

ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN CARBOHIDRATO-PROTEÍNA EN LA GOMA DE *SPONDIAS MOMBIN* POR CROMATOGRAFÍA DE EXCLUSIÓN POR TAMAÑO (SEC) Y RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN)

**María Leal*¹, Maríza Martínez¹, Olga Beltrán¹, Gladys León de Pinto¹, Luc Picton²,
Didier Le Cerf², Hassan Oulyadi³ y Laure Guilhaudis³**

¹Centro de Investigaciones en Química de los Productos Naturales, Facultad de Humanidades y Educación. Universidad del Zulia. Apartado 526, Maracaibo, Zulia (Venezuela). Correo electrónico: mariagabriela.leal@hdes.luz.edu.ve

²Laboratoire "Polymères, Biopolymères et Membranes". UMR 6522 CNRS, Université de Rouen. 76821 Mont Saint Aignan Cedex, Francia

³Equipe de Chimie Organique et Biologie Structurale, Laboratoire de RMN. UMR 6014 CNRS, Université de Rouen. 76821 Mont Saint Aignan Cedex, Francia

RESUMEN

La goma de *Spondias mombin* está constituida por una fracción glucídica mayoritaria y un componente proteico importante (20,65%). El objetivo de esta investigación es profundizar en el estudio de la naturaleza de la interacción carbohidrato-proteína en la goma de *S. mombin*, por cromatografía de exclusión por tamaño (SEC, de sus siglas en inglés) y resonancia magnética nuclear (RMN). La goma original se sometió a hidrólisis alcalina, para propiciar la ruptura de los enlaces peptídicos presentes, con persistencia del enlace covalente carbohidrato-proteína. Se obtuvieron perfiles cromatográficos por SEC, en columna abierta y utilizando detectores de dispersión de luz (MALLS, de sus siglas en inglés) e índice de refracción diferencial (DRI, de sus siglas en inglés), y espectros de RMN uni- y bi-dimensionales de las gomas original e hidrolizada. La goma de *S. mombin* es un sistema heterogéneo constituido por tres fracciones: las dos primeras, con una baja proporción de proteína, probablemente complejos Arabinogalactanes-proteína (AGPs), y otra de masa molar menor y mayor proporción de proteína, indicativo de una glicoproteína. El péptido asociado a las fracciones incluye en su constitución alanina, valina, leucina, lisina, ácidos aspártico y glutámico, treonina y prolina, resistente a las condiciones de hidrólisis alcalina utilizada. Los datos espectroscópicos corroboran las evidencias químicas.

Palabras claves: Exudado gomoso, *Anacardiaceae*, *Spondias mombin*, SEC, RMN.

ABSTRACT

Spondias mombin gum is constituted by a carbohydrate main fraction and an important protein component (20.65%). An exhaustive study of the carbohydrate-protein interaction in *Spondias mombin* gum, using Size Exclusion Chromatography (SEC) and Nuclear Magnetic Resonance (NMR), was the objective of this investigation. The original gum was submitted to an alkali hydrolysis, to break the peptide bonds, without affecting the carbohydrate-protein linkage. Elutions profiles were obtained using SEC at atmospheric pressure and coupled to a Multi angle laser light scattering (MALLS) and Differential Refractive Index (DRI) detectors, uni and bi-dimensional NMR spectra were also obtained from the original and hydrolyzed gums. *Spondias mombin* gum is a heterogeneous system, constituted by three fractions. The first two ones, with a low proportion of protein, may correspond to arabinogalactan-protein structures (AGPs) while the last one, with a low molar mass but a relative high protein proportion is probably a glycoprotein. The peptide associate to these fractions contains alanine, valine, leucine, lysine, acids aspartic and glutamic, threonine and proline, and it is partially degraded by alkaline conditions. The spectroscopic evidences are according to the chemical findings.

Key words: Gum Exudate, *Anacardiaceae*, *Spondias mombin*, SEC, RMN

1. INTRODUCCIÓN

Spondias mombin (*Anacardiaceae*), especie característica de zonas de vida de bosque seco tropical [1], exuda una goma clara muy soluble en agua. La goma de *Spondias mombin* contiene una fracción glucídica constituida principalmente por galactosa y arabinosa, y, en menor proporción, por residuos de manosa y ramnosa [2].

El contenido de proteína (%), superior al reportado para otras gomas de *Spondias* [2, 3], sugiere que existe un componente proteico importante en el exudado gomoso de *Spondias mombin*.

Estudios de fraccionamiento por cromatografía de exclusión por tamaño (SEC), en combinación con hidrólisis alcalina y/o enzimática, han demostrado el papel importante que tiene el componente proteico en la estructura de estos heteropolímeros, en particular en la constitución de los complejos Arabinogalactano-proteína (AGP). La capacidad emulsionante de las gomas se atribuye en gran parte a la proteína presente en estos últimos [4, 5].

En consecuencia, el objetivo de este trabajo es aproximarnos a la naturaleza de las interacciones carbohidrato-proteína presentes en la estructura de la goma de *Spondias mombin*, usando cromatografía de exclusión por tamaño (SEC), en combinación con hidrólisis alcalina, y espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN).

2. PARTE EXPERIMENTAL

2.1. Origen, recolección y purificación de la goma. La goma se recolectó de especímenes debidamente identificados como *Spondias mombin* L., localizados en Maracaibo, Estado Zulia (Venezuela), durante la época de sequía (Enero-Marzo, 2009). La identificación taxonómica fue realizada por la Licenciada Carmen Clamens, botánica taxonomista de la Universidad del Zulia (Venezuela). La goma se colectó periódicamente, cada 15 días, posterior a la práctica y/o remoción de heridas realizadas a nivel del tronco. La goma se limpió manualmente, se disolvió en agua (3% m/v), se filtró (a través de gasa y papel Whatman N° 41), se dializó contra agua de chorro circulante (48 horas) en membranas para diálisis de celofán Spectrapore de 45 µm, peso molecular de corte (*cut-off*) 12.000-14.000 g/mol y finalmente se liofilizó en un equipo Labconco modelo Freezone 6, previa congelación de la muestra en una mezcla frigorífica (acetona/hielo seco).

2.2. Métodos generales.

2.2.1. Hidrólisis alcalina de la goma original. La goma original purificada (10 g), se trató con una solución saturada de hidróxido de bario (250 mL, 25°C, 2 horas), a continuación se calentó en baño de maría (a 100°C durante 8 horas). El producto obtenido de la hidrólisis, se neutralizó con ácido sulfúrico (1 M), se filtró, dializó y liofilizó [6, 7].

2.2.2. Composición de aminoácidos de las gomas original e hidrolizada. La muestra (40 mg) se hidrolizó (HCl 6 M, 110°C, 24 horas) bajo atmósfera de nitrógeno. El residuo se seco al vacío y se disolvió en isotiocianato de fenilo, para obtener los correspondientes aminoácidos feniltiocarbamilados. Los productos derivados se inyectaron en un cromatógrafo líquido marca Nova 7, provisto de una columna Pak C 18 (Waters), adaptado a un detector UV (254 nm). Como fase móvil, se usaron dos sistemas de disolventes, Disolvente A: acetonitrilo/agua (60/40), y

disolvente B: una mezcla de acetato de sodio trihidratado (0,19% m/v) y trietilamina (0,5 mL) a un pH de 5,7. Se determino el contenido de nitrógeno por el método de *Kjeldahl* [8].

2.3. Técnicas analíticas. La determinación de la masa molecular y de la distribución de masas (MWD y RHD) se hizo por cromatografía de exclusión por tamaño (SEC), de alta resolución, acoplado en línea con detectores de difusión de luz (*Multi Angle Laser Light Scattering*, MALLS) e índice de refracción diferencial (DRI). La señal de luz difundida es proporcional al producto de la concentración por la masa molecular, mientras que la señal DRI, es proporcional solamente a la concentración.

2.3.1. Perfiles de elución de las gomas original e hidrolizada, obtenidos por SEC en columna abierta. La muestra (100 mg) se disolvió en la fase móvil (10 mL NaCl, 0,1M), se sembró en una columna de vidrio (50 cm de largo por 1,5 cm de ancho, diámetro interno) empacada con *SEPHACRYL S-400HR*. Se colectaron fracciones cada 2 mL, manualmente. Se determinó el contenido de carbohidratos totales midiendo en un espectrofotómetro de UV a 490 nm, luego de aplicar el método de *Dubois* [9] a cada alícuota colectada, y el contenido de proteínas totales se determinó midiendo a 220 nm cada alícuota directamente.

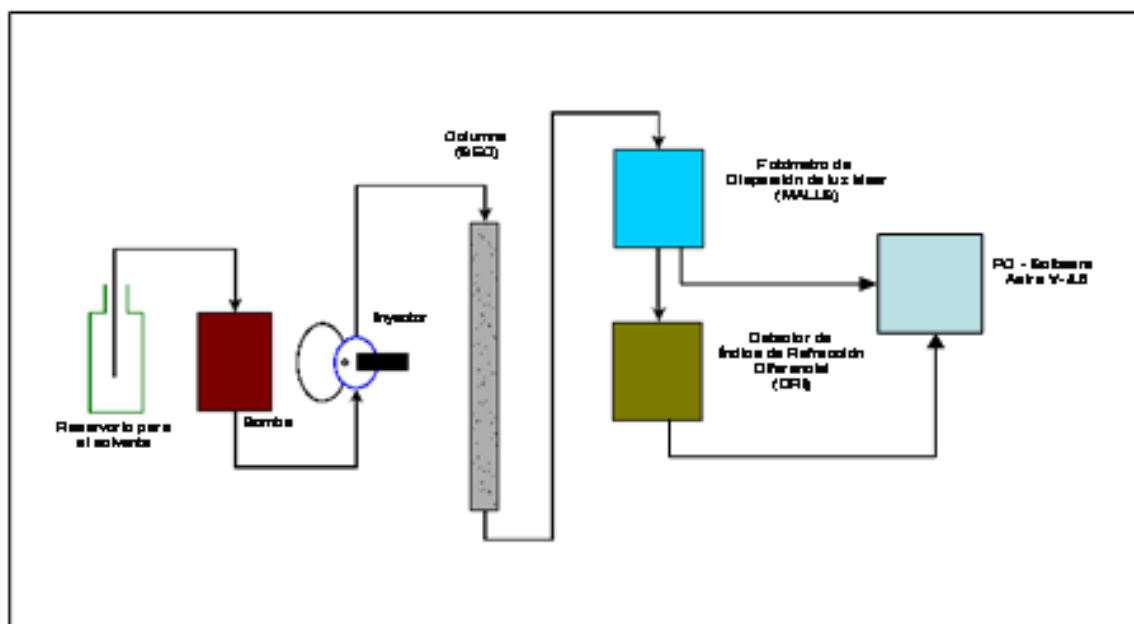


Figura 1. Diagrama en bloque del acoplamiento en línea del cromatógrafo de exclusión por tamaño (SEC) con el fotómetro de dispersión (MALLS) y el detector de índice de refracción diferencial (DRI).

2.3.2. Cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) de alta resolución. Se uso un cromatógrafo de exclusión por tamaño, provisto de un guarda columna OHPAK SB-G y dos columnas de separación colocadas en serie, OHPAK SB-804 y SB-806 HQ (*Shodex*). Las columnas están rellenas con un gel de poli(hidroximetacrilato de metilo). Este cromatógrafo configurado en

línea con los detectores (véase la Figura 1): a) Fotómetro de difusión de luz (*Dawn-Enable Optical System* (EOS), *Wyatt Technology Inc.*) provisto de una celda K5 con 18 fotodiodos y un láser de He-Ne ($\lambda = 690$ nm), un detector QELS (*Wyatt Technology*) conectado en un ángulo de 115° , y un software *Astra V-4.85* para el procesamiento de los datos. La técnica de SEC-MALLS, ha sido descrita anteriormente [10], y b) Un refractómetro diferencial (ERC 7515A), para determinar la concentración de cada fracción eluida, de acuerdo a los valores clásicos usados para polisacáridos de dn/dc (0,15 mL/g). La muestra (5 mg) se disolvió en 1 mL de la solución eluyente (LiNO_3 0,1M + NaN_3 0,02%) y se inyectó a través de un bucle de 100 μL . La fase móvil (LiNO_3 0,1M) se filtro a través de un filtro de 0,1 μm (*Millipore*) y se desgasifico (ERC 413). La velocidad de flujo fue de 0,5 mL/min (*Flom HPLC pump 301*).

2.3.3. Espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN). Los espectros de RMN se corrieron en un espectrofotómetro *AVANCE III* de 600 MHz (*Broker, Wissenbourg, Francia*) equipado con una celda criogénica TXI (^1H , ^{13}C , ^{15}N), que incluye apantallamiento en el gradiente Z. La muestra (100 mg) se disolvió en agua deuterada (D_2O) (550 mL), y los datos se obtuvieron a 300 K. Para los experimentos de ^1H , ^{13}C , y DEPT, se usaron parámetros ya establecidos. Para la identificación del sistema de espín se usaron los siguientes experimentos bidimensionales; COSY (^1H - ^1H), HMQC (^1H - ^{13}C) y HMBC (^1H - ^{13}C). Todos los datos obtenidos se procesaron en una estación de trabajo PC usando el software *TOPSPIN 1.3* (*Broker*). Los desplazamientos químicos de protón y carbono se reportaron a partir del TMS, como estándar externo.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El perfil de elución (SEC-en columna abierta) de la goma de *Spondias mombin* (véase la Figura 2A) corrobora que constituye un sistema heterogéneo como se reportó previamente [11].

Las dos primeras fracciones, de mayor masa molecular, y menor proporción de proteína, Figura 2A, probablemente corresponden a complejos arabinogalactano-proteína (AGPs). La última fracción, que aparece a mayor volumen de elución (93-150 mL) podría sugerir la presencia de una glicoproteína, como se ha descrito para la goma arábica [4].

Por otra parte, los perfiles de elución obtenidos por cromatografía de exclusión por tamaño (SEC), utilizando detectores de luz dispersa e índice de refracción (véase la Figura 2B), confirman la presencia de estas tres fracciones en la goma de *S. mombin*. Las masas molares promedio en número y en peso (M_n y M_w) indican que existe un alto grado de dispersidad en la muestra ($I_p = 3,8$) (véase la Tabla 1). El hecho de observar tres poblaciones por DRI demuestra que éstas se encuentran en proporción suficiente para ser detectadas (por ejemplo 20, 50 y 30%, respectivamente) (véase la

Tabla 1). Por su parte, la dispersión de luz de la última población fue poco intensa, como para ser detectada (Figura 2B) lo cual sugiere que esta compuesta por estructuras de masas molares bajas.

La espectroscopia de RMN uni- y bi-dimensional (homo ^1H - ^1H y heteronuclear ^1H - ^{13}C), de la goma sin fraccionar, corroboró la presencia de una fracción glucídica importante constituida por galactosa 3-O, 6-O y 2, 3, 6- tri-O-enlazada, α -L-arabinofuranosa terminal y 3-O-enlazada, β -L-arabinopiranososa terminal y 2-O-enlazada; β -L-rhamnopiranososa terminal y 2-O-enlazada y ácido 4-O-metil- α -D-glucurónico; como se había reportado previamente [12]. Los desplazamientos químicos y las principales correlaciones se muestran en la Tabla 2 [13-15]. Asimismo, se observan señales, aunque en menor número, atribuibles a residuos de aminoácidos, por ejemplo, de alanina y treonina [16, 17] presentes en la goma de *S. mombin* (Tabla 3), probablemente localizados en la periferia de la estructura (véase la Figura 3).

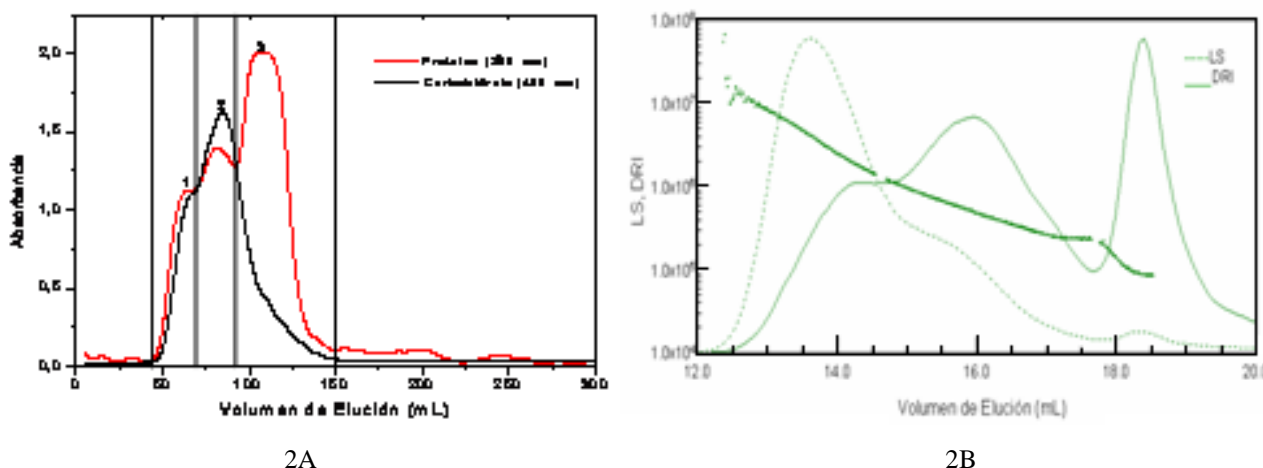


Figura 2. Perfil de elución de la goma original de *Spondias mombin* obtenido por cromatografía de exclusión por tamaño en columna abierta (1A) y cromatografía de exclusión por tamaño acoplada a detectores de Multi Angle Laser Light Scattering (dispersión de luz) (SEC/LS, 1B) e índice de refracción diferencial (SEC/DRI, 1B).

Tabla 1. Distribución de masas moleculares de la goma original de *Spondias mombin* obtenida por cromatografía de exclusión (SEC) acoplada a detectores de Multi Angle Laser Light Scattering (luz dispersa) e índice de refracción diferencial (DRI).

<i>Poblaciones</i>	<i>Volumen de elución (mL)</i>	<i>Proporción (%)</i>	<i>M_w g/mol</i>	<i>M_n g/mol</i>
<i>Goma Original</i>	12,3-20,9	75	980.000	260.000
<i>Fracción 1</i>	12,3-14,6	20	3.350.000	2.500.000
<i>Fracción 2</i>	14,6-17,6	50	560.000	450.000
<i>Fracción 3</i>	17,6-20,9	30	~100.000	~100.000

Índice de dispersidad, $I_p = M_w/M_n = 3,8$.

Tabla 2. Datos espectroscópicos de RMN^a de los monosacáridos constituyentes de la goma de *Spondias mombin*

Tipo de residuo	Desplazamiento químico (δ , ppm)
\rightarrow 2) β -L-Rham _p (1 \rightarrow)	C-1: 99,00; C-2': 80,16 ; 82,00 H-1: 5,05 ;5,20 H-2: 4,10;4,20
β -L- Rham _p (1 \rightarrow)	C-2: 72,00; 72,50 C-3: 74,00 H-1: 5,05 -CH ₃ : 1,09; 1,11; 1,15
β -L-Gal _p (1 \rightarrow 6)- β -L-Gal _p A B	A = C-1: 102,50 H-1: 4,38 ^b B = C-6': 68-69 (inv. DEPT-135) ^b
\rightarrow 2,3,6) β -L-Gal _p (1 \rightarrow)	C-1: 102,50 C-2': 82,00 C-6': 68-69 (inv. DEPT-135) H-1: 4,38; 4,40 ^c H-2: 3,21 ^c
\rightarrow 3) β -L-Gal _p (1 \rightarrow)	C-1:102,50; C-2:72,90; C-3:82,00; C-5:74,90; 75,00; C-6:60,16 (inv DEPT-135) H-1: 4,1 H-2:3,29 H-3:3,2
α -L- Ara _f (1 \rightarrow)	C-1: 106,80; C-2: 82,00; C-3: 76,25; C-4: 83,00 C-5: 62,50 (inv. DEPT-135) H-1: 5,09; H-2: 3,29; H-3: 4,1 H-4: 4,1
α -L- Ara _f (1 \rightarrow 3)- α -L- Ara _f A B	A = C-1 ^d : 107,00; 108,00; 109,00 C-2: 81,00; 82,00; C-3: 76,00 H-1: 5,00; 5,10 ^b ; H-2: 4,10 B = C-3': 83,90 ^b
β -L- Ara _p (1 \rightarrow)	C-5: 63,00 (inv DEPT-135)
\rightarrow 2) β -L-Ara _p (1 \rightarrow)	C-5: 65,50 (inv DEPT-135)
4 OMe - AGlc (1 \rightarrow)	C-1: 99,00 OMe: 60,00 (NO inv DEPT-135)

^{a)} Ref [13-15]; ^b Señales correlacionadas en HMBC, ^{c)} Señales correlacionadas en COSY; ^{d)} C-1 de Ara_f en 3 ambientes' = enlazado

Tabla 3. Composición de aminoácidos de la goma original de *Spondias mombin*, obtenida por HPLC.

Aminoácido	Porcentaje
Ácido aspártico	10,73
Ácido glutámico	10,29
Hidroxiprolina	18,55
Serina	7,26
Glicina	4,32
Histidina	0,88
Arginina	1,76
Treonina	5,74
Alanina	5,77
Prolina	5,19
Tirosina	4,62
Valina	3,35
Metionina *	1,27
Cisteina	1,89
Isoleucina	2,97
Leucina	6,98
Fenilalanina	5,25
Lisina	3,18
Total	100,00

Composición (%) con base en el contenido total de proteína de la goma (20,65%).

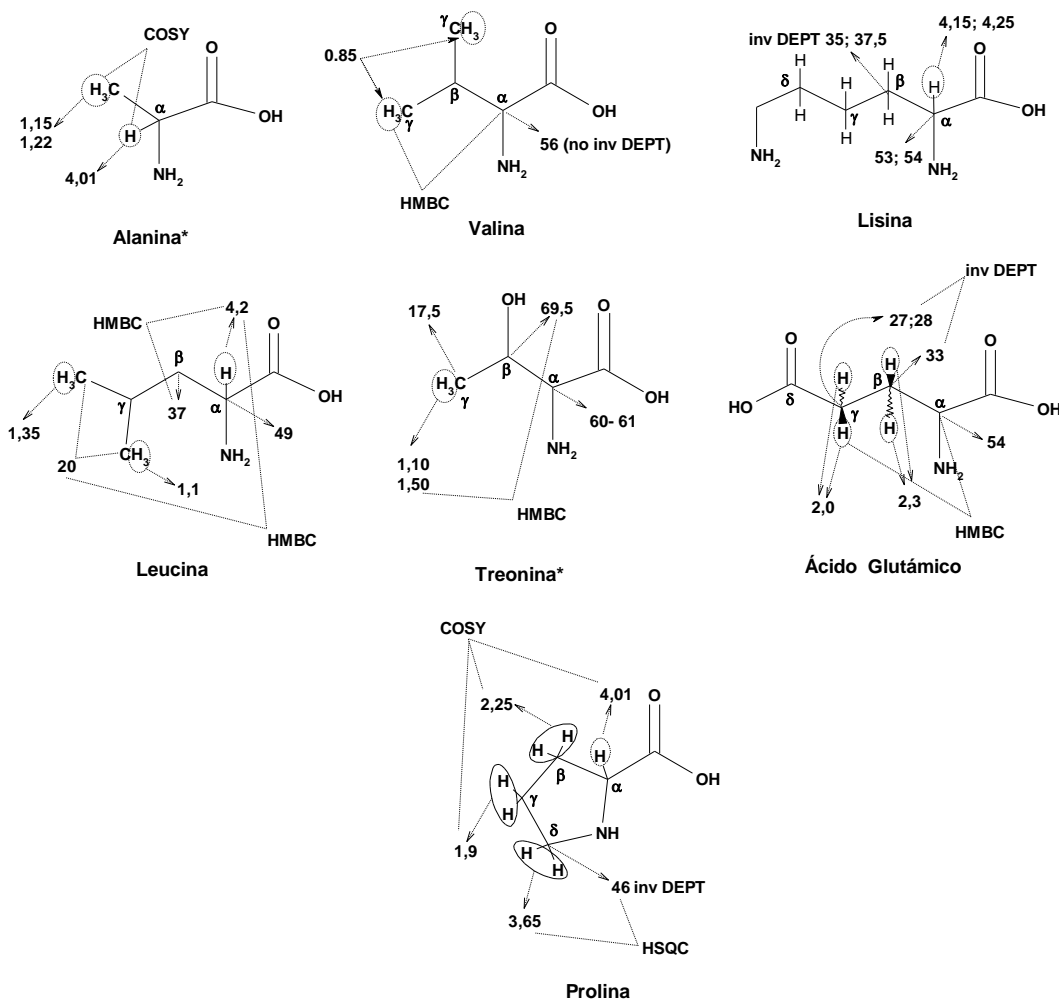
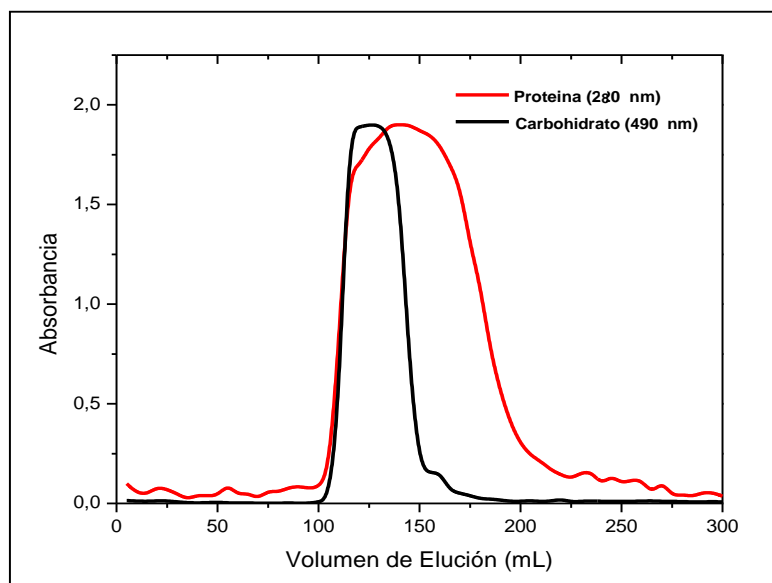


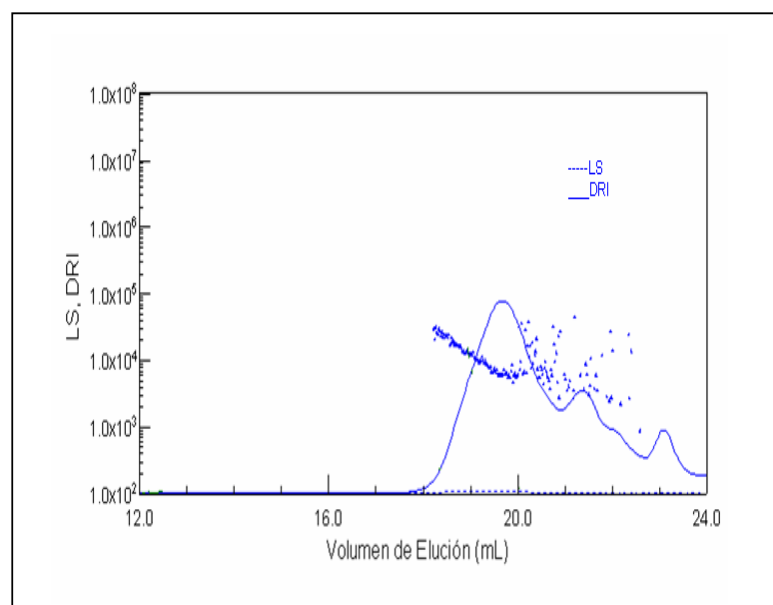
Figura 3. Desplazamientos químicos (δ , ppm) de los aminoácidos presentes en la goma de *Spondias mombin*, después de la hidrólisis alcalina. * Estas señales también se observan en los espectros de la goma original.

El perfil de elución SEC (en columna abierta) de la goma de *S. mombin*, después de la hidrólisis alcalina, mostró un solo pico ancho (100-225 mL) (Figura 4A) mientras que el perfil SEC, usando DRI, mostró una mejor resolución (Figura 4B); se detectaron las tres fracciones descritas anteriormente para la goma original, pero a volúmenes de elución mayores (Figuras 2B y 4B), lo cual permite suponer que hubo ruptura parcial de los enlaces peptídicos presentes en cada una de ellas. El perfil SEC de la goma hidrolizada, usando LS, no mostró ninguna señal como indicador de la degradación experimentada por las tres fracciones (Figura 4B).

La comparación de los datos espectroscópicos de la goma hidrolizada y dializada corrobora que la ruptura del péptido no fue completa, bajo las condiciones de hidrólisis alcalina usada se observan correlaciones que evidencian la persistencia de distintos residuos de aminoácidos aromáticos y alifáticos probablemente unidos por enlaces peptídicos (Figura 5). No se detectaron señales a ~ 180 ppm que permitan sugerir la presencia o predominio de grupos carboxilos de aminoácidos libres [18]



4 A



4 B

Figura 4. Perfil de elución de la goma de *Spondias mombin* después de la hidrólisis en medio básico ($\text{Ba}(\text{OH})_2$) obtenido por, cromatografía de exclusión por tamaño en columna abierta (4A) y cromatografía de exclusión por tamaño acoplada a un detector de *Multi Angle Laser Light Scattering* (luz dispersa) (SEC/LS, 4B) y otro de índice de refracción diferencial (SEC/DRI, 4B)

El HSQC, Figura 5B, muestra algunas señales asignables al C_δ de lisina y C_β de los ácidos glutámico y aspártico, predominantes en la estructura (véase Tabla 3) [19]. El COSY, por su parte, exhibe correlaciones $\text{H}_\alpha/\text{H}_\beta$ atribuibles a distintos residuos de aminoácidos [16, 17].

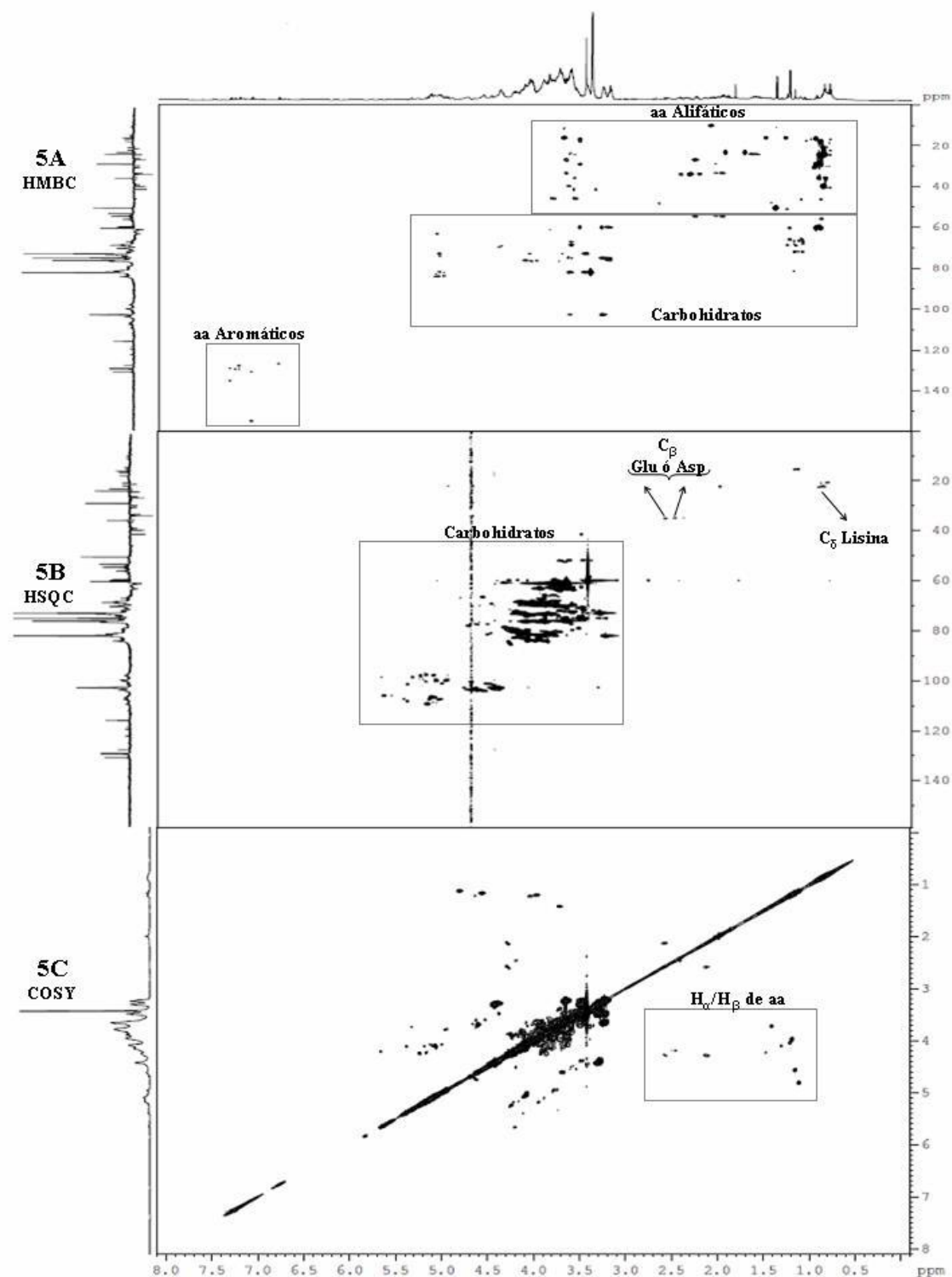


Figura 5. Espectros de resonancia magnética nuclear, HMBC (5A), HSQC (5B) y COSY (5C) de la goma hidrolizada de *Spondias mombin*. aa: Aminoácidos.

4. CONCLUSIONES

La goma de *Spondias mombin* es un sistema heterogéneo, constituido por tres fracciones importantes a las cuales se encuentran asociado, en la periferia, péptidos que incluyen en su constitución alanina, valina, leucina, lisina, ácidos aspártico y glutámico, treonina y prolina,

resistentes a las condiciones de hidrólisis alcalina utilizadas.

Los datos espectroscópicos se corresponden con los resultados obtenidos por cromatografía de exclusión.

Agradecimientos. Los autores agradecen al Convenio ECOS-NORD Francia-Venezuela, a través del proyecto: Fonacit P1-2006000733, por la colaboración prestada en el desarrollo de la fase experimental de esta investigación.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] Ewel J, Madriz A. Zonas de vida de Venezuela. Ministerio de Agricultura y Cría, Ediciones del Fondo Nacional de Investigaciones Agropecuarias. Editorial Sucre, Caracas, Venezuela, 1968. Pág. 264.
- [2] León de Pinto G, Martínez M, Sanabria L, Rincón F, Vera A, Beltrán O, Clamens C, *Food Hydrocol.*, **14**, 259 (2000)
- [3] León de Pinto G, Martínez M, Mendoza JA, Ocando E, Rivas C, *Biochem. System. and Ecol.*, 23(2), 151 (1995)
- [4] Randall R, Phillips G, Williams P, *Food Hydrocol.*, **2**, 131 (1988)
- [5] Randall R, Phillips G, Williams P, *Food Hydrocol.*, **3**, 65 (1989)
- [6] Ferrer R, León de Pinto G, Martínez M, *CIENCIA*, **9(2)**, 277 (2001)
- [7] Beltrán O, León de Pinto G, Martínez M, Picton L, Cozic C, Le Cerf D, Muller G, *Carbohydr. Polym.*, **62**, 239 (2005)
- [8] AOAC. 1995. Official Methods for Analysis of the Association of Official Analytical Chemists, vol.2 W. Kenneth Herlich (Editor). Washington, DC: Association of Official Analytical Chemists. Part 925.09 y 923.03
- [9] Dubois M, Gilles K, Hamilton J, Rebers P, Smith F, *Analy. Chem.*, **28**, 350 (1956)
- [10] Picton L, Bataille I, Muller G, *Carbohydr. Polym.*, **42**, 23 (2000); Katime I, Katime O, Katime D "Cromatografía líquida: teoría y aplicaciones". Editorial de la Universidad de Guadalajara. Guadalajara. Jalisco (México) 1998
- [11] Leal M, Beltrán O, León de Pinto G, *AFINIDAD*, **64(527)**, 38 (2007)
- [12] León de Pinto G, Martínez M, Beltrán O, Rincón F, Igartuburu M, Rodríguez L, *Carbohydr. Polym.*, **43**, 105 (2000)
- [13] Martínez M, León de Pinto G, Bozo de González MI, Herrera J, Oulyadi H, Guilhaudis L, *Food Hydrocol.*, **22**, 1310 (2008)
- [14] Larrazabal M, Martínez M, Sanabria L, León de Pinto G, Herrera J, *Food Hydrocol.*, **20**, 908 (2006)
- [15] Martínez M, León de Pinto G, Sanabria L, Beltrán O, Igartuburu M, Bahsas A, *Carbohydr. Res.*, **338**, 619 (2003)
- [16] Moore B, Trishman I, Seng D, Hho D, Jensen P, Fenical W, *J. Org. Chem.*, **64**, 1146 (1999)
- [17] University of Texas (s.f.) Identifying Amino acids in the protein NMR spectra en: http://hoffman.cm.utexas.edu/research/aa_h_nmr.pdf
- [18] Shindo H, Egan W, Cohem J, *J. Biol. Chem.*, **253**, 6751 (1978)
- [19] Hernández I, Macedo M, Berlinck R, Ferreira A, Godinho M, *J. Brazilian Chem. Socie.*, **15**, 441 (2004)