-	→2) Gal (1→
4,6-Me <sub>2</sub> -Gal	-	-	1.111	2,3) Gal (1→
3,6-Me <sub>2</sub> -Gal	1.120	1.110	-	2,4) Gal (1→
3,4-Me <sub>2</sub> -Gal <sub>p</sub>	1.159	-	-	2,6) Gal (1→

<sup>a</sup> Tiempos de retención relativos al 1,5-di-O-acetil-2,3,4,6-tetra-O-metil galactitol (Tr 35,813 min). G.O. = goma original. Deg. A = goma degradada A. Deg. B = goma degradada B.

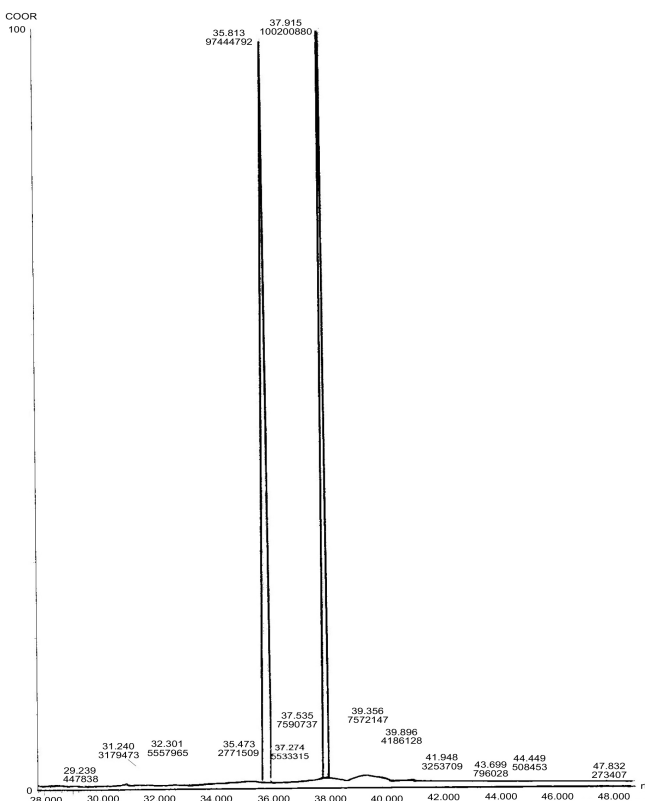


Figura 3. Perfil cromatográfico de los acetatos de alditol del oligosacárido 2, Rgal 0,78 (a).

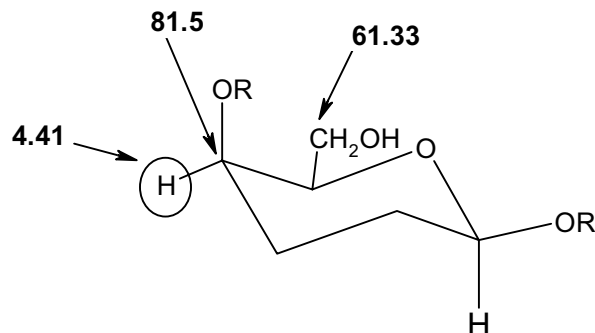


Figura 4. Desplazamientos químicos de los residuos de 4-O-β-D-galactosa presentes en el oligosacárido 2.

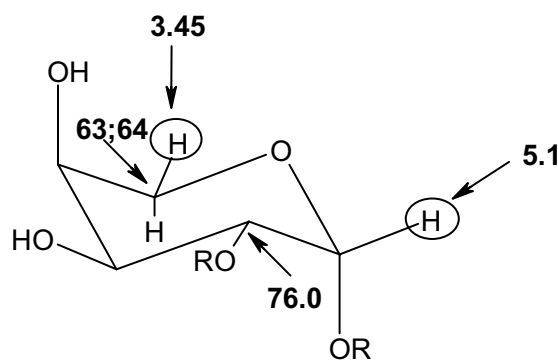


Figura 5. Desplazamientos químicos de los residuos de 2-O-β-L-arabinopiranosas constituyentes del oligosacárido 2.

espectroscópicos están en concordancia con el análisis de metilación, Tabla 1, correspondientes a las gomas original, degradadas A y B. Los residuos 4-O- y 2,4-di-O-α-L-ramnopiranosos están presentes en la goma original de *C. odorata*. La presencia de residuos de 4-O-α-L-ramnosa se ha reportado previamente para la goma en estudio<sup>(7)</sup>. El oligosacárido 2, con una movilidad cromatográfica Rgal 0.78 (a), (solvente ácido), tiene una composición química similar al oligosacárido 1; está constituido por residuos de galactosa, arabinosa, y ramnosa. El análisis de metilación reveló el predominio de residuos de β-D-galactosa (terminales y 4-O-enlazados), Fig. 3, con patrones de fragmentación característicos para este tipo de residuos, Tabla 2. El análisis espectroscópico bidimensional (TNTocsy y HMQC) evidenció las correlaciones correspondientes a residuos de 4-O-β-D-galactosa (15), Fig. 4, y 2-O-β-L-arabinopiranosas (16), Fig. 5.

La goma degradada B, núcleo de la estructura, está constituida por galactosa, ramnosa y ácidos urónicos<sup>(7)</sup>. El análisis de metilación de este polímero degradado, Tabla 1, revela que la ramnosa interna está 2-O- enlazada, probablemente sustituida en posición 4, en concordancia con los datos de metilación correspondientes a las gomas original y degradada A, y el análisis espectroscópico de los oligosacáridos 1 y 2. Por otra parte, el análisis de los acetatos de alditol de la goma degradada B demuestra que, en el núcleo, predominan los residuos de 3-O-β-D-galactosa, algunos de los cuales están sustituidos en posición 2, Tabla 2. El espectro HMQC, Fig. 6, muestra la mayoría de las correlaciones para los residuos de 3-O-β-D-galactosa. Los datos estructurales obtenidos permiten proponer un posible modelo para el núcleo de la goma de *C. odorata*, Fig. 7.

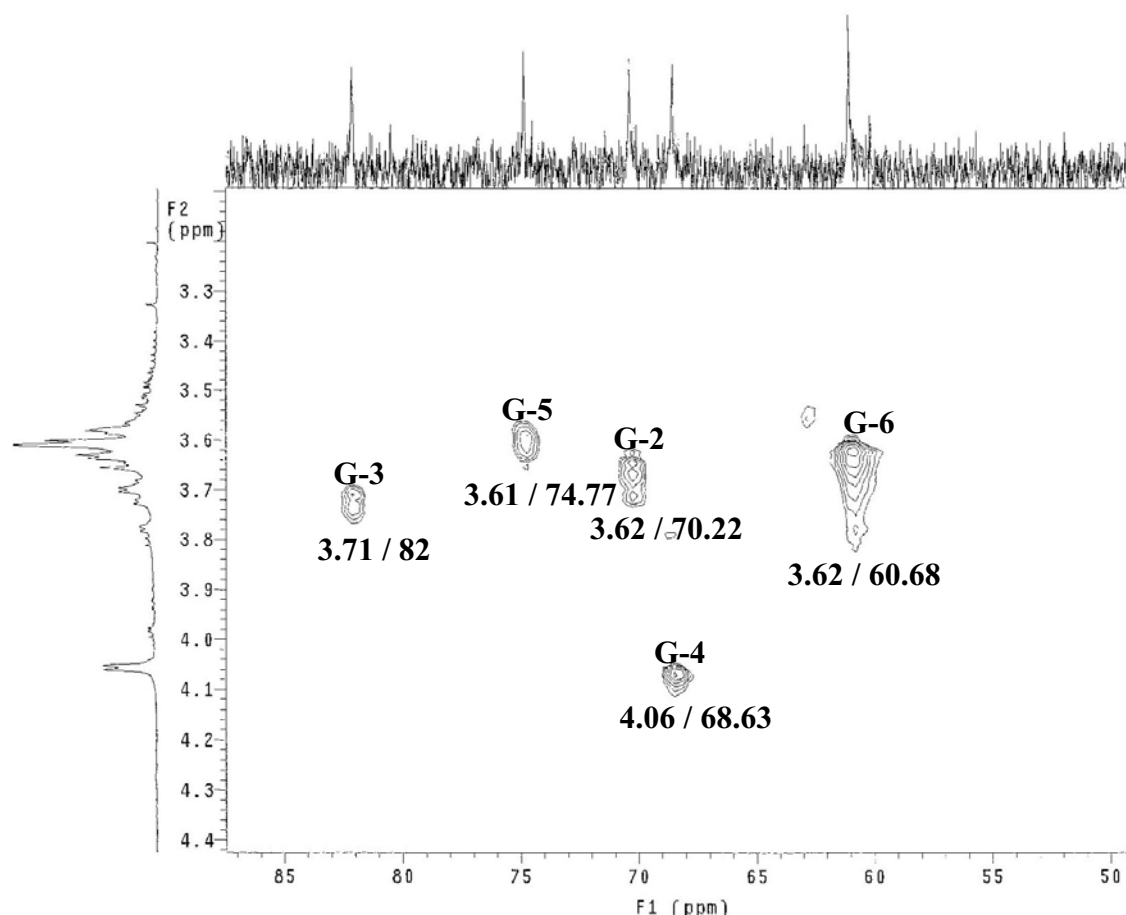


Figura 6. Espectro HMQC de la goma Degradada B de *C. odorata*.

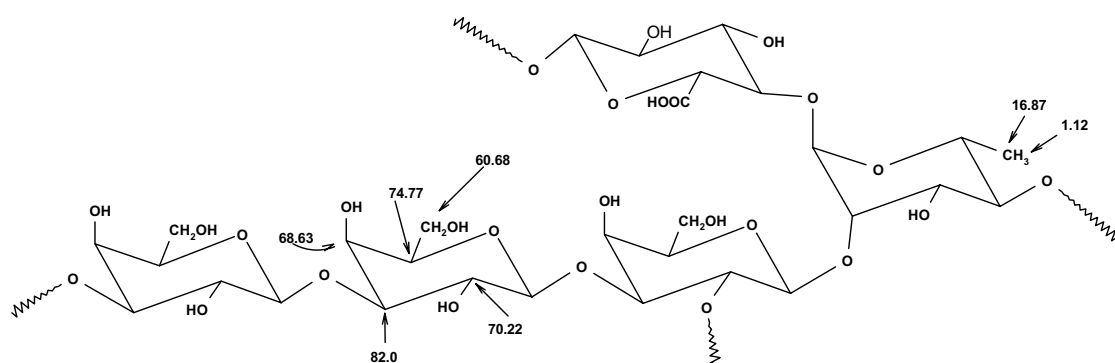


Figura 7. Posible modelo estructural para el núcleo de la goma de *C. odorata*. Gal:Ram (3:1). Los residuos de ácido  $\beta$ -D-glucurónico se encuentran 4-O-enlazados(7,8).

TABLA II

Patrones de fragmentación característicos para los residuos de galactosa terminal y 4-O-enlazada presentes en el oligosacárido 2.

Azúcar metilado	Tr <sup>a</sup>	Tipo de enlace	Fragmentos característicos (m/z)
2,3,4,6-Me <sub>4</sub> -Gal	1.00	Galp (1→	59,71,87,101*,117,129,145,161, 205
2,3,6-Me <sub>3</sub> -Gal	1.059	→ 4) Galp (1→	87,101,117*,129,233

<sup>a</sup> Tiempos de retención relativos al 1,5-di-O-acetil-2,3,4,6,-tetra-O-metil galactitol (T. 35,813 min).

## CONCLUSIONES

El análisis espectral y los datos químicos proporcionados por los oligosacáridos 1 y 2 revelaron la presencia, en las ramificaciones, de 4-O- y 2,4-di-O- $\alpha$ -L-ramnosa, 2-O- $\beta$ -L-arabinopiranososa y 4-O- $\beta$ -D-galactosa. Los residuos de  $\alpha$ -L-ramnosa internos se encuentran 2-O-enlazados, con ramificaciones en posición 4; en el núcleo, predominan los residuos de 3-O- $\beta$ -D-galactosa, algunos de éstos sustituidos en posición 2.

La caracterización de fragmentos menos complejos del polímero, proporciona información valiosa acerca de la estructura de todo el polisacárido.

## AGRADECIMIENTO

Los autores agradecen al Vicerrectorado Académico, Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico (VAC-CONDES), el soporte financiero al proyecto (CC-0294-05) el cual permitió el desarrollo de esta investigación.

## BIBLIOGRAFÍA

- <sup>(1)</sup>. Randall, R.C.; Phillips, G.O.; Williams, P.A. «Fractionation and characterization of gum from *Acacia senegal*». *Food Hydrocol*, 3: 65-75, 1989.
- <sup>(2)</sup>. Martínez, M.; León de Pinto, G.; Rivas, C.; Ocando, E. «Chemical and spectroscopic studies of the gum polysaccharide from *Acacia macracantha*». *Carbohydr Polym*, 29: 247-252, 1998.
- <sup>(3)</sup>. León de Pinto, G.; Martínez, M.; Sanabria, L. «Structural features of the polysaccharide gum from *Acacia glomerosa*». *Food Hydrocol*, 15: 461-467, 2001.
- <sup>(4)</sup>. León de Pinto, G.; Martínez, M.; Beltrán, O.; Rincón, F.; Igartuburu, J.; Francisco, L. «Structural investigation of the polysaccharide isolated from *Spondias mombin*». *Carbohydr Polym*, 43: 105-112, 2000.
- <sup>(5)</sup>. Gutiérrez de Gotera, O.; Martínez, M.; Sanabria, L.; León de Pinto, G.; Igartuburu, J.M. «1D- and 2D-NMR spectroscopy studies of the polysaccharide gum from *Spondias purpurea* var *lutea*». *Food Hydrocol*, 19: 37-43, 2005.
- <sup>(6)</sup>. Anderson D.M.W, Bell P.C. «Structural analysis of the gum polysaccharide from *Anacardium occidentale*». *Anal. Chim. Acta*, 79: 185-187, 1975.
- <sup>(7)</sup>. González de Troconis, N.; Martínez, M.; León de Pinto, G. y Bahsas, A. «Estudio químico y espectroscópico del polisacárido de la goma de *Cedrela odorata*». *Ciencia*, 9 (2): 285-293, 2001.
- <sup>(8)</sup>. Bozo de González, M.I.; Martínez, M.; León de Pinto, G.; Michelena de Baéz, E.; Angel Guío, J. «Selective Cleavage of the uronosil linkages present in *Cedrela odorata* gum exudate». *Ciencia*, 12 (3): 215-220, 2004.
- <sup>(9)</sup>. Agrawal, P. «NMR spectroscopy in the structural elucidation of oligosaccharides and glycosides». *Phytochemistry*, 31: 3307-3390, 1992.
- <sup>(10)</sup>. Graterol, E.; Mesa, L.M.; Rodríguez de Valero, S.; Ortega, J.; Avila, D.; León de Pinto, G. «Comportamiento de *Aspergillus Niger* ATCC 11414 en la goma de *Acacia glomerosa*. Aislamiento y caracterización de dos oligosacáridos». *Afinidad*, 62 (518): 302-306, 2005.
- <sup>(11)</sup>. Purdie, T.; Irvine, J.C. «The alkylation of sugars». *J. Chem. Soc.*, 83: 1021-1037, 1903.
- <sup>(12)</sup>. Haworth, H.N. «A new method of preparing alkylated sugars». *J. Chem. Soc.*, 107: 8-16, 1915.
- <sup>(13)</sup>. León de Pinto, G.; González de Troconis, N.; Martínez, M.; Clamens, C.; Vera, A.; Ocando, E. «Composition of three Meliaceae gum exudates». *Ciencia*, 4 (1): 47-52, 1996.
- <sup>(14)</sup>. Colson, P.; King, R.R. «The <sup>13</sup>C-R.M.N. spectra of disaccharides of D-glucose, D-galactose and L-rhamnose as models for immunological polysaccharides». *Carbohydr. Res*, 47: 1-3, 1976.
- <sup>(15)</sup>. Bock, K.; Pedersen, Ch.; Pedersen, H. «<sup>13</sup>C-Nuclear magnetic resonance data for oligosaccharides». *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem*, 42: 193-225, 1984.
- <sup>(16)</sup>. Mizutani, K.; Kasai, R.; Nakamura, M.; Tanaka, M. «N.M.R. spectral study of  $\alpha$ - and  $\beta$ -L-arabinofuranosides». *Carbohydr. Res*, 185: 27-38, 1989.